

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成14年度採択研究代表者

柳田 敏雄

(大阪大学大学院生命機能研究科 教授・研究科長)

「ゆらぎと生体システムのやわらかさをモデルとするソフトナノマシン」

## 1. 研究実施の概要

熱ゆらぎによって駆動する生体分子モーターの仕組みを、まず実験的に詳細に記述する。レバーアーム説に代表される構造変化による運動モデルではミオシンの運動は説明できないことが示され、さらに単頭ミオシンを使ってブラウン運動による運動の可能性が確かめられた。方向性のないランダムなブラウン運動はATPのエネルギーを使って方向性が与えられる。その分子機構に迫る計測システムを立ち上げることを目指した。具体的にはレール蛋白側のアクチンフィラメントの役割を検証するシステムの構築を目指している。また、熱揺らぎによるメカニズムを理論的アプローチと協調して進めてゆく。

## 2. 研究実施内容

### ①熱揺らぎを駆動力にしたミオシンの運動の解析

#### (i) 単頭ミオシンを使った運動の解析

ミオシンVは2つのモーター部位を持つ分子モーターで、ヒトが歩行するように片方のモーター部位で支えている間にもう一方のモーター部位で動いていくことを交互に繰り返して運動していると考えられている。しかもネック部位が長いことに対応してステップサイズが大きく、レバーアーム説を支持していると思われた。しかし遺伝子工学的にレバーアームの長さを短くした変異ミオシンVや、天然に短いレバーアームを持ったミオシンVIでも同じように動くことが示され、ミオシンの運動は機械論的なメカニズムでは説明できないことが分かってきた。

そこでそのメカニズムを探るために1本足の単頭ミオシンVの力学的特性を調べた。遺伝子工学的手法を用いて単頭ミオシンを調製し、ミオシンロッドと共重合させミオシンコフィラメントに固定し、単頭のミオシンの引き起こす運動を、その方向をコントロールしながら計測するようにした。ナノメトリーの計測はアクチンフィラメントの両端にビーズをつけ、レーザートラップを使っておこなった。その結果、アクトミオシンの相互作用する最適の角度を確認することにより従来観察できなかった連続運動が観察できた。単頭のミオシンVでも双頭のミオシンVと同じように大きなステップを持って連続運動することがわかった。レバーアーム説では単頭ミオシンは滑り運動をしないはずなので、この結果

を説明することはできない。(論文印刷中)

#### (ii) ミオシンVIのやわらかな運動

ミオシンVIは短いレバーアームにもかかわらず、大きなステップサイズを持つことが示され、そのメカニズムが注目されている。ミオシンVI単分子をビーズにつけ、レーザートラップしてナノメトリーを行った。その大きな特徴は負荷依存性を持つなど力学特性が環境に大いに依存していることである。ステップの大きさは負荷によって小さくなることが示された。これはミオシンが本来ゆらぎによる柔軟の機構で機能していることによる。そこでこの性質をさらに詳しく計測することで、そのメカニズムを探った。(投稿準備中)

#### (iii) キネシンを使った熱揺らぎの役割の検証

キネシンは1個のATP分子の加水分解で1ステップ運動することが分かっている。しかしこの分子モーターでも、逆方向のステップが存在することを考えステップの方向性を解析してみると、ブラウン運動によりステップしていることが分かってきた。ATPのエネルギーはこのランダムな方向性を制御するために使われている。詳しい解析によるとそれはエントロピー的に方向性が決められていることが分かった。(投稿準備中)

### ②方向性制御のためのアクチンフィラメントの役割

#### (i) アクチンフィラメント上に沿った協同性のイメージング

アクチンフィラメント上でATP存在下で結合をイメージングした。その結果すでに滑り運動しているミオシン分子の前に別のミオシン分子が付きやすいことが示された。このことは運動しているミオシンの前方に何らかの場が作られ、結合が強くなっていることを示しており、ランダムなブラウン運動をするミオシン分子に方向性を与えるメカニズムとして重要な発見であると思える。(投稿準備中)

またこれに対応してアクチンの分子内の構造を1分子で計測した。アクチン分子内特定の2点に2種の蛍光色素で標識化しその間のエネルギー移動を観察することにより、そのダイナミックな構造変化を観察した。その結果、アクチン分子は複数の構造を持つことが示され、ATP存在下でミオシンの影響を受けて大きな構造変化をすることが示された。これは上述の場の存在とも考えあわせ。アクチンの積極的な役割を強く示唆するものである。(投稿準備中)

### ③熱揺らぎとタンパク質の機能

分子モーターで見られた特性は広くタンパク質のもつ一般的性質によると思われる。タンパク質の持つこのような特性と機能の関係を調べるべく、情報伝達タンパク質であるRasの構造変化機能を調べた。Rasの構造を1分子FRETで計測したところ、モータータンパク質と同じように多形構造を持つことが分かり、機能の多機能性と密接に関係しているらしい。Rasの変異タンパク質を作成し機能と構造の相関を探っている。

### 3. 研究実施体制

#### ゆらぎと機能相関計測グループ

- ① 研究分担グループ長：柳田 敏雄（大阪大学・教授）
- ② 研究項目：1分子計測技術による分子モーターのダイナミクスの計測  
生体システムでの柔らかい機構の計測

#### 構造ダイナミクス解析グループ

- ① 研究分担グループ長：難波 啓一（大阪大学・教授）
- ② 研究項目：電子顕微鏡を使った分子モーターの動的構造解析

#### モーター分子の設計作成グループ

- ① 研究分担グループ長：池辺 光男（マサチューセッツ大学教授）
- ② 研究項目：遺伝子工学を使ったモータータンパク質の設計作成

#### 理論・モデリンググループ

- ① 研究分担グループ長：菊池 誠（大阪大学・教授）
- ② 研究項目：ブラウン運動を基礎とした理論解析と分子モーターのモデリング

#### 人工筋肉グループ

- ① 研究分担グループ長：長田 義仁（北海道大学教授）
- ② 研究項目：人工筋肉の創製

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Y. Ishii, M. Nishiyama, T. Yanagida Mechano-chemical coupling of molecular motors revealed by single molecule measurements. Current protein and peptide science 5, 81-87 (2004)

#### (2) 特許出願

なし