

研究報告書

「階層構造を有する ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製」

研究期間：平成 20 年 10 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日

研究者：3503 角五 彰

1. 研究のねらい

生体のシステムはその構成要素が高次の階層構造を作り上げることで高度な機能を発現している。例えば骨格筋や心臓などの構成要素は分子モーターであるアクチン・ミオシンというナノオーダーサイズのタンパク質分子である。構成要素となるこれらの分子だけではダイナミックな運動やポンプなどの機能を果たすことができない。生体内ではこれらの分子が繊維状の集合体をつくり、それらが配向してサルコメアという筋節となり、さらに筋繊維、筋原繊維とスケールを上げるとともに高次の階層構造が付与されていく。このように高次に渡る秩序構造を持つことではじめて生体システムの高度な機能発現が可能となる。その機能は構成要素の単なる総和とは明らかに異なっている。このような非線形的な機能発現は創発といわれ、生体システムの持つ最大の特徴である。生体システムに見られる階層構造は各々の構成要素が ATP や GTP などの化学エネルギーを消費しながら能動的な自己組織化により作り上げられる。生体の運動システムの主な構成要素には上に挙げたアクチン以外にチューブリンというタンパク質分子も含まれる。興味深いことにこれらの要素は全ての真核生物に存在し、しかも種間での保存性が非常に高いことが知られる。このことは階層構造の組み立て原理があらゆる生き物で共通であることを示唆している。

本研究では生体運動システムの構成要素であるアクチン/ミオシン、チューブリン/キネシンをマシンやデバイスのビルディングブロックとして捉え、これらを能動的に自己組織化させながら集積することで、数マイクロから数十マイクロに及ぶバンドル状、リング状などの多分子集合体の創成を目指す。

研究課題

1) 能動的自己組織化原理に基づく生体分子モーター高次元集積法の確立

エネルギー(ATP)散逸系で生体分子モーター間の相互作用を制御することで多様な高次元集合体集積法の確立を目指す。

2) 生体分子モーター高次元集合体の創発機能発現とその機構解明

課題 1) で創製した生体分子モーター高次元集合体を ATP 依存的に運動発現させるとともに発現機能を構造の観点から考察する。

上記課題が達成されるとこれまで実現されたことのない高効率・高機能な ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製が可能となる。これらは生体適合性が期待されることや ATP をエネルギー源としていることから生体内で利用可能なアクチュエーターとしても期待できる。また階層構造と運動機能における創発との関係を調べることで生体動力システム特有の非線形現象を理解できると期待される。

2, 研究成果

課題：生体分子モーター能動的自己組織化法の確立（チューブリン/キネシン系）

チューブリンモノマーから構成される微小管は円筒状の構造を有し、生体内では細胞骨格として細胞の形態支持、また分子モーターであるキネシンとともに機能することで細胞内での物質輸送、細胞分裂時の紡錘系形成などに関与している。このキネシンを固定した基板上で極性をもった微小管はATP共存のもと一方向に滑り運動を発現する。本研究ではこの滑り運動を利用しながら微小管を能動的に集積していくことを着想した。微小管同士に引力相互作用を持たせるため、ビオチン(Bt)およびストレプトアビジン(St)を微小管表面に修飾する。Bt-St間の強い相互作用によりキネシン上で滑り運動する微小管はある距離まで近づくと自発的に集合体を形成する(Figure 1)。

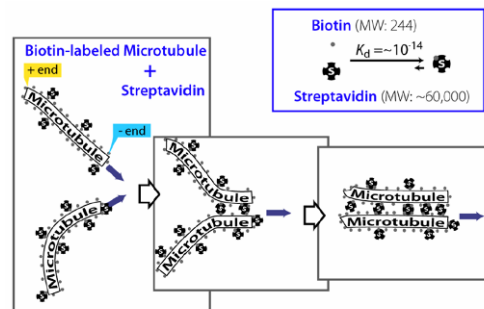


Figure 1. Schematic illustration of the active self-organization of MTs

次に、微小管の能動的自己組織化における微小管密度(チューブリン濃度換算) Bt-St 修飾比の影響について検討した(Figure 2)。微小管の集合体形成は運動開始直後から観察され4時間後にはBt-St修飾比率、チューブリン濃度に応じて様々な形態(バンドル状、ネットワーク状、リング状)の集合体が形成されることがわかった。またリング状の微小管集合体はバンドルとネットワーク形成条件の間で特異的に現われていることもわかった。バンドルやリング状の微小管集合体の並進あるいは回転する速度(約 30 nm/s)は集積化する前のビオチン修飾微小管1本の速度(約 27 nm/s)とほぼ同程度であることから集合体が単一極性を有するものと考察された。これは、相反した極性を持つフィラメントが能動的自己組織化過程で排除されていくためであると考えられる。リング状集合体のサイズは直径 1μm から 40μm と広く分布することがわかった(Figure 3)。リングの速度はサイズにほとんど依存しないことがわかった。

