

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24654139

研究課題名(和文) DNAナノ構造体を用いた筋肉再構成系の機能的デザインと内部状態イメージング

研究課題名(英文) Designing and imaging of reconstructed muscle using DNA nanostructure

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生命の材料である蛋白質とDNA分子を使って人工筋肉をデザイン・作成し、その特性を蛋白質1個レベルの解像度で観察・解析することで、生命の持つ巧みな省エネ戦略、柔軟性や適応性を解明するのが最終目的である。

DNAorigamiと呼ばれる新規技術とモーター蛋白質をハイブリッドさせて、サブミクロンサイズのモーター集合体を作成できた。モーターの個数制御や空間配置制御方法を確立し、詳細な生物物理解析を可能にする技術基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Our goal is to clarify the mechanism of energy-saving, flexibility and adaptability of muscle by creating an artificial muscle made of proteins and DNA molecules and observing the dynamics at the single molecule resolution.

I used DNA nanotechnology called DNAorigami and the nanosized modules were hybridized with motor protein molecules. I succeeded in constructing the artificial motor protein assembly with sub-micrometer size. Through this experiment, I confirmed the methodology for controlling the number and spacing of motor molecules. This novel methodologies enables us to analyze the emergence mechanism of unique properties of life.

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：ナノバイオリボティクス DNAorigami 人工筋肉 メカノバイオロジー モーター蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 1分子計測技術や遺伝子工学的手法の発展によって、特にモーター蛋白質の作動原理に関して理解が進んでいる。しかし、これらの研究は、モーター蛋白質1個を単離した系を対象としている。筋肉などの多数個のモーターが関与するシステムが機能中における、内部状態（個々の運動素子のふるまい、運動素子間での運動の相関、協同性や干渉性）の直接観察が望まれている。

(2) 筋収縮機構の研究には70年以上の歴史があり、組織、細胞から単分子、再構成系のレベルまで詳細な計測とモデル化が行われている。しかし、再構成系においてすら、モーター集合体の中の個々のモーターのふるまいの1分子計測は成功していない。近年、我々は、1分子計測技術とDNAナノ材料とを融合することによって、2分子システムではあるが、協同的な力発生中のモーター1個の運動計測に成功している。

2. 研究の目的

本研究では、1分子計測技術と3次元ナノ構造体がプログラマブルなDNAorigamiを融合することによって、以下の目標を達成する。

(1)モーター分子の個数と空間配置が制御された筋肉再構成系のデザイン

(2)筋肉再構成系内の個々のモーター運動の高時空間分解能(マイクロ秒、ナノメートル)およびモーター間の運動相関計測技術の開発と計測

3. 研究の方法

(1) 筋肉は、分子モーターであるミオシンが自己集合し、アクチンフィラメント上を一方方向運動することで収縮を行う。ミオシン分子は、非常に緻密に空間配置されており、隣り合うモーターが14.3 nm 間隔で、収縮軸方向から見て40度ずつ回転しながら配置されている。空間周期を考慮した理論的なモデルにおいて、その空間周期の変調に対して共鳴的に速度が増加もしくは減少する結果が得られている。また、収縮速度の外部負荷応答も空間周期に強く依存していた。そこで、空間周期の変調を目的に、ミオシン分子を1 nmの精度で配置可能なDNAorigami テンプレートの設計と作成を行う。また、外力応答も調べるために、システムに外力を加えることが可能なDNAナノスプリングの設計と作成を行う。

DNAorigami は2006年にRothermundが開発した技術で、100種類以上のオリゴヌクレオ

チドを7000 ntsの一本鎖DNAとハイブリダイズさせることによって2次元もしくは3次元的なナノ構造物を作成する技術である。DNAの化学修飾は容易なため、蛋白質とナノ構造物の任意の部位を化学的に架橋することで、蛋白質や蛍光分子の配置が可能になる。蛋白質とDNAorigamiの連結を容易にするために、蛋白質側を遺伝子改変してSNAP-tagを付加する。SNAP-tagは20kDaのペプチドタグであり、その基質であるベンジルグアニンをオリゴヌクレオチドに化学修飾しておけば、SNAP-tagに特異的にオリゴヌクレオチドラベルできる。このオリゴと相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドをDNAorigami テンプレートに配置することによって、お互いの連結が可能となる。

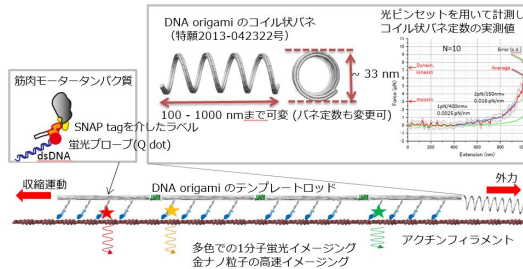
(2)作成するモーター-DNAorigami ハイブリッドのモーターをターゲットとして蛍光プローブラベルを行う。半導体量子ドットは明るく長時間蛍光を発するプローブであり、30ミリ秒の時間分解能で1-2 nmの空間分解能を達成する。蛍光波長の異なる量子ドットをハイブリッドシステム内にラベルすることによってモーター間の協調性や干渉性を可視化できる。半導体量子ドット表面にはストレプトアビジン修飾を施すことによって、ミオシンモーター部位のN末にラベルしたビオチン(Halo-tag リガンド)と結合してモーター部位のモニターが可能となる。同様の結合システムで、アビジン修飾された金ナノ粒子もモーター部位にラベルすることが可能であり、金ナノ粒子の散乱光を1分子観察すればマイクロ秒領域での分子動態を可視化することが出来る。

4. 研究成果

(1) ファージ由来の一本鎖DNAを足場として、モーター-DNAorigami ハイブリッドのテンプレートとなるロッド構造を作成した。直径8 nm、長さ400 nmのサイズであり、ロッドを連結して長さを長くすることも可能なよう拡張性を施してある。天然の筋肉では、42.9 nmの空間周期で配置されたミオシン分子が一本のアクチンフィラメントに相互作用する。アクチンフィラメントは二重らせん構造をしており、36 nmの周期を持つ。この構造ミスマッチが重要であるとの我々の仮説をもとに、天然の周期と同様の42.9 nmでミオシンを結合する部位をテンプレートに設計するとともに、14.3 nm、28.6 nm、36 nmの空間周期を持たせることができるテンプレートを設計した。サーマルサイクラーを用いて実際に作成し、アガロース電気泳動による精製と生成物の電子顕微鏡による確認を行った。

図1 人工筋肉のデザインの模式図

(2) 外力を付加するためのナノスプリングについても、同様に設計を行い、直径 30 nm,



300-1100 nm まで伸び縮み可能なコイル構造を作成した。この構造は特殊なため、特許申請を行った。光ピンセット法を用いて Force-extension curve を実測し、ばね定数の評価も行った。これによって、バネの長さを観察すれば、どのくらいの外力がかかっているか定量可能となった。

(3) 予備実験として、筋肉のミオシンに近いミオシン V, ミオシン VI を用いて DNA origami との連結と運動特性の観察を行った。ナノスプリングに連結することでミオシン間に働く張力がスプリングの伸び縮みとして直視できる。スプリングに蛍光ラベルを行うことで、ミオシン V, VI の結合したスプリングが伸び縮みしているのが確認された。ただ、ガラスとの非特異的な結合が観察結果に影響を与える可能性も示唆されたので、ガラスをポリエチレングリコールでコートし、非特異的な修飾が起こらない環境を構築した。

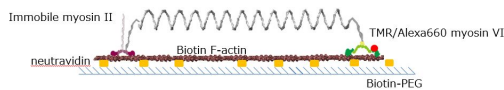


図2 張力存在下での1分子動態観察

また、ミオシン分子に量子ドットをラベルし1分子イメージングすることで、スプリングによる外力が加えられた条件下でのミオシンの分子動態の測定にも成功した。

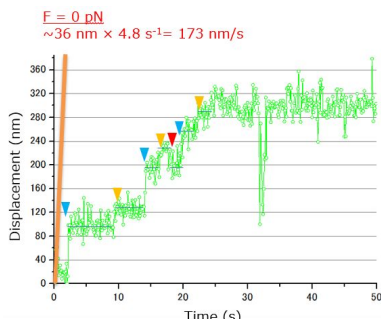


図3 張力存在下での1分子動態の一例

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2件)

岩城 光宏, ブラウン型ナノマシンの作動原理、生物物理会誌、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

[学会発表](計6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

〔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〕

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