

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：63903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02418

研究課題名(和文) 生体1分子オングストローム計測法の開発

研究課題名(英文) Development of single-molecule measurement with angstrom precision

研究代表者

飯野 亮太 (IINO, Ryota)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領域・教授

研究者番号：70403003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：プラズモニック金属ナノ粒子の散乱イメージングを用いた光学顕微鏡1分子計測で、原子レベル(オングストロームレベル)の位置決定精度とマイクロ秒の時間分解能を達成する手法を開発した。また、開発した生体1分子オングストローム計測法をキネシン、V1-ATPaseといったリニア分子モーターや回転分子モーターに適用することに成功し、その化学力学共役機構や運動素過程の詳細を解明した。さらに、銀ナノ粒子と金ナノ粒子をプローブに用いたデュアルカラー高速高精度1分子計測法や、生体分子モーター1分子の運動の軌跡から化学状態に依存した自由エネルギープロファイルを推定する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体1分子オングストローム計測法により、高度な機能を発現する生体分子機械の作動原理を原子レベルの位置決定精度で解明することが可能になり、生体分子モーターのエネルギー変換機構の多様性や普遍性が明らかとなりつつある。また本手法は、生体分子機械よりもずっと小さな人工分子機械の原子レベルの動きの可視化にも有用と考えられ、生物学のみならず化学分野における応用展開も期待される。さらに、デュアルカラー高速高精度1分子計測法は3色以上のマルチカラーに発展させることが可能であり、従来の蛍光イメージング代わる汎用的バイオイメージング技術となり得る可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed an optical microscopic single-molecule method based on the scattering imaging of plasmonic metal nanoparticles, and achieved atomic-level (angstrom-level) localization precision and microsecond time resolution. In addition, the developed method has been successfully applied to linear and rotary molecular motors such as kinesin and V1-ATPase to elucidate their chemo-mechanical coupling mechanism and elementary process of motion in detail. Furthermore, we have developed a dual-color, high-speed/high-precision single-molecule measurement method using silver and gold nanoparticles as probes, and a method estimating chemical state-dependent free energy profile from the single-molecule trajectory of the movement of molecular motor.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター 1分子計測 光学顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

光学顕微鏡による1分子計測は、生体分子モーターの運動素過程の可視化を目的として1990年代半ばに勃興し、日本の研究者が大きく貢献してきた。光学顕微鏡の空間分解能は観察波長の半分程度だが、1分子の観察像(点像分布関数)の中心位置を見積もることで1 nmの位置決定精度を達成でき、分子モーターがダイナミックに動く様子をリアルタイムで計測できる。この「1分子ナノ計測法」は、分子モーターの作動機構の解明に寄与してきた。

1分子ナノ計測のプロブとしてよく用いられるのは蛍光色素とポリスチレンビーズである。蛍光色素は「小さな」プロブであり、分子モーターとの1:1標識が容易という利点を持つ。一方、得られるフォトン数が限られるため、計測の時間分解能はミリ秒程度が限界という欠点がある。さらに、不可逆的に褪色するため長時間の観察は困難である。ポリスチレンビーズは「大きな」プロブであり、高いS/Nの像が得られるのでマイクロ秒の時間分解能が達成でき、褪色もしない。しかし水の粘性抵抗が大きく、分子モーターの自由な動きを抑制してしまうという欠点がある。これらの欠点のため、分子モーターの作動機構は完全には明らかになっていない。

我々が開発してきた金属ナノプロブによる1分子計測は、上記の欠点を克服でき、分子モーターの作動機構に迫ることができる。金ナノ粒子は光を強く散乱し、1 nmの位置決定精度とマイクロ秒の時間分解能を達成することができる。金ナノ粒子にかかる水の粘性抵抗は無視できるほど小さく、結合位置を適切に選べば分子モーターの機能を阻害せずに本来の速い自由な動きを追うことができる。また褪色もせず、長時間観察が可能である。

