表面固定されたタンパク質のナノ力学[†]

猪飼 篤

東京工業大学大学院生命理工学研究科 ☎ 226 8501 神奈川県横浜市緑区長津田町 4259

(2001 年 4 月 6 日受付; 2001 年 7 月 4 日掲載決定)

Nanomechanics of Surface Immobilized Protein Molecules

Atsushi IKAI

Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology
4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226 8501

(Received April 6, 2001; Accepted July 4, 2001)

Proteins and polypeptides were first covalently immobilized on a solid surface and then extended by a tensile force applied at the two ends of the polymer chain. The method consisted of introducing cysteine residues at N- and C-termini of protein molecules and covalently immobilizing them on an amino-silanized surface of a crystalline silicon wafer. The other end of the protein molecule was cross-linked to a functionalized AFM (atomic force microscope) tip with covalent cross-linkers. The relationship between the tensile force and the extension length of the molecule was measured using the force curve mode of AFM. Results obtained with a polyglutamic acid that takes helical conformation in acidic and random coil state in neutral and alkaline media is described. Also the relationships measured with β -sheet globular protein, carbonic dehydratase are given.

1. 研究目的

我々の研究目的は、原子・分子のナノ力学研究を表面固定した生体高分子系の解析とその結果を利用した工学操作に応用するところにある。生体高分子の一つであるタンパク質の機能構造は DNA の一次元塩基配列情報が細胞内でアミノ酸配列に翻訳された後に、アミノ酸の持つ化学的性質の 3 次元的広がりを基礎に、基本的には自発的機構で実現される「自己組織化」構造の典型的な例である。20 種のアミノ酸が 100 以上連結した高分子のセグメント間の非共有結合的相互作用は非常に多くの組み合わせを持つため、通常の計算技法では自己組織化の結果作られる立体構造を熱力学的に安定な構造として予測することが困難である。一方、実験的には水溶液内におけるタンパク質の立体構造再生過程は複雑な過程を経て進行することが予想されながら、強い協同現象として進行するために、反応中間体を捕捉するのに困難を極め

てきた結果、反応過程の解析が遅れていた。またタンパク質の力学的性質については、従来法では単一タンパク質分子に対する力学操作が不可能であったため、どの程度の力を印加するとタンパク質分子の立体構造が破壊されるのか、置かれた状態に応じてタンパク質の力学的性質はどのように変化するのか、その変化はタンパク質の生体機能に対してどのような変化をもたらすのか、などについての知見はほとんど存在していなかった。ところが近年ナノプローブテクノロジーの発展とともに、特に原子間力顕微鏡を使用した力学測定が単一タンパク質分子に対して行えるようになったことを受け、DNA やタンパク質分子に力学的変形を加えた際のストレス・ストレーン関係を実測する研究がドイツ、アメリカを中心に各地で行われるようになってきた^{1, 3-5)}。我々は 1996 年にタンパク質の力学変形に関する最初の論文を発表して以来、常に世界に先駆ける実験を試みてきている^{6-8, 10, 11, 13)}。特にドイツ、アメリカのグループが複数の構造ユニットがタンデムに並んでいるタンパク質をその両端から延伸することにより、各ユニットが次々に破壊される様子を、脆性破壊応力の閾値として測定してい

[†] 第 20 回表面科学講演大会 (2000 年 11 月 29 日 ~ 12 月 1 日) にて発表

E-mail: aikai@bio.titech.ac.jp

Fig. 1 Schematic representation of single protein molecule stretching experiment.

るのに対して、我々は真に単一タンパク質をその両端あるいは表面の任意の2点に張力をかけることにより破壊する際の分子内応力の変化を延伸距離にたいして測定することに成功し、タンパク質の内部凝集エネルギーを算出することができた。

まず、単一タンパク質延伸実験の模式図を Fig. 1 に示す。この模式図では、AFM の探針と基板の間にはすでにタンパク質分子を上下に引き伸ばす様子を示している。AFM の探針は柔らかな片持ち梁（カンチレバー）の自由端に固定されているので、分子を引き伸ばす際の張力により下向に引かれる。その下向変位をカンチレバーの背面にレーザー光を照射しその反射光の方向の変化を上下2分割あるいは上下左右4分割したフォトダイオード製の位置検知器で検出する。カンチレバーの変位（ D ）にそのバネ定数を乗じたものが張力（ F ）に等しく、またピエゾチューブの下方移動距離（ d ）からカンチレバーの変位量を差し引いた値が高分子鎖の伸び（ $E = d - D$ ）となる。このようにして得た張力と伸びの関係を F - E カーブで表わす。

2. 研究方法

2.1 ポリグルタミン酸

平均重合度が 65、最大重合度が 100 のポリグルタミン酸を合成し、そのカルボキシル末端にシステイン残基を一つ導入した。C-末端のメルカプト基、N-末端

のアミノ基がそれぞれ分子内で唯一の官能基となる。基板はシリコン（111）面を用い、探針は窒化シリコン製のものを用いた。いずれも 3-aminopropyl-triethoxysilane（APTES）あるいは 3-mercaptopropyl-triethoxysilane（MPTES）（Aldrich Chem., Milwaukee, WI）を用いて機能化して用いた。さらにポリグルタミン酸を固定するにあたっては、基板側には succinimidyl 6[3-(2-pyridyldithio)-propionamido-] hexanoate（LC-SPDP）（Pierce, Rockford, IL）、あるいは、NHS-PEG 3400-MAL（Shearwater Co., PEG 架橋剤と略す）を用いた。PEG 架橋剤はおよそ 30 nm の長さをもつポリエチレングリコールが入った架橋剤である。探針側にはシリコンを APTES で機能化した後、2 価性化学架橋試薬 disuccinimidyl suberate（DSS）を用いた。この探針がポリグルタミン酸に接触してそのアミノ基と共有結合を形成することを予想している。Fig. 2 にポリグルタミン酸の固定の様子を示す。

2.2 炭酸デヒドラターゼ

タンパク質をその両端から延伸するには、両端にユニークな化学的性質を持つ官能基を導入する必要がある。我々はメルカプト基（-SH）を持つアミノ酸であるシステイン残基を両端に導入した。ウシ赤血球由来の炭酸デヒドラターゼはもともとシステインを含まないので、この変異導入によりタンパク質をその両末端で原子間力顕微鏡の探針と基板に化学的に結合することが可能となった。どちらの末端が探針に結合するか、基板に結合するかは指定することはこの場合はできない。シリコン基板とシリコン探針をアミノ末端を持つシラン化剤で処理したあと、アミノ基とメルカプト基に反応性をもつ 2 価性化学架橋試薬の使用により炭酸デヒドラターゼ変異体を基板に固定した。この基板を原子間力顕微鏡の溶液セルの中におき、緩衝液を満たした後、同様に 2 価性化学架橋試薬で修飾した探針を接触させることで基板炭酸デヒドラターゼ探針という共有結合連鎖を形成した。この後、探針-基板間距離を増大することによりタンパク質を力学的に変形し、その際に探針をつけたカンチレバーの反り（ D ）から張力を、探針-基板間距離から D を差し引いて炭酸デヒドラターゼの伸びを測定した。

3. 実験結果

3.1 ポリグルタミン酸

酸性溶液中で α ヘリックス構造を、中性溶液中ではランダムコイル構造をとるポリグルタミン酸について行い、タンパク質構造の中核をなす基本構造の一つである α ヘリックス構造の力学的性質を測定することに成功した。この結果を応用して、 α ヘリックス構造を基本

Fig. 2 Cross-linking of polyglutamic acid (PGA) to the silanized surface of silicon substrate using bifunctional cross-linkers. PGA has unique amino and sulfhydryl groups on its N- and C-termini, respectively, and cross-linked to the silanized AFM tip and the substrate using appropriate bifunctional cross-linkers. (Taken from ref. 11 with permission)

