

高速 AFM による作動中のタンパク質の高解像撮影

(金沢大学) ○安藤敏夫

High-resolution filming of proteins in action by high-speed AFM

(Kanazawa University) ○Toshio Ando

【序】タンパク質の構造・機能相関の解明のために様々な技術が利用されているが、主なアプローチは X 線回折や NMR による構造解析と、蛍光顕微鏡や光ピンセットなどによる 1 分子動態解析である。既に 9 万種類のタンパク質の詳細な 3 次構造が明らかにされ、そのリストは今も増え続けている。しかし、得られる情報は静止構造に限られる。1 分子解析では回折限界を破る超解像蛍光顕微鏡が開発されているものの、あくまでも光学プローブの動態解析であり、タンパク質分子そのものは観察できない。すなわち、構造 (モノ) と動態 (コト) を同時に観察する技術が欠如しており、それがタンパク質の機能メカニズムの理解を困難にしてきた大きな要因である。従って、そのような観察を可能にする技術の開発は、困難だが探究すべき重要な課題である。

この観察を可能にする顕微鏡は、高空間分解能、高時間分解能、液中試料観察能、プローブを介せずに実体そのものを直接観察、低侵襲性の 5 つの条件を満たす必要がある。原理的にこのすべての条件を満たす可能性を秘めた顕微鏡は原子間力顕微鏡 (AFM) しかない。AFM は 1 画像を撮るのに分のオーダーの時間がかかるため、高時間分解能をもたない。低侵襲性についてはある程度実現されている。それ以外の条件はクリアしている。従って、AFM を高速化し、低侵襲性と両立させることができれば、生命科学のひとつの夢を実現できる。

この可能性を実現すべく、AFM の高速化に向けた開発が約 20 年前に着手され、種々の技術開発、初期装置の改良を経て、2008 年頃に高速 AFM は我々のグループにより完成された。この新規顕微鏡はタンパク質分子の像を 1 フレーム当たり 40-80 ミリ秒で、機能を乱さずに撮ることができる。この装置は既に約 25 台が世界の研究室で利用されており、種々のタンパク質の動態観察研究が進められている。

【高速 AFM イメージング研究の概要】これまでに、(i) タンパク質の機能に密接した構造変化と分子プロセス、(ii) 自己集合プロセス、(iii) ダイナミックな拡散、相互作用プロセス、(iv) 天然変性タンパク質、(iv) DNA 折り紙やナノロボット、(v) 酵素反応などの高速 AFM 観察が行われている。(i) については、歩くミオシン V、光に応答するバクテリオロドプシン、構造変化が回転伝搬する F_1 -ATPase、中央のチャンネルが開く $P2X_4$ 受容体が観察された。力学作用そのものが機能であるモータタンパク質では、機能そのものが動画映像に現れるため、その映像は極めて直接的に機能メカニズムの詳細を明らかにした。バクテリオロドプシンや F_1 -ATPase では、僅か 5 nm 程度の空間内にある複数の分子やサブユニットが識別され、それらの相互関係が直接画像に現れるため、他の手法では発見が困難な協同性が発見された。自己集合過程は、核形成、複数の直列・並列に進む成長過程、自己集合体の極性や非等方性、及び、それに伴う集合キネティクスの不均一性などを

含むため、極めて複雑である。従来の手法ではこれら全体の動的プロセスを解読することは困難であるが、高速 AFM は成長する構造体の異なる場所で直列・並列に進む複数のプロセスを同時に可視化でき、自己集合メカニズムの解明に極めて有効である。天然変性タンパク質は、決まった構造を持たずに機能する従来のタンパク質の概念を覆す新しいタンパク質群であるが、その多様な構造形態を捉える手段がこれまでにはなかった。電子顕微鏡では天然変性タンパク質は細すぎて見えず、また、結晶化しないため X 線結晶構造解析は無効である。従って、天然変性領域を同定するだけでも時間のかかる作業であるが、高速 AFM は天然変性領域を可視化でき、且つ、それがとる多様な構造形態を捉えることができる。結晶性セルロースを分解するセルラーゼのように固液界面で反応が進む酵素では生化学的測定が非常に難しい。それ故、例えば、時間とともに反応が急激に減少するメカニズムや、異なる種類のセルラーゼカクテルで起こる酵素反応速度の著しい増大のメカニズムは長く不明のままであった。高速 AFM の観察により、例えば前者の問題については酵素分子の交通渋滞が原因であることが動画映像で明瞭に示された。以上のように、従来の手法では極めて難しい発見が高速 AFM では容易であることが次々と実証されている。

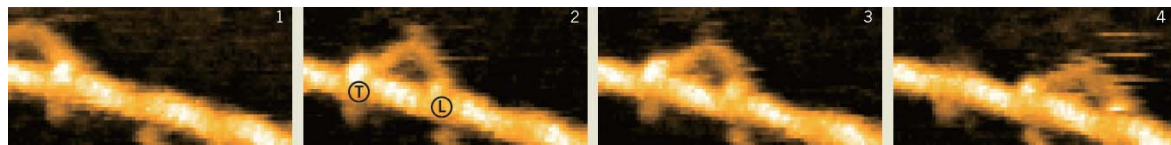


図 ミオシン V の前進運動を捉えた高速 AFM 像

【高速 AFM イメージングによる新発見の例：歩くミオシン V】等価な 2 本の脚をもつミオシン V はアクチン線維上を連続的に運動するため、その運動の様子を連続的に追跡できる。それ故、蛍光顕微鏡などにより詳しい解析が進められ、ATP1 分子の分解毎に 2 本の等価な脚が前脚と後ろ脚の役割を交互に切り替えながら 36 nm の歩幅でアクチン線維上を歩くことが証明された。しかしながら、前進運動のために必要な分子内張力発生と ATPase 反応との関係や、ATP 分解によって開放されるエネルギーがどのように使われるかといったモータタンパク質の本質的な問題まで踏み込むことはできていなかった。歩行運動中、或いは、それ以外の状態のミオシン V 分子の高速 AFM 観察は、既に知られている事実を映像の形で示すだけに留まらず、この本質的な問題に踏み込めるだけの詳細な情報を与えることに成功した。その結果、エネルギー変換機構について驚くべき結論を導き出した。すなわち、後ろ脚に ATP が結合して後ろ脚がアクチンから一旦解離しさえすれば、その後にはエネルギーの注入なしに 1 歩前進し、ATP の加水分解で開放されるエネルギーは前進運動には使われない。ATP の加水分解は、前進の力学過程が一方向に進むことを保証するだけである。この重要な結論は、インターラクティブ高速 AFM という新しい手法によって最近直接証明された。

【謝辞】これらの研究は、研究室の多くの学生とスタッフ、そして多くの共同研究者との成果である。ここに深く感謝します。

【文献】T. Ando, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 12468-12472 (2001); T. Ando, et al., Prog. Surf. Sci. 83, 337-437 (2008); T. Ando, Nanotechnology 23, 062001 (2012); T. Ando, et al., Annu. Rev. Biophys. 42, 393-414 (2013); N. Kodera, et al., Nature 468, 72-76 (2010); T. Uchihashi, et al., Science 333, 755-758 (2011); M. Shibata, et al., Nat. Nanotechnol. 5, 208-212 (2010); K. Igarashi, et al., Science 333, 1279-1282 (2011).