

研究報告書

「顕微鏡による膜タンパク質1分子の3次元構造変化・機能マッピング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 政池 知子

1. 研究のねらい

タンパク質の「静止画」である構造情報を「動画」に発展させることが本研究のねらいである。

近年、X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡などの技術開発により、可溶性蛋白質のみならず膜蛋白質の構造情報も蓄積され、複数の中間体まで明らかになりつつある。これらの「静止画」を「連続写真」として扱い、機能発現のメカニズムを議論することも現実的になってきた。しかしそれをさらに「動画」にして蛋白質の作動機構を説明するためには、実際に機能を発揮している最中に結晶で得られた構造が中間体として現れるのかを検証し、更に中間体同士の間をつなぐ構造変化の途中経過も実際にとらえることが重要である。

本研究では、光学顕微鏡を用いて蛋白質1分子の構造変化を2次構造レベルで検出することで、作動機構を説明する動画を得ることを1つの柱とした。まず、モデル蛋白質として骨格筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase と ATP 合成酵素の一部分である F_1 -ATPase を選んだ。結晶構造を手掛かりとして、大きな構造変化が予測されるドメイン毎に蛍光分子を標識し、これをプローブとした角度変化検出を通じて構造変化を動画にするという戦略である。ただし、このアプローチのみでは各構造変化がもたらす酵素反応の素過程にまで踏み込むことはできない。

そこで次に、本研究のもう1つの柱として位置付けたのが、構造変化の動画に酵素反応の進捗を関連づけることである。構造変化に共役する酵素反応の素過程を明らかにすることができれば、検出された各構造がどの反応中間体に相当するのか検証が可能となる。このために、蛍光性ヌクレオチドの1分子観察や、リン酸結合蛋白質を用いたリン酸解離のタイミング検出のための実験系構築を目標とした。

本さきがけ研究の3つ目の柱は、生物学的階層を上り、オルガネラレベルでの構造変化に着目することである。たくさんのモータータンパク質ダイニンが ATP 依存的に微小管上を滑り運動することで微小管の間に屈曲が生まれ、繊毛軸系の鞭打ち運動が発生することが知られる。この運動を顕微鏡下において3次元で観察し、気管からの異物排出機構を解明することを目的とした。

このようにして本さきがけ研究では、ヌクレオチド加水分解に伴って酵素機能を発揮する蛋白質群の動画を通じて、作動機構の普遍性と多様性に迫った。

2. 研究成果

(1) 概要

蛍光分子の角度を検出するための光学顕微鏡を構築し、時間分解能 100 ミリ秒、角度分解能約±2 度で蛍光分子の遷移双極子モーメントの向きをサンプル面への射影角度(XY)として決定することが可能となった。また、励起光の偏光の向きをサンプル面に垂直な向き(Z)に設定して蛍光分子の観察を行い、蛍光分子の Z 成分も定性的に見積もった。

この顕微鏡を用いてディスク状人工脂質二重膜ナノディスクに埋め込んだイオンポンプ Ca^{2+} -ATPase に標識した蛍光分子を観察したところ、界面活性剤無しでも凝集することなくガラス基板上に単離固定され、1 分子レベルでの角度検出が可能であることがわかった。そこで、PドメインもしくはAドメインへの優先的な蛍光標識が想定される Ca^{2+} -ATPase を用意し、 Ca^{2+} -ATPase がターンオーバーする条件で構造変化検出を行った。その結果、蛍光分子の角度が観察中に変化する分子がいくつか見出された。そこで、各中間体の滞在時間について時定数の詳しい解析を検討している。

回転分子モーター F_1 -ATPaseについては、これまでの研究で中心軸回転に伴う触媒サブユニットの C 末端ヘリックスの構造変化を検出した例がある (Masaike, T. *et al. Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008)。そこで、本研究では構造変化マッピングという観点でこれを拡張することを目標とした。ヌクレオチド結合部位から中心軸の回転を駆動する C 末端ヘリックスに至るまでの各ドメインを代表する部位を6種類選定し、そこにシステイン変異を導入して蛍光標識と構造変化観察を進めた。一方蛍光分子とは別波長で、中心軸に結合した回転観察用ビーズを同時に観察する光学系を立ち上げた。この同時観察の光学系を用い、2箇所ドメインの角度変化を中心軸の回転と同時に測定した。その結果、中心軸の回転角度の変化に伴い触媒サブユニットに標識した蛍光分子の角度変化が検出される分子が見いだされた。

また、蛍光性ヌクレオチドや蛍光標識リン酸結合蛋白を用いて酵素上での反応の素過程を可視化する方法の開発や、3次元構造変化検出をオルガネラに拡張し繊毛運動を定量化する研究も行った。このようにして、光学顕微鏡による構造変化・機能観察を進めた。

(2) 詳細

研究テーマ1 「膜蛋白質 Ca^{2+} -ATPase の局所構造変化の1分子観察」

旭川医大・鈴木研究室の協力により、ディスク状人工脂質二重膜に埋め込んだ膜蛋白質 Ca^{2+} -ATPase を用意し、ガラス基板上に単離して固定した。PドメインもしくはAドメインに優先的に結合すると考えられる方法で標識した蛍光分子をプローブとして、励起光の偏光の向きを一定速度で回転させる全反射型顕微鏡を用い遷移双極子モーメントの角度決定を行った。まず溶液交換により2つの中間体間を遷移する構造変化の検出を試みた。しかし、画像のドリフトや溶液の流れによるガラスからの分子の解離などの問題があったため、次に溶液交換を行わず 2 つか 3 つの中間体の構造間を巡回すると考えられる溶液条件で角度の推移を測定した。また、ナノディスクの末端に結合したヒスチジンタグでサンプルを固定するために、ガラス基板を Ni-NTA で修飾した。その結果、角度変化を繰り返す分子がいくつか見いだされた。今後、視野中の分子のうち角度検出が可能な分子の割合を調べ更に適切な溶液とガラスの条件を検討し、各角度に滞在する時定数の解析と生化学的に求められた各中間体間の

速度定数から見積もった時定数との対応を考察する予定である。

本研究では、学習院大学・西坂研究室の協力により上記の方法と並行してデフォーカスイメージングの手法でも角度変化検出を試みた。この測定の過程で、ナノディスクに埋め込まれた Ca^{2+} -ATPase に標識されている蛍光分子は、 Ca^{2+} -ATPase の構造を強固に固定する溶液条件でも、1 分子観察に最適なレーザー強度下で秒単位の暗状態に頻繁に陥ることがわかった。これまでのところ、この現象は蛍光分子と脂質の相互作用の変化によるものであると予想している。この現象を定量化すれば、ナノディスクに組み込まれた分子を組み込まれていない分子と区別して観察することができる可能性も拓けると考える。

研究テーマ 2 「局所構造変化マッピングによる F_1 -ATPase の回転駆動機構の解明」

F_1 -ATPase は、触媒部位への ATP 結合をきっかけとした構造変化が C 末ドメインへ伝搬して動きが拡大し、中心軸を押すことで回転を駆動すると考えられてきた。本さきがけ研究者のこれまでの研究では、ATP 加水分解の素過程ごとの中心軸のステップ状回転に対応する触媒サブユニットの C 末端ヘリックスの角度変化ステップが明らかになった。しかし、C 末端でのこの構造変化がどのような構造変化のリレーで生み出されるのかは未解明であった。

そこで本研究では、横浜市大・池口研究室 伊藤祐子博士の提案したモデルを参考に ATP 加水分解サイトと C 末端ヘリックスを繋ぐ特徴的な 2 次構造を抽出し、6 種類のダブルシステイン変異体を作成して 2 箇所固定蛍光分子で標識し、これをプローブとして偏光変調顕微鏡を用いて角度変化検出を行った。このテーマでは、テーマ 1 とは異なり触媒サブユニットに標識した蛍光分子以外に中心軸に結合したビーズも別波長で同期撮影し、触媒サブユニットの構造変化と中心軸の回転運動の関係を調べた。条件検討を重ねた結果、中心軸が回転している F_1 -ATPase の触媒サブユニットに蛍光分子が結合している分子の発見頻度が高まり、触媒サブユニットのヘリックスの構造変化と中心軸の回転の相関関係を示すデータが得られつつある。

研究テーマ 3 「マウス気管繊毛の 3 次元運動」

学習院大学・西坂研究室の協力を得て 3 次元位置検出顕微鏡を構築し、浜松医大・池上浩司博士・瀬藤光利博士の技術協力により単離・脱膜してガラス基板上に固定したマウスの気管上皮繊毛 1 本 1 本の動きを、先端に結合した蛍光ビーズの動きとして観察した。繊毛運動の軌跡を球面近似して運動の各パラメーターを調べた結果、野生型マウスでは広範囲の Ca^{2+} 濃度で運動に顕著な差異が見られなかった。しかし、ATP については高濃度になるに従い鞭打ち速度が増加し振幅には違いが認められず、結果として周波数が増加していると考えられる。このことからまず、繊毛運動における周波数の堅牢性が明らかになった。更に本研究結果を総合して、異物侵入により細胞内に Ca^{2+} が流入してシグナルとなって ATP 産生を亢進し、その結果として繊毛運動が活性化することで粘液の流速を上げ、異物排出に寄与するというモデルを立てた。

