

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710144

研究課題名(和文)細胞内超分子機械の機能変調イメージング

研究課題名(英文)Visualization of Mechanical Response of Molecular Machines working in vivo

研究代表者

西山 雅祥(Nishiyama, Masayoshi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：10346075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生きた細胞内で働くタンパク質分子機械の機能発現をコントロールできる新しい分析手法の開発に取り組んだ。高圧力技術を利用して、細胞内のタンパク質と水との相互作用を変えながら高解像度の実時間観察を行える新しい顕微鏡を構築した。開発した高圧力顕微鏡を用いて、生きた大腸菌内でトルク発生を行うべん毛モーターの回転方向を変化させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we developed a new assay that enables to control the functional expression of molecular machines working in living cells. We constructed a new high-pressure microscope that allows us to modulate the intermolecular interactions between protein and water molecules. By using this system, we were successful to change the rotational direction of Escherichia coli flagellar motors.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ化学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子モーター 分子機械 高圧力顕微鏡 水和 べん毛モーター 1分子計測 バイオイメージング

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内に含まれる物質のうち、実に7割は水分子である。タンパク質をはじめとする生体分子は、その表面や内部を水分子に取り囲まれ水素結合を形成している。こうした水とタンパク質の相互作用は、複雑な立体構造形成や、酵素活性をはじめとする生命活動に必須な化学反応を生みだしている。言葉をかえると、タンパク質と水との相互作用を変えることができれば、分子構造や機能も変わることになる。

研究代表者は、これまでから、高圧力下での実時間イメージングを可能にする高圧力顕微鏡の開発を行ってきた。一般に、100 MPa程度の圧力下では、タンパク質分子間の疎水性相互作用や静電相互作用が可逆的に弱まるため、分子構造や機能を可逆的に変化させることができる。また、都合のいいことに、圧力は細胞膜を破壊する事なく、その内部にまで伝達させることができるメリットがある。本研究課題では、生きた細胞内で働くタンパク質分子機械の機能発現をコントロールできる新しい *in vivo* イメージングの技術開発に着手した。

### 2. 研究の目的

大腸菌は、生命科学分野で幅広く利用されている代表的なモデル生物である。高圧力研究においても、常圧環境で生育する生命体が高圧力環境下でどのような影響を受けるのかを調べるため、高圧力下にある大腸菌の細胞増殖や分裂反応に関してよく調べられてきた経緯がある。これまでの研究により、高圧力下にある大腸菌は運動能力を失うことは知られていたが、その詳細な阻害機構は知られていなかった。本研究課題では、生きた大腸菌内で運動能を生み出しているべん毛モーターに注目し、その回転運動が高圧力下でどのように変化するのか明らかにする研究に取り組んだ。数ある代表的な生命機能の中でも運動機能は、実時間観察を可能とする光学顕微鏡の特徴を生かせる研究課題である。高圧力下で各種の顕微観察像を取得できる装置を開発し、新しい分析手法を確立することが目的である。

### 3. 研究の方法

図1に、研究代表者が開発した高圧力顕微鏡の写真を示す。ハンドポンプのレバーを文字通り手で動かすと、圧力媒体である蒸留水が押し込まれ、セパレーター内にある厚さ0.2 mm のテフロン製の膜を変形させる。このテフロン膜の変形を介して、水圧が高圧力チャンバー内を満たす緩衝溶液の圧力へと適切に変換され、高圧チャンバー内に封入した実験サンプルに圧力をかけることができる。

装置の耐圧性能は150 MPaであり、地球上で最も深い場所である太平洋のマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部(10,924 m、海上保安庁観測船による測定値)の静水圧~110 MPaよりも高い値である。この装置を利用して、観測窓に吸着させた直径1 $\mu$ mのビーズを観察したところ、圧力100 MPa条件下であっても結像能や倍率にほとんど影響はなく、常圧力とは変わらぬ解像度で多様な顕微観察像(明視野、暗視野、位相差、蛍光像)が得られることが確認できた(図2)。



図1 高圧力顕微鏡

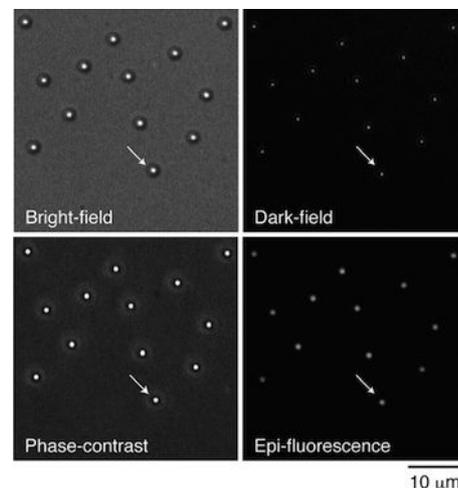


図2 1 $\mu$ mビーズの各種顕微観察像

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸菌の遊泳運動観察

大腸菌は、細胞外に長く伸びたべん毛繊維をスクリューのように回転させることで遊泳運動を行っている。培養した大腸菌を高圧力チャンバーに封入し、菌体の位相差像を観察した。図3に大腸菌の遊泳運動の軌跡を示す。常圧力下(0.1 MPa)では、菌体は約  $20 \mu\text{m s}^{-1}$  の速度で滑らかに泳いでいたが、圧力の増加とともに、泳ぐ菌体の割合や、その速度がだんだん低下していった。圧力が80 MPa に到達するとすべての菌体は遊泳運動を停止し、ブラウン運動により水溶液中を不規則に動きはじめた。常圧力まで減圧したところ、減圧後、菌体は再び、元の運動能を回復したため、高圧力による遊泳運動の阻害は可逆的であることが明らかになった。

##### (2) べん毛モーターの回転運動観察

大腸菌べん毛モーターの回転運動を測定するために、テザードセルの実験を行った。この実験系では、べん毛繊維をカバーガラスなどの光学基盤(今回の実験では高圧力チャンバーの観測窓)に吸着させることで、細胞内にあるモーターが発生する回転運動を細胞本体の回転として手軽に観察できる。圧力を変えながらテザードセルの回転運動がどのように変化するのかを調べた(図4)。

常温常圧(20℃、0.1 MPa)下では、モーターは反時計方向に滑らかに回転していたが、圧力値の増加とともに、回転速度が少しずつ低下した。意外なことに、大腸菌が遊泳運動を完全に停止した80 MPa であっても、モーターは依然として反時計方向に回転運動を持続しており、その速度は、加圧前の約60%であった。さらに、直径250nmの金微粒子を動きの指標としてべん毛繊維に取り付け、低粘性抵抗条件下で回転運動を観察したところ、80MPa であっても大腸菌が遊泳運動を持続できるだけのトルクを発生していることが判明した。

遊泳運動を行う大腸菌は、回転するべん毛繊維を束化することで、一方向性の推進力を発生させている。つまり、高圧力下にある大腸菌の運動能が停止するメカニズムとして、

べん毛繊維の束化阻害が要因として考えられる。

##### (3) べん毛モーターの逆回転運動

テザードセルの実験系を用いて、さらに圧力を高めてモーターの回転運動を観察した。120 MPa 以上の圧力条件下では、一部のモーターは、これまでとは逆方向、つまり、時計方向に回りはじめた。それ以外にも、回転方向を頻繁に変更しながら回転運動を持続するモーターや、回転運動を停止したモーターなども見られた。モーターの回転の方向性について解析したところ、時計方向つまり、逆方向に回転する確率は圧力の増加と共にシグモイド状に増加することが明らかになった。また低温条件下では、より低い圧力で逆に回り出した。反時計方向と時計方向の回転状態が熱平衡状態にあると仮定すると、その平衡定数は高圧力と低温では同じように変化することになる。したがって今回の実験結果は熱力学的にもつじつまがあうことになる。

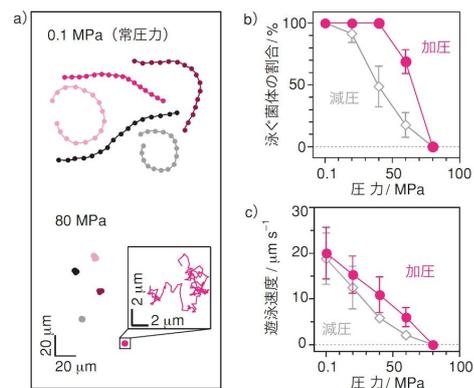


図3 大腸菌の遊泳運動 a) 遊泳運動の軌跡(5秒間). b) 泳ぐ菌体の割合. c) 遊泳速度.

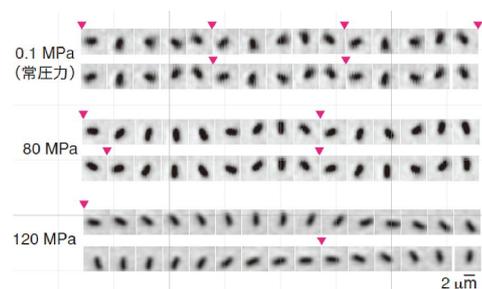


図4 回転するテザードセルの連続画像(1秒間)。同じ菌体の位相差像を各圧力で取得。

自然界では、べん毛モーターの回転方向は、リン酸化型 CheY の結合反応によりコントロールされている。高圧力下をかけることで、あたかもリン酸化型 CheY が結合したかのようにモーターの構造が変化したものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件) \*Corresponding authors

