

AFMを用いたタンパク質研究～現状と展望～

—猪飼 篤先生に就いて—

内橋貴之

金沢大学理工研究域

日本発の生物物理学の特集ということで、東工大・猪飼先生が原子間力顕微鏡 (AFM) を用いたタンパク質研究、特にタンパク質の1分子力計測から発信される生体ナノ力学 (nano-biomechanics) について、その現状と将来展望をレビューされた¹⁾。筆者には猪飼先生の文章を受けて、AFMを用いたタンパク質研究の現状と展望について、自由に書くようにとの仰せである。筆者は、これまでおもにAFMの装置開発に携わってきており、表面科学に近い分野から始まり、最近になって生物物理に関連するAFM装置開発およびタンパク質の観察に従事している。AFMの特徴の1つはイメージングと力学的操作の両方ができることにあり、そのどちらも生物物理学に有効な解析手段をもたらすものである。すべての解析装置がそうであるように、AFMにも長所と短所があり、それらを理解し課題を解決することで、AFMが生物物理学に真に有益な情報を与える手法になると考える。そこで、本稿では、猪飼先生の生体ナノ力学の勧めを受けて、日頃感じているAFMという実験方法の生物物理学における現在の位置づけと課題、将来の展望をレビュー的にまとめたと思う。

1986年にBinnig, Quateらによって発明されたAFM²⁾は、絶縁体表面でも高解像度で表面形状を可視化できる装置として急速に広まった。そもそも、AFMは走査型トンネル顕微鏡 (STM) が導電性試料しか測定できないという欠点を克服するために開発された装置で、当初はプローブと試料の間に働く原子間力を利用して無機材料の表面形状をイメージングするのみであった。現在では原子間力検出から派生して、金属あるいは磁性体をコートしたカンチレバーを利用した磁気力、静電気力により磁性や電荷分布も可視化できるようになっており、プローブ顕微鏡ファミリーとして発展してきている。動作モードも、初期の探針と試料を常時接触させるコンタクトモードから間欠的な接触を行うタッピングモード³⁾、非接触モード⁴⁾まで、試料や測定環境に応じて使い分けられている。1987年には早くもAFMが溶液環境下で動作することが実証

され⁵⁾、その後の微細加工技術を利用したマイクロカンチレバー、光てこ変位検出方式の開発や操作性に優れた市販装置の出現で、多種多様なタンパク質、核酸、染色体から細胞まで多岐にわたる試料に適用されてきている。

AFMは生物物理学でどのような問題解決に利用されているであろうか？ いいかえれば、既存の解析装置では得られない、AFMでのみ知ることができる情報とは何であろうか？ 周知のとおり、AFMの主要な特徴は、溶液中に存在するタンパク質やDNAを1分子レベルで直接可視化できることにある。生体試料の高分解能構造解析装置としては、まず走査型電子顕微鏡 (SEM) や透過型電子顕微鏡 (TEM) が用いられてきた。しかしながら、観察には、通常真空環境が必要であり、さらには重金属による被覆や染色も必要となる。そのため、得られる観察データは、その試料が実際に機能しているときの状態を反映しているかどうかを知ることは困難である。電子顕微鏡を用いて機能している状態にあるタンパク質の構造を解析する手段として、氷包埋された試料をcryo-TEMで観察し単粒子解析によって立体構造を得る方法が広く用いられている。この手法では、生理状態にあるタンパク質の構造を10 Å程度の高分解能で決定することが可能であるが、多くの分子を平均化して解析する必要がある。また、X線結晶構造解析やNMRによって正確な構造を決定可能であるが、タンパク質の結晶化などの多大な労力・時間と大掛かりな装置が必要といった制約がある。AFMは比較的簡便に“生”の状態で高解像な画像を得ることができることは大きな利点と考えられる。しかし残念ながら、分解能の点では電子顕微鏡の単粒子解析や回折法の威力には遠く及ばない。AFMに単粒子解析法を援用し、タンパク質のヘリックスを画像化できた報告例もあるが⁶⁾、高分解能な構造決定という点では、新たに得られる情報は多くないと考えられる。

