

1 分子計測でみる生命活動とブラウン運動

江崎 誠治・柳田 敏雄*

Measurement of Single Molecular Processes for Nano-Bioscience

Seiji ESAKI and Toshio YANAGIDA*

In recent years, single molecule detection techniques have been developed as unique experimental tools to observe the behavior of biomolecules and have brought new aspects life sciences. Examining single nano-biomolecules offers many advantages over ensemble measurements. Using single molecule imaging and nanometry techniques, mechanical and chemical processes generated by molecular motors were investigated. It has been reported that mechanical events of individual myosin motors were clearly detected and that myosin molecules move stochastically along an actin filament. These results strongly suggest that the movement of myosin is affected by thermal agitation. The molecular motors can harness thermal energy to perform mechanical work by consuming the energy released from ATP hydrolysis reaction.

Key words: single molecular detection, motor protein, myosin, actin, ATP, stochastic movement

生命は、数多くの化学反応が複数箇所ですべて同時に進むことで、高度な機能を実現している。五感の働きも脳機能も、突き詰めれば体を構成する細胞で起こっている化学反応の積み重なりである。細胞ひとつをとってみても、細胞を一杯に満たしている分子どうしが互いにせわしく相互作用をしている。よく見かける細胞の図や写真はあくまでも静止画であって、実際の姿のある一瞬を写したに過ぎない。

細胞の中で営まれる生命活動とは、一体どんなものなのだろうか。また、どのような化学反応が生命を支えているのだろうか。前者の疑問に答えるべく、細胞や細胞内部を観察する方法が考案され、顕微鏡法などが進展した。また、後者の疑問に対する方法として、すりつぶした細胞を対象とした生化学的な研究方法が確立された。例えば、電子顕微鏡法などにより細胞や生体分子の微細構造が解かれたことで、生命を具体的に理解するすべを得たといえる。また、分子生物学的な手法を駆使することで、細胞内外のシグナル伝達経路についての理解も進んだ。

これだけでも生命に関して非常に多くの情報が集められ

たといえるが、まだ十分ではなかった。生命活動を劇にたとえるならば、劇に出演する役者と舞台の作りをいくら詳しく知ろうとも、肝心の台本の内容がわからなければ、劇を知ったことにはならない。役者がいつ舞台に現れ、どのようなせりふをいい、どんな振る舞いをするのかといった一連の流れを知ってはじめて、生命の本質がみえてくるはずである。生命科学の次なるターゲットは、生命活動を担う分子がどのようなメカニズムに基づいて機能しているのかを探ることである。

生体分子が機能する様子を知るには、分子の活躍している現場に立ち会うことが不可欠である。電子顕微鏡は光学顕微鏡よりもはるかに高い分解能をもつが、生きている分子を生きたまま観察するには可視光線を使う光学顕微鏡のほうが適している。

生体内での化学反応を追跡すべく、これまでは溶液系の研究が進められてきた。しかし、溶液にはアボガドロ数オーダーの莫大な数の分子が含まれているので、溶液系の実験から得られる結果は、膨大な数の分子たちの平均的な挙動に過ぎない。平均値から得られる情報もちろん大切で

大阪大学大学院生命機能研究科ナノ生体科学講座 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-3 ナノバイオ棟) *E-mail: yanagida@physl.med.osaka-u.ac.jp

はあるが、どのタイミングで、こういったプロセスにより反応が進められているのか、といったメカニズムに関する情報はほとんど得られない。個々の分子が反応する様子を追跡できれば、反応の詳細を知ることができるに違いない。

このような要請から1分子計測技術が進展を遂げ、生体分子が働く仕組みもみえるようになってきた。この技術は特に、生体の中で運動を担っている分子モーターの研究に活用されている。そこで本稿では、分子モーターについて取り上げ、1分子計測技術によりわかってきた事柄を解説していくことにする。

1. 分子モーター

生体中で運動に関与する蛋白質群を分子モーターと総称する。筋肉の収縮、細胞内の小胞輸送、細胞分裂時の物質輸送などの機能はすべて分子モーターが担っており、ATP（アデノシン三リン酸）をADP（アデノシン二リン酸）と無機リン酸に加水分解するときに得られるエネルギーをもとに運動をしている。大きさや形・機能の仕方に違いはあるが、運動様式に注目すると分子モーターは、蛋白質などでできたレールに沿って運動するタイプ（リニアモーター）と、回転運動をするタイプ（回転モーター）とに分類される。本稿で取り上げるアクトミオシン系は、リニアモーターの代表格で、筋収縮に関与している。

