

生体分子の光捕捉と運動測定

西山 雅 祥

生き物の特徴のひとつとして、「動き」を挙げるができる。動物は文字通り、「動く生き物」であり、多くの個体は筋肉を用いて移動することができる。また、細胞レベルでも、細胞分裂や形態の変化等のように動きを伴う現象が数多く存在する。こうした生き物の運動機能には、分子モーターとよばれるタンパク質のアクチュエーターが動力源として関与している。分子モーターの動作原理を探る試みは歴史が古く、今まで膨大な数の研究が行われてきたものの、いまだその解明には至っていない。一般に、分子モーターの大きさは10 nm程度であり、その上、複雑な3次元立体構造をとっている点が理由として挙げられる。X線結晶構造解析や電子顕微鏡を用いれば、静止画像として分子の形をみることは可能である。しかしながら、得られた像が本当に運動機能を発現している現場をとらえているという確証はない。また、水溶液中では周囲の水分子等は高速でとびまわっているため、分子モーターは「嵐のような」熱ゆらぎにさらされ、確率過程論的に動くことが挙げられる。従来の実験では、膨大な数の分子集団を用いており、検出されるのは分子集団の平均値であった。このように、個々の分子の振る舞いがかき消されたデータをもとにして、分子内部で生じている化学反応過程を演繹するのは、非常に困難を伴う。もし、なんらかの形で分子集団にトリガーをかけて、すべての分子を同時に駆動させることが可能ならば、ある程度の情報を得ることは可能となる。しかしながら、多くの場合、トリガーをかけることさえ困難を伴う。

それに対して、近年、市販されている光学顕微鏡に改良を加えることで、生体分子1分子の振る舞いを直接計測で

きる技術が開発された¹⁻⁴⁾。生体分子1個の振る舞いをみたり、捕まえたり、操作したり、さらには、その動きをナノメートルの分解能で計測することが可能になったのである。こうした1分子計測の原理は明解である。光学顕微鏡下で生体分子1個の振る舞いを直接観測できるように、分子に目印をつけるのである。大別すると、分子に蛍光色素を化学修飾させ、近接場光を用いてその蛍光を検出する手法と^{5,6)}、分子よりも大きく可視化が容易なプローブを用いて、その像を拡大して検出する手法がある。後者の手法では、ポリスチレンやガラス、金コロイド等のナノメートルからマイクロメートル程度のプローブを用いることが多い。光ピンセットは、生体分子を結合させたプローブを捕捉し、自由に操作したり、熱ゆらぎを抑制し分解能を向上させることに用いられる(光ピンセットそのものに関しては、他の解説を参照されたい⁷⁾)。本稿では、光ピンセットを用いた分子操作と、その技術を応用した生体分子1分子の力学計測について記述する。

1. 分子を自在に操作する

まず、生体分子をマイクロメートル程度の微小球(プローブ)に結合させ、次に光ピンセットを用いてこれを捕捉する。生体分子の計測において、光ピンセットは基本的に分子間の相互作用様式を調べるツールとして用いるので、分子機能を阻害することなくプローブ表面に結合させる必要がある。特に生体分子の力学計測においては、分子とプローブを固く結合させることにより、余計な弾性要素を除去することが必須となってくる。生体分子を結合させる「のり」として、抗原抗体系やアビジン-ビオチン系などが用いられているが、観測対象に応じて試行錯誤を繰り返すことが多く、今なお大きな課題となっている。さて、光ピンセットでとらえた分子は、光の集光点を動かすことによ

科学技術振興事業団国際共同研究1分子過程プロジェクト(〒562-0035 箕面市船場東 2-4-14)
E-mail: nishi@yanagida.jst.go.jp

り、水溶液中を3次的に自由に操作できるようになる。これにより、分子の性質にあわせて、計測したい分子の振る舞いをより観測しやすい形に配置し、実験を行うことができるわけである。これは、試験管の中でランダムに生じる化学反応を傍観していた従来の計測手法とはまったく異なるものである。

