

「生命活動のプログラム」

平成 8 年度採択研究代表者

木下 一彦

(慶應義塾大学理工学部 教授)

## 「一方向性反応のプログラミング基盤」

### 1. 研究実施の概要

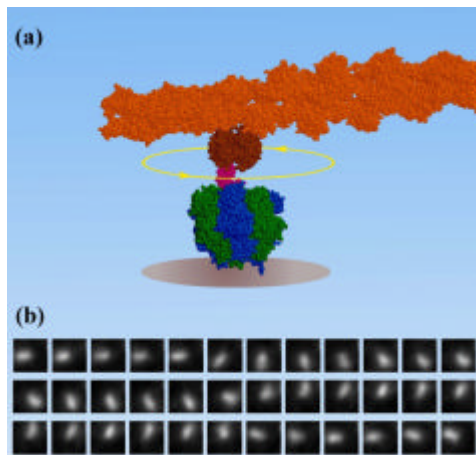
生命活動の根元を担うのは、たった 1 分子で機能を発揮する、「分子機械」である。生体内では、種々の素反応が特定の方向に進められることにより生命活動が織りなされるが、これらの反応を進めるのが分子機械である。我々は、これらの分子機械がいったいどのような仕掛けで働くのか、分子内で何が起きているのかを、光学顕微鏡の下で、1 分子が働いている現場を直接「見て操作する」ことにより、解明したいと考えている。とくに、生体内で一方向への「動き」ないし「力」を生み出す役目を担う、「分子モーター」の働く仕掛けを探りたい。

これまでの研究成果の第一は、ヒトをはじめとしてほとんどあらゆる生き物の中に、分子 1 個の中でのくるくる回転が起きている「回転モーター」があることを証明し、さらにそのモーターの燃料消費（エネルギー変換）効率がなんと 100% 近いこと、負荷の大きさによらず一定の力を出す仕組みがあること、など従来知られていた分子モーター（リニアモーター）にない画期的な性質を持つことを見いだしたことである。また、分子機械の観察・操作に、たんぱく質分子に比べて遙かに大きな目印ないしハンドルを結合させることが有効なことを提唱し、一例として、世界で初めて DNA 1 分子に結び目を作ることに成功した。

現在、上記の回転モーターの解析をさらに進めるとともに、DNA 上を動くリニアモーターの研究なども始めている。分子機械の動作原理の解明およびそのための新手法の開発を通じて、新しい学問分野である一分子生理学・一分子工学の先駆けとなることを目指したい。

## 2. 研究実施内容

### (1) 回転分子モーター



生命活動のエネルギー源であるATPを合成するのは、ATP合成酵素と呼ばれる酵素たんぱく質である。その一部である $F_1$ -ATPaseと呼ばれるユニットを取り出すと、逆反応としてATPを分解するが、このときATPのエネルギーを使って回転モーターとして働くことが分かった。左図(a)の緑と青の部分がモーターの固定子で、ピンクの部分が回転子である。回転を可視化するため、固定子をガラス面(灰色)に結合させ、回転子に糊の役目をさせるたんぱく質(こげ茶色)を介して長いアクチン線維(茶色)を結合させた。(注: 図は白黒ですが、原図はカラーです。詳細は発表論文をご参照願います。)

アクチン線維には蛍光色素を結合させ、蛍光顕微鏡下で観察したところ、(b)の連続写真のように、120度おきのステップ状に回転することが分かった。 $F_1$ -ATPaseの大きさは、幅・高さとも10ナノメートルほどで、天然・人工を問わず、知られているかぎり世界最小の回転モーターである。生体内でATP合成酵素に組み込まれた場合は、このモーターは強制的に逆回転させられ、その結果としてATPを合成するものと考えられる。

モーターとしての $F_1$ -ATPaseの力学的性質を詳細に調べた結果、次のようなことが分かった。

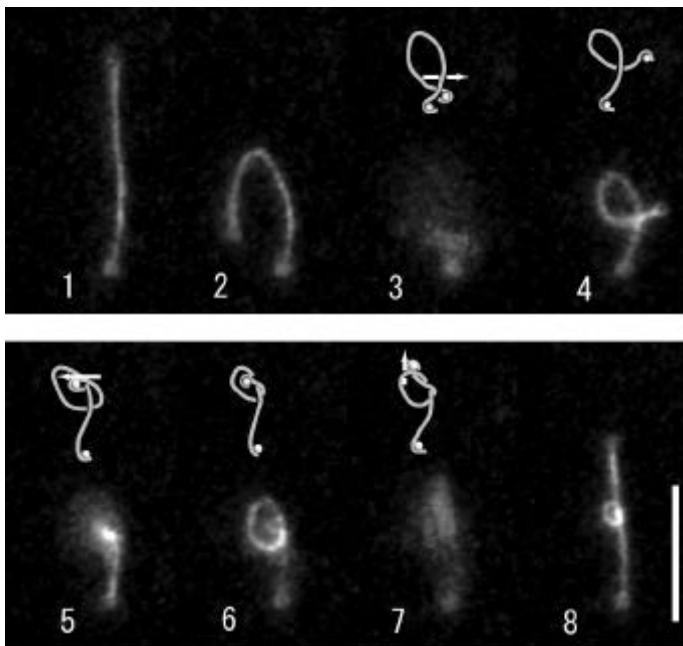
- ( ) 回転は、このたんぱく質分子1個だけで起きる。複数が集合したり、他のたんぱく質分子が介在する必要はない。
- ( ) 回転は、上図(a)の上側から見て、常に反時計方向。
- ( ) 固定子部分には、ATPを分解する部位が3ヶ所存在する(上図(a)の緑色のサブユニットが3個あり、それぞれに1ヶ所、分解部位がある)が、それに対応して、回転は120度おきに起きる。
- ( ) 回転を引き起こすのに、3ヶ所のATP結合部位すべてにATPが結合する必要はなく、2ヶ所で十分。
- ( ) 回転速度・負荷によらず、モーターの出す力(トルク)は一定。
- ( ) 120度ごとにモーターがする力学的仕事(出力)はやはり条件によらず一定。
- ( ) 120度回転するごとにATP分子1個が消費される(分解される)。
- ( ) ATP1分子を分解するとき得られるエネルギー(入力)とそのときにする仕事(出力)を比べるとほぼ等しく、エネルギー変換効率は100%近くに達し

得る。より厳密には、ATP分解のエネルギーはATP濃度などの条件により変化するが、出力は常に一定で、入力エネルギーを下げたことによって出力に近づけても、モーターはちゃんと回る。

- ( ) 時々逆方向にステップすることがあるが、その場合もATP 1分子を消費するらしい。
- ( ) 120度のステップの中で、回転力(トルク)は一定。すなわち、回転力は回転子の向きによらず常に一定。

以上のような性質から回転のメカニズムを推定するには、電気モーター(やはり効率は100%近い)からの類推が有効かもしれない。直流電気モーターは交換子と呼ばれるスイッチが組み込まれることにより一方向に回転するが、 $F_1$ -ATPaseにも似たようなスイッチ機構が存在するのか、あるいはスイッチなしで回る原理を採用しているのか、実験からの推定を試みる予定である。逆回転によるATP合成(力学的仕事による化学合成)にもチャレンジしてみたい。

## (2) 分子のひもを結ぶ



一分子操作技術の開発の一環として、ひも状の分子を、光ピンセットを用いて結ぶことに成功した。左図はDNAの場合で、DNA 1分子の両端に直径1ミクロンのプラスチックビーズを付け、それぞれを光ピンセット(強力なレーザー光を1点に集光させることにより焦点に向かう引力を生じさせる)で摘んで操作した。たんぱく質のひもであるアクチン線維も、同様に結ぶことができた。

結び目を作るとひもの曲率半径を連続的に制御できるので、曲

率に依存した分子間相互作用の研究に役立つ。たとえば、DNA上で働くたんぱく質分子は、多かれ少なかれDNAを曲げることが期待されるので、あらかじめDNAを結んで曲げておくと、DNAへの結合が強くなると期待される。ひも自身は、曲げると力学的に弱くなることが期待され、実際、結んだアクチン線維は結ばないものに比べて数百分の1の張力で切れてしまった。

DNAの方は、結んでも簡単には切れず、ミクロの手術糸として使えるかもしれ

ない。たとえば細胞を2つに縊ったり、細胞の突起の根本を縛ったりして、1つの生きた細胞を2つの部屋に分けることができるかもしれない。信号伝達や物質輸送の仕組みなどの研究に役立つことが期待される。

### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

"Formation of giant liposomes promoted by divalent alkali cations: Critical role of electrostatic repulsion"

Ken-ichirou Akashi, Hidetake Miyata, Hiroyasu Itoh, and Kazuhiko Kinoshita, Jr. *Biophys. J.*, 74 (1998) 2973-2982.

"F<sub>1</sub>-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps"

Ryohei Yasuda, Hiroyuki Noji, Kazuhiko Kinoshita, Jr., and Masasuke Yoshida *Cell*, 93 (1998) 1117-1124.

"Synthesis of fluorescent substrates for protein tyrosine phosphatase assays"

Takumi Watanabe, Masaya Imoto, Hiroki Taniguchi, Kazuhiko Kinoshita, Jr., and Kazuo Umezawa

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8 (1998) 1301-1302.

"Direct observation of the rotation of  $\gamma$  subunit in F<sub>1</sub>-ATPase"

Yasuyuki Kato-Yamada, Hiroyuki Noji, Ryohei Yasuda, Kazuhiko Kinoshita, Jr., and Masasuke Yoshida

*J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 19375-19377.

"F<sub>1</sub>-ATPase: A rotary motor made of a single molecule"

Kazuhiko Kinoshita, Jr., Ryohei Yasuda, Hiroyuki Noji, Shin'ichi Ishiwata, and Masasuke Yoshida

*Cell* 93 (1998) 21-24.

"Linear and rotary molecular motors"

Kazuhiko Kinoshita, Jr.

*Adv. Exp. Med. Biol.*, 453 (1998)

"Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization"

Hidetake Miyata, Shuji Nishiyama, Ken-ichirou Akashi, and Kazuhiko Kinoshita, Jr.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 2048-2053.

"Tying a molecular knot with optical tweezers"

Yasuharu Arai, Ryohei Yasuda, Ken-ichirou Akashi, Yoshie Yarada, Hidetake Miyata, Kazuhiko Kinoshita, Jr., and Hiroyasu Itoh

Nature, 399 (1999) 446-448.

"Rotation of Escherichia coli F1-ATPase"

Hiroyuki Noji, Katrin Hasler, Wolfgang Junge, Kazuhiko Kinosita, Jr.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 260 (1999) 597-599.

他 9 件