

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19519

研究課題名(和文)糖鎖の合成と分解過程を可視化する高速AFM/一分子FRET技術の確立

研究課題名(英文) Development of high-speed AFM/single-molecule FRET to visualize synthesis and degradation of carbohydrate chain

研究代表者

内橋 貴之(Uchihashi, Takayuki)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：30326300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：高速AFM/全反射照明蛍光顕微鏡複合機にイメージスプリッティング光学系を組み込み、高速AFMと一分子FRETの同時計測が可能なシステムを開発した。糖鎖合成酵素K4CPと多糖分解酵素セルラーゼTrCel6Aの一分子FRET計測のための蛍光標識試料を調製し、糖鎖の伸張やセルラーゼの構造変化に伴うFRET効率の変化を計測することができ、同時観察用試料の調製法を確立した。これらの試料に対し、高速AFMと一分子FRETの同時観察を試みたが、様々な問題に直面し、期間内に成功には至らなかったが、現在、同時計測を可能にするための測定条件の確立を急いでおり、近い将来、同時計測が可能になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々のタンパク質の構造とそのダイナミクス計測は、タンパク質の機能発現のメカニズムの直接的理解を可能にすることから、生命現象を理解する上で必須である。高速原子間力顕微鏡と一分子FRET計測の融合は、両手法の欠点を補いタンパク質一分子のダイナミクスの詳細が定量的に解析できる。この手法でこれまで困難であった、タンパク質のダイナミクス現象を計測できるようになり、生命科学分野の発展に大きなインパクトを与える手法になると考えられる。本研究成果は、複合計測の実現可能性と萌芽を示すものであり、学術的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We have incorporated an image-splitting optical system into a combined high-speed AFM/ total-reflection fluorescent microscopy system which enables us to perform high-speed AFM imaging and single-molecule FRET simultaneously. We prepared the fluorescent labeling sample for single-molecule FRET measurements for bacterial chondroitin polymerase K4CP and glycoside hydrolase cellulase, TrCel6A, and succeeded in measuring changes of the FRET efficiently due to the extension of the chondroitin chain and the structural change of the cellulase. Although we tried to observe these molecule with the combined high-speed AFM and single-molecule FRET system, in the face of various problems, we have not reached the success within the period. However we are now establishing the optimum measurement conditions for the simultaneous observation and thus assume that we can gain novel insights about molecular mechanisms with detailed single-molecule analysis using the combined system.

研究分野：生物物理学

キーワード：高速原子間力顕微鏡 一分子FRET 複合計測 糖鎖合成酵素 多糖分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は細胞分化や免疫制御、神経活動といった様々な生命現象に関与していることから、核酸・タンパク質とならぶ第3の生命鎖とも呼ばれ、その生物学的重要性に鑑み近年活発な研究が進められてきた。糖鎖の生合成は糖転移酵素により触媒され、これまで生化学的手法による生成物の解析や X 線回折および NMR による構造解析などで鎖合成の機構について研究されてきたが、一分子レベルで酵素の構造ダイナミクスと糖鎖合成反応を計測する手法がなかったため、その分子機構は未だ明らかになっていない点が多い。コンドロイチンは N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) とグルクロン酸 (GlcA) の二糖の繰り返しによって構成される糖鎖で、糖転移酵素 K4CP により合成される。K4CP は 2 つのドメインから構成され、糖鎖合成は連続的ではなく各ドメインの活性部位間を糖鎖が拡散によって行き来するような非連続的な伸張反応を行っているとするモデルが提唱されてきた。しかしながら、K4CP 酵素のドメイン間にどのような構造変化が生じ、それが糖鎖の伸張とどのように共役しているのかは不明で、本当に非連続的な合成反応を行うのかについても決定的な証拠は得られていない。糖鎖合成の分子機構を完全に理解するには、従来の生化学・構造解析法に加えて、一分子計測アプローチで酵素の構造ダイナミクスと糖鎖の伸張を同時に観察することが極めて重要である。

また、糖鎖は非共有結合的に集合してセルロースのような難分解性の結晶を形成し、植物細胞壁成分などで地球上に大量に存在するためにバイオマスとしての利用価値が大きい。セルロースは多糖加水分解酵素であるセルラーゼによって二糖単位で加水分解され、セルロース上を連続的に移動しながら加水分解することが明らかにされている。セルラーゼによる結晶性多糖の加水分解は、素過程として、1. セルロース単分子鎖の結晶表面からの引き剥がし (脱結晶化)、2. 触媒トンネルへの取り込み、3. 結合の加水分解、4. 生成二糖の解離、を含む。しかしながら、これらの素過程のうちどれが反応の律速過程なのかは明らかになっていない。さらに、1. の脱結晶化がどのように引き起こされるのかは全く分かっていない。これらを明らかにするには、加水分解反応の素過程と構造変化を一分子レベルで同時に計測するアプローチが必須であった。

