

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成27年 6月15日現在

機関番号：32689
研究種目：特別推進研究
研究期間：2009～2014
課題番号：21000011
研究課題名（和文） 一分子生理学を超えて：生体分子機械を力で優しく働かせる
研究課題名（英文） Beyond single-molecule physiology: Letting molecular machines work by soft force
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
交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：474,900,000円

研究成果の概要（和文）：たんぱく質分子機械が働く仕掛けを探るのに、個々の分子が働いている現場を顕微鏡下で直接観て、さらに必要なら力を加えて応答を観るのが、一分子生理学である。従来は妨害方向に力をかける例が多かったが、外力で積極的に「働かせてやる」ことによる理解を目指した。働かせて得た成果ばかりとは言えないが、回転分子モーターの逆回転による ATP 合成の仕組みを始めとして、リニア一分子モーター、DNA 上で働く分子機械、さらに超分子レベルにおいて細胞分裂機構などにつき、多くの知見を得た。

研究成果の概要（英文）：A powerful means for understanding the mechanism of a protein molecular machine is single-molecule physiology where one directly watches the behaviors of individual molecules under a microscope. One may apply a force to learn from the response of the machine, but, in most cases so far, the force was in an impeding direction. Here, we propose to reach a better understanding by applying an external force to a machine “to let it work” properly. With this and other approaches we have been able to elucidate the mechanism of ATP synthesis effected by reverse rotation of a rotary molecular motor, and various mechanistic aspects of rotary and linear molecular motors, protein machines that work on DNA, and the supramolecular machinery for cell division.

研究分野：生物物理学

キーワード：たんぱく質分子機械 エネルギー変換 光学顕微鏡 一分子観察・操作

1. 研究開始当初の背景

たんぱく質（ないし RNA）の分子は、たった1個だけで見事な機能を発揮する。これら「分子機械」の働く仕掛けを解き明かしたい。そのために最も有効な手段として、個々の分子が働いているところをその場観察し、必要なら力を加えて応答を観るという「一分子生理学」を、標榜し実践してきた。しかし観るだけだと、仕掛けの想像は出来ても決め手に乏しく、また従来の一分子生理学における力の加え方は、分子機械を壊す・止める・邪魔する、といった負の作用が大部分であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、外からかけた力によって分子機械を「働かせて」みることにより、仕掛けを理解することを試みようとした。電位差や ATP などの、分子機械の本来の駆動力源を無くしてしまっ、あるいは分子機械の

大事な部品を取り去ってしまっ、ヒトの加える力で代替できないかを問う。うまく動かしてやることができたなら、まさに仕掛けの核心をついたことになる。優しく力を加えるのがミソで、正しい場所に正しい方向に力がかかれば、わずかな力で動くはずである。小さな分子機械が相手なので、そう簡単に成功するとは期待できないが、誰もが納得できる答えを1つでも2つでも得ることを目標とした。

3. 研究の方法

光学顕微鏡の下で、1個1個のたんぱく質分子機械の働きを観察する。動きや構造変化は、大きさミクロンオーダーのビーズなど、分子に比べてはるかに大きな目印を結合させることにより、一目で分かるような動画として示す。巨大目印は、力をかけるためのハンドルとしても用いる。光ピンセットでビー

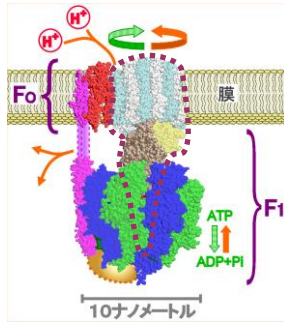
ズを摘んで引っ張る、磁気ピンセットで磁気ビーズを引っ張るあるいは回転させる、微小ピペットで吸い付ける、など。紡錘体など超分子構造が相手の場合は、針による伸張や切断、カンチレバーによる圧縮なども用いる。

