



単一分子の分析と生命物理学

単一分子計測からわかったこと、これからの課題

野地博行 Hiroyuki NOJI

生体分子の機能を単一分子単位で計測することで、構造のダイナミクスや、反応メカニズム、そして分子ごとの構造や反応速度の揺らぎなど、多分子系では知ることのできない情報が得られる。本稿では、筆者らが行ってきたF₁-ATPaseの回転1分子計測を紹介する。また、マイクロデバイスと組み合わせた新しい計測技術や、今後より重要となる膜タンパク質の1分子計測の実例を紹介しながら、将来の単一分子計測の方向性を議論したい。

単一分子計測からわかること

生体分子の働く様子を一分子単位で計測することで、構造ダイナミクス、反応の素過程、反応速度・構造状態の分布などを直接知ることができる¹⁾。構造ダイナミクスに関しては、初期の1分子計測では分子モーターに見られるようなナノ・メートルスケールの移動など大きな運動に限られていたが、最近では10°以下の回転運動計測²⁾やオームストロング単位の1分子計測³⁾も可能である。反応条件をうまく設定すれば、生体分子の触媒反応を各反応素過程に分解して計測することができる。そして、このような計測を多数の分子に対して行くと分子の構造状態や反応速度の分布を得ることができ⁴⁾、個々の分子の状態を長時間観察することで生体分子の反応速度の揺らぎなどを知ることでもできる。また、単一分子計測は、分子集団における非常にマイナーな分子種が実は決定的な役割を担っていることを明らかにすることもできる。本稿では、筆者らの研究を紹介しながら、単一分子計測の有効性の

のじ・ひろゆき

大阪大学・産業科学研究所 教授

〔経歴〕1997年東京工業大学総合理工学研究科博士課程修了、博士(理学)。JST 博士研究員、さきがけ研究員を経て2001年東京大学生産技術研究所助教授、05年より現職。〔受賞〕1998年 Grand Prize、Amersham Pharmacia Biotech&Science Young Scientist Prize、2006年学術振興会賞。〔専門〕1分子生物物理学。〔連絡先〕567-0047 茨木市美穂ヶ丘8-1 (勤務先)

E-mail: hnoji@sanken.osaka-u.ac.jp

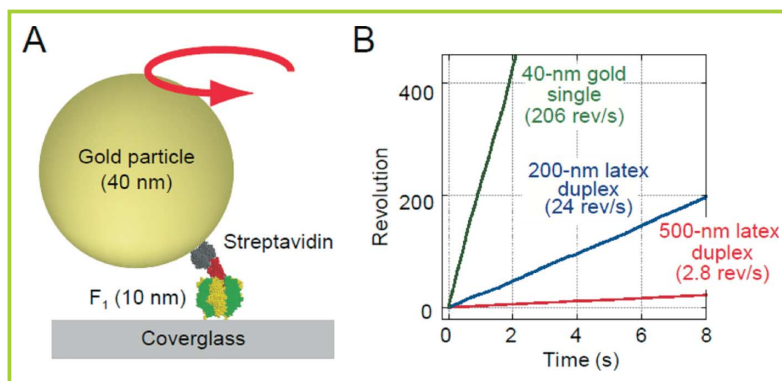


図1 F₁-ATPaseの回転観察

A: 実験の模式図。B: 実際に観察された回転タイムコース。使用するプローブの大きさによってF₁-ATPaseが受ける粘性抵抗が異なるため、プローブが小さいほど回転速度が上昇し、室温では200 rev/sに達する。

一端を解説したい。また、後半では、単一分子計測の将来展望に関する私見を述べたい。

F₁-ATPaseの1分子計測

F₁-ATPaseはATP合成酵素を構成する2つの回転分子モーターの1つであり、単独ではATPを加水分解して分子内部の回転子を回転させる⁵⁾。筆者らは、F₁-ATPaseが回転分子モーターであることを実証⁶⁾して以来、F₁-ATPaseの「化学反応エネルギーを力学的エネルギーに変換する分子メカニズム」の解明に取り組んできた。F₁-ATPaseの外径は10 nm、回転子の直径は2 nmと非常に小さいため、この回転運動を計測するためには、回転の目印となるプローブを接続する必要がある。初期の実験では蛍光標識されたフィラメントタンパク質を用いたが、現在では直径40~200 nmの金コロイド粒子やプラスチックビーズを用いている(図1)。

