

論文内容の要旨

論文題目 Single-molecular unfolding of staphylococcal nuclease
studied by intermolecular force microscopy

(分子間力顕微鏡によるスタフィロコッカルヌクレアーゼ
1分子アンフォールディングの研究)

氏名 坂根 勲

これまでのタンパク質の折れ畳みの実験は、多数個のタンパク質分子を対象として、それらの平均値を測定する方法で行われてきた。この方法では、少数の折り畳み中間体や、不安定な折れ畳み中間体からの信号は、大多数の平均的な構造からの信号に埋もれてしまう。

この問題を解決するためには、1分子に対する測定が必要となる。この研究では、スタフィロコッカルヌクレアーゼ (SNase) 1分子を、分子間力顕微鏡によって力学的に伸長しアンフォールドさせる実験を行った。

分子間力顕微鏡

分子間力顕微鏡 (IMF) とは、分子内や分子間に働く微細な力を計測するために、原子間力顕微鏡 (AFM) に独自の改良を施した装置である。自作の極めて柔らかいカンチレバー (0.1 pN/nm) と、光の輻射圧を利用したカンチレバーの位置制御機構により、サブピコニュートンの力分解能とナノメートルの位置分解能での計測が可能となった。

従来の AFM では、カンチレバーの力とたわみを独立に制御できないために、余剰弾性力の問題が生じるが、フィードバック機構によりそれが回避できることを示した。

SNase

SNase は、149 残基から成る球状タンパク質であり、 α ヘリックスと β シートからなる。フォールディングの研究の対象として、これまで詳しく研究されてきた。

システインの持つチオール基は、金に化学吸着することが知られている。SNase を力学的に伸長するため、SNase の N 末端と C 末端にシステインを導入した変異体を作製した。この変異体は、ジスルフィド基を形成し、自己重合する能力も持っていたため、単量体から多量体までの様々な形態の SNase について計測することが可能であった。

金基板上での活性測定

金基板上に吸着した SNase が変性していないことを確認するため、金基板上に吸着した SNase の DNA 加水分解活性を測定した。SNase が吸着した金基板上に λ DNA の溶液を滴下し、 37°C で 24 時間反応させた。反応後の DNA 溶液をアガロースゲルで電気分解し、断片化した DNA の長さから活性を求めた。その結果、活性を持つ分子が $1\ \mu\text{m}^2$ あたり 1 つあると見積もられた。

金基板上の SNase の 1 分子イメージング

1 個のタンパク質を伸長することができるかを確認するため、Cy3 蛍光色素で標識した SNase を金基板上に吸着させ、その蛍光像を観察した。その結果、金基板上の SNase の間隔がおおよそ $1\ \mu\text{m}$ で有ることが分かった。IFM のプローブ先端の曲率半径は、大きく見積もっても $100\ \text{nm}$ であるから、一度に一つだけのタンパク質を伸長することが可能であることが確認された。

SNase の力学的アンフォールディング

フォースカーブの解析

分子を力学的に伸長することにより、伸長した長さと力の関係 (フォースカーブ) を得ることができる。IFM により単一の SNase 多量体分子を伸長した結果、図 1 に見られるような結果を得た。この図は、同一の多量体分子を (1),(2),(3) の順番にしたがって伸長・短縮・伸長した場合のフォースカーブである。(1) では、 $95\ \text{nm}$ のピークから $10\ \text{nm}$ 離れた所に $105\ \text{nm}$ の小さなピークが観察された。このピークは、考察の結果、SNase の C 末部分の α ヘリックスがアンフォールドした結果生じた物と同定された。

球状タンパク質の一部が力学的にアンフォールドする結果が得られたのは初めてのことである。また、この $105\ \text{nm}$ のピークは、同一のタンパク質に対する 2 回目の伸長である (3) では観察されなかった。これは、力学的アンフォールディング過程において、部分的なアンフォールド状態を経由する過程と、そういう過程を経ずに直接アンフォールドする過程の二つが有ることを示している。力学的アンフォールディングにおいて、二つのアンフォールド経路が示されたのは初めてのことである。

