トピックス

高速AFMによるタンパク質集合体のダイナミクスの観察

中山隆宏, 紺野宏記 金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所

山田正仁 金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学(神経内科学)

小野賢二郎 昭和大学医学部内科学講座神経内科学部門

1. はじめに

生体分子の集合体がつくる構造は生物の至る所にある。生体分子集合体は、DNA がつくる染色体・核、タンパク質がつくる細胞外マトリックス・細胞骨格、セルロースがつくる細胞壁、脂質がつくる細胞膜など生命の構造・機能に重要な役割を担う。生体分子集合体は疾病にも関わる。アミロイドタンパク質の凝集はアルツハイマー病、牛海綿状脳症 (BSE) のプリオン病などを引き起こし、脳の機能を失わせる。生体分子集合体がどのようにつくられるのか、生体分子集合体を基質とする酵素 (分解酵素, 合成酵素など) の動態は、基質の構造とどのように関連するのか、その分子メカニズムの解明は生体分子集合体研究の課題となっている。

しかし、生体分子集合体の多くは不溶性で、実験手法が制限される。また、アミロイドタンパク質のように集合過程が多段階の平衡反応である場合、各段階の集合体を精製、安定して維持できず、複数の段階の集合体の混在が実験結果の解釈を複雑にする。

そこで私たちは、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を用いる観察手法に着目した。高速 AFM 観察は、探針で走査して、ステージ上に存在する分子の立体構造を撮影し、分子の可溶性、不溶性に撮影は依存しない。また、ステージ上の観察視野内すべての分子をナノメートルスケール空間分解能・サブ秒時間分解能で動画撮影できるので¹⁾、集合体の形成段階別に精製しなくても個別の集合体の立体構造の動態を追跡できる。

本稿では、最近私たちが高速 AFM を用いて新しい知見を得ることに成功したアルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイド β タンパク質 1-42 ($A\beta_{1-42}$) の凝集線維伸長における立体構造動態²⁾と、細胞生物学研究でよく使われる細菌型コラーゲン分解酵素のコ

ラーゲン線維分解のメカニズム³⁾について紹介する。

2. アミロイド β タンパク質 1-42 凝集線維伸長過程

$A\beta_{1-42}$ は 42 残基のアミノ酸から成り、 $A\beta$ バリエーションの中で最も神経毒性が高く、アミロイドプラーク (老人斑) の主成分である。アミロイドプラークを構成する $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維形成は、他のアミロイドタンパク質と同じメカニズムと考えられている (図 1)。共通する凝集過程は、①線維の核を形成する段階における「健常型」から複数の「病変型」への立体構造変化、②核や線維の伸長における「病変型」構造の自己複製である⁴⁾。このモデルでは、線維の構造は核形成段階で決まり、線維構造の自己複製機能がアミロイド線維構造の増殖・伝播・遺伝を規定する。

この凝集モデルは多分子分析の様々な実験結果から提唱されているが、実際に個別の線維レベルでモデルが当てはまるか検証するため、私たちは高速 AFM を用いて $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維伸長を観察した。

試料チャンバーに $A\beta_{1-42}$ を投入し、高速 AFM 観察ステージであるマイカ上で $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維が伸長する様子を観察したところ、構造の異なる 3 つのタイプ: ①約 100 nm 毎に高さが周期的に変動する「らせん型」、②高さのピークがない「直線型」、③らせん型と直線型が同一線維内で共存する「混在型」の線維が伸長する様子を観察できた (図 2)。らせん型と直線型の

図 1
アミロイド線維形成の従来モデル。

Visualization of Protein Assembly Dynamics by Using High-speed Atomic Force Microscopy

Takahiro WATANABE-NAKAYAMA¹, Hiroki KONNO¹, Masahito YAMADA² and Kenjiro ONO³¹Nano Life Science Institute (WPI-NanoLSI), Kanazawa University²Department of Neurology and Neurobiology of Aging, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University³Department of Neurology, School of Medicine, Showa University

伸長様式は、図 1 の自己複製モデルと合致していて、伸長部分の構造はもとの線維構造と同じだった。混在型は、らせん型、直線型の一方の様式で伸長後に一部の領域の構造が他方の様式に切り替わってできるのではなく、伸長時に伸長様式が時々他方に切り替わってできることがわかった（図 2 下段の矢印）。この混在型の伸長様式は従来のモデルでは説明できない。

