

# 研究報告書

## 「生細胞膜分子動態を観る極限時空間分解能 AFM の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 山下 隼人

### 1. 研究のねらい

細胞が機能し、環境と相互に作用するためには、細胞を覆う細胞膜中の膜タンパク質分子が働くことが必須であり、それぞれの細胞の多様な機能の多くは膜タンパク質が担っている。このことから「個々の生細胞における膜タンパク質分子を、網羅的に極限の精度と時空間分解能で直接観る技術」があれば、1 細胞内の多様な膜タンパク質の構造・動態・相互作用が同時に分かり、1 細胞レベルの表現系・機能・個性の理解が格段に進むと考えられる。

現在の 1 細胞イメージングでは、電子顕微鏡のように細胞表面の「構造を詳細に観る」技術や蛍光顕微鏡のように膜分子の「ダイナミクスを高速で観る」技術を用いて研究が行われているが、このような「高い空間分解能」と「高い時間分解能」を同時に満たす技術はこれまでなかった。一方、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は溶液中において生体分子の動態をナノメートルかつ数十ミリ秒の時空間分解能で直接可視化可能な顕微鏡として、これまで細胞から精製した様々なタンパク質の機能する様子を捉える事に成功してきた。このことは、高速 AFM が前記の 2 つの技術の橋渡しとなり、生細胞中の膜分子動態を捉えることができる有力な技術となりうる可能性を示していると考えられるが、一方で課題も存在する。細胞は柔らかい構造をしているため、AFM でその表面構造を正確にトレースするのは困難であることに加えて、精製タンパク質に対して細胞は非常に大きく、細胞と分子のスケールギャップが AFM の時空間分解能を制限している。

そこで本研究では、高速 AFM を用いて 1 細胞膜分子動態のイメージングを実現するため、細胞イメージングにおける極限の時空間分解能を持つ AFM 技術の開発を行うことで、生きた 1 細胞における表面膜タンパク質分子の構造と動態プロセスをナノレベルの空間分解能、数十～数百ミリ秒オーダーの時間分解能で可視化する新しい 1 細胞計測手法を創成することが本研究のねらいである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生きた細胞上の膜分子を高解像度に可視化するための AFM 技術の開発を行った。その中で、新しい構造の AFM スキャナーを開発することで、細胞膜表面観察における時空間分解能を向上させ、生きたバクテリア細胞上で、個々の分子構造を可視化することに成功した(特許出願済)。そこで、バクテリア細胞イメージングの応用として、抗菌薬の作用過程の観察を行い、殺菌過程の初期における細胞膜のマクロな構造変化が、膜中の微小な分子集合体の欠陥によって引き起こされることを明らかにした(論文準備中)。また、動物細胞の表面分子観察に向けて、AFM 技術開発を進めた。

さきがけ期間中に、同領域内において、理化学研究所の谷口博士とクロマチン 3 次元構造

の高分解能構造解析に関する共同研究、名古屋大学の樫田准教授と SNA および 6 重鎖構造の高速 AFM 解析、および東京大学の山口講師と光応答性細胞固定化剤修飾基板の表面構造評価に関する共同研究を行い、1 報の論文を出版、2 報の論文を現在準備中である。

以下にそれぞれの研究成果について詳細を説明する。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1 「細胞上膜分子を可視化するための原子間力顕微鏡技術の開発」

