

Title	走査プローブによる1分子操作技術の開発と分子間相 互作用の測定
Author(s)	喜多村,和郎
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144052
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

# 走査プローブによる1分子操作技術の開発と 分子間相互作用の測定

Direct measurement of intermolecular interactions by manipulating

a single protein molecule with a scanning probe

# 博士学位論文 1998年1月

喜多村和郎

目次

要旨.	•••••••••••••••••••		•••••	•••••••	••••••	4
	≠ 4A					
1. 月	「論	•••••	••••••	••••••	••••••	5
1.1	生体分子間	相互作用と機能多	卷現			5
1.2	アクトミオ	シン分子モーター	ーのメカニズムに	関する研究の歴史	的経緯	6
1.3	1分子蛍光	観察と1分子力	学測定		••••••	
1.4	本研究の目	的及び意義			••••••	9
2. 走	査プローブに	よるタンパク質	の1分子捕捉・携	她作		11
2.1	目的			••••••		11
2.2	エバネッセ	ント場照明		•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	••••••	
2.3	プローブ顕得	数鏡下におけるコ	バネッセント場所	§明法	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	
2.4	材料と方法	••••••		•••••		
2.5	結果	••••••	·····	••••••		21
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	2.5.1 対物レ	ンズ型エバネッヤ	こント照明法の評価			21
2	2.5.2 1分子會	<b>蛍光観察</b>				21
2	2.5.3 走査プ	ローブによる S1	の1分子捕捉・搏	•作		

	2.6	考察	27
3.	ミオ	トシン S1 の 1 分子変位計測	29
	91	目的	
	0.1		
	32	材料と方法	30
	3.3	結果	36
	3	.3.1 ナノメートル変位計測	36
	3	<b>3.2</b> 1分子のS1が発生する変位	39
	3	3.3.3 変位の発生過程	48
			59
	3.4	考察	
	. 0	$A = 1 \Delta Z \cap S = 3$ 成本 中天 亦位	
	э	.4.1 1万千の51が光王9 5変位	
	3	342 変位の発生過程	57
	3	3.4.3 ミオシンの運動メカニズム	60
4	結調		63
-	, чн н	410	
5	謝	辞	64
6	. 文ī	献	65
			· _ ·
	-		69

要旨

生体分子間の相互作用を1分子レベルで計測するために、タンパク質1分子を蛍 光顕微鏡で可視化し、走査プローブで捕捉・操作する技術を開発した。 モーター タンパク質であるミオシンの頭部 (ミオシンサブフラグメント1;以下SI)の1分 子を走査プローブで捕捉・操作し、ガラス表面上に固定されたアクチンフィラメン トとの滑り方向の相互作用による変位・力を計測したところ、ATP 加水分解反応 (ATPase) と共役したナノメートルの変位およびサブピコニュートンの力が検出さ れた。 S1 は1回の ATPase サイクル中に1分子で最大 30 nm の変位を発生し、そ の変位は 5 nm を単位とするステップ状の変位が複数回起こることによって引き起 こされていることを発見した。 すなわち、ミオシンの ATPase 反応と力学反応が 1:1 に対応せず、ミオシン分子は1回の ATPase サイクル中に何回も力学反応を引 き起こすことができることを直接証明する初めてのデータである。 これらの結果 は、従来の構造変化説を根本から否定するものであり、ミオシンの運動メカニズム (例えば構造変化と力発生の関係など)を考える上で非常に重要である。

本研究によって開発された技術によって、タンパク質ータンパク質間だけでなく タンパク質ーDNA、ーリガンド、一脂質など、あらゆる生体高分子間の相互作用 による力・変位を1分子で計測することが可能となり、生体分子機械の人工機械に はない、より柔軟な動作メカニズムを解明する道が拓けたといえる。

# 1. 序論

# 1.1 生体分子間相互作用と機能発現

タンパク質などの生体分子は、そのほとんどが対になる分子との相互作用によっ てその機能を発現しており、その相互作用を知ることは生体分子の機能発現メカニ ズムを明らかにする上で特に重要である。 これまで生体分子の分子間相互作用に ついては、溶液中における蛍光プローブ法などの生化学的な実験やX線結晶構造解 析によって行われてきた。 溶液を用いた実験は、多数の分子からのシグナルの平 均から個々の分子の挙動をモデル化して推測するという方法であり、結晶構造解析 では原子分解能で分子やその複合体の形はわかるが、その実時間での挙動すなわち 機能発現中の変化を追跡することは困難である。

一方、1986年に Binnig らによってはじめて開発された原子間力顕微鏡 (AFM) (Binnig et al., 1986)は、近年の改良に伴って、少数分子で生体分子の相互作用力を 実時間で計測できうる顕微鏡として盛んに利用されている (Florin et al., 1994; Radmacher et al., 1994; Lee et al., 1994; Rief et al., 1997)。しかしながら AFM は、計測 できる力の分解能がナノニュートンのオーダーであり、また柔らかい生体分子は探 針 (走査プローブ)の接触により損傷を受けるため、ピコニュートンレベルのタン パク質間相互作用を計測するには根本的に問題がある。 本研究では、タンパク質1分子に働く分子間相互作用を高分解能で実時間計測し、 その相互作用メカニズムを明らかにすることを目的として、タンパク質1分子を損 傷を与えることなく走査プローブで捕捉・操作する技術の開発をおこなった。 さ らにそれを用いて、分子間相互作用のモデル系としてモータータンパク質ミオシン とアクチンの滑り相互作用による変位や力を1分子計測した。新しく開発した技 術は汎用性の高いものであり、モータータンパク質に限らず他の生体分子における 分子間相互作用を計測でき、エネルギー変換や情報伝達など広く生命現象における 生体分子のメカニズムに迫ることができるであろう。 また、分子レベルの相互作 用を明らかにすることが、さらに上位のシステムである細胞、組織や個体のレベル における相互作用を理解する上で重要な知見となるであろう。

## 1.2 アクトミオシン分子モーターのメカニズムに関する研究の歴史的経緯

筋収縮に代表される生体運動を担うモータータンパク質ミオシンは、ATP (アデノ シン三リン酸)を加水分解して生じる自由エネルギーを、アクチンフィラメントに対 する滑りという力学的エネルギーに変換している。 これまでミオシンの運動メカ ニズムに対するモデルとしては、筋線維を用いた実験や構造学的研究に基づいた考 察から、ATP 分解と 1:1 に対応したミオシン頭部の構造変化によって力発生がおこ るとする「ミオシンの首振り仮説」(Huxley, 1969; Huxley & Simmons, 1971; Fisher et al., 1995) が定説とされてきたが、それを裏づける決定的な証拠は未だない。 一方 で、収縮中の筋肉においてミオシンの大きな構造変化が起こっていないという実験 結果 (Yanagida et al., 1981;Irving et al., 1995) や、*in vitro* 運動再構成系において ATP 分解と 1:1 に対応した首振りでは説明できないほど大きなステップサイズ (1ATP 分 解中にミオシンがアクチンフィラメントに沿って進む距離) が報告されている (Yanagida et al., 1985; Harada et al., 1990)。 これらの相反する結果は、これまでの実 験が多数の分子を含む系で行われ、それらの平均の挙動をみて個々の分子の挙動を 推測するという方法によってなされてきた為であると考えられる。

1984 年、蛍光顕微鏡技術を用いて 1 本のアクチンフィラメントが可視化された (Yanagida et al., 1984)。 さらにガラスニードル (Kishino & Yanagida., 1988; Ishijima et al., 1991, 1994, 1996) や光ピンセット (Saito et al., 1994; Finer et al., 1994; Molloy et al., 1995) を用いたマイクロマニピュレーション技術によって 1 本のアクチンフィ ラメントを操作し、少数のミオシン分子による力発生を高感度に計測することが可 能になった。 これらの技術の進歩によって、アクトミオシンの分子メカニズムに関 する研究は飛躍的に進歩してきたと言える。 しかしながら、これら従来の研究にお いては、分子の数を少なくしていって、たまたま分子 1 個を測っているというもの であり、1 分子であるという証明はない。 また非常に少数の分子を in vitro で表面 に結合させることによる分子へのダメージや、個々の分子の置かれた状況の違いに もとづく計測結果の違いを区別することは非常に困難である。 すなわち、個々の分 子を測定していたとしても、分子の状態をコントロールせずに全ての分子からのシ グナルを平均してしまっているため、得られた結果はそれ以前の多数の分子で行っ てきた実験結果を再現しているだけに過ぎない。 モータータンパク質の分子メカ ニズムに迫るには、1つ1つの分子を観察し、その挙動を直接測ることが必要不可 欠である。

