モータータンパク質1分子の動きを見る，化学反応も見ろ*

樋口 秀男**

Observation of Motility and Chemical Reaction by Single Molecules of Motor Proteins

Hideo HIGUCHI

1. はじめに；1分子タンパク質科学登場

この特集の読者の中には、小さい頃、昆虫や海の生き物の採集に出かけたことをなつかしく思い出す方も多いのではないだろうか。筆者もその一人であった。動くものに興味を引かれ、採集した生き物を家で飼い、すぐに死んでしまい、死骸を寂しく川に流したものである。大学に入り子供心がよみがえり、生物の動きを司る筋肉細胞の生理機能を調べた。当時の研究目的は筋肉の動きを分子レベルで理解する事であった。しかし、あの手この手を尽くしても、筋肉細胞を対象とした研究から分子の機能を直接引き出すのは困難であった¹⁾。

それは次のような理由による。筋肉細胞は何兆個もの運動タンパク質のミオシン分子が規則的に配列し分子集団で力発生を行う。古くから、この筋肉細胞の力や速度を解析して、ミオシン分子の力や力学応答の予想が立てられた。これはちょうど、多人数で行う綱引きの時に、綱に掛かる力と綱の動きから、様々な仮定のもとに各人の力のだし方や力の大きさを推測するのに類似している。人間ならばかけ声を掛けてみんなが一斉に力を出すことができるので、平均の力と力が出る時間経過を推測することが可能だが、ミオシン分子は人間と同じように振る舞うとは思えない。力を出さない分子もいるだろうし、出す力も分子によって違うかも知れない。もしかすると、みんなとは逆向きに力を出す分子もいるかも知れない。すなわち重要な問題は次の2点である。何分子のミオシン分子が力を発生しているのか？ミオシン分子1分子の発生した力の大きさや方向は時間とともにどのように変化するのか？これらの疑問に対する答えを多分子系の実験結果から推論し、1分子の機能を推測するのだから、その結論は不確実なものにならざるおえない。

より推論をなくすためにはどのような実験系を組めば良いだろうか？従来の多分子を扱う研究の問題は、分子の挙動の平均像しか見えず、個々の分子の挙動を追跡できないことにある (Fig. 1)。この問題を回避するために1分子の機能を直接観測できれば、不確かな仮定などい

らずに1分子の機能を理解できるではないか²⁾⁻⁴⁾。ちょうど、一人で綱引きを行い、綱に掛かる力と綱の動きを観測すれば、その人の力のだし方や、力の大きさを直接理解できると同じように1分子測定から1分子機能を理解できよう (Fig. 1)。でもどうやって、1分子の動きや力を測定すればよいのだろうか？

2. タンパク質1分子の住む nm, pN, ms の世界

“どうやって測定するか？”を見つけるためにモータータンパク質1分子の住む世界の距離、力、時間のスケールを考えてみよう。モータータンパク質の機能部分の大きさは約10 nm であり (ミオシン頭部16 nm, キネシン頭部7 nm, ダイニン頭部20 nm)、モータータンパク質の運動のレールの単位サイズも10 nm 程度 (アクチン分子5 nm, 微小管を構成するチューブリン分子8 nm) である (Fig. 2)。このように、10 nm 程度がモータータンパク質1分子の住む世界の距離のスケールになるだろう。力のスケールは、エネルギー=力×距離なので、モータータンパク質の分解する1分子のATPの加水分解エネルギー (約 10^{-21} J = 10 pN × 10 nm) を距離10 nm で割って、10 pN 程度と見積られる。時間のスケールは距離10 nm をモータータンパク質の運動の速度約1 μ m/s で割った10 ms 程度であろう。すなわち、モータータンパク質1分子の住む世界の距離・力・時間スケールは、10 nm・10 pN・10 ms のオーダーであろう。これらのスケールで起こる1分子の機能を直接観測するためには、これらのスケールよりもさらに高い分解能、すなわち、1 nm, 1 pN, 1 ms 分解能を持つ測定装置を創ればよい。

3. nm 変位と pN 力を見る

これまでの実験で、nm スケールの1分子を観測するためには電子顕微鏡が用いられてきた。しかし、電子顕微鏡観察の最大の欠点は観察のためにタンパク質を乾燥させ、固定し、染色などをしなければならず、モータータンパク質などの動くタンパク質を生きた状態で観察するのは不可能なことであった。光学顕微鏡ならば、生きた状態でモータータンパク質の動きを観測することが可

