

氏 名	よこ 横 かわ 川 まさ 雅 とし 俊
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 97 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Direct visualization and analysis of a single-molecule reaction by using fast-scanning atomic force microscopy (高速原子間力顕微鏡による一分子反応観察・解析法に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 西 田 栄 介 教 授 井 上 丹

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、新規に開発された液中高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）というツールを用いて、生体分子の“動的構造のナノスケール・リアルタイム解析”を行い、対象試料の分子機能・分子反応機構解析を試みたものである。具体的には、以下2つの生体分子反応の解析を行っている。

1) II 型制限酵素 *ApaI* による DNA 切断反応の高速 AFM 観察。

本研究では、試料を基板表面に完全に固定化するのではなく、静電引力を利用した試料固定法を応用し、試料溶液中のイオン組成及び pH を調整することで試料（DNA および *ApaI*）のマイカ基板上での運動性の制御を行い、高速 AFM を用いて *ApaI* による DNA 切断反応を可視化することに成功している。

反応観察・解析の結果、①観察された分子運動は、AFM 測定によるアーティファクトではなく、ブラウン運動（二次元拡散係数は、 $2.0 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ ）であること、② *ApaI* はホモ二量体として DNA へ結合すること、③結合した *ApaI* 二量体は DNA 上で一次元拡散運動をしていること、④特定塩基配列の認識後は、非常に短い時間で DNA 切断を終えること、⑤ DNA 切断後は、切断された DNA の末端とともに酵素も二つの単量体へと分離してゆくことを明らかにした。

2) 大腸菌の分子シャペロン GroEL/GroES の一分子反応解析。

GroEL の二次元結晶体を試料に用いることで、その構造変化および溶液中に存在する対となる分子（GroES）との結合・解離反応の様子を高速 AFM 観察により一分子レベルで検出することに成功している。

まず、GroEL の構造変化に関しては、ATP/ADP 存在下において GroEL は、closed 型と open 型の2つの分子構造をとり、両者の間を数秒の時間スケールで行き来していることを明らかにした。その際、ATP の加水分解は必須ではなく、ATP/ADP の結合・解離により構造変化が引き起こされていること、構造変化は非常に速いこと（数マイクロ秒以内）、協同的であること、また、ADP 結合型 open 構造は ATP 結合型と比べ不安定であることを明らかにした。

GroES の結合解離反応に関しては、その結合時間の分子解析から、GroES の結合後二つの律速段階（3s および 5s）を経た後 GroES の解離に至るという結論を得ている。

さらに、様々な ATP/ADP/ATPanalogue 濃度下における open 型 GroEL と GroEL-GroES 複合体との構造寿命の比較から、GroEL 自身の open-closed 構造変化ではなく ATP の加水分解が、GroES 解離反応における律速反応であることを示している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、新規に開発された液中高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）というツールを、生体分子反応の可視化および解析にとりいれ、対象分子の反応機構解明を目指したものであり、その評価できる内容は以下の通りである。

1) 構造生物学の分野においては、従来、電子顕微鏡解析や X 線構造解析といった試料の静的構造の高分解能解析が中

心であったが、本研究では、高速 AFM を用いることで試料の構造動態のナノスケール・一分子解析を行っている。こうしたアプローチ（実験・解析）は、世界的にもほとんど為されておらず先進的な研究であると言える。

2) 高速 AFM を用いることで、II 型制限酵素 *ApaI* による DNA 切断反応を、一分子レベルで観察することに成功している。また、その詳細な反応解析から、*ApaI* が二量体として DNA へ結合すること、結合した *ApaI* が DNA 上で一次元拡散運動をしていること、*ApaI* の二量体が DNA の切断を行っていること、DNA 切断と同時に *ApaI* は二つの単量体にわかれ DNA から解離していくことを、それぞれ明らかにしている。巨視的実験系では得ることの難しいこれらの知見は、制限酵素の反応機構を解明していく上で非常に有用であると考えられる。

3) 大腸菌の分子シャペロン GroEL の反応観察を行い、ATP/ADP 依存的な GroEL の open-close 構造変化、および GroEL に対する GroES の結合・解離反応を一分子レベルで直接とらえることに成功している。また、不安定反応中間体である GroEL の open 構造に関して詳細な解析を行い、ADP 結合型 open 構造は、ATP 結合型 open 構造に比べ不安定であること、open-close 構造変化は非常に速く数マイクロ秒以内に完了すること、またその際、ATP の加水分解ではなくヌクレオチドの結合・解離によって引き起こされていることを、ここで明らかにしている。

以上の結果は、構造的側面から一分子レベルで制限酵素反応・シャペロン反応の詳細を解析していることに加え、非常に単純化した2つの実験系において高速 AFM による実験・解析法を確立している点が評価できる。特に、高速 AFM 観察をもとにした一分子反応速度論的解析は、今後、様々な生体分子試料の反応解析に応用することが可能であり、非常に有用なものである。よって、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成18年11月13日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。