

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570128

研究課題名(和文)1分子力学測定によるタンパク質の動的微細構造の探索

研究課題名(英文) Study of Dynamic Structures of Protein molecules by single molecule force spectroscopy

研究代表者

川上 勝 (KAWAKAMI, MASARU)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70452117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：原子間力顕微鏡を用いて、ポリペプチド鎖1分子の力学、粘弾性測定を行い、その動的構造と機能の相関について研究を行った。ポリグルタミン酸、ポリリジンなどでは、一分子力学測定からは、定まった構造をもたない、柔らかい構造を取っていることが分かり、一方で、ポリプロリン鎖では、これまでの予想どおり、他のポリペプチド鎖とは異なり、非常に硬い構造を取ることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We Studied the dynamic structures of various polypeptides at single molecule level using the technique of Atomic force microscopy. Single molecule force spectroscopy revealed that Polyglutamic acid, polylysine have very flexible structure, while polyproline has a very rigid, resilient structure.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、非常に数多くの生物学的、あるいは疾病に関して非常に重要なタンパク質が、単独ではほとんど安定な構造を持たないことが報告されている。これらタンパク質は天然変性タンパク質 (Intrinsically Disordered Protein: IDP と略) と呼ばれ、IDP の多くが重要な生物学的機能をもつこと、またアルツハイマーやパーキンソン病といったアミロイド病の原因物質であることから、その構造、機能とダイナミクスの解明が急がれている。しかし IDP は決まった構造を持たないこと、また従来の分光法で扱うタンパク質濃度では会合、凝集がおこってしまうため、その解析は困難であった。一方、蛍光や力学測定を通して「1分子」を観測対象とした研究が近年急速に発達してきた。申請者はこれまで、原子間力顕微鏡 (AFM) を応用し、カンチレバー先端部と基盤にタンパク質やポリマー 1 分子を固定して引っ張り、そのフォースカーブや、分子を捉えているカンチレバーの振動解析から、1分子のダイナミクス情報を得る研究を進めてきた。

これまで、タンパク質 (タイチン、protein L、GroES 7 量体、ミオグロビン、p53、ミオシン) や糖鎖 (デキストラン、セルロース)、ポリマー (PEG) などの 1 分子フォースカーブ測定、カンチレバー揺らぎの測定により、各分子の力学特性、粘弾性を決定し、そこから分子内にわずかに存在する構造、その構造変化の自由エネルギー曲線の決定に成功している。

2. 研究の目的

本研究では、この AFM による 1 分子力学測定を IDP の僅かな構造の検出に応用する。実際、我々は分子動力学シミュレーションの結果から、ポリペプチド鎖のフォースカーブや引っ張られた状態での揺らぎの信号が、構造 (ランダムコイルやヘリックス) と大きな相関が有る証拠を得ている (次項参照)。つまりフォースカーブや揺らぎ (粘弾性情報) の測定から、IDP の構造やダイナミクスを見積もることが可能であると期待される。

基本的な 1 分子力学測定装置、揺らぎ測定装置はこれまでの研究により、すでに完成しているため、装置開発の必要はない。本研究では、1 分子力学測定、およびカンチレバーの揺らぎ測定から、引っ張っている分子のフォースカーブ、および分子の粘弾性情報を抽出し、それらが分子の構造とどのような相関関係にあるのかを、アミノ酸配列が単純で、かつ他の分光法で構造 (特に二次構造) がよく知られた分子 (ポリペプチド) を対象として調べる。例として、溶液の pH によって

ヘリックス、ランダムコイル、シート、hydrophobic collapse を取るモデルペプチド鎖 (ポリリジンやポリグルタミン) を用いて AFM 実験を行い、2 次構造や collapse 構造を取ることでフォースカーブ、粘弾性がランダムコイルに比べてどのように変化するか、その関連について調べる。そのうち、シヌクレインや A など IDP を測定対象とし、同様の実験を行い、そのフォースカーブ形状や粘弾性の実測結果を、モデルペプチドの結果とを照らし合わせ、また MD の予測結果とも比較することで、IDP に含まれる微細 (と思われる) 構造の検出を目指す。こうして得られた IDP の構造の情報から、これまで検出できなかった構造が一体どの程度、どの配列部分に存在するのかを明らかにし、構造の有無と機能 (生物学的機能、凝集能、毒性) の相関を調べることで、IDP に関する新たな知見を得ることを目標とする。

3. 研究の方法

現有の AFM 装置と、申請者が開発した 1 分子力学測定システムを用い、ヘリックス、ランダムコイル、シート、hydrophobic collapse を取るモデルペプチド鎖 (ポリリジンやポリグルタミン) を用いて AFM 実験を行い、2 次構造や collapse 構造を取ることでフォースカーブがどう変化するか調べる。そのうち、シヌクレインや A など IDP に対して同様の実験を行い、実測結果を、モデルペプチドの結果とを照らし合わせ、また MD の予測結果とも比較し、IDP に含まれる微細 (と思われる) 構造の検出を目指す。こうして得られた IDP の構造の情報から、これまで検出できなかった構造が一体どの程度、どの配列部分に存在するのかを明らかにし、構造の有無と機能の相関を調べることで、IDP の機能に関する新たな知見を得る。

研究は大きく 3 つに分かれる。ひとつは 1 分子の力学応答を高感度で検出するための装置の開発であり、これには原子間力顕微鏡の改造、カンチレバー、基盤の改良が含まれる。

それと並行して、対象タンパク質、モデルペプチドの合成、精製、基盤への化学固定法の試行を開始する。

測定システム完成後、まずモデルペプチドであるホモポリペプチド、ランダムコイルなどの試料の 1 分子熱揺らぎスペクトルを測定する。

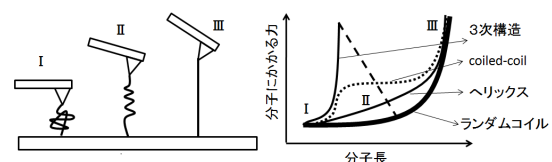


図 1. AFM による一分子力学測定概念図 (左) と得られる力学曲線の例 (右)。

4. 研究成果

図2に、本研究で開発されたモデルペプチドの一つであるポリプロリンの金表面への共有結合を介した固定法を示す。ポリプロリンの場合、側鎖が無く、反応性をもった官能基はC末端のカルボキシ基のみである。本手法では、金基板にあらかじめアミド基を持った分子のSAM（自己組織化単分子層）を作成しておき、このアミド基と、ポリプロリンC末端のカルボキシ基を、アミンカップリング反応を用いて結合させる方法を取った。

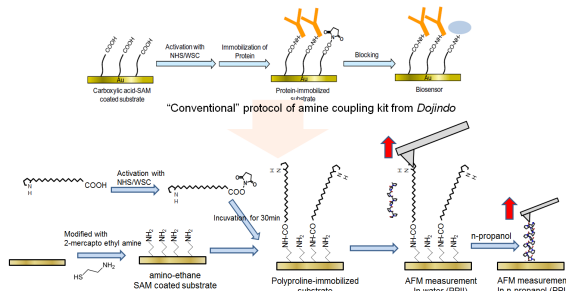


図2. ポリプロリン分子の金基板への固定法

その結果、単なる非特異性相互作用を利用した場合に比べて、共有結合による固定化を施した系では、AFMカンチレバーによって分子を引っ張ることのできる確率が圧倒的に向上することを確認できた。

同様に、モデルペプチドであるポリ-L-グルタミン酸、ポリリジンも金基板上に固定し、一分子力学測定を行った結果を図3に示す。ここで気付いたことは、ポリプロリンの力学曲線が、他に比べて有意にその傾きが大きい事、またその曲線が、伸長に沿って直線的に上昇することを見出した。

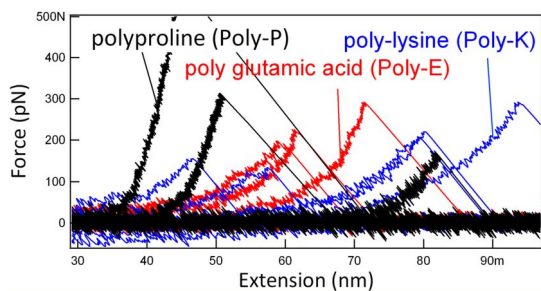


図3. 各モデルペプチドの1分子力学曲線。

ここで、ポリプロリンの構造を考えてみると、ポリプロリンは、水溶液中ではポリプロリンヘリックスIと呼ばれる、非常に特殊な構造を取ることが示唆されており、その形状に加えて、剛直性が有ることが示唆されている。実際にその剛直性を利用して、ポリプロリンの両端に蛍光プローブを修飾し、その蛍光エネルギー移動(FRET)効率から、分子の長さ(蛍光プローブ間距離)とFRETの効率の補正に用いられている。しかしこれまで、その力学強度の情報は得られていなかった。

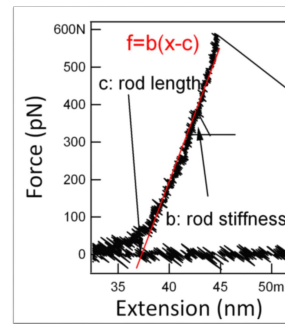


図4. ポリプロリンの力学曲線の解析図。

そこで得られたポリプロリンの力学曲線から、図4に示すように直線的な傾きと、その傾きが張力ゼロに外挿した際の伸長度(分子の長さ)を記録し、これをさまざまな長さの分子のデータに関して取り出し、プロットしたものを図5に示す。

