

## 蛋白質1個における局所的構造変化の可視化

西坂 崇之

学習院大学 理学部 物理

### 概要

$F_1$ -ATPase は1分子でできた回転分子モーターである。この回転のメカニズムを明らかにする目的で、1分子による1回の化学反応、そして力学反応を、光学顕微鏡を用いて同時に画像化する実験系を構築した。新しい顕微鏡技術を用いることにより、1分子を対象にした研究は、今や蛋白質の中の情報に踏み込む段階にまで到達しようとしている。

### 1. 新しい顕微鏡技術

蛋白質の活性を定量的に調べる場合、分光学的手法が主流であり、活性の指標となる分解産物に反応して光の吸収もしくは蛍光が変化するプローブが用いられる。この時、測定の対象とされる蛋白質は約  $10^{12}$ 、一兆個にも達する。同じ光を用いるのであれば、分光器よりはるかに感度と空間分解の高い技術が存在する。それが光学顕微鏡である。カメラやフィルター、光学系の急速な技術の発展により、水の中の1個の蛍光色素を検出することが可能となっている。本研究では、1分子を観察する技術の中で、全反射型蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescent microscope, TIRF) に注目して顕微鏡技術の開発を行った。TIRF とは、色素の励起に用いるレーザー光をガラスと水の界面で全反射させ、ガラス近傍に発生するエバネッセント場により試料を観察する手法である。エバネッセント場は深さ $\sim 100$  ナノメートルで消光し水中に侵入しないので、水中に色素がある場合でも、通常の方法に比べ格段に背景光を抑えることができる。

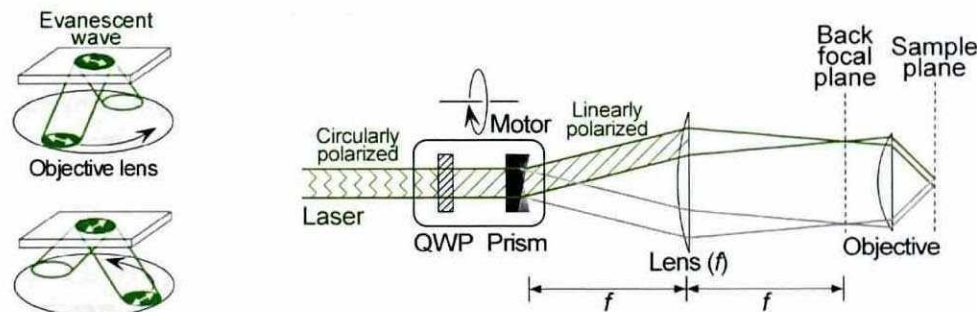


図1 偏光が時間と共に回転する全反射型顕微鏡の模式図

(文献 1 およびその Supplementary Information より転載)

光学系の概念図と模式図を図1に示す。蛍光色素は、色素固有の特定の波長によって励起されて光を放出するが、その励起効率、色素の振動モーメントの向きに依存する。色素の向きと励起光の偏光が一致している場合には信号は最大となり、直行する場合は最小となる。図の光学系では、エバネッセント場の偏光が時間と共に回転している(関連特許 1)。この光学系で1分子の蛍光色素を観察すると、色素はその向きを反映して明滅を行うことになる。

### 2. 1分子の反応の画像化

この技術を用いて、 $F_1$ -ATPase が ATP を加水分解する瞬間の画像化を試みた。 $F_1$ -ATPase は ATP 合成酵素の1部分であり、 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  のサブユニット構成になっている。ATP を分解しながら一

方向に回転する分子モーターであることが、東工大の野地ら(現・阪大)によって証明され、その回転メカニズムの解明は生物学における重要な課題の1つとなっている。

本研究では、回転の最小単位である  $\alpha_3\beta_3\gamma$  を試料として用いた。図2(左)に実験系の模式図を示す。基質である ATP は、蛍光色素 Cy3 で標識されており、ガラス面上に固定した1分子の  $F_1$ -ATPase と ATP が結合・解離する様子は高感度カメラで撮影される。 $F_1$ -ATPase には ATP を結合する触媒部位が3カ所あるので、複数個の ATP/ADP から1回の反応を分離する必要があり、溶液には無標識の ATP を混在させている。モーターの回転軸である  $\gamma$  の回転はポリスチレンの微小球(ビーズ)によって検出する(文献 2)。

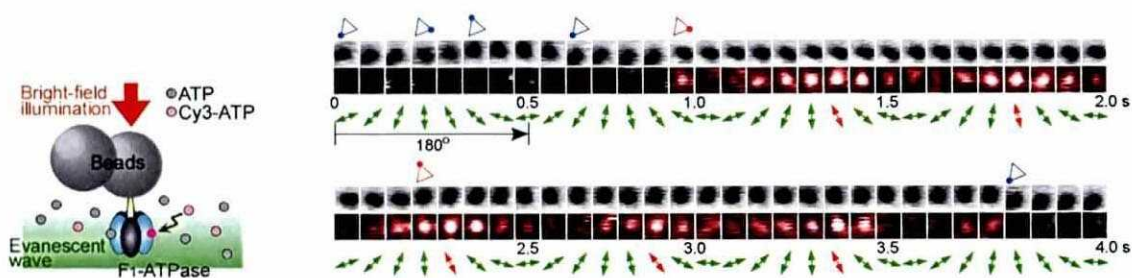


図2 実験の模式図(左)と力学反応と化学反応の同時測定の詳細写真(右) (文献 1より転載)

