

LECTURES

ようこそ，1分子生理学へ．

生理学実験法講座「1分子生理学」連載に当たって

大阪大学大学院生命機能研究科

佐甲 靖志

生理学会誌編集委員会のご依頼により，本号から3号にわたって生理学実験講座のシリーズとして「1分子生理学」5編を連載することとなった．これから大きな発展が期待されている1分子観察・計測の実験法について専門家の先生方に解説して頂く．この3月に福岡で行われた生理・薬理合同年会において井出徹さんと私とで“Single-molecule physiology”と題したシンポジウムをオーガナイズしたが，本シリーズはそのシンポジウムの演者の方々に依頼した．いずれもこの分野の第一線で働いている研究者である．

掲載のタイトルと著者は以下のように予定している．

6月号

「生体内の回転分子モーターの1分子計測」

原 陽子，野地博行（東大・生産研）

7・8月号

「X線1分子計測で分子内構造変化を見る」

佐々木祐次（Spring 8）

「DNA モーターの1分子機能解析」

原田慶恵（東京都臨床研）

9月号

「単一チャネルの電気・光学的同時計測」

井出 徹（科学技術振興事業団）

「細胞内情報処理過程の1分子観察」

佐甲靖志（阪大院・生命機能）

蛍光色素標識による生体分子の1分子計測は，もともと生体分子モーター蛋白質の研究から始ま

った [1, 2]．原さんと野地さん，原田さんにはそれぞれ F_1 ATPase [3] と RNA polymerase [4] という蛋白質分子モーターを題材にして，蛋白質1分子を観察しその機能を計測する方法について解説して頂く．化学反応と力学反応の関係をどのように計測し，酵素反応メカニズムの解明に結びつけるのかといった点で，計測法のみならず，データ解析から蛋白質反応のモデルの構築まで，分子モーターに限らずすべての蛋白質研究の見本を提供して下さい．

Single channel recoding が蛋白質1分子計測の始まりであることは，生理学会の方々には申し上げるまでもない．詳細な解析の進んだチャネル分子の機能，特に gating のメカニズムを知るにはチャネルの構造変化の計測が突破口になるだろう．ある種のチャネル分子は結晶構造も得られるようになってきたが，動的構造変化をするには1分子イメージングが最良の方法のひとつであると考えられる．むしろ他の方法もあるのだが，後に述べるように1分子計測は特に時系列データの取得に有利な点があるからだ．井出さんは世界で初めて単一チャネル分子からの光記録と電気信号記録を同時に行った [5]．この実験技術の詳細を紹介して頂く．

蛍光1分子観察は，ガラス基盤上や人工膜に再構成された分子の観察から，細胞内の分子計測にまで拡張されている [6]．9月号では私が，細胞内蛍光1分子計測について書かせていただく．

蛍光法だけが1分子計測の方法ではない．佐々木さんにはX線回折法をつかった蛋白質の構造

変化の追跡法について解説して頂く。X線1分子計測法は、蛍光法を遙かに凌ぐ空間精度で1分子内の構造変化を捉えることができる [7]。佐々木さんはこの方法をDNA、分子モーター、イオンチャンネルなどに精力的に応用されている。

1分子計測は従来の多分子計測にない利点を持っている。従来の多分子計測で得られるのは、ほとんど平均値の情報だけであるのに対し、1分子計測では平均値の外に、値の分布や時間的・空間的な値のゆらぎを知ることができる。分子反応のキネティクスやダイナミクスを知るには反応の時系列情報が必要であるが、1分子計測では、多分子の反応の同期をとる必要がないからこの点でも優れている。分子は確率的に働くので反応の中間状態の検出は多分子計測では容易に行うことができない。1分子計測で一回ごとの分子反応の入出力をデジタル検出することにより、優れた定量性を得ることもできる。これらの1分子計測の特徴は、すべて分子の反応メカニズムを推定する上で多分子計測に較べて非常に有利な点である。

もちろん1分子計測には多くの困難があるのであるが、それをどのように克服していくか、現在

1分子計測法の限界が何処にあるかといった点も、この連載で明らかにされていくであろう。

1分子計測はまだまだ始まったばかりの実験法である。応用の分野は限りなく広がっており、改良・発展の余地も十二分にある。本実験講座シリーズの読者が次々と1分子計測法を採用され、生理学の発展に寄与されることを願ってやまない。記事をご覧になってご不明の点やご質問などがあれば、躊躇なく著者の方々に連絡をとって頂きたい。

