1P177

ATP 存在下におけるキネシン単頭結合内の状態変化

○秋山 留美¹、小口 祐伴¹、石渡 信一^{1,2} (¹ 早大院・理工・生命理工、² 早大院・理工・物理)

キネシンは双頭構造を持ち、ATP 加水分解エネルギーを利用して微小管の+端方向へ小胞を輸送するモータータンパク質である。我々はこれまで、微小管とキネシン1分子の結合を破断させるために必要な力(破断力)を測定することで、nucleotide-free 状態と AMP-PNP 状態ともに双頭結合であることを明らかにした(ただし、単頭結合-双頭結合間の変換速度は異なる)。また同様に、単頭ヘテロダイマーキネシン1分子を用いて破断力測定したところ、平衡状態にある各ヌクレオチド結合状態において、異なる破断力(ADP: 3.4 (3.9) pN, nucleotide-free と AMP-PNP: 7 (10) pN; +端(-端)方向負荷)をもつ弱結合と強結合の2つの結合状態が単頭結合内に存在することを明らかにした。そこで今回、単頭ヘテロダイマーキネシンと微小管の結合の破断力を、非平衡状態にある1 mM ATP 存在下において測定した。その結果、2つのピークを持つ破断力分布が得られた。そして各ピークの値は、各ヌクレオチド一定条件で得られた弱結合と強結合に対応する破断力の値にほぼ一致した。このことは、ATP 加水分解サイクル中に単頭結合内において弱結合(ADP 状態)・強結合(AMP-PNP 状態または nucleotide-free 状態)の状態変化が生じていることを示唆する。さらに、負荷上昇速度を変化させ同様の実験を行ったところ、負荷上昇速度の増加に伴い、破断力が増加した。これらの負荷上昇速度と破断力ピーク値の変化の関係性から、キネシン頭部への負荷と ATP 結合能の関係性を考察するとともに、キネシン頭部に働く内部負荷に基づく歩行メカニズムに迫りたい。

R.Akiyama, Y.Oguchi and S.Ishiwata : Transition of binding states of each kinesin head in the presence of ATP

1P179

分子モーターの連携に由来する運動の効率化

○江崎 誠治¹、石井 由晴²、柳田 敏雄^{1,2} (¹ 阪大院・生命機能・ナノ生体、² 科技振・ソフトナノマシン)

生理条件下では、溶媒分子などの絶えざる衝突により、生体分子の位置・形状は激しく揺らいでいる。こうしたノイズな環境にある為、個々の生体分子の振舞いも確率論的にはなるが、それでも正しく機能している。激しい揺らぎの中にありながらも生体分子が正しく働くメカニズムを明らかにすべく、分子モーター・ミオシンが揺らぎを利用して動くモデルの構築を進めてきた。そして、相互作用場に摂動を与えることで、方向性のある運動を取り出し得ることを確認した。また、ATPase サイクルとの対応関係を考慮した運動モデルの提案も行った。

一方多分子の系では、平均化により揺らぎの影響が打ち消され、個々の分子が示す方向性が強調される。その為確率論的というよりも寧ろ決定論的な挙動を示し、単分子の場合よりも効率的に機能する。しかし例えばミオシンに於いて、単分子では高々 30 nm に過ぎない変位が、フィラメント構造では 60 nm 以上に及ぶ例が報告されており、単なる平均化では説明のつかない現象もある。多分子の運動を考えるには、分子同士の連携など、平均化以外の要素も検討する必要があると言えよう。

そこで分子内・分子間・フィラメント内部での分子モーターの連携を考慮に入れ、モデルを構築した。フィラメントでは、各ミオシンヘッドが弾性要素で結ばれると仮定し、ATP の加水分解サイクルに共役したアクチンフィラメントの構造変化も盛り込むことで、ATPase 反応に伴うアクトミオシンの滑り運動をシミュレーションにより追跡した。その結果、1 回の ATPase サイクルで 100 nm 以上もの長距離にわたる滑り運動が生じ得ることが解った。この系を基に、確率論的に動作する素子が連携することでもたらされる運動の効率化について、定量的に議論する。

S.Esaki, Y.Ishii and T.Yanagida : Effective movement of the cooperative action of multi-headed molecular motors

1P178

Myosin VI-actin interaction: Dependence on loading direction and nucleotide state of a motor

○Mikhailenko Sergey¹、小口 祐介²、Olivares Adrian³、De La Cruz Enrique³、石渡 信一¹ (¹ 早大・理工・物理、² 早大院・理工・生命理工、³ Molecular Biophysics & Biochemistry Dept., Yale Univ.)

Myosin VI is the only characterized pointed-end directed member of the myosin family. It exists as a monomer, but, when artificially dimerized, was shown to “walk” processively along the actin filament with an unexpectedly long (more than 30 nm) step. Here, to get further insight into the mechanism of its processive movement, we studied the mechanical properties of a single myosin VI-actin complex, including the unbinding force and the elastic modulus, in various nucleotide states. A plastic bead with an attached single myosin VI molecule was trapped by laser tweezers, brought close to an actin filament, which was firmly attached to the glass surface via the biotin-streptavidin interaction, and the stage was then moved with a constant speed, inducing the external loading on the myosin-actin bond, towards either pointed or barbed end of the actin filament. The measurements were performed for both rigor and ADP-bound states. The effect of various parameters, such as the loading rate or nucleotide concentration, was studied as well. We detected the necessary conditions, under which the unbinding force depends on the loading direction. Based on these results, we propose a model for the myosin VI processivity.

S.Mikhailenko, Y.Oguchi, A.Olivares, E.De La Cruz, and S.Ishiwata : Myosin VI-actin interaction: Dependence on loading direction and nucleotide state of a motor

1P180

高粘性下での小胞結合単頭ミオシン VI のバイアス拡散運動

○岩城 光宏^{1,2}、岩根 敦子³、池辺 光男⁴、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 阪大院・基礎工、² CREST、³ 阪大院・生命機能、⁴ Univ. of Massachusetts Medical school)

ミオシン VI はエンドサイトーシスに関与し、アクチンフィラメント上を1方向に運動することで小胞を輸送するモーター蛋白質である。通常、ミオシンは二量体化していることで小胞輸送に必要な長距離運動能を獲得する。しかし、ミオシン VI は細胞内に存在する天然のものを精製してきても、安定して単量体で存在している(Lister 2004)。我々が精製したミオシン VI も単量体で存在し、GFP を融合したミオシン VI の1分子観察を行なってもアクチン上の連続的な運動は観察されないことを昨年の年会で報告した。ただし、ミオシン VI の小胞結合部位にポリスチレンビーズを結合させると 100 nm 程度の連続的な運動が観察できた。連続的な運動頻度の統計解析、ビーズに結合した GFP ミオシン VI の1分子観察による解析、二量体を強制的に形成させたミオシン VI 変異体の運動特性との比較から、連続的な運動は単量体ミオシン VI 1 分子が持つ特性であることが示された。

ミオシン VI の小胞輸送は、高密度のアクチンメッシュワークの中で行なわれている。このメッシュワークが、細胞内で粘性が上がっている主な要因となっている。今回、同じメッシュワーク構造によって粘性を上げるメチルセルロースを用いて、細胞内と同等程度の粘性下でビーズを結合した GFP ミオシン VI の1分子観察を行なった。高粘性によってビーズの拡散は遅くなり、アクチン上のビーズ結合ミオシン VI は頻繁に結合・解離を繰り返しながらも1方向に運動を行うのが観察された。単量体1分子の条件でも1 μ m 程度の運動が可能であり、単量体2分子程度の条件にするとさらに安定して1方向運動を行なった。細胞内の小胞輸送においてミオシン VI の二量体化は必ずしも必要とせずに、単量体1分子もしくは数分子あれば機能を果たすことができると考えられる。

M. Iwaki, M. Ikebe, T. Yanagida : Biased diffusional motion of cargo bound single-headed myosin-VI observed in high viscous solution