

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840057

研究課題名(和文) 個々の要素分子の動態を同時計測して生体分子システムの動作原理を探る

研究課題名(英文) Uncovering operating principle of bio-molecular system by simultaneous observation of dynamics of multiple individual molecules

研究代表者

市村 垂生 (Ichimura, Taro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：50600748

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)：ナノスケールで近接する複数の単分子の相互作用や協働性を研究するためのツールとして、複数分子を同時にナノトラッキングする手法を開発した。多色標識とイメージング分光によってこれを実現した。蛍光プローブとして量子ドットを用いた。原理検証実験によって、30ms以下の時間分解能において数ナノメートルの位置推定精度を達成できることを示した。並進モータータンパクであるミオシンがアクチン上で1次元的に動作する様子をナノメートル精度で追跡することに成功した。また、装置を拡張して、2次元的なナノトラッキングも実現し、複数の分子がナノメートルスケール内で交差する様子の観察にも成功し、本手法の威力を示すに至った。

研究成果の概要(英文)：Simultaneous nanometric tracking of multiple motor proteins was achieved by combining multicolor fluorescent labeling of target proteins and imaging spectroscopy, revealing dynamic behaviors of multiple motor proteins at the sub-diffraction-limit scale. Using quantum dot probes of distinct colors, we experimentally verified the localization precision to be a few nanometers at temporal resolution of 30 ms or faster. One-dimensional processive movement of two heads of a single myosin molecule and multiple myosin molecules was successfully traced. Furthermore, the system was modified for two-dimensional measurement and applied to tracking of multiple myosin molecules. Our approach is useful for investigating cooperative movement of proteins in supramolecular nanomachinery.

研究分野：分光計測、バイオイメージング

キーワード：単分子イメージング 生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

生物の運動を司る様々な分子機械では、構成素子である様々なタンパク質が組織的に運動することで、システム全体としての力や変位を出力している。モーター分子に代表される力発生素子は、それぞれブラウン運動でゆらぎながら確率的に運動や化学反応をしているにも関わらず、システムは安定で且つ高いエネルギー効率を達成する。各種モーター分子については、ここ20年の間に、単一蛍光分子イメージング法などの計測技術に支えられ、動作様式、力発生の機構、エネルギー効率といったことが次々と明らかにされてきた[Funatsu, Nature 1995]。しかし、単一分子レベルの個々の素子の運動特性を、単純に足し合わせても分子機械全体の動作原理を理解することはできない。分子機械として働くときには、素子分子間に働く同期、促進、抑制などの相互作用により、協働性が生み出され、システムを効率よく動作させている。実際に、分子機械の代表である筋肉の研究では、素子であるミオシン II が互いに運動を阻害し合わない仕掛けを持つことが提唱されている[Kaya, Science 2010]。また、エネルギー効率の観点から見ても、筋肉ミオシンの1分子計測から見積もられるエネルギー効率よりも、分子機械(ミオシンフィラメント)の計測結果から見積もられるエネルギー効率が大きいことが知られていて、長年未解明のままになっている[Higuchi, Nature 1991]。

このように、「分子機械」と「単一分子」、これら2つの階層のつながりを理解することは、現在の生物物理学において1つの重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子機械レベルの研究と単一分子レベルの研究の中間の階層での研究に挑戦する。すなわち、動作する分子機械内で個々の素子がどのようにして協働的に力発生を行っているかを直接計測により明らかにすることを目指す。モデル実験系として、筋肉ミオシンを選択し、ミオシンフィラメント上に並んだ多数のミオシンモーターを同時に動態計測する。筋肉ミオシン研究においては、近年の単一ミオシン分子力発生メカニズムに関わる数々の詳細な研究にもかかわらず、機械としての動作については原理はおろか、動作様式すら明らかになっていない。「なぜ筋肉ミオシンの頭部は2頭なのか」、「筋肉の力 - 短縮速度関係は何に由来しているのか」、「そもそも力発生中の筋肉中でいったい何割のミオシン分子が力を出しているのか」。これらの問いに対する明確な答えは未だに得られていない。

