

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：特別推進研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16002013

研究課題名（和文） 一分子生理学による生体分子機械の動作機構の解明

研究課題名（英文） Elucidating mechanisms of biological molecular machines by single-molecule physiology

研究代表者

木下 一彦 (KINOSITA, Kazuhiko, Jr.)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30124366

研究成果の概要：

光学顕微鏡下の一分子生理学、とくに「一目で分かる」研究を標榜し、巨大目印による分子機械の動き・構造変化の直接可視化を通じて、動作機構の解明を試みた。回転分子モーター F₁-ATPase における化学反応 力学的仕事の共役スキームをほぼ完成させ、分子機械一般に通じ得る共役原理を提出した。一方、回転軸無しでも回転するという意外な発見をし、構造に基づく機能の説明は振出しに戻った。二本足のモーター、ミオシンの脚の動きの直接観察に成功し、ブラウン運動をうまく使って歩くことを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	84,900,000	25,470,000	110,370,000
2005 年度	85,300,000	25,590,000	110,890,000
2006 年度	86,500,000	25,950,000	112,450,000
2007 年度	102,700,000	30,810,000	133,510,000
2008 年度	89,600,000	26,880,000	116,480,000
総計	449,000,000	134,700,000	583,700,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：一分子観察、一分子操作、回転分子モーター、F₁-ATPase、

リニアー分子モーター、ミオシン V、磁気ピンセット、光ピンセット

1. 研究開始当初の背景

たんぱく質ないし RNA でできた「分子機械」の働きは確率的で、2つ以上の分子機械の動きを同期させることはできない。仮に一斉刺激により同期させたとしても、すぐにばらばらになる。従って、分子機械の動作原理を解明するには、どうしても1個1個の分子が機能している様子を現場で連続観察する必要がある。さらに個々の分子に操作を加えて、それに対する応答も調べるのが、一分子生理学である。

そもそも分子1個が「機械」として働くことの直接証明は、パッチクランプ法の発明によるイオンチャンネルの一分子測定であった。これは、チャンネルの確率的動作の実証を初めとする目覚ましい成果を上げたが、チャンネル電流の測定が原理であるため、他の分子機械への応用がきかなかった。

汎用一分子生理学の嚆矢は、1993年のBlockらによるキネシンの歩幅測定。サブミクロンの巨大ビーズを付けてナノメートルサイズの分子モーターキネシンの歩行動作を実時間観察したのである。我々も同時期にミオシンの歩幅測定を試みていたが後れを取った。そこで、歩幅測定は、実は脚の動き、すなわち分子機械の構造変化の直接観察に他ならないと、考え方の転換を図った。以来巨大プローブによる構造変化の直接観察を目指し、2000-2004年度特別推進研究「一分子生理学の立ち上げ：一個の分子機械の機能と構造変化の直接観察」において、回転分子モーターF₁-ATPaseの機構解明を初めとする成果を上げた。一分子生理学は、その創設期から我が国が大きな貢献をしてきたが、我々も牽引車の役目を果たせたと思う。

2000年頃から、内外で一分子生理学に参加する研究者が急増した。しかし、測定装置・技術の開発という色彩がかなり濃く、一分子レベルの測定そのものが研究目的であるものが多かった。その中で我々は、一分子測定で初めて分かることを目指し、本研究を立ち上げた。必ずしも複雑な装置に頼ることなく、「一目で分かる」観察結果に基づき、生体分子機械の作動原理を分かりやすく示すことをねらった。

2. 研究の目的

光学顕微鏡下の一分子生理学を駆使して、分子機械の動作原理の根元的理解に到達することを目指した。具体的対象としては、可逆な回転分子モーターであるF₁-ATPaseや、リニアー分子モーターであるミオシンなどのATP駆動の分子機械、およびATP合成酵素のF₀部分などプロトンないしイオン流駆動の分子機械の、動作原理の

解明を主眼とした。個別の分子機械の動作機構もさることながら、多種多様な分子機械の研究の嚆矢となり見本・参考となるような、一般原理の提出を目指した。

「一目で分かる」研究として、プラスチックビーズなど分子機械に比べて巨大な目印を使い、分子機械の動き・構造変化を直接可視化することを標榜した。巨大目印は、磁石や光による分子機械の操作や、分子機械の出す力の測定にも用いられる。必要に応じて蛍光性ATPなどの蛍光色素一分子イメージングも加えて、分子機械の動作原理を探ろうとした。

3. 研究の方法

(1) ミオシンの歩行運動の可視化

二本足のミオシンVの片足の脚部(軽鎖結合部位)に巨大目印として微小管を結合させ、2つのビーズの間に吊り橋状に張ったアクチン線維の上を歩かせて、脚の動きを直視した。この研究は困難を極め、わずかなデータしか得られなかったため、脚部に結合した微小管の方をガラス面に固定し、アクチン線維の方の動きを観察する系も開発した。こちらは、歩行動作に伴うアクチンのスイングが10回以上連続するのを観察することが出来、一步ごとにアクチンの位置がずれていくのも確認できた。

(2) F₁-ATPaseにおける化学反応と力学反応(回転)の共役

3つの活性部位における化学反応と回転の連携を明らかにするため、蛍光性ATP(ADP)アナログを用いた一分子イメージングにより結合・解離を可視化しつつ、回転子サブユニットに結合させた(磁気)ビーズにより回転を観察した。さらに、磁気ピンセットを用いてビーズの回転を制御し、結合・解離の角度依存性を詳細に調べた。ビーズのわずかな動きから、F₁の出す回転力も見積もった。

燐酸の結合・解離を調べるには、回転子に40nmの金粒子を結合させ、その高速回転を超高速カメラにより毎秒8,000フレームで捉えた。燐酸濃度を変えたときの回転の様子の変化(待ち時間の増大、逆回転の出現)から、燐酸の結合・解離のタイミング、さらに結合常数の角度依存性を決定した。

活性部位にトリプトファンを導入することにより、アナログでないATPの結合も測定した。

(3) F₁-ATPaseの遺伝子改変(回転軸削除)

回転子であるサブユニットのどの部分が回転に重要かを調べるため、固定子部分に突き刺さっている回転軸部分(のC

末および N 末のヘリクス 2 本よりなるコイルドコイル)を先端から順に遺伝子的に削除した。大きく削除した変異体は安定性が悪いため、低温処理をさけるなどの工夫をした。

(4) F₁-ATPaseの活性の温度依存性

4-70 の範囲で温度制御できる顕微鏡ステージを開発するとともに、金粒子の高速回転観察のための暗視野顕微鏡装置を改良し、回転の温度特性を詳細に調べた。ATP 加水分解活性は、耐熱菌のたんぱく質を用いた ATP 再生系を用いて測定した。

(5) ATP 合成酵素の回転

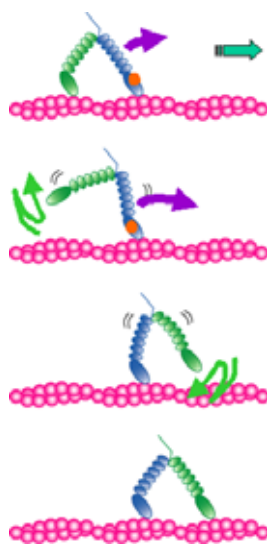
F₁-ATPaseとプロトン駆動回転モーター(まだ完全な証明はない)F₀の複合体であるATP合成酵素の回転観察を試みた。酵素を脂質膜(巨大リポソーム)中に再構成し、F₀の回転子と目されるc-ring(c subunitのリング状集合体)にビーズを結合させ、一方F₁側の固定子である σ_3 -ringをガラス面に固定して、ビーズの回転を観察した。

4. 研究成果

(1) ミオシンの二足歩行運動の仕組み

今のところ片脚の動きしか見えていないが、水中に張ったアクチン線維上をミオシンが進むにつれ、「歩行」から予想されるような往復のスイングが見られ、片方向のスイングは大きな揺らぎを伴った。逆に微小管をガラス面ないし水中に固定し、アクチン線維の方をスイングさせる系では、詳細な解析に耐える動画を得られた。5年越しで得た描像を、右図に示す。

ミオシンが両脚で立った姿勢から始めると(図・上)、後脚が持ち上がるとともに前足の足首が前屈して前脚が前傾する。この足首の曲げはATP(オレンジ)加水分解に駆動されるため、一方向に進行し、前脚は大きな揺らぎなしにスッと前にスイングする(紫矢印)。一方持ち上がった後脚は、脚の付け根を中心に、回転ブラウン運動する(緑矢印)。脚の付け根は完全な自在継ぎ手となっており、



持ち上がった脚は空間のあらゆる方向をランダムに経巡る。最終的に、着地している前足のさらに前方約 35nm に着地する。前方に着地するのは、前脚の前傾により腰が前方に出ているためである。ブラウン運動部分の可視化は初めてで、脚の付け根が完全に自由という結果は予想されていなかった。

実は、腰が前方にでただけだと、後ろ向きに負荷がかかって腰が引かれたときになおかつミオシン(一般の二本足モーター)が前進することを説明できない。我々は、持ち上がった足の爪先が下がることにより、前方着地の場合のみ足裏が正しくレール(ミオシンの場合アクチン)に平行になるという、爪先上下仮説を提唱している。片脚のみにしたミオシンVの脚部を固定し、足裏付近に巨大プローブを付けることにより、アクチン無しで(持ち上がった足に相当)実際に爪先上下が起きることを、最近動画として示せた(投稿準備中)。

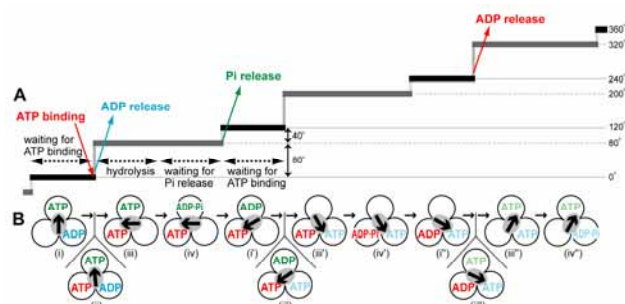
(2) F₁モーターにおける化学反応と力学反応(回転)の共役

共役スキームの完成

3つのサブユニット上にある3つの活性部位における化学反応(ATP結合、加水分解、磷酸解離、ADP解離)がどのように中央のサブユニットの回転を引き起こすか、逆にその回転角がどのように3つの活性部位の化学反応の進行を制御するのか、を明らかにすることができた(下図)。ADP解離のタイミングを蛍光性ATPアナログの一分子イメージングから、磷酸解離を回転の高速イメージングから求めた。7年を要した研究で、4人の査読者に激賞された。“This is an extremely high quality paper containing a comprehensive account of a large body of experimental work and its significance for understanding the mechanism of F₁-ATPase. It consists of two parts, the first identifying the mechanochemical step in F₁ that corresponds to phosphate release, the second analysing the binding and unbinding of ATP. Each alone would be a suitable body of work for publication in any journal.”

Boyerの結合変化説の具体的証明

磷酸解離駆動の40度回転に伴い、磷酸に対する



る親和性が 10^4 以上低下することを示せた。外力による逆回転でATPが合成されるとき、40度の逆回転に伴い、溶液中から磷酸を結合することになる。

結合ヌクレオチド数

活性部位にトリプトファンを導入し、高ATP濃度ではの描像と異なり3個のヌクレオチドが結合することを示した。しかし3個目は、活性と関係なく、前ページ下の図で空きになっている活性部位に溶液中のヌクレオチドが出入りするだけであることが分かった。図のスキームを支持するだけでなく、の結果では120度の曖昧さの残っていた磷酸解離のタイミングも完全に決定された。また、で得られたADP解離のタイミングは、無理矢理回転を遅くした状態で決めたものだが、通常の回転時でも正しいことが分かった。これらにより、 F_1 の結晶構造(本質的に1種類しか解かれていない)は、多くの研究者の期待のようにATP待ち状態に近いものでなく、80度回転後の状態に近いことが分かった。

(3) 回転軸無し F_1 モーターの回転

回転子を囲む筒(固定子)の中に突き刺さった回転軸と呼ぶべき部分を遺伝子的に全部削ってしまっても(右図)、多少もたつきながら回り続けることが分かった。回転子頭部が固定子の上にちょこんと乗った形で、遅いながらも百回転以上、正しい方向に回る。全く予想外の結果である。また、回転子の先端をポリペプチドを介して固定子と共有結合させてしまっても、wild typeと遜色のない回転が起きる。



(4) F_1 モーターの回転の温度依存性

我々の好熱菌由来の F_1 は、65において毎分12万回転を超える速度で回ることが分かった。超遠心機を超える。一方、4においては従来知られていなかった律速段階が現れる。

(5) ATP合成酵素

好熱菌由来のATP合成酵素をリポソーム中に再構成し、膜内にあることを蛍光染色により確認した上で、 F_1 部分におけるATP加水分解により F_0 の回転子であるc-ringが回転することを示せた。しかしながら、プロトン駆動の F_0 の回転の可視化には、まだ成功していない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計18件)

- (1) Y. Onoue, T. Suzuki, M. Davidson, M. Karlsson, O. Orwar, M. Yoshida, and K. Kinosita Jr. "A giant liposome for single-molecule observation of conformational changes in membrane proteins" *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)*, [査読有] 1788 (2009) 1332-1340.
- (2) M. D. Hossain, S. Furuike, Y. Maki, K. Adachi, T. Suzuki, A. Kohori, H. Itoh, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "Neither helix in the coiled coil region of the axle of F_1 -ATPase plays a significant role in torque production" *Biophys. J.*, [査読有] 95 (2008) 4837-4844.
- (3) S. Furuike, K. Adachi, N. Sakaki, R. Shimo-Kon, H. Itoh, E. Muneyuki, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "Temperature dependence of the rotation and hydrolysis activities of F_1 -ATPase" *Biophys. J.*, [査読有] 95 (2008) 761-770.
- (4) S. Furuike, M. D. Hossain, Y. Maki, K. Adachi, T. Suzuki, A. Kohori, H. Itoh, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "Axle-less F_1 -ATPase rotates in the correct direction" *Science*, [査読有] 319 (2008) 955-958.
- (5) K. Adachi, K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "Coupling of rotation and catalysis in F_1 -ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation" *Cell*, [査読有] 130 (2007) 309-321.
- (6) K. Shiroguchi & K. Kinosita, Jr. "Myosin V walks by lever action and Brownian motion" *Science*, [査読有] 316 (2007) 1208-1212.
- (7) K. Kinosita, Jr., K. Shiroguchi, M. Y. Ali, K. Adachi, & H. Itoh. "On the walking mechanism of linear molecular motors" *Adv. Exp. Med. Biol.*, [査読無] 592 (2007) 369-384.
- (8) M. D. Hossain, S. Furuike, Y. Maki, K. Adachi, M. Y. Ali, M. Huq, H. Itoh, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F_1 -ATPase is dispensable for torque generation" *Biophys. J.*, [査読有] 90 (2006) 4195-4203.
- (9) N. Sakaki, R. Shimo-Kon, K. Adachi, H. Itoh, S. Furuike, E. Muneyuki, M. Yoshida & K. Kinosita Jr. "One rotary mechanism for F_1 -ATPase over ATP concentrations from millimolar down to nanomolar" *Biophys. J.*, [査読有] 88 (2005) 2047-2056.
- (10) K. Kinosita, Jr., M. Y. Ali, K. Adachi, K. Shiroguchi, & H. Itoh. "How two-foot molecular motors may walk" *Adv. Exp. Med.*

Biol., [査読無] 565 (2005) 205-219.

- (11) M. Y. Ali, K. Homma, A. H. Iwane, K. Adachi, H. Itoh, K. Kinoshita Jr., T. Yanagida, & M. Ikebe. "Unconstrained steps of myosin VI appear longest among known molecular motors" *Biophys. J.*, [査読有] **86** (2004) 3804-3810.
- (12) K. Kinoshita, Jr., K. Adachi, & H. Itoh. "Rotation of F₁-ATPase: How an ATP-driven molecular machine may work" *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, [形式的査読] **33** (2004) 245-268.

[学会発表](計136件)

- (1) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited symposium lecture*) "How does F₁-ATPase rotate?" **Nobel Symposium** on single molecule spectroscopy in chemistry, physics and biology. 2008. 6.1-6, Stockholm, Sweden.
- (2) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited plenary lecture*) "Single-molecule physiology of protein machines" European Biophysics Congress. 2007. 7.14-18, London, England.
- (3) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited plenary lecture*) "Single-molecule physiology under an optical microscope" XXIII Biennial of the Society of Microscopy of Spain. 2007. 7.3-6, Bilbao, Spain.
- (4) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited plenary lecture*) "Single-molecule physiology of protein motors" Nano Tech Insight. 2007. 3.10-17, Luxor, Egypt.
- (5) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited lecture as the 2006 National Lecturer*) "Probing Nature's Nanoscale Machines with Micro-scale Probes" Biophysical Society 50th annual meeting, 2006.2.18-22, Salt Lake City, Utah, USA.
- (6) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited symposium lecture*) "F₁-ATPase: A molecular transducer of chemical and mechanical energies" **Nobel Symposium** 132: Energy in Cosmos, Molecules and Life, 2005.06.18-22, Stockholm, Sweden.
- (7) Kazuhiko Kinoshita, Jr. (*invited symposium lecture*) "F₁-ATPase: a rotary motor / generator" **Nobel Symposium** 131: Controlled Nanoscale Motion in Biological and Artificial Systems, 2005.06.13-17, Bäckaskog, Sweden.

[その他]

研究室ホームページ(業績他)

<http://www.k2.phys.waseda.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木下 一彦 (KINOSHITA KAZUHIKO Jr.)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30124366