

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06580

研究課題名(和文)原子間力顕微鏡と化学発光タンパク質を用いたATP超解像イメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of ATP super-resolution imaging method using atomic force microscopy and chemiluminescent proteins

研究代表者

市川 壮彦 (Ichikawa, Takehiko)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・特任助教

研究者番号：10462201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：原子間力顕微鏡(AFM)とルシフェラーゼを用いてアデノシン三リン酸(ATP)のナノスケール分布を測定可能な顕微鏡作製を行った。集束イオンビーム装置を用いることによりAFMカンチレバー探針先端約100 nmの領域のみにタンパク質を結合する技術の開発に成功した。また、市販の共焦点顕微鏡に自作AFMを組み込み、細胞用共焦点-AFM同時測定系の構築を行った。さらに、直径100 nm以下の穴からATP含有溶液を放出する装置を開発し本研究の理論を検証することを可能にした。一方で当初使用を予定していたバイオセンサーが本技術には適さないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したAFM探針先端へのタンパク質の局所的な吸着方法はrecognition imagingを始めとするAFM探針を用いたイメージング技術にとって基盤的技術になる可能性を持つ。現時点では化学的修飾方法を用いたセンサー付加が行われているが、本研究で開発した方法を用いることによって比較的簡便にしかも数十ナノメートルの精度で目的タンパク質を結合させることが可能になる。さらに本研究で構築した共焦点-AFM融合顕微鏡は近年増加しつつある細胞のAFM観察を行う上で基本的な機器となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I have worked on developing microscopy capable of measuring the nanoscale distribution of adenosine triphosphate (ATP) using an atomic force microscope (AFM) and a luciferase protein. By using a focused ion beam system, I succeeded in developing a technique to bind the biosensor proteins only to a region of about 100 nm at the tip of the AFM cantilever. In addition, I incorporated a home-made AFM into a commercially available confocal microscope and constructed a confocal-AFM simultaneous measurement system for cells. I also developed a device to emit ATP-containing solution from a hole of less than 100 nm in diameter, which enabled us to verify the theory of this microscopy. On the other hand, it became clear that the biosensor initially planned to be used was not suitable for this technology.

研究分野：生物物理学

キーワード：原子間力顕微鏡 超解像顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

バイオイメージング技術は細胞や組織中の目的タンパク質を生きた状態で経時的に観察することが可能な技術である。遺伝子上で標識することが可能であるため、主に遺伝子やタンパク質レベルでメカニズムの解明を行う現在の生物学にとって欠かせない基盤的ツールとなっている。しかし、可視光を用いることによる回折限界のため観察される蛍光 1 分子の輝点を約 **200 nm** 以下にすることは困難でありオルガネラ内部構造など微小スケールでの観察が難しい問題が存在する。

近年、この問題に対し回折限界を越えてイメージングを行う方法が開発されつつある。例えば、誘導放出抑制法、確率的光学再構築法、構造化照明法等が報告されており、他にも探針を用いる方法としては近接場光を照射しながら走査する走査型近接場光顕微鏡が存在する (**J Vangindertael, et al. Methods Appl. Fluoresc 2018, A. M. Sydor, et al. Trends Cell Biol 2015, F. Lange, et al. J Cell Sci. 2001**)。ところが、これらの超解像技術でも実質的な空間分解能は **10 - 100 nm** 程度であり、オルガネラ微細構造の観察には十分とは言えず、また中には時間がかかるものも多い。そこで、本研究ではサブナノスケールの分解能で高速スキャンも可能な原子間力顕微鏡 (**AFM**) の探針先端にアデノシン三リン酸 (**ATP**) が結合すると発光を触媒するルシフェラーゼを結合することにより、**200 nm** 以上の大きさに広がる発光スポットの中心位置を探針先端 (直径 **1 - 10 nm**) に限局させ **ATP** の超解像イメージング像を得る。空間・時間分解能は **AFM** の性能に準拠するため既存の超解像顕微鏡に比べて高分解能・高速な画像取得が可能になる。

2. 研究の目的

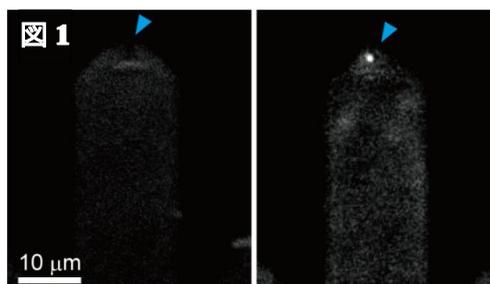
本研究では **ATP** 超解像顕微鏡の構築を主目的とする。サブナノスケールの分解能を持つ **AFM** の探針先端に **ATP** と結合すると発光するルシフェラーゼタンパク質を結合し、**AFM** による表面形状測定と同時に発光状態を観察することにより **AFM** の高い分解能で **ATP** の存在を測定することが可能になる。そしてこの顕微鏡を用いてミトコンドリア内膜及び外膜表面の観察を行う。ミトコンドリア内膜には電子伝達系タンパク質群が存在し内膜の中と外のプロトン濃度勾配を用いて **ATP** 合成酵素が **ATP** を合成しマトリックス内に放出する。マトリックス内で蓄積された **ATP** は **ADP-ATP** 交換輸送体タンパク質を介して内膜-外膜の間隙に放出される。**ATP** 合成酵素は内膜のクリステに局在することが知られているが (**K. M. Davies, et al. PNAS 2011**) **ADP-ATP** 交換輸送体タンパク質が内膜中で局在するのか、全体的に分布するのか、クラスターを形成するのかといったことは未だ不明である。さらに、ミトコンドリア外膜にはポリンと呼ばれる膜貫通タンパク質が存在し、小さな分子は自由拡散するので生成された **ATP** もこのチャンネルを通して細胞質中に拡散すると考えられている (**E. J. Weeber, et al. J Biol Chem 2002**)。このポリンはがん細胞では発現が増加しているものの、がん細胞中のポリンは透過性を持たない可能性が示唆されている (**N. M. Mazure, Biochim Biophys Acta Bioenerg 2017, V. Shoshan-Barmatz, Biochim Biophys Acta Bioenerg 2015**)。正常細胞とがん細胞のミトコンドリア外膜における **ATP** 放出分布を明らかにすることによりがん化によるミトコンドリアの機能変化の解明を行う。

3. 研究の方法

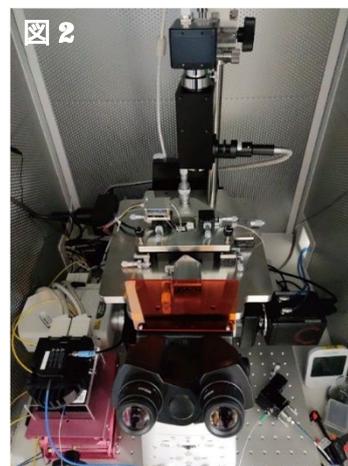
カンチレバーの先端とルシフェラーゼの結合は探針にアミノ基を付加しタンパク質のカルボキシル基とカルボジイミド架橋をする方法もしくはアミノ基を付加した探針にニトリロ三酢酸を介してタンパク質の **His** タグと結合させる方法を考えた。検出系は市販の共焦点顕微鏡に自作 **AFM** を融合させた顕微鏡の作製を行う。また、本研究の理論を検証するための人工的な評価系を構築することを試みる。ミトコンドリアの単離は市販のキットを用いて行う。

