

1 分子計測の躍進

石渡 信一 (早稲田大学理工学術院 ishiwata@waseda.jp)

はじめに

生物とは何か、生きているとはどういう状態か、生物と非生物の構造はどのように違うのか、これらの素朴な問いに答えたい。ではどのように答えるか。我々生物物理学を標榜するものは、生物を作る物質の特性について数理的に表現し、物理化学の言葉で理解したい、それを上位の階層へと積み上げることによって、物理学・化学の原理に則ったものとして、生き物の状態を表現し理解したい。

そこで我々は、生き物といえども地球上に存在する“もの”の集合体であるという大前提のもと、“もの”の集合体のあり方の中に、生物らしさの本質を見出そうとしている。現在地球上に生息する生き物は、C, O, H, N, Sといった比較的軽い元素からでき、 Ca^{2+} , Mg^{2+} などの海水の成分により制御されている。しかしそれらが組み上がった物質・組織は、無機物の結晶構造のような規則性はなく、生物に固有のものであり、様々な生物機能を担っている。多様な生物機能には、それぞれ固有の分子構造が用意されている。我々は、これらを“生物分子機械”^{1,2)}あるいは“バイオナノマシン”と呼ぶ。生物分子機械は、化学反応を制御する酵素であったり、高次の組織を作り上げる支柱であったり、さらに適宜自発的に生成・消滅(物質代謝)を繰り返す動的な分子集合体などである。

生物分子機械の構造と機能の研究は長年にわたって、溶液系の分光学的研究にゆだねられてきた。それは何兆個にも及ぶ分子の平均的な構造と機能の研究であった。その間、次世代をにらむ研究者たちは、1分子レベルでの構造と機能の解析をしたいという願望を抱いてきた。³⁻⁵⁾それを生物物理学の主要課題にしようという機運は、我が国の場合、1970年代後半から始まり、熱心な議論が行われた。とくに、生物運動を担うタンパク質分子モーターの構造と機能を解明するためには、1分子解析が必須だという認識が広まった。アクチンフィラメントや微小管と呼ばれる“細胞骨格”の上を動く分子モーター(アクチンフィラメントにはミオシン、微小管にはキネシンやダイニン)の動きを捉える必要がある。多数個の平均値ではわからない動態(機能している現場)を、長距離長時間にわたって追跡したい。では、それを実現するにはどうしたら良いか。容易なことではないが、すでに実現可能性の一端が見え始めていた。具体的な1分子解析が実現したのは、1本の遺伝子DNA(太さ約2 nm, 長さおよそ数 μm)やアクチンフィラメント(太さ約7 nm, 長さおよそ数 μm 以上)の可視化に成功した光学顕微鏡法(蛍光顕微鏡法)の開発に始まり、直径1 μm のブラ

スチックビーズを捕捉し、pNオーダーの力を計測できる光ピンセット法(2018年ノーベル物理学賞)の開発や、酵素の基質となるATPなどの蛍光性分子の創成により、1分子を蛍光像として捉え操作する手法の開発など、1分子解析のための様々な蛍光顕微鏡法が開発されたことによる。生物学に新しい領域を切り拓いた1分子生物学と、それを支える1分子計測法は、生物分子機械の研究とともに発展してきたと言える。³⁻⁵⁾

1980年代までの半世紀にわたる生物運動の研究は、筋収縮・制御機構の研究を中心に展開され、「筋フィラメントの滑り運動機構」を土台に発展した。しかし、筋フィラメント(アクチンフィラメントとミオシンフィラメント)が“滑り運動”している様は未だ誰も見たことがなかった。いわんや、ミオシン分子モーターが力学酵素であり、力発生の原動力であることはわかっているが、分子モーターがどのように運動し力を出しているのかは、多数の分子モーターの形態変化の平均値や、電子顕微鏡観察による固定像などをもとに推測されていたに過ぎなかった。

ここ30年の1分子計測の躍進の歴史

そこでここでは、主として過去30年にわたる1分子計測の躍進の歴史を、分子モーター研究の展開に沿ってまとめよう。1分子計測法は、1) 1分子イメージング法と、2) 1分子操作法に大別できる。

1) については、1本のアクチンフィラメントを可視化し、その曲げのブラウン運動の解析を通じて、フィラメントの硬さを明らかにした光学顕微鏡法(蛍光顕微鏡法)が挙げられる。次に、原子間力顕微鏡(AFM)をビデオレートまで高速化することにより、アクチンフィラメント上を36 nmのステップで2足歩行する非筋ミオシンVの運動が直視されたことや、光学顕微鏡法により微小管上を8 nmのステップで2足歩行するキネシンが実時間画像化されたことなどが、1分子計測法のハイライトとなった。ただし、光学顕微鏡法の場合、ミオシンVやキネシン分子そのものが画像化されたわけではなく、分子モーターを表面に吸着した微小ビーズを光ピンセットで捕捉してブラウン運動を抑えることで、ビーズの運動のナノ計測が実現された。このように、生体分子の運動をナノメーター精度で記録・解析する手法の多くは、大きなプローブを通して分子運動を捉え、そのプローブの変位や回転を計測するものであった。この手法は、ATP合成酵素である $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$ が回転モーターであることの直接証明に見事に応用された。また、

大きなプローブを使わず、目的の分子に直接結合した蛍光色素の1分子蛍光像の追跡から、分子モーターのステップサイズや酵素活性などを計測する1分子計測法も開発された。これらの方法の時間分解能は、超高感度・高速カメラの進展により、今やサブミリ秒を超えている。

2) については、分子モーターや細胞骨格に結合した微小ビーズを光ピンセットで捕捉し、分子モーター1分子が発生する数pNの力を計測したり、光ピンセットで加えうる数十pNの力でビーズに一定の力や撃力を加えることにより、分子モーターや細胞骨格の力学特性や分子モーターがなす力学的仕事のエネルギー効率などが求められた。とくに1分子エネルギー論については、ATP合成酵素の研究が飛躍的に進んでいる。このように、分子モーターの物理的基盤がかなり明らかになってきた。

生物分子機械は、何も、いわゆる生物運動を担う分子モーターに限らない。例えばDNAの複製を担う複製因子やDNAの遺伝情報のメッセンジャーRNA(mRNA)への転写を担う転写因子なども、遺伝情報(A, T, G, Cなど塩基配列)に沿って一方向に運動する分子モーターと言える。mRNAの塩基配列をもとにタンパク質を合成する巨大複合ナノマシンであるリボソームも、化学エネルギーを用いる分子モーターである。このような遺伝情報の読み取りに関与する分子の運動性を記録・解析することも可能になった。これらの研究には、ガラス基板表面上の100 nm程の厚みの領域を照明できる全反射照明法や、Zero-mode waveguides法など、特定の限られたナノ領域だけに光を当てる照明法(エバネッセント照明法)の開発が役立ってきた。

以上でまとめた1分子計測法は、そのほとんどが、精製し純化した生体分子モーターシステムのための研究法であった。最初に掲げた、生物学における根本的な問い“生命とは何か”に答えるためには、生命の基本構造である細胞の中で機能する生体分子の働きを明らかにする必要がある。1分子生物学の次の発展は、細胞内にある目的の分子が働く様子を捉えることにあり、多くの研究者が考えており、そのための顕微技術も発展している。遺伝子組換え技術を用いて、GFP(Green Fluorescent Protein: 2008年ノーベル化学賞)などの蛍光タンパク質を融合した複合タンパク質を細胞内に発現することで、細胞内の1分子蛍光顕微観察・解析も実現している。GFPをもとに、様々な波長の発色団を持つ蛍光タンパク質が人工的に作成され活用されている。さらに、細胞中の蛍光タンパク質、あるいは蛍光色素を結合したタンパク質を、回折限界を超える空間分解能で画像化・解析しうる“超解像光学顕微鏡法”も開発された(2014年ノーベル化学賞)。今後は、時間分解能の向上とともに、様々な細胞中での1分子動態が解明されることだろう。

1分子計測の将来像

1分子計測の将来像はどのようなものであろうか。まず、

現状の自然な延長線上には、細胞内の複数の分子の間の連携を捉えることがある。筋細胞の主要な機能は力発生だが、熱産生や物質代謝など、全ての細胞が担うべき多くの機能も同時に発揮している。外部からの物理的・化学的刺激に対して適切に応答しつつ、それらを時空間的に自発的に制御している。そのような構造と機能の自己組織化は、様々な生体分子間の時空間的協調性のなせる業である。しかし、複数分子の動態を同時にイメージングするだけでは、その動態が細胞機能にとって何を意味するのかはわからない。つまり、出来事の因果関係の時空間的なネットワークを明らかにする必要がある。しかし、たくさんの矢印からなるネットワーク図だけでは、出来事の順番はわかっても、その細胞機能のメカニズムまではわからない。ネットワーク図に収まらない多次元の時空間連携の様相を明らかにし、システムを構成する多元要素が織りなす動態のメカニズムを解明することが必要である。多次元空間で働く多元要素の統合的理解を、1分子計測の積み上げによって実現したい。

これとは逆の向きに進む将来像としては、1分子計測法をさらに深く追究する道がある。これまでの1分子計測法は、大きなプローブを通して追跡する手法はもちろん、AFM法であっても、分子の重心だと概形の変化を追跡するものであった。一方、蛍光分光法の1分子応用では、ナノ分子の構造変化と機能をも1分子レベルでイメージングし解析することができる。分子モーターについて言えば、ATP加水分解の化学エネルギーを分子運動の力学エネルギーへと変換するエネルギー変換(化学力学共役)の物理学は、構造(変化)を見るだけでは解明されない。生体分子の構造と機能の関係を解明できる1分子分光法の開発が必須であろう。

細胞という“ミクロの大都会”²⁾では、多種多様な生体分子が単独で、あるいは協調して、時々刻々それぞれの機能を自律的に発揮している。さらに、これらが実現している「反応場」、すなわち細胞膜に区切られた物理的(温度、圧力、負荷、粘性、電磁場など)・化学的(pH、各種イオン濃度など)環境という「反応場」の時空間変動も忘れてはならない。この「反応場」をミクロに画像化した上で、その中で働く生体分子システムの設計原理を明らかにすること、それが1分子計測技術の発展の先に見える。

参考文献

- 1) 石渡信一, 会誌編集委員会, 日本物理学会誌72, 7 (2017)—生体分子機械.
- 2) 日本化学会編, 『分子マシンの科学—分子の動きとその機能を見る』(化学同人, 2017).
- 3) 原田慶恵, 石渡信一編, 『1分子生物学』(化学同人, 2014).
- 4) 合原一幸, 岡田康志編, 『〈1分子〉生物学—生命システムの新しい理解』(岩波書店, 2004).
- 5) 野地博行編, 『1分子ナノバイオ計測(化学フロンティア)』(化学同人, 2014).

(2018年10月17日原稿受付)