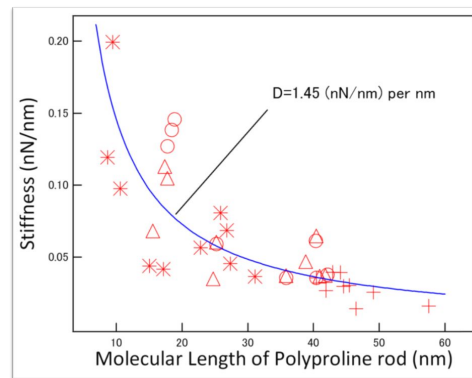


図5. 各分子の長さ、力学曲線の傾き(分子の弾性)のプロット図。

明らかに、ポリプロリン分子の長さとその弾性には反比例の関係が見られ、そのカーブフィッティングから、ポリプロリンの単位長さ辺りの弾性が1.5 nN/nmと見積もられた。ここでは述べないが、ポリプロリンは、有機溶媒中ではさらにコンパクトで固いポリプロリンIヘリックスの構造を取ることが示唆されている(直接的な力学測定は全く行われていない)。この系に対しても測定を行い、我々はヘリックスIの硬さを2.5 nN/nmと見積もることに成功した。

これらの弾性値は、他の構造を取らないポリペプチドや、ヘリックスやコイルドコイルをとる分子に比べて、ずっと大きく、立体構造を取るタンパク質の硬さに近い。すなわち、ポリプロリンは、単独で、高次構造に含まれた状態のポリペプチドと同等の硬さを持つことが分かった。

本結果は、これまでその構造は示唆されてきたが、実測することのできなかつた分子の型や構造に関する情報を定量的に得ることができたことを意味しており、ポリプロリンの構造と機能の関連を解明するために有用な情報を得たことを示している。

今後、他のモデルペプチドに対しても同様の測定を行い、ペプチドの構造と硬さの定量的な測定を行い、従来の手法では捕えることができなかった分子の動的な構造を、定量的に計測する手法を確立していきたい。

本研究期間内では、当初の予定であったIDP配列を持ったペプチドの測定には至らなかった。研究期間終了後も引き続きこれらIDPペプチドの測定を行い、それまでのモデルペプチドの一分子力学測定の結果を参考にし、これまで計測が不可能とされてきたIDPの構造とダイナミクス、そして昨日との相関を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1) KM. Tych, ML. Hughes, J. Bourke, Y. Taniguchi, M. Kawakami, DJ. Brockwell, L. Dougan, Optimizing the calculation of energy landscape parameters from single-molecule protein unfolding experiments. Phys Rev E 91, 012710 (2015), 査読有り

2) I. Popa, R. Berkovich, J. Alegre-Cebollada, C. L. Badilla, J. A. Rivas-Pardo, Y. Taniguchi, M. Kawakami and J. M. Fernandez, Nano-mechanics of HaloTag Tethers, J. Am. Chem. Soc. 135, 12762-12771 (2013), 査読有り

3) Y. Taniguchi and M. Kawakami*, Variation in the mechanical unfolding pathway of p53DBD induced by interaction with p53 N-terminal region of DNA, PLOS ONE 7, e49003 (2012), 査読有り

4) M. Kawakami*, A Soft and Transparent Handleable Protein Model, Rev. Sci. Instrum. 83, 084303 (2012), 査読有り

5) A. Ikeda-Kobayashi, Y. Taniguchi, D. J. Brockwell, E. Paci and M. Kawakami*, Prying open single GroES ring complexes by force reveals cooperativity across domains, Biophys. J. 102, 1961-1968 (2012), 査読有り

6) Y. Taniguchi, A. Kobayashi and M. Kawakami*, Mechanical Unfolding Studies of Protein Molecules, BIOPHYSICS, 8, 51-58 (2012), 査読有り

[学会発表](計 3 件)

1) M. Kawakami, "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates highly resilient structure of Polyproline helix" 日本生物物理学会. (2013/10/28-2013/10/30). 京都国際会館(京都府、京都市)

2) Masaru Kawakami: "Single molecule force spectroscopy by AFM indicates highly resilient structure of Polyproline helix" IMS Workshop. (2013/05/25-2013/05/26). 岡崎カンファレンスセンター(愛知県、岡崎市)

3) M. Kawakami, Mechanical Unfolding Pathways of Holo-myoglobin Explored by AFM-based Single Molecule Force Spectroscopy, Indo-Japan Joint Workshop on "Recent Advances in Spectroscopy and Microscopy: Fundamentals and Applications to Materials and Biology", (2012/11/20-2012/11/21) (Hyderabad, India)

[図書](計 2 件)

1) 川上 勝, 第 IV 編 結晶構造の実用編 6. 3D 印刷技術を用いた分子模型の作成, 杉山成監修, タンパク質結晶の最前線, (株)シーエムシー出版

2) 川上 勝, 第 4 章 1 分子計測 (4.1 及び 4.3 節), 寺島正秀編集, 揺らぎ・ダイナミクスと生体機能 - 物理化学的視点から見た生体分子 -, (株)化学同人 (2013), pp42-68

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 勝(Kawakami Masaru)

山形大学・理工学院研究科 准教授

研究者番号: 70452117

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし