

## 生体分子1個のイメージング、ナノ操作

石島秋彦

最近、筆者らは蛍光色素分子1個を水溶液中で直接実時間イメージングする顕微鏡を開発した。これにより、蛍光標識したタンパク質やDNAなど生体分子1個の動きや構造変化、そして化学反応を直接実時間で見ることが可能になった。また、見るだけでなく、プローブやレーザーを使って生体分子に触れナノモーターの精度で操作することもできるようになった。こうして、ナノモーターサイズの生体分子1個が化学反応を伴って仕事をする現場を、まるでマクロな人工機械を調べる感覚で捉えることが可能になった。ここでは、これらの技術を生体運動を担っているタンパク質分子モーターに応用した例を示し、生体分子機械のやわらかな働きのしくみについて議論する。

タンパク質でできた分子モーターがどのような分子メカニズムで動き、仕事をしているのか、膨大な数の研究者が数十年にわたって研究してきたにもかかわらず、まだよくわかっていない。以前は、主に筋肉細胞やそれから抽出した運動タンパク質の懸濁液を用いて研究された。しかし、これらの実験系には多くのタンパク質分子が含まれるので、一つ一つのタンパク質の振舞いを推論するのは至難の技であった（たとえば、直径50 μm、長さ1 mmの筋肉細胞には数兆個の運動タンパク質が含まれている）。未知の機械のしくみを知ろうとするとき、われわれはまず、その動きをよく観察し、触れて調べるであろう。見ることも、触ることもしないでその仕組みを解明するには生体分子機械は複雑すぎる。そこで筆者らは、1個の分子モーターを直接見て、それに触れる

方法を開発することにした。しかし、人工機械なら簡単にできるこれらのことでも大きさが数nmしかなく、しかも、水溶液中で活動するきわめてデリケートな分子モーターを相手にするときは、全く新しいテクノロジーの開発が必要である。

最近、蛍光標識したタンパク質分子1個を水溶液中で生きたまま直接見ながら、それを非常に繊細なニードルやレーザーで捉え操作し、タンパク質の動きや力をナノメートル、ピコニュートン（100億分の1g重）の精度で測定するというすばらしいテクノロジーが開発された。そして、化学反応と運動・力発生の過程を、1分子のレベルで直接見ながら、分子モーターが化学エネルギーをどのようにしくみで運動に変えているのかを調べるという夢のような研究が可能になった。

### 1. 分子モーターを研究するための新しいテクノロジー 1.1 蛍光分子1分子を見ることによってタンパク質1分子が見える

分子や原子といった小さな物体の観察には、これまで電子顕微鏡が使われてきた。しかし、この方法では水溶液中で動いているタンパク質分子を直接見ることはできない。生きたタンパク質分子を直接見るために、水溶液中でナノメートルサイズの物体を観察するという新しい方法を開発しなくてはならない。水溶液中の観察には光学顕微鏡を使うしか方法がない。コントラストの低いタンパク質を見るために、暗視野や微分干渉など数々のコントラストをあげる努力がなされてきた。しかし、タンパク質分子を見るにはまだ不十分であり、しかも目的以外の物質も検出してしまう。それゆえ、これまでには、タンパク質分子の動きを直接見ることはできなかっ

科学技術振興事業団柳田生体運動子プロジェクト（〒562 箕面市船場東 2-4-14)  
E-mail: ishijima@yanagida.jst.go.jp

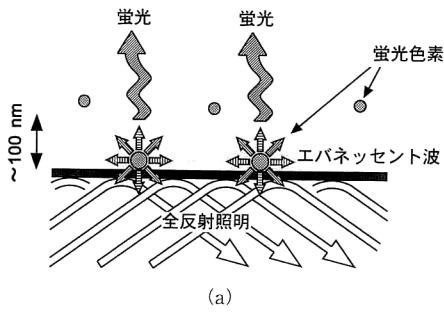
たのである。

しかし、遠く離れた星も夜空で輝いていれば、その形まで見ることはできないが、輝点として見ることができる。筆者らは、この原理を使って、タンパク質分子を光の点として見ることにした。まず、タンパク質分子を光らせるために蛍光色素分子1個を結合させる。そして、強力なレーザー光源で照明すると、高感度カメラで十分検出できるだけの蛍光が発せられ、その蛍光像を撮影できるはずであった。しかし、実際は、散乱光やごみなどによる背景光が見たい蛍光色素分子の蛍光の何十倍何百倍もあり、通常の蛍光顕微鏡では星間に星を見ているような状態で何も見えなかった。背景光の大部分は、強力

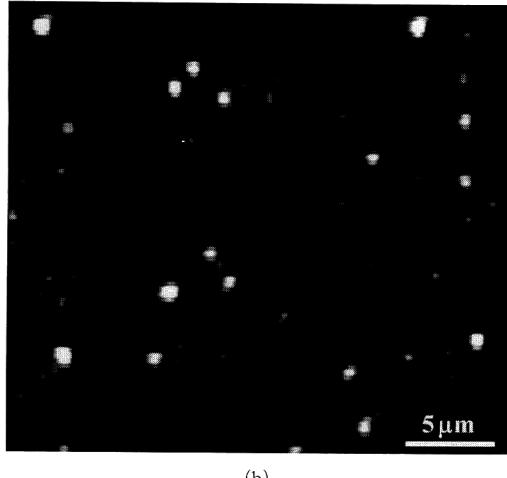
なレーザーで広い範囲を照明することによるもので、見たいタンパク質分子とそのごく近傍だけを照明すれば、背景光は大きく抑えられるはずである。そこで、筆者らはレーザーをガラスと水溶液の界面で全反射させたとき、ガラス表面にできるエバネセント波と呼ばれる特殊な光を用いた。このエバネセント場は表面から100 nm程度までにしか局在しないので、蛍光分子近傍のみを励起することになり、背景光を大きく抑えることができる(図1a)。このほか、ガラス、フィルター、レンズ、イマージョン油等を注意深く選択することで、最終的に背景光を市販の蛍光顕微鏡に比べ2000分の1以下(1~2光子/秒)にまで減らした。こうして、初めて蛍光色素1分子を水溶液中で実時間観察することに成功した(図1b)<sup>1)</sup>。

## 1.2 分子モーター1分子の運動を見る

蛍光色素1分子を観察できる蛍光顕微鏡を使って、まずキネシン1分子の運動を直接見た。キネシンという分子モーターは、レール役の微小管から離れることなく連続的に運動すると考えられている。遺伝子工学を使って運動機能に影響を及ぼさないと思われる部位に蛍光色素1分子を結合させたものを用意した。図2に、キネシン



(a)



(b)

図1 1分子蛍光イメージング。a) 原理の説明図。レーザーを臨界角を越えてガラスと水溶液の界面に入射すると、光は全反射され、ガラス表面にエバネセント(消滅)場と呼ばれる特殊な光が発生する。この光は、通常の光と違って水溶液中に伝搬することなく、ガラスの表面のごく近傍にまつわりついている。深さは、100~200 nm しかなく、ガラス表面に存在する蛍光色素とそのごく近傍しか照明しないので、背景光を大きく減少させることができ。b) a)の方法で観察した蛍光色素1分子の蛍光像。ミオシン分子の頭に付けたCy 3と呼ばれる蛍光色素を観察している。露光時間1/30秒。

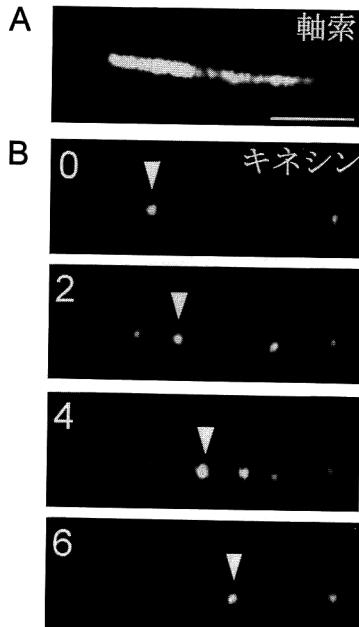


図2 キネシン分子1個の滑走運動。遺伝子工学を使って、キネシン分子の尾に蛍光色素を特異的に結合するアミノ酸(システィン)を導入し、そこに、蛍光色素(Cy 3)を付ける。a) 微小管。b) 図1aのシステムを使って観察した、蛍光標識キネシン分子1個が微小管に沿って滑走運動する様子。数字は時間(秒)。

分子1個が微小管に沿って運動する様子を示す。これは、タンパク質1分子が運動している様子を直接(1分子を、生きたまま、リアルタイムで)見た最初の研究である<sup>2)</sup>。

### 1.3 分子モーターの1分子化学反応を見る

次に、1分子を観察できる蛍光顕微鏡を用いて分子モーターが化学エネルギーを獲得する際の1分子のATP(アデノシン三リン酸)の分解反応過程を直接観察した。ATPの機能が損なわれない部位に蛍光色素分子を結合させ、これがミオシン分子によって分解される様子を見た。図3aに示したように、蛍光ATPを溶液にいれると、エバネセント場領域以外にあるときは、もちろん蛍光を出さないし、もしその領域に入ったとしても、分子の熱運動が速いため、ビデオレートで動くテレビカメラや検出器(アバランシフォトダイオード)の受光面に像を作らず、背景光を均一にあげるだけである。蛍光ATPがガラス表面にあるミオシンや分子に結合する

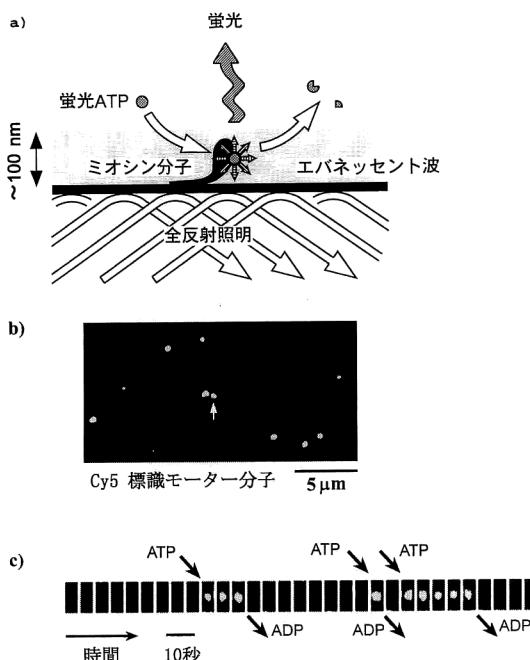


図3 ATP分解反応の1分子イメージング。a) 原理。説明は本文を参照。b) ガラス表面に固定したミオシン分子の蛍光像。ミオシン分子は、Cy 5と呼ばれる色素で標識し、赤色レーザーで照明した。c) b)の矢印で示されているミオシン分子1個に、蛍光性のATP(Cy 3-ATP)が結合解離する様子を示している。Cy 3-ATPは、Cy 5と比べ吸収波長、蛍光波長とも短波長側にあるので、緑色レーザーに切り替え照明し、フィルターを通してCy 3-ATPだけの蛍光像を分離して観察している。

と、そこにとどまるので、受光面に蛍光スポットを作り、そこで加水分解、解離するとその蛍光スポットは消える。このように蛍光スポットのまたたきが、1分子のATPが1分子のモーターテンパク質に結合し、そこで分解され、解離していく過程そのものということになる(図3b, c)。このように、1分子蛍光顕微鏡は、モーター分子1個が1分子のATPを分解する様子を直接見ることを可能にした。

### 1.4 レーザーで分子モーターを操作する: 光ピンセット

分子モーター1個の運動や化学反応を直接観察できるようになったので、つぎはそれをレーザーで捕捉し操作して、力や動きをそれぞれピコニュートン、ナノメートルの精度で測定する技術について説明する。レーザーをレンズで絞ると、焦点では光が集中し光の強度が非常に高くなる。そして焦点から少しでも離れると、光強度は急激に減少する。すなわち、焦点近傍では光の強度の勾配が非常に大きくなる。そこに、透明な球状の小さな物体(正確には直径数μmから数十nmの誘電体)を近づけると、光強度勾配によって吸い寄せられる。これを利用して、レーザービームで物体をつかみ、動かして操作するのが光ピンセットである。近赤外の波長のレーザーを使うので、レーザーメスのように生体を傷つけることはない。タンパク質分子を直接光ピンセットでつかめればよいのであるが、残念ながら小さすぎてそれはできない。そこで、直径1μmから数十nmのマイクロビーズにタンパク質分子の端を特殊なりを使って固定し、マイクロビーズをレーザーでつかみ操作する。

図4aは、レールとなるアクチングリメントの両端をマイクロビーズに付け、ビーズをレーザーで操作しているところを示している。モーター分子であるミオシン分子の運動を測定するときには、ミオシン分子をガラス表面に固定し、アクチングリメントを操作しミオシン分子と相互作用させる。そこで発生する変位や力は、ビーズの動きを高感度で測定することにより決める。

光学顕微鏡で2点を分離できる分解能は光の回折限界の制約を受けるため、数百nmである。しかし、1点の位置の変化の場合は波の回折限界の制約を受けない。測定法は、ビーズの対物レンズで拡大した透過像を4分割のフォトダイオードの中心に投影し、左右または上下に並んだセンサーの光強度の差をとる。ビーズが少しだけ動くと、検出器に拡大して投影された影も動くので、光強度差が変化する。この光強度の差は、マイクロビーズの位置変化に非常に敏感で、原子1個程度の大きさ、

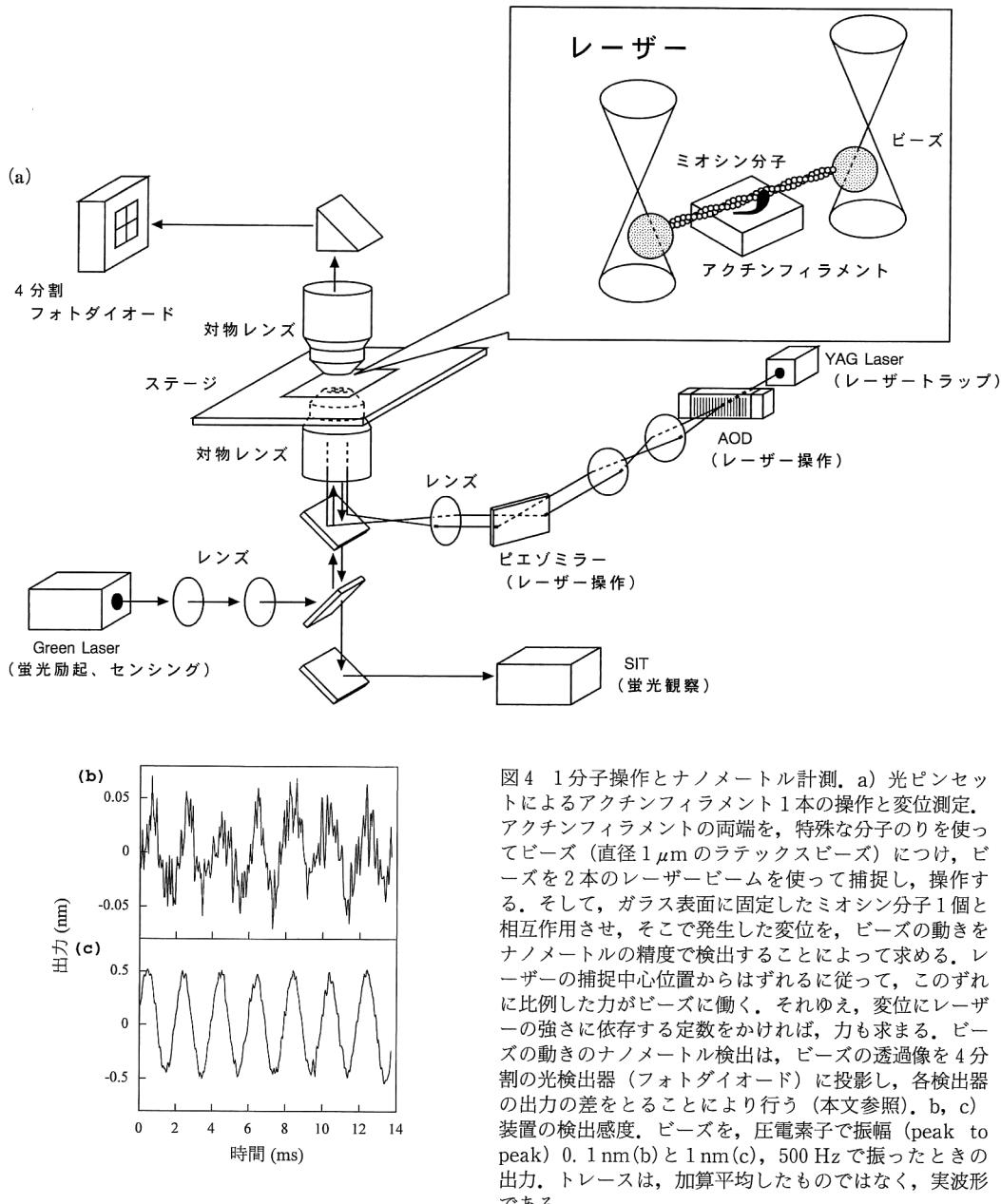


図4 1分子操作とナノメートル計測。a) 光ピンセットによるアクチンフィラメント1本の操作と変位測定。アクチンフィラメントの両端を、特殊な分子のりを使つてビーズ（直径1 μmのラテックスビーズ）につけ、ビーズを2本のレーザービームを使って捕捉し、操作する。そして、ガラス表面に固定したミオシン分子1個と相互作用させ、そこで発生した変位を、ビーズの動きをナノメートルの精度で検出することによって求める。レーザーの捕捉中心位置からはずれるに従って、このずれに比例した力がビーズに働く。それゆえ、変位にレーザーの強さに依存する定数をかけば、力も求まる。ビーズの動きのナノメートル検出は、ビーズの透過像を4分割の光検出器（フォトダイオード）に投影し、各検出器の出力を差をとることにより行う（本文参照）。b, c) 装置の検出感度。ビーズを、圧電素子で振幅（peak to peak）0.1 nm(b)と1 nm(c), 500 Hzで振ったときの出力。トレースは、加算平均したものではなく、実波形である。

0.1 nm (1億分の1 cm) の動きも検出できる（図4 b, c)<sup>3-5)</sup>。

### 1.5 ミオシンの1分子力学応答

図5に、上記の方法（図4）で測定したミオシン分子のひとつの頭部によって引き起こされる変位（ステップサイズと呼ぶ）を示す。図の上のトレースがビーズの変位の時間経過である。20 nm程度の変位が起こっていることが見られる。下のトレースはビーズのブラウン運動

の大きさの変化を示している。相互作用（ビーズに捕まえられているアクチンフィラメントと、ガラス上のミオシンとが結合する）が起こると、ビーズのブラウン運動が抑えられるため、ゆらぎの大きさが減少する。したがって、ブラウン運動の大きさをモニターすることにより相互作用している場所を容易に検出できる。この結果、ミオシン分子は約20 nm程度の変位を起こすことがわかった。

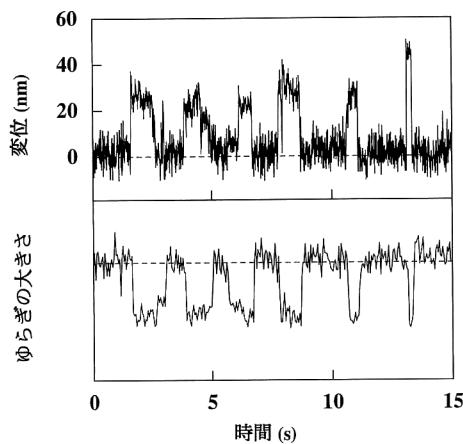


図5 分子モーター1個が発生する変位と力。a) 頭1個のミオシン分子による変位。ATP濃度は $1\mu\text{M}$ 。b) ビーズのブラウン運動の大きさの時間変化。点線のところが、相互作用していないときのブラウン運動の大きさである。ビーズに捕まえられているアクチンフィラメントがガラス上のミオシン分子と相互作用すると、系の弾性率が上昇し、結果としてブラウン運動が小さくなる。この変化をモニターすることにより、相互作用している場所を特定できる。

