# 生物物理

SEIBUTSU BUTSURI

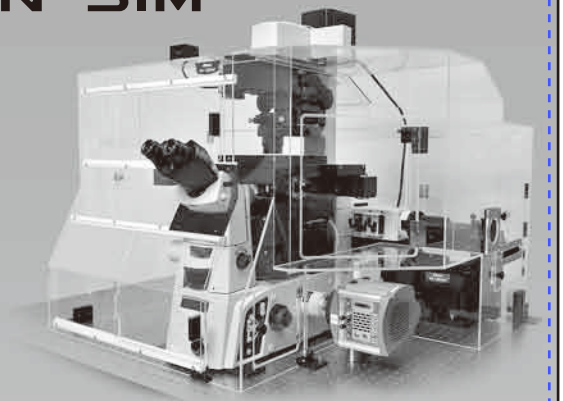
ISSN 0582-4052 CODEN : SEBUAL
2012 年 6 月（通巻 301 号）
3
Vol.52

マウス大脳皮質視覚野の 2 光子イメージング
ユニークな歩行機能をもつミオシン VI
熱ゆらぎを利用する―情報熱機関の実現―
光化学系 II の高分解能構造と水分解機構
線虫の記憶
ウイルスゲノムの適応進化
アミロイド線維伸長中間体の観察
タンパク質のアロステリーと配列デザイン原理
DNA メチル化状態の電気的検出
メンブレノミクス研究
解鎖タンパク質の構造
Rho GTPase 活性化イメージング

日本生物物理学会 THE BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN http://www.biophys.jp

Nikon

N-SIM

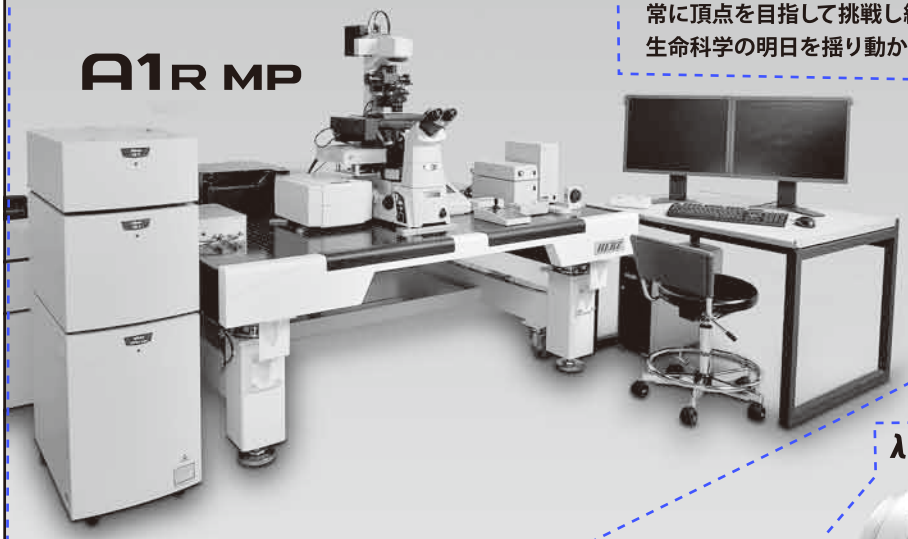


N-STORM

# 先進をゆく顕微鏡が、
# 生体/ライブセルイメージングの新時代を切り拓く。

微細な世界を見る技術が、また新たな次元に到達しました。
常に頂点を目指して挑戦し続けるニコンの高度な顕微鏡技術が、
生命科学の明日を揺り動かします。

A1R MP



λS対物レンズ

**超解像顕微鏡**
**N-SIM/N-STORM**

●100nm以下の解像度で、0.6秒/枚*での連続画像取得が可能な「N-SIM」。
●従来製品の約10倍（約20nm）の分解能を実現した「N-STORM」。
＊2D-SIM/TIRF-SIMモードで最速の場合。

**高速多光子共焦点レーザー顕微鏡システム**
**A1R MP**

●独自の高速スキャニング技術と高感度受光技術により、600μm以上の 深部からの画像を420枚/秒（512×32画素）で可視化します。

**広帯域・高解像対物レンズ**
**λS対物レンズ**

●超低屈折率を誇るニコン独自の薄膜技術、ナノクリスタルコートを採用。
●広範囲波長での高い透過率と同時に、広い色収差補正を実現しています。

販売元
株式会社ニコン／株式会社ニコン インステック
カタログ・パンフレット等のご請求は、(株)ニコンインステック　バイオサイエンス営業本部へ
100-0006 東京都千代田区有楽町1-12-1(新有楽町ビル4F) 電話(03)3216-9163
■本社カスタマーセンター（フリーダイヤル）0120-586-617　■ニコンインステックホームページ　www.nikon-instruments.jp/instech/

目次に戻る

平成 25 年度次期会長および平成 25・26 年度委員の選挙を行っております.
締切は 7 月 1 日（日）です. ぜひご投票ください.

# 選 挙 公 告

日本生物物理学会会則および細則に基づき A. 平成 25 年度次期会長，B. 平成 25・26 年度委員の選挙を行います. 下記の「選挙要項」をご精読の上，期日までにご投票ください.

記

平成 25 年度次期会長および平成 25・26 年度委員選挙
期日：2012 年 7 月 1 日（日）必着

**選挙要項**

（1）本選挙は，会誌に綴じ込まれている投票用紙，および，添付されている返信用封筒により郵送で行う.
（2）本選挙の選挙権者は，本年 4 月 1 日現在における本学会正会員で本年度の学会会費を完納しているものとする.
（3）投票用紙に記載された被選挙者の中から適当と思われる候補者を選出する. 所定欄以外に記入してあるものは無効である.
（4）記入し終えた投票用紙を返信用封筒に入れ，封筒表面（宛名面）の下部の指定箇所に投票者の氏名，会員番号を記入し，7 月 1 日（日）までに必着するよう，郵送すること.
（5）封筒表面（宛名面）下部に投票者の氏名，会員番号の記入のない投票，および，添付以外の封筒を使用したものは無効である.
（6）次期会長，委員選挙の開票は細則第十五条に基づき，公開により 7 月 2 日（月）午後 2 時より大阪大学大学院生命機能研究科内において行う.

## A. 平成 25 年度　次期会長選挙要項

平成 25 年度次期会長は，平成 26・27 年度の会長になられる方で，会長職の引継を兼ねて，会長になる前年度から運営委員会に参加される方です.

日本生物物理学会細則の第十六条に次期会長の選挙要項などが決められています.

その抜粋を記載しますと，

第十六条　1. 運営委員会で次期会長候補者 3 名を推薦し，正会員の投票により，最高得票者を次期会長とする.
2. 最高得票を得た者が 2 名以上ある場合には，その者について改めて投票を行う.
このとき最高得票を得た者が 2 名以上である場合には，抽選により決定する.

運営委員会では，細則に推薦手続きの方法についての規定がないことから，今回は以下のようにして次期会長の候補者を決定いたしました. まず，53 名の学会委員に次期会長候補者を 3 名連記で推薦していただき，その後運営委員会において，学会委員から推薦の多かった候補者について討議した後投票を行い，最高得票者から順に 3 名を決定しました. 次期会長としてふさわしいと思われる候補者を投票用紙に記入してください.

（A1） 次期会長候補者（50 音順）
七田　芳則（京都大学大学院理学研究科）
原田　慶恵（京都大学物質－細胞統合システム拠点）
由良　　敬（お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科）
（A2） 本選挙は選挙要項に従って行う．
（A3） 投票は無記名で行う．上記 3 名の次期会長候補者の中から次期会長として適当と思われる候補者を 1 名選び，投票用紙の①部分を鉛筆で塗りつぶして投票する．複数塗りつぶしたものについては無効とする．
（A4） 開票の結果により，最高得票者を次期会長とする．また，最高得票者が 2 名以上である場合は，その者について改めて選挙を行う．
（A5） この選挙により選出された次期会長の任期は平成 25 年度より 1 年間である．その後平成 26・27 年度の会長となる．
（A6） 次期会長候補者略歴（50 音順）

1. 七田　芳則
現　　職: 京都大学大学院理学研究科　教授
生年月日: 1951 年 10 月 18 日
学　　歴: 1974 年　大阪大学理学部生物学科卒
1979 年　京都大学大学院理学研究科生物物理学専攻博士課程修了
理学博士
職　　歴: 1979 年　日本学術振興会奨励研究員（京都大学）
1979 年　京都大学理学部助手
1993 年　京都大学理学部助教授
1998 年　京都大学大学院理学研究科教授　現在に至る
専門分野: 視覚・ロドプシン・GPCR（G タンパク質共役型受容体）をキーワードにして，種々の機能性タンパク質の分子的な性質・多様性・進化を原子・アミノ酸のレベルから研究しています．
生物物理学会とのかかわり:
大学院時代からの会員で年会には毎年出席しています．委員，運営委員，かなり昔に会誌編集実行副委員長，副会長（2000-2001），邦文誌編集委員長（2008-2009）を務めました．いつまでも元気で多様性のある学会であることを願っています．

2. 原田　慶恵
現　　職: 京都大学物質－細胞統合システム拠点　教授
生年月日: 1959 年 11 月 13 日
学　　歴: 1982 年　茨城大学理学部生物学科卒業
1974 年　大阪大学基礎工学部生物工学科卒
1988 年　大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻　博士課程修了　工学博士
職　　歴: 1988 年　日本学術振興会奨励研究員
1989 年　大阪大学基礎工学部教務職員
1992 年　新技術事業団 ERATO 柳田生体運動子プロジェクト研究員
1997 年　科学技術振興事業団 CREST 生命活動のプログラムチーム 13 研究員
1998 年　慶應義塾大学理工学部専任講師
2000 年　財団法人東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員
2008 年　京都大学物質－細胞統合システム拠点　教授
専門分野: 個々の生体分子を直接観察する 1 分子イメージング顕微鏡法や生体分子を光や磁石のピンセットで捕まえて操作する方法などを使って，細胞内で物質輸送を行うタンパク質，遺伝情報の発現にかかわるタンパク質などの機能を調べています．

生物物理学会とのかかわり：

大阪大学基礎工学部生物工学科の大沢文夫先生の研究室に大学院博士課程の学生として加わって生物物理を知りました．生物学科出身でそれまで動物学会に所属していた私には，はじめ違和感がありましたが，その後すぐに生物物理っ子になりました．これまでに委員，運営委員，副会長（2009-2010）会誌副編集委員長（2012-）などを務めました．

3. 由良　敬

現　職：お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科　教授

生年月日：1966 年 2 月 10 日

学　歴：1988 年　早稲田大学理工学部応用物理学科卒
1990 年　早稲田大学大学院理工学研究科物理学及び応用物理学専攻　修士課程修了
1993 年　名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻　博士課程修了
1999 年　博士（理学）

職　歴：1992 年　名古屋大学大学院理学研究科　学術振興会特別研究員
1993 年　名古屋大学理学部生物学学科　助手
1996 年　名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻　助手
2002 年　日本原子力研究所計算科学推進センター　研究員
2005 年　日本原子力研究開発機構システム計算科学センター　研究副主幹
2006 年　九州大学　客員准教授兼任
2008 年　お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科　教授　および
お茶の水女子大学生命情報学教育研究センター　センター長

専門分野：計算生物学，特に核酸の複製，修復，転写，輸送にかかわる生体高分子の構造計算生物学と分子進化．

生物物理学会とのかかわり：

学部 4 年生の時から会員．運営委員を 3 期務め，現在は副会長．年会などの担当は経験なし．生物物理学を次世代に広めていくことを本務とこころえ，スタッフが自分 1 名のみの研究室で，日々 10 名以上の学生を指導するとともに，月曜日と日曜日以外は毎日 1 コマないしは 2 コマの講義を行っている．

## B. 平成 25・26 年度　委員選挙要項

平成 25・26 年度の委員は，正会員 3 名以上の推薦のあった候補者の中から正会員の投票によって決定いたします．会誌 2012 年 2 月号（52 巻 1 号）で委員候補者の推薦を公募いたしましたところ，推薦された方は 426 名，その内 3 票以上獲得し候補者となった方は 104 名でした．以下の委員候補者の中から，適当と思われる候補者の氏名（10 名以内）を投票してください．

（B1）　委員候補者（所属）

| | | |
|---|---|---|
| 赤坂　一之（近畿大） | 秋山　修志（分子研） | 新井　宗仁（東大） |
| 新井　由之（阪大） | 有賀　隆行（東大） | 有坂　文雄（東工大） |
| 飯野　亮太（東大） | 池上　貴久（阪大） | 池口　満徳（横浜市大） |
| 石北　　央（京大） | 石渡　信一（早稲田大） | 稲葉　謙次（九大） |
| 井上　圭一（名工大） | 井上　裕一（東北大） | 岩佐　達郎（室蘭工大） |
| 岩根　敦子（阪大） | 上田　太郎（産総研） | 上田　昌宏（阪大） |
| 大澤　研二（群馬大） | 太田　善浩（東京農工大） | 岡本　祐幸（名大） |
| 小倉　尚志（兵庫県立大） | 片平　正人（京大） | 加藤　晃一（岡崎統合バイオ） |
| 加納　ふみ（東大） | 鎌足　雄司（岐阜大） | 上久保裕生（奈良先端大） |
| 川岸　郁朗（法政大） | 川戸　　佳（東大） | 北尾　彰朗（東大） |

北村美一郎（徳島文理大）
城所　俊一（長岡技科大）
工藤　成史（東北大）
河野　秀俊（原研）
笹井　理生（名大）
篠原　康雄（徳島大）
杉浦　美羽（愛媛大）
陶山　　明（東大）
曽和　義幸（法政大）
高橋　卓也（立命館大）
田中　　勲（北大）
寺北　明久（大阪市大）
鳥羽　　栞（大阪市大）
内藤　　晶（横浜国大）
中村　春木（阪大）
西山　雅祥（京大）
野村慎一郎（東北大）
坂内　博子（理研）
廣田　　俊（奈良先端大）
藤原　　慶（東北大）
右田たい子（山口大）
武藤　悦子（理研）
村本　和優（兵庫県立大）
安永　卓生（九工大）
倭　　剛久（名大）
木寺　詔紀（横浜市大）
木下　賢吾（東北大）
栗原　和枝（東北大）
小嶋　誠司（名大）
皿井　明倫（九工大）
下野　和実（松山大）
杉田　有治（理研）
十川久美子（東工大）
高野　光則（早稲田大）
田口　英樹（東工大）
田中　裕人（NICT）
徳富　　哲（大阪府大）
富重　道雄（東大）
永井　健治（阪大）
奈良　敏文（松山大）
根岸　瑠美（東工大）
芳賀　　永（北大）
樋口　秀男（東大）
深田　吉孝（東大）
古川　良明（慶応大）
水谷　泰久（阪大）
村上　　緑（名大）
八木　俊樹（東大）
山崎　昌一（静岡大）
由良　　敬（お茶大）
木戸秋　悟（九大）
木村　哲就（分子研）
黒田　　裕（東京農工大）
児嶋長次郎（阪大）
七田　芳則（京大）
城　　宜嗣（理研）
須藤　雄気（名大）
園山　正史（群馬大）
高橋　　聡（東北大）
楯　　真一（広島大）
塚本　寿夫（分子研）
徳永万喜洋（東工大）
豊島　陽子（東大）
中迫　雅由（慶応大）
西坂　崇之（学習院大）
野口　　巧（名大）
林　久美子（東北大）
広瀬　恵子（産総研）
藤田　克昌（阪大）
槇　　亙介（名大）
宮田　真人（大阪市大）
村田　武士（千葉大）
矢島潤一郎（東大）
山下　高廣（京大）

（B2）　本選挙は選挙要項に従って行う．

（B3）　上記 104 名の委員候補者の中から，委員として適当と思われる候補者（10 名以内）を選び，投票用紙の①部分を鉛筆で塗りつぶして投票する．10 名を超える候補者に投票したものは無効とする．

（B4）　開票の結果により，得票順に定数（25 名）だけを当選とする．会費滞納者が当選した場合は，学会の請求により直ちに滞納分の支払いがある場合に限りこれを有効とする．
また，最下位が同点の場合は抽選により順位を決定する．

（B5）　この選挙により選出された委員の任期は平成 25 年度より 2 年間である．

平成 24 年 6 月
日本生物物理学会選挙管理委員長　南野　　徹

# 境界にいることを楽しもう

巻／頭／言

日本生物物理学会の運営委員を務めるようになってから，中高生や一般の方々に「生物物理学」を説明する機会が増えた．大学の講義の際にも生物物理学という言葉を発する機会が多々ある．そういう場での相手の反応はどういうわけか決まっており，「物理と生物がくっつくのですか？」であり，けげんな顔をされる．「それがね，…」と弁明のような説明を始めなければならなくなる．説明が終わっても，相手はけげんな顔のまま．なぜこのような展開になるのだろうかと，こちらはなやんでしまう．振り返って，自分自身がはじめて生物物理学という言葉を聞いた30年ほど前には，これはきっとおもしろいと直感したし，齋藤信彦先生にこれでも読んでみなさいと，岩波新書の旧字体で書かれた「生命とは何か」（シュレーディンガー著:岡小天，鎮目恭夫訳）をポンと渡され，一生懸命読んで，これはすごいと思ったのを覚えている．同級生も生物物理学という言葉に違和感は感じていなかったと思う．ところが現在では，物理学は「物理学」，生物学は「生物学」と何となく垣根が高くなり，本来は1つである自然科学を，理解しやすいようにと便宜的につくった区分けが固定し，人々がその呪縛に縛られているようである．学際領域とか境界領域という言葉を使って，この区分けを壊さなければならなくなったわけだが，「際」とか「境」という漢字が，学生から見ると，2つ以上のことを勉強しなければならない，さらには崖っぷちのイメージをいだかせるらしく，負担が多くて危ないものには近づかないという雰囲気になってしまっている．どうしましょうと，憂鬱になる日々である．先日，このようにぼやいていたら，「それは先生が保守的で，そのことが学生に映っているだけではありませんか」といわれた．むむっと思ったが，それは真実かもしれない．自分自身が学生のときには，何でもやってやろうという強烈な先生がいたような気がする．どうやらやらなければならないことは，崖っぷちにいることはスリルがあっておもしろいということを身をもって示しながら，学問領域には崖っぷちなんか実は存在しないことに気がついてもらうことのようである．というわけで，これからはもっとマニアックに元気よく自分の「生物物理学」を語っていくことに努めてみようと思っている．みなさんにもぜひそうしてもらいたい．最近学生から，「何であんなに目を輝かして講義ができるのですか？」と半分あきれられたようなコメントをもらえたのは，変革の兆しに違いない．

由良　敬，Kei YURA
お茶の水女子大学・生命情報学教育研究センター，教授

生物物理 3
SEIBUTSU BUTSURI Vol.52
日本生物物理学会 THE BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN http://www.biophys.jp
2012 年 6 月 Vol.52 No.3（通巻 301 号）

巻頭言

123 境界にいることを楽しもう
由良 敬 YURA, K.

解説

126 *in vivo* 2光子励起機能的カルシウムイメージング法によって見えてきた大脳皮質視覚野抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの特徴選択性および可塑性の違い
The Difference in Property between Excitatory and Inhibitory Neurons, as Revealed by *in vivo* Two-photon Functional $Ca^{2+}$ Imaging
惣谷和広 SOHYA, K. 蝦名鉄平 EBINA, T. 津本忠治 TSUMOTO, T.
*in vivo* 2 光子 $Ca^{2+}$ イメージング法によって多数のニューロン活動を計測する方法は，非常に有用な脳機能イメージング法の 1 つとなっている．本稿では，これによって見いだされたマウス大脳皮質一次視覚野における GABA ニューロンと興奮性ニューロンの方位（傾き）選択性や眼優位可塑性の違いについて解説する．

総説

132 ユニークな歩行機能をもつミオシンVI
Tracing Hidden Myosin VI Lever Arms
西川 宗 NISHIKAWA,S. 有本行雄 ARIMOTO, I.
過去の 1 分子計測技術は，ミオシン VI がアクチン上を歩く分子モーターであることを明らかにしたが，脚より長い歩幅で移動する大きな謎を残したままであった．しかし，空間分解能と時間分解能を向上した近年の 1 分子計測技術により，ミオシン VI に隠された長い脚の存在が明らかになった．

136 熱ゆらぎを利用する―情報熱機関の実現―
Utilizing Thermal Fluctuations: Experimental Demonstration of Information-heat Engine
鳥谷部祥一 TOYABE, S. 宗行英朗 MUNEYUKI, E.
Maxwell の悪魔は，熱力学法則の根幹にかかわる疑問を投げかけ，観測や情報が熱力学で果たす役割を理解する契機となった．われわれは，ブラウン粒子を用いてこのガジェットを実現し，ミクロな自由度に関する「情報」を用いて自由エネルギーを汲み出すことに成功した．沙川–上田の理論を引用しつつ，情報と熱力学のつながりを見ていきたい．

140 高分解能構造から見えてきた光合成水分解の仕組み
Mechanism of Photosynthetic Water-splitting Based on the High Resolution Structure of Photosystem II
沈 建仁 SHEN, J.-R. 梅名泰史 UMENA, Y. 川上恵典 KAWAKAMI, K. 神谷信夫 KAMIYA, N.
光化学系 II は 19 個のサブユニットを含む分子量 350 kDa の膜タンパク質複合体で，光合成において水分解・酸素発生反応を触媒している．われわれは光化学系 II の結晶構造を 1.9 Å 分解能で解析し，酸素発生触媒中心を含む複合体の詳細な構造を解明し，水分解反応の機構について多くの重要な知見を得た．

※本文中「（電子ジャーナルではカラー）」の記載がある図は，http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/ でカラー版を掲載しています．

次／号／予／告

ESR によるモータータンパク質の動的解析……荒田敏昭
繊毛運動・構造とチューブリン修飾……池上浩司，瀬藤光利
tRNA 擬態による mRNA 品質管理……小林　幹，石谷隆一郎，濡木　理
一酸化窒素還元酵素の結晶構造……日野智也，當舎武彦，城　宜嗣
電子線トモグラフィ法による真核細胞鞭毛の構造……石川　尚
タンパク質立体構造変化のデータベース解析……雨宮崇之
……ほか

**トピックス**

144 線虫の記憶
*C. elegans* Memory
**杉　拓磨 SUGI, T.**

146 ウイルスゲノムの適応進化：
タンパク質立体構造に基づくウイルス適応度地形の解析
Adaptive Evolution of Viral Genome: Analysis of the Fitness Landscape of a Virus based on the Protein Structure
**渡部輝明 WATABE, T.　岸野洋久 KISHINO, H.**

148 アミロイド線維伸長における中間体構造の捕捉と構造解析
Kinetic Intermediate of $\beta_2$-microglobulin Fibril Elongation Probed by Tryptophan Fluorescence Spectroscopy and H/D Exchange-NMR
**茶谷絵理 CHATANI, E.　小沼　剛 KONUMA, T.　後藤祐児 GOTO, Y.**

150 タンパク質のアロステリーと配列デザイン原理
Protein Allostery and Sequence Design Principle
**高田彰二 TAKADA, S.**

152 1 分子電流計測による非標識 DNA のメチル化検出
Electrical Detection of DNA Methylation
**筒井真楠 TSUTSUI, M.　谷口正輝 TANIGUCHI, M.　川合知二 KAWAI, T.**

154 リポソーム固定化技術を用いたメンブレノミクス研究
Membranomics Research Using Liposome Immobilization Technique
**島内寿徳 SHIMANOUCHI, T.**

156 解鎖タンパク質構造の新規高速生成法
A New Efficient Method for Generating Conformations of Unfolded Proteins
**関　安孝 SEKI, Y.**

**トピックス（新進気鋭シリーズ）**

158 2 光子蛍光寿命イメージングによる Rho GTPase 活性化の
単一シナプスレベル可視化解析
Imaging Rho GTPases Activation in Single Dendritic Spines by 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
**村越秀治 MURAKOSHI, H.**

160 支部だより
162 若手の声
164 海外だより

生物物理 52（3），126-131（2012）

解説

# *in vivo* 2光子励起機能的カルシウムイメージング法によって見えてきた大脳皮質視覚野抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの特徴選択性および可塑性の違い

惣谷和広[1,2]，蝦名鉄平[1]，津本忠治[1]

[1]RIKEN, BSI, 大脳皮質回路可塑性研究チーム
[2]JST，さきがけ，「脳神経回路の形成・動作と制御」領域

"*in vivo* two-photon functional $Ca^{2+}$ imaging" is a powerful tool to analyze neural circuits of the cerebral cortex in the physiological condition. To monitor activities of excitatory neurons, inhibitory (GABAergic) neurons and astrocytes, we applied this imaging method to visual cortex of transgenic mice, in which GABAergic neurons express fluorescent protein (EGFP or Venus). With this method, we can monitor the neural activities from hundreds of excitatory and GABAergic neurons (and also from astrocytes) *in vivo*. We found that the difference in response selectivity and ocular dominance plasticity between excitatory and GABAergic neuron in the mouse visual cortex.

**Two-photon excitation / *in vivo* $Ca^{2+}$ imaging / Fluorescent protein / Visual cortex / Orientation selectivity / Ocular dominance plasticity**

## 1. はじめに

大脳皮質神経回路網は，大別すると，末梢の感覚器官によって受容された外界の情報を伝達する興奮性ニューロン（グルタミン酸を神経伝達物質とする神経細胞），興奮性ニューロンの活動を制御する抑制性（GABA）ニューロン（γ-アミノ酪酸：GABA を神経伝達物質とする神経細胞）および大脳皮質内の恒常性維持にかかわっていると考えられているグリア細胞の3種類の細胞群からなる．その中でも，GABA ニューロンの機能は，単に神経回路網の活動レベルを抑制するだけでなく，興奮性ニューロンの特徴選択的な情報処理の形成など，大脳皮質神経回路網の情報処理機構に非常に重要な役割を果たしていることが示唆されている．GABA ニューロンの作用に関する詳細な仕組みについて調べるためには，*in vivo* で，興奮性ニューロンが活動しているときに GABA ニューロンがどういった活動をしているのかといったことを直接的に観察することが必要であるが，今までは非常に困難であった．

そこで，今回，われわれは，*in vivo* **2光子励起**機能的カルシウムイメージング法[8]を改良し，脳神経回路網内に大別される3種の細胞活動を弁別しながら同時イメージングすることに成功した．これにより，大脳皮質一次視覚野神経回路網内の GABA ニューロンと興奮性ニューロンの特徴選択性や眼優位可塑性の違いについて新しい知見を見いだすことができた[1), 2)]ので，詳細を解説したい．

## 2. 2光子励起蛍光顕微鏡と脳機能 $Ca^{2+}$ イメージング

近年の蛍光イメージング装置の急速な発展や蛍光タンパク質の改良に伴い，脳神経回路網の活動をリアルタイムイメージングする方法は，空間的かつ時間的な知見を得る上で非常に有用な手段の1つと認識されている．特に1990年に Webb 博士らによって開発された2光子励起レーザー走査型蛍光顕微鏡[3]は，2光子励起法のユニークな特色から，

①高解像度での蛍光観察，および局所的な光生理活性物質の活性化や不活性化が可能である．
②蛍光退色や試料への光熱障害が抑制される．
③試料深部での蛍光観察が可能である．
④1つの波長で多重蛍光観察が可能である．

といった点で神経科学研究においては非常に有効な手段である[4]．この方法は1990年代中ごろからシナプ

**The Difference in Property between Excitatory and Inhibitory Neurons, as Revealed by *in vivo* Two-photon Functional $Ca^{2+}$ Imaging**
Kazuhiro SOHYA[1,2], Teppei EBINA[1] and Tadaharu TSUMOTO[1]
[1]Laboratory for Cortical Circuit Plasticity, RIKEN-BSI
[2]JST PRESTO PROJECT "Development and Function of Neural Networks"

※図3は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

スをターゲットとした研究にさかんに用いられるようになった[5)-7)].

一方，この顕微鏡は，多数のニューロン群の活動計測というもう少しマクロなものをターゲットとした目的にも用いられている．それが *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法である[8)]．その原理は，ニューロンの活動電位発生時に生じる細胞内カルシウムの濃度上昇をカルシウム蛍光指示薬の蛍光変化としてとらえることで，ニューロンの活動を計測するというものである．これは，2003 年になって Stosiek 博士らによって *in vivo* の脳標本に応用されたものである．さらに 2004 年に，Nimmerjahn 博士らによって，Sulforhodamine101（SR101）色素がアストログリア細胞を特異的に染色することが示され[9)]，2005 年に大木博士によって，この方法が大脳皮質一次視覚野ニューロンの視覚応答特性の解析に応用され，その有用性が示された[10)]．しかしながらこの方法では，GABA ニューロンを弁別することは不可能であった．

われわれは，この *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法を GABA ニューロンが特異的に蛍光タンパク質（EGFP もしくは Venus）を発現するトランスジェニックマウスに適用し，GABA ニューロンと興奮性ニューロン，アストログリア細胞を弁別して，細胞の活動を計測することに成功した[1)]．**図 1** に示すように，カルシウム指示薬 Fura-2 は，およそ 900 nm 以上の波長領域では 2 光子吸収効率が低く，逆に GABA ニューロンに特異的に発現している蛍光タンパク質とアストログリア細胞を特異的に染色する SR101 蛍光色素はおよそ 950 nm 付近の波長でも高い 2 光子吸収効率を有していることがわかる．つまり，

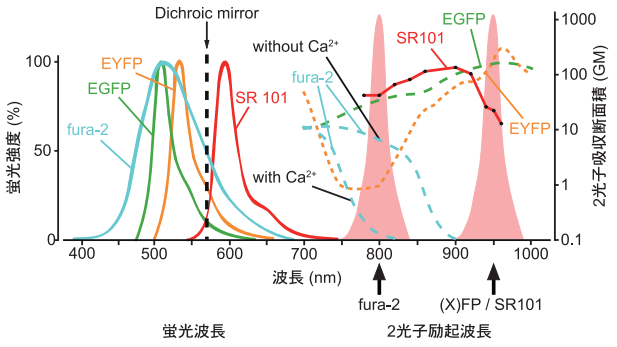



**図 1**
蛍光色素の 2 光子励起波長と蛍光波長．グラフ左側にわれわれが用いている色素の蛍光スペクトル，右側にそれらの 2 光子吸収スペクトルをおのおの示す[1), 18)]（われわれが用いているトランスジェニックマウスは，GABA ニューロンに蛍光タンパク質 EGFP もしくは Venus を発現している．Venus は変異型 EYFP であるので，ここでは，Venus の代わりに EYFP の 2 光子吸収スペクトルと蛍光スペクトルを示した）．

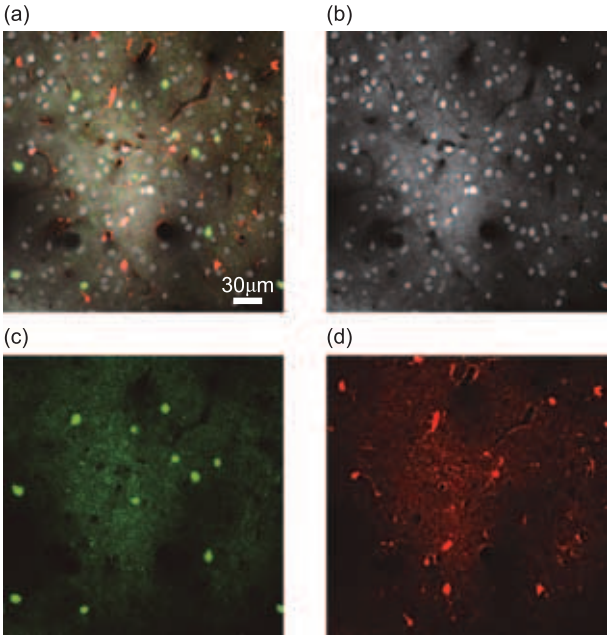



**図 2**
*in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージングにおける大脳皮質神経回路網内の 3 種の細胞の同定．（a）（b）～（d）の merge 画像．（b）800 nm 励起による Fura-2 染色画像（細胞活動の計測）．（c）950 nm 励起による蛍光タンパク質画像（GABA ニューロンの同定）．（d）950 nm 励起による SR101 染色画像（アストログリア細胞の同定）．

われわれの用いた絡繰りは，**図 1** に示すように，細胞の活動計測は，Fura-2 を 800 nm ピークのパルスレーザーで 2 光子励起することで行い，その後，蛍光タンパク質と SR101 色素を 950 nm で励起することで細胞の同定を行うというものである（**図 2**）．

## 3. 大脳皮質一次視覚野の方位選択性

大脳皮質一次視覚野では，1960 年代からの Hubel と Wiesel の研究[11)] 以来，網膜に与えられた視覚刺激に対して，特定の方位（傾き）刺激に反応する「方位（傾き）選択性をもつニューロン」が存在することが知られており，現在，「脳は特徴選択的に情報処理を行うという概念」が成立している．視覚情報というのは網膜の細胞から視床にある外側膝状体（LGN）を経由して大脳皮質一次視覚野に伝えられるのだが，網膜のニューロンも外側膝状体のニューロンもこの方位選択性は有していない．そこで問題になってくるのが，「大脳皮質一次視覚野ニューロンは，どうやって方位選択性を獲得するのか」である．しかし，いまだその動作原理については仮説の域を出ない多くの謎が残されている．

1960 年代に Hubel と Wiesel らが提唱した有名な

feed-forward モデル[11]は，網膜–LGN から送られてくる情報が，大脳皮質一次視覚野でシナプス統合されて方位選択性が形成されるというモデルであり，現在，多くの研究者に受け入れられている．しかしながら，このモデルでは，GABA ニューロンの方位選択性形成における機能は割愛された単純モデルであり，1970 年代に示された Sillito 博士らによる GABA 阻害剤によって大脳皮質内抑制を阻害すると，大脳皮質一次視覚野のニューロンの方位選択性がなくなるという実験結果[12]を説明することができない．よって，現在では，GABA ニューロンの方位選択性形成における機能を考慮したモデルも多く存在し，さまざまな議論がなされている[13]．おそらく，こういった論争は，現時点での GABA ニューロンの視覚応答に関して，*in vivo* で GABA ニューロンの活動を直接的に計測することが困難であるのも 1 つの原因ではないかと思われる．

## 4. GABA ニューロンの方位（傾き）選択性

そこで，われわれは，前述したイメージング法を用いて，GABA ニューロンと興奮性ニューロンの方位（傾き）選択性を計測した[1]．**図 3** の実験概略図に示すように，マウスに 0 度からランダムに 45 度ステップで白黒バーの視覚刺激を 5 秒ずつ 15 秒の間隔をあけて提示し，そのときに起こるニューロン活動を *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法で計測した．

その結果，**図 4a** に代表的な興奮性ニューロンと GABA ニューロンの視覚応答例を示したが，興奮性ニューロンは従来からいわれているように，ある特定の方位（傾き）に選択的な視覚応答を示すのに対して（ここでは 0 度の傾きの視覚刺激特異的に応答），GABA ニューロンはどの方位（傾き）の視覚刺激に対しても視覚応答を示した．**図 4b** は，**図 4a** のニューロンの視覚応答を提示した視覚刺激の方位（傾き）で極座標プロットしたもので，このプロットからも興奮性ニューロンと GABA ニューロンの方位（傾き）選択性の違いがわかる．また，方位（傾き）選択性の強度を定量化する目的でよく用いられる OSI 値（Orientation Selectivity Index：**図 4** 下部式）というパラメーターを計算し，興奮性ニューロンと GABA ニューロンの OSI 値の分布を比較したところ（**図 5**），やはり GABA ニューロンは，興奮性ニューロンに比べ，優位に低い OSI 分布を示した（*K-S* test, $p<0.001$）．以上のことより，① GABA ニューロンは，大脳皮質一次視覚野内で視覚刺激非依存的にランダムに活動しているわけではなく，視覚刺激によって確かに視覚応答を示す．② その視覚応答性は，興奮性ニューロンのような強い選択性を示さず，どの方位（傾き）視覚刺激に対しても視覚応答を示す．ということが明らかとなった．

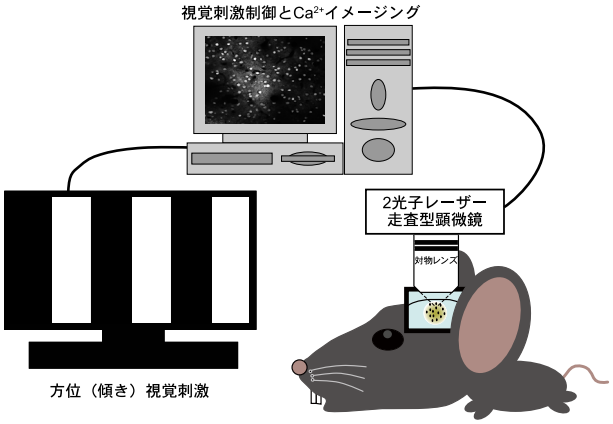



図 3
*in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージングにおける大脳皮質一次視覚野ニューロンの視覚刺激応答実験の概略図．視覚刺激反応は傾きをもった白黒のバーをマウスへ提示する．

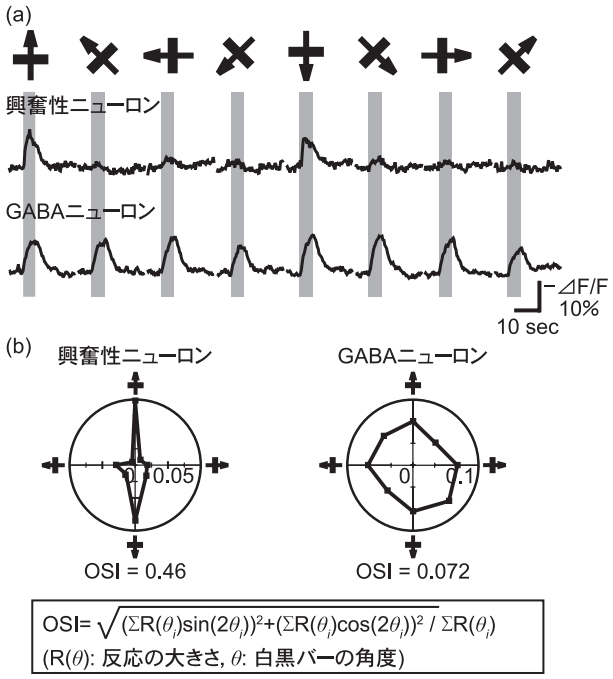



図 4
*in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージングによるマウス大脳皮質一次視覚野興奮性ニューロンと GABA ニューロンの方位（傾き）選択性の解析．（a）興奮性ニューロンと GABA ニューロンの視覚応答反応．（b）（a）に示した興奮性ニューロンと GABA ニューロンの方位（傾き）視覚刺激に対する視覚応答の大きさを極座標プロットで示したもの．OSI（Orientation Selectivity Index）は，方位（傾き）選択性の強度を示す指標で，1 に近い値を示すほど方位（傾き）選択性の強度が強いことを表している．

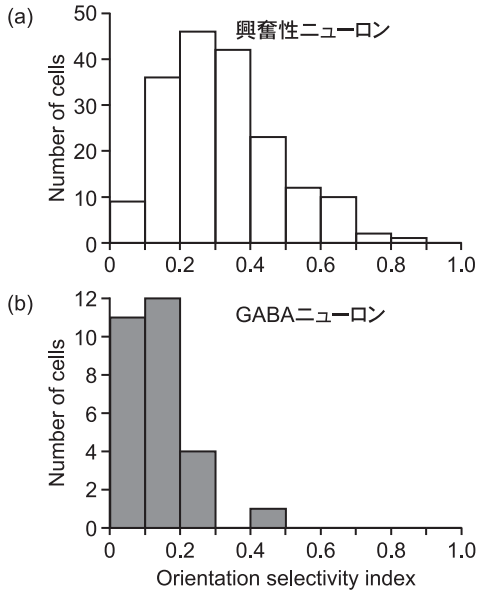



図 5
マウス大脳皮質一次視覚野興奮性ニューロンと GABA ニューロンの方位（傾き）選択性．(a) 興奮性ニューロンの OSI 分布．(b) GABA ニューロンの OSI 分布．

## 5. 大脳皮質一次視覚野の両眼反応性と眼優位可塑性

ヒトを含め，げっ歯類やネコ，サルなど多くの高等生物では，眼を 2 つ有している．大脳皮質一次視覚野のニューロンでは，おのおのの眼に対する視覚応答の強さの割合が異なっており，この視覚応答特性は，両眼反応性（**図 6a**）とよばれる．また，片眼をある一定期間遮蔽すると，大脳皮質一次視覚野のニューロンの両眼反応性は可塑的に変化することが知られており，これは，眼優位可塑性（**図 6b**）とよばれる．これらの研究も大脳皮質一次視覚野ニューロンの方位（傾き）選択性の研究と同じく多くの研究がされてきた[14]．

その中で，マウス大脳皮質一次視覚野は，ネコやサル，ヒトなどの高等生物に見られる眼優位性カラムは存在しないものの，両眼反応性領域という両眼から視覚情報の入力を受け取る領域がある．そこに存在するニューロンは，反対側の眼に強く反応する傾向があるが（**図 6a**），片眼遮蔽による眼優位可塑性を有しており（**図 6b**），遺伝子操作が可能で比較的大掛かりな実験を要さないなどの利点から，発達期初期の感受性期（臨界期）における脳神経回路網の可塑性モデルとして，今では多くの研究者が研究対象としている[15),16)]．

今までの知見から，マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域のニューロンは，大きく 2 つの①両眼反応性を示すが，その反応性は同側の眼への視覚刺激で誘発される視覚応答よりも反対側の眼への視覚刺激で誘

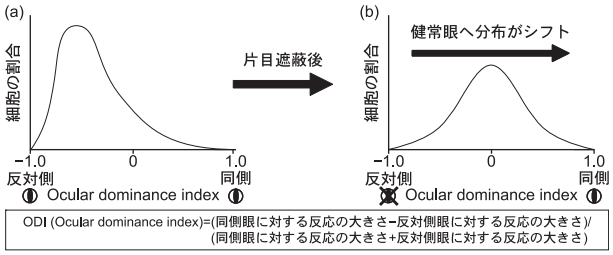



図 6
マウス大脳皮質一次視覚野ニューロンの両眼反応性と眼優位可塑性を示す ODI 分布模式図．(a) 発達期（臨界期）におけるマウス大脳皮質一次視覚野のニューロンの ODI 分布．(b) 発達期（臨界期）における片目遮蔽後のマウス大脳皮質一次視覚野のニューロンの ODI 分布．ODI（Ocular dominance Index）は，大脳皮質一次視覚野ニューロンの両眼反応性を示す指標．ODI（Ocular dominance Index）は，大脳皮質一次視覚野ニューロンの両眼反応性を示す指標で，−1 に近い値を示すほど反対側の眼への視覚刺激に対して強く視覚応答を示し，1 に近い値を示すほど同側の眼への視覚刺激に対して強く視覚応答を示す．0 は，両方の眼への視覚刺激に対して均等に視覚応答を示す．

発される視覚応答のほうが大きいニューロンが多く存在する（**図 6a**）②片眼遮蔽によって誘発される眼優位可塑性（**図 6b**）は，発達期初期の感受性期（臨界期）（マウスでは生後 19 日から 32 日）の幼弱脳に現れ，臨界期をすぎた大人の時期，つまり成熟脳では，眼優位可塑性はあるものの，眼優位可塑性を誘発するには，長い期間の片眼遮蔽が必要であり（幼弱脳では 2 ～ 4 日で誘発されるのに対し，成熟脳では 7 日以上を要する），その強さは非常に弱いということがわかっている[15)]．そして最近になって，この発達期初期に感受性期が局限するためには，大脳皮質一次視覚野の GABA ニューロンの活動の成熟が関与しているという研究が，薬理学的な方法を使って報告された[16)]が，なぜ，GABA ニューロンの活動が成熟すると発達期初期にだけ感受性期が局限するのかという疑問に対して，GABA ニューロンの作用や機能発達などに関する詳細なメカニズムについてはいまだ謎である．これらの知見は，やはり従来のブラインドによる微小電極を用いた電気生理学的な手法に基づいたもので，今まで GABA ニューロンと興奮性ニューロンの両眼反応性や眼優位可塑性の違いはまったく研究されてこなかったのである．よって，この謎を解いていくためにも，GABA ニューロンの可塑的な変化を直接観察することは重要であると考えられる．

## 6. GABA ニューロンの両眼反応性と眼優位可塑性

そこで，やはりわれわれは，前述した遺伝子改変マウスを利用した *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイ

メージング法を用いて，GABA ニューロンと興奮性ニューロンの両眼反応性と眼優位可塑性を解析した（**図 7a**）[2]．**図 7b** に示すように，マウス大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域におけるニューロンは，今までの知見と一致して，反対側の眼にバイアスのある両眼反応性を示すが，細胞の種類を区別して解析を行ったところ，**図 7c, d** に示すように，GABA ニューロンは，興奮性ニューロンよりも両眼により等しく反応する傾向があることがわかった．

また，眼優位可塑性については，**図 8** に示すように，感受性期（臨界期）の幼弱脳の大脳皮質一次視覚野両眼反応領域における GABA ニューロン，興奮性ニューロン共に強い眼優位可塑性を示した（生後 28 日前後から 2 日間片眼遮蔽したマウスと片目遮蔽を行っていないコントロールマウスを計測比較した）．一方，臨界期後の成熟脳の大脳皮質一次視覚野両眼反応領域における興奮性ニューロンは，**図 8a, c** に示すように，眼優位可塑性は示すものの，非常に弱い眼優位可塑性を示した（生後 60 日前後から 7 日間片眼遮蔽したマウスと片目遮蔽を行っていないコントロールマウスを計測比較した）．しかしながら，成熟脳の GABA ニューロンでは，**図 8b, c** に示すように，感受性期（臨界期）の幼弱脳のそれより弱いものの，興奮性ニューロンが示した眼優位可塑性より大きな眼優位可塑性を示した．

今回得られた眼優位可塑性の知見に関して，**図 9** にまとめると，大脳皮質一次視覚野両眼反応領域における興奮性ニューロンは，従来いわれてきたように，発達期初期における感受性期（臨界期）の幼弱脳に眼優位可塑性を有し，その強度は臨界期をすぎると非常に減弱してしまうが，GABA ニューロンは，発達期初期の感受性期（臨界期）をすぎた成熟脳においても興奮性よりも大きな眼優位可塑性能を有していることが示唆された[2]．

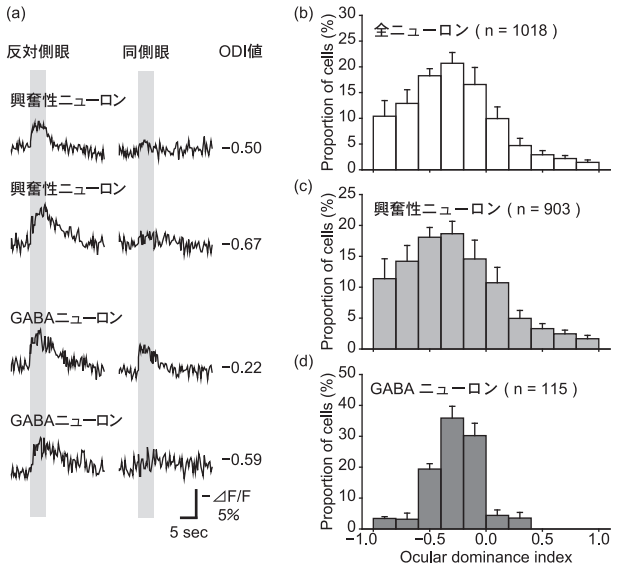



**図 7**

*in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージングによるマウス大脳皮質一次視覚野両眼反応領域における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの両眼反応性の解析．（a）興奮性ニューロンと GABA ニューロンの視覚応答反応．（b）全ニューロンの ODI 値の分布．（c）興奮性ニューロンの ODI 値の分布．（d）GABA ニューロンの ODI 値の分布．c, d のグラフを比較すると，興奮性ニューロンに比べ，GABA ニューロンの ODI 分布が，ODI = 0 に近いところに固まって分布している．つまり，GABA ニューロンは，興奮性ニューロンより，両眼に均等に反応する傾向がある．

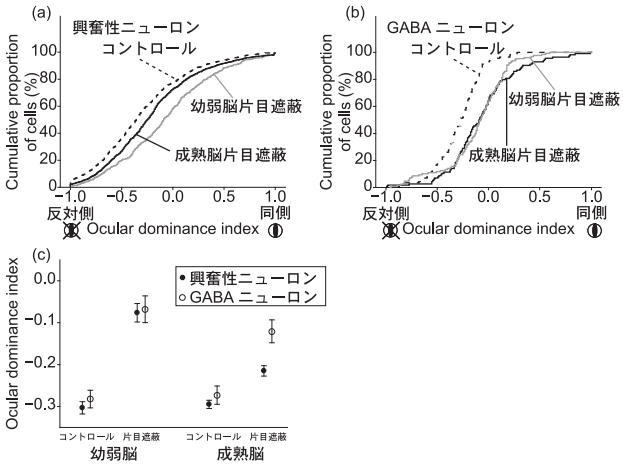



**図 8**

発達期（幼弱脳）と発達期後（成熟期）のマウス大脳皮質一次視覚野両眼反応領域における興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性．（a）片目遮蔽によって引き起こされた幼弱脳と成熟脳の興奮性ニューロンの ODI 値分布の変化．（b）片目遮蔽によって引き起こされた幼弱脳と成熟脳の GABA ニューロンの ODI 値分布の変化．（c）（a），（b）を ODI 平均値で示した．図 6 で示したように，片目遮蔽によって眼優位可塑性を誘発すると，視覚応答の強度が健常眼優位となり，ODI 値の分布は健常眼側へシフトする（a, b では，片目遮蔽を行っていないコントロールマウスに比べ，片目遮蔽による眼優位可塑性を誘発したマウスでは，ODI 値の cumulative proportion が右側にシフトしている）．

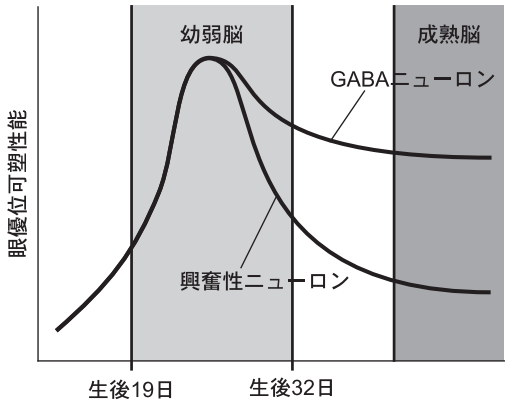



**図 9**

生後発達における大脳皮質一次視覚野両眼反応性領域の興奮性ニューロンと GABA ニューロンの眼優位可塑性能強度変化の模式図．

## 7. おわりに

このように 2 光子励起レーザー走査型蛍光顕微鏡は，現在，神経科学においては非常に強力なツールの 1 つとなっている．しかしながら，今回紹介した *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージング法は退色の問題から，長期にわたってニューロン活動をモニターすることは困難である．最近では，カルシウム反応を計測できる蛍光タンパク質の出現[17]により，長期的な *in vivo* 2 光子励起機能的カルシウムイメージングが可能となりつつある．このような技術革新によって，近い将来，これまでの視点とはまったく異なった，局所回路網レベルの視点から脳神経回路網の動作原理や機能発達が明らかにされることが期待される．

## 文　献

1） Sohya, K. *et al.*（2007）J. Neurosci. **27**, 2145-2149.
2） Kameyama, K. *et al.*（2010）J. Neurosci. **30**, 1551-1559.
3） Denk, W. *et al.*（1990）Sience **248**, 73-76.
4） Helmchen, F., Denk, W.（2005）Nat. Methods **2**, 932-940.
5） Svoboda, K. *et al.*（1997）Nature **385**, 161-165.
6） Engert, F., Bonhoeffer, T.（1999）Nature **399**, 66-70.
7） Matsuzaki, M. *et al.*（2001）Nat. Neurosci. **4**, 1086-1092.
8） Stosiek, C. *et al.*（2003）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 7319-7324.
9） Nimmerjahn, A. *et al.*（2004）Nat. Methods **1**, 31-37.
10） Ohki, K. *et al.*（2005）Nature **433**, 597-603.
11） Hubel, D. H., Wiesel, T. N.（1962）J. Physiol. **160**, 106-154.
12） Sillito, A. M.（1975）J. Physiol. **250**, 305-329.
13） Isaacson, J. S., Scanziani, M.（2011）Neuron **72**, 231-243.
14） Wiesel, T. N., Hubel, D. H.（1963）J. Neurophysiol. **26**, 1003-1017.
15） Gordon, J. A., Stryker, M. P.（1996）J. Neurosci. **16**, 3274-3286.
16） Hensch, T. K. *et al.*（1998）Science **282**, 1504-1508.
17） Nakai, J. *et al.*（2001）Nat. Biotechnol. **19**, 137-141.
18） Zipfel, W. R. *et al.*（2005）Nat. Biotechnol. **21**, 1369-1377.

惣谷和広

**惣谷和広（そうや　かずひろ）**
RIKEN-BSI 研究員，JST さきがけ「脳回路の形成・動作と制御」領域兼任研究員
1973 年千葉県生まれ．2005 年大阪大学大学院医学研究科博士課程修了．医学博士．02-04 年日本学術振興会特別研究員．04-05 年 JST-SORST 研究員．05 年より現職．09 年より JST さきがけ研究員兼任．
研究内容：大脳皮質神経回路網の機能解析
連絡先：〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
RIKEN-BSI 大脳皮質回路可塑性研究チーム
E-mail: sohya@brain.riken.jp

蝦名鉄平

**蝦名鉄平（えびな　てっぺい）**
RIKEN-BSI 研究員
2011 年東京農工大学大学院工学府博士課程修了（指導教官：黒田裕准教授）．工学博士．11 年より現職．
研究内容：大脳皮質視覚情報処理機構の解析，タンパク質工学
連絡先：同上
E-mail: teppei-ebina@brain.riken.jp

津本忠治

**津本忠治（つもと　ただはる）**
大脳皮質回路可塑性研究チーム・シニアチームリーダー，RIKEN-BSI 副センター長
1967 年大阪大学医学部卒業．医学博士．83-2005 年大阪大学大学院医学系研究科教授．05-09 年 RIKEN-BSI ユニットリーダー．05-10 年日本神経科学学会会長．09 年より現職．11 年より RIKEN-BSI 副センター長．
研究内容：大脳生理学
連絡先：同上
E-mail: tsumoto@brain.riken.jp
URL: http://tsumoto.brain.riken.jp/index_j.html

解説

**用語解説**

**2 光子励起**
Two photon excitation
基底状態にある分子がほぼ同時に 2 つの光子を吸収して励起状態に遷移する現象を 2 光子励起という．このとき，吸収される光子 1 個分のエネルギーは，基底状態と励起状態のエネルギー準位の半分に相当するエネルギーをもつ．
（126 ページ）　（惣谷ら）

※本文中ゴシックで表記した用語を解説しています．

生物物理 52（3），132-135（2012）

総説

# ユニークな歩行機能をもつミオシンVI

西川　宗　（株）ニコン　インストルメンツカンパニー
有本行雄　（株）オリンパスメディカルシステムズ

Unlike other molecular motors, myosin VI has much larger and broadly distributed step sizes than those predicted from its structure. Here, this discrepancy was consistently elucidated by highly sensitive single molecule imaging technique. The large step sizes and its variability were attributed to an extended rigid lever arm and two distinct tilt angles which causes newly found large and small step size.

**Myosin VI / Lever arm hypothesis / Single molecule / TIRF microcopy / Dark field microscopy**

## 1.　ミオシンの運動メカニズム

生体分子モーターは生物の動的プロセスに必須の分子機械であり，ミオシンファミリーはその1種である．ミオシンはクラスによりおのおの特徴ある役割を担っており，たとえばミオシンIIは筋収縮や細胞質分裂，ミオシンVやVIは小胞輸送や細胞構造の維持に関与している．ミオシンI，VI，VIIの変異は難聴を引き起こすため，内耳のステレオシリアの機能に必須と考えられている．

ミオシンの構造は，ATPase活性と共役してアクチンと結合解離するヘッド，力学運動の起点となるコンバータ，そこから伸びるレバーアームとテイルから構成される（**図1a**）．レバーアームは脆弱なαヘリックスであるが，カルモジュリンなどが軽鎖として結合して補強される．テイルからはクラスにより大きく異なり，コイルドコイルを形成して2量化したり，運搬用の荷物を結合するなどさまざまである．

力発生や長距離の移動には，ATP加水分解によるエネルギーを力学的な仕事に変換する必要があり，この仕組みはレバーアームモデルで説明できると教科書に書いてある（**図1b**）．このモデルによると，ATP加水分解に伴うヘッドの小さな構造変化がコンバータの角度変化となり，硬いレバーアームにオールを漕ぐような大きな構造変化（パワーストローク）を与える．その証拠として，ミオシンVのレバーアームはミオシンIIの3倍長いため（**図1a**），パワーストロークもやはり3倍大きくなる．

## 2.　レバーアームモデルを脅かすミオシンVI

ミオシンVIはアクチンフィラメント上を2つのヘッドで2足歩行する[1),2)]（以下，2足歩行の説明ではヘッドを足と表現する）．また，他のミオシンとは逆方向に歩くため，細胞内ではミオシンVIがエンドサイトーシス，ミオシンVがエキソサイトーシスなど方向性による役割分担が可能になる．

分子量約150 kDaのミオシンVIの構造は，ヘッド，コンバータ，短いレバーアーム，コイルドコイルを形成するテイル，カーゴ結合部位と一般的であり（**図1a**），歩行や逆走の仕組みはヘッド周辺の2つの特別な挿入配列が担っている．1つはATP結合部位の近く（Cys278-Ala303）で加水分解サイクルに介入し，歩行中の前足へのATP結合を阻害する．常に後足が先にアクチンから解離するため，前方へ効率よく歩行できる[3)]．もう1つはコンバータの直後（Pro774-Tyr812）でレバーアームの向きを反転し，コンバータの正の回転をレバーアームの負の回転に変換する[4)-6)]．これだけで逆方向に歩くとは，分子機械はなんともシンプルな設計思想である．

さて，ミオシンVIの数々の特殊機能の中でも，とりわけ業界を悩ませたのは2足歩行の歩幅である．ミオシンVIのレバーアームはミオシンIIなみに短いが（**図1a**），どういうわけかミオシンVなみの大きな歩幅で歩いてしまう．ミオシンVIの歩幅は大きくバラつくため，歩行中にレバーアームがタイミングよく伸びるアンフォールディングモデルが提案された

**Tracing Hidden Myosin VI Lever Arms**
So NISHIKAWA[1] and Ikuo ARIMOTO[2]
[1]Nikon Corporation, Instruments Company
[2]Olympus Medical Systems Corporation

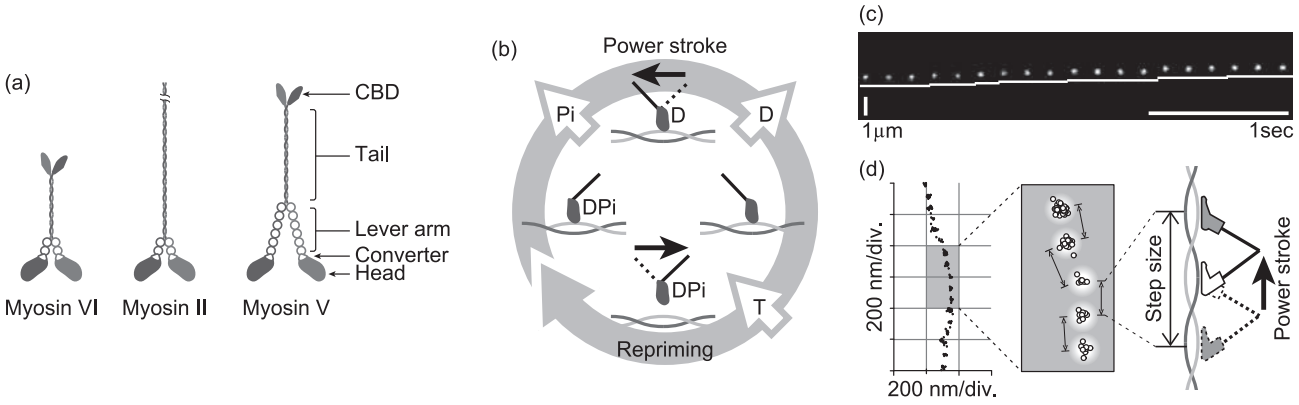



図 1
(a) ミオシンの構造．ミオシン V のレバーアームは VI や II の 3 倍長い．CBD はカーゴ結合ドメイン．(b) レバーアームモデルの概要．ADPPi 状態（DPi）のヘッドがアクチンに結合し，リン酸の放出と共にレバーアームが回転．ADP(D) を放出して ATP(T) が結合すると，ヘッドが解離して構造をリセット．(c) 蛍光顕微鏡下でのミオシンのステップ移動．(d) 輝点のフットプリント．t 検定で区分した点群間の距離がステップサイズとなる（片足標識では歩幅の 2 倍）．

