

# Mechanochemical Coupling in Brain Myosin V

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Ando, Toshio メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00034795">https://doi.org/10.24517/00034795</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



# 脳ミオシンVの化学・力学カップリング

(課題番号：12480198)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金

(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 **安藤 敏夫**

金沢大学附属図書館 研究科 教授)



0400-07355-2

491.41  
A552

# 脳ミオシンVの化学・力学カップリング

(課題番号 12480198)

平成12-14年度科学研究費補助金 基盤 (B) (2)

研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 安藤敏夫

(金沢大学大学院自然科学研究科教授)

発行者寄贈

## 目次

表紙	1
目次	2
1 はじめに	3
2 研究発表	5
学術雑誌	
解説・総説	
著書	
国際会議基調講演	
国際会議など招待講演	
国内会議招待講演	
口頭発表・ポスター	
3 研究内容・成果の概略	10
<u>3-1. ミオシンVのプロセッシブ運動の証明</u>	
<u>3-2. ミオシンVのプロセッシブ運動の詳細解析</u>	
<u>3-3. 単頭ミオシンVの調製と特性</u>	
<u>3-4. 単頭ミオシンVから再構成した双頭ミオシンVの運動</u>	
<u>3-5. ビーズの運動（無生物でもアクチンフィラメント上を滑走するか）</u>	
<u>3-6. 高速 AFM によるミオシンVの動態撮影</u>	
<u>3-7. ファッシンで束化されたアクチンフィラメントとミオシンVの相互作用</u>	
4 未発表データ	15
<u>4-1. ミオシンVのプロセッシブ運動の詳細解析</u>	
<u>4-2. 単頭ミオシンVの調製と特性</u>	
<u>4-3. 単頭ミオシンVから再構成した双頭ミオシンVの運動</u>	
<u>4-4. ビーズの運動（無生物でもアクチンフィラメント上を滑走するか）</u>	
<u>4-5. 高速 AFM によるミオシンVの動態撮影</u>	
5 発表論文・解説・総説	23

## 1 はじめに

この5年ほどの間のミオシンに関する研究の大きな進展の第一は「ミオシンスーパーファミリー」の発見であろう。これは生化学を超えた細胞生物学の発展によるところが大きい。わが国のミオシン研究は筋肉の研究に始まり、多くの生化学者がミオシンを含めた筋肉の研究に世界的貢献をしてきた。しかし、その後ミオシンの生化学はもう終わったとして他の分野に移ってってしまった生化学者が多く、細胞生物学の隆盛により「ミオシンスーパーファミリー」が次々と発見される中でわが国の貢献がはなはだ少ないのは極めて残念なことである。非筋肉細胞にもアクチンが存在することをわが国が最初に見出しているにも拘らず、この伝統は長く継承されてこなかった。唯一植物のミオシンX Iで貢献しているのみである。ミオシンスーパーファミリーの中でもひととき注目され比較的多くの研究が成されたのはミオシンVであった。メキシコの生化学者が脳に存在するミオシンを検索するなかで発見され、米国との共同研究を通して精製法も確立された。他方、皮膚の色に異常のあるマウスの原因遺伝子の検索を通して、ミオシンVが色素顆粒を運搬することが突き止められた。細胞内での役割から、ミオシンVはアクチンフィラメント上を1分子で連続的に運動するモータータンパク質（プロセッシブモーター）であることが示唆された。スタンフォード大の Spudich のグループはレーザートラップ法を使って、ひよこ脳から精製したミオシンVが数ステップ連続的に運動し、そのステップの大きさが約 36nm であることを突き止めた。しかし、固定されたアクチンフィラメント上をミオシンVが1分子で連続的に運動することは示されていない。我々の研究室ではそのことを明確に示すために、アクチンフィラメントの基板への固定法、ミオシンVの蛍光染色法を確立し、ミオシンVが極めて長距離連続的に運動することを示すことに成功した(Sakamoto et al., BBRC 272:586-590 (2000))。この簡便な方法はその後広くミオシンVの研究に用いられるようになった。他方、ミオシンVのATPase反応の研究が、Sweeneyの研究室でネックの短いS1の発現系を用いて行われ、ADPの放出が律速段階になっていること、ADPの親和性がATPよりも高いこと、Actin-activated ATPase活性が10/s程度であることが示された。しかし、Actin-activated ATPase活性については組織から精製したものでは1/s程度であることが我々の研究室でも他の研究室でも示された。Sakamotoらの研究により、ミオシンV1分子の運動速度は最大1 $\mu$  m/s程度であり、ATPase活性から判断して1ATP分解あたり400nm程度、すなわち10ステップ以上運動することになる。

本研究の当初の目的は、1ATP分解あたり1ステップなのか10ステップ以上であるのかの真偽を明らかにすることにあつた。ミオシンVのプロセッシブ運動を様々な条件で測定し真偽を明らかにすべく検討を行ったが、この目的のためには単頭ミオシンVの調製が必須と判断し、その調製法及び単頭ミオシンVの性質の研究、及び単頭ミオシンVから双頭ミオシンVの再構成の研究を開始した。また、1ATP分解あたり複数ステップの可能性が大きいと判断し、ルースカップリングの証明のために無機物である粒子がアクチンフィラメ

ントに沿って運動する可能性を検討した。他方、これまで並行して進めてきた高速原子間力顕微鏡の開発がほぼ同時期に出来上がったため、ミオシンVを材料として高速原子間力顕微鏡による動態撮影も開始した。水溶液中で激しく動くミオシンVを映像として見ることに世界で初めて成功し、この方法の有効性を示す研究に多くの時間を割かざるをえなくなった。この研究は本基盤研究Bの範囲を超えるものではあるが、その成果もこの報告書に記載した。他方、我々の研究と同時期に米国ではミオシンVが1分子で連続運動するという利点を生かして、Sakamotoらが開発したアッセイ法に基づき、2つの頭部がこの運動中にどのように振舞っているかを調べる研究が行われた。所謂 Hand-over-hand モデルの検証である。その結果、少なくとも ATP 濃度が低い場合には Hand-over-hand の様式で連続運動していることが確認された。組織から精製されたミオシンVの Actin-activated ATPase 活性と発現系の活性との大きな違いが何によるものであるかは依然として不明であるが、ミオシンVの尾部が頭部と結合するという報告が出され、組織から精製されたミオシンVではこの結合が ATPase 活性を阻害している可能性がある。ネックの長さがネイティブと同じ HMM 発現系ではやはり活性が高いということが最近示され、尾部の阻害効果が示唆される。この基盤研究Bの3年間という短い期間にも我々の研究室も含めて国内外で予想外の展開がなされた。この基盤Bで当初目指した問題解明に成功したとはいえませんが、更なる問題を発見するとともに、モータータンパク質の動態撮影という新しい試みを実施できたという点で、実りの多い3年間であった。科学研究補助金による支援に感謝したい。

\* 研究組織

研究代表者 安藤 敏夫 (金沢大学大学院自然科学研究科教授)

\* 研究経費

(単位：千円)

	直接経費	間接経費
平成 12 年度	7,200	0
平成 13 年度	1,800	0
平成 14 年度	1,600	0
計	10,600	0

## 2 研究発表

### [学術雑誌]

- 1) T. Sakamoto, I. Amitani, E. Yokota, and T. Ando  
Direct Observation of Processive Movement by Individual Myosin V Molecules.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**:586-590 (2000)
- 2) I. Amitani, T. Sakamoto, and T. Ando  
Link between the Enzymatic Kinetics and Mechanical Behavior in an Actomyosin Motor. *Biophys. J.* **80**:379-397 (2001).
- 3) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda  
A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12468-12472 (2001)
- 4) T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito and A. Toda  
A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Jap. J. Appl. Phys.* **41**:4851-4856 (2002).
- 5) T. Ando  
A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action.  
*Proc. of International Federation for Medical & Biological Engineering*  
**3** (Part2):22-26 (2002).
- 6) T. Ando, N. Kodera, Y. Naito, T. Kinoshita, K. Furuta, and Y.Y. Toyoshima  
A high-speed Atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *ChemPhysChem* **4**:1196-1202 (2003).
- 7) R. Ishikawa, T. Sakamoto, T. Ando, S. Higashi-Fujime and K. Kohama  
Polarized Actin Bundles Formed by Human fascin-1: Their Sliding and Disassembly on Myosin II and Myosin V in vitro. *J. Neurochem.* **87**:676-685 (2003).

