

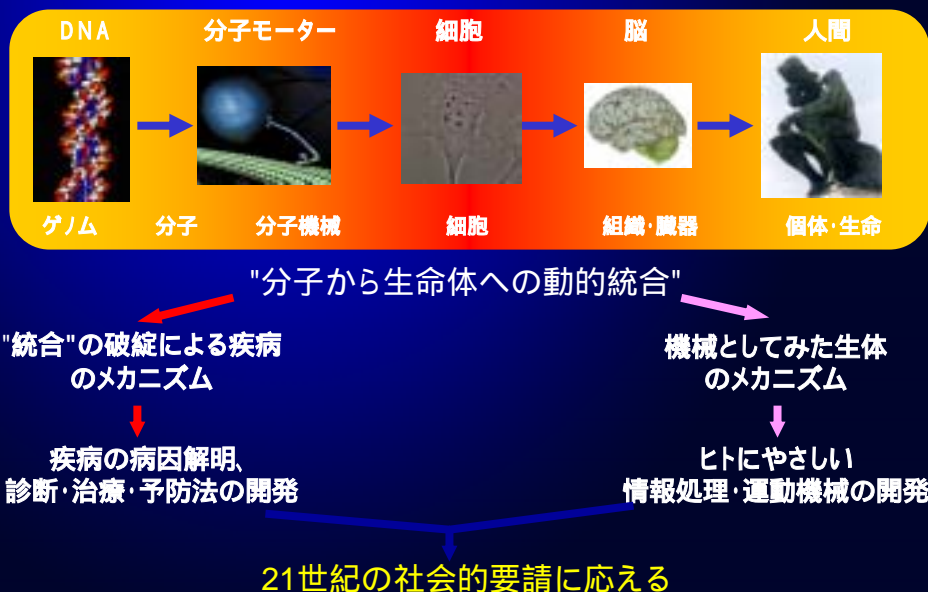
# しなやかな生体分子機械のしくみを 1分子ナノ計測で読む

柳田敏雄

大阪大学

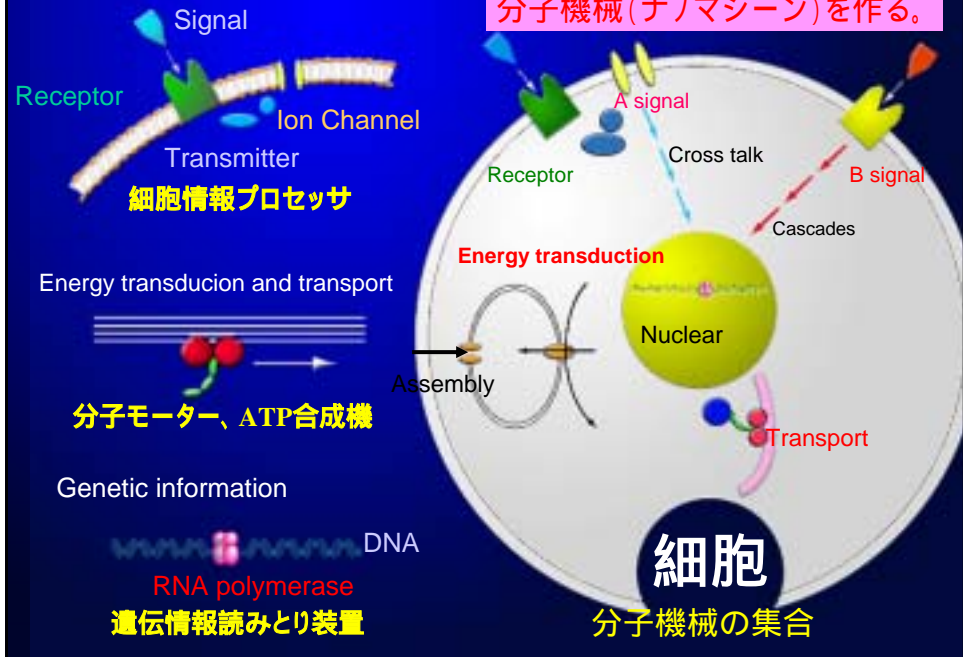
(生命機能研究科、医学研究科)

## 生体の成り立ち

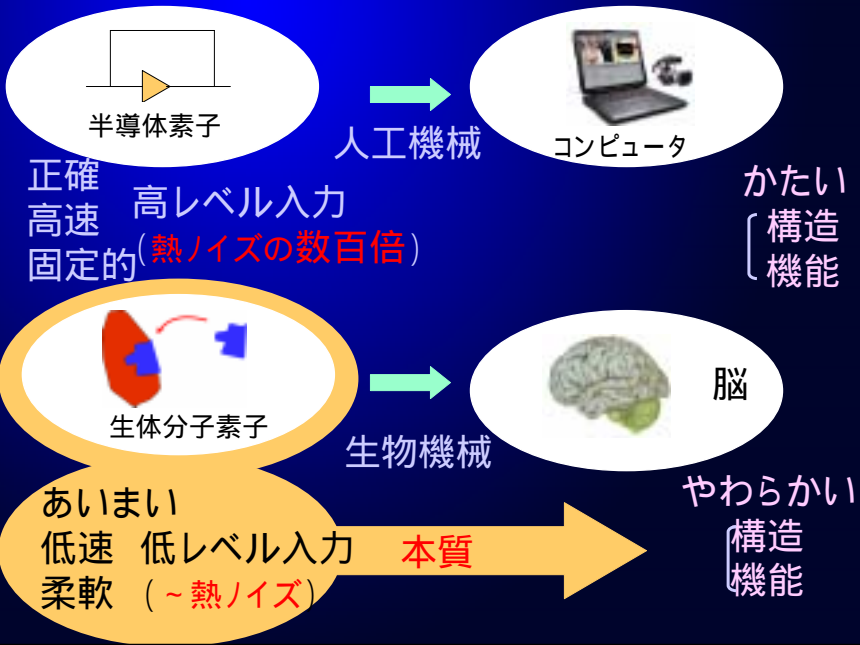


生体分子は集合していろいろな役割を果たす

分子機械(ナノマシーン)を作る。



### 生物機械と人工機械のちがい



# 人工機械と生物機械の素子の比較

	人工	生物	(比)
動作時間	ナノ秒 ( $10^{-9}$ )	ミリ秒 ( $10^{-3}$ )	$1/10^6$
正確さ (S/N)	$10^{80}$	$10^4$	$1/10^{76}$

正確  
高速

あいまい



生物らしさの  
秘密に迫る！

コンピュータ

## Approach

ナノテクノロジーと1分子計測技術

1分子イメージング

1分子捕捉



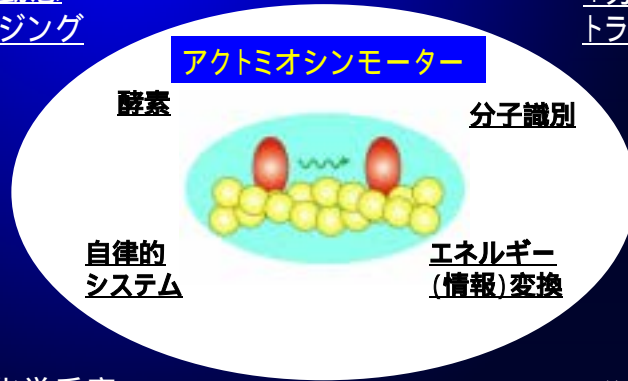
化学反応の  
1分子イメージング

1分子ナノ操作

# 1分子ナノ計測を使って分子機械を研究する

1分子動態  
イメージング

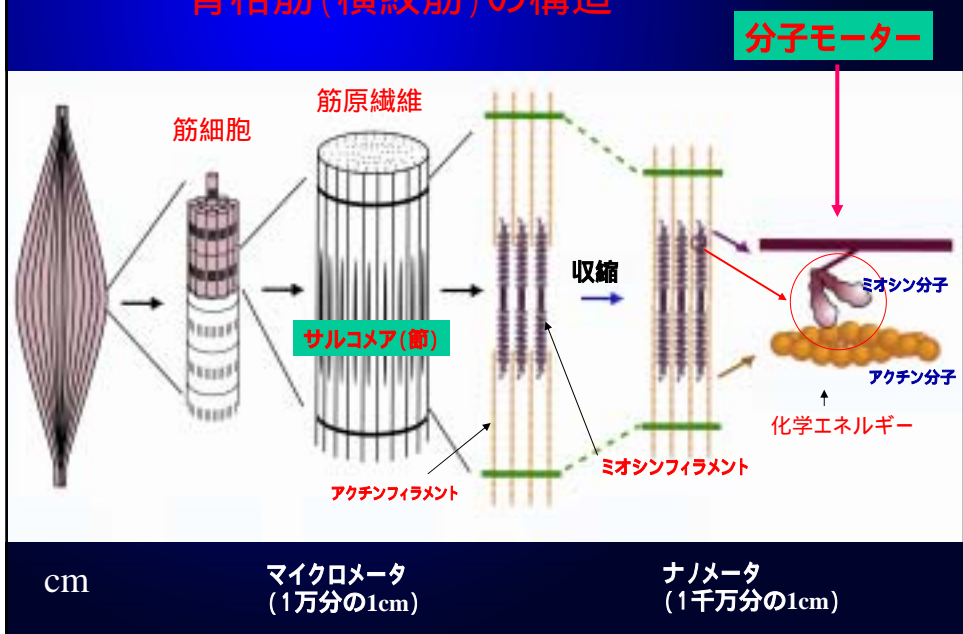
1分子  
トラッピング



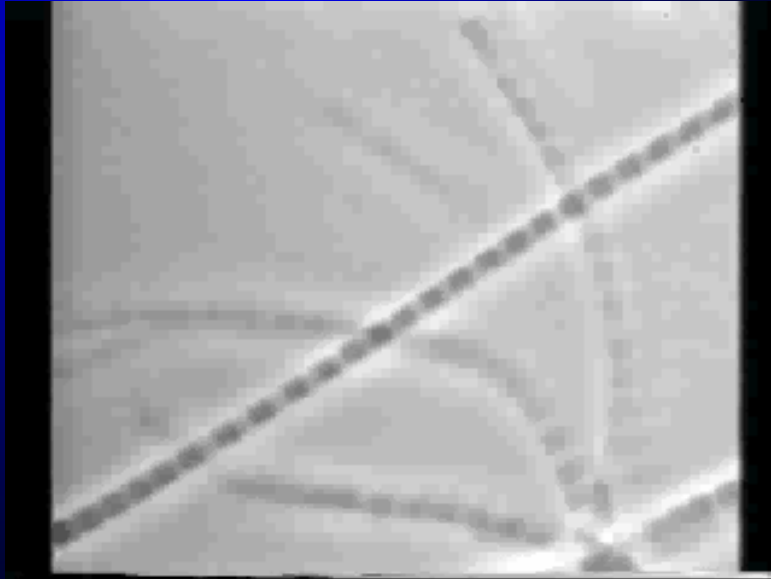
1分子化学反応  
イメージング

1分子  
ナノ操作

## 骨格筋(横紋筋)の構造

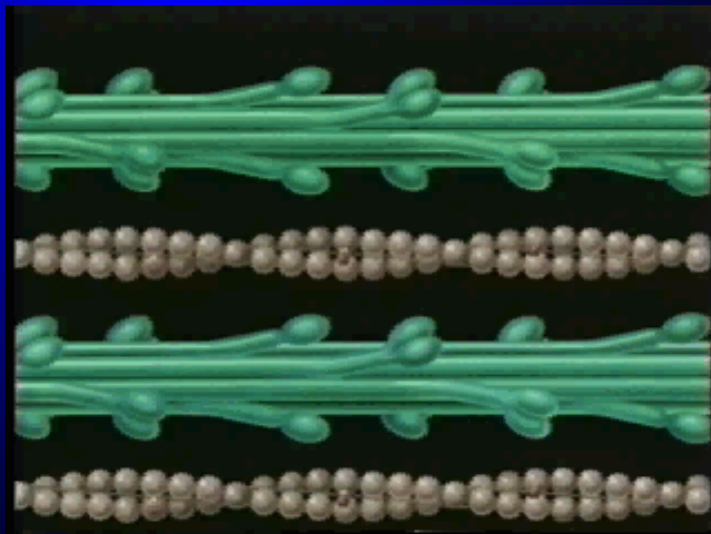


# 横紋筋収縮



From Prof. Ishiwata

# 滑り説(定説)



7nm

1千万分の  
7cm

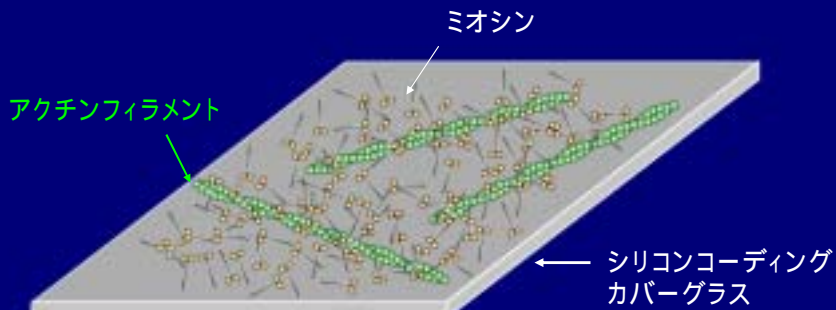
From H.E.Huxley and A.F. Huxley

## 蛍光標識した単一アクチンフィラメントの蛍光像

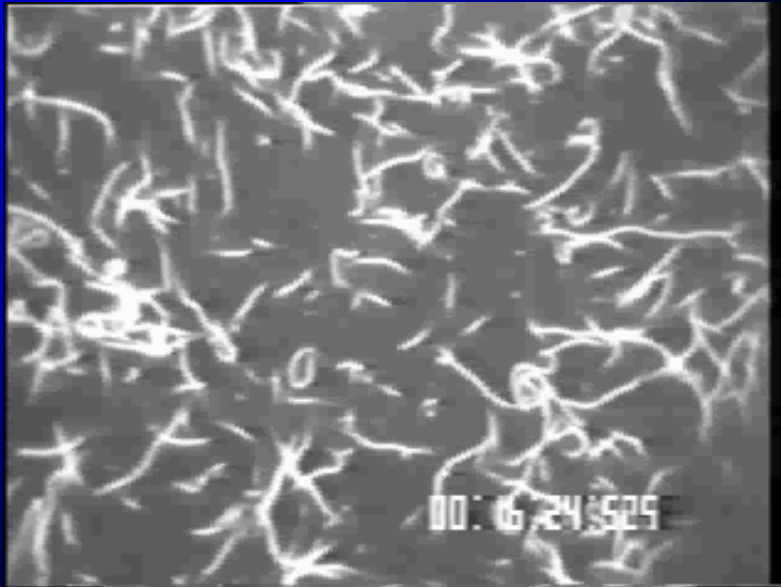


Yanagida, et. al. Nature 307 (1984), 316 (1985)

## 顕微鏡下でアクチンフィラメントの運動を見る 分子レベルで筋収縮を直接見る！



## アクチンフィラメントの滑り運動



Harada, et al. Nature 326 (1987), Kishino et al. Nature 334, (1988)

生体分子が働いている現場を如何に捉えるか？

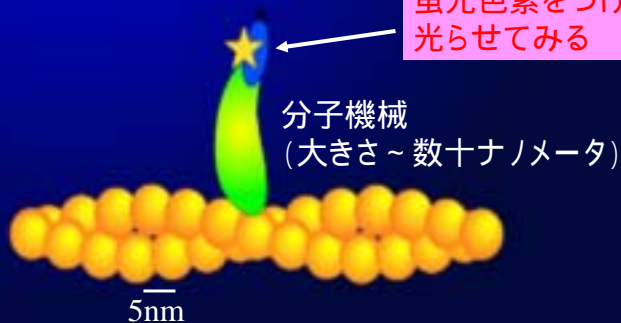
・分子1個を見て触れて調べる → 1分子ナノ技術

### 1) 分子1個を見る

“Seeing is Believing”

水の中の分子は直接  
見えない

蛍光色素をつけて  
光らせてみる

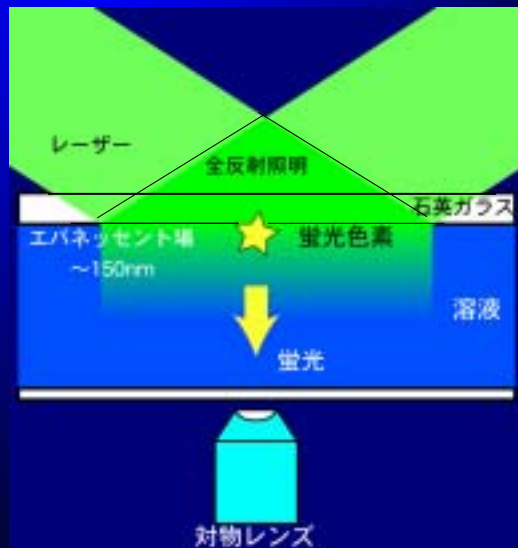


夜空に光る星は遠くにあっても見える



## 蛍光色素の1分子イメージング

エバネッセント光はナノ領域に集光 → 蛍光色素だけを照らす



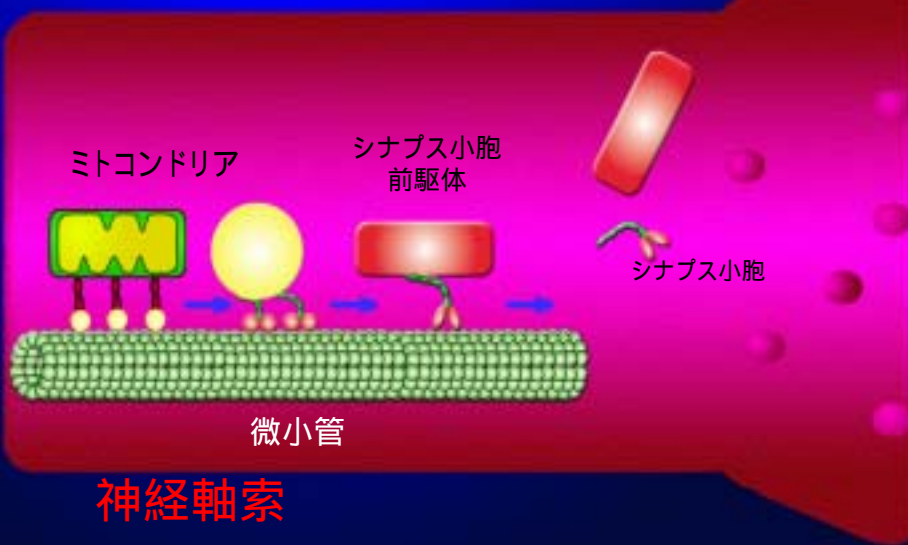


# Cy3-ミオシン分子の1分子イメージング



Funatsu, Harada, Saito et al., Nature 374(1995)

## キネシンモーター



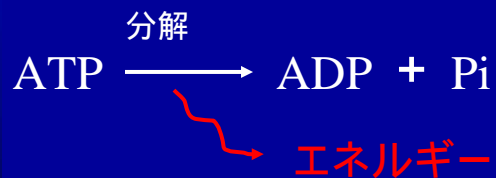
数nmの  
キネシン  
モーター



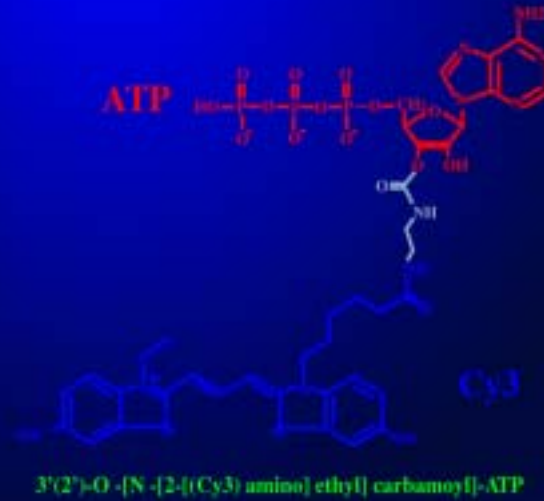
1nm(ナノメートル)  
= 1千万分の1cm

Vale, Funatsu, Harada, *et al. Nature* 380 (1996)

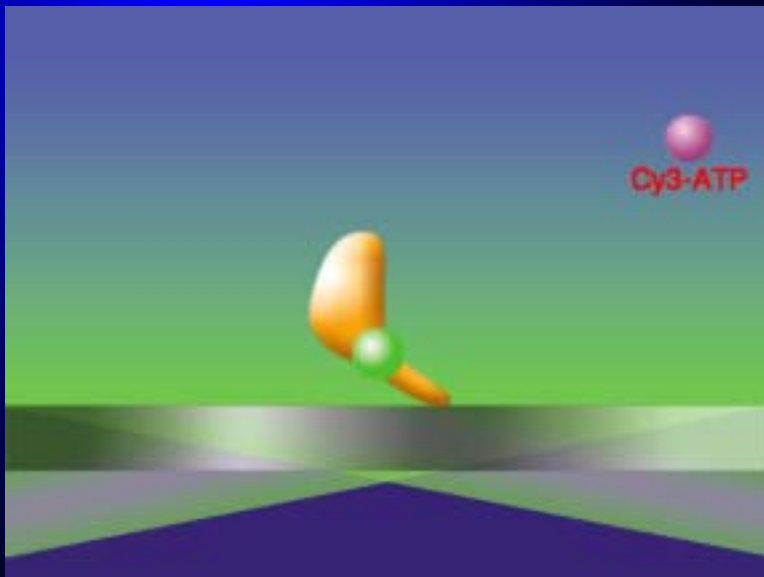
分子機械はATP(アデノシン3リン酸)が分解するときの  
化学エネルギーで駆動される



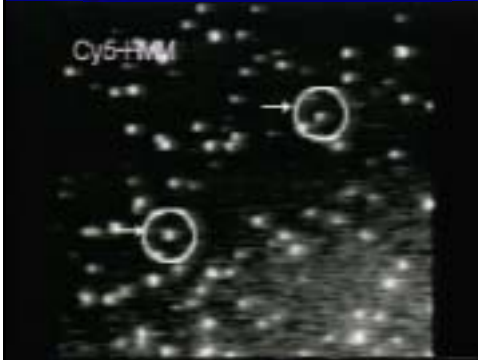
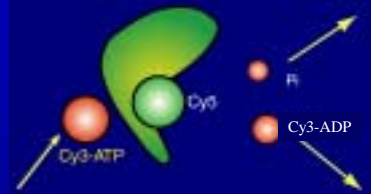
# 3'(2')-O-Cy3-ATP



## ATP分解反応サイクルの1分子イメージング



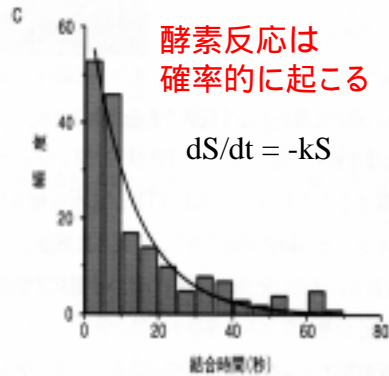
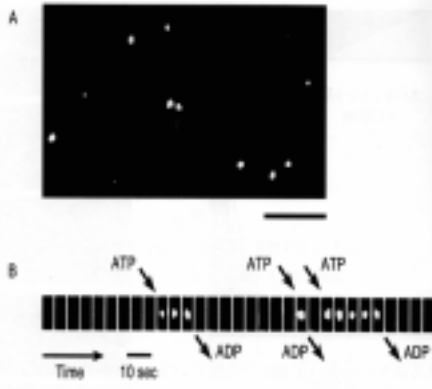
# ATP hydrolysis cycles



Movie

Funatsu T., Harada, Y. Tokunaga, M. et al. *Nature* 374, '95

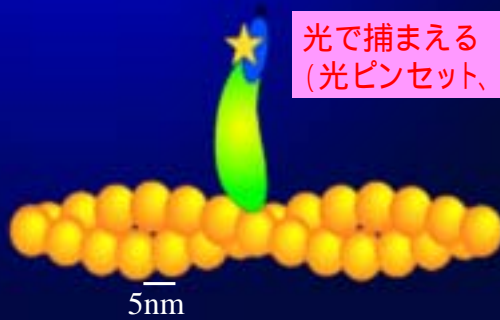
## 酵素 (ATPase) 反応の1分子イメージング



# 1分子ナノ技術

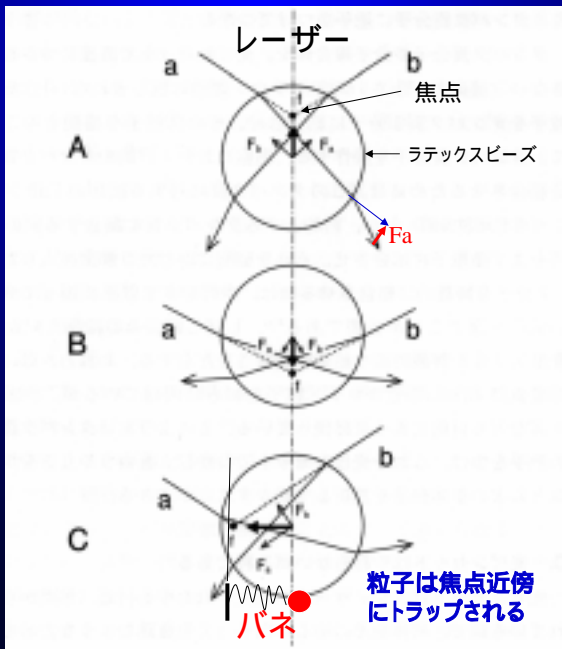
1) 分子1個を見る

2) 分子1個を捕まえてナノ操作する



光で捕まえる  
(光ピンセット、プローブ)

## 光ピンセットの原理



誘電体が光強度勾配に沿って焦点に引き寄せられる力を利用して微粒子を補足する。

From Askin

# 光ピンセットによるアクチンフィラメントの操作



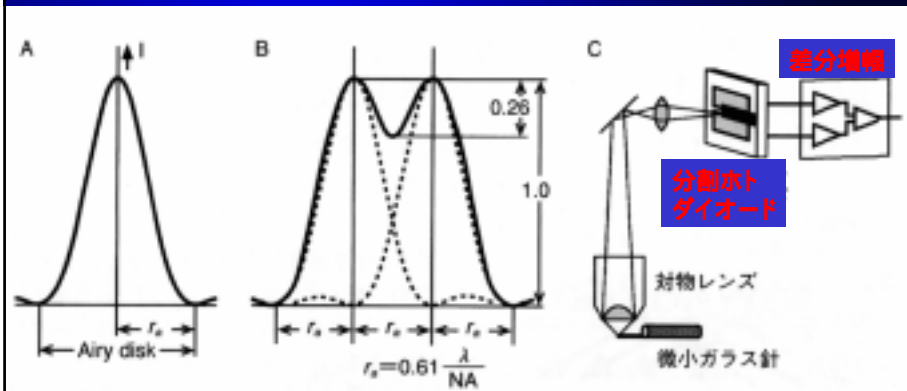
アクチンフィラメント



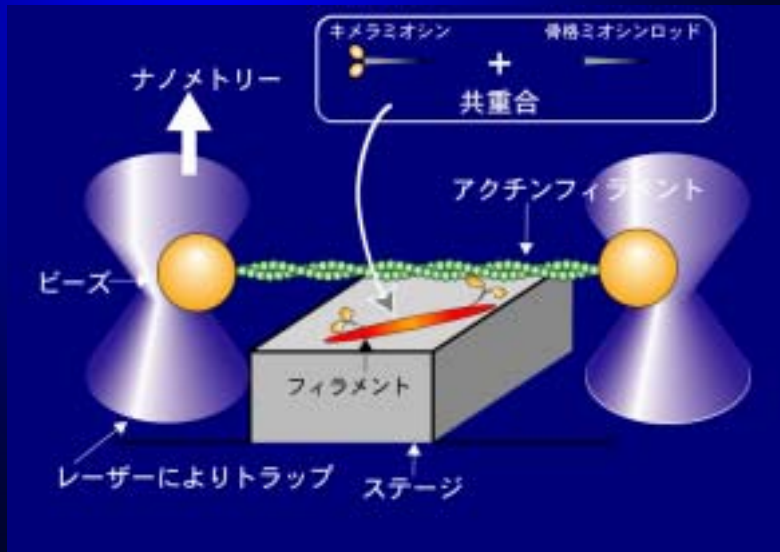
DNA

## ナノ計測

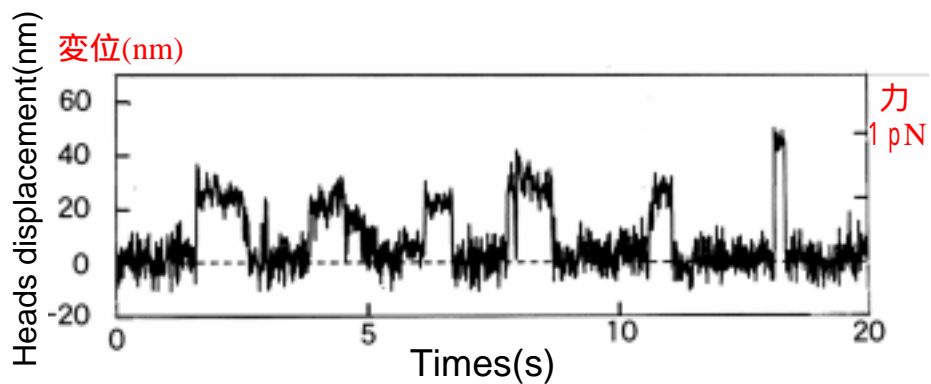
光学分解能 =  $0.61 / (\lambda / NA) \sim 200\text{nm}$  しか、  
変位は  $< 1\text{nm}$  の分解能で決めることができる！



# 光ピンセットとナノ計測を用いたミオシンモーターの1分子計測

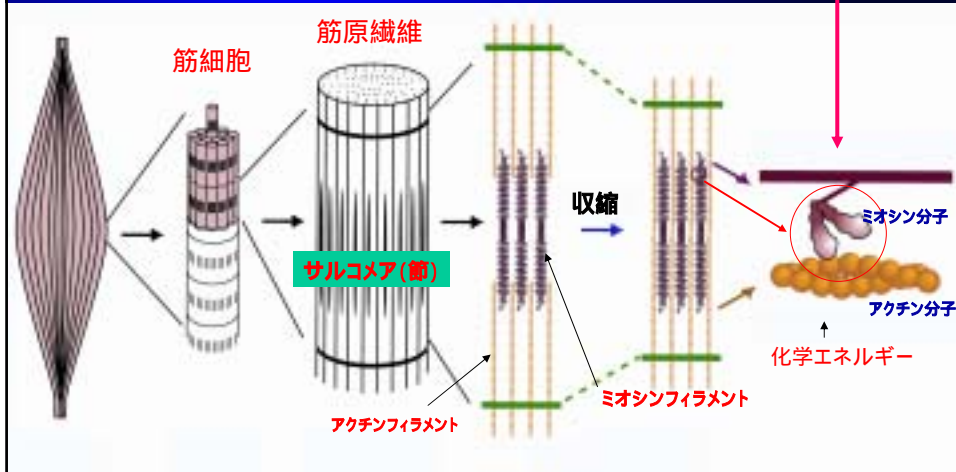


## ミオシン1分子が発生する力と変位



# 分子モーター1個の動き、化学反応を計って調べる

## 分子モーター

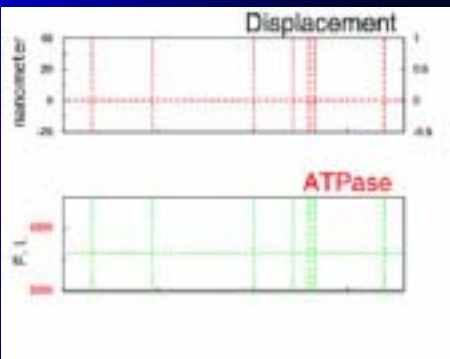
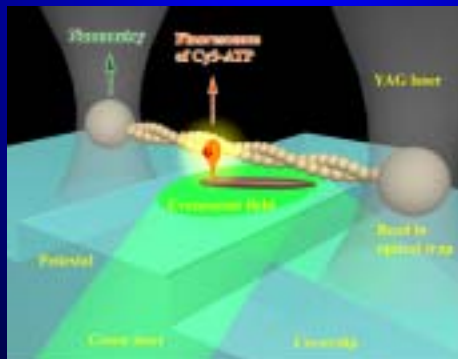


cm

マイクロメータ  
(1万分の1cm)

ナノメータ  
(1千万分の1cm)

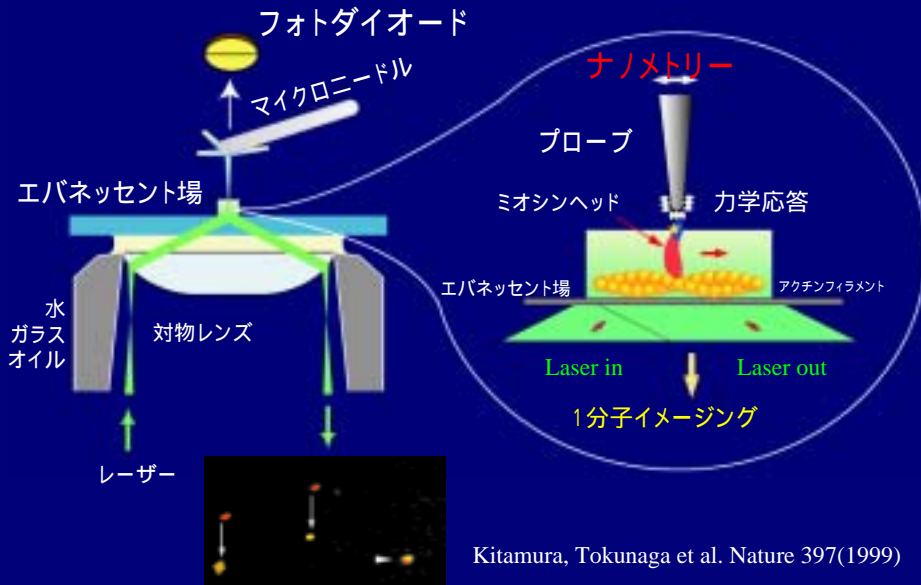
# ATP分解サイクルと力学反応の1分子同時測定



変位:ATPaseサイクル=1:1



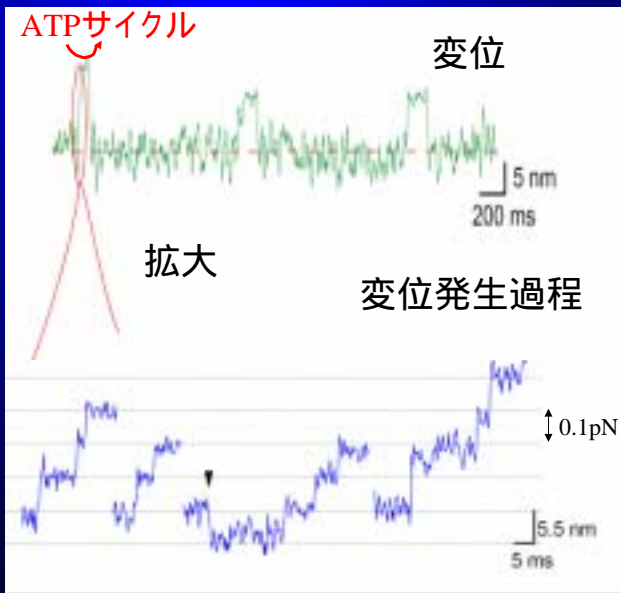
# ミオシンモーターの運動計測



Kitamura, Tokunaga et al. Nature 397(1999)

ミオシンの1分子イメージング

## 変位発生の過程



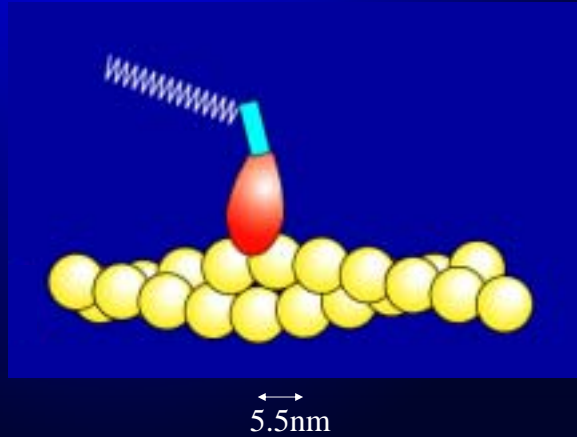
0.1 pN = 千万分の1g (重)

5.5 nm = 千万分の5.5 cm

5ms=千分の5秒

# 結果

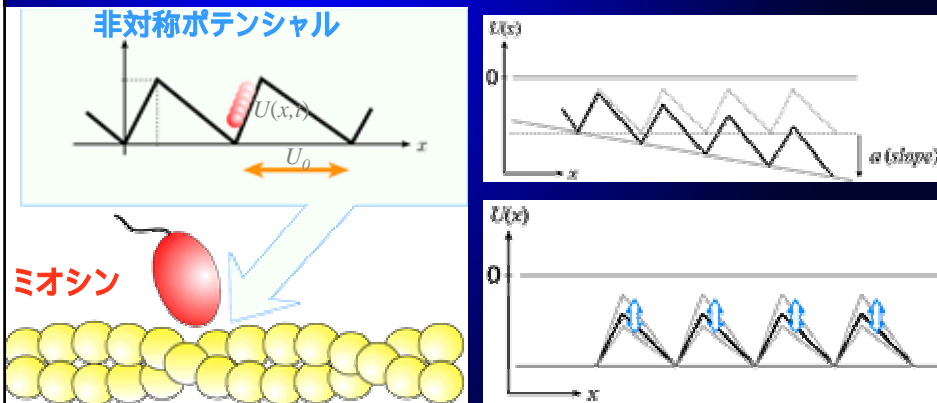
ミオシンはブラウン運動(熱ノイズ)で動いている



## モデル

摂動ポテンシャルによってブラウン運動にバイアスをつける

摂動ポテンシャル



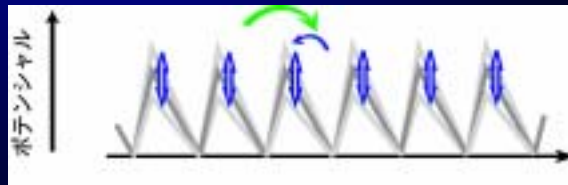
アクチンフィラメント

非対称ポテンシャル  
(アクチンとミオシンのインターフェイス)  
を反転すれば運動方向が反転する

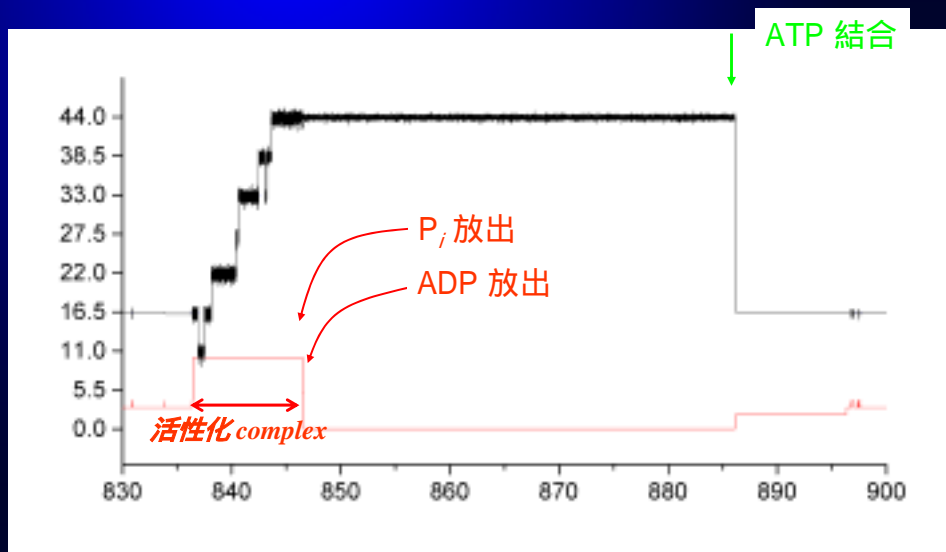
ブラウン運動から一方向の運動を取り出すには  
エネルギーが必要

↓ その方法は？

(例1) 異方性のポテンシャルを全くランダムでない様に揺らす。



## ミオシン分子の動き (シミュレーション)



## 結論

### ユニークな分子モーターの動作原理:

熱ノイズから逃げるのではなく、それをうまく利用している。

比較:人工機械は熱ノイズから逃げるために莫大なエネルギーを使っている

- 1) 運動の起源はブラウン運動
- 2) ATPのエネルギーは、ランダムなブラウン運動から方向性のある運動をとりだす(選択:情報の獲得)に使っている。

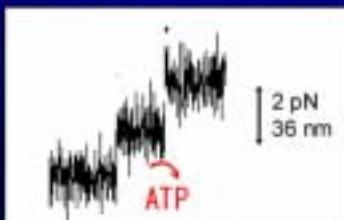
## エネルギー効率

(MyosinV)



$$E = 2 \text{ pN} \times 36 \text{ nm} \\ = 72 \times 10^{-21} \text{ J}$$

$$G_{\text{ATP}} = -80 \times 10^{-21} \text{ J/mol}$$



$$\text{Efficiency} > 60\%$$

熱ノイズ程度の化学エネルギーを最大 > 60% の効率で変換

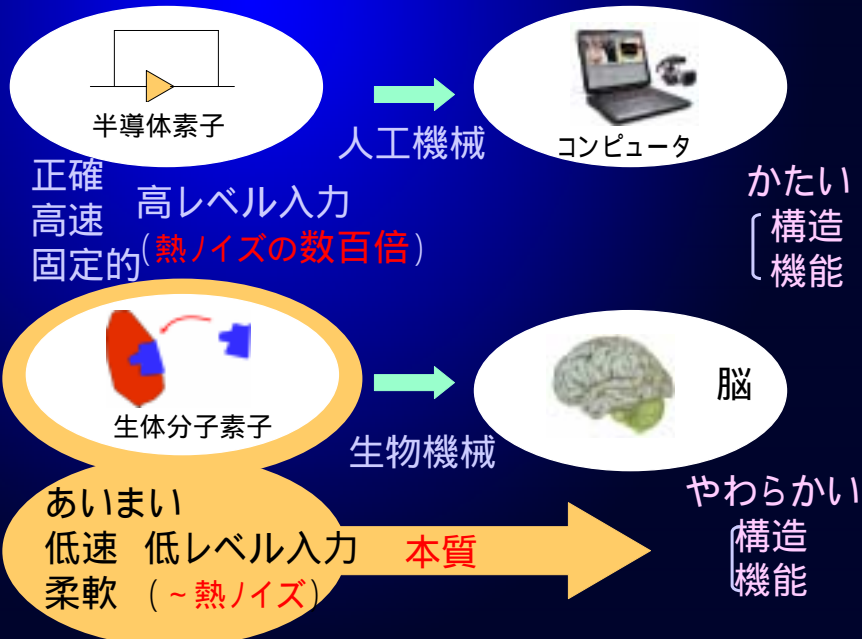
## 結論

### ユニークな分子モーターの動作原理:

熱ノイズから逃げるのではなく、  
それをうまく利用している。

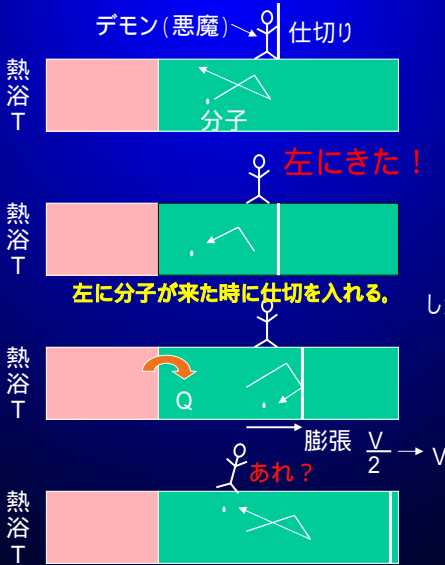
- 1) 運動の起源はブラウン運動
- 2) ATPのエネルギーは、ランダムなブラウン運動から方向性のある運動をとりだす(選択:情報の獲得)に使っている。
- 3) 熱ノイズ程度のエネルギーで効率よく働く。

## 生物機械の“やわらかさ”の本質に迫る



# 情報とエントロピー Szilardのピストンデモン

コンピュータは1ビットの情報を獲得するのに  
いくらのエネルギーが必要か？



→ で粒子は熱浴からQのエネルギーをもらって膨張する。

$$Q = \int_{V/2}^V p dv$$

$$= k_{BT} \int_{V/2}^V \frac{dv}{v}$$

$$= k_{BT} \ln 2 \text{ である。}$$

しかし、 と は全く同じ状態である。

Qは何に使われた？

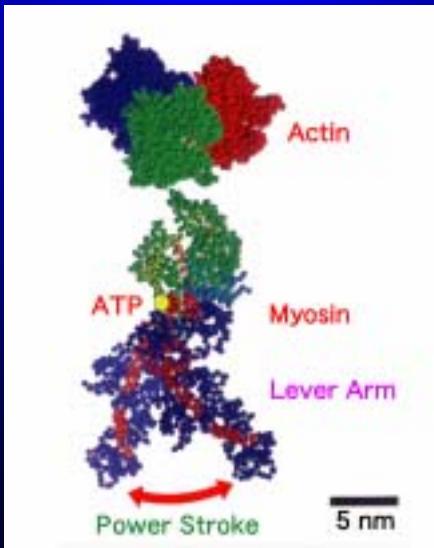
デモンは で分子が左にあるという情報を得ている。右と左の状態を判断している  
ので、デモンは1ビットの情報を得ている。!!

**$Q = k_B T \ln 2 = 0.6 k_B T / \text{ビット}$**   
(コンピュータ ~ 2億  $k_B T / \text{ビット}$ )

← 物の事の数

シャノンの情報量のDef.  $I = -\text{ClnP} = -k_{BT} \ln P = -S$  (エントロピー)

我々の結果は、“タンパク質の働きは化学反応と1:1に結合した構造変化でひきおこされる”という  
広く受け入れられているコンセプトに挑戦してる。



西洋的:  
デジタル  
機械論的

東洋的:  
アナログ  
あいまい  
(ファジィ)



# Swimming against the tide

Toshio Yanagida rejects the conventional biophysical explanation of muscle contraction. No one doubts his technical genius, but could the debate he started ultimately hold back the field? David Cyranoski investigates.

Iconoclast, rebel, technical wizard — these are just some of the descriptions that have been applied to Toshio Yanagida, host of last week's *Perspectives in Molecular Medicine* symposium in Igou.

Myosin II molecules, myosin II has two heads joined by 'neck' regions to a coiled 'tail'. In muscle cells, the tails of myosin II molecules align together to form 'thick filaments' with the heads and heads further out from the

tail head involves the hydrolysis of one ATP molecule. Because of this straightforward relationship between energy input and mechanical action, the lever-arm theory is

## その他の1分子実験

DNA

ATP合成モーター

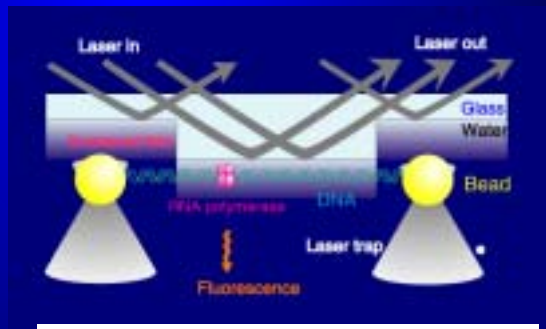
イオンチャネル

# 遺伝情報読みとり装置

光ピンセットによるDNAの1分子操作



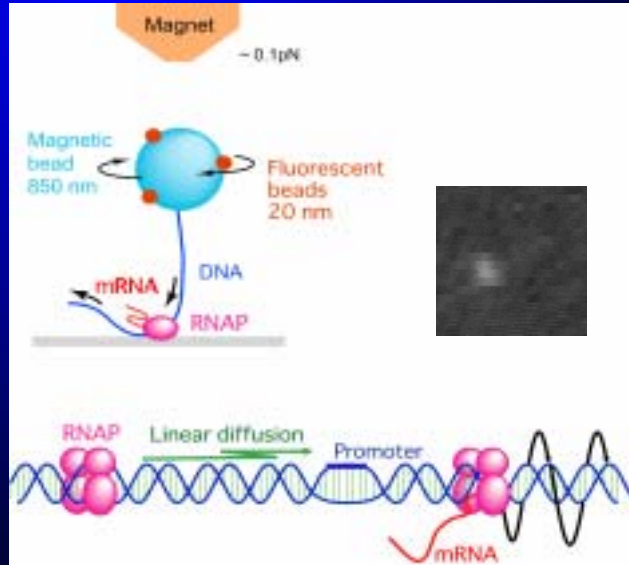
# 転写過程の1分子イメージング



Harada, Funatsu, et al.  
Biophys. J. (1999)

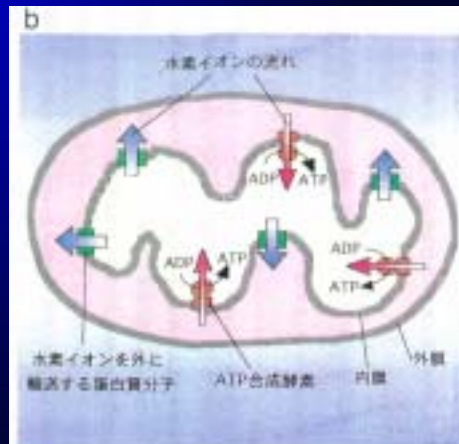


# 遺伝情報発現過程の1分子イメージングと計測 (DNA1分子のシーケンス)

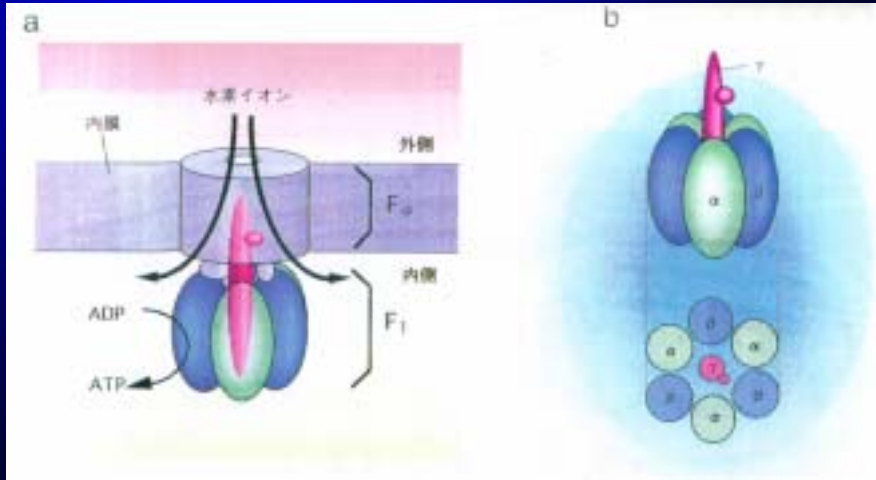


Harada, Kinoshita, et al. Nature (2001)

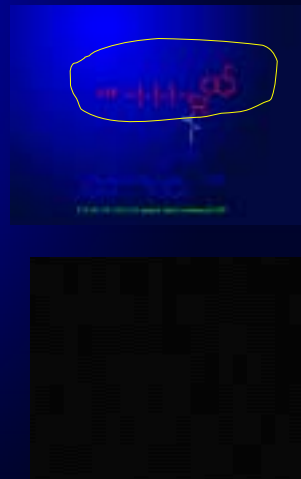
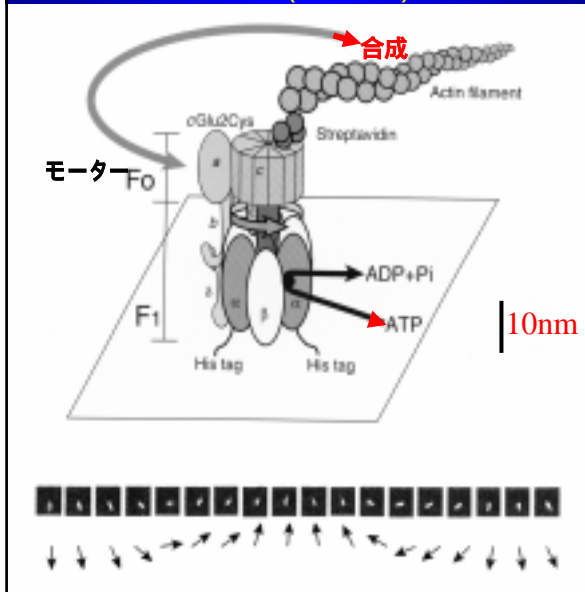
# ATP合成モーター 細胞とミトコンドリア



# ATP合成酵素の構造

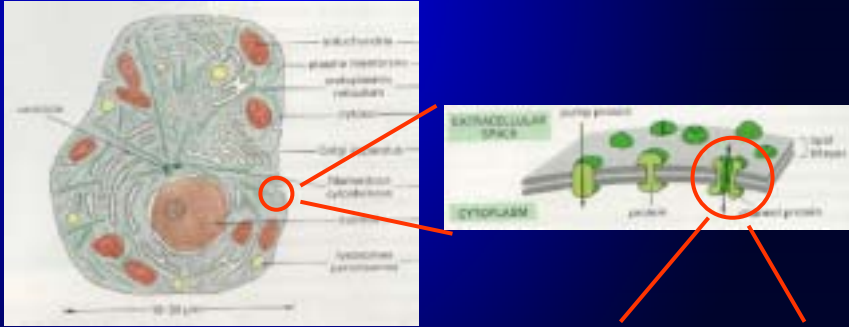


## ATP合成 (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) 酵素は回転モーター

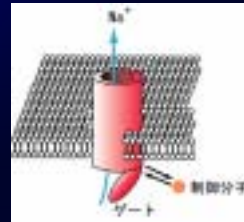


Noji et al. Nature 386 '97

# イオンチャンネルとは



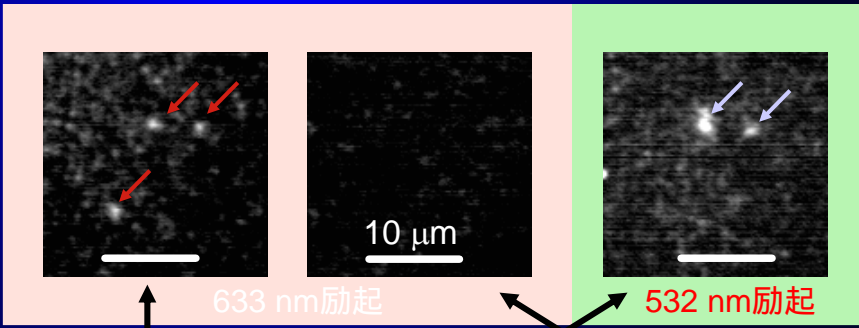
生体膜を貫通する大きさ ~ nmの細孔  
 細胞の電気信号を制御することにより、  
 あらゆる細胞活動に関与  
 → 多くの疾病の原因: 創薬の40%のターゲット



# イオンチャンネルとリガンドの結合

Ryanodine receptor (チャンネル)

Ryanodine (リガンド)

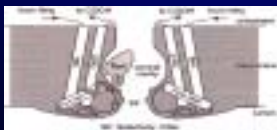


Cy5/anti-RYR/RYR

Bodipy FL-X

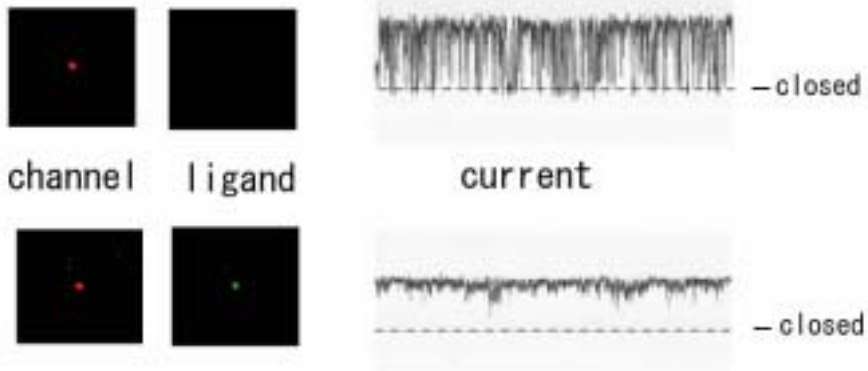
Ide, Takeuchi

## A putative model of ryanodine-RYR interaction

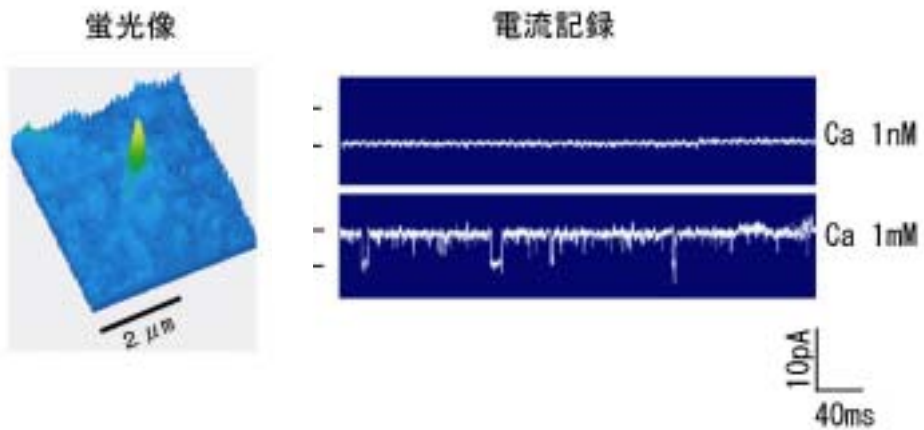


At nanomolar concentration, ryanodine, a plant alkaloid, locks the channel into a long-lived open subconductance state. RYR is predicted to have one high affinity ryanodine binding sites.

## チャンネル・リガンド・電流の同時測定

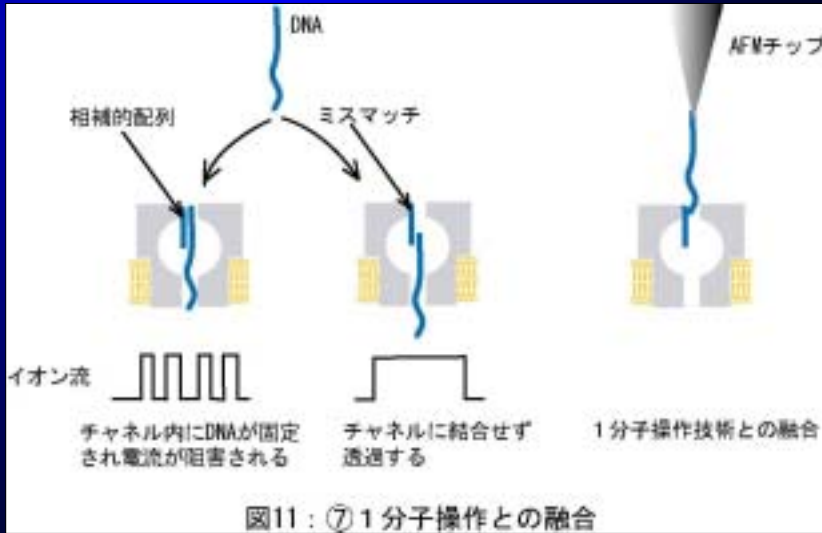


## 1分子からの信号測定例(同時計測)

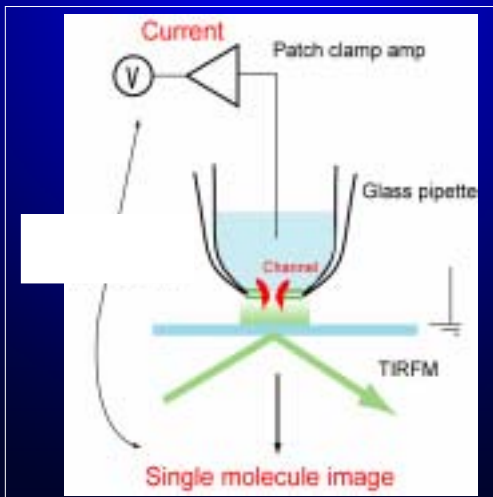


K-チャンネルの同時計測

# 1分子イメージングをナノ操作との融合



# Single-molecule imaging in tip-dip lipid bilayer



Searching new method for single-molecule imaging

- more convenient
- more popular

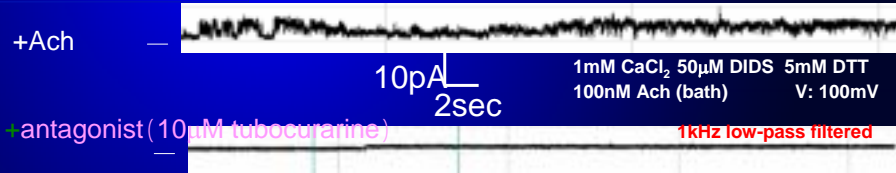
Application of patch electrode

↓  
Diminishing the bilayer area

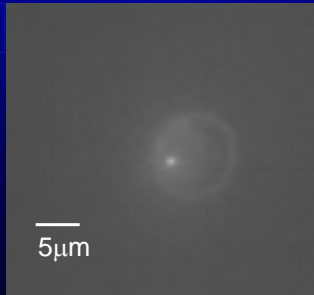
↓  
Observation of all bilayer membrane  
Decrease of capacitive noise

# Imaging and electrical records of nAChR using tip-dip method

## Electrical records



## Imaging



Single molecule of nAChR might be observed

nAChR was labeled with cy5-maleimide (labeled cystein residue was not specified)  
Molar dye/protein ratio was 0.3  
Em: 633 nm  
Epi fluorescence observation

生体素子は

**熱ゆらぎ**を積極的に利用する

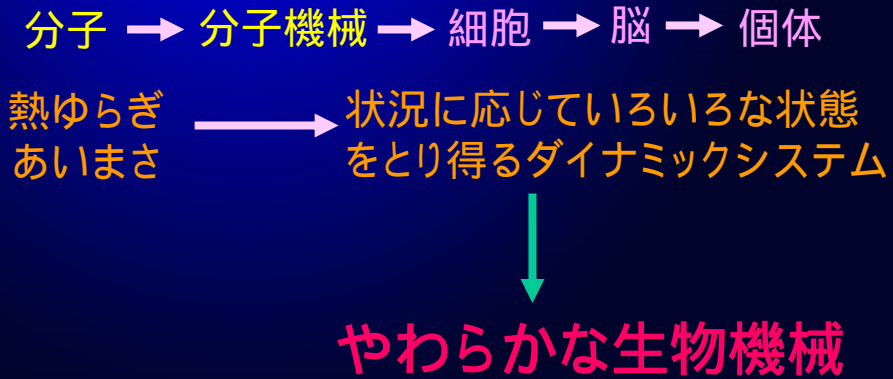


- 1) 熱ノイズ程度の低いエネルギーで効率よく働く
- 2) 動作は確率的(ゆらぎ)であいまい

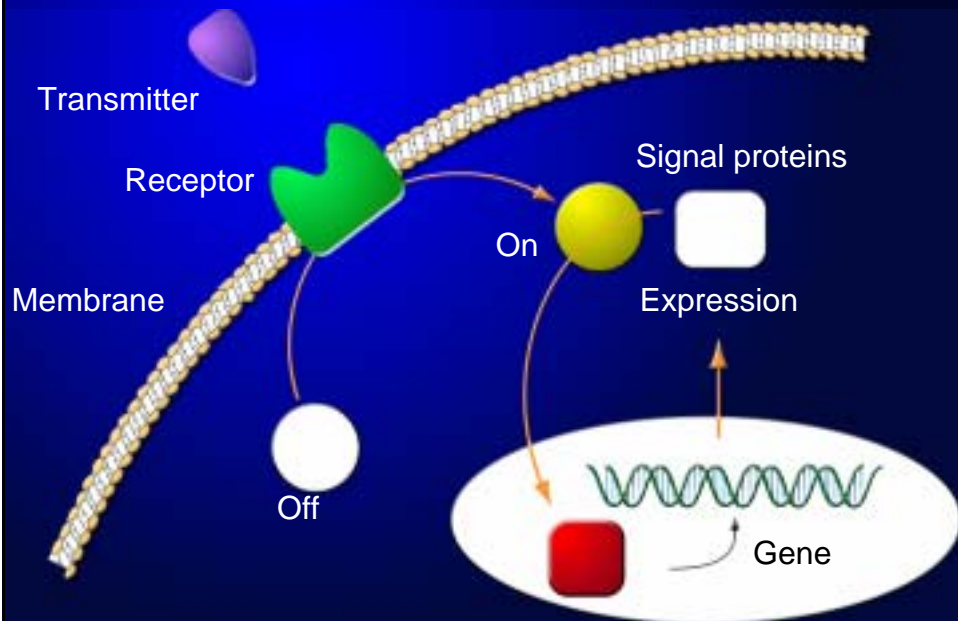
機能的  
やわらかさ?

# システム化

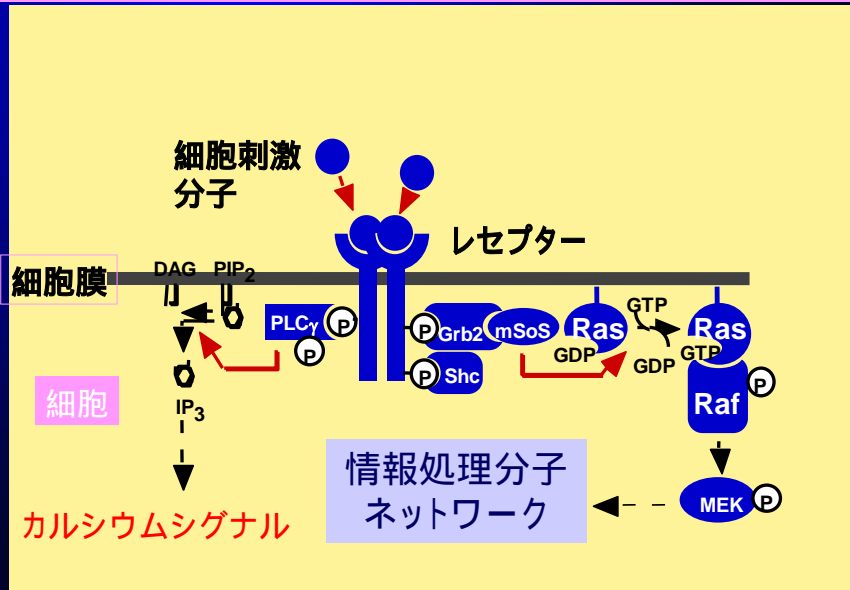
非線形結合非平衡



## 分子からシステムへ (細胞情報伝達・処理)

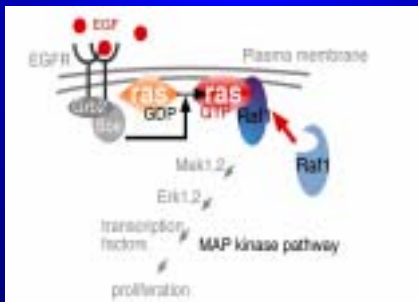


# 細胞内情報伝達・処理 1分子イメージング

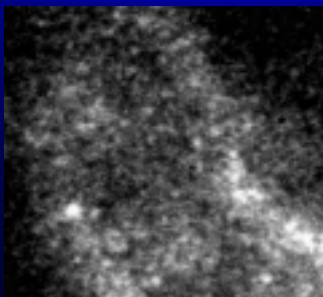


## EGF → Ras → Raf1へのシグナル伝達の1分子イメージング

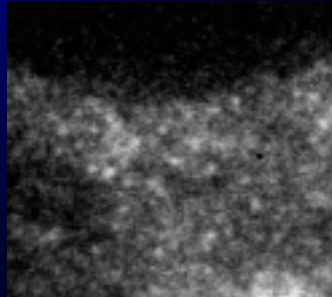
EGFのレセプターへの結合



Ras



Raf

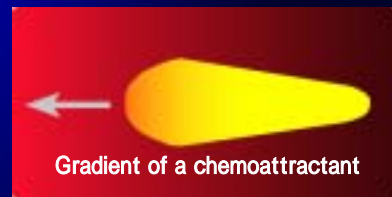
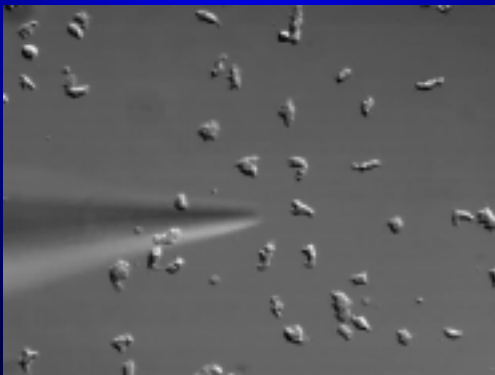




# アメーバー走化性応答の 1分子解析

細胞の情報処理でも熱ゆらぎを  
うまく利用している？

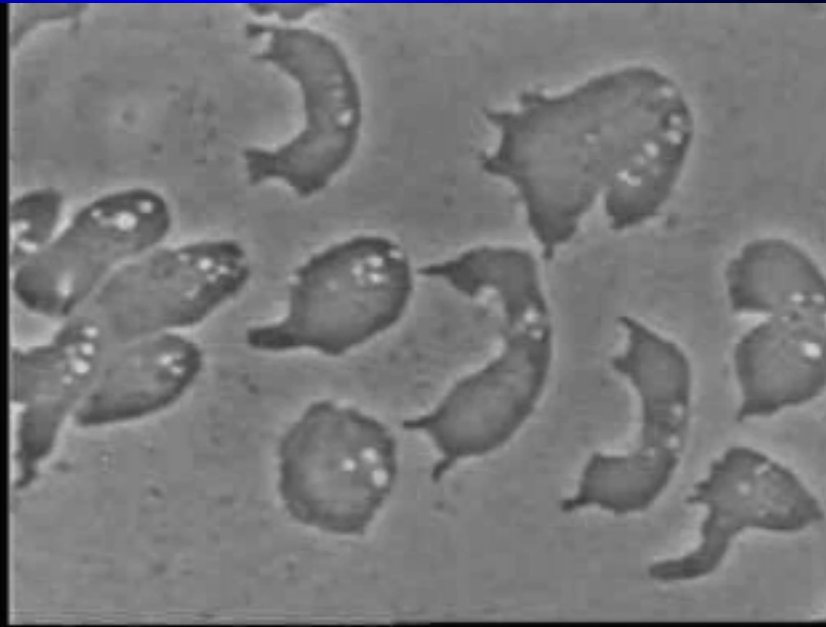
アメーバーは走化性誘因物質の小さな濃度勾配  
のシグナルを感知出来る



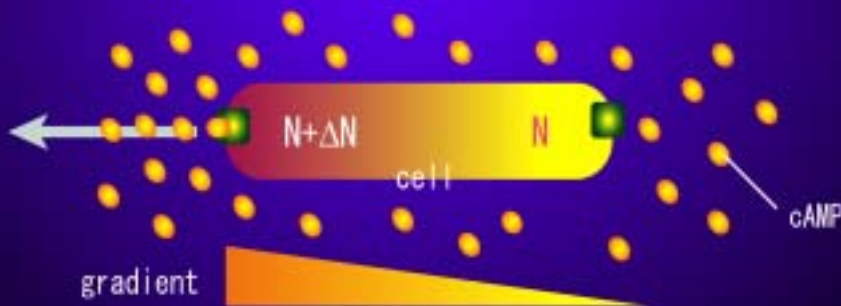
最低刺激濃度 (nM程度)

細胞両端での結合勾配の差

ゆらぎ  $\frac{\Delta N/N}{\langle \delta N^2 \rangle}$  2%  
5%



アメーバーは、ノイズの数分の1しかない小さなシグナルを感知出来る巧妙な情報処理機構を持っている？

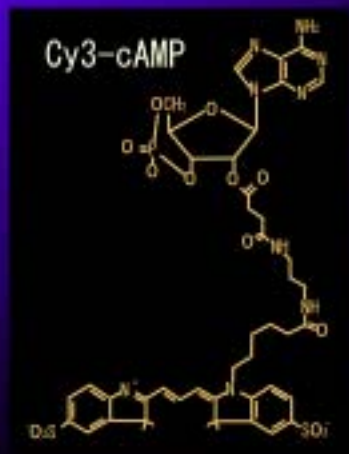
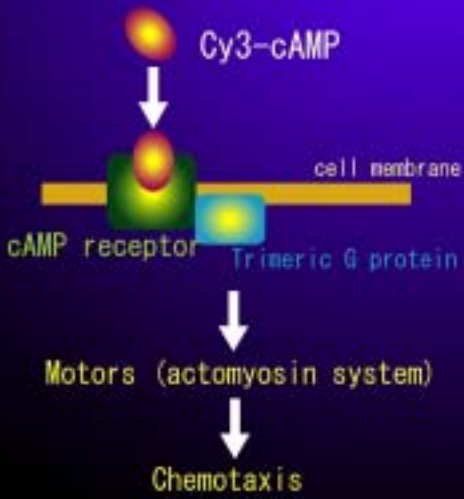


at threshold stimulation (ナノモル、勾配2%)

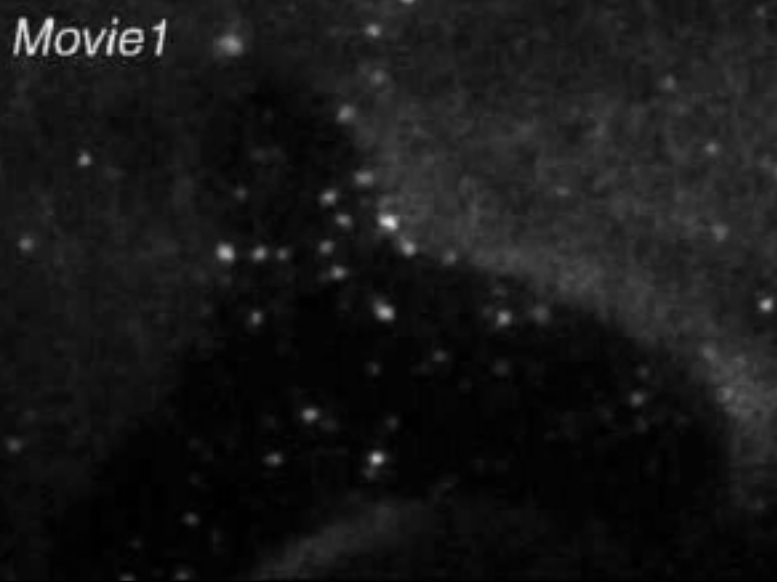
$$\Delta N/N = 0.02 \quad (\text{Signal}) \quad \text{結合数前後差}$$

$$\sqrt{\langle \delta N^2 \rangle} / N = 0.05 \quad (\text{Noise}) \quad \text{結合数のゆらぎ}$$

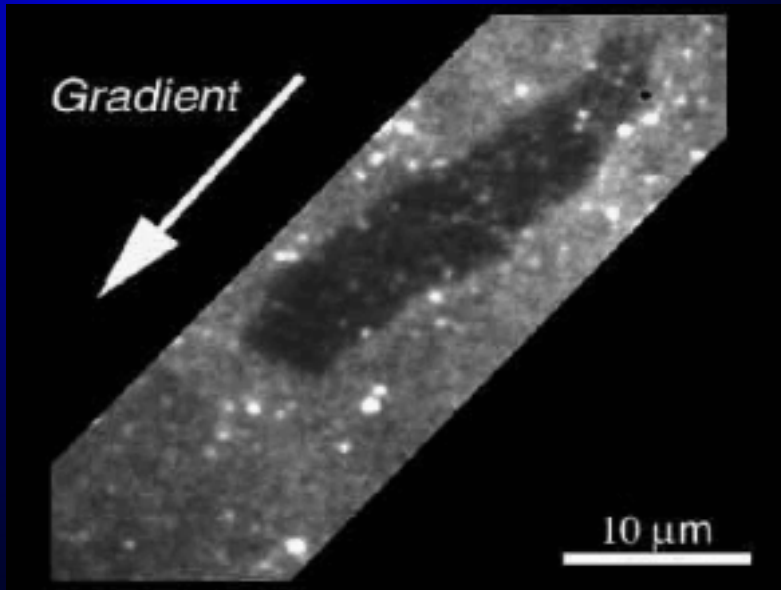
# 走化性誘因物質蛍光アナログ(Cy3-cAMP) の1分子イメージング



# 蛍光走化性誘因物質 (Cy3-cAMP)の 細胞膜上の1分子イメージング (静止時)

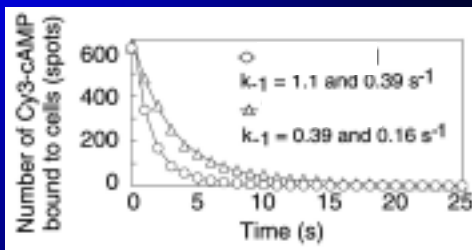


蛍光走化性誘因物質の細胞膜上の  
1分子イメージング(走化時)



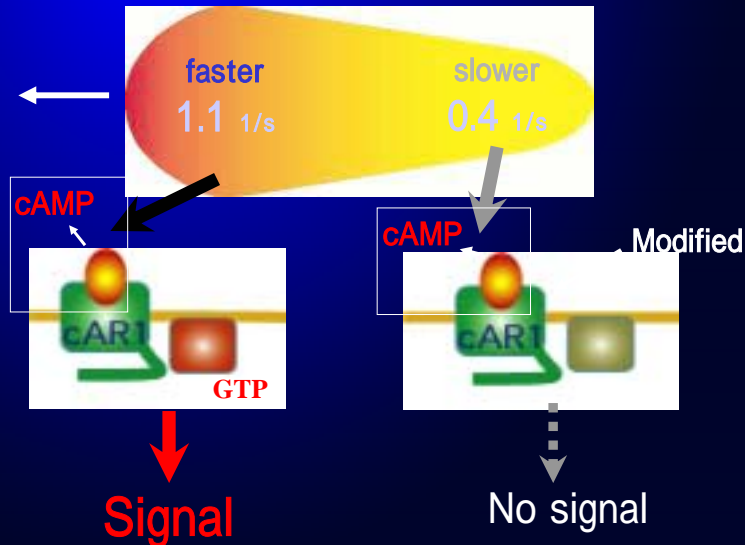
cAMP受容体結合キネティクスにおける  
仮足部-尾部極性

Cy3-cAMPの解離キネティクス

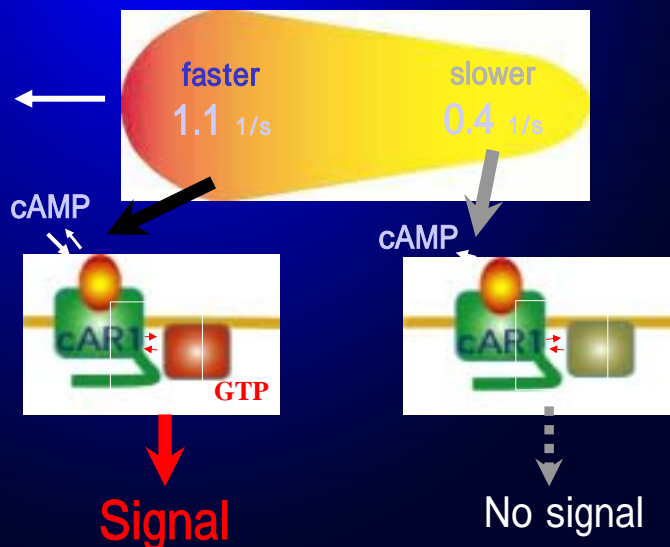


# 受容体は変調されている

前方向は活性化、後方向は不活性化

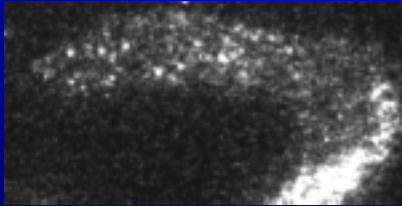


# cAR1とG-蛋白質の相互作用1分子イメージング

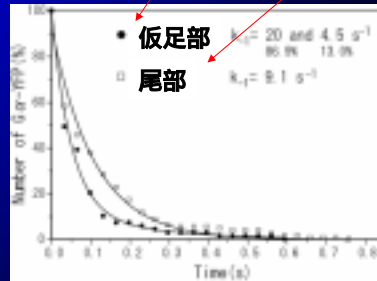
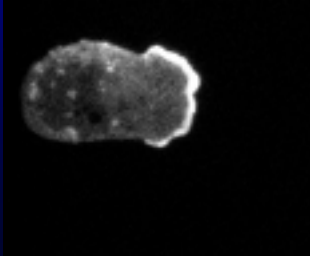


# 三量体G蛋白質の1分子観察

尾部



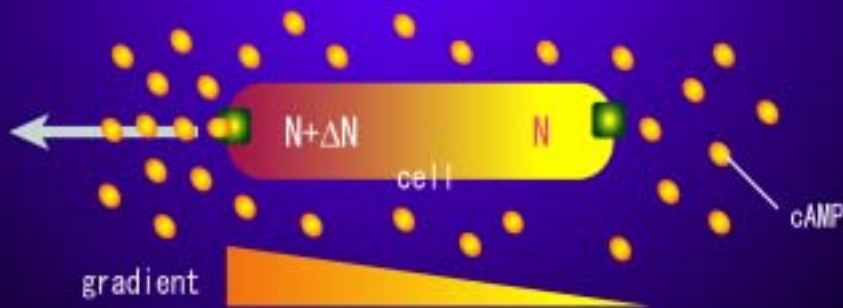
仮足部



仮足部でG蛋白質の短い結合がみられた。

Miyanaga, Ueda, et al.

アメーバーは、ノイズの数分の1しかない小さなシグナルを感知出来る巧妙な情報処理機構を持っている？

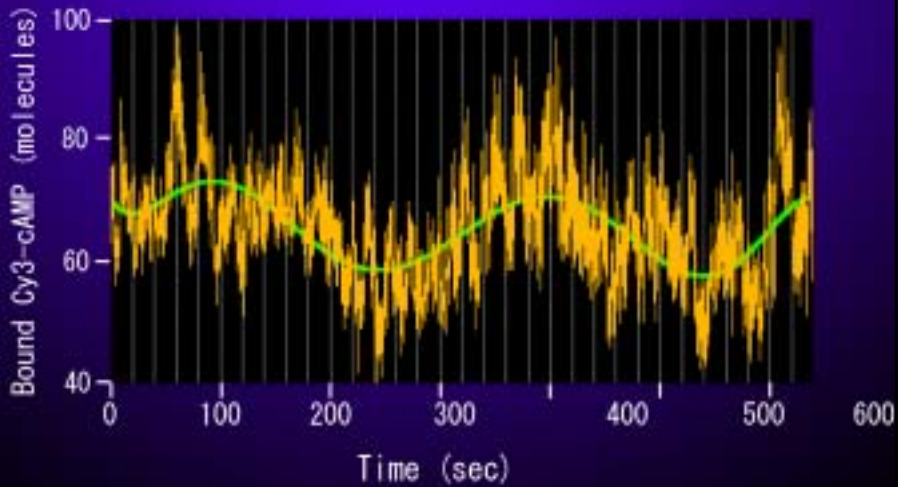


at threshold stimulation

$$\Delta N/N = 0.02 \quad (\text{Signal}) \quad \text{結合数前後差}$$

$$\sqrt{\langle \delta N^2 \rangle} / N = 0.05 \quad (\text{Noise}) \quad \text{結合数のゆらぎ}$$

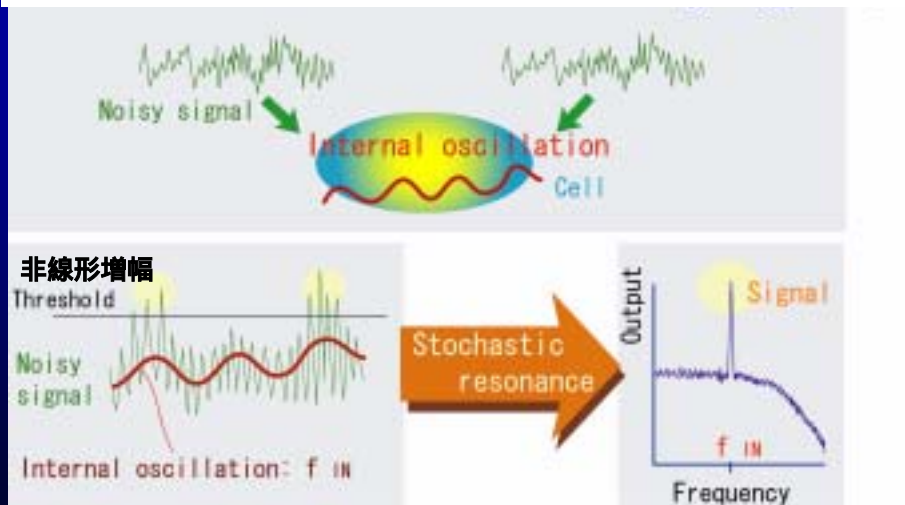
# 誘因物質結合数(入力信号)のゆらぎ



20 -30 sec  
6 min

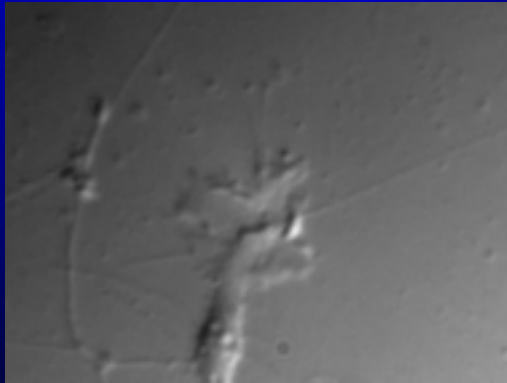
ノイズで周期的な入力信号

アメーバーはどのようにしてノイズな  
シグナルを検出するのか？

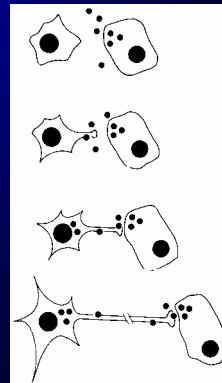


熱ノイズを利用して情報処理をしている。

# 神経細胞におけるNGFシグナルの1分子イメージング (ネットワーク形成のメカニズム)

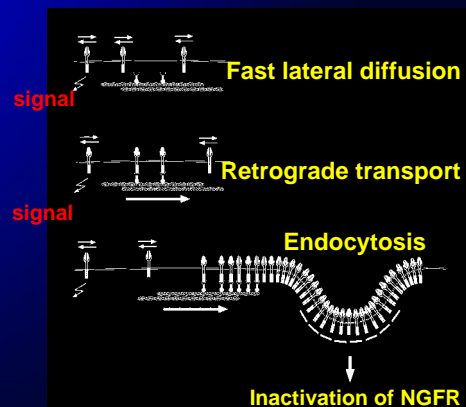
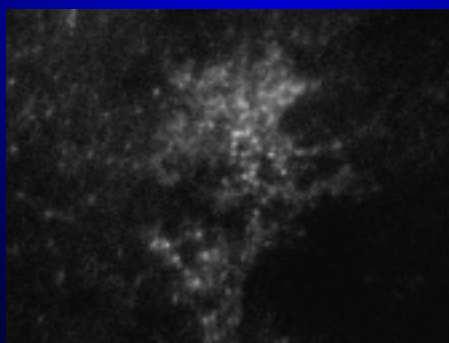


70x time lapse



# Single-molecule Imaging of NGF/NGFR Complexes Inducing Neurite Growth

## NGF シグナル伝達



Tani, et al.