アクトミオシン系には、分子の識別・酵素活性・エネルギーの変換・自己集合能など、生理機能に直接関係する性質が数多く備えられている。そのためアクトミオシンが理解できれば、生体分子全般の機能する仕組みもわかるかもしれない。こうしたもくろみのもと、これまでも非常に精力的に研究が進められてきた。アクトミオシンが示す出力が「運動」であり計測をしやすいというメリットがあったことも、分子モーターの研究を後押しした要因のひとつかもしれない。

筋肉を構成する階層構造を図1に示す。筋肉は筋節（サルコメア）とよばれる繰り返し構造を基本単位とし、このサルコメアを構成するアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの2種類のフィラメントの相互作用が筋力を生み出す。脳から運動神経を伝わってきた神経インパルスが筋肉に達すると、ATPの加水分解反応と共役してアクチンとミオシンの相対的な滑り運動が引き起こされ、筋収縮が生じる。

ミオシンはそのアミノ酸配列の違いなどから、筋肉に含まれるミオシン（ミオシンII）を含めて、現在では18種に分類されているが、ATPの加水分解で得られるエネルギー

を使い、アクチンフィラメントに沿った運動をするという共通項をもつ。そのミオシンがアクチンフィラメントに沿ってどのように運動しているのか、ATPのエネルギーをどのように活用しているのか、といった疑問に答えるために1分子計測は使われてきた。

2. 1分子イメージング

生体分子のサイズは高々数十ナノメートル程度に過ぎない。ミオシン分子が運動活性を示す部分（ミオシン頭部）の大きさも20 nm×5 nm×5 nm程度である。こうしたサイズは可視光線の回折限界以下なので、個々の生体分子の姿を光学顕微鏡で捉えることはできない。そのため、生体分子を観るには工夫が必要となる。そのひとつが、生体分子に蛍光色素を結合させることである。蛍光色素1分子から放出される光子の量は高感度カメラで検出可能なので、生体分子の機能を損なわないように蛍光色素を結合させれば、生体分子を可視化できる。けれども、ちょうど夜空に光り輝いて見える星が昼間にはまったく見えないのと同じ理由で、通常の蛍光顕微鏡では背景光が多過ぎて1分子を観察することはできない。水溶液中には水のラマン散乱・不純物の乱反射・非観察領域からの蛍光など、1分子からの蛍光を邪魔する要因に事欠かない。こうした背景光を抑えるには、限られた領域だけを照射し、観たい分子を選択的に照らす励起光を用いればよい。この目的から、レーザー光を水溶液とガラス面との境界で全反射させたとき界面近傍の約100 nmの領域に生じるエバネセント照明が採用された。エバネセント光は、通常の光学顕微鏡に比べて背景光を1/2000にまで減らせるうえに界面付近のみが照射されることから、ガラス表面に固定された蛍光色素やガラス表面付近をゆっくりと移動する蛍光色素だけが、輝点として観察される。

図2(a)は、ガラス基盤上に固定されたアクチンフィラメントに沿ってミオシン分子が運動する様子を示した連続写真である。この実験で使われたミオシンは神経細胞内の小胞輸送にかかわるミオシンであるが、生理条件下とほぼ同等の速度（ $\sim 1.0 \mu\text{m/s}$ ）で滑り運動をしている様子が観察された¹⁾。また、ガラス表面に吸着させたミオシン分子に、蛍光標識したATPが結合・解離する様子を図2(b)に示す。あらかじめミオシン分子の位置を確認しておき、標識したATPからの蛍光をその位置で観察する。水溶液中を自由に拡散する分子の運動は非常に速いため、ATPがミオシンと結合し、加水分解後にADPが放出されるまでの間だけ、蛍光を輝点として捉えることができる。この輝点の明滅を記録することで、ミオシン分子の化学反応が

