3P133

光ピンセット法による植物ミオシンの単一分子力学測定

○富永 基樹¹、小嶋 寛明¹、横田 悦雄²、中森 鈴奈¹、新免 輝男²、大岩 和弘¹ (¹通信総合研究所・生体物性、²姫工大・理)

植物細胞の原形質流動は、細胞小器官に結合した植物ミオシンが、アクチンフィラメント上を滑り運動することにより発生する。物質を高速運搬する機能を有した植物ミオシンの運動メカニズムについては、まだ明らかにされていないことが多い。今回我々は、分子レベルでのこのメカニズムを調べるために、タバコ培養細胞 BY-2 から、原形質流動に関与している 175kDa ミオシン (ミオシン XI) を単離精製し、光ピンセットによる単一分子力学測定を行った。実験では、ビーズ表面に 175kDa ミオシン分子を運動活性を損なうことなく固定する必要がある。そこで、大腸菌で発現させたペプチド (C 端側 100 残基) に対するポリクローナル抗体を作成し、これを介して直径 $1\ \mu\text{m}$ のビーズ表面への吸着を行った。このビーズは $100\ \mu\text{M}$ ATP 存在下で、ガラス表面に固定したアクチンフィラメント上を $10\ \mu\text{m}$ 以上にわたって滑り運動をおこなった。次に、ミオシン・ビーズ混合比を調整し、運動に関与するミオシンがビーズあたり一分子になるような条件で光ピンセットによる力測定を行ったところ、ビーズはアクチンフィラメントから離れることなく $200\sim 300\text{nm}$ にわたり連続的に運動を行った。この運動の軌跡の中には、ステップ状の変位が観察された。このような運動は、 $100\ \mu\text{M}$ ATP および $5\ \mu\text{M}$ ATP 存在下でも共に観察された。いずれの場合も、最大力は 1pN 以下であった。 $100\ \mu\text{M}$ ATP 存在下での、ビーズの変位速度は $5\sim 10\ \mu\text{m}/\text{sec}$ であり、タバコ培養細胞の原形質流動速度と一致していた。

175kDa 植物ミオシンはプロセッシビティを示し、およそ $1\text{pN}/\text{分子}$ 程度の小さい力発生ししかない (骨格筋ミオシンの $1/5$ 程度) 細胞内物質輸送に適応したミオシンであることを以上の結果は示唆している。M.Tominaga, H.Kojima, E.Yokota, R.Nakamori, T.Shimmen and K.Oiwa : Optical-trap nanometry of the plant myosin at a single molecule level

3P135

光ピンセットを用いた車軸藻ミオシン 1 分子力学測定 - ATP 濃度依存性についての考察 -

○岡本 圭一郎¹、木村 祐史²、平川 昇³、藤目 杉江³、石島 秋彦¹ (¹名大院・工、²阪大院・基工、³名大院・理)

車軸藻ミオシンは、車軸藻細胞内でアクチンフィラメント上を滑り運動することにより原形質流動を引き起こす。その滑り速度は非常に速く、骨格筋ミオシンのおよそ 10 倍の $60\ \mu\text{m}/\text{sec}$ で運動する。どのような機構の違いにより、このような速い滑り速度を実現しているのか、生体分子の運動メカニズムを解明するうえで非常に興味深いところである。

最近の研究から、車軸藻ミオシンは骨格筋ミオシンとは異なり、溶液中の ADP の影響によって、運動に大きな影響を受けることがわかった。(2001 年会 木村) そこで我々は、車軸藻ミオシンの ATP 加水分解反応の特性について調べ、力学特性との対応を理解し、速さのメカニズムを探ることを目的とした。

本研究では、ATP 濃度を下げていったとき、ADP を加えたとき、さらに ATP 再生系をもちいたときなど、様々な溶液条件で、車軸藻ミオシンの 1 分子力学測定を行っている。そして、車軸藻ミオシン 1 分子の引き起こす変位の大きさ、持続時間などがどのように変化していくのかを解析し、化学反応と力学特性との関係について報告する予定である。

K.Okamoto, Y.Kimura, N.Hirakawa, S.Fujime, A.Ishijima : Single molecular mechanics of Chara myosin measured by optical tweezers. Consideration of ATP concentration dependence.

3P134

車軸藻ミオシンの 1 分子力学

○木村 祐史^{1,2}、岡本 圭一郎²、藤目 杉江³、石島 秋彦² (¹阪大・基礎工、²名大院・工、³名大院・理)

車軸藻ミオシンは *in vitro* motility assay において、アクチンフィラメントを数十 $\mu\text{m}/\text{s}$ で走らせる。我々はこの車軸藻ミオシンの速い滑り運動のメカニズムに迫るために、レーザートラップ法を用いて車軸藻ミオシンの力学的特性を調べてきた。昨年の年会での豊嶋らの報告によると、飽和 ATP 濃度 (1mM) において変位の継続時間は 100ms であり、車軸藻ミオシンの速い滑り運動と対応がなかった。この長い継続時間の原因として、我々は ATP 加水分解により生じた ADP がミオシンからの ADP の解離を阻害している可能性があると考え、ATP 再生系を溶液に加えて力学測定をおこなった。すると、ATP 濃度が 2mM ではスパイク状の変位が計測された。さらに、ATP 濃度を $1\ \mu\text{M}$ まで下げても、継続時間がおよそ 100ms から 200ms のステップ状の変位を計測することができた (図 1)。以上のことから、車軸藻ミオシンは骨格筋ミオシンと異なり、溶液中のわずかな ADP の存在が力学反応サイクルに影響を及ぼすことを強く示唆している。本年会においては、車軸藻ミオシンのステップサイズ、ステップの継続時間の ATP 濃度依存性から、車軸藻ミオシンの速い滑り運動のメカニズムについて議論をしたいと思います。

図1. 車軸藻ミオシンが発生する変位の時間経過。[ATP]= $1\ \mu\text{M}$

Y.Kimura, K.Okamoto, S.Higashi-Fujime and A.Ishijima : single molecule analysis of Chara myosin

3P136

Processive と non-Processive 運動を使い分ける車軸藻ミオシン

○大口 雅美、藤目 杉江 (名大院・理)

車軸藻ミオシンは XI 型に属し、骨格筋ミオシンの 10 倍という速い滑り速度がその最も大きな特徴である。この速い滑り運動が如何にして発生するか、その分子メカニズムを明らかにすることが我々の課題である。

レバースームモデルに依れば、アクチン活性化 ATP 分解活性が 10 倍高ければ、車軸藻ミオシンの滑り運動の速さは理解できる。然し、ほぼ同じ 25s^{-1} であった。では、ストローク時間が短いのだろうか。だが、*in vitro* 運動アッセイ法でアクチン線維の連続した滑り運動に必要な最低ミオシン分子密度は $\sim 500\text{分子}/\mu\text{m}^2$ と HMM の場合とはほぼ同じであった。このことから、アクチン・ミオシン結合時間は同程度と推測される。

然し、車軸藻ミオシンでは滑り速度、及びアクチン活性化ミオシン ATPase 共に強い ADP 阻害を受けることを我々は見出した。これより、アクチン・ミオシン・ADP 状態での高い affinity が予想される。車軸藻ミオシンは低 ATP 濃度 ($< 1\ \mu\text{M}$) に於いて pivot 運動を示し、processive モーターの性質をもつ事を昨年報告した。低 ATP 濃度における滑り速度は $1\sim 2\ \mu\text{m}/\text{s}$ と非常に速い。

ATP 濃度と滑り速度の関係を検討した結果、ATP 濃度、滑り速度の逆逆プロットから車軸藻ミオシンの化学力学エネルギー変換過程には Processive、non-Processive の 2 つの異なる経路があり、環境に合わせて使い分けられていることが示唆された。この 2 つの基本過程がどのように切り換えられるのか、更に詳細に検討して報告する。

M.Ooguchi and S.Higashi-Fujime : Chara myosin switches the pathway between processive and non-processive movement