## 2. 研究の目的

本課題では金属ナノプロブを用い、生体1分子計測法の位置決定精度を原子レベルに改善した「1分子オングストローム計測法」を開発する。本手法を様々なリニア分子モーター、回転分子モーターに適用し、高速かつ高精度で1分子計測することで、これまでに観えていなかった動きを可視化する。これにより、一方向性運動の機構、高効率なエネルギー変換の機構、分子モーターを構成するサブユニット(部品)間の協調機構の徹底的な理解を行う。金属ナノプロブを用いて、分子モーターの揺らぎを含めた速い自由な動きを高速・高精度で観察する手法は申請者ら独自の取り組みである。本課題で開発する手法は分子モーターだけでなく生体分子機械の全般に適用可能であり、その創造性、発展性は高い。

## 3. 研究の方法

### (1) 1分子オングストローム計測法の開発

我々が以前開発した全反射レーザー暗視野顕微鏡をさらに改善した。画像ピクセルサイズの最適化、試料ステージのドリフト最小化、顕微鏡密閉化による背景光揺らぎの低減等に取り組んだ。また、アキシコンレンズを用いた輪帯照明光学系を構築してより高いレーザーパワーを利用可能にした。開発した手法をリニア分子モーターキネシンに適用して運動素過程を可視化し、キネシンは直進運動の際に一方向に回転していることを提案した。さらに、銀ナノ粒子と金ナノ粒子はプラズモン共鳴波長の違いに起因し散乱効率の高い波長が異なる性質を利用し、それぞれの共鳴波長に合わせたレーザーによる照明とデュアルビュー結像光学系を組み合わせ、銀ナノ粒子、金ナノ粒子を識別して同時に計測するデュアルカラー高速高精度1分子計測法を開発した。

### (2) $V_1$ -ATPaseの1分子計測

1分子オングストローム計測法を、腸内細菌 *Enterococcus hirae* 由来の回転分子モーター $V_1$ -ATPaseに適用し、化学力学共役機構の詳細を解明した。

### (3) 化学状態に依存した生体分子モーターの自由エネルギープロファイルの推定

生体分子モーター1分子の運動の軌跡における化学状態を「隠れた」状態とし、隠れマルコフモデルによりその状態遷移を取り扱った。また、ベイズ推定の枠組みで、化学状態依存的自由エネルギープロファイル、拡散係数、状態間遷移速度定数を推定する手法の開発を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 1分子オングストローム計測法の開発

まず、位置決定精度の下限値を決める要素を特定するため、入射光強度や粒径を変えて計測を行った。その結果、位置決定精度はフォトン数の平方根に比例して向上することを確認した。この結果は、位置決定精度を定める理論式とよく一致した。さらに、従来の全反射レーザー暗視野顕

微鏡の位置決定精度の下限値が約 3 Å であり、検出器（高速 CMOS カメラ）の信号の飽和が下限値を決めることを見いだした。検証結果に基づき、位置決定精度の向上を図るため、アキシコンレンズを用いた輪帯照明型の全反射レーザー暗視野顕微鏡を開発した。輪帯照明にすることで、これまで対物レンズの 1 点に集光していたレーザー光を円状に分散できた。これにより対物レンズの光損傷を抑え、入射可能な光強度を高めることを可能にした。さらに、検出器のピクセルサイズを小さくすることで、信号の飽和を抑制した。これらの改良により、位置決定精度の下限値を 1.3 Å まで向上させることに成功した（図 1）。

また、位置決定精度と時間分解能の関係についても検証した。モータータンパク質の動作は、化学反応素過程がミリ秒、化学反応を引き金とした機械的な運動がマイクロ秒の時間スケールで進行する。モータータンパク質が動く仕組みを理解するには、高い位置決定精度と共に、高い時間分解能が必要となる。しかし、時間分解能と位置決定精度はトレードオフの関係にある。時間分解能が高いほど、画像 1 フレームで得られる光子数が低下し、位置決定精度が低下するためである。今回開発した装置は、入射光強度を高めることができるため、高速かつ高精度な 1 分子計測を実現できる。実際、33 μs の時間分解能で 5.4 Å の位置決定精度を達成した。