が[7),8)]，後ろに引っ張っても歩幅が変化しない他の実験結果をうまく説明できていない．短足なのに歩幅が大きいミオシン VI の存在は，歴史あるレバーアームモデルを根本から否定してしまったのだ[9)]．

本総説では，この不可解なミオシン VI の歩行の仕掛けに迫ったわれわれの研究[10)]を追懐したい．

## 3. ステップサイズは 2 種類あった

歩行モーターの歩幅計測で簡便なものは，全反射照明蛍光顕微鏡と冷却 CCD カメラを使った 1 分子トラッキング[11)]である．アクチンを接着したカバーガラスの上に蛍光標識したミオシンを加えると，夜の高速道路さながら次々と動く輝点を撮影できる（**図 1c**）．10,000 フォトン程度の明るい輝点であれば，ガウス関数でフィッティングするだけでナノメートル精度の位置検出ができる．ミオシンの片足だけ蛍光標識すれば，歩幅の 2 倍に相当するステップサイズを輝点の移動量から計算できる（**図 1d**）．

片足だけを蛍光標識するには，蛍光カルモジュリンをもともとレバーアームに結合しているそれと置換すればよい[12),13)]．しかし，レバーアームが歩行中に回転したり伸縮するなら，この標識は正確な歩幅を教えてくれない．そこで，われわれはミオシンのヘッドにある N 末端を Halo-tag を介してビオチン標識し，アビジンつきの Qdot を少し混ぜることで片足のみを標識した．この方法では足を直接蛍光標識しており，レバーアームの挙動に影響されない歩幅計測が期待できる．さらに，Qdot は褪色までの総フォトン数が大きいため，ビデオレート（30 fps）で 2 nm の空間分解能の計測が可能となった．

**図 2a** はわれわれのミオシン VI の計測結果であり，過去の報告と同様，ステップを繰り返しての前進と，ときおりの後ステップが観察された．しかし過去の報告に反して，前ステップは 72 nm と 44 nm の大小ステップからなり，後ステップは –42 nm であった（**図 2b**）．さらに，それぞれのステップサイズはバラつかずミオシン V の標準偏差と同程度であった．

ステップまでの待ち時間を解析すると（見えない足のステップとの逐次反応），大小のステップいずれも ADP 解離速度は 4.4/sec，ATP 結合速度は 0.037/uM/sec となり過去の報告と一致した．ミオシン VI のバラつくステップサイズは，大小ステップを判別できない蛍光標識が原因だったようである．

後ステップまでの待ち時間は一次反応で，反応速度は大小ステップと一致した．前足の ATP 結合阻害が不完全だと後ろにステップするようである．

## 4. レバーアームは長かった

ステップ動作はビデオの 1 コマ（～ 30 msec）以内に終了するので，レバーアームがアンフォールドして足を伸ばす瞬間を計測できなかった．そこでわれわれは Qdot の代わりに金ナノ粒子でヘッドを標識し，全反射照明の暗視野顕微鏡と高速 CMOS カメラを使い，とても速い 1 分子トラッキングを行った．金ナノ粒子の暗視野像は輝度の飽和や褪色がないので，Qdot の実験の 1000 倍（～ 30,000 fps）の撮影速度でも 2 nm の空間分解能を維持することができる[14)]．

**図 2c** はミオシン VI のステップの瞬間の軌跡であ

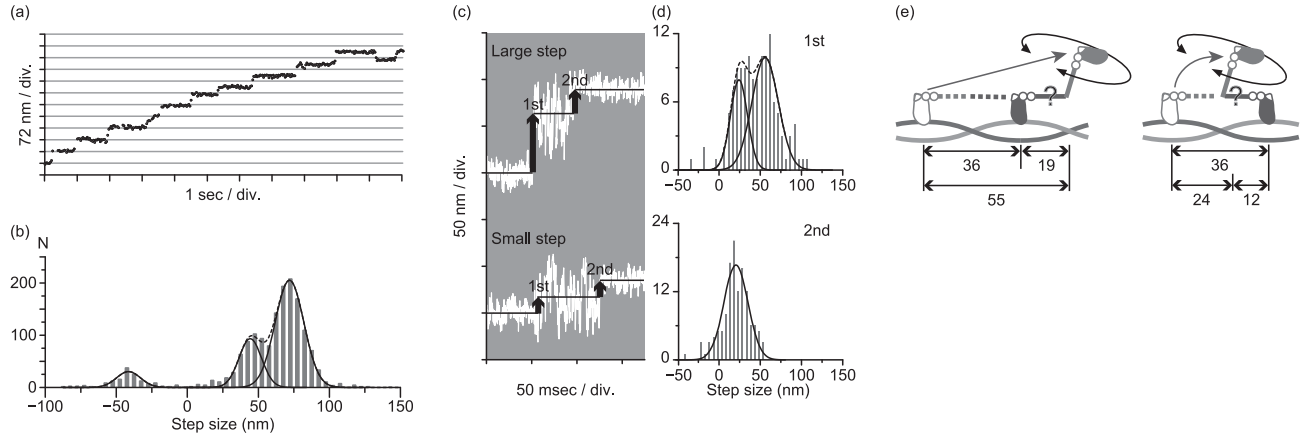



図 2

(a) ミオシン VI の片足に標識した Qdot の位置変化．褪色の制限が少なく長時間追跡が可能．(b) ステップサイズの分布．ピークは大ステップ（71.9 ± 8.9 nm），小ステップ（43.6 ± 6.9 nm），後ステップ（–41.5 ± 7.0 nm）に相当．(c) ミオシン VI の片足に標識した金ナノ粒子の位置変化．ステップの瞬間に 15 msec ほどゆらぐ．ゆらぎの平均位置で大小ステップを 1st と 2nd のサブステップに区分．(d) 前ステップのサブステップ分布．1st サブステップには大サブステップ（55.4 ± 14.68 nm）と小サブステップ（23.8 ± 8.8 nm）が存在する．2nd サブステップは 1 種類（20.1 ± 12.3 nm）のみ存在する．(e) 1 分子トラッキング結果から，追加のレバーアームの存在が演繹された．

り，大小のステップ（75 nm と 44 nm）の途中にヘッドが激しくゆれる中間状態を検出できた．ステップ開始から中間状態までの距離は 55 nm と 24 nm の大小 2 種類あり，中間状態からステップ終了までの距離は 20 nm のみであった（**図 2d**）．つまり大小ステップは中間状態にいたるまでに決定されるのである．

中間状態はミオシン V でも報告されており[15)-17)]，解離した後足が股関節（2 つのレバーアームの分岐点）を中心にブラウン運動でぐるぐる次の着地点を探す過程である．ミオシン VI の歩幅が最初 36 nm であれば，大ステップでの股関節は軸足の 19 nm 前方（=55 – 36 nm）に，小ステップでは 12 nm 後方（=24 – 36 nm）に存在する（**図 2e**）．このことは，軸足のレバーアームが回転すれば大ステップ，回転しなければ小ステップになることを意味する．

レバーアームの回転の前後で股関節が 31 nm（=19 + 12 nm）動くのであれば，16 nm（=31/2）以上のレバーアームが必要である．構造から予測されたミオシン VI のレバーアームは 6 nm 程度であるし，ほどけて長く柔らかくなれば股関節の移動量はさらに短くなるはずである．足りない 10 nm 分のレバーアームは，ミオシン VI のどこに隠されているのだろう？

これまでミオシン VI のテイルのコイルドコイル構造は PAIRCOIL アルゴリズムで予測されてきた[7)]．しかし，Stanford 大学の Spudich らは X 線小角散乱と円 2 色性測定の結果から，テイルの大半は 2 量化しない小球構造と特殊な α ヘリックスとなり，10 nm の追加のレバーアームになる可能性を報告した[18)]．この長さはわれわれの計測結果にピタリと一致する．一般に α ヘリックスは溶液中で不安定かつ柔らかいが，4 つの負電荷アミノ酸（E）と 4 つの正電荷のアミノ酸（R と K）からなる ER/K モチーフが堅牢な α ヘリックスを形成し，カルモジュリン不要の硬いレバーアームになるらしい[19)]．ミオシン VI のレバーアームは長く硬いのである．

後ステップを同様に解析すると，–20 nm と –22 nm のサブステップを検出できた．つまり股関節は軸足の 16 nm 前方（=36 – 20 nm）にあり，硬いレバーアームが大きな後退を許さないため，後ステップのサイズは小さくなるのである．

## 5. 小ステップは千鳥足か？

ミオシン VI の歩き方を**図 3** にまとめる．まず両足はアクチンの繰り返し構造に相当する 36 nm の歩幅で結合し，前足への ATP 結合は阻害されている．後足に ATP が結合すると，前足のレバーアームの状態により股関節の位置が決定し，そこを中心に後足がブラウン運動を開始する（**図 3a, b**）．解離した足は股関節の前方 20 nm のアクチンに結合してステップを完了する．後ステップでは阻害が解除されている前足に ATP が結合し，ブラウン運動を経て後足の近くのアクチンに結合する（**図 3c**）．

ところで，ミオシン VI は前後の小ステップの結果として両足を揃えた状態となる．ミオシン V のように小胞輸送が目的であれば小ステップは非効率なだけである．ミオシン VI は逆向きの歩行と引き換えに効率を犠牲にした妥協の産物なのだろうか？ それとも

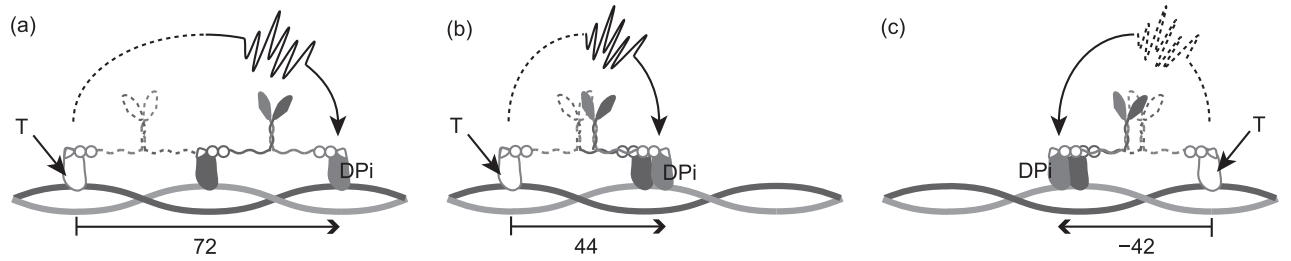



図 3
(a) 大ステップのプロセス．ATP(T) の結合で後足がアクチンから解離し，パワーストローク後の股関節を中心にブラウン運動する．ADPPi（DPi）状態となり前方のアクチンに結合する．(b) 小ステップのプロセス．パワーストローク前の股関節を中心にブラウン運動し，前方のアクチンに結合する．両足揃いからの小ステップも存在する．(c) 後ステップのプロセス．前足がアクチンから解離し，パワーストローク後の股関節を中心にブラウン運動する．レバーアームが硬いため後足付近が後ステップの限界．

両足揃いに特別な機能があるのだろうか？

ミオシン VI は運び屋としてだけでなく，ステレオシリアやゴルジ装置の空間構造を維持する固定具としても機能する．固定具として外部張力に抗う際には，両足を揃え外力を等分配すれば解離リスクを軽減できる．外力が 2 pN 以上になると突如アクチンから解離しにくくなるとの報告もあり[20]，これが両足揃いの効果である可能性が高い．ミオシン VI は 2 足歩行で目的地まで移動し，固定具となるポイントでは機能を賢くスイッチするのではなかろうか．

1 分子研究で明らかになったミオシン VI の多彩な機能は，今後の研究により細胞内の多様な役割に紐付けられるだろう．外力方向が縦横無尽にゆらぐ細胞内で，運び屋と固定具の動的な機能切替はいかに安定動作するのだろう？　ミオシン VI はまだまだわれわれの期待を超えて期待に応えてくれそうである．

## 謝　辞

本総説は大阪大学・柳田研究室の柳田敏雄氏，岩根敦子氏，須河光弘氏，小森智貴氏，池崎圭吾氏，大阪大学・野地研究室の上野博史氏との研究内容を平易に解説したものである．早稲田大学・木下研究室の古池晶氏には暗視野顕微鏡について多くを教わりました．以上に加え，助言いただいた各研究室の方々に御礼申し上げます．

## 文　献

1） Rock, R. S. *et al.*（2001）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 13655-13659.
2） Nishikawa, S. *et al.*（2002）Biochem. Biophys. Res. Commun. **290**, 311-317.
3） Sweeney, H. L. *et al.*（2007）EMBO J. **26**, 2682-2692.
4） Wells, A. L. *et al.*（1999）Nature **401**, 505-508.
5） Ménétrey, J. *et al.*（2005）Nature **435**, 779-785.
6） Bryant, Z. *et al.*（2007）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 772-777.
7） Rock, R. S. *et al.*（2005）Mol. Cell **17**, 603-609.
8） Mukherjea, M. *et al.*（2009）Mol. Cell **35**, 305-315.
9） Spudich, J. A., Rock, R. S.（2002）Nat. Cell Biol. **4**, E8-E10.
10） Nishikawa, S. *et al.*（2010）Cell **142**, 879-888.
11） Yildiz, A. *et al.*（2003）Science **300**, 2061-2065.
12） Okten, Z. *et al.*（2004）Nat. Struct. Mol. Biol. **11**, 884-887.
13） Yildiz, A. *et al.*（2004）J. Biol. Chem. **279**, 37223-37226.
14） Ueno, H. *et al.*（2010）Biophys. J. **98**, 2014-2023.
15） Veigel, C. *et al.*（2002）Nat. Cell Biol. **4**, 59-65.
16） Shiroguchi, K., Kinosita, K. Jr.（2007）Science **316**, 1208-1212.
17） Dunn, A. R., Spudich, J. A.（2007）Nat. Struct. Mol. Biol. **14**, 246-248.
18） Spink, B. J. *et al.*（2008）Nat. Struct. Mol. Biol. **15**, 591-597.
19） Sivaramakrishnan, S. *et al.*（2009）Biophys. J. **97**, 2993-2999.
20） Altman, D. *et al.*（2004）Cell **116**, 737-749.

西川　宗

**西川　宗（にしかわ　そう）**
（株）ニコン
2003 年大阪大学大学院博士課程終了．博士（理学）．JST CREST 研究員，大阪大学大学院生命機能研究科助教などを経て，09 年より現職．
連絡先：〒 244-8533 神奈川県横浜市栄区長尾台町 471
E-mail: Nishikawa.So@nikonoa.net

有本行雄

**有本行雄（ありもと　いくお）**
（株）オリンパスメディカルシステムズ
2009 年大阪大学大学院生命機能研究科修士課程修了．09 年より現職．
連絡先：〒 036-0357 青森県黒石市追子野木 2 丁目 248-1
E-mail: ikuo_arimoto@ot.olympus.co.jp

生物物理 **52**（3），136-139（2012）

総説

# 熱ゆらぎを利用する―情報熱機関の実現―

鳥谷部祥一[1,2]，宗行英朗[1]

[1]中央大学理工学部物理学科

[2]Ludwig-Maximilians-Universität München

We review the relationship between information and thermodynamics, especially with focusing on the issues surrounding the Maxwell's demon. Furthermore, we briefly introduce our experimental demonstration of an "information-heat engine", which can pump heat from an isothermal environment by using information about the system's microscopic degrees of freedom.

**Maxwell's demon / Nonequilibrium thermodynamics / Brownian motion / Information / Jarznyski equality**

## 1. Maxwell の悪魔と Szilard エンジン

コップ 1 杯の水には，$10^{24}$ 個もの水分子が含まれており，これらは秒速数百メートルで運動している．このように，ただの水も非常に小さいスケールではすさまじい世界である．すると，それら水分子のエネルギーを利用すれば，エネルギー問題など一気に解決しそうである！ しかし，これが残念ながらできない．この制約が**熱力学第二法則**である．水分子が同じ方向に揃って動いているのならそれで車を押すことができるが，動きが乱雑なのでそのエネルギーを使えないのだ．しかし，乱雑に動いていても，もし，個々の分子の動きを追うことができれば，そのエネルギーを利用できないだろうか．これを実現するのがMaxwellの悪魔である[1),2)]．

透熱壁で囲まれた空間で運動する 1 分子気体を考える（**図 1**）．i）中央に仕切りを入れると，この分子は 1/2 の確率で左と右のどちらかの部屋に入る．ii）もし左にいた場合は仕切りの左側に，右にいた場合は仕切りの右側におもりをつける．そして，仕切りの固定をはずし，**準静的**に等温膨張させれば，周囲から吸収した熱でおもりをもちあげて $k_BT\ln 2$ の仕事を取り出すことができる．iii）仕切りとおもりを除けば最初の状態に戻ってサイクルが 1 まわりしたことになる．さて，仕切りの挿入やおもりの脱着には，理想的には仕事がいらない．それにもかかわらず，サイクルをまわすたびに $k_BT\ln 2$ の仕事を取り出せてしまうのである．しかし，熱力学第二法則に反するこのような第二種永久機関を，絶対に作ることができないとわれわれは経験上信じている．では，どこにカラクリがあるのだろうか．これが Maxwell の悪魔のパラドックスであり，その解決には 100 年以上が必要であった．

サイクル自体には問題がなさそうなので，怪しいのは，このサイクルを運転する操縦者である．その操縦者を「悪魔」とよぶことにする．悪魔が何をしているのか注意深く考えてみると，まず，分子が左にいるか右にいるかを測定する．測定すると，悪魔のメモリーに情報が記憶される．この情報に基づいて制御をして仕事を取り出し，記憶した情報を消去する．情報を消

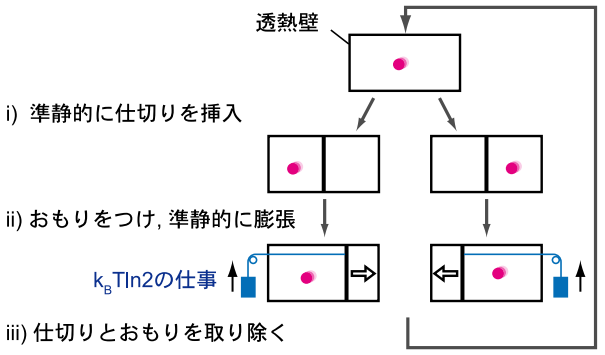



図 1
Szilard エンジン[1),2)]．Maxwell の悪魔の本質をとらえ，情報と操作の関係を定量的に扱うことが可能なモデル．サイクルをまわすたびに，$k_BT\ln 2$ の仕事を取り出すことができる．

**Utilizing Thermal Fluctuations: Experimental Demonstration of Information-heat Engine**

Shoichi TOYABE[1,2] and Eiro MUNEYUKI[1]

[1]Chuo University

[2]Ludwig-Maximilians-Universität München

※図 1– 図 3 は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

さなければ悪魔のメモリーはどんどん増えてしまうので，悪魔自身のサイクルはまわらない．サイクルでなくてもよいのなら，第二法則うんぬんは関係ない．さて，どうやら情報の測定や消去というのが怪しい．しかし，「情報」を物理でどう扱えばよいのだろうか．

## 2. 情報量

身のまわりを見てみると，「情報」というのはそれだけで存在することはなく，レコード盤上の凹凸，電圧，磁石の向きなど，必ず物理的な実体にコードされている．したがって，情報の獲得，消去，通信，複製などの情報処理は常に物理的な過程であり，物理法則に支配される．情報の量（情報量）を以下のように定量化することも可能である．

Shannon は，確率 $p_i$ で生じるイベント i を観測したときに得られる情報量を $-\log p_i$ と定義した[3]．この定義によれば，情報量とは「驚き」の多寡といえる．たとえば，野原でクローバーを摘んだときに，3 つ葉だと驚きはしないが，4 つ葉だと驚く．したがって，「4 つ葉だ」という情報のもつ情報量の方が大きくなる．1 回の観測で得られる情報量の期待値は $H=-\Sigma_i p_i \log p_i$ となり，これを Shannon 情報量（Shannon エントロピー）とよぶ．このように定義すると，「情報量」が満たすべき性質を備え，また，物理法則との相性がよい．log を自然対数と解釈し $H$ に Boltzmann 定数を掛ければ Gibbs エントロピーと同じ形である．

$H$ は，得た情報により減少する不確定性の大きさを定量化している．クローバーは，摘む前から，おそらく 3 つ葉だろうと予想できる．つまり，もともとの不確定性が小さいので $H$ は小さい．しかし，サイコロを振って「偶数が出る」かどうかはまったく予想できないので $H$ が大きくなる．式の形からわかるように，すべてのイベントが等確率で生じる場合に $H$ は最大となる．ところで，測定にはエラーがつきものであり，4 つ葉なのに 3 つ葉だと勘違いすることもあるだろう．その分だけ，実際に観測で得る情報量は $H$ よりも少なくなる．エラーを含めた情報量は，相互情報量 $I$ として記述できる．詳細は他に譲るが，相互情報量とは観測者とシステムが共有する Shannon 情報量であり，測定にエラーがない場合は $I=H$ となる．

## 3. 情報処理のコスト

悪魔の話に戻りたい．測定に関しては Brillouin による議論が有名である．彼は分子 1 個の位置を測定するためには，少なくとも光子 1 個が必要であると考えた．しかし，分子の周りには黒体放射による $k_BT$ のエネルギーをもった光子が存在しており，それらと区別して分子の位置を測定するためには，$k_BT$ よりもずっと大きなエネルギーをもつ光子が必要である．彼は，そのような測定に必要な仕事を含めれば，Szilard エンジンから正味の仕事を取り出すことはできないと主張し，第二法則との整合性を説明しようとした．しかし，その後，IBM の Bennett は，光を使わない機械仕掛けの測定装置を考案し，必ずしも測定に光は必要とせず，そして，測定には必ずしも仕事が必要ないことを示した．

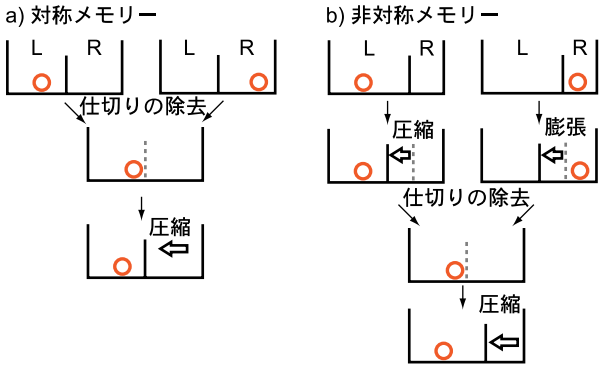



図 2
情報の消去．(a) Landauer-Bennett のメモリーモデル．気体分子の位置を測定すると，分子が箱の左にいたら L，右にいたら R に粒子が入る．仕切りを除去し，圧縮して常に L 状態にすれば，分子の位置とメモリーの状態との間の相関はなくなり，L か R かという 1 bit の情報を消去できる．図 1 と似た図だが，こちらは「悪魔のメモリー」であることに注意．(b) 沙川–上田の非対称メモリーモデル．

すると，怪しいのは情報消去である．IBM の Landauer と Bennett は，悪魔のメモリーを箱の中の粒子としてモデル化し（**図 2a**），1 bit の情報を消去するには，少なくとも $k_BT\ln 2$ の仕事が必要であることを示した（Landauer 原理）．この仕事を含めれば，結局，Szilard エンジンから正味の仕事は取り出せず第二法則と整合する．情報消去になぜ仕事が必要なのかを想像するのは容易ではないが，エントロピーを減らすのに仕事が必要であることを思い出すとわかりやすいかもしれない．測定によりメモリーは L か R の 2 状態をとるようになりメモリーのエントロピーは増えるが，情報を消去するためには仕事をしてエントロピーを減らさなくてはいけない．

## 4. 沙川–上田の情報熱力学

教科書的には，これで Maxwell の悪魔は解決ということになる．しかし，まだ続きがある．2009 年，沙川と上田は，悪魔のメモリーを非対称にすると

（図 2b），その非対称性の大きさに応じて，情報消去に仕事が必要なくなったり，もしくは，情報消去により仕事を取り出せたりできることを示した[4]．しかし，今度は測定に仕事が必要になる．彼らは，相互情報量 $I$ の測定と消去に必要な仕事を足し合わせると，これが $k_BTI$ 以上になることを示した．すなわち，オリジナルの Landauer 原理は対称メモリーという特殊な状況に限られ，より一般的には，消去と測定に必要な仕事にトレードオフがあり，それらの和に対して下限が存在するわけである．さらに，相互情報量 $I$ を用いて取り出せる仕事は最大で $k_BTI$ であることも彼らは示している[5]：

$$W_{\text{測定}} + W_{\text{消去}} \geqq k_BTI \geqq W_{\text{出力}}.$$

これが Maxwell の悪魔と熱力学第二法則との整合性に関する現在の解釈である．なお，相互情報量が情報熱力学において重要な役割を果たすことを明らかにしたことも，彼らの大きな功績である．

## 5. 情報–自由エネルギー変換

Maxwell の悪魔に関する 150 年近い議論を通して 2 つのことがわかってきた．1 つは，すでに述べたように，情報は常に物理的な実体にコードされ，したがって，情報処理は常に物理的な過程であることである．もう 1 つは，情報があれば，Szilard エンジンのように自由エネルギーをくみ出すことができることである．熱力学で習うように，等温過程で取り出せる最大仕事は，自由エネルギー $F = U - TS$ の減少分である．これを情報論的にいい換えれば，エントロピーは，われわれが系に関してもっている情報の不確かさといえ，情報が完全でないので系をきちんと制御できず，すべてのエネルギーを取り出すことはできない．しかし，ミクロな自由度を測定して情報が得られれば，系のエントロピーを減らして自由エネルギーを増やし，余計に仕事を取り出すことができそうである．

## 6. 情報–自由エネルギー変換の実現

われわれは，ブラウン粒子の熱ゆらぎを高速カメラで追い，得た情報を粒子にフィードバックすることで，情報–自由エネルギー変換をはじめて実現した．

2 枚のガラスの間を水で満たし，天井のガラス表面に，2 個連なったポリスチレン粒子をたんぱく質のリンカーを用いて 1 点でピン止めした（図 3a）．この周りで粒子は自由回転でき，回転ブラウン運動をする．床面に蒸着した 4 重極電極に高周波（1 MHz）の交流電圧を印加した．4 つの電極で位相を適当にずらすと，電極の間に楕円状に回転する電場を生じさせることができる．このような電場下で，粒子は勾配のある周期ポテンシャルを角度方向に感じる．実際にポテンシャルを見積もると，非常にきれいな sin 状となり，その振幅は 1.5 $k_BT$，勾配は 1 回転あたり 1 $k_BT$ と，熱ゆらぎと同程度の大きさであった．電場なので瞬時に変調でき，たとえば，楕円状回転電場の方向を 90° 回転させると，位相が反転したポテンシャルを得ることができた．

この系を用い，次のようなリアルタイムのフィードバック制御を行った（図 3b）．ある瞬間に，粒子の角

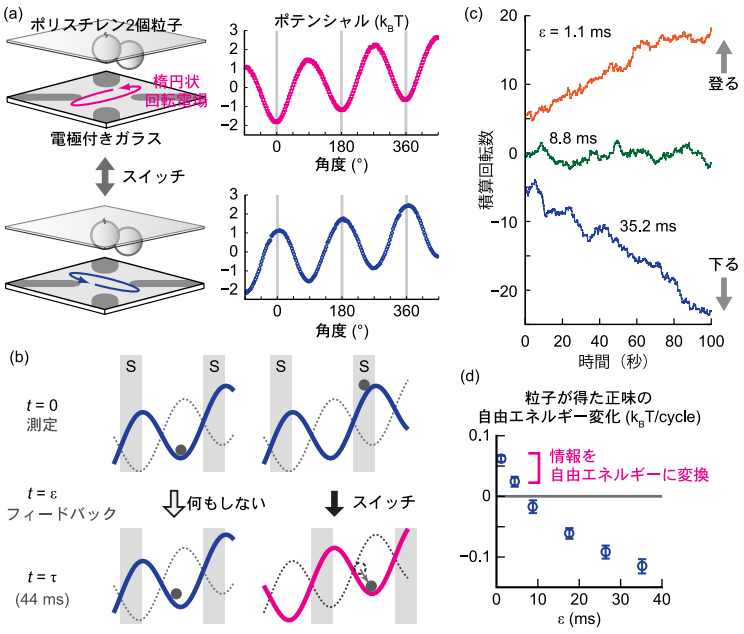



図 3
情報–自由エネルギー変換の実現[7]．（a）実験系および粒子が感じるポテンシャル．（b）フィードバック制御の 1 サイクル．1 サイクルは $\tau = 44$ ms で，$t = \tau$ で次のサイクルが始まる．これを繰り返す．$\varepsilon$ は測定してから制御するまでの時間遅れであり，フィードバックの効率を決める．（c）粒子の回転トラジェクトリ．（d）粒子が得た正味の自由エネルギー．1 サイクルあたり，粒子が獲得した自由エネルギー差と粒子にした仕事の差として計算．仕事は，スイッチ前後のポテンシャルエネルギーの差として計算．

度を測定する．粒子は，たいていは谷底でブラウン運動しているが，たまに，少し登ったSという領域にいる．もし，Sに粒子を観測したら，ポテンシャルをスイッチし，それ以外の場合は何もしない．このサイクルを繰り返すと，スイッチするたびに粒子は高い確率で1段高いところに登るので，だんだんと勾配を登っていくことが期待できる．この系はSzilardエンジン（**図1**）を模した系になっている．ポテンシャルのスイッチは，Szilardエンジンにおける仕切りの挿入に相当する．Szilardエンジンでは仕切りを挿入してから測定しているが，本実験では，おもりが熱ゆらぎにより自発的にもちあがる（粒子が勾配に逆らって登る）のを見計らって，つまり，測定してから仕切りを挿入している．これらを，PC上のプログラムによって全自動で制御しており，PCが「悪魔」に相当する．

さて，このようなフィードバック制御を行った結果，確かに粒子を勾配に逆らって登らせることができた（**図3c**）．ただし，測定してから制御するまでの時間遅れ$\varepsilon$を延ばすと，熱ゆらぎに押されてせっかくSまでたどり着いても，スイッチする前に高い確率でまた谷に落ちてしまうので，登れない．

さて，Szilardエンジンと違い，ポテンシャルのスイッチにより，粒子に仕事をしたり，もしくは，粒子が電場に対して仕事をする．これは，ポテンシャルを切り替えた瞬間の粒子の位置に依存する．もし，粒子に外から仕事をして勾配を登らせたのであれば，特に面白くはない．そこで，エネルギーの収支をきちんと見積もってみた．すると，$\varepsilon$が短いときは，熱力学第二法則を見かけ上破り，外からした仕事以上に粒子が自由エネルギーを獲得したことがわかった（**図3d**）[7]．これが可能なのは，ミクロな運動である個々の熱ゆらぎを測定し，その情報に基づいて制御をしたからである．熱ゆらぎで励起されてSまで登ったときに，ポテンシャルをスイッチさせることで，吸収した熱エネルギーを熱浴には返さず儲けてしまったわけである．

なお，測定したときにSにいる確率を$p$とすれば，1回の測定で得るShannon情報量を$H=-p\ln p-(1-p)\ln(1-p)$と計算できる．本実験では測定エラーはほぼ無視でき，相互情報量$I$は$H$とほぼ等しい．正味の自由エネルギー増加量を$k_{\mathrm{B}}TI$で割った「情報–自由エネルギー変換効率」は約30%であった．悪魔であるPCやその周りを含めた系全体では獲得した自由エネルギー以上にエントロピーは増えているはずであり，熱力学第二法則は当然ながら破れていない．しかし，ミクロな系に注目すると，情報と自由エネルギーが交換されているように見えるわけである．

ところで，統計力学では，熱力学第二法則はJarzynski等式として記述される．Jarzynski等式は，熱力学第二法則をゆらぎの影響まで含めて一般化しうた等式であり，きわめて重要である．本実験のようなフィードバック系ではそのままでは使えないが，沙川と上田によって，フィードバック系に一般化されたJarzynski等式が導かれている[6]．われわれは，情報熱機関の最も基本的な関係式の1つと期待できるこの等式を，高精度で実証することにも成功した[7]．

## 7. まとめと展望

本実験では，ブラウン粒子の熱ゆらぎを測定し，得た情報に基づいて粒子周りの環境を制御することで，粒子の自由エネルギーを増やすことができた．悪魔と粒子は離れた場所にあり，情報を介してPCから粒子に自由エネルギーを転送したともいえる．その意味で，この「情報熱機関」はナノデバイスの新しい制御法としても期待できるかもしれない．一方，生物物理においても，たとえば分子モーターがこのような「ガジェット」を含んでいると考えると面白い議論ができるかもしれない[8),9)]．本稿を書くにあたり，沙川貴大氏と佐野雅己氏に原稿を読んでいただきました．お礼を申し上げます．

## 文　献

1） Leff, H. S., Rex, A. F.（2003）“Maxwell’s demon 2”, Institue of Physics Publishing, London.
2） Szilard, L.（1929）Z. Phys. **53**, 840-856.
3） Shannon, C.（1948）Bell Sys. Tech. J. **27**, 379-423, 623-656.
4） Sagawa, T., Ueda, M.（2009）Phys. Rev. Lett. **102**, 250602.
5） Sagawa, T., Ueda, M.（2008）Phys. Rev. Lett. **100**, 080403.
6） Sagawa, T., Ueda, M.（2010）Phys. Rev. Lett. **104**, 090602.
7） Toyabe, S. *et al.*（2010）Nature Phys. **6**, 988-992.
8） Kawaguchi, K., Sano, M.（2011）J. Phys. Soc. Jpn. **80**, 083003.
9） Toyabe, S. *et al.*（2012）EPL **97**, 40004.