* 原稿受付 1999年10月1日

** 東北大学 工学研究科

Fig. 1 1分子計測の特徴

従来の多分子を用いた実験系で計測できるのは、平均値であるので、分子が多状態を取ったり、ランダムな反応をしているときには、分子の機能を明確には理解できない。そのため、結果の解釈に多くの仮定を必要とするときがある。それに対して、1分子計測で機能を測定できれば、それぞれの分子の時事刻々の状態が直接的にとらえられるので、結果の解釈が簡単である。

Fig. 2 モータータンパク質

主なモータータンパク質は3種類知られている。神経軸索内の顆粒の輸送を行うキネシン（全体の分子量は約40万、機能頭部の分子量は約4万）、骨格筋・心筋・平滑筋の力強い動きを行うミオシン（全体の分子量は約50万、機能頭部の分子量は約13万）、精子鞭毛の振動や神経軸索内の顆粒の輸送を行うダイニン（全体の分子量は約200万、機能頭部の分子量は約50万）。キネシンとダイニンは微小管と相互作用して運動を行う。ミオシンはアクチンフィアメントと相互作用して力を発生する。キネシン・ミオシン・ダイニンどれも、細胞分裂の時に力を合わせて大活躍をする。

能であるが、1分子のタンパク質は小さすぎて光学顕微鏡では直接には見ることはできない。そこで、タンパク質にビーズやガラス針などの大きな目印を付ければ、光学顕微鏡で間接的にモータータンパク質の動きを追跡できる²⁾⁻⁴⁾。これはちょうど、遠く離れた位置からは、蟻の姿が見えなくても、蟻の運ぶ大きな昆虫の死骸の動きから蟻の動きを追跡できるのと似ている。

小さな分子に、このような目印を付ければ動きを見ることが出来るだろうが、極微のナノメートルの動きを追

跡できるのだろうか？ 実際、光学顕微鏡の分解能は200 nmしかないので、とても1 nmの動きなど追えないと思ってしまう。でも待てよ、光学顕微鏡の分解能とは“2つの点を分離して見分けることの出来る距離の限界”のことだ。1点の位置を観察する場合、1点が変位をすれば、像もそれに対応した変位をするので、像の中心を追跡すればいくらかでも小さな変位を測定することができるはずだ (Fig. 3 a)。

さて、実際の測定では、タンパク質を結合した細いガ

ラス針や小さなビーズを可視光で照らし、対物レンズでその像を1千ないし10万倍に拡大する (Fig. 3 a)。そうするとガラス針やビーズの1 nmの動きが $1\mu\text{m}$ –0.1 mmに拡大される。10万倍に拡大した場合には、肉眼でもガラス針やビーズの1 nmの動き(拡大後は0.1 mmの動き)を確認できる。動きを精密に測定するために、拡大像を2つの隣り合った光センサーに写す。もし像が2つのセンサーの中央に位置すれば、光強度は両センサーで等しいため光強度の差はゼロになり、ガラス針やビーズが変位すると拡大像も変位し、両センサーでの光強度の差が生まれる (Fig. 3 b)。この光強度の差を電氣的に記録すればガラス針やビーズの変位を高精度で測定できる。この方法を用いて、実際にどのくらいの位置分解能が得られるかを測定した (Fig. 3 c)。ガラス針の根元をピエゾ素子で nm レベルで正弦波状に振動させたところ、なんと0.1 nmの振動を1 ms分解能で計測できた。0.1 nmといえば原子1個の大きさではないか! この装置により、目的の1 nm以下の変位測定が可能となった。

力をバネばかり等ではかる場合は力=バネ定数 $\times$ 変位で与えられるので、pNレベルの微小な力を測定するためには、バネ定数を小さくするか変位を小さくすればよいことになる。変位の分解能は上に示したように1 nm程度なので1 pNを測定するには1 pNの力で1 nm以上伸びるようなとても柔らかなバネ(1 gのおもりで10 m伸びる)を作らなければならない。それには2つの方法がある。1つは細いガラスニードルや金属針の曲げを利用する方法ともう一つは光の「バネ」を利用する方法である。ここでは光バネの説明をする。