私たちは、線維端がらせん型構造と直線型構造の間で切り替わり得ると考えた（図 3）。線維端は一方の隣がアミロイドタンパク質と結合していないので、構造を変化させる自由があると考えた。切り替わった線維端構造を鋳型にして自己複製することにより、同一線維内でらせん型と直線型が共存することができる。

アミロイド線維端の構造切り替え反応の存在を検証するため、線維伸長の場の周囲の物理化学条件を変えると構造切り替えの頻度とらせん型、直線型の伸長様式の出現頻度が変化するか調べた。試料チャンパー中の電解質をナトリウム塩またはカリウム塩にして $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維伸長の高速 AFM 観察を行った。ここで、チャンパー内の電解質を変えて実験を行った意図は、 $A\beta_{1-42}$ とマイカ基板表面との相互作用力を変えることにある。マイカ表面は水溶液中で負に帯電しており、タンパク質試料と静電的相互作用がはたら

図 2 $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維伸長の高速 AFM 動画のキモグラフ。(上段)らせん型、(中段)直線型、(下段)混在型。矢印は伸長様式が切り替わった時点を示す。

図 3 アミロイド線維形成の改訂モデル。

図 4 溶液中の電解質をナトリウム塩（左上）、カリウム塩（右上）にしたときの $A\beta_{1-42}$ アミロイド線維の高速 AFM 像。右上写真中の○、●はらせん型、直線型の伸長様式の領域を示す。下段は、1 時間観察後の両条件での線維の長さの分布（左下）、線維の種類の割合（中央下）、伸長様式の頻度（右下）を示す。

く。この静電的相互作用は水溶液中の陽イオンによって低減されるが、同一濃度でもナトリウムイオンよりカリウムイオンの方が低減効果が大きい⁵⁾。高速 AFM 観察の結果、ナトリウム塩、カリウム塩で線維の長さの分布に有意差は無かったが、ナトリウム塩ではらせん型線維とらせん型伸長様式が圧倒的に多かったのに対して、カリウム塩ではほとんどが混在型線維でらせん型伸長様式の頻度が減少し、直線型伸長様式の頻度が増加した（図 4）。この結果は、周囲の物理化学環境に応じて自由エネルギープロファイルを変える構造切り替え反応がアミロイド線維端に存在すること、核形成後もアミロイド線維の構造が変更できることを示している。近年、認知症患者によって $A\beta$ 線維構造が異なることが明らかになっており、線維構造と症状の関連が示唆されている⁶⁾。本研究の結果は、重篤な症状をもたらす線維構造を、症状を穏和する線維構造に変更できる可能性を示している。

3. 細菌型コラゲナーゼによるコラーゲン線維分解

細菌型コラゲナーゼは細菌が宿主動物に感染するときの毒素タンパク質で、コラーゲンに対する特異性が高く、様々なタイプのコラーゲンを分解できることから、細胞生物学研究の細胞単離などに使われる。コラゲナーゼの活性は基質コラーゲン線維形成の影響を受けること⁷⁾、コラーゲン線維内の隣り合うコラーゲン分子が切断部位を覆うこと⁸⁾が知られているが、コ

図 5

細菌型コラーゲナーゼ ColG によるコラーゲン線維分解の高速 AFM 観察。重ね合わせ像の黒色域は残存した領域、白色域は結合しなかった空白域。コラーゲンと ColG の領域は、高さの相違と起伏変化の相違でフィルターを通すことで区別した。

図 6

コラーゲン線維上の ColG 分子の運動の連続写真。触媒阻害剤非存在下 (左) と存在下 (右)。0.3 秒間隔。

ラーゲン線維上のコラーゲナーゼの動態は不明であった。

私たちはコラーゲン線維構造とコラーゲナーゼの運動を高速 AFM でリアルタイムで直視すれば、コラーゲン線維構造とコラーゲナーゼの運動の関係を明らかにできると考えた。コラーゲン分子が 0.2 M 以上の KCl を含む中性緩衝液中で、チューブ状コラーゲン線維と内部構造のよく似たシート状コラーゲン線維 (マイクロリボン) をマイカ表面上に形成することを利用した⁹⁾。マイクロリボンには、AFM 像の断面プロファイルからコラーゲン分子の C 末端と N 末端の配向を特定できる利点もある⁹⁾。Clostridium histolyticum コラーゲナーゼ ColG を投入したところ、ColG がマイクロリボンの内部ではなく、縁に結合して線維軸に平行な方向に徐々にマイクロリボンを消失させる様子を観察できた (図 5)。この結果はマイクロリボン内のコラーゲン分子間相互作用が ColG の結合・触媒を阻害することを示している。また、ColG は触媒活性依存的にコラーゲンの C 末端から N 末端方向に運動していて、この運動が触媒反応と共役していることも明らかにできた (図 6)。

