

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

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）

Molecular mechanism of the motor proteins revealed by advanced 3-D tracking method.

研究代表者

西坂 崇之 (NISHIZAKA TAKAYUKI)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：40359112

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測・操作、構造生物学、バイオイメージング、タンパク質

1. 研究計画の概要

本研究課題では、これまでに開発を進めてきた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、1分子のレベルで解明することを目的とする。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。これらの技術について、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、光学顕微鏡の新しい手法を切り開く。そしてこの手法を通じて、蛋白質の内部における特定の部位の構造変化の検出に応用する。ダイナミックな構造変化が期待される部位を1個の蛍光色素で標識し、その部位のわずかな動きが定量的に捉える。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。

2. 研究の進捗状況

現在までの研究成果として、光学機器メーカーとの連携により、3次元の光学系について製品化が可能なレベルの試作機を完成することができた。この装置を用い、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行った。関連する研究は、国内（研究員の矢島氏は生物物理学会若手奨励賞を受賞、H19年度）においても国外（関連成果を *Nature Structural & Molecular Biology* に発表、H20年度）においても高い評価を得ている。また全反射型顕微鏡を用い、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について、1分子のレベルで調べるという画期的な研究を進めることができた。助教の政池知子氏の成果は *Nature Structural & Molecular Biology* に発表され（H20年度）、新聞にも報道された。生物物理学会若手奨励賞も受賞している。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している

本課題で進めている主要な2つの研究が、どちらも *Nature* 姉妹紙に掲載されるという予想以上の評価を得ることができ、課題がたいへん順調に進んでいることが確認できた。

4. 今後の研究の推進方策

微粒子の3次元の運動を検出する光学顕微鏡については、タンパク質レベルでの測定に必要なハードそのものの開発がほぼ終了したため、次の段階として、測定装置としての確度を完全に評価する手法の開発を行う。実験的な新しい切り口として、高時間分解能における測定という方向に研究を発展させる。また初年度からの研究を通じて、回転分子モーター F1-ATPase において、ATP の加水分解による触媒部位のコンフォメーション変化の検出に成功している。この実験系を磁気ピンセットや光ピンセットといった顕微操作が可能な技術と組み合わせ、外部の負荷に対応した局所的な構造変化の検出を行う。酵素反応の可逆性は、ATP 合成酵素の大きな特徴であり、その機能を実現するためのメカニズムについて直接的に検証する重要な研究になると考えられる。

5. 代表的な研究成果

(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 Masaike, T., Koyama-Horibe, F., Oiwa, K., Yoshida M. & Nishizaka, T. “Cooperative three-step motions in catalytic subunits of F1-ATPase correlate with 80° and 40° substep rotations” *Nat. Struct. Mol. Biol.* (査読有) **15**, 1326-1333 (2008)
- ② Yajima, J., Mizutani, K. & Nishizaka, T. “A torque component present in kinesin-5 revealed by 3D tracking” *Nat. Struct. Mol. Biol.* (査読有) **15**, 1119-1121 (2008)
- ③ Adachi, K., Oiwa, K., Nishizaka, T., Furuike, S., Noji, H., Itoh, H., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr. “Coupling of Rotation and Catalysis in F1-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation” *Cell* (査読有) **130**, 309-321 (2007)
- ④ 西坂崇之、政池知子 「F1-ATPaseの化学ー力学カップリング：1分子の反応を顕微鏡でとらえる」*生物物理* (査読有), **47**, 118-123 (2007)
- ⑤ 西坂崇之、政池知子 「化学反応の1分子イメージング技術ー回転分子モーターへの応用ー」*蛋白質・核酸・酵素* (査読無) **52**, 317-322 (2007)

[学会発表] (計 47 件)

- ① 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)
- ② 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 Symposium*, HKUST, Hong Kong (13th Jan., 2009)
- ③ 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
- ④ 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” 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

⑤ 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

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ①名称：3次元位置観測方法及び装置
発明者：西坂崇之 (80%)・水谷佳奈 (20%)
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2006/312958
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 (62.5%)・学校法人学習院 (37.5%)
種類：特許
番号：PCT/JP2006/312958
年月日：特願2006-144050
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：PCT 出願
番号：PCT/JP2007/60554
年月日：平成19年5月23日
国内外の別：国外

[その他]

- ① 朝日新聞朝刊、科学欄、2009年3月9日 政池知子氏の成果が報道される
- ② 日本生物物理学会 第46回年会において、学会の若手奨励賞を政池知子氏が受賞、2008年12月4日
- ③ 第4回 日本学術振興会賞を西坂崇之が受賞、2008年3月3日、理工系「1分子レベルにおけるタンパク質の構造と機能の相関メカニズムの解明」
- ④ 日本生物物理学会 第45回年会において、学会の若手奨励賞を研究員の矢島潤一郎氏が受賞、2007年12月21日