

原子間力顕微鏡の紹介とその応用

京都大学大学院薬学研究科
松本 治、高井伝仕、碓谷佳代、亀甲達彦、辻本豪三

Introduction and Applications of Atomic Force Microscopy

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
Osamu Matsumoto, Denshi Takai, Kayo Togiya, Tatsuhiko Kikko, and Gozoh Tsujimoto

タンパク3000プロジェクトの下、包括的な蛋白質の構造解析が進行しているが、大量発現系構築と結晶化がその大きな障壁になっており、構造決定出来ないものも少なからず出てくると思われる。そのとき、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)による構造研究はその点で三つのメリットがあると思われる。1)必要とするサンプル量が少なくて済む。2)単分子直接観察なので、結晶化のような特別なサンプル調製の必要がない。3)原理は単純で、操作は光学顕微鏡のレベルでX線解析ほど難しい。

AFMの分解能は、現在のところX線解析とは比べようもないが、とりあえず、インタクトな状態での1分子観察が出来るので、X線解析技術を補う便利なツールであると考えている。

はじめに

2003年は、DNA二重らせん構造発見から50年の節目にあたり、また、ヒューマン・ゲノム解析のまとめの年にも当たっている[1, 2]。これらゲノム情報は、創薬研究分野にも思わぬインパクトを与えた。それは、人間の遺伝子の総数が3万にも満たず、すべての蛋白質の一次構造が明らかになってしまったことだ。創薬のターゲットである蛋白質の個数は有限個であるために、その蛋白質について誰かが網羅的に特許を抑えれば、他者には永久にチャンスがなくなる。そのため、世界中の製薬会社が大同団結し、あたかも、帝国主義時代の植民地争奪戦のような状況を呈している。おそらく、その影響を多分に受けていると思われるが、構造生物学の分野においても網羅的な立体構造解析プロジェクトが全世界的に進行している。

しかしながら、蛋白質や核酸など生体高分子のX線解析は図1(Proteome Structural Genomics pilot project (Brookhaven National Laboratory, The Rockefeller University and Albert Einstein College of Medicine; <http://proteome.bnl.gov/progress.html>)より改作)に示すように、イギリスのstructural genomicsのグループの報告[3]を待つまでも無く、目的の10%程度しか構造決定に至っていないのが現状かと思われる。逆に考えると、これから構造解析に挑戦される蛋白質のうち90%は構造決定不能のまま放置される可能性を意味する。

また、創薬研究の分野のターゲットとして最も注目を浴びているのは細胞内情報伝達系であろう。この系の解析は、今まではほんの少数の蛋白質間の相互作用のみをモニターするだけの単純な実験系で済んでいたが、研究が進行するにつれて、驚くべきたくさんの種類の蛋白質が関与していることが分かってきた。例えば、

核内レセプターに關与する蛋白質は50種以上にも上ると言われ、しかも、このことは核内レセプターにとどまらず、細胞内蛋白質のほとんど全部が何らかの複雑な超分子集合体を形成しているような雰囲気である。このような超分子複合体をそのままX線解析することは、かなり難しいと思われ、現在一つ一つの蛋白質を各個解析しそれらを組み合わせて全体像を想像してゆく地道な研究が進められている。しかしながら、G蛋白質受容体などでみられるように、リガンド結合により大幅に立体構造が変化するものもあり、その機能発現メカニズムを理解するには様々な条件での立体構造解析を包括的に行わねばならない。