例えば、アクチンフィラメント上を滑走するミオシン分子を観測する際には、どちらか一方をガラス表面に固定することで、他方の動きを観測していた。一般に、タンパク質はガラス表面では変性しやすいものであり、このような実験系では、ガラス表面の影響を無視することはできない。そこで、アクチンフィラメントの両端にビーズをとりつけ、2つの光ピンセットでフィラメントを水溶液中につり下げてしまえば、ガラスの影響を考慮することなく、分子間の滑り運動が観測可能となる⁸⁾。また、光ピンセットを用いてアクチンフィラメントをびんと張り、ガラス表面のミオシン分子と相互作用させると、アクチン分子の力学計測も可能となる⁹⁾。後述するキネシン分子と比べて実験系が異なるのは、骨格筋のミオシン分子はキネシン分子のように1分子で長距離にわたって運動する機能をもたないことと(長くても数十ナノメートル)、光ピンセットでは球状ビーズの回転方向の自由度を抑制できないことに起因している。つまり、アクチンフィラメントをびんと張ることで、ビーズの回転方向の自由度をなくし、分子が発生する微小な変位を検出可能にしているのである。その一方で、ビーズが回転方向に自由に動くことを利用し、アクチンフィラメントのねじれ弾性を検出する試みもなされている¹⁰⁾。また、ビーズの捕捉位置を変化させることで、フィラメント(微小管)を屈曲させて曲げ剛性をもとめたり^{11,12)}、マニピュレーションの技術に磨きをかけることで、DNAなどを結ぶところもなされている¹³⁾。

要約すると、光ピンセットを用いた生体分子の操作技術とは、分子間の相互作用を最も観測に適した形へと配置する技術にほかならない。生体分子1分子の運動計測は、こうした分子操作・配置の技術に加えて、ビーズの動きを精密に計測する技術から成立している。次章では、細胞内の物質輸送などの役目を担っている分子モーター：キネシンの1分子計測について解説する。

2. 1分子の動きをみる

2.1 分子モーター：キネシン

キネシン分子とは、細胞内で物質輸送などに関与している代表的な分子モーターであり、微小管に沿って運動する。今、仮に細胞を都市とすれば、都市に張り巡らされて

いる道路が微小管であり、キネシン分子は運送トラックとして例えることができる。運ばれる荷物は、細胞の形態形成や情報伝達などに必要な物質である。細胞内は溶液で満たされているので、わざわざ運ばなくても拡散運動で十分ではないかと思われる人がいるかもしれない。確かに、直径200 nm程度の荷物なら、10 μm の距離をブラウン運動のみで移動するのに10分程度しか要しない。しかしながら、脳の神経細胞では長さが1 m以上にもわたっており、生命活動に必須となるタンパク質などを合成できる器官は、その一端にしか存在しないのである。この1 mもの距離を自由拡散だけで輸送するには、計算上60万年以上も要することになる。つまり、分子モーターによる物質輸送は高等生物が生き残るために必要不可欠な機能なのである。

キネシン分子は、牛脳やイカの神経軸索等から天然に存在するキネシンを精製する場合と、大腸菌を利用して、アミノ酸配列を組み替えた変異体を発現・精製する場合がある(近年では後者の手法が主流である)。また、微小管はチューブリンとよばれるタンパク質の重合体から構成されており、新鮮な牛脳から精製することが多い。生体分子の1分子計測についての解説記事では、光学的な計測手法への記述が主であり、分子の調整などに関して語られることはそう多くはない。しかしながら、生体分子の1分子計測はあくまでタンパク質の生化学実験の延長であり、分子の機能活性を損なうことなくいかにして計測条件を整えるかは実験者の腕のみせ所となっている。華麗な計測技術の陰では、理屈通りにはうまく動いてくれない分子と格闘せざるを得ないのが現状である。

このように、生体分子の1分子計測は、遺伝子工学を用いたさまざまな変異体の作製、生化学を主に用いた分子の精製と調整、光学的な手法を用いた装置開発と計測の集合体であり、境界領域の研究であることが如実に表れている。

