

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770148

研究課題名（和文）電気化学高速原子間力顕微鏡を用いたP型ATPaseの一分子反応解析

研究課題名（英文）Single molecule reaction analysis of P-types ATPase using electrochemical fast-scanning atomic force microscopy.

研究代表者

横川 雅俊（YOKOKAWA MASATOSHI）

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：50447885

研究成果の概要（和文）：

イオンポンプは、生体膜を隔ててイオンを輸送する膜タンパク質の一種であり、ATPを加水分解して得られる化学エネルギーを用い、濃度勾配に逆らってイオンを能動輸送する。近年、形質膜中でカチオン輸送を行うP型ATPaseの中の一つである筋小胞体カルシウムポンプ（SERCA）の結晶構造解析が進み、ダイナミックな構造変化を伴うイオン輸送の実体が明らかにされつつある。

本研究では、そうしたP型ATPaseの反応動態を一分子レベル・リアルタイムスケールで解析し、その分子反応機構に迫ることを目的に、液中高速原子間力顕微鏡を利用した実験・観察系の構築を行った。これにより、ATP依存的に上下に構造変化をくり返すSERCA及び細胞膜ナトリウムポンプの様子をダイレクトに捉えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Ion pumps transport specific cationic ion across the biomembrane against a concentration gradient through the energy obtained from ATP hydrolysis. Recent progresses in crystallographic study of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA), which is one of the best-characterized P-type ATPases, allow us to discuss the transport mechanisms involving dynamical structural changes of P-type ATPases.

In this study, we constructed a novel method to analyze molecular reaction of P-type ATPase at a single molecular level and real time scale using a newly developed fast-scanning atomic force microscopy. Using the system, we succeeded to observe single molecule of SERCA and plasma membrane sodium pump act as a pumping machine by direct detection of their repeatedly up-and-down conformational changes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：P型ATPase・SERCA・ Na^+ -Pump・高速AFM・一分子解析

1. 研究開始当初の背景

イオンポンプは、生体膜を隔ててイオンを

輸送する膜タンパク質の一種であり、ATPを加水分解して得られる化学エネルギーを用い、濃度勾配に逆らってイオンを能動輸送する。これらの機能は、生物が生きていく上で必須である。近年、形質膜中でカチオン輸送を行うP型ATPaseの中の一つである筋小胞体カルシウムポンプ(SERCA)の結晶構造解析が進み、ダイナミックな構造変化を伴うイオン輸送の実体が明らかにされつつある。その一方で、SERCA以外のP型ATPase分子に関しては研究が遅れている。特に、SERCAにはないサブユニット構造(α , β -subunit)を持つ細胞膜ナトリウムポンプでは、構造的側面からみた反応の全容はもとより、特徴である β -subunitの構造、イオン輸送過程における β -subunitの役割など、依然として不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、P型ATPaseの反応動態を一分子レベル・リアルタイムスケールで解析し、その分子反応機構に迫ることを目的に、高速原子間力顕微鏡観察及び電気生理学的解析を利用した新規実験観察系の構築を行う。これにより、一分子レベルでP型ATPase分子の動的構造機能解析が可能となり、ATPの化学エネルギーを利用したイオン輸送機構の分子レベルでの理解を目指す。

3. 研究の方法

P型ATPaseの一分子動態解析を困難たらしめている要因は、対象が高等動物の膜タンパク質であるため発現・精製が困難であり、変異体の研究が著しく制限されているという試料上の制約、反応速度(イオン輸送速度)が高速であるため(20-100 cycles/sec)蛍光顕微鏡を用いた実験手法では一分子レベルでその動態を追跡することが困難であるという測定上の制約、そして、極一部の膜タンパク質を除いて結晶化がなされておらず、その構造情報が不明である点が上げられる。こうした問題に対し、我々は、採取された試料を“直接見る”というシンプルなアプローチをとり、液中高速原子間力顕微鏡(高速AFM)を利用した生体分子反応の観察・解析方法の確立を試みてきた。具体的には、ナノメートルスケールの空間分解能・秒間40フレーム(>3000 Hz)の時間分解能で観察可能な高速AFMを用いて、シャペロニン分子の反応や、P型ATPaseがATP依存的に60-80サイクルで“首振り運動”をする様子を1分子レベル・リアルタイムに捉えることに成功している。これらの実験手法は、特殊な試料作製方法(突然変異体の作製や化学修飾)を必用とせず、少量の試料をもとに直接測定を行うことが可能であるため、精製・結晶化の困難な膜タンパク質試料の解析にも適している。ま

