

研究報告書

「単一分子 DNA のナノポアシーケンシング」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：田中 裕行

1. 研究のねらい

走査型プローブ顕微鏡 (SPM) は、1960 年代後半から Young 等 (米国国立標準局) が開発した topographiner に始まり、現在では、走査型トンネル顕微鏡 (STM) や原子間力顕微鏡 (AFM) として普及することとなった。SPM は単一分子解析・操作手法としても有用であるが、そもそも化学種帰属や元素識別を行うには、特別な工夫が必要となる (参照：第二期生西野・齋藤)。さらに、電子顕微鏡の場合と同様に、観察対象とする系によっては、特別な試料調整法の開発が必須となることも多い。実験技術的なノウハウを要求するパッチクランプのような電気生理学的手法が必要となる系に SPM は殆ど適応されていない。我々は、超高真空低温という特殊で静的な実験条件において DNA のシーケンシングを STM の電流変化の検出で行ってきた。本研究では、そこから大きく飛躍させ、生体ナノポアのイオン電流をパッチクランプで計測しつつ同時に、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し、イオンチャネルタンパク分子の機構解析や DNA のシーケンシングに発展させることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 脂質二分子膜基板の開発：テフロンサポート

本研究では、SPM とパッチクランプによる電流計測の同時測定を実現させられるか否かで研究の成否が決定的に決まってしまう。研究開始当初より手段を選ばない試行錯誤を続け (図 1a-b)、その結果、電気生理学でよく使われる“削り取り法”を独自に改良し、さらに、低融点テフロンを用いると脂質二分子膜のサポート基板に適した真円に近い微細孔が容易に得られることを見いだした (図 1c)。さらに改良し (図 2a)、どこまで微細な孔を作成できるかを試みたところ、図 2 に示すように、直径数マイクロメートル程度のきれいな円形に近い微細孔を、高価で大がかりな微細加工装置も使わずローテクだけで作成することに成功した。

(2) 脂質二分子膜基板の開発：電流計測

前述の手法で作成したテフロンの微細穴に脂質二分子膜を作成し、単一チャンネル電流測定 (パッチクランプ測定) を行ってみた。エアバブル法によって、脂質二分子膜を微細穴に形成し、コンダクタンスの比較的小さく、安定なチャンネルとして有名なグラミシジンチャンネルを測

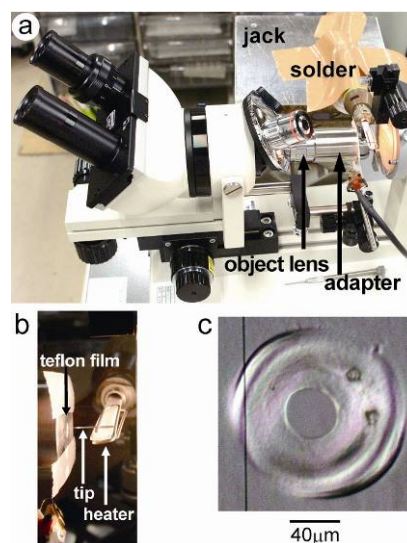


図 1 初期のテフロン基板作成装置
加熱した針で穴をあける

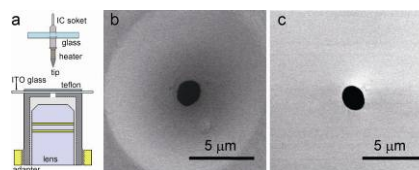


図 2 第二世代のテフロン基板作成装置
の模式図及び微細孔の写真 (両側)

定した。全般にノージーだが、量子化された飛び飛びの値をとる電流を測定することができた(図 3)。ちなみに、チャンネル導入前の電流値(リーク電流)は、0.5pA 以下で、絶縁抵抗は TΩ 近い。さらに、印可する電位差を装置の最大電圧である 1V にまで上げてもすぐには壊れることがなく、安定な膜を得ることに成功した。

