

「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、1分子レベルで実験的に記述し、“ゆらぎ”を機能に利用する分子機械の挙動を調べ、その動作原理に迫る。また、その素子の特性が生体システムの“やわらかさ”にどのように関連しているか検討する。これまで一分子の分子モーターを操作し計測できる技術を開発し、多分子計測では測れないさまざまな動的挙動を計測してきた。その結果、ランダムなブラウン運動を一方にバイアスして機能する分子モーターの動作の様子を明らかにした。同様な原理はタンパク質の構造-機能関係においても見いだされ、構造のゆらぎが他の生体分子との相互作用の結果、反応を一方にバイアスする機構を明らかにした。分子構造のゆらぎについては、情報伝達タンパク質などでも同様な機構が明らかにされ、その機構の普遍性が期待されている。自己制御、自己組織化を特徴とする生物システムでゆらぎの役割が次第に明らかになってきた。

分子モーターはランダムな熱ゆらぎをどのようにして方向性ある運動に変換しているのか、その分子メカニズムはまだよく分かっていない。また、生体システムの中で、分子モーターがどのように振る舞うか、今後の課題である。現在このような疑問に答えるべく、さらに研究が進められている。

2. 研究実施内容

①熱ゆらぎを駆動力にした分子モーターの運動の解析

(i) キネシンのブラウン運動を使った1方向運動

キネシンは1個のATP分子の加水分解で前か後ろかに1ステップ運動することが知られている。前後のステップの方向性を解析してみると、ステップ運動はブラウン運動によることが明らかにされた。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性の運動にバイアスされる。そのバイアスの機構として、分子計測と熱力学的解析を組み合わせた解析から、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明らかになった(nature chemical biology)。ATP濃度依存性からキネシンの化学-力学関係を詳しく調べ、ルースカップリングであることを示した(論文投稿中)。

(ii) 拡散を利用して長距離運動する分子モーターのメカニズム(ミオシンVIの運動)

通常ミオシンがアクチンフィラメントのレールの上を、物質を運びながら長距離進むためには、2つの頭部を交互にステップさせるハンドオーバーハンドの機構によると説明されている。しかし、ミオシンVIでは生体中、単頭で長距離輸送している。顕微鏡下で、負荷が存在するとき、ミオシンVIは長距離運動することが示された(Biophys. J.)。負荷の拡散が遅いため、それを錨として長距離運動が可能になると思われる。ランダムな運動を一方向性の運動にバイアスするメカニズムとして、ストレインセンサーモデルを提唱、それを証明するために実験系を構築して、実験を行っている。外力の方向によってミオシンVIのアクチンフィラメントへの結合レートが異なり、この結果はストレインセンサーの存在を示唆している。

(iii) バイアスブラウン運動によるステップ運動

ATP1分子が加水分解する間に、筋肉ミオシン(ミオシンII)のステップ運動は、特定の方向にバイアスしたブラウン運動によって構成されることが、1分子のミオシン分子を結合した走査プローブ顕微鏡を使って直接計測できた。この方法を使って、単頭ミオシンVやVIのステップ運動も同じようにバイアスブラウン運動によることを示した。双頭のミオシンVの大きなステップは、レバーアームの回転による大きなステップとブラウン運動による滑り運動よりなることが考えられる(BBRC)

②タンパク質の構造ゆらぎと機能

(i) アクチンの構造変化を通してミオシンの運動の活性化

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。一分子エネルギー移動法を使って1分子レベルで、アクチンフィラメント上のアクチンモノマー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行き来していることが示された(nature chemical biology)。この変化はミオシン結合に対して協同的に起こっているように見える。そこでミオシンの結合とアクチンの構造の関係を詳しく調べている。

(ii) 情報スイッチ蛋白質Rasの構造ゆらぎ

アクチンで見られた構造ゆらぎは細胞内スイッチ蛋白質であるRasでも観察された。同様に1分子FRET法を使ってRasの構造ゆらぎを情報伝達の多様性との関連で調べた。GTPで活性化された後にも非活性化状態が存在すること、また動的構造解析により、エフェクター蛋白質と相互作用することによって多型構造のうち一つが選択されることが示唆された。このような構造変化がシステム内でどのような役割を果たしているか、今後の課題である。(BBRC)

(iii) 構造-機能のシミュレーション

ミオシンの構造変化と機能の関係を探るために、粗視化 Go-like model を構造変化を扱うために拡張し(dual-Go model), これを用いてミオシンの構造変化とヌクレオチド解離シミュレーションを行なった。ヌクレオチドとミオシンの引力相互作用強度によって解離と構造変化のカップリングの様子が変化することを示した(論文投稿中)。またコンバータ部に一定力を加えることにより、解離速度が変化するストレインセンサー的挙動を、再現することができた(論文準備中)。

③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、お互いに相互作用しながら機能している。上にみてきたように、分子モーターやタンパク質ではランダムな熱ゆらぎを利用し、他の分子との相互作用を通して方向性ある機能を獲得している。システムの中に分子が置かれたとき、1分子で観察された特性は、さらに新たな特性を獲得し、それがシステムの“やわらかさ”に寄与していると思われる。一分子計測技術を多分子の中の一分子に応用し、システムの中の挙動を調べられるよう、計測技術の開発を行っている。また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ている。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、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。今後、計測と理論の両面からアプローチし、ゆらぐ分子とそれが構成するシステムのやわらかさを追求してゆく。

3. 研究実施体制

(1)「ゆらぎと機能相関計測」グループ

①研究者名

柳田 敏雄(大阪大学大学院生命機能研究科 教授)

②研究項目

- ・ ゆらぎと機能相関計測

(2)「構造ダイナミクス解析」グループ

①研究者名

難波 啓一(大阪大学大学院生命機能研究科 教授)

②研究項目

- ・ 構造ダイナミクス解析

(3)「モデリング」グループ

①研究者名

菊池 誠 (大阪大学大学院生命機能研究科 教授)

②研究項目

・理論モデリング

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Kozuka J, Yokota H, Arai Y, Ishii Y, Yanagida T. Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament. *Nature Chemical Biology* 2, 83-86 (2006)
- Matsuoka, S., Iijima, M., Watanabe, T. M., Kuwayama, H., Yanagida, T., Devreotes, P. N. and Ueda, M. Single-molecule analysis of chemoattractant-stimulated membrane recruitment of a PH domain-containing protein. *Journal of Cell Science*. 119, 1071-1079 (2006)
- Vazquez, F., Matsuoka, S., Sellers, W. R., Yanagida, T., Ueda, M. and Devreotes, P. N. Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 103(10), 3633-3638 (2006)
- S. C. Shibata, K. Hibino, T. Mashimo, T. Yanagida and Y. Sako, Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements. *Biochem Biophys Res Commun.* 342: 316-22 (2006)
- Iwaki M, Tanaka H, Iwane AH, Katayama E, Ikebe M, Yanagida T. Cargo-Binding Makes a Wild-Type Single-Headed Myosin-VI Move Processively. *Biophys J.* 90(10):3643-52 (2006)
- Arai Y, Iwane AH, Wazawa T, Yokota H, Ishii Y, Kataoka T, Yanagida T. Dynamic polymorphism of Ras observed by single molecule FRET is the basis for molecular recognition. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):809-15 (2006)
- Nishikawa M, Nishikawa S, Inoue A, Iwane AH, Yanagida T, Ikebe M. A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. *Biochem Biophys Res Commun.* 1159-64 (2006)
- T.Ichikawa, T.Aoki, Y.Takeuchi, T.Yanagida, T.Ide¹ @Immobilizing single lipid and channel molecules in artificial lipid bilayers with annexin A5. *Langmuir* 22(14):6302-6307(2006)
- T.Ide, T.Aoki, Y.Takeuchi, T.Yanagida Lysenin forms a voltage-dependent channel in artificial lipid bilayer membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,346(1): 288-92(2006)
- J. Ichinose, M. Morimatsu, T. Yanagida and Y. Sako Covalent immobilization of epidermal growth factor molecule for single-molecule imaging analysis of intracellular signaling. *Biomaterials* 27:3343-50 (2006)
- Y. Teramura, J. Ichinose, H. Takagi, K. Nishida, Y. Sako Single-molecule analysis of epidermal

- growth factor binding on the surface of living cells. *EMBO J.* in press (2006)
- Y. Miyanaga, S. Matsuoka, T. Yanagida, M. Ueda, Stochastic signal inputs for chemotactic response in *Dictyostellium* cells revealed by single molecule imaging techniques, *Biosystems* in press (2006)
 - S. Tanaka, W. Fritzsche, Y. Sako and T. Yanagida Synthesis of Long-Template DNA using Enzymatic Reactin and Regular Alignment of Au-nanoparticles, *Chemistry Letters* Vol.35 No.11:1290-1291 (2006)
 - T. Okada, H. Tanaka, A. H. Iwane, K. Kitamura, M. Ikebe, T. Yanagida The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 354: 379-384 (2007)
 - Y. Tsukasaki, K. Kitamura, K. Shimizu, A.H. Iwane, Y. Takai and T. Yanagida Role of Multiple Bonds Between the Single Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Revealed by High Sensitive Force Measurements. *J. Mol. Biol.* 357; 996-1006 (2007)
 - M.J. Sato, M. Ueda, H. Takagi, T.M. Watanabe, T. Yanagida, M. Ueda Input-output relationship in galvanotactic response of *Dictyostelium* cells. *Biosystems* 88(3); 261-272 (2007)
 - Y. Taniguchi, P. Karagiannis, M. Nishiyama, Y. Ishii, T. Yanagida, Single molecule thermodynamics in biological motors. *Biosystems* 88, 283-292 (2007).
 - J. Kozuka, H. Yokota, Y. Arai, Y. Ishii and Y. Yanagida, Dynamic polymorphism of actin as activation mechanism for cell motility. *Biosystems* 88(3): 273-282(2007)
 - M. Sugawa, Y. Arai, A.H. Iwane, Y. Ishii and Y. Yanagida Single molecule FRET for the study on structural dynamics of biomolecules, *Biosystems* 88(3): 243-250(2007)
 - Y. Miyanaga, S. Matsuoka, T. Yanagida and M. Ueda, Stochastic signal inputs for chemotactic response in *Dictyostellium* cells revealed by single molecule imaging techniques, *Biosystems* 88(3): 251-260(2007)
 - S. Esaki, Y. Ishii, M. Nishikawa and T. Yanagida Cooperative actions between myosin heads bring effective functions, *Biosystems* 88(3):293-300(2007)
 - T. Yanagida, M. Ueda, T. Murata, S. Esaki and Y. Ishii, Brownian motion, fluctuation and life, *Biosystems* 88(3): 228-242(2007)