

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：93801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650057

研究課題名(和文)イオン駆動型生体分子モーターの光による人為的駆動法の開発

研究課題名(英文)The development of the method for driving ion-driven biological rotary motor with optical illumination

研究代表者

木村 祐史(Kimura, Yuji)

浜松ホトニクス株式会社・中央研究所・専任部員

研究者番号：90713371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、FoF1-ATP合成酵素を、光照射により駆動させる挑戦的な研究である。この目的を達成するために、(1)マイクロ流路デバイスをベースとしたFoF1-ATP合成酵素測定・操作システムを構築し、巨大化大腸菌膜に存在する呼吸鎖複合体I、並びにFoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送活性の機能イメージングに成功した。その後、(2)エバネッセント光照射によりFoF1-ATP合成酵素が駆動されるか評価・検討を行った。結果としては、FoF1-ATP合成酵素の活性は検出されなかった。今後の課題として、ATP合成に必要な自由エネルギー濃度を下げるなどの溶液条件を検討する必要性などが明確となった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to drive FoF1-ATP synthase with optical illumination. For this purpose, 1) we developed an evaluation and manipulation system for FoF1-ATP synthase by using microfluidics device. The device enabled us to image proton pumping activity of respiratory chain complex I and FoF1-ATP synthase embedded on a membrane of a large-sized protoplast from E-coli, in real time. 2) To drive the ATP-synthase activity, the membrane of the large-sized E-coli protoplast was illuminated with evanescent field. The synthesized ATP was monitored with luciferin/luciferase system. In the observation period (~10 min), however, the activity was not detected. It suggests more detailed analyses on electro-chemical potential are needed.

研究分野：生物物理学

キーワード：生体膜 イオン駆動型分子モーター 1分子計測(SMD) マイクロ・ナノデバイス ナノバイオ

## 1. 研究開始当初の背景

活性を保持した状態で生体高分子を調べるためには、水溶液中での計測が可能な光学顕微鏡に基づいた技術が主に使われる。それらの中でも光ピンセットは、生体高分子を操作する目的でよく用いられる。これは、レーザー光を高NAの対物レンズによりサンプル面に絞り込み、集光点において微粒子を捕捉する技術である。生体高分子であるタンパク質は直接捕捉するには小さすぎるため、数100 nmから数 $\mu\text{m}$ のビーズを介して捕捉・操作する。これにより、モータータンパク質を任意の位置に移動させたり、負荷を与えてモーターとしての特性を調べるという操作が可能となった(図1)。一方で、モータータンパク質の機能そのもの、すなわち力の発生そのものを直接操り、自在に駆動する手法は報告されていない。

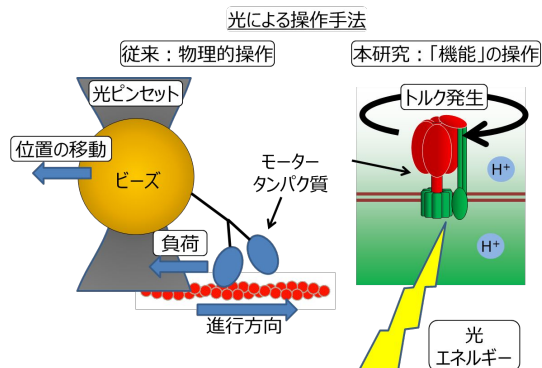
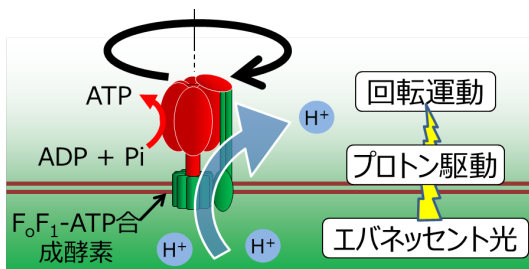


図1 モータータンパク質を光により操作する手法の比較

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、モータータンパク質の機能を自在に操作する手法の開発を目的として、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素の光による駆動に挑戦する(図2)。

$F_0F_1$ -ATP合成酵素は、生体膜内外のプロトン濃度・電位勾配により作り出される電気化学ポテンシャルをエネルギー源としてATPを合成する、イオン駆動型回転分子モーターである。この電気化学ポテンシャルを光により創出することでモーターに駆動力を与え、モーター活性を自在に操作する手法を



### 光によるモータータンパク質の駆動

図2 モータータンパク質の光駆動

開発することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

本研究の目的である、モータータンパク質の光による駆動を達成するために、以下に示すように研究を実施した。

(1)膜タンパク質解析用 MEMS 流路デバイスをベースとした  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素測定・操作システムの構築

膜タンパク質解析用 MEMS 流路デバイスを本研究に用いるために、以下の二つの機構を開発した。

誘電泳動により懸濁液から目的の巨大化生体膜のみを分離する機構

溶液交換に伴う圧力変化を補償する機構

(2)巨大化大腸菌内膜タンパク質によるプロトン輸送活性のリアルタイム機能イメージング

構築したシステムの有用性を示すために、巨大化大腸菌膜に存在する呼吸鎖複合体 I と  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素のプロトン輸送活性の蛍光イメージングを行った。まず巨大化大腸菌を MEMS 流路デバイス内微細小孔に捕捉・固定した後、流路内を蛍光性 pH 指示薬で満たした。次に、NADH や ATP を流入させ、pH 変化に伴う蛍光強度変化から pH 変化をモニターすることで、プロトン輸送活性を検討した。

(3)エバネッセント光を利用した、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素の光による人為的な駆動を実施した。

巨大化大腸菌を MEMS 流路デバイス内微細小孔に捕捉・固定し、溶液を ATP 合成用のバッファーに交換した。その後、エバネッセント光を照射し、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素が ATP を合成するかをルシフェリン/ルシフェラーゼを用いて検出、評価・検討を行った。

## 4. 研究成果

(1)膜タンパク質解析用 MEMS 流路デバイスをベースとした  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素測定・操作システムの構築

膜タンパク質解析用 MEMS 流路デバイスは2つの流路を持ち、流路の間が壁で仕切られている。壁が薄くなっているところに微細小孔( $\sim 2 \mu\text{m}$ )を持つ(図3)。流路内微細小孔にリポソーム状の巨大化生体膜を捕捉・固定し、生体膜上の  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素をはじめとした膜タンパク質の活性を測定する。この流路デバイスを本研究に用いるにあたり、次の二つの問題があった。一つ目は、細胞懸濁液

に含まれる細胞破砕物が微細小孔を詰まらせ、巨大化大腸菌の捕捉成功率を大きく下げてしまうという問題である。この問題に対処するために、MEMS 流路デバイス内に 1 対の平行電極を用意し、誘電泳動により懸濁液から目的の巨大化生体膜のみを分離する機構を開発した(図 4)。この仕組みにより、懸濁液から巨大化大腸菌が高い割合で分離取得されることが確認され、ほぼ巨大化大腸菌だけが微細小孔部に到達するため、実験効率の大幅な改善を実現した。二つ目は、流路内の溶液交換時に、微細小孔に保持された巨大化大腸菌が流路内の圧力変動により破壊されてしまう問題である。圧力変動に対処するために、溶液交換に伴う圧力変化を補償する機構を考案・開発し、外部からの特別な制御なしに流路内の圧力をほぼ一定に保つことが可能となった。この機構を用いて、巨大化大腸菌を捕捉した後に溶液交換を実施した(図 5)。すると、巨大化大腸菌を保持しつつ、また破壊することなく溶液交換を行うことができることを確認した。

