１．研究課題名：一分子生理学による生体分子機械の動作機構の解明
２．研 究 期 間：平成 16 年度～平成 20 年度
３．研究代表者：木下　一彦（早稲田大学・理工学部・教授）

４．研究代表者からの報告

（１）研究課題の目的及び意義

たんぱく質ないし RNA でできた「分子機械」が働く原理を解明するため、１個１個の分子が機能している様子を現場で連続観察し、さらに分子に操作を加えてそれに対する応答を調べるのが、一分子生理学である。本研究は、光学顕微鏡下の一分子生理学を駆使して、分子機械の動作原理の根元的理解をめざす。具体的には、可逆な回転分子モーターである F1-ATPase や、リニア一分子モーターであるミオシンなどの、ATP 駆動の分子機械、および ATP 合成酵素の Fo 部分などプロトンないしイオン流駆動の分子機械の、動作原理の解明を主眼とする。個別の分子機械の動作機構もさることながら、多種多様な分子機械の研究の嚆矢となり見本・参考となるような、一般原理の提出をめざす。

本研究ではとくに、必ずしも複雑な装置に頼ることなく、「一目で分かる」観察結果に基づき、生体分子機械の作動原理を分かりやすく示すことを目標とする。プラスチックビーズなど、分子機械に比べて巨大な目印を使い、分子機械の動き・構造変化を直接可視化する。巨大目印は磁石や光による分子機械の操作や、分子機械の出す力の測定にも用いる。必要に応じて蛍光性 ATP などの蛍光色素一分子イメージングも加えて、分子機械の動作原理を探る。

巨大目印を用いた一分子生理学は、思いつくのは簡単だが、実現は試行錯誤の連続で、失敗に終わるのが大部分である。しかし、うまくいけば大きな実を結び、他分野にもインパクトを与える。新しい道を切り開き、一分子生理学をリードしていきたい。

（２）研究の進展状況及び成果の概要

回転分子モーターF1-ATPase における化学反応（ATP 分解）と力学反応（回転）の共役機構が明らかになった。F1 の駆動エネルギーは、３ヶ所の活性部位での ATP 分解により得られる。120 度おきのステップ状回転のたびに ATP 一分子が消費され、120 度ステップはさらに約 80 度と 40 度のサブステップに分かれる。共役の仕組みは：(1) ATP 待ち状態において一つだけ空いている活性部位に ATP が結合すると回転が始まり、同時に、(240 度前に ATP として結合された) ADP が解離。ATP 結合と ADP 解離の両者に駆動されて 80 度の回転が起きる。(2) 80 度の位置で、一つ前（200 度前）に結合された ATP が ADP と燐酸に分解される。(3) 燐酸解離がおき、それが 80 度→120 度の回転を駆動。(1’) 次の ATP が結合。とくに(2)において、回転に伴い燐酸に対する親和性が一万倍以上低下することを示すことができた。逆回転により ATP を合成する場合、120 度→80 度の回転で燐酸親和性が増し、溶液中から燐酸を結合することになる。Boyer の結合変化説の、初めての直接的証明と考えられる。

F1 の回転子であるγサブユニットの、回転軸部分をほぼ全部削ってしまっても回転し続けるという、驚くべき結果を得た。残りのγサブユニットは、固定子であるα３β３サブユニットの筒の入口にちょこんと乗っているだけと思われるが、それでも正しい方向に百回転以上回ることを確認できた。

２本足の分子モーター・ミオシンＶの歩行機構も明らかになった。脚の付け根はほぼ完全に自由な自在継ぎ手となっており、持ち上がった脚は激しい回転ブラウン運動の後前方に着地する。

５．審査部会における所見

Ａ（現行のまま推進すればよい）

近年のタンパク質研究の大展開として期待される分子の可視化を牽引する成果を提供した。細胞内分子モーターの研究では、ミオシンＶ脚タンパク質の新固定化法の開発で、ミオシンがリニアモーターとなりアクチン分子上で特徴的な歩行が可視化された。ATP 合成酵素のタンパク質構造改変の研究では F1ATPase のγサブユニットを消失させた改変タンパク質を用い、軸分子が無くても ATP 駆動能がある、画期的な現象が証明された。さらに好熱菌 F1ATPase による至適生育温度下の顕微鏡観察では、従来の常識をはるかに覆す驚異的な回転が観察された。これらの成果はいずれも学問発展に大きく寄与し、質の高い論文として多数発表され、研究情報の提供に貢献した。これら種々の優れた研究成果の実現には、他者の追随を許さない絶妙な技術開発が大きく寄与し、研究代表者、博士研究員、大学院生のチームが一丸となり作り上げた努力がうかがえる。本研究は、独自に開発してきた研究手法により生物物理学に波及効果を与えたのみならず、学問の枠を超え、難解で重要とされている生命科学の当課題に挑戦し、世界的にリードできるレベルに引き上げたことが高く評価された。