4. 研究成果

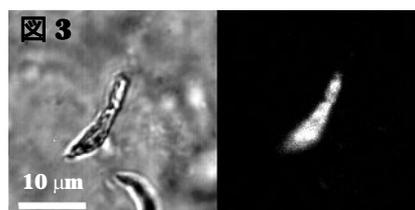
まず **AFM** 探針先端にバイオセンサータンパク質を結合する方法の開発に取り組んだ。探針にアミノ基を付加した後 **Maleimide** を介して **nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)** を付加して **His** タグ付きタンパク質を付加する方法、金コート後に **Ni-NTA** を付加して **His** タグ付きタンパク質を付加する方法、**UV** 照射後にビオチン-ウシ血清アルブミン (**BSA**) を吸着させてアビジンを介してビオチン付加タンパク質を付加する方法を試みた結果、金コート及びビオチン-**BSA** 付加についてはある程度のタンパク質付加を行うことが可能であることが分かった。次にこれらの方法を探針先端のみに適応させる方法について検討した。その結果、集束イオンビーム (**FIB**) 装置を用いて探針先端付近のみに金コ



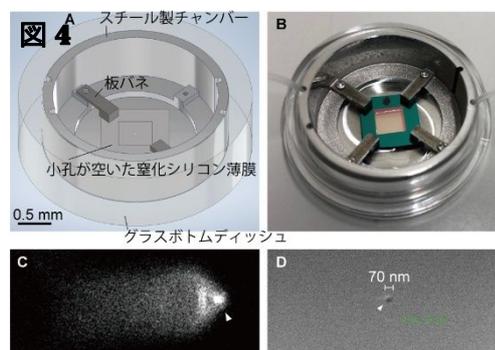
ートを行うことによって **Ni-NTA** を付加して **His** タグ付き緑色蛍光タンパク質 (**GFP**) を結合させることが可能であることが分かった。ただ、この方法ではタンパク質が容易に解離してしまう問題があった。そういった時、研究代表者は電子ビーム照射後に目的タンパク質溶液に浸漬するだけで特定の場所にタンパク質を吸着させることが可能であることを発見した。さらにウエスタンプロット用のブロッキングバッファーで予めカンチレバー表面をブロッキングした後に電子顕微鏡で目的部位を電子照射することにより目的の数十ナノメートルスケールの領域のみに目的タンパク質を結合させる方法を開発した。この方法を用いてカンチレバー (**BL-AC40TS-C2**, オリンパス) の先端に精製 **GFP** を結合させた所、探針先端のみで蛍光を確認することができた (図 1、左図は電子照射なし、右図は探針先端 **30 nm** の範囲に電子照射した。青色矢印部分が探針先端)。電子ビームでタンパク質が吸着するメカニズムはまだ不明であるが、恐らく電子ビーム照射によって電子顕微鏡チャンバー内にわずかに混在している炭素が吸着し疎水性となることで照射部のみタンパク質が吸着するためと考えている。次にこの方法を用いてルシフェラーゼタンパク質を吸着させたが、発光強度が想定していたより弱く検出するには数秒以上の露光時間が必要であることが分かったため、点走査を想定している本顕微鏡では時間がかかりすぎることから他のバイオセンサーを検討することにした。現在、高い輝度と早い応答で知られる **iATPSnFR1.1** (M. A. Lobas et al. *Nat Comm* 2019)、やカルシウムに応答するバイオセンサータンパク質である **GCaMP6f-RS09** (T. Chen et al. *Nature* 2013) の精製を行っている。



本研究では **AFM** 観察と発光イメージングを同時に行うために、市販の共焦点顕微鏡 (**C2 plus**, ニコン) に自作の **AFM** を組み込んだ共焦点顕微鏡-AFM 融合顕微鏡を作製した (図 2)。研究代表者自身が設計・組み立て・制御系構築に関わり細胞や生体試料を観察するのに適した融合顕微鏡の作製を行った。研究代表者の所属する研究室ではこれまでもいくつかの **AFM** を自作しているが、これらの **AFM** とは異なり本融合顕微鏡はガラスボトムディッシュ上の細胞を観察することが可能で **AFM** 観察と同時に共焦点顕微鏡での蛍光観察も可能である。また、ヒーティング機能も備わっておりサンプル周りを **37°C** に保つことで生きた細胞やオルガネラを観察することができる。



