

報道資料

令和 6 年 8 月 26 日

報道機関各位

長岡技術科学大学
東京大学大学院理学系研究科
東北大学

単一生体分子の温度による微細な構造変化を解析する新たな一分子計測技術を開発

概要

長岡技術科学大学 産学融合トップランナー養成センター 山崎洋人産学融合特任講師、工学専攻 機械工学分野 海藤光太(研究当時:修士課程 2 年生)、松田杏介(研究当時:修士課程 2 年生)、機械創造工学課程 加藤拓(研究当時:4 年生)、東北大学 流体科学研究所 馬淵拓哉准教授、東京大学 大学院理学系研究科 上村想太郎教授らの研究グループは、単一タンパク質の温度による微細な構造状態の変化を解析する新たな一分子計測技術を開発しました。これは、従来型よりも検出感度の高い「非対称薄型ナノポア」の加工技術と、レーザー加熱による温度コントロール技術である「ナノポアサーモスコピー法」を組み合わせることで初めて実現しました。この技術を用いて構造中間状態にあるシトクロム c^{注1}を解析したところ、温度上昇に伴い α ヘリカル構造^{注2}の変性が促進されることが示唆され、本技術の有効性が実証されました。この新たな技術は、温度によるタンパク質の構造変化の解析のみならず、翻訳後修飾によるタンパク質、修飾塩基による DNA・RNA 分子などの構造状態の解析にも応用が可能で、生命現象の理解を進めるための有力な解析ツールとして期待されます。本研究成果は、米国化学会「Nano Letters」に掲載されました。

研究の背景と目的

タンパク質は、生命体において重要な機能を果たす生体分子であり、タンパク質の構造を理解することは、生命現象の解明や医療創薬の発展において重要です。一分子計測技術は、ナノメートル(100 万分の 1 ミリメートル)からオングストローム(1,000 万分の 1 ミリメートル)スケールの分解能で生体分子の動的構造を調べることができる解析ツールとして、タンパク質の構造解析に利用されてきました。しかし、既存技術の多くは、標的分子を化学的に修飾する前処理が必要で、時間と費用がかかります。さらに、この化学的修飾が生体分子の機能に影響を及ぼす可能性があることも課題とされてきました。

近年、このような課題を解決する解析ツールとして「ナノポア計測」が開発されました。この方法では、シリコン材料に直径わずか数ナノメートルの微細な孔であるナノポアに印加電場をかけることにより、ナノポア内部に流れ込むイオン量(イオン電流)を測定します。生体分子がナノポア通過するとイオン電流が遮断されますが、このときの遮断電流を解析することで分子構造を調べることができます。このナノポア計測は、DNA、RNA、タンパク質の配列決定や構造状態、タンパク質間相互作用、DNA/RNA-タンパク質相互作用などの解析ツールとして、幅広い分野への応用が期待されています。

一般的に、タンパク質の構造特性は、温度依存的な構造変化で評価されていますが、これまでにナノポア計測を用いたタンパク質の構造解析の研究では、これを調査した研究はありません。そこで、本研究では、最適なナノポア加工方法を検討し、感度の高い非対称薄型ナノポアの加工を実現しました。これにレーザー加熱を

用いた温度コントロール技術である「ナノポアサーモスコピー法」を活用して、温度によるシトクロム c の構造変化を評価しました。

研究内容と結果

本研究では、シトクロムcを検出するにあたり、山崎が独自開発した「レーザーエッチング破断法」を用いて、窒化シリコンナノ薄膜上に直径わずか数ナノメートルのナノポアを加工しました。本加工では、膜厚 50 ナノメートルの窒化シリコンナノ薄膜に青色レーザーを照射し、同時に電圧を印加することで、窒化シリコンナノ薄膜が照射箇所だけが徐々に薄くなり、最終的に破断現象によりナノポアが作製されます。図 1a と b に実験系および加工時の電流波形を示します。本研究では、ナノ薄膜の上面・下面での薄膜化するスピードが異なる pH 条件下で加工を行うことで、感度が高く、非対称かつ薄型のナノポア（非対称薄型ナノポア）の加工が可能になりました（図 1a と b）。

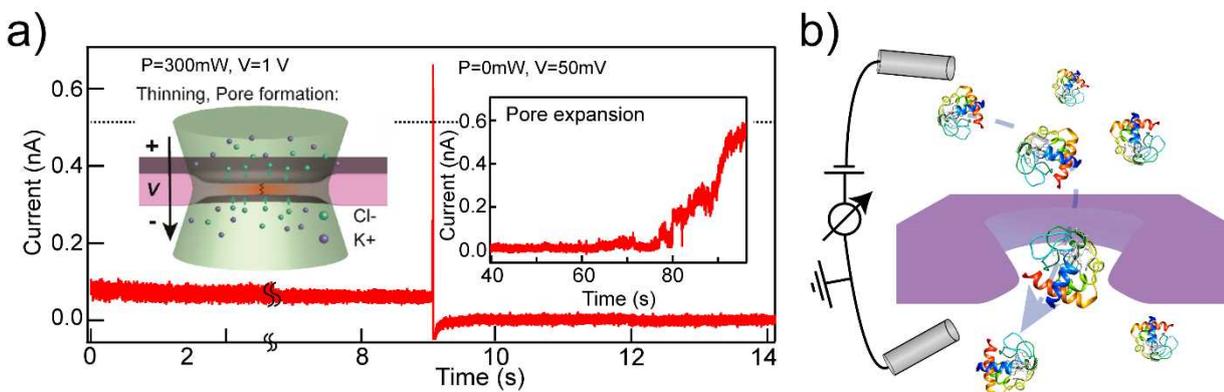


図 1 a) 非対称薄型ナノポアの加工時の電流波形、b) 非対称薄型ナノポアを用いたタンパク質（シトクロム c）の検出

ナノポアが非対称薄型形状であることは、電流特性から確認できており、これを用いてシトクロムcを検出しました（図 2a）。これを解析した結果、電流遮断率 50~60%の領域に最大 1 ミリ秒程度の遮断電流波形が現れ、通常ナノポア計測では得られない通過特性が見られました（図 2b と c）。具体的には、シトクロムcがナノポア上面で捕捉されることで一定時間滞留した後に、ナノポアを通過する様子を示すことが電圧依存性から明らかになりました。このような通過過程を経ることで、通常の検出方法よりも長い時間をかけて解析ができるため、より詳細な生体分子の構造情報を得られるようになりました。

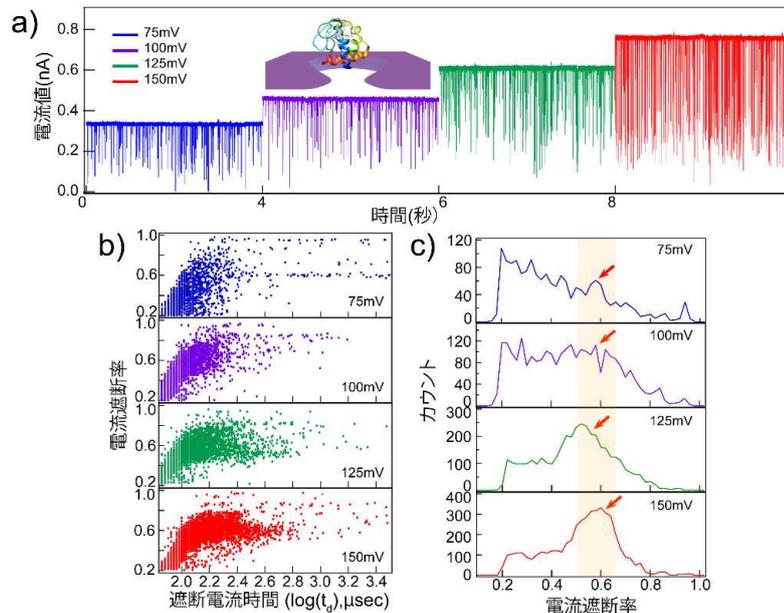


図 2 非対称薄型ナノポアによるシトクロムc検出 a) 印加電圧 75、100、125、150mV におけるシトクロムc検出波形、b) 実験結果の散布図(横軸: 遮断電流時間、縦軸: 電流遮断率)、c)電流遮断率のヒストグラム

このアプローチを用い、シトクロムcの温度依存的な構造変化を調べました。ナノポア付近の温度コントロールを行うために、独自開発技術である「ナノポアサーモスコピー法」を活用しました。これは、窒化シリコンナノ薄膜に可視光レーザーを照射すると薄膜が光を吸収する特性を利用することで、レーザー照射領域の温度調整を瞬時に行うことができる技術です。この技術により、ナノポア近傍の温度を上昇させると、電流遮断が大きくなる様子が観察されました。この結果を、分子動力学シミュレーション^{注3}を用いて、シトクロムcの構造変化を詳細に解析したところ、シトクロムcの α ヘリカル構造が加温によって変性することにより、電流遮断が増加することが示されました(図3)。

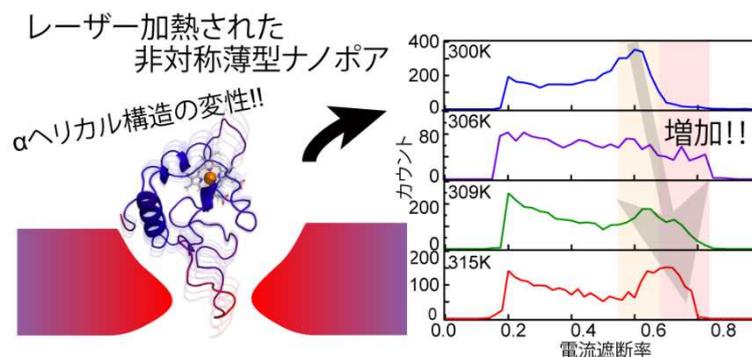


図 3 レーザー加熱された非対称薄型ナノポアによるシトクロムc検出

今後の展望

本研究では、窒化シリコンナノ薄膜に非対称薄型ナノポアを加工する技術と、レーザー照射による温度調整技術を組み合わせた新たな一分子計測系を開発し、これを用いてシトクロム c を検出することで、シトクロム c の中間構造状態に及ぼす温度の影響を評価しました。シトクロム c の構造変化は、細胞のアポトーシス(プログラムされた細胞死)に関係するため、本研究で得られた知見は、生命現象の解明への貢献が期待されます。加えて、わずかな α ヘリカル構造の変性が検出できたことから、本研究で開発した技術は、タンパク質の折れ畳みメカニズムや、修飾塩基による DNA・RNA 構造解析など、生体分子の構造解明への研究を促進し、基礎生命科学のみならず、医学や創薬分野にも大きな貢献をもたらすことが期待できます。

用語の説明

注 1: シトクロムc

細胞のエネルギー生産において重要なタンパク質です。そのため、古くから構造が調べられているタンパク質であり、開発技術の評価する上で最適なタンパク質です。

注 2: α ヘリカル構造

タンパク質を構成する構造のひとつであり、右巻きらせん構造をとります。

注 3: 分子動力学シミュレーション

原子レベルで生体分子を設計して、温度変化や電圧印加が生体分子に与える影響を解析するシミュレーションです。

研究助成

本研究は、科学技術振興機構(JST) 戦略的創造研究推進事業 ERATO(課題番号:JPMJER2002)、創発的研究支援事業(課題番号:JPMJFR212H)、科学研究費助成事業 基盤研究 B(課題番号:JP23H04396)、若手研究(課題番号:23K13642)、特別研究員奨励費(課題番号:20J00261)の支援により実施されました。

掲載論文

- 【題名】 Photothermally Heated Asymmetric Thin Nanopores Suggest the Influence of Temperature on the Intermediate Conformational State of Cytochrome c in an Electric Field
- 【著者名】 Hirohito Yamazaki, Takuya Mabuchi, Kouta Kaito, Kyosuke Matsuda, Hiromu Kato and Sotaro Uemura
- 【掲載誌】 Nano Letters
- 【掲載日】 2024年8月12日
- 【DOI】 10.1021/acs.nanolett.4c02547

研究者連絡先

国立大学法人長岡技術科学大学

産学融合トップランナー養成センター 産学融合特任講師

山崎洋人(やまざき ひろひと)

TEL:0258-47-9727

E-mail:hirohitoyamazaki@vos.nagaokaut.ac.jp

国立大学法人東京大学 大学院理学系研究科

生物科学専攻 教授

上村想太郎(うえむら そうたろう)

TEL:03-5841-4396

E-mail:uemura@bs.s.u-tokyo.ac.jp

国立大学法人東北大学 流体科学研究所 准教授

馬淵拓哉(まぶち たくや)

Tel: 022-217-5225

Email: mabuchi@tohoku.ac.jp

報道連絡先

長岡技術科学大学 大学戦略課企画・広報室

TEL:0258-47-9209 FAX:0258-47-9010

E-mail: skoho@jcom.nagaokaut.ac.jp

東京大学大学院理学系研究科・理学部 広報室

TEL:03-5841-8856 FAX:03-5841-1035

E-mail: media.s@gs.mail.u-tokyo.ac.jp

東北大学 流体科学研究所 広報戦略室

TEL:022-217-5873

E-mail: ifs-koho@grp.tohoku.ac.jp
