

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670107

研究課題名(和文)半導体ナノ加工技術を利用したX線1分子動態計測法の開発

研究課題名(英文)Development of the DXT method by Photolithography

研究代表者

清水 啓史(Shimizu, Hirofumi)

福井大学・医学部・講師

研究者番号：50324158

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究ではイオンチャネル蛋白質の1分子構造変化を計測するX線1分子動態計測法用の観測チャンパー開発、観測プローブ開発をフォトリソグラフィー技術を用いて行った。

X線1分子動態計測法(DXT法)では金ナノ結晶を観測プローブとして蛋白質に取り付け、放射光X線を用いて観測する。フォトリソグラフィー技術によって、ナノメートルおよびマイクロメートルスケールのパターンニングを行うことで、X線による散乱ノイズの少ない観測チャンパー、およびサイズ制御した観測プローブが作製可能であることを見出した。

研究成果の概要(英文): In this project we developed the Diffracted Xray Tracking(DXT) method, which can measure single-molecule conformational changes of ion channel proteins, by applying the photolithography technique to a probe and a recording chamber. In the DXT method a gold nanocrystal was attached to an ion channel protein as a probe, and the diffraction spots from the nanocrystal was elicited by radiation of the synchrotron white xray. Tracking the motions on the detector plane can be translated into the protein motions. We found the methods for fabrications of the size-controlled probe in nano-meter scale and the recording chamber with low xray-scattering noise in micrometer scale by using photolithography technique.

研究分野: physiology

キーワード: Single molecule Ion channel protein dynamics

1. 研究開始当初の背景

イオンチャネル蛋白質は細胞内外のイオン輸送を行うことによって、情報伝達を担う重要な蛋白質である。創薬の標的分子としても注目度が高い。イオンチャネル蛋白質の高分解能の立体構造が1998年に初めて明らかになると、機能する際にどのように動くかに注目が集まった。代表者はX線1分子計測法を用いて、イオンチャネルの1分子の開閉構造変化をビデオレートで1分子動画計測することに世界で初めて成功した(H.Shimizu, et.al. Cell (2008) 132 67-78)。

イオンチャネル蛋白質の開閉構造変化を1分子動画計測するX線1分子動態計測法では、蛋白質にとりつける観測プローブとして金ナノ結晶を用い、放射光X線を観測光として金ナノ結晶からの回折点の運動計測を行う(図1)。観測チャンバーとしてはガラス基板チャンバーを用いていた。動態計測用の金ナノ結晶は蛋白質の運動の負荷となりうるため、計測法を定量的な観測法とするには様々なサイズの観測プローブのサイズを揃えて作製する必要があった。また、ガラス基板観測チャンバーはそれ自身がX線を散乱し、運動計測の妨げとなりうるため(図2)、散乱の少ない材料を用いた観測チャンバー開発が必要であった。

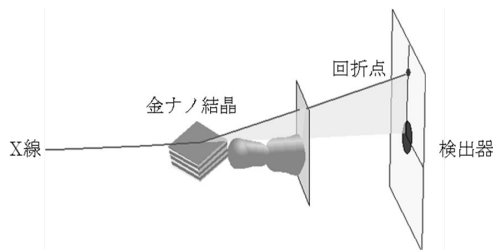


図1 X線1分子動態計測法の概要

基板上に固定したイオンチャネル蛋白質に金ナノ結晶を取り付け、放射光X線を照射する。金ナノ結晶からの回折点の運動を検出器上で動画観測する。蛋白質の動きを回折点の動きとして観測することができる。

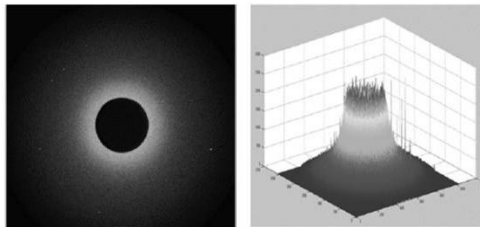


図2 従来観測チャンバーの取得画像例

画像(左) 輝度のプロット図(右)

