

令和元年5月24日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14375

研究課題名(和文) 生体ブラウニアンマシン集合系のデザインと協調メカニズムの解明

研究課題名(英文) Design of Brownian motor assembly and deciphering the coordinated motion

研究代表者

岩城 光宏 (Iwaki, Mitsuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、熱ゆらぎの場の中で安定かつ省エネルギーで生理的機能を創発する筋肉の収縮単位であるミオシンフィラメントを、DNAナノテクノロジーを駆使してデザインし、内部のモーター分子群の動態を1分子レベルで解析するのが目的である。今回、DNAオリガミとヒト骨格筋ミオシンから構成された人工ミオシンフィラメントの設計を行い、全反射照明型の暗視野顕微鏡、高速原子間力顕微鏡を駆使することで、フィラメント内のミオシン1分子動態と分子間での協調的な運動をこれまでにない解像度で直視することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの生命活動のエネルギー源はアデノシン三リン酸(ATP)であり、その加水分解で得られる自由エネルギー差は、熱ゆらぎ( $\sim kBT$ )の高々20倍程度である。そのため、このエネルギーを駆動源にする生体分子は、熱ゆらぎを完全に遮断できず、ある程度の誤作動も許容しながら機能するブラウニアンマシンである。今回、骨格筋や心臓拍動を駆動するブラウニアンマシンであるミオシン集団内の個々の分子動態を世界で初めて直視することに成功した。心臓拍動のメカニズムやミオシンの遺伝的変異を原因とする心筋症の理解、化学的なナノマシン設計への大きな指針を提供することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Muscle contraction can be explained by the swinging lever-arm model. However, the dynamic features of how the myosin head swings the lever-arm and its initial interactions with actin are not well understood even though they are essential for the force generation, contraction speed, heat production, and response to mechanical perturbations. This is because myosin heads during force generation have not been directly visualized. Here, we engineered thick filaments comprising DNA origami and recombinant human muscle myosin, and directly visualized the heads during force generation using nanometer-precision single-molecule imaging. We found that when the head diffuses, it weakly interacts with actin and then strongly binds preferentially to the forward region as a Brownian ratchet. Upon strong binding, the head two-step lever-arm swing dominantly halts at the first step and occasionally reverses direction. These results can explain all mechanical characteristics of muscle contraction.

研究分野：生物物理

キーワード：DNAナノテクノロジー ミオシン 筋収縮 1分子計測 ブラウニアンラチェット

1. 研究開始当初の背景

多くの生命活動のエネルギー源はアデノシン三リン酸(ATP)であり、その加水分解で得られる自由エネルギー差は、熱ゆらぎ( $\sim k_B T$ )の高々20倍程度である。そのため、このエネルギーを駆動源にする生体分子は、熱ゆらぎを完全に遮断できず、ある程度の誤作動も許容しながら機能している。研究代表者はこれまでに、ATPを駆動力として力発生を行うモーター蛋白質、ミオシンの運動素過程観察と力学摂動を1分子レベルで行ってきた。生命の運動素子1個を単離した系において従来の機能発現モデルを覆し、ブラウニアンマシンとしての性質に光を当てることができたが、骨格筋や心筋のような、ミオシン(ブラウニアンマシン)の集合系(ミオシンフィラメント)において、どのように個々の分子が熱ゆらぎの場の中で協調しながら安定かつ効率的な収縮を行っているのかは、長い筋肉研究の歴史の中でも直視された例はなく、残された大きな課題であった。

2. 研究の目的

熱揺らぎの場の中で安定かつ省エネルギーで生理的機能を創発する筋肉の収縮単位であるミオシンフィラメントを、DNAナノテクノロジーを駆使してデザインし、内部のモーター分子群の動態を1分子レベルで解析する。モータータンパク質であるミオシンのフィラメント内での動態および生み出される力場の可視化、モーター間の力学的なコミュニケーションによって創発される協同効果の観察を通して、筋肉を代表とする生命の運動装置が、不確定性の多い揺らいだ場の中でいかに極小エネルギーで安定かつ効率的に動作するかを理解するのが最終目標である。

3. 研究の方法

DNAオリガミで作成したフィラメント様ナノ構造体と、筋肉細胞から発現・精製した筋肉ミオシンを用いて人工ミオシンフィラメントを作成する。フィラメント内の複数のミオシン分子近傍に蛍光もしくは光散乱プローブ(金ナノ粒子)をラベルして、1分子蛍光顕微鏡もしくはレーザー暗視野顕微鏡を用いて1分子観察を行う。フィラメント内のミオシン分子の運動素過程観察、ミオシン分子間の運動相関を解析する。

4. 研究成果

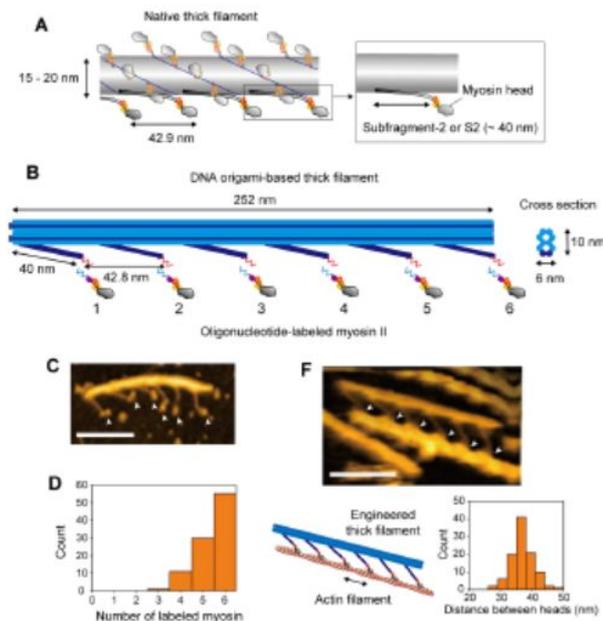


図1 人工ミオシンフィラメント

シンフィラメントを設計することに成功した。

(1) 天然のミオシンフィラメントは、モーター部位(ヘッド)の配置がバックボーンに対して右らせん構造を取り、同じ配向を持つヘッドが42.9 nm間隔で並んでいる(図1A)。この構造を厳密に再現した、DNAナノ構造物を作製し、骨格筋細胞から発現・精製した骨格筋ミオシンIIaをDNAナノ構造物の目的の部位にラベルを行った(図1B)。AFM観察により、設計通りの人工ミオシンフィラメントが出来上がっていることを確認し(図1C)、90%以上のラベル率を持って、ミオシンヘッドが結合していることを確認した(図1D)。また、ATP非存在下でアクチンフィラメントライゲル結合をさせてAFM観察を行ったところ、筋細胞内で観察されるクロスブリッジ構造も確認できた(図1F)ため、生理的なジオメトリに非常に近い形で、ミオ

(2) 次に、人工ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを結合させたアクトミオシン複合体を形成後に、ATPを添加し高速AFMにてミオシン動態の観察を行った。In vitro motility assayの蛍光観察で見られるような、アクチンフィラメントの滑り運動を観察す