このように、1分子操作技術とナノメートル計測技術の開発によって、分子モーター1個の力学特性を直接測定することができた。

#### 1.6 ミオシン1分子のATP分解反応と力学応答的同时測定

上で見られた、ミオシン分子頭部1個で引き起こされた矩形波状の変位に、何分子のATPの分解反応が含まれているのであろうか。分子モーターが化学エネルギーをどのように使って運動しているかを調べるために、重要な情報である。そこで、筆者らはATP分解の1分子測定技術と1分子力学測定技術を組み合わせた、新しい顕微鏡システムを開発し、別々に測定してきたATPの分解反応と力学反応を同時に測定することを試みた。図6aに、そのシステムの概略を示す。ミオシン分子を、ガラス表面に固定し、下からエバネッセント場で照明し、蛍光ATP1分子がフィラメント上のミオシン分子頭部によって分解される過程をモニターする。そして、上で述べてきたように、両端をビーズにつけたアクチンフィラメントを光ピンセットで操作し、ミオシン分子頭部1個と作用させ、同時に運動も測定する。図6bに、その結果が示されている。大きさが数十nmのパルス的な変位は、1分子のATP分解反応と対応していることがわかった。すなわち、ミオシン分子頭部1個が20nm程度の変位を1分子のATP加水分解で引き起こ

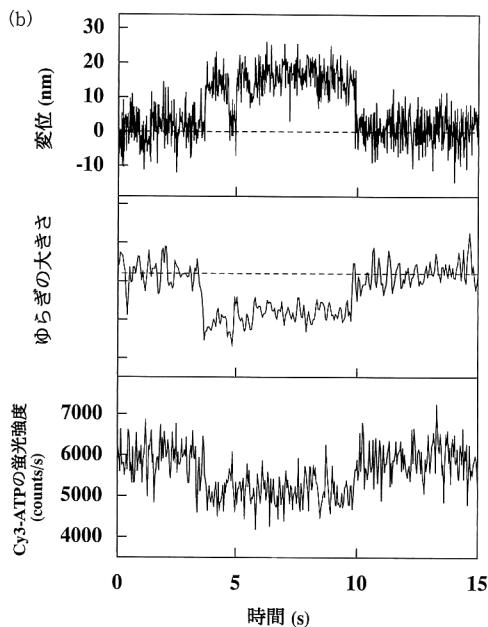
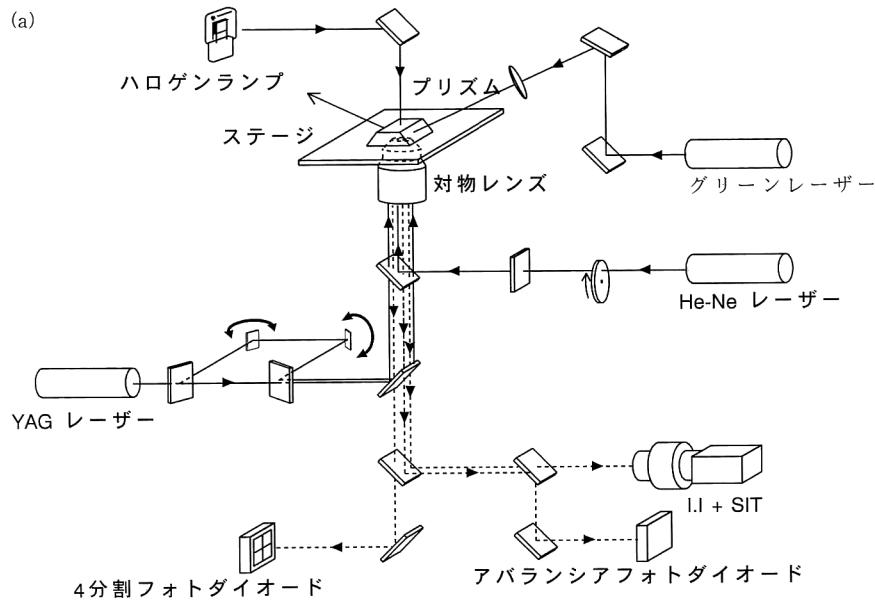
すことができるこことを初めて直接測定した。

#### 2. 化学シグナルに対する力学応答の多様性

1分子変位計測、1分子同時計測の結果から、1個のATPの加水分解に伴う変位の大きさは、約20nmという大きな値を示した。ミオシン分子自体の大きさが16nm程度であるので、タンパク質が構造変化をして運動するという単純なモデル（首振り説）では予想できない大きさである（首振り説では、5nm程度）。これは、構造変化が起こっているにしても、それがATPの単純な結合解離によって引き起こされる変化ではなく、1回のATP分解反応中にミオシン分子は何個ものアクチン分子と結合解離を繰り返していることを示唆している。しかも、ステップサイズは外からかける負荷に依存しており、大きな負荷をかけるとそれは小さくなる、すなわち、構造変化の回数は一定しているのではなく負荷によって変化する。