# 1.3 1分子蛍光観察と1分子力学測定

1995 年、蛍光色素 1 分子を水溶液中で実時間観察することが可能になった (Funatsu et al., 1995; Sase et al., 1995)。さらに蛍光 1 分子観察技術を用いることによ って、ミオシン 1 分子の ATP 加水分解反応の可視化 (Funatsu et al., 1995; Tokunaga et al., 1997) や、1 分子分光、1 分子蛍光エネルギー移動法 (Ishii et al., 1997) が可能に なり、タンパク質 1 分子による化学反応や構造変化を実時間で観察できるようにな った。一方、前項に述べたようにガラスニードル (Kishino & Yanagida., 1988; Ishijima et al., 1991, 1994, 1996) や光ピンセット法 (Svoboda et al., 1993; Finer et al., 1994; Molloy et al., 1995) を用いたマニピュレーション法とナノメーター変位計測を組み 合わせ、モータータンパク質 1 分子が発生する変位や力が計測されてきた。 さら に最近、この2 つの革新的な技術を組み合わせることによって、ミオシン 1 分子に よる ATP 分解反応と力発生を同時に計測することに成功している (Ishijima et al., in press)。

しかしながら、これらアクチンフィラメントを介してミオシンの変位を計測する 場合のアクチンフィラメントの弾性や、また光ピンセット法ではビーズの回転など の不確定要素が計測に影響を与えるため (Kojima et al., 1994; Dupis et al.,1997; Mehta et al., 1997)、変位の正確な見積もりが難しい。 ミオシン1分子の発生する変 位や力を正確に知るためには、ミオシン1分子を直接操作し、不確定な要素を最小 限に抑えた系で実験を行う必要がある。

## 1.4 本研究の目的及び意義

本研究では、タンパク質分子間の相互作用を1分子レベルで計測・可視化するた めにタンパク質1分子を蛍光によって確認し、走査プローブで捕捉・操作する技術 の開発を第1の目的とする。そのために、以下の2つの技術を開発した。

・プローブ顕微鏡下での蛍光色素1分子の可視化

・走査プローブによるミオシン頭部 (S1)1 分子の捕捉と操作

さらに、これらの開発した技術を用い、モータータンパク質ミオシン1分子がア クチンフィラメントと相互作用して発生する変位を計測し、ミオシンの化学ー力学 エネルギー変換のメカニズムを考察することを第2の目的とする。 1 分子を蛍光によって確認し操作することによって、分子ごとの条件の違いによ る応答のばらつきを分離することができる。 さらに、ミオシン S1 を直接操作して いるので、不確定な弾性要素などを最小限に抑えることができる。

本研究によって実現された、タンパク質1分子捕捉・操作技術と分子間相互作用 の1分子計測技術は、モータータンパク質のみならず、あらゆる生体高分子(たと えばレセプターとリガンド、DNA と DNA 相互作用タンパク質など)に応用するこ とが可能であり、生体分子における分子間認識、エネルギー変換や情報伝達のメカ ニズムを理解する上で有効な研究手段になりうると考えられる。



図1 走査プローブを用いた生体分子間相互作用計測の模式図

# 2. 走査プローブによるタンパク質の1分子捕捉・操作

## 2.1 目的

タンパク質1分子対の分子間相互作用を計測するためには、走査プローブを用い てタンパク質1分子を見ながら、活性を持ったまま捕捉し、自由に操作することが 必要となる。 そこでまず、対物レンズ型エバネッセント照明法によって、捕捉す る目的のタンパク質 1 分子を活性を持ったまま顕微鏡下で実時間観察することを 可能にした。 光の全反射によって生ずるエバネッセント場によって水溶液中実時 間で蛍光色素1分子を可視化することが可能になったが (Funatsu et al., 1995)、これ を走査プローブ顕微鏡に応用するために新しいエバネッセント場照明法を開発し た。 走査プローブには、先端の曲率半径が約15 nm である酸化亜鉛 (ZnO) の針状 結晶 (以下ウィスカー) (Kitano et al., 1990; Kado et al., 1992)を先端に接着したバネ 定数の小さい柔らかいガラスニードルを用いた。 酸化亜鉛はシランカップリング 剤を用いて表面を化学基で修飾することによって、ビオチンなどの生化学物質を表 面に導入することができる。 柔らかいガラスニードルを使うことによってタンパ ク質に与えるダメージを最小限に抑える。 また、ビオチン化タンパク質 (Biotin dependent transcarboxylase, 以下 BDTC) を用い、活性を持ったままタンパク質を蛍 光標識したり、捕捉するための「のり」となる分子を導入した。

# 2.2 エバネッセント場照明

エバネッセント場とは、2 つの屈折率の異なる媒質の境界面に発生する電磁場で ある。 光が高屈折率媒質 (ガラス) から低屈折率媒質 (水) に進入する時、入射角 がある一定の角度 (臨界角) 以上の大きさになると、2 つの媒質の境界面で全反射 する。 このとき、低屈折率媒質側の境界面のごく近傍にのみ定在する電磁場が発 生するが、この電磁場をエバネッセント場という。 エバネッセント場の特徴とし ては、低屈折率媒質側へ伝播しないこと、電場の強度が境界面からの距離に依存し て指数関数的に減衰することが挙げられる。 エバネッセント場強度 *I* の境界面か らの距離 *z* 依存性は次の式であらわされる (Axelrod, 1989)。

$$I(z) = I(0) \exp\left\{-z \frac{4\pi}{\lambda_0} \sqrt{n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2}\right\},\$$

ここで、z は境界面からの距離、I(0) は z = 0 すなわち境界面での電場強度、 $\lambda_0$ は光の波長、 $\theta$ は光の入射角、 $n_1 \ge n_2$ は媒質の屈折率で $n_1 < n_2$ である。 入射角が 大きいほど、光の波長が短いほどエバネッセント場のしみだし深さは浅くなる。

エバネッセント場はガラスと水の境界面から数百 nm 以下の範囲に局在するの で、1分子蛍光観察する際の背景光となる水のラマン散乱や試料の表面以外の部分 (非観察領域)からの蛍光や散乱光を最小限に抑えることができる。

# 2.3 プローブ顕微鏡下におけるエバネッセント場照明法

プリズムを用いたエバネッセント照明法による 1 分子蛍光観察 (Funatsu et al., 1995) では、試料の上面を観察するために対物レンズの作動距離の制約を受け、試 料の厚みを 10 μm 程度以下にしなければならない (図 2)。 そこで、プローブ顕微 鏡などの開放系や厚みのある試料においてエバネッセント照明を実現するために、 水の屈折率よりも高い開口数を持つ対物レンズを用いた対物レンズ型エバネッセ ント照明法を開発した。

作成した装置の概要を図3に示す。 プリズムを用いることなく対物レンズのみ で全反射を起こすことにより、水とカバーガラスの境界面にエバネッセント場を発 生させる。 光学系の簡単化のため無限遠補正系の対物レンズ (Plan Apo 100×, N.A. 1.4; オリンパス)を用いた。まず照明光となるレーザーをレンズの後焦点面 に集光させる。 レーザーの光軸と対物レンズの光軸中心が一致している時は落射 照明になる (ケーラー照明)。レーザーの光軸を平行移動させ、対物レンズの光軸 中心から外していくとレーザーの入射角は大きくなり、ある一定の距離を超えると レーザーの入射角は臨界角をこえ、全反射する。 対物レンズ型エバネッセント照 明法はプリズム型にくらべて、光学系が比較的簡単で落射照明との切換えも可能 で、試料の厚みに制限がないなどの利点を有する。



図2 エバネッセント照明法の比較



#### 図3 装置の模式図

(a) 全体図。ダイオード励起 Nd:YAG レーザー (YAG 532) からの直線偏光の光は 1/4 波長板 (λ/4) で円偏光にし、蛍光色素の吸収ダイポールの向きによる影響をなく す。レーザーが対物レンズの後焦点面に焦点を結び、試料面での照射範囲が約 100 µmになるように凸レンズ (L) で集光する。レーザーは1次元のステージに設置したミラ ー (M) で反射した後、顕微鏡に設置した特注のダイクロイックミラー (DM) で反射し対 物レンズ (OL1) に入射する。ミラーの位置を移動させることによりエバネッセント照明と 落射照明を切り替える。試料の蛍光像は、対物レンズ (OL1) と撮影レンズ (PL) によ って結像され、バンドパスフィルタ (BF) によって蛍光以外の背景光を除去した後、イン テイシファイアを取り付けた SIT カメラ (ISIT) によって検出される。ナノメートル変位検 出については後述。 (b) 対物レンズ型エバネッセント照明法の模式図。

