生命を支える生体分子機械

- ナノテクノロジーをはるかに越えた微細構造設計 -

wwPDB Foundation 主催
一般社会人・学生（高校生以上）向け講演会
「タンパク質のかたちが支える生命科学と創薬への応用」
大阪梅田ハートンホール（毎日新聞ビル地下１階）2012.10.13

難波 啓一

大阪大学 大学院 生命機能研究科

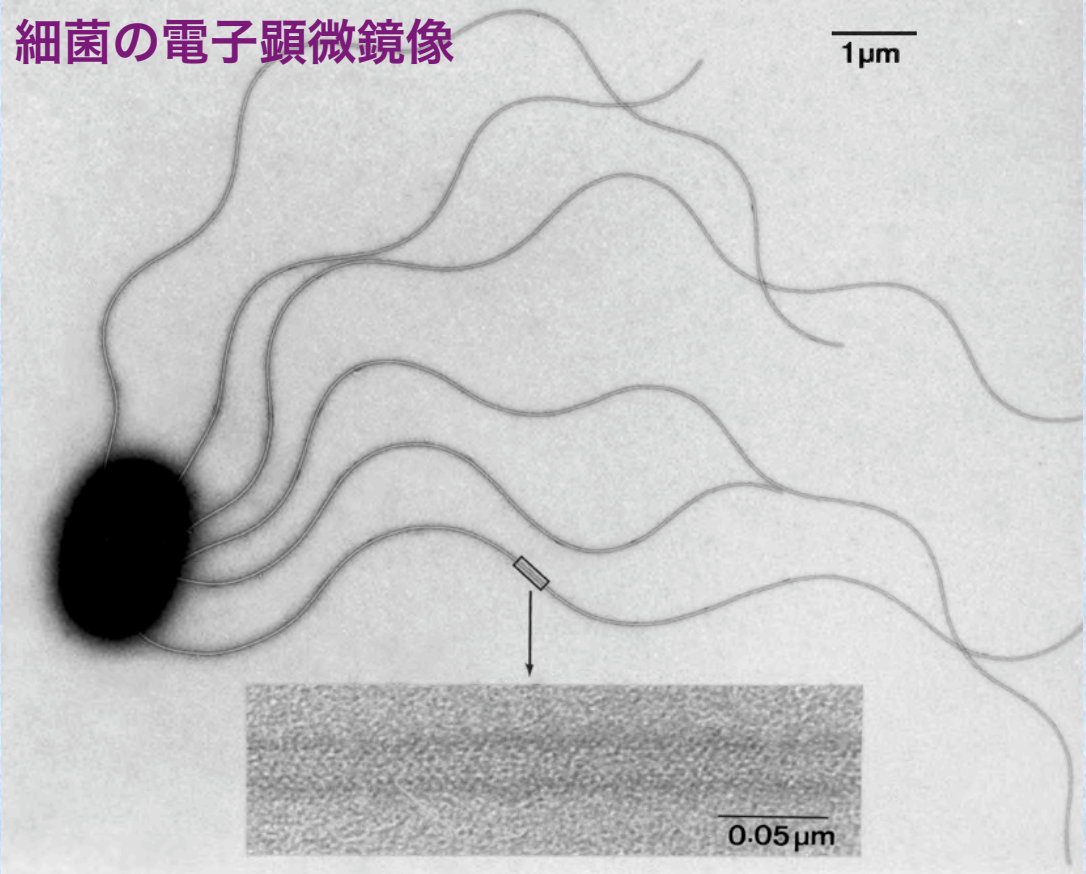
講演内容

- タンパク質はどれぐらい小さいか
- タンパク質はどれぐらいすごいか
- タンパク質のかたちを見る技術
- どんなものが見えて何がわかるか

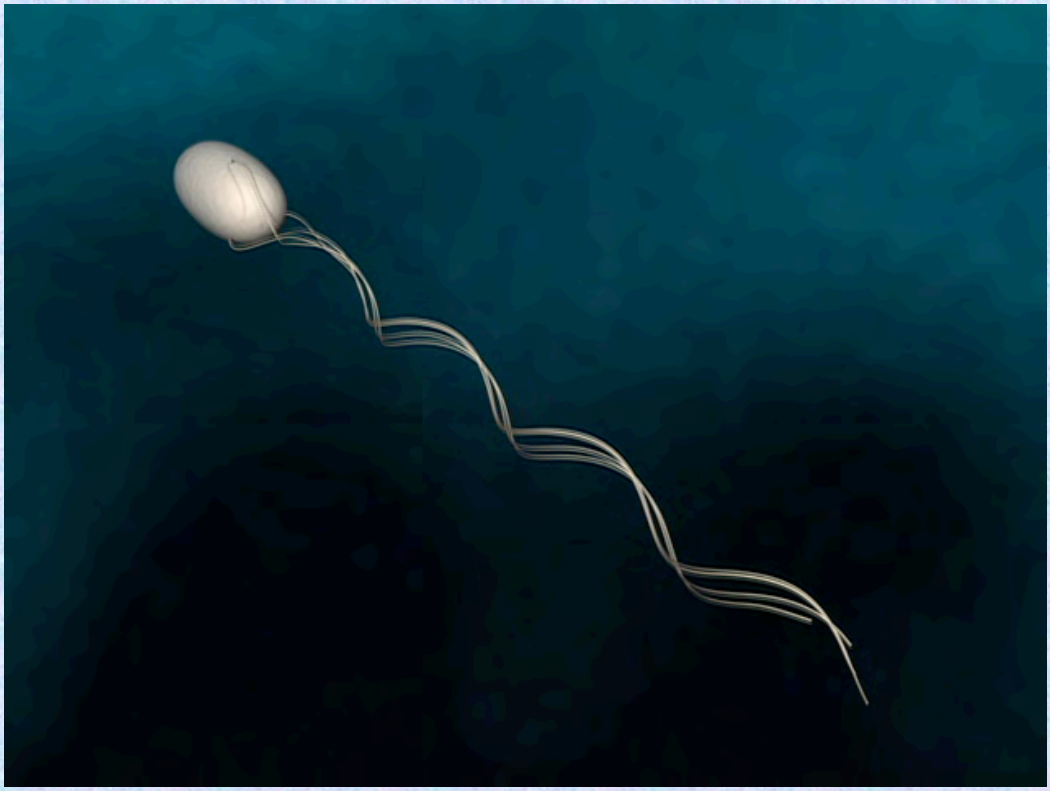
タンパク質はどれぐらい小さいか

細菌の運動器官べん毛でその大きさを見る

細菌の電子顕微鏡像



らせん型プロペラのべん毛を束にして泳ぐ細菌

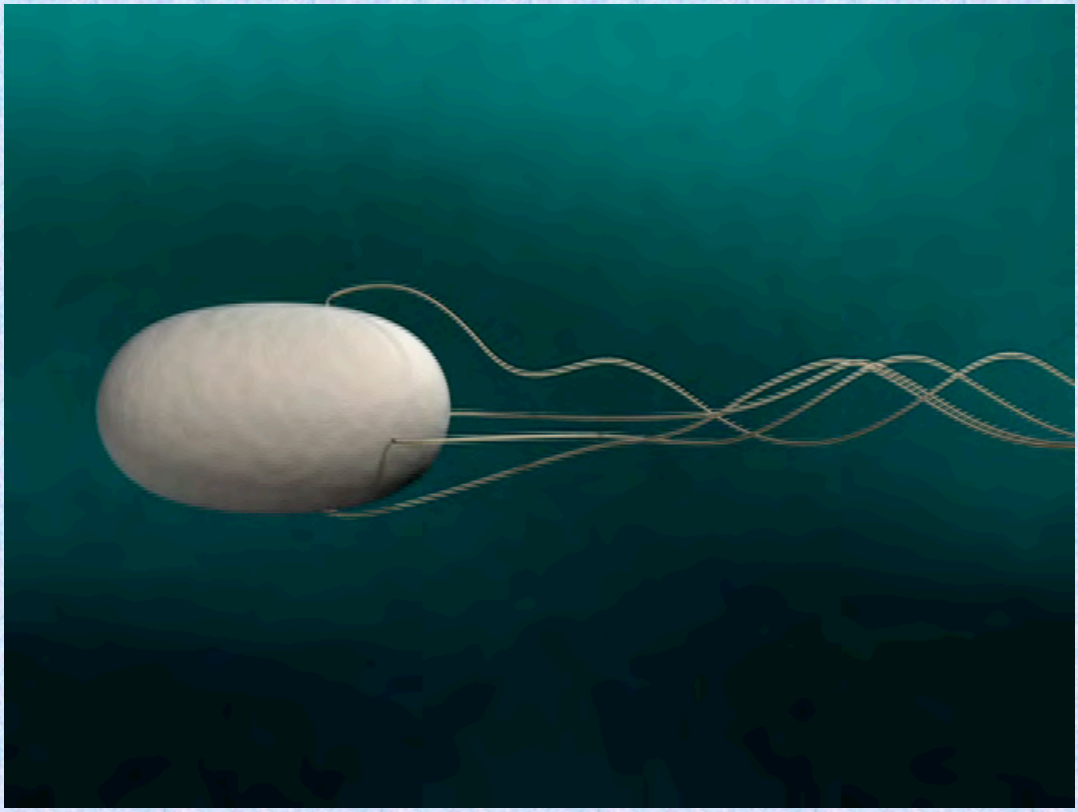


Protonic NanoMachine

暗視野光学顕微鏡で見た細菌の泳ぎ

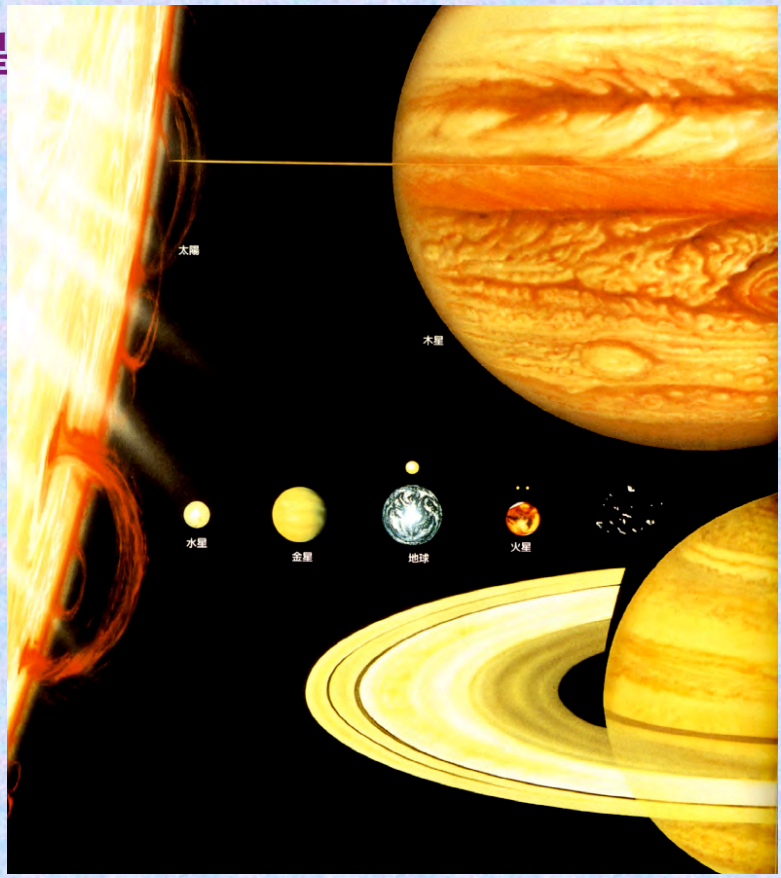
Protonic NanoMachine

べん毛モーターのエネルギー源は水素イオンの流れ



Protonic NanoMachine

太陽と惑星



地球の直径
13,000 km

太陽の
100分の1

太陽-地球の距離の
1万分の1

Protonic NanoMachine

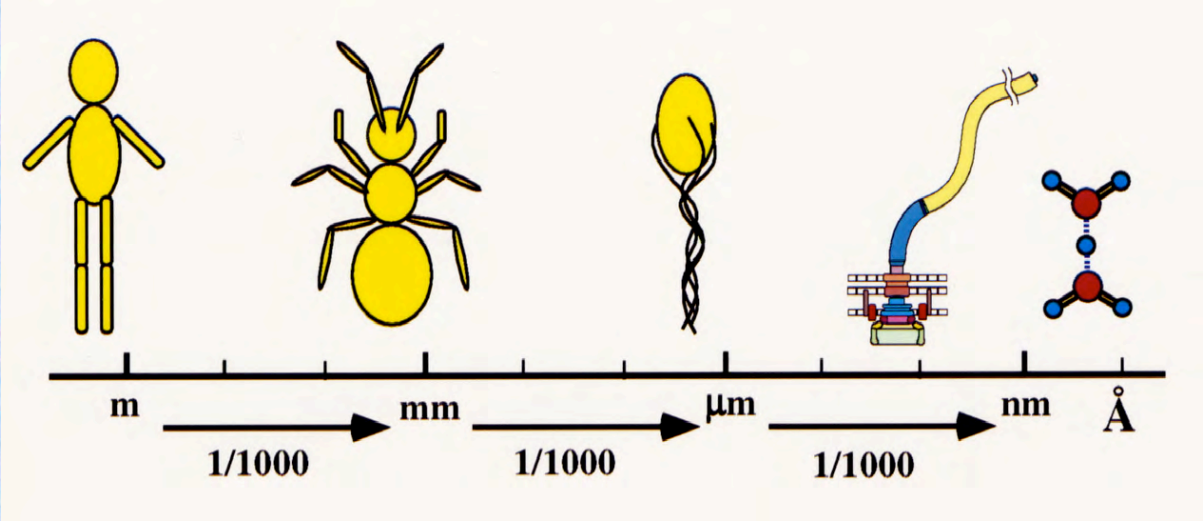
法輪寺
京都嵐山

ヒトのスケール
1.5 ~ 2.0 m

地球の
1千万分の1

Protonic NanoMachine

人間のスケールからナノスケールまで



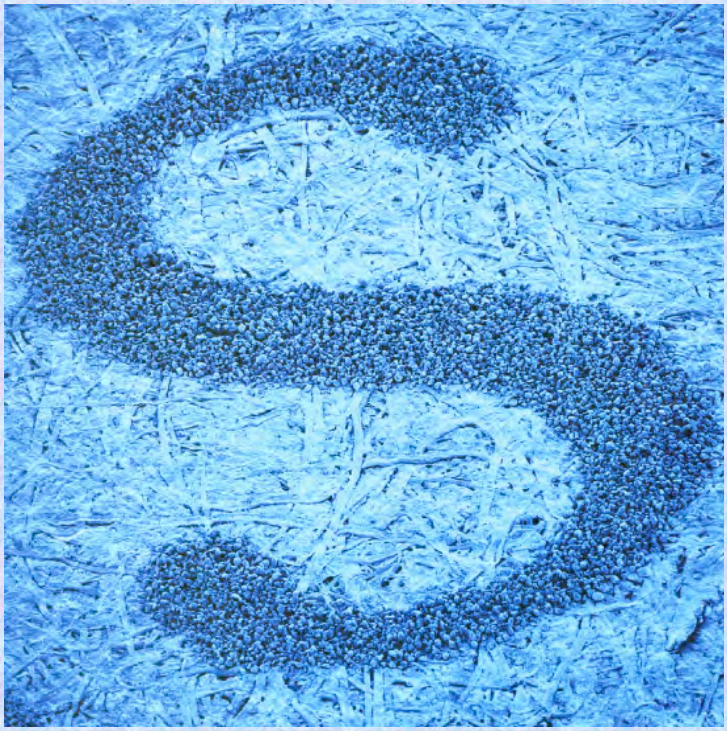
Dynamic NanoMachine

縫い針と10円玉の文字

幅 ~1 mm　　ヒトの1000分の1

Protonic NanoMachine

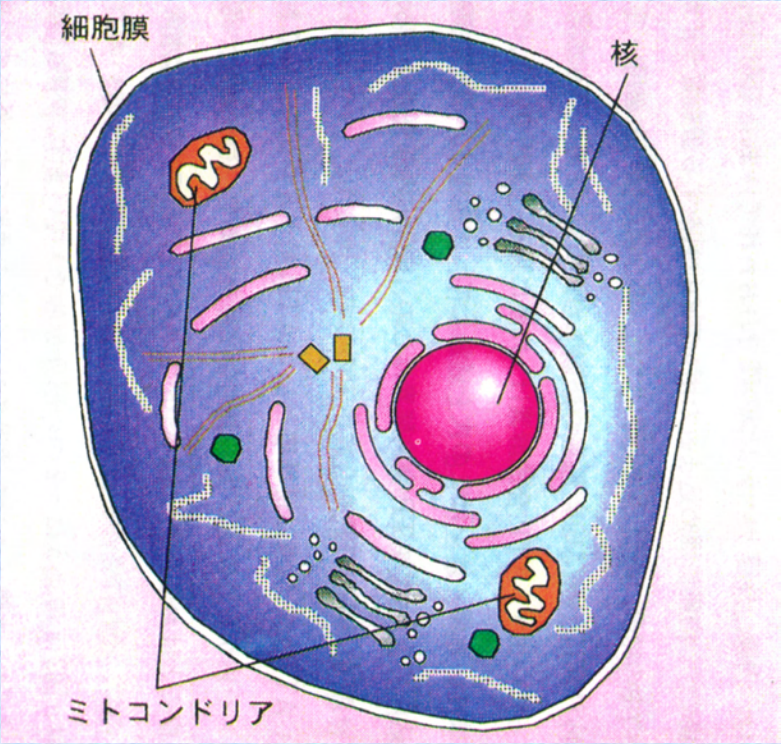
レーザープリンターのトナー粒子



サイズ　~10 μm（ミクロン）

Protonic NanoMachine

細胞内部の構造



サイズ
~10 μm

Dynamic NanoMachine

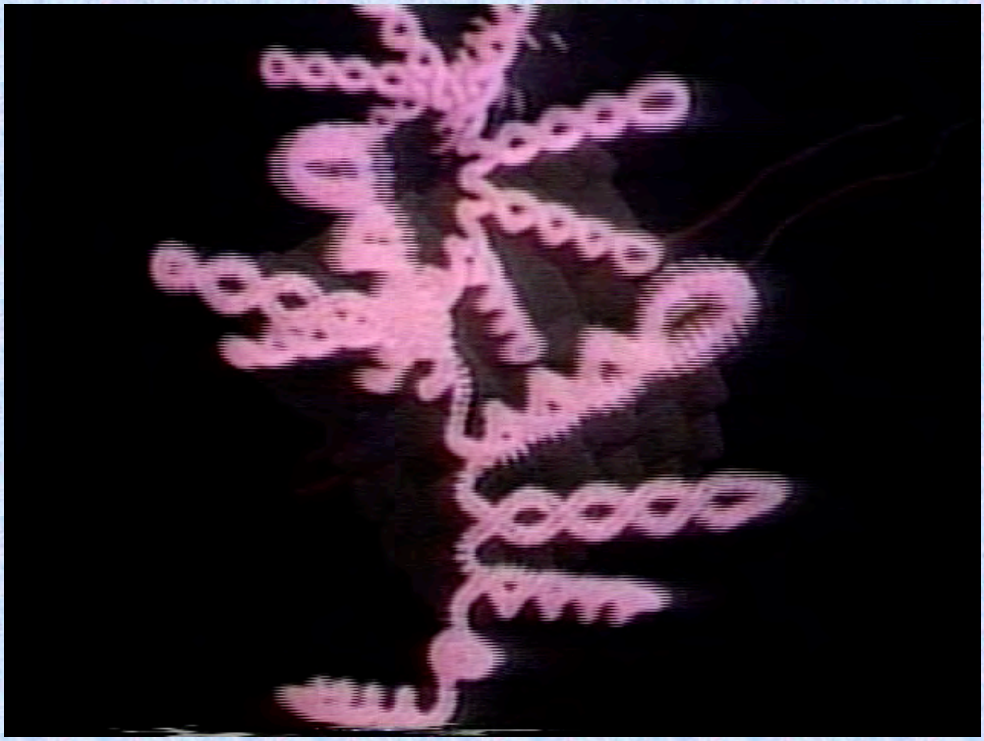
細胞分裂のための染色体の複製と分割

ヒガンバナの染色体

By Andrew & Wishia Bajer
