

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21710120

研究課題名（和文） 生体ナノモーターのブラウン運動過程の力学的制御

研究課題名（英文） Mechanical control of the Brownian process for bio nano-motors

研究代表者

岩城 光宏 (IWAKI MITSUHIRO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30432503

研究成果の概要（和文）：暗視野観察と光ピンセット法を組み合わせた1分子観察顕微鏡を構築することで、生体ナノモーターであるミオシンV分子の運動プロセス内のブラウン運動過程の力学的制御を行うことに成功した。ブラウン運動過程の滞在時間やノイズとしての性質の負荷依存性の解析から、生体ナノモーターの運動機構に対する熱ノイズの役割をモデル化することができるようになり、確率共鳴現象などを利用したナノマシンの制御の足がかりを作ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：I constructed the dark-field microscopy combined with an optical trap for the single molecule measurements. Using this apparatus, I succeeded in both direct observation of Brownian search process in the stepping motion of bio nano-motor, myosin-V and mechanical control of the process. Dwell time analysis, noise analysis for the Brownian process and the load dependency enabled us to model bio nano-motor from a viewpoint of the roll of thermal noise in mechanical function. This is an important result toward control of nano-machine using noise such as stochastic resonance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子生理・生化学

1. 研究開始当初の背景

近年のモーター蛋白質の1分子計測技術の進歩により生体ナノモーターと人工モーターとの違いが明確になってきた。モーター蛋白質は熱ノイズを無視できない程度の入力エネルギーで駆動され、ある程度の誤作動を容認しながら機能している。正確に駆動される人工モーターとはこの点において対照

的である。生体ナノモーターの機能発現においては、その過程において熱ノイズの影響を受けることで確率的で多様な運動を可能にし、その自発的な運動にわずかな制御（バイアス）を加えて1方向運動やモーター素子間の同調性、外部環境に対する柔軟性を獲得していると考えられるようになってきた。

2. 研究の目的

生体内で小胞輸送、筋収縮、細胞分裂などの動的な活動を積極的に担うモーター蛋白質は天然に存在するナノマシンであり、人工モーターとは異なるユニークな特性を持つ分子機械の設計・機能発現原理、熱ノイズの対処法を明らかにすることを目的とする。そのために、生体リニアナノモーターであるミオシンVの1方向運動時におけるブラウン運動過程の可視化と光ピンセット法による力学的摂動を可能とする1分子計測顕微鏡の開発を行う。

3. 研究の方法

ミオシンの1方向運動ステップ内部のブラウン運動過程の直接観察および力学的変調をするために、暗視野観察系と光ピンセット光学系を組み合わせた光学顕微鏡を構築する。ミオシンのモータードメインの特異的部位にハロタグによりビオチン化しアビジン修飾した金ナノ粒子を結合させる。金ナノ粒子の暗視野像をマイクロ秒、1ナノメートルの時空間分解能で観察し、かつ、金ナノ粒子を光トラップする。EODを利用したマイクロ秒操作を行い、ブラウン運動過程を力学的制御する。金属粒子を光トラップする際に発生する可能性のある熱の影響を排除するためにリンカーなどの工夫を行う。

4. 研究成果

(1) 暗視野観察を行う光学系にはいくつかのバリエーションが存在するが、各々を試しレーザートラップ光学系との相性から対物レンズ型の暗視野観察を採用した。高開口対物レンズのI R領域の透過率を上げた特注品を始めとして本研究を遂行するために各々の部品の最適化を行った。60nmの金ナノ粒子の光トラップにおいては、10マイクロ秒

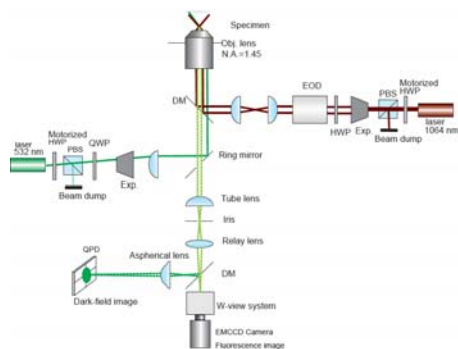


図1 構築した顕微鏡の模式図

の時間分解能で約1ナノメートルを達成し、ミオシンの運動中におけるブラウン運動過程(数十ナノメートルの運動範囲で十数ミリ秒程度)を十分に検出できる系となった。また、プローブの操作についても、電気光学素子(EOD)を導入することによって20-30マイクロ秒の応答時間で操作することができるようになった。プローブのサイズによって、操作出来る時間スケールの限界値は影響されるが、ブラウン運動を行っている時間(十数ミリ秒)の間に十分操作可能なスペクを達成することができた。

(2) 金ナノ粒子は溶液条件によって凝集しやすくなり実験に支障が出てくる。また、蛋白質を失活させやすいので、表面修飾が必須となる。アビジン分子の非特異的な吸着では凝集が防ぎにくいいため、アルカンチオール修飾を施したうえでアビジンコートを行うことで凝集の改善と蛋白質の失活をある程度防ぐことが可能となった。

(3) ミオシンVのモータードメインに金ナノ粒子を結合させて力学的摂動がない条件での観察を行い運動活性の保持を確認した。その条件下で、金ナノ粒子をトラップし運動を観察したところ一方向ステップ状変位を観察することができた。これは、従来のプローブよりも3-5倍程度微小で時間分解能の高い世界最高スペックの系の構築に成功した。しかしながら、過去の知見よりもモーターの運動速度が速く、金属粒子を光トラップすることにより発生する熱の影響によりミオシンのATP加水分解酵素反応が加速されたことが示唆された。

(4) 熱発生の問題を回避するために、金属粒子から若干サイズが大きくなるもののポリスチレン製の200nmの粒子に変更した。ただし、それでは従来の方法と同じでありしかもそのサイズのためにミオシン分子のモーター部位に特異的に結合させることが困難となる。そこで、60nmのDNAをナノスケールの紐として利用することで、本研究の目的を達成する実験系を構築することができた。DNAの一端はビオチン化し、もう一端はジゴキシングニン修飾を施した。モーター部位に結合したアビジンとDNAを繋ぎジゴキシングニン抗体コートビーズとDNAを繋ぐことで熱発生することなく、ビーズを光トラップし、かつ、モーター部位を力学操作できた。

図2にそのデータを示すが、ミオシンVの一方向運動ステップの内部にブラウン運動過程がクリアに確認された。外力存在下でのこのブラウン運動過程の観察は世界で初めてであり、現在論文を準備中である。

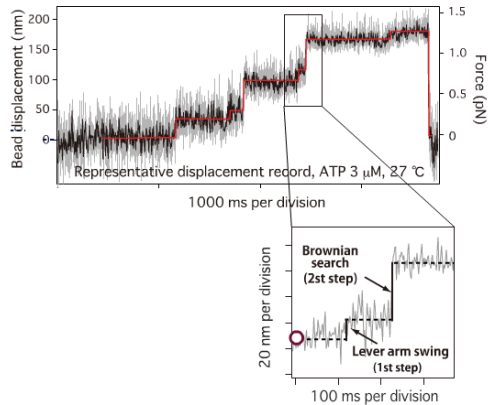


図2 外力存在下におけるモーターのブラウン運動過程の観察

プリミティブな条件として、運動方向と逆方向に定常負荷を加えた場合、ブラウン運動の揺れ幅が抑制されるものの、ステップの大きさ、ステップが完了するまでの時間は影響を受けにくかった。また、ブラウン運動自体は方向性を持たないランダムなブラウン運動であった。そのため、ミオシンV分子は、ランダムなブラウン運動を利用して一方向ステップを生成するものの、外力の影響をうまく排除する仕組みを持っていることが示唆された。

(5) 実験結果より、ミオシンVの運動メカニズムについて、ブラウン運動（熱ノイズ）を組み込んだ形でのモデル化を行い、シミュレーションで再現することができた。ノイズによるナノマシンの制御、ナノモーターを利用したドラッグデリバリーやナノアクチュエータの効率化の可能性を探っていく上で重要な成果を上げることができたと確信している。

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)

①K. Amano, T. Yoshidome, M. Iwaki, M. Suzuki, M. Kinoshita, "Entropic potential field formed for a linear-motor protein near a filament: Statistical-mechanical analyses using simple models", Journal of Chemical Physics, Vol. 133;045103-1-045103-11 (2010)、査読あり

②M. Iwaki, A. Iwane, T. Shimokawa, R. Cooke, T. Yanagida, "Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI

steps", Nature Chemical Biology, Vol. 5;403-405 (2009)、査読あり

〔学会発表〕(計 11件)

①M. Iwaki, "Observation and control of mechanical process in skeletal myosin steps", Workshop on Hydration and ATP energy 2011, 2011年3月16日、仙台

②M. Iwaki, "Observation of mechanical process for myosin-II by a dark-field microscopy combined with an optical trap", Biophysical Society 55th Annual meeting, 2011年3月5日、Baltimore, Maryland

③M. Iwaki, "Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps", Gordon research conferences -Stochastic physics in biology-, 2011年1月23-29日、Baltimore, Maryland

④M. Iwaki, "Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps", Gordon research conferences -Stochastic physics in biology-, 2011年1月23-29日、Baltimore, Maryland

⑤M. Iwaki, "Visualizing and clarifying the mechanical properties of the myosin V Brownian search with optical tweezers", RIKEN QBic Kick-off meeting, 2010年10月26-27日、OLABB, Osaka

⑥M. Iwaki, "Observation of mechanical process for myosin-II by a dark-field microscopy combined with an optical trap", 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20-22日、東北大学

⑦M. Iwaki, "Brownian search-and-catch mechanism for actomyosin", International symposium on single molecule nano detection and its application to life science, 2010年4月17日、淡路夢舞台国際会議センター

⑧M. Iwaki, "Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps", Biophysical society 54th annual meeting, 2010年2月20-24日、San Francisco

⑨M. Iwaki, "Brownian search-and-catch mechanism for myosin VI steps", Watching biomolecules in action symposium, 2009年12月15-17日、千里ライフサイエンスセンター

⑩岩城 光宏, 「ミオシンVIのストレインセンサーの定量解析」、第47回日本生物物理学会年会, 2009年10月29日、徳島文理大学

⑪岩城 光宏, 「ナノ粒子を利用したモーター蛋白質の高速1分子ナノイメージングと操作」、第82回日本生化学会大会, 2009年10月21日、神戸ポートアイランド

〔図書〕(計 2件)

①岩城光宏、日本生物物理学会、「生物物理：ストレイセンサーが制御するミオシンV Iのブラウン運動整流機構」、2010年、88-89

② Mitsuhiro Iwaki, 大阪大学出版会、「Annual Report of Osaka University -Academic Achievement- 2009-2010」、2010年、1頁

〔その他〕

報道関連情報

①岩城光宏、日本経済新聞「筋肉を収縮させる力 分子センサーが制御」2009年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 光宏 (IWAKI MITSUHIRO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30432503