# 2.4 材料と方法

## ミオシンサブフラグメント-1 の調製

ミオシンサブフラグメント-1 (以下 S1) は、ニワトリ胸筋から単離したミオシン (Szent-Gyrögy, 1951) をタンパク質分解酵素パパイン(Worthington)で、Mg<sup>2+</sup>存在下、 20℃で 10 分間処理することによって得た。パパイン消化によって得られた S1 は、 ヘビーメロミオシン (HMM) が混在しているため、高速液体カラムクロマトグラ フィー (HPLC) ゲルろ過カラム (Superose 6; Pharmacia) によってさらに精製した ものを用いた。

# トリ砂のうミオシン調節軽鎖-BDTC 融合タンパク質の調製

トリ砂のうミオシン調節軽鎖 (以下 cgmRLC) と BDTC の融合タンパク質 (以下 BDTC-cgmRLC) は、クローニングした cgmRLC の cDNA を BDTC を含む発現ベク ター (PinPoint-Xa1; Promega) に挿入し、大腸菌で発現したものを精製した (Iwane et al., 1997; Trybus & Chatman, 1993)。

## S1 の蛍光ラベルとビオチン化

システインとビオチンを1つづつ持つBDTC-cgmRLCを、蛍光色素 Cy3 でラベ ルした後、S1の調節軽鎖と交換することによって、1分子のS1に1分子のCy3と 1分子のビオチンを導入した。アミノ基反応性の Cy3-NHS (Biological Detection Systems) をアダプター試薬 PEM (同仁化学) と 40℃で一晩反応させ、チオール基 反応性に変換したものを、BDTC-cgmRLCとモル比1:6で反応溶液 (0.6 M NaCl, 2 M 塩酸グアニジン, 10 mM PIPES pH7.0) 中、25℃で2 時間反応させた。未反応の Cy3 はゲルろ過カラム (NAP-5; Pharmacia) によって除いた。 Cy3 でラベルした BDTC-cgmRLC と S1 をモル比 10:1 で反応溶液 (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 10 mM PIPES pH7.0) 中、40℃で 20 分間反応させた (Iwane et al., 1997)。 未反 応の BDTC-cgmRLC は HPLC ゲルろ過カラム (Superose 6; Pharmacia) によって取り 除いた。得られた S1 (以下 Cy3-BDTC-S1) のラベル率は、モル吸光係数 (Cy3; 150,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> @ 552 nm、BDTC-S1; 0.83(mg/ml)<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> @ 280 nm, 分子量 145 kDa) より計算すると、ほぼ 100 %であった。

# ZnO ウィスカーのアミノシラン化、ビオチン化

ZnO ウィスカーのアミノシラン化は以前の方法 (Tokunaga et al., 1997; Aoki et al., 1997) に若干の修正を加えて行った。 ZnO ウィスカーをエタノールで数回洗い、 アミノシラン液 (5%(v/v) 3-aminopropyltriethoxysilane (LS-3150; 信越化学), 2.9% H<sub>2</sub>O, 0.01% HCl in ethanol) に浸して一晩室温で反応させる。 エタノールでよく洗 うことで未反応のアミノシランを除き、エタノール中、4℃で保存する。 アミノシ ラン化したウィスカーは、アミノ基反応性のビオチン化試薬 biotin-(AC<sub>5</sub>)<sub>2</sub>-Osu (同 仁化学)の1mMエタノール溶液に浸し、室温で一晩反応させることでビオチン化 した後、エタノールで数回洗い、エタノール中、4℃で保存する。

#### 走査プローブの作成

走査プローブとして用いたガラスニードルは以前の方法に従って作成した (Ishijima et al., 1996)。ビオチン化した ZnO ウィスカーはエポキシ系接着樹脂 (Araldite Rapid; Ciba-Geigy) によってガラスニードルの先端に接着する。

#### 1 分子蛍光観察

観察に用いたカバーガラス (24 mm × 32 mm; Matsunami) は 0.1 M KOH とエタノ ール、蒸留水で超音波洗浄したあと蒸留水中で保存しておく。 10-100 pM の Cy3-BDTC-S1 を洗浄済カバーガラスにのせ、端曲がりカバーガラス (18 mm × 18 mm)をかぶせる。 色素の褪色を防ぐための脱酸素系 (4.5 mg/ml グルコース, 0.036 mg/ml カタラーゼ, 0.216 mg/ml グルコースオキシターゼ)と 0.5% (v/v) 2-メル カプトエタノールを含む、アッセイバッファー (25 mM KCl, 5 mM MgCl2, 20 mM HEPES pH7.8)を灌流し、顕微鏡下で観察する。 蛍光像はビデオテープに記録し、 画像解析装置 (EXCEL II; 日本アビオニクス) によって解析した。

#### 1分子捕捉·操作

図 6 に実験の模式図を示す。 洗浄したカバーガラスに 10 pM 程度の Cy3-BDTC-S1 を 5 µl のせる。 1 分子蛍光観察時と同じように、脱酸素系、2-メルカプ トエタノールを含むアッセイバッファーで灌流した後、顕微鏡にセットする。 顕 微鏡に走査プローブを取り付け、ガラス上のサンプル (Cy3-BDTC-S1) 以外の場所 でプローブにストレプトアビジンを結合させる (1 mg/ml ストレプトアビジン溶液 中で 10 分間)。 フリーのストレプトアビジンを洗い流した後、サンプル領域に移 動し蛍光を観察する。1 分子の蛍光スポットに走査プローブの先端を近づけてい き、スポットの周り 1 µm 四方を操作する。S1 は BDTC に含まれるビオチンとプ ローブ先端のストレプトアビジンの結合によってプローブの先端に捕捉される。 走査プローブはステージに取り付けたピエゾ素子によってサブナノメートルの分 解能で操作することが可能である。

## 2.5 結果

# 2.5.1 対物レンズ型エバネッセント照明法の評価

対物レンズを用いて入射光 (Nd:YAG laser, λ = 532nm) を全反射させた時に発生 するエバネッセント場をプローブ先端に捕捉した蛍光ビーズの蛍光強度から求め た(図 4)。ストレプトアビジン化された蛍光ビーズ (直径 200 nm, Molecular Probes) を、ビオチン化したプローブの先端に捕捉し、ガラス表面に近づけたときの蛍光強 度をビデオ解析により計測した。その結果、蛍光強度はガラス表面からの距離に対 して 1 次の指数関数でよく近似され、エバネッセント場のしみだし深さ (蛍光強度 が 1/e になる距離) は、170 nm と求められた。しみだし深さより求められる光の入 射角は 64°となり、N.A. 1.4 の対物レンズを用いた場合の全反射する入射角の範囲 61.0°(臨界角) < θ < 67.4° (N.A. 1.4)を満たしていた。すなわち、対物レンズを用いた 全反射照明によりエバネッセント場が発生していることが確かめられた。

#### 2.5.2 1分子蛍光観察

Cy3-BDTC-S11分子のカバーガラス表面上での蛍光像を図 5a に示す(16 フレー ム積算後の画像)。 図中の輝点のそれぞれが Cy3 1分子に対応している。 観察し た蛍光スポットが蛍光色素1分子によるものであることは、蛍光強度の時間変化を 解析し、色素の褪色が量子的に(一段で)起こることにより確認した(図 5b)。 ま た蛍光強度の分布はシングルピークとなり (図 5c)、観察された蛍光スポットが蛍 光色素1分子に対応していることが確認された。

# 2.5.3 走査プローブによる S1 の 1 分子捕捉・操作

ストレプトアビジンでコートされたプローブ先端を蛍光を発している分子に近づけ、分子の周りを走査することにより1分子のS1を捕捉する。 S1はアビジン -ビオチン結合によって、プローブ先端に捕捉される。

図7aは走査プローブの先端に1分子のCy3-BDTC-S1が捕捉されたことを示す蛍 光像である。 捕捉されていない分子は試料ステージとともに動くが、プローブ先 端に捕捉された分子 (右矢じりで示す)は、試料ステージとは独立に動く。このこ とから、プローブ上に1分子が捕捉されたことが証明された。 捕捉された1分子 のタンパク質はプローブに取り付けられたピエゾアクチュエータによって 3 次元 的にサブナノメートルの分解能で操作することが可能である。

プローブ先端に捕捉された分子が1分子であることは捕捉された分子の蛍光色素の褪色及び蛍光強度の分布によって確認した(図7b)。褪色が量子的に起こること、蛍光強度の分布がシングルピークになることから、捕捉された分子が1分子であることが証明された。





図4 エバネッセント場の定量 (a)実験の模式図。直径200 nmの蛍光ビーズをプローブで操作し、その蛍光 強度を解析する。(b)ビーズとガラス表面の距離(横軸)に依存した蛍光強度の 変化(縦軸)。蛍光強度変化は1次の指数関数で近似された(赤線)。 a