た、こうした1分子レベルでの生命現象の理解は、従来のマクロ的な計測では平均化されて見えなかった現象を直接とらえることが可能であり、生体分子の反応メカニズムや分子機能を解明していく上で有効な解析手法であると考えられる。

まず、既に確立されている精製手法に従い、ウサギ骨格筋筋小胞体(SERCAを多量に含む小胞)およびイヌ腎臓細胞膜 Na^+ -Pumpを多量に含む小胞の単離・精製を行った。さらに、界面活性剤Deoxycholate(DOC)で可溶可処理を施した試料も調整し、これらを測定試料とした。

ウサギ骨格筋筋小胞体に関しては、バッファー(75 mM MOPS-KOH, 150 mM KCl, 7.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM CaCl_2 , 0.5 mM EGTA, pH 7.0)で希釈し、タンパク質濃度50 ng/ μl に調整した。これを劈開し正常な表面を露出させた直径1 mmのマイカ基板上に2 μl 滴下し、30分間静置することで基板上への試料固定を行った(図1)。その後、余分なSR溶液をバッファーで洗い流し、高速AFMにより観察を行った。

高速AFM測定は、室温中(但し、試料周辺温度は、およそ40度)、上記バッファー中で行い、高速AFMの走査速度は1-5 frames/sec(1000 Hz)で行った。

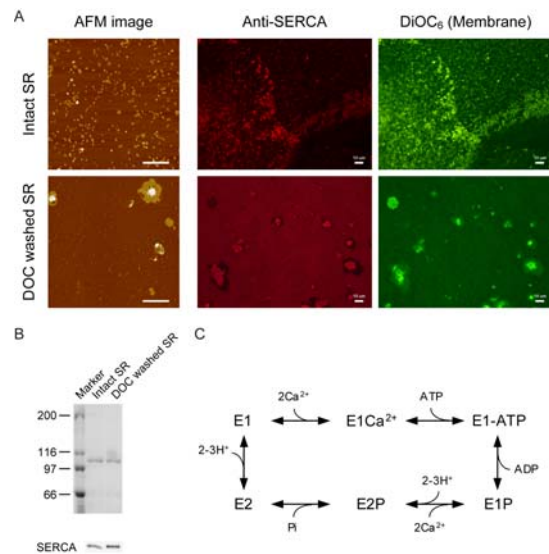


図1. 精製SR試料およびDOC可溶化SR試料。(A) 試料の大気中AFM像および免疫染色蛍光観察像。DOC可溶化処理後は、小胞が互いに融合し大きな膜状試料として存在している様子が確認された。その際、マイカ基板上の膜厚は5 nm程であり、1枚の脂質二重膜として基板上に固定化されている事が確認された。(B) CBB染色像。(C) SERCAの反応モデル(Post-Albers scheme)。

4. 研究成果

表面分析装置であるAFMを利用するには、

測定試料の基板上への固定化が必要不可欠である。本研究では、P型ATPaseを含む小胞試料（筋小胞体試料）のマイカ基板への固定化には、一切の化学的処理を施しておらず、静電的相互作用のみで行っている。これにより、SERCAの生理的な反応活性を損なうことなく、膜試料の固定化を実現し、さらに、SERCA分子の膜内の拡散運動を抑制することにも成功した。本実験環境化における、SERCAの二次元拡散係数は $0.4 \pm 0.2 \text{ nm}^2/\text{s}$ (mean \pm S.D.)であった。SERCA分子の存在は、AFMによる構造観察、免疫染色法による蛍光観察、および電気生理学的解析により確認した。

続いて、10 nM ATP および $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$ イオン存在下において、マイカ基板上に展開した筋小胞体（細胞質側）中のSERCA分子を高速AFMにより観察した結果を図2A上に、観察された構造のX軸・Y軸方向の断面を図2A下に示す。その結果、時間的に前後に存在する構造と比較して、明らかに高さ・形状の異なる構造（at 4 sec）が存在している事が明らかとなった。高さの差は、2-3 nm。構造上の特徴から、高さが低くY字状の構造がE1-Ca²⁺構造（カルシウム結合・ATP非結合型構造）で、高さの高い構造（elevated-form）はATP結合により誘起された構造（E1ATP, E1P, E2P, E2構造等）であると推定される。これを確認すべく、E1-Ca²⁺構造、及びE2構造の観察を行った。その結果、Ca²⁺イオン存在下・ATP

