

安藤 敏夫

金沢大学理工研究域数物科学系
教授

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

§ 1. 研究実施体制

(1) 安藤グループ

- ① 研究代表者: 安藤 敏夫 (金沢大学理工研究域数物科学系, 教授)
- ② 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

- ① 主たる共同研究者: 小椋 光 (熊本大学発生医学研究所, 教授)
- ② 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

- ① 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)
- ② 研究項目
 - ・Dynamamin 系 GTPase の高速 AFM 解析のための再構成系の確立
 - ・Dynamamin 系 GTPase の高速 AFM 解析

§ 2. 研究実施の概要

ATP や GTP といったヌクレオチド三リン酸 (NTP) を分解する酵素である ATPase/GTPase の多くはその分解で開放されるエネルギーを利用して力学的な仕事をする。それ故、メカノエンザイムと呼ばれる。通常単独では機能しない。NTP を分解しつつ動的に構造を大きく変化させるとともに、パートナータンパク質、基質タンパク質、サブユニットとの相互作用を動的に変える。それらの変化が力学的作用となって機能を発現する。従って、動く、引っ張る、押す、裂く、絞るといった力学作用の現場を高い空間時間分解能で直接観ることは、ATPase/GTPase がもつ多彩な機能の発現機序の理解にとって最も素直で直接的なアプローチである。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、タンパク質を染色したりラベルすることなく、溶液環境下で動作中のタンパク質分子の構造動態を直接観ることを初めて可能にした。メカノエンザイムの力学的動作は機能と直結しているため、高速 AFM はメカノエンザイムの機能そのものをスクリーンに映し出すことができる。実際、図 1 に示すように Actin 線維上を歩行運動する Myosin V 分子の運動を捉え、歩行メカニズムやエネルギーの利用の仕方について深い洞察を与えることに成功している。

本プロジェクトではチーム外の研究者の協力も得て多くのメカノエンザイムを主な対象にして高速 AFM 観察を行い、それらの機能発現機序の詳細解明を目指している。しかし、成功に至るまでにはいくつかのハードルを越えなければならない。溶液中に浮いている分子は高速 AFM では観察できないため、分子を基板に載せる必要がある。それ故、観察すべき対象と現象に適した基板など最適なアッセイ系を構築することが要求される。試料を調製し、選んだ基板を使って試験観察を行い、その結果を参考にアッセイ系を検討し、変異体の調製、基板の変更、再度試験観察といった作業を繰り返す根気の要る作業である。

本年度は、ATPase については、AAA 型分子シャペロンである ClpB, p97/VCP や 26S プロテアソーム、及び、時計タンパク質 KaiA/B/C の観察を継続した。ClpB とヒト VCP については機能に直結すると思われる構造変化を捉えることに成功した。また、オートファジーの進行に関わる PAS 複合体形成の観察などを継続して行った。それらに加え、新たな試料系として、V₁-ATPase, HECT 型 Ubiquitin ligase, 鞭毛タンパク質の輸送に関わる FliI, グループ II 型シャペロニン, DNA 関連の ATPase である Gyrase, SbcCD, MukB, などの調製ないしは試験観察を行った。GTPase については、Dynamin/Amphiphysin 複合体のリング状複合体の構造変化と複合体による膜切断の高速 AFM 観察に向けてアッセイ系を検討した。前者については電子顕微鏡観察による形態解析も行った。Dynamin/Cortactin 複合体については、リング状複合体の構造変化を高速 AFM 観察するためのアッセイ系を検討した。マリアダイナミンについては、GTPase 活性などの生化学的性状を調べると共に、膜変形過程を形態観察するための実験系を構築した。

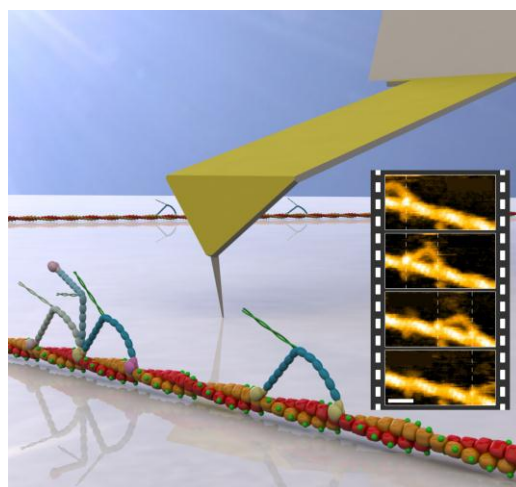


図 1. Myosin V の歩行運動の高速 AFM 観察