

「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

(岡崎国立共同研究機構総合バイオサイエンスセンター 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。

平成12年度の主な成果は、RNAポリメラーゼがDNA上を回転しながら進む螺旋モーターであることを証明したこと、すでに回転モーターであることを証明したF1-ATPaseのサブステップを発見し回転機構解明に一步迫ったこと、リニアモーターであるキネシンの微小管に対する単頭結合・双頭結合の2状態がヌクレオチド依存的に変換することを示して歩行モデルを支持したこと、2つの回転モーターの複合体と考えられているATP合成酵素のFo部分の回転を証明する上での問題点を明らかにしたこと、などである。

2. 研究実施内容

本チームは、3つの研究グループの協力により研究を進めている。平成12年度の、各グループの、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、各グループ間の協力体制をとりまとめるとともに、分子モーターの動作機構解明を目的とした、1分子計測・操作技術の開発を行ってきた。今年度の主たる成果として、(1a)RNAポリメラーゼのDNA鎖上にそった回転の直接観測(原田ら、Nature)や、(1b)F1-ATPaseの回転時のサブミリ秒領域のキネテクス(安田ら、Nature、印刷中)の2点をあげることができる。これまで、我々は、タンパク質でできた分子機械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、あるいは、ここぞと思う部分の構造変化を調べるには小さな目印をもちいる、あるいは両者を組み合わせて用いること

の有効性を提唱してきたが、今年度の成果はまさにこの提唱の有効性を実証したものである。以下に、それぞれの内容について簡単にまとめる。

(1a) RNAポリメラーゼのDNA鎖に沿った回転の直接観測

RNAポリメラーゼがDNA鎖に沿って動くモータータンパク質であることはすでに分かっていた。我々は、RNAポリメラーゼをガラス基盤上に固定し、ポリメラーゼにより転写されるDNAの一端に磁気ビーズをあらかじめ取り付け、この磁気ビーズを磁気ピンセットでつり上げておいて（磁気ビーズには、回転の様子や、向きがわかるように、さらに小さな蛍光性のビーズを取り付けてある）、磁気ビーズの回転運動の様子を観測した。なんと、100回転以上も、磁気ビーズは、同じ方向に回転したのである。回転方向および回転速度から、RNAポリメラーゼがDNAの情報を読んでRNAを合成する際に、DNAの二重螺旋に沿ってDNAを引き込んでいることがわかった。我々の実験系の場合は、RNAポリメラーゼを固定して、DNAの回転を観測しているが、細胞内では、RNAポリメラーゼが、DNAの螺旋に沿って回転しているかもしれない。この実験の成功のカギは、大きなハンドルである磁気ビーズをつり上げて、DNAがかってに高次構造をとることを防いだこと、その磁気ビーズの回転運動に注目したことである。大きなビーズが回転運動を遅くしている可能性はあるのだが、しっかりと回転運動を記録することに成功した。

(1b) 回転運動を行うF1-ATPaseのサブミリ秒領域のキネテクス

我々がこれまで開発してきたF1-ATPaseの回転アッセイ法では、比較的大きなプローブ（1 μ m程度）を、回転子である γ サブユニットに取り付けて観測していた。F1-ATPaseがエネルギー変換効率100%の回転モーターであること、回転トルクが負荷・回転速度・ATP濃度によらず常に一定で約40pNnmであること、さらに、120度毎のステップモーターであること、などがこの方法で見いだされた。しかし大きなプローブは、水の大きな粘性抵抗に逆らって運動しなければならないので、回転運動の詳細を調べるには不利になる。すでに、昨年度の研究で、1分子の向きや回転運動を調べる顕微鏡を開発して、無負荷の状態でもF1-ATPaseが負荷が有るときと同じメカニズムで回転していることを証明した。しかし、測定の対象となったのは、ATPの極低濃度の場合だけで、試作した顕微鏡の検出感度、時間分解能では、高濃度領域の回転運動の挙動について調べることができなかった。そこで、新たにレーザー暗視野顕微鏡を試作し、強い信号の期待できる金粒子を回転のプローブとして用いることにした。金粒子の直径は、わずか40nmで、F1-ATPaseと比較すればまだ大きいのだが、水の抵抗は無視できる。この方法により、120度の回転ステップをさらに分解する約90度と30度のサブステップがあることが分かった。90度のサブステップ

を行うまでの時間は、ATP濃度に依存していた。つまり、90度のサブステップは、ATPの結合サイトへの結合により引き起こされ、あとの30度は、代謝物、すなわち、ADPあるいは、Piの解離に深く関わっていることを証明できた。ATPの加水分解でなく結合と解離が仕事を生み出すというこの結果は、ATPのエネルギーを使う分子機械一般に敷衍できる可能性が高い。

(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。本年度の主な成果の1つはキネシンの歩行モデルを強力にサポートしたことである。

キネシンが微小管上を“歩く”仕組みについては、単頭・双頭結合とを繰り返すというhand-over-hand (HoH) モデルが提唱されている。ところが、単頭結合・双頭結合の2状態があることをはっきり示す結果がこれまでなかった。我々は、キネシンと微小管との1分子結合力を、1) ATP非存在下、2) AMP-PNP (ATPアナログ) とADPの共存下、3) AMP-PNP存在下という、HoHモデルにおける鍵となる3つのヌクレオチド状態で顕微計測した。その結果、1) と2) では単頭結合、3) では双頭結合であると結論でき、HoHモデルが強く支持された。このことは、キネシン分子モーターの歩く仕組みの中に“分子内双頭間分子協調性”が存在することを強く示唆する(川口、石渡、Science)。また、キネシンが発生する力は温度に依存せず、しかし歩く速度と歩く距離は温度の上昇とともに増大することを示した(川口、石渡、BBRC)。

ミオシン・アクチン系においては、心筋収縮系が振動系であり心拍リズムを担う土台として適応していることなどを示した。

(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。

F1-ATPaseは、ATP合成酵素の一部であり、実際の細胞の中では、膜に埋まったFoと呼ばれる部分と対になって存在している。細胞の中では、Foの部分で、膜内外のプロトンの濃度勾配を感じて、cサブユニットの集合体が回転し、サブユニットを回転させていると信じられているのである。この合成酵素全体の回転運動も、F1-ATPaseと同様の方法で調べられている。Foの回転が確認され、回転モーターとしての研究が始まるかに思えたのだが、特異的な阻害剤の効果がない等問題があり、実は、膜部分のサブユニットの抽出段階に問題があることが分かってきた。試料の調製方法を検討した結果、細胞中と同様に、脂質膜上に酵素を再構成させる方法が有力であることがわかり、このシステムによる回転アッセイ法

の開発を行っているところである。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Kinosita, K. Jr., Yasuda, R. and Noji, H. F_1 -ATPase : a highly efficient rotary ATP machine.

Essays Biochem., 35, 3-18(2000)

Kinosita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H. and Adachi, K. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency.

Philos. Trans. R. Sci. Lond. B., 355, 473-490(2000)

Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. & Kinosita, K. Jr. Stepping rotation of F_1 -ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 7243-7247(2000)

Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinosita, K. Jr., and Ishiwata, S. Characterization of single actomyosin rigor bonds: Load-dependence of lifetime and mechanical properties.

Biophys. J. 79, 962-974(2000)

Hara, K. Y., Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Kinosita, K. Jr., and Yoshida, M. The role of the DELSEED motif of the γ subunit in rotation of F_1 -ATPase.

J. Biol. Chem. 275, 14260-14263(2000)

Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N., and Kinosita, K. Jr. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase.

Nature 409, 113-115(2001)

Kawai, M., Kawaguchi, K., Saito, M. and Ishiwata, S. Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles.

Biophysical J. 78, 3112-3119(2000)

Ishiwata, S., Tadashige, J., Masui, I., Nishizaka, T. and Kinosita, K. Jr. Microscopic analysis of polymerization and fragmentation of individual actin filaments.

Molecular Interactions of Actin 32, 79-94(2001)

Yasuda, K., Okano, K. and Ishiwata, S. Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation.

Biotechniques 28, 1006-1011(2000)

Okano, K., Yasuda, K. and Ishiwata, S. Position-specific release of DNA from a chip by using photothermal denaturation.

Sensors & Actuators B 64, 88-94(2000)

Kawaguchi, K., and Ishiwata, S. Temperature dependence of force, velocity, and processivity of single kinesin molecules.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 272, 895-899(2000)

Kawaguchi, K., and Ishiwata, S. Nucleotide-Dependent Single- to Double-Headed Binding of Kinesin.

Science 291, 667-669(2001)

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(2000)

Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M., Capaldi, A. C. Observations of rotation within the F_0F_1 -ATP synthase: deciding between rotation of Foc subunit ring and artifact. *FEBS Lett.* 470, 244-248(2000)

Bald, D., Noji, H., Stumpp, M.T., Yoshida, M, Hisabori, T. ATPase activity of a highly stable $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of thermophilic F_1 can be regulated by the introduced regulatory region of gamma subunit of chloroplast F_1 .

J. Biol. Chem. 275, 12757-12762(2000)

Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, K, Wakabayashi, T., Yoshida, M. V-Type H^+ -ATPase/synthase from a Thermophilic Eubacterium, *Thermus Thermophilus* ; Subunit Structure And Operon.

J. Biol. Chem. 275, 13955-13961(2000)

Muneyuki, E., Noji, H., Amano, T., Msaikae, T., Yoshida, M. F_0F_1 -ATP synthase: general structural features of 'ATP-engine' and a problem on free energy transduction.

Biochim Biophys Acta. 1458, 467-81(2000)

Noji, H, Yoshida, M. The rotary mechine in the cell ; ATP Synthase.

J Biol Chem. 276, 1665-1668(2001)