

## 特集 —— 生物関連高圧研究の最前線 ——

## 高圧力顕微鏡の開発と生物ナノマシンの運動観察

Direct Observation of the Motility of Biological Nanomachines at High Pressure

西山 雅祥

Masayoshi NISHIYAMA

Molecular motor is a typical molecular machinery in which the characteristic features of proteins are integrated; these include enzymatic activity, energy conversion, molecular recognition and self-assembly. These biologically important reactions occur with the association of water molecules that surround the motors. Applied pressures can alter the intermolecular interactions between the motors and water. Here, we describe the development of a high-pressure microscope and a new motility assay that enables the visualization of the motility of molecular motors under conditions of high pressure.

[*molecular motors, high-pressure microscopy, single molecule measurement*]

## 1. はじめに

光学顕微鏡は、手軽にマイクロメートルスケールの物体を観察できる汎用性に優れた研究機器である。誰しも子供の頃、学校の顕微鏡を使って微生物などを観察した経験があるかと思われる。現在、生命科学分野の研究室で使用されている顕微鏡も基本的な原理や仕様は同じであり、研究対象である細胞や組織などをカバーガラスなどの間に挟んで観察することが多い。当然ながら、通常の顕微鏡観察用の道具ではサンプルに圧力をかけることはできないため、顕微鏡観察用の特別な高圧力容器が必要となる。読者の中にはダイヤモンドアンビルセル (DAC) などを想像される方もいるであろう[1]。確かに2つの観測窓を対向させる形で配置させてあるので光学系は似ているが、装置の設計思想は少し異なる。一般に、タンパク質や細胞・組織といった生体試料は加圧により変化しやすいため[2-4]、DACのようなギガパスカル (GPa) 領域の耐圧性能が求められることはまずない。では、メガパスカル (MPa) 程度の「穏やかな」高圧力で十分なら装置開発もさほど難しくないと、そうではない。耐圧性能を維持しながら顕微鏡としての光学性能を向上させるこ

とが困難なのである。NMR や吸光・蛍光分光などの一般的な分光法とは異なり、高圧力を光学顕微鏡と組み合わせた例がそう多くないのがその証左であろう。筆者らは、100 MPa 程度の圧力下でタンパク質分子の構造や機能が変化することに着目し[2-4]、その変化を可視化できる新しい分析技術の開発に取り組んできた。本稿では、筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡について解説し、高圧力下で行ったタンパク質分子モーターの1分子計測について紹介する。

## 2. 高圧力顕微鏡

## 2.1 高圧力チャンバーと対物レンズ

意外に思われるかも知れないが高圧力下での顕微鏡観測は歴史が古い。1880年代後半には、すでに、深海から採取された海洋小生物の観察例がある[2]。その後も、大腸菌に代表されるバクテリアや酵母、培養細胞、筋肉や神経などの生体組織を対象にして圧力の応答をみる研究が行われてきた[2-5]。これらの実験は光学顕微鏡観察用の高圧力チャンバーを使って実施されてきたのだが[6-10]、後述するようにその多くは耐圧性能を確保するため顕微鏡としての

光学性能を犠牲にしてきた経緯がある。これは高压容器一般に言えることだが、観測窓（および、その周辺）は加圧時に破損しやすい場所であり、装置全体の耐圧性能を左右する重要な部位となっている[1,11]。設計者にとっては腕の見せ所でもあり、泣き所でもある。顕微観察用の高压力チャンパーの場合、観測窓とその周辺の制約はとりわけシビアであると言えよう。実はその要因を生み出しているのは顕微観察の要となる対物レンズなのである。

対物レンズは光学顕微鏡の中でも最も重要な部品である[12,13]。多くの生物顕微鏡用の対物レンズは通常のカバーガラス（厚さ $\sim 0.17$  mm）に近接させて使うことを前提に設計されており、その作動距離（対物レンズの先端からカバーガラス表面（外側）までの長さ）は1 mm以下のものが多い。そのため、カバーガラスを高压力チャンパーの観察窓として考えると、窓材自体の強度不足に加えて観察窓をチャンパー外部から支持することの困難さにも直面することになる（観察窓を支持する部位が対物レンズと干渉する）。要するに、ほとんどの生物用顕微鏡の対物レンズは高压力チャンパーと相性が悪いことになる。選択肢はそう多くはないので、観察時の光学性能を満たす対物レンズに合わせて、顕微観察用の高压力チャンパーをデザインすることになる。選定条件として、1) 作動距離が長く、2) (少なくとも) カバーガラスよりも厚い窓材に対応可能であり、3) 開口数もそれなりに高い、などが挙げられる。

このような状況において、筆者はCFI S プランフルオールシリーズの40倍対物レンズ（ELWD ADM40×C, NA=0.60, WD=3.6–2.8 mm, カバーガラスの厚み=0–2 mm, ニコン）を選択した（ちなみに、オリンパスからも同様の対物レンズは市販されている）。光学窓の厚みを0–2 mmまでの範囲で自由に選択可能であり、作動距離も3 mm程度確保できる。開口数については十分とは言えないものの、十分に明るく光るサンプルであれば蛍光観察も可能である。この対物レンズの内部には位相リングが内挿されており、細胞の形態観察などには多用される位相差観察も実施できる。

この対物レンズの選択については特に目新しさはないかと思われる。何故なら過去の研究においても似たような対物レンズが採用されてきたからである。しかしながら、これまで発表されてきた高压力チャンパーでは、高压力容器の窓材としてよく採用されている強度の高い材質（ダイヤモンド ( $n_e=2.424$ ),

サファイヤ ( $n_e=1.771$ ), 石英 ( $n_e=1.458$ )) が使われることが多かった。著者はこれらの材質の光学基板（厚さ1 mm）にビーズ（直径0.2  $\mu\text{m}$ ）を固定し上述の対物レンズを使ってその蛍光像を取得し、通常のスライドガラスを使った観察結果と比較した。その結果、観察時の波長領域によって異なるので一概には言えないものの、概してダイヤモンドでは解像度が顕著に低下し、またサファイヤや石英においても解像度が少し低下した。これは、通常対物レンズはカバーガラスやスライドガラス ( $n_e=1.515\sim 1.530$ ) を前提として設計されているため、屈折率の違いが結像能の低下を招いているのである。ちなみに、対物レンズの開口数が高くなるほど、両者の屈折率のミスマッチが顕著に解像度を低下させることになる。したがって、観察に必要な解像度を考慮した上で、光学基板の屈折率や厚さ（厚みがまずと対物レンズの設計値からのズレが顕著となる）を選択する必要がある。筆者はこれまで光学顕微鏡の開発に従事してきたこともあり[14–17]、耐圧性能よりも光学性能を優先し、今回は対物レンズとの相性が最も良いガラス基板（BK7,  $n_e=1.519$ ）を光学窓に採用した。

## 2.2 光学顕微観察用の高压力チャンパーの開発

Fig. 1 に筆者らが開発した顕微観察用の高压力チャンパーの断面図と写真を示す[18–20]。チャンパーはニッケル合金（Hastelloy C276）を用いて製作し（笹原技研, 京都）、本体60×50×20 mm）と照明（コンデンサー）側のウィンドウ支持台（ $\phi=20$  mm,  $t=5$  mm）から構成されている。ウィンドウ支持台をねじ込むことで、O-ring（P10）とバックアップリング（PEEK）で簡便に圧力シールを施せる仕様とした（注記：バックアップリングは無くても可）。加圧装置などをチャンパー本体につなげるため高压配管の接続ポートを2つ設けた。

高压力チャンパー内を観察するためにPoulter型の高圧光学窓を設けた[11]。対物レンズ側の開口径は1.5 mm、テーパ角は76°、深さは2.5 mm、コンデンサー側の開口径は2 mm、テーパ角は67°、深さは4 mmとした（Fig. 2）。これらの開口部には、ガラス製（BK7）の光学窓（対物レンズ側、 $\phi=6$  mm,  $t=1.5$  mm；コンデンサー側、 $\phi=6$  mm,  $t=2.0$  mm, 笹原光学, 京都）をエポキシ系樹脂で固定した。光学特性として、チャンパー中央部では、対物レンズ側の開口数はNA=0.60、コンデンサー

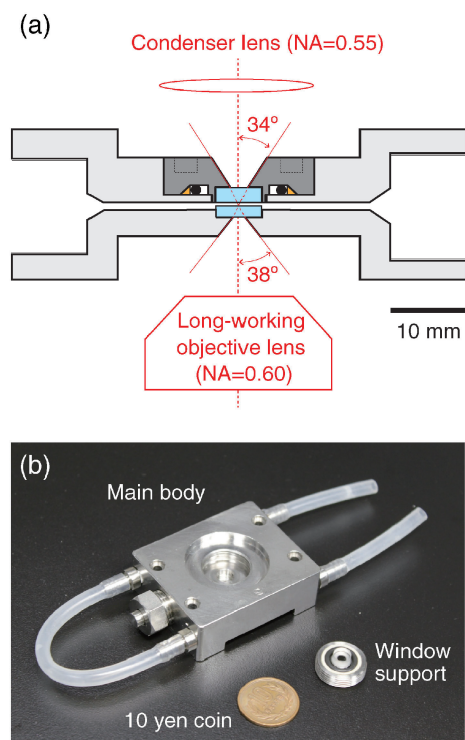


Fig. 1. (Color online) High-pressure chamber for optical microscopy. (a) Cross section of the high-pressure chamber. (b) Disassembled components of the chamber with a coin (diameter 23.5 mm) shown for size comparison.

側は  $NA = 0.55$  となる。このように両側の開口数を広げたことで、従来までの高圧力チャンバーでは難しかった位相差像の取得も可能にした。

高圧力チャンバーの内容積は $\sim 50 \mu\text{l}$ 程度であり、光軸に沿って約  $0.2 \text{ mm}$  の隙間を設けてある。この隙間を利用すれば、カバーガラスの小片（ダイヤモンドペンで $\sim 3 \text{ mm}$ 四方に切断）と両面テープを使って、チャンバー内にフローセルを構築できる[20]。これにより、通常の生体試料の調製の際によく行う緩衝液（バッファー溶液）の交換作業を行える。後述する ATP 合成酵素  $F_1\text{-ATPase}$  の回転計測では [33],  $\text{Ni}^+\text{-NTA}$  で修飾したガラス小片でフローセルを構築して、 $F_1\text{-ATPase}$  を流し込んで暫く待ち、その後、溶液交換を行うことで未吸着の  $F_1\text{-ATPase}$  を取り除くことができた。このように高圧力チャンバー内部で溶液交換を繰り返すことにより、観察に適した実験系を構築できるのが重要な点と言えよう。なお、フローセルを構築しない場合は、コンデン

サー側の窓材を厚くして水溶液の厚さを薄くすることで（現時点で $\sim 50 \mu\text{m}$ を達成）バックグラウンドを下げることもできる。顕微鏡測用の高圧力チャンバーにもとめられるのは耐圧性能や開口数といった基本スペックのみではない。観測対象をチャンバーに封入してフタを閉めるだけではなく、チャンバー内でサンプルを調製し、本当に見たい現象をより見やすく配置させることが重要なのである。これは、写真撮影に際して、カメラの光学性能もさることながら被写体の構図やコンディションがむしろ大事なのと似ていると言えよう。

### 2.3 高圧力顕微鏡の開発

筆者らが開発した高圧力顕微鏡の概念図と写真を示す (Fig. 2a, b)。装置は研究対象となるサンプルを封入し圧力をかける高圧機器と光学顕微鏡からなる。前者の機器は、顕微鏡測用の高圧力チャンバー (Fig. 1)、圧力変換器（セパレーター） (Fig. 2c)、加圧装置 (Fig. 2d) から構成される。

まず、加圧装置として、蒸留水を圧力媒体として用いる小型高圧ハンドポンプ（HP-150, シンコーポレーション）を用いた。ハンドポンプの吐出容量は1ストロークあたり約  $500 \mu\text{l}$  であり、最大  $150 \text{ MPa}$  まで使用できる。蒸留水の静水圧は圧力ゲージ（PG-2TH, Max  $200 \text{ MPa}$ , 共和電業）と表示器（WGI-400A, 共和電業）で計測した。これらの加圧装置は防振台から分離して設置し、コイル状に丸めた長い  $1/16$  インチ高圧配管でセパレーターに連結することで、ポンプ操作の度に顕微鏡に機械振動が伝わるのを防いだ。

次に、セパレーターを搭載させることで、圧力ライン内に充填するバッファー溶液の総量を減らした [20,21]。というのも、タンパク質や細胞などの生体試料の実験では pH やイオン強度などの調整が必要不可欠であり、実験内容に応じて頻りに交換しなければならない。時として高価な試薬を使うことも考慮すると、効率的（経済的）な実験系の構築が望ましいと言えよう。Fig. 2c にセパレーターの写真を示す。セパレーター本体は円筒形状（SUS630（焼き入れ処理後に加工）、 $\phi = 50 \text{ mm}$ ,  $L = 94 \text{ mm}$ ）であり、その内部は厚さ  $0.2 \text{ mm}$  のテフロン製のキャップで2つの空間に分離してある (Fig. 2a)。キャップの内部はバッファー溶液、外部は蒸留水で満たされている。加圧時には蒸留水がセパレーターへと流入し、テフロンキャップの変形を介してバッ

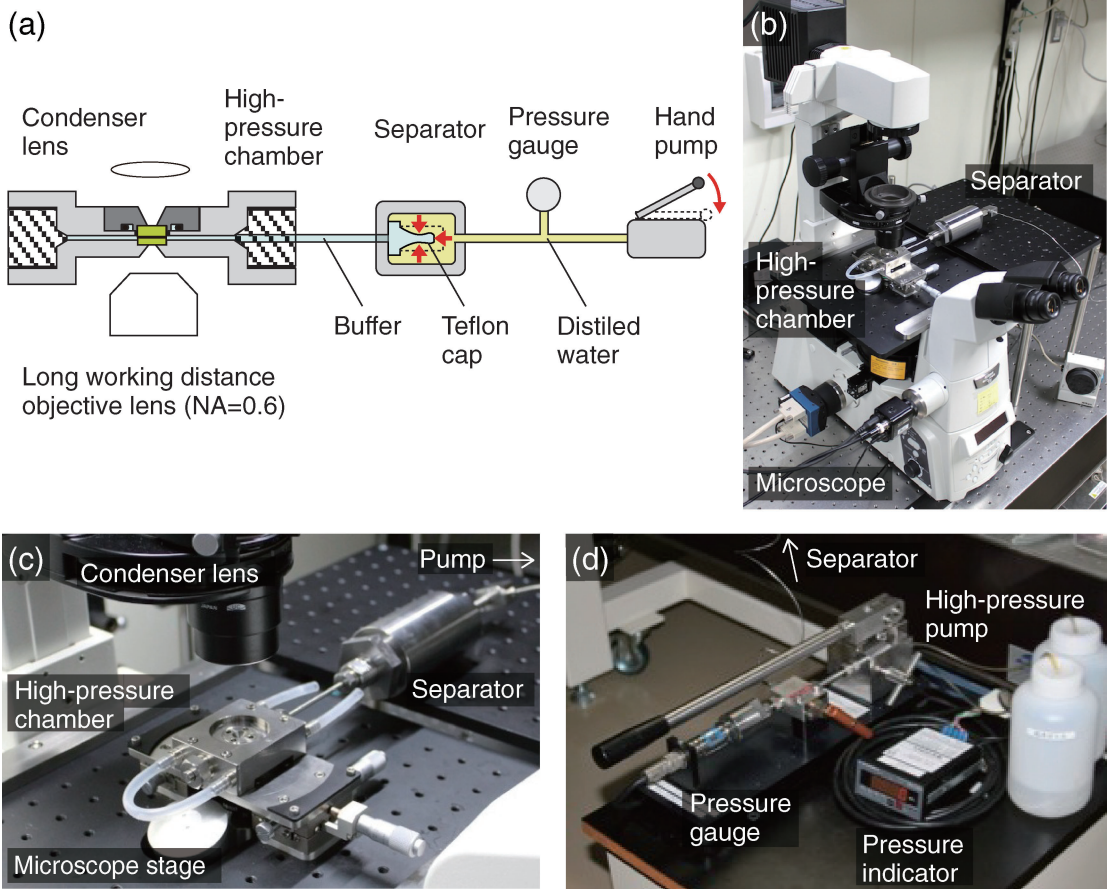


Fig. 2. (Color online) High-pressure microscope. (a) Schematic drawing of the experimental setup (not to scale). (b–d) Photographs of the high-pressure microscope; High-pressure chamber (b) and separator (c), High-pressure pump (d).

液の圧力へと適切に変換される (Fig. 2a)。高圧容器内に充填されるバッファー溶液の大部分はテフロンキャップ内に存在するため、実験時には～7 ml 程度のバッファー溶液を毎回用意すればよいことになる。

これらの高圧機器を市販の倒立型電動顕微鏡 (Ti-E, ニコン) と組み合わせて、防振台 (AS-II 1809TM, 日本防振工業) に据え付けた [19,20]。高圧力チャンパー内部の観察には、上述の長作動距離の対物レンズ (ELWD ADM40×C, ニコン) を用いた。高圧力チャンパーの固定と操作を自由に行うため、チャンパーの位置決めを行える自作ステージを作製した [19,20]。この光学顕微鏡に CCD カメラ (WAT-120N+, 撮像素子 1/2 インチ, WATEC) を搭載させると、高圧チャンパー内の 150×100 μm 程度の領域を録画できた。当然ながら、対物レンズ

とカメラの間に中間変倍レンズなどを内挿することで倍率は変更できる。チャンパーを XY 方向に動かすことで観察場所を変えることはできるが、チャンパー開口部の機械的な制約により位相差観察が可能な範囲はおおよそ直径 700 μm 程度であった。

## 2.4 性能評価

これまで開発してきた装置の高圧容器としての性能評価を行った [19,20]。まず、高圧力チャンパー内に蒸留水を充填し、ハンドポンプの圧力上限値となる 150 MPa まで加圧した所、圧力漏れが生じることなく、長時間にわたって安定して高圧力環境を維持できた [19]。この耐圧性能は、地球上で最も深い場所である太平洋のマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部 (10,924 m, 日本の海上保安庁の観測船による測定) の静水圧～110 MPa よりも高い値と

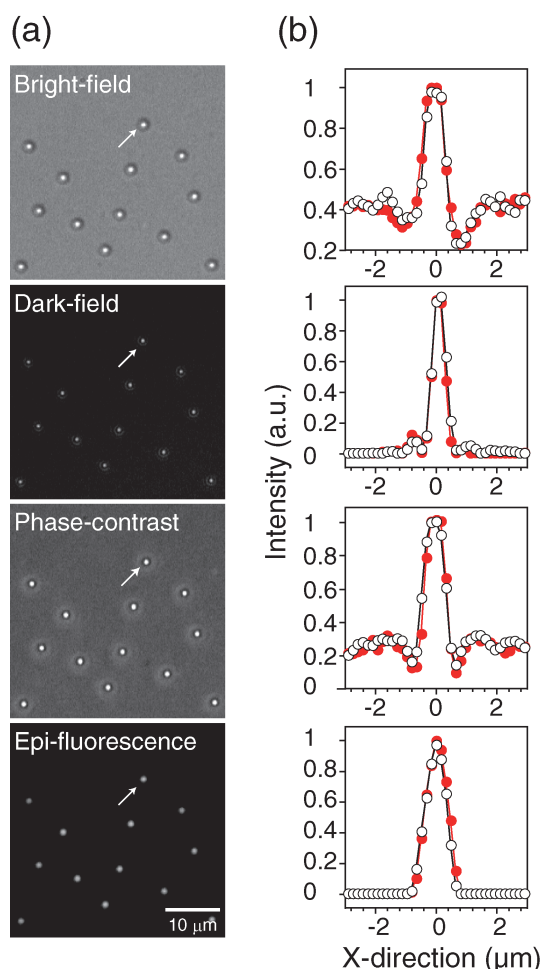


Fig. 3. (Color online) (a) Various microscopic images of the same 1- $\mu\text{m}$  beads at 100 MPa. The acquired images were displayed without processing contrast enhancement and brightness offset. (b) Intensity profile of the bead at 0.1 (open circles) and 100 MPa (solid circles). The intensity profile of the same bead was plotted at each pixel in the x direction. The arrows in *A* indicate the corresponding original images.

なっている。つまり、JAMSTEC が保有するしんかい 6500 などの潜水艇により深海底から採取された微生物を対象にして、生息環境を概ね実験室で再現できることになる[22]。一般に、100 MPa の圧力環境では、タンパク質内部のキャビティにまで水分子は侵入せず、タンパク質表面にある親水性や疎水性残基と水分子との相互作用が変化する程度である[3,4]。筆者らの研究では、タンパク質構造を破壊するのではなく、タンパク質の分子構造や機能活

性に変調をかけてその応答を調べることが目的であるため、耐圧性能としては十分であると言えよう。

次に、光学顕微鏡としての性能評価を行った[19,20]。高圧力チャンバーの観測窓に直径 1  $\mu\text{m}$  のビーズを吸着させ、圧力を変化させながらその像を取得した。加圧による高圧力器具の変形に伴い、結像位置が変化した。ただし再現性があることから、あらかじめ予測される位置に焦点を合わせておくことで、圧力変化直後から画像を取得できた[19]。さらに、加圧時における結像能を精査するため、100 MPa でビーズの各種観察像を取得した (Fig. 3a)。矢印で示したビーズの強度プロファイルについて常圧力下の結果と比較したところ、両者はほぼ一致した (Fig. 3b)。これは、筆者らが開発した顕微鏡の結像能は圧力値に依存しないことを意味する。

追記として、光学顕微鏡下では直接「見る」ことが難しいバッファー溶液の物性変化についてまとめておく。圧力は熱力学的なパラメーターであるため、観測対象となる分子や細胞のみならず、チャンバー内のバッファー溶液それ自体の性質まで変化させてしまうことが知られている。筆者らは、100 MPa の圧力条件下で温度、粘度、pH がどのように変化するかを調べた。その結果、チャンバー内の溶液温度は一時的に 0.1°C 上昇し、粘性は 5% 増加した。また、緩衝液 (10 mM Tris などの Good's buffer) の pH は 0.1 増加した[19–21]。これらの物性変化は、筆者らの実験では影響が小さいため、安心して話を前に進めることができる。

## 2.5 今後の展望

ここでは、筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡の構成と性能評価について紹介してきた。この装置を用いれば、体長が 1  $\mu\text{m}$  程度の大腸菌であっても、通常の顕微鏡と同様に研究を行うことができる。残された技術的な課題としては、高圧ラインのデッドボリュームと対物レンズ側の開口数の問題が挙げられる。前者については、筆者らはセパレーター機能を内蔵した高圧力チャンバーを開発し、バッファー溶液の容積を 100  $\mu\text{l}$  にまで減らすことに成功している[23]。ただ、この装置ではコンデンサー側の開口数が小さいという問題がある。各種の顕微観察像を取得できる汎用性の高い仕様にするため、今後も改良が必要である。

後者の対物レンズ側の開口数については、依然として深刻な課題といえよう。現在の高圧力顕微鏡で

は対物レンズの開口数は0.6であり、特に蛍光観察時には観測対象の選択に大幅な制約を受けているのが実状である。今後は、100 MPa 程度の耐圧性能を維持しながら、開口数がより大きな油浸対物レンズを利用できる装置開発に取り組みたい[24,25]。これが実現すれば、最先端の顕微鏡技術を導入し高圧力によってもたらされるタンパク質分子の構造変化や機能変調を高感度に検出することができるであろう。高圧力容器の耐圧性能と光学特性を如何にして両立させるのか、高圧力研究の古くて新しい課題がここにある。

### 3. タンパク質分子機械の運動変調

#### 3.1 生物分子モーター

生き物の特徴の一つとして、「動き」を上げることができる。動物は文字通り、「動く生き物」であり、多くの個体は筋肉を用いて移動することができる。また、細胞レベルでも、細胞分裂や形態の変化等のように動きを伴う現象が数多く存在する。こうした生き物の運動現象を生み出しているのが生物分子モーターと総称されるタンパク質であり、ATPの加水分解反応やイオン濃度勾配などから取り出した化学エネルギーをもとにして、力発生や滑り運動を生み出している。これは、光学顕微鏡下で動きを見ることで、タンパク質の機能評価を行えることを意味する。

1990年代の半ば、水溶液中で駆動する生体分子1分子の構造変化や酵素活性などを直接観察できる「1分子計測技術」が開発され、分子モーターのエネルギー出力に相当する運動の素過程を実測できる時代が幕を開けた[26,27]。現在では、1分子計測技術は分子モーターのみならず、様々な生体分子の機能評価に応用されるに至っている[28,29]。こうした1分子計測は分子モーターの運動能を高い精度で測定できる「検出」技術であるのに対して、筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡法は分子モーターの運動能を変調できる「摂動」と言えよう。多くの分子モーターは周囲を取り囲む水分子と相互作用しながら、運動機能を生み出している。高圧力をかければ水との相互作用が変わるため、分子構造や酵素活性の変化を通じて、モーターの運動能は変化するに違いない。高圧力顕微鏡法による「摂動」と1分子計測による「検出」を組み合わせれば、分子モーターが水との相互作用を通じて生み出す生物らしい

機能発現メカニズムを明らかにできると期待できる。筆者らは、開発した装置を用いて世界最小の分子モーターであるF<sub>1</sub>-ATPaseの回転計測を行った。F<sub>1</sub>-ATPaseが発生する回転運動はまさにタンパク質の酵素活性そのものであり、高圧力下でタンパク質の1分子機能解析を成功させた世界初の事例と言えよう。

#### 3.2 ATP合成酵素F<sub>1</sub>-ATPase

ATPは生体内に幅広く分布し、化学エネルギーの放出や貯蔵、物質代謝・合成といった重要な役割を担っているため「エネルギーの通貨」とも形容されている。このATPはミトコンドリアの内膜にあるATP合成酵素によってADPとPiから合成されている。興味深いことに、ATP合成酵素からその一部であるF<sub>1</sub>-ATPaseを取り出すと、溶液中にあるATPがADPとPiへと逆に加水分解されることが知られていた。BoyerはF<sub>1</sub>-ATPaseがATPの加水分解に際して、分子構造の一部が回転するという(当時としてはセンセーショナルな)仮説を提唱し論争を巻き起こしていた。その後、WalkerらはF<sub>1</sub>-ATPaseの構造解析に成功し(当時としては世界最大の分子量)、回転運動を彷彿とさせる分子構造が明らかとなった。とはいえ、F<sub>1</sub>-ATPaseの外径は10 nm、回転が予想される部位は直径2 nmしかない。仮に回っているとしても実証するのは困難であると思われていた。そして、機が熟した1997年、日本人の研究グループ(野地, 安田, 吉田, 木下)は光学顕微鏡下ではっきりとF<sub>1</sub>-ATPaseの回転運動を捉えることに成功した[30](この快挙の舞台裏は以下の文献からうかがえる[31,32])。このブレークスルーにより、同年、Boyer, Walker両氏にノーベル化学賞が授与されたことは記憶に新しい。その後も日本の研究グループは、常に世界をリードしながら分子機構に迫る重要な知見を明らかにし続けてきている[28,29]。

研究が進んだ理由の1つとして、F<sub>1</sub>-ATPaseに見られる観察に適した優れた運動特性が挙げられる。通常、F<sub>1</sub>-ATPaseはカバーガラスなどに固定して回転運動を観察する。だから顕微鏡下で同じ場所を見ているだけで、「回る」という運動を計測できる。次に、回転は連続的な運動である。運動を生み出す化学反応が次々に生じるので、詳細な化学反応過程を調べやすいというメリットがある。さらに、分子内部の構造変化が回転運動を生み出しているの

比較的シンプルな動作機構と言えよう。他の生物分子モーターの場合、複数の分子が結合・解離を繰り返しながら運動を生み出しているのとは対照的であり、要するに、これは反則だろうと愚痴を言いたくなるぐらい研究に適しているのである。筆者らはこの  $F_1$ -ATPase の持つ優れた運動特性に着目した。現状の装置でも 1 分子計測は十分に実現可能であると。

### 3.3 高圧力下での $F_1$ -ATPase の回転計測

$F_1$ -ATPase の回転部分 ( $\gamma$  サブユニット) は直径 2 nm しかない。これまで、その回転運動を可視化するため、 $\gamma$  サブユニットに顕微鏡下での観察が容易な大きな目印を取り付ける手法が採られてきた。例えるなら、アリの葉っぱを運ぶ様子を 2 階から眺めるようなものである。アリの姿を捉えることはできなくても、葉っぱの動きからアリが引っ張る様子は観察できる。筆者らは、ビーズ (直径数百ナノメートル) を  $F_1$ -ATPase の  $\gamma$  サブユニットに取り付けて、回転運動を計測することにした。現状の装置では対物レンズ側の開口数は  $NA=0.60$  であり、光学的には十分な性能とは言いがたい。しかしながら、ビーズを観察することに問題はない。こうして、高圧力で  $F_1$ -ATPase の 1 分子計測を行う研究に取り組んだ [33,34]。  $F_1$ -ATPase の周囲を取り巻く水分子との相互作用を変えることで、回転運動は変化するとに違いないと思われたからである。

高圧力チャンバー内に  $F_1$ -ATPase の回転アッセイの実験系を構築し、圧力値を変えながら回転速度がどのように変化するか調べた (Fig. 4a)。これまでの研究により  $F_1$ -ATPase は、ATP を 1 つ加水分解すると  $120^\circ$  のステップ回転を行うことが明らかにされている。ステップ回転を検出しやすい低い ATP 濃度条件で実験を行ったところ、圧力値に依存せず、 $120^\circ$  の回転ステップが検出された (Fig. 4b)。高圧力下であってもステップの立ち上がり部分は急峻であり (Fig. 4c)、トルク発生時の分子構造やポテンシャルの形状は圧力の影響をあまり受けていないことになる。実は高精度で回転運動を観察すると、 $120^\circ$  ステップは  $80^\circ$  と  $40^\circ$  の連続したサブステップからなることが明らかにされている。圧力をかけても  $80^\circ$  と  $40^\circ$  サブステップを分離して検出できないということは、2 つのサブステップ間にある化学反応はほとんど圧力の影響を受けないことになる。

その一方で、高圧力下では隣接する  $120^\circ$  ステップの時間間隔は長くなった。その後、0.1 MPa に減圧すると、 $120^\circ$  ステップ間の時間間隔は元の値へと減少したので、 $F_1$ -ATPase の酵素活性は圧力に対して可逆的に変化したことになる。この反応過程を明らかにするため、様々な ATP 濃度や圧力値で実験を行った。  $F_1$ -ATPase の回転速度 (3 倍すると ATP の加水分解速度となる) を ATP 濃度に対してプロットすると、一般的なミカエリス-メンテンの式でカーブフィットできた (Fig. 4d)。各圧力下においてミカエリス-メンテンの解析を行うと、圧力値の増加と共に  $V_{max}$  (最大反応速度) は低下し、 $K_m$  (ミカエリス定数: 酵素-基質親和性の目安) が増加することが明らかになった (Fig. 4e)。次に、変異体 [ $F_1(\beta E190D)$ ] を用いて実験したところ、2 つある角度状態のうち ATP 結合角度に、圧力に依存して遅くなる反応過程があることが明らかになった [33]。実験結果をまとめると、 $F_1$ -ATPase の  $120^\circ$  ステップは圧力に依存して変化する反応と、変化しない反応から構成されていたことになる。そのうち顕著な圧力依存性を示したのは ATP 結合反応とその後の反応であった。これら 2 つの化学反応の活性化体積はそれぞれ  $+100 \text{ \AA}^3 (= 60 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1})$  と  $+88 \text{ \AA}^3 (= 53 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1})$  であり、両者共に水分子 3 個分程度の体積変化に相当した。

### 3.4 今後の展望

ここでは、ATP 合成酵素  $F_1$ -ATPase を対象に高圧力下での回転計測について紹介してきた。高圧力をかけると、 $F_1$ -ATPase の ATP 結合反応とそれ以外の一部の反応が阻害されることが判明した。それでは、何故、高圧力下では一部の反応過程が阻害されたのであろうか？ おそらくその答えは、水を含んだ MD 計算から得られるであろう。  $F_1$ -ATPase は世界最小の分子モーターとはいえ、その分子量は約 38 万もある。少し前の計算環境からすると MD 計算を行うには困難な大きさと言えよう。しかしながら、近年では、計算機の演算能力が飛躍的に向上してきており、実は、 $F_1$ -ATPase の MD 計算もすでに実施されている [29,35,36]。

では、高圧力下での MD 計算は可能であろうか？ 答えは YES である。実は計算機実験の場合、分子と水分子を入れる箱の体積を小さくするだけで高圧力環境を作り出すことができる。高圧力環境下で  $F_1$ -ATPase の MD 計算を実施して、常圧力下で

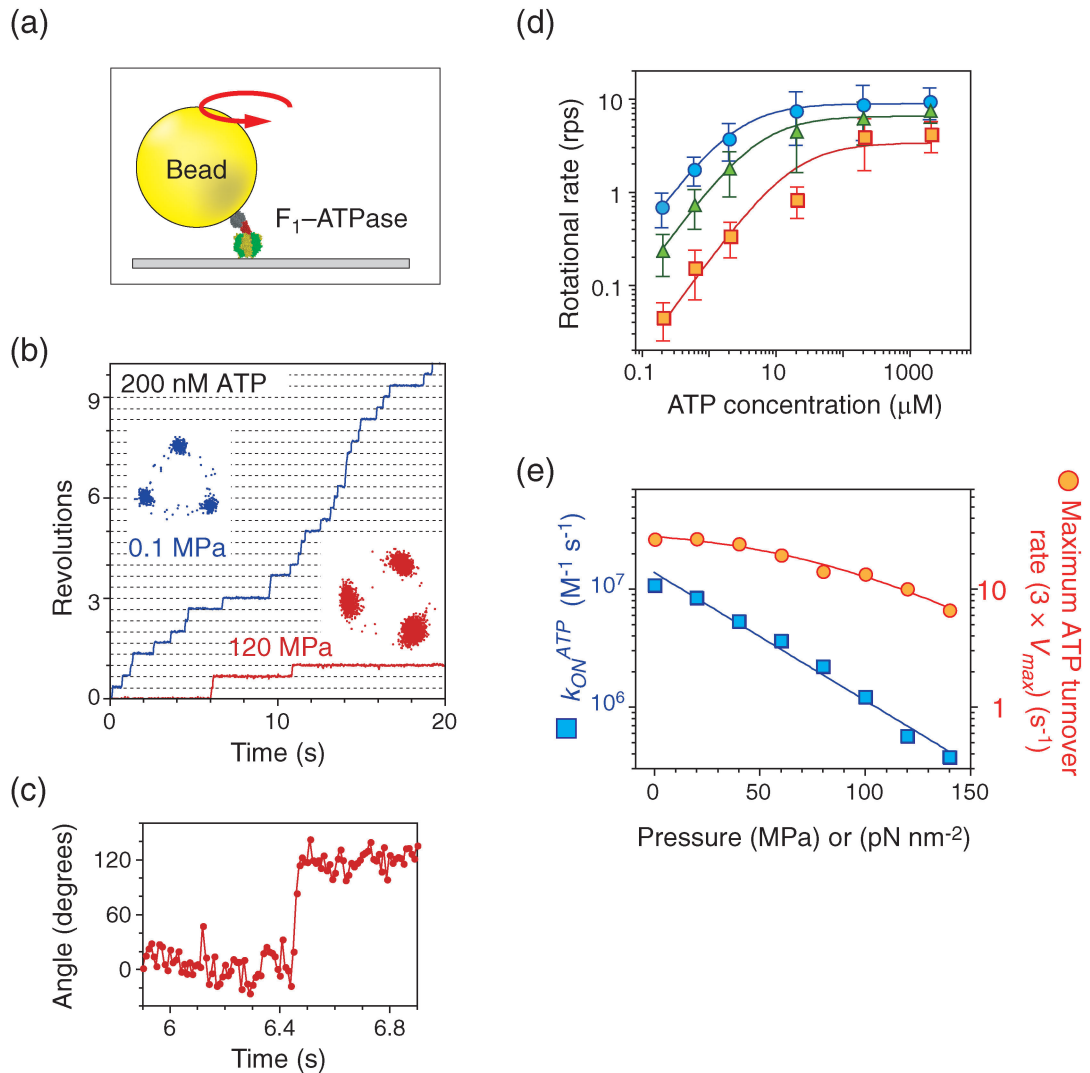


Fig. 4. (Color online) Stepping rotation of  $F_1$ -ATPase. (a) Experimental systems. (b) Time courses and their centroid traces of the rotation of  $F_1$ -ATPase at 200 nM ATP. (c) Rising phase of single  $120^\circ$  step on an expanded scale at 120 MPa and 200 nM ATP. (d) Rotational rates as a function of ATP concentration at 0.1 (circles), 60 (triangles) and 120 MPa (squares). (e) Pressure dependence of the apparent ATP binding rate,  $k_{ON}^{ATP}$  (squares) and maximum ATP turnover rate,  $3 \times V_{max}$  (circles).

の演算結果と比較すれば、きっと違いは出てくるであろう。短時間であるが周囲の水分子も含めて詳細な情報が得られる MD 計算、長時間にわたるグローバルな変化(酵素活性)を追跡できる顕微観察、共に圧力という同じ摂動下にある結果を比較することで回転運動を生み出す詳細な分子機構を明らかにできるであろう。最後に、筆者らは好熱菌由来の  $F_1$ -ATPase を使って実験を行ったのだが、現時点で

は十分な分解能で分子構造が明らかにされていない。構造解析の研究並びに、巨大分子のより長時間にわたる MD 計算の確立を待つことにしよう。

#### 4. まとめ

本稿では、高圧力顕微鏡とタンパク質分子モーターの 1 分子運動計測について解説してきた。ここ



では紙面の関係で紹介しきれなかったが、筆者らは高圧力顕微鏡を使って大腸菌べん毛モーターが高圧力下では逆向きに回りますことを発見している[18,37,38]。おそらく、高圧力をかけることで細胞内にある水分子との相互作用が変化し、モーターの分子構造が大きく変化したのが原因と思われる。高圧力技術を使えば細胞内で働くタンパク質であってもその機能をダイナミックに変化させる一例と言える。これまでの研究から、微生物の成育や死滅が圧力に依存して大きく変化することが知られている。その圧力応答に直接寄与するタンパク質を顕微鏡下で観察できれば、詳細な分子機構も明らかにできそうである。

近年、細胞外から与える力学刺激に応じて、タンパク質の発現量や個体発生時の形態が大きく変化することが明らかにされてきている[41]。これまでは、細胞への力学刺激として、基板に固定した細胞に対して培養液の流れずり応力が利用されてきた。筆者は、高圧力を力学刺激として用いることで、ずり応力と同様の効果が出せるのではないかと考えている。培養液を加圧するだけで力学的なストレスを与えることができるので、細胞を基板などに固定する必要はない。さらに、スケールアップを容易に行えるというメリットがあるので、再生医療への応用を見据えて個体発生や分化誘導への応用も期待できる。

水分子はナノメートルの世界では個々の粒子として振る舞い、衝突現象や水合として働く。それがマイクロメートルの世界になると衝突頻度の違いに伴うゆらぎを生み出し、ミリメートルではマクロな力学作用となる。高圧力技術を用いると、様々なスケールにおいても水を介して生体試料に影響を及ぼすことができる。筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡を用いれば、きっと水との相互作用で生み出される生物らしい反応機構を明らかにできるであろう。生命体の階層をまたいで生命活動を操作する新しい手法として、高圧力顕微鏡法を発展させていきたい。

## 謝 辞

本論を執筆するに際し、常日頃からご支援をいただいている京都大学物質-細胞統合システム拠点の原田慶恵教授に深く謝意を表します。本研究は、同志社大学の木村佳文教授、京都大学の寺嶋正秀教授、理化学研究所の奥野大地博士、東京大学の野地博行教授との共同研究です、この場を

お借りしてお礼申し上げます。また、本研究は科学研究費補助金と伊藤科学技術振興会の支援により達成されたものです。

## 参考文献

- [1] 八木健彦: 超高圧の世界 (岩波書店, 東京, 2002).
- [2] 谷口吉弘: 新しい高圧力の科学(講談社, 東京, 2003), 第6章, p. 244.
- [3] 阿部文快: 化学と生物, **42**, 573 (2004).
- [4] B.B. Boonyaratankornkit, C.B. Park, D.S. Clark: *Biochim. Biophys. Acta*, **1595**, 235 (2002).
- [5] S. Koyama S, M. Aizawa: *Extremophiles*, **6**, 413 (2002).
- [6] E.D. Salmon, G.W. Ellis: *J. Cell Biol.*, **65**, 587 (1975).
- [7] H. Vass, S.L. Black, E.M. Herzig, F.B. Ward, P.S. Clegg, R.J. Allen: *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 053710 (2010).
- [8] 出口茂, 辻井薫, 堀越弘毅: 微生物利用の大展開, 今中忠行 監修 (エス・ティー・エス, 東京, 2002), p. 405.
- [9] 向井貞篤: 高圧力の科学と技術, **21**, 18 (2011).
- [10] H. Vass, S.L. Black, E.M. Herzig, F.B. Ward, P.S. Clegg, R.J. Allen: *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 053710 (2010).
- [11] 網田富士嗣, 梶本興亜 編著: 高圧力実験装置の設計と工作 (京都大学物理化学研究会, 京都, 2005).
- [12] 野島博 編: 顕微鏡の使い方ノート 改訂第3版 (羊土社, 東京, 2011).
- [13] S. Inoue, K.R. Spring: ビデオ顕微鏡 (共立出版, 東京, 2001).
- [14] M. Nishiyama, E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida, H. Higuchi: *Nature Cell Biol.*, **3**, 425 (2001).
- [15] M. Nishiyama, H. Higuchi, T. Yanagida: *Nature Cell Biol.*, **4**, 790 (2002).
- [16] Y. Taniguchi, M. Nishiyama, Y. Ishii, T. Yanagida: *Nature Chem. Biol.*, **1**, 342 (2005).
- [17] 西山雅祥, 曾和義幸, 石島秋彦: 物性研究, **85**, 593 (2006).
- [18] 西山雅祥, 曾和義幸: 化学, **68**, 31 (2013).
- [19] M. Nishiyama, Y. Sowa: *Biophys. J.*, **102**, 1872 (2012).
- [20] 西山雅祥, 木村佳文: LTM センター誌, **22**, 18 (2013).
- [21] M. Nishiyama, Y. Kimura, Y. Nishiyama, M. Terazima: *Biophys. J.*, **96**, 1142 (2009).
- [22] 加藤千明: 進化する食品高圧加工技術(エス・ティー・エス, 東京, 2013), p. 65-84.

- [23] M. Nishiyama, S. Kojima: *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 9225 (2012).
- [24] 西山雅祥: 特許第 5207300 号, 特願 2008-264944 (2008).
- [25] H. Vass, S.L. Black, C. Flors, D. Lloyd, F.B. Ward, R.J. Allen: *Appl. Phys. Lett.*, **102**, 154103 (2013).
- [26] 柳田敏雄, 石渡信一 編: ナノピコスペースのイメージング (吉岡書店, 京都, 1997).
- [27] 柳田敏雄: 生物分子モーター (岩波書店, 東京, 2002).
- [28] 原田慶恵, 石渡信一 編: 1 分子生物学 (化学同人, 京都, 2014).
- [29] 野地博行 編: 1 分子ナノバイオ計測 (化学同人, 京都, 2014).
- [30] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinosita Jr.: *Nature*, **386**, 299 (1997).
- [31] 立花隆: 脳とビッグバン (朝日新聞社, 東京, 2000).
- [32] 吉田賢右: 蛋白質核酸酵素, **54**, 1986 (2009).
- [33] D. Okuno, M. Nishiyama, H. Noji: *Biophys. J.*, **105**, 1635 (2013).
- [34] D. Okuno, M. Nishiyama, H. Noji: *Asia Pacific Phys. News Lett.*, **3**, 25 (2014).
- [35] 伊藤祐子, 池口満徳: 生物物理, **55**, 23 (2015).
- [36] 林重彦: 計算と生命 (岩波書店, 東京, 2012) 第 3.3 章, p. 98.
- [37] M. Nishiyama, Y. Sowa, Y. Kimura, M. Homma, A. Ishijima, M. Terazima: *J. Bacteriol.*, **195**, 1809 (2013).
- [38] 西山雅祥: 生物物理, **53**, 264 (2013).
- [39] 岩橋均: 日本農芸化学会誌, **74**, 609 (2000).
- [40] 本間貴之: 日本農芸化学会誌, **78**, 399 (2004).
- [41] 小椋利彦 監修: 細胞工学, **33**, 9 月号 (2014).  
[2015 年 2 月 10 日受付, 2015 年 4 月 10 日受理]

© 2015 日本高圧力学会