

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870173

研究課題名(和文) 生体分子モーターキネシンの非平衡エネルギー変換効率の定量

研究課題名(英文) Non-equilibrium energy conversion efficiency measurement of molecular motor kinesin

## 研究代表者

有賀 隆行 (Takayuki, Ariga)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：30452262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内では様々な分子機械が働いている。その中の1つ、微小管というレールの上を歩き、荷物を運ぶモーター分子であるキネシンが、入力となる化学的なエネルギーをどれだけ効率よく力学的なエネルギーに変換しているかを、非平衡物理学の最新の理論を用いて、実験およびシミュレーションの両面から研究を行った。その結果、キネシンの非平衡的な振る舞いが確認できた一方で、運動の無駄となる非熱的な散逸をあまり行わない事も明らかになった。

研究成果の概要(英文)：A large variety of bio-molecular machines are working in cells. Especially, kinesin is walking on the microtubule rail to carry various cargos. We investigated the mechano-chemical efficiencies on the kinesin molecular motor by using a novel non-equilibrium equation through both experimental measurement and simulation approaches. The results showed kinesin's non-equilibrium behaviors and revealed that they do not produce so much futile non-equilibrium dissipation.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測・操作 生体物質の物理 非平衡物理学 エネルギー変換 生体分子モーター

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では、様々な生体機械がエネルギー変換装置として働いている。これまでの研究では、主として ATP 加水分解の化学ポテンシャルを力学的な仕事に変換する分子モーター（微小管をレールとして細胞内で小胞体などを輸送するキネシン等）を題材に、分子の機能に着目した観察研究が主流であった。しかし、そのメカニズムの理解の急速な発展と比較して“エネルギー変換”としての物理的側面に関しては理解が遅れているのが現状であった。

その原因は1分子に着目するような少数分子の系ではゆらぎの効果が顕著に現れるために完成された熱力学の適用が難しいこと、また、ATP を消費して駆動するモータータンパク質は本質的に非平衡な環境でありながら、その統一的な理論の枠組みが完成されていないことなどが原因として挙げられる。しかし、近年になって非平衡条件で成り立つ幾つかの等式が理論的に提唱 (Evans *PRL* 1993, Jarzynski *PRL* 1997, Harada *PRL* 2005)され、その実験的検証 (Wang *PRL* 2002, Liphardt *Science* 2002, Toyabe *PRL* 2010) も進みつつある。

その一例として回転分子モーターである  $F_1$  では先行してエネルギー変換効率に着目した研究が行われており、ATP 合成酵素としての可逆的な役割を反映した高い（ほぼ100%の）変換効率が示された (Toyabe *PNAS* 2011)。それとは対照的に、我々が対象としているキネシン分子ではゆらいだ環境を最大限に利用している特異な機構が明らかになり、さらにはその最大力の変化から、変換効率も酵素の特性によって変化することが示唆された。こうした機構の理解の進展にもかかわらず、キネシン分子ではどれだけの入力自由エネルギー変化が力学的な出力として変換されるかという、エネルギー変換効率の定量すら行われていないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

非平衡系で成り立つ最新の理論を利用した一分子キネシンのエネルギー変換効率の定量的な計測を通じて、生体分子という“物の理”を理解すると共に、現在急速に発展しつつある非平衡物理学の基礎となるデータを提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 生体内でいかに有効にエネルギーが利用されているかを定量的に理解するため、1分子の野生型キネシンについて、入力となる自由エネルギー変化 (ATP の化学ポテンシャル変化) を制御しながら力学的出力を測定し、エネルギー変換効率を定量する。

(2) 新しい非平衡理論式 (Harada-Sasa 等式) を利用した非平衡エネルギーの定量を行

うため、1分子のキネシンに対して力学的な摂動を与えてその応答をするため、プログラム可能なロジックボード (FPGA) を利用した高速フィードバックを導入した1分子力学応答の顕微鏡を新たに開発した (図1)。