1. \***Nishiyama M.**, *et al.*, (6 名中 1 番目)  
High hydrostatic pressure induces CCW to CW reversals of the *Escherichia coli* flagellar motor. *J. Bacteriol.* **195** (8) 1809-14 (2013).  
【査読有】
2. Okuno D., \***Nishiyama M.** & \*Noji H.  
Single molecule analysis of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase under high hydrostatic pressure. *Biophys. J.* **105**(7) 1635-42 (2013). 【査読有】
3. **西山雅祥** & 木村佳文  
高圧力顕微鏡, *LTM センター誌* **22**, 18-27 (2013). 【査読有】
4. **西山雅祥**  
バクテリア・べん毛モーターが高圧力下で逆向きに回り出す!?, *生物物理* **53** (5) 264-5 (2013). 【査読有】
5. **西山雅祥** & 曾和義幸  
細胞内の水で生命活動を操る!-高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング, *化学* **68** (9) 31-6 (2013). 【査読無】
6. \***Nishiyama M.** & \*Sowa Y.  
Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. *Biophys J.*, **102** (8) 1872-80 (2012). 【査読有】
7. \***Nishiyama M.** & Kojima S.  
Bacterial Motility Measured by a Miniature Chamber for High-Pressure Microscopy. *Int. J. Mor. Sci.* **13** (7) 9225-39 (2012). 【査読有】
8. **西山雅祥**  
染色体を牽引する「分子エンジン」, *化学* **67** (1) 66-7 (2012). 【査読無】

〔学会発表〕(計 17 件)

【招待講演】

1. **西山雅祥** 高圧力を用いたタンパク質分子機械の構造変化イメージング, 日本機械学

会 2013 年度年次大会, 岡山, 2013 年 9 月

2. **西山雅祥** 極限環境で駆動する生体ナノマシンの直接観察, 法政大学ナノテクセミナー, 法政大, 2013 年 8 月
3. **西山雅祥** タンパク質分子モーターの力学変調と高分解能イメージング, 東北大学大学院工学研究科 応用物理学セミナー, 仙台, 2013 年 1 月
4. **Nishiyama M.** Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. 9<sup>th</sup> International Conference on Flow Dynamics, Sendai, Sept 2012
5. **西山雅祥** バクテリア遊泳運動の力学変調イメージング, 法政大学ナノテクセミナー, 法政大, 2012 年 8 月
6. **西山雅祥** 生物分子モーターの 1 分子計測と熱ラチェット型運動機構, 力学的決定性と統計性の中間領域を探る IV, 関西セミナーハウス (京都), 2012 年 3 月
7. **西山雅祥** 高圧力下での生体分子機械の運動機能変調イメージング, 日本機械学会 第 24 回バイオエンジニアリング部門 講演会, 大阪大学, 2012 年 1 月
8. **Nishiyama M.**, High-pressure microscopy for modulating the structure and function of biomolecules. 第 49 回 日本生物物理学会年会, 姫路, 2011 年 9 月

【一般発表】

1. **西山雅祥**, 曾和義幸, 高圧力顕微鏡の開発と生体分子機械の運動変調, 応用物理学会, 相模原, 2014 年 3 月
2. **Nishiyama M.** & Sowa Y., Dynamic conformational changes of flagellar filament observed by high-pressure microscopy BLAST XI, Tucson, USA, Jan 2013. " Selected as a Talk "
3. **西山雅祥** ATP 駆動型分子モーターの運動変調イメージング, 特殊環境微生物セミナー, 海洋研究開発機構・横浜研究所, 2012 年 11 月
4. **Nishiyama M.** & Sowa Y. Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. 7th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, Otsu, Japan,

Oct 2012.

5. 西山雅祥, 曾和義幸, 高圧力下で大腸菌の遊泳運動を観察する, 第9回21世紀大腸菌研究会, 長浜, 2012年6月
6. 西山雅祥, Bacterial Motility at High Pressure, 2012年べん毛研究交流会, 静岡, 2012年3月.
7. **Nishiyama M.** & Sowa Y., Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure. 56th Annual Meeting of Biophysical Society, San Diego, USA, Feb 2012. “ Selected as a Talk ”
8. 西山雅祥, 曾和義幸, 高圧力下にあるバクテリア遊泳運動の阻害機構, 2012年生体運動研究合同班会議, 筑波, 2012年1月
9. **Nishiyama M.** & Sowa Y., Microscopic analysis of bacterial motility at high pressure, 第49回日本生物物理学会年会, 姫路, 2011年9月.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西山雅祥 (MASAYOSHI NISHIYAMA)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号 : 10346075