

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570149  
 研究課題名（和文） 最速モーター車軸藻ミオシンのユニークなアクチン結合様式の研究  
 研究課題名（英文） Unique actin binding motif of the fastest motor protein, *Chara* myosin.  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：伊藤 光二 (ITO KOHJI)  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院融合科学研究科・講師  
 研究者番号：50302526

研究成果の概要：車軸藻ミオシンはすべてのモータータンパク質のなかで最速の運動速度をもつ。分子生物学的手法による変異実験により、車軸藻ミオシンはアクチンとの結合様式が独特であるということ、この独特の結合様式が最速運動をうみだす主要な要因ということを示した。また、電子顕微鏡観察により車軸藻ミオシンはアクチンと結合するとヌクレオチドポケットが大きく開くことがわかった。これらのことから車軸藻ミオシンは独特の様式でアクチンと結合することにより、ヌクレオチド結合ポケットが大きく開き、ADP の解離が促進されることにより最速運動を引き起こしていると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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，車軸藻

## 1. 研究開始当初の背景

ミオシンは多様なクラスに分かれているが、運動速度、ATP 加水分解エネルギー、運動方向、連続運動性 (processivity)、などの性質はミオシンの種類によって大きく異なっている。最近、これらの多種多様なミオシンについて研究がおこなわれて、筋肉ミオシンを用いては見つからなかったミオシンの運動機構に関する新しい知見が数多く得られてきている。このことは、さまざまな特徴をもつミオシンを研究することは、多種多様なモーター特性をうみだす分子機構をも明らかにするのみならず、ミオシンの化学-力学エネルギー変換機構モデルの構築や検証にも有効であることを示す

ものである。淡水産の藻類である車軸藻ミオシンは 50  $\mu\text{m/s}$  で動く最速の分子モーター蛋白質で、この桁違いのこの速さのため注目されてきた。それは、どのような機構でこの速い速度を生み出しているかを解き明かすことは、ミオシンの化学-力学エネルギー変換機構の解明においても大きな知見となると期待されているからである。研究代表者・伊藤はこれまでの研究により分子生物学的手法を用いた蛋白質発現系を用いて車軸藻ミオシンの発現を成功していた。

## 2. 研究の目的

車軸藻ミオシンが他のミオシンに比べて、

何故、これほど速いのかを分子生物学的手法および電子顕微鏡観察により明らかし、そしてそれをもとにミオシンの化学-力学エネルギー変換機構の新たな知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(研究代表者・伊藤)

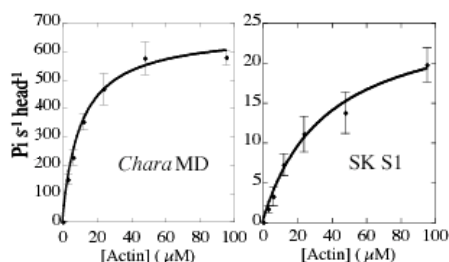
骨格筋ミオシン、平滑筋ミオシン、V型ミオシン、細胞質粘菌II型ミオシンなどこれまでに研究されてきたミオシンのほとんどはミオシンのループ2と呼ばれる領域にリジンのクラスターがありループ2の正味の電荷はプラスに帯電している。骨格筋ミオシン、平滑筋ミオシン、粘菌ミオシンなどを用いた研究により、ミオシン上のプラスに帯電したループ2がマイナスに荷電したアクチンのN末端領域に結合していることがわかっている。また、ループ2の正電荷が大きいほどアクチンとの親和性が大きいことが知られている。これに対して車軸藻ミオシンはループ2に正の電荷をもつアミノ酸がほとんどなく、ループ2の正味の電荷は0である(表1)。

表1. Sequences of loops 2 of various myosins

	Loop 2		
	Length	Net charge	Sequences
<i>Chara</i>	17	0	FP ADEGTKAPSKFMSIG
Chick Sk	28	+3	FATYG GEAEGGGGKGGKGGSSSQTVS
Chick Sm	36	+3	WKDQVDRIV GLDQM AKMTESLPSASKTKGGMFRTVG
<i>Dd</i> II	20	+2	FNDPN IASRAKKGANFTVA
Chick Va	45	+6	FQDEEKAISPTSATPSGRVPLSRTPVPAKARPGQTSKZHKKTIVG

しかし、ループ2の正味の電荷が0の車軸藻ミオシンのアクチンに対する親和性は、正味の電荷が+3の骨格筋ミオシンのものより高い(図1)。

図1



これらのことから車軸藻ミオシンは他のミオシンと違いループ2でアクチンと結合しているのではなくループ2以外に強い正電荷に荷電した領域があり、そこでアクチンと結合している可能性が考えられる。そのような強い正電荷に荷電した領域を調べたところループ3と呼ばれる領域がその候補

に挙げた(表2)。

そこで、車軸藻ミオシンは他のミオシンと

表2. Sequences of loop 3 of various myosins

	Loop 3	
	Length	Net charge
<i>Chara</i>	6	+5
Chick Sk	10	+3
Chick Sm	8	+3
<i>Dd</i> II	6	+1
Chick Va	6	+2

異なりループ3でアクチンと結合しているのか？、そしてループ3を介してのユニークなアクチンとの結合が車軸藻ミオシンの速いアクチン滑り運動の原因となっているのか？、を分子生物学的手法により車軸藻ミオシンのループ3およびループ2に変異を加えることにより調べた。

(研究分担者・安永)

車軸藻ミオシンはミオシン頭部として発現、精製したものをを用いた。一方、アクチンはウサギ骨格筋から抽出したものをを用いた。ミオシン単独、もしくはアクチンと硬直複合体で結合したものを液体エタンで急速凍結し、そのまま電子顕微鏡(EF-2000, 液体窒素温度ホルダーCT3500)にて観察した。画像処理はすべて、Eosを用いた。アクチン・ミオシン硬直複合体に関しては、らせん対称性を用いて初期構造を得た後、単粒子解析法による構造解析を行い、精密化を行った。ミオシン単独の構造については、ミオシンVの原子モデルを初期構造として、向きを決定し、逆投影法を用いて、三次元再構成を行った。

### 4. 研究成果

(研究代表者・伊藤)

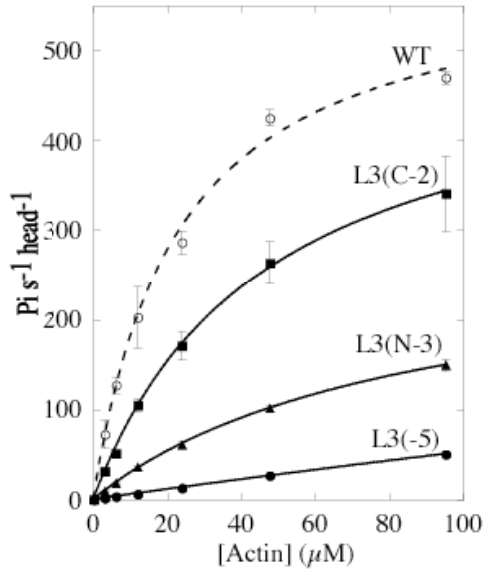
#### 4.1 ループ3変異

車軸藻ミオシンのループ3がアクチンとの結合にはたしている役割を調べるためにループ3に変異を与えループ3の正電荷を変化させた4つの変異ミオシンを作製し、それぞれについてアクチン活性化ATP分解活性を調べた。

野性型(WT)の車軸藻ミオシンはループ3に正味の正電荷は+5である。それに対して、L3(-5)はループ3の5つの正電荷をすべてアラニンに置換した変異であり正味の正電荷が0である。L3(N-3)、L3(C-2)はそれぞれループ3のN末の3つの正電荷、およびC末の2つの正電荷をアラニンに置換した変異であり正味の正電荷はそれぞれ+2、+3となっている。L3(+2)はループ3のN末にさらに2つの正電荷、つまりKKを付加しており正味の正電荷は+7となっている。ループ3の変異および野性型のそれぞれに対して、アクチン濃度を変化させたときのATP加水分

解活性がどのようになるかを調べた(図2)。アクチンの濃度が高くなるにつれ、どれもATP分解活性が高くなった。しかしループ3に変異をもっているものはその高くなりやすさが少なかった。

図2



それぞれについてミカエリスメンテンプロットによりアクチン活性化ATP分解活性のVmaxとKappを求めた(表3)。

表3. Sequences, V<sub>max</sub> and K<sub>app</sub> of loop 3 mutants

	Sequence <sup>a</sup>	Net charge	V <sub>max</sub> (Pi/head/s) <sup>b</sup>	K <sub>app</sub> (μM) <sup>b</sup>
L3(-5)	AAAFAA	0	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
L3(N-3)	AAAFKR	+2	260	81
L3(C-2)	KHKFAA	+3	540	44
WT	KHKFKR	+5	580	23
L3(+2)	KKKHKFKR	+7	390	12

表3をみてわかるように、ループ3の正味の正電荷が減少するとVmaxが減少し、またアクチンに対する親和性も減少した(Kappは増加した)。特にアクチンの親和性に対するループ3の正味の電荷の依存は顕著であった。L3(-5)はアクチンに対する親和性が低すぎてアクチンの濃度の増加につれATP分解活性もほぼ直線的に増加し、グラフが寝てこなかった(図2)、VmaxとKappはミカエリスメンテンプロットから求めることができなかった。

ループ3の電荷をさらに増したL3(+2)は、野性型と比べてさらにアクチンとの親和性が増加した(Kappが減少した、表3)。この

ことはVmaxに関してはループ3には最適な電荷、または最適な長さが必要であることを示唆している。

ループ3の変異はATP分解活性には大きく影響をあたえたが、アクチン滑り速度にはあまり影響を与えなかった(図3)。

#### 4. 2 ループ2変異

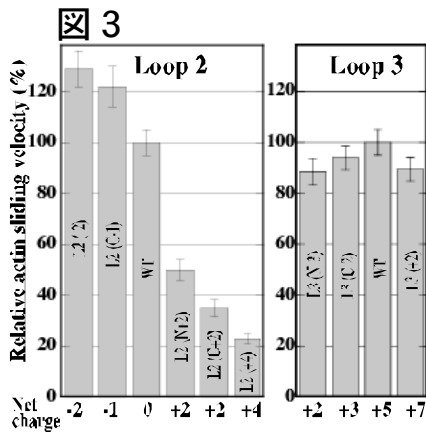
車軸藻ミオシンのループ2は短く、また正電荷の数も少なく、わずか2つしかない。そしてループ2の正味の正電荷(プラスの電荷の数からマイナスの数を引いた数)は0である(表1)。さらに他のミオシンと異なり、ループ2に存在する2つの正電荷はクラスターを形成しておらず、3つのアミノ酸を間にはさんでいる。以下、車軸藻ミオシンのループ2にある2つの正電荷であるリジンについてN末側のものをリジン-N、C末側のものをリジン-Cと呼ぶ。ループ2が車軸藻ミオシンのアクチン活性化ATP分解活性、アクチンとの親和性、運動性に与える影響を調べるために6つのループ2変異を作製した(表4)。

表4. Sequences, V<sub>max</sub> and K<sub>app</sub> of loop 2 mutants.

	Sequence <sup>a</sup>	Net charge	V <sub>max</sub> <sup>b</sup> (Pi/head/s)	K <sub>app</sub> <sup>b</sup> (μM)
L2(-2)	FPADEGTAPS <del>AF</del> MSIG	-2	570	103
L2(C-1)	FPADEGTKAPSAFMSIG	-1	690	69
L2(N-1)	FPADEGTAPS <del>KF</del> MSIG	-1	540	21
WT	FPADEGTKAPSKFMSIG	0	580	23
L2(N+2)	FPADEGGGKGGTKAPSKFMSIG	+2	630	8.2
L2(C+2)	FPADEGTKAPSKKKFMSIG	+2	500	8.3
L2(+4)	FPADEGGGKGGTKAPSKKKFMSIG	+4	470	2.8

L2(-2)はリジン-N、リジン-Cの両方のリジンをアラニンに置換したもので、正味の正電荷はマイナス2である。L2(C-1)、L2(N-1)はそれぞれリジン-N、リジン-Cをアラニンに置換したものであり、どちらも正味の正電荷は-1である。L2(N+1)はリジン-NのN末端側にGGKKGを付加したものである。正味の正電荷は+2である。L2(C+2)、L2(+4)は野性型およびL2(N+1)のリジン-CのC末側にKKを付加したもので、正味の正電荷はそれぞれ、+2および+4である。