とするカルモジュリンの延伸曲線を解析した。原子間力顕微鏡探針のバネ定数は、測定結果の精度を決める重要な因子である。その測定には熱振動の振幅を測定したパワースペクトルをもとに、エネルギー等分配則を利用して得る方法を利用した¹⁴⁾。

原子間力顕微鏡利用した単一分子実験で最も問題となる点は、分子の基板あるいは探針への吸着をどうやって防ぐかである。フォースカーブは一次元的な簡単なカーブである上、実際に引き伸ばされているタンパク質の様子を見ることがまだできない状態なので、Fig. 2のようなフォースカーブ上の力のピークがタンパク質分子固有の構造破壊によるものなのか、あるいは分子の一部が基板や探針に吸着しているのを無理に引っ張って剥がす結果現われるものなのかを見分けることはきわめて難しい。我々は、シリコン基板上にタンパク質を結合する際に使う2価性化学架橋試薬として20–30 nmの長さを持つポリエチレングリコールのスペーサーを持つものを使用することにより吸着のない力学曲線を得ることができた。その後、ポリエチレングリコールのない架橋剤を使用してタンパク質の延伸曲線としては同様の曲線を得ることができたので、最終結果にはタンパク質の基板ないし探針への吸着の影響は小さいものと考えることができる。

Fig. 3 Mechanical extension of PGA with strong adsorption to the substrate. PGA was stretched between the tip and the substrate and the force-extension curves were obtained. The total extension length was about 30 nm in accordance with the degree of polymerization of the sample PGA, and the F-E curves between 20 and 30 nm were of similar shape with the random coil extension. The initial parts were, however, dominated by strong effect of adsorption of PGA to the substrate. (Taken from ref. 11 with permission)

Fig. 4 (A) Extension at pH 3.0, (B) Retraction at pH 3.0, (C) Extension at pH 7.0, (D) Retraction at pH 7.0. (Taken from ref. 11 with permission)

ポリグルタミン酸の実験には PEG 架橋剤を用いることにして、以後の実験を進めた。Fig. 3 は酸性領域および中性領域におけるポリグルタミン酸の F-E カーブを示したものである。

また、Fig. 5 は Fig. 4 のような実験から得た各 pH での F-E カーブの平均値を pH 8 から 3 までの 6 個の異なる pH について描いたものである。この図では、PEG 架橋剤の延伸部分は差し引いている。

これらの結果からまずポリグルタミン酸の力学的な性質が溶液 pH により大きく変化していることがわかる。中性のランダムコイル状態では小さい力で大きく伸びる柔らかい鎖であり、酸性条件ではより固いヘリックス状態に変化することが見て取れる。固体表面でも溶液中と同じようにヘリックス コイル転移をするかどうかはわからないが、この測定結果はその推察を支持している。図中、WLC の注のある曲線は、ゴム弾性理論で知られるエントロピー弾性を示すランダムコイル鎖のモデルのうちで、worm like chain と呼ばれるモデルによる曲線であり、パラメータである平均持続長としてアミノ酸残基一つ分にあたる 0.37 nm を用いた場合である。この結果を見てやや不思議な感があるのは、ヘリックス状態のポ

リグルタミン酸が全長近く引き伸ばされるまで張力が単調に増加してゆく点である。この点についてはポリペプチドの 2 面角 (ϕ , ψ) の分布を与えるラマチャンドランプロットを考慮に入れる考察により定性的には説明できる。すなわち右巻きらせん構造に相当する ($\phi \sim -60^\circ$, $\psi \sim -50^\circ$) の位置から、完全伸長状態 ($\phi \sim -180^\circ$, $\psi \sim -180^\circ$) に至る過程はエネルギー的に常に上り坂となると考えられる。これに加えて、おそらく主鎖のペプチド結合の水素結合で定義される α ヘリックス構造のみの力学的性質を見ているのではなく、側鎖および水和水などを含むポリグルタミン酸水和体全体の力学応答を見ている結果としてこのようなスムーズな F-E カーブが得られたと考えている。pH 8 の場合、分光学的にはランダムコイル鎖状態であるが、力学的には WLC 鎖の結果と異なる曲線となっている原因としてやはり主鎖だけでなく側鎖間のエンタルピー的な相互作用があるものと考えている。

