

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：32606  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22870028  
 研究課題名（和文）高速偏光変調顕微鏡による F1-ATPase の構造変化と化学反応の同時観測  
 研究課題名（英文） Simultaneous observation of conformational changes and the chemical reaction of F1-ATPase under the TIRF microscopy with high-speed polarization modulation  
 研究代表者  
 政池 知子（MASAIKE TOMOKO）  
 学習院大学・理学部・助教  
 研究者番号：60406882

研究成果の概要（和文）：1個の蛋白質を対象として、その構造変化と触媒反応の対応を明らかにするのが本研究の目的である。蛋白質 F1-ATPase に蛍光分子の目印を結合し、全反射型顕微鏡でその向きの変化を検出することにより構造変化を測定した。これまでの顕微鏡を改良することで、蛍光分子1個の向きの検出を角度分解能2度、時間分解能0.1秒にまで向上した。また、顕微鏡ステージに磁場を発生させる装置を組み合わせ、この酵素反応方向の違いによる構造変化経路の違いを見出した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study is to correlate conformational changes of an enzyme with chemical reaction steps. We linked a fluorescent molecule to F1-ATPase as a probe of conformations and detected its changes in orientation under the optical microscope. By improvements of the microscope, we achieved an angle resolution of 2 degrees and a temporal resolution of 0.1 s. By combining this microscope with magnetic tweezers, differences in conformational profiles during different chemical pathways were indicated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物学・生物物理学

キーワード：構造変化、全反射型顕微鏡、1分子観察、F1-ATPase

## 1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者は、分子モーター F1-ATPase を対象として、3つの触媒サブユニットβがそれぞれの触媒サイトでの ATP 加水分解の化学反応に伴って構造変化を起こし、中心軸サブユニットγの回転を駆動する機

構の解明を目指し研究を行ってきた。その結果、1分子の F1-ATPase の中の1つの触媒サブユニットβの C 末端ドメインの構造変化と中心軸γの回転を顕微鏡下で同時に観察することに成功した。この研究では、βの C 末端ヘリックスに1つの蛍光分子を2箇所固定し、近接場光の偏光の向きを 2Hz で回転させ

る偏光変調全反射型顕微鏡を用いて励起した。一方中心軸 $\gamma$ の回転は、結合したポリスチレンビーズの像の回転として別波長で検出した。その結果、触媒サイトにおけるヌクレオチド状態の変化に呼応して触媒サブユニットはそれぞれ  $+40^\circ$ ,  $-20^\circ$ ,  $-20^\circ$  という3ステップの構造変化を繰り返し、中心軸のステップ状回転を駆動することを明らかにした。このように、 $\beta$ における構造変化、ATPaseの化学反応、 $\gamma$ の回転の力学反応の関係を初めて明らかにした (Masaike, T. *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2008)。

しかし、この研究では、構造変化検出の時間分解能が 0.5 秒であったため、時定数 0.5 秒未満の短い滞在時間の化学状態における構造の検出は残された課題となった。

## 2. 研究の目的

蛋白質の局所的構造変化と基質結合・解離の関係を調べることは、作動機構を解明するうえで重要な意味を持つ。

本研究では  $F_1$ -ATPase をモデルとして、触媒サブユニット $\beta$ の C 末端ヘリックスの向きの変化を指標として open 型、closed 型間の構造変化を検出し、同時に $\beta$ サブユニットへの蛍光性基質 Cy3-ATP の結合・解離を検出することにより、両者の関係を明らかにすることを目的とした。

そのために、これまで用いてきた偏光変調全反射型顕微鏡を改良し、触媒サブユニット $\beta$ の C 末端ヘリックスに結合した蛍光分子 1 個の遷移双極子モーメント向きを検出する時間分解能を 1 桁以上向上させる。これにより、 $F_1$ -ATPase の ATP 加水分解反応において時定数が短いと考えられる ADP 解離待ち、リン酸解離待ちのそれぞれの化学状態における構造を明らかにし、構造変化と化学反応の素過程を完全に対応づける事を目指した。

## 3. 研究の方法

まず、偏光変調の光学系で励起光の偏光を回転させる速度を上げるため、中空モーターの回転速度をこれまでの 1Hz から 10Hz に上げた。さらに、これまで image intensifier で検出していた蛍光を EMCCD で受像することにより、蛍光強度の検出感度を向上させた。更に、受像側に励起光の偏光の回転と同期する工夫を施し、蛍光分子の輝点の明滅を三角関数で近似することではなく像のパターンから偏光の向きを一目で決定することができるようにした。これにより、滞在時間 0.1 秒の構造でも検出可能な光学系を実現し

た。

次に、偏光の回転速度を更に高めるための技術開発を行った。これまで用いてきたステップモーターとは異なるメカニズムで回転する新規の中空モーター 2 種を検討した。モーターに組み込むため、プリズムと 1/4 板を安定に接着する方法と、直径を小さくするためにこれらの素子を削る方法について光学素子を扱う会社と協同で検討した。また、それぞれのモーターに同光学素子をはめ込むためのアダプターを設計した。これら 2 種のモーターは 25Hz ~ 数百 Hz での回転が可能であり、今後更なる開発が見込まれる。

最後に、偏光変調顕微鏡と磁気ピンセットとよばれる磁場発生装置を組み合わせた。磁石を顕微鏡ステージ上に 2 対配置し、バイポーラー電源から磁石に巻いたコイルに電流を流すと磁場が発生する。この磁場は顕微鏡ステージ上のサンプル面方向に自在に回転させることができるため、 $F_1$ -ATPase の中心軸に結合した磁気ビーズを任意の方向に向けることが可能になった。中心軸の回転方向の向きを操作することにより、触媒サブユニットにおける化学反応の進行速度をある程度制御できると考えた。構造変化検出の時間分解能を向上させるのとは逆の発想で、構造変化自体を遅くすることにより構造変化を検出できるようにするというアプローチである。

この磁気ピンセット付中速偏光変調全反射型顕微鏡を用いて、1 分子の  $F_1$ -ATPase の中心軸が回転中に起こる触媒サブユニットの構造変化を検出した。まず、蛍光分子を C 末端ヘリックスに結合した  $F_1$ -ATPase をガラス基板上に固定し、中心軸に磁気ビーズを結合した。次に、 $F_1$ -ATPase が ATP の加水分解エネルギーを利用して自発回転する時と、磁気ピンセットの磁場に従って ATP 加水分解 / 合成方向に強制回転する時両方の触媒サブユニットの構造変化を比較した。

## 4. 研究成果

「3. 研究の方法」で述べた顕微鏡の改良により、1 個の蛍光分子の偏光の向きを検出時間分解能を 0.1 秒にまで上げることができた。この実験系を用い、蛍光標識した単離触媒サブユニットをガラス表面に固定して性能評価を行ったところ、角度分解能は 2 度であることがわかった。

次に、 $F_1$ -ATPase の  $\alpha_3\beta_3\gamma$  部分複合体を用い、触媒サブユニット $\beta$ の構造変化検出を行った。磁気ピンセットで ATP 加水分解方向に強制

回転させたところ、触媒サブユニットは構造変化角度の大きさにばらつきがみられるものの、おおむね酵素が自発的に回転するときと同様の構造変化を起こしていることがわかった。また、ATP 結合により駆動される open から closed への構造変化の途中で、自発回転では見られなかった中間的な構造の可能性も示唆された。

ATP 合成方向に強制回転させたときには ATP 加水分解の逆反応が起こるため、構造変化も経路は同じで逆方向の変化が起こると予想したが、実際には加水分解方向の回転では見られなかった構造変化パターンが検出された。具体的には、ATP 加水分解の場合から想定される ATP 合成中の構造変化は

Open partially closed Closed Open であるのに対し、実際には

Open Closed partially closed Open という変化を辿った。この原因として、ATP 合成と加水分解では構造変化経路が異なるという可能性がまず挙げられる。ホロ酵素としての F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP 合成酵素は、膜を介した電気化学的ポテンシャル差によりεサブユニットがダイナミックに構造変化を起こし、ATP 合成型になることで ATP 加水分解を選択的に阻害する事が知られる。εサブユニットが不在の場合でも ATP 合成方向では触媒サブユニットが特有の構造変化を起こす可能性は十分にあり、興味深い。もう一つの可能性としては、ATP 再生系を使用しているため、溶液中に ATP 合成の基質となる ADP が無く、中心軸を回転させても触媒サブユニットが ATP 合成に適切な構造変化をすることができないのかもしれない。この場合は、中心軸の回転だけでなく触媒サブユニットへの適切な基質結合が ATP 合成方向の反応進行に重要であるという証拠につながる。

以上、偏光変調顕微鏡の時間分解能は発展途上であるが、現段階の時間分解能でも F<sub>1</sub>-ATPase の回転速度を抑えることで化学状態と構造状態を対応付ける道が開けた。今後、更に高速化した偏光変調顕微鏡と磁気ピンセットを組み合わせ、F<sub>1</sub>-ATPase の化学・力学変換メカニズムに迫りたい。

#### 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 6 件)

(1) Coupling of chemical events and mechanical work in single F<sub>1</sub>-ATPase molecules revealed under the optical microscope  
Masaïke, Tomoko, Hasimoto, Yuh, Nishizaka,

Takayuki

*The Journal of Physiological Sciences* 62 (Supplement 1) S58 (2012)

査読無

<http://www.springer.com/biomed/human+physiology/journal/12576>

(2) 「ATP 加水分解蛋白質の映画撮影」

生物物理学会誌 300号記念 若手研究者から「生物物理の未来に寄せて」

政池知子

日本生物物理学会誌 生物物理 52, 108-109 (2012)

査読有

<http://dx.doi.org/10.2142/biophys.52.108>

(3) “A change in the radius of rotation of F<sub>1</sub>-ATPase indicates a tilting motion of the central shaft.”

須河光弘、岡田薫、政池知子、西坂崇之  
*Biophysical Journal* 101, 2201-2206 (2011)

査読無

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.016>

(4) “Simultaneous observation of chemomechanical coupling of a molecular motor.”

西坂崇之、橋本優、政池知子

*Methods in Molecular Biology, Single Molecule Enzymology: Methods and Protocols* 778, 259-271 (2011)

査読有

[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-261-8\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-261-8_17)

(5) 「タンパク質 1 分子とその中身を観察する顕微鏡技術」

西坂崇之、政池知子

顕微鏡 45, 173-179 (2010)

査読無

(6) 「F<sub>1</sub>-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」

政池知子

トピックス新進気鋭シリーズ

日本生物物理学会誌 生物物理 50, 132-133 (2010)

査読有

<http://dx.doi.org/10.2142/biophys.50.132>

[学会発表](計 25 件)

(1) 「光学顕微鏡を用いた 1 分子観察により解明する F<sub>1</sub>-ATPase の化学・力学反応の共役

機構」

政池知子

日本生理学会 (信州大学松本キャンパス)  
2012年3月31日

(2) 「F1-ATPase の一つの触媒サイトにおける ATP 結合から切断までの中心軸の角度変化」

橋本優

2012年 生体運動研究合同班会議 (筑波大学第2エリア・2H棟 101室) 2012年1月8日

(3) 「光学顕微鏡を用いた蛋白質とオルガネラ1個の動きの観察 モーター蛋白 F1-ATPase と気管上皮繊毛をモデルとして」

政池知子

第37回日本生体エネルギー研究会, ICORP 「ATP 合成制御プロジェクト」合同シンポジウム (京都産業大学・神山ホール大会議室) 2011年12月21日

(4) 「F1-ATPase と繊毛軸系をモデルとした、酵素とその集合体の動きの可視化」

政池知子

第49回日本生物物理学会年会 (兵庫県立大学・書写キャンパス) 2011年9月16日

(5) 「ねじれた 軸を持つ F1-ATPase 変異体の高時間分解能回転観察」

橋本優

第49回日本生物物理学会年会 (兵庫県立大学・書写キャンパス) 2011年9月16日

(6) 「F1-ATPase の $\gamma$ の傾き変化および $\beta$ - $\beta$ 間距離変化の検出」

須河光弘

第36回日本生体エネルギー研究会, 特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム (大阪大学・銀杏会館) 2010年11月20日

(7) 「F1-ATPase に結合した蛍光ヌクレオチドを高時間分解能で画像化する」

橋本優

第36回日本生体エネルギー研究会, 特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム (大阪大学・銀杏会館) 2010年11月18日

(8) 「F1-ATPase の構造変化とサブユニット間相互作用」

政池知子

第36回日本生体エネルギー研究会, 特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム (大阪大学・銀杏会館) 2010年11月

18日

(9) 「光学顕微鏡で解き明かす分子モーターの作動原理」

西坂崇之

第36回日本生体エネルギー研究会, 特定領域研究「革新的ナノバイオ」合同シンポジウム (大阪大学・銀杏会館) 2010年11月18日

(10) “Imaging of rotary molecular motor F1-ATPase”

政池知子

日本生物物理学会 第48回年会 (東北大学川内キャンパス) 2010年9月21日

(11) 「F1-ATPase に結合した蛍光性ヌクレオチドを高時間分解能で画像化する」

橋本優

日本生物物理学会 第48回年会 (東北大学川内キャンパス) 2010年9月21日

(12) “Tilting of the  $\gamma$  subunit and conformational changes of the  $\alpha_3\beta_3$  in F1-ATPase”

須河光弘

日本生物物理学会 第48回年会 (東北大学川内キャンパス) 2010年9月21日

(13) 「外力による中心軸回転中の F1-ATPase の触媒サブユニットの構造変化」

政池知子

特定領域研究「膜超分子モーターの革新的ナノサイエンス」第5回班会議 (学習院大学・創立百周年記念会館) 2010年6月24日

〔図書〕(計1件)

(1) 「酵素反応の1分子イメージング」

西坂崇之、政池知子

酵素利用技術大系 - 基礎・改変・高機能化・産業利用まで - エヌ・ティー・エス 72-75 (2010)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

政池 知子 (MASAIKE TOMOKO)

学習院大学・理学部物理学科・助教

研究者番号: 60406882

(4) 研究協力者

西坂 崇之 (NISHIZAKA TAKAYUKI)

学習院大学・理学部物理学科・教授

研究者番号: 40359112