

自己組織化を用いた生体分子の高精度な配置技術

古田健也

生物を構成するナノメートルサイズの機械は、細胞の中で自分勝手に振舞っているように見えるが、結果として調和の取れた働きをすることで重要な生命機能を発現している。最近になって、このような仕組みを理解するためには、集合体の見せる機能と個々の素子間の相互作用との関係を知ることがますます重要であるとされてきている。本稿では、このような分子間相互作用を研究するための最新実験技術を簡単に紹介する。

1 はじめに

生物が驚異的に小さいエネルギー消費量で情報通信・処理を行っていることはよく知られているが、生物はそれだけにとどまらず、自己組織化、自己複製、柔軟性といった、人工機械がいまだに実現できていない高度な情報処理を、当然のように日々行って世代を重ねている。このような機能がどのような仕組みで実現されているのかを理解し応用することが出来れば、人類の発展にとって大きなブレイクスルーになると考えられるが、この仕組みを解明するためには、まず、小さな分子の集合体である生体システムがどのように設計されているかを知る必要がある。

X線結晶構造解析法や1990年頃から盛んになった1分子顕微技術により、生体内で働く生体分子の分子機械としての一面が明らかにされ、今日までにタンパク質やRNAなどの生体分子が、あたかも極小サイズの機械のように振る舞い、様々な機能を果たしていることが分かってきた。これらの「生体分子機械」は紐状のポリマーで出来ており、これが自律的に折りたたまれることで、ある程度決まった構造を持ち、驚異的な効率で化学反応を触媒したり、微小な物質をレールに沿って運んだりといった多様な役割を果たすことが出来ることが分かってきている。

このように、個々の生体分子機械の動作メカニズムについては徐々に詳細が明らかになりつつあるが、それにもかかわらず、生物がシステムとして柔軟性、恒常性を見せる階層と、1分子レベルの生体分子機械の階層の間には大きな理解のギャップが存在する。つまり、生物が自律システムとして優れた特性を持っているのは言うまでもないことだが、このシステムが組織化される仕組みについては、本質的な意味で全く解明されていないと言ってもよい。1つの仮説として、システムが自己組織化される仕組みは各々の素子に組み

込まれており、部分が全体に、全体が部分に影響するようなフィードバック・ループが回り続ける過程で、ある構造（物理的な構造だけでなくネットワーク構造を含む）に落ち着くような仕組みが考えられる^[1]。このフィードバック・ループが適切に設計されることに依って、例えば生体内で必要な周期的機能を外部の周期に適応させることができるような柔軟性を持つと同時に、外部のパルスのな攪乱に影響を受けない頑強性とを併せ持つ仕組みがうまく作動していると考えられる。このような仕組みは、特にシステムに参加している役者の種類が増えた時に、結果を決定論的には予測できないような複雑さを持つことが知られている。従って、たとえ素子単体のメカニズムを詳細に明らかにしたとしても、それがシステムとして働く時の特性は自明でない、という事態がしばしば発生する。そこで、このような複雑なシステムを理解するためには、生体分子機械のミクロな性質が、システム全体のマクロな性質とどのように関連しているかを調べる必要がある。そのために、ちょうど飛行機の設計に風洞実験が多用されているのと同様に、素子を改変してはその集合体の機能を観察する、という実験サイクルを迅速に行えるような実験系が必須である。この実験系では、どのような種類の素子をどのように集積するか、というパラメータを出来るだけ精密に制御することが重要になる。

2 生体分子機械を精密に配置する技術

このような実験系を構築する上で問題となるのが生体分子機械の小ささである。生体分子機械は小さいもので数ナノメートル、大きいものでも数百ナノメートル程度であり、これを基板上にナノメートル精度で配置することは、ロボットとマイクロマニピュレータを用いても大変困難な作業である。そこで我々は、近年

