

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 新世代ナノ計測の開発と生体分子への応用

2 研究者氏名: 石島 秋彦

3 研究の狙い:

現在のナノ計測システムに比べ、高時間、空間分解能を有する新世代ナノ計測システムを開発し、ナノメートルレベルで生体分子の運動を正確に計測することを目的とする。これらの計測系を開発することにより、運動タンパク質以外の生体分子にもその研究分野を広げ、生体分子のエネルギー変換機構の解明を目指す。

近年、開発されてきたナノマニピュレーション技術(ナノメートルオーダーの物体を直接捕捉し、操作する技術)は、ナノスケールの生体分子の運動を1分子レベルで計測できるようになってきて、生命科学の研究に大きな影響を与えてきた。しかし、まだこの計測システム自体が不完全なシステムであり、さらにまだ十分とはいえない分解能のため、これらの研究から得られた結果が歪曲されて理解されている。筋収縮を司るミオシン分子の発生する変位の大きさにおいて運動を正確に計測することは、生体内でのエネルギー変換メカニズムを明らかにする上でも非常に重要な課題である。これまでに様々な研究者が様々な手法を用いてミオシン1分子の発生する変位を求めてきた。しかし、これらの結果は必ずしも一致しない。その原因として考えられるのが、測定系に含まれる不確かな成分がミオシンの変位をゆがめているからである。さらに真の運動変換メカニズムを明らかにするためには、現在の分解能(位置などの情報をどの程度精度よく計測できるかの指標)では不十分であり、1nm以下、 $10^4\text{s}^{-1}$ 以上の分解能が必要である。

測定系に含まれる不確かな成分とは、トラップビーズの回転拡散運動、接着分子の弾性、アクチンフィラメントのたわみ成分の弾性要素などでの計測系の非線形弾性要素であると考えられる。これらの要素を排除し、正確に計測するためには、プローブの小型化、新しい計測系を開発が必要である。現在ナノ計測に用いられている計測用のビーズの大きさは1マイクロメートルであり、計測対象である生体分子に比べて非常に大きく、生体分子の速い運動(サブミリ秒)を計測することができない。そこで、プローブを小型化できれば、時間分解能(位置などの情報をどの程度の時間間隔で計測できるかの指標)は向上し、非線形弾性要素の影響を小さくすることが可能である。さらに、プローブ自体のゆらぎ成分を高周波に広げることとなり、実質的なゆらぎ成分を小さくすることが可能となり、空間分解能(位置などの情報をどの程度の位置制度で計測できるかの指標)も向上する。しかし、小さいプローブを使用すると、その位置を高いS/Nで計測することが困難になる。現時点での可能性が高い計測システムはレーザー斜光照明法とバックフォーカル計測システムである。レーザー斜光照明法とは、直接光ではなく、散乱光を用い、ビーズの散乱光をフォトダイオードに投影する。バックフォーカル計測システムとは、ビーズの結像を使用するのではなく、フォーリエ像を用いる。今までの基礎研究から、これらの計測システムを用いれば、0.2マイクロメートル程度の小さなビーズでもS/Nよくビーズの変位を計測することが可能であることがわかっている。しかし、まだレーザーを用いることによる低周波のノイズ成分の上昇、コヒーレンス性(光などの位相がどの程度そろっているかの指標)の低減の必要性など克服しなければならない課題が存在する。

4 研究成果:

4.1 バクテリアべん毛モーターの回転機構の解明

#### 4.1.1 バクテリアべん毛モーターのトルク・回転速度関係の解明

バクテリアは菌体表面のらせん状のべん毛繊維をスクリューのように回転させることにより、推進力を得て溶液中を遊泳する。その回転方向を逆転することで泳ぐ方向の転換を行い、より良い環境へ向かっていく能力も兼備している。細胞膜にはべん毛を回転させる役割を持つモータータンパク質が埋め込まれており、そこから細胞質内に流入するイオンのエネルギーからモーターの回転力(トルク)を生み出している、生物界でも数少ない回転運動器官である。

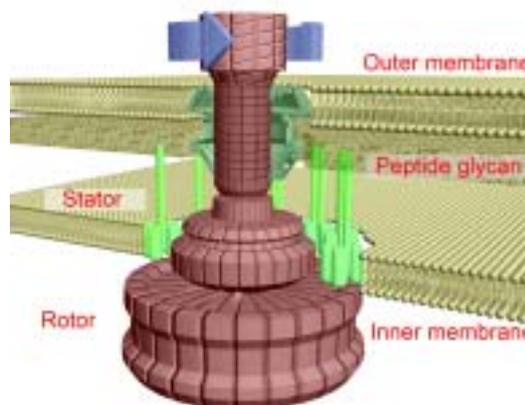


図1 バクテリアべん毛モーター

バクテリアべん毛モーターの回転における外液ナトリウム濃度と回転速度との関係を計測した(図1)。その結果、回転速度はナトリウム濃度に依存し、約100 mMで最大回転速度に達した。さらに、フィラメントに固定したビーズの径に依存し、ビーズ径が大きくなり、粘性抵抗が増えるに従い最大回転速度は減少した。この粘性抵抗と回転速度から発生トルクを見積もることができる。図2に回転速度と発生トルクとの関係を示す。そして発生トルクの回転速度依存性を明らかにした。さらに簡単な4状態モデルで再現することができた。これらの結果をまとめ、10月に学術雑誌に投稿した。

