

【基盤研究(S)】

理工系 (総合理工)



研究課題名 極めて柔らかい膜環境にあるタンパク質分子のナノ動態イメージングの実現

金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター・特任教授

あんどう としお
安藤 敏夫

研究課題番号：17H06121 研究者番号：50184320

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子イメージング・ナノ計測

【研究の背景・目的】

代表者が世界に先駆けて開発した高速原子間力顕微鏡 (以下、高速 AFM) により、タンパク質分子が機能しているときの姿・動作を光学プローブを介さずに直接動画観察することが可能になった。この顕微鏡は製品化され、世界普及が進行している。その結果、我々が行った開拓的イメージング研究に続き、タンパク質分子の動的プロセスが国内外で高速 AFM 撮影され、従来技術では困難であった発見が続いている。しかし、極めて柔らかい膜環境下で働くイオンチャネルやポリペプチドの膜透過輸送を担うトランスロコンといった膜タンパク質の生理的イオン環境下での動的プロセスの高速 AFM 観察は未だ実現されていない。その原因は、膜が極めて柔らかいため、AFM 探針との接触で大きく変形し、そこに存在する膜タンパク質分子を高解像で捉えることができないからである。膜断片を基板に直接載せてこの問題を回避することは可能だが、膜表裏の間にイオンなどの濃度勾配を形成できず、また、ポリペプチドの膜透過が阻害されてしまう。

そこで本研究では、極めて柔らかい膜環境中で起こる膜タンパク質の動的プロセスの高速高解像イメージングを実現するための技術開発を実施する。

【研究の方法】

代表者が高速 AFM の開発と応用研究で長く培ってきた技術をベースに、①膜タンパク質を含む脂質平面二重層膜の小さい面を宙に張り、膜表裏の間にイオン・分子の濃度勾配を形成できる技術を開発する。②これまで進めてきた非接触イメージング可能な走査型イオン伝導顕微鏡 (以下、SICM) の高速化・低ノイズ化の研究を更に発展させるとともに、高い空間分解能を有する高速 SICM を実現する。

SICM は電解質を含むガラスピペットをプローブとして使い、ピペット内の電極と外液の電極の間を流れるイオン電流を計測する (図 1)。ピペット先端が試料表面に接近するとイオン電流が減少することを利用して、試料表面の高さを見積もる。それ故、非接触イメージングが可能である。だが、空間分解能は AFM には

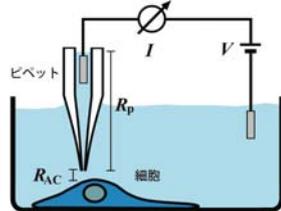


図 1. SICM の模式図

及ばない。空間分解能を上げるには、小さい開口径をもつピペット先端を開口径程度の距離まで近づける必要がある。だが、開口の周りのガラス壁は厚いため、イオン電流はその壁直下にある試料を敏感に検出できない。それ故、ピペット先端は試料に接触して試料を破壊する。そこで、開口の周りの壁を薄くする加工技術を開発するとともに、カーボンナノチューブ (CNT) をプローブとして利用するための技術を開発する。これらの技術の有効性を、精製したタンパク質系、ミトコンドリアの外膜・内膜に組み込まれた膜タンパク質などの動態観察により実証する。

【期待される成果と意義】

高速・高解像・非接触の三条件を満たすプローブ顕微鏡が実現される。その結果、これまで不可能であった極めて柔らかい膜環境下にある膜タンパク質の動態をサブ分子分解能で観察することが可能になる。また、宙に浮いたタンパク質分子などの動態観察も可能になるため、例えば、脱膜した筋原線維のような高次構造体中存在するタンパク質分子の動態観察さえ可能になる。高速・高解像 SICM は将来更に進化して細胞内の様々な構造やダイナミクス of 可視化を実現する可能性を秘めている。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・高速 AFM のバイオ応用に関する総説：T. Ando, T. Uchihashi, and S. Scheuring, Filming biomolecular processes by high-speed atomic force microscopy (2014) *Chem. Rev.* **114**, 3120-3188.
- ・SICM の総説：C.-C. Chen, Y. Zhou, and L. A. Baker, Scanning ion conductance microscopy (2012) *Annu. Rev. Anal. Chem.* **5**, 207-228.
- ・CNT が脂質二重層膜に自動的に挿入され、CNT の中をイオンが流れることを実証した論文：J. Geng *et al.*, Stochastic transport through carbon nanotubes in lipid bilayers and live cell membranes (2014) *Nature* **514**, 612-615.

【研究期間と研究経費】

平成 29 年度 - 33 年度 126,400 千円

【ホームページ等】

http://biophys.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_J.html