and Sinya Inoue at Marine Biology Laboratory

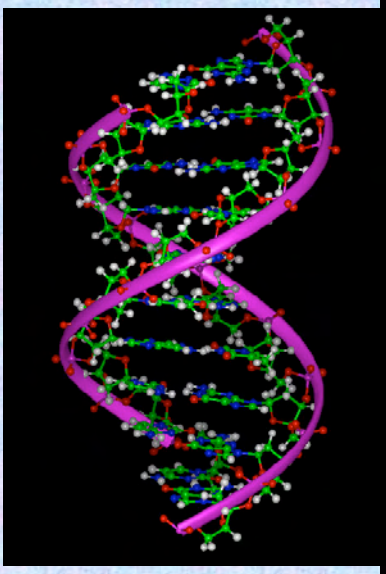
Dynamic NanoMachine

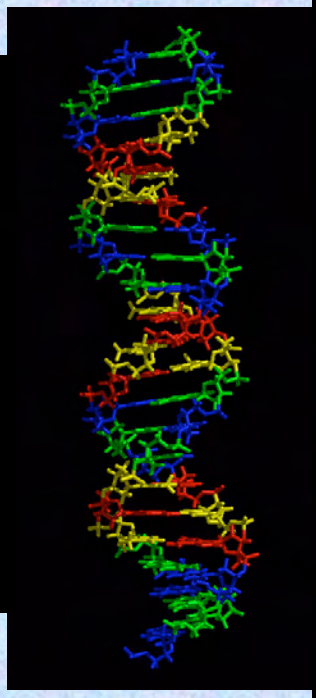
染色体がほどけるとDNAが見える

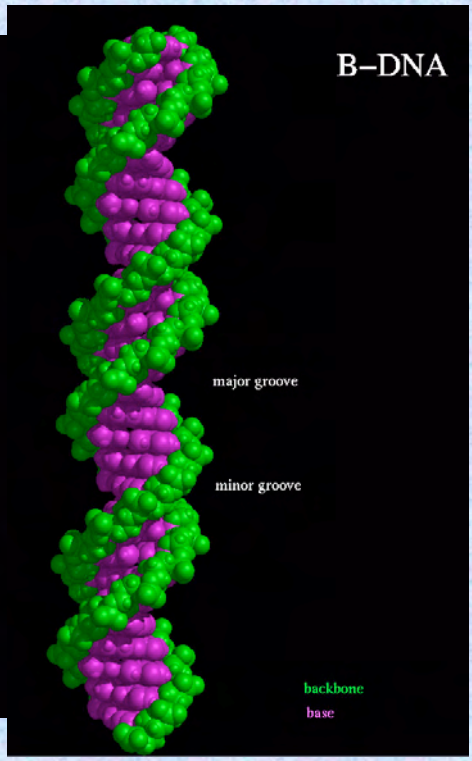


Dynamic NanoMachine

DNA分子の２重らせん構造の発見　1953年





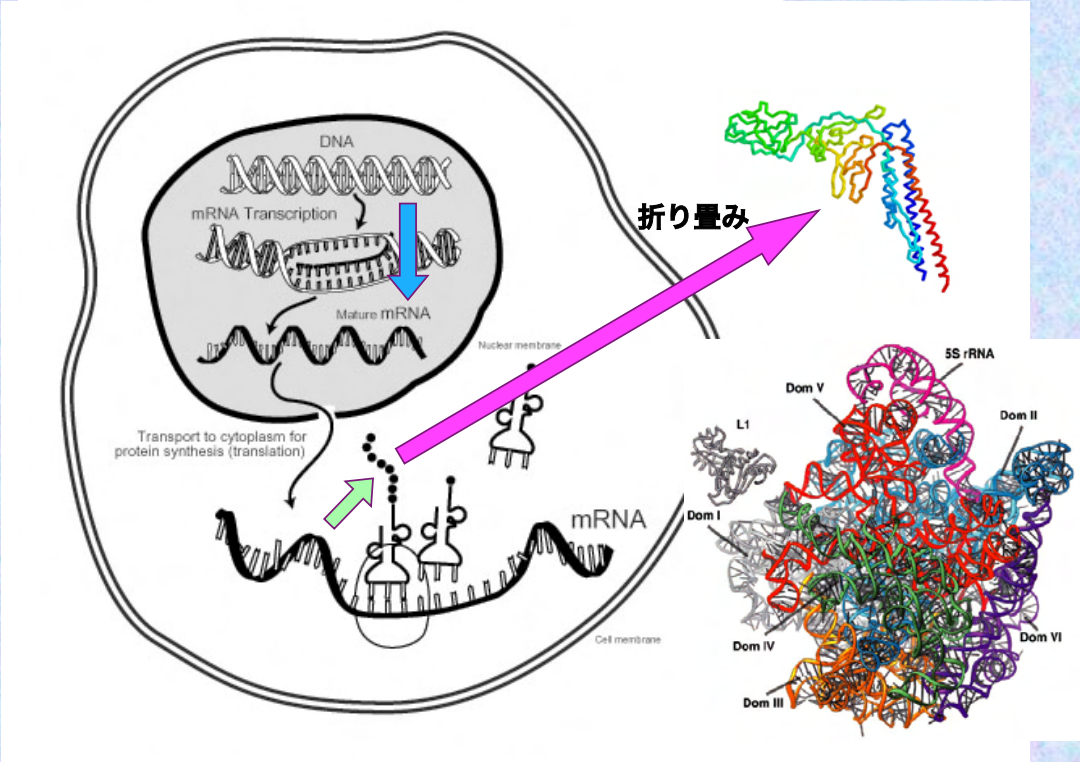


Watson & Click (1953) *Nature*

Dynamic NanoMachine

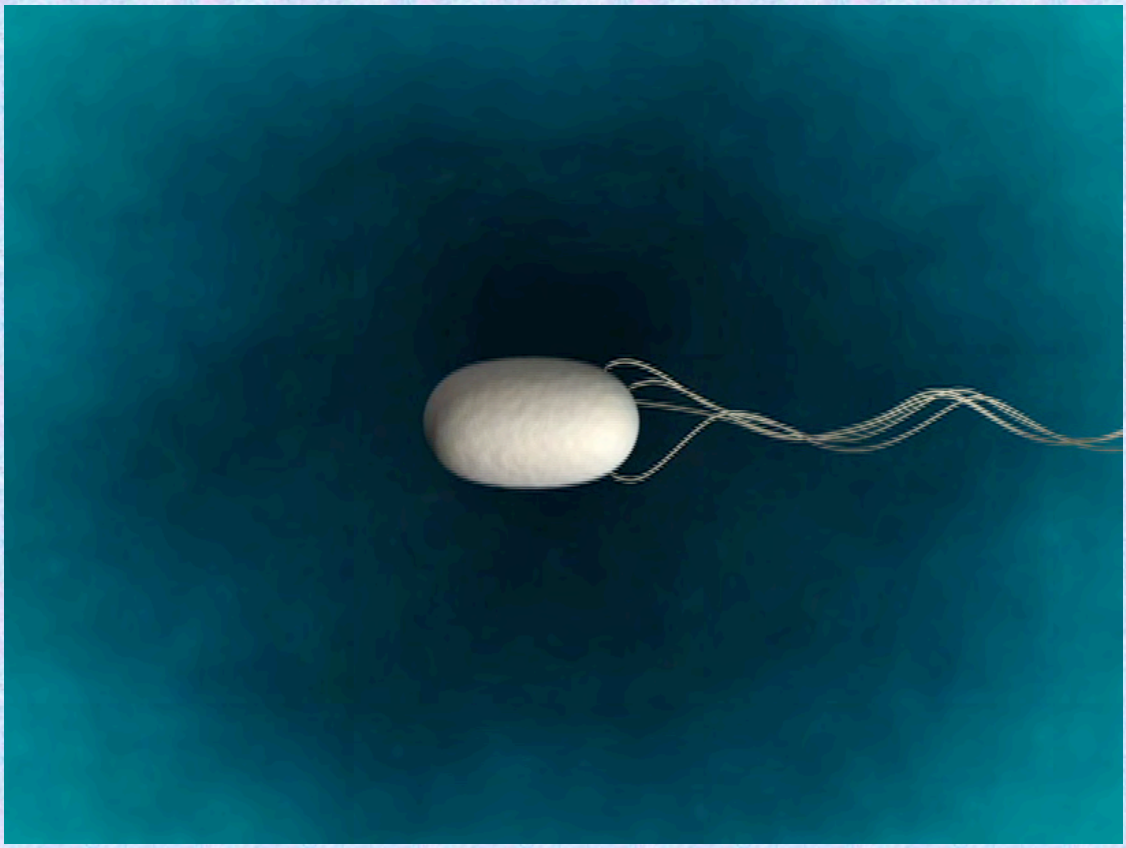
DNA → RNA → ポリペプチド → タンパク質

1次元　1次元　1次元　折り畳み　3次元



Dynamic NanoMachine

細菌べん毛の形態形成

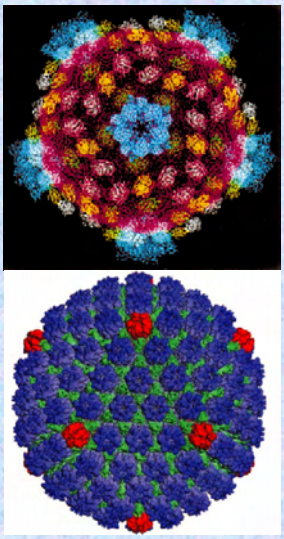


Protonic NanoMachine

生体超分子ナノマシン

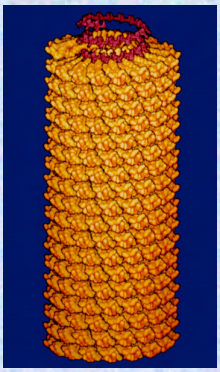
タンパク質や核酸の複合体

球状ウイルス



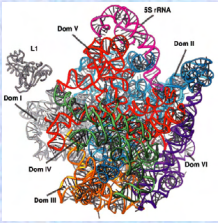
30–80ナノメートル

棒状ウイルス



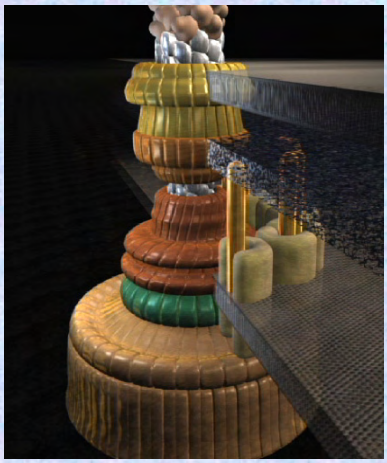
18ナノメートル

リボソーム



20ナノメートル

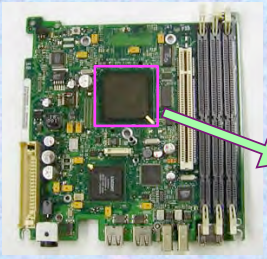
べん毛モーター

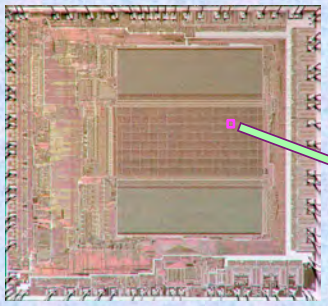


45ナノメートル

Protonic NanoMachine

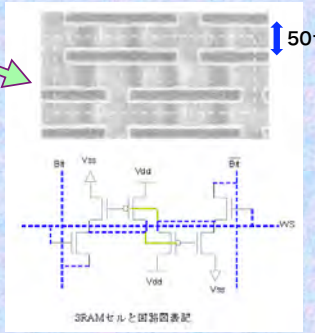
コンピュータの心臓部CPUの半導体微細回路





45ナノメートル

50ナノメートル



京コンピュータでは864筐体に88,128個のCPUが使われ
消費電力は13メガワット（13,000,000ワット）

Protonic NanoMachine

蛋白質はナノサイズの分子機械

Proteins are molecular machines of nano-scale

生命のあらゆる機能を支えるナノマシン

