

# 細胞内での生体分子による輸送とその制御

有賀隆行<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 大阪大学大学院 生命機能研究科

## 概要

生命は、蛋白質や核酸などから成るさまざまな分子機械が細胞内で働くことによって構成されている。私は、そのなかでもとりわけ、エネルギー通貨とよばれる ATP を加水分解することによって運動機能を発生する分子モーターと呼ばれる蛋白質酵素に注目し研究を行っている。ここでは、その運動観察を通じて明らかになりつつある力生成のメカニズムや、機能制御のメカニズムについて報告する。

## Transportation and reguration by biomolecules in cells.

Takayuki Ariga<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

## Abstract

Life is operating by various biomolecules consist of proteins, nucleic acid and so on in cells. Above all, I'm studying the protein enzymatic molecular motors, which express the motor functions by hydrolysing ATP. Here, I report the mechanism of the power generation and the regulation.

## 1 はじめに

生体を構成する細胞内では、多数の分子機械が働くことによって複雑な機能を提供している。とりわけ分子モーターと呼ばれる蛋白質で構成された一連の酵素群は、私たちの運動に必要不可欠な筋肉の伸縮運動や、池の水を組んできて簡単な顕微鏡で覗くとすぐに観察することのできるアメーバや細菌などの単細胞の運動だけでなく、細胞内部での分子の輸送や、細胞のかたちの形成、感覚機能の獲得など、さまざまな機能に関して活躍している [1]。

私は、このような多彩な分子モーターの生成する力学的な運動機能が、ご飯を食べて酸素を呼吸するといった化学的なエネルギーソースをもとにして、一体どのようなメカニズムで生成されているのか？といったメカノケミカルカップリング (化学-力学共役機構) を明らかにすることを目的として研究を進めている。[§2 燃料とエンジン]

一方で、これらの分子モーターは、やたらめったら燃料を消費して好き勝手に無秩序に走りつづ

るわけではなく、一つ一つの分子がきちんと必要な荷物を識別し、必要とされる場所に輸送し、また、必要の無いときには無駄にエネルギーを消費せずに休んでいるといった制御機構を備えている。今回は、運動機能の研究過程で明らかになった、この制御機構の一部分について、大きな熱ゆらぎに曝された環境下でのその確率的な振舞いと、小さなエネルギー消費で効率よく、うまく制御された荷物輸送の機構について報告する。[§3 荷物輸送と制御]

## 2 燃料とエンジン

### 2.1 生体内エネルギー通貨：ATP

分子モーターはアデノシン 3 リン酸 (ATP) を加水分解して ADP とリン酸 (Pi) へと変換する酵素作用を持っている。その ATP には ADP に比べて高いエネルギー ( $\sim 20 kT$ ) が蓄積しており、分子モーターの運動に限らず、さまざまな細胞内での生体機能のエネルギー源として利用されている。ひとりの人間は通常一日にほぼ体重と同じ量 (50 kg) の ATP を消

費しているが、もちろん体重と同じだけの ATP が常に体内に蓄積されているわけでない。細胞内での ATP は、“酸化リン酸化”と呼ばれる ADP と Pi から ATP を合成するプロセスを経て常に産出され、消費されている。そこではまず、呼吸により得られた酸素から電子を得てミトコンドリアの膜内外での水素イオン ( $H^+$ ) の濃度勾配を形成する。そしてその  $H^+$  の濃度勾配をエネルギー源として ATP を合成する工場もまた  $F_0F_1$  ATP 合成酵素と呼ばれる分子機械なのである (図 1a)。

## 2.2 発電機とモーター：ATP 合成酵素

$F_0F_1$  ATP 合成酵素は、大きくわけて二つの部分複合体からなっている。ミトコンドリア内膜に生みこまれた、膜内外の  $H^+$  を輸送するポンプの働きをする  $F_0$  部分と、ATP の合成/加水分解を担当する  $F_1$  部分である。膜内外に大きな  $H^+$  の濃度勾配がある条件下において、 $F_0$  部分で  $H^+$  が流れることによって  $F_1$  部分で ATP が合成される。また逆に、 $F_1$  部分で ATP が加水分解されると、 $F_0$  は  $H^+$  を膜の外へと流しこむポンプとして働くことができる。そして  $F_0$  での  $H^+$  の流れと、 $F_1$  での ATP 合成/加水分解は、その中心を付きぬけるロッド部分での「回転」を介して共役していることが、近年明らかになってきた。

これはまさに、タービンによって電気力を生成する発電機と、電気をエネルギー源として回転するモーターが、ほぼ同じ仕組みの逆反応であることと似ている。すなわち、蛋白質酵素一分子が ATP の加水分解や  $H^+$  の流れといった化学エネルギーを力学的エネルギーに (相互に) 変換する仕組みを持っていることを意味している。

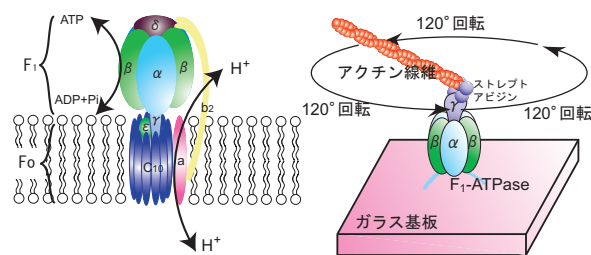


図 1: a.  $F_0F_1$  ATP 合成酵素。膜内に存在して  $H^+$  ポンプとして働く  $F_0$  部分と膜の外に突き出て ATP 合成/加水分解を担う  $F_1$  部分からなる。b.  $F_1$ -ATPase の回転観察。回転観察用プローブとして長い線維状蛋白質であるアクチンフィラメント (約  $1 \mu m \sim 3 \mu m$ ) を結合している。

## 2.3 回転する分子モーター： $F_1$

この部分複合体 ( $F_1$ ) 分子が回転するという事実は、分子に大きなプローブを付けて顕微鏡下で実際にその回転を直接観察するという仕事によって証明された (図 1b)[2]。そしてその回転は、1 個の ATP の加水分解につき、 $1/3$  回転 ( $120^\circ$  回転) するステッピングモーターであることが明らかになっている [3]。また逆に、この回転を人為的に逆方向に回すと、ATP を合成できることも実験であきらかになった [4]。

## 2.4 $F_1$ の回転メカニズム

では、ATP の加水分解をエネルギー源として、そのような一方方向性の回転力を生み出すメカニズムは一体どうなっているのだろうか? その為に私は、3 対称に配置された 3 つの ATP 触媒部位の一つのみに変異を導入する手法を開発した (図 2a)[5]。この手法を用いて ATP 加水分解の素過程に影響を与える変異体を一つの触媒部位に導入したハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転を高時間分解能で観察すると、ATP 結合待ち以外にも、1 回転中に 2ヶ所で停止する非対称な回転が観察された (図 2b)。この結果は、分子内部での協調した働き、すなわち 3 つの触媒部位で、順番に役割を交代しながら ATP の加水分解を行うことにより、1 方向性の回転運動を効率よく取りだす仕組みの存在を示している [6]。

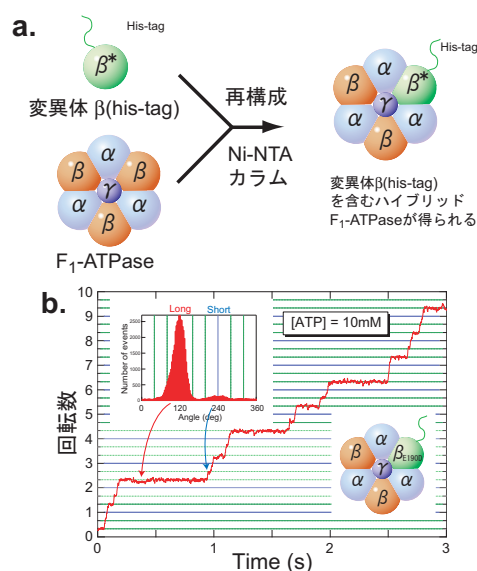


図 2: ハイブリッド  $F_1$ -ATPase。a. ハイブリッド  $F_1$ -ATPase の再構成。b. ハイブリッド  $F_1$ -ATPase の回転の軌跡。

### 3 荷物輸送と制御

#### 3.1 レールの上を走るモーター分子達

細胞内では一般にアクチンや微小管とよばれる長い棒状の分子がメッシュ構造を作り、細胞の形を作りあげている。そしてその棒状分子を「レール」として、ミオシン・キネシン・ダイニンなどのモーター分子達が、その上を走りまわりながら、細胞内部のあちからこちらへと荷物(小胞体など)を運ぶ機能している [7]。それらの運動がどのようにして行なわれているか? といったメカニズムにも興味があるところだが、ここでは、その一つであるミオシン V に注目し、荷物をどのように選択して、目的の場所へと運んでいるのか? といった制御機構に触れる。

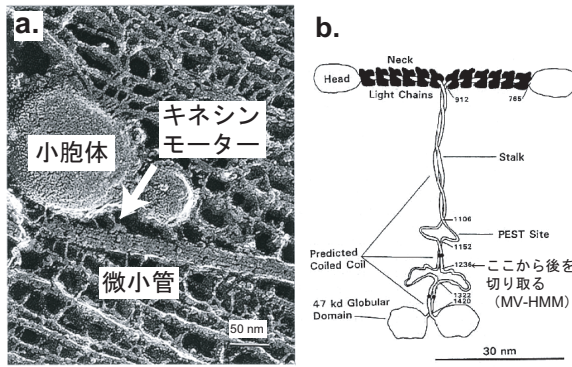


図 3: a. 小胞体を運ぶキネシンモーター (白矢印) の電子顕微鏡写真。文献 [7] より引用・改変。b. ミオシン V の構造。文献 [9] から引用・改変。矢印から下を切り除いたものを MV-HMM と呼び以下の実験で用いた。

#### 3.2 アクチンの上を歩く分子: ミオシン V

ミオシン V はアクチン線維上を走る小胞体輸送を担うモーター蛋白質である。このモーターは、1 個の ATP 加水分解あたり 36 nm のステップで、アクチンのレール上を解離することなく連続的に進むことが 1 分子観察手法により明らかになっている [8]。

一方でミオシン V は 4 つのドメイン構造からなっている [9]。それぞれ (1) アクチンと結合する部位と ATP 加水分解部位を持つモータードメイン、(2) 片側につき 6 つのカルモジュリン結合するネック (首) ドメイン、(3) 3 つのコイルドコイルドメインから成り、2 量体を形成する長いストロークドメイン、(4) 尻尾の先にある荷物と結合するための球状ドメインである。

そして近年、その球状ドメインがヘッドドメインと結合することによって不活性状態を作ることが明らかになった [10]。この事実は、荷物を運ばない状態では、エネルギーを消費せずに待機しているような制御機構を持っていることを示している。

#### 3.3 1 分子で連続的に走るということ

ミオシン V の運動は 2 つのヘッド部位が交互に歩くように運動することで、1 分子で連続的にアクチン上を進むことができるというモデルが広く受け入れられている。そのような 1 分子で連続的に進む機能を確認するために、制御部位である球状ドメインを遺伝的に切りとったミオシン V (以下 MV-HMM) を作製し、荷物のかわりとして直径 1  $\mu\text{m}$  のビーズを付けてその運動を光学顕微鏡下で観察した。

MV-HMM が 1 分子で連続的に走ることが可能かどうかの判定には、Poisson 統計を用いた。荷物であるビーズにモーター (MV-HMM) 分子をくっつける際の混合比 ( $r$ ) を変えたときに、ビーズ 1 つあたりにモーター分子が付く個数 ( $n$ ) の分布確率  $P(n)$  は、以下の式で表される。(但し  $\lambda$  はフィットパラメータである。)

$$P(n) = \frac{(\lambda r)^n}{n!} \exp(-\lambda r) \quad (1)$$

その運動を観察したときに、すべてのビーズのうちどれだけのものが運動されるかの確率  $P$  を混合比  $r$  に対してプロットすると、1 分子のみ、あるいはそれ以上で連続的な運動が出来る場合には  $P(n \geq 1, r) = 1 - \exp(-\lambda r)$  の式によく合い、動くために 2 分子以上が必要な場合には  $P(n \geq 2, r) = 1 - \exp(-\lambda r) - \lambda r \exp(-\lambda r)$  でフィットできる。

MV-HMM の運動機能を確認したところ、おどろくべき結果として、比較的生理的条件下に近い高塩濃度存在下 (300 mM KCl) では、連続的に運動できないという結果があらわれた。しかし、ビーズとモーターの混合条件を低濃度存在化 (25 mM KCl) に変えると、野生型と同様に連続的に運動できるということがわかった。また、この連続的に運動できない状態は、コイルドコイルドメインを完全に切りとった頭だけの単量体のミオシン V 分子とほぼ同様の特性を示していた。

以上の結果から、生理的条件下 (比較的高塩濃度) では、1 量体構造と 2 量体構造が転移する平衡状態にあり、その状態は塩濃度によって左右されていることが示唆された (図 4 左側)。

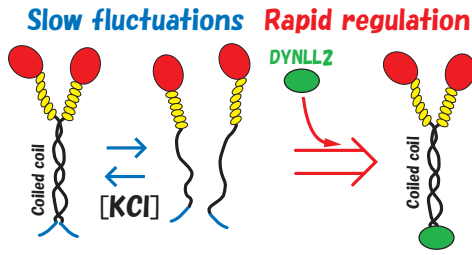


図 4: ミオシン V の 1 量体 - 2 量体平衡と制御因子による転移

### 3.4 荷物と制御機構

では一体、このような 1 量体-2 量体の平衡状態の存在にはどのような生理的な意味があるのだろうか？

近年、微小管上の上を走るモーターであるダイニンに結合する小さな蛋白質 (DYNLL2) が、ミオシン V のコイルドコイル構造の後側にも結合するという結果が報告された [11]。この結果は、荷物を結合するための“糊”の役割をしている小さな蛋白質が、荷物選択の“タグ”のような役割もしていることを示している。また、DYNLL2 はミオシン V のコイルドコイル構造の 2 量体化を安定化することも示された。これらの結果と前節での連続的な運動の制御を鑑みると、荷物選択のために糊付けされた小さなタグ蛋白質は、それと同時に、運動機能全体の ON/OFF スwitch の役割をしていることを示している (図 4 右側)。

以上のように、様々なモーター分子達は、より小さな因子 (タグ) を付けることによって、運ぶべき荷物を選択し、狙った方向へ効率よく運ぶ (無駄な動きはなるべくしないようにする) 仕組みを備えていることが明らかになった。

## 4 展望

§2 では回転モーターである  $F_1$  の運動発生機構の研究を通して分子内部での協調した働きと力発生のメカニズムを、また §3 では、線形モーターであるミオシン V の持つ本質的にゆらいだ構造と生理的な制御機構について見てきた。これらを通じて、蛋白質酵素 1 分子が、その内部状態には多彩な構造状態を持ち、それがとても小さな因子 (アロステリックファクター) によって整流されるという普遍的な構造が見えてきた (図 5)。

約半世紀前に提出された、分子内部でのアロステ

リック効果による協同性の発現という単純な数理モデルから出発した概念 [12, 13] を、ナノテクノロジーを駆使した直接観察の技法によって、1 分子内部を可視化することがようやく可能になってきた。このような生体内で効率良く働く分子モーターの仕組みやその制御機構を学ぶことにより、人間の使うエンジンや交通流の問題に生かされる時代が来ることを期待している。E-mail: ariga@phys1.med.osaka-u.ac.jp

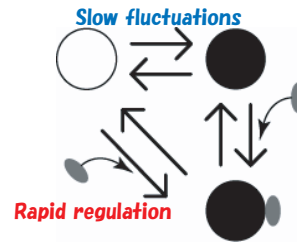


図 5: 蛋白質の自発的ゆらぎと協同性について

## 参考文献

- [1] B. Alberts, “細胞の分子生物学 第 4 版”, Newton Press, (2004).
- [2] H. Noji, *et al.*, *Nature*, **386**, 299 (1997).
- [3] R. Yasuda, *et al.*, *Cell*, **93**, 1117 (1998).
- [4] H. Itoh *et al.*, *Nature*, **427**, 465 (2004).
- [5] T. Ariga, T. Masaike, H. Noji and M. Yoshida, *J. Biol. Chem.*, **277**, 24870-24874 (2002).
- [6] T. Ariga, E. Muneyuki and M. Yoshida *Submitted*.
- [7] N. Hirokawa, *Science*, **279**, 519 (1998).
- [8] A. D. Mehta *et al.*, *Nature*, **400**, 590 (1999).
- [9] R. E. Cheney *et al.*, *Cell*, **75**, 13 (1993).
- [10] F. Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **279**, 2333 (2004).
- [11] W. Wagner *et al.*, *Biochemistry*, **45**, 11564 (2006).
- [12] J. Monod *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965).
- [13] D. E. Koshland, Jr. *et al.*, *Biochemistry*, **5**, 365 (1966).