

# 研究報告書

## 「分子複合体と動物個体での機能を結ぶ1分子可視化計測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 12 月～平成 27 年 3 月

研究者: 茅 元司

### 1. 研究のねらい

筋肉の収縮は、サルコメアとよばれる周期構造の中央に位置するミオシンフィラメント上のミオシンが周りを囲むアクチンフィラメントに相互作用し、アクチンフィラメントをサルコメア中央方向に引きこむことで収縮を引き起こす。本研究では、まず1分子計測技術を駆使して、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメント1本ずつが相互作用する最小単位の収縮系を再構成し、ミオシン1分子とミオシンフィラメント(ミオシン集合体)の動態を直接かつ同時に捉える実験系を構築する。この実験からミオシン1分子の機能がミオシン集合体の機能発現にどのように拡張されていくのか検討する。またこうした実験データを元にシミュレーションモデルを構築し、理論的な理解を深め、さらに得られたモデルパラメータを用いて、サルコメア3次元構造を加味したシミュレーションを行い、サルコメア内における動態を予測する。この予測データを検証するために、マウス骨格筋サルコメア内のタンパク質に GFP を融合させたタンパク質を発現させて、in vivo サルコメア動態を計測する実験系を構築し、シミュレーション予測と合わせて、サルコメア内におけるタンパク質の機能発現を検討する。このような1分子計測と in vivo サルコメア計測、そしてこの階層間のギャップをつなぐシミュレーションという3つの研究アプローチの構成から、ミオシン1分子の機能が、ミオシンフィラメント、サルコメア構造レベルといった高次の階層構造における収縮機能発現にどのように拡張されていくのか統合的に理解していく。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

1分子計測においては、ミオシン1分子の動態を直接とらえるためにミオシン制御軽鎖を大腸菌で発現させたビオチンタグ入り制御軽鎖と入れ替え、そこにアビジンコーティングした金コロイド粒子(Φ20-30nm)を結合させ、その散乱像を高速度カメラで撮影した(10000 フレーム/秒)。また同時にミオシンフィラメントの発した力を計測するため、NEM化処理したミオシンをコーティングしたビーズ(Φ400nm)をアクチン片端に結合させて、光ピンセットでビーズをトラップすることにより、ミオシンと相互作用中の力を計測した(図1a)。この計測からミオシンフィラメントの発する力とそのフィラメント上にある1分子の動態を同時にとらえることに初めて成功した(図1b)。

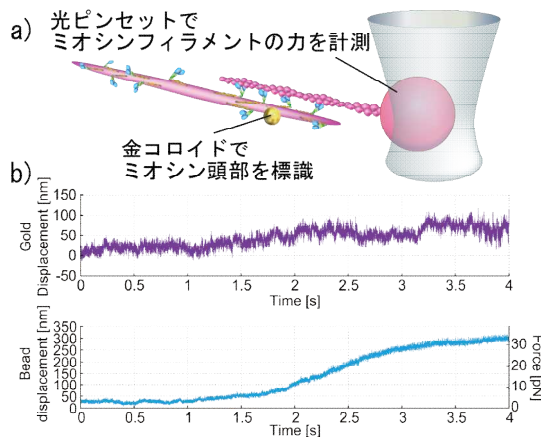


図1 a) ミオシン1分子とミオシンフィラメントの動態を同時計測する実験系, b) ミオシン頭部の変位と集合体による力波形。

ミオシンフィラメントの発する力を解析すると(1mM ATP)、30pN 前後の大きな力を発生させていることがわかった。さらにステップ状に変化する力波形が観測され、特に高負荷におけるステップ状の力発生は、ミオシン1分子では不可能であり、複数の分子が同期して力発生する協同的な特性を示唆する結果である。そこでシミュレーションモデルを構築し、ミオシン分子間の力発生が同期するメカニズムについて検討した。実験データを再現するようにパラメータを推定した結果、低負荷から高負荷にかけて同期して力発生するミオシン分子数が増加する特性がみえてきた。力発生の同期現象を起こす因子として、負荷依存的に力発生状態の遷移率が変化する特性が重要であることがわかった。またパワーストロークとよばれる構造変化による力発生が2段階あると、1段階の場合に比べ同期する確率が上がることも判明した。

このシミュレーションモデルをもとに、サルコメア構造内でのアクチンの変位を予測した。その結果、等尺性収縮(サルコメア長一定)においても、その内部にあるアクチンは揺らいていることが予測された。こうしたアクチン1本の揺らぎを予測した報告はない。そこで、アクチン先端に局在するトロポモジュリンを標識すれば、アクチンの変位を評価できると考え、トロポモジュリン-GFP をエレクトロポレーションによりマウス前頸骨筋に発現させることを試みた。その結果、トロポモジュリン-GFP の発現による縞状の蛍光像が観測され(図 2)、今後はアクチン一本一本の変位を捉えるために発現量の調整や背景光の削減などの検討が必要である。

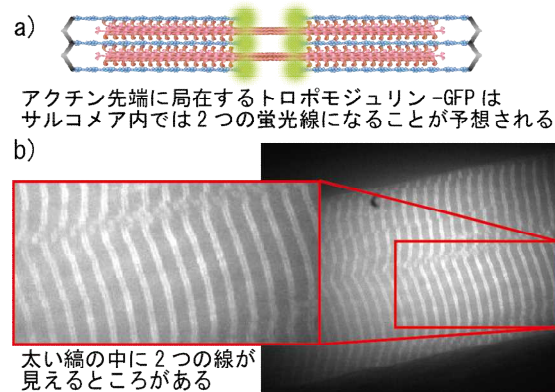


図2 a) 予想されるトロポモジュリンの局在位置と蛍光像(2重線の蛍光像), b) マウス筋肉内におけるトロポモジュリン-GFPの発現。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「ミオシン1分子とミオシン集合体の動態を同時に可視化する1分子計測」

このテーマの達成にあたり、ミオシン1分子とその集合体の動態を同時にとらえる光学系の開発が必須であり、金コロイドの散乱像を獲得する光学系と光ピンセット光学系を組み合わせた顕微鏡を開発することに成功した(図 3)。またミオシンの制御軽鎖にビオチンタグを入れるにあたり、当初はN末端のみに入れていたが、C末端と両方に入れることでアビジン化金コロイド粒子との結合能があがった、また bifunctional にすることにより金粒子の揺らぎを抑え S/N 比を上げることに成功し、ミオシン頭部の動態をとらえるにあたり、より有効な標識が可能となった。これまで分子モーター頭部単体を金粒子で標識し、その動態をとらえた報告はいくつかあるが、この分子を含む集合体の動態も同時に捉え得る光学系の開発は、本研究が初めてである。この実験系を用いて現時点までに多数のデータを獲得しており、ミオシン1分子頭部の動態と同時に、ミオシン集合体の動態を計測することに成功している。現在はその解析法を模索中であり、最終的には、これらの実験データからミオシン1分子の機能とその分子集合体の機能の関わりを明らかにしたい。またシミュレーションで判明してきたミオシン分子間の協同性に重要な因子である負荷依存的な結合時間の変化、2段階の構造変化などについても

これらのデータから検討していきたい。

### 研究テーマ B「階層間の機能をつなぐシミュレーションモデルの開発」

研究テーマ A におけるミオシンフィラメントの力計測から、上記概要で述べたようなミオシン分子間の協同的な力発生が予想され、その分子メカニズムを明らかにするシミュレーションモデルを構築することに成功した。具体的に説明すると、構造変化に伴う力発生状態の遷移率が負荷依存的であることにより、高負荷においては

遷移率が低い。各分子がアクチンに結合した状態でスタックする。ここである分子の相互作用でアクチンが動き始めると、スタックした分子のストレインがリリースされ、それにより遷移率が上昇し次の状態へ移行できるようになり、構造変化に伴って力発生を一斉に始める。このような負荷依存的な遷移率特性が、ミオシン分子間の力発生を同期させる仕組みである。さらに力発生の同期は、2 段階の構造変化による力発生を持つ場合のほうが、1 段階の場合よりも頻繁に起こることも判明し、2 段階の構造変化による力発生の重要性も示唆された。こうしたミオシン分子間の力発生が同期する可能性を1分子レベルで実験的に示し、そのメカニズムを解く理論モデルを構築できたことは大きな意義があると考えている。さらに、このモデルをもとに in vivo サルコメア構造内におけるダイナミクスを予測するモデルを構築したことにより、これまでは想像されてこなかった、等尺性収縮時におけるアクチンフィラメントの揺らぎ(伸び縮み)を予想できたことは、今後の in vivo サルコメア内における計測の意義をもたらすものである。