高速 AFM は現在、精製タンパク質のイメージングで応用され、様々な成果が上がっているが、一方で細胞イメージングでは、細胞表面の静止構造や、細胞全体もしくはマクロな膜表面のダイナミクスの計測は行われているが、細胞上膜分子の計測は、ほとんど行われていない。AFM による精製タンパク質の分子イメージングと細胞イメージングの大きな違いの一つに、細胞全体のサイズと分子のサイズにスケールギャップが存在することである。マイクロメートルオーダーのサイズを持つ細胞全体構造とナノメートルオーダーの膜タンパク質分子を AFM で機械走査(スキャン)する際、このスケールギャップが時空間分解能を制限しているため、細胞上では分子を観察することが困難となっていた。AFM スキャナーの走査性能を向上させ、細胞表面での膜分子動態をナノメートルかつミリ秒オーダーの時空間分解能で撮影可能にするため、細胞全体を撮影する広域走査と注目する表面膜分子領域のみを高速高解像に撮影する狭域走査とを合わせ持った複合型のスキャナーシステムの開発を行った。その走査性能の評価を行った結果、広域走査は最大走査範囲 4~6  $\mu\text{m}$ 、最高約 1.0sec/frame で走査でき、狭域走査は 0.7~1.5  $\mu\text{m}$ 、約 30msec/frame で走査可能な特性が得られた。このことから、広域を低速、狭域を高速高精度に走査可能なスキャナーを実現できたことが分かった(国内・PCT 特許出願済)。また、X,Y 走査だけでなく、Z 走査においても広域と狭域を分担した機械構造の開発を行い、広域は約 2 倍の走査範囲を確保し、狭域は約 2 倍の走査帯域を実現した。またこの複合型スキャナーの実際のイメージングにおける性能評価として、まず、天然由来の精製紫膜の観察を行った。従来の細胞観察スキャナーでは高速走査において紫膜中のバクテリオロドプシン(bR)の分子構造を識別できなかったが、新開発の複合型スキャナーでは、1 分子構造を明瞭に可視化することができた。さらに溶液中における生きた細胞イメージングにおける性能評価として、バクテリア細胞の細胞表面イメージングを行った。磁性細菌の細胞表面の外膜には膜貫通型タンパク質であるポーリンが多量に存在していることが分かっていたが、従来の高速 AFM スキャナーではそれらの細胞上での分子配置を明らかに出来ていなかった。一方、本研究にて開発したスキャナーを用いた結果、培養液中の生きた磁性細菌細胞上でポーリンと考えられる 3 量体分子が部分的に規則正しく配列している様子を可視化でき、細胞上での膜分子構造を明らかにすることが出来た。また同じグラム陰性細菌である紅色細菌でも細胞観察を行った結果、外膜表面に多数のポーリンと考えられる 3 量体分子が密集して存在し、膜中で揺らいでいる様子を 1.0sec/frame の走査

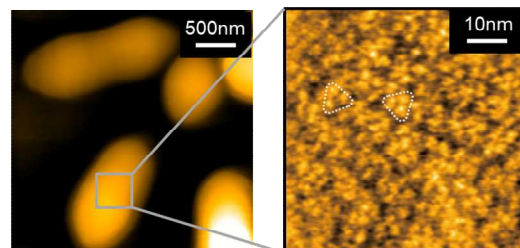


図 1: バクテリア細胞の高速 AFM 像  
(左:細胞全体像、右:細胞表面拡大像)

速度、3nm以下の空間分解能で観察することに成功した(図1)。この時空間分解能は、AFMによる生きた細胞上での分子観察として世界最高であり、これらの成果は現在、論文投稿準備中である。