2. 研究の目的

高速 AFM はタンパク質の並進運動や構造変化などのダイナミクスを溶液環境下で可視化できる手法であるが、空間分解能は 2-5nm 程度であり、タンパク質内部の微小な構造変化を定量的に検出することは困難である。一方、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) は、近接した 2 個の色素分子間 (ドナーとアクセプター) のエネルギー移動による色素分子の蛍光強度変化を検出する手法であり、観察対象分子の 2 カ所の位置を色素分子 (FRET プロブ) で標識することで、分子の構造変化に起因する色素間距離の変化を定量的に計測することができる。そこで、本研究ではこれら 2 つの一分子計測手法を融合し、高速 AFM と一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の同時計測可能なシステムを開発し、糖鎖合成と分解過程における酵素のダイナミクスを一分子レベルで解析できる基盤技術を確認することを目的としている。

3. 研究の方法

まず、高速 AFM と一分子 FRET の同時観察が可能なシステムを構築する。具体的には、これまで開発してきた高速 AFM / 全反射蛍光顕微鏡に、FRET 検出のために 2 色の蛍光を同時に計測できるようにイメージスプリッティング光学系を組み込むとともに、光学系と同時計測のための各種パラメーターの最適化を行なう。同時に、糖転移酵素 K4CP および糖加水分解酵素セルラーゼの FRET 計測のための蛍光標識の最適化を行なう。これら全てが成功した後、高速 AFM / 一分子 FRET 複合機により K4C 及びセルラーゼが機能している様子を高速 AFM で観察すると同時に、FRET 効率の計測を行い、機能動態の詳細を解析する。

4. 研究成果

以下に実施項目ごとの研究成果について述べる。

1. 高速 AFM / 一分子 FRET 複合システムの開発： 現行の高速 AFM / 全反射照明蛍光顕微鏡に、2 色蛍光を同時観察できるイメージスプリッティング光学系を組み込み、高速 AFM 観察と同時に 1 分子 FRET 観察が可能な複合機を開発した (図 1)。FRET 光学系システムを組み込んだ状態でも高速 AFM は問題なく動作し、また、FRET プロブ導入済みのセルラーゼ TrCel6A がセルロースに沿って連続運動する様子を観察し、複合機の動作確認を行った。



図 1: 高速 AFM / 一分子 FRET システム。

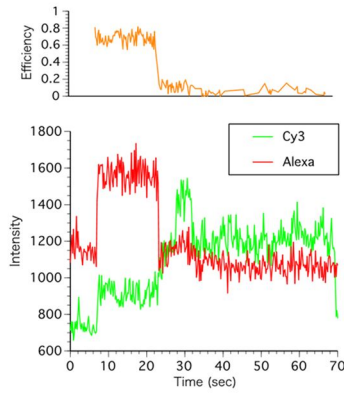


図 2: K4CP-Alexa647 と糖基質 CH4-Cy3 との FRET 検出.

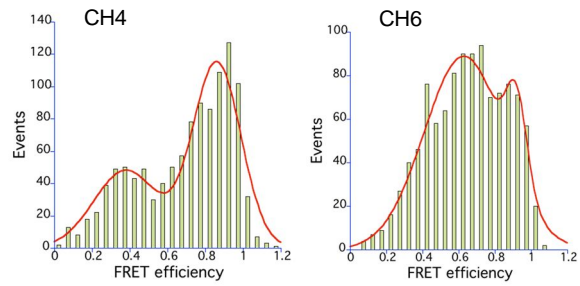


図 3: CH4-Cy3 (左) と CH6-Cy3 (右) の FRET 効率.

2. 糖転移酵素 K4CP および糖基質の蛍光標識 : K4CP はタンパク質表面に 3 つのシステイン残基を持つ。K4CP を Alexa647 で標識し、質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて調べたところ、Cys674 のみが Cy3 で標識されていることが分かった。また、K4CP-Alexa647 は酵素活性を維持していることも確認できた。次に、K4CP-Alexa647 で FRET が検出できるかどうかを 1 分子 FRET で確かめた結果、高濃度の K4CP-Alexa647 (10 nM) をガラス基板へ吸着させ、低濃度の糖基質 CH4-Cy3 (1 nM) を結合させる条件で FRET 信号を検出することが

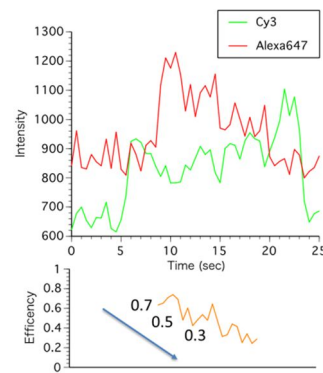


図 4: K4CP の段階的な FRET 効率の減少.

