

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390037

研究課題名(和文) タンパク質超分子機械のダイナミック構造変化イメージング

研究課題名(英文) High-pressure microscopy for controlling the structure of protein filaments

研究代表者

西山 雅祥(Nishiyama, Masayoshi)

京都大学・白眉センター・准教授

研究者番号：10346075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、これまでの研究において、高圧力下でのタンパク質分子の構造変化や機能変調を実時間で観察できる高圧力顕微鏡を開発してきた。本研究課題では、タンパク質フィラメントを研究対象として、高圧力で構成単位であるタンパク質間の相互作用を変化させながら、高圧力下で誘起されるフィラメント構造を観察する研究を実施した。その結果、高圧力技術を用いて、細菌べん毛繊維の超らせん構造や、微小管の重合脱重合をダイナミックに変化させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a high-pressure microscope that enables to observe the structure and function of protein molecules. In this research project, we have studied the conformational changes of protein filaments at high-pressure. By using this system, we were successful to change the helical structure of flagellar filaments and microtubule dynamics.

研究分野：生物物理

キーワード：高圧力 顕微鏡 微小管 べん毛 ナノバイオ 分子モーター 分子機械 タンパク質水和

1. 研究開始当初の背景

細胞内に含まれる物質のうち、実に7割は水分子であり、生体分子の周囲をぐるりと取り囲んでいる。細胞内にある物質の中でも、タンパク質は圧力の影響を受けやすい物質の代表例であり、周りを取り巻く水分子との相互作用により、複雑な立体構造を形成し、機能発現を行っている。これまでの研究により、静水圧を利用することで、タンパク質と水との相互作用が変化することが明らかにされてきた。

概ね 100 MPa、つまり私達が日常生活を過ごす大気圧環境 (0.1 MPa) の約 1,000 倍の圧力をかけると、分子間の結合力 (静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合など) が弱まり、分子構造や機能活性が変わることになる。研究代表者らは、光学顕微鏡下を用いて、高圧力下で生じる構造変化や機能変調を可視化できる新しい分析手法の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、高圧力下で誘起されるタンパク質分子の構造変化を光学顕微鏡下で観察する研究に取り組んだ。研究対象として選択したのはタンパク質フィラメントである。一般にタンパク質のモノマーはナノメートルオーダーの大きさであり、光学顕微鏡下での観察にはあまり適していない。しかしながら、モノマー間の相互作用によりマイクロメートルオーダーの高次構造を形成すれば観察は容易となる。

そこで、本研究課題では、細菌の運動器官であるべん毛繊維と真核生物の細胞骨格である微小管を対象として研究を実施した。高圧力顕微鏡を利用すれば、高圧力でフィラメントを構成するタンパク質間相互作用を変えながら、その影響をフィラメント構造の変化として実時間で観察できるので、装置の特長を生かした研究を実施できる。

3. 研究の方法

図1に、研究代表者が開発した高圧力顕微鏡の写真を示す。装置は、倒立型顕微鏡、高圧力チャンバー、圧媒変換器(セパレーター)、ハンドポンプ(写真外)から構成されている。

ハンドポンプのレバーを文字通り手動で動かすと、圧力媒体である蒸留水が押し込まれ、セパレーター内にある厚さ 0.2 mm のテフロン製の膜を変形させる。このテフロン膜の変形を介して、水圧が高圧力チャンバー内を満たす緩衝溶液の圧力へと適切に変換され、高圧力チャンバー内に封入した実験サンプルに圧力をかけることができる。装置の耐圧性能は 150 MPa であり、地球上で最も深い場所である太平洋のマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部 (10,924 m、海上保安庁観測船による測定値) の静水圧 ~ 110 MPa を上回る。高圧力チャンバーの内部は長作動距離の対物レンズを利用して観察可能であり、多様な顕微観察像を取得可能である。

本研究では、この装置に共焦点スキャナ (CSU10) に直接レーザー光を入射させることで照明強度を高めた光学系を開発した。また、よりコントラストの高い位相差像を取得するために、コリメートした高圧水銀ランプの輝線を利用した照明系を開発した。



図1 高圧力顕微鏡

4. 研究成果

(1) 細菌べん毛の超らせん構造変化

細菌べん毛はフラジェリン分子の素繊維11本から構成されたタンパク質フィラメントである。これまでの研究により、隣接するフラジェリン素繊維間の結合様式が変わることで、超らせん構造がダイナミックに変化することが知られている。本研究では、圧力を変えながら、べん毛繊維の超らせん構造がどのように変化するか観察した。

蛍光染色したべん毛繊維を常圧力(0.1 MPa)下で顕微鏡観察したところ、Normalと呼ばれる構造のみが取得された。それに対して、高圧力下では(20-80 MPa) Normalに加えてCoiled coilやCurly I(or II)といった構造が混在しており、3種のらせん構造の割合は圧力に依存して変化した。

また、圧力値を60から80 MPaに増加させて数分後、Coiled coilから、curly I(or II)へと超らせん構造が0.1秒以内に变化する様子が観察された。おそらく、圧力変化直後では、フラジェリンの素繊維間でひずみとして蓄えられていた余剰エネルギーが一気に解放された結果、ドミノ倒しのようにフラジェリン間の結合様式がフィラメントに沿って変化したのだと推察される。

(2) 微小管の重合脱重合ダイナミクス

微小管は全ての真核生物に存在する細胞骨格である。チューブリン分子間の非共有結合により数珠つながりに結合することで、直径約25 nmの細長い管状のフィラメント構造を形成している。本研究では人工細胞系を利用して、高圧力下での微小管の重合脱重合を調べる実験を行った。

図2に、内部に微小管を封入したリポソームの位相差像を示す。微小管の重合により(0.1 MPa, 25°C)膜の内側から押す力で膜突起が形成される。これらの突起は、方向性が揃わない微小管数十本程度から構成されて

いると考えられる。この膜突起をもつリポソームを加圧したところ(60 MPa)、わずか数十秒で突起が短縮してしまった。その後、すぐに減圧して大気圧に戻し、同じリポソームの観察を続けたところ、膜突起はほぼ同じ位置から伸長しはじめ、約10分後には元の長さに戻った。なお、この膜突起の短縮速度も圧力と共に増加し、その増加率は生細胞やの結果と似ていたことから、高圧力は微小管を構成するチューブリン分子間の相互作用に直接作用していることが示唆された。

高圧力下では、チューブリン分子間の結合部分に水分子が侵入しやすくなり、解離反応が進行すると考えられる。この水分子による微小管脱重合メカニズムは、連なったチューブリン分子のMD計算を併用することで明らかにできるであろう。計算機実験の場合、チューブリンと水分子を入れる箱を小さくすると高圧力環境をつくりだすことができる。高圧力顕微鏡を使って得られた結果と、MD計算から示唆された水分子の動きを照らし合わせることで、微小管の重合・脱重合の制御機構が明らかにできると期待される。また、筆者らの高圧力顕微鏡法を応用すれば、常圧力下よりも速い速度で微小管の解離反応がすすむため、新しい抗がん剤のスクリーニングの迅速化にも貢献できそうである。

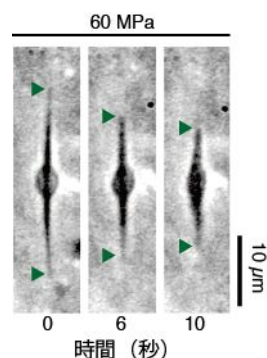


図2 実験結果。微小管を封入したジャイアントリポソームの位相差像(60 MPa)。膜突起の先端をやじりで示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

*Corresponding Authors

1) ***Nishiyama M.**, Sowa Y., Kimura Y., Homma M., Ishijima A. & Terazima M., High hydrostatic pressure induces CCW to CW reversals of the *Escherichia coli* flagellar motor. *Journal of Bacteriology*, 査読有, Vol.195, No.8, 2013, pp.1809-1814.

DOI: 10.1128/JB.02139-12

2) *Watanabe T.M., Imada K., Yoshizawa K., **Nishiyama M.**, Kato C., Abe F., Morikawa T., Kinoshita M., Fujita H. & Yanagida T., Glycine insertion makes yellow fluorescent protein sensitive to hydrostatic pressure. *PLoS ONE*, 査読有, Vol.8, No.8, 2013, e73212.

DOI: 10.1371/journal.pone.0073212

3) Okuno D., ***Nishiyama M.** & *Noji H., Single molecule analysis of the rotation of F₁-ATPase under high hydrostatic pressure. *Biophysical Journal*, 査読有, Vol.105, No.7, 2013, pp.1635-1642.

DOI: org/10.1016/j.bpj.2013.08.036

4) Okuno D., **Nishiyama M.** & Noji H., Viewing the rotation of molecular motors at high pressure. *Asia Pacific Physics Newsletter*, 査読無, Vol.3, No.2, 2014, pp.25.

5) Takekawa N., **Nishiyama M.**, Kaneseki T., Kanai T., Atomi H., Kojima S. & *Homma M., Sodium-driven energy conversion for flagellar rotation of the earliest divergent hyperthermophilic bacterium., *Scientific Reports*, 査読有, Vol.5, 2015, pp.12711.

DOI: 10.1038/srep12711

6) Hayashi M., ***Nishiyama M.**, Kazayama Y., Toyota T., Harada Y. & *Takiguchi K., Reversible morphological control of tubulin-encapsulating giant liposomes by hydrostatic pressure., *Langmuir*, 査読有, Vol.32, No.15, 2016, pp.3794-3802

DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00799

7) **西山雅祥**, 木村佳文, 高圧力顕微鏡 LTM センター誌, 査読有, Vol.22, 2013, pp.18-27.

8) **西山雅祥**, 曾和義幸, 細胞内の水で生命活動を操る! -高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング 化学, 査読無, Vol.68, No.9, 2013, pp.33-38.

9) **西山雅祥**, バクテリア・べん毛モーターが高圧力下で逆向きに回り出す!? 生物物理 査読有, Vol.53, No.5, 2013, pp.264-265.

10) **西山雅祥**, タンパク質間相互作用を力学刺激で操作する, 化学と生物, 査読有, Vol.49,

No.12, 2014, pp.782-784.

11) **西山雅祥**, 高圧力顕微鏡の開発と生物ナノマシンの運動観察 高圧力の科学と技術, 査読有, Vol.25, No.2, 2015, pp.126-135.

12) **西山雅祥**, タンパク質分子機械の力学変調計測 機械の研究, 査読無, Vol.67, No.12, 2015, pp.1067-1074.

13) **西山雅祥**, 高圧力技術を用いた生命活動操作イメージング 現代化学, 査読無, No.538, 2016, pp.48-49.

〔学会発表〕(計15件)*招待講演のみ記す

1) **Nishiyama M.**, Single molecule analysis of ATP-driven molecular motors at high pressure. 7th International Meeting on Biomolecules under Pressure, Montpellier, France, July 2014.

2) **Nishiyama M.**, High-pressure microscopy for studying bacterial motility machinery., Microbiology and Biogeochemistry of the Deep Sea and the Deep Biosphere, Shanghai, China, June 2015.

3) **Nishiyama M.**, High-pressure microscopy for studying molecular motor and cytoskeleton. 8th International Meeting on Biomolecules under Pressure, Dortmund, Germany, February 2016.

4) **西山雅祥**, 極限環境で駆動する生体ナノマシンの直接観察, 法政大学ナノテクセミナー, 法政大, 2013年8月

5) **西山雅祥**, 高圧力を用いたタンパク質分子機械の構造変化イメージング, 日本機械学会2013年度年次大会, 岡山大, 2013年9月

6) **西山雅祥**, タンパク質分子機械の力学変調イメージング, 第259回光ナノサイエンス特別講義, 奈良先端科学技術大学院大学, 2014年4月

7) **西山雅祥**, 細胞内で働く分子マシンを細胞外からあやつる, 法政大学ナノテクセミナー, 法政大, 2014年8月

8) **Nishiyama M.**, Development of a New High-pressure Microscope. Manipulation of Integrated Molecular Reaction Processes in living cell, Kyoto, 2014年9月

9) **Nishiyama M.**, Manipulating the molecular machinery by water molecules of the hydration. 第52回日本生物物理学会年会, 札幌, 2014年9月

10) **西山雅祥**, 高圧力を用いたタンパク質分子機械の運動変調イメージング, 第55回高

圧討論会, 徳島大, 2014 年 11 月

11) 西山雅祥, 力学刺激で細胞運動を操作する, 第 103 回生命機能研究科コロキウム, 大阪大, 2014 年 12 月

12) 西山雅祥, タンパク質分子機械の力学変調コントロール, 理研シンポ・細胞システムの動態と論理, 理研, 2015 年 4 月

13) 西山雅祥, 新しい光学顕微鏡の開発による生体運動イメージング, 早大, 2015 年 7 月

14) 西山雅祥, タンパク質分子機械の力学変調イメージング, 北海道大学フロンティア化学教育研究センター, 北大, 2015 年 8 月

15) Nishiyama M., High-pressure microscopy for manipulating cellular architecture and functions. 第 53 回日本生物物理学会年会, 金沢大, 2015 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

1) Nishiyama M., *Springer*, Chapter 27: High-pressure microscopy for studying molecular motors. in *High Pressure Bioscience – Basic Concepts, Applications and Frontiers, Subcellular Biochemistry*, 査読有, Vol.72, 2015, pp.593-611, DOI: 10.1007/978-94-017-9918-8_27

2) 西山雅祥, 三恵社, 高圧力顕微鏡法による細菌運動観察 『高圧バイオサイエンスとバイオテクノロジー』, 2015, pp.75-81.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 雅祥 (NISHIYAMA, Masayoshi)
京都大学・白眉センター・特定准教授
研究者番号: 10346075

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし