1P321

タンパク質分子の機能動態を捉える高速 AFM の開発

○古寺 哲幸¹、宮城 篤¹、山下 隼人¹、中北 諒¹、坂下 満¹、伊藤 悠徳¹、内橋 貴之^{1,2}、安藤 敏夫^{1,2,3} (¹金沢大・理・物理、²JST・CREST、³金沢大・フロンティア)

タンパク質分子の動作の仕組みを理解するには、機能している最中のタンパク質分子の構造形態を捉えることが重要である。それには、“高い空間分解能”と“生理現象を捉えるに有効な時間軸”を併せ持った革新的な技術の開発が望まれている。その技術となる可能性を持つ顕微鏡として、原子間力顕微鏡 (AFM) がある。AFM は、水溶液中に存在する生きたタンパク質分子をナノ解像度で観察することを可能にした唯一の顕微鏡である。しかしながら、従来型の AFM はその大きな機械系の安定な動作を得るために低い走査速度が要求され、1 枚の画像を得るために分のオーダーの時間を要してしまうという欠点を持っていた。AFM の特徴を最大限に引き出すには、その走査速度を飛躍的に向上させる必要がある。そこで、我々は AFM に含まれる全てのデバイスの高速化に取り組み、高速 AFM を世界に先駆けて開発した。その結果、水溶液中でマイカ上に緩やかに固定されたミオシン V 分子のナノ動態を 80 ms/frame の映像として捉えることに成功した (T. Ando *et al.* (2001) *PNAS* 98, 12468)。その後、フィードバック帯域の向上、探針-試料間に働く力の軽減、Caged 光分解光学系の導入など、いくつかの改良に取り組み、高速 AFM の性能は着実に向上してきている。現在、その高速 AFM を用いて、モータータンパク質や分子シャペロンを中心にタンパク質分子の機能動態の観察に取り組んでいる。当日は、現在の高速 AFM の性能を示し、高速 AFM が捉えた液中ナノメートル世界で機能するタンパク質分子の映像を紹介したい。

N. Kodera, A. Miyagi, H. Yamashita, R. Nakakita, M. Sakashita, H. Ito, T. Uchihashi and T. Ando : Development of a high-speed atomic force microscope for imaging of dynamic behavior of protein molecules

1P323

溶液中 Pulsed-Force-Mode を利用した分子マッピング

○春田 洋孝¹、森居 隆史¹、吉村 成弘²、岡田 知子³、小川 昌克³、岡田 孝夫¹ (¹生体分子計測研究所、²京大院・生命科学・分子情報、³産総研・生物機能工学)

AFM を Pulsed-Force-Mode (PFM) で使用し分子マッピングを試みた。PFM とは、カンチレバーを sin 波で振動させ、試料への接触・解離を繰り返しながら測定するモードであり、基本的にはフォースカーブを全ピクセルで得る事と同等である。Force Volume では数時間から数 10 時間かかる測定を数 10 分で行うことができ、1 回の測定で記録した情報を解析することにより、同一視野のトポイメージや機械的特性、分子間結合力などの多くの情報を得ることが可能である。HeLa 細胞表面には CD44 分子が発現している事が知られている。カンチレバーに抗 CD44 抗体を結合させ HeLa 細胞表面の溶液中 PFM による測定を行った (図 A、B)。またネガティブコントロールとしてカンチレバーに標準 IgG を結合させて同様の測定を行った (図 C、D)。図 A、C は Deflection 像であり図 B、D は結合カイメージである。抗 CD44 抗体を用いた測定ではネガティブコントロールと比べるとより高頻度に結合力が検出されており、CD44 分子の存在を検出したことが示唆された。この研究は一部、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) バイオ・IT 融合機器開発プロジェクトの助成によって行われたものである。

H. Haruta, T. Morii, Shige H. Yoshimura, T. Okada, Y. Ogawa and T. Okada : Molecular mapping using Pulsed-Force-Mode AFM in solution

1P322

高速 AFM によるダイニン C の動態観察

○宮城 篤¹、古寺 哲幸¹、榊原 齊²、大岩 和弘²、安藤 敏夫^{1,3} (¹金沢大院・自然科学、²情報通信研究機構、³CREST/JST)

モータータンパク質は ATPase 反応に共役してその構造を変化させることで機能を発現していると考えられている。そのためモータータンパク質の機能の解明には“動的な構造情報”を得ることが重要である。それには、“高い空間分解能”と“生理現象を捉える時間分解能”を併せ持つ観察手法が必要である。我々はその革新的技術となる高速 AFM を開発し、80ms/frame のイメージング速度でモータータンパク質の動きを追うことが可能になった。我々は、この高速 AFM を用いてダイニン C の動態観察を行ってきた。ダイニン C は ATP 加水分解サイクル中に、ステム-ストーク間の角度が変化することが示唆されている。これは、バナジウム酸塩を用いて、ATP 加水分解サイクルの中間状態で止めたダイニン C を観察することで得られた結果である (Stan A. Burgess *et al.* (2003) *Nature* 421, 715-718)。我々はこの角度変化を動的に捉えることを目的に観察を行い、観察例は少ないながらもダイニン C 1 分子が運動する様子の連続撮影に成功した。この観察では、ステムが規則的に運動する様子が観察された、またその運動の頻度はダイニン C の ATPase レートとほぼ一致している。現在、観察例を増やすとともに、ATP 濃度依存性、ステム-ストーク間の角度分布、ステムの可動範囲を調べることを目的に実験を行っている。

A. Miyagi, N. Kodera, H. Sakakibara, K. Oiwa, T. Ando : Dynamic behavior of dynein c captured by high-speed AFM

1P324

シャペロニン GroEL に起こる構造変化の高速 AFM による解析

○谷口 雅昭¹、宮城 篤¹、古寺 哲幸¹、安藤 敏夫^{1,2} (¹金沢大院・自然科学、²CREST/JST)

原子間力顕微鏡 (AFM) は、生体分子を 1 分子レベルで直接観察できる魅力的な装置であるが、従来の AFM では走査速度が遅く分子プロセスを観察できない。当研究室において開発された高速 AFM は非常に素早いタンパク質分子の振る舞いを捉えることを初めて可能にした。我々は、この高速 AFM を用いてタンパク質のフォールディングの補助を行う分子シャペロン GroEL システムの観察を試みた。大腸菌由来のシャペロニン GroEL は、ATP 結合によりアピカルドメインに大規模な構造変化を起こすことが知られている。これらの構造変化が起きますと、標的タンパク質は GroEL 内部に取り込まれる。更に補助タンパク質である GroES が結合することにより、キャビティー内部に包埋されフォールディングが進行すると考えられている。シャペロニンの反応機構を理解する上で重要であると考えられる ATP 結合から GroES との複合体形成までに生じる GroEL の構造変化に着目して動態イメージングを行った。GroEL タンパク質は、マイカに吸着させた。ATP または ADP 存在下では、ヌクレオチド結合によって引き起こされた GroEL の構造変化に由来すると考えられる高さの変化が観察された。また、GroES と GroEL の結合・解離の様子も観測することが出来た。さらに、Caged-ATP のフォトリシスを利用して GroES の GroEL への結合過程を観測した。本発表では、GroEL の構造変化と GroES との相互作用過程の詳細な解析結果を発表し、シャペロニンのメカニズムについて議論する予定である。

M. Taniguchi, A. Miyagi, N. Kodera and T. Ando : Analysis of conformational changes in the chaperonin GroEL using high-speed AFM