

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2007～2009
課題番号：19207011
研究課題名（和文） 細胞運動システムの階層的機能構築
研究課題名（英文） Hierarchical Functional Construction of Cellular Motile Systems
研究代表者
石渡 信一（ISHIWATA Shin'ichi）
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：10130866

研究成果の概要（和文）：本課題は、分子モーターシステムの“酵素機能における力の役割”を1分子レベルから分子集合体、ひいては細胞に至るまでの階層構造に着目して研究することにある。この3年間での主な研究成果をまとめる。1) アクチンフィラメントの上を一分子で歩行運動する Myosin V に、光ピンセットを用いて様々な方向に外力を加え、それに対する ATP 存在下での歩行運動の安定性や、ADP 存在下での様々な角度に加えた外力による破断力を測定し、安定な歩行運動機構を論じた（Oguchi et al., *Nature Chem. Biol.* 2010；Myosin VI については、Oguchi et al., *PNAS*. 2008）。また Myosin V や VI に限らず、Myosin II や Kinesin に関する1分子破断力測定の結果を纏めたレビューを発表した（Mikhailenko et al., *J. Royal Soc. Interface* 2010）。2) 単一筋原線維を用いて、中間活性化条件における外力刺激に対する各筋節の応答性を調べ、応答するものとしめないものとの2状態に分かれること、そして筋節間の力学連結性を明らかにし、多分子モーター系に特徴的な筋収縮・制御機構を解明した（Shimamoto et al., *PNAS*, 2009）。3) 横紋筋の自励振動現象（SPOC）を含む収縮特性を説明する理論を構築した（Sato et al., *Submitted* 2010）。4) カエル（*Xenopus*）卵の抽出液中で自己組織化された染色体分裂装置の力学特性（縦横の弾性率）と力学刺激応答に関する研究成果の第一弾を発表した（Itabashi et al., *Nature Methods*, 2009）。分裂装置に大変形を加えると自発的に小さなサイズに再編成されるなどの新知見を得た。5) 染色体分裂装置のラグビーボール形状の維持機構を解明する目的で、一对のガラス微小針を顕微操作して長軸（極）方向に引っ張り変形を加え、その応答性を定量的に検討した。その結果、強制的な形態変形に対して、微小管の重合・脱重合やキネシン・ダイニン系のモーター活性を通じて、ラグビーボール形状を維持するように適応することが明らかになった（論文準備中）。6) HeLa 細胞に局所熱パルス（0.1 から数 の温度変化、1 秒以上のパルス幅）を加えると、Ca²⁺振動が誘起されること、しかも、37 付近では0.2 ほどの小さな温度変化に応答することを発見した。これに IP₃ 受容体が関与していることを証明した（Suzuki et al., *HFSP J*, 2009）。

研究成果の概要（英文）：We focused on the examination of the effect of force on the activity of the molecular motors in a wide range of the hierarchical organization of the biological systems, from single molecules to assemblies of the motors and further on to the cells. Main achievements are summarized as follows: 1) The external forces were applied at various angles to the individual

molecules of myosin V, processively moving on actin filaments in the presence of ATP, to test the robustness of the motor's motility under various loads. Furthermore, the mechanism ensuring high stability of the myosin V's motility under external loads was revealed by applying loads in various directions and measuring the unbinding forces of individual actin–myosin V complexes at different [ADP] (Oguchi *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, 2010; for myosin VI, see Oguchi *et al.*, *PNAS*, 2008). The main results of the unbinding force measurements on different motors, including myosins V and VI, as well as myosin II and kinesin, were summarized and published (Mikhailenko *et al.*, *J. Royal Soc. Interface*, 2010). 2) The response of individual sarcomeres in a single myofibril to the external mechanical stimulation under intermediate activation conditions revealed the coexistence of two types of sarcomeres: those responding to the application of load, and those remaining indifferent. These observations confirmed the existence of a mechanical inter-sarcomere coordination, helping us to establish the characteristic mechanism of muscle contraction and regulation (Shimamoto *et al.*, *PNAS*, 2009). 3) We constructed the theoretic model explicitly describing the characteristics of contraction, including the auto-oscillation (SPOC), in a striated muscle (Sato *et al.*, 2010, submitted). 4) We published the first report based on our research on vertebrate meiotic spindles self-assembled in *Xenopus* egg extracts, in which we tested their mechanical properties, such as deformability and stiffness, and the response to mechanical perturbations (Itabashi *et al.*, *Nature Methods*, 2009). This work reported, inter alia, that the spontaneous re-assembly of spindles of different sizes can be induced by applying large controlled external loads. 5) To reveal the mechanisms underlying the stability of a characteristic “rugby ball”-like shape of the meiotic spindle, we quantitatively tested its response to mechanical stretch along the polar (long) axis, produced by the micromanipulation with a pair of microneedles. These measurements clearly demonstrated that a spindle responds to the large externally induced deformations, being able to preserve its shape via the modulation of polymerization /depolymerization of microtubules and the activity of kinesin and dynein molecular motors (MS in preparation). 6) We found that the local heating of HeLa cells using the ≥ 1 sec heat pulses, which increase the local temperature within cells by 0.1~few degrees centigrade, induces the oscillation of intracellular $[Ca^{2+}]$. Moreover, around 37°C the cell responds to small, $\sim 0.2^\circ C$, temperature changes, in which the IP_3 receptors were shown to be involved (Suzuki *et al.*, *HFSP J.*, 2009).

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2007年度 | 24,900,000 | 7,470,000 | 32,370,000 |
| 2008年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 2009年度 | 7,600,000 | 2,280,000 | 9,880,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 40,100,000 | 12,030,000 | 52,130,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生体分子モーター、SPOC、一分子計測、細胞分裂機構、細胞温度イメージング

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始した2007年4月の時点で、本課題に関係する研究の背景を簡潔にまとめる。1) 1分子レベルの研究では、Kinesin Myosin VなどのProcessive分子モーターの歩行運動メカニズムについて、分子内応力の重要性が指摘されていたが、実験的な証拠が不足していた。また、細胞内で運動する分子モーターには、あらゆる角度に負荷が加わると推測されるが、それに対する応答性については調べられていなかった。2) 横紋筋の中間活性化条件での自励振動現象(SPOC)の分子メカニズムについては、幾つもの状況証拠は得られていたが、納得できる理論は存在しなかった。3) 染色体分配装置の定量的なマイクロ力学研究は全く行われていなかった。我々自身もまだ研究を開始して間もなく、一つの論文も発表できていなかった。4) 細胞温度のイメージングや、細胞機能への熱パルスの影響についての研究は、細胞内での局所的熱産生の細胞生物学的な興味が出つつあったが、まだほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

1分子・分子集合体から高次構造体に至る各階層において、生体分子モーターシステムの"酵素機能における力の役割"を普遍的な原理として明らかにし、"酵素機能と力発生"の間に織りなすフィードバックループの存在を明確にすることを目的とする。具体的には、各種のMyosinやキネシンの、各ヌクレオチド状態における1分子結合様式や、結合のダイナミクスを明らかにする。遺伝子操作によってこれらの分子モーターや基質フィ

ラメントをつくるアクチン、チューブリンのアミノ酸置換体を作成し、分子モーターのみならず基質フィラメントの能動的機能についても検討する。1分子研究と並行して独自の分子集合体の再構成系を構築し、生体分子モーターシステムの構造・機能連関を明らかにする。そして究極の生体分子モーターシステムとして細胞分裂装置を取り上げ、有糸分裂における力の役割を明らかにする。温度パルス・イメージング法を開発し、生体システム階層性の最上位に位置する細胞研究の新局面を拓く。

3. 研究の方法

(1) 1分子モーターの試料と研究方法

昆虫細胞(sf9)発現系を用いて片足状態のミオシンV、VIを発現・精製し、光学顕微鏡の下、光ピンセット法を用いて外力を加えることで、分子内張力を再現し、ADPの結合能の外力依存性を検討した。

(2) 頭部間の連絡がとれなくなったミオシンV変異体の調製

ミオシンVコンバータードメイン内のフェニルアラニンをアラニン置換した変異体(F697A、F749A)を作成し、酵素活性測定や1分子運動解析を行った。

(3) 昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いた変異アクチンの発現とワンステップ精製法の確立

内在性アクチンに対し変異アクチンの圧倒的な高発現を示す昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を使用することで、内在性アクチンの分離プロセスを省略し、さらにワンステップでアクチンを精製する方法を確立した。

(4) 微小管系の構造と機能

- , -tubulin の点変異体を出芽酵母より発現・単離精製し(武藤悦子研(理研)による)キネシン-微小管相互作用や歩行運動への影響を、光学顕微鏡下、光ピンセット法を用いて検討した。

(5) 再構成運動系(nano-muscle系)

横紋筋の筋原線維を Gelsolin 処理することで選択的に細い(アクチン)フィラメントを除去して残った A 帯(太い(ミオシン)フィラメントの束)に対して、プラスチックビーズに結合した一本の精製アクチンフィラメントを滑り込ませるという実験系(A帯滑り運動系、別名 nano-muscle 系)を用いた。

(6) 染色体分配装置の調製と解析

ゼノパス卵エクストラクト中で自己組織的に形成された紡錘体の顕微力学操作を、先端径が 1 μm 程度の微小ガラス針や、MEMS カンチレバーを用いて行った。さらに、微小管ダイナミクスの解析に、蛍光 Tubulin の動きを追跡できる FSM (Fluorescence Speckle Microscopy) 法を導入した。

(7) ミクロ熱励起・温度イメージング

ミクロ熱励起法: ガラスピペット先端部に金属粉の固まり(直径数 μm)を固着し、そこに赤外レーザー光を集光して熱することで熱源とする方法を用いた。

ミクロ温度計: 先を閉じたガラスピペット先端部に蛍光色素 Eu-TTA を入れ、温度により変化する Eu-TTA の蛍光強度を EMCCD カメラで撮影・計測した。空間分解能は 1~2 μm 、温度分解能は最大で約 0.1 。

温度感受性ポリマー: 水溶液中、相転移温度前後で、6~7 の温度上昇により蛍光強度を約 13 倍強くする性質を持つ温度感受性蛍光ポリマー-poly(DBD-AE-co-NNPAM-co-NIPAM)を奈良女子大岩井薫研究室から提供され、これをマイクロインジェクションによって

HeLa 細胞の細胞質に導入した。

温度感受性シート: Eu-TTA を含む薄膜をガラスディッシュ上に作成し、薄膜の蛍光強度変化を EMCCD カメラで記録し、細胞の 2 次元温度変化のマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 1分子モーターのメカノケミストリー

ミオシン V を対象に、歩行運動方向だけでなく様々な角度に負荷を加え、分子内張力による ADP 結合能の変調機構を検討した。その結果、ミオシン V は様々な分子内張力に対応して歩行運動を制御できること、横力(運動方向に直交する外力)を受けても安定に運動できることが分かった。さらに、ミオシン V のレバーアーム(足に相当する部分)を短くすると、特定方向の分子内張力のみ歩行制御が可能であった。これらのことは、様々な分子内張力に対応した二足歩行の制御に、分子内張力を制御するレバーアーム部が重要であることを強く示唆する。

(2) 微小管系の構造と機能

-と -tubulin のアミノ酸置換変異体を用い、キネシン・微小管相互作用に関するアミノ酸残基を特定した。その結果、-tubulin 内の E415 が弱結合状態に大きく関与し、さらにキネシンからの ADP の解離を促進する役割を持つことも明らかになった。

(3) 頭部間の連絡がとれなくなったミオシン V 変異体の解析

ミオシン V コンバーター変異体(F697A と F749A)の酵素活性と FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)による構造変化の有無を調べたところ、両方とも ATPase 活性は保持しているが、F697A は構造変化を起こさず、F747A は構造変化を引き起こすが、アクチンの滑り速度は低下した。この結果は、プロセス運動における分子内応力の重要性を示唆する。

(4) 昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を

用いたリコンビナントアクチンの発現とワンステップ精製法の確立

C末端部位に His タグを付加したゲルゾリン (G4-6) を大腸菌で発現精製し、これをアクチン精製のためのアフィニティカラムとして用いる手法を開発した。この方法によって、様々な細胞からアクチンを簡便かつ大量に精製できるものと期待される。

(5) 再構成運動 (nano-muscle) 系

Nono-muscle 系において、Rigor 結合の破断が周期的に起きていることを示す結果を得た。さらに、そこで見られた幅の広いギャップが、アクチンフィラメントの 72 nm 周期とミオシンフィラメントの 42.9 nm 周期のずれに由来するものであることが示唆された。

(6) SPOC (自発的振動収縮) の理論構築

横紋筋が中間活性化条件で示す自発的振動収縮現象を理解することができる理論を構築した。この理論に基づいて振動波形、収縮・振動・弛緩の 3 状態を示す相図などを再現することに成功した。

(7) 紡錘体のミクロ力学・形状制御機構

Xenopus 卵エクストクラトを用いた *in vitro* 紡錘体形成系を用い、MEMS カセンサー (東京大下山勲研提供) とガラス微小針、そして蛍光顕微鏡を組み合わせることにより、紡錘体を直接顕微操作し解析する実験系を構築した。これを用いて、紡錘体を極間軸 (長軸) 方向、および幅 (短軸) 方向にそれぞれ圧縮し、紡錘体の力学特性と変形応答を解析した。その結果、負荷を加える時間が短いと、紡錘体は粘弾性的な性質を示した。一方、負荷が大きいと大変形して塑性的な性質を示した。しかし興味深いことに、一度塑性変形したのちに、元の形状と相似で安定な内部構造をもつ “小さな紡錘体” が自発的に再構築された。さらに FSM 法を用いて変形中の微小管内の Tubulin の動きを追跡した結果、形状回

復の過程で微小管密度の制御が自律的に行なわれていることを見出した。

(8) 細胞の熱パルス・温度イメージング

局所的な熱パルスを HeLa 細胞に与えたところ、加熱中に Ca^{2+} の小胞体への取り込みを促進し、再冷却直後に Ca^{2+} 放出を引き起こすことを見出した。 Ca^{2+} 放出を引き起こす温度変化には閾値が存在し、実験温度を 22 から 37 に上げると閾値は 1.5 から 0.2 まで減少した。さらに小胞体膜に存在する Ca^{2+} -ATPase による Ca^{2+} 取り込みと、イノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) からの Ca^{2+} 放出とのバランスが熱パルスで一時的に崩壊することで、この非常に高い温度感受性をもつ Ca^{2+} ダイナミクスが生まれることが分かった。

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 30 件) 全論文査読有

- 1) Ishiwata, S., Shimamoto, Y., and Suzuki, M. “Molecular motors as an auto-oscillator.” *HFSP J.* (2010) in press.
- 2) Mikhailenko, S.V., Oguchi, U., and Ishiwata, S. “Insights into the mechanisms of myosin and kinesin molecular motors from the single-molecule unbinding force measurements.” *J Royal Soc. Interface.* 7, S295-S306. (2010).
- 3) Oguchi, Y., Mikhailenko, S. V., Ohki, T., Olivares, A. O., De La Cruz, E. M., and Ishiwata, S. “Robust processivity of myosin-V under off-axis loads.” *Nature Chem. Biol.* 6(4), 300-305. (2010).
- 4) Uchimura, S., Oguchi, Y., Hachikubo, Y., Ishiwata, S., and Muto, E. “Key residues on microtubule responsible for activation of kinesin ATPase.” *EMBO J.* Mar 11, (2010).
- 5) Sato, T., Shimosawa, T., Fukasawa, T., Ohtaki, M., Aramaki, K., Wakabayashi, K., and Ishiwata, S. “Actin oligomers at the initial stage of polymerization induced by increasing temperature under low ionic strength: Study with small-angle X-ray scattering.” *BIOPHYSICS.* 6, 1-11. (2010).
- 6) Kubota, H., Mikhailenko, S. V., Okabe, H., Taguchi, H., and Ishiwata, S. “D-loop of actin differently regulates the motor function of myosins II and V.” *J. Biol. Chem.* 284, 35251-35258. (2009).

- 7) 板橋岳志、鈴木和也、高木潤、石渡信一
“紡錘体の力学計測” *生物物理* **49**,
250-251. (2009).
- 8) Shimamoto, Y., Suzuki, M., Mikhailenko, S,
V., Yasuda, K., and Ishiwata, S. “Inter-
sarcomere coordination in muscle revealed
through individual sarcomere response to
quick stretch.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
106, 11954-11959. (2009).
- 9) Matsuba, D., Terui, T., O-Uchi, J., Tanaka,
H., Ojima, T., Ohtsuki, I., Ishiwata, S.,
Kurihara, S., and Fukuda, N. “Protein
kinase A-dependent modulation of Ca²⁺
sensitivity in fast skeletal muscle
reconstituted with cardiac troponin.” *J. Gen.
Physiol.* **133(6)**, 571-581. (2009).
- 10) Ohki, T., Ohno, C., Oyama, K.,
Mikhailenko, S. V., and Ishiwata, S.
“Purification of cytoplasmic actin by
affinity chromatography using the
C-terminal half of gelsolin.” *Biochem.
Biophys. Res. Commun.* **383**,146-150(2009).
- 11) Liou, Y. -M., Watanabe, M., Yumoto, M.,
and Ishiwata, S. “Regulatory mechanism of
smooth muscle contraction studied with
gelsolin-treated strips of Taenia Caeci in
Guinea Pig.” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*
296, C1024-C1033. (2009).
- 12) Itabashi, T., Takagi, J., Shimamoto, Y., Onoe,
H., Kuwana, K., Shimoyama, I., Gaetz, J.,
Kapoor, T. M., and Ishiwata, S. “Probing the
mechanical architecture of the vertebrate
meiotic spindle.” *Nature Methods.* **6(2)**,
167-172. (2009).
- 13) Tseeb, V., Suzuki, M., Oyama, K., Iwai, K.,
and Ishiwata, S. “Highly thermosensitive
Ca²⁺ dynamics in a HeLa cell through IP3
receptors.” *HFSP J.* **3**, 117-123. (2009).
- 14) Shimozawa, T., and Ishiwata, S.
“Mechanical distortion of single actin
filaments induced by external force:
Detection by fluorescence imaging.”
Biophys. J. **96**, 1036-1044. (2009).
- 15) Fukuda, N., Terui, T., Ohtsuki, I., Ishiwata,
S., and Kurihara, S. “Titin and troponin:
central players in the Frank-Starling
mechanism of the heart.” *Curr. Cardiol. Rev.*
5, 119-124. (2009).
- 16) Oguchi, Y., Mikhailenko, S.V., Ohki, T.,
Adrian O. Olivares., Enrique M. De La
Cruz., and Ishiwata, S. “Load-dependent
ADP binding to myosins V and VI:
Implications for subunit coordination and
function.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**,
7714-7719. (2008).
- 17) Mikhailenko, S. V., Oguchi, Y., Ohki, T.,
Shimozawa, T., Olivares, A. O., De La Cruz,
E. M., and Ishiwata, S. “How load and the
nucleotide state affect the actin filament
binding mode of the molecular motor
myosin V.” *J. Korean Phys. Soc.* **53**,
1726-1730. (2008).
- 18) Terui, T., Sodnomsersen, M., Matsuba, D.,
Udaka, J., Ishiwata, S., Ohtsuki, I., Kurihara,
S., and Fukuda, N. “Troponin and titin
coordinate length-dependent
activation in skinned porcine ventricular
muscle.” *J. Gen. Physiol.* **131**, 275-283.
(2008).
- 19) Udaka, J., Ohmori, S., Terui, T., Ohtsuki, I.,
Ishiwata, S., Kurihara, S., and Fukuda, N.
“Disuse-induced preferential loss of the
giant protein titin depresses muscle
performance via abnormal sarcomeric
organization.” *J. Gen. Physiol.* **131**, 33-41.
(2008).
- 20) Shimamoto, Y., Suzuki, M., and Ishiwata, S.
“Length-dependent activation and auto-
oscillation in skeletal myofibrils at partial
activation by Ca²⁺.” *Biochem. Biophys. Res.
Commun.* **366**, 233-238. (2008).
- 21) Shimamoto, Y., Kono, F., Suzuki, M., and
Ishiwata, S. “Non-linear force-length
relationship in the ADP-induced contraction
of skeletal myofibrils.” *Biophys. J.* **93**,
4330-4341. (2007). 他 9 編
〔学会発表〕(計 107 件)
- 1) Ishiwata, S. “Hierarchical chemo-mechanical
feedback loop in bio-motile systems.”
Int. Symp. on Fifty years of Biophys. R
es. at Nagoya University” Nagoya, March
12-14, 2010 (Invited talk) 他 106 件
〔図書〕(計 2 件)
- 1) 石渡信一 “自己組織化とは - 生物” 「自
己組織化ハンドブック」NTS 刊 (2009)
pp. 20-21
- 2) Ishiwata, S., and Matsunaga, Y., “Physics
of self-organization systems.” World
Scientific. (2008)
- 〔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：
<http://www.ishiwata.phys.waseda.ac.jp/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
石渡 信一 (SHIN'ICHI ISHIWATA)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：10130866
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 研究連携者 なし