2.2 キネシン1分子の力学計測

キネシン1分子の力学計測を行う際の概念図を示す(図1)。キネシン1分子の動きを可視化するために、本研究では、直径0.2 μm のビーズ(ポリスチレン製ラテックス球)を目印として用いる。ビーズは集光したレーザー光で照明し¹⁴⁾、その散乱光像を1000倍に拡大した後、4分割フォトダイオード上に投影する¹⁵⁾。したがって、分子の動きは光センサー上のビーズの暗視野像の動きとして検出できる(図2)。次に、光ピンセットでビーズを捕捉し、ビーズ自身の熱ゆらぎを抑制することにより、ナノメートルの位置分解能が達成可能となる。光ピンセットで捕捉され

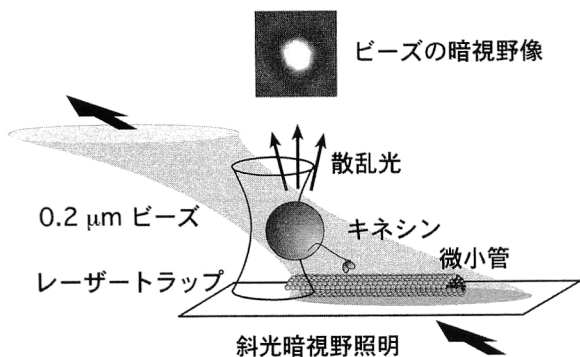


図1 実験系の概略図。微小管に沿って運動するキネシンをビーズの動きとして検出する。

た球状プローブは、光の集光点を中心にして変位に比例した勾配力を受けるため、分子に加わる負荷は、(光ピンセットのばね定数 (\sim pN/nm)) \times (ビーズの変位) から容易に計算できる。これは、生体分子1分子が行う仕事量やエネルギー効率の議論が可能であることを意味する。

図3はキネシン1分子が発生する変位を記録したものである。ビーズが光ピンセットの捕捉中心から遠ざかるに従い負荷が大きくなるため、キネシン分子の運動速度は低下していく。キネシン1分子が負荷に逆らって発生できる最大力は約7 pNであり、負荷の高い領域では進行方向とは逆向きのステップ、バックステップを生じたり、分子が微小管から解離しやすくなる(ビーズは光ピンセットの捕捉中心に戻る)。トレースの一部を拡大すると、ステップ状の変位を繰り返しながら運動していることがみてとれる。ステップの大きさは8 nmであり、比較的大きなビーズを用いた過去の報告例と一致する^{16,17}。また、キネシンの8 nm ステップは、1 ATPの加水分解と対応している^{17,18}。つまり、8 nm ステップには分子の動作原理にかかわる重要な反応が隠されている可能性が高いのである。従来の測定系の分解能(ミリ秒)では、8 nm ステップの立ち上がり部分で何が起きているのか検出できなかった。本研究では小さなビーズを用いることにより、ビーズ自身が受ける粘性抵抗を軽減させ、応答時間を20 μ sにまで向上させることに成功した。次章では、8 nm ステップの変位生成過程を解析し、何が起きているのか議論する。

3. 1ステップの中身を見る：マイクロ秒の世界へ

3.1 8 nm ステップの立ち上がり時間

図4は、8 nm ステップの検出例を拡大して表示したものである。上のトレースが急峻に立ち上がっているのに対して、他の2つはゆっくりとした立ち上がりを見せている。トレースの一部には、50~100 μ s周期の振動がのっているように見えるが、これらは、ローパス・フィルター

