

平成22年 3月 23日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19579004

研究課題名（和文） ミオシンファイブの歩行機構：足首の角度制御の仕組み

研究課題名（英文） Walking mechanism of myosin V: how 'ankle' action is regulated

研究代表者

城口 克之（SHIROGUCHI KATSUYUKI）

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：00454059

研究成果の概要：

ミオシンファイブはアクチン線維上を一方向に運動する代表的な二本‘足’型分子モーターである。足首の角度変化を光学顕微鏡で初めて直接観察した。ATP の結合により角度変化が開始すること、変化した足首の角度が数十秒間安定に保たれた後、元の角度に戻ることを明らかにした。この角度の安定性により、負荷存在下においてもミオシンファイブが一方向に運動できることを説明し、新たな運動機構を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,000,000	0	3,000,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計			3,650,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質、分子モーター、顕微鏡、構造変化、ATP

## 1. 研究開始当初の背景

ミオシンファイブは、ATPの加水分解エネルギーを利用してアクチン線維上を一方向に運動し、細胞内で荷物の輸送を行っているリニアモーター蛋白質である。二本の長い‘脚’と(図)、アクチンへの結合とATP加水分解を行う部位を含む‘足’を持ち、

アクチン線維上を‘歩く’と考えられている。他のリニアモーター蛋白質であるダイニンや他の種類のみオシンと比べ、キネシン-1と同様にもっとも歩行機構の研究が進んでいる代表的な蛋白質の一つである。蛍光色素を片方の脚に結合させ、その位置や角度を計測した結果から (Forkey J.N. et al., Nature, 2003, Yildiz A. et al.,

Science, 2003)、アクチン線維から解離した後足を前方に振り出し、人のように歩くという hand-over-hand モデルが広く支持されている。しかしながら、人が歩くときに利用している重力や惰性(又は慣性)は蛋白質のナノメートルの世界では極めて小さく、逆にブラウン運動の影響は大きいと考えられ、歩行機構は原理的に人のそれと異なるはずである。

Hand-over-hand モデルに基づき、両足着地状態を始点として考えると、(1) 前足ではなく後足がアクチン線維から解離する、(2) 解離した後足がアクチン線維に結合している足よりさらに前方に着地する必要がある。(1)は分子内引力により実現していることを三つのグループが報告している(Veigel C. et al., Nat. Cell Biol., 2005, Purcell T. J. et al., PNAS, 2005, Oguchi et al., PNAS, 2008)。(2)については筆者らがその機構を解明しつつある。後足は、アクチンから解離後に‘股関節’を支点として回転ブラウン運動をし、一方、アクチン線維と結合している足の脚が前に傾き股関節を前方に動かすことを示した(Shiroguchi K., Kinoshita K., Science, 2007)。これは、回転ブラウン運動中の足が、結合している足より前方のアクチン線維まで到達できることを意味する。しかし、これらの機構だけでは説明できない実験結果が報告されていた。負荷により、着地しているアクチンによる股関節の前方移動を妨げても、ミオシンファイブは前方に運動できるのである。

筆者らはアクチン線維から離れてブラウン運動している足のつま先が脚に対してつま先を下げていれば(図)、股関節の前方移動によるバイアスが軽減されても浮いた足が選択的に前方に着地できると考えた。つま先が下がっていると、浮いた足が後方のアクチン線維に近づいても、‘足の裏’がアクチン線維と平行にならず、ミオシンのアクチン結合部位がアクチン線維と接することができないからである。後足がアクチン線維から解離するときにつま先は上がっているため、上記の機構を実現するためには、アクチン線維から解離した後(ATPがミオシンに結合した後)につま先を下げる必要がある。

## 2. 研究の目的

アクチン非存在下において、ミオシンファイブの足首の角度変化を直接観察し、浮いた足のつま先上下運動を含めた機械的側面からのミオシンファイブの歩行モデルを統合的に説明する。具体的には、ATPを結合した(アクチン線維から解離した)足は素早くつま先を下げるのか、または制御されずに揺らぐのかなど角度の時間変化を示し、一方方向性運動におけるつま先上下機構の寄与を示す。

代表的なリニアモーター蛋白質であるミオシンファイブの歩行機構の解明は広い範囲の研究者に新たな知見を与えられる。微小管上を運動するキネシンやダイニンも二本足構造をしているものが多く、どちらもミオシンファイブのように両足を交互に前にだして歩行すると考えられており、その主な機構は共通している可能性が高い。もし、ルール(アクチン線維や微小管)から解離した足のつま先が下がっている状態で安定しているのであれば、脚の部分に柔らかい要素があるキネシンが効率よく前方歩行するメカニズムも説明できると考えられる。脚が柔らかいと、ルールに結合している足による股関節の前方移動が少なく、解離している足が再び後方に着地する可能性も比較的高いが、つま先が下がったまま後方着地するには構造的に無理が生じ、その確率は下がるからである。キネシンやダイニンも数 pN の負荷に逆らって前進歩行することが示されており、負荷により股関節前方移動が少なくなると考えられる。したがって前述したように、浮いた足のつま先が安定して下がっているかどうかは重要な要素である。

## 3. 研究の方法

蛋白質の反応や動きは原理的に確率的である。本研究では、90度程度だと考えられている足首の二つの角度間の遷移の頻度や滞在時間を観察するため、動きが平均化されず、また、連続観察が可能な光学顕微鏡による一分子観察の系を開発した。

ミオシンファイブは本来ダイマー(二本足)であるが、ここではアクチン線維から解離して浮いている足に注目するため、遺伝子工学

を用いて片足にしたミオシンを用いた。足にプローブ（ビーズ）を特異的に結合させるため、N末端に tag を挿入し、発現、精製した（米国 Yale 大学、Prof. Enrique De La Cruz との共同研究）。抗体、ビオチン-アビジン結合を利用して、光学顕微鏡下で向きが判別できる大きさのビーズ（duplex）を足に結合させた。また、脚に結合しているカルモジュリンを別の tag がついたカルモジュリン（遺伝子工学により作製、大腸菌で発現、精製）と入れ替え、tag の抗体を用いて脚を特異的に小さい（通常の光学顕微鏡では見えない）ビーズに結合させた。小さいビーズは基盤（ガラス）表面に吸着させたが、プローブのビーズの動きが基盤（ガラス）表面により制限されにくいようにするために用いた。

角度変化のヌクレオチド依存性を示すために Caged-ATP、UV 照射系を顕微鏡に導入した（Caged-ATP 溶液に UV を照射すると ATP が産生される）。UV 照射系の光路を独立にして電磁シャッターを用い、コンピュータ制御をして任意のタイミングで ATP を産生できるようにした。また、ATP 産生を一回の観察中に複数回行えるようにするため、アピラーゼ（ATP を加水分解する酵素）を溶液に加えて UV 照射により産生した ATP を加水分解させ、ATP 濃度を数秒間で無視できるほどの低濃度に戻るようにした。

UV 照射時間や強度を変化させることにより産生される ATP 濃度を制御し、産生された ATP 濃度を、回転モーターである  $F_1$ -ATPase などを用いて定量した。プローブの像を記録するカメラに UV 照射の光の一部を直接導入し、シャッターの開閉のタイミングとプローブの角度変化のタイミングを同時に取得できるようにした。

顕微鏡観察から得られる結果（速度定数など）と溶液系から得られる結果を直接比較するため、stopped flow を用いて同じ蛋白質の活性（反応速度定数）を計測した。

#### 4. 研究成果

UV 照射（ATP 産生）の後、数秒以内にスイングするビーズが観察され、スイングしたビーズは安定した角度（B）に数十秒間滞在し、その後もとの角度（A）に戻った。この動作は UV 照射に依存した。同じビーズで複数回繰り返すものを解析用データとして採用した。

上述したようにミオシンファイブの歩行において、ATP 結合により後足がアクチン線維から解離すること、そしてアクチンから解離する前の足首の角度はつま先上げ方向であることから、観察された角度 A をつま先上げ、角度 B をつま先下げの向きとした。

一回の照射時間を短くした時や、UV の強度を弱くするとスイングをするまでに必要な照射回数が増加した。また、スイング後につま先下げの向きに滞在しているときに UV を照射しても角度変化は起こらなかった。これらにより、ミオシンに ATP が結合することによりスイングが開始することが示された。ビーズが結合したミオシンが通常（溶液中）の活性を保っているかを示すため、ATP の結合速度を定量した。これは UV 照射パターンを工夫し、数分程度、ミオシン周辺の ATP 濃度を一定に保つ条件を決定することで実現した。ATP 濃度を変化させて求めた、ビーズが結合しているミオシンの ATP 結合速度は、溶液中で測定したそれとほぼ一致した。

つま先下げの向きから 1 秒間程度、つま先上げの向きに戻って再び下げの向きに戻る現象も時々観察されたが、この現象を除くとつま先下げの向きには平均で約 40 秒間滞在し、その分布は一つの時定数で説明できた。この時定数は溶液系で測定したリン酸の解離定数（約 50 秒）とほぼ一致した。したがって、つま先を下げているミオシンは ADPPi を結合していると考えられた。