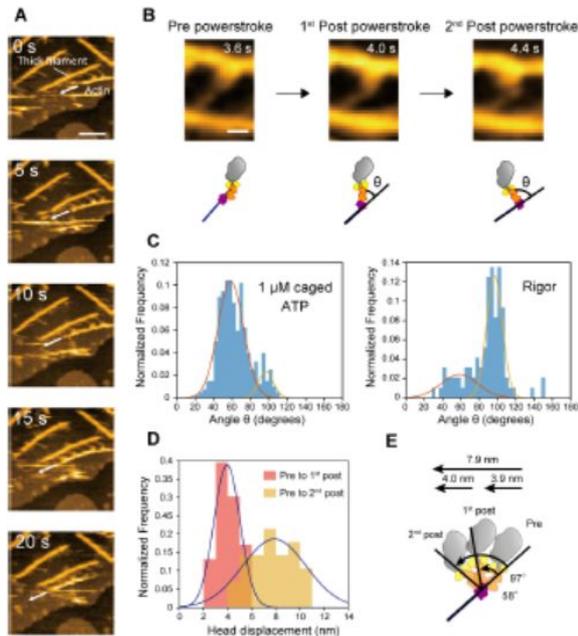


図2 ヘッドの構造動態解析

となる割合が多く、内部負荷がかかるためではないかと考えている。いずれにせよ、筋肉ミオシンのレバーアームの構造変化を直視した例は初めてであり、今回の構造動態は、A.F. Huxley, H.E. Huxley らが提唱してきた、筋収縮の理論モデルの大前提となるクロスブリッジ動態の仮定とコンシステントであり、筋収縮のほぼ全ての力学特性(負荷-速度関係、エネルギー効率、熱産生、外力摂動時の適応特性など)を説明可能にする分子基盤を証明した、筋収縮研究のマイルストーンとなる。

- (3) さらに、高時間分解能でのミオシン動態を捉えるために、全反射照明型のレーザー暗視野顕微鏡法を構築し、ミオシンフィラメント内のヘッドレバーアームの近傍に40nmの金ナノ粒子をラベルした(図3A,B)。また、ミオシン1分子の動態を正確にとらえるために、この系では、ミオシンフィラメント内の他のミオシンラベル位置に、ミオシンでなく、アクチン結合タンパク質であるアクチニンのアクチン結合部位をラベルすることにした。アクトミオシン複合体と同様の構造を形成するかAFM観察を行ったところ、同様の構造形成さ

