

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20118009

研究課題名(和文) ATP駆動蛋白質の化学力学変換機構の1分子解析

研究課題名(英文) Single Molecule analysis for the Mechano-Chemical Conversion of ATP-driven proteins

研究代表者

岩城 光宏(Iwaki, Mitsuhiro)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：30432503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 26,500,000円、(間接経費) 7,950,000円

研究成果の概要(和文)：水は生命の源であり、筋肉収縮を引き起こすミオシンなどあらゆる生体分子は水溶液中で機能発現する。ミオシンはATP分子の持つエネルギーを力学的なエネルギーに変換するが、変換メカニズムにおける水の役割は不明であった。本研究では、浸透圧変調条件にてミオシンエネルギー変換素過程を1分子レベルで観察し、浸透圧変調がもたらす水和状態変化とエネルギー変換機構との関わりを明らかにした。水の並進エントロピーによってミオシンとアクチンとの結合力が大きく変化し、ATPの化学状態変化に伴う水和・脱水和エネルギー変化が力発生にも大きく影響を与え、エネルギーの観点から水が重要な因子として働いていることが明確になった。

研究成果の概要(英文)：Water is a origin of life and various biomolecules like myosin which induces muscle contraction emerge functions in water environment. It is known that Myosin converts chemical energy of ATP into mechanical work, however, the role of water in the conversion mechanism was unclear. Here, we observed elementary mechanical processes of myosin in action in the presence of osmolyte. we found entropic potential field of water molecules formed for a actomyosin interface regulates binding force between myosin and actin. Further, hydration/dehydration dynamics around actomyosin affected force generation. We suggest water explicitly play an important role in the force generation in terms of energy conversion.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：ATP加水分解酵素 モーター蛋白質 アクトミオシン 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

(1) ATP(アデノシン三リン酸)は生体システムを維持するためのエネルギー媒体の役割の中心を担うにも関わらず、その加水分解エネルギーの実体はいまだ不明である。加水分解に伴う自由エネルギー変化(ΔG)は、真空中か水中かで劇的に変わるため、反応前後における物質と水との相互作用が大きく寄与するが、溶液化学の視点からのアプローチはなされていない。

(2) ATP のエネルギーを利用して生体内での機能を発現する蛋白質の代表としてモーター蛋白質が挙げられる。モーター蛋白質は ATP 加水分解酵素であり、加水分解に伴う化学自由エネルギー変化を力学エネルギーに変換し、筋収縮や細胞内物質輸送を行う。これらモーター蛋白質の機能発現(力発生や一方向運動)は現在では、最新の生物物理手法を用いて1分子レベルでの可視化が可能となっている。最新の溶液化学と1分子計測技術を融合することによって、ATP のエネルギー変換メカニズムを水との作用を繰り込んだ形で理解することが可能な状況が整ってきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、モーター蛋白質の1つであるミオシンを対象に、その力発生過程を可視化可能な技術開発を行う。力発生の前後の可視化は従来の一分子計測技術で可能であるが、素過程の可視化の成功例はない。これにより、エネルギー変換の最重要プロセスで水がどのような役割を果たしているのか、直接的な議論が可能となる。

(2) 可視化によって得られたデータを溶液化学の専門家と議論を行う。水の作用を調べるために、ショ糖などの浸透圧調整剤を添加し、その摂動に対してエネルギー変換素過程でどのような応答を示すか調べ、溶液化学の理論からの考察を加える。

3. 研究の方法

(1) ミオシンの力発生過程を可視化するために、金粒子を用いた高速ナノイメージング、高速操作型光ピンセット顕微鏡、および DNA ナノツールを新規開発する。金粒子の散乱光は蛍光よりも十分な光強度を持つので、マイクロ秒領域での1分子イメージングが可能となる。1分子の輝点を2次元ガウス関数フィットすることで中心を1-2 nm 精度で位置決めできる。数十ナノメートルの変位発生(力発生)の始まりから終わりまでに数十ミリ秒かかるため、その素過程を追うのに十分な時間的空間的分解能が得られる。

高速操作型光ピンセット顕微鏡と DNA ナノ

ツールはセットにして実験に用いる。光ピンセットは生体分子1個に力学的な外力を加えることが可能な手法であり、力を加えることで、蛍光粒子や金粒子の1分子イメージングでは得られないエネルギーに関する情報を得ることができる。金粒子ナノイメージングのデータと合わせることで、分子動態に対応する自由エネルギー変化を定量することが可能となる。DNA ナノツールを新規開発することによって、通常的光ピンセット法では得られない、力発生過程をモニターしつつ外力を加え自由エネルギーやミオシンの仕事を定量できる。

