

研究の概要

筋収縮の分子メカニズムを解明するために、運動タンパク質の計測技術の開発を一貫して行ってきた。水溶液中でのアクチンフィラメント1本のイメージングと操作法を開発し、これとナノメートル計測法と組み合わせ、筋肉分子モーター、ミオシンの発生する変位と力を *in vitro* で計測することに成功した。さらに、生物応用を可能にする水溶液中での1分子イメージング法の開発に成功し、ミオシン分子モーター 1 個の動きを実時間観察することに成功した。こうして、筋収縮が、バイアスブラウン運動(ゆらぎ)で起こっていることを明らかにした。最近では、細胞、そしてさらにヒト脳など生命機能全般において“ゆらぎ”の積極的な役割について研究を進展させている。

詳細な説明

1) アクチンフィラメント1本のイメージングと操作

筋収縮の研究は、1970年前後に A.F. Huxley, H.E. Huxley らが提案していた仮説“首振り説”が、柳田(JMB,1981)と米国のグループ(D.Thomas ら、Nature, 1982)によって覆された。こうして、筋収縮の研究は振り出しに戻り、新たな筋収縮の研究が始まった。それまで筋収縮の研究は、筋肉細胞を使った力学測定や X-線回折による構造解析か、生化学的研究が主であったが、柳田らがアクチンフィラメント1本の可視化と操作法を開発し、筋収縮の研究に変革をもたらした。筋肉収縮は、アクチンフィラメントと運動タンパク質ミオシンが相互作用して引き起こされる。アクチンフィラメントは直径が約7nm しかなく、分解能が約300nm の光学顕微鏡で、すなわち、水溶液中で直接観るのは不可能と考えられていた。1984年、恩師の大澤文夫教授の研究室でアクチンフィラメント1本を蛍光ファロイジンでラベルし、蛍光顕微鏡と超高感度カメラを使って、水溶液中で直接可視化することに成功した(Nature, 1984)。さらに、アクチンフィラメントを極細のガラス針で捉え、操作する方法を開発し、ミオシンとの相互作用で起こるアクチンフィラメントの変位と力を計ることに成功した(Nature, 1988)。筋肉細胞から抽出し精製したアクチン、ミオシンなど運動タンパク質を使って *in vitro* で運動や力を分子レベルで直接計測することを可能にしたのである。

この蛍光標識アクチンフィラメントのイメージング法を使って、木下一彦らが ATP 合成酵素 F1が回転することを証明し(Noji ら、Nature,1997)、それが1997年のノーベル化学賞を決定づけたことはよく知られた話である。

