

高速原子間力顕微鏡を用いた バクテリオロドプシンの光励起に伴う動態観察

柴田幹大 金沢大学・理工研究域数物科学系

1. はじめに

タンパク質の機能発現における構造変化を実空間、実時間で直接イメージングすることは生物物理学分野に限らず生命科学の「夢」である。しかし、光学顕微鏡や電子顕微鏡に代表される従来法では、この「夢」を実現することはできない。では、どのようにしてタンパク質の動きをイメージングできるのであろうか？

原子間力顕微鏡 (AFM) は液中環境下でナノスケールの構造をイメージングできる数少ない手法の1つである。しかし、1画像を得るのに分オーダーの時間を必要とする従来のAFMではタンパク質の動きを捉えるに十分な時間分解能をもたない。われわれのグループは、世界に先駆けてAFMの高速化技術を開発し、2001年にはタンパク質の動態を80 ms/frameのイメージング速度で観察することに成功した¹⁾。現在ではタンパク質の機能や構造を乱すことなく、その動的振る舞いを安定に可視化できるようになっている^{2), 3)}。本稿では光駆動プロトンポンプタンパク質、バクテリオロドプシン (bR) の光励起に伴う動態観察結果について紹介する⁴⁾。高速化技術の詳細は総説を参照されたい⁵⁾。

2. バクテリオロドプシン

bRは高度好塩菌の細胞膜に存在する光駆動プロトンポンプタンパク質で、光を吸収するための発色団としてレチナール分子をもち、視物質ロドプシンと同様に7回膜貫通型構造をしている。レチナール発色団は光を吸収すると、色の異なる中間体を經由して細胞質側から細胞外側へプロトンを能動輸送する⁶⁾。また、天然の状態では3量体を形成し、その3量体が六方格子状に配列した2次元結晶を構成する。これまでに、光励起に伴う構造変化はさまざまな実験手法により報告されてきたが⁷⁾、その構造変化を実空間、実時間で直接観察した例はない。

3. 光励起に伴うバクテリオロドプシンの構造変化

野生型 bR の光反応サイクルは約 10 ms であり、われわれの高速 AFM でも、その構造変化を明瞭に捉えることは難しい。そこで、光反応サイクルが約 10 s と野生型に比べて千倍程度遅い D96N 変異体を用いた。

図 1 に光照射前 (a) と波長 532 nm の光照射中 (b) の細胞質表面の AFM 画像 (イメージング速度 1 s/frame) を示す。光照射前は規則正しい 3 量体配列 (図 1 中三角形) が観察されたが、光照射中は各 bR 分子が 3 量体の中心から外側に開くような構造変化が観察された (図 1a, b)。この変化は光を切った後、数秒で元に戻り、光に応答して繰り返し観察される高い再現性を示した。その一方で、細胞外表面 (図 1c, d) は光照射による顕著な構造変化は観察されなかった。細胞質表面の光照射前と光照射中に観察された bR 分子の形状を比較すると、光照射中では bR 分子の表面形状が主要な突起部とマイナーな突起部に分かれる (図 1e)。7 本の α -ヘリックス (A-G) の原子モデルと比較すると、主要な突起部は E-F ループに対応し、マイナーな突起部はヘリックス A, B に対応することがわかる。このことから、観察された構造変化は、結晶構造が溶啞しているように、光励起に伴う E-F ループの変位と考えられる。この外側へ開く E-F ループの構造変化により、各 bR 分子は、隣り合う 3 量体の bR 分子のほうに接近し、あたかも新しい組み合わせの 3 量体が形成されたかのように観察される (図 1b)。

bR の光反応サイクルは pH に強く依存し、アルカリ環境下では M 中間体の寿命が長くなることが知られている。そこで、いくつかの異なる pH 環境下 (pH 7, 8, 9) で高速 AFM 観察を行い励起状態 (構造変化している状態) の寿命を比較した。その結果、分光学的手法によって報告された結果と同様に pH に依存して励起寿命が長くなった。この結果は、高速 AFM で観察された構造変化が探針・試料間接触によるアーティファクトでないことを示しており、真に

