

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：84502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770147

研究課題名(和文) 神経接合部の階層縦断的運動計測による情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Multiscale motion analysis of membrane proteins at neuromuscular junction

研究代表者

関口 博史 (SEKIGUCHI, Hiroshi)

公益財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・研究員

研究者番号：00401563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：情報伝達に関わる受容体の1分子内運動と集合体・並進的運動を時間スケール縦断的に計測する手法開拓を目指し、X線1分子追跡法(DXT)の高速化および高度化を行った。プローブとなる金ナノ結晶の良質化、小型化および機能化、そして高速カメラ・高速シャッター導入による計測システムの最適化に取り組み、高速測定(10 μ s/f)を実現し、アセチルコリン受容体がアゴニスト作用時にねじれ運動と傾き運動が活性化すること、アンタゴニスト作用時に不活性化することがわかった。また、量子ドットのDXTプローブとしての利用可能性を検討した。量子ドット蛍光による並進運動計測とDXT・分子内運動計測の同期プローブとして期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we engaged in developing the experimental technique to track internal motion and translational motion of membrane proteins at multi-time scale based on diffracted X-ray tracking method (DXT). In DXT, the internal motion of an individual single protein is monitored through the trajectory of the Laue spot from the nanocrystal labeled on the objective protein immobilized on the substrate surface. We improved a quality of the gold nanocrystal and optimized the experimental system to monitor ligand-induced motion of membrane protein, acetylcholine receptors, at several 10 micro seconds scale. Moreover, we examined a quantum dot as a DXT probe, that could be suited to track internal motion (DXT) and translational motion (fluorescence microscope) of membrane proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測 ナノ結晶 分子内運動 構造変化 揺らぎ

1. 研究開始当初の背景

隣接する神経細胞間の情報伝達は、主に神経伝達物質とその受容体である膜タンパク質を介して行われる。膜タンパク質の多くは複合体から構成され、各サブユニット間の協同的な構造変化を通して機能する一方で、分子の集合・離散といった分子集団としての局在を制御している。このような分子内運動と分子集団としての状態制御に関する相関的な情報は待望されているものの、分子内運動を精緻に観測する手法が整備されていないために十分な知見が得られていない。

本研究課題では、タンパク質分子内運動が高精度に観察可能な X 線 1 分子追跡法 (Diffracted X-ray Tracking: DXT) を基盤として、手法の高速化、高度化を行い、情報伝達に関わる分子として重要な受容体や、それらの分子で構成される集合体のダイナミクスを時間スケール縦断的に計測する実験手法を開拓する。

X 線 1 分子追跡法は、生体分子に標識した極微結晶を X 線回折によってモニターする方法で、1990 年後半に Sasaki らによって発案されて以降、光励起に伴うバクテリオロドプシンの分子内構造変化やカリウムイオンチャネル (KcsA) のイオン透過に伴う分子内構造変化を検出することに成功し、生理的機能と分子内構造変化を結びつける重要な知見を得ている。この手法は特に、分子内の極めて微小な回転運動 (0.006 度以下の精度) を観察することに適している。本研究課題提案者は 2009 年後半から DXT 法を用いた複合体タンパク質の分子内運動計測に従事し、DXT 法の膜タンパク質・研究への適用を実現するために、その高速化、高度化が必須あると考え、本課題の提案に至った。

2. 研究の目的

情報伝達に関わる分子として重要な受容体や、それらの分子で構成される集合体のダイナミクスをマイクロ秒から数秒といった時間スケール縦断的に計測する実験手法を開拓し、ミクロからマクロまでに至る一連の動的な挙動変化を定量・抽出することを目指す。本研究課題では X 線 1 分子追跡法の高速化および高度化に取り組み、情報伝達に重要な役割を果たすアセチルコリン受容体のリガンド受容に伴う内部運動計測を試みる。

3. 研究の方法

本研究では受容体・膜タンパク質のとりかかりとして、シビレエイ膜面分に高密度に存在するアセチルコリン受容体を対象として、DXT の高時間分解計測を行った。

高速測定を実現するために、エネルギー幅が広く、且つ高フラックスの X 線が照射可能な大型放射光施設 SPring-8 (BL40XU) にて測定を行い、入射 X 線はエネルギー幅 14.0 ~ 16.5 keV、15.2 keV にピークを持つように設定した (図 1 挿入グラフ)。高速 CMOS カメラ

と、X 線照射による試料損傷を最小限に抑えるための高速シャッターを導入した (図 1)。

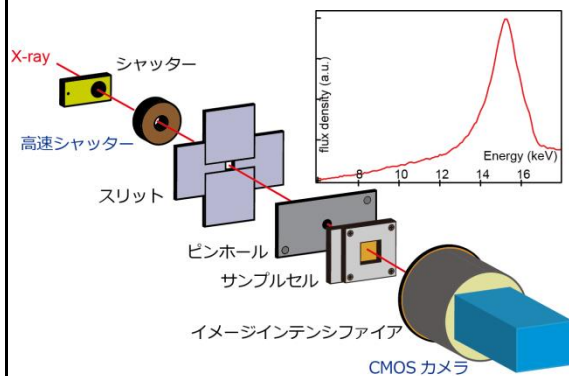


図 1: 高速 DXT 概要。測定はエネルギー幅が広く且つ高フラックスな X 線が照射可能な SPring-8 BL40XU にて行った

プローブとなる金ナノ結晶は、蒸着した金を KCl あるいは NaCl 単結晶基板上でエピタキシャル成長させて作製するが (Thin Solid Films 471, 91-95, 2005)、その蒸着量、蒸着速度、アニーリング温度などを最適化し、高速 DXT 測定可能で且つ小さなナノ結晶を作製した。また、市販されている金コロイド粒子、金ナノロッドや量子ドットを入手し、DXT 測定に適合するか試した。

アセチルコリン受容体のアゴニストおよびアンタゴニスト受容時の構造変化をモニターするために実験セル中にアセチルコリンおよびトキシン存在下、非存在下で測定を行い、運動の差異について解析した。解析に際し、回折斑点を追跡するプログラムと追跡したトレースから運動を評価する手法は自前で開発した。

4. 研究成果

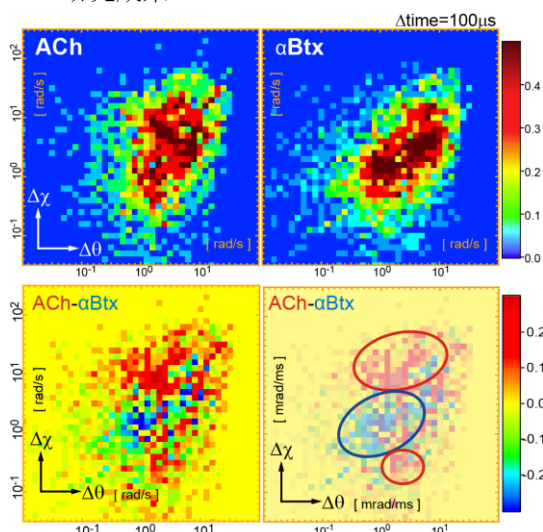


図 2: アセチルコリン受容体の二次元モーションマップ。X 軸に傾き運動、Y 軸にねじれ運動を示す。グラフ右上にいくほど運動速度は速くなる。アセチルコリン存在下 (ACh) とトキシン (α Btx) 存在下を比較して差分を取ること (ACh-α Btx)、ACh 受容時に 2 つの回転軸の運動が活性化されたことがわかった

本研究課題ではX線1分子追跡法のプローブとなる金ナノ結晶の良質化や高速カメラ・高速シャッターの導入によるX線1分子追跡法の実験システムの最適化に取り組み、アセチルコリン受容体のリガンド受容に伴う内部運動変化を高時間分解能で計測することに成功した(図2)。また、1分子内回転運動と同期して、分子の並進運動が観測可能なプローブについて検討した。各々の成果について箇条書きで以下に挙げる。

