

研究課題別評価書

1. 研究課題名

熱揺らぎを利用した粘弾性測定による1分子内部運動の解析

2. 氏名

川上 勝

3. 研究のねらい

生命現象の解明には、生体内で働いている分子、特にタンパク質分子の動的構造の研究が非常に重要となる。本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)技術を基礎とし、基盤に固定された生体1分子をAFMカンチレバーで捕らえ、分子を引っ張りつつ、カンチレバーの「熱揺らぎ」や、磁化されたカンチレバーへの振動磁場による強制振動によって分子を揺らし、レバーの振動スペクトルの解析から分子の応答を「粘弾性」という形で計測する技術開発を目的とする。さらに、粘弾性を理論的に解釈し、対象分子の動的物性、内部構造のダイナミクスの議論を可能とし、究極的には、生体分子の重要な生化学的機能とダイナミクス情報の関係について、独自にあたらしい知見を得ることを目指す。

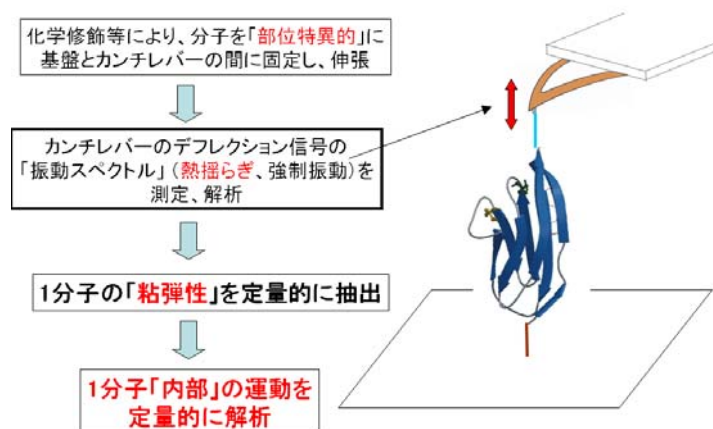


図1 AFMによる1分子ダイナミクス測定の様式図

4. 研究成果

1分子粘弾性測定装置の開発

本研究の基礎となる1分子粘弾性測定システムを構築した。システム概念図を図2に示す。AFM検出部は市販の装置を用い、新たに導入したコンピュータによりカンチレバーの歪み信号(デフレクション)と振動成分を記録する。デフレクションは分子に加えられている力として記録され、またフィードバック機能によりスキヤナを駆動することで、分子にかかる力をリアルタイムに制御し、任意の張力における粘弾性の測定を可能としている。熱揺らぎによる測定の場合は、AC成分は熱ノイズスペクトルとして高速で記録され、これをフーリエ変換してスペクトル密度関数(PSD)とし、1分子を調和振動子として扱った場合のPSD式を用いたフィッティングにより、カンチレバーおよび1分子の粘弾性の値を決定する。磁場によるカンチレバーの強制振動を用いる場合は、カンチレバーの振幅と位相をコンピュータで記録し、調和振動子モデルによる解析から、1分子粘弾性を決定する。本研究期間前半期で、装置の作製は終了し、1分子粘弾性を定量的に測定するシステムを完成させた。