このような状況に対して、筆者らは伝統的なX線

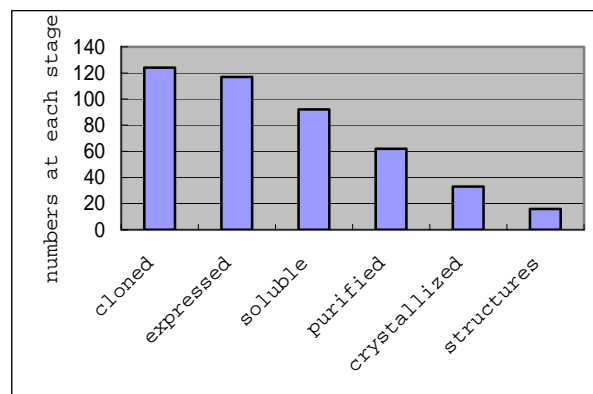


図1) クローンから構造に至る様々な段階におけるヒストグラム、文献[3]より改作

解析技術のみですべての蛋白質の構造解析にアプローチすることはもはや限界かと思われ、何らかの補助的なツールを模索してきた。

本稿では、ここ数年、取り組んできた原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy) について、報告したい。これは、X線解析や電子線解析に取って代わるほどの分解能は望めないが、独特のさまざまなメリットがあり補助的なツールとしてうまく使えばそれなりに役に立つと考えている。今までの経験の中からいくつかについて紹介したい。

方法

原子間力顕微鏡の全体図を図2に示す。右下の小さいのが顕微鏡本体である(日本ビーコ(株) / Digital Instruments 社、NanoScope IIIa)。操作は、我々のシステムでは MS-DOS のパソコンで行っている。大部分が自動化されているので、初心者でも大まかな生体高分子像であれば比較的簡単に観察することが出来る。図3にサンプル調製の概念図を示す。十分に精製したサンプル(図ではミオシン分子)を数ピコモルの濃度に希釈し、雲母表面に5-10マイクロリットル程度滴下する。雲母は珪素原子のハニカム構造が基本骨格を形成しており、そのパイ軌道が垂直方向に立つため、雲母表面は薄くマイナスの電荷を帯びている。そのため、サンプルが親水性のものであればたいい静電相互作用により吸着可能である。逆に筆者の経験では疎水的なサンプルはほとんど吸着しなかった。疎水的なサンプルに対する基盤は、熱分解黒鉛 HOPG (high Oriented Pyrolytic Graphite) が良好なようである。また、雲母は劈開性があるので、作業直前に新しい劈開面を創出すると原子のレベルでの平面性を確保することが出来るし、また、コンタミを防ぐことが出来る。もちろん、これらの作業はクリーンベンチ下で行う必要がある。さもないと、花粉の季節にサンプル調製を行ったとき、たくさん花粉が降り積もってきた。次に、バッファーに含まれる塩を除くため、また、十分に吸着出来なかったサンプルを除くために表面を超純水で十分に洗浄する。サンプルを乾燥させ気相中で観察する方が一般に分解能がよいので我々はそのようにしている。このとき洗浄が不十分であると、AFM のスケールでは巨大な塩の結晶がそびえ立ち、肝心のサンプルが埋没してしまう。最近では、液中観察が主流になってきているが、スキャナーが水に弱くすぐにだめになってしまうことや操作が結構大変で、しかも分解能が悪くなるので、筆者らはあまり試みていない。

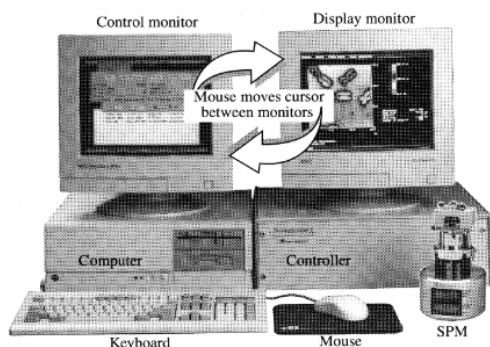


図2) AFMの構成図(日本ビーコ(株) / NanoScope IIIa マニュアルより)

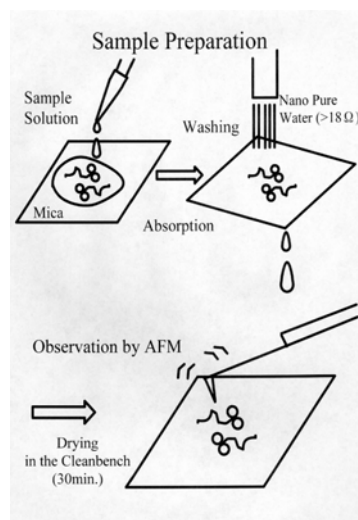


図3) サンプル調製の概念図

図4にプローブを示す。左がコンタクトモード用(兼、液中タッピングモード用)で、右がタッピングモード用である。我々は普通、気相中のタッピングモードで観察するので、主に、右のプローブを用いる。針の長さが約0.1ミリで表面が金でコートされている。図5にあるような光学系のもと、レーザー光を上部から照射すると針の先端に当たった光は反射し、さらにミラーでもう一度反射し、上下2分割のフォトマルへ移行する。このとき、上下双方の入射光の強度比が等しくなるように調整しておく。ここで、サンプルを動かすスキャナーについて言及したい。これはピエゾ素子で出来ているので、ある範囲で与えた電圧に比例した分だけ全体を伸ばした

り縮めたりすることが出来る。しかも、X、Y、Zの3方向独立に電圧をかけることが出来るのでナノメートルの単位でサンプルを3次的に自由に移動させることが出来る。これにより、図6に示す原理で測定が可能となる。基盤の位置にプローブが来たときをゼロに調整し、サンプルによって、プローブが上向いたとき、その分スキャナーを縮ませることにより、反射光をゼロの位置まで補正する。このときにかかった電圧を記録することで、その点における高さ情報を得ることが出来る。これを二次元にスキャンすることで、サンプルの形状を測定する。このとき、このコンタクトモードと呼ばれるプローブを引きずる方法で柔らかいサンプルをスキャンすると、たいいていのサンプルは表面に傷が付き、劣化してしまうため、そこで、サンプル表面をたたきながら、測定するタッピングモードと呼ばれる方法で観察する。観察時間は機種にもよるが1Hzのスキャン速度における512X512の解像度で約20分程度である。しかしながら、最後に改めて言及したいが、1フレームを10m secという高速で画像を撮影出来る高速AFMも開発されている[4]。

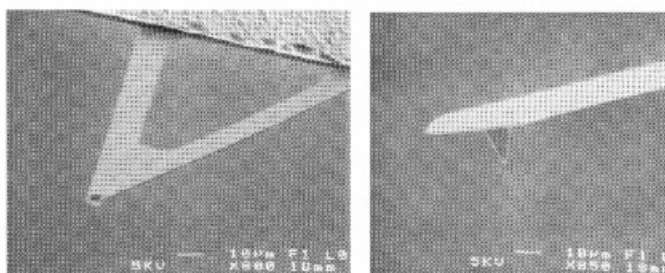


図4) プローブ(左 コンタクトモード用、右 タッピングモード用) (日本ビーコ(株)/Nanoscope IIIa マニュアルより)

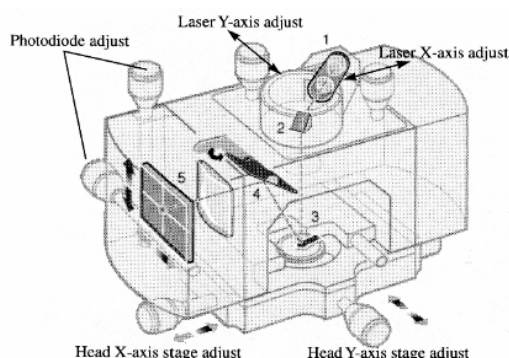


図5) 光学系 (日本ビーコ(株)/Nanoscope IIIa マニュアルより)

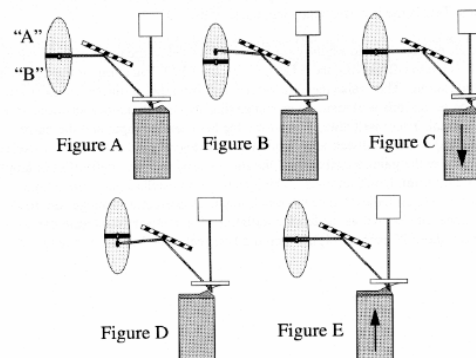


図6) 測定原理 (日本ビーコ(株)/Nanoscope IIIa マニュアルより)