Ca²⁺ の影響

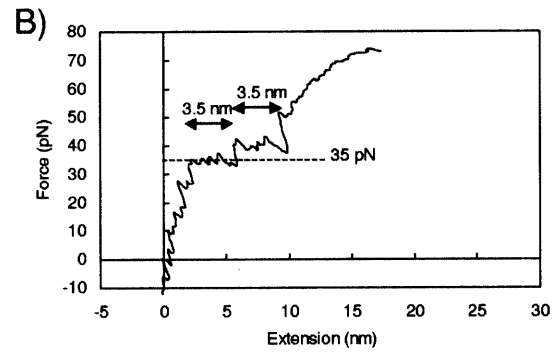
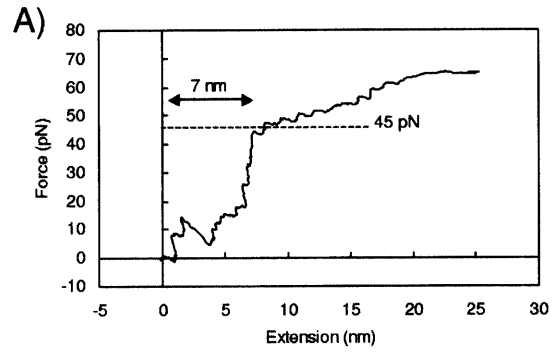
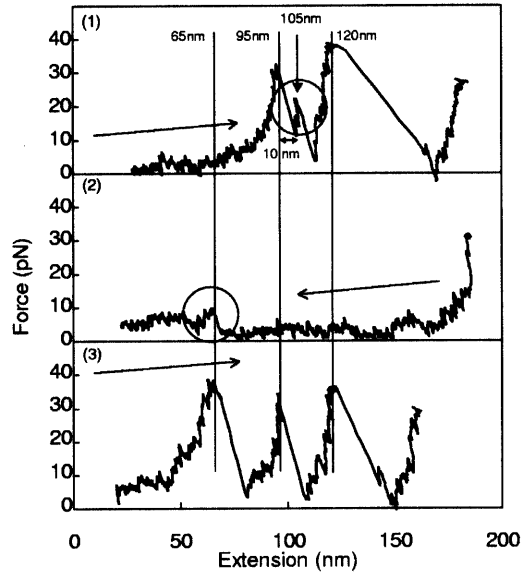
カルシウムイオン (Ca²⁺) や SNase の阻害因子である pdTp は、SNase と結合して、SNase を安定化することが知られている。そこで、Ca²⁺ が SNase の力学的伸長にどのような影響を与えるかを調べるため、Ca²⁺ が存在するもとで SNase の伸長実験を行った。その結果、多くの場合、SNase は IFM で計測できる力の範囲内では伸長せず、アンフォールドに強い力を必要とする安定な構造をとっている事が分かった。しかし、図 2 に見られるような特徴的なフォースカーブを示す結果も得られた。

統計的な処理

図 1 や図 2 のようなフォースカーブの特性を調べるため、個々のフォースカーブについて、そのピークに対応する伸長と力を統計的に処理した。その結果、図 3 に見られるような統計分布を得た。この分布は、(A) に示されているように、ピークとピーク間の距離について分布を取ったものである。その結果、Ca²⁺ が無い時、(B) の様な結果が得られた。部分的なアンフォールディングの結果として生じる距離差に対応したピークが (*1) や (*2) に見られた。Ca²⁺ が有る時の分布 (C) は 15 nm 付近にピークがあるだけで、Ca²⁺ が無いときと明確な差が生じた。

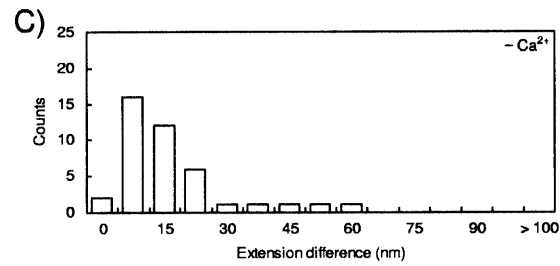
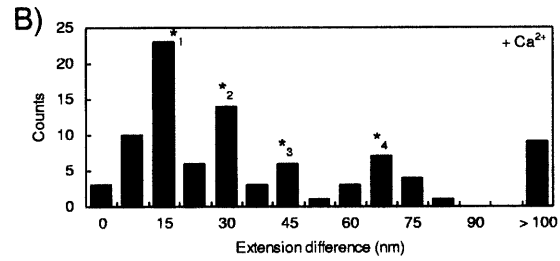
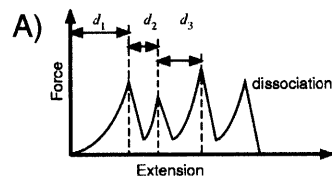
力学的アンフォールディング経路のモデル

実験で得られたフォースカーブ (図 1) や統計分布 (図 3) と、SNase の二次構造とを対応させて考察を行い、SNase の部分的なアンフォールドは、C 末の α ヘリックスがアンフォールドしたものと同定した。また、Ca²⁺ の結合ドメインが N 末側の β シートを中心とした部位に集中していることから、Ca²⁺ は主に β シート部分を強固にし、そのため、Ca²⁺ 存在下における分布図 3 (C) では、その部分のアンフォールディングに対応するピークが見られないと説明された。



☒ 1:

☒ 2:



☒ 3: