

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 16 年度採択研究代表者

安藤 敏夫

(金沢大学大学院自然科学研究科 教授)

「タンパク質のナノダイナミクス高速撮影装置の開発」

## 1. 研究実施の概要

タンパク質の機能解明に資する「タンパク質ナノ動態高速撮影装置 (高速 AFM)」を開発する。形状ばかりでなく物性マップの動態をも撮影できる装置とする。また、いくつかの試料系の動態を捉え、その機能解明を目指す。これまでのところ、上記の目標を実現すべく、装置に含まれるデバイスの最適化や新しいデバイスの開発を行い、これらを組み込んだ高速 AFM を製作した。イメージング速度はビデオレートを実現した。物性マップ取得のための方法論については、検討を継続している。試料系については、観察に適した AAA タンパク質とその基質、DNA 関連のタンパク質などの発現方法の検討や基板の開発を進め、これら試料系の試験的なイメージングを行ってきた。Katanin による微小管切断過程を AFM 観察できる見通しが立った。これまで観察を続けてきた Myosin V のアクチンフィラメント上でのプロセッシブ運動、シャペロニン GroEL-GroES の反共同的相互作用については、本格的なイメージングに成功した。探針・試料間にかかる力の軽減化も進展したが、まだ十分な軽減化には至っていない。今後は、この最重要課題に取り組むとともに、機能動態イメージングの成功例を増やしていく。

## 2. 研究実施内容

### [1] 高速 AFM のデバイス開発

タンパク質の機能を乱さないほど探針・試料間に働く力を軽減し、且つ、高速走査を可能にするために、様々な技術開発を進めてきた。以下にそれらを説明する。

**(a) 高速スキャナー**：高速化にとってボトルネックになっており、且つ、開発が難しいデバイスである。 piezo 素子をエッジ部だけでベースに固定することで、共振周波数を自己共振周波数に維持できることを見出した。後述の逆伝達関数位相補償法との組み合わせで、500kHz の帯域を実現した。低周波側に残る共振をまだ完全に除去できていない。

**(b) カンチレバーの光励振・駆動**：探針・試料間の距離制御を試料ステージスキャナーで行う代わりに、カンチレバーに光を照射して熱膨張で変位させることで制御できることを見出した。熱膨張過程は遅いが、後述の逆伝達関数位相補償法により高速化を実現した。

その結果、ミオシン V 分子のビデオレートイメージングに成功した (図 1)。このイメージングでは非常に高い解像度が得られたが、その原因が何にあるかはまだ明らかでない。

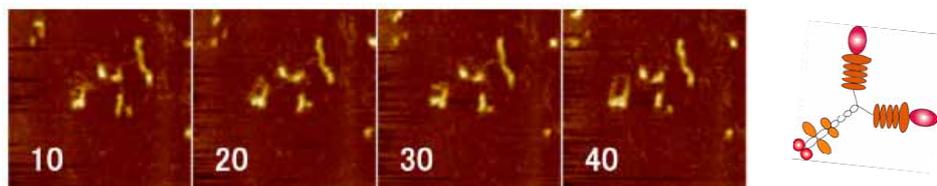


図 1 : ビデオレートで撮影したミオシン V の AFM 像 (走査範囲 240nm)

**(c) 新規逆伝達関數位相補償法の開発 :**

高周波側でのゲインの減少と位相遅れを、微分回路を利用して補償する逆伝達関数補償法はすでにある。しかし、微分回路のゲインを高周波まで伸ばすことには限界がある。そこで、去年度アイデアを掴んだ任意逆伝達関数  $G(s)$  の逆伝

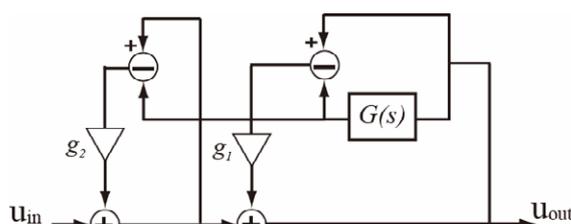


図 2 : 2 重ループ型任意逆伝達関数発生回路

達関数を自動的に生成する回路を検討し、図 2 に示す複数ループ型の回路を実際に作成してその効果を検討した。上述の熱膨張過程の位相補償や、スキャナーの位相補償など、非常に汎用性の高い優れた方法であることを確認できた。