### [解説・総説]

- 1) 安藤敏夫 「原子間力顕微鏡でタンパク質の動きをリアルタイムに撮影する」 *ファルマシア* **38**(6):508-512 (2002)
- 2) 安藤敏夫 「リアルタイム AFM」 *電子顕微鏡* **37**(1): 45-50 (2002).
- 3) 安藤敏夫 「解説 高速原子間力顕微鏡—液中ナノメーター世界の高速撮影—」 *生体の科学* **54**(1):54-60 (2002).
- 4) 安藤敏夫 「解説 高速原子間力顕微鏡 —液中ナノメーター世界の高速撮影—」 *化学と工業* (8):877-879 (2002).
- 5) 安藤敏夫 「総説 原子間力顕微鏡—生命科学への適用—」 *生化学* **74**(11):1329-1342 (2002).

- 6) 安藤敏夫 「超高性能顕微鏡を開発して生命現象の謎に迫る – 高速原子間力顕微鏡の開発と動くタンパク質分子の観察」 金沢大学サテライト・プラザミニ講演記録 3(4):1-19 (2002)
- 7) 安藤敏夫 「高速原子間力顕微鏡 – 生体分子のナノダイナミクス撮影 –」 応用物理 72(10):1304-1308 (2003).
- 8) 安藤敏夫 「モータータンパク質の運動が高速 AFM で見えた！」 化学 59(1)28-29 (2004)
- 9) 安藤敏夫、古寺哲幸 「生体分子のナノ動態撮影 – リアルタイム AFM –」 バイオインダストリー (印刷中) .
- 10) 安藤敏夫 「高速原子間力顕微鏡 – 液中ナノメーター世界の高速撮影 –」 金沢大学機器分析センターNEWS 2:3-7 (2003).

#### [著書]

- 1) 安藤敏夫 生体分子の高速ダイナミクス撮影 4章4節 p.395-406 in 「ナノバイオテクノロジーの最前線」 植田充美監修 シーエムシー出版 (2003)

#### [国際会議基調講演]

- 1) European Medical & Biological Engineering Conference (Vienna, 2002年12月)

#### [国際会議など招待講演]

- 1) MIT Seminar (Mechanical/Biological Engineering) (Boston, 2004年2月)
- 2) The 19<sup>th</sup> International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology (奈良, 2003年12月)
- 3) World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (Sydney, 2003年8月)
- 4) Vth Annual Linz Winter Workshop on Single Molecule Techniques in Biophysics and Drug Discovery (Linz, 2003年2月)
- 5) 藤原セミナー (箱根、2002年10月26-30日)  
“A High-speed Atomic Force Microscope for Studying Biological Macromolecules in Action.”
- 6) かずさ DNA 研究所国際シンポジウム (千葉, 2002年2月)
- 7) The 9<sup>th</sup> International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (熱川, 2001年12月)
- 8) International Workshop on Genetic Materials as a Target of Nanotechnology (大阪、12月21日)

#### [国内会議招待講演]

- 1) 精密工学会シンポジウム「バイオ技術と超精密位置決め技術」(東京工業大学、2001年、3月28日)
- 2) モータータンパク質の動作原理を探るワークショップ(東北大学、2001年6月22-23)



- 日) 「ミオシンVの化学・力学カップリング」
- 3) 日本電子顕微鏡学会 SPM 研究部会第 4 回研究会 (2001 年 12 月 2-3 日、出雲玉造温泉) 特別講演「高速原子間力顕微鏡の開発」
  - 4) 東京工業大学吉田研究室セミナー (東京工業大学、2001 年 1 月 18 日) 「高速原子間力顕微鏡 –動くタンパク質の観察–」
  - 5) 電子顕微鏡学会第 58 回学術講演会 医・生物系シンポジウム 生命現象解明のための多彩な SPM 技法の開拓 (大阪国際交流センター、2002 年、5 月 15~16 日) 「リアルタイム AFM」
  - 6) 金沢大学サテライトプラザ ミニ講演 (7 月 5 日) 「超高性能顕微鏡を開発して生命現象の謎に迫る –高速原子間力顕微鏡の開発と動くタンパク質分子の観察–」
  - 7) 第 4 回・振興調整費総合研究全体班会議<アクチン・フィラメントの構造と動態の解析による筋収縮・調節機構の解明> (理化学研究所播磨研究所 SPring-8、2002 年 7 月 22-23 日) 研究推進委員として研究発表 「タンパク質分子のナノ動態撮影」
  - 8) 石川県教育センター教育研究(金沢、2002 年 8 月 8 日) 「高速原子間力顕微鏡の開発」
  - 9) 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会 有機バイオ SPM 研究会 (千葉幕張メッセ、2002 年 9 月 6 日) 「高速走査 SPM –液中ダイナミクス観察–」
  - 10) 解剖学会形態科学シンポジウム (金沢大学医学部記念館、2002 年 10 月 5 日) 「原子間力顕微鏡の動的形態科学への適用」
  - 11) 第 22 回表面科学講演大会 日本表面科学会 (早稲田大学総合学術情報センター、2002 年 11 月 26-28 日) 「高速原子間力顕微鏡–液中ナノメーター世界の高速撮影」
  - 12) 公開シンポジウム バイオイメージングとナノテクノロジー (東京国際フォーラム、2003 年 2 月 20-21 日) 「高速 AFM でタンパク質の動きを見る」
  - 13) 阪大基礎工学部生物工学科セミナー (阪大、2003 年、5 月 14 日) 「動態観察原子間力顕微鏡の開発とモーター蛋白質のダイナミックス」
  - 14) 第 30 回電顕皮膚生物学会学術大会 第 30 回記念企画招請講演 (金沢、2003 年 9 月 13 日) 「高速原子間力顕微鏡 –液中ナノメーター世界の高速撮影–」
  - 15) 日本薬学会第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (金沢、2003 年 11 月 13 日) 企画講演「高速 AFM で見るタンパク質のナノ動態」
  - 16) 東北大学多元物質科学研究所ミニシンポジウム (東北大、2004 年 1 月 14 日) 「高速原子間力顕微鏡 タンパク質のナノ動態撮影」
  - 17) 応用物理学会東海支部基礎セミナー 「バイオナノテクノロジー」 (名古屋工業大学、2004 年 1 月 23 日) 「高速 AFM による生体分子のナノダイナミックス撮影」
  - 18) 日本学術振興会 第 167 委員会セミナー (東京工業大学、2004 年 1 月 29,30 日) 「高速原子間力顕微鏡 (生体分子のナノダイナミックス撮影装置) の最近の展開」
  - 19) 熊本大学拠点形成研究 B 「原子レベルの生命機能と細胞システムへの展開」 主催ミニシンポジウム 「蛋白質の構造と動きを見る」 (熊本大学、2004 年 3 月 9 日) 「蛋白質の動きを観察する高速原子間力顕微鏡」

[口頭発表・ポスター]

- 1) 筋収縮・細胞運動研究会（帝京大学医学部、2001年12月7-8日）  
「高速 AFM で動くタンパク質を見る」（古寺発表）
- 2) 生体運動合同班会議（千葉大、2001年1月7-9日）  
「高速 AFM の開発」（安藤発表）
- 3) 生体運動合同班会議（千葉大、2001年1月7-9日）「単頭ミオシンVのプロセッシング運動」（木下発表）
- 4) 米国生物物理学会年会（San Francisco、2001年2月23-27日）”Analysis of Processive Movement by Myosin V” (T. Ando, T. Sakamoto, T. Kinoshita, M. Yamabuki) *Biophys. J.* 82:409a (2002)
- 5) 「タンパク質の一生」吉田班会議（沖縄ホテルムーンビーチ、2002年、10月27-30日）  
「GroEL/ES の構造変化のリアルタイム計測・イメージング」
- 6) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「アクチンのホットスポットの検出」（高橋輝行、木下達也、安藤敏夫）
- 7) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「高速 AFM による微小管上のキネシン一分子の観察」（古田健也、内藤康行、古寺哲幸、豊島陽子、安藤敏夫）
- 8) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「F1-ATPase からの ATP の解離」（齊藤究、伊香祐子、徳永万喜洋、二井将光、安藤敏夫）
- 9) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「アクチン・ミオシンV系の高速 AFM によるリアルタイム観察」（伊藤誉浩、安藤敏夫）
- 10) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「単頭脳ミオシンVの運動解析」（木下達也、安藤敏夫）
- 11) 日本生物物理学会第40回年会（名古屋大学東山地区、2002年11月2-4日）  
「高速 AFM の開発：生体分子のリアルタイム観察に向けて」（古寺哲幸、矢田部桂、伊藤誉浩、内藤康行、安藤敏夫）
- 12) 生体運動合同班会議（アクロス福岡、2002年、1月9-11日）  
「ミオシンVの運動解析」（衣笠元気、木下達也、高橋輝行、安藤敏夫）
- 13) 生体運動合同班会議（アクロス福岡、2002年1月9-11日）  
「高速 AFM によるモーター分子一分子の動態撮影」（内藤康行、古寺哲幸、伊藤誉浩、古田健也、豊島陽子、安藤敏夫）
- 14) 米国生物物理学会（San Antonio、2002年3月1-5日）  
“Single-headed Myosin V Moves along Actin Filaments” (T. Kinoshita & T. Ando) *Biophys. J.* 84:116a (2003)
- 15) 米国生物物理学会（San Antonio、2002年3月1-5日）  
“Improvements on a High-speed Atomic Force Microscope” (N. Kodera, Y. Naito, T. Ito & T. Ando) *Biophys. J.* 84:467a (2003)

- 16) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「単頭脳ミオシンVの運動解析」木下達也、柳浦大志、安藤敏夫
- 17) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「アクチンのホットスポットの検出」高橋輝行、木下達也、安藤敏夫
- 18) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「高速 AFM による単頭ダイニンの動態撮影」内藤康行、榊原斉、大岩和弘、安藤敏夫
- 19) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「高速 AFM の改良」古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫
- 20) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「高速 AFM による FtsH2 次元結晶のイメージング」又多恵子、安藤敏夫、小椋輝
- 21) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「ミオシンVにおける無負荷プロセッシング運動の高分解能測定」平山潤太、木下達也、安藤敏夫
- 22) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「ミオシンVの尾部の Actin-activated ATPase 活性に与える効果」柳浦大志、木下達也、安藤敏夫
- 23) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
「高速 AFM 用カンチレバーのフッ素修飾」宮城篤、古寺哲幸、安藤敏夫
- 24) 日本生物物理学会第41回年会 (新潟朱鷺メッセ、2003年9月23-25日)  
シンポジウム「アクチン、微小管の知られざる物性とその構造的基盤」  
「アクチンフィラメントに形成された場で無生物は走るか？」安藤敏夫
- 25) 生体運動合同班会議 (東京大学駒場、2004年1月8-10日)  
「ミオシンVの運動解析」(木下達也、高橋輝行、柳浦大志、安藤敏夫)
- 26) 生体運動合同班会議 (東京大学駒場、2004年1月8-10日)  
「高速 AFM が捉えたモータータンパク質のナノ動態」(古寺哲幸、内藤康行、宮城篤、安藤敏夫)
- 27) 米国生物物理学会 (Baltimore, 2003年2月14-18日)  
“Real-time AFM Analysis of DNA-enzyme Reaction” (M. Yokokawa, S. Yoshimura, Y. Naito, T. Ando, A. Yagi, H. Takahashi & K. Takeyasu)  
Biophys. J. 86:589a (2003)
- 28) 米国生物物理学会 (Baltimore, 2003年2月14-18日)  
“Dynamic Behavior of Motor Proteins in Action Captured by High-speed Atomic Force Microscope” (N. Kodera, Y. Naito, A. Miyagi, T. Ando, H. Sakakibara & K. Ooiwa) Biophys. J. 86:589a (2003)

### 3 研究内容・成果の概略

詳しくは、本報告書の後半に綴じた論文、解説記事に、未だ出版されていないものについては4章に記載されているが、ここでは全体の見通しをよくするために、研究内容ごとに概説する。

#### 3-1. ミオシンVのプロセッシブ運動の証明

-  $\text{Ca}^{2+}$ ではミオシンVの各頸部に4個の Calmodulin(CaM)が結合しているが、 $+\text{Ca}^{2+}$ では解離することが知られている。このことを利用して、Cy3を約2分子ラベルしたCaMをミオシンVに導入することができた。導入数はミオシンV1分子あたり2個であった。これにより、個々のミオシンV分子を明るく可視化することができるようになった。アクチンフィラメントの基板への固定は以下のように行った。ニトロセルロースコートしたカバーガラス上にビオチン化したBSAを固定し、その上にStreptoavidinを結合させる。ビオチン化率1/100程度のアクチンフィラメントをこのStreptoavidinに結合固定する。対物レンズ型エバネッセント照明の蛍光顕微鏡で、この固定されたアクチンフィラメントに沿って蛍光ラベルされたミオシンVが運動する様子を観察した。KCl濃度が100 mM以下では、ミオシンVはアクチンフィラメントの端まで連続的に運動した。運動速度はイオン強度とともに増大し、150 mM KClでほぼ飽和して1  $\mu\text{m/s}$ 程度であった。アクチンフィラメントの滑走アッセイでは0.5  $\mu\text{m/s}$ 程度で飽和する。Actin-activated ATPaseの最大活性はイオン強度に依存せず、約1.2/s/headで、アクチンに対する $K_m$ は100 mM KClで1  $\mu\text{M}$ 程度であった。この最大活性と最大運動速度から単純に計算すると、1ATP分解あたりミオシンVは約400nm運動することになる。この研究成果は *BBRC* 272:586-590 (2000)に発表した。この研究は本基盤研究Bの開始時点とほぼ重なっていて、重要な出発点となるものである。。

#### 3-2. ミオシンVのプロセッシブ運動の詳細解析

Spudichのグループはレーザートラップを用いてミオシンVの運動を観測し、ステップ変位間の停滞時間(Dwell Time)のATP濃度依存性の解析から、1ATP分解当たり36nmの変位を行っている結論づけた。しかし、この解析では、脳から精製されたミオシンVのATPase活性が発現S1のそれと同じであることを前提にしている。我々は固定されたアクチンフィラメント上を個々のミオシンV分子がプロセッシブに運動しているときのステップ変位、及びDwell Timeを同様な手法で解析した。その結果はSpudichらの結果にほぼ等しい。我々の手法では、ビデオ映像の位置解析は約2nmの空間分解能をもつ。まず、我々が以前求めた2mM ATP存在下でのActin-activated ATPase活性が低い原因がATP分解中に生成されるADPによる阻害効果によるという可能性を検討した。2mM ATP存在下では、ATP再生系を用いた場合と用いない場合で活性に違いは見られなかったため、以前の

データは信頼できると判断した。次に、ATP 濃度が低いときの運動解析を行った。低い ATP 濃度 (10-200  $\mu$ M) ではステップ変位が明瞭に検出され、約 38nm であった。また、滑走距離と滑走時間は ATP 濃度が極めて低い場合 (10, 20  $\mu$ M) を除き、それぞれ、400nm、0.8s となった。これらの数字は、Actin-activated ATPase の最大活性と運動速度から見積もった 1ATP 分解あたりの運動距離及び、1 頭部が ATP を分解する時間にほぼ等しい。このことは偶然であるかどうかの判断は難しい。ところで、ATP 濃度が低い場合にはミオシン V はアクチンから解離しやすく、ATP 濃度が高い場合には解離しにくい。一見矛盾するが、ATP の結合・解離のステップと、ATP が結合して反応が前進するステップの拮抗を考えると矛盾がないように思われる。すなわち、反応が前進するのに比べて、ATP の結合・解離は速く、ATP 濃度が高い場合には両頭部とも ATP を結合しているため、どちらかの頭部では反応が前進しており、アクチンから解離しにくくなっている。ATP 濃度が低いと、反応が前進するのに時間がかかり、前進する前に ATP は結合・解離を繰り返している。それ故、両頭部で反応が前進しないまま ATP が結合する割合が増えるために解離し易くなる。このように考えると、低濃度 ATP で観察された滑走距離、及び滑走時間は 1ATP 反応の間の現象であると考えることができ、1ATPase サイクル中に 400nm 滑るという以前の推測を支持することになる。しかしながら、2 つの頭部が関わる現象であるため複雑であり、断定的な結論を出すことが難しい。

### 3-3. 単頭ミオシン V の調製と特性

2 つの頭部があるためにデータの解釈が難しくなる点を避けるには、単頭ミオシン V の運動データから明快な答えを出せるはずである。しかし、単頭ミオシン V がプロセシブであるかどうかは不明である。そこで、まず単頭ミオシン V を調製し、その性質を調べた。何種類かのプロテアーゼを試みたところ Proteinase K がすっきりした分解産物を与えることが分かり、以下ではすべて Proteinase K (以下 PK と略) を用いた。ミオシン V のネック領域は CaM で保護されている。+Ca<sup>2+</sup>を加えて CaM を解離させれば、ネック領域で消化されて単頭ミオシン V が調製できるのではと考えた。-Ca<sup>2+</sup>, +Ca<sup>2+</sup>で消化過程を比較したところ、95kDa 断片の生成が+Ca<sup>2+</sup>で見られるのに対して、-Ca<sup>2+</sup>では見られなかった。分子量、及びアクチンとの結合から判断して、95kDa 断片はモーターのコア部分とネック領域を併せ持つ頭部であることが判明した。モーターのコア内部でも若干の切断が見られ SDS 電気泳動で 67kDa が見られる。尾部は、ネック・尾部境界部で切断されたのち更に分解されていく。単頭ミオシン V はアクチンとの共沈により精製できた。AFM 観察によっても紡錘状に見え、明らかに頭部であると判断された。単頭ミオシン V の運動を見るには蛍光ラベルする必要があるが、ミオシン V に適用した CaM 置換の方法は使えない可能性があった。すなわち、CaM を解離させたあとに切断しているために、Cy3 ラベル CaM は結合しなくなっている可能性がある。実際に試したところ、Cy3-CaM は単頭ミオシン V に結合した。アクチンフィラメント上の単頭ミオシン V の運動を観察したが、ミオシン V に比べ圧倒的

に解離しやすいものであった。それでもなお短い距離は滑走するように観察された。これがアクチンフィラメント上でのブラウン運動であるのか、ATPase 反応に駆動される運動であるかを調べるために、運動の方向性を更に調べた。アクチンフィラメントの P 端を Cy3 で強く染色してアクチンフィラメントの極性が分かるようにして、運動の方向性を調べた。その結果、ブラウン運動が大半で、一方向性の運動は極めて短い (36nm 以下) ものであった。従って、単頭ミオシン V はプロセッシブでない判断された。以上成果は現在論文を準備中である。

#### 3-4. 単頭ミオシン V から再構成した双頭ミオシン V の運動

単頭ミオシン V がプロセッシブでないことがはっきりし、その結果、ミオシン V のプロセッシブ運動の化学・力学カップリングについて解釈を容易にできる実験系を組むことが難しくなってしまった。双頭ミオシン V では、2つの頭部が互いに力学的に束縛し合うはずであり、例えば ATP 濃度を下げたときには片方がアクチンに強く結合し、その結合はもう片方が ATP を分解して運動するのを妨げる。これが実験データの解釈を複雑にしてしまう。そこで、柔らかい紐で単頭ミオシン V をつなげて擬似双頭ミオシン V を調製し、その運動特性を調べる実験を行った。未だすべてのデータを出しているわけではないが、興味ある結果が得られている。紐として長さが 35 nm の PEG2 本を用いた。この PEG の片端にはアミノ基反応性の NHS が、他端には Biotin が付いている。CaM のアミノ基をこの PEG で反応させたものをまず精製し、この CaM-PEG を単頭ミオシン V の CaM と置換する。単頭ミオシン V-PEG を Streptoavidin を介して 2 分子結合させて擬似ミオシン V とする。運動速度はミオシン V の数分の 1 であったが、この擬似ミオシン V はプロセッシブであった。ATPase サイクル中でどちらかの頭部がアクチンに結合している確率が高く、片方が解離しても柔らかい紐を介してつなぎ留められており、アクチンから解離する状態を通り過ぎて再びアクチンに結合すると考えられる。こうして、アクチンから完全に解離することが妨げられる。PEG-CaM-Cy3 が結合した単頭ミオシン V と、PEG-CaM が結合した単頭ミオシン V を連結して、片方にのみ蛍光ラベルを導入して、プロセッシブ運動をこの蛍光ラベルを通して観察した。長さ 35 nm の PEG2 本でつないだ試料では、ステップ変位は平均約 70 nm であった。通常ミオシン V でも片方のネック領域をラベルした場合にはステップ変位は約 70 nm であるので、PEG2 本の長さ分長くなっているにも拘らず同じステップ変位をしていることになる。また、このステップ変位の間も、ステップ変位して停止しているときも、2本の PEG は弛んでいるはずである。このことは、ミオシンの運動機構のうち広く信じられている Swinging Lever-arm Model では説明できない。このモデルでは、前方にある頭部の構造変化 (屈曲) が後方の頭部をアクチンから引き離し前方に繰り出すと考えており、2つの頭部間の強い力学的束縛が重要である。また、このモデルでは、前方に変位する頭部自身は力を発生せずに、受動的に変位すると考えている。弛んだ紐を介した場合には力学的束縛は極めて緩く、前方頭部の屈曲は後方に伝わらない。前方

に変位する頭部自身が変位するための力をアクチンに対して発生しているとは考えられない。これは高速 AFM の観察例と一致するように思われる。更には、紐が長くても、紐がなくても、ステップサイズが同じであることは、ステップサイズが2つの頭部が開く（跨ぐことが可能な）距離で決まっているのではないことを示しており、従来の説に合わない。Swinging Lever-arm 説では説明できないメカニズムが働いていることを強く示しており、この方向の研究の一層の展開はおもしろい事実を更に引き出すものと期待される。

### 3.5 ビーズの運動（無生物でもアクチンフィラメント上を滑走するか）

アクチンフィラメントとミオシンVとの相互作用によりアクチンフィラメントに沿って場が形成され、その場に引っ張られてミオシンVが運動するという考え方もありうる。この考え方が正しいとすると、場に引っ張られるものはミオシンVである必要はなく、無生物の物体でも運動すると考えられる。そこで、タンパク質との吸着がほとんどないと考えられるアクリルアミドビーズにアミノ基と Cy3 を導入し、このアクチンフィラメント上での運動を観察した。ミオシンVと ATP 存在下ではこのビーズはアクチンに沿って1方向に運動した。運動速度はミオシンVのそれにほぼ一致した。もちろん、このビーズがミオシンVに吸着していれば当然の話だが、吸着しないことが確認された。ビーズの運動速度はビーズの大きさに関係せず、極めて小さいビーズ（直径 3 nm 前後）でも連続的に運動した。ミオシンVがビーズを押ししているとも考えられるが、このような小さいビーズを連続的に押せるとは考えにくい。色々な条件でビーズの運動を調べた結果、ビーズの運動はミオシンVが運動する場合以外は運動しなかった。例えば、ATPase 反応は正常に近いが、アクチンから解離せず運動しない HMM ミュータントを用いた場合にはビーズの運動は観察されなかった。この現象の解釈として、①ミオシンVがビーズを押し続ける、②場によってビーズが運動する、の2つがありうる。どちらが正しいか現在のところ結論は出せないが、①が正しい場合でもこのビーズの運動から積極的に以下のことが言えそうである。ミオシンVが連続的に運動する場合、後方にあるヘッドがアクチンフィラメントから解離して前方に繰り出すとは考えられない。解離するのであれば小さいビーズを跨いで運動すると考えられるからである。

### 3.6 高速 AFM によるミオシンVの動態撮影

以前から開発を進めていた高速 AFM 装置が本基盤研究 B の期間内に出来上がった関係で、基盤研究 B の研究の対象であるミオシンVをこの高速 AFM で撮影することにした。計画には入っていない内容であるが、かなり時間をかけたこともあり、また興味ある結果が出てきたのでここで報告する。この高速 AFM は 250nm 程度の走査範囲であれば、1 画像を 80ms で撮れる。従って、ナノメータースケールでタンパク質の振る舞いを連続的な映像として見る事が可能である。また、探針・試料間にかかる力は極めて小さい。まず ATP 存在下におけるミオシンV単独の振る舞いを観察した。ときおりヘッド部がその中心（モ

ーターのコア部分とネックの境目付近)で屈曲する様子が観察された。しかし、ミオシンV単独のATPase活性は低く、この屈曲を繰り返し観察することは装置のドリフトがあって難しい。また、2-3回観察されたとしても、その屈曲運動がATPase反応に駆動されているのか単なるブラウン運動であるかを識別することは困難である。そこで、高速AFMに紫外線パルス照射装置を導入し、Caged-ATPに紫外線を照射してATPを放出する前後を同期イメージングした。その結果、紫外線照射に同期して屈曲運動が観察された。ほぼまっすぐな状態から180度近く急に折れ曲がり1-2秒のうちに元に戻る。Caged-ATPを含まない場合には紫外線照射に同期した屈曲運動は観察されないことから、この屈曲運動がATPase反応に駆動されていることは間違いない。ミオシンVはマイカ基板にある程度吸着し完全に自由というわけではない。他方、アクチンフィラメントはマイカにほとんど吸着しない。それ故、基板に固定したアクチンフィラメントに沿ってミオシンVが連続運動する様子を観察するまでには至っていない。尾部が基板に束縛されてはいるものの頭部がアクチンフィラメントに結合して一方向に頭部が運動する様子を複数捉えることができた。両頭部ともアクチンに結合していることはまれで、片方の頭部がアクチンと結合し、そのままアクチンに沿って運動した。この運動距離は約36nmであり、アクチンの螺旋の半周期にあたる。ミオシンのアクチンに沿った運動はこれまで所謂「歩行モデル」で説明されてきた。このモデルによれば、前方にある頭部が屈曲運動し、それにより後方にある頭部がアクチンから解離して前方に繰り出される。つまり、変位する頭部自身は前進するための力を発生しない。従って、変位するためには2つの頭部が存在することが必須である。しかし、AFM映像からは、変位する頭部自身が前進のための力を発生しているように見える。未だ断定できる段階にはないが、AFMによってタンパク質の振る舞いを直視することがようやく可能な時代になり、ミオシンの運動の様式について近い将来明確な答えが出せるものと期待される。以上の成果は装置部分といくつかの観察については、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12468-12472 (2001), *Jap. J. Appl. Phys.* 41:4851-4856 (2002), *Proc. of International Federation for Medical & Biological Engineering* 3 (Part2):22-30 (2002), *ChemPhysChem* 4:1196-1202 (2003)に発表するとともに、いくつかの日本語の解説記事に発表した。

### 3.7 ファッシンで束化されたアクチンフィラメントとミオシンVの相互作用

ミオシンVは神経細胞の成長円錐のダイナミクスに関与している。成長円錐の糸状仮足ではアクチンフィラメントは束になり前方に押し出されるとともに、後方では脱重合が起こっていると考えられている。アクチンフィラメントの束化因子の少なくともひとつはFascinである。まず、Fascinで形成されるアクチン束のなかの各フィラメントの極性が揃っていることを見出した。このことは生理的に整合性がある。この束化アクチンをミオシンVコート基板上で滑走させると、滑走先端側(P端)から束が解けていった。糸状仮足後方部でも同様なことが起こっていると考えられる。すなわち、ミオシンVは束を解離させ



ながら後方にアクチンフィラメントを押し出している。この成果は *J. Neurochem.* 87:676-685 (2003)に発表した。

#### 4 未発表データ

ここでは論文や解説に未だ載せていないデータをまとめる。

##### 4-1 ミオシンVのプロセッシブ運動の詳細解析

図1にいくつかのATP濃度でのミオシンVのステップ変位の記録を示す。ATP濃度が高くなるとステップ変位は不明瞭になるが、低い場合にははっきりと見える。ステップサイズのヒストグラムをとると、ATP濃度が $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ のときには約 $40\text{nm}$ にピークをもつが、 $200\mu\text{M}$ 以上では大きなステップ $60\sim 80\text{nm}$ のデータ数が増えてきて、広い分布を示す。ビデオレートのイメージングでは時間分解能が足りないことが原因と考えられる。

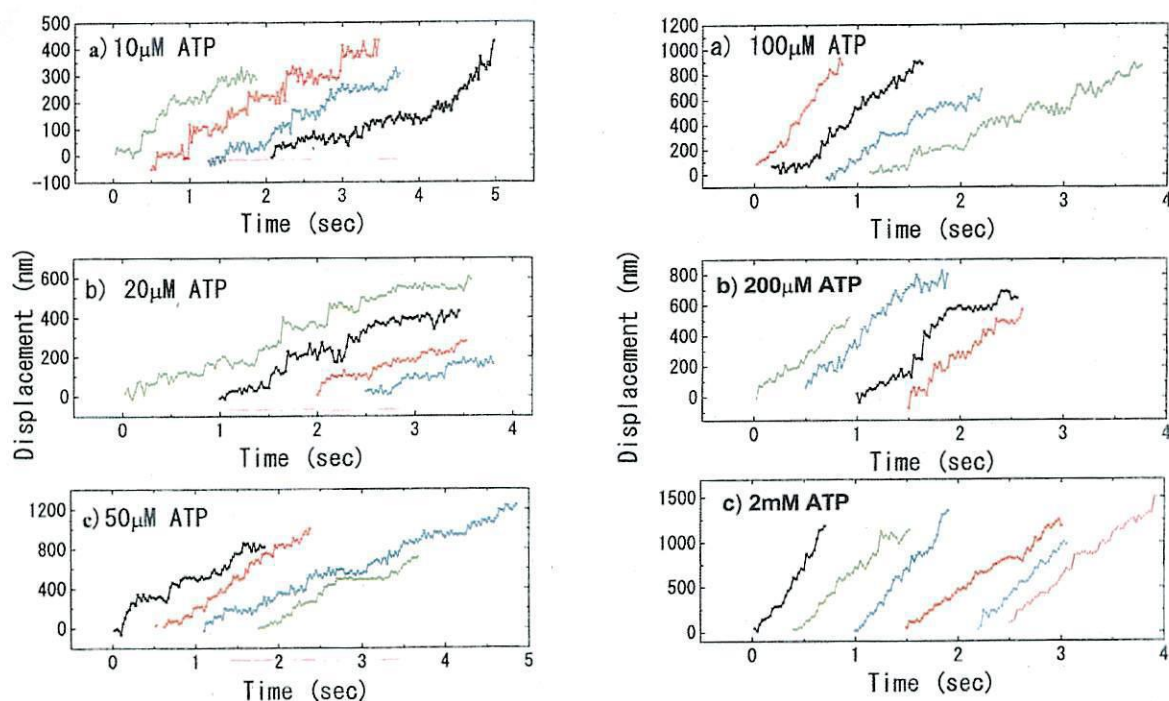


図1: 色々なATP濃度におけるミオシンVのステップ変位の記録。溶液条件は、 $20\text{mM}$  imidazole (pH 7.6),  $2\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1\text{mM}$  EGTA,  $1\text{mM}$   $\beta$ -Mercaptoethanol,  $0.1\text{M}$  KCl, various [ATP],  $0.2\text{mg/ml}$  glucose oxidase,  $0.36\text{mg/ml}$  catalase,  $4.5\text{mg/ml}$  glucose, at  $20^\circ\text{C}$ .

色々なATP濃度におけるDwell Timeのヒストグラムを図2に示す。このヒストグラムをSpudichのグループ(Rief et al. (2000) *PNAS* 97:9482-9486)は双頭構造を無視して単順なキネティクスで解析している。ATP濃度依存の2次速度定数 $k_1/[\text{ATP}]$ のステップと、非依

存の 1 次速度定数  $k_2$  のステップの 2 段階で変位が起こると考え、このヒストグラムを

$$Y = \frac{Ak_1k_2}{k_1 - k_2} [\exp(-k_2t) - \exp(-k_1t)] \quad (1)$$

でフィットした。我々も同様のフィットを行ったところ、図 3 に示すように  $k_1$  は ATP 濃度に比例し、 $k_2$  は ATP 濃度に関係がなかった。 $k_1/[ATP]=0.4 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ 、 $k_2=18 \text{ s}^{-1}$  と求めた。これらの値は Rief らのものとほぼ同じであり、レーザートラップを用いた彼らの測定法と、完全にフリーに運動させる我々の方法の違いによらず、同じ現象を捉えていると言える。変位の起こらない時間は、ADP の解離と新しい ATP の結合の過程が起きていると考え、 $k_1$  は ATP 結合速度定数、 $k_2$  は ADP の解離速度になる。ATPase 反応サイクルの律速段階が ADP の解離ステップだとする De La Cruz らの発現 S1 の結果 (De La Cruz et al. PNAS (1999) 96:13762-13731) をそのまま使えば、 $k_2$  は ATPase 速度にほぼ等しくなるはずであり、実際  $k_2$  の値は S1 の ATPase 反応速度にほぼ一致する。しかし、Rief らも我々もひよこ脳から精製したミオシン V を用いており、その ATPase 活性は約  $1.2 \text{ s}^{-1}$  である。また、(1) 式は双頭構造を無視しており、ATP を結合していない頭部が運動に対する負荷になることをまったく考慮していない。何故発現 S1 と組織から精製したミオシン V の ATPase 活性に 10 倍以上もの隔りがあるのかまったく不明のままである。どちらが真の活性を示しているのかを明らかにする問題が残されている。

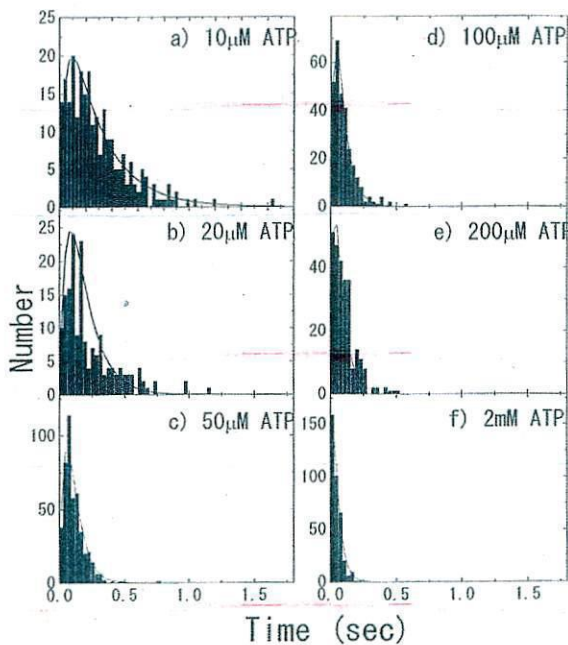


図 2 : Dwell Time のヒストグラム。

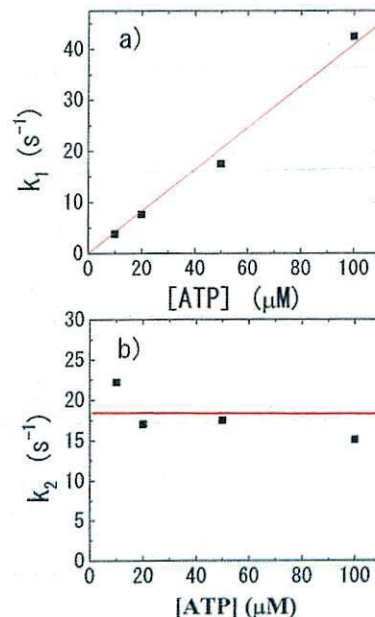


図 3 :  $k_1$ ,  $k_2$  の ATP 濃度依存性

#### 4-2 単頭ミオシン V の調製と特性

ミオシンVを $\pm\text{Ca}^{2+}$ で ProteinaseK (PK) 処理した試料の SDS-PAGE を図4に示す。 $\pm\text{Ca}^{2+}$ で大きな差が見られた。 $-\text{Ca}^{2+}$ の時には、125 kDa の主要なバンドと 50~80 kDa の間に複数のバンドが見られる。この複数のバンドのうち 67kDa を除いては PK の濃度を上げるとなくなっていった。ミオシンVには Protease に弱いいわゆる PEST 部位が尾部の中間ほどの位置に存在することが知られているので、125 kDa は PEST 部位から N 端側の部分である。PEST 部位から C 端側は速やかに小さいフラグメントに分解されていってしまう。他方、 $+\text{Ca}^{2+}$ の条件下では、125 kDa はほとんど現れず代わりに 95 kDa のバンドが現れる。67 kDa の量は $\pm\text{Ca}^{2+}$ に依存しない。アクチンフィラメントとの共沈実験より、125 kDa、95 kDa、67 kDa もアクチン結合部位を含むことが分かった。その他知られている事実及び $\pm\text{Ca}^{2+}$ の効果から総合して判断すると、95 kDa はネック領域で切断された N 端側（すなわち、S1 に対応）であり、67 kDa は S1 の内部で切断されたフラグメントであると結論できる。PK:MyosinV=1:50 で双頭成分のないかなり高純度の S1 が調製されることが分かった。 $\pm\text{Ca}^{2+}$ で消化し、アクチンとの共沈を利用して精製した試料の AFM 像（図5）から、125 kDa は HMM に、95 kDa は S1 であることが証明された。

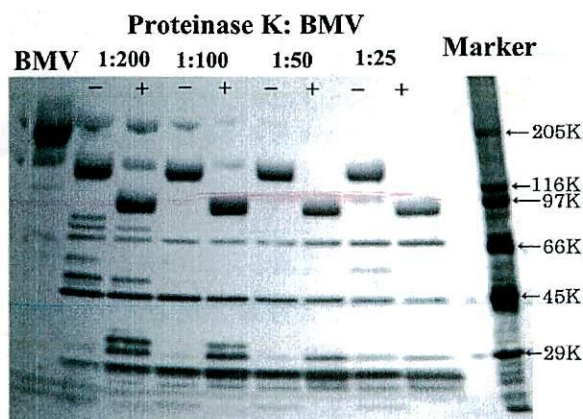


図4: MyosinV の PK 処理の SDS-PAGE. +は $+\text{Ca}^{2+}$ 、-は $-\text{Ca}^{2+}$ を表す。

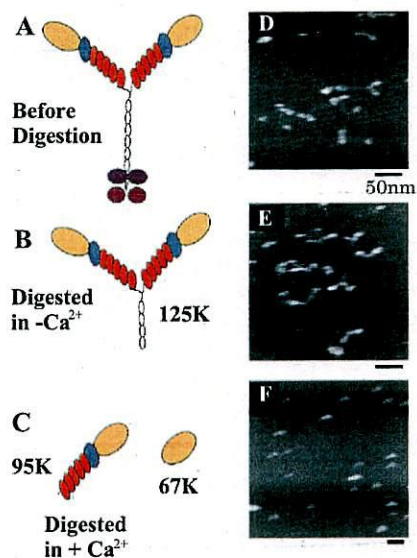


図5:  $\pm\text{Ca}^{2+}$ で PK 処理したアクチン結合フラクションの AFM 像。

こうしてほぼ純粋な S1 が調製できたので、基板に固定されたアクチンフィラメントに沿った S1 の運動を調べた。 $+\text{Ca}^{2+}$ で消化して得た S1 であるので、CaM 結合部位で切断されたものである可能性が高く、蛍光ラベルした CaM は S1 に導入されないのではないかと思っただが、実際に調べてみると Cy3-CaM は S1 に導入された。S1 は、ATP 存在下では、アクチンフィラメントへの親和性が低く、結合しても直ぐに解離してしまっただが、若干アクチンフィラメントに沿って運動する様子が観察された。これが本来の運動であるのか、ブラウン運動であるかを調べるために、P 端を強く蛍光染色したアクチンフィラメントを用いて運動の方向性を調べた。その結果、観察された運動のほとんどは両方向性でありブラウン

