

研究課題名 一個の生体超分子の局所的な構造変化の検出

所属研究機関 独立行政法人 通信総合研究所

研究者氏名 西坂 崇之

研究計画の概要

研究の趣旨・目的

近年、1個1個の分子を区別して顕微操作し、その性質を調べていくという研究が飛躍的に進歩している。生体分子においても、従来はマクロな分子の集団において研究されていた試料が、個々の分子を対象にして個性や不均一性が定量化され始めている。これら一分子生理学とも呼ぶべき流れを受け、本課題では、1個の生体分子の中で起きる構造変化を、生きたまま顕微鏡下で可視化するという研究を目的とした。分子モーターや蛋白質分解酵素は、基質の結合によりダイナミックな構造変化を伴い、それが機能に密接に関係すると考えられている。これらの構造変化を1分子のレベルで検出することで、多様な機能を持つ蛋白質の複合体 = 生体超分子が動作するメカニズムを明らかにしていこうとするものである。

研究対象の1つである F_1 -ATPaseは、東工大の野地らにより97年に回転分子モーターであることが証明され、BoyerやWalkerらにノーベル賞をもたらした。このわずか10ナノメートルの分子モーターの動作原理は未解決な部分が多く、1分子を対象にした実験が急務である。申請者はこの分野の第一人者である野地氏と共同研究を行ってきており、本課題においても、彼らのグループのサンプルを用いて研究を進めた。他には、本グループで既に1分子での成果を発表しているミオシンやダイニン、それらと共通する構造を持つ分解酵素であるプロテアソームに対して新しい光学系を応用する計画であった。

研究計画の概要

1年目は、水溶液中で蛍光色素1分子の偏光方向（振動面）を検出できる、新しいタイプの全反射型蛍光顕微鏡を開発した。これには光源であるレーザー、特注の光学系、改造した顕微鏡などを組み合わせる必要があった。これと平行して観察に用いる試料の予備的な実験に着手を行った。2年目は、分子モーターや分解蛋白などの試料を、1分子のレベルで実際に観察することを試みた。今後の発展としては、最終的な目標である蛋白質の構造変化を検出するという方向が考えられる。生体超分子について、今回の課題で開発した顕微鏡を応用し、新しく得られた結果を、X線結晶解析など既存のデータと比較することで、特有の構造から多様な機能を実現するメカニズムを明らかになるだろう。また光学系を完全な形にし、可能であれば市販品として通用するような洗練された形式に改良していくことも検討している。

所要経費一覧

(単位：百万円)

研究項目	所要経費		
	13年度	14年度	合計
1. 全反射蛍光顕微鏡光学系 画像解析システムの開発	←————→ 15.6	————→ 10.4	26.0
2. 新しい全反射顕微鏡による 生体分子の観察	←————→ 3.9	————→ 9.4	13.3
所要経費(合計) (間接経費を含む)	19.5	19.8	39.3

.研究成果の概要

研究成果の概要

研究計画において提案した、新しいタイプの全反射蛍光顕微鏡を実際に作製した。これは界面の全反射領域において発生するエバネッセント波の偏光を利用することで、1個の蛍光色素分子の向きを検出するという新しい技術である。これを用いれば、1個の生体分子の特定の部分の構造変化がリアルタイムで検出できる。この技術の基本概念と光学系について、2001年10月に特許申請を行った。また顕微鏡の製作過程で、色素の振動モーメントの向きによらずに色素を観察できる全反射蛍光顕微鏡を考案し、2002年10月に特許申請を行った。

また、この顕微鏡を用い、 F_1 -ATPase が回転しているとき、どの分解サイトのこういった反応が回転を引き起こすのか？という点を明らかにした。 F_1 -ATPase はATP合成酵素の1部であるが、それ単独では サブユニットを一方に回すことのできる回転分子モーターである。加水分解サイトはサブユニットと サブユニットの境界、主に サブユニット側にあり、サブユニットの周りを 120° おきに取り囲んでいる。実際に蛍光性 ATP 1分子を可視化することで、3つの分解サイトを区別しながら、1個のATPの結合と解離を可視化するのに成功した。

ところで本研究課題は、申請時の予定では、3年間の計画であった。初年度に装置の開発を行い、2年目で実際に生物試料を観察し、3年目で最終的な目標である蛋白質の構造変化を検出する予定であった。2年目までの計画は順調に進み、ATP 1分子の方向を光学顕微鏡下で検出することに成功した。これは、水溶液中で向きを検出することに成功した生体分子の中で、おそらく最小のものであろう。

波及効果、発展方向、改善点等

全反射照明は、高いSNで蛍光分子を観察できる顕微鏡の手法だが、これを用いて直接分子の方向を検出する技術は未だ確立されていない(ペンシルバニア大のグループからの報告が1例あるのみである)。本課題はそれに挑戦するもので、十分な予算により研究が完遂できれば、電子顕微鏡やエネルギー移動法に続いて一般的な方法として広く認められると期待される。この手法は、国際的にも様々な基礎的な実験に応用されるポテンシャルを持っている。光学顕微鏡の技術無しには生物の研究は発展せず、分子の方向を決める技術が世界の水準を上げると期待している。また本成果は、こういった基礎的な装置を開発する一方、生体超分子からなる分子機械の動作原理の解明も目指した。精緻な生物の分子機械の仕組みに迫ることで、人間の作る機械のメカニズムの欠点、優れた点について考え直すための足がかりができるかも知れない。ここから全く新しい装置やシステムのアイデアが生まれ、社会の発展に貢献する可能性がある。

また本研究課題は、3年の予定を繰り上げ、14年度で終了することになった。申請研究者が平成15年4月1日より、常勤職員(助教授)として学習院大学理学部に就職し、任期付き研究員でなくなったためである。本研究課題で完遂できなかった幾つかの目標は、学習院大学の研究室においても引き続きの課題としたい。

.研究成果の公表等の状況

(1) 研究発表件数

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合 計
国 内	0 件	0 件	3 件	3 件
国 際	0 件	3 件	4 件	7 件
合 計	0 件	3 件	7 件	10 件

(2) 特許等出願件数

合計 2 件 (うち国内 2 件、国外 0 件)

(3) 受賞等

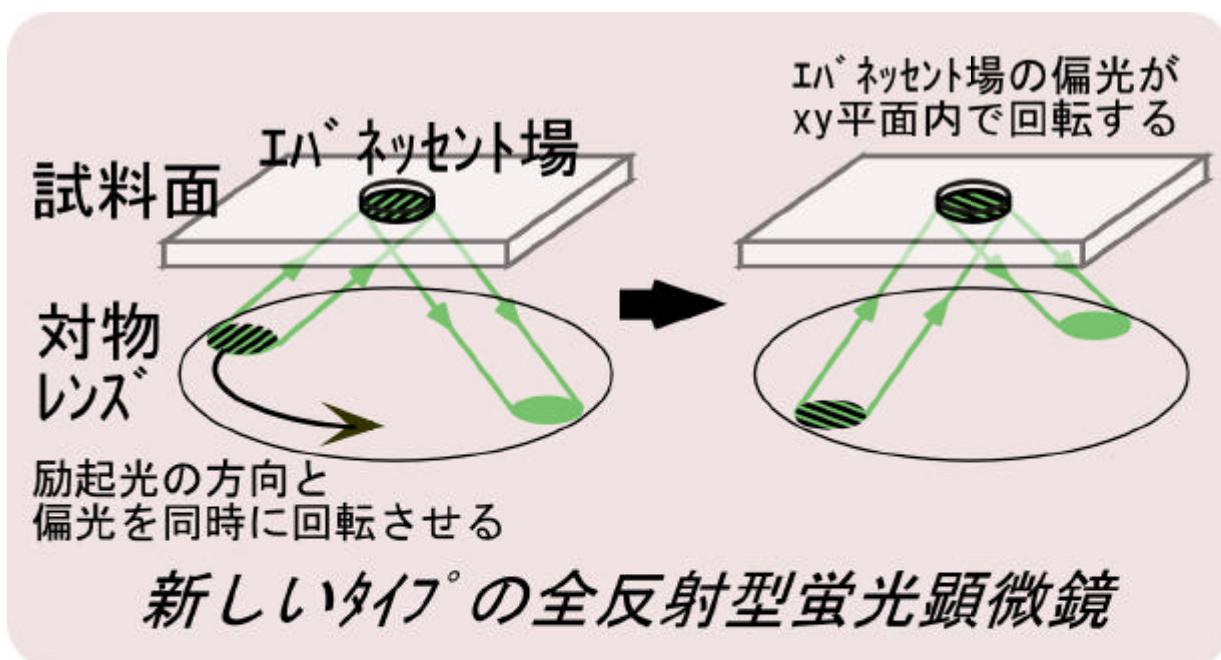
0 件

(4) 主な原著論文による発表の内訳

0 件

(5) 主要雑誌への研究成果発表

0 件

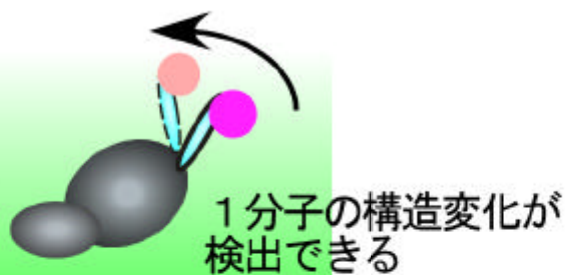


これを実現する光学系を作製する

生体超分子に応用

● 局所的蛍光ラベル

生体超分子



● 蛍光性の基質

