

令和元年6月14日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05248

研究課題名(和文) アクティブなゆらぎ環境下での生体分子モーターキネシンの1分子運動解析

研究課題名(英文) Single Molecule Motion Analysis of Biomolecular Motor Kinesin in an Active Fluctuation Environment

研究代表者

有賀 隆行 (ARIGA, Takayuki)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授(特命)

研究者番号：30452262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：微小管の上を歩きながら荷物を運ぶ生体分子モーターであるキネシンは、熱ゆらぎがその運動機能に関わっている。一方、それらが働く細胞内部も熱ゆらぎとは別に非熱的なゆらぎを自ら生みだしていることが明らかになった。そこで本研究では、そのような非熱的にゆらいだ環境におけるキネシンの運動を、実験と理論の両面から検証した。その結果、キネシンは外力のゆらぎによって、その運動様式を変化させることが明らかになった。また、微小な外力に対する応答と速度ゆらぎの関係から散逸を計測し、キネシンの非平衡エネルギー論を明らかにした。さらに、生きた細胞内での力学計測を目指して、計測装置の改良と新しいプローブ粒子の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、レール上を歩行するタイプの分子モーターであるキネシンで初めて、エネルギーの入出力の解析を行うことができた。また、そのキネシンの運動が、細胞の内部という特殊な環境に特化した性能を持っていることも示唆された。それらの成果は、生物が、未だ人類の知らない未知のエネルギー変換の仕組みをうまく利用している可能性を仄めかしており、本研究はそれを理解する道を拓いた。このように、小さな生体分子から学ぶエネルギー変換の仕組みは、近年活発に開発されている人工分子モーターの構築や設計(2016年度ノーベル化学賞受賞)と、そのドラッグデリバリーシステムへの医療応用などにも役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Kinesin is a molecular motor that carries various loads while walking on a microtubule, where thermal fluctuation is involved in the motor function. On the other hand, it has been revealed that the intracellular environment where they work also generates nonthermal fluctuation in addition to the thermal fluctuation. In this study, the motion of kinesin in such a non-thermally fluctuated environment was examined both experimentally and theoretically. As a result, we found that kinesin changes its motion behavior by adding external force fluctuations. Next, we clarified the nonequilibrium energetics of kinesin by measuring its dissipation from the relationship between the velocity fluctuation and the response to a tiny external force. In addition, with the aim of the force measurement in living cells, we improved the measurement system and developed novel probe particles.

研究分野：生物物理学

キーワード：生体分子モーター エネルギー変換 1分子計測・操作 非平衡物理学 生物物理

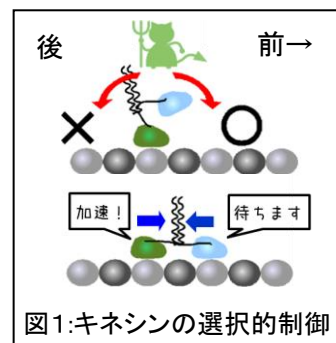
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では、ATP合成酵素の部分複合体であるF<sub>1</sub>や、微小管というレール上を二足歩行して小胞を輸送するキネシンに代表される生体分子モーターがエネルギー変換装置として働いている。そしてその個々のメカニズムについては、90年代から急速に発展した光学顕微鏡を用いた1分子計測技術により、多くの理解が得られてきた。しかし、これらの生体分子モーターを非平衡系で働く自律システムとみなしたときに、適用すべき普遍法則が確立されていないことはもとより、その確立を目指した研究自体が、ほとんど行われていないのが現状であった。

我々はこれまで、生体分子モーターを用いた従来の1分子計測手法を「1分子」からさらに階層を1つ下げ、1つの分子を複数のサブユニットが協調して働くシステムとみなして分子内部での構造変化を直接観察する系を構築してきた。例えば、回転分子モーターであるF<sub>1</sub>では3つあるサブユニットの1つのみに変異を導入する手法を独自に開発し、F<sub>1</sub>が実際に3つの酵素部位で別々の働きを順番に交代で行う機構を明らかにした(Arigo *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007)。

