

研究課題別評価

1. 研究課題名 : 1分子の3次元像再構成法に基づく分子モーター作動機構の探索

2. 研究者氏名 : 片山 栄作

3. 研究の狙い :

動くこと、は生命の最も重要な属性の1つであり、多くの場合、その動きは生物分子モーターが担う。そのような「分子機械」の働く仕組みを調べることは大変魅力的な研究課題であるが、永年にわたる多くの研究者の努力にもかかわらず、未だに十分な理解ができていない。本研究は、急速凍結ディープエッチ・レプリカ電子顕微鏡法を用いて蛋白質分子が働く現場を直接観察することを目指すとともに、われわれが新たに開発した3次元画像解析法を駆使して、ATPをエネルギー源に、アクチン・フィラメントに沿って滑る分子モーター、ミオシンが、機能中にどのような構造変化を起こしているかを探り、その分子メカニズムの解明に迫る試みである。

アクトミオシン滑り運動の分子機構として世界に最も広く受け入れられた仮説は「レバーアーム首振り説」である。その根拠は構造生物学の結果によるところが大きい。1993年にミオシン頭部S1の結晶構造 (Rayment et al.) が、引き続いてヌクレオチド結合状態のS1の構造 (Fisher et al., 1995; Dominguez et al., 1998) が解かれた結果、ATP結合により、S1のモーター部分とそれに連なる長いヘリックス部分 (レバーアーム) の間で分子が強く折れ曲がることが明らかになった。他のさまざまな状況証拠と併せて、ATP結合によるレバーアームの折れ曲がりこそが滑り運動の力の源と信じられるようになったが、実際に滑り運動が起きている現場を直接見る手段はなかった。一方、分子モーターの機能の解析は、日本と米国でほぼ同時に開発された「1分子生理学」の手法の導入により、ここ10数年、著しい進歩を遂げた。蛍光顕微鏡を用いて1個1々の蛋白質分子やリガンドを直接観察し、操作し、分子の各種の物理量を一切平均化することなく測定するという斬新な発想により、従来のやり方では想像もつかなかった多くの重要な、そして驚くべき実験事実が次々に明らかになった。そのような画期的な方法論は、生命の基本原則を調べるための重要な手法としてすっかゝり定着し、他の研究領域にも急速に波及しつつある。

蛋白質の立体構造を調べるには、X線結晶回折法と多次元NMR解析法が多用される。しかし構造を知りたい蛋白質を何でも解析できる訳ではなく、それぞれ特有の条件を満たさなければ構造を解くことはできない。さらに、これらの方法により得られる構造情報は空間的にも時間的にも膨大な数の分子を平均化したものであり、揺れの大きい部分の構造は決まらない。それに対して、電子顕微鏡による直接観察法は、空間分解能こそそれらには及ばないものの、ほとんど任意の材料を対象として、個々の蛋白質粒子を直接観察できる、つまり「見たいものを見る」ことができる点で強力である。その一つ「急速凍結ディープエッチ・レプリカ法」は、あらゆる生命現象を1ミクロ秒以内に凍結固定し、その切断面にロータリー・シャドウイングを施して写し取った材料の表面構造を透過型電子顕微鏡で観察する方法である。適切な処理が施されれば、溶液中あるいは細胞内における個々の蛋白質粒子の高コントラストの実像を1.5 - 2 nmにおよぶ空間分解能で得ることも可能である。これは、蛋白質分子内のサブドメイン構造の配置が識別できるほどの分解能であるが、レプリカ試料は金属とカーボンのみから成るので、生の材料とは異なり、電子線に対して非常に安定であるという別の利点がある。われわれは、そのようなレプリカ試料中に含まれる個々の粒子の姿を、電子顕微鏡内で広い角度範囲にわたって傾斜撮影し、それら一連の像の間の立体視差から算出した試料面上各点の高さの連続的な値を出発点として、対象粒子の3次元表面プロファイルを精密に再構成する画期的な手法を開発した。また、3次元構造既知の蛋白質に関

しては、それがレプリカ試料中ではどのような像を与えるべきかをコンピュータ・シミュレーションで予測する方法を併せて考案し、それらを相補的に用いることで蛋白質の動的な立体構造を探る新たな手法を画策している。これら一連の手法が、「1分子生理学」に対応するユニークな構造解析法として使えるであろうとの期待のもと、3年間の「さきがけ研究」に携わることとなった。

4. 研究結果：

滑り運動中のアクチン・ミオシンの構造を急速凍結・ディープエッチ・レプリカ法で観察するため、1分子生理学の基本となる「*in vitro* アクチン滑り運動アッセイ法」を改変して用いた。アクチン・フィラメントに骨格筋重メロミオシン(HMM)を結合させて硬直複合体を作り、それを細かく砕いたマイカと混合した。硬直複合体中のHMMはその尾部でマイカ表面に吸着してアクチンの軌道を作り、そこにATPを加えると、アクチン・フィラメントは一方向に滑り出す。この時、液体ヘリウムで冷却した純銅ブロック表面に材料を押し付けると、一瞬のうちに全てを凍結固定することができる。得られた試料をフリーズ・フラクチャーして蛋白質周囲の氷を昇華させた後に白金/カーボンでロータリー・シャドウイングを施し、そのカーボン・レプリカを電子顕微鏡で観察した。この結果、滑り運動を始める前の硬直複合体と滑り運動中のミオシン頭部の構造には大きな違いが見出された。その違いに関しては既に発表済みである(Katayama, 1998)ので詳述しないが、硬直複合体中のミオシン頭部は比較的均一な構造を取っているのに対し、滑り運動中には様々な形状が見られ、平均化を要する従来の方法により構造解析ができないことは一見して明らかであった。そこでアクチンに結合したミオシン頭部クロスブリッジを1分子ずつ構造解析する方針で研究を開始した。

まず、レプリカ試料が大量の電子線照射に耐えることを利用して、各粒子の高倍率像をできる限り広い傾斜範囲で多数撮影した。これらの画像を、われわれ自身が開発した3次元再構成ソフトウェア(工学院大学・馬場則男教授チームとの共同研究)により処理して対象の3次元像を得た。3次元再構成は以下の手順に従って行った。1) 先ず、傾斜撮影した多数の画像の回転軸の方向とそれに沿った位置を画像相関法を用いて検索し、一連の画像の相対位置を精密に揃える。それに並行して各画像の精密な傾斜角を決定する。2) 各画像を、軸に垂直な断層面に分割し、それぞれの面内で相関法により見つけた対応点の高さを、立体視差を用いて精密計測する。これにより、後の処理の基本となる各点の高さのプロファイルが得られる。3) 傾斜角0度の画像の断層面における輝度分布を、シャドウイングによる金属膜の厚さに比例するものと仮定し、前項で決めた高さのプロファイルの上に重ねて、断層面中の密度分布の初期近似とする。4) 仮定した高さプロファイル上の密度分布をそのまま別の角度に傾斜投影し、その角度における実際の画像のデータと比較する。異なっていれば、それらが合致するように元の密度分布を修正する。5) すべての傾斜画像にわたってこれらの処理を実行し、逐次近似法により連立方程式を解いて全体の誤差が最小となるようにする。6) 画像中のすべての断層面に関して以上の処理を実行し、それらを再配置することにより3次元像が再構成される。

一方、蛋白質の原子座標データが得られている場合には、その表面の凹凸のプロファイルが推定できるので、電子顕微鏡で観察されるべきレプリカ像を予測できると考えられる。蛋白質分子のモデルを任意の方向に置き、座標データ中の各原子に適当な半径を与えて太らせた後、市販のレイ・トレーシング・ソフトウェアで多方向から影付けしてロータリー・シャドウイングの効果を得る。さらに電子顕微鏡の球面収差の影響を表

わすために、像を少々ぼかす。この方法を用いれば、推定される蛋白質の構造変化に応じて原子座標に修正を加え、そのシミュレーションで得られた像を実際のレプリカの電子顕微鏡像と比較して、推定した構造変化の信憑性を検証できる。

まず、われわれの方法自体の妥当性を検定するための対照材料として、構造解析が進んでいる単独のHMM頭部とアクトHMM硬直複合体の構造を解析した。ミオシン頭部にATPが結合するとレバーアーム部分が強く屈曲することを述べたが、ATPまたはそのアナログADP/バナジン酸を結合したHMMの急速凍結レプリカでも同様の像が得られる(Katayama, 1998)。3次元再構成されたそれらのレバーアーム部分はX線結晶回折による骨格筋S1の構造とATPを結合した平滑筋S1の構造の中間の屈曲を示した。後者は、レバーアーム先端部分を人為的に付加したデータであり、屈曲角度は任意性を含む。われわれのレプリカ像は、結晶解析の結果と良く合致していると思なされるであろう。

Milligan (1996) による硬直複合体のモデルは、結晶から直接解かれた訳ではなく、アクチン・モノマーから想定されたアクチン・フィラメントの構造に骨格筋S1の構造をコンピュータ上でフィットさせて作った人為的なドッキング・モデルである。しかしそのモデルは、さまざまな生化学的実験データを良く説明することから、信頼性はかなり高いと考えられている。われわれは、アクトHMMのフリーズ・レプリカ像からその3次元再構成を行うとともに、アクトS1の原子モデルから、そのレプリカ像のシミュレーションを行い、アクトHMMの実際のレプリカ像との比較を行った。その結果、以下のことが判明した。レプリカ像に見るアクトHMM硬直複合体の構造は、アクチンとS1の結晶データから推定されたドッキング・モデルに近い。アクチン結合部に近いモーター領域では、上位50Kドメインが少し下方に回転している以外はほぼ完全に一致する。それに対し、レバーアーム部分は微妙に異なっていた。HMMでは2個のS1がS2でつながっており、アクチンと頭部の結合様式の違いによってそれぞれのレバーアームが色々なコンフォメーションを取るためであろう。これらはいずれも妥当な結果であり、われわれが考案した新たな手法は、構造解析の手段として十分に役立つものと思われる。そこで、無負荷条件で滑り運動中のHMMのクロスブリッジを、1粒子ごとに広範囲に傾斜して連続撮影し、それらのコンフォメーションの解析を行った。

滑り運動中のクロスブリッジのモーター領域は、アクチンと、少なくとも3種類以上の様式で結合していた。3種類とは、1)上位50Kドメインのみで結合する場合、2)下位50Kドメインのみで結合する場合、そして、3)それらの両方で結合する場合である。3次元再構成まで終った粒子の数はまだ少なく、あくまで予備的な結果ではあるが、アクトミオシンの境界部分の構造は硬直複合体とは異なっている場合が多い。一方、欧米を中心に世界の大多数の研究者が正しいと信じてきた「レバーアーム首振り説」においては、アクトミオシンの境界部分の構造は常に保持され、ATP結合によるミオシン頭部内の大きな構造変化こそが滑り運動を引き起こす張力の源であると想定している。実際に観察された粒子のうちのかなりのものは境界部分の構造が異なっており既に大前提との隔たりがある。レバーアーム部分は硬直複合体中とは異なるさまざまな向きにあり、滑り運動により動いていることは間違いないが、その方向は、ATP結合型S1の原子モデルとは必ずしも一致しない。結晶中では見られない構造も実現されているようである。しかし、最終結論を下すには、少なくとも数100個の粒子のコンフォメーションを解析して統計的に処理することが必要であろう。次々に解析を続けてはいるが、1分子づつ構造解析する都合上、個々の演算に相当な時間を要し、未だ十分な例数には達し

ていない。これまでに観察されたレプリカ試料中での構造のそれぞれがクロスブリッジ構造の時間経過を表わすと仮定すれば、ミオシン頭部はアクチン上を揺れながら前進するような状況が想定される。その意味で、柳田教授らの研究チームが提唱する「方向性を持つブラウン運動」(“Biased Brownian Motion”) なら説明可能である。

ごく最近、アクチンを巻き込むように結合しているミオシン頭部のコンフォメーションが、これまでに X 線回折で解かれていない新たな構造を表わしている可能性が浮上した。この構造は、ミオシン頭部中心近くの 2 個の高反応性システイン残基を化学架橋して調製した産物の構造に酷似しており、そのシステイン残基を含むヘリックスが壊れている反応中間体を観察しているものと解釈される。このような構造が観察できたことは、急速凍結固定法の優位性を強く示唆しているものと考えられる。いずれにせよ、高性能のコンピュータを導入して演算処理を格段に高速化することにより、できるだけ多くの粒子の 3 次元画像解析を進めることが必須である。

ミオシン・ファミリーは、現在知られているだけでも 20 種類近くのメンバーを含む大きなグループであり、構造的にも機能的にも微妙に異なるさまざまな分子種が見出されている。われわれは、外部の研究チームとの協力により、それら天然の分子種やその変異種を材料として「レバーアーム首振り説」の信憑性を検証している。

まず、粘菌ミオシン-II の変異種を用いた研究を行った(産業技術総合研究所・上田太郎博士との共同研究)。G680V S1 はレバーアームの屈曲点にあるグリシンがバリンに置換したため、ADP/Pi 結合状態の活性中間体が異常に安定化される S1 である。ATP 存在下でこれをアクチンに加え、複合体の構造をネガティブ染色により観察した。この変異 S1 は予想通り、通常の S1 ならほぼ完全に解離する条件でもかなり強くアクチンに結合していたが、興味深いことに、比較的高温では硬直複合体に似た、伸びた構造を取るのに対し、低温では小さく丸まった構造に変換することが判明した。このような構造は、われわれがずっと以前に、化学架橋したアクト S1 で見出した構造 (Katayama, 1989) に酷似するが、その解釈については現在検討中である。

ミオシン-V は非常に長いレバーアーム部位を有する特徴的な分子である。1 分子だけで、長距離にわたって解離することなくアクチン・フィラメント上を滑る「プロセスシブな運動」で知られている。その理由として、アクチン・フィラメントの長周期らせんに沿って同一位相の位置にあるモノマーに、2 個の頭部が 35 nm 間隔で交互に結合し、レバーアーム部分の屈曲によってあたかも歩くように進むためであり、それはレバーアーム首振り説の強い証拠として主張されてきた。大阪大学の柳田敏雄教授、マサチューセッツ大学の池辺光男教授のチームに協力して、そのレバーアームを元の 6 分の 1 にまで短縮させた変異種の行動を調べたところ、元のミオシンと全く同様に 35 nm のステップサイズで動くことが分かった。電子顕微鏡により構造を調べても、レバーアーム部分は短く、2 個の頭部の間隔が運動時に広がる可能性も否定された。レバーアームの首振りでは全く説明不可能な現象である。

ミオシン-VI は、アクチン上を逆方向に進むモーターとして、ミオシン・ファミリーの中でも特異な存在である。このミオシンは野生型の状態で既にレバーアームが短く、上記の変異ミオシン-V と同じ長さである。ところが、このミオシンも、ミオシン-V と同じくアクチン上を「プロセスシブ」に、しかも 35 nm のステップサイズで動くことが判明した。電子顕微鏡で観察した構造は変異ミオシン-V と類似しており、S2 部分がほどけてミオシン頭部の間隔が広がるような現象も見られなかった(柳田教授、池辺教授のチームとの共同研究)。

以上の通り、われわれの実験結果はいずれも、従来の「レバーアーム首振り」説とは相容れないものであった。

5. 自己評価：

以下は研究を開始して第2年度目に入る前の時点で設定した研究計画と展望である。

- 1) 実際に張力を発生しているミオシンの構造を観察する。その3次元再構成像を得る。
- 2) さまざまな機能的特徴を持つ、別種類あるいは変異種ミオシンの構造を探索し、従来のミオシンと比較検討する。
- 3) 原子モデルを再構成像に合わせて変形させ、不安定な反応中間体のコンフォメーションのモデルを作る。安定なコンフォメーションとのエネルギー状態の差、あるいはその差が分子内のどの部位に由来するかを検討する。
- 4) 現在の3次元再構成過程を自動化、高速化する。
- 5) 限られた条件の下で、より高精度の3次元像を得るための新たな再構成法を開発する。
- 6) 急速凍結レプリカ法は材料を問わず、組織・細胞中の蛋白質複合体も扱えるので、それらの3次元再構成像を得る可能性を探る。

当初設定した以上の研究計画のうち、3年間の期限内に達成できなかった項目は、1)および3)の後半のみである。その意味では、目標の75%程度は達成したと言えるであろう。当研究は解析のために必要な技術の開発が研究内容のかなりの部分を占めることが大きな特徴であるが、その技術は世界に前例がないものであり、他の目的にも幅広く応用できる。究極の目標である「分子モーターの作動機構の解明」にはまだまだ遠く得られた内容の論文化も見通しが立っていないが、総合的には80%以上の目標達成率と自己評価している。

6. 研究総括の見解：

ミオシン分子のダイナミックな微細構造を急速凍結デープエッチ・レプリカ法を用いて電子顕微鏡像を得て、その3次元再構成により解明した。その結果はX線結晶解析から得られた知見を補完するもので、さらなる解析が大いに期待される。この方法は他の蛋白質にも応用可能である。世界に前例のない技術を確立して、その幅広い応用展開で成果をあげられたい。

7. 主な論文等：

(1) 論文

- K. Tamano, S.-I. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai & C. Sasakawa: Supramolecular structure of Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* 19: 3876-3887. 2000
- N. Utsunomiya-Tate, K.-I. Kubo, S.-I. Tate, M. Kainosho, E. Katayama, K. Nakajima, & K. Mikoshiba: Reelin molecules assemble together to form a large protein complex, which is inhibited by the function-blocking CR-50 antibody. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 97: 9729-9734. 2000
- K. Yamane, E. Katayama, & T. Tsuruo: The BRCT Regions of Tumor Suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 678-684. 2000
- K. Yamane, E. Katayama, & T. Tsuruo: p53 contains a DNA break-binding motif similar to the functional part of BRCT-related region of Rb. *Oncogene*, 20: 2859-2867. 2001

H. Tanaka, K. Homma, A. Hikkoshi-Iwane, E. Katayama, R. Ikebe, J. Saito, T. Yanagida, & M. Ikebe: The motor domain, not a long neck domain, determines the large step of myosin-V: Nature, 415: 192-195. 2002

S. Nishikawa, K. Homma, Y. Komori, M. Iwaki, T. Wazawa, A. Hikkoshi Iwane, J. Saito, R. Ikebe, E. Katayama, T. Yanagida, & M. Ikebe. Class VI myosin moves processively along actin filaments backward with large steps. Biochem Biophys Res Commun. 290: :311-317. 2002

K. Tamano, E. Katayama, T. Toyotome, & C. Sasakawa : Shigella Spa32 is an essential secretory protein for functional type III secretion machinery and uniformity of its needle length. J Bacteriol. 184: 1244-1252. 2002

M. Fukuda, E. Katayama & K. Mikoshiba: The calcium-binding loops of the tandem C2 domains of synaptotagmin VII cooperatively mediate calcium-dependent oligomerization. J Biol Chem. 2002 May 28 [epub ahead of print]

S. Yoshida, E. Katayama, A. Kuwae, H. Mimuro, T. Suzuki & C. Sasakawa: Shigella deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. EMBO J. 21: :2923-2935. 2002

(2) 口頭発表 (招待講演のみ)

E. Katayama: Three-dimensional subdomain architecture of myosin head during in vitro actin sliding movement. The 11th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience/COE International Conference. "Frontiers in Molecular Motors Research: From Gene, Structure, Dynamics to Functions". Hyogo Japan. Nov. 2000

片山栄作 :機能中の蛋白質 1分子の構造を探る: 第45回日本電子顕微鏡学会シンポジウム「見る限界を越えて」: 岡崎 2000年11月

片山栄作 :遺伝子発現制御と立体構造: 「1分子生理学と立体構造」:シグナル伝達研究とゲノム 医科学の最先端と医薬品への応用コース(ゲノム医科学編):東京 2000年12月

片山栄作、市瀬紀彦、馬場則男 :分子機械の働くしくみを電子顕微鏡で探る:日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会シンポジウム「凍結技法 ?生体の真の姿を求めて-」:福岡 2001年5月

片山栄作、馬場則男、白石知子、相沢慎一 :急速凍結 フリ-ズレプリカ法による細菌べん毛基部の立体構造解析 :日本電子顕微鏡学会第57回学術講演会シンポジウム「微生物 :見なければならぬもの、皆で積極的に探しましょう」:福岡 2001年5月

片山栄作 :機能中の蛋白質 1分子の立体構造解析シグナル伝達研究とゲノム 医科学の最先端と医薬品への応用コース(ゲノム医科学編)東京 2001年11月

片山栄作 :新たな原理に基づく蛋白質分子複合体の3次元構造解析 :日本電子顕微鏡学会関西支部電子顕微鏡技術研究会「細胞、分子の3-Dイメージング」:岡崎 2001年12月

E. Katayama Three-dimensional image analysis of protein molecules in function. International Symposium on "Emerging Fields of Biomedical Research and New Industry by Integrating Biotechnology, Information Technology and Nanotechnology". Tokyo Japan Mar. 2002 .

片山栄作、市瀬紀彦、宮林信治、高橋透友、馬場則男 :作動中の蛋白質の一瞬の3次元構造を捉える :日本電子顕微鏡学会第58回学術講演会シンポジウム「凍結技法 -動的形態解析への応用-」:大阪 2002年5月

永山国昭、片山栄作 :「タンパク質の働きを観る新手法-構造生物学と細胞生物学のインタ-フェイス」-形態と機能の新しい結合 :第2回日本蛋白質科学会年会ワークショップ :名古屋 2002年6月

片山栄作 :滑り運動中のミオシンクロスブリッジの構造観察から分子メカニズムに迫る :第2回日本蛋白質科学会年会ワークショップ :名古屋 2002年6月

その他、一般口頭発表 18件