

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等高次機能構造体
の構築と利用」

研究課題「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」

研究終了報告書

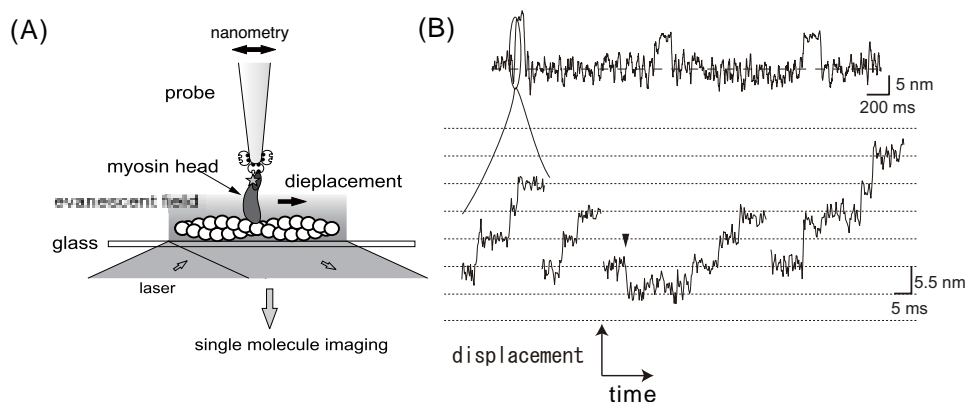
研究期間 平成14年11月～平成19年10月

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)

1 研究実施の概要

正確さ、速さ、メモリーなど我々自身の能力を超えたさまざまな機械が人の手で作られているが、一方生物の柔軟な機能は真似ができない。本プロジェクトの研究構想の背景にある問いかけは「人工機械とは違う生物のメカニズムは何なのか」という疑問である。この疑問に対して柳田グループでは生物を精確に計測することで手がかりが得られると考え、これまで最先端計測技術を開発し、それを使って生物の計測を行ってきた。生物のさまざまな機能は、蛋白質によって担われている。蛋白質分子は集合し分子機械を構成して、細胞や組織の中で状況に応じてその働きを柔軟に変え、“やわらかな”機械として機能している。生物のもつ柔軟性とは、生物分子機械のやわらかさに由来するものである。生物分子機械は、人工機械とはさまざまな点で異なる。大きさが数十ナノメートルで熱ゆらぎの影響を大きく受け、しかも、機能するための使うエネルギーは熱エネルギーと大差がない。それにもかかわらず、効率よく働いている。これはトランジスタなど人工機械が、熱エネルギーとかけ離れた莫大なエネルギーを使って、精確に高速に働くのとは基本的にメカニズムが異なっている。それでは一体、生物分子機械は熱ゆらぎにさらされながら、どのように働いているのだろうか。

この生物分子機械の仕組みを解明するために、柳田グループでは分子モーター・ミオシンを対象に選び計測を行った。分子モーターはATPの化学エネルギーを力学的な仕事に変換する機械であり、生物の運動に関する機能を担っている。分子モーターは他の分子機械を構成する蛋白質とさまざまな共通の特性を持ち、またその機能を物理計測で精度よく評価できるという利点がある。つまり分子モーターの高精度の計測で得られた結果は、さまざまな生物分子機械を知る手がかりとなる。まず分子モーターの機能を精確に記述するために、個々の分子モーターを観る、捕まえる、操作するという1分子計測技術を開発し、計測を行ってきた。この研究から1分子イメージング、1分子ナノ操作、1分子化学反応イメージングといった技術が生まれた。



プローブ顕微鏡によるミオシンの運動の計測。この計測では1分子のミオシン分子を観ながら、プローブの先端に捕捉し、プローブの変位を高精度に計測することでミオシン1分子の運動を計測する。(A)計測の概念図。(B)ミオシン2分子の変位トレースと立ち上がり部分の拡大図。これまで瞬間的な変化しか測れなかったステップが詳細に計測でき、ミオシンモーターはブラウン運動を基礎にした運動をしていることがわかった。

この技術を使って、個々の分子モーターの動きと発生する力をそれぞれナノメートル、ピコニュートンの精度で計測することができるようになった。その結果、ミオシンモーターは熱ゆらぎから逃げるのではなく、熱ゆらぎ-ブラウン運動を巧みに利用して動いていることが明らかになった。ところが、ブラウン運動の運動の方向はランダムなので、分子モーターが全体として方向性のある運動をするために、何らかの方法で一方向

にバイアスしなければならない。どのようにバイアスされるのか、入力エネルギーがどのように使われるのか、そのメカニズム解明こそが、人工機械とは異なる「ゆらぎを利用した生物分子機械」のメカニズム解明へのカギであり、当プロジェクトの目指すゴールであった

具体的な研究の戦略としては、

- I. 1分子計測技術をさらに展開し、1分子のゆらぎレベルまで高精度に測れるようシステムの構築を行い、分子モーターの動作機構を精度よく計測する。生物ナノマシンが使っているナノテクを記述する。
- II. 分子モーターに見られるランダムなブラウン運動を規則的な一方向運動に変換する機構をさぐる。
- III. 分子機械を構成する蛋白質の構造ゆらぎと機能の関係を計測し、生物分子機械や分子モーターのメカニズムと比較をする。
- IV. このようにして得られた1分子モーター、1分子機械の特性がシステムに組み込まれたときに、どのような役割を演じているか、計測、理論的にアプローチする。個々の分子が持っている“あいまいさ”がシステムの“やわらかさ”に変換するメカニズムを探る。

各項目に従って、もう少し詳細に概要を述べる。まず①の高精度の計測による分子モーターの計測について。1分子計測はまだ生まれて間もない計測手法である。まだまだ未熟な技術であり、また何が計測できるか可能性が大きく広がっている状況である。目的にあった計測技術の開発、工夫が必要である。一方、近年になって筋肉ミオシン以外にたくさんの種類のミオシンが見つかり、分子モーターの研究も幅が広がった。ミオシン5、ミオシン6は細胞内で物質輸送に係わるミオシンモーターであり、1個の分子でもアクチンのレールから外れることなく長距離進むプロセブなモーターである。また遺伝子を使った蛋白質の調整も容易であり、1分子計測を使った精度の高い計測に適しているので、ミオシン5、ミオシン6を使って分子モーターの計測とメカニズムの解明を行う。(i)1分子蛍光イメージングの空間・時間分解能を改良し、生理的条件に近い条件で無負荷のミオシン5のステップ運動を計測する。光を用いた計測の回折限界による分解能の限界を越えるために画像解析(FIONA法)により分解能を向上させた。さらに、褪色までの時間が長く、明るいQdotというプローブを用いて計測を行い、生理的ATP濃度でステップ運動を計測することが出来た。これにより、従来のレーザートラップのように2つの頭部(モータードメイン)の重心の移動を追跡するのではなく、モーターの特定の位置(たとえば、2つのうちひとつの頭部)を追跡することが可能になり、ステップ運動の新しい情報を得ることが出来るようになった。(ii)1分子蛍光イメージングによるATPの加水分解反応の計測と、ステップ運動の同時計測を行い、化学-力学カップリングを直接計測した。ステップ運動の計測にはダブルトラップ法、またはFIONA法によるステップ運動の計測をもちい、生理的ATP濃度に近い条件での計測が可能となった。さらに(iii)ミオシン5のステップ運動に熱ゆらぎが係わっていることを計測によって確かめる。そのためにステップ運動しているミオシン分子の回転を観察した。ミオシン分子の双頭構造から考えて、アクチンフィラメントの上をステップ運動をしてゆくためには、ミオシン分子は頭部を回転しながらステップ運動をしなければならない。その回転運動の計測は、ガラス基盤に固定したミオシン分子の周りに回転するアクチンフィラメントを観察することによって実現した。計測した回転は機械的に一方向に回転するのではなく、熱ゆらぎによって方向がランダムであることが分かった。最後に(iv)走査プローブを使って1分子のミオシン分子を捕まえ、その運動を調べた。この方法を使って、筋肉ミオシンにサブステップが存在すること、その運動は一方向にバイアスしたブラウン運動であることが見つかった。筋肉ミオシンと同じようにミオシン5にサブステップが存在するのか調べた。そ

の結果、ミオシン5でも筋肉ミオシンと同じように、サブステップが存在し、方向性のあるブラウン運動が観察された。

②のランダムなブラウン運動と一方向へのバイアスについて、まず(i)単頭のミオシンを使ってブラウン運動の可能性を調べた。ミオシン5やミオシン6の長距離運動には2つの頭部があることが必須であり(ひとつの頭がステップする間、もう一方の頭はレールに結合し分子がレールから外れないように長距離進む)、1つの頭部ではアクチンフィラメントからすぐに外れてしまう。それでもミオシン5では連続ステップすること、またやミオシン6では大きな荷物を結合しているときには長距離運動することが示され、ブラウン運動の重要性が示唆された。単頭のミオシン6が長距離運動するとき、その方向は双頭ミオシン6と同じであった。そこで(ii)ランダムなブラウン運動が方向性ある運動にバイアスされるメカニズムを探った。ミオシン6では、そのメカニズムとしてストレインセンサーモデルを提唱し検証を行った。ミオシンは張力の前後方向を通して方向を感知し、前方向でブラウン運動を止めモーターの運動の方向性を決めていく、と考えられる。前後に張力を与えながらミオシン6を運動させ、アクチンへの結合に張力の方向性依存があることを示した。(iii)微小管の上をステップ運動するキネシンモーターも前後にステップしながら一方向に運動をする。そのメカニズムを調べるために、キネシンで個々のステップ運動を、正確に計測し、統計的、熱力学的な解析を行った。その結果、前後のステップのバイアスはキネシンと微小管の間のステリックエントロピーによるものであると考えられた。

③の蛋白質の熱ゆらぎと方向性ある反応のメカニズムでは、蛋白質の構造ゆらぎを1分子レベルで計測した。蛋白質のランダムなゆらぎは多分子系では平均化されて観察できない。1分子での構造のゆらぎは1分子エネルギー移動法(FRET)の技術を開発、計測することが出来た。蛋白質に複数の状態が存在し、その間を秒オーダー、ミリ秒オーダーの時間スケールでゆらいでいる蛋白質を、活性化という機能との関係で議論することが出来た。

1分子の蛋白質、ひとつの分子モーター、分子機械の特性がある程度分かった時点で、④のシステムへの展開を図った。これまでの計測してきた単独で機能している分子モーターを、お互いに相互作用しながら働いているシステムへおいたときの効果を調べる。実際筋肉ミオシンはたくさんのモーターで機能しているシステムであり、そのメカニズムは個々の分子の特性だけでは理解できない。1分子で存在するモーターの計測から、多数のモーターが存在するシステムでの1分子計測へ技術を拡張する。一方、単独のミオシンモーターの計測結果を基礎に計算機を使って、システムでおこることをシミュレーションし、多分子系の実験結果と比較する。

これらの研究を通して、生物特有の分子機械のメカニズムが垣間見られるようになってきた。ナノメートルサイズのやわらかな分子機械から学ぶものは多い。今後生物から学んだ分子機械の動作原理を新しいエンジニアリングにいかしてゆく道も開けてきたように思われる。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

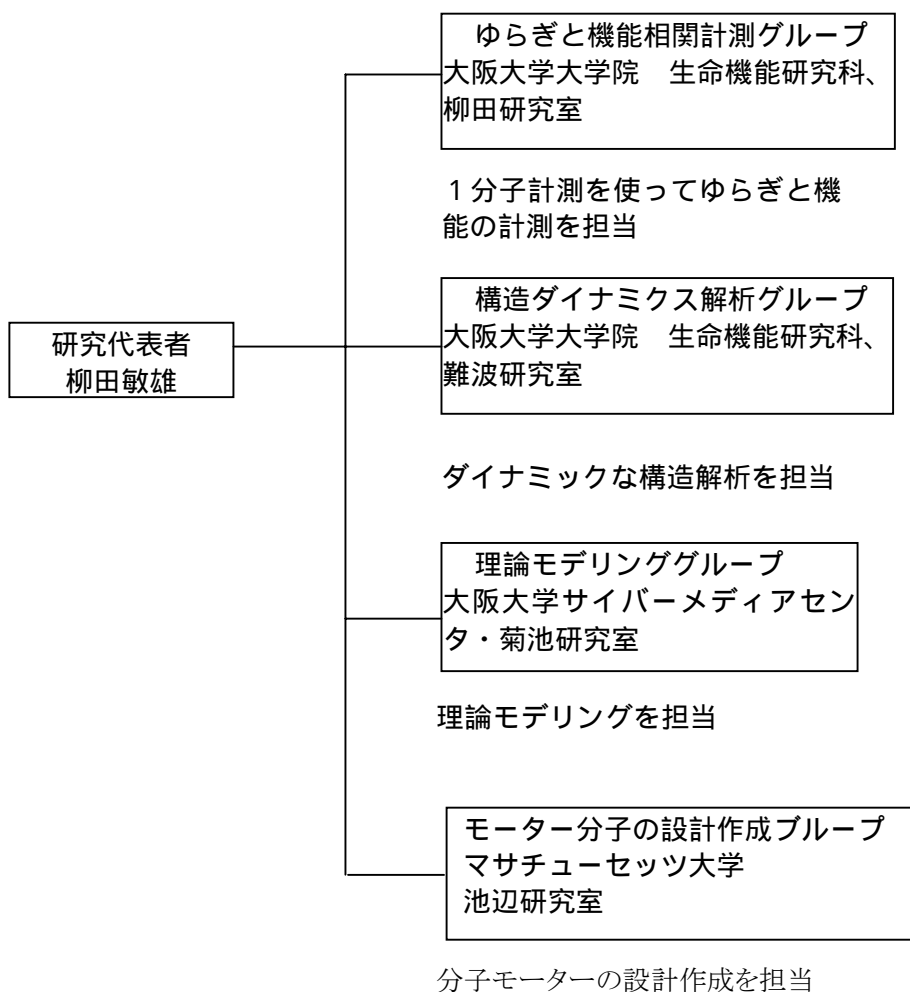
研究開始時の目標としては、(1)ATP の化学エネルギーをどのように使ってランダムなブラウン運動を規則性ある運動に変換しているか解明する。(2)ブラウン運動を利用した挙動は“あいまい”であるが、システムを構成したとき、生体システム特有の“やわらかさ”や自律性になるしくみを探る。そのために、(i) 個々の分子の機能とゆらぎを曖昧さなしに計測する1分子計測技術を展開・確立し、計測を行う。(ii) 高精度の計測にふさわしいミオシン試料を調整する。(iii)蛋白質、その集合体のダイナミックな構造を調べる。(iv) 得られたデータを理論的解析を加えて理解する。

試料として筋肉ミオシン(ミオシン2)の代わりに、データの解釈のあいまいさの少ないプロセシブモーターであるミオシン5、ミオシン6、キネシンも用いた。これらのモーターでは遺伝子を使って蛋白質調整が容易にでき、計測の幅が格段に広がった。1分子計測技術として操作プローブ顕微鏡を使ったサブステップの確認が、やらなければならない課題であった。ミオシン5などの調整試料を使ってステップの計測を行い、筋肉ミオシンで見つかったサブステップをプロセシブなミオシンでも確認することができた。これまで分子モーターのステップ運動の観察は、微小ガラスニードルやレーザートラップなど比較的大きなプローブをつけてその動きを追跡することで計測していたが、1分子イメージングに高精度画像解析技術を組み合わせ、数ナノメートルの空間分解能で1分子の動きを追跡することが可能になった。Qdot を使うことで空間・時間分解能をさらに改良し、生理条件下でもステップ運動が詳細に解析できるようになった。しかも従来の方法ではモーターの重心の運動を計測していたが、この方法ではプローブの位置を反映することになり、情報量が増えたことになり、また無負荷の条件でステップ運動が計測できるようになった。さらにこの方法で、これまでのレーザートラップイメージングに加え、化学-力学カップリングの直接計測の手段が広がったことで、得られる情報量が増大する。

プロセシブな運動の中にゆらぎが係わっていることを示すには、精度を上げることのみならず、これまで計測していないパラメータを測ることで達成された。ミオシン5がネック部分で回転しながらステップ運動をしていることは、固定したミオシンの周りをアクチンフィラメントが回転することで観察できた。ブラウン運動が係わっていることは、その回転の向きの解析から強く示唆された。ランダムなゆらぎから規則的な運動への変換のメカニズムの解析のためには、さらに計測系の改良とデータの蓄積が必要だった。レーザートラップ法もS/Nを改良することにより、これまで以上に広い範囲の条件で個々のステップで観察することができ、統計的・熱力学的な解析が可能になった。この方法を使ってキネシンの一方向性の運動のメカニズムとして、キネシンと微小管の向きを考慮したステリックモデルが提唱された。単頭ミオシンが特定の方向へ連続運動することを見だし、ミオシンのストレインセンサーモデルを提唱した。モデルの可能性を実験的に確認するために、新しい計測システムを構築した。

蛋白質のダイナミクスが直接計測できる技術として1分子 FRET イメージングを確立した。レール蛋白質アクチン、情報蛋白質 Ras を使って蛋白質の構造の多型性がみつき、熱ゆらぎを利用したスイッチング機構を明らかにすることができた。ゆらぎから規則的な反応への変換は蛋白質自体も使っている手法だった。筋肉ミオシン(ミオシン2)はシステムの中で機能している。そこで、筋肉ミオシンのシステム内で個々の分子の挙動を計測すべく、1分子計測技術をシステムに導入することがはかられた。一方、1分子計測の結果に基づいて構築した筋肉モデルでは、筋肉を使った実験で報告されている大きなステップが可能であることが、計算機を使ったシミュレーションで確認された。このように1分子計測で明らかにされたユニークな動作は、システムの特性と深く関わっていることがわかってきた。この原理を利用した新しいエンジニアリングなどへの展開が期待される。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 ゆらぎと機能の相関の計測 (大阪大学大学院 生命機能研究科 柳田チーム) (1)研究実施内容及び成果

3.1.1 ミオシン5モーターのナノテクノロジー

3.1.1-1 ミオシン5モーター

ナノメートルサイズの分子機械が熱ゆらぎに乱されることなく、熱エネルギーと大差ない入力エネルギーで機能するには、どのような戦略を使っているのだろうか。それを調べるために、分子機械を徹底的に計測する。そのために1分子計測技術を開発し、それを使って計測を行った。1分子計測は個々の分子を可視化し、捕捉、操作して、多分子計測では直接計測できない動的な挙動やランダムに起こる現象を記述することを可能にする。これらの技術を使って、ミオシンやキネシンのメカニズムにつ

いて飛躍的に理解が進んだ。一方、分子生物学、細胞生物学の進歩によって、これまで知られていなかったたくさんの種類のミオシンが同定された。なかでもミオシン5やミオシン6は細胞内で物質輸送の役割を担い、数個の分子で機能しており、1分子計測に有利であり、また遺伝子技術を使った蛋白質調整もしやすい。そこで、これらのモーターに1分子計測を使ってミオシンモーターの基本的特性をより詳細に調べた。

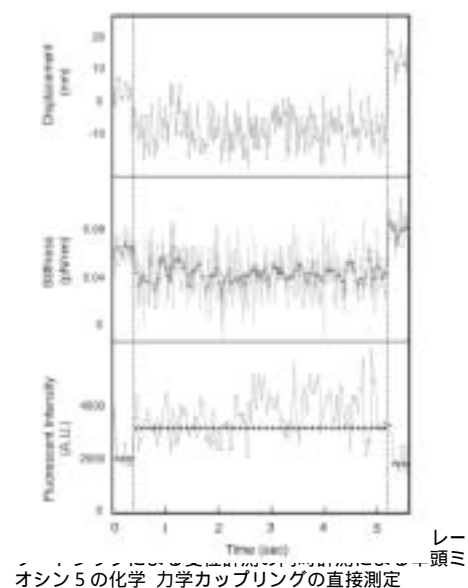
ミオシン5はミオシン2と異なり、1個のATP分子を加水分解することによって、アクチンフィラメントのピッチに相当する36nmの大きなステップを何回も繰り返して長距離進むこと(プロセッシブな運動)が分かっている。この大きなステップは、ミオシン頭部と尾部とを結ぶネックドメインの長さが長いことと関係していると考えられている。ミオシンの構造の研究を基礎に、ATPの化学状態に対応してミオシン頭部では構造変化が起り、ネックドメインが回転してステップ運動するというレバーアームモデルの予想と一致するからである。しかし、ミオシン5のネックドメインの長さを短くしたとき、また短いネックドメインを持ったミオシン6でも、大きなステップをすることが観察され、そのメカニズムは未だに議論の対象となっている。そこでマサチューセッツ大学の池辺研究室と共同でミオシン5や6の調整を行い、1分子計測した。

3.1.I-2 無負荷のミオシン5のステップ運動

これまで分子モーターの運動はレーザートラップを使ってその重心の運動を計測していたが、1分子イメージングを使ってプローブの位置での運動を高分解能で計測できるようになった。光の回折限界のため1分子からのイメージは100nm程度に広がって見える。そこで1分子に由来する輝点上で光子の空間分布を定量的に解析することによって、分子の位置を数ナノメートルの高分解能で決めるFIONA法が開発された。さらに近年開発された明るいプローブであるQドットを使って、生理的条件に近い条件で早いステップ運動をビデオレート、数ナノメートルの精度で計測できるようになった。またQドットを使うことで褪色までの時間が長くなり、長時間観測することが可能になった。この結果、ミオシン5の頭部は76nmのステップをして運動していることがわかった。このことはミオシン5はアクチンフィラメント上で僅かに回転しながら進んでいる。さらにステップの大きさをアクチンモノマー単位で区別することも可能になり、ミオシン5はアクチンフィラメント上の2つの結合部位の自由度を持ちながらステップしていることがわかった(Sugawaらにより *Biophys. J.*別冊2008にアブストラクト掲載)。

3.1.I-3 ミオシン5の化学-力学カップリング

1分子のATPの化学反応を追跡するために、蛍光性ATPを合成、ミオシン分子への結合解離を1分子レベルで計測する。このイメージングと力学計測を同じミオシン分子について同時に行えば、化学反応と力学イベントの時間関係を直接に計測することができる。力学計測としてレーザートラップを使った変位計測を行った(T.Komoriらにより論文投稿中)。この結果、ATPの結合はアクチン・ミオシンの解離を引き起こし、アクチン・ミオシンの結合はADPの解離を引き起こすことが示された。さらに詳しい解析の

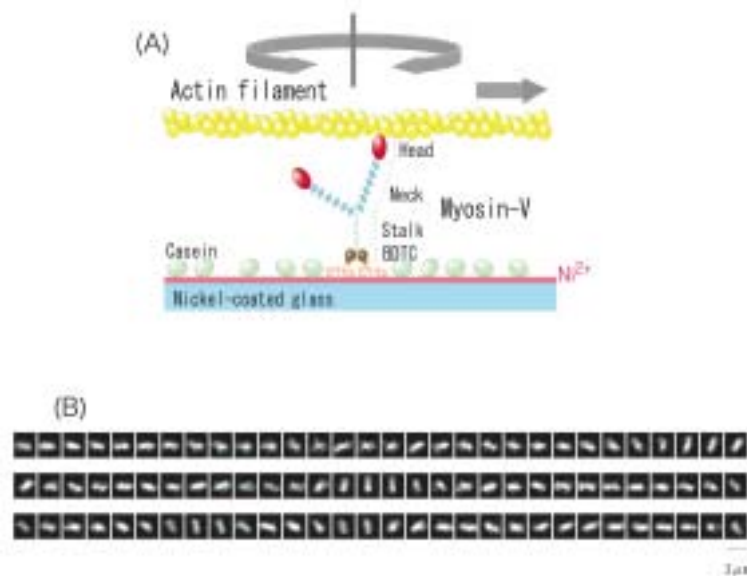


結果、変位発生後ADP解離が70ミリ秒程度遅れることがわかった。ADPの解離の遅れはミオシン5が2つの頭部を交互にステップするプロセシブ運動にとって重要である(T.KomoriらによりBiophys. J.別冊2008にアブストラクト掲載)。

レーザートラップを使った変位計測の代わりにQドットを使った変位計測を化学力学同時計測に使うことによって、加える蛍光性ATPの濃度を生理的条件まで増やすことができるようになった。エバネッセント照明では照射体積を大幅に減らしたものの、溶液中の蛍光分子による背景光の増加のため加える蛍光分子の濃度は制約される。Qドットと蛍光性ATPの間のFRETを使うと10ナノメートル程度の蛍光ATPしか計測に寄与しなくなるので、大幅に背景光を減らすことができ、加える蛍光ATPの量を100倍程度増やすことができた(SugawaraらによりBiophys. J.別冊2008にアブストラクト掲載)。

3.1.1-4 ミオシン5のステップに付随した回転ブラウン運動の観察

ミオシン5の2つの頭部は相同であり、アクチンフィラメントに沿って同じ向き結合し、2つの頭部を交互にステップしてゆくためには、ミオシン5はネック部位を捻りながら運動してゆくはずである。しかもミオシンの構造変化でステップ運動してゆくとしたら、回転は常に同じ方向に起こることが予想される。ステップ運動中のミオシン5の捻り運動は、スライドガラスにミオシンを固定し、アクチンフィラメントの回転を観察することで可視化し、ステップ運動のメカニズムを探ることにした。



ステップ運動に伴うミオシン5頭部のランダムな回転の計測。(A) 回転運動はガラス基盤に固定したミオシン5の周りのアクチンフィラメントの回転を観察することによって計測した。(B) 観察された蛍光標識したアクチンフィラメントの回転

ミオシン5はC末端に融合したHis-tagとガラス上にコートしたニッケルを使ってガラス基盤に固定した。固定したミオシン5の周りを、蛍光標識したアクチンフィラメントが回転しながらミオシン分子上を滑り運動するのが観察された。アクチンフィラメントの回転は滑らかにおこるのではなくステップ状に起きている。その大きさは90°であった。平均の速度と回転の起こる頻度から考えて、1回のステップ運動で2回ネック部位の回転が起こり、ATP濃度依存的な時間間隔で起こる回転と、非依存的な時間間隔で起こる回転とからなる。ATP濃度依存的に起こる回転は、ATP結合に伴うミオシ

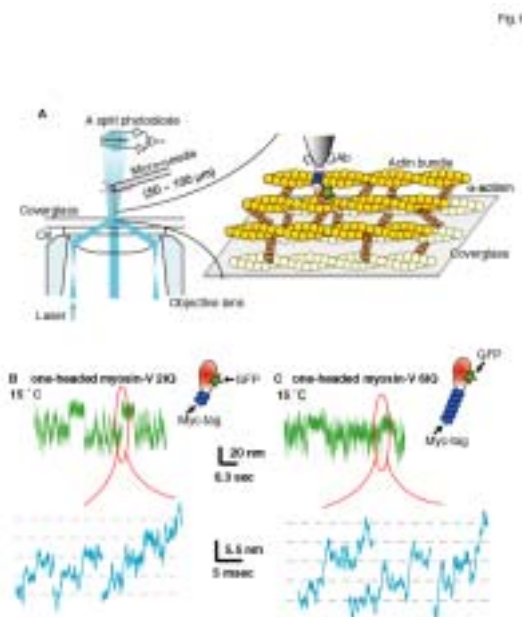
ン頭部のアクチンフィラメントへの結合時に起こる回転に対応し、それに引き続いて起こるATP非依存的な回転は、ミオシンのアクチンからの解離したときに起こる回転である。アクチンから解離すると2つの頭部は相対的に180°回転するが、2つの頭部で平等にその回転を担うと90°回転することになる。回転の方向は時計回りと反時計回りと半々に起こっていた。回転の方向がお互いにどう関連しているか調べてみると、1回のステップ運動内でおこる回転の間には、方向に相関があったが、異なったステップで起こる回転の間に相関はなく、回転はランダムに起こっていることがわかった。このことからハンドオーバーハンドのメカニズムでステップ運動しているミオシン5ではステップ運動に伴ってネック部位の捻りが観察された。また、その回転の方向はランダムであったことから、アクチンフィラメントから解離したミオシン頭部はブラウン運動で次の結合部位を探していることが示唆された。このことは細胞内の混み合った環境で複数個のミオシン5分子で物質を運んでいるときに、有利であると考えられる。(Y.Komoriらによりnature Structural and Molecular Biologyに掲載、2007)

3.1.1-5 ミオシン5における5.5nmサブステップ

ミオシン2の計測では、操作プローブ顕微鏡を使い、レーザートラップ法より高精度の計測が可能になり、ステップの詳細が調べられている。操作プローブ顕微鏡では、1個1個のミオシン分子を走査プローブの先端に捕捉し操作してミオシン分子の変位を計測する。走査プローブの作成や実験操作など高度な技術を必要とし、実験を行う研究者に負うところが大きかった。今回、この顕微鏡を再構成し新しい実験者によって、ミオシン5を使って、他のミオシンでもサブステップが存在するか確認するための計測が行われた。

走査プローブ(微小ガラス針の先端にカンチレバーをつけて作成)にミオシン1分子を捕捉し、ガラス基盤に固定したアクチンフィラメントと相互作用させた。ATPのある時ミオシン分子の運動は走査プローブの動きを計測することで測定した。レーザートラップを使ったアクチンフィラメントの動きの計測と比べ、計測システムを堅くすることができ、より高分解能でミオシンの運動を計測することができた。その結果、筋肉ミオシンは、ATP1個の分子を加水分解する間に、複数のサブステップをすることが観察された。詳しい解析から、ミオシンのステップは一方方向にバイアスされたブラウン運動によるものであることが示された。つまり単頭のミオシン2はフィラメント状に並んだアクチンモノマーの上を前後にブラウン運動しながら、全体として一方方向に進んでステップしていることがわかった

そこで我々はこのプローブ顕微鏡を使って、ミオシン5、ミオシン6のステップ運動の詳



プローブ顕微鏡を使ってミオシン5の5.5nmサブステップを計測 (A)計測の概念図 (B)計測例 ミオシン5の変位のトレース(緑)と立ち上がりの拡大図(青) 左右はネック部位の長さが違う。

細を調べた。走査プローブに捕捉した分子が単分子であることは、融合したGFPの蛍光を1分子観察することで確認をした。このようにして走査プローブに捕捉した単頭ミオシン5の大きなステップは複数のサブステップからなることが観察された。ペアワイズ距離解析やパワースペクトルによる解析からステップの大きさはアクチンモノマー間の距離に対応する5.5nmであることがわかった。この5.5nmステップはミオシン2のサブステップと同じような特性を持っていた。ステップは確率的に起こり、ときに後ろ向きのステップが観察され、1方向にバイアスされたブラウン運動と解釈される。ATP濃度を変えたとき、大きなステップの間の時間間隔は変わったが、5.5nmステップの間の時間間隔はATP濃度にはよらなかった。それに対し、温度を下げると、5.5nmステップの時間間隔はのび、ステップを区別しやすくなった。レバーアームモデルではネックドメイン(レバーアーム)の長さを2IQから6IQに長くすると、ステップの大きさは長さに比例して変わると主張しているが、5.5nmステップの大きさはネックドメインの長さにはよらず、一定の大きさだった。

双頭のミオシン5でも計測を行った。35nmの半分の17nmステップが観察された。このようなステップの中間状態はこれまでも、高負荷状態や2,3-butanedionemonooeime存在下でも報告されており、走査プローブに結合したときにも同様に中間状態がみられた。分解能をさらにあげて解析すると17nmステップの中に5.5nmステップが観察され、双頭ミオシン5でも単頭ミオシン5と同じように5.5nmステップが見られた。一方向へのバイアスはアクチンフィラメントに沿ってらせん状に並ぶ結合部位へのミオシンの結合しやすさがステリックに増え、もっとも安定に結合できる位置で止まるものと思われる

これらの結果を基に双頭ミオシン5のステップ運動のホッピングモデルを提唱した。2つの頭がアクチンに結合しているとき、2つの頭部は互いに引き合う力を及ぼし合う。運動の進行方向に力のかかった後方の頭部にATPは優先的に結合し、アクチンフィラメントから外れる。はずれた頭部はアクチンと弱く相互作用しながらブラウン運動し、結合した前の頭部を越すと、アクチンフィラメント上に沿ったポテンシャルに沿ってステップ運動をする。3から4ステップでポテンシャルの底、つまり安定した結合に達する。頭部は後ろ向きにネックドメインから負荷を受けることになり、Piの抄出が促される。それで頭部はアクチンに強く結合するようになる。以降2つの頭部は交代に役割を変えながらステップ運動を繰り返す。

5.5nmステップはミオシン6でも同じように観察され、バイアス・ブラウン運動は筋肉のミオシンに特有なものではなく、他のミオシン、プロセシブ運動するミオシン5、ミオシン6にも共通に存在することがわかり、ミオシン運動に普遍のメカニズムであることが示唆された。

走査プローブ顕微鏡はプローブの作成、計測のプロセスの煩雑さなど、さまざまな技能が要求されている。計測の各プロセスの見直しを行い、かなり改良を加えたが、全体としては大きな変革をもたらすほどではなかった。またこの顕微鏡の汎用性を上げることは差し迫った課題であり、さまざまな試みがなされたが、大きな向上にはつながらなかった。しかし異なったミオシン種で、基本的に同じような結果が得られたことは、計測の普遍性を証明するものである。(T.OkadaらによりBBRCに論文掲載、2007)

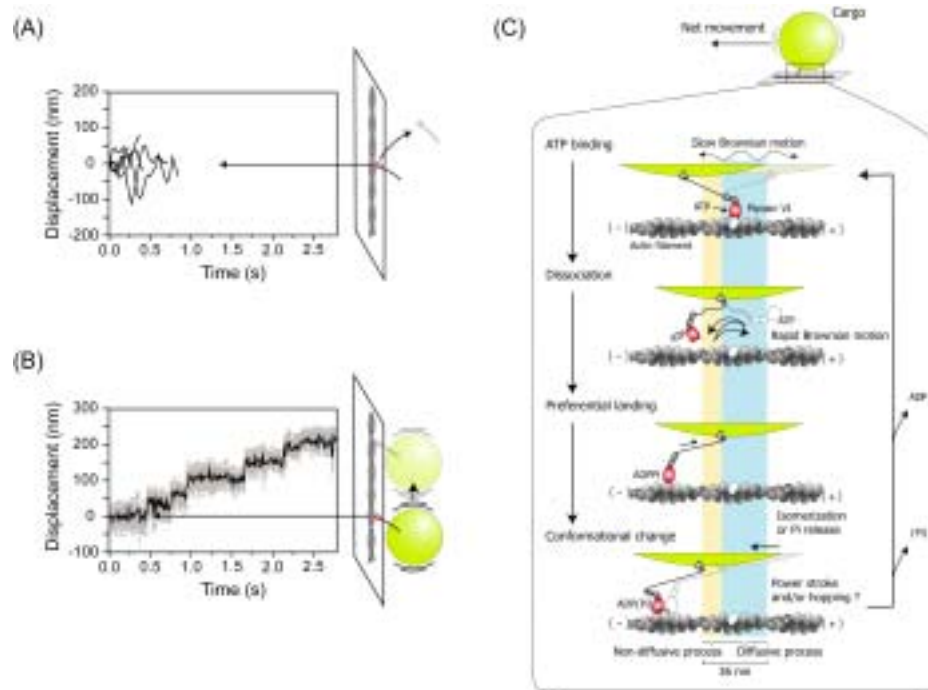
3.1.II 分子モーターにおけるランダムな運動から規則的運動への変換のメカニズム

3.1.II-1 単頭ミオシン6のプロセシブ運動

ミオシン5、6はプロセシブなモーターであり、アクチンフィラメントから外れることなく、一方向へ長い距離運動することができる。特にミオシン5の大きなステップ(35

nm)は長いネックドメインと関連づけられ、ネックドメインの回転によりステップ運動するというレバーアーム説による説明が、広く受け入れられている。それに対しミオシン6はネックドメインの長さが短いにもかかわらずミオシン5と同じ大きなステップを示す。またステップの分布も大きく、ブラウン運動がかかっていることが示唆されている。一部の構造がほどけ、アクチンフィラメントから外れた頭部が大きなステップをできると考えられている。

これまでプロセシブ運動は双頭のモーターによるものと考えられてきた。二つの頭部を使って、ひとつの頭部が強く結合している間に、もう一方がステップし、モーター分子はアクチンレールから外れることなく長距離運動すると思われているからである(ハンドオーバーハンドメカニズム)。しかしミオシン6について、生体中で双頭ではなく単頭で機能している、ということがわかってきた。双頭のモーターがハンドオーバーハンドのメカニズムで機能しているならば、単頭モーターではすぐにアクチンから外れて長距離運動できないはずである。単頭モーターの長距離運動についてはKIF1aという単頭キネシンは、バイアスブラウン運動することで長距離輸送をしている。合成した単頭ミオシン5についてレーザートラップを使って計測したところ、単頭ミオシン5は大きなステップを数回行うことが示された(Watanabeらにより2004年PNASに掲載)。また天然のミオシンIXでは、レーザートラップと蛍光イメージングからプロセシブな運動をすることが示された(NishikawaらによってBBRCに掲載、2006)。その構造の中の挿入部とアクチンとの付加的な相互作用でミオシンは解離することなく長距離進むと思われる。



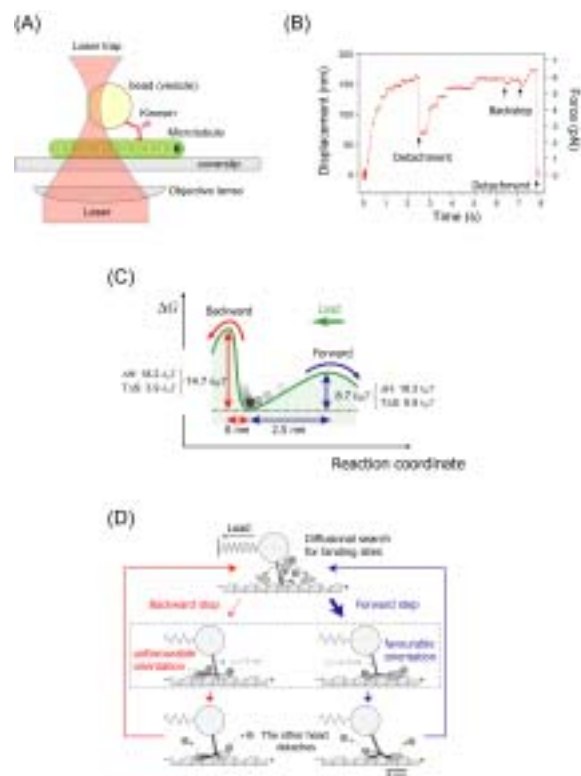
単頭ミオシン6は負荷を背負ったときプロセシブな運動をする。負荷なし(A)および負荷があるとき(B)の単頭ミオシン6の運動 (C) 単頭ミオシン6のプロセシブ運動へのモデル

そ

れではミオシン6の場合は単頭で、どのようにプロセシブに運動するのか。実際、ワイルドタイプの単頭ミオシンではプロセシブには運動できないことが示された。生体中では長距離にわたって小胞体などが運ばれる。そこで実際にものを運んでいるミオシン6を模して、運搬物としてビーズをミオシン6に背負わせて、その運動を観察した。ビーズを結合したミオシン6は長距離運動することがビーズのイメージングから示された。単頭のミオシン6は負荷を背負うことで長距離運動していたのである。

それではミオシン頭部がアクチンフィラメントから解離したときに、アクチンフィラメントから外れない機構は何か。ビーズが大きいために、その拡散が遅いことである。ビーズはミオシン分子に比べ遙かに大きい。そのためにミオシン分子がブラウン運動して次の結合サイトを探している間、ビーズは大きく拡散しない。そのためビーズとミオシンの複合体がアクチンフィラメントから外れる前にミオシンはアクチンの次の結合サイトに再結合し、ステップを完了することができる。ミオシンがアクチンフィラメントに結合している間、ビーズはブラウン運動する。この運動が一方向性の運動であるためには、ブラウン運動をバイアスする機構が必要である。ミオシン分子やビーズがブラウン運動した後、どちらかの方向への結合が選択的に選ばれる。我々はミオシン6の場合、頭部にストレインセンサーがあり頭部にかかる負荷を感じて前方向への結合が促進される、と考えた。ビーズがゆっくり拡散運動する間、早くブラウン運動するミオシンが前方向に進んだとき、後ろ方向に負荷を受ける。その負荷によって、ATP加水分解の分解生成物がミオシンから解離する反応が促進され、ミオシンはアクチンに強く結合する。また、ミオシンがアクチンに強く結合しているとき、ビーズはゆっくりブラウン運動する。ビーズが前方向に位置したとき、ミオシンは進行方向に負荷を受ける。その負荷により、ミオシンにATP結合しやすくなり、一方向性の運動が可能になる。このように、ミオシンの化学反応が負荷依存的であるには、ミオシン分子内にストレインセンサーがあるに違いない。(IwakiらによりBiophysical Journalに掲載、2006)

そこでストレインセンサーによるメカニズムが実際にあるかどうか検証する計測システムを立ち上げ、計測を行った。レーザートラップを使って単頭ミオシン6を結合したビーズを前後に振り、前方向、後方向に負荷をかけながらATP存在下でアクチンフィラメントと相互作用させた。その結果、十分に早くビーズを前後に振って、ミオシン頭部が進行方向に対して後ろ向きの負荷がかかったときに、アクチンフィラメントに強く相互作用した。このことから、ミオシン6にはストレインセンサーが存在し、ミオシン頭部が前方向にブラウン運動したときに後ろ向きに負荷がかかったとき、ストレインセンサーが感知しアクチンフィラメントと強く相互作用するようになる。双頭のミオシンでは2つの頭部の間で相互に力がかかり、前にいる頭部に後ろ向きの力がかかり、前方に着陸することになる。(Iwakiらにより論文投稿準備中)



キネシンの前後のステップの解析 (A)レーザートラップによるキネシンのステップ運動の計測 (B)キネシンの変位トレース (C)キネシンステップのエネルギー地形 (D)キネシンステップ運動モデル

3.1.II-2 エントロピーを使って前にステップするキネシン

微小管上を滑り運動するキネシンのステップはATPの加水分解と1:1に対応して必ず8nmの大きさを持ち基本的にはタイトカップリングのモーターを考えられる。2つの頭部を使って、2足歩行するように、キネシンは2つの頭部をハンドオーバーハンドのメカニズムで交代にステップさせな

がらプロセッシブ運動する。しかし、負荷によってステップの方向は前ばかりではなく、後ろにもステップすることが示された。特に、過剰な負荷のあるときには、後ろ向きにATPを使って8nmステップすることが示された。微小管から外れたひとつの頭部はブラウン運動によって次の結合サイトを探す。そのとき、前方か後方の結合サイトを選ぶが、どのようなメカニズムで選ぶかまだわかっていない。

そこで、キネシンのステップ運動を1分子力学計測を使って計測し、統計的また熱力学的な解析を用い調べた。計測はレーザートラップによる力学計測で、従来より小さなビーズ(0.1ミクロン)を使い、変位計測は暗視野照明で時間、空間分解能を向上させ、負荷の小さいときや高温など速いステップ運動に対しても個々のステップが検出できるようになった。ステップ運動のキネティクス、前後の方向性を温度を変えながら計測した。ステップの大きさはどんな温度でも、負荷でも一定で8nmだった。ステップ間の時間は負荷とともに、長くなり、その分布から、早い反応と遅い反応の組み合わせからなることがわかった。早い反応は負荷によらず、主に化学反応によるプロセスであり、遅い反応が負荷依存的であり、力学反応を伴う過程であった。また、負荷が増加するとバックステップが増え、ストール力で前後のステップ数が同じになった。

1分子計測のデータを使って、キネティックスのパラメータを決めた。その結果、前後のステップの差は、活性化エネルギーの差にして $6k_B T$ であることがわかった。前後差についてはこれまでネックリンカー部の構造変化によるとの報告があったが、この構造変化のための自由エネルギー差は $1\sim 2k_B T$ であり、キネシンの前後差を説明するには不十分であることがわかった。この活性化エネルギーを詳細に調べるために、温度依存性のデータを使ってエンタルピーからの寄与とエントロピーからの寄与とに分けて評価したところ、前後差を決めているのは、ほぼエントロピーからの寄与によることがわかった。

このエントロピー差がどのようにして生じているか、我々はキネシンと微小管の相互作用がステリックに非対称であることに注目をした。微小管はその重合体に沿って構造の非対称性がある。また非対称な構造を持ったキネシンは、もう一方の結合している方の頭部を中心に自由にブラウン運動をして微小管上の次の結合部位を探す。キネシンと微小管の相互の方向は進行方向の前と後で反対になる。キネシンの進行方向の結合部位では微小管の方向とキネシンの方向とが一致する確率が高いが、反対方向の結合部位ではその確率は低い。そこでキネシンは、確率的に前への結合を選ぶ。(この結果はTaniguchiらによりnature chemical biology掲載,2005)

この解析の基礎になっていたのが、すべてのステップや解離はいずれもATPの加水分解を伴っているということであった。そこで、それぞれのキネティックスのパラメータをATP濃度で評価するために、ATP濃度を変えて計測を行った。その結果、前方向のステップ、後ろ方向のステップ、そして微小管からの解離ともに、同じATP濃度依存性を示し、ATP加水分解を伴った反応であることが証明できた。このようにして、両方向のステップ、解離が混在する系でも、すべてのプロセスがATP加水分解を伴っていることが証明された(論文投稿中)。このようにして、ATP加水分解しても必ずしも前方向のステップをするとは限らず、前後のステップを含むという意味でタイトカップリングしているとは言えない。

3.1.III. 蛋白質の熱ゆらぎを使った機能スイッチング機構

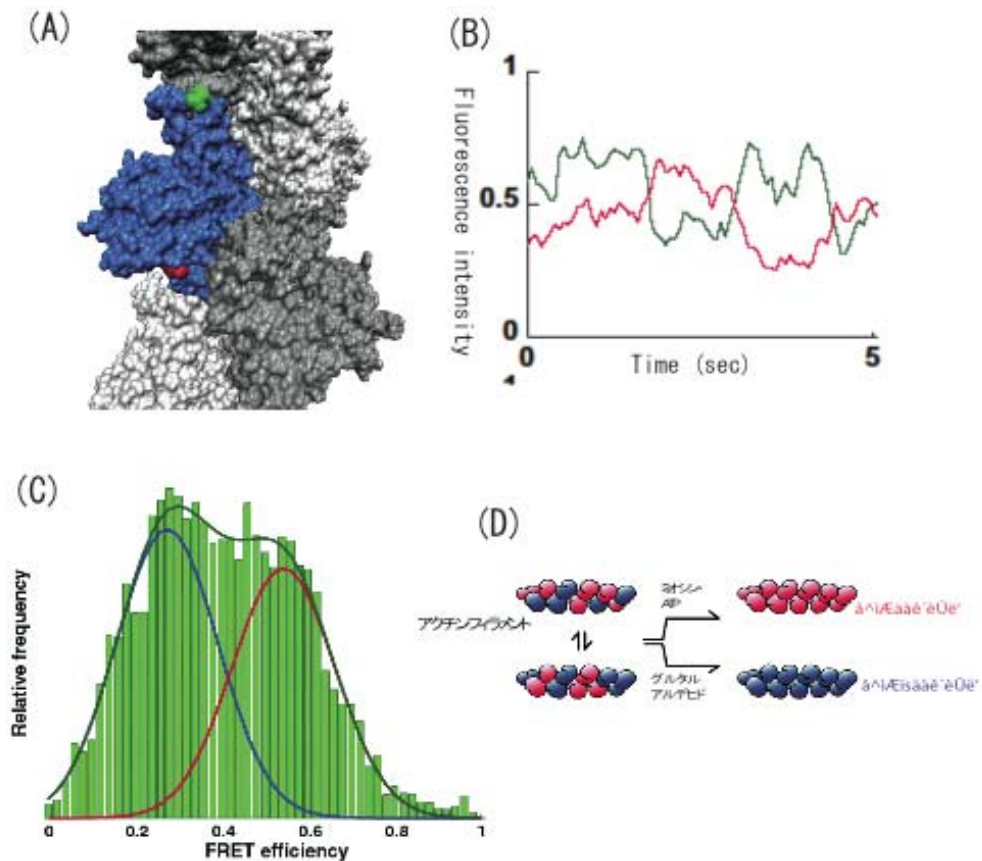
3.1.III-1 アクチンの動的構造

分子モーターや分子機械は蛋白質からなる。蛋白質の構造は熱ゆらぎをうけて動的に変化している。構造ゆらぎを1分子レベルで計測し、機能との関係を調べることにした。これより、分子機械のゆらぎとの機能について基本的な特性が得られることを期待した。

蛋白質の構造ゆらぎは1分子 FRET 法を使って動的な変化を計測した。1分子 FRET では蛋白質の特定の位置に標識した2つの蛍光プローブ間の距離を通して構造変化を計測することになる。

アクチンフィラメントは細胞骨格や、ミオシンモーターに対してはレールとしての役割を果たしている。ミオシンがアクチンフィラメントに結合したとき、ミオシンの ATPase は大きく活性化する。力学的にもミオシンの運動に強く関わっていることは、分子内で化学架橋したアクチンが生化学的機能を維持したまま、ミオシンの運動活性を抑制することから示唆されている。しかしその詳細はまだわかっていない。

そこで、アクチンの特定のアミノ酸 (Cys-s74, Gln-41) をドナーとして Cy3、アクセプターとして Cy5 で蛍光標識し、1分子 FRET 法を使ってアクチンの動的な構造と機能の関連を調べることにした。1分子からの蛍光は光子検出が確率的にゆらいでいることを反映して、その強度はゆらいでいる。蛋白質の構造ゆらぎによる信号のゆらぎと、蛍光計測のゆらぎを区別するために周波数分析を行い、FRET に由来する変化の周波数帯を特定し、その周波数帯 (数Hz) で信号を解析した。この周波数帯では、ドナーとアクセプターの蛍光が逆相関しながら時間と共に大きく変化していることが示された。蛍光変化は主には FRET 変化によるものであることが予想される。定量的に評価するためにシミュレーションの値と比較した結果、得られた蛍光変化は十二分に FRET の変化によるものであることが示された。



1分子 FRET を使ったアクチンのダイナミックな構造の計測 (A) アクチンフィラメント上のアクチンのモデル (B) FRET のデータ例 (ドナー (緑) アクセプター (赤) の蛍光の時間変化 (C) FRET 効率の分布のヒストグラム (D) 構造ゆらぎを利用したミオシン運動の活性化のモデル

ドナーとアクセプターの蛍光強度の変化から FRET 効率の変化を時間に対してプロットすると、比較的大きな値と比較的小きな値の間をゆっくりと秒オーダーの時間でゆらい

でいる。時間変化のトレースの個々の値はヒストグラムにとり、数多くの分子のデータを積算すると、ヒストグラムは少なくとも2つの分布を持っていることがわかり、アクチンの構造には、少なくとも2つの状態が区別できることが示された。その2つの状態の間を自発的に行き来している。

この2つの構造状態は、アクチン上を運動するミオシンの運動機能と関連していることが、異なった機能状態のアクチンの構造と比較することからわかった。アクチンフィラメントの上にミオシン5を走らせた時、その FRET はもはや時間的に大きく変化することはなく、その値はアクチンだけの時の2つのピークのうち、大きな FRET 状態に対応していた。一方、アクチンを化学架橋してミオシンの運動能を抑えると、アクチンの FRET の時間ゆらぎはやはり抑えられ、この場合にはその値は、2つのピークのうち、小さい FRET 値のピークに対応していることが示された。このようにして、アクチンは、ミオシンの運動を“活性化する状態”と、ミオシンの運動を“抑制する状態”の間を自発的にゆらいでいることがわかった。アクチンはミオシンが結合してはじめて活性化の状態へ変化するのではなく、ミオシンが結合する前に、すでに活性化する状態と抑制する状態を準備していて、ミオシンはそのうち“活性化する状態”により強く結合することにより活性化状態“を選ぶ。その結果、もとの2つの状態間の存在確率が“活性化する状態”に移動する、ということである。

(Kozuka らによって *nature chemical biology* に掲載された(2006))

3.1.III-2 情報蛋白質Rasでの構造のダイナミクス

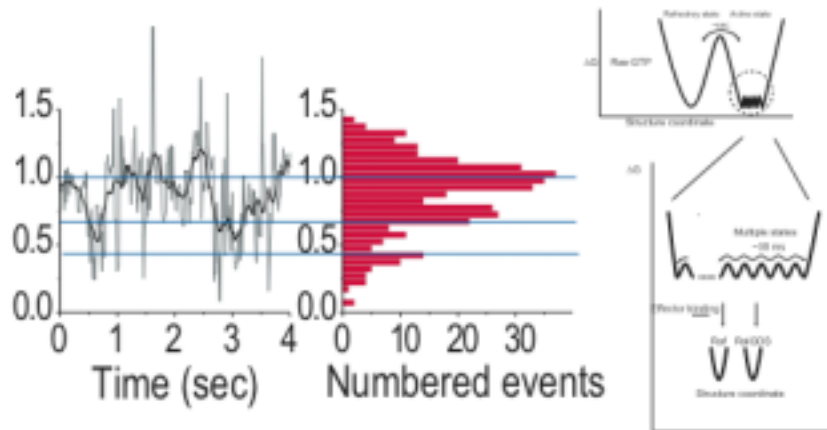
アクチンで見られた構造ゆらぎは細胞内情報スイッチ蛋白質であるRasでも観察され、ゆらぎを使った調節機構は蛋白質一般に見られる特性であるように思われる。細胞は外からの刺激、情報に応じて細胞分裂や走化性など機能している。外からの情報分子や刺激は細胞表面の受容分子を活性化し、次々と下流の情報蛋白質に伝えられる。細胞の情報伝達機構については、そのプロセスにかかわる分子が同定され、複雑な反応経路が解明されつつある。細胞内には数多くの情報伝達経路が存在し、Rasは複数の反応経路にかかわり、信号伝達経路の交差点にもなっている。しかし、Rasが多様な信号をどのように交通整理し、正しい情報を伝えているかそのメカニズムは良くわかっていない。NMRによる構造研究では、Ras分子は複数個の構造を持ち、ダイナミックにその構造の間をゆっくりと秒オーダーの時間をかけて遷移していることが示された。アクチンで多状態の構造が一分子イメージングを使って観察されたので、同じ手法を使ってRasのダイナミックな構造を調べてみることにした。

スイッチドメインだけにシステインを持つRasを作成、ドナーとしてCy3でラベル、合成したCy5GTPを結合させることでアクセプターを導入、分子内FRETを1分子計測し構造のダイナミクスを観察した。コントロール実験に比べFRETが起こっているときはドナー、アクセプターの蛍光は時間と共に変化した。時間トラジェクトリーの個々のデータからFRET効率を計算しヒストグラムをとると、高いFRET効率を持った大きな分布の他に、比較的低いFRET効率の小さな分布示された。時間変化では、その間をゆっくりとゆらいでいることが示された。Rasの結合蛋白質であり信号伝達の下流にあたるTalGDSあるいはRaFを加え、ダイナミックな構造への効果を調べた。このとき低FRET効率の小さな分布はほとんど消失し、高FRET効率の分布だけが観察された。実際、蛍光性GTPを使った多分子計測から不応状態ではGTPの蛍光が変化することが報告されており、小さなFRET値の状態はこの不応状態に対応したものと考えられる。RasはGTPで活性化されても不応状態が存在し、Ras結合蛋白質が結合したときはじめてリグランド状態はなくなる。

一方高FRET効率の分布は、ひとつのガウス分布で近似されこれ以上分離できな

いが、実際にはたくさんの状態の集まったものである可能性はある。不応状態と他の状態は秒オーダーでゆっくりしているので動的にも見分けがつき分離ができる。不応状態を取り除いたデータで時間変化の相関を計算した。Rasだけでは相関時間は約30ミリ秒だった。これは何らかのFRET変化が起こっており、30ミリ秒くらいの時間相関を持っていることを示している。これにRalGDSあるいはRaFといったエフェクターを加えると相関時間は短くなり、計測系の時間分解能以下になった。つまりエフェクターがあるともはや数十ミリ秒でおこる状態変化は起こっていない。複数の状態からエフェクターによってつこうぞうが選ばれたと考えられる。つまり、Rasは複数の構造状態を用意して、その間を自発的に転移している。エフェクターが結合したとき、その複数の構造の中からエフェクターの結合に適合した状態が選ばれると考えられる。Rasはこのようにたくさんの構造状態を用意することによって、たくさんのエフェクターと相互作用をし、信号を交通整理しているのであろう。(この結果はAraiらによりBBRCに掲載された、2006)

生きた細胞でRasの膜への結合を計測したところ、結合には二つの状態があることがわかった。この状態と上述した構造の状態との関連は未だ不明である。今後その関連が明らかになり、細胞中で構造・機能の関連が調べられる。



Rasのダイナミックな構造。(A) FRET効率の時間変化と分布。右図はエネルギー地形の概略図

このようにして、2つの蛋白質の結果は、蛋白質の構造は、他の蛋白質と相互作用して構造が変化するのではなく、相互作用する前からすでに構造を用意しており、その構造の間をゆらいでいる。他の蛋白質との相互作用はゆらぎの平衡を移動し、新しい構造が優位となる。ゆらぎ→相互作用による選択→一方向への反応は、ゆらぎから一方向性の運動を実現した分子モーターとも相通ずるメカニズムであり、生物に共通に使われているメカニズムだと思われる。

3.1.IV. あいまいな分子からやわらかな生物システムへ

これまで1分子計測は、1分子単独で機能している現場で計測を行ってきた。しかし実際には、他の分子と相互作用したり、組織化された状況の中で機能している。このとき、蛋白質や分子機械は、単独で機能しているときと、異なった振る舞いをすることが予想される。1分子の様子が分かった次は、このようなシステムの中での挙動を記述する。

ミオシン2はフィラメントや、さらに高次構造を形成し、多数のミオシンモーターで協同的に働き力発生や運動する。システムでのメカニズムを理解するために、2つ

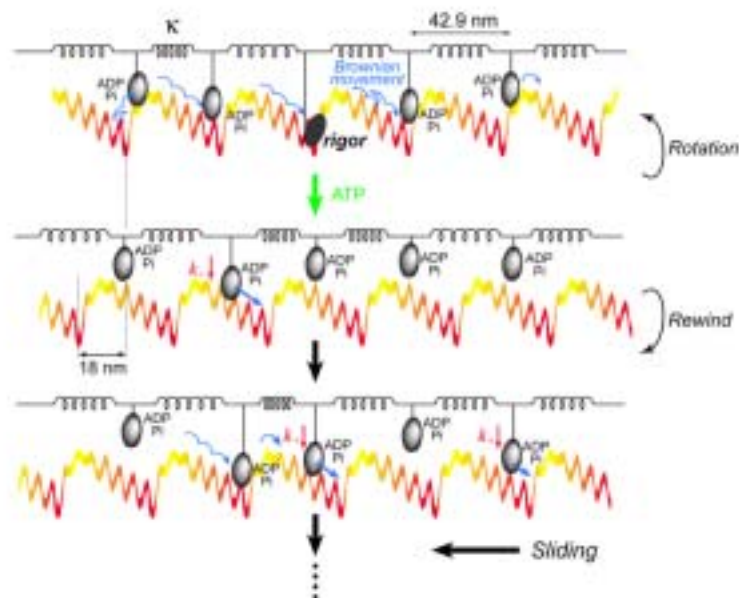
のアプローチを展開している。ひとつは、1分子計測の結果を基に、システムでの振る舞いを計算機シミュレーションを使って調べる。2つ目は、実際にシステムの中で1分子計測を行い、システムに拘束されながら機能する分子の振る舞いを計測する。

3.1.IV-1 ラチェットによるミオシン2の運動の記述とシステム

単頭のミオシン2は単独で存在するとき、前後へ 5.5nmのサブステップ運動して全体として1方向へ運動している。この運動はさまざまなモデルを使って説明が試みられている。我々は非対称な周期ポテンシャルの上をブラウン運動する粒子として、その運動を記述した。そのままでは方向性ある運動は発生できないので、このポテンシャルを(1)空間的に勾配を与える、あるいは、(2)ポテンシャルを早く振動する。その時の運動を1分子計測のデータと対応つけるために、ランジュバン方程式を使ってシミュレーションした。その結果、前後にステップ状に滑り運動する様子を再現することができ、ATPase のキネティック・パラメーターを使って、実際の実験結果を再現することもできた。(Esakiらにより Proc. Jap. Acad.より掲載、2003)

またこのモデルを発展させて、ミオシンの2つの頭がバネでつながれたときの運動をシミュレーションした。バネの強さ、バネの自然長と、アクチオシンのポテンシャルの大きさの兼ねあいで、運動は加速したり、ブレーキがかかったりする。非常にバネが強いときには、剛体棒でつながれたダンベールの運動として考えられ、自然長がポテンシャル周期の半分の時には、ステップサイズが半分になることが示された。半ステップサイズの運動は、バネの強さが、ポテンシャルの強さと同じくらいの時にも、現れることが示され、1分子実験との比較が可能となった(Esakiらにより論文投稿準備中)。

1分子計測の結果とそれを表現したモデルをもとに、計算機上で筋肉を構成しシミュレーションをおこなった。



筋肉内でのミオシンの運動のシミュレーションモデル

フ

フィラメント上のミオシン分子はバネでつながれている。ミオシン分子はアクチンフィラメントに沿ったポテンシャルに従って運動する。ポテンシャルはフィラメントに固定したミオシンとらせん状に並んだアクチンモノマーの立体構造を反映して1方向へ傾いている。1個の孤立したミオシン分子は立体障害で1ピッチつまり7個のアクチンモノマー以上に進むことはできないが、他のミオシン分子が関わっていることで、この

立体障害を越えることが可能になる。ミオシンが ATP 加水分解の分解生成物を解離した時、筋肉ではアクチンフィラメントが回転することが報告されているが、この時この回転に伴ってアクチンフィラメント上のポテンシャルはフィラメント軸に沿ってずれる。他のミオシン分子にとってポテンシャルの底から解放されることになり、継続して滑り運動をすることが可能になる。このようにして多分子の存在する筋肉上では大きなステップをすることができる。実際、筋肉では大きなステップサイズも報告されており、このモデルが現実的であるように思われる (Kitamura らにより Biophysics に掲載された)。

3.1.IV-2 システムの中でのミオシン2モーターの挙動

もう一つのアプローチは、多分子が働くシステムの中で実際に計測を行い、ミオシンモーターの振る舞いを計測する。アクチンミオシンの速度とそのゆらぎを ATP 濃度を変えながら運動アッセイを使って解析した。タイトカップリングのミオシン5に対し、ミオシン2では平均速度とゆらぎの関係がミカエリス-メンテン機構から外れ、ルースカップリングであることが示唆され、ミオシン分子間の協同性の結果、ATP 加水分解当たり大きなステップサイズを持つことが支持された (論文投稿中)。また、筋肉や筋原繊維の中で1分子のミオシンを可視化し、その挙動を追跡している。今後、この研究の延長線から、生体のシステムの特徴を明らかにすることが可能になるだろう。

(2)研究成果の今後期待される効果

分子モーターの機能にはブラウン運動が係わっており、ランダムなブラウン運動が一方方向へバイアスされる過程が存在することが、さまざまなモーターで明らかになった。分子モーターは、他の分子機械のユニークな特性を備えており、典型的な分子機械と考えられる。分子モーターで得られたメカニズムは、他の分子機械のいいモデルになると思われる。

ゆらぎが生物の働きの中でさまざまに利用されていることは、最近多くの場面で報告されている。細胞はゆらぎに比べ小さな入力信号に応答して機能している。ノイズをうまく利用して小さな信号を増幅している機構があるに違いない。あるいは、我々の脳は非常に複雑な働きをしていると思われているが、そのメカニズムも分子の世界と同じようなメカニズムで機能している可能性が示されている。エンジニアリングの世界に、ゆらぎを巧みに取り入れることで、これまでにないロボットやマニピュレータが生まれる可能性が、検討されている。分子機械で得られたユニークな動作特性を人工機械に取り入れることにより、新しい原理に基づく人工機械を作ることができる。生物分子機械の動作原理を取り入れたアクチュエータは、これまでの機械にはない画期的な動作を示すだろう。生物のように柔軟に機能し、効率よく機能することが期待される。このアプローチは工学、医学など、さまざまな分野に応用され、生体システムのユニークさを備えた新しいタイプの機械として活用されるだろう。逆にこのアプローチは、生物とは何か、という疑問を問いかけることにもなる。正に社会が求めている問いかけであり、ヒトにやさしい、環境にやさしい機械への一歩である。

3.2 分子モーターの理論モデリング (大阪大学 サイバーメディアセンター 菊池チーム)

- (1)研究実施内容及び成果
- (2)研究成果の今後期待される効果

生体分子モーターの運動メカニズムを理論的に研究するには、大きくふたつの立場が考えられる。ひとつは熱ラチェットなどを用いた現象論的なモデルで、多くの場合、モータータンパク質の「構造」はあらわに考慮されない。ミニマリスト的モデルと言ってもいいだろう。逆の立場はいわばマキシマリスト的モデルで、全原子計算によってタンパクの構造ゆらぎを調べようとするものである。しかし、我々は生体分子モーターの運動メカニズムを理解し、さらに将来新しい分子モータータンパクを設計するためには、その二者の間レベルのモデルが必要であると考えた。

タンパク質はポリペプチド鎖からなるやわらかい物質であり、生体内で熱ゆらぎの影響を強く受ける。他の高分子と際立って違う特徴は、生理条件下で特定の天然構造に折りたたむことである。folding は熱揺らぎのもとで一方向に進む過程なので、やはり熱揺らぎの中で一方向の運動を行なう分子モーターがこのfolding 過程を利用していると考えことは自然であろう。特にファネル描像が多くのタンパクのfolding をうまく説明することが認められるようになって以降、我々を含むいくつかのグループが、folding にもとづく分子モーターのメカニズムについて研究を行なっている。

ファネル描像からのひとつの帰結として、タンパク質構造は天然構造のまわりで揺らいでおり、時には自発的なunfold とrefold も起きることが導かれる。もちろん、分子モータータンパク全体としてのfolding-unfoldingが運動を引き起こすと考えるのは時間スケールの観点からも無理がある。しかし、中心の疎水性コアを壊さない程度の「部分的なfolding-unfolding」が運動に関係すると考えるのは、むしろ自然であろうというのが、我々の立場である。

部分的folding をあらわに考慮するには、少なくとも鎖の構造を取り入れたモデルでなくてはならない。それも天然構造のトポロジーが十分によく表現できる程度の解像度を持つモデルであることが望まれる。我々はその程度の「中間レベルのモデル」を用いて分子モーターの構造ゆらぎを調べ、運動メカニズムとの関係を議論した。モデルとしては、アミノ酸1個をひとつの球とみなして、主鎖のトポロジーは正確に表現できるようにし、相互作用として郷モデルまたはその拡張(Go-like と総称される)を用い、天然構造とそこへのfolding が(少なくとも定性的には)現実を再現できるものを主として用いた。Go-like モデルはタンパク質の「ファネル描像」を実現する最も簡単なモデルであり、小型球状タンパク質の折れたたみ過程のみならず、中間状態を持つある程度複雑な折れたたみ過程うまく記述できることが実例で示されている。ただし、以下で述べるように、単純なGo-like モデルでは不十分な点が多く、分子モーター研究に適したいくつかのモデルを提案した。ここで、全原子を用いた分子動力学計算はこの目的には不向きであることを強調しておきたい。ミオシンやキネシンといったサイズのタンパク質の運動を分子モーターの動作する時間スケールにわたって全原子計算で追跡することは、現時点では望みがない。また、本研究で用いた一連の「中間レベルのモデル」は、相互作用パラメータを連続的に変化させたり、仮想的な運動をさせるなど、さまざまな「操作」が容易であり、「メカニズム」研究には適している。

我々は、中間レベルモデルを用いた計算機シミュレーションにより、分子モータータンパクの構造揺らぎと構造変化を調べた。特に注目したのはヌクレオチドの役割である。

3.2.1 ミオシン・モータードメインの構造変化とヌクレオチド解離(高城, 菊池)

ミオシンモータードメインについて、構造変化とヌクレオチド解離の動力学計算を行なったGo-model は構造変化(「ランダムコイル \leftrightarrow コンパクトな天然構造」ではなく「コンパクトな構造1 \leftrightarrow コンパクトな構造2」)を扱うには適していないため、我々はこれを拡張し、(準)安定な構造を複数取り得る新たな粗視化モデルとして、dual-Go モデルを提案した。また、従来粗視化モデルではヌクレオチド等のリガンドは扱われてこなかったが、結合部位におけるリガンドの有無は、構造ゆらぎを考えるうえで重要であると考え、ヌクレオ

チドも粗視化して取り入れた。これにより、ヌクレオチドの解離とミオシンモータードメインの構造変化がどのように関係するかを議論することが可能となった。

このモデルを用いてミオシンモータードメイン(*Dictyostelium discoideum* myosin II) pre-powerstroke 構造(PDB:1vom, ADP.Pi アナログを結合) からnear-rigor 構造(PDB:1q5g, ヌクレオチド無) へのヌクレオチド解離を伴う構造変化を計算し、以下の結果を得た。

1

1. ヌクレオチドが結合している間はnear-rigor 構造への緩和がおこらない。これより、構造緩和におけるヌクレオチドの役割として、ミオシンの構造変化を止めて自由エネルギーランドスケープを切り替えることが示唆される。また、ヌクレオチドとミオシンの引力相互作用の強さを変化させると、それにもなって構造変化とヌクレオチド解離との協同性が変化する。これは、モーターの動作におけるヌクレオチドの役割について再考を促す結果と言えそうである(Takagi and Kikuchi, Biophys. J.)。

2. ヌクレオチドによる構造変化の抑制効果は、陽にヌクレオチドを扱わずとも、ヌクレオチド結合部位を仮想的なバネにより固定することによっても示すことができる。同様に、様々な部位をバネで「かためる」ことにより、阻害剤やアクチン結合によるADP 解離の阻害・促進を定性的に再現することができた。これより、リガンドが特定の部位を動きにくくすることによって構造変化を調整する働きをすることが統一的に理解できる。

3. ミオシンのコンバーター部に一定の外力をかけた状態で構造変化・ヌクレオチド解離シミュレーションを行ない、ヌクレオチド解離速度が外力の向きや大きさによって変化することを示した。ヌクレオチドの結合・解離の速度が、ミオシンにかけられた外力に応じて変化することは実験で示唆されており、Strain Sensor 機構と称されている。計算結果は実験と定性的に一致しており、Strain Sensor のメカニズムを明らかにするものである。また、この外力に対する応答の強さは、ヌクレオチド-ミオシン間の相互作用強度によって変化する(Takagi and Kikuchi, 論文準備中)

ミオシンはクラスにより大きく振舞いが異なり、ミオシン5 などはヌクレオチド状態と運動がタイトに対応している(タイトカップリング) とされるのに対し、ミオシンII では必ずしも1 対1 でない(ルースカップリング) と言われている。同じクラスに属するミオシンでも、その種類により構造とヌクレオチド状態との対応は必ずしも同じではない。また、外力への応答の強さも、クラスや種類によって異なるという実験報告もある。我々の計算結果は、このようなミオシンの種類による挙動の違いをヌクレオチドとの親和性を軸とした統一的に理解する可能性を示唆している。

3.2.2 キネシン、チューブリンの構造ゆらぎ解析((検崎,) 菊池)

モータータンパクであるキネシンとそのレールを構成するチューブリンそれぞれについて、幅広い温度領域での熱平衡計算を行ない、構造ゆらぎ解析を行なった。構造緩和ではなく熱平衡ゆらぎに注目するのは、キネシンとヌクレオチドの結合やキネシンとチューブリンの結合が構造ゆらぎによって実現すると考えたからである。熱平衡計算には膨大な計算時間を要するため、我々は、X 線構造をもとにした(ハイブリット) 格子モデルにGo-like モデルによる天然構造を再現する相互作用を与えたものを用いた。さらに計算手法として、菊池が(千見寺,) 統計数理研究所・伊庭幸人助教授と協力して開発したMulti-Self-Overlap Ensemble (MSOE) MonteCarlo 法を用いることにより、このような大きなタンパク質の熱平衡計算に成功した。構造ゆらぎに対して主成分分析を適用し、以下の結果を得た

1. ヌクレオチドが結合しない状態で、キネシンの大きな構造ゆらぎはふたつあり、それぞれSwitch I とSwitch II 領域を含む領域に局在する。これらはまたヌクレオチドおよびレールタンパクとの結合部位である。ミオシンの構造緩和と合わせて考えるなら、リガンド結合部位はリガンドが存在しない状態で大きく揺らいでおり、リガンド結合によって「かたまる」というのが一般的な原理であると思われる。なお、計算で見出された大きく揺らぐ領域は、最近の実験結果とconsistent であり、いっぽう天然構造まわりでの微小揺らぎ

のみを考える弾性ネットワークモデルの結果とは一致しない。これはキネシンのリガンド結合に弾力的な揺らぎを超える大きな構造揺らぎ、端的には「部分的unfolding」が関与することを強く示唆する。(Kenzaki and Kikuchi, Proteins, 印刷中)

2. チューブリンでもリガンド結合部位・チューブリン重合時の結合部位・キネシン結合部位に大きな構造揺らぎが局在している。中でも注目すべきはキネシン結合部位である。ここでは小さな領域が大きくほどける「部分的unfolding-refolding」が観測される。この結果は、モーターとしての機能発現にはモーターのみならずレール側の構造揺らぎが重要な役割を果たしていることを示唆する。つまり、両タンパクの「部分的unfolding-refolding」が共同的に起きて結合解離を制御しているのではないかという予想である。そうであれば、レールタンパクは単なる静的なレールとして存在するのではなく、その構造揺らぎを通してキネシンの運動に積極的に関わっている可能性がある(Kenzaki and Kikuchi, 論文投稿中)

2

3.2.3 キネシンのヌクレオチド状態と構造ゆらぎ((金田,) 高城, 菊池)

単頭キネシンKIF1A は、微小管親和性の低い弱結合モードと親和性の高い強結合モードの2つのモードを持つ。我々は、KIF1AのGo-likeモデルを用いた分子動力学シミュレーションを行ない、いくつかの異なるヌクレオチド状態について構造ゆらぎの解析、比較を行なった。その結果、微小管結合部位に位置する $\alpha 4$ ヘリックスのゆらぎがヌクレオチド状態により異なることを明らかにした。近年、KIF1Aの2つのループ(L11,L12)がモード切り替えに寄与していることを示唆する実験結果が報告されている。 $\alpha 4$ はL11とL12の間に位置しており、我々の結果は、このモード切り替えのメカニズムと関係すると考えられる。 $\alpha 4$ のゆらぎは、弱結合に相当する状態では小さく、強結合では大きい。ゆらぐ(部分的unfold-refoldも含む)ことによって、結合相手(微小管)とより結合しやすくなると考えられる。ここでも、リガンド結合部位はリガンドが存在しない状態で大きく揺らいでおり、リガンド結合によって「かたまる」という一般的原理が見られる(Kanada, Takagi, and Kikuchi, 論文準備中)

3.2.4 その他

1. Funnel 描像は、天然構造が同じであればfolding過程も同じであることを示唆するように思われている。これは二状態転移する小さなタンパクにはうまく当てはまり、folding中間状態を持つタンパクでもうまくいく場合がある。しかし、実験的には例外も多く、大きなタンパクにfunnel描像がどの程度適用できるかは、あまり明らかではなかった。我々は分子モーターをGo-likeモデルの枠組で研究しているので、この問題についても検討しておく必要があった。対象として、種類によりさまざまなfolding過程が観測されているC-type Lysozymeを選び、サブドメインごとの相互作用の強さを変えていったところ、実験的に得られているすべてのfolding過程が得られた。これはGo-likeモデルの枠内でもモデルには自由度があり、さまざまな実験結果がその自由度の範囲内で再現できることを意味する。これより、我々が注目する「部分的folding-unfolding」についても、Go-likeモデルで扱うことが正当化される(Kenzaki and Kikuchi, Chem. Phys. Lett., 出版済み)

2. Funnel 描像を認めてしまうなら、計算のためのモデルは必ずしも全原子やアミノ酸単位で粗視化したものである必要はない。天然構造のトポロジーが適当にうまく表現できるなら、もっと要素の少ないモデルでもいいはずである。特に大きな分子モーターを研究するためには、要素数を減らして計算できるなら、それに越したことはない。我々は要素数を減らしたGo-likeモデルを提案し、その自由エネルギー構造を調べた。折れたたみ中間状態をもつRNaseHについての計算から、要素数を1/3程度に減らしてもfolding過程は定性的に変わらないことを確かめた(Shimoyama and Kikuchi, J. Phys. Soc. Jpn., 印刷中)

また、分子モーターへの応用として、このモデルでSecA の自由エネルギー構造を計算し、アロステリーを実現する自由エネルギー構造を得た(Shimoyama and Kikuchi, 論文準備中)

3. 分子モーターの説明として一般に「ATP は高エネルギー分子である」と言われることが多い。しかし、いったいこれはどういう意味なのだろうか。モーターとATP の結合は実は「吸熱反応」であるという意見もある。また、関連する話題として「アクチン重合は吸熱反応」という意見もある。そこで、直接的なモデルではないが、toy-model として簡単な格子タンパクモデルの重合反応を調べ、適当な条件下では「吸熱的重合」が起きうることを見出した。この場合、重合にともなって、結合部位以外の部分で「揺らぎ」が増大する。ミオシンの構造緩和のところでも述べたことと合わせ、ヌクレオチドの役割については再考が必要であろう。

4 研究参加者

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
柳田 敏雄	大阪大学	教授	1分子計測	H14,11～
佐甲 靖志	理化学研究所	主任研究員	一分子計測	H14,11～
岩根 敦子	大阪大学	助教授	蛋白質調製	H15,1～
石井 由晴		研究員	1分子計測	H15,1～
谷口 恵里		チーム事務員		H15,4～
三室 孝子		技術員	蛋白質調製	H15,5～
流 久美子		研究補助員		H18.9～
岡田 拓也		特認研究員(委託費より)		H18.4～ H17.5～H18.3 31
小塚 淳		特認研究員(委託費より)		H18.4～ H17.5～H18.3 31
西川 宗	大阪大学 JST	助手	1分子計測	H19.4～ H16,4～H18.1
田中 裕人			1分子計測	H15,1～H18.8
蓮見 尚子				H15,5～H18.8

高木 拓明			計算機シミュレーション	H15.5~H16.3
江崎 誠治			計算機シミュレーション	H15.6~H15.12
小森 靖則	大阪大学	特任研究員	1分子計測	H19.4~ H17.5~H19.3
西川 正俊	大阪大学	特任研究員	1分子計測	H19.4~ H18.4~H19.1
岩城 光宏	大阪大学	特任研究員	1分子計測	H19.4~ H18.4~H19.1 H17.5H18.3
新井 由之	大阪大学	特任研究員	1分子計測	H18.4~ H17.5~H18.3
松本 里実	大阪大学	学振特別研究員	1分子計測	H16.4~
佐藤 雅之	大阪大学	学生D 3		H17.4~
小森 智貴	大阪大学	学生D 2		H18.4~
宮永 之寛	大阪大学	学生D 4		H16.4~
須河 光弘	大阪大学	学生D 3		H17.4~
森松 賢順	大阪大学	学生D 2		H18.4~
塚崎 克和	大阪大学	特任研究員		H16.4~
佐甲 靖志	理化学研究所 大阪大学	主任研究員 助教授	1分子計測	H18.4~ H15.4~H18.3
西山 雅祥	京都大学	助手	1分子計測	H16.10~
池辺 光男	マサチューセッツ医科大学	教授	モーター分子の設計	H14.11~
本間 和明	マサチューセッツ医科大学		モーター分子の設計	H14.11~
長田 義仁	北海道大学	教授	人工筋肉の創製	H14.11~
ダン 剣	北海道大学	助教授	人工筋肉の創製	H14.11~
難波 啓一	大阪大学	教授	構造解析	H14.11~

菊池 誠	大阪大学	教授	モデリング	H14.11~
時田 恵一郎	大阪大学	助教授	モデリング	H14.11~
高城 史子		研究員	モデリング	H15.8~

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 36 件)

M. Ikebe, A. Inoue, S. Nishikawa, K. Homma, H. Tanaka, A. H. Iwane, E. Katayama, R. Ikebe, T. Yanagida, "Motor function of unconventional myosin", *Adv. Exp. Med. Biol.*, **538**, 143-156 (2003)

T. Yanagida, Y. Ishii, "Stochastic processes in nano-biomachines revealed by single molecule detection", *Biosystems*, **71**, 233-244 (2003)

K. Kitamura, T. Yanagida, "Stochastic properties of actomyosin motor", *Biosystems*, **71**, 101-110 (2003)

M. Nishiyama, H. Higuchi, Y. Ishii, Y. Taniguchi, T. Yanagida, "Single molecule processes on the stepwise movement of ATP-driven molecular motors", *Biosystems*, **71**, 147-158 (2003)

K. Hibino, T. M. Watanabe, J. Kozuka, A. H. Iwane, T. Okada, T. Kataoka, T. Yanagida, Y. Sako, "Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells", *CHEMPHYSICHEM*, **4**, 748-753 (2003)

S. Esaki, Y. Ishii, T. Yanagida, "Model describing the biased Brownian movement of myosin", *Proc. Japan Acad.*, **79**, 9-14 (2003)

T. Watanabe, H. Tanaka, A.H. Iwane, S. M-Yonekura, K. Homma, A. Inoue, R. Ikebe, T. Yanagida, M. Ikebe, "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)

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

- H. Yokota, K. Kaseda, H. Matsuura, Y. Arai, A.H. Iwane, Y. Ishii, T. Kodama, T. Yanagida, *J. nanoscience and nanotechnology* 4. 616–621 (2004)
- K. Kitamura, M. Tokunaga, A.H. Iwane, T. Yanagida, Mechanism of muscle contraction based on stochastic properties of single actomyosin motors observed in vitro. *Biophysics* 1, 1–19 (2005)
- T. Uyemura, H. Takagi, T. Yanagida, Y. Sako, Single-molecule analysis of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. *Biophys. J.* 88(5):3720–3730 (2005)
- T. Tani, Y. Miyamoto, K. Fujimori, T. Taguchi, T. Yanagida, Y. Sako, Y. Harada, Trafficking of a Ligand-Receptor Complex on the Growth Cones as an Essential Step for the Uptake of Nerve Growth Factor at the Distal End of the Axon: A Single-Molecule Analysis. *The Journal of Neuroscience* 25(9):2181–2191(2005)
- Y. Taniguchi, M. Nishiyama, Y. Ishii, T. Yanagida. Entropy rectifies the Brownian steps of kinesin. *Nature Chem. Biol.* 1, 346–351 (2005)
- A.H.Iwane, H. Tanaka, S. Morimoto, A. Ishijima, T. Yanagida, The neck domain of myosin II primarily regulates the actomyosin kinetics, not the stepsize. *J. Mol. Biol.* 353: 213–221 (2005)
- J. Kozuka, H. Yokota, Y. Arai, Y. Ishii, T. Yanagida, Dynamic polymorphism of single actin molecules in the actin filament. *Nature Chemical Biology* 2, 83–86 (2006)
- S.C. Shibata, K. Hibino, T. Mashimo, T. Yanagida Y. Sako, Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements. *Biochem Biophys Res Commun.* 342: 316–22 (2006)
- M. Iwaki, H. Tanaka, A.H. Iwane, E. Katayama, M. Ikebe, T. Yanagida, Cargo-Binding Makes a Wild-Type Single-Headed Myosin-VI Move Processively. *Biophys J.* 90(10):3643–52 (2006)
- Y. Arai, A.H. Iwane, T. Wazawa, H. Yokota, Y. Ishii, T. Kataoka, T. Yanagida, Dynamic polymorphism of Ras observed by single molecule FRET is the basis for molecular recognition. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(3):809–15 (2006)
- M. Nishikawa, S. Nishikawa, A. Inoue, A.H. Iwane, T. Yanagida, M. Ikebe, A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. *Biochem Biophys Res Commun.* 1159–64 (2006)
- J. Ichinose, M. Morimatsu, T. Yanagida 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.* 25,4215–4222 (2006)
- S. Esaki, Y. Ishii, M. Nishikawa, T. Yanagida. Cooperative actions between myosin heads bring effective functions, *Biosystems* 88(3):293–300 (2007)

V. V. Yakovlev, S. Nishikawa, T. Yanagida, "Imaging of cooperative motion on a simulated energy landscape", Proc. SPIE "Nanoscale Imaging, Spectroscopy, Sensing and Actuation for Biomedical Applications IV", 6447-12, D1-D8 (2007)

T. Yanagida, M. Ueda, T. Murata, S. Esaki, Y. Ishii, "Brownian motion, fluctuation and life", Biosystems, 88(3), 228-242 (2007)

J. Kozuka, H. Yokota, Y. Arai, Y. Ishii, 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, Y. Yanagida, "Single molecule FRET for the study on structural dynamics of biomolecules", Biosystems, 88(3), 243-250 (2007)

Y. Taniguchi, P. Karagiannis, M. Nishiyama, Y. Ishii, T. Yanagida, "Single molecule thermodynamics in biological motors", Biosystems, 88(3), 283-292 (2007)

Y. Tsukasaki, K. Kitamura, K. Shimizu, A. H. Iwane, Y. Takai, 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)

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. Komori, Iwane K. Yanagida T. Myosin-V Makes Two Brownian 90° Rotations per 36nm-Step Nature Structural & Molecular Biology 14, 968-973 (2007)

H. Kenzaki and M. Kikuchi, "Diversity in Free Energy Landscape and Folding Pathway of Proteins with the Same Native Topology", *Chem. Phys. Lett.*, vol.427, pp.414-417 (2007)

F. Takagi and M. Kikuchi, "Structural Change and Nucleotide Dissociation of Myosin Motor Domain: Dual Go Model Simulation", *Biophys. J.*, 3820-3827 (2007)

H. Kenzaki, M. Kikuchi, "Free energy landscape of kinesin by a realistic lattice model", *Proteins*, 71, 389-395 (2007)

H. Shimoyama, M. Kikuchi, "Coarse-graining of coarse-grained protein model", *J. Phys. Soc. Jpn.*, 76(10) 103801 (2007)

Y. Ishii, Yanagida T. How single molecule detection measures the dynamic action of life? HFSP journal 1. 15-29 (2007)

T. Yanagida, M. Iwaki, Y. Ishii Single molecule measurements and molecular motors Phil. Trans R. Society London B. in press (2008)12

(2)その他の著作物 (総説、書籍など) (海外 8 件。国内12件)

柳田敏雄 「線形モータを測る」 ナノテクノロジーハンドブック IV バイオ・化学へ使う 101-104 (オーム社)(2003)

Y. Sako, T. Yanagida, "Single-molecule visualization in cell biology", Nat Rev Mol Cell Biol., 4, SS1-SS5 (2003)

Y. Ishii, K. Kitamura, H. Tanaka, T. Yanagida, "Molecular motors and single-molecule enzymology", *Methods Enzymol.*, 361, 228-245 (2003)

和沢鉄一,石井由晴 「蛋白質の動的構造 ナノテクノロジーハンドブックIV バイオ・化学へ使う」 90-94 (オーム社)(2003)

石井由晴,江崎誠治,西川 宗,上田昌宏 「ナノテクノロジー大事典」生体分子運動システム 785-798 (工業調査会)(2003)

江崎誠治,柳田敏雄 生体ナノ分子機械の一分子計測 *Medical Imaging Technology*, 21(5), 338-343 (2003)

石井由晴、柳田敏雄 1分子生理学 筋肉の収縮機構をナノテクノロジーで解明する ナノテクノロジーによる生命科学 ナノバイオロジー(竹安邦雄編)105-120 (2004)

Y. Ishii, T. Yanagida, Single molecule manipulation for bioelectronics in *Bioelectronics* (Willner and Katz eds.)(2004)

石井由晴,柳田敏雄 「1分子生理学 筋肉の収縮機構をナノテクノロジーで解明する」 ナノテクノロジーによる生命科学 ナノバイオロジー(竹安邦夫編) 105-120 (共立出版)(2004)

江崎誠治,柳田敏雄 生物分子モーターの働くしくみ (連載:今からでも遅くない物理入門) *細胞工学* 23(8), 957-961

江崎誠治,西川 宗,柳田敏雄 「細胞生物学 セレクトドレビュー2」 生命科学における1分子計測 3-16 (中山書店)(2004)

江崎誠治,柳田敏雄 一分子計測でみる生命活動とブラウン運動 *光学*, 34(12), 639-44 (2005)

T. Yanagida, J. Kozuka, T. Okada, Y. Taniguchi, M. Iwaki, Y. Ishii, Single molecule nano-bioscience: Fluctuations and adaptive biological molecular machines. *ano-biophotonics vol. 3* pp1-21 ed. By Masuhara H., Kawata S., and Tokunaga F. (Elsevier) (2007)

T. Yanagida, Muscle contraction mechanism based on actin filament rotation. *Advances in experimental medicine and biology vol. 592* pp 359-367 iRegulatory mechanisms of striated muscle contraction ed. By Ebashi S., and Ohtsuki I.(Springer)(2007)

西川宗 全反射蛍光顕微鏡技術(TIRFM) *日本臨床(日本臨床社)*, 65, 263-269 (2007)

柳田敏雄、石井由晴、岩城光宏、西川正俊 1分子計測で何がわかるか 第7章第1節 非侵襲・可視化ハンドブック pp. 691-701 (2007)

T. Yanagida, Y. Miyanaga, M. Sugawa, M. Sato, Fluctuation and noises in biosciences *AIP conference proceedings* 922 pp. 10-15 (2007)

T. Yanagida, J. Kozuka, T. Okada, Y. Taniguchi, M. Iwaki, Y. Ishii, Single -molecule nano-biosciences; Fluctuations and adaptive biological molecular machines. In *Nano biophotonics-Science and technology* (Masuhara H., Kawata, S., and Tokunaga, F. ed.)

Elsevier 3-21 (2007)

S. Nishikawa, T. Komori, T. Ariga, T. Okada, Y. Ishii, T. Yanagida, T. Imaging and manipulation of an actomyosin motor. Single-Molecule Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory Pr) pp.325-46 (2007)

西川 宗 ミオシンの運動方向を逆転する仕掛け 別冊「化学」「第二ステージに進んだ分子マシン」(化学同人) (2008)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 59 件、国際会議 26 件)

海外での会議

2003(平成15)

柳田敏雄 Single molecule nano-bioscience. 11th European congress on biotechnology. スイス・バーゼル (2003.8.24-29)

柳田敏雄 Single molecule experiments on molecular motors and cell signaling. International symposium on elucidating biomolecular networks by single-molecule technologies. スイス・アスコナ (2003.10.30)

柳田敏雄 How does myosin without rigid lever arm generate large steps? ALPBACH WORKSHOP ON MOLEULAR MOTORS. オーストリア・アルプバッハ (2004.3.26-4.3)

2004(平成16)

田中裕人 An actomyosin motor moves by biased Brownian motion. The 1st Pacific-rim international conference on protein science. 横浜 (2004.4.14-18)

柳田敏雄 How does myosin without rigid long neck domains generate successive large steps? Wenner-Gren International symposium. スウェーデン・ストックホルム (2004.8.18-22)

石井由晴 Dynamic polymorphism of a cellular signal protein Ras studied by single molecule. ACS Single molecule meeting, 米国フィラデルフィア+東京 (2004.8.20+29)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-bioscience. 10th International workshop on single molecule detection and ultrasense. ドイツ・ベルリン (2004.9.17-29)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-bioscience The 8th International Conference on. デンマーク・コペンハーゲン (2004.9.17-29)

2005(平成17)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience: Learning Nanoscience from Biology a Novel Symposium on Controlled Nanoscale Motion in Artificial and Biological Systems スウェーデン (2005.6.12-6.19)

柳田敏雄 Myosin Movement beyond the lever Arm GORDON RESEARCH CONFERENCES 米国・ボストン(2005.7.2-7.11)

柳田敏雄 Dynamic polymorphism of actin molecules in the filament

FEBS/ESF advanced workshop Intergrated Approaches in Cytoskeleton
Research ルクセンブルク (2005.8.27-8.29)

柳田敏雄 Single molecule study on the actomyosin motor 15th IUPAB+5th
EBSA International Biophysics Congress フランス (2005.8.29-9.3)

柳田敏雄 A mechanism of the muscle contraction based on actin filament rotation
Joint 61th Harden Conference/EMBO Workshop イギリス (2005.9.16-9.24)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience: Learning nano technology from Biology
Opening Ceremony Osaka Univ-Groningen office • Collaboration Symposium オランダ
(2005.10.23-10.26)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience ATPCTP-KU Joint Conference on
Bio-complexity 韓国 (2005.11.1-11.4)

柳田敏雄 A mechanism of the muscle contraction based on actin filament rotation
BIOCOMP 2005 イタリア (2005.12/11-12/15)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience: Learning nano technology from
Biology Frontiers in Chemical Biology: Single Molecules イギリス (2006.3/25-3/30)

2006 (平成18)

柳田敏雄 Single Molecule NanoBioscience: Learning nanotechnology from biology Les
Houches Summer School フランス (2006.5/22-5/27)

柳田敏雄 Myosin and Kinesin Motors Gordon Research Conference on Single
Molecule Approaches to Biology アメリカ(ニューロンドン) (2006.6/20-6/25)

柳田敏雄 Single molecule imaging for elucidating the mechanism in utilizing fluctuation by
biosystems Woods Hole Physiology Course アメリカ(ボストン) 7/9(日)-7/16(日)

柳田敏雄 A mechanism for muscle contraction based on actin filament rotation The 6th
International Muscle Energetics Conference カナダ(バンフ) (2006.7/23-7/28)

菊池誠, "Free-energy landscape of lattice protein model", 2006 NCTS November Workshop on
Critical Phenomena and Complex Systems, Chung-Yuan Christian University, Taiwan,
(2006.11.10-12)

柳田敏雄 Single Molecule NanoBioscience Single Molecule Biophysics Winter
Workshop 2007 Aspen(アメリカ) (2007.2/4-2/12)

”柳田敏雄 Fluctuation and Relaxation of Motor Proteins”, 2006 NCTS November Workshop
on Critical Phenomena and Complex Systems, Chung-Yuan Christian University, Taiwan,
(2006.11.10-12)

2007 (平成19)

柳田敏雄 Fluctuation and Operation of Life BIOCOMP 2007 ナポリ(イタリア)
(2007.9.23-9.30)

石井由晴 Biased step movement of molecular motors BIOCOMP 2007 ナポリ
(イタリア) (2007.9.23-9.30)

柳田敏雄 Sigle molecule nanobiology The 8th Shanghai Roundtable Nanobiology-
A Challenge for the Future Shanghai Institute for Advanced Studies 上海(中国)
(2007.2.1-8)

国内

2003(平成15)

田中裕人 生体分子モーターの1分子ナノ計測. 第31回薄膜・表面物理セミナー 7/11

2005(平成17)

柳田敏雄 生命科学からみた光科学技術への期待 特別シンポジウム「横断・融合的学
術としての光・光量子科学—その最前線と多様な応用技術展開—」東京大学 4/13

柳田敏雄 1分子ナノテクノロジーと生命科学 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会・学
術講演会大阪国際会議場 5/21

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス —ゆらぎと生体機能— 21世紀 COE 化学科セ
ミナー名古屋大学 7/15

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス —ゆらぎと生体機能— 第43回茅コンファレン
ス 大泉高原八ヶ岳ロイヤルホテル 8/21-24

柳田敏雄 生命科学に学ぶナノテクノロジー 第6回日本分子脳神経外科学会 千里ラ
イフサイエンスセンター 9/4

柳田敏雄 Single-molecule Nano Bioscience LP ナノ第二回オープンワークショップ 梅
田スカイビル 10/6-7

柳田敏雄 最先端計測でみる生体分子と脳の働き 世界物理年 究める科学・活かす技
術タワーホール(東京) 10/15

柳田敏雄 1分子計測科学のナノバイオサイエンス 全科展 in 大阪 ヒューマンライフサ
イエンスフォーラム2005 インテックス大阪 10/20(木)

柳田敏雄 ナノテクノロジーでみる生物分子モーターの仕組み スーパーサイエンスハイ
スクール阪大(ナノ棟・セミナー室) 10/21

柳田敏雄 ノイズと生命機能:電子デジタル情報処理と生体情報処理 情報通信機構と
の連携シンポジウム 大阪大学中ノ島センター 10/21

柳田敏雄 A mechanism for the muscle contraction based on actin filament rotation トロ
ポニン発見40周年記念国際シンポジウム 岡崎コンファレンスセンター 10/26-28

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス 東京大学大学院講義 東京大学 11/15

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス 第11回光ナノサイエンス特別講義 兼 第16
回生物物理セミナー 奈良先端大学 12/2

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス 京都大学基礎研究会 京都大学 12/15-16

柳田敏雄 Single-molecule Nano Bioscience Bio-ADIT2006 千里ライフサイエンスセ
ンター1/26-27

柳田敏雄 Single-molecule Nano Bioscience: Learning Nanoscience from Biology
International Symposium on Bio-and Nano-Electronics in Sendai 仙台エクセル東急
3/2-3

柳田敏雄 ゆらぎの科学が変える未来の暮らし 公開シンポジウム 中ノ島公会堂 3/7

2006(平成18)

柳田敏雄 Role of fluctuations in adaptive biosystems 第20回国際生化学・分子生物学会
会議(20th IUBMB) 国立京都国際会館 6/19

柳田敏雄 生命科学とナノテクノロジー 科学ゼミナール 東京電力エネルギー
館 9/9

柳田敏雄 最先端計測技術でみる”ゆらぎ”と生命機能 第24回未来医療セミナー 阪
大付属病院 9/27

石井由晴 自然が創るナノマシン—タンパク質の動作メカニズム 日本醸造学会平成18
年度大会における合同講演会 東京北トピア 10/11

柳田敏雄 1分子ナノサイエンス:ノイズを利用する生体機能 ナノ粒子研究会 第37回
公開講演会 大阪国際会議場 10/27

柳田敏雄 Single molecule study for elucidating the mechanism involved in utilizing
fluctuations by biosystems EABS & BSJ 2006 (東アジア生物物理学会) 沖縄コンベン
ションセンター 11/12-11/16

小塚淳 1分子 FRET 法により見えるアクチンの動的多形性 1分子 FRET 法により見え
るアクチンの動的多形性 奈良先端科学技術大学院大学 11/21(火)

柳田敏雄 1分子ナノバイオロジー～ノイズを利用する生物機械～ NHK フロンティア
研究講演会東京(放送技術研究所) 11/29

柳田敏雄 1分子ナノテクノロジーと生命科学の融合 第36回日本免疫学会総会 大阪
国際会議場 12/13

柳田敏雄 1分子ナノバイオロジー～ノイズを利用する生物機械～ 第11回先端科学技
術シンポジウム 関西大学 千里キャンパス 1/18

江崎誠治 揺らぎが駆動する分子モーターと協同性 2006年度第2回バイオナノ研究会
城崎大会議館 1/23

柳田敏雄 1分子ナノサイエンス—ゆらぎと生命機能— 特定領域バイオ操作第4回公
開シンポジウム 大阪大学豊中キャンパス 図書館ホール 3/9

高城史子 フォールディングモデルの拡張による 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 JST CREST 生命現象計測分析領域 仙台市太白区ホテル 勘
3/13-14

柳田敏雄 1分子ナノテクノロジーと生命科学の融合 第112回日本解剖学会総会・全
国学術集会 大阪国際会議場 3/27

2007(平成19)

柳田敏雄 1分子イメージング 第27回日本医学会総会 リーガロイヤルホテル 4/6

柳田敏雄 第150回 日本学術会議総会 日本学術会議講堂 4/8-4/10

柳田敏雄 アクチンとミオシンの運動学 第7回 Cardiovascular Frontier Conference
六本木フォーラム タワーホール 4/14

柳田敏雄 Single Molecule Nanobiology for Elucidating the Mechanism Involved in
Utilizing Fluctuations by Biosystems The 16th International Symposium on the
Application of Ferroelectrics 2007 奈良県新公会堂 5/30

柳田敏雄 Myoshin-V Makes Two Brownian 90° Rotations Per 36 Nm-Step 第56回藤
原セミナー 北海道 グラントホテルニュー王子 8/23-8/27

柳田敏雄 Molecular Dynamics Studied by Single Molecule detection The 2nd
International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis 早稲田大学国際会議場
9/7

柳田敏雄 Fluctuation and Noise in Biosciences 19th International Conference on
Noise and Fluctuations 独立行政法人 国立青少年総合センター 9/10

柳田敏雄 生物から学ぶシステム バイオに学ぶ高次自己組織化ナノテクノロジーシン
ポジウム 品川プリンスホテル 9/12

柳田敏雄 Function of life and fluctuation Nishinomiya-Yukawa International &
Interdisciplinary Symposium 2007 コープイン京都 (10/15)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience-Role of the fluctuations in adaptive
biological molecular machines- Hamano-Kobe International Symposium on Laser and
Nano/Bio Sciences クラウンプラザ神戸 (10/19)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience:Learning nanotechnology from Biology
Kobe University Frontier Technology Forum- Nanotechnology and Biotechnology from
Next-Generation Photonics 神戸大学・瀧川記念会館(11/2)

柳田敏雄 ゆらぎと生命機能分子計算とゆらぎの講演会 情報通信研究機構 未来ICT
研究センター(11/7)

柳田敏雄 ナノバイオサイエンス:ノイズと生命機能 応用物理学会 有機分子・バイオエ
レクトロニクス分科会(M & BE) 大阪大学 銀杏会館 (11/12)

柳田敏雄 1分子ナノバイオロジー:ゆらぎと生命機能 21世紀COEプログラム「極限
量子系とその対称性」シンポジウム2007 東京大学理学部1号館小柴ホール (11/14)

柳田敏雄 Mechanism involved in Utilizing Fluctuations by Biosystems The Third
Yamada Symposium (YS3) From Chaos to Cosmos: Integration in Biological Systems 湘
南国際村センター (11/17)

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス:ゆらぎと生命機能 Optics & Photonics Japan
(日本光学会 年会) 大阪大学コンベンションセンター (11/26)

柳田敏雄 Single Molecule Nano-Bioscience: Role of the fluctuations on adaptive
biological molecular machines. 10th Workshop on FCS and Related Methods 北海道大
学 Conference Hall (11/27)

柳田敏雄 1分子ナノバイオサイエンス:ゆらぎと生命機能 第10回 Research レジデント
セミナー 武田薬品 千里阪急ホテル (12/5)

2008(平成 20)

柳田敏雄 生体ゆらぎに学ぶソフトナノマシン ナノ・バイオ系合同シンポジウム ベルサール九段(東京) (1/22)

柳田敏雄 高次生命機能システムのダイナミクス 平成19年度大阪大学物質・材料化学研究推進機構「総会・講演会 阪大・工学研究科 (1/23)

西川宗 ナノ歩行モーターの1分子計測 第4回電気学会バイオマイクロシステム研究会名古屋大学 (H20.2.12)

柳田敏雄 Nanobio-Technology UK-Japan seminar ‘Sharing Best Practice in Technology Transfer and University-Industry Collaboration’ 京都大学・百周年時計台記念館 (2/18)

柳田敏雄 Single molecule nanobiology for elucidating the mechanism involved in utilizing fluctuations by biosystems 第一回 HOPE ミーティング つくば国際会議場 (2/27)

柳田敏雄 分子情報生命科学シンポジウム 北海道大学 (2/29-3/1)

柳田敏雄 Stock and flow of functional molecules in synapse 生理研 (3/17-19)

柳田敏雄 第85生理学会大会 京王プラザホテル東京 (3/25)

② 口頭発表 (国内会議 12 件、国際会議 13 件)
海外での会議

2002 (平成14)

田中裕人 Single molecule nanometry of single-headed myosin-V by optical tweezers. 第47回米国生物物理学会. 米国・サンアントニオ (2003.2.28-3.7)

岩城光宏 Load-dependence of step size and kinetics of single myosin VI molecules, 第47回米国生物物理学会. 米国・サンアントニオ (2003.2.28-3.7)

石井由晴 Dynamic structures of cytochrome c revealed by single molecule imaging. 5th European Symposium of the Protein society. イタリア フィレンツェ (2003.3.29-4.2)

2005(平成17)

岡田拓也 A single-headed Myosin V moves along an actin filament with ~ 5.6 nm steps. Joint 61th Harden Conference/EMBO Workshop イギリス (2005.9/16-9/24)

岩根敦子 Cargo binding regulates the processivity of single-headed wild-type myosin-IV Joint 61th Harden Conference/EMBO Workshop イギリス (2005.9/16-9/24)

柳田敏雄 Single Myosin-V and -VI head step along the actin filament with ~ 5.5 nm steps US Biophysical society meeting 米国ソルトレイクシティ (2005.2/17-2/24)

2006(平成18)

岩城光宏 Biased diffusion model driven by a single-headed myosin Physics of Molecular Machines フランス (2006.5/22-5/27)

田中裕人 Thermodynamics of information processing in molecular motor system Physics of Molecular Machines フランス (2006.5/22-5/27)

岩城光宏 Single molecule nano measurement of actomyosin motor 5th World Congress of Biomechanics ドイツ (2006.8/3)

柳田敏雄 Single Molecule NanoBioscience Single Molecule Biophysics Winter Workshop 2007 アメリカ(アスペン) (2007.2/4-2/12)

柳田敏雄 Single Molecule NanoBioscience Single Molecule Biophysics Winter Workshop 2007 アメリカ(アスペン) (2007.2.4-2.12)

有賀隆行 The concerted nature between three catalytic subunit when driving the F1 rotary motor Single Molecule Biophysics Winter Workshop 2007 アメリカ(アスペン) (2006.2/4-2/12)

2007〔平成19〕

下川哲也 The cooperative effect on coupled ratchet-type molecular motor. BIOCAMP 2007 ナポリ(イタリア) (2007.9.23+9.30)

国内

2004(平成16)

江崎誠治 確率的に5.5nmステップをするミオシン頭部間の協同性が1ATP当たり60nm以上の滑走距離を生み出す 生体運動研究合同班会議 大阪・千里ライフサイエンスセンター (H17.1.7-9)

岩城光宏 単頭ミオシン6の連続的な運動の獲得と運動メカニズム 生体運動研究合同班会議 大阪・千里ライフサイエンスセンター (H17.1.7-9)

塚崎克和 高感度分子間力顕微鏡により検出された細胞間接着分子の新しい分子認識メカニズム 生体運動研究合同班会議 大阪・千里ライフサイエンスセンター (H17.1.7-9)

2005(平成17)

岡田拓也 単頭ミオシン5は、アクチンフィラメント上を ~ 5.5 nmのステップで連続的に運動する 生体運動班合同班会議 東京大学 (H18.1/26-27)

小塚淳 アクチン分子の動的多型 生体運動班合同班会議 東京大学 (H18.1/26-27)

2006(平成18)

小森智貴 ミオシン5のATP加水分解と変位の同時計測 2007年生体運動研究合同班会議 金沢市文化ホール (H19.1/9)

須河光弘 高濃蛍光ATPで1分子イメージング 2007年生体運動研究合同班会議 金沢市文化ホール (H19.1/9)

2007(平成19)

岩城光宏 高速スキャン実験によって明らかにされたミオシンのアクチンに対する張力依存的な結合 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

小森靖則 ミオシン V の36nm ステップに伴う2つの90° 回転 日本生物物理学会第45 回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

2008(平成20)

小森靖則 ミオシン V は2 度のブラウン回転運動により36nm ステップの歩行をする
2008 年生体運動研究合同班会議 (仙台)(H20.1.8)

岩城光宏 ミオシン VI の張力依存的な方向性制御機構 2008 年生体運動研究合同班会議 (仙台)(H20.1.8)

高城史子 ミオシンモータードメインの構造変化とヌクレオチド解離シミュレーション
2008 年生体運動研究合同班会議 (仙台)(H20.1.8)

① ポスター発表 (国内会議 69 件、国際会議 26 件)

海外での発表

2003(平成15)

小森靖則, Asymmetric binding of myosin V and VI to an actin filament. 第48回米国生物物理学会. 米国・ボルチモア (2004.2.14-18)

谷口雄一 Forward and backward movements of single kinesin molecules described by free energy landscape. 第48回米国生物物理学会. 米国・ボルチモア (2004.2.14-18)

2004(平成16)

石井由晴 Esaki, Ishii, Yanagida Stochastic movements of muscle myosin; from single head to filament 米国生物物理学会 米国・ロングビーチ (2004.2.11-18)

2005(平成17)

岩城光宏 Cargo binding makes a single-headed wild-type myosin-VI move processively
Gordon research conference USA ボストン (2005.7/3-7/8)

西川宗 Myosin II uses the great portion of energy for rotational movement Gordon research conference USA ボストン (2005.7/3-7/8)

石井由晴 Dynamic polymorphism of actin molecules in the actin filaments Gordon research conference SA ボストン (2005.7/3-7/8)

塚崎克和 Direct Observation of molecular recognition between cell adhesion molecules using flexible glass microneedle US Biophysical society meeting USA ソルトレイクシティー (2006.2/28-2/23)

有賀隆行 Development of a novel microscope for simultaneous observation of mechano-chemical coupling US Biophysical society meeting 米国ソルトレイクシティー (2006.2/28-2/23)

谷口雄一 It is entropy that biases the kinesin Brownian steps forward US Biophysical society meeting 米国ソルトレイクシティー (2006.2/28-2/23)

岩城光宏 Processivity of cargo bound single-headed wild-type myosin-V US Biophysical society meeting 米国ソルトレイクシティー (2006.2/28-2/23)

2006(平成18)

高城史子 Structural Change Myosin Motor Domain and Nucleotide Dissociation: Molecular Dynamics Simulation Physics of Molecular Machines: Joining theory and experiments, フランス 5/22-5/27

岩根敦子 Single molecular visualization of self-regulated kinesin motility Single Molecule Approaches To Biology アメリカ(ニューロンドン) (2006.6/20-6/25)

石井由晴 dynamic structure of proteins as regulation mechanism Gordon Research Conference アメリカ(ニューロンドン) (2006.6/20-6/25)

西川宗 Simultaneous observation of rotatory and stepping motions of single myosin II molecules The Biophysical Society 2006 Discussion Meeting アメリカ(カリフォルニア) (2006.10/18-22)

小塚淳 Dynamic polymorphism of actin as activation mechanism for cell motility 2007 WINTER CONFERENCE ON BIOPHYSICS アメリカ(アスペン) (2007.2/4-2/12)

須河光弘 Single molecule FRET imaging of enzymatic reactions at high concentrations of fluorescently labeled ligands Biophysical Society 51st Annual Meeting アメリカ(ボルチモア) (2007.3/2-8)

小森智貴 The construction of measurement system for simultaneous observation of myosin V Biophysical Society 51st Annual Meeting アメリカ(ボルチモア) (2007.3/2-8)

2007(平成19)

岩城光宏 Strain-Dependent Binding Rate Controls Directionality of Molecular Motor BIOCAMP 2007 ナポリ(イタリア) (2007.9.23-9.30)

有賀隆行 Measurement System for Mechano-Chemical Coupling: Combining Optical Tweezers and Fluorescent Microscopy. BIOCAMP 2007 ナポリ(イタリア) (2007.9.23-9.30)

小森智貴 Simultaneous Observation of ATPase and Displacement by Myosin V BIOCAMP 2007 ナポリ(イタリア) (2007.9.23-9.30)

2008(平成20)

小森智貴 Direct observation of chemo-mechanical coupling in single headed myosin V The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

西川正俊 Mechanochemical Coupling In Actomyosin Motility With Fluctuation Analysis The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

岩城光宏 Strain-dependent search and capture mechanism for directional motion of myosin-VI The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

岩根敦子 Relationship between Myosin Va ATPase activity and motility. The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

小森靖則 Myosin-V makes two 90° Brownian rotation per 36nm step The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

高城史子 Structural Change and Nucleotide Dissociation of Myosin Motor Domain: Simulation Study using Dual Go Model The Biophysical Society 52nd annual meeting & 16th International Biophysics Congress Long Beach, U.S.A. (2008.2.1-7)

国内

2003(平成15)

新井由之 rasの構造多型性の1分子イメージング. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

江崎誠治 分子モーターの運動活性における分子間協同性. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

谷口雄一 自由エネルギー地形により描かれるキネシン1分子の確率的な運動. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

小森靖則 1分子イメージングに見るアクトミオシン結合のポテンシャル. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

岡田拓也 ミオシン5⁶7nmサブステップを複数回繰り返し、大きな変位を発生する. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

渡邊朋信 ミオシン5の双頭構造は、運動の連続性を高める. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

岩城光宏 レバーアームモデルでは説明できないミオシン(ミオシン6)の運動特性. 第41回日本生物物理学会. 新潟 (H15.9.23-25)

2004(平成16)

田中裕人 アクトミオシン分子モーターの1分子イメージング 日本宇宙生物科学階講演. 愛知県・藤田保健衛生大学 (H16.9.30-10.2)

小塚淳 アクチンは動的多型をとる 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

市川壮彦 アネキシン5で流動性を減少させた人工脂質膜中の1分子観測 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

谷口雄一 ステリックエントロピー障壁がキネシンのステップ運動の方向性を決める 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

松岡里実 脂質組成異常細胞に見られる走化性情報伝達反応の逆転 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

宮永之寛 細胞性粘菌の走化性に関するG蛋白質の細胞内1分子イメージング 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

塚崎克和 高感度1分子相互作用計測による細胞間接着分子ダイナミクス 第27回日本分子生物学会年会 神戸・ポートアイランド (H16.12.8-9)

塚崎克和 高感度分子間力顕微鏡により検出された細胞間接着分子の新しい分子認識メカニズム 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

西川宗 1分子を見ながら力学計測する 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

須河光弘 1分子FRET計測の標準化 生物物理学会 京都・国際会議場(16.12.13-15)

柴田晶カール PC12D細胞における神経成長因子による活性化した受容体の運動パターンとクラスター形成生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

松岡里実 走化性におけるPTEN局在のポジティブフィードバック機構 生物物理学会 京都・国際会議場 H16.12.13-15

佐藤雅之 細胞性粘菌の送電性におけるcAMP刺激の効果 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

上村武 上皮成長因子受容体の二量体化による過剰反応性のカルシウム応答 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

寺村裕治 一分子蛍光観察による上皮成長因子(EGF)の結合挙動の動力学解析 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

江崎誠治 協同性をもたらすブラウン運動モーターの自律性 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

喜多村和郎 A preferential binding model for processive 5.5nm steps of myosin-II 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

岩城光宏 単頭ミオシン6のCargoの結合が運動の連続性を制御する 生物物理学会 京都・国際会議場 (H16.12.13-15)

高城史子 ミオシンモータードメインの構造緩和シミュレーション、2004年物理学会秋季大会(物性)、青森、(H16.9.1)

高城史子 ミオシンモータードメインの構造変化とヌクレオチド解離シミュレーション、東京、(H16.3.27)

2005(平成 17)

田中裕人 アクトミオシンの1分子計測 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター (H17.11.23+25)

市川壮彦ら リアノジン_リアノジン受容体チャネル結合の電気光学的1分子同時測定 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター (H17.11.23+25)

岩城光宏 高粘性下での小胞結合単頭ミオシンVIのバイアス拡散運動 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター (H17.11.23+25)

新井由之 Switch I 部位に蛍光色素を導入した変異体 Ras の構造の1分子 FRET 計測

日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

上村武 細胞膜上1分子観察による上皮成長因子と受容体の結合速度解析 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

小森靖則 レバーアームを使わないミオシンVのプロセッシブ運動 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

小塚淳 Dynamic polymorphism of actin molecules in the actin filament 日本生物物理学会年会札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

岡田拓也 単頭ミオシン(筋)は、アクティンフィラメント上を $\sim 5.6\text{nm}$ のステップで連続運動する 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

須河光弘 生体分子ダイナミクス検出に向けた1分子 FRET 計測の定量的計測 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

高城史子 ミオシンモータードメインの構造変化とヌクレオチド解離シュミレーション 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

田中裕人ら 分子モーターの情報論的考察 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

西川宗 ミオシン(筋)の変化と回転の同時計測 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ 11/23(水)-11/25(金)

西川宗 確率的に動くミオシンモーターの協同的なふるまい 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

江崎誠治 分子モーターの連携に由来する運動の効率化 日本生物物理学会年会 札幌コンベンションセンタ (H17.11.23+25)

2006(平成18)

塚崎克和 Multiple somain interactions between the single cell adhesion molecule nectin and cadherins, revealed by high sensitive force measurements EABS&BSJ(東アジア生物物理学会)沖縄コンベンションセンター(H18.11.12-15)

江崎誠治 Cooperativity causes plasticity in molecular motors EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

小塚淳 The mode of interaction between myosin V and actin filament EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

小森智貴 The construction of measurement system for simultaneous observation of myosin EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター(H18.11.12-15)

青木高明 Single channel properties of lysenin measured in the artificial lipid bilayer EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

森松賢順 The micro needle study of the relationship between myosin and a single actin filament EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

松岡里実 Disturbances in chemotactic signaling by an alteration in membrane lipids
EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

宮永之寛 Relevance of ternary complex model to intracellular dynamics of G
protein-coupled chemoattractant receptor in living Dictyostelium cells EABS&BSJ(東ア
ジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

須河光弘 Single molecule FRET imaging of enzymatic reactions at high concentrations
of fluorescently labeled ligands EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンシ
ョンセンター (H18.11.12-15)

西川正俊 Unit step-size in the movement of myosin filament EABS&BSJ(東アジア生
物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

谷口雄一 Loose coupling between chemical reaction and mechanical work in kinesin
EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

新井由之 Multiple conformational changes of Ras observed by single molecule FRET
EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター 11/12-15

岡田拓也 The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves
directional steps along actin subunits EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コ
ンベンションセンター (H18.11.12-15)

高木拓明 Spontaneous cell motion in the developmental process of Dictyostelium
discoideum EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター
(H18.11.12-15)

有賀隆行 Coiled coil domain of myosin V EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄
コンベンションセンター (H18.11.12-15)

高城史子 Intramolecular Correlation and Structural Change of Myosin Motor Domain",
EABS&BSJ(東アジア生物物理学会) 沖縄コンベンションセンター (H18.11.12-15)

三室孝子 5th East Asian Biophysics Symposium 日本分子生物学会 2006 フォーラ
ム(分子生物学の未来) 名古屋国際会議場(H18.12/6)

高城史子 Structural Change of Myosin Motor Domain and Nucleotide
Dissociation Discussions on "Theory and simulation of biomolecular systems 神戸舞子ビ
ラ (H18.12/12-16)

2007〔平成 19〕

小森智貴 Simultaneous Observation of ATPase and Displacement by Myosin
V 56th Fujihara Seminar The Molecular Motor Conference 2007 (H19.8.24)

須河光弘 Single molecule FRET imaging of enzymatic reactions at high concentrations
of fluorescently labeled ligands 56th Fujihara Seminar The Molecular Motor Conference
2007 (H19.8.24)

森松賢順 The micro needle study of the relationship between myosin and a single actin
filament 56th Fujihara Seminar The Molecular Motor Conference 2007 (H19.8.24)

高城史子 dual-Go model を用いたタンパク質多量体形成シミュレーション 日本物理
学会 第 62 回年会 北海道大学 (札幌市) (H19.9.21-24),

西川正俊 アクトミオシン滑り運動のゆらぎ解析によるエネルギー変換機構について 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

小塚淳 Dynamic cooperative binding of myosin V on actin filament 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

三室孝子 ミオシンVa ATPase 変異体の運動活性への影響 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

岩根敦子 Relationship between actin-activated ATPase activity and motility of Myosin Va. 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

西川 宗 ミオシン5の高速1分子イメージング 日本生物物理学会第45回年会 (横浜) (H19.12.21-23)

西川 宗 ナノ歩行モーターの1分子計測第4回 電気学会バイオマイクロシステム研究会(2.12)

(4)特許出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

(5)受賞等

①受賞

②新聞報道

(1) 「たんぱく質動く仕組み解明」日本経済新聞・2005年10月10日付・朝刊19面

(2) 「レーザー技術で発見・ノイズ利用し”歩く”」読売新聞・2005年10月26日付・

朝刊28面

(3) 「Molecular motors: rocking and rolling.」Nature Chemical Biology 1, 319-320 (2005).

(3)は解説記事

(4) 「脳細胞内の運び屋千鳥足移動」日経新聞・2007年9月24日付け

③その他

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 18 年 9 月 19 日～21 日	生体ゆらぎ研究会	大阪大学	40 名	チームミーティング

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

ゆらぎを利用する概念は新しいプロジェクト、科学技術振興調整費 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成「生体ゆらぎに学ぶ知的人工物と情報システム」に取り入れられている。このプロジェクトでは「ゆらぎの利用」の視点から生体システムの機能発現の仕組みを徹底的に追及すると共に、その知見を取り入れた新しいナノ材料物質科学、情報システム科学、ロボット工学を基盤とした新たな融合領域を創出することによって、生体特有の柔軟な機能を実現した新しい知的人工物および情報システムの創製を目指し、企業とも組んで広範囲な展開が期待されている。

(2)実用化に向けた展開

分子モーターの動作原理に学んだ、ゆらぎを利用したメカニズムを取り入れたエンジニアリングは、新しいマニピュレータ、ロボットの開発の新しい方向性を示すものであり、産学協同で開発が進められている。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

特にコラボレーション下という形には発展していないが、他チームとの技術の共有化やディスカッション、研究室訪問は、研究代表者、研究員さまざまなレベルで日常的に行われ、研究の発展に大きく寄与している。

(2)領域横断的活動とその効果

本プロジェクトの技術開発の基礎は、さまざまな異なった分野の技術を取り入れることである。その意味で、ナノテクノさまざまな分野が集結した会では、多くの刺激を受け、要素技術やナノ分野の現状を学ぶことができた。逆に我々が生物計測で悩んでいることを多分野の人に伝えることは、彼らへの刺激にもなっているようであった。領域を越えて異なった分野の人が集える機会は、これから基礎にせよ、応用にせよ研究・開発を展開してゆく上で非常に重要であるということを、実感を持って学ぶことができた。

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

一分子イメージングに代表される一分子計測技術は、さまざまな分野への応用が期待される。これまでの計測では得られないような成果が期待され、新たな可能性を含んでいる。今や生物の分野では、さまざまな応用が期待され、多くの研究者がこの技術を使い、他の技術と組み合わせながら新しい展開を求めている。今後さらに展開が期待される。

ゆらちを利用したメカニズムの理解が生物機能の理解には必須であることが、明らかにな

りつつある。この原理のエンジニアリングへの応用は、新しいエンジニアリングの可能性として今後発展が期待される。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

社会から生物らしさ、人間らしさへの要求が強くなっているとき、生命のユニークな特徴である「ゆらぎ」を取り入れた柔らかい機械は、この要求に答えるものである。さまざまなミオシンで示唆された「ゆらぎ」、ブラウン運動がどのように利用されているか、その道筋をさらに明らかにすることが必要とされている。

11 結び

一分子計測技術を、ゆらぎを精確に計測できるレベルまで開発することができ、分子モーターでゆらぎを利用して働くメカニズムが明らかになってきた。また、細胞やヒトの脳でも同じような原理が働いていることがだんだんわかってきた。これをさまざまな人工機械に応用する時が来ていると感じている。それがまた分子モーターや分子機械の研究にもフィードバックされる。絶え間ない計測技術の開発、分子レベルでのメカニズムの解明こそが、技術革新を支えるものであり、今後基礎と応用の両輪をうまく噛み合わせながら研究を進めてゆくことが重要である。

若い研究者が自分のアイデアをぶつけて、試してみる機会がもっともってあってもいいのではないか。自分達の研究環境作り、システム作り、プロジェクトの運営にもっと積極的に参加できたらよい。



使用した顕微鏡はすべてそれぞれの目的に合うように設計され、組み立てられた。左が走査プローブ顕微鏡、右が一分子イメージング顕微鏡である。



研究室のメンバー