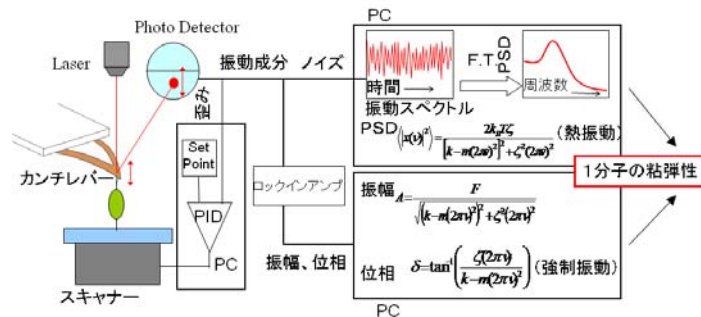


図2 1分子粘弾性測定用AFM装置の模式図

糖鎖(デキストランとセルロース)の粘弾性測定

生体分子の中でも構造が単純である糖鎖を対象として、デキストランとセルロースの各張力における粘弾性スペクトルを熱揺らぎ法により取得したところ、糖鎖の1分子粘弾性は分子の長さ に反比例することが分かった。弾性については、直列につながったバネの長さ と全体としてのバネ定数の関係からこれは予想された結果であるが、粘性についても同様の振る舞いが見られたことは新しい知見であった。1分子の粘性を考えると、対象とする1分子と、その周りの水分子との摩擦(粘性)が原因だとすると、粘性は分子の長さ(水分子との接触面積)に比例するはずであるが、実際には分子の長さ に反比例し、さらには、デキストラン分子については、ピラノース環のイス型—舟型のコンフォメーションの張力による構造転移を反映して粘性が大きく変化することを見出した(図3左)。これらのことから、本手法で計測している粘性は、分子「内部」の「摩擦」によるものであり、粘弾性は分子の構造転移を鋭敏に示す指標となることが分かった。さらに、ピラノース環の構造転移を持たない糖鎖であるセルロースの粘弾性スペクトルとの比較により、ピラノース環のイス型—舟型間の構造転移に関するエネルギー地形を詳細に決定することができた(図3右)。

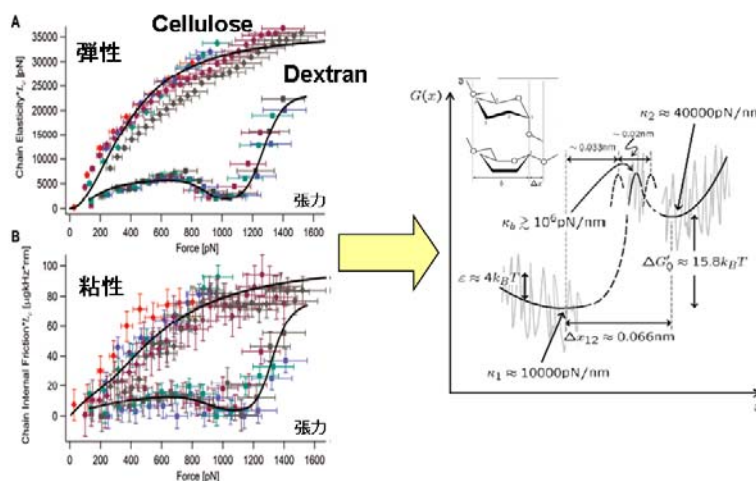


図3. セルロースとデキストランの1分子粘弾性スペクトルの解析から、ピラノース環のイス型—舟型間の構造転移に関するエネルギー地形を決定

ポリペプチド鎖 1分子の粘弾性測定

構造を持たないポリペプチド鎖を引っ張り、各張力における1分子粘弾性を熱揺らぎ法、強制振動法の双方の手法で測定し、その理論的解釈を試みた。その結果、ポリペプチド鎖の粘弾性は、分子内摩擦を持った worm-like-chain モデルを用いることで、実験結果をよく説明する

ことが出来た。セルロースとデキストランの例で分かるように、ある構造転移由来の粘弾性を抽出、議論するためには、構造を持たない分子の粘弾性を参照することが必要である。今回の結果から、タンパク質の構造の転移を議論するための参照分子として、構造を持たないポリペプチドの粘弾性の定量的測定とその理論的解釈を行うことが出来た。

ミオシン尾部構造の1分子粘弾性測定

2本のペプチド鎖が Coiled-coil 構造を取っているミオシンの尾部の1分子粘弾性測定を磁場強制振動法によって行った。その結果、デキストラン測定の際に見られたような、下に凸の粘弾性スペクトルが得られた(図4右)。これは内部構造転移の存在を示すものであり、この場合は明らかに Coiled-coil 構造の unfolding-refolding によるものである。転移前は、ミオシンは構造を持たないポリペプチド1本鎖、2本鎖よりもはるかに大きい粘弾性を示しており、転移後は、ポリペプチド1本鎖の粘弾性とほぼ一致することが分かる。これらの振る舞いはミオシン尾部の、モーター部で発生した力を伝達する機能と密接に関連していると考えられる。今後は、この unfolding-refolding 転移と、ポリペプチド鎖、さらに剛直な coiled-coil 構造の振る舞いを取り入れた理論モデルを構築して実測値を解析することで、coiled-coil 構造のフォールディングに関するエネルギー地形を詳細に求めることが可能になると期待される。もうひとつの興味深いこととして、転移後(図3右、 >0.15 nN)、ミオシンの粘性はポリペプチド一本鎖よりもわずかに大きい値を示していることが分かる。これは、coiled-coil 構造の崩壊後も、2本のポリペプチド鎖は絡み合っており、カンチレバーの振動により片方の一本鎖を揺らすことで、2本の鎖間の摩擦が起こり、これを1分子の粘性の増加分として検出している可能性がある。