30





図5 Cy3標識したS1の1分子イメージング

(a)Cy3-BDTC-S1の蛍光像。16フレーム加算平均した像。スケールバーは2 μm。 (b)(a)中矢印で示した蛍光スポットの蛍光強度の時間変化。20秒付近で1段で褪 色している(下矢印)。(c)蛍光強度分布。分布はガウシアンで近似され、蛍光強 度の平均1620、標準偏差450であった。



図6 1分子捕捉実験の模式図

蛍光で確認した1分子のS1のまわりを走査し、分子を捕捉。ステージを動かす ことにより、操作する。





図7 S1の1分子操作

(a) 1分子操作している時の蛍光像。カバーガラスをピエゾで動かした時の プローブ先端に捕らえられたS1(右矢印)とガラスに吸着しているS1の像。 赤と黄のスポットは、それぞれ、ステージを動かす前と後の像である。 プローブに捕捉された分子はステージと独立に動く事で捕捉されたと確認 できる。スケールバーは5 µm。(b) 捕捉された1分子のCy3-BDTC-S1の蛍 光強度のヒストグラム。近似曲線により求めた平均1123、標準偏差365。

# 2.6 考察

対物レンズ型エバネッセント場照明法によって、しみだし深さが 約 170 nm の エバネッセント場を発生させることに成功した。さらにこれを用いることにより、 走査プローブ顕微鏡下で、蛍光標識した 1 分子のミオシン S1 を実時間可視化する ことに成功した。 このように対物レンズ型エバネッセント照明法は、比較的簡単 な光学装置で蛍光色素 1 分子を観察することが可能で、試料の厚みに制限がなく、 走査プローブ顕微鏡など他の装置との組み合わせも容易であり、非常に汎用性の高 い蛍光顕微鏡法であるといえる。

1分子蛍光観察法によってモータータンパク質ミオシン S1 の 1 分子を観察しな がら、走査プローブの先端に捕捉し、サブナノメートルの精度で 3 次元的に自由に 操作することに成功した。 目的とするタンパク質 1 分子を直接見ながら操作する ことは世界でも例はなく、本研究が初めてである。 走査プローブによるタンパク 質 1 分子操作技術を光フィードバックを用いた分子間力顕微鏡 (Tokunaga et al., 1997; Aoki et al., 1997) に応用することで 1 分子レベルの分子間相互作用の場を検 出、 画像化することが可能になった。 本研究では、モータータンパク質ミオシン S1 の 1 分子を操作し、対になるタンパク質アクチンとの滑りの相互作用を計測し たが (次章)、さらにこの手法を他のさまざまな生体分子にも応用することで、そ の動作原理の解明に直接つながるものと期待される。 1分子イメージング・マニピュレーション技術の特長としては、1分子を操作す ることによって平均しない個々の分子の挙動を高分解能で追跡できることが挙げ られるが、さらに蛍光性のリガンド等を用いることによって、複数の反応(たとえ ば化学反応と力学反応)を同時に測定できるという利点も有する。すなわち、ある 一定の入力(ATP分解のエネルギーやリガンド結合など)に対して、1分子のタン パク質がどのように応答するのかを同時に計測できるわけである。システム理論 においては、わかっている入力(インパルスやステップ)を与えた時の出力から、 システムを特徴づける伝達関数を求めることができる。生体分子システムにおい てもそのシステムの中身を知るためには、入出力関係をはっきりさせる必要があ り、1分子イメージング・マニピュレーションによる入出力反応の同時測定技術は、 生体分子システムの動作原理を知るための大きな技術的ブレイクスルーとなるこ とは間違いない。

# 3. ミオシン S1 の 1 分子変位計測

3.1 目的

前章までで述べた、1分子捕捉・操作技術で最大のポイントとなるのは、タンパ ク質分子を活性を保った状態でマニピュレーションするということである。 走査 プローブによって捕捉された S1 が活性を保っているかを確かめるために、ガラス 表面上に固定されたアクチンフィラメントと ATP 存在下で相互作用させ、S1 が発 生する変位をナノメートル計測した。 ミオシンとアクチンの相互作用は、カ・変 位という物理量を引き起こすため、計測することのできる力や変位がそのまま機能 に結びついているという点で、分子間相互作用と機能の関係を知る上では理解しや すい分子システムであるといえる。 一方、序章でも述べたように、ミオシンが発 生する変位についてはこれまでさまざまな値が報告されており、いまだ決着がつい ていない。 当然そこから導き出される運動メカニズムについても不確定な部分が 多い。

本研究では、計測における不確定な要素を最小限にし、1分子のミオシンが発生 する変位を正確に求め、また変位の発生過程を詳細に解析することによってその運 動メカニズムを考察することを目的として実験を行った。

# 3.2 材料と方法

S1の精製及び蛍光標識

前述の通り

#### アクチン及び α-アクチニンの調製

アクチンはウサギ骨格筋のアセトンパウダーより抽出し、Spudich と Watt の方法 (1971) により精製した。  $\alpha$ -アクチニンはウサギ骨格筋より抽出した。 ウサギ骨 格筋の筋原線維を 50%(v/v) glycerol 中で -20°C、1 ~ 2 週間放置した後、 Hasselbach-Schneider 液 (0.6M KCl, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1M KPB pH 6.4) で5回洗う。一晩放置した後、沈殿に 1mM NaHCO<sub>3</sub>を加えホモジナイズし、遠心 の沈殿をとる。この操作を4回繰り返し、3回目と4回目の上清をとって硫安を加 え、12-17 g/dl の画分を回収することにより骨格筋  $\alpha$ -アクチニンを得た。

# アクチンバンドルの作成

モノマーアクチン (G-アクチン) を 1/10 当量の α-アクチニン存在下で重合させ ることによりアクチンバンドルを作成した。 0.1 mg/ml の G-アクチンに 1/10 当量 の α-アクチニンを加え、アッセイバッファーに一晩透析する。 蛍光顕微鏡で可視 化するために、BODIPY FL-phallacidin でラベルしたものを実験に使用する。

#### 実験手順

洗浄したカバーガラスに 0.1 mg/mlの α-アクチニン溶液をのせ、端曲がりガラス でふたをして1分待つ。フリーのα-アクチニンを洗い流し、アクチンバンドルを 含む溶液を流す。これによってアクチンバンドルがガラス表面上に固定される。1 mg/ml の BSA でガラス表面をブロックした後、1 nM 程度の Cy3 ラベルした BDTC-S1 をアクチンバンドルに rigor 結合させる。 0.5%の 2-メルカプトエタノー ル、脱酸素系を含むアッセイバッファーで洗った後、顕微鏡にセットし、アクチン と S1 を蛍光により確認する。 次に、プローブを顕微鏡に取り付け、カバーガラ スの別の場所で1 mg/mlのストレプトアビジンをのせ10分間反応させる。結合し ていないストレプトアビジンを洗った後、プローブをサンプル領域に移動させ、 S1 をビオチンーアビジン結合によりプローブ先端に捕捉する。 ATP を 1 µM (また は ADP を 1 mM) になるように加え、プローブを操作して S1 とアクチンを相互作 用させる。 捕捉された分子の数は蛍光強度によって求め、2 分子以上である場合 のデータは削除した。 全ての実験は温度 27±1℃、低負荷 (プローブのバネ定数: 0.01~0.05 pN/nm)の条件下で行った。

## 変位のナノメートル計測

プローブのナノメートル変位計測システムを図8に示す。1分子蛍光観察が可 能な倒立型蛍光顕微鏡 (IMT-2, オリンパス光学) に明視野顕微鏡を組み込み、対物 レンズ (NCF Plan ×60 DIC, ニコン) と撮影レンズ (NFK 3.3× LD, オリンパス) に よってプローブの明視野像を得る(拡大率300倍)。光源としてはレーザーを用い、 ケーラー照明法によって照明した。プローブの像を2分割光センサ (OP701A, セ ンテック)上に投影し、2つのフォトダイオードに入る光量の差でプローブの変位 を検出する。 この方法によれば、光の波長で規定される光学顕微鏡の分解能 (約 0.2 μm) よりもはるかに高い空間分解能 (< 1 nm) で変位を計測することができる (Ishijima et al., 1996)。 2 分割光センサの出力は、24 kHz のサンプリング周波数で DAT (RD-120TE, TEAC) に記録し、パーソナルコンピュータ (FMV-5166DPT, 富士 通) に取り込み、解析ソフト (DADisp, アストロデザイン; LabVIEW, National Insturuments; ORIGIN, Microcal Software) で解析した。 センサの出力は電圧 (Volt) であるので、得られたデータを変位 (nm) に変換する必要がある。 電圧→変位の 変換は以下の手順に従って行う。 まず、センサ上に間隔 10 µm のマイクロメータ の像を投影し、倍率 (M倍)を正確に求める。 次に、プローブの像をセンサ上に投 影し、センサを 10 μm の振幅で動かし、その時のセンサの出力 (Vnm とする) を 求める。プローブに取り付けたピエゾアクチュエータにある振幅の電圧 (Vin とす

る)を与えてプローブを変位させた時の出力 (Vout とする)を求める。以上から、 ピエゾの電圧-変位変換係数 (Vout × 1000/M/Vnm)/Vin (nm/V) が求まる。 これを 用い、実験毎にピエゾに Vi の入力を与えてプローブを振動させた時のセンサの出 力 Vo を計測することによって電圧を変位に変換する。

## プローブのバネ定数の決定方法

プローブのバネ定数は、クロスキャリブレーション法 (Ishijima et al., 1996) 及び 熱ゆらぎのスペクトル解析法より求めた。 クロスキャリブレーション法では、基 準となるガラス針とのたわみの比によって実験に使用するプローブのバネ定数を 求める。 基準となるガラス針のバネ定数は、あらかじめ重さを量っておいた微小 なおもりをガラス微小針にのせ、重力によるたわみの量を顕微鏡下で測定し、求め た。

熱ゆらぎの自乗平均変位〈Δx<sup>2</sup>〉とバネ定数はエネルギー等分配の原理、

$$\frac{1}{2}K_{B}T=\frac{1}{2}k\langle\Delta x^{2}\rangle,$$

によってあらわされる。 ここで、 $K_B$ : ボルツマン定数、T: 絶対温度、k: プロー ブのバネ定数である。 熱ゆらぎの自乗平均変位 〈 $\Delta x^2$ 〉 はブラウン運動のパワース ペクトル密度を全周波数にわたって積分することで求め、上の関係式を使ってプロ

ーブのバネ定数を求めた。



図8 ナノメートル変位測定装置の模式図 走査プローブ (P) の明視野像を2分割光センサ (PD) 上に投影し、センサの差動出力 を増幅回路 (Amp.) で増幅した後、DATレコーダに記録、コンピュータで解析した。 照射系及び蛍光観察法は図3に同じ。

# 3.3 結果

# 3.3.1 ナノメートル変位計測

2 分割センサを用いたナノメートル変位検出によって計測された、走査プロー ブのナノメートルレベルの変位を図9に示す。 プローブに取り付けたピエゾアク チュエータを微小な振幅の正弦波で振動させた。 図を見ても明らかなように1 nm の変位もはっきりと検出することが可能である。 図 10 は、プローブに与える振幅 とセンサの出力の関係をあらわしている。 1 nm 以下の変位から 100 nm の変位ま で非常に良い直線関係が得られ、この方法によるナノメートル計測の信頼性が高い ことを示している。



図9 走査プローブを水中で正弦波で振動させた時の振幅応答 プローブに取り付けたピエゾアクチュエータに 20 Hz の正弦波を与えた時 の2分割光センサの出力。各データは 16 回の加算平均後の波形。



図 10 プローブに与える正弦波の振幅とセンサの出力の関係 プローブ (弾性率 0.47pN/nm) に 20 Hz の正弦波を与えた。 < 1 nm から 100 nm までの変位に対して良い直線関係が得られた。

# 3.3.2 1分子の S1 が発生する変位

1分子のS1がアクチンと相互作用して発生する変位の実波形、およびプローブ のゆらぎの分散からエネルギー等分配則により求めたスティフネスの変化を図 11 に示す。S1とアクチンが相互作用(結合)することによってスティフネスが上昇 するので、このスティフネスの上昇をS1とアクチンの相互作用の指標とした。ATP の濃度が1 µM であるため、相互作用の継続時間が充分長く(図 12)、これによっ て熱ノイズと相互作用のシグナルをはっきりと区別することができる(図 11;矢 印)。

相互作用の継続時間のヒストグラムは、1 次の指数関数で良く近似され、近似曲線から求めた時定数は 0.3 秒であった (図 12)。 低濃度 ATP の条件では、rigor 状態にある S1-アクチン複合体に ATP が結合する反応が律速となるため、相互作用の継続時間は S1-アクチンの rigor 複合体に ATP が結合する時間を表していると考えられる。 従って、反応式

# $A \cdot M + ATP \xrightarrow{k_{+}} A \cdot M \cdot ATP \xrightarrow{fast} A + M \cdot ATP$

において、S1-アクチン rigor 複合体に ATP が結合する 2 次の反応定数 (k<sub>+</sub>) は、継 続時間 (τ) と ATP の濃度 ([ATP]) によって、

$$k_{+} = \frac{1}{\tau \times [\text{ATP}]} = \frac{1}{0.3 \times 10^{-6}} = 3 \times 10^{6} M^{-1} s^{-1},$$

と求められる。 この値は、S1 とアクチンの溶液を用いた生化学的な実験結果 (Woledge et al., 1985) と良く一致する。 すなわち、観察された変位が1分子のS1 によるものであるということを強く示しており、同時に、この変位が1ATPase サ イクルによるものであることをあらわしている。

1分子の S1 が発生する変位の大きさは、実験毎つまり分子毎に異なっており、 大きく変位するもの (図 11a)、小さい変位のもの (図 11b) が観察された。 変位の ヒストグラムを各分子毎にプロットしたものを、図 13 に示す。 変位はある広がり を持って分布し負の変位も観察されたが、この広がりの大部分はプローブの熱ゆら ぎによる擾乱効果によるものであると考えられる (Molloy et al., 1995)。 柔らかい プローブは、平行位置すなわち変位0を中心に大きく熱ゆらぎする。 もし、プロ ーブが熱ゆらぎによって平行位置から負の方向へ 30 nm 動かされた時、S1 がアク チンに結合して、その後相互作用により 20 nm 変位したとすると、観察される変 位は 20-30 = -10 nm となる。 逆に、 熱ゆらぎで正の方向に 30 nm 変位していたとす れば観測される変位は 20+30 = 50 nm となる。 すなわち、観察された変位の分布 は、S1 とアクチンが相互作用していない時のプローブのゆらぎの分散をもつガウ ス分布となることが予想され、1 分子の S1 が発生する変位は分布の中心で与えら れる (Molloy et al., 1995)。 図 13 を見ても明らかなように、S1 はさまざまな大き さの変位をしめすことがわかった。 さらに、変位0に対して正と負の2つの中心 を持つガウス分布を示すものも観察された。 正と負のピークは、変位0に対して ほぼ対称な位置にあり、両方の分布は共に S1 がアクチンと相互作用していない時 のプローブのゆらぎの分散をもっていた。 ミオシンの変位する方向はアクチンの 極性で決まっているため、正と負のピークはそれぞれアクチンバンドル内の極性の 反対のアクチンフィラメントと相互作用した結果であると考えられる。 したがっ て、それぞれの分布の中心が S1 の変位をあらわしていると考えられる。このよう にして得られた 1 分子の S1 が発生する変位の大きさをヒストグラムにした (図 14)。 1 分子の S1 による変位の大きさは 5 から 30 nm の間に分布し、約 50%の分 子 (11/21) が 15nm 以上の変位を発生することがわかった。 この結果は、従来の 構造変化から予測される値(約5 nm)よりも数倍大きい値であり、S1のヌクレオ チド結合による構造変化が力発生にどのように関与しているかを考える上で非常 に興味深い結果であるといえる。 これまでにも、ミオシン1分子による大きな変 位は報告されているが (Ishijima et al., 1994, 1996; Tanaka et al., 1997)、それらの変位 は全てタンパク質のバネ成分による補正を行った結果であり、本研究で開発した手 法によって初めて、補正を行うことなく大きな変位が発生することを直接示したこ とは非常に重要で大きな成果である。

観察された S1 の変位が、アクティブなものつまり ATP 加水分解のエネルギーを 使ったアクチンフィラメントとの滑り相互作用であることを確かめるために、ATP を S1 によって加水分解されない ADP におきかえた実験を行った結果、1 mM ADP 存在下で S1 の変位は 0 つまりプローブの熱ゆらぎだけを反映するものであった (図 15)。 これは、ATP 存在下で観察された変位は S1 とアクチンの滑り相互作用で あり、単なる結合解離ではないことを示している。



# 図11 変位の実波形

プローブのバネ定数: (a) 0.01 pN/nm, (b) 0.02 pN/nm。 各々上のトレースは変位の実波形を示す。 サンプリング周波数24 kHzで記録したデータを灰色:2 kHzのローパスフィルタ、黒:20 Hzのロー パスフィルタを通した波形。 右軸はプローブの変位とバネ定数から求めた力の大きさ。 下のトレースは、プローブのゆらぎの分散を20 ms毎に計算しエネルギー等分配則から求めたステ ィフネスの変化。スティフネスの増加によってS1とアクチンの相互作用を判定した(図中矢印)。



図12 変位の継続時間 (duration)のヒストグラム 変位の半値幅をdurationとして、ヒストグラムにプロットした。ヒストグラムは 1次の指数関数で近似され、時定数は0.3秒であった。



図13 変位のヒストグラム

分子毎に平衡位置からのプローブの変位の大きさをヒストグラムにプロットした。点線はプローブのゆらぎ幅を持つガウス分布で最小二乗近似したものである。ヒストグ ラムは1つのガウス分布で近似されるもの(a)、2つのガウス分布で近似されるもの(b) が見られた。S1の変位は、分布の中心であらわされる(矢印;本文参照)。



図14 S1の変位のヒストグラム 図13 のヒストグラムの中心から求めた S1 の変位をヒストグラムにプロットした (n = 21)。





図15 1 mM ADP存在下での変位 (a) 実波形。 (b)変位のヒストグラム。3回の実験データを1つのヒストグラムに プロット。分布の中心で与えられるS1の変位は0 (矢印)。

# 3.3.3 変位の発生過程

これまでは、1 分子の S1 がアクチンと相互作用して発生する変位の大きさだけ を見てきたが、各々の変位は 1ATPase サイクルに対応しており (Ishijima et al., in press)、実際に S1 がアクチンと相互作用してアクティブな状態にあるのは、変位パ ルスの立ち上がり部分であると考えられる。 そこで、それぞれの変位の立ち上が りの部分を拡大して詳細な解析を行った。

まずはじめに、それぞれの変位の立ち上がりの始めの 10 ミリ秒を平均した (35 trace; 図 16)。 図中にも示したように、変位の立ち上がりは2相性を示し、はじめ に 10 µm/s 以上の速い速度で立ち上がり、ついで 3 µm/s の速度で立ち上がる。 は じめの速い立ち上がりは、プローブのブラウン運動を含んでいるためであり、1 ミ リ秒以降の立ち上がりが S1 の変位をあらわしているものと考えられる。

図 17a に示す変位の立ち上がり部分を時間軸に対して拡大したものが図 17b であ り、階段状に増加していることがわかる。 この階段状のステップが如何なる大き さで起こっているのかを以下に示す手順で解析した。 サンプリング周波数 24kHz で記録されたデータを 2kHz のローパスフィルタに通した後、各変位の立ち上がり の部分だけを抽出する。 さらに前後 2 ポイントのウインドウ幅をもつメディアン フィルタを通し、得られた波形について 1.25 ミリ秒毎に平均の変位を求め、次の 平均変位との差を計算する (隣接平均変位)。 隣接平均変位をヒストグラムにプロ

ットし、多重ピークガウス分布で近似した。 この解析の結果 0.5, 5.6, 9.8, 14 nm に 中心を持つことがわかった (図 18)。 すなわち、前節で述べた 15 nm をこえる大き な変位も、速い時間領域では 5 nm を単位とするステップ状に変位していることを 意味している。 これまで、さまざまな系でミオシンの発生する変位が計測されて きたが、このように変位の微細構造まで観察された例は初めてであり、本研究にお ける、大きな成果の1つである。



図16 変位の立ち上がり速度 変位の立ち上がり0-10 msecの平均(35トレース)。



# 図17 ステップ状の変位発生過程

サンプリング24kHzで記録したデータを2kHzのローパスフィルタを通した後の波形。 上の波形の赤で囲った部分を時間軸に対して拡大すると、矢印で示すようなステッ プ状の変位が観察された。



図18 ステップのヒストグラム

1 μM ATPでの変位の立ち上がりのステップをヒストグラムにプロットした(計算方法は本文)。ヒストグラムは、約5 nm毎にピーク(矢印)を持つ多重ピークのガウス 分布で最小二乗近似された(赤線)。(a) 全データ。(b) 0付近のガウス分布を引いた 分布。

## 3.4 考察

# 3.4.1 1分子の S1 が発生する変位

走査プローブと2分割光センサを用いたナノメートル変位計測によって、1分子のS1を操作し、アクチンと相互作用させその変位を計測することに成功した(図11)。1分子のS1が発生する変位の大きさは分子毎に5から30 nmの間でさまざまな値が観察された(図14)。この分布は、各実験毎にS1やアクチンの状態が異なることに起因するものと考えられる。

最近、光ピンセット法を用いた実験から、アクチンフィラメントとミオシンの相 対的な相互作用角度によって変位の大きさが異なり、0° すなわち生体中と同じ相 互作用角度で最大変位を発生し、90° に近づくにつれて変位の大きさが減少するこ とが分かっている (Tanaka et al., 1997)。本研究において計測された S1 の変位の分 布に置き換えて考えると、大きな変位を発生する S1 は、アクチンフィラメントと の方向が 0° に近い状態にあり、小さな変位を示すものは 90° 近くになっているも のと解釈できる。 しかしながら、変位の大きさのばらつきはアクチンフィラメン トとの方向性だけではなく、S1 が捕捉された時のプローブやガラス表面との物理 的接触による損傷なども大きな原因の1つであると考えられる。

また、図 13b に示されたような変位 0 に対して正と負の両方の変位を発生する分 子が存在するのは、アクチンバンドルを実験に用いているためである。 ミオシン の運動方向はアクチンフィラメントの方向性によって決まっている。 実験に用い たアクチンバンドル内には反対の方向を向いたアクチンフィラメントが含まれて いるため、変位のヒストグラムにおける負のピークは反対方向のアクチンフィラメ ントと相互作用した結果である。 前述の光ピンセットを用いた実験において、ア クチンフィラメントとミオシンの相互作用角度を 180° すなわち反対方向にして も 0° のときと同程度の変位が観察される。 図 13b において正と負のピークが変 位 0 に対してほぼ対称な位置にあることは光ピンセットの実験結果とも良く一致 し、負のピークは反対方向のアクチンフィラメントと相互作用したものであると結 論づけられる。

本研究において観察された、1分子のS1による変位は最大30 nmにもおよんだ。 ミオシン 1 分子の発生する変位はこれまでさまざまなグループによって光ピンセ ットなどをもちいて計測されてきたが、それらの値はいづれも5~10 nmという小 さな値であった (Spudich et al., 1994; Molloy et al., 1995; Guilford et al., 1997)。 本研 究で得られた値 (最大 30 nm)との矛盾については以下のように考えられる。 ま ず、以前の実験では、1分子であるという証明がない。 低濃度 ATP の条件では、2 分子以上が相互作用していると、必ず rigor でかたく結合する分子があり、その力 が負荷となって、変位を減少させる原因となる。 さらに、ガラス表面に非特異的 にまばらに結合させたミオシンと 1 本のアクチンフィラメントとの相互作用を計

測しているので、たとえ1分子の変位を計測していたとしても、状態の異なる全て の分子からのシグナルを平均してしまっている。 一方、本研究で用いた走査プロ ーブによる1分子操作によれば、蛍光によってたしかに1分子であることを確認 し、状態の異なる分子毎に計測することが可能で、分子にとってより好ましい状態 で相互作用した時のシグナルを分離できるわけである。 また、本研究では1分子 を操作してアクチンバンドルと相互作用させアクチンの実効濃度をあげているた め、S1とアクチンがより相互作用しやすい状況を作り出している。 すなわち、ア クチンフィラメントのらせん構造から、1本のフィラメントでは30 nm 連続して相 互作用するのは難しいが、バンドルでは複数のアクチンと相互作用して 30 nm も の大きな変位をすることが可能であると考えられる。

さらに、光ピンセットを用い1本のアクチンを操作して計測する系では、アクチ ンフィラメントの弾性やビーズの回転などの不確定な弾性要素が存在するため (Dupis et al.,1997; Mehta et al., 1997)、測定系のコンプライアンスが高く(~0.05 pN/nm)、変位の見積もりに影響を与え、得られた変位に補正を必要とする (Tanaka et al., 1997)。それに対し、走査プローブを用いて S1 を直接操作する場合、S1 はビ オチンーアビジン結合によってプローブに硬く結合しているので不確定な弾性要 素は入りにくい。 しかしながら、走査プローブとして円筒型のガラスニードルを 用いているため、ガラスニードルのねじれによるコンプライアンスが存在する。ガ ラスニードルのねじり弾性率 ( $K_r$ ) と曲げ弾性率 ( $K_B$ ) の比は式、

$$\frac{K_T}{K_B} = 0.27 \left(\frac{l}{r}\right)^2,$$

で与えられる。ここで *l* はガラスニードルの長さ、*r* は ZnO ウィスカの長さであ る。 本研究において用いたプローブでは、 *l* ~ 100  $\mu$ m、*r* ~ 10  $\mu$ m であるので、  $K_T/K_B \sim 27$  となる。 プローブの曲げ弾性率 0.02 pN/nm の時、ねじり弾性率は 0.02 × 27 = 0.54 pN/nm となるので、プローブのねじれによるコンプライアンスは低負荷 の実験条件では無視することができる。

1 分子の S1 が 1ATPase サイクル中に変位する 30 nm という値は、S1 自身の大き さ (約 20 nm) や S1 の構造変化から予測される変位 (5~10 nm) の数倍であり、従 来からミオシンの運動メカニズムとして定説とされてきた「首振りモデル」に疑問 を投げかけるものである。

## 3.4.2 変位の発生過程

観察された変位の立ち上がり速度は3 µm/s 程度で、他分子系の in vitro motility assay で得られているアクチンフィラメントの速度と同程度であった (図 16)。 こ のことは、1 分子が 1ATPase サイクル中に引き起こす反応がマクロな反応と同じで ある事を示している。 すなわち S1 の構造変化という非常に速い反応 (µsec) の足 し合わせでマクロな運動が決まっているのではなく、1 分子の運動そのものがマク ロな運動を決めていると考えられる。

さらに変位の発生過程を詳細に解析することによって、低時間分解能では大きな 変位としか観察されないが、速い時間領域では 5 nm を単位とする階段上のサブス テップが存在することが明らかになった (図 17)。 ミオシンとは別の、神経軸索の 小胞輸送などをになうモータータンパク質であるキネシンは、マイクロチューブル 上をその構造に由来する 8 nm のステップで連続的に解離することなく運動するこ とができることが知られている (例えば Svoboda et al., 1993; Kojima et al., 1997) が、キネシン単頭 1 分子では連続的に運動しないことから (Inoue et al., 1997)、運 動の連続性は双頭構造に由来し、2 つの頭部があたかも 2 足歩行するように運動す るためであるとかんがえられている (Kojima et al., 1997)。単頭である S1 の 1 分子 がアクチンから解離することなくステップ状に変位することは、驚異的な事実であ る。さらにその周期が 5 nm であることは、S1 の構造変化に由来するものとも考え られるが、アクチンモノマーの大きさともほぼ一致していることは興味深く、運動 メカニズムを考える上で非常に重要な結果である。

本研究で用いたプローブの時間分解能は、周波数領域でたかだか 100 Hz (τ~2 msec) 程度であり、光ピンセット法に比べると 1/10 以下である。 このように時間 分解能の低いプローブを用いているのにもかかわらず、分解能ぎりぎりの速い時間 領域でのステップが観察されたことは一見不思議に見える。 しかしながら、測定 系の応答時間 (τ) はバネ定数に反比例し、S1 が結合している時の見かけのバネ定 数 (0.1 ~ 0.5 pN/nm) で決まり、S1 とアクチンの相互作用を観察している時の実質 的な応答時間は、フリーのブラウン運動に比べておよそ 10 倍程度速くなっている からである。さらに見かけのバネ定数が高いため、ブラウン運動が小さくなり S/N 比が向上しているためでもある。 1 分子捕捉技術を用いて、不確定な弾性要素を 減少させ測定系のコンプライアンスを下げる事によって、正確に変位の大きさを見 積もることに成功しただけでなく、測定の分解能までも向上させることに成功した わけである。 実際、測定系のコンプライアンスが高い光ピンセットの系では S/N 比が悪く、本研究で得られたような速いステップ状の変位は観察されていない。

観察している1つの大きな変位が、1回の ATPase サイクルによるものであることは、実験で用いた ATP 濃度条件、さらには蛍光性 ATP を用いた化学反応と力学反応の同時測定 (Ishijima et al., in press) から明らかである。 したがって、変位の

発生過程における速いステップは 1ATP 分解中に起こっており、1ATPase サイクル 中に複数回の力学的過程(となりのアクチン分子に移る、もしくはミオシン頭部の 構造変化)を引き起こしていると考えられる。 化学反応と力学反応が 1:1 に対応 しているのではなく、1回の化学反応に対して多数の力学反応が起こっており、化 学-力学反応のルースカップリング示す直接の証拠が得られたわけである。

# 3.4.3 ミオシンの運動メカニズム

序章にも述べたとおり、これまでミオシンの運動メカニズムは 1969 年にイギリ スの H. E. Huxley が筋線維中のクロスブリッジの構造学的研究を基に提唱した「首 振り説」が定説とされてきた。 さらに、ATP 分解中の S1 の大きな構造変化 (Wakabayashi et al., 1992) や、S1の結晶構造 (Rayment et al., 1993; Fisher et al., 1995) が明らかになり、 Uyeda らによる in vitro motility assay の結果 (Uyeda et al., 1996) や Molloy らの S1 による 1 分子変位計測 (Molloy et al., 1995) などの結果とあわせ て、ミオシンのヌクレオチド分解過程に起こる構造変化が力発生の直接の原因であ るという説が欧米では確立したかに見える。 しかしながらその一方で 1ATPase サ イクル中に複数回の力学反応が起こっているという結果 (in vitro: Yanagida et al., 1985; Harada et al., 1990; in muscle: Higuchi & Goldman, 1991; Lombardi et al., 1992;) や、筋収縮中にミオシンヘッドが少ししか角度変化していないという結果 (Irving et al., 1995)もあり、1ATPase サイクル中における S1 の1回の構造変化が力発生に 直接結びついているかどうかは、はっきりしていない。

本研究では、S1は1分子で1ATPase サイクル中に1回の構造変化では説明でき ない大きな変位を発生し、さらにその変位は5nm周期の連続的なステップで変位 するという結果を世界で初めて示した。 ミオシンは5nmを単位ステップとし、 1ATP 分解中にそのステップを複数回繰り返し行っているということを示しており、これまでの論争に終止符を打つ明確な証拠を提示するものである。

前述したように 5 nm という値はアクチンモノマーの大きさと一致している。 首振りモデルをはじめとするこれまでのミオシン運動メカニズムは、そのほとんど がアクチンフィラメントを全く伸び縮みしない完全な剛体棒のように取り扱って おり、アクチンフィラメントは運動メカニズムにおいて、全く受動的な役割しか果 たしていない。 しかしながら、運動はミオシンとアクチンの相互作用から生み出 されるものであり、ミオシンだけがアクティブな働きをしているとは考えにくい。 最近、アクチンフィラメントは長軸方向にも回転方向 (フィラメントのねじり方 向) にも「普通の」 タンパク質と同じような柔らかさを持っていることが示されて いる (Kojima et al., 1994; Tsuda et al., 1996)。 さらに回転方向の動きは、ATP 分解中 のミオシンによって活性化されるという結果もある。 これらを本研究の結果と考 え合わせると、アクチンフィラメントもミオシンの運動に積極的に関与している可 能性を示唆しており、アクチンフィラメントの状態も考慮に入れた運動メカニズム を考える必要があるのではないだろうか。 また、S1 が 1ATPase サイクル中にアク チンフィラメントの上を解離せずにアクチンモノマーの周期と同じ5nm ステップ で運動するということは、ミオシンは ATP 分解による自由エネルギーを自分自身

もしくはアクチンフィラメントにためておき、そのエネルギーを小出しに使っていることも十分に考え得る。

今後は、アクトミオシンの運動を分子間相互作用という観点から捉え、それを1 分子レベルで直接計測することによって、真の運動メカニズムに迫りたいと考えて いる。

# 4. 結論

走査プローブ法と1分子蛍光観察法を組み合わせることによって、タンパク質1 分子を顕微鏡で観察しながら、プローブの先端に捕捉し、自由に操作する技術の開 発に成功した。 これを用い、モータータンパク質ミオシン S1 の1分子をマニピ ュレーションし、アクチンフィラメントとの滑りの相互作用を計測した。 1分子 の S1 がアクチンフィラメントとの相互作用によって、1ATPase サイクル中に最大 で 30 nm の変位を発生すること直接測定し、さらにその変位は 5 nm を単位とする ステップ状に起こることを世界で初めて示した。 この結果は、これまでの定説で あった「ATP 加水分解反応と 1:1 に共役した首振りモデル」を否定するものであり、 生物分子モーターの分子機構の解明において歴史的とも言うべき重要な知見を与 えている。

さらに本研究で開発した技術は、他の生体分子の物理計測にも応用可能であり、 生体分子間相互作用を統一的に理解し、生体分子のエネルギー変換・情報伝達をは じめとするさまざまな生命現象の分子メカニズムを明らかにすることを可能にす る生命科学研究史上のブレイクスルーである。

## 5. 謝辞

この学位論文を作成するにあたってお世話になった全ての方々に感謝いたします。

柳田敏雄教授には、常日頃からの的確なご助言とご指導に心より感謝します。

葛西道生教授と中野馨教授には大変お忙しい中、本論文の副査をして頂きました。 深く感謝いたします。

科学技術振興事業団柳田プロジェクトの徳永万喜洋博士 (現 国立遺伝研) には、 大学院に入学した当初から5年の永きにわたり直接研究のご指導をいただきまし た。何も知らなかった私が現在こうして論文を提出できるのも彼のご指導のおかげ であり、ことばにつくせないほど感謝しています。

生物物理研究室の岩根敦子助手には、試料作成に対して多大な助言と協力を頂きました。彼女の協力がなければ本研究は為し得ませんでした。心から感謝します。

生物物理研究室のメンバー、特に同期生としていっしょに研究を行ってきた井上裕 一君、田中裕人君、横田浩章君には、日頃から有益な議論をしていただきました。 彼らとのディスカッションから得たものも多く、何物にも代え難い財産としてこれ からの研究に生かしていきたいと思います。

最後になりましたが、科学技術振興事業団柳田プロジェクトの研究員及び事務室の 方々には、平素より貴重なご助言とご指導をいただきました。 が送れたのも皆様のおかげと大変感謝しております。

> 1998年1月 喜多村和郎

## 6. 文献

- Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K., Tokunaga, M. & Yanagida T. Non-contact scanning probe microscopy with sub-piconewton force sensitivity. *Ultramicroscopy* 70 45-55 (1997).
- Axelrod, D. Total internal reflection fluorescence microscopy. *Meth. Cell Biol.* **30**, 245-270 (1989).
- Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, Ch. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett. 56, 930-933 (1986).
- Dupuis, D. E., Guilford, W. H., Wu, J. & Warshaw, D. M. Actin filament mechanics in the laser trap. J. Muscle Res. Cell Motil. 18, 17-30 (1997).
- Finer, J. T., Simmons, R. M. & Spudich, J. A. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113-119 (1994).
- Fisher, A. J. et al., X-ray structures of myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADP·BeF<sub>x</sub> and MgADP·AlF<sub>4</sub>. *Biochemistry* **34**, 8960-8972 (1995).
- Florin, E. -L., Moy, V. T. & Gaub, H. E. Adhesion forces between individual ligandreceptor pairs. *Science* 264, 415-417 (1994).
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. & Yanagida, T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374, 555-559 (1995).
- Guilford, W. H. et al. Smooth muscle and skeletal muscle myosins produce similar unitary forces and displacements in the laser trap. *Biophys. J.* **72**, 1006-1021 (1997).
- Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D. & Yanagida, T. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assay. J. Mol. Biol. 216, 49-68 (1990).
- Higuchi, H. & Goldman, Y. E. Sliding distance between actin and myosin filaments per ATP molecule hydrolysed in skinned muscle fibres. *Nature* **352**, 352-354 (1991).
- Huxley, A. F. & Simmons, R. M. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233, 533-538 (1971).

Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. Science 164, 1356-1366 (1969).

- Inoue, Y. et al. Movements of truncated kinesin fragments with a short or an artificial flexible neck. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7275-7280 (1997).
- Irving, M. et al. Tilting of the light-chain region of myosin during step length changes and active force generation in skeletal muscle. *Nature* **375**, 688-691 (1995).
- Ishii, Y. et al. Communication between troponin-C and -I revealed by single molecule fluorescence spectroscopy and FRET. *Biophys. J.* 72, A283 (1997) *Abst.*
- Ishijima, A., Doi, T., Sakurada, K. & Yanagida, T. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin *in vitro*. *Nature* **352**, 301-306 (1991).
- Ishijima, A. et al. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nanomanipulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1057-1063 (1994).
- Ishijima, A. et al. Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces. *Biophys. J.* **70**, 383-400 (1996).
- Ishijima, A. et al. Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin. *Cell* in press.
- Iwane, A. H., Kitamura, K., Tokunaga, M. & Yanagida, T. Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 76-80 (1997).
- Kado, H., Yokoyama, K. & Tohda, T. Atomic force microscopy using ZnO whisker tip. *Rev. Sci. Instrum.* 63, 3330-3332 (1992).
- Kasas, S. et al. *Escherichia coli* RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry* **36**, 461-468 (1997).
- Kishino A. & Yanagida T. Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* **334**, 74-76 (1988).
- Kitano, M., Hamabe, T., Maeda, S., & Okabe, T. Growth of large tetrapod-like ZnO crystals. J. Crystal Growth 102, 965-973 (1990).

- Kojima, H., Ishijima, A. & Yanagida, T. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by *in vitro* nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12962-12966 (1994).
- Kojima, H., Muto, E., Higuchi, H. & Yanagida, T. Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.* **73**, 2012-2022 (1997).
- Lee, G. U., Chrisey, L. A. & Colton, R. J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* 266, 771-773 (1994).
- Lombardi, V., Piazzesi, G. & Linari, M. Rapid regeneration of the actin-myosin power stroke in contracting muscle. *Nature* **355**, 638-641 (1992).
- Mehta, A. D., Finer, J. T. & Spudich, J. A. Detection of single-molecule interaction using correlated thermal diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7927-7931 (1997).
- Molloy, J. E., Burns, J. E., Kendrick-Jones, J., Tregear, R. T. & White, D. C. S. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature* **378**, 209-212 (1995).
- Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, H. G. & Hansma, P. K. Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope. *Science* 265, 1577-1579 (1994).
- Rayment, I. et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261, 50-58 (1993).
- Rayment, I. et al. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* 261, 58-65 (1993).
- Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. & Gaub, H. E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276, 1109-1112 (1997).
- Saito, K., Aoki, T., Aoki, T. & Yanagida, T. Movement of single myosin filaments and myosin step size on an actin filament suspended in solution by a laser trap. *Biophys. J.* 66, 769-777 (1994).
- Saito, K., Tokunaga, M., Iwane, A. H. & Yanagida, T. Dual color microscopy of single fluorophores bound to myosin interacting with fluorescently-labelled actin using anti-Stokes fluorescence. J. Microsc. 188, 255-263 (1997).

- Sase, I., Miyata, H., Corrie, J. E. T., Craik, J. S. & Kinosita Jr, K. Real time imaging of single fluorophores on moving actin with an epifluorescence microscope. *Biophys. J.* 69, 323-328 (1995).
- Svoboda, K., Schmidt, C. F., Schnapp, B. J. & Block, S. M. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* **365**, 721-727 (1993).
- Tanaka, H., Ishijima, A., Honda, M., Saito, K. & Yanagida, T. Orientation dependent displacements by one-headed myosin molecules in a synthetic myosin filament. *Biophys. J.* 72, A55 (1997) *Abst.*
- Tokunaga, M., Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K. & Yanagida, T. Subpiconewton intermolecular force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 566-569 (1997).
- Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H. & Yanagida, T. Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 47-53 (1997).
- Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A. & Yanagida, T. Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured by in vitro micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12937-12942 (1996).
- Uyeda, T. Q. P., Abramson, P. D. & Spudich, J. A. The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4459-4464 (1996).
- Wakabayashi, K. et al. Small-angle synchrotron X-ray scattering reveals distinct shape changes of the myosin head during hydrolysis of ATP. *Science* **258**, 443-447 (1992).
- Yanagida, T. Angles of nucleotides bound to cross-bridges in glycerinated muscle fiber at various concentrations of  $\varepsilon$ -ATP,  $\varepsilon$ -ADP and  $\varepsilon$ -AMPPNP detected by polarized fluorescence. J. Mol. Biol. 146, 539-560 (1981).
- Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K. & Oosawa, F. Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* 307, 58-60 (1984).
- Yanagida, T., Arata, T. & Oosawa, F. Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle. *Nature* **316**, 366-369 (1985).

## 7. 参考文献

- Iwane, A. H., Kitamura, K., Tokunaga, M. & Yanagida, T. Myosin subfragment-1 is fully equipped with factors essential for motor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230, 76-80 (1997).
- Tokunaga, M., Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K. & Yanagida, T. Subpiconewton intermolecular force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 566-569 (1997).
- Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A. H. & Yanagida, T. Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 47-53 (1997).
- Aoki, T., Hiroshima, M., Kitamura, K., Tokunaga, M. & Yanagida T. Non-contact scanning probe microscopy with sub-piconewton force sensitivity. *Ultramicroscopy* 70 45-55 (1997).
- Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane, A. H. & Yanagida, T. Manipulation and nanometer measurement of a single motor protein molecule captured directly by a scanning probe. *Biophys. J.* 72, A55 (1997) *Abst.*