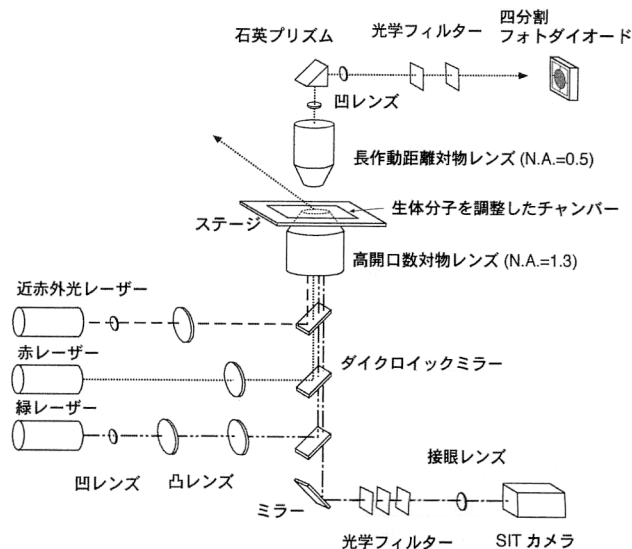


図2 顕微鏡の概略図。近赤外レーザーは光ピンセット、赤レーザーは斜光暗視野照明、緑レーザーはビーズと微小管にラベルした蛍光色素を励起するために用いる。

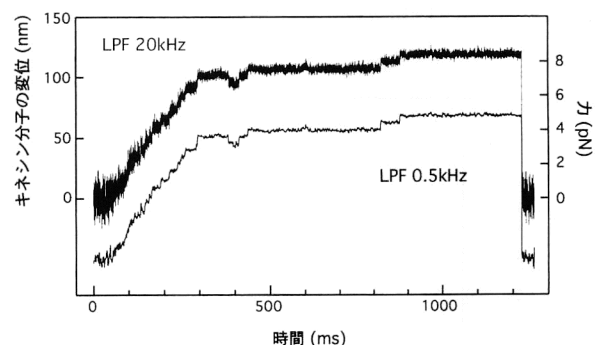


図3 キネシン1分子の力学計測。1 mM ATP濃度におけるキネシン1分子の変位。上のトレースには20 kHz、下のトレースには500 Hzのローパス・フィルターを適用している。キネシンがステップ状の変位を繰り返しながら運動する様子がみてとれる。

のカットオフ周波数(20 kHz)に起因するものであり、分子の動きとは関係がない。

8 nm ステップの変位生成過程を調べるために、個々のトレースを指数関数的に立ち上がる曲線でフィットさせ、立ち上がり(0~63%)に要する時間(立ち上がり時間： τ)とステップが始まる時刻を最小二乗法で求めた($n=152$)。その結果、立ち上がり時間には負荷との相関がみられず、そのヒストグラムは指数関数的な分布を示した(図5)。立ち上がり時間の平均値は48 μ sであり、ビーズの応答時間(\sim 20 μ s)の2倍以上の値を示した。これは、8 nm ステップの変位生成過程において、なんらかの化学反応が存在することを示している。

3.2 連続する4 nm サブステップ

8 nm ステップの立ち上がり部分で何が起きているのか

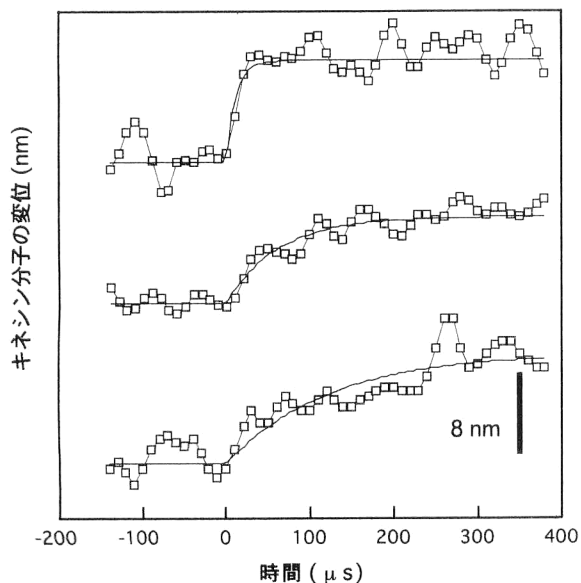


図4 8 nm ステップの立ち上がり部分. 20 kHz のローパス・フィルターを通した後, $10 \mu\text{s}$ ごとにプロットした. 指数関数的に立ち上がる曲線でフィットさせ, 立ち上がり時間 ($0 \sim 63\%$) を求めた. 各トレースの立ち上がり時間は, 上から順に, $11, 63, 121 \mu\text{s}$ であった.

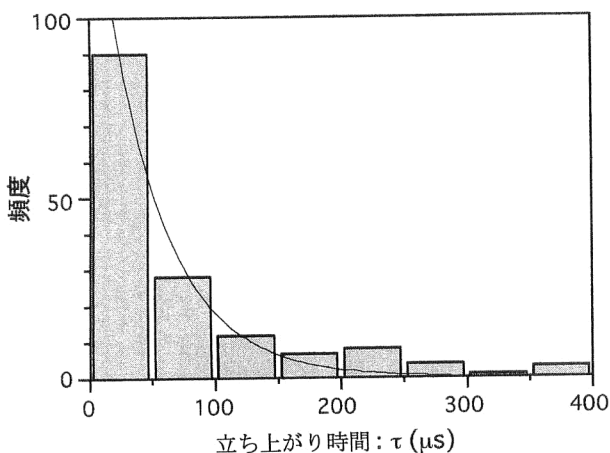


図5 立ち上がり時間の分布. ヒストグラムを指数関数でフィットさせ平均値 $47 \mu\text{s}$ を得た. この値はビーズの時間応答能の2倍以上であり, 立ち上がり部分に未知の化学反応が介在している可能性が示唆されている.

調べるため, ステップが始まる時刻をもとにステップをそろえて, 変位のトレースを平均化した. まず, 立ち上がり時間 (τ) を基準にして, 個々のステップを3つのグループに分け (グループ I, $\tau < 50 \mu\text{s}$, 59%; グループ II, $50 < \tau < 100 \mu\text{s}$, 18%; グループ III, $\tau > 100 \mu\text{s}$, 23%), グループごとにステップを平均化した (図6). グループ I の平均トレースは急速な立ち上がりを示した. その立ち上がり時間は $26 \mu\text{s}$ であり, ビーズの応答時間に近い値をとった.

これに対して, グループ II とグループ III の平均トレース

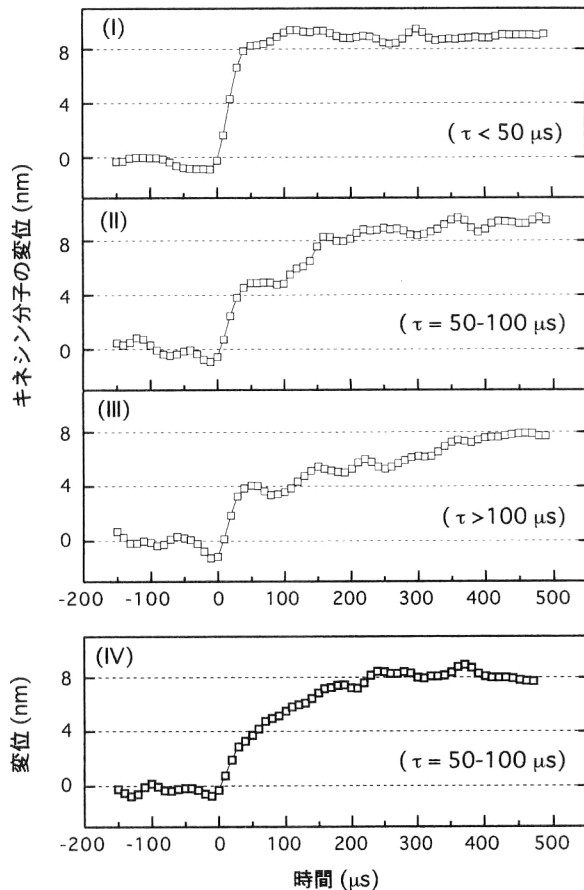


図6 4 nm サブステップ. 立ち上がり時間 (τ) をもとに3つのグループに分類してから, ステップが始まる時刻をそろえて各グループごとに平均化した (グループ I ($\tau = 0 \sim 50$, $n = 90$), グループ II ($\tau = 50 \sim 100$, $n = 28$), グループ III ($\tau = 100 \sim 400$, $n = 34$)). トレース IV はコンピュータシミュレーションにより求めた平均トレースであり, サブステップの兆候はみられなかった.