NanoMachines that support every single mechanism of life

ナノメートル：10億分の1メートル
nano meter: 1/1,000,000,000 meter

タンパク質はどれぐらいすごいか

コンピュータとのエネルギー効率の比較

ゲノムＤＮＡと蛋白質

ゲノムDNA：遺伝情報記録媒体の鎖状高分子

読み取り・編集制御コードもついている

タンパク質：生命のあらゆる機能を支える分子機械

- 食べる　　：消化酵素
- 身体を作る：代謝酵素
- 病気を防ぐ：抗体やサイトカイン
- 味わう　　：化学物質受容体
- 見る　　：光受容体
- 考える　　：イオンチャネルや神経伝達物質受容体

Protonic NanoMachine

基礎生命科学から先端医療へ

遺伝子コード（DNAの塩基配列）一つの違い
あるいは、様々な外的要因

↓

タンパク質の機能が損なわれる

↓

生命システムの動作不良、異常（病気、疾患）

↑

先端医療戦略・創薬

↑

タンパク質や超分子の立体構造情報

Protonic NanoMachine

iPS細胞もタンパク質の働きによって作られる

山中伸弥教授（京大）グループにより開発された技術

皮膚の細胞（分化した体細胞）に4つの遺伝子を導入

↓

遺伝子がタンパク質を発現生成

↓

タンパク質が核内のゲノムDNAに働きかけ

↓

細胞が初期化（リプログラミング）

↓

どんな細胞にでも分化できる幹細胞と同様の能力を獲得

↓

再生医療、医薬のスクリーニング

生命

ナノテクノロジーの
宝庫

↑↑↑↑↑

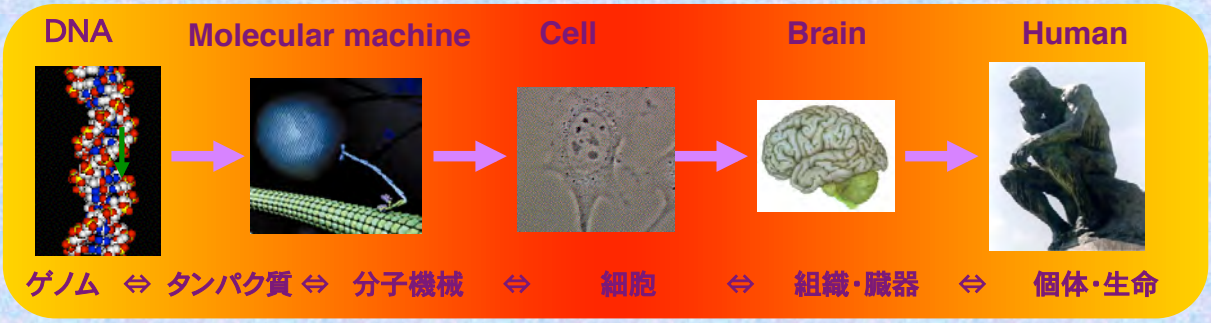
チームワークとネットワーク

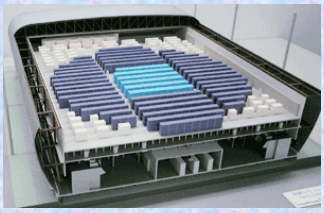
↑↑↑↑↑↑↑↑

蛋白質ナノマシン
柔らかくてかつ高精度の動作機構

自己組織化 ➡ 大量生産が容易 ➡ ナノテクノロジーへの応用

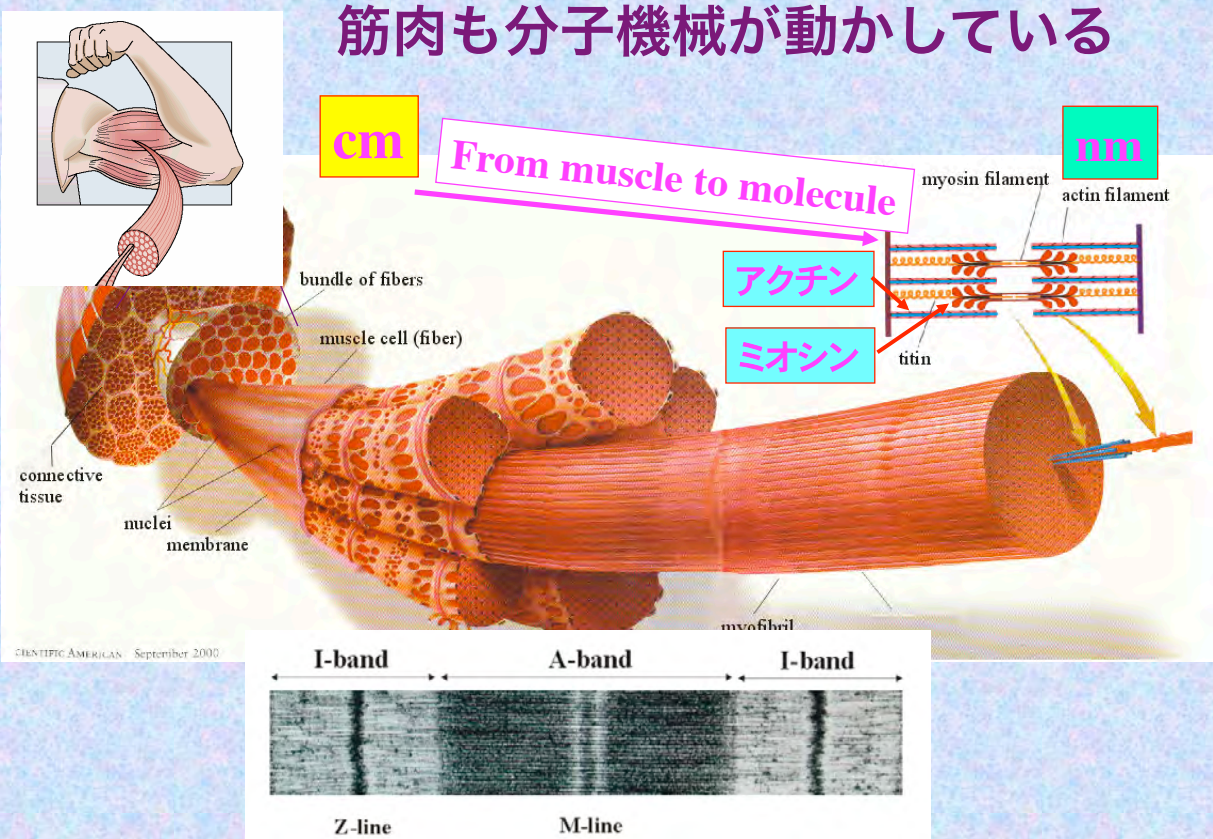
生命を支える生体分子ナノマシンとコンピュータの違いは?





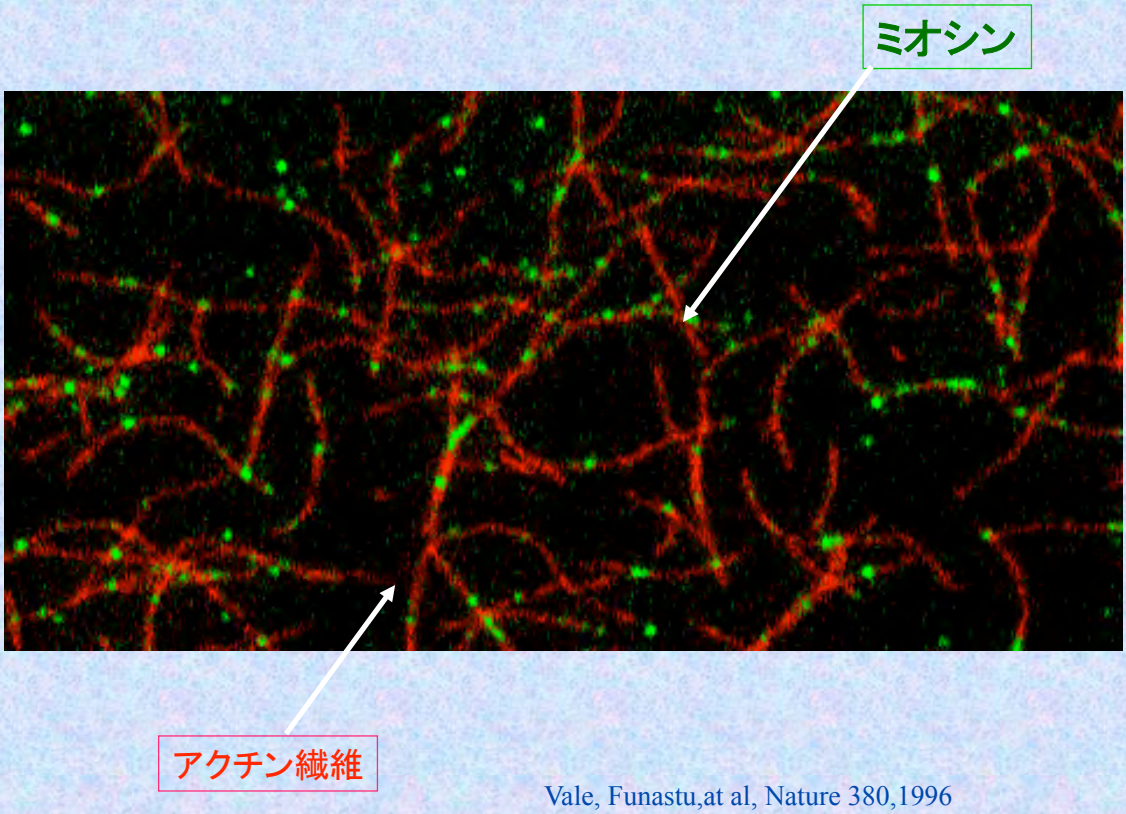
Protonic NanoMachine

筋肉も分子機械が動かしている



Protonic NanoMachine

分子モーターのイメージング



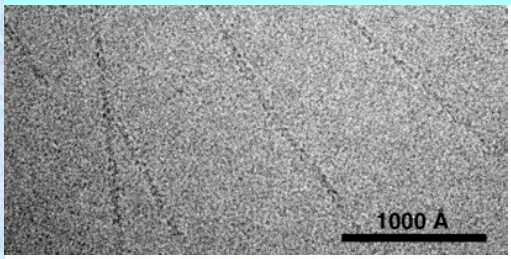
Vale, Funastu,at al, Nature 380,1996
Nishikawa, Iwane, et al. 2006