**(d) 探針・試料間に働く力の軽減化 :** 既に開発した動的 PID 制御法により力の軽減化はかなり成功した。しかし、弱いタンパク質間相互作用を完全に乱さない程度には至っていない。この壁を破るべく様々な試みを行ってきた。未だ明確な答えは出ていないが、非接触高速 AFM の可能性もありそうな感触を掴んでいる。

**[2] イメージング**

ミオシン V がアクチン上を Hand-over-hand 様式で連続的に運動する様子を去年度よりも鮮明に撮影することに成功した。カンチレバーの自由振動振幅を 1nm まで小さくして、探針・試料間にかかる力を軽減化したことが成功の要因であった。1nm の中には熱揺らぎが含まれるた

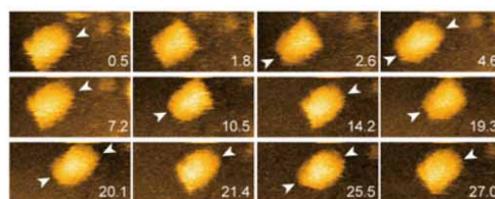


図 3 : GroEL・GroES の結合・解離反応の反共同性を捉えた AFM 像

めにノイズが多い。また、ATPase 反応に制御された GroEL への GroES の結合・解離が反共同的に起こる明確な証拠を映像として捉えることにも成功した (図 3)。すなわち、2 つある GroEL のリング間で、GroES の結合したリングと結合していないリングが交互に交換される。また、この交換の直前に両方のリングに GroES が結合した中間体 (図 3 の 4.6 秒、20.1 秒、25.5 秒目のフレーム) と、GroES が全く結合していない中間体 (図 3 の 1.8 秒目のフレーム) が存在することを突き止めた。前者の方が高い確率で現れた。

### [3] 物性マップ取得手法の検討

これまでの研究により、位相変調 (PM) 方式の AFM を用いることにより、探針・試料間に働く力の検出感度が一桁以上向上することが判明している。そこで、この高感度な PM-AFM を基本にして、水中で様々な物性 (エネルギー散逸、親水性・疎水性、表面電位、水和殻) の動的変化を高速に捉えるための新しい測定法について実験的に検討した。

(a)探針・試料間的高速エネルギー散逸測定法の開発：探針・試料間の力学的な相互作用によって散逸されるエネルギーを高速に測定することができる高速エネルギー散逸測定回路を開発した。開発した方法は、高速サンプリング法と高速演算を併用した方法であり、カンチレバーの一回の振動からエネルギー散逸を高速に測定することが可能である。今後、生体試料の粘弾性や水和殻などを高速に撮像できるかどうかを検討する。

(b)タンパク質の親水性・疎水性測定法の開発：生体試料の分極の動的変化を高速に捉えるために、光異性化反応で分極の有無が切り替わるフォトクロミック材料で探針を修飾し、外部からの刺激光により探針の分極を高速で切り替えながら、計測を行う方法について検討した。フォトクロミック分子の間に適度な割合のスペーサ分子を共吸着させることにより、分子の密集による立体障害を排除し、完全に可逆的な異性化反応を実現できることを確認した。また、異性化反応を効率的に起こさせるための光学系の配置についても検討した。

### [4] AAA タンパク質

AAA 型シャペロンによるタンパク質やその会合体の構造変換の様子を高速 AFM で捉え、その機能解明を目指している。主に 3 つの系で、高速 AFM 観察に適用させるための準備研究を行った。

