

事後評価報告書

研究課題名：高速 AFM 法による膜タンパク質のダイナミクス計測

研究代表者名：

2-1. 日本側研究代表者：

内橋 貴之（金沢大学 大学院自然科学研究科 准教授）

2-2. 英国側研究代表者：

John Ryan（オックスフォード大学 物理学部／バイオナノテクノロジーIRC
教授）

総合評価：（優）

3. 研究交流実施内容及び成果：

本研究交流では、英国側の高解像度 AFM 技術と日本側の高速 AFM 技術を融合し、バクテリオロドプシンをモデル蛋白質として光刺激に対する構造変化や2次元結晶の動的変化を観察し、高時空間分解計測に基づく新しいバイオナノテクノロジー技術を開拓することを目的とする。

研究成果としては以下のものが挙げられる。

(1) 高速 AFM 装置の改良とバクテリオロドプシン (bR) の高分解能観察法の確立

高調波 (RF) 重畳技術を応用し、変位検出感度を 0.6 nmp-p 程度まで改善した。さらにオックスフォード大学で検討されてきたバッファ条件や AFM 観察のパラメータ（振動振幅、探針条件等）を適用するなどにより、bR 2次元結晶（紫膜）を明瞭に観察した。

(2) バクテリオロドプシンの膜内拡散過程の観察

高速 AFM の変位検出用レーザーパワーの調整を行うことで、2次元結晶を安定に観察可能とした。結晶端で bR 分子が激しく結合/解離を繰り返している様子を観察することができ、吸着・脱離過程は単一分子ではなく、ほとんどの場合に3量体の状態で起こることを示した。紫膜中の巨大欠陥中で3量体が脂質膜中を回転しながら水平移動している様子も観察した。拡散軌跡を解析し、拡散定数は結晶近傍では約 $10^{-5} \cdot \text{m}^2/\text{s}$ 、結晶端から離れた位置では約 $10^{-4} \cdot \text{m}^2/\text{s}$ であり、2種類の拡散挙動を示すことを明らかにした。日本側研究チームとしては、これら拡散定数は蛍光顕微鏡で観察される孤立した膜たんぱく質の拡散定数に比べると4桁近く小さな値であることから、本実験のような高濃度な状態では、周囲に存在する膜タンパク質との相互作用によって拡散が強く制限されていると考えている。

(3) 光吸収に伴う bR 構造変化と脱結晶化過程の観察

紫膜に緑色レーザーを照射し、19ms/frame の高速走査で分子を観察した。光照射時には1分子の輝点が約 1nm の間隔で2個に分裂している様子を観察した。ヒドロキシルアミン添加と光照射による bR 分子の退色に伴う紫膜の脱結晶化過程の観察にも成功し、脱結晶化が3量体の脱離とその点欠陥を起点とした結晶構造の崩壊により進行していくことを明らかにした。

(4) その他

確立した高速 AFM による膜タンパク質の高分解能観察技術を他の試料にも適用し、結晶構造が揺らいでいるため低速 AFM では観察できなかったハロロドプシンの高分解能観察に成功し、3 量体を基本ユニットとした六方晶構造をとっていることを明らかにした。さらにストレプトアビジン 2 次元結晶の観察にも適用し、結晶中の単欠陥のブラウン運動に異方性があることを示した。

研究成果の今後期待される効果であるが、本研究により高速 AFM では蛍光ラベルの必要が無く、かつ高濃度な条件でも個々の膜タンパク質分子の拡散過程を数百 ms の間隔で観察可能であることが実証され、様々な膜タンパク質への応用が期待できる。

従来、光吸収サイクルの構造解析に用いられてきた回折法や NMR 法では、低温状態でかつ高濃度な試料が必要であったが、高速 AFM ではより生理的条件に近い状態で構造変化を観察できると期待される。

今後の計画として、日本側研究チームは G タンパク質共役型受容体であるロドプシンの研究を進めていく計画を持っている。また、光サイクルが非常に遅く測定が容易であると思われる変異体での測定を計画しており、これにより光受容に対する構造変化を観察することで、従来法では知りえなかった光サイクルにおける構造変化の分子間協同性に関して知見が得られると期待している。