次に我々は、キネシンに前述のF<sub>1</sub>で開発した手法を適用し、加水分解の素過程のみを遅くするR203K変異を一方の頭部のみに導入したヘテロダイマーキネシンの1分子観察を行った。その結果、変異を導入した頭部が前側にあるときには素早く運動でき、後側にあるときに律速過程となることが観察された。この結果は、従来受け入れられていた前頭部での加水分解による構造変化によって後頭部が前に運ばれるというパワーstroke仮説(Rice *Nature* 1999)を明確に否定しており、“前・後頭部の微小管からの結合・解離を加水分解反応で制御することにより、浮いた頭部の熱ゆらぎから一方向性の運動を作りだす”という新たな運動モデルを提示した(図1)。



さらに、レーザー光で微小な誘電体を捕捉する光ピンセットにフィードバックを導入したフォースクランプ装置(次頁図2)を用いて、キネシンの力学特性を計測した。その結果、ヘテロダイマーキネシンは、エネルギー源となる供給ATP濃度が同じ条件下にもかかわらず、最大力が野生型の約半分になるという結果が得られた。これらの結果から、キネシンは「熱ゆらぎ」を積極的に利用し整流することで力生成を行う、マクスウェルの悪魔型の運動機構を持つことを明らかにした(有賀、物性研究、2011)。

以上のように、これまでの研究では代表者の成果も含めてモーター分子の「機能」だけに着目した観察研究が主流であり、その発展と比較すると物理的側面に関しては理解が遅れているのが現状であった。その原因は1分子のような小さい系ではゆらぎの効果が顕著に現れるために完成された熱力学の適用が難しいこと、またATPを消費して駆動するモーター分子は本質的に非平衡な系でありながら、その統一的な理論の枠組みが完成されていないことなどが原因として挙げられる。しかし、近年になって非平衡条件で成り立つ幾つかの等式が理論的に提唱(Evans *PRL* 1993, Jarzynski *PRL* 1997, Harada *PRL* 2005)され、その実験的検証(Wang *PRL* 2002, Liphardt *Science* 2002, Toyabe *PRL* 2010)も進みつつある。そこで我々は、非平衡系で成り立つ新しい等式(Harada-Sasa 等式)を利用することで、モーター分子からの非平衡散逸を計測し、モデルシミュレーションの結果と比較しながら生体内の運動で意味のあるエネルギー変換効率の定量を進めてきた。

一方で、それらが実際に働いている細胞内という場合は、レールとして機能している細胞骨格それ自体がアクティブに非平衡ゆらぎを生み出しているという新しい知見が、研究協力者である九州大学の水野准教授らによりマイクロレオロジーの観点から明らかにされてきた(Mizuno *Science* 2007)。細胞内でのモーター分子の挙動は*in vitro*(試験管内)で知られている特性だけでは説明出来ないことも多く、これらの“アクティブな外部環境”の生み出す非平衡ゆらぎが、細胞内でゆらぎを利用するモーター分子の運動に積極的な寄与をしているのではないかと着想した。

### 2. 研究の目的

キネシンの運動に、人為的に外力のゆらぎを与える手法、さらには生きた細胞内での運動観察および操作手法を確立し、その環境下での運動様式やエネルギー変換効率、非平衡散逸といった物理量を定量・解析する。アクティブな非平衡ゆらぎを与える環境内での分子モーターの運動解析およびモデルシミュレーションとの比較を通じて、分子モーターが非平衡な環境下で行うエネルギー変換の定量的な理解と、細胞内で見られる分子モーターの挙動と*in vitro*での挙動の違いの定性的な理解を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 我々のこれまでの研究では、*in vitro* で、すなわちガラスチャンパー内の水溶液中に、モーターであるキネシンとレールとなる微小管、さらに小胞を模した荷物の代わり兼計測プローブとなる微小ビーズという最小の組み合わせのみを再構成した系において、キネシンの運動解析を行ってきた(図2)。しかし、実際の細胞内では細胞を形作る細胞骨格そのものがアクティブに働く非平衡な環境を構築していることが明らかになっている。そこで我々は、非平衡なゆらぎを持つ外部環境がキネシンの運動に与える影響を調べるために、まずはキネシンの運動に対して光ピンセットを用いて外力にゆらぎを与え、その運動を観察した。