従来のガラスチャンバーで計測すると、中心部に高い背景ノイズが観測され、しばしば回折点の観測に支障があった。

2. 研究の目的

本研究ではX線1分子動態計測法を定量的な動態計測法とすることを目的とした。半導体ナノ加工技術を応用して、金ナノ結晶のサイズ制御法を開発すること、およびノイズの小さな観測チャンバーの素材および形状加工法を開発することを開発目標とした。

金ナノ結晶のサイズ制御法を確立することによって、結晶サイズによって観測される蛋白質の運動がどのような影響を受けるかを定量的に評価することができる。また、背景ノイズの小さい観測チャンバーを開発することによって、輝度の低い観測点の運動も背景ノイズに埋もれることなく、連続的に観測することが可能になる。

3. 研究の方法

24年度に共同利用が始まった京都大学次世代低炭素ナノハブ創成拠点を利用して、半導体ナノ加工用の機器および微細構造観察用の機器を用いて開発を実行した。金ナノ結晶作製については清水が、観測チャンバー開発にあたっては平井が担当した。

ナノ結晶作製においては、ターゲット基板上に作製した金薄膜にナノパターンニング技術を用いてパターン形成を行った。観測チャンバーについては、X線散乱の少ない素材を探索し、その素材を用いてフォトリソグラフィ技術を用いて作製できることを見出した。

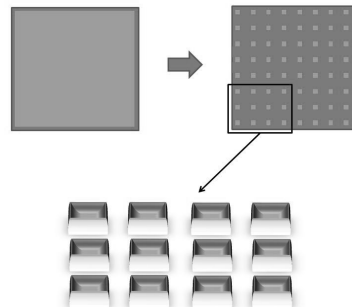


図3 ナノパターンニング法の概略

基板上に形成した薄膜を島状にパターンを形成し、観測プローブのサイズを制御する

4. 研究成果

次世代低炭素ナノハブの機器類を用いて金ナノ結晶のサイズ制御に取り組んだ。詳細な条件検討を行うことにより、基板上にナノサイズの金のパターンを島状に形成することに成功した(図3)。

また、作製したナノ粒子がX線の回折能を持つかどうかを、放射光施設を利用して検証実験を行った。その結果、パターンニングによって得られた金ナノ粒子が結晶性を持ち、蛋白質の動態計測に応用可能であることを

確認した。

低ノイズ観測チャンバー開発について、ガラス基板を用いた観測チャンバーよりもノイズの小さい素材を用いて観測チャンバー製作を試みた。蛋白質の動態計測には水溶液層が必要であるが、溶液層自身が背景ノイズの原因となることから、溶液層が薄ければ薄いほどよい。フォトリソグラフィ技術を用いて基板上に薄層の溶液層を形成し、イオンチャンネル蛋白質の動きを液中で観測できるチャンバーを作製した(図4)。観測チャンバー自体の背景ノイズ特性を放射光施設で計測した。その結果、図5のように従来型に比べて運動計測の妨げになる背景ノイズの小さな観測チャンバーを開発することに成功した。

以上の開発の成功により、X線1分子動態計測法を定量的な動態観測法とすることへの端緒を得られた。今後はこれらの開発を進め、様々なサイズの観測プローブをサイズを揃えて作製すること、また背景ノイズの小さい観測チャンバーを用いたイオンチャンネル蛋白質の動態観測が期待される。

本研究課題の成果は新学術領域研究(課題番号:15H01633)、基盤(B)研究(課題番号:15H04675)の基礎となって継承・発展されることとなっている。

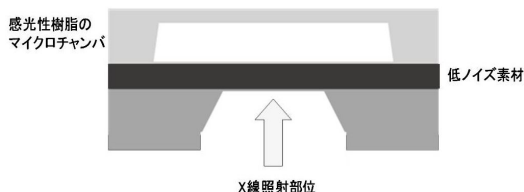


図4 観測チャンバーの概念図

低X線バックグラウンドノイズ素材を用いて観測チャンバーを作製した。半導体加工技術を用いて観測窓を設け、フォトリソグラフィ技術によって溶液層を保持するマイクロチャンバーを作製した。

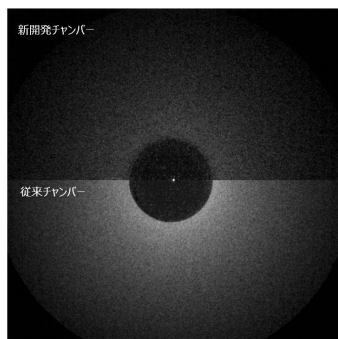


図5 観測チャンバーの背景ノイズ比較

新しく開発した観測チャンバー(上半分)と旧型観測チャンバー(下半分)の背景ノイズを比較すると新型の背景ノイズが小さいことがわかる。明るい方が輝度が高いことを示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

H. Nakao, K. Ikeda, M. Iwamoto, H. Shimizu, S. Oiki, Y. Ishihama, M. Nakano pH-dependent promotion of phospholipid flip-flop by the KcsA potassium channel *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 1848 (2015) 145-150 査読有

A. Yamakata, H. Shimizu, M. Osawa, S. Oiki: Structural changes of the KcsA potassium channel upon application of the electrode potential studied by surface-enhanced IR absorption spectroscopy *Chem. Phys.* 419 (2013) 224-228 査読有

[学会発表](計6件)

Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Shigetoshi Oiki: Relationship between Structural Fluctuations and the Opening Conformational Changes of The KcsA Potassium Channel. 第120回日本解剖学会総会 全国学術集会, 第92回日本生理学会 2015年3月21日~23日 神戸国際会議場・展示場

Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Yoshikazu Hirai, Osamu Tabata, Shigetoshi Oiki "The diffracted X-ray tracking method for recording the single-molecule conformational changes of the KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution", The 45th Natl Inst Physiol Sci (NIPS) International Symposium, Okazaki, Japan, 25-28 November, 2014 ..

平井義和、田畑修、清水啓史: X線1分子動態計測法で用いる低ノイズ観測チャンバーの開発 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第30回研究会(CHEMINAS30)2014年10月2日~3日 北海道大学フロンティア応用科学研究棟

Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Yumiko Oota, Shigetoshi Oiki: The Enhancement of the Structural Fluctuations Prior to The Opening Conformational Changes of the KcsA Potassium channel. 第52回日本生物物理学会 2014年9月25日~27日 札幌コンベンションセンター

Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Antoine Royant, David von Stetten, Laurent Guerin, Micahel Wulff, Shigetoshi

Oiki: Development of a method for measuring single-molecule motions of the KcsA potassium channel in a sub-millisecond time resolution. Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Satio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses. 2014年4月21日～25日 OIST seaside house, Okinawa

清水啓史、岩本真幸、老木成稔 高時間分解能で蛋白質の分子揺らぎと構造変化を計測するためのX線1分子動態計測法の開発
第51回日本生物物理学会 2013年10月28日～30日 国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

イオンチャネル蛋白質1分子の動きを動画でとらえる～X線1分子動態計測法の開発～
清水啓史、井上良幸
NanotechJapan Bulletin Vol.6, No.5, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 啓史 (Shimizu, Hirofumi)
福井大学・医学部・講師
研究者番号：50324158

(2) 研究分担者

平井 義和 (Hirai, Yoshikazu)
京都大学大学院・工学系研究科・助教
研究者番号：40452271

(3) 連携研究者

田畑 修 (Tabata, Osamu)
京都大学大学院・工学系研究科・教授
研究者番号：20288624