(1) 神経伝達に重要な役割を担っているアセチルコリン受容体(nAChR)を対象に、1分子高速測定($10\mu\text{s}/f \sim 100\mu\text{s}/f$)を行った。アセチルコリン受容体は、アゴニスト受容に伴って結合サイトのねじれ運動と傾き運動の2つの回転軸の運動が活性化されること、またアンタゴニストが作用することでこれらの運動が不活性化されることがわかった(図2)。これらの知見は、電子線結晶学による最新の知見(Unwin and Fujiyoshi, JMB 2012)と合致する(投稿中)。

(2) 金ナノ結晶の良質化、小型化を試みた。プローブとなる金ナノ結晶は、蒸着した金をKClあるいはNaCl単結晶基板上でエピタキシャル成長させて作製する(Thin Solid Films 471, 91-95, 2005)。蒸着速度やアニリング温度を最適化し、DXT高速測定可能な小さな粒径の金ナノ結晶の作製に成功した。図3に作成した金ナノ結晶のAFM評価図を示す。現状で粒径は20nm-80nmに分布する。今後、さらなる小型化に努める。

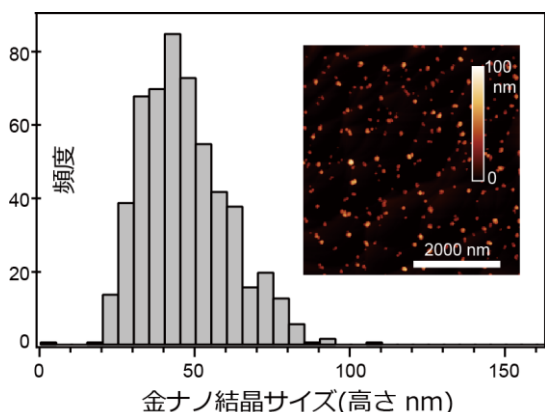


図3: AFMによる金ナノ結晶サイズ評価。

(3) X線1分子追跡法のプローブとなる金ナノ結晶の大きさ依存的な回転運動速度分布から、真の回転速度が見積もれることを示した。金ナノ結晶の小型化は試みているものの、小さいナノ結晶でも直径20nmと膜タンパク質分子の大きさに相当するほどに大きい。今回、観測される回折斑点を指標として大まかな金ナノ結晶サイズを算出し、運動速度のサイズ依存性を調べた(図4)。サイズが小さくなるに連れて観測される回転速度が速くなり、外挿することで元々の運動速度を見積もれる可能性が示せた。

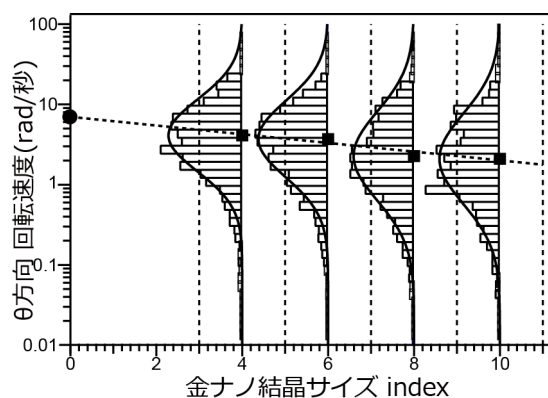


図4: 回転運動速度のナノ結晶サイズ依存性

(4) DXT動画解析の自動化に取り組み、効率よい解析が実現した。機能に密接に関係すると見込まれるS/Nが悪く速い運動については手でピックアップせざるをえない状況であるため、今後さらなる改良が必要である。また、DXTで観察可能な2つの回転軸の運動を可視化するために、図2に示すような二次元モーションマップで表現することを試みた。

(5) 金ナノ結晶表面のポリエチレングリコールや抗体などを化学修飾することで、その可溶化、機能化に取り組んだ。従来のX線1分子追跡法では、界面活性剤を用いて金ナノ結晶を可溶化していたが、脂質膜上で機能する膜タンパク質のダイナミクスを計測する上で問題であった。化学修飾する分子が大きいほど可溶化は容易になるが、目的とする分子内運動計測の妨げにもなりうるので注意が必要である。

