

令和 5 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：2019～2021

課題番号：19H03189

研究課題名(和文) 生体にみられる振動運動の高精度測定と振動の統合的理解にむけた理論構築

研究課題名(英文) Measurement of oscillatory movements of biological systems and unified theory of the oscillation

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体にみられる振動運動のメカニズムを実験と理論の両面から統合的に理解を行った。心筋から精製したミオシン分子にみられる振動的運動を説明するために、3状態モデルを立て、シミュレーションを行ったところ、ミオシンの力を発生するのは逆向きに反応が起こることが重要であることが推定された。心筋細胞の温度を数度あげると自励振動が起こるが、この振動を解析し、シミュレーションと突き合せたところ逆反応が重要であることが支持された。さらに、心筋から精製したミオシン分子を用いて、負荷をかけると逆反応が頻繁に起こる現象が確認され、逆反応と振動が密接に関係す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

心臓の規則的な拍動は、周期的な電気信号で引き起こされることが定説となっている。しかしながら、心筋から精製した心筋細胞は、電気信号がなくても、温度を数度あげるだけで自励的な振動が起こることが観察された。本研究ではこの振動現象がどうして起こるかを、理論と実験の両面から解明を行った。シミュレーションにより、ミオシンが力を出すのと逆の反応が起こることが、振動に重要であることが示された。この示唆は、心筋細胞や精製したミオシン分子を用いた実験結果によって支持された。すなわち、心臓はもともと振動する性質を持っており、電気信号は、おそらく振動を安定化する作用があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of oscillatory motion in living organisms was investigated from both experimental and theoretical perspectives in this study. We developed a three-state model to explain the oscillatory motion of myosin molecules in cardiac muscle and the importance of the reverse reaction of powerstroke was suggested from the model simulations. The importance of the reaction was supported by the work that self-oscillations of immature cardiomyocytes was analysed and compared with the simulation with the reverse stroke model. The reversal reaction of myosin purified from cardiac muscle was observed frequently under high load, suggesting a close relationship between the reverse reaction and oscillation.

研究分野：モータータンパク質の運動

キーワード：モータータンパク質 心筋 鞭毛 ミオシン ダイニン

1. 研究開始当初の背景

人体や生物には、さまざまな周期性を持つ振動運動がある。心臓は、ペースメーカー細胞の周期的な活動電位に同調して起こる心筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の増減に合わせて振動するといわれているが、単離した心筋細胞では、 Ca^{2+} 濃度と独立に心臓の周期に近い振動周期で運動を行うことが明らかとなった。この発見は、心筋細胞に元来振動のが備わっており、ペースメーカー細胞は、ミオシンの振動を安定的に起こしている可能性が示唆された。

さらに、ミオシンフィラメントのミオシン分子をアクチンフィラメントと相互作用させて、力を測定したところ、力の上昇と下降をなんども繰り返す振動のような波形も報告されていることから、ミオシン分子に振動の要素がある可能性がある。

ミオシンとは別に振動で有名なのは、精子鞭毛である。ウニ精子鞭毛は約 50Hz の振動運動を行う。精子鞭毛の断片上にあるダイニン列に対して、微小管を 45 度から垂直に相互作用させることで、相互作用する分子を 10 分子以下に減らしたとき、振動運動が観察された。近年、ダイニン列と相互作用する微小管に力を加えると、正方向だけでなく逆方向の運動も見られた。これらは、ダイニン少数分子にすでに振動能が存在していること示唆しており、ミオシン集団の持つ振動と類似している可能性がある。

2. 研究の目的

生体振動に寄与する分子種は異なっても、力学的性質に類似性が見られれば、周期運動を統一的理論によって理解できる可能性がある。そこで本研究では振動運動メカニズムを実験と理論の両面から統合的に理解するために、改良した装置を用いて精製モーター多分子 (3 - 100 分子) による周期的な振動運動の高精度計測および 1 分子の弾性率を測定し、実験結果を統一的に説明できる振動理論および反応モデルを構築する。さらに、心筋細胞・精子鞭毛・細胞分時の振動運動を高精度で測定し、理論およびモデルを細胞用に修正を行い、細胞の振動運動も統一的に理解する。

3. 研究の方法

(1) 幼若心筋細胞の筋節長の観察

未熟な Wistar ラットより精製された心筋細胞に pAcGFP(-アクチニン) プラスミドをトランスフェクトすることで、筋節の Z-line を蛍光観察できるようにした。蛍光を観測するために倒立顕微鏡 (IX-70) に高感度カメラと油浸対物レンズを装着した。高時間分解能の解析のため、フレームレートを 500fps に調整した。心筋細胞の温度をサーモスタット制御インキュベートにより 37.0 に制御した。温度ジャンプを 1550nm レーザーで行った。

(2) 心筋ミオシンの力測定

頭部 (S1) のないミオシンと頭部のあるミオシンを混ぜるとで、アクチンフィラメントと相互作用するミオシン分子数を約 17 分子になるように調整した。アクチンフィラメントにポリスチレンビーズを結合した。ビーズをレーザートラップし、アクチンをミオシンと相互作用させることで力発生を行い、ビーズの変位とトラップバネ定数から力を算出した。

4. 研究成果

(1) 筋肉サルコメア自励振動のシミュレーション

筋肉サルコメアに起こる自発振動性収縮(SPOC)は、急速なサルコメア伸長波が単一の筋原線維に沿って伝播する。サルコメアの長さで形成される格子間隔には逆関係があるので、ミオシン分子に横方向の力学的平衡を考慮したモデルシミュレーションによって、振動現象をうまく説明できた。また、このモデルでは、ミオシン分子の逆方向の reversal stroke が重要であることも示された。(Washio T. et al. Scientific Rep. 2019)

(2) 幼若心筋細胞の自励振動

心筋細胞を 38 ~ 42 °C に温めることによって生じるサルコメア振動 (高温振動) における Z-line の蛍光を 500fps で取得し、個々のサルコメアの高温振動の振動波形を調べたところ、細胞内の Ca^{2+} 濃度変化に伴ってサルコメアは HSOs の振動振幅を変化させるが、振動周期は一定に保つことが明らかとなった。鷲尾らとの共同研究で、サルコメア内部のミオシンの状態を考慮したモデルのモンテカルロシミュレーションを行い、縮みながら振動し続ける特徴も再現できることが明らかとなった。このモデルは、首振り運動を行ったミオシンが reversal stroke を行うことが振動に重要であると示唆された。(Shintani S. et al. Scientific Rep. 2020)

(3) 心筋ミオシンにみられる逆方向運動

心筋ミオシンはアクチンフィラメントをステップ状に変位させた。心筋ミオシンは骨格筋ミオシンに比べて低負荷で逆向きのステップを生じやすい一方、大きな力を発生できることが判明した。この逆向きのステップがミオシンの reversal stroke と関係しているかを確認するために、心筋ミオシンの 1 分子実験を行った。その結果、心筋ミオシンは 3 つの安定状態を持ち、その安定状態間を双方向に遷移できることを示唆する実験結果が得られた。これは、心筋ミオシンの reversal stroke を直接観測した最初の例である。リバースストロークの生理学的意味を調べるために、等尺性収縮を起こしている心筋のサルコメア内のミオシンの動態をシミュレーションしたところ、1 秒間当たりの ATP 消費量が、リバースストロークのあまり起こらない骨格筋ミオシンに比べ、約二分の一であることが判明した。この結果は心筋ミオシンはエネルギー消費を抑え、効率的に振動を行うモーターであることが明らかとなった。(Hwang Y. et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2021)

(4) ウニ精子鞭毛の階層構造における振動運動の観察

ウニ精子鞭毛は、分子から鞭毛に至る階層構造と力学・振動特性とがどのように関係するか明らかにした。実験では、ウニ精子鞭毛軸系にビーズ、また doublet bundle や 1 本の doublet と相互作用する重合微小管にビーズを結合し、光ピンセット法によって力や変位を計測した。鞭毛内でのダイニン集団が発生する力の特性やダイニン分子の特性を明らかにした。軸系と doublet bundle の力ほぼ同じで、これらの長さに比例していた。さらに、軸系、doublet bundle、1 本の doublet で振動運動が観察され、振動は、ステップ状に起こることが明らかとなった。解析の結果、振幅、振動数やステップサイズは、階層よらないことが明らかとなった。これらの結果は、力発生や振動は、階層にあまり依存せず、おそらくダイニン分子それ自身の性質を反映していることが示唆された。さらに、ミオシンモデルと類似の反応モデルで、ダイニンの振動が再現できることが、予備実験により示され、ミオシンとダイニン分子は、振動において共通点があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kohsuke Gonda, Hiroshi Negishi, Mayumi Takano-Kasuya, Narufumi Kitamura, Naoko Furusawa, Yasushi Nakano, Yoh Hamada, Masayuki Tokunaga, Hideo Higuchi, Hiroshi Tada, Takanori Ishida.	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterogeneous drug efficacy of an antibody-drug conjugate visualized using simultaneous imaging of its delivery and intracellular damage in living tumor tissues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 1 - 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100764	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 -
1. 著者名 Shintani Seine A., Washio Takumi, Higuchi Hideo	4. 巻 10
2. 論文標題 Mechanism of contraction rhythm homeostasis for hyperthermal sarcomeric oscillations of neonatal cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-77443-x	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 -
1. 著者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi and Masatoshi Ishikawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Visualization Method for the Cell-Level Vesicle Transport Using Optical Flow and a Diverging Colormap	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/s21020522	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 -
1. 著者名 Seohyun Lee and Hideo Higuchi.	4. 巻 10
2. 論文標題 3D rotational motion of an endocytic vesicle on a complex micro-tubule network in a living cell.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed. Opt. Exp.	6. 最初と最後の頁 6611-6624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.10.006611	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 -

1. 著者名 Naohiko Shimada, Hirotaka Kinoshita, Takuma Umegae, Satomi Azumai, Nozomi Kume, Takuro Ochiai, Tomoka Takenaka, Wakako Sakamoto, Takayoshi Yamada, Tadaomi Furuta, Tsukuru Masuda, Minoru Sakurai, Hideo Higuchi, and Atsushi Maruyama.	4. 巻 1904032
2. 論文標題 Cationic Copolymer-Chaperoned 2D/3D Reversible Conversion of Lipid Membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adma.201904032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Washio*, Seine A. Shintani, Hideo Higuchi, Seiryu Sugiura and Toshiaki Hisada.	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of myofibril passive elastic properties on the mechanical communication between motor proteins on adjacent sarcomeres.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-45772-1	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 -

1. 著者名 Seohyun Lee*, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, and Masatoshi Ishikawa.	4. 巻 112541J
2. 論文標題 Optical flow of vesicles: computer vision approach for endocytosis of Nano Particles in a living cell.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SPIE BiOS	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2543455	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 -

1. 著者名 Yongtae Hwang, Takumi Washio, Profile Toshiaki Hisada, Hideo Higuchi, and Motoshi Kaya.	4. 巻 118
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 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 1 - 11
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, and Masatoshi Ishikawa.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Classification of Metastatic Breast Cancer Cell using Deep Learning Approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEE ICAIIC	6. 最初と最後の頁 425-428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/ICAIIIC51459.2021.9415245	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 -

1. 著者名 Shimaa A. Abdellatef, Hisashi Tadakuma, Kangmin Yan, Takashi Fujiwara, Kodai Fukumoto, Yuichi Kondo, Hiroko Takazaki, Rofia Boudria, Takuo Yasunaga, Hideo Higuchi, and Keiko Hirose	4. 巻 e76357
2. 論文標題 Oscillatory movement of a dynein-microtubule complex crosslinked with DNA origami.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 elife	6. 最初と最後の頁 1 - 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.76357	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15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Seine A Shintani, Takumi Washio, Hideo Higuchi
2. 発表標題 Contraction Rhythm Homeostasis manifested in warmed cardiomyocytes
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan. (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田英暁, 樋口秀男
2. 発表標題 損傷した細胞における損傷した細胞における細胞内粘性の経時的測定
3. 学会等名 日本物理学会 第76 回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黄勇太, 鷺尾巧, 樋口秀男, 茅元司
2. 発表標題 Molecular properties of single cardiac myosin adapted for heart functions revealed by single- and multi-molecule approaches
3. 学会等名 第58 回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田英暁, 樋口秀男
2. 発表標題 Cytoplasmic Viscosity and Cellular Viability of the Damaged Cells
3. 学会等名 第58 回日本 生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田英暁, 樋口秀男
2. 発表標題 損傷した細胞における細胞内粘 性と生存確率の関係
3. 学会等名 日本物理学会2020 秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黄勇太, 鷺尾巧, 樋口秀男, 茅元司
2. 発表標題 Reverse stroke of cardiac myosin revealed by single molecule mi- croscopy is essential for heart function
3. 学会等名 第57 回日本 生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideo Higuchi and Kazuo Sasaki
2. 発表標題 Universal walk- ing model for processive motor proteins.
3. 学会等名 Joint Workshope of NanoLSI and Universal biology institute (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motoshi Kaya, Yongtae Hwang and Hideo Higuchi.
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 2nd Joint Symposium between mechanobaiology institute and Universal biology institute. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原貴史, 真行寺千佳子, 樋口秀男
2. 発表標題 Measurement of force generation by dynein ensemble on a doublet microtubule obtained from sperm agella
3. 学会等名 第57 回日本生物物理学会年会、
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田英暁, 樋口秀男
2. 発表標題 Responses of cells to local heat- ing in cells using a nanoparticle
3. 学会等名 第57 回日本生物物 理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Ota, Hideo Higuchi
2. 発表標題 Relations between Motions of Intracellular Particles and Cell Death in Damaged Cells.
3. 学会等名 The 59th Annual meeting of the biophysical society of Japan.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takakuni Fukumoto, Kazuo Sasaki, Hideo Higuchi
2. 発表標題 Unified Understanding of Active Motions Driven by Proteins
3. 学会等名 The 59th Annual meeting of the biophysical society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Masatoshi Ishikawa, Hideo Higuchi.
2. 発表標題 Understanding of vesicle transport using machine learning and image processing technology.
3. 学会等名 The 59th Annual meeting of the biophysical society of Japan.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideaki Ota, Hideo Higuchi
2. 発表標題 Quantitative evaluation of the decrease in intracellular mobility of cells in which ATP synthesis is inhibited
3. 学会等名 第60 回日本 生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi.
2. 発表標題 An automatic detection and tracking method for the 3D reconstruction of vesicle movement in a living cell
3. 学会等名 第60 回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Higuchi and C. Shingyoji.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Pan Stanford Publishing	5. 総ページ数 436
3. 書名 Handbook of dynein 2nd.	

〔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
研究 分担 者	佐々木 一夫 (Kazuo Sasaki) (50205837)	東北大学・工学研究科・学術研究員 (11301)	

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
---------	---------