

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22227005

研究課題名(和文)生物運動の制御基盤；化学力学フィードバックループ

研究課題名(英文)Regulatory Basis of Biomotility: Chemo-mechanical Feedback Loop

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の第一の目標は、輸送・振動・分裂などの生物要素運動に必要な分子モーターや細胞骨格動態などが生み出す力が、要素運動の制御にフィードバックするという化学力学フィードバックループ(CMFループ)の存在を明らかにすることであった。その点、筋収縮自励振動(SPOC)現象における「ミオシンクロスブリッジ(CB)による力発生、筋フィラメントの滑り運動、フィラメント格子間隔の変化、CB形成確率の変化」というループの存在が強く示唆されたこと、外力パルス依存的に染色体分配のタイミングが調節されること、細胞質分裂に必要な収縮環の形成を人工細胞系で実現するなど、CMFループの具体例を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study is to make clear the existence of Chemo-mechanical feedback loop (CMF loop) in the regulation of elementary processes of bio-motility such as intracellular transport, oscillation and cell division. We have demonstrated several examples of CMF loop such as 1) self-oscillation (SPOC) phenomena in the contractile system of muscle, i.e., "force generation due to myosin cross-bridges (CB), sliding motion of myofilaments, change in the lattice spacing of myofilaments, change in the probability of CB formation", 2) the timing of chromosome segregation within a HeLa cell depends on the direction of externally applied mechanical impulse, and 3) the realization of the spontaneous formation of contractile ring within a cell-sized confined space, showing the importance of boundary condition for the ordered cytoskeletal structure.

研究分野：生物物理学

キーワード：生体分子モーター 1分子生物学 化学力学フィードバック 筋収縮自励振動 SPOC 細胞分裂 人工細胞 細胞熱力学

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は長年に亘って**生物運動機能の階層性**に着目した研究を進めてきた。その過程で、1分子モーター(キネシン、ミオシンV)の歩行運動(**物質輸送**)における内部応力と酵素活性機能とのメカノケミカルカップリング(分子内シンクロ)の存在を明らかにした。筋分子モーターの集合体である筋原線維では**自励振動**(SPOC)現象を発見し、そのメカニズムの研究から分子間シンクロの存在を示唆した。特に、心筋収縮系のSPOC現象の研究を通じて、「**心臓(心機能)はナノとマクロが力を通じて直結している臓器である**」という新概念を着想し提唱した(Ishiwata, S. et al. *Adv. Exp. Med. Biol.* 592, 341-358, 2007)。これらの研究の過程で、

酵素活性→能動的分子構造変化→力発生→収縮→受動的分子・集合体変形→酵素機能の変調

という化学力学フィードバックループ(CMF loop)の存在を示唆することができた。

(2) 本研究課題では、この着想を実証し強固なものにするために、**1分子モーター輸送系**(Myosin V, VI, IX, Kinesinなど)筋(原)線維SPOC振動系に加え、さらに一段上位の階層(**図1**)に位置する細胞分裂・染色体分配運動系を取り上げる。一方我々は、階層性が示す運動の特徴を抽出するための新しい実験系や実験手法の開発(例えば、マイクロ温度パルス法、細胞温度イメージング)にも力を注いできた。新しい実験系としては、1分子モーター系と筋(原)線維系の間をつなぐ“**A帯滑り運動系**”の開発に成功し、分子モーターの独立性・協調性の厳密な検証に新しい手法を提供できた。

