

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570159

研究課題名（和文） 100%近い duty-ratio をもつクラス VIII ミオシンの機能解析

研究課題名（英文） Characterization of enzymatic property plant specific class VIII myosin.

研究代表者 伊藤 光二（ITO KOHJI）

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：50302526

研究成果の概要（和文）：ミオシンは 35 のクラスに分かれている。このうち高等植物に存在するクラス VIII ミオシンの酵素機能はまったく調べられていなかった。本研究は、クラス VIII ミオシンの酵素機能を調べた結果、運動速度が非常に遅く、ATP 分解活性も非常に小さいミオシンであることがわかった。また、遊離  $Mg^{2+}$  によって運動速度、ATP 分解活性が大きく制御されることがわかった。そして、この制御は遊離  $Mg^{2+}$  が ADP 解離速度を制御することによって行っていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Myosin is motor protein which converts chemical energy into mechanical movement. Phylogenetic analysis revealed that myosins consist of at least 35 classes. Among these classes, plant has only 2 classes, namely, class VIII and class XI. Although enzymatic and motile properties of class XI myosin have been well studied, those of class VIII myosin have not been studied so far. Thus, We studied the enzymatic and motile properties of *Arabidopsis* class VIII myosin, *ATM*. We have found that actin sliding velocity by *ATM* was very slow and actin-activated ATPase activity of *ATM* was very low. In addition, we also found that both the actin sliding velocity and the actin-activated ATPase activities were regulated by free  $Mg^{2+}$ . Kinetic analyses using stopped flow apparatus revealed that free  $Mg^{2+}$  controlled ADP dissociation rate from acto-myosin-ADP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：ミオシン, 分子モーター, アクチン, シロイヌナズナ, 植物, キネティックス, 遊離マグネシウムイオン

## 1. 研究開始当初の背景

ミオシンは ATP の加水分解で生じた化学エネルギーを、アクチンの方向性の運動という力学エネルギーに変換する代表的なモーター蛋白質である。ミオシンはすべての真核生物

に存在し、筋収縮、音波振動の伝達、細胞運動、細胞内オルガネラの運動、原形質流動、エンドサイトーシスなど、組織レベルから細胞レベルにいたるまで多様な運動に関与している。ミオシンはそのモーター領域のAMI

ノ酸配列の系統学的解析から大きく分けて 35 のクラスに分類されており、またそれぞれのクラスの中でも多くのサブクラスに分類されている。クラス、サブクラスが違えばミオシンの特性は大きく異なってくる。例えば、運動速度や ATP 加水分解活性はそれぞれ最大 1000 倍近く違う。そして 1 分子の ATP の加水分解あたりに発生する力の大きさやステップサイズもそれぞれ 10 倍近く違う。また、アクチン繊維を滑らす方向もミオシンのクラスにより異なる。さらに duty ratio も 5% ~ 70% とミオシンのクラスにより大きく異なる。このように、ミオシンはクラス、サブクラスにより酵素特性が多様性に富んでおり生物の複雑多様な機能を行っている。

このような多様性に富むミオシンのそれぞれの酵素特性を明らかにすることは生物の多様な運動機構の分子レベルでの理解には必要不可欠である。また、それぞれのミオシンの多様性機構の詳細を明らかにすることは、ミオシンの化学-エネルギー変換機構のさらなる理解につながる可能性もある。実際に、近年のクラス V やクラス VI ミオシンを用いた研究により、ATP 加水分解に対応したレバーアームの構造変化により化学エネルギーが力学エネルギーに変換されるというレバーアームモデルが有力となっている。しかし、このモデルが妥当だとしても化学-力学エネルギー変換の素過程についてはほとんどわかっていない。一方、単純なレバーアームモデルでは説明できない実験結果もある。そこで、ミオシンの化学-力学エネルギー変換機構の詳細な解明のためには、これまでにない新たな特性をもつミオシン機能解析が有意義と考えられる。

## 2. 研究の目的

ミオシンは 35 のクラスに分かれているが、高等植物にはクラス XI とクラス VIII ミオシンの 2 クラスが存在する。クラス XI ミオシンは非常に速い運動速度、非常に高い ATP 分解活性と動物のミオシンにないユニークな特徴をもっており、クラス XI ミオシンの研究によってミオシンの多様性機能や運動機構について多くの知見が得られてきた。一方、植物に存在するもう一方のクラス VIII ミオシンについてはその酵素機能がまったく調べられていなかった。クラス VIII ミオシンもクラス XI ミオシン同様に動物のミオシンにないユニークな酵素機能をもっていること予想できる。クラス VIII ミオシンの酵素機能がわかればクラス VIII ミオシンが植物内での働きの理解が進むだけでなく、ミオシンの多様性機能の理解やミオシンの化学-力学エネルギー変換機構のさらなる理解につながる。以上の理由で本研究はクラス VIII ミオシンの酵素機能の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