(a) 線虫由来 p97：昆虫細胞・バキュロウイルスの発現系により精製した線虫由来の 2 種類の p97 が、ハンチンチンのエクソン 1 の凝集を抑制すること、および変性ロダネーゼの凝集も抑制することを明らかにしたが、凝集反応自体が数十分～時間のオーダーで進行する遅い反応であることから、高速 AFM 観察には向いていないことが判明した。今後、p97 が凝集体を脱凝集する活性を示せば、脱凝集反応の AFM 観察を試みる。

(b) Katanin および spastin：微小管切断タンパク質である katanin および spastin の作用機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、昆虫細胞・バキュロウイルスの発現系により精製したヒト katanin およびウニ katanin と大腸菌の発現系により精製した線虫 spastin ホモログ SPAS-1 について蛍光標識した微小管を用いて、微小管切断条件を検討した。その結果、ヒト katanin と線虫 SPAS-1 についてはまだ良好な結果を得ていないが、ウニ katanin について、ATP 依存的微小管切断が効率

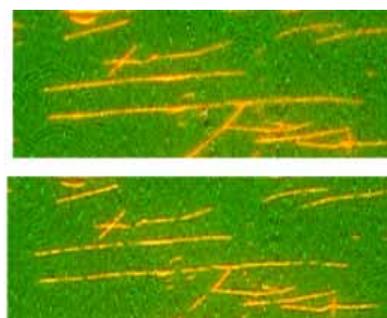


図 4：Katanin による微小管の切断。Katanin を加えた直後 (上) と 90 秒後 (下) の微小管の蛍光像。

良く起こる条件を見出した。AFM 観察のために用いるマイカ基板上でも、微小管の切断を再現性よく観察できた (図 4)。ウニ katanin の変異体の構築も進めている。

(c) 大腸菌 FtsH : ATP 依存性プロテアーゼ FtsH の基質分解機構を高速 AFM で明らかにすることを目標に、GST-flavodoxin-GFP の両末端に His<sub>6</sub> タグを付加したモデル基質を構築し、その分解を確認した。この基質の分解は中央の flavodoxin から開始することが分かっており、両末端の His<sub>6</sub> タグで基板上に 2ヶ所固定し、FtsH による分解過程を AFM 観察する計画である。

### [5] DNA 関連タンパク質

DNA の複製・修復・組み換えなどに関与する超分子複合体の作用機序を、高速 AFM 観察を通して明らかにすることを目標に、多数の試料系から高速 AFM 観察に適した候補を探索した。昨年から引き続き DNA の相同組換えやクロマチン関連の複合体の他、新たに脂質代謝関連蛋白質等の発現精製を行った。

(a) RuvA・RuvB・Holliday 分岐複合体 : 昨年に引き続き RuvAB 複合体の試料供給を行うと共に、複合体の安定性を電子顕微鏡で調べた。さらに、金沢大学お

いて高速 AFM 観察を行った。その結果電子顕微鏡像と対応性のよい像を取得することができた (図 5)。また分岐点移動の観察に適した Holliday 分岐 DNA の設計を検討した。長鎖 (365 塩基対) DNA、中鎖 (87 塩基対) DNA、及び基板への固定も視野に入れたピオチン化 DNA を調製し AFM 観察を行った。

(b) クロマチンのリモデリング : ポジショニングの良い 601 配列を 4 つタンデムに連結した DNA を構築し、それを用いてヌクレオソームが 4 つ連なったテトラヌクレオソームを再構成・精製した。このクロマチンのモデル系としてのテトラヌクレオソームの、水溶液中での形態を AFM で観察した。また大腸菌の発現系によるリモデリング因子 FACT 複合体の精製を行い、同様に AFM で観察、試料の像を確認することができた。

(c) 新規試料の探索 : 新規試料の一つとして脂質代謝において重要な脂肪酸  $\beta$  酸化多機能酵素複合体を調製し、AFM 観察を行った。

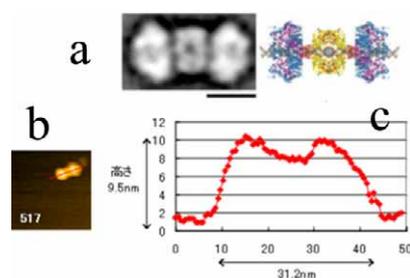


図 5 : RuvA・RuvB・Holliday 分岐複合体の AFM 像。a)電頭像と原子モデル、b)AFM 像、c)AFM 像の断面プロファイル

## 3. 研究実施体制

### (1) 「高速 AFM 開発」グループ

①研究分担グループ長 : 安藤 敏夫 (金沢大学大学院自然科学研究科 教授)

