

タンパク質 1 分子とその中身を観察する顕微鏡技術

Watching Single Molecule under Optical Microscopes

西坂 崇之, 政池 知子

Takayuki Nishizaka and Tomoko Masaike

学習院大学理学部物理

要旨 1分子生物物理学は、たった1個のタンパク質を実験対象としてその性質を理解しようという研究分野である。可視光で検出できるプローブを用いてタンパク質を標識し、タンパク質自身の動きや反応のダイナミクスを、特徴的な照明方法や高感度カメラを駆使して顕微鏡下で観察する。活性を保ったままの状態、1分子の情報を画像化するというのが最大の特徴である。高濃度のタンパク質を用いた分光学的な手法では検出できない、平均化によって見えなくなるような中間状態を検出できるというポテンシャルを有しており、この方法論によって特に分子モーターの研究は飛躍的に進んできた。著者らのグループでは、主に蛍光顕微鏡の開発を進め、これまで困難とされてきた1分子の化学・力学反応観察に新しい道筋を開いた。また最近になって、回転分子モーターである F_1 -ATPase の局所的な構造変化の検出に成功した。X線構造解析では見えていなかった新しい構造を発見したのである。

キーワード：モーター分子、1分子生物物理学、 F_1 -ATPase、全反射型蛍光顕微鏡

1. はじめに

水中における1個の蛍光色素、1個のタンパク質を扱うという新しいアイデアと手法が提案されて以来¹⁾、早くも15年の月日が経とうとしている。今や1分子生物物理学（あるいは「生きたまま、活性を持ったままのタンパク質の姿を扱う」という思いを込めて「1分子生理学」を標榜する研究者もいる）は、1つの研究分野として確立されたと言えるだろう。そしてその新規性や重要性は未だに衰えず、新しい方向性も打ち出されている。1つは細胞生物学との融合であり、細胞内での複雑なカスケードを少しでも単純な形で理解し、そして本質を抽出するという新しい手段として注目されている²⁾。もう1つは意外なことに、社会貢献に値するテクノロジーの1つとしてであり、例えば次世代DNAシーケンサーの基本原則に用いられるという画期的な研究も進んできている³⁾。

本解説では、こうした新しい展開に至る少し手前、言わば90年代から現在までのトラディショナルな1分子生物物理学に焦点を絞って、2-4, 6節で背景を紹介したい。精製してきたタンパク質を、1分子のレベルで理解しようとして続けられてきた数々の研究は、色々な意味で1つの到達点に達していると思う。それに向け活躍してきたのは、光ピンセットや全反射型蛍光顕微鏡といった、タンパク質1個を操作/可視化する技術であった。究極のねらいは、タンパク質が動

作する瞬間を、そのまま画像化するという1点につける。5, 7節で、この切り口からの著者らの研究について述べたい。

2. タンパク質は正確に動くのか—1個のモーターの動きをとらえた顕微鏡

ATP（アデノシン3リン酸）をエネルギー源として動作する分子モーターは、今や教科書的にも、時計のように正確に動く分子機械であることが受け入れられている。しかしタンパク質の構造を、熱揺らぎのもとで遷移するポテンシャルとして考えた場合、例えばエネルギー差のある2つの構造状態を確率的に行ったり来たりしているはずのタンパク質に対して、決定論的に状態を遷移する瞬間がある（その瞬間をまざまざと観測できる）はずだ、と断言してしまっても良いのだろうか。もちろん、酵素のメカニズムに関するモデルを教科書に書く場合には、古くから構造とカップルした化学状態の遷移が **explicit** に書かれてきた。しかしそれは、確率的に滞在期間が長い状態があることを模式的に表すただのマンガであり、1個のタンパク質分子が機械のように動作することを保証するものではなかったはずである。タンパク質を、文字通り **molecular machine** として扱って良いというアイデアを担保したのは、たった1個の分子モーターが正確に動くことをとらえた光学顕微鏡による研究であったといえるだろう。

1985年に、Ronald D. Valeを筆頭著者とするMichael P. Sheetzらの研究により、新しい分子モーターとして **kinesin**（以下キネシン）が発見された⁴⁾。それまでに研究されてきたミオシンやダイニンとは異なり、このモーターは、たった1個の分子でありながら微小管から解離せずに1方向に進むという性質が見いだされ⁵⁾、その尺度を表す言葉として