4. 研究成果

以下の①②などは、5の発表論文の番号。

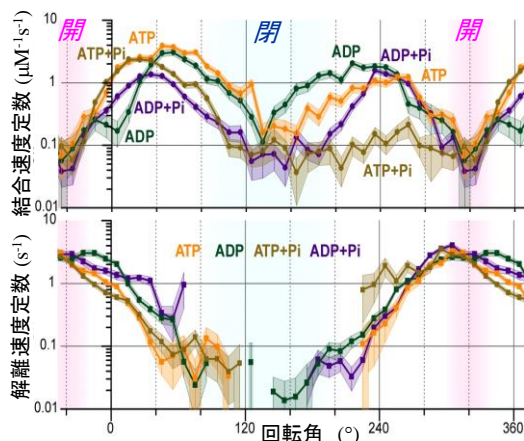
(1) 回転して働く分子機械 ATP 合成酵素

生命活動のエネルギー源 ATP は、右図のように F_0 と F_1 部分よりなる F_0F_1 -ATP 合成酵素が、ADP と磷酸 (P_i) を繋げて作る。 F_0 は水素イオン (プロトン) 駆動の回転モーター、 F_1 は ATP 分解により駆動される回転モーターで、



F_0 は図の下から見て反時計回り (赤矢印) に、 F_1 は時計回り (緑矢印) に回ろうとする。向きが逆なのだが、両者の回転子は繋がって一体となっている (点線で囲まれた部分)。プロトン流そうとする力が強いと、 F_0 が勝ち、 F_1 は逆回転させられる。すると、 F_1 内での ATP 分解反応も逆行して、ADP と P_i から ATP が合成されると考えられている。 F_1 が勝つ場合は、ATP が分解され、プロトンが逆向きに運ばれる。ATP の合成・分解という化学反応と、回転という力学反応が、いったいどのように共役するのだろう。

まずは単離した F_1 部分を用いて、共役の仕掛けを探った。 F_0 の代わりに磁気ビーズを付け、エネルギー源の ATP も無しで、磁気ピンセット (磁石) でゆっくりと、本来の回転方向ないし F_0 による ATP 合成回転の方向に回してやった。このとき、微量の蛍光性 ADP ないし ATP を溶液に加えておき、どのタイミングで結合・解離するかを観察した。その結果を結合・解離の速度定数の形にまとめて、回転角の関数として表したのが下図である。



ピンクの部分は結合が遅く解離が速い、すな

わちこの角度域では結合部位 (活性部位) が開いた状態であることを示す。320°から ATP 合成方向 (図で左方向) に回転させていくと、ADP・ATP とともに結合速度は上がり解離速度が下がり、どちらもしっかりと結合するように活性部位が開いていくことが分かる。ただし、合成に必要な P_i の存在下では、ATP の結合速度が上がらない。すなわち、 P_i が ATP の結合を邪魔して、もう一つの合成基質である ADP のみの結合を許す仕掛けになっている。さらに回転を続けて水色の角度域に入ると、活性部位がしっかりと閉じ、もはや ATP も ADP も新たに結合はできない。結合速度定数を見ると、この角度域を境に、ATP の方が ADP より結合しやすくなることが分かる。すなわち、活性部位が ADP 親和型から ATP 親和型に変化し、すでに結合していた ADP と P_i は繋げられて ATP となる。0°を越えて回転を続けていくと、活性部位が再び開いていき、ATP が溶液中に放出される。こうして ATP 合成を説明できた (⑤)。Boyer の結合変化説 (1997 年ノーベル化学賞) の実体を示すことができた訳である。より一般的には、たんぱく質の構造変化 (今の場合回転子部分の回転) に伴い、基質に対する親和性が何桁にもわたり連続的に変化する様子が、初めて観えたといつてよい。誘導適合 (induced fit) の実態を捉えたものである。なお、弱い (優しい) 磁場を用いているので、磁気ビーズの向きから、 F_1 の出す回転力の角度依存性も測定でき (現在解析中)、回転の力学エネルギーがどのように ATP 合成の化学エネルギーに変換されるのかも分かりつつある。ATP が結合すると、あるいは ADP が解離すると、 F_1 を順方向に回転させる力が発生し、ADP 結合、ATP 解離は逆方向 (ATP 合成方向) の回転力を発生することが、観えつつある。