ミオシン分子のMgATPによる分子運動について

ミオシンは筋肉収縮のための基本素子として古くから注目を浴びており、ヘッド部分について既に結晶解析も完了されている[5]。この詳細な解析結果より ATP 結合サイトすら明確に決められているが、分子モーターとしてどのように働くのかははっきりしなかった。そこで、我々はウサギ骨格筋より抽出したミオシンに対して、エネルギーとして MgATP を加えた場合、どのような構造変化をきたすかを検討した。図7に MgATP のない環境下でのミオシン分子のAFM画像を示す。同じサンプルを左が等高線を示す height mode で、右が amplitude mode(プローブを左から右へスキャンするとき分子にぶつかって針があがるときに、黒く、下がるときに白く描くとあたかも右から光が当たったかのように表現することになる。)で描いた画像である。マニュアル通りの操作で、容易に画像化することができた。2つの頭部と長いテールが明確に観察され、しかも、それぞれ非常にリラックスした状態になっている。よく見ると、テールはアルファヘリックスのコイルドコイルで

きているが、螺旋らしき模様も散見できる。一方、4mM MgATP の環境下での分子像を図 8 に示す。先ほどのものと比べ、頭部が屈曲し、2つの頭部の相対的な位置関係も様々なバリエーションを呈している。さらに興味深いことに、コイルドコイル構造の頑丈な構造がかなり急な角度で折れ曲がっている。また、全部の解析は済んでいないが、一次構造との比較によりその折れ曲がりの位置のほとんどプロリンが存在していた。おそらく、MgATP によりテールのコイルドコイルの構造が、何らかの機構でタイトな折れ曲がり構造を示していると考えている。これらは、雲母に吸着させた状態で観察しているため吸着時に何らかのアーティファクト性によりこのような差が生じたかもしれないと思い、次の実験を行った。ミオシン溶液を雲母に滴下し、すぐさま水で洗浄させると、瞬間的に吸着された分子のみ観察されるので、あたかも、ハエ取り紙にくっついたハエを見るかのように、溶液構造を強く反映した構造が見えるはずである。滴下後、1秒、15秒、30秒と吸着時間を変化させて観察させたものを図9に示す。図7のときより10倍濃い濃度のミオシン分子を吸着させた。15秒でほぼ、表面に全て吸着したらしく、30秒のものはほとんど変化が見られなかった。MgATP のない条件で観察したが、分子像は長い吸着時間のものとほぼ同じであったので、ミオシンと雲母の吸着はほぼ瞬間的に起こり、その構造は溶液構造を強く示唆するものとなっている[6]。この結果は、最近高速 AFM で撮影されたミオシン分子のアニメーションとほぼ同じであった[4]。