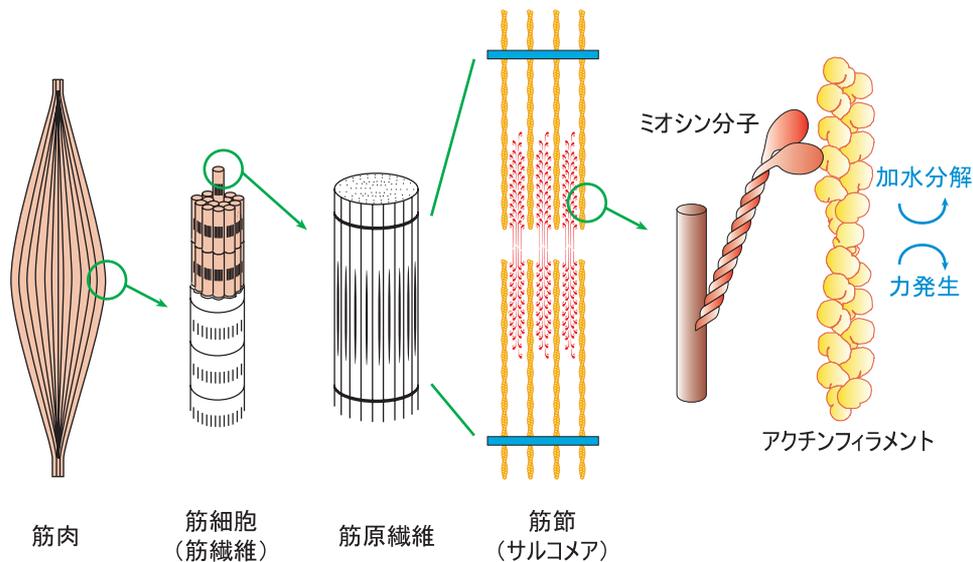


図1 筋肉の階層構造。

追跡された²⁾。

3. 1分子ナノメトリー

イメージング法により、1分子レベルでの運動の様子をみることができた。しかし一部の例外を除けば、イメージングの時間分解能はビデオレート (30 fps)、空間分解能も 100 nm 程度である。生体分子は 10 ms・10 nm の世界に生きているので、分子モーターの運動メカニズムを知るにはミリ秒・ナノメートルの分解能での計測が必要となる。そこで、1分子だけを捕まえ、その挙動を高精度・高時間分解能で計測する1分子ナノメトリー法を確立させた。ビーズを用いる光ピンセット法とガラス針を用いるガラスマイクロニードル法の2つの方法が1分子ナノメトリーの代表例である。いずれの手法でも、蛍光色素のかわりに取り付けられたマイクロメートルサイズの大きなプローブの動きを計測することで生体分子の動きを追跡する。

ビーズにレーザーを照射すると、ビーズと水溶液との界

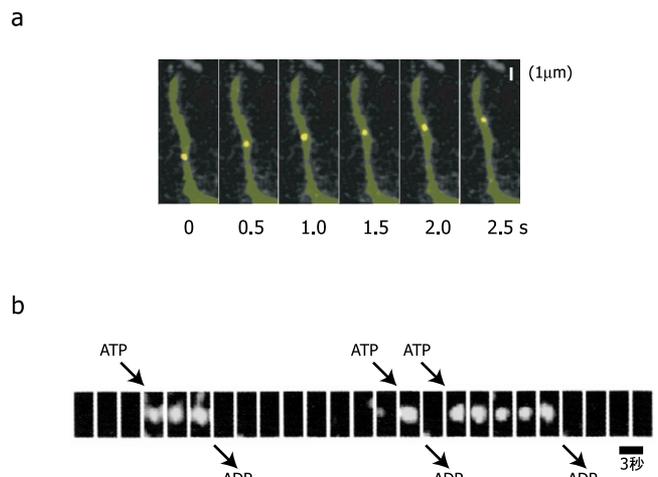


図2 1分子イメージング法により、アクチン上をミオシン分子が運動する様子 (a) や、ATP の加水分解反応の様子 (b) が可視化された。

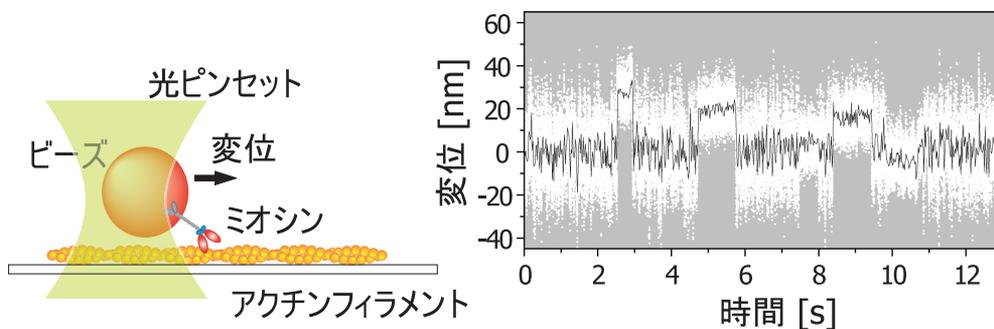


図3 光ピンセット法によるアクチンフィラメントの変位の様子。白線は実測値、黒線は移動平均後のデータを示す。

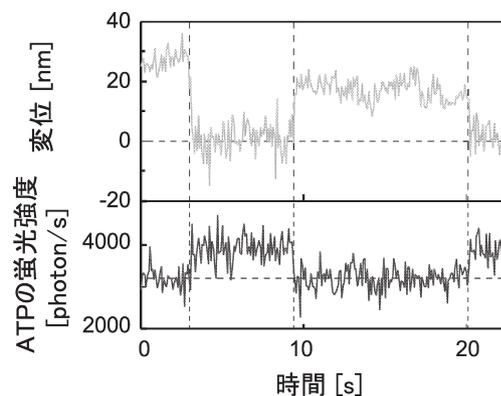
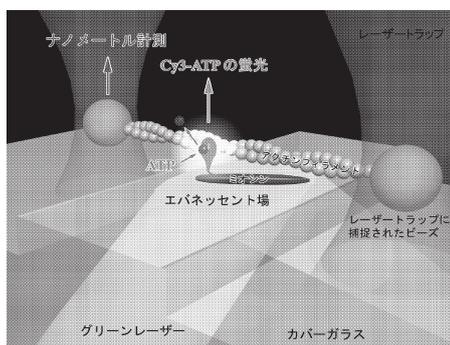


図4 1分子イメージング法と光ピンセット法を組み合わせると、化学反応と力学反応とを同時に計測した。

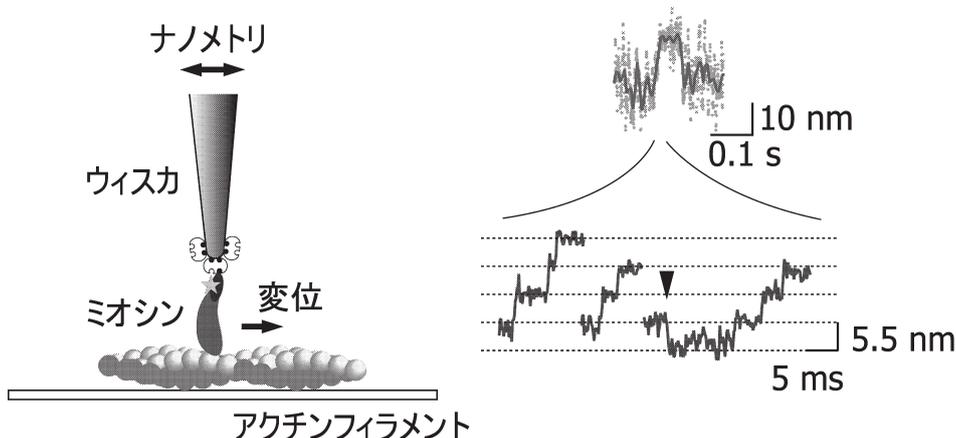


図5 ガラスニードル法によるミオシン分子の変位計測。変位は階段状のステップから構成されていた。矢印の箇所では後ろ方向の変位がみられる。

面でレーザーが屈折するため焦点方向に放射圧が生じる。レーザーの強度がガウス型ならば焦点近傍で放物線型のポテンシャルを生じるので、焦点にビーズを捕捉できる。これが光ピンセット法の原理で、レーザーの焦点位置や顕微鏡のステージを制御すると、非接触のままビーズをナノメートル精度で操作できる。

両端にビーズをついた1本のアクチンフィラメントを光ピンセットで捕まえ、ガラス表面に固定したミオシン分子に近づける(図3)。溶液にATPを入れておけば、アクチンはミオシンと相互作用し、変位を生む。その変位に応じてビーズが動くので、ビーズの動きをナノメートル精度でモニターすればアクチンとミオシンの滑り距離がわかる³⁾。この計測により、アクチンとミオシンは5~30 nmのスパイク状の変位を生み、しばらくその変位を保った後、相互作用を終えて変位はゼロに戻る、という一連の動作が見いだされた。

さらにATPのエネルギーがどのように使われているかを調べるために、1分子イメージング法と光ピンセット法と

を組み合わせ、ATPの加水分解反応と変位発生とを同時に追跡した⁴⁾。図4に実験系の概略と結果を示す。両端にビーズをついたアクチンフィラメントを、ガラス表面に固定されたミオシン分子に近づける。ここまでは先の実験と同じだが、今度は水溶液中に蛍光標識されたATPが入っているため、ATP(に付いている蛍光色素)の輝点の明滅とビーズに生じる変位とが同時に記録される。両者の対応関係から化学反応と力学反応との相関が求められ、1回のATPの加水分解反応に伴い変位が1回生じることがわかった。

光ピンセット法は比較的容易に1分子計測を行えるという利点をもっている反面、ミオシンの変位をアクチンフィラメントとビーズを介して間接的に測るといった構造的な難点も抱えている。アクチンフィラメントとビーズとを十分に固く結合させられないため、ビーズの変位は実際のミオシンの変位よりも過小評価される危険性がある。より直接的にミオシンの変位を計測するには、これから述べるガラスマイクロニードル法が適している。

柔らかいガラスニードルの先に、ナノメートルサイズの酸化亜鉛結晶（ウィスカ）を固定する。蛍光標識したミオシン分子の位置を観察しながら、ウィスカの先端にミオシン1分子を捕まえる。そして、このミオシンをガラス表面に吸着させたアクチンフィラメントに近づけ、ATP存在下で生じるミオシンの変位を直接的に計測した（図5）。この方法ではミオシンとウィスカの間が非常に固く結合しているため、ミオシンが生み出す速い変位をも正確に計測できる。光ピンセットではスパイク状としかみえなかった変位が、5.5 nmを基本単位とする階段状のステップで構成されていることがわかった⁵⁾。1回の変位はATP1分子の加水分解反応と共役するが、変位に含まれるステップの回数は1~5回の間で分布をもち、時として後ろ方向に進むこともあった。この結果から、ミオシン分子の動きは確率的であり、ブラウン運動を使っている可能性が示唆された。

4. 生体分子の運動メカニズム

ATPの加水分解に共役してミオシンのネック部位に構造変化が生じ、あたかも首を振るかのように動き力を出す、というモデルが従来より提唱されてきた（首振り説）。この説は結晶構造解析の結果などを参考にしており、人工機械とのアナロジーからか、広く受け入れられてきた。この首振り説では、化学反応と力学反応とが一対一に対応しており、1回のATP分子の加水分解反応で生じる変位は常に一定となることが予想される。しかし1分子計測によればミオシンの生み出す変位の大きさは一定ではなく、しかも変位は複数回のステップから構成されていた。この実験結果は、首振り説とは相容れない。首振り説の根拠のひとつでもある結晶構造解析の結果は、張力発生に伴う構造変化を主張しているが、その構造変化がいつ生じたのかについては言及していない。結晶構造は動いている瞬間を反映するのではなく、変位を起こす前後それぞれの状況を反映するに過ぎないからである。したがって、ネック部位の構造変化は張力発生の原因とすることもできるが、結果とすることもまた可能である。首振り説の立場を前者とするならば、これからみる確率モデルの立場は後者といえるかもしれない。

確率モデルは首振り説に変わる作業仮説で、ナノメートルで示されたミオシンの確率的な挙動を説明するためのアイデアのひとつである。ミオシン1分子の示す変位をみると、運動方向は前後にゆらぎ、ステップをしていない瞬間も決してひとつところにとどまってははいない。これは何を意味するのか。計測系は確かにノイズであるが、

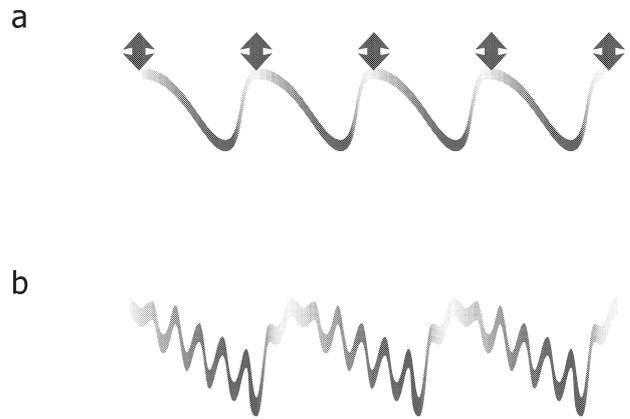


図6 ブラウン運動から方向性を取り出すための工夫例。ポテンシャルに時間的に変動する摂動を与える場合 (a) と、立体構造からポテンシャルにバイアスが生じる場合 (b)。

雑音を図5のようなトレースを生み出したとは考えにくい。それよりもむしろ、周囲の揺動の影響を強く受けながら機能している、とみるのが自然だろう。1 nm³の中に33個も含まれている水分子が常に蛋白質と衝突を繰り返しているのだから、その効果がみえるのは当然かもしれない。また、エネルギーの観点から考えても、入力となるATPの加水分解エネルギーの大きさは20 $k_B T$ 程度 (k_B はボルツマン定数、 T は系の絶対温度)で、熱ノイズの高々20倍に過ぎず、この程度の入力で熱ゆらぎを排除するのは難しい。このアプローチは、莫大なエネルギーを注ぎ込んで熱ゆらぎを排除するという人工機械、ひいてはそのアナロジーである首振り説と対極をなしている。

以上のことから、ミオシン分子は周囲の熱ゆらぎの影響を強く受けつつも一方向に運動している描像が浮かんでくる。つまり生体分子は、ブラウン運動の効果を排除するのではなく味方につけるといって、人工機械的とはまったく異なるアプローチで機能しているのかもしれない。ATPのエネルギーはブラウン運動の整流に使われているのだろう。

問題は、そんなメカニズムをどうやって実現するかわだが、ブラウン運動にバイアスをかけることは、それほど難しいことではない。たとえ一部であるとしても、ATPのエネルギーを使って相互作用場に摂動を与えれば、方向性をもった運動を取り出せる。図6 (a) に示すようなポテンシャルが時間変動すれば、それだけで一方向性の運動が生じる⁶⁾。あるいは相互作用をする蛋白質どうしの立体配置が図6 (b) のようになればバイアスのある運動が得られる⁷⁾。こうしたアイデアの創案とともに、最近ではエネルギー論も議論されている⁸⁾。

ブラウン運動の影響を強く受ける系で正しく機能する分

子モーターの運動に、実験・計算・理論それぞれの特色を生かしたアプローチが進められ、メカニズムの解明に向けた研究が進められている。人工機械とは根本的に異なるメカニズムを明らかにすることで、生体分子のもつ柔軟でしなやかな特性の本質に迫ることが期待される。また、こうして得られた知見は、ヒトにも環境にもやさしいナノデバイスの創出にも有効となるだろう。生命を演じている役者たちの台本が手に入る日もそう遠くはないかもしれない。

文 献

- 1) S. Nishikawa, K. Homma, Y. Komori, M. Iwaki, T. Wazawa, A. H. Iwane, J. Saito, R. Ikebe, E. Katayama, T. Yanagida and M. Ikebe: "Class VI myosin processively along actin filaments backward with large steps," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290** (2002) 311-317.
- 2) 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.
- 3) H. Tanaka, A. Ishijima, M. Honda, K. Saito and T. Yanagida: "Orientation dependent displacements by single one-headed myosin molecules in a synthetic myosin filament," *Biophys. J.*, **75** (1998) 1886-1894.
- 4) A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi, H. Tanaka and T. Yanagida: "Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin," *Cell*, **92** (1998) 161-171.
- 5) K. Kitamura, M. Tokunaga, A. H. Iwane and T. Yanagida: "A single myosin head moves along an actin filament with regular 5.3 nanometres," *Nature*, **397** (1999) 129-134.
- 6) S. Esaki, Y. Ishii and T. Yanagida: "Model describing the biased Brownian movement of myosin," *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **79** (2003) 9-14.
- 7) K. Kitamura, M. Tokunaga, S. Esaki, A. H. Iwane and T. Yanagida: "Mechanism of muscle contraction based on stochastic properties of single actomyosin motors observed *in vitro*," *Biophysics*, **1** (2005) 1-19.
- 8) K. Sekimoto: "Kinetic characterization of heat bath and the energetics of thermal ratchet models," *J. Phys. Soc. Jpn.*, **66** (1997) 1234-1237.

(2005年7月11日受理)