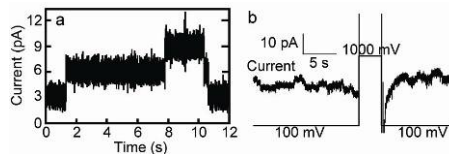


図 3 単一チャンネル電流測定(パッチクランプ測定)の一例と安定性の確認

(3)パッチクランプとAFMとの融合:モデル基板でのイオン電流とAFMの同時測定

AFMと組み合わせる場合、AFMの構造にもよるが、一般的にAFMのワークディスタンスは小さいため、パッチクランプ用のセルの厚みは薄い方がよい。そこで、セルの下側のコンパートメントをアガロースゲルによりゲル化し、Oリングなどの嵩高い部分を省略できるようにした。このような支持膜は、無支持膜に比べて安定で長寿命というメリットもある。

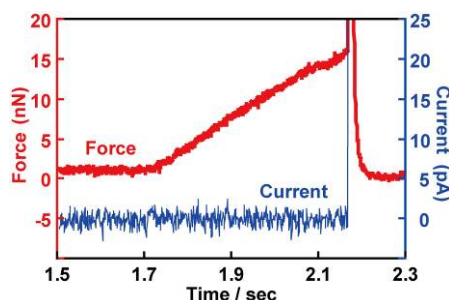


図 4 水和ゲルサポートされた人工脂質二分子膜 電流-力同時計測例

そのようなセルで、フォースカーブと膜電流測定の同時計測を行ってみた(図 4)。プローブの負荷が徐々に増加するが、膜電流は特に変化がない。しかし、やがて突然、膜電流が飽和し、プローブの負荷が小さくなってしまった。これは、非可逆的に脂質二分子膜が破壊され下地の軟らかいアガロースゲルにプローブが突き刺さってしまったと理解でき、このようにパッチクランプ可能な水和ゲル支持型の脂質二分子膜のシステムを AFM と融合させることに成功した。

(4)パッチクランプとAFMとの融合:イオンチャンネルゲートのAFMによる操作

個々の原子分子を可視化・分光できるだけでなく操作できることが、SPMの他の分析手法と大きく異なる特徴の一つである。そこで、チャンネルのゲートを AFM によって操作し、その応答をパッチクランプで検出することを試みた。

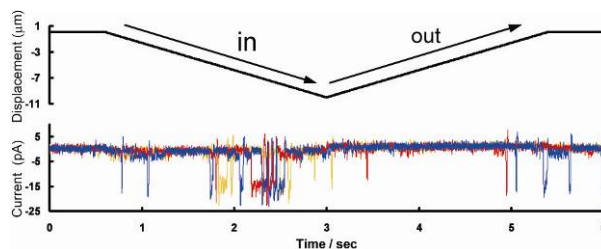


図 5 AFM のプローブ操作とイオン電流との相関の同時計測

チャンネルの開確率を制御する構造はゲートとよばれ、電位、リガンドや機械などの刺激によってチャンネルはゲーティングされる。KcsA の開確率は、pH が中性の時は低く、酸性のときは高い。また、KcsA がゲーティングされるとき、つまり、刺激を感じそれがゲート(イオンフィルタ)に伝わるとき、タンパクの構造が変化すると予想されている。そこで、この構造変化を AFM プローブによる機械刺激として直接入力することによりゲーティングさせることを実験のポイントとした。

C 末端にヒスチジンタグをつけられた KcsA チャンネルを AFM プローブに修飾し、前述のセルに、膜が破れない程度の条件でプローブを繰り返し押し込み一引き戻しさせながら膜電流計測を行った。酸性条件(pH4.0)の場合では、AFM プローブが押し込む途中で電流に変化が現れ、プローブが無負荷の状態でも、KcsA のコンダクタンスに対応する電流が測定された。とこ

ろが、中性条件(pH7.2)では、プローブを連続的に何度も押し込み(in)ー引き戻した(out)が、KcsA のコンダクタンスに対応する電流が際だって多く測定されたところは、押しつけている条件(in)のところであった(図 5)。これらの結果は、AFM プローブに修飾された KcsA が、独自の手法で作成した人工脂質二分子膜のセル内に再構成され、しかも、AFM プローブが押し込まれるときの機械刺激によって、ゲーティングがバイアスされたことを表している。このように、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し実証した。