〒171-8588 東京都豊島区目白1-5-1

TEL: 03-3986-0221

E-mail: takayuki.nishizaka@gakushuin.ac.jp

2010年7月17日受付

processivity という概念が定着した。分子モーターが基質フィラメントと相互作用する際、1個の分子がすぐに解離してしまふ場合には processivity が低い、逆に何度も連続して繰り返し化学反応を行える場合には processivity が高いと表現する。Processivity の高いキネシン（後に conventional kinesin-1 と分類される）の運動は、一見すると滑らかだが、1個の分子が運動している以上、その動きの中には最小の単位があることが期待される。そして1993年、Steven Block のグループがその最小単位が 8 nm（ナノメートル）であることを示した⁶⁾。微小管の繰り返し構造を、1個の分子がきっちりとしたりながらステップ状の運動を行うということが、直接、顕微鏡下で検出されたのである。

この検出を可能にしたのは2つの技術であった。1つは熱揺らぎを抑えるための光ピンセットである。これはモーターの力測定や顕微鏡操作の役割も担う。モーター自体の動きは、可視光で検出できる大きさの目印（プローブ、例えば 200 nm–1 μm のポリスチレンビーズ）を通じて見ることができる。しかし分子1個と連結したプローブは必ずバネ成分を含み、このバネの揺れは、モーターのステップの動きをはるかに超えてしまう。本来の動きがノイズにかき消されてしまうわけである。バネを引っ張り、モーターの動きを直接プローブの動きに反映させる役割として、光ピンセットは理想的なツールであった。筆者も後に光ピンセットで1分子の性質を調べる研究を展開し^{7,8)}、細胞運動への応用も試みている⁹⁾。

もう1つは、8 nm という顕微鏡の分解能より小さい変位を検出する技術であった。ビデオ画像からナノメートルの動きが検出されることは既に分かっており¹⁰⁾、フォトダイオードによる位置検出によって時間分解能も上げることも可能である。この技術は十二分に成熟し、今や DNA 上の RNA ポリメラーゼの動きや¹¹⁾、分子モーターによる3次元の運動を直接検出することさえ可能になっている¹²⁾。

キネシンのステップ検出がサイエンスの世界にもたらしたものは、分子モーターのメカニズムに関する1つの知見という枠をはるかに超えていた。1つには、タンパク質を1分子で研究することが可能なのだという新しいドグマである。もちろん1分子といえども、頑丈に働く robustness を持つ生体分子でなくてはならないという前提は必要だが、それでも条件さえ整えば、試験管の中で1兆個を単位に行った研究がたった1個に集約できるという可能性を我々に示してくれた。そしてもう1つは、タンパク質は確かに機械のように動く（少なくとも人間が検出できる精度で1個の分子が動き得る）というのだという、確かな担保を酵素学に与えてくれた。

「機械」をどう定義するかは科学者によって様々だが、その「エネルギーの形態を変化する仕組みを持つ」というのが1つの基準だろう。例えば水車は単純な仕掛けだが、水が落下する時に失う位置エネルギーを回転という運動エネルギーに変換する立派な機械である。車軸やはね車が、機械を動かすための「装置」としての実体である。多くの酵素は化

学反応を触媒する役割を担い、その化学エネルギーの一部あるいは大部分を別の形のエネルギーに変換して特別な機能を実現する。分子モーターの場合はそこがたいへん分かりやすく、「方向性を持った運動」という力学エネルギーを生み出す「機械」としてこの酵素を考えることができる。

さてこの「機械」の仕組みを考えるに当たって、例えば連続的なポテンシャルを質点が推移するといった実体を持たない（あるいはそのモデルを満たささえすれば実体を考える必要がない）議論に留まらず、「装置」としての実体を与えて良いのだと宣言したのが、キネシンのステップ研究がもたらしたものの本質であったと思う。この研究によって、特に分子モーターの分野では、1個の動態を直接観るという方向に大きな舵が切られた。ミオシンやダイニンにおいても1分子レベルでの研究が盛んに行われた。そしてその到達点の1つが、後述する、1分子でできた回転分子モーターである F₁-ATPase である。

3. 1回の化学反応を視た顕微鏡

分子モーターのステップ状の変位、すなわち、モーターという素子の単位出力を測定する試みとは別に、入力に注目する研究が阪大の柳田敏雄先生のグループによって進められた。タンパク質への入力の最小単位というのは、基質1個の1回の分解に他ならない。ガラスに固定したミオシン分子に対する ATP の結合・解離を、蛍光性基質の輝点として検出する実験系が構築されたのである¹⁾。この研究による、“1分子の化学反応が直接目で見える”というメッセージは強烈であった。教科書に書かれている、1個の酵素による1回の酵素反応という説明図が、そのまま実験手法になっているのである。これはマンガだ、さすがにマンガ好きの日本人の仕事だ、と失礼ながら強く思った。