化学反応と回転の共役の時系列に関しては、基本スキームを完成させた (⑬) つもりであったが、 P_i の結合解離のタイミングにつき異説が出ており、さらに研究を進めている。

F_1 の回転子部分 (左上の図の薄茶色部分: 青と緑の固定子ユニットの作る円筒に突き刺さっている) に、さまざまな大規模変異 (基本的に欠失変異) を導入して回転力を測定した結果、回転子を構成するアミノ酸残基の中に、回転力発生に必須なものは1つもないことが分かった。すなわち、塩橋形成や水素結合などのアミノ酸特異的な相互作用は、どれ1つとして回転力発生に必要ではない。おおよそに同じ形の物体ならば、何を突き刺してやっても、回転子として力強く回ることが示唆される (③⑨)。

F_0F_1 の親戚の V_0V_1 -ATPase においては、ATP 駆動の回転中に、12箇所での短時間停止が見られた (右図)。 V_0 の回転子 (左上の図



で膜中の水色と白の円筒部分)は、12個のユニットからなるので、 V_0 内での回転子-固定子相互作用が初めて見えたものと思われる。この回転は V_1 部における ATP 分解が駆動しているため、 V_0 と V_1 の回転子が一体となっていることの証明でもある (11)。

また、脂質膜小胞中に再構成した ATP 合成酵素を用いて、ATP 合成速度に、膜電位とプロトン濃度差という2つのプロトン駆動力が同等の寄与をすることを示した。それぞれ単独ないし片方が負のときも、両者の代数和としてのプロトン駆動力に応じた合成速度を出すことを示したのは、種々の合成酵素を通じて初めてである (7)。プロトン駆動の ATP 合成の逆反応としての、ATP 分解駆動によるプロトンポンプ活性の定量も、ほぼ完成しつつある。ATP 合成酵素研究の歴史は長いですが、ポンプ活性を定量したという報告は、我々が調べた限り、なぜか未だにない。

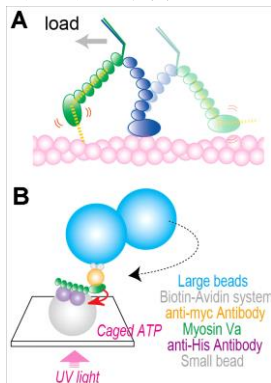
(2) イオンチャネルの手動開閉

多くのイオンチャネルは、膜にかかる電位差により開閉が制御されている。正電荷をたくさん持った電位センサーと呼ばれる部分が、電場に応じて動くことによりイオンの通り道を開閉すると考えられているが、まだ不明な点が多い。そこで、電位センサーを直接、電場を使わずに引っ張ることにより、チャネルを開くことを試みた。本研究の狙いそのままのテーマである。成功したのだが、実験は困難を極め、例数が稼げない。より簡便な方法を開発して、なんとか完成させたい。

(3) リニア分子モーターと細胞分裂

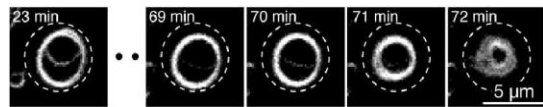
ミオシン・キネシンなど、ATP のエネルギーを使って線維状構造に沿って直線的に移動するリニア分子モーターは、逆に、線維を動かすための駆動装置としても働く。

アクチン線維の上を「歩いて」荷物を運ぶミオシン V に関しては、以前の研究で、持ち上がった脚が腰を中心にふらふらと回転ブラウン運動をすることを示した。回転揺らぎは前後均等に起きるわけだが、それでもミオシンが前進するのは、後脚が上がると同時に前足の足首が前傾して腰を前に出すからである。ところがこのミオシンは、腰を後に引っ張られてもちゃんと前に進む。本研究では、足が持ち上がると同時に爪先が下がることを示した (右図の緑の足)。脚が前方に振れたときのみ足裏が正しくアクチンに平行になる訳で、前進を保証



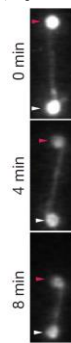
する仕掛けである (10)。二足歩行機構に関する、(少なくとも代表者にとって)最後の疑問に答えることができた。なお、このモーターは、後だけでなく斜めに引っ張られてもちゃんと歩き続ける。着地した前足が簡単には外れない仕組みになっているおかげであることが分かった (14)。細胞内でアクチン線維が曲がったり枝分かれしたりしていても、ちゃんと歩き続けられる訳である。

ミオシンは、細胞分裂時にも活躍する。細胞を2つにくびり切るとき、くびれる部分にアクチン線維が環状に集まり、その輪をミオシン II が収縮させる (収縮環) と考えられているが、直接の証明はなかった。そこで、細胞を模した液滴を油の中に作り (下図の点



線)、界面には脂質分子を配した。中に、アクチン、ミオシン、アクチン束化因子 (アクチンどうしを繋ぐたんぱく質でも一般的な集積促進剤でもよい) の3つと ATP を入れるだけで、アクチン線維は自動的に束ねられて環を形成し、さらに時間が立つにつれ環が収縮した。細胞内では数十種類のたんぱく質が関わる過程の本質を、たった3種の因子で再現できることを示唆するもので、細胞分裂の仕組みの全容を解く重要な手がかりになると期待される (2)。

細胞分裂時に染色体を分配するのは、微少管がラグビーボール状の束になった構造を持つ、紡錘体である。紡錘体中央に集まった染色体を、微少管が引っ張って引き離す。この過程に関わると考えられているキネシン様タンパク質 MCAK が、微少管の両端に結合して微少管を脱重合 (短縮) させることにより、約 1 pN の「脱重合力」を出せることが分かった。右図のように、MCAK を介して1本の微少管の両端にビーズを結合させておくと、外力に抗してビーズが互いに近づいていく。生体内で、MCAK が染色体移動に必要な力を発揮できることを示す結果である (13)。

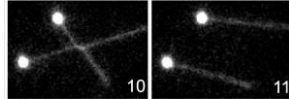


また、微小針や微小カンチレバーによる操作系を開発し、紡錘体に力をかけて変形させ、さらに2つに切り分けたり再び融合させることにも成功した。変形に対する紡錘体の応答は粘弾性的で、とくに粘性要素には、モーターたんぱく質による微少管どうしの動的架橋が効くことが分かった (12)。紡錘体のラグビーボール形状は基本的に非常に安定で、分割や融合などの前後で体積が大きく変わっても、軸比は保たれる。一方、紡錘体の大きさを決めるのは、基本的に微少管の量である (4)。さらに、細胞全体にごく短時間

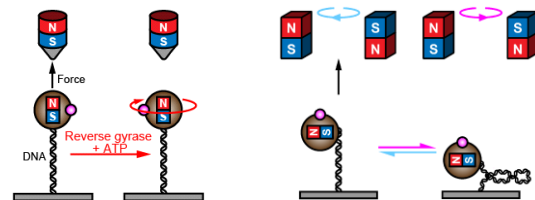
(0.1 秒以下) 力をかけるだけで、染色体分裂のタイミングを制御できることを発見した。紡錘体を引き延ばす方向に力をかけると分裂が早まり、縮める方向だと遅くなる (8)。高次システムのレベルでの、外力による機能補助 (促進) といってもよいかもしれない。

(4) DNA 上で働く分子機械

生体内で、長い DNA は複雑に絡み合うが、その絡み合いを解くのが、トポイソメラーゼと呼ばれる一群のたんぱく質分子機械である。DNA にビーズを付けて光ピンセット操作で絡み合わせておき、II 型トポイソメラーゼ存在下でまるで魔術のように DNA どうしのすり抜けが起きることを、初めて可視化した (右上図)。図は 30 回絡めておいた結果だが、このような多重絡まりを解くときは、DNA 上に一分子のトポが 10 秒程度留まり、その間にもう一本の DNA を次々と通過させる (6)。百聞は一見にしかず、DNA どうしの交差角依存性なども、曖昧さなしに調べられる。



また、高温で DNA の二重螺旋をさらにきつく巻くように捻っていく、好熱菌の持つ酵素 reverse gyrase の働きも可視化した。70°C で顕微鏡観察ができる系を開発し、磁気ビーズを付けた DNA を磁気ピンセットで上方に引っ張っておいて、reverse gyrase を作用させた。下図左のように DNA の回転を許し、DNA に



捻れがたまらないようにすると、一分子の reverse gyrase が DNA を 100 回以上連続して捻り続ける。一方、上図右のように回転を止めた場合は、捻られた DNA が図のように超らせん構造をとり、ビーズを沈める。磁石対を回して捻りを解いてやるとビーズはいったん浮くが、すぐに reverse gyrase が働いてまた沈む。好熱菌の DNA は環状なので、超らせん形成が生理的反応である。反応速度を解析すると、無負荷 (捻りがたまっていない状態) での速度は、従来の生化学による見積りに比べて 100 倍以上も速かった。しかし DNA に捻れがたまるにつれ反応は急速に遅くなり、捻れ戻す力がほぼ 5 pN・nm に達したところで、反応は進まなくなる。この捻れ戻し力は、そこでもう一捻りさせるのに必要な仕事が熱エネルギーの 6 倍程度、あるいは ATP 分解で得られるエネルギーの数分の一、という小さなものである。すなわち、reverse gyrase は DNA をほんのわずかにだけ巻き上げた状態

に保ち、何かの理由で DNA がほどけたときにはさっと巻き上げる。軽い巻き上げで高温での DNA の熱変性を防ぎ、なおかつ DNA の複製や転写などらせんをほどく必要のある生理反応を邪魔しないという、よくできた分子機械である。なお、反応には ATP が必要だが、一捻りに 2 個以上の ATP が消費されてしまう。熱揺らぎ頼りの、ルースな共役機構に基づく反応モデルを提出した (1)。興味深いことに、この酵素の働きを助けてやろうと、磁石で DNA を捻ってやったところ、reverse gyrase は助けを拒否して DNA を捻り戻してしまった。この逆反応の詳細は、現在解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 65 件、うち 59 件査読有)

- ① T. Ogawa, ... K. Kinoshita, Jr. (6 番目/6 人中) “Direct observation of DNA overwinding by reverse gyrase” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (2015) 7495-7500. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1422203112
- ② M. Miyazaki, ... S. Ishiwata (5/5) “Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings in vitro” *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 480-489. 査読有 doi: 10.1038/ncb3142
- ③ R. Chiwata, ... K. Kinoshita, Jr. (9/9) “None of the rotor residues of F₁-ATPase are essential for torque generation” *Biophys. J.* 106 (2014) 2166-2174. 査読有 doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.013
- ④ J. Takagi, ... S. Ishiwata (6/6) “Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size” *Cell Rep.* 5 (2013) 44-50. 査読有 doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.021
- ⑤ K. Adachi, ... K. Kinoshita, Jr. (5/5) “Controlled rotation of the F₁-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis” *Nat. Commun.* 3 (2012) 102. 査読有 doi: 10.1038/ncomms2026
- ⑥ K. Yogo, ... K. Kinoshita, Jr. (6/6) “Direct observation of strand passage by DNA-topoisomerase and its limited processivity” *PLoS ONE* 7 (2012) e34920. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0034920
- ⑦ N. Soga, ... K. Kinoshita, Jr. (2/4) “Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis” *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 9633-9639. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.335356
- ⑧ T. Itabashi, ... S. Ishiwata (6/6) “Mechanical impulses can control metaphase progression in a mammalian cell” *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 109 (2012) 7320-7325. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1116749109
- ⑨ R. Chiwata, ... K. Kinoshita, Jr. (8/8) “Torque generation in F₁-ATPase devoid of the entire amino-terminal helix of the rotor that fills half of the stator orifice” *Biophys. J.* 101 (2011) 188-195. 査読有 doi: 10.1016/j.bpj.2011.05.008
- ⑩ K. Shiroguchi, ... K. Kinoshita, Jr. (6/6) “Direct observation of the myosin Va recovery stroke that contributes to unidirectional stepping along actin” *PLoS Biol.* 9 (2011) e1001031. 査読有 doi: 10.1371/journal.pbio.1001031
- ⑪ S. Furuike, ... K. Kinoshita, Jr. (5/6) “Resolving stepping rotation in *Thermophilus* H⁺-ATPase/synthase with an essentially drag-free probe” *Nat. Commun.* 2 (2011) e1001031. 査読有 doi: 10.1038/ncomms1215
- ⑫ Y. Shimamoto, ... S. Ishiwata (3/5) “Insights into the micromechanical properties of the metaphase spindle” *Cell* 145 (2011) 1062-1074. 査読有 doi: 10.1016/j.cell.2011.05.038
- ⑬ Y. Oguchi, ... S. Ishiwata (5/5) “The bidirectional depolymerizer MCAK generates force by disassembling both microtubule ends” *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 846-885. 査読有 doi: 10.1038/ncb2256
- ⑭ Y. Oguchi, ... S. Ishiwata (6/6) “Robust processivity of myosin V under off-axis loads” *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 300-305. 査読有 doi: 10.1038/nchembio.322
- ⑮ R. Shimo-Kon, ... K. Kinoshita Jr. (6/6) “Chemo-mechanical coupling in F₁-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis” *Biophys. J.* 98 (2010) 1227-1236. 査読有 doi: 10.1016/j.bpj.2009.11.050

[学会発表] (計 165 件、うち国外 54 件)

- ① S. Ishiwata (Plenary) “Manipulation of cellular structure and function with physical parameters: Mechanical/thermal regulation and boundary conditions” A*STAR-JST joint workshop, 2015.1.12, Singapore
- ② K. Kinoshita, Jr. (Invited public lecture) “Nature’s smallest rotary engine: why we eat and why we breathe” Nick and Maggie DeWolf Lecture, 2015.1.8, Wheeler Opera House, Aspen, USA
- ③ T. Ogawa, ... K. Kinoshita, Jr. (6/6) “Direct observation of DNA overwinding by reverse gyrase” 8th Biennial workshop on single molecule biophysics, 2015.1.4-9, Aspen Center for Physics, Aspen, USA
- ④ S. Ishiwata (Invited talk / Discussion leader)

- “Boundary conditions and temperature modulate performance of actomyosin motors in a nanoscopic space” Gordon res. conf., 2014.7.7, Snow Mount Resort, VT, USA
- ⑤ K. Kinoshita, Jr. (Invited) “Letting molecular machines work by soft assisting force” Gordon res. conf., 2014.6.13-18, Lucca, Italy
- ⑥ S. Ishiwata (Invited) “Contractile system of muscle as an auto-oscillator” Active soft and biological matter workshop, 2012.9.30-10.5, Ecole de Physique des Houches, France
- ⑦ S. Ishiwata (Invited) “Micro-mechanics of cell division and chromosome segregation” UK-Japan symp. for mechanochemical cell biology, 2012.8.22-26, Birmingham, UK
- ⑧ K. Kinoshita, Jr. (Invited) “Single-molecule physiology and beyond” 17th Int. Biophys. Congr., 2011.10.30-11.3, Beijing, China
- ⑨ K. Kinoshita, Jr. (Invited) “Progress and regress in single molecule physiology” IX European Symp. Protein Soc., 2011. 5.22-5.26, Stockholm, Sweden
- ⑩ S. Ishiwata (Invited) “Mechanochemistry of biotile systems: From single molecules to supramolecular assemblies”, 1st KIAS conf. subcel. dynam., 2011.7.25-28, Seoul, Korea
- ⑪ K. Kinoshita, Jr. (Plenary) “Single-molecule studies of the mechanics of molecular motors” 6th World Congr. biomechanics, 2010. 8.1-6, Suntec Convention Centre, Singapore

[図書] (計 2 件)

原田慶恵・石渡信一 編, 化学同人, 「1 分子生物学」, 2014, 総ページ 292

[その他]

報道関係 (計 14 件)

- ① 石渡信一 “細胞分裂装置 (収縮環) の形成メカニズムの一端を解明”, 日経産業新聞, 2015.3.26
- ② 石渡信一 “細胞分裂の速度 力かかると変化 / 早大・東大が現象発見”, 日経産業新聞, 2012.5.21

ホームページ

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

<http://www.ishiwata.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

(2) 研究分担者

石渡 信一 (ISHIWATA, Shin'ichi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 10130866