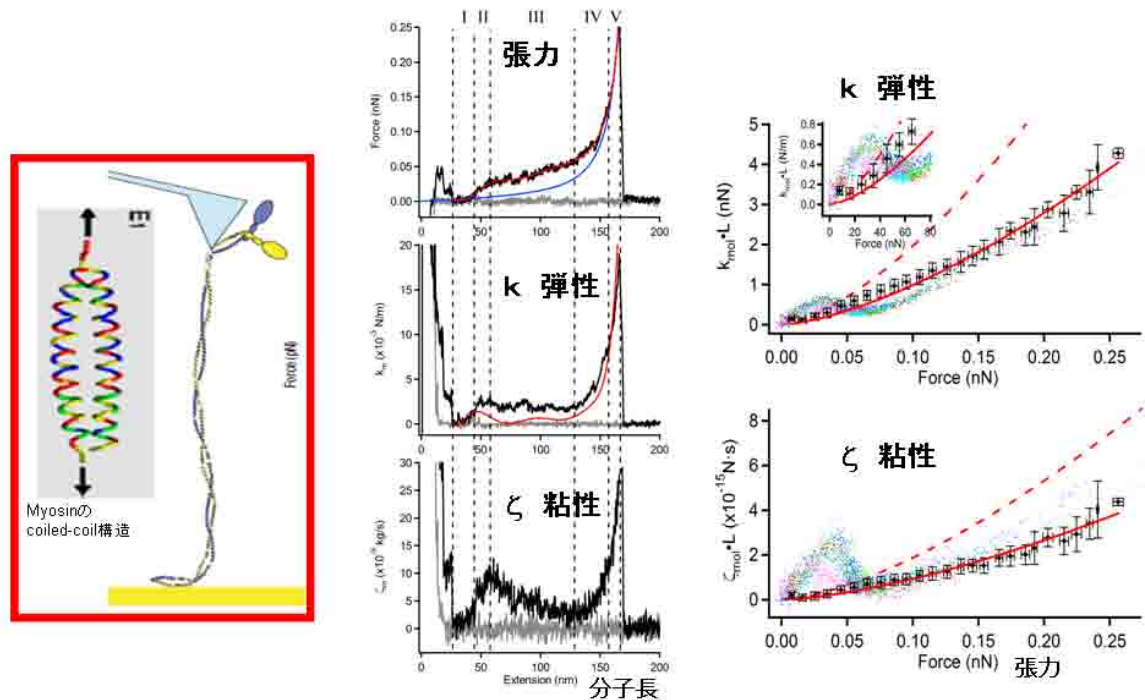


図4 (左)ミオシン尾部のAFM伸張実験の模式図。(中央)フォースカーブ、弾性、粘性の分子長依存性(右)ミオシンの1分子粘弾性スペクトル(dot)、ポリペプチド1本鎖の観測値(●)と1本鎖、2本鎖の理論曲線(赤実線、破線)

マイクロピラーを用いたAFMカンチレバーの粘性の低減と粘性、力感度の向上

次に2本のペプチド鎖が Coiled-coil 構造を取っているミオシンの尾部の1分子粘弾性測定を磁場強制振動法によって行った。その結果、デキストラン測定の際に見られたような、下に凸の粘弾性スペクトルが得られた(図4右)。これは内部構造転移の存在を示すものであり、この場合は明らかに Coiled-coil 構造の unfolding-refolding によるものである。転移前は、ミ

