

## 生体分子機械の作動原理

飯野亮太（自然科学研究機構 岡崎統合バイオ・分子研）iino@ims.ac.jp

### はじめに：生体分子機械は高性能・高機能

生命の活動はタンパク質でできた多種多様な生体分子機械が担っている。生体分子機械の大きさは数ナノメートルと小さいが、1個の分子（または分子複合体）で働くことができる。これらの分子機械は高い反応効率や正確性など、人間が作った機械に負けない、またはそれ以上の高度な性能を発揮する。例えば DNA 合成酵素を含む DNA 複製装置は、4 種類のヌクレオチドを基質とし鋳型 DNA に相補的な DNA を合成する。この時、誤ったヌクレオチドが導入される割合は  $10^{10}$  回に 1 回程度と言われている<sup>1)</sup>。正しい塩基対と誤った塩基対の間の結合エネルギーの差が水素結合 1 個分程度（熱揺らぎのエネルギーと同じくらい）であることを考えると驚異的な正確性である。DNA 合成酵素を駆動する入力エネルギーは、ヌクレオチドを付加する際に解離するリン酸基の放出により得られ、その大きさは熱揺らぎのエネルギーの 10 倍程度である。一方、人間の作った機械では、大きな入力エネルギーを使って熱揺らぎを抑え込み正確な応答を達成する。分子機械と人間の作った機械では、作動原理が全く違っているようにみえる<sup>2)</sup>。その作動原理を理解することが我々の目標である。

### 生体分子モーター：最も研究されている生体分子機械

生体分子機械の中でもっとも精力的に研究が行われているのは、入力エネルギーを力学的仕事に変換して直進運動や回転運動を行う生体分子モーターである。例えば、上記の DNA 合成酵素に加え、細胞内で小胞を輸送するキネシン（図 1A）や筋収縮を担うミオシンは直進運動をするリニアモーターであり、それぞれ DNA、微小管、アクチン線維上を直進運動する。厳密には、DNA のようにレールがらせん構造を持っている場合は単なる直進運動ではなく、レールのらせんに沿って進んでいく。DNA 合成酵素がリニアモーターなのは、レールの DNA を鋳型として DNA を複製するには

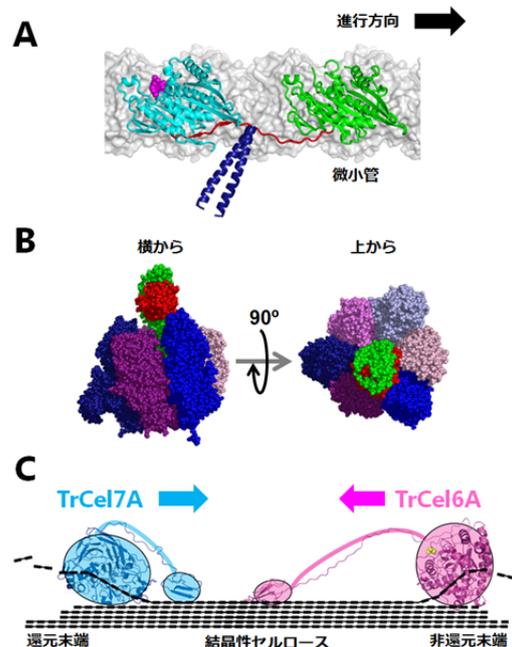


図 1. 生体分子モーターの例

(A) リニア分子モーターキネシン。(B) 回転分子モーター $V_1$ 。(C) リニア分子モーターセルラーゼ。結晶性セルロースを還元末端または非還元末端から加水分解して直進運動する。

ルールに沿って動くことが必須だからである。他方、回転運動する生体分子モーターとして古くから知られていたのは、細菌の鞭毛である。細菌の鞭毛は多数の構成部品からなる巨大な複合体で、鞭毛線維と細胞膜に埋まったモーター部分からなる。モーター部分は固定子と回転子から構成され、固定子が回転子につながった鞭毛を回転させることで細菌は推進力を獲得する。研究が進んでいる他の回転モーターとしては、アデノシン 3 リン酸 (ATP) を合成する  $F_0F_1$ -ATP 合成酵素 ( $F_0F_1$ )、細胞膜を介してイオンを能動輸送する V-ATPase ( $V_0V_1$ ) といった膜タンパク質が挙げられる<sup>3,4)</sup>。それぞれ、膜から突き出た親水性の  $F_1$ 、 $V_1$  (図 1 B)、細胞膜に埋め込まれた疎水性の  $F_0$ 、 $V_0$  の 2 つの回転モーターの複合体である。 $F_0F_1$ 、 $V_0V_1$  の機能は ATP の合成、イオンの能動輸送であり、回転運動自体は目的ではない。なぜ進化の過程で回転運動が選ばれたのか？これは重要な問いであるが明確な答えはない。

### エネルギー源：化学結合エネルギーとイオンの電気化学ポテンシャル

生体分子モーターの駆動に必要な入力エネルギー源は大きく 2 つに分類できる。1 つ目は化学結合のエネルギーである。特に ATP をアデノシン 2 リン酸 (ADP) と無機リン酸 (Pi) に加水分解する際に放出されるエネルギーが良く使われる。キネシンやミオシンといったほとんどのリニアモーターは ATP 加水分解酵素であり、ATP 加水分解の自由エネルギーを利用して直進運動する。また  $F_1$  や  $V_1$  は、ATP 加水分解駆動の回転モーターである。さらに最近、ATP 以外の化学結合エネルギー源で動く分子モーターも発見され注目されている。例えば結晶性多糖のセルロースやキチンを効率的に分解するセルラーゼ (図 1 C)、キチナーゼはリニアモーターであるが、駆動エネルギー源は ATP ではなくルールである多糖の加水分解エネルギーそのものである<sup>5)</sup>。セルラーゼ、キチナーゼはバイオマスの有効利用の観点で大きく注目されている新しい分子モーターであり、我々も研究のターゲットにしている<sup>6)</sup>。

もう 1 つのエネルギー源は細胞膜を介したイオンの電気化学ポテンシャルである<sup>3)</sup>。電気化学ポテンシャルで駆動する分子モーターは、細菌の鞭毛、 $F_0$ 、 $V_0$  である。全て回転モーターでありリニアモーターの報告はない。水素イオンの電気化学ポテンシャルを使う回転モーターが一般的だが、水素イオンでなくナトリウムイオンの電気化学ポテンシャルを駆動力とするものもある。これらは海水中など、生育環境に適応するための進化の結果として出現したと考えられている。尚、 $F_0F_1$  や  $V_0V_1$  では、化学結合エネルギーと電気化学ポテンシャルが力学的回転運動を介して可逆的に変換される。すなわち、電気化学ポテンシャルが大きい場合には ATP が合成され、ATP 加水分解の自由エネルギー (ATP, ADP, Pi の濃度で決まる) が大きい場合には、細胞膜の濃度勾配に逆らってイオンが能動輸送される。この点で  $F_0F_1$  や  $V_0V_1$  は、ナノサイズのエネルギー変換素子と言える。

## 1 分子計測：生体分子機械の作動原理を調べる強力な手法

分子モーターを初めとする生体分子機械の作動原理を理解するには、入力されたエネルギーがどのように変換されて力学的仕事として出力されるのかを詳細に調べることが必要である。例えば ATP 加水分解で駆動する分子モーターでは、ATP 結合、リン酸結合の破断、生成した ADP や Pi の解離という一連の化学反応の素過程が、構造変化、力発生および変位という力学的応答とどのように共役しているかを理解する必要がある。また、イオンの電気化学ポテンシャルで回転する分子モーターでは、イオンの結合・解離がどのように回転トルクに変換されるのか詳細に調べる必要がある。1 分子計測は、このエネルギー変換過程を調べる手法として有効である。なぜなら、分子の振る舞いは本質的に確率的なので複数の分子が完全に同期して働くことはなく、多分子計測では時間的・空間的な平均化が起きて機能発現の素過程を捉えることが困難だからである。現在、1 分子計測の技術の主力となっているのは、水中で実際に機能する生体分子機械を観測できる光学顕微鏡である。

大きさが数 nm 程度で無色透明な分子モーターを光学顕微鏡で観察するには、プローブをつける必要がある。大まかに分けて、分子モーターより小さなプローブと大きなプローブの 2 種類がある。小さなプローブとしてよく用いられるのは蛍光色素である。また、クラゲなどで発見された蛍光タンパク質を遺伝子レベルで結合させプローブにすることもできる。蛍光色素や蛍光タンパク質を結合させエバネッセント場を利用した照明（いわゆる全反射照明）を用いると、個々の分子モーターの動きを比較的容易に観察することが出来る<sup>7)</sup>。小さなプローブの利点は、分子モーターの機能を阻害せずにプローブを結合させることが容易な点である。さらに蛍光色素の励起モーメントの向きの計測や、同時に導入した 2 種の蛍光色素間の共鳴エネルギー移動の計測により、分子モーターの構造変化を検出することもできる。欠点は、放出される光子数が限られるためミリ秒以下の高い時間分解能での計測が困難な点、および不可逆的な褪色で観察時間が限られる点である。これらの欠点を改善するため最近では、発光するナノサイズの無機材料である量子ドットが利用されることも多い。

大きなプローブの代表例は、直径数 100 nm から数  $\mu\text{m}$  のポリスチレンビーズである。ポリスチレンビーズは位相差法や微分干渉法で直接観察することができ、ビーズの動きを分子モーターの動きとして追跡できる。蛍光色素よりずっと高い S/N 比の画像が得られ、マイクロ秒オーダーの高い時間分解能で計測を行うことができる。また、光ピンセット法でビーズを捕捉することで分子モーターが出す力を計測することもできる。さらに磁性ビーズを用いれば磁石で外力をかけ操作することも出来る（磁気ピンセット法<sup>8)</sup>。大きなプローブの欠点は、大きいので水の粘性抵抗が無視できず分子モーターの動きが遅くなる、結合位置によっては機能を阻害する、といった点である。

上記の様に小さなプローブと大きなプローブにはそれぞれ利点があるが、両者の利点を兼ね備えているのが、直径数 10 nm 程度の金ナノ粒子である<sup>9)</sup>。金ナノ粒子にかかる水の粘性抵抗力は無視できるほど小さく、熱揺らぎを含んだ分子モーターの速い運動を観測することができる。得られる S/N 比も高く、マイクロ秒の高い時間分解能で計測することも可能である。また、金ナノ粒子の代わりに金ナノロッドを用いると、その向きの変化を高い時間分解能で計測することができる(図2)<sup>10)</sup>。この手法は、生体分子モーターの構造変化を調べる非常に有力な手法である。

また、最近発展が著しい新しい光学顕微鏡以外の 1 分子計測法として、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM) が挙げられる<sup>11, 12)</sup>。高速 AFM はプローブを結合させる必要がなく、ナノメートルレベルの空間(高さ)分解能および数 10 ミリ秒の時間分解能で分子モーターのダイナミクスを観察できる強力な手法である。上述したセルラーゼやキチナーゼは、高速 AFM を用いた観察で初めてリニアモーターであることが証明されている<sup>13, 14)</sup>。

### ポーズとステップ：生体分子機械の運動の素過程

1 分子計測で得られた生体分子モーターの運動の典型的な軌跡を図3に示す。図3AはF<sub>1</sub>の回転運動、図3Bはキネシンの直進運動である。横軸は時間、縦軸は変位量(回転角度または移動距離)である。この図のように、運動の軌跡には停止(ポーズ)と急激な動き(ステップ)が存在する。一般に分子モーターはポーズの間、化学反応の素過程(基質結合、結合破断、生成物解離等)が起こるのを待っている。それぞれの素過程は確率的に起こるので、ポーズの長さにはばらつきがみられ、その分布はポーズの間の反応の律速過程の数に依存して変化する。一次反応では指数関数的に減衰する。他方、ステップ時は力を発生する。このポーズとステップが分子モーターの基本的挙動である。

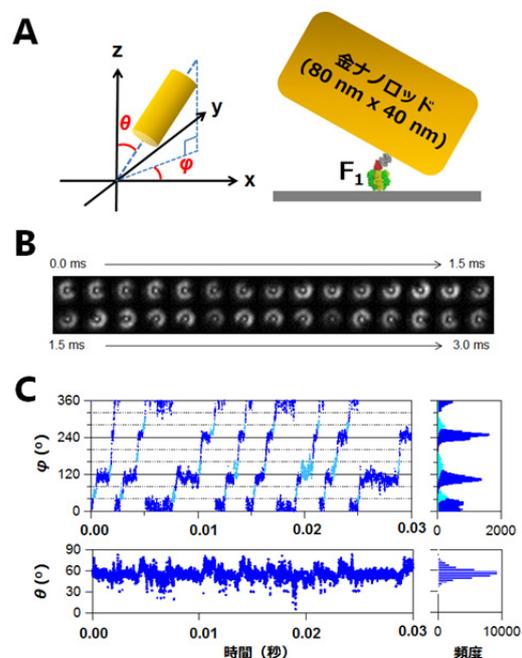
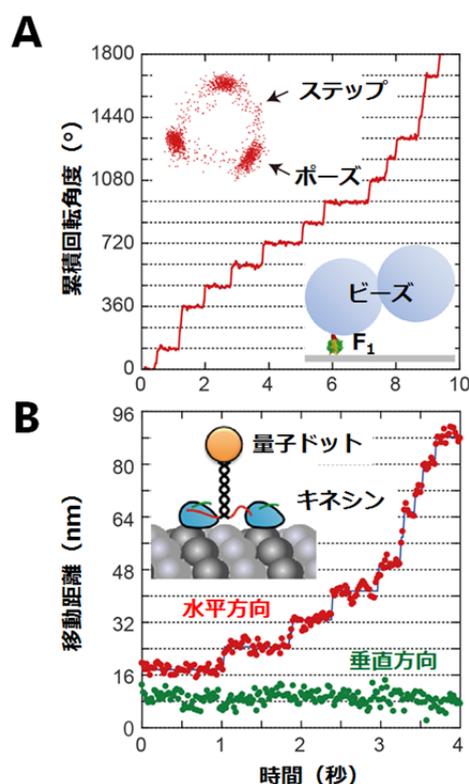


図2. 金ナノロッドを用いたF<sub>1</sub>の1分子回転計測  
(A) 金ナノロッドの方位角 $\phi$ と極角 $\theta$ の定義と実験系の模式図。回転子 $\gamma$ に金ナノロッドを結合。(B) 観察像のモンタージュ画像。(C) 方位角 $\phi$ と極角 $\theta$ のタイムコース。時間分解能3マイクロ秒。

ポーズの間にも分子モーターは熱揺らぎに曝されており、その構造は最安定構造の周りで揺らいでいる。揺らぎによりどのような不安定構造が出現するのかは、一般的な酵素反応機構における誘導適合 (induced fit) モデルと構造選択 (conformational selection) モデルの論争にも関連する重要な観点である。また、ステップ時のプローブの揺らぎの情報を上手く使うと、モーターの発生する力を計測することが出来る。モーターの発生する力は通常、プローブの粘性係数と移動速度の積から粘性抵抗力として計測される (尚、この手法で計測される力は保存力でないことに注意されたい)。しかしながら、プローブの粘性係数を正確に見積もるのは通常それほど容易ではない。そこで、揺らぎの定理である Fluctuation Theorem をもとにプローブの粘性係数を必要としない力の計測法が最近考案されている<sup>15)</sup>。



**図 3. 生体分子モーターのポーズとステップ**  
 (A) ポリスチレンビーズをプローブとして用いた  $F_1$  の回転運動。右下の inset はビーズの重心座標の分布。120°離れた3か所でポーズがみられる。(B) 量子ドットをプローブとして用いたキネシンの直進運動。コイルドコイル領域を標識。微細管に沿って運動している。ステップサイズは 8 nm。

### パワーストロークとブラウニアンラチェット：生体分子機械が力を発生する機構

1 分子計測に加え構造解析は生体分子モーターの作動機構を理解するための強力な手法である<sup>4)</sup>。ATP を駆動力とするいくつかの分子モーターでは、基質や反応生成物の結合の有無により大きく異なる構造が得られている。これらは化学反応の素過程で出現する複数の構造状態に対応し、それぞれの構造間で遷移が起こると考えられる。図 4A は骨格筋ミオシン S1 フラグメントの結晶構造であり、基質を結合していない状態と ADP·Pi を結合した状態では、レバーアーム領域の向きが大きく異なっている。このことから、反応生成物の解離によりレバーアームが大きく動くと考えられている。この動きが筋収縮の源であるとしたのがいわゆるレバーアーム仮説である。また  $F_1$  では、ヌクレオチド結合で触媒サブユニット  $\beta$  が開いた構造から閉じた構造に大きく変化することが明らかになっている (図 4B)。そしてこの閉じた触媒サブユニット  $\beta$  は回転子サブユニット  $\gamma$  を押しているように見え、開いた触媒サブユニット  $\beta$  は回転子サブユニット  $\gamma$  に押されているように見える。これらの例の様に、分子モーターが触媒する化学

反応に伴う構造変化は力発生機構の一つであると考えられておりパワーストロークと呼ばれる。

他方、細菌の鞭毛、 $F_0$ 、 $V_0$ といったイオンの電気化学ポテンシャルで回転する分子モーターでは、力発生に構造変化ではなくブラウン運動が重要な役割を果たすと考えられている<sup>16, 17</sup>。これらの分子モーターは電気化学ポテンシャルが存在しない状態では、回転子が固定子に対し方向性のない回転ブラウン運動を行い、膜電位や膜の両側でのイオン濃度差はこのブラウン運動の方向性にバイアスかけると考えられている。これをブラウニアンラチェットと呼ぶ。但し、 $F_0$ 、 $V_0$ と細菌の鞭毛には作動機構には重要な相違点がある。それは、イオンの輸送方向と回転方向の関係である。 $F_0$ 、 $V_0$ では膜を介するイオンの電気化学ポテンシャル(イオンの輸送方向)の向きが逆転すると回転方向も共役して逆転する。一方、細菌の鞭毛は電気化学ポテンシャルとは独立に回転方向を逆転させることが出来る。また、上述のセルラーゼやキチナーゼは、パワーストロークではなくレールの上をブラウニアンラチェットで動くリニアモーターであると考えられている。

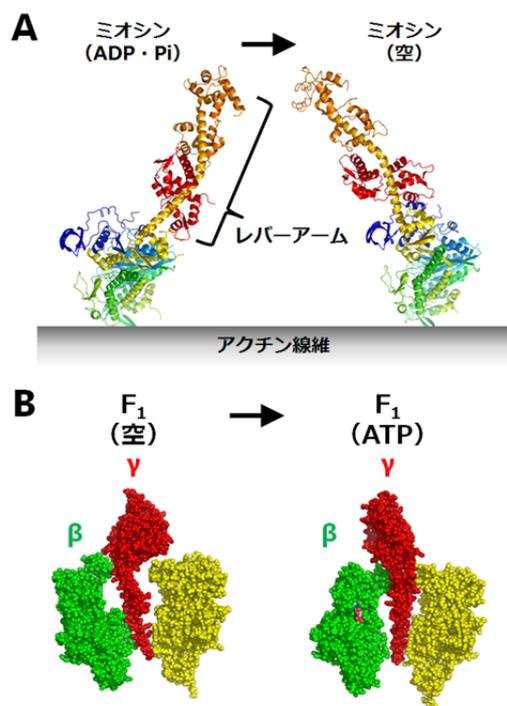


図4. 生体分子モーターの構造変化 (パワーストローク)

(A) 骨格筋ミオシン S1 フラグメントの構造変化。ADP と Pi を結合した状態と基質を結合していない状態では、レバーアームの向きが大きく異なる。(B)  $F_1$  の構造変化。基質を結合していない触媒サブユニット  $\beta$  は開いた構造をとっている。一方、ATP を結合した  $\beta$  は閉じた構造をとっており、回転子サブユ

### おわりに：今後は調べるだけでなく創りたい！

我々は、分子モーターを初めとする生体分子機械の1分子計測を今後もさらに推し進めたいと考えている。具体的には、1ナノメートル以下の位置決定精度、 $1^\circ$ 以下の角度分解能、1マイクロ秒以下の時間分解能での1分子計測を無負荷のプロープで達成し、分子モーターのエネルギー変換の素過程を徹底的に明らかにしたい。このような技術は生体分子機械だけでなく、人工合成した分子機械の特性解析にも有効であると我々は期待している<sup>18, 19</sup>。また今後重要なアプローチは、自然界に存在する生体分子機械を調べるだけでなく、天然に存在しない新しい生体分子機械を積極的に創ることで作動原理をボトムアップで理解することだと考える<sup>20</sup>。計算科学による合理設計や非天然アミノ酸の導入等<sup>21, 22</sup>、様々な手法の適用が可能となりつつある。望む機能を持つ分子機械を自在に創造する「分子機械設計学」の確立を目指したい。

## 文献

1. B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the Cell*, 6th Edition, p.242, Garland, New York (2015)
2. P. Karagiannis, Y. Ishii, T. Yanagida. *Chem Rev.* **114**, 3318-3334 (2014)
3. R. Iino, H. Noji. *IUBMB Life.* **65**, 238-246 (2013)
4. R. Iino *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **31**, 49-56 (2015)
5. C. M. Payne, *et al.*, *Chem Rev.* **115**, 1308-448 (2015)
6. Y. Shibafuji *et al.*, *J. Biol. Chem.* **289**, 14056-14065 (2014)
7. 飯野亮太 全反射照明蛍光顕微鏡「先端バイオマテリアルハンドブック」p.132-137. NTS (2012)
8. Y. Rondelez *et al.*, *Nature*, **433**, 773-777 (2005)
9. H. Ueno *et al.*, *Biophys. J.* **98**, 2014-2023 (2010)
10. S. Enoki *et al.*, *Anal. Chem.* **87**, 2079-2086 (2015)
11. T. Uchihashi *et al.*, *Science.* **333**, 755-758 (2011)
12. T. Ando, T. Uchihashi, S. Scheuring, *Chem Rev.* **114**, 3120-88 (2014)
13. K. Igarashi, *et al.*, *Science.* **333**, 1279-1282 (2011)
14. K. Igarashi, *et al.*, *Nat. Commun.* **5**, 3975 (2014)
15. K. Hayashi *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **104**, 218103 (2010)
16. Y. Sowa *et al.*, *Nature.* **437**, 916-919 (2005)
17. R. Watanabe *et al.*, *Nat. Commun.* **4**, 1631 (2013)
18. T. Ikeda *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10082-10085 (2014)
19. S. Erbas-Cakmak *et al.*, *Chem Rev.* **115**, 10081-206 (2015)
20. M. Nakamura *et al.*, *Nat Nanotechnol.* **9**, 693-697 (2014)
21. N. Koga *et al.*, *Nature.* **491**, 222-227 (2012)
22. A. Yukawa *et al.*, *Biochemistry.* **54**, 472-480 (2015)