

Title	モータータンパク質の1分子力学
Author(s)	小嶋, 寛明
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129307
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

モータータンパク質の1分子力学

(Single molecule mechanics of motor proteins)

博士論文

小嶋 寛明

モータータンパク質の1分子力学

目次

序章	はじめに	1
第1章	単一アクチンフィラメントの力学的性質	
1-1	序	2
1-2	手法	3
1-3	結果	9
1-4	考察	19
第2章	キネシン分子の1分子力学測定	
1-1	序	27
1-2	手法	28
1-3	結果	36
1-4	考察	67
	参考文献	72
	参考論文	79

序章 はじめに

モータータンパク質は、生物らしさの源である'動き'を分子レベルで司っている。それらの仲間には、筋収縮を担うアクチン-ミオシン系、繊毛の運動を担う微小管-ダイニン系、バクテリアの鞭毛モーター、そして神経細胞での軸索輸送を担う微小管-キネシン系など様々なものがある。これらの生物分子モーターは、いわゆるメソスコピックな領域の世界に存在しており、我々が日常体験している世界とは全く異なる環境にある。たとえば溶液中においては音速に近い速度の水分子に衝突され、常に激しく揺動を受けていることなどがそうである。それにも関わらず、その熱ゆらぎのエネルギーの20倍程度に過ぎないATPの加水分解エネルギーを利用して、1方向に動くことが出来る。その動作の根底には我々にとって未知の機構があるに違いない。我々の興味はその謎を解き明かすことにある。近年、生物分子モーターの動作原理を説明するものとして、マクロな領域ではノイズに過ぎない熱ゆらぎを、自らの運動に積極的に利用するような、興味深いモデルが多数提案されて来ているが、未だにどのメカニズムが真実なのかは決着を見ていない。これらの疑問に答えを出すためには、対象となる系をできるだけ単純化し、メカニズムを述べるために必要かつ十分な時間及び空間分解能でモータータンパク質の動きや力学的、化学的な振る舞いを検出した実験データが必要不可欠である。そこで本研究では、モータータンパク質の動作原理を明らかにするという大きな目標を達成するために、1分子ナノメーター計測の手法を基盤技術として、モータータンパク質の性質を様々な側面から明らかにして行くことを目標とした。

この論文は、大きく分けて2つのテーマに分かれている。まず第1章では、生物分子モーターを構成する部品の物性を理解するために、単一アクチンフィラメントの長軸方向の動的弾性率の測定について述べた。そして、モータータンパク質が弾性を持つということが、分子モデルの構築に与える影響を考察し、その重要性について議論した。第2章では、モータータンパク質が運動を引き起こす際、モーター分子自身が実際にはどのように動いているのかを知るために、キネシン-微小管系での1分子力学測定について述べた。ここでは、キネシン分子の基本的な運動特性を述べるとともに、微小管上でのキネシン分子の動きから導かれる、力発生時におけるキネシン分子内の2つの頭部の動作について議論した。

第1章 単一アクチンフィラメントの力学的性質

1-1 序

数ある生物分子モーターのなかでも、アクトミオシン系は研究対象として最も歴史が古く、最も盛んに研究されてきた。1953年と1971年にはA.F.Huxleyらの一連の研究によりアクトミオシンの相互作用の分子モデルが筋線維の力学応答の実験結果に基づいて提案された。このモデルは筋収縮の特性を広い範囲に渡って説明できる非常に優れたモデルであり、筋収縮の問題も決着がついたように思われたが、いくつかの問題点も抱えていた。その中の1つにアクチンフィラメントの弾性率を無限大としてモデルを構築しているということがあった。もしアクチンフィラメントが有限の弾性率を持ち、力発生時においてミオシン分子の頭部の大きさ程度伸び縮みするならば、モデルの基礎となった実験の結果を根本から見直す必要が出てくる。すなわち、生物分子モーターの動作メカニズムを述べる際には、その力学的な性質を明らかにしておくことが重要である。そこで、本章においては、筋収縮を司るモータータンパク質の一方の主役であるアクチンフィラメント弾性的性質を、ガラスマイクロニードルによる分子マニピュレーション技術とナノメトリーの技術を用いて計測し、アクチンフィラメントの柔らかさから発生する問題点について議論を行う。

1-2 手法

1-2-1 サンプルの調製

実験に用いたすべてのタンパク質はウサギのback skeletal muscleより調製した(29)。

Gアクチンはアセトンパウダーより抽出し精製を行った。アクチン-トロポミオシンフィラメントを作製するためには、150 mM KCl/20 mM Hepes pH 7.8 バッファー中で0.5 mg/mlのトロポミオシン(3)を1 mg/mlのアクチンに混合した。アクチン又はアクチン-トロポミオシンフィラメント (アクチンモノマーにして 2.5 μ M) は、Gアクチンを 5 μ M ファロイジンテトラメチルローダミン(PHDTMR)とともに、100 mM KCl/20 mM Hepes pH 7.8 バッファー中で4 $^{\circ}$ C において一晩 incubate することにより作製した(37)。PHDTMRはフィラメントを安定化すると同時に、蛍光顕微鏡下での観察を可能とする。実験に使用する直前に、アクチンフィラメントはモノマーに換算して8.3 nMになるように希釈した。

ミオシン分子は骨格筋より抽出し、精製を行った。ミオシンは液体窒素によって急速凍結し、-80 $^{\circ}$ Cのフリーザーの中に保存した(9)。

すべての測定は、25 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM Hepes (pH 7.8), 0.5 % 2-メルカプトエタノール, 脱酸素酵素系(glucose, 2.3 mg/ml; catarase, 0.018 mg/ml; glucose oxidase, 0.1 mg/ml)を含む溶液中で、25-27 $^{\circ}$ Cにおいて行った。

1-2-2 測定システム

測定は、マイクロニードルをプローブとして用いた分子操作技術と、光センサーを用いたナノメーター変位検出技術を組み合わせて行った。タンパク質1分子を扱うという性質上、プローブの大きさはサブミクロンのオーダー、そのバネ定数はpN/nmのレベルであることが要求される。またプローブはnmの精度で操作されることが必要であり、分子の変形を観測するためにはnmの動きを正確に検出することが重要である。

ガラスマイクロニードルの作製

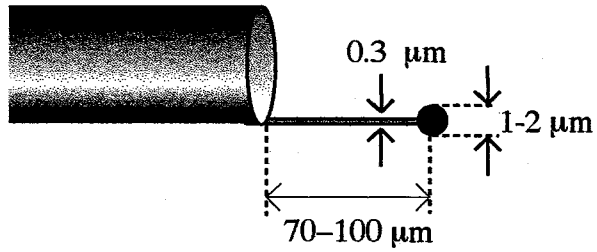
実験に用いたガラスマイクロニードルは、直径が約 $0.3 \mu\text{m}$ という非常に細いものである(図1-1)。マイクロニードルは直径 1 mm のガラス棒をガラス電極プラー(PD-5; Narishige, Tokyo)によって引き延ばし、実体顕微鏡の下で、エポキシ樹脂によって直径約 $100 \mu\text{m}$ の固いガラスロッドに接着してのち、加熱した直径 $5 \mu\text{m}$ の白金線によって長さが $70\text{--}100 \mu\text{m}$ になるように切断した。ニードルの変位は光センサーによって、明視野像の動きを検出することによって行うので、コントラストを上げるために、先端に直径約 $2 \mu\text{m}$ のニッケル粒子を接着した(21)。

本研究で用いたマイクロニードルのバネ定数は $K_N = 0.5 - 5.4 \text{ pN/nm}$ である。ニードルのバネ定数は、バネ定数の分かっている基準針とのクロスキャリブレーションによって求めた。基準針のバネ定数は、基準針の先端に $1.2\text{--}2.4 \mu\text{g}$ の鉄線(直径 $25 \mu\text{m}$ 、長さ $300\text{--}600 \mu\text{m}$)製の重りをのせ、そのときの垂直方向のたわみを検出することによって決定した(24)。