(6) 市販されている量子ドットのDXTプローブとしての利用可能性を検討した。量子ドットの蛍光観察による並進運動計測とX線1分子追跡法による1分子内回転運動計測を同期して行えるプローブとして期待できる。

本研究で得られた成果の内容で、3D-AINAS 2012にてポスター賞を受賞した。またアメリカ生物物理学会・年会においてもインパクトが高い内容として2013年、2014年と2年連続で口頭発表にピックアップされた。アセチルコリン受容体のダイナミクス計測に関する研究内容は論文としてまとめ、現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① 佐々木裕次、一柳光平、関口博史、“X線回折動画からのタンパク質1分子内部動態計測”, PF News Vol. 31 No. 4 page 15-21 (2014), 査読なし

- ② H. Sekiguchi, A. Nakagawa, K. Moriya, K. Makabe, K. Ichianagi, S. Nozawa, T. Sato, S. Adachi, K. Kuwajima, M. Yohda and Y. C. Sasaki, “ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking”, PLoS ONE 8:e64176 (2013), 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

- ① H. Sekiguchi, M. Tokue, Y. Nishino, K. Ichianagi, N. Yagi, A. Miyazawa, T. Kubo, Y. C. Sasaki, “Single Molecule Motion Maps of Open and Desensitization States of Nicotinic Acetylcholine Receptors” 58th Annual Meeting of Biophysical Society (February 15-19, 2014, Moscone Center, San Francisco, USA)
- ② H. Sekiguchi, Y. Yamamoto, A. Nakagawa, K. Moriya, M. Arita, K. Ichianagi, M. Yohda, N. Yagi and Y. C. Sasaki, “Cooperative Motion of a Multi-subunit Protein Visualized by X-ray Single Molecule Tracking”, 57th Annual Meeting of Biophysical Society (February 2-6, 2013, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA)
- ③ M. Tokue, K. Hoshisashi, H. Sekiguchi, N. Yagi, K. Ichianagi, Y. Nishino, A. Miyazawa, T. Kubo, Y. C. Sasaki, “3D Micro-second X-ray Single Molecule Tracking of Nicotinic Acetylcholine Receptor with Picometer Accuracy”, 57th Annual Meeting of Biophysical Society (February 2-6, 2013, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA)
- ④ 関口博史, 山本陽平, 有田真優乃, 一柳光平, 野澤俊介, 佐藤篤志, 足立伸一, 養王田正文, 八木直人, 佐々木裕次, 「タンパク質複合体・協同的運動の1分子解析」, 第26回放射光学会年会(2013年1月12-15日, 名古屋大学)
- ⑤ 関口博史, 「高速X線1分子追跡法による複合体タンパク質・ダイナミクス計測」, 京都府立大学生命物理化学セミナー「蛋白質の動的挙動解明に向けた革新的分析手法」(2012年11月3日, キャンパスプラザ京都第一会議室, 京都市)
- ⑥ 関口博史, 山本陽平, 有田真優乃, 西野有里, 宮澤淳夫, 養王田正文, 八木直人, 佐々木裕次, 「複合体タンパク質・分子内運動の高速1分子計測」, 新学術領域「揺らぎと生体機能」「水和とATP」合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」, (2012年9月14-15日 大阪ガーデンパレス)
- ⑦ H. Sekiguchi, Y. Yamamoto, M. Ariga, Y.

Nishino, K. Ichianagi, N. Yagi, A. Miyazawa, M. Yohda, Y. C. Sasaki, “Cooperativity analysis of multi-subunit proteins by 3D X-ray single molecule tracking”, International workshop on 3D atomic imaging at nano-scale active sites in materials (3D-AINAS 2012) (August 6-8, 2012, Media hall in Kashiwa library, University of Tokyo, Chiba, JAPAN)

[図書] (計 0 件)

[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

<http://researchmap.jp/hisekiguchi/>

3D-AINAS 2012, Best Poster Awards, H. Sekiguchi “Cooperativity analysis of multi-subunit proteins by 3D X-ray single molecule tracking”

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口 博史 (SEKIGUCHI, Hiroshi)
高輝度光科学研究センター・利用研究促進
部門・研究員
研究者番号: 00401563

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし