

Visualization of individual heavy meromyosin molecules by fluorescence microscopy and force measurement of rigor bond by atomic force microscopy

著者	国岡 由紀
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
volume	平成8年6月
page range	153-157
year	1996-06-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/16025">http://hdl.handle.net/2297/16025</a>

氏名	国岡由紀
生年月日	
本籍	岡山県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第182号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Visualization of individual heavy meromyosin molecules by fluorescence microscopy and force measurement of the rigor bond by atomic force microscopy (単一ヘビメロミオシン分子の蛍光顕微鏡での可視化とAFMによるリゴール結合力測定)
論文審査委員	(主査) 安藤敏夫 (副査) 板垣英治, 鈴木健之 桜井勝, 大橋信喜美

## 学位論文要旨

The purpose of the present study is to open a way to study uni-molecular physiology of actomyosin motor. Observation of a system consisting of an ensemble of molecules scarcely leads to elucidation of elementary processes of physiological actin, since they are often hidden by averaging out. Observation of uni-molecular behavior, on the other hand, can allow a direct evaluation of what we see. In uni-molecular physiology it is technically essential to visualize individual molecules. In the present study I first developed a method to visualize, by fluorescence microscopy, individual heavy meromyosin (HMM) molecules of skeletal muscle. In the first step monobiotin cadaverine was incorporated into the S2 region of HMM with the aid of catalysis by guinea pig liver transglutaminase. The enzymatic biotinylation altered neither the actin-activated ATPase activity of HMM nor the ability of HMM to actuate actin filaments to slide. Then Ultra-avidin-coated fluorescent nanoparticle that had been developed in our laboratory was attached to the biotinylated sample. The attachment of the tag to the biotinylated HMM also did not alter the motile activity of HMM. Then using an atomic force microscopy integrated with an epifluorescence microscope, the interaction force was measured, between a single HMM molecule at the apex of an AFM cantilever tip, and actin bundle fixed onto cover slip. The tip was brought very close to a single HMM bound to an actin bundle that had been fixed onto a cover slip, and was scanned around the pinpointed HMM molecule. By this procedure a single HMM molecule was successfully captured at the apex of a cantilever. The measurement of "force-distance curve" allowed us to detect binding and unbinding behavior between a single HMM and actin. The force required to break the rigor bond was 16pN on average. As shown in this study we now became able to handle and manipulate a single HMM molecule and to make

a direct observation of its mechanical behavior.

筋肉の収縮は2種類のタンパク質、アクチンとミオシンが、ATP加水分解の際に放出される化学結合エネルギーを利用して、互いに滑り運動をすることによっておこる。アクチンは直径約5 nmの球状分子が繊維状に重合したものである。ミオシンは、球状のヘッド(S1)と繊維状のテールからなり、2つの重鎖がテール部分でコイルドコイルを形成し、双頭構造をとっている。これまでの研究によって、ミオシンのS1部分にATP加水分解活性と運動活性があることがわかっている。しかし、ATPの加水分解で放出される化学エネルギーを、どのように力学的エネルギーに変換しているのかはまだ明らかになっていない。このエネルギー変換のメカニズムを探るためには、エネルギー変換機能の最小単位である単一モータータンパク分子の化学-力学特性を知ることが必要であると考えられる。近年、多くの研究者がこの問題に取り組んでおり、我々の研究室では、単一HMM分子と、単一ATP分子を蛍光顕微鏡下で可視化し、原子間力顕微鏡(AFM)と組み合わせて、HMMとATPの相互作用と力発生の様子を同時に観察することを目標に研究を行っている。本研究では1モータータンパク分子の発生する力の測定と滑り運動の観察のための実験系を確立することを目標に、単一ヘビーメロミオシン(HMM)分子を蛍光顕微鏡での可視化を中心に必要な技術の開発を行った。蛍光顕微鏡に組み込まれた原子間力顕微鏡(AFM)へこれを応用し、アクチン-HMM間のリゴール結合の垂直方向の破断力を測定した。

### 単一 HMM 分子の可視化

アビディン-ビオチン間の特異的結合を利用し、HMMに非常に明るい蛍光性ビーズを導入するために、HMM分子の運動活性を損なわずにビオチンを導入する方法の開発と、蛍光性ビーズの検討を行った。

