

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19420

研究課題名(和文)細胞内におけるFoF1-ATP合成酵素1分子の回転計測技術の開発

研究課題名(英文)Development of the detection method for the rotation of FoF1-ATP synthase at a single molecule level in a living cell

研究代表者

榎 佐和子(荳口佐和子)(Enoki, Sawako)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：50467635

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):細胞内のエネルギー通貨として知られるATPの主な合成系として、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化が知られており、その最終酵素であるFoF1-ATP合成酵素が回転運動によりATPを合成する。ATP合成反応の細胞内での調節については未だに不明な点が多いが、生きた細胞内のATP合成反応の直接的な計測はなされていない。本研究では、棒状金ナノ粒子の位置と回転を3次元で高時空分解能で計測できる技術を開発した。これは棒状金ナノ粒子をプローブとして、細胞内においてFoF1-ATP合成酵素1分子の回転をリアルタイムに計測する基盤技術となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、金ナノロッドをプローブとして細胞内のATP合成酵素の回転、すなわちATP合成活性を検出するための基盤技術を確立した。この手法は他の多くの酵素にも応用可能であり、本手法を病気と関連する酵素、病変細胞に応用することで、様々な病気のメカニズム解明や薬剤開発等の応用的研究にも大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文):The main synthetic system of ATP known as intracellular energy currency is oxidative phosphorylation in mitochondria, and its final enzyme, FoF1-ATP synthase, synthesizes ATP by rotational movement. Although there are still many unclear points regarding the intracellular regulation of the ATP synthesis reaction, direct measurement of the ATP synthesis reaction in a living cell has not been performed. In this research, we developed a technique that can measure the position and rotation of a rod-shaped gold nanoparticle in three dimensions with high spatiotemporal resolution. This is a basic technology for measuring the rotation of a FoF1-ATP synthase at a single molecule level in a living cell in real time using rod-shaped gold nanoparticles as a probe.

研究分野：生物物理

キーワード：分子モーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内のエネルギー通貨として知られるATPの主な合成系として、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化が知られており、その最終酵素であるFoF1-ATP合成酵素が回転運動によりATPを合成する。しかし、細胞内のATP濃度を一定に保つ仕組みや、細胞の癌化や分化にともなう代謝状態の変化の分子メカニズムなど、ATP合成反応の細胞内での調節については未だに不明な点が多い。これまで酸化リン酸化によるATPの合成は、細胞集団の酸素消費量を計測することで間接的にモニタリングすることしか出来なかった。

2. 研究の目的

細胞内においてFoF1-ATP合成酵素1分子の回転をリアルタイムに計測する技術を開発し、一細胞、単一ミトコンドリアのレベルで細胞のATP合成活性を議論することを可能にする。細胞内の回転計測はこれまで技術的に困難であったが、本研究では研究代表者が開発してきた、プローブの3次元配向を検出するイメージングシステムを発展させて用いることにより、細胞内におけるFoF1-ATP合成酵素の回転を直接計測するための基盤技術を開発する。

3. 研究の方法

金ナノロッド(棒状金ナノ粒子)は、長軸の方向に散乱光が偏光する性質を持ち、長時間安定で強いシグナル強度を持つことから、高時空間分解能で並進と回転運動を計測することが可能である。金ナノロッドをプローブとして、細胞内を3次元で移動する酵素1分子の構造変化を検出するための技術を開発する。高輝度の照明光を用いた金ナノ粒子の配向検出用の暗視野顕微鏡を組み、得られた散乱像を理論的に計算された像でフィッティングすることにより、金ナノロッドの3次元位置(x, y, z)と配向(θ, φ)(図1)を高時空間分解能で検出する。

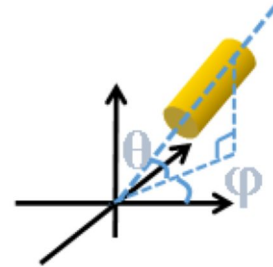


図1. 金ナノロッドの3次元配向

4. 研究成果

これまで研究代表者が開発してきたのはサンプル平面に固定した酵素の計測システムであった。そこで、細胞内のFoF1-ATP合成酵素の回転計測に適用するために、これまでのプローブの3次元配向に加え、新たにサンプル基盤からの高さ z をフィッティングパラメータとして加え、3次元位置(x, y, z)と配向を同時に計測する手法の開発に取り組んだ。まず高輝度の照明光を用いた金ナノ粒子の配向検出後方散乱型対物暗視野顕微鏡を組み立てた。この新規のシステムを評価するため、水中を自由拡散する金ナノロッド1粒子の散乱光を $10 \mu\text{s}$ の時間分解能で撮影し、金ナノロッドの配向と位置の計測を行った。その結果、水中を自由拡散する金ナノロッドの3次元位置と配向の計測に成功し、金ナノロッドの拡散は、並進、回転拡散、共に、理論的に予想される拡散定数を持つ自由拡散の式に従うことが明らかになった。このことは、10マイクロ秒の時間分解能で金ナノロッドの3次元の位置と配向を正しく計測できたことを示している。しかし、カメラの検出範囲をすぐに外れてしまうこと、焦点から外れて散乱像が広がりピクセルあたりの輝度が弱まってしまうこと等により、拡散粒子の散乱像が数10msで追跡できなくなってしまうことが問題となっていた。そのため、この問題を解決するいくつかの試みに取り組んだ。まず、焦点が外れることに対する問題に対して、焦点深度を伸張する光学系を顕微鏡のイメージング系に取り込み、この系に対応する解析プログラムを作成した。次に試料の3次元位置をリアルタイムに検出して、試料位置をフィードバックするシステムの作成に取り組んだ。3次元位置をフォトダイオードでリアルタイムに計測するための光学系を組み、3次元の試料位置を計測できることが確認できた。既製品のステージは応答が遅かったため、軽量ステージを自作することで高速にステージ

を駆動することが可能になった。さらに、広い範囲を高速に長時間計測できる高速カメラを購入したので、これまで開発した技術と組み合わせることで、数 10 分間、高速に金ナノロッドの位置と配向を解析することが可能となった。これらの結果から細胞内を移動する ATP 合成酵素の回転を検出する技術的な基盤ができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	岡田 康志 (okada yasushi) (50272430)	東京大学・理学系研究科・教授 (12601)	