

提出日:2020 年 5 月 8 日

2019 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		シャペロニン CCT 複合体動態の高速 AFM イメージング	
申請者 (実験責任者)	氏名	新木 和孝	
	所属機関名・部局名	国立研究開発法人 産業技術総合研究所	
	職名	主任研究員	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)			超解像 AFM(FM-AFM 及び、3D-AFM)
		○	高速 AFM
			SICM
NanoLSI 受入担当教員名		中山 隆宏 准教授	
<p>本研究は、シャペロニン CCT 複合体の高速 AFM 解析を通して、CCT 複合体がどのような動態変化を伴ってそのシャペロン活性を発揮しているのかを観察することを目的としている。</p> <p>シャペロニン CCT 複合体 (Chaperonin Containing TCP-1 または TCP-1 Ring Complex) は、ATP 加水分解のエネルギーを利用して、細胞内の新生タンパク質のフォールディングを助けている。その構造は、60kDa 程度の 8 種類の異なるサブユニットがリング状に並び、そのリングが 2 重に合わさった 800kDa 程度の巨大複合体構造をとっている。代表的な基質として、アクチンや微小管が知られている。高速 AFM 解析により、CCT 複合体がどのような動態変化を伴ってそのシャペロン活性を発揮しているのかを直接観察することで、タンパク質の構造形成という生命現象の基本的なプロセスへの理解が進むものと考えられる。</p> <p>本研究期間では、①異なる立体構造位置にタグを入れた CCT 複合体をマイカ上にそれぞれ固定化し、高速 AFM 解析を行い、②その実験系で ATP を誘導産生させることで、CCT 複合体の動きの経時変化が捉えられるのかを中心に研究を進めた。</p> <p>①に関しては、バクテリア (真正細菌) のシャペロニン GroEL/ES の高速 AFM 解析で用いられているタマジジン結晶化法を応用し、CCT 複合体をマイカ上に揃えて固定化し、高速 AFM 解析できるのかを検討した。その結果、3 つの異なる位置にタグを入れた CCT 複合体を基板上に固定化し、配向を揃えながら高速 AFM 観察をすることができた。</p> <p>②に関しては、Caged-ATP と紫外線照射系を用いることで ATP 産生を制御し、ATP 産生に伴う CCT 複合体の動態が観察できることを確認した。さらに代表的基質を用いた動態変化を定量解析することにも成功した。</p> <p>今後は、今回の結果の再現性を検証しながら、異なる基質との定量解析や、基質との相互作用力の定量化、基質の結合・乖離の一連の過程を高速 AFM 解析していく予定である。</p>			