オシンは構造を持たないポリペプチド 1 本鎖、2 本鎖よりもはるかに大きい粘弾性を示しており、転移後は、ポリペプチド 1 本鎖の粘弾性とほぼ一致することが分かる。これらの振る舞いはミオシン尾部の、モーター部で発生した力を伝達する機能と密接に関連していると考えられる。今後は、この unfolding-refolding 転移と、ポリペプチド鎖、さらに剛直な coiled-coil 構造の振る舞いを取り入れた理論モデルを構築して実測値を解析することで、coiled-coil 構造のフォールディングに関するエネルギー地形を詳細に求めることが可能になると期待される。

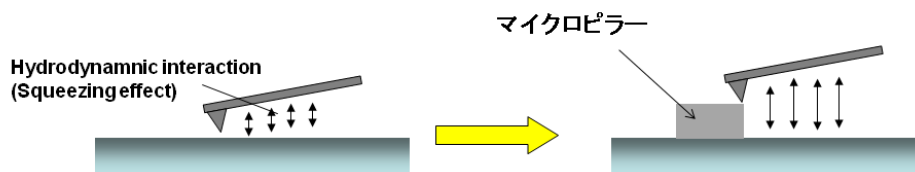


図5 マイクロピラー構造を持った基盤の使用によりカンチレバー自身の粘性の大幅な低減を実現。 →1分子粘性測定感度上昇が期待される。

5. 自己評価

当初の目標では、早い段階で1分子粘弾性測定システムを構築し、データを出すことを目標に掲げていたが、実際に研究開始から1年以内にシステムは完成し、安定して1分子粘弾性の測定を行うことに成功しており、装置開発の面ではほとんど目標をクリアできたと考える。AFMによる1分子力測定、粘弾性測定に関し、新しい測定法の提案や、粘性の大幅な低減をもたらす新手法の提案などについて論文発表(Nanotechnology (2008), Langmuir (2009))を行い、この分野に独自の貢献が出来たと評価する。

実際に得られた1分子の理論的解釈については、非常に単純な分子の粘弾性とダイナミクスの関連付けについては、国内外のポリマー理論研究者との議論を行い、学術雑誌上への論文発表(Biophys J (2007), Faraday Discussions (2008))という形で結果を出していると自己評価する。しかし、まだまだ酵素のような複雑なタンパク質分子における大きな構造変化を伴う内部運動については、粘弾性を一義的に関連付けるところまでには至っておらず、今後もデータ取得を重ね、議論を続けていくことが必要である。

また最大のテーマである、「生体機能に重要な機能と内部運動の関連について」の研究に関しては、目標とするタンパク質の調製に手間取り、さきがけ研究期間内に有用なデータを得て論文として公表できるまでには至らなかった。これは、さきがけ研究と同時に文字通りゼロからの研究室の立ち上げが必要であったこと、開始2年半の間は学外のレンタルラボ(貸しオフィス)という限られた研究環境であったことが多分に影響し、装置開発と同時に分子生物学という異なる分野の同時進行が非常に困難であることを痛感した。また、筋肉タンパク質ミオシンの粘弾性測定とその理論的解釈について、その成果をさきがけ期間中に論文を発表できなかったことが悔やまれる(現在 Biophys J に投稿中)。

現在は、新しい研究棟への移設も終了(2009年3月)し、整った研究環境を得て、精力的に新規タンパク質の調製と測定を行っており、研究の遅れを取り戻すよう努めている。今後2年の間には成果を論文としてまとめたい。

6. 研究総括の見解

AFMでポリペプチド1分子の粘弾性を観測出来る装置を作製したことは高く評価出来る。タンパク質機能と関連する微小変形領域での粘弾性の測定が望まれるが、一層の測定感度の向上に努めて欲しい。また、生体系への応用として可能性があるのか少しでも示して欲しい。

かった。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

• Y. Taniguchi, D. J. Brockwell, and M. Kawakami, The Effect of Temperature on Mechanical Resistance of the Native and Intermediate States of I27, *Biophysical Journal*, 95, 5296, 2008