ミトコンドリアの単離は **Mitochondria Isolation Kit** (**abcam**) を用いて行った。図 3 はイヌ腎臓尿細管上皮由来細胞を培養した後キットを使って精製した結果と **TMRE Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit** (**abcam**) を用いてミトコンドリアの膜電位を測定した結果である。活性のあるミトコンドリアが単離できたことを示している。



本研究ではミトコンドリアやオルガネラ表面のナノスケール **ATP** 分布測定を行う予定だが、その前に開発したイメージング技術の評価するための評価系を構築する必要がある。そのために、研究代表者は窒化シリコンの薄い膜に小さな穴を開け、膜の両側に異なる **ATP** 濃度の溶液を入れることによって小孔から高い **ATP** 濃度が放出して **ATP** 濃度のナノスケールの勾配を作製する装置の開発を行った。図 4A は装置の 3 次元 CAD 画像、図 4B は組み立てたチャンバーの写真である。このチャンバーは **35 mm** のガラス底のディッシュの上に置かれ、厚さ **0.5 m** の窒化ケイ素膜の小孔によって内側の溶液と外側の溶液を分離している。その結果、窒化ケイ素膜を通して先端部の蛍光を確認することができた (図 4C)。また、**FIB** を用いて直径 **100 nm** 以下の小さな穴を開ける条件を検討した (図 4D)。

本研究は本研究費によっていくつかの重要な技術開発と顕微鏡開発を達成することができた。今研究はこれからも継続していくが、本研究費によって開発された様々な技術と装置は他の多くの研究にとって必要なものでありこれから役に立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ichikawa Takehiko, Stuckenholtz Carsten, Davidson Lance A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Non-junctional role of Cadherin3 in cell migration and contact inhibition of locomotion via domain-dependent, opposing regulation of Rac1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73862-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Penedo Marcos, Shirokawa Tetsuya, Alam Mohammad Shahidul, Miyazawa Keisuke, Ichikawa Takehiko, Okano Naoko, Furusho Hirotoishi, Nakamura Chikashi, Fukuma Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell penetration efficiency analysis of different atomic force microscopy nanoneedles into living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87319-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Penedo Marcos, Miyazawa Keisuke, Okano Naoko, Furusho Hirotoishi, Ichikawa Takehiko, Alam Mohammad Shahidul, Miyata Kazuki, Nakamura Chikashi, Fukuma Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Visualizing intracellular nanostructures of living cells by nanoendoscopy-AFM	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabj4990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abj4990	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ngo Kien Xuan, Nguyen Phuong Doan N., Furusho Hirotoishi, Miyata Makoto, Shimonaka Tomomi, Chau Nguyen Ngoc Bao, Vinh Nguyen Phuong, Nghia Nguyen Anh, Mohammed Tareg Omer, Ichikawa Takehiko, Kodera Noriyuki, Konno Hiroki, Fukuma Takeshi, Quoc Nguyen Bao	4. 巻 -
2. 論文標題 Unraveling the Host-Selective Toxic Interaction of Cassiicolin with Lipid Membranes and Its Cytotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/PHYTO-09-21-0397-R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichikawa Takehiko, Wang Dong, Miyazawa Keisuke, Miyata Kazuki, Oshima Masanobu, Fukuma Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Chemical fixation creates nanoscale clusters on the cell surface by aggregating membrane proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03437-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 市川 壮彦
2. 発表標題 原子間力顕微鏡と多孔窒化シリコン薄膜を用いた生きた細胞表面の高分解能観察方法の開発
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川 壮彦
2. 発表標題 肺がん細胞膜上の c-Met 受容体分子を原子間力顕微鏡で観察する方法の開発
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市川 壮彦
2. 発表標題 化学固定は膜タンパク質を凝集することによって細胞表面にナノスケールのクラスターを形成する
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 市川 壮彦
2. 発表標題 化学固定は膜タンパク質を凝集することにより細胞表面にナノスケールのクラスターを形成する
3. 学会等名 学術変革領域(A)クロススケール新生物学キックオフミーティング
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 走査型プローブ顕微鏡及びそれを用いた細胞表面の観察方法	発明者 福間剛士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-199540	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------