それでは連載を開始しましょう。3ヶ月間おつき合いを頂きます。

1. Funatsu, T. et al. *Nature* 374, 555–559 (1995)
2. Sase, I. et al. *Biophys. J.* 69, 323–328 (1995)
3. Noji, H. et al. *Nature* 386, 299–302 (1997)
4. Harada, Y. et al. *Nature* 409, 113–115 (2001)
5. Ide, T. et al. *Jpn. J. Physiol.* 52, 429–434 (2002)
6. Sako, Y. et al. *Nature Cell Biol.* 2, 168–172 (2000)
7. Sasaki, Y.C. et al. *Phys. Rev. Lett.* 87, 248102–1–4 (2001)

LECTURES

第1回

生体内の1分子回転モーター

東京大学生産技術研究所

原 陽子, 野地 博行

I. はじめに

生きている生体分子が動く様を分子単位で観察し、さらにAFMや光ピンセット、磁気ピンセットなどを用いて分子を操作することでそのダイナミクスを明らかにする研究は、対象とする試料のスケールこそ異なるが生理学に通じる。そのため、この研究分野は最近「1分子生理学」と呼ばれている。私たちは、クルクルと回転するモーターとしては世界最小である F_1 -ATPaseの1分子生理学を行なっている。本解説では、これまでに私たちが開発してきた回転分子モーターの1分子観察手法について解説する。

II. F_1 -ATPaseについて

ATP合成酵素の一部である F_1 -ATPaseは、3つの α サブユニットと3つの β サブユニットが交互に並んだリング構造をつくり、その中心を回転子である細長い γ サブユニットが貫いている（図1）。ATP加水分解の活性中心は β に存在し、3つの β が順番にATPを加水分解することで順番にトルクを発生し、真ん中の γ を一方向に回す。 F_1 -ATPaseの結晶構造によると、 $\alpha\beta$ リングの外径は10 nm、 γ の直径は2 nmである。私たちは、今から6年前に F_1 -ATPaseが回転の様子を1分子観察するための実験系を開発し [1]、さらにその手法を応用・改変することによって、このモーターの特性を明らかにしてきた。

III. 試料の調整

はじめに F_1 -ATPaseの調整、修飾方法につい

て述べる。私たちは、好熱菌（thermophilic *Bacillus* PS3）由来の F_1 -ATPaseを用いている [1]。1分子観察を行う際、対象とするたんぱく質の安定性やその活性を確認しておくことは必須である。好熱菌の F_1 -ATPaseは溶液中で安定であり、かつATP加水分解活性も高い。これらの性質は、顕微観察時におけるダメージを最小限に止め、ATP加水分解に伴う回転を検出できた要因の一つである。

たんぱく質の特定の部位の向きを検出するためには、その分子をある向きにしっかりと固定することが必要である。 F_1 -ATPaseをガラス表面上に固定するために、10個のヒスチジンタグを3つの β のN末端側に導入し、Ni-NTA（ニトリロ三酢酸）でコートしたガラス表面上に結合させた。これにより固定子である $\alpha_3\beta_3$ が、ガラス面側にし

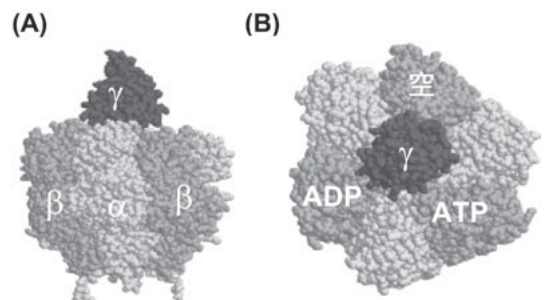


図1. F_1 -ATPaseの結晶構造 [6]

(A) 横から見た構造。

(B) 上（膜側）から見た構造。3つの β 上でATPの加水分解を行い、真ん中の γ を回転させる。

っかりと結合したF₁-ATPaseを得た。

γ とアクチン線維との結合は、 γ に遺伝子工学的にシステインを導入し、ビオチンを結合させ、あらかじめビオチン化しておいたアクチン線維と、ストレプトアビジンを介して行った(図2, A)。F₁-ATPaseの場合、 γ とプローブの間の固定が1点だけでも、その回転を検出することができたが、できれば2点以上で固定して、プローブとたんぱく質の間の自由回転のないサンプルを用いることをお勧めする。(F₁-ATPaseも現在は2点でプローブと結合させている。)

IV. 大きなプローブを結合させて回転を可視化する方法

γ の直径は2 nm程であり、光学顕微鏡で見えるには小さすぎるため、 γ 自身の回転を直接捕らえることはできない。これを解決するためには、回転モーターの軸受けにあたる $\alpha_3\beta_3$ をガラス表面

に固定し、軸にあたる γ に大きな目印を結合させればよい。大きな目印として、蛍光染色した長さ1~5 μ m程のアクチン線維[1, 2]や直径100~500 nm程のプラスチックビーズ[3]を γ の先に結合させ、回転の観察を行った。以下にその方法について述べる。

A. 蛍光性アクチン線維を用いる方法

2枚のカバーガラスを用いてフローセルを作製し、その中の溶液を交換することによって回転観察を行った。まず、パラフィルムで作製した2つのスペーサーで仕切ったフローセルを作製する。この中へNi-NTAでコートしたビーズ、1~10 nMのストレプトアビジン化F₁-ATPase、50 nMの蛍光ラベルしたアクチン線維の順に流し込み、最後に任意のATP-Mgが入った溶液をセル内へ流し込み、蛍光顕微鏡下で観察する。ATP溶液には、蛍光性アクチン線維の蛍光退色を防ぐための酸素除去系(0.5% 2-mercaptoethanol, 6

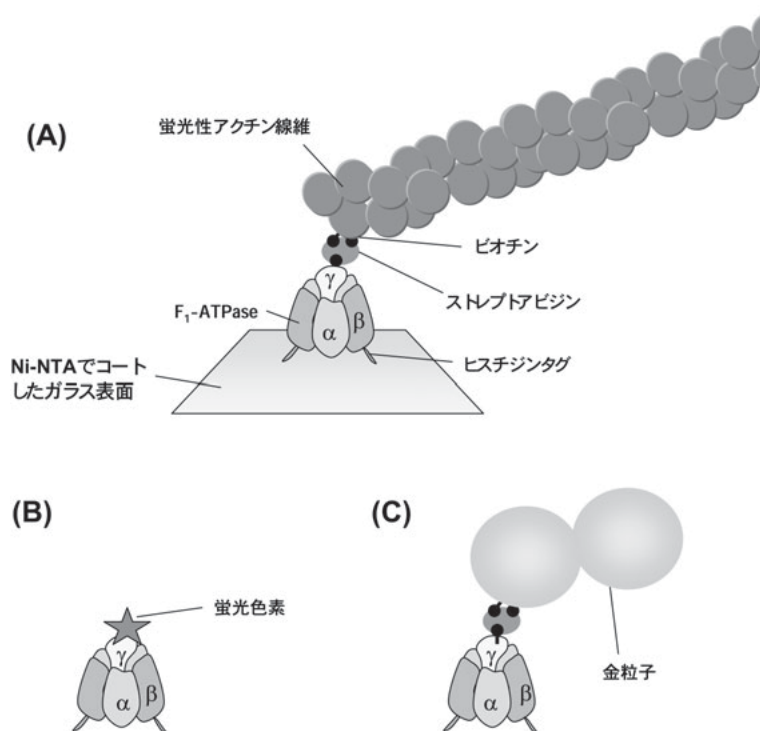


図2. F₁-ATPaseに (A) 蛍光性アクチン線維, (B) 1分子の蛍光色素, (C) 金粒子を、それぞれ結合させた1分子観察系の模式図。

mg/ml glucose oxidase, 30 U/ml catalase) が入っている。アクチン線維の蛍光像は、蛍光色素を水銀ランプで励起し、image intensifierで増幅した後に、CCD (Dage MTI) カメラを用いて観察した (図3, A)。

実際に、高濃度のATPがあると、顕微鏡下でアクチン線維が一方方向にくるくると回転している様子が観察された (図3, B)。アクチン線維の回転方向はすべて、反時計回り (F_0 側から見た回転方向) で、 F_1 -ATPaseの結晶構造から予想される γ の回転方向と一致していた [1]。長いアクチン線維はゆっくりと回転し、短いものは早く回転していたが、これは粘性抵抗がアクチン線維の長さの三乗に比例するためである。これに角速度をかけて必要なトルクの大きさを計算すると、常に ~ 40 pN $\cdot$ nmに達した。また、この回転は120°ごとのステップに分けられ、1つのステップは1つのATPによって起こることがわかった [2]。

