

細胞内の水で生命活動を操る！

—— 高圧力下で観るタンパク質水和変調イメージング

西山雅祥^{1,2}・曾和義幸³

¹京都大学白眉センター・²同大学物質-細胞統合システム拠点
³法政大学生命科学部

タンパク質に高い圧力をかけると、水との相互作用が変わるため、タンパク質の分子構造や機能をコントロールすることができる。この原理を用いた高圧力顕微鏡法により、生きた細胞内で働くタンパク質分子モーターのダイナミックな運動変化がはじめて捉えられた。

タンパク質と水の相互作用が変化すると…

代表的なモデル生物である大腸菌は、生命活動を営むため、わずか1 μm 程度しかない小さな体のなかに約4000種類ものタンパク質を発現させている。実際の発現量は数個～数千個とばらつきが多いとはいえ、そのちっぽけな体のなかはタンパク質やそのほかの生体分子でいっぱいに満たされていることになる。ただし、細胞内に含まれる物質のうち、約70%は水である。細胞内の水は、タンパク質の周囲をぐるりと取り囲んでいる。水分子は、タンパク質の表面や内部で水素結合を形成することで複雑な立体構造を形成し、酵素活性をはじめとする生命活動に必須な化学反応を生みだしている。

では、このタンパク質と水分子の相互作用が変わるとどうなるだろうか？ おそらく、タンパク質の構造や機能も変化するに違いない。うまく使えば、細胞の生命活動もコントロールできるかもしれない。そこで着目したのが高圧力技術

である。筆者らは、高圧力下でタンパク質の構造変化や機能変調を高解像度で測定できる高圧力顕微鏡の開発を行ってきた。ここでは、この高圧力顕微鏡を利用して、生きた細胞内で働くタンパク質を操る新しい研究手法について紹介する。

高圧力環境を覗いてみる

高圧力は、化学分野にとってなじみの深い技術である。人工ダイヤモンドをはじめとする新物質の合成や溶媒和などの研究分野に加えて、タンパク質構造の研究にも利用されてきた^{1,2)}。私たちが日々生活している大気圧環境では（1気圧＝0.1 MPa）、タンパク質は分子間相互作用により複合体を形成し、酵素活性をはじめとする機能発現を行っている（図1）。これが100 MPa程度の圧力環境下では、おもにタンパク質表面の水和状態が変化し、タンパク質分子間の結合に寄与する静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合などが弱められてしまう²⁾。その結果、オリゴマーが解離しはじめる。さらに500 MPa以上の圧力になると、タンパク質内部の隙間（キャビティー）にまで水分子が侵入してしまうため、立体構造は崩壊し機能活性も失われてしまう。筆者らは、100 MPa程度の圧力領域において、タンパク質は変性しないまでも構造や機能が変化することに着目し、これらの変化を光学顕微鏡下で観察できる新しい分析手法の開発に取り組んできた^{3,4)}。

筆者らが開発した高圧力顕微鏡は、倒立型顕微鏡に搭載する高圧力チャンバーとセパレーター（図2a）、および、圧力を加えるハンドポンプから構成されている（図2b）。実験サンプルを封入する高圧力チャンバーは、加圧時に生じる歪みに対して可塑的に変形できるようにニッケル合金（ハステロイ C276）を用いて製作した（図2c）。チャンバーには、対物レンズ側とコンデンサー側にそれぞれ開口部を設けること

にしやま・まさよし ● 京都大学白眉センター特定准教授、同大学物質-細胞統合システム拠点連携准教授、2001年大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程修了、＜研究テーマ＞新しい光学顕微鏡を開発し、生体分子が動くしくみを明らかにすること、＜趣味＞息子と遊ぶこと
そわ・よしゆき ● 法政大学生命科学部講師、2003年大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程修了、＜研究テーマ＞細菌べん毛モーターが回転するしくみを明らかにすること、＜趣味＞散歩

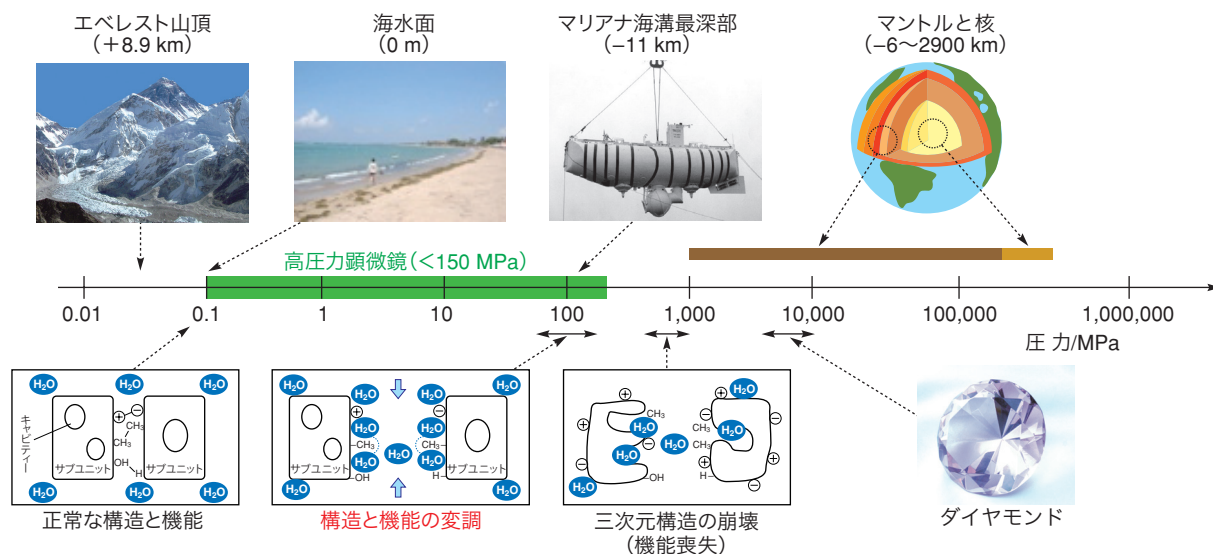


図1 高圧力とタンパク質構造

で、各種の光学顕微観察像が得られるようにしてある。高解像度の顕微観察を行うためには、開口部を広げ、かつ観測窓を薄くしなければならないが、そうすると当然ながら壊れやすい構造となり、耐圧性能が下がってしまう。NMRや紫外可視分光などに比べると、高圧力容器と顕微鏡の相性は原理的に悪いといえる。こうした相反する要請を満たす装置をつ

くれるかどうか、高圧力顕微鏡開発の鍵となる。

図3に装置の概念図を示す。ハンドポンプを文字どおり「手動」で10秒ほど動かせば、チャンバー内の圧力は、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、海上保安庁観測船による測定値）の静水圧～110 MPaまで到達できる（最大150 MPaまで加圧



図2 高圧力顕微鏡

a) 高圧力チャンバーとセパレーター。b) ハンドポンプと高圧力機器。c) 高圧力チャンバーの本体。本体の裏側となる対物レンズ側の開口径は1.5 mm、テーパ角は76°であり、ガラス製の光学窓（厚さ1.5 mm）をエポキシ樹脂で固定した。コンデンサー側の光学窓支持台の側面にはネジ溝を設けてあり、Oリングとバックアップリングで簡単に圧力シールを施した。

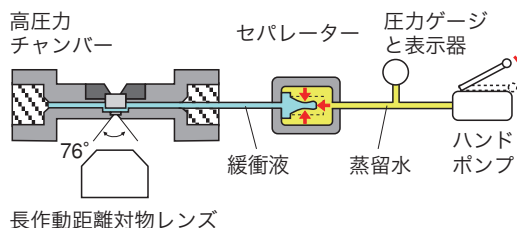


図3 高圧力顕微鏡の概念図

ハンドポンプを動かすと、圧力媒体である蒸留水が押し込まれ、セパレーター内へと流入する。水圧により厚さ0.2 mmのテフロン製の膜を変形させることで、高圧力チャンバー内を満たす緩衝溶液の圧力へと適切に変換される。

