

研究課題別評価書

1. 研究課題名

分子モーターシステムの制御理論構築とその実験的検証

2. 氏名

田中 裕人

3. 研究のねらい

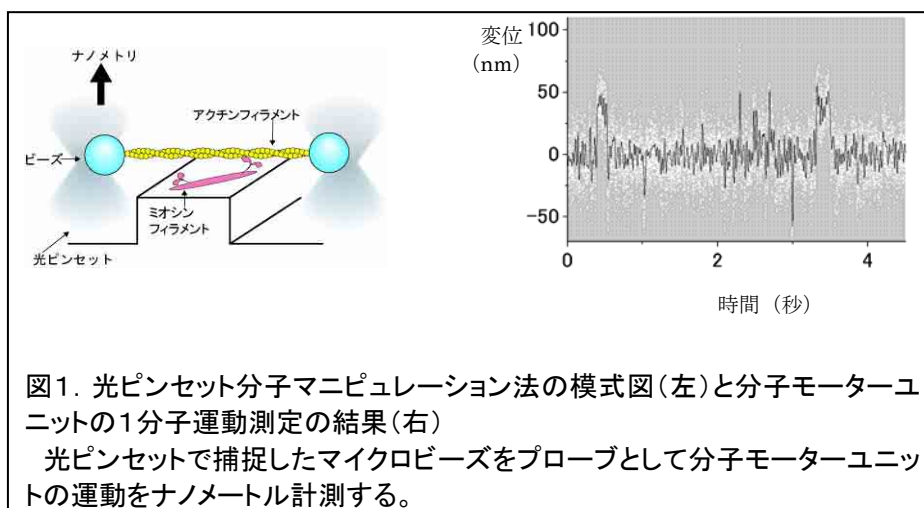
近年の1分子計測技術の目覚ましい発展により、ミオシン生体分子モーターの、その機能の“揺らぎ”が明らかになってきた。1個の分子モーターは、熱ノイズをうまく利用して確率的に前後に“揺らぎ”ながら前方向に動いて行くのである。この確率的素子をシステムとして統合したものが筋肉であり、その機能は時空間的にダイナミックな制御をみごとに発現している(力、速度、正確さ、エネルギー効率などを自律的にバランスさせる)。本研究では、この分子モーター1個を動作ユニットと捉え直し、筋肉(サルコメア)をシステム(分子モーターの非線形結合システム)として捉え直すことで、素子レベルの“揺らぎ”運動処理が、どのようにして生命システムのダイナミックな反応機構を実現するのか? その設計アルゴリズムの解明・創出を目指す。研究対象にミオシンを選択することにより、これまで蓄積された膨大な研究結果を利用して数理モデルを構築すること、また、1分子測定技術を応用して、実験的にダイナミックな運動処理過程を実際に検証することにより、リアルな生体システム(広く応用の利く)の理解・構築を目指す。

4. 研究成果

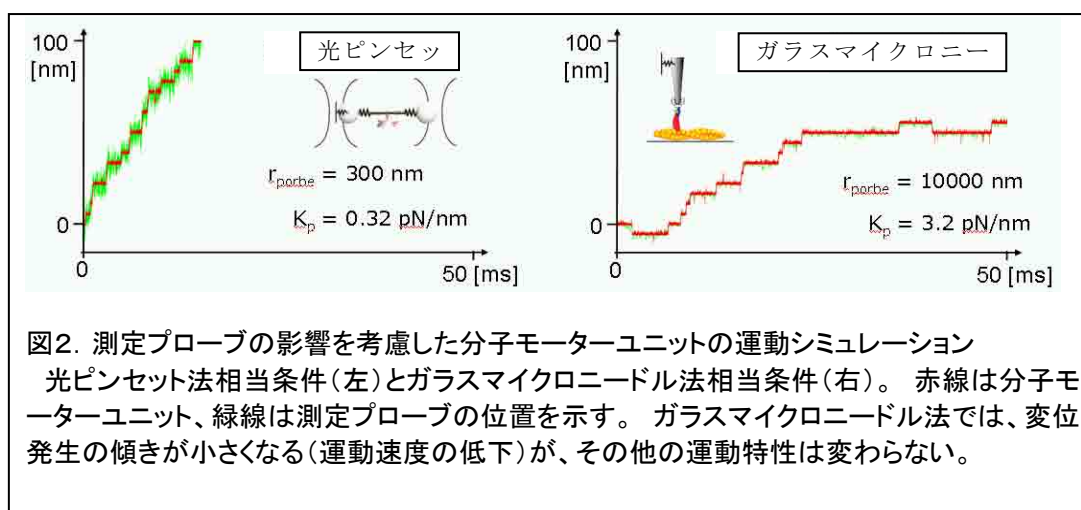
本研究においては、計算機シミュレーションと1分子測定実験を併用することで、分子レベルの生体システムの数理モデル構築とその実験的検証を目指した。分子モーターシステムでは、骨格筋(筋肉)を最も大きなシステムとし、筋細胞、筋原線維、サルコメア、アクチン分子、と階層構造を経て分子にまで至るが、本研究では、1個のミオシンを分子モーターユニット、数~数10個の分子モーターから構成される構造を分子モーターシステムとして研究を進めた。