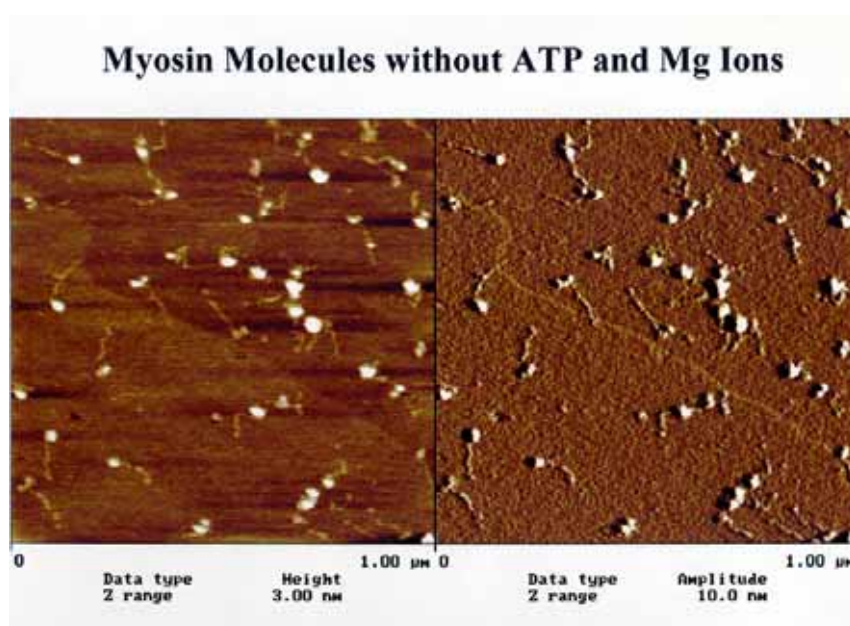


図 7) MgATP 非存在下のミオシン分子像

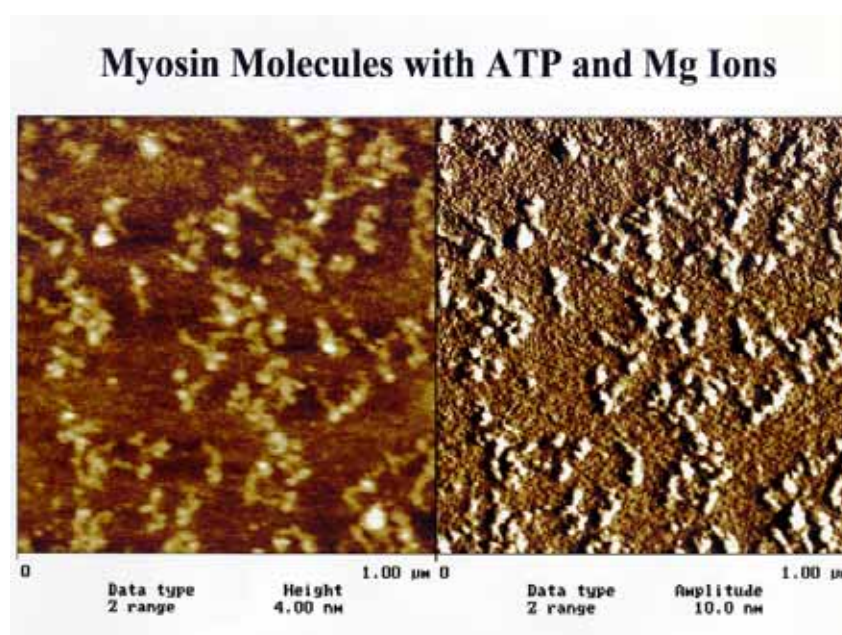
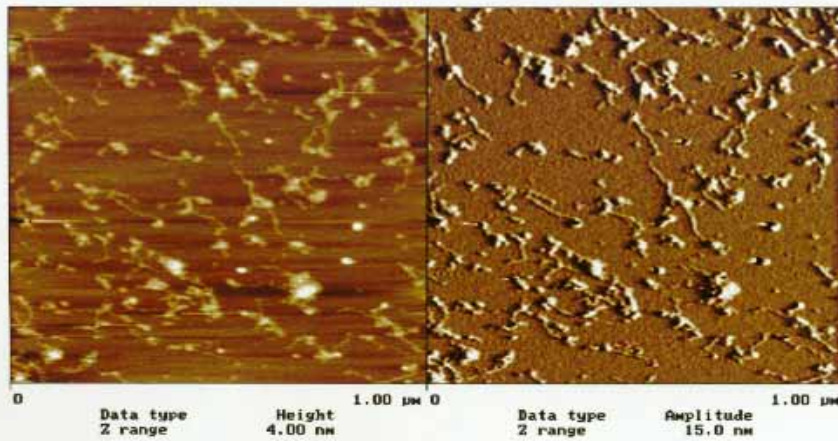


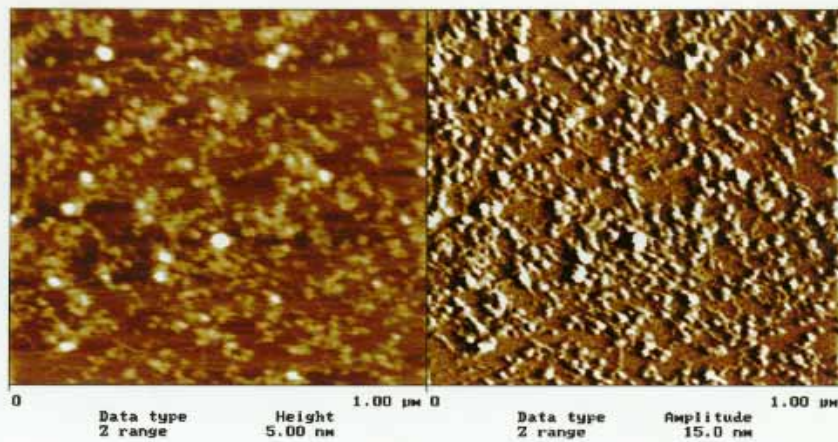
図 8) 4mM MgATP 存在下のミオシン分子像

Absorption Time Course

1sec.