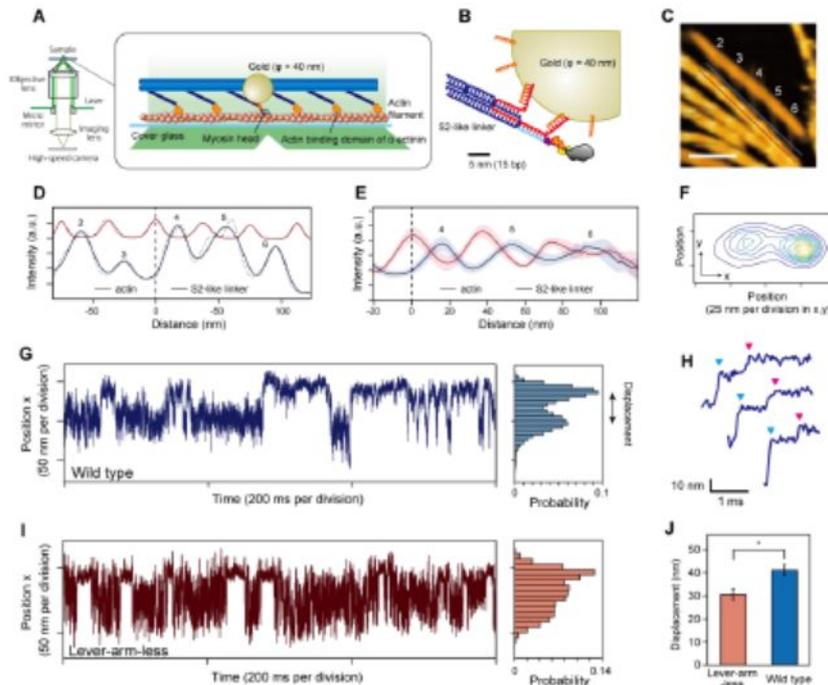


図3 ヘッドの高速1分子イメージング

ることができ(図2A)、驚くべきことに、クロスブリッジの構造変化まで捉えることが可能になった(図2B)。クロスブリッジは、ミオシンヘッドとレバーアーム、S2部位と呼ばれるコイルドコイル構造から構成されている。力発生時には、レバーアームの構造変化が報告されているので、おそらく、レバーアームの構造変化を捉えていると考えられる。力発生に伴うレバーアームの構造変化は2段階で起きており、逆戻りすることもあることから可逆的な構造変化であることが直視できた。ATP存在下では、2段階目までの構造変化を行う確率は少なく、1段階目で止まることがほとんどであった(図2C)。ヘッドの変位を定量すると、5+5 nmの2段階で起きることが分かった(図2D,E)。1段階目で止まる理由としては、おそらく、ATP濃度が低いため、ミオシンフィラメント内でドラッグモーター

れることが確認された(図 3C-E)。ATP 存在下にて、ミオシンにラベルされた金ナノ粒子の重心位置を 5 オングストローム、40 マイクロ秒の分解能にて観察を行ったところ、ヘッドの一方方向運動が観察された(図 3F,G)。ステップの立ち上がりを見ると、2 段階で起きており(図 3H)、10nm 程度の変位であったことから、レバーアームの構造変化由来のシグナルであると考えられた。そこで、レバーアームを削った変異体を構築し、同様の実験を行ったところ、10nm の変位が消失したため(図 3I,J)、立ち上がり 2 段階目の 10nm ステップはレバーアームの構造変化による力発生であることが確認された。驚くこととして、レバーアームがなくても一方方向運動は観察され、30nm 程度のステップサイズであった。これは、ヘッドがアクチンに対してバイアス結合をしていることを示しており、筋収縮において、ブラウニアンラチェットの機構が働いていることを示唆した。

- (4) そこで、バイアス結合の過程を詳細に観察するために、立ち上がり直前のトラジェクトリをノンパラメトリックなベイズ推定法によるアクチンとの相互作用解析を行った。

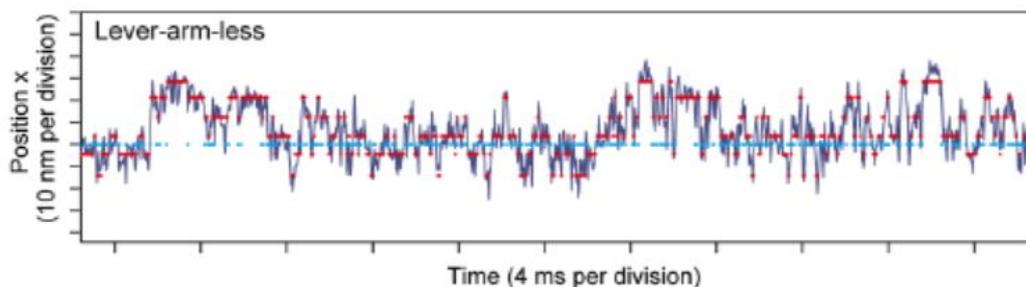
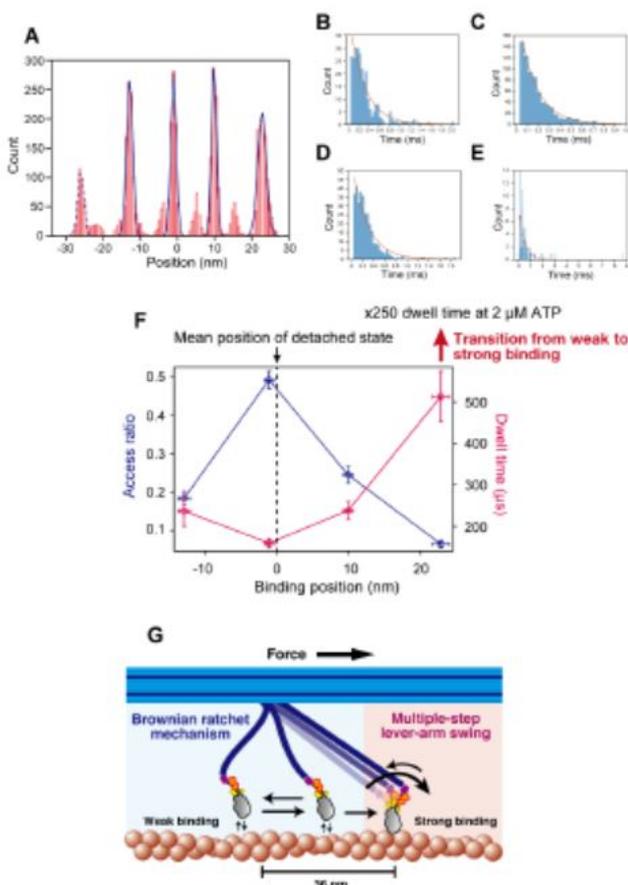