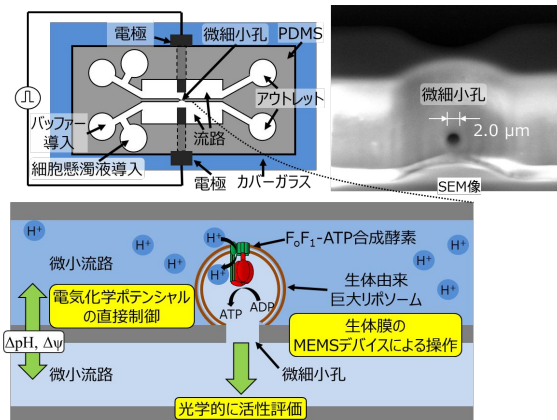


図 3 膜タンパク質解析デバイス

## (2) 巨大化大腸菌内膜タンパク質によるプロトン輸送活性のリアルタイム機能イメージング

このデバイスの動作を評価するために、次のように、巨大化大腸菌の膜に存在する呼吸鎖複合体 I の機能イメージングを行った。まず、ペニシリン系抗生物質により得られた巨大化大腸菌を微細小孔に捕捉・固定した。次に、直流パルスにより微細小孔部にて膜を穿孔することで、大腸菌内部側にある NADH (複合体 I の駆動剤) 結合部位にアクセスすることを可能とした。その後、流路内を蛍光性 pH 指示薬で満たし、巨大化大腸菌内部とつながっている側の流路へ NADH を導入した。すると、もう一方の流路で、蛍光性 pH 指示薬が明るくなる様子が観察できた(図 6)。これは、複合体 I が膜を超えてプロトンを大量に輸送したことを示唆している。NADH を ATP に変えても同様の蛍光強度の増大が観察できたことから、 $F_0F_1$ -ATP 合成酵素のプロトン輸送活

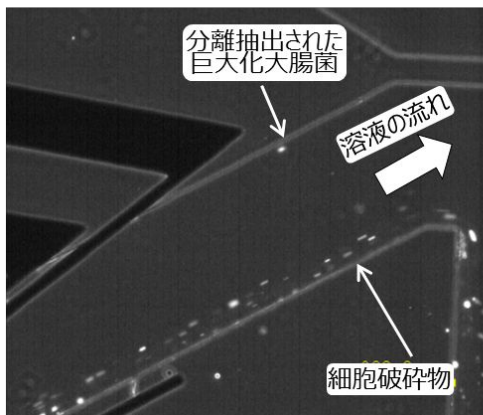
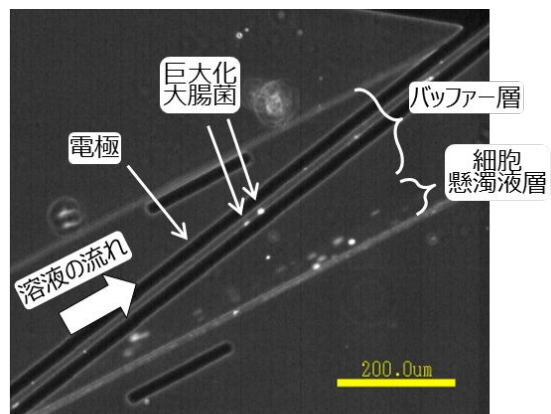
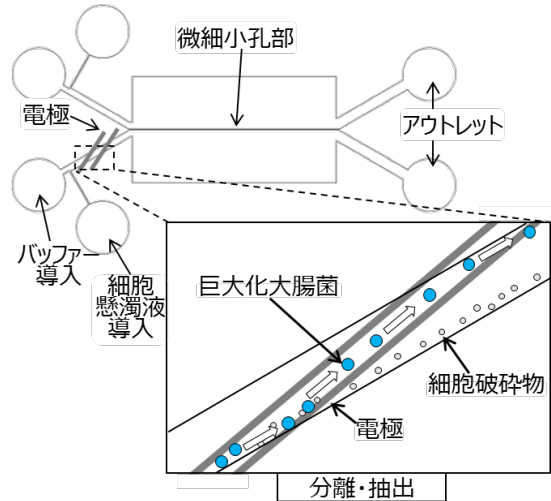