(2) 上記方法はミオシン分子動態を詳細に可視化することが可能であるが、一方で、分子動態とカップルする ATP 加水分解反応を直接可視化することはできない。そこで、バルクアッセイにはなるが、一分子計測で行う溶液条件にてストップフローを用いた ATP 加水分解反応素過程の反応速度定数を定量する。研究協力者として千葉大学の伊藤光二氏にデータの取得を依頼する。

(3) 上記測定条件におけるアクトミオシン周りの溶媒和ダイナミクスや水の並進エントロピーがアクトミオシン相互作用に及ぼす影響を九州大学の秋山良氏、京都大学の木下正弘氏と議論を行う。浸透圧調整剤が水のダイナミクスに与える影響とミオシンの力発生最重要過程に与える影響を考察し、水のダイナミクスとエネルギー変換との関わりを明らかにできる。

4. 研究成果

(1) 金粒子の高速ナノイメージングをミオシン V に適用した。ミオシン V は ATP 加水分解あたり 75 nm の変位を発生することが知られている。30 マイクロ秒の時間分解能で観察すると、75 nm の素過程として、55 nm の急激な変位(1-2 ミリ秒の立ち上がり時間)と、ランダムなブラウン運動(16 ミリ秒の時定数を持つブラウンアンサーチ)、ブラウン運動から方向性が取り出されて前方のアクチンに強くキャッチする過程が観察された。浸透圧調整剤としてショ糖を1-2 M 加えた条件下では、各ステップサイズには変化がみられないものの、ブラウンアンサーチの時間が2倍程度長くなり、75 nm のステップ間隔が5-10倍程度長くなった。

高速操作型光ピンセットの開発のために、自作の暗視野顕微鏡に近赤外レーザーを組み込んだ。また、近赤外光をマイクロ秒で操作するために、Electro-optic deflector (EOD)を組み込んだ。これによって、ミオシン分子が結合した微小粒子(直径200 nm)を光トラップして100 マイクロ秒で300 nm 移動

可能な操作ができるようになった。この微小粒子表面に長さ 60 nm の二本鎖 DNA を結合させて、その先端にミオシンのモーター部位を結合させた。ミオシンが運動すると、その動きが DNA 分子を介して微粒粒子に伝わり、間接的に運動をモニターすることができる。同時に、光ピンセットでやさしく 1pN 程度の力を付加できるので、外力存在下でのミオシンの運動が観察できる（図 1）。

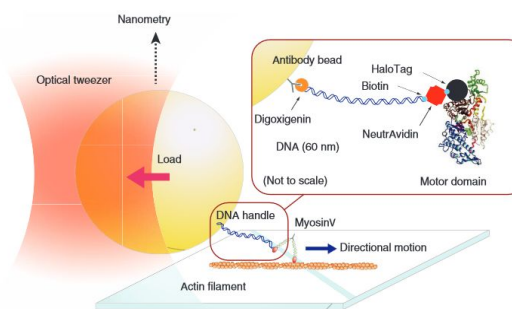


図 1 実験系の模式図

実験の結果、金粒子のイメージングで観察された 55 nm ステップはミオシンのレバーアーム部位の構造変化に起因し、構造変化に伴う自由エネルギー変化が最大 $3 k_B T$ ($k_B T$ は平均の熱エネルギー) であること、およびブラウンアンサーチの後に起こるキャッチで $>10 k_B T$ の仕事を行うことが分かった。さらに、キャッチするタイミングは外力が調節しており、ミオシンは張力センシングを行って、ランダムなブラウン運動から一方向運動を取り出していることが分かった。この過程がエネルギー的にも大きな割合を占める最重要メカニズムであると結論づけられる（図 2、発表論文の 1, 2, 4, 5 参照）。

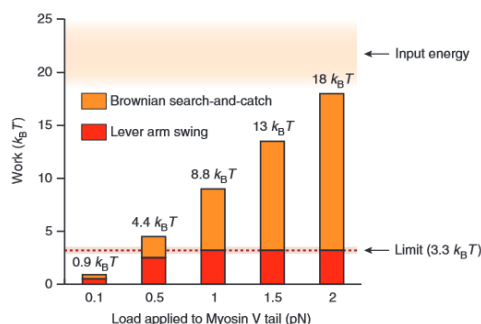


図 2 エネルギー変換の内訳

上記の実験系で、シヨ糖を加えると、金粒子での観察同様に、ステップサイズは変わらないものの、ブラウンアンサーチの時間が長くなった。加えて、驚くべきことに、ブラウンアンサーチの間にモーター部位がアクチンフィラメントに沿ってバイアスブラウン運

動を起こすケースも観察された。金粒子実験では観察されていなかったが、光ピンセットでは後方外力がかかっているために、ブラウンアンサーチの時間は、シヨ糖存在下で、100 ミリ秒くらいまで長く詳細な観察が可能になったことに起因するのではないかと考えられる（金粒子のシヨ糖存在下での滞在時間は 30 ミリ秒）。もしくは、金粒子が立体障害となりアクチンとの相互作用を部分的に阻害しているかもしれない。いずれにしろ、この結果は、シヨ糖の添加によってミオシンとアクチンとの相互作用が強められたことを強く示唆する。

(2) ストップフロー実験によって以下のことが分かった。

ADP リリースはシヨ糖の影響を受けない。

ATP のモーター部位への結合も影響を受けない。

ATP がモーターへ結合した後に、モーターがアクチンから解離する過程がシヨ糖によって劇的に遅くなる。

以上の結果と 1 分子観察の結果を合わせて定性的ではあるが次の議論ができる。

75 nm のステップが起こるのはモーターに ATP が結合しアクチンから解離してからであることが知られている。シヨ糖によって、アクチンから解離しにくくなっているため、ステップから次のステップまでの時間が長くなるのは、1 分子観察の結果と良く合う。シヨ糖によってモーターがアクチンから解離しにくくなるのは、ミオシンアクチン間の結合力が強められたと考えられる。そのために、ブラウンアンサーチしているときにアクチンとの相互作用が観察された。

(3) これまでの実験結果を踏まえて、溶液化学の専門家らと議論を行った。シヨ糖分子の周囲には 1 分子あたり平均 10 個程度の水分子を拘束することができる。シヨ糖 1M 以上の溶液条件では、ほぼすべてのバルク水は拘束されており、おそらくアクトミオシンの水和水もシヨ糖側に移動している可能性もある。アクトミオシンの水和水が脱水和されると、ミオシンとアクチンの結合は強められる方向に向かうため、親和力が強くなる。一分子観察やストップフローでの結果と良く合う。

加えて、シヨ糖のような大きな粒子が溶液中にあると、水の並進エントロピーに起因する蛋白質間相互作用も強められる傾向がある（木下らとの論文 3 参照）。水の並進エントロピー効果は疎水性相互作用の 90% 程度を説明できるものであり、一分子観察やストップフローでの結果を良く説明できる。

結論として、水和ダイナミクスとミオシンの力発生にはどのような関係があるだろうか？

ATP 加水分解に伴う自由エネルギー変化は今回の溶液条件では、 $-20 k_B T$ である。このうちの $18 k_B T$ 程度が力学的な仕事としてアクトミオシン系の外界になされる。また、 $18 k_B T$ のうちの 8 割にあたる $15 k_B T$ は、ブラウニアンサーチとそれに付随したキャッチの過程から来ることも今回のプロジェクトで明らかにした点である。この過程で想定される水の作用としては、ミオシンが強くキャッチするのに伴うアクトミオシン周りの水和水の脱水和、および水の並進エントロピー効果(疎水相互作用)によるキャッチの維持である。脱水和に伴う自由エネルギー変化は正である(エネルギーバリアとなる)が、それを凌駕するだけの並進エントロピー効果による負の自由エネルギー変化が起こる。木下らの準定量的な理論解析でも十分説明できることが示されている。今回の実験は、ショ糖によって脱水和が起こりやすくなりエネルギーバリアが下がりキャッチが起こりやすくなってアクチンに沿ったバイアスブラウン運動が観察されやすくなったと考えられる。

細胞内では、多種多様な生体分子が混雑しており水の並進エントロピー効果もショ糖での効果と同様に強められる方向にある。実際の細胞内で力発生を計測すれば、ミオシンのアクチンに沿ったバイアスブラウン運動(力発生)が観察されるかもしれない。また、細胞周期によって細胞内の混雑の具合も変化するため、ミオシンとアクチン間の親和力の変化(例えば細胞分裂時のアクトミオシン収縮リングに分裂を有利に引き起こすことができるかもしれない)や力発生モードのスイッチングが起こる可能性も見えてきた。これらの現象が細胞内で見えれば、水の作用(役割)は生理的に本質的な重要性を持つことになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

岩城 光宏、ブラウン型ナノマシンの作動原理、生物物理学会誌、査読有、53 巻、2013、164-165

DOI:10.2142/biophys.53.164

K.Fujita, M. Iwaki, A. Iwane, L. Marcucci, T. Yanagida, Switching of myosin-V motion between the lever-arm

swing and Brownian search-and-catch, Nature Communications, 査読有, 3, 2012

DOI:10.1038/ncomms1934

K. Amano, T. Yoshidome, M. Iwaki, M. Suzuki, M. Kinoshita, Entropic potential field formed for a linear motor protein near a filament: Statistical mechanical analyses using simple models, Journal of Chemical Physics, 査読有、133, 045103, 2010

DOI: 10.1063/1.3462279

岩城光宏、ストレインセンサーが制御するミオシン VI のブラウン運動整流機構、生物物理学会誌、査読有、50 巻、2010、88-89

DOI: 10.2142/biophys.50.88

M. Iwaki, A. Iwane, T. Shimokawa, R. Cooke, T. Yanagida, Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps, Nature Chemical Biology, 査読有, 5, 2009

DOI: 10.1038/nchembio.171

[学会発表](計14件)

M. Iwaki, T. Yanagida, W. Shih, Designing of Self-assembled Bio molecular System and the Detection at the Single Molecule Resolution, 58th Annual Meeting, Biophysical Society, 2014 年 2 月 15 日 2 月 19 日, Moscone Center, San Francisco, USA

M. Iwaki, T. Yanagida, W. Shih, Designing of Self-assembled Bio molecular System and the Detection at the Single Molecule Resolution, 第 51 回生物物理学会年会、2013 年 10 月 28 日 10 月 30 日、京都国際会館、京都

M. Iwaki, Multiple regulation of force generation mode for single actomyosin motor, 7th International Conference on Engineering Complexity (招待講演), 2013 年 6 月 10 日 6 月 13 日, Hotel Hohe Dune, Rostock-Warnemunde, Germany

岩城 光宏、アクトミオシンモーターの 1 分子計測から見た ATP エネルギー変換と共溶媒の効果、新学術領域研究公開終了シンポジウム(招待講演)、2013 年 5 月 22 日、KKR 東京、東京

M. Iwaki, Discovery of strain-sensor mechanism in motor protein and the quantification for the energy conversion, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演), 2012 年 9 月 22 日 9 月 24 日, 名古屋大学、愛知

M. Iwaki, Brownian search-and-catch

mechanism in motor protein and the quantification for the energy conversion, Workshop:Active Dynamics on Microscales(招待講演), 2012年9月16日 9月19日, Lorentz Center, Netherland

岩城光宏他、ミオシン XI の1分子解析、日本植物学会第76回大会(招待講演)、2012年9月15日 9月17日、兵庫県立大学、兵庫

岩城 光宏、ATP 駆動蛋白質の化学力学変換機構の1分子解析、新学術領域合同公開シンポジウム、2012年9月14日 9月15日、大阪ガーデンパレス、大阪

M. Iwaki, Observation of mechanical process for myosin-II by a dark-field microscopy combined with an optical trap, Biophysical Society 55th Annual meeting, 2011年3月5日、Baltimore, Maryland

M. Iwaki, Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps, Gordon research conferences -Stochastic physics in biology-, 2011年1月23-29日、Ventura, California

岩城光宏、共溶媒の効果：ATP 駆動蛋白質の1分子計測の場合、日本物理学会第65回年次大会(招待講演)、2010年3月22日、岡山大学、岡山

M. Iwaki, Effect of Cosolvent on Brownian search-and-catch mechanism for actomyosin, International Symposium on Hydration and ATP energy, 2010年3月8-10日、仙台

M. Iwaki, Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps, Biophysical society 54th annual meeting, 2010年2月20-24日、San Francisco

岩城光宏、ナノ粒子を利用したモーター蛋白質の高速1分子イメージングと操作、第82回日本生化学会大会(招待講演)、2009年、10月21日、神戸国際会議場、兵庫

〔図書〕(計3件)

岩城 光宏、ナップ、筋機能改善の理学療法とそのメカニズム、2014、印刷中

M. Iwaki, World Scientific, Engineering of Chemical Complexity II, 2014, in press

M. Iwaki, L. Marcucci, Y. Togashi, T. Yanagida, World Scientific, Engineering of Chemical Complexity, 2013, 79-100

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ポリヌクレオチドを用いたコイル及びその製造方法

発明者：岩城 光宏

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2013-042322

出願年月日：2013年3月4日

国内外の別：国内

〔その他〕

報道関連情報

岩城光宏、日本経済新聞「筋肉を収縮させる力 分子センサーが制御」2009年5月

Mitsuhiro Iwaki, 大阪大学出版会、「Annual Report of Osaka University -Academic Achievement- 2009-2010」, 2010年、1頁

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/cdo/iwaki-subg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 光宏 (IWAKI, Mitsuhiro)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：30432503