

4.

一方向性反応のプログラミング基盤 分子機械はどのように働くか

木下 一彦

岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター

表題の「一方向性反応のプログラミング基盤」というのは、何のことだかお分かりにならないと思う。「生命活動のプログラム」という主題のCRESTプロジェクトに応募するため、苦し紛れに付けた研究課題名である。しかし、研究を終了する今になって、なかなか的を得た名前であったと思い始めている。

化学反応というのは、本来可逆で、どちら向きにも進行し得るものである。しかし生き物の中では、特定の方向に進む反応、ないしその結果として特定の方向に向かう分子の動き、を枚挙するのに暇がない。しかもその多くが、エネルギー的に損な、本来起こりにくい方向への反応である。蛋白質の合成反応も、細胞がナトリウムイオンを細胞外に汲み出すのも、それだけを取り出せば不自然な反応である。ほおっておけば、蛋白質は分解され、細胞内外のイオン濃度は等しくなる、はずのところを、逆向きに反応が進行する。

不自然な(=起きにくい)反応を進行させる仕掛けは、より強力で起きやすい反応と、「共役」させることにある。共役とは、2つの反応(図1の赤と青の矢印)が必ず同時に起きるようにすることである。例えば我々の体の中にあるATPがADPと燐酸(Pi)に分解される反応はかなり強力なので、ATP分解と蛋白質合成を共役させれば、ATP分解により得られるエネルギーを使って合成反応を進められる。生き物は、このような共役の仕掛けをプログラム単位とし、いろいろな共役機構を精緻なプログラムに組み上げることにより、活動しているのではなからうか。その基盤となる共役の仕組み、ある反応を駆動源に用いてもう一つの反応を不自然な方向に進行させる仕掛け、を探ろうというのが、本研究の趣旨であった。

生体中で2つの反応を共役させて進行させるのは、蛋白質(あるいはRNA)分子1個でできた、「分子機械」である。蛋白質の分子は、図2の例に示すように、原子が縦・横・奥行きそれぞれ数十個ならんだ塊にすぎない。こんなものが、一体どうやって、反応の共役などという高級な仕事を成し遂げられるのだろうか。

答を教えてくださいそうなのは、図2に示す、F₁-ATPaseという名前の蛋白質である(以下F₁-エフワンと呼ぶ)。分子1個でできた回転モー

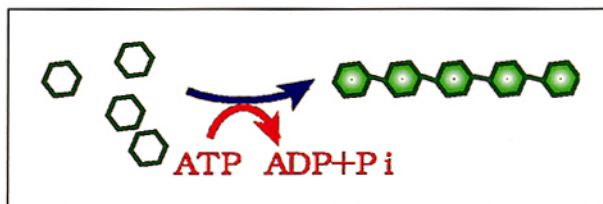


図1 赤の反応を青の反応と共役させ、強引に青を進める。

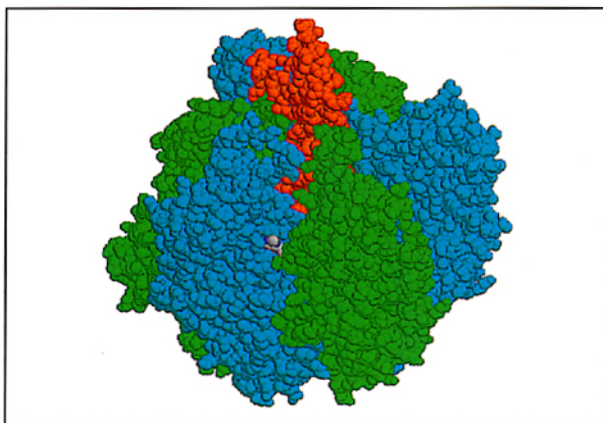


図2 F₁モーター。直径約10nm(10万分の1ミリ)。小さな球は原子を表す。

ターで、図中のオレンジの部分 (γ という名前) が、3つの β (緑) と3つの α (青) でできた筒の中をクルクル回る。エネルギー源はATPで、ATPの分解反応との共役により、回転という力学的仕事が行なわれるのである。この分子機械は実によくできていて、逆回転させると、ATPが合成されてしまう (といっても証明はまだ)。つまり、外から力を加えて逆回転という反応を起こさせることにより、共役したATP分解反応の方も無理やり逆に進行させられ、ADPとリン酸からATPを作ってしまうのである。電気モーターを逆回転すると発電機になるのと同じ要領である。我々の体の中には、回転子である γ を逆回しする仕掛けがあり、F₁モーターの生理的役割は、他の分子機械に供給するためのATPを合成することにある。

