

「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(リニアーモーター)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、 F_1 -ATPaseの逆回転によるATP合成を試みている。大きな目印の有効性の一例として、世界で初めてDNA1分子に結び目を作ることに成功したことはすでに報告した。

現在、顕微鏡システムの高機能、高精度化を図りながら、上記の回転モーターの解析をさらに進めるとともに、DNA上を動くリニアーモーターの研究なども始めている。このモーターがDNAのらせんに沿ってすすむ回転モーターの一種であることもわかりはじめている。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

本チームでは、3つの研究グループの協力体制をとり研究を進めている。それぞれの研究実施内容と研究成果をまとめる。

(1) 計測センターグループ

本グループは、チームの中心として、1分子計測・操作技術の開発および分子モーターの動作解析への応用をめざしている。

(1 a) F₁-ATPaseの回転機構

ATP合成酵素の一部であるF₁-ATPaseは、 $\alpha_3\beta_3$ というサブユニット組成を持ち、3つの β のそれぞれがATP加水分解(ATP合成酵素内ではATP合成)部位を持つ。 $\alpha_3\beta_6$ 量体の筒の中で、ATPの加水分解から得られるエネルギーによりサブユニットが回転することを、光学顕微鏡下で証明した。これまでに分かった回転特性を以下に列挙する。

- (i) たった1分子でできた世界最小の回転モーターである。
- (ii) $\alpha_3\beta_3$ だけで回転を引き起こせる。他の2つは不要。
- (iii) α は、おそらく β とともに回転子の一部となる。
- (iv) 回転方向は、合成酵素の膜内部分であるF₀の側から見て反時計回り。
- (v) 回転は120度おきのステップ状に起こる。
- (vi) 回転トルクは、負荷・回転速度・ATP濃度などによらず常に一定で、約40 pNnm。
- (vii) したがって120度ステップあたりにする力学的仕事も一定で約80-90 pNnm。
- (viii) 120度ステップあたり1分子のATPを消費。
- (ix) 細胞内に近い条件では、このモーターのエネルギー変換効率はほぼ100%。
- (x) Bi-site反応(3つの活性部位のうち2つ以内にnucleotideが結合)が基本。
 - (x i) ときどきバックステップが起きる。このときもおそらくATP1分子を消費。
 - (x ii) ATPの結合(ないし加水分解)は、分子内に回転のポテンシャルエネルギーを作り出す。その高さは約80-90 pNnmで、反時計方向120度前方に向かい直線的に減少。

さらに未発表データとして

- (x iii) 無負荷の最高回転速度は23 μ m/sで毎秒約100回転。
- (x iv) 最高速度でも120度ステップ(ステップ時間はATP分解時間のごく一部)。
- (x v) エネルギー源はATPでなくGTPでもよく、効率はやはり100%近い。
- (x vi) 蛍光1分子の測定により、無負荷でも120度のステップがあり、ステップあたり1分子のATPを消費すること、ATPの結合速度定数は

変わらない。

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ている。強制逆回転によるATP合成(力学的仕事による化学合成)もチャレンジしはじめた。逆回転はすでに成功していて、ATP合成の検出が鍵である。

(1 b) 新しい顕微鏡技術の開発

顕微鏡の高操作性・高精度化を目指し、下記のような顕微鏡の開発した。

(i) ガラス表面近くだけの蛍光を観察できるエバネッセント励起法は、1分子観察に有用である。従来と異なり、無偏光でしかも試料操作が容易なように対物レンズを通した励起ができる光学系を開発した。 F_1 -ATPaseに蛍光性ATP analog 1分子が結合・解離する様子を、そのATP分子の向きとともに観察することに成功した。

(ii) 多くの磁気ビーズを同時に操作できる磁気ピンセットシステムを開発し、DNAの捻れ弾性測定、さらにDNA上で働く分子モーターの動作解析に応用している。

(2) 分子モーターグループ

本グループは、早稲田大学理工学部石渡研究室を中心に、ミオシン・キネシンなどのリニアモーターおよび収縮装置としての筋肉のメカニズム解析を目指している。

(2 a) 温度パルス顕微鏡

赤外レーザー光を金属微粒子に吸収させることにより、10ミリ秒以内に顕微鏡試料の温度を数十度上下させる技術を開発した。たんぱく質試料が高温で劣化する以前に高温での振る舞いを観察できる。骨格筋ミオシンを使い、アクチンの滑り速度として50 $\mu\text{m}/\text{秒}$ という世界最高速を得た。また、マイクロチップ表面のDNAの局所的可逆的融解(一本鎖の遊離)および再結合を示せた。

(2 b) 収縮装置の再構成と収縮制御機構

骨格筋および心筋において、細い線維(アクチン線維に制御たんぱく質が結合したもの)を選択的に除去した後、再構成する手法を開発した。これにより、筋肉の自励振動現象(SPOC)がアクチン・ミオシン系に固有の現象であり、制御たんぱく質は必要ないことを示した。また、顕微鏡下でアクチン線維1本1本の重合過程を初めて観察することに成功した。

(3) ATP合成酵素グループ

本グループは、東京工業大学資源化学研究所吉田研究室を中心に、ATP合成酵素の反応機構の解明を目指している。

(3 a) F₁-ATPaseの回転

すでに好熱菌由来のF₁-ATPaseが回転することが示されているが、さらに大腸菌および葉緑体由来のATP合成酵素でも反時計回りの回転を示すことを示した。ATP合成酵素の機構がバクテリアおよび植物で（そしておそらく動物でも）共通であることを意味する。

また、サブユニットがサブユニットと同様に回転することから、は に結合して回転子の一部を形成することが示唆された。

(3 b) F₁-ATPaseの加水分解機構

F₁-ATPaseの結晶構造（反応停止状態）では、3つのサブユニットのうち2つが閉じた（C）構造、一つが開いた（O）構造を取っている。CC間の架橋反応の解析から、正常な加水分解反応中にもCCO構造が現れること、nucleotide 1個を結合した状態（120度ステップの始状態および終状態）ではCCO以外の構造を取ること、などが示唆された。

また、大腸菌における従来の説に反して、好熱菌ではサブユニットは活性を阻害しないことが分かった。最近Walkerらが発表した合成酵素の構造と矛盾しない結果である。加水分解活性を容易に失う変異体を用いても、ATP合成反応は正常に起きることが示された。サブユニットを時計回りに回転させることにより、固く結合したADPを解離させられることを示唆する。

3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Adachi, K., Kinoshita, K. Jr., and Ando, T. Single-fluorophore imaging with an unmodified epifluorescence microscope and conventional video camera.

J. Microscop. 195, 125-132 (1999).

Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K. and Kinoshita, K Jr. Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization.

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

Arai, Y., Yasuda, R., Akashi, K., Harada, Y., Miyata, H., Kinoshita, K. Jr. and Itoh, H. Tying a molecular knot with optical tweezers.

Nature 399, 446-448 (1999).

Kato, H., Nishizaka, T., Iga, T., Kinoshita, K. Jr. and Ishiwata, S. Imaging of thermal activation of actomyosin motors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 9602-9606 (1999) .

Noji, H., Hasler, K., Junge, W., Kinoshita, K. Jr., Yoshida, M., and Engelbrecht, S. Rotation of *Escherichia coli* F₁-ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260, 597-599 (1999) .

Miyata, H., Marriott, G. Akashi, K., Nishiyama, S., Ohki, K. and Kinoshita, K. Jr. Cell deformation mechanism studied with actin-containing giant vesicle, a cell mimicking system. Giant Vesicles, P. L. Luisi and P. Walde, Eds, John-Wiley & Sons, pp.320-333 (2000).

Akashi, K., Miyata, H. and Kinoshita, K. Jr. Observation of a Variety of Giant Vesicles under an Optical Microscope. Giant Vesicles, P. L. Luisi and P. Walde, Eds, John-Wiley & Sons, pp.46-48 (2000).

Kinoshita, K. Jr. Real time imaging of rotating molecular machines. FASEB J. 13, S201-S208 (1999).

Fukuda, N., and Ishiwata, S. Effects of pH on spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. Pflugers Arch., 438, 125-132 (1999).

Fujita, H. and Ishiwata, S. Tropomyosin modulates pH dependence of isometric tension. Biophys.J. 77, 1540-1546 (1999).

Fukuda, N., Kajiwara, H., Ishiwata S. and Kurihara, S. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. Circ. Res. 86, e1-e6 (2000).

石渡信一 "筋収縮滑り運動機構とトライボロジー " トライボロジスト45, 119-125 (2000).

藤田英明、佐々木大輔、石渡信一 "生体分子モーター系における分子シンクロナイゼーションの研究" バイオサイエンスとインダストリー 58, 256-259

Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M., Noji, H. Cross-linking of two beta subunits in the closed conformation in F₁-ATPase. J. Biol. Chem. 274, 5701 - 5706 (1999)

Bald, D., Muneyuki, E., Amano, T., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M. The noncatalytic site-deficient 3 3 subcomplex and FoF₁-ATP synthase can continuously catalyse ATP hydrolysis when Pi is present. Eur. J. Biochem. 262, 563 - 568 (1999)

Hisabori, T., Kondoh, A., Yoshida, M. The subunit in chloroplast F₁-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. FEBS Lett. 463, 35 - 38 (1999)

Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Noji, H., Hara, K., Yoshida, M., Hisabori, T. 3
3 complex of F1-ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* can maintain steady state
ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites.
Biochem. J., 343, 135 - 138 (1999)

Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T., Yoshida, M.
subunit, an endogeneous inhibitor of bacterial F1-ATPase, also inhibits FoF1-ATPase. *J.*
Biol. Chem. 274, 33991 - 33994 (1999)

Muneyuki, E., Noji, H., Amano, T., Msaïke, T., Yoshida, M. FoF1-ATP synthase:
general structural features of 'ATP engine' and a problem on free energy transduction.
Biochem. Biophys. Acta 44854, 1 - 15 (2000)

Msaïke, T., Mitome, N., Noji, H., Muneyuki, E., Yasuda, R., Kinoshita, K.Jr., Yoshida,
M. Rotation of F1-ATPase and the hinge residues of the subunit.
J. Exp. Biol. 203, 1 - 8 (2000)