総説

荷電粒子の微小管上の1次元ブラウン運動 —非特異的で緩やかな分子間相互作用のモデル—

箕浦逸史, 武藤悦子 (独)理化学研究所

To understand the mechanism underlying the one-dimensional (1D) Brownian motion of proteins, we analyzed the behaviors of counterions along microtubules using the electroorientation method and compared these with the 1D Brownian motion of charged nanoparticles. Both results demonstrated that during 1D Brownian motion, each positively charged nanoparticle behaves as a polycation constrained within the electrostatic field around the microtubules. Owing to the polyelectrolytic nature of microtubules, nanoparticles can move along microtubules with a diffusion constant independent of the charge density of the microtubules. The study highlights the possibility that 1D Brownian motion of proteins is based on a similar, nonspecific charge-dependent mechanism.

One-dimensional Brownian motion / microtubule / polyelectrolyte / electrostatic interaction

1. 微小管の長軸に沿った1次元ブラウン運動

タンパク質間の相互作用は、しばしば「鍵と鍵穴」に例えられ、その結合は一般に特異的かつ強固なものと考えられている。しかし近年、モーター分子をはじめとする様々な細胞骨格関連タンパクが、アクチンや微小管などのフィラメント上で1次元(1D)ブラウン運動を示す例が次々と報告され(図1a)^{1),2)}、その分子間相互作用は「鍵と鍵穴」とはかなり様相が異なることが明らかになりつつある。

1Dブラウン運動においては、静電相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。その根拠としては、(1)溶液の塩濃度を上げていくと運動持続時間が短縮すること、(2)微小管上のブラウン運動の場合に、チューブリン分子のC末端に集中する負荷電アミノ酸や微小管結合タンパクの正荷電アミノ酸を人為的に削ると、1Dブラウン運動が不安定化することがあげられる。

微小管上でタンパク分子が、静電相互作用を基盤として1Dブラウン運動を行う仕組みとして、2つの異なる考え方が可能である³⁾⁻⁵⁾。1つは、微小管上に4 nmごとの間隔で並ぶチューブリンのC末のポリペプチド鎖に対して、タンパクは静電的な結合解離を繰り返して、ジャングルでツタの間を渡り歩くターザンのよう

に運動するという考え方(図1b上)。もう1つは、微小管は全体として非常に強く負に帯電し、長軸方向に等ポテンシャル面を形成しているため、正電荷を帯びたタンパクはその上を多価イオンとして自由に動き回る、という考え方である(図1b下)。この場合、微小管の負電荷はチューブリンC末に集中している必要はなく、微小管全体の電荷密度が重要と考えられる。

生物学の分野では、微小管の静電相互作用という点、C末の負電荷にスポットライトがあてられることが多く、十分な物理化学的考察がされないまま前者のモデルが仮定される傾向にあった。しかし最近のわれわれの計測は、1Dブラウン運動の基本的メカニズムとして後者を支持する結果となったので、以下にその概要を報告したい。

2. 微小管の表面電荷の挙動を調べる

微小管は、非常に多くの負電荷を帯びており、一種の高分子電解質とみることができる。一般に塩溶液中の高分子電解質は、静電相互作用により表面に多くの対イオンが集積している。これらの対イオンにとって、高分子電解質は長軸方向に等ポテンシャルであり、対イオンはその長軸に沿って自由に動き回ることができる^{6),7)}。高分子電解質の理論によれば、もし高

One-dimensional Brownian Motion of Charged Particles along Microtubules: A Model System for Weak, Nonspecific Interactions

Itsushi MINOURA and Etsuko MUTO

Brain Science Institute, RIKEN

※図1-図3は、電子ジャーナル(<http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>)ではカラー版を掲載しています。

図 1
1D ブラウン運動とそのモデル. (a) 全反射顕微鏡で観察した単頭キネシン KIF1A の 1D ブラウン運動. 写真は 0.5 秒ごとの連続写真で、輝点が KIF1A、横線が微小管. (b) ブラウン運動の 2 つのモデル. (上) タンパク分子は、負電荷アミノ酸の集中するチューブリン C 末端との間で、静電的な結合・解離を繰り返すことによって、微小管の長軸に沿った運動を行う. (下) 多価イオンであるタンパク分子は、負電荷を帯びた微小管の静電場に緩く拘束されつつ、微小管の長軸方向には自由に動き回る.

分子電解質の負電荷が増えると、それに応じて表面に集積する対イオンの数も増えるが、お互いの電荷は打ち消しあうため静電場の大きさは一定に保たれ、対イオンの運動性は高分子電解質の電荷密度に影響を受けないことが予想される.

ここから類推してわれわれは、微小管結合タンパク

が示す 1D ブラウン運動も、多価イオンであるタンパク分子が、微小管上の等ポテンシャル面を微小管の長軸方向に動き回ることによって起きているのではないだろうか、と考えた (図 1b 下).

この仮説を検証するため、まず最初にわれわれは、微小管上の対イオンの挙動が微小管の持つ電場の大きさやどう相関しているか、調べてみた. 溶液中の微小管に外部から高周波電場を与えると、微小管が電気力線方向に配向することが知られている (図 2a). この現象は、交流電場中で微小管上の電荷が振動して双極子モーメントが誘導され、その結果回転トルクが生じて微小管が配向したものと考えられる (図 2b). このとき、微小管が電場から受けるトルクと溶液の粘性抵抗によって受けるトルクはつりあっていると考えられ、微小管の配向速度からその導電率を求めることができる. この方法で求めた微小管の導電率は 1.5×10^2 mS/m で、周囲の水の約 14 倍という大きな値となった⁵⁾. このように大きな導電率はタンパク質やアミノ酸の電子分極で説明することは到底不可能で、もともと微小管の周囲に集積して長軸方向にブラウン運動している対イオンが、外部電場によってその分布に偏りを生じたためと考えられる (対イオンの分極). 実際、溶液のイオン種を変えた計測も、外部電場による対イオン分極を裏付ける結果となった⁵⁾.

高分子電解質の理論からは、対イオン分極の大きさは、微小管の長軸方向の電荷密度に依存することが予想され、線密度が 0.7 e/nm (2 価イオンの場合) 以下の

図 2
交流電場による微小管の配向. (a) 溶液中の微小管に 1 MHz, 9×10^4 V/m の交流電場をかけると、微小管は電場の向きに配向した. (b) 配向中の微小管においては、電場から受ける静電的トルクと溶液の粘性抵抗から受けるトルクがつりあっている. (c) 微小管の導電率は電荷密度と直線関係にある. (d) 微小管の対イオン分極の模式図.

©2006 Elsevier

範囲では、対イオン分極はほとんど起こらないことが予想される。実際に溶液の pH を変化させたり負荷電アミノ酸が集中するチューブリンの C 末端を削除するなどして、微小管の電荷密度と導電率の関係を調べてみると、理論的予想の通り、電荷密度が一定の値以上の範囲できれいな直線関係が成り立った (図 2c)。このことから、微小管の電荷密度に比例して、表面を運動できる対イオンの数が増えることが確かめられた (図 2d)。導電率が対イオン数に比例して増加するということは、個々のイオンの運動性は微小管の電場の大きさによって変化しないということでもある。

3. 荷電ナノビーズで 1D ブラウン運動を再現する

微小管表面に拘束された対イオンが、微小管表面を自由に動き回ることができるように、正の電荷を帯びた粒子やタンパクも、電荷密度や大きさが適当なら、微小管表面の電場に拘束されて、長軸方向に熱運動をすることが予想される (図 3a)。

実際に、アクリルアミドゲルで人工的に合成したナノサイズのビーズに、正の電荷をもつアミノ基を導入し、この荷電ビーズと微小管との相互作用を調べてみ

たところ、アミノ基を導入しない無電荷のビーズでは微小管との相互作用が見られないのに対し、荷電ビーズは微小管に結合し、長軸に沿ってブラウン運動する様子が観察された (図 3b)⁸⁾。ビーズの電荷が増えるにつれその拡散係数は急激に減少し、運動の持続時間は長期化した (図 3c)。どちらのパラメーターもビーズの電荷 Q の指数関数であった (図 3d, e)。

以上の結果に基づいて、われわれは、1D ブラウン運動中の荷電ビーズは微小管への結合 (B 状態) と拡散運動 (A 状態) を繰り返しながら微小管の長軸に沿って動き回り、ある閾値を越える熱エネルギーを得ると、微小管から溶液中に解離する (F 状態)、とする 3 状態モデルを考えた (図 3f)。モデルに基づいて、拡散定数のデータ (図 3d) から結合のエネルギー (B 状態と A 状態のエネルギー差) を求めると、ビーズの電荷あたり $0.1 k_B T$ という値が得られ、一方、持続時間のデータ (図 3e) から、A 状態のビーズが微小管から解離するのに必要な活性化のエネルギーは電荷あたり $0.12 k_B T$ と見積もられた。A 状態のビーズは、多価イオンとして微小管表面の拡散層で動き回っているが、電荷 Q が増えるにつれ、微小管表面の Stern 層 (荷電表面の対イオン固定層) に取り込まれて B 状態

図 3 タンパク質分子の 1D ブラウン運動を荷電ナノビーズで再現する。(a) 作業仮説: 正電荷を帯びた人工的な粒子は、多価イオンとして 1D ブラウン運動を行うことができる。(b) 暗視野顕微鏡で観察した、荷電ナノビーズのブラウン運動 (0.83 秒ごとの連続写真)。(c) 各時間におけるビーズの原点からの移動距離。アミノ基の密度は、(上から) 0.30, 0.55, 0.96 /nm³。(d, e) 拡散係数 (d) と持続時間 (e) の電荷依存性。(f) 1D ブラウン運動の 3 状態モデル。

©2010 Elsevier

になりやすくなり、その結果、拡散係数が減少したと考えられる。つまるところ、微小管上の荷電ビーズの振る舞いは、高分子電解質である微小管上を動き回る多価イオンと同等にみなすことができる（図 1b 下）。

一方、本論冒頭で述べたターザンモデル（図 1b 上）について検証するため、チューブリンの C 末を削除した微小管を使って荷電ビーズのブラウン運動を調べてみたところ、ビーズは C 末を削除した微小管でもほとんど拡散係数を変えずに安定したブラウン運動を示した。C 末との結合・解離は、ビーズの 1D ブラウン運動に必要な不可欠ではないことが明らかになった。C 末の有無にかかわらず同じような大きさの拡散係数が得られたのは、微小管表面で対イオンが集積した結果、C 末の有無にかかわらず微小管の電場がほぼ一定に保たれていたためと推察される。

末節になるが、微小管上で対イオン集積が起きているのに、ビーズ表面では対イオン集積が起これないことを読者は不思議に思われるかもしれないが、われわれの使ったビーズは微小管に比べ電荷密度が一桁低く、対イオン集積が起これなくて当然といえる^{6),7)}。

4. 今後の展開：タンパク質の 1D ブラウン運動

微小管上に展開される 1D ブラウン運動は、微小管の高分子電解質としての性質を基盤とする現象であり、人工的な荷電ビーズのモデルでは、ビーズはあたかも電場に拘束された多価イオンのように振舞っていることが明らかになった。モーターをはじめとするタンパク質分子の 1D ブラウン運動においても、おそらく同様のメカニズムが働いているものと推測される⁸⁾。特異的結合も関与するタンパクの系では、C 末が運動の制御に重要な調節機能を果たしている可能性があり⁹⁾、今後の研究の進展が興味深い。

謝 辞

高分子電解質の理論については大沢文夫博士（愛知工業大学）に多くの御教示を頂きました。荷電ビーズによる 1D ブラウン運動の研究は、片山栄作博士（東京大学）、関本謙博士（パリ第 7 大学）との協力で進められました。この場を借りて深く謝意を表します。

文 献

- 1) Okada, Y., Hirokawa, N. (1999) *Science* **283**, 1152-1157.
- 2) Iwaki, M. *et al.* (2006) *Biophys. J.* **90**, 3643-3652.
- 3) Okada, Y., Hirokawa, N. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 640-645.
- 4) Ramey, V. H. *et al.* (2011) *Mol. Biol. Cell* **22**, 457-466.
- 5) Minoura, I., Muto, E. (2006) *Biophys. J.* **90**, 3739-3748.
- 6) Oosawa, F. (1971) *Polyelectrolytes*, pp. 13-26, Marcel Dekker, New York.
- 7) Manning, G. S. (1972) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **23**, 117-140.
- 8) Minoura, I. *et al.* (2010) *Biophys. J.* **98**, 1589-1597.
- 9) Minoura, I. *et al.* (2010) *生物物理* **50** (Suppl. 2), S54.

箕浦逸史

箕浦逸史（みのうら いつし）

理化学研究所脳科学総合研究センター研究員
1996 年日本学術振興会特別研究員、99 年東京大学大学院理学系研究科修了。博士（理学）。岡崎基礎生物学研究所協力研究員を経て 2001 年より現職。

研究内容：タンパク質間相互作用におけるゆらぎの役割を物理化学、生理学の両面から解析している。
連絡先：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
E-mail: minoura@brain.riken.jp

武藤悦子

武藤悦子（むとう えつこ）

理化学研究所脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究内容：微小管とモータータンパクの相互作用解析

連絡先：〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

E-mail: emuto2@brain.riken.jp

URL: <http://mtu.brain.riken.jp/indexJap.html>