運動が大半を占め、若干 B 端に向かう短距離の運動であることが判明した (図 6)。よって、S1 は運動能力をもつが、プロセッシビティを失っていると結論される。ところで、PK 消化で得られる S 1 の Actin-activated ATPase 活性はミオシン V のそれよりも、各頭部当たり換算で、5 倍程度高くなった。PK 処理は頭部内の切断も伴うので、この原因がどこにあるかを直ぐに判断することは難しいが、尾部の消化による可能性もありえる。

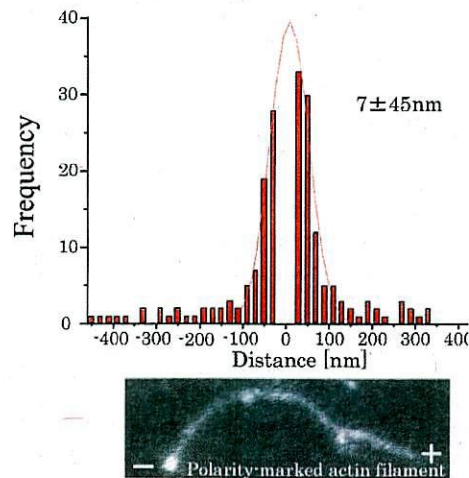


図 6：単頭ミオシン V の運動距離と運動方向の分布。下の挿入図は P 端を強く染色したアクチンフィラメントに結合した単頭ミオシン V の蛍光顕微鏡写真。

#### 4-3 単頭ミオシン V から再構成した双頭ミオシン V の運動

図 7 に模式的に示したような擬似 HMM を単頭ミオシン V から再構成した。PEG は非常に柔らかく AFM で観察しても激しく運動していた。片方のネック領域の CaM を蛍光ラベルしてそのアクチンフィラメントに沿った運動を観察した。運動速度は 2 mM ATP 存在下で  $0.16 \mu\text{m/s}$  で、ミオシン V の 1/6 程度であった。明瞭なステップ変位が見られ、そのステップ変位の平均は約 70 nm であった (図 8)。これはミオシン V 頭部のステップサイズにほぼ等しい。ところで、Swinging Lever-arm 説では、前方の頭部の屈曲運動により後方の

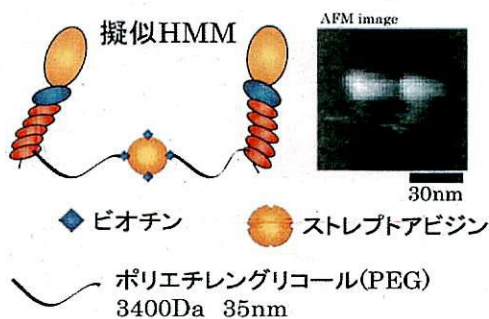


図 7：S1 から再構成した擬似 HMM の模式図。挿入図は高速 AFM で撮影した擬似 HMM の像。

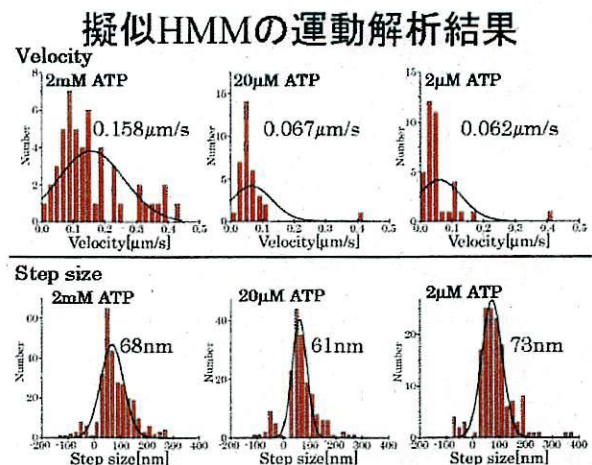


図 8：擬似 HMM のアクチンフィラメント上の運動を解析した結果。上段：運動速度、下段：ステップサイズ

頭部がアクチンから解離させられ前方に繰り出されると想定している。PEG がピンと張っているときを考えると、前方の頭部の屈曲運動は後方に伝わるが、後方のミオシンVがアクチンから解離したとたんに後方の頭部は力学的束縛を前方頭部から受けなくなってしまふ。更に、70 nm のステップ変位をしながら両頭部が運動していると考え、PEG がピンと張ることはない。従って、観察された擬似 HMM のプロセッシング運動は Swinging Lever-arm 説では説明し難い。

#### 4-4 ビーズの運動 (無生物でもアクチンフィラメント上を滑走するか)

Swinging Lever-arm モデルに代わり、以下の仮説を考えた。「ATPase 反応中間体にあるミオシンVがアクチンフィラメントに相互作用してアクチンフィラメントの構造を変え、その変化によりアクチンフィラメントに「場」が形成される。その「場」にミオシンVは一方向に引っ張られて運動する。」この仮説が正しいとした場合に推測される現象を捉えることでこの仮説の真偽を調べることを目指した。「場」に引っ張られるのはミオシンVに限らないであろう。無生物でも「場」を感じることはできるはずである。そこで、「場」を静電場と仮定し、電荷をもつビーズがアクチンフィラメントに沿って一方向に運動するかどうかを調べた。扱った系の模式図を図9に示す。アクチンフィラメントを大きなビーズを橋げたとして宙につり、そこにミオシンVと蛍光ラベルされた電荷ビーズを加え、電荷ビーズの運動を観察した。図10に示すように、電荷ビーズはアクチンフィラメントに沿って一方向に運動した。

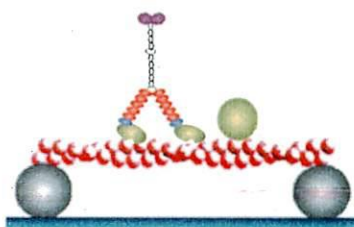


図9：無生物（電荷ビーズ）の運動を調べるための試料系の模式図。

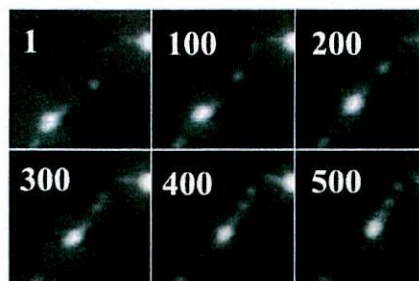


図10：蛍光ラベル電荷ビーズのアクチンフィラメントに沿った一方向性運動。数はフレーム番号(30 フレーム/s)。大きいビーズも小さいビーズもほぼ同じ速度で移動している。

この運動速度はビーズの大きさ (3~50 nm) に依らず、また速度はミオシンVの運動速度にほぼ一致した。もちろん、ビーズがミオシンVに吸着していれば当然の結果であるが、吸着していないことはいくつかの方法で確認した。このビーズの運動が起こる理由として、(a)ビーズがミオシンVに押されている。(b)ビーズが「場」に引かれている、が考えられる。1~5 nm の大きさ (平均 3 nm) のビーズでも同様な運動が観察されるので、このように小さいビーズでもミオシンVに押され続けることは考えにくい。しかしながら、これまで行った種々の実験から、「ミオシンVがアクチンフィラメントに沿って運動しているときのみビーズの運動が起こる」という結果になった。それ故、ビーズが運動しているミオシンVに押されている可能性は否定できない。但し、ミオシンVがステップ変位するのに対し

て、ビーズの運動にはステップ変位は観察されなかった。「押される」のか、「場に引かれる」かの区別を実験的に明らかにする手法を未だ見つけかねている段階である。「押されている」としても、この実験結果は次のことを示唆しているように思われる。すなわち、頭部がアクチンから解離して前方に繰り出されているとは考えると、小さいビーズを連続的に押し続けることはできない。それ故、ステップ変位時にミオシンVはアクチンから解離しないと考えられる。ところで、アクチンフィラメントに静電場が形成される可能性は本当にあるのであろうか。アクチンフィラメントの螺旋構造に歪みが生じ、それにより電荷が作る場に歪みが生じ、フィラメント方向の場が形成される可能性を検討した。実際の電荷分布ではなく、アクチン・アクチン接触領域に±電荷を配置して計算した結果を図 11 に示す。螺旋構造の非対称な歪みが一方向性の場を形成する可能性があることがしめされた。

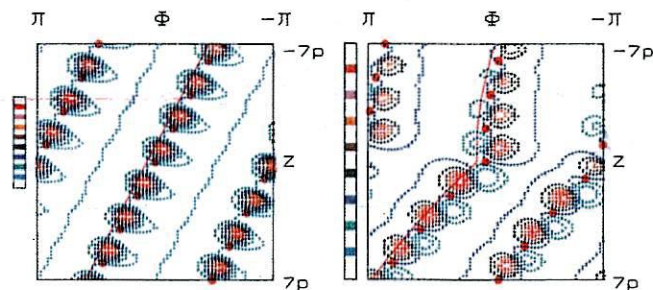


図 11：モデルアクチンフィラメントの歪みで生ずる静電場。等電位線で示す。  
左図：螺旋に歪みのない場合、右図：螺旋に非対称な歪みが生じた場合。

#### 4-5 高速 AFM によるミオシンVの動態撮影

当初予定していなかった研究であるが、本基盤研究以前から開発を進めてきた高速 AFM が一通り完成し、また、この高速 AFM で捉えるミオシンVの動態は化学・力学カップリングについて貴重な情報を与えるはずであると考え、この研究も行った。まず、ミオシンV単独で ATP と相互作用するときの動態を捉える試みを行った。ミオシンV単独の ATPase 活性は非常に低く、ATPase 反応に伴う構造形態変化（力学的応答）を繰り返し観察することは難しい。例え 1 回観察されたとしても、それがブラウン運動によるものであることを否定することは難しい。そこで、Caged-ATP に紫外線を照射して ATP を短時間に放出する前後を同期撮影することを行った。高圧水銀ランプとメカニカルシャッターを組み合わせ、紫外線パルス照射装置を作成し、高速 AFM に導入した。未だ例数は少ないものの、図 1 2 に示すような紫外線照射に同期したミオシンVの大きな構造形態変化を映像として捉えることに成功した。紫外線照射前には両頭部とも比較的まっすぐな形態をしていて、図 1 2 の左側の頭部はマイカ表面から自由でふらふらと運動しているのが観察された。紫外線照射直後に左側の頭部はほぼその中央付近で大きく屈曲し、約 1.5 秒後にまっすぐな形態に戻った。この屈曲とまっすぐな形態への戻りが ATPase 反応のどのステップで起こっているかを判断することは難しい。しかし、これまでの生化学的知見により、ATP 結合後

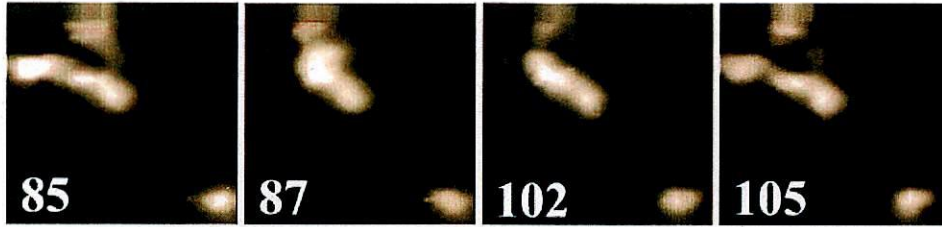


図 12 : ATPase 反応によって起こるミオシン V の構造変化の連続画像 (80ms/frame) 、数はフレーム番号

に ATP は速やかに加水分解され、ADP・Pi になり、ADP・Pi 状態で長く留まると考えられる。この知見と得られた像の変化を一致させることはできない。おそらく、ATP の結合により屈曲し、ADP・Pi 状態になりまっすぐな形態への戻りが起こっているものと考えられる。従って、まっすぐな形態への戻り過程の状態は長寿命の ADP・Pi 状態とは異なる第 2 の ADP・Pi 状態なのではないかと考えられる。実際、ATP が定常的に存在するときにミオシン V を観察しても、まっすぐな形態をもつものがほとんどであり、長寿命の ADP・Pi 状態ではまっすぐな形態をもつと考えられる。上述の形態変化は一見所謂パワーストロークを表しているように思えるが、従来の考え方とは合わない。従来の考え方では、ADP・Pi 状態がプレパワーストローク状態であり、そのときに頭部は大きく屈曲していると想定している。まっすぐな形態への戻りがパワーストロークであり、これには Pi 放出が伴うと考えられている。従って、高速 AFM によるミオシン V の構造形態の直接観察を今後も継続して多くのデータを集積することにより化学・力学カップリングの仕組みの理解に大きく近づくものと期待される。ATP 存在下でアクチンフィラメントとミオシン V は結合・解離を自然に行う。従って、これらの相互作用は極めて弱い力で支配されている。このような系を高速 AFM で観察を行うことは難しい。すなわち、試料の高さ情報を得るには、振動する探針が試料を叩く必要があるが、その叩く力は極めて弱くなければならない (一定に保つ振幅値の減少量は極めて小さくなければならない)。従って、ATP 存在下で相互作用しているミオシン V・アクチンフィラメント系は高速 AFM が挑戦すべき難しい試料系であるといえる。探針が試料を叩く力を大幅に軽減する新しいフィードバック手法とフィードバック帯域を向上させる手法を開発して、この試料系のイメージングに挑戦した。マイカ基板を高い密度でミオシン V コートし、そこにアクチンフィラメントを ATP とともに加えた。この系でアクチンフィラメントが滑走することを蛍光顕微鏡で確認した。この系を高速 AFM でイメージングしたところ、アクチンフィラメントが滑走していた (図 13)。その滑走速度は蛍光顕微鏡で観測した結果と一致した。従って、カンチレバー探針は試料系を乱さない程度に試料を叩いていることになる。ミオシン V の濃度を下げ、ズームインして、

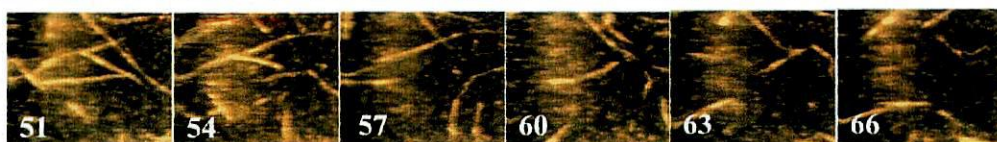


図 13 : ミオシン V がコートされた基盤の上を滑走するアクチンフィラメントの AFM 映像。走査範囲は  $1\mu\text{m}$ 。数はフレーム番号 (160ms/フレーム)。背景に見える小さな粒子はミオシン V である。

ATP 存在下でアクチンフィラメントと相互作用するミオシンVの振る舞いをイメージングした。この場合、ミオシンVの頭部は基板から完全にフリーではないので、アクチンと相互作用しているように見えるミオシンV分子の数は多くはないが、いくつかの分子について振る舞いを観察することができた。分かり易い例を図14に示す。この例では頭部はマイカから自由でふらふらしていた。その頭部がアクチンフィラメントに接触した直後に右側に移動していった。頭部の付け根辺りはマイカ表面に束縛されているため30 nm程度運動してアクチンから解離した。この観察事実は、「運動（移動）する頭部自身がアクチンフィラメントとの間で運動のための力を発生している」ことを示唆しており、Swinging Lever-arm 説と合わない結果になっている。

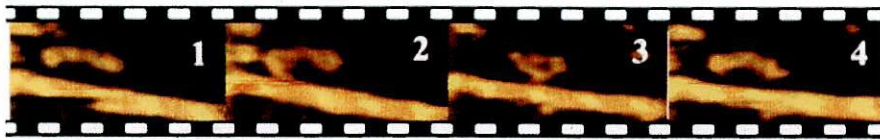


図14: アクチンフィラメントと接触して直ぐにアクチンフィラメントに沿って運動するミオシンVの AFM 映像 (80ms/フレーム)。片方の頭部のみの接触で運動が起こる。