鳥谷部祥一

**鳥谷部祥一（とやべ　しょういち）**
ミュンヘン大学研究員
2007年東京大学大学院理学系研究科物理学専攻博士課程修了，博士（理学）．中央大学理工学部物理学科助教を経て，11年10月より現職．
研究内容：非平衡物理，生物物理．
連絡先：Amalienstr. 54, 80799 München, Germany
E-mail: s.toyabe@lmu.de

宗行英朗

**宗行英朗（むねゆき　えいろう）**
中央大学理工学部物理学科教授
1989年東京大学大学院理学系研究科生物化学専門課程博士課程修了，理学博士
研究内容：生物物理学
連絡先：〒112-8551 東京都文京区春日1-13-27
E-mail: emuneyuk@phys.chuo-u.ac.jp

生物物理 **52**（3），140-143（2012）

総説

# 高分解能構造から見えてきた光合成水分解の仕組み

沈　建仁[1]，梅名泰史[2]，川上恵典[2]，神谷信夫[2]

[1]岡山大学大学院自然科学研究科

[2]大阪市立大学複合先端研究機構

Photosystem II (PSII) is a membrane-protein complex consisting of 17 trans-membrane subunits and 3 peripheral, extrinsic subunits with a total molecular mass of 350 kDa for a monomer. PSII performs a series of light-induced electron transfer reactions, leading to the conversion of light energy into biologically useful chemical energy, coupled with this is the splitting of water and generation of molecular oxygen. Both the chemical energy converted and molecular oxygen generated by PSII are indispensible for sustaining life on the earth; thus PSII is an extremely important protein complex. We have succeeded in crystallizing the PSII complex at a resolution of 1.9 Å, and analyzed its structure. Here we describe the structure of PSII, in particular the $Mn_4CaO_5$-cluster, which is the catalytic center of water-splitting, analyzed at the atomic resolution. Based on these, we discuss the possible mechanisms of light-induced water-splitting and its implications in artificial photosynthesis.

**Photosystem II / oxygen evolution / water splitting / photosynthesis / membrane proteins / crystal structure**

## 1. はじめに

光化学系 II（Photosystem II, PSII）は，酸素発生型光合成において，光エネルギーを利用して水を酸素，プロトン，電子に分解する反応を触媒している膜タンパク質複合体である．水は地球上豊富にある安定な物質であるが，PSII ではいとも簡単に分解されており，その仕組みはいまだ明らかになっていない．しかし，PSII による水分解反応は，光エネルギーを生物が利用可能な化学エネルギーに変換する点，および酸素を産出する点できわめて重要である．水の分解によって生じる電子はチトクローム $b_6f$ 複合体，PSI を経由して $NADP^+$ の還元に用いられる．また，プロトンは**チラコイド膜**のルーメン側に蓄積して，膜を隔てたプロトン濃度勾配の形で ATP 合成の駆動力を供給する．そして光合成にとって不要な副産物である酸素は，地球上の好気的生物の生存に必要なだけでなく，オゾン層の形成・維持にも不可欠である．

PSII における水分解・酸素発生反応の機構を解明するため，これまで多くの研究が展開され，膨大な知見が蓄積されてきた．この反応の直接の触媒中心は 4 つの Mn と 1 つの Ca からなる $Mn_4Ca$ クラスターであり，それが Kok サイクル[1)] とよばれる，$S_0$ ～ $S_4$ の遷移状態を経て 2 分子の水を分解している．

## 2. PSII の高分解能結晶化

これまでの膨大な研究にもかかわらず，PSII の水分解触媒中心である $Mn_4Ca$ クラスターの詳細な構造は長い間不明であった．その最大の原因は，PSII が巨大な膜タンパク質複合体であり，その高分解能結晶化が困難であることによる．PSII の構成サブユニットは原核生物のシアノバクテリアと真核生物の藻類，高等植物の間で若干の違いがあるが，その中心部分，すなわち，反応中心や各電子伝達成分，および各サブユニットのアミノ酸配列は高度に保存されている．シアノバクテリア由来の PSII は 17 種の膜貫通サブユニットと 3 種の膜表在性（親水性）サブユニットを含み，これ以外に 35 分子のクロロフィル，カロテノイド，プラストキノン，ヘム，非ヘム鉄，Mn, Ca, Cl など多数の補欠因子をもち，総分子量が 350 kDa に及ぶ複合体であり，さらに 2 量体を形成して存在している．

PSII の結晶化は，2001 年にドイツの Zouni らが好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を用いてはじめて成功し，3.8 Å 分解能の構造を報告した[2)]．筆者らも近縁の好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来の PSII の結晶化に成功し，2003 年にその構造を 3.7 Å 分解能で報告した[3)]．また，Barber・Iwata らは 2004 年に *T. elongatus* 由来の PSII 構造を 3.5 Å 分解能で

**Mechanism of Photosynthetic Water-splitting Based on the High Resolution Structure of Photosystem II**

Jian-Ren SHEN[1], Yasufumi UMENA[2], Keisuke KAWAKAMI[2] and Nobuo KAMIYA[2]

[1]Graduate School of Natural Science and Technology, Faculty of Science, Okayama University

[2]The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka City University

報告し[4]，Zouni らは結晶の分解能を徐々に向上させ，2009 年に 2.9 Å 分解能の構造を報告した[5]．これらの構造解析により，PSII を構成する 20 サブユニットすべての配置，および 20 個以上の脂質を含む多くの補欠因子の構造が示され，PSII 電子伝達鎖の相対位置関係がおよそ明らかになった．しかし，これまでの分解能では $Mn_4Ca$ クラスターの構造を解明するには不十分であり，得られた電子密度図では Mn と Ca が分離しておらず，それぞれの位置を決定することはできなかった．さらに金属イオン間をつないでいる酸素原子（オキソ酸素），あるいは基質として存在するであろう水分子に対応する電子密度はまったく見えなかった．$Mn_4Ca$ クラスターのアミノ酸配位子も確定されたとはいえず，各グループ間で異なった配位パターンが報告されていた．

PSII 結晶の分解能を向上させるため，筆者らは *T. vulcanus* PSII を用いて標品の純度や結晶化条件の改善を続け，1.9 Å 分解能を与える結晶の析出に成功した．以下に 1.9 Å 分解能で解析された PSII 水分解触媒中心の構造を紹介し，酸素発生反応の機構について議論する[6),7)]．

## 3. PSII の全体構造

1.9 Å 分解能で解析された PSII 構造の最大の特徴は，多くの水分子が見つかったことである（**図 1**）．最終的に決定された構造では，PSII 2 量体あたりに 2795 個の水分子が同定できた．同じ結晶を用いて，1.75 Å の波長で収集したデータを用いて解析した 2.5 Å 分解能の構造では，2 量体あたり 862 個の水分子しか見つからなかったので[6]，水分子の同定に高い分解能がいかに重要かがわかる．

PSII に結合している水のほとんどは，チラコイド膜のストロマ側表面とルーメン側表面という 2 つの層に分布しており，膜貫通領域にはわずかな水しか存在していない（**図 1b**）．これは膜タンパク質の一般的な特徴ともいえるが，PSII ではルーメン側に D1, D2, CP47, CP43 各サブユニットの親水性ループや 3 つの表在性タンパク質からなる大きな親水性領域があり，より多くの水分子が分布している．これらの水分子のうち，$Mn_4Ca$ クラスターの配位子や水素結合ネットワークの形成に関与しているものもあり，PSII にとって重要な機能の一部を担っている．

膜貫通領域は疎水性であり，水はほとんど存在しないとされていたが，PSII の膜貫通領域にはいくつかの水分子が存在している．これらの水分子のほとんどはクロロフィルの配位子，あるいはその水素結合相手としてはたらいている．クロロフィルの Mg は通常，His などのアミノ酸によって配位されるが，PSII にある 35 分子のクロロフィルのうち，7 分子は直接の配位アミノ酸をもっておらず，代わりに水分子が配位している．これらのクロロフィルには，直接配位する水分子以外に，さらに 2 つの水が近傍にあり，水素結合を形成している．したがって，アミノ酸配位子をもっていないクロロフィル 1 個あたりに，3 つの水分子が存在することになり，これらは膜貫通領域で見つかった水分子のほとんどを占めている．

## 4. $Mn_4CaO_5$ クラスターの構造

1.9 Å 分解能では，Mn, Ca イオンの電子密度がはっきり分かれており，それぞれの位置，およびそれらの間の距離をはっきりと決定することができた[6),7)]．金属イオン間をつないでいるオキソ酸素に対応する電子密度もはっきり確認することができ，4 つの Mn，1 つの Ca をつないでいるのが 5 つの酸素原子で，全体が $Mn_4CaO_5$ という化学式であることがはじめて明らかとなった（**図 2**）．

解析された $Mn_4CaO_5$ クラスター構造の最大の特徴は，ゆがんだ椅子型であるといえる．このうち，3 つの Mn，1 つの Ca，4 つのオキソ酸素が歪んだキュバン型のイスの座部を作り，4 つ目の Mn はキュバンの外側にあり，オキソ酸素を通してキュバンとつながっている（**図 2**）．

このようなゆがんだ形を作り出している要因は 2 つあり，1 つは Mn-O 間と Ca-O 間の結合距離の違い，もう 1 つは 5 つのオキソ酸素の間で，金属イオンとの結合距離に違いがあることである．Mn-O の典型的な結合距離は 1.8 ～ 2.1 Å であるが，それに対して，Ca-O 間の結合距離は 2.3 ～ 2.5 Å と明らかに長い．また，5 つのオキソ酸素のうち，O5 と金属イオンとの結合距離が 2.4 ～ 2.7 Å で，他のオキソ酸素（O1 ～ O4）と金属イオンとの結合距離より長くなっていた．このことは，5 つのオキソ酸素のうち，特に O5 は周りの金属イオンとの結合が弱くて切れやすい，いい換えれば，O5 が高い反応性を有していることを示唆している．このような非対称的な構造は，水分解反応の触媒機構を考える上で重要な意味をもっているかもしれない．すなわち，水分解の触媒としてはたらくためには，それ自身が反応の過程で構造変化を行うという構造上の「柔軟性」を備えもつ必要がある．$Mn_4CaO_5$ クラスターがもし対称的で規則正しい構造を形成して

いれば，反応に伴う構造の変化が容易ではなく，触媒活性が発揮できないかもしれない．これは，水分解の人工触媒を合成する上でも重要な意味をもっており，水分解の人工触媒を得るには，非均一触媒（heterogeneous catalysis あるいは asymmetric catalysis）の原理を応用した非対称構造をもつ化合物を見つけることが重要かもしれない．

$Mn_4CaO_5$ クラスターには，4 つの水分子が配位しており，そのうち，2 つ（W1, W2）はキュバンの外側にある Mn4 に，残りの 2 つ（W3, W4）は Ca に結合している（**図 2**）．このことは，これら水分子のうち

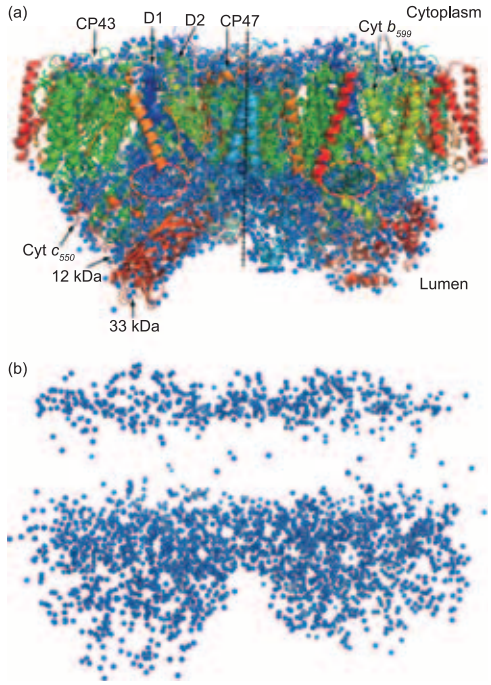



図 1
（a）チラコイド膜の側面から見た PSII 2 量体の全体構造．赤丸は $Mn_4CaO_5$ クラスターの位置を，青色のボールは水分子を示している．（b）タンパク質を除いた水分子の分布．

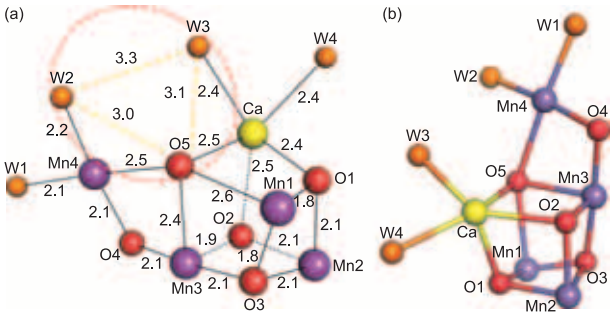



図 2
（a）$Mn_4CaO_5$ クラスターの構造と各原子間の距離（Å）．W1 ～ W4 は水分子．赤点線で囲まれた円は水分解の反応部位，黄色点線は水素結合を示す．（b）ゆがんだ椅子型の形がはっきり見えるように A の構造を回転したもの．

の 1 つまたは 2 つは水分解の基質としてはたらいていることを示唆している．O5 が高い反応性を有していることを考えると，O-O 結合が形成されるのは，O5 付近である可能性が高い．4 つの配位水のうち，W2 と W3 は O5 と最も近く，それぞれ O5 と水素結合距離内にある．したがって，O5, W2, W3 のうちのどれか 2 つが水分解の基質としてはたらき，O-O 結合を作っていることが示唆された．

## 5. 水素結合ネットワーク

高分解能の PSII 構造において，$Mn_4CaO_5$ クラスターから複合体のルーメン側表面までをつなぐ水素結合ネットワークが複数個見つかり，プロトンの排出経路，あるいは基質水の進入経路としてはたらいている可能性が示唆された．

水素結合ネットワークの 1 つは $Y_Z$ とよばれる，D1-Tyr161 残基を経由したものである．$Y_Z$ は PSII の反応中心である P680 に電子を渡し，その代わりに $Mn_4CaO_5$ クラスターから電子を奪い取る役割をもっている．$Y_Z$ は W4 と直接，または W3，さらに W1,

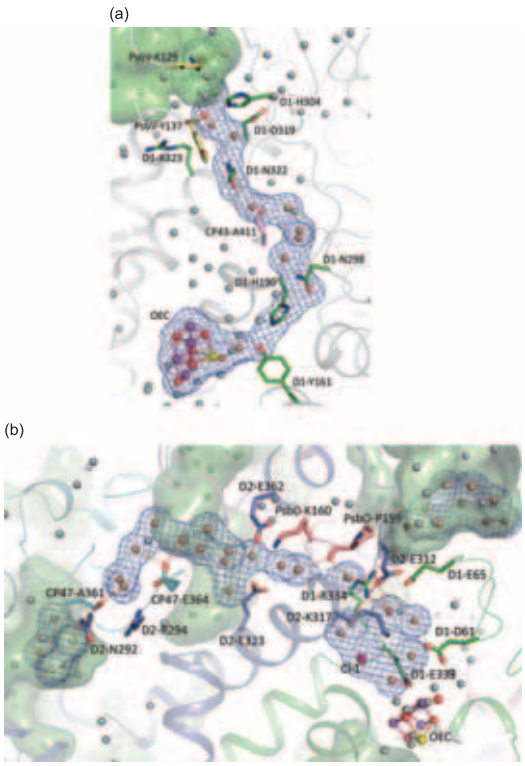



図 3
（a）$Mn_4CaO_5$ クラスターから $Y_Z$ を経由した水素結合ネットワーク．（b）$Mn_4CaO_5$ クラスターから D1-D61, Cl-1 を経由した水素結合ネットワーク．いずれの図においても，薄緑色はルーメン側表面の溶液領域を，青い網線で囲まれた部分は水素結合ネットワークでつながれたパス領域を表している．

W2 とは別の水を経由して間接的に水素結合でつながっている（**図 3a**）．この水素結合ネットワークは D1-His190，D1-Asn298 や他のいくつかの荷電／親水性アミノ酸，および水分子を経て，最終的に PsbV の C- 末端に近い PsbV-Lys129 残基からルーメン側の溶液に出ている．したがって，プロトンはこのネットワークを経由して $Mn_4CaO_5$ クラスターからルーメン側溶液に排出される可能性がある．このネットワークは，$Y_Z$ の電子伝達活性と連動していることから，PCET（proton-coupled electron transfer）パスともよばれている．しかし，このパスが実際にプロトンの排出にはたらいているかどうかはさらなる研究を待たなければならない．

もう 1 つ典型的な水素結合ネットワークの例は，Mn4 に結合している水分子の 1 つである W2 を起点として，D1-Asp61, Cl-1，およびいくつかの荷電／親水性アミノ酸，水分子によって構成され，最終的にルーメン側溶液に出ている（**図 3b**）．このうち，Cl-1 は $Mn_4CaO_5$ クラスターの近傍で見つかった 2 つの塩素結合部位のうちの 1 つで[8), 9)]，$Mn_4CaO_5$ クラスターからの水素結合ネットワークの起点に近い位置にあり，プロトンチャンネルの構造維持に役立っているかもしれない．

## 6. 今後の展望

これまで 2.0 Å を超える分解能で構造が解析された膜タンパク質の中で，PSII は最大のものである．これによって $Mn_4CaO_5$ クラスターの詳細な構造，水分子の存在位置，水素結合ネットワークなど多くの新しい知見が得られ，水分解・酸素発生の反応部位についても重要な情報が得られた．しかし，解析された構造はおもに暗黒で安定な $S_1$ 状態のものであり，この構造のみから水分解の反応機構を決定することは困難である．今後は S 状態遷移に伴う中間状態，特に $S_2$, $S_3$ 状態の構造を解析する必要がある．また，プロトンチャンネル，水チャンネルを明確に同定するには，各水素結合ネットワークを構成しているアミノ酸残基を改変し，得られた変異株の構造・機能を解析する必要がある．そして PSII の多くの構成サブユニット，特に 10 kDa 以下の低分子量サブユニットの機能を解明するため，それぞれの欠失変異体の構造・機能解析を行い，サブユニットの欠失により引き起こされる構造変化を明らかにする必要がある．このような PSII の構造・機能解析には，X 線結晶構造解析だけでなく，微小な変化を検出できる振動分光法[10), 11)] を中心とした物理的測定，および理論計算との連携が重要である．

## 文　献

1） Kok, B. *et al.*（1970）Photochem. Photobiol. **11**, 457-475.
2） Zouni, A. *et al.*（2001）Nature **409**, 739-743.
3） Kamiya, N., Shen, J.-R.（2003）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100**, 98-103.
4） Ferreira, K. N. *et al.*（2004）Science **303**, 1831-1838.
5） Guskov, A. *et al.*（2009）Nat. Struct. Mol. Biol. **16**, 334-342.
6） Umena, Y. *et al.*（2011）Nature **473**, 55-60.
7） Kawakami, K. *et al.*（2011）J. Photochem. Photobiol. B **104**, 9-18.
8） Murray, J. W. *et al.*（2008）Energy Environ. Sci. **1**, 161-166.
9） Kawakami, K. *et al.*（2009）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 8567-8572.
10） Noguchi, T.（2008）Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci. **363**, 1189-1194.
11） Noguchi, T.（2008）Coord. Chem. Rev. **252**, 336-346.

沈　建仁

**沈　建仁（しん　けんじん）**
岡山大学大学院自然科学研究科・教授
1990 年東京大学大学院理学研究科修了，理学博士．理化学研究所基礎科学特別研究員，研究員，先任研究員を経て，2003 年より現職．
研究内容：光合成光化学系 II 複合体の構造と機能
連絡先：〒 700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1
岡山大学大学院自然科学研究科（理）
E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

梅名泰史

**梅名泰史（うめな　やすふみ）**
大阪市立大学複合先端研究機構・特任准教授
連絡先：〒 558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138
大阪市立大学複合先端研究機構
E-mail: umena@ocarina.osaka-cu.ac.jp

川上恵典

**川上恵典（かわかみ　けいすけ）**
大阪市立大学複合先端研究機構・特任准教授
連絡先：同上
E-mail: keikawa@sca.osaka-cu.ac.jp

神谷信夫

**神谷信夫（かみや　のぶお）**
大阪市立大学複合先端研究機構・教授
1981 年名古屋大学大学院理学研究科修了，理学博士．理化学研究所研究員，副主任研究員，大阪市立大学大学院理学研究科教授を経て，2010 年より現職．
研究内容：構造生物化学
連絡先：同上
E-mail: nkamiya@sci.osaka-cu.ac.jp

生物物理 **52**（3），144-145（2012）

トピックス

# 線虫の記憶

**杉　拓磨** 京都大学大学院工学研究科

## 1. はじめに

神経科学の分野で，50 年近く実証を得ていない「おばあちゃん細胞仮説」とよばれる有名な仮説がある[1]．おばあちゃん細胞仮説とは，祖母なら祖母を，父なら父を記憶するニューロンがそれぞれに存在するという仮説である．つまり，環境からの刺激それぞれに対応して，それを記憶するニューロンが個々に存在するという仮説である．

1990 年，カンデルらは転写因子 CREB を発見し，後にノーベル医学・生理学賞を受賞した[2]．CREB は記憶成立の象徴的な分子であったため，発見以降，特定の刺激に対して CREB が機能するニューロン，つまり，特定の刺激を記憶するニューロンが見つかり，記憶の解明は収束に向かうことが期待された．ところが，そのようなニューロンの同定を，多くの神経科学者が試みているが，一部のニューロン[3]を除き，ほとんどみつかっていない．その最大の理由は，多くのモデル動物の神経系は膨大な数のニューロンからなるため，個々のニューロンを 1 ニューロン単位で分離解析することが困難なためである．本稿では，1 ニューロン単位の分子解析が唯一可能な線虫 *C. elegans* をモデル系に，分子遺伝学的解析と *in vivo* イメージングにより発見された「温度記憶を担うニューロン」とその制御機構について紹介する．

## 2. CREB 依存的に温度記憶を担うニューロン AFD

*C. elegans* は，302 個のニューロンからなる神経系を利用し，温度や振動を記憶する．たとえば，23°C で飼育されると，飼育温度を記憶するので，温度勾配上に置かれた場合，1 時間後には，23°C 付近へと移動する（**図 1a**）[4]．この温度走性行動を担う神経回路において，温度受容ニューロン AFD の神経活性の測定から，AFD は温度上昇に対し，過去に飼育された温度付近で反応することが示されていた[5]．この生理学的解析から，AFD は，過去の飼育温度を記憶する可能性が考えられた．そこで私たちは，分子レベルの解析によりこの可能性を検証した．CREB の線虫オルソログ *crh-1* を欠失した変異体の温度走性行動を確認した結果，変異体は温度記憶異常を示していた（**図 1b** 左）．この変異体のそれぞれのニューロンに特異的に，*crh-1/creb* の cDNA を発現させ，個々の変異体の記憶異常の回復の有無を確認した結果，驚くべきことに，唯一，AFD に cDNA を発現させた場合にのみ，完全に回復した（**図 1b** 右）．この結果から，AFD は CREB の機能ニューロン，つまり，温度記憶をもつ唯一のニューロンであることが示された（**図 1c**）[6]．最近，振動刺激の記憶においても，*crh-1/creb* が機能するニューロンの同定実験から，介在ニューロン AVA, AVD, AVE が振動記憶を担う可能性が示された[7]．これらの研究は，*C. elegans* において，温度では AFD が，振動では AVA, AVD, AVE が「おばあちゃん細胞」であることを示していた．

## 3. 温度記憶を制御する温度受容システムの発見

23°C を記憶している *C. elegans* を 17°C で飼育すると，約 4 時間で，17°C の記憶を獲得し，温度勾配上で 17°C 付近へと移動するようになる[4]．私たちは，17°C の記憶を獲得する前後で，マイクロアレイ解析を行った[8]．温度記憶形成過程で，有意な発現変化が見られた 79 個の遺伝子を精査した結果，一過性のヒートショックに反応して発現変化する *hsp* 遺伝子が複数含まれていた．このことから，*hsp* 遺伝子の上流でその発現を調節する転写因子ヒートショックファクター 1（HSF-1）に着目した．リアルタイム PCR やレポーター GFP の観察から，予想通り HSF-1 は飼育温度域内の温度変化を感知することが示された．そこで HSF-1 の機能低下型変異体の行動を確認したところ，飼育された温度に移動しない異常が見られた．次に，*hsf-1* の cDNA を細胞特異的に *hsf-1* 変異体に発現させ，個々の異常の回復を確認していった結果，興味深いことに，行動異常は，神経系だけでなく筋肉や腸に HSF-1 を発現させた場合にも回復した．このことは，HSF-1 が全身のさまざまな細胞で温度を感知することを示していた．

---

***C. elegans* Memory**

Takuma SUGI
Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University

※図 1 は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

次に私たちは，カルシウムインディケーターである cameleon を用い，*hsf-1* 変異体のニューロンの活性のイメージングを行った．その結果，*hsf-1* 変異体では温度上昇に対する AFD の神経活性の大きさや反応温度域が異常であることが示された．このことから，HSF-1 による温度シグナルは細胞非自律的に AFD を制御することが示された（**図 1c**）．

## 4. エストロゲンによる AFD の温度記憶制御

数年前，エストロゲンの受容体をノックアウトしたマウスが，空間の位置記憶に異常を示すことが報告された[10]．われわれは，先のマイクロアレイ解析において，HSF-1 の下流で発現変化した遺伝子の中に，エストロゲン合成にかかわる遺伝子が含まれていたことに着目し，*C. elegans* へのエストロゲンの投与実験を行った．その結果，エストロゲンは AFD に作用し，温度記憶を変化させる効果が見られた（**図 1c**）．さらに，エストロゲン受容体様タンパク質をコードする遺伝子 *nhr-69* を欠失した変異体と *hsf-1* 変異体を用い，*hsf-1* と *nhr-69* の遺伝学的な上下関係を調べた．その結果，NHR-69 は AFD で機能し，HSF-1 の温度シグナルの受け手であることが示された．以上の結果から，**図 1c** のように，(i) 温度記憶過程で，*C. elegans* は，HSF-1 を介し，全身で周囲の温度を感じ，その感知はエストロゲンを介し，AFD の記憶を変化させ，さらに (ii) 温度の勾配がある土壌で，0.01°C/cm の温度の違いを感知できる AFD を使い，獲得した記憶と照合しながら，目的温度に向かうと考えられた[8]．これまで「記憶の際，環境刺激は感覚ニューロンの膜タンパク質により受容される」ということが知られていたが，新たに「感覚ニューロンとともに，非神経系の体細胞も転写因子 HSF-1 を介して温度受容し，記憶の変化を導く」という概念が示された．

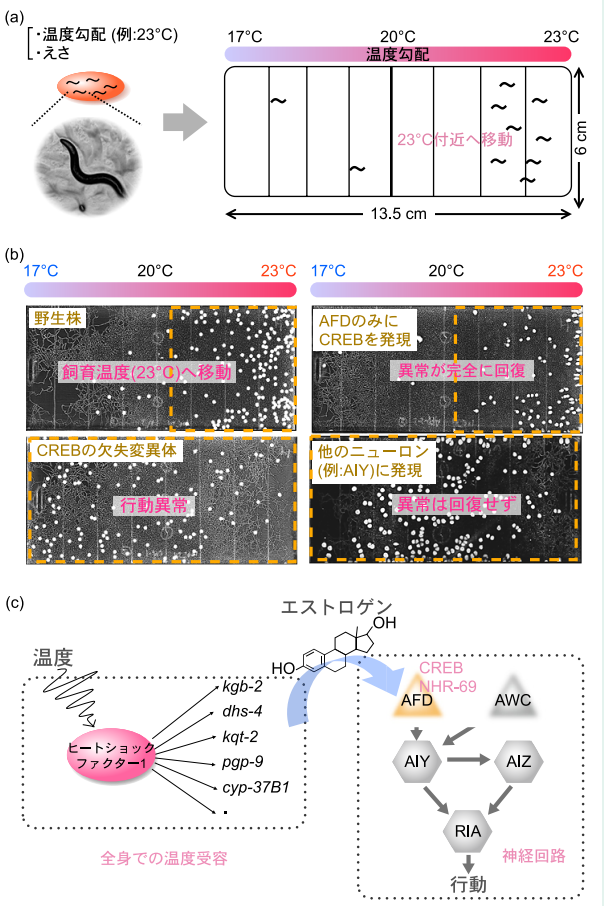



図 1
(a) 温度走性行動．(b) CREB の機能細胞の同定．温度勾配プレート上での白い点は線虫 1 個体を表す．(c) HSF-1 による温度記憶制御

## 5. おわりに

今回紹介した研究から，*C. elegans* ではじめて温度や振動といった特定の刺激を記憶するニューロンの存在とその記憶の制御機構が分子レベルで示された．記憶のメカニズムを明らかにするには，今後，記憶形成の際に，これらのニューロンではたらく分子機構を解明することが必要不可欠である．記憶の実体を担う分子を本質的にとらえることが期待される．

## 謝　辞

本稿で紹介した研究は，名古屋大学大学院理学研究科の森郁恵教授および研究室の方々との共同成果です．現所属先の京都大学大学院工学研究科の白川昌宏教授と京都大学物質–細胞統合システム拠点の原田慶恵教授のご理解とご協力に感謝いたします．

## 文　献

1) Gross, C. G.（2002）Neuroscientist **8**, 512-518.
2) Kandel, E. R.（2001）Science **294**, 1030-1038.
3) Quian Quiroga, R. *et al.*（2005）Nature **435**,1102-1107.
4) Mori, I. *et al.*（2007）Curr. Opin. Neurobiol. **17**, 712-719.
5) Kimura, K. D. *et al.*（2004）Curr. Biol. **14**, 1291-1295.
6) Nishida, Y. *et al.*（2011）EMBO Rep. **11**, 855-862.
7) Timbers, T. A., Rawkin, C. H.（2011）Behav. Neurosci. **1255**, 560-566.
8) Sugi, T. *et al.*（2011）Nat. Neurosci. **14**, 984-992.
9) Akerfelt, M. *et al.*（2010）Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **11**, 545-555.
10) Liu, F. *et al.*（2008）Nat. Neurosci. **11**, 334-343.

杉　拓磨

**杉　拓磨（すぎ　たくま）**
京都大学大学院工学研究科・日本学術振興会特別研究員 PD
2007 年京都大学大学院生命科学研究科修了．同年から名古屋大学大学院理学研究科 CREST 研究員，11 年 4 月より現職．
研究内容：*C. elegans* の記憶をコードする核内リモデリングの解析
連絡先：〒606-8501 京都市左京区吉田本町
iCeMS Complex2 101 号室
E-mail: sugi.takuma.32r@st.kyoto-u.ac.jp

生物物理 52（3），146-147（2012）

トピックス

# ウイルスゲノムの適応進化:タンパク質立体構造に基づくウイルス適応度地形の解析

渡部輝明 高知大学医学部附属医学情報センター
岸野洋久 東京大学大学院農学生命科学研究科

## 1. はじめに

タンパク質はアミノ酸配列を変異させることで環境に適応していくが，遺伝子上で起こった突然変異は環境に特有の選択圧のもとで淘汰されていく．SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルスは宿主細胞に侵入するため，宿主の細胞表面にある受容体（細胞受容体）にウイルス粒子膜上のタンパク質を結合させる．この受容体結合タンパク質（RBP）は，その変異において以下の拮抗する選択圧を受けている．宿主へ適応したウイルスはRBPによる細胞受容体への結合能を維持し続ける必要があるが，その一方で免疫系からのRBPへの攻撃をかわしていかなければならない．われわれはこのような状況での選択圧のもとで，タンパク質に生じた変異がどの程度の割合で固定されるのかをSARSコロナウイルスのRBPを用いて解析した[1]．

## 2. 解析の前提とあらまし

変異ウイルスが新たなウイルス株として定着するようすをシミュレートするには，宿主（ここではヒト）の集団を考える必要がある．100万人規模のワクチン接種を想定し，その1%（1万人）がウイルスに感染したとする．このとき感染者はワクチン接種を受けているため，それらの人は治癒することを前提としているが，新たな感染者が生じるであろうことから全体としての規模は1万人を維持していると考える．さらにそのうちの1人に変異ウイルスが出現したことを想定し，この1万人規模のウイルス感染者全体が変異ウイルスによる感染者となる確率を計算した．

SARSコロナウイルスの場合，潜伏期間が感染後3～5日あり，発症から数日以内には医療処置を受けることが想定されるため，他の宿主へ感染できる期間は感染後10日程度と考えられる．そのためこの期間でのウイルス量の総量を新たな宿主への感染能力を示す尺度とすることができ，ウイルスの**適応度**として定義する．宿主内でのウイルス量は，われわれの扱う数理モデルにおいてはRBPと細胞受容体との結合能と，ワクチン接種により獲得した抗体（免疫グロブリン）との結合能の2つの尺度で測ることができる．変異ウイルスにはRBPに生じた変異によって，2つの結合能において野生型との間で差が生じる．この差によって変異ウイルスの宿主内におけるウイルス量が野生型の場合を上回るようであれば，変異ウイルスが野生型を駆逐し宿主集団全体に拡がる可能性がある．

## 3. ウイルス動態の数理モデルと適応度

正常細胞，感染細胞，ウイルス，そして抗体の4者で宿主内動態を表現する方程式系がNowakらによって提案されている[2]．さらにわれわれは相互作用の強さを分子間の結合能と関連させて，ウイルスのタンパク質変異に伴う結合能の変化を方程式系のパラメータに反映させた．具体的には正常細胞とウイルス粒子の相互作用強度を表すパラメータ（$\beta$）を細胞受容体とRBPとの結合能に，ウイルス粒子と抗体との相互作用強度を表すパラメータ（$q$）をRBPと免疫グロブリンとの結合能に対応させた．さらに数理モデルに変異ウイルスの出現を導入し，同一宿主内での野生型と変異型のせめぎ合いを考慮した．**図1**に得られた適応度地形の1例を示した．細胞受容体への結合能を維持（または強化）し，抗体攻撃を回避するため抗体との結合能を低下させるように変異したウイルスは，宿主内での適応度を上げることになる．そのことが**図1**の適応度の等高線で示されている．

宿主全体に定着する確率（固定確率）は集団遺伝学の理論を用いて計算できる．具体的には，変異ウイルスの適応度と野生型の適応度の比を用いて**選択的優位性**

**Adaptive Evolution of Viral Genome: Analysis of the Fitness Landscape of a Virus based on the Protein Structure**
Teruaki WATABE[1] and Hirohisa KISHINO[2]
[1]Center of Medical Information Science, Kochi University
[2]Graduate School of Agriculture and Life Science, University of Tokyo

※図2は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

とし，さらに変異ウイルスの出現した宿主内での変異ウイルス量と野生型ウイルス量の比から変異ウイルス感染宿主の初期頻度確率を得て固定確率を計算した．

## 4. ウイルス変異のシミュレーション

**図 1** に示した適応度地形上をどのように変異ウイルスが移動してゆくのかを，RBP に生じた変異を以てウイルスの変異としたシミュレーションにより調べた．SARS コロナウイルスの RBP と細胞受容体の複合体構造は X 線結晶構造解析により決定されている[3]．同様に RBP と免疫グロブリンとの複合体も 2 種類決定されており，抗体 80R との複合体[4] と，抗体 m396 との複合体[5] が公開されている．野生型ウイルスの RBP と細胞受容体との結合能 $K_a^{CR(W)}$ は複合体構造データを用いて，複合体での配列分布と単体での配列分布の尤度比から推定できる[6]．同様に免疫グロブリンとの結合能 $K_a^{AB(W)}$ も複合体構造データを用いて推定できる．以上を用いて，RBP の結合領域においてアミノ酸残基を 1 残基変異させて再び複合体の結合能（$K_a^{CR(M)}$ および $K_a^{AB(M)}$）を計算した．われわれはこれら野生型結合能と変異型結合能の比が数理モデルでウイルスを特徴付けるパラメータ $\beta$ と $q$ における比と等しいことを仮定して，ウイルスの変異と集団への定着をシミュレートした：$\beta^{(M)}/\beta^{(W)} = K_a^{CR(M)} K_a^{CR(W)}$（$q$ も同様）．

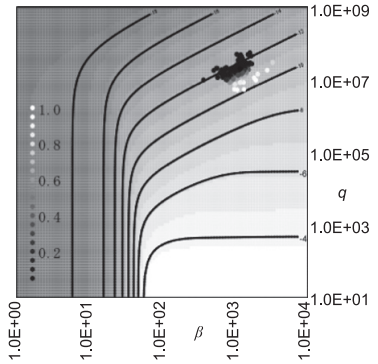



図 1
数理モデルにより得られた適応度地形．ウイルス粒子が，正常細胞と相互作用する強度（$\beta$）と抗体と相互作用する強度（$q$）のせめぎあいが見て取れる．結合領域における 1 残基置換による変異ウイルスの位置を固定確率（0：黒～ 1：白）と共に示した．

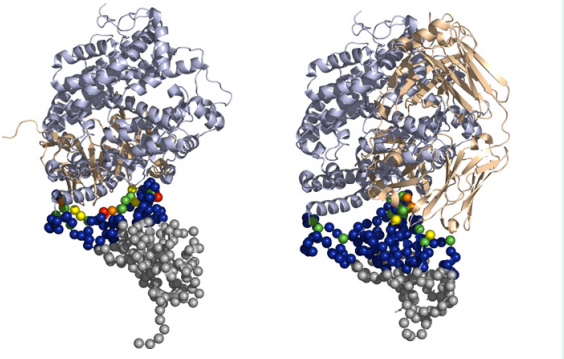


図 2
高い確率で定着し得る変異を起すアミノ酸残基の α 炭素原子の位置を暖色の球で示した．RBP と細胞受容体（薄青）の複合体構造（PDB code：2AJF）の上に RBP と免疫グロブリン（薄橙：図左は 80R，右は m396）の複合体構造（PDB code：左 2GHW，右 2DD8）を重ねたものである．

## 5. 適応進化に寄与するおもなアミノ酸残基

**図 2** に宿主集団に高い確率で定着し得る変異を起こすアミノ酸残基を示した．赤色は 19 通りの変異における固定確率の平均が 0.6 以上の残基を示しており，オレンジ色は 0.4 以上を示している．それらの内のいくつかの変異では 0.9 を超える固定確率を示した．

## 6. まとめ

高い確率で宿主集団に定着し得る変異を起こす残基を予測した．さらに突然変異率を考慮することで，宿主集団に定着する変異がどの程度の時間的な尺度で起こり得るのかを予測することができる．こうした予測は，ワクチン開発において有用な知見を与えるものと期待される．本研究とその周辺についての詳細は文献 7 を参照されたい．

## 文　献

1） Watabe, T., Kishino, H.（2010）Mol. Biol. Evol. **27**, 1782-1791.
2） Nowak, M. A., Bangham, C. R. M.（1996）Science **272**, 74-79.
3） Li, F. *et al.*（2005）Science **309**, 1864-1868.
4） Hwang, W. C. *et al.*（2006）J. Biol. Chem. **281**, 34610-34616.
5） Prabakaran, P. *et al.*（2006）J. Biol. Chem. **281**, 15829-15836.
6） Watabe, T. *et al.*（2007）Mol. Biol. Evol. **24**, 1627-1638.
7） 渡部輝明，岸野洋久（2012）統計数理 **60**, 掲載予定.

渡部輝明

**渡部輝明（わたべ　てるあき）**
高知大学教育研究部医療学系連携医学部門講師（医学情報センター）
2010 年より現職．博士（理学）．博士（医学）．
研究内容：生物進化，分子進化
連絡先：〒 783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮
E-mail: twatabe-mi@umin.ac.jp

岸野洋久

**岸野洋久（きしの　ひろひさ）**
東京大学大学院農学生命科学研究科教授

生物物理 52（3），148-149（2012）

トピックス

# アミロイド線維伸長における中間体構造の捕捉と構造解析

茶谷絵理 神戸大学大学院理学研究科
小沼　剛 サントリー生命科学財団生物有機科学研究所
後藤祐児 大阪大学蛋白質研究所

## 1. はじめに

アミロイド線維は，タンパク質の誤った折りたたみにより形成される超分子的重合体である．アミロイド線維の沈着を伴う疾患はアミロイドーシスと総称され，約 30 種類報告されている．さらに最近では，神経変性疾患での沈着物もアミロイド線維構造をもつことが明らかとなり，アミロイド線維の形成原理には強い関心が寄せられている．

アミロイド線維構造は，「核依存性伸長」という，線維末端にモノマー体のタンパク質が付着し重合していく様式で形成される[1]．これにより，アミロイド線維は，線維軸に沿って自己の構造を複製しながら一方向に伸びてゆく．伸長によるアミロイド線維の増幅は，疾病が感染し伝播する際の分子基盤と考えられたいへん重要であるが，モノマー分子がどのように線維末端に結合し，線維構造を複製するかの詳細なメカニズムはいまだに明らかにされていない．

これを解明するため，筆者らは，透析アミロイドーシスの原因タンパク質である $\beta_2$ ミクログロブリンのアミロイド線維について，伸長過程で経由する速度論的中間体を捉えて観察しようとした．本稿では，これまでに行ってきた一連の解析について紹介したい．

## 2. どのようにすれば伸長中間体を捉えられるか

$\beta_2$ ミクログロブリンは，酸性条件下でアミロイド線維の断片（シード）を核として添加すると，アミロイド線維の伸長が速やかに進行する．この反応には，少なくともシードとモノマータンパク質の 2 分子が関与することを考慮すると，シードの末端にモノマー分子が結合した伸長中間体を経由することが予想されるものの，捕捉した事例は報告されていない．しかし，伸長反応を酵素反応に見立てると，過剰量の線維（酵素）に少量のモノマー（基質）を添加すれば，酵素反応の前定常状態のように伸長中間体（酵素・基質複合中間体）が過渡的に蓄積する可能性がある（図 1）．

## 3. トリプトファン蛍光測定による伸長中間体の実証

上記の考えに基づき，筆者らは，中間体が蓄積するようすを反応速度論の観点から捉えようとした．伸長反応の追跡にはトリプトファン蛍光スペクトル変化を用いたが，高シード濃度条件では，シード由来の蛍光が測定の大きな妨げとなり，モノマーとして添加したタンパク質由来のスペクトル変化をうまく観測できなかった．そこで，タンパク質分子内部のトリプトファン残基を潰した無蛍光性の変異体シードを作製したところ，あらゆるシード濃度条件で蛍光スペクトル変化の追跡ができるようになった（図 2a）．一定濃度の希薄モノマー溶液にさまざまな濃度でシードを加えて測定を行った結果，見かけの速度定数が高シード濃度領域で飽和することが確認された（図 2b）．これは，酵素反応の前定常状態で見られる現象であり，伸長中間体の存在がはじめて確認された．

興味深いことに，速度定数の飽和は予想に比べてはるかに低いシード濃度で観察され，結合しているモノマー数は，1 つのシード末端に対しおおよそ数十にもなることが示された．筆者らにとっても予想外であったが，線維末端の側面付近にも複数のモノマーが不活性型として結合することでリザーバーのような役割を果たし，線維軸方向に効率よく伸長するという新たなモデルが提案された（図 2c）．

## 4. 水素–重水素（H/D）標識による中間体の構造解析

さらに，伸長中間体のより詳細な構造特徴を知るため，タンパク質フォールディングにおける中間体の解析を飛躍的に進めた画期的手法である H/D 標識-NMR 法を用いての構造解析を試みた．図 3a はクエンチトフロー装置の概要である．4 種類の溶液を逐次

**Kinetic Intermediate of $\beta_2$-microglobulin Fibril Elongation Probed by Tryptophan Fluorescence Spectroscopy and H/D Exchange-NMR**

Eri CHATANI[1], Tsuyoshi KONUMA[2] and Yuji GOTO[3]
[1]Graduate School of Science, Kobe University
[2]Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences
[3]Institute for Protein Research, Osaka University

※図 3 は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

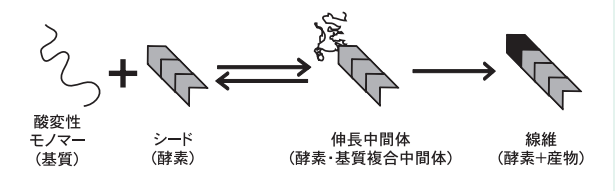



図 1
核依存性伸長反応過程に経由することが予想される速度論的中間体.

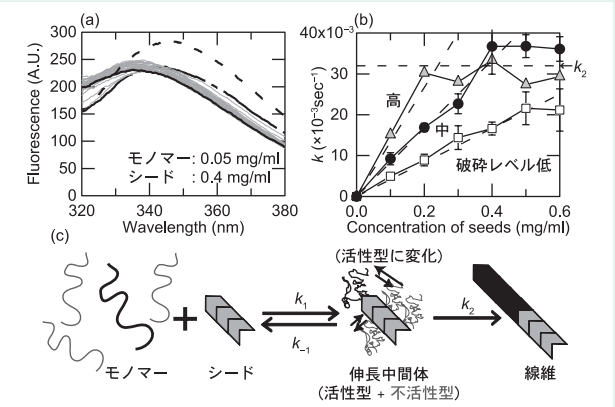



図 2
(a) 伸長反応に伴うトリプトファン蛍光スペクトル変化の 1 例. 鎖線（反応開始 10 秒後）から実線（600 秒後）に向かって変化するようすが観察された. 破線は反応前の酸変性モノマーのスペクトル. (b) 高シード濃度領域での速度定数の飽和のようす. シードの破砕レベルを変えたところ, 線維末端数が多くなるにつれて飽和濃度が低濃度側にシフトした. (c) 解析結果より提案された線維の伸長スキーム.

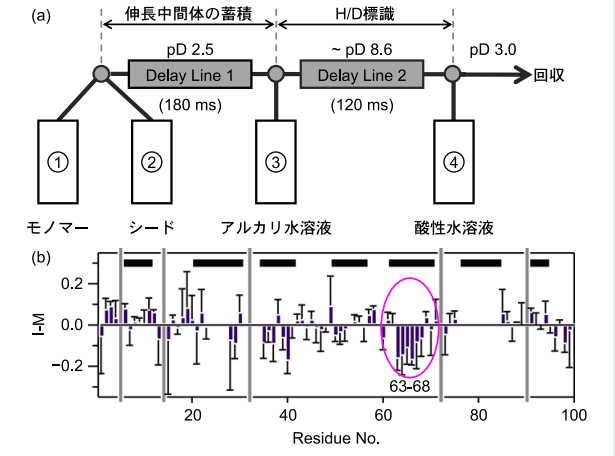



図 3
(a) パルス H/D 標識の概略. (b) その後の NMR 解析により得られた重水素交換プロファイル. 酸変性モノマーを差し引いた差プロファイルとして示した結果, 酸変性構造に残存する疎水性クラスター領域（63-68 位）に負のピークが確認された. 上部の横線は, ネイティブ構造でのβシート領域を示す.

混合することにより, 中間体を蓄積させた直後に試料の pH を瞬時に変化させて, 120 ミリ秒というごく短い H/D 交換パルスを与えた. その後, 各アミノ酸残基の交換程度を $^{1}$H-$^{15}$N HSQC スペクトルをもちいて調べた. 溶液 NMR によるアミロイド線維の直接観測は困難であるが, 星野らが開発したジメチルスルホキシドで解離させる方法[3] を組み合わせ, 実施することができた.

その結果, 中間体構造の H/D 交換は酸変性状態に類似しており, ほぼほどけた状態で線維と弱く結合していることが明らかとなった. 先述のように, 伸長中間体ではモノマーは線維側面にも結合していることが予想される. もし不活性型が強固に線維側面と相互作用していれば, 線維末端へのダイナミックな移動, あるいは再結合が阻まれるであろう. 弱い相互作用様式は, 1 つの線維末端に多数結合しながら伸長するスキームにおいて, たいへん合理的である.

同時に, 酸変性構造に存在する 63-68 位の疎水性クラスター領域までがほどけているという, 興味深い特徴も明らかとなった（**図 3b**）. 筆者らは, 同領域が線維末端の認識に関与するのではないかと考えている.

## 5. おわりに

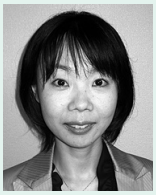
今回の伸長中間体の捕捉および構造解析により, アミロイド線維化に伴うタンパク質分子の構造変化に大きく迫ることができた. アミロイド線維は扱いが難しく構造情報が乏しいが, 今後さらに解析条件や方法の工夫を行い, これまでのフォールディング研究で行われてきた中間体構造の観察に並ぶ残基レベル, 定量レベルでの解析をめざすことで, アミロイド線維形成機構の解明の道がより大きく拓けることが期待される.

## 謝　辞

本稿で紹介した研究は, 大西玲奈氏, 櫻井一正博士, 八木正典博士, 池上貴久博士, 内木宏延教授との共同研究であり, ここに深く感謝いたします.

## 文　献

1) Jarrett, J. T., Lansbury P. T. Jr.（1993）Cell **73**, 1055-1058.
2) Chatani, E. *et al.*（2010）J. Mol. Biol. **400**, 1057-1066.
3) Hoshino, M. *et al.*（2002）Nat. Struct. Biol. **9**, 322-326.
4) Konuma, T. *et al.*（2011）J. Mol. Biol. **405**, 851-862.


茶谷絵理

**茶谷絵理（ちゃたに　えり）**
神戸大学大学院理学研究科准教授
京都大学大学院農学研究科修了, 博士（農学）. 日本学術振興会特別研究員（阪大蛋白研）, 立命館大学薬学部助教などを経て 2011 年より現職.
研究内容：アミロイド線維の形成機構
連絡先：〒657-8501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1
E-mail: chatani@crystal.kobe-u.ac.jp
**小沼　剛（こぬま　つよし）**
サントリー生命科学財団生物有機科学研究所研究員
連絡先：〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1
E-mail：konuma@sunbor.or.jp
**後藤祐児（ごとう　ゆうじ）**
大阪大学蛋白質研究所教授
連絡先：〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2
E-mail: ygoto@protein.osaka-u.ac.jp

生物物理 52（3），150-151（2012）

トピックス

# タンパク質のアロステリーと配列デザイン原理

高田彰二　京都大学大学院理学研究科生物物理学教室

## 1. タンパク質の設計原理について

ランダムにアミノ酸を並べてポリペプチドをつくっても，タンパク質らしい性質をもつ分子ができる確率はきわめて低い．逆にいうと，タンパク質は進化を通じてそのアミノ酸配列を巧みにデザインしてきた．それでは，タンパク質は，どのような要請からどのようにアミノ酸配列をデザインしてきたのか，これはタンパク質の設計原理という普遍的で基礎的な問題である．

酵素などの多くのタンパク質にとって特定の3次元構造へフォールディングすることは機能実現に有利である．したがってフォールディング能という強い要請があり，これらのタンパク質はその要請を満たすべく配列を進化させてきた．過去30年のタンパク質フォールディングの基礎研究によって，これはタンパク質の整合性原理あるいはフラストレーション最小の原理という形で理解されてきた．これがタンパク質の第一の設計原理といえるであろう[1]．

フォールディング能と同時に，酵素の機能実現には，基質の化学反応を触媒するためにいくつかの機能性アミノ酸を特定の場所に配置することが重要である．その設計原理は，基質の遷移状態を特異的に安定化するように，基質の周りにいくつかのアミノ酸を配置するということであろう．これは第二の設計原理である．

構造と機能の次に何が要請されるだろう．細胞の中でタンパク質が素子として働くことが可能であるためには，そのタンパク質機能をオン・オフする調節・制御が必須である．機能のオン・オフスイッチは，ほとんどのタンパク質に課せられた要請であり，それを実現するためにタンパク質はアロステリック効果を獲得してきた．アロステリック効果とは，「制御分子AがタンパクP質に結合しているか否かによって，タンパク質Pが基質Sに及ぼす機能が変化する（ただしAとSは直接相互作用してはいない）」効果のことである．現代的には，アロステリック効果は，制御分子Aとの結合によってタンパク質Pの3次元構造が変化することによって実現されていると理解されている．

それでは，アロステリーを実現するための設計原理はどのようなものだろうか．この点はまだそれほどよく理解されていない．ここでは，アロステリーを実現するためにタンパク質の配列がどのような性質をもっているか，を理解するための最近の研究を紹介する．

## 2. 局所的なフラストレーション

フォールディング研究におけるフラストレーション最小の原理で著名なWolynesらは，数年前から，個々のタンパク質について，部分的・局所的に残っているエネルギー相互作用のフラストレーションを調べていた[2]．あるタンパク質構造において，アミノ酸iの周りの相互作用がどれくらい整合的であるか，逆にいうとどれくらいフラストレーションが残っているかを定量化するためにフラストレーション指数を導入した．これは，アミノ酸iの周りの相互作用が，対象とする天然構造においてよりも，同じタンパク質の変性構造アンサンブルにおいてより安定であるときフラストレーション指数が高くなるように定義されている．個別に調べていくと，機能部位に近いところで顕著にフラストレーション指数が高いアミノ酸の集団が見つかる傾向が大きかった[2]．

さらに昨年（2011年），PDBに2つの構造が存在する23個の単量体アロステリックタンパク質について，フラストレーション指数の分布を系統的に調べた論文が発表された[3]．それによると構造変化する部分のアミノ酸のフラストレーション指数は，2つのうち少なくとも1つの構造では例外なく高かった．面白いことにヘモグロビンのようにオリゴマーでアロステリック転移を示す場合には，両方の構造においてフラストレーション指数が低い例があった．

この研究と関連してわれわれは（Wolynesとも共同で）全原子モデルであるAMBERのエネルギー関数（ただし溶媒は連続体モデルで近似されている）を用いて，類似の調査を行った[4]．具体的に，AMBERのエネルギー関数は近似的に原子対の相互作用エネル

**Protein Allostery and Sequence Design Principle**

Shoji TAKADA
Department of Biophysics, Graduate School of Science, Kyoto Univerisity

ギーの和で表現できる．したがって，あるアミノ酸 i に属する原子と別のアミノ酸 j に属する原子の対の相互作用エネルギーの和をとると，アミノ酸対 ij の相互作用エネルギーが計算できる．これを PDB に 2 つの構造が存在する 71 個のアロステリックタンパク質について網羅的に計算し，結果を分析した．

まず個々のアロステリックタンパク質について，近距離に接近（これを接触とよぶ）しているアミノ酸対を集めた．それを，両方の構造で接触している対（共有対）と，片方の構造でだけ接触している対（特異的対）とに分け，各集合のアミノ酸対エネルギーの分布を調べてみると面白いことがわかった．たとえばアデニル酸キナーゼの場合を**図 1a** に示す．共有対と特異的対の対エネルギー分布は際立って異なる．共有対の集合は，やや長いすそ野をもつ指数分布をしており，まれには際立って強い対エネルギーをもっているものがある．一方，特異的対の集合は，弱いエネルギーのところに分布が偏っており，強い相互作用をするアミノ酸対が存在しない．特異的対は，一方の構造では接触していないのだから，もう 1 つの構造でもそれほど強い相互作用をしていないのである．同じ傾向は，テストした 71 個のアロステリックタンパク質すべてにみられた（**図 1b**）．したがってこの傾向は普遍的なものと考えられる．構造変化する際に切断されるべきアミノ酸対の接触はそもそも弱いのである．この違いの原因は，特異的対に使われるアミノ酸の組成が異なること，同じアミノ酸種でも相対距離が異なること，同じアミノ酸種かつ同じ距離でも周りの文脈が異なることが複合的に寄与している．後ろの 2 つは，特異的対の相互作用にはフラストレーションがあり，そのために相互作用が弱いということを示唆している．

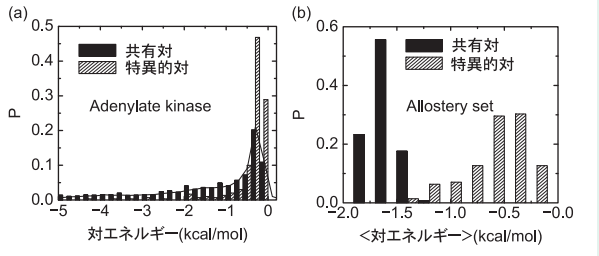



図 1
アロステリックタンパク質の共有対（黒）と特異的対（斜線）のアミノ酸対エネルギーの分布．(a) アデニル酸キナーゼ．(b) 71 個のアロステリックタンパク質についての，共有対と特異的対の値の平均値を表す．

## 3. 大振幅ゆらぎと構造変化

このような特異的なアミノ酸対エネルギーの特徴は，アロステリックタンパク質のゆらぎと構造変化にどのような影響を及ぼすだろう？　われわれはまず，上述の全原子モデル（AMBER）によるアミノ酸対の相互作用エネルギーを直接反映させたアミノ酸分解能の**郷モデル（AICG モデル）**[1] を構築した．AICG モデルでは，天然構造で接触しているアミノ酸対 ij は，全原子モデルで計算したアミノ酸対エネルギーに比例した強さで相互作用する．したがって，アロステリックタンパク質では 2 節で述べたとおり，構造変化する際に解離することになる特異的対は弱い相互作用となる．

71 個のアロステリックタンパク質の 2 つの状態おのおのについて，AICG モデルと単純な従来の郷モデルとを比較した．単純な郷モデルでは（AICG モデルとは対照的に），天然構造で接触しているアミノ酸対 ij はすべて同じ強さで相互作用する．比較の結果，AICG モデルは単純郷モデルに比べて高い頻度で大振幅ゆらぎを誘起することがわかった．より重要なこととして，AICG モデルにおける大振幅ゆらぎは，単純郷モデルにおけるものよりも，構造変化すべき方向に近いことがわかった．上記 2 点は，2 節で述べた特異対の相互作用がもつフラストレーションを取り込むことで，アロステリックタンパク質の各状態における構造ゆらぎが，そのままそのタンパク質の構造変化に関係づけられることを示している．

## 文　献

1) 高田彰二（2010）生物物理 **50**, 158-159.
2) Ferreiro, D. U. *et al.*（2007）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 19819-19824.
3) Ferreiro, D. U. *et al.*（2011）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 3499-3503.
4) Li, W. *et al.*（2011）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108**, 3504-3509.

高田彰二

**高田彰二（たかだ　しょうじ）**
京都大学理学研究科准教授
京都大学理学研究科化学専攻修士修了，神戸大学理学部講師，助教授を経て現職，総合研究大学院大学博士（理学）
研究内容：生体分子システムのモデリングとシミュレーション
連絡先：〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町
E-mail: takada@biophys.kyoto-u.ac.jp
URL: http://theory.biophys.kyoto-u.ac.jp/

生物物理 52（3），152-153（2012）

トピックス

# 1分子電流計測による非標識DNAのメチル化検出

筒井真楠, 谷口正輝, 川合知二　大阪大学産業科学研究所

## 1. DNAメチル化

地球上の生物は，細胞分裂の際，デオキシリボ核酸（DNA）を構成する4種類の塩基分子（チミン（T），アデニン（A），シトシン（C），グアニン（G））の配列を母細胞から娘細胞へと受け渡すことで，その形状や機能などの遺伝情報を次世代に伝えていると考えられてきた．しかし近年になって，メチル化，アセチル化といった後成的なDNAやヒストンの化学修飾状態も，遺伝子発現の多様性にかかわる遺伝暗号として重要な役割を担っていることが明らかにされた．こうした塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能の変化はエピジェネティクスとよばれている．中でも特にDNAメチル化により生じる遺伝子異常は発がん過程に関与することで知られ，DNAを形作る30億個の塩基分子対にわずかな量含まれる5-メチルシトシン（mC）の配置を簡単にマッピングできるようになれば，がん診断や治療・予防に大きく寄与できると期待されている．しかし光検出法を基盤とする従来のDNAシークエンサーではmCをCと区別して検出することができない．そのため現状では重亜硫酸ナトリウムを用いてメチル化されていないCをウラシル（U）に化学変換させるなどして，現在のシークエンサーでもmCを識別可能にするといった前処理が必須となっている．このことが，ただでさえ長い時間と多大な費用が必要な塩基配列解読処理（次世代シークエンサーの場合，ヒトゲノム解読には10万ドルの費用と2カ月の時間が必要）に拍車をかけており，エピゲノム診断の実現における根本的な障壁として認識され始めている[1]．

## 2. ゲーティングナノポアシークエンサー

そこで従来の光検出による方法とはまったく異なる新しい塩基配列解読技術を開発しようという動きが世界中に広まっている．そして数あるデバイスの中で有力視されているものの1つがゲーティングナノポアだ[2]．その構造は，$SiO_2$などのメンブレンに空けられた直径数ナノメートル（1ナノメートル＝$10^{-9}$メートル）のきわめて小さい貫通孔と，その脇に作りこまれた1対のナノ電極で構成される[2]．このデバイスを用いると，1分子DNAがナノ孔を通過する際にナノ電極間を流れる微弱な電流を計測することで，各塩基分子を流れる電流の大きさの違いから孔に入ってきたDNAの頭から尻尾までの塩基配列を一気に読み取ることができると考えられている．実際，アメリカ国立衛生研究所（NIH）の試算によると，この電気的検出法を採用することでヒトゲノム解読にかかる費用・時間がわずか1000ドル・1日で済むようになるという，個別医療の実現も見えてくるような数値が打ち出されている[3]．

## 3. ナノ電極を用いたメチル化シトシンの1分子識別

ナノポアシークエンサーの研究開発は，今や米国を中心とする有力企業（IBM，イルミナ，ロッシュ，サムスンなど）や数多くの大学が熾烈な競争を繰り広げる分野に成長してきている．そのような中にあって，われわれはゲーティングナノポアデバイスがもつ最も重要な機能である「ナノ電極対を用いた1塩基分子識別」をいち早く実証することができた[4]．まずわれわれは原理実証に必要となる，電極間の隙間が塩基分子の大きさ（約1ナノメートル）と同じ程度のナノ電極対を作製するために，ナノ加工機械的破断接合（Nano-MCBJ）を応用した自己破断接合法を新たに開発した．Nano-MCBJの基本構造は，ポリイミド基板上に電子線描画法を用いて作製されるナノスケールの金属製両端支持梁である[4]．梁中央にはノッチが形成されており，ポリイミド基板を機械的に撓ませると，梁がノッチ部で徐々に狭窄され破断する．このとき，基板の曲げを精密にプログラム制御することで，接合破断後に形成されるナノ電極間の距離をサブピコメートルの高精度で調節可能になる[4]．実際にNano-MCBJを用いて1ナノメートル電極ギャップを作製し，ヌクレオチドモノ

**Electrical Detection of DNA Methylation**

Makusu TSUTSUI, Masateru TANIGUCHI and Tomoji KAWAI
The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University

※図1，図2は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

マー分子の水溶液中で電極間にトラップされる 1 塩基分子の電流計測を行ったところ，G>A>C>T の順に大きい電流値が得られた．この単一分子識別を可能にする電流値の大小関係は，各塩基分子に固有の最高被占軌道（HOMO）エネルギーと電極フェルミ準位間のエネルギーギャップと相関があることから（**図 1**），分子の電子状態を反映した単一分子電気伝導度の違いにより生じたものであることが強く示唆される[4]．以上のようにして，ゲーティングナノポアで想定している「ナノ電極対を用いた 1 塩基分子識別」が実証された．余談ではあるが，この結果が学術誌に掲載された日と同時期に，ほぼ同じ内容の実験結果が米国の研究グループにより発表された．このことからもナノポア研究が現在いかにホットな研究分野であるかが伺える．

では同様の計測方法を DNA メチル化検出に適用した場合どうなるだろうか．mC の HOMO エネルギーは他の塩基分子よりも高い準位にあることから，単一分子電流値は mC>G>A>C>T のようになることが予測できる（**図 1**）．そこで主要なメチル化サイトとして知られる CpG 領域を想定して[1]，GGGG と mCmCmCmC のホモオリゴマーについて単一分子電流計測を行ったところ，予測の通り電流値は mCmCmCmC>GGGG となり，ナノ電極対を用いて電気的に mC と G が単一分子レベルで識別可能なことがわかった．またさらに mCGmCG のヘテロオリゴマーについて電気計測を行ったところ，mC と G の単分子電気伝導度を指標としてオリゴマー内の mC と G が電気的に識別可能なことが明らかになった（**図 2**）[5]．

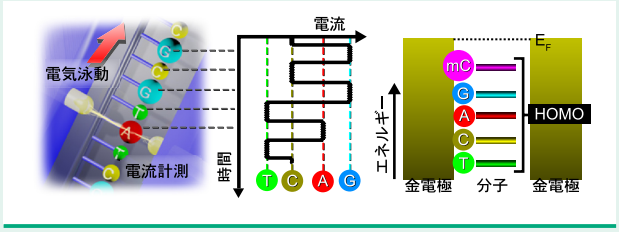



図 1
（左図）ナノ電極を用いた 1 分子電流計測による DNA 塩基分子識別．（右図）エネルギー準位図．塩基分子の HOMO と電極フェルミ準位とのエネルギー差が小さいほど，より大きい電流が分子を介して流れる．

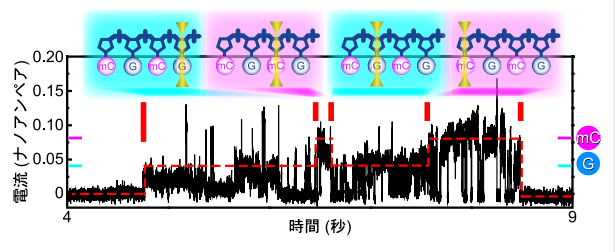



図 2
mCGmCG オリゴヌクレオチドの単一分子電流計測．紫と青線はそれぞれ mC と G の単一分子電流レベルを示す．mCGmCG を流れる電流は G と mC の電流レベル間をステップ状に変化する（赤点線）．

## 4. 電気的メチル化解析の実現に向けて見えてきた課題

これらのナノ電極対を用いた電流計測によって，ゲーティングナノポアを用いた DNA メチル化解析の実現可能性が拓かれた．しかし同時に課題も見えてきている．電極間にトラップされた塩基分子の配向・形状のゆらぎをどう抑えるかは，塩基識別精度・確度の観点から重要な課題になるだろう．また DNA が電極間を流れる速度を一定にするような制御技術も必要となる．さらに，メチル化検出に要する時間短縮を達成するには，ピコアンペアレベルの微弱なシグナルを 1 MHz 以上の帯域で計測するための電流アンプ系の開発や，大容量データを統計的に処理しメチル化状態などの情報を抜き出すためのアルゴリズムの考案とソフトウェア化も求められるであろう．まだまだ課題山積ではあるが，電流計測による DNA メチル化検出原理が実証されたことが起爆剤となり，この 1 分子計測技術が近い将来新しいがん診断・治療法の発見に役立出てられる実デバイスへと昇華する日がくることを期待する．

## 文　献

1） Baker, M.（2010）Nature Methods **7**, 181-186.
2） Branton, D. *et al.*（2008）Nature Biotechnol. **26**, 1146-1153.
3） 米国 NIH のニュースリリース
http://www.genome.gov/12513210
4） Tsutsui, M. *et al.*（2010）Nature Nanotechnol. **5**, 286-290.
5） Tsutsui, M. *et al.*（2011）J. Am. Chem. Soc. **133**, 9124-9128.

筒井真楠

**筒井真楠（つつい　まくす）**
大阪大学産業科学研究所助教
2006 年京都大学大学院博士課程修了
研究内容：ナノバイオデバイス
連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ケ丘 8-1
E-mail: makusu32@sanken.osaka-u.ac.jp

谷口正輝

**谷口正輝（たにぐち　まさてる）**
大阪大学産業科学研究所教授
2001 年京都大学大学院博士課程修了
研究内容：単分子科学
連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ケ丘 8-1
E-mail: taniguti@sanken.osaka-u.ac.jp.
URL: http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/jp/organization/nnc/nnc_06.html

川合知二

**川合知二（かわい　ともじ）**
大阪大学産業科学研究所特任教授
1974 年東京大学大学院博士課程修了
研究内容：DNA ナノテクノロジー
連絡先：〒 567-0047 大阪府茨木市美穂ケ丘 8-1
E-mail: kawai@sanken.osaka-u.ac.jp
URL: http://www.kawaisaisentan.osaka-u.ac.jp/

生物物理 52（3），154-155（2012）

トピックス

# リポソーム固定化技術を用いたメンブレノミクス研究

島内寿徳　大阪大学大学院基礎工学研究科

## 1. はじめに

近年，脂質2重層からなる閉鎖系小胞（リポソーム）を生体膜モデルとして用いて，無細胞タンパク質合成系のコンパートメント（区画）化による人工細胞の研究が展開されている[1]．また，リポソーム膜界面での無細胞タンパク質合成の制御，ペプチド断片の酵素様活性の発現，タンパク質の構造形成反応の促進効果など，従来のコンパートメント効果では十分に説明できない現象も報告されている[2]．このような事例の蓄積から，生体膜，それを模倣した2分子膜分子集合体（ベシクル，リポソームなど），ならびに，複数膜からなるシステムは，(1) 通常の条件では安定であるが，(2) 潜在的な機能を保持し，(3) ストレス条件下においてダイナミックに潜在機能の発現を誘導する，と考えられる．筆者らのグループは，これを「メンブレノーム」と定義している[3]．これらの機能の誘導には引き金があるはずである．それを明らかにすることが，上記の問題に応えることになるだろう．このような背景の下，筆者らは，リポソーム固定化技術を活用した相互作用解析ツールを開発し，メンブレノミクス研究を展開してきた．本稿ではその成果の一端を紹介する．

## 2. リポソームを利用する分析手法の展開

生体膜，あるいはそのモデルシステムが感知する刺激・外乱をいかに検出するか？　サイズ排除クロマトグラフィーとリポソーム固定化技術を組み合わせた，固定化リポソームクロマトグラフィー（Immobilized-Liposome Chromatography; ILC）を用い，**図 1a** のように，タンパク質の構造状態を溶出速度の遅れとして検出可能であることを示した[4)-6)]．この溶出速度の遅れは，対象分子の構造変化（疎水性変化）と良好に相関し，対象分子–リポソーム間の疎水性相互作用の定量計測や未知試料の疎水性の評価ツールとして利用できる[4]．しかし，リポソームと対象分子間の疎水性相互作用を誘導するためには，ある程度の構造変化が必要であり（**図 1a** の下段），**カラムの理論段数**の増大による感度の改善が必要であった．2次元固体基板上へのリポソームの固定化は理論段数を極限まで高めることに相当する．そこで，電解質を封入したリポソームを電極上に固定化し，拡散電流を検出する固定化リポソームセンサ（Immobilized-Liposome Sensor; ILS）を開発した[7]．**図 1b** のように，電解質の漏出により，電極近傍で酸化還元反応が進行し，電極への電子移動が起こる．この過程は電極表面反応が律速過程であり，この実験系を用いて微弱な構造変化を捉えることに成功した．しかし，膜攪乱効果の弱いタンパク質の検出は困難であった．電解質の漏出（二次情報）を検出するからである．そこで，質量変化（一次情報）の高感度解析が可能な水晶振動子（QCM）法とリポソーム固定化技術とを組み合わせ，IL-QCM 法を開発した[6]．この方法は拡散電流のような二次情報を利用しない分，高感度である．たとえば，ロイシン1残基だけを光学異性化させたペプチド1と2を明瞭に区別することができる（**図 1c**）[6]．固定化するリポソームの組成を検討することで，対象分子を高感度に検出可能な脂質組成が判明する．さらに探索範囲を広げるため，**図 1d** のように，Indium Tin-Oxide（ITO）に蛍光分子封入リポソームを固定化し，蛍光漏出を網羅的に計測する手法も提案している[3]．この手法により，リポソームの表面状態に関するライブラリー（Membrane Library）を得た．これは目的の脂質組成を探索する有力なツールになる．たとえば「アルツハイマー病原因タンパク質 Aβ を強く検出できるリポソームの脂質組成は？」という問いを考える．酸化脂質含有リポソームは Aβ と強く相互作用するという知見[8] を出発点にすると，ライブラリー上では類似の表面状態である脂肪酸含有リポソームが候補になる[9]．検証の結果，この探索の妥当性が示された[9]．このアプローチにより，ILS や IL-QCM のさらなる高感度化が可能になり，Aβ 検出センサの開発にもつながる．

こういった実験例からわかるように，相互作用解析ツールを駆使することにより，対象分子がどのような

**Membranomics Research Using Liposome Immobilization Technique**

Toshinori SHIMANOUCHI
Graduatie School of Engineering Science, Osaka University

※図 1 は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

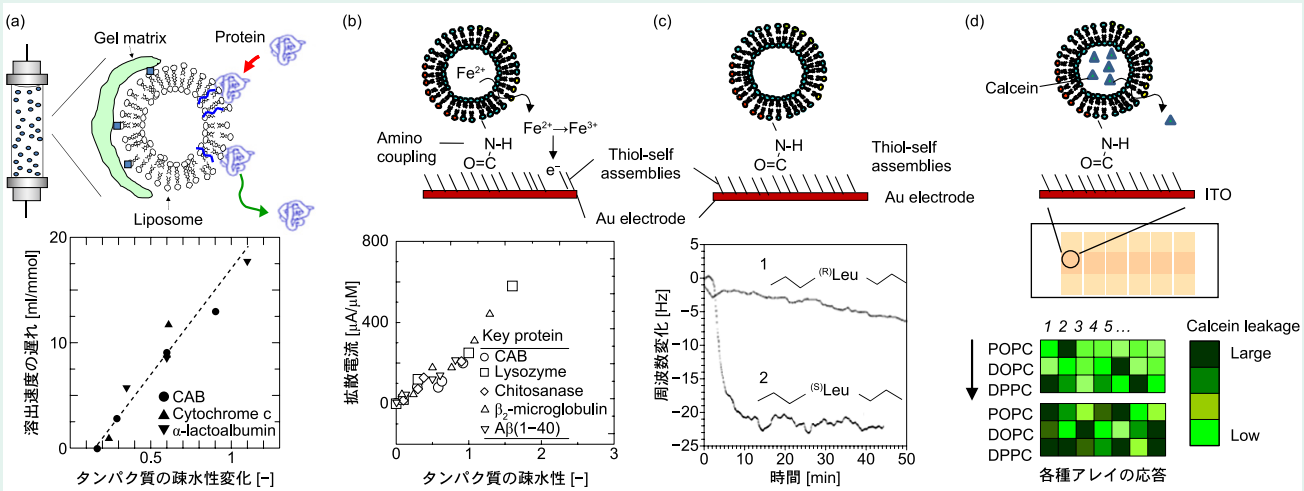



図 1
(a) ILC によるタンパク質の溶出速度の遅れと疎水性変化の関係．(b) ILS により検出した拡散電流とタンパク質の疎水性の関係．(c) IL-QCM によるペプチドの吸着過程のモニタリング．ペプチド 1 と 2 の詳細は文献 6 を参照．(d) ITO 上に構築したリポソームアレイ．サンプルによる応答挙動の統計学的処理法は文献 3 を参照．

組成・相状態の脂質膜界面に配向しやすいかを検討することができる．

## 3. 膜界面のダイナミクスへのアプローチ

メンブレノミクス研究の目標の 1 つは，脂質膜界面に配向する対象分子の構造形成に伴う機能発現過程を解明することである．たとえば脂質膜界面上において，ペプチドやタンパク質は高次構造を変化させる場合があるが，それらの立体構造の安定化エネルギーはたかだか数 kJ/mol である．したがって，脂質膜界面がこの安定化エネルギーを上回る揺動を与えていると考えられる．こういった前提から膜界面ダイナミクスを議論するため，リポソームを構成するリン脂質分子の頭部の運動状態を誘電分散解析（DDA）法により検討した．DDA 法はラベルフリーな非破壊検査法であり，双極子モーメントの微視的な回転ブラウン運動の解析に有用である．リン脂質ホスファチジルコリン（PC）分子の頭部は $PO_2^-$-$(CH_2)_2$-$N^+(CH_3)_3$ なる構造であり，永久双極子を有する．したがって，DDA 法により，脂質膜界面での頭部の運動状態の解析が可能である．得られた結果の解析から，脂質の頭部は，40 〜 50 kJ/mol の活性化エネルギーで回転ブラウン運動をしていることがわかった[9]．脂質膜に配向したペプチドやタンパク質は，脂質頭部に摂動を制限されており，立体構造の安定性が変化しているのだと考えられる．

## 4. おわりに

脂質膜界面の分子の運動性が，膜界面に配向したタンパク質やペプチドの立体構造を制御する．膜界面によるタンパク質の無細胞合成系の制御やペプチドの酵素様機能の誘導などの現象もこの機構により説明できるかもしれない．膜界面が誘導する（潜在的な）機能/現象を総括的に理解できる枠組みの 1 つであるメンブレノミクス研究は，今後の生物物理の重要な一翼を担うと期待している．

## 謝　辞

本稿は，久保井亮一名誉教授，馬越大教授（大阪大院・基礎工），ならびに研究室の学生，卒業生の研究による成果であります．謹んで感謝します．

## 文　献

1) Sunami, T. *et al.*（2010）Langmuir **26**, 8544-8551 など．
2) Umakoshi, H. *et al.*（2010）J. Biotechnol. **147**, 59-63 など．
3) Shimanouchi, T. *et al.*（2009）Membrane **34**, 342-350.
4) Yoshimoto, N. *et al.*（2006）Biochem. Eng. J. **29**, 174-181.
5) Shimanouchi, T. *et al.*（2007）Biochim. Biophys. Acta **1768**, 2726-2736.
6) Shimanouchi, T. *et al.*（2009）ChemBioChem **10**, 1978-1981.
7) Jung, H. S. *et al.*（2007）Membrane **32**, 294-301.
8) Koppaka, V. *et al.*（2003）J. Biol. Chem. **278**, 36277-26284.
9) Shimanouchi, T. *et al.*（2010）Desal. Water Treatment **17**, 45-51.
10) Shimanouchi, T. *et al.*（2011）Colloids and Surfaces B, **88**, 221-230.

島内寿徳

**島内寿徳（しまのうち　としのり）**
大阪大学大学院基礎工学研究科助教
2000 年大阪大学大学院基礎工学研究科・博士後期課程退学，01 年同助手，07 年助教，博士（工学）
研究内容：メンブレノミクス研究によるアミロイドーシス機構の解明
連絡先：〒 560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3
E-mail: tshima@cheng.es.osaka-u.ac.jp

生物物理 52（3），156-157（2012）

トピックス

# 解鎖タンパク質構造の新規高速生成法

関　安孝　岩手医科大学薬学部

## 1. はじめに

タンパク質は主鎖がほどけた（解鎖）状態ではどのような構造的な特徴をもつのか．この素朴な疑問は，球状タンパク質の折りたたみ問題や安定化機構の解明には決定的に重要である．なぜなら，折りたたみ問題では解鎖状態はその初期状態と考えられるし，安定性は天然状態と変性解鎖状態の自由エネルギー差で定義されるからである．さらに近年では，天然変性タンパク質の機能の重要性が認知され，よりいっそう解鎖タンパク質の構造特性に注目が集まっている．

典型的な解鎖状態である高濃度の変性剤による変性状態は，溶液X線散乱（SXS）法から得られる，平均2乗半径（$R_{sq}$）の残基数依存性[1]とSXSプロフィル（散乱強度の角度依存性）の形状[2]，および多次元NMR法による$^{3}J_{HNC\alpha}$結合定数[3]から，所謂ランダムコイル鎖であると考えられている．ところが，多次元NMR法による残余双極子結合（RDCs）は，ホモポリペプチド鎖の予測値と異なり，配列に依存した特徴的な値を示すことが示されている[4]．

このように解鎖タンパク質では，異なる測定法から得られる構造特性が，一見矛盾してしまうことがある．これは解鎖状態が膨大な数の構造のアンサンブルとして存在し，各測定法はその一断面を見ているにすぎないことが原因である．これら多様な測定結果と矛盾しない解鎖タンパク質の構造アンサンブルを計算機内に生成することができれば，この矛盾が解消されるだけでなく，実験からはわからない，より詳細な構造特性が明らかになるはずである．ここでは，筆者が新規に開発した解鎖構造生成法の特徴と，例としてSXS実験との比較による解析結果を紹介する．

## 2. 主鎖2面角頻度分布に基づく解鎖構造生成法

筆者が開発した構造生成法[5]の特徴は，予め指定する任意の主鎖2面角（$\phi$, $\psi$）の頻度分布を使って解鎖構造を生成することにある．得られる構造アンサンブルの主鎖2面角分布は，用いた2面角頻度分布に一致する．つまり，構造生成に用いる主鎖2面角頻度分布に多様性をもたせることで，同じランダムペプチド鎖であっても構造特性の異なる構造アンサンブルを生成することができる．ここでは，各アミノ酸残基が他の残基の影響を受けず独立に，かつランダムに残基構造が決まる構造をランダムペプチド鎖とよんでいる．

本構造生成法のもう1つの特徴は，その高速性である．PDBから抽出した主鎖2面角頻度分布を用いることで，隣接残基間の原子間立体障害を予め排除することができる．さらに，われわれが独自に開発した鎖伸長アルゴリズム（詳しくは文献5参照）により，配列上離れた残基間の立体障害の検出と回避の計算時間を最小化することができる．また，得られる構造は，すでに局所エネルギー最小状態であり，構造最適化が必要ない．以下では，これらの特徴を生かした解析例を示す．

## 3. $R_{sq}$の残基数依存性の実測との比較

SXS実験から得られる$R_{sq}$は，鎖状高分子の大局的な構造特性を反映する．ヘテロポリマーであるタンパク質の場合でも，高濃度変性剤による変性状態において，残基数の異なるタンパク質の$R_{sq}$が測定され，その残基数依存性[1]が求められている．

$$R_{sq} \approx R_0 \cdot N^{\nu} \qquad (1)$$

ここで，$\nu$はスケーリング指数であり，ランダムフライト鎖（$\nu = 0.5$）や排除体積効果を考慮した統計鎖（$\nu \approx 0.6$）で理論的に値が示されている．$R_0$は長さの次元をもつ量であり，$N$は残基数である．本来$N$は残基間をつなぐ仮想結合の数であるが，$N$が大きい場合は近似的に上式が成り立つ．文献1で実測値から求まったパラメータとわれわれの計算結果の比較を**図1**に示す．この解析では，104～379残基にわたる12種類の異なるサイズのタンパク質の解鎖構造を使用した．1つのタンパク質につき，6種類の異なる主鎖2面角頻度分布を用いた．これらの頻度分布は，残基がPDBの構造中でとる2次構造の種類を使って分類し

A New Efficient Method for Generating Conformations of Unfolded Proteins
Yasutaka SEKI
School of Pharmacy, Iwate Medical University

構築される．（詳細は文献 5 参照）生成される構造はランダムポリペプチド鎖であり，α-helix や β-sheet は含まれない．したがって，これら分布の主要な差は（$\phi$, $\psi$）マップ上での α 領域（$\phi = -65°$, $\psi = -45°$ 付近，α ヘリックス構造の採る 2 面角領域）への出現頻度（$\eta_\alpha$）である．**図 1** の横軸は，この分布の違いを反映している．計 72 種類の構造アンサンブル（タンパク質種 12×頻度分布 6）は，それぞれ $10^7$ 個の構造からなる．この解析ではさらに，文献 6 の方法と同様に，溶媒露出表面積に比例する溶媒和自由エネルギーを仮定し，ボルツマン因子による統計重率を用いた重み付け平均を行った．**溶媒和パラメータ σ** が，正であれば貧溶媒，負であれば良溶媒を意味する．

**図 1a** から，変性剤変性状態タンパク質は，良溶媒，つまりペプチド鎖は溶媒に露出する傾向にあることがわかる．さらに**図 1b** から，主鎖 2 面角頻度分布は，$\eta_\alpha$ が 20% 以上必要であることがわかる．このような重み付け平均をすると，実質的なサンプル数は激減するが，高速に構造が生成可能な本法では解析可能である．

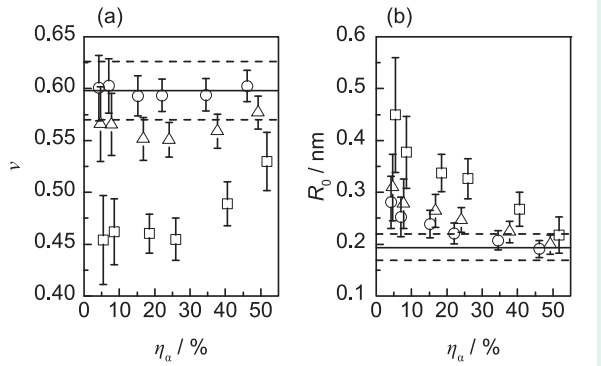



図 1
高濃度変性剤変性状態タンパク質 $R_{sq}$ の残基数依存性パラメータの実験と計算の比較．実線と破線は実験から得られた値とその誤差を示す．各点は計算値を示す．横軸は主鎖 2 面角の α 領域出現頻度，点の形は溶媒和パラメータの値，σ（◯:−10，△:0，□:+10 J mol$^{-1}$ Å$^{-2}$）を示す．文献 5 の Fig. 8 を改変した．

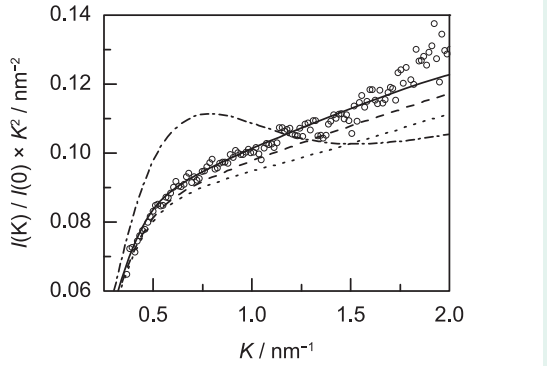



図 2
尿素変性アポミオグロビンの Kratky Plot．白丸は実測値[7]，線は計算値である．線種（$\eta_\alpha$/%, σ/J mol$^{-1}$ Å$^{-2}$）：実線（35, −10），破線（23, −5），点線（17, 0），一点破線（9, +10）．文献 5 の Fig. 9 を改変した．

## 4. SXS プロフィルの実測との比較

同様の構造生成法，重み付け平均を用いて，実測の SXS プロフィルとの比較をした結果を**図 2** に示す．計算 SXS プロフィルは，30 個（頻度分布 6 種×溶媒和パラメタ 5 種）の中から，実測 $R_{sq}$（5M Urea アポミオグロビン：4.36 nm[7]）に近い値を示す 4 つの SXS プロフィルを**図 2** に示している．**図 2** より明らかに $\eta_\alpha = 35\%$，$\sigma = -10$ J mol$^{-1}$ Å$^{-2}$ の構造アンサンブルが最も実測を再現する．この結果は，**図 1** で示した結果と一致する．

**図 2** のような SXS プロフィルが実験で得られた場合，ランダムコイル鎖であると一言で片付けられる場合が多いが，本構造生成法を用いた解析をすることで，より詳細な構造特性に関する知見を得ることができる．

## 5. 今後の展開

ここでは SXS 法を使った解析例を示したが，構造をもとに実測値を予測計算できる方法であれば，同様の解析が可能である．特に NMR の化学シフトや RDCs などには，解鎖タンパク質の配列部位に固有の構造特性の情報が含まれると期待される．今後，本構造生成法は解鎖タンパク質の詳細な構造特性の解析に有効活用が期待される．

## 文　献

1） Kohn, J. *et al.*（2004）Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 12491-12496.
2） Kataoka, M., Goto, Y.（1996）Fold. Des. **1**, R107-R114.
3） Smith, L. J. *et al.*（1996）J. Mol. Biol. **255**, 494-506.
4） Jensen, M. R. *et al.*（2009）Structure **17**, 1169-1185.
5） Seki, Y. *et al.*（2011）J. Chem. Theory Comput. **7**, 2126-2136.
6） Wang, Y. *et al.*（2008）J. Mol. Biol. **377**, 1576-1592.
7） Seki, Y. *et al.*（2007）Biochemistry **46**, 234-244.

**関　安孝（せき　やすたか）**
岩手医科大学薬学部構造生物薬学講座講師，2001 年長岡技術科学大学工学研究科博士課程修了，博士（工学）
研究内容：計算機を用いたタンパク質の構造と物性
連絡先：〒 028-3694 岩手県矢巾町
E-mail: sekiyasu@iwate-med.ac.jp

関　安孝

生物物理 52（3），158-159（2012）

トピックス 新進気鋭シリーズ

第49回 日本生物物理学会年会 若手招待講演

# 2光子蛍光寿命イメージングによるRho GTPase活性化の単一シナプスレベル可視化解析

村越秀治 自然科学研究機構・生理学研究所

## 1. はじめに

神経回路の形成，機能の基礎となるシナプス結合の可塑性は，シナプスの後端を形成する**スパイン**内のカルシウムシグナルによって制御されていると考えられるが，スパインのサイズは0.1フェムトリットル程度と非常に小さく，しかも組織深部に位置するため，内部で起こるシグナル伝達は，これまでほとんど明らかにされてこなかった（**図1a**）．しかし最近，2光子蛍光寿命イメージング法の進歩により，組織深部で分子同士の相互作用や活性を可視化することが可能になった[1),2)]．申請者らはこの方法を用いて，海馬組織中のスパイン内で低分子量Gタンパク質Rho GTPaseの活性化を可視化することに成功し[3)]，これらの分子がシナプス可塑性を引き起こすために必須であることを明らかにしたので報告したい．

## 2. Rho GTPase

スパイン内にはアクチンが密集しており，その重合状態が可塑的変化，すなわち，スパインの形態やシナプス伝達効率に大きな影響を与えることがわかりつつあった（**図1a**）[4)]．そこでわれわれは，アクチン重合を制御するRho GTPaseに着目し，これらの分子の活性を観察することでシナプス可塑性の制御機構を調べることにした．Rho GTPaseの活性制御はGDP/GTP交換因子やGTPase活性化タンパク質との相互作用によって行われている[5)]．活性化により，分子構造が大きく変わるため，下流のエフェクター分子とのアフィニティーが大きく増加する．これによって，下流分子の局在を変化させたり，キナーゼ活性を上昇させることでシグナル伝達を制御している．

## 3. 2光子アンケイジング刺激による活性化観察

本研究では，神経細胞がネットワークを保ったままで観察を行うために，ラットの海馬のスライス（厚み300 μm程度）を用いて，次のような手順で実験を行った．1）Rho GTPaseであるCdc42とRhoAの活性を観察するためのFRETセンサーをそれぞれ作製した（**図1b**）．すなわち，単量体GFPを融合させたCdc42をFRETのドナーとし，下流のシグナル分子であるPak3の活性化Cdc42結合ドメインにmCherryを2つ融合させたものをアクセプターとした[3)]．また，RhoAのFRETセンサーも同様の方法で，アクセプターとしてRhotekinの活性化Rho A結合ドメインを用いることで作成した[3)]．次に，遺伝子銃を用いて，スライス中の神経細胞に，Cdc42，あるいはRhoAのFRETセンサーを発現させた．2）720 nmのレーザーでケイジドグルタミン酸[6)]をスパイン先端付近の1 μm程度の領域のみで2光子アンケイジ（0.5 Hz，30パルス）することで，単一スパイン刺激を行った．アンケイジされたグルタミン酸はNMDA受容体に結合し，スパイン内へのカルシウム流入を引き起こすことによって長期増強を誘起する（**図1a**）[6),7)]．3）このようにしてスパインに可塑的変化（体積増加）を誘起させ，同時にRho GTPaseの活性を自作の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡で可視化した[3)]．

## 4. Rho GTPase活性化の時空間分布

FRETセンサーを発現した神経細胞の樹状突起上の1個のスパインを刺激して長期増強を誘起したところ，スパインの体積増加と共に，非常に大きなCdc42とRhoAの活性化（FRETの増加）が見られた（**図1c, d**）．興味深いことに，Cdc42とRhoAは構造が非常に似ているにもかかわらず，空間的に異なる活性分布を示した．すなわち，Cdc42の活性はスパインに限局しており，RhoAの活性は樹状突起へと広がっていた（**図1c**）．そこで，空間分布の違いが拡散速度によるものであるかどうかを調べるために，光活性型GFPを融合させたRho GTPaseのスパイン内での滞在時間を調べたところ，Cdc42とRhoA共に5秒程度と非常

**Imaging Rho GTPases Activation in Single Dendritic Spines by 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy**

Hideji MURAKOSHI
National Institute for Physiological Sciences

※図1は，電子ジャーナル（http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/）ではカラー版を掲載しています．

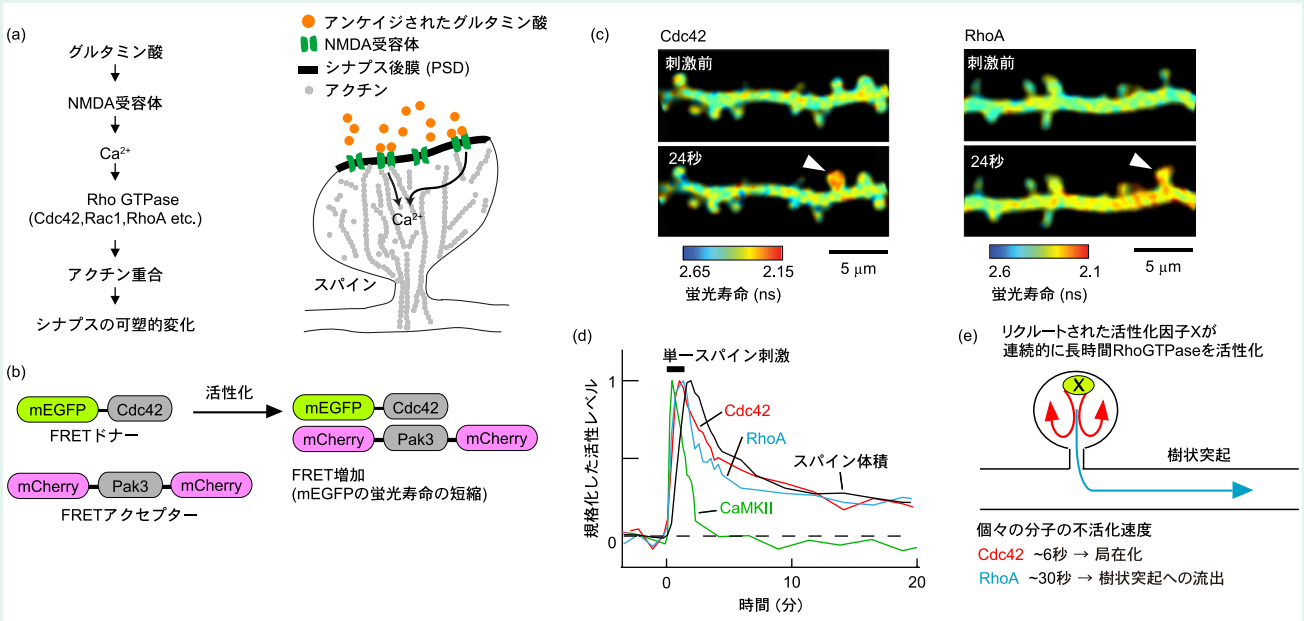



図 1
(a)（左）Rho GTPase にかかわるシグナル伝達カスケード（右）スパインの模式図．シナプス後部（樹状突起側）にあるマッシュルーム様の構造がスパイン．(b) Cdc42 FRET センサーの模式図．mEGFP を 920 nm のレーザーで 2 光子励起し，蛍光寿命をモニターする．(c) Cdc42 と RhoA のスパイン刺激後の蛍光寿命イメージ．暖色（蛍光寿命が短い方）は活性が高いことを示す．(d) アンケイジング刺激後のシグナル分子活性化とスパインの体積変化のタイムコース．(e) モデル図．スパイン刺激後に活性化因子がスパイン内にリクルートされ，Rho GTPase を数十分以上の間連続的に活性化し続ける．個々の Cdc42 はスパイン内で活性化された後，樹状突起へ拡散するよりも前に不活化される．RhoA は不活化速度が遅いため，活性化された状態で樹状突起へ拡散する．このように，常に活性化と不活化を連続的に続けることで長時間の局所的な活性化を可能にしている．図は文献 3 より改変．

に短時間であった[3),8)]．すなわち，Cdc42 の局在化した活性は，拡散が遅くなることによってではなく，個々の分子の早い不活化によるものであると考えられる（**図 1e**）．次に，各分子の活性化のタイムコースをみると，まず，CaMKII が一過的に数十秒程度活性化する[9)]．続いて Rho GTPase の活性化が起こり，刺激開始後 1 分でピークに達した後，元のレベルよりも少し高い位置で数十分以上安定化し，スパインの体積変化との相関が見られた（**図 1d**）．次に，Rho GTPase の機能を調べるため，薬剤処理や shRNA を用いて Cdc42，あるいは RhoA の活性を阻害したところ，RhoA の活性化はスパイン体積増大のトリガーとして，また，Cdc42 は体積増大を維持するためのメモリー分子として機能していることが明らかになった．

## 5. おわりに

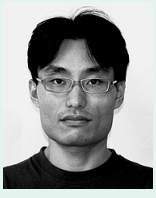
2 光子蛍光寿命法と 2 光子刺激を組み合わせることで，細胞がネットワークを保ったままでスパイン形態の変化とタンパク質の活性状態を同時に観察することができるようになった．今後，さまざまな分子の働きを見ることによってシナプス可塑性の仕組みが詳細に解明されるであろう．

## 謝　辞

本稿で紹介した研究は，筆者が Duke 大学博士研究員として，安田涼平研究室で行ったものの成果であり，ここに深謝いたします．

## 文　献

1) 村越秀治ら（2008）実験医学増刊 **26**, 30-37.
2) Yasuda, R. *et al.*（2006）Nature Neurosci. **9**, 283-291.
3) Murakoshi, H.（2011）Nature **472**, 100-104.
4) Okamoto, K. *et al.*（2004）Nature Neurosci. **7**, 1104-1112.
5) Luo, L. *et al.*（2000）Nat. Rev. Neurosci. **1**, 173-180.
6) Matsuzaki, M. *et al.*（2004）Nature **429**, 761-766.
7) Noguchi, J. *et al.*（2005）Neuron **46**, 609-622.
8) Yasuda, R.（2011）Curr. Opin. Neurobiol. **21**, 313-321.
9) Lee, S. J. *et al.*（2009）Nature **458**, 299-304.


村越秀治

**村越秀治（むらこしひでじ）**
自然科学研究機構生理学研究所准教授
2005 年名古屋大学理学研究科生命理学博士課程修了（理学博士）．05 年～07 年日本学術振興会特別研究員．07 年～11 年デューク大学神経科学部門にて研究員．11 年 7 月より現職（11 年 10 月より JST さきがけ研究者兼任）．
研究内容：神経細胞内シグナル分子の可視化と操作
連絡先：〒 444-8585 愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38
E-mail: murakosh@nips.ac.jp

生 物 物 理 Vol.52 No.3（2012）

# 支 部 だ よ り

## 2011 九州支部例会報告
## 2011 日本生物物理学会九州支部例会運営委員会

入佐正幸

九州工業大学情報工学部

2011 年 12 月 4 日に福岡県飯塚市のがみプレジデントホテルにて，「2011 日本生物物理学会九州支部例会」が開催された．午前 9 時から午後 5 時までの間に，基調講演 2 件（テーマは「蛋白質分子の分子認識と機能の相関」）を含む発表が行われた．当日参加者を含む参加者数は 69 名であった．九州支部（開催時の支部長は九州工業大学の皿井明倫）ではしばらく例会が開かれていなかったため，事実上の第 1 回という位置づけになった．なお，この例会のプログラムおよび口頭・ポスター発表の著者・演題は，

www.irisa-lab.bio.kyutech.ac.jp/1stKyushuAnnualMeeting BPSJ/

に掲載しているので，興味がある方はぜひご覧下さい．

基調講演 1 として，金谷茂則先生（大阪大学大学院工学研究科）に「リボヌクレアーゼ H の基質認識機構」と題してご講演いただいた．リボヌクレアーゼ H は RNA/DNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを選択的に切断する．RNA/DNA の基質認識部位の特徴や 2 価の金属イオンをもつ活性部位について，最新の X 線結晶構造解析を元に，さまざまな角度から解説が行われた．背景では，このタンパク質が HIV-1 の増殖に必須でありエイズ治療薬開発につながることが紹介され，聴衆の興味を誘っていた．リボヌクレアーゼ H と立体構造が類似しているタンパク質に，この例会の別の発表者が題材としている制限酵素 EcoRV や基調講演 2 の若林先生が題材としているモータータンパク質アクチンが含まれることから，冒頭から活気をおびた質疑が行われた．

金谷茂則先生

若林健之先生

基調講演 2 として，若林健之先生（帝京大学・理工）に「アクチンフィラメントにおける分子間相互作用」と題して，ご講演いただいた．電子顕微鏡法，X 線結晶解析法，NMR 法など各種の構造解析法を駆使して，アクチンフィラメントを基盤とした相互作用を原子レベルから理解できるようになったことに参加者は興味深く聞き入っていた．アクチンフィラメントの重合に関する物理学観点からの質疑応答もあり，また，講演終了後も議論が続くなど，本会の締めくくりにふさわしい，基調講演となった．

一般研究発表では，11 題の口頭発表（講演 10 分＋

E-mail: irisa@bio.kyutech.ac.jp

支部例会参加者の全体撮影

質疑応答 5 分）と 32 題のポスター発表（90 分）が行われた．口頭発表では，学生の発表が多かったにもかかわらず，レベルの高い内容があり，有意義な議論がなされた．ポスター発表は，学生による未完成な研究の発表が多かったが，ポスドク，教員の参加者による活発な質疑応答が行われ，今後の研究を発展させる上で有益であっただけでなく，学生への教育的効果も大きいと感じた．今回，学生による積極的な研究発表を奨励するため，発表賞を設けた．古賀由香里さん（熊本大薬）による「hMTH1 の基質認識機構：pH との関係性について」と，渡邊慶太さん（九州工大情報工）による「冷陰極電界放出銃を用いたクライオ電子顕微鏡法による小さい生体分子複合体構造解析への挑戦」の 2 題が受賞した．また，非会員の方からも演題をお寄せいただき，お互いに刺激を受けた．支部例会は，学会の枠を超えた交流の場としても活用できる可能性があると感じた．

ここ数年生物物理学会の年会での発表が英語になったこともあり，年会での発表は若い人特に学生にとっては少々敷居が高くなっている．また，分野が細分化して，いろいろな分野の人が混じって討論できるような機会が少なくなったように感じる．生物物理学会九州支部ではしばらく例会を開いてこなかったが，このような状況もあるので，できるだけいろいろな研究分野の学生や若い研究者が気楽に発表して討論ができるような場を提供するため，例会を開くこととなった．今回は開催地である九州工業大学が交通の不便な場所にあるので，できるだけアクセスの便を計るため，駅の近くのホテルを会場とすることになった．それでも，福岡市のような知名度がないので集まってもらえるか心配したが，結局は用意した会場がほぼ一杯になり，口頭発表とポスター発表でも活発な討論が行われ安心した．数十年前のまだ小さかった生物物理学会年会の雰囲気を思い出した．今後もこのような例会を定期的に続けていければよいと思う．

この例会の運営は，2011 日本生物物理学会九州支部例会開催委員会により行われた．委員（50 音順）は，入佐正幸（九州工業大学情報工学部生命情報工学科）：総括，小松英幸（同上）：連絡（案内），皿井明倫（同上）：プログラム（予稿），藤井聡（同上）：会計，安永卓生（同上）：会場，である．もちろん，この例会は九工大の学生を含むさまざまな方々の助力によって開催にこぎつけることができた．この場を借りて深く感謝したい．なお，この原稿は入佐（1, 2 節），安永（3），小松（4），皿井（5）が下書きを執筆し，入佐が全体をまとめた．

生 物 物 理 Vol.52 No.3（2012）

# 若 手 の 声

## 会長交代のご挨拶
## 関西支部京都の活動へおこしやす

山本暁久
京都大学大学院理学研究科吉川・市川研究室 D2

### 会長挨拶

京都大学大学院理学研究科吉川・市川研究室 D2 の山本暁久です．昨年の会長である都築峰幸さん（名大）から引き継いで，今年の 1 月から 1 年間，生物物理若手の会の会長を務めています．M1 のときに軽い気持ちで夏の学校に参加して以来，京都支部長と夏学校長を経て会長もやらせていただくことになりました．よろしくお願いします．

若手の会の活動は「夏の学校（夏学）」「支部セミナー」の 2 つに大別できます．今年の夏学は柴崎宏介さん（北大・D2）が校長を務め，北海道支部が企画・運営をしています．支部は現在，北海道，関東，中部，関西にあり，各地で研究交流と情報交換のためのセミナーが不定期的に行われています．

### 若手の会への誘い

若手の会の活動で特に皆さんに知ってもらいたいのが，自分と同年代の若手研究者が何に興味をもっているかを簡単に，かつ気軽に知ることができるということです．これは，研究のネットワークを広げる 1 つのきっかけになり，自分自身の研究生活を充実させるうえでたいへん有用な経験になると思います．学部生・大学院生が普段研究室で生活している中では，このような機会はそれほど多く経験できるものではないでしょう．若手の会の活動は，HP（http://bpwakate.net/）や ML，Twitter（@bpwakate, @bpwakate_event）で確認していただけますので，ぜひ一度，若手の会の活動をのぞいてみてください．また，活動内容は役員の自主性に委ねられているので，「役員になって，セミナーで○○先生を招待したい」「一緒に夏学をつくってみたい」といった希望がある方は，ぜひ名乗りをあげてください．

関西支部は，去年までの京都，大阪，神戸支部を一時的に統合したもので，機会があればまた独立して活動できるようになるとよいと思っています．また，支部のない東北や九州からも夏の学校への参加は毎年あるので，新しく支部を興したいという方がいらっしゃれば歓迎します．ぜひご連絡ください．

最後に，平素より若手の会の活動にご支援ご協力いただいている，生物物理学会会員の皆様および研究機関と企業の皆様，そして若手の会の役員をはじめとする皆様に厚くお礼申し上げます．

E-mail: yamamoto@chem.scphys.kyoto-u.ac.jp

鈴木まゆ
京都大学大学院工学研究科梅田研究室
大阪大学大学院理学研究科後藤研究室

### 京都からこんにちは

はじめまして．生物物理若手の会関西支部の京都を担当しております，鈴木まゆです．会長の山本さんの挨拶にもありましたように，今年から関西の方では支部が合併しました．支部長というのにはどうも抵抗がありまして，「担当」とさせていただきました．

私の生物物理若手の会との出会いは 2010 年の夏の学校でした．もともと私は，学部では物理を学び，修士課程から京都大学梅田研で生物の視点から膜についての研究を行ってきました．入学当時は，恥ずかしながら生物物理という分野についてあまり知りませんでしたが，梅田研准教授の池ノ内さんに導かれる形でこの分野を知り，夏の学校に参加しました．その際に支部活動に誘われ，現在にいたります．

### ジャーナルクラブ

生物物理ではいろいろなモノを材料に，いろいろな方法で研究が行われていて，それがとても魅力的です．自分自身の研究に対してもさまざまなアプローチ方法があり，それを論文から学ぼうと努めます．けれども，私のように生物の実験をおもにやっている学生にとっては，シミュレーションの論文や理論攻めの論文を読むのは非常に難しいものです．またその逆もあ

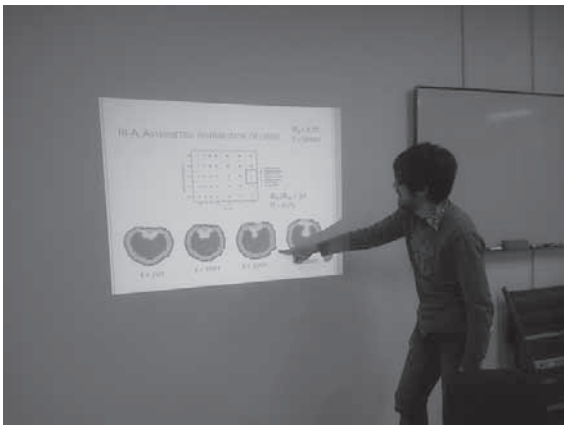
E-mail: m-suzuki@protein.osaka-u.ac.jp

ると思います．そこで京都支部では，生物よりの学生も，物理よりの学生も，シミュレーションをしている学生もいることから，それぞれのバックグラウンドでおもしろいジャーナルを紹介しあおうという「ジャーナルクラブ」をはじめました．

- 第 1 回　12 月：鈴木まゆ@京大梅田研
  Daniel Lingwood *et al.*（2011）Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nature Chemical Biology*, 7, 260-262.
- 第 2 回　1 月：堀直人@京大高田研
  Philip M. D. Severin *et al.*（2011）Cytosine methylation alters DNA mechanical properties. *Nucleic Acids Research*, 39, 8740-8751.
- 第 3 回　2 月：山本暁久@京大吉川研
  Kai Yang *et al.*（2009）Shape deformation and fission route of the lipid domain in multicomponent vesicle. *Physical Review E*, 79, 051924.

このように今のところ月 1 ペースです．研究室でのジャーナルクラブでは「こんな基本的なこと聞いていいのかな」とか「的はずれなこと聞いても大丈夫なのかな」などと思う学生も少なからずいると思うのですが，京都支部でのジャーナルクラブは，ラフなスタイルで，思ったことを思ったときにいうというかたちになっています．少しでも疑問に思ったら聞く．質問されて担当者がわからなくても，みんなで考えてみる．1 時間強の時間を使って，ジャーナルをみんなで読む．なかなか 1 人ではこの手の論文は読むのが難しいだろうな，読まないだろうなと思うものでも，人に説明してもらい，疑問に思った時点で質問をして解決していくと，「そういうふうに考えたらいいのか」「こういう図はこういうふうに解釈すればいいんだな」とわかってくるものです．とても有意義な時間だと個人的には思っています．ただ，せっかくいろんな分野の論文を読むことのできるよい機会なのですが，参加者が多くないということが少し寂しいです．

これを読まれている，近畿圏にお住まいのあなた！学生のあなた！　次回のジャーナルクラブに参加してみませんか？？　月に 1 度程度で，おもに土曜日の夕方から開催しています．和気あいあいとした寄り合いになっています．ぜひ，参加してください．詳細な情報は若手の会のメーリングリストよりみなさまにお知らせいたします．みなさまの参加をお待ちしております．



第 3 回ジャーナルクラブのようす．
参加者の質問に答える発表者の山本さん．

## その他セミナー

関西支部（京都）では，ジャーナルクラブの他にもいろいろなセミナーを企画しています（原稿執筆は 3 月）．4 月末には若手の会京都支部のメンバーで，それぞれの学振申請書の見せ合い・意見交換会を行う予定です．提出予定の学生が，少し分野の離れた学生に申請書を読んでもらい，わかりにくいところや読んだ感想をいい合う会になると思います．このような企画であったため，少人数性の会にする必要があり全体への告知は避けました．顔見知り，少人数性ならではの率直な意見を聞くことができる有意義な会となると思います．また，5 月 19 日（土）に，プロジェクトをとるとはどういうことなのかを題材にした講演会を開催する予定です．大きなプロジェクトをとられたことのある先生をお招きし，プロジェクトを①とるまで ②期間中 ③終了後について，お話ししていただこうという企画です．申請書を書きプロジェクトをとり，どのような研究を行い，どのような成果を得たのか．研究者をめざす学生が，このようなお話を聞けるというのは非常に意味があると思っています．

## 最後に…

いちばん最初の私の所属先に 2 つの所属先があって，こりゃなんだ？と思われる方もおられるかもしれません．私は，先で述べましたように修士課程 2 年間は京大梅田研で学んでいましたが，今年の 4 月からは阪大後藤研でお世話になっています．この記事の執筆時期は 3 月でしたし，生物物理の世界に足を踏み入れるきっかけを与えてくださったのは梅田研の先生だったので，感謝の気持ちを込めて 2 つの所属先を書かせていただきました．

生 物 物 理 Vol.52 No.3（2012）

# 海外だより

## ～米国若手 PI の或る平凡な 1 日～

井上尊生

ジョンズホプキンス大学

### はじめに

修士・博士課程では東大薬学部の長野哲雄先生，菊地和也先生のもとでケミカルバイオロジーを学び，東大医学部の飯野正光先生，廣瀬謙造先生のもとで薬理・生理・細胞生物を学ぶ．特に当時助手であった菊地・廣瀬両先生にはたいへんお世話になり，このとき授かったすばらしい教育には感謝してもしきれない．2003 年に学位取得後，スタンフォード大学医学部の Tobias Meyer 先生のもとでシステムズバイオロジーを学ぶ．Tobias の研究室は日本の徒弟制に近い．特に何かを積極的に教えてくれることはなく，機会があれば自分で見て覚える．世界中の優秀なポスドクが集まっているので，みなすでにかなり自立しているのだ．2008 年よりジョンズホプキンス大学医学部で研究室を開き，現在にいたる．ダイナミックな細胞運動を詳細に記述・理解・再構築することをめざしている．既存の実験技術で対応できないような問題を解決するために，有機化学，細胞生物学，バイオエンジニアリング，計算化学，生物物理そして構成生物学の知識・概念・技術を有機的に取捨・融合・駆使している．今回，米国での若手研究者がどのような研究生活を送っているか紹介したいが，“海外だより”のバックナンバーに大部分のことはカバーされているようである．そこでもっと具体的に，すなわち筆者の或る平凡な 1 日がどのようであるか，時系列を追ってまとめてみた．

2012 年 1 月 25 日

6:30　起床

6:32　歯を磨き，朝と昼のごはんを箱に詰める．

7:00　着替えて，家を出る．車で出勤．

7:25　研究室着．お茶を入れる．DNA シークエンスの結果をチェック．お茶はだいたい飲まない．

7:35　エタ沈ミニプレップ開始．一次繊毛プロジェクトに関連したプラスミド，36 サンプル．研究棟はオープンラボスタイルなので，10 個ほどのラボが入っている全フロアーが見渡せるが，まだ誰もいない．

8:45　制限酵素処理による確認を開始．この間ずっと，となりのラボから流れてくれる US ポップを聞く．誰か消し忘れたらしく，同じ曲を何十回と聞くはめに．Steven（バイオメディカルエンジニアリング，以後 BME，の大学 4 年生）と昨日の実験についてと，この曲についてディスカッションする．

10:00　朝ごはんを食べる．明日の授業で使うスライドを確認．講義内容はチロシンキナーゼ概論で，前半は分子レベル，後半は機能・病態レベルで解説する．Brian（BME 大学院 1 年生）と Virtual Cell を用いて，膜脂質とタンパク質の結合様式をモデリングすることについてディスカッション．

11:00　制限酵素処理終了．14 コンストラクトのうち 12 コンストラクトは OK．Allison（細胞分子生物学専攻，以後 BCMB，の大学院 2 年生）と膜構造が細胞遊走に与える影響についてディスカッション．

12:00　ラボミーティング．Ben（BME 大学院 5 年生）が担当．お昼ごはんを食べながら参加．マイクロ流路系の最適化についてと，COMSOL を用いての偏微分方程式による一次繊毛内におけるタンパク質拡散シミュレーションについてのプログレスレポート．

13:30　Steven と一次繊毛内でのカルシウムイメージングについてディスカッション．

14:20　Melinda（BME 大学 2 年生）とディスカッション．共焦点顕微鏡を用いて経時測定した細胞辺縁の運動を，定量解析している．統計処理について説明．

14:50　最近発表した Science Signaling の論文についてインタビューを受けたときの原稿を校正する．プレスリリースはシンプルでわかりやすい方が良いとのことで，Lowe 症候群のことはカットされた．

15:15　Nature，Science，Science Signaling をチェック．MIT の Ron Weiss 先生の特集を読む．10 年も前から，細胞の中にコンピューターを構築しようとしている，構成生物学のパイオニアの 1 人．

16:00　Beckman Young Investigator という若手研究者向けのグラント獲得のための研究提案を書く．アメ

E-mail: jctinoue@jhmi.edu

リカの景気がここ何年か悪く，財団への寄付金が減ったこともあり，このグラントは一時中断．今回募集が再開されたが，ここ数年分の研究者がどっと押し寄せるので，かなり競争が激しくなると予想される．

17:00　Nature Chemical Biology にアクセプトになった論文の校正．Bob（テクニシャン）と Fumi（ポスドク）がすでに直したものを最終チェック．

17:30　BME の大学院応募者の採点・評価．ジョンズホプキンスのこの学部は全米でもトップレベルなので，非常に優秀な学生がいる．面接が楽しみ．

18:20　道路の混雑状況をパソコンで確認してから，オフィスを出る．

18:55　帰宅．手を洗って，うがいをして，着替える．Tachi（4 歳の息子）とサッカーとかくれんぼを合わせたような遊びをする．家族と夕食．

20:00　植物ホルモンを使った論理ゲートを細胞内に構築した最近の仕事に関して，Fumi が“新着ライフサイエンスレビュー”用に書いた原稿を直す．

20:30　Tachi にピアノを教え，一緒にお風呂．

21:30　この原稿用に今日 1 日の記録をまとめる．一次繊毛に関する論文，Biochemical Journal からの査読依頼を受けた論文，Chemical & Engineering News などを読む．

24:00　就寝．

ポスドクのときとの違いは，実験が減り，デスクワーク・ディスカッションが増えたことである．またメールの送信数も飛躍的に増えた（この日は 23 通．2006 年同日は 1 通）．これはメールを介して仕事が進むことが多いためで，優先順位が高い．では平凡でない日はどうかというと，他大学にセミナーをしに行ったり，学会に参加したり，あるいはオフィスに閉じこもって研究費の申請書をひたすら書いたりする．たまに同僚の先生と週末の早朝にゴルフをすることもある．そのときに研究室運営の秘伝を伝授してもらう．

第 4 回　アイディアコンテスト．
2011 年 12 月 10 日，我が家にて．

研究室の行事として，毎年夏に海の見える公園でバーベキューをしたり，夏と冬の 2 回，アイディアコンテストと称して，研究員が 5-10 分ほどで研究に関するアイディアをチョークトークしている（写真）．普段の研究テーマに関係したものでも，まったく関係ないテーマでもよい．たとえば，Lady Gaga などのセレブリティーの iPS 細胞から筋肉細胞を再生して，お肉を売るというビジネスができるのでは，というアイディアがでた．これにはみんな引いてしまった．また Chris（BCMB 大学院 1 年生）のアイディアは，実際に試したところとてもうまくいって，現在論文を執筆中である．

## おわりに

今年の研究室の最大の目標は一次繊毛のプロジェクトを成就させ，この領域で革命を起こすことである．ちなみに去年の目標は，研究室初の大学院生を獲得することであったが，研究員たちの協力もあって達成することができた．創造性が高く，やる気のある研究員たちはとても頼もしい．こんな研究室に興味をもっていただけたら幸いである．詳細はこちらをどうぞ．

www.jhu.edu/inouelab

用語解説

### 熱力学の第二法則
The second law of thermodynamics

熱力学系の時間発展の向きを制約する法則．等温環境から吸熱して仕事を取り出し続ける「第二種永久機関」を禁止する．さまざまな表現があり，「孤立系のエントロピーは増加する」というエントロピー増大則もその 1 つ．
（136 ページ）　（鳥谷部ら）

### 準静的な過程
Quasistatic process

系が常に平衡状態にあると見なせるぐらい，非常にゆっくりと系の外部パラメータを変化させる理想的な極限の操作過程．2 つの状態間を遷移させたとき，通常，準静的な過程において最大の仕事が取り出せる．（136 ページ）　（鳥谷部ら）

### チラコイド膜
Thylakoid membrane

葉緑体やシアノバクテリアの細胞内に存在する膜構造．光合成の電子伝達系や光リン酸化が行われる場で，光化学系 I，光化学系 II，シトクロム *b6f*，ATP 合成酵素などのタンパク質複合体が存在している．葉緑体ではスタッキングしているもの（スタッキングチラコイド）とそうでないもの（ストロマチラコイド）があるが，シアノバクテリアではスタッキングしていないもののみが存在している．（140 ページ）　（沈ら）

### 適応度
Fitness

野生型と変異型で感染者数の比が $(1-p):p$ であったとき，次世代でその比が $(1-p)w:pw'$ となった場合，$w$ および $w'$ をそれぞれ野生型と変異型の適応度という．（146 ページ）　（渡部ら）

### 選択的優位性
Selective advantage

野生型に対する変異型の適応度の比 $w'/w$ が 1 より大きい場合，変異型は優勢であり，その選択的優位性は $s = w'/w - 1$ で表される．優勢である場合，選択的優位性は正であり，劣勢の場合は負となる．（146 ページ）　（渡部ら）

### 郷モデル
Go model

タンパク質の天然構造情報を直接利用して，天然構造におけるエネルギーを最小に，変性の程度に応じてエネルギーを高くするように設計されたモデルの総称．通常，結合角度などによる局所ポテンシャルと非局所アミノ酸対の対ポテンシャルから構成される．（151 ページ）　（高田）

### AICG モデル
Atomic interaction-based coarse grained model

タンパク質の天然構造において接触しているアミノ酸対のエネルギーを，全原子力場を用いて計算し，それに比例するアミノ酸対相互作用をもつように構築した粗視化郷モデルである．ソフトウエア CafeMol に標準実装されている．
（151 ページ）　（高田）

### カラムの理論段数
Number of theoretical plate

理論段数（N）とは，カラムの分離効率を表わす指標であり，大きいほど検出・分離に有利である．移動相中の対象分子を固定相に分配させるカラム分離においては，両者の接触面積の増大を図ることで N を増大できる．リポソームを固定相と見なせば，固定化担体上のリポソーム密度の増大が N の増大の鍵である．（154 ページ）　（島内）

### 溶媒和パラメータ
Solvation parameter

溶質を溶媒の固定点に導入したときの系の自由エネルギー変化を溶媒和自由エネルギー（$\Delta G_{solv}$）という．$\Delta G_{solv}$ の近似法の 1 つに溶媒露出表面積（*ASA*）近似がある．このとき，$\Delta G_{solv} = \sigma\, ASA$ と近似するが，この $\sigma$ が溶媒和パラメータである．
（157 ページ）　（関）

### スパイン
Spine

神経細胞の樹状突起から突き出ているマッシュルーム様の形をした直径 0.5 um 程度の構造体をスパイン（棘突起）とよぶ．内部には，グルタミン酸受容体や，アクチンなどのさまざまな分子が密集しており，前シナプスからのシグナルを受け取る後シナプスとしての役割を果たしている．
（158 ページ）　（村越）

※本文中ゴシックで表記した用語を解説しています．

書評

## 化学・生命科学系のための物理化学

Raymond Chang［著］，岩澤康裕，北川禎三，濱口宏夫［訳］
東京化学同人，2003 年，B5 変形判，688 ページ，6,195 円（税込）．

本書は，米国で学部学生向け教科書として大好評となった Raymond Chang 氏著の PHYSICAL CHEMISTRY for the Chemical and Biological Sciences の全訳本である．気体分子運動論や熱力学法則，反応速度論，化学結合，量子力学，分光学などを含むオーソドックスな構成であるが，血管や肺，タンパク質など生命科学を例にした解説，章末問題も多く見られる．また酵素反応，光生物学，巨大分子など生体分子を中心とした章もあり，生物化学の基礎的な内容が十分に盛り込まれている．全体的に物理化学の立場から化学・生命科学をひも解く面白さも感じる．図書の構成としては，両側に余白部分が大きくあり，適宜わかりやすい図が掲載されている．この余白部分は，学習者のメモスペースとしても役立つことだろう．さらに章末問題については，別途英語版で解答集（Problems and Solutions）が発売されている．解答集は平易な英文であり，学生の予習復習に役に立つ．これ 1 冊で，1-2 年生の物理化学導入から，3-4 回生への発展的内容までが含まれており，タイトル通り化学・生命科学系学生にふさわしい教科書である．

（立命大・薬・北原　亮）

書評

## 統計学を拓いた異才たち

デイヴィッド・サルツブルグ［著］，竹内恵行，熊谷悦生［訳］
日本経済新聞社，2006 年，四六判，456 ページ，2,310 円（税込）．

PC の普及によって統計学的な手法への敷居が低くなり，私たちは研究のあらゆる段階で統計学の手法を用いるようになった．こうした統計学の浸透は革命に例えられている；今や，いたるところで「P 値」が表示されている．私たちは，分析者の主観からはなれた客観的な保証を統計学の手法に求める．しかし，この保証はどの程度に確かなのだろうか？

実際には学問としての統計学はたいへんに人間臭い領域であるようだ．そこにはいくつもの相反する考え方があって，それぞれが学派をつくり，異なる方法論を用意している．当然，どの考えで分析するかによって，得られる結論は変わってくる．本書はそうした統計学の成り立ちを，何人かの主要な登場人物たち―新しい考え方を提出するのはごく少数の統計学者である―の人となりに迫りながら紹介している．いろいろな考え方を手際よくまとめてくれているだけでなく，それら人物たちのエピソードがことのほか面白い．もちろん本書は統計学を網羅的にカバーするものではないが，ともすれば無味乾燥になりがちな教科書の傍らにおけば，統計学に血肉が通う．

自分の研究のために使う統計的手法を，その原理からよく理解することの必要性を認識するためにもご一読をお勧めする．また訳者の手になる注釈や原典のリストもたいへん有難い．

（秋田県立大・生物資源科学　小西智一）

編集後記

「モノを理解するのではなく，コトを理解したい．」そう考え，生物研究の門を叩いて今にいたります．分子生物学に代表される“原因”遺伝子の同定・記述は研究の第一段階としては必要ではありますが，それだけではモノを単純に理解したに過ぎません．モノが移動したり，結びつきあったり，活性／抑圧しあったり，といった関係の性質，つまりコトを理解することが肝要かと考えます．あるいは，個別のモノにこだわって調べているようでも，モノの理解を深く掘り下げることで，その背景にあるコトの有り様を浮き彫りにするのが，生物物理研究の真骨頂かもしれません．

生物物理誌も 52 巻を迎えました．今号では，神経，進化，統計物理，タンパク質，と話題も豊富に，今回も皆様のもとにお届けすることができうれしく思います．昨今では，モノとモノの関係そのものを調べる研究も始まっています．物理生物学やシステム生物学とよばれる分野です．加えて，発生や進化といったチャレンジングな分野にも定量・解析・理論化のコトの理解が広まりつつあります．現在の生物物理の分野ではまだ主流にはなっていないけれども，しかし重要な分野に触れる機会をつくり，読者が知見を広げるきっかけになれば編集委員としてとてもうれしく思います．読者の皆様が，毎号届くのが刺激になる紙面づくりをめざしております．生物物理の研究が，その歩みを止めずに，貪欲に新たな領域を飲み込み発展することを祈念するものであります．

（T. S.）

**生物物理学会運営委員会**

難波啓一（大阪大学大学院生命機能研究科）／ keiichi@fbs.osaka-u.ac.jp ..... 会長
由良　敬（お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科）／ yura.kei@ocha.ac.jp
..... 副会長，男女若手委員長，賞・助成金選考委員長
石島秋彦（東北大学多元物質科学研究所）／ ishijima@tagen.tohoku.ac.jp..... 副会長，出版委員長，年会担当，ホームページ
今田勝巳（大阪大学大学院理学研究科）／ kimada@chem.sci.osaka-u.ac.jp ..... 将来計画，出版（邦）
大沼　清（長岡技術科学大学産学融合トップランナー養成センター（TRI））／ kohnuma@vos.nagaokaut.ac.jp ..... ホームページ
神取秀樹（名古屋工業大学大学院工学研究科）／ kandori@nitech.ac.jp..... 広告，庶務，出版（欧）
須藤雄気（名古屋大学理学研究科）／ z47867a@cc.nagoya-u.ac.jp ..... 広告，庶務
高田彰二（京都大学理学研究科）／ takada@biophys.kyoto-u.ac.jp ..... 経理，将来計画，物理学会
瀧ノ上正浩（東京工業大学大学院総合理工学研究科）／ takinoue@dis.titech.ac.jp..... 書記
出村　誠（北海道大学先端生命科学研究院）／ demura@sci.hokudai.ac.jp ..... 年会担当
野地博行（東京大学工学研究科）／ hnoji@appchem.t.u-tokyo.ac.jp..... 企画啓蒙，外交・国際交流
原田慶恵（京都大学物質−細胞統合システム拠点（iCeMS））／ harada.yoshie.4r@kyoto-u.ac.jp ..... 企画啓蒙
政池知子（学習院大学理学部物理学科）／ tomoko.masaike@gakushuin.ac.jp ..... 男女共同参画担当，広告，庶務
光岡　薫（（独）産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター）／ kaorum@ni.aist.go.jp ..... 経理，物理学会
南野　徹（大阪大学大学院生命機能研究科）／ tohru@fbs.osaka-u.ac.jp ..... 選挙，出版（邦）
村上　緑（名古屋大学大学院理学研究科）／ midori@bio.phys.nagoya-u.ac.jp..... 出版（欧）
山下敦子（理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター）／ atsuko@spring8.or.jp..... 書記，年会担当

**平成 24 年度「BIOPHYSICS」誌編集委員会**

石渡信一（早稲田大学理工学術院物理学科）／ ishiwata@waseda.jp ..... 編集委員長
老木成稔（福井大学医学部医学科）／ oiki-fki@umin.ac.jp..... 副編集委員長
河村　悟（大阪大学大学院生命機能研究科）／ kawamura@fbs.osaka-u.ac.jp
安永卓生（九州工業大学情報工学部生命情報工学研究系）／ yasunaga@bio.kyutech.ac.jp
水上　卓（北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科）／ mizukami@jaist.ac.jp
有賀隆行（東京大学大学院工学系研究科）／ ariga@ap.t.u-tokyo.ac.jp
片岡幹雄（奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科）／ kataoka@ms.naist.jp.....ABA 委員
村上　緑（名古屋大学大学院理学研究科）／ midori@bio.phys.nagoya-u.ac.jp..... 出版担当運営委員
神取秀樹（名古屋工業大学大学院工学研究科）／ kandori@nitech.ac.jp..... 出版担当運営委員

**平成 24 年度ホームページ編集委員会**

相沢智康（北海道大学大学院先端生命科学研究院）／ aizawa@mail.sci.hokudai.ac.jp..... 編集委員長
由良　敬（お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科）／ yura.kei@ocha.ac.jp..... 次期編集委員長
千見寺浄慈（名古屋大学大学院工学研究科）／ chikenji@tbp.nuap.nagoya-u.ac.jp
北尾彰朗（東京大学分子細胞生物学研究所）／ kitao@iam.u-tokyo.ac.jp
和沢鉄一（東北大学大学院工学研究科）／ wazawa@material.tohoku.ac.jp
大沼　清（長岡技術科学大学産学融合トップランナー養成センター（TRI））／ kohnuma@vos.nagaokaut.ac.jp
..... ホームページ担当運営委員
石島秋彦（東北大学多元物質科学研究所）／ ishijima@tagen.tohoku.ac.jp..... ホームページ担当運営委員
光岡　薫（（独）産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター）／ kaorum@ni.aist.go.jp .... オブザーバー（経理）

## 賛助会員

賛助会員は以下の通りです.

（株）エー・イー企画
キヤノン（株）下丸子 F 棟技術資料センター
　嶋田紀子
共立出版（株）
CRIMSON INTERACTIVE PVT. LTD.
彩’s　FACTORY
（株）ジオナ
（独）情報通信研究機構未来 ICT 研究センターバイオ
　ICT グループ計算神経サブグループ
（財）阪大微生物病研究会
（株）成茂科学器械研究所
（株）菱化システム科学技術システム事業科学部

## 生物物理会誌編集委員

中村春木　（大阪大学蛋白質研究所）／ harukin@protein.osaka-u.ac.jp ..... 編集委員長
原田慶恵　（京都大学物質–細胞統合システム拠点（iCeMS））／ harada.yoshie.4r@kyoto-u.ac.jp ..... 副編集委員長
青柳里果　（島根大学生物資源科学部）／ aoyagi@life.shimane-u.ac.jp
岩崎憲治　（大阪大学蛋白質研究所）／ ikenji@protein.osaka-u.ac.jp
川原茂敬　（富山大学大学院理工学研究部（工学））／ kawahara@eng.u-toyama.ac.jp
鈴木誉保　（（独）農業生物資源研究所）／ takaosuzuki@affrc.go.jp
永山昌史　（北海道大学大学院工学研究院）／ macci@eng.hokudai.ac.jp
坂内博子　（理化学研究所脳科学総合研究センター）／ hbannai@brain.riken.jp
池上貴久　（大阪大学蛋白質研究所）／ tiik@protein.osaka-u.ac.jp
今元　泰　（京都大学大学院理学研究科）／ imamoto@rh.biophys.kyoto-u.ac.jp
北原　亮　（立命館大学薬学部）／ ryo@ph.ritsumei.ac.jp
澤井　哲　（東京大学大学院総合文化研究科）／ cssawai@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp
十川久美子（東京工業大学大学院生命理工学研究科）／ ksogawa@riken.jp
湊元幹太　（三重大学大学院工学研究科）／ tsumoto@chem.mie-u.ac.jp
南野　徹　（大阪大学大学院生命機能研究科）／ tohru@fbs.osaka-u.ac.jp ..... 出版担当運営委員
今田勝巳　（大阪大学大学院理学研究科）／ kimada@chem.sci.osaka-u.ac.jp ..... 出版担当運営委員

## 生物物理編集地区委員

寺本　央　（北海道大学電子科学研究所）／ teramoto@es.hokudai.ac.jp ..... 北海道地区
林久美子　（東北大学工学研究科）／ kumiko@camp.apph.tohoku.ac.jp ..... 東北地区
黒田　裕　（東京農工大学工学部生命工学科）／ ykuroda@cc.tuat.ac.jp ..... 関東地区
古寺哲幸　（金沢大学理工研究域）／ nkodera@staff.kanazawa-u.ac.jp ..... 北陸地区
笹井理生　（名古屋大学工学研究科）／ sasai@nuap.nagoya-u.ac.jp ..... 中部地区
寺北明久　（大阪市立大学大学院理学研究科）／ terakita@sci.osaka-cu.ac.jp ..... 関西地区
杉浦美羽　（愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター）／ miwa.sugiura@ehime-u.ac.jp ..... 中国・四国地区
水野大介　（九州大学高等研究機構）／ mizuno@phys.kyushu-u.ac.jp ..... 九州地区


本学会の連絡先は下記の通りです.

1. 会長室
   〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3
   大阪大学大学院　生命機能研究科内
   TEL 06-6879-4625　FAX 06-6879-4652
   E-mail bpsjp@biophys.jp
2. 正会員(学生会員を含む), 機関会員および賛助会員の入会, 退会, 会費納入, 住所変更などの手続き, 会誌発送
   〒 113-0033 東京都文京区本郷 5-29-12-1304
   中西印刷株式会社東京事務所内　日本生物物理学会事務支局
   TEL 03-3816-0738　FAX 03-3816-0766　E-mail bsj@nacos.com
3. 会誌の広告
   〒 101-0051 千代田区神田神保町 3-2-8
   昭文館ビル 3F　株式会社エー・イー企画
   TEL 03-3230-2744　FAX 03-3230-2479
4. 学会ホームページニュース欄の原稿（無料および有料), その他学会の運営に関すること
   〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-3
   大阪大学大学院　生命機能研究科内
   TEL 06-6879-4625　FAX 06-6879-4652
   E-mail bpsjp@biophys.jp
5. 学会誌の編集に関連する業務（投稿を含む）
   〒 602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル
   中西印刷株式会社内　日本生物物理学会編集室
   TEL 075-441-3155　FAX 075-417-2050
6. 日本生物物理学会の www ホームページ
   http://www.biophys.jp

本誌記事の動物実験における実験動物の扱いは, 所属機関のルールに従っています.


生物物理 SEIBUTSU BUTSURI
日本生物物理学会 THE BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN

Vol.52 No.3（通巻 301 号）　2012 年 5 月 25 日発行

編集発行　日本生物物理学会
制作　中西印刷株式会社編集室
〒 602-8048　京都市上京区下立売通小川東入ル
TEL 075-441-3155　FAX 075-417-2050
デザイン　齋藤知恵子



複写される方へ
本会は下記協会に複写に関する権利委託をしていますので, 本誌に掲載された著作物を複写したい方は, 同協会より許諾を受けて複写して下さい. 但し(社)日本複写権センター(同協会より権利を再委託）と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません.（社外頒布用の複写は許諾が必要です.）
権利委託先：(社）学術著作権協会
〒 107-0052　東京都港区赤坂 9-6-41　乃木坂ビル
TEL 03-3475-5618　FAX 03-3475-5619　E-mail: info@jaacc.jp
なお, 著作物の転載・翻訳のような, 複写以外の許諾は, 学術著作権協会では扱っていませんので, 直接発行団体へご連絡ください.
また, アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は, 次の団体に連絡して下さい.
Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA01923　USA
TEL　1-978-750-8400　　FAX　1-978-646-8600
Notice for Photocopying
If you wish to photocopy any work of this publication, you have to get permission from the following organization to which licensing of copyright clearance is delegated by the copyright owner.
＜ All users except those in USA ＞
Japan Academic Association for Copyright Clearance, Inc. (JAACC)
6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan
TEL 81-3-3475-5618　FAX 81-3-3475-5619　E-mail: info@jaacc.jp
＜ Users in USA ＞
Copyright Clearance Center, Inc.
222 Rosewood Drive, Danvers, MA01923 USA
TEL 1-978-750-8400　FAX 1-978-646-8600

目次に戻る

BIOPHYSICS
The Biophysical Society of Japan

## 日本生物物理学会が発信するアジア・オセアニア中心の欧文誌

# BIOPHYSICS

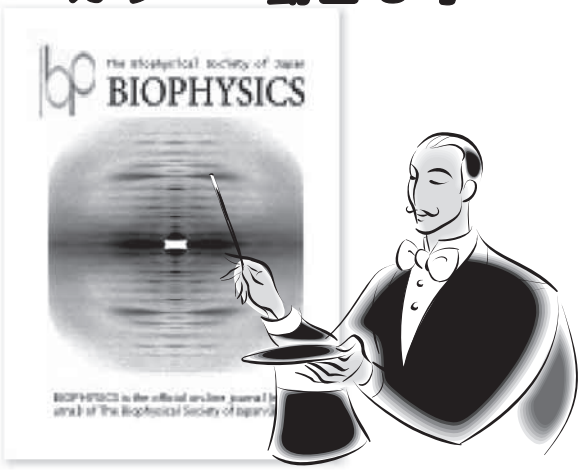
**オープンアクセス**
**素早い審査・掲載**
**カラー・動画も可**

適当なジャーナルが見つからない方
レビュー論文の発表の場を探している方

■ 従来の Regular articles, Reviews, Notes に加え、

- **Mini-reviews,**
- **Experimental Protocols,**
- **Hypothesis and Perspectives,**
- **Database and Computer programs**

などの新しいカテゴリーの論文（査読付）も歓迎します。




**奮ってご投稿下さい！！**

**BIOPHYSICS** は、オープンアクセスの電子ジャーナルです。投稿論文は生物物理の広範な分野のエディターが対応し、素早い審査と掲載を目指しています。

ページ数に制限はなく（短報も歓迎）、カラー、動画も自由に使い、皆さんの研究成果やレビューを十分に説明する場を提供しています。我が国発の、特徴ある論文の投稿を歓迎します。

学会誌の記事の中から会誌編集委員会の推薦で英語レビューを依頼するなど、学会誌との連携も図っています。

編集委員会委員長：石渡信一（早稲田大学）

最新の論文、投稿規定等に関しては
http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophysics

BIOPHYSICS　検索

BIOPHYSICS について詳細をお聞きになりたい方は、下記の委員まで。
委員長：石渡信一（早稲田大）
副委員長：老木成稔（福井大）
委員：河村悟（阪大）、安永卓生（九工大）、片岡幹雄（奈良先端大）、水上卓（北陸先端大）、村上緑（名大）、有賀隆行（東大）、神取秀樹（名工大）

The Biophysical Society of Japan
**日本生物物理学会**

目次に戻る


| | |
|---|---|
| ㈱ニコン　インステック | No. 301-1 |
| ㈱菱化システム | No. 301-2 |
| オリンパス㈱ | No. 301-3 |
| 日本電子㈱ | No. 301-4 |
| 和光純薬工業㈱ | No. 301-5 |
| 大陽日酸㈱ | No. 301-6 |


※直接連絡される場合には，必ず「生物物理を見て」とお付け加え下さい．

## 【PLEASE COPY】

広告製品資料請求は下記宛E-mailか，この用紙をコピーしFAXでご請求下さい。

| 希望項目 / 請求番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 使用目的・知りたい仕様など，ご要望事項があればお書き下さい |
|---|---|---|---|---|---|---|
| No. | | | | | | |
| No. | | | | | | |
| No. | | | | | | |
| No. | | | | | | |
| No. | | | | | | |

1. 購入希望　2. サンプル希望　3. 価格表希望　4. 担当者訪問希望　5. カタログ希望

| | |
|---|---|
| 住所変更（あり・なし）<br>※○印をつけて下さい | お名前（フリガナ） |
| 勤務先名 | ご所属 |
| 所在地（フリガナ）<br>（〒　　）　TEL.　　FAX. | |

ご研究内容をわかりやすくご記入下さい

**E-mail: adinfo@aeplan.co.jp**
FAX to 03(3230)2479
株式会社　エー・イー企画

ClairScope™

JASM-6200

大気圧走査電子顕微鏡

真空から大気へ

大気圧下の試料をASEM*で観察できます。

電子と光の融合

試料をASEM*と光学顕微鏡で同視野観察できます。

開放された空間

試料室が大気圧下にあるため試料操作（薬品投与等）が容易です。

ASEM*:Atmospheric SEM




お問い合せは、電子光学機器営業本部（EO販促グループ）TEL:042(528)3353

JEOL
Serving Advanced Technology

日本電子株式会社 http://www.jeol.co.jp/

本社・昭島製作所 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野３－１－２ TEL：042-543-1111
営業企画室 〒190-0012 東京都立川市曙町2－8－3 新鈴春ビル3F TEL：042-528-3381
札幌 (011) 726-9680・仙台 (022) 222-3324・筑波 (029) 856-3220・東京 (042) 528-3211・横浜 (045) 474-2181
名古屋 (052) 581-1406・大阪 (06) 6304-3941・広島 (082) 221-2500・高松 (087) 821-0053・福岡 (092) 411-2381

ISO 9001 & 14001 REGISTERED FIRM


＜資料請求番号 301-4＞


日本生物物理学会 発行

生物物理

広告掲載に関するお問い合わせは、下記にお願いします。

株式会社 エー・イー企画

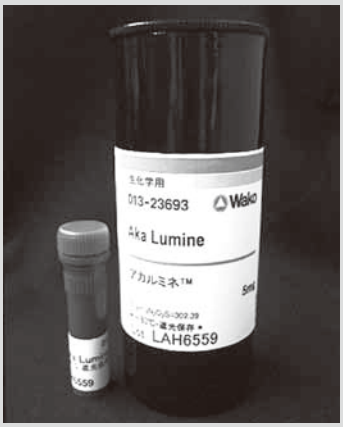
TEL : 03-3230-2744
FAX : 03-3230-2479
http://www.aeplan.co.jp
E-mail : adinfo@aeplan.co.jp

SEIBUTSU BUTSURI
THE BIOPHYSICAL SOCIETY OF JAPAN

Wako

# アカルミネ™

## 近赤外発光ルシフェリンアナログ




- ◆ 近赤外発光基質
- ◆ 発光波長 670～680nm
- ◆ 水・ヘモグロビンの吸収を受けにくい
- ◆ *in vivo* イメージングに最適

## *in vivo* イメージングデータ

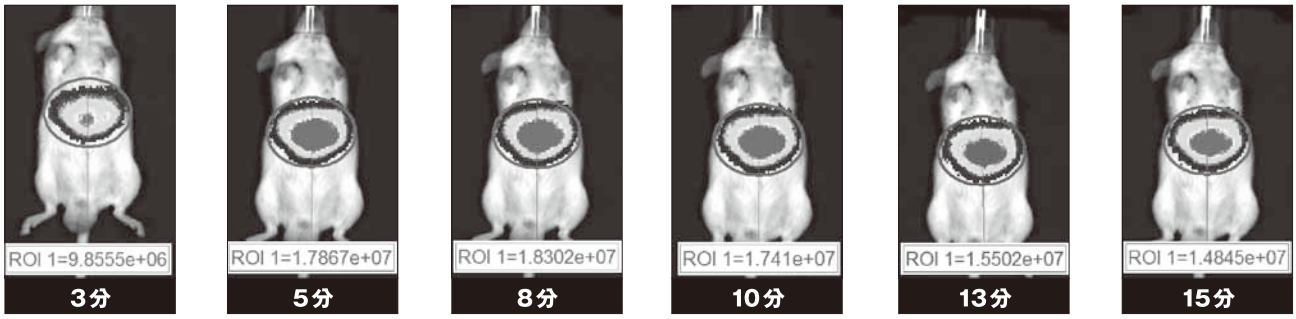
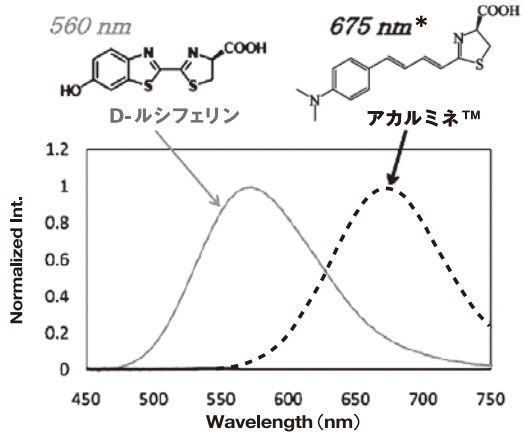



図. アカルミネ™投与後、3分, 5分, 8分, 10分, 13分, 15分の撮影像（データ提供元：筑波大学代謝内科　武内先生）

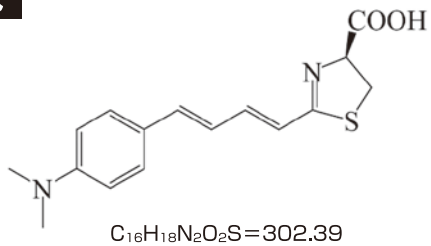
## [製品情報]

### 驚きの発光波長を実現!!




*Phostinus pyralis* 由来ルシフェラーゼを用いた場合

### 構造式




$C_{16}H_{18}N_2O_2S$＝302.39

### 溶解性

水及び50mM りん酸カリウム緩衝液（pH 6.0）…500μmol/L

［参考文献］
1. 牧　昌次郎：光学, **39**(7), 320(2010).
2. 牧　昌次郎：和光純薬時報, **79**(4), 2(2011).

| コードNo. | 品　名 | 規　格 | 容　量 |
|---|---|---|---|
| 017-23691 | アカルミネ™ | 生化学用 | 1mg |
| 013-23693 | | | 5mg |

和光純薬工業株式会社

本　　社：〒540-8605　大阪市中央区道修町三丁目1番2号
東京支店：〒103-0023　東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号
営 業 所：北海道・東北・筑波・東海・中国・九州

問い合わせ先
フリーダイヤル：0120-052-099　フリーファックス：0120-052-806
URL：http://www.wako-chem.co.jp
E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

お問い合せはこちらまで

Ryoka Systems Inc.
Chemical Computing Group社 日本総代理店
株式会社 菱化システム
科学技術システム事業部
〒104-0033 東京都中央区新川1-28-38東京ダイヤビル3号館3階

TEL: 03-3553-9206
FAX: 03-3553-9207
URL: http://www.rsi.co.jp/ e-mail: support@rsi.co.jp

※記載の商品名等は各社の登録商標、または商標です。 ※本広告の仕様は予告無く変更する場合があります。