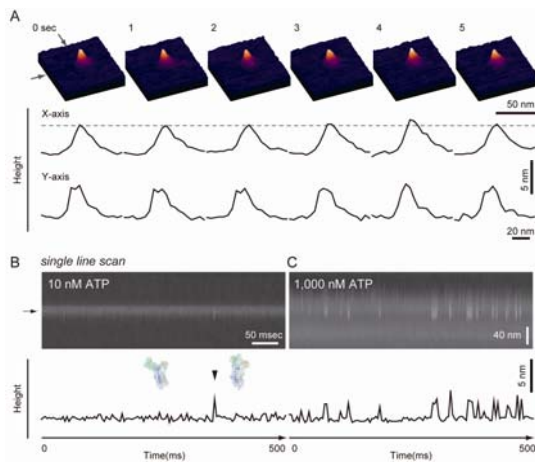


図2. 高速AFMによるSERCAの一分子反応観察。(A) Ca²⁺イオン、及び、ATP存在下におけるSERCA構造のタイムラプス像。下段にはそのX、Y軸方向の断面を示す。測定開始後から3-4秒目に、その前後とは明らかに高さ・形状の異なる構造が観察された。(B)、(C) Single-line-scan法によるmsec時間分解能でのSERCA構造の経時観察。下段にはその高さ方向の断面（横軸は時間）を示す。数msecオーダーで進行する反応が観察された。また、これらの反応がATP濃度依存的事実であることが確認された。

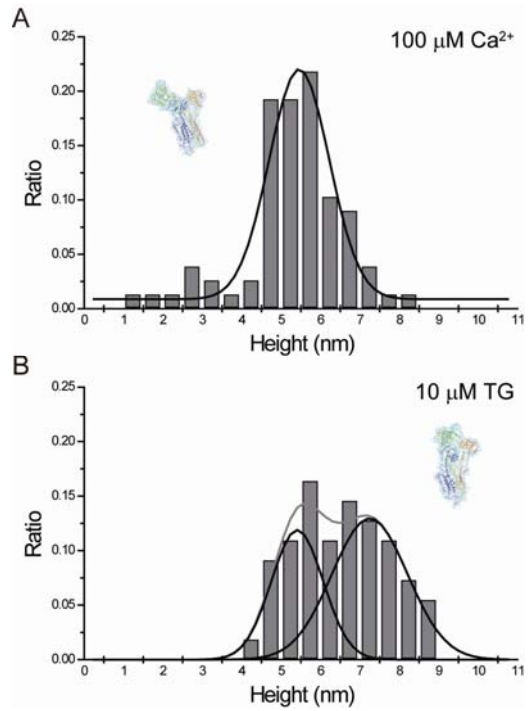


図3. SERCA細胞質ドメインの膜上高さの分布。(A) $100 \mu\text{M Ca}^{2+}$ イオン存在下・ATP非存在下における高さ分布。(B) 10 nM Ca^{2+} イオン存在下・ $10 \mu\text{M TG}$ 存在下における高さ分布。

非存在下においては、膜上から $5.4 \pm 0.8 \text{ nm}$ の高さを持つ構造が多数観察された（図3A）。これは、E1-Ca²⁺構造の高さに一致する。一方、E2類似構造を形成させる際に用いられるThapsigargin存在下においては、 $7.2 \pm 1.0 \text{ nm}$ と、E1-Ca²⁺構造よりも2 nm程高い構造をとる事が確認された（図3B）。

次に、より高い時間分解能で反応を捉える事を目的に、SERCAの高さ変化のみに着目し、その経時変化をとらえることを試みた（図2B：縦軸が高さ・横軸が時間軸（0-500ミリ秒）に相当）。その結果、数ミリ秒という非常に短い時間elevated-formを保ったのち、直ちに元の高さに戻るといった現象が繰り返して観察された。この現象は、ATP濃度に依存し、ATP濃度（0- $100 \mu\text{M ATP}$ ）の上昇に伴い上下運動の頻度が増えるという結果が得られた（図4A）。一方、カルシウムイオン濃度を下げていくと、elevated-formに留まる時間が長くなるという結果が得られた。これら反応上の特徴およびPost-Albers schemeとの対比から、図2Bにみられる1ピークがSERCA反応の1サイクルに相当すると考えられる。さらに、1 mM ATP存在下においては、高さ変化が殆どみられずelevated-formをとり続けるという興味深い結果が得られた（図4B）。これは、高濃度ATP存在下において、これまで着目してきたE1-Ca²⁺構造を経ない新しい反応過程を示唆するものである。