分子モーターシステムの運動処理を分子レベルで理解するためには、ナノサイズの分子を捕まえ操作(マニピュレーション)し、その運動の詳細を測定する必要がある。こうした詳細な測定に対して有力な手法の1つが1分子測定法であり、これまで様々な測定が行われてきた。本研究では、実験的検証の道具として、光ピンセット分子マニピュレーション法を用いた。この光ピンセット法を、分子モーターユニット(ミオシン1分子)に応用した実験結果等も発表してきた(図1, Tanaka et al., JBC, 2008)。

こうした分子マニピュレーション法では、操作&測定のためプローブ(測定プローブ)を分子モーターユ



ユニットに結合させ計測を行う(図1参照)。分子モーターの大きさは光学顕微鏡の解像度以下であるため直接観測することができず、その動きはこの結合させた測定プローブの動きとして観測する。こうした分子モーターの動作機構を物理的に理解するためには、測定プローブの影響を考慮して分子モーターの運動を検討し、可観測なデータから、分子の運動を理解する必要があると考えられる。つまり、分子モーターユニット&システムの運動がマニピュレーション(測定プローブ)によりどのような変調を受けるかを理解することは、分子モーターの運動の理解を目指した数理モデルの構築ならびに分子測定系のデザインにとって非常に重要となる。そこで、測定プローブが連結された分子モーターの運動を、ランジュバン方程式を用いてシミュレーションした。詳細は省くが、シミュレーションを使用して、分子マニピュレーションで使用される光ピンセット法とガラスマイクロニードル法を検討した。測定プローブのサイズや分子モーターとの結合の強さには特性があり、それぞれの測定プローブ特性を加味してシミュレーションを行った。その結果、光ピンセット法に比較して、ガラスマイクロニードル法では、分子モーターの滑り速度が減少する可能性があることが計算機シミュレーションで示された。詳細は省くが、滑り速度以外の運動特性は、光ピンセット法、ガラスマイクロニードル法ともほぼ同じであることも示された。このシミュレーション結果は、実際の測定結果と一致しており、マニピュレーションのための測定プローブにより、分子モーターの運動が変調されていることを示唆している。これらのことは、要求される実験デザインに応じて測定プローブ特性を設計することで、分子モーターの運動を変調させ、その運動を高空間分解能で検出できる可能性を示している(Tanaka, Biophys. Soc. annual meeting, 2009, 2010)。この分子モーター運動変調(摂動)の可能性は、分子モーターユニット&システムの運動特性を調べて理解する上で、非常に重要と考えられる。現在継続して測定プローブ条件の詳細検討を行っており、また、この計算機シミュレーションを実証するための計測装置の作成を継続している。この測定装置は、後述の分子モーターシステム特性測定への応用も視野に入れ、作成している。



次に、分子モーターユニットをベースとした分子モーターシステムのモデル構築を行った。モデル構築に際しては、これまで蓄積されてきた分子モーターユニットと分子モーターシステムの実験結果を参考に構築を行った。本研究で扱う分子モーターシステムは骨格筋を最も大きなシステムとし、骨格筋を構成する最小ユニットであるミオシン分子を分子モーターユニットとみなす。本研究では、分子モーターユニットを数～数10個システム化することで発現する、分子モーターユニットとは異なるシステムの特性に注目して、モデル構築を行った。注目した1つの特性は、「ステップサイズの可変性」である。分子モーターのステップサイズとは、1個の分子モーターユニットが1個のATPを加水分解する間に動く距離である。1分子測定により、1個で動く場合の分子モーターユニットのステップサイズが直接測定され、～

15nmと示された。分子モーターシステムのステップサイズは間接的ではあるが $\geq \sim 60\text{nm}$ にもなると見積もられている。このように、分子モーターは環境に応じて(1個で働く or 複数で働く)自律的に調節する機能を分子(分子システム)レベルで有する可能性が示唆される。こうした分子ユニットと分子システムの機能を説明する数理モデルの構築を行った。本研究で構築したモデルは、ラチェットモデルをベースとして、運動の発生機構に2つの経路を仮定したモデルを作成した。この結果、分子モーターユニットと分子モーターシステムで異なるステップサイズを説明するモデルの構築を達成した(図3)。

このモデルを要約すると、分子モーターシステム中で分子モーターユニットが働く場合、分子モーターが1個で働く場合と異なり、システム中の他の分子モーターユニットから押されたり引かれたり(バネを介して相互作用)することで、自律的にエネルギーの無駄使いを省き、効率よく働くことが示される。こうした結果は、“ゆらぎ”をベースとしたユニットでシステムを

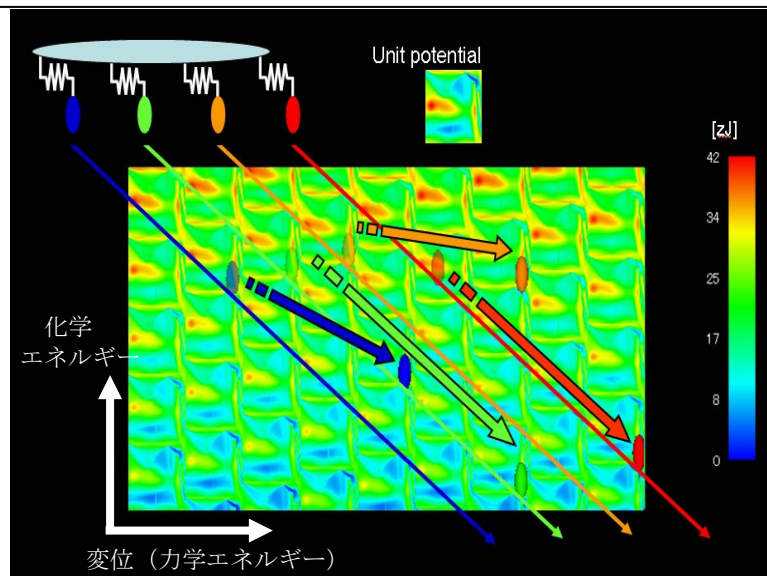


図3. 数理モデルを使った分子モーターの運動シミュレーション結果

4つの分子モーターユニットを連結した分子モーターシステムの運動。ポテンシャルマップ上の遷移として分子モーターの運動を表現。縦軸が化学エネルギー、横軸が変位(力学エネルギー)を表す。分子モーターは化学エネルギーを消費しながら(上から下に移動)、ポテンシャルにドライブされて、変位を発生(左から右に移動)する。細い矢印は、分子モーターユニットがそれぞれ1個で働いた場合の経路。太い矢印は、システム中で働いた場合の経路。このモデルでは、分子モーターが環境に応じて遷移経路を自律的に変えることが示される。

構成すると、自律的に機能を調節するシステムが実現できる可能性を示唆している。

このモデルから予想される、分子モーターシステムの運動特性は、ユニットステップのステッピングレート(ユニットステップの前後比)が、分子モーターユニットのそれと比較して、数倍低くなることである(Tanaka, Biophys. Soc. annual meeting, 2008, 2010)。また、運動速度の分布も変化することが予想される。こうした変化を直接測定しモデル実証を達成するため、分子モーターユニット&システムの運動を高空間分解能で測定する計測装置が重要となる。これまでに装置の作成は終えており、現在、装置の調整・改良を行いつつ分子測定を継続中である。

5. 自己評価

研究課題1(数理モデル構築)

目標: 分子モーターの、システム化のアルゴリズム・構築原理の数理的解明(モデル構築)

達成: ポテンシャル駆動をベースとした運動モデルを構築。1分子 & 分子モーターシステムの運動を再現するモデルの構築を達成

問題点: モデル構築の手法にランダムサーチ過程を加えたため、モデル構築に時間がかかる。構築したモデルの特徴抽出手法の開発が必要

研究課題2(実験的検証)

目標: 分子モーターシステム(in vitro motility assay 系のアクチンフィラメントやプローブ)の運動の高時間・高空間分解能測定システムの作製

達成: 高速CCDカメラと蛍光励起シャッター(EOM)を連動させた、蛍光標識分子の高速検出装置を作成

問題点: 高精度、大量データの取得を行う必要があり、EOMからのレーザー出力の安定化(フィードバックシステム)と、自動解析システムの検討が必要

研究課題3(数理モデル構築)

目標: 分子モーターの運動発生過程を変調するマニピュレーション手法の検討と開発

達成: 1分子測定の実験結果をベースとして、計算機シミュレーションを用いて分子モーターの運動を変調するマニピュレーション手法(測定プローブ)の提案。実験装置作成への提案を継続中。

問題点: 計算に時間がかかるため、実験手法(マニピュレーション法)における細部の条件検討に時間がかかる。

研究課題4(実験的検証)

