

機関番号：17104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570155

研究課題名 (和文) 力発生中のミオシンの電子顕微鏡による観察技術の開発

研究課題名 (英文) Development of observation technology with electron microscope of force-generating myosin

研究代表者

安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：60251394

研究成果の概要 (和文)：

力発生中のミオシンを電子顕微鏡法で開発するための観察技術の開発を目指した。一つは、磁場によりアクチンに力をかけ、ミオシンフィラメントとの間での力発生している状態を観察することを目指し、基礎的な観察は可能となった。今ひとつは、単粒子及び、電子線トモグラフィ法を使った単一ミオシン頭部とアクチンフィラメントとの相互作用状態の電子顕微鏡法による観察方法、特に、三次元構造解析のための基礎技術を開発した。その結果、アクチン及びアクチンミオシン硬直複合体の高分解能三次元像を得ると共に、アクチンフィラメントに結合したミオシン頭部の3次元像を得ることができた。

研究成果の概要 (英文)：

We tried to develop observation technology with electron microscopes of force generating myosin. One necessary technology is to observe the active interaction between a myosin filament and an actin filament during force generation. The actin filament could be, in success, pulled by a magnetic bead, which was linked to the actin covalently. The other is to observe three-dimensional structure of single myosin head and actin filament by electron cryo-microscopy. We developed new three-dimensional reconstruction programs for single particle analysis and electron tomography of frozen-hydrated specimens and obtained highly-resolved 3D map of actin filaments/actomyosin complexes and preliminary 3D maps of single head myosin bound to a single actin filament.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,080,000	4,780,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：運動・輸送、ミオシン、筋肉、アクチン、電子顕微鏡、力発生

1. 研究開始当初の背景

ミオシン・アクチンは筋収縮や細胞運動など、真核生物における運動、形態形成を支える重要な分子モーターの一つである。この分子モーターの機能発現の分子メカニズムを知るためには、ミオシン及びアクチンの構造、

特に、力発生時の構造と機能相関を理解することが重要である。

研究開始当時において、アクチンやミオシンのモノマーの単独の構造は、X線結晶解析法やすでに報告されていた。また、電子顕微鏡法において、アクチン・ミオシンのナノメ

の構造を理解することは重要である。現在、モデリングを継続して実施している。

その中で、アクチンと結合した場合には、ミオシンのもつ50Kドメインの構造は、これまで報告があるような、サブドメインレベルの剛体的な変化だけではないことがわかった。すなわち、そのサブドメインの中でも、 α ヘリックスの位置が大きくずれるような変化が起きていることが分かった。今後、原子モデリングを通して、メカニズムにつなげることを明確にしていく予定である。

次に、単独で、アクチンフィラメントに結合したミオシン頭部の3次元像を得るための技術開発を行った。アクチンフィラメントの構造をテンプレートとして、参照画像有りの単粒子解析法を適用した。その結果、アクチンフィラメントに対して、一分子のミオシンが結合していると考えられる密度を得ることに成功した。まだ、密度が十分でないため、詳細な議論は出来なかった。今後、さらに観察試料の数を増やし、手法を検討する。

最後に、今回開発してきた電子顕微鏡法の改善(Yasunaga & Wakabayashi, JEM, 2008)及び構造解析法の開発を他の試料に対しても適用した。その結果、ダイニン(Takazaki, et al., Cytoskeleton, 2010; Liu et al., Eukaryotic Cell, 2008)、アクチントロポミオシン複合体(Murakami et al., ProNAS, 2008)などの構造解析に成功し、学術誌に報告することができた。

以上のことから、目的となる力発生時のミオシンの構造解析のための基礎的な技術開発ができたと考えている。

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7件)

④Murakami, K., Yasunaga, T., Noguchi, T.Q.P., Gomibuchi, Y., Ngo, K.X., Uyeda, T.Q.P., and Wakabayashi, T.: Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release, *Cell*, 143:2, 275-287 (2010) (査読有)

②Takazaki H., Liu Z., Jin M., Kamiya R., and Yasunaga T.: Three Outer Arm Dynein Heavy Chains of Chlamydomonas reinhardtii Operate in a Coordinated Fashion Both *In Vitro* and *In Vivo*, *Cytoskeleton*, 67:7 466-476 (2010) (査読有)

③Kobayashi H., Azuma R., and Yasunaga T.: Expression of excess receptors and negative feedback control of signal pathways are required for rapid activation and prompt cessation of signal transduction, *Cell Communication and Signaling* 7:3 (2009) (03 Mar 2009)

<http://www.biosignaling.com/content/7/1/3> (査読有)

④Ueno H., Yasunaga T., Shigyoji, C. and *Hirose K : Dynein pulls microtubules without rotating its stalk, *ProNAS*, 105, 19702-19707 (2008) (査読有)

⑤Liu Z., Takazaki H., Nakazawa Y., Sakato M., Yagi T., Yasunaga T., King S.M., and *Kamiya R.: Partially functional outer arm dynein in a novel Chlamydomonas mutant expressing a truncated γ heavy chain, *Eukaryotic Cell*, 7, 1136-1145 (2008) (査読有)

⑥Murakami K., Stewart M., Nozawa K., Tomii K., Kudou N., Igarashi N., Shirakihara Y., Wakatsuki S., Yasunaga T., and Wakabayashi T.: Structural basis for tropomyosin overlap in thin (actin) filaments and the generation of a molecular swivel by troponin-T., *ProNAS*, 105(20), 7200-5 (2008) (査読有)

⑦Yasunaga, T., Wakabayashi, T.: Evaluation of a 2k CCD camera with an epitaxially-grown CsI scintillator for recording energy-filtered electron cryo-micrographs., *Journal of Electron Microscopy*, 57(3), 101-112 (2008) (査読有)

[学会発表] (計41件)

1. 山下理沙, 新谷 優, 安永卓生, 「ミオシンのUP/DOWN 構造遷移バイアスに関する拘束付きMD法による検証」、生体運動合同班会議、大阪市立大学、大阪、2011年1月7-9日

2. 我妻竜三、小屋迫光太郎、安永卓生、「電子線トモグラフィーにおける反復再構成手法—技術開発のポイント」、日本顕微鏡学会生体構造解析分科会、研究討論会 (X)、湯沢ニューオータニホテル、湯沢、2010年12月27-28日
3. 我妻竜三、小屋迫光太郎、安永卓生、「SIRT electron tomography system: design & development」、2010年日本バイオインフォマティクス学会年会、九州大学、福岡、2010年12月13-15日
4. 我妻竜三、小屋迫光太郎、安永卓生、「SIRTシステムの開発」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010年12月4日
5. 金明月、安永卓生、「クライオ電子線トモグラフィーを用いた金属標識へのアプローチ」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010年12月4日
6. 山下理彩、中尾亮太、瀧本雄介、坂本寛、安永卓生、「電子顕微鏡画像に基づいた原子モデル構築のための支援ツールの開発」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010年12月4日
7. 渡邊慶太、小川佳織、安永卓生、「クライオ電子顕微鏡法の低分子量タンパク質の3次元再構成法への挑戦」、日本顕微鏡学会九州支部総会、九州大学、福岡、2010年12月4日
8. 渡邊慶太、小川佳織、安永卓生、「クライオ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体の可視化」、可視化情報学会全国講演会、国分シビックセンター、霧島、2010年10月7-8日
9. 山下理沙、瀧本雄介、中尾亮太、坂本寛、安永卓生、「電子顕微鏡画像解析のための GUI 環境を有した新規分子可視化ツールの開発」、可視化情報学会全国講演会、国分シビックセンター、霧島、2010年10月7-8日
10. 我妻竜三、小屋迫光太郎、安永卓生、電子線トモグラフィーの高速化:繰り返す再構成に対する GPGPU の活用、日本生物物理学会年会、東北大学 (仙台市)、2010年9月20-22日
11. 鶴崎聖也、安永卓生、「電子顕微鏡を用いたトモグラフィー画像解析システムの検証」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010年9月20-22日
12. 太田興希、高崎寛子、安永卓生、「少数の傾斜面像からの3次元像構築によるタンパク質ポリモルフィズムの検出」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台市、2010年9月20-22日
13. 山下理沙、中尾亮太、坂本寛、安永卓生、「擬似原子モデル構築のための GUI を持った支援ツールの開発」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010年9月20-22日
14. 塚田祥弘、若林健之、安永卓生、「硬直状態におけるアクチン-ミオシン硬直複合体の三次元構造」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010年9月20-22日
15. 日高裕明、峰寛、伊藤光二、山本啓一、安永卓生、「クライオ電子顕微鏡法による車軸藻ミオシンの高速移動分子メカニズムの解明」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010年9月20-22日
16. 渡邊慶太、小川佳織、安永卓生、「小さい生体分子複合体のためのクライオ電子顕微鏡法の挑戦」、第48回日本生物物理学会年会、東北大学、仙台、2010年9月20-22日
17. 吉竹純一、岩崎憲治、安永卓生、「ランダムコンカルティルト法によるタンパク質構造

解析の半自動化」、第 48 回日本生物物理学会
年会、東北大学、仙台市、2010 年 9 月 20-22
日

18. 安永卓生、「単粒子解析法に向けた各種ソ
フトウェアの開発（指定講演）」、日本顕微鏡
学会年会第 66 回学術講演会、名古屋国際会議
場、名古屋市、2010 年 5 月 23-26 日

19. 我妻竜三、小屋迫光太郎、金名月、高崎寛
子、大田興希、白川圭太、塚田 祥弘、鶴崎聖
也、吉竹純一、大熊康夫、日高裕章、山下理
沙、渡邊慶太、安永卓生、「Eosプラットフォーム開発と利用環境」、日本顕微鏡学会年会
第66回学術講演会、名古屋国際会議場、名古
屋、2010年5月23-26日

20. Yasunaga T., Azuma R., Jin M.,
「Electron tomography using our
development software, Eos」, China-Japan
3D-EM Forum 2010, Beijing, China, January
4-7 2010

21. 塚田祥弘、若林健之、安永卓生、「アクチ
ン-ミオシン硬直複合体の高分解能 3 次元像
の獲得」、日本顕微鏡学会九州支部会、九州
工業大学、北九州市、2009 年 12 月 6 日

22. 我妻竜三、金 明月、高崎寛子、富永彰人、
福地弘晃、大田興希、白川圭太、塚田祥弘、
鶴崎聖也、吉竹純一、安永卓生、「Eos プラ
ットフォーム：GPGPU ならびに立体視テクノ
ロジー」、日本顕微鏡学会九州支部会、九
州工業大学、北九州市、2009 年 12 月 6 日

23. 峰寛、伊藤浩二、山本啓一、安永卓生、「電
子顕微鏡一三次元再構成を用いた車軸藻ミオ
シンの構造解析」、第 4 6 回日本生物物理学会、
福岡国際センター、2 0 0 9 年 1 2 月 3 日～
5 日

24. 新名人士、谷口香苗、西野有里、岩崎憲治、
高木淳一、宮澤淳夫、光岡薫、安永卓生、「多

種の処理ツールの統合による半自動 3 次元再
構成システムの開発」、第 4 6 回日本生物物理
学会、福岡国際センター、2 0 0 9 年 1 2 月
3 日～5 日

25. 瀧本雄介、安永卓生、「2 + 3 次元画像を
用いた、可視化・可聴化による特徴像の解析
補助ツールの開発 2」、第 4 6 回日本生物物
理学会、福岡国際センター、2 0 0 9 年 1 2
月 3 日～5 日

26. 村上健次、安永卓生、若林健之、「アクチ
ンの吐露歩ミオシン結合モチーフについて」、
第 4 6 回日本生物物理学会、福岡国際センタ
ー、2 0 0 9 年 1 2 月 3 日～5 日

27. 安永卓生、岩崎憲治、宮澤淳夫、「電子顕
微鏡画像処理システム Eos2 の構築」、第 4 6
回日本生物物理学会、福岡国際センター、2
0 0 9 年 1 2 月 3 日～5 日

28. 安永卓生、「情報工学が切り拓く新しい世
界 ～生物が創り出すナノ世界探訪」、2009 九
州 PC カンファレンス・基調講演、九州工業大
学、2009 年 11 月 14 日～15 日

29. Tsukada Y., Wakabayashi T., Yasunaga T.,
「Obtainment of high resolution 3D map of
actin-myosin rigor complex」、第 47 回生物
物理学会年会、アクティとくしま・徳島文理
大学徳島キャンパス、徳島、2009 年 10 月 30
日～11 月 1 日

30. Yoshitake J., Iwasaki K., Yasunaga T.
「Semiautomated analysis of protein
structure by the random conical tilting
method」、第 47 回生物物理学会年会、アクテ
ィとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス、
徳島、2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日

31. Tsurusaki S., Yasunaga T., 「Tests of
the tomography system using a transmission
electron microscope」、第 47 回生物物理学

会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009年10月30日~11月1日

32. Azuma R., Jim M., Takazaki H., Tominaga A., Fukuchi H., Ohta K., Shirakawa K., Tsukada Y., Tsurusaki S., Yoshitake J., Yasunaga T., 「Development of Eos: efficient 3D reconstruction of biomolecules from electron micrographs by enabling GPU computing and use of stereoscopic devices」, 第47回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009年10月30日~11月1日

33. Ohta K., Yasunaga T., 「Protein polymorphism detection using subtomographic maps and structural classification」, 第47回生物物理学会年会, アクティとくしま・徳島文理大学徳島キャンパス, 徳島, 2009年10月30日~11月1日

34. 安永卓生, 「単粒子解析とトモグラフィー」, 第25回分析電子顕微鏡討論会, 幕張メッセ, 2009年9月1日~2日

35. 安永卓生, 瀧本雄介, 岩崎憲治, 宮澤淳夫, 「画像処理ソフトウェア Eos のツール統合による発展」, 第65回日本顕微鏡学会学術集会, 仙台国際センター, 2009年5月26日~29日

36. 安永卓生, 「クライオ電子顕微鏡を用いたモーター分子の構造解析」, 生体運動合同班会議, 東京大学, 2009年1月11日

37. 安永卓生, クライオ電子顕微鏡法の現状と将来, 顕微鏡学会・九州支部会, 久留米大学, 2008年12月6日

38. 峰寛, 安永卓生, 「電子顕微鏡-3次元再構成法を用いた車軸藻ミオシンの反応メカニズムの解明」, 顕微鏡学会・九州支部会, 久留

米大学, 2008年12月6日

39. Nishino Y., Yasunaga T. and Miyazawa A., 「A new protein labeling technique using genetically encoded metallothionein tag for electron microscopy」, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008

40. Yasunaga T., Goto T., Imamura M., Matuura A., Murayama R., Niina H., Takimoto Y., Iwasaki K. and Miyazawa A., 「Development of Electron Tomography Systems integrated with our Developed Image Analysis Environment, Eos」, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference, Jeju, Korea, 2-7 November 2008

41. 安永卓生, 「電子顕微鏡でみえるものはなにか」, P&P先端技術講演会, 九州大学, 2008年10月16日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp> (安永)

6. 研究組織

研究代表者

安永卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院

・教授

研究者番号: 60251394