図2(右)に1分子観察の例を示す。連続写真のそれぞれの組みは、2つのカメラを用いて同時に撮影されており、上の行は  $\gamma$  の回転を示すビーズの像(白の背景に黒い楕円体)、下の行は蛍光性 ATP の結合と解離を示す。始めの約1秒は、無標識の ATP により、ビーズは約 7 時→3 時→11 時の順番で反時計回りに回転している。やがて Cy3-ATP が  $F_1$  に結合し、その瞬間に、ビーズは約 7 時の方向から 3 時の方向にステップした。Cy3-ATP が結合している間(赤で強調した範囲)に、もう一度ステップを行い、さらに次のステップと Cy3-ヌクレオチドの解離が同時に起こる。バルクの実験において  $F_1$  は Cy3-ATP を Cy3-ADP に分解する活性を示すことから、解離した Cy3-ヌクレオチドは Cy3-ADP へと加水分解されていると考えられる。従って、この連続写真が示しているのは、蛋白質の力学反応(ビーズ、すなわちサブユニットの回転)と化学反応(Cy3-ATP の結合と Cy3-ADP の解離)のカップリングそのものである。

この測定で特徴的なのは、本研究で開発した独自の顕微鏡を用いているため、エバネッセント波の偏光が試料の  $xy$  平面内において一定速度で回転しているという点である(連続写真の下にある両矢印が偏光の向き)。結合後の Cy3-ATP の強度を見ると、偏光の回転に応じて強度が明滅しており、ここから ATP の角度、すなわち機能している触媒サイトを同定できる。同じ分子を対象にして複数の Cy3-ATP によるステップを調べたところ、 $\gamma$  の角度と ATP の方向には明らかな相関があることが分かった。3つある触媒サイトのうち、どこに ATP が結合したのかを区別することに成功し、その結果として、回転軸  $\gamma$  の向きは ATP を結合した触媒サイトによって決定されることが明らかになったのである。

### 3. $F_1$ -ATPase の回転メカニズム

本研究で用いている変異体タンパク質(文献 3)は、無標識の ATP によって 1/3 回転( $120^\circ$ )のステップを刻むが、Cy3-ATP を用いた時には、 $120^\circ$  の中に  $80^\circ$  と  $40^\circ$  という2つのサブステップを刻むという性質を持つ。この特徴を指標にして回転の解析を詳細に行った結果、図3に表すような回転スキームが完成された。

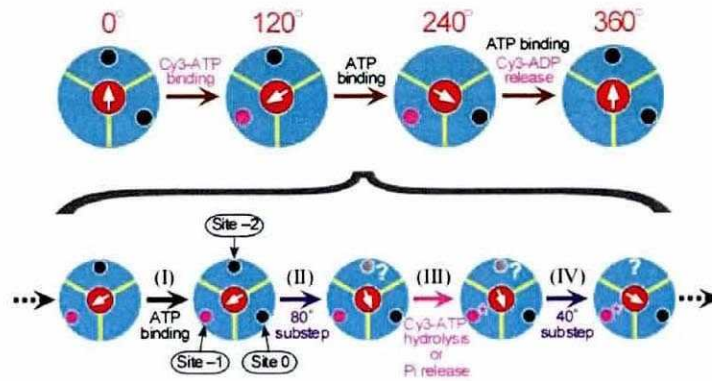


図3  $F_1$ -ATPase の回転スキーム

上の4つの模式図は、 $\gamma$  の角度が1/3回転ずれたATP結合待ちの状態を表しており、小さい丸はATPもしくはADPを表している。ATPが結合して全ての反応が終了する度に、 $\gamma$  軸は120°ステップを完了し、再びATP結合待ちの状態に戻る。ここで  $\gamma$  が‘0°’を向いている時に Cy3-ATP が結合したと考え、サブステップが観察されるのは‘120°’→‘200°’と‘200°’→‘240°’のステップであることが分かった。もっとも新しくATPを結合したサイトを‘site ゼロ’と名付け、その前とさらに前のATPを結合したサイトをそれぞれ‘site マイナス 1’、‘site マイナス 2’と名付たとすると、‘120°’→‘240°’の回転において Cy3-ATP が占有しているサイトは‘site -1’であることが分かる。こうして中間状態に関する重要な知見として、「40°サブステップは(いまATPを結合したサイトから見て)1つ前のサイトにおける反応が支配している」という結論が導かれた。

#### 4. 1分子の構造変化へ

本研究を通じて、 $F_1$ -ATPase の回転における化学状態の詳細が明らかになったが、ATP加水分解反応に伴う駆動機構そのものは未だ明らかになっていない。近年解かれたいくつかの結晶構造から、触媒サブユニット  $\beta$  は複数のコンフォメーションを取りうる 것이予想されている(図4、左のSpacefillモデルで示したN末端付近のLeuで構造を重ねている)。そこで偏光の向きが回転する全反射型顕微鏡を用い、回転中の  $\beta$  サブユニットの構造変化の検出を試みた(文献4)。

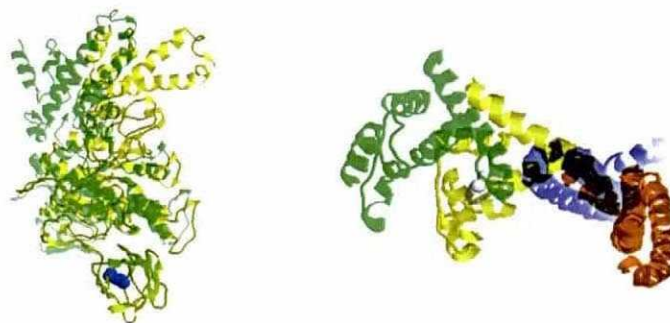


図4 左:結晶構造から予想される横方向から見た  $\beta$  サブユニットの構造変化(緑→黄)  
右:上側から見た1つの  $\beta$  の構造変化(緑→黄)と  $\gamma$  軸の回転(紫→茶)

3つある  $\beta$  触媒サブユニットのうち、1つの  $\beta$  のC末端ドメインにのみに蛍光分子を標識したところ、Cy3-ATPの実験と同様、色素が明滅する様子が観察された。 $\gamma$  サブユニットが120°おき

の3箇所滞る時に、この信号を解析したところ、信号の位相が優位に変化することが分かり、 $\beta$  の局所的な構造変化の検出に成功した。具体的な角度変化の詳細については、現在解析中であるが、たった1つの分子に注目しながら、順々に起こる構造変化のひとつだけを見分ける事が可能になっている。こういった技術を用いることで、活性を持った生きた酵素の局所的な構造変化について、結晶構造と照らし合わせて議論することが可能になっていくだろう。今後はさらに高速化を目指した測定に発展させる予定である(関連特許 3)。

## 5. 2次元から3次元へ

従来の顕微鏡観察では、試料の運動について二次元の情報しか含まれず、垂直方向の位置を正確に知ることはできなかった。そこで微粒子の変位をナノメートルオーダーで3次元的に検出する新しい光学顕微鏡、TdTIP (three-dimensional tracking by an insertion of prism) Microscope を開発した(特許 4)。この光学顕微鏡で捉えた蛍光単粒子の像は、プリズムによって二つに分けられており、それぞれの像の平行移動量から水平方向の変位、相対移動量から垂直方向の変位が、独立かつ同時に検出できるという特徴を持つ。蛍光微粒子もしくは1個の蛍光色素による標識によってあらゆる蛋白質に応用できるため、今後、一分子生理学への大きな貢献が期待される。現在、この手法を等方的全反射型顕微鏡(特許 2)や独自の暗視野顕微鏡(特許 5)と組み合わせ、分子モーターの立体的な動きを定量的に検出する実験系の構築を試みている。

## 参考文献

1. Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M. and Kinoshita, K., Jr. "Chemomechanical coupling in  $F_1$ -ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation" *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 142-148 (2004)
2. Nishizaka, T., Mizutani, K. and Msaaike, T. "Single-molecule observation of rotation of  $F_1$ -ATPase through micro beads" *Methods Mol. Biol.*, in press.
3. Muneyuki, E., Watanabe-Nakayama, T., Suzuki, T., Yoshida, M., Nishizaka, T. and Noji, H. "Single Molecule Energetics of  $F_1$ -ATPase motor" *Biophys. J.*, in press.
4. 政池知子、吉田賢右、大岩和弘、西坂崇之「 $F_1$ -ATPase の  $\gamma$  サブユニットが回転中の触媒サブユニット  $\beta$  のコンフォメーション変化」日本生物物理学会第42回年会予稿 (2005)
5. Nishizaka, T., Mizutani, K., Okada, K. and Msaaike, T. "Imaging of Structural Change of  $F_1$ -ATPase at The Single-Molecule Level" *Biophysical Journal*, 588a (abstr., 2006)

## 関連特許

1. 特許3577514号 「全反射型蛍光顕微鏡」  
発明者:西坂崇之 特許取得日:平成 16 年7月 23 日
2. 特許3671227号 「全反射型蛍光顕微鏡および照明光学系」  
発明者:西坂崇之 特許取得日:平成 17 年4月 28 日
3. 特願 2005-101764 「高時間分解能画像化方法及び装置並びに全反射型蛍光顕微鏡」  
発明者:西坂崇之 出願日:平成 17 年3月 31 日
4. 特願 2005-197049 「3次元位置観測方法及び装置」  
発明者:西坂崇之 (80%)、水谷佳奈 (20%) 出願日:平成 17 年7月6日特許出願
5. 特願 2006-144050 「暗視野顕微鏡およびその調整方法」  
発明者:西坂崇之 (75%)、安田涼平 (25%) 出願日:平成 18 年5月 24 日特許出願