

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		YANAGIDA TOSHIO					
①研究代表者氏名		柳田 敏雄		②所属研究機関・部局・職 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授			
③研究課題名	和文	細胞内1分子計測法を用いた走化性情報処理システムの解析					
	英文	Single-molecule analysis of chemotactic signaling system					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		26,300	16,400	16,400	12,300	12,300	83,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
柳田 敏雄		大阪大学・大学院生命機能研究科・教授		1分子生理学		総括・1分子計測法の開発	
佐甲 靖志		大阪大学・大学院生命機能研究科・助教授		細胞生物学・生物物理学		神経細胞の細胞内1分子計測	
岩根 敦子		大阪大学・大学院生命機能研究科・助手		分子生物学・生物物理学		遺伝子工学・蛋白質調整	
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>細胞は環境からの微弱なシグナルを高感度で検出し、生命活動に重要な様々な生理学的応答を行なう。細胞が化学物質の空間的濃度勾配を検出して一定の方向へと移動する走化性応答においては、数分子から数十分子の化学シグナルの入力差が細胞の振る舞いに影響を与えることが分かっている。走化性応答を誘起するシグナルには熱ゆらぎに起因するノイズが伴い、時にはノイズがシグナルより大きい場合さえ知られている。細胞はそうした微弱で曖昧なシグナルをナノメートルサイズの生体分子により受容・処理するために、そのシグナル伝達過程も熱ゆらぎによるランダムな揺動の影響を常に受け、本来的にノイジーである。しかしながら、細胞はそうした微弱で曖昧なシグナルに対してさえもしばしば的確に安定して応答する。ゆらぎの中で安定した応答を行なう仕組みを解明することは、細胞内情報処理研究における重要な課題となっている。</p> <p>本研究は、神経細胞や粘菌細胞などにみられる走化性の情報処理メカニズムを解明することを目的とする。予備的な研究から、走化性の情報処理では「ノイズ処理」の仕組みが決定的に重要であることが分かってきた。我々が開発してきた細胞内1分子計測法を用いて、化学刺激の受容から細胞運動の制御にいたる情報伝達過程を細胞内で1分子イメージングすることにより、熱ゆらぎの影響を受けながらはたらく情報伝達分子の振る舞いを明らかにする。また、情報処理の理論モデルを構築する。ゆらぐ環境に適応してきた生物情報処理システムの特徴を1分子レベルでの精密実験と理論・計算機実験の両面から明らかにしていく。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

我々はこれまで世界に先駆けて生体分子を 1 分子イメージングする蛍光顕微鏡法を開発し、モーター蛋白質をはじめとする様々な蛋白質の化学反応・力学反応・構造変化などを 1 分子レベルで解明してきた (Funatsu et al., 1995; Tokunaga et al., 1998; Ishijima and Yanagida, 2001)。さらに、1 分子計測法を細胞生物学研究、医学・生理学研究へと展開するための技術開発の一環として、生きた細胞の中で生体分子を 1 分子イメージングする蛍光顕微鏡法を開発し、世界で初めて細胞内 1 分子イメージングに成功した (Sako et al., 2000; Ueda et al. 2001; Sako and Yanagida, 2003)。こうした先行研究を踏まえ、本研究では主に次の 3 点について研究を進めてきた。(1)細胞内 1 分子イメージング技術のさらなる開発。(2)ゆらぐ世界の情報処理メカニズムを解明するためのノイズ解析法、理論モデルの構築。(3)本研究の具体的研究ターゲットである走化性情報処理システムの細胞内 1 分子解析。