次に、金ナノ粒子の粒径と位置決定精度の関係についても検証した。金ナノ粒子にかかる慣性力や水の粘性抵抗は、モータータンパク質の動きを阻害しない程度に十分小さいことが確認されているが、さらに粒径を下げることであれば、生体分子の動きを妨げる可能性をより低減できる。しかし、粒径と位置決定精度もトレードオフの関係にあり、粒径の低下に伴って散乱強度が非線形に減少する。粒径 20 nm、30 nm、40 nm の金ナノ粒子を計測して比較した結果、散乱強度が粒径の 4 乗に比例して大きく変化することを確認した。しかし、開発した顕微鏡装置では入射光強度を高めることで微小な粒子からも強い散乱光を得られ、粒径 30 nm でも 1.9 Å の位置決定精度が達成可能であった。

さらに、開発した高位置決定精度かつ高速な 1 分子計測法を用い、キネシンが微小管上を歩行する様子を観察した（図 2）。キネシンの片方の足に粒径 40 nm の金ナノ粒子を結合し、10 μs の時間分解能で足の動きを詳細に観察した。先行研究では、微小管から外れた足は進行方向に対して右側で揺らぐ（ブラウン運動する）ことが明らかとなっており、キネシンは一方方向に回転しながら直進運動する可能性が示唆されていた。今回、さらに高い時間分解能で観察することで、微小管に結合している足が離れる瞬間の動きが明らかになった。足が離れる際、進行方向に対し左側に向かう動きがみられなかったことから、キネシンは確かに回転しながら直進していると結論した。

また、銀、金ナノ粒子を用いたデュアルカラー高速高精度 1 分子計測では、粒径 40 nm の銀ナノ粒子に波長 404 nm のレーザー、粒径 40 nm の金ナノ粒子に波長 520 nm のレーザーを照明光として用いることで、両者をデュアルビュー光学系の 2 つのチャンネルで同時に観察することが可能であった。2 つのチャンネル間のシグナルのクロストークや背景光は十分に低く、8.9 μs の時間分解能でのリン脂質分子の拡散運動の 1 分子計測を達成した。

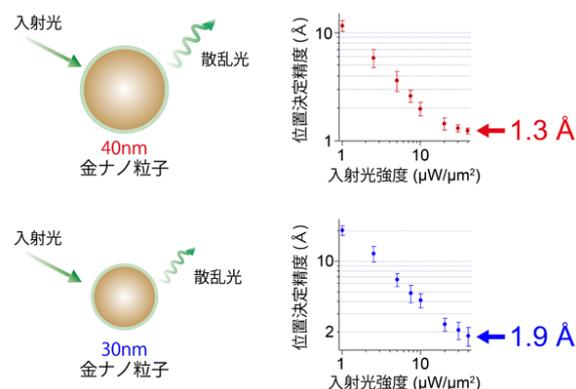


図 1. 金ナノ粒子の位置決定精度と入射光強度の関係。(上) 直径 40nm の場合。位置決定精度の下限値は 1.3 Å。(下) 直径 30nm の場合。位置決定精度の下限値は 1.9 Å。

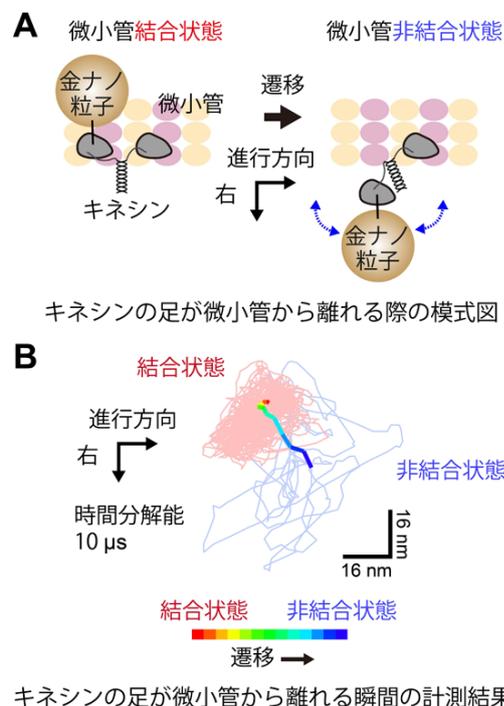


図 2. 金ナノ粒子を片足につけたキネシンの運動。(A) キネシンの片足が微小管から離れる前後の模式図。(B) 片足が微小管から離れる瞬間の金ナノ粒子の動き。

## (2) $V_1$ -ATPase の 1 分子計測

$V_1$ -ATPase の回転軸に粒径 40 nm の金ナノ粒子を回転運動の可視化プローブとして取り付け、100  $\mu$ s の時間分解能で回転運動を 1 分子計測することに成功した。その結果、1 個の ATP の加水分解に相当する 120° の回転がさらに、40° と 80° のより小さな角度の回転 (サブステップ) に分離できることを初めて発見した (図 3)。また、ATP 加水分解が遅い変異体を用い、さらに反応生成物の ADP を加えた実験では、本来の回転方向 ( $V_0$  部分からみて反時計回り) とは逆向きに -80° もしくは -40° 回転する様子が観察された (図 4)。回転運動中の停止時間の分布を解析することで、40° サブステップ前の停止では 3 つ、80° サブステップ前の停止では 1 つ、合計で 4 つの時定数が得られ、これらの時定数が ATP 加水分解反応の 4 つの素過程 (ATP の結合、ATP のリン酸結合の開裂、反応生成物 ADP の解離、反応生成物リン酸の解離) に対応することを明らかにした。さらに、1 分子計測で得られた結果を X 線結晶構造解析による構造情報と組み合わせることで、 $V_1$ -ATPase の化学力学共役機構のモデルを提案した (図 5)。

本研究で明らかにした  $V_1$ -ATPase の化学力学共役機構では、反応生成物のリン酸が先に  $V_1$ -ATPase から解離し、もう一つの反応生成物の ADP は後から解離する。類縁の回転分子モーター  $F_1$ -ATPase との比較で興味深いのは、 $F_1$ -ATPase ではこの順番が逆 (ADP が先、リン酸が後) な点である。細胞内には ATP と ADP の両方が存在し、しかも ATP の濃度は ADP の 10 倍程度高いことが知られている。よって  $F_1$ -ATPase が細胞内で ATP 加水分解の逆反応である ATP 合成を行うためには、このような細胞内環境下で ATP ではなく ADP を選択的に結合する必要がある。 $F_1$ -ATPase は逆反応の ATP 合成時、リン酸を先に結合することで ATP の結合を防いでいると考えられている。他方、細胞内での  $V_1$ -ATPase の役割は ATP 加水分解によるイオンの能動輸送 (電気化学ポテンシャルの形成) であり、この場合はリン酸と ADP のどちらが先に解離しても問題ないと考えられる。このように、 $F_1$ -ATPase と  $V_1$ -ATPase の化学力学共役機構の違いは、それぞれの生理的な役割と密接に関係していることが示唆された。

今後は水溶性の  $V_1$ -ATPase だけでなく、 $V$ -ATPase 複合体 ( $V_0$  と  $V_1$  の複合体全体) を対象とし、エネルギー変換機構、エネルギー変換効率および可逆性について理解したいと考えている。 $V$ -ATPase は、ナノサイズのエネルギー変換装置であり、ナノサイズの発電装置とも言える。本研究を  $V$ -ATPase のエネルギー変換の仕組みの研究へとさらに発展させることで将来、生体に適合したナノサイズの発電装置の開発等に繋がる可能性が期待される。

## (3) 化学状態に依存した生体分子モーターの自由エネルギープロファイルの推定

最初にも、生体分子モーターの運動のモデル化を行った。生体分子モーターの運動は、化学状態に応じて切り替わる自由エネルギープロファイル上の拡散運動であると考えられる。具体的には例えば、図 6A で示すように、1 分子の運動の軌跡の中で、化学状態 1 の自由エネルギー面上で運動する部分 (赤色) と化学状態 2 の自由エネルギー面上で運動する部分 (青色) に分けることができる。しかし通常、この化学状態の切り替えを 1 分子計測で同定することは容易ではない。そこで、化学状態を「隠れた」状態として、隠れマルコフモデルを用いてその状態遷移を取り扱った (図 6B)。