研究テーマ 4 「極小体積のマイクロチャンバー内での微小管ダイナミクスとリン酸検出」

マイクロデバイスを使用すると、数 fL ~ 数十 fL の極小体積溶液中における蛋白質の振る舞

いを観察することができる。これを利用して、微小管ダイナミクスの観察とリン酸検出系の構築を行った。

まず、微小管ダイナミクスの観察の狙いは、細胞内の微小体積環境を模倣し、容積組成の急激かつ局所的な変化が重合・脱重合に及ぼす影響を調べることにある。大阪大学・産業科学研究所・榊原昇一博士の協力を得て、微小管形状の細長いモールドを用いて体積約 15fL のオーバル型 PDMS 樹脂製マイクロチャンバーを作成し、このチャンバー内に理研・QBIC・岡田康志博士と東大・島知弘博士から供与を受けた微小管のシードと遊離チューブリンを閉じ込め、微小管重合・脱重合を撮影することに成功した。マイクロリットルオーダーの十分な体積がある条件での重合・脱重合との比較は、溶液交換の効率やチャンバーの乾燥などのいくつかの技術的問題を克服した後に慎重に議論すべきではあるが、これまでのところ極小体積空間では重合・脱重合のサイクルが比較的速いという特徴が示唆されている。

リン酸検出系については、本さがけ研究者主宰の研究室で調製した蛍光標識リン酸結合蛋白を蛍光分光器によるリン酸滴定に供し、リン酸結合に伴う蛍光強度の増加率が高いロットをその後の実験に用いる事とした。上記オーバル型チャンバーと油中水滴チャンバーにこれを封入したところ、顕微鏡下でもリン酸濃度依存的な蛍光強度増加を検出できる場合があった(東大・野地研究室との共同研究)。今後この結果の再現性を検証する。

3. 今後の展開

Ca^{2+} -ATPase についてはナノディスクだけでなく平面膜や膜チャンバーデバイスとの組み合わせを検討し、ガラスに対する配向が均一になるように工夫することによって結果の解釈が付きやすくなるようにしたい。

F_1 -ATPase については、触媒サブユニット以外にも蛍光標識を行うことで、 F_1 -ATPase 全体としての構造変化マッピングに拡張することが重要であると考えます。

マウスの気管繊毛運動の3次元観察については、ポリグルタミン酸化酵素以外のノックアウトマウスを用いて3次元パラメーターを比較し、粘液の流れが生み出される機構をより多面的に理解するつもりである。

リン酸結合蛋白については、体積をより小さくすることにより、アトリーットルレベルでのデジタルカウンティングを可能にすることや、リン酸を1分子レベルで検出する実験への応用を検討したい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本さがけ研究では、活性を保った蛋白質もしくはオルガネラの構造変化や機能を光学顕微鏡による1分子観察で解明する構造生命科学を展開した。本研究により人工脂質二重膜に埋め込んだ蛍光標識膜蛋白質の2次構造レベルでの角度変化を1分子で検出するための技術が進歩したと考える。また、可溶性蛋白質については角度検出を複数の部位に拡張し、2次構造配置変化の因果関係を明らかにする「構造変化マッピング」を実現しつつある。3次元解析については気管繊毛運動の観察において実現した。機能の可視化については、リン酸結合蛋白とマイクロデバイスを用いて独自の検出系を構築しつつある。このよう

に、研究課題のすべてのキーワードを内包する研究を遂行することができた。ただ、今後は現在明らかになっている知見を論文化するために、データをまとめる作業を急ぐ必要がある。

研究実施体制については、本さがけ研究者が主宰する研究室において研究補助者と多数の学生と連携しつつ、研究を軌道にのせ、実験を効果的に行うことができた。また、個人研究ではあるが多数の共同研究者に恵まれ、多角的な展開が可能となった。焦点を絞った研究が肝要であるという指摘があれば謙虚に受け止めるが、今後これらの研究結果の「芽」を見定めてテーマを絞り込み、長期的にさがけ研究の成果として発信していく事を覚悟している。研究費執行状況については、前半の時期に必須の大型装置を購入して運用を開始し、以後は消耗品を中心に購入して適切に使用することができた。