3. 今後の展開

本研究での成果をふまえ、イオン電流とプローブ操作の相関の同時測定手法をさらに発展させ、DNA を修飾したプローブを用いてナノポアシーケンシングを行う。また、イオンチャネル蛋白分子を1分子の分解能で可視化させる顕微鏡動作も行う。また、そのために必要となるマルチプローブ機構の開発を行う。さらに、多角的に理解を行うために、蛍光顕微鏡やラマン顕微鏡などとの融合、いわゆるマルチモーダル化にも発展させたいと考えている。

4. 自己評価

上述のように、当初の目標に掲げた、「生体ナノポアのイオン電流をパッチクランプで計測し、同時に分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発」については、ローテクを生かした独自のアイデア(特許技術等)により達成できた。さらに共同研究者により提供された KcsA というイオンチャネルタンパク分子を修飾されたプローブ探針をプローブ操作により、そのイオンチャネルの開閉を制御(バイアス)し、その機能をパッチクランプのイオン電流として同時計測し、イオンチャネルタンパク分子の機構解析に適應することに成功した。一方、「DNA のシーケンシング」に関しては、マルチプローブの開発に研究資源が期間内に都合できず、平成24年度中の達成を目指している。

本研究成果でふれたように、絶縁体のフィルムに直径数マイクロメートルオーダーのきれいな円形に近い微細孔を、高価で大がかりな微細加工装置も使わず、いわゆるローテクだけで作成することに成功したのだが、この成果の評価のために参考となるエピソードを挙げておきたい。共同研究をしていた阪大・生命機能の電気生理学グループにこの成果を説明したとき、「どうやってそんな小さな穴をあけるんですか?」と驚かれてしまった。経緯の詳細はよく知らないが、過去にそのような穴を形成できないために、やりたい研究ができなかったということであった。

課題を提案したとき、単一チャネルのレベルのパッチクランプと SPM をちゃんと融合した研究例はなかった。それを独自のアイデアで安価で簡便でロバストに融合でき、論文と特許を早々とさせたことは幸先がよかった評価している。また、研究を遂行するにあたって、予算の使い方が適切だったことも成功の一因となっており、適切なアドバイスをいただけた JST の事業とスタッフのサポートも評価されるべきと感じている。

なお、総括から、研究開始前の訪問面談にて、申請者自身だけでなく、「学生が興味を持って研究ができるように指導せよ」とのアドバイスをいただいていた。関係した二人の学生が共に面白いと感じ推進してくれたので、これは達成されたと認識している。一方、所属研究室の教授退官を見越した「転出」に関する対応は未達成で、手のひらの孫悟空であったと実感して

いる。

5, 研究総括の見解

比較的短期間の研究で、分子修飾された SPM プローブの操作と電流の相関をダイナミックに取得できる実験技術・分析手法を開発し実証した点は評価出来る。今後、この基盤を当初目標である DNA のナノポアシーケンシング実現に向けて如何に効率良く研究をフォーカス出来るかがポイントであろう。本人は研究の方向としてマルチモーダル化を指向しているようであるが、目標が発散して、「二兎を追う者一兎をも得ず。」とならないように着実な研究計画を持って進めることが望まれる。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. M.Kitta, H.Tanaka and T. Kawai, Rapid Fabrication of Teflon Micropores for Artificial Lipid Bilayer Formation, Biosensors and Bioelectronics 25 (2009) 931-934. |
| 2. M. Kitta, T. Ide, M. Hirano, H. Tanaka, T. Yanagida and T. Kawai. Direct Manipulation of a Single Potassium Channel Gate with an Atomic Force Microscope Probe. Small, 7(16), (2011) 2379-2383. |
| 3. 田中裕行. 簡便な安定化脂質二分子膜プラットフォームの開発とその応用. 表面科学Vol. 32, No. 7, (2011) 445-450. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件
発 明 者: 田中裕行、橘田晃宜、川合知二
発明の名称: 平面脂質二重膜の形成方法
出 願 人: JST
出 願 日: 2010/2/17

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

主要な学会発表

・「膜タンパク質の電氣的・力学的同時計測による一分子測定」表面科学会、大阪大学
2010年11月。(本講演により、表面科学会会誌への寄稿の招待を受けた。)