力学的性質の上でヘリックス コイル転移が現われるかどうかを見るために、F-E カーブの積分値を延伸距離の関数として表わしてみたのが Fig. 6 である。

この図で見ると、円 2 色性スペクトルで測定したヘリ

Fig. 5 Extension curves of PGA at different pHs. The lowest and highest solid curves correspond to the results at pH 8.0 and 3.0. Solid curves between the two curves correspond in order to results at pH = 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, respectively. (A) before and, (B) after subtraction of PEG contribution. The curves designated as PEG in (A), and as WLC in (A) and (B), are, respectively, the F-E curve for polyethylene glycol cross-linker, and a curve for the worm-like chain model of a theoretical random coil. (Taken from ref. 11 with permission)

ックス コイル転移と同様の pH 依存性を示すのは延伸がおよそ 20 nm 程度までであることがわかる。試料自体の長さをおよそ 10 nm とするとこれは 100% 程度の伸びとなる。ポリペプチドの円 2 色性スペクトルは 190–230 nm 付近に α ヘリックス, β シート, 不規則構造に特有のコットン効果を示すことが知られており, 特に α ヘリックス構造だけからなるポリグルタミン酸のような場合は, 222 nm における負のコットン効果の深さと α

Fig. 6 pH dependence of the work to extend PGA at different pH and to different length. (Taken from ref. 11 with permission)

ヘリックス構造をとる残基の割合 (α ヘリックス%) が線形関係にあることが知られている。

α ヘリックス構造を持つポリグルタミン酸の F-E カーブがどのような役に立つかというと, タンパク質の中で α ヘリックス構造を主として持つカルモジュリンやミオグロビンの力学的性質を理解するのに役立つ^{11, 12)}。

3.2 炭酸デヒドラターゼの分子ナノ力学

炭酸デヒドラターゼは 259 個のアミノ酸残基からなる球状タンパク質であり, その立体構造の特徴は 10 個の β シート構造からなるコア構造があること, 及び C-末端付近に「結び目」構造が存在することである。従来の溶液論的な研究により, この分子の構造破壊と再生において, 天然状態でもランダムコイル状態でもない中間的な構造が出現することが知られている。この分子の両末端にシステイン残基を導入して原子間力顕微鏡により延伸を行うと, 天然構造の時と変性剤をいれてランダムコイル状態にしたときで, Fig. 7 のように大いに異なるフォース・エクステンションカーブが得られる^{8, 9)}。

天然構造のタンパク質が非常に引き伸ばし難いのは, C-末端付近にある「結び目」構造のためではないかと考え, C-末端側のシステイン残基導入位置を, 253 番目とした変異体を作成した。この分子は生体機能を持ち, 立体構造は天然構造とほぼ等しいものと考えられる。この分子を原子間力顕微鏡で延伸すると, Fig. 7 でみた天然構造のフォース・エクステンションカーブとは大いに異なる広い範囲に広がる Fig. 8 にみるような 2 種類のカーブを得た。

そこで, 天然構造を持つ炭酸デヒドラターゼにのみ結

Fig. 7 Extension curves of carbonic dehydratase. Native (left) and denatured protein (right). The F-E curves for the native protein show stretching up to 15 nm where the covalent cross-link system was mechanically broken. Curves for denatured protein reached almost the theoretical limit of the protein extension of 96 nm. The solid line at the far right represents the F-E curve for the WLC model. (Taken from ref. 9 with permission)

Fig. 8 Carbonic dehydratase with replacement of Glutamine 253 to Cysteine. The native protein was extended to 65-95 nm in this case. (Taken from ref. 13 with permission)

