様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年5月29日現在

研究種目：特定領域研究
研究期間：2004～2008
課題番号：16083201
研究課題名（和文）　ナノシステム内情報伝達の制御メカニズム

研究課題名（英文）　Regulatory Mechanism of nano-sysytems of motor proteins

研究代表者
樋口　秀男（HIGUCHI HIDEO）
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：90165093

研究成果の概要：　生体モータータンパク質を分子・分子集合体・細胞の３つの階層からアプローチし，各階層の機能メカニズムを解明すると同時に全体を俯瞰した生体運動や制御機構の構築を目指す．主な研究成果は，1．精製モーター１分子の３次元的な運動を蛍光性量子ドットを用いて2nm精度で測定できる装置を開発して、ダイニンのステップ観察に成功した。ステップサイズは８ナノメートルで、最大力は約８pN であった。2．細胞内モーター分子の変位と力を３次元的に測定できる装置を開発し小胞輸送を２nmの精度で観察することに成功し、小胞はダイニンによって、微小管上を真直ぐに輸送されることが明らかとなった。３．筋収縮を行うミオシン分子の複数が発する力や弾性率をÅ精度で測定し、ミオシン分子が8nmの変位をし、分子の弾性率は非線形であることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
16年度	16,500,000	0	16,500,000
17年度	26,600,000	0	26,600,000
18年度	26,600,000	0	26,600,000
19年度	20,200,000	0	20,200,000
20年度	15,600,000	0	15,600,000
総　計	105,500,000	0	105,500,000

研究分野：　生物系
科研費の分科・細目：　生物科学系
キーワード：　細胞、モータータンパク質、１分子、CdSe、ナノメートル計測

１．研究開始当初の背景

モータータンパク質の１分子を見て、操り、測ることによって、従来の多分子系を用いた研究では推測しかできなかった数々の新しい知見が得られた。しかしナノシステムとしてのモータータンパク質の制御メカニズムは明らかにされていなかった。

２．研究の目的

モータータンパク質は複数の頭部と複数の軽鎖を結合し、複数のレールタンパク質と相互作用することで力発生を行っているナノシステムである。運動を行うに際して、頭部間やレール間でシステム内の情報を伝達することが本質的である。本研究では精製分子や細胞内分子の力学情報を解明し、運動のメカニズムや制御との関係を明らかにする。また、レールとモーター間やレール内でも情報が伝えられている可能性があり、レールの

物理化学的性質の変化を捉える。

３．研究の方法

本研究では、これまでに見たことがない現象を解析するために、多分子測定装置や細胞内の１分子装置を開発した。個々の装置の内容については、「研究成果」の欄に個別に書き込んだ。

４．研究成果

(1)蛍光粒子を用いたモータータンパク質のナノ蛍光イメージング

タンパク質１分子に蛍光を標識して，イメージングされた像を解析することで，位置精度 2nm を得た．位置精度をあげるためには，顕微鏡の振動の減少，背景光の減少，イメージング装置のノイズの低減そして光子数の増加するなどのテクノロジーが必要である．振動の減少には，レーザートラップナノ計測で培われたノウハウが活かされた．背景光の減少のためには，レーザーからの光を通さず，蛍光のみを透過する優れた光学フィルターが選ばれた．イメージング装置のノイズの低減と明るいイメージを得るためには，電子増幅する EM-CCD が利用された．光子数の増加のためには，強力レーザーあるいは集光したレーザー光などにより，蛍光を励起する光を強くした．安定な有機蛍光色素ローダーミンや Cy-ダイでも，50 万個程度の光子を CCD が受光する間に，酸素や水と化学反応を起こし，蛍光を発しなくなる．2 nm の分解能を出すためにはおおよそ１万個の光子が必要であるから，50 万個の光子で測定できるデータ数は 50 点程度である．50 点で解析できる運動はとても限られてしまうので，もっと光子が必要である．近年市販されている CdSe 量子ドットは直径 3～6 nm とタンパク質程度の大きさを持ちつつ，光子を合計 5000 万個程度受光できる．2 nm の分解能であれば 5000 点のデータを得ることができる．ビデオレートなら 6 分程度の観察が可能である．この方法を利用して，モータータンパク質であるダイニンやキネシンに量子ドット(CdSe)を結合して，8 nm のステップが観察された（Toba，樋口ら PNAS2006)

(2)量子ドットによる細胞内ナノイメージング

我々は，蛍光性ナノ粒子を用いて，運動中の細胞表面や内部の詳細な観測を試みた．乳がんの約 30%では細胞膜上のレセプター HER2 を過剰発現している．このタンパク質に対する抗体（抗 HER2 抗体）は，乳がん患者に投与さる分子標的抗がん剤である．この抗 HER2 抗体を蛍光性量子ドットに化学架橋させた．これを乳がん細胞 KPL-4 と混合したところ，まず量子ドットは細胞膜に結合し，1 時間ほどの間に，細胞内に膜ごと小胞を形成して取り込まれた（エンドサイトーシス）．その後，量子ドットを含んだ小胞は細胞内を細胞核に向けて輸送された．この小胞の運動をレーザー共焦点顕微鏡で蛍光観察を行った．対物レンズを上下にずらすことで，観察像の 3 次元像を取得し，新たに開発された装置にて解析した．330ms 毎に 9 枚の共焦点像を取得し，ひとつの 3 次元画像を構築した．そして，量子ドットの 3 次元位置を取得するため，蛍光強度を重みとした輝点の重心を計算するソフトウェアを開発した．細胞内において，モーター蛋白質によって輸送されている量子ドットの位置の経時変化を三次元計測できた（分解能～10 nm）．さらに，その装置で，抗体-量子ドットが細胞膜から核付近に輸送される過程が単一分子レベルでナノイメージングされた．現在では，細胞内のタンパク質や受容体の動態を 2 nm かつ 0.3 ms で解析することに成功し，ステップ状の運動を捉えることができた(渡辺ら Biophys.J. 2007).

(3)ミオシンVの制御の１分子イメージング

ミオシンVに結合した 12 個のカルモジュリンのうち１分子でも失われると，アクチンから解離して，運動能が失われることが明らかとなった（アン・樋口 Nature Struct. Mol. Biol. 2004)．須藤研が作成した，組み換え単頭ダイニンの運動特性を調べたところ，単頭が２分子集合すると，運動できることが明らになった。

(4)細胞内に導入した QD の運動

細胞内のモータータンパク質１分子の運動は、昨年はエンドサイトーシスを利用した方法で、間接的な観察に成功した。しかしながらこの方法では標識タンパク質は小胞内にあるので、細胞質タンパク質と直接は相互作用ができなかった。そこで今年度は、量子ドットにタンパク質を結合した複合体を細胞に直接導入する新しい方法を確立した．実験では、市販の通常は DNA をトランスフェクションさせる試薬（FuGENE－HD）に標的分子であるファロイジン（アクチン線維に結合），tubulin 抗体（微小管に結合）やキネシンを結合した量子ドット（QD）を混ぜて，これを培養細胞に導入することに成功した．ファロイジン－QD は細胞

周辺にあるアクチンに結合し，tubulin 抗体 -QD は核方向に直線的に分布する微小管に結合することが確認された．モータータンパク質キネシンは，微小管上を不均一の速度で動いた．細胞内のキネシンの最大運動速度は２μm/s であり、精製したキネシンを用いた In vitro motility assay における最大速度１μm/s の約２倍であった．一方、微小管 -QD の速度は低頻度ではあるが１μm/s となった。キネシンは微小管の上を動くことから、今回観察したキネシンの最大運動速度は微小管に対するキネシンの運動と微小管の運動の和であることが強く示唆された。このように、細胞内の分子を直接観察することで、新しい細胞像が描けてくることが明らかとなった (Yoo et al. Exp Cell Res 2008)。

(5)ミオシンフィラメント内ミオシン分子の弾性とステップサイズ

天然に近い構造を有したフィラメント上において、ミオシン１分子の力学特性を解明した。フィラメント自己組織化の条件を検討し，機能的なミオシン分子数が 2 -6 分子しかないフィラメントを作製した。このフィラメント上におけるミオシン１分子の動きと力を、レーザートラップナノメトリーにより計測した。その結果、ミオシンは１回の力発生で 5nm 動きこれを何回も繰り返し数百 nm 運動し、最大 12pN の力を発生した．このときの最大効率は 50%程度と見積もられた．運動距離や効率が筋肉で得られた値に合致したことから，筋肉内でのミオシン１分子の基本特性が 5nm 変位と 12pN の力であることが明らかとなった。したがって、ミオシン１分子の機能は、複数分子を含むフィラメント化で、向上することが示唆された。これは、力を出していないミオシン分子がアクチンと結合し、アクチンの解離を抑え、力を出すミオシンが最大力を発揮出来る状態を作っているためと考えた。また、量子ドットをアクチン線維に結合し、ミオシン分子の弾性率を測定したところ、伸びるときは硬く、押されたときには非常に柔らかいことが明らかとなった。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 33 件）（すべて査読有）

1. M. Iwaki, A. H. Iwane, T. Shimokawa, R. Cookes and T. Yanagida (2009) Brownian search and catch mechanism for myosin -VI steps. Nature Chemical Biology. , 5(6), 403 -405 (2009)
2. Furuta A., T. Yagi, H. Yanagisawa, H. Higuchi, and *R. Kamiya. Systematic comparison of In vitro motile properties between chlamydomonas wild -type and mutant outer arm dyneins each lacking one of the three heavy chain. J. Biol. Chem. 284, 5927 -5935 (2009).
3. T. Komori, S. Nishikawa, T. Ariga, A. H. Iwane and T. Yanagida. (2009) Simultaneous measurement of nucleotide occupancy and mechanical displacement in myosin -V, a processive molecular motor. Biophys. J. 96: L04 -06.
4. Yoo J., T. Kambara, K. Gonda, and *H. Higuchi. Intracellular imaging of targeted proteins la -beled with Quantum Dots. Exp Cell Res. 314, 3563 -3569 (2008)
5. Sazaki,G., M.Okada, T. Matsui, T. Watanabe, H. Higuchi, K. Tsukamoto and K. Nakajima. Single -Molecule Visualization of Diffusion at the Solution -Crystal Interface. Crtstal Growth and Design. 8, 2024 -2031 (2008)
6. Watanabe S., T.M. Watanabe, O. Sato, J. Awata, K. Homma, N. Umeki, H. Higuchi, R. Ikebe, and *M. Ikebe. Human Myosin Vc Is a Low Duty Ratio Nonprocessive Motor. J. Biol. Chem. 283, 10581-10592 (2008)
7. T. Komori, S. Nishikawa, T. Ariga, A. H. Iwane and T. Yanagida. (2008) Measurement system for simultaneous observation of myosin V chemicaland mechanical events. Biosystems 93: 48 -57.
8. M. Iwaki, A. H. Iwane, M. Ikebe and T. Yanagida. (2008) Biased Brownian motion mechanism for processivity and directionality of single -headed myosin -VI. Biosystems 93: 39 -47.
9. Y. Arai, A. H. Iwane, Y. Ishii and T. Yanagida. (2008) Spontaneous conformational fluctuations in cell signaling proteins of Ras. Progress of Theoretical Physics Supplement 173: 229 -234.
10. M. Nishikawa, H. Takagi, T. Shibata, A. H. Iwane and T. Yanagida. (2008) Fluctuation analysis of mechanochemical coupling depending on the type of biomolecular motors. Phys. Rev. Lett. 101: 128103 -128106.
11. Y. Komori, A. H. Iwane and *T. Yanagida. Myosin -V makes two Brownian 90°

rotations per 36 nm-step. Nature Structural & Molecular Biology, 14: 968-973, (2007).

12. M. Sugawa, Y. Arai, A. H. Iwane, Y. Ishii and *T. Yanagida. Single molecule FRET for the study on structural dynamics of biomolecules. Biosystems 88: 243-250, (2007).
13. T. Okada, H. Tanaka, A. H. Iwane, K. Kitamura, M. Ikebe and *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).
14. Y. Tsukasaki, K. Kitamura, K. Shimizu, A. H. Iwane, Y. Takai and *T. Yanagida. Role of multiple bonds between the single cell adhesion molecules, nectin and cadherin, revealed by high sensitive force measurements. Journal of Molecular Biology 367:996-1006, (2007).
15. Watanabe, T.M., T. Sato, K. Gonda and *H. Higuchi. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in a living cell using dual-focus imaging optics. Biochem. Biophys. Res. Comm. In press. (2007).
16. Watanabe, T.M. and *H. Higuchi. Stepwise Movements in Vesicle Transport of HER2 by Motor Proteins in Living Cells. Biophysical J. 92, 1-12, (2007).
17. H. Tada, *H. Higuchi, T. M. Wanatabe, and N. Ohuchi: In vivo Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice. Cancer Res. 2007 67: 1138-44.
18. *K. Sasaki, R. Kanada, and S. Amari. Efficiency of Energy Transduction of a Molecular Chemical Engine Journal of the Physical Society of Japan 76, 023003(1)-023003(4) (2007)
19. S. Li-Shishido, T. M. Watanabe, H. Tada, *H. Higuchi and N. Ohuchi. Reduction in nonfluorescence state of quantum dots on an immunofluorescence staining. Biochem. Biophys. Res. Comm. 351, 7-13, (2006).
20. S. Toba, T.M. Watanabe, L-Y Okimoto, Y.Y. Toyoshima and *H. Higuchi. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103, 5741-45 (2006)
21. A.H. Nguyen, V.T. Nguyen, Y. Kamio and H. Higuchi. Single-Molecule Visuarization of Enviroment-Sensitive Fluorophores Inserted into cell membranes by Staphylococcal gamma-hemolysin. Biochemistry 45, 2570-6 (2006)
22. M. Nishikawa, S. Nishikawa, A Inoue, A. H. Iwane, E. Katayama, *T. Yanagida and M. Ikebe. A unique mechanism for the processive movement of single-headed myosin-IX. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343: 1159-1164, (2006).
23. Y. Arai, A. H. Iwane, T. Wazawa, H. Yokota, Y. Ishii, T. Kataoka and *T. Yanagida. Dynamic polymorphism of Ras observed by single FRET is the basis for molecular recognition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343: 809-815.
24. T. Wazawa, Y. Ishizuka-Katsura, S. Nishikawa, A. H. Iwane and *S. Aoyama. Grafting of Poly (ethylene glycol) onto Poly (acrylic acid)-Coated Glass for a Protein-Resistant Surface. Anal. Chem. 78: 2549-2556, (2006).
25. M. Iwaki, H. Tanaka, A. H. Iwane, E. Katayama, M. Ikebe and *T. Yanagida. Cargo binding makes a wild-type single-headed myosin-VI move processively. Biophys. J. 90: 3643-3652, (2006).
26. Takashi Kamei, Seiji Kakuta and *Hideo Higuchi. Biased Binding of Single Molecules and Continuous Movement Of Multiple Molecules of Truncated Single-Headed Kinesin. Biophysical Journal, 88, 2068-77, (2005)
27. Nguyen HoaAnh and *Hideo Higuchi. Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. Nature Struct Mol Biol, 12,127-132, (2005)
28. *K. Sasaki. Molecular Chemical Engines: Pseudo-Static Processes and the Mechanism of Energy Transduction J. Phys. Soc. Jpn 74, 2973-80 (2005)
29. *K. Sasaki. Molecular Chemical Engines: Pseudo-Static Processes and the Mechanism of Energy Transduction Journal of the Physical Society of Japan 74, 2973-80 (2005)
30. Monma N, Nguyen VT, Kaneko J, Higuchi H and *Kamio Y. Essential Residues, W177 and R198, of LukF for Phosphatidylcholine-Binding and Pore-Formation by Staphylococcal

{gamma}-Hemolysin on Human Erythrocyte Membranes. J Biochem (Tokyo). 136:427-431(2004).
31. Uemura S, Higuchi H, Olivares AO, De La Cruz EM and *Ishiwata S. Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor. Nat Struct Mol Biol. 11:877-83, (2004).
32. Higuchi H, Bronner CE, Park HW and *Endow SA. Rapid double 8-nm steps by a kinesin mutant. EMBO J. 23:2993-9, (2004).
33. *Yanai, M. J.P. Butler, T. Suzuki. H. Sasaki and H. Higuchi. Regional rheological differences in locomoting neutrophils. Am. J. Physiol. 287,C603-611 (2004)

〔学会発表〕(計15件)
1. Higuchi, H.: Cargo Transport by Single Molecular Motors. The Biophysical Society's 53rd An-nual Meeting. Boston, USA. 2009. 2.
2. Higuchi, H.: Motility of single molecules of dynein, kinesin, and myosin in vitro and in cells. Symposium on the MESO CONTROL of the cells, by the cells, for the cells. Kyoto, Japan. 2009. 1.
3. Higuchi, H.: Molecular mechanism of dynein motility in vitro and cells. The 46th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Fukuoka, Japan. 2008.12.
4. Higuchi, H.: Imaging of stepwise motility of single motor molecules in living cells. 39th NIPS International Symposium & 7th OIB Symposium. Okazaki, Japan. 2008.11.
5. Higuchi, H.: Myosin, kinesin and dynein in vitro and cells. 2nd International Symposium on Bio-nanosystems. Tokyo, Japan. 2008.10.
6. Higuchi, H.: Step size and force generated by motor protein dynein. 236th National Meeting & Exposition of the American Chemical Society. Philadelphia, USA. 2008.8.
7. Higuchi, H.: Step size of dynein is determined by distances of a power stroke and fluctuation. Gordon Reserch Conferences. New Hampshire, USA. 2008. 6.
8. Higuchi, H.: Single molecule imaging of motor proteins in vitro and in vivo. Bio-Soft Matter Workshop. Tokyo, Japan. 2008.6.
9. Higuchi, H.: Step size and force generated by axonemal and cytoplasmic dynein. Biophysical society Discussion meeting. Alisoma, USA . 2006.10.
10. Higuchi, H. and T.M. Watanabe: Single molecule imaging of motor proteins in living cells. The 7th international conference on systems Biology. Yokohama, Japan. 2006.10.
11. Higuchi, H.: Introduction to the motor proteins. International symposium on Bio-nanosystems. Mastushima, Japan. 2006.9.
12. Higuchi, H.: Coordination of two single-headed cytoplasmic dyneins creates processive move-ment. Gordon Research Conference. New Hampshire, USA. 2006. 6.
13. Higuchi, H., T.M. Watanabe, H. Tada and N. Ohuchi: Nano-biology and nano-medicine on can-cer cells. Nano-Science and Technology for Medical Applications. Sendai, Japan. 2005.2.
14. Higuchi, H., T.M. Watanabe, H. Tada and N. Ohuchi: Nano-biology and nano-medicine on can-cer cells. Nano-Science and Technology for Medical Applications. Sendai, Japan. 2005.2.
15. Higuchi, H.: Biased Binding, Processive Steps and Oscillatory Movement of Single-headed Kinesin. Structural Insights into Kinesin Function. Washington, USA. 2004.12.

〔図書〕(計5件)
1. 樋口秀男 「生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」 羊土社 実験医学増刊 Vol.26 125-131, (2008.)
2. 樋口秀男 「単一量子ドットのバイオ・医療ナノイメージング」 Ohmsha ナノメディシン 52-63, (2008.2)
3. 樋口秀男 「量子ドットを用いたがん細胞の単一分子イメージング」 シーエムシー出版 量子ドットの生命科学領域への応用 176-185, (2007.8)
4. 樋口秀男 「生体分子モーター」 NTS出版 非侵襲・可視化技術ハンドブック 732-737, (2007.6)
5. 樋口秀男 「分子モーター概論」 朝倉書店 生物物理学ハンドブック

340-342，(2007.4)

〔産業財産権〕
○取得状況（計 6 件）

1． 名称：光学装置及び結像方法
発明者：渡邉朋信，樋口秀男
権利者：同上
種類：特許権
番号：2006-112946
取得年月日：2006 年 4 月 17 日
国内外の別：国内

2． 名称：光学装置
発明者：渡邉朋信，樋口秀男，佐藤崇
権利者：同上
種類：特許権
番号：2005-336613
取得年月日：2005 年 11 月 22 日
国内外の別：国内

3． 名称：位置解析方法及び位置解析装置
発明者：渡邉朋信，樋口秀男
権利者：同上
種類：特許権
番号：2005-307917
取得年月日：2005 年 10 月 24 日
国内外の別：国内

4． 名称：がん細胞への選択的作用組成物および治療用レーザー照射装置
発明者：渡邉朋信，樋口秀男
権利者：同上
種類：特許権
番号：2005-163399
取得年月日：2005 年 6 月 03 日
国内外の別：国内

5． 名称：顕微鏡ステージ、および、焦点位置計測装置と共焦点顕微鏡システム
発明者：渡邉朋信，樋口秀男
権利者：同上
種類：特許権
番号：2005-128871
取得年月日：2005 年 4 月 27 日
国内外の別：国内

6． 名称：単粒子三次元位置追跡方法
発明者：渡邉朋信，樋口秀男
権利者：同上
種類：特許権
番号：2004-303004
取得年月日：2004 年 10 月 18 日
国内外の別：国内

〔その他〕
（ホームページ）
http://nanobio.phys.s.u-tokyo.ac.jp/NanoSystem/

（公開発表）
1． 2004 年 1 月 7-9 日　第 2 回全体・総括班会議（大阪府，生体運動合同班会議）
2． 2005 年 1 月 6-8 日　第 3 回全体・総括班会議（東大，生体運動合同班会議）
3． 2006 年 1 月 6-8 日　第 4 回全体・総括班会議（東大，生体運動合同班会議）
4． 2006 年 9 月 1-3 日　第 5 回全体・総括班会議　国際シンポジウム(宮城県松島町)
5． 2007 年 1 月 6-8 日　第 6 回全体・総括班会議（金沢市，生体運動合同班会議）
6． 2008 年 10 月 29 日-11 月 1 日　第 7 回全体・総括班会議　国際シンポジウム(東大)
7． 2009 年 1 月 9-10 日　第 8 回全体・総括班会議（東大，生体運動合同班会議）

６．研究組織
(1)研究代表者
樋口　秀男（HIGUCHI HIDEO）
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：90165093

(2)研究分担者
佐々木　一夫（SASAKI KAZUO）
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：50205837

岩根　敦子（IWANE ATSUKO）
大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授
研究者番号：30252638

(3)連携研究者
なし