発達してきた DNA ナノ構造体を足場として利用し、生体分子機械を混ぜるだけで自律的に集積する試みを行ってきた。DNA 構造体の中でも 2006 年に米国 CalTech の P. Rothemund が開発した DNA オリガミと呼ばれる構造体は、天然に存在するウイルス由来の 1 本鎖 DNA を約 200 種類の短い DNA の断片を使って予め設計した形に固定し、約 100 ナノメートル四方の決まった構造を作製するもので、設計の自由度が従来の DNA ナノ構造より遥かに大きいことが特徴である^[2]。図 1 はチューブ状になるように設計した DNA オリガミの 15 箇所に、約 30 ナノメートルの間隔で生体分子機械の一種であるキネシンというタンパク質モータを配置した例を示す。DNA で出来た足場にタンパク質モータを配置するための鍵となるのは、DNA とタンパク質モータそれぞれに取り付けた酵素タグシステムと呼ばれる仕掛けである。これは、ちょうど鍵と鍵穴のように、組み合わせの合ったものしか結合しないように出来ており、これらを予め DNA とタンパク質モータのそれぞれに取り付けておけば、これらを混ぜるだけで所望の位置に所望のタンパク質モータが配置される (図 1)。DNA は化学合成が可能であり、DNA の配列の一部に特定の官能基を導入することができるため、酵素タグシステムの鍵穴にあたる物質を DNA オリガミの特定の位置に導入することが容易である。また、酵素タグシステムの鍵にあたる酵素タグについては、タンパク質モータに融合するように予め遺伝子操

作をしておくことで、タンパク質モータと酵素タグを繋げたものを大量に精製することが可能である。

3 分子の運動を計測する技術

今回実験に用いたタンパク質モータと呼ばれる分子は、生体内で線路の役割を果たすタンパク質フィラメントの上を、化学エネルギーを使って一方向に動くことで筋肉や物質輸送の駆動力を担う素子で、生物特有の低エネルギー消費かつノイズ耐性が高いという性質を利用した新たな動力源や通信素子への応用が期待されている。タンパク質モータは通常複数の分子が集積した状態で働くことが知られているにも拘わらず、複数の分子が集積した複合体の性質はほとんど分かっていない。その理由は、非常に小さいサイズの分子の数と配置を制御することが技術的に大変難しいからである。そこで我々は、1 分子と多分子の間の理解のギャップを埋めるため、DNA を足場として分子を配置する新しい技術を開発し、タンパク質モータを 1、2、3、4 分子と集積していった場合のシステムの出力 (輸送速度、距離、発生した力など) を、高精度な顕微技術によって計測した^[3]。ここで用いた顕微技術は、1 分子の蛍光色素を観察するための全反射蛍光顕微鏡法と、ピコニュートンレベルの力を測定できる光ピンセットと呼ばれるものである。全反射蛍光顕微鏡法は、ガラスと水の屈折率の違いにより、その境界でレー

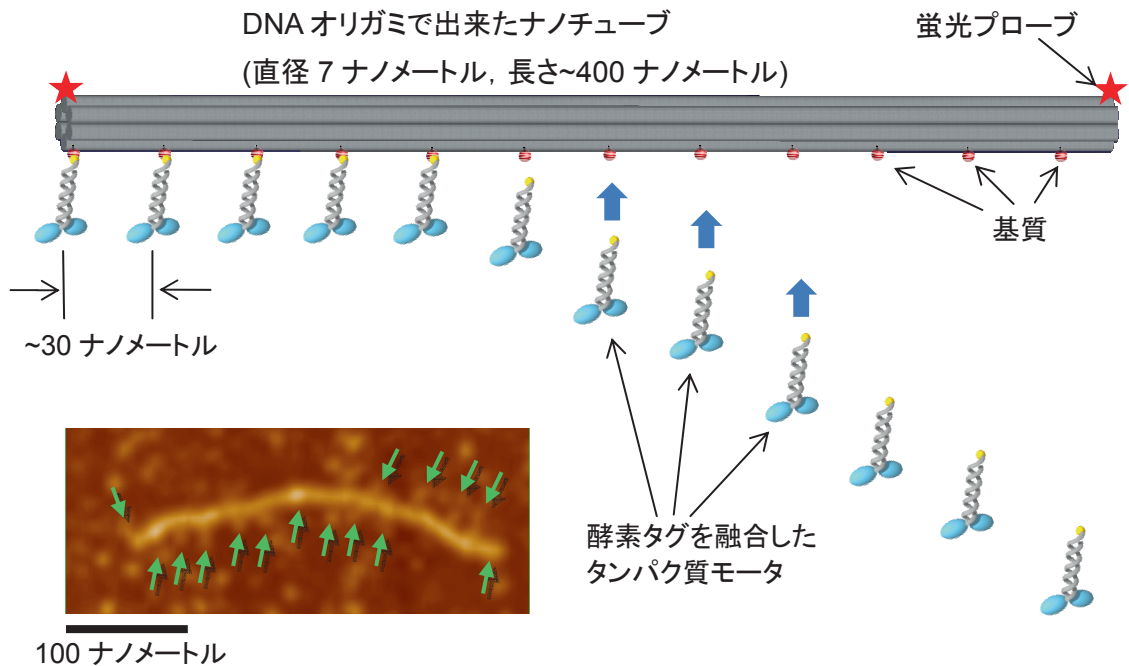


図 1 タンパク質モータ複合体の自己組織的な構築法
 (上) 酵素タグが認識する人工基質 (リガンド) を導入した 1 本鎖 DNA 断片を、テンプレートとなる DNA オリガミ構造体へ導入しておき、酵素タグを末端にもつタンパク質モータと混合することで、自己組織的にタンパク質モータ複合体を構築する。
 (下) タンパク質モータ複合体の AFM 画像。矢印の位置にタンパク質モータが配置されている。

レーザー光を全反射させ、その際にわずかに滲みだした光を使ってガラスの近傍（数百ナノメートル）にある蛍光色素のみを励起することで極めて低いバックグラウンドを実現し、1分子の蛍光を検出できる顕微鏡である^[4]。超高感度のCCDカメラで撮影した蛍光スポットを、2次元ガウス関数でフィッティングすることによって、通常の蛍光顕微鏡の分解能から想像される精度を遥かに超える、1ナノメートル程度の位置決め精度が得られる^[5]。ただし、時間分解能は数十ミリ秒のオーダーであり、タンパク質モータの状態変化などの速い時間スケールの現象を計測することには向かない。一方、光ピンセット装置は、開口数の大きな対物レンズでレーザー光を集光することでマイクロメートルオーダーの微小な物体を捕捉し、レーザー光の位置を動かすことで、試料中で物体を自在にマニピュレート出来る光学顕微鏡である^[6]。捕捉されたマイクロビーズは捕捉位置を中心に単純なバネとして近似できるため、力を測定するためのプローブとして利用できる(図2)。空間分解能については、マイクロビーズの像を4分割フォトダイオードに投影して差動アンプの出力を観るため非常に高く(条件によってはナノメートル以下)、その上、時間分解能はマイクロ秒オーダーで、タンパク質モータのダイナミックな状態変化を追うことが可能である。

4 タンパク質モータ集合体の性質

これらの技術を用いてタンパク質モータ集合体による運動を測定した結果、1分子では効率良く動くことが出来ないタイプのタンパク質モータが、2分子が結合した複合体では非常に効率的に機能を発揮することが分かった(図3)。また、複数のタンパク質モータに依る輸送性能は分子間の距離のべき乗に反比例したことから、分子間のカップリングがタンパク質モータ複合体の性能に大きな影響を与えることが分かった。また、意外だったのは、1分子ではあまり性能が良くないタイプのタンパク質モータは、集団になると比較的大きな力を出せるなど、性能が一様に改善するのに対して、1分子でも良く動くタイプのタンパク質モータは集団になると分子同士が邪魔し合い、結局1分子の場合と大差無い性能しか出せない、という結果が得られたことである。このことは、生物が、集団で動作することに適した設計の素子とそうでない素子を、働く部位に応じて使い分けていることを示している。さらに別の種類のタンパク質モータでは、多分子が複合体を形成した時にだけ働くような、いわば自己制御機構が備わっていることが分かってきた。このタイプのタンパク質モータは、孤立した1分子の状態ではほとんどの時間、効率的な運動が出来ないような構造を取るが、多分子が集まって複合体を作った場合には、タ

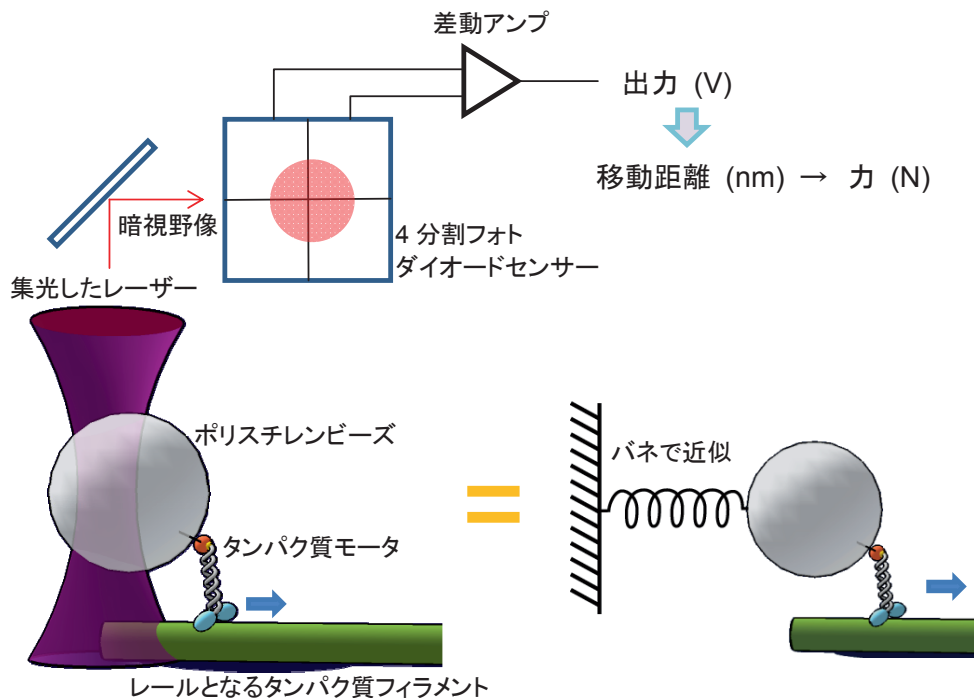


図2 光ピンセット装置によるタンパク質モータの性能評価
集光した赤外レーザーにより、ポリスチレンビーズを捕捉し、タンパク質モータ複合体の力発生を計測する。4分割フォトダイオードセンサーで検知した信号は差動アンプを経て移動距離の情報に変換される。光ピンセットはバネとして近似できるので、フックの法則より、タンパク質モータが発生した力の大きさを知ることが出来る。

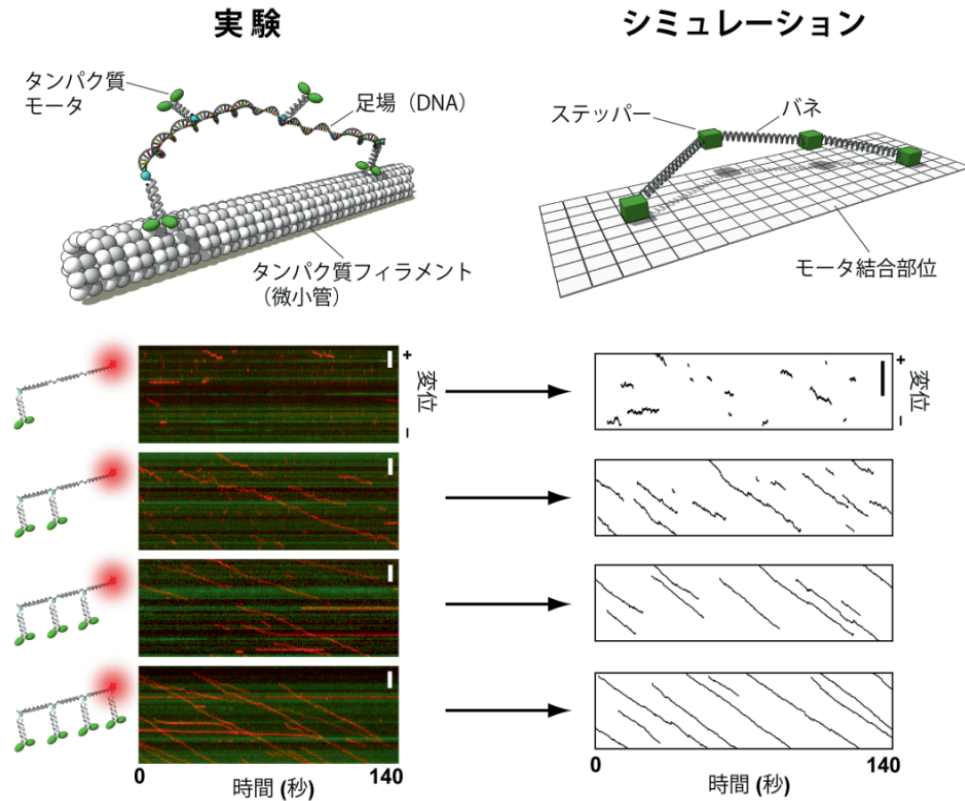


図3 DNAを足場としたタンパク質モータシステムの運動とモデルシミュレーション
 (左) 分子システムの模式図と微小管に沿った分子システムの運動軌跡：システムを構成するタンパク質モータ分子(Ncd)の数が1個から2個になった途端、微小管に沿った連続運動がみられるようになった。赤いラインが運動の軌跡。
 (右) モデルの概略とシミュレーションによって再現した運動軌跡：構成分子が1個から2個に増えた際の運動連続性の大きな変化を再現できた。スケールバー=3マイクロメートル。

ンパク質モータ同士がお互いを活性化することで、複合体全体として非常に効率的に機能を発揮するようになった。この仕組みの鍵となるのは、分子間に働く力学的な相互作用が個々の分子を活性化することであり、活性化された分子がさらに別の分子を活性化することによってポジティブ・フィードバック・ループを作り、これが安定な輸送機能の発現を促していると考えられる。このことは、それぞれの分子に全体を統制するための制御機構が備わっていることを示しており、明確な司令者がいなくても分子が集積しただけで機能がオンになるような仕組みを、細胞が巧みに利用していると言える。

5 今後の展望

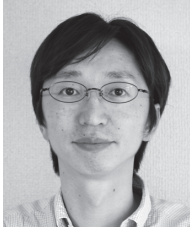
もし、素子の中に集合体全体を統制する機構を組み込んだ、真にボトムアップ型のシステムを人間が設計できるようになれば、トップダウン型のシステムのように司令部が故障した時に崩壊するような脆弱性が無く、環境に柔軟に対応できる自律的な人工システムを作ることが出来る。しかしながら、このような非線形システムの設計原理は現状では自明でない。我々がや

るべきことは、既に驚異的に性能の良いボトムアップ型システムを実現している生物に倣って多数の人工システムを試作してデータを集め、そこから帰納的に基礎理論を構築することである。かつて先人たちが、林檎が落ちるところを観察し、惑星の周期運動を観察したデータから帰納的に力学の理論を構築したように、本研究は、生物の部品を使ってシステムを作っては観察するという実験サイクルに依って、生物を模倣した新しいデバイスを作るための基礎理論を構築する足掛かりになると考えている。

【参考文献】

- 1 Strogatz, S., "From Kuramoto to Crawford: exploring the onset of synchronization in populations of coupled oscillators," *Physica D* 143 pp. 1-20, 2000.
- 2 Rothmund, P.W., "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns," *Nature* 440, pp. 297-302, 2006.
- 3 Furuta, K., Furuta, A., Toyoshima, Y.Y., Amino, M., Oiwa, K., and Kojima, H., "Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors," *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A* 110, pp. 501-506 2013.
- 4 Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., and Yanagida, T., "Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution," *Nature* 374, pp. 555-559, 1995.

- 5 Yildiz, A., and Selvin, P.R., "Fluorescence imaging with one nanometer accuracy: application to molecular motors," *Acc. Chem. Res.* 38, pp. 574-582, 2005.
- 6 Ashkin, A. and Dziedzic, J.M., "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria," *Science* 235, pp. 1517-1520, 1987.



古田健也 (ふるた けんや)

未来 ICT 研究所 バイオ ICT 研究室 主任研究員
博士 (学術)
生物物理学、分子モーター