これまでの1分子回転計測によって、 F_1 -ATPaseの運動特性や反応メカニズムを詳細に明らかにすることができた。例えば、連続的に回転している様子から F_1 -ATPaseが発生するトルクが約40 pN・nmであることや、その最高回転速度が数百Hzに達することなどが明らかとなった。また、 F_1 -ATPaseの回転計を様々な条件で行うことで、特定の反応素過程で回転が停止するステップ状の回転運動を観察することができる。例えば、溶液のATP濃度を下げることによってATP結合待ち状態で回転が停止する120°ステップ回転を観察できる(図2A)。この待ち時間のヒストグラムを解析することで、ATP結合速度定数や、120°回転が1回のATP加水分解と共役していることを明らかにした。このような計測を積み重ねることで、 F_1 -ATPaseの反応スキームに関しては最終的な解明が目前となっている⁷⁾。また、 F_1 -ATPaseの結晶構造と同じ状態で固定するために、回転子と固定子の間で可逆的な化学架橋がかかる変異型 F_1 -ATPaseを作成し、その回転計測中に架橋実験を行った⁸⁾。この実験から、1分子計測で見られる停止位置と結晶構造の関係を明らかにすることができ、分子メカニズムを1分子計測の結果と結晶構造の両方に基づいて議論することができるようになった。

マクロデバイスを用いた1分子計測

以上のように、生体分子が大きな構造変化するときには1分子計測が非常に強力である。しかし、実は1分子計測は、触媒反応そのものは得意ではない。例えばATPなどのリガンドを蛍光標識することで、その結合・解離を1分子計測することができるが、厳密には結合の前後で化学反応が起こったのかを知ることはできない。生化学実験では、触媒反応は主に反応生成物の吸収や蛍光から計測するが、酵素1分子の活性を検出する感度はない。そこで筆者らは、微細加工技術を用いて極めて小さな試験管