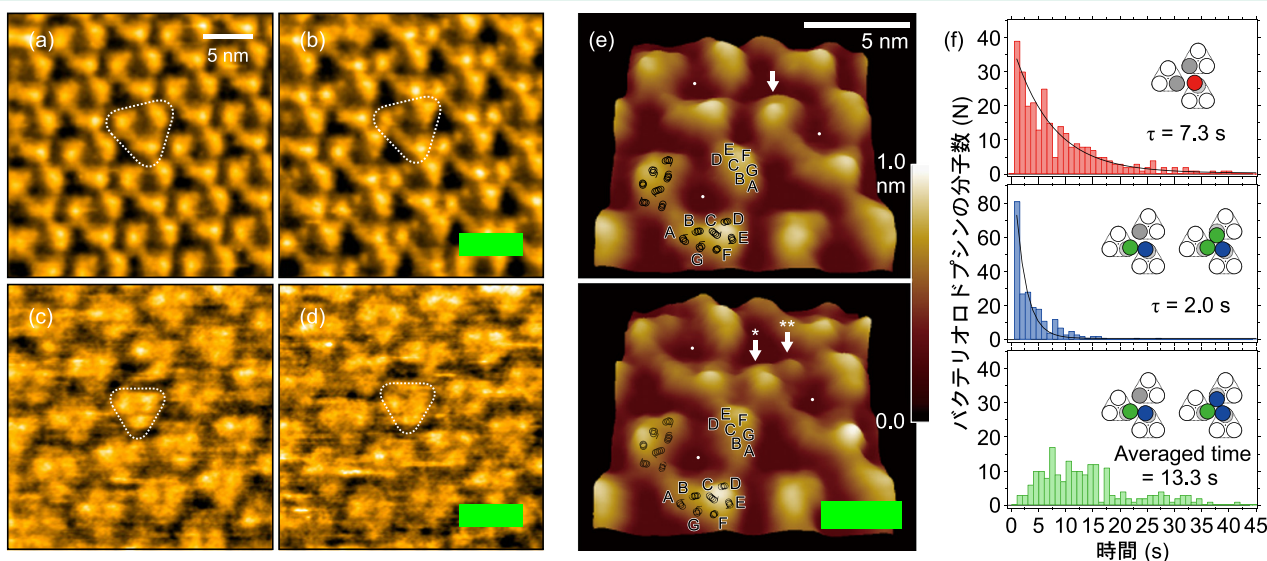


図 1
 (a-d) 細胞質表面と細胞外表面の光照射前後での D96N bR 変異体の AFM 画像。(a) (b) 細胞質表面, (c) (d) 細胞外表面。イメージング速度は 1 s/frame で、三角形は bR の 3 量体を示す。図中右下のバーはグリーンレーザー (532 nm) 照射中を表す。(e) 光 Off 時 (上図) と光照射中 (下図) の拡大した細胞質表面の AFM 画像。細胞質表面のヘリックス A-G を重ねて表示している。上図の矢印は光 Off 時に観察される突起部で、光照射中は 2 つに分かれて見える (* と **). (f) 近接する bR 分子の状態による励起寿命の協同効果。ヒストグラムの色と図中の分子の色 (赤, 青, 緑) を対応して表示する。(電子ジャーナルではカラー)

bR の機能 (光駆動プロトンポンプ) と関係した構造変化であると考えられる。

次に、励起する光の強度を変えることで、反応する bR の分子数をコントロールした。その結果、周りの bR 分子の状態によって、励起寿命が変化する協同性を示すことがわかった。この協同性は、3 量体内の分子間で起こるのではなく、隣り合う 3 量体に属する bR 分子間で起こる。周りの分子が構造変化を起こしていない場合、その励起寿命は 7s 程度である (図 1f 上図)。ところが、周りの bR 分子がすでに構造変化を起こしている状態で、後から構造変化を起こした場合、その励起寿命は短くなり 2s 程度になる (図 1f 真ん中図)。一方、最初に構造変化を起こした分子の励起寿命は長くなり 13s 程度となる (図 1f 下図)。興味深いことに、この協同性は、全 bR 分子の挙動を平均化した解析では打ち消されるが、個々の bR 分子の振る舞いを高速 AFM で詳細に解析することでわかってきた新事実である。

4. おわりに

このように、高速 AFM はタンパク質の動的構造変化を可視化するだけにとどまらず、これまでアンサンブル平均としてしか観測できなかった生体分子の挙動を詳細に捉えることができる。また、近年さまざまな生体分子の動態変化が高速 AFM を用いて明らかにされつつある⁸⁾⁻¹⁰⁾。近い将来、さらに多くの生体分子に

対して高速 AFM が適用され、従来の手法では検出できない生体分子そのものの構造変化や、詳細な分子メカニズムが解明されるであろう。

謝辞

安藤敏夫教授、内橋貴之准教授、山下隼人博士 (金沢大学)、神取秀樹教授 (名古屋工業大学) らとの共同研究成果であり、深く感謝致します。

文献

- 1) Ando, T. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12468-12472.
- 2) Yamashita, H. *et al.* (2009) J. Struct. Biol. **167**, 153-158.
- 3) Yamamoto, D. *et al.* (2009) Biophys. J. **97**, 2358-2367.
- 4) Shibata, M. *et al.* (2010) Nature Nanotech. **5**, 208-212.
- 5) Ando, T. *et al.* (2008) Prog. Surf. Sci. **83**, 337-437.
- 6) 神取秀樹 (2001) 日本物理学会誌 **56**, 75-82.
- 7) 柴田幹大, 神取秀樹 (2004) 生物物理 **44**, 113-117.
- 8) Shinozaki, Y. *et al.* (2009) Plos Biol. **7**, e103.
- 9) Igarashi, K. *et al.* (2009) J. Biol. Chem. **284**, 36186-36190.
- 10) Sugimoto, S. *et al.* (2010) J. Biol. Chem. **285**, 6648-6657.



柴田幹大

柴田幹大 (しばた みきひろ)

日本学術振興会特別研究員 SPD
 2007 年名古屋工業大学大学院工学研究科・博士課程修了, 工学博士 05-06 年名古屋工業大学 (DC1), 07 年名古屋工業大学 (PD) を経て 08 年 4 月より現職。

研究内容: イオン輸送タンパク質における動的構造変化の解析

連絡先: 〒 920-1192 石川県金沢市角間町

E-mail: rshibata@staff.kanazawa-u.ac.jp

bR の高速 AFM ムービー

URL: http://www.s.kanazawa-u.ac.jp/phys/biophys/bR_movies.htm