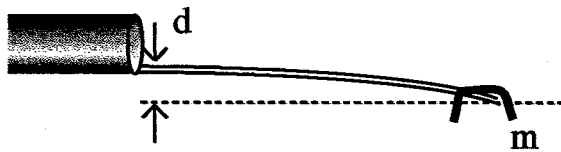
ガラスニードルの時間分解能はガラスニードルにステップ状変位を与えたときの緩和時間 $\tau_N (=K_N/\xi_N; \xi_N$:溶液中でのニードルの摩擦係数)で表される。 τ_N はガラスニードルの熱ゆらぎのパワースペクトル密度関数のコーナー周波数 f_c により、 $\tau_N = 2\pi f_c$ と表される(2-3-1節参照)。熱ゆらぎのパワースペクトルより見積もったニードルの時間分解能は、 $K_N = 0.5 \text{ pN/nm}$ のとき 0.3 ms 、 $K_N = 5 \text{ pN/nm}$ のとき 0.03 ms 程度であった。

ガラスニードルへのアクチンフィラメントの捕捉はニードル表面にミオシン分子をコートしておき、rigor 結合をさせることによって行った(24)。

A



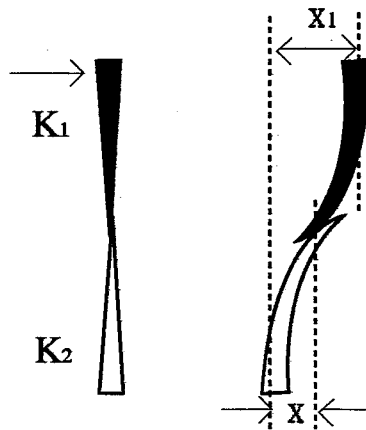
B



$$K = mg / d$$

m : 重りの質量、d : ニードルのたわみ、g : 重力加速度

C



$$K_1 = K_2 \cdot \frac{x}{x_1 - x}$$

図1-1 ガラスマイクロニードル

A 測定用ニードルの形状、B 基準針の作製、C クロスキャリブレーション

装置

単一アクチンフィラメントをガラスマイクロニードルによって操作し、nm変位をmsオーダーの時間分解能で検出する手段は、基本的には石島らにより開発されてきたものと同じである。図1-2A に装置の模式図を示す。装置は倒立型蛍光顕微鏡上に構成されている。ガラスマイクロニードルは水圧式マイクロマニピュレーターと piezo素子によって駆動される。これはmmのダイナミックレンジ、nmの精度を持っている。nm変位を検出するためには、ガラスニードルの先端のニッケル粒子の像（拡大後の直径は約 500 μ m）を二分割フォトダイオード（1つのセルのサイズ：1030 \times 1010 μ m, セル間の間隙：30 μ m）上に投影する。二分割フォトダイオードの差動出力はガラスマイクロニードルの動きに非常に敏感であり、<1 nmの動きも検出することができる(図1-3)。センサーの時間分解能は 0.03 ms となっている。センサーの差動出力はデジタルデータレコーダー(RD101T; TEAC , Tokyo)によって記録し、FFTアナライザー(R9211A; Advantest, Tokyo)およびコンピューター(PC-9801; NEC, Tokyo)によってデータ解析を行った。

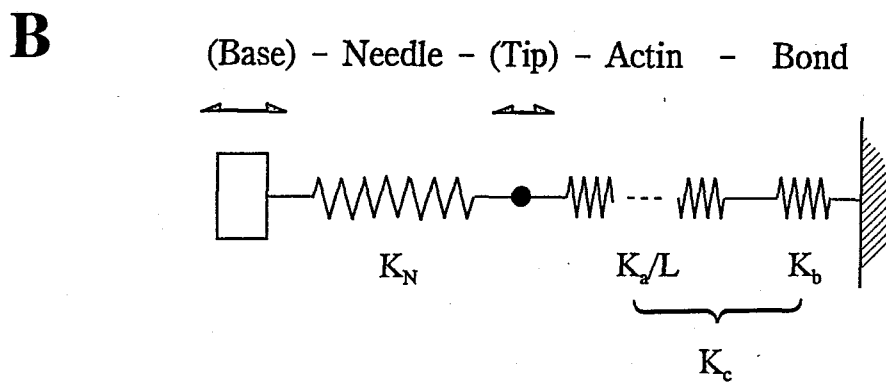
