

「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)

「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、実験的に詳細に記述し、その動作原理を探る。当グループではこれまで一分子計測技術を開発し個々の分子モーターの動態を計測することにより、メカニズムの解明を目指してきた。その結果、熱揺らぎによって駆動する分子モーターの特性を明らかにしてきた。また近年、多種類の異なった特性を持ったミオシン分子がみついている。これを利用してミオシンの運動について、さまざまな情報が得られている。その結果は、構造変化によって運動が引き起こされているとしたレバーアーム説で説明されているデータもあり、一方それでは説明できないデータも蓄積されている。これらのデータを統合的に説明するモデルの構築と実験との検証が望まれている。さらに、現実の分子モーターの機能と比較するためにシステムの中での分子モーターの振る舞いについて、計測、理論的なアプローチを行ってゆく。

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双頭分子モーターで、2つのモーター部位を交互に動かして長距離運動をしている。長いネック部位に対応して大きなステップサイズを示し、構造変化によってステップ運動するレバーアーム説によって説明されてきた。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、ミオシンの運動は構造変化による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ひとつだけモーター部位を持つ単頭ミオシンVの力学的特性を調べた。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である。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、ミオシン分子の向きをコントロールしながら計測するようにした。その結果、従来観

察できなかった単頭ミオシンVの連続運動が観察できた。また双頭ミオシン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。この結果は熱揺らぎによる滑り運動によってのみ説明することができる。（論文掲載）

(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。しかも、生体中では単頭として機能することがわかった。長い距離にわたって物質を運んでいる生体中の機構の解明は生理的にも重要である。実際ミオシンVIそれ自身の運動は長い距離進まないが、負荷（計測ではビーズ）を背負っているときには長距離進むことが示され、負荷依存的な挙動をすることがわかった。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ている。（投稿中）

(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のエネルギーを使ってランダムなブラウン運動は一方向性の運動にバイアスされる。一分子計測と熱力学的解析を組み合わせたステップ運動の解析から、キネシン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。（投稿中）

② 分子モーターのメカニズム

モーター活性にとってアクチンフィラメントの役割は重要である。アクチンフィラメント上での複数のミオシン分子の結合、滑り運動のイメージングによって、アクチンフィラメントを通じた協同性の可能性など検討している。そのためには一分子蛍光イメージングの空間分解能を上げることが必要であり、解析を行っている。

さらにミオシンがアクチンフィラメントの上を滑り運動するときの動き方をレーザートラップによるアクチンフィラメントの操作と力学計測できる計測システムを確立している。ミオシンVの滑り運動とアクチンフィラメントの回転を同時に計測し、二重らせんに沿ったアクチンフィラメント上の運動を解析している。

ATPの加水分解反応とそれを利用した分子モーターの滑り運動のカップリングは、一分子計測で直接同時に計測することで、計測することができる。レーザートラップを使った力学計測により、ATP一分子によって引き起こされるステップ運動が計測され、また蛍光標識したATPにより加水分解反応を一分子レベルで観察することができる。これまでの実験では、化学エネルギーの放出と力学的仕事の間に、時間的な遅れがあることが示唆されている。この結果をさらに確実にするために、蛍光標識ATPの精製など基礎的技術の開発を積み上げてきた。

③ アクチンフィラメントの動的特性

アクチンフィラメントは分子モーターミオシンのレールとして機能しているほか、細胞中でさまざまな機能にダイナミックに関与している。そこでアクチンの分子内の構造

を1分子レベルで計測した。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、とりわけ、ミオシンのモーター活性にとって活性化状態、非活性化状態に対応した構造の間をゆっくりと構造転移していることが、示された。このようなダイナミクスは、アクチンフィラメントの動的役割を考えると、非常に重要であると思われる。（投稿準備中）

④ システムの中での分子モーター

生体分子は一分子で機能しているのではなく、実際には多分子でシステムを構成し機能している。多分子システムで生体分子はお互いに相互作用しながら、一分子でみられた特性をさらに増幅させていることが予想される。一分子計測の結果を基礎に多分子系での挙動をシミュレーションを使って計算した。ランダムにブラウン運動するモーター分子が方向性を持った運動にバイアスする系で、モーター分子同士がバネでつなぎ、一方向運動がより強調される条件を検討した。また筋肉のような多分子モーターシステムで協同性が発現する可能性を探った。（論文掲載）

⑤ ミオシンの構造変化のシミュレーション

ミオシンのヌクレオチドの状態変化に伴う構造変化を緩和シミュレーションを使って調べた。その結果、パワーストロークの変化の途中に中間状態のあることが示唆された。さらに構造変化の過程における各部位のゆらぎの相関、アクチン結合部位への拘束を加えた場合のダイナミクスの変化変化について調べた。

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

(1) 論文発表

- Watanabe, T. Tanaka, H., Iwane, A.H., Yonekura, S.M., Homma, K., Inoue, A., Ikebe, R., Yanagida, T., Ikebe, M., A one-headed class V myosin molecule develops multiple large (approximately 32-nm) steps successively. Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A. 101, 9630-9635 (2004)
- Ishii, Y., Nishiyama, M., Yanagida, T., Mechano-chemical coupling of molecular motors revealed by single molecule measurements. Current Proteins and Peptide Science 5, 81-87 (2004)
- Yokota, H., Kaseda, K., Matsuura, H. Arai, Y., Iwane, A., Ishii, Y. Kodama, T. Yanagida, T. J. nanoscience and nanotechnology 4. 616-621 (2004)
- Ikebe, M., Inoue, A., Nishikawa, S., Homma, K., Tanaka, H., Iwane, A.H., Katayama, E. Ikebe, R., Yanagida, T., Motor function of unconventional myosin. Adv. Eep. Med. Biol. 538, 143-156 (2004)
- Kitamura, K., Tokunaga, M., Iwane, A.H., Yanagida, T. Mechanism of muscle contraction based on stochastic properties of single actomyosin motors observed in vitro. Biophysics 1, 1-19 (2005)