謝 辞

高速 AFM 観察技術について、高速 AFM 開発者の金沢大学安藤敏夫教授、内橋貴之教授 (現名古屋大学)、古寺哲幸教授に大変お世話になりました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ando, T. *et al.* (2013) *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 393-414. DOI: 10.1146/annurev-biophys-083012-130324.
- 2) Watanabe-Nakayama, T. *et al.* (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

113, 5835-5840. DOI: 10.1073/pnas.1524807113.

- 3) Watanabe-Nakayama, T. *et al.* (2016) *Sci. Rep.* **6**, 28975. DOI: 10.1038/srep28975.
- 4) Petkova, A. T. *et al.* (2005) *Science* **307**, 262-265. DOI: 10.1126/science.1105850.
- 5) Czajkowsky, D. M. *et al.* (2003) *J. Microsc.* **211**, 1-7. DOI: 10.1046/j.1365-2818.2003.01208.x.
- 6) Lu, J. X. *et al.* (2013) *Cell* **154**, 1257-1268. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.035.
- 7) Welgus, H. G. *et al.* (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9516-9521.
- 8) Perumal, S. *et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 2824-2829. DOI: 10.1073/pnas.0710588105.
- 9) Cisneros, D. *et al.* (2006) *J. Struct. Biol.* **154**, 232-245. DOI: 10.1016/j.jsb.2006.02.006.

中山隆宏

中山隆宏 (なかやま たかひろ)

金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所准教授

2008 年東京工業大学大学院総合理工学研究科物質電子化学専攻修了 (理学), 08-12 年東京工業大学大学院生命理工学研究科・イノベーション研究推進体博士研究員, 12 年金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター助教, 17 年同准教授を経て同年 10 月より現職。

研究内容: 生体分子の構造動態解析

連絡先: 〒920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: tnakawata@se.kanazawa-u.ac.jp

紺野宏記

紺野宏記 (こんの ひろき)

金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所准教授

2001 年東京工業大学大学院総合理工学研究科物質電子化学専攻修了 (理学), 日本学術振興会特別研究員 (DC2), 02-05 年 JST/ERATO 研究員, 09-11 年東京工業大学資源科学研究所助教, 11 年金沢大学理工研究域バイオ AFM 先端研究センター准教授を経て 17 年 10 月より現職。

研究内容: 生体分子の構造動態解析

連絡先: 同上

E-mail: hkono@se.kanazawa-u.ac.jp

山田正仁

山田正仁 (やまだ まさひと)

金沢大学医薬保健研究域医学系脳老化・神経病態学 (神経内科学) 教授

1984 年東京医科歯科大学医学系研究科博士課程修了 (医学), 88 年カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部博士研究員, 99 年東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科助教授を経て 2000 年より現職。

研究内容: 認知症, アミロイド, 神経変性疾患の研究

連絡先: 〒920-8640 石川県金沢市宝町 13 番 1 号

E-mail: m-yamada@med.kanazawa-u.ac.jp

小野賢二郎

小野賢二郎 (おの けんじろう)

昭和大学医学部教授

2002 年金沢大学大学院医学系研究科博士課程修了 (医学), 03 年金沢西病院脳神経センター神経内科医長, 05 年金沢大学医学部附属病院神経内科助手, 07 年カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) 神経学教室 (David B. Teplow 教授) 博士研究員, 09 年金沢大学附属病院神経内科助教授, 11 年金沢大学附属病院神経内科講師 (兼医局長), 14 年金沢大学附属病院神経内科病院臨床准教授着任を経て, 15 年 7 月より現職。

研究内容: 神経変性疾患の研究

連絡先: 〒142-8666 東京都品川区旗の台 1-5-8

E-mail: onoken@med.showa-u.ac.jp