できた(図 2)。この場合、糖基質 CH4-Cy3 が K4CP-Alexa647 へ結合することで FRET が起こり、糖基質の解離により FRET が消失すると解釈できる。また、長さが異なる糖基質 CH6-Cy3 と比較すると、CH4 と CH6 の FRET 効率に違いが見られた。糖鎖が短い CH4 では FRET 効率 0.9 の分子が 64 % で、FRET 効率 0.4 の分子が 36 % であった。その一方、糖鎖が 2 糖ほど長い CH6 では FRET 効率 0.9 の分子が 10 % で、FRET 効率 0.6 の分子が 90 % であった (図 3)。K4CP の結晶構造を元に、糖基質 (CH4, CH6) の結合位置を推定すると、Cys674 との距離は CH4 の方が近い (CH4 では 1.04 nm, CH6 では 1.39 nm,) ことが分かり、この距離の違いが FRET 効率の違いを生じていると考えられる。さらに、K4CP-Alexa647 に糖基質 CH4-Cy3 を加え、単糖である UDP-GalNac と UDP-GlcA を加えると、段階的に FRET 効率が減少する分子が見られた(図 4)。

糖鎖の伸張に伴い K4CP-Alexa647 と CH4-Cy3 が離れ、FRET 効率が減少したと解釈できる。これらの結果から、K4CP の FRET 標識試料は完成し、糖鎖の成長を FRET 効率の変化から検出できることが確認できた。

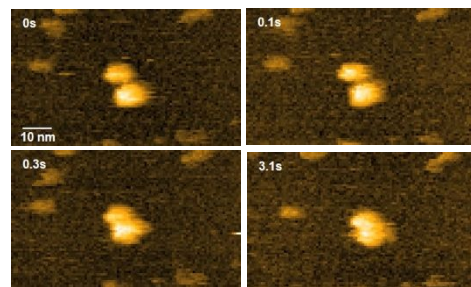


図 5: K4CP の高速 AFM 画像.

次に、高速 AFM/一分子 FRET 複合機での観察を試みた。高速 AFM 画像では K4CP の 2 つのドメインが近づいたり離れたりする様子を観察することができた (図 5)。

3. 糖鎖分解酵素セルラーゼ TrCel6A の蛍光標識 : セルラーゼ TrCel6A の触媒ドメインにある Ser386 とセルロース結合ドメインにある Thr19 にそれぞれシステイン残基を導入し、マレイミ

ド反応で蛍光色素を標識した。1分子 FRET 計測の結果、520 nm の励起光下 (Cy3 の励起波長) において Alexa647 の蛍光が観察されたので (図 6)、FRET を検出できたと考えられる。FRET 効率のデータを解析すると FRET 効率 0.7 (83%) と 1.0 (17%) の 2 種類が見出された (図 7)。また、FRET 効率は、セルロース結合ドメインと触媒ドメインが十分近い距離にある場合 (FRET

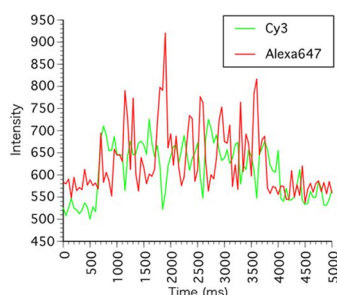


図 6: セルラーゼの基質結合ドメインと触媒ドメインを標識した蛍光色素間の FRET.

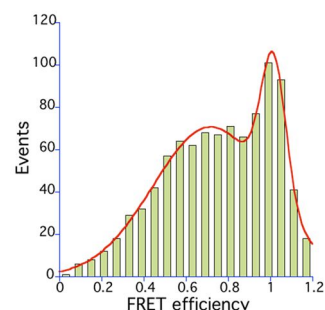


図 7: セルラーゼにおける FRET 効率の 2 相分布

効率 1.0) は分布がシャープになる一方、2つのドメイン間の距離が長い場合 (FRET 効率 0.7) は、広く分散した分布が得られた。これは TrCel6A のセルロースへの結合様式がいくつも存在していることを示唆している。

高速 AFM/1 分子 FRET 複合機で同時観察を試みたが、セルロースに結合する TrCel6A を頻度よく観察することが困難であった。FRET を検出する実験条件 (~pM) では TrCel6A の濃度が低く、高速 AFM で頻度よく観察することが困難で、その一方で、高速 AFM で観察できる濃度では、FRET を検出するには濃いという問題があった。