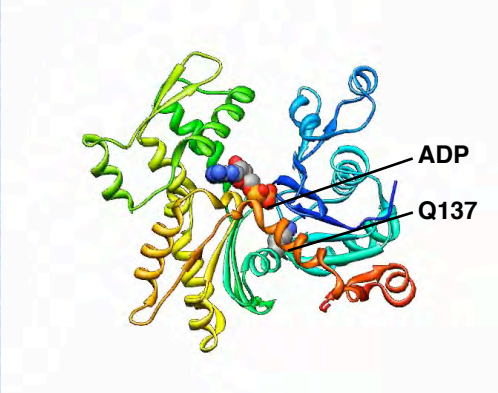
Protonic NanoMachine

筋肉のアクチン繊維の立体構造と原子モデル

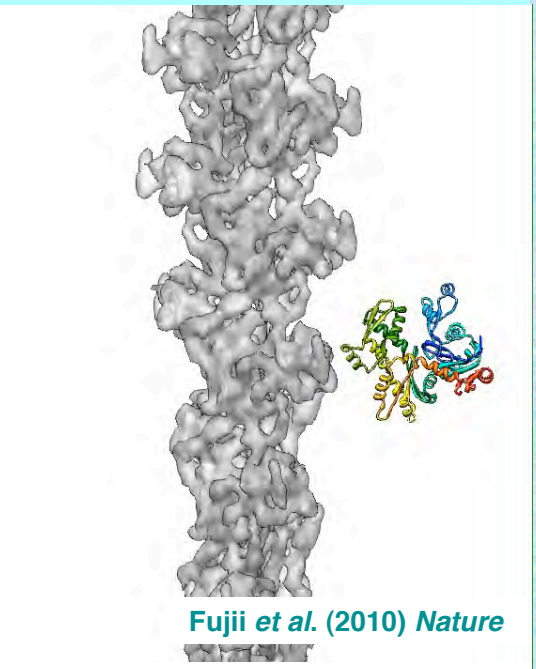
細くて柔らかいため数十年も解けなかった構造が
低極低温電子顕微鏡により明らかに

約500枚のCCDデータ収集 2日間； 画像解析 3日間； 分解能 6.6 Å





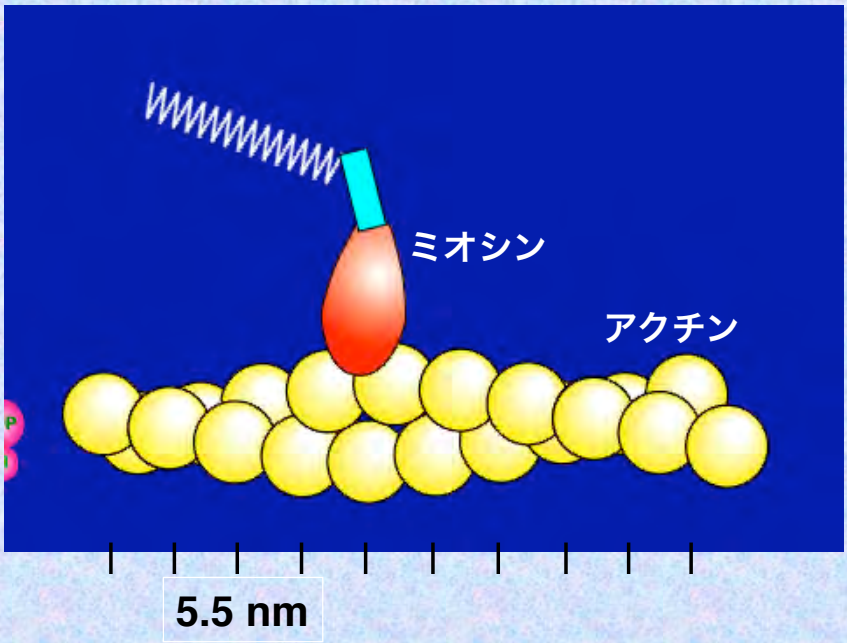
繊維形成にともなうアクチン分子の構造変化



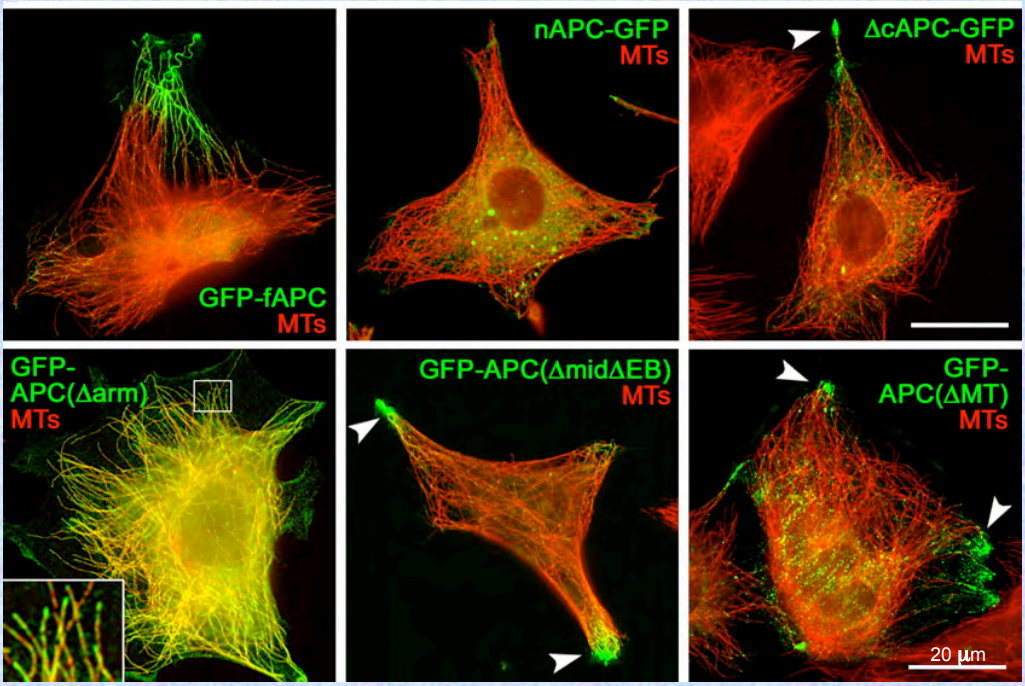
Fujii *et al.* (2010) *Nature*

N末端を含むすべての2次構造を可視化

ミオシン分子がアクチン繊維の上を歩く



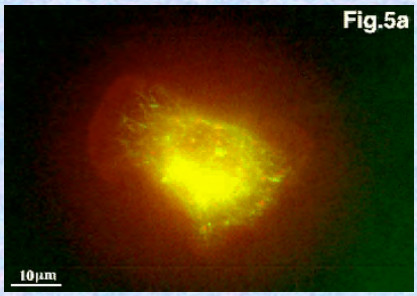
蛍光顕微鏡で見た上皮細胞の細胞骨格



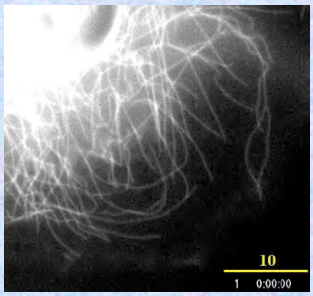
Localization of mutant APC proteins in *Xenopus A6 cells*

Matsui *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.*

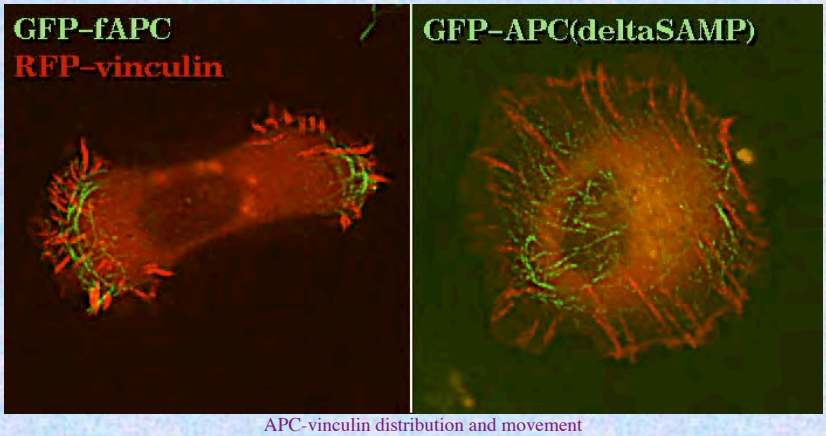
細胞の活動を支える細胞骨格のダイナミックな動きと形態形成



APC spreading
Mimori-Kiyosue *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* 148: 505-518



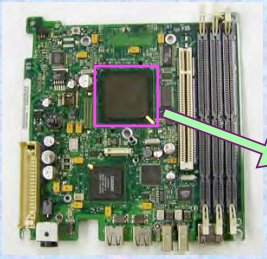
Dynamic instability of microtubule
ERATO Tukita Cell Axis Project, JST

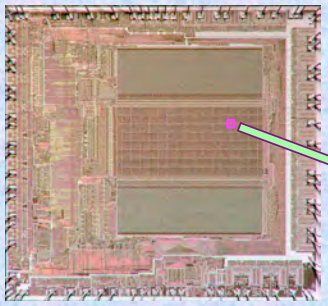


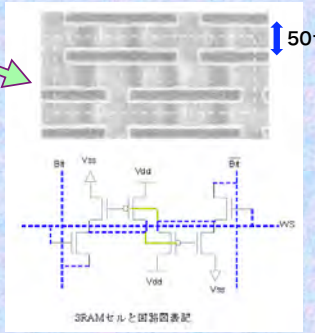
APC-vinculin distribution and movement
APC: adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein
Matsui *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* 283: 33006-33020

By Mimori-Kiyosue

コンピュータの心臓部CPUの半導体微細回路







人工のシステムではすべての階層で厳密に設計され制御されるが
生体の複雑さではそれは不可能で、ゆらぎを許容した制御が使われている。

Protonic NanoMachine

生体マシンと人工デバイスの大きな違い

(視覚情報処理・飛行制御)
ショウジョウバエの脳
~ 10^{-6} W (マイクロワット)

~ 10^{7} W (10メガワット)
京コンピュータ
(毎秒1京回の高速計算)

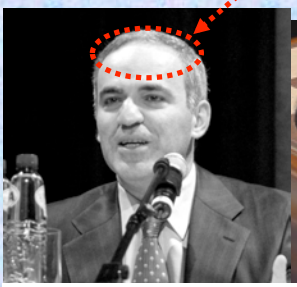
回転速度: ~ 300 Hz (Hイオン駆動型)
~ 1500 Hz (Naイオン駆動型)
トルク: ~ 5×10^{3} pN-nm
消費エネルギー: ~ 3×10^{-16} W (10^{-16} は1京分の1)
エネルギー変換効率: ~ 100% (?)
＊電気化学ポテンシャルが熱ノイズ (k_BT) に近いレベルでも回転

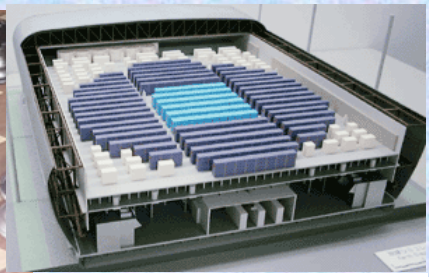
Protonic NanoMachine

ヒトの脳が思考中の消費エネルギーは１ワット!!

20ワット
(静止中)
＋
～1ワット

50,000 ワット





Garry Kasparov
世界チャンピオン

スーパーコンピュータ
Blue Gene (IBM)

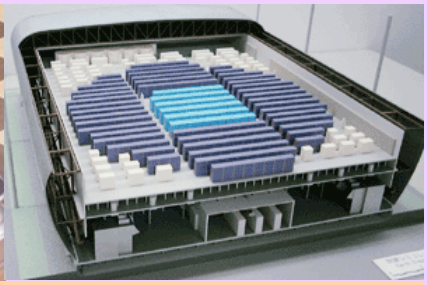
吉岡、柳田（大阪大学生命機能研究科・脳情報通信融合研究センター）

Protonic NanoMachine

脳とコンピュータのしくみの違いは何か？

1ワット

50,000ワット



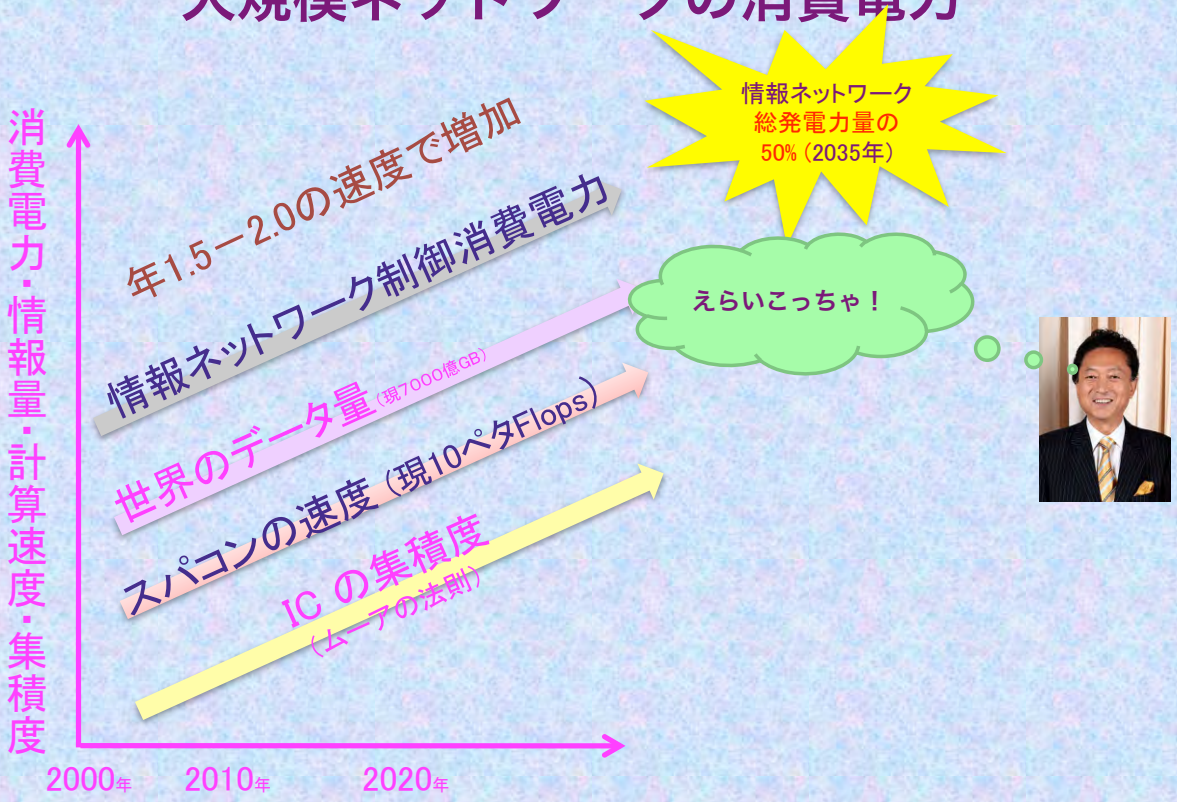
- ノイズを遮断せず利用
- いい加減に作動
- あいまいに制御

などが示唆される

- ノイズを遮断
- 正確に作動
- 厳密に制御

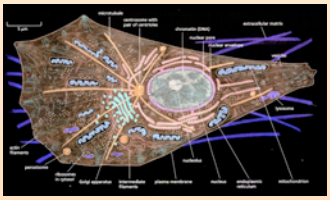
吉岡、柳田（大阪大学生命機能研究科・脳情報通信融合研究センター）

大規模ネットワークの消費電力



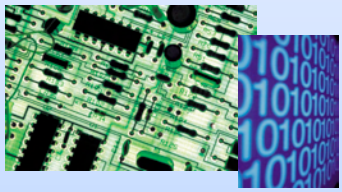
生命をシステムとして研究することが必要

生命システム



複雑・超多次元・ダイナミック
ゆらぎを許容するいい加減制御
（予測困難や突然の状況変化にも対応）
超低消費エネルギー（細胞は１兆分の１ワット）

人工システム



厳密制御ができる程度の複雑さ・2次元
厳密な決定論的・デジタル的制御
（状況変化の予測が明確な場合にのみ対応）
ノイズ遮断のために高消費エネルギー

生命システムは、人工システムのアナロジーが使えない

生命システムの理解には新しい概念が必要

厳密制御が困難な複雑ダイナミックシステムを巧妙に制御する
生命特有のメカニズムを解明し操作する

Protonic NanoMachine

タンパク質のかたちを見る技術

X線・NMR・電子顕微鏡

Protonic NanoMachine

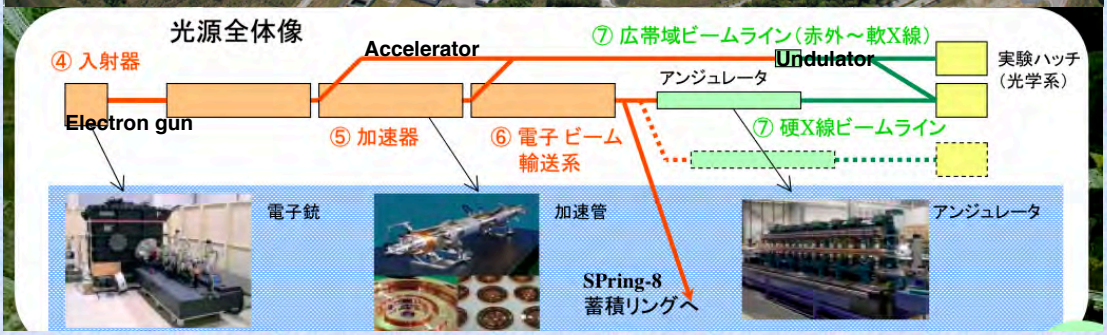
生体分子の立体構造解析に活用可能な技術

- **X線結晶構造解析**
  長所：高分解能で解析可能（0.6～3 Å）
  欠点：結晶化という困難なステップと数mgの試料が必要

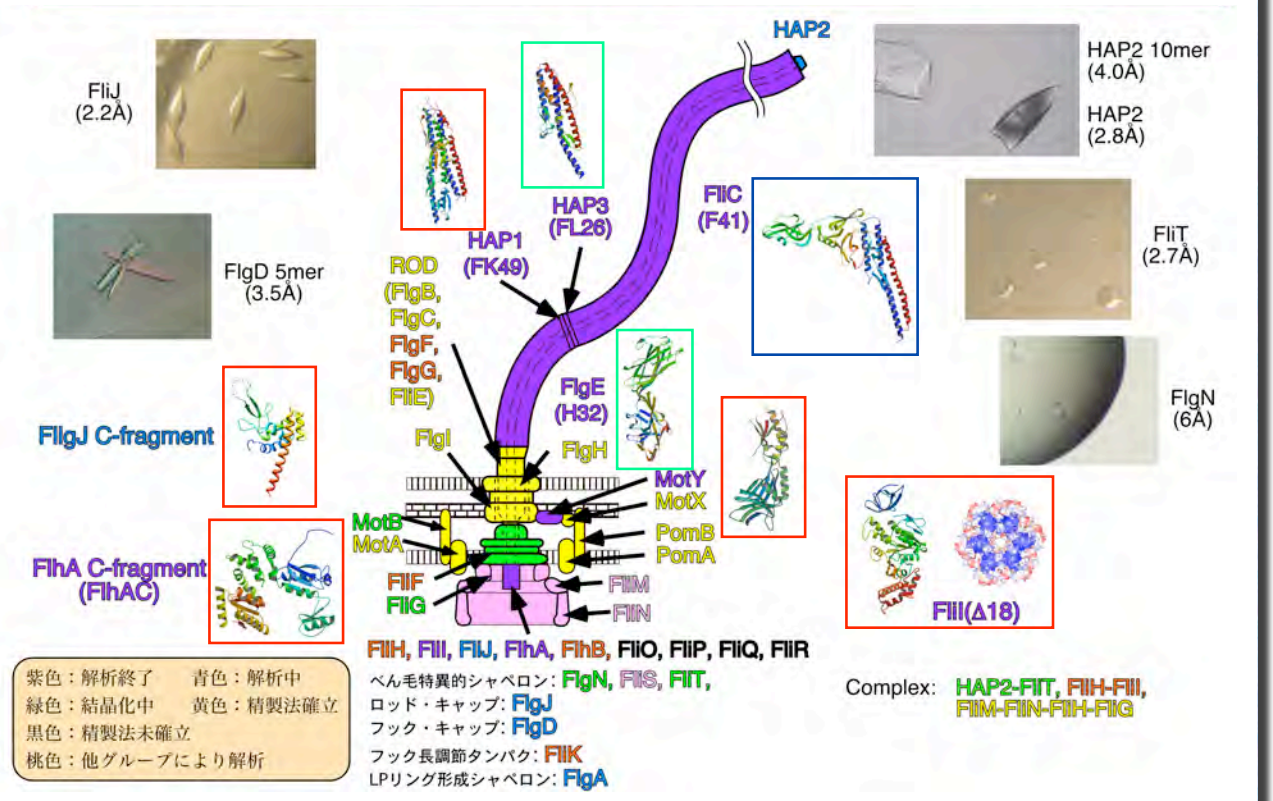
- **NMR**
  長所：水溶液試料でよく分解能も比較的高い
  欠点：分子量の上限が50 kDa程度で、数mgの試料が必要

- **低温電子顕微鏡**
  長所：極めて僅かな水溶液試料（数10μg）で分子量に上限なし
  欠点：小さな分子は不得意で高分解能の解析はまだ比較的困難

兵庫県播磨の高輝度放射光施設 SPring-8と X線自由電子レーザー SACLA

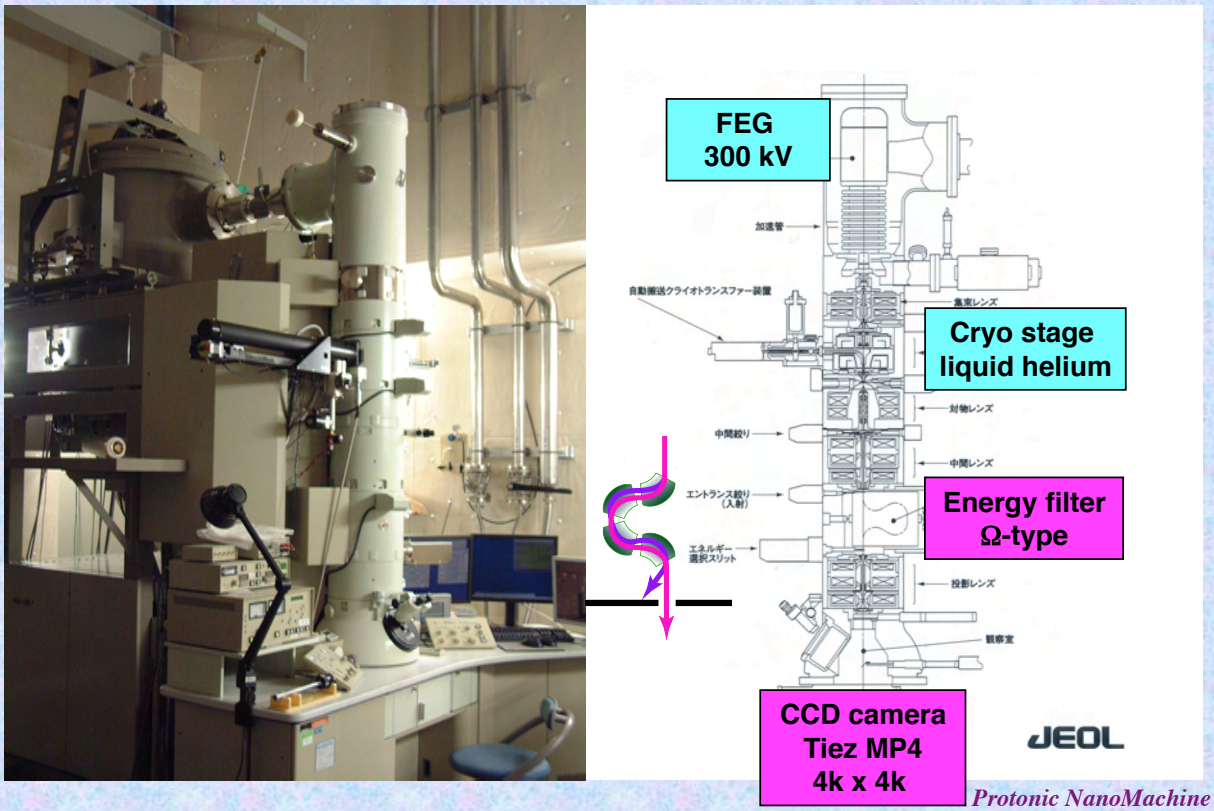


べん毛のような超分子はばらばらにして結晶化・構造解析



極低温電子顕微鏡 JEM-3200FSC

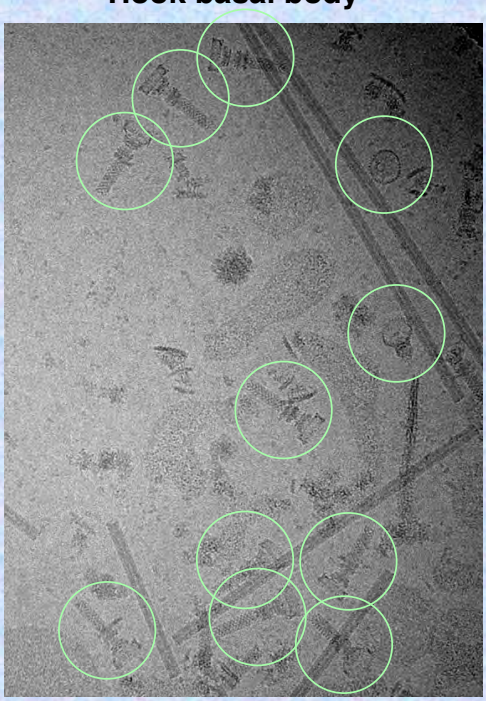
加速電圧300kV電界放射型電子銃、液体ヘリウム冷却試料ホルダー等



Protonic NanoMachine

Electron cryomicroscopy of flagellar subcomplexes

Hook basal body



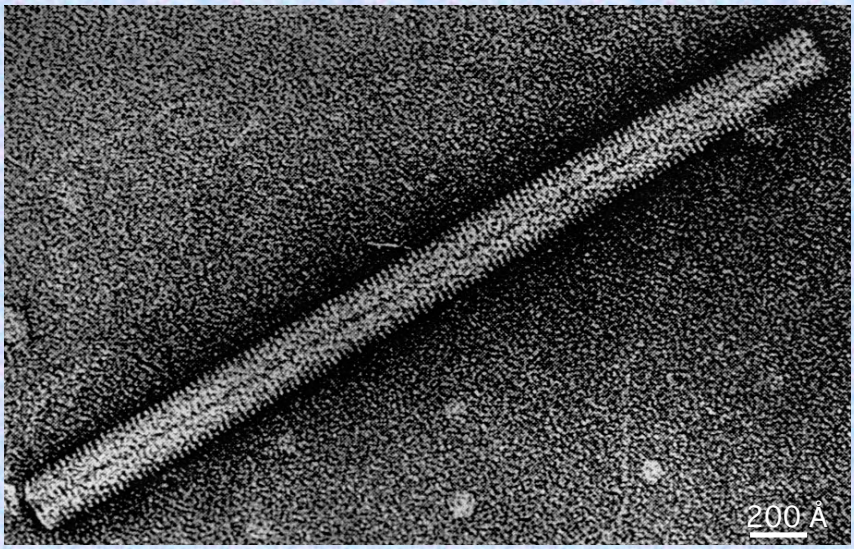
Polyrod basal body

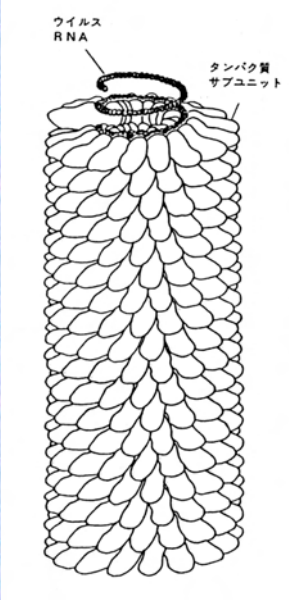
Fujii & Kato, *unpublished*

Miyata & Kato, *unpublished*

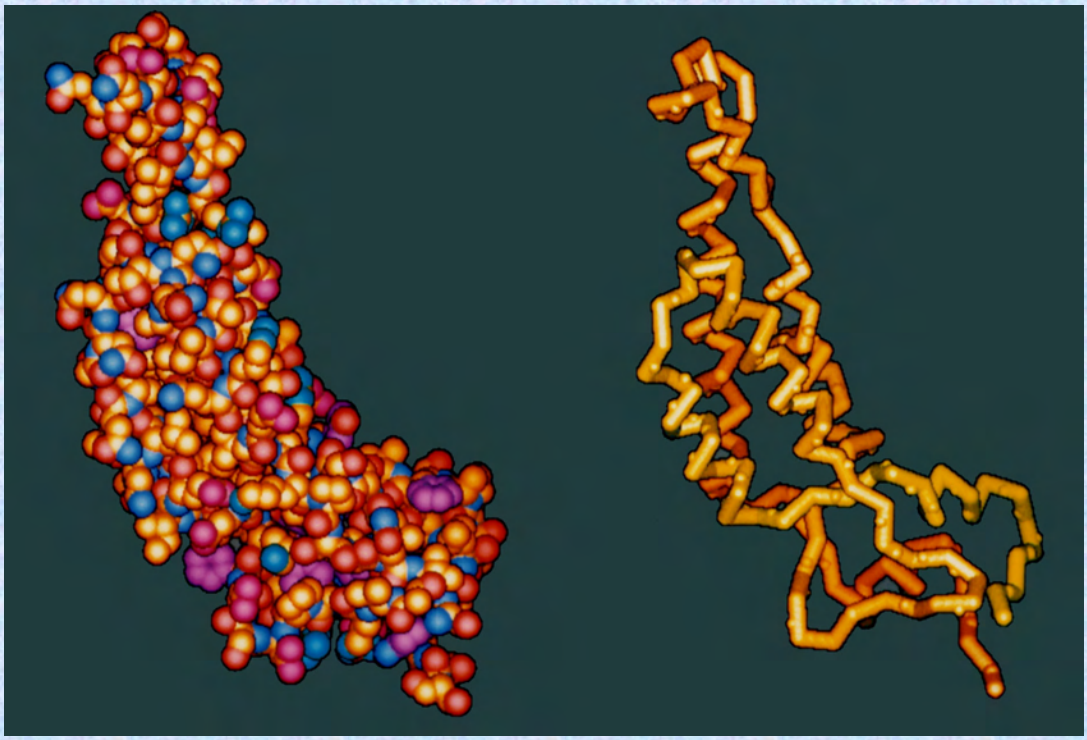
どんなものが見えて何がわかるか

タバコモザイクウイルスの電子顕微鏡写真と模式図



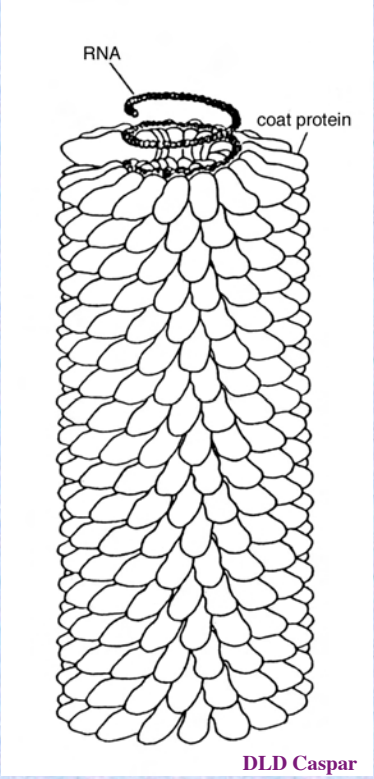


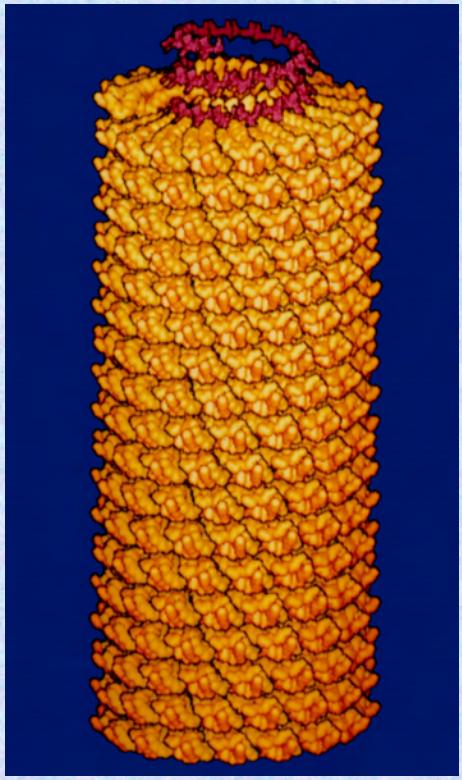
TMV コートタンパク質（全原子と骨格構造）



Namba & Stubbs (1986) *Science*

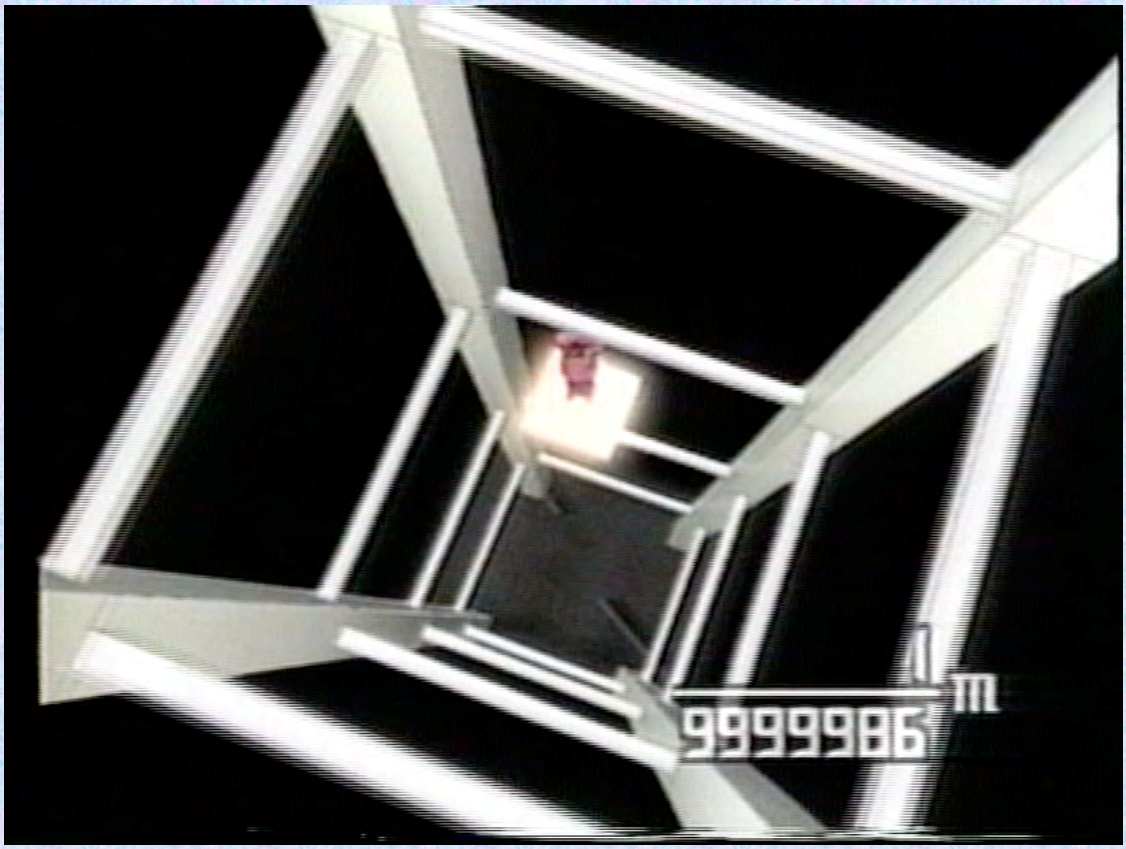
TMV （全長のおよそ１／７）





Protonic NanoMachine

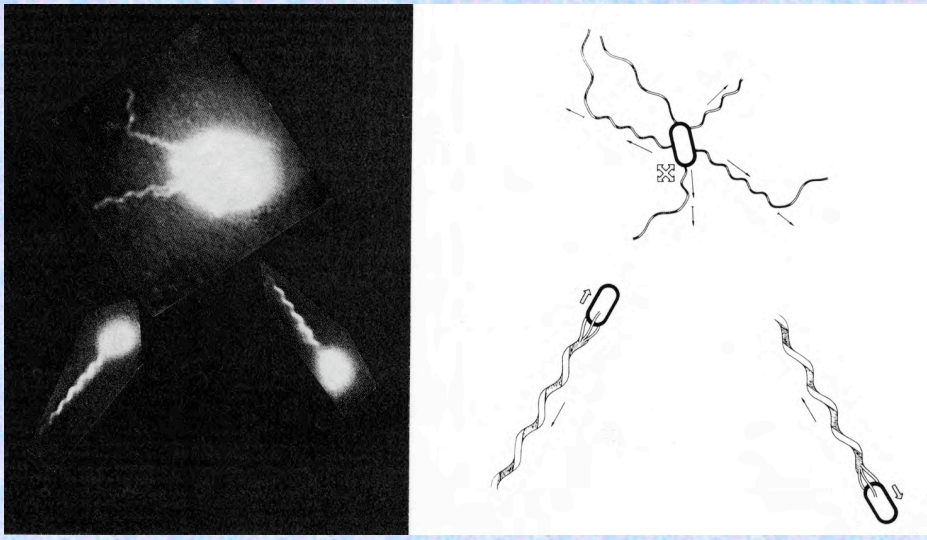
TMVの自己集合過程



Protonic NanoMachine

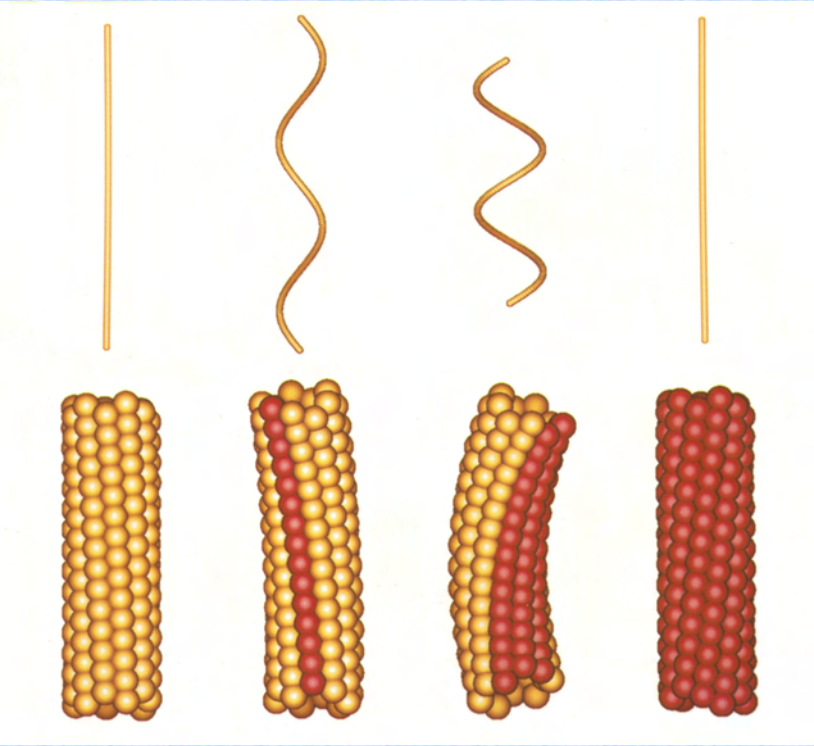
細菌の泳ぎと方向変換はモーターの回転方向に依存

べん毛モーターが反転すると左巻らせんのプロペラが右巻きに変換し、束がほぐれて菌体の向きを変える



Macnab & Ornston (1977) *J. Mol. Biol.*

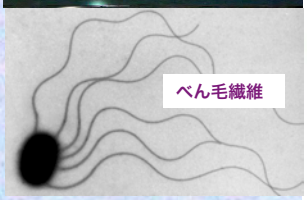
左巻-右巻らせん変換のしくみ（仮説）

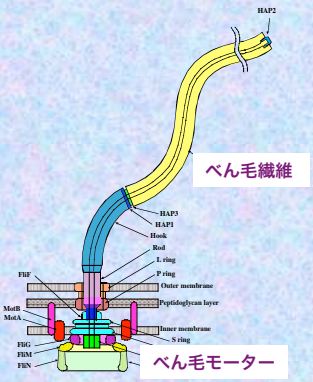


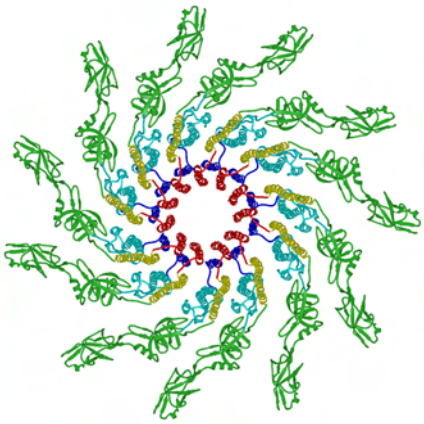
Based on the proposal by Asakura (1970) and Calladine (1975)

Protonic NanoMachine Lab

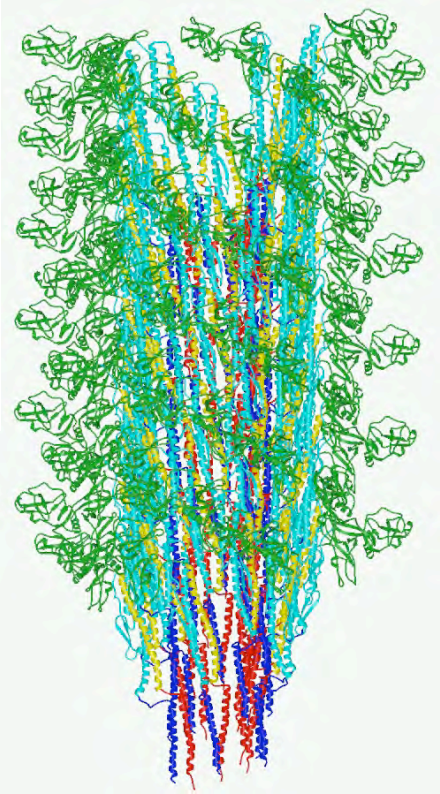
細菌べん毛繊維（R型）の全原子モデルを完成







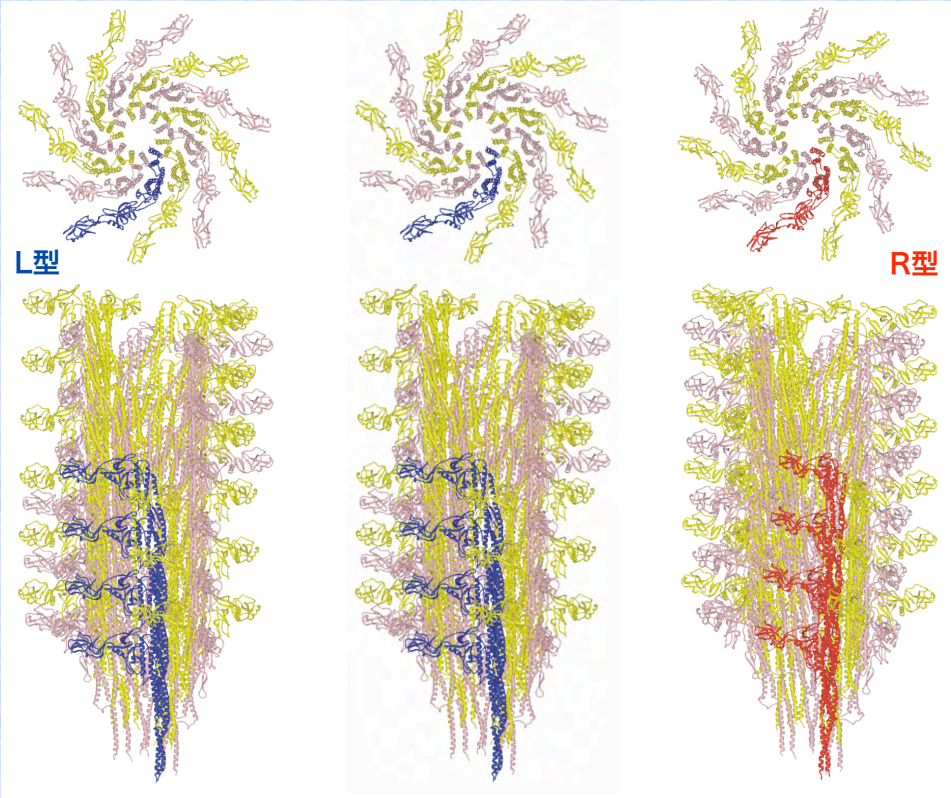
極低温電子顕微鏡により撮影した1千枚以上の電顕フィルムから1万本以上のべん毛繊維像を収集。高画質像を100本選び解析して立体像を再構成しタンパク質の主鎖側鎖の見える分解能を達成した。
＊ただし6年を要した。



Yonekura & Maki-Yonekura *et al.* (2003) *Nature*

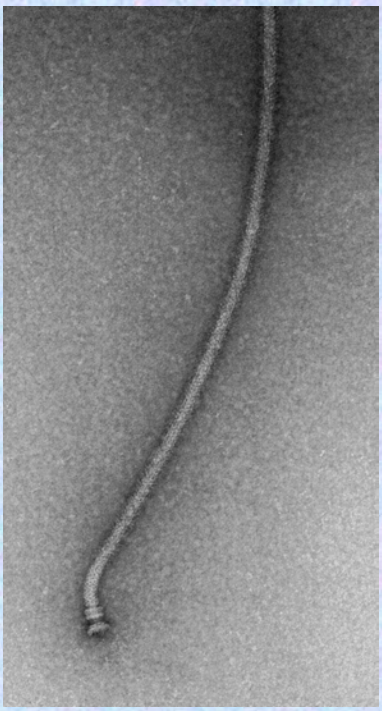
L型とR型べん毛繊維の原子モデルを完成

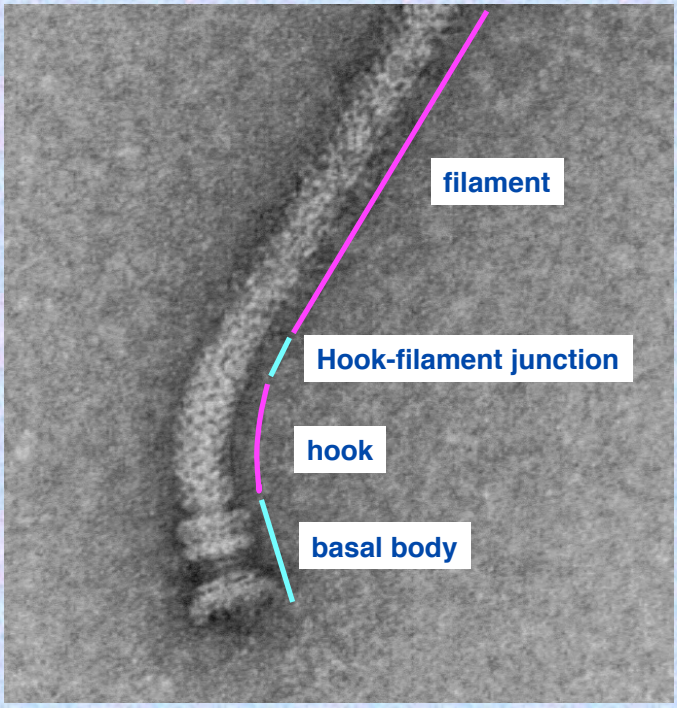
素繊維の構造と相互作用が2状態間でスイッチするようすを解明



Maki-Yonekura *et al.* (2010) *Nature Struct. Mol. Biol.*

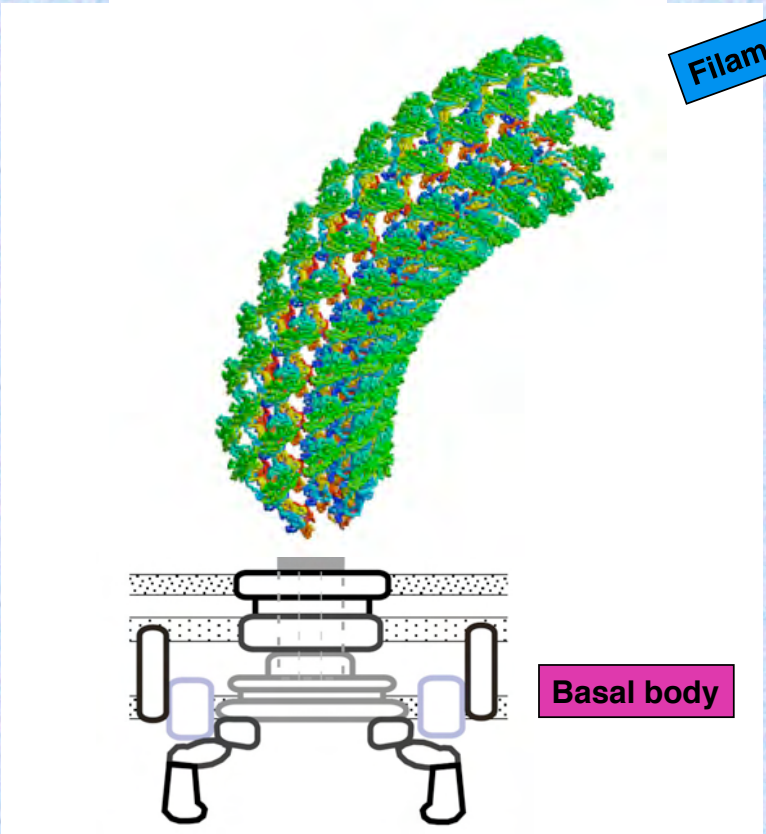
べん毛の根元にある基部体とフック





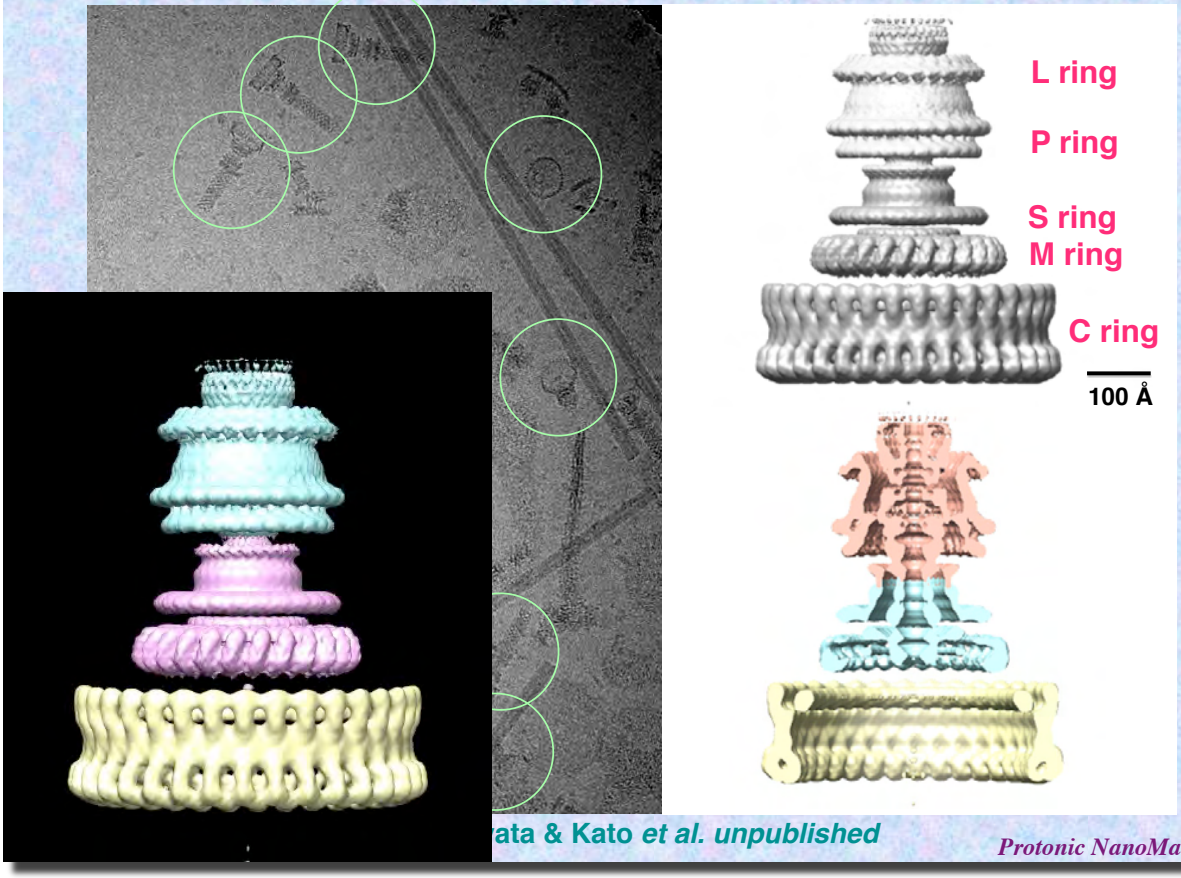
By Nao Moriya

べん毛フックのユニバーサルジョイントとしての動き



Protonic NanoMachine

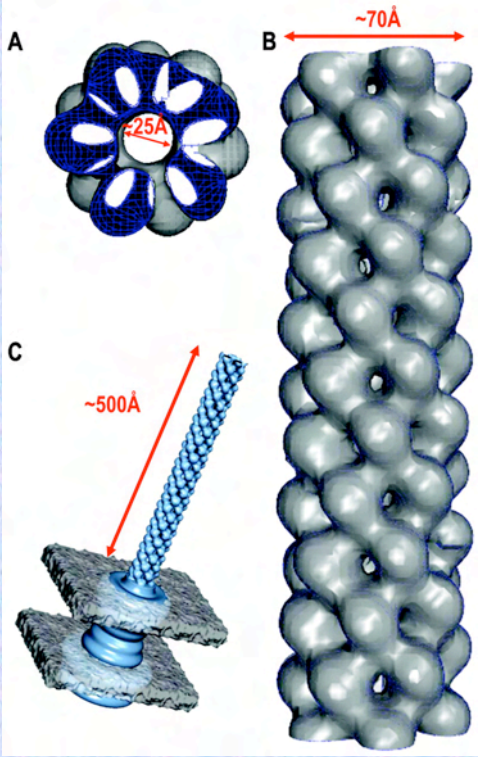
べん毛モーターの構造



ata & Kato *et al. unpublished*

Protonic NanoMachine

赤痢菌が感染時に使う注射針（ニードル複合体）

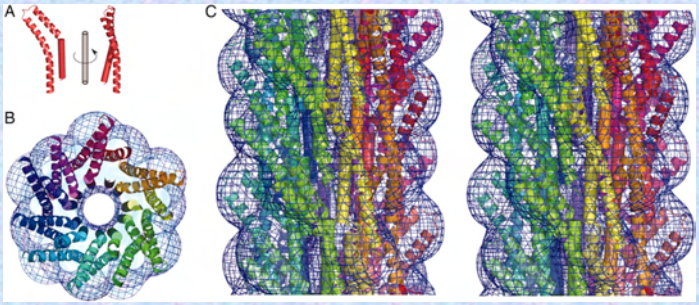


Cordes *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*

赤痢菌はニードル複合体（３型タンパク質分泌装置）と呼ばれるタンパク質複合体の装置を注射針のように使い宿主の腸上皮細胞内に病原性因子を注入し、細胞骨格を再編成して自らの細胞内への侵入を助けさせる。

宿主細胞とニードルの先端の接触が病原性因子の分泌を起こす信号として根元に伝わり、分泌装置を活性化する。

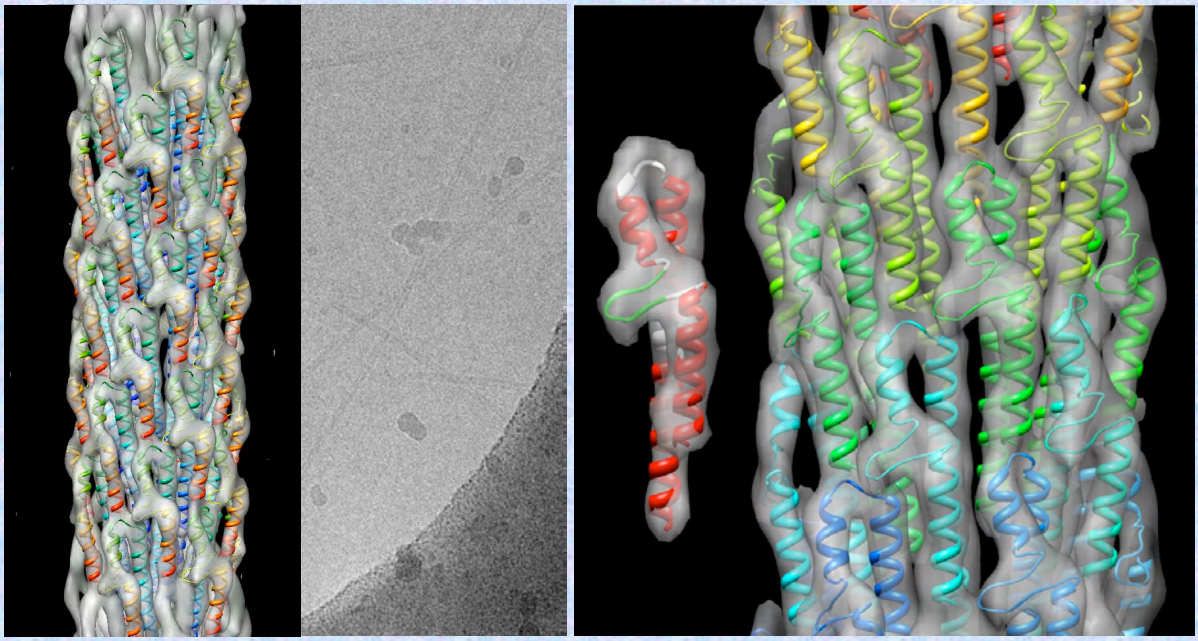
ニードルを構成する蛋白質MxiHのＸ線結晶構造を解像度の低いニードルの立体像に当てはめたモデル



Deane *et al.* (2006) *PNAS*

Protonic NanoMachine

極低温電子顕微鏡を用いて解明したニードルの構造



MixH: 85 residues　Tube diameter: only 7 nm

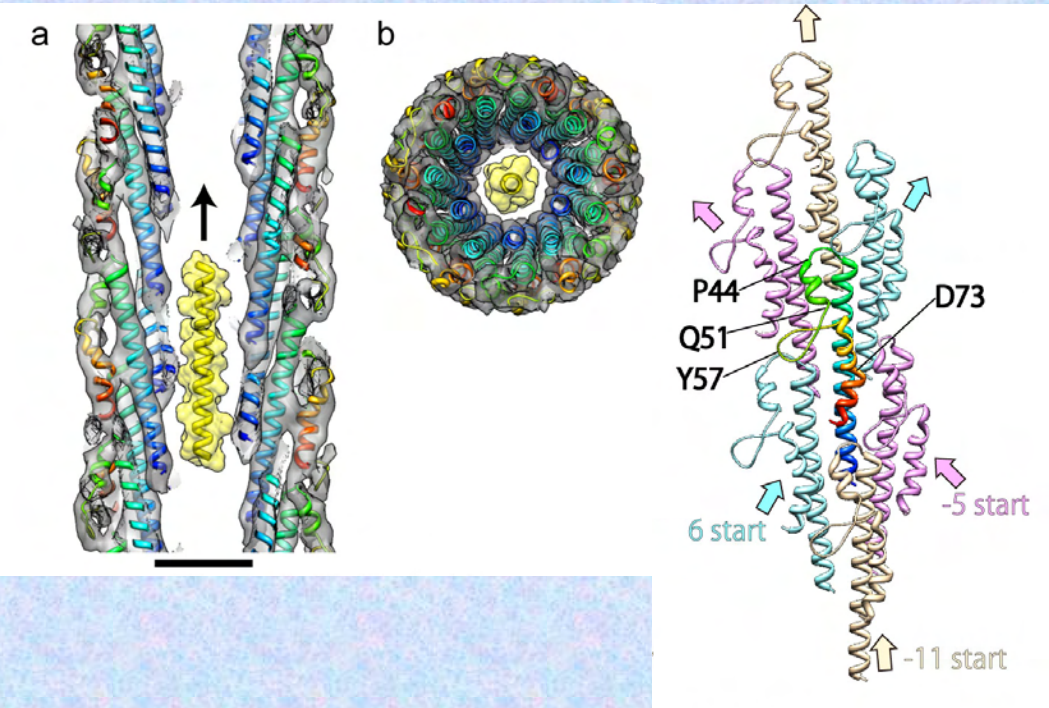
CryoEM image collection: 1 day　Helical image analysis: 3 days

Resolution of the 3D map: 6.5 Å

Fujii, Cheung, Kato, Blocker *et al.* (2012) *PNAS*

Protonic NanoMachine

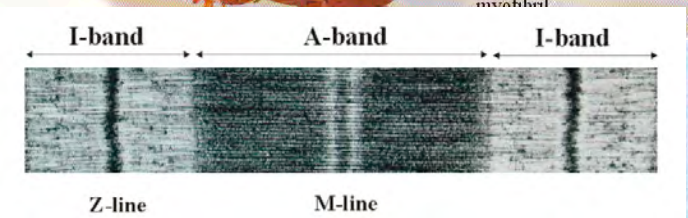
ニードルの中心孔を病原性因子が輸送される様子



Fujii, Cheung, Kato, Blocker *et al.* (2012) *PNAS*

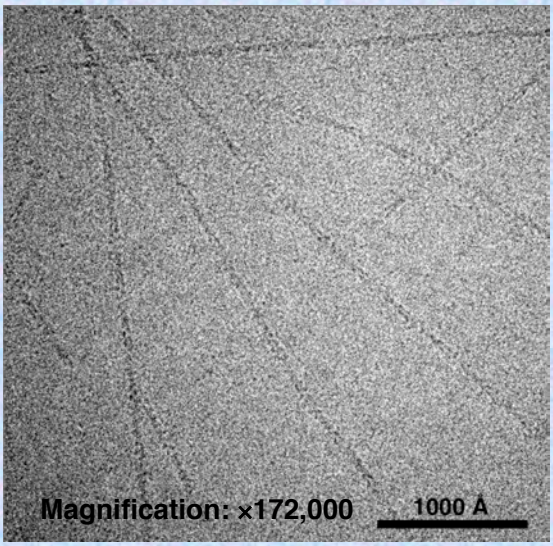
Protonic NanoMachine

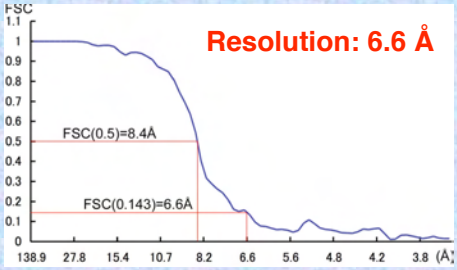
骨格筋の微細構造

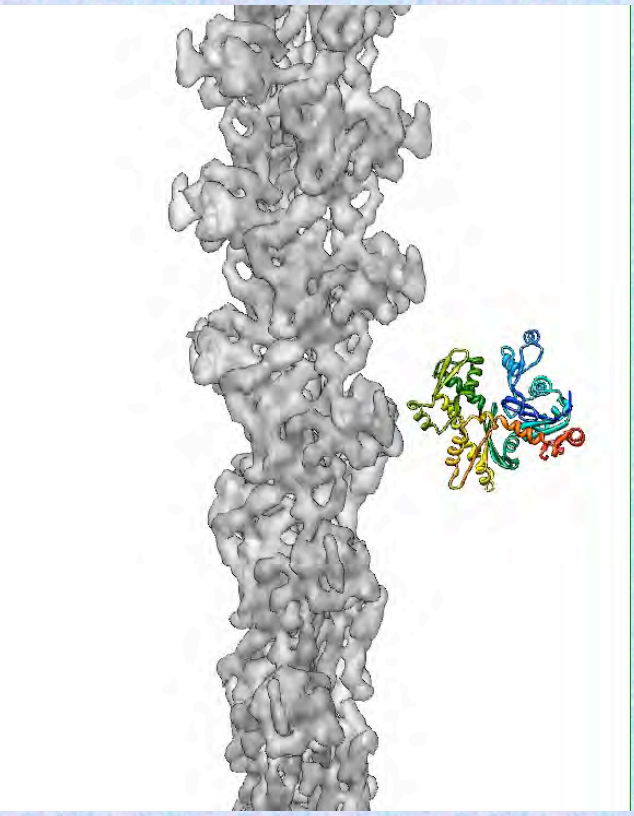


Protonic NanoMachine

骨格筋のアクチン繊維の構造







Fujii *et al.* (2010) *Nature*

Protonic NanoMachine

Protein Data Bankには様々なタンパク質の立体構造情報が置かれ、医学や生命科学そしてナノテクノロジーの発展に役立っている

Protonic NanoMachine

Contributors

CryoEM studies

Takayukii Kato
Takashi Fujii
Masamichi Ashihara
Tomoko Miyata
Koji Yonekura [Riken Harima]
Saori Maki-Yonekura [Riken Harima]

Brandeis University (hook 2004)
Tanvir R. Shaikh [Wadsworth Ctr]
James Chen
Dennis Thomas [MPI Biochemistry]
David J. DeRosier

University of Tokyo (hook 2004)
Akio Kitao

University of Utah (rod)
Fabienne F. V. Chevance
Kelly T. Hughes

University of Bristol (needle)
Ariel J. Blocker
Martin P. Cheung

Osaka University (F-actin)
Toshio Yanagida
Atuko K. Iwane

Florida State University (TMV disk)
Donald L. D. Caspar

University of Virginia (IHRSR)
Edward H. Egelman

X-ray studies

Katsumi Imada
Fadel Samatey
Hideyuki Matsunami
Shigehiro Nagashima
Kazuya Hasegawa [SPring-8]
Ichiro Yamashita [ATRL, Panasonic]
Ferenc Vonderviszt [Univ. Veszprém]

Protonic NanoMachine Project, ERATO, JST (1997-2002)
Dynamic NanoMachine Project, ICORP, JST (2002-2008)
Protonic NanoMachine Laboratory, Osaka University (2002-)