これらの問いが明らかになっていない最大の理由は、測る方法がなかったからである。通常の光学顕微鏡では近接するミオシンヘッドを識別して動態を観察することはできない。これが、これまで筋肉ミオシン研究のデッドロックとなってきた。近年進歩著しい超解像光学イメージング技術は、空間分解能だけで言えばミオシンヘッドを空間的に一つずつ識別して見えるレベルに達し

ている。しかし、モーターの動態が見える数ミリ秒以下の時間分解能を同時に有する手法は、申請者の知る限り存在しない。全反射照明蛍光顕微鏡による一分子ナノメトリー技術は、単一ミオシン研究において大きなブレークスルーとなったが、多分子同時観察に資する新たなブレークスルーが必要である。

## 3. 研究の方法

量子ドット標識技術と分光計測技術を基盤とする「分光超解像ナノメトリー」と呼ぶべき新規計測法を開発し、多数のミオシンの動態観察の実現を目指す。この方法では、アクチンフィラメント上でナノ領域で近接して並ぶミオシンヘッドを異なる色の蛍光プローブで標識し、分光器を通してイメージングすることで、それぞれのヘッドを同時に動態計測する。これにより、1次元の変位をナノメートルの精度で計測することができる。さらに、2次元の変位を計測するための方法を提案し、試作する。ビームスプリッターで画像を2つに分割してそれぞれ異なる方向に分光した像を観察し、計算によって視野内の個々のミオシンヘッドの2次元変位を推定する。

## 4. 研究成果

原理検証実験として、並進モーターであるミオシン V と VI を用い、基板上に固定したアクチンフィラメント上での動態計測を行った。量子ドット(QD)を蛍光プローブとして用い、ピオチン化したミオシンの軽鎖にアビジン化 QD を固定した。上述の方法によって1次元計測した結果、アクチンフィラメントでのナノメートルスケール内で複数のミオシンが移動する様子を観察することができた。同時に4つのミオシンを計測することにも成功している。

同様の試料を用いて、2次元動態計測の実証実験にも取り組んだ。上記と同様、ミオシン VI を用い、アクチンフィラメント上での複数分子の動作をやはりナノメートルの精度で計測することに成功した。とくに、2つのミオシンがアクチン上を歩きながら順位が入れ替わる様子を観察することにも成功した。

また、本手法で達成しうる位置推定精度を実験的に評価した。基板上に固定した QD の位置を数十フレームに渡って計測し、統計的に位置推定精度を見積もった。その結果、現状の装置システムにおいて、10ms の時間分解能で最高 4nm、30ms の時間分解能で 3nm 程度の位置推定精度での一分子動態計測が可能であることを示した。これは、通常の一分子計測の精度とほぼ同程度であり、従来の位置推定精度を以て、複数の分子を同時に動態計測できるようになった。2次元動態計測の場合は、蛍光を2つの光路に分岐するため、光子数が半分になるため、推定精度はおおよそ 2 倍程度になることがわかった。

蛍光スポットの中心位置推定アルゴリズムについても検討した。楕円ガウス関数のフィッティングにより位置推定を行ったが、スペクトルは系がガウス形状でないため、スポット形状は厳密に

は楕円ガウスにはならない。スポット形状が楕円でない場合に達成しうる位置推定精度を数値シミュレーションによって調べ、楕円ガウスフィッティングの適用範囲を検討した。この結果、比較的短波長の QD では楕円ガウスフィットで問題ないが、長波長の QD ではスペクトル形状が非対称となるため、スポット位置推定もスペクトル形状を考慮した関数を用意する必要があることがわかった。

以上のように、本研究期間をとおして、提案する手法による複数分子の同時動態計測の可能性を実験的に示すことができた。今後、ミオシンに限らず他の並進モータタンパク質(キネシン、ダイニン)や回転モータなど、様々な分子動態計測への応用が期待される。

## 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 11 件)

T. Morikawa, T. Ichimura, et al., Dependence of fluorescent protein brightness on protein concentration in solution and enhancement of it, Scientific Reports 6, 2016, Art. No. 22342. [査読有]

DOI: 10.1038/srep22342

渡邊朋信、市村垂生、藤田英明、ラマン散乱分光スペクトルによる細胞分化状態の可視化、BIO INDUSTRY 33 巻、2016 年、pp. 19-25. [査読有]