15sec.



30sec.

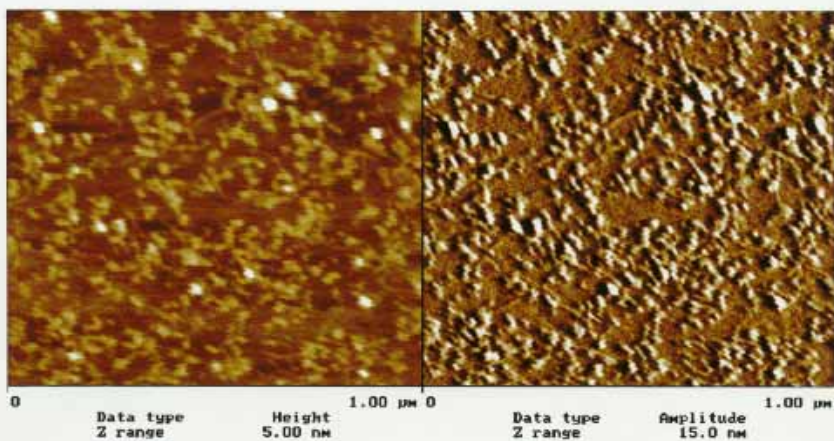


図9) ミオシン分子の雲母吸着に対する時間変化

プラスミドの陽イオン性リポソームによる縮退現象について

遺伝子治療は、目的のプラスミドを細胞内へ導入することが第一歩である。そのツールにいろいろと知られているが、陽イオン性リポソームを目的プラスミドと混合させることで、導入効率を引き上げることが広く用いられている。我々は、陽イオン性リポソームがプラスミドの構造にどのような影響を与えるのかを AFM で調べてみた[7,8,9]。

プラスミド(約4000 bp)はリン酸基によるチャージの反発でお互いが絡まりあわないように設計されている。そのため、図10に示すようなオープンな構造が多く見られた。しかしながら、雲母表面が薄い負電荷であるにも関わらず、簡単に DNA が吸着していた。また、DNA 濃度が非常に濃い場合、あたかもスパゲティを上から見たような画像が見え、その静電的な反発が構造にどの程度影響を与えているか、現在のところ、筆者らは混乱している。

加える陽イオン性リポソーム濃度を次第にあげてゆくと、図11のようなユニークな構造が見えた。これにより、濃度に依存して、かなり小さくまとめあげることができることが分かった。しかしながら、大変興味深いことは、取込み効率は必ずしも一番小さいものが良いわけではなかったことである。そのため、プラスミドの取込みには細胞膜のエンドサイトーシスか何か生物学的なメカニズムを暗示している。