植物細胞はタンパク質分解酵素に満たされている液胞がほとんどの容積をしめるため、植物細胞から天然のミオシンを精製するのは非常に難しい。そこで、分子生物学的手法によるミオシンの発現、精製をおこなった。シロイヌナズナのクラス VIII ミオシン *ATM* を cDNA からクローニングし、その MD および MD-1IQ を昆虫細胞発現用のプラスミドの pFastBac に組み込んだ。それぞれのコンストラクトには精製用に His-tag, *in vitro* 運動アッセイ用のために、myc-tag をつけた。ミオシンのウィルスの産生、増殖には昆虫培養細胞 Sf9 を使用した。ミオシン発現用には昆虫培養細胞 High Five を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) Constructs

アミノ酸配列から予想される *ATM* の構造模式図を図 1; Native *ATM* に示す。すなわち、N 末にモータードメイン (MD) があり、その次にカルモジュリン結合 IQ motif が 4 つ続く。それぞれの IQ motif にカルモジュリン様の軽鎖が結合すると考えられる。IQ motif の後に、159

アミノ酸の短い coiled-coil があり、C 末には球状尾部がある。本研究では、MD

および、MD-1IQ を用いた (図 1; MD, MD-1IQ)。

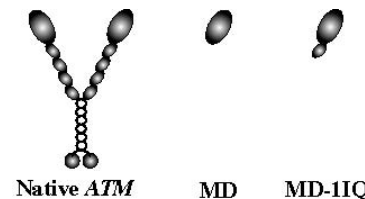


図 1. 天然のシロイヌナズナ クラス VIII ミオシン *ATM* (Native *ATM*) と分子生物学的手法でつくった MD および MD-1IQ

### (2) ATPase 活性

アクチンを含まない、MD だけの basal  $Mg^{2+}$ ATP 加水分解活性は 25 °C で  $0.008 \pm 0.0007$  Pi/ sec だった。次にアクチン存在下の濃度を  $Mg^{2+}$ ATP 加水分解活性を様々なアクチン濃度で測定した。ミオシンの ATP 加水分解活性はアクチンフィラメント存在下で活性化され、そのアクチン濃度変化による活性化曲線はミカエリス・メンテン型となる。最大活性である  $V_{max}$  の半分の活性をもたらすアクチン濃度 ( $K_m$  値) はアクチンとの親和性の指標となる。この値が小さいほどアクチンとの親和性が高い。MD のアクチン活性化 ATP 分解活性は 2 mM ATP, 4 mM  $Mg^{2+}$  存在下で  $V_{max}$  が  $3.4 \pm 0.1$  Pi/s,  $K_m$  が  $4.4 \pm 0.2$   $\mu$ M であった (図 2; 1.9 mM free  $Mg^{2+}$ )。MD-1IQ も MD とほとんど同じ活性であった ( $3.7 \pm 0.2$  Pi/s,  $K_m$  が  $4.3 \pm 0.8$   $\mu$ M)。植物ミオシンはこれまでクラス XI が調べられてきたが、クラス XI ミオシンは ATP 分解活性が非常に高いことが知られている。本研究によっ

て、植物に存在するもう一方のクラス VIII ミオシンは ATP 分解活性が非常に低いことがわかった。

### (3) *in vitro* 運動アッセイ

MD および、MD-1IQ によるアクチン図縁運動速度を *in vitro* 運動アッセイによって測定した。MD は 2 mM ATP および 4 mM  $Mg^{2+}$  存在下で  $0.020 \pm 0.0027 \mu\text{m/s}$  であった (図 3; MD, 1.9 mM free  $Mg^{2+}$ )。一方、MD-1IQ は  $0.089 \pm 0.0132 \mu\text{m/s}$  であった (図 3; MD-1IQ, 1.9 mM free  $Mg^{2+}$ )。MD と MD-1IQ のレバーアームの長さを Myosin Va の結晶構造から予測すると、MD は 3 nm で、MD 1IQ は 7 nm である。ミオシン運動速度はレバーアーム長に比例するので、MD と MD1IQ の速度の差の主な要因はレバーアーム長さによると考えられる。速度がレバーアーム長と正確な正比例ではないのは MD1IQ のレ

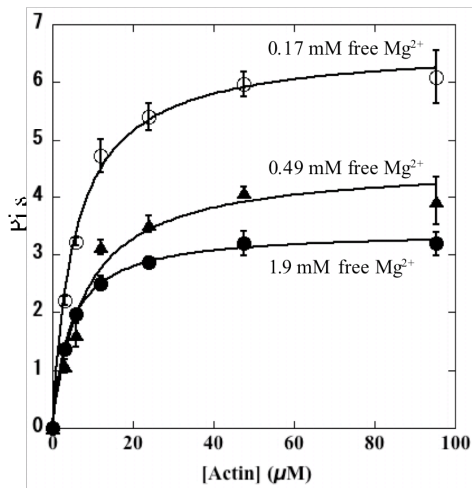


図 2. MD のアクチン活性化 ATP 分解活性と遊離  $Mg^{2+}$

バーアームは IQ motif がレバーアームの主な部分だが、MD のレバーアームはすべて MD から成り立っており、レバーアームの物質の剛性が違うためと考えられる。天然のシロイヌナズナの ATM は IQ motif が 4 つあり、レバーアーム長は 27 nm と考えられるので、速度は約  $0.3 \mu\text{m/s}$  程度と予測される。これからクラス VIII ミオシンは、これまで酵素活性や運動速度が調べられてきた植物のもう一方のクラスのみオシンであるクラス XI より一桁以上遅いミオシンであることがわかった。

### (4) ストップドフローによる速度論的解析

MD を用いて ストップドフロー装置による速度論的解析をおこなった。ミオシンによるアクチン滑り運動はステップ距離をアクチンとの強い結合時間で割った値に近似される。先ほど示したように、クラス VIII ミオシン ATM はアクチン滑り運動速度が非常に低いが、これは主にアクチンとの強い結合時間が小さいことに起因すると考えられる。なぜなら、

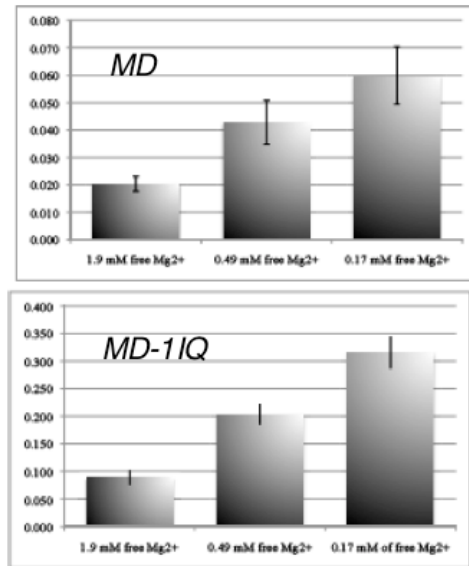
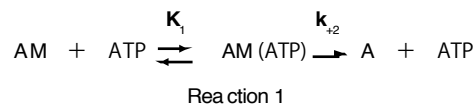


図 3. MD と MD-1IQ の運動速度と遊離  $Mg$

ステップ距離は速度の違う種々のミオシンを比べてもそれほど変わらないからである。アクチンとの強い結合時間は、アクチン-ミオシン-ADP 複合体からの ADP 解離速度と ATP のミオシンに結合によるアクチンからの解離速度によって規定される。クラス VIII ミオシン ATM のそれぞれの解離速度をストップドフロー装置で測定した。

#### ① ATP の MD 結合によるアクチンからの解離速度

ATP によるアクトモータードメインの解離は Reaction 1 のように 2 段階反応でおこると考えられる。そのときの速度定数は  $K_1 k_{+2} [\text{ATP}] / (1 + K_1 [\text{ATP}])$  と表される。Reaction 1 の最初の反応はアクトモータードメインと ATP の結合、解離の平衡反応であり、2 段階目の反応はモータードメインの異性化によるアクチンからの解離である。



$K_1 k_{+2}$  を決定するためピレンラベルしたアクチン-MD 複合体をストップドフロー装置で様々な濃度の ATP (最終濃度が 100 - 3000  $\mu\text{M}$ ) と混ぜた。ピレンラベルしたアクチンはミオシンと解離すると蛍光強度が上昇する。この性質を利用してアクトモータードメインの解離をピレンラベルしたアクチンの蛍光の上昇により観察した。図 4 の挿入図は 0.5  $\mu\text{M}$  のピレンラベルしたアクチンとモータードメイン複合体を最終濃度 500  $\mu\text{M}$  の ATP と 25°C において混ぜたときの蛍光の上昇を示している。これを single exponential でグラフフィティングすると、その速度定数は  $450 \text{ s}^{-1}$  であった。これをいろいろな ATP 濃度で行った。図 4 の横軸はその ATP 濃度で縦軸

が速度定数である。グラフを  $K_1 k_{+2} [ATP] / (1 + K_1 [ATP])$  にフィットして  $K_1$  を  $k_{+2}$  求めた。 $1/K_1$  が  $470 \mu\text{M}$  で、 $k_{+2}$  が  $450 \text{ s}^{-1}$  であった。また、生理的な ATP 濃度 ( $2 \text{ mM}$ ) のときの解離速度は  $\sim 500 \text{ s}^{-1}$  であった。この結果からクラス VIII ミオシン *ATM* は遅い運動速度を持つが ATP のミオシン結合によるアクチンからの解離速度については遅くなかった。このことからアクチン-ミオシン-ADP 複合体からの ADP 解離速度が遅い可能性が示唆される。

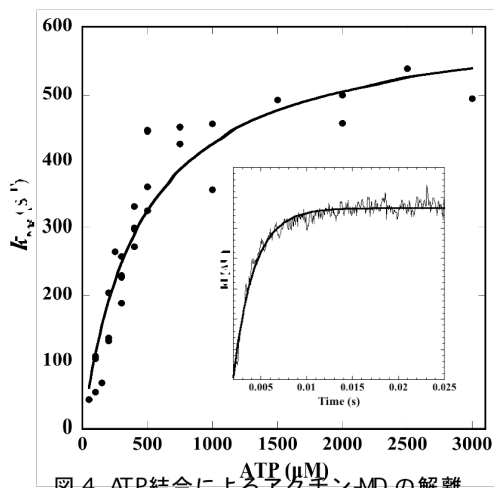


図 4. ATP 結合によるアクチン-MD の解離.

②アクチン-MD-ADP 複合体からの ADP 解離速度

ピレンラベルしたアクチン-MD 複合体溶液に様々な濃度の ADP 混ぜて平衡状態にした。この溶液をストップフロー装置で最終濃度  $2 \text{ m}$  の ATP と混合した。ADP 濃度が低いときは約  $500 \text{ s}^{-1}$  の速度定数の非常に速い反応がみれるが (図 6 の青丸)。これは低い ADP 濃度のときには、アクチンと結合している MD に ADP が結合していないものがあることを示す。ADP 濃度が高くなるに従って ADP が結合していない MD の割合が少なくなっていく、ADP 濃度が  $40 \mu\text{M}$  以上になると約  $500 \text{ s}^{-1}$  の非常に速い反応はみられなくなる。これはアクチンに結合した MD のすべてが ADP を結合していることを示す。しかし、この状態でも single exponential へのフィットはうまくできず、double exponential にう

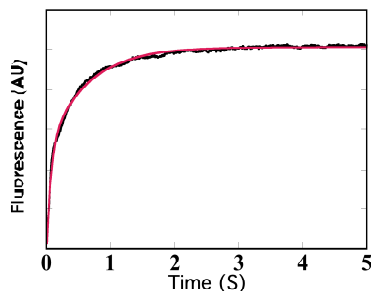


図 5. ADP 存在下でのピレンアクチン-MD の ATP 結合による解離反応蛍光の増加 (黒線) は double exponential (赤線) とよくフィットした。速い速度定数は  $16 \text{ s}^{-1}$ 、遅い速度定数は  $1.7 \text{ s}^{-1}$ 、amplitude は 50% : 50% であった。

まくフィットでき、 $16 \pm 1.8 \text{ s}^{-1}$  の速い反応と、速度定数  $2.4 \pm 0.9 \text{ s}^{-1}$  の遅い反応からなっていた (図 5)。この  $\sim 16 \text{ s}^{-1}$  のやや速い反応と、 $\sim 2.4 \text{ s}^{-1}$  の遅い反応は  $1 - 40 \mu\text{M}$  のどの ADP 濃度のときも存在し、また、その存在比は (速い反応) : (遅い反応) はほぼ同じであった (図 6)。

