

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K04908

研究課題名(和文) タンパク質分子間相互作用の力学変調と高分解能イメージング

研究課題名(英文) High-resolution imaging of intermolecular interactions undergoing mechanical modulation

研究代表者

西山 雅祥(Nishiyama, Masayoshi)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：10346075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質と表面をとりまく水分子は高圧力下で影響を受けやすいことが知られている。本研究では、これまで世界にさきがけて開発していた高圧力顕微鏡の性能を向上させるとともに、人工細胞や生きた細胞など様々な試料を対象にして実験を行った。生きた細胞内ではたらくタンパク質分子機械を高圧力下で操作することで、細胞の生命活動が活性化する様子を可視化することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの生命科学分野では、遺伝子操作や化学物質を添加することで、細胞内での生命活動を操作する研究が実施されてきた。本研究で開発した技術は、これらの既存の技術とは異なり、静水圧という「力」を用いた新しい細胞操作技術である。今後も研究を継続し、圧力による活性化を通じて、新しい医療技術の芽を育むことができるように努めていく。

研究成果の概要(英文)：Application of hydrostatic pressure is a powerful method for modulating intermolecular interactions between protein and water molecules. We have developed a high-pressure microscope that is optimized both for the best image formation and for the stability to hydrostatic pressure up to 150 MPa. The developed apparatus allows us to visualize the structural and functional changes of molecular machines. By using high-pressure microscopy, we have developed a novel technique that controls the molecular machines working in living cells. The developed technique successfully demonstrated that application of pressures can increase the activity in living cells.

研究分野：生物物理

キーワード：高圧力顕微鏡 水和 分子間相互作用 分子機械 細胞活動の活性化

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内に含まれる物質のうち、実に7割は水分子であり、生体分子の周囲をぐるりと取り囲んでいる。細胞内にある物質の中でも、タンパク質は圧力の影響を受けやすい物質の代表例であり、周りを取り巻く水分子との相互作用により、複雑な立体構造を形成し、機能発現を行っている。これまでの研究により、静水圧を利用することで、タンパク質と水との相互作用が変化することが明らかにされてきた。これまでの研究により、概ね 100 MPa、つまり私達が日常生活を過ごす大気圧環境 (0.1 MPa) の約 1,000 倍の圧力をかけると、分子間の結合力 (静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合など) が弱まり、分子構造や機能活性が変わることが明らかにされている。

研究代表者は、高圧力を用いた分子操作の可能性に着目し、細胞内の化学反応過程を操作できる新しい実験系の開発に取り組んできた。過去の研究では、高圧力下の光学顕微鏡観察の実施例は少なく、また報告された顕微鏡では耐圧性能と光学性能を両立できていない例が多く見られた。研究代表者は、世界に先駆けて高精細な顕微鏡観察像を取得できる高圧力顕微鏡を開発し、精製したタンパク質分子機械や細菌などの圧力応答を調べてきた (*Biophys J.* 2009, 2012, 2013; *J. Bacteriol* 2013; *PLOS ONE* 2013)。さらに、知的財産権の取得 (特許第 5207300 号)、市販化 (シンコーポレーション製造販売) によるアウトリーチ活動にも務めてきた。

本研究提案に先立ち、研究代表者は代表的な細胞骨格である微小管を人工細胞に封入した後、高圧力をかけながら人工細胞の形態変化を直接観察することに成功した (*Langmuir* 2016)。高圧力では微小管の脱重合が生じ、減圧すると微小管は再重合を開始し、人工細胞は元の形状に戻った。これは、人工細胞に封入した微小管を構成するチューブリン分子は高圧力下で変性する事なく、脱重合と再重合できたことを意味する。この知見を生きた細胞に応用すれば、細胞内ではたらく分子機械を変性させることなく、外から操作できる可能性がある。これは、従来までの生命科学で用いられてきた遺伝子組換えや化学物質を添加することなく、静水圧で細胞の生命活動をコントロールできる可能性を示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が開発してきた高圧力顕微鏡を活用して、人工細胞や生きた細胞に封入した分子機械を操作することで、細胞形態や細胞分化などを操作できる新しい研究手法を開発する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

図 1 に、高圧力顕微鏡の写真を示す。高圧力装置は、顕微鏡観察用の高圧力チャンバー、圧力変換器 (セパレーター)、ハンドポンプ、圧力ゲージおよび、表示器から構成されている。これらの部品を倒立型顕微鏡に組み合わせた。ハンドポンプのレバーを文字通り手で動かすと、圧力媒体である蒸留水が押し込まれ、セパレーター内にある厚さ 0.2 mm のテフロン製の膜を変形させる。このテフロン膜の変形を介して、水圧が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、高圧チャンバー内に封入した実験サンプルに圧力をかけることができる。装置の耐圧性能は 150 MPa であり、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 (~11,000 m) の静水圧 ~110 MPa を上回る。高圧力チャンバーの内部は長作動距離の対物レンズを利用して観察可能であり、多様な顕微鏡観察像を取得できる。

また、高圧力チャンバーの外縁部には流路を設けているので、恒温槽の水を循環させることで、内部の温度をかえることができる。この手法を応用すれば、5~85℃の範囲でチャンバー内部の温度を変えながら顕微鏡観察を実施できる。

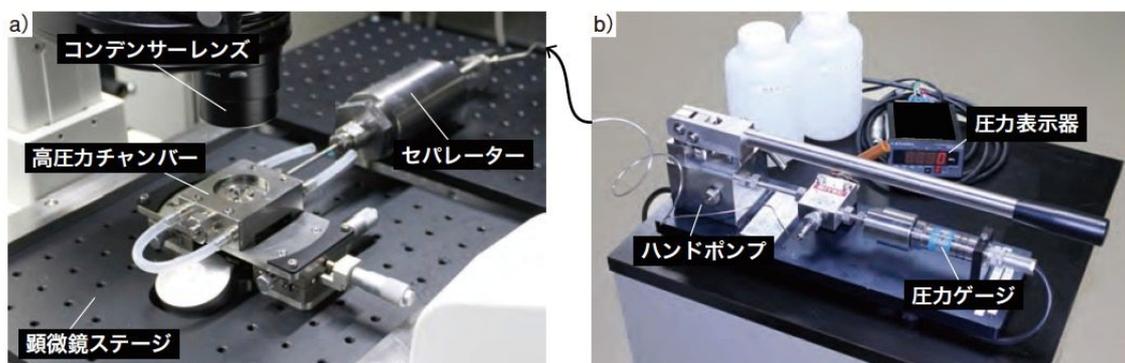


図 1 高圧力顕微鏡 a)倒立型顕微鏡に搭載した高圧力装置。b)ハンドポンプ。

## 4. 研究成果

高圧力顕微鏡法を用いた主な研究成果は下記の通りである。

### ・ミニチュア培養器の開発

高圧力チャンバーに内挿できるミニチュア培養器を開発した。このミニチュア培養器は安価に製作できるため、使い捨てが可能である。さらに誰もが簡単に利用できる仕様となっている。そのため、あらかじめ多数のミニチュアチャンバーに細胞を培養しておくことができる。1台の高圧力チャンバーに、多数のミニチュアチャンバーを入れ替えながら実験することで、実験効率を飛躍的に向上させることができた。

### ・高圧力下にある微小管の重合・脱重合コントロール

人工細胞内に封入した微小管の脱重合反応について、生細胞ならびに抗がん剤で安定化させた微小管と比較することで、高圧力による影響を調べた。解析結果からは、実験系によらず微小管の重合能は高圧力下で直接弱められていることが示唆された。高圧力下で見られた微小管の脱重合反応は、主として両端からのチュープリン分子の解離反応であり、微小管の中央部分での切断により微小管が短縮される頻度は少ないと推察された。

### ・高圧力下での細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度コントロール

細胞は外部からの刺激に応じて、細胞内のイオン濃度を大きく変化させる。このイオン濃度変化にともない、細胞内で駆動する分子機械は駆動様式を大きく変化させることが知られている。ここでは、圧力刺激による細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度変化について、緑藻細胞クラミドモナスの軸系振動を利用して調べた。クラミドモナスは細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度が高くなると、軸系振動の様式を大きく変え、後ろ向きに泳ぐ性質がある。高圧力顕微鏡下でクラミドモナスの軸系振動を高速ビデオ撮影したところ、80MPa では野生株の半分は後ろ向きに泳ぐことが明らかになった。この遊泳運動の逆転現象は、水溶液中の  $Ca^{2+}$ 濃度に依存しないため、高圧力は細胞内にある小胞体などから  $Ca^{2+}$ の放出を誘導し、細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度を上昇させていると示唆された。