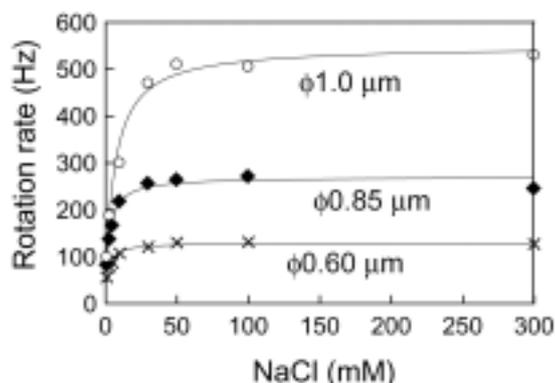


図2 NaCl濃度と回転速度との関係

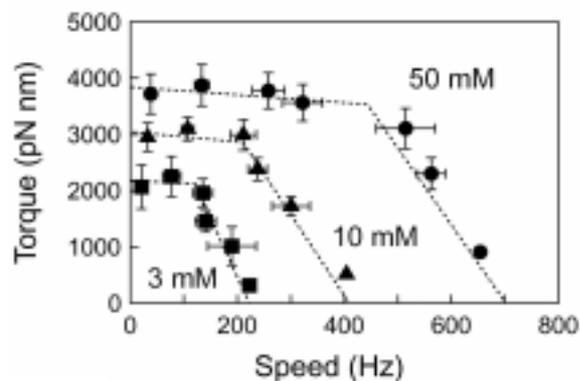


図3 回転速度と発生トルクとの関係

さらに、リチウムイオンによるトルク - 回転速度関係を計測した。その結果を図1に示す。図からも明らかなようにリチウムイオンにおいてもトルク - 回転速度関係はナトリウムの場合と同様に低回転域ではトルクが一定となり、高回転域に於いて減少することを見いだした。また、最大トルク、最大回転速度はナトリウムの場合に比べて、1/2、1/5という値を示した。この結果を以前にも用いた4状態モデルでの再現を試みたところ、イオンの結合定数を変化させる、という単純なパラメーター変化でナトリウム、リチウムの場合を説明することに成功した。

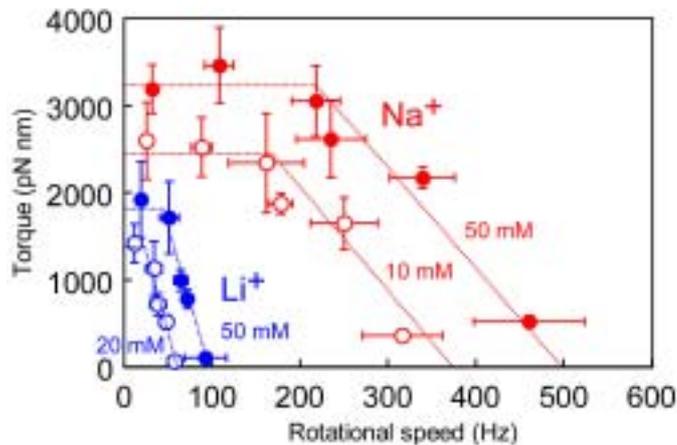


図4 ナトリウム、リチウムイオンにおけるトルク - 回転速度関係

#### 4.1.2 キメラ菌体の構築、最適化

本問らによって構築されたナトリウム駆動型とプロトン駆動型のバクテリアべん毛モーターのキメラ菌体を用いて、回転計測系への最適化を図ることを行った。このキメラ菌体はローターはプロトン駆動型由来、ステーターはプロトン駆動型とナトリウム駆動型とのキメラタンパクというものを有し、ナトリウムイオンの流れによって回転発生することができる。菌体自体はプロトン駆動型である大腸菌を用いるため、安定した回転計測、タンパクの発現の制御、走化性(バクテリアなどの生物が化学物質により、引き寄せられたり、逆に避けていったりする行動)などの情報伝達との関連、など様々なメリットがある(図5)。

