シリコン窒化膜を用いたＸ線一分子動態計測用溶液チャンバの開発

Microfabricated SiN-based solution chamber for Diffracted X-ray Tracking method

京都大工 [1]，福井大医 [2]，○山内 一慶 [1]，田渕 友樹 [1]，平井 義和 [1]，岩本 真幸 [2]，
土屋 智由 [1]，清水 啓史 [2]，田畑 修 [1]
Kyoto Univ. [1], Univ. of Fukui [2], ◦Ikkei Yamauchi[1], Tomoki Tabuchi[1], Yoshikazu Hirai[1],
Masayuki Iwamoto[2], Toshiyuki Tsuchiya[1], Hirofumi Shimizu[2], Osamu Tabata[1]
E-mail: i_yamauchi@nms.me.kyoto-u.ac.jp

近年，生体膜上に存在する膜タンパク質であるイオンチャネルを標的分子とした薬剤開発が注目されており，イオン透過性発現機構の理解が求められている[1]．そこで，従来の X 線結晶構造解析のような静的構造解析に加え，チャネルの動的な構造変化を解析するために，X 線一分子動態計測法（Diffracted X-ray Tracking method, DXT 法）が開発された．DXT 法は，金ナノ結晶が修飾されたイオンチャネルを基板に固定し，白色 X 線を照射する（Fig. 1）．このとき，金ナノ結晶で回折して検出器で記録される回折点の軌跡から，チャネルの動的構造変化に伴う屈曲運動と回転運動を解析することができる. これまでに, pH 依存性を持つ K^+チャネルである KcsA について，チャネルの回転に伴う構造変化がイオン透過路の開閉に関連することが示された[2].

従来の DXT 実験系では，ガラス基板上にチャネルを固定していたため，観測光の X 線がガラス基板を透過した際に生じる散乱 X 線が, 観察像上に大きなバックグラウンドノイズ(Background noise, BGN）を作り，回折点の効率的な観察を妨げていた．そこで我々は，微細加工で観測窓用のメンブレン構造を作製可能なシリコン窒化膜（SiN）を用いた溶液チャンバを開発した．この溶液チャンバを用いてチャンバの設計寸法に依存した BGN の大きさ(Fig. 2 (left))を評価するとともに，pH の異なる 2 種類の溶液中で KcsA の DXT 計測を実施した．その結果，pH 7.0 では屈曲運動に相当する半径方向の軌跡を，pH 4.5 では回転運動に相当する円周方向の軌跡をそれぞれ確認し，イオン透過路の開閉に対応する pH に依存した運動を観察することに成功した(Fig. 2 (right)).

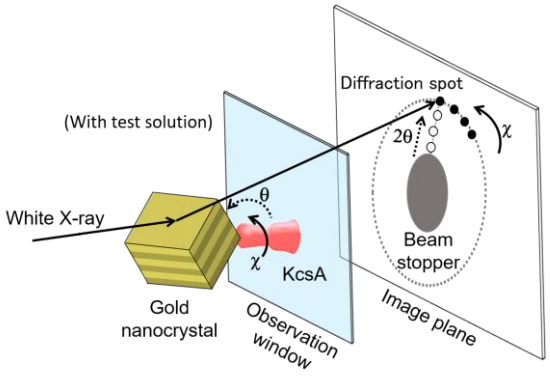

Figure 1. Principle of DXT method

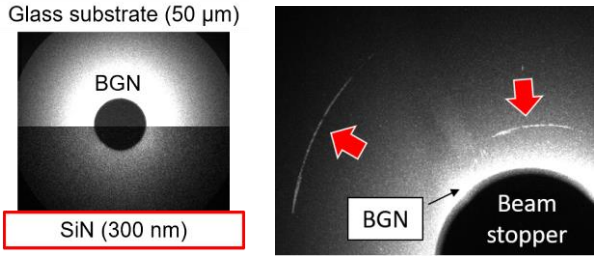

Figure 2. BGN from conventional and suggested material (left)， trajectory of KcsA motion in acidic pH（right）.

[1] S. Oiki, *J. Physiol*, 2015, 593(12), pp. 2553-2573.
[2] H.Shimizu *et al.*, *Cell*, 2008, 132(1), pp. 67-78.