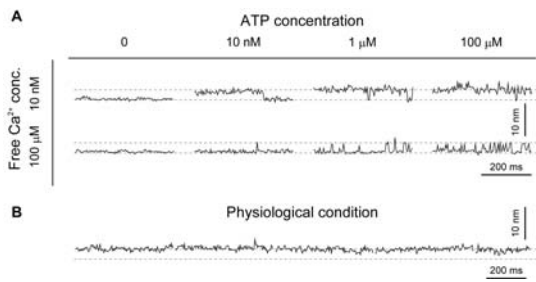


図 4. Single-line-scan 法による SERCA 反応の高時間分解能解析. (A) SERCA 構造変化の ATP 濃度、及び、Ca²⁺ イオン濃度依存性. ATP、及び、Ca²⁺ イオン濃度の増加に伴い、構造変化の頻度（スパイク状のシグナル）が増加する傾向が確認された. (B) 生理的条件下における SERCA 構造変化. 上記条件より更に高濃度の ATP 存在下 (1 mM ATP、及び、100 μM Ca²⁺ イオン存在下) においては、SERCA の顕著な構造変化が完全に消失した.

こうした、高速 AFM を用いた SERCA のリアルタイム一分子反応解析は、脂質二分子膜内における膜タンパク質の構造変化に着目した 1 分子解析法であり、SERCA 以外の P 型 ATPase、さらには他の膜タンパク質の反応解析にも応用することが可能である. 現在までに、SERCA とは異なるサブファミリーに属する P 型 ATPase の一例として、イヌ腎臓細胞膜 Na⁺-Pump の構造観察を進めており、その大きな特徴であるサブユニット構造をそれぞれ観察する事に成功している. さらに、細胞内に大きく突出した α-subunit に関しては、SERCA 同様の構造の首振り運動をしている様子が確認された.

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 3 件)

1. Sanchez H, Suzuki Y, Yokokawa M, Takeyasu K, Wyman C*. Protein-DNA interactions in high speed AFM: single molecule diffusion analysis of human RAD54. (2011) *Integr. Biol.* **3**(11), 1127-34 (査読有)
DOI: 10.1039/C1IB00039J
2. Yokokawa M, Takeyasu K. Motion of the Ca²⁺-pump captured. (2011) *FEBS J.* **278**(17), 3025-31 (査読有)
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08222.x
3. Yokokawa M, Carnally SM, Henderson RM, Takeyasu K, Edwardson JM. Acid-sensing ion channel (ASIC)1a undergoes a height transition in response to acidification. (2010) *FEBS Lett.* **584**(14), 3107-10 (査読有)
DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.050

[学会発表] (計 4 件)

1. Ikemoto K, Seki T, Kojima K, Sassa F,

Yokokawa M, Suzuki H, Coulometric detection of an analyte in a liquid plug using a one-electrode system, 第 28 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2011 年 9 月 26 日・タワーホール船堀 (東京)

2. Yokokawa M, Fujimoto F, Kitamura M, Yokokawa R, Kotera H, Dual Q-dot transport on microtubule array with polarity defined by nanotracks and microtubule motility control, The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, Jan, 26 2011・Cancun, Mexico.

3. Yokokawa M, Kitamura M, Yokokawa R, Kotera H, Polarity orientation of individual microtubules by nanochannels, 第 27 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2010 年 10 月 14 日・くにびきメッセ (松江)

4. 横川雅俊, 北邨益飛, 横川隆司, 小寺秀俊, マイクロ・ナノ構造を用いた微小管の個別極性配向と並列ナノ操作技術の確立, 第 21 回 化学とマイクロ・ナノシステム研究会 2010 年 6 月 10 日・東京大学

[図書] (計 3 件)

1. Yokokawa M, Itoh D, Suzuki H. Electrochemical microdevices. *Biochemical Sensors: Mimicking Olfactory and Gustatory Senses. In press.*
2. Yokokawa M, Itoh D, Suzuki H. Nanotechnology for highly sensitive detections. *Applications of Nanomaterials in Sensors and Diagnostics. In press.*
3. Suzuki Y, Yokokawa M, Yoshimura S, Takeyasu K. Biological Application of Fast-Scanning Atomic Force Microscopy. (2011) *Scanning Probe Microscopy in Nanoscience and Nanotechnology, part II* 217-246

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横川 雅俊 (YOKOKAWA MASATOSHI)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号: 50447885