3I1345

ミオシン V 一分子の滑り速度 / ATPase

○坂本 武史、安藤 敏夫 (金沢大・理・物理)

我々は、ひよこ脳から精製抽出したミオシン V を使って、ミオシン V 一分子の滑り運動観察・計測をおこなった。ひよこ脳ミオシン V は、一本の重鎖あたり頸部に 6 個の IQ モチーフがあり、そこに 4 ~ 5 個のカルモジュリンが結合し、ミオシン II などに結合している軽鎖が結合しているとされる。蛍光性 Cy3-カルモジュリンとカルモジュリンを置換することで蛍光標識したミオシン V を得た。アクチンをピオチン化し、基板をアビジンコートすることでアクチンフィラメントを基板に固定した。蛍光性ミオシン V 一分子の滑り運動は、エバネッセント照明下で観察した。その結果、蛍光性ミオシン V 一分子が、アクチンフィラメント上をプロセッシブに滑り運動している様子を多数観察できた。KCl 濃度 150mM 程度まで上げても、蛍光性ミオシン V 一分子は、アクチンフィラメントから離れることなく Barbed end まで滑り運動した。蛍光性ミオシン V が、Barbed end から解離しないので時間とともに Barbed end が明るくなっていった。また、蛍光性ミオシン V の滑り運動ビデオ解析によりステップ上の運動が観察された。滑り速度は、1 (μ m/sec) であった。Actin-Activated ATPase の最大活性は、2.4 (s⁻¹) であった。この結果よりミオシン V 一分子は、1 ATP あたり約 400nm 滑走する計算になる。本当にそうなのであろうか。それに答えるべく現在、新しい手法で研究を進めている。その結果を報告する予定である。

T.Sakamoto, T.Ando : Sliding velocity / ATPase of a single myosin V molecule

3I1415

ミオシン I によるアクチン線維束の変形

○瀧口 陽子、本田 誠、宝谷 紘一、瀧口 金吾 (名大・院理・生命理学)

高分子存在下で、アクチン線維は自然に束化する。このアクチン線維の束は、アクチン同士の距離が近く架橋もされていないことから、ミオシンによって引き起こされる複数のアクチン線維間の滑り運動を観察するのに適している。1991 年、高分子メチルセルロースによって形成させたアクチンの束に双頭の HMM を ATP と共に作用させると、束が収縮し最終的に星状体を形成することが見出され、このとき束内でアクチン線維が各々の極性・向きに従って sorting-out されることが示唆された (1)。ところで、単頭の S-1 ではこのような束の収縮は起こらない。これらの結果は、各ミオシンモーターの機能とその頭部構造とが重要な関係にあることを示している。

実際に生物が発現させているミオシンには、ミオシン I のような単頭のものやミオシン II やミオシン V のような双頭のもの存在しているが、その生体中における詳しい機能の違いはまだ明らかになっていない。そこで本研究では、アクチン線維の束にニワトリ小腸から精製したミオシン I を ATP と共に作用させ、その挙動を暗視野顕微鏡で観察した。その結果、ミオシン I によりアクチン線維の束が屈曲運動を示した後、その束の先端からアクチン線維がほどけて滑り出していくのが観察された。これは、HMM の場合は、束内で向きの同じアクチン線維が揃えられて更に太く束ねられていくことによってアクチンの束が収縮していくのに対し、ミオシン I の場合は、束内のアクチン線維の間で絶えず滑り運動が繰り返されることによってアクチンの束が伸長していることが考えられる。今後、この現象をさらに詳しく解析する予定である。

1. Takiguchi, K., J. Biochem., 109, 520-527 (1991).

Y. Tanaka-Takiguchi, M. Honda, H. Hotani and K. Takiguchi : Myosin-I-induced sliding movements between actin filaments within an actin bundle

3I1400

ミオシン V はネックドメインの 80% を削除しても、ステップのサイズ、連続性、速度は変化しない

○田中 裕人¹、本間 和明²、岩根 敦子³、片山 栄作⁴、池辺 光男²、柳田 敏雄^{1,3} (¹ 科技振・1 分子過程プロジェクト、² Dept. of Physiol., Univ. of Massachusetts Medical School、³ 阪大・医、⁴ 東大・医科研)

ミオシン V は 2 つの頭部を持ち、各々に 6 個の軽鎖 (LC) 結合部位からなる長い (23nm) ネックがある。1 分子力学測定と電顕の結果から、長いネックをレバーアームのように使い、アクチン半ピッチ (36nm) に沿って連続して歩くモデルが提唱されている。本研究では、LC 結合部位の 6 個中 5 個を削除したミュータントミオシン V (myosinV/ Δ 5) を作成し、光ピンセットを使い、1 分子変位測定を行った。

myosinV/ Δ 5 でも、野生型とほぼ同じ 30-40nm の大きなステップ状の変位が観察された (図 1, 矢印)。ステップ状の変位は連続して起こるが、方向は無負荷近くでも一定ではなく前後にゆらいだ。前後方向への頻度の差は、1 μ M ATP では同程度、2mM ATP でも 2-3 倍程度であった (図 2)。ATPase 活性と滑り速度もほとんど変化なかった。S2 部分がほどけていることもなかった (EM)。また、1ATP サイクル中のステップの数は 5-6 回と見積もられ、安藤らの結果と同じく化学力学結合はルースであった。これらの結果はレバーアーム説では説明できない。ミオシン V は、アクチンフィラメントに沿ってバイアスされたブラウン運動で運動している可能性が高い。

H.Tanaka, K.Homma, A.H.Iwane, E.Katayama, M.Ikebe, T.Yanagida : The step size, processivity, and velocity of myosin V are independent on its neck length.

3I1430

ミオシン S 1 によるステップ状変位の 1 分子解析: 負荷-速度関係

○喜多村 和郎¹、岩根 敦子²、柳田 敏雄^{1,2} (¹ 科技振・1 分子過程プロジェクト、² 阪大・医・第一生理)

アクトミオシンの力発生機構を明らかにするために、我々は 1 分子のミオシン S1 を直接観ながらガラスニードルのプローブで操作し、力発生過程を高分解能で測定してきた。これまでに、負荷が 1pN 以下の低負荷の条件では、ミオシン S1 は 1 個の ATP を加水分解する間に、アクチンフィラメント上を約 5.5nm のステップを複数回行って進み、その回数は可変 (1-5 ステップ) であることを示した。

今回、負荷を与えたときの変位を測定することで、負荷の大きさと、単位ステップの大きさ、ステップに要する時間、1 回の ATP 加水分解反応あたりのステップの回数の関係を調べた。負荷が大きいく (1-3pN) は、単位ステップの大きさは約 5nm で低負荷の時とほぼ同じであったが、1ATP 分解サイクルあたりのステップの回数は半減 (1-3 ステップ)、ステップに要する時間 (Dwell time) は、低負荷時に比べて約 1.5 倍になった (7.6ms)。

さらに詳しい負荷依存性を調べるため、1 分子のミオシン S1 のステップから力-速度関係を求めた。各々の負荷における速度は、単位ステップの大きさをそのときのステップの Dwell time で割ることによって計算した。正の負荷すなわちミオシンが変位する方向と反対に引っ張られるときは、速度は負荷の増加とともに減少した。しかし、負の負荷すなわちミオシンが変位する方向に引っ張られるときは、負荷の増加とともに速度は一旦減少するが、さらに負荷が大きくなると増加し、大岩らが遠心顕微鏡によって求めた、アクチンケーブル上を滑走するミオシンビーズの力-速度関係と同様の傾向を示した。

今回得られた力-速度関係やこれまでに報告した速度の温度依存性 ($Q_{10} \sim 2.5$) などの結果は、筋線維や *in vitro* motility assay など多分子の系で見られる運動特性を、1 個のアクトミオシンがすでに有しているということを意味している。

K. Kitamura, A. Hikikoshi-Iwane and T. Yanagida : Single molecule analysis of actomyosin motor: Load dependence