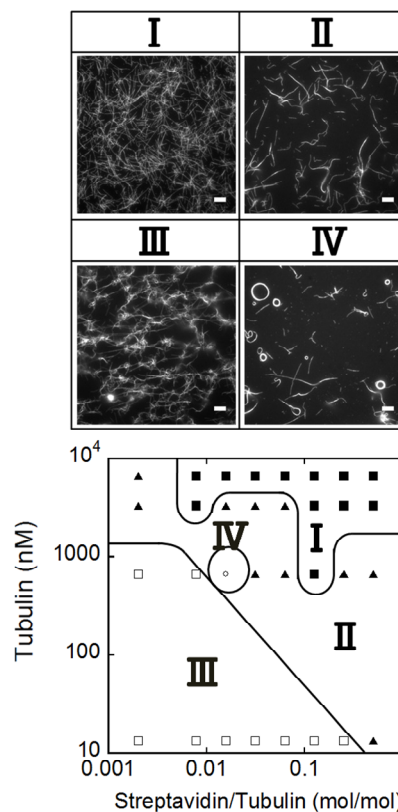


Figure 2: FM image and phase diagram for the morphology of MTs assemblies after 4h of active self-organization on the kinesin-fixed surface. Effect of the streptavidin and tubulin concentration on the morphology of MTs assembly. I: network, II: Bundle, III: Single filament, IV: Ring.

また、リングは2次元平面内で回転しているため回転方向に対して対称性が生じる。形成されたリングでは左回転(93%、n=222)：右回転(7%、n=16)と大きな差が生じることがわかった。透過型電子顕微鏡(TEM)観察により左回転が優勢に観察されたリング系では主に左巻き螺旋構造を有する微小管により構成されていることが推測された。これより回転方向の優勢と微小管のフィラメント構造に何らかの相関があることが示された。

課題：リング状微小管集合体の回転方向制御。次に微小管の構造(プロトフィラメント数(PF))に着目しリング状の微小管集合体の回転方向の制御を目指した。系統的な研究の結果、微小管の重合時のインキュベーション時間に依存し回転方向の優先性が変化すること

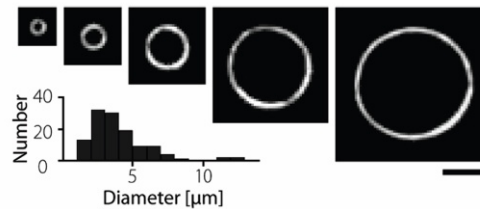


Figure 3. Size distribution and motility assay of aggregated MTs in ring-shape. (a) Images of ring-shaped MT bundles with various sizes and their size distribution: scale bar, 5 μ m.

とがわかった (Figure4)。同時にインキュベーション時間に伴う PF 数の増加が観察され、これより微小管の螺旋構造変化(左巻き 右巻き)が推測された (Figure 5)。

また GTP の非加水分解アナログ (GMPCPP) を用いた微小管の能動的自己組織化により、曲げ剛性も集合体の構造形態に大きく影響することがわかった。このようにフィラメントレベルの構造が集合体の構造形態さらに集合体の運動性に大きく影響してくることがわかった。非平衡系でエネルギー散逸的に構築される構造体は環境の変化にも自律的に応答したリモデリングが可能であると推測される。

課題：リング状微小管集合体のサイズ制御。

これまで得られたリング状微小管集合体の直径サイズは nm ~ 数十 μ m と大きな分散性がある。リング状微小管集合体そのものをビルディングブロックとして利用する際にはサイズの分散性を抑える必要がある。試行の過程で、能動的自己組織化を気液界面で行うとリングサイズの揃ったリング状微小管集合体を得ることがわかった。そこで気液界面で Motility assay を可能にするシステムを構築し新たな生体分子モーター集積法を確立した (未発表)。