本研究課題の実施により、高速 AFM と一分子 FRET の複合装置の開発に成功し、また、高速 AFM/一分子 FRET のための分子への蛍光標識の条件もかなり詰めることができた。現時点では、未だ同時測定に最適な基板や測定条件を見出すことはできていないが、期間終了後も継続して実験をすすめることで、近い将来可能になると期待している。本研究課題で開発した装置はタンパク質の機能発現機構の解明の手法として大きな潜在力を有しており、一分子ダイナミクス計測の新規計測手法の開発の観点から萌芽的研究の目的は十分達せられたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. A. Nakamura, T. Tasaki, Y. Okuni, C. Song, K. Murata, T. Kozai, M. Hara, H. Sugimoto, K. Suzuki, T. Watanabe, T. Uchihashi, H. Noji and R. Iino, "Rate constants, processivity, and productive binding ratio of chitinase A revealed by single-molecule analysis", *PCCP* **20**, pp. 3010-3018 (2018).
2. T. Uchihashi and S. Scheuring, "Review: Applications of high-speed atomic force microscopy to real-time visualization of dynamic biomolecular processes", *BBA Gen. Sub.* **1862**, pp. 229-240 (2018).
3. T. Uchihashi, Y. Watanabe *et al.*, "Dynamic structural states of ClpB involved in its disaggregation function", *Nat. Commun.* **9**, 2147 (2018).
4. T. Uchihashi, H. Watanabe and N. Kodera, "Optimum Substrates for Imaging Biological Molecules with High-Speed Atomic Force Microscopy", *Meth. Mol. Biol.* **1814**, 15-179 (2018).
5. T. Umakoshi, S. Fukuda, R. Iino, T. Uchihashi, T. Ando, "High-speed near-field fluorescence microscopy combined with high-speed atomic force microscopy for biological studies", *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* (in press).

[学会発表] (計 9 件)

1. T. Uchihashi, "Connection between AFM data and computational simulation - image processing for quantitative analysis and demands from the experimental side -", Trends in Computational Molecular Biophysics Workshop (Kanazawa, 2018).
2. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscopy for direct visualization of biological macromolecules at work", The 79th Okazaki Conference "Synthetic, Biological, and Hybrid Molecular Engines", (Okazaki, 2018).
3. T. Uchihashi, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Visualization and Manipulation of Biological and Artificial Molecules", SPMonSPM 2018 (Leuven, Belgium, 2018).
4. T. Uchihashi, "Imaging and Manipulation of Biological Molecules with High-Speed Atomic Force Microscopy", ICN-T 2018 (Brno, Czech Republic, 2018).
5. T. Uchihashi, "High-Speed Atomic Force Microscopy for Visualization of Dynamic Processes in Biological and Artificial Supramolecules", ISPM 2018 (Tempe, USA, 2018).

6. T. Uchihashi, "Direct observation of self-assembly process of biological and artificial fibrils using high-speed atomic force microscopy", Interhierarchical understanding of materials and life through molecular observation (Okazaki, 2018).
7. T. Uchihashi, "High-speed atomic force microscopy: A tool for visualizing dynamic behavior from proteins to cells", The 28th 2017 International Symposium on Micro-NanoMechanical and Human Science (Nagoya, 2017).
8. T. Uchihashi, "Visualization of Single-Molecule Dynamics Using High-Speed Atomic Force Microscopy", The 2nd Korea-Japan Joint Symposium on Single-Molecule Biophysics 2017 (Seul, Korea, 2017).
9. T. Uchihashi, "Direct observation of single molecule dynamics at work with high-speed atomic force microscopy", Frontier in Single Molecule Biophysics 2017 (Neve Ilan, Israel. 2017).

[図書] (計 2 件)

1. 内橋貴之, 実験医学増刊 Vol.36 No.20, 「生きてるものは全部観る！ イメージングの選び方・使い方 100」(原田慶恵, 永井健治 編): 第5章 走査型プローブ顕微鏡「原子間力顕微鏡・高速原子間力顕微鏡」, 羊土社, 2018年12月3日.
2. T. Uchihashi, "High-Speed Atomic Force Microcopy": pp. 263-267 in Compendium of Surface and Interface Analysis (The Surface Science Society of Japan, Eds), Springer (2018).

[その他]

ホームページ等

<http://d.phys.nagoya-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究分担者氏名：飯野 亮太

ローマ字氏名：RYOTA IINO

所属研究機関名：大学共同利用機関法人自然科学研究機構 分子科学研究所

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 70403003

(2)研究協力者

研究協力者氏名：矢木 宏和

ローマ字氏名：HIROKAZU YAGI

所属研究機関名：名古屋市立大学

職名：講師

研究者番号 (8 桁) : 70565423

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。