

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26610135

研究課題名(和文)生体分子システムのデザインと機能創発機構の解明

研究課題名(英文)Design of molecular assembly system and the single molecule observation

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) 2,800,000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分子を使って筋肉収縮の機能単位であるサルコメアをデザインし、その特性を1分子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標である。
DNAオリガミのロッド、バネを作成し、これらと連結するための、ヒト骨格筋ミオシンモーター部位の発現・精製系を確立することが出来た。27個のミオシンが連結された1次元ミオシンアレイのプロセッシブ運動を観察することもできるようになった。

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 single molecule resolution.
I succeeded to design and construct DNA origami rod and nanospring which is a key components of our artificial muscle system. In addition, we constructed human skeletal myosin with peptide tag to be linked with DNA origami and confirmed the motility using in vitro motility assay. I succeeded in observing processive motion of one dimensional array of myosin-DNA rod complex using TIRF microscopy.

研究分野：数物系科学

キーワード：ナノバイオリボティクス モーター蛋白質 メカノバイオロジー 合成生物学 人工筋肉

1. 研究開始当初の背景

水溶液中の生体分子動態を単分子レベルで可視化する1分子計測技術が生物学の様々な重要課題に適用されている。しかしながら、これらの研究は生体システムから単離された単一分子系であり、様々な生体分子群が自己集合して相互作用しながら新たな生体機能を発現する生体分子集合系ではない。分子集合系は、分子と細胞の階層の中間に位置し、2つの階層をシームレスにつなぐために、その機能創発機構の1分子解析が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、1分子蛍光イメージングや光ピンセット法といった1分子計測技術と、3次元ナノ構造体を作成可能なDNAオリガミ技術を融合することによって、生体分子集合体がプログラム可能なシステムを構築し、デザインされたシステムの1分子解析を行うのが目的である。具体的には筋肉のようなアクチュエータシステムおよび、遺伝子転写システムをターゲットにする。

3. 研究の方法

サルコメアは筋肉収縮の機能単位であり、30種類以上のタンパク質が自己集合して相互作用しながら効率的、柔軟かつ省エネな収縮システムを構築している。サルコメアの自己組織化の仕組みは未だ不明であり、その全ての構成要素を精製するのは困難であるため、収縮に必須なミオシンとアクチンおよび、DNAオリガミから成る最少要素での人工サルコメアを作成する。本研究では、その立ち上げとして1次元的なミオシン分子のアレイ(人工ミオシンフィラメント)を作成しその運動観察を行うが、将来的には3次元化を行い、順次、サルコメアタンパク(トロポニン、トロポミオシン、プロテインCなど)を追加しながら筋収縮の機能創発機構およびサルコメア構造の役割を明らかにしていく。そのために、以下の方法確立・実用化に力を入れて研究を進めてきた。

(1) DNAオリガミはDNA分子をバンドル化してナノ構造体を1nmの精度で構築する技術であり、化学修飾も容易なため蛋白質分子をナノ構造物の任意の位置に配置することが可能である。蛋白質分子とオリガミは1本鎖同士のDNAのハイブリダイゼーションを介して結合するストラテジーを採用している。そのため、ミオシン分子に1本鎖DNAをラベルするためのタグを融合したコンストラクトを発現精製する必要がある。筋芽細胞を用いて筋肉のミオシンを発現する系が5年前に報告されたため、その方法を用いて、運動活性を有した発現・精製系の確立を行った。

(2) ミオシン分子の1次元アレイを作成するためのDNAオリガミロッドのデザインを行い、ミオシン数分子から数十分子までのシステム構築を行った。サルコメア内のミオシン分子は、約43nm周期で配置されており、バックボーンとモーター部位は約40nmのコイルドコイル(S2部位)によって連結されている。そのため、ミオシンロッドに43nm周期でS2部位を模したリンカー部位を配置し、1本鎖DNAラベルされたミオシンモーター部位を連結できるようにデザインを行った。また、ロッドの長さは400nm程度が限界であり、ミオシン9個しか配置できないため、ロッドをオリゴマー化して数十個が配置できるようなデザインを行った。

(3) 構築したミオシンアレイに外力を加えた状態で1分子蛍光イメージングすることが可能なDNAオリガミスプリングの作成と実用化も行った。従来の1分子計測手法では、光ピンセットと1分子蛍光イメージング法を用いて実現することができるが、技術的には非常にスループットが悪く実験自体が難しい。また、高時空間分解能で1分子運動観察を行うために必要な蛍光量子ドットや金ナノ粒子プローブは光ピンセットとの力学的な相互作用や発熱の問題で適用が難しい。本研究で実用化を目指すDNAスプリングは、光ピンセットに代わる力学操作を可能にするツールとして研究代表者が新規開発したものであり、簡便かつ高いスループットを持って力場存在下での1分子イメージングを行うことが期待できる。

遺伝子転写システムについては、mRNAを産生するRNAポリメラーゼと転写制御因子群をDNAオリガミ上でアSEMBルした1分子観察用のプラットフォーム作成を行う。全反射照明を用いた1分子蛍光イメージングは、ガラス表面近傍のみの観察しかできないため、ガラス表面から数十ナノメートル離れた位置に2本鎖DNAを張れるように台座型のDNAオリガミを作成する。その台座の一端に複数の転写制御因子とRNAポリメラーゼが100nmのDNAを介して連結できるようにする。こうすることで、比較的弱い親和性しか持たない転写制御因子群をマイクロモーターの実効濃度でプロモーター近傍に漂わせることができるため、転写因子群とRNAポリメラーゼの相互作用を1分子レベルで可視化できると期待した。

4. 研究成果

(1) ヒト骨格筋ミオシンIIのアイソフォームであるIIaについて、十分な発現を確認し、Hisタグを用いた精製および陰イオン交換カラムを用いた精製を用いて筋芽細胞由来の内因性ミオシンを排除した形で精製を行う

ことができた。また、十分な運動活性を有した分子のみをセレクションするために、アクチンフィラメントのアフィニティ精製を行い、*in vitro* モーティリティアッセイによって運動活性を有することを確認することができた。また、C末に付加した SNAP-tag に1本鎖DNAをラベルし、SDS-pageによってほぼ100%近いラベル率を持つことが確認できた。

(2) オリゴマー化可能なDNAオリガミロッドのデザインを行い、アガロースゲルもしくはショ糖密度勾配遠心法を用いた精製によって十分な濃度のサンプルを得ることが出来た。また、原子間力顕微鏡を用いてその形状がデザイン通りになっているか、欠損したサンプルがないかなどの確認を行い、実験を行うのに十分なクオリティで得られることが確認できた(図1)。



図1. DNAロッドの原子間力顕微鏡写真

(3) 以前から実用化を進めていた、コイル形状のDNAオリガミバネを非筋ミオシンであるミオシンV, VIを連結し、その運動観察に成功した。ミオシンモーター部位に蛍光量子ドットをラベルし、その運動を2nm精度で観察することが出来た。1色観察だけでなく2色観察も行うことが可能であり、モーター部位間の協同的な運動が力学的な作用に反応して変化することを可視化することが出来た(図2)。

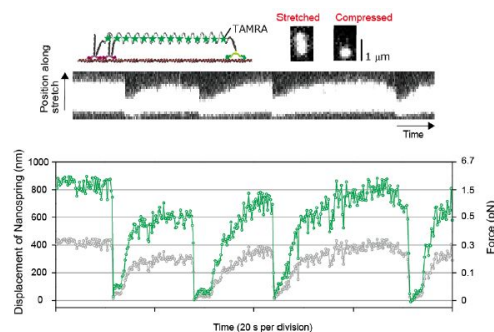


図2. DNAバネとミオシンVIの1分子イメージング実験。図では、バネに蛍光ラベルをしてミオシンVIの運動に反応してバネの伸び縮みを観察している。

このように、力場存在中での1分子蛍光イメージングを実現する新たな実験系の実用化に成功したため、その成果を現在、Nature Methods 誌に投稿中である。

最後に、DNAロッドにヒト骨格筋ミオシンをラベルしてその運動観察を行った。DNAロッドを蛍光ラベルし、1分子蛍光イメージングを行うと、アクチンフィラメント上でのプロセッシブ運動が観察された。骨格筋ミオシン1分子では、ノンプロセッシブな運動しか起こさないため、ミオシン多分子が引き起こす収縮運動を再現できたことになる。

以上より、筋肉を対象にして、1分子計測技術とDNAオリガミを融合した極めて斬新かつ実用性の高い実験系を立ち上げることができ当初の目標をクリアできたと考えられる。

遺伝子転写システムをターゲットにした実験については、研究協力者の藤田氏が発現・精製したRNAポリメラーゼとDNAオリガミの台座テンプレートのアセンブリの確認を行った。台座となるDNAオリガミは50nm四方の立方体形状をとり、アガロースゲル電気泳動を用いた確認で、欠損のない良質のナノ構造物を作成できたことが強く示唆された。このオリガミをTAMRAで蛍光ラベルし、2本鎖DNAおよびQdot655で蛍光ラベルしたRNAポリメラーゼを加え2色の1分子観察を行ったところ、オリガミの台座とRNAポリメラーゼの共局在が確認でき、複合体が形成されていることが分かった。しかしながら、期待していたストイキオメトリーは、オリガミ:RNAポリメラーゼ=2:1であったが、蛍光強度から見積もった実際の値は、オリガミ:RNAポリメラーゼ=1:>10であった。おそらく、DNAオリガミにRNAポリメラーゼが非特異的に結合していると考えられるため、非特異的結合を防ぐためのオリガミ表面加工を施すことが必要であると考えられる。いくつか考えられる加工法があるため、今後の課題として継続して取り組んでいく予定である。

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)

M. Iwaki, A. Iwane, K. Ikezaki, T. Yanagida, Local heat activation of single myosins based on optical trapping of gold nanoparticles., *Nano Letters*, 15, 2456-2461, 2015, 査読有 DOI: 10.1021/nl5049059

K. Fujita, M. Iwaki, Myosin V is a biological Brownian machine., *Biophysics and Physicobiology*, 10,

〔学会発表〕(計6件)

岩城光宏、Wickham Shelley, 池崎圭吾, 柳田敏雄, Shih William, プログラム可能なDNAバネにより明らかにされたミオシンVIの外力依存的なギアチェンジ機構、第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日、金沢大学、石川

岩城光宏、デザイン生物物理と高解像1分子イメージングから探る生体システムの設計原理、早稲田大学理工学部招待講演、2015年7月2日、早稲田大学、東京

岩城光宏、プログラム可能なDNAバネにより明らかにされたミオシンシステムのデザインと制御、第5回分子モーター討論会(招待講演)、2015年6月13日、東大駒場キャンパス、東京

岩城光宏、高解像1分子イメージングから心臓のダイナミクスを探る、応用物理学会・量子エレクトロニクス研究会(招待講演)、2014年12月19日、上智大学軽井沢セミナーハウス、長野

M. Iwaki, Anchoring mechanism of myosin VI revealed with a programmable DNA origami spring, Gordon Research Conferences, Muscle & Molecular motors (招待講演)、2014年7月6日、Mount Snow Resort, USA

岩城光宏、Wickham Shelley, 池崎圭吾, 柳田敏雄, Shih William, DNAオリガミバネを用いたミオシンVIのアンカー機能の分子動態計測、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月25日、札幌コンベンションセンター、北海道

〔図書〕(計2件)

M. Iwaki, World Scientific Lecture notes in Complex systems., 2014, 57-72.

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, 247-264.

〔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・生命システム研究センター・上級研究員

研究者番号：30432503

(2) 研究協力者

藤田 恵介 (FUJITA, Keisuke)