4. 事後評価結果

4-1. 総合評価

本研究課題は高速原子間力顕微鏡技術を持つ金沢大学グループと高分解能タンパク質観察技術を持つオックスフォード大学グループとの適切に焦点が絞られた誠にユニークな共同研究課題であり、当初の目標はほぼ達成された。相手先の若手研究者の来日・滞在も多く、日本の技術に相手側が興味を示していることが実感できる。共同研究が実質的であったことが伺われる。膜タンパク質のダイナミクス研究に新しい手法を提供することが期待出来る成果である。

研究期間内に、bR 以外の膜蛋白質についての成果が乏しい。申請ではチャンネル膜タンパク質についての詳細な研究計画が書かれており、また、GPCR ロドプシンについての研究が進まなかったが、今後の進展が期待出来る。

4-2. 研究交流の有効性

本研究の目標はオックスフォード大学が低速 AFM で培ってきた高分解能観察のノウハウを金沢大学に導入すると共に、高速 AFM の高感度化（空間分解能の向上）のための装置改良を進めることにより膜蛋白質のダイナミック計測法を確立することである。3 年間という短期間にもかかわらず、測定の間時間分解能は数分から数百ミリ秒まで向上し、変位検出感度 0.6 nm が達成された。この測定系をバクテリオロドプシンに適用し、脂質膜内で 3 量体を維持したまま拡散していることを実証した。さらに紫膜の巨大欠陥中で 3 量体

が脂質膜中を、孤立した膜タンパク質より4桁近く低い拡散係数で、回転しながら水平移動していることを明らかにすることができた。これらの成果はバクテリオロドプシンの生理機能の解明に大きな寄与をするだけではなく、この測定系の膜蛋白質ダイナミクス研究一般への応用の可能性を強く示唆する画期的な科学技術の進展といえる。しかし、ロドプシンの光受容サイクルにおける1分子の構造変化は時間分解能が不十分であるため観測に成功しなかった。3年間という短期間であるので、このことによってこの研究課題の評価が下がるとは考えられない。むしろ、今後の方針として光受容サイクルの遅い、突然変異体の研究が計画されているが、時間分解能を高めるための装置改良に対する意欲が示されていないことは残念なことである。

この研究期間中に博士後期課程大学院生が何度か相手国側機関を訪問し、相手国側機関からも頻繁に来訪者があった。したがって、同じようにAFMを利用した研究が推進されている研究室であっても、それぞれ手法や考え方に大きな差があることを深く認識する機会が与えられた。また、日本側研究グループの規模が小さいことのため、大学院生にとっては英国からの来訪者との交流の密度も高かったと推定される。これらは、当該大学院生の今後の研究者としての成長に大きく寄与すると考えられる。

本推進事業が端緒となって、金沢大とオックスフォード大のAFM技術を相補的に融合することを目指す共同研究が開始され、当初の目標はほぼ達成された。本推進事業で達成された技術によって可能な研究対象（例えば、突然変異バクテリオロドプシンの光受容に伴う構造変化の解析）を求めるならば、これ以上の研究交流の必要性はない。しかし、さらに装置改良と実験条件の改善によって空間時間分解能を高めて、より興味深い生命現象に取り組む意欲がある場合は、この事業を開始したことを好機会と捉えて、さらに長期的視野に基づく研究交流が推進されるであろう。

4-3. 当初目標の達成度

小規模な研究グループ間の交流であったが、どちらもAFMを利用した研究を推進していたこと、焦点の絞られた共同研究目標であったことのため、誠に適切な研究交流の実施体制が作られた。それは3年間に延180回の相互派遣が行われたことから明らかである。これにより、小規模研究グループ間の焦点の絞られた共同研究の有効性がこの事業によって具体的に明らかにされたともいえる。しかし、当初の計画に比べて実際に行うことができた研究が少なく、特にチャンネル膜タンパク質の研究はほとんど手がつけられていないようであるが今後期待したい。

相互派遣は上述の通り有効かつ適切に行われ、本事業の推進に大きく寄与した。一方、日本側研究グループが小規模であったためか、本事業の研究代表者の主催するシンポジウムは一度も開催されていない。しかし、本研究期間中に日英セミナー（Workshop of the UK-Japan Biotechnology Collaboration）が2度開催され、そこで本研究の成果は発表されているため、情報発信、外部評価の機会は十分にあったと判断出来る。