

performed by one-way repeated-measure ANOVA and the post hoc Tukey's test for multiple pairwise comparisons. For ELISA detection of the released BDNF, the values normalized to the basal value were averaged for 4 wells in one experiment. These values were then averaged for 4 independent experiments (separate platings) and statistical analysis was performed using one-way repeated-measure ANOVA and the post-hoc Tukey's test for multiple pairwise comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Acknowledgments

This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (KAKENHI 18700373), and a grant for Health Science Research Including Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation awarded to K.S.; Health and Labour Science Research Grants for Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (KAKENHI 13672319), awarded to K.N.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.brainres.2007.02.093.

REFERENCES

- Acsady, L., Kamondi, A., Sik, A., Freund, T., Buzsaki, G., 1998. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 3386–3403.
- Aguado, F., Carmona, M.A., Pozas, E., Aguilo, A., Martinez-Guijarro, F.G., Alcantara, S., Borrell, V., Yuste, R., Ibanez, C.F., Soriano, E., 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130, 1267–1280.
- Alsina, B., Vu, T., Cohen-Cory, S., 2001. Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat. Neurosci.* 4, 1093–1101.
- Balkowiec, A., Katz, D.M., 2002. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, 10399–10407.
- Beyer, C., Karolczak, M., 2000. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signaling. *J. Neurosci. Res.* 59, 107–116.
- Beyer, C., Ivanova, T., Karolczak, M., Kupperts, E., 2002. Cell type-specificity of nonclassical estrogen signaling in the developing midbrain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 319–325.
- Beyer, C., Pawlak, J., Karolczak, M., 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *J. Neurochem.* 87, 545–550.
- Bothwell, M., 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophins receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 223–253.
- Cambiasso, M.J., Carrer, H.F., 2001. Nongenomic mechanism mediates estradiol stimulation of axon growth in male rat hypothalamic neurons in vitro. *J. Neurosci. Res.* 66, 475–481.
- Clarke, C.H., Norfleet, A.M., Clarke, M.S., Watson, C.S., 2000. Perimembrane localization of the estrogen receptor (protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 71, 34–42.
- Cochilla, A.J., Angleson, J.K., Betz, W.J., 1999. Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Ann. Rev. Neurosci.* 22, 1–10.
- Craven, S.D., Bredt, D.S., 1998. PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93, 495–509.
- Danzer, S.C., McNamara, J.O., 2004. Localization of brain-derived neurotrophic factor to distinct terminals of mossy fiber axons implies regulation of both excitation and feedforward inhibition of CA3 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 24, 11346–11355.
- De Simoni, A., Griesinger, C.B., Edwards, F.A., 2003. Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J. Physiol.* 550 (Pt. 1), 135–147.
- Dieni, S., Rees, S., 2002. Distribution of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor proteins in the fetal and postnatal hippocampus and cerebellum of the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 454, 229–240.
- Duncia, J.V., Santella III, J.B., Higley, C.A., Pitts, W.J., Wityak, J., Fietze, W.E., Rankin, F.W., Sun, J.H., Earl, R.A., Tabaka, A.C., Teleha, C.A., Blom, K.F., Favata, M.F., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Horiuchi, K., Copeland, R.A., Scherle, P.A., Trzaskos, J.M., Magolda, R.L., Trainor, G.L., Wexler, R.R., Hobbs, F.W., Olson, R.E., 1998. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (20), 2839–2844.
- Garner, C.C., Nash, J., Haganir, R.L., 2000. PDZ domains in synapse assembly and signaling. *Trends Cell Biol.* 10, 274–280.
- Gartner, A., Staiger, V., 2002. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (9), 6386–6391.
- Germain, S.J., Campbell, P.S., Anderson, J.N., 1978. Role of the serum estrogen-binding protein in the control of tissue estradiol levels during postnatal development of the female rat. *Endocrinology* 103, 1401–1410.
- Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S., 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10, 1286–1291.
- Hartmann, M., Heumann, R., Lessmann, V., 2001. Synaptic secretion of BDNF after high frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 20, 5887–5897.
- Haubensak, W., Narz, F., Heumann, R., Lessmann, V., 1998. BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J. Cell Sci.* 111, 1483–1493.
- Hojo, Y., Hattori, T., Enami, T.A., Hurokawa, A., Suzuki, K., Ishii, H.T., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T., Kawato, S., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 865–870.
- Ikegaya, Y., Nishiyama, N., Matsuki, N., 2000. L-type Ca²⁺ channel blocker inhibits mossy fiber sprouting and cognitive deficits following pilocarpine seizures in immature mice. *Neuroscience* 98, 647–659.
- Ivanova, T., Kupperts, E., Engele, J., Beyer, C., 2001. Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism. *J. Neurosci. Res.* 66, 221–230.
- Jontes, J.D., Smith, S.J., 2000. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27, 11–14.
- Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A., Kaneko, M., 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C

- and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 436–440.
- Kay, A.R., Alfonso, A., Alford, S., Cline, H.T., Holgado, A.M., Sakmann, B., Snitsarev, V.A., Stricker, T.P., Takahashi, M., Wu, L.G., 1999. Imaging synaptic activity in intact brain and slices with FM1-43 in *C. elegans*, lamprey, and rat. *Neuron* 24, 809–817.
- Kelly, M.J., Levin, E.R., 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 152–156.
- Koyama, R., Yamada, M.K., Fujisawa, S., Katoh-Semba, R., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2004. Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 24, 7215–7224.
- Kramar, E.A., Lin, B., Lin, C.Y., Arai, A.C., Gall, C.M., Lynch, G., 2004. A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24 (22), 5151–5161.
- Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M., Rune, G.M., 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neurosci.* 24, 5913–5921.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863–870.
- Lawrence, J.J., McBain, C.J., 2003. Interneuron diversity series: containing the detonation-feedforward inhibition in the CA3 hippocampus. *Trends Neurosci.* 26, 631–640.
- Lessmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374.
- Matsunaga, W., Shirokawa, T., Isobe, S., 2004. BDNF is necessary for maintenance of noradrenergic innervations in the aged rat brain. *Neurobiol. Aging* 25, 341–348.
- McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C., 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 295–318.
- McEwen, B., Akama, K., Alves, S., Brake, W.G., Bulloch, K., Lee, S., Li, C., Yuen, G., Milner, T.A., 2001. Tracking the estrogen receptor in neuron: implication for estrogen-induced synapse formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7093–7100.
- Mizuhashi, S., Nishiyama, N., Matsuki, N., Ikegaya, Y., 2001. Cyclic nucleotide-mediated regulation of hippocampal mossy fiber development: a target-specific guidance. *J. Neurosci.* 15 21 (16), 6181–6194.
- Murphy, D.D., Cole, N.B., Greenberger, V., Segal, M., 1998a. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18 (7), 2550–2559.
- Murphy, D.D., Cole, N.B., Segal, M., 1998b. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (19), 11412–11417.
- Nakagami, Y., Saito, H., Matsuki, N., 1997. The regional vulnerability to blockade of action potentials in organotypic hippocampal culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 103 (1), 99–102.
- Okabe, S., Miwa, A., Okado, H., 2001. Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J. Neurosci.* 21, 6105–6114.
- Patterson, S.L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K.C., Scanlin, H., Drake, C., Kandel, E.R., 2001. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* 32, 123–140.
- Pozzo-Miller, L.D., Inoue, T., Murphy, D.D., 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 81, 1404–1411.
- Qin, L., Marrs, G.S., Mckim, R., Dailey, M.E., 2001. Hippocampal mossy fibers induce assembly and clustering of PSD95-containing postsynaptic densities independent of glutamate receptor activation. *J. Comp. Neurol.* 440, 284–298.
- Rasika, S., Alvarez-Buylla, A., Nottebohm, F., 1999. BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in an adult brain. *Neuron* 22, 53–62.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G.L., Levin, E.R., 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimmers. *Mol. Endocrinol.* 18, 2854–2865.
- Rothermel, J.D., Parker Botelho, L.H., 1988. A mechanistic and kinetic analysis of the interactions of the diastereoisomers of adenosine 3',5'-(cyclic)phosphorothioate with purified cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. J.* 251, 757A–762A.
- Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y., Nakazawa, K., 2002. Effects of 17 β -estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in an organotypic hippocampal culture. *Neuroendocrinology* 76, 223–234.
- Scharfman, H.E., MacLusky, N.J., 2005. Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci.* 28 (2), 79–85.
- Scharfman, H.E., Mercurio, T.C., Goodman, J.H., Wilson, M.A., MacLusky, N.J., 2003. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 23, 11641–11652.
- Segal, M., Murphy, D., 2001. Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. *Horm. Behav.* 40 (2), 156–159.
- Segars, J.H., Driggers, P.H., 2002. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 349–354.
- Seil, F.J., Drake-Baumann, R., 2000. TrkB receptor ligands promote activity-dependent inhibitory synaptogenesis. *J. Neurosci.* 20, 5367–5373.
- Sohrabji, F., Miranda, R.C., Toran-Allerand, C.D., 1995. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11110–11114.
- Squinto, S.P., Stütt, T.N., Aldrich, T.H., Davis, S., Bianco, S.M., Radziejewski, C., Glass, D.J., Masiakowski, P., Furth, M.E., Valenzuela, D.M., Distefano, P.S., Yancopoulos, G.D., 1991. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65, 885–893.
- Tait, R.J., Skanchy, D.J., Thompson, D.P., Chetwyn, N.C., Dunshee, D.A., Rajewski, R.A., Stella, V.J., Stobaugh, J.F., 1992. Characterization of sulfoalkyl ether derivatives of beta-cyclodextrin by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 615–622.
- Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka, S., Mizui, T., Kishi, S., Shirao, T., 2003. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J. Neurosci.* 23, 6586–6595.
- Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E., 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.* 19 (14), 5792–5801.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2004. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G-protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632.
- Toran-Allerand, C.D., Guan, X., MacLusky, N.J., Horvath, T.L., Diano, S., Singh, M., Connolly Jr., E.S., Nethrapalli, I.S., Tinnikov, A.A., 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* 22, 8391–8401.
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D., 2002. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn. Mem.* 9 (5), 224–237.
- Woolley, C.S., 1998. Estrogen-mediated structural and functional

- synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm. Behav.* 34 (2), 140–148.
- Woolley, C.S., Schwartzkroin, P.A., 1998. Hormonal effects on the brain. *Epilepsia* 39 (Suppl. 8), S2–S8.
- Wu, Y.J., Kruttgen, A., Moller, J.C., Shine, D., Chan, J.R., Shooter, E.M., Cosgaya, J.M., 2004. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 are sorted to dense-core vesicles and released via the regulated pathway in primary rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 75, 825–834.
- Znamensky, V., Akama, K.T., McEwen, B., Milner, T., 2003. Estrogen levels regulate the subcellular distribution of phosphorylated Akt in hippocampal CA1 dendrites. *J. Neurosci.* 23, 2340–2347.

日本臨牀 第65巻・第2号（平成19年2月号）別刷

特集：分子イメージング

原子間力顕微鏡 (AFM) による 蛋白質のイメージング

山越葉子 中澤憲一 土屋利江

原子間力顕微鏡 (AFM) による 蛋白質のイメージング

山越 葉子¹ 中澤 憲一² 土屋 利江³

Protein imaging by atomic force microscopy

¹Yoko Yamakoshi, ²Ken Nakazawa, ³Toshie Tsuchiya

¹Associate Researcher, Department of Chemistry and Biochemistry,
University of California at Santa Barbara

²Division of Pharmacology, ³Division of Medical Devices,
National Institute of Health Sciences

Abstract

Atomic force microscopy (AFM) has been used for imaging of non-conductive surface using a cantilever with a sharp probe to mediate the atomic force interaction between the probe and substrate. The application of AFM for the imaging of protein including transmembrane protein has been studied and revealed their single molecular structure on a nanometer scale. Especially for the transmembrane proteins that lack of 3D structural information obtained by X-ray crystallography, AFM imaging has significant advantages. Since the imaging is capable in the aqueous solution, the obtained images are expected to provide information that reflects structures found in the living cells. Additionally, the force curve measurement for intra- or inter-molecular non-covalent interaction such as protein folding or ligand-receptor interaction will be explained.

Key words: atomic force microscopy, protein imaging, recombinant P2X₂ receptor

1. 蛋白質の構造解析

生体の主要構成成分の一つである蛋白質は、生体内での有機化合物の代謝(酵素など)、情報伝達(受容体など)、組織骨格形成などにかかわる機能性分子であり、その機能に関連する構造の解析は現在の化学の分野で最もホットな分野の一つである。一般にアミノ酸配列を決定する一次構造解析は、繁用法があり、その結果から、 α -ヘリックスや β -シートなどの二次構造が推定される。しかし生体内での蛋白質の機能に大

きくかかっている三次元構造の決定は困難な点が多い。

現在行われている蛋白質三次構造決定法としては、X線結晶構造解析法と核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance: NMR)分光法などがあげられる。X線解析法は解析対象とする蛋白質の単結晶を調製し、X線の照射回折を行い、三次元的画像を得るもので、解像度が非常に高い(\AA レベル)という利点がある。特に近年の放射光を用いた測定法の開発により、解析される蛋白質の数は飛躍的に伸びた。しかし、本法は単

¹カリフォルニア大学サンタバーバラ校 ²国立医薬品食品衛生研究所薬理部 ³同療品部

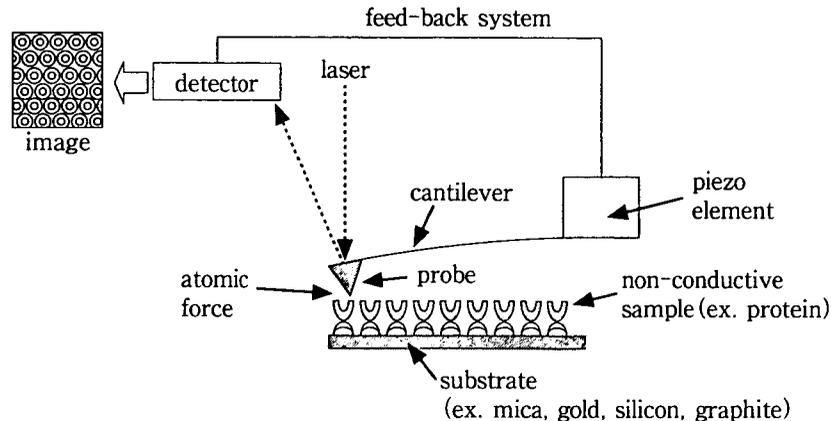


図1 原子間力顕微鏡(AFM)の模式図

結晶の調製が困難である難溶性の蛋白質の解析にはあまり向いておらず、また、得られる構造が結晶格子内における分子構造であるため、動的な構造ではなく、活性型の蛋白質の構造との相関には不明な点が残る。後者のNMR法は溶液中での測定法であり、生体内の蛋白質の挙動に近い情報を求めることが期待され、また、核オーバーハウザー効果(nuclear overhauser effect: NOE)などの手法を用いると、核の間の空間的距離の情報が得られ立体的構造に関する解析も可能である。ただし、蛋白質をNMRで測定して得られるスペクトルは、非常に複雑で解析が難しく、¹⁵N-enrichした試料の調製が必要になる場合もある。また、試料としては高濃度溶液が必要であるため、難溶性あるいは微量しか発現していない蛋白質の解析にはあまり向いていない。

2. なぜ原子間力顕微鏡(AFM)で蛋白質の画像化を行うのか?

原子間力顕微鏡(AFM)を用いた蛋白質の解析の目的は蛋白質の大まかな構造と機能を知ることである。現在のところ、AFMの解像度はX線解析に遠く及ばない(大まかに言って1/10程度である)が、AFMを用いることの利点を以下にあげる。

- (1) 試料の量が微量で済む。
- (2) 高濃度溶液や単結晶の調製が不要である。
- (3) 溶液中測定も可能であり、より生体内環境に近い条件下での測定が可能である。

(4) 経時的測定モードによりダイナミックな構造情報が得られる。

(5) 単一分子測定が可能である。

3. AFMからどんな情報が得られるのか?

a. 装置の概略とイメージング

AFMが最初に発表されたのは、1986年にPhysical Review Letters誌に掲載されたIBM-チューリヒの研究者達の報告¹⁾においてである。同研究グループはその数年前に、走査型トンネル顕微鏡(scanning tunneling microscope: STM)を発表し、原子像の画像化に成功しているが(1986年ノーベル物理学賞受賞)、トンネル電流を利用したSTM²⁾が電導性のサンプルの測定のみ適用されるのに対し、AFMは非電導性のサンプルの測定も可能であり、DNAや蛋白質などの生体高分子の新しい解析手法として、威力を発揮することが期待されている。

機器の基本的な構造は、主に以下の4つの部分からなる(図1)。

- (1) 試料の表面を走査する微細な探針(probe)
 - (2) 探針と試料表面との間に働く原子間力を増幅する微小な板ばね(cantilever)
 - (3) 探針および板ばねの高さや位置を調節する圧電(ピエゾ)素子
 - (4) 板ばねの変位を測定するレーザー光と、その反射を検出するフォトダイオード検出器
- 試料と原子間力を介して直接相互作用するのは板ばねに結合した探針の先端で、その位置制御は微細な圧電素子の動きによって行われ

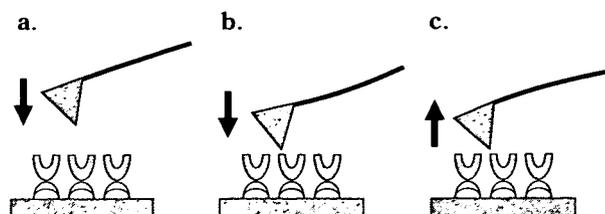


図2 AFM 探針の試料の相互作用と板ばねのそり

a: 試料へ接近. b: 試料へ接触と, 板ばねのそり.
c: 試料からの離脱と原子間力による板ばねのそり.

る(図2). 試料表面にナノメートルレベルの距離で接近した板ばねは探針と試料との間に生じる原子間力に応じてそり(deflection)などの変位を起こす. そこにレーザー光を照射し, 生じる反射光を四分割フォトダイオードディテクターで検出し, その結果に基づきサンプルのトポグラフィカルな情報を画像化するのである. 具体的な蛋白質のイメージングの例は, 4. 測定法の項に後述する.

b. アンフォールディング

蛋白質の機能に大きくかわる三次元構造は, 蛋白質のフォールディング(折りたたみ)により形成されるが, その機構に関しては未知の部分が多い. しかし, BSEに代表されるように蛋白質のミスフォールディングが疾患に関連している例が知られるようになり, フォールディングに関する基礎的知見は, 疾患の検出あるいは診断に重要な役割を果たすことが期待される.

ミュンヘン大学のGaubらのグループは, 膜貫通型蛋白質の一つバクテリオロドプシンを用いて, AFMによるアンフォールディングの実験を行った³⁾. バクテリオロドプシン分子が多量に発現した*Halobacterium salinarum*の紫膜を劈開したばかりのマイカ表面上にマウントし, そこへAFM探針を接触させた後引っぱり上げると, フォースカーブに繰り返しパターンがみられた(図3). フォースカーブ上にピークが生じた距離と, フォールディングしているアミノ酸残基の長さは一致しており, ピークは蛋白質のフォールディングパターンを示していると考えられた.

c. 分子間相互作用の測定

(chemical force microscopy)

ハーバード大学のLieberらは, AFM探針先端を特定の有機化合物で修飾し, 対象とする試料表面の官能基を選択的に検出しようとするchemical force microscopyを報告した⁴⁾. 彼らは, 金で表面をコートしたシリコンナイトライド探針上に親水基(-COOH)あるいは疎水基(-CH₃)を末端に有するアルキルチオール分子で自己組織化膜(self assembled monolayer: SAM)を形成させる方法でAFM探針の修飾を行い, フォースカーブ測定を行った(図4). その結果, CH₃/CH₃, CH₃/COOHおよびCOOH/COOH対での相互作用の違いをフォースカーブで検出することに成功した.

同様に, SAMで修飾したAFM探針を用いて, 分子のキラリティーの判別⁵⁾, 超分子ホストゲストコンプレックスの結合能の測定⁶⁾などが報告されている. Gaubらのグループは, このchemical force microscopyをレセプター対リガンドの結合能測定に応用し, ストレプトアビジンとビオチンの結合能をフォースカーブとして測定した. この手法を種々のレセプター-リガンド対に応用することで, 将来的にはごく微量の蛋白質を用いたドラッグスクリーニング法として有用となる可能性も考えられる(図5).

4. 測定法(各論)

a. 試料の調製法

AFM測定において, 最も要となるところが, 試料の調製法である. 測定結果の良し悪しは, この試料調製法によるといっても過言でない. AFMは基本的にナノメートルレベルでの表面解析である. したがって, 測定する試料はできるだけ平坦なものである必要がある. 調製した試料の凸凹が激しいと, 単分子レベルでの測定を行う解像度が望めなくなるからである.

基板としては, マイカ, 単結晶金, グラファイトなどの原子レベルで平坦なものを用いる. マイカ, グラファイトは, 劈開したばかりのものを用い, 金は蒸着後高温でアニールし単結晶表面を形成したものを用いる. ここに目的の蛋

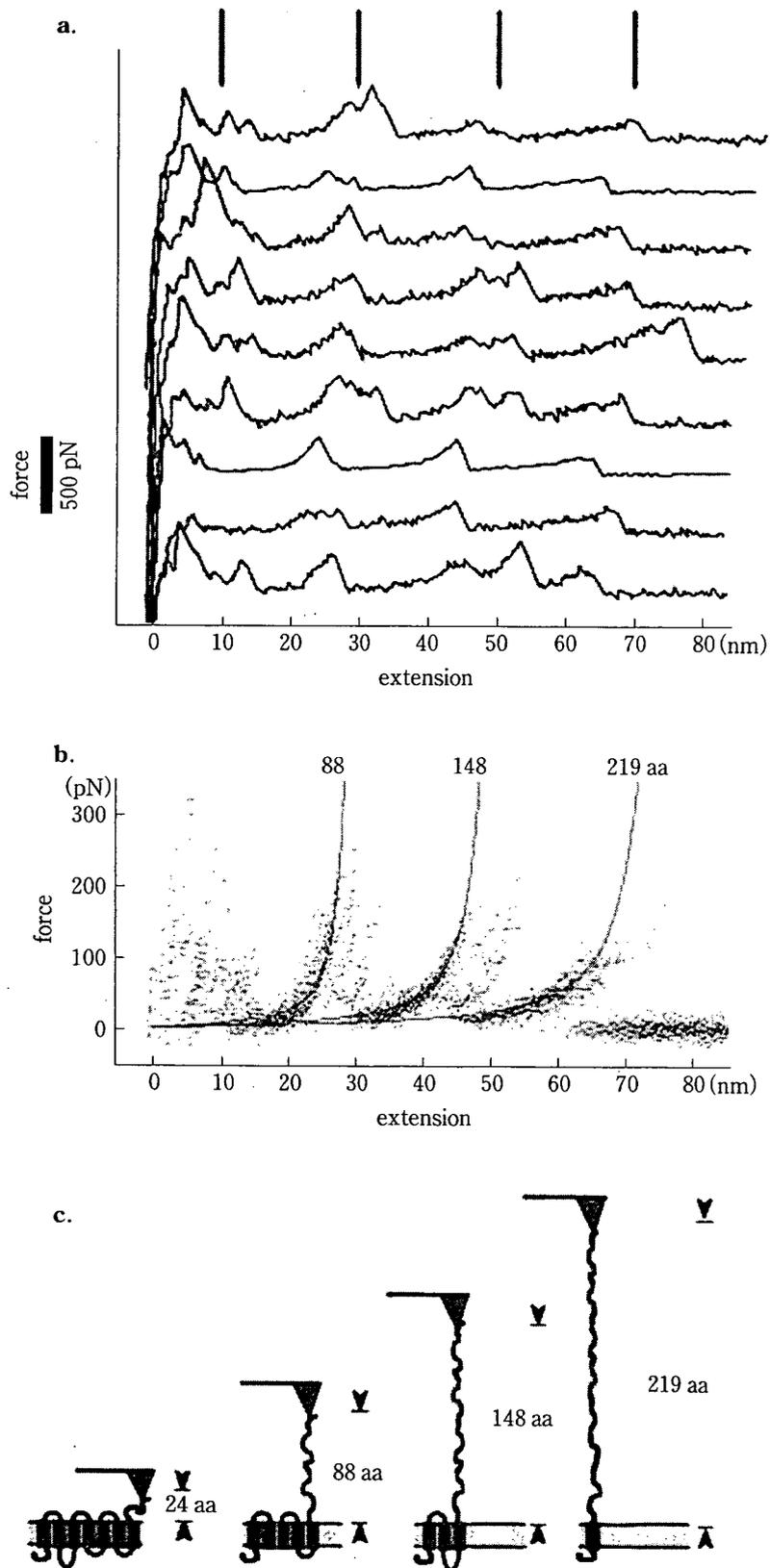


図3 AFMを用いた蛋白質アンフォールディングの実験

細胞膜中の膜蛋白質にAFM探針を接触(-1 nN, 1秒間)させ、C末端をAFM探針の先端に接着させる。それを引っ張ると、フォースカーブが生じ、カーブ上のピークまでの距離は、予測されているフォールディングパターンのアミノ酸残基の長さとも一致する。

(文献³⁾より引用)

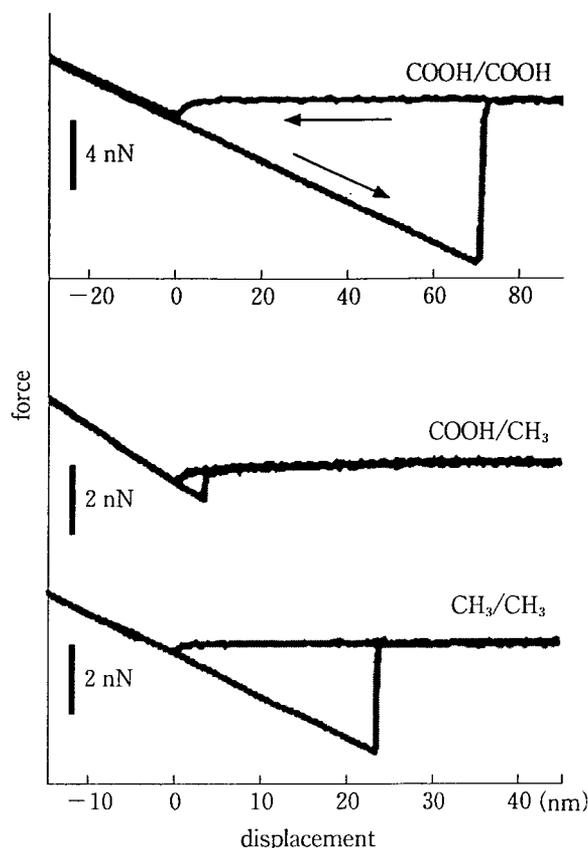


図4 末端に親水基あるいは疎水基を有する分子の自己組織化膜で修飾したAFM探針によるフォースカーブの測定 (文献⁴⁾より引用)

白質を単分子膜として不動化させる。測定する蛋白質は、nativeなものを用いる場合もあれば、精製したものを用いる場合もある。膜結合型蛋白質では、細胞膜上に蛋白質が大量に発現していれば、それを直接測定することも可能であるが、精製した蛋白質を基板上に不動化したうえで測定する場合もある。測定は、溶媒を乾燥させたうえで行う場合と、溶液中でそのまま行う場合がある。いずれにしても超純粋な溶媒を用い、ほこりなどが基板に吸着しないような環境下で試料調製を行う必要がある。図6に調製法の異なる試料のイメージングの例を示す。乾燥した試料の大気中測定では蛋白質の凝集がみられたが、水溶液中での測定では、分散した蛋白質が単分子レベルで観測された。緩衝溶液中での測定では、蛋白質の再構築がよく観察され、チャンネル孔らしき構造も観測された⁷⁾。

b. 測定

1) 測定モード

基本測定モードには、コンタクトモード、タッピングモード、ノンコンタクトモードの3種類があり(図7)、測定する試料に応じてモードを選択する必要がある。コンタクトモードは、探針の先端と試料を接触させながら測定する方法で、探針と試料の接触により生じる板ばねのそりをフィードバックシステムで一定に保つように設定し、電気的信号をもとに画像化する。スキャン速度を上げることができる、比較的凹凸の大きい試料の測定にも適しているなどの利点があるが、直接接触することにより試料に損傷が生じる可能性があるため、ソフトな試料(特に生物学的試料)の測定にはあまり適していない。これに対し、タッピングモードと、ノンコンタクトモードは一定の周波数で振動させた板ばねを用いた測定法である。タッピングモードでは、探針が試料に最も近づくときに軽く試料に接触するが、ノンコンタクトモードでは、全く接触しない。試料と探針が接近すると、相互作用により振動幅に変化が生じるが、これらのモードではフィードバックシステムにより振動幅を一定に保つよう調節し、その調節に必要な電気的信号をもとに画像化を行う。双方とも試料と探針の接触が少なく、ソフトな試料の測定に適している。

2) カンチレバー

AFMの解像度は探針の先端に依存する。すなわち、高分解能な測定のためには、探針の先端がなるべく微細であることが重要である。この微細加工が可能であること、更に、高い共振周波数を得られるという理由から、シリコン、シリコンナイトライドなどの素材が現在汎用されている。また、前述のchemical force microscopyなどの応用測定に用いられる、金コート済みの探針も市販されている。

更に高い解像度を達成するためには、探針の先端が非常に鋭利であることが求められ、単分子であることが理想である。より微細な探針素材としてはカーボンナノチューブを用いる研究も行われている⁸⁾。

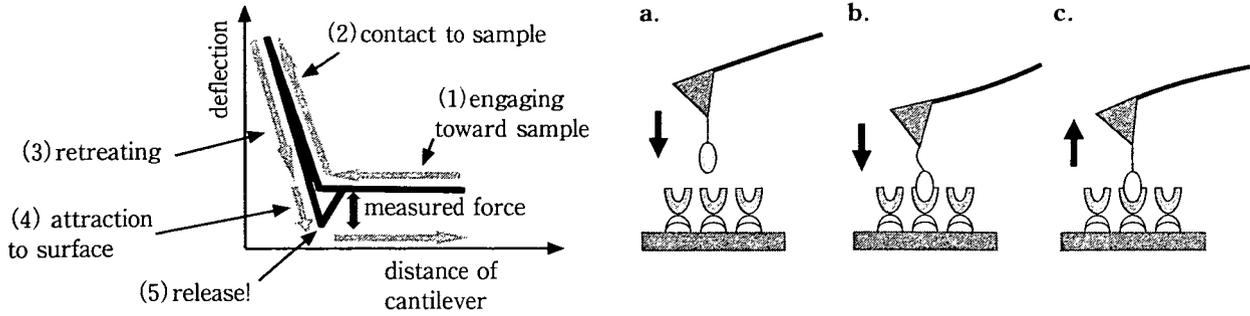


図5 Chemical force spectroscopy を用いたレセプターとリガンド間の分子間相互作用の実験
 a: 試料に接近. b: 試料に接触. c: 相互作用(フォースとして現れる).

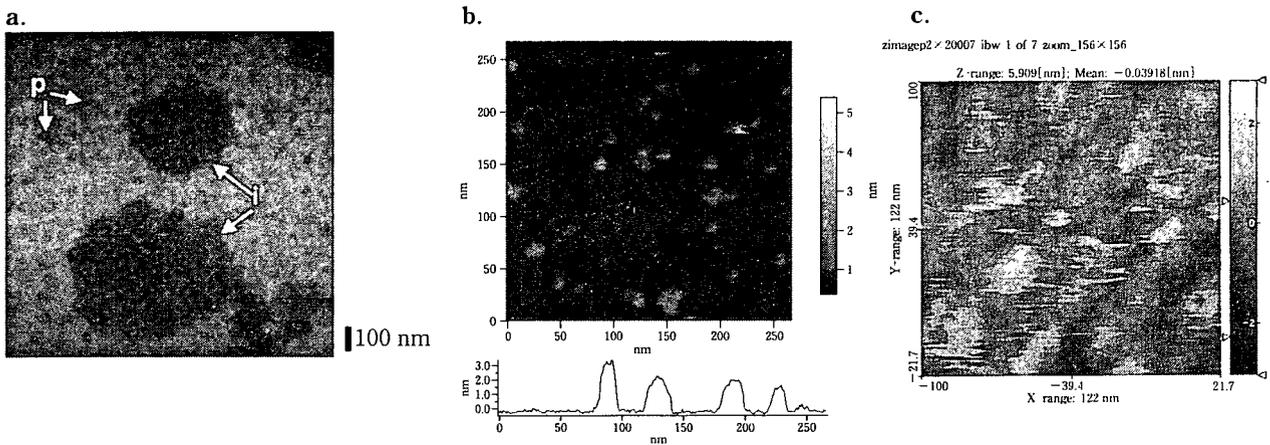


図6 膜蛋白質 P2X₂ 受容体の AFM によるイメージング

- a: 蛋白質水溶液をマイカ上に滴下後、乾燥させたサンプルを測定した画像。蛋白質が島状に凝集している状態が見える。
- b: 蛋白質水溶液をマイカ上に滴下、そのまま水中で測定した画像とその断面図。蛋白質が単分子状に分散している状態が見える。
- c: 蛋白質の緩衝溶液をマイカ上に滴下、そのまま緩衝液中で測定した画像。蛋白質が再構築し、チャンネル状の構造を取っている状態が見える。

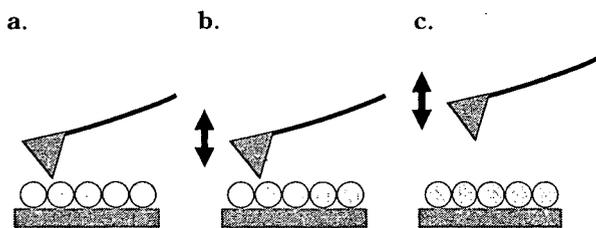


図7 AFM の測定モード

- a: コンタクトモード. b: タッピングモード.
- c: ノンコンタクトモード.

3) 膜結合型蛋白質のイメージングの例

難溶性で単結晶の作成が難しい膜蛋白質のイメージングにおいて、AFM が最も威力を発揮する。ドレスデン工科大学の Müller らの研究グループは、膜蛋白質の AFM イメージングを

精力的に行っている。その成果の例を図8に示す。

図8は、Cx26 Hela細胞に多量に発現したコネキシン26分子を精製後、マイカ上にマウントして緩衝液中で AFM 測定を行ったものである⁹⁾。コネキシン分子の細胞外部分がサブ分子レベルで観測されている。コネキシン分子が六量体でチャンネル孔を有する様子がわかる。図8-aはカルシウムイオン非存在下、bは存在下での測定で、カルシウムイオンの添加により蛋白質のコンフォーメーションが変化し、チャンネルの入り口の直径が1.5nmから0.6nmへと小さくなる事が観測された。

図9は脂質二重膜中に埋包させた膜蛋白質

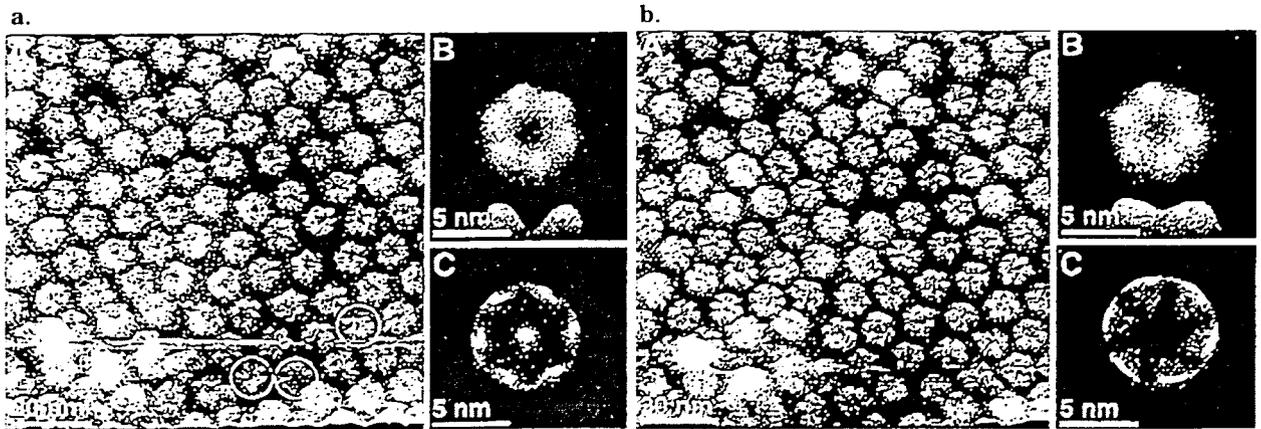


図8 コネキシン分子のAFMイメージ

a: Ca^{2+} 非存在下での画像. b: Ca^{2+} 存在下での画像. コンフォーメーションの変化がみられる.
(文献⁹⁾より引用)

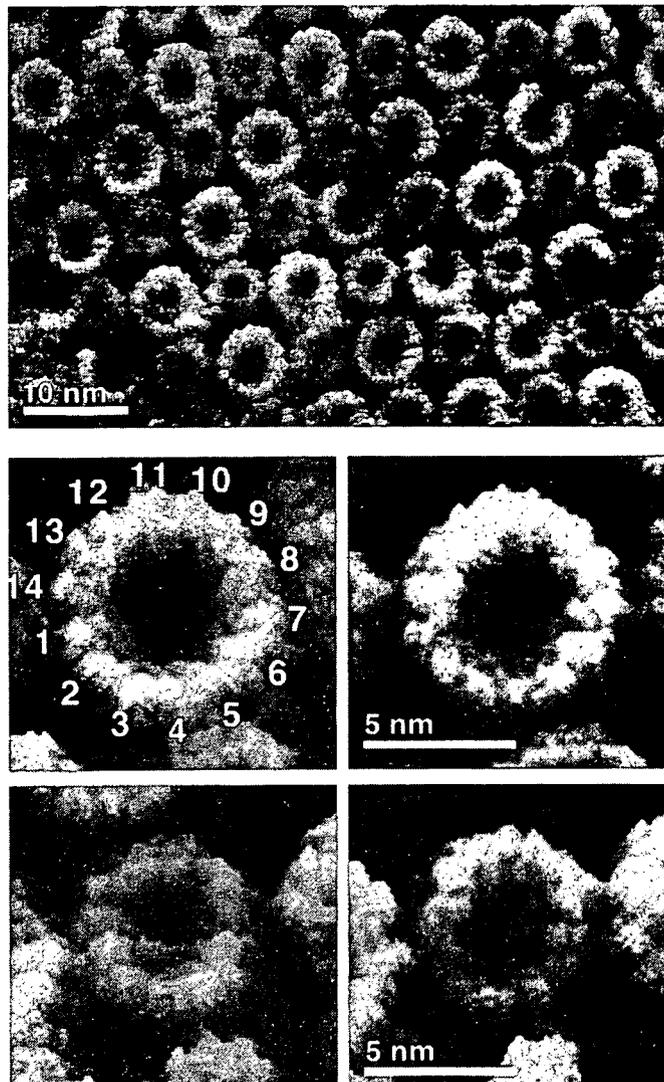


図9 精製後脂質二重膜中で再構築させた spinach chloroplast ATP synthase のAFMイメージ
(文献¹⁰⁾より引用)

のAFMイメージの例である^{10,11)}。精製したATP synthaseをdodecyl maltosideの存在下、フォスファチジルコリンおよびフォスファチジン酸と混合することで埋包させマイカ上で測定を行った。

5. 今後の進展

以上に紹介したように、AFMの生物試料への応用は主として膜蛋白質の解析に利用されている。これは、膜蛋白質の基板上での配向が均一であり、解析が行いやすいためである。膜蛋白質のX線結晶構造解析が酵素などの水溶性蛋白質より困難であることを考慮すれば、解像度は落ちるとはいえAFMの形状解析がこの種の蛋白質の研究に今後も有用であると予想される。また、X線による構造解析が既になされている

蛋白質についても、AFMによる水溶液中の形状解析が動的構造について新たな知見をもたらす可能性が考えられる。

本稿では、単一蛋白質のイメージングの例を紹介したが、2種以上の蛋白質の水溶液中での会合状態を観察することも可能である。例えば、受容体とこれに直接的に働くエフェクター分子(G蛋白質など)との会合状態を観察することにより、生化学的応答の機構の可視化が可能となるかもしれない。

分子間相互作用の測定については、受容体とそのリガンド、酵素とその基質などの分子相互作用を1分子レベルで解析できれば、生体の分子メカニズムについて、これを力学的に解析するという全く新しい分野を切り開くことになるであろう。

■ 文 献

- 1) Binning G, et al: Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* **56**: 930-934, 1986.
- 2) Binning G, et al: Surface study by scanning tunneling microscopy. *Phys Rev Lett* **49**: 57-61, 1982.
- 3) Oesterhelt F, et al: Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* **288**: 143-146, 2000.
- 4) Frisbie CD, et al: Functional group imaging by chemical force microscopy. *Science* **265**: 2071-2074, 1994.
- 5) McKendry R, et al: Chiral discrimination by chemical force microscopy. *Nature* **391**: 566-568, 1998.
- 6) Schönherr H, et al: Individual supramolecular host-guest interactions studied by dynamic single molecule force spectroscopy. *J Am Chem Soc* **122**: 4963-4967, 2000.
- 7) Nakazawa K, et al: Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. *Eur J Pharmacol* **518**: 107-110, 2005.
- 8) Wooley AT, et al: Structural biology with carbon nanotube AFM probes. *Chem Biol* **7**: R193-R204, 2000.
- 9) Müller DJ, et al: Conformational changes in surface structure of isolated connexin 26 gap junctions. *EMBO J* **21**: 3598-3607, 2002.
- 10) Seelert H, et al: Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405**: 418-419, 2000.
- 11) Seelert H, et al: Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase. *J Mol Biol* **333**: 337-344, 2003.