(1) 細胞内 1 分子イメージング技術の開発

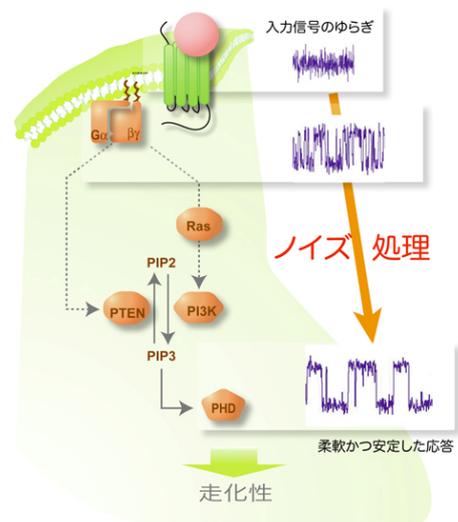
従来の細胞内 1 分子顕微鏡法では鮮明な 1 分子画像の取得が細胞底面のみに限られていたが、照明法を改良することにより細胞表面全面にわたって高コントラストな 1 分子観察が可能になった。これにより細胞全面でのリガンド結合数 (シグナル入力数) の定量化が可能になり、カルシウム応答に必要なリガンド数の閾値が数百個程度であることを明らかにした (Uyemura ら 2005)。また、多色の 1 分子同時イメージング光学系を開発し、これを用いて受容体 1 分子の入出力関係の定量化に成功した (Ichinose ら 2004)。さらに、ケージド化合物の光分解反応を利用した細胞刺激法 (ケージド刺激法) を 1 分子光学系に導入し、シグナル入力の精度を向上させることができた。本研究で計画した 1 分子顕微鏡の新規開発はほぼ終了した。

(2) ノイズ解析法および理論モデルの構築

細胞内のシグナル伝達過程はノイズが伴うために、不規則なシグナルを解析するための体系的な方法論が必要である。本研究では、工学などで使われるスペクトル解析法を細胞内情報伝達研究に適用することを試みてきた。結果、入力信号 (リガンド結合数) の周波数特性が明らかになり、受容体のランダムなオン・オフ 2 状態モデルで理論的に記述可能であることが分かった。また、柴田・藤本 (2005) による Gain-fluctuation 関係式を走化性情報伝達系に適用することにより、ノイズ処理におけるシグナル時間積算の重要性が明らかになった。

(3) 走化性情報処理システムの細胞内 1 分子解析

リガンド結合から細胞運動に至る情報伝達経路の分子群のいくつかについて細胞内 1 分子イメージングが可能になり、主に次のような知見を得ている。(i)神経細胞への神経成長因子 (NGF) の結合を 1 分子イメージングし、細胞運動の誘起に必要な NGF 分子数の計測に成功した (Tani ら 2005)。(ii) 三量体 G 蛋白質 $G\alpha\beta\gamma$ の 1 分子イメージングにより、細胞質・細胞膜間でのシャトリングを見いだした。(iii) 仮足形成位置の制御にはたらく PTEN 分子の膜結合がポジティブフィードバック制御を受けていることを明らかにした。(iv) 仮足形成に重要な Ras-Raf1 (Hibino ら 2004) および PH ドメイン蛋白質の 1 分子イメージングにより、その細胞膜結合が細胞極性と関連して空間的に制御されていることを見いだした。



⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

「これまでの研究経過」において記載した3点に関して特記事項について述べる。

(1) 細胞内1分子イメージング技術の開発

我々は細胞内情報伝達におけるゆらぎの役割を探っている。我々が開発してきた細胞内1分子計測法の進展により、ようやくノイズなシグナル伝達過程を実験的に直接捉えられるようになってきた。これにより、「シグナルの時間的変化にみられる不規則なゆらぎと細胞応答の関係」や「細胞内微小環境とシグナル伝達の空間的多様性」など生体分子の時間的・空間的なゆらぎに対する理解が必要となる現象を実験的に扱えるようになってきた。工学における情報処理を比較したとき、細胞内情報処理の特徴の一つはゆらぎ(ノイズ)を伴うことであり、情報学として新しい視点が必要となるだろう。本研究におけるシグナル分子数の直接計測という手法は、生理学におけるシグナル計測法・閾値決定法として全く新しい実験技術を提供しており、世界に先駆けた成果といえる(Uyemuraら2005)。