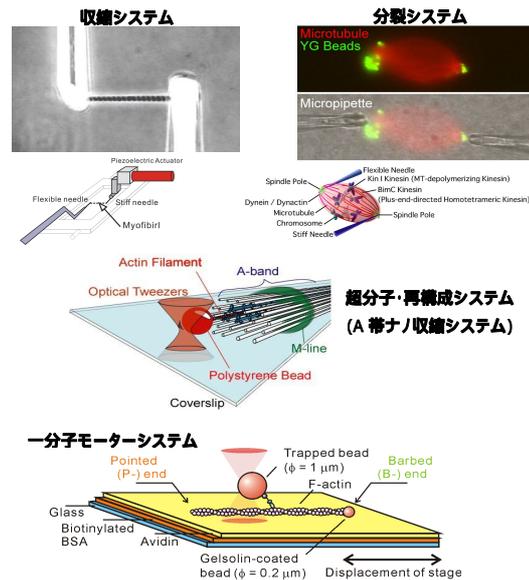
(3) 自励振動(SPOC)現象は収縮と弛緩の中間活性化条件で見られるが、最近、筋フィラメントの相互作用ナノ空間の変動を考慮し、横方向の力の釣合い式を含む全く新規なモデルを樹立できた(本研究課題で発展)。その一方で、心筋収縮系のSPOC周期が各動物の心拍周期と強く相関することから、自励振動特性は心拍機能の基盤であるという新しい概念を提唱した。これは世界的にみても新しい概念であり、我々の独壇場と言って良い(ヨーロッパの研究グループが実験・理論の両面から独自の成果を発表したが、我々のレベルには達していない)。

2. 研究の目的

生物運動の典型例として細胞内物質輸送、筋収縮系自励振動、細胞・染色体分裂に着目し、分子モーターや細胞骨格が生み出す力そのものが、輸送・振動・分裂という要素運動の制御に重要な役割を担っていることを明らかにする。すなわち、モータータンパク質

系自身が生み出す力によるタンパク質(集合体)の歪みや、酵素反応ナノ空間の変動を自らの酵素活性にフィードバックして活用するという化学力学フィードバックループ(CMF loop: 化学シグナルと力学過程とのカップリング)が、生物運動系の自律的制御機構として各階層ごとに存在すること、そして階層を貫く共通原理として存在することを示し、多様な様態とメカニズムを解明する。

図1 生体運動系の階層構造



3. 研究の方法

(1) 生物運動系の最下層に位置する1分子モーター系として、アクチンフィラメント上を歩くMyosin分子モーター(V, VI, VIIやIX)と、微小管の上を歩くキネシンの“輸送運動”を取り上げる。顕微解析手法を用いて、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。分子モーターについては遺伝子操作により特定の部位に変異を加えたときの運動機能への影響を詳細に検討する。さらに、アクチンや微小管(チューブリン)についても、Baculovirus 昆虫細胞系を用いたアミノ酸変異体の発現法と、変異アクチンのゲルゾリン精製法を開発したことから、アクチンフィラメントと微小管における機能部位を同定し、ひいては、これらの基質フィラメントは分子モーターのための単なるトラックか、という長年の命題を検討する。

(2) 高次の生物運動系として、“筋収縮系”と“細胞(染色体)分裂装置”を取り上げる。それぞれ、50年以上の研究の歴史をもつが、筋収縮系は生体運動系の典型として、CMF loopに関して新しい視点を与え、一方細胞分裂装置は、多数の分子が出入りする究極の生体分子モーターシステムとして、本研究課題にとって格好の研究対象である。

筋収縮メカニズムの研究はHuxleyによる滑り運動機構に尽きているとも言えるが、そ

れは最大活性化条件での運動のことであり、心拍時に重要な中間活性化条件での運動様態については未解決の課題が残されている。それが自励振動現象であり、我々が SPOC 現象と名付けた現象である。この課題にはメカニズムと生理的意義の両面から取り組むが、前者については満足すべき理論的枠組みができたので、この理論を高次システムへと展開する。そこで理論が新たに示唆する未知の振動特性について実験的な検証を行う。生理的意義については、心筋細胞や心臓を使った実験によって、電気的リズムと SPOC 筋節振動との相関を通して新知見を得る。

(3) “細胞・染色体分裂”については、生理的環境にとらわれない立場で、力学特性（硬さ）、発生力、そして外力が分裂機能に及ぼす作用など、CMF Loop に注目して自由に力学的摂動・擾乱を与えるという、分子モーター研究で培ってきた分子操作のノウハウを全てつぎ込む。染色体分配における Check Point が力のバランスによって決まっているのかを明らかにする。これと並行して、染色体分配に関わるタンパク質の異常が“ガン化”に直結していることから、各種の薬剤による特定のタンパク質の阻害作用を組み合わせる。

以上の研究に新しい視点を与える温度パルス顕微手法、温度分布顕微イメージング手法といった、我々独自の顕微操作・解析手法を開発・洗練する。

4. 研究成果

(1) 一分子系における成果 (論文 10)

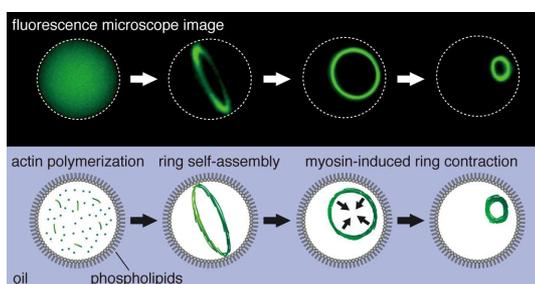
紡錘体内に存在し、微小管を両端から脱重合するタンパク質として知られる MCAK が、脱重合に伴って約 1 pN の力を発生することを、1 分子計測によって明らかにした。このことは、染色体分配の際に必要な力発生は微小管の + 端が素繊維にほどけて湾曲することにある、という定説が唯一のものではない可能性を示唆したことになる。

(2) 再構成系における成果 (論文 1)

真核生物では、細胞分裂時にその赤道面に、主にアクトミオシンからなるリング状のバンドル(収縮環)が形成される。収縮環の形成・収縮機構の解明は細胞生物学における中心的課題の一つだが、その自発形成と収縮の物理的仕組みはよく分っていない。そこで、生理的環境にとらわれない立場で、アクトミオシンが発生する収縮力と、外力(膜の硬さ)が分裂機能に及ぼす作用を調べるといった研究方針に従い、細胞サイズの油中微小液滴及びリポソームと精製タンパク質を用いて収縮環をモデル化した“再構成分裂システム”を開発し、形成と収縮の仕組みを CMF loop に基づいて理解することを目指して研究を進めた。

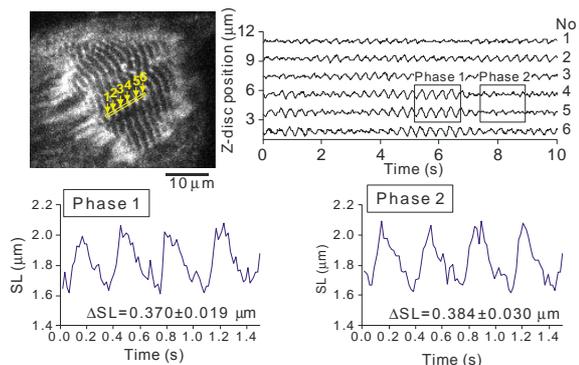
細胞サイズの微小球状液滴(外側が油、界面がリン脂質 1 重膜)に、精製したアクチン

とミオシン(酵素断片の HMM) それに加えてアクチンバンドル化因子(PEG、あるいはアクチニン)を封入し、ATP 存在下の非平衡状態でリング状のアクトミオシンバンドルを自発形成させることに成功した。リングは常に球形の赤道面に形成された。さらに、適量の天然ミオシンを加えると、リングが収縮することを発見した(下図参照)。これらのことは、収縮環の形成には、球形という物理的な束縛(境界)条件の中でアクチンが重合すれば十分であることを示唆している。すなわちリングを維持するには、アクトミオシンが発生する滑り力と、球状の閉空間による反発力、アクチン束の曲げ弾性力のバランスが重要であることが示唆された。現在、リポソームが分裂できる(つまり人工細胞系が持つべき特性を示す上での)生化学的及び物理的条件を明らかにするための実験を行っている。



(3) 幼若心筋細胞における拍動解析 (論文 3: Shintani *ら*, *BBRC*, 457, 165-170, 2013)

サルコメアの Z 線に蛍光タンパク融合 α -actinin を発現させ、輝線の位置変化の計測から細胞内のサルコメア収縮運動の高精度計測(SD; 3 nm, fps 50)を実現した。

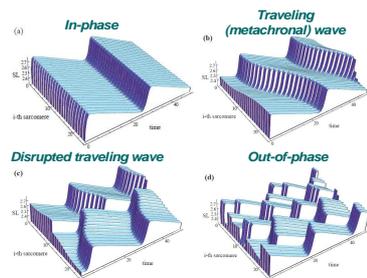


Ryanodine、thapsigargin によって筋小胞体の Ca^{2+} 濃度制御機能を阻害した上で、ionomycin によって細胞内 Ca^{2+} 濃度を pCa 6 程度に制御すると、細胞内サルコメアが収縮自励振動することを見出した(Cell-SPOC)。単層、2 次元的なサルコメア集団の収縮自励振動観測系でもある。上図はその典型例だが、Phase1 と Phase2 で輝線の振幅は大きく異なるが、輝線間距離(サルコメア長)の振動はほぼ同じ振幅・波形となっている。Cell-SPOC において、振動子が集合することで、高次のパターンを生み出すことを端的に示している。さらに、Cell-SPOC 時と電気刺激時のサルコメア収縮波形は、新生仔ラット心拍(240

- 300 bpm)と同等の 4 - 5 Hz の振動時と区別のつかない波形となることが分かった。これは、電気刺激による拍動時も、収縮波形を決めているのは Ca^{2+} 濃度の変化ではなく、Cell-SPOC と同様の CMF loop であることを示唆している。

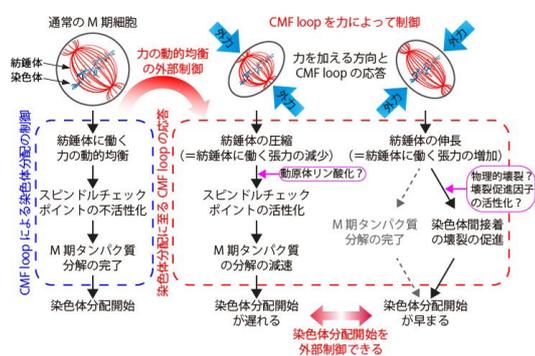
(4) SPOC 動態を記述するモデルの構築 (論文 5,9 : Sato ら, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2011)

筋収縮系の SPOC 動態と状態図を定量的に再現できるユニットモデルを構築することに成功した。これまで SPOC を理解しようというモデルは幾つもあったが、抽象論か、あるいは具体的だが誤った仮定(例えば、サルコメア内の巨大弾性タンパク質 Titin/Connectin を重視)に基づくものであった。我々のモデルは、分子モーターが働く、サルコメア内のナノ空間の特性を考慮した、実験事実に基づく自然なモデルとなっている。さらに、ユニットモデルを粘弾性的に直列につないだ 1 次元連結(筋原線維)モデルを構築し、筋原線維にみられる様々な SPOC 波(定常波、分断波、シンク口波など)の存在を再現することに成功した(図参照)。さらに、筋原線維モデルを横方向に弾性的に接続した、筋線維(束)モデルも構築した(論文査読中)。SPOC については、20 年ぶりにレビューを書いた(石渡、佐藤、物理学会誌 2015)。



(5) 染色体分配における CMF loop を力によって外部制御することに成功 (論文 7)

染色体分配機構における CMF loop を理解するために、“染色体分配を外力で制御する”可能性を探った。我々独自の顕微操作手法であるマイクロ加工歪み計を用い、紡錘体の極間長軸方向、もしくは幅方向に細胞を一瞬圧縮することにより、分裂期の哺乳動物培養細胞内の紡錘体に働く力の動的均衡に摂動を与えた。その結果、圧縮の方向と、圧縮の大きさや速度に依存して、紡錘体に働く張力を、細胞膜を介して増減できることが分かった。その上、張力を減少すると、染色体分配開始のタイミングが遅れ、一方、張力を増加すると、早まることを見いだされた。さらに、動原体タンパク質や細胞周期制御タンパク質の分子動態を解析した結果、有糸分裂中期の進行中に細胞が受ける様々な外部負荷に対して、CMF loop の異なる応答性が明らかにな



った(図参照)。また、薬剤処理によって染色体分配を抑制した細胞に適切な力パルスを加えると、ある割合で染色体分配が開始されることも新たに発見した。以上、染色体分配における CMF loop への外力の作用を明らかにし、染色体分配という細胞機能が外部から物理的に補完・制御可能であることを示すことができた。

(6) 紡錘体粘弾性モデルの構築 (論文 2,6)

微小ガラス針を用いた紡錘体の直接顕微操作法を用いて紡錘体内の力のバランスを崩し、それに対する応答を観察することで、紡錘体の形状制御に関する CMF loop を明らかにすることを目的とした。これまでに紡錘体は微小ガラス針を用いて変形すると、負荷をかける時間に応じて(粘)弾性的に形状が回復することが分かった。また、変形に要する負荷を測定することで、紡錘体の粘弾性モデルを構築し、各要素の弾性定数、粘性係数を求めることに成功した。紡錘体の構造と分子モーターの発生する力のバランスに着目した予備的な数理モデルも構築できた。

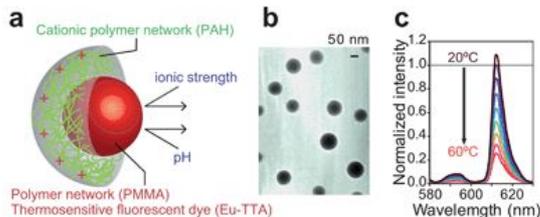
(7) 局所熱パルスによる心筋収縮 (Oyama ら, *BBRC* 2012) と細胞機能の光制御 (Oyama ら, *Sci. Rep.* 2015; *Biophys. J.* 2015)

我々は、局所熱パルス刺激による HeLa 細胞内 Ca^{2+} 濃度の制御法を開発してきた(Tseebr ら *HFSP J* 2009; Itoh ら *Chem Commun* 2016)。そこで心筋細胞でも、熱パルスによって Ca^{2+} 濃度上昇とそれに伴う収縮反応が見られると推測した。成体ラットから採取した心室筋細胞に、1455 nm の赤外レーザーによる熱パルスを与えた。その結果、心筋細胞は温度上昇時に収縮し、レーザー照射を止めると弛緩することが分かった。2.5 Hz の連続的な熱パルスは、周期的な収縮と弛緩を引き起こした。生体内温度に近い温度(36 °C)では、約 3 分の温度上昇に対して半数以上の細胞が収縮した。驚いたことに、加熱収縮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、Fluo-4 を用いた蛍光観察からは確認されなかった(電気刺激による収縮反応時には一過的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察された)。そこで Ca^{2+} -free の溶液中で、除膜した心筋細胞に熱パルスを与えたところ、収縮反応がみられた。これらの結果は、熱パルスによる収縮機構は、 Ca^{2+} シグナルを介さない点において、電気刺激による収縮機構とは異なる

ることを示唆する。こうして、収縮装置、熱発生装置として知られる筋肉の、温度感受性という新しい収縮特性を見出すことができた。

(8) 細胞内の温度変化を高空間分解能で計測可能なナノ温度計の開発(論文4)と応用(論文8)

細胞内の pH やイオン強度などの環境変化は、従来の蛍光強度変化型温度計による温度測定を困難にしてきた。そこで、蛍光色素を高分子ネットワークで覆うことで、蛍光スペクトルが pH やイオン強度には応答せず、温度変化にだけ応答するナノ粒子の開発を試みた。Europium (III) thenoyltrifluoroacetate trihydrate (Eu-TTA) を Poly(methyl methacrylate) (PMMA) に内封し、少なくとも pH 4 ~ 10、KCl 0 ~ 500 mM の範囲で蛍光強度が一定のナノ粒子(粒径約 210 nm)を作成した(下図)。このナノ粒子の蛍光強度は、20 から 60 の範囲の温度変化に対して線形に変化し、1 の温度上昇に対して、2.2%(25 基準)減少した。1 秒間ごとの空間・温度分解能はそれぞれ 5.3 nm、0.3 であった。このナノ温度計は細胞内に自発的に取り込まれ、細胞内の酸性小胞に包まれることを確認した。しかも、この小胞は方向性を持って微小管上を輸送されることが分かった。輸送されているナノ温度計に対して熱パルスを与えた際の、小胞内の温度変化と輸送速度変化を同時に観察したところ、温度上昇に伴って輸送速度が上昇した。こうして、「歩くナノ温度計(Walking nanothermometer)」としての細胞内温度測定法を構築することができた。



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 41 件)

- Miyazaki, M., Chiba, M., Eguchi, H., Ohki, T. and Ishiwata, S. (2015) *Nature Cell Biol.* **17**, 480-489. "Cell-sized spherical confinement induces the spontaneous formation of contractile actomyosin rings *in vitro*" DOI: 10.1038/ncb3142
- Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Shimamoto, Y., Kapoor, T.M. and Ishiwata, S. (2014). *Biophys. J.* **106**, 735-740. "Micro-mechanics of the vertebrate meiotic spindle examined by stretching along the

pole-to-pole axis."

DOI: 10.1016/j.bpj.2013.12.033

- Shintani, S., Oyama, K., Kobirumaki, F., Shimozawa, F., Ohki, T., Ishiwata, S., and Fukuda, N. "Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with α -actinin-AcGFP in Z-discs" *J. Gen. Physiol.*, **143**, 513-524. (2014). DOI: 10.1085/jgp.201311118.
 - Takei, Y., Arai, S., Murata, A., Takabayashi, M., Oyama, K., Ishiwata, S., Takeoka, S., and Suzuki, M. (2014). "A nanoparticle-based ratiometric and self-calibrated fluorescent thermometer for single living cells" *ACS Nano* **8**, 198-206. DOI: 10.1021/nm405456e
 - Sato, K., Kuramoto, Y., Ohtaki, M., Shimamoto, Y. and Ishiwata, S. (2013). *Phys. Rev. Lett.* **111**, 108104. "Locally and globally coupled oscillators in muscle." DOI: 10.1103/PhysRevLett.111.108104
 - Takagi, J., Itabashi, T., Suzuki, K., Kapoor, T.M., Shimamoto, Y. and Ishiwata, S. (2013). *Cell Rep.* **5**, 44-50. "Using micromanipulation to analyze control of vertebrate meiotic spindle size." DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.021
 - Itabashi, T., Terada, Y., Kuwana, K., Kan, T., Shimoyama, I. and Ishiwata, S. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 7320-7325. "Mechanical impulses can control metaphase progression in a mammalian cell." DOI: 10.1073/pnas.1116749109
 - Oyama, K., Takabayashi, M., Takei, Y., Arai, S., Takeoka, S., Ishiwata, S. and Suzuki, M. (2012). *Lab Chip* **12**, 1591-1593. "Walking nanothermometers: Spatiotemporal temperature measurement of transported acidic organelles in single living cells." DOI: 10.1039/C2LC00014H
 - Ishiwata, S., Shimamoto, Y. and Fukuda, N. (2011). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **105**, 187-198. "Contractile system of muscle as an auto-oscillator." DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.11.009
 - Oguchi, Y., Uchimura, S., Ohki, T., Mikhailenko, S.V. and Ishiwata, S. (2011). *Nature Cell Biol.* **13**, 846-852. "The bidirectional depolymerizer MCAK generates force by disassembling both microtubule ends." DOI: 10.1038/ncb2256.
- [学会発表](計 169 件)

Ishiwata, S. (Plenary Lecture) 2015.1.12 A*STAR-JST Joint Workshop on "Development of Fundamental Technology for Biodevices Enabling Dynamic Analysis and Control of Cells." Singapore. "Manipulation of Cellular Structure and Function with Physical Parameters."

Ishiwata, S. (Invited Talk, Discussion Leader) 2014.7.7 Gordon Res. Conference on Muscle and Molecular Motors, Snow Mount Resort, VT, USA. "Boundary Conditions and Temperature Modulate Performance of Actomyosin Motors in a Nanoscopic Space."

Ishiwata, S. (Invited talk) 2013.07.03 The 22nd French Phys. Soc. General Congress, Marseille, France. "Characterization of Molecular Motors *in vitro* and in a Cell."

Ishiwata, S. (Invited talk) 2012.08.22-26. UK-Japan Symposium for Mechanochemical Cell Biology, Birmingham, UK. "Micro-mechanics of cell division and chromosome segregation."

Ishiwata, S. (Discussion Leader, Invited Talk) 2011. 07.10-15. Gordon Conference on Muscle and Molecular Motors, New Hampshire, USA. "Novel Insights into Mechanisms of Molecular Motors: Robust Processivity of Myosin V and Force Generation by the Depolymerizing Kinesin MCAK."

〔図書〕(計1件)

原田慶恵・石渡信一 編著、化学同人、1
分子生物学、2014、292

〔その他〕

報道関連:

・科学新聞 2015年09月11日1面 細胞内
温度の不均一性めぐる論争がホットに

・日経産業新聞 2015年03月26日10面

細胞分裂の一部再現、カプセル内リング構造

・科学新聞 2012年03月23日1面 細胞内
を歩く「ナノ温度計」の開発 他

ホームページ URL:

<http://www.phys.waseda.ac.jp/bio/ishiwata/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

武岡 真司 (TAKEOKA Shinji)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 20222094

鈴木 団 (SUZUKI Madoka)

早稲田大学・重点領域研究機構・

主任研究員(准教授)

研究者番号: 40350475

宮崎 牧人 (MIYAZAKI Makito)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号: 40609236

板橋 岳志 (ITABASHI Takeshi)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号: 20434384

Sergey V. Mikhailenko

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 10424805

下山 勲 (SHIMOYAMA Isao)

東京大学大学院・情報理工学系研究科・
教授

研究者番号: 60154332

福田 紀男 (FUKUDA Norio)

東京慈恵会医科大学・細胞生理学教室・
准教授

研究者番号: 30301534

島本 勇太 (SHIMAMOTO Yuta)

国立遺伝学研究所・准教授

研究者番号: 80409656

小口 祐伴 (OGUCHI Yusuke)

東京大学・理学系研究科・生物科学専攻・
生物化学科・特任助教

研究者番号: 40599370

大山 廣太郎 (OYAMA Kotaro)

東京慈恵会医科大学・細胞生理学教室・
学振PD

研究者番号: 70632131

新谷 正嶺 (SHINTANI Seine)

東京大学・理学系研究科・物理学専攻・
学振PD

研究者番号: 40650536

高木 潤 (TAKAGI Jun)

国立遺伝学研究所・博士研究員

研究者番号: 40632196

佐藤 勝彦 (SATO Katsuhiko)

北海道大学・電子科学研究所・准教授

研究者番号: 90513622