可能)。また、高圧力をかけても結像能や倍率にほとんど影響はなく、常圧力とは変わらぬ解像度で多様な顕微観察像(明視野、暗視野、位相差、蛍光像)が得られる。

ここで、顕微鏡では「見えない」水溶液の物性変化について追記しておこう。なぜなら圧力は代表的な熱力学パラメータであり、観測対象のみならず水溶液の物性まで変えてしまうからである。顕微鏡は見るための道具だが、見えるものばかりに気を取られていると、手品のようにままとだまされかねない。“Seeing is believing (百聞は一見に如かず)”というものの、信じる前に確認することが大切である。100 MPaの圧力をかけて実測したところ、チャンバー内の溶液温度は一時的に0.1℃上昇し、粘性は5%増加した。また、緩衝液(10 mM トリスなどのグッドバッファー)のpHは0.1増加した。これらの物性変化は、ここで紹介する研究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。

大腸菌の遊泳運動を見る

大腸菌は、高圧力が生命活動に与える影響を調べる際のモ

デル生物として、これまで多くの研究で利用されてきた。筆者らは、高圧力環境下を実時間観察できるという光学顕微鏡の特徴を生かして、大腸菌の遊泳運動を観察してみることにした。

大腸菌の表面には、べん毛と呼ばれるらせん状の繊維が何本も生えている(図4a)⁵⁻⁷⁾。べん毛繊維の根元には、それぞれべん毛モーターと呼ばれる回転器官があり、細胞外から流入するイオン流を利用して、べん毛全体をぐるぐると高速回転させている(図4b)。こうした反時計方向に回るべん毛繊維が寄り集まり、あたかも1本の繊維のように回転すると、推進力のベクトルがそろうのである。こうして大腸菌は水のなかを自由に泳げるようになる。自然界では、大腸菌はただ闇雲に泳ぎ回っているのではなく、環境の変化を感知してモーターを時計方向に回して、泳ぎにブレーキをかけることがある。筆者らは、モーターの回転方向を切り替える応答制御因子(後述)をもたず、常にモーターを反時計方向に回転させて遊泳する菌体を用いて、大腸菌の運動特性を調べた。

図5(a)に大腸菌の遊泳運動の軌跡を示す。常圧力条件(0.1 MPa)では、菌体は約20 $\mu\text{m s}^{-1}$ の速度で滑らかに泳いでいたが、圧力の増加とともに、泳ぐ菌体の割合や、その速度がだんだん低下していった(図5b, c)。圧力が80 MPaに到達するとすべての菌体は遊泳運動をやめ、ブラウン運動により水溶液中を不規則に動きはじめた。80 MPaというと、水深8000 mの静水圧に相当する。その後、圧力を下げると、菌体は運動能を回復していった。加圧過程と減圧過程において、同じ圧力値でも運動能に違いが見られたものの、概して、圧力に対して運動能は可逆的に変化するといえるだろう。きっと、高圧力下ではべん毛モーターがなんらかの理由で回りにくいのだろうと予想されたのだが、話はそれほど

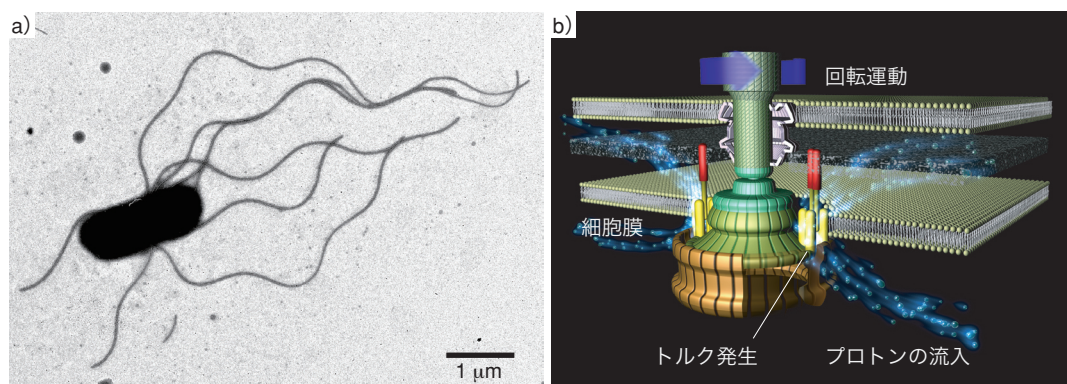


図4 大腸菌の運動器官

a) 電子顕微鏡写真(撮影：大阪大学大学院生命機能研究科 宮田知子特任助教)、b) べん毛モーターの構造(CG提供：東北大学多元物質科学研究所 石島秋彦教授)。

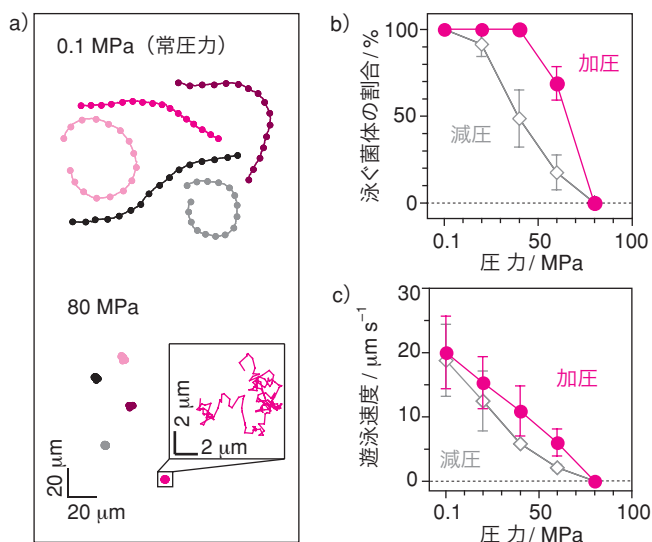


図5 大腸菌の遊泳運動

a) 大腸菌 ($\Delta cheY$) 遊泳運動の軌跡 (5 秒間). b) 泳ぐ菌体の割合の圧力依存性. c) 遊泳速度の圧力依存性.

単純ではなかったのである。

べん毛モーターの回転を見る

モーターの回転を測定するには、細胞外へと伸びているべん毛繊維の動きを見ればよさそうに思えるが、技術的にはそう簡単ではない。というのも、べん毛繊維の直径は約 20 nm しかないうえ、菌体はべん毛繊維を約 200 Hz の速度で回転させているからである。筆者らは、べん毛モーターの回転運動を観察するために、今から 40 年ほど前に開発されたテザードセルの実験を行った (図 6 a)。このテザードセルの実験系では、べん毛繊維をカバーガラスなどの光学基盤 (今回の実験では高圧力チャンバーの観測窓) に吸着させ、モーターの回転運動を菌体の回転として観察することになる。べん毛繊維に比べて、菌体は大きく、かつ、粘性抵抗により回転速度が 10 Hz 程度に遅くなるため、顕微鏡下ではとても観察しやすくなる。ちなみに、この大きな目印を動きの指標として利用する手法は、今日では、タンパク質 1 分子の運動測定法としてもおおいに活用されている⁸⁾。

筆者らは、圧力を変えながらテザードセルの回転運動がどのように変化するかを調べた (図 6 b)³⁾。常温常圧 (20 °C, 0.1 MPa) 下では、菌体は反時計方向に滑らかに回転した。その後、圧力を増加させると、回転速度は低下したものの、80 MPa に達しても依然として反時計方向に回りつづけていた。つまり、モーターはトルク発生をやめていないことになる。ここで前に示した大腸菌の遊泳運動の結果 (図 5)

を思い起こしてほしい。80 MPa の圧力条件下では、菌体は遊泳運動を完全に停止していたはずである。大腸菌が泳ぐ際には、複数のべん毛繊維を束ねて回転させている。おそらく、高圧力下ではこの束化の過程がうまくいかないため、一方向性の推進力が生まれないと考えられる。

あっ、逆に回りだした！

さらに圧力を上げると、何が起こるのだろうか？ おそらく、すべてのモーターはなんらかの理由で止まってしまうと予想していた。しかし、話はここから急展開を迎えることになる。圧力を 120 MPa まで上げたところ、あるモーターが逆方向、つまり時計方向に回転しはじめたのである！ (図 6 b)⁹⁾。時計方向に回りだしたモーター「回転状態①：時計方向」の隣には、あるときは時計方向、しばらくすると反時計方向と頻りに回転方向を変更する「②：方向が定まらない」、依然として、同じ方向に回り続ける「③：反時計方向」や、回転を停止してしまったモーター「④：停止」が観察された⁷⁾。次に、圧力を再び常圧 (0.1 MPa) まで下げたところ、約半数のモーターは再び反時計方向に回りはじめたのに対して、残りのモーターは減圧後も停止したままであった。このように、圧力という力学刺激に対して、モーターの応答は一様ではなかったことが興味深い。

こうした回転状態の変化を定量的に評価するため、圧力に対して可逆的に応答したモーターのみを選択し解析を進めた。図 6 (c) に、各圧力における四つの回転状態の割合を示す。常圧 (0.1 MPa) では、すべてのモーターは反時計方向に回転していたので、「反時計方向」の割合は 100% であった。その一方、圧力の増加とともに「反時計方向」の割合は減少し、代わってそれ以外の三つの状態が増加してきた。次に、停止状態を除いて、モーターが時計方向に回転する確率を計算した (図 6 d)。20 °C では、80 MPa まで加圧しても時計方向に回る確率はあまり変化せず、ほぼゼロであったのに対して、100 MPa 付近から急峻な立ち上がりを見せた。次に、低温条件下で同様の実験を行ったところ、時計方向に回る確率はより低い圧力で大きく変化した。高い圧力と低い温度が系に対して同様の効果をだすのだから、熱力学的につじつまは合う。またこの結果は、-2 °C まで温度を下げると、常圧下であってもモーターが逆に回ることを示した報告例とも一致する¹⁰⁾。

自然界に生息する大腸菌は、栄養分や温度などの環境変化を感知すると、シグナル伝達過程を経て応答制御因子であるタンパク質 CheY がリン酸化され、細胞内の濃度が上昇する。

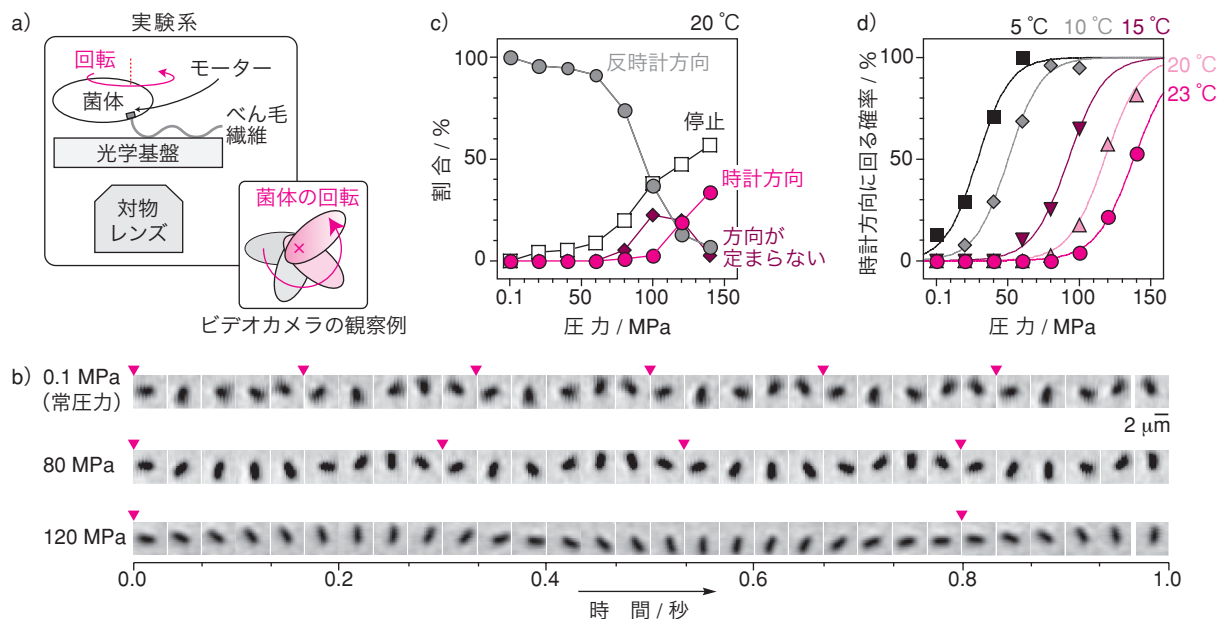


図6 大腸菌べん毛モーターの回転計測

a) テザードセルの実験系と観察例。べん毛繊維の一部を改変すると (*fliC-sticky*)、べん毛抗体を使わずに光学基盤にべん毛を吸着できる。b) 回転するテザードセルの連続画像。同じ菌体 ($\Delta cheY fliC-sticky$) の回転運動を各圧力で観測した (菌体が1回転するごとに▼を記載)。c) 高圧力下で観察された4種類の回転状態の割合。圧力に対して可逆的に変化するモーターを選別し、各圧力下での割合を求めた。d) モーターが時計方向に回る確率。モーターが二つの状態 (反時計方向と時計方向) 間で平衡関係にあると仮定すると、Y軸の値の10%から90%への増加は、 $4.4 k_B T$ の自由エネルギー変化に相当する。

このリン酸化型 CheY がモーターに一定数結合するとモーターの構造が変化し¹¹⁾、反時計方向の回転から時計方向に一気に切り替わるため、泳ぎにブレーキがかかる。モーターが時計方向に回る確率はリン酸化型 CheY の濃度に対してシグモイド状に変化することが知られている (ヒル係数 ~ 10)¹²⁾。図6(d)を見てもらいたい。各温度条件で、時計方向に回る確率は圧力増加に対してやはりシグモイド状の立ち上がりを示している。筆者らは、高圧力をかけることで、あたかもリン酸化型 CheY が結合したかのようにモーターの構造が変化してしまい、その結果、本来は回るはずのない時計方向に回転しはじめたのではないかと考えている。

高圧力顕微鏡法の展望

ここでは、高圧力技術を利用して、細胞内で働くタンパク質の動作特性をダイナミックに変化させる新しい分析手法について解説してきた。細胞内で行われる多くの化学反応は、水のなかで繰り広げられている。この手法を用いると、今回紹介してきた細胞の運動機能のみならず、さまざまな生命現象を担う反応過程をコントロールできるだろう。

最後に今後の課題と研究の方向性について概観する。まず、現在の装置の仕様では、高圧力チャンバーの耐圧性能を確保

するため、開口数を十分に広げられず、微弱な蛍光像の観察には適していない。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¹³⁾。これが実現すれば、全反射照明法や光ピンセットなどの1分子計測の手法を導入し⁸⁾、高圧力によってもたらされる分子の構造変化や機能変調を、より高い感度や分解能で観察できる。

次に、高圧力顕微鏡を用いた研究として、大きく二つの方向性があげられる。一つ目の方向性としては、1分子もしくは小数分子程度の小さな系への適用である。近年では、計算機の演算能力の向上に伴い、水を含んだ MD 計算を長時間実施できるようになりつつある。実は、演算時に箱の体積を少し小さめに設定するだけで、手軽に高圧力環境のシミュレーションが可能となる。ここで解説した顕微解析による分子構造の変化や機能変調の高感度検出に加えて、高圧力下での演算結果を比較することで、水分子がどのようにしてタンパク質の構造形成や機能発現に関与しているのか、その具体的な役割が詳細に明らかになるであろう。

もう一つの方向性として、細胞および組織といったより複雑な系への応用があげられる。近年、細胞に対する力学刺激が、細胞内でのタンパク質発現量や個体発生時のダイナミッ

く形態変化に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。これまでの研究では、細胞の周囲に流れをつくり、ずり力により力学的な刺激を与える間接的な手法などが用いられていた。しかしながら、このような手法では、細胞の形状などに依存して刺激の大きさも異なるため、定量的な議論がしにくい。それに対して、高圧力は等方的な力学作用であり、細胞や組織の形状に依存せずどの方向からも一様な力学刺激として作用するため、原理的に定量性や再現性に優れているといえよう。高圧力による力学刺激と高感度顕微観察の手法は、個体発生や分化誘導などへの応用が期待できる。



光学顕微鏡を使うと、細胞内で繰り広げられる生命活動のメインステージに立ち、スポットライトを浴びているさまざまな役者たち(タンパク質)を眺めることができる。ここで紹介したのは、いわば黒子ともいえる水分子を利用し、役者を操る新しい技術である。メカノバイオロジーの新潮流として発展させていきたい。

謝辞：本稿の執筆に際しまして、大腸菌の電子顕微鏡写真は大阪大

学大学院生命機能研究科難波研究室の宮田知子特任助教に撮影していただきました。べん毛モーターのCG 画像は東北大学多元物質科学研究所の石島秋彦教授から提供していただいたものです。お二人のご協力に対して心より感謝いたします。また、常日頃からご支援をいただいている法政大学生命科学部の川岸郁朗教授、京都大学物質・細胞統合システム拠点の原田慶恵教授には、この場をお借りしてお礼申し上げます。本研究は、同志社大学理工学部の木村佳文教授、名古屋大学大学院理学研究科の本間道夫教授、東北大学多元物質科学研究所の石島秋彦教授、京都大学大学院理学研究科の寺嶋正秀教授との共同研究であり、科学技術振興機構さがけ「生命現象と計測分析」および、科学研究費補助金の支援により達成されたものです。

参考文献

- 1) 毛利信男 編、『新しい高圧力の科学』、講談社 (2003)。
- 2) 阿部文快, 化学と生物, **42**, 573 (2004)。
- 3) M. Nishiyama, Y. Sowa, *Biophys. J.*, **102**, 1872 (2012)。
- 4) 西山雅祥, 木村佳文, LTM センター誌, **22**, 18 (2013)。
- 5) 相沢慎一, 『バクテリアのべん毛モーター』、共立出版 (1998)。
- 6) H. C. Berg, “*E. coli* in Motion,” Springer, New York (2003)。
- 7) Y. Sowa, R. M. Berry, *Q. Rev. Biophys.*, **41**, 103 (2008)。
- 8) 柳田敏雄, 石渡信一 編, 『ナノピコスペースのイメージング：生物分子モーターのメカニズムを見る』、吉岡書店 (1997)。
- 9) M. Nishiyama, Y. Sowa, Y. Kimura, M. Homma, A. Ishijima, M. Terazima, *J. Bacteriol.*, **195**, 1809 (2013)。
- 10) L. Turner, S. R. Caplan, H. C. Berg, *Biophys. J.*, **71**, 2227 (1996)。
- 11) 今田勝巳, 南野徹, 化学, **67**(2), 37 (2012)。
- 12) P. Cluzel, M. Surette, S. Leibler, *Science*, **287**, 1652 (2000)。
- 13) 西山雅祥, 特許第 5207300 号, 特願 2008-264944 (2008)。

平成25年9月1日発行(毎月1回1日発行)通巻748号 昭和15年4月18日第3種郵便物認可 CODEN:KAKYAU ISSN 0451-1964

C H E M I S T R Y

化学

SEPTEMBER
2013
Vol.68

9

解説 • Research article

医薬品合成の 革新的な不斉触媒反応

研究物語 • Research story

酵素を“誤作動”させて行う有機合成