構造決定という点でAFMが電子顕微鏡やX線結晶構造解析に及ばないのであれば、タンパク質研究に

AFM を用いる大きな利点とはいったい何であろうか？ 1 つには、電子顕微鏡などでは観察が難しい膜タンパク質の集合状態を可視化できることがあげられる。例として、円盤膜中でロドプシンがダイマー列を形成する AFM 画像が提出され⁷⁾、その後のロドプシン研究に多大なインパクトを与えた。このダイマー列構造についてはいまだに真偽が議論されているが、この研究は生体膜中におけるタンパク質超分子構造解析に AFM が大きく資する可能性を示している。もう 1 つ、AFM の大きな利点として、同一分子の構造変化を追跡可能であることがあげられる。最近では筆者の所属するグループの安藤敏夫教授を中心としてイメージング速度の各段の向上が図られ、タンパク質のダイナミクスを AFM で可視化できるようになってきている⁸⁾。実際に、ミオシン V やバクテリオロドプシンの生理機能に関連した構造変化⁹⁾や GroEL-GroES の分子間相互作用の可視化に成功している。タンパク質のダイナミクス観察法としては蛍光 1 分子顕微鏡が強力なツールとして生物物理学の中心をなす技術であるが、蛍光色素や GFP などのラベルリングを必要とすること、分子そのものの形態を観察できない、膜タンパク質結晶のように密集した高濃度状態での観察ができないという弱点も抱えている。高速 AFM はタンパク質の構造そのものを視覚化できることから、蛍光輝点の軌跡の詳細な解析から導かれていた結論を一目で導くことができる。そういったことから、1 回イメージングに成功すれば、回答がすぐさま得られるということになり、従来の蛍光 1 分子観察を補完または凌駕する手法になると期待される。しかし、その一方でイメージングに先鋭な探針を使用するがゆえの問題点もある。それは、探針自体の形状によって画像が大きく異なるという点である。しばしば、多探針効果によりアーティファクトが生じ、間違った像解釈を誘発したり、再現性の低下をもたらす。また、探針からの力がタンパク質間の相互作用に与える影響も考慮しなければならない。たとえば、ミオシン V とアクチン間の stall force は光トラップの実験から 3 pN 程度と見積もられているが、AFM 探針からの平均的な力は小さくした場合でも 10 pN 程度はかかってしまう。さらには、生体試料は柔らかいのが特徴であるが、探針からの斥力や探針との凝着によってしばしば致命的な構造破壊が生じる。

一方で、探針との凝着力を積極的に利用し制御することで、情報を得ようとするのがフォースカーブ計測によるタンパク質の力学的特性計測である。1994 年の Gaub らによるアビジン-ビオチン間の結合力測定¹⁰⁾、タイチンのアンフォールディング計測¹¹⁾や猪飼先生らによる単一タンパク質の延伸実験¹²⁾が先駆けとなり、これまで生体ナノ力学の分野が確立されてきた。タン

パク質の力学操作は、従来法でも光学顕微鏡と組み合わせた磁気・光ピンセットを用いて行われているが、1 個の分子にビーズを接着する必要がなく、かつ高い感度で力検出ができることから、多くの場合 AFM が使われている。また、フォースカーブ計測は、1 分子の引っ張りだけでなく細胞の凝着力や粘弾性分布などの計測も可能なことから、従来法では不可能な生体分子の機械特性に関する情報を得ることができる。

以上述べてきたように、AFM のイメージングと力計測機能は、既存の生体分子解析手法の弱点を補完する、さらには AFM でしか計測できない情報も与えることができる。しかしながら、生物物理分野において AFM はまだまだマイナーな存在である。試料の形状をおおまかにつかむために、“粗さ計”的な使用方法をされている方は多数おられるが、電子顕微鏡や光学顕微鏡のように主要な解析手法としてタンパク質研究を進めているパワーユーザーの人口は圧倒的に少ない。単に電子顕微鏡や光学顕微鏡に比べて歴史が浅いことがおもな原因かもしれないが、蛍光顕微鏡による 1 分子観察が 1990 年代頃から始められたことを考えると、技術の未成熟さだけではないように思われる。やはり、いまだ AFM を用いてはじめて明らかになったメカニズムや現象などでインパクトのある成果がほとんどないためであろう。AFM をタンパク質の解析装置として、得られたデータを信頼性のあるものにするためには、上で述べた問題点を克服するための装置の改良や周辺技術の開発が必須である。イメージングでは、安定で先鋭な探針、タンパク質間の相互作用を乱さず観察できる支持基板の開発が試料系毎に必要となる。フォースカーブ計測では得られたデータを説明できる理論やシミュレーション、本当に 1 分子の延伸実験が行われていることを担保する何らかの検証方法も必要であろう。AFM が生物物理分野で多くの研究グループで利用されるようになるにはまだ時間が必要かもしれないが、われわれ、現在携わっている研究者が改良を重ねながら信頼性のあるデータを世に出して普及していく努力が必要であると思う。

文 献

- 1) 猪飼 篤 (2010) 生物物理 **50**, 68-69.
- 2) Binnig, G. *et al.* (1986) Phys. Rev. Lett. **56**, 930-933.
- 3) Zhong, Q. *et al.* (1993) Sur. Sci. **290**, L688-L692.
- 4) Giessibl, F. J. (1995) Science **267**, 68-71.
- 5) Marti, O. *et al.* (1987) Appl. Phys. Lett. **51**, 484-486.
- 6) Müller, D. J. *et al.* (1995) Biophys. J. **68**, 1681-1686.
- 7) Fotland, D. *et al.* (2003) Nature **421**, 127-128.
- 8) Ando, T. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12468-12472.
- 9) Shibata, M. *et al.* (2010) Nature Nanotech. **5**, 208-212.
- 10) Moy, V. T. *et al.* (1994) Science **266**, 257-259.
- 11) Rief, M. *et al.* (1997) Science **276**, 1109-1112.
- 12) Mitsui, K. *et al.* (1996) FEBS Letters **385**, 29-33.