
シリーズ 「化学から見た物性物理」

生物分子モーターのステップ計測と運動解析

京都大学 大学院理学研究科 西山 雅祥*

名古屋大学 大学院工学研究科 曾和 義幸*、石島 秋彦

(2005 年 10 月 14 日受理)

1. はじめに

生き物の特徴の一つとして、「動き」を上げることができる。動物は文字通り、“動く生き物”であり、多くの個体は筋肉を用いて移動することができる。また、細胞レベルでも、細胞分裂や形態の変化等のように動きを伴う現象が数多く存在する[1]。こうした生き物の運動現象を生み出しているのが、生物分子モーターと総称されるタンパク質であり、ATP の加水分解反応やイオン濃度勾配などから取り出した化学エネルギーをもとにして、力発生や運動を生み出す分子機械である[2-5]。生物分子モーターは高いエネルギー変換効率で駆動しており、その動作メカニズムを明らかにすることが、筆者らをはじめとする多くの研究者にとって大きな研究目標となっている。構造生物学的な研究では、分子の「かたち」から分子メカニズムに迫るために、複雑な分子構造を（時には）原子座標の精度で明らかにしてきている。それに対して、筆者らは、分子モーターの「はたらき」である運動機能に注目して、実際に動きを「観る」ことで分子メカニズムに迫るアプローチをとっている。

生物分子モーターが機能を発現するのは水溶液中であるので、光学顕微鏡を主に使うことになる。しかし、その大きさは10ナノメートル程度であり、光学顕微鏡下で直接観測することはできないので、分子に「目印」を取り付け、その動きから分子モーターの動きを測定している。近年、その目印とその検出方法を工夫することで、水溶液中にある生体分子1個の振る舞いを測定できる「1分子計測技術」が大いに発展を遂げている[3]。この技術を用いると、生物分子モーターのエネルギー出力に相当する運動の素過程を計測することが可能となり、化学-力学エネルギー変換メカニズムを調べることができる。

本稿では、2つの生物分子モーターについて行われた運動の素過程計測と運動解析を紹介するものである。バクテリアの推進力を生み出すべん毛モーターは、「モーター」とい

* Corresponding Authors (m-nishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp, sowa@bp.nuap.nagoya-u.ac.jp)

う言葉から連想されるような回転運動を生み出すロータリー・モーター型の分子機械である。第2章では、曾和らが世界で初めて成功したべん毛モーターの回転運動の素過程検出について紹介する。それに対して、キネシンは、細胞内でタンパク質フィラメントである微小管に沿って一方向性の滑り運動を発生するリニア・モーター型の分子機械である。第3章では、西山らが行ったキネシンのステップ状変位の運動解析と、確率的なステップ生成機構について解説したい。

2. バクテリアのべん毛モーターのステップ検出

バクテリアのべん毛モーターは、イオンの電気化学的エネルギーにより駆動する回転分子機械である。モーターの回転は、小さなステップ回転の繰り返しによるものと期待されているが、これまでにステップ回転を直接検出されたという報告はない。第2章では、我々が世界で初めて成功した、べん毛モーターのステップ運動の検出について概説したい[6]。

2.1 イオンで駆動するロータリー型分子機械：べん毛モーター [7]

2.1.1 べん毛の構造

バクテリアは体長わずか $1\mu\text{m}$ 程度の単細胞生物であり、我々の身近では大腸菌やサルモネラ菌などがよく知られている。一般にバクテリアと聞くと、食中毒などの病気を我々にもたらす悪者扱いを受けるのだが、「動き」に注目すると彼らはとても興味深い研究対象である。わずか一つの細胞で、周囲の環境を感知・情報処理し、より良い環境へと移動する走化性と呼ばれる一連の行動をやつてのける。この細胞運動は、細胞本体から伸びた直径約 20nm 、長さ $10\mu\text{m}$ 程度の「べん毛」と呼ばれるらせん状の運動器官を回転させることで推進力を得ている(図 2-1a)。

べん毛は 50 種類以上のタンパク質が自己集合して構築され、その構築機序の解析に

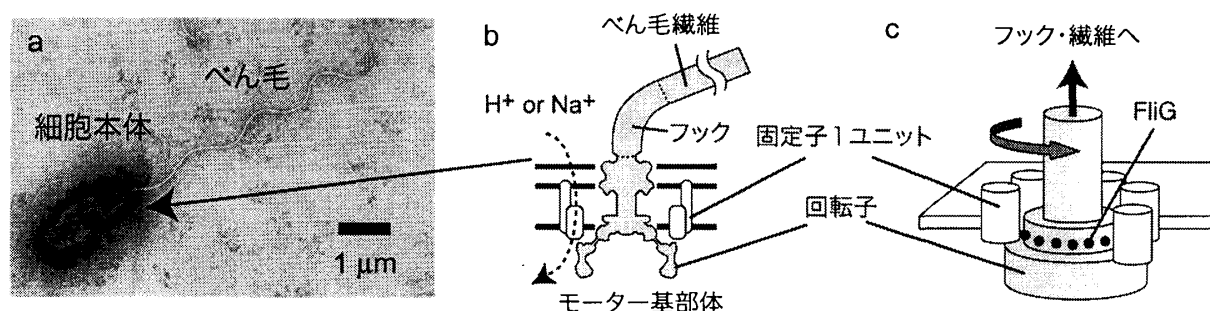


図 2-1. バクテリアべん毛

a. 海洋性ビブリオ菌の電子顕微鏡写真、b. バクテリアべん毛の模式図、c. べん毛基部体の模式図

ついて一分野ができるほど複雑な構造をしている。大まかなべん毛の構造は、1. 膜に埋まり回転トルクを生み出すモーター基部体、2. プロペラに相当するべん毛繊維、3. 両者をつなぎユニバーサルジョイントとして機能するフックの3つに分けることができる(図 2-1b)。べん毛繊維およびフックに関しては、大阪大学の難波らのグループによって原子モデルが発表され、その柔軟な機能と構造の相関が明らかになりつつあり、詳しい解説記事を参考にされたい[8]。

モーター基部体の回転運動は、直径約 45nm の回転子が、その周りに配置されている約 10 個の固定子と相互作用することにより生み出されると考えられる(図 2-1c)。回転子全体の構造解析においては、電子顕微鏡像と画像解析によって構造の回転対称性を明らかにする研究が大きな成果を上げている。また、回転子を構成するタンパク質の中でも特に回転力の発生に必須となる FliG, FliM, FliN に関しては、タンパク質の X 線結晶構造解析によって、原子モデルが明らかになりつつある。それに対して固定子の場合、2 種類のタンパク質が複合体を形成しイオンチャネルとして機能していると予測されているものの、未だ構成タンパク質の結晶化は成功しておらず、今後の研究の進展が待たれる。

2.1.2 H⁺駆動型モーターと Na⁺駆動型モーター

べん毛モーターは、水中にて機能するため陽イオンを利用している点では異っているが、我々が日常使っている電気モーターと同様に、電気的なエネルギーによって駆動する。イオンがモーターのイオンチャネルを通り、細胞外から細胞内に流れ込む際に得られる自由エネルギーが回転トルクに変換される。また、その自由エネルギー ΔU は、

$$\Delta U = e \cdot imf = e \cdot \left\{ \Delta V - k_B T \cdot \ln \left(\frac{[ion]_{out}}{[ion]_{in}} \right) \right\} \quad (\text{式 2-1})$$

と規定される。但し、 e は電気素量、 imf はイオン駆動力、 ΔV は 膜電位、平均熱エネルギー $k_B T$ 、 $[ion]_{out}$ は細胞外イオン濃度、 $[ion]_{in}$ は細胞内イオン濃度である。

回転運動を生み出す自由エネルギーを決定する共役イオンが、H⁺の場合は H⁺駆動型モーター、Na⁺の場合は Na⁺駆動型モーターと呼ばれている。通常の中性条件付近に棲息する大腸菌やサルモネラ菌は H⁺駆動型モーターをもっており、海に棲む海洋性ビブリオ菌やプロトン駆動力を作りにくい高アルカリ強度環境下に棲息する好アルカリ性バクテリアなどはナトリウム駆動力を利用することが知られている。H⁺駆動型モーターと Na⁺駆動型モーターは、共役イオンは異なっているものの、多くの共通点が見られる。例えば、電子顕微鏡で観察された回転子の構造や大きさ、構成される遺伝子に高い相同性がある。また、固定子を構成するタンパク質は、H⁺駆動型モーターに関しては MotA と MotB、Na⁺駆動型モーターに関しては PomA と PomB であり、アミノ酸配列から予測される固定子の三次構造が似ていることは確認されている。さらに、分子生物学的手法により作成された H⁺駆動型と Na⁺駆動型の固定子の様々な混合比率のキメラモーターが機能していることから、両イオンによる回転メカニズムは共

通であると考えられる。

2.1.3 回転計測の方法(図 2-2)

らせん型のべん毛繊維を、染色・固定して光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察すると波形に見えるため、真核生物の鞭毛と同じように波打ち運動の機構で動いていると元々は考えられていた。しかし、べん毛繊維を回転させて運動しても良いという仮説が提唱され、べん毛繊維が回転しているのか、それとも繊維の形状を変化させているのか議論がまきおこった。この議論に決着を付けたのは、1974 年に報告されたテザードセル法を用いた回転運動の直接観察であった[9]。テザードセル法とは、カバーガラスにべん毛繊維の抗体をコートし、べん毛繊維を付着させることで、バクテリア本体の回転を観察する手法である。この手法を用いれば、粘性抵抗の大きなバクテリア本体が回転することになるので、回転速度は数 Hz 程度にまで減少し、通常のビデオ録画で簡単に解析することができるようになる。これまで行われてきたべん毛の回転運動の機能解析は、そのほとんどがテザードセル法を用いて行われたものである。べん毛モーターでは 1 モーターの運動解析が実に 30 年以上も前からスタートしていたことになる。

しかしながら、テザードセル法では、モーターが繊維を回転させているような低負荷の条件下での解析が出来ない。1 本のべん毛繊維の静止画像および低速回転は、高輝度の暗視野法によって観察されていたものの、高速で回転しているモーターの解析には適さなかった。1990 年、工藤らは、これまでの限界を打ち破る画期的な手法となるレーザー暗視野顕微鏡法を考案し、べん毛繊維 1 本の回転運動を直接観察することに成功した[10]。レーザー暗視野顕微鏡法は、べん毛繊維に細く絞ったレーザーを斜めから照射し、その散乱光のみを記録する方法であり、高い S/N を実現する。この方法によって、H⁺駆動型のモーターでは 200~300Hz、Na⁺駆動型モーターでは最大 1700Hz もの周波数で高速回転していることが明らかになった。

ATP 駆動型モーターの研究では、光学顕微鏡で直接観察することができない生体分子に μm 程度の径を持つプラスチックの球(ビーズ)を目印として付着させ、その動きをナノメ

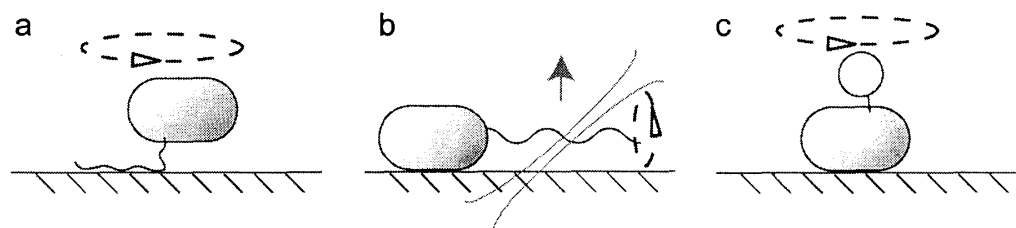


図 2-2. べん毛モーターの回転計測方法

a. テザードセル法、b. レーザー暗視野顕微鏡法、c. ビーズアッセイ

ートルの精度で検出するビーズアッセイがよく用いられるのだが、べん毛モーターの回転計測にも取り入れられている[11]。また、ビーズアッセイは、回転運動を S/N の高い信号として検出できるだけでなく、ビーズのサイズによって粘性抵抗を任意に設定できる点でも非常に優れている。回転モーターの出力特性を評価する際に、発生トルクと回転速度の関係を知ることが重要であり、我々のグループでもビーズアッセイを用いて、 Na^+ 駆動型べん毛モーターのトルク-スピード関係を計測し、本質的に H^+ 駆動型と同じ特性を持つことを明らかにしている[12,13]。

2.2 ステップの直接観察

べん毛モーターについて、1 モーター解析が始まったのが 1974 年であったことは紹介したが、その 2 年後の 1976 年には、モーターのステップの検出に向けて言及した論文が提出されている[14]。その当時から、べん毛モーターの回転は、小さなステップ回転の繰り返しによるものと期待されていた。ところが 30 年近く前から議論されているにもかかわらず、これまでべん毛モーターにおいて、ATP 駆動型モーターでは見られるステップ運動は直接観察されておらず、見かけ上は滑らかな回転しか観察されていない。

2.2.1 ステップ計測への戦略

はじめに、べん毛モーターのステップがなぜ検出されてこなかったのか考えたい。まず、べん毛モーターは高速回転するため、装置の時間分解能の限界で検出されなかったことが挙げられる。また、モーターと繊維をつなぐフックは回転方向に対してバネのような作用を持つので、もし仮にステップ運動をしていても、力学的な負荷がかかることによってダンピングが起こり、ステップを検出することは難しいであろう。さらに、1 個のモーターには複数個の固定子が回転力の発生に関わっているので、発生するトルクが大きくなる上に、出力が複雑になることが予想される。

これらの問題はお互い密接に関連し合っているのだが、相互作用している固定子の数を減らし、モーターを低速度で回転させることで解決できると期待される。そこで、我々はイオン駆動力と固定子の数を制御できる系を構築し、ビーズアッセイにより高い時間空間分解能で計測を行うことで、ステップの検出を試みることにした。

2.2.2 大腸菌で機能する Na^+ 駆動型キメラモーター

H^+ 駆動型と Na^+ 駆動型モーターは同様のメカニズムで回転していることが予想出来ることはすでに述べた。しかし、モーターの機能を計測するという立場からでは、それぞれの違った特徴が見えてくる(表 2-1)。大腸菌は通常 H^+ 駆動型モーターを持つのだが、べん毛モーターに限らず多くの研究はモデル生物として大腸菌を用いており、これまでの多くの情報の蓄積、分子生物学的手法が確立されていることなど試料として最適であることは言うまでもない。

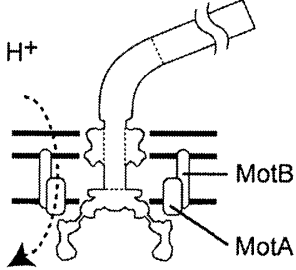
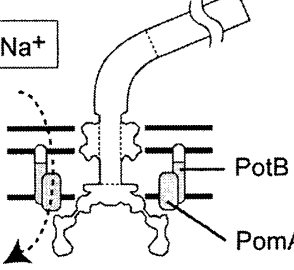
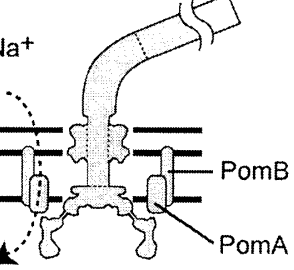
模式図			
モーター	大腸菌 H ⁺ 駆動型	キメラ Na ⁺ 駆動型	ビブリオ Na ⁺ 駆動型
細胞本体	大腸菌	大腸菌	ビブリオ菌
メリット	情報量多い 分子生物学的手法を使える	情報量多い・分子生物学 入力エネルギーの操作容易	入力エネルギーの操作容易
デメリット	入力エネルギーの操作困難	特になし	情報量が少ない 分子生物学を使いにくい

表 2-1. キメラモーターの特徴のまとめ

模式図中の白は大腸菌、灰色はビブリオ菌由来の構成要素を示している。

しかしながら、水溶液中の H⁺濃度を制御することによる駆動力の調節は、pH が変化することによる細胞への悪影響があり、現実的には困難である。それに対して、Na⁺駆動型モーターでは外液の Na⁺濃度の変化でナトリウム駆動力を制御出来ることや、ナトリウムイオンチャネルへの特異的阻害剤が存在することから、入力の制御が容易である。

このジレンマを解決するために、筆者らは大腸菌内で Na⁺駆動型として機能するキメラモーターを採用した。Na⁺駆動型の固定子タンパク質 PomA と、H⁺駆動型の固定子タンパク質 MotB と Na⁺駆動型の固定子タンパク質 PomB を融合させた PotB は、大腸菌の H⁺駆動型の回転子と相互作用して Na⁺駆動型として機能することが明らかにされている[15]。本来大腸菌が持つ固定子タンパク質 MotAMotB の遺伝子を欠損させ、Na⁺駆動型の固定子 PomAPotB を薬剤による発現誘導によってその数を制御できるように大腸菌の改変も行った。また、回転方向の切り替えを制御するタンパク質 CheY および細胞本体にビーズが付着することを防ぐために細胞外の構造物である PilA の遺伝子をゲノムから欠損させた。固定子タンパク質を発現誘導する薬剤の濃度を低くし、少数の固定子を持つようにバクテリアを培養して、サンプルとした。

2.2.3 計測系について

モーターの回転運動を観測できるように、大腸菌の sticky-filament (べん毛繊維を構

成するタンパク質の一部を欠損させ疎水性を高めたもの)にビーズを付着させ、その重心位置の動きを2つの異なる手法で検出した(図 2-3)。

1) Back focal plane interferometry (BFP)。BFP 計測では、対物レンズに平行に入射した 1064nm のレーザーが作る集光点(光ピンセットと同じ光学系だがビーズに力が加わらない強度で用いる)に検出したいビーズを配置する。直径 500nm の比較的大きなビーズを用いることで、ビーズによって前方散乱される光強度を十分に大きくすることができ、コンデン

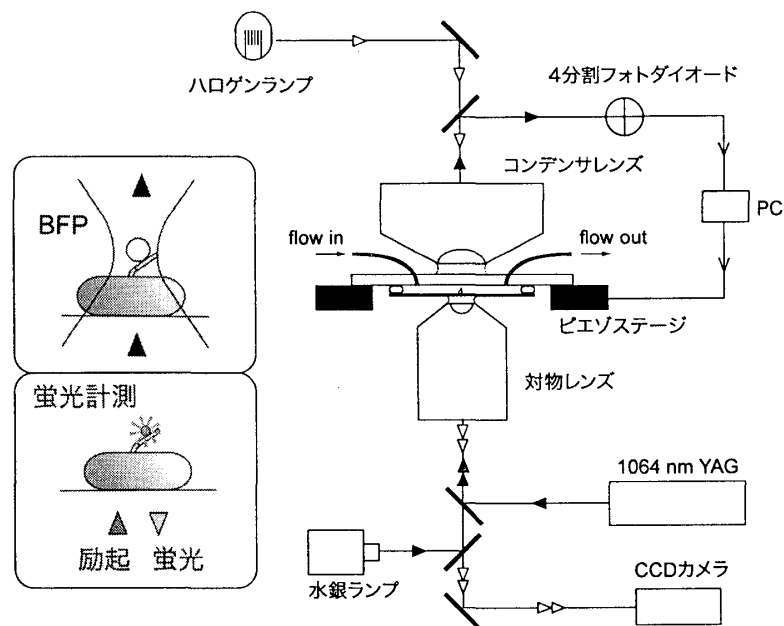


図 2-3. 計測系模式図

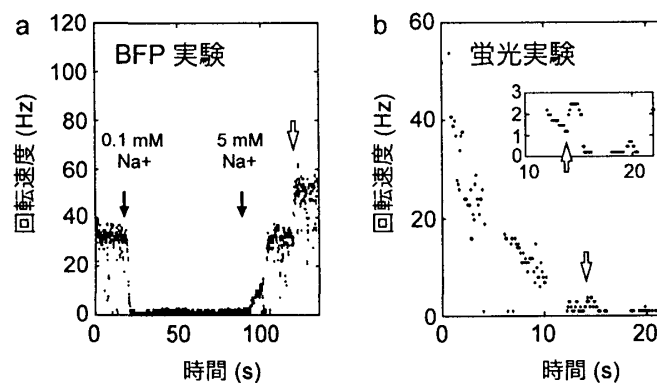


図 2-4. 低速回転条件の設定

a. BFP 実験の溶液交換時の速度変化。黒矢印間での Na 濃度は 0.1mM である。b. 蛍光実験時の光ダメージによる回転速度変化。BFP 実験、蛍光実験ともに白矢印で見られる速度の 2 倍変化は固定子の数が 1 から 2 への変化であると解釈される。

サレンズの後焦点面では参照光とビーズによる散乱光との間で明瞭な干渉模様を形成することができる。この像を4分割フォトダイオードに結像させることによってビーズの重心位置をナノメートルの精度で検出できるようになる。BFP計測では、低い Na^+ 濃度に溶液交換することで、ナトリウム駆動力を下げた低速回転を作り出した。図2-4aは、溶液交換したときの典型的な速度変化を示しており、低濃度(0.1mM)条件下では約1Hzの回転速度であった。

2) 蛍光ビーズ法。水銀ランプを光源として、蛍光ビーズの落射蛍光像を高速度カメラで観測する。バクテリア本体から発せられる蛍光はほとんど無いので、直径200nmの小さなビーズを用いて線形性の良いデータを得ることができる。CCDカメラで撮影した16x16ピクセルの画像を2.4kHzもの高速度で読み出し、1枚の画像ごとに蛍光像の強度分布に対して2次元ガウシアンでフィッティングを行い、ビーズの重心位置を5nmの精度で決定することが出来た。蛍光ビーズ計測では光による積算的なダメージによってナトリウム駆動力を下げた低速回転を作り出した。図2-4bは蛍光実験での200nmビーズの典型的な速度変化を示している。滑らかな速度の減少は光ダメージが誘導する膜電位の減少のせいであると考えられ、離散的な速度の変化(inset)は可逆的な固定子ユニットの不活性化の結果であると考えられる。

2.2.4 ステップ回転の解析

BFPおよび蛍光ビーズの計測方法ともに、ビーズの重心位置を示すXYシグナルをプロットすると、低速度領域ではどの角度も平均的に滞在しているわけではなく、長く滞在している角度が見られた(図2-5a, inset)。そこで、XYプロットを回転楕円軌道とモデル化して重心位置の角度の時間変化を計算した。図2-5aは500nmビーズと200nm蛍光ビーズの低速度回転時の角度と時間のグラフを示しており、図2-5b,cは図2-5aのトレースの一部を拡大して示している。これらのトレースを見ると、明らかに滑らかに回転しているわけではなく、約 14° のステップ状の回転が見て取れる。ビーズの回転半径は約100nmであるので、我々の検出装置による角度分解能は、位置分解能が5nmである蛍光ビーズ法でも少なくとも 3° はあり、優位な角度変化と考えられる。また、時折逆方向へのステップ(グラフでは、マイナス方向へのステップ)が見られ、その出現頻度は回転速度に依存し、低速度ほど高いようであった。これらのステップの大きさに、規則性があるかを確認するために、ステップ状の変位が確認された全ての変位トレースから、ステップの大きさを求めた。図2-5dは、ステップの大きさのヒストグラムであり、 13.7° の基本単位があることが確認された。つまり、べん毛モーターは、平均26回ステップすることで1回転することになる。ここでは示していないが、ステップの大きさに回転速度による差異は認められなかった。

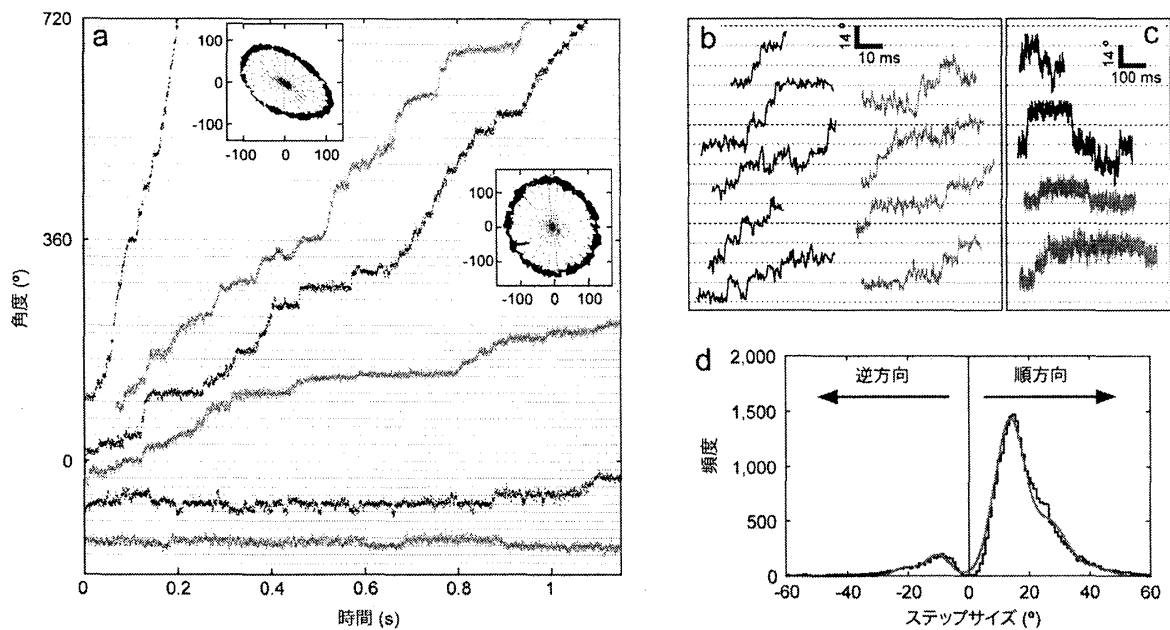


図 2-5. 低速回転時のステップ回転 a-c. 低速回転時の角度-時間のトレース、灰色は BFP 実験、黒色は蛍光実験のデータを示している。d. ステップサイズの実験データとガウシアンを重ね合わせによるフィッティング。ピークの値は 13.7° であった。

2.2.5 ステップ回転に対する考察

モーターの回転が、連続的なステップ状の回転によるものか、それとも本質的に滑らかなのかという問いは、回転メカニズムに大きく関係する。我々のキメラモーターを用いた回転計測によると、1 回転あたり平均 26 ステップを連続的に行うことで回転していることが明らかとなった。この値は、回転子のトルク発生に最も重要なタンパク質と考えられている FliG が作るリングの対称性と一致した(図 2-1 参照)。ATP 駆動型分子モーターと同様に、モーターが沿って動くトラックの周期性の離散的な特性を反映していると考えられる。

これまでべん毛モーターのエネルギー入出力関係は、イオン 1 個の流入により発生する回転角度をもとにして議論されてきた。従来までの研究により、イオン駆動力が $6k_B T/\text{ion}$ ($\text{imf}=150\text{mV}$) の条件下では固定子 1 ユニットあたり平均約 $70 k_B T/\text{rad}$ のトルクを発生させていることが明らかにされている。よって単一イオンが引き起こすステップの最大角度は、エネルギー保存則より、

$$\begin{aligned}\text{ステップ角度(rad)} &= (\text{単一イオンが持つ自由エネルギー}) / (\text{発生トルク}) \\ &\approx 0.0857\text{rad}\end{aligned}$$

であるから、約 5° と見積もられる。それに対して、筆者らが回転運動から実測した素過程は 13.7° であったので、少なくとも単一イオンの流入が、1 ステップの角度変化を引き起こすよ

うな入出力応答ではなさそうである。

自然界に存在するバクテリアの場合は、周囲の状況に応じてべん毛の回転方向を変化させている。この回転方向を切り替える制御タンパク質が CheY である。今回、我々が用いたバクテリアは CheY をコードする遺伝子を欠損させているので、通常の条件では決して逆方向に回転することはなく、今回の条件でも回転方向の切り替えは起こっていないと考えられる。それにもかかわらず、しばしば逆方向へのステップが観察されたことは注目に値する。これは、回転運動を作り出すポテンシャルエネルギーは順方向のステップを生むだけでなく、逆方向のステップを生み出す性質をもつことを示すものである。今回、回転運動から素過程を検出するべくモーターを低速度で回転させる条件で実験を行ったため、回転運動を発生させるエネルギーポテンシャル差が小さいこと予想される。そのため、逆ステップの出現確率が上昇し、明瞭に捉えられたのであろう。このように、ステップが生み出される方向には本質的に確率性が関与している可能性が高く、運動を平均化しない素過程を観察することで初めて明らかになった事実である。

最後に、逆方向のステップの頻度から見積もられる回転運動に必要な自由エネルギーを考察する。ステップを駆動する自由エネルギー ΔG は、両方向性のステップを生み出すプロセスとは関係なく、

$$\text{逆方向の出現確率} / \text{順方向の出現確率} = \exp(-\Delta G / k_B T)$$

として与えられる。我々の実験条件では、 ΔG は回転速度に依存して、 $0 \sim 3k_B T$ であった。この値と回転計測している細胞のナトリウム駆動力を比較すれば、ステップに関与するイオンの数を見積もることは可能である。イオン駆動力を決定する膜電位と細胞内部のイオン濃度は、蛍光試薬を用いての計測が実現可能であろう。また、生体膜上にあるイオンチャネルの研究で用いられるパッチクランプなどを応用して、直接的にイオン流を検出する技術の開発ができれば、よりダイレクトに入力を計測できる。本研究で、素過程の出力の検出が可能であることは明らかになったので、今後は実際に回転計測しているモーターに対する入力を検出する技術を開発し、入出力応答を決定することが重要である。

2.3 まとめ

今回検出した回転ステップ運動は、イオンの流れによって駆動する分子モーターにおいて構造と機能の相関を示した初めてのデータであることを強調したい。イオン駆動型モーターにおいても ATP 駆動型分子モーターと同様に 1 分子レベルでの素過程を議論出来る段階になったと言えよう。バクテリアべん毛モーターは ATP 駆動型モーターのように顕微鏡下で再構成できておらず、回転運動の計測に際しては、条件の設定など難しい点が多い。しかしながら、イオン濃度を変えることで入力エネルギーを広範囲にわたって任意に設定できることから、エネルギー変換に関わる多くの情報を我々に与えてくれるに違いない。

3. キネシンモーターのステップ計測と運動解析

前章で紹介したべん毛モーターとは異なり、キネシンはタンパク質フィラメントである微小管に沿って運動するリニア型の分子モーターである。キネシンのステップ状変位が検出されたのは、今から10年以上前のことになるのだが、従来の装置の分解能ではステップ検出を行える実験条件に制限があり、これまでステップ状変位をもとにした運動解析はほとんど行われてこなかった。筆者らは、暗視野照明型のナノメートル計測装置を開発することで、キネシンのステップ状変位を広範な条件下で検出することを可能にした。第3章では、ステップ状変位をもとにした運動解析から明らかになった、キネシンの運動特性について紹介したい。

3.1 リニア・モーター型分子機械：キネシン

3.1.1 細胞内物質輸送とキネシンの発見

神経細胞は、核のある細胞体と、そこから伸びた多数の樹状突起と、1本の軸索から構成されている (Fig. 3.1)。細胞体の大きさが数十マイクロメートル程度であるのに対して、軸索は長いもので、10cm から 1m にも達することがあり、細胞の形状は極めて特徴的なものとなっている。神経細胞の主な役割は、外部からの情報を樹状突起で受け取り、細胞体で統合し、軸索を介して標的細胞へと伝達することにある。情報の出力に際して、長い軸索内を電気的インパルスが伝搬し、その末端に到着するとシナプスから神経伝達物質が放出され隣の細胞へと情報を伝える。このような活動がすみやかに完遂されるためには、あらかじめ、必要となる物質が軸索の先端部分にまで供給されておかねばならない。ところが、蛋白質をはじめとする多くの重要な分子は、軸索内ではなく、遠く離れた細胞体で合成されているのである。細胞体から軸索末端へと膜小器官を1m輸送するのに、単なる拡散運動だけでは8年かかるとする試算もあり、軸索内には能動的に物質を輸送する仕掛けがあると昔から考えられてきた。

実際に、軸索内の物質輸送を光学顕微鏡下で観測できるようになったのは1980年代のことである。米国の Allen らは、ビデオカメラで捉えた微分干渉顕微像に対して、コントラストを増強する手法を開発し、軸索中で小胞が滑走する様子を観測することに成功した

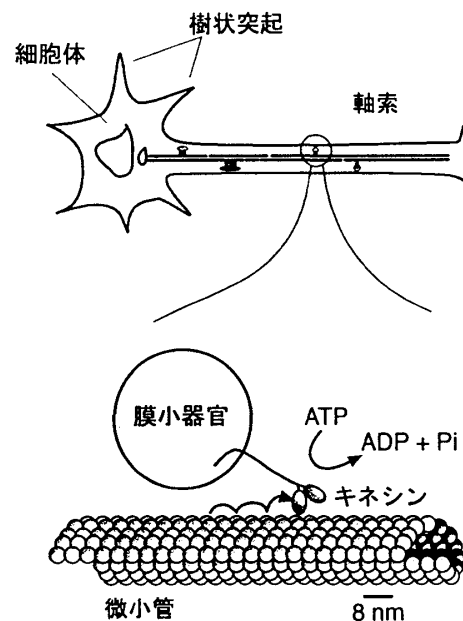


図 3.1 細胞内物質輸送とキネシン

[1]。ちょうどその頃、軸索内にはタンパク質フィラメントである微小管 (microtubule) が多量に含まれていることが明らかになってきたので、微小管と相互作用するタンパク質が軸索内の輸送現象の担い手になっているのではないかと考えられるようになった。1985 年、米国の Vale らは、微小管のプラス端方向に滑り運動を発生する ATP 駆動型分子モーターの同定に初めて成功し、ギリシャ語の *kinein* (=動く) にちなんで、キネシン (kinesin) と名付けた[16, 17]。微小管のプラス端は、軸索の末端方向に向けて並んでいるので、タンパク質などが詰め込まれた小胞をキネシンがせおいこめば、細胞体から軸索の末端に向けて輸送できることになる (図 3.1)。例えるならば、微小管を都市と都市を結ぶ高速道路とすると、キネシン分子は運送トラックということになる。今日では、ゲノム解析により、45 種類ものキネシン型タンパク質がヒトの遺伝子にコードされていることが判明しているが、本稿では、一番初めに同定された従来型のキネシン (kinesin-1) の運動計測と動作メカニズムに関して解説していくことにする。

3.1.2 キネシンと 1 分子計測

キネシンは全体として双頭構造をとるヘテロダイマーであり、分子量約 11 万 5 千の重鎖と 6 万 5 千の軽鎖 2 個ずつから構成されている[18]。各重鎖の N 末端には約 340 のアミノ酸からなる球状部位があり、「モータードメイン」と呼ばれている。モータードメインには、ATP の加水分解反応を触媒する酵素活性と微小管への結合能があるため、運動を発生する中枢部分といってよい。ヒトが二本の足を交互に動かしながら歩行するように、これら 2 つのモータードメインを交互に微小管と結合・解離させることで、キネシンは微小管に沿って滑り運動を発生させていると考えられている (hand-over-hand モデル) [19]。

キネシンは、1 分子でも微小管から解離することなく、連続して ATP の加水分解反応を行うことで、長距離 ($\sim 1\mu\text{m}$) にわたって滑り運動を持続させるという特徴があり、プロセッシブ性 (逐次前進性) と呼ばれている。1990 年、米国の Block らは、このプロセッシブ性を活かした 1 分子計測の実験系を構築する。あらかじめ、キネシンに動きの目印となるビーズを取り付けておき、キネシンが、ガラス表面に吸着している微小管に結合し、滑り運動を発生する様子を観測することに成功した[20]。その 3 年後、Block 研の Svoboda らは、光ピンセット (Box 3.1) で捕捉されたビーズの干渉像をナノメートルの精度で計測できる装置を開発し、キネシンが 8nm を単位とするステップ状の変位を繰り返しながら微小管を移動する様子を捉えることに成功した[21]。このステップサイズは、レールとなる微小管の構成単位であるチューブリンドダイマーの長さとも一致したので、キネシンの運動単位は、微小管の構造によって決められていることが明らかになった。

しかしながら、これまで検出されてきたキネシンのステップ状変位は、キネシンの歩みが遅くなるような条件下で検出されたものばかりである。従来の装置の分解能が不十分なこともあり、キネシンが最高速度で滑り運動を行えるような生理的条件に近い環境では、ステ

ップ状の変位は観測されていない[21,22]。それゆえ、これまで行われてきたキネシンの運動解析では、ステップ状の変位が検出されていない変位トレースから滑り速度をもとめ、その変化を調べる研究が主流となっていた。それに対して、筆者らは、ステップ状変位をもとにしたキネシンの運動解析を行うことにした。キネシンの運動特性を詳細に調べるためには、運動の素過程をもとにした解析がより正確であると考えられたからである。まずはじめに筆者らは、キネシンが最高速度で滑り運動をおこなえるような生理的条件下でも、ステップ状変位を検出できるように、ナノメートル計測装置の分解能を向上させることから着手した。

3.2 キネシン1分子の高時間分解能ナノメートル計測

3.2.1 暗視野照明型ナノメートル計測法の開発

従来までのナノメートル計測では、10nm 程度の大きさしかないモータードメインに対して極めて大きなビーズ（直径 1 μ m 程度のポリスチレン球）を目印として用いることが多かった（本文のフォントの大きさが 10nm とすると、冊子の縦方向の長さが 1 μ m 程度となる）。大きなビーズを用いると、光学顕微鏡下でその像をはっきりと観察できるし、光ダイオード上に投影すれば、光信号としても弱くはない。しかしながら、大きなビーズは可視化が容易な反面、水溶液中の粘性抵抗が大きく、時間応答能の制約を受けるという問題点があった。そこで、筆者らは、ナノメートル計測の時間分解能を向上させるため、小さなビーズ（直径 200nm）を用いた新しい装置の開発に取り組んだ。開発当初、明視野型や微分干渉型などの結像系を試みたものの、小さなビーズから鮮明な像を得ることはできなかった。そこで、バクテリアのべん毛モーターの高速回転運動の検出に利用されていた斜光暗視野照明法を導入したところ[10]、小さなビーズから明瞭で十分な光強度をもつ暗視野像をとりだす事に成功した。

Box 3.1 光ピンセット

光ピンセットとは、レンズで光を回折限界にまで集光させることで、光の放射圧を利用して溶液中の微粒子などを捕捉する光技術である[23,24]。この光学系を顕微鏡に導入することで、研究対象となる微小物体を顕微鏡で観察しながら、非接触・非侵襲で捕捉し、三次元的に自由に動かすことができるようになる。また、光を遮断するだけで、任意の場所で捕捉物を手放すことができる。この「光の手」は、マイクロメートルスケールの物体の物性評価や細胞の顕微操作などにも利用される便利なツールである[24,25]。光ピンセットで捕捉されたビーズは、（その変位量が一定範囲内であれば）捕捉中心からの距離に比例した復元力をうけることになる（フックの法則）。この超高感度の「バネばかり」を利用すれば、ビーズにかかる力をサブピコニュートンの分解能で測定できるようになる。

図 3.2a に、暗視野照明型ナノメートル計測装置を用いたキネシン 1 分子の力学計測の模式図を示す[26, 27]。あらかじめ、キネシンと直径 200nm の蛍光ビーズ（ポリスチレン製ラテックス球）を 1 : 1 程度のもル比で混合し、キネシン 1 分子をビーズ表面に非特異的に吸着させておく。2 枚のカバーガラスを組み合わせた「チャンバー」内で、このキネシンービーズ溶液や、蛍光修飾した微小管、ATP などを含むサンプル溶液の調整を行い、顕微鏡に取り

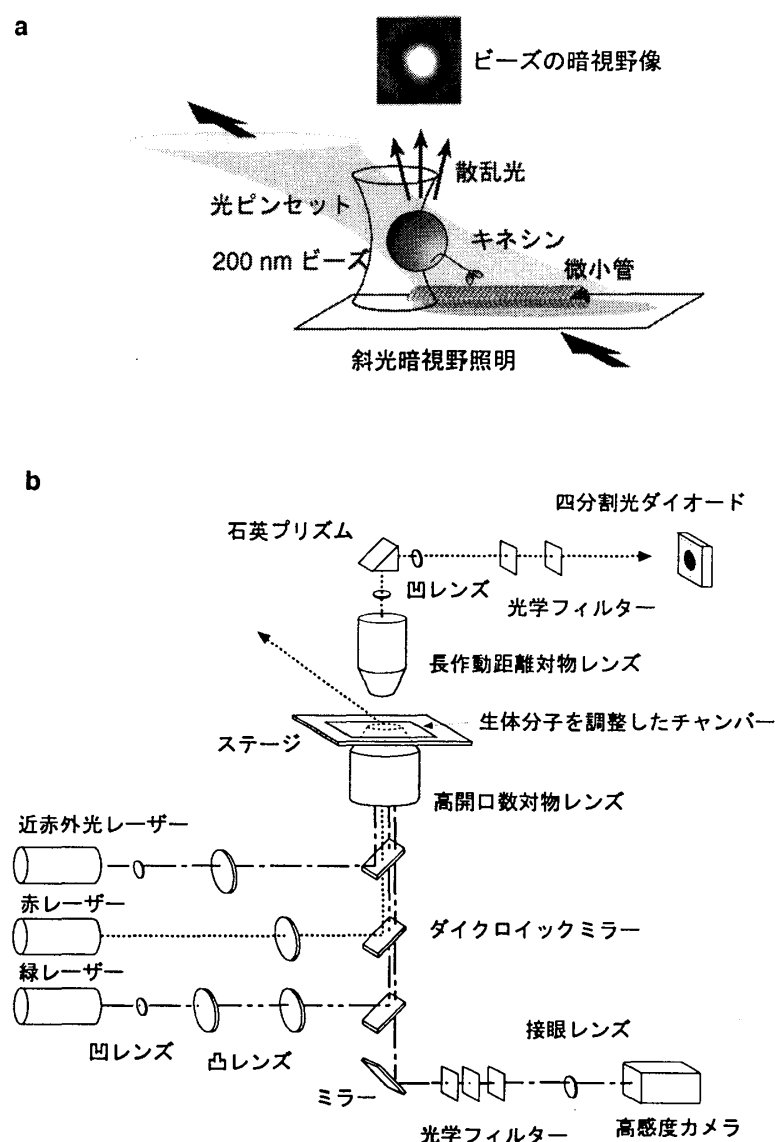


図 3.2 暗視野照明型ナノメートル計測装置. a キネシンの 1 分子ナノメートル計測の概略図. b 顕微鏡の概略図。近赤外レーザー光は光ピンセット、赤レーザーは斜光暗視野照明、緑レーザーはビーズと微小管にラベルされている蛍光色素の励起に用いる。

付ける。溶液中にあるキネシン-ビーズを落射蛍光像を頼りに探し、光ピンセットで捕捉し、カバーガラス上にしっかりと吸着している微小管まで移動させる。ビーズ表面にあるキネシンが微小管に結合し滑り運動をはじめれば、顕微鏡下で滑り運動系を再構成できたことになる(図 3.1 と比較されたし)。ビーズを集光したレーザー光で斜めから照明し、その散乱光を開口数の小さな対物レンズを用いて集め、1000 倍に拡大し、暗視野像として四分割光ダイオードの中心に投影する(図 3.2b)。つまり、ビーズの暗視野像の動きを、各ダイオードに入射する光強度の変化として測定するのである。

光学顕微鏡の分解能は、 $0.61 \lambda / \text{N.A.}$ (λ : 光の波長、N.A.: 対物レンズの開口数) であり、およそ数百ナノメートル程度となる。しかしながら、このアップの壁と呼ばれる理論的な制限は、隣接する 2 つの像を分離して検出する際の定義であり、1 つの像の重心位置を計測する場合はこの制約はうけなくなる。本研究のように、分割型の光ダイオードを用いた測定系では、分解能を決める要素は、1) 光ダイオードに入射する光強度の大きさと、2) ビーズの像のコントラストである。従来から用いられてきた干渉型や明視野型の照明系を用いると、ビーズによる回折光と直接光(0 次の回折光)が光ダイオード上で結像することになる。このような光学系では、光ダイオードには大きな強度を持つ光信号が入射するものの、実はそのほとんどは、直接光に由来する光成分となってしまう。つまり、ビーズの位置を測定するにあたり、光信号の S/N が低くなる検出系といえよう。それに対して、本研究の場合は、ビーズの散乱光は肉眼で観察できるほど強度が高く、かつ、直接光を排除して、ビーズの暗視野像のみを光ダイオード上に結像させているので、極めて検出感度の高い測定系となっている。

3.2.2 キネシンのステップ状変位の検出

筆者らが開発した暗視野照明型のナノメートル計測装置を用いて、キネシン 1 分子の運動計測を行った。図 3.3a に、1mM ATP 存在下で検出されたキネシンの変位トレースを示す。キネシンが 8nm ステップを繰り返しながら(図中の矢印)、運動していく様子がはっきりとみてとれる。キネシンのステップ状変位を生理条件に近い状況(高濃度の ATP 存在下で、かつ、ほぼ無負荷の力領域)から検出できたのは、これが初めてである[27,28]。先でもふれたが、これまで検出されてきたキネシンのステップ状変位は、キネシンの歩みが遅くなるような条件下で検出されたものばかりであった[20]。また、8nm ステップ間の変位トレース(100kHz のサンプリングレイトで記録された生波形)において、ビーズの熱揺らぎをスペクトル解析したところ、最高で 15 μ s の時間応答能があることが確認できた。これは、分子モーターの変位計測としては、世界最高の時間分解能である。

キネシンの変位トレースを構成するステップの大多数は、前方方向(微小管の+端方向)に発生していた。ところが、図 3.3b に示すように、力の大きな領域(>5 pN)に限定すれば、前方方向とは逆向きにステップ(Back step)したり、キネシンが微小管から解離する(ビ

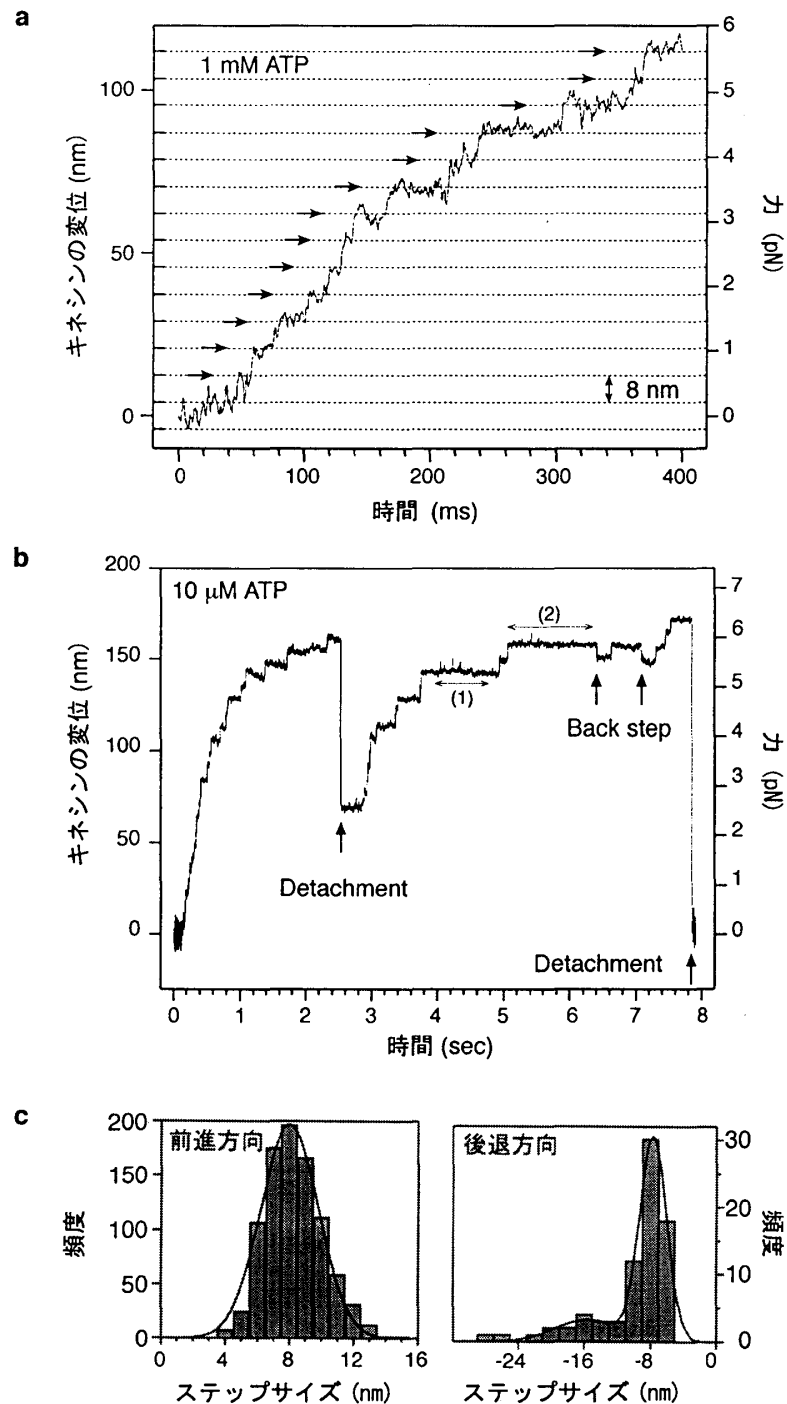


図 3.3 キネシンの 1 分子ナノメートル計測 a-b, キネシンのステップ状変位。サンプリングレート 20kHz で記録した変位トレースを 500Hz のローパスフィルターを通して表示してある。 c, キネシンのステップサイズ。ステップの前後の位置の差からステップサイズを直接求めた。

ーズは光ピンセットの捕捉中心に戻る) 現象 (Detachment) が頻繁に生じているのである。前方方向へのステップと同様に Back step の大きさもほぼ 8nm であり、微小管の構造を反映した値を示していた (図 3.3)。しかしながら、従来までの研究では、Back step は出現頻度の少ない“誤作動”として扱われることが多く、詳細な運動解析は行われてこなかった。その結果、「キネシンは ATP を加水分解した後、必ず前にステップする」という運動モデルが提案されるに至っている。筆者らは、これまで見過ごされきた後ろ方向へのステップに着目し、ステップの方向性を考慮した運動解析を行うことにした。キネシンが後ろ向きに生み出すステップは本当に誤作動なのであろうか？次節で検証を行っていく。

3.3 キネシンの運動解析と確率的な

ステップ生成メカニズム

3.3.1 キネシンの前進運動と後退運動

キネシンの変位トレースは、

1) (前進方向への) 8nm ステップ、2) 後退方向へのステップ (back step)、3) 微小管からの解離 (detachment) の3種類の変位様式から構成されていた。そこで、変位トレース全般にわたって、これらのステップ状変位が明瞭に検出されているデータのみを選び出し、ステップの種類、力の大きさ (負荷)、ステップから次のステップまでの時間間隔について調べた。[28-30]

図 3.4a は、1mM ATP 条件下で計測した変位トレースから3種類のステップ状変位の出現頻度を 1pN 毎に数えて、それぞれの割合をプロットしたものである。前方方向への 8nm ステップの出現確率は、4pN 以下の力領域ではほぼ 100%近いのに対して、それ以上の力領域では、力の増加と共に減少することが明らかになった。それに対して、back step と detachment は、力の増加と共に出現確率が増加した。両者の負荷依存性に

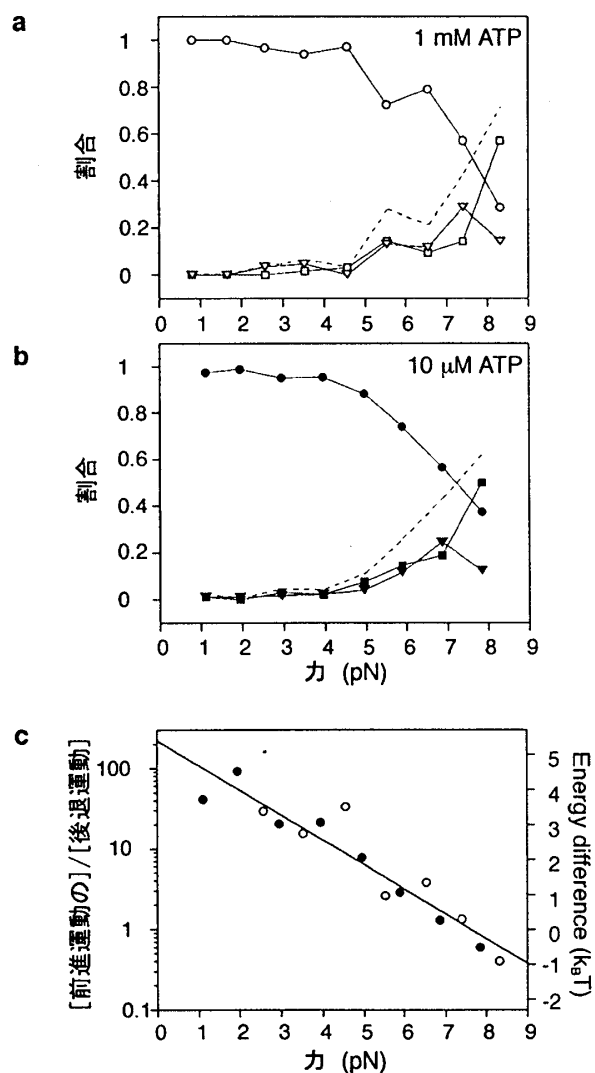


図 3.4 ステップの方向性.

a-b, 8 nm ステップ (○, ●), back step (▽, ▼), detachment (□, ■) の出現確率.

c, 前進運動と後退運動の比 1mM (○) and 10μM (●) ATP.

は類似性が見られたので、後退運動として足しあわせプロット（点線）したところ、前進運動（8nm ステップ）と後退運動の出現確率は 7~8pN の負荷領域で一致した。これは、キネシン 1 分子が発生できる最大力となる力領域である。低い ATP 濃度（10 μ M）の変位トレースからも同様の結果が得られたので（図 3.4b）、ATP の結合反応と運動の方向性の決定とは異なるプロセスで行われていると考えられる。運動の方向性を決めるプロセスを調べるため、前進運動と後退運動の出現確率の比を計算したところ、その値は負荷の増加共に指数関数的に減少することが明らかになった（図 3.4c）。この運動方向の負荷依存性については、次節で紹介する。

キネシンの変位トレースをもとにして、ステップから次のステップまでの時間間隔（Dwell time）を計測し、あと側のステップの種類により 3 つに分類した。例えば、図 3.3b において、(1)の Dwell time は 8nm ステップが生じるまでの時間間隔、(2)は back step までの時間間隔である。図 3.5a は、キネシンが前にステップするまでの時間間隔について、力の領域毎に平均値を求めプロットしたものである。大きな力の領域や（高負荷）、ATP 濃度が低い場合に、ステップまでの時間が長くなることが見てとれる。前者は、キネシンがうしろに引っ張られることで前に進みにくくなることを意味し、後者は、ATP 分子が結合するまでの時間が

長くなることに起因すると解釈できる。同様に、back step までの時間間隔と detachment までの時間間隔を解析したところ、前進運動の場合と同じような負荷依存性、ATP 濃度依存性をもつことが明らかになった（図 3.5b）。実は、この興味深い結果は、キネシンは後ろに戻る時も、前に進む時と同様の化学反応過程をたどることを意味している。言い換えると、「キネシンは ATP の加水分解反応を行っても、必ずしも前に進むわけではない（後ろに戻っても良い）」ということになる。

3.3.2 キネシンの両方向性運動の解析

筆者らは、両方向性の運動に関する一連の実験結果を説明するために、「キネシンは ATP を加水分解した後に、前か後のどちらかに運動する」という確率的な要素を含む運動モデルを考案した（図 3.6a）[28,29]。このモデルの最大の特徴は、

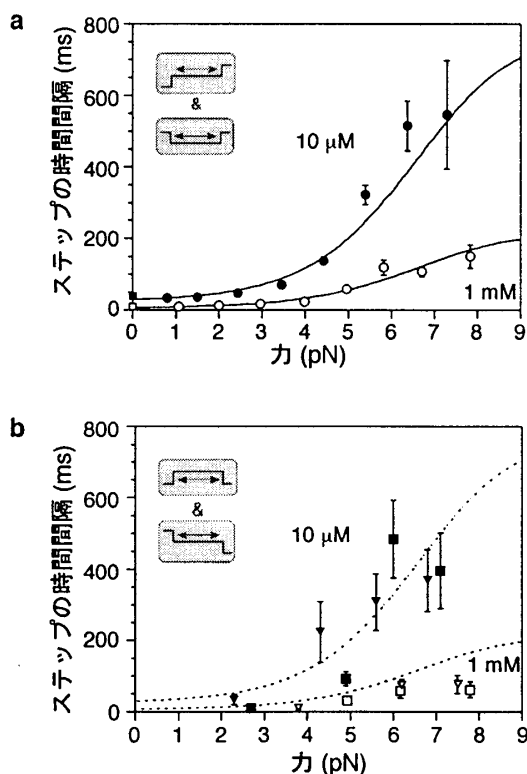


図 3.5 ステップの時間間隔.

a, 8 nm ステップまでの時間間隔 (○, ●)
 b, back step までの時間間隔 (▽, ▼)、
 detachment までの時間間隔 (□, ■)。
 それぞれ 1mM and 10 μ M ATP.

キネシンの前進運動と後退運動は、同一状態から競合的に発生するため、化学反応経路は途中で分岐する点にある。これは、キネシンは毎回同じ方向に運動できるように、あらかじめ決められているのではなく、確率的に決定されることを意味している。なお、back step と detachment の負荷特性は似ていたの（図 3.4ab、図 3.5b）、後退運動としてひとつにまとめている。また、3 状態モデルを用いているのは、1mM ATP 条件下の dwell time の負荷依存性から、負荷に依存して長くなる成分と依存しない成分の 2 成分が存在しており、ATP 濃度を減らすと ATP が結合するまでの時間が 3 成分目として新たに加わるからである。この 3 つの状態数は、キネシンのモータードメインに結合しているヌクレオチドの結合状態（ヌクレオチドなし、ATP 結合状態、ADP 結合状態）の数とも一致するものである。また、ADP 結合状態を分岐点にしたのは、キネシンのモータードメインと微小管との結合力が弱くなるので、運動を生み出す際に重要な働きをしていると考えられるからである。

はじめに、このキネシンの運動モデルにおいて、最も重要となる分岐点でのキネティクスを考える。[K.D]状態にあるキネシンが前に進むまでの反応速度を k_{3f} 、後ろに戻るまでの反応速度を k_{3b} とおく。これら 2 つの反応速度のもつ意味をはっきりさせるためには、

$$k_{3f} = (k_{3f} + k_{3b}) \times \frac{k_{3f}}{k_{3f} + k_{3b}}, \quad (3.1)$$

$$k_{3b} = (k_{3f} + k_{3b}) \times \frac{k_{3b}}{k_{3f} + k_{3b}}. \quad (3.2)$$

と書くと良い。右辺の第一項は、[K.D]状態の消滅速度であり、運動の方向に依存せず同じ値をとる。それに対して、第二項は、前進運動（後退運動）が生成する確率を示す。力が大きくなると、Dwell time は長くなり、前進運動と後退運動の出現比率は変化するのだから、 k_{3f} と k_{3b} は力の大きさに依存する反応速度と考えられる。

ここで、Arrhenius/Eyring のキネティクスを用いて、 k_{3f} と k_{3b} の負荷依存性について、障壁のあるポテンシャルの活性化エネルギーに関連づけて考えることにする（図 3.6b）。横軸を微小管に沿った方向の反応座標、縦軸に前進運動と後退運動の活性化エネルギーとすると、キネシンの両方向性運動を非対称な自由エネルギー曲面に束縛された粒子の運動として考えることができる。ATP の加水分解反応が伴わなければ、キネシンは滑り運動を発生できないので、この自由エネルギー曲面は、ATP の化学エネルギーにより形成されたと考えてよさそうである。このポテンシャル内に束縛された粒子は熱揺らぎによりランダムに駆動するのだが、障壁の高さには差があるので、低いほうに運動しやすくなる。これらの障壁の高さを $E_f + Fd_f$ 、 $E_b + Fd_b$ とする。但し、 E_f と E_b は無負荷での活性化エネルギーであり、 d_f と d_b は負荷の感受性を表すパラメーターであり、距離の次元を持つ。ポテンシャル面上での粒子の運動に関して、ボルツマン分布を仮定すると、障壁を越える反応速度は、

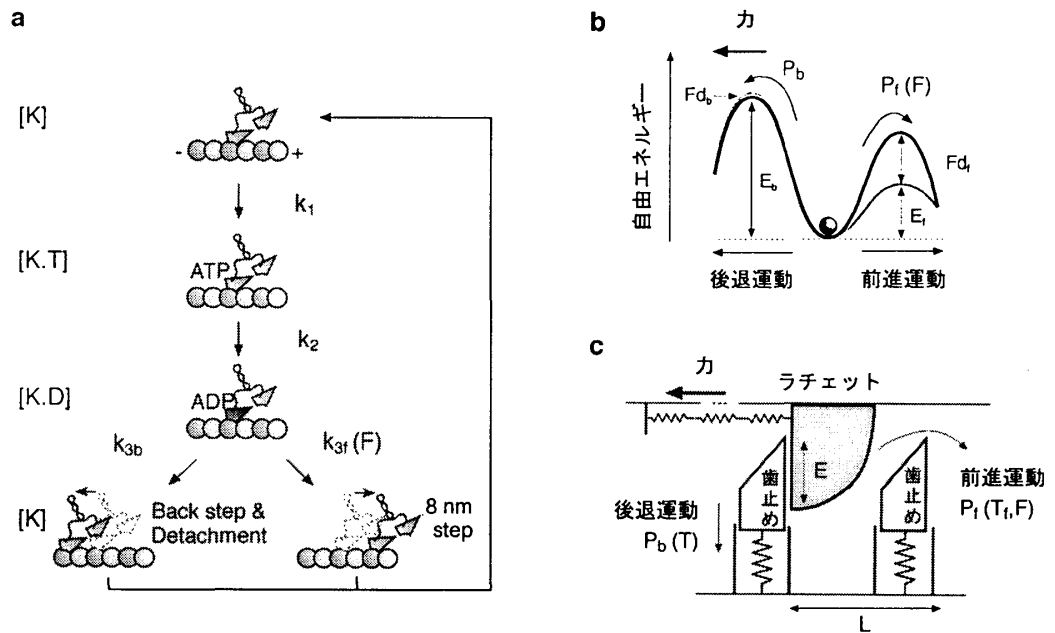


図 3.6 キネシンのキネティクスモデル a, 分岐型キネティクスモデル。キネシンは ATP を加水分解した後、前か後ろのどちらかに一つ進む。 b, キネシンの両方向性運動を生み出す非対称ポテンシャル。 c, ファインマンの熱ラチェットモデル。ラチェットと歯止めはキネシンと微小管に対応すると考えてある。

$$k_{3f} \propto \exp\left[-\frac{E_f + F \cdot d_f}{k_B T}\right], \quad (3.3)$$

$$k_{3b} \propto \exp\left[-\frac{E_b + F \cdot d_b}{k_B T}\right] \quad (3.4)$$

となる。ここで、 k_B はボルツマン定数、 T は実験時の温度 (298 K) である。以上のような、分岐点での反応速度 k_{3f} と k_{3b} とその負荷依存性を表す E_f と E_b 、 d_f と d_b に加えて、実験結果 (図 3.4c、図 3.5a) に対するデータフィットから求めた (Box 3.2)。図 3.5a の実験結果には、反応速度 k_1 と k_2 も反映されているので、この解析から求まるが、両方向性運動という観点からは重要性が低いので、本稿では特に議論しない。

図 3.7 は、反応速度 k_{3f} と k_{3b} の負荷に対してプロットしたグラフである。まず幅広い負荷領域にわたって、 k_{3f} は k_{3b} よりも大きな値をとることで、キネシンの一方向性の運動が説明される。直感的に考えるならば、キネシンを後ろに引く力が強くなると、前に進みにくくなり (k_{3f} は減少)、後ろに戻りやすくなる (k_{3b} は増加) と予想される。得られた結果では、 k_{3f} は負荷の増加に従って指数関数的な減少を示したのに対して、 k_{3b} は負荷に対する依存性がみられなかった。

この k_{3f} と k_{3b} に見られる負荷依存性について、非対称ポテンシャル (図 3.6b) を用

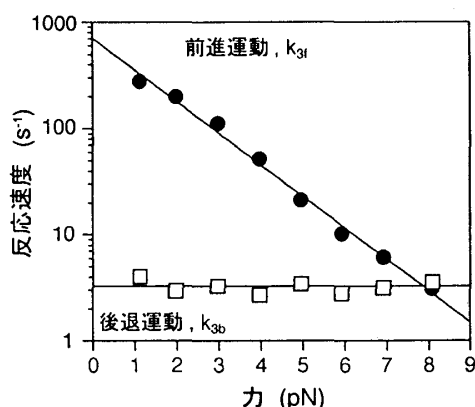


図 3.7 前進運動と後退運動の反応速度. 前進運動の反応速度が負荷の増加とともに指数関数的に減少するのに対して、後退運動の反応速度には負荷依存性がない。ファインマンの熱ラチェットモデルと現象論的には同じである。

いて、キネシンの運動特性との対応について説明する。負荷がゼロの時は、前方の障壁が後方に対して $5.4 k_B T$ 低いので (図 3.6b の灰色の曲線)、粒子は、ほぼ 100%に近い確率で前に運動することになる (後ろに戻る確率は~0.5%)。これは無負荷でキネシンが実質的に前向きにしかステップしないことに対応する。次に、負荷が加わった場合を考えると、前方の障壁のみが高くなり ($d_f=3.0$ nm, $d_b=0.1$ nm)。前後の障壁のエネルギー差は縮まることになる (図 3.6b の黒色の曲線)。すると粒子はポテンシャル内に束縛される時間が長くなるだけでなく、後ろの障壁を越える確率も大きくなる。これは、高負荷時において、キネシンの Dwell time が長くなり、back step や detachment の頻度が高くなることに対応する。やがて、負荷が 7.4pN に達すると、前方の障壁が後方の障壁の高さに一致するので、どちらの障壁を越える頻度も等しくなり、粒子の運動から方向性は消えてしまう。言い換えると、運動の方向性がなくなる力を、キネシン 1 分子が発生できる最大力として定義できることになる。

以上の考察から、キネシンの運動特性は、非対称ポテンシャルの前方の障壁を高くするだけで説明されることが示された。しかしながら、このモデルには、負荷をかけても、後ろの障壁の高さが変化しないという必然性はどこにもない。それならば、非対称ポテンシャルに障壁の高さが負荷に依存しないような仕掛けを組み込んではどうだろうか？ これまでは、ポテンシャルに束縛されている粒子が障壁を越える速度をその高さで議論してきただけである。それに対して、キネシンや微小管はタンパク質であり、そのかたちには異方性があるので、粒子やポテンシャルの形状に異方性をもうけてもよさそうである。次節では、大沢らが筋収縮の力学特性を説明する際に用いたファインマンの熱ラチェットを用いて、運動解析を行っていく。

Box 3.2 データ解析の方法[28, 30]

キネシンの前進運動と後退運動の比は、分岐点における反応速度 k_{3f} と k_{3b} の比に等しいので、

$$\frac{k_{3f}}{k_{3b}} = R_0 \cdot \exp\left(-\frac{Fd}{k_B T}\right), \quad (3.5)$$

$$R_0 = \exp\left(\frac{E_b - E_f}{k_B T}\right) \quad (3.6)$$

と記述できる。ここで、 d は $d_f - d_b$ である。図 3.4c のプロットに対して、数式 (3.5) をフィットしたところ、 $R_0=221$ 、 $d=2.9$ nm という結果が得られた。

ATP 濃度が十分に高く、キネシンに ATP が結合する速度が十分に大きい場合は、観測されるステップ間の時間間隔 τ は、ATP が結合してからキネシンがステップするまでの時間 τ_{cat} に等しいと考えられる。1mM ATP のステップの時間間隔 (図 3.5a) に対して、次式をフィットすればよい。

$$\tau_{cat} = \tau_2 + \tau_3 \cdot \left\{ \left(\frac{R_0}{R_0 + 1} \right) e^{-Fd_f/k_B T} + \left(\frac{1}{R_0 + 1} \right) e^{-F(d_f - d)/k_B T} \right\}^{-1} \quad (3.7)$$

で与えられる。ここで、 τ_2 は $1/k_2$ 、 τ_3 は無負荷時の $1/(k_{3f} + k_{3b})$ に等しい。それに対して、ATP 濃度が低く、ATP の結合反応が律速となる場合は (10 μ M ATP)、 $\tau > \tau_{cat}$ となるので、次式を併用して補正する必要がある。

$$\tau = \tau_{cat} \cdot \left(1 + \frac{K_m}{[ATP]} \right) \quad (3.8)$$

但し、 K_m は Michaelis 定数 (=27 μ M) である。図 3.5a のプロットにフィットすればよい。その結果、 $\tau_2=7.0$ ms、 $\tau_3=1.3$ ms、 $d_f=3.0$ nm、 $d_b=0.1$ nm が求まった。数式 (3.6) より、無負荷時における前後の障壁のエネルギー差は、 $E_b - E_f = 5.4k_B T$ となる。

3.3.3 ファインマンの熱ラチェットを用いた運動解析

ファインマンは、1963 年の講義で熱力学の第二法則を説明するために思考実験をおこなった[31]。その際に考案したのが熱ラチェット模型である。この模型を用いると、非対称な形をした爪と歯止めに「温度差」をもうけることで、方向性のない乱雑な熱運動から仕事をとりだすことができる。近年では非対称ポテンシャルなどを用いて、熱揺らぎから一方向性の運動を生み出す仕掛けが提案されているが[32]、ファインマンの熱ラチェットはその先駆けとなった模型である。1990 年、大沢らは、このファインマン型の模型を用いて、筋肉の収縮過程における力学特性の説明を試みている[33, 34]。詳細はさておき、分子モーターの研究からみて、ファインマン型の熱ラチェットの一番の特徴は、マクロにみると一方向性の滑り運動が

発生していても、その素過程では、前に行ったり、後ろに戻ったりしており、運動方向が定まっていない点にある。つまり、運動の素過程を生み出す反応プロセスには、本質的に確率性が含まれている。この点は、キネシンの滑り運動において、ステップの方向が確率的に決められているという結果と同じである。ここでは、ファインマン型の熱ラチェットモデルを用いて、キネシンが前に動く反応速度 (k_{3f}) と後ろに戻る反応速度 (k_{3b}) の解析を行っていく。

図 3.6c にファインマン型の熱ラチェットの模式図を示す。ラチェットはキネシン、歯止めの列は微小管に対応しており、ラチェットの 1 コマあたりの変位量が、キネシンのステップサイズ (微小管の周期構造) に相当すると考えている。ラチェットは水平方向、歯止めは垂直方向にのみ揺らぐことが可能で、ラチェットの円形斜面が歯止めの斜面に面している。また、ラチェットの温度を T_f 、歯止めの温度を実験時の温度 T ($=298\text{K}$) とする。ラチェットが前方向に 1 コマ進むためには、その円形斜面で歯止めを押し下げる仕事 E と、負荷 F に抗して距離 L 進むための仕事を行う必要がある。そのために必要なエネルギーは、温度 T_f の熱浴から借りなければならない。それに対して、後ろ方向に進むためには、構造上の制約によりラチェットは歯止めを押し下げることができないので、温度 T の熱浴からエネルギーを借りて歯止めを引っ込める必要がある。従って、ラチェットが前向き、または、後ろ向きに動く確率 (反応速度) はボルツマン分布にしたがい、それぞれ

$$\exp\left[-\frac{E+F\cdot L}{k_B T_f}\right], \quad (3.9)$$

$$\exp\left[-\frac{E}{k_B T}\right] \quad (3.10)$$

に比例する。キネシンの運動解析から得られた k_{3f} と k_{3b} は、ファインマンの熱ラチェットと同様の負荷依存性を示している (図 3.7)、数式 (3.9) と (3.10) のカーブフィットを行い、 T_f と E を求めることができる。その結果、爪の温度は $T_f=2.8T$ ($\sim 830\text{K}$) で、障壁の高さは $E=8.4k_B T$ に対応することが明らかになった[28-30]。これは、ファインマンの熱ラチェットに対応する現象が、生体分子のダイナミクスから実験的に見いだされた世界で初めての事例であると思われる。

ここでは、キネシンの運動特性とファインマンの熱ラチェットの関係について議論してみたい。数式 (3.9) (3.10) を一次元非対称ポテンシャル (図 3.6b) から得られた数式 (3.3)

(3.4) と比較してみる。第一に、負荷が反応速度に与える影響を考えてみる。非対称ポテンシャルでは、負荷に対する感受性を示すパラメーターを用いたが、 $d_f=3.0\text{ nm}$ と $d_b=0.1\text{ nm}$ となる必然性は不明であった。それに対して、ファインマンの熱ラチェットでは、負荷の影響が明瞭に示されている。ラチェットが前に動く反応速度には、負荷 F に対する感受性パラメーターとして距離 L を用いることで、ラチェットが力に対して行う仕事が FL として明瞭に組み込まれている。また、ラチェットが後ろに動く反応速度には、ラチェットと歯止めの形状を利用

して力の影響をのぞいている。注目すべきは、ラチェットが前に動く場合と後ろに動く場合を、それぞれ、ラチェットの熱揺らぎと、歯止めの揺らぎに分離している点である。キネシンにはモータードメインが2つあることを思い起こすと、2つのモータードメインがそれぞれ微小管と相互作用することで、ラチェットと歯止めの役割を果たしている可能性も考えられる。

第二に、反応速度の違いを生み出す要因を考えたい。非対称ポテンシャルの場合では、Arrhenius/Eyring 型の反応速度論に基づき、分母の温度は実験時の温度で固定しておき、障壁の高さで反応速度（確率）の大小関係を議論することになる。それに対して、ファインマン型の熱ラチェットでは、分母の「温度」の違いで反応速度の大小関係を議論することになる。ところが、ラチェットと歯止めに $T_f=2.8T$ に相当する「温度差」をどのようにして保持させるかが問題となる。溶液中にある溶質分子は通常、ピコ秒の時間領域で振動エネルギーを散逸させてしまうため、タンパク質がミリ秒～秒のオーダーにわたり、振動エネルギーの形で「高温状態」を保持するのは困難であると考えられる。したがって、ファインマンの熱ラチェットにおける「温度」は、通常の意味で用いるマクロなエネルギーとしてではなく、別の形で捉え直す必要がある。その「温度差」の解釈として、「構造揺らぎの非対称性」を提案してみたい。キネシンや微小管は複雑な立体構造を持つタンパク質であり、ATP の加水分解反応により結合様式を変化させていることは知られている。構造に異方性があるうえで、相互作用様式に異方性をもうければ、構造揺らぎに異方性が生じて不思議はないだろう。最近、筆者らは、 k_{3f} と k_{3b} の温度依存性を解析することで、反応速度の違いが活性化エントロピーの差から生じていることを明らかにしている[35]。この活性化エントロピーの違いには、キネシンのモータードメインの構造揺らぎの違いが反映されていると解釈することもできる。キネシンは、どのようなメカニズムでファインマン型の熱ラチェットを達成しているのか、また、その物理的な意味はどこにあるのか、これらは実験家のみならず、理論家にとっても今後の大きな課題である。

3.4 キネシン1分子の力学特性

筆者らの取り組みにより、キネシンは ATP を加水分解したあと必ずしも前にステップするわけではなく、後ろに戻りうるようになった。つまり、キネシンのステップ生成過程は、確率的なステップ生成機構であることを意味する。化学ー力学エネルギー変換過程において確率性が介在すると、その力学特性はどのようなものとなるのか、考察していきたい。

キネシンの力学特性を考えるうえで、まず重要になるのは、エネルギー入力と出力である。前者は、ATP を加水分解して得られる自由エネルギーであり、 $\sim 20k_B T$ であると考えられている（これは、アクトミオシン系の実測値から類推された値である）。後者に関しては、キネシンは前方向だけでなく、後ろ方向にもステップするので、2種類の出力を考慮する必要がある。なお、微小管から解離する現象（detachment）では、その変位量を定義できないため、厳密にはエネルギーの出力値の議論はできない。しかしながら、3.3.1 節を見てももらえれば分

かるように、back step と detachment の負荷特性は似ているので (図 3.4ab、図 3.5b)、ここでは両者を後ろ向きへの 8nm ステップと考えると (つまり、変位量は-8nm)、議論を進める。

1) 力と速度の関係。まず、ステップの方向性を表すパラメーター $\epsilon(F)$ を

$$\epsilon(F) = P_f - P_b = \frac{k_{3f} - k_{3b}}{k_{3f} + k_{3b}} \quad (3.11)$$

と定義する。但し、 P_f と P_b は前にステップする確率と後ろにステップする確率であり、 k_{3f} と

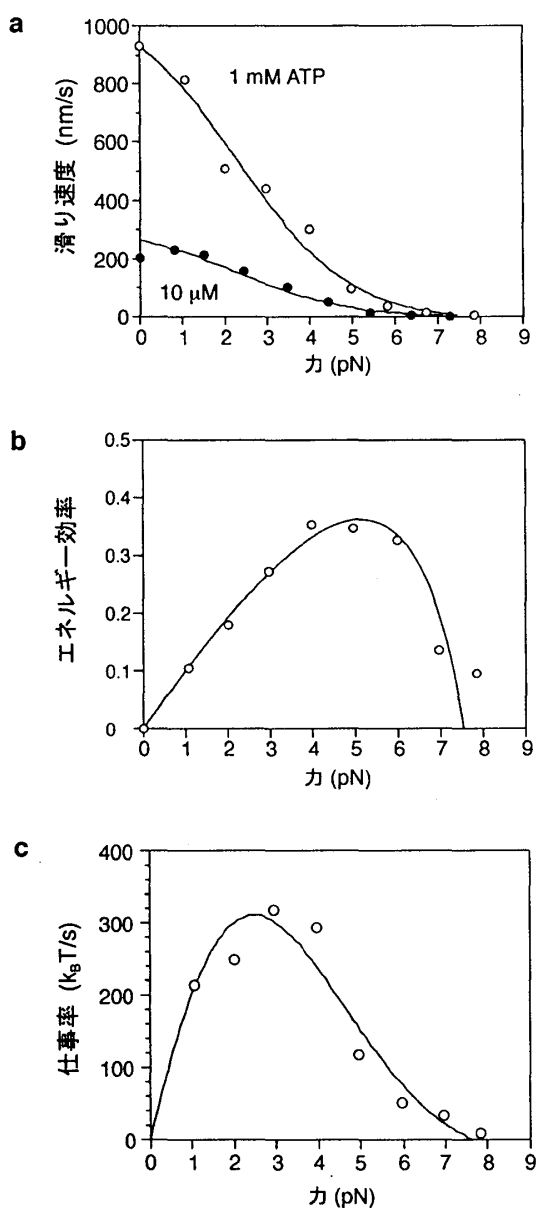


図 3.8 キネシン 1 分子の力学特性 a, 力-速度関係 b, 力-エネルギー効率関係 c, 力-仕事率関係

k_{3b} を用いて書き換えることもできる。キネシンのステップは前方向と後ろ方向に生じるが、ある力領域における平均変位量は、 $\varepsilon(F)$ を用いると次式で定義できる。

$$L \cdot \varepsilon(F) \quad (3.12)$$

但し、 L はキネシンのステップサイズ (=8nm) である。従って、キネシンの滑り速度は、ステップ間の時間間隔 τ を用いると、

$$V(F) = \frac{L \cdot \varepsilon(F)}{\tau(F)} \quad (3.13)$$

となる。図 3.8a は、ATP 濃度 1mM と 10 μ M の実験結果をもとにして、(3.13) 式より得られたキネシンの力-速度関係である。キネシンの滑り速度は、ATP 濃度が低い条件や力が必要な領域では低下することが見て取れる。後者に関しては、力が増加すると、ステップ効率 $\varepsilon(F)$ が小さくなることと、ステップ間の時間間隔 τ が大きくなることの2つの要因がある。

2) 力とエネルギー効率の関係。キネシンがステップ状変位を発生させる際に行う仕事は、力とキネシンの平均変位量との積で与えられる。この仕事を行うにあたり、キネシンは ATP を1つ加水分解しているので、そのエネルギー効率は、

$$E(F) = \frac{F \cdot L \cdot \varepsilon(F)}{20k_B T} \quad (3.14)$$

で与えられる。図 3.8b に 1mM ATP の実験結果から得られた力-エネルギー効率関係を示す。キネシンのエネルギー効率は、中程度の力領域で最大となり、35%となる（筋肉の場合ではエネルギー効率の最大値は 50%前後となる）。なお、通常、ATP を加水分解して得られる自由エネルギー値は、ヌクレオチド濃度に依存して変化することになる。しかしながら、生理的条件下では、ATP は ADP や P_i に対して過剰に存在しており、また、今回の実験でも溶液中のキネシンの濃度はおよそ 2pM なので、ATP の加水分解反応に伴うヌクレオチドの濃度変化は無視してもよい。

3) 力と仕事率の関係。キネシンの仕事率 P は、単位時間あたりにキネシンが行う仕事量から与えられるので、

$$P = \frac{F \cdot L \cdot \varepsilon(F)}{\tau(F)} \quad (3.15)$$

となる。図 3.8c は 1mM ATP の実験結果から得られた力-仕事率関係である。図 3.8b に示したエネルギー効率よりも小さな力領域で最大値をとる。同様の実験結果は筋肉の仕事率からも得られている。

以上の議論は、筆者らが、キネシンの確率的なステップ生成機構をもとにして考案したものである。生物分子モーターの中にはステップ状変位の検出に成功してはいるが、ほとんどの場合、ステップの方向性を考慮した運動解析は行われていないのが実情である。本稿で示した解析方法を用いることで、生物分子モーターの運動特性が詳細に明らかにされると期

待される。

3.5 まとめ

これまでは、キネシンは ATP を加水分解したあと必ず前に進むことになる、決定論的なステップ生成機構が支持されてきた。しかしながら、筆者らが、キネシンのステップ状変位をもとにした運動解析を行ったところ、キネシンは ATP を加水分解したあと、必ずしも前に進むわけではなく、後ろにも戻りうることが明らかになった。これは、キネシンのステップ生成機構が確率的なものであることを意味しており、その要因として、熱揺らぎの影響が考えられる。キネシンは激しい熱揺らぎにさらされながらもどのようにして化学—力学エネルギー変換を行い、マクロに見て一方向性の運動を生み出しているのだろうか？その詳細なメカニズムは未だ謎のままである。今後の研究の流れとして、キネシンには2つのモータードメインがあることから、滑り運動発生時における各モータードメインの役割を調べるのが重要になると考えられる。キネシンの1分子力学計測から、分子内部の力学計測へ、より一層、分子メカニズムに迫るような研究が期待される。

4. むすび

本稿では、2つの異なる生物分子モーターについて行われたステップ検出と運動解析について紹介してきた。べん毛モーターとキネシンでは、エネルギー入力や運動の様式など異なる点が多いものの、ステップ状変位の検出を通じて大きな2つの共通性が見られた。まず第一に、ステップの大きさはタンパク質の構造が反映されたものであり、決定論的な性質を帯びていた。第二に、ステップの方向は必ずしも一方向に決められておらず、ステップの生成機構には確率性が反映されていた。タンパク質の構造を反映したステップの大きさや、逆向きのステップが存在することは、筋収縮を担うアクトミオシン系やATP合成酵素のF₁モーターのステップ計測からも明らかにされているので[2,5]、今後他の分子モーターからも同様の性質が見つけだされると期待される。

今日では、タンパク質の立体構造が原子座標の精度で次々と明らかにされてきている。その精緻な構造をもとにすると、人工の機械のように100%確実に動作するイメージを抱いてしまう。それに対して、筆者らの取り組みからは、生物分子モーターの化学—力学エネルギー変換過程には確率的な過程が大きく関与していることが示唆された。もし、分子モーターが第3章で議論したファインマンのラチェットのような仕掛けを備えているならば、方向性のない熱揺らぎから、仕事や一方向性の運動を生み出すことも可能であろう。この場合、生物分子モーターは熱揺らぎを直接的な駆動力として運動をうみだすことになり、その運動メカニズムも動的でダイナミックなイメージとなる。生物分子モーターはナノスケールの分子機械であ

り、我々が住んでいる世界とは全く違う、熱揺らぎが大きな影響を及ぼす世界で駆動している。筆者らの研究から示唆された動的でダイナミックなメカニズムは、分子レベルでの生物らしさのあらわれであろうか、それとも、ナノスケールの物理法則につながる知見であろうか。今後の研究の発展に期待したい。

謝辞

べん毛モーターの回転計測は、名古屋大学理学部の本間道夫教授、薬師寿治助手、オックスフォード大学の Richard M. Berry 博士との共同研究であり、深く感謝いたします。また、キネシンの実験結果は、科学技術振興事業団・国際共同研究・1分子過程プロジェクトで得られたものであり、大阪大学の柳田敏雄教授に深く感謝いたします。また、共同研究者として、樋口秀男教授、武藤悦子博士、井上裕一博士、石井由晴博士、谷口雄一博士に協力して頂いています。一連の研究について議論をしてくださいました京都大学の寺嶋正秀教授、名古屋大学の美宅成樹教授には深くお礼申し上げます。本研究を行うにあたり、日本学術振興会（曾和）、住友財団とカシオ科学振興財団（西山）から援助を得ています。

引用文献

- [1] 宝谷紘一、神谷律 編，細胞のかたちと運動，共立出版（2000）
- [2] 石渡信一，生体分子モーターの仕組み，共立出版（1997）
- [3] 柳田敏雄、石渡信一 編，ナノピコスペースのイメージング，吉岡書店（1997）
- [4] 柳田敏雄，生物分子モーター，岩波書店（2002）
- [5] 安田涼平、野地博行，生物物理 **39**, 361-366（1999）
- [6] Sowa *et al.*, *Nature*. **437**, 916-919 (2005)
- [7] 相沢慎一，バクテリアのべん毛モーター，共立出版（1998）
- [8] 難波啓一，生物物理 **43**, 118-123 (2003)
- [9] Silverman, M. & Simon, M. *Nature* **249**, 73-74 (1974)
- [10] Kudo, S., Magariyama, Y. & Aizawa, S.-I. *Nature* **346**, 677-680 (1990)
- [11] Ryu, W. S., Berry, R. M. & Berg, H. C. *Nature* **403**, 444-447 (2000)
- [12] Sowa, Y., Hotta, H., Homma, M. & Ishijima, A. *J. Mol. Biol.* **327**, 1043-1051 (2003).
- [13] Yorimitsu, T., Sowa, Y., Ishijima, A., Yakushi, T. & Homma, M. *J Mol Biol* **320**, 403-13 (2002)
- [14] Berg, H. C. in *Cell Motility* Vol. A 47-56 (Cold Spring Harbor Press, New York, 1976).
- [15] Asai, Y., Yakushi, T., Kawagishi, I. & Homma, M. *J. Mol. Biol.* **327**, 453-463 (2003).

- [16] Vale, R.D., Reese, T.S. & Sheetz, M.P., *Cell*, **41**, 39-50 (1985)
- [17] 神谷律、丸山工作, 細胞の運動, 培風館 (1992)
- [18] 川口憲治、上村想太郎、石渡信一, 生物物理, **42**, 156-161 (2002)
- [19] Vale, R.D. & Milligan, R.A., *Science*, **288**, 88-95 (2000)
- [20] Block, S.M., Goldstein, L.S.B., Schnapp, B.J., *Nature*, **348**, 348-352 (1990)
- [21] Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. & Block, S. M., *Nature*, **365**, 721-727 (1993).
- [22] Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H. & Yanagida, T. *Biophys. J.* **73**, 2012-2022 (1997).
- [23] 増原極微変換プロジェクト 編, マイクロ化学, 化学同人 (1993)
- [24] 浮田宏生, マイクロメカニカルフォトリクス, 森北出版株式会社 (2002)
- [25] 増原宏, 細川陽一郎, レーザーが拓くナノバイオ ケイ・ディー・ネオブック (2005)
- [26] Nishiyama, M., Muto, E., Inoue, Y., Yanagida, T. & Higuchi, H., *Nature Cell Biol.* **3**, 425-428 (2001).
- [27] 西山雅祥, 光学 **30**, 445-450 (2001).
- [28] Nishiyama, M., Higuchi, H. & Yanagida, T., *Nature Cell Biol.* **4**, 790-797 (2002).
- [29] 西山雅祥, 樋口秀男, 生物物理 **44**, 75-80 (2004)
- [30] Nishiyama, M., Higuchi, H., Ishii, Y., Taniguchi, Y. & Yanagida, T., *Biosys.* **71**, 147-158 (2003).
- [31] Feynman, R.P., ファインマン物理学 Vol. II, 岩波書店 (1963)
- [32] Riemann, P., *Phys. Rep.* **361**, 57-265 (2002).
- [33] 大沢文夫, 講座: 生物物理, p184-191, 丸善 (1998)
- [34] Vale, R.D. & Oosawa F., *Adv. Biophys.* **26**, 97-134 (1990)
- [35] Taniguchi, Y., Nishiyama, M., Ishii, Y. & Yanagida T., *Nature Chem. Biol.* **1**, 342-347