②研究項目

- ・ 高速 AFM の開発
- ・ 試料観察と基板の開発

- ・ AFM 装置のプラットフォーム及び AFM 像解析のためのプログラム開発

(2) 「物性マッピング機能開発」グループ

- ①研究分担グループ長：菅原 康弘（大阪大学大学院工学研究科 教授）
- ②研究項目
  - ・ 物性マッピング機能の開発

(3) 「AAA タンパク質研究」グループ

- ①研究分担グループ長：小椋 光（熊本大学発生医学研究センター 教授）
- ②研究項目
  - ・ AAA タンパク質の調製と改変

(4) 「DNA 関連タンパク質研究」グループ

- ①研究分担グループ長：森川 耿右（大阪大学蛋白質研究所 教授）
- ②研究項目
  - ・ DNA 関連タンパク質の調製と改変

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表(原著論文)

- Morita, S. (Osaka Univ.), Yamada, H. (Kyoto Univ.), and Ando, T. (Kanazawa Univ.), “Japan AFM roadmap 2006”, *Nanotechnol.* **18**: 084001 (pp. 10) (2007).
- Uchihashi, T., Yamashita, H., and Ando, T. (Kanazawa Univ.), “Fast phase imaging in liquids using a rapid scan atomic force microscope”, *Appl. Phys. Lett.* **89**, 213112 (2006).
- Koide, H., Kinoshita, T., Tanaka, Y., Tanaka, S., Nagura, N., Meyer zu Hörste, G., Miyagi, A., and Ando, T. (Kanazawa Univ.) “Identification of the specific IQ motif of myosin V from which calmodulin dissociates in the presence of Ca<sup>2+</sup>”, *Biochemistry* **45**(38): 11598-11604 (2006).
- Kodera, N., Sakashita, M., and Ando, T. (Kanazawa Univ.) “A dynamic PID controller for high-speed atomic force microscopy”, *Rev. Sci. Instrum.* **77**(8): 083704 (pp. 7) (2006).
- Yakushiji, Y., Nishikori, S., Yamanaka, K., and Ogura, T. (Kumamoto Univ.) “Mutational analysis of the functional motifs in the ATPase domain of *C. elegans* fidgetin homologue FIGL-1: Firm evidence for an intersubunit catalysis mechanism of ATP hydrolysis by AAA ATPases”, *J. Struct. Biol.* **156**:93-100 (2006).
- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. (Kumamoto Univ.) “Characterization of

mutants of the *Escherichia coli* AAA protease, FtsH, carrying a mutation in the central pore region”, *J. Struct. Biol.* **156**: 109-114 (2006).

- Okuno, T., Yamanaka, K., and Ogura, T. (Kumamoto Univ.), “Flavodoxin, a new fluorescent substrate for monitoring proteolytic activity of FtsH lacking a robust unfolding activity”, *J. Struct. Biol.* **156**: 115-119 (2006).
- Kobayashi, N., Li, Y.J., Naitoh, Y., Kageshima, M., and Sugawara, Y. (Osaka Univ.), “High-Sensitivity Force Detection by Phase-Modulation Atomic Force Microscopy (PM-AFM)”, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **45**(30), L793-L795 (2006).
- Kageshima, M., Togo, S., Li, Y.J., Naitoh, Y., and Sugawara, Y. (Osaka Univ.), “Wide-band and hysteresis-free regulation of piezoelectric actuator based on induced current for high-speed scanning probe microscopy”, *Rev. Sci. Instrum.*, **77**(10), 103701(pp. 6) (2006).

## (2) 特許出願

平成 18 年度特許出願: 3 件 (CREST 研究期間累積件数: 7 件)