ここで活躍したのは全反射型顕微鏡（total internal reflection fluorescence microscope, TIRFM）である。水溶性タンパク質が水中にある時は、屈折率が 1.33 である水の中に浮かんでいることになる。これに対してガラス面にタンパク質を固定した場合には、屈折率が 1.53 と 1.33 の境界に位置することになる。この境界に、平行度の保たれたレーザー光を臨界角度（全反射の起きる角度； $\theta = \arcsin(1.33/1.53) = 60.4^\circ$ ）以上の角度で入射した場合、その界面には evanescent field（以下エバネッセント場）が発生する。これは特殊な近接場であり、通常光のように光が伝搬することはない。強度が境界面に垂直に指数関数的に減少するので、言わば、うすい光の膜が境界面に発生することになる。

タンパク質と結合していない基質は、水中を素早くブラウン運動するため、見ることはできない。しかも励起場は光の膜の範囲にしか無いために、背景光としてのノイズはとてつもなく低く抑えられる。こういった状況で、1分子の基質が1個のタンパク質に結合した瞬間にのみ、高感度カメラでシグナルが検出されるのである。

今でこそ、背景光を抑えた状態であれば蛍光色素1分子の

検出が可能だということは広く認められているが、さきがけの仕事においてはそれを証明するためにさまざまな困難が伴った。船津高志先生は、電子顕微鏡と蛍光顕微鏡を対応することで確かにタンパク質1分子のシグナルであることを示している¹⁾、また現在ニコン社の佐瀬一郎氏は、アクチン繊維の重合の性質から1分子の輝度の見積もりを行った¹³⁾。いずれも15年前の1分子開闢こんにちの時代であるが、こういった基礎的な検証から、今日の1分子研究の土台が築かれたことは忘れてはならない。

後述するように、筆者らのグループでは蛍光性基質を観察する手法を回転分子モーターに応用している。従来の一方向からの全反射照明では、色素の励起効率がエバネッセント場の偏光に大きく依存してしまう。そこで全方位からのレーザー照射を実現し(図1B)、色素の角度に依らずになるべく均一な1分子からの信号を取り出すシステムを構築している。

4. 世界最小の回転モーターを発見した蛍光顕微鏡

ミトコンドリアの内膜や葉緑体のチラコイド膜に局在するATP合成酵素は、膜タンパクであるF₀部分と、触媒部位を

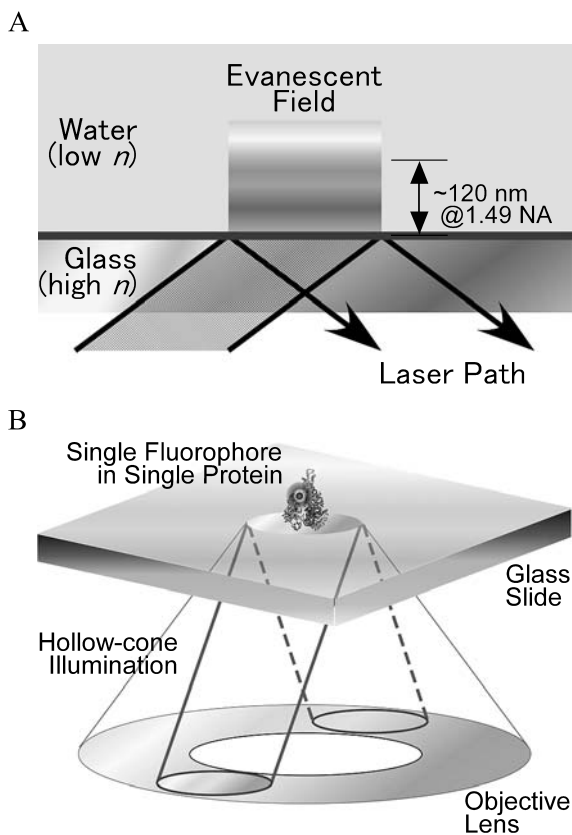


図1 A. TIRFMの模式図。屈折率の高い媒質と低い媒質(ここではガラスと水)の境界面において、平行度の保たれたレーザーを全反射させると、境界面にエバネッセント場が発生する。開口数(numerical aperture, NA)が1.49の場合、約120 nmの距離で $1/e^2$ に減衰する。B. エバネッセント場により1分子を観察する手法の模式図。ガラス面に固定されたタンパク質に蛍光性基質が結合している、輝点として観察される。水中の色素は速いブラウン運動のために基点として見えない。

持つ可溶性のF₁部分からなる。このF₁部分単独では、合成ではなくATPを加水分解するという性質を持つため、F₁-ATPaseと呼ばれる。これが回転モーターではないかという仮説が、1994年のX線結晶構造解析¹⁴⁾により、にわかには現実味を帯びた。単純なコイルドコイル構造を成している~10 Åの軸状の構造が、3つの触媒サイトに取り囲まれていたのである(図2A)。しかも、それぞれのサイトに結合しているヌクレオチドはATP状態、加水分解したADP状態、空の状態と解釈することができ、あたかも連続的な反応を3つのサイトが受け持っているスナップショットのように見えたのである。

かねてよりATP合成酵素を研究していた、当時東工大の吉田賢右教授(現在、京都産業大学)のグループの中に、F₁-ATPaseが回転モーターであることを証明しようというアイデアを持った学生がいた。現在、東大化学科教授の野地博行氏である。佐瀬一郎氏は、偏光を用いた顕微鏡によってアクチン繊維の回転運動を定量的に評価する研究¹⁵⁾を進めていたが、こういった1分子の手法によってF₁-ATPaseの回転が画像化できると考えたのである。そしてより単純な手法として、蛍光標識した数μmのアクチン繊維を回転軸に結合させた試料によって、太さがわずか2 nmの軸の回転はビデオテープに撮影された¹⁶⁾。

ところでタンパク質の世界は我々の直感とは異なり、大きさのスケールは意味を持たない(運動を支配するのは質量であるという人間の感覚があり、そして往々にして大きさの違いが質量の違いを反映するため、大きさのスケールでものを考えてしまうのである)。レイノルズ数が極端に小さい系で速度を決定するのは、運動に関連するエネルギーと粘性抵抗である。たいへんな偶然であったが、F₁-ATPaseの場合、1個のATP分解のエネルギーから得られるトルクは、適当な長さのアクチン繊維を秒のオーダーで回転させる粘性抵抗と一致したのである! キネシンのステップの研究でも同じだが、精密な装置だけで決定的な研究が成功するわけではない。その装置に見事にマッチングしたサンプルに恵まれた瞬間に、1分子の研究は成就する。F₁-ATPaseもその格好の例だったのである。世界最小の回転分子モーターの発見は、その年の内に関連する研究者にノーベル賞をもたらした。残念なことに日本の研究者は含まれなかったが、以後、F₁-ATPaseモーターに関する研究は、回転観察について日本の研究グループの独走態勢のまま今日に至っている。

5. F₁の動作原理を可視化した多画像顕微鏡

3つの触媒サイトを持つF₁-ATPaseは、こういった動作原理で軸を1方向に回転させるのだろうか。タンパク質科学や生物物理学では、様々な階層での様々な疑問に答えがなくてはならないわけだが、そもそもの重要な問いかけとして、幾つのヌクレオチドが回転に関与しているのかという謎があった。

生体内のエネルギー通貨であるATPは、酵素による加水

分解によってADP(アデノシン2リン酸)とPi(無機リン酸)となり、そして酵素から放出される。つまり酵素の化学状態としては、空の状態・ATPを結合した状態・分解産物を結合した状態の3状態(もし分解産物を順番に放出するのであれば、2つの分解産物のうち1つを放出したもう1状態)が存在する。これらのどれかの化学状態に対応する構造が、分子モーターのステップ状の動きとカップルするわけである。例えば骨格筋のミオシンの場合、加水分解後にまずPiが放出され、この放出が大きな構造変化に対応することが明らかにになっている。

F₁-ATPaseの場合、ステップ間の滞在時間の解析から、1回のステップ状の回転(120°の回転)に正味1個のATPが消費されていることが強く示唆されていた¹⁷⁾。しかし触媒サイトは3つあるので、1回のステップですべての化学反応が終了する必要はない。むしろ連続的な反応を1方向に行うためには、3つのサイトで反応を分け合った方が、回転の方向性が生まれるので都合が良いように思える。2つのサイトで1個の反応が完了するモデルはbi-site mode、3つのサイトのモデルはtri-site modeと呼ばれ、回転メカニズムの基本的な部分であるだけに重要な議論の1つとなっていた。bi-site modeでは基本的に1個のヌクレオチド(ATPあるいはADP)が酵素に結合しており、ここに新しくもう1つの基質が結合すると、もとあったADPが放出されて反応が完了する。つまり、分子あたりの基質の結合数は1→2→1となる。これに対し、tri-site modeでは2→3→2となる。

F₁-ATPaseの回転は、シリンダーをガラスに結合し、軸の回転をプローブで観察するため、分子自体はガラス面に固定されたままである。ここにミオシンで活躍した、船津先生らの化学反応が見える実験系を適用すれば、回転に関与する基質の個数を直接数えることができるはずである。筆者らは90年代の終わり頃よりこの研究に着手した。実験当初は蛍光性の基質だけを用いて回転を観察していたが、無標識のATPを加え、連続的な回転の中に蛍光性基質1回の反応を加えるというアプローチを試みた(図2B)。すると1つの基質が結合している間に、回転軸は2つの角度を取る様子が観察されたのである(図2C)。ビーズの連続写真(上の列)と蛍光の連続写真(下の列)を対応させると分かるように、蛍光性ATPが結合した瞬間(①)のあと、そのATPが外れる(③)前に、無標識のATPの結合によるもう1つのステップ(②)が観察されたのである。この結果は、あるATPが結合し、それがADPとして外れるためにはさらに2つのATPが結合しなくてはならない動作原理を強く示唆する。F₁-ATPaseはtri-site modeで回転することが示された(図2D上)。またこの観察にはただのTIRFMではなく、偏光を時間と共に回転させる仕掛けも加わっており、蛍光性ATPがどの触媒サイトに結合したかを決定することもできた。回転軸の方向と、基質を新しく結合したサイトの方向には見事な相関があり、「触媒サイトの化学状態が回転軸の方向を決定する」という、回転のメカニズムのもっとも基本的な部分を

明らかにすることができた。

詳しくは原著¹⁸⁾を参照されたいが、この研究には思わぬおまけがあった。私が研究に用いたF₁-ATPaseの変異体には、測定前には予想しない性質があり、蛍光性ATPを基質にした場合にだけ酵素の中間状態が長くなったのである。この特殊な性質のために、どの触媒サイトの反応が中間状態として働いているかを明らかにすることができた(図2D下)。120°の基本回転ステップの中には、80°と40°のサブステップがあり、それぞれに寄与しているサイトの違いも明らかになったのである。40°サブステップがリン酸放出によって駆動されることも引き続き示され¹⁹⁾、F₁-ATPaseは、中間状態まで含めてそれぞれの化学状態が見事に運動に連動している分子モーターであることが分かってきた。

6. 「同時測定」の歴史

先の3節と5節で解説した、力学反応(分子モーターのステップ状の動き)と化学反応(蛍光性の基質の結合と解離)を画像化する実験は、複数の異なる現象を対応させることができることから、分野の狭い領域では「同時測定」というjargonで呼ばれてきた。後述するように、例えばモーターの動作がタイトカールスかといった議論に決着をつけるポテンシャルを有するため、重要な情報を与えてくれる実験手法と考えられている。

最初の同時測定は98年に報告され、アクチンと骨格筋ミオシン(myosin-II)の1つの機能部位(ミオシン頭部)の相互作用を観察したものであった²⁰⁾。myosin-II 1分子は、共同性を持たない2つの機能部位と重合のための領域から成るが、酵素処理によって、1つの機能部位だけを精製することができる。光ピンセットによって水中に張られたアクチンフィラメントが、ミオシン頭部と相互作用する瞬間に何が起こるかが調べられた。

この研究手法、および結果が与える重要性はとてもインパクトのあるものであったため、たくさんのモータータンパクについて同時測定の研究が試みられたようである。しかし実際に論文のレベルまで到達したものは、これまでに4報しか報告されていない^{18~21)}。どれも*Nature*やその姉妹紙、*Cell*といった論文誌となっているが、興味深いことに、すべて日本人が第1著者である。1つだけでも難しい1分子レベルの実験を、2つ組み合わせるといふことにはたいへんな苦労が伴う。サイエンスそのものの話題ではないが、綿密な技術開発、そして慎重かつ怒濤のデータ解析というのは、やはり日本人が得意とする研究姿勢であり、日本のお家芸だと改めて思う。

7. タンパク質の中の動きをとらえた顕微鏡

ナノメートルの動きを顕微鏡下で追いかけるというトラッキングの概念より、1分子全体の動きやサブユニットの回転を追うことができるようになった。しかしタンパク質の内部の、例えば機能に関連した小さな動きは、さらに小さくオン

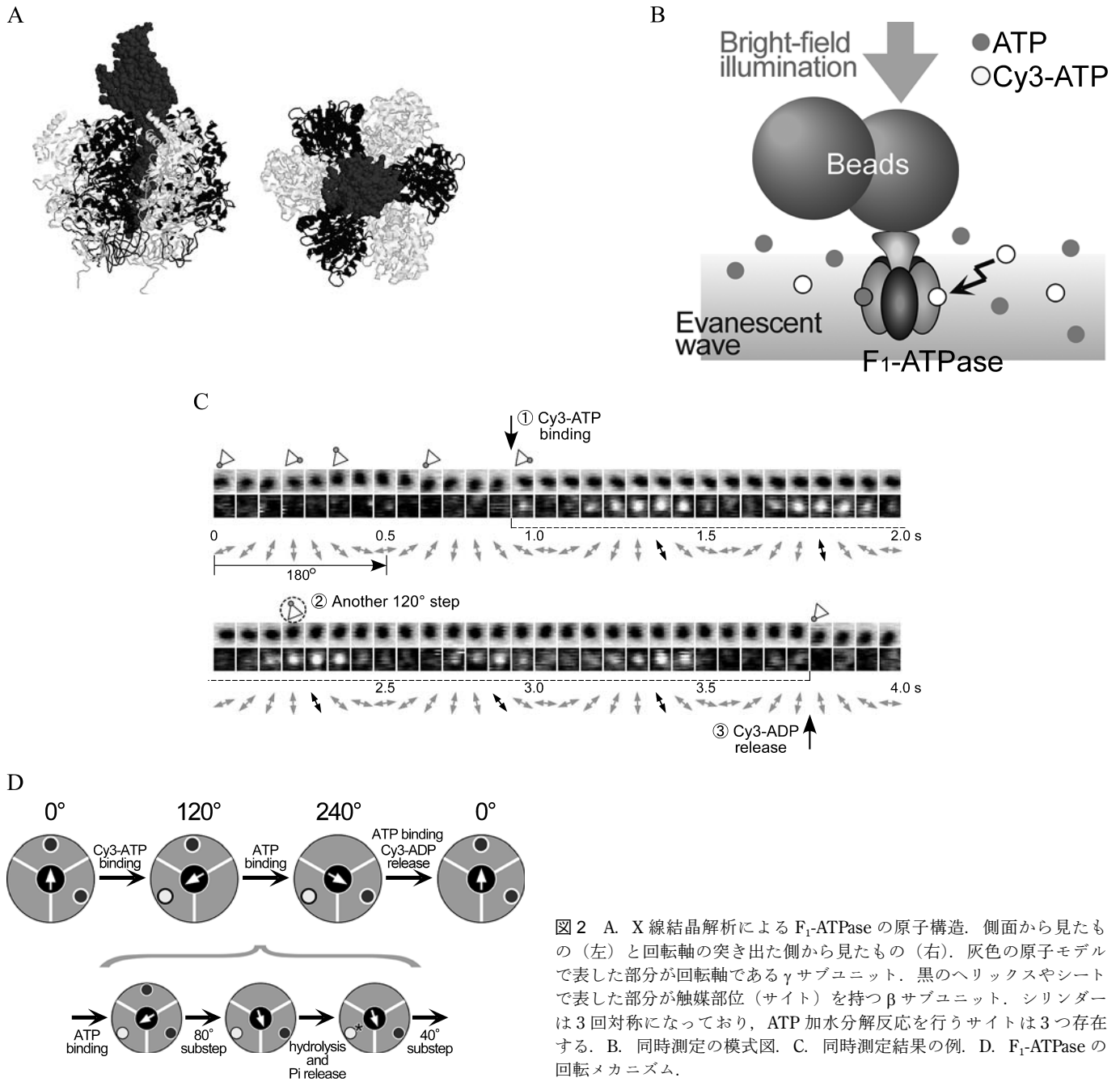


図2 A. X線結晶解析によるF₁-ATPaseの原子構造. 側面から見たもの(左)と回転軸の突き出た側から見たもの(右). 灰色の原子モデルで表した部分が回転軸であるγサブユニット. 黒のヘリックスやシートで表した部分が触媒部位(サイト)を持つβサブユニット. シリンダーは3回対称になっており, ATP加水分解反応を行うサイトは3つ存在する. B. 同時測定の様式図. C. 同時測定結果の例. D. F₁-ATPaseの回転メカニズム.

グストロームのレベルである. どうすれば追いかけることができるだろうか. 1分子FRETの技術によって距離の変化はある程度検出できるようになったが, 構造変化を量的に見積もるためには, まだまだ技術的な困難がある. 筆者らのグループは, 励起に用いる偏光を時間と共に変調させる光学系の開発を行った(図3A, B). 色素の励起効率, 吸収遷移モーメントに対する相対的な励起光の偏向の角度に依存するので, 強度の明滅の位相から, 色素の向きを高い精度で決定することができる. しかもベースはTIRFMであるため, 背景光を最小限に抑えることができる.

この実験系を, 4, 5節で紹介したF₁-ATPaseについて, その構造変化の検出に応用した²²⁾. 構造変化が大きいと予想

されるC末端付近に蛍光色素をラベルし, 回転軸の位置に対応して, 触媒サブユニットのドメイン角度をマッピングしたのである(図3C). ここで観察しているのは, たった1つの触媒サブユニットの構造変化だが, 連続的な回転を行うモーターにおいては, 位相を1ステップ(120°ぶん)ずらせば隣の構造が予想できる. つまり, ある瞬間の3つのサブユニットの全体構造を再構成できるのである.

以上の考察から, 2つの異なるシリンダーの構造があることが分かった(図3D). 興味深いことに, 1つの組み合わせ(CCO)構造は, これまでに解かれてきたX線結晶構造解析の結果に一致するが, CC'Oに相当する構造は報告されていない. 我々の実験では, 1分子を観察しながら回転軸の角度

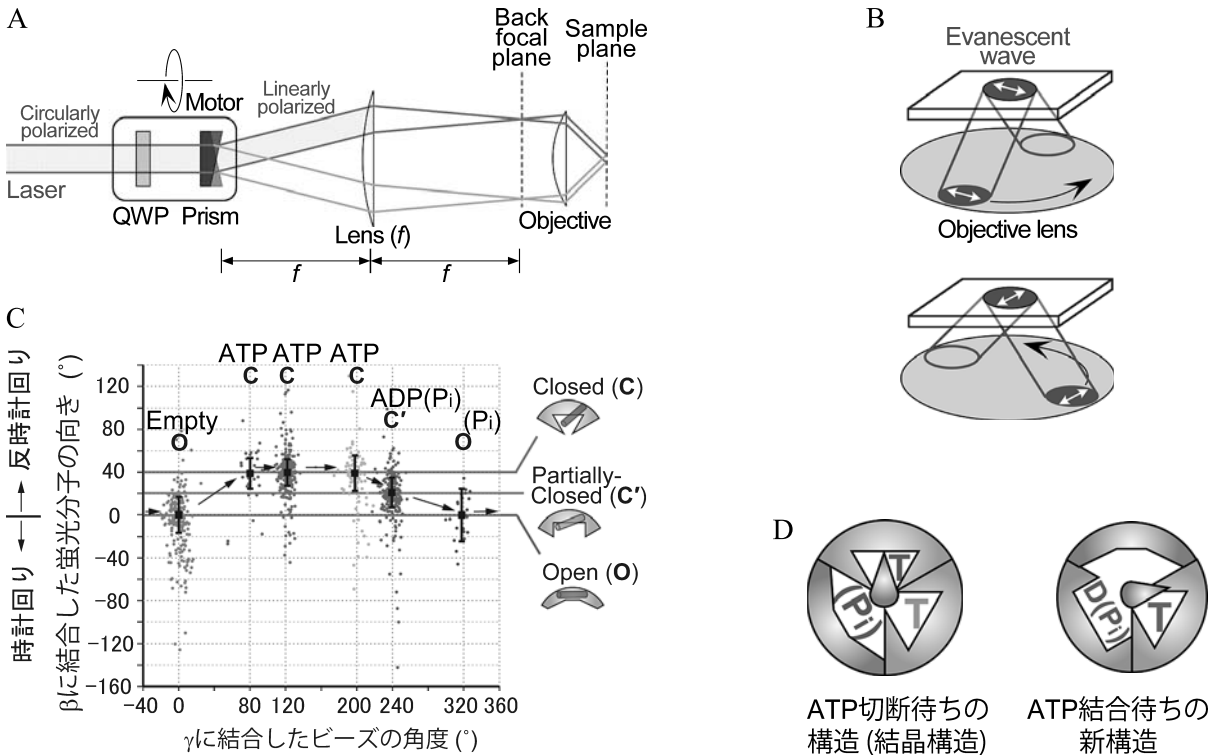


図3 A. 筆者（西坂）の発明による偏光変調 TIRFM の原理図. B. エバネッセント場の偏光が時間と共に変化する様子を表した模式図. C. 測定の実データの例²²⁾. 軸の向きと触媒サイトの構造が同時にモニターできている. 1分子の明滅の位相を定量化することで, 1分子の中の1本の α ヘリックスの構造変化が検出できる. D. これまでの結晶構造で提案されていた構造(左, CCO)と筆者らの発見した新しい構造(右, CC'O)の模式図²²⁾.

も同時に見ているために, それぞれの触媒サブユニットがどのような化学状態になっているかも確定できる. 従って, これまで議論の対象となってきた X 線結晶構造は, 海外のグループで広く信じられていた「分解産物を放出して基質結合を待っている」構造ではなく, 「反応途中の中間状態」であることが明らかになったのである. 1分子の研究からタンパク質の新しい構造が提案された例はこれまでになく, 本研究は, 1分子レベルの構造生物学に先鞭をつけた研究であると考えている.

8. 1分子測定の限界

前述した1回の化学反応を観察する実験が試みられた背景として, モーターを機械として考えた場合, 入力(ATPの加水分解エネルギー)と出力(ステップ状の変位)にどのような対応があるのだろうかという問題提起があった. 1つには, タンパク質の特定の構造には特定の化学状態が対応し, その対応は厳密に1対1で決まっているという考え方. もう1つは, タンパク質にはある程度のデカップリングが許される仕組みが内在しており, その柔軟性がタンパク質の動作メカニズムの本質的な部分ではないかという考え方である. 研究者によって定義は異なると思うが, 前者をタイトカップリング, 後者をルースカップリングと表現することができる. ミオシンの筋原繊維レベルの研究で, 分子1個によるATPの運動が分子のサイズを超えると見積もられた研究があっ

た²³⁾ため, ステップサイズ論争としてこの2つのアイデアは対立した. ATPの加水分解が画像化され, なおかつその時のミオシンによる変位が計測できれば, この論争には決着がつくはずであった.

しかしながら, この2つの仮説を1分子の系で決着するという試みにはそもそもの矛盾があったと思う. というのは, 仮に特定の構造に対する化学状態が平均的に決まっていたとしても, マクロな熱揺らぎの下にあるミクロな素子の振る舞いを1分子として直接データにするわけだから, 確率的にタイトでは説明できない振る舞いが観測されるのは当たり前である. だからこそ, 測定がぎりぎりのS/Nで行われる場合, どのノイズレベルであればタイトかルースかが判断できるのかという議論が, そもそも前提として必要なはずである. これが徹底的に行わなければ, データから結論を導き出すことができるわけがない. 極論すれば, どのような測定でもルースを示唆する測定点は必ず得られるはずで, そこに注目すればルースが結論となるし, そのデータをエラーとして切り捨てれば, メカニズムの本質としてのタイトに行き着くわけである. 筆者の理解では, ルースを証明した, つまりある測定をエラーとして切り捨てることのできずなおかつそれが機能の本質であることを証明した論文は, まだ世に出ていない. 熱揺らぎによって大きく曲がる柔らかい構造がモーターの中にあって, それが重要な意味を持つ仕組みも特殊なミオシンについて分かっている²⁴⁾が, これは単に構造変化の分布の増

加を熱揺動が担っているだけである。こと分子モーターのメカニズムについては、世界的にルースカップリングという概念は受け入れられていないというのが現状である。

9. 展望

分子モーターの動作原理を明らかにするため、1分子を研究対象にできるさまざまな特徴的な技術が磨かれ、そして次々と様々な形で開花している。モーターの動きとエネルギーの入力をまざまざと可視化する、同時測定技術は、この分野における1つのランドマークとも言えるだろう。こういった技術は、1分子レベルでの酵素反応を明らかにするアプローチとして注目され、いくつかはたいへん重要な研究や応用へと発展している。今後はタンパク合成の可視化²⁵⁾や、より複雑な構造を持つオリゴマー状タンパク、膜タンパク質へと応用され、生命科学の中の1分野としてますます存在感を増していこう。これからの展開に注目されたい。

文 献

- 1) Funatsu, T., *et al.*: *Nature*, **374**, 555–559 (1995)
- 2) Morimatsu, M., *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 18013–18018 (2007)
- 3) Eid, J., *et al.*: *Science*, **323**, 133–138 (2009)
- 4) Vale, R.D., Reese, T.S. and Sheetz, M.P.: *Cell*, **42**, 39–50 (1985)
- 5) Howard, J., Hudspeth, A.J. and Vale, R.D.: *Nature*, **342**, 154–158 (1989)
- 6) Svoboda, K., *et al.*: *Nature*, **365**, 721–727 (1993)
- 7) Nishizaka, T., *et al.*: *Nature*, **377**, 251–254 (1995)
- 8) Nishizaka, T., *et al.*: *Biophys. J.*, **79**, 962–974 (2000)
- 9) Nishizaka, T., Shi, Q. and Sheetz, M.P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 692–697 (2000)
- 10) Gelles, J., Schnapp, B.J. and Sheetz, M.P.: *Nature*, **331**, 450–453 (1988)
- 11) Woodside, M.T., *et al.*: *Science*, **314**, 1001–1004 (2006)
- 12) Yajima, J., Mizutani, K. and Nishizaka, T.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1119–1121 (2008)
- 13) Sase, I., *et al.*: *Biophys. J.*, **69**, 323–328 (1995)
- 14) Abrahams, J.P., *et al.*: *Nature*, **370**, 621–628 (1994)
- 15) Sase, I., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5646–5650 (1997)
- 16) Noji, H., *et al.*: *Nature*, **386**, 299–302 (1997)
- 17) Yasuda, R., *et al.*: *Cell*, **93**, 1117–1124 (1998)
- 18) Nishizaka, T., *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 142–148 (2004)
- 19) Adachi, K., *et al.*: *Cell*, **130**, 309–321 (2007)
- 20) Ishijima, A., *et al.*: *Cell*, **92**, 161–171 (1998)
- 21) Sakamoto, T., *et al.*: *Nature*, **455**, 128–132 (2008)
- 22) Masaike, T., *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1326–1333 (2008)
- 23) Yanagida, T., Arata, T. and Oosawa, F.: *Nature*, **316**, 366–369 (1985)
- 24) Shiroguchi, K. and Kinosita, K., Jr.: *Science*, **316**, 1208–1212 (2007)
- 25) Uemura, S., *et al.*: *Nature*, **464**, 1012–1017 (2010)