

GeoAFM シミュレーターの使用実績

金沢大学 内橋貴之

我々のグループでは、高速 AFM を用いて生理環境下にあるタンパク質の構造ダイナミクス観察を行っている。高速 AFM で基板に固定されたタンパク質を観察した場合、サイズが小さく特徴的な構造が見いだせない場合には、AFM 像が実際に目的タンパク質を観察しているかどうかを客観的に評価することが困難である。また、AFM 観察にはタンパク質を基板に固定するが、AFM 像のみから固定されたタンパク質の配向を知ることも困難なことが多い。タンパク質結晶構造の PDF ファイルから AFM 像を再構成できる GeoAFM シミュレーターは AFM 像の解釈を行う上で非常に強力なツールである。我々は、これまで GeoAFM シミュレーターを回転モーター F_1 -ATPase やキチン分解酵素キチナーゼの AFM 像シミュレーションに適用し成果を挙げている。^{1,2)} 以下に F_1 -ATase に適用した例について述べる。

F_1 -ATPase は ATP の加水分解エネルギーを利用してサブユニットを一方向に回転させる回転分子モーターである。 F_1 -ATPase は 7 個の主要なサブユニットから構成されており、3 個の α と β のサブユニットが交互に配置した六量体リングの中心穴に、シャフト状の γ サブユニットが突き刺さっている。ATP 存在下でこの γ サブユニットが反時計回りに回転し、この回転は、3 つの β サブユニットが順番に構造変化することによって駆動されていると考えられている。 β サブユニットの構造変化

を高速 AFM で観察するために γ サブユニットが無い $\alpha_3\beta_3$ 固定子リングのみの観察を行った。 $\alpha_3\beta_3$ リングを化学修飾したマイカに固定して、ATP 非存在下で高速 AFM 観察したところ、図 1(a),(b) に示すような 2 種類の特徴的な六量体リング構造が観察された。AFM 像と F_1 -ATPase の結晶構造を比較すると、(a) が C 末端側、(b) が N 末端側を観察していると考えられた。実際に、GeoAFM シミュレーターで ATP 非結合型の F_1 -ATPase の結晶構造から、 γ サブユニット部を取り除いた PDB ファイルから C 末と N 末側の AFM 像を再構すると、高速 AFM 像に非常によく似た像が得られた。高速 AFM で観察されたタンパク質の配向をより説得力のある形で示すことが出来る。また、C 末側のシミュレーション像で α サブユニットが β サブユニットより高く観察

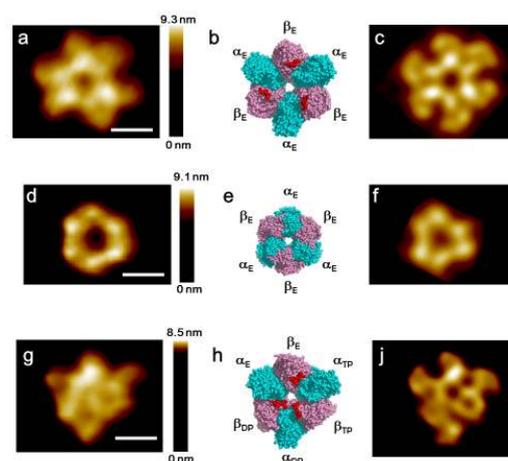


図1 AFM 像とシミュレーション像の比較(a), (d)は ATP 非存在下で観察される 2 種類の AFM 像。(c), (f) はそれぞれ結晶構造から GeoAFM により構成された F_1 -ATPase の C 末側と N 末側のシミュレーション像。(g)は ATP 存在下で観察される AFM 像。(j)は ATP 結合状態の結晶構造から再構成されたシミュレーション像。(b), (e), (f)はシミュレーションに使った結晶構造。

されることがわかり、これから高速 AFM 像で見られるサブユニットの配置を決定することが出来た。さらに、ATP 存在下では六量体リング構造の変化が見られ、2 個の β サブユニットが閉じた構造が観察された。ATP 結合型の結晶構造 PDB ファイルから C 末側の AFM 像を再構成したところ、このシミュレーション像も AFM 像に細部までよく一致し、高速 AFM により ATP 結合による β サブユニットの構造変化を観察していることが確認できた。このようにシミュレーション像と実際の AFM 像を比較することにより、AFM 像のコントラストがタンパク質のどのような構造に起因するのかを明瞭に知ることが出来る。また、GeoAFM では探針形状を自由に変えることができるので、探針サイズを変えたシミュレーション像と AFM 像を比較することで、観察時の探針のサイズも推定することが出来る (図 2)。これから、図 1 で示す AFM 像が得られた際の探針半径はおおよそ 0.5nm 程度であると考えられた。

我々が最初にこの高速 AFM 像を発表した際には、結晶解析を専門とする研究者からは AFM で観察された構造変化は、 F_1 -ATPase の結晶構造から推定される構造変化に比べて大きすぎるとの疑義があがった。しかしながら、シミュレーション像を示すことによりこの疑義は簡単に払拭され AFM 像が信頼される一助となった。このように GeoAFM シミュレーターは AFM でタンパク質のどこを見ているかを一目瞭然に示すことが出来ることから、AFM ユーザーがデータの解釈をする際に強力な武器となる。我々の研究室でも高速 AFM 像で得られた像が本当に目的とするタンパク質を観察しているのか、あるいは想定される基板への吸着をしているのか、などの確認に日常的に使用している。今後、ますます機能改良により使いやすいシミュレーターの開発を期待している。

参考文献

- 1) T. Uchihashi, R. Iino, T. Ando, and H. Noji, "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F_1 -ATPase, *Science* 333, 755-758 (2011).
- 2) K. Igarashi, T. Uchihashi, T. Uchiyama, H. Sugimoto, M. Wada, K. Suzuki, S. Sakuda, T. Ando, T. Watanabe, and M. Samejima, "Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin", *Nature Communications* 5, 3975 (2014).