

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「ATP/GTP が駆動するタンパク質マシナ
リーの動的構造生命科学」

研究終了報告書

研究期間 平成25年10月～平成31年3月

研究代表者：安藤 敏夫
(金沢大学ナノ生命科学研究所、特任
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

代表者が世界に先駆けて開発した高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は、マーカーでラベルすることなく溶液環境下にあるタンパク質分子をナノ解像度の動画映像として直接観ることを初めて可能にした。機能中に個々の分子で進行する動的な構造変化やプロセスを観察できるため、従来の構造生物学や一分子生物学では困難であった発見を可能にする。本研究では、誕生してから間もないこの技術を出来るだけ多くの対象に適用し、高速 AFM の革新性・有効性を広く実証することを目指した。多くの対象候補があるが、動く、引っ張る、押す、裂く、絞るといった力学作用が機能そのものと思われるメカノエンザイムをまずは中心に据え、試料調製、個々の対象に適したアッセイ系の検討、試験観察を通して取捨選択しつつ対象を広げていった。また、試料を載せる基板も含め、特定の観察に必要な周辺技術の開発も行った。

安藤グループが高速 AFM 関連の技術的サポート、周辺技術の開発、多様な系のイメージング研究を行い、安藤グループと竹居グループが連携して GTPase で駆動される Dynamamin 系のアッセイ系開発とイメージング研究を行い、安藤グループが組み上げ熊本大学に設置した高速 AFM 装置を使って小椋グループが AAA+タンパク質系を中心にイメージング研究を行った。尚、2017 年度途中から安藤グループから独立した内橋グループは安藤グループで行っていた研究を継続するとともに、イメージング研究の対象を広げた。

総計約 50 種類のタンパク質系を手掛けた。技術的な問題などにより断念した系はあるものの、実験継続中の系も含め重要な発見があった。いずれの発見も、高速 AFM なしには不可能、或いは、高速 AFM なしには長期間の多方面からの研究を必要とするものばかりであり、高速 AFM イメージングの威力が見事に実証された。例えば、シャペロン GroEL の等価な二つのリング間で生ずるアロステリックコミュニケーションの解明はその典型であろう。ATP 結合の負の協働性により、片方のリングにしか ATP が結合せず、それ故 GroES も片方のリングにしか結合できないとする主流の説に対し、それを否定する非常に多くの研究があるものの、いずれも真のコミュニケーションの実体を捉えるに至っていない。それ故、シャペロン反応サイクルの全貌解明にも誰も成功していない。GroES の結合・解離の高速 AFM 観察はこの困難な問題に短期間で決着をつけた。二つのリング間で起こる二種類のアロステリックコミュニケーションの存在が明らかになった。いずれのコミュニケーションでも、一方のリングで起こる ATPase 反応の遷移ステップがタイマーとなり、他方のリングでの反応進行を制御し、それにより二つのリングで 180 度の位相差をもつ同期した反応が効率良く進行する。また、経路分岐を含む複雑なシャペロン反応スキームの全貌を初めて明らかにすることに成功した。説明は省くが、時計タンパク質 KaiC の概日リズムの安定性メカニズム、バクテリア鞭毛モーターのイオン環境に応じたスイッチングのメカニズム、GTPase である Dynamamin が膜小胞を形成するメカニズム、凝集したタンパク質を ATP 駆動で脱凝集する分子シャペロン ClpB の機能に直結する大規模な構造変化、膜孔形成毒素 SLO の膜孔形成過程、天然変性タンパク質のダイナミクスなどの解明も、高速 AFM による構造動態・分子プロセスの直接観察なしには不可能と思えるものばかりである。

イメージング中にオペレーターが指定した試料の特定位置に制御された大きな力を探針から加え、その効果をイメージングするために開発したインターラクティブモードも、この手法ならではの発見に導いた。例えば、酸化還元酵素であるペロキシレドキシシン(Prx)の ATP/ADP 添加、或いは、過酸化によって形成され、且つ、ペロキシダーゼから分子シャペロンへと機能変換する球状高分子量複合体の実体がこの手法により初めて解明された。負電荷を有するリポソームの表面に Prx 六量体が格子状に結合したものが実体であった。また、機能変換は脂質結合によって形成される六量体の段階で起ることも発見された。この球状高分子量複合体は最近研究が活発化しているエクソソームの一種と考えられる。実際、これまでに成分が解析されているエクソソームの多くに Prx が含まれている。酸化ストレスなどに伴う膜トラフィックの活性化により Prx の球状高分子量複合体が形成され、また、ストレスによって生じた変性タン

パク質がこの複合体に結合し、エクソソームとして細胞外に放出されることが示唆された。こうして、高速 AFM が細胞生物学上の未解明問題の解明にも威力を発揮することが実証された。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 概要: シャペロニン GroEL について以下の事実を発見した。ATP → ADP-Pi のステップがタイマーとなり反対側のリングからの ADP の解離を制御し、基質タンパク質がトランスリングから解離する時間を稼ぐ。また、ADP-Pi → ADP のステップがタイマーとなり反対側のリングでの ATP 結合にともなう(おそらく基質タンパク質を内孔に移行させる)構造遷移を制御する(もしくは、その反対)。これらの制御が二つのリングでの同期した反応進行を実現している。また、反応スキームの全貌を明らかにした。
2. 概要: 時計タンパク質 KaiC について以下の事実を発見した。長時間(約 12 時間)に亘るリン酸化反応は頻繁且つ短時間(約 1 秒)に起こる KaiA との結合・解離で活性化されるとともに、リン酸化が KaiC の KaiA への親和性低下へとフィードバックされる。このフィードバック効果が、リン酸化反応の振動に貢献するとともに、細胞内で KaiABC 系の各成分の濃度が大きく揺らぐ中でも安定な KaiC のリン酸化状態振動の概日リズムを実現する。
3. 概要: ペロキシレドキシシン(Prx)について以下の事実を発見した。Prx 二量体が負電荷を有する脂質と結合すると、六量体に変換し、且つ、分子シャペロンへと機能変換する。その六量体が ATP/ADP を結合、或いは、過酸化されると、結合していた脂質はリポソームとなり、その表面上に六量体が結合した球状高分子量複合体が形成される。この現象は、酸化ストレスなどによって変性したタンパク質を細胞外に排出、或いは、リソソームで分解する機構のひとつと示唆される。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 概要: ATPase/GTPase に限らず多様なタンパク質系の機能メカニズム解明に高速 AFM が有効且つ革新的な技術であり、今後のタンパク質研究の発展に大きく貢献する技術であることを広範な試料系を対象に実証した。

<代表的な論文>

1. D. Noshiro and T. Ando, "Substrate protein dependence of GroEL-GroES interaction cycle revealed by high-speed AFM imaging", *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 373, 20170180 (2018). DOI: 10.1098/rstb.2017.0180
2. T. Mori, S. Sugiyama, M. Byme, C. H. Johnson, T. Uchihashi, T. Ando, "Revealing circadian mechanisms of integration and resilience by visualizing clock proteins working in real time", *Nat. Commun.* 9, 3245 (13 pages) (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-05438-4
3. T. Haruyama, T. Uchihashi, Y. Yamada, N. Kodera, T. Ando and H. Konno, "Negatively charged lipids are essential for functional and structural switch of human 2-Cys peroxiredoxin II", *J. Mol. Biol.* 430, 602-610 (2018). DOI: 10.1016/j.jmb.2017.12.020

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 安藤グループ

研究代表者: 安藤 敏夫 (金沢大学ナノ生命科学研究所, 特任教授)

研究項目

- ・試料操作可能な高速 AFM の開発
- ・高速 AFM の周辺デバイスの開発
- ・ATP-PEG の合成と利用検討
- ・モータータンパク質・ダイナミン系などの高速 AFM 解析

② 小椋グループ

主たる共同研究者: 小椋 光 (熊本大学発生医学研究所, 教授)

研究項目

- ・AAA 型分子シャペロンの高速 AFM 解析
- ・その他の分子シャペロンの高速 AFM 解析

③ 竹居グループ

主たる共同研究者: 竹居 孝二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科, 教授)

研究項目

- ・Dynamain 系 GTPase の高速 AFM 解析のための再構成系の確立
- ・Dynamain 系 GTPase の高速 AFM 解析

④ 内橋グループ (2017 年度途中から)

主たる共同研究者: 内橋 貴之 (名古屋大学大学院理学研究科, 教授)

研究項目

- ・リング状 ATPase (ClpB, PilB) の高速 AFM 解析
- ・Kai タンパク質間相互作用の高速 AFM 観察
- ・プロテアソーム関連タンパク質の高速 AFM 解析
- ・高速 AFM 周辺技術の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ① 領域内での連携: 遠藤斗志也チーム, 永田和宏チーム, 野田展生チーム, 吉川雅英チームと共同研究を行い, 現在も継続中。対応するさきがけの領域では, 横浜市大の有田恭平氏, 奈良先端大の塚崎氏, 千葉大学の村田武士氏と共同研究を行い, 一部は継続中。
- ② 国内の研究者との連携: 阪大の南野徹氏ら, 富山大学の水口峰之氏, 横浜市立大学の佐藤衛氏, 福岡大学の山本大輔氏, 東京農工大学の篠原恭介氏・養王田正文氏, 山形大学の奥野貴士氏, 甲南大学の渡辺洋平氏, 分子科学研究所の加藤晃一氏, 及び, 東京医科歯科大学の青木和広氏と共同研究を行い, 一部は継続中。
- ③ 海外の研究者との連携: Johannes Kepler University of Linz の Peter Hinterdorfer 氏, Weill Cornell Medicine の Simon Scheuring 氏, University of Basel の Roderick Lim 氏, University of Montpellier の Pierre-Emanuel Milhiet 氏, University of Bourgogne の Eric Lesniewska 氏らとは, 2008 年から現在まで高速 AFM 国際コンソーシアムのメンバーとして高速 AFM 研究の世界普及活動で連携してきた。本 CREST プロジェクトでは, Colorado State University の Jeffrey Hansen 氏, University of California, Davis の Anna Kalashnikova 氏, Aix-Marseille University の Sonia Longhi 氏ら, University of Michigan の Ayyalusamy Ramamoorthy 氏, KU Leuven の Willem Vanderlinden 氏, Western University の Mikko Karttunen 氏, University of Vanderbilt の Carl Johnson 氏ら, Virginia Polytechnic Institute and State University の Zhaoming Yang 氏らと共同研究を行い, 一部は継続中。