このように持続可能な研究体制を確立したことにより、今後公開されることが予想されるさまざまな蛋白質の結晶構造に本さがけ研究の手法を適用し、相関構造解析へと発展させる技術的基盤ができたといえる。これにより、作動メカニズムに焦点を当てた機能回復を主眼に置いて創薬に展開したり、様々な分子の高感度検出キットを作成したりすることにより社会・経済への波及効果が期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

「先端に蛍光ビーズを結合させることによる繊毛運動の Ca^{2+} 濃度依存性3次元観察」、「改良型偏光変調全反射型顕微鏡の利用による構造変化マッピング」、「進化型偏光変調全反射型顕微鏡の利用による1分子3次元角度検出」、「PDMS マイクロチャンバーに閉じ込めた微小管の観察」、「オーバル型チャンバーに閉じ込めた微小管の観察」等、様々な系で光学顕微鏡観察による1分子の動きを観測しており、技術開発面では進展が見られた。今後は、開発した技術に適した、生理的に意義のあるシステムをうまく探し出し、よりインパクトのある成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 菊池洋輔, 中裕佑, 小酒部秀光, 岡本哲明, 政池知子, 上野博史, 鳥谷部祥一, 宗行英朗
“Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric b subunit and the a_3b_3g subcomplex of F_1 -ATPase” <i>Biophys. J.</i> , 2013 年, 105, 2541-2548 |
| 2. 木下佳昭, 中根大介, 須河光弘, 政池知子, 水谷佳奈, 宮田真人, 西坂崇之
“Unitary step of gliding machinery in <i>Mycoplasma mobile</i> ”
<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA.</i> , 2014 年, 111, 23, 8601-8606 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数 : 0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

「光学顕微鏡により明らかにするモーター蛋白とその集合体の動き」

政池知子, 西坂崇之

物理学会 第 68 回年次大会, 2013 年 3 月 26 日, 広島大学, 招待講演

“Motions in Ciliary Axonemes that Cause Functions”

政池知子, 西坂崇之

The 25th CDB Meeting, 2013 年 6 月 18 日, 理研 CBD, 招待講演

「1個から数個の分子が引き起こす運動と酵素反応のイメージング」

政池知子, 池上浩司, 瀬藤光利, 鈴木裕, 西坂崇之

第 51 回 日本生物物理学会年会・シンポジウム, 2013 年 10 月 29 日, 京都国際会議場,
シンポジウムオーガナイザー

「プローブの向きと位置から蛋白質の局所構造変化を検出する」

政池知子, 鈴木裕, 西坂崇之

日本顕微鏡学会第 57 回シンポジウム, 2013 年 11 月 16 日, ウィンクあいち, 招待講演

“Imaging Motions, Functions, and Reactions of Single Molecules”

政池知子

OIST workshop Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and
Quantitative Analyses, 2014 年 4 月 21 日, 沖縄科学技術大学院大学, 招待講演

“Conformational changes and chemistry of single-molecule enzymes revealed under the
optical microscope”

政池知子

Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, 2014 年 6 月 8 日-11 日, 日本科学未来
館, 招待ポスター発表

“Observation of Single-Molecule Enzymes through Probes under the Optical Microscope”

政池知子

Taiwan-Japan Symposium on Polyscale Technologies for Biomedical Engineering and
Environmental Sciences, 2014 年 9 月 13 日, 台湾新竹市・清華大学, 招待講演

「イオンポンプとの比較による、塩化物イオンチャネル CFTR の作動機構研究」

政池知子, 相馬義郎

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, 招待講演

「膜輸送蛋白等の計測における1分子顕微鏡観察とマイクロデバイスの活用」



政池知子

第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月15日, 金沢大学・角間キャンパス, 招待講演

【受賞】

第5回 資生堂女性研究者サイエンスグラント 受賞 (2012年度)

【著作物】

Coupling of chemical events and mechanical work in single F_1 -ATPase molecules revealed under the optical microscope.

Masaïke, T., Hasimoto, Y., Nishizaka, T.

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

「ATP加水分解蛋白質の映画撮影」

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)

「Following the Random Walk: Howard Berg 先生インタビュー」

小嶋誠司, 政池知子, 南野徹, 宮田真人 日本生物物理学会誌 「生物物理」 54, 4. 227-229, (2014)

「新しい偏光イメージングとトラッキング技術」

木下佳昭, 政池知子, 西坂崇之

DOJIN BIOSCIENCE SERIES 17 1 分子生物学 第14章 P193-194 化学同人 (2014)

「蛍光偏光イメージング」

西坂崇之, 政池知子

発光の事典 —基礎からイメージングまで— 7.3.7章 朝倉書店 (2015)