

解説

バイオナノマシンの1分子計測とエネルギー論

西山雅祥, 原田崇広

(受取日: 2005年1月31日, 受理日: 2005年3月3日)

Single Molecule Measurements and Energetics of Biological Nanomachine

Masayoshi Nishiyama and Takahiro Harada

(Received January 31, 2005; Accepted March 3, 2005)

Movement is a fundamental characteristic of all living things. This biogenic function is attributed to molecular motors in a cell. Molecular motors are mechano-chemical enzymes that generate forces by using chemical energy derived from the hydrolysis reaction of adenosine triphosphate (ATP) molecules. Despite a large number of studies on this issue, the mechanism of mechano-chemical energy transduction is still unsolved. In this review, we describe the experimental and theoretical approaches for elucidating the mechanism how kinesin motors generate the unidirectional movement along a microtubule. By use of a novel single-molecule-detection technique, we detected the elementary processes on the sliding movement of single kinesin molecules. Motility analysis has revealed that a stochastic mechanism underlies in the unidirectional movement of kinesin. To explain the energetic aspects of the stochastic movements, we constructed a new phenomenological framework based on non-equilibrium statistical mechanics, and determined the energetic balance in single kinesin molecules. It is indicated that the hydrolysis energy of ATP is effectively used to generate the unidirectional movement. Our experimental and theoretical approaches will help to understand thermodynamics of nano-world.

1. はじめに

生理学と熱力学との結びつきは、実は熱力学の成立以前に遡る。19世紀の中頃、オランダ船の船医であったR. マイヤーは、船が熱帯地方に入ると船員の血液の色がより赤みを増す、という事実に気がついた。彼はこの発見を契機にして、生体のエネルギー代謝の問題に取り組み、最終的にエネルギー保存則の概念(熱力学第一法則)に到達したのである。そしてこのあと熱力学は現在のように壮麗な体系へとまとめられることとなる。¹⁾ 現在のように科学の専門分業化が進んだ時代から見ると、このような医学・生理学的な知見を基に、最も基本的な物理学の原理が見いだされたという事実は、実に驚くべきことのように思える。しか

し逆に言えば熱力学がきわめて普遍的に適用可能な学問体系であることを示していると言えるだろう。

熱力学成立の歴史を細解くと、蒸気機関の仕組みを解析することにより、さまざまな知見が蓄積されていったことが分かる。¹⁾ 蒸気機関は熱を仕事に換える、いわばマクロなエネルギー変換装置である。それに対して本稿で紹介していくのは、細胞内にあるナノスケールのエネルギー変換装置、生体分子モーター(参考: フロギストン)の話である。近年、生体分子1個の動きを観測する技術が開発され、タンパク質が行う仕事を精密に計測することが可能となってきた。^{2,3)} マイヤーの生理学は熱力学の基礎を築いたが、最新の技術により明らかにされた生体分子モーターの生理学は、ナノスケールにおける熱力学の新しい様相につながっ

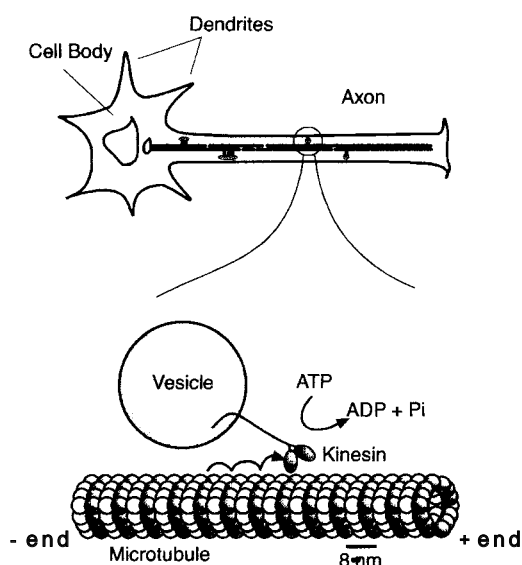


Fig.1 Kinesin and organelle transport in nerve axon.

ていくのではないかと期待したくなる。本稿では、まず、代表的な分子モーターであるキネシン分子の紹介を行い(2章), その動作原理の解明を目指して、西山が行ったキネシン1分子の運動計測(3&4章)と、その実験結果に対して原田が行った理論解析(5&6章)に関して紹介していきたい。

2. 生体分子モーター・キネシン

神経細胞の細胞体 (cell body) からは、多数の樹状突起 (dendrites) と共に1本の軸索 (axon) が伸びており、軸索の長さは長いもので、10 cm から1 mにも達している (Fig.1)。細胞体の大きさが数十マイクロメートル程度しかないことを考慮すると、その形状は極めて特徴的であると言える。細胞体で合成されたタンパク質などを軸索の先端まで運ぶのに、単なる拡散運動にまかせるだけではあまりにも非効率的であり、昔から軸索内にはなんらかの能動的な物質輸送システムがあると考えられてきた。この神経軸索内の輸送現象の担い手として同定されたのが、キネシン (kinesin) である。キネシンはタンパク質フィラメントである微小管 (microtubule) に沿って、ある決まった向き (+端方向) に滑り運動を発生できることが明らかにされた。^{3,4)} 微小管の+端は、神経軸索の末端方向に向いているため、キネシンが、タンパク質が詰め込まれた小胞などをせおいこめば、軸索の末端まで輸送できることになる (Fig.1)。例えるならば、微小管を都市と都市をつなぐ高速道路とすると、キネシン分子は運送トラックということになる。ちなみに、このキネシンという名前は、ギリシャ語のkinein (= 動く)

にちなんでつけられたものである。

キネシンがアデノシン3リン酸 (ATP) 1分子を加水分解して得られる自由エネルギーは約 $20 k_B T$ であり、この化学エネルギーをもとにして、滑り運動を発生させていると考えられている。この化学-力学エネルギー変換を担っているのが、二つの相同な球状頭部である。この頭部は、約350のアミノ酸からなりたっており、そこには微小管結合部位とATP/ADP結合部位がある。キネシンは、これら二つの頭部を交互に微小管と結合・解離させることで一方方向性の滑り運動を発生していると考えられている。⁴⁾ この運動モデルは、Hand-over-hand model と呼ばれており、ヒトが2本の足を交互に前方に動かしながら歩く様子と似ている。

キネシンの頭部の大きさは7 nm程度であるため、1ナノメートルの位置分解能をもつ顕微鏡を開発すれば、キネシン分子が微小管上を“歩く”様子を観測できそうである。ここで、重要なのは、多くのキネシン分子による動きではなく、1分子の動きを直接捉える必要がある点である。なぜなら、不特定多数のキネシン分子がうみ出す滑り運動では、個々の分子の動きが平均化されてしまい、キネシンが持つ本当の運動特性を探ることが困難だからである。第3章では、筆者らが開発した生体分子1分子が発生するナノメートルの変位を計測できる顕微鏡と、キネシン1分子の運動計測について紹介する。

3. キネシン1分子のナノメートル計測

通常の光学顕微鏡を用いても、ナノメートル程度の大きさしかないタンパク質の姿を「直接」みることはできない。そこで考案されたのが、光学顕微鏡下で観測が容易なマイクロメートルスケールの大きな目印 (微小球) を標的分子に吸着させておき、目印の動きから分子の動きを検出する手法である。さらに、光ピンセット (後述) を用いて微小球の熱揺らぎを抑制させると、位置分解能が向上し、分子の動きをナノメートルの精度で検出できるようになる。²⁾ 光ピンセットとは、レーザー光を回折限界以下の領域に集光させることで、光の放射圧を利用して、溶液中にある微粒子の捕捉や操作を行う手法であり、顕微鏡下で微小物体を自在に操る「光の手」として幅広く用いられている。^{5,6)} 筆者らは、暗視野照明型のナノメートル計測法を開発することで、生体分子1分子が生成するナノメートルの変位をマイクロ秒の時間分解能 (世界最高感度) で検出することを可能にした。^{7,8)}

Fig.2(a)に、筆者らが開発したキネシン1分子の運動計測の概念図を示す。まず、キネシンと直径 $0.2 \mu\text{m}$ の蛍光ビーズ (ポリスチレン製ラテックス球) を1:1程度のモル比で混合し、キネシン1分子をビーズ表面に非特異的に吸着させておく。このキネシン=ビーズ溶液、蛍光修飾した微小管、

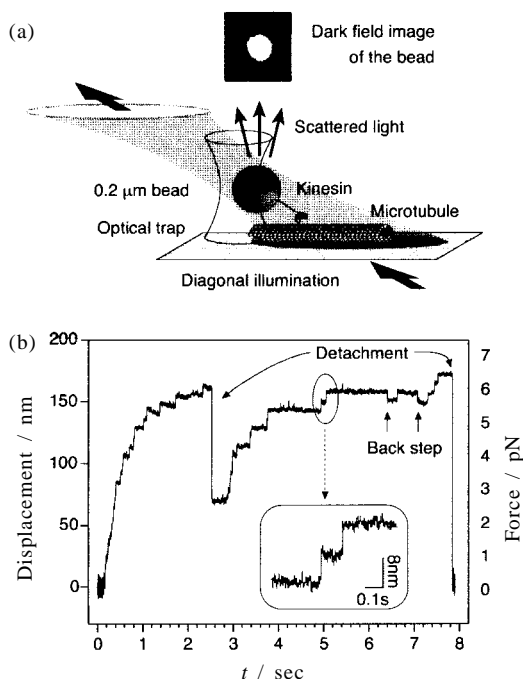


Fig.2 Nanometry of single kinesin molecules. (a) Schematic diagram of optical trapping nanometry system (not to scale). (b) Time course of the displacement of single kinesin molecules. [ATP] = 10 μ M. The displacement of kinesin was obtained from the bead displacement taking into consideration the compliance of the experimental system.

ATP などを含むサンプル溶液を調整し、2枚のカバーガラスを組み合わせた「チャンバー」に封入し、顕微鏡にとりつける。光ピンセットを用いて、このキネシン・ビーズを捕捉、操作し、ガラス表面にしっかりと吸着している微小管と相互作用させて、キネシン・微小管系の滑り運動を顕微鏡下で再構成する (Fig.1 と比較されたし)。ビーズを集光したレーザー光で斜めから照明し、その散乱光を暗視野像として四分割光ダイオードに投影する。つまり、ビーズの位置の変化は、四つある光センサーに入射する光量の変化として検出されることになる。ナノメートルの位置分解能は、微小管に結合したキネシンと光ピンセットの二つのバネがビーズを逆方向に引っ張り合い、ビーズの熱揺らぎが抑制されることで達成される。光ピンセットに捕捉されたビーズは、焦点からの変位に比例した勾配力を受けるので (フックの法則)、ビーズに加わる捕捉力は、「光ピンセットのバネ定数 (\sim pN nm⁻¹)」と「捕捉中心からの距離」の積から容易に計算できる。この光ピンセットがもつ「バ

ネばかり」の性質を用いると、キネシン分子に加わる力を求めることができるので、生体分子が行う仕事やエネルギー効率の議論が可能となる。

Fig.2(b)は、キネシン1分子が微小管に沿って発生する変位の測定例である。ビーズが捕捉中心から遠ざかるに従って負荷が大きくなるので、キネシン分子の運動速度は低下していく。キネシン1分子が負荷に逆らって発生できる最大力は約7 pNである (もし、ビーズに複数のキネシンが吸着していると、最大力はより大きな値となるので、「1分子」の確認を行う際には良い指標となる)。変位トレースの一部を拡大すると、キネシンがステップ状の変位を繰り返し発生しながら運動する様子がみとれる。このステップの大きさは、ATP濃度や力の大きさに依存せず、常に8 nmであった。^{9,10)} それでは、キネシンのステップサイズは、どのようにして決められているのだろうか？ヒトの歩幅は足の長さで決められるのだが、キネシンの場合は滑り運動の際にレールとなる微小管によって決められている。微小管の構成単位はチューブリンダイマーであり、その長さはちょうど8 nmである。以上のような実験結果をもとにすると、キネシン分子には、微小管によってあらかじめ定められている次の結合部位へと正確に移動できる“決定論的”な運動モデルがふさわしく思える。しかしながら、高負荷領域のトレースをよく見ると、進行方向とは逆向きのステップ (Back step) や、キネシンが微小管から解離し、ビーズが光ピンセットの捕捉中心に戻る現象 (Detachment) が頻繁に生じている。従来までの装置では、ベストデータでようやくステップ状変位が観測できるかどうかという状況であり、出現頻度の少ない後ろ向きの運動に対して詳細な解析は行われていなかった。第4章では、ステップの方向性を考慮したキネシンの運動解析を紹介すると共に、その結果浮かび上がってきた“確率的な”運動モデルを提案したい。

4. キネシンの確率的なステップ生成メカニズム

筆者らは、変位トレースの全負荷領域にわたって、ステップ状の変位が明瞭に検出されているものを選び出し、次に、各ステップの負荷の大きさ、運動の方向性、ステップ間の時間間隔 (Dwell time) をひとつひとつ丹念に調べあげた。^{11,12)} 運動の方向性は、+端方向への8 nmステップを“前進運動”として、バックステップ (Back step) や微小管からの解離 (Detachment) を“後退運動”として解析した。バックステップと微小管からの解離をまとめているのは、これらを別の現象として解析を行ったものの、負荷依存性などにおいて、ほとんど違いがみられなかったからである。

Fig.3(a)は、ATP濃度1 mMの変位トレースから、各負荷領域における前進運動と後退運動の数を数え、それぞれ

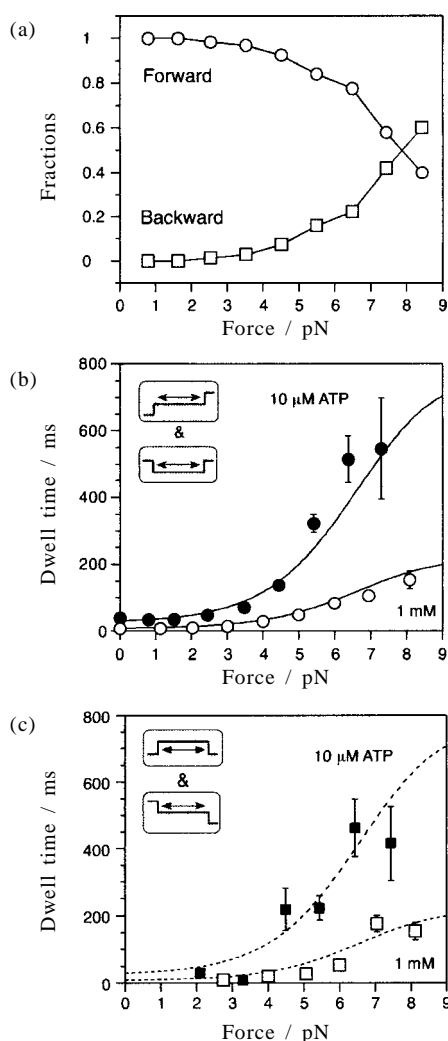


Fig.3 Analysis of the forward and backward movements. (a) Ratio of the forward (○) and backward (□) movements at 1mM ATP. (b) Dwell time before the forward movement. 1 mM (○) and 10 μM (●) ATP. (c) Dwell time before the backward movement. 1 mM (□) and 10 μM (■).

の割合をプロットしたものである。後退運動の出現頻度は、低負荷領域 (< 4 pN) では数%にも満たないが、負荷の増大と共に増加し、キネシン1分子が発生する最大力である7~8 pNの負荷領域では後退運動と前進運動の割合は一致した。低いATP濃度(10 μM)の変位トレースからも同様の結果を得たので、ATPの結合反応と運動の方向性の決定とは異なるプロセスで行われていると考えられる。

次に、ステップ間の時間間隔(Dwell time)の長さをわかり、各負荷レベルで平均値を求めた。Fig.3(b)は、キネ

シンが前向きにステップするまでのDwell timeの平均値をプロットしたものである。Dwell timeが長くなる、つまり、キネシンの“歩み”が遅くなるのは、負荷が大きい場合や、ATP濃度が低い場合であることが見てとれる。前者は、キネシンがうしろに引っ張られることで前に進みにくくなることを意味し、後者は、ATP分子が結合するまでの時間が長くなることに起因すると解釈できる。同様に、後退運動までのDwell timeを解析したところ、前進運動の場合と同じような負荷依存性、ATP濃度依存性をもつことが明らかになった(Fig.3(c))。これは、キネシンは後ろにステップする時でさえ、ATPを加水分解する必要があり、前にステップする場合と同様の化学反応経路をたどることを意味する。特に、大きな負荷のもとでは、後ろに戻るまでのDwell timeも長くなるという結果は、直感に反するものである。

以上のような実験結果を説明するために、筆者らは、「キネシンはATPを加水分解した後、前か後ろのどちらかにステップする」という“確率的な”モデルを考案した(Fig.4(a))。このモデルでは、キネシンの前進運動と後退運動は、同一状態から競合的に発生するため、化学反応経路は途中で分岐することになる。これは、キネシンは毎回同じ方向に運動できるように、あらかじめプログラムされているのではなく、周囲の熱揺らぎの影響により、運動方向は、毎回、確率的に決定されることを意味している。この運動モデルを用いて、運動の方向性とステップの時間間隔(Fig.3)の解析を行い、各反応速度を決定した。^{11,12)}キネシンの両方向性運動を考える上で最も重要な前進運動の反応速度(k_{3f})と、後退運動の反応速度(k_{3b})を示す(Fig.4(b))。低負荷領域では、 k_{3f} は k_{3b} に対して十分大きいので、キネシンはほぼ100%の確率で前方向にステップできるのだが、負荷の増大と共に、 k_{3f} の値が指数関数的に低下し、運動の方向性が失われていくことになる。ここで興味深いのは、 k_{3f} のみが負荷に依存し、 k_{3b} は負荷と独立である点である。この点については第5章で再びふれる。

キネシンの運動機能を、滑り運動の速度とエネルギー効率から見てみよう。キネシンの滑り速度は、ATP濃度が低い条件や高負荷領域では、低下することが見て取れる(Fig.5(a))。これは、ATPの結合反応(k_1)がATP濃度に依存しており、前にステップする反応(k_{3f})が負荷に依存することに起因している。次に、ATP1分子を加水分解して得られる自由エネルギーを $20 k_B T$ として、エネルギー効率の議論を行った(生理的条件下では、ATPはADPやPiに対して過剰に存在しており、また、今回の実験でも、溶液中のキネシン濃度は約2 pMなので、ATPの加水分解反応に伴うヌクレオチドの濃度変化は無視できる)。Fig.5(b)には、キネシンが1ステップあたりに負荷に対して行う仕

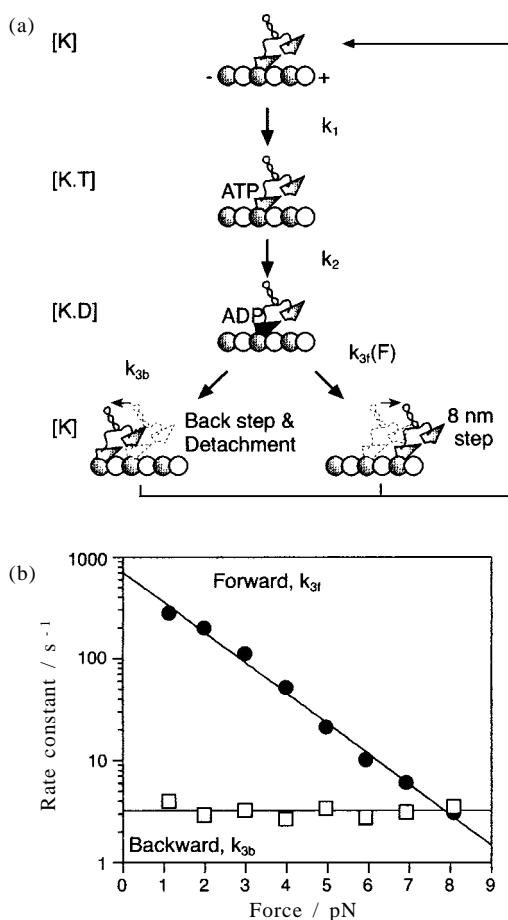


Fig.4 Stepping kinetics of the bi-directional movement. (a) Branched kinetic pathway. Kinesin attached to the microtubule with one motor-domain [K]. The ATP molecule binds to the head [K.T] and is hydrolyzed [K.D]. After kinesin moves either to the forward or backward direction, the ADP molecules are released [K]. (b) Load dependence of the rate constants of k_{3f} and k_{3b} .

事量 (= 平均変位 × 力) を、 $20 k_B T$ で割った値をプロットしてある。高負荷領域で、エネルギー効率が低下するのは、負荷の増加により、後ろ向きに運動する割合が増加するので、平均変位量が低下するからである。このようなキネシンの滑り速度とエネルギー効率の負荷依存性は、筋繊維の実験結果とよく似ていることも追記しておこう。

筆者らの取り組みにより、キネシンは、ATPの加水分解反応が、必ず前向きのステップとカップルするような“決定論的な”モデルではなく、運動方向があらかじめ決定さ

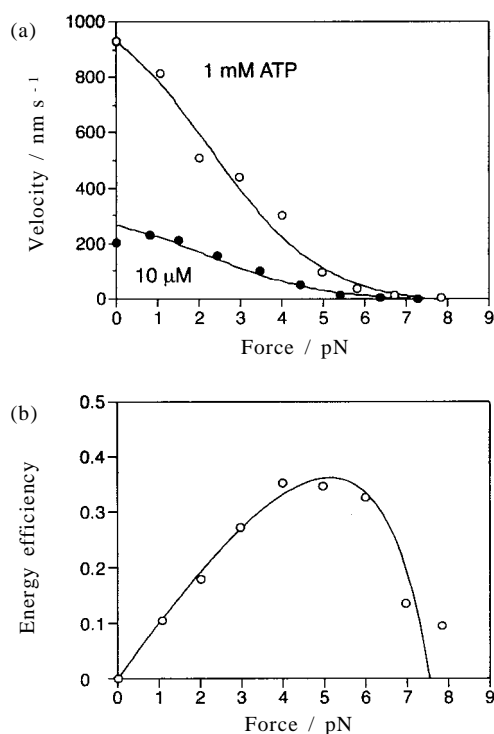


Fig.5 Mechanics and energetics of the bidirectional stepwise movement. (a) Force-Velocity Relationships. 1 mM (○) and 10 μM (●) ATP. (b) Energy efficiency. The solid line represents the estimation by the theory.

れていない“確率的な”運動モデルが適切であることが明らかになった。これは、分子モーターの運動モデルとしてこれまでも理論的に研究されてきた、粒子がポテンシャル中を熱揺らぎによって確率的に運動するというモデルを支持する結果でもある。第5章では、Brownian ラチェットと呼ばれるこれらのモデルを紹介し、ここまでの実験結果の理論的な説明を試みる。

5. 分子モーターの理論モデル： Brownian ラチェット

これまでも説明してきたように、キネシンの運動では、ATPの加水分解反応によって得られたエネルギー $\Delta\mu$ により、一方向への運動が駆動されている。一般に流れのある現象を解析する際には線形非平衡の熱力学がよく用いられる。ではキネシンの運動も線形非平衡の熱力学で説明できるだろうか？ご存じの様に線形非平衡熱力学では、駆動力 X とそれによる流れ J との間に関係が成り立つことを出発点とする。

$$J = \lambda \cdot X \quad (1)$$

例えば、 J が電流、 X が電場ならば、これはオームの法則であり、 J が熱流で X が温度勾配であればフーリエの法則と言うことになる。それでは J をキネシンの平均速度 v とし、 X を加水分解エネルギー $\Delta\mu$ だと思えば、同様に式(1)のような関係が成り立つだろうか。残念ながら、空間座標系を反転させてみたとき、 v にはマイナスがつくが、 $\Delta\mu$ は変化しないことを考えると、両者が式(1)のような等式で結ばれることはあり得ないことが分かる。¹³⁾ これは、キネシンの運動を線形非平衡の熱力学では扱えないことを意味しており、まったく違うアプローチが必要となってくる。そのために発展させられてきた理論モデルが、以下で紹介するBrownian ラチェットである。¹⁴⁾

Brownian ラチェットの説明に入る前に、まずBrown運動の理論を思い出していただきたい。ナノメートルサイズの非常に小さな粒子が、水溶液環境中で一次元のレールの上を運動しているような状況を想定しよう。この粒子はレールからポテンシャル力を受けているが、そのほかにも周囲の溶媒分子などから常に熱揺動力を受けており、その結果としてレールの上をBrown運動する。そのような粒子の運動は、レールに沿った粒子の位置を $x(t)$ として次のようなLangevin方程式によって記述できる。

$$\gamma \frac{dx}{dt} = - \frac{U(x)}{x} - f + \zeta(t) \quad (2)$$

左辺の項は溶媒やレールから受ける粘性抵抗力 (γ は粘性係数) であり、右辺一項目がレールから受けるポテンシャル力、二項目は一定の負荷、右辺三項目が溶媒分子などから受ける熱揺動力である。熱揺動力 $\zeta(t)$ は平均が0で、分散が $2\gamma k_B T$ の白色ガウスノイズであるとする。通常慣性項の効果は粘性項に比べて小さいので、ここでは無視してしまっている。微小管は周期的な構造をしており、また $+/ -$ の方向性があるので、

[仮定1]ポテンシャル $U(x)$ は x に関して周期的であり、また反転対称でない

とする。この方程式は微粒子の単なる拡散運動を記述するものである。従って、ポテンシャルが非対称であろうと、無負荷時の平均速度は0でなければならない(さもなければ熱力学第二法則を破ってしまう)。このようなLangevin方程式についてのより詳しい解説は文献を参照されたい。¹⁵⁾

それではどうすれば、キネシンのように揺らぎながらも一方向性の運動ができるようになるだろうか? キネシンや微小管のようなタンパク質は複雑な内部自由度を持つが、そうした内部自由度が両者の相互作用に影響すると考えることはそれほど不自然ではない。そこで、そのような内部

自由度のうち重要なものが一つあるとして、粒子がレールから受けるポテンシャル力が位置 x だけでなく、その内部自由度 y の関数でもありとしてみよう。つまり式(2)の $U(x)$ が $U(x,y)$ であると考えるのである。自由度 y も揺らいでいるはずなので、その時間変化も似たようなLangevin方程式で記述できるとしてみよう。

$$\eta \frac{dy}{dt} = - \frac{U(x,y)}{y} + \zeta(t) \quad (3)$$

ここで、 η は y の運動に関する粘性係数、 $\zeta(t)$ は熱揺動力(平均0の白色ガウスノイズ)である。さらに、

[仮定2]ATPの加水分解によって放出されたエネルギーによって、自由度 y が受ける熱揺動は周囲の溶媒の温度よりも高い温度 T_F に対応する

とする。すると、 $\zeta(t)$ の分散は $2\eta k_B T_F$ となる。この[仮定2]がミソなのであるが、実は、この仮定をおくだけで、無負荷時の平均速度は0ではなくなってしまふ。なぜなら[仮定2]によりこの系は、温度の異なる二つの熱浴に「同時に」つながれた非平衡系になるからである。非平衡条件下にある系は第二法則を満たす必要はないので、系の対称性がもともと破れていれば(仮定1)、平均速度が0になる理由がない。こういうと狐につままれた様な気分になるが、(2)と(3)のモデルについて数値計算によって、実際に平均速度が有限の値を持つことがすでに示されている。¹⁶⁾

実は、ここで説明したモデルは、Feynmanがその有名な教科書で提案したラチェット模型^{17,18)}をLangevin方程式に焼き直したものである。¹⁶⁾ $U(x,y)$ として適当な関数を採用すれば、キネシンの実験で見られたような前進運動と後退運動の特徴的な負荷依存性も再現できるようになる。実際に、Feynmanの熱ラチェット模型を用いて、Fig.4(b)の実験結果をフィッティングしてみると、温度 T_F は熱浴の温度 T の3倍程度となり、分子モーターの運動をよく再現することができる。^{11,12)} T_F の物理的実体は未だ明らかではないものの、他の分子モーターの運動解析からも、 $T_F \sim 3T$ となることが示されているので^{11,12)}分子モーターのメカニズムの普遍性を探る上で、重要な意味を持つ可能性が高いと言える。1分子計測による実験的研究が進む中で、現実性を伴ったモデルや理論的な枠組みの構築は当面の課題である。

6. 分子モーターのエネルギー論

ところで、最初に触れたATPの加水分解エネルギー $\Delta\mu$ は、 T_F の様なパラメータとどのように関係づけられるのだろうか? これを考えるには、この系へのエネルギーの出入りを計算する必要がある。式(2)、(3)の様なLangevin方程式で表される系のエネルギー収支に関する議論は近年関本らによって整備されはじめ、Stochastic Energetics と呼ば

れている。¹⁹⁾ 数学的な厳密さはここでは気にしないことにすると、その基本的な考え方は以下のようなものである。式(2)や(3)はつまるところ運動方程式であるので、系にはたらく力のバランスを表している。Newtonの運動方程式を思い返せば分かるように、力のバランス式に速度を掛けたものは単位時間当たりのエネルギー収支を表す式となる。従って式(2)に dx/dt を、式(3)に dy/dt を掛けてそれぞれ足しあわせると、系へのエネルギーの出入りを表す式

$$\frac{dU(x,y)}{dt} + f \frac{dx}{dt} = \left\{ -\eta \left(\frac{dy}{dt} \right)^2 + \zeta \frac{dy}{dt} \right\} - \left\{ \gamma \left(\frac{dx}{dt} \right)^2 - \xi \frac{dx}{dt} \right\} \quad (4)$$

を得る。左辺の第一項はポテンシャルの時間変化率を表し、定常状態では0である。第二項は負荷に抗してする仕事率に対応する。そして右辺の一つ目の括弧が、単位時間当たり自由度 y を介して受け取る熱量、二つ目の括弧が同じく x を介してはき出す熱量であると解釈できる。

この手法を用いると、与えられたモデルのエネルギー収支を計算することが可能となる。しかし、式(4)をキネシン分子の実験結果と照らし合わせようとする、直ちにいろいろ困難に直面してしまう。まずキネシンにおいて自由度 y が何かははっきりしない。さらに自由度 y に対する粘性係数 η は実験的に求められていないばかりか、現状では、測定の仕方さえ分からないのである。したがって、このままではエネルギーの出入りに関して、式(4)と実験結果を比べることはできない。この問題を解決するため、原田は現象論的考察により、実験的に測定可能な量だけで閉じたエネルギー流入・流出量の表式を提案した。²⁰⁾ 以下では、その理論を簡単に紹介したい。

この理論では、内部自由度 y のように物理的実体の分からないものを導入することをやめて、現象論的に分子モーターの運動を記述できるような実効的運動方程式を作り、それを解析するという方針をとる。このような運動方程式に最低限必要なのは、分子モーターの一方方向性の運動を引き起こすような駆動力とそれに対する負荷、それから粘性抵抗力と熱揺動力であろう。そうした量をあらかじめ運動方程式に組み込んでおいて、あとから実験的に得られたパラメーターでそれらの値を決めることにする。実験で得られるパラメーターを再現できるよう、以下のようなやや一般化されLangevin方程式を用意する。

$$\Gamma(t-t') \frac{dx(t')}{dt'} dt' = -f + \Xi(t) + \varphi_0 + \varphi(t) \quad (5)$$

変数 $x(t)$ はここでもレールに沿ったモーターの位置を表す。方程式(5)の左辺は粘性項である。ただし粘性係数に対応す

る $\Gamma(t)$ は、少し一般化して時間に依存する関数であり、 t が大きくなると速やかに0になる性質をもつことにする。この項は $\Gamma(t)$ と dx/dt とのたたみ込みになっている事に注意されたい。これにより、粒子の受ける粘性抵抗が、少し前の粒子の速度にも依存する場合でも記述できるようになっている。次に右辺第一項の $-f$ は、以前と同じく外部負荷であり、 φ_0 と $\varphi(t)$ の項は分子モーターが発生する力に対応している。分子モーターが発生する力といっても、それは時間的に揺らいでいるはずなので、その平均値を φ_0 、それを差し引いた残りを $\varphi(t)$ とおいてある。最後に、 $\Xi(t)$ は、熱揺動力に対応しており、その平均値は0である。また、その大きさは周囲の溶媒の温度 T と先程の粘性関数 $\Gamma(t)$ を使って

$$\langle \Xi(t)\Xi(t') \rangle = k_B T \Gamma(t) \quad (6)$$

と決めておく。 $\langle \dots \rangle$ は平均値を表すが、この式は「揺動散逸関係」という熱揺動力が満たすべき性質を一般化したものである。²¹⁾

以上のように説明してきた各項の性質から、分子モーターが熱揺動力の影響を受けながらも、力を発生し、一方向に進んでいく様子が、方程式(5)に記述されていることが想像して頂けると思う。特にこの方程式の著しい特徴として、 $\Gamma(t)$ のFourier-Laplace変換が、速度の複素感受率の逆数に一致する。また、 $\varphi(t)$ の自己相関関数と、速度ゆらぎのパワースペクトルなども直接対応づける事が可能である。つまり、数式(5)は、実際の測定にかかるような量から構成された、分子モーターの実効的運動方程式になっている。このような実効的運動方程式と、式(2),(3)のようなラチェットモデルを記述するLangevin方程式との関係については文献²²⁾を参照されたい。

エネルギー収支を見るには、Stochastic Energeticsの場合と同じように、方程式(5)の両辺に dx/dt を掛けて時間平均をとってやればよい。運動方程式(5)の統計的性質は、測定可能な量で書けているので、エネルギー流入・流出量も速度の感受率やパワースペクトルといった測定量だけで記述できる。²⁰⁾ それらの具体的な表式は煩雑なのでここでは省略するが、その代わりに、少し近似を導入することで得られる便利な公式を紹介することにしよう。この公式を用いると、キネシンのエネルギー効率の実験結果 (Fig.5(b)) と直ちに比較できるようになる。それによると、単位時間当たり分子モーターが消費する自由エネルギー P は、

$$P \approx \varphi_0 v + \frac{D/\chi - k_B T}{\tau} \quad (7)$$

と書ける。ここで、 D は分子モーターの実効的な拡散係数、 χ は外力に対する移動度、また、 τ はDwell timeに対応す

る時定数である。式(7)右辺の一項目は、モーターの出す平均力によってなされる仕事を表す。また、第二項の分子は、熱平衡状態では満たされるべき Einstein の関係式^{15,21)}

$$D = \chi k_B T \quad (8)$$

が、非平衡状態で破れる度合いに対応する。つまりこの項はATPの加水分解エネルギーによって、ゆらぎが増幅されるという効果を表している。従って式(7)は、モーターへのエネルギー入力の一部が仕事に変わり、残りはゆらぎとして散逸されることを表現していて、直感的なイメージにも合致しているであろう。

式(7)の右辺に、筆者らの実験をはじめとする各種の実験結果を代入したところ、キネシンが単位時間あたりに消費する自由エネルギーとして、 $P \approx 7.2 \text{ pN nm ms}^{-1}$ という値が得られた。これは、ATPの加水分解エネルギー $\Delta\mu \approx 20 k_B T$ を、無負荷時のターンオーバーレート $\tau_{\text{ATPase}} \approx 10 \text{ ms}$ で割った値 ($\Delta\mu / \tau_{\text{ATPase}} \approx 8.4 \text{ pN nm ms}^{-1}$) に近い値である。次に、エネルギー消費率 P で、キネシンの仕事率(平均速度×力)を割った値をFig.5(b)に重ねてみると、実験結果とよく一致していることがわかった。

本章の最初に説明した Stochastic Energetics は、モデルがあらかじめ分かっている場合にはそのエネルギー収支を計算する処方箋を与えてくれるが、キネシンのようにまだそのメカニズムに不明な点が残っているような場合には、実験データと比較を行えるようなエネルギー論はこれまで存在しなかった。それに対して、ここで示した方法では、キネシンのエネルギー消費率を他の観測可能なパラメーターと関係づけることができる。このように、系の詳細に立ち入ることなく、測定可能な量同士を関係づけられるのは現象論の優れた点である。例えば、熱力学は完全な現象論であると言われることがあるが、それは熱力学が測定量同士の閉じた関係を与えるからである。系の詳細に依存しないそのような関係式は、簡単に測定できる量をはかることで、他の(より測定が難しい)量を知ることができるというメリットを持つ。分子モーターの場合、1分子計測によって力学測定は比較的精度良く行えるが、入力エネルギーを測定することにはまだ技術的課題が多い。本章で提案した現象論的方法が、そうした状況で役に立つことが期待される。

7. むすび

本稿では、1分子計測による分子モーターの滑り運動測定と非平衡統計力学に基づいた理論解析について紹介してきた。筆者らをはじめとする多くの研究者の取り組みにより、分子モーターは、熱揺らぎの影響を受けながらも、高いエネルギー効率で駆動していることが明らかになってき

た。この自然界に存在する“ナノマシン”からその動作原理を学ぶことにより、ナノワールドにおける新しい自然法則を発見できると期待される。そして、そうした知見を蓄積していくことによって、これまでとは異なる新しい原理で動作するナノデバイスを創出することも夢ではないのではないだろうか。

謝 辞

本研究の実験結果は、科学技術振興事業団 国際共同研究 1分子過程プロジェクトにて得られたものであり、大阪大学の柳田敏雄教授に深く感謝いたします。これらの研究について議論をしてくださった京都大学の吉川研一教授、寺嶋正秀教授、東京大学の佐々真一助教授ほか、有益なコメントをして頂いた市川正敏博士、高木拓明博士、江崎誠治博士、鈴木洋一様には深く感謝いたします。本研究を行うにあたり、笹川科学研究助成(西山)と日本学術振興会(原田:特別研究員No.05494)から援助を得ています。

文 献

- 1) 高林武彦, 熱学史, 海鳴社 (1999).
- 2) 柳田敏雄, 石渡信一編, ナノピコスペースのイメージング, 吉岡書店 (1997).
- 3) 合原一幸, 岡田康志編, <1分子> 生物学, 岩波書店 (2004).
- 4) 川口憲治, 上村想太郎, 石渡信一, 生物物理 **42**, 156 (2002).
- 5) 増原極微変換プロジェクト編, マイクロ化学, 化学同人 (1993).
- 6) T. Harada and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. E* **69**, 031113 (2004).
- 7) M. Nishiyama, E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida, and H. Higuchi, *Nature Cell Biol.* **3**, 425 (2001).
- 8) 西山雅祥, 光学 **30**, 445 (2001).
- 9) K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block, *Nature* **365**, 721 (1993).
- 10) H. Kojima, E. Muto, H. Higuchi, and T. Yanagida, *Biophys. J.* **73**, 2012 (1997).
- 11) M. Nishiyama, H. Higuchi, and T. Yanagida, *Nature Cell Biol.* **4**, 790 (2002).
- 12) 西山雅祥, 樋口秀男, 生物物理 **44**, 75 (2004).
- 13) A. カチャルスキー, ピーター F. カラン著 青野 修, 木原 裕, 大野宏毅訳, 生物物理学における非平衡の熱力学, みすず書房 (2002).
- 14) P. Reimann, *Phys. Rep.* **361**, 57 (2002).
- 15) 太田隆夫, 非平衡系の物理学, 裳華房 (2000).
- 16) K. Sekimoto, *J. Phys. Soc. Jpn.* **66**, 1234 (1997).
- 17) R. P. Feynman, ファインマン物理学 Vol.II, 岩波書

- 店 (1963).
- 18) 大沢文夫, 講座: 生物物理, 184, 丸善 (1998).
 - 19) 関本 謙, ゆらぎのエネルギー論, 岩波 (2004).
 - 20) T. Harada, *Europhys. Lett.* **70**, 1 (2005).
 - 21) 戸田盛和, 久保亮五編, 岩波講座 現代物理学の基礎 6 - 統計物理学, 岩波書店 (1972).
 - 22) T. Harada, K. Hayashi, and S. Sasa, *J Phys. A: Math. Gen.*, in press; cond-mat/0501371.

要 旨

「動き」は生命の基本的な特徴である。この生体機能を生み出しているのは、細胞の中に存在する分子モーターである。分子モーターはアデノシン3リン酸 (ATP) 分子の加水分解反応によって取り出したエネルギーをつかって力を生み出す酵素である。化学・力学エネルギー変換の機構については多くの研究が行われてきたが、いまだ解明されていない。この解説では、キネシン分子が微小管に沿って一方向に運動するメカニズムを明らかにするために筆者らが用いた、実験及び理論的アプローチを紹介する。我々は、新しい一分子検出法を用いて、キネシン分子の滑り運動の素過程の検出を行い、その運動特性を解析した。その結果、キネシンの一方向性の運動は、確率的な過程を経て産み出されていることが明らかになった。このような確率的な運動をエネルギー論的な立場から説明するため、我々は、非平衡統計力学に基づいた現象論的枠組みを新たに構築し、

キネシンの滑り運動におけるエネルギー収支を決定した。その結果、ATP加水分解反応によって得られたエネルギーは、効果的に一方向性の運動を産み出すことに使われていることが明らかになった。我々が開発した実験的、理論的手法は、ナノワールドにおける熱力学を理解するための端緒となることが期待される。



西山雅祥 Masayoshi Nishiyama
 京都大学大学院理学研究科, Graduate School of Science, Kyoto Univ., TEL. 075-753-4023, FAX. 075-753-4000, e-mail: m-nishi@kuchem.kyoto-u.ac.jp
 研究テーマ: 生体分子機械の動作原理の実験的研究
 趣味: 読書



原田崇広 Takahiro Harada
 京都大学大学院理学研究科, Graduate School of Science, Kyoto Univ., TEL. 075-753-3749, FAX. 075-753-3779, e-mail: harada@chem.scphys.kyoto-u.ac.jp
 研究テーマ: 生命現象に関係する非平衡開放系の実験と理論
 趣味: 音楽演奏