

液中サブナノ分解能 AFM 計測のための微小管外側表面モデルの確立

Outer Surface Model of Microtubules for Subnanometer-scale AFM Investigation in Liquid

○高尾一史¹, 浅川雅¹, 内橋貴之¹, 池上浩司², 瀬藤光利², 福岡剛士^{1,3} (1. 金大院, 2. 浜松医大, 3. ACT-C/JST)

○Kazufumi Takao¹, Hitoshi Asakawa¹, Takayuki Uchihashi¹, Koji Ikegami², Mitsutoshi Setou² and Takeshi Fukuma^{1,3}

(1.Kanazawa Univ., 2.Hamamatsu Univ. School of Medicine, 3.ACT-C/JST)

E-mail: k.takao@stu.kanazawa-u.ac.jp

重要な細胞骨格である微小管は、チューブリンが形成する中空管状のタンパク質集合体である。微小管の機能を理解するためには、モータータンパク質などが相互作用する「外側表面」の構造・機能を解明することが重要である(Fig. 1a)。なかでも外側表面に突出した C 末端構造は、分子間相互作用を制御する役割を持つと考えられているが、あらゆる分析手法でも構造解析が困難である。一方、液中で原子分解能を有する周波数変調 AFM(FM-AFM) はタンパク質の二次構造を可視化できる空間分解能を有しており、C 末端構造など外側表面を直接計測する分析手法として検討してきた。しかし、微小管を基板に固定して液中 FM-AFM 観察した場合、微小管上面の熱揺動や変形が原因で高分解能観察が困難であった(Fig. 1b)。そこで本研究では、微小管の熱揺動や変形を抑制し、外側表面をサブナノ分解能で AFM 計測できる外側表面モデルを確立することを目指した。

まず微小管を強く基板に固定することで熱揺動や変形を抑制できると考え、負の表面電荷を有する微小管を APTES 修飾マイカに吸着させた。しかし、強い相互作用によって中空管状構造が壊れて内側表面が露出したシート状構造に変化することが分かった。そこで微小管の機械的強度を向上させるために、脱重合阻害剤である Taxol 濃度を段階的に増加させてみた。その結果、Taxol 濃度を 40 μM まで増加させると、微小管が扁平状に固定されることが分かった(Fig. 1c)。扁平状構造は熱揺動や変形が大きく抑制され、サブナノメートル分解能で安定に液中 FM-AFM 観察することが出来た(Fig. 1d)。この扁平状構造はグルタルアルデヒドなどの化学架橋を行っておらず、微小管本来の表面構造を維持しており、外側表面モデルとして分子スケールの構造解析や機能の解明への応用が期待される。

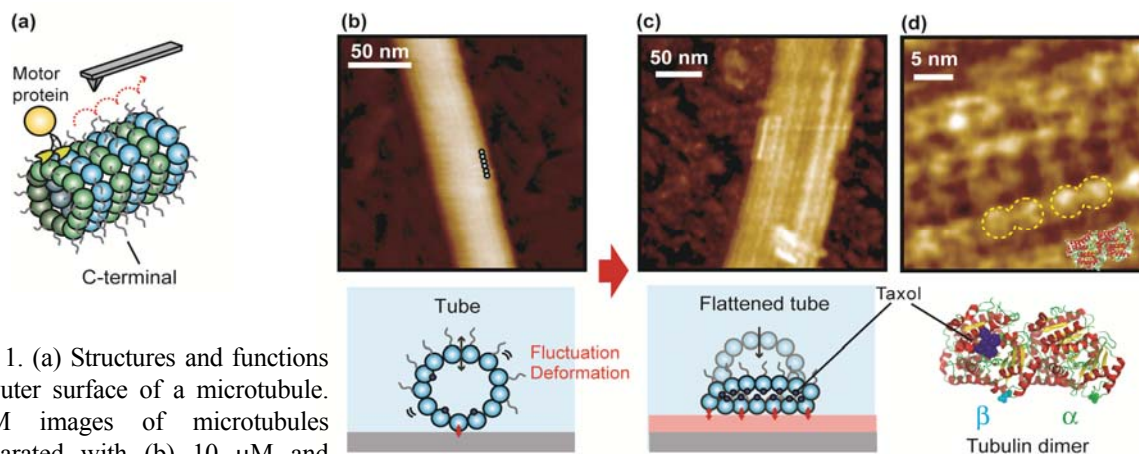


Fig. 1. (a) Structures and functions of outer surface of a microtubule. AFM images of microtubules prepared with (b) 10 μM and (c)(d)40 μM taxol.