

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成21年度採択分

平成24年 5月31日現在

研究課題名（和文） **一分子生理学を超えて：
生体分子機械を力で優しく働かせる**
研究課題名（英文） **Beyond single-molecule physiology:
Letting molecular machines work by soft force**
研究代表者
木下 一彦 (KINOSITA KAZUHIKO Jr.)
早稲田大学・理工学術院・教授



研究の概要： たんぱく質ないしRNA でできた分子機械の仕掛けを、1個1個が働く現場を顕微鏡下で直接観察することにより探るのが、従来の一分子生理学である。仕組みが複雑だと、観るだけではなかなか根本理解に至らない。外から力を加えてみる。その力で邪魔してみるという従来の発想でなく、働きを助けるような力のかけ方を探る。本来の駆動力源を奪い、あるいは重要部品を取り除いた上で、動かなくなるかどうかではなく、外力を使って正しく働かせてやる道がないか問う。優しく動かしてやることにより、反応も探る。分子機械の部品間さらに分子機械同士の作用の伝達は力によると考えており、力がどのように作用するかを通じて、仕掛けを明らかにする。外力の補助により、新しい機能も生み出せるかもしれない。

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：F₁-ATPase、ATP合成酵素、イオンチャネル、リニア一分子モーター

1. 研究開始当初の背景

分子機械1個の働き（動き）を直視できるようになって20年弱、一分子生理学は様々な分子機械の働く仕掛けを明らかにしてきた。マクロな測定では平均値しか分からないが、個々の状態ないし反応経過の詳細を区別できれば、より深い理解に至れるというのが多くの研究者の立場。我々は、確率的に動く分子機械はそもそも同期がとれない（一斉に調子を揃えて働かせられない）、従って1個を観なければ働きそのものの明快な描像が得られない、という信念の下、巨大プローブを分子機械に付けることにより、「一目で分かる理解」を目指してきた。回転モーターF₁-ATPase、リニア一分子モーターミオシンなど、動画としての理解に貢献したつもりである。

2. 研究の目的

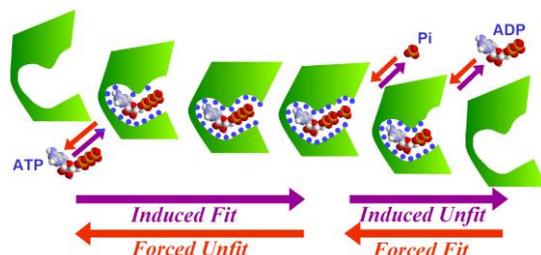
しかし相手の仕掛けが複雑になると、観るだけではなかなか本質に迫れない。力（摂動）を加えるのが一法だが、従来は、力で妨害したらどうなるかを問う研究がほとんどだった。そこで本研究では、ATP合成酵素やイオンチャネルなどを、本来の駆動源の代わりに優しい外力で正しく動かしてやることを試みる。文字通り、手で動かして「やる」ことにより、仕掛けに迫る。

3. 研究の方法

磁気ピンセット（磁石により磁気ビーズを回転させたり引張る）、光ピンセット（光でビーズを掴む）、微小ピペット、などを用いて分子機械に力を加え、正逆両方向に働かせてやると同時に、加えられた弱い力に応じて分子機械が出す正逆両方向の力を計る。

4. これまでの成果

(1) F₁-ATPaseの結合変化。回転子サブユニットを外力で回転させることにより、ヌクレオチドの結合・解離の速度定数を回転角の関数として決定できた。結合定数は4桁以上にわたり連続的に変化し、ATPとADPが区別された。これまで、下図のような抽象的なモデル（緑がたんぱく質、青い点が結合力を表す）を用いてATP分解がたんぱく質構造変化を引き起こす（仕事をする）ことを説明してきたが、具象化できたことになる。外力により図



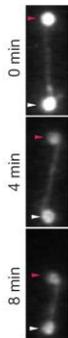
を右から左にたどるときに ATP が合成されることも説明でき、Boyer の結合変化説に実態を与えた。なお、合成時には燐酸が巧みに働いて合成効率を上げることも分かった。

(2) F_1 の回転子残基はどれも必要ない。回転は回転子とその回りの固定子サブユニットの相互作用で生じる。しかし、回転子サブユニットの回転軸や外側に突き出した頭部などを大きく削除しても十分有意な（野生体の約半分）回転力が出る。必須残基は一つもない。

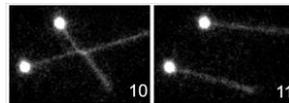
(3) F_0F_1 -ATP 合成酵素。生体内ではプロトン駆動の回転モーター F_0 が F_1 に結合して ATP を合成する。一分子測定に適した好熱菌の ATP 合成酵素はこれまで活性が非常に低かったが、高活性標品の調製に成功した。これを用いて、プロトン濃度差および膜電位が合成活性に代数和として同等の寄与をすることを、初めて負の値も含めて示した。逆反応としての ATP 駆動のプロトンポンプを、初めて一分子で定量した。親戚の VoV_1 では、右図（論文 3）のように Vo の回転子の 12 回対称性を反映するサブステップ回転を捉えるとともに、 V_1 単独ではサブステップがなく F_1 と反応機構が異なることを示した。



(4) リニア一分子モーター。二本足で歩くミオシン V は、持ち上げた脚が完全にランダムな回転ブラウン運動をし、一方着地した足首が ATP 駆動で前屈することにより腰が前に出るので、上がった足は前方着地する（既報）。今回、後足が持ち上がるとすぐ爪先が下がることにより、腰が負荷により後に引っ張られていてもちゃんと前方着地が保証されることを示した（論文 2）。光ピンセットにより横や斜めに力を加えても、ちゃんと歩けることも示した（論文 5）。また、微少管を脱重合させるキネシン MCAK が、脱重合時にも微少管の端にとどまって短縮力を出せることが分かり（右図；論文 4）、この力が染色体分配に寄与する可能性を示した。



(5) DNA 上で働く分子機械。II 型トポイソメラーゼが絡まり合った DNA をほどくマジックを、初めて可視化した（右図：論文



1)。また、IV 型は右回りと左回りの絡み合いを区別して解くことが知られているが、この区別は DNA の交差角度に依存し、鈍角になったときに一方が抑制される（他方が促進されるわけではない）ことが分かった。日本で発見された、唯一 DNA を右に（二重螺旋がきつくなる方向に）巻き上げる酵素 reverse gyrase が、これまでの生化学知見と異なり、たった一分子でも DNA を回し続けることが分かった。反応の詳細を調べている。

(6) 紡錘体（染色体分配装置）。分子機械システムとしての紡錘体に注目し、外力で変形させたり、2分割あるいは2つを融合させたりしても、形状（軸比）が保たれることを示した。分子モーターを阻害すると変形するが、一部に外力を加えるだけで元の形に戻るといふ不思議な現象も見つかった。

5. 今後の計画

本研究で賭けてみたかった夢は、電位依存性イオンチャネルを外力（電気力ではない）で直接操作して開閉すること、ATP 合成酵素のプロトン駆動の回転を直視できる系を開発すること、および ATP 合成酵素を外力で逆回転させてプロトンポンプにすること、である。いずれも、いつ成功してもおかしくない状況にきており、最後の試行錯誤をしている。

もう一つの目玉として、成果(1)の延長上に、 F_1 の 3 つの活性部位のどこにどのヌクレオチドが結合しているかを特定した上で、回転力の角度依存性、その積分として回転のポテンシャルエネルギーが測れる見通しがついた。分子機械の働きの究極の理解として夢見つつ、実現は文字通りの夢と思っていた。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

（研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線）

(1) K. Yogo, T. Ogawa, M. Hayashi, Y. Harada, T. Nishizaka, and K. Kinoshita Jr., Direct observation of strand passage by DNA-topoisomerase and its limited processivity, *PLoS ONE*, 7, e34920 (2012)

(2) K. Shiroguchi, H. E. Chin, D. Hannemann, E. Muneyuki, E. M. De La Cruz, and K. Kinoshita, Jr., Direct observation of the myosin Va recovery stroke that contributes unidirectional stepping along actin, *PLoS Biol.*, 9, e1001031 (2011)

(3) S. Furuie, M. Nakano, K. Adachi, H. Noji, K. Kinoshita, Jr., and K. Yokoyama, Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilis* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe, *Nat. Commun.*, 2, e1001031 (2011)

(4) Y. Oguchi, S. Uchimura, T. Ohki, S. V. Mikhailenko, and S. Ishiwata, The bidirectional depolymerizer MCAK generates force by disassembling both microtubule ends, *Nat. Cell Biol.*, 13, 846-852 (2011)

(5) Y. Oguchi, S.V. Mikhailenko, T. Ohki, A.O. Olivares, E. M. De La Cruz, and S. Ishiwata, Robust processivity of myosin-V under off-axis loads, *Nat. Chem. Biol.*, 6, 300-305 (2010)

原著論文 17, 総説類 4, 海外招待講演 18。

ホームページ等

<http://www.k2.phys.waseda.ac.jp>

<http://www.ishiwata.phys.waseda.ac.jp/>