図 4 ヘッドとアクチンの弱結合

図 4 の青色の線がアクチンから解離してブラウン運動しているヘッドの平均位置であり、赤線がベイズ推定によって認識されたアクチンとの弱結合である。アクチンフィラメント上で複数の結合部位を探索している様子が観察され、各位置へのアクセス頻度(つまりオンレイト)と、結合時間(オフレイト)が位置依存的事であることを発見した(図 5A-F)。これは、いわゆるブラウニアンラチェットが持つ典型的な特性であり、弱結合の最前方にて強結合に入りレバーアームスウィングをすることがわかった。筋肉におけるこのようなブラウニアンラチェット機構(図 5G)を証明したのは初めての例となる。



結論として、今回、人工ミオシンフィラメントを開発することで、フィラメント内の分子動態をこれまでになく解像度で捉えることができた。また、今回データ示さないが、高速 AFM によって、各ミオシン動態の運動相関も直視することができ、協同的な力発生など興味深い現象を観察するに至った。フィラメント内の協同現象を解明できる日も近いと考えている。

図 5 弱結合の解析とヘッドの力発生モデル

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

K. Hayashi, Y. Tsuchizawa, M. Iwaki, Y. Okada, "Application of the fluctuation theorem for noninvasive force measurement in living neuronal axons." *Molecular Biology of the Cell*, mbcE18010022 (2018), 査読有 DOI: 10.1091/mbc.E18-01-0022

### 〔学会発表〕(計 5 件)

岩城光宏, 「DNA ナノテクノロジーと1分子計測技術の融合が拓くモーター分子動態・力の高解像イメージング」, 第8回分子モーター討論会, 2018年

岩城光宏, 「DNA ナノテクノロジーと1分子計測技術の融合が拓く分子動態・力の高解像イメージング」第56回日本生物物理学会年会シンポジウム, 2018年

岩城光宏, 「DNA ナノテクノロジーが開拓するナノメディシン」, 第55回薬剤学懇談会研究討論会, 2018年

岩城光宏, 「幹細胞分化の力学制御を指向したDNA ナノデバイス開発」, BioJapan2017, 2017年

岩城光宏, 「DNA ナノテクノロジーの生命科学研究への応用と現状」, 武田薬品工業株式会社湘南研究所セミナー, 2017年

### 〔図書〕(計 3 件)

岩城光宏, バイオサイエンスとインダストリー(B&I)、幹細胞分化の力学制御を指向したDNA ナノデバイス開発, 2018, Vol.76, 160-161

M. Iwaki, K. Itoh, K. Fujita, ELSEVIER, *The role of water in ATP hydrolysis energy transduction by protein machinery*, Single molecule analysis of actomyosin in the presence of osmolyte, 2018, 245-256

岩城光宏, 自動車技術(超の世界), 世界最小の人工バネでタンパク質の動きを捉える, 2017, Vol. 71, 96-97

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：川口 利華

ローマ字氏名：Rika Kawaguchi

研究協力者氏名：藤田 恵介

ローマ字氏名：Keisuke Fujita

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。