

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25390041

研究課題名(和文) 微小電場により誘導されるバイオモーター素子の変調と集積化

研究課題名(英文) Modulation and accumulation of bio-motors by micro electric fields

研究代表者

羽鳥 晋由 (Hatori, Kuniyuki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：00283036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：モータータンパク質であるミオシン・アクチンの運動能力のマイクロ輸送システムへの応用が期待されている。その実現のためには運動方向や速度の制御が必要となる。本研究では速度制御のために、導電性ガラスに電流を印加することによる温度制御と微小電極間に電位を印加することによる pH 制御を考案した。これらの外的電気制御によって、ATP 存在下でのミオシンにより駆動されるアクチン線維の速度上昇と下降を可能にした。しかしながら、微小電場による運動方向の制御には至らなかった。その他、アクチン線維をマイクロビーズに付加する方法でも輸送が可能であった。

研究成果の概要(英文)：The motility of actin-myosin motor proteins is expected to be applied to micro-delivery system. The motility control in direction and in velocity is necessary for this purpose. In this study, we proposed temperature-control by application of current to electrically conductive glass and pH-control by application of voltage to micro Pt electrodes. Using these methods, the velocity of actin filaments driven by myosin motors with ATP hydrolysis could be reversibly increased and decreased in response to electrical input. However, the micro electric field could not induce an alignment of actin filaments during movement. In the context of micro delivery, actin-decorated micro-beads are capable of translocation between the actin and myosin.

研究分野：筋収縮の分子機構

キーワード：アクトミオシン モータータンパク質 マイクロデリバリーシステム 運動制御 pH制御 温度依存性

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子モーターであるミオシンとアクチンによる運動系の微小輸送システムへの応用が期待されている。このような分子モーターは、細胞内でのオルガネラの輸送、細胞の形状維持、細胞運動に直接的に関与している。その能力を、微小輸送システムにおいて、標的分子への結合、輸送、濃縮、分析に適用させることが考えられる[1]。実際には、ガラス基盤上にミオシンを固定し、そこへアクチン線維とアデノシン三リン酸(ATP)を添加することで、アクチン線維がその構造極性に基いて線維長軸方向に滑り運動を行なう。アクチン線維を蛍光標識する方法により、この運動の様子を蛍光顕微鏡下で観察でき、速度や方向などの詳細な解析が行われている[2]。この系では、個々の線維の運動方向に規則性は認められない。そのため、物質輸送の観点から、その運動方向や速度の制御が課題となっている。

## 2. 研究の目的

アクチン線維とミオシンから成る運動系において、微小電場を加えることでアクチン線維運動の方向や速度を制御することが可能かどうかを検証した。微小電場を適用するために、運動系のガラス基盤上に直接的に電流を印加する方法と微小電極を設置して電位を印加する方法を用いた。これによりアクチン線維の運動がどのように変調されるのかを定量的に評価することを目的とした。加えて、アクチン線維による物質輸送能力を評価するため、アクチン線維をマイクロビーズに結合させた場合や人工的な高分子(ポリエチレングリコール: PEG)をアクチン線維に付加した場合の運動性を調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料と機器

アクチンとミオシンをウサギ骨格筋から抽出し、精製した。ミオシンをキモトリプシン消化によって切断し、ヘビーメロミオシン(HMM)部分を精製し、用いた。アクチン線維はローダミン・ファロイジン(Sigma-Aldrich, P1951)によって蛍光標識された。コロジオン(0.2%)で処理したスライドガラス(24 mm × 50 mm, 厚さ0.17 mm)に、カバーガラスの両端に両面テープを貼り付けたものを固定しフローセルとした。必要な溶液を順次フローセルに灌流してアクチン・ミオシン運動系を構成した[3]。観察時の標準的な条件は、25 mM KCl, 25 mM imidazole-HCl (pH 7.4), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 0.5% 2-mercaptoethanol, 3 mg/ml glucose, 0.1 mg/ml glucose oxidase, 0.02 mg/ml catalase とした。観察には蛍光顕微鏡(ニコン, Ti-U)と油浸100倍の対物レンズを使用し、顕微鏡像を高感度カメラ(ワテック,

WAT-910HX)を介してパソコンに動画像として記録した。動画像解析には、ImageJ (NIH)およびActiner(アクチン線維速度自動計測ソフトウェア:本研究のために開発)を使用した。

### (2) 導電性ガラス

電流を印加しながら顕微鏡下での直接的な観察を可能とするため、以下の透明性の導電性ガラスを用いた。

導電性高分子 PEDOT/DSS (Sigma-Aldrich, 483095)を含む溶液(PEDOT/PSS 43%, N-Methyl-2-pyrrolidone 2.8%, KBM-403 0.9%, Isopropanol 53%, Dynol 604, 0.3%)をスライドガラスの24 mm × 8 mmの範囲に塗布し、乾燥させた。エチレングリコールやカーボンナノファイバー(昭和電工, VGCF-H)を添加した場合も行った。塗布した箇所に導線をドーナツ型で固定した。

上記のものとは独立に、酸化インジウムスズ(ITO)コートスライドガラス(SPI Supplies, 06500AB, 22 mm × 40 mm, 厚さ0.17 mm)を購入した。スライド両端に導電テープを貼り付けて導線と接続させた。

### (3) 白金電極

フローセル内に2本の白金電極(ニラコ, 直径0.05 mm)を間隙1 mmで設置した。

### (4) 電源

導電性ガラスを用いた実験では、直流電源(松定プレジジョン, P4K-80M-LDe)を接続し、連続的または断続的に電流を印加した。白金電極の場合には、ファンクションジェネレータ(Tektronix, AFG1022)を接続し、0.1秒間の電圧パルスを繰り返して印加した。

### (5) アクチン修飾マイクロビーズ

直径1.0 μmの正電荷マイクロビーズ(Polysciences, Microspheres carrying amino groups polystyrene, 17010)懸濁液0.08%とアクチン線維0.1 mg/mlを溶液A(25 mM KCl, 25 mM imidazole-HCl (pH 7.4), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT)中で60分間混合した。HMMを固定させたスライドガラスにビーズ・アクチン混合液を導入した後、1 mM ATPとした溶液Aを添加し、運動を開始させた。KCl濃度を可変とした。観察には、位相差顕微鏡(ニコン, TMD-photo, 対物レンズ40×)を使用した。

### (6) PEG化アクチン線維

分子量2000, 5000, 10000のPEG-maleimide (Sigma-Aldrich, 731765, 63187, 712469)とアクチンモノマー(1 mg/mL)をそれぞれモル比1:20(actin:PEG)でG-buffer(5 mM HEPES (pH 7.8), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>)中で混合し、4で24時間反応させた。PEG

化アクチンと未修飾アクチンから共重合線維を調製し、ローダミン・ファロイジンによって蛍光標識した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 電流存在下でのアクトミオシン運動

PEDOT/DSS をコートしたガラスの導電度は  $0.7 \mu\text{S}$  であった。5% エチレングリコールと  $1 \text{ mg/ml}$  カーボンナノファイバーを添加した場合、 $10 \mu\text{S}$  まで増加した。このガラスをさらにコロジオンで処理し、HMM を固定させ、アクチン線維運動を構成させたところ、蛍光顕微鏡下で個々の線維を観察することができた。そして PEDOT/DSS コート上でもアクチン線維の運動が生じることが確認された。電圧を  $30 \text{ V}$  まで印加したとき、アクチン線維の運動の方向性や速度に変化はなかった。このとき電流は  $4 \mu\text{A}$  となり、溶液添加前に比べて  $100$  倍程度電導度が低下した。これらの結果は、PEDOT/DSS コート上でアクトミオシン運動は可能であるが、十分な電流を印加する目的は達成できないことを示す。

そのため、透明性と導電性が高い ITO コートガラスを用いて、同様な実験を行った。 $8 \text{ V}$  の印加で  $0.22 \text{ A}$  の電流が得られた。ITO コートガラス上でもアクチン線維の蛍光像を明確に観察でき、滑り運動も実行できた。印加電流の増加に伴ってアクチン線維の滑り速度が増加した。電流印加直後から指数関数的（見かけ上、時定数  $45$  秒程度の一次遅れ応答）に速度が増加し、電流停止後も指数関数的に減少した。この比較的遅い応答は電流による直接的な効果ではないことを示し、電流による発熱の効果であることが判明した。温度の増減と速度のそれは極めて同調していた。 $0.17 \text{ A}$  の印加後  $120$  秒で、 $25$  から  $36$  まで昇温し、速度は  $6 \mu\text{m/s}$  から  $11 \mu\text{m/s}$  まで増加した。 $0.22 \text{ A}$  の印加では、 $48$  まで昇温し、速度が  $16 \mu\text{m/s}$  となった。また  $0.22 \text{ A}$  の  $12$  秒間の印加と停止を繰り返すことで、 $36$  の昇温と速度上昇を繰り返して実行可能であった。一方で、電磁気的な効果の有無を検証するため、電流印加時のアクチン線維の速度ベクトルを  $1/30$  秒間隔で解析した。電流方向の速度成分および垂直方向の速度成分の分布はいずれも対称性を示し、さらにこれらの分布の特徴に違いは認められなかった。これらの結果より、 $0.22 \text{ A}$  までの電流はアクチン線維の運動方向に影響を及ぼすことはないが、電流値に応じて温度を変化させる方法によって運動速度を制御可能であることが明らかになった[3]。

##### (2) 微小電極間でのアクトミオシン運動

微小電場を発生させるために、アクトミオシン滑り運動系に電極を設置し、電圧印加時の応答を調査した。間隙  $1 \text{ mm}$  の電極間に  $2.5 \text{ V}$  を  $0.1$  秒印加した時、陽極側でアクチン線維運動の停止が、陰極側で運動の促進が観察

された。この運動の応答は、印加から  $1$  秒以内で起こった。また、運動の停止から数秒後に速度が回復したことから、可逆的な効果であった。一方で、運動方向が電場方向に依存しなかったため、アクチン線維の電気泳動とは異なる効果であると考えられた。アクチン線維に pH 感受性色素 (5-(6)-carboxy RhodFluor; Setrareh Biotech) を結合させ、電圧印加時の蛍光強度を測定した。その結果、陽極側で pH の低下が、陰極側で pH の増加が確認されたため、水の電気分解による効果であることが予想された。実際に、アクトミオシン運動は、pH 6-9 の範囲で速度が増加することが知られている。電圧印加に伴う pH と速度の変化は著しく共役していた。pH 変化の範囲を調節するためには、緩衝試薬の濃度と種類が重要であった。MES と Tris を組み合わせて使用した場合、電圧印加の極性を交互に切り替えることで pH 6.8 から pH 8.2 の範囲で変化させることができた。アクチン線維の速度は pH 変化に応じて繰り返し増減した。 $0.2 \text{ Hz}$  の電位切り替えまで顕著に速度変化がみられたが、 $0.5 \text{ Hz}$  では pH の変化に比べて速度変化は小さかった。このことはアクトミオシン運動の pH 応答が  $1$  秒程度の遅れをもつことを示唆する。これまでアクトミオシン運動を可逆的にかつ能動的に停止させる方法がなく、本研究の方法は、オンデマンドに運動を制御する有益な方法となり得る[4]。

##### (3) アクチン線維による物質輸送

アクチン線維による物質輸送のために、アクチン線維より大きな物体に多数の線維を結合させた場合と、より小さな物質を単一线維に結合させた場合について調査した。

正電荷をもつ直径  $1.0 \mu\text{m}$  のポリスチレン微小球とアクチンを混合したとき、モノマーのアクチンではほとんど結合しなかったが、アクチン線維では微小球表面積の  $13\%$  まで結合した。このアクチン線維結合微小球は、ATP 非存在下でスライドガラスに固定されたミオシンと結合し、ATP 存在下で約  $1.5 \mu\text{m/s}$  の速度で一方向に運動した。この運動はブラウン運動から予測される拡散距離よりも十分大きいことから、アクトミオシン相互作用による能動的な運動であると考えられる。また、KCl 濃度が  $0-50 \text{ mM}$  の範囲でこの運動が認められ、 $75 \text{ mM}$  以上の濃度ではブラウン運動を示した。また、電気泳動による分析では、 $100 \text{ mM}$  KCl の条件でアクチン線維と微小球の結合量は  $25 \text{ mM}$  KCl の場合とほぼ同様であった。この KCl 濃度依存性は、微小球からのアクチンの解離ではなく、アクトミオシン相互作用の性質によるものと考えられる。

直線状の軌跡で運動する傾向にあり、移動端-端距離と軌跡距離の比は約  $0.8$  で、単一のアクチン線維の値  $0.5$  よりも高かった。これらの結果により、アクチン線維を結合させる方法でポリスチレンのような人工的な物体を能動的に輸送することが可能であるこ

とが明らかになった[5]。

これとは異なる方法で、1本のアクチン線維が輸送できる物体の大きさの限度を評価した。アクチン分子にポリエチレングリコール(PEG)を共有結合させた。PEGの分子量2000のとき、アクチン線維はミオシン上を滑り運動し、付加していない場合と同様の速度を示した。一方で、運動する線維数の割合は、繊維中のPEG/アクチンの混合割合に応じて低下した。また付加したPEGの分子量が大きくなるに従って、運動する線維数の割合が低下し、分子量10000のとき、10%以下になった。PEGの慣性半径は2000では2nm、10000では5nmと見積もられており、PEG10000の大きさはアクチンモノマーの大きさに相当する。このことは、アクチン線維上のすべての領域がPEGで覆われてミオシン頭部の結合が立体的に阻害されたため、運動が抑制されたことを示唆する。2nm程度の物体の付加ならば運動性を維持できると考えられる。

#### (4)まとめ

以上のように、本研究ではアクトミオシン運動速度に関して、導電ガラスへの電流印加による増加、微小電極への電圧印加による減少・停止を可能にした。そして、アクチン線維を介した物質輸送が可能であり、その条件を明らかにした。これらと方向制御の方法[6]を組み合わせることで、アクトミオシンを利用した微小輸送システムの開発進展への寄与が期待できる。

#### 参考文献

- [1] van den Heuvel, M. G. L., Dekker, C., *Science* 317(2007) 333-336.
- [2] Homsher, E., Wang, F., Sellers, J. R., *Am. J. Physiol.* 262 (1992) C714-723.
- [3] Wada, R., Sato, D., Nakamura, T., Hatori, K., *Arch. Biochem. Biophys.* 586 (2015) 51-56.
- [4] Hatori, K., Iwase, T., Wada, R., *Arch. Biochem. Biophys.* in press.
- [5] Oyama, T., Hatori, K., *Bull. Yamagata Univ. (Eng.)* 36 (2016) 1-11.
- [6] Nicolau, D. V., Suzuki, H., Mashiko, S., Taguchi, T., Yoshikawa, S., *Biophys. J.* 77 (1999) 1126-1134.

#### 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)

Hatori, K., Iwase, T., Wada, R., Switching of actin-myosin motors by voltage-induced pH bias in vitro, *Arch. Biochem. Biophys.* 603 (2016) 64-71. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.012>

Oyama, T., Hatori, K., Translocation of cationic polystyrene microspheres associated with actin filaments on a surface coated with myosin motors, *Bull. Yamagata Univ. (Eng.)* 36 (2016) 1-11. 査読有

<http://www.lib.yamagata-u.ac.jp/all/lib/elib/kiyou//kiyoue/kiyoue-36/imagage/kiyoue-36-001to011.pdf>

Wada, R., Sato, D., Nakamura, T., Hatori, K., Temperature control of the motility of actin filaments interacting with myosin molecules using an electrically conductive glass in the presence of direct current, *Arch. Biochem. Biophys.* 586 (2015) 51-56. 査読有  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.001>

[学会発表](計 4件)

Hatori, K., Abe, T., Wada, R., A reversible change in the velocity of the motility of actin filaments on a heavy meromyosin-coated surface under an electric field, 日本生物物理学会第53回年会, 金沢大学, 石川県金沢市 (2015.9.14)

Hatori, K., Souma, H., Pegylation of actin affects motile fraction rather than the velocity of actin filaments on myosin, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市 (2014.9.26)

Wada, R., Nakamura, T., Hatori, K., Movement of actomyosin on a conductive base under DC current, 日本生物物理学会第52回年会, 札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市 (2014.9.26)

Hatori, K., Munakata, S., Effect of polyethylene glycol on the motility of actin and regulated thin filaments on myosin molecules, 日本生物物理学会第51回年会, 京都国際会議場, 京都府京都市 (2013.10.28)

[その他]

ホームページ等

<http://khatori.yz.yamagata-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

羽鳥 晋由 (HATORI, Kuniyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号: 00283036