ループ3の変異と違い、ループ2の変異はアクチン活性化ATP分解活性のVmaxにはあまり影響を与えなかった(表4)。しかし、驚くべき事にループ2の変異はアクチンとの親和性と同時にアクチン滑り速度に大きく影響を与えた(図3)。



リジン-Cをアラニンに置換した L2(C-2)と L2(-2)はどちらもアクチンとの親和性を激減させたが(表4), それとともにアクチン滑り運動速度を増大させた(図3)。これとは反対にループ2の電荷を増大させたとき, とくにC末側にリジンを付加したときは親和性の増大(表4)につれてアクチン滑り速度を減少させた(図3)。

#### 4. 3 ループ2変異の速度論的解析

ループ2の正電荷を削ったときはアクチン滑り速度が増加し, 正電荷を付加したときはアクチン滑り速度は減少したがこの理由を明らかにするために L2(+4)のアクチン滑り速度が減少した理由を調べた。アクチン滑り運動速度はアクトミオシンからのADP解離速度とアクトミオシンのATPによる解離速度で規定される。つまり L2(+4)のアクチン滑り速度が減少した理由はこれらのうちどちらか, もしくは両方の速度が減少したからと考えられる。そこで, それについて検証するために, ストップドフロー装置を用いた速度論的解析を行った(図4)。

図4

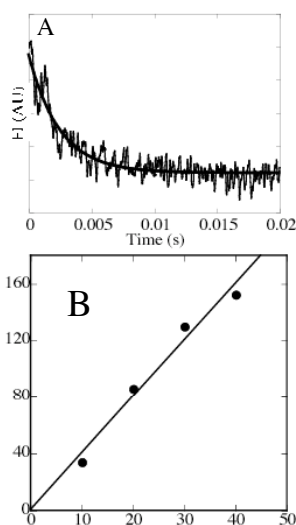
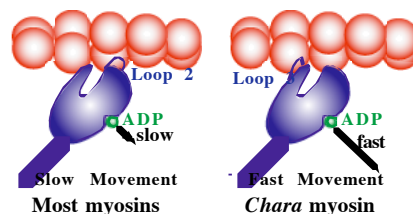


図4Aで示されているように, L2(+4)のmantADP解離速度は  $480 \text{ s}^{-1}$  と野生型の20%であった。一方, アクトミオシンのATPによる解離速度定数は  $4.0 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  と野生型の  $4.0 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  とほぼ同等であった。これらの結果は L2(+4)のアクチン滑り速度が遅くなった理由はアクトミオシンからのADP解離速度が遅くなったからということがわかった。以上をまとめると, ループ2に正電荷が増えるとアクチンとの親和性が上昇するとともにミオシンからのADP解離速度が減少し, それによりアクチン滑り速度が減少することがわかった。

#### 4. 4 車軸藻ミオシンのアクチンとのユニークな結合様式

これまでの結果をまとめると, ループ2の電荷を上げるとアクチンとの親和性が増すがそれとともにミオシンからのADP解離速度が減少しアクチン滑り速度が減少する。一方, ループ3の電荷を上げたときはアクチンとの親和性は上昇するがアクチン滑り速度はほとんど変化しない。つまり, アクチンとの親和性はループ2の正電荷でもループ3の正電荷でも保つことができるがループ2の正電荷の場合はアクトミオシンのADP解離速度を減少させて, アクチン滑り運動速度を幻想させる。車軸藻ミオシンは速い速度を維持するためにループ2の正電荷を落とし, その代わりにループ3の正電荷を上げてアクチンとの親和性を保つように進化したと推測できる(図5)。

図5



(研究分担者・安永)

#### 4. 5 車軸藻ミオシンとアクチンとの結合様式のクライオ電子顕微鏡による観察。

アクチンと Chara-ミオシンとの硬直複体をクライオ電子顕微鏡撮影後, 三次元再構成を行い, 下図に示した三次元再構成像を得た。一方で, 単粒子解析法を用いて, ミオシン単独の構造解析を行った。これらを比較すると, アクチンとの結合により, ATP結合部位に大きなクレフトを生じていることがわかった。ミオシン単独ではみられないため, アクチンとの結合により生じたと考えら得る。