• M. Kawakami and D.A. Smith, A new atomic force microscope force ramp technique using digital force feedback control reveals mechanically weak protein unfolding events, *Nanotechnology*, 19, 495704, 2008

• M. Kawakami, Y. Taniguchi, Y. Hiratsuka, M. Shimoike and D. A. Smith, Reduction of the damping on an AFM cantilever in fluid by the use of micro pillar stage, *Langmuir* 26, 1002, 2009

(2) 受賞

• AFM BioMed Conference Best Poster Presentation Award 受賞 (2008年10月)

(3) 著書

• Recent Advances in Single-Molecule Biophysics with the use of Atomic Force Microscopy, Masaru Kawakami and Yukinori Taniguchi, John Wiley & Sons Inc., 2010, Chapter 7

(4) 学会発表

学会発表(国際)

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Single Molecule dynamics studied with Atomic Force Microscopy: the effect of temperature on the energy landscape of mechanical unfolding of proteins MPSA 2008 (The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis), 2008/8/26

• Y. Taniguchi, M. Kawakami A single-molecule force spectroscopy study on the influence of temperature on the mechanical unfolding of proteins AFM Biomed Conference, 2008/10/15

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Temperature Effect on the Fluctuation of Titin I27 Domain: A Single-Molecule Force Spectroscopy Study with AFM Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions and Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules 2009/3/16

• M. Kawakami, Y. Taniguchi The Dynamic Force Spectroscopy with AFM Reveals the Internal Dynamics of Biomolecules at the Single Molecule Level Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions and Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules 2009/3/16

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Single-molecule viscoelasticity measurement of polysaccharides using the second vibration mode of cantilever XI International Scanning Probe Microscopy Conference, 2009/6/17

学会発表(国内)

•Masaru Kawakami, Katherine Byrne, Bhavin S. Khatri, David J. Brockwell, Tom C. B. Mcleish, Sheena E. Radford and D. Alastair Smith, "Single molecule dynamics of biomolecules studied by atomic force microscopy" 有機バイオ SPM 研究会 2007, 2007/08/27

•Quantitative detection of the fluctuation of proteins with AFM, Masaru Kawakami, 生物物理学会年会(シンポジウム講演), アスティ徳島, 2009/10/31

(6)招待講演

招待講演(国際)

•Recent advances in Single Molecule Dynamics of biomolecules With AFM., Masaru Kawakami and Yukinori Taniguchi, New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements: Experiments and Theories, Osaka Univ., 2008/12/08

•Exploring the energy landscape of single protein molecules by mechanical unfolding experiments, Masaru Kawakami, The 3rd International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nagoya Univ., 2009/12/20-21

招待講演(国内)

•原子間力顕微鏡による生体1分子の分子内ダイナミクス研究, 川上勝, 第122回物理化学セミナー, 大阪大学大学院理学研究科, 2006/12/23

•原子間力顕微鏡による一分子ダイナミクス, 川上勝, 文部科学省オープン・リサーチ・センター第2回生体分子システムの物理科学研究センター研究会, 関学・梅田キャンパス(梅田アプローズタワー), 2008/3/08

•原子間力顕微鏡による1分子生物物理学への挑戦, 川上勝、谷口幸範, 平成20年度日本顕微鏡学会 走査型プローブ顕微鏡分科会, 金沢 ITプラザ, 2009/01/29

•原子間力顕微鏡を用いた生体高分子の1分子ダイナミクスの研究, 川上勝、谷口幸範, 京都大学 非線形動力学コロキウム, 京都大学理学部5号館, 2009/04/22

•生体1分子の粘弾性測定, 川上勝, 167委員会, 大阪大学 銀杏会館, 2010/01/07

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

•B. S. Khatri, K. Byrne, M. Kawakami, D. J. Brockwell, D. A. Smith, S. E. Radford and T. C. B. McLeish, Internal friction of single polypeptide chains at high stretch, Faraday Discussions, 139, 35, 2008

•P. Sadler, E. Petrik, Y. Taniguchi, J. R. Pullen, M. Kawakami, S. E. Radford, D. Brockwell, Identification of a Mechanical Rheostat in the Hydrophobic Core of Protein L, Journal of Molecular Biology, 393, 237, 2009