このように、化学シグナルに対しタンパク質分子が多様に応答できるという証拠はこれまでほかでは見つかっていない。リガンド（ATPやカルシウムなど化学シグナルになる物質）が結合すると、モータータンパク質に限らず、タンパク質は一般に構造変化を伴って応答するが、このリガンドの結合と応答は単純に1:1に対応していて、1回のリガンド結合でタンパク質の応答の回数が外部環境などの状況変化に応じて変化するようなことはないと考えられてきた。タンパク質の働くしくみは、この1:1仮説を基本に考えられてきたので、1分子計測を使って得られた上の結果は、タンパク質全般の研究に関わる根元的な問題を提起している。

また、ATP1分子当たりの化学エネルギーは平均熱雑音エネルギーの20倍程度なので、これを何回かにわけて使用すると1回に構造変化に使われるエネルギーは平均熱雑音エネルギーと大差ないことになる。分子モーターは最大80%にもおよぶ高い効率で働くので、平均熱雑音エネルギーと大差ない小さな入力エネルギーで非常に高い効率で作動する機械ということになる。これは、筆者らが作る人工機械と大きく異なるところである。人工機械の代表であるコンピューターを構成している素子（トランジスター、IC）の場合は、熱雑音の数百倍という大きなエネルギーをつぎ込んで作動させている。熱雑音と大差ない小さなエネルギーで効率よく作動する人工素子をつくる設計原理を筆者らはまだ知らない。これは、タンパク質特有の非常に優れた性質なのである。



### おわりに：分子モーターによる生物機械のやわらかさ

筆者らは、生物分子モーターの個々の性質を、1分子測定技術を使って詳細に調べてきた。そして、人工機械にはみられない特徴的な性質として、1) 入力シグナルに対し、固定的な力学応答をするのではなく、状況に応じて多様な力学応答をすること、2) 入力エネルギーレベルが平均熱雑音レベルと大差ないにもかかわらず、効

図6 ATP分解反応と力学応答の1分子同時測定。  
(a) 1分子ATP分解反応イメージングの光学系と光ピニセットを用いた1分子力学計測の光学系を組み合わせた、ATP分解反応と力学応答の1分子同時測定装置の概略。(b) 結果。上のトレースが、単頭ミオシン1個による変位を示し、中のトレースがビーズのブラウン運動の変化、下が高感度光検出器で測定した蛍光ATPの蛍光強度の変化（結合・解離）を示している。ATPがミオシンに結合すると、アクチンフィラメントとミオシンが解離し、ビーズの位置が0へ、コンプライアンスが元に戻るのがわかる。相互作用が始まり、変位が発生し、コンプライアンスが減少した後、ATPが解離することがわかる。Cy3-ATP濃度は50 nMである。図5に比べて、相互作用する頻度が少ないのはATP濃度が低いためである。

率よく働くということが明らかになった。これらの性質がどのようなメカニズムで働いているかを明らかにするためには、まだ多くの実験と理論的考察が必要であるが、ゴールはそれほど遠くないようを感じる。筆者らの夢は、分子モーターの研究を基本にして、人工機械とは全く異なる新しい設計原理を使って、筋肉や脳のようなやわらかい運動機械、情報機械を創ることである。

### 文 献

- 1) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida: "Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution," *Nature*, **374** (1995) 555-559.
- 2) R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y.

- Harada and T. Yanagida: "Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules," *Nature*, **380** (1996) 451-453.
- 3) A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada and T. Yanagida: "Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin *in vitro*," *Nature*, **352** (1991) 301-306.
- 4) A. Ishijima, Y. Harada, H. Kojima, T. Funatsu, H. Higuchi and T. Yanagida: "Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199** (1995) 1057-1063.
- 5) A. Ishijima, H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funatsu and T. Yanagida: "Multiple- and single analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: Unitary steps and forces," *Biophys. J.*, **70** (1996) 383-400.

(1997年5月1日受理)