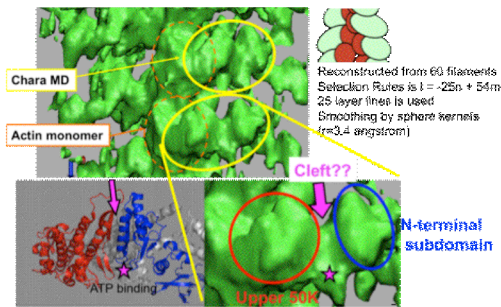


図 アクチン・ミオシン硬直複合体の三次元再構成。(a)は、らせん対称性・単粒子解析による3次元再構成像。緑の等高面を表示している。(b)は、らせん対称性として用いた対称性パラメータを示している。(c)は、X先結晶解析によるMyosin Vの原子モデル。類似性の高い構造として用いた。赤は、Upper-50K、青はN端 domain を表現している。(d)は、(a)の拡大像。ピンクの矢印は、ATP結合部位にあたる。赤い★印は、活性部位を示している。

このことは、Chara-ミオシンがアクチンと結合することで、ADP解離とATP結合が促進することの分子メカニズムを与える可能性がある。

## 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 4 件)

① Ito K., Ikebe M., Kashiyama T., Mogami T., Kon T. and Yamamoto K. Kinetic mechanism of the fastest motor protein, Chara myosin. *J. Biol. Chem.* 282, 19534-19545 (2007), 査読有り

② Nunokawa SY, Anan H, Shimada K, Hachikubo Y, Kashiyama T, Ito K. and Yamamoto K. Binding of Chara Myosin Globular Tail Domain to Phospholipid Vesicles. *Plant Cell Physiol*, 48, 1158-1166 (2007), 査読有り

③ Yuri Nishino, Takuo Yasunaga and Atsuo Miyazawa. A genetically encoded metallothionein tag enabling efficient protein detection by electron microscopy, *Journal of Electron Microscopy*. 56, 93-101 (2007), 査読有り

④ 安永卓生, 「電子顕微鏡画像解析ソフトウェア統合環境 Eos の試み」, 42, 214-216 (2007), 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

① Hiroaki Kojima\*, Kohji Ito†, Dietmar J. Manstein†, Keiichi Yamamoto†, Kazuhiro Oiwa\* Load dependent kinetics of the Chara myosin motor domain with an artificial neck region, Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics, Long Beach, CA, USA, 2008年2月3日

② 安永卓生, 「電子顕微鏡でみえるものはなにか」(招待講演) P & P 先端技術講演会, 2008年10月16日, 九州大学

③ 安永卓生, クライオ電子顕微鏡法の現状と将来(招待講演) 顕微鏡学会・九州支部会, 2008年12月6日, 久留米大学

④ 峰寛, 安永卓生, 「電子顕微鏡—3次元再構成法を用いた車軸藻ミオシンの反応メカニズムの解明」 顕微鏡学会・九州支部会, 2008年12月6日, 久留米大学

⑤ 安永卓生, 「クライオ電子顕微鏡を用いたモーター分子の構造解析」, 生体運動合同班会議, 2009年1月11日, 東京大学

⑥ 峰寛, 伊藤光二, 山本啓一, 安永卓生, 「電子顕微鏡—三次元再構成を用いた車軸藻ミオシンの構造解析」, 第46回日本生物物理学会, 2009年12月3日~5日, 福岡国際センター,

⑦ 伊藤光二, 松本梨絵, 山本啓一, 「植物のみに存在するクラス VIII ミオシンの運動特性」 生体運動合同班会議, 2009年1月11日, 東京大学

[図書] (計 1 件),

安永卓生 (共著), 「ナノイメージング」第一編ナノイメージングを可能にする顕微鏡法・第3章電子顕微鏡を用いたナノイメージング, (株) N T S, 2008年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://life.s.chiba-u.jp/yamamoto/web/itohp.pdf>

(伊藤)

<http://www.yasunaga-lab.bio.kyutech.ac.jp/>

(安永)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 光二 (ITO KOHJI)

千葉大学・大学院融合科学研究科・講師

研究者番号：50302526

(2)研究分担者

安永 卓生 (YASUNAGA TAKUO)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・

教授

研究者番号：60251394