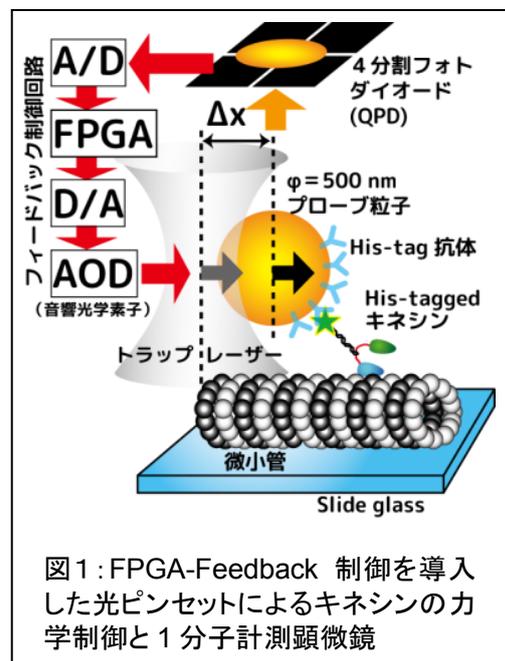


図1: FPGA-Feedback 制御を導入した光ピンセットによるキネシンの力学制御と1分子計測顕微鏡

(3) 前項で構築した1分子力学応答計測顕微鏡をキネシンに適用して、様々な外力の摂動を与えたときの応答と速度相関 (キネシンのゆらぎ) を計測した。理論式 (Harada-Sasa 等式) と比較することで非平衡散逸とそこから導かれる速度や負荷に依存したエネルギー効率を定量した。

(4) キネシンの現象論的な理論モデルを構築し、実験結果から得られたパラメータを元に、ポアソンステップとランジュバン方程式を組み合わせたシミュレーションを行い、実験結果と理論との整合性を検証した。

### 4. 研究成果

(1) 1分子の野生型キネシンについて、入力となる自由エネルギー (化学ポテンシャル) 変化を制御しながら、フィードバック制御を備えた光ピンセット顕微鏡法により、外力と速度の関係を計測し、準静的なエネルギー効率を定量した。可逆的な回転分子モーターである  $F_1$ -ATPase と違い、(準静的にも) 100% の効率が得られないことを明らかにした。

(2) 1分子のキネシンに精密な力学制御を行い、正確な応答計測を可能とするために、これまでに構築していた従来型のフィードバック制御を備えた光ピンセット顕微鏡に対してプログラム可能なロジックボード (FPGA ボード) を利用した高速フィードバック制御回路を新たに組み込んだ (図1)。この結果、計測の時間分解能 (20kHz) と同じ速度でのフィードバックループを可能とし、

ブラウン運動にも追従する、ほぼリアルタイムでの高速フィードバック制御を可能とした (図 2)。

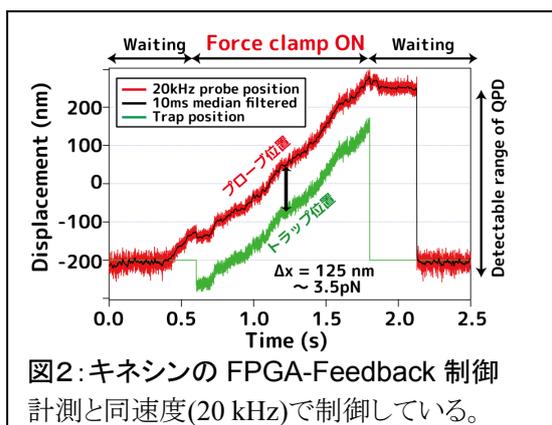


図2: キネシンの FPGA-Feedback 制御計測と同速度(20 kHz)で制御している。

(3) 前項で構築した 1 分子力学応答計測顕微鏡をキネシンに適用して、様々な外力の摂動を与えたときの応答と速度相関 (キネシンのゆらぎ) を計測した。この結果、高周波数領域では、応答関数と速度相関が一致するが、低周波領域において両者に解離がみられた。この結果は、揺動散逸定理の破れが観測されたことを意味している。この差分から、キネシンが非平衡的な過程で散逸するエネルギー量を定量した。

(4) キネシンの反応モデルを単純化したポアソンステップと、外力を加える対象である荷物となるビーズのランジュバン方程式を組み合わせた現象論的モデルを構築した。そこに、(1) で得られた外力と速度の関係から求めた各素過程の速度論的パラメータを導入し、キネシンの運動の現象論的シミュレーションを行った。その結果、現象論的シミュレーションは力学応答計測の実験結果をほぼ再現した。また、実験結果とシミュレーションを比較することで、キネシンの茎部の持つコンプライアンスに由来する緩和挙動が、実験結果の理論的解釈を難しくしていることも明らかにした。

<引用文献>

① Evans, D. J., Cohen, E. G. D., & Morriss, G. P. (1993). Probability of second law violations in shearing steady states. *Physical Review Letters*, **71**(15), 2401.

② Jarzynski, C. (1997). Nonequilibrium equality for free energy differences. *Physical Review Letters*, **78**(14), 2690.

③ Harada, T., & Sasa, S. I. (2005). Equality connecting energy dissipation with a violation of the fluctuation-response relation. *Physical review letters*, **95**(13), 130602.

④ Wang, G. M., Sevick, E. M., Mittag, E., Searles, D. J., & Evans, D. J. (2002). Experimental demonstration of violations of the second law of thermodynamics for small systems and short time scales. *Physical Review Letters*, **89**(5), 050601.

⑤ Liphardt, J., Dumont, S., Smith, S. B., Tinoco, I., & Bustamante, C. (2002). Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality. *Science*, **296**(5574), 1832-1835.

⑥ Toyabe, S., Okamoto, T., Watanabe-Nakayama, T., Taketani, H., Kudo, S., & Muneyuki, E. (2010). Nonequilibrium energetics of a single F<sub>1</sub>-ATPase molecule. *Physical review letters*, **104**(19), 198103.

⑦ Toyabe, S., Watanabe-Nakayama, T., Okamoto, T., Kudo, S., & Muneyuki, E. (2011). Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F<sub>1</sub>-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(44), 17951-17956.

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)

① N. Uchida, K. Okuno, Y. Niitani, X. Ling, T. Ariga, M. Tomishige, T. Aida Photoclickable dendritic molecular glue: noncovalent-to-covalent photochemical transformation of protein hybrids *Journal of the American Chemical Society* 査読有 **135**, 4684-4687 (2013)  
DOI: 10.1021/ja401059w

② T. Aoki, M. Tomishige, T. Ariga†, “Single molecule FRET observation of kinesin-1’s head-tail interaction on microtubule”, *BIOPHYSICS* 査読有, **9**, 149-159 (2013)  
DOI: 10.2142/biophysics.9.149

[学会発表] (計 12 件)

① 有賀隆行、富重道雄、水野大介 生体分子モーターキネシンの非平衡エネルギー計測、ゆらぎと構造の協奏 第 2 回後

悔シンポジウム、2015年5月1日、東京大学 本郷キャンパス

- ② 有賀隆行、富重道雄、水野大介 生体分子モーターキネシンの非平衡エネルギー計測、領域横断研究会「細胞力学と細胞運動の協奏」、2014年12月19日～2014年12月20日、九州大学 箱崎キャンパス
- ③ N.Sawairi, T. Ariga, M. Iwaki, M. Tomishige, K. Hayashi, Investigation of the mechanism of cooperative cargo transport by multiple kinesins. 第52回日本生物物理学会、2014年9月25日～2014年9月27日、札幌コンベンションセンター
- ④ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、柳島大輝、水野大介、フィードバックマイクロレオロジーを用いたソフトマターの力学挙計測、第120回日本物理学会九州支部例会、2014年12月6日、崇城大学
- ⑤ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、柳島大輝、水野大介、フィードバックMRによる細胞骨格の力学挙計測、領域横断研究会「細胞力学と細胞運動の協奏」、2014年12月19日～2014年12月20日、九州大学 箱崎キャンパス
- ⑥ H. Honda, K. Nishizawa, T. Ariga, T. Yanagishima, D. Mizuno, Fluctuation and response of soft materials measured by dual-feedback microrheology. International Conference “Physics of Structural and Dynamical Hierarchy in Soft Matter” 2015年3月16日～2015年3月18日、東京大学生産技術研究所
- ⑦ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、柳島大輝、水野大介、フィードバックマイクロレオロジーによるソフトマターのゆらぎと応答の観測、日本物理学会第70回年次大会、2015年3月21日～2015年3月24日、早稲田大学
- ⑧ T. Ariga, M. Thomishige, D. Mizuno Non-equilibrium energy measurement of molecular motor kinesin. International Symposium of Fluctuation and Structure of Equilibrium 2015, 2015年8月20日～2015年8月23日、Kyoto Japan.
- ⑨ 有賀隆行、富重道雄、水野大介、分子モーターキネシンの非平衡エネルギー計測、ゆらぎと構造の協奏第2回公開シンポジウム、2015年4月30日～2015年5月1日、東京大学 本郷キャンパス
- ⑩ N. Honda, K. Nishizawa, T. Ariga, D.

Mizuno, Dual-feedback microrheology in cytoskeletal networks, APS March Meeting 2016, 2016年3月17日、Baltimore, USA

- ⑪ N. Honda, K. Nishizawa, T. Ariga, T. Yanagishima D. Mizuno, Dual-feedback microrheology in cytoskeletal networks, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2016年8月20日～2015年8月23日、Kyoto, Japan
- ⑫ 本田菜月、西澤賢治、有賀隆行、水野大介、多重フィードバックによる細胞骨格のマイクロレオロジー計測、第5回ソフトマター研究会、2015年12月18日、宮城県仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

有賀 隆行 (ARIGA, Takayuki)  
九州大学・大学院理学研究院・特任准教授  
研究者番号：30452262