

解 説

生物分子モーターのナノ操作と動作原理

原田 慶恵*・齋藤 実*・石島 秋彦**,***・柳田 敏雄*,***

* 新技術事業団生体運動子プロジェクト 〒562 箕面市船場東 2-4-14

** (株)本田技術研究所和光研究センター 〒351-01 和光市中央 1-4-1

*** 大阪大学基礎工学部生物工学科 〒560 豊中市待兼山町 1-3

(1994年2月21日受理)

Nano-Manipulation of Bio-Molecular Motor and Its Working Principle

Yoshie HARADA,* Kiwamu SAITO,* Akihiko ISHIJIMA*,** and Toshio YANAGIDA*,***

* Bio-motron Project, ERATO, JRDC, 2-4-14, Senba-Higashi, Mino 562

** Wako Research Center, HONDA R & D Co. Ltd., Wako 351-01

*** Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science,
Osaka University, Toyonaka 560

1. はじめに

最近マイクロニードルやレーザービームを使って、蛋白質分子を直接顕微鏡下で観察しながら、サブナノモーター、サブミリ秒の精度で操作する分子直視・分子操作技術が開発され大きな関心をよんでいる。これらの技術は、主に生物分子モーターの研究分野で発展してきたもので、1分子の動き、力を直接計測することができるところまでできている。これまで、触れることはもちろん見ることもできないと思われていた分子の世界であったが、これらの技術の進展で、今やマクロ機械と同じような感覚で分子機械を研究することが可能になりつつある。本稿では、この分子直視・分子操作技術を使った分子モーターの研究について述べる。

筋収縮など生体運動の多くは、ATPの化学エネルギーで駆動されるアクチンとミオシンからなる分子モーターによって引き起こされる(図1)。しかし、膨大な数の研究にもかかわらず、その分子メカニズムはまだよくわかっていない。この問題の解明が難しいのは、おそらく分子モーターのメカニズムが人工機械のアナロジーから予測されるような単純なものではないためであろう。分子モーターはナノモーターオーダーの大きさしかなく、柔らかな構造をしているために、強烈な熱振動にさらされている。したがって、分子モーターは熱ノイズに埋もれて働いていることになる。それにもかかわら

ず、分子モーターは、最大50%以上という非常に高いエネルギー変換効率で働いている。このように柔らかさと高い効率を合わせ持つ分子モーターは、人工機械が熱振動から逃れるためにある程度の大きさと硬い構造を必要とし、平均熱エネルギーから大きくかけ離れた大きなエネルギーをつぎ込んで初めて効率よく作動するのとは対象的である。言い替えれば、蛋白質分子モーターは人工機械とは基本的に異なる巧みな原理で働いていることが想像される¹⁾。

これまで、分子モーターのメカニズムの研究は筋肉細胞や精製した蛋白質の懸濁液などの巨視的な実験系を用いて行われてきた。しかし、これらの系には、莫大な数の蛋白質分子が含まれており正確な情報を得るにはおそらく複雑すぎる。分子モーターの動きに直接アプローチする新しい研究方法の開発が必須である。これを目的として、筋肉から抽出、精製したモーター蛋白質から *in vitro* で運動を再構成するいろいろなモデルが考案されてきた。そのなかで、最近最も注目を浴びているのが、蛍光標識したアクチンフィラメント一本を直接蛍光顕微鏡で観察し、ミオシンとの相互作用で引き起こされる滑り運動を測定できる *in vitro* 運動再構成モデルである。このモデルにおいて、さらに、アクチンフィラメントをマイクロニードルやレーザービームで操作することにより個々のミオシン分子の運動と力をそれぞれサブナノモーター、サブピコニュートンの分解能で測定できる

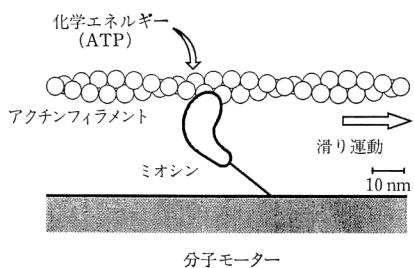


図 1 アクトミオシン分子モーター

アクトミオシン分子モーターは、アクトミオシン複合体がアクトミオシン分子とアクトミオシン分子との間でATP分解エネルギー（化学エネルギー）を使ってアクトミオシン分子とアクトミオシン分子との相互作用によって引き起こされる。

技術も最近開発された。これにより、分子モーターの動作に直接アプローチする道が拓かれた。

2. 分子モーターの再構成と直接観察

蛋白質は水溶液中でのみ生きているので、その観察には光学顕微鏡を使う必要がある。しかし、顕微鏡の分解能は光の回折で制限 ($\geq 0.2 \mu\text{m}$) され、蛋白質分子またはその小さな集合体を見るには不十分である。そこで、色々な工夫がなされてきた。最も有効な方法は、強力な蛍光色素でそれを標識し、強力な光でそれを励起し蛍光像を高感度カメラで記録することである。計算の上では、市販の高感度カメラを使って集合体ではなく1分子の観察も可能である。しかし、蛍光標識による蛋白質の機能への影響や、強力な光で励起したときの色素の退色、そこで発生する活性化酸素などによる蛋白質の変性の問題があり、実際の観察は容易ではない。我々は単一アクトミオシン分子を、その分子構造を安定化するファロイジン（分子量700の環状ペプチド）と強力な蛍光色素であるテトラメチルローダミンとの複合体で標識することにより、その機能をほとんど失うことなく、長時間、安定に観察できることを明らかにした。これにより、ATP存在下でミオシン分子と相互作用している最中のアクトミオシン分子の動きを直接観察することが可能になった（図2(a))²⁾。

この方法を使って、アクトミオシン分子の屈曲運動がATPを含む溶液中でミオシンのサブフラグメント(HMM, S-1)と相互作用中に変化するという興味深い結果が示された。しかし、筋肉内で起っているであろうアクトミオシン分子の一方向性の運動は見られなかっ

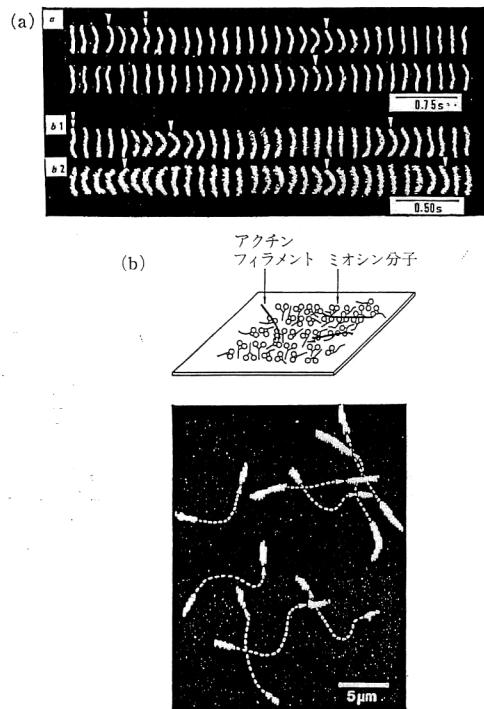


図 2 単一アクトミオシン分子モーターの直接観察と運動再構成

a) アクトミオシン分子モーターは蛍光色素と環状ペプチド（ファロイジン）の複合体で標識し、強力な光源で励起しその蛍光像を高感度TVカメラ(SIT)で観察したもの。上2列は、アクトミオシン分子の熱屈曲運動を0.15秒ごとに撮ったもの、下2列は、ATP存在下でミオシン相互作用中の運動を0.1秒ごとに撮ったものを示す。b) 運動再構成モデル。ウサギの骨格筋から抽出・精製したミオシン分子を変性しないように化学処理したガラス表面に固定し、そこに蛍光標識したアクトミオシン分子をATP存在下で加えると、筋肉内で起きているのと同じ滑り運動が顕微鏡下で観察される（上）。下の写真は1.5秒間隔で撮った写真を重ねたもの。

た。その後、ミオシン分子または、そのサブフラグメント(HMMやS-1)を基板に固定すると、それに沿ってアクトミオシン分子が筋肉中と同じくらいの速度で一方向に運動することが示された（図2(b))^{3,4)}。こうして、分子モーターの動きを顕微鏡下で直接追跡することが可能となった。

3. 分子モーターのナノ操作とピコニュートン張力の測定

次に、アクトミオシン分子一本をマイクロニードルで操作し、分子モーターの動き、力をナノメーター、ピコニュートンの精度で直接測定できる高感度測定装置に

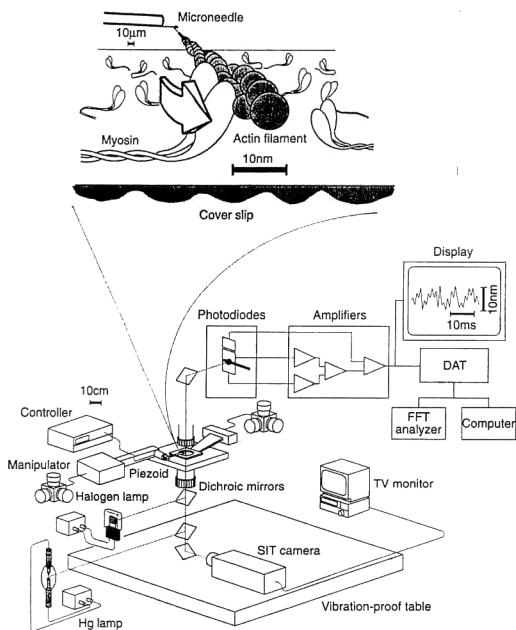


図3 分子モーターの超微操作とサブナノメーター変位計測システムの概略図

蛍光顕微鏡下で、蛍光標識した一本のアクチングリメントの一端を微小ガラス針でとらえ、もう一端をミオシンをコートしたガラス表面に接触させる。そこで生じた運動、力をガラス針の変位を測定して決める。ガラス針の変位は、図の計測システムにより 0.1 nm (約 0.05 pN に相当する), 0.2 ms の精度で検出される。

について説明する(図3)⁵⁾。粘性抵抗と慣性による時間分解能の劣化を抑えるため、直径約 0.2~0.3 μm、長さ 50~70 μm のガラスマイクロニードルを用いた。このマイクロニードルを太く固い支持棒に付け、それをピエゾアクチュエーターと水圧型メカニカルマニピュレーターにつなぐ。ピエゾアクチュエーターとメカニカルマニピュレーターを用いることにより、数 mm から 0.1 nm 以下の広い範囲でニードルを操作することが可能である。分子モーターによる運動と力の測定は、ニードルの変位から測定するが、変位は下記のような電子計測を行うことにより非常に高い分解能で決められる。

ガラスニードルの絶対位置は、光学顕微鏡を用いる限り回折限界により使用している光の波長の 2 分の 1 程度 (200~300 nm) の精度でしか決めることはできない。しかし、その変位はこの限りではない。例えば、ガラス針の像を二つの光検出器の中央に投影し、その変位を二つの検出器の光強度の差としてとらえると、波長の 1000 分の 1 以下の変位もとらえることができる。

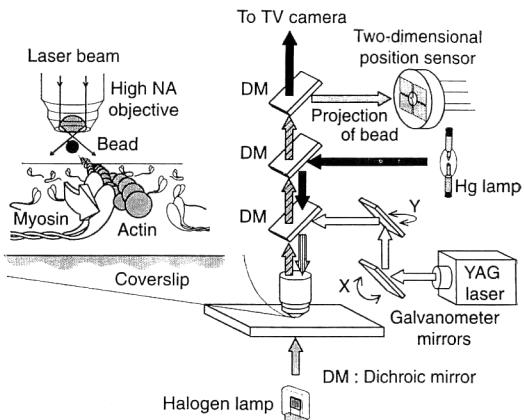


図4 光ピンセットによる分子モーターの操作とナノメーター変位計測

アクチングリメントを操作するニードルの先端にコントラストをあげるために、直径約 1 μm のニッケル粒子をつけ、それを安定化したアクチングリメントのじゃまにならない波長 (~750 nm) の光で照射し、その透過像を 2 分割のホトダイオードに投影する。二つの光电流を電流電圧変換し差動アンプを通して、その差出力をデジタルデータレコーダーに記録し、FFT アナライザ、コンピューターで解析する。ピエゾアクチュエーターでガラス針に 0.08 から 200 nm の範囲で変位を与えたとき、差出力は直線的に変化し、0.1 nm 以下のガラス針の変位も検出できることが示された。この変位は、ガラス針の曲げの弾性率が pN/nm のオーダーであることを考慮すると、~0.1 pN の力に相当する。また、急激な変位をニードルの根元に与えたときの先端の位置の変化から、0.2 ミリ秒の動きにニードルが追従することも示された。アクチングリメントと相互作用して滑り運動を引き起こすミオシン頭部の大きさは 10~20 nm、最大の発生力は数 pN そして ATP 加水分解のサイクル時間は数ミリ~数十ミリ秒であるから、この装置の分解能は、ATP 加水分解反応に共役した個々のミオシン頭部の動き、力の時々刻々の変化を追跡するのに十分である。

4. 光ピンセットによる分子操作(図4)

光ピンセット法は、単一レーザービームを集光して誘電体粒子に照射した時粒子が放射圧勾配にしたがって力を受けることを利用し、それを捕捉、操作するものである^{6,7)}。これは、レーザーによる原子分子の捕捉、冷却技術から発展してきたもので、25 nm から 100 μm の大きさの粒子に適用できる。最近、近赤外のレーザーを用いると、細胞や生体試料をほとんど損傷を与えることな

く捕捉できることが示され、生物試料の非接触操作法として大きな関心を集めている。しかし、直径約7 nm のアクチンフィラメントは小さすぎるため、光ピンセットでは直接捕捉することはできない。そこで、まずレーザービームで直径1 μm 程度のポリスチレンラテックスビーズを捕捉し、それにモーター蛋白質を付けて操作する。図4はその装置を示している。100 mW のパワーで～50 pN の捕捉力が得られた。これは、ミオシン1分子の発生する最大の力が数 pN であることを考慮するとかなり大きな力である。

マイクロニードルの場合と同様にアクチンフィラメントの一端をレーザーでトラップしたビーズでとらえ、もう一端をガラス表面に固定したミオシンと相互作用させる。ビーズに水平方向の力が加わると、ビーズの中心がレーザービームの中心からずれ、力はおおよそそのずれに比例する。それ故、ビーズの変位を高分解能で計測すれば、分子モーターの運動、力をニードルの時と同様にナノメーター、ピコニュートンの精度で計測できる。

5. 張力ゆらぎのノイズ解析と單一分子モーターの直接張力計測

この装置を使って、少數(<10)のミオシン分子による張力ゆらぎを測定した。ゆらぎのノイズ解析は、生体膜のイオンチャネルの電流ゆらぎの解析で示されたように、個々の分子のキネティックな性質を調べるには非常に強力な方法である。これまで、筋線維や筋原線維を使って張力ゆらぎやミオシン頭部につけた蛍光ラベルの偏光蛍光のゆらぎの測定が試みられたが、そこに含まれるモーター分子の数が多く、またそれらが複雑な構造に組み込まれていたために信号の平均化が起こり、詳しい解析を可能にするような明確なゆらぎは測定できなかった。しかし、力発生に含まれるミオシン分子の数を数個にまで減らせる *in vitro* 運動モデルと高感度張力測定装置の開発は、個々のモーター分子由来の大きさ張力ゆらぎの測定を可能にした。すなわち、個々の分子モーターの力発生過程に直接アプローチできるようになったのである。

図5Aに張力ゆらぎの一例が示されている⁵⁾。これは、アクチンと相互作用するミオシン頭部の数を比較的少なくし、ガラス針による負荷を大きくし、ガラス針の変位が少ししか起こらないようにした時、すなわち等尺条件に近い状態での記録である。上向きの矢印で、アクチンフィラメントの一端がミオシンを敷いたガラス表面に接触し力を発生している。力発生に含まれるミオシン頭部の

数が少ないので大きなゆらぎが観察されている。矢印より前のゆらぎは、フリーのガラス針の熱振動である。張力ゆらぎのパワー密度スペクトルは、低い周波数で一定、高い周波数では $1/f^2$ に比例して減少するローレンツ型になった。また、張力ゆらぎの2乗平均は平均張力に比例していた。これらの性質は、ミオシン頭部が力ゼロまたは非常に小さい状態と比較的大きな力を発生する二つの状態を個々独立に確率的にとっていることを示している。それ故、データはミオシン頭部がオフ(力=ゼロ)とオン(力=F)の二つの状態をランダムに確率的にとる2状態モデル(図6a)で解析された。力発生状態には複数の力の異なるサブステイトがあり、一つのオン状態でも力は一定でないかもしれないが、ATPの加水分解反応に共役した分子モーターの力発生過程のアウトラインを調べる目的には、2状態モデルは十分良い近似であろう。解析の詳細は原著または専門書にゆずるが、この解析によって、ミオシン頭部がオンそしてオフ状態に入る速度定数、オン状態にいる割合、ATP 分解サイクル中に起こるオン-オフサイクルの回数、ミオシン頭部一つが発生する力といった基本的パラメータが求まる。結果を要約すると、ミオシン頭部は8.4/秒の速度でオン状態に入り、23/秒の速度でオフ状態に戻り、オン状態にいる割合は約40%である。このオン-オフサイクルは1 ATP 分解サイクルに1回起こる。オン状態の(平均)力は5～6 pN で、オン-オフ 1 サイクルで平均した力は 2.3 pN である。

アクチンフィラメントと相互作用するミオシン分子の数を極端に減らすと、図5Bのように、パルス状の力が発生する。この力パルスの性質は、多分子による力ゆらぎのノイズ解析から導かれる個々の分子の性質とよく一致した。すなわち、1分子のミオシンによる力、変位が直接計測されていることを示している。1化学反応(ATP 分解反応)に共役したアクトミオシン分子モーターの動きを直接記録したのはこれがはじめてである⁸⁾。

相互作用するミオシン頭部の数を増やすと、アクチンフィラメントがミオシンコート表面に接触した時、それに沿って滑走し、ガラス針が大きく変位する(図5C)。図右下に滑走している部分のゆらぎ(平滑曲線からのずれ)を時間スケールを引き伸ばして示してある。左のゆらぎはガラス針のみの熱振動である。真の力ゆらぎは、右のゆらぎから左を差し引いたものになるので、図から明らかのように、滑走中の力ゆらぎはほとんどないことを示している。この例では、平均滑走速度は約2 μm/s(無負荷時の最大速度の約25%)であったが、1 μm/s 以

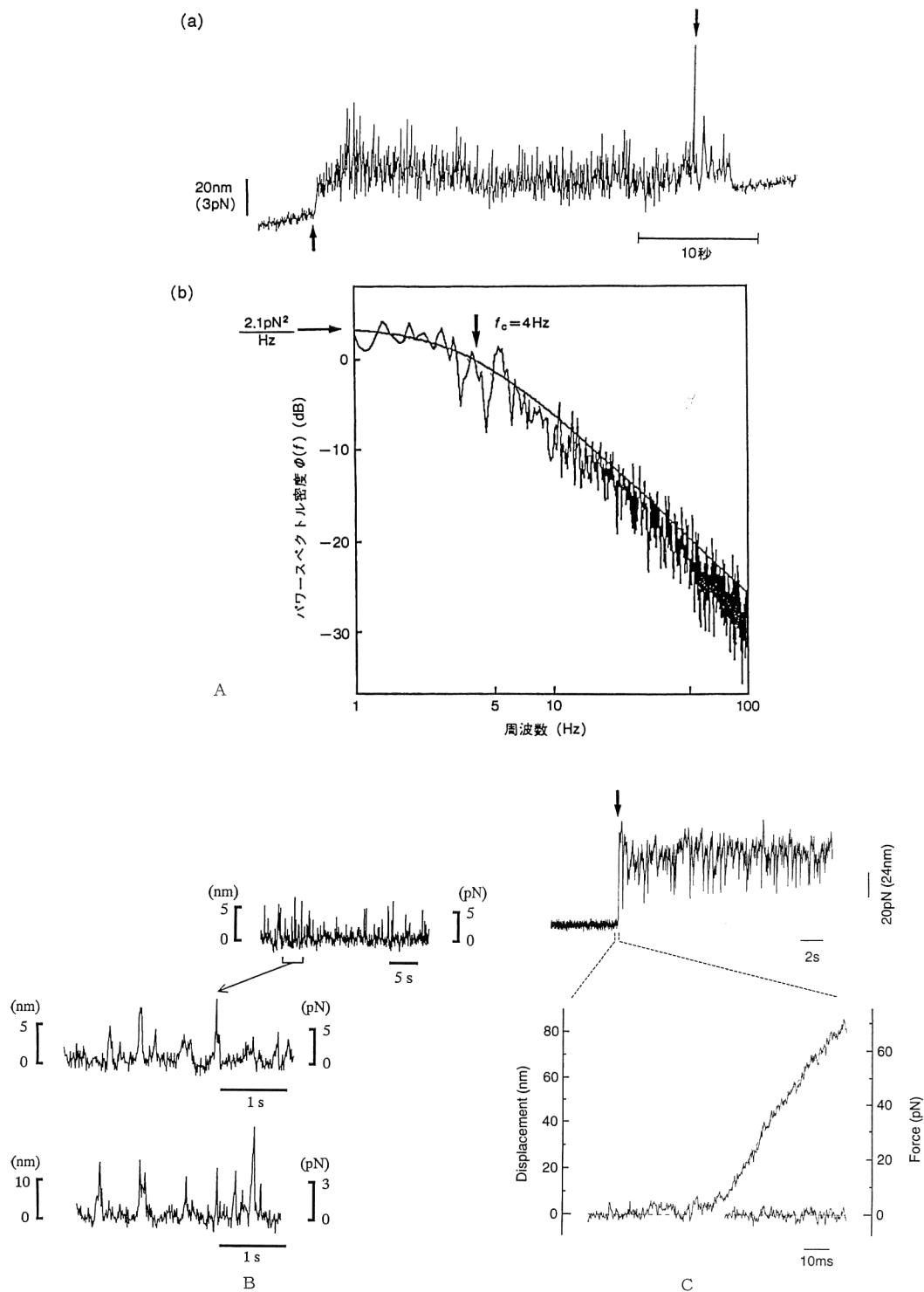


図 5 多分子モーターと単一分子モーターによる張力発生

A) 多分子モーターによる張力ゆらぎとパワースペクトル。B) 単一分子モーターによる張力。負荷の大きい時（上）と中程度（下）の時の張力パルス。パルスは、ミオシン1分子によって引き起こされた力（変位）に対応している。C) 滑走中の張力ゆらぎ。

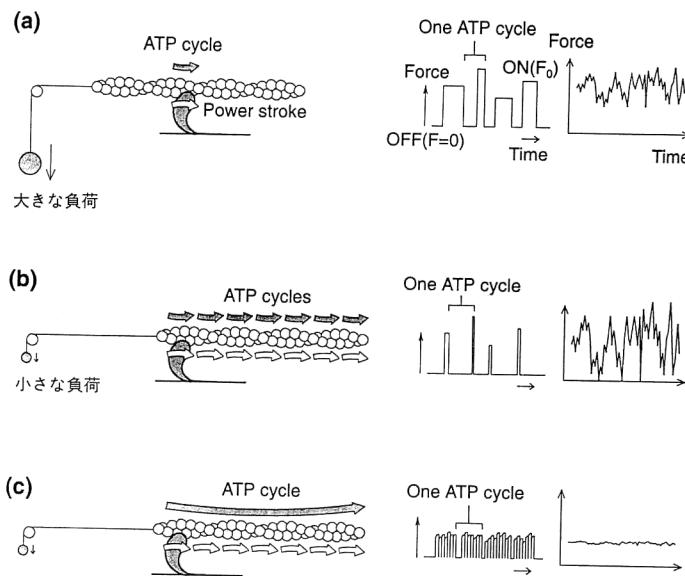


図 6 新しいアクトミオシン分子モーターの動作原理
 (a) 負荷が大きく等尺条件に近いときは、分子モーターは ATP の化学エネルギーを一気に使って大きな力（パワーストローク）を発生する。
 (b) これまでのモデル。負荷の大きさに関係なく、ATP 分解サイクルとパワーストロークが 1 : 1 に厳密に結合している。(c) 新しいモデル。ATP サイクルとパワーストロークの回数は、負荷に応じて柔軟に変化する。負荷が減り、ある程度の速度になると、ATP のエネルギーを小出しにして何回もパワーストロークをくり返し、効率よく滑らかに大きな変位をひき起こす。中央と右のレーンは、それぞれ、オン・オフ 2 状態モデルでの一つのミオシン頭部の力発生の時間経過と複数のミオシン頭部が含まれるときの力ゆらぎ（コンピュータシミュレーション）を示す。

上の速い速度で同様の結果になり、 $0.2 \mu\text{m}/\text{秒}$ 以下では等尺状態と同程度の大きなゆらぎが見られた。このように、ある程度の速度以上になると力ゆらぎが減るという大変興味深い結果となった。これは、アクトミオシン分子モーターが負荷が大きい時と小さい時で、ATP 分解サイクルとパワーストロークサイクルの共役を柔軟に変えることができるることを強く示唆している（図 6）。

6. 新しいアクトミオシン分子モーターの運動メカニズム

このように、分子モーターは負荷や速度に応じて化学反応と力学反応の共役を自ら調節できることが明らかになってきた。もし、これが正しいとすると ATP の加水分解エネルギーはいったんミオシン頭部に蓄えられ、小出しにして多くのパワーストロークサイクルを引き起こすのに使われることになる。そうすると、1 回のパワーストロークサイクルで使用されるエネルギーは 1 分子の ATP 加水分解エネルギー（約 20 k_{BT} ）の 10 分の 1 以下になることもある。それゆえアクトミオシン分

子モーターは入力エネルギーレベルが平均熱ノイズレベル (k_{BT}) であっても最大 50% 以上という高いエネルギー変換効率で働く非常に巧妙な機械ということになる。しかし、物理的観点からすると、小さな蛋白質分子が、エネルギーを蓄えそれを長時間（数ミリ秒以上）小出しに使うのは非常に難しい。それは、ある安定な状態に貯めたエネルギーを仕事に使う時、一気に使わないと、溶液中の分子との衝突や蛋白質分子内で熱振動している原子との相互作用によって、熱として非常に短時間（おそらくナノ秒以下）に放出されてしまう可能性が大きいと考えられるからである。このエネルギー小出しのメカニズムを説明するためには、おそらく全く新しい概念が必要であろう。このように、アクトミオシン分子モーターの研究は、ATP の加水分解エネルギーがどのように小出しにされ多くのパワーストロークを引き起こすのか、どうして、強烈な熱振動にさらされているミクロでやわらかい分子モーターが平均熱エネルギーと大差ない入力エネルギーを高い効率で力学エネルギーに変換できるのかを調べる挑戦的で刺激的な問題に発展してき

た¹⁾.

ここでも直接観察、超微操作技術を使った分子モーターの動態の研究は重要情報を与えてくれると期待され、さらなる技術の開発が望まれる。さらに、動態を計測するだけでなく、分子の運動を外部から選択的に変調し滑り運動に変化を与えることができれば、問題解決に大きな糸口を与えるであろう。我々は、いま、通常光でない特殊な光（エバネッセント光）を使った光ピンセット法による分子操作、ブラウン運動の制御の可能性を探っている⁷⁾。また、最近アクチン、ミオシン頭部の結晶構造が原子レベルで解かれ、詳細な構造学的アプローチも可能になっており、この問題の解決はここ数年で飛躍的に進むものと期待される。

文 献

- 1) T. Yanagida, Y. Harada and A. Ishijima: TIBS 18 (1993) 319-324.
- 2) T. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama and F. Oosawa: Nature, 307 (1984) 58-60.
- 3) S.J. Kron and J.A. Spudich: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 (1986) 6272-6276.
- 4) 柳田敏雄、原田慶恵：蛋白質 核酸 酶素, 34 (1989) 1784-1792.
- 5) A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada and T. Yanagida: Nature (Lond.), 352 (1991) 301-306.
- 6) A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm and S. Chu: Opt. Lett., 11 (1986) 288-290.
- 7) 斎藤 実、青木高明、柳田敏雄：蛋白質 核酸 酶素, 1994, 印刷中。
- 8) A. Ishijima, Y. Harada, H. Kojima, T. Funatsu, H. Higuchi and T. Yanagida: Biophys. Biochim. Res. Commun., 199 (1994) 1057-1065.