

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656165

研究課題名(和文)熱ゆらぎ運動原理で駆動する分子マシンの構築

研究課題名(英文)Creation of molecular machine driven by Brownian motion

研究代表者

平塚 祐一 (Hiratsuka, Yuichi)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10431818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は原始的な熱ゆらぎ運動系と考えられるインフルエンザウイルスの運動能に着目し、その運動機構を真似た分子機械を作製することである。ウイルスは細胞感染前に細胞表層を移動することが知られている。しかしウイルスが持つタンパク質には運動に関与するモータータンパク質は存在しない。ウイルス表層に存在するのは宿主細胞に接着または遊離に働く2つのタンパク質のみである。ウイルスはこの2種のタンパク質を使って原始的な運動を作り出していると想像されている。本研究ではこのウイルス様の超分子複合体を人工的に作製しこの仮説を証明し、またこの原理を利用したより高効率な運動システムを構築し応用展開を図った。

研究成果の概要(英文)：Aim of this project is to construct novel molecular machine, which is driven by using Brownian motion like a mechanism of movement of influenza virus. It is known that influenza virus moves over a cell before infection to the cell. The virus, however, does not have motor proteins, which is known as protein to drive a movement. Virus has only two kinds of protein on its cortex, which function as binding and releasing against host cell. We speculate that those two proteins make a primitive movement of virus. In this study, we constructed super molecular complex like influenza virus to prove the hypotheses. Moreover we challenged to improve the system to more stable and efficient.

研究分野：ナノバイオ

キーワード：マイクロマシン ナノマイクロ

1. 研究開始当初の背景

生体内には「動き」に関与するタンパク質が多数存在する。筋収縮、細胞運動、細胞内物質輸送、微生物の遊泳など、モータータンパク質と呼ばれる良く知られた一群の運動性タンパク質の他にも、未だその作動原理の全く解明されていない運動現象が多数報告されている。これまで、研究代表者はこのモータータンパク質の運動機能を利用したマイクロマシン技術の開発を行ってきた。バクテリアを駆動源にした微小回転モーターの開発や、最近では魚類の色素細胞の分子機構を模倣したモータータンパク質で駆動する光学素子の開発に世界にさきがけて成功させてきている。

生物から発見された運動は、人類がこれまで考案してきたモーター・アクチュエータの作動機構とは質的に異なる。化学ポテンシャルを優れたエネルギー効率で力学的仕事に変換するメカニズムは、熱ゆらぎなどナノメートル空間での特徴を活かした分子システムによると考えられており、現在、生物物理学を中心にその作動原理の研究が精力的に進められている。そうした中で、インフルエンザウイルスも生体運動の一種であることが近年報告された[1,2]。細胞表面でのウイルスの動きは明らかに拡散運動とは異なる方向性のある成分を含み、何かしらの運動機構があると示唆された。

①堺立也「インフルエンザウイルスの感染行動」*細胞* **37** 32-35 (2005) ②堺立也, 大内正信「宿主細胞表面でのインフルエンザウイルスのスライディング」*日本臨床* **61** 1860-1863 (2003)

2. 研究の目的

本研究の目的は、インフルエンザウイルスの運動能に着目し、その運動機構を真似た分子機械を作製することである。インフルエンザウイルスは一般に動くとは考えられていない、しかし、近年の詳細な調査によると、ウイルスは細胞感染前に細胞表層を移動することが発見され、これが感染力と関連する可能性が示唆されている。ところが、インフルエンザウイルスが持つタンパク質には運動に関与するいわゆるモータータンパク質などは存在しない。ウイルス表層に存在するのは宿主細胞に接着また遊離に働く2種のタンパク質のみである。ウイルスはこの2種のタンパク質を使って原始的な運動を作り出していると想像できる。本研究では、この

ウイルス様の超分子複合体を人工的に作製し、この仮説を証明すると共にこの原理を利用したより高効率な運動システムを構築、マイクロマシンの新素子として応用展開を図る。

インフルエンザウイルスは2種の表層タンパク質をもつ。第一は細胞接着に関与するヘマグルチニンで、宿主の細胞表層に存在するシアル酸を認識し結合する。第二はノイラミニダーゼと呼ばれる、先のシアル酸を分解する酵素である。インフルエンザの型はこの2種の組み合わせで決まりHxNy型と称され、宿主や感染力を決定している。第二のタンパク質ノイラミニダーゼは一般的には、細胞内で増殖したウイルスが細胞結合に必要なシアル酸を分解することで感染細胞との接着を剥離しウイルスを感染細胞から放出するために働くと考えられている。

ウイルスが細胞表面を運動できるのは、細胞表面への接着・解離の繰り返しとウイルス本体の拡散運動が協調し、拡散運動の一方方向性の成分の抽出を可能にしている想像される(図1)。つまり、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼがウイルス表面に均一ではなくある程度偏って分布することにより、接着の方向性に偏りが生じ、その結果、拡散運動の一方方向性成分を取り出していると考えられる。これは広い意味での熱ゆらぎ運動機関といえる。そこで、本研究では、この分子の偏りをタンパク質の超分子複合体を利用することによりナノメートルレベルで人工的に作製し、この作動原理によるナノ粒子の運動を実証し、インフルエンザウイルスの運動現象の本質を探った。さらに、ナノ・マイクロマシンの駆動源としての可能性を探った。

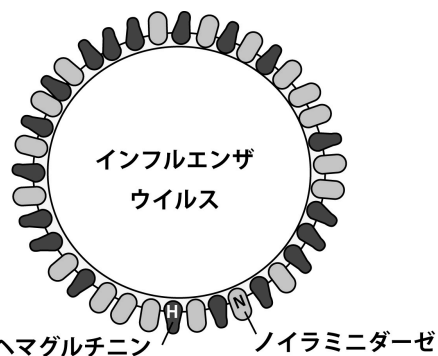


図1) インフルエンザウイルスの構造: ウィルス表層にシアル酸結合能を持つヘマグルチニンとシアル酸分解に働くノイラミニダーゼの2種のタンパク質が存在する。これらが協調してウイルスは細胞上を動くと考えられている。大きさ約百 nm

3. 研究の方法

インフルエンザウイルスの一方方向性運動は、シアル酸の結合能を持つヘマグルチニンとそれを分解するノイラミニダーゼがウイルス表面に不均一（局所的に非対称）に配置されているためと考えられる。本研究では、この非対称構造をナノメートルレベルで、人工的に制御された構造として作り出し、実際のウイルスよりも高効率に動くタンパク質超複合体の構築を試みた。超複合体の骨格には、細胞骨格タンパク質である微小管を利用した。微小管の重合を制御することにより棒状構造の半分にヘマグルチニン様タンパク質、もう半分にノイラミニダーゼ様タンパク質を配置した。本研究では、安全性を考えウイルス自身のタンパク質は利用せず、ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼと同等の活性を有するレクチンおよびシアラーゼを利用した。市販されているヘマグルチン及びノイラミニダーゼを化学修飾法によりビオチン化またはSNAPタグ化することにより、これらを溶液中で混ぜることで可動性の超分子複合体を自発的に作る系を構築し、シアル酸表面上で運動させた。

インフルエンザウイルスの表層にはシアル酸との結合・分解に関与する2つのタンパク質、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼが存在する。これらはウイルス表面の不均一に分布していると考えられている（図1）。ウイルスの運動メカニズムは次の一連の動作の繰り返しによって生じていると考えられている（図2）。1）ヘマグルチニンによるシアル酸表面への結合、2）ノイラミニダーゼによるシアル酸の非対称な分解、3）ウイルスの表面からの解離と表面拡散、4）方向性のある再結合。

天然のウイルスではこの非対称な分布は確率的に偶然に生じると考えられている。

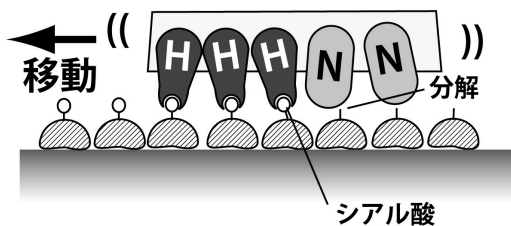


図2) ウイルス運動の予想図：ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼはウイルス表層に不均一に分布する。ノイラミニダーゼのシアル酸分解活性によりヘマグルチニンの結合可能な領域に非対称性が現れる。ウイルスの結合解離とブラウン運動により、方向性のある運動が生まれる。

本研究では、この非対称分布を人工的に作製し、より効率的に運動するナノ運動素子の開発を目指した。

ウイルス由来のタンパク質は安全性を考慮し利用を避けた。そこで、まずヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼと同等の作用を示す代替タンパク質を選定した。これらは生物種全般において多数存在することが知られ、前者はレクチン、後者はシアラーゼと呼ばれている。レクチンは生物種間で広く存在するがシアル酸との結合活性は分子種によって大きく異なる。ウイルスのように運動を生じさせるには、強力な結合ではなく、結合と解離が繰り返される至適な活性が必要となる。ウイルス・ヘマグルチニンのシアル酸に対する解離定数は数mMであることが報告されており、これに相当するレクチンとして、小麦由来のアグリチニンなど候補として考えた。本研究ではこれらのタンパク質の市販品を化学修飾法により、後述の超分子ナノ構造に結合する連結部位をもった人工レクチンまたは人工シアラーゼを構築した。

微小管によるタンパク質分子の配列化：

タンパク質には自己集積により数ナノからマイクロメートルの立体構造を構築するものが複数種存在する。これらのうち細胞骨格タンパク質として働く微小管は、特に大きく・固い構造をもつ。本研究ではこの微小管に着目し、ナノ運動素子の骨格として利用した。微小管はチューブリンと呼ばれる直径約5nmのモノマー分子が重合し、管状の構造を形成したもので、直径25nm、長さは数十nmから数十umなど重合時間や濃度により生体外に様々な長さで作りに出すことが可能なタンパク質である。

レクチンおよびシアラーゼを微小管に非対称に固定する方法として次の方法を計画した（図3）。a) まずビオチンを共有結合させた短い微小管を作製する（重合核）。b) その後、さらにチューブリンを加え微小管を伸長させ、ビオチン化された領域と非ビオチン化領域を持った微小管を作製する。c) その後アビジン・ビオチン結合を介しシアラーゼをビオチン化領域に結合させる。d) 最後にレクチンを非ビオチン化領域に固定する。

本法では、微小管とレクチン・シアラーゼの連結に、上記のビオチン・アビジン結合法の他に、以前我々が作製した微小管アン

カー分子を利用する。レクチンまたはシアラーゼとアンカー分子を連結させたタンパク質を構築し、混ぜるだけでタンパク質超複合体を形成させる。

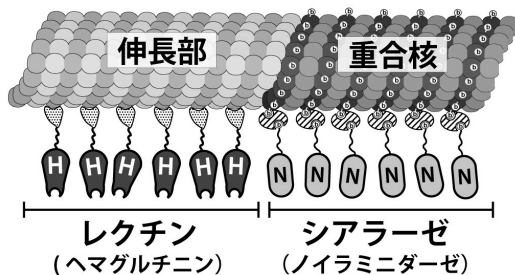


図3) 非対称構造をもった運動性超分子複合体：微小管の重合核にシアラーゼを選択的に結合、一方、伸長部にはレクチンを結合させ、非対称構造を持ったタンパク質超複合体構造を作製する。

構築したレクチン・シアラーゼ超複合体をシアル酸コートしたガラス表面に添加し、ガラス表面上での運動を観察した。シアル酸のガラス表面へのコーティングには、シアル酸BSA（市販品）またはフェチュインなど天然のシアル酸結合タンパク質をガラス表面に物理吸着させた系を用いた。

4. 研究成果

ウイルスが動く原動力はウイルス表面にあるシアル酸結合酵素と分解酵素の作用が原因であると考えられる。ウイルス表面の局所領域でそれらの酵素が非対称に局在した場合、分解酵素が結合対象物のシアル酸を分解すると、その後、分解された側にはそのウイルスが結合できなくなり、ブラウン運動により分解酵素が無い側にウイルスが一方向に移動すると思われる。そこで本研究ではこの非対称性を人工的に作製した。非対称性を作製するための足場として微小管を利用した。本研究では微小管とシアル酸結合酵素（レクチン：小麦アグリチニン）およびシアラーゼを適度の長さで連結するために、動かない変異キネシン（T93N, 93番目のスレオニンがアスパラギンに変異）をリンカー分子として微小管に連結した。市販品のレクチンをBG-GLA-NHS（ベンジルグアニン標識用試薬）で化学修飾し、ベンジルグアニンと共有結合できるSNAPタグをC末端に持った動かない変異キネシン（K465SNAP-T93N）と混ぜることでレクチン・キネシン複合体を得た。さらに微小管を加えることで、レクチン・キネシン・微小管複合体を作製した。

このレクチンと微小管複合体をシアル酸が結合したタンパク質（フェチュイン）をコートしたガラス表面かけたところ、この超分子複合体とシアル酸コート表面の結合させることに成功した。次に微小管上に分解酵素と結合酵素局所的に配置した複合体をシアル酸付きガラスに結合させ運動を観察したが残念ながらその複合体の動きは観察されなかった。原因は恐らくシアル酸とレクチンの結合力が強すぎてブラウン運動が生じなかったためと考えられる。今後、シアル酸の結合酵素の種類または濃度を調整して一方向運動を実現させたい。

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0件）

特になし

〔学会発表〕（計1件）

1. 平塚祐一、新田高洋「モータータンパク質の自己集積により形成される収縮性ファイバ」第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム、2014年10月20日～2014年10月22日、くにびきメッセ（島根県、松江市）

〔図書〕（計0件）

特になし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

特になし

○取得状況（計0件）

特になし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/hiratsuka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 祐一 (HIRATSUKA YUICHI)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10431818