合すると考えられている酵素活性の阻害剤を緩衝液中に添加してからフォースカーブを測定した。その結果、Fig. 8 に示されたカーブは新しい2種類に分類されることがわかった。すなわち、我々がタイプIIと呼ぶ、一つのグループは阻害剤添加前とあまり変化のないものであるが、タイプIと呼ぶもう一つのグループは大いに変化して、30-40 nmまでは100 pN以下の小さい張力で延伸され、それ以上の延伸に対しては急激な張力の増加が見られた。この様子を Fig. 9 に示す。後のグループは明らか

Fig. 9 Effect of inhibitor on the F-E curves of carbonic anhydrase with replacement of Glutamine to Cysteine. The curves in Fig. 8 were now grouped into two quite different F-E curves showing that about half of the molecules were capable of interacting with the inhibitor whereas the rest were not. (Taken from ref. 13 with permission)

に阻害剤と結合できる天然構造を取っていると結論し、先のグループは阻害剤と結合できる構造はもっていないと結論した。

この性質を利用して、タイプIとIIを、阻害剤を吸着剤としたアフィニティークロマトグラフィーを使用することにより、分離することに成功した。分離後の各分画を原子間力顕微鏡により再びフォースカーブをとって調べてみると、確かに阻害剤との相互作用が再現できることがわかった。この時点で、我々は原子間力顕微鏡がタンパク質の力学的に異なる構造異性体を区別できる能力があることを明らかにした。

二つの構造異性体はアミノ酸残基の一種であるトリプトファン残基の蛍光スペクトルで見限り区別はつげたく、また天然構造とも区別できない。両者の円偏光2色性スペクトルはまったく同一とは言えないが少なくとも良く似ている。フォースカーブ測定中に、タイプIからIIへの転移が見られることもあることから、水溶液中での延伸に対してはタイプIIの方が安定な構造を表わしていると考えられる。両者の構造的な違いに関しての見解は今のところ少ないが、一方がC-末端付近の「結び目」構造を持つ構造であり、他方は持たないという可能性が高い。これら二つの構造がまったく異なる経路で生じたのか、あるいは遅いながらも平衡状態にあるのかについては今後の研究に待つ必要がある。

4. 今後の発展的課題

今後の研究の発展として次のような項目を取り上げる

予定である。

1. 得られているフォース・エクステンションカーブをそれぞれの分子の立体構造を踏まえて理論的な説明を与えることにより、複雑系としての理解を深める。
2. 延伸途中のタンパク質分子の形態を何らかの方法で可視化するための装置を使用する。

文 献

- 1) C. Bustamante, J.F. Marko, E.D. Siggia and S. Smith: *Science* **265**, 1599 (1994).
- 2) M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann and H.E. Gaub: *Science* **275**, 1295 (1997).
- 3) A.F. Oberhauser, P.E. Marszalek, M. Carrion-Vazquez and J.M. Fernandez: *Nat. Struct. Biol.* **6**, 1025 (1999).
- 4) M. Carrion-Vazquez, A.F. Oberhauser, S.B. Fowler, P.E. Marszalek, S.E. Broedel, J. Clarke and J.M. Fernandez: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3694 (1999).
- 5) M. Rief, J. Pascual, M. Saraste and H.E. Gaub: *J. Mol. Biol.* **286**, 553 (1999).
- 6) K. Mitsui, M. Hara and A. Ikai: *FEBS Letters* **385**, 29 (1996).
- 7) A. Ikai, K. Mitsui, Y. Furutani, M. Hara, J. McMurty and K.P. Wong: *Jpn. J. Appl. Phys.* **36**, 3887 (1997).
- 8) T. Wang and A. Ikai: *Jpn. J. Appl. Phys.* **38**, 3912 (1999).
- 9) T. Wang and A. Ikai: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 9 (2001).
- 10) A. Ikai and T. Wang: *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 3784 (2000).
- 11) A. Idiris, M.T. Alam and A. Ikai: *Protein Engineering* **13**, 763 (2000).
- 12) R. Hertadi and A. Ikai: submitted to *Protein Science*.
- 13) M.T. Alam and A. Ikai: *Appl. Phys. A* **72**, S 121-124 (2001).
- 14) H. Arakawa, Y. Okajima and A. Ikai (to be published).