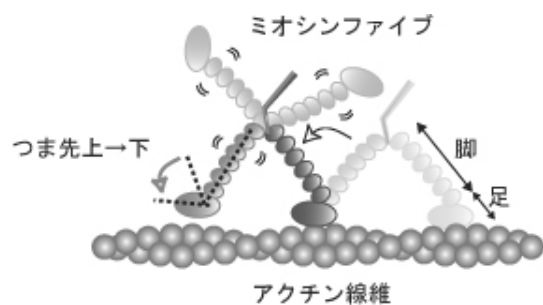


図 ミオシンファイブの歩行機構

つま先上げと下げの向きの角度変化量は約 90 度で、電子顕微鏡による観察から報告されていた角度とほぼ一致した（Burgess et al., JCB, 2002）。それぞれの角度滞り時の角度分布は正規分布でよく説明でき、揺れの程度を示す  $\sigma$  はつま先上げと下げの向きでそれぞれ  $24 \pm 10^\circ$  と  $26 \pm 9^\circ$  であった。つま先下げの向きの角度の安定性を示すエネルギーを求めると  $5.2 k_B T$  となり、この程度のエネル

ギーで、つま先を下げた向きを上げた向きと区別していることが明らかとなった。

これらの結果から、浮いた足は安定してつま先を下げていることが示された。したがって、浮いた足が後方のアクチン線維に近づいたとしても、アクチン結合部位がアクチン線維の方向に向かない時間が多いため、後方には結合しにくい。これにより、浮いた足の足首の角度もミオシンファイブの運動の一方方向性の実現に寄与していることが明らかとなった。前述したように、この機構はアクチン線維に結合している脚の角度変化によるバイアスと異なり、負荷存在下でも有効である。

現在、本研究の成果をまとめた論文を投稿中である。

#### 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 1 件)

①城口克之、“2 本足モーター、ミオシンVの脚の動きを見る”、*生物物理*、49 027-029 (2009)

[学会発表] (計 7 件)

①K. Shiroguchi, H. F. Chin, E. Muneyuki, E. M. De La Cruz and K. Kinosita Jr., Watching ‘ankle’ action of myosin V, 53<sup>th</sup> Annual Meeting of the Biophysical Society of U.S.A Boston Massachusetts U.S.A., March 2009.

②城口克之、ミオシンVのリカバリーストロークの顕微鏡観察：一方向性運動における役割、東京大学、2009. 1. 9-11.

③城口克之、Harvey Chin、宗行英朗、Enrique M. De La Cruz、木下一彦、ミオシンVの足首の動きを見る (アクチンなし)、日本生物物理学会第 46 回年会、福岡国際会議場、福岡、2008. 12. 3-5.

④城口克之「一分子による構造変化の研究：ミオシンVの歩き方」

大阪大学蛋白質研究所セミナー ‘蛋白質の構造変化の仕組みを探る’

大阪大学蛋白質研究所、2008 年 3 月 3 日

⑤城口克之 「ミオシンVの歩く仕組みと、生体 ‘モーター’ の理解へ向けて」

日本生物物理学会第 45 回年会, 横浜, 2007 年 12 月

⑥城口克之 「二本 ‘足’ を持つ輸送モーター、ミオシンVの歩き方」

「アクチン・ミオシン：分子と細胞を如何にして結び付けるか」の会、ワークショップ

早稲田大学 2007 年 11 月 10 日

⑦ Katsuyuki Shiroguchi “ ‘Walking’ mechanisms of myosin V, a two-‘foot’ linear motor protein”The 5th 21st century COE symposium on Physics of Self-organization Systems 「Toward Next Generation Physics」 Ibuka Hall International Conference Center Waseda University, Tokyo, September 2007

[図書] (計 2 件)

①K. Shiroguchi

A rod probe reveals gait of myosin V

Physics of Self-Organization Systems, edited by S. Ishiwata and Y. Matsunaga (*World Scientific*, Singapore, 2008) pp. 37-46.

②城口克之

ミオシンVは梃子 (てこ) の動作とブラウン運動により歩く

*Japanese Scientists in Science*, p17 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

①

発明者： 城口克之, 木下一彦

発明の名称：光学顕微鏡の長焦点深度観察方  
法と光学顕微鏡

権利者： 早稲田大学、メイジテクノ株式  
会社

特願： 2008-23166

出願日： 2008 年 2 月 1 日、国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

城口 克之 (SHIROGUCHI KATSUYUKI)

早稲田大学・理工学術院・講師

00454059

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者