### ・高圧力下での歯根膜細胞の観察。

生体内で生理的に生じている高圧力環境を顕微鏡下で再現し、細胞動態を直視する研究を行った。歯根膜細胞は歯と歯槽骨の間に位置し、垂直に配向することで歯を支持している。この咬歯根膜細胞は咀嚼時において細胞を引っ張る力(伸展力)や圧力といった機械刺激にさらされている。これまでの研究により、歯周組織がうける咬合圧は、通常食物摂取時には約10MPa(水深1,000m相当の静水圧)、歯ぎしりにおいてはより大きな圧力が負荷されていると考えられている。この咬合圧は、適当な範囲内であれば細胞の活性化や分化に寄与することが知られているが、生理的な閾値を超えると、炎症性サイトカインの産生などにより歯周組織の炎症や破壊を惹起してしまう。

本研究では高圧力下で歯根膜細胞がどのように力学刺激に応答するのか実時間で可視化する研究を行った。健常な患者から採取した歯根膜細胞を常圧力下で培養し、高圧力下(20MPa以上)で観察したところ、歯根膜細胞の形態変化、および、その内部にあるアクチンストレスファイバーの縮小が見られた。常圧力に戻した後、同じ細胞を観察し続けたところ、基板表面に沿って再び広がる様子が観察された。次に、高圧力下で細胞核の形状を観察した。20MPa以上の圧力下では、細胞核の断面積が時間とともに減少することが明らかになった。この結果は、静水圧が細胞核膜のダイナミクスを大きくかえる可能性が示された。

高圧力下での細胞核膜輸送のダイナミクスが変わりうることを示されたので、細胞核膜の内外を行き来する転写因子 FoxO3a の局在イメージングを行った。常圧力下では、FoxO3a は核内及び、細胞質側にわたって一様に分布していたのに対して、高圧力では FoxO3a の核内局在化が観察された。免疫染色でも同じ結果を確認できた。

### ・高圧力による線虫の寿命を延ばす実験

歯根膜線維芽細胞で得られた知見を元にして、生きた線虫に静水圧をかける実験を行った。生きた線虫においても、老化抑制に関与する転写因子 FoxO3a が細胞質側から核内への移行がみられた。この転写因子 Foxo3a には、核内局在により老化を抑制するはたらきがある。生きた線虫に1日1度静水圧をかける実験を行ったところ、寿命が延びることを確認できた。

以上のように、本研究活動を通じて、高圧力技術を用いることで生きた細胞内で繰り広げられる生命活動をドラスティックに生命活動を操作できることを示すことができた。何より重要なのは、高圧力下で生じている現象を実時間で観察することで、重要な知見が次々に得られたことである。今後も高圧力を用いた生命活動操作技術の開発を継続し、圧力による活性化を通じて、新しい医療技術の芽を育むことができるように努めていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hata H., Nishiyama M. & Kitao A.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Molecular dynamics simulation of proteins under high pressure: Structure, function and thermodynamics.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.07.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yagi T. & Nishiyama M.	4. 巻 10
2. 論文標題 High pressure induces vigorous flagellar beating in Chlamydomonas paralyzed-flagella mutants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58832-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hata H., Nishihara Y., Nishiyama M., Sowa Y., Kawagishi I. & Kitao A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Pressure-induced Protein-Peptide dissociation simulated by parallel cascade selection molecular dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-59172-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe N., Morimatsu M., Fujita A., Teranishi M., Sudevan S., Watanabe M., Kagi H., Nishiyama M., Naruse K. & Higashitani A	4. 巻 523
2. 論文標題 Increased hydrostatic pressure induces nuclear translocation of DAF-16 / FOXO in C. elegans.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 853-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyotake Y., Nishiyama M., Yokoyama F., Kawamoto J., Ogawa T. & Kurihara T.	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel lysophosphatidic acid acyltransferase of Escherichia coli produces membrane phospholipids with a cis-vaccenoyl group and is related to flagellar formation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 745-12pages
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama Masayoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Controlling the Motility of ATP-Driven Molecular Motors Using High Hydrostatic Pressure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Role of Water in ATP Hydrolysis Energy Transduction	6. 最初と最後の頁 325 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-10-8459-1_19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西山雅祥, 金井保, 竹川宣宏	4. 巻 96
2. 論文標題 細菌の祖先がもつ運動マシナリーを現代に蘇らせる	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 11-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Sotaro, Masanari-Fujii Misa, Kobayashi Shinya, Kato Chiaki, Nishiyama Masayoshi, Harada Yoshie, Wakai Satoshi, Sambongi Yoshihiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Commonly stabilized cytochromes c from deep-sea Shewanella and Pseudomonas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 792 ~ 799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1448255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takiguchi K., Hayashi M., Kazayama Y., Toyota T., Harada Y. & Nishiyama M.	4. 巻 41
2. 論文標題 Morphological Control of Microtubule-Encapsulating Giant Vesicles by Changing Hydrostatic Pressure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 288 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama M. & Arai Y.	4. 巻 1593
2. 論文標題 Tracking the Movement of a Single Prokaryotic Cell in Extreme Environmental Conditions.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 175 - 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-6927-2_13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 High-pressure microscopy for tracking dynamic properties. of molecular machines.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysical Chemistry	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpc.2017.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西山雅祥, 瀧口金吾, 林真人	4. 巻 51
2. 論文標題 高圧力顕微鏡法による微小管のダイナミックコントロール	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 118 - 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 10件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Nishiyama M.
2. 発表標題 Pressure-induced activation of the cell motility
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口陽平, 西山 雅祥, 甲斐 寛彬, 入部玄太郎, 成瀬恵治, 森松 賢順
2. 発表標題 High hydrostatic pressure induces cardiomyocyte contraction
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 Mechanical stress modulates the homeostasis of periodontal ligament
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishiyama M., Yagi T.
2. 発表標題 Viewing the rhythmical beating motion of paralyzed-flagella mutants of Chlamydomonas at high-pressure
3. 学会等名 HPBB2018(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishiyama M.
2. 発表標題 High-pressure microscopy for controlling molecular machines in living cells.
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) 2018, Siem Reap, Cambodia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 雅祥
2. 発表標題 静水圧を用いた細胞活動の活性化イメージング
3. 学会等名 同志社大
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 ヒト由来歯根膜細胞の力学刺激応答イメージング
3. 学会等名 第78回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 メカノストレスによる歯周組織リモデリング機構の解明
3. 学会等名 第55回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 高圧力顕微鏡を用いたヒト由来歯根膜細胞の実時間観察
3. 学会等名 特殊環境微生物セミナー2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 高圧力顕微鏡法を用いたヒト由来歯根膜細胞の動態イメージング
3. 学会等名 第58回高圧討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田彩乃, 森松賢順, 西山雅祥, 高柴正悟, 成瀬恵治
2. 発表標題 咀嚼時に高圧力が負荷されるヒト由来歯根膜細胞を可視化する
3. 学会等名 2018年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujita A., Morimatsu, M., Nishiyama M., Takashiba S., Naruse K.
2. 発表標題 EFFECTS OF MECHANICAL STRESS ON PERIODONTAL LIGAMENT
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 高圧力顕微鏡を使った生体運動イメージング
3. 学会等名 Bio-Divセミナー（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 高圧力顕微鏡法による細胞構造コントロール
3. 学会等名 第55回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 高圧力顕微鏡を用いた深海微生物の運動観察
3. 学会等名 第6回分子モーター討論会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishiyama M.
2. 発表標題 High-pressure microscopy for controlling the dynamics of microtubule cytoskeleton
3. 学会等名 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishiyama M., Kato c., Imai H.
2. 発表標題 Microscopic analysis of the swimming motility of deep-sea bacteria at high pressure.
3. 学会等名 5th International Workshop on Deep-Sea Microbiology, Kyoto (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 高静水圧環境の分子ダイナミクスを直接みる
3. 学会等名 第59回日本顕微鏡学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishiyama M.
2. 発表標題 High-pressure microscopy for controlling molecular machines in living cells.
3. 学会等名 第54回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西山雅祥
2. 発表標題 生きた細胞内で働く分子機械を高圧力顕微鏡法でみる
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nishiyama M, Hayashi M., Takiguchi K. & Harada Y.
2. 発表標題 REVERSIBLE MORPHOLOGICAL CONTROL OF TUBULIN-ENCAPSULATING GIANT LIPOSOMES BY HYDROSTATIC PRESSURE
3. 学会等名 61st Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西山雅祥	4. 発行年 2017年
2. 出版社 養賢堂	5. 総ページ数 59-62
3. 書名 高圧力顕微鏡法によるタンパク質分子機械の回転制御 (書名: 高度物理刺激と生体応答)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>1. 番組撮影協力。NHKスペシャル「超深海地球最深への挑戦」(2017年8月27日)</p> <p>2. 論文 (Yagi&amp;Nishiyama, 2020) に関して、プレスリリースを発信 (県立広島大学、近畿大学)。Webでの転載記事は52件確認できた。</p> <p>3. 論文 (Yagi&amp;Nishiyama, 2020) に関して、Jonathon Howard教授 (Yale Univ., USA) がFaculty 1000 Primeに推薦して下さる。</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森松 賢順  (Morimatsu Masatoshi)  (70580934)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教   (15301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	上之家 由美子  (Kaminoe Yumiko)		