対物レンズで直径約 $0.8\mu\text{m}$ に集光したレーザー光を直径0.2–1.0 μm のポリスチレンビーズに当てる。ビーズによって光が曲げられるために光の運動量は変化する。そのときに、ビーズは光の曲がった方向とは逆向きに反作用の力を受ける。いま、ビーズが集光の中心より右に動いたとしよう、このときビーズの右側に当たる光強度が減少するので、光がビーズを右に押す力が減少し、従ってビーズは左に動く。すなわち、ビーズが右に動くとき光はビーズをそれとは逆の左に押し、「光のバネ」で捕まえ(トラップ)られる。この時のバネ定数は波長1064 nm、出力0.1 Wのレーザーを用いた場合では約0.1 pN/nmとなる (Fig. 3 d)。このバネ定数のとき1 nmの位置分解能があれば0.1 pNの力分解能を持つこととなる。かくして、1 nm, 1 pN, 1 msの分解能を得ることができた。

4. キネシン1分子のナノメートルの動きを見る

まずは、運動の単純なモータータンパク質キネシン1分子の運動の分子機構を紹介する。キネシン分子は神経軸索の内で微小管と相互作用して物質輸送を行う1985年に単離された比較的新しいモータータンパク質である

Fig. 3 ナノメートル計測法

顕微鏡の2点を識別する分解能は200 nmであるが拡大されたビーズの像を4つの光センサーに結び(a), 光量の差からガラス針の動きを正確に測定することができる(b), c。ガラス針を振幅0.1 nmと1 nmの正弦波で振った時、検出された動き。レーザートラップを用いたビーズの捕捉(トラップ)。ビーズは光の焦点方向に引き寄せられる。ビーズのブラウン運動の大きさから捕捉のバネ定数を求めることができる。

(Fig. 1, Fig. 4 a)。キネシンの特徴とは、微小管と相互作用するキネシン分子の数をたやすく1個にすることができ、しかも、たった1分子のキネシン分子でも微小管から解離することなく長距離かつ長時間(と言っても1秒程度)運動を継続することができることである。実験では牛の脳神経細胞から精製したキネシン分子を直径1 μm のポリスチレンビーズ1個当たり1分子の割合で混ぜ、キネシン分子をビーズ表面に結合させる。このキネシン付きビーズをレーザーにより捕まえ、ガラス表面に結合した微小管の上に持ってゆく (Fig. 4 b)。ビーズ上のキネシン分子が微小管に近づくとき相互作用して運動を開始する。ビーズの動きを nm $\cdot$ pN 分解能で計測する

ことによって間接的にキネシン分子の運動を追跡することができる (Fig. 4 c). キネシン分子が微小管と相互作用すると, はじめ速い速度で変位し, 力が大きくなるにつれて次第に速度が低下し, ついにはほとんど変位せず, 一定の最大力 7 pN を維持し, そのうち解離し, 力はゼロに戻る.

変位をよく見ると変位はなめらかに変化するのではなく, 階段状に変化する^{4), 5)} (Fig. 4 c). 1 段の変位の大きさは力や速度によらず約 8 nm であった. 微小管内のチューブリン分子の間隔が 8 nm であることから, キネシン分子のステップ (歩) 幅はチューブリン分子の大きさによって規定されていると考えられる. さらに, キネシン分子のステップと次のステップまでの時間間隔のヒストグラムを取ると, 頻度は時間とともに指数関数的に減少した. この結果はステップが 2 状態の化学反応の状態の遷移時におこることを示唆する⁵⁾. すなわち, キネシンは人間の歩行時に足が交互に動くように, キネシンの 2 つの機能部位が交互に動くことによって前進すると考えられる.

5. ミオシン 1 分子のナノメートルの動きを見る

ミオシンはアクチン繊維と相互作用して, 骨格筋をはじめ, 心筋, 平滑筋の収縮と非筋細胞の運動を担っている (Fig. 1, 5 a). ミオシンを用いた 1 分子の実験は次のように行われた. まず, 天然のミオシンとミオシンの力を出す頭部をタンパク質分解酵素で削り取った頭なしミオシンを精製する. 少量の頭のある天然ミオシンと大量 (天然ミオシンの約 1000 倍) の頭なしミオシンを混ぜると, 長さ 3–10 μm のフィラメントを形成し, そのミオシンフィラメント内にはミオシン頭部が 1 個程度しか存在しない. このフィラメントをガラス上に固定する. 一方, アクチンフィラメントの両端にはビーズを付けておき, レーザーでトラップし, ミオシンフィラメント上

に持って行く (Fig. 5 b). ミオシンが力を出すとアクチンフィラメントに力が伝わり, ビーズは変位をする. この変位と力を nm · pN 計測する. その結果, 生理的 ATP (ATP とはミオシンやキネシンのエネルギー源) 濃度 (1 mM) のとき, 短時間 (約 20 ms) での変位が観察された (Fig. 5 c). キネシンの連続的な力発生に対して, ミオシンは次の ATP がミオシンに結合するやいなやアクチンフィラメントからはずれてしまうのである. 我々の筋肉が長時間力を出すことができるのは, 多分子がランダムに力を発生するためである.

ATP 濃度を下げると (10 nM), ミオシンが次の ATP を結合するのに時間を要するので, 長時間力を維持することが出来る. そのため, 変位は矩形波状になり, その変位の大きさは約 20 nm であった (Fig. 6 b). ATP 濃度を下げたときに, ミオシンはどのようにして 20 nm の変位を起こしているのだろうか? これまでの研究ではミオシン頭部のアクチン結合部付近は力発生中に角度を変えず, ミオシン頭部の下部が 2–5 nm 変化すると考えられている^{6), 7)}. 数 nm では 20 nm 変位の一部しか説明できない. 可能な解釈はミオシン分子はアクチンフィラメントからはずれることなく, いくつかのアクチン分子と相互作用をすることである.

もう一つの大きな発見は, 20 nm の変位は ATP 濃度が低かろう (10 nM) と高かろう (1 mM) と約 20 ms 以内の短時間におこることである. 10 nM の ATP 濃度では, ミオシンが次の ATP を分解するまで平均 20 秒もかかるので, 20 ms の短時間に分解できる ATP の数は 1 分子に限られるはずである. だとすると, ATP 1 分子の分解中に 20 nm 変位, すなわち, 数個のアクチンを乗り換えて何回も力を出しつづけていると考えられる. 従来の仮説は「1 回の化学反応に対して 1 回の力学反応が対応しており, 1 分子 ATP の分解中に 1 回の力発生をする」だった. ところが, 1 分子を用いて得たこ

Fig. 4 キネシン 1 分子の力と変位の測定

a. キネシンの原子構造 b. キネシン 1 分子をビーズに付け, レーザートラップして, 微小管と相互作用させる. ビーズの動きをナノメートル分解能で測定して, ビーズの動きからキネシンの動きを測定する. c. キネシン 1 分子の変位と力発生の時間経過. 8 nm を単位とし, 階段状に進むのが特徴.

Fig. 5 ミオシン1分子の力とATP分解反応の同時測定

a. ミオシンの原子構造 b. ガラス上にミオシンの機能頭部を1個程度含んだフィラメントを結合させる。このミオシンと、両端をビーズに結ばれたアクチンフィラメントを相互作用させる。ミオシンの力発生により、アクチンフィラメントが動き、さらにその動きはビーズに伝わる。このビーズの動きをナノメートル分解能で測定する。1分子のATP分解反応は蛍光標識したATP分子を緑のレーザーで全反射照明することで励起する。c. ATP濃度が1 mMの時のミオシン1分子による力発生。スパイク上の変位がミオシンの力。右の拡大図に示すようにミオシンは20 msでアクチンからはずれ、力がゼロに戻る。

の結果は「1分子ATP分解中に何回か力発生をすることができる」と解釈でき、従来の仮説を覆すものである。1分子のATP分解中にミオシンが何回も力発生をするためには、1分子のATPのエネルギーを小分けにして使う必要がある。いつ、どのようにエネルギーを小出しにするのだろうか？タンパク質科学に残された重要な課題である。

6. 1分子ATP分解反応を可視化する

ミオシンの力発生がATP分解のどの過程で起こるかを確かめるためには、生きたモータータンパク質の1分子ATP反応を見なければならぬ。電子顕微鏡を用いても見えないATP分子をいかにして見ればよいのだろうか？その方法の1つは、キネシン1分子の動きをビー

Fig. 6 ATP1分子の分解反応の可視化

a. Fig. 5 bに示した実験のビデオ像。蛍光ATPがミオシンに結合すると蛍光強度が矢印で示したようにスポットとして見える。5秒-10秒間で蛍光ATPはミオシンから解離し、蛍光強度はゼロとなる。b. 蛍光ATPがミオシンに結合したときのミオシンの変位と蛍光強度の増加を示す。1分子の力学反応と化学反応を同時に測定できた。

ズの動きから見たようにATP分子にビーズ(直径200-1000 nm)を結合させるか蛍光分子(直径1 nm)を結合し¹²⁾、ビーズ又は蛍光の位置よりATPの位置や結合・解離時刻を決めるのである。ここでは蛍光分子を用いた実験を紹介しよう (Fig. 5 b)^{8), 9)}。ミオシン1分子の力を測定した実験サンプル内の溶液に蛍光分子を結合したATPを加える。もし、蛍光ATPがミオシンに結合すればその位置が光り、ATPを分解すればATP(たぶんADP)がはずれ光がなくなる。問題なのはミオシンに結合していない溶液中の蛍光ATPも光ってしまい、ミオシンに結合した蛍光ATP分子はバックグラウンドと区別できないことである。もしバックグラウンドの明るさが1分子の蛍光強度程度にすることができればミオシンにATPが結合した場所がそれ以外の場所の2倍の明るさになるので区別ができる。このようにバックグラウンドの明るさを下げるためには、蛍光ATPの濃度を下げればよい。例えば通常の落射蛍光顕微鏡を用いた場合にはサンプル内全面の蛍光が励起され光るため、蛍光ATPの

濃度を 0.1 nM 以下にする必要がある。このような低濃度では、ミオシンは 2000 秒 (33 分) に 1 回しか ATP を結合できず実用的ではない。この問題は、ガラス表面付近 (約 150 nm) のみを照明する全反射照明法によって解決された⁸⁾。この方法で蛍光 ATP 濃度を 20 nM まで上げることができ、10 秒に 1 回程度の結合が起こるようになった (Fig. 6)。図に見られるように ATP が結合するとミオシンはアクチンフィラメントからはずれた。これは多分子系の実験からも予想されていた現象である。驚いたのは、ATP 又は ADP (蛍光はアデニンに付いているので ADP のときも光る) がはずれてから数 100 ms 後にも力が出せることである。ミオシンは ATP を分解した後も、エネルギーを貯め込んでおり、その貯められているエネルギーが力発生に利用されていると考察できる。もしこれが本当ならば、驚くべき結果である。なぜならば、タンパク質に数 100 ms もの間の“記憶”があることを示唆するからである。

7. 終わりに

モータータンパク質のキネシンやミオシンの 1 分子運動を解析して、初めて、運動の分子機構解明の糸口に近づけた感がある。例えば、キネシンは 8 nm の歩幅で機能部位を交互に動かし、最大力は 7 pN に達する。ミオシンは 20 nm のスパイク状の変位をし、ATP のエネルギーは貯蔵される。これらの結論は従来の多分子を扱う研究では推論が困難であった。一分子を直接観察する生命科学は 7 年前に生まれたまだ幼子にすぎないが、この短期間に明らかにされた結果は我々のモータータンパク質に対する考え方を変えつつある¹⁰⁾。我々が若い頃採集した虫達の動きの奥に隠された分子機構の解明は遠い未来ではなさそうである。

参考文献

- 1) Higuchi, H. and Y. E. Goldman.: Sliding distance between actin and myosin filaments per ATP molecule hydrolyzed in skinned muscle fibers, *Nature*, 352 (1991) pp. 352–354.
- 2) Ishijima, A., T. Doi, K. Sakurada and T. Yanagida: Subpiconewton force fluctuations of actomyosin in vitro, *Nature (Lond.)*, 352 (1991) pp. 301–306.
- 3) Ishijima, A., Y. Harada, H. Kojima, T. Funatsu, H. Higuchi and T. Yanagida: Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 199 (1994) pp. 1057–1063.
- 4) Svoboda, K., C.F. Schmidt, B.J. Schnapp and S.M. Block: Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry, *Nature (Lond.)*, 365 (1993) pp. 721–727.
- 5) Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H. and Yanagida, T.: Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry, *Biophys. J.* 73 (1997) pp. 2012–2022.
- 6) Wakabayashi, K., M. Tokunaga, I. Kohn, Y. Sugimoto, T. Hamanaka, Y. Takezawa, T. Wakabayashi and Y. Amemiya: Small-angle synchrotron X-ray scattering reveals distinct shape changes of the myosin head during hydrolysis of ATP, *Science*, 258 (1992) pp. 433–447.
- 7) Whittaker, M., E.M. Wilson-Kubalek, J.E. Smith, L. Faust, R.A. Milligan and H.L. Sweeney: A 35-Å movement of smooth muscle myosin on ADP release, *Nature (Lond.)*, 378 (1995) pp. 748–751.
- 8) Funatsu, T., 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 (Lond.)*, 374 (1995) pp. 555–559.
- 9) Ishijima, A., 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) pp. 161–171.
- 10) 樋口秀男: モータータンパク質 1 分子の動きをみる, *実験医学*, 17 (1999) pp. 473–480