

機関番号：32606  
 研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2006 年度～2010 年度  
 課題番号：18074008  
 研究課題名（和文）3次元を検出する新しい原理の光学顕微鏡で解明する膜超分子モーターの作動原理  
 研究課題名（英文）Mechanics of supermolecular motor proteins revealed by an advanced optical microscope designed to track three dimensional dynamics.  
 研究代表者  
 西坂 崇之（TAKAYUKI NISHIZAKA）  
 学習院大学・理学部・教授  
 研究者番号：40359112

研究成果の概要（和文）：新しい光学顕微鏡技術を用い、膜超分子モーター（主に FoF1-ATPase）の作動原理について、分子のレベルにおける解明を試みた。タンパク質の部分的な領域が機能する瞬間のダイナミクスが可視化され、化学反応と対応づけることもできた。さらにキネシン-微小管系におけるコクスクリュ運動の直接可視化にも成功した。これらの技術や成果は「1分子構造生物学」という新しい学問領域に発展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The final goal of our group is to establish the missing link between chemical reaction and mechanical event in molecular motors. To achieve this, we have developed advanced versions of conventional optical microscopes and applied them into single-molecule techniques. Our main contributions are following two studies: one is about the kinesin-microtubule system and the other F1-ATPase. These techniques are applicable to other molecular machines, hopefully in more sophisticated ways, and we hope to investigate this in future studies as a new research field 'single-molecule structural biology.'

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	24,300,000	0	24,300,000
2007 年度	24,300,000	0	24,300,000
2008 年度	24,300,000	0	24,300,000
2009 年度	23,300,000	0	23,300,000
2010 年度	16,200,000	0	16,200,000
総計	112,400,000	0	112,400,000

研究分野：生物学／複合新領域

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理学

キーワード：1 分子生物物理学 光学顕微鏡 分子モーター タンパク質科学 顕微操作

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の代表的な特許として、①粒子の運動を3次元で検出することのできる光学系、および②色素1分子の角度を高い精度で決定できる全反射型顕微鏡がある。これらの技術は、空間分解能と時間分解能の2点について性能を向上させれば、蛋白質の動作機構について分子レベルで調べられるというポテンシャルを持つ。これまでに研究代表者は、

アクチン-ミオシン系リニアモーターや、回転分子モーターについての研究を進めており、新しい技術をこういったモーター蛋白に応用する方向性を打ち出していた。

## 2. 研究の目的

新しい光学顕微鏡技術を用い、膜超分子モーター（主に FoF1-ATPase）の作動原理につ

いて、分子のレベルにおける解明を進める。蛋白質はその特徴的な機能を実現するために、内部における特定の部位の構造変化を必ず伴う。その検出は通常ナノメートルレベルであり、一般の光学顕微鏡で検出することは不可能である。これまではX線結晶解析から得られたスナップショットをもとに議論されてきたが、新しい技術により、直接可視化することを試みる。従来はNMRやX線結晶解析でしか議論されなかった蛋白質の構造変化について、活性を持った1分子を対象に研究を行うことができるようになるはずである。

### 3. 研究の方法

顕微鏡開発のパートについては主に研究代表者の西坂が進め、生物試料については研究分担者・研究員・また共同研究者が提供するものを対象に測定を行った。ダイナミックな構造変化が期待される蛋白質もしくは部位にマーカーを標識し、その動きをナノメートルレベルの3次元の変位、もしくは角度の変化として、定量的に捉えるという実験系を構築した。解析についても、それぞれの測定に特化したものを1個の蛍光色素で標識し、その部位のわずかな動きを角度の変化として定量的に捉える。

### 4. 研究成果

#### 1) 分子モーターによる微小管の回転観察の直接測定

開発した3次元位置検出手法を用い、リニア分子モーターであるキネシン・微小管系における回転成分を検出する研究を進めた。装置開発については、助成研究者である西坂、研究室に所属する学生である水谷佳奈氏が行い、生物試料の調製と実際の測定については、科研費研究員である矢島潤一郎氏が行った。

最初に Qdot を微小管に特異的に結合し、ガラス面上に結合したキネシンによってこの微小管が滑り運動が観察できる実験系を開発した。キネシンにゲルゾリンという別のタンパク質を融合したリコンビナントを用い、また Qdot と微小管の結合にはビオチン-アビジン系をのりとして用いている。

この Qdot の動きを通じて、微小管のコークスクリュー状の動きを直接観察する実験系が完成された。これまでも、微小管の先端や後端に非対称なマーカーを付け、その動きから回転を定量化する方法は存在したが、タンパク質レベルの大きさである~10 ナノメートルのプローブによって回転を直接観察した成果は今回が初めてである。

