

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02408

研究課題名(和文)新規超解像法を用いて心筋ミオシン集合体内の個々の分子振動運動をとらえる

研究課題名(英文)A novel super-resolution imaging method for capturing individual molecular dynamics in cardiac myosin ensembles

研究代表者

茅 元司 (Kaya, Motoshi)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：00422098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：一般に、2つの分子の距離が200nm以下になると、顕微鏡の空間分解能の限界により各分子の位置を検出することはできない。そこで開発されたのが、超解像イメージング法である。従来の方法は時間分解能が低かったが、本研究ではタンパク質の揺らぎが十分に見えるマイクロ秒の分解能で超解像イメージングすることに挑戦した。その結果、150nmの距離にあるミオシン2分子がアクチンと相互作用している様子を50マイクロ秒の時間分解能で捉えることに成功した。また、心筋ミオシンに特徴的な構造変化を見出し、この特性により心筋ミオシン分子集団は同調して力発生することができ、効率的な心臓収縮を実現していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の動態を捉えることのできる時間分解能を持つ超解像顕微鏡は現状存在しないが、本研究では、十分な時間分解能を持つ超解像イメージング法の礎となる成果を得ることができた。本手法を更に発展させれば、細胞内の各分子の詳細な動態を追従できる画期的な超解像イメージング法が確立されることが期待される。また、心筋ミオシンの研究成果は、心筋症の発症機構や新薬の開発において大いに役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：In general, when the distance between two molecules is less than 200 nm, the position of each molecule cannot be detected due to the limitation of the spatial resolution of the microscope. Therefore, a super-resolution imaging methods have been developed. However, the conventional methods have low temporal resolution and thus, we attempted to achieve super-resolution imaging with microsecond resolution, which is sufficient to see the fluctuations of proteins. As a result, we succeeded in capturing the interaction of two myosin molecules with actin at a distance of 150 nm with a time resolution of 50 microseconds. In addition, we found a unique structural change in cardiac myosin, which allows cardiac myosin ensembles to execute synchronous force generation, resulting in efficient heart contraction.

研究分野：生物物理

キーワード：心筋ミオシン 心臓収縮 超解像イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の中で機能するタンパク質は集団で機能するものが多く、こうした集団内の個々の分子がどのように機能しているのか知ることは、細胞活動を理解する上でとても重要である、しかし、粒子の像(蛍光像など)が200 nm以下の距離に近づくと、顕微鏡の空間分解能の限界(回折限界)のため、個々の粒子の位置を判別することができない問題があった、しかし近年、様々な工夫により回折限界を超えた分解能をもつ超解像顕微鏡が考案され、細胞内のタンパク質の局在の様子や機能が垣間見えてきた。しかし既存の超解像顕微鏡の大きな問題点は、時間分解能が低いことである。多くのものは秒オーダーの時間分解能であり、タンパク質のゆらぎや高速な動態を捉えることは不可能である。特に我々が研究対象としているモータータンパク質のように、マイクロ秒オーダーのゆらぎの中で1ミリ秒前後の短い期間に構造変化するタンパク質の動態を捉える超解像イメージングは考案されていなかった。しかし、東京大学物理学専攻蘆田祐人、上田正仁グループが考案した超解像イメージング法(引用文献1)により、時間分解能を失わず超解像イメージングを行う手法(Multi-Emitter Localization method, MEL法)が考案され、タンパク質の動態を捉えることのできる高速超解像イメージング法の可能性が見えてきた。

申請者は骨格筋ミオシンの分子特性が、如何に分子が集団となって効率的な筋収縮を生み出すためにデザインされているのか、研究をしてきた。また骨格筋ミオシンとアミノ酸組成が8-9割等しい心筋ミオシンについても研究を進めてきた。心筋ミオシンは、分子構造が似ていることから、骨格筋ミオシンと極めて似た分子特性を持って、心臓の収縮を担っているだろうと考えられてきた。申請者の実験において心筋と骨格筋ミオシン集団の力発生を比較してみると、心筋ミオシン集団は、骨格筋ミオシン集団の2倍程度の大きな力を出し、また骨格筋ミオシン集団とは異なる自律機能を持つことが判明し、これらの違いを生む特性が心筋ミオシン分子自身にある可能性が見えてきていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、主に3つの点に着目して研究を進めた、

タンパク質の動態を捉えることのできるマイクロ秒の時間分解能を持つ高速超解像イメージング法とその実験系の構築。

開発する超解像イメージング法を用いて、ミオシン各分子の動態と分子集団の力発生を同時に計測する。

心臓機能に特化した心筋ミオシンの分子特性を実験とシミュレーションから明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) MEL法による高速超解像イメージング法の評価

タンパク質動態を捉えるための高速超解像イメージング法の開発に向けて2つの方向から進めた。1つ目はMEL法の推定精度の評価で、マイクロ秒の時間分解能で超解像イメージングを行うため、高速撮影時でも十分なフォトン数を稼ぐためには金ナノ粒子の散乱像を使うことが必要であった。そこで、金ナノ粒子の散乱強度に匹敵する画像を人工的に作り、2つの仮想金ナノ粒子の距離を段階的に近づけた画像を用意し、この時の各粒子の座標をMEL法を用いて計算し、真値と比較して推定の精度を評価した。2つ目は、金ナノ粒子の散乱像を捉える顕微鏡の構築である。特に散乱像の揺らぎを抑えるための顕微鏡の改良に焦点を絞った。

#### (2) 高速超解像イメージング法を用いたミオシン分子動態

上記の高速超解像イメージングに向けた実験系の開発が進行する中、ミオシン頭部に金ナノ粒子を標識し、アクチン線維との相互作用時の粒子の散乱像を高速カメラで撮影し、実際の実験に対するMEL法による超解像イメージングの評価を行なった。具体的には、同一ミオシンフィラメント上(200-300 nmの範囲内)のミオシン2分子の位置を検出することを目的として、ミオシンフィラメント重合に使うミオシンの1/3に対して、制御軽鎖をピオチンタグの入った制御軽鎖に入れ替えたものを用意した。これらピオチンタグを入れたミオシン分子を含むフィラメントにおいて、アビジンコートした金ナノ粒子を反応させてミオシン分子を標識した。50マイクロ秒で撮影した金ナノ粒子散乱像に対し、MEL法を用いて粒子数と各粒子の変位を推定し、回折限界内に位置するミオシン複数分子の動態評価への可能性を検討した。

#### (3) 心臓機能に特化した心筋ミオシン分子特性の解明

心筋ミオシンの分子特性を評価するにあたり、超解像イメージングを用いた計測とは別に、心筋ミオシン1分子を単離し、アクチン線維と相互作用させた状態で負荷をかけて分子の動態を評価した。この計測から、構造変化する反応速度やアクチンからの解離速度などを定量化し、シミュレーションモデルのパラメータとして導入して、シミュレーションモデルを構築した。このシミュレーション結果から、心筋ミオシンが多分子集団において発生する力特性を特徴付ける重要な分子特性を検証した。さらに、このシミュレーションを心臓内のサルコメア構造を加味し

たモデルに拡張させ(ミオシン分子数の増加,アクチンとZ帯の結合を特徴付けたバネ弾性の導入,カルシウム濃度の周期的変化を特徴付けたアクチン線維への結合速度の導入),心臓収縮機能に大きな影響を与える分子特性,また安定した心臓収縮を生む機構の解明を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) MEL法による高速超解像イメージング法の評価

使用した金ナノ粒子(直径40 nm, 50マイクロ秒間隔で撮影)の散乱像に相当する強度分布を持つ2つの粒子像を人工的に作り,2つの粒子の位置をMEL法により推定した(図1a)。粒子間の平均距離を200 nmから30 nmまで縮めていき,一方の粒子の位置を正弦波上に变化させた動画から,各粒子の位置を推定した。その結果,60 nmの距離までは90%以上の推定精度を持つことがわかった(図1b)。この結果から,理想的な粒子の散乱像においては60 nmまでの距離にあるタンパク質の動態を検出できることがわかった,一方で,金ナノ粒子の散乱像を計測する顕微鏡において1つ大きな問題は,散乱像の強度が揺らぐことであった。この原因を検証したところ,既製の顕微鏡における対物レンズの固定部位が僅かに上下に揺らぐことが原因であった。そこで,この部位を取り外し対物

レンズを顕微鏡筐体に固定し,小型のステージを piezo素子駆動型のモーターで動かす様式に変更することで,この問題を解消して50マイクロ秒の撮影間隔で撮影した金ナノ粒子の像を0.5 nm精度で計測できることを確認した。分子モーターのゆらぎや構造変化は数 nmのオーダーゆえに,この結果は十分な精度と考えられる。

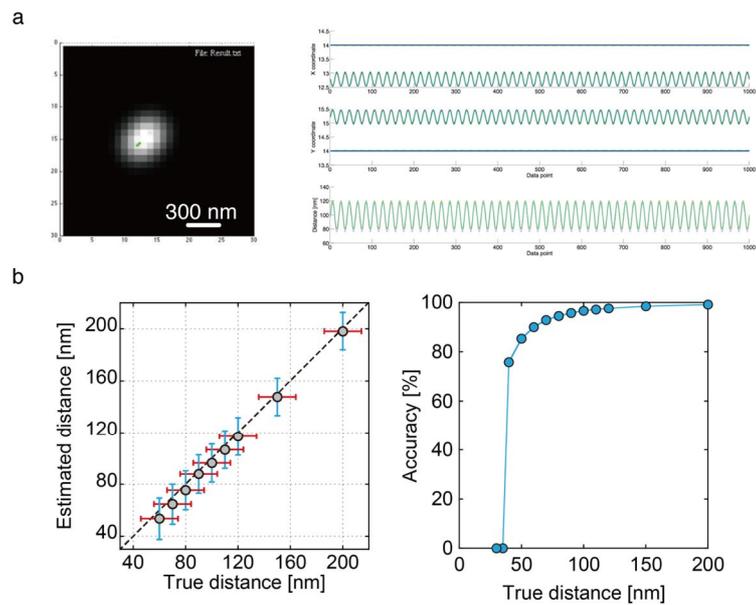


図1 MEL法を応用した超解像イメージングの推定精度の検討。a) 金ナノ粒子2個の擬似散乱像(左)。2つの粒子間平均距離が100 nmの時に,片方の粒子を±20 nm動かし,もう片方の位置を固定した時の真値(青)とMEL法により検出された2粒子の位置推定値(緑)(右)。この場合,推定値の精度は90%を超える。b) 2粒子間の距離を200 nmから60 nmまで変えた時の距離の推定値と真値の関係(左)。完全に推定値が真値とあっている場合は,点線状の対角線上に乗る。この時の推定精度と2粒子間の距離の関係(右)から,距離が60 nmまでは推定精度が90%以上であった。

##### (2) 高速超解像イメージング法を用いたミオシン分子動態

回折限界内に位置するミオシン複数分子に金ナノ粒子を標識して,その散乱像から各分子の位置を検出する実験に関しては,ミオシンフィラメント上の金ナノ粒子散乱像を撮影し,MEL法を用いて,粒子の数とその位置を推定した。その結果,ミオシンフィラメント上に150 nm程度の距離で近接した2粒子の像を検出し,各ミオシン分子の動態を捉えることに成功した(図2)。しかし,多くの粒子像においては,複数の粒子が検出されたものの,これらの分子の変位は極めて似ており,独立した分子の動態を捉えているようには見えないものもあった。その原因は,粒子間の距離が近づくと散乱像同士の間干渉が起こり,お互いの散乱強度にクロストークが生じるためであった,しかし本研究期間において,こうした散乱像同士の干渉効果を検証する実験の考案から実施までに至る十分な時間がなく,今後の検討事項となった。

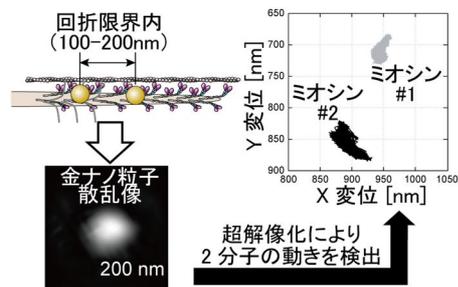


図2 ミオシンフィラメント上のミオシン2分子動態の計測。ミオシンフィラメント上のミオシン2分子を金ナノ粒子で標識し,その散乱像を高速カメラで撮影した。この画像から,2つの粒子位置をMEL法を用いて推定した結果のXYプロット。ミオシン分子間の距離が150 nm程度の時,各分子の独立した動態に分離して検出できている。

### (3) 心臓機能に特化した心筋ミオシン分子特性の解明

心筋ミオシンと骨格筋ミオシン 1 分子に負荷を作用させた状態での構造変化のダイナミクスを光ピンセットを用いて評価したところ (図 3a), 心筋ミオシンは主に 3 つの構造状態に分布し, さらにその状態間を繰り返し遷移している様子が見られた (図 3b 上段). その一方で, 骨格筋ミオシンは 1 つの構造状態に主に分布し, 構造状態を変えるような遷移はほとんど見られなかった (図 3b 下段). このような構造ダイナミクスの大きな違いは, 以下のように解釈できる. 心筋ミオシンは, 収縮方向にアクチンを滑らせる構造変化であるパワーstrookと, その逆向きの構造変化であるリバースstrookを起こすことで, この 3 つの構造状態間を頻繁に遷移する (図 3c). 一方, 骨格筋ミオシンはリバースstrookは殆ど起こさないために, 主にパワーstrook後の構造状態に分布する. 従って, 心筋ミオシンにおいて, 頻繁にリバースstrookする特性が特徴的であることが判明した. そこで, このリバースstrook特性を取り入れたシミュレーションモデル (HRS モデル) とリバースstrookを起こし難い骨格筋ミオシンタイプのモデル (LRS モデル) を構築し, これらの特性の違いが分子集団の力発生に与える影響を検証した. その結果, HRS モデルはリバースstrookを頻繁に起こすことで, より多くの分子がアクチンと結合した状態に留まりやすく, LRS モデルに比べて 2 倍近い力を出し, 申請者が以前に計測した心筋ミオシンフィラメントの力発生の特徴に極めて似た結果を示した. さらに, このモデルを心臓内のサルコメア構造におけるシミュレーションに拡張するため, 心筋ミオシン分子数を 75 分子 (サルコメア構造内のアクチン 1 本に作用する分子数に相当) に増やし, アクチンと Z 帯の硬い結合を特徴付けた弾性特性を入れ, さらに周期的な収縮と弛緩を生み出すカルシウム濃度変化をミオシン頭部のアクチン結合速度に反映させた (図 4a). このシミュレーション結果から, HRS モデルにおけるサルコメア内アクチン 1 本に作用する力波形は, 安定した収縮力発生の後, 迅速に力がゼロに落ちる特性を示した. 一方, LRS モデルをベースにした場合は, 力波形は安定せず, またゼロになる部分もないものであった. HRS モデルで観察された力波形は, まさに左心室の血圧変化に似ており, こうした結果を踏まえると, 心筋ミオシンは負荷の増加に依存してリバースstrookを頻繁に起こすことにより, より多くの分子がアクチンと結合して大きな力を長時間維持できること (図 4b, の部分), またその後にリバースstrook アクチンからの解離という一連の反応を分子間で連鎖的に起こすことで, 一気に力を低下させることが分かった (図 4b, の部分). さらにリバースstrookは, ミオシンの ATP 加水分解サイクルの進行を抑えるため, ATP エネルギーの消費率を抑える効果があることも予想された (図 4c). 以上の結果より, 心筋ミオシンに特徴的なリバースstrookは, 心臓の収縮期における安定した血液の拍出, また収縮末期から弛緩期における迅速な血圧低下を生み出し, さらにエネルギー消費を抑えた収縮の鍵となっていることがわかった. この研究成果は, 今年 (2021 年) に学術論文に掲載された (発表論文 1),

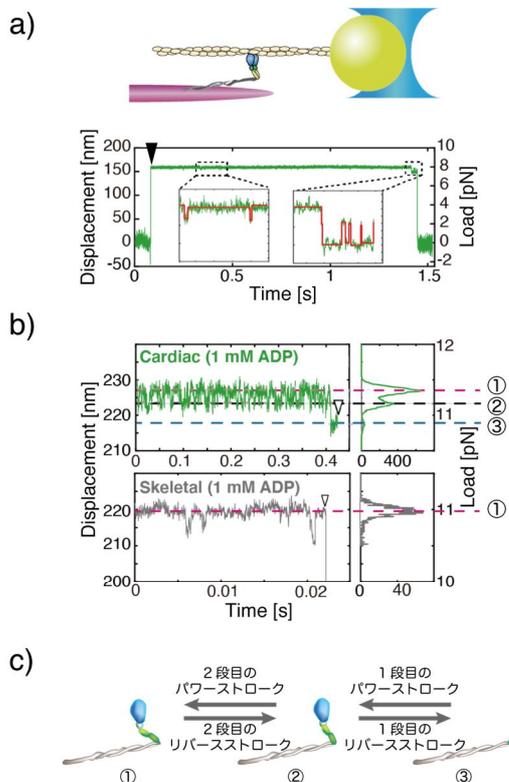


図 3 ミオシン 1 分子の構造変化計測. a) 単離したミオシン 1 分子にアクチンを結合させて, 光ピンセットで引っ張り, ミオシンに負荷をかける (下のプロットにて黒い矢じりが示すところで, ビーズの変位が急激に起きている部分). 負荷を印加した状態のミオシンの構造変化をビーズの変位から検出する. b) 心筋ミオシン (緑) と速筋ミオシン (灰色) における構造変化. 心筋ミオシンの変位波形のヒストグラムには 3 つのピークが見られ, 3 つの構造状態①、②、③間を遷移することを示している. 一方, 骨格筋ミオシンには 1 つのピーク (構造状態①) のみで, この構造状態に主に分布する. c) 心筋ミオシンの 3 つの構造状態. 構造③から①への遷移は, 2 段階のパワーstrookにより収縮方向に動く. 構造①から③への遷移は, 2 段階のリバースstrookにより収縮方向と逆向きの動きとなる.

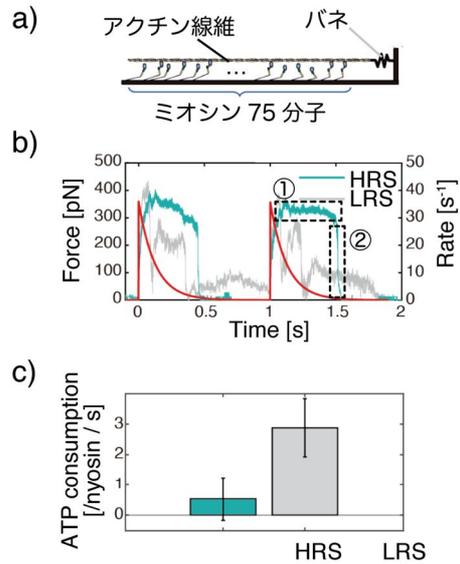


図 4 サルコメア内における力発生のシミュレーション. a) サルコメア内では 75 分子程度がアクチン線維 1 本と相互作用するので、この状態をモデル化した。アクチン線維に作用する力は、アクチンに取り付けたバネの伸びから算出した。b) シミュレーションにより計算されたアクチン 1 本に作用する力波形。赤い線は、心臓内で周期的な収縮と弛緩を生む周期的なカルシウム濃度変化を示す。リバースストロークをするモデル (HRS, 緑) の波形は、左心室の血圧波形 (図 1a) 同様に、安定した力発生 (点線エリア①) が見られ、その後は急峻に力が下がってゼロになっている (点線エリア②)。一方、リバースストロークしにくいモデル (LRS, 灰色) では、安定した力発生が見られず、また力がゼロにならない。c) ATP の消費率の比較。ミオシン 1 分子の 1 秒あたりの消費 ATP 分子数は、パワーstroークするモデル (HRS) の方がパワーstroークしないモデル (LRS より) 圧倒的に低いことがわかる。

<引用文献>

1 Y, Ashida and M, Ueda,  
Precise multi-emitter localization method for fast super-resolution imaging,  
Optics Letters 41, 2016, 72-75

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hwang, Y., Washio, T., Hisada, T., Higuchi, H. and Kaya, M.	4. 巻 118 (6)
2. 論文標題 A reverse stroke characterizes the force generation of cardiac myofilaments, leading to an understanding of heart function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2011659118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 6件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Yongtae Hwang, Takumi Washio, Toshiaki Hisada, Hideo Higuchi and Motoshi Kaya
2. 発表標題 Reverse stroke of cardiac myosin revealed by single molecule microscopy is essential for heart function.
3. 学会等名 63rd Annual Meeting of Biophysical Society Baltimore, USA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtae Hwang, Hideo Higuchi and Motoshi Kaya
2. 発表標題 Collective behaviors of cardiac myosin molecules for effective cardiac function.
3. 学会等名 LMU-UT Joint Workshop on Statistical and Biological Physics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黄勇太, 樋口 秀男, 茅 元司
2. 発表標題 心機能に適した心筋ミオシンの集団的性質
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茅 元司, 蘆田佑人, 上田正仁, 樋口 秀男
2. 発表標題 回折限界内に位置するミオシン複数分子の動態計測
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黄勇太, 樋口 秀男, 茅 元司
2. 発表標題 光ピンセット技術を用いた心筋ミオシン集団の力学的性質
3. 学会等名 ナノ学会第16回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoshi Kaya
2. 発表標題 Molecular properties of cardiac myosin , leading to an understanding of heart function
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会, Symposium: Cardiomyocyte Function (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茅 元司
2. 発表標題 心筋および骨格筋ミオシンの個性とその機能を探る
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会、共催シンポジウム：新学術領域研究「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」光圧操作の新展開：生物物理学のための新しいアプローチ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茅 元司
2. 発表標題 骨格筋ミオシンの分子特性と骨格筋における機能発現
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会, フォーラム: 骨格筋細胞研究がリードする新しい健康かがくの分子生物学新基礎 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motoshi Kaya
2. 発表標題 Reverse stroke of cardiac myosin is essential for heart function: lessons from skeletal myosin
3. 学会等名 Keynote lecture at The 4th Rocky Mountain satellite Muscle Symposium. Canmore, Canada (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoshi Kaya
2. 発表標題 Function of cardiac myosin essential for heart contraction
3. 学会等名 2nd East Asian Symposium On Single-Molecule Biological Sciences. Seoul Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yongtae Hwang, Takumi Washio, Toshiaki Hisada, Hideo Higuchi and Motoshi Kaya
2. 発表標題 Difference in molecular properties between cardiac and skeletal myosins determines types of contraction required in heart and skeletal muscles
3. 学会等名 64th Annual Meeting of Biophysical Society San Diego, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	蘆田 祐人 (Ashida Yuto) (00845464)	東京大学・大学院理学系研究科 物理学専攻・准教授  (12601)	
連携研究者	上田 正仁 (Ueda Masahito) (70271070)	東京大学・大学院理学系研究科 物理学専攻・教授  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------