

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49294">https://hdl.handle.net/11094/49294</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

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 2 2 1 8 1 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 75 nm 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 100 nM 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、100 nM 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 3 nm 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 10 nm 以内にあるときのみ起こる現象といえるので、10 nm 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 100 nM 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 を足にみだててアクチンフィラメント上を一方方向に 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  $100\text{ nM}$  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する。