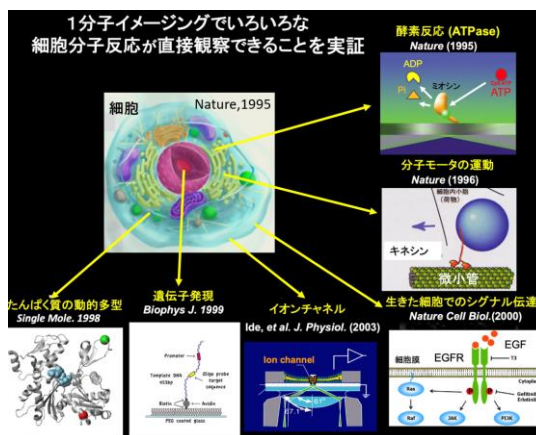
2) ナノ計測法による変位と力の1分子計測

アクチンフィラメントの一端を極細のガラス針に付け、もう一端をミオシン分子を付けたガラス表面に触れさせると、ミオシン分子がアクチンフィラメントを引っ張りガラス針がたわむ。このたわみを測定して、ミオシン分子が発生する変位や力を求める。ミオシン1分子が発生する変位や力は小さいので、針の直径を0.2-0.3ミクロンメートルとし、そのたわみをナノメートルで計測する方法を開発した。光学顕微鏡で針を観ているので、そのままでは、回折限界により数百 nm 程度の精度でしか測れない。そこで、ガラス針の像を二分割のホトダイオードに投影し、その出力の差分から針の像の中心位置を1ナノメートルの精度で計測する方法を開発した。こうして、変位を1ナノメートル、力にすると1ピコニュートンの精度で計測することに成功した(2014年にノーベル化学賞を受賞した超解像の原理の一つはこの方法で、蛍光分子の蛍光像の中心位置を数ナノメートルの精度でコンピュータを使って画像解析により求めている)。こうして、ミオシン1分子が発生する力が約2ピコニュートンであることを初めて示した(Nature,1991; BBRC, 1994)。ガラス針によるアクチンフィラメントの操作は、A.アシュキンは開発したレーザーを使った光ピンセット(2019年ノーベル物理学賞)でも可能になり、その

方法も広く使われている(Spudich ら、Nature,1994)。

3) 1分子イメージング法

アクチンフィラメントのイメージングでは、アクチン分子に1個蛍光分子がついているので、数百個の蛍光分子を観ていたことになる。ここでは、蛍光色素1分子をイメージングする方法の研究開発である。

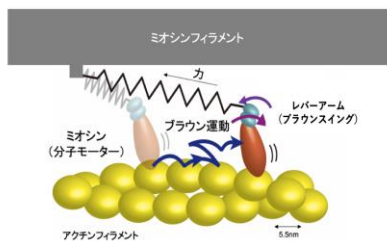
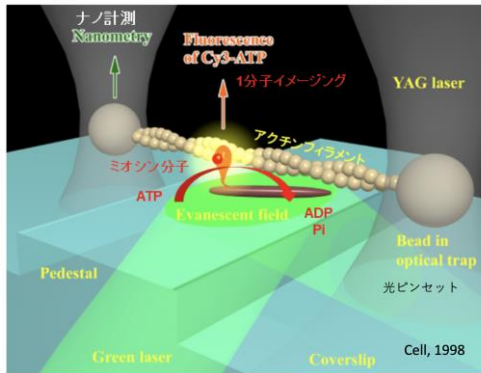


水溶液中では、水分子の衝突、微量に含まれる活性酸素によって蛍光分子の強度は数分の1以下になり、不安定ですぐに退色してしまうこと、さらに水分子のラマン散乱やその他微量のゴミによりバックグラウンドノイズが大きい。柳田らは、ERATO プロジェクトを立ち上げ、水溶液とガラスの界面で全反射する時生じる近接場(エバネッセント場とも呼ばれ、波長の数分の1の範囲に光を集めることができる)を使って蛍光分子とその極近傍だけを照明する局所励起法(水溶液からのノイズが減る)を採用し、また顕微鏡の光学系を綿密に改良し、さらに溶液から活性化酸素やゴミを取り除くなどステップバイステップに詰めていき、1995年、初めて水溶液中で蛍光色素1分子のイメージングに成功した(Nature, 1995)。その後、この方法で、酵素反応(Nature, 1995)、モーター分子(キネシン)の微細管に沿った運動(Nature, 1996)、生きた細胞中でのシグナルタンパクの情報伝達(Nat. Cell Biol, 2000; Science, 2001), FRETによるタンパク質の構造変化(Single molecule, 1998)、そして DNA とタンパク質の相互作用(Biophys. J., 1999)など多くの生体分子反応を実時間で1分子イメージングできることを実証し、生命科学の全般で1分子イメージング法が強力なツールになることを示した。実際、世界中で広く使われ、次世代の生命科学を拓く目覚ましい成果が多くあげられている。“1 分子生物物理学”の誕生である。

4) 筋収縮の分子メカニズムの解明: バイアスブラウン運動モデル

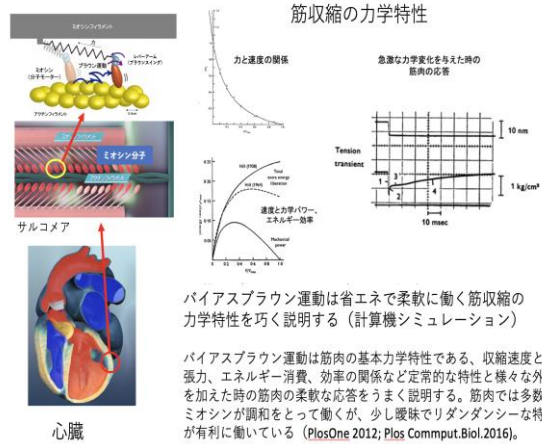
1分子イメージング法とナノ操作計測法を駆使して、筋肉分子モーター、ミオシンの変位、力、ATP 分解反応と力学反応の共役など基本的パラメータを直接決定した(Cell, 1998)。さらに大きな発見は、分子モーターがブラウン運動を利用して“ゆらぎ”ながら働いているということである(Nature, 1999)。この発見は、1985年に大澤文夫教授と発見した化学反応と力学反応は必ずしも1:1にカップルしていないという“ルースカップリング”を支持するものである(Nature, 1985)。さらに、2019年には、DNA 折り紙を使って再構成した筋肉ミオシンフィラメントを使って、アクチンと相互作用し運動を引き起こしているミオシン分子1個の構造変化と運動を直接可視化することに初めて成功した(Comm.Biol.2019)。こうして、筋収縮が、ミオシン分子頭部の構造変化(レバーアームスイング)のブラウン運動とアクチンフィラメントに沿った拡散ブラウン運動が順方向にバイアスされて引き起こされる、バイアスブラウン運動で起こることを決定づけた。さらに、構造変化と拡散のバイアスブラウン運動は、筋肉の基本的力学特性をうまく説明することをコンピュータシミュレーションで明らかにした(PlosOne, 2012;Plos.Comp.2014)。

1分子計測(1分子イメージング、操作、ナノ計測)によるミオシン分子モーターの化学反応(ATP分解)と力学反応の同時測定



筋収縮のバイアスブラウン運動モデル

ミオシンはアクチンフィラメントの沿って前後にブラウン運動し、たまたま前方向のアクチンに触れるとアクチンと強く結合し、さらにこれもブラウン運動で前後にゆらいでいたミオシン分子の尾部(レバーアーム)スイングが前方向になった時、ATP分解産物(ADP+Pi)が解離しミオシンの運動が止まり一歩進む。そして、新たにATPがくると、ミオシンはアクチンから解離し元の状態にもどり、またブラウン運動が始まる。こうして、ミオシンは一步一步前に進んでいく。方向を感知するのは、ミオシンに備わっている歪みセンサーであることも見出している(Nat.Chem.Biol. 2009)。ミオシンの運動はブラウン運動で引き起こされ、ATPのエネルギーはアクチンに強く結合したミオシンを解離させ元の状態にもどすため、言い換えれば、ランダムなブラウン運動から前方向の運動を取り出す(整流する)ために使われている。



研究の発展

1分子イメージング・ナノ計測技術は、1)超解像顕微鏡への発展、そして2)1分子DNAシーケンサーの開発により生命科学の躍進と医療応用に大きく貢献している。さらに、3)バイアスブラウン運動(ゆらぎ)を利用する仕組みは、複雑な人工システムの省エネ制御に有効であることを示し、企業化が期待されている。

1)1分子イメージングとナノ計測の超解像顕微鏡への発展

溶液中、生きた細胞中での蛍光分子動態の一分子計測技術のもう一つの華やかな応用例が、超解像蛍光顕微鏡法である。一分子計測技術を用いた蛍光分子局在化法によって、顕微鏡の分解能が一気に20倍以上向上した。その源流は、柳田らによる一分子計測技術であり、柳田らの論文が発表された1995年以降、超解像蛍光顕微鏡の論文は指数関数的に増加し、過去5年間だけで2000報を超える論文が発表されCell, Nature, Scienceの三大誌だけでも40報もの論文が発表されている。その内容は多岐にわたり、細胞質と核の間の物質輸送を司り、神経疾患・老化・癌など様々な疾患とも関わる核膜孔や、脳で学習や記憶を司る素単位であるシナプスなど、医学生物学的に重要な微細構造の研究のような基礎生物学的応用から、疾患関連SNPsや自閉症モデルマウスの神経細胞などの医療応用に直結した研究まで、幅広い分野に大きな影響を与えている。そのため、超解像顕微鏡の開発には、「生きた細胞の中で個々の分子の動きが見えるようになり、パーキンソン病やアルツハイマー病の脳神経細胞の分子を捉えるほか、受精卵の中のタンパク質ひとつひとつまで追跡できるようになり、医学生物学に革命的な影響を与えつつある」としてノーベル賞が2014年に授与された。

2)1分子酵素反応イメージングのDNAシーケンサーへの発展

基礎科学の計測技術が臨床現場にまでその影響を与えている代表的な例が、DNAシーケンシングである。特に、21世紀になって出現した次世代シーケンシングと呼ばれる大量塩基配列技術は、個人のゲノム情報の1塩基レベルでの解析を現実的に実施可能なものとした。しかし、この実現には、超並列型の短い配列(一般的に200塩基以下)を大量に取得し、それをコンピュータの大量情報処理で30億を超えるヒト全ゲノム上にマッピングする作業が必要なのが現状であった。そのため、解析に必要な消耗品費が下がっても、実際に個人ゲノムを解析するためには大規模なコンピュータ施設が必要となり、また短い配列の組み合わせによる再構成であるがために複数の塩基変異がどちらのアリル上にあるのかの判別も容易ではなかった。この問題の解決には長いDNA鎖の塩基配列を

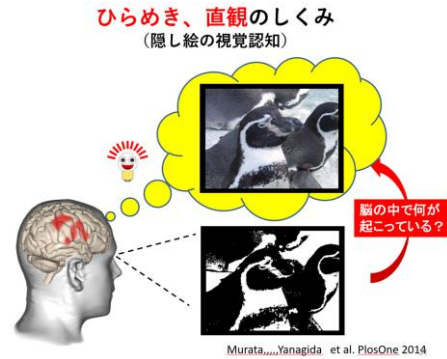
一続きの文字列として高精度で決定できる計測系が必要であり、その課題は1分子実時間シーケンシング技術によって達成された。こうした系は2010年ぐらいから実用機として市場に現れ、2016年には20 kb以上の長さの配列情報を数時間の間に1 Gbを1ランで解析する装置が利用可能になる、すなわち、1日でヒト全ゲノム3Gbを読むことが可能になることを意味する。(PacBio社を中心に開発販売されているが、ロッシュからも2016年春から医療目的で販売される)。これは、従来のショートリードの代表的な次世代シーケンサーの配列長として1000倍、解析時間で言うと約100倍の効率化を達成している。何よりショートリードデータによるような大量データ解析を避けられる点は、現実的な個別化医療の実現のためには重要なポイントである。さらに、このシーケンサー自体のコスト低下も相まって、今後の個人ゲノム解析のメインストリームに乗ると期待されており、生命科学、そして医療に与えるインパクトは計り知れない。この計測系は、柳田らのグループによって切り拓かれた近接場光学系を使った1分子実時間酵素反応計測(Nature, 1995)の発展(柳田らは、全反射でできる近接場を使って、酵素反応(ミオシン分子のATP分解サイクル)を観たが、PacBio社は、数百ナノメートルの窪みを作り(ゼロモードキャビティ)、そこに発生するより狭い局所励起ができる近接場を使いよりRNAポリメラーゼの酵素反応をより高い精度で計測している)であり、基本的な計測コンセプトは同じである。

3) バイアスブラウン運動(ゆらぎ)を利用するモデルの発展

柳田らが提案しているバイアスブラウン運動(熱ゆらぎ)は、分子モーター(廣川ら Science 1999; Nature 2003; J. Spudichら, Nat. Str. Biol., 2007)以外にもDNA-タンパク相互作用(S. Blockら, Nature, 2005; E. Nuderら, Cell, 2005; C. Bustamanteら, Science, 2009)、遺伝子発現(S. Xie Nature, 2006)、細胞シグナル伝達(M. Ueda, T. Yanagida, Science, 2001; B. Kobilkaら, Nature, 2017)やCa²⁺イオンポンプ(Toyoshimaら JPS, 2004)などでも働いていることが報告されるようになり、熱ゆらぎを有効利用するバイアスブラウン運動は、生物分子機械のメカニズムを解明する基本コンセプトとなってきた(Chemical Rev. 2014, ProJAS, 2017)。分子機械だけでなく、ヒトの脳の視覚認知でも自発ゆらぎ(この場合は、熱ゆらぎではなくエネルギー消費を伴った自発ゆらぎである)が働いていることを、隠し絵の認知実験で示している(PlosOne, 2014)。

柳田のバックグラウンドは工学で、生物の仕組みに学んで工学に革新を起こすという夢を持っている。彼によると、生物と人工機械の根本的な違いは、消費するエネルギーの差である。例えば、神戸に設置されたスパコン“京”の消費電力は、1500-2000万ワットである。それに対して、ヒトの脳は、おそらく“京”より複雑に見えるのに、消費エネルギーは20ワット(考えている時とそうでない時の差は、1ワット)と桁違いに少ない。これは、根本的にアルゴリズムが異なることを示唆している。柳田は、大澤文夫教授との議論の下、生物分子モーターがノイズ(ゆらぎ)を遮断せず、うまくそれを利用するメカニズムに違いはないと考え、大阪大学で立ち上げられた“ゆらぎ”プロジェクトに参加し、工学者、企業と協力して研究を進めた。まず、“ゆらぎ”のコンセプトを定式化し、その定式を使って、約10,000ノードを持つ日本のコンピュータネットワークの制御を試みた。どちらも、厳密に制御しようとする、組み合わせが膨大となり、制御不能になる。ゆらぎ方程式を使って、コンピュータネットワークをほどほどに良い解を出すように制御すると、今使われている制御方法にくらべ、消費電力を1000分の1、そして急激な変動や事故に対する頑強性(ロバスト性)が数倍あがるのが、シミュレーションレベルで示すことができ、現在、電気通信の日本を代表する企業と実用化に向け研究開発が進んでいる。2050年にはITが今

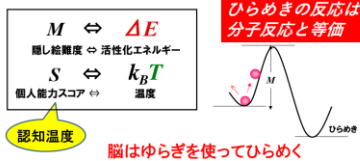
の日本の発電量の50%近くを消費するという深刻な報告が経産省から出されているが、このゆらぎプロジェクトが成功すれば、その社会貢献は甚大である。



視覚的ひらめきの定量的解析 ひらめき速度の式を発見

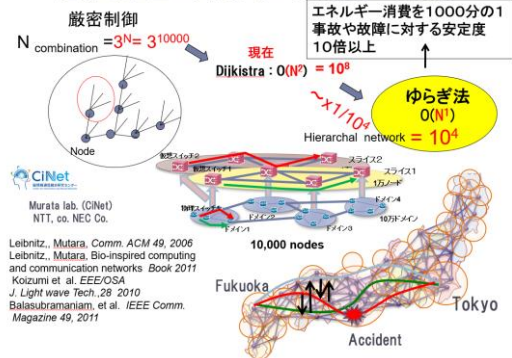
$$v = 1/t = C \exp(-M/S) \quad \text{隠し絵の探索速度の式}$$

$$v = v_0 \exp(-\Delta E/k_B T) \quad \text{Arrheniusの式(化学反応速度)}$$



脳はゆらぎを使ってひらめく

通信コンピュータネットワークの制御への応用



人材育成

柳田研究室及び柳田が主催した研究プロジェクトから多くの研究者を輩出している。例えば、大学教授として、阪大3名、東大2名、京大2名、岡大2名、東工大1名、名大1名、山梨大1名、広大1名、光産業創生大1名が活躍している。