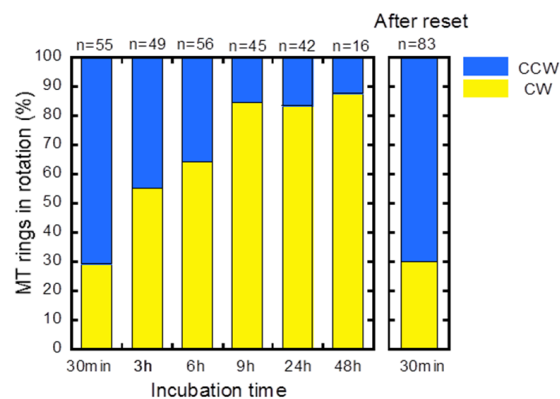


Figure 4. Effect of incubation time of MTs formation on the preferential rotation of MTs ring formed by Active Self-Organization on kinesin-fixed surface.

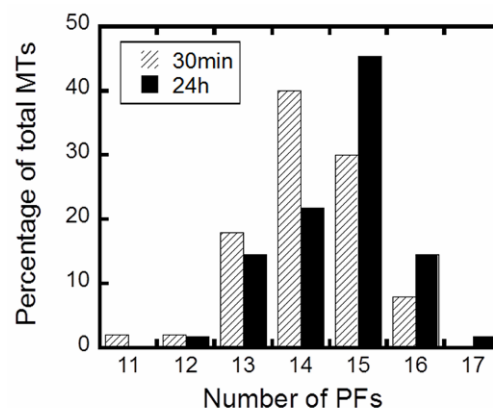


Figure 5. Distribution of PFs number of MTs prepared by 30 minutes (shadow) (n=50) and 24 hours (dark) (n=55) incubation at 37 $^{\circ}$ C.

Figure 6 はキネシン上で ATP に依存して滑り運動している微小管へ気液界面を接触させたときに観察される微小管の蛍光イメージである。気液界面に接触している微小管がリング状の集合体を形成していることが確認される。今回、得られたリング状集合体のサイズを評価したところ、平均直径が約 $1.8\mu\text{m}$ 、標準偏差が約 $0.4\mu\text{m}$ となり、これは気液界面を利用しない能動的自己組織化法で作成したリング状集合体(平均直径が約 $3.9\mu\text{m}$ 、標準偏差が約 $2.2\mu\text{m}$)と比べサイズ、分散性ともに小さいことがわかった。また本系におけるリング状微小管集合体の収率は気液界面法で 50% と非常に効率が良いこともわかった(能動的自己組織化法では 0.4%)。また微小管のリング形成過程を *in situ* でかつリアルタイムでの観察に初めて成功した。

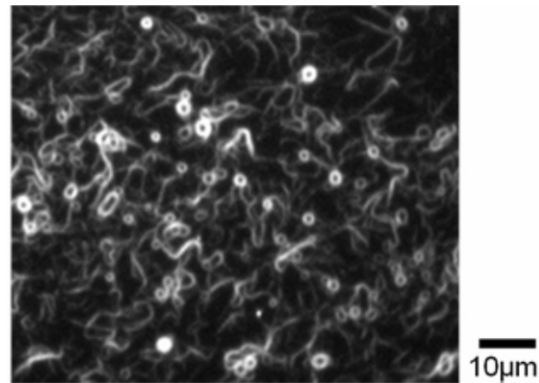


Figure 6. Typical morphology of MT assemblies formed at the air-buffer interface. The image was captured under fluorescence microscope. Scale bar: $10\mu\text{m}$.

課題：微小管集合体の秩序構造形成における非対称重合場の効果。

生体システムは、非平衡かつ非対称な環境で秩序構造を形成し維持している。自己組織化過程における時空間情報も高次構造形成には必要不可欠なものであると考えられる。こ

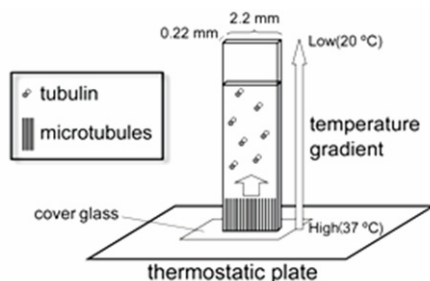


Figure 7. Schematic illustration of the experimental setup for preparing highly oriented MTs by using asymmetric polymerization conditions induced by a temperature gradient in a confined space

のような解釈の基、温度勾配を用いた非対称的な重合場で配向微小管集合体の作成を試みた。Figure 7 に示すように高濃度のチューブリンが入ったキャピラリー($2.2\text{mm} \times 0.22\text{mm} \times 25\text{mm}$) に温度勾配をかけると下端から長軸に沿って強い複屈折が現れることがわかった(Figure 8)。

蛍光顕微鏡でキャピラリー内を評価すると配向した微小管集合体が観察された。さらに配向微小管集合体に GFP-キネシンを相互作用させ ATP 存在下で GFP-キネシンの運動方向

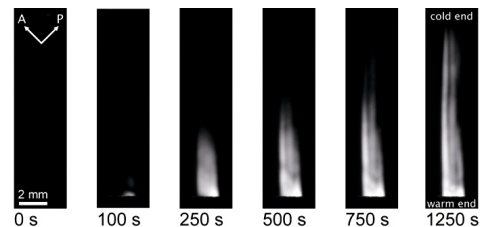


Figure 8 Cross-polarizing microscopic images of the MT assembly prepared using a temperature gradient in a confined space.

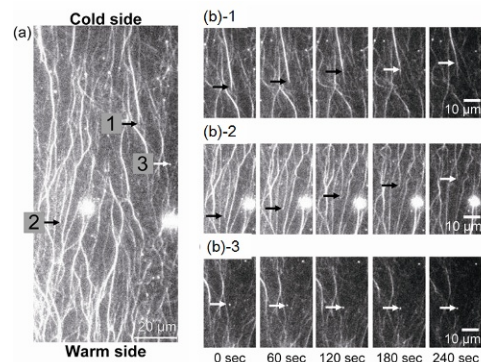


Figure9. Motility of GFP-kinesins on the MT assembly. (a) FM image of GFP-kinesins on MTs. (b)-1 and (b)-2, Enlarged fluorescence images of GFP-kinesins moving toward the cold end. (b)-3 GFP-kinesins moving toward the warm end along the MT tracks.

を追跡するとその多く（90%）が上端に向かうことがわかった(Figure 9)。キネシンは微小管の+端方向へと運動するため、微小管はプラス端を上方に向け配向していることがわかる。このように自己組織化と非対称環境を組み合わせることで生体分子モーター集合体にセンチメートルオーダーの構造秩序を付与することが可能となった。

課題：生体分子モーター能動的自己組織化法の確立（アクチン/ミオシン系）

アクチン/ミオシンは筋肉の主要構成成分である。これらの分子はイオン強度に応じて分散・凝集状態を変化させる。アクチン/ミオシンから成る凝集体はアクトミオシンと呼ばれる。アクトミオシンの凝集過程に剪断応力を印可しながら縮合剤(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide)で架橋することで繊維状のアクトミオシゲルが得られる(A Kakugo et. al. Adv. Mater 2003)。本課題では得られるアクトミオシゲルを ATP 依存的に収縮・弛緩させながら能動的に自己配向させることを目指した。Figure 10 は ATP 添加直後から収縮するアクトミオシゲルのタイムラプス像である。

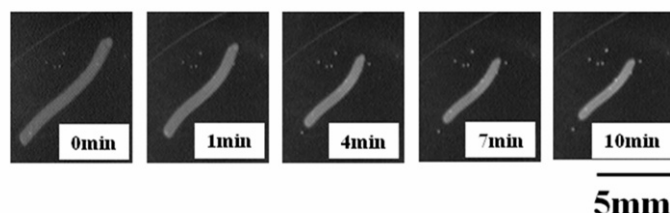


Figure 10. Time-lapse images of AM gel shrinking upon the addition of 5 mM ATP

アクトミオシゲルは主に長軸方向を収縮させながら 10 分後には収縮前の 70%の長さになる。収縮率の時間依存性を未架橋アクトミオシン(Native)とアクトミオシゲル(Gel)で比較する

と、ゲル化により収縮率が4%程度、初期収縮速度が200%程度増加していることが分かった。また化学架橋されたアクトミオシゲルは繰り返し収縮・弛緩に耐えられるほどの力学強度を有することが分かった。さらにアクトミオシゲルの収縮速度は収縮・弛緩を繰り返すことで増加することも明らかとなった(Figure11)。図11ではアクトミオシゲルの収縮速度は6%/min (First run)から15%/min(Second run)へと増加している。偏光顕微鏡

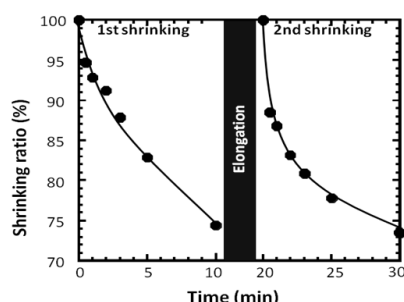


Figure 11 Time profile of repeat shrinking of AM gels upon the addition of ATP. The AM gels were stretched for 10 min to their original lengths in low-

