

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13860

研究課題名(和文)アクチンフィラメントの多形性を応用した水和状態制御によるミオシン駆動

研究課題名(英文)Driving myosin by polymorphism and hydration-state control of actin filaments

研究代表者

鈴木 誠 (Suzuki, Makoto)

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：60282109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タンパク質複合体の水和状態を制御することでATP加水分解によらずにミオシンコート基板上をF-actinを駆動する試みを行なった。初めにF-actinの2次構造・3次構造制御を水溶液中のMg(2+)とCa(2+)各イオンの交換で可能であることをCD分光測定により確かめた。次に、ミオシンにAMPPNPを結合させ低イオン強度下のMg-F-actinとの弱い結合状態を始状態として、caged-Caを用いてUV光照射による局所的なCa²⁺放出を行い、60nm程度の有意な変位をするF-actinが観測された。さらに実験数を増やして確認を要するが、今回の実験でその可能性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we carried out an experiment to examine whether F-actin could be driven on a myosin-coated substrate by controlling the hydration state change of actomyosin complex without using ATP hydrolysis. Firstly, by CD spectroscopy, it was confirmed that the secondary and tertiary structures of F-actin were controlled by changing Mg(2+) and Ca(2+) concentrations using EGTA. Secondly, as the initial weak-binding state, acto-myosin (heavy meromyosin) complex with AMPPNP at relatively low ionic condition was formed. When the Ca²⁺ concentration was increased by using caged-Ca and irradiation of UV light, we observed ~60 nm displacement of a Q-dot attached on F-actin. Further experiments must be made to confirm this observation and to establish this new driving principle.

研究分野：生物物理

キーワード：actomyosin ATP energy hydration free energy driving force hydration control water entropy polymorphism Ca ion control

1. 研究開始当初の背景

蛋白質のフレキシビリティは機能を生み出すために必須であるという認識は普及している。しかし、フレキシビリティを積極的に並進運動などの機能発生に利用する工学デザインの取り組みは筆者の知る限りまだなされていない。本研究は、これまで新学術領域研究「水和とATP」等で解明してきた水和過程がもたらす蛋白質3次元構造安定性への定量的影響や蛋白質と基質間結合の熱力学量の定量的影響について得られた知見を基に、アクチンフィラメント上をミオシン頭部S1をATP加水分解反応によらずに水和状態の安定性制御により駆動しようとする斬新な試みである。この研究を達成する鍵は、ミオシン頭部がF-actin上のポテンシャルの底で安定した状態から、化学的刺激によりF-actin構造を変えることでポテンシャルを変えて不安定化させ、より新たなポテンシャルの底に移動させる仕組みを実現することにある。そのポテンシャル計算の基盤が水和自由エネルギーである。これは連携研究者の木下が開発した方法で計算可能であり、その基盤は論文発表済みである。実験上の鍵の1つはF-actinの構造を可逆的に制御することであるが、これは既存の論文的知見と著者らの水和測定実験により確認済みであり、実験上は化学的刺激としてのイオン交換の操作にある程度のスキルを要する。あとはナノメートル空間分解の運動計測実験を行って確認することが課題である。

2. 研究の目的

筋肉収縮の分子リニアモーターであるアクチンフィラメントとミオシンのすべり運動(図1)を、ATP加水分解反応を用いずに、F-actinの構造多形性と水和状態制御法を応用してモーター駆動機構の構成反応要素をデザイン・構築し、リニア駆動機構の実証をめざす。

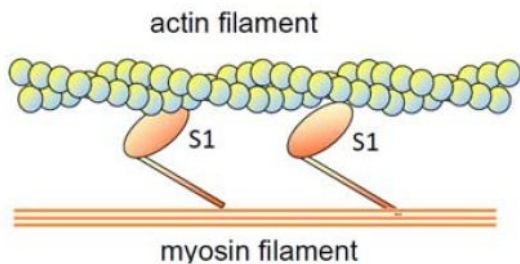


図1 分子リニアモーター・アクトミオシン

3. 研究の方法

この駆動システムを実現するためにはF-actinのらせん線維構造が必要である。このらせん構造は固定ではなく、構造がスイッチできることが重要になる。F-actinは2価イオン交換等により構造をスイッチできる。構造スイッチを誘起するために2価イオンの交換をキレート剤と液交換法を用いて行う。S1-ADPはF-actinと強結合(静電+疎水)しているが、ADPがAMPPNPと置換されるとその結合点から離れて図5のS1-AMPPNPの弱い結

合のポテンシャル曲線上に移る。もしそこが最安定点ではなければ、より安定な点(二重らせん溝部がモルフォメトリック熱力学論的に水の並進エントロピーが最大)に向かう運動(らせん標準ピッチ36.5nmの数分の1)が期待される(図2)ので、光学顕微鏡で輝点位置変化のナノメートル計測を実施した。

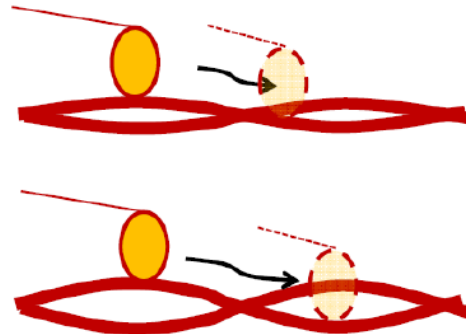


図2 F-actinのらせん構造上のミオシンS1の最安定位置への移動の模式図

4. 研究成果

F-actinフィラメントを構成する2つのらせん形ストランドの相対配置はMg²⁺結合時とCa²⁺結合時で異なることが小田・前田のX線線維回折や藤井らの電顕観察で明らかになっている。ここでは、水溶液中での構造変化を確認するためにCD分光測定(図3)を行った。2次構造ではMg²⁺結合時に222nm吸光変化からわずかにヘリクス含量がCa²⁺結合時より低下すること、3次構造ではMg²⁺結合時に290nm付近に明らかなコットン効果が確

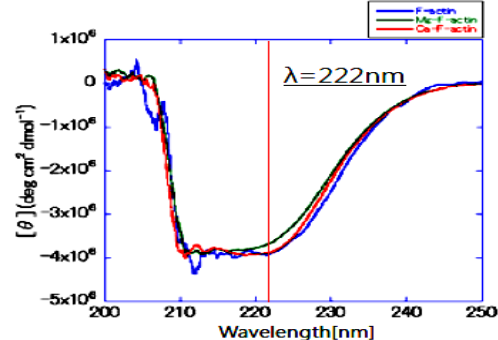


図3 F-actin水溶液のCDスペクトル(短波長領域)

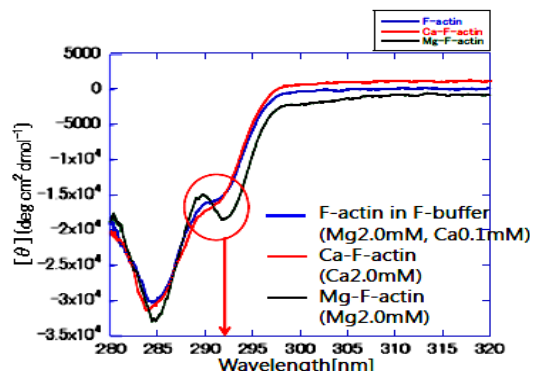


図4 F-actin水溶液のCDスペクトル(長波長領域)丸印はTrp由来Cotton効果を示す。

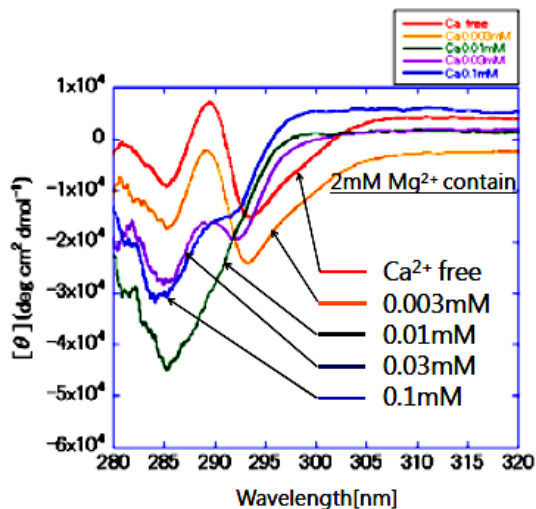


図5 F-actin 3次構造の二価イオン組成による制御

認められた。(図4)この2次構造・3次構造の変化は先のX線や電顕による観察と矛盾しない。ここではF-actin水溶液中のMg²⁺とCa²⁺各イオンの交換を行うため、EGTA添加とCaCl₂添加を組み合わせることで繰り返しイオン交換を行う方法を確立した。(図5)

<ATP加水分解によらずミオシンコート基板上をF-actinを駆動する試み>

ここではF-actinの2次構造・3次構造制御のために、水溶液中のMg²⁺とCa²⁺各イオンの交換を行うため、下記2つの方法を試みた。1回目としてEGTA添加とCaCl₂添加を組み合わせることで繰り返しイオン交換を行う方法を採用した。連携研究者である岩城(理研)の協力を得て、光学顕微鏡下、ミオシンコートガラス基板上でQ-dotを結合したF-actinの移動距離の測定を試みた。Q-dotの移動において数nmの位置分解をするために、Q-dot蛍光輝点をガウス関数で近似して中心点をもとめ、また基板そのものの位置ドリフトを補正するため基板上に固定されたQ-dotsとの三角測量から、F-actin長軸方向のF-actin上Q-dotの移動距離を計測した。しかしながら、溶液の交換によるイオン交換のために、F-actinの運動測定時間より長いインターバルが入ったため必要な位置精度が得られなかった。しかも基板上のQ-dotsもそれぞれブラウン運動を示したため、3個の基板固定Q-dotsそれぞれの位置の時間変化を計測し、基板の測定時間中の変位をまずもとめた。この手法を次の測定に適用した。

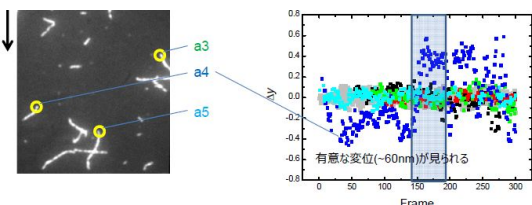


図6 UV照射Caイオン制御によるF-actin移動距離の測定。はy方向(1 pixel=74nm)

2回目に caged-Ca(DM ニトロフェン-Ca)を2mM溶液に365~375nmUV光を5秒間照射によるCa²⁺放出を行い、Q-dot位置の移動距離測定を行った。図6の右図横軸は10 frames/sで30秒間測定した結果を示す。その結果、60nm程度の変位をするF-actinが観測された。測定誤差は基板上Q-dotsの固定がよければ5nmの空間分解の可能性もあるが、今回の実験では変動誤差20nm程度であった。その意味では、有意な位置変化を観測したといえる。期待した位置変化より大きいことは他の原因も検討する必要がある。現時点で観測数がまだ十分な数に達していないのでさらに実験数を増やして確認を要する。この運動を繰り返し測定できれば、ATP加水分解によらずにナノマシンを駆動する手法の確立につながる。今回の実験でその可能性を確認することができた。

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 3件)

— George Mogami, Makoto Suzuki, Nobuyuki Matubayasi, Spatial-Decomposition Analysis of Energetics of Ionic Hydration, *J. Phys. Chem. B.* 120 (2016) 1813-1821. 査読有

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b09481

— Makoto Suzuki, Asato Imao, George Mogami, Ryotaro Chishima, Takahiro Watanabe, Takaya Yamaguchi, Nobuyuki Morimoto, and Tetsuichi Wazawa, Strong Dependence of Hydration State of F-actin on the Bound Mg²⁺/Ca²⁺ Ions, *J. Phys. Chem. B.* 2016, 120 (28), 6917-6928. 査読有

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b02584

— Takahashi, Hideaki; Umino, Satoru; Miki, Yuji; Ishizuka, Ryosuke; Maeda, Shu; Morita, Akihiro; Suzuki, Makoto; Matubayasi, Nobuyuki, Drastic Compensation of the Electronic and Solvation Effects on the ATP Hydrolysis Revealed Through a Large-Scale QM/MM Simulations Combined with a Theory of Solutions, *J. Phys. Chem. B.* 2017, 121 (10), 2279-2287. 査読有

DOI:10.1021/acs.jpcc.7b00637

[学会発表](計 11件)

— Makoto Suzuki, George Mogami et al., Strong Mg²⁺/Ca²⁺ Ion Dependence of Hydration of F-actin[Annual Meeting of Biophysical Society of Japan](2016年11月25-27日, 日本国, Tsukuba) ポスター(一般)

— Takaya Yamaguchi, George Mogami, Makoto Suzuki, et al., Tertiary structure of F-actin affected by

- Mg²⁺/Ca²⁺ and temperature[Annual Meeting of Biophysical Society of Japan](2016年11月25-27日, 日本国, Tsukuba) ポスター(一般)
- Yuki Ochiai, George Mogami, Makoto Suzuki, Hydration study on myosin subfragment 1 and some other proteins by Raman OH-stretching spectroscopy [Annual Meeting of Biophysical Society of Japan](2016年11月25-27日, 日本国, Tsukuba) ポスター(一般)
- Yasutaka Naito, Makoto Suzuki, Hydration analysis of amino acids by Raman OH-stretching spectroscopy [Annual Meeting of Biophysical Society of Japan](2016年11月25-27日, 日本国, Tsukuba) ポスター(一般)
- Makoto Suzuki, Hyper mobile water of F actin and muscle contraction [IGER International Symposium on "Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage"] (2016年12月12-13日, 日本国, Nagoya) 口頭/ポスター(一般)
- 鈴木 誠, やわらかさと溶媒効果が生み出す高次分子機能とエネルギー変換 [FRIS Annual Meeting 2017] (2017年2月15-16日, 仙台) 口頭(一般)
- 鈴木 誠, Hyper Mobile Water とアクトミオシンの駆動力[「水和とATPエネルギー」研究会] (2017年3月5-7日, 仙台) 口頭(基調)
- 最上讓二, 鈴木 誠, イオンの水和エネルギー(2体項と多体項)の空間分布[「水和とATPエネルギー」研究会] (2017年3月5-7日, 仙台) 口頭(一般)
- 和沢鉄一, 鈴木 誠, 周波数領域蛍光偏光法によるアクチンに係留した蛍光プローブの回転運動性とその共溶媒効果の解析[「水和とATPエネルギー」研究会] (2017年3月5-7日, 仙台) 口頭(一般)
- 児玉孝雄, 鈴木 誠, Macrostate-shift Model of Myosin: Retrospect and Prospect[筋生理の集い] (2017年12月17日, 東京) 口頭(一般)
- 鈴木 誠, 児玉孝雄, Hyper mobile water around F-actin and muscle contraction[筋生理の集い] (2017年12月17日, 東京) 口頭(一般)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：
 〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.material.tohoku.ac.jp/atpwater/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)
 東北大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：60282109

(2) 研究分担者

最上 讓二 (MOGAMI, Jouji)
 東北大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号：70713022

(3) 連携研究者

松林 伸幸 (MATUBAYASI, Nobuyuki)
 大阪大学・大学院基礎工学研究科・教授
 研究者番号：20281107

(3) 連携研究者

木下 正弘 (KINOSHITA, Masahiro)
 京都大学・エネルギー理工学研究所・教授
 研究者番号：90195339

(3) 連携研究者

岩城 光宏 (IWAKI, Mitsuhiro)
 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

(4) 研究協力者

山口貴也 (YAMAGUCHI, Takaya)
 東北大学・大学院工学研究科修士2年