



Title	歩行中のミオシンVの1分子ATPase計測
Author(s)	須河, 光弘
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49294
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	須河光弘
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第22181号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	歩行中のミオシンVの1分子ATPase計測
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 難波 啓一 教授 野地 博行

論文内容の要旨

細胞内小胞輸送を担うミオシンVはアクチンフィラメント上を一方向に連続移動する2量体化ATPaseである。これまでの研究から、各々のATPaseはヌクレオチド状態に応じてアクチンと結合解離(ATP状態で解離、ADP状態で結合など)しながら、2つのATPaseを足にみたてて二足歩行のようにアクチンフィラメント上を移動すると考えられている。この二足歩行モデルによれば、後足は前へステップして前足となるサイクルを繰り返すので、新しいATPは択一的に後足に結合する必要がある。しかし、ミオシンVの前後の足でATPに対する親和性が異なるメカニズムはまだ明らかにされていない。そこで、前足ではADPの解離が抑制、あるいは後足では促進されることで、後足に優先的にATP結合することを1分子計測により実証することを試みた。

まず歩行運動を詳細に計測するために、量子ドット(QD)を利用した高速1分子イメージング技術を開発した。ミオシンVの片足に量子ドットを標識し、運動をナノメートル精度、ビデオレート(30フレーム/秒)で検出することが可能となった。これにより、ミオシンVは、ATP濃度に依存せずに平均75nmのステップを行うことがわかった。次に、ステップの待ち時間の統計解析により、前足においてはADP解離が抑制されていることが示唆された。また、全反射顕微鏡法によるCy3-ATPの1分子イメージングと運動計測とを同時に行うことで、ミオシンVのステップとATPase cycleのタイミングの検出が可能になり、前足からのADP放出抑制を直接可視化することに成功した。しかし、全反射顕微鏡法による1分子イメージングでは前後足の判別はモデル依存となり、かつ100nM以上のCy3-ATPを利用できない。前後足へのATPの結合を直接計測するには、歩行中のミオシンVの片足のみのATP加水分解反応を可視化することが必要不可欠である。さらに、100nM以上のより生理条件に近い高ATP濃度での計測も実現したい。そこで、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を応用した新しい1分子酵素反応可視化技術の開発を試みた。

新しい可視化技術では、QDをFRETのドナーとしてミオシンVの片足のATP結合部位近傍約3nmの位置に修飾した。Cy3-ATPはアクセプターであり、QD修飾した足に結合した場合のみドナーよりエネルギー供給を受けて励起されるので、前後の足の判別が可能である。また、FRETはドナーとアクセプターが約10nm以内にあるときにのみ起こる現象といえるので、10nm以上離れたアクセプター(Cy3-ATP)は励起されない。また、ドナーとしてQDを使うことで、ドナーの励起光によりアクセプターを直接励起するのを回避できる。結果、溶液中のCy3-ATP濃度が100nM以上でも1分子酵素反応を可視化できる。この可視化法を用いてミオシンV単分子のATP加水分解反応

を行ったところ、 $1\mu\text{M}$ の Cy3-ATP 存在下で 1 分子酵素反応の可視化に成功した。この方法を二量体化させたミオシン V に適用することで、運動中のミオシン V のステップと ATPase cycle の同時計測が可能となり、前後足での協同的な ATPase cycle の制御が明らかになるだろう。

論文審査の結果の要旨

細胞内小胞輸送を担うミオシン V は二量体の ATPase であり、二つの ATPase を足にみたててアクチンフィラメント上を一方向に 2 足歩行する。このような運動が可能なのは、前後の足で ATPase cycle が制御され、選択的に後足に ATP が結合するためだと考えられているが、その挙動は明らかではない。そこで、全反射顕微鏡法による Cy3-ATP の 1 分子可視化および量子ドット (QD) を利用した高速 1 分子イメージング技術を用いて、ATPase cycle と歩行運動の同時計測を行った。これにより前足からの ADP 放出が抑制され、後足になってから ADP が放出されていることがわかった。また、前足へ ATP が結合しても逆方向へは動かないことを示唆する結果も得た。このようにミオシン V は前足からの ADP 放出を抑制することで後足へ ATP が結合する確率を高め、さらに、たとえ前足に ATP が結合したとしても逆方向へは動かないようにすることで、アクチンフィラメント上を安定に一方向に連続移動できることが明らかとなった。

また、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を応用した新しい 1 分子酵素反応可視化法を開発した。これは、従来の全反射顕微鏡法では Cy3-ATP の 1 分子可視化が 100 nM 以上では不可能であったのを可能にする技術である。ドナーである QD をミオシン V に標識し、Cy3-ATP がミオシン V に結合したときのみ FRET が起きて Cy3-ATP が可視化されるように工夫することで、Cy3-ATP $1\mu\text{M}$ にて ATP 加水分解反応の 1 分子可視化に成功した。

学位論文と口頭発表により、研究分野に関する基礎知識、研究内容に対する理解度の深さ、そして研究内容と成果などについて審査を行い、博士号の学位を授与するに値するものと考える。