B. プラスチックビーズを用いる方法

また、 γ の先にプラスチックビーズを結合させれば、特殊な顕微鏡を用いなくても通常の光学顕微鏡で簡単に回転を観察することができる。ビーズは市販のアミノ基ラベルのものや、カルボキシラベルのものを、ビオチン化して γ の先に結合させればよく、蛍光色素の退色の問題もないため、酸素除去系など也不需要ない。きわめて簡便な回転観察系である。均一にしたガラス表面に F_1 -ATPaseを固定することによって、引っかかりのほとんどないきれいな回転を長時間観察できるというメリットがある。

私たちは、この系で1分子の F_1 -ATPaseを長時間観察することによって、 F_1 -ATPaseが活性化状態と不活性化状態の間を行き来していることを発見した [3]。図4に γ の回転のタイムコースを示す。それぞれの分子が30秒程の回転と停止を繰り返している様子がわかる。停止位置は β の配置

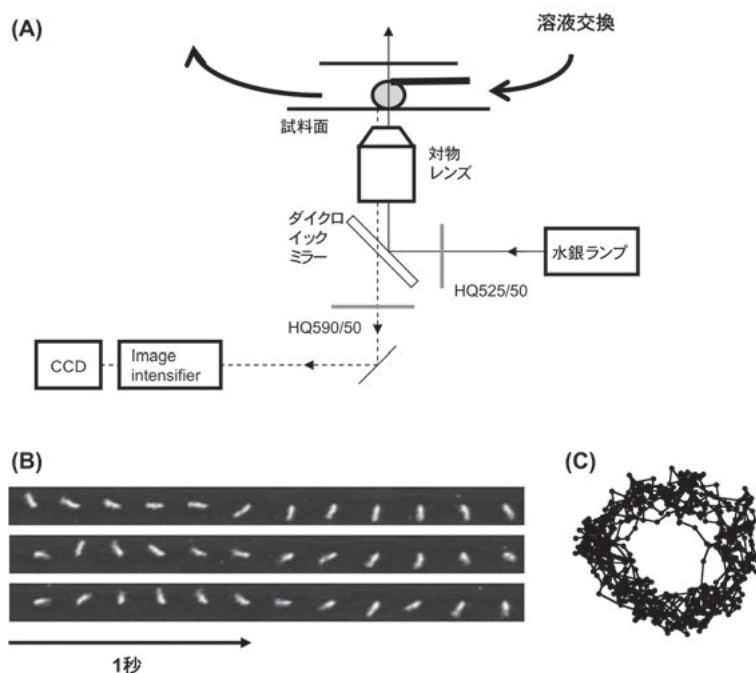


図3. アクチン線維の顕微鏡観察

- (A) 蛍光顕微鏡の光学系
- (B) ATP 2 mMでの γ に結合させたアクチン線維の回転の様子 (連続写真)
- (C) アクチン線維の重心の軌跡。

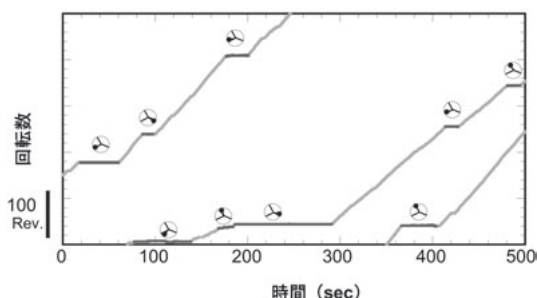


図4. F_1 -ATPaseの長時間の回転のタイムコース
[ATP] 2 mMでの γ に結合させたビーズの回転. 3ヶ所の停止位置を円の中の3本の線で表し, 停止位置を丸で示した.

に対応して120°ごとに3点で, 停止時間はビーズの大きさに依存しない. 溶液系のATP加水分解活性の時間変化との比較から, この停止状態が β 上の触媒部位にADPを強く結合して不活性化したADP阻害状態に対応することがわかった. また, 停止位置は, 次節に述べる金粒子の高速回転で検出された90°のサブステップの位置とほぼ同じ位置であることも明らかになった.

V. 小さなプローブをつけて反応の素過程を見る

大きなプローブを結合させた実験系によって, F_1 -ATPaseの回転トルクを測定し, 120°の回転ステップ, 活性化と不活性化の遷移を観察することができた. しかし, F_1 -ATPaseに比べてずっと大きなアクチン線維は, F_1 -ATPaseの早い動きを見ることはできない. 実際にアクチン線維を結合させた F_1 -ATPaseの回転速度は最大で6~8回転/秒で, 溶液系のATP加水分解活性から予想される100回転/秒に比べてずっと低いのである. また, 大きなプローブが立体的に回転を妨げたり, F_1 -ATPase本来の性質を変えてしまったりする可能性も残っていた. そこで足立ら [4] は1分子の蛍光色素 (~2 nm) を, 安田ら [5] は金粒子 (~40 nm) を, アクチン線維よりもずっと小さなプローブとして γ の先に結合させて回転の観察を試みた.

A. 1分子偏光観察

初めに小さな蛍光色素1分子 (~2 nm) を用

いて, その偏光の変化から1分子の回転を観察した方法について紹介する.

γ の蛍光色素標識は, γ に変異導入したシステインに対して, SH反応性のCy3-マレイミドを反応させることによって行った. 固定化の指標としてこのサンプルの蛍光異方性を調べた結果, 0.32という非常に高い値を得た. この値は, たんぱく質上にある色素分子の角度揺らぎが, 平均25°以下であることを示すもので, 蛍光色素が F_1 -ATPaseにしっかりと固定していることがわかる. また, 蛍光1分子イメージングにはゴミのないクリーンなガラス基板が必要である. そのため, ガラス表面は20 N KOHで1晩以上浸け置き洗浄したカバーガラスを3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシランでエポキシ基化し, アミノ-NTAを反応させてNi-NTA化した. このようにしてほとんどゴミのないきれいなガラス表面を作ることができた.

蛍光色素1分子の向きは次の2つの方法, 1) 色素分子から発光する蛍光の縦・横偏光成分, 2) 色素分子の吸収モーメントの向きに依存した励起効率, から検出した. 1) は, 図5, Aの(i)に示すように $\lambda/4$ 板で円偏光にしたレーザー光で励起した色素からの蛍光を, 偏光ビームスプリッターで縦偏光成分と横偏光成分に分け, 同時に同じカメラで観察するという方法である. また, 2) は図5, Aの(ii)に示すように円偏光線に1 Hzで回転する偏光板を挿入し, 試料面で連続的に回転する直線偏光の励起光をつくり, その光で励起した色素からの蛍光を観察するという方法である.

その結果, ATP低濃度の条件では, 1), 2) どちらの方法でも, 回転している分子と回転しない分子を見分けることができ, 0°, 120°, 240°の3つのステップに対応する蛍光強度変化を得ることができた. しかし, 画像の取り込みがビデオ時間分解能であったために, 高濃度ATPにおける高速な回転を観察することはできなかった.

B. 金粒子を用いた暗視野レーザー顕微鏡による観察

次に, 金粒子を用いて F_1 -ATPaseの高速回転

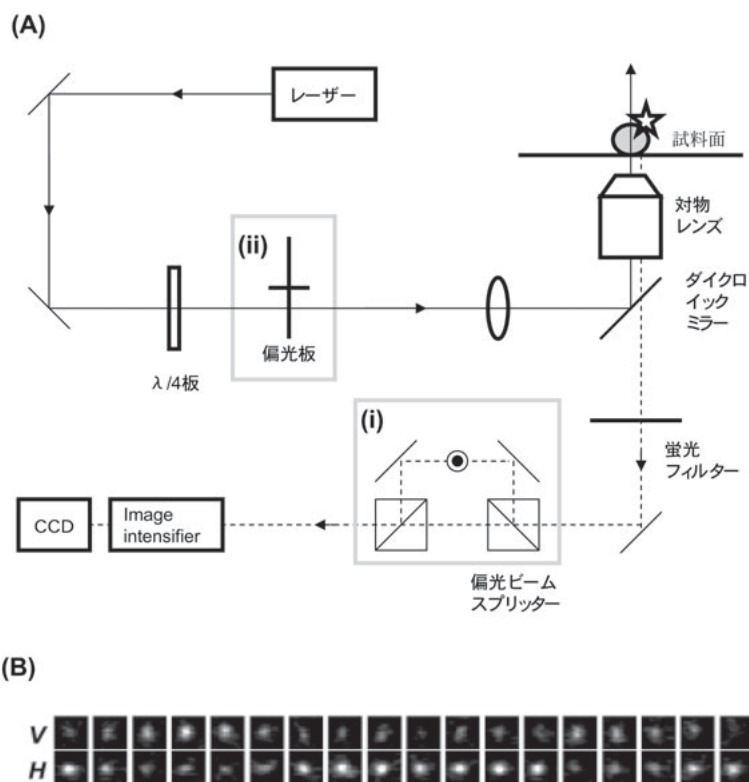


図5. (A) 1分子偏光観察のための光学系. (i) と (ii) は独立に使用する.
(B) 蛍光の偏光成分から検出した20 nM ATPでの γ の回転の様子. 縦 (V)
横 (H) 偏光成分に分けた蛍光1分子の連続イメージ.

を検出した方法について述べる [5]. 金粒子は F_1 -ATPase の4倍程度の大きさで, 金粒子にかかる粘性抵抗は $1\ \mu\text{m}$ のアクチン線維の1000分の1しかないので, もはや F_1 -ATPase 本来の回転を邪魔しない. 金粒子の回転半径は $25\sim 55\ \text{nm}$ 程で, 顕微鏡下でその重心の軌跡を検出できるぎりぎりの大きさである. 高速回転を検出するために, 8000 フレーム/秒の高速 CCD カメラを用いて, 強いレーザーを観察面に斜めから照射し, 金粒子からの散乱光のみを暗視野顕微鏡で観察する. これによって, F_1 -ATPase の回転を観察した.

その結果, 高濃度 ATP 存在下でも, F_1 -ATPase は 130 回転/秒で 120° 毎のステップ状の回転をしていた. また, この 120° のステップは 90° と 30° のサブステップに分けられ, それぞれのステップにかかる時間は非常に短く ($0.1\ \text{msec}$), サ

ブステップとサブステップの間には $1\ \text{msec}$ の2つの反応が起こっていることがわかった. 現在のところ, 90° のサブステップは ATP の結合によって起こり, おそらく, はじめの $1\ \text{msec}$ の反応は ATP の加水分解, 残りの $1\ \text{msec}$ の反応は加水分解産物である ADP もしくはリン酸の解離に伴って起こると予想されている.

このように, 結合させるプローブを小さくし, 高速カメラで観察すると, これまで見えなかった反応の中間状態も捉えることができるようになる. 時間分解能と空間分解能を上げることは, 早い反応や構造変化を捉える有効な手段の1つである.

VI. 磁気ピンセットによる分子操作

最近, 1分子の回転を観察するだけでなく, 操

作することができる磁気ピンセットの系が開発された。この系では、 γ の先に磁気ビーズを結合させて、外部磁場によって γ の向きを変化させることができる。具体的には、顕微鏡の観察面の上方に電磁石を置き、電磁石にコンピューターから電圧を入力し、観察面に任意の磁場を与える。磁場の大きさや方向を変化させることによって、 γ を外力によって静止させたり、回転させたりすることができるというものである。この系によって、これまで予想もしなかったような F_1 -ATPaseの性質が明らかにできると期待している。

VII. おわりに

大きなもしくは小さなプローブを使った1分子イメージングは、個々のたんぱく質の動きを追うことができる非常に有用な方法である。ここではこれまでに開発された様々な回転の1分子観察法について紹介した。これらの方法が、たんぱく質のダイナミックな構造変化を実時間で明らかにしたいと考えている、多くの研究者の方々の役に立てば幸いである。

文 献

1. Noji H, Yasuda R, Yoshida M & Kinosita K Jr: Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase. *Nature* 386, 299–302, 1997.
2. Yasuda R, Noji H, Kinosita K Jr & Yoshida M: F_1 -ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° step. *Cell* 93, 1117–1124, 1998.
3. Hirano-Hara Y, Noji H, Nishiura M, Muneyuki E, Hara KY, Yasuda R, Kinosita K Jr & Yoshida M: Pause and rotation of F_1 -ATPase during catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13649–13654, 2001.
4. 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. U.S.A.* 97, 7243–7247, 2000.
5. Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinosita K Jr & Itoh H: Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F_1 -ATPase. *Nature* 410, 898–904, 2001.
6. Gibbons C, Montgomery M G, Leslie A G & Walker J E: The structure of the central stalk in bovine F_1 -ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1055–1061, 2000.