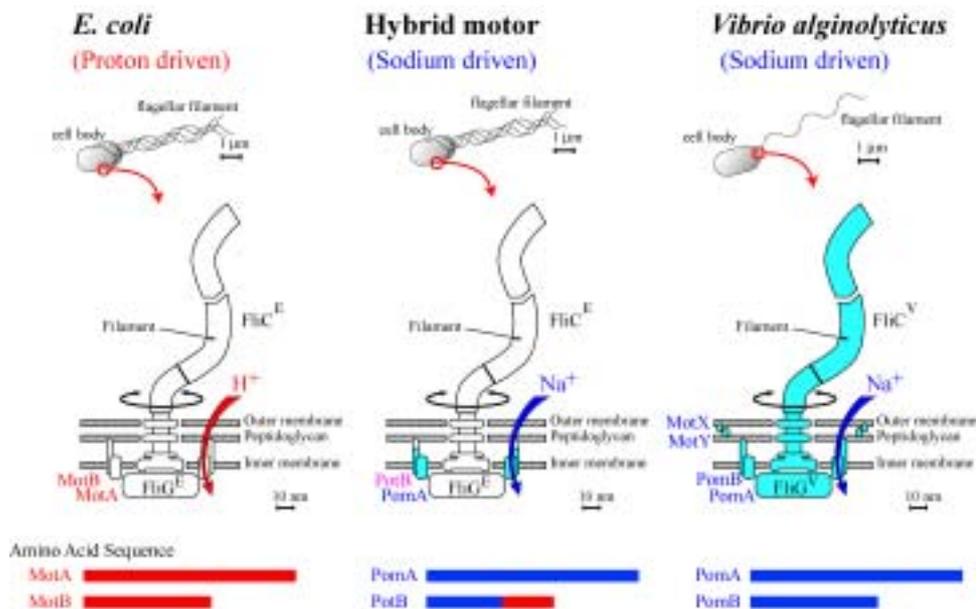
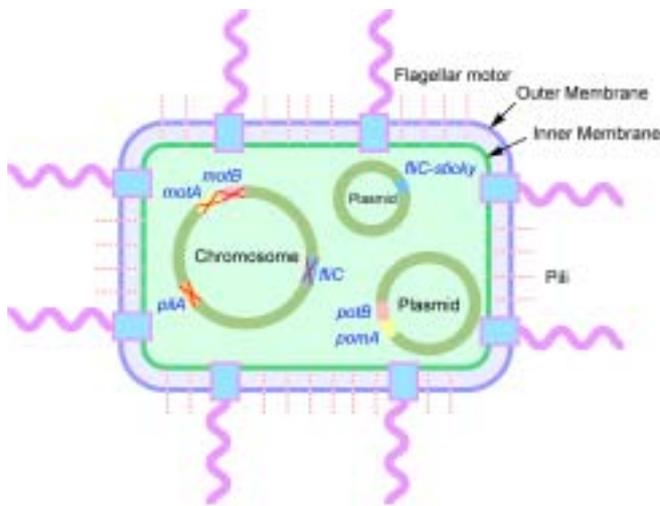


図5 キメラ菌体の構成。左側がプロトン駆動型である大腸菌、右側がナトリウム駆動型であるビブリオ菌、中央がキメラ菌体。ローターは大腸菌由来、ステーターは大腸菌とビブリオ菌のキメラ、ナトリウム駆動となる。



このようにして得られた新キメラ菌体のべん毛の回転はナトリウム依存性を示していることが確認できた。この新しく構築したキメラ菌体を用いて、まず回転の安定性を確認した。その結果を図6に示す。

図6 回転計測に適したキメラ菌体の構成。大腸菌由来の *motA*, *motB*, *pilA*, *fliC* 遺伝子をつぶし、新たに *fliC-sticky* 遺伝子を導入した。

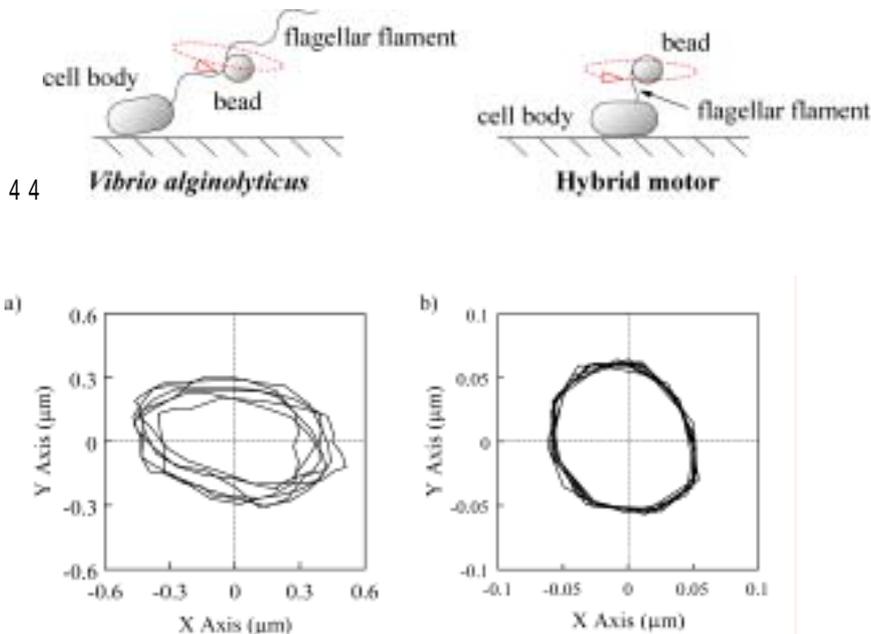


図7 ビブリオ菌を用いた計測結果(左)と新キメラ菌体を用いた計測結果(右)

図7からも明らかなように、ビブリオ菌を用いた結果に比べて、新キメラ菌体を用いた結果は、非常に安定していることがわかる。これは、ビブリオ菌は極毛のため、斜め、もしくは直立した菌体を用いてしか計測ができないのに対し、新キメラ菌体は側毛であるため、ガラス上に菌体がしっかりと固定されているため、安定した回転計測が可能になったものと思われる。

#### 4.1.3 キメラ菌体を用いた回転ステップの計測

回転運動の素過程を計測するために、ステーターユニットの発現量を調節し、できるだけ少

ない発現量、たった一つのステーター、による回転計測を試みた。その結果、1回転中にステップ状の運動を計測することに成功した。1回転中のステップの様子を明らかにすることは、回転メカニズムを明らかにする上で非常に重要なことである。

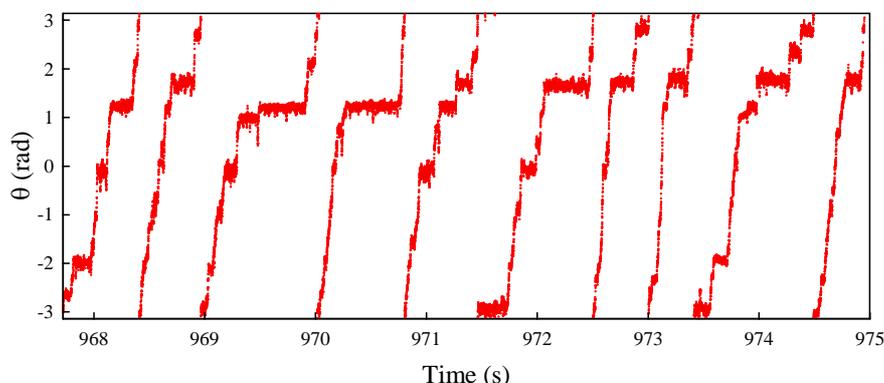


図8 1回転中のステップ状運動の様子

このステップ状の変位の大きさを明らかにするために、Pairwise Distance Distribution Function (PDDF)法を用いた。その結果、0.08、0.14(回転)という位置にピークが現れ、それぞれ1回転中に12.7ステップ/回転という値になる。さらに、ステップの様子を詳しく見てみると、微小なステップ状の変位を見ることができた。

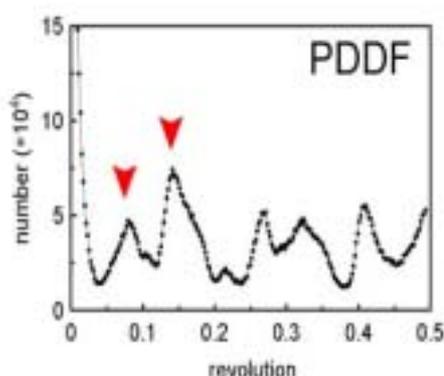


図9 Pairwise Distance Distribution Function (PDDF)法による結果。

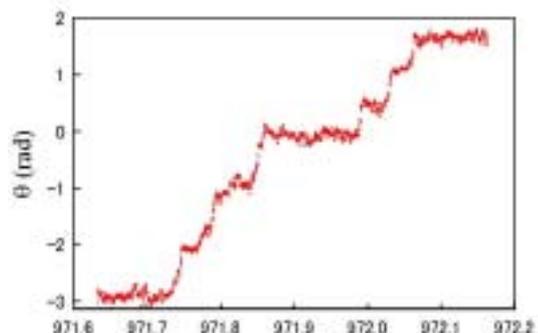


図10 微小ステップの様子

このステップの様子を上と同様の Pairwise Distance Distribution Function (PDDF)法を用いて解析した結果、0.03(回転)という位置にピークが現れ、1回転中に33ステップ/回転という値になる。この値は、ローター側の構造体であるC-ringの重合数とほぼ一致する。

今回の研究により、1回転中のステップを初めて計測することに成功した。このことは、いままで多数の研究者が計測を試みていた結果であり、非常に重要な結果である。しかしながら、まだステップの大きさ、発現時の条件、など不明な点が多々ある。従って、今後さらなる研究を遂行し、ステップ発現の条件を明らかにし、回転動作機構を明らかにしていく予定である。

## 4.2 バックフォーカル照明系の構築

光学顕微鏡を用いた生体分子の1分子計測においては、図11に示すような光学系を用いてナノメートルのオーダーで計測を行っている。生体分子を直接計測することは現状ではまだ不可能であるので、生体分子にプローブを固定し、そのプローブの運動を計測している。プローブの変位は4分割のフォトダイオード上にプローブの像を結像し、その作動出力から生体分子の運動を計測している。しかし、最初に述べたようにあまりにも生体分子自身、生体分子の運動の大きさとプローブの大きさが違うため、現状では、生体分子の運動を正確に計測できているとは言い難い。プローブの大きさをできる限り小さくすれば、より正確に生体分子の運動を計測できるが、現在用いられている計測手法、明視野、位相差(図11、左の二つ)では、プローブが小さくなるとフォトダイオードに投影される像自体の大きさ、光強度が小さくなり、その変位を正確に計測することが困難である。そこで、新しい計測手法、斜光照明、バックフォーカル計測システム(図11、右二つ)を新たに構築し、微小プローブの変位計測システムの構築を試みた。斜光照明法とは、明視野、位相差のようにプローブを透過する光の強度、位相情報などの直接光を用いるのではなく、斜めから照射したレーザーによる散乱光をフォトダイオードに投影するものである。また、バックフォーカル計測システムとは、プローブの結像像ではなく、フーリエ像をフォトダイオードに投影して、その変化を計測するものである。

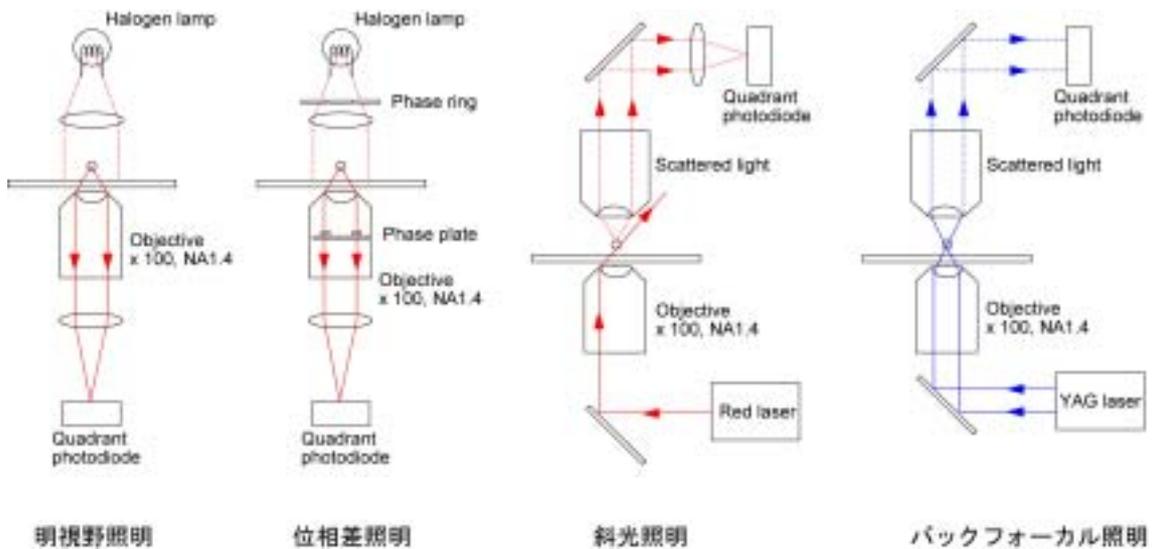


図11 さまざまなナノ計測システム

今回は、バックフォーカル計測システムを紹介する。この新しい照明系(図11)の構築、性能の評価を行った。図12にバックフォーカル像の連続写真を示す。直径1ミクロンのビーズを振幅400nmの正弦波で振動させたときの像である。このように、バックフォーカル像がプローブの運動を反映していることがわかる。

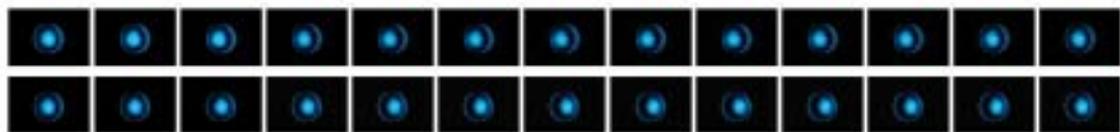


図12 バックフォーカル像の連続写真

新しく構築したバックフォーカル照明系において、従来の位相差像による照明系との比較を行った。図13に従来の位相差照明において直径が1ミクロン、0.5ミクロンのビーズを50Hzで振動させたときのフォトダイオードの出力の結果を示す。直径1ミクロンにおいては、ビーズの変位が1nmでも十分な出力を示しているが、直径0.5ミクロンのビーズでは2nmの変位でもうその変位を計測できていない。ビーズの径が0.3ミクロン以下であると計測に十分なシグナルを得ることができず、結果としてS/Nが悪くなり、実際の計測には適さない。

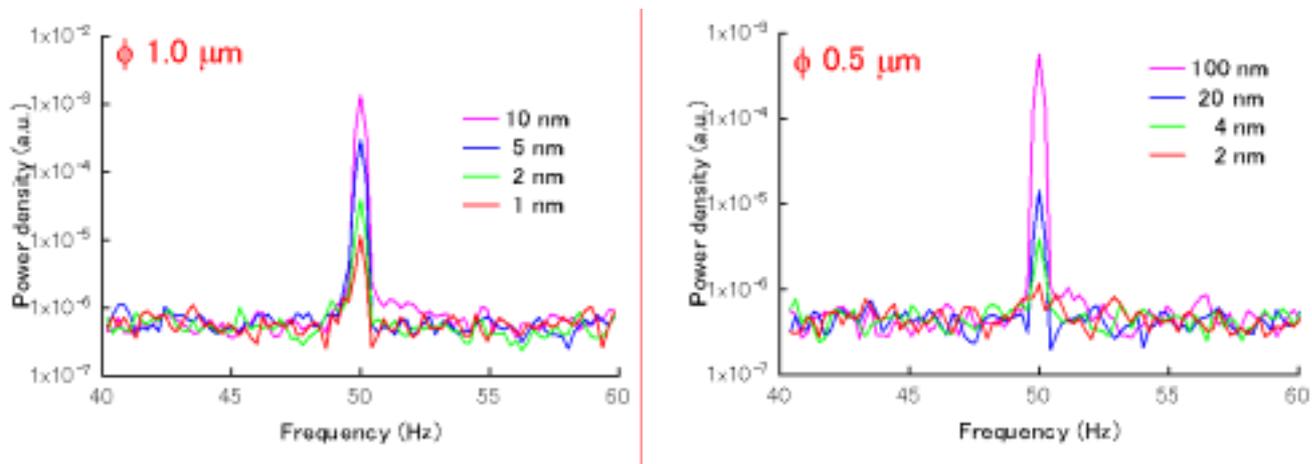


図13 位相差照明におけるビーズの大きさと出力との関係

そこで、バックフォーカル計測システムを用いて、どの程度の小さいビーズまで十分な感度を持ち得るかを評価した。図14にバックフォーカル計測システムにおいて直径が1ミクロン、0.2ミクロンのビーズを50Hzで振動させたときのフォトダイオードの出力の結果を示す。

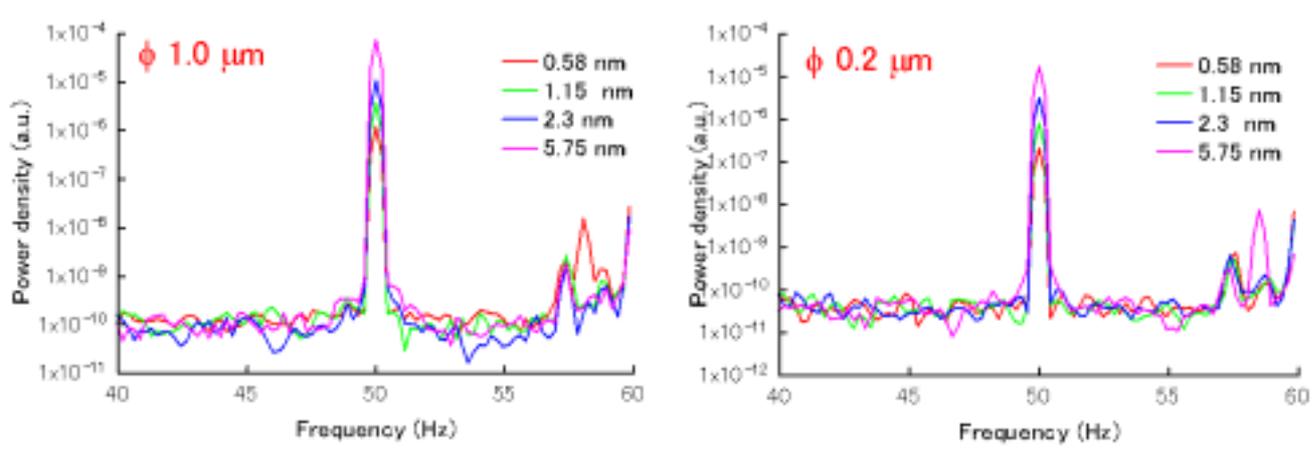


図14 位相差照明におけるビーズの大きさと出力との関係

図からも明らかのように、バックフォーカル計測システムでは直径0.2ミクロンのビーズにおいても、0.58nmという変位まで十分に感度があることがわかる。また、さまざまな問題点、レーザーによるスペクルノイズ、低周波のゆらぎ、光学系の最適化、などを解決していかなければなら

ないが、これらの新しい計測システムを構築していくことにより、生体分子の運動をより正確に計測可能なシステムを構築できるものと思われる。

#### 5 自己評価:

これまでの研究において、新しい光学系の開発、生体分子の運動メカニズムの解明、という両面から研究を行ってきた。しかし、限られた時間、人員により、いずれの研究計画も当初の計画通りに完結できたとは言えない。しかし、生体分子の運動メカニズムの解明においては、新しいキメラ菌体を用いることにより、従来計測できていなかった回転中の素過程を初めて明らかにすることが可能となった。さらに新しい光学系の開発においては従来の計測手法に比べて飛躍的に分解能の向上が見込まれることを示唆できた。いずれもこの研究方針が正しいことを示しており、この研究方針をさらに突き進めていく自信となった。さらに、このような従来の研究システムを改善、改良していくという方針だけではなく、まったく新しいシステムを導入し、従来の研究システムとは全く違うシステムの構築も必要である。そのためにも、自分の研究フィールドだけではなく、異分野のフィールドにも積極的に参加し、新しい素材、ツールを探し出していくことが今後必要になると感じた。

#### 6 研究総括の見解:

現在のナノ計測システムに比べ、高時間、空間分解能を有する新世代ナノ計測システムを開発し、ナノメートルレベルで生体分子の運動を正確に計測することを目的として研究を進めた。その結果、新しい光学系の開発において従来の計測法に比べて飛躍的に分解能の向上が見込まれることを示唆できたこと、さらに生体分子の運動メカニズムの解明において新しいキメラ菌体を用いることにより、従来計測できなかった回転中の素過程を初めて明らかにすることができたことは、大きな成果であり、高く評価できる。

今後は、さらに高時間、空間分解能を上げた計測システムの開発を目指すことにより、生命科学の研究分野の発展に貢献することが期待できる。

#### 7 主な論文等:

##### 発表論文

1. Ishii, Y., **Ishijima, A.** & Yanagida, T., *TRENDS in Biotechnology*, **19(6)**, 211-216, (2001): Single molecule nanomanipulation of biomolecules
2. Kitamura, K., **Ishijima, A.**, Tokunaga, M., & Yanagida, T., *JSAP International*, **4**, 4-9, (2001) : Single-Molecule Nanobiotechnology
3. **Ishijima, A.**, & Yanagida, T., *Trends in Biochemical Sciences*, **26 (7)**, 438-444, (2001): Single molecule nanobioscience
4. Ishii, Y., **Ishijima, A.** & Yanagida, T., *Results and Problems in Cell Differentiation*, **36**, 87-105, (2002): Coupling between chemical and mechanical events and conformation of single protein molecules
5. Kitamura, K., **Ishijima, A.**, Tokunaga, M. & Yanagida, T., *AAPPS Bulletin*, **11, (4)**, 2-8, (2002): Single-Molecule Nanobiotechnology
6. Yorimitsu T, Sowa Y, **Ishijima A**, Yakushi T, & Homma M, *J Mol Biol* Jul 5; **320(2)**, 403-13, (2002) : The Systematic Substitutions Around the Conserved Charged Residues of the Cytoplasmic Loop of Na(+)-driven Flagellar Motor Component PomA
7. Nomura, F., Honda, M., Takeda, S., Inaba, T., Takiguchi, K., Itoh, T.J., **Ishijima, A.**, Umeda, T. & Hotani, H., *Journal of biological physics*, **28 (2)**, 225-235, (2002): Morphological and topological transformation of membrane vesicles
8. Hotani, H., Nomura, F., Takeda, S., Inaba, T., Takiguchi, K., Itoh, T.J., **Ishijima, A.** & Umeda, T., *In*

*New Approaches to Structural Mechanics, Shells and Biological Structures* (H. Drew & S.o Pellegrino eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 435-446, (2002): Morphological and Topological Transformation of Liposomes

9. Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M. & **Ishijima, A.**, *Journal of Molecular Biology*, **327/5**, 1043-1051, (2003): Torque speed Relationship of the Na<sup>+</sup>-driven Flagellar Motor of *Vibrio alginolyticus*
10. Kimura Y, Toyoshima N, Hirakawa N, Okamoto K. & **Ishijima A.** *J Mol Biol*, May 9, **328(4)**, 939-950, (2003): A Kinetic Mechanism for the Fast Movement of Chara Myosin
11. H. Hotani, T. Inaba, F. Nomura, S. Takeda, K. Takiguchi, T. J. Itoh, T. Umeda and **A. Ishijima**, Mechanical analyses of morphological and topological transformation of liposomes, *Biosystems*, Vol 71, Pages 93-100 , (September 2003)

### 国際会議発表論文

1. H. Hotani, T. Umeda, Y. Suezaki, F. Nomura, K. Takiguchi: Mathematical Analysis of Morphological and Topological Transformation of Membrane Vesicles, BIOMATHEMATICS and RELATED COMPUTATIONAL PROBLEMS(BIOCOMP2002), Hotel Baia, Vietri sul Mare, Italy, June 3-9 (on 7), 2002, Abstract pp 159, invited
2. Kimura, Y., Toyoshima, N., Hirakawa, N., Okamoto, K., **Ishijima, A.** & Higashi-Fujime, S., *BIOPHYS J*, **82 (1)**, 1999 Part 2 JAN (2002): Mechanical properties of Chara myosin
3. Hotani, H., Nomura, F., Honda, M., Takeda, S., Itoh, T. J., **Ishijima, A.** & Umeda, T., 4<sup>th</sup> International Conference Biological Physics(ICBP2001), Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan, July 30-Aug, 3(on31), (2001),: Morphological and topological transformation of membrane vesicles
4. **Ishijima, A.**, Kimura, Y. & Higashi-Fujime, S., *Biophys J.*, **84(2)**, 117a, A, (2003): Kinetic Mechanism for the Fast Movement of Chara Myosin
5. Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M. & **Ishijima, A.**, *Biophys J.*, **84(2)**, 572a, (2003): The Effect of Na<sup>+</sup> on Torque-Speed Relationship of Na<sup>+</sup>-driven Flagellar Motor