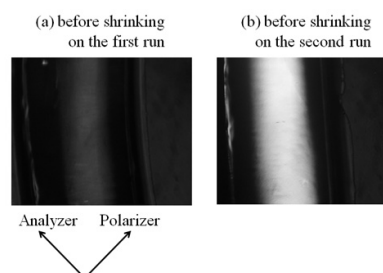


Figure 12. Polarized light microscopic (PLM) images of AM gels (a) before shrinking in the first run and (b) before shrinking in the second run.

を用い収縮後のアクトミオシゲルを観察したところ大域に複屈折性が発現していることが分かった(Figure12)。これはアクトミオシゲルに配向秩序が形成されていることを示唆するものである。このようにアクトミオシゲルを ATP 依存的に収縮・弛緩させることで能動的に自律配向させることに成功した。

課題：生体分子モーターの耐用時間評価と延長化。

生体分子モーターの実用化に向け耐用時間の延長が重要な課題となる。生体分子モーターは熱や圧力変化、表面物性、浸透圧、pHなどの物理的、化学的あるいは分解酵素などの生化学的要因により構造変化し、運動にかかわる機能を失う。また活性酸素種（ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドイオン、一重項酸素等）による酸化変性も機能失活に関わる。これまで生体分子モーターの *in vitro* motility assay にはグルコースオキシダーゼとカタラーゼを組み合わせた酵素系の活性酸素種の除去システム（スカベンジャー）が一般に用いられてきた。これは活性酸素種の元となる酸素そのものを除去するシステムである。しかし、このスカベンジャーでは過酸化水素などのより強い酸化剤が発生することなどから効果は数時間程度しか持続しないものであった。本課題では嫌気チャンバー(ICS)を導入することで生体分子モーターの耐用時間の延長を目指した。Figure13 に ICS の概略図を示す。耐用時間は ICS 内でキネシン・微小管系の Assay セルを構築しその運動持続性から評価した。従来の酵素系では数時間後には完全に運動が停止してしまうのに対し ICS 内では 10h 後でもほぼ 100% 近くの微小管が運動しているのが確認された。微小管の運動性は最長 8 日間まで持続可能であることがわかった。このように生体分子モーターの耐用時間を数時間程度から一週間近くまで延長することに成功した。

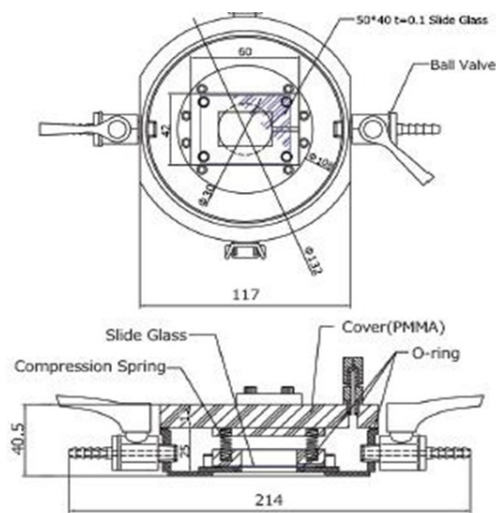


Figure 13. Design of inert chamber. Numbers in the figure indicate distance in mm.

3, 今後の展開

構造と機能との相関をさらに詳しく調べていくことで生体システムの階層構造の役割や機能創発現象についても新たな見解を与えると期待している。今後、分子モーターの自己組織化を時空間的にも制御することでさらに高次の階層構造を有する集合体を作り上げていく予定である。また ATP をエネルギー源とすることから生体環境に近い条件で駆動する高効率な運動素子としても期待される。今後は物質やエネルギー供給の許される非平衡系の特徴を生かした自己修復型運動素子の創製を目指していきたい。

4, 自己評価

生体分子モーターの能動的自己組織化における微小管集合体の構造決定因子を明らかにした。リング状集合体に焦点を絞り、フィラメント構造と回転運動方向との相関を示した。秩序構造形成における非対称環境場の重要性を示した。生体分子モーター集合体の自律配向特性を見出した。新規課題を設定し、生体分子モーターの耐用時間を大幅に延長した。

これらの成果から、当初の目的に対し概ね達成できたと評価した。

5, 研究総括の見解

生体システムの高度な機能発現は、高次にわたる秩序構造を持つことではじめて可能となる。その機能は構成要素の単なる総和とは明らかに異なっている。このような非線形的な機能発現は創発といわれ、そのメカニズムを解明することは、本領域の最重要課題である。

本研究では生体運動システムの構成要素であるアクチン/ミオシン、チューブリン/キネシンをビルディングブロックとして捉え、これらを自己組織化させながら集積することで、数マイクロから数十マイクロに及ぶ多分子集合体運動素子の創成を目指している。

角五氏は微小管集合体の並進あるいは回転する速度は集積化する前の微小管 1 本の速度 (約 27 nm/s) とほぼ同程度であることから、集合体が単一極性を有するという重要な知見を見出した。これは、相反した極性を持つフィラメントは能動的自己組織化過程で排除されていくためではないかと考察された。またインキュベーション時間に伴う微小管の螺旋構造変化 (左巻き 右巻き) や、GTP の非加水分解アナログ (GMPCPP) を用いた曲げ剛性変化も集合体の運動形態に大きく影響を与えることを示した。さらに、キャピラリー内で配向した微小管集合体の多く (90%) が上端に向かうことから、微小管はプラス端を上方に向け配向していること、アクトミオシンゲルを ATP 依存的に収縮・弛緩させることで能動的に自律配向させることなど数々の重要な知見をあきらかにした。

自己組織化と非対称環境を組み合わせることで生体分子モーター集合体にセンチメートルオーダーの構造秩序を付与することが可能となり、しかも、自己組織化に伴う、運動性変化を対応させたことは創発という現代科学のもっとも重要な課題解明の契機となるもので高く評価されよう。上記課題が引き続き進展することにより、これまで実現されなかった高効率・高機能の ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製が可能となることも将来期待される。

6, 主な研究成果リスト

- 1) Kakugo, A.; Tamura, Y.; Shikinaka, K.; Yoshida, M.; Kawamura, R.; Furukawa, H.; Osada, Y.; Gong, J. "Formation of Well-Oriented Microtubules with Preferential Polarity in a Confined Space under a Temperature Gradient" *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131, 18089-18095.
- 2) Kawamura, R.; Kakugo, A.; Osada, Y.; Gong, J. "Selective Formation of a Linear-Shaped Bundle of Microtubules" *Langmuir* 2010, 26, 533-537.
- 3) Kabir, A.; Inoue, D.; Kakugo, A.; Kamei, A.; Gong, J. "Prolongation of the Active Lifetime of a Biomolecular Motor for in Vitro Motility Assay by Using an Inert Atmosphere" *Langmuir* 2011, 27, 13659-13668.
- 4) Kakugo, A.; Kabir, A.; Hosoda, N.; Shikinaka, K.; Gong, J., "Controlled Clockwise-Counterclockwise Motion of the Ring-Shaped Microtubules Assembly"

Biomacromolecules 2011, 12, 3394-3399.

5) Tamura, Y.; Kawamura, R.; Shikinaka, K.; Kakugo, A.; Osada, Y.; Gong, J.; Mayama, H. "Dynamic self-organization and polymorphism of microtubule assembly through active interactions with kinesin" *Soft Matter* 2011, 7, 5654-5659.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

著書

1) 角五彰、龔劍萍 「ATP 駆動型ソフトバイオマシンの創製」、『未来を動かすソフトアクチュエータ-高分子・生体材料を中心とした研究開発-』、シーエムシー出版、第 31 章 p322-331 (2010)

2) 角五彰、龔劍萍 超分子サイエンス&テクノロジー 「生体分子モーターの集積化と機能化 ATP 駆動型バイオマシンの創製 」 p869-879 (2009)

解説総説

1) Kabir, A.; Kakugo, A.; Sada, K.; Gong, J. Osada, Y. " How to Integrate Biological Motors towards Bio-Actuators Fueled by ATP " *Macromolecular Bioscience* 2011, 11, 1314-1324.

2) 井上大介、角五彰、龔劍萍 「生体分子モーターの動的自己組織化が生むエキゾチック機能」化学工業7月号、第62巻、7号、1-5

3) 角五彰、龔劍萍 「人工生体組織の創製に向けた取り組み」-生物物理10月号、第50巻5号 244-247 (2010)

4) 角五彰、龔劍萍 「ATP駆動型のゲル運動システム」、未来材料、vol18, No8, 40-44 (2009)