モルモット肝臓由来のトランスグルタミナーゼを用いて、HMMのS2部分にダンシルカダベリンを導入できることを示した(図1)。HMM1分子あたり最大4分子のダンシルカダベリンが導入された。ダンシルカダベリンに替えて、ビオチンカダベリンも同様に導入されることを確かめた。HMMの活性部位はS1であることがわかっているので、S2にラベルを導入してもHMMの活性に変化はないと考えられる。このことを確認するため、HMMのアクチンアクティベーターATPase活性の測定(図2)と、インヴィトロ運動アッセイ系を用いてHMMがアクチンフィラメントを滑り運動させるときの平均滑り速度の測定(表1)を行ったところ、ビオチン化による変化はなかった。

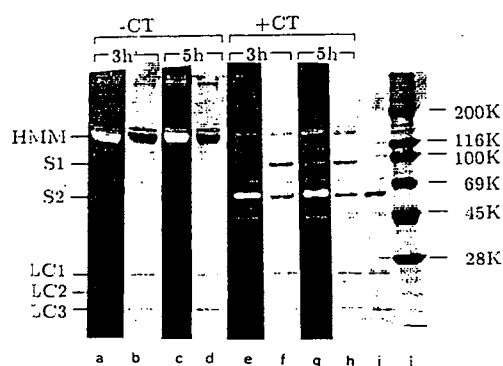


図1 トランスグルタミナーゼ反応によって導入されたダンシルカダベリンのHMM分子内の位置

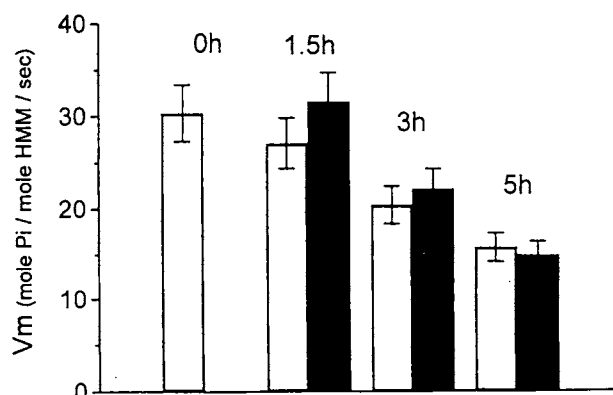


図2 HMMのアクチンアクティベーターATPase活性に対するビオチンカダベリン導入の影響。

本研究で使用する蛍光性ビーズには次の条件が必要である。

1. 蛍光顕微鏡で一個一個が確認できるよう充分明るいこと
2. アクトHMM間の相互作用を妨げないために、数十nm以下の大きさであること
3. アクチン、HMMに対し吸着しないこと

市販の蛍光性ビーズを試したところ、この条件に合うものは無かったので、我々の研究室で合成したものを使用することにした。このビーズは、サイズ、結合する蛍光色素の量、ビーズ表面の化学的性質を自由にコントロールすることができるので都合が良い。これを利用して、上の3つの条件を満たすビーズを作成することができた。この蛍光性ビーズをビオチン化HMMに結合させるために、ビオチンを共有結合させ、アビディンでコートすることにした。アビディンの誘導体であるウルトラアビディンが、タンパク質やガラスに対する吸着が少なく本研究の目的に最も適していた。精製したウルトラアビディン-蛍光性アクリルアミドナノビーズは、HMMやアクチンに吸着せず、また低イオン強度の溶液中ではガラスに吸着しないという優れた性質を持っていた。

以上のように作成したビオチン化HMMとウルトラアビディン-蛍光性アクリルアミドナノビーズを溶液中で混合して、HMM-ビーズ複合体を形成させた。このとき、少量のビオチン化HMMに対して過剰量のビーズを加えたので、一個のビーズに2個以上のHMMが結合している確立は非常に低い。さらにこれをアクチンアフィニティーカラムで精製したので、HMMを結合していないビーズや、精製途中で活性を失ったHMMは取り除かれた。HMMはビーズと結合しても、インヴィトロ運動アッセイ系で、未処理のHMMと同じ速度でアクチンフィラメントを走らせることができた(表1)。従って「蛍光顕微鏡で見える1個の輝点には、必ず1個の活性を持ったモータータンパク分子が存在し、それ以外の場所にはモータータンパク分子は無い」という状態を実現できた。

表1 HMMとHMM-ビーズ複合体上のアクチンフィラメント滑り速度。

	Nitrocellulose-coated cover slip ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	UltraAvidin-bead-coated cover slip ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )
Control <sup>a</sup>	4.8 $\pm$ 1.0 (n=34)	— <sup>c</sup>
Biotinylated HMM <sup>b</sup>	4.7 $\pm$ 0.9 (n=34)	4.5 $\pm$ 0.8 (n=35)

### AFMによる力測定

上記の方法で精製したHMM-ビーズ複合体と、アクチンとの間の結合力の測定を試みた。アクチンはプラス電荷を持たせたガラス基盤上に結合させた。このガラス基盤とHMM-ビーズとの吸着を防ぐため、アクチンを太いバンドル(束)にした。

以下のようにして「ピンポイントアプローチ」により、AFM探針先端にHMM-ビーズを結合させた。ガラス基盤上にアクチンバンドルを結合させ、そこに、HMM-ビーズをリゴール結合させた。アクチンバンドル上に結合したビーズの蛍光像を確認しながら、ビオチンを共有結合させた探針先端をビーズに近づける。蛍光顕微鏡の分解能では、ビーズと探針を約数百nm程度に近づけるのが限界である。そこで、ビーズと探針先端の蛍光像の位置を一致させた後、探針を1 $\mu\text{m}$ 四方にわたってゆっくりとスキャンさせた。その後、探針をガラス基盤表面から引き上げるとアクチンバンドル上からビーズの蛍光像が消え、探針先端にビーズの像が確認された。

次に、HMM 1分子を結合したAFM探針先端を、アクチンバンドルの像の真上に移動させ、アク

チンバンドルとの間のフォースーディスタンスカーブを測定した(図3)。ここで縦軸の力はプラス方向が斥力を、マイナス方向が引力を表す。HMMのアクチンバンドルへの結合と解離の際の両方の力が測定された(図3 a)。ATP存在下ではこのような現象は見られないことから、アクチン-HMM間のリゴール結合力であると推定される。同じ場所でもり返し測定することができ、リゴール結合の破断力は $16 \pm 5\text{pN}$  ( $n=30$ )であった。ATP存在下ではこのような力の現象は見られないことから、アクチン-HMM間のリゴール結合の破断であると推定される。この力は同じ場所でもり返し測定することができ、破断力は $16 \pm 5\text{pN}$  ( $n=30$ )であった。単一HMM分子とアクチンフィラメント間のリゴール結合の垂直方向の破断力はこれまで測定されたことが無かった。この実験によって、「生きた」HMM分子へのピンポイントアプローチと、マイクロマニピュレーションが可能であることが示された。

以上のように、HMM-ビーズを用いて、AFMによりモータータンパク1分子を自由に操作し、その発生する力を測定することが可能になった。このことは、今後の「一分子生理学」の研究の発展に大きく寄与するものである。

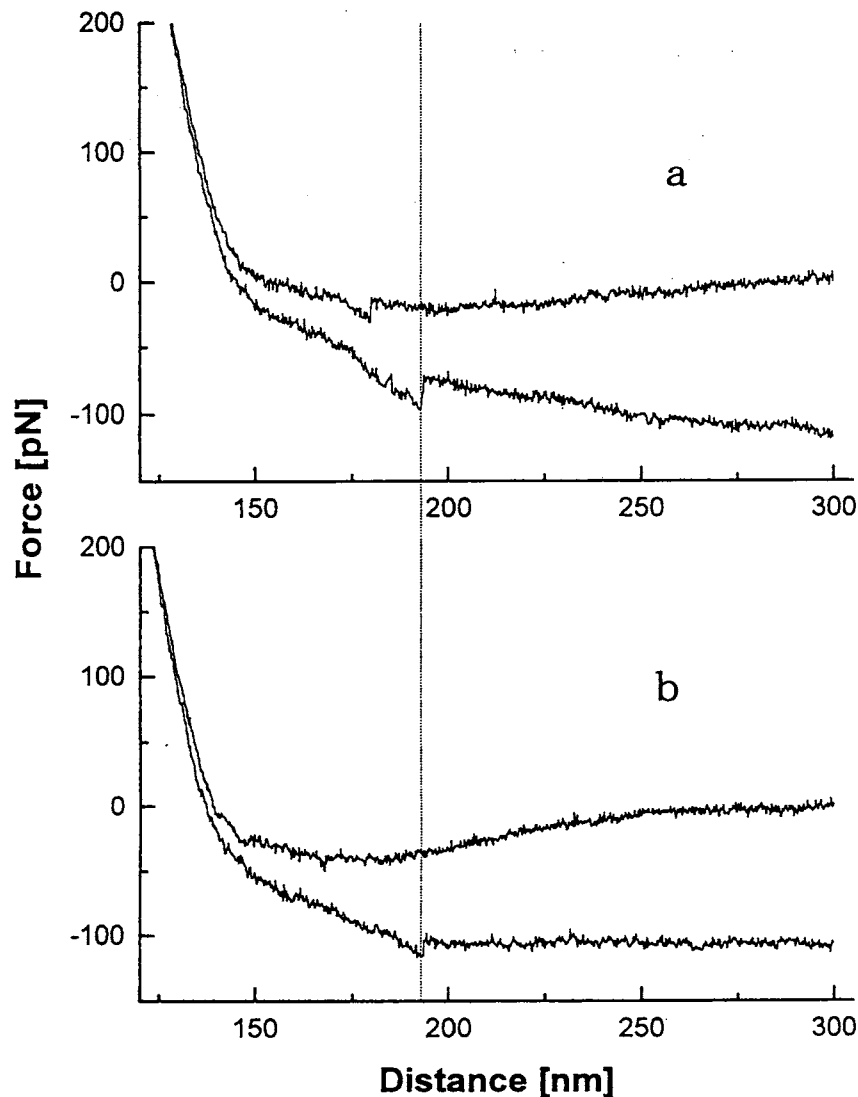


図3 HMM-アクチン間のフォースーディスタンスカーブ

## 学位論文の審査結果の要旨

平成8年2月6日に理学部431号室に於いて、国岡由紀の学位申請に対し、口頭発表及び質疑応答を90分間にわたり行い別記5名の教官で審査した。学位論文の研究において、アクトミオシンモータータンパク質系の働きを1分子レベルで調べる「1分子生理学」を展開することによりこのタンパク質系の機能発現現象の基本的問題点を明白にすることを目指し、1分子生理学を實踐するに必要な技術開発及び1分子生理現象の一部観察・測定を行った。まず、モータータンパク質1分子を蛍光顕微鏡で可視化するための技術開発を行った。これは、タンパク質に非特異的に吸着しない蛍光性超微粒子の合成、モータータンパク質の機能を損なわない標識法の開発からなる。その結果、運動活性を保ったままでヘビメロミオシン(HMM)分子1分子を蛍光顕微鏡下で可視化することに成功した。また、標識位置を生化学的手法及び原子間力顕微鏡(AFM)・電子顕微鏡観察により同定した。標識位置はHMM分子S2部のC末端のすぐそばにあるグルタミンであった。これは機能に重要なミオシン頭部から一番遠い所に位置する。次に、この可視化されたHMM1分子のアクチン上での滑り運動観察を試みた。ATP存在化でのアクチンとHMMとの間の弱い親和性のためにHMM分子はアクチンから容易に離れてブラウン運動により観察視野からすぐに消えてしまう。従って、1分子の振る舞いを追跡することはできない。この困難を克服するために、蛍光性超微粒子にマグネタイトを導入、また蛍光顕微鏡に磁気回路を組んだ。これによりHMM1分子の追跡を可能にした。例数は少ないものの1分子の滑り運動を観察した。その滑り速度は滑り運動に対する古典的なアイデアでは説明できないものであった。最後に、HMM1分子をAFMカンチレバー探針先端に捉え、その1分子と基板に固定されたアクチンとの相互作用をAFMで観察した。ヌクレオチドの存在しないときのそれらの結合の力(ライガー結合力)を16pNと求め、それらの認識距離が最少10nmであることを明らかにした。HMM1分子の滑り運動及びタンパク質1分子に働く力・認識距離を直接観察・測定できたことは世界で初めての成功である。以上、学位論文の研究内容は非常にレベルの高いものであり、欧文誌に掲載する論文も良く書けていて一流の仕事と判断できる。よって、本学位申請に対し審査委員全員一致して博士(理学)の学位を授与できるものと判断し合格と判定した。