### 研究テーマ C「マウス in vivo サルコメア内における収縮タンパク質動態の計測」

研究テーマ B のシミュレーションモデルからサルコメア内におけるアクチンフィラメントが等尺性収縮であっても、ダイナミックに揺らいでいる可能性が予測された。そこで、この興味深い現象を検証するために、アクチン先端に局在するトロポモジュリンに着目し、トロポモジュリン-GFP をエレクトロポレーションにより発現させた。当初、様々な方法でタンパク質の発現方法について検討したが、比較的若い3週齢程度のマウスに対してエレクトロポレーションにより発現させる方法が最も発現効率が高いことが判明した。発現したトロポモジュリン-GFP を観察したところ、太い縞状の蛍光が見える(図 3)。しかし予想していた細い2本の縞は殆ど観察されなかった。場所により、2本の縞がみえるが、10nm オーダーでの変位をとらえるに十分な S/N 比ではない。おそらく共焦点顕微鏡の観察面である筋線維表面だけでなく深部でも発現しており、これらの GFP 蛍光像が重なるため、シャープな2重線がかき消され、太い1本の線にみえるのだと推測している。今後は、こうした問題点を解決することが in vivo サルコメア計測では重要であると考えている。

本研究の in vivo 計測は、マウス麻酔下での計測ゆえに、マウスの呼吸や拍動により観察視野が揺らぐこと、さらに電気刺激による筋収縮を起こすと観察視野が一瞬にして顕微鏡視野から外れてしまう問題があり、これらの問題点を解決するためのリアルタイムフィードバック

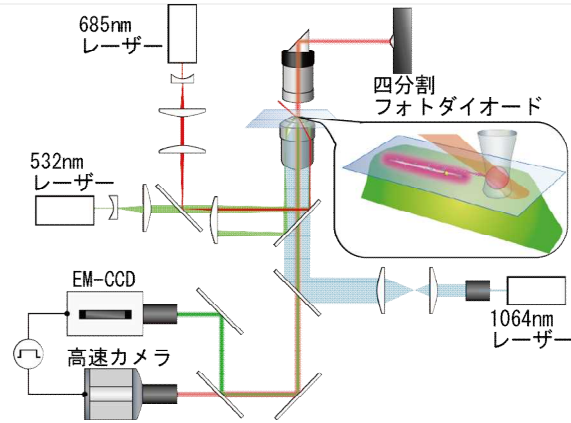


図 3 ミオシン頭部に標識した金コロイド散乱像の変位とミオシンフィラメントの力を計測する顕微鏡の概要。

制御による電動ステージの開発が必要であった。マウス筋肉に蛍光ビーズを注入すると、共焦点顕微鏡観察面より表層の筋線維膜表面付近にビーズは付着する。本研究で開発した顕微鏡では、顕微鏡から出射した光をダイクロイックミラーで、650nm 以上の波長とそれ以下の波長に切り分け、650nm 以下の蛍光は共焦点顕微鏡へ、それ以上の蛍光は高速カメラに投影させた。さらに、高速カメラ前に位置する結像レンズの位置を調整し、筋線維膜表面付近に焦点を結ぶように調整し、その面付近に付着した蛍光ビーズ像のみを高速撮影し、PC 画面上で追跡するビーズを指定して、その重心座標をリアルタイムに計算することで、呼吸や筋収縮による視野の移動量を算出し、1ms 毎にステージコントローラーに移動量コマンドをおくり、ターゲットビーズの位置を常に一定に保つようにステージを動かすリアルタイム制御システムを構築した。この方法により、XY 平面の制御には成功した。しかし、呼吸や収縮による移動は3次元的に起こるため、今後は Z 方向の制御もする必要があることが判明した。何れにしても、生きた動物における in vivo 計測にむけたリアルタイムフィードバック制御システム構築の足がかりとなるものができ、完成にむけた課題も見えてきたのは大きな成果である。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A の1分子計測においては、今後より詳細な解析を進めて、この計測でしか議論することの出来ない1分子の機能とその集合体機能の関わりについて明らかにしていきたい。また、シミュレーションモデルから提唱された負荷依存的な特性、2段階の構造変化なども検証することができるため、こうした検討項目についても考察していく。シミュレーションモデルでは、より3次元的なサルコメア立体構造、また現在はアクチンやミオシンを剛体として近似しているが、これらを弾性体として扱い、より現実的なサルコメア構造を加味したモデルでサルコメア動態をシミュレーションしていく。in vivo 計測においては、まず GFP 融合タンパク質を発現させた筋肉から一本の筋線維を単離し、また除膜した skinned fiber においてトロポモジュリン GFP の蛍光像を観察していく。この実験では、筋肉での in vivo 計測に比べ背景光の影響が少ないので、このような好条件下においてアクチンフィラメントの揺らぎを計測することが可能か検討したい。skinned fiber での力計測は確立された手法であり、ここに発現させたタンパク質の蛍光画像の同時計測を組み込むことで、新しい計測手法が確立できると期待している。ステージのリアルタイムフィードバック制御に関しては、Z(奥行き)方向における制御も必要であることが判明した。この制御には、一般的には対物レンズポジショナーが用いられるが、本研究では高速な制御が必要であり、対物レンズポジショナーは不向きである。今後は、高速に Z 方向のフォーカスを可変できる制御方法を開発していく。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