### 国内会議発表論文

1. 石島秋彦、日本機械学会 関東支部 第7期 総会講演会(2000):光測定手法を用いた生体分子の1分子計測
2. 稲葉岳彦、本田誠、滝口金吾、宝谷紘一、石島秋彦: リポソームの膜突起形成に必要な力測定 : 日本生物物理学会 第39回日本生物物理学会年会 2001、2P157
3. 岡本圭一郎、木村祐史、平川昇、藤目杉江、石島秋彦: 光ピンセットを用いた車軸藻ミオシン1分子力学測定 - ATP濃度依存性についての考察 - : 日本生物物理学会 第39回日本生物物理学会年会 2001、3P135
4. 笠原秀明(名大院・工・応用物理): 細胞内輸送小胞の捕捉及び運動測定: 日本生物物理学会 第39回日本生物物理学会年会 2001、3P214
5. 高山治久、曾和義幸、本間道夫、石島秋彦: べん毛モーター回転におけるLi<sup>+</sup>とNa<sup>+</sup>濃度依存性の検討: 日本生物物理学会 第39回日本生物物理学会年会 2001、3P168
6. 曾和義幸、堀田博之、本間道夫、石島秋彦: Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターの回転計測: 日本生物物理学会 第39回日本生物物理学会年会 2001、3P173

7. 平川昇、岡本圭一郎、石島秋彦、藤目杉江：車軸藻ミオシンの力 - 速度関係：日本生物物理学会 第 39 回日本生物物理学会年会 2001、3P137
8. 木村祐史、岡本圭一郎、藤目杉江、石島秋彦：車軸藻ミオシンの 1 分子力学：日本生物物理学会 第 39 回日本生物物理学会年会 2001、3P134
9. 稲葉岳彦、滝口金吾、宝谷紘一、石島秋彦：光ピンセットによる膜突起形成の力学的測定：日本生物物理学会 第 40 回日本生物物理学会年会 2002、1G1345
10. 曾和義幸、堀田博之、本間道夫、石島秋彦：Na<sup>+</sup>駆動型べん毛モーターのトルク-スピード関係における[Na<sup>+</sup>]の影響：日本生物物理学会 第 40 回日本生物物理学会年会 2002、3E1015
11. 稲葉岳彦、石島秋彦、滝口金吾、宝谷紘一：膜小胞における球状部と膜突起の共存条件：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B345
12. 羽田成宏、石島秋彦：細胞内輸送小胞のマニピュレーション：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B545
13. 加藤伸彦、石島秋彦、稲葉岳彦、滝口金吾、梅田民樹、宝谷紘一：膜小胞の力学的特性に対する脂質組成の影響：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B597
14. 曾和義幸、薬師寿治、本間道夫、石島秋彦：大腸菌で機能する Na<sup>+</sup>駆動型モーターの回転計測：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B434
15. 町山裕亮、白井啓介、石島秋彦：微小ビーズを用いた actomyosin の 1 分子力学計測 光ピンセット法における時間・空間分解能の向上：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B476
16. 南野徹、曾和義幸、西條由見子、杉山滋、石島秋彦、大澤研二、難波啓一：サルモネラ菌の運動性に及ぼされるべん毛モーター蛋白質複合体 MotA/B のマルチコピー効果日本生物物理学会：第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B506
17. 白井啓介、町山裕亮、石島秋彦：車軸藻ミオシンの 1 分子力学計測： - 運動活性の低下を防ぐために -：日本生物物理学会 第 41 回日本生物物理学会年会 2003、B482
18. 野瀬宏、町山裕亮、石島秋彦：車軸藻ミオシンの 1 分子力学測定 - プロセッシブ運動の検討 -：日本生物物理学会 第 42 回日本生物物理学会年会 2004、3P167
19. 曾和義幸、Alexander Rowe、薬師寿治、本間道夫、Richard Berry、石島秋彦：細菌べん毛モーター低速回転時のステップ検出：日本生物物理学会 第 42 回日本生物物理学会年会 2004、3P204
20. 清水彬生、曾和義幸、永井萌土、斎藤弥八、新井史人、石島秋彦：水溶液中でのカーボンナノチューブの可視化：日本生物物理学会 第 42 回日本生物物理学会年会 2004、3P303

#### 総説・解説

1. 石島秋彦、マイクロマシン、617-620、2002：生体リニアモーター、回転モーターの運動メカニズム
2. 「図解 高分子新素材のすべて」、(株)工業調査会 (予定)

#### 特許出願

1. 光学顕微鏡における位相リングスリット、平成13年12月28日
2. 粘度測定方法および測定装置、平成14年8月23日

#### **招待講演**

1. 8<sup>th</sup> Keihanna International Conference on Molecular Biophysics、 (2002): The torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*
2. The 30th NIPS International Symposium、 Frontiers of Biological Electron Microscopy  
- Proteins to Supramolecules -、 Mar 12-15、 2003、 The torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*
3. The 4th European Biophysics Congress、 July 5-9、 2003、 Alicante、 Mechanical force required for membrane protrusion formation
4. The 1<sup>st</sup> International Conference on Single-Molecule Bionanotechnology for Cell Membrane Biology、 Aug 20-22、 2003、 The torque-speed relationship of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor of *Vibrio alginolyticus*
5. The 8th Membrane Research Forum、 Nov 23-26、 2004、 Single molecule measurements of Linear and Rotational bio-motor

#### **受賞等**

1. 応用物理論文賞 ((社)応用物理学会)  
「ナノ領域の光の生物への応用 - 生体分子1個の化学反応と力学反応の同時計測 - 」