ATPの分解・合成という化学反応と、正逆の力学的回転を、どちら向きにも共役させることができるこの分子機械。その仕掛けを議論する前に、ATP分解で駆動される回転モーターとしての性質を列挙しておこう。いずれも、このモーター1分子の回転を光学顕微鏡の下で観察することにより、我々が得た結果である。

- (i) 回転は、図2の小さな蛋白質分子たった1個だけで起きる。他に助けは要らない。
- (ii) 回転は、図2の上側から見て、常に反時計回り。すなわち、方向を決める仕掛けがある。
- (iii) ATPを分解する部位は3つの β (図2の緑) にそれぞれに1ヶ所あるが、それに対応して、回転は120度おきのステップ状に起きる。ステッパーモーターである。
- (iv) 少なくとも低速域では、速度・負荷によらず、一定の力 (トルク) を出す (高級乗用車なみ)。
- (v) 120度ごとにモーターがする力学的仕事 (出力) はやはり条件によらず一定。
- (vi) 120度回転するごとにATP分子1個が消費される (分解される)。
- (vii) ATP1分子を分解するとき得られるエネルギー (入力) とそのときにする仕事 (出力) を比べるとほぼ等しく、エネルギー変換効率は100%近くに達し得る。ヒトの作るエンジンの効率はせいぜい10%程度。ただし電気モーターは効率がよく、99%を越えるとか。
- (viii) まれに逆方向にステップする。分子機械はヒトの作る機械と違い、たまに間違えるのが特徴。
- (ix) 120度ステップの中で、回転力 (トルク) は一定。すなわち、回転力は回転子の向きによらず常に一定。エンジンだと、ガソリンが爆発した瞬間のみ強い力で、ガクガクする。
- (x) 超高速度撮影によると、無負荷時の最高回転速度は平均毎分8,000回転 (レーシングカーのエンジンなみ)。最高速でも120度ステップし、ステップ中の瞬間速度は毎分10万回転以上。
- (xi) 120度ステップは、よく見ると約90度と30度のサブステップに分かれており、その間に、回転をほとんど伴わない2つの約1ミリ秒かかる反応が介在する。
- (xii) 90度サブステップはATPのF₁への結合により駆動され、30度サブステップは分解産物 (ADPまたはリン酸) がF₁から離れることにより引き起こされる。
- (xiii) ATPの代わりに、よく似たGTPやITPを用いても回転は起き、出力は変わらない。しかし、似てはいるが少し小さめのCTPやUTPでは、回転が起きない。

注目すべきは、(xi) と (xii) である。F₁に結合したATPが分解されるのは、おそらく (xi) の1ミリ秒の反応のどちらかで、この間はいったん回転が起きない。つまり、分解反応そのものは回転 (力学的仕事) とほとんど共役しないのである。ATP駆動の蛋白質分子機械 (少なくともF₁) は、図3に示すように、ATPが結合したときに大きな構造変化を起こし (図3の緑の部分の屈曲)、分解産物が出ていくときに構造が元に戻る。これらの構造変化、とくに第一のATP結合時の構造変化が、パワー (仕事) のもとだと考えられる。蛋白質分子の身になってみればもっともな話で、空っぽの結合部位にATPが結合するときは、ATPとの間に何本も「手」 (水素結合などの弱い結合) が結ばれるのだから、その力を借りて身を曲げることにより仕事ができる。一方、ATPがADPとリン酸に分かれ

るだけでは、手の数がそれほど変化しない。

ATPの分解産物が放出されると、蛋白質分子は「バネ」のように元に戻ると考えられる。ATP結合による曲げとADP放出による戻りはちょうど逆の構造変化で、両方ともうまく仕事に利用するのは難しそうだが、それを実現した高効率の分子機械がF₁モーターということになる。

図3で、蛋白質分子を曲げる力のもと、広く空いた結合部位の壁をATPが自分の周りに引きつけることにある。引きつければ引きつけるほど、結合の「手」が増えるわけである。これを逆に考えると（作用反作用の法則）、蛋白質分子を外力により図の方向に曲げて結合部位を狭めてやれば、ATPへの親和性が高まる（結合の手ができやすくなる）ことになる。ADPが出て曲げが戻る所も、逆に考えると、曲げが戻るにつれADPへの親和性が低下することになる。これらの親和性変化が、F₁の働きにとって重要な役目を果たすと考えられる（下記）。

ATPの分解それ自体はほとんど回転を引き起こさない（仕事をしない）、と述べたが、それでは何のために分解が起きるのか。第一は、分子機械を初期状態にリセットするためである。ATPが結合して屈曲により仕事をした後は、ATPに対する親和性が非常に高く、これが離れてくれないと先に進めない。そこで、ADPと燐酸の2つに分けることにより、離れやすくしてやるのである（分かれることにより、それぞれを引きとめる「手」の数が減る）。

第二の理由として、ATPの分解の時にも実はほんの少し回転が起きる（分解と回転が共役している）と仮定すると、以下に述べるように、逆回転によるATPの合成をうまく説明できる。今のところ実験的証拠はほとんどないが、ここにF₁の巧妙な仕掛けがあるのではないかと想像している。

仕事をするための蛋白質の構造変化（どの向きにどれだけ曲がってどれだけ力を出すか）の仕掛けは、蛋白質分子の中にすでにプログラムされており、ATPは、そのプログラムに従って蛋白質を動かすだけである。このように考える理由は上記（xiii）で、ATPの類似物質が、組込みのプログラムを起動できるものとできないものの2種に分かれ、起動さえできれば出力は同じだからである。

以上、実験結果および実験結果からの比較的ストレートな類推をまとめた。これらに基づき、F₁の動作原理を説明できるモデルを作ることができる。直感的に分かりやすいように、回転軸であるγをカムに見立てた（図

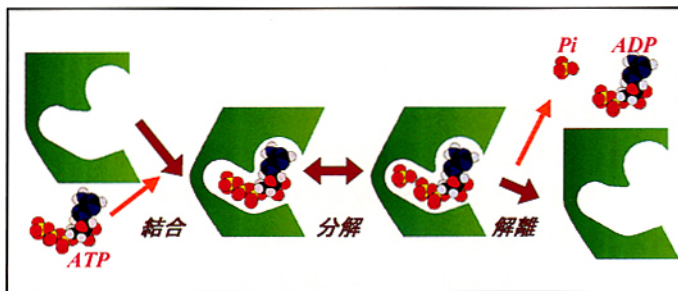


図3 ATP駆動の分子機械が働く仕掛け。蛋白質分子（緑）の構造変化（屈伸）がかぎ。

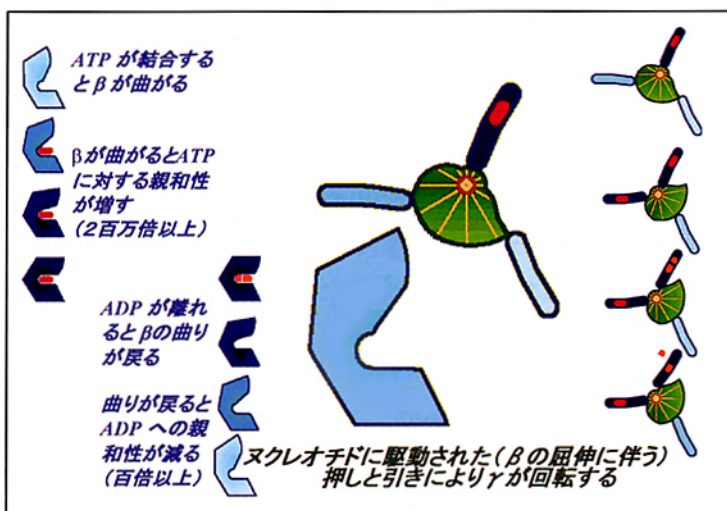


図4 F₁モーターの機械的モデル。中央上部は平面図で、カムの形状をしたγ（緑）を3方からβ（青）が押し引きする。左のβの側面図が下に描かれている。ATP（赤）が結合するとβが曲がってカムを押し、ADPと燐酸（橙）が解離するとβの曲げが戻ってカムを引っ張る。βの色の濃さは、ATPないしADPへの親和性の強さを表す。

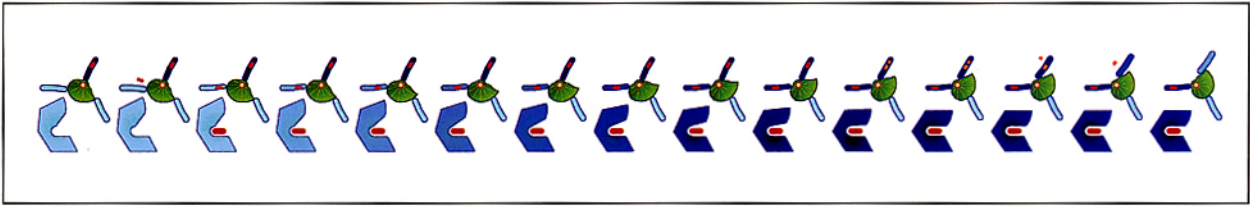


図5 120度の回転。左の β にATPが結合すると、その β の押しで約90度回転、次に右上の β から燐酸とADPが解離し、その β の引きでもう30度回る。

4)。120度ステップの間の一連の動作を図5に示す。

このモデルが、ちゃんと反時計回りに回るのは、次の仕掛けによる。一つは、2つの β が空いているとき(図4右上ないし図5左)、正しい方にATPが結合するようになっている。カム傾きのおかげで、2つの空き β のうち、左側の方がすでに少し曲がっており、こちらのほうがATPに対する親和性が高いのである。(たまに間違っただけにATPが結合すると、上記(viii)の逆向きのステップが起きる)。

もう一つの仕掛けは、 β のカムと接触する部分が、平面図において左右にわずかに首を捻るところにある。ATPを結合したときはカムに向かって左に、分解されると真っ直ぐ、ADPになると右に首を捻るのである。つまり、ATP分解に伴い、 γ を反時計回りに少しだけこじる(分解と回転の共役)。このおかげで、図4の右下の3駒のように、左の β の押しによる γ の回転にともない、右上の β の首が右に捻られてATPが分解され、一方左の β は右に首を捻れないから分解が起きない。正しい方のATPが分解されるのである。

このモデルで、 γ を力づくで時計回しすれば、ATPが合成される。図5の右端から始めると、右上の β がカムに引き込まれるにつれ、ADPに対する親和性が高まるので、溶液中からADPを結合する(首が右に捻れているのでATPは結合しない)。さらに時計回しを続けると、首が真っ直ぐになって燐酸を結合し、続いて首が左に捻れてATPが合成される。このATPはしっかりと結合して離れない。一方左の β に結合している、一つ前のステップで合成されたATPは、時計回しを続けるにつれて β の曲がり戻されるので、最終的に外に出ていく。

このモデルがどの程度現実を反映しているか、今後の実験次第であるが、ATPの分解・合成と正・逆回転という力学過程がどのように「共役」し得るのか、少なくとも作業仮説は示せたと思う。

体の中にはキネシンやミオシンと呼ばれるリニア分子モーターもあり、やはりATPがエネルギー源で、F₁同様、ATPの結合・解離に伴う構造変化を利用していると考えられる。リニア分子モーターの特徴は、キネシンなら微小管、ミオシンならアクチンという、蛋白質製のレールの上を一方方向に動いていくことである。キネシンの場合、2本の足を使って歩くように進むといわれており、足とレールの結合・解離が歩行メカニズムの鍵となる。早大グループにより、ATPを結合したキネシンは2本足、ADPだと1本足でレールに結合することが分かり、さらに2本の足のうち前足でなく後ろ足がちゃんと外れる仕掛け(方向性を保証する仕掛け)も分かりつつある。

我々の大目標は、光学顕微鏡の下で分子機械1個の働きを見つめ、必要なら操作を加えることにより、分子機械の動作原理の解明を行う、「一分子生理学」の展開である。上記以外にも、生体内でF₁を逆回しさせているF₀モーター、DNAの遺伝情報を読みとるリニアモーターであるRNA合成酵素、筋収縮の主役であるリニアモーターミオシン、などの研究を行ってきた。一分子を操作する手段としての光ピンセット、磁気ピンセット、温度パルス顕微鏡、などの開発も行ってきた。以下の文献リストを参照されたい。

わがままなチームリーダーに辛抱強くつきあってくださった、梅沢事務員・伊藤研究員をはじめとするチームメンバーの皆様、池袋事務所をはじめ事業団の方々に、心から感謝いたします。

主要文献リスト

- 1) Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S. & Kinosita, K. Jr. Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5646-5650 (1997).
- 2) Ishiwata, S., Miki, M., Shin, I., Funatsu, T., Yasuda, K. & dos Remedios, C.G. Inter-head distances in myosin attached to F-actin estimated by fluorescence energy transfer spectroscopy. *Biophys. J.* **73**, 895-904 (1997).
- 3) Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr. & Yoshida, M. F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps. *Cell* **93**, 1117-1124 (1998).
- 4) Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinosita, K. Jr. & Yoshida, M. Direct observation of the rotation of ϵ subunit in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**, 19375-19377 (1998).
- 5) Kinosita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H., Ishiwata, S. & Yoshida, M. F₁-ATPase: A rotary motor made of a single molecule. *Cell* **93**, 21-24 (1998).
- 6) Bald, D., Amano, T., Muneyuki, E., Pitard, B., Rigaud, J. L., Kruij, J., Hisabori, T., Yoshida, M. & Shibata, M. ATP synthesis by FoF₁-ATP synthase independent of noncatalytic nucleotide binding sites and insensitive to azide inhibition. *J. Biol. Chem.* **273**, 865-870 (1998).
- 7) Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M. & Ohkuma, S. V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* **273**, 20504-20510 (1998).
- 8) Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M. & Noji, H. Cross-linking of two beta subunits in the closed conformation in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 5701-5706 (1999).
- 9) Fujita, H. & Ishiwata, S. Spontaneous oscillatory contraction without regulatory proteins in actin filament-reconstituted fibers. *Biophys. J.* **75**, 1439-1445 (1998).
- 10) Fukuda, N., Fujita, H., Fujita, T. and Ishiwata, S. Regulatory roles of MgADP and calcium in tension development of skinned cardiac muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 909-921 (1998).
- 11) Adachi, K., Kinosita, K. Jr. & Ando, T. Single-fluorophore imaging with an unmodified epifluorescence microscope and conventional video camera. *J. Microscop.* **195**, 125-132 (1999).
- 12) Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K. & Kinosita, K. Jr. Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2048-2053 (1999).
- 13) Arai, Y., Yasuda, R., Akashi, K., Harada, Y., Miyata, H., Kinosita, K. Jr. & Itoh, H. Tying a molecular knot with optical tweezers. *Nature* **399**, 446-448 (1999).
- 14) Kato, H., Nishizaka, T., Iga, T., Kinosita, K. Jr. & Ishiwata, S. Imaging of thermal activation of actomyosin motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9602-9606 (1999).
- 15) Noji, H., Häslar, K., Junge, W., Kinosita, K. Jr., Yoshida, M. & Engelbrecht, S. Rotation of *Escherichia coli* F₁-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 597-599 (1999).
- 16) Kinosita, K. Jr. Real time imaging of rotating molecular machines. *FASEB J.* **13**, S201-S208 (1999).
- 17) Fukuda, N. & Ishiwata, S. Effects of pH on spontaneous tension oscillation in skinned bovine cardiac muscle. *Pflügers Arch.* **438**, 125-132 (1999).
- 18) Fujita, H. & Ishiwata, S. Tropomyosin modulates pH dependence of isometric tension. *Biophys. J.* **77**, 1540-1546 (1999).
- 19) Tsunoda, S. P., Muneyuki, E., Amano, T., Yoshida, M. & Noji, H. Cross-linking of two β subunits in the closed conformation in F₁-ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 5701-5706 (1999).
- 20) Bald, D., Muneyuki, E., Amano, T., Kruij, J., Hisabori, T. & Yoshida, M. The noncatalytic site-deficient $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex and FoF₁-ATP synthase can continuously catalyse ATP hydrolysis when Pi is present. *Eur. J. Biochem.* **262**, 563-568 (1999).
- 21) Yagi, H., Tozawa, K., Sekino, N., Iwabuchi, T., Yoshida, M. & Akutsu, H. Functional conformation changes in the TF₁-ATPase β subunit probed by 12 tyrosine residues. *Biophys. J.* **77**, 2175-2183 (1999).
- 22) Hisabori, T., Kondoh, A. & Yoshida, M. The γ subunit in chloroplast F₁-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* **463**, 35-38 (1999).
- 23) Amano, T., Matsui, T., Muneyuki, E., Noji, H., Hara, K., Yoshida, M. & Hisabori, T. The $\alpha_3\beta_3\gamma$ complex of F₁-

- ATPase from thermophilic *Bacillus PS3* can maintain steady state ATP hydrolysis activity depending on the number of non-catalytic sites. *Biochem. J.*, **343**, 135-138 (1999).
- 24) Nogi, T., Fukami, T. A., Ishida, M., Yoshida, M. & Miki, K. Purification, crystallization & preliminary crystallographic analysis of *Thermus thermophilus* V_1 -ATPase B subunit. *J. Struct. Biol.*, **127**, 79-82 (1999).
 - 25) Kato-Yamada, Y., Bald, D., Koike, M., Motohashi, K., Hisabori, T. & Yoshida, M. ϵ subunit, an endogenous inhibitor of bacterial F_1 -ATPase, also inhibits F_0F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **274**, 33991-33994 (1999).
 - 26) Masaike, T., Mitome, N., Noji, H., Muneyuki, E., Yasuda, R., Kinoshita, K. Jr. & Yoshida, M. Rotation of F_1 -ATPase and the hinge residues of the β subunit. *J. Exp. Biol.* **203**, 1-8 (2000).
 - 27) Kinoshita, K. Jr., Yasuda, R., Noji, H. & Adachi, K. A rotary molecular motor that can work at near 100% efficiency. *Philos. Trans. R. Sci. Lond. B.*, **355**, 473-490 (2000).
 - 28) Adachi, K., Yasuda, R., Noji, H., Itoh, H., Harada, Y., Yoshida, M. & Kinoshita, K. Jr. Stepping rotation of F_1 -ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7243-7247 (2000).
 - 29) Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinoshita, K. Jr. & Ishiwata, S. Characterization of single actomyosin rigor bonds: Load-dependence of lifetime and mechanical properties. *Biophys. J.* **79**, 962-974 (2000).
 - 30) Fukuda, N., Kajiwara, H., Ishiwata, S. & Kurihara, S. Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle. *Circ. Res.* **86**, e1-e6 (2000).
 - 31) Kawai, M., Kawaguchi, K., Saito, M. & Ishiwata, S. Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles. *Biophys. J.* **78**, 3112-3119 (2000).
 - 32) Yasuda, K., Okano, K. & Ishiwata, S. Focal extraction of surface-bound DNA from a microchip using photo-thermal denaturation. *Biotechniques* **28**, 1006-1011 (2000).
 - 33) Okano, K., Yasuda, K. & Ishiwata, S. Position-specific release of DNA from a chip by using photothermal denaturation. *Sensors & Actuators B* **64**, 88-94 (2000).
 - 34) Hara, K. Y., Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Kinoshita, K. Jr. & Yoshida, M. The role of the DELSEED motif of the β subunit in rotation of F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 14260-14263 (2000).
 - 35) Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Noji, H., Kinoshita, K. Jr., Yoshida, M. & Capaldi, A. C. Observations of rotation within the F_0F_1 -ATP synthase: deciding between rotation of F_0 subunit ring and artifact. *FEBS Lett.* **470**, 244-248 (2000).
 - 36) Bald, D., Noji, H., Stumpp, M.T., Yoshida, M. & Hisabori, T. ATPase activity of a highly stable $\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex of thermophilic F_1 can be regulated by the introduced regulatory region of γ subunit of chloroplast F_1 . *J. Biol. Chem.* **275**, 12757-12762 (2000).
 - 37) Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, K., Wakabayashi, T. & Yoshida, M. V-Type H^+ -ATPase/synthase from a Thermophilic Eubacterium, *Thermus Thermophilus*, Subunit structure and operon. *J. Biol. Chem.* **275**, 13955-13961 (2000).
 - 38) Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N. & Kinoshita, K. Jr. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* **409**, 113-115 (2001).
 - 39) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinoshita, K. Jr. & Itoh, H. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F_1 -ATPase. *Nature* **410**, 898-904 (2001).
 - 40) Kawaguchi, K. & Ishiwata, S. Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin. *Science* **291**, 667-669 (2001).
 - 41) Kawaguchi, K. & Ishiwata, S. Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy. *Cell Motil. Cytoskel.* **49**, 41-47 (2001).
 - 42) Noji, H., Yoshida, M. The rotary machine in the cell; ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* **276**, 1665-1668 (2001).
 - 43) Yoshida, M., Muneyuki, E. & Hisabori, T. ATP synthase - a marvelous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 669-677 (2001).
 - 44) Noji, H., Bald, D., Yasuda, R., Itoh, H., Yoshida, M. & Kinoshita, K. Jr. Purine but not pyrimidine nucleotides support rotation of F_1 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**, 25480-25486 (2001).