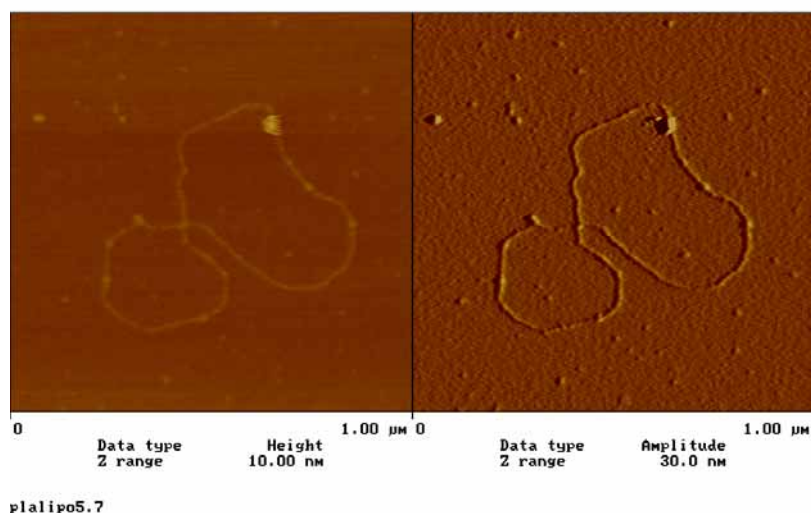


図 10) プラスミドの AFM 像

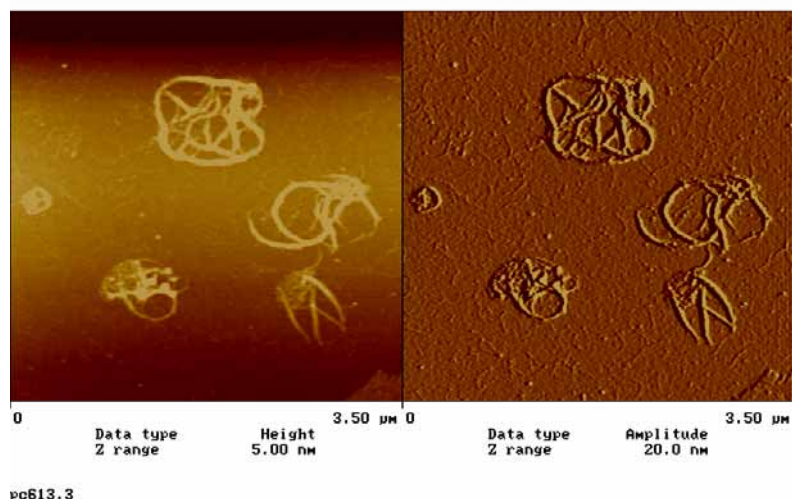


図 11) カチオン性リポソーム下のプラスミド

最後に

AFMを取り巻く環境は、金沢大学理学部の安藤らが開発した高速原子間力顕微鏡により、一変した[4]。ミオシン分子が液体中でMgATPをエネルギーとして生き生きと動き回っているところをアニメーションとして捉られている。このシステムと、我々が別途見いだした表面プラズモン共鳴のチップへのサンプル固定化方法とを組み合わせ、あたかも、犬に首輪をつけたかのように、分子を比較的自由に動いてもらって実際に働いている様子をアニメーションとして見てみたいと考えている。そうすることでいろいろな薬理活性を持つ酵素複合体に対して薬物を投与したときの立体構造変化や超分子複合体形成過程などがリアルタイムで見ることが出来るかもしれない。

(謝辞)ミオシンの研究において名古屋大学の谷口美恵子先生に、プラスミドの研究において京都大学の高倉喜信先生に、また、そのほかのたくさんの方々にお世話になりました。謹んで感謝いたします。

参考文献

- 1) Dreus, J. *et al.*, *SCIENCE*, **287**, 1960 (2000)
- 2) Venter, J. C. *et al.*, *SCIENCE*, **291**, 1304 (2001)
- 3) Chayen, N. E. & Saridakis, E. *Acta Cryst.*, **D58**, 921 (2002)
- 4) Ando, T., Kodera, N., Takai, E., Maruyama, D., Saito, K. & Toda, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12468 (2001)
- 5) Kollmar, M., Durrwang U., Kliche W., Manstein D. J. & Kull F. J. *EMBO J.* **21**, 2517 (2002)
- 6) Matsumoto, O., Nishino, Y., Okuda, A., Taga, T. & Taniguchi, M. *SCANNING*, **20**, 143 (1998)
- 7) Sakurai, F., Nishino, Y., Okuda, A., Matsumoto, O., Taga, T., Takakura, Y. and Hashida, M. *Nucleic Acids Symposium Series*, **39**, 73 (1998)
- 8) Sakurai, F., Inoue, R., Nishino, Y., Okuda, A., Matsumoto, O., Taga, T., Yamashita, F., Takakura, Y. and Hashida, M., *J. Control Release*, **66** 255-269 (2000)
- 9) Sakurai, F., Nishioka, T., Saito, H., Baba T., Okuda, A., Matsumoto, O., Taga, T., Yamashita, F., Takakura, Y., Hashida, M. *Gene Therapy*, **8**, 677 (2001)