図 4 誘電泳動による巨大化生体膜の分離取得

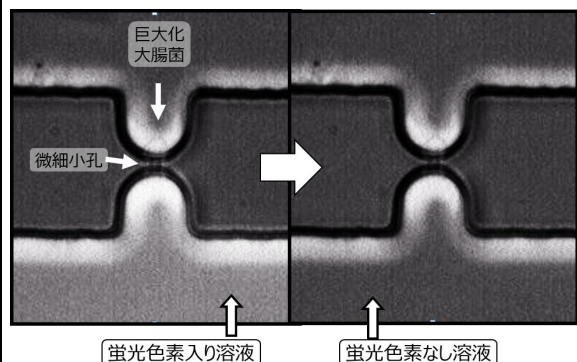


図 5 流路デバイス内溶液の交換の様子

性も検出できたと考えられる。以上のように、本デバイスは生体膜に挿入されている膜タンパク質の機能をリアルタイムで測定することができる。

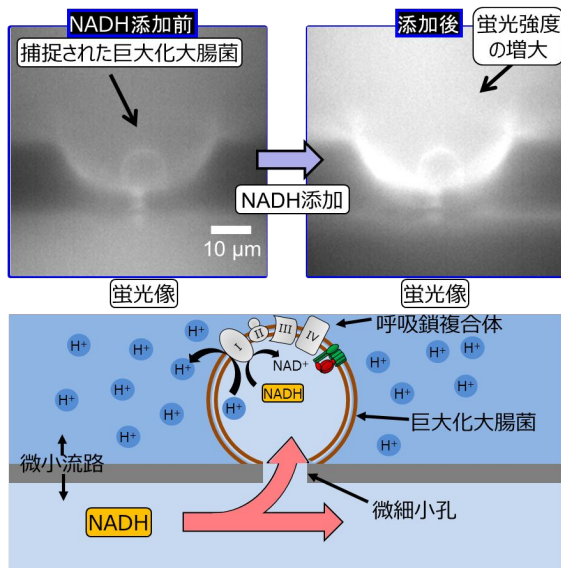


図 6 巨大化大腸菌膜プロトン輸送活性の蛍光イメージング

### (3) エバネッセント光を利用した、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素の光による人為的な駆動

構築したシステムを用いて流路内部溶液を反応溶液へと交換した後、エバネッセント光照射により  $F_0F_1$ -ATP合成酵素が駆動されるか評価・検討を行った。バッファはATPの材料であるADPとリン酸、合成されたATPを検出するためのルシフェリン/ルシフェラーゼを含み、エバネッセント光には試料へのダメージが少ない近赤外レーザー(1064 nm)を用いた。

エバネッセント光の照射を開始してから10分程度観察を行ったが、ルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光は検出されず、結果としては、 $F_0F_1$ -ATP合成酵素の活性は検出されなかった。電気化学ポテンシャルの形成に必要なエネルギーを十分に供給できていないことなどが原因と考えられる。今後の課題として、ATP合成に必要な自由エネルギー濃度を下げるなどの溶液条件を検討する必要性などが明確となった。

今後、本研究を発展させていくことで、光という電磁波によるモータータンパク質の機能操作への端緒を切り開き、生物学の研究を次世代のステージに押し上げるものと期待される。

## 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)

[学会発表](計 3件)

木村祐史、風見紗弥香、橋本優、伊藤博康

“Development of a novel system for the real-time analysis of biological membranes by using a microfluidic device.”、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月26日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

風見紗弥香、木村祐史、伊藤博康  
“Establishment of a new process for preparation of porcine heart mitochondria, and their activity measurements.”、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月26日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

木村祐史、風見紗弥香、橋本優、伊藤博康、  
「ミトコンドリア内膜タンパク質のマイクロ流路デバイスによる実時間解析」、第54回日本生物物理学会年会、2016年11月25日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 祐史 (KIMURA, Yuji)

浜松ホトニクス株式会社・中央研究所・専任部員

研究者番号：90713371

### (4) 研究協力者

風見 紗弥香 (KAZAMI, Sayaka)

浜松ホトニクス株式会社・中央研究所・研究員

研究者番号：80727991