

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20710096

研究課題名（和文）生体分子機械の構造揺らぎ操作とナノ計測技術の開発

研究課題名（英文）Manipulation and nano-measurement of the structural fluctuation of biomolecules.

研究代表者

西山 雅祥（MASAYOSHI NISHIYAMA）

京都大学大学院理学研究科・助教

研究者番号：10346075

研究成果の概要（和文）：

タンパク質は周囲をとりまく、水分子と相互作用することで、高次構造の形成や酵素活性を可能としており、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究課題では、高圧力により、生体分子と水との相互作用を変化させながら、生体分子の構造変化や機能変調を実時間観察できる高圧力顕微鏡を開発した。この顕微鏡にハイスピードカメラを組み合わせることで、生体分子モーターの回転運動を変調しながら、ナノメートル計測を行った。

研究成果の概要（英文）：

Protein hydration is an important factor for structural formation and enzyme activity. To study the effects of hydration, it is desirable to monitor protein structures or biological activities by modulating the intermolecular interaction between protein and water molecules. In this study, we have developed a novel microscopy for visualizing the pressure-induced changes in the structure and function of biomolecules. We demonstrated that the rotational movement of molecular motors is successively detected with nanometer spatial resolution at high pressure.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000   | 3,250,000 |
| 2009年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノバイオサイエンス

キーワード：生体分子機械、分子モーター、ゆらぎ、高圧力、光学顕微鏡、1分子計測、ナノメートル計測、光ピンセット

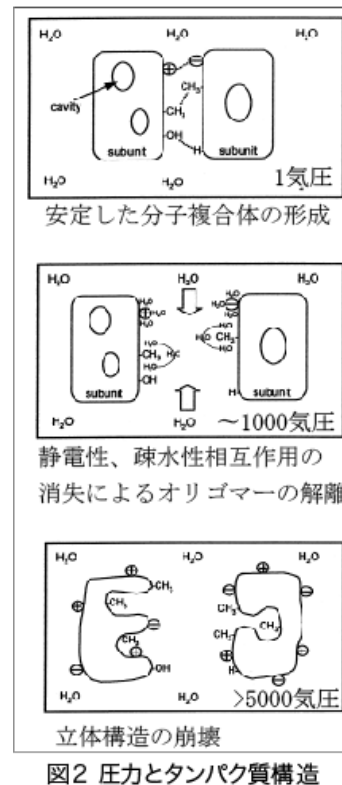
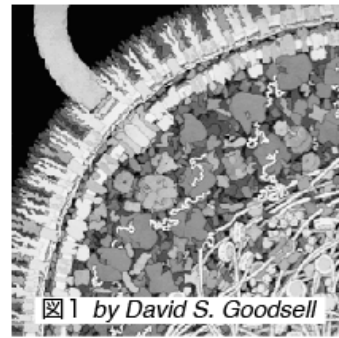
## 1. 研究開始当初の背景

図1は、大腸菌の断面図を模式的に描いたものである。細胞内には生体分子が高密度に詰め込まれている様子が見て取れる。大腸菌に限らず細胞内の生命活動は、高密度環境にある分子間相互作用で成立している。しかしながら、この絵の中に、細胞内に含まれる分子のうち70%にも達しているにも関わらず描かれていない分子がある。それが水分子であり、タンパク質を取り囲むとともに、エネルギー的に最適化し、高次の立体構造形成や酵素活性を円滑に進める重要な役割を担っている。言い換えると、タンパク質やリガンドの構造を変えなくても、水和状態の変化させることで生体分子間相互作用を変調できることを意味する。しかしながら、これまでの研究手法では、水分子との相互作用と機能発現の関係を調べるのが困難であった。