#### 研究テーマ2「バクテリア細胞上の分子動態観察と薬剤に対する応答プロセスのナノ計測」

生細胞表面の膜分子を1分子レベルの解像度で可視化するためのAFM技術として研究テーマ1で開発した複合型AFMスキャナーを用いて、バクテリア細胞における膜分子動態イメージングへの応用に取り組んだ。グラム陰性細菌では、最外層である外膜にポーリンと呼ばれる膜貫通型のタンパク質が存在し、細胞外のイオンなどを取り込む際の透過障壁となっており、この分子に変異が起きることで、細菌が薬剤耐性を持つことが知られている。そのため細菌の多剤耐性の研究においても非常に重要なタンパク質である。本研究では、磁性細菌、紅色細菌や大腸菌などのグラム陰性細菌の細胞表面の観察を行い、ポーリンと考えられる多数の3量体分子を観察することが出来た。一方、最近の研究で、大腸菌の外膜では外膜タンパク質が膜タンパクアイランドと呼ばれる分子集合体を形成することが明らかにされた(P. Rassam, (2015) *Nature*)が、アイランド内での分子配置の詳細は明らかにはなっていなかった。本研究にて、大腸菌外膜を観察したところ、アイランドと考えられるクラスター構造を観察することに成功し、クラスター内と比べクラスター周辺では分子拡散が大きいことが分かった。しかしながら、それらの拡散は、複数のクラスターからなる膜タンパク質の密集環境により、非常に限局していることも明らかとなった。また、これら外膜タンパク質の分子種の同定とその局在を調べるため、大腸菌の外膜で発現していることが知られている膜タンパク質 OmpF の抗体を投与した結果、細胞表面分子に結合する様子を観察することが出来た。このことから、抗体を用いることによりAFMで観察している細胞膜タンパク質の分子種を同定することも可能であることを示せた。

次に、バクテリア細胞イメージングへのさらなる応用として、抗菌薬による殺菌過程のナノスケール観察を行った。細胞表面観察中にポリペプチド系の抗生物質を投与したところ、時間とともに細胞表面に数nm程度の球状構造体が幾つも出現する様子が観察された。その後、細胞表面全体にわたって数十nm程度のこぶのようなラフな起伏に構造変化し、やがて細胞全体の構造が崩れ溶菌したことから、抗菌薬投与後、初期過程において膜分子が細胞外へ脱離し、幾つもの欠損が生じることにより細胞膜表層に大きな構造変化が生じたと考えられる。これまでの研究で細胞膜のマクロな変化は観測されていたが、その変化が生じるミクロなプロセスは明らかになっていなかった。これらの計測により、本研究で開発した技術が、薬剤に対する細胞のナノスケールでの応答過程をイメージングするツールとして有用であることを示せた。

#### 研究テーマ3「動物細胞のAFM観察のための技術開発」

動物細胞に対する生細胞膜分子イメージングのモデルターゲットとして水チャネルであるアキュアポリン4(AQP4)を、培養細胞COS7細胞で発現させ、AFMで観察を試みた。AQP4のアイソフォームであるM23は、脳グリア細胞中で、特徴的な分子集合であるアレイ構造を形成し、自己免疫疾患である視神経脊髄炎に関与している。また、培養細胞中でもこのAQP4に特徴的なアレイ集合を形成することが知られている。そこで、まずAFM装置に、新たに蛍光観察シ

システムを組み込み、eGFP fusion AQP4(M23)を発現した COS7 細胞のイメージングを行った。AQP4 分子が発現していることを蛍光像で確認し、その特定の 1 細胞に AFM 探針をアプローチしてイメージングできるシステムを構築した。この観察において蛍光が輝点として観察されたことから、AQP4 が細胞で分子集合していると考えられ、その輝点付近に探針をアプローチして AFM イメージングを行ったところ、AQP4 の分子構造の観察は出来なかったが、自己免疫疾患の原因となる抗 AQP4 抗体を細胞観察中に投与し、イメージングを行った結果、抗体と考えられる分子の結合が観察された。さらに、免疫反応の次の過程である抗体に補体が結合する過程を観察するため、補体の投与を行ったが、大きな変化が見られなかった。細胞上における生理過程の観察には、環境温度が重要なファクターとなることから、AFM 観察溶液の温度を制御するためのチャンバーの作製に取り組んだ。これにより哺乳動物細胞観察に最適な 37°C の培養液環境下で AFM イメージングが可能となった。