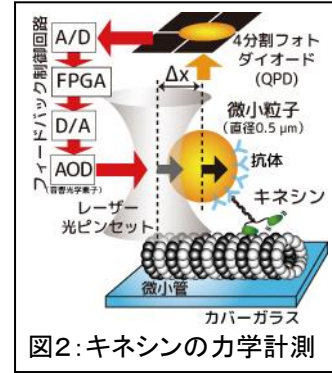


図2: キネシンの力学計測

(2) また近年、分子モーターの効率を測る一つの指標として、ゆらぎと応答を結びつける新しい非平衡関係式(Harada-Sasa 等式)が提唱された(Harada *PRL* 2005)。この理論を用いると、キネシンに積極的な外力による摂動を与えて得られる運動の応答と、速度のゆらぎを観測することにより、その差分から非平衡過程で散逸するエネルギーを算出できる。さらに仕事として用いられるエネルギーと比較することで、ATP 加水分解から利用できるエネルギー効率の定量が可能となる。そこで、キネシンに微小な外力ゆらぎを与えてその応答を計測し、非平衡エネルギー変換効率を定量した。

(3) これまでに確立した光ピンセットのフィードバック制御に加えて、観察ステージにもフィードバック制御を導入する装置の改良を行った。光ピンセットと観測ステージの両方にフィードバックを導入する「Dual フィードバック」という装置については、同様の計測装置が細胞内におけるレオロジー計測のために、研究協力者である水野大介准教授らと共同で開発している。この Dual フィードバックは細胞のように大きく動いてしまう媒質中でプローブとなる微小粒子を安定に追いかけてながら細かい力学操作を可能にする仕組みであり、本計画ではこれを前述のキネシン 1 分子計測用の顕微鏡に導入する。この導入により、これまで行う事ができなかった細胞内でのキネシン運動のフィードバック制御計測への応用を可能とした。

(4) 発展的な計画として、キネシンの力学計測を実際に生きた細胞内で行い、Harada-Sasa 等式を用いた細胞内でのキネシン運動の非平衡散逸の定量を目指した。単純には細胞内で計画(2)同様の計測を行うものであるが、細胞内に打ち込んだプローブ粒子の観察自体は研究協力者である水野准教授の研究室でも既に行われており、キネシンを付加した粒子を用いることで運動する粒子としての観察が可能となる。ちなみに、細胞内でのキネシンによる単純な力計測自体は既に報告されている(Leidel *Biophys. J.* 2012 他)が、フィードバック制御を用いた力学応答計測には前例がなく、新しい知見が期待できる。

### 4. 研究成果

(1) 実際にゆらぎの影響を見る実験に先立って、これまでに得られた実験的パラメーターを元にした現象論的なキネシンのモデルを用いて、外部ゆらぎがどのようにキネシンの運動に影響を及ぼすか、計算機シミュレーションを行った。その結果、キネシンは外部の非熱的なゆらぎに応答して、運動様式を変化させることが示唆された。この知見を実験で検証するために、シミュレーションと並行して、これまでキネシンの運動計測に用いていた高速度フィードバック制御を可能とした光ピンセット装置にさらなる改良を加え、キネシンの運動に非ガウスのノイズを与える系の開発を行った。キネシンの運動計測に外部的なゆらぎを加えるための、高速度フィードバック制御を可能にした光ピンセット装置(図2)にさらなる改良を加え、キネシンの運動に非ガウスのノイズを与える系を確立した。その装置を用いて実際にキネシンの運動を観察したところ、外部からの力のゆらぎに伴ってその運動様式が変化するという実験結果を得た。その実験結果はシミュレーションによる理論予測と定量的にも一致を見ており、背景となる普遍的な物理法則に対する考察を加えた論文を投稿準備中である。

(2) 同じくこれまでに開発した高速度フィードバック制御を可能にした光ピンセット装置(図2)を利用して、外部から微小な力のゆらぎを与えて

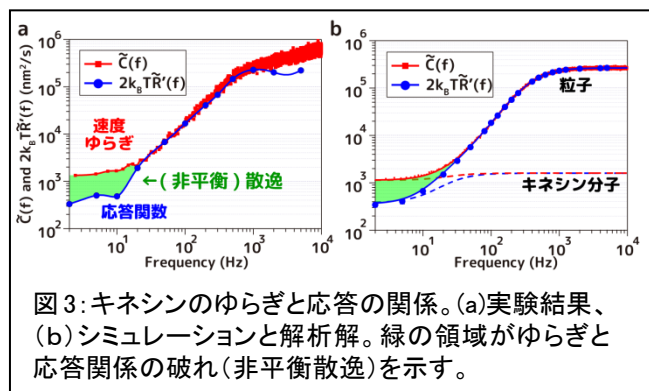


図3: キネシンのゆらぎと応答の関係。(a)実験結果、(b)シミュレーションと解析解。緑の領域がゆらぎと応答関係の破れ(非平衡散逸)を示す。

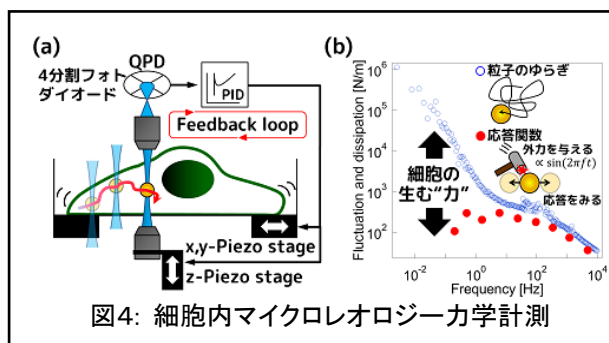


その応答を計測した。その結果を Harada-Sasa 等式を用いて解析したところ、キネシンの動きに伴う非平衡散逸が得られた (図 3a)。しかし、観察している粒子を介してなされる散逸は、入力のある自由エネルギーや、一定外力に対する仕事率に比べて桁違いに小さく、大きな“見えない散逸”が存在するという非自明な結果が得られた。その由来を探るため、我々はキネシンの数理モデルを構築し、計算機シミュレーションを通じてその挙動を再現した (図 3b)。さらに、このキネシンモデルに対して解析的に解く事を可能し、その解析解を用いることで、外部からの微小なゆらぎにより、粒子の応答だけでなく、キネシン分子がどのような応答を示すのかを理論的に求めることを可能にした (図 3b 点線)。その結果、“見えない散逸”は、キネシン分子の内部から散逸している“内部散逸”であることが示唆された。その成果は *Physical Review Letters* 誌に論文として発表した(雑誌論文①=T. Ariga *et al.*, *Phys. Rev. Lett.* **121**, 218101, 2018)。当該論文は、PRL 誌の *Editors' Suggestion* に選ばれ、また、*Featured in Physics* として APS 誌上で紹介記事 (A. G. Hendricks, *Physics* **11**, 120, 2018) も書かれた。

この成果は、代表者の所属する山口大学と、共同研究を行った青山学院大学、九州大学との共同でプレスリリースも行った ([http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2018/\\_7502.html](http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2018/_7502.html))。

(3) 生きた細胞内部でのキネシンの 1 分子計測を目指して、装置のさらなる改良を行った。これまで力のフィードバック制御を可能にしていた計測装置 (図 2) に、3D ピエゾステージを導入し、光ピンセット (力) と同時にステージ (位置) のフィードバックも可能とする Dual フィードバック機構を 1 分子力学顕微鏡に組み込んだ。

また、細胞内での 1 分子力学応答計測の前段階として、メラミン粒子を細胞に打ち込み、その粒子に光ピンセットで応答計測することで、生きた細胞の内部環境でのゆらぎと応答の計測も行った (図 4a)。その結果、細胞内環境が大きくゆらいでいるということが定量的に明らかになった (図 4b)。研究協力者の水野准教授らとの共同研究として行ったその成果は *Science Advances* 誌に発表した (雑誌論文②=K. Nishizawa *et al.*, *Science Advances* **3**, e1700318, 2017)。



(4) 発展的な計画としていた、生きた細胞の内部でのキネシン運動の直接計測を目指して、細胞内部でも光ピンセットによる操作を可能とする計測プローブの改良を行った。細胞内部は高い屈折率を持つため、通常の粒子を用いた光ピンセット法ではその操作が難しいという問題があった。その解決のため、高い屈折率と低い反射率を持つ新しい計測プローブとなる粒子を作製した。化学合成により作製した新しい粒子については、電子顕微鏡を用いて構造を確かめ、*in vitro* の条件で光ピンセットを用いたキネシンの力学計測が出来ることも確かめた。実際に生きた細胞内への導入にはさまざまな困難があり、研究期間内での成功までは至らなかったが、(3) で開発した Dual フィードバックを導入した新しい顕微鏡装置と、新規のプローブ粒子は、細胞内での 1 分子力学応答計測への道を拓くと期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① T. Ariga\*, M. Tomishige, D. Mizuno, Nonequilibrium energetics of molecular motor kinesin, *Physical Review Letters*, **21**, 218191(2018) DOI: 10.1103/PhysRevLett.121.218101, 査読有。
- ② K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C. F. Schmidt, T. Ariga, D. Mizuno\*, “Feedback-tracking microrheology in living cells”, *Science Advances*, **3**, e1700318 (2017) DOI: 10.1126/sciadv.1700318, 査読有。

[学会発表] (計 17 件)

- ① 有賀隆行、「生体分子モーター・キネシンのエネルギー収支」、福工大土曜談話会、2019/03/23、福岡・福岡工業大学 (招待講演)
- ② 有賀隆行、「生体分子モーターの非平衡エネルギー論 ～キネシンは効率の悪いモーターだった！？～」、第 2 回岡崎発動分子科学セミナー、2019/02/18、岡崎・分子研 (招待講演)
- ③ T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, “Nonequilibrium energetics of single molecule motor, kinesin”, 10th biennial workshop on Single Molecule Biophysics, 2019/1/6, Aspen, CO, USA
- ④ T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, “Energetics of molecular motor kinesin”, International Conference on APEF2018, 2018/11/11, Tokyo, Japan
- ⑤ 有賀隆行「分子モーターキネシンの非平衡エネルギー論と細胞内アクティブ環境」理論と

実験研究会 2018/10/04 広島・広島大学（口頭発表）

- ⑥ T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, “Nonequilibrium Energetics of Single Molecule Motor, Kinesin-1”, 62nd Annual Meeting Biophysical Society, 2018/2/17, San Francisco, USA
- ⑦ T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, “Nonequilibrium energy dissipation from molecular motor kinesin”, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017, 2017/11/20, Sendai, Japan
- ⑧ 有賀隆行、富重道雄、水野大介「Nonequilibrium energetics of kinesin」第55回日本生物物理学会年会、2017/09/18、熊本・熊本大学黒髪北キャンパス
- ⑨ 有賀隆行、富重道雄、水野大介「キネシンの非平衡エネルギー計測と解析」日本物理学会 第72回年次大会、2017/03/17、大阪・大阪大学豊中キャンパス
- ⑩ 有賀隆行、富重道雄、水野大介 “Non-equilibrium dissipation of kinesin” 第54回日本生物物理学会大会、2016/11/26、茨城・つくば国際会議場
- ⑪ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、水野大介 “Nonlinear mechanical properties of Cytoskeletons measured with Dual-Feedback Microrheology” 第54回日本生物物理学会大会、2016/11/25、茨城・つくば国際会議場
- ⑫ 有賀隆行、“Non-equilibrium energetics of molecular motor kinesin” ゆらぎと構造の協奏第3回領域研究会 2016/06/17 福岡・九州大学伊都キャンパス
- ⑬ N. Honda, K. Nishizawa, T. Ariga, D. Mizuno, “Dual-feedback microrheology in cytoskeletal networks”, 2016/03/17 APS March Meeting 2016, Baltimore, USA
- ⑭ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、水野大介「多重フィードバックによる細胞骨格のマイクロレオロジー計測」第5回ソフトマター研究会 2015/12/18 仙台・東北大学青葉山キャンパス
- ⑮ N. Honda, K. Nishizawa, T. Ariga, T. Yanagishima, D. Mizuno, “Dual-feedback microrheology in cytoskeletal networks”, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2015/08/20 Kyoto, Japan
- ⑯ T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, “Non-equilibrium energy measurement of molecular motor kinesin”, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2015/08/20, Kyoto, Japan
- ⑰ 有賀隆行、富重道雄、水野大介「生体分子モーターキネシンの非平衡エネルギー計測」ゆらぎと構造の協奏第2回公開シンポジウム 2015/05/01 東京・東京大学本郷キャンパス

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ：[https://researchmap.jp/ariga\\_takayuki/](https://researchmap.jp/ariga_takayuki/)

プレスリリース：[http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2018/\\_7502.html](http://www.yamaguchi-u.ac.jp/weeklynews/2018/_7502.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：水野 大介

ローマ字氏名：(MIZUNO, Daisuke)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。