テーマ A の1分子計測については、達成率 70%程度であり、今後の継続的な計測と解析が必要である。この実験は、マイクロ秒で 1-2nm の精度での計測が要求され、極めてチャレンジングな1分子計測で、こうした精度での計測ができる実験系を構築できたことには満足してい

る。この実験の特徴はミオシン 1 分子の動態とミオシン集合体の動態を同時に直接とらえて、タンパク質 1 分子の機能と集合体の機能の繋がりを直接評価できる点である。従って、ここから得られる知見は、生物物理分野をはじめ生命機能分野全般において大いに注目が集まると期待している。

テーマ B のシミュレーションは、かなり完成度の高いものが出来たと感じている、達成度は 90%程度と感じており、特に分子間の協動的な力発生のメカニズムを提唱することが出来たのは大きい。さらに、サルコメア構造といった高次の階層構造で起きうるダイナミクスを予測し、興味深い現象を示唆できたことには満足している。今後、このモデルを発展させて、より現実的なサルコメア構造や力学特性を加味すれば、多くの筋肉や心臓研究者の実験データをシミュレートすることのできるモデルが構築できる。特に心臓疾患モデルのシミュレーションや手術後の心機能評価の評価などにも役立ち、医療現場でのツールとしての発展も期待できる。

テーマ C の *in vivo* サルコメア計測は、まだまだ課題の残る状態であり、達成率 50%程度と感じている。この研究では、マウスを対象とするために解剖学的な処置も必要であり、経験のある技官を雇うことで随分と研究を進めることが出来たとは感じているが、前述したように今後の課題を多く残している。筋肉内で標的タンパク質を発現し、その動態をとらえた研究は極めて稀であり、こうした実験系が確立すると、これまでは免疫染色や電顕といった固定画像に頼ってきた筋ジストロフィーなどの近年注目度の高い筋疾患研究にも有用な計測手法として注目され、普及していくことが期待できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ミオシン1分子とミオシン集合体の動態を同時に可視化する1分子計測を行うために、金コロイドの散乱像を獲得する光学系と光ピンセット光学系を組み合わせた精度の高い顕微鏡の開発に成功したことを高く評価します。

階層間の機能をつなぐシミュレーションモデルを駆使して、*in vivo*において、ミオシン1分子の機能が、オシンフィラメント、サルコメア構造レベルといった高次の階層構造における収縮機能発現にどのように拡張されていくのか、統合的な理解に着実に結びつくことと楽しみにしております。そして、この領域の大きな命題でもある生物の階層構造の理解に貢献するものと思います。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kaya M. and Higuchi H. Stiffness, working stroke, and force of single-myosin molecules in skeletal muscle: elucidation of these mechanical properties via nonlinear elasticity evaluation. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013, 70, 4275-4295

(2) 特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 参考書、総説

1. 茅 元司 2 章 筋肉ミオシン,「1 分子生物学」原田慶恵・石渡信一編 科学同人,2014,20-35.
2. 茅 元司 1 分子レーザートラップ顕微鏡によるアクチンとミオシンの物理化学的ダイナミクスの解析. 特集「生化学に新たな視点を与える技術の開発と応用」生化学,2014,86,174-183.
3. 茅 元司,樋口秀男 筋肉の巧みな収縮メカニズム. 感染・炎症・免疫,2012,42,116-123.

#### 招待講演

1. 茅 元司(2014)1 分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム. 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフィotonicsの展望」筑波大学東京キャンパス文京校舎.
2. 茅 元司(2014)1 分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く. 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」国立京都国際会館.
3. Motoshi Kaya (2014) Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. Gordon Research Conference (Muscle & Molecular Motors), Mount Snow Resort West Dover, VT USA.
4. 茅 元司(2013)骨格筋ミオシン分子複合体の力発生に特化したミオシン 1 分子の特性とダイナミクス. 第 51 回日本生物物理学会年会シンポジウム「少数個分子の協同が生み出す生命機能のメカニズム」国立京都国際会館.
5. Motoshi Kaya and Hideo Higuchi (2012) Effect of non-linear elasticity of skeletal myosins on force generation in muscle. 56th annual meeting of Biophysical Society, Motility subgroup symposium, San Diego USA.