(2) ノイズ解析法および理論モデルの構築

細胞におけるノイズなシグナル伝達過程を理論化・体系化した研究はない。しかし、工学などで用いられる不規則信号論や非線形科学・非平衡科学の考え方を細胞内情報処理研究に適用することにより、ある程度の理論構築は可能であると期待される。実際、我々はこうした研究を開始しており、「これまでの研究経過」に記載したようないくつかの成果を得ることができた。また、ノイズを利用したセンシングや秩序形成の仕組み(確率共鳴やノイズインデューズドオーダーなど)を細胞内情報伝達系に適応できるのか、理論的考察をすすめている。こうした過程で、細胞内情報伝達に関する既存の数理モデルの中には、ゆらぎを考慮することによって破綻するモデルがあることも見いだした。我々が目指している『生体分子による確率的な情報処理(stochastic biomolecular computation)』の理論においては、生体分子の熱ゆらぎやコピー数の少数性に起因する数のゆらぎが情報処理システムの振る舞いに及ぼす影響について議論が可能になるだろう。近年、遺伝子発現の研究分野においても生体分子のゆらぎが注目を集めており、生物学における「ゆらぎの科学」の拡大を示している。

(3) 走化性情報処理システムの細胞内1分子解析

ゆらぐ世界で機能する細胞内情報伝達系の特徴を理解するためには、受容体などの情報伝達分子の活性のゆらぎ(時間的・空間的変化)を計測し、細胞応答との関係を明らかにすることが重要である。我々は神経細胞(Taniら2005)やHeLa細胞(Uyemuraら2005)、粘菌細胞*Dictyostelium*(Uedaら2001)において、リガンド結合(受容体の活性化)の時間的・空間的変化を1分子計測することに成功した。また、リガンド結合から走化性運動に至る情報伝達経路の分子群について1分子イメージングが可能になっており、ノイズなシグナル伝達過程の実際の姿が見えてきた。情報伝達ネットワークが示す複雑な回路(カスケード、クロストーク、フィードバック、フィードフォワード等)がノイズを処理する過程を実測しつつある。理論・計算機実験と連携させることにより、「ノイズ除去によるシグナル増強」「ノイズ付加によるシグナル増強あるいは消去」「特定周波数成分の抽出」といった情報処理を行なう回路(情報処理モジュール)を特定できる可能性がある。こうした研究により、ゆらぐ環境に適応してきた生きものらしい情報処理システムの構築原理に迫ることができるだろう。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

論文発表

- Hibino K, Watanabe TM, Kozuka J, Iwane AH, Okada T, Kataoka T, Yanagida T, and Sako Y: Single- and multiple-molecule dynamics of the signaling from H-Ras to cRaf-1 visualized on the plasma membrane of living cells. CHEM PHYS CHEM 4: 748-753 (2003)
- Sako Y, Yanagida T: Single-molecule visualization in cell biology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Suppl: SS1-5. Review. (2003)
- Yanagida T, Ishii Y: Stochastic processes in nano-biomachines revealed by single molecule detection. Biosystems. 71: 233-44. (2003)
- Murai T, Miyazaki Y, Nishinakamura H, Sugahara KN, Miyauchi T, Sako Y, Yanagida T, Miyasaka M: Engagement of CD44 Promotes Rac Activation and CD44 Cleavage during Tumor Cell Migration. J Biol Chem. 279: 4541-50 (2003)
- Ichinose J, Murata M, Yanagida T, Sako Y: EGF Signalling Amplification Induced by Dynamic Clustering of EGFR., Biochem. Biophys. Res. Comm. 324: 1143-1149 (2004)
- Ichinose J, Sako Y, Single-molecule measurement in living cells, Trends in Ana. Chem. 23: 587-594 (2004)
- Uyemura T, Takagi H, Yanagida T, and Sako Y: Single-molecule imaging of epidermal growth factor signaling that leads to ultrasensitive calcium response. Biophys J. in press. (2005)
- Tani T, Miyamoto Y, Fujimori K, Taguchi T, Yanagida T, Sako Y and Harada Y: Trafficking of a Ligand-Receptor Complex on the Growth Cones as an Essential Step for the Uptake of Nerve Growth Factor at the Distal End of the Axon: A Single-Molecule Analysis. J. Neurosci. 25: 2181-2191 (2005)
- Ueda M, Miyanaga Y, and Yanagida T: Single-molecule analysis of chemotactic signaling mediated by cAMP receptors on living cells. In CMC Methods in signal transduction series "G Protein-Coupled Receptors: Structure, Function and Ligand Screening". in press. (2005)
- 佐甲靖志: 細胞内情報処理過程の1分子観察. 生理学会誌 65, 277-282 (2003)
- 森松美紀, 佐甲靖志: 1分子計測法による細胞内分子システムの解析. BME 18: 19-26 (2004)

図書

- Ishii Y, Yanagida T: Single molecule measurements and molecular motors. In "Molecular motors" (ed. by Schliwa, M.) Wiley, pp305-323 (2003)
- Ishii Y, Kitamura K, Tanaka H, Yanagida T: Molecular motors and single molecule enzymology. Methods in enzymology 351: 228-245 (2003)
- 上田昌宏、佐甲靖志: 1分子と細胞, ナノテクノロジーハンドブック IV編 バイオ・化学へ使う」オーム社 pp123-127 (2003)
- 和沢鉄一・石井由晴: 蛋白質の動的構造, ナノテクノロジーハンドブック IV編 バイオ・化学へ使う」オーム社 pp90-94 (2003)
- 柳田敏雄: 線形モータを測る, ナノテクノロジーハンドブック IV編バイオ・化学へ使う」オーム社 pp101-104 (2003)
- 石井由晴、西川宗、江崎誠治、上田昌宏: ナノテクノロジー大事典: 生体分子運動システム, 工業調査会, pp785-798 (2003)
- 佐甲靖志: 細胞内情報処理システムを1分子計測する, 「<1分子>生物学 生命システムの新しい理解」合原一幸、岡田康志編, 岩波書店, pp43-81 (2004)
- 石井由晴・柳田敏雄: 1分子生理学: 「ナノテクノロジーによる生命科学ナノバイオロジー」, 共立出版, pp105-120 (2004)
- 佐甲靖志: ナノテクノロジー「医学を学ぶための生物学」谷口直之、米田悦啓編, 南江堂, pp429-436 (2004)

国際会議・学会等における発表（代表的な発表のみ記載した）

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, TRANSDUCERS'03, アメリカ・ボストン、平成15年6月7日—6月10日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, 11th European Congress on Biotechnology スイス、平成15年8月24日—8月29日

Toshio Yanagida: Single molecule experiments on molecular motors and cell signaling, Elucidating Biomolecular Networks by Single Molecule Technologies, スイス、平成15年10月26日—11月4日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, The 7th Asian Conference on Analytical Sciences, 中国香港、平成16年7月27日—7月29日

Toshio Yanagida: Dynamics of Biological Systems, WENNER-GREN INTERNATIONAL SYMPOSIUM "Force Generation in Biological Systems", 大阪大学・サンフランシスコオフィス開所記念セミナー、平成16年9月8日—9月11日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, 10th International Workshop on 'Single Molecule Detection and Ultrasensitive Analysis in Life Sciences, ドイツ・ベルリン、平成16年9月22日—9月24日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, Micro TAS(Total Analysis Systems)2004 conference, スウェーデン・コペンハーゲン、平成16年9月25日—9月29日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, Shanghai International Conference on Physiological Biophysics 2004(ICPB'04), 中国上海、平成16年11月10日—11月13日

Toshio Yanagida: Single Molecule Nano-Bioscience, 21st meeting of the Council of Scientists(HFSP), フランス・ストラズバーク、平成16年2月28日—3月2日

柳田敏雄「ナノバイオサイエンス」—ノイズを利用して動く生物分子機械—豊田特別講演、平成15年5月8日、豊田中央研究所

柳田敏雄「ナノテクノロジーと生物分子モーターのしくみ」—ヒトに優しい機械づくりをめざして—、日本表面科学会、平成15年5月16日、東京理科大学

柳田敏雄「ナノテクノロジーを駆使した生物物理学の進歩」第51回循環力学研究会、平成15年5月31日、東京（大手町ファーストスクエア）

柳田敏雄「1分子ナノテクノロジーで生体システムを読む」第42回日本エム・イー学会大会、平成15年6月3日、札幌コンベンションセンター

柳田敏雄「ナノテクノロジーで観た生物の巧みなしくみ」第3回日本蛋白質科学年次、平成15年6月24日、札幌コンベンションセンター

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」第5回国際ゲノム会議、平成15年6月27日、パシフィコ横浜

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス：熱ゆらぎを利用する生物機械」東京大学談話会、平成15年6月27日、東京大学

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」The International Nanophotonics Symposium Handai、平成15年7月25日、大阪大学

柳田敏雄「Single Molecule imaging of dynamic molecular and cellular systems」第41回生物物理学会、平成15年9月24日、新潟（朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター）

柳田敏雄「1分子ナノ計測で見た生物システムのやわらかさ」九州大学医学部百周年記念式典、平成15年10月20日、九州大学

柳田敏雄「Single molecule experiment on molecular and cellular dynamics」The COE Molecular Motor Conference 2003、平成15年11月6日—11月8日、箱根

柳田敏雄「しなやかな生体分子機械のしくみを1分子ナノ計測で読む」COEシンポジウム、平成15年11月15日、経団連会館（東京）

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」IUBS-TAIB Symposium on "Stochastic Events in Biological System"、平成15年11月28日—11月29日、湘南国際村センター

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス」バイオグリッドシンポジウム、平成15年12月8日、千里ライフセンター

柳田敏雄「ゆらぎと生体機能」ナノバイオスクール、平成15年12月12日—12月14日、ホテルフロラシオン青山

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス」分子ナノ工学とバイオサイエンス・テクノロジー、平成15年12月18日—19日、早稲田大学

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」JST異分野研究者交流フォーラム、平成16年1月12日—15日、ホテルアローレ（石川県）

柳田敏雄「1分子ナノ計測で見た生体システム機能のやわらかさ」早稲田物理系21COEシンポジウム、平成16年2月27日—28日、早稲田大学

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス」第2回ナノテクノロジー総合シンポジウム、平成16年3月16日、東京ビックサイト

柳田敏雄「生命科学とナノテクノロジー」慶應理工学概論講演、平成16年5月12日、慶應義塾大学

柳田敏雄「バイオナノテクノロジーの現状と将来」法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター開設シンポジウム、平成16年6月3日、法政大学

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」、Oxford-Kobe Seminar: UK-Japan Collaborations in Bionanotechnology 平成16年7月2日—3日、オックスフォード大学神戸インスティテュート

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」国際光学会議(ICO'04)、平成16年7月12日、幕張メッセ

柳田敏雄「ゆらぎと生体機能」JST異分野フォーラム「揺らぎと生命」、平成16年7月21日—23日、北ビワコホテル・グラツィエ

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス：熱ノイズを利用する生物分子機」第49回物性若手夏の学校、平成16年8月1日、岩手網張温泉休暇村

柳田敏雄「生物物理から見た分子情報生命科学」理化学研究所、平成16年8月6日、分子情報生命科学研究会

柳田敏雄「1分子ナノ計測法と生命現象の解明」東京コンファレンス2004「分析科学と人間社会」、平成16年9月2日、幕張メッセ国際会議場

柳田敏雄「熱ゆらぎを利用する生物分子機械」第22回日本ロボット学会技術講演会、平成16年9月16日、岐阜大学

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」オープンワークショップ「バイオとナノテクノロジーの融合研究」、平成16年10月7日、京都テルサ

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience」第77回日本生化学会大会、平成16年10月13日、パシフィコ横浜

柳田敏雄「ゆらぎと生体機能」情報科学研究科COEプログラム、平成16年12月1日、大阪大学・情報科学研究科

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス」産総研・広島大学合同シンポジウム、平成16年12月17日、千里ライフサイエンスセンター

柳田敏雄「1分子ナノ計測で見た生体システムのやわらかさ」日本生体エネルギー研究会第30回討論会、平成16年12月17日、大阪大学・銀杏会館

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス」JST異分野フォーラム「顕微・計測科学のフロンティア」、平成16年1月13日—15日、静岡・大仁ホテル

柳田敏雄「生命の仕組みを一分子ごとに追跡する」第二回分野横断スクール・ナノバイオスクール、平成16年1月17日—18日、虎ノ門パストラル

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience: Learning Nanoscience from Biology」理化学研究所(和光)、平成16年1月18日、Self-organization-Initiative Nano-Engineering(SINE)

柳田敏雄「1分子ナノバイオサイエンス：生物に学ぶナノテクノロジー」ナノバイオ国際シンポジウム、平成16年2月25日、東京ビックサイト

柳田敏雄「Single Molecule Nano-Bioscience: Learning Nanoscience from Biology」Molecule-Based Information Transmission and Reception(MB=ITR2005)、岡崎コンファレンスセンター

(その他学会発表多数)