

氏名	坂本 武史
生年月日	
本籍	東京都
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第432号
学位授与の日付	平成13年9月28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	脳ミオシンVの化学・力学カップリング
論文審査委員(主査)	安藤 敏夫(理学部・教授)
論文審査委員(副査)	大橋信喜美(理学部・教授) 鈴木 建之(理学部・教授) 櫻井 勝(理学部・教授) 福森 義宏(理学部・教授)

学位論文要旨

Myosin V is an unconventional myosin thought to move processively along actin filament. To have hard evidence for the high processivity, we sought to observe directly the movement by individual native chick brain myosin V (BMV) molecules with fluorescent calmodulin. Single BMV molecules did exhibit highly processive movement along actin filaments fixed to a coverslip. BMV continued to move up to the barbed end of its actin track, and not readily detach from actin. The barbed end, therefore, got brighter with time, because of a constant stream of BMV traffic. The maximum speed of the processive movement was $1 \mu\text{m}/\text{sec}$, and the maximum actin-activated ATPase rate was 2.4s^{-1} . These values apparently imply that BMV travels a great distance, 400nm, per an ATPase cycle. We further made a high-resolution analysis of the processive movement of myosin V. From the analysis, we found that single myosin V molecules move along an actin filament with regular 60nm steps. The results of these studies reached the conclusion that myosin V makes multiple steps of movement (the total displacement, about 400nm) during the single ATP turnover cycle.

序論

生き物の特徴の1つは、「動く」ということである。身近に見られる植物のように移動をしない生き物においても、細胞の中では絶えず何らかの運動を行っている。この運動の基本は、モーターとなるタンパク質が細胞骨格であるタンパク質との間に起こす運動である。ミオシン、キネシン、ダイニンは、代表的なモータータンパク質である。ミオシンは、最初筋肉で発見され、現在では筋肉以外の様々な細胞の運動にも関わっていることが知られている。ミオシンが、アクチンとの相互作用によって運動を行うのに対し、キネシンやダイニンは微小管と相互作用することによって運動を行う。ダイニンは、鞭毛・繊毛において発見された。キネシンは、ダイニンとともに多く細胞に存在して物質の輸送・膜小胞の移動などに関わっている。

モータータンパク質は、ATP加水分解で獲得したエネルギーを滑り運動(力学的仕事)に変換する。この化学・力学エネルギー変換は、どのような仕組みで行われているのだろうか？こ

の問題は、二つのモデルを中心に長い間論争が行われてきた。1つは、ATP加水分解反応に1:1に対応した構造変化に基づくタイトカップリング説。1つは、ATP分解と力学的過程とが1:1には対応せず確率的であるとするルースカップリング説である。間接的な実験手法やそれから得られる実験データの解釈などの違いにより、明確な結論が得られず論争に終止符が打たれることはなかった。この問題を解決するためには、モータータンパク質1分子のATP分解と滑り運動を同時に観察するのが一番の近道に思える。いままで、モータータンパク質1分子の滑り運動を直接観察した例はキネシンを除いてない。しかしながら、キネシンは、基質特異性が高く、“見えるATP”である蛍光性ATPアナログを利用できない。本研究で私は、ミオシンVが1分子で連続的に運動できる、すなわち、プロセッシブモーターであることを発見した。ミオシンVは、基質特異性が低い。それゆえこの発見は、化学・力学カップリングの解明に重要な貢献をすることが期待される。本研究では、この発見に続いて1分子運動の詳細な解析及びATPase反応測定を行った。その結果は、1ATPの加水分解でミオシンVは単位ステップ(平均60nm)を繰り返しながら約400nm滑走するという重大な結論に導いた。

1 分子ミオシンVのプロセッシブ滑り運動観察

ミオシンVは、ひよこ脳から精製した。本研究で私は、ミオシンV一分子の滑り運動観察に成功し、ミオシンVがプロセッシブモーターであることを明らかにした。この成功は、ミオシンV一分子の可視化とアクチンフィラメントの固定などに基づく実験系の確立による。まず、ミオシンV一分子を可視化するには、活性を保ったまま蛍光標識する必要がある。蛍光色素の直接ラベルは、ミオシンVの運動活性を失わせてしまった。頸部に結合しているカルモジュリンは、マイクロモル濃度のカルシウム存在中で部分的に解離する。このことを用いて、蛍光標識した牛脳カルモジュリンを本来結合しているカルモジュリンと交換することに成功した。一方、アクチンの固定では、生理活性を保持したまま固定する必要と観察視野内にある程度多くアクチンを存在させることが必要である。これは、以下のような方法で解決することができた。ニトロセルロースをコートしたガラス基板上にピオチンラベルしたBSAを敷きつめる。次に、ストレプトアビジンを基板に固定されたピオチンに結合させる。最後に、ピオチン化ラベルしたアクチンを固定する。

蛍光色素数分子からの微弱な蛍光を観察するには、市販の蛍光顕微鏡では背景光が邪魔をして観察できなかった。そこで、対物型エバネッセント照明系を採用した。これにより、溶液中の蛍光性ミオシンVは、エバネッセント照明領域(基板表面から100nm程度)以外にあるときはもちろん蛍光を出さないし、その領域に入ったとしても分子の熱運動が速いため、背景光を均一にあげるだけである。それゆえ、アクチンに結合したミオシンVのみが輝点として観察された。

ミオシンVは、約100mMKCl濃度以下でアクチン上を離れることなくアクチンの端(B端)まで滑走した。B端は、時間とともに明るく大きな輝点になった(図1)。それは、ミオシンVが、次々にB端まで滑走しなかなかに離れないからである。ミオシンVの滑走距離は、イオン強度が上がると短くなった。150mMKCl濃度でミオシンVの滑走距離は、およそ2.4 μm であった。滑り速度は、1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。アクトミオシンVのATPase活性は、2.5 s^{-1} であった。滑り速度と酵素活性からミオシンVは、1ATPで400nm滑走していることになる。しかし、この結果は、以下のようにも考えられた。ミオシンVの滑り運動は、活性のあるものだけを見ていて、ATPaseは不活性化されたミオシンVも考慮にいれている。つまり、酵素活性(ATPase)は、もっと高い(30 s^{-1})のではないかという疑問があった。Mehtaらは、光ピンセットを用いてミオシンV一分子の滑り運動を測定した。そして、Mehtaらは、滑り速度(0.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$)と滑り運動解析の結果から高いATPase活性(15 $\text{s}^{-1}\text{head}^{-1}$)であることを主張していた。もし、高いATPase活性が本当ならば、本研究で使用したミオシンVは、90%以上活性が失われていることになる。このことを調べるためにATP存在中でミ

オシンVとアクチンの共沈実験を行った。一分子滑り運動しているミオシンVは、ほとんど止まることなく滑り運動を行っている。もし、ミオシンVが活性を失いアクチンと結合できないとするとミオシンVは、アクチンと共沈されないはずである。結果は、90%以上のミオシンVがアクチンと共沈された。したがって、本研究で使用したミオシンVは、ほとんどすべて活性を保っている。そして、ミオシンVは、1ATPで400nm滑走していることを強く示唆した。

1分子ミオシンVのステップ運動解析

本研究では、詳細な滑り運動解析をするために空間・時間分解能をさらに上げた。受光素子の性質のため残像効果のあるSITカメラからそれが無いデジタルCCDカメラに換えた。そして、画像データは、圧縮保存(Mpeg形式)してしまうデジタルビデオテープではなく、直接CCDカメラからパソコンへ保存した。したがって、時間分解能は、最大13msec/frame(実際の限界はそれ以上)まで上げられた。また、蛍光観察感度を上げるために顕微鏡とCCDカメラの間にII(image intensifier)を取り付けた。滑り運動解析(輝点解析)は、テンプレートマッチング法で行った。この方法では、輝点のコントラストが高いほど高い空間分解能で解析できる。観察する時の倍率を500倍から750倍に上げることでさらに空間分解能を上げた。顕微鏡システムの改良は、10.9nm/pixel、20msec/frameという高時間・空間分解能を実現した。

ミオシンVの詳細な滑り運動解析は、平均60nmのステップ状の運動(図2)を明らかにした。滑り運動観察は、ATP濃度を変えて(10 μ M~2mM)行った。アクトミオシンVのATPase反応のKmは、約400 μ Mであり、ATP濃度がこのKmより十分小さい場合には連続したステップ変位は1ATPの分解中に起こっていると考えられる。ステップ間の止まっている時間(DwellTime, T)のヒストグラムは、Mehta&Spudichらと同様な曲線フィット(①式)で解析を行った。

$$Y=A * k_1 * k_2 / (k_1 - k_2) * (\exp(-k_2 T) - \exp(-k_1 T)) \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

その結果、得られた速度定数(k_1 , k_2)は、Mehtaらとよく一致した。しかしながら、ミオシンVの運動メカニズムは、Mehtaらの1ステップ/1ATPということにはならない。同様のミオシンVを使っているにもかかわらず、Mehtaらは、ミオシンVの1分子運動測定の結果から高いATPase活性を仮定し、本研究結果と違う結果(ATPase=15s⁻¹)を直接証拠なしに採用している。本研究のATPase活性は、2.5s⁻¹である(直接測定結果)。ミオシンVは、1ATPで単位ステップ(平均60nm)を繰り返し400nm滑走する。この結果は、以下のようなデータ解析によって証明できた。

ミオシンVのATPaseサイクルは、0.8sec(1.2s⁻¹head⁻¹)であり、100 μ M ATP濃度以下のミオシンV一分子の滑走時間(RunTime)は、0.8secとなりATPaseサイクルタイムと一致する。また、1ATP当たり400nmという滑走距離は、滑り運動観察の解析から求められた滑走距離(RunLength)200~400nmと一致した。したがって、ミオシンVが、1ATPで単位ステップ(平均60nm)を繰り返しながら400nm滑走していることがわかる。しかしながらDwellTime(ステップ間の止まっている時間)から算出した k_1 と k_2 は、ATPaseサイクル中の何を意味しているのだろうか?本研究では、ミオシンVの運動メカニズムに対して図3のような反応スキームを考えた。十分低いATP濃度で1分子滑り運動を行っているミオシンVは、ほぼ片方の頭部にのみATPを結合している。ATPを結合していない方の頭部は、すべり運動の抵抗になると考える。つまり、ミオシンVの2頭部の問題を考慮した。Head1は、ATPを分解し滑り運動を行える頭部である。Head2は、滑り運動の抵抗となり、ATPが高速に結合・解離を繰り返している。Head2にATPが結合するとHead2は、アクチンから離れるのでHead1が滑り運動できる。Head2のこの繰り返しでミオシンVは、一時的に止まりながらも滑り運動ができる。

反応スキームのそれぞれの速度定数を以下に示す。

DwellTime から算出した k_1 ($0.4\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) は、ATP 濃度に依存したアクトミオシン V への ATP 結合 2 次速度定数であり、反応スキーム上で k_{+1} を示す。反応スキーム上の k_{-1} は、ATP が飽和した濃度 (2mM) での DwellTime から算出した k_1 であり 120s^{-1} である。また、DwellTime から算出した k_2 (18s^{-1}) は、ATP 濃度に依存しない値であり、反応スキーム上 k_{+2} を示す。

以上により、ミオシン V が、1ATP で単位ステップ (平均 60nm) を繰り返しながら約 400nm 滑り運動を行っていることを実験データと反応スキームに基づく考察の両面から明確に示すことができた。