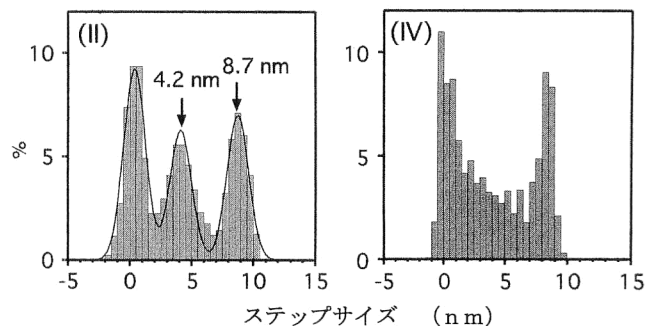


図7 平均トレースの統計解析. 図6 で示した平均トレース II と IV において, 時刻: $t = -150 \sim 450$ の区間における変位の pairwise distance を計算した結果. II のヒストグラムに関しては, ガウス型の分布曲線の和でフィットさせたところ, 4.2 nm と 8.7 nm にピークをもった.

では, 速いサブステップと遅いサブステップの2つから 8 nm ステップが構成されていることが示された. グループ II のトレースにおいて, はじめのサブステップでは, 立ち

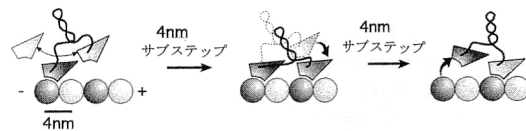
上がり時間は $25 \mu\text{s}$ であり、プラトーに達してから $70 \mu\text{s}$ 程度の間休止した。その後、2つ目のサブステップが $40 \mu\text{s}$ の立ち上がり時間で上昇し、 8 nm のステップが完了した。グループIIIのトレースは休止状態がはっきりとしないが、 8 nm の変位が2つのサブステップに分離している点では一致している。グループIIとグループIIIのはじめのサブステップにおいて、立ち上がり時間はそれぞれ、 $25 \mu\text{s}$ と $27 \mu\text{s}$ であり、ビーズの応答時間にほぼ一致した。これは、はじめのサブステップにおいて、キネシンはビーズの応答時間を超える速い速度で変位している可能性を示唆するものである。グループIIの平均トレースから変位の pairwise distance を計算すると¹⁶⁾、そのヒストグラムは 4.2 nm と 8.7 nm にピークを示した (図7(II))。これは2つのサブステップの変位の大きさがともに約 4 nm であることを示唆している。

2つの 4 nm サブステップは、グループ分けや平均化の過程で生じるアーティファクトではないことを示すために人為的に波形を作製しシミュレーションを行った。指数関数的にゆっくりと ($\tau=50\sim 100 \mu\text{s}$) 立ち上がる 8 nm ステップにビーズの熱ゆらぎを加えた後、実験データと同じように波形の平均処理を行った。その結果得られたトレースには、サブステップの兆候はみられなかった (図6(IV)、図7(IV))。

本研究の取り組みにより、 8 nm ステップは2つの 4 nm サブステップから構成されていることが明らかになった。微小管は長さ 4 nm の α チューブリンと β チューブリンのヘテロダイマーから構成されている。キネシン分子の運動モデルとして hand-over-hand モデル、もしくは hopping on a leg (けんけん) モデルを考えることができる (図8)。前者のモデルでは、キネシン分子は2つのモータードメインを交互に動かしながら運動することになる。はじめのサブステップは、解離しているモータードメインが微小管と新たな結合をつくる反応であり、次のサブステップでは、うしろのモータードメインが微小管から解離する反応として解釈できる。一方、後者のモデルでは、キネシンのモータードメインは、隣接するチューブリンモノマーに沿ってステップしていくことになる。サブステップの大きさとチューブリンモノマーの大きさが一致するため、つじつまはあう。このモデルでは、運動するために必ずしも2つのモータードメインを必要としない。