この手法を用い、キネシン-1、および細胞分裂に関与するキネシン-5について、双頭もしくは単頭の場合にどのような回転運動を行うかが詳細に調べられた。回転のピッチは processivity に関与することが分かり、リニアモーター Eg5 が回転モーターとして機能する様子が、ありありと画像化された。

この成果に関連して、科研費研究員の矢島潤一郎氏は、平成 19 年度の生物物理学会若手奨励賞を受賞した(発表研究題目「単頭キネシンによる微小管の並進・回転運動機構の研究」)。また中心となる成果については、原著論文 (Junichiro Yajima, Kana Mizutani & Takayuki Nishizaka “A torque component present in kinesin-5 revealed by 3D tracking” *Nature Structural and Molecular Biology* **15**, 1119-1121 (October 2008)) として発表した。

現在、ATP 濃度や分子モーターの密度、変異体の影響といった点から回転のピッチを測定し、キネシンモーターが回転を生み出す機構を分子レベルで調べている。

以上、3次元位置検出手法を用いて分子モーターの新しい性質を解明した成果は、国内においても国際的にも高い評価を得ている。研究員であった矢島氏は、2010 年度より東京大学大学院・総合文化研究科の准教授として採用され、引き続き分子モーターの研究を研究代表者と共同で発展させている。

#### 2) タンパク質内部のコンフォメーション変化の可視化

化学状態と蛋白質内部のコンフォメーション変化がどのように対応しているかは、生物物理学における最重要課題の1つである。この問いに答える目的で、色素の振動モーメントの向きを、特殊な全反射型顕微鏡で可視化するという方法を用い、F1-ATPase の構造変化を、特定の領域に限定して可視化することに成功した。

$\beta$  サブユニットの C 末端ドメインの構造変化について、1分子のレベルで再現性良く検出でき、さらにバイブリッドのミュータントを用いることで化学状態とのカップリングも明らかにできた。

この成果に関連して、研究分担者の政池知子氏は、平成 20 年度の生物物理学会若手奨励賞を受賞した(発表研究題目「F1-ATPase をモデルとした1分子構造変化検出による酵素機能発現の理解」)。また中心となる成果については、原著論文 (Tomoko Masaïke, Fumie Koyama-Horibe, Kazuhiro Oiwa, Masasuke Yoshida & Takayuki Nishizaka “Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations” *Nature Structural and Molecular Biology* **15**, 1326-1333 (December 2008)) として発表した。さらに新聞(朝日新聞3月9日

朝刊、9 ページ) にも報道された。  
以上、偏光変調全反射型蛍光顕微鏡によるタンパク質コンフォメーションの可視化を成し遂げた成果は、国内においても国際的にも非常に高い評価を得ている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Tsuji, T., S. Kawai-Noma, C.G. Pack, H. Terajima, J. Yajima, T. Nishizaka, M. Kinjo, H. Taguchi, Single-particle tracking of quantum dot-conjugated prion proteins inside yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. 405(4): p. 638-43.
2. Nishizaka, T., Molecular Bio-Motors in Living Cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2010.
3. Tabata, K.V., K. Sato, T. Ide, T. Nishizaka, A. Nakano, H. Noji, Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J*, 2009. 28(21): p. 3279-89.
4. 政池知子, 西坂崇之, 蛋白質の局所構造変化を 1 個のレベルで可視化する, 蛋白質・核酸・酵素, 2009, 54, 1919-1927
5. Yajima, J., K. Mizutani, T. Nishizaka, A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008. 15(10): p. 1119-21.
6. Masaïke, T., F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008. 15(12): p. 1326-33.
7. Nishizaka, T., K. Mizutani, T. Masaïke, Single-Molecule Observation of Rotation of F1-ATPase Through Microbeads. *Methods Mol. Biol.*, 2007. 392: p. 171-82.
8. Nishizaka, T., T. Masaïke, 化学反応の 1 分子イメージング技術, 蛋白質・核酸・酵素, 2007. 52(4): p. 317-22.
9. 西坂崇之, 政池知子, F1-ATPase の化学-力学カップリング: 1 分子の反応を顕微鏡でとらえる, *生物物理*, 2007, 47, 118-123
10. Muneyuki, E., T. Watanabe-Nakayama, T. Suzuki, M. Yoshida, T. Nishizaka, H. Noji, Single Molecule Energetics of F1-ATPase Motor.