この隠れマルコフモデルに基づいて、モデルがどれだけ実際の 1 分子の運動の軌跡に適合しているかを評価する確率 (尤度) を計算した。また、自由エネルギープロファイルについてあらかじめ予想されることを事前確率としてモデリングした。この尤度と事前確率の積で表される事後確率を用いたモンテカルロ・サンプリングにより、ベイズ推定の枠組みで、化学状態依存的な自由エネルギープロファイル、拡散係数、状態間遷移速度定数を推定する手法を開発した。

次に、開発した手法をリニア分子モーターであるキチナーゼに適用した。キチナーゼが糖鎖を分解しながら 1 方向に運動する軌跡のデータにこの手法を適用した結果、その背後にある特徴的な自由エネルギープロファイルを推定することができた (図 7)。この結果からキチナーゼは、

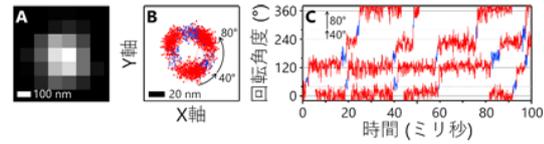


図 3.  $V_1$ -ATPase の回転運動の例

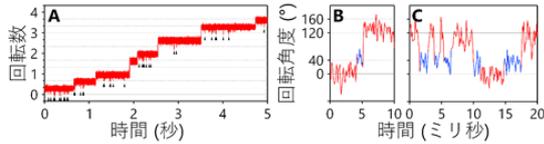


図 4.  $V_1$ -ATPase のバックステップの例

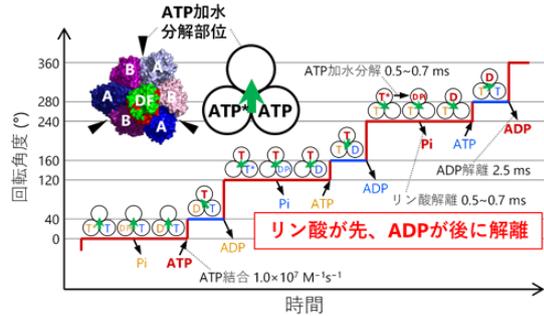


図 5.  $V_1$ -ATPase の化学力学共役機構。

比較的低い自由エネルギー障壁を超えてブラウン運動することで糖鎖を触媒サイトに引き込み、糖鎖の加水分解反応と生成物解離により化学状態が切り替わることで、1方向性運動を実現していることが明らかとなった。本成果により、我々が以前提唱した Burnt-bridge ブラウニアンラチェット機構に物理的な基礎を与えることができた。

