

「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柔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、動作原理の解明を目指す。当グループでは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特性の計測を行ってきた。その結果、ランダムなブラウン運動を一方向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。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、多様なメカニズムがわかってきている。一方、異なった分子種の間にも共通のゆらぎを基礎にした運動機構が見つかり、今後その生理的な役割の解明が待たれる。また分子構造のゆらぎについても計測が可能となり、ゆらぎを制御することにより機能が調節される機構が明らかにされた。分子構造のゆらぎについては、情報伝達蛋白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されてきた。

2. 研究実施内容

熱ゆらぎによって駆動する分子モーターを始め分子機械の特性を計測し、その動作機構を明らかにする。そのために、機能している分子の挙動を動的に実時間で捕らえる計測系を開発し計測する。1 分子レベルで分子モーターの動きや蛋白質の構造の変化をゆらぎまで正確に計測できる系を構築した。このような実験系は 1 分子蛍光イメージングや 1 分子操作法を基礎にしている。このようなゆらぎを計測する系では、数回のイベントだけでは系を記述することが出来ないため、繰り返し計測をおこない統計的に解析をおこなった。その結果、ランダムな熱ゆらぎを特定の方向へバイアスする機構の手がかりが得られた。

①熱揺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 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、負荷を背負って運動しているときは逆方向のステップが増えるなど前後のステップが存在する。前後の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解析から、前後のステップのエントロピー差のために、キネシンのブラウン運動は決まった方向へバイアスされ、一方向性の運動が実現することが分かった。(nature chemical biology掲載)

(ii) 拡散を利用してレールからはずれずに長距離運動を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では生体中で単頭で機能していることが示された。単頭でどのように長距離進むことが出来るのか、分子モーターのメカニズムを解明する手がかりになると思われる。1分子イメージングや1分子ナノ計測の結果、ミオシンVIでは負荷を背負うことによって、長距離運動することが示された。つまり負荷となるビーズや細胞内での小胞体の拡散が分子モーターに比べてゆっくりしているため、レールからはずれる前にステップ運動をすることが出来ると考えられる。さらに予想されるように溶液の粘性が上がることにより、その傾向はさらに増強される。(Biophys. J. 印刷中)

(iii) バイアスブラウン運動によるステップ運動

筋肉ミオシン (ミオシンII) ではATP 1分子が加水分解する間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、走査プローブ顕微鏡を使って1分子のミオシン分子を操作してはじめて示された。この方法を使って、他のミオシン分子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って構成されていることが示された。ミオシンV36ナノメートルと大きなステップでステップ運動することが示され、レバーアームを回転させてステップ運動をするというレバーアーム説により説明がされている。単頭のミオシンVを1分子操作しプローブ顕微鏡を使って計測を行った。レバーアーム説ではレバーの長さによってステップの大きさが変わるが、この実験からはレバーアームの長さを変えても、同じようにステップ運動することが示された。またミオシンVIでも同様のステップ運動が見られた。(論文投稿中)

②蛋白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を担っている。アクチンフィラメント上のアクチン1分子の構造

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、構造変化を実時間で観察できた。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。(nature chemical biology)

(ii) 情報スイッチ蛋白質Rasの構造ゆらぎ

細胞内スイッチ蛋白質であるRasはさまざまな構造をとることによって情報伝達の信号のスイッチ役をしているのでは、と考えられている。そこで1分子FRET法によりその構造ゆらぎを計測した。その結果アクチンと同様構造は多型性を示し、その間を遷移していることが示された。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。(Biophys. Biochem. Res. Commu.印刷中)

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システムで協同性が発現する可能性を探った。(論文掲載)

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

「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

「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. 主な研究成果の発表

(1) 論文（原著論文）発表

- T. Uyemura, H. Takagi, T. Yanagida and 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 and 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)
- K. Kitamura, M. Tokunaga, S. Esaki, A.H. Iwane and T. Yanagida, Mechanism of muscle contraction based on stochastic properties of single actomyosin motors observed in vitro. *Biophysics* 1, 1-19 (2005)
- Y. Taniguchi, M. Nishiyama, Y. Ishii, and 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, and 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 and Y. Sako, Formation of signal transduction complexes during immobile phase of NGFR movements, *BBRC* 342: 316-22 (2006)
- Y. Arai, A.H. Iwane, T. Wazawa, H. Yokota, Y. Ishii, T. Kataoka and T. Yanagida, Dynamic polymorphism of Ras observed by single molecule FRET is the basis for molecular recognition, *BBRC* in press
- M. Nishikawa, S. Nishikawa, A. Inoue, A.H. Iwane, Yanagida, T. and M. Ikebe, A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX, *BBRC* in press