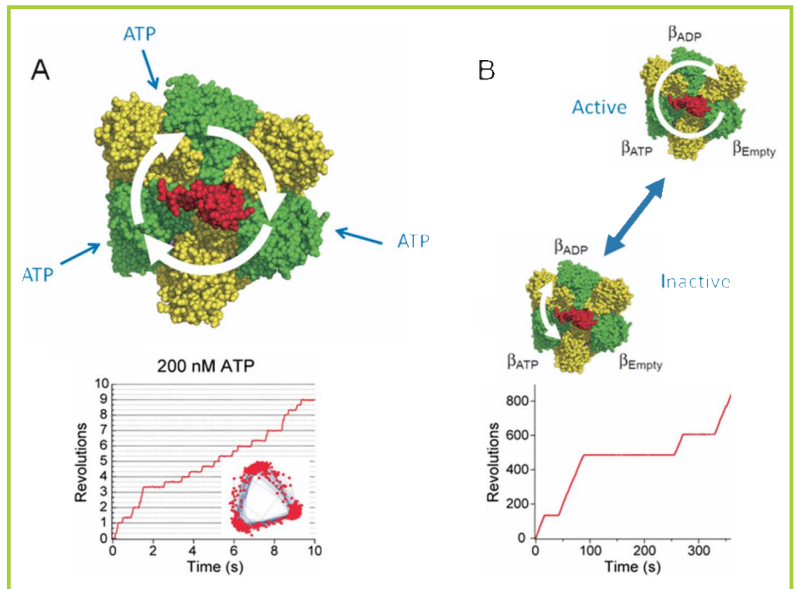


図2 1分子計測で明らかとなった F_1 -ATPaseの性質

A: ATP結合に伴う120°ステップ回転。B: 活性状態(連続回転状態)と不活性状態(回転停止状態)の間の遷移。

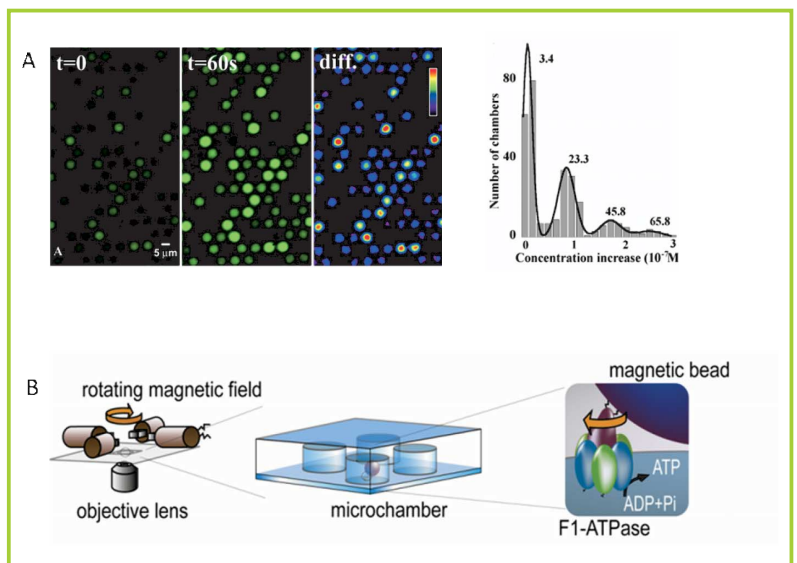


図3 超微小溶液チャンバーを用いた1分子計測

A: 1分子酵素(β -galactosidase)アッセイ。左は酵素活性の分布。0、1、2、3分子相当のピークが確認される。B: F_1 -ATPase強制逆回転によるATP合成反応計測。

を作成し、その中に酵素分子を1個だけ閉じ込めてその触媒反応を計測した(図3A)⁹⁾。さらに、この中に F_1 -ATPaseを閉じ込めて、これを強制的に逆回転させたときに合成されるATP量を見積もることにも成功した(図3B)^{10,11)}。このように、単に光学的なシステムに依存するだけでなく、マイクロ・ナノデバイスを組み合わせると1分子計測の幅は格段に広がる。筆者らと同様のシステムを用いて細胞内でタンパク質が合

成される様子を1分子単位で計測した例も発表されている¹²⁾。

単一分子計測の展望

今後、単一分子計測はどのように発展するだろうか？ 1つの方向は、より精度の高い計測である。空間分解能に関しては、非線形光学技術を用いて回折限界を超える分解能を持つイメージング技術が複数開発されている。また、高速AFMやX線を用いた計測技術も開発されており、今後はさらに詳細な構造変化の計測が可能となるだろう。時間分解能に関しては、カメラの性能が律速となっている。筆者らのグループでは約1 nmの位置決定精度で9.1 μsec の運動計測が可能となっている(図4)。より高速なカメラがあれば、時間分解能はさらに一桁は改善できる見通しである。

また、今後はこれまで1分子計測が困難であった膜タンパク質への応用が重要になると思われる。膜を舞台とした細胞内シグナル伝達や物質輸送は、膜タンパク質同士の弱い相互作用によって成り立っている場合が多い。このようなシステムを計測対象とするためには、脂質二重膜を顕微鏡下で作成し、そこに目的の膜タンパク質群を再構成しなくてはならない。筆者らは、顕微鏡下で平面膜を作成しタンパク質を6種類再構成することで、輸送小胞形成のダイナミクス計測を行っている。この実験は極めて困難であるが、多分子系の実験では予想もつかなかった結果を多数得ている¹³⁾(図5)。

また、本稿では取り上げることができなかったが、今後は生きている細胞内での分子計測がより重要度を増すであろう。特に、単なるイメージングではなく、積極的に分子に摂動を与えることで、分子そして細胞全体の応答を計測するための実験が必要となると思われる。

謝辞：ここで紹介した実験では多数の共同研究者にお世話になった。特に、京都産業大学の吉田賢右先生、早稲田大学の木下一彦先生、東京大学の藤田博之先生、竹内昌治先生、佐藤健先生、中野明彦先生、大阪

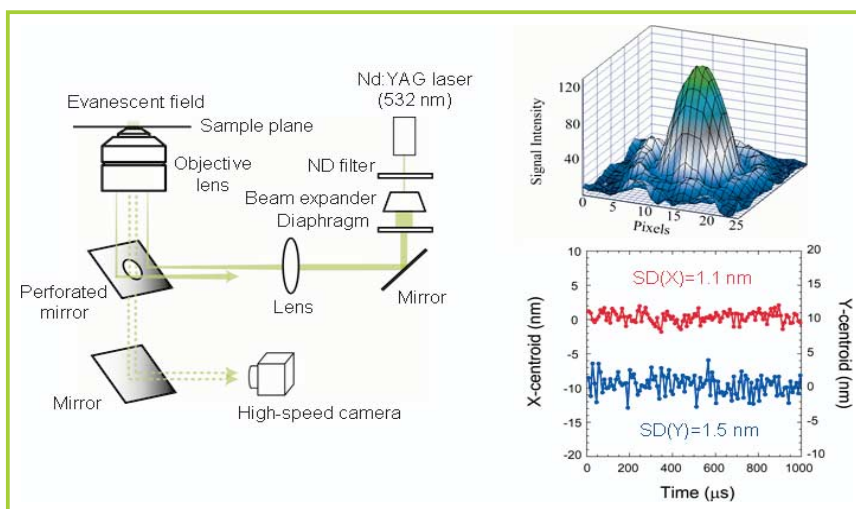


図4 エバネッセント照明を用いた暗視野顕微鏡を用いた超高速1分子イメージング
左：光学系の模式図。右：40 nm 金コロイドのイメージング。

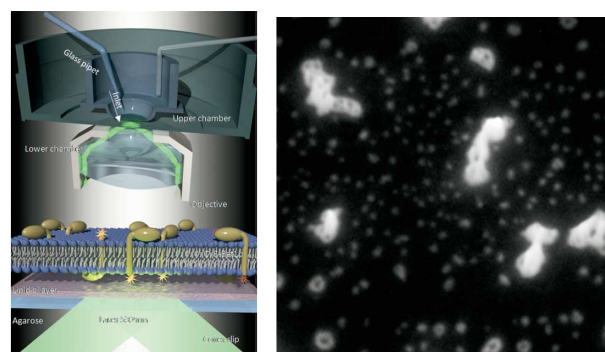


図5 人工平面膜中に再構成した膜タンパク質の1分子観察
左：模式図。右：小胞輸送に係るタンパク質(COPII)タンパク質のGTP依存的自己集合の様子。白い部分がCOPIIタンパク質の集合体。

大学の井出徹先生、そして実際に実験を行った奥野大地、田端和仁、飯野亮太、上野博史らの諸氏に深く感謝する。

- 1) 野地博行, ナノバイオ計測の実際, 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編, 講談社, 2007.
- 2) T. Msaikhe, F. Koyama-Horibe, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15, 1326.
- 3) E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, S. M. Block, *Nature* **2005**, 438, 460.
- 4) B. P. English et al., *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 87.
- 5) 奥野大地, 野地博行, *化学と工業* **2008**, 61, 514.
- 6) H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, K. Kinoshita, Jr., *Nature* **1997**, 386, 299.
- 7) K. Adachi, et al., *Cell* **2007**, 130, 309.
- 8) D. Okuno et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 20722.
- 9) Y. Rondelez et al., *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 361.
- 10) 野地博行, *バリティ* **2008**, 123, 13.
- 11) Y. Rondelez et al., *Nature* **2005**, 433, 773.
- 12) L. Cai, N. Friedman, X. S. Xie, *Nature* **2006**, 440, 358.
- 13) K. V. Tabata, K. Sato, T. Ide, T. Nishizaka, A. Nakano, H. Noji, *EMBO*, in press.