研究開始にあたり、研究代表者が着目したのは、高圧力技術である。図2にタンパク質間相互作用と圧力の関係を示す。一般に、常圧力下では静電相互作用、疎水性相互作用などにより、タンパク質分子は、安定した分子間相互作用により、複雑な高次構造を形成し、酵素活性などの機能発現を行っている。しかしながら、1000気圧程度の圧力をかけると（海洋で最も深い所であるマリアナ海溝最深部で1100気圧）、これらの相互作用が弱められ、分子構造の揺らぎに伴い、分子間の結合が切断されはじめる。それに伴い、タンパク質は複雑な四次構造形成や機能発現が阻害されることになる。これらの構造変化は圧力に対して、可逆的な範囲にとどまるものの、~5000気圧を超える圧力下では、立体構造が不可逆的に崩壊することになる。研究代表者は、1000気圧程度の圧力作用によるタンパク質間相互作用の変調に着目し、高圧力下にある生体分子や細胞の機能変調を観察できる新しい実験系の開発に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、タンパク質と水との相互作用を変化させることで、分子構造の揺らぎを変調できる高圧力技術と、生体分子の構造変化や機能発現を高い精度でリアルタイムイメージングできる光学顕微鏡を組み合わせ、新しい分析技術を開発すること目的とする。この高圧力顕微鏡を用いて、代表的な生体分子機械である生体分子モーターの運動計測を行い、高圧力による運動機能の変調と計測を行う。本研究課題の遂行を通じて、水との相互作用がどのような形で生物らしい機能発現につながるのか明らかにすることを最終目的とする。



## 3. 研究の方法

本研究課題の遂行に当たり、最も重要な課題が、光学顕微鏡観察用の高圧チャンバーの開発である。高圧力下での高解像度・高検出能の顕微鏡観測を行うには、耐圧性能を維持しながら、高圧チャンバーの開口数を高めることが重要な鍵となる。ここでは、耐圧性能を重視型と開口数を広げることを重視した2種の高圧チャンバーの開発を行い、それぞれの性能を生かした顕微鏡観測システムを開発した。上記装置を用いて、高圧力下で、キネシン-微小管系のフィラメント構造を観察し、キネシン-微小管系の結合力を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 耐圧性能重視型高圧チャンパー

長作動距離の対物レンズ (WD~3mm, NA=0.6) を用いて、光学顕微鏡測を行える高圧力チャンパーを開発した。高圧力チャンパー本体は、ニッケル合金 (ハステロイ C276) を採用し、O-ring を用いて簡便に圧力シールができる仕様にした。耐圧性能は 2000 気圧であり、本体にもうけた流路に恒温槽の水を循環させることで、チャンパー内の温度を調節できるようにした (図 3)。観測窓の窓剤には、硬度よりも屈折率を重視し、対物レンズとの相性のいいガラス (厚さ 1.5mm, BK7) を採用した。対物レンズ側、コンデンサー側の開口数は、それぞれ、NA=0.6, 0.55 であり、チャンパー内の明視野像、位相差像、暗視野像、落射蛍光像を観察できる光学系を開発した (図 4)。また、ハイスピードカメラを組み合わせることで、チャンパー内の生体分子に取り付けたビーズの重心位置を画像解析によりナノメートルレベルの精度で計測できる観測システムを構築した。

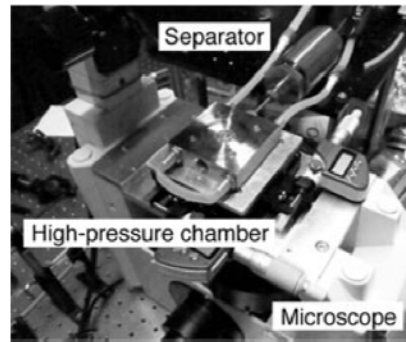


図 3 高圧力顕微鏡

##### (2) 高開口数型高圧チャンパー

高解像度の顕微鏡測を可能にするため、開口数が高く、作動距離の短い油浸型の対物レンズ (WD=0.15, NA=1.65, AP0100XOHR, Olympus) を利用できる高圧チャンパーを開発した。耐圧性能を確保するため、開口径を 0.1mm と小さくし、硬度の高いサファイア窓剤 (厚さ 0.2mm) を外側から貼り付ける仕様を採用した (西山雅祥, 顕微鏡測用高圧容器, 特願 2008-264944)。耐圧性能はおおむね、1000 気圧程度であるが、現時点では安定しておらず、今後も改良を続ける必要がある。常圧力という条件ではあるが、チャンパー内で、光ピンセットを用いたナノ操作を行い、また、対物レンズ型エバネッセント照明の光学系を作製した。これらは、高圧力下での生体分子モーターの 1 分子計測を行う上で必要となる基盤技術となる。

