

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247022

研究課題名(和文)階層を登る1分子生理学 - 分子内、1分子そして細胞へ -

研究課題名(英文)Single molecule physiology, inner molecules, molecules and cells

研究代表者

樋口 秀男 (Hideo, Higuchi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90165093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,300,000円

研究成果の概要(和文)：組換えヒト双頭ダイニン分子の力測定と単頭ダイニンの破弾力の測定を行った。その結果ダイニン分子は、約6pNの大きな力を発生する能力があり、天然ダイニンの発する力と同程度であった。単頭ダイニンの破弾力は、ADP、AMPPNP、核酸なしでは強結合であったが、ADPVi存在下では弱結合であった。また力を前方向に加えると外れやすかった。ダイニンの前方への歩行に有利であることが明らかとなった。

細胞内にPAR-1膜タンパク質がエンドサイトーシスされる過程を3次元的に高精度(~10nm)に測定を行った結果、細胞膜から細胞内にエンドサイトーシスするだけでなく、細胞内から細胞膜に戻る反応も発見された。

研究成果の概要(英文)：We use optical trapping to show the single molecule properties and the effect of load on the mechanochemical cycle of the motor domain of human dynein. The double-headed motor domain is responsible for producing a high force of ~6 pN with a predominant step size of 8 nm. An unbinding force measurement indicates that dynein-microtubule binding is weak for the ADP-vanadate state and strong for the nucleotide-free, AMPPNP and ADP states. The unbinding force was weaker when dynein was pulled toward the minus end of microtubule. Our results suggest that force plays an important role in the mechanochemical cycle of dynein to ensure the increasing of a probability for rear-head detachment with strain.

We imaged the trafficking of PAR-1 carrying vesicles to analyze the movement of activated PAR-1 after internalization. By the triple-view method consisting of dual-focus fluorescence and phase contrast optics, we detected endocytosis quantum dots 3-dimensional with high special precision.

研究分野：生物物理学

キーワード：ダイニン 単頭 力 変位 エンドサイトーシス 1分子 Tatペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年我々は、モーター分子の運動に基本となるパラメーターを探索するために、組み替えダイニン頭部に柔らかなリンカーを挿入してダイマー化した組換え体の1分子特性を測定した。その結果、柔らかいダイマーは天然のダイニンに比べて、ステップサイズの分布が約2倍に増え、一方、力や速度は約半分に減少した。この結果から我々は、分子の柔らかさが1分子力学機能を決定付けたとの仮定をした。さらに、微小管に結合したダイニンに前進方向の力を掛けたときのダイニンの解離速度は後退方向に掛けたときの約3倍も早くなった。すなわち解離速度は力に対して非対称であることが明らかとなった。これらの結果から、モーター分子の運動の基本となるパラメーターは、(1) パワーストローク距離、(2) 非対称な解離定数、(3) 解離頭部の揺らぎ幅、(4) 結合頭部の弾性率であると考えられた。

2. 研究の目的

小胞輸送や筋収縮に関与するモータータンパク質(ミオシン・キネシン・ダイニン)の1分子研究が進展したにもかかわらず、分子内構造変化や細胞内での分子メカニズムはあまり研究されておらず依然不明である。そこで本研究ではモータータンパク質の運動メカニズムを広い階層で統合的に理解するために、新しい1分子計測技術を開発し、分子内構造変化を捉え分子内弾性を測り、細胞内での個々の分子の力学測定を行い、モーターの運動を説明できる運動モデルの構築を行い細胞内でのモーター分子の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

方法は、成果の中に含めた形で、記述した。

4. 研究成果

生体環境に近い高ATP濃度においてもミオシンフィラメントの力変位測定を行い、ミオシン1分子反応に由来するstep size と dwell time (ステップ-ステップ間の時間間隔)の特性を調べた。ミ

オシンフィラメント内のミオシン約20分子がアクチンと相互作用できるようにフィラメントの長さやミオシン頭部混合率を調整した。この際、様々なATP濃度条件下で同様の計測を行った。実験ではピオチニルアクチンフィラメントに結合させたアビジンビーズを光ピンセットにより捕捉し、蛍光標識されたミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが平行に配向するように相互作用させ、その際に発生したアビジンビーズの変位を測定した。また高ATP濃度での実験ではミオシン個々の現象が数msで完了することが予測されたため、既存の顕微鏡の改良を行うことで時間分解能を上げて測定をした。その結果、1mM、100 μ M、10 μ M ATPにおける変位トレースでステップ状の変位を確認できた。step size が負荷の増大とともに減少する傾向と、dwell time が負荷の増大とともに増加する傾向は各ATP濃度で確認された。また、ミオシンの弾性部位の伸びから予想される力よりも高負荷の力が発生していたので、高負荷の力発生には複数分子のミオシンが寄与していると考えた。そこで各負荷の状態ではミオシン何分子がアクチンと結合しているのかをdwell time から推定した。その結果、ミオシンフィラメント中のアクチンと相互作用可能なミオシン分子数は17分子であり、無負荷では2分子程度が、最大力付近では8分子程度が結合していると推定した。そして、弾性部位の伸び力関係と結合しているミオシンの弾性部位の分布からミオシンフィラメント全体で出す力を計算したところ、ミオシンが力を出した後も複数回に渡り力を出し続けることができれば、30pN程度の高負荷に抗して運動出来ることが予想された。これらの結果を説明できるモデルを構築し、A.F. ハックスレーが行った筋線維の力を急速に緩めると一旦は力が減少するがすぐに力が回復する実験で説明できることが明らかとなった。また、ミオシン分子があたかも協調的にふるまうような変位を示すことも明らかとなった。

Hetero 頭部ダイニンの歩行メカニズム

これまで、細胞質ダイニンは二つの重鎖が交互に

構造変化して力発生を行うことで、微小管上を二足歩行していると予想されてきた。ところが、これまでの私の研究により、一方の重鎖を構造変化及び力発生をしない「活性を失った」重鎖に代えても、微小管上を一方向へと二足歩行することが明らかになった。細胞質ダイニンの2つの重鎖に別々の蛍光色素または量子ドットを導入することで、2つの重鎖の動きを高時間・空間分解能で追跡するシステムが整った。このシステムを利用することで、2つの重鎖が交互にステップするだけでなく、一方の重鎖が連続してステップする場合があること、野生型の重鎖が「活性を失った」重鎖を物理的に微小管から引き剥がしていることが明らかとなった。それでは、細胞質ダイニンの動作に一方の重鎖の寄与は必要ないかということではない。光ピンセットを用いた計測から、ダイニンが負荷に抵抗して力を発生させるためには、両方の重鎖が構造変化することが重要だということもわかった。また、重鎖の構造変化自体は6 pN以上という強い力を出しうるが、少なくとも細胞性粘菌のダイニンでは、微小管との結合が大きな負荷に耐えられず、これが細胞質ダイニンの発生させる力を規定していることも示唆された。

これらの特性が、「片足が死んでも二足歩行可能」という細胞質ダイニンのユニークな性質を生み出している。真核細胞の細胞質では、微小管のプラス端方向への物質輸送に関わるキネシンは多くの種類が存在するのに対し、反対側への輸送を司る細胞質ダイニンは一種類だけである。そのため、細胞質ダイニンはさまざまな状況に応じて、その運動を調節できるものと考えられる。本研究は、これまでに得られた一つの重鎖の構造情報や反応キネティクスと、実際の二量体としての運動や力発生仕組みとを結び、細胞質ダイニンの細胞内での調節機構研究の基盤となるものと評価できた。

組換えヒト細胞質ダイニンの力・変位測定

細胞質ダイニンはATP加水分解のエネルギーを使って微小管上を移動する分子モーターである。2つの細胞骨格モーター「細胞質ダイニン」と「キ

ネシン」は微小管上を移動しながらオルガネラやタンパク質を輸送する役割を担っており、ダイニンは細胞膜から核付近まで輸送し、キネシンは反対方向核から細胞膜まで輸送を行う。細胞内では、この逆方向に移動するモータータンパク質をうまく調節して正確に輸送を行っていると考えられるが、その制御機構は分かっていない。この制御機構のモデルの1つに「綱引きモデル」がある。このモデルは輸送する荷物に結合しているダイニンとキネシンの数によって移動する方向が決定されるというものであり、荷物に結合する分子数と1分子が発生する事ができる最大力が重要な要素となる。ダイニンが発生する力に関しては我々のグループが天然ダイニンを用いて7 pNであると主張しているのに対し、1-2 pNしか出さないと主張するグループもあり、未だに論争が続いている。そこで我々はどちらが正しいかを確かめるために運動を制御する可能性のある尾部を切り取ったモーター部位のみヒト細胞質ダイニンを発現し、運動と力測定を行った。ダイニンを結合した220 nmのビーズを光ピンセットを用いて捕捉してガラス上にある微小管上に結合させ、ATPを加えてダイニンを運動させた時のビーズの変位を計測する事により最大発生力を見積もった。その結果、ダイニンのモーター部位の最大力は約7 pNであり、我々のグループが以前に報告したブタ精製ダイニンの最大力と同程度であった。さらに破断力を測定する事で微小管との結合状態の詳細を解析した。ヌクレオチドなし、AMPPNP、ADP、ADP・Vi存在下でダイニンと微小管を結合させ、ステージ（微小管）を動かす事により、ダイニン・微小管に外部負荷をかけて結合を破断させた。その結果、ADP・Vi存在下で破断しやすく、ヌクレオチドなし、AMPPNP、ADP存在下では大きな破断力であった。ダイニンの進行方向に負荷をかけた時の方が順方向に負荷をかけた時よりも破断力が弱く、すなわち前進しやすいことを裏付ける結果を得た。以上により、ダイニンは大きな力を発生することができ、前進するのに都合の良い破断力を持つことが明らかとなった。

細胞内に HIV - Tat ペプチドが侵入するメカニズムの解明

HIV-1Tat タンパク質形質導入領域 (TatP) が細胞に入り輸送されるメカニズムは、そのペプチドの侵入の反応様式の不十分な理解のため不明なままであった。

我々は、量子ドットを TatP に結合して 7nm の空間精度で細胞表面及び細胞内での TatP 分子反応の測定に成功した。量子ドットに約 8 分子の TatP を結合した場合は、細胞膜に強く結合して細胞内に輸送された。ところが、一価の TatP を結合しただけでは、細胞内にはほとんど取り込まれなかった。量子ドット-TatP が細胞膜に結合し細胞内輸送されるために Heparin sulfate プロテオグリカン (HSPGs) が必要か否かを調べるため、HS を酵素によって除去を行った。すると、TatP が細胞膜に結合しなくなったことから、HSPG が TatP を細胞膜につなぎとめていることが示唆された。

TatP が HSPG に結合すると、Rac1 が活性化し、それによって、細胞内に取り込まれていることも明らかとなった。

これらの結果は細胞表面に TatP の最初の結合機構を明らかにし、TatP の数の重要性を示している。

PAR-1 のエンドサイトーシス過程の 3D イメージング

がん化を誘発する膜タンパク質 PAR-1 (Protease activated receptor 1) を過剰発現した培養細胞内がどのようにして、膜タンパク質を細胞内に取り込むのかその過程の追跡をおこなった。PAR-1 は、スロンピンや MMP1 といった分解酵素によって、アミノ酸の一部が切断されることで活性化し、これに伴い G タンパク質系のカスケードが活性化して細胞運動能を亢進し、転移を起こすことが知られている。我々は、細胞膜上の PAR-1 のエンドサイトーシス速度とスロンピンによるカスケードの活性化とに関連があるかをしらべるために、3 次元的位置検出を行った。PAR-1 に対するモノクローナル抗体 (権田, 樋口 J. Biol. Chem 2010) に量子ドットを結合して、PAR-1 の位置を検出した。量子ドット 抗体複合体を細胞と反応させてから、約 2 時間後には、細胞上の量子ドットの半数が細胞内に取り込まれることが判明した。さらに詳しく調べるために、3 次元的位置を数 nm 精度で検出できる装置を用いて、PAR-1 がどのようにエンドサイトーシスするのかを明らかにした。約 150 秒の位置追跡によって、エンドサイトーシスする PAR1 膜表面上を動くだけの PAR1 そして、膜の中から外に向かうエンドサイトーシスとは逆方向の運動が見られた。膜の中から外に向かう PAR-1 は、一度エンドサイトーシスした小胞が舞い戻ってきたのか、あるいは、リサイクリングの途中を見ているのかのいずれであろうと考えている。

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 7 件)

1. Ichimura T., T. Jin, H. Fujita, H. Higuchi and T.M. Watanabe. Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles. *Frontiers in Physiology*. 00273 (2014.7). 査読有
2. Kaya. M. and H. Higuchi. Stiffness, working stroke and force of single myosins in skeletal muscle: Elucidation of these mechanical properties by nonlinear elasticity. *Cell and Mol. life Sci.* 70: 4275-4292 (2013.8). 査読有
3. Yasuhiro Suzuki*, Chandra Nath Roy, WarunyaPromjunyaku, Hiroyasu Hatakeyama, KohsukeGonda, Junji Imamura, Biju Vasudevan Pillai, NoriakiOhuchi, Makoto Kanzaki, Hideo Higuchi, and Mitsuo Kaku. Single quantum dot tracking reveals that an individual multivalent 2 HIV-1

Tatprotein transduction domain can activate machinery for 3 lateral transport and endocytosis. *Mol. Cell Biol.* 33: 3039-3049 (2013.6). 査読有

4. 樋口秀男, 神原丈敏 「歩行型分子モーター, ダイニン」 *パリティ* 28, 14-15 (2013.3) 査読無
5. 茅元司, 樋口秀男 ビジュアルレビュー: 筋肉の巧みな収縮メカニズム. *感染・炎症・免疫* 42-2, 28-35. (2012.7) 査読無
6. 樋口秀男 「マウス個体内の1分子計測」 *現代化学* 488, 46-47 (2011.11)
7. 樋口秀男 「ナノバイオ」 *理大科学フォーラム* 8, 19-24 (2011.8)

[学会発表](計 19 件)

1. Motoshi Kaya, Yoshiaki Tani, Takumi Washi, Toshiaki Hisada and Hideo Higuchi: Intermolecular cooperativity of skeletal myosins enhances force output in myofilaments. The 59th Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore MD, USA(2015.2. 7-11)
2. 茅元司 鷲尾巧 久田俊明 樋口秀男 「骨格筋ミオシンの協同的な力発生メカニズム」生体運動合同班会議 東京(2015.1.7-9)
3. Taketoshi Kambara, Yoshiaki Tani, Tomohiro Shima, and Hideo Higuchi. Unbinding force measurement of recombinant human cytoplasmic dynein. The Gordon Research Conference on Muscle & Molecular Motors. New Hampshor USA(2011.7.10-15)
4. 茅元司, 谷芳明, 小林琢也, 樋口秀男: ミオシンフィラメント上における骨格筋ミオシン分子間の協同性, 第52回生物物理学会, 札幌(2014,9.25-27) 菊島健児, 樋口秀男: 蛍光量子ドットを用いた細胞内 高速小胞輸送機構の解明, 第52回生物物理学会, 札幌(2014,9.25-27)

5. 木下慶美, 神原丈敏, 池田諭史, 茅元司, 樋口秀男: ヒト細胞質ダイニンのパワーストローク測定, 第52回生物物理学会, 札幌(2014,9.25-27)
6. 木下慶美, 神原丈敏, 池田諭史, 茅元司, 樋口秀男: ヒト細胞質ダイニンのパワーストローク測定, ナノ学会第12回大会, 京都(2014,5.22-24)
7. 茅元司, 樋口秀男 Molecular properties and dynamics of single skeletal myosins designed for force generations in ensemble of myosin molecules 第51回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
8. 神原丈敏, 木下慶美, 中山貴之, 樋口秀男 Biophysical and Biochemical characterization of human cytoplasmic dynein. 第51回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
9. 木下慶美, 神原丈敏, 池田諭史, 樋口秀男 Power Stroke Measurement of Human Cytoplasmic Dynein 第51回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
10. 池田諭史, 茅元司, 樋口秀男 Contribution of S1 and S2 portion of myosin to nonlinear elasticity of skeletal myosin molecules 第51回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
11. 佐々木一夫, 樋口秀男 Mechanism of backward stepping in myosin V 第51回日本生物物理学会年会, 京都(2013.10.28-30)
12. Taketoshi Kambara, Yoshiaki Tani, Motoshi Kaya, Tomohiro Shima, and Hideo Higuchi. The mechanomhemical cycle of human cytoplasmic dynein under external force. 14th International Alpbach Workshop on Molecular Motors. Alpbach Austria (2013.3.16-21)
13. 神原丈敏, 谷芳明, 茅元司, 島知弘, 樋口秀男, 外部負荷存在下でのヒト細胞質ダイニン

のメカノケミカルサイクル, 第50回日本生物物理学学会年会 (2012.9.22-24)

14. Higuchi H. and M Kaya Single molecule biophysics in an in vivo and in vitro. Japan-Taiwan joint symposium. Kyoto. 2012. 3.8)
15. Shima T, Ito K, Kon T, Ohkura R, Higuchi H., Sutoh K. "Coordination of two heads of cytoplasmic dynein" The 9th International Conference on AAA Proteins, Kumamoto, Japan, (2011. 11.6-10)
16. 神原文敏, 谷芳明, 島知弘, 樋口秀男, 組換えヒト細胞質ダイニンの力測定, 第49回日本生物物理学学会年会, 兵庫(2011.9.16-18)
17. Shima T, Higuchi H., Sutoh K, "Relationship between the power stroke and force generation of cytoplasmic dynein", 49th Annual meeting of the Biophysical Society of Japan, Himeji, Japan, (2011.8.16- 18)
18. Taketoshi Kambara, Yoshiaki Tani, Tomohiro Shima, and Hideo Higuchi. Unbinding force measurement of recombinant human cytoplasmic dynein. Dept. of Otolaryngology, Northwestern University Feinberg School of Medicine. Illinois USA(2011.7.8)
19. 神原文敏, 谷芳明, 島知弘, 樋口秀男, ナノ粒子を用いた組換えヒト細胞質ダイニンの力・変位測定, ナノ学会第9回大会, 札幌(2011.6.6-8)

〔図書〕(計 2 件)

1. 樋口秀男, 多田隈尚史 分担執筆 「12章 細胞内での運動」 化学同人「1 分子生物学」石渡信一, 原田慶恵編(2014.10)
2. Y Toyoshima and H. Higuchi "Motile and Enzymatic properties of native dynein molecules" in Handbook of Dynein. K. Hirose and LA Amos ed. (2012.2)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 共焦点顕微鏡画像システム

発明者: 樋口秀男, 下澤東吾

権利者: 樋口秀男, 下澤東吾

種類: 国際出願

番号: PCT/JP2011/62551

出願年月日: 2011年5月31日

国内外の別: 国際

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) 樋口 秀男 (東京大学理学系研究科 教授)

研究者番号: 90165093