

Development of a highest-speed atomic force microscope and elucidation of the nano-structural dynamics of biological Molecular motors

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ando, Toshio メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034716

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



最高速AFMが解き明かす生物分子モーターの ナノ構造ダイナミクス

(課題番号：15101005)

平成15年度～平成19年度科学研究費補助金
(基盤研究(S))研究成果報告書

平成20年3月

金沢大学附属図書館



1300-04369-5

表者 安藤 敏夫
学自然科学研究科 教授)

最高速 A F M が解き明かす生物分子モーターの
ナノ構造ダイナミクス

(課題番号：15101005)

平成 15 年度～平成 19 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (S)) 研究成果報告書

金沢大学附属図書館

平成 20 年 3 月



1300-04369-5

研究代表者 安藤 敏夫

金沢大学自然科学研究科 教授

著 者 寄贈

目次

1. はじめに	2
*研究組織 *研究経費	3
2. 研究発表	3
(1) 論文	3
(2) 研究発表 (招待講演)	4
(一般講演・ポスター発表)	9
(図書)	14
3. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況	15
4. 解説	17
(1) ミオシン V の機能動態撮影	17
1.はじめに	
1.1. Myosin と Actin	17
1.2. Myosin V の構造	17
1.3. Myosin V の運動の分子メカニズム	18
2. Myosin V-Actin Filament の動態の高速 AFM 観察	
2.1. 基板に吸着した Myosin V で駆動される Actin Filament のすべり運動	19
2.2. Actin Filament との Myosin V の結合様式の AFM 観察	20
2.3. 2 足歩行の高速 AFM 観察	22
2.4. Actin Filament に結合する Myosin V 分子の配置	23
2.5. 2 足歩行のモデル	24
(2) シャペロニン GroEL・GroES の結合・解離反応のイメージング	24
1.はじめに	24
2. GroEL-GroES 反応サイクルの高速 AFM 観察	
2.1. 試料系のセットアップ	26
2.2. 高速 AFM 観察と反応スキーム	26
(3) Dynein のイメージング	29
1.はじめに	29
2. Dynein C の AFM イメージング	29
3. 微小管の調製	29
4. 双頭 Dynein のプロセッシブ運動の観察	30
5. 謝辞	32
6. 発表論文リプリントなど	33

1 はじめに

ダイナミクスはタンパク質の重要な属性のひとつである。タンパク質分子機械の機能は、ダイナミックな構造変化と他の分子とのダイナミックな相互作用によって生ずる。様々なタンパク質がある中で、力と運動の発生を担うモータータンパク質は、ダイナミクスそのものが機能とも言えるタンパク質であり、ダイナミクスの解明が機能メカニズムに直結する。一方、超えがたい技術的困難により、タンパク質の機能メカニズムの解明において最も不足している重要な情報もダイナミクスである。その技術的困難を打破して、高い空間分解能と有効な時間軸を併せ持つ新しい顕微鏡を開発する必要がある。

この基盤研究（S）の開始以前に、我々は世界に先駆けて高速 AFM を開発していたが、その性能はタンパク質の機能メカニズム解明に資するほどには十分でなかった。本研究の目標は、第一に、この第一世代高速 AFM の性能をタンパク質のナノ機能動態を捉えられるレベルに向上させること、第二に、その性能向上により、モータータンパク質を中心にいくつかのタンパク質の機能解明に直結する映像データを得て、この新しい手法の有効性を実証することであった。この5年間にわたる研究により、上記の目標は十分に達成された。当初目指した装置性能の向上を果たすとともに、当初予定していなかった高速位相コントラストイメージングという新しい機能も実現した。この性能向上と装置のオペレーションや試料側の工夫により、ミオシンVの歩行運動、GroEL-GroES 間の反協同的相互作用といった生理機能動態を捉えることに成功し、それらの分子メカニズム解明に迫ることができた。また、タンパク質の機能動態ばかりでなく、タンパク質2次元結晶中の点欠陥の運動やタンパク質の非構造領域の可視化・同定といった従来の手法では扱えない問題にも適用できることを実証した。

本成果報告書では、既に論文になった内容、現在印刷中あるいは投稿中の論文にある内容は、それらの論文と原稿を報告に代えさせて頂き、現在執筆中あるいは準備中の内容については、解説のなかで記載した。

* 研究組織

研究代表者 安藤 敏夫 (金沢大学自然科学研究科 教授)

* 研究経費

(単位 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	16,900	5,070	21,970
平成 16 年度	16,300	4,890	21,190
平成 17 年度	14,800	4,440	19,240
平成 18 年度	11,100	3,330	14,430
平成 19 年度	11,100	3,330	14,430
総計	70,200	21,060	91,260

2 研究発表

(1) 論文 (全 18 件)

1. D. Yamamoto, T. Uchihashi, N. Kodera, and T. Ando, Anisotropic diffusion of point defects in two-dimensional crystal of streptavidin observed by high-speed atomic force microscopy, *Nanotechnology* (in press).
2. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D Yamamoto, M. Taniguch, A. Miyagi, and H. Yamashita
Invited Review: High-speed AFM and nano-visualization of biomolecular processes. *Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol.* 456: 211-225 (2008).
3. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, D Yamamoto, M. Taniguch, A. Miyagi, and H. Yamashita
Review: High-speed atomic force microscopy for observing dynamic biomolecular processes, *J. Mol. Recognit.* 20: 448-458 (2007).
4. K. Shinohara, N. Kodera, and T. Ando, Single molecular imaging of a micro-Brownian motion and a bond dcission of a dupramolecular chiral π -conjugated polymer as a molecular bearing driven by thermal fluctuations. *Chem. Lett.* 36: 1378-1379 (2007).
5. H. Yamashita, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, D. Yamamoto, and T. Ando, Tip-sample distance control using photothermal actuation of a small cantilever for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 78:083702 (5 pages) (2007).
6. S. Morita, H. Yamada, and T. Ando, Japan AFM roadmap 2006, *Nanotechnol.* 18:084001(10pp) (2007).

7. T. Uchihashi, H. Yamashita, and T. Ando, Fast phase imaging in liquids using a rapid scan atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.* 89, 213112 (2006).
8. N. Kodera, M. Sakashita, and T. Ando, A dynamic PID controller for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 77(8): 083704 (7 pages) (2006).
9. H. Koide, T. Kinoshita, Y. Tanaka, S. Tanaka, N. Nagura, G. Meyer zu Hörste, A. Miyagi, and T. Ando, Identification of the specific IQ motif of myosin V from which calmodulin dissociates in the presence of Ca^{2+} . *Biochemistry* 45(38):11598-11604 (2006).
10. M. Yokokawa, C. Wada, T. Ando, N. Sakai, A. Yagi, S.H. Yoshimura and K. Takeyasu, Fast-scanning atomic force microscopy reveals the ATP/ADP-dependent conformational changes of GroEL. *EMBO J.* 25:4567-4576 (2006).
11. M. Yokokawa, S.H. Yoshimura, Y. Naito, T. Ando, A. Yagi, N. Sakai, K. Takeyasu, Fast-scanning atomic force microscopy reveals the molecular mechanism of DNA cleavage by ApaI endonuclease. *IEE Proc Nanobiotechnol.* 153(4):60-66 (2006).
12. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, and M. Sakashita, High-speed atomic force microscopy for studying dynamic behavior of protein molecules at work. *Jpn. J. Appl. Phys.* 45(3B):1897-1903 (2006).
13. T. Uchihashi, N. Kodera, H. Ito, H. Yamashita, and T. Ando, Feed-forward compensation for high-speed atomic force microscopy imaging of biomolecules. *Jpn. J. Appl. Phys.* 45(3B):1904-1908 (2006).
14. T. Ando, T. Uchihashi, N. Kodera, A. Miyagi, R. Nakakita, H. Yamashita, & K. Matada, High-speed aFM for studying the dynamic behavior of protein molecules at work. *e-J. Surf. Sci. Nanotech.* 3:384-392 (2005).
15. N. Kodera, H. Yamashita and T. Ando, Active damping of the scanner for high-speed atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 76:053708 (5pages) (2005).
16. 15. N. Kodera, T. Kinoshita, T. Ito, and T. Ando, High-resolution imaging of myosin motor in action by a high-speed atomic force microscope. *Adv. Exp. Med. Biol.* 538:119-127 (2003).
17. R. Ishikawa, T. Sakamoto, T. Ando, S. Higashi-Fujime and K. Kohama, Polarized actin bundles formed by human fascin-1: Their sliding and disassembly on myosin II and myosin V in vitro. *J. Neurochem.* 87:676-685 (2003).
18. T. Ando, N. Kodera, Y. Naito, T. Kinoshita, K. Furuta, and Y.Y. Toyoshima, A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Chem. Phys. Chem* 4:1196-1202 (2003).

(2) 学会発表

<招待講演> (国際会議) (全 22 件)

1. T. Ando, American Physics March Meeting (New Orleans, March 10-14, 2008) Symposium on High Bandwidth Dynamic Atomic Force Microscopy, "High-speed AFM for studying dynamic biomolecular processes"
2. T. Ando, X Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 15-18, 2008) "Visualization of dynamic biomolecular processes by high-speed AFM".
3. T. Ando, 9th International Conference on Atomically Controlled Surfaces, Interfaces and Nanostructures (Tokyo, Japan, November 11-15, 2007) "High-speed atomic force microscopy for visualizing biomolecular processes."
4. T. Ando, Atomic Level Characterization '07 International Conference (Kanazawa, Japan, October 28-November 2, 2007) "Dynamic biomolecular processes dissected by high-speed AFM"
5. T. Ando, 6th International Workshop on Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, October 9, 2007) "High-speed AFM for visualizing biomolecular processes."
6. T. Ando, 13th International Conference on Surface Science (ICSS-13), International Conference on Nanoscience and Technology 2007 (ICN+T 2007) (Stockholm, Sweden, July 2-6, 2007) "Development of high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecule".
7. T. Ando, International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, Korea, June 11-14, 2007) "High-speed atomic force microscopy for visualizing dynamic biomolecular processes"
8. T. Ando, AFM BioMed Conference 2007 (Barcelona, Spain, April 19-21, 2007) "Dynamic behaviors of proteins at work captured by high-speed atomic force microscopy".
9. T. Ando, IX Linz Winter Workshop (Linz, Austria, February 3-5, 2007) "Protein dynamics captured by high-speed AFM".
10. T. Ando, 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, January 16-18, 2007) "Instrumentation of high-speed AFM and observation of protein dynamics".
11. T. Ando, 9th International Conference on Non-contact Atomic Force Microscopy (Kobe, July 16-20, 2006) "Rapid scan atomic force microscopy".
12. T. Ando, Symposium "Single Molecule Biology" in the 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (Kyoto, June 19, 2006) "High-speed AFM and its potential to explore nano-biology".
13. T. Ando, SPM 2006 Conference (Scanning Probe Microscopy, Sensors & Nanostructures) (Montpellier-La Grande Motte, France, June 3-6, 2006) "High-speed AFM".
14. T. Ando, Okinawa Institute Science & Technology International Workshop on "Single Molecule Analysis" (Bankoku Shinryokan, Okinawa, Japan, April 16-22, 2006) "Rapid scan atomic force microscopy".
15. T. Ando, International Symposium of Surface Science and Nanotechnology 4 (the Omiya Sonic

- Center, Omiya, Japan, Nov. 14-17, 2005), “High-speed AFM for studying the dynamic behavior of protein at work”.
16. T. Ando, International Conference “Seeing at the Nanoscale III” at the University of California, Santa Barbara, 2005 年 8 月 13-16 日, “High-speed AFM and its potential to explore nano-biology”
 17. T. Ando, STM '05 (13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/ Spectroscopy and Related Techniques (Sapporo, 2005 年 7 月), “High-speed AFM for studying the dynamic behavior of protein molecules at work.”
 18. T. Ando, Symposium “Muscle Contraction and Cell Movement” at the University of Colima, Colima, Manzanillo, Mexico, 2005 年 1 月 20-26 日, “Dynamic behavior of myosin V and reconstructed HMM studied by Single molecule assay and high-speed AFM”
 19. T. Ando, Oxforde-Kobe Seminar: UK-Japan Collaborations in Bionanotechnology (Kobe Institute, July 1-3, 2007), “High-speed atomic force microscope.”
 20. T. Ando, MIT Seminar (Mechanical/Biological Engineering) (Boston, February 20, 2004), “High-speed atomic force microscopy for viewing protein molecules at work.”
 21. T. Ando, The 19th International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology (Nara, December 2-3, 2003), “Nanometer-scale dynamic behavior of motor proteins revealed by high-speed AFM”
 22. T. Ando, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (Sydney, August 28, 2003), “Motor proteins at work Imaged by high-speed atomic force microscopy.”

<招待講演> (国内会議) (全36件)

1. 安藤敏夫、新潟大学物理学科コロキウム 「生体分子の振る舞いを直接見る高速 AFM」, 2007 年 12 月 4 日 (12 月 3-5 日の物理学科集中講義「生物物理学」とともに)
2. 安藤敏夫、分析化学会第 56 年会、特別シンポジウム「ナノ分析・計測化学が変える バイオ研究」, 「タンパク質 1 分子のリアルタイム AFM イメージング」、徳島大学工学部、2007 年 9 月 21 日
3. 安藤敏夫、応用物理学会秋の年会、第 29 回応用物理学会論文賞受賞記念講演、「生体分子のダイナミクスを可視化する高速 AFM」、北海道工業大学、2007 年 9 月 4 日
4. 安藤敏夫、日本海イノベーション会議第 1 回フォーラム、「分子の動きを高速でとらえる顕微鏡の開発」、北国新聞会館 20 回ホール、2007 年 7 月 28 日
5. 安藤敏夫、ナノ粒子研究会第 39 回講演会「ナノ計測技術の最前線とナノ粒子」、「高速原子間力顕微鏡の開発と生命科学への応用」、航空会館 (東京都港区西新橋) 2007 年 5 月 11 日
6. 安藤敏夫、2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会 シンポジウム「SPM による液中観察の新展開」、「生体分子の動態を撮影する高速 SPM」、青山学院大学相模原キャンパス 2007 年 3 月 28 日

7. 安藤敏夫、第 44 回茅コンファレンス「物性研究における計測技術の最前線～観る技術は今～」:「生体分子ナノダイナミクス撮影装置－高速 AFM－」裏磐梯ロイヤルホテル、2006 年 9 月 8-11 日
8. 安藤敏夫、新世代研究所第 3 回バイオ SPM 研究会 「細胞測定・観察（高感度・高速 AFM）」 新潟市岩室温泉（ゆもたや） 2006 年 12 月 20 日
9. 安藤敏夫、大阪大学生命機能研究科 研究交流会セミナー「高速 AFM で捉えるタンパク質のナノ機能動態」2006 年 12 月 13 日
10. 安藤敏夫、日本ビーコ SPM 新技術セミナー「高速 AFM イメージング技術の現状と世界の動向」日本ビーコ東京本社、2006 年 10 月 18 日
11. 安藤敏夫、文部科学省第一回ナノバイオスクール「生命現象を知る」:「バイオ（高速）原子間力顕微鏡」、人材開発センター富士吉田研修所、2006 年 8 月 24-26 日
12. 安藤敏夫、未踏科学技術協会バイオ・ナノテクフォーラム 先端課題メンタリング講座シリーズ 3「イノベーションのためのナノマテリアル・ナノプロセス講座」(全 4 回)第 1 回:「生体分子のナノダイナミクス高速撮影装置の開発～動作中のタンパク質の動画観察～」、東京虎ノ門未踏科学技術協会会議室、2006 年 8 月 10 日
13. 安藤敏夫、文部科学省科学研究補助金特定領域「バイオ操作」第 3 回公開シンポジウム、名古屋大・野依学術交流館ホール、2006 年 6 月 30 日、特別講演「高速 AFM の開発 ～生体分子のナノ動態撮影～」
14. 安藤敏夫、日本化学会「可視化研究の最前線」講演会、2006 年 6 月 28 日、日本化学会 7 階ホール・東京御茶ノ水、「生体分子のナノ動態を撮影する高速 AFM」
15. 安藤敏夫、文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクト第 3 回分野横断スクール「ナノバイオスクール:生体細胞を観る」、2006 年 1 月 16～17 日、東京コンファレンスセンター・品川、「生体分子の活動を観る高速 AFM の現状と今後の展開」
16. 安藤敏夫、特定領域「生体超分子構造」第 2 回公開シンポジウム 生体超分子－構造・機能解明への果敢なる挑戦、2005 年 12 月 12～13 日、KKR 金沢、特別講演「生体分子・超分子のダイナミクス観察を可能にする高速 AFM」
17. 安藤敏夫、バイオイメージング学会 第 14 回大会、2005 年 10 月 26 日～28 日、東京大学農学部弥生講堂、「高速 AFM が切り拓く新しいタンパク質研究の可能性」
18. 安藤敏夫、表面分析研究会 PSA-05, 2005 年 10 月 17 日～18 日、石川県音楽堂、「高速 AFM」
19. 安藤敏夫、マイクロビームアナリシス第 141 委員会 第 120 回研究会、2005 年 6 月 9 日～10 日、淡路島夢舞台国際会議場、「高速 AFM の開発とナノバイオロジーへの展開」
20. 安藤敏夫、日本顕微鏡学会第 61 回学術講演会 シンポジウム「原子間力顕微鏡の新展開」指定講演、つくば国際会議場、2005 年 6 月 1 日、「高速 AFM による生体分子のナノダイナミクス撮影」

21. 安藤敏夫、日本薬学会年会シンポジウム「新たな生命科学分野を切り拓く分子イメージング」東京臨海副都心、2005 年 3 月 29 日、「高速 AFM が切り拓く新しいタンパク質研究の可能性」
22. 安藤敏夫、日本生物物理学会第 42 回年会（京都）シンポジウムシンポジウム「ナノバイオエンジニアリングの基礎としての生物物理学」京都国際会議場、2004 年 12 月 13 - 15 日、「高速原子間力顕微鏡が拓く新しいナノバイオロジーの可能性」
23. 古寺哲幸、宮城篤、前田大輔、榊原斉、大岩和弘、安藤敏夫、日本生物物理学会第 42 回年会シンポジウム「分子モーター研究の最新潮流」、京都国際会議場、2004 年 12 月 13 - 15 日、「高速 AFM によるダイニン・ミオシン V のダイナミクス観察」
24. 安藤敏夫、特許庁研修講義「高速原子間力顕微鏡」 2004 年 12 月 8 日 東京 特許庁
25. 安藤敏夫、第 3 回北陸ポストゲノム研究フォーラム 金沢大癌研究所 2004 年 11 月 30 日 「高速 AFM が拓く新しい分子生命科学の可能性」
26. 安藤敏夫、日本顕微鏡学会 シンポジウム（名古屋大学）2004 年 11 月 8-9 日、「高速原子間力顕微鏡で動く分子を見る」
27. 安藤敏夫、名古屋大学工学部 VBL シンポジウム「生体高分子の 1 分子イメージングと構造の物性と機能」、2004 年 10 月 17-18 日、「生物分子モーターのナノ構造ダイナミクス」
28. 安藤敏夫、応用物理学会 薄膜表面分科会企画シンポジウム「カンチレバー技術の最前線 ー作成から応用までー」招待講演「生体分子の高速 AFM 観察」2004 年 9 月 1 日 東北学院大
29. 安藤敏夫、レーザー顕微鏡研究会（理化学研究所、2004 年 7 月 1-2 日）「特別講演：高速 AFM が拓く新しい生体分子研究」
30. 安藤敏夫、熊本大学拠点形成研究 B「原子レベルの生命機能と細胞システムへの展開」主催ミニシンポジウム「蛋白質の構造と動きを見る」（熊本大学、2004 年 3 月 9 日）「蛋白質の動きを観察する高速原子間力顕微鏡」
31. 安藤敏夫、日本学術振興会 第 167 委員会セミナー（東京工業大学、2004 年 1 月 29,30 日）「高速原子間力顕微鏡（生体分子のナノダイナミクス撮影装置）の最近の展開」
32. 安藤敏夫、応用物理学会東海支部基礎セミナー 「バイオナノテクノロジー」（名古屋工業大学、2004 年 1 月 23 日）「高速 AFM による生体分子のナノダイナミクス撮影」
33. 安藤敏夫、東北大学多元物質科学研究所ミニシンポジウム（東北大、2004 年 1 月 14 日）「高速原子間力顕微鏡 タンパク質のナノ動態撮影」
34. 安藤敏夫、日本薬学会第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（金沢、2003 年 11 月 13 日） 企画講演「高速 AFM で見るタンパク質のナノ動態」
35. 安藤敏夫、第 30 回電顕皮膚生物学会学術大会 第 30 回記念企画招請講演（金沢、2003 年 9 月 13 日） 「高速原子間力顕微鏡 ー液中ナノメーター世界の高速度撮影ー」

36. 安藤敏夫、阪大基礎工学部生物工学科セミナー（阪大、2003 年、5 月 14 日）「動態観察原子間力顕微鏡の開発とモーター蛋白質のダイナミックス」

<一般講演・ポスター発表>（全67件）

1. N. Kodera, D. Yamamoto, T. Ando, Biophysics Meeting (Long Beach, Feb. 2-6, 2008, "Structural dynamics of acto-myosin V studied by high-speed AFM"
2. N. Kodera, D. Yamamoto, and T. Ando, X. Annual Linz Winter Workshop (Linz, Austria, Feb. 16-19, 2008), "Dynamic behavior of acto-myosin V captured by high-speed AFM"
3. D. Yamamoto, M. Taniguchi and T. Ando, 6th International Workshop on Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, October 9, 2007), "Chaperonin GroEL-GroES action revealed by high-speed atomic force microscopy."
4. N. Kodera, D. Yamamoto, T. Ando, 6th International Workshop Scanning Probe Microscopy in Life Sciences (Berlin, Germany, Oct. 9, 2007), "Dynamic behavior of acto-myosin V visualized by high-speed AFM"
5. D. Yamamoto, M. Taniguchi and T. Ando, International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, Korea, June 11-14, 2007), "Investigation of GroEL-GroES action by high-speed atomic force microscopy"
6. N. Kodera, T. Ando, International Scanning Probe Microscopy Conference (Jeju, Korea, June 10-14, 2007) "Structural dynamics of acto-myosin V revealed by high-speed AFM"
7. 名倉直希、齊藤優太、安藤敏夫、生体運動研究合同班会議 2008（仙台市戦災復興記念館、2008 年 1 月 7-9 日）「ヘッドで固定されたミオシン V が駆動するアクチン滑り運動」
8. 表冴子、田中慎一郎、名倉直希、安藤敏夫、生体運動研究合同班会議 2008（仙台市戦災復興記念館、2008 年 1 月 7-9 日）「ミオシン V のカルシウム調節」
9. 名倉直希、齊藤優太、田中祐介、安藤敏夫、日本生物物理学会（パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日）「頭部を基板に固定したミオシン V-S1 でのアクチン滑り運動」
10. 谷口雅昭、山本大輔、古寺哲幸、安藤敏夫、日本生物物理学会（パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日）「高速原子間力顕微鏡を用いたシャペロニン GroEL における基質タンパク質の結合と解離の一分子観察」
11. 古寺哲幸、山本大輔、安藤敏夫、日本生物物理学会（パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日）「高速 AFM によるアクトミオシン V の動態観察」
12. 田中慎一郎、小出博史、表冴子、安藤敏夫、日本生物物理学会（パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日）「Calcium regulation of myosin V」

13. 宮城篤¹、津中康央²、内橋貴之¹、真柳浩太²、広瀬進³、森川耿右²、安藤敏夫¹ (¹金沢大学、²大阪大学、³国立遺伝学研究所) 日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) 「高速 AFM による、タンパク質の Disorder 領域の可視化」
14. 山下隼人¹、Kislon Voitchovsky²、内橋貴之¹、Sonia Antoranz Contera²、山本大輔¹、J. F. Ryan²、安藤敏夫¹ (¹金沢大学、²Univ. of Oxford) 日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) 「高速 AFM による bR 2 次元結晶の脱結晶化及び再結晶化過程のダイナミクス観察」
15. 斉藤優太、名倉直希、田中慎一郎、安藤敏夫、日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) “Myosin V S1 tethered at its head can propel actin filaments movement”
16. 高橋尚久、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) 「高速 AFM のための高速 AFM スキャナーとそのアクティブダンピングについて」
17. 山本大輔、谷口雅昭、安藤敏夫、日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) 「高速原子間力顕微鏡による GroEL-GroES の結合・解離測定」
18. 安藤彰良、今井将之、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、日本生物物理学会 (パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日) 「高速原子間力顕微鏡のスキャナーの改良」
19. 内橋貴之、山下隼人、安藤敏夫 (金沢大学)、Kislon Voitchovsky, Sonia Contera, John Ryan (Univ. of Oxford)、「高速 AFM による膜タンパク質の高速・高分解能観察」、(2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会 (青山学院大学相模原キャンパス、2007 年 3 月 28 日) .
20. 山下隼人、内橋貴之、古寺哲幸、宮城篤、山本大輔、安藤敏夫、「レーザー照射による AFM カンチレバーの直接駆動」、2007 年春季第 54 回応用物理学関係連合講演会 (青山学院大学相模原キャンパス 2007 年 3 月 29 日) .
21. 山下隼人、内橋貴之、安藤敏夫 (金沢大学)、芝田幹大、古谷祐詞、神取秀樹 (名工大)、Kislon Voitchovsky, Sonia Antranz Contera, John F. Ryan (Univ. of Oxford)、「高速 AFM による膜タンパク質の高分解能動態イメージング」、生物物理学会中部支部討論会、(岡崎統合バイオサイエンスセンター、2007 年 3 月 16 日) .
22. Kodera, N. (Kanazawa Univ.), “Structural dynamics of acto-myosin V revealed by high-speed AFM”, 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, January 16-18, 2007).
23. Yamamoto, D. (Kanazawa Univ.), “Chaperonin GroEL-GroES action captured by high-speed AFM”, 1st Kanazawa Workshop on Atomic Force Microscopy (Kanazawa, January 16-18, 2007).
22. 古寺哲幸、山本大輔、安藤敏夫、「高速 AFM によるアクトミオシン V の動態観察」、生体運動研究合同班会議 2007 (金沢、2007 年 1 月 9 日) .

23. 田中慎一郎、小出博史、安藤敏、「ミオシン V のカルシウム調節」、生体運動研究合同班会議 2007 (金沢、2007 年 1 月 9 日)。
24. H. Yamashita, T. Uchihashi, D. Yamamoto, T. Ando (Kanazawa Univ.), Voitchovsky, K., Antranz Contera, S., and Ryan, J. (Univ. of Oxford), “High-resolution dynamic imaging of membrane proteins by high-speed AFM”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Nov. 12-16, 2006).
25. R. Nakakita, T. Uchihashi, and T. Ando, “Improvement of high-speed AFM scanner”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Nov. 12-16, 2006).
26. T. Uchihashi, H. Yamashita, N. Koder, R. Nakakita, and T. Ando, “Direct driving of the high-speed AFM cantilever by photo-thermal expansion toward video-rate imaging of biomolecules”, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Okinawa, Nov. 12-16, 2006).
27. H. Yamashita, T. Uchihashi, T. Ando, “Fast Phase Detection for High-Speed AFM”, International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (Basel, July 30-Aug. 4, 2006).
28. T. Uchihashi, H. Yamashita, T. Ando, K. Voitchovsky, S.A. Contera, and J. Ryan (Univ. of Oxford), “High-Resolution Dynamic Imaging of Membrane Proteins with High-Speed AFM”, International Conference on Nanoscience and Technology 2006 (July 30-August 4, 2006).
29. T. Uchihashi, H. Yamashita, and T. Ando, “Phase Imaging with High-Speed AFM” SPM 2006 Conference (Scanning Probe Microscopy, Sensors & Nanostructures), (Montpellier-LaGrande Motte, France, June 3-6, 2006).
30. S.A. Contera¹, K. Voitchovsky¹, H. Yamashita², T. Uchihashi², N. Kodera², T. Ando², J. F. Ryan¹ (¹Oxford Univ., ²Kanazawa Univ.)、 “Small amplitude sub-molecular resolution AC-AFM and High-Speed AC-AFM of purple membranes in fluid: non-continuum effects inside the double layer”、米国生物物理学会 (Salt Lake City, 2006 年 2 月 18-22 日)。
31. 内橋貴之、山下隼人、安藤敏夫、「高速 AFM による生体物性計測に向けて」、生体運動研究合同班会議 (東大農学部弥生講堂、2006 年 1 月 6-8 日)。
32. 古寺哲幸、山本大輔、安藤敏夫、「高速 AFM によるアクトミオシン V の動態観察」、生体運動研究合同班会議 (東大農学部弥生講堂、2006 年 1 月 6-8 日)。
33. H. Yamashita¹, K. Voitchovsky², T. Uchihashi¹, S.A. Contera², N. Kodera¹, J.F. Ryan², T. Ando¹ (¹Kanazawa Univ., ²Oxford Univ.)、 “High-resolution dynamic imaging of membrane proteins by high-speed AFM.”、米国生物物理学会 (Salt Lake

City, 2006 年 2 月 18-22 日).

34. 中北諒、古寺哲幸、安藤敏夫、「高速 AFM スキャナーの改良」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
35. 坂下満、古寺哲幸、安藤敏夫、「カンチレバー励振強度の制御による高速 AFM のイメージングの安定化」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
36. 伊藤悠徳、山下隼人、古寺哲幸、内橋貴之、安藤敏夫、「自己励振を用いた高速 AFM の FM 検出イメージング」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
37. 内橋貴之、古寺哲幸、山下隼人、伊藤悠徳、安藤敏夫、「フィードフォワード補償による高速 AFM 距離制御の広帯域化」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
38. 山下隼人、古寺哲幸、宮城篤、伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫、「レーザ照射によるカンチレバーの直接駆動を用いた高速 AFM の距離制御」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
39. 古寺哲幸、宮城篤、山下隼人、中北諒、坂下満、伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫、「タンパク質分子の機能動態を捉える高速 AFM の開発」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
40. 宮城篤、古寺哲幸、榊原齊、大岩和弘、安藤敏夫、「高速 AFM によるダイニン C の動態観察」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
41. 谷口雅昭、宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫、「シャペロニン GroEL に起こる構造変化の高速 AFM による解析」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
42. 田中祐介、小出博史、早川史洋、上田太郎、安藤敏夫、「ミオシン V の運動メカニズム」日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
43. 小出博史、田中祐介、早川史洋、Gabriel Meyer zu Hoerste、安藤敏夫、「ミオシン V の Ca^{2+} 存在下で解離するカルモジュリンを結合してた IQ モチーフの同定」、日本生物物理学会（札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日）.
44. T. Uchihashi, N. Kodera, H. Itoh, H. Yamashita and T. Ando, “Feed-Forward Control for High-Speed AFM Imaging of Biomolecules, STM '05 (13th International Conference on Scanning Tunneling Microscopy/Spectroscopy and Related Techniques (Sapporo, 2005 年 7 月)).
45. T. Ando, N. Kodera, A. Miyagi, H. Yamashita, “Further Improvement of the High-speed Atomic Force Microscope”, Biophysics Meeting, Los Angeles, Feb.12-16, 2005.
46. M. Yokokawa, A. Yagi, N. Sakai, T. Ando, and K. Takeyasu, “Single Molecule

Analysis of Protein-Protein Interactions by Fast Scanning Atomic Force Microscopy”, Biophysics Meeting, Los Angeles, Feb.12-16, 2005.

47. 宮城篤、古寺哲幸、前田大輔、安藤敏夫「高速 AFM によるモータータンパク質などの動態撮影」生体運動合同班会議 大阪千里ライフサイエンスセンター、1月7日～9日、2005年
48. 小出博史、木下達也、安藤敏夫「ミオシンVの化学修飾と運動特性」
生体運動合同班会議 大阪千里ライフサイエンスセンター、1月7日～9日、2005年
49. 又多恵子、古寺哲幸、宮城篤、安藤敏夫「タンパク質のAFM映像を原子モデルに照らして理解するための解析法」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
50. 前田大輔、宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫「高速AFMによるタンパク質の動態撮影に資する基板開発」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
51. 伊藤悠徳、内橋貴之、安藤敏夫「高速AFMの性能向上のための改良」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
52. 宮城篤、前田大輔、古寺哲幸、大岩和弘、安藤敏夫「高速原子間力顕微鏡によるモータータンパク質分子の動態観察」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
53. 田中祐介、木下達也、小出博史、安藤敏夫「量子ドットを用いたミオシンVの高分解能蛍光観察系の開発」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
54. 小出博史、木下達也、田中祐介、安藤敏夫「Ca²⁺存在下でのミオシンVの1分子観察」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
55. 木下達也、小出博史、田中祐介、安藤敏夫「単頭ミオシンVから再構成した擬似HMMの運動」、日本生物物理学会第42回年会（京都） 12月13-15日、2004年
56. N. Koder, Y. Naito, A. Miyagi, T. Ando, H. Sakakibara & K. Ooiwa, 米国生物物理学会(Baltimore, 2004年2月14-18日), “Dynamic Behavior of Motor Proteins in Action Captured by High-speed Atomic Force Microscope” *J. Biophys. J.* 86:589a (2003)
57. M. Yokokawa, S. Yoshimura, Y. Naito, T. Ando, A. Yagi, H. Takahashi & K. Takeyasu, 米国生物物理学会 (Baltimore, 2004年2月14-18日), “Real-time AFM Analysis of DNA-enzyme Reaction” *J. Biophys. J.* 86:589a (2003)
58. 古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫、生体運動合同班会議（東京大学駒場、2004年1月8-10日）、「高速AFMが捉えたモータータンパク質のナノ動態」
59. 木下達也、高橋輝行、柳浦大志、安藤敏夫、生体運動合同班会議（東京大学駒場、2004年1月8-10日）、「ミオシンVの運動解析」
60. 宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「高速AFM用カンチレバーのフッ素修飾」

61. 柳浦大志、木下達也、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「ミオシンVの尾部のActin-activated ATPase 活性に与える効果」
62. 平山潤太、木下達也、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「ミオシンVにおける無負荷プロセッシブ運動の高分解能測定」
63. 又多恵子、安藤敏夫、小椋輝、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「高速AFMによるFtsH2次元結晶のイメージング」
64. 古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）「高速AFMの改良」
65. 内藤康行、榊原斉、大岩和弘、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「高速AFMによる単頭ダイニンの動態撮影」
66. 高橋輝行、木下達也、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）「アクチンのホットスポットの検出」
67. 木下達也、柳浦大志、安藤敏夫、日本生物物理学会第41回年会（新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日）、「単頭脳ミオシンVの運動解析」

（3）図書 （全9件）

1. 安藤敏夫、9章3節 走査型プローブ顕微鏡 P.509-513 in 「生物物理学ハンドブック」石渡信一、桂 勲、桐野豊、美宅茂樹 編集 朝倉書店（2007年）.
2. 安藤敏夫、7章7節 AFMによる分子イメージング P.758-768 in 「非襲侵・可視化技術ハンドブック」 小川誠二、上野照剛 監修 NTS 出版（2007年）
3. 安藤敏夫、13章 リアルタイムAFM イメージング p.140-151 in 「ナノバイオ計測の実際」三原久和、小島英理、馬場嘉信 編集 講談社サイエンティフィック（2007年4月）
4. T. Ando, Chapter 14 (pp.109-116), “High-speed SPM” in “Roadmap of Scanning Probe Microscopy”, S. Morita (Ed.), Springer (2006).
5. 安藤敏夫、2章10節 高速AFM p.150-156 in 「ナノオプティクス・ナノフォトリクス」河田 聡 監修 フロンティア出版（2006年5月）
6. 安藤敏夫、4章5節 高速SPM p.99-105 in 「走査型プローブ顕微鏡 最新技術と未来予測」 森田清三編集 丸善（2005）
7. 安藤敏夫、高速AFMータンパク質分子の動的振舞いの観察 トピックス編 3章 p.109-113 in 「わかる実験医学シリーズ バイオイメージングがわかるー細胞内分子を観察する多様な技術とその原理」 高松哲郎編集 羊土社（2005）
8. 安藤敏夫、リアルタイムで“見る”ナノの世界 分子の動きを捉える 9章 p.121-149 in 「ナノバイオロジー」 竹安邦夫編集 共立出版（2004）

9. 安藤敏夫、生体分子の高速ダイナミクス撮影 4章4節 p.395-406 in 「ナノバイオテクノロジーの最前線」植田充美監修 シーエムシー出版 (2003)

3. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

<特許> (国内出願) (全7件)

1. 内橋貴之・安藤敏夫・山下隼人、「高速・高感度位相検出法及び高速 AFM の高感度化」、金沢大学、2005 年 12 月 20 日、特願 2005-366395.
2. 安藤敏夫、「走査プローブ顕微鏡およびアクティブダンピング駆動制御装置」、金沢大学、2006 年 9 月 6 日、特願 2006-241920.
3. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・高橋尚久、「原子間力顕微鏡」、金沢大学、2006 年 9 月 4 日、特願 2006-238886.
4. 安藤敏夫・坂下満・内橋貴之、「走査プローブ顕微鏡」、金沢大学、2005 年 12 月 19 日、特願 2005-364797.
5. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・山下隼人、「走査プローブ顕微鏡及びカンチレバー駆動装置」、金沢大学、2005 年 5 月 31 日、特願 2005-159910.
6. 安藤敏夫・林美明、「走査型プローブ顕微鏡および分子構造変化観測方法」、金沢大学・オリンパス、2004 年 1 月 9 日、特願 2004-507986.
7. 安藤敏夫・古寺哲幸・酒井信明、「アクチュエーター制御方法及びその装置並びに走査型プローブ顕微鏡」、2003 年 12 月 25 日、特願 2003-431554 (特許第 4083517 号、2008 年 2 月 22 日) .

<特許> (外国出願) (全 8 件)

1. 安藤敏夫・内橋貴之・山下隼人、「走査プローブ顕微鏡」、金沢大学、2006 年 12 月 12 日、PCT/JP2006/324723.
2. 安藤敏夫・坂下満・内橋貴之、「走査プローブ顕微鏡」、安藤敏夫・坂下満・内橋貴之、金沢大学、2006 年 10 月 12 日、PCT/JP2006/320415.
3. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・山下隼人、「走査プローブ顕微鏡およびカンチレバー駆動装置」、金沢大学、2006 年 5 月 26 日、PCT/JP2006/310535.
4. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・山下隼人、「走査プローブ顕微鏡およびカンチレバー駆動装置」、金沢大学、2007 年 12 月 19 日、6756635.6 (欧州) .
5. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・山下隼人、「走査プローブ顕微鏡およびカンチレバー駆動装置」、金沢大学、2007 年 11 月 29 日、11/915,940 (米国)
6. 安藤敏夫、「走査プローブ顕微鏡およびアクティブダンピング駆動制御装置」、金沢大学、2007 年 7 月 27 日、PCT/JP2007/064731.

7. 安藤敏夫・内橋貴之・古寺哲幸・高橋尚久、「原子間力顕微鏡」、金沢大学、2007年7月27日、PCT/JP2007/064732.
8. 安藤敏夫・林美明、「走査型プローブ顕微鏡および分子構造変化観測方法」、金沢大学・オリンパス、2004年1月9日、PCT/JP2004/000110.

4. 解説

(1) ミオシンVの機能動態撮影

1. はじめに

1.1. MyosinとActin

MyosinはActin Filamentと相互作用することにより力を発生し運動を起こすモータータンパク質の1種である。エネルギー源は、生体のエネルギー変換を担うタンパク質が多く利用している磷酸化合物であるATP（3 磷酸）である。MyosinはATPをADP（2 磷酸）とPi（無機磷酸）に分解する酵素であり、その分解で生ずる化学エネルギーを力学エネルギーに変換する。Myosinには様々な種類が存在しスーパーファミリを形成している。最初は筋収縮を担うタンパク質（Myosin IIと現在呼ばれている）として見出されたが、現在では筋肉細胞に限らずほとんどすべての細胞に存在することが知られている。ほとんどのMyosinはホモ2量体で、Actinと相互作用する部位とATPを分解する部位を有する頭部、頭部に続くネック部位、ネックに続く尾部をもつ。尾部で2量体は繋がる。

Actin FilamentはActin分子（直径約5 nm程度の球状タンパク質、G-actinとも呼ばれる）が半周期約36 nmの2重らせん状に重合したものである。長さ方向に極性があり、重合が速く起こる端をプラス端、重合が遅い端をマイナス端という。筋肉のMyosin IIの頭部をATPの存在しない条件下（筋肉の死後硬直の状態に対応）でActin Filamentに結合させると、頭部はActin Filamentに対して或る一定の角度で結合する。その結果、矢尻様の構造ができる。矢尻はマイナス端方向を指す。

Myosinの中には、1分子でアクチン上を運動するもの（プロセッシブモータと呼ばれる）と、多分子が重合した場合でしか働かないものなどがある。前者の代表例はMyosin V、後者の代表例はMyosin IIである。また、ほとんどのMyosinはアクチンに対してマイナス端方向に力を発生するが、プラス端方向に力を発生するMyosin VIがある。違う言い方をすると、Myosin VはActin Filamentのプラス端に向かって動くが、Myosin VIはマイナス端に向かって動く。

1.2. Myosin Vの構造

Myosin Vは他のほとんどすべてのMyosinと共通する

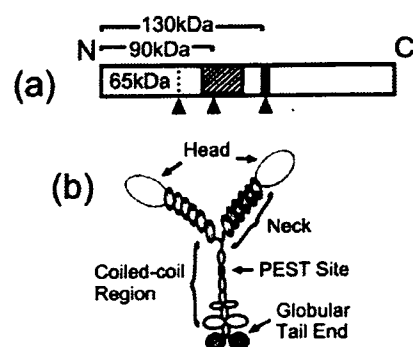


図 1. Myosin V の構造。(a)1 次構造の模式図。斜線部は 6 つの IQ モチーフ領域。3 つの矢印はプロテアーゼで切断される部位を示す。左側から、頭部内、IQ2-IQ3 境界部、PEST 部位。(b)分子形状の模式図。

構造的特徴をもっているが、Myosin Vに特徴的な点は、長いネック領域と尾部末端にカーゴを結合する球状部位をもつことである（図1）。尾部のCoiled-coilのネックに近い部分にPEST部位があり、タンパク質分解酵素で容易に切断できる。この切断により尾部をほとんど持たない双頭のHMMを得ることができる（図2a）。ネックには6個のIQモチーフがあり、平滑筋Myosinと共通するELC鎖と

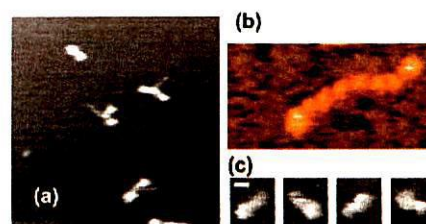


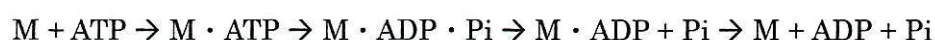
図2. Myosin VのProtease処理で得られた(a)・(b)HMMと(c)S1（スケールバー10 nm）のAFM像。

Calmodulin（ほぼ1：5の割合）が結合している。Myosin Vの高解像AFM像（図2b）で、ネックに結合しているCalmodulinとELCが観察されるが、1本のネックあたり3つしか見えない。残る3つはネックの反対側に結合しているためである。Myosin Vの活性はカルシウム制御を受けるが、Ca²⁺の結合部位はCalmodulinである。Ca²⁺の結合により、1つのネックあたりCalmodulin 1分子が解離するが、そのCalmodulinは頭部側から2番目に位置するIQモチーフ（IQ2）に結合していたものである。このCalmodulinの解離によってIQ2が表に出るが、タンパク質分解酵素で処理すると、IQ2とIQ3の境界部で切断が起こり、IQ1とIQ2をもつ頭部（S1）が得られる（図2c）。このS1にはELCは存在せず、従って、ELCはIQ3とIQ6の間のどこかに結合していることになる。Ca²⁺のCalmodulinへの結合により、CalmodulinがIQ2から解離すると、Myosin VのATPase活性は若干上がるが、逆に運動活性を失う。

細胞内では、尾部はカーゴを結合していると思われるが、精製したMyosin Vはカーゴを結合していない。このカーゴを結合していない尾部は低いカルシウム濃度条件下で頭部に結合すると言われている。この結合により、Myosin VのATPase活性とモータ活性が抑制されると考えられている。従って、カーゴを結合していないMyosin Vは2種類のカルシウム調節を受けることになる。

1.3. Myosin Vの運動の分子メカニズム

Myosin Vは1分子でActin Filament上を長距離運動し（このような性質をもつものはプロセスモータと呼ばれている）、細胞内で物質を運搬する機能を担っている。このプロセス性があるため、運動している1分子を追跡することが可能である。それ故、全反射蛍光顕微鏡や光ピンセット法を駆使してこの10年間に集中的に研究され、運動の分子メカニズムがかなりはっきりしてきた。ここで、分子メカニズムとは、ATPの分解反応の進行とともに、Myosin V分子にどのような変化が生じ、Actin Filamentとの相互作用にどのような変化が起こり、1方向の運動を実現しているか、というメカニズムである。Myosin V分子のATP分解部位で起こる反応を簡単に記すと、



となる。ここで、MはMyosin Vの表す。Actin Filamentはこの反応の燐酸放出とADP放出のステップを加速する。但し、Myosin Vは2量体であり、2つの頭部はネック部を介して繋がっており、互いに力学的束縛を及ぼすため、2つの頭部での化学反応の進行も互いに影響を及ぼすことになる。運動に関する以下の3点はほぼコンセンサスが得られている。

- ① 力が発生する部位は頭部のコンバータドメインで、ATPの頭部への結合（或いはATPの加水分解）で構造が変化する。この変化が、Piの放出時に元に戻るときにMyosinからActin Filamentに運動のための力が働く。
- ② コンバータドメインに繋がっているネック部は、この構造変化により頭部に対して角度を変化させる。ネック部は長いので、コンバータドメインの小さい構造変化によりネック部の先端は大きく移動する。この大きな移動により、Myosinはアクチン上で一方向に大きく変位するか、もしくは、Actin Filamentが一方向に大きく変位する。Swinging Lever-armモデルと呼ばれる。
- ③ 2つの頭部は、ヒトが2本の脚で歩くようにして、Actin Filament上を運動する。Hand-over-hand運動と呼ばれる。

頭部とネックが脚となり、2本の脚が交互に前脚・後ろ脚となること（Hand-over-hand運動）は、全反射蛍光顕微鏡観察により事実として確立している。

2. Myosin V-Actin Filamentの動態の高速AFM観察

2.1. 基板に吸着したMyosin Vで駆動されるActin Filamentのすべり運動

Myosin VとActin Filamentとの親和性が高い低イオン強度の条件下では、Myosin Vはマイカ表面に強く吸着してしまうため、Actin Filament上を歩くMyosin Vの観察はできない。そこで、基板に吸着したMyosin Vによって駆動されるActin Filamentの運動観察から研究を進めた。Actin Filamentは一般に数 μm あり、観察視野に収まらない。従って、視野に見えるActin Filamentと相互作用しているMyosin VがActin Filamentの運動を実際に駆動しているのか判断できない。たまたま、基板に吸着した2分子のMyosin Vと相互作用し、視野内に収まる短いActin Filamentを観察することができた（図3）。Actin Filamentと結合しているMyosin Vの頭部がはっきりと観察された。図3において、これらの頭部は左側を指しており、従って、このActin Filamentの極性を判断できる。すなわち、左側がマイナス端である。実際、このActin Filamentは左側に運動した。この左側への運動時において結合したMyosin Vがどのような挙動を示すかは興味のあるところであるが、目立った大きな変化は観察されなかった。



図 3: マイカ基板表面に吸着した Myosin V に駆動されて一方向に動く Actin Filament の AFM 像。イメージング速度 160 ms/frame。画像中の数値はフレーム番号。

2.2. Actin Filament との Myosin V の結合様式の AFM 観察

ATP の Myosin V による分解過程で生ずる化学的中間状態と運動に関わる力学的状態とはカップルしているはずである（と思われる）。AFM では化学的中間状態を捉えることは難しく、Myosin V の運動過程で変遷する化学状態を同定することは現在のところできない。そこで、ATP が存在しないとき、ADP が存在するとき、そして、ADP・Pi を模擬する AMP-PNP が存在するときの Myosin V 頭部の Actin Filament への結合の様子を観察した。Myosin V のマイカ表面への吸着を抑えるために、イオン強度を上げた。また、Myosin V の尾部が基板に吸着する傾向が強いので、プロテアーゼ処理により得た HMM を、一部の実験で用いた。Actin Filament には負の電荷が多く、負電荷をもつマイカ表面には吸着しないが、視野内外の Myosin V と結合するため、激しく運動せず視野内に留まる。

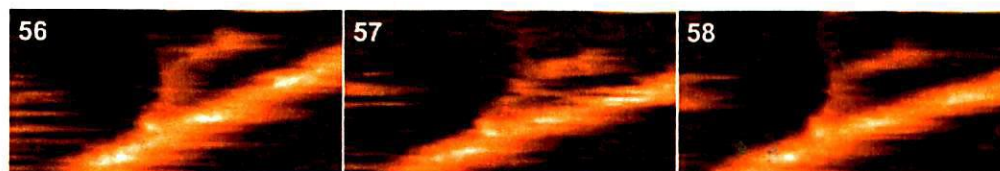


図 4 : Actin Filament にライガー結合した Myosin V の AFM 像。イメージング速度 100 ms/frame。数字はフレーム番号。

ATP が存在しない溶液条件下では、どの種類の Myosin でもその頭部は Actin Filament に高い親和性をもつことが知られている。この条件下で特徴的な結合様式が観察された。すなわち、2 つある頭部の内、1 つの頭部しか Actin Filament に結合しない（図 4）。もう 1 つの頭部は Actin Filament に接近しても決して結合しない。この結合した頭部の矢尻様構造から、結合している頭部・ネックは後ろ脚に対応していると判断できる。ADP 存在下でも同様に、後ろ脚のみが Actin Filament に結合した。ATP が存在しないときと同様に、ADP を結合した Myosin の頭部は Actin Filament に高い親和性をもつことが知られており、高い親和性をもつ条件下では、後ろ脚しか結合できないようである。次に、ADP・Pi 状態を模擬する AMP-PNP 存在下で観察を行ったところ、AMP-PNP 濃度が高い場合には、Myosin V の Actin Filament への結合はほとんど観察されなかった。濃度を下げると、後ろ脚しか結

合しないMyosin Vの他に、両脚とも同一のActin Filamentに結合したMyosin Vも観察された（図5）。観察を続けると、片方の脚がActin Filamentから解離するが、結合したままの脚の矢尻様構造から、解離した脚は後ろ脚であると判断できる。

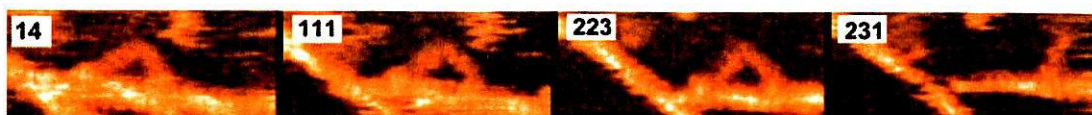


図5：AMP-PNP（50 μ M）存在下でActin Filamentに結合したMyosin VのAFM像。イメージング速度 100 ms/frame。数字はフレーム番号。フレーム 231 では、後ろの頭部はActin Filament から解離して前脚の頭部が矢尻様構造と取っている。

両方の頭部に同時には結合しない程度のAMP-PNP存在下で両脚が結合し、ATP非存在下とADP存在下では後ろ脚のみが結合することから、AMP-PNPが結合して初めてActin Filamentに結合できる頭部は前脚の頭部であると結論できる。

ここまでの観察を解釈する。まず、Actin Filamentに強く結合するライガー状態（ヌクレオチド非存在下）とADP存在下で、両頭部のうち片方しか結合しない観察結果は以下のように解釈できる。ネック終端で繋がった等価な頭部をActin Filamentに結合させるように配置すると、後ろ脚の頭部表面にあるActin結合部位はActin分子の方を向く（図6）。その結果、Actin Filamentに結合できるが、前脚の頭部のActin結合部位はActin分子の方を向くことができず、Actin Filamentに結合できない。両脚の頭部両方をActin Filamentに結合させるためには、2つの脚を接近させなければならないが、2つの頭部・ネックはそれほど柔軟ではなく、互いに排斥仕合うため、接近することができない。

AMP-PNPが前脚の頭部に結合すると、コンバータドメインの構造変化により、頭部・ネックの連結部の回りを頭部は回転し、それにより、Actin結合部位はActin分子の方を向く。その結果、両脚ともActin Filamentに結合すると考えられる（図7）。

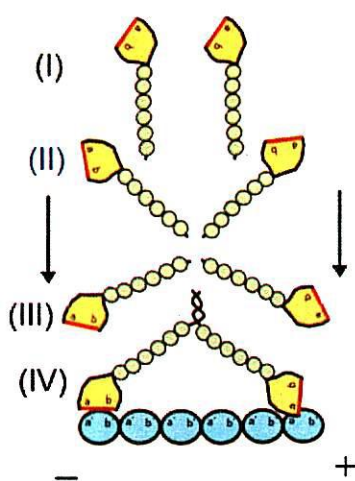


図6：等価な2つの頭部をActin Filamentに結合させると（I→IV）、頭部のActin結合部位（赤線）は異なる方向を向くことを示す模式図。

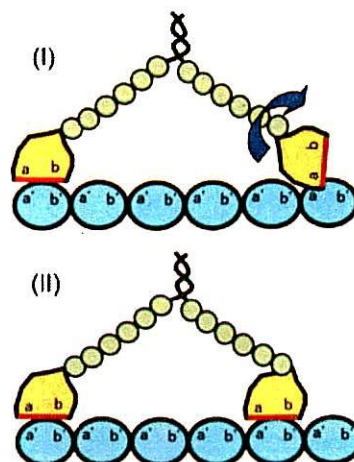


図7：前脚の頭部が頭部・ネックの接続部の回りを矢印の方向に回転すると、両脚ともActin Filamentに結合できるようになることを示す模式図。

2.3. 2 足歩行の高速AFM観察

ATP存在下におけるMyosin VのActin Filament上での2足歩行を高速AFM観察することは難しい課題であった。Myosin Vのマイカ表面への吸着を防ぐために、溶液のイオン強度を上げると、Myosin VのActin Filamentへの親和性が低下し、カンチレバー探針との接触により、Myosin VがActin Filamentから容易に解離してしまう。Dynamic PID制御により、セットポイント振幅を自由振動振幅に近づけ、探針が試料を叩く力を弱くすることはできるが、それでも尚、叩く力が強すぎる。カンチレバーのPeak-to-peak自由振動振幅を通常の5 nmから1-2 nmに減ずる方法で対処した。振幅の減少によりフィードバック帯域は下がるものの、Myosin Vの2足歩行観察に成功した。

両脚結合状態と片脚結合状態が交互に現れ、Myosin Vは一方向に運動した（図8）。両脚結合状態で後ろ脚の頭部がActin Filamentから解離すると、ネック・ネック間接合部の周りを後ろ脚は大きく回転した。この回転により、後ろ脚の頭部は前脚を越えて前方に繰り出される。この繰り出された脚はしばらくの間ブラウン運動するが、前方のActin Filamentに結合する。

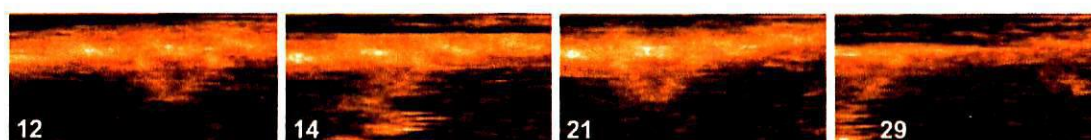


図8：Myosin Vの2足歩行を捉えたAFM像。イメージング速度 100 ms/frame。数字はフレーム番号。片脚結合状態（フレーム 14、29）ではブラウン運動が激しく鮮明ではないが、結合している脚の矢尻様構造が分かる。

2足歩行が連続的に観察される確率はそれほど高く、両脚結合から片脚結合に遷移する場合（すなわち、半歩前進）と、Actin Filamentから解離した後ろ脚が前方のActin Filamentに結合し新しい前脚となる場合（すなわち、1歩前進）が多く観察された。これら多くの観察例で共通に多く観察された2つの特徴的な振る舞いがある。ひとつは半歩前進する直前（後ろ脚がActin Filamentから解離する直前）に、前脚のネック部が前方に湾曲・屈曲する振る舞いである（図9）。もうひとつは、新しく前脚になった頭部がActin Filament上を更に5 nmほど前進する振る舞いである。

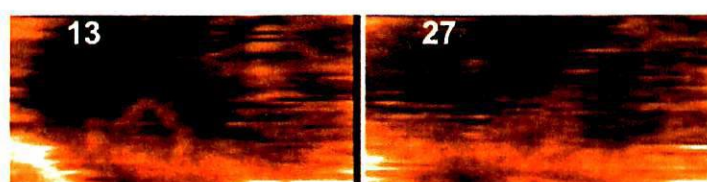


図9：Myosin Vの前脚の湾曲・屈曲を示すAFM像。イメージング速度 100 ms/frame。数字はフレーム番号。フレーム 13でも前脚は湾曲しているが、後ろ脚がActin Filamentから解離する直前に前脚が大きく屈曲する。

2.4. Actin Filamentに結合するMyosin V分子の配置

図8では、Myosin VはActin Filamentよりも下側にあつて、右から左に向かって歩行している（従って、左側がActin Filamentのプラス端で右側がマイナス端である）。これまで行ったすべての観察で、まったく同じ振る舞いを示した。Myosin VがActin Filamentよりも上側にある場合には、Myosin Vは必ず左から右に向かって歩行した。この一見不思議な振る舞いの理由をここで考える。図8でActin Filamentに結合している頭部はActin Filamentよりも高い位置にある。すなわち、Actin Filamentの頭部結合サイトは手前側にある。図8のActin FilamentをY軸の周りに回転させ、左右を入れ替えると、Actin Filamentの頭部結合サイトは向こう側（マイカ表面側）を向くことになる。従って、Actin Filamentよりも下側に位置するMyosin VはActin Filamentに結合できなくなる。すなわち、Actin Filamentの左右を入れ替えると、Myosin Vが手前側にある頭部結合サイトに結合するためには、Myosin VはActin Filamentよりも上側に位置しなければならない。

ATP存在下で歩行運動している場合に限らず、ライガー状態でも、ADP存在下、AMP-PNP存在下でも後ろ脚が前脚よりも左側に見える場合には、Myosin VはActin Filamentよりも必ず上に位置し、逆に後ろ脚が前脚よりも右側に見える場合には、Myosin VはActin Filamentよりも必ず下に位置していた。この振る舞いも、上記のことから理解できる。このことはAFM観察のように基板上にActin Filamentがあるという特殊事情だけではなく、細胞内でもActin Filamentがある面に接している場合やActin Filamentが束化している場合には必ず起こる振る舞いである。

Myosin VはActin Filamentの上に乗って一方向に歩行するとこれまではアプリアリに考えられてきたが、実際には、Myosin VはActin Filamentの側面に結合しながら一方向に歩行することが明らかになった。

図8の像を注意深くみると、アクチンフィラメントの高さが高いところ（明るく見えるところ）にはMyosin Vの頭部は結合せず、低い所に結合している。すなわち、2重らせんを平面上に置いたときに、低い位置にあるActin分子のMyosin V頭部結合サイトが手前側に向いている。Myosin Vの2つの頭部は約36 nm離れてActin Filamentに結合しており、従って、36 nm離れた2つの頭部結合サイトは2重らせんのそれぞれのストランドに属している。すなわち、Myosin Vは2重らせんの異なるストランドに常に相互作用していることになる。このことはActin Filamentの2重らせん構造より自明のことであるが、これまで明確に述べられてことはない。

Actin Filamentに結合するMyosin V分子の配置に関する以上の議論を模式的に表すと図10のようになる。



図10：Myosin VとActin Filamentの結合に関する分子配置の模式図。

2.5. 2足歩行のモデル

以上の高速AFMイメージングから得られたMyosin VとActin Filamentとの結合様式と運動形態から、Myosin Vの運動に関して以下のような分子モデルが建てられる。

- ①後ろ脚の頭部にADPが結合し、前脚の頭部にヌクレオチドが結合していない状態では、後ろ脚のみがActin Filamentに結合している。
- ②前脚の頭部にATPが結合するか、結合したATPがADP・Piへと分解されると、頭部は頭部・ネック接続部の周りに回転し、その結果、両脚ともActin Filamentに結合する。
- ③Actin Filamentとの結合によりPiが解離すると、前脚の頭部は頭部・ネック接続部の周りを逆回転する。
- ④逆回転した頭部はADP結合状態のため、Actin Filamentとの親和性が高いためActin Filamentから解離しない。その結果、逆回転によりネック部が湾曲・屈曲する。
- ⑤前脚のネック部の湾曲・屈曲により、後ろ脚は前方に引っ張られる。
- ⑥両頭部ともADP結合状態であり、Actin Filamentとの親和性に違いはないが、後ろ脚は前方に引っ張られ、前脚は後方に引っ張られているかの違いが生じている。
- ⑦前方に引っ張られると、ADPの解離が促進される結果、後ろ脚の頭部からADPが解離し、そこにATPが結合する。
- ⑧ATPを結合した後ろ脚の頭部はActin Filamentとの親和性を低下させ、その結果、Actin Filamentから解離する。また、同時にATPはADP・Piへと分解され、頭部は頭部・ネック接続部の周りを回転する。
- ⑨後ろ脚のActin Filamentからの解離により、前脚の湾曲・屈曲は解消され、矢尻様構造でActin Filamentに結合できるようになる。その結果、後ろ脚は前方に繰り出される。
- ⑩前方に繰り出された脚は激しくブラウン運動するが、その平均位置は前方に偏っている。その結果、ブラウン運動しつつ前方にあるActin Filamentにある頭部結合サイトに結合する。このプロセスは②と同じである。

マイナーな修正は必要である可能性はあるが、上記の一連のプロセスは高速AFM観察結果やMyosin Vの生化学的な性質と合致しており、基本的に正しいものと思われる。

(2) シャペロニン GroEL・GroES の結合・解離反応のイメージング

1. はじめに

シャペロニン GroEL・GroES は、大腸菌におけるタンパク質のフォールディングを媒介する。GroEL は 14 個の ATPase サブユニットからなり、背中合わせになった 2 つのリング構造をもつ (図 11)。コシャペロニンは ATP 依存的に GroEL のリング上面に結合する。

GroEL・GroES の結合・解離反応は、ATP 結合に関する 2つのリングの非対称な振る舞いによって支配される。ひとつのリング内では、正の協同性をもって 7 個の活性中心（赤道面に存在）に ATP は結合する。他方、2つのリング間には強い負の協同性が存在する。これらの協同性は生化学的研究と数学的なモデルによって解析されてきた。ひとつのリングへの ATP の結合により、GroES は ATP を結合したリング（cis リング）に結合し、その結果、非対称な GroEL-GroES 複合体が形成される。Cis リングで ATP が加水分解され、無機リン酸 Pi が放出されると、もう片方のリング（trans リング）は ATP を結合できるようになる。Trans リングへの ATP の結合は、cis リングからの GroES と ADP の解離を誘導する。そして、trans リングは GroES を結合し、cis リングとなり、次の反応サイクルへと進む（図 12）。

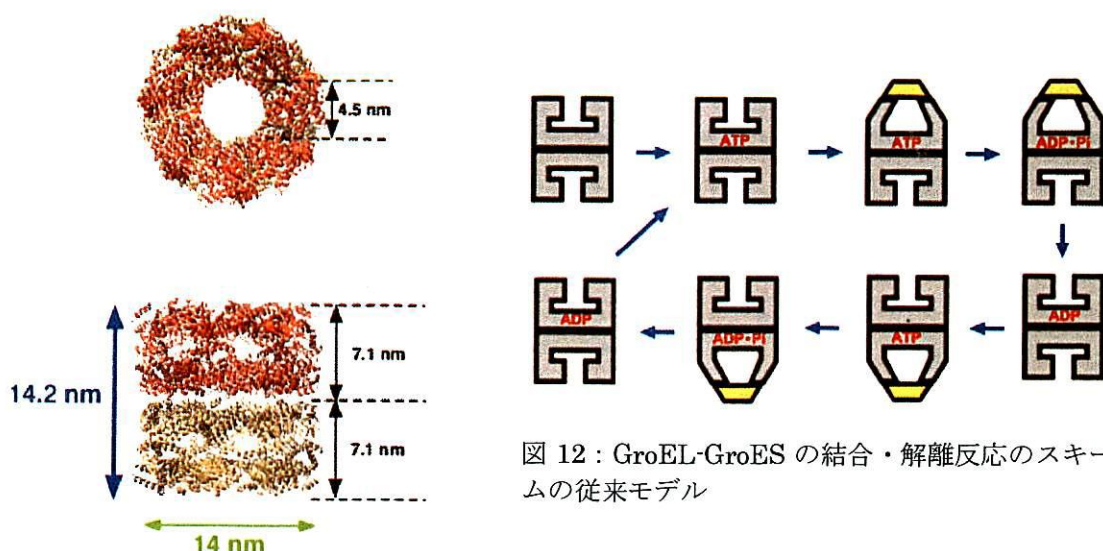


図 11 : GroEL のリング構造

図 12 : GroEL-GroES の結合・解離反応のスキームの従来モデル

上記の反応サイクルは、一連の生化学的研究から提唱されたものである。しかし、多分子のアンサンブルを対象にした測定では個々の分子イベントを正確に知ることは難しい。従って、上記のモデルは単一分子レベルで直接明らかにされる必要がある。例えば、cis リングと trans リングのスイッチングの直前に現れる中間体には 2つの可能性がある。ひとつは、GroES をまったく結合していない裸のリング、もうひとつは、両リングに GroES が結合した 3 量体 GroES・GroEL・GroES である。3 量体の存在は電子顕微鏡観察により確認されているものの、生化学的な研究からは否定されてきた。この問題は長い間議論されてきたが、解決に至っていない。

2. GroEL-GroES 反応サイクルの高速 AFM 観察

2.1. 試料系のセットアップ

GroEL-GroES の反応サイクルを高速 AFM 観察するためには、GroEL は基板に固定され、GroES は溶液中に自由に拡散している実験配置を実現する必要がある。GroEL をマイカ表面に直接載せると、リングの上面がマイカ表面に吸着する。従って、円柱状の GroEL の側面と基板が接触するようにするような基板が必要になる。また、その基板は GroES が吸着しない性質ももたなければならない。すなわち、選択特異的な GroEL の固定が可能な基板をまず調製しなければならない。

Streptavidin は Biotin (Vitamin H) を特異的に結合し、その複合体の寿命は十日以上あると言われている。また、Streptavidin は多くの種類のタンパク質に対して非特異的吸着が少ないタンパク質としても知られている。そこで、Biotin を含む脂質の二重層膜上に Streptavidin の 2 次元結晶を形成させたものを基板とし (図 13a)、GroEL の赤道面に Cystein を導入したミュータントを田口らの方法により調製した。図 13b に示すように、GroEL を側面で基板に固定できた。GroEL 単体では長方形のブロックのように見え、GroES が ADP 存在下で片方のリングだけに結合したものは弾丸の形に見える。また、期待したように、GroES はこの基板に対し非特異的吸着をまったく示さなかった。

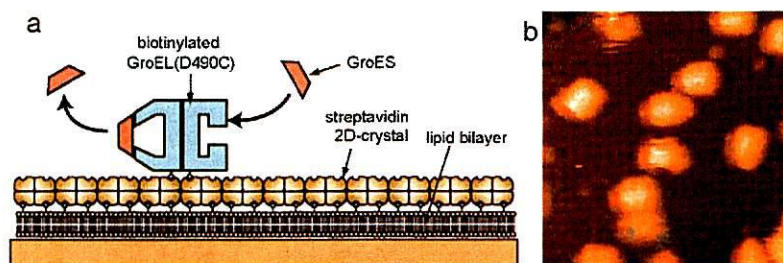


図 13 : GroEL-GroES の結合・解離反応の高速 AFM 観察のための試料系の調製。
(a) GroEL の側面で固定する基板と GroEL の配置の模式図。(b)ADP 存在下で観察した GroEL 及び GroEL-GroES 複合体の AAFM 像。

2.2. 高速 AFM 観察と反応スキーム

GroEL は比較的脆い試料であるため、フィードバック走査の小さいエラーで生ずる探針からの横方向の力を小さくする必要がある。幸い、GroEL-GroES 反応はそれほど速くないため、0.25 s/frame のイメージング速度で十分動態を追うことができ、それ故、横方向の力がほとんどかからない状態でイメージングすることができた。図 14a に連続イメージングで得られた像の一部を示す。GroES を結合していない長方形のブロック、GroES が片方のリングに結合した弾丸の他に、両リングに GroES が結合したフットボールが観察された。2

つのリングそれぞれの GroES の ON 状態と OFF 状態の時間的変化を図 14b に示す。この図から、2つのリングが ON 状態と OFF 状態を交互に繰り返していることが明らかである。また、この交互のスイッチングの直前に、両リングに GroES が結合した状態が現れている（矢印で示す）。

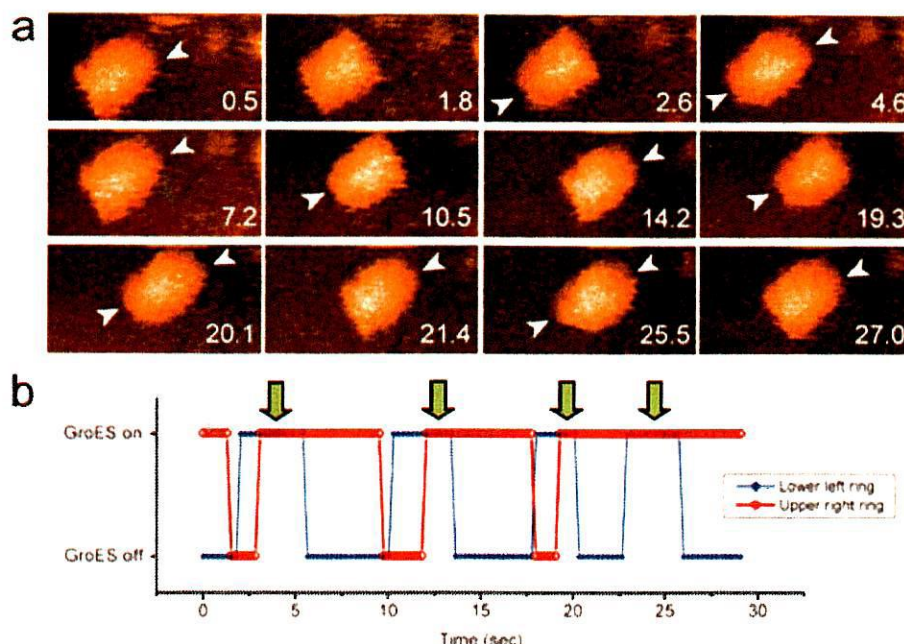


図 14 : (a) GroEL-GroES の結合・解離反応を捉えた AFM 像。イメージング速度 0.25 s/frame、走査範囲 $100 \times 50 \text{ nm}^2$ 。矢印は GroES が結合しているリングを示す。(b) 2つのリングの ON 状態と OFF 状態の時間変化。矢印は両リングに GroES が結合した状態を示す。

図 15 に、上記と同様の多くの観察から得られた結果をまとめた。GroEL の 2つのリングでの GroES の交互の結合・解離は約 75%以上の割合で観察され、この交互のスイッチングの直前の中間状態は 50%がフットボール型であった。フットボール型中間状態の寿命は短いため、0.25 s/frame のイメージング速度では検出されなかったものがあると考えられ。従って、ほとんどの場合、フットボール型中間体を経て、2つのリングでの GroES の交互の結合・解離が起こっているものと結論される。

図 17 に、上記の観察から得られた GroEL-GroES 反応のスキームを示す。フットボール状態の化学反応中間体が ADP-リングと ATP-リングの両方をもつ状態に対応するかどうかは不明であるが、そうでない場合には新たな中間対を想定しなければならなくなる。

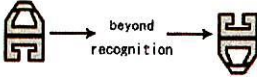
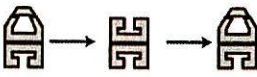
a	complex	ratio (%)	b	GroES binding-release action	ratio (%)
		2.2	1.		13.8
GroEL			2.		50.0
	57.4	3.		11.7	
GroEL-GroES			4.		3.2
	40.4	5.		21.3	
GroEL-(GroES) ₂					
	n = 1329			n = 94	

図 15 : (a)ATP 存在下で観察された 3 状態の存在割合。
(b)片方のリングに GroES が結合した状態の 2 つのリング間のスイッチングの観察された複数の経路の割合。

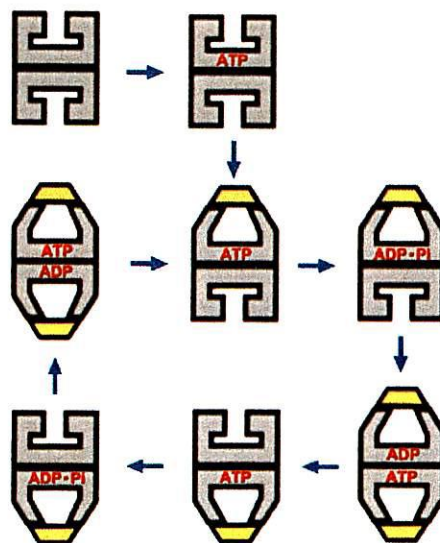


図 16 : 高速 AFM 観察の結果から得られた GroEL-GroES 結合・解離反応のスキーム。

(3) Dynein のイメージング

1. はじめに

Dynein は微小管と相互作用するモータータンパク質で、鞭毛や繊毛の軸系に存在する Dynein と細胞質 Dynein に大きく分けられる。アミノ酸配列の相同性から AAA+ファミリー ATPase に属し、他の AAA+ファミリー ATPase と同様にリング構造をもつ。1 本の軸系中には内腕 Dynein、外腕 Dynein が存在し、内腕 Dynein には単頭と双頭のいくつかの亜種が存在する。細胞質 Dynein には 3 頭、双頭の何種類もの Dynein が存在し、物質輸送に関わっている。分子レベルでの運動機構に関する研究は、情報通信総研の大岩研究室で、クラミドモナスの内腕 Dynein の単頭亜種である Dynein C を用いて始められた。

Dynein C はリング状の頭部から大きな Stem と細い Stalk が突き出た構造をしている。Stalk はすべての Dynein に存在し、Coiled-coil 構造の先端に球状の部分がある。この球状の部分で微小管と相互作用することが知られている。ヌクレオチド非存在下、ADP・Vi 存在下での Dynein の電顕写真から、Stalk・Stem 間の角度がこれらの 2 つの条件下で異なることが見出された。この角度変化がパワーストロークとなり微小管に力を及ぼすものと思われる。Dynein C は 1 分子でプロセシブに微小管上を運動すると報告されたが、生理的溶液環境下ではプロセシブではない。

双頭や 3 頭の Dynein は Stem 部で連結している。細胞質 Dynein は物質輸送を担うことから、プロセシブ性をもつと期待されるが、確認されているものは少なく、必ずしも細胞内において 1 分子で物質輸送を担っているわけではないらしい。

2. Dynein C の AFM 観察

大岩グループから提供された Dynein C の動態を AFM イメージングする研究は本基盤(S)の開始以前から行ってきた。大岩グループと Burgess らの共同研究による電顕観察結果と同様に、溶液中にある Dynein C の AFM 観察によっても Stem・Stalk 間の角度がヌクレオチド依存的に異なることを確認している。ヌクレオチド非存在下では平均 138 度で、ADP・Vi 状態では 158 度であった。また、ATP 存在下で、Stalk は動かず、Stem 部がこの角度の間をカタカタ動く様子も観察できている。ほぼ成功したかに思えたこの研究を論文に纏め上げるために、特に ATP 存在下での Stem の運動の観察を継続して行っていたが、再現性のあるデータが得られなかった。基板の種類、溶液のイオン組成など条件を種々変えて観察を重ねたが、最初の成功と思われた観察結果を再現することは結局できなかった。

3. 微小管の調製

微小管の試料には十分に重合していないプロトフィラメントがかなり残る。この試料をマイカ基板に載せるとプロトフィラメントが先に基板に吸着し、微小管が基板に吸着できない。Dynein の微小管に沿ったプロセッシブ運動の観察のために、まずこの問題を解決する必要があった。色々検討した結果、スウィングングロータを用いたショ糖密度勾配法により、プロトフィラメントと微小管をほぼ完全に分離することができ、この問題を解決することができた(図 17)。また、遠心前にグルタルアルデヒド処理することにより、得られた微小管を懸濁するときにプロトフィラメントが生ずるのを防ぐことができた。

微小管の高さは約 25 nm あり、Dynein との相互作用を高速イメージングするときのフィードバック走査に大きな負荷がかかる。そこで、Tubulin の Zn シートの調製を試みた。Zn 存在下で Tubulin を重合させると、シート状に重合し、そのシートの端で Dynein は相互作用できることが知られている。実際、図 18 に示すように、Zn シートが形成された。ショ糖密度勾配法によるプロトフィラメントと Zn シートの分離はまだ完全ではない。

4. 双頭ダイニンのプロセッシブ運動の観察

東大の豊島研究室から双頭の細胞質ダイニンを提供して頂いた。ブタ脳から精製した双頭 Dynein は Stem 部が長く、双頭構造が鮮明に解像できた。先端が球状の細い Stem 2 本もはっきり観察された(図 19)。しかし、残念ながらプロセッシブではいことがはっきりしたため、高速 AFM での観察はできなかった。また、ATPase 反応に伴う構造変化を捉えようと試みたが、目立った変化は観察されなかった。次に、プロセッシブ性が確認されたイースト菌から精製された双頭 Dynein の運動を観察した。この Dynein の Stem 部は短く、2つの頭部は接近しているため双頭構造がはっきりと観察できなかった。しかし、AMP-PNP 存在下において Stalk 先端で微小管上に結合した Dynein 分子が観察された(図 20)。また、プロセ

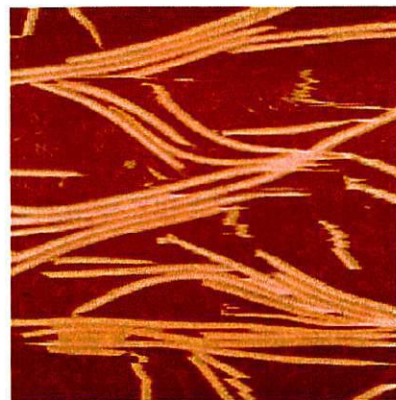


図 17: 微小管の AFM 像。走査範囲 1.6 μ m。

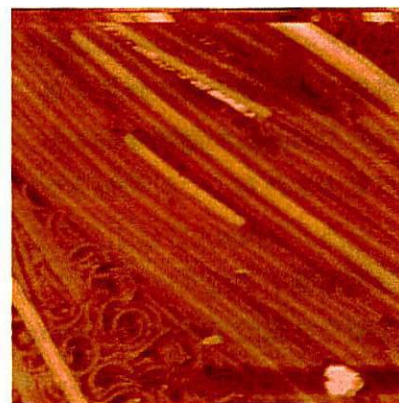


図 18: Tubulin の Z シートの AFM 像。走査範囲 240 nm。

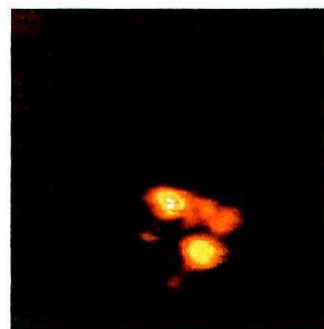


図 19: ブタ脳細胞質 Dynein の AFM 像。走査範囲 200 nm。

ッシブ運動は比較的容易に観察することができた (図 21)。Myosin V の Actin Filament との弱い親和性に比べ、この双頭 Dynein の微小管との親和性は高いようで、探針との接触はそれほど問題にならなかった。図 21 の像では、Dynein は微小管の側面と相互作用しており、Dynein 分子の直下には何も無い。それにもかかわらず観察できていることは、Stalk と微小管の相互作用がかなり強いことを示唆している。しかし、Stalk は見えず、2つの頭部を識別できておらず、この映像からは運動メカニズムを示唆する事実は引き出せなかった。Tubulin の Zn シートで運動を観察すれば Dynein の構造が解像できると期待したが、Zn シートは不安定で、Dynein との相互作用で壊れた。

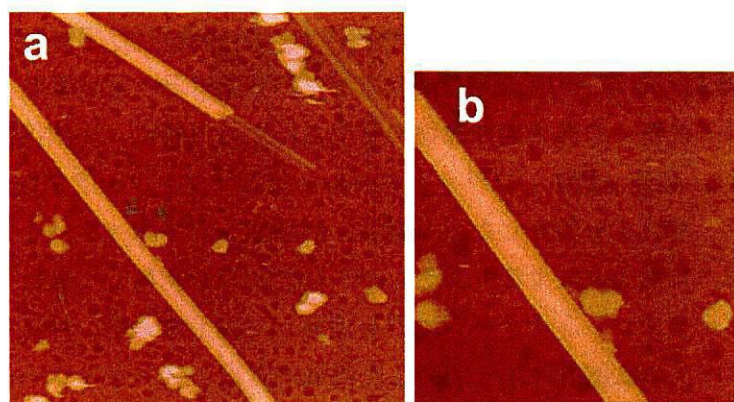


図 20 : AMP-PNP 存在下でのイースト菌の双頭 Dynein と微小管との結合を捉えた AFM 像。走査範囲(a)940 nm、(b)440 nm。

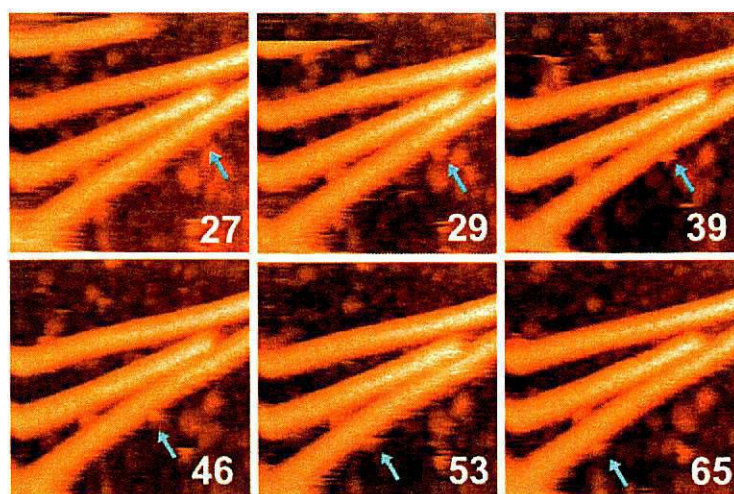


図 21 : イースト菌の双頭 Dynein のプロセッシブ運動を捉えた AFM 像。走査範囲 500 nm、イメージング速度 1s/frame。運動速度は約 7 nm/s。数字はフレーム番号、矢印は Dynein を指している。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金・基盤研究（S）によって遂行された。本研究の成果は、当研究室の多くのメンバーによる科学技術研究に対する献身的な努力に多くを依っている。土曜日も休日も、昼夜研究室の明かりが消えることはなかった。学生さんを直接指導するとともに、高速位相イメージング、フィードフォワード制御などを達成した内橋貴之准教授、スキャナーのアクティブダンピング、ダイナミック PID を開発し、特に、Myosin V の高速 AFM 観察を成功させた古寺哲幸博士、GroEL-GroES の反応や Streptavidin 2 次元結晶中の点欠陥の運動などの高速 AFM 観察を成功させた山本大輔博士、GroEL、GroES、及び、GroEL のミュータントを調製した谷口雅昭博士、DyneinC の Stem 運動や Actin Filament のすべり運動の高速 AFM 観察を成功させた内藤康行君と宮城篤君、Myosin V の調製を何度となく行った多くの博士前期課程の学生さんたち（特に、小出博史君、田中裕介君、田中慎一郎君）、高速 AFM のプラットフォームとなるソフトウェアプログラムを完成させ、また、ドリフト補償法を開発した坂下満君、何種類ものスキャナーを根気強く製作し試験した中北涼君、光熱効果によるカンチレバーのたわみを利用して探針・試料間距離の高速制御を実現しビデオレートイメージングを達成した山下隼人君、探針・試料間接触の高感度検出法やフーリエ振幅計測法を開発した高橋尚久君、Z スキャナーの構造の最適解を見出した岡崎康孝君に感謝したい。また、最終的な成功に至る以前の試行錯誤を根気強く進めた多くの学生さんにも感謝したい。また、微小カンチレバーを提供して下さったオリンパスの北澤正志さん、なかなか成功しなかった DyneinC の観察に根気強く付き合っ

て試料を提供して下さった情報通信研究所の大岩研究室のメンバーの方々にも感謝したい。最後に、研究に専念することを可能にしてくれた家内にも感謝したい。

発表論文リプリントなど