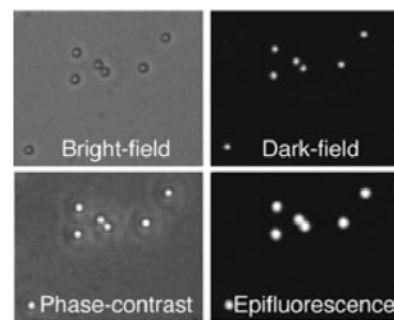


図 4 高圧チャンパー内の顕微鏡測像

##### (3) 微小管の脱重合アッセイ

高圧チャンパーの窓剤に、キネシン分子を吸着させ、AMP, PNP とタキソール存在下で、方向性を識別させた微小管を結合させた。1500 気圧の圧力下で、2 分おきに微小管の蛍光像を観察したところ、+ 端、- 端の両方から、 $\sim 1 \mu\text{m min}^{-1}$  の速度で、短縮しはじめた (図 5 A)。次に、短縮速度の圧力依存性を調べたところ、圧力の増加に伴い、短縮速度は指数関数的に増加した、どの圧力値でも + 端、- 端の方向性による違いは見られなかった (図 5 B)。常温常圧力下では、タキソールで安定化させた微小管は、フィラメント構造を安定して保つのに対して、高圧力下では、

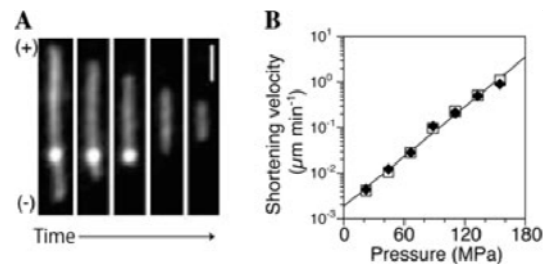


図 5 (A) タキソールで安定化した微小管の脱重合反応 (B) 短縮速度の圧力依存性

水分子が tubulin 分子間の結合部位に入り込み、分子間相互作用が弱められた結果、両端から順番に脱重合反応が生じていると考えられる。また、AMP, PNP 存在下で、微小管の断片をキネシンに結合させ、高圧力下で観察した所、圧力の増加とともに、解離速度が増加する傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

① 雑誌論文 (計2件)

1 **Nishiyama M.**, Kimura Y., Nishiyama Y. & Terazima M., Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin-microtubule complex. *Biophysical Journal* **96**, 1142-1150 (2009). 【査読有】

2 **Nishiyama M.**, Shimoda Y., Hasumi M., Kimura Y., & Terazima M., Microtubule depolymerization at high pressure. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1189**, 86-90 (2010). 【査読有】

② 学会発表 (計10件)

【招待講演】

1 **Nishiyama M.**  
Thermodynamic control of bacterial flagellar motors, 47th Annual meeting of Biophysical society of Japan, Tokushima, October, 30, 2009.

2 **西山雅祥**,  
バクテリア・べん毛モーターの高速回転運動計測と熱力学的解析, 第5回 広島大・海洋研究開発機構・近大合同セミナー, 広島大, 2009年10月9日

3 **西山雅祥**,  
高圧力顕微鏡の開発とバクテリアべん毛モーターの回転計測、圧力バイオサイエンスセミナー, JAMSTEC, 2009年6月4日

4 **西山雅祥**,  
高圧力によるべん毛モーターの回転運動変調, 第46回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008年12月4日

【一般発表】

5 **Nishiyama M. et al.** (3名中1番目)  
High-pressure microscopy for modulating the structure and function of biomolecules. 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, USA, February 21, 2010.

6 Hasumi M. *et al.* (3名中3番目)  
Effect of pressure on the torque of the bacterial flagellar motor. 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, USA, February 24, 2010.

7 **Nishiyama M. et al.** (3名中1番目),  
High-pressure microscopy for modulating intermolecular interaction between protein and water molecules, JST/CREST Symposium:

Watching Biomolecules in Action, Senri Life Science Center, December 15, 2009.

8 **Nishiyama M. et al.** (3名中1番目),  
High-pressure microscopy for modulating the structure and function of biomolecules, 54th Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, USA, February 21, 2009.

9 **Nishiyama M. et al.** (7名中1番目),  
High-pressure microscopy for modulating the torque generation of bacterial flagellar motors, 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, Boston, USA, March 4th, 2009.

10 **西山雅祥** 他 (3名中1番目)  
1分子イメージング・ナノ操作を可能にする高圧力顕微鏡法, 第46回日本生物物理学会年会, 福岡国際会議場, 2008年12月5日

④ 産業財産権

○出願状況 (計1件)

名称: 顕微鏡用高圧容器

発明者: 西山 雅祥

権利者: JST

種類: 特許

番号: 特願 2008-264944

出願年月日: 2008年10月14日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山雅祥 (MASAYOSHI NISHIYAMA)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 10346075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし