

# 研 究 報 告 書

## 「高圧力を用いた分子間相互作用変調イメージング」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

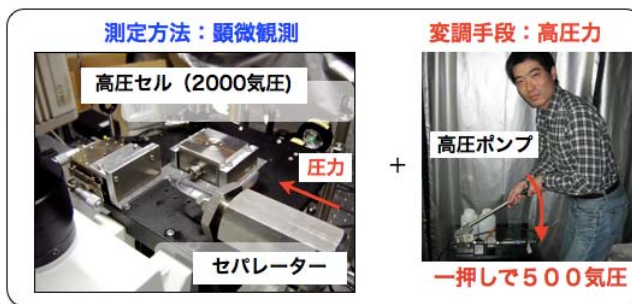
研究者：西山 雅祥

### 1. 研究のねらい

水溶液中でタンパク質1分子の構造変化や機能を観測できる1分子イメージングが開発されたのは15年前のことである。1分子イメージングは、開発当初から今日に至るまで、従来までの膨大な分子を用いた実験系では平均化の過程で失われていた「個々の分子の生の情報」を得ることができる手法として、多くの研究者に利用されてきた。タンパク質分子機械の代表例である分子モーターでは、1分子に目印を取り付けることで、ナノメートルの変位や構造変化などを検出することが幅広く行われるようになり、動作原理を調べる強力なツールとして定着した感がある。分子モーター1個の動きを見ていると、メインの運動方向とは異なった方向、つまり、逆向きにも、時々、ステップすることが検出されてきた。これらのマイナーイベントの検出は、1分子計測の開発当初に期待されていたことであり、熱揺らぎに激しく揺さぶられながらも効率よく駆動する分子モーターの運動特性を明らかにする上で鍵となる重要なイベントであると考えられている。しかしながら、分子モーターの多くは、構造的に定められた方向に、動くように巧妙に仕掛けられており、マイナーイベントの検出は可能であっても、定量的な議論に持ち込むことは、ほとんどの場合困難となっている。言い換えると、生体分子機械の精緻な構造や機能を少しいじって、マイナーイベントを効率よく検出、定量化できれば、動作原理の解明につながることを意味する。さきがけ研究では、細胞内にあるタンパク質をとりまく水分子に着目し、高圧力技術で、タンパク質と水分子との相互作用を変化させて、その構造変化・機能変調について顕微観測を行う新しい分析手法の開発に取り組んだ。

### タンパク質と水が生み出す生物らしい機能発現メカニズムの解明

新規開発する分析技術  
高圧力顕微鏡



研究ターゲット  
タンパク質と水

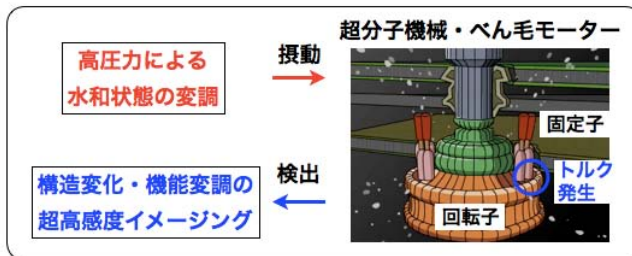


Figure 1 さきがけ研究の概要

## 2. 研究成果

さきがけ研究では、1) 高圧力下での高感度実時間イメージングを可能にする高圧力顕微鏡を開発し、2) バクテリアの運動器官であるべん毛モーターの回転運動を研究ターゲットとして研究をすすめた(Fig. 1)。これまでの研究により、高圧力の影響は、測定対象となる構造体が複雑であるほど、より低い圧力下で構造と機能が変化することが知られている。バクテリアの運動器官であるべん毛モーターは巨大なタンパク質複合体であり、高圧力によるダイナミックな構造変化と機能変調が期待され、かつ、遺伝子操作および、培養方法の簡便さなどメリットも多い。また、「動き」という機能は顕微鏡下での精密計測が可能であるため、定量的なデータを元にして動作原理に迫ることができる。

### 1) 新しい分析手法: 高圧力顕微鏡の開発

細胞内にある水分子は、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働きがある。言い換えると、タンパク質と水との相互作用を変えることができれば、構造や機能活性のコントロールを行えることを意味する。これまでの研究により、高圧力下では、タンパク質の水和状態が変化するため、立体構造の揺らぎが大きくなり、また、タンパク質間の相互作用が弱まることが知られている。こうした知見は、NMR や吸光・蛍光などの分光測定を通じて得られたものであるが、高圧力技術と光学顕微鏡を組み合わせた報告例はほとんどない。なぜなら、耐圧性能を維持することと、開口数を拡げて高解像の顕微観察像を取得することは相反する要素であり、両立させることは困難であったからである。さきがけ研究において、研究代表者は、高圧力技術をタンパク質構造と機能をかえる変調作用として用い、その変化を高解像の顕微観察により検出する新しい分析技術の開発に取り組んだ。

高圧力下の実時間イメージングを可能にする「高圧力顕微鏡」の開発において、最も重要な課題は、耐圧性能を維持しながら、高開口数の観測窓をもつ高圧チャンバーの開発にある(Fig. 2a)。これまでから、トライアンドエラーを繰り返しながら設計を繰り返し、耐圧性能重視型と高開口数重視型の異なる2種類の高圧チャンバーを開発してきた。耐圧性能重視型高圧チャンバーでは、本体の材料として、粘りがあり可塑的に変化するニッケル合金(ハステロイ C276)、また、観測窓の材料としては、良好な顕微観察像を得るため通常のガラスを採用した。この結果、マリアナ海溝最深部(11,000m)の静水圧の約2倍に相当する2000気圧までの耐圧性能を有しながら、長作動距離の対物レンズ(WD~3mm, NA=0.6)を用いて、チャンバー内の明視野像、位相差像、暗視野像、落射蛍光像を観察できる顕微鏡を開発できた(Fig. 2b)。この高圧チャンバーにハイスピードカメラを組み合わせることで、チャンバ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できた。

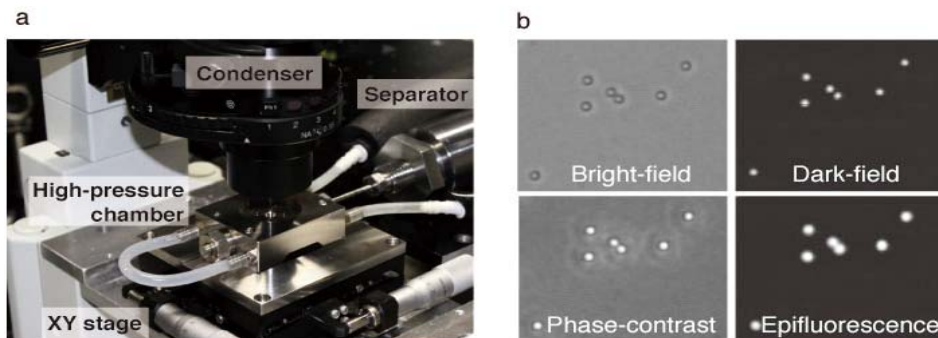


Figure 2 高圧力下での光学顕微観察システム a, 高圧チャンバーと周辺部の写真。b, 高圧チャンバーの観測窓に固定した 1 $\mu$ m ビーズの各種顕微観察像。Bar= 5 $\mu$ m

次に、高開口数型高圧チャンバーでは、高解像度の顕微鏡観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, APO100XOHR, Olympus) を利用できる仕様とした。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ことで (西山雅祥, 顕微鏡用高圧容器, 特願 2008-264944)、現在、1000 気圧程度の耐圧性能を達成させることに成功している。この高圧チャンバーに、光ピンセットによる操作技術や、対物レンズ型エバネッセント照明の光学系を組み込みずみであるため、今後は、高圧力下での 1 分子イメージングへと展開していきたい。

## 2) バクテリア・べん毛モーターの回転運動変調イメージング

バクテリアのべん毛モーターは、自然界には数少ない回転運動を生み出す生物分子機械であり、その速度は毎分 1 万回転にも達している。バクテリアは、この回転モーターで長いらせん状のフィラメント (べん毛繊維) をスクリューのように回転させることで、水の中を自由に泳ぎまわっている。べん毛モーターは、数十種類ものタンパク質が何百個と集まってできている複雑な分子集合体である。回転運動の発生に関わる重要な部位として、べん毛繊維の根元に位置する「回転子」と、それを取り囲むように位置する約 10 個の「固定子」が挙げられる (Fig.1)。細胞外にあるイオンが固定子に結合後、固定子-回転子間の相互作用によりトルクを発生させているのだが、その詳細な動作メカニズムは明らかにされていない。機能評価の点からみても、*in Vitro* 再構成系での実験ができないので、生きた細胞内で行われる回転方向の調節、ならびにトルク発生を制御し計測することが技術的に困難であることが、大きな理由として挙げられる。さきがけ研究では、高圧力技術を利用して、細胞内にある水分子とべん毛モーターの相互作用を変えることで、回転機能の変調と検出に取り組んだ。

高圧力顕微鏡の観測窓にべん毛繊維を吸着させて、細胞本体の回転運動を観察した (Fig. 3a)。実験に用いた菌体からは、べん毛モーターを時計方向 (CW) に回転させるシグナルタンパク質である CheY を欠失させているので、通常条件下では、全てのモーターは反時計方向 (CCW) に回転することになる (Fig.3b)。しかしながら、このモーターは、1200 気圧下では、時計方向 (CW) に回転しはじめた (Fig.3c)。あるモーターに着目し、各圧力下における回転運動のトレースを Fig. 3d に示す。回転速度が圧力増加とともに単調に減少したのに対して、回転方向が 1200 気圧を境に反転した様子が見て取れる。それ以外の例として、高圧力下で

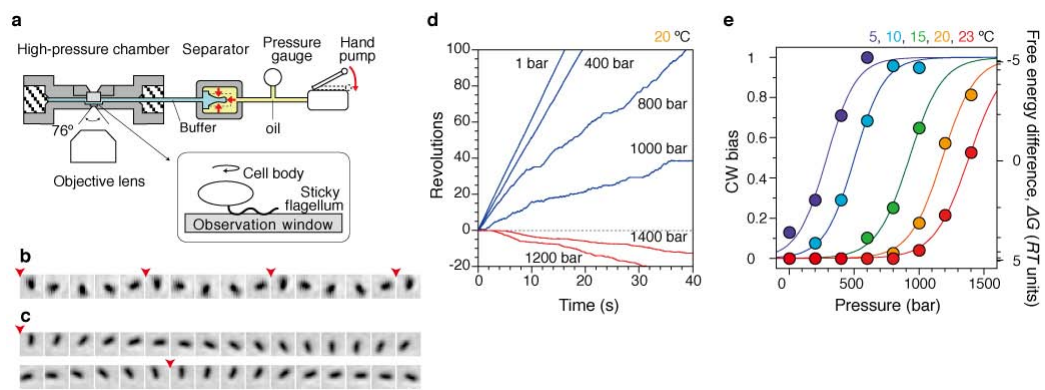


Figure 3 高圧力により引き起こされたべん毛モーターの逆回転運動。a, 実験系。b and c, 回転する菌体の連続写真。同じべん毛モーターの回転運動について 1 気圧 (b) と 1200 気圧 (c) で位相差像を観察した。赤い矢印は 1 回転を示す。時間間隔は 33ms。Bar = 2 $\mu$ m。d, 同じべん毛モーターにおける回転運動のトレース (CCW 向きの回転を正の値)。e, CW バイアス。各条件下でべん毛モーターが CW 方向に回転する時間をもとめ、全体として CW 方向に回転する確率について計算した。

回転方向が定まらず両方向に回転するモーターや、依然として CCW 方向に回転するモーター、回転を停止させた例などが見られた。このような回転の方向性について定量的に評価するため、1つ1つのモーターが CW 方向に回転する時間を求め、全体として、モーターが CW 方向に回転する確率(CW バイアス)を計算した(Fig.3e)。圧力の増加と共に、CW バイアスはシグモイド状に増加し、低温では圧力の影響がより顕著にあらわれることが明らかになった。高圧力と低温は平衡定数や反応速度に対して同様の効果が期待されるので、熱力学的にもつじつまはあう。おそらく、高圧力をかけることで、べん毛モーターが CheY 結合時のような構造へと変化していると考えられる。

次に、高圧力がどのようにして、べん毛モーターのトルク発生過程を変調するのか明らかにするため、べん毛モーターの高速回転ナノ計測を行った。高圧力顕微鏡にハイスピードカメラを組み合わせて、べん毛繊維に取り付けたポリスチレン・ビーズの高速回転運動を記録した(Fig. 4a)。その回転速度と発生トルクを様々な圧力下で測定したところ、常温常圧において、べん毛モーターが低速で回転する領域では(0~140Hz)、見かけのトルクは約 1500pNnm でほぼ一定であり、高速度領域では(>140Hz)発生トルクは急激に減少した。圧力の増加に伴い、幅広い速度領域で回転速度の低下が見られたが、べん毛モーターが発生できる見かけ上のトルクの最大値に変化は見られなかった(Fig.4b)。この高圧力下でのトルクスピード関係は、サルモネラ菌で、細胞内 pH を下げて得られた結果とよく一致していた(Nakamura *et al.*, *J. Mol. Biol.* 386, 332-338 (2009))。したがって、高圧力下では、あたかも細胞内のプロトン濃度が増加したかのように、プロトンの流入速度が低下していると考えられる。同様の結果は、海洋性ビブリオ菌・周毛欠損株の遊泳運動や、ならびに、同菌体由来の Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターの高速回転計測からも得られた。

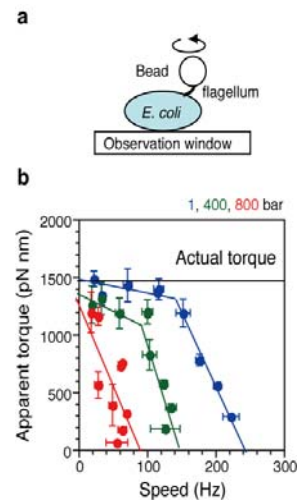
また、モーターの回転速度の圧力依存性解析から、圧力やビーズサイズに伴う粘性抵抗値に関わらず、モーターが発生するトルクは常に一定値(1470pNnm)であることが明らかになった。この知見を元にすると、べん毛モーターのトルク発生モデルとしては、イオンの流入と構造変化が1:1に共役したタイトカップリングモデルのみならず、必ずしも1:1に対応しないルースカップリング型のモデルでも説明できることが判明した。今後は、高圧力下での固定子-回転子の結合解離の直接観察や、モデル解析を通じて、詳細な動作原理を明らかにしていきたい。

また、モーターの回転速度の圧力依存性解析から、圧力やビーズサイズに伴う粘性抵抗値に関わらず、モーターが発生するトルクは常に一定値(1470pNnm)であることが明らかになった。この知見を元にすると、べん毛モーターのトルク発生モデルとしては、イオンの流入と構造変化が1:1に共役したタイトカップリングモデルのみならず、必ずしも1:1に対応しないルースカップリング型のモデルでも説明できることが判明した。今後は、高圧力下での固定子-回転子の結合解離の直接観察や、モデル解析を通じて、詳細な動作原理を明らかにしていきたい。

### 3. 今後の展開

本研究課題で開発した高圧力顕微鏡法は、今後2つの展開を期待できる。まず、基礎研究では、比較的分子の構造変化や機能活性を高圧力下で計測し、水を含んだMD計算との比較から、機能発現における水分子の役割を具体的に解き明かすことができるであろう。具体的には、ATP合成酵素:F<sub>1</sub>モーターがその対象としてもっともふさわしいと考えられる。次に、応用研究として、高圧力が等方的な力学作用であることを利用して、細胞・組織に対する一様な力学効果として用いることができる。これまでの研究では、細胞などに力学作用を与えるさいには、水流によるズリ力などが用いられてきたが、細胞の形などによりその効果が異なるというデメリットがある。高圧力技術を用いて、細胞膜を介したシグナル伝達過程やタンパク質発現量の制御を行い、メカノバイオロジーの新潮流として展開していきたい。

### 4. 自己評価



**Figure 4** べん毛モーターの回転ナノ計測。a, 実験系。b, トルクスピード関係

さきがけ研究では、1) 高圧力下での光学顕微鏡測を行える新しい分析技術の開発と、2) バクテリアべん毛モーターの回転運動を研究対象にして3年半の研究を行ってきた。まず、1)において顕微鏡測用の高圧力チャンバーの開発が要であり、耐圧性能と高開口数の維持、次に、汎用性の2点が重要項目であった。前者については、1分子イメージングを可能にする高開口数は達成し、特許申請にいたったものの、耐圧性能が未だ不十分であり、今後課題を残す状況である。後者については、汎用性を重視した高圧チャンバーを開発することで、明視野像、暗視野像、位相差像、蛍光像と各種の顕微画像の取得が可能であり、現在では、装置一式を共同研究者にあずけて、研究を開始するに至っている。今後は、高圧力を用いた新しい分析技術として普及させていきたい。

次に、研究対象として選んだべん毛モーターには、大腸菌の培養の容易さに加えて、複雑な構造体であるがゆえに高圧力の影響を出しやすく、かつ、その機能である回転運動は光学顕微鏡下で定量しやすいというメリットがあった。研究課題として挙げた高圧力下での回転方向と回転速度の定量化はほぼ達成できた。残された課題として、べん毛モーターのトルク発生時における固定子-回転子間の結合解離反応の圧力による変調と可視化が挙げられる。高圧力顕微鏡の改良を進めながら、残された課題として取り組んでいきたい。