目標: 分子モーターシステムの運動発生過程を高空間分解能で解析するための実験手法の作成と、測定によるモデルの実験的検証

達成: 分子モーターシステム中の分子モーターの位置(運動)を高速検出するための、レーザー強度、シャッター速度、蛍光色素、溶液条件の選定を継続中

問題点: 蛍光分子の位置を高精度で決定する操作(PC)に時間がかかり、蛍光色素の選定、溶液条件の検索、レーザー調整の条件検討に時間がかかる

6. 研究総括の見解

分子モーターの、システム化のアルゴリズム・構築原理の数理的解明(モデル構築)については、ポテンシャル駆動をベースとした運動モデルを構築し、1分子 & 分子モーターシステムの運動を再現するモデルの構築したことは、評価する。また、分子モーターシステムの運動の高時間・高空間分解能測定システムの作製についても、高速CCDカメラと蛍光励起シャッター(EOM)を連動させた、蛍光標識分子の高速検出装置を完成させた。この装置を駆使し、今後、新しいナノバイオの原理が生まれることを期待する。

7. 今後の展開

さがけ研究の期間を経て、開始当初の予定より遅れたが基礎となる部分(数理モデル構築、計測装置作成とも)の構築を達成した。さがけ研究機関中に、こうした数理モデル等の成果は学会での発表は行ってきたが、論文発表が間に合わなかった。今後、まず、これらの数理モデルの研究成果を論文にて発表を行っていくこと予定している。

今後の発展として、本研究で取り扱った“ゆらぎ”をベースとした分子システムは、分子モーターシステムだけでなく、他の多くの生体(分子)システムに応用できることが期待される。しかし、まだ残されている問題も多く、その問題解決と応用が今後の展開と考えている。数理モデル研究での問題点は、①エネルギー入出力 & ポテンシャル概念の一般化、と②機能を実現する

必要条件の抽出、である。今回構築した数理モデルは、分子モーターにある程度特化したものであるためエネルギー入出力やポテンシャルと言った概念が使用できた。他の生体(分子)システムに応用する場合、そうした可観測物理パラメータ以外のパラメータをどのように数理モデルに取り込むか?がポイントとなる。また、数理モデルにおける最も重要な要素(必要条件)をポテンシャル概念からどのように抽出するか?もまた重要なポイントとなる。今後は、こうした残された問題に取り組みつ、モデル構築の応用展開を行って行く予定である。

また、計測装置に関しては、モデルから予想される物理現象を捉える、より高感度な測定法と、高度なマニピュレーション法が期待される。モデルからの予測と組み合わせて計測を進めることで、大きな展開が期待できる。生体(分子)システムの理解に必要な情報を取得するため、モデルから最適な外部摂動(変調、マニピュレーション)を予測し、それを実験的に実行するための測定装置を作成・改良・調整し実験を行い検証する。

今後、数理モデルと分子計測を平行して進めて行くことで、生体システムの動作機構解明への展開を試みていく予定である。

8. 主な論文等

【A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの】

① 論文

1. Tanaka H, Homma K, White HD, Yanagida T, Ikebe M., Smooth muscle myosin phosphorylated at single head shows sustained mechanical activity., *J. Biol. Chem.*, vol.283(23), p.15611-8, 2008.

② 著書

1. 非侵襲・可視化技術ハンドブック、株式会社エヌ・ティー・エス、第7章第3節 生体1分子操作・計測、石島秋彦、井上裕一、福岡創、田中裕人 (2007)

③学会発表

1. Biophysical society 54th annual meeting (2010) MATHEMATICAL MODEL OF MULTIPLE MYOSIN SYSTEM WITH MEASUREMENT PROBES, FOCUSING ON ENERGY EFFICIENCY. Hiroto Tanaka

2. 日本生物物理学会第47回年会(2009) 多分子ミオシンシステムの運動モデル(測定プローブの影響を含めたエネルギー効率の視点から) Mathematical model of multiple myosin system with measurement probes, focusing on energy efficiency. Hiroto Tanaka

3. Biophysical society 53rd annual meeting (2009) Construction of myosin model explaining difference between experimental results observed with scanning probe and optical tweezers. Hiroto Tanaka

4. Joint meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress (2008) Mathematical Model Of Myosin Motor Focused On Interaction Length Of Single Myosin (stepsize) And Multiple Myosin System (sliding Distance). Hiroto Tanaka, Akihiko Ishijima

【B. 本研究課題に関連した成果で主なもの】

①論文

1. Okada T, Tanaka H, Iwane AH, Kitamura K, Ikebe M, Yanagida T., The diffusive search mechanism of processive myosin class-V motor involves directional steps along actin subunits., *Biochem Biophys Res Commun.*, vol.354(2), p.379-84, 2007.