本稿では、生体分子モーターの光捕捉と運動計測について解説してきた。光ピンセットは、分子モーターだけではなくさまざまな生体分子の計測にも利用されており、細胞

Hand-over-hand モデル



Hopping on a leg モデル

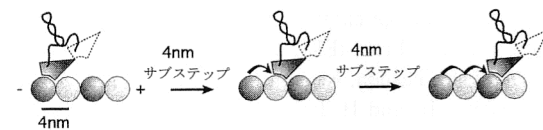


図8 キネシンの運動モデル。Hand-over-hand モデルと hopping on a leg モデル。 4 nm サブステップはどちらのモデルでも説明可能。

への応用もなされている^{19,20)}。今や、生体分子の機能計測において強力な手法として定着しつつある。

これまでのライフサイエンスは、生命活動を支える分子を同定することに主眼がおかれてきており、生体分子がどのような機能を有しているのかいまだはっきりしないことが多い。ヒトゲノムの解読が終了しポストゲノム時代の到来が声高に唱えられるなか、タンパク質の機能を正確に計測する技術が、今求められている。巧妙な生命システムを調べ、その設計原理を応用することにより、筋肉のように力強くときにはしなやかに動く運動機械や人間の脳のように融通性のあるコンピューターの創出が期待される。

文 献

- 1) 柳田敏雄, 石渡信一編: ナノピコスペースのイメージング (吉岡書店, 東京, 1997)。
- 2) 石渡信一編: 生体分子モーターの仕組み (共立出版, 東京, 1997)。
- 3) 曾我部正博, 白倉治郎編: バイオイメージング (共立出版, 東京, 1997)。
- 4) Y. Ishii and T. Yanagida: "Single molecule detection in life science," *Single Mol.*, **1** (2000) 5-16.
- 5) 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.
- 6) M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane and T. Yanagida: "Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235** (1997) 47-53.
- 7) 増原極微変換プロジェクト編: マイクロ化学 (化学同人, 京都, 1993)。
- 8) K. Saito, T. Aoki, T. Aoki and T. Yanagida: "Movement of single myosin filament and myosin step size on an actin filament suspended in solution by a laser trap," *Biophys. J.*, **66** (1994) 769-777.
- 9) 石島秋彦, 小嶋寛明, 田中裕人: "ナノ領域の光の生物への応用", *応用物理*, **68** (1999) 556-560.

- 10) Y. Tsuda, H. Yasutake, A. Ishijima and T. Yanagida: "Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by *in vitro* micromanipulation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93** (1996) 12937-12942.
- 11) 田代英夫, 矢内 勝: "光による細胞の操作", 光学, **28** (1999) 556-560.
- 12) K. Visscher, S. P. Gross and S. M. Block: "Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing," Proc. IEEE, **2** (1996) 1066-1076.
- 13) Y. Arai, R. Yasuda, K. Akashi, Y. Harada, H. Miyata, K. Kinoshita, Jr. and H. Itoh: "Tying a molecular knot with optical tweezers," Nature, **399** (1999) 446-448.
- 14) S. Kudo, Y. Magariyama and S. Aizawa: "Abrupt changes in flagellar rotation observed by laser dark-field microscopy," Nature, **346** (1990) 677-680.
- 15) M. Nishiyama, E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida and H. Hideo: "Substeps within the 8 nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules," Nat. Cell Biol., **3** (2001) 425-428.
- 16) K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp and S. M. Block: "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry," Nature, **365** (1993) 721-727.
- 17) H. Kojima, E. Muto, H. Hideo and T. Yanagida: "Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry," Biophys. J., **73** (1997) 2012-2022.
- 18) M. J. Schnitzer and S. M. Block: "Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step," Nature, **388** (1997) 386-390.
- 19) 楠見明弘, 藤原敬宏: "生細胞中での1分子計測と制御", 光学, **28** (1999) 544-548.
- 20) 西坂崇之: "光ピンセットによる生体分子の顕微操作", 日本ME学会雑誌, **15** (2001) 3-9.

(2001年4月9日受理)