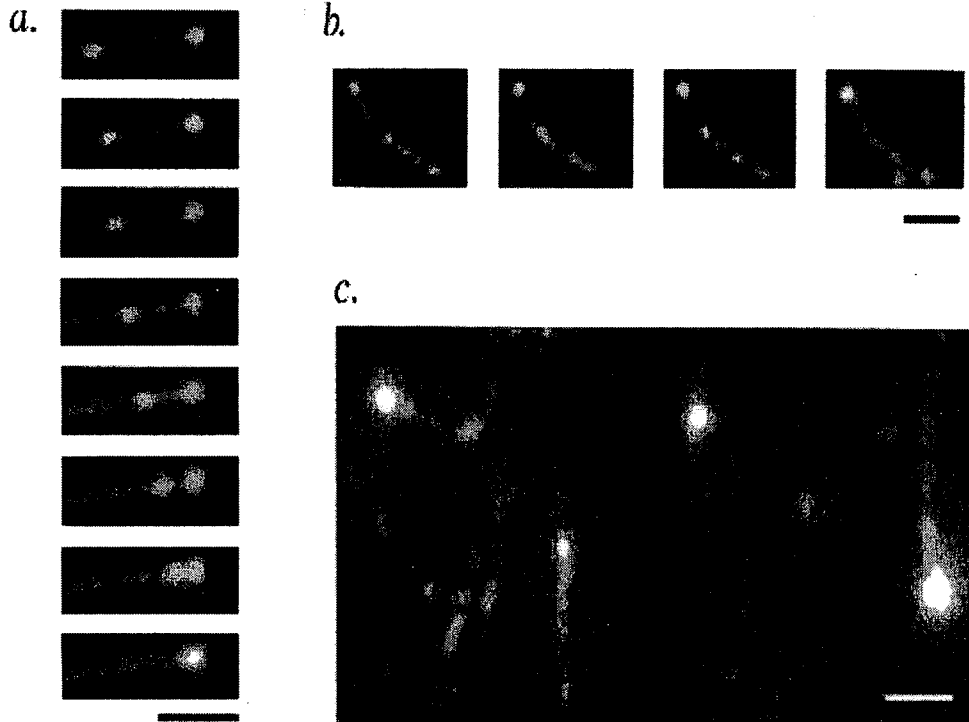


図1 Cy3-ミオシンV一分子によるプロセス滑り運動画像

(a) アクチンフィラメントに沿ったミオシンV一分子のビデオ連続画像。フレームレートは、0.5秒間隔である。アクチンフィラメントは、ローダミンググリーンファロイジンで蛍光ラベルしてある。左にある輝点が、アクチンフィラメントの右端(B端)にある輝点へ向かって運動している。(b) 2秒間隔のビデオフレーム画像。Cy3-ミオシンVがアクチンフィラメントの矢じり端へ次々に運動してくるので、徐々に矢じり端の輝点が大きくなっていく。アクチンフィラメントは、非蛍光性であるファロイジンでラベルしている。(c) 滑り運動観察をしてから1分後の全体画像。アクチンフィラメントは、非蛍光性であるファロイジンでラベルしてある。KCl濃度は、(a)75mM、(b)(c)25mMでそれぞれおこなっている。スケールバーは、すべて2 μ mである。それぞれの画像のカメラゲインとオフセットは、すべて異なる。(b)と(c)内での画像に対するそのパラメーターは、(a)よりも低く設定してあった。それぞれの場合の蛍光強度は、測定できなかった。

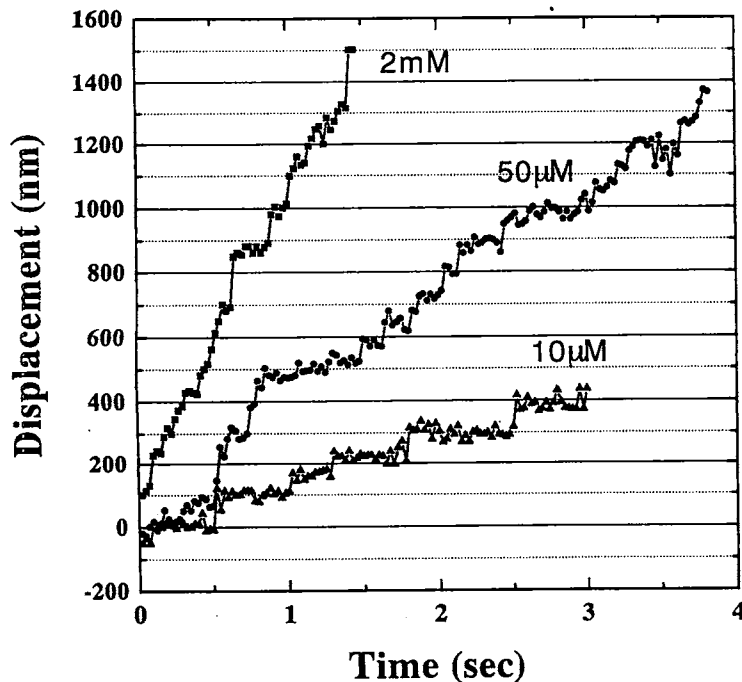
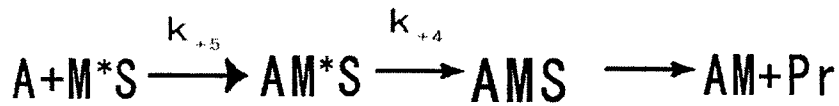


図2 ミオシンVのステップ運動解析
ATP濃度は、それぞれ10 μ M、50 μ M、2mMである。階段状のステップが見える。ステップ間の止まっている時間(DwellTime)は、ATP濃度が低いと長くなった。この図は、滑り運動しているミオシンVの中でも長く滑り運動しているものを選んでいるので、平均の滑走時間(RunTime)は、低い。RunTime:10 μ MATPで1.2(sec)、50 μ MATPで0.8(sec)である。2mMATPでは、離れずに滑り運動を続けていた。

Head 1



Head 2

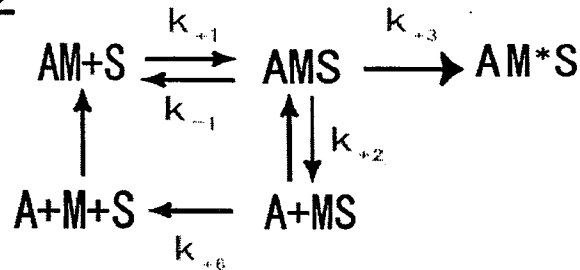


図3 ミオシンV滑り運動の反応スキーム

A:アクチン, M:ミオシン, S:ATP, Head:ミオシンVそれぞれの頭部。速度定数(k)の値は、本文参照。

学位論文審査結果の要旨

坂本武史君の学位申請に対し、平成13年7月25日に理学部物理会議室に於いて予備審査会を行い、更に8月16日に同会議室において口頭発表及び質疑応答を行い、審査した(大橋審査委員は都合のため8月16日の審査会には出来なかったもので、予備審査後7月30日に口頭発表と質疑応答の機会を別に設け、審査を行った)。

生体分子モーターと呼ばれるタンパク質は筋収縮、核・細胞分裂、顆粒運搬などの細胞内における力学機能を支える。ミオシンと呼ばれる分子モーターはアクチンフィラメント(AF)と相互作用して力や運動を発生する。ミオシンはATP加水分解で供給される化学エネルギーを直接力学的エネルギーに変換する。細胞生物学の進展により、現在では17クラスのマシソンが存在し、それぞれ特異な機能をもつことが明らかにされている。坂本君は、それらの内クラスVに属するミオシンVを研究対象に選んだ。ひよこ脳から抽出精製したミオシンVの蛍光染色法、AFの基板への固定法などを開発し、ミオシンVが1分子で数ミクロンにわたりAFから解離せずプロセッシブに運動することを発見した。これはプロセッシブなミオシンの最初の発見となった。1分子の振る舞いを連続的に追跡できる系が遂に見つかったという意味で、この発見は、分子モーターにおける化学・力学共役機構の研究に重要な貢献をした。ミオシンに関する最近の総説や論文にはこの坂本君の仕事が大きく取り上げられていることから、その重要性がわかる。この発見に続いて、様々な条件下でプロセッシブ運動を観察し、その詳細な顕微解析を行った。この運動は約60nmのステップ状変位からなること、1ATPの加水分解サイクル中にこのステップ変位は数回起こり、1ATP当たり平均で400nm運動することを明らかにした。つまり、1ATPの加水分解で供給されるエネルギーは一度には使われず「小出し」に使われる、ルースな化学・力学カップリング機構を証明した。

以上、学位論文の研究内容はレベルが高く、生体エネルギー変換機構の研究に大きく貢献した。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。