

# 柳田生体運動プロジェクトの研究成果

## 目次

1. 単一蛍光分子直視技術の開発	2
2. 1分子酵素反応のイメージング	4
3. 単一分子モーターの滑り運動のイメージング	5
4. DNA結合タンパク質-DNA相互作用のイメージング	6
5. 1分子スペクトロスコーピーとタンパク質の多形性	7
6. 分子間力顕微鏡の開発	9
7. 生体分子1分子の捕捉と力測定	11
8. ミオシンの1分子ナノ計測	13
9. キネシンの1分子ナノ計測	15
10. 1分子の化学・力学カップリングの直接証明	17
11. アクチン・微小管の協同性	18

## 1. 単一蛍光分子直視技術の開発

水溶液中の蛍光色素 1 分子を直接観察することに成功した。

### 研究成果の概要

分子や原子を直接見ることは、これまで電子顕微鏡、原子間力顕微鏡などを用いて出来ていた。しかし、水溶液中で働くタンパク質など生体分子 1 個を観ることは出来なかった。そこで、蛍光顕微鏡で水溶液中の蛍光 1 分子の可視化をおこない、生体分子 1 個を可視化した。

対物レンズなど蛍光顕微鏡の部品を改良し背景光を抑え、水中の蛍光色素 1 分子をビデオレートで観察することができた。また、背景光を出来る限り小さくするために、全反射蛍光顕微鏡法によるエバネッセント光を導入した。エバネッセント光はスライドガラス表面から約 150nm 幅の領域しか照明しないので、溶液からの背景光を最小に抑えることが出来る。

この技術によって生体分子など小さな分子でも 1 分子が直接水中で観察できるようになった。実際この技術を使って生体分子 1 個の働く現場やその化学反応のイメージングが行われた。(図 1、図 2)

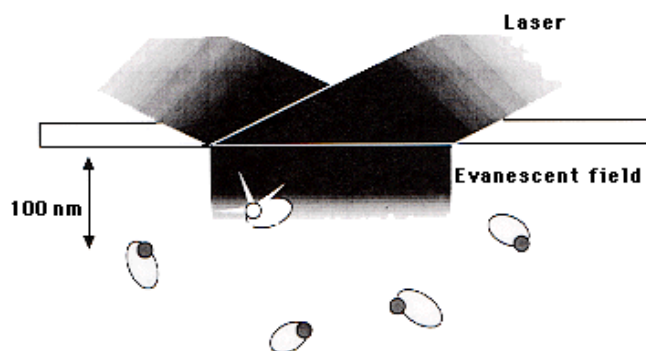


図 1 エバネッセント照明

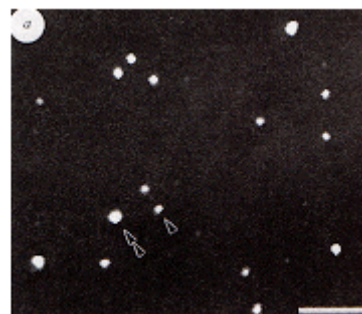


図 2 1 分子のイメージ

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 細胞等で単一生体分子のイメージング
- 2) 1 分子化学反応の解明

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) T.Funatsu, Y.Harada, M.Tokunaga, K.Saito and T.Yanagida: Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous Solution, Nature Vol.374 p.555-559(1995)

- 2) 船津 高志、武藤 悦子「1 分子イメージング」ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターのメカニズムを見る(吉岡書店) 柳田敏雄・石渡信一編 第 4 章 p.64-79(1997)
- 3) 船津 高志「分子直視—蛋白質 1 分子の動きを見る—」Symposia '94 創造科学技術研究報告会第 1 部講演要旨集 p.31-36(1994)
- 4) T.Funatsu, Y.Harada, H.Higuchi, M.Tokunaga, K.Saito, R.Vale and T.Yanagida: Single Molecule Imaging of Motion and ATPase Reaction of Motor Proteins, Biophysical Journal Vol.70 p.A6(1996)

〔研究者名〕 船津 高志、原田 慶恵、徳永 万喜洋、齋藤 究

## 2. 1分子酵素反応のイメージング

1分子のATPが酵素上で加水分解する様子を実時間、実空間イメージングした。

### 研究成果の概要

1分子可視化技術を展開して、蛍光性ATP1分子が酵素に結合し、加水分解され離れてゆく様子を観察した。ガラス上に固定したモータータンパク質であるミオシン分子にATP分子が結合、分解する様子がビデオで輝点の点滅として観察された。

このイメージングでは、静止もしくはゆっくりと動いている分子だけが輝点として観察され、水溶液中をただブラウン運動している分子はそれによるゆらぎのため観察されない。(図1、図2)

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 酵素反応機構の解明
- 2) エネルギー変換系、情報変換系のメカニズムの解明

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) T.Funatsu, Y.Harada, M.Tokunaga, K.Saito and T.Yanagida:  
Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous Solution, Nature Vol.374 p.555-559(1995)
- 2) A.H.Iwane, T.Funatsu, Y.Harada, M.Tokunaga, O.Ohara, S.Morimoto and T.Yanagida:  
Single Molecular Assay of the Individual ATP Turnovers by a Myosin-GFP Fusion Protein Expressed in vitro, FEBS Letters Vol.407 p.235-258(1997)
- 3) 原田 慶恵「1分子の酵素反応を見る」パリティ Vol.10 No.11 p.28-30(1995)
- 4) 原田 慶恵「1分子酵素反応を観る」Symposia '95 創造科学技術研究報告会第4部講演要旨集 p.62-68(1995)

〔研究者名〕 船津 高志、徳永 万喜洋、原田 慶恵

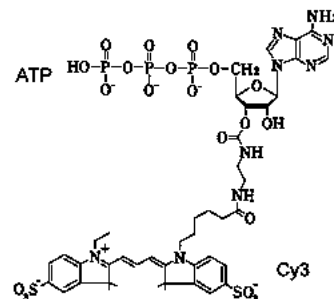


図1 蛍光性ATPの化学構造

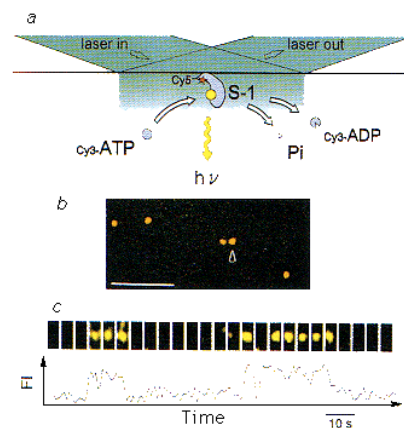


図2

- (a) 1分子ATP反応イメージングの模式図
- (b) ミオシン分子のイメージング
- (c) 1つのミオシン分子上でのATP分子の蛍光イメージの時間変化

### 3. 単一分子モーターの滑り運動のイメージング

単一分子モーターの滑り運動を直接観察することに成功した。

#### 研究成果の概要

1分子可視化技術により、実際に分子が機能している現場を直接観察することが可能になった。ここでは、蛍光標識したモータータンパク質であるキネシン1分子が微小管というレールタンパク質に結合し、滑り運動する様子を直接、実時間観察した。1分子のモータータンパク質が長い距離にわたって滑り運動をすることが初めて示された。(図1)

#### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 神経細胞内での物質輸送の機構の解明
- 2) 細胞内でのタンパク質分子の挙動のイメージング

#### 特許出願

なし

#### 報告書他

- 1) R.D.Vale, T.Funatsu, D.W.Pierce, L.Romberg, Y.Harada and T.Yanagida: Direct Observation of Single Kinesin Molecules Moving along Microtubules, Nature Vol.380 p.451-453(1996)
- 2) 船津 高志、原田 慶恵「分子モーター1分子の動きを観る」実験医学 Vol.14,p.73-75(1996)

〔研究者名〕 船津 高志、原田 慶恵、Ron Vale

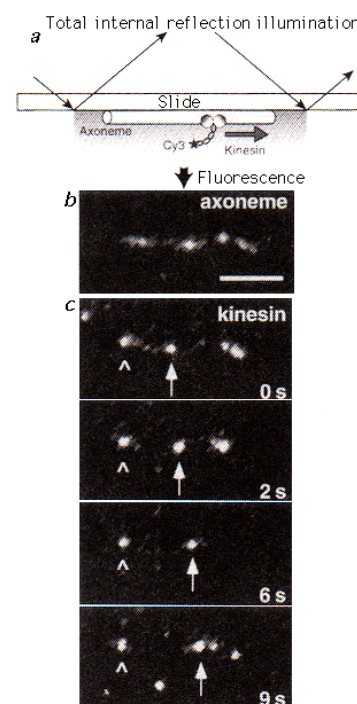


図1  
(a) 微小管上のキネシン分子の滑り運動  
(b) レールタンパク質のイメージ  
(c) レールタンパク質の上を滑り運動するキネシン1分子の滑り運動のイメージ

#### 4. DNA 結合タンパク質-DNA 相互作用のイメージング

DNA 上で RNA ポリメラーゼ 1 分子が相互作用する様子を実時間観察することによりイメージングした。

##### 研究成果の概要

DNA 結合タンパク質である RNA ポリメラーゼが DNA に結合し機能する様子を 1 分子イメージング技術と 1 分子操作技術を使って直接観察した。レーザートラップでその両端を固定した DNA の上に蛍光標識した 1 分子の RNA ポリメラーゼが結合し、特異的な結合部位であるプロモーター部位を探す様子が観察された。(図 1、図 2)

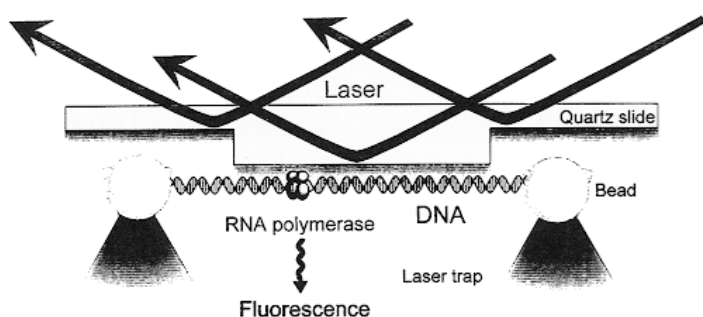


図1 DNA と RNA ポリメラーゼの相互作用のイメージング

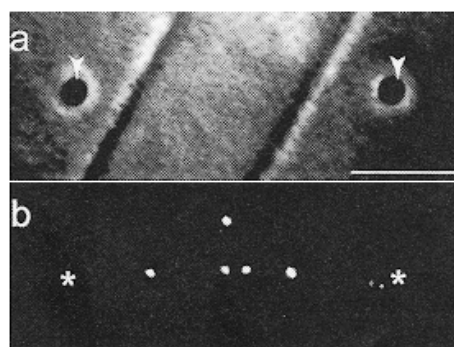


図2 DNA と RNA ポリメラーゼのイメージ  
(a)DNA の両端に固定されたビーズ  
(b)DNA 上の RNA ポリメラーゼ

##### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 遺伝情報発現場所のイメージング
- 2) 遺伝情報発現の制御機構の解明

##### 特許出願

なし

##### 報告書他

- 1) 原田 慶恵「DNA モーター」ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターのメカニズムを見る(吉岡書店) 柳田敏雄・石渡信一編 第 8 章 p.120-129(1997)

〔研究者名〕原田 慶恵、船津 高志

## 5. 1分子スペクトロスコピーとタンパク質の多形性

水溶液中の生きたタンパク質1分子の内部構造を実時間でイメージングした。

### 研究成果の概要

1分子分光や偏光を使って個々のタンパク質分子の形態や状態を見る技術を開発した。特にエネルギー移動法と1分子イメージング技術を組み合わせ水溶液中で生きたタンパク質1分子の構造を捉えることに成功した。これにより多分子計測による平均化のために隠されていたタンパク質分子の特性が観測できた。

その結果、タンパク質の形態は多形性があり、一つ一つのタンパク質はあたかも個性を持っているかのように振る舞うことが分かった。また、1つのタンパク質分子を見ていると、ダイナミックにその多様な構造の間を秒オーダーでゆっくり変化していることが分かった。

(図1、図2)

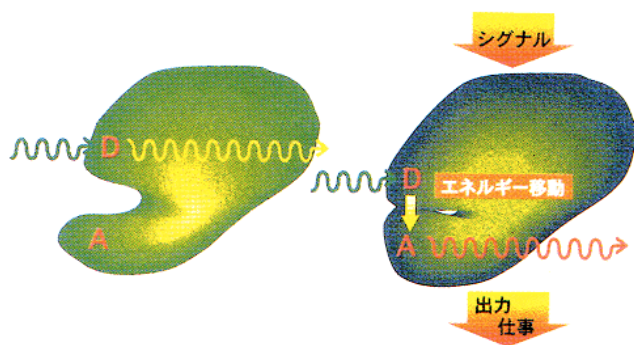


図1 1分子エネルギー移動とタンパク質の構造

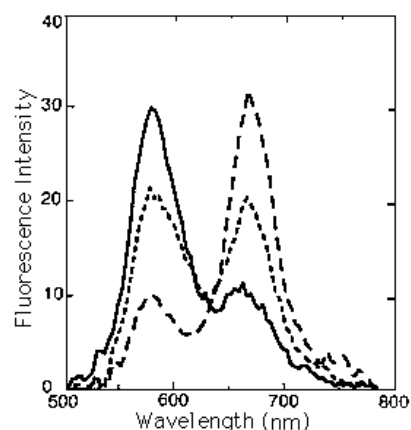


図2 蛍光スペクトルの時間変化

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 水溶液中でタンパク質1分子の構造の決定
- 2) タンパク質の動的構造の多形性
- 3) 細胞中などで単一生体分子の構造の決定

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) 石井 由晴「タンパク質の動的多形性を1分子に観る」ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターのメカニズムを見る(吉岡書店) 柳田敏雄・石渡信一編 第7章 p.110-119(1997)

- 2) 石井 由晴「蛋白質分子の個性を観る」Symposia '96 創造科学技術研究報告会第 3 部講演要旨集 p.9-15(1995)
- 3) Y.Ishii, T.Funatsu, T.Wazawa, T.Yoshida, J.Watai, M.Ishii and T.Yanagida: Communication between Troponin-C and -I Revealed by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy and FRET, Biophysical Journal Vol.72 p.A283(1997)

〔研究者名〕 石井 由晴、船津 高志



## 6. 分子間力顕微鏡の開発

生体分子間の相互作用をイメージングするために、サブピコニュートンの分解能の力計測と非接触計測を可能にする分子間力顕微鏡を開発した。

### 研究成果の概要

サブピコニュートンの分子間相互作用を直接イメージングするために分子間力顕微鏡の開発を行った。サブピコニュートンの精度の力を測定できるよう超高感度のカンチレバーを自作した。このような柔らかいカンチレバーは、自身のブラウン運動によって大きくゆらいでしまうが、これをレーザー光の輻射圧を利用して制御することができた。しかもこの技術は、ゆらぎの問題を解決するばかりでなく、非接触で力測定することを可能にした。これにより生体分子を損なうことなく測定することができるようになった。

これを使って疎水相互作用を測定したところ 100 ナノメートルを越す長距離力であることが分かった。(図1、図2、図3、図4)

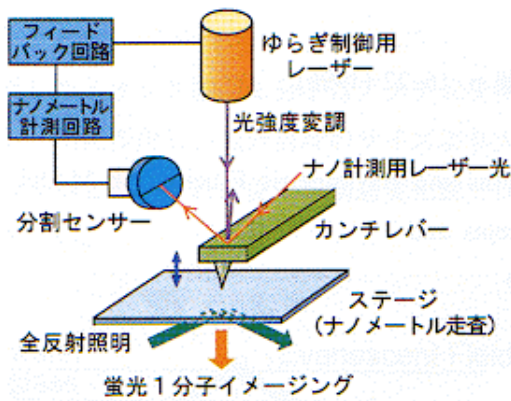
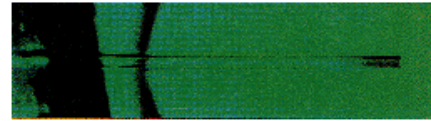
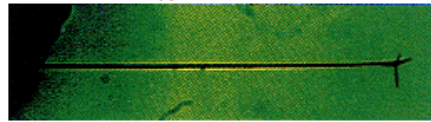


図1 分子間力顕微鏡

上からの像



横からの像



100 $\mu$ m

100 $\mu$ m

図2 ガラスを引き延ばして作ったカンチレバー

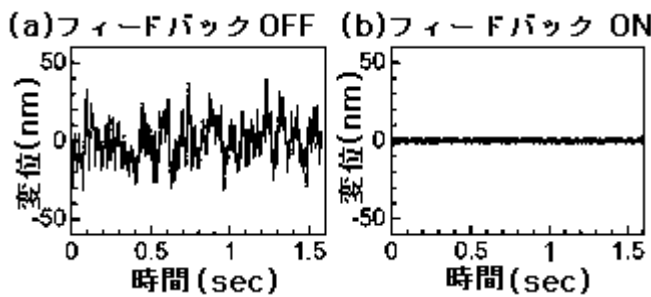


図3 カンチレバーの熱ゆらぎと光輻射圧  
フィードバックによるその抑制

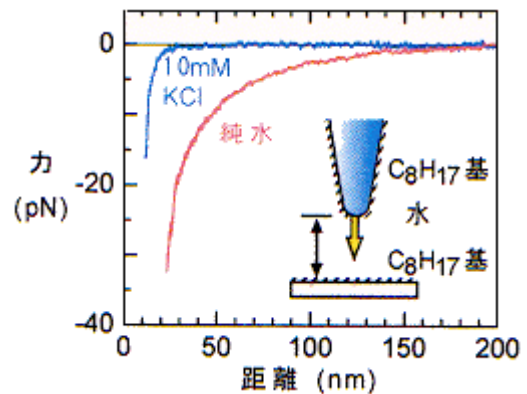


図4 疎水表面間に働く引力

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 超高感度カンチレバーの作成
- 2) 熱ゆらぎの光による制御
- 3) 非接触計測による分子間力計測
- 4) 生体分子間の長距離相互作用

### 特許出願

- 1) 光操作方法

平 6-220689 徳永 万喜洋、柳田 敏雄 (平成 6 年 9 月 14 日)

光の輻射圧を用いてゆらぎを止め高精度操作・計測をする技術

- 2) 多次元極微小変位計測方法とその装置

平 6-111612 徳永 万喜洋、柳田 敏雄 (平成 6 年 5 月 25 日)

ナノメートル領域の微小変位の 3 次元同時計測技術

### 報告書他

- 1) M.Tokunaga, T.Aoki, M.Hiroshima, K.Kitamura and T.Yanagida: Subpiconewton Intermolecular Force Microscopy, Biochemical and Biophysical Research Communication Vol.231 p.566-569(1997)
- 2) 徳永 万喜洋「分子間相互作用の時空間への展開」Symposia '96 創造科学技術研究報告会第 3 部講演要旨集 p.16-22(1996)
- 3)M.Tokunaga: Direct Trapping and Nanometry of Single Motor Proteins and Asymmetric Fluctuation Model JST Forum for Multidisiplinary Research, "New Concepts and Techniques: Experiments vs.Computing" p23(1997)

〔研究者名〕 徳永 万喜洋

## 7. 生体分子 1 分子の捕捉と力測定

生体分子モーターミオシン 1 分子を生きたまま捕捉、その機能を計測した。

### 研究成果の概要

分子間相互作用の研究をするためには、生きたまま生体分子 1 個を捕まえることが必須である。プローブ顕微鏡において蛍光 1 分子イメージングを可能にするために対物レンズエバネッセント照明法を開発した。また、遺伝子工学技術を使って生体分子 1 個をその機能を保ったままプローブの先に捕捉した。

捕捉したミオシン頭部 1 分子はアクチンフィラメントと相互作用し、自分自身のサイズより大きな変位を示した。これは従来の構造変化説では説明できない。(図 1、図 2、図 3)

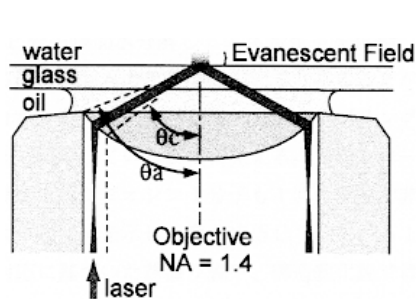


図1 対物レンズ型全反射照明による  
1分子蛍光イメージング

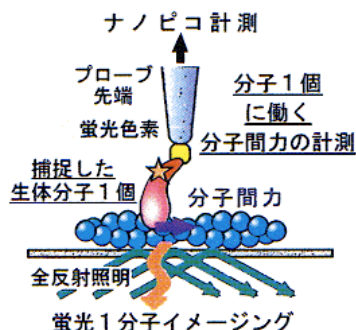


図2 1分子捕捉・力測定

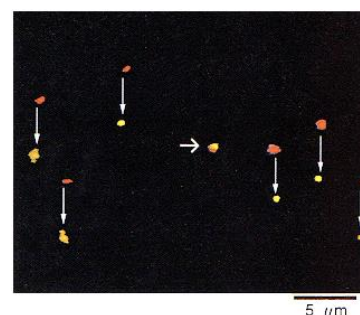


図3 1分子捕捉。捕捉されたミオシン分子はステージを動かしても動かない

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 対物レンズを使って光照射の切り替え
- 2) 1 生体分子の捕捉と操作
- 3) 動的分子間相互作用の計測

### 特許出願

- 1) 光照射切り替え方法

平 7-324897 徳永 万喜洋、齋藤 究、柳田 敏雄 (平成 7 年 12 月 13 日)

レンズを使って光照射の方法を切り替える技術ならびにその目的のためのレンズ。

### 報告書他

- 1) M.Tokunaga, K.Kitamura, K.Saito, A.H.Iwane and T.Yanagida: Single Molecule Imaging of Fluorophores and Enzymatic Reactions Achieved by Objective-Type Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, Biochemical and Biophysical Research Communication Vol.235 p.47-53(1997)

- 2) K.Kitamura, M.Tokunaga, A.H.Iwane, K.Saito and T.Yanagida: Manipulation and Nanometer Measurement of a Single Motor Protein Molecule Captured Directly by a Scanning Probe, Biophysical Journal Vol.72 p.A55(1997)

〔研究者名〕 徳永 万喜洋

## 8. ミオシンの1分子ナノ計測

筋肉の分子モーターであるミオシン1分子の力学特性を調べた。

### 研究成果の概要

筋肉のミオシンなど生物分子モーターはATPの加水分解によって化学エネルギーを滑り運動や、力発生に変換している。しかし、エネルギー供給の化学反応過程と力発生などの力学過程の結びつきについては1:1に対応しているものと単純に仮定してきた。ところが最近の研究でこの仮定が怪しいことが示唆されてきた。実験システムの複雑さ、平均化に伴う曖昧さを減らしてこの仮定を確かめようと1分子計測で調べた。

マイクロニードルや、レーザートラップを使ってミオシン1分子の力ゆらぎをナノメートル、ピコニュートンの精度で測定したところ、1個のATP分子が加水分解してエネルギーを供給している間に何回もの化学反応が起こり得ることが示された。負荷に応じて化学・力学カップリングを変えて機能しているように見える。またプローブに捕捉されたミオシン1分子も1回の反応で非常に大きな変位を示し、今まで信じられている1:1対応に基づいた首振り説や、構造変化説では説明できない結果がえられた。(図1、図2)

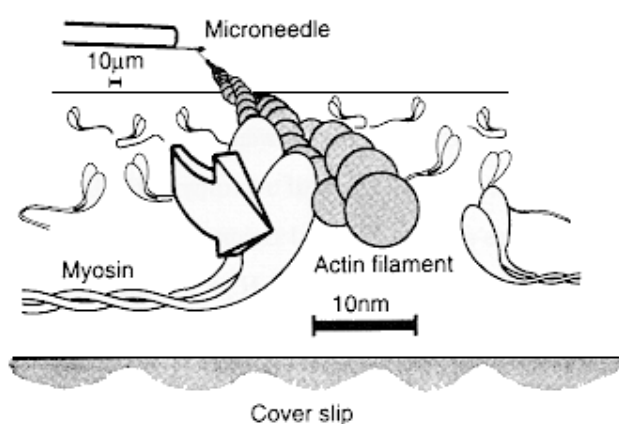


図1 マイクロニードルによるミオシン1分子の力の計測

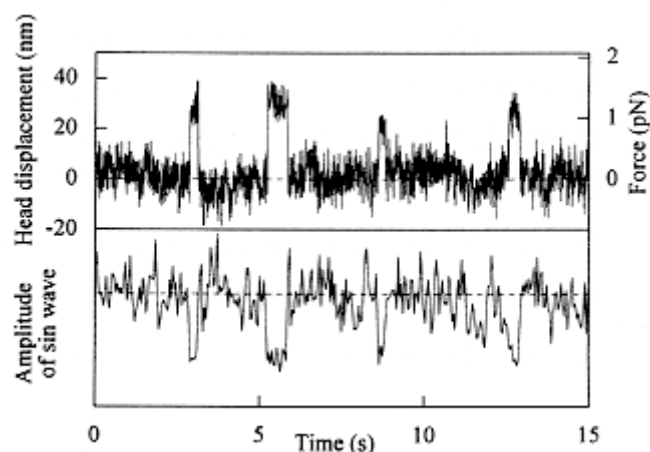


図2 単頭ミオシンによる力発生

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生物分子モーター機構の解明
- 2) 生体エネルギー変換系の理解

### 特許出願

なし

## 報告書他

- 1) T.Yanagida, Y.Harada and A.Ishijima: Nano-manipulation of Actomyosin Molecular Motors in vitro: A New Working Principle, Trends in Biochemical Sciences Vol.18 No.9 p.319-324(1993)
- 2) A.Ishijima, Y.Harada, H.Kojima, T.Funatsu, H.Higuchi and T.Yanagida: Single-Molecule Analysis of the Actomyosin Motor Using Nano-Manipulation, Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.199 p.1057-1063(1994)
- 3) T.Yanagida and A.Ishijima: Forces and Steps Generated by Single Myosin Molecules Biophysical Journal Vol.68 p.312s-320s(1995)
- 4) A.Ishijima, H.Kojima, H.Higuchi, Y.Harada, T.Funatsu and T.Yanagida: Multiple and Single-Molecule Analysis of the Actomyosin Motor by Nanometer-Piconewton Manipulation with a Microneedle: Unitary Steps and Forces, Biophysical Journal Vol.70 p.383-400(1996)
- 5) H.Tanaka, A.Ishijima, M.Honda, K.Saito and T.Yanagida: Orientation Dependent Displacement of a Single One-headed Myosin Molecules in a Synthetic Myosin Filament, Biophysical Journal Vol.72 p.A55(1997)
- 6) 樋口 秀男、石島 秋彦「分子モーター1 個のナノメートルの動きを見る」ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターのメカニズムを見る(吉岡書店) 柳田敏雄・石渡信一編 第5章 p.80-101(1997)
- 7) 石島 秋彦「分子操作—蛋白質 1 分子の力を計測する—」Symposia '94 創造科学技術研究報告会第1部講演要旨集 p.37-46(1994)

〔研究者名〕 石島 秋彦、小嶋 寛明

## 9. キネシンの1分子ナノ計測

神経細胞で物質輸送を担っているキネシンについて1分子力学計測を行った。

### 研究成果の概要

キネシンは神経軸索で単分子で微小管上を滑り運動し物質輸送を行っている分子モーターである。ミオシンとの構造の類似性が指摘され、その構造と機能の関係を調べることはモータータンパク質一般の特性を知る上で重要である。

レーザートラップ法を使った1分子計測技術に caged 化合物のテクニックを導入し、ATP や ADP との反応の動的解析や、遺伝子工学手法とを組み合わせ、構造と機能の関係を調べるなど1分子ナノメートル計測の枠を広げ、キネシンの特性を幅広く調べた。その結果、キネシンは人が歩行運動するように運動するなどその様子が詳しく記述できるようになった。(図1、図2)

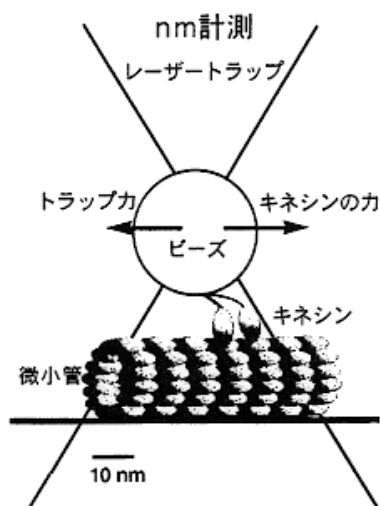


図1 キネシン1分子の力測定

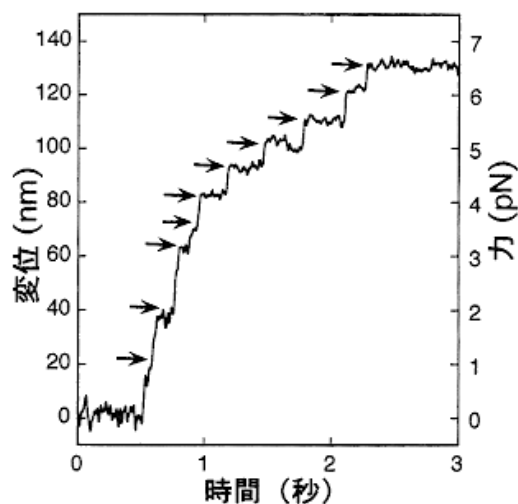


図2 キネシン1分子の変位

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生物分子モーターの機能の解明
- 2) 神経細胞での物質輸送の理解

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) H.Kojima, E.Muto, H.Higuchi and T.Yanagida: Mechanics of Single Kinesin Molecules Measured by Optical Trapping Nanometry, Biophysical Journal in press

- 2) H.Higuchi and T.Yanagida: Detachment of Single Kinesin Molecules from Microtubules Induced by the Photolysis of Caged ADP, *Biophysical Journal* Vol.72 p.A62(1997)
- 3) H.Kojima, E.Muto, H.Higuchi and T.Yanagida: Cooperative Step Movement of Single Kinesin Molecules, *Biophysical Journal* Vol.70 p.A36(1996)
- 4) H.Higuchi, E.Muto, Y.Inoue and T.Yanagida: Kinetics of Force Development by Single Kinesin Molecules Activated by Laser Photolysis of Caged ATP, *Biophysical Journal* Vol.70 p.A36(1996)
- 5) 樋口 秀男、柳田 敏雄「モータータンパク質 1 分子のナノメートルの動きを観る」*医用電子と生体工学* 第 35 巻 特別号(1997)
- 6) 樋口 秀男、石島 秋彦「分子モーター1 個のナノメートルの動きを見る」*ナノピコスペースのイメージング—生物分子モーターのメカニズムを見る*(吉岡書店) 柳田敏雄、石渡信一編 第 5 章 p.80-101(1997)
- 7) 樋口 秀男「1 分子力学反応を観る 運動タンパク質 1 分子の化学反応と力学反応を同時計測する」*Symposia '95 創造科学技術研究報告会第 4 部講演要旨集* p.69-74(1995)
- 8) 小嶋 寛明「1 分子ナノ操作法による 1 分子力学」*Symposia '96(Osaka)創造科学技術研究報告会講演要旨集* p.19-26(1996)

〔研究者名〕 樋口 秀男、武藤 悦子、小嶋 寛明



## 10. 1分子の化学・力学カップリングの直接証明

1分子の化学・力学カップリングの直接証明 アクトミオシンについて 1分子化学反応と力学反応の同時計測を行いその間のカップリングを直接測定した。

### 研究成果の概要

1分子イメージング法により ATP1分子の反応を観察、レーザートラップ法を使って1分子の力学計測を同時に行い、その間のカップリングを直接観察した。この結果、化学反応と力学反応は必ずしもが直接 1:1 に対応していないことが示された。また、ATP からのエネルギーがそのまま使われているのではなく、一度ミオシンなどのタンパク質に蓄えられ、それから使われていると考えないと説明できないような結果が得られた。(図1、図2)

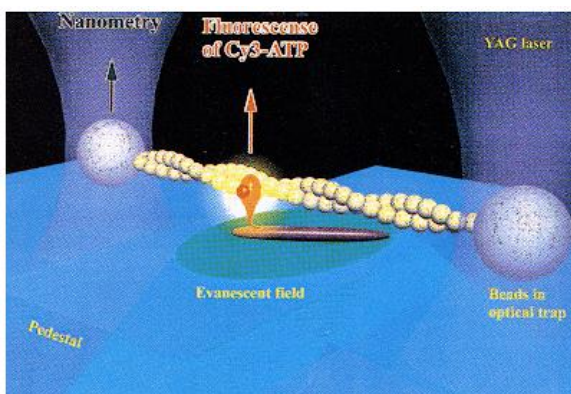


図1 化学反応・力学反応の同時測定

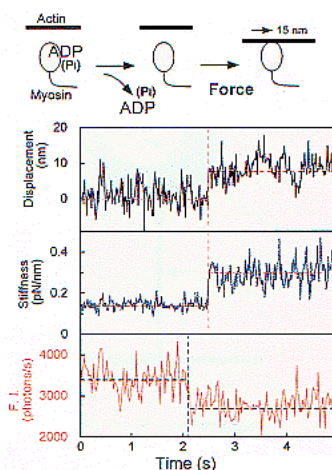


図2 化学反応と力学反応は必ずしも 1:1 に対応していない

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生体エネルギー変換系で入力・出力カップリングの直接証明
- 2) 生体エネルギー変換系、情報変換系での機能の解明

### 特許出願

なし

### 報告書他

なし

〔研究者名〕 石島 秋彦、小嶋 寛明、船津 高志、徳永 万喜洋、樋口 秀男

## 11. アクチン・微小管の協同性

分子モーターにとってレールタンパク質であるアクチン、微小管の物理的性質を調べた。

### 研究成果の概要

分子モーターが滑り運動するとき、一方のレールタンパク質がどんな役割をしているか知るためにアクチンや微小管の物理的性質が調べられた。この結果、これらは柔らかいフィラメントであり、2つ以上の状態をとり協同的にその間を遷移してモータータンパク質の機能に積極的に関わっていることが示唆された。(図1、図2)

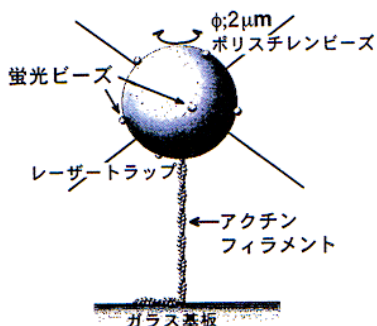


図1 アクチンフィラメントの回転のよわらかさ

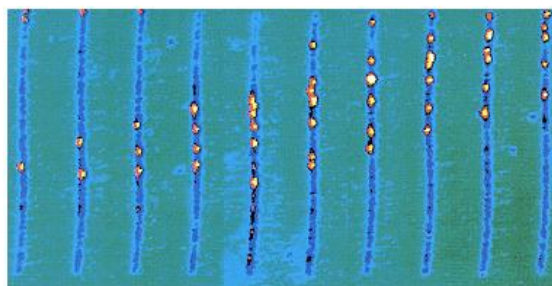


図2 キネシン分子の微小管への協同的結合

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 生体分子間の相互作用の動的機構
- 2) 細胞内での分子間コミュニケーション

### 特許出願

なし

### 報告書他

- 1) H.Kojima, A.Ishijima and T.Yanagida: Direct Measurement of Stiffness of Single Actin Filaments with and without Tropomyosin by In vitro Nanomanipulation, Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. Vol.91 p.12962-12966(1994)
- 2) E.Muto and T.Yanagida: Cooperative Binding of Kinesin Molecules to a Microtubule in the Presence of ATP, Biophysical Journal Vol.72 p.A62(1997)
- 3) Y.Tsuda, H.Yasutake, A.Ishijima and T.Yanagida: Torsional Rigidity and Strength of Single Actin Filaments Measured Directly by in vitro Micromanipulation, Biophysical Journal Vol.70 p.A34(1996)
- 4) Y.Ishii, J.Watai and T.Funatsu: Imaging of Cooperative Binding of Tropomyosin along an Actin Filament and between the Two Actin Strands, Biophysical Journal Vol.70 p.A34(1996)

〔研究者名〕 武藤 悦子、小嶋 寛明、石井 由晴