*Biophys J*, 2007. 92(5): p. 1806-12.

11. Adachi, K., K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuïke, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., Coupling of rotation and catalysis in F1-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell*, 2007. 130(2): p. 309-21.

[学会発表] (計 7 2 件)

招待講演と口頭発表のみ記入

1. 西坂崇之, 矢島潤一郎, 須河光弘, 足立健吾, 政池知子 “Imaging structure and function of motor proteins under optical microscopes.” 7th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium & Annual Meeting of the Indian Biophysical Society (IBS), India Habitat Center, New Delhi, India (February 2, 2011)
2. 西坂崇之 “分子モーターの動態を可視化する光学顕微鏡技術” 第 5 回 NIBB バイオイメージングフォーラム, 岡崎コンファレンスセンター (January 11, 2011)
3. 政池知子, 龍口文子, 西坂崇之 “回転分子モーター F1-ATPase のイメージング Imaging of rotary molecular motor F1-ATPase.” 日本生物物理学会 第 48 回年会, 東北大学・川内北キャンパス (September 21, 2010)
4. 西坂崇之, 足立健吾, 龍口文子, 政池知子 “プリズムによる 3 次元光学トラッキング技術の応用 / 1 分子を対象にした光ピンセット操作と 3 次元立体視表示 Application of 3-D prismatic optical tracking: single-molecule optical tweezers approach and stereoscopic 3-D view.” 日本生物物理学会 第 48 回年会, 東北大学・川内北キャンパス (September 20, 2010)
5. 西坂崇之 “Imaging function of motor proteins under optical microscopes” International workshop on dynamic cross-effect in softly condensed matter, 国立情報学研究所(4th November 2009)
6. 田端和仁, 佐藤健, 井出徹, 西坂崇之, 中野明彦, 野地博行 “Visualization of COPII vesicle formation process reconstituted in the artificial lipid bilayer” 「人工脂質二重膜上に再構成した COPII 小胞形成過程のイメージング」 日本生物物理学会 第 47 回年会, アスティとくしま, 2009 年 10 月 30 日

7. 西坂崇之、足立健吾、矢島潤一郎、Sergey V. Mikhailenko、須河光則、政池知子“Imaging structure and function of motor proteins at the single molecular level”International Symposium: Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins, 京都芝蘭会館 (9th Sep., 2009)
8. 西坂崇之「光学顕微鏡による分子モーターの構造機能相関の可視化」生理学研究所研究会「作動中の膜機能分子の姿を捉えるー静止画から動画へー」自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター (3rd Sep., 2009)
9. 西坂崇之、矢島潤一郎、足立健吾、政池知子“Imaging structure and function of motor proteins at the single molecular level” TSRC Workshop on Protein Dynamics, Telluride Science Research Center, Telluride U.S.A. (6th Aug., 2009)
10. 西坂崇之、矢島潤一郎、足立健吾、政池知子“Visualizing structure dynamics and function in single motor proteins” The 4th Asian And Pacific Rim Symposium On Biophotonics, The Shilla Jeju, South Korea (28th May., 2009)
11. 政池知子、小山 史恵、龍口 文子、大岩 和弘、吉田 賢右、西坂 崇之「触媒サブユニットの構造変化から探る F1-ATPase の回転駆動メカニズム」第 9 回日本蛋白質学会年会、シンポジウム「タンパク質のダイナミクス計測のためのイメージング技術」、熊本全日空ホテルニュースカイ、2009 年 5 月 22 日
12. 西坂崇之、矢島潤一郎、Sergey V. Mikhailenko、政池知子“Imaging structure and function of motor proteins by using advanced optical microscopes” The 6th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, HKUST, Hong Kong (13th Jan., 2009)
13. 西坂崇之、矢島潤一郎、政池知子「生体分子の構造と機能を 1 個のレベルで可視化する」BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム「生命システムの階層間をまたぐイメージング技術」、神戸ポートアイランド、2008 年 12 月 12 日
14. 政池知子、小山-堀部史恵、大岩和弘、吉田賢右、西坂崇之“F1-ATPase as a model for understanding mechanisms of enzyme functions through detection of conformational changes in single molecules” 「F1-ATPase をモデルとした 1 分子構造変化検出による酵素機能発現の理解」日本生物物理学会 第 46 回年会 若手奨励賞 招待講演、福岡国際会議場、2008 年 12 月 3 日
15. 西坂崇之、矢島潤一郎、政池知子“Direct observation of structure and function of motor proteins at single molecular level” International Symposium on Surface Science and Nanotechnology シンポジウム講演、早稲田大学、2008 年 11 月 11 日
16. 西坂崇之「光学顕微鏡を用いた 1 分子構造生物学への挑戦」第 3 回 生体分子イメージングの新たな技術開発に関する研究会、名古屋市桜華会館、2008 年 2 月
17. 西坂崇之、宮田真人、政池知子“Imaging structure and function of motor proteins at the single molecular level by using advanced optical microscopes” 日本生物物理学会 第 45 回年会 シンポジウム講演、パシフィコ横浜、2007 年 12 月
18. 政池知子、小山史恵、吉田賢右、大岩和弘、西坂崇之“Conformational changes of the catalytic subunit  $\beta$  in single F1-ATPase molecules revealed by TIRF microscopy with polarization modulation” 日本生物物理学会 第 45 回年会 シンポジウム講演、パシフィコ横浜、2007 年 12 月
19. 原田慎吾、西坂崇之、政池知子“Measurements of phosphate release from a mutant F1-ATPase using phosphate binding protein” 第 30 回 日本分子生物学会年会・第 80 回 日本生化学会大会 合同大会 口頭発表、パシフィコ横浜、2007 年 12 月
20. 西坂崇之“Biomechanics of Motor Proteins on a Molecular Scale” The International Conference on Science of Friction、伊良湖ビューホテル、2007 年 9 月
21. 西坂崇之、水谷佳奈、中根大介、見理剛 (国立感染症研究所)、矢島潤一郎、宮田真人、政池知子「細胞と分子モーターの動きを画像化する新しい顕微鏡技術」日本マイコプラズマ学会・第 34 回学術集会、紀州加太休暇村、2007 年 5 月
22. 鈴木純也、寺島勲、水谷佳奈、政池知子、宮田真人、西坂崇之「光ピンセットを用いた Mycoplasma mobile のゴーストの

力測定」日本マイコプラズマ学会・第 34 回学術集会、紀州加太休暇村、2007 年 5 月

23. 西坂崇之 “Single Molecule Nano-Biology — Watch and Touch Single Molecules” JAFoS 2006, Portland USA, 2006 年 12 月 (Invited Chair)

24. 政池知子、岡田薫、水谷佳奈、吉田賢右、西坂崇之 「新しい顕微鏡技術を用いたFoF1-ATP合成酵素の分子内コンフォメーション変化の検出」日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋国際会議場、2006 年 12 月

25. 吉田由美、下澤東吾、西坂崇之、石渡信一、竹内昌治 “Muscle proteins as high speed nano transporters on micro patterns.” MEMS 2006、Istanbul Convention & Exhibition Centre、Istanbul、Turkey、2006 年 1 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 4 件)  
国内と PCT のみ記入

1. 名称：3次元位置観測方法及び装置  
発明者：西坂崇之  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構  
種類：特許  
番号：PCT/JP2006/312958  
出願年月日：平成 18 年 6 月 29 日  
国内外の別：国外

2. 名称：暗視野顕微鏡およびその調整方法  
発明者：西坂崇之 (75%)、安田涼平 (25%)  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構  
種類：特許  
番号：特願 2006-144050  
出願年月日：平成 18 年 5 月 24 日  
国内外の別：国内

3. 名称：暗視野顕微鏡およびその調整方法  
発明者：西坂崇之 (75%)、安田涼平 (25%)  
権利者：独立行政法人科学技術振興機構  
種類：特許  
番号：PCT/JP2007/6055  
出願年月日：平成 19 年 5 月 23 日  
国内外の別：国外

○取得状況 (計 1 件)

1. 名称：高時間分解能画像化方法及び装置並びに全反射型蛍光顕微鏡

発明者：西坂崇之

権利者：独立行政法人科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許 4 4 4 8 4 7 1 号

取得年月日：平成 1 7 年 3 月 3 1 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.gakushuin.ac.jp/univ/sci/phys/nishizaka/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西坂崇之 (TAKAYUKI NISHIZAKA)

研究者番号：40359112

学習院大学 理学部 教授

(2)研究分担者

政池知子 (TOMOKO MASAIKE)

研究者番号：60406882

学習院大学 理学部 助教

(3)研究員 3 名

矢島潤一郎 (YAJIMA JUNICHIRO)

足立健吾 (ADACHI KENGO)

須河光弘 (SUGAWA MITSUHIRO)

(4)研究補助員 2 名

堀部恵子 (HORIBE KEIKO)

龍口文子 (TATSUGUCHI AYAKO)