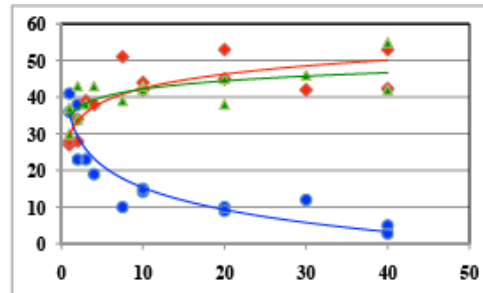


図 6. ピレンアクチン-MD 様々な濃度の ADP 溶液を最終濃度  $2 \text{ mM}$  の ATP と混ぜた蛍光反応を triple exponential にフィットしたときの Super Fast (青) と slow (赤) と Fast (緑) の amplitude の比

(5) 遊離  $\text{Mg}^{2+}$  による ATPase と運動速度の調節  
高等植物シロイヌナズナのクラス VIII ミオシン、*ATM* の運動速度は非常に遅かった。これと同様の遅い運動速度をもつミオシンとして動物のクラス I ミオシン、クラス V ミオシン、クラス VII ミオシンが知られている。これらのミオシンの酵素活性は遊離  $\text{Mg}^{2+}$  によって調節を受けることが知られている。そこでクラス VIII ミオシン、*ATM* について ATPase 活性と運動速度が遊離  $\text{Mg}^{2+}$  によって調節を受けるか調べた。その結果、遊離  $\text{Mg}^{2+}$  が減少するに従い ATPase 活性も (図 2)、運動活性 (図 3) も上昇することがわかった。遊離  $\text{Mg}^{2+}$  が  $1.9 \text{ mM}$  から  $0.17 \text{ mM}$  へとなるにしたがい ATPase 活性は約 2 倍、運動活性は約 3 倍上昇していた。次に遊離  $\text{Mg}^{2+}$  を変化させたときに、アクチン-MD からの ADP 解離反応がどのように変わるか調べた。

前述のように、遊離  $\text{Mg}^{2+}$  が  $1.9 \text{ mM}$  のとき ADP 解離反応は速度定数  $\sim 16 \text{ s}^{-1}$  の速い反応と、速度定数  $\sim 2 \text{ s}^{-1}$  の遅い反応の 2 種類が存在した。遊離  $\text{Mg}^{2+}$  を  $0.17 \text{ mM} - 2.7 \text{ mM}$  まで変化させても  $\sim 2 \text{ s}^{-1}$  の遅い速度定数の反応と  $\sim 16 \text{ s}^{-1}$  の速い速度定数の反応の 2 種類が存在した。しかし、その比は遊離  $\text{Mg}^{2+}$  に依存して大きく変わった。図 7 は速い反応と遅い反応の合計を 100% とする相対値を用いて、遊離  $\text{Mg}^{2+}$  と速度定数の関係を比較した図である。赤が速い反応 ( $\sim 16 \text{ s}^{-1}$ ) の割合を示し、青が遅い反応 ( $\sim 2 \text{ s}^{-1}$ ) の割合を示している。遊離  $\text{Mg}^{2+}$  が小さくなるほど速い反応の割合が多くなることがわかった。

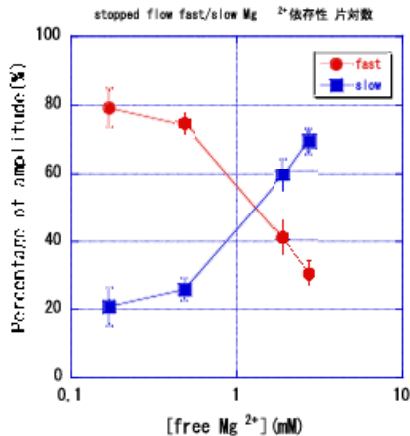


図7. 遊離Mg<sup>2+</sup>濃度と2つの速度定数の割合

以上の結果からアクチン-MD からの ADP 解離速度について図8のモデルが考えられる。すなわち、AM-Mg<sup>2+</sup>はMg<sup>2+</sup>が結合している状態と結合していない状態が平衡状態にある。Mg<sup>2+</sup>が結合している状態では~16 s<sup>-1</sup>のADPの速い解離反応がおき、結合していない状態では~2 s<sup>-1</sup>の遅い解離反応がおきる。



図8. 遊離Mg<sup>2+</sup>によってADP解離速度を変化させるモデル

運動速度の律速はADP解離反応である。また、ATPaseもADP解離反応が律速の1つである。その結果、遊離Mg<sup>2+</sup>によってADP解離速度が変化し、運動速度やATPaseが変化したと考えられる。

最後に遊離Mg<sup>2+</sup>によって制御される2つのADP解離速度について以下に考察する。植物細胞の原形質における遊離Mg<sup>2+</sup>濃度は0.40mMである(Yazaki et al., 1988)。

ATMは原形質連絡に局在している。原形質連絡とは隣接する植物細胞間を繋ぐ構造であり、栄養物やタンパク質の輸送に関与している。ATMを含むクラスVIIIミオシンのアクトミオシン複合体は、原形質連絡を開閉させることで、タンパク質などの大型の分子を含む物質の輸送に関与していると考えられている(Avisar et al., 2008)。

1つ目の役割は、外部からの物理的な力によって張力を発生することである。アクトミオシンADP状態はライゴール(硬直)状態とも呼ばれ、アクチンとミオシンが固く結合し、張力の発生に適した形である。このことから、外部から力がかかった時にミオシンが構造変化を起こし、Mgが解離しにくくなることでライゴール状態を維持することができる。こ

れによってアクチンとミオシンの強い結合状態の時間が飛躍的に長くなり、張力の発生と遅い運動速度を実現させていると考えられる。ATMは発生した張力によって原形質連絡の構造を維持・変化させていると考えられる。

2つ目の役割はMg<sup>2+</sup>濃度の変化によって2つの状態が変化し、原形質連絡の開閉を制御するという役割である。これには2つのパターンがあると考えられる。1つ目は光合成によるATP合成系の活性化に伴って、細胞間の物質輸送効率を高めATPの合成をより効率よく行えるようにサポートする役割である。植物細胞内では、特に葉緑体において光量の変化によって遊離Mg<sup>2+</sup>濃度が増加するという報告がある(Ishijima et al., 2002)。また、緩衝液中のマグネシウム濃度に変化がない場合、ATP濃度が上昇すると遊離Mg<sup>2+</sup>濃度が減少する。これらのことから、光合成によるATP合成が活性化し植物細胞内のATP濃度が上昇すると、相対的に遊離Mg<sup>2+</sup>濃度が減少し、ATMの運動活性がfast型に移行することによって、周囲の細胞との物質輸送を活性化していると考えられる。2つ目は細胞死などの致命的なダメージの細胞間連鎖の回避である。原形質連絡によって細胞同士が繋がっている植物細胞では、隣接する細胞で異常が発生した場合、速やかに原形質連絡を閉鎖しなければ異常が周辺に連鎖・拡大してしまう。隣接する細胞の死に伴う細胞内構造の崩壊によって、その細胞と繋がっている原形質連絡に流入するMg<sup>2+</sup>濃度が局所的に増大した場合、張力を特に強く発生させて原形質連絡を閉じ、連鎖的な死から細胞を守る事ができると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Ito K, Yamaguchi Y, Yanase K, Ichikawa Y, Yamamoto K.

Unique charge distribution in surface loops confers high velocity on the fast motor protein Chara myosin.

Proc Natl Acad Sci USA. 査読有 Vol.106, 2009, 21585-21990

DOI: 10.1073/pnas.0910787106

② Iwaki M, Iwane AH, Shimokawa T, Cooke R, Yanagida T.

Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps.

Nat Chem Biol. 査読有 Vol. 5, 2009, 376-377

DOI: 10.1038/nchembio.171

[学会発表] (計22件)

①伊藤光二, 原口武士, 山本啓一, 最速ミオ

シンであるクラス XI 車軸藻ミオシンの酵素機能解析, 第 84 回日本生化学学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 国立京都国際会館

② 富永基樹, 木村篤司, 山本啓一, 中野明彦, 伊藤光二 高速型シャジクモ・シロイヌナズナキメラミオシン XI がシロイヌナズナ細胞内輸送および成長に及ぼす影響 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 9 月 18 日, 東京大学 駒場キャンパス

③ M. Iwaki, K. Fujita, A. Iwane, L. Marcucci, T. Yanagida Energetics and switching of myosin-V force generation between lever-arm swing and Brownian-search-and-catch. Gordon Research Conferences "Muscle & Molecular Motors". 2011 年 7 月 10 日, New London, USA  
〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 成長増強植物及びその作出方法

発明者: 富永基樹, 伊藤光二

権利者: 富永基樹, 伊藤光二, 理化学研究所

種類: 特許

番号: 米国特許 61/502, 764

出願年月日: June 29, 2011

国内外の別: 外国(米国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 光二 (ITO KOHJI)

千葉大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号: 50302526

### (2) 研究分担者

岩城 光宏 (IWAKI MITSUHIRO)

大阪大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30432503