

生物分子エンジンの動作原理



柳田 敏雄*

はじめに

生体内では主にタンパク質からなる超マイクロ分子機械によって、様々な営みが驚くべき巧妙さでなされている。この生物分子機械がどのような動作原理で働いているのか、この魅力的な問題に分野を問わず多くの人々が関心を寄せ、また最近では直接関わりを持つ研究者が急増している。しかし、このきわめて精巧にできた目にも見えない超マイクロ分子機械を取り扱うには既存の研究方法はすでに限界が来ており、新しい研究方法、特にそれに合った計測方法を開発しなければならない。

理想をいえば、この分子機械を人工機械のように目で見て、直接触れて調べる研究方法を開発することである。“百聞は一見にしかず”である。しかし、普通に考えれば水溶液中でナノメートルオーダーの機械を相手にこのようなことができるとは思えない。ところが最近、運動タンパク質分子を顕微鏡下で直接観察しながらそれをマイクロニードルで操作し、1オングストロームの分解能でその動きを計測する方法が開発された。ここでは、この生体分子機械の超微操作法と超高感度計測法について解説する。

生体運動を担う分子機械

筋肉や非筋肉細胞に見られる様々な運動は、主にアクチンとミオシンと呼ばれる2種類のタンパク質分子によって構成される分子機械—超マイクロ分子エンジン—によって引き起こされる。この分子エンジンはATPと呼ばれる化学物質の分解時に得られる化学エネルギーを使って働く。このタンパク質からなる超マイクロ化学分子

エンジンは、大きな発熱も伴わず常温常圧下で働き、効率は最大では80%にも達する。また、最近になって平均熱エネルギー (kT) レベルの入力エネルギーでも高いS/N比で働くことができ、状況に合わせて自らその動きを調節できる、いわゆるインテリジェントマシンであることがわかってきた。

では、この分子エンジンの動作原理はどのようなになっているのであろうか？ 膨大な数の研究が長年にわたってなされてきたが、残念ながら現在まだそのほとんどがわかっていない。そこで我々はこれまでとは別の角度からこの問題に取り組むため、筋肉から抽出精製したタンパク質からこの分子エンジンを再構成し、その動きを顕微鏡下で直接観察し、操作する新しい技術を開発した。

単一アクチンフィラメントの直接観察と分子エンジンの再構成

筋肉や一般の細胞内ではアクチンはらせん状に重合して直径約7nmのフィラメントを構成し、運動はこのアクチンフィラメントがミオシン分子に沿って滑走する事により引き起こされる。まず、このアクチンフィラメント1本の動きを観察することから始める。タンパク質の働きを観るためには光学顕微鏡を使って水溶液中で観察する必要がある。しかし、アクチンフィラメントの直径は約7nmで、光学顕微鏡の分解能の数十分の一しかないので、そのままでは観ることはできない。しかし、アクチンフィラメントを強力な蛍光色素—アクチンとの接着剤の役割をするファロイジン（キノコ毒の一種）と蛍光色素テトラメチルローダミン複合体—で標識し、強力な光源で励起すると、蛍光像として長時間、安定に観察できることがわかった。

*柳田敏雄(Toshio YANAGIDA), 大阪大学基礎工学部生物工学科, 教授, 工学博士, 生物物理

これは、はるか遠くの星でも夜空では輝いて見えるのと同じ原理である。見えると言ってもその蛍光は極微弱なので、超高感度TVカメラ（SITカメラ）、画像解析装置を使って撮影、解析する。

次に、筋肉中で起こっているのと同じ滑り運動を顕微鏡下で再現する方法について述べる。試薬でよく洗浄したカバーガラスの表面を疎水

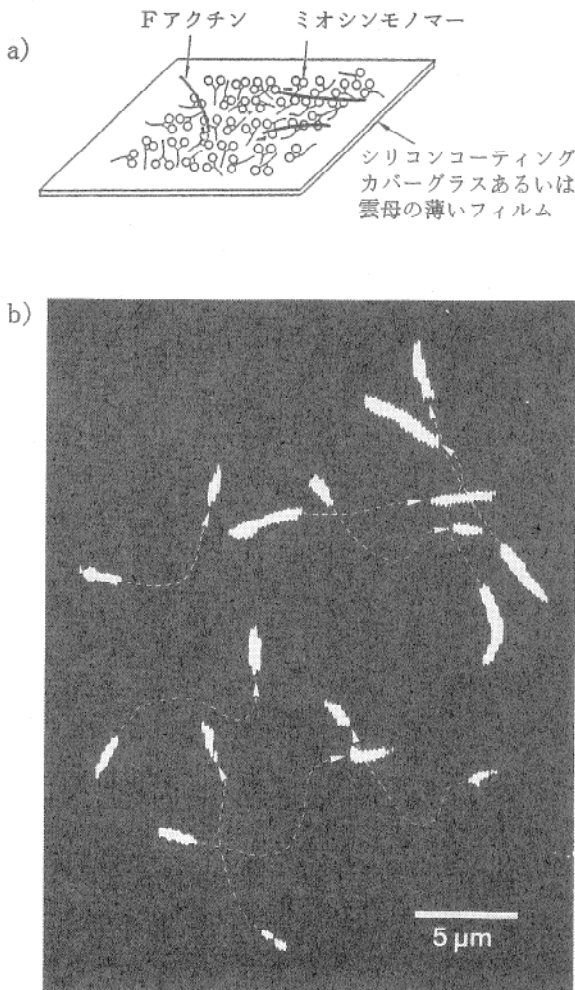


図1 ミオシン分子に沿ったアクチンフィラメントの滑り運動

- a) シリコンコーティングしたカバーガラスの表面にミオシンを吸着させ、そこにアクチンフィラメントを加える。これに酸素除去したATPを含む緩衝液を加え滑り運動を開始させる
- b) テレビモニタに映し出されたミオシン分子に沿ったアクチンフィラメントの滑り運動を示すため、時間の異なる2枚の写真を、1枚のフィルム上に重ね撮りしたもの。時間間隔は1.5s、ミオシンフィラメントは蛍光標識されていないのでモニタ上には映っていない

性のシリコンで処理し、ミオシン分子をそこに固定する。ミオシン分子を変性しないように固定するのがみそである。そこに蛍光標識したアクチンフィラメントをATPを含む溶液と共に加えると、単一のアクチンフィラメントが数 $\mu\text{m/s}$ の速度でミオシン分子に沿って滑走運動するのが観察される。この速度は無負荷時に筋肉中でアクチンフィラメントがミオシン分子に沿って滑走する速度と同じである。すなわち筋収縮が分子のレベルで再構成され、その動きが直接観察できるようになった訳である（図1）。

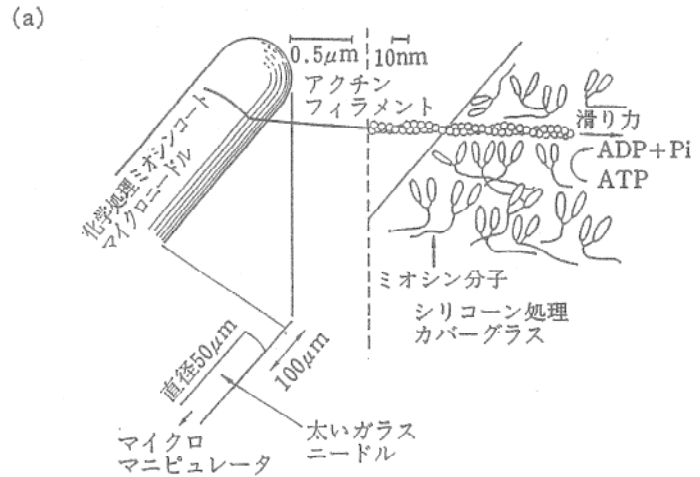
単一アクチンフィラメントの超微操作

つぎに、一本のアクチンフィラメントを観察するだけでなく、ガラスマイクロニードルでそれをつかまえ、操作する方法について述べる。蛍光標識したアクチンフィラメントの一端を蛍光顕微鏡下で $1\mu\text{m}$ 以下の操作精度を持つマイクロマニピュレーターに連結したガラスマイクロニードルを操作してつかまえる。マイクロニードルの表面はアクチンフィラメントの接着剤の働きをする化学処理したミオシンでコートされている。簡単につかまえるといっても、アクチンフィラメントは太さが約 7nm しかない柔らかい線維で、それを太さが数百倍もあるガラスニードルでつかまえるわけであるから易しいことではなかった。ごく最近まで見ることもさえずかしいだろうと思われてきた分子の世界であったが、今直接触れてみることもできるようになったのである（図2a）。

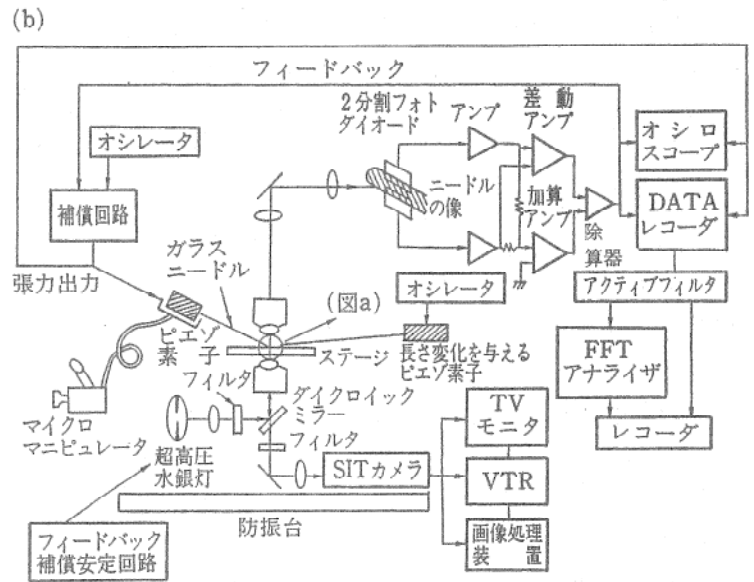
分子エンジンが発生するパワー

上の技術を使ってガラス表面上に固定したミオシン分子との相互作用によって発生する力の直接測定について説明する。単一アクチンフィラメントの一方の端を柔らかいニードルに結合させ、もう一方の端は、ATP存在下でミオシン分子を固定したガラス表面に触れさせる。アクチンフィラメントはガラス表面上のミオシン分子に沿って運動しニードルを引っ張る。ニードルはたわみ、あるところで平衡に達する。発生した力はそのニードルのたわみから測定できる。このニードルはきわめて柔らかく、 1pN 、

(a) 右と左で倍率を変えて示してある。高い時間分解能を得るため、図のように $100\mu\text{m}$ 程度の短く細いニードルを使う。これにより1ミリ秒以下の分解能が得られた。太さは直径約 $0.5\mu\text{m}$ のものを用いた。



(b) 測定装置。蛍光標識アクチンフィラメントは超高圧水銀ランプで照射され ($\lambda=510\sim 540\text{nm}$)、(反射) 蛍光像は下から高感度SITカメラで撮影される。一方、アクチンフィラメントを操作しているガラスニードルの透過像を2分割のフォトダイオードで受け、差動アンプを通して2つの出力の差を求め、FFTアナライザで解析する。この差動出力はガラスニードルの変位に非常に敏感で 0.1nm の分解能でその変位を検出できる。ガラスニードルの位置を差動出力をピエゾアクチュエータにフィードバックすることによりコントロールし、そのときのフィードバック電圧をモニタすれば、等尺条件、等張条件などでの張力が求まる。市販の水銀アークランプは数%のリプルを有するので、光の一部をフォトダイオードで受け、その出力を電源にフィードバックすることにより 0.05% 程度に抑えている。



(c) ピエゾアクチュエータで引き起こしたガラスニードルの変位と差動アンプ出力 (パワースペクトル) の関係。変位が 0.1nm まで直線関係がある (空間分解能がある)。

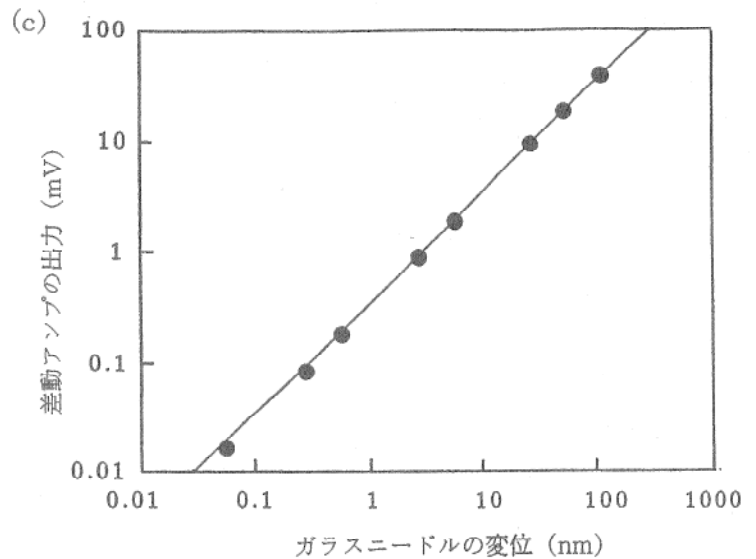


図2 1 Åの分解能で分子エンジンの動きを計測するシステム

すなわち100億分の1gの力が計測できる。また、後で述べる方法を併用すればさらに1,000億から1兆分の1gの力も計測できる。こうして、ミオシン分子(一つの頭当り)は約50億分の1gの力を発生することが分かった。

筋肉細胞中では多くのミオシン分子がその尾の部分がより集まって束となり太いフィラメントを構成している。そしてフィラメント表面から突出している頭部に沿ってアクチンフィラメントが滑走することにより短縮が起こる。ここでは、ミオシンフィラメントを個々の分子にばらばらに分解したもの、そしてさらにその分子をタンパク質分解酵素で頭部と尾部に切り放し、ATP分解触媒作用とアクチン結合部位を持つ頭部のみをカバーガラス表面に固定しても一つ一つの頭部は、筋肉中で最大張力を発生している時のミオシン分子頭部とほとんど同じ力を発生することがわかった。

今の測定系にはまだ最低でも10個程度のミオシン分子頭部が含まれており真の意味で単一の分子エンジンの操作までに至っていないが、ここまでくるともう次に述べるような測定技術、データ解析法を組み合わせることにより、個々の分子エンジンの働きを直接的に調べることができる。ちなみに、これまで実験に用いられてきた最小のユニットは筋原線維と呼ばれるもの(骨格筋を構成する両フィラメントの束で、直径約1 μ m)を100 μ mの長さに切ったものである。この細くて短い柔らかい線維を操作するには大変な熟練を必要とするが、それでもこれに含まれる分子エンジンの数は1,000万個以上にもなるのである。

1 オングストロームの分解能で分子エンジンの動きを計測する

タンパク質分子から分子エンジンを再構成し直接操作するところまでできた。次はこの分子エンジン個々の動きを時々刻々とらえる方法について説明する。ナノメーターオーダーの分子エンジンの動きを見るには、ナノメーター以下の分解能でその動きを計測しなければならない。我々はアクチンフィラメントを操作しているガラス針の変位を1オングストロームの分解能で

測定する技術を開発し、張力と滑り運動の“ゆらぎ”をサブミリ秒、1オングストローム($< 0.1\text{pN}$)という超高分解能で測定する装置を完成した(図2b, c)。“ゆらぎ”の大きさは分子エンジンの数のルートに逆比例する $\propto\sqrt{n}$ 。今の測定系に含まれる分子エンジンの数は10個程度であるから“ゆらぎ”の解析から個々の分子エンジンの動きを詳細に調べることができる。すなわち、一つの分子エンジンで起るATP分解の化学反応に対応した力学反応の過程を詳細に直接追跡できる道が開けたと言える。

参 考 文 献

筋収縮のメカニズムに関するもの

- 1) 柳田：筋収縮研究の新しい波，パリティ(丸善)，1-4, 52/53 (1986)
- 2) 柳田：ノイズレベルの入力エネルギーで作動する分子機械—筋肉，科学(岩波)，58-8, 477/485 (1988)

運動再構成に関するもの

- 3) T. Yanagida et al. : Direct Observation of Single F-Actin Filaments in the Presence of Myosin, *Nature*, 307-5946, 58/60 (1984)
- 4) T. Yanagida et al. : Sliding Distance of Actin Filament Induced by a Myosin Cross-Bridge During One ATP Hydrolysis Cycle, *Nature*, 316-6026, 366/369 (1985)
- 5) Y. Harada et al. : Sliding Movement of Single Actin Filaments on One-Headed Myosin Filament, *Nature*, 326-6115, 805/808 (1987)

超微操作，ナノメトリーに関するもの

- 6) A. Kishino and T. Yanagida : Force Measurements by Micromanipulation of a Single Actin Filament by a Glass Needle, *Nature*, 334-6177, 74/76 (1988)
- 7) 柳田：生体運動を担う分子機械の超微操作，パリティ(丸善)，4-6, 66/69 (1989)