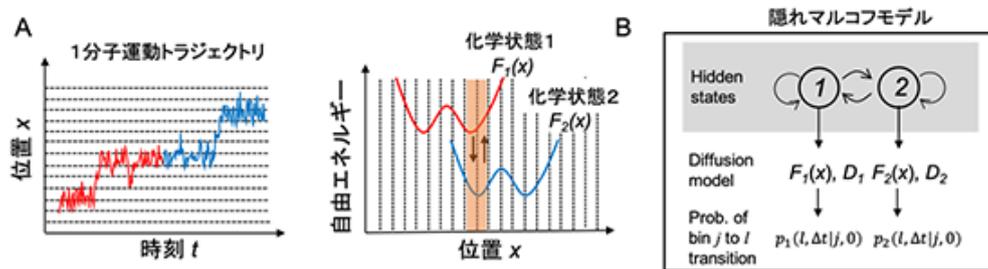


図6. (A) 1分子の運動の軌跡と、対応する化学状態依存的自由エネルギープロファイル。(B) 化学状態を「隠れた」状態として扱う隠れマルコフモデル。

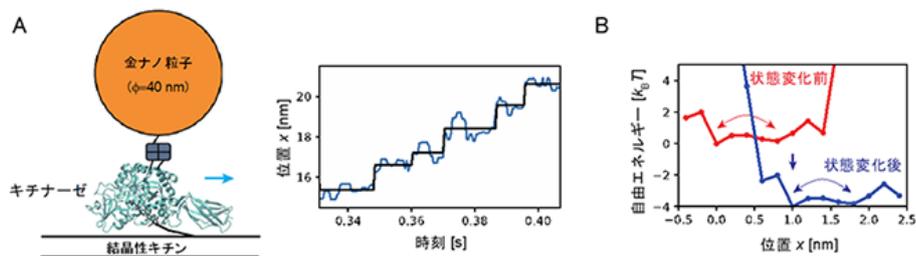


図7. (A) キチナーゼ1分子実験における1方向性運動。(B) 推定された化学状態依存的自由エネルギープロファイル。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iida T, Minagawa Y, Ueno H, Kawai F, Murata T, Iino R	4. 巻 294
2. 論文標題 Single-molecule analysis reveals rotational substeps and chemo-mechanical coupling scheme of <i>Enterococcus hirae</i> V1-ATPase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 17017-17030
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.008947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ando J, Nakamura A, Visootsat A, Yamamoto M, Song C, Murata K, Iino R	4. 巻 115
2. 論文標題 Single-nanoparticle tracking with angstrom localization precision and microsecond time resolution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2413-2427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2018.11.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okazaki K, Nakamura A, Iino R	4. 巻 124
2. 論文標題 Chemical-state-dependent free energy profile from single-molecule trajectories of biomolecular motor: Application to processive chitinase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Phys Chem B	6. 最初と最後の頁 6475-6487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.0c02698	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura A, Okazaki K, Furuta T, Sakurai M, Ando J, Iino R	4. 巻 17
2. 論文標題 Crystalline chitin hydrolase is a burnt-bridge Brownian motor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.BSJ-2020004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中村彰彦, 岡崎圭一, 古田忠臣, 櫻井実, 飯野亮太	4. 巻 10
2. 論文標題 セラチア菌由来キチン加水分解酵素の運動機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 89-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Rotational Substeps and Chemo-Mechanical Coupling Scheme of Enterococcus hirae V1-ATPase Revealed by Single-Molecule Analysis
3. 学会等名 Tokyo ATPase Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 High-speed single-molecule imaging analysis of protein molecular motors with plasmonic nanoprobe
3. 学会等名 Seminar in IBS Center for Molecular Spectroscopy and Dynamics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryota Iino
2. 発表標題 Processive chitinase is a Brownian monorail operated by fast catalysis after peeling a rail from chitin crystal
3. 学会等名 Workshop on "Molecules, Materials, Devices and Systems" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 生体・人工分子マシンの共通原理の理解を目指して
3. 学会等名 第15回AMO討論会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯野亮太
2. 発表標題 プラズモニクナノプローブを用いた生体分子の時分割1分子イメージング
3. 学会等名 2018年度 物理学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Monique Honsa, Kimitoshi Takeda, Akihiro Otomo, Hanjin Liu, Tomohiro Shima, Ryota Iino
2. 発表標題 Performance of step-finding algorithm based on the Schwarz Information Criterion depends on noise and data points per dwell-time
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Nakamura, Naoya Kobayashi, Takahiro Kosugi, Rie Koga, Nobuyasu Koga, Ryota Iino
2. 発表標題 Improvement of thermostability and catalytic activity of a PET degrading enzyme derived from metagenome database
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子研飯野グループホームページ  
[https://groups.ims.ac.jp/organization/iino\\_g/index.html](https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html)  
分子モーターの1方向性運動モデルの新規推定法の開発 キチナーゼの運動メカニズム解明につながる  
[https://www.ims.ac.jp/news/2020/07/28\\_4729.html](https://www.ims.ac.jp/news/2020/07/28_4729.html)  
回転分子モーターV1の化学力学エネルギー変換機構を解明（飯野グループ・飯田大学院生ら）  
[https://www.ims.ac.jp/news/2019/10/25\\_4457.html](https://www.ims.ac.jp/news/2019/10/25_4457.html)  
自然科学研究機構 分子科学研究所 飯野グループ  
[https://groups.ims.ac.jp/organization/iino\\_g/index.html](https://groups.ims.ac.jp/organization/iino_g/index.html)  
光学顕微鏡で原子レベルの位置決定精度を達成（飯野グループら）  
[https://www.ims.ac.jp/news/2018/11/28\\_4134.html](https://www.ims.ac.jp/news/2018/11/28_4134.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------