動物細胞は、バクテリア細胞などに比べると、細胞表面構造が非常に柔らかく、物理的に表面をトレースして構造を可視化する AFM では、その表面を正確にトレースすることが難しい。そこで、柔らかい細胞表面を探針で正確かつ高速にトレースするため、従来のカンチレバーに比べて軟らかい(バネ定数の小さい)カンチレバーの開発を推進した。電子線露光によりフォトマスクを作製し、エッチングプロセスでカンチレバーを加工することにより、試作として市販品よりも約 10 倍軟らかいカンチレバーを目指して開発を行ったが、カンチレバーのサイズが非常に小さく薄いため、作成は非常に困難であった。しかしながら、従来の約 2 倍軟らかい構造のカンチレバー試作品が作製できることが確認できた。また、このカンチレバーをイメージングで使用するためには、裏面から変位検出のためのレーザーを照射する必要があるため、TEM 観察に用いられる  $\text{Si}_3\text{N}_4$  薄膜基板を用いて薄膜窓部分にカンチレバーを作成後、中央で 2 つに割ることで、Si 深堀加工を省いたプロセスの導入を行った。これらの開発はまだ途上であり、将来的に実用化に向けて、現在も改良を進めている。

また、従来の高速 AFM のフィードバック制御はアナログシステムであるため、操作が複雑で、細胞生物研究者が一般的に用いている光学(蛍光)顕微鏡と比べ、操作が難しい。加えて、回路系の変更・増設が容易ではなく、装置も大型である。そこで、FPGA を用いた制御技術を導入することでシステムのデジタル化を試みた。既存の AFM システムの中でアナログ制御を行っていた差動増幅・振幅計測・PID 制御など主要な回路を FPGA で作製することに成功し、デジタルシステムとして使用できることを確認した。一方で、実機において高速イメージングで使用するには高速 AD/DA 変換可能なデバイスの導入が必要であることが分かり、今後も継続して改良を進める予定である。

#### 研究テーマ 4「高速 AFM の様々な生体分子・生体材料計測への応用」

さきがけ 1 細胞領域内での共同研究として、Hi-CO 法によるゲノム構造解析を推進する理化学研究所・谷口博士と、高速 AFM を用いて生理溶液中で高解像度 3 次元ゲノム構造解析を行った。これにより、Mg 存在下・非存在下でヌクレオソームアレイの凝集構造に優位な差があることを定量的に解析することに成功し、ゲノム構造と生理学的機能との相関を明らかにできた。また、名古屋大学・樫田先生と 6 重鎖構造の高速 AFM による溶液中での構造解析を行い、粒径を定量解析することに成功し、その結果を論文報告した。さらに、光応答性細胞固定化剤基板を用いた応用研究を推進している東京大学・山口先生との共同研究で、細胞膜裏

打ち構造を高速 AFM で計測するため山口先生の PEG 脂質修飾基板技術を導入した。現在、AFM ステージ上に PEG 脂質修飾基板を用いて作製した細胞シートをのせ、細胞膜裏側構造の AFM 計測を行っているところであり、細胞内分子動態の超解像計測へ向けた新たな技術展開に繋がることが期待される。

### 3. 今後の展開

本さがけにて開発した AFM 技術が、バクテリア細胞イメージングにて効果を発揮することを示せたことから、今後は様々なバクテリア細胞の研究へ応用展開していく。細胞膜タンパク質の分子レベルでの構造変化や生理作用に伴う細胞膜分子の拡散挙動の変化などの具体的な分子スケールの現象解明に取り組む。そのためには、各分野の専門家との共同研究が不可欠であることから、さがけを通じて構築した研究の連携関係を深めていくとともに、本さがけにより得られた研究成果を積極的に外部発信していく。また、動物細胞のイメージング技術に関しては開発途上であることから、引き続き改良を行うとともに、モデル細胞系でのイメージングを通して、突破口を見出す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

研究目的の達成状況に関しては、当初の目的である細胞上の分子をナノメートル解像度で可視化するための技術開発は概ね達成することができ、バクテリア細胞に対して、分子解像度のイメージングを実現することが出来た。また、動物細胞のイメージングでは、まだ十分目的を達成できているとは言えないが、今後に繋がる知見を取得することが出来た。研究実施体制としては、研究開始段階では技術の土台となる高速 AFM 装置はあったが、細胞イメージングや試料準備のための環境・設備・装置がなかったため、研究期間前半は細胞イメージングを実施するための装置構築や細胞試料調整環境の導入・整備などに予算を執行し、これらテーマを研究室学生に教育指導するとともに、技術開発を行い、研究期間後半は、新規 AFM 技術開発とバイオイメージングを平行して推進することができた。細胞のライブイメージングは現在、蛍光顕微鏡技術を用いた手法が主流である一方で、更なる解像度の向上が求められている。そういった中で、本研究にて開発を進める AFM 技術は当該分野に将来ブレークスルーをもたらすポテンシャルを持つ有力な技術として期待できる。1細胞領域は様々な技術やターゲットサンプルを持つヘテロな専門家の集団であったことから、積極的に共同研究を推進することで、これまでの自分自身の研究だけでは到達しえない、技術の応用先を広げ、発展させることが出来た。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

時空間分解能が向上した新しい構造の高速・広領域 AFM スキャナーを開発し、世界で初めて生きたバクテリアにおける細胞膜タンパク質の分子構造とその動きを可視化することに成功しました。この高速 AFM を用いて、抗菌薬を投与後、細胞膜から膜分子が脱落し、それによ

て膜表面の構造が大きく変化し、溶菌に至る過程をリアルタイムに観察することができました。生細胞におけるナノスケールの動的なプロセスを観察する際に、本研究で開発した AFM 技術が非常に有効であることを示すものです。また、細胞だけでなく生体分子やバイオ材料のイメージングでも成果が得られています。これらの技術は特許も出願されており、今後さらなる応用と発展が期待されます。まとまった大きな論文発表につながり、この技術を世界にアピールすることを期待します。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. D. Katsube, H. Yamashita, S. Abo, and M. Abe, “Combined pulsed laser deposition and non-contact atomic force microscopy system for studies of insulator metal oxide thin films”, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, (2018) 9, 686–692.
2. H. Kashida, Y. Hattori, K. Tazoe, T. Inoue, K. Nishikawa, K. Ishii, S. Uchiyama, H. Yamashita, M. Abe, Y. Kamiya, H. Asanuma, “Bifacial nucleobases for hexaplex formation in aqueous solution”, *Journal of the American Chemical Society*, (2018) 4, 8456–8462
3. M.Hashimoto, T.Ogawa, S.Kitaoka, S.Muto, M.Furuya, H.Kanetaka, M.Abe, H.Yamashita, “Control of surface potential and hydroxyapatite formation on TiO<sub>2</sub>scales containing nitrogen-related defects”, *Acta Materialia*, (2018) 155, 15, 379–385

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1.

発 明 者: 山下隼人、阿部真之  
発明の名称: スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡  
出 願 人: 大阪大学  
出 願 日: 2017/1/10  
出 願 番 号: 特願 2017-002183

2.

発 明 者: 山下隼人、阿部真之  
発明の名称: スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡  
出 願 人: 大阪大学  
出 願 日: 2017/12/7  
出 願 番 号: PCT/JP2017/044060

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. 山下隼人、「高速原子間力顕微鏡によるナノメートル世界の動的観察」、平成 28 年度・「物質・材料科学研究推進機構」講演会、大阪大学、2017 年 1 月 26 日

【学会発表】

1. 山下隼人, 田岡東, 福森義宏, 阿部真之、「生細胞膜分子イメージングのための高速 AFM スキャナーの開発」、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、福岡国際会議場、2017 年 9 月 5 日～8 日
2. H. Yamashita, A. Taoka, Y. Fukumori, M. Abe, “Molecular imaging on living bacterial cell surface by high speed AFM”, 第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19 日～21 日
3. H. Yamashita, A. Taoka and M. Abe, “Molecular imaging of dynamic process on bacterial cell surface by high speed AFM”, 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山大学、2018 年 9 月 15 日～17 日

【総説】

1. 山下隼人、「ナノスケールの動的プロセスを可視化する高速 AFM」、生産と技術、2017,Vol.69, No.4, 18-26