

令和元年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04773

研究課題名(和文)1分子・少数分子・細胞内モーター分子の運動機構を実験・理論の両面から解明する

研究課題名(英文) Experimental and theoretical studies on function of single and multiple molecules

研究代表者

樋口 秀男 (Higuchi, Hideo)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授

研究者番号：90165093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の物質輸送や細胞分裂を担うモータータンパク質であるキネシン、ミオシンV、ダイニンは一歩幅で長距離を解離することなく、前進運動や後退運動を行う。これら三種類のモータータンパク質の1分子の運動特性を統一的に記述するために運動を単純化して、2つの状態を遷移する数理モデルを提案し、このモデルによって本研究や過去の実験結果をうまく説明することができた。また、筋肉由来のミオシン多分子による力発生を測定した結果、協同的に力発生を行うことが、実験的にもシミュレーションによっても明らかとなった。このような協同的な運動が単離幼若心筋の周期的収縮と関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの生命科学は、多様性や複雑性に関する研究が多い一方で、物理学が得意とするような統一性や普遍性の研究が少なく、これらの分野の今後の発展が望まれている。その意味で、今回の運動を簡単な数式で統一的に説明した研究は、輸送タンパク質にとどまらず、ATPを利用する多くのタンパク質の運動を説明できる可能性を秘めており、学術的意義が大きい。また、心筋細胞の振動現象のメカニズム解明は、心臓の運動を記述する際重要である。従って、今後心臓や心臓疾患を理解するための基礎となり、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Processive molecular motors, kinesin-1, myosin-V and dynein-1, that play a role in vesicle transport in cells take hundred steps without dissociation from microtubule and actin filament. We constructed the unified model that explains the dwell time of steps and the ratio of numbers of forward to backward steps from the simple rate of forward and backward steps. The model was fitted well to the data obtained previously and in this work.

The myosin assembly purified from skeletal muscle interacted with actin filament. The force and displacement were measured by optical tweezers. The energy calculated from the force and step displacement was larger than the energy liberated from one ATP molecule hydrolysis, suggesting that the step reaction is cooperative interaction of myosin molecules. The oscillatory motion of single cardiac cell was also explained by the cooperative interaction with reverse reaction.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子モーター 1分子 少数分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、大きく3つの系(単一分子、複数分子、細胞)に関する研究であるから、それらの背景を説明する。

モーター分子1分子測定によって、分子運動の概要はわかってきた。キネシンは頭部を交互に動かし(Kasedaら *Nature Cell Biol*2003)、ATP結合によってキネシンに~3nmの変位が起こり(Kamaei& Higuchi *Biophys J* 2005)、ステップサイズ8nmで前後にステップし8pNの力発生を行う(Nishiyamaら *Nature Cell Biol* 2001&2002、)。小胞輸送を行うミオシンVも定性的にキネシンに似ており36nmのステップを行う(Uemuraら *Nature Mol Biol* 2004)。ダイニン分子の1分子測定は困難を極めたが、我々は測定に成功し、キネシンと瓜二つの性質を持つことを明らかにした(Tobaら *PNAS* 2006、Shingyoujiら *Cytoskeleton* 2015)。このように似た特性を持った分子に共通のメカニズムがあるはずであるが、いまだ解明されていない。

一方、筋肉ミオシンは、先に述べた歩行分子とは異なり、アクチン線維に結合後、パワーストロークを行った後、アクチン線維から解離する。そのため、世界に先駆けて少数分子による力学特性の測定が行われた(Kaya & Higuchi *Science* 2010)。ミオシン約6分からなるフィラメントを用いても、同時に力を発生する分子は1分子であり、その1分子が負荷によらず8nmのステップ状の変位を行うことを明らかにした。この研究では、ミオシンが解離しにくくするために、低ATP濃度で実験が行われた。従って、生理的高ATP濃度下での運動については明らかになっていない。

2. 研究の目的

細胞の分裂・輸送・運動は、3種類のモーター分子(キネシン・ミオシン・ダイニン)とレール分子(微小管、アクチン線維)によって担われている。これらモーター1分子あるいは少数分子(<~50分子)の運動メカニズムを明らかにすることによって、細胞内のさまざまな現象を説明できると期待される。なぜならば、細胞内の現象のほとんどは、1分子あるいは少数のモーター分子が関与すると考えられているからである。そこで、本研究では、モーター1分子の運動に共通する原理を抽出し、運動の数値モデルを立て、モデルで予言されるパラメーターを実験的に検証する。1分子の運動モデルを少数分子の運動に当てはまるように改良を加え、多分子運動を説明する。さらに、細胞内の小胞輸送や筋肉細胞内ミオシン線維の運動を説明する運動モデルを構築する。

3. 研究の方法

研究成果の中に研究の方法について記載する。

4. 研究成果

ダイニン1分子のパワーストロークにともなう微小管の変位の測定

ダイニン頭部のパワーストロークが運動を担っていることを明らかにするため、単量体ダイニン1分子が微小管結合に伴い発生する変位を光ピンセットにより測定を行った。ヒト由来のダイニン1を昆虫細胞系を用いて発現し、Flagタグを用いて精製した。リング内にBFP、linkerのN端にGFPを導入した単量体ダイニンを作製し、微小管非存在下でのFRET効率やlinkerのスイング度合いを評価した。高ATP濃度ではFRET効率は51%と高く、ATP濃度低下に伴いFRET効率は17%まで低下した。ダイニン単体ではリン酸放出とATP結合が律速過程であると考えられると、高ATP濃度ではpre状態(パワーストローク前の状態)のダイニンの割合が多いためFRET効率が高く、ATP濃度低下に伴いapo状態(ヌクレオチド非結合の状態)の割合が増加することでFRET効率が減少し、3 μ M ATPで2状態の割合が半々であるというモデルを構造研究に基づいて提案した。次にダブルトラップ法を用いて、ダイニンが微小管に結合した後に運動した変位を測定した結果、ATP濃度低下に伴い、変位は8nm(高ATP濃度)から0nm(apo状態)に減少した。ATP濃度依存的FRET効率から提案したモデルを踏まえると、高ATP濃度ではpre状態のダイニンが微小管と結合して8nm運動し、ATP濃度低下に伴いパワーストローク後のapo状態のダイニンが微小管に結合する割合が増加するため運動変位が0nmに減少し、13 μ M ATPでpre、apo状態のダイニンが微小管に結合する割合が半々であるというモデルで説明できた。さらに、高ATP濃度でのダイニン単量体の変位8nmがlinkerのスイングにより引き起こされていることを確認するため、linkerのスイングが阻害された変異ダイニンを用いて変位を測定した。その結果、微小管と結合してもダイニンの運動変位は起こらなかった。以上より、生体内と同程度の高ATP濃度のとき、ダイニン単量体はパワーストロークに伴い微小管上をマイナス端方向に8nm運動し、8nmの運動変位でダイニン二量体の運動を担うことができると考えられた。

二足歩行運動を行う分子モーターの統一モデル

細胞内の物質輸送や細胞分裂を担うモータータンパク質であるキネシン、ミオシンV、ダイニンは一定の歩幅で長距離を解離することなく歩行を行う。これらモーターは、前進運動だけでなく、後退運動も行う。これら3種類のモータータンパク質の運動特性を統一的に記述するために運動を単純化して、2つの状態を遷移する数値モデルを提案した。モーターはレールの上

をその周期に等しい歩幅で移動し、両足結合状態から後ろ足がレールから解離すると片足状態になり、そこからレール(微小管やアクチン線維)の前方に着地して前方ステップを行い、両足結合状態に戻る。両足結合状態から前足が解離すると別の片足状態を経由して、レール後方に着地して後方ステップを行う。モータータンパク質にはレールに沿って外力が作用している場合を考える。ステップから次のステップまでの時間(dwell time)や後方ステップの頻度が負荷に依存することが実験的に知られていることから、本研究では、両足状態からの前方および後方への遷移の速度が負荷に対して指数関数的に依存すると仮定を行った。計算の結果、単位時間あたりの後方ステップ数と前方ステップ数の比 r と平均 dwell time の負荷依存性を2つの指数の和あるいは定数を加えた割り算で表すことができた。

キネシン1分子の広い負荷領域におけるステップ運動

細胞内でキネシンが機能するときは1分子ではなく複数の分子が集団になって働いていると考えられており、後ろ向き・前向きに大きな負荷がかかると考えられる。この集団の運動を理解するためにはキネシンの前方向の運動、後ろ方向の運動、微小管からの解離に関する dwell time (キネシンのステップとステップの間の時間)の負荷依存性を知らなければならない。そこで、キネシンの前進・後退・解離反応に関する運動モデルの構築することを目的として研究を行った。マウス kinesin-1(KIF5a)を大腸菌で発現し、His タグを用いて精製を行った。キネシンと微小管を相互作用させ、力を発生した後、前方や後方にレーザートラップの位置をずらすことで、前進方向の負荷や後ろ方向の負荷を与えた。先行研究では前向きの負荷(マイナス負荷)では、dwelltime はあまり負荷に依存せず一定であるとされてきたのだが、本研究の結果、指数関数的に減少することが明らかとなった。また、 -3pN で後退ステップを初めて検出することができた。後ろ向きに負荷がかかると指数関数的に dwell time は長くなることでキネシンの運動は遅くなり、 12pN を超えると前進運動は観察されなくなった。さらに大きな負荷をかけると、後ろ方向の運動速度が指数関数的に速くなることがわかった。この結果は佐々木 茅 樋口らの数理モデルに一致した。また、高精度な顕微鏡を作製したことで、これまで観察されていなかった 1ms 以下の非常に速い 8nm の後退ステップを観察することができた。この速いステップは後退ステップの約 30% を占めていた。この新しく発見されたステップは、先行研究では装置の時空間分解能が足りずに 16nm のステップとして観察されてきたものと考えられる。本研究で新しく得られた結果を表現できるように先行研究のモデルを修正することで、キネシンの運動における律速反応の負荷依存性を解離反応も含めてすべて求めることができた。

ミオシン多分子の運動特性の測定とシミュレーション

筋収縮を担う骨格筋ミオシン分子の力発生において、多分子間の力発生における協同性メカニズムの解明を行った。ウサギ骨格筋からミオシンおよびアクチンを精製し、ミオシン分子と頭部のないロッドミオシンを重合させ、ミオシン約 17 分子程度がアクチン 1 本と相互作用する系を作成した。ミオシンフィラメントをガラスに固定し、アクチン線維を相互作用させて、分子が発する力を光ピンセットを用いて計測した。その結果、ステップ状に変化するアクチンの滑り運動が観測された。このステップに力を掛けステップにおけるエネルギーを求めたところ、ATP の加水分解エネルギーに 1 倍を超えたことから、ミオシン複数分子が同調して力を発生していることが示唆された。さらにシミュレーションモデルの結果から、こうしたミオシン分子間力発生を同調させる重要な要因として以下の3つが判明した。1) ミオシン頭部のストレインに依存する化学反応変化、2) パワーストロークと呼ばれるミオシン頭部の構造変化が複数段階に分かれていること、3) 生理学的な条件に近い高濃度 ATP。以上のように、骨格筋ミオシンの特性はミオシンが複合体を形成して力発生する上でより協同的になるようにデザインされ、またこうした機能発現により高効率な筋収縮が実現すると考えられる。

心筋細胞の振動現象の計測と振動メカニズム

単離心筋細胞の昇温時に誘起される高速サルコメア振動(Shintani et al. 2015)を高精度で測定し、シミュレーションによって運動を説明する試みを行った。幼若ラットから心臓を摘出し、心筋細胞を単離し、 α アクチニン G F P を発現させた。培養された心筋細胞近くに、 1550nm のレーザーを照射し水の光吸収によって温度上昇を誘起した。観察時間分解能をあげるために、 488nm のレーザの集光度をあげた。その結果、 500frame/s の高速で、心筋細胞の内部のサルコメアの位置を数 nm 精度で解析することが可能となった。昇温時のサルコメアは、カルシウム濃度変化に依存する長さ変化を行ないつつ、その数倍の早さである数 Hz の HS0s 振動を同時に行うこと、その HS0s の振動は、振幅や振動の収縮・弛緩の時間比率はカルシウム濃度変化に依存して変化するが、振動周期は一定の値に保つことを明らかにすることが出来た。ミオシンの化学力学状態を考慮したサルコメア集団のシミュレーションモデルを用いてこの現象の再現を試みたところ、ミオシン分子のパワーストローク後、ADP が解離していない状態でミオシンアームに伸長的なひずみが逆反応をトリガーするとの仮定をおくと、現象の再現が出来るということが分かった。この仮定は、ミオシンアームの伸びが大きいと、前の状態に戻る可能性が高くなり、逆反応がおこることで、エネルギーが消費を抑えて、振動が起こることを示唆している。また、この現象は、早い弛緩を誘起し、心筋のポンプとしての効率をたかめることもあきらか

となった。

細胞の損傷を定量する新しい方法の開発

損傷を受けた細胞の死の過程や、損傷からの回復の過程を理解するためには、細胞の損傷の度合いである損傷度を測定することが重要である。そこで、細胞の損傷度を非侵襲で計測する新しい方法を開発し、細胞の損傷を定量的に評価した。実験では、ヒトがん細胞を用いて、赤色光照射によって活性酸素を発生する赤色蛍光色素 IR700 を細胞にエンドサイトーシスさせることで取りこませた。細胞を顕微鏡に設置し、位相差顕微鏡にて細胞構造を記録した。細胞に赤レーザーを照射し細胞に損傷を与えたところ、細胞の位相差像でコントラストの強いベシクルなどの細胞内小器官の運動が弱まる現象を発見した。この運動の弱まりを定量的に評価するために、位相差像の各ピクセルの強度揺らぎを解析する光ゆらぎ解析法を開発した。その結果、損傷度に依存して細胞内運動が低下することを光ゆらぎ解析によって定量的に明らかとした。次に損傷が起こる原因を明らかにした。IR700 の光活性化によって、リソソームが破壊されることが蛍光観察によってあきらかとなった。さらに細胞内のキネシンやダイニンは細胞内輸送にかかわることから、精製したキネシンやダイニンを用いて IR700 を光活性を行ったところ、微小管の運動が停止することが観察された。したがって、細胞損傷度に依存して細胞内輸送系が損傷を受け、それを光ゆらぎ解析法で計測していると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

1. Seohyun Lee and Hideo Higuchi. 3D rotational motion of an endocytic vesicle on a complex microtubule network in a living cell. bioRxiv 576702 (2019).
2. K. Sasaki, M. Kaya, and H. Higuchi. A unified walking model for dimeric motor proteins Biophys. J.115, 1-12 (2018). 査読有
3. Yoshimi Kinoshita, Taketoshi Kambara, Kaori Nishikawa, Motoshi Kaya and Hideo Higuchi. Step Sizes and Rate Constants of Single-headed Cytoplasmic Dynein Measured with Optical Tweezers. Sci. Rep. 16333 (2018). 査読有
4. Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi. Numerical method for vesicle movement analysis in a complex cytoskeleton network. Opt. Express 26, 16236- 16239 (2018). 査読有
5. Takumi Washio, Seine A. Shintani, Hideo Higuchi and Toshiaki Hisada. Analysis of spontaneous oscillations for a three state power stroke model. Physical Review E. 95, 022411 (2017). 査読有
6. Motoshi Kaya, Yoshiaki Tani, Takumi Washio, Toshiaki Hisada and Hideo Higuchi. Coordinated force generation of skeletal myosins in myosin filaments through motor coupling. Nature Communications 8,16036 (2017). 査読有
7. Morito Sakuma, Sayaka Kita and Hideo Higuchi. Quantitative evaluation of malignant gliomas damage induced by photoactivation of IR700 dye. Science and Technology of Advanced Materials. 17, 473-482 (2016). 査読有

[学会発表](計 19 件)

1. S. Shintani, T. Washio, Y. Hwang, M. Kaya and H. Higuchi. Molecular mechanism of self-oscillatory contraction of cardiac muscle. Internatinal Symposium on Nanomedicine. Ube Yamaguchi (2018.12.6-9).
2. 近藤 雄一、佐々木 一夫、樋口 秀男、広い負荷領域の測定から明らかになったキネシン 1 分子のステップ運動、第 56 回生物物理学会年会 岡山 (2018.9.15)
3. Lee Seohyun, Hideo Higuchi Three-dimensional vesicle motion in complex cytoskeletal network revealed by numerical analysis method. 第 56 回生物物理学会年会、岡山 (2018.9.15) .
4. Hideo Higuchi, Yuichi Kondo and Kazuo Sasaki. Unified walking model for processive motor proteins and its experimental evidences Joint symposium between UBI and MBI in NUS Natinal university of Singapore. Singapore (2018.4.14-15).
5. 佐々木一夫、茅元司、樋口秀男 二足歩行型分子モーターの統一モデル 第 73 回日本物理学会 春季大会 野田市 東京理科大 (2018 .3.22-25) .
6. 近藤雄一、佐々木一夫、樋口秀男 高負荷におけるキネシン 1 分子のステップ運動 第 73 回日本物理学会 春季大会 野田市 東京理科大 (2018 .3.22-25) .
7. 黄勇太、茅元司、樋口秀男 心筋ミオシンの集団的性質の解明 第 73 回日本物理学会 春季大会 野田市 東京理科大 (2018 .3.22-25) .
8. Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi. Focus Stabilization by Axial Position Feedback in Biomedical Imaging Microscopy. IEEE Sensors Applications Symposium, Seoul, South Korea (2018. 3. 12 - 14).
9. Yuichi Kondo , Hideo Higuchi. Neck linker of kinesin is low force generator. The 55th

- Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2017.9.19-9.21).
10. Seohyun Lee, Kohsuke Gonda, Motoshi Kaya, Hideo Higuchi. Trafficking of endocytic vesicles in live cancer cells. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2017.9.19-9.21).
 11. Yoshimi Kinoshita, Taketoshi Kambara, Kaori Nishikawa, Motoshi Kaya, Hideo Higuchi. The step size and microtubule-binding time of single-headed dynein. The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2017.9.19-9.21).
 12. Motoshi Kaya, Takumi Washio, Hideo Higuchi. Molecular Mechanism of Synchronous Force Generations among Myosin Molecules. The 61st Annual Meeting of Biophysical Society, New Orleans, USA (2017.2.11-15).
 13. Yoshimi Kinoshita, Taketoshi Kambara, Kaori Nishikawa, Motoshi Kaya, Hideo Higuchi. The power stroke distance of human cytoplasmic dynein. Biophysical Society 61st Annual Meeting, 222-Plat, New Orleans, LA, USA (2017.2. 11-15).
 14. Yoshimi Kinoshita, Taketoshi Kambara, Kaori Nishikawa, Motoshi Kaya, Hideo Higuchi. Measurement of the power stroke distance of cytoplasmic dynein motor. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Tsukuba International Congress Center, Ibaragi, (2016. 11. 25-27).
 15. Seine A. Shintani, Takumi Washio and Hideo Higuchi. “Contractive oscillations intrinsic to heating cardiomyocytes maintain the period against late Ca²⁺ variations”, The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (Tsukuba) (2016.11.27).
 16. Kazuo Sasaki, Motoshi Kaya, Hideo Higuchi. A unified walking model for dimeric motor proteins. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Tsukuba International Congress Center, Ibaragi, (2016. 11. 25-27).
 17. Seohyun Lee, Kohsuke Gonda and Hideo Higuchi. Trafficking of endocytic PAR-1 carrier vesicles in cancer cell. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, Japan (2016.11.25-27).
 18. Motoshi Kaya. Molecular mechanism of synchronous force generations among skeletal myosins. Symposium: Modeling and Manipulation of Life: a Challenge to Unveil Its Complex Mechanism. The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Tsukuba, Japan (2016.11.25-27).
 19. Morito Sakuma, Sayaka Kita and Hideo Higuchi. Specific Movement of Vesicles in the Damaged Brain Tumor Stem Cell. The 68th Annual Meeting of the Japan Society for of Jap Cell Biology, Kyoto, Japan (2016.6.15-17).

〔図書〕(計 2 件)

1. H. Higuchi and C. Shingyoji. Measuring the Motile Properties of Single Dynein Molecules. Chapter 5 In Handbook of dynein 2nd. Hirose and Amos eds. Pan Stanford Publishing (2019) In press
2. 樋口秀男 数理科学 「ファイマンラチェット-生体分子の運動の理解にむけて-」 633、34-39 (2018.9)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 <http://bp.phys.s.u-tokyo.ac.jp/higuchipro/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 一夫

ローマ字氏名：Kazuo Sasaki

所属研究機関名：東北大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：50205837

研究分担者氏名：茅 元司

ローマ字氏名：Motoshi Kaya

所属研究機関名：東京大学

部局名：理学系研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 00422098

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。