URL:

[https://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=5053](https://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=5053)

J. Kaneshiro, T. M. Watanabe, H. Fujita, and T. Ichimura, Full control of polarization state with a pair of electro-optic modulators for polarization-resolved optical microscopy, Applied Optics 55, 2016, 1082-1089. [査読有]

DOI: 10.1364/AO.55.001082

市村垂生、矢野隆章、局在表面プラズモンを利用した超解像顕微分光とイメージング、分光研究、64 巻、2015 年、pp. 582-598. [査読有]

URL:

[http://www.bunkou.or.jp/prints/prints\\_6406.html](http://www.bunkou.or.jp/prints/prints_6406.html)

藤田英明、市村垂生、渡邊朋信、細胞状態を示す指紋：細胞からのラマンスペクトル、現代化学、536 巻、2015 年、pp. 36-40. [査読有]

URL:

<http://www.tkd-pbl.com/book/b211101.html>

T. Ichimura, L.-d. Chiu, K. Fujita, H. Machiyama, S. Kawata, T. M. Watanabe, H. Fujita, Visualizing the appearance and disappearance of the attractor of differentiation using Raman spectral imaging,

Scientific Reports, 5, 2015, Art. No. 11358.

[査読有]

DOI:10.1038/srep11358

B. G. David, K. Okamoto, T. Kakizuka, T. Ichimura, T. M. Watanabe, H. Fujita, Gene dynamics of core transcription factors for pluripotency in embryonic stem cells, J. Biosci. Bioeng., 119, 2015, 406-409. [査読有]

DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.09.011

市村垂生、ラマン顕微鏡による細胞状態の計測、生物物理、54 巻、2014 年、pp. 315-317. [査読有]

URL:

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/54/6/54\\_315/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophysics/54/6/54_315/_pdf)

T. Ichimura, T. Jin, H. Fujita, H. Higuchi, T. M. Watanabe, Nano-scale measurement of biomolecules by optical microscopy and semiconductor nanoparticles, Frontiers in Physiology, 2014, fphys.2014.00273. [査読有]

DOI: 10.3389/fphys.2014.00273

渡邊朋信、市村垂生、定量生物学推進に向けた先端バイオイメージング技術開発、生体の科学、65 巻、2014 年、pp. 390-391. [査読有]

URL:

<http://medicalfinder.jp/doi/abs/10.11477/mf.2425200004>

S. Higuchi, T. M. Watanabe, K. Kawauchi, T. Ichimura, H. Fujita, Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers, Journal of Bioscience and Bioengineering 117, 2014, 749-755. [査読有]

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.011

(学会発表) (計 6 件)

市村垂生、垣塚太志、池崎圭吾、金城純一、藤田英明、渡邊朋信、波長分離による複数分子ナノ追跡、第 56 回応用物理学会年会(名古屋国際会議場・愛知県名古屋市、2015 年 9 月 13-16 日)。[口頭発表]

市村垂生、L.-d. Chiu、藤田克昌、渡邊朋信、藤田英明、ラマン散乱顕微鏡による細胞状態遷移の一細胞計測、日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会(国立京都国際会館・京都府京都市、2015 年 5 月 13-15 日)。[ポスター発表]

市村垂生、振動分光顕微鏡による細胞状態遷移の計測、4D 細胞計測全体会議(理化学研究所・埼玉県和光市、2015 年 1 月 22 日)[口頭発表]

T. Ichimura, Label free optical imaging to quantify the quality in biological complex system, 32nd Physics Congress of Samahang Pisika ng Pilipinas (Quezon City, the Philippines, Oct. 17-20, 2014). [招待講演]

T. Ichimura, Label-free optical imaging for

measurement of cellular states, The 11th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (Matsumoto, Japan, Sep. 28-29, 2014). [招待講演]

市村垂生、非標識光学イメージングで細胞状態を測る、第23回日本バイオイメージング学会学術集会(大阪大学吹田キャンパス・大阪府吹田市, 2014年9月4-6日)。[招待講演]

(図書)(計1件)

渡邊朋信、市村垂生、化学同人、「1分子生物学」2014年、14章、pp. 179-192.

(産業財産権)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村 垂生 (Ichimura, Taro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 50600748