## 5. 研究総括の見解

タンパク質、生体膜、細胞、個体等への圧力効果はかなり以前から種々の分光法等を用いて研究されて来ており、バロバイオロジーという研究分野に発展している。本研究では圧力変調出来る光学顕微鏡を新たに開発したことは大いに評価出来る。これを用いてべん毛モーターの回転に及ぼす圧力の作用の研究に応用している。圧力を変えることによって H<sup>+</sup> や Na<sup>+</sup>の流入が変調しモータータンパク質のトルクに影響を与えていることを明らかにしている。しかし何故 800 気圧でモーターの回転方向が逆転するのか解明してほしい。圧力の作用は水構造の変化や分子集合体の変化をもたらす。分子レベルの変化と分子システムの変化を区別して解明するには高圧力顕微鏡のみでは困難ではないだろうか。しかしながら本研究はその方向に着実に進展しつつあると言えよう。ユニークな本研究を高く評価したい。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Nishiyama M.</u>, Kimura Y., Nishiyama Y. &amp; Terazima M. Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin- microtubule complex. <i>Biophysical Journal</i>, 96 (3) 1142-1150 (2009).</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Nishiyama M.</u>, Shimoda Y., Hasumi M., Kimura Y. &amp; Terazima M. Microtubule depolymerization at high pressure. <i>Ann NY Acad Sci.</i> 89 (1) 86-90 (2010).</li> </ul>

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

発 明 者: 西山雅祥  
 発明の名称: 顕微鏡測用高圧容器  
 出 願 人: JST  
 出 願 日: 2008/10/14

### (3) 受賞

• 西山雅祥、日本生物物理学会 第5回若手奨励賞受賞(2009年10月)

(4) 著書

- ・西山雅祥、(仮題)べん毛モーターが高圧力下で逆に回り出す?!、生物物理  
(*in preparation*)

(5) 学会発表

学会発表(国際)

・Nishiyama M., Shimoda Y., Hasumi M., Kimura Y., Terazima M. Direct observation of microtubule depolymerization *in vitro* at high-pressure conditions. 5th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. San Diego, SA, USA, Sep. 2008

・Nishiyama M., Sowa Y., Kumazaki S., Kimura Y., Homma M., Ishijima A., Terazima M. High-pressure microscopy for modulating the torque generation of bacterial flagellar motors, 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, Boston, USA, Mar, 2009.

・Nishiyama M., Kimura Y., Terazima M. High-pressure microscopy for modulating the structure and function of biomolecules. 52nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, SA, USA, Feb. 2010.

・Hasumi M., Terazima M., Nishiyama M., Effect of pressure on the torque of the bacterial flagellar motor. 52nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, SA, USA, Feb. 2010.

・Nishiyama M., Sowa Y., Kimura Y., Homma M., Ishijima A., Terazima M. Reverse rotation in bacterial flagellar motors at high hydrostatic pressures. BLAST XI, New Orleans, LA, USA, Jan. 2011, "Scheduled for a Talk"

学会発表(国内)

・下田義樹、西山雅祥、小嶋誠司、本間通夫、木村佳文、寺嶋正秀、Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターにおける遊泳速度の圧力応答、第45回日本生物物理学会年会、横浜、2007年12月

・西山雅祥、木村佳文、寺嶋正秀、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、2008年12月

・蓮見学、寺嶋正秀、西山雅祥、バクテリアべん毛モーターの発生トルクの圧力依存性、第47回日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月

・加藤篤、寺嶋正秀、西山雅祥、Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターの回転速度の圧力依存性、第48回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月

(6) 招待講演

招待講演(国際)

・Nishiyama M. Control of Bio-nanomotors by High-pressure Techniques, *NanoMedicine 2010*, Beijing, China, Oct. 2010

・Nishiyama M. Pressure-induced reverse rotation in bacterial flagellar motors, 6th International Meeting on Biomolecules under Pressure, March 2011

招待講演(国内)

・西山雅祥 高圧力による生体分子間相互作用変調イメージング、CREST 中山チームミーティング、京都、2008 年9月

・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、2008 年 12 月

・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、横浜、2009 年 6 月

・西山雅祥 高速カメラを用いたリアルタイムナノ計測、デジモ社ランチョンセミナー、第 48 回 日本生物物理学会年会、仙台、2010 年 9 月

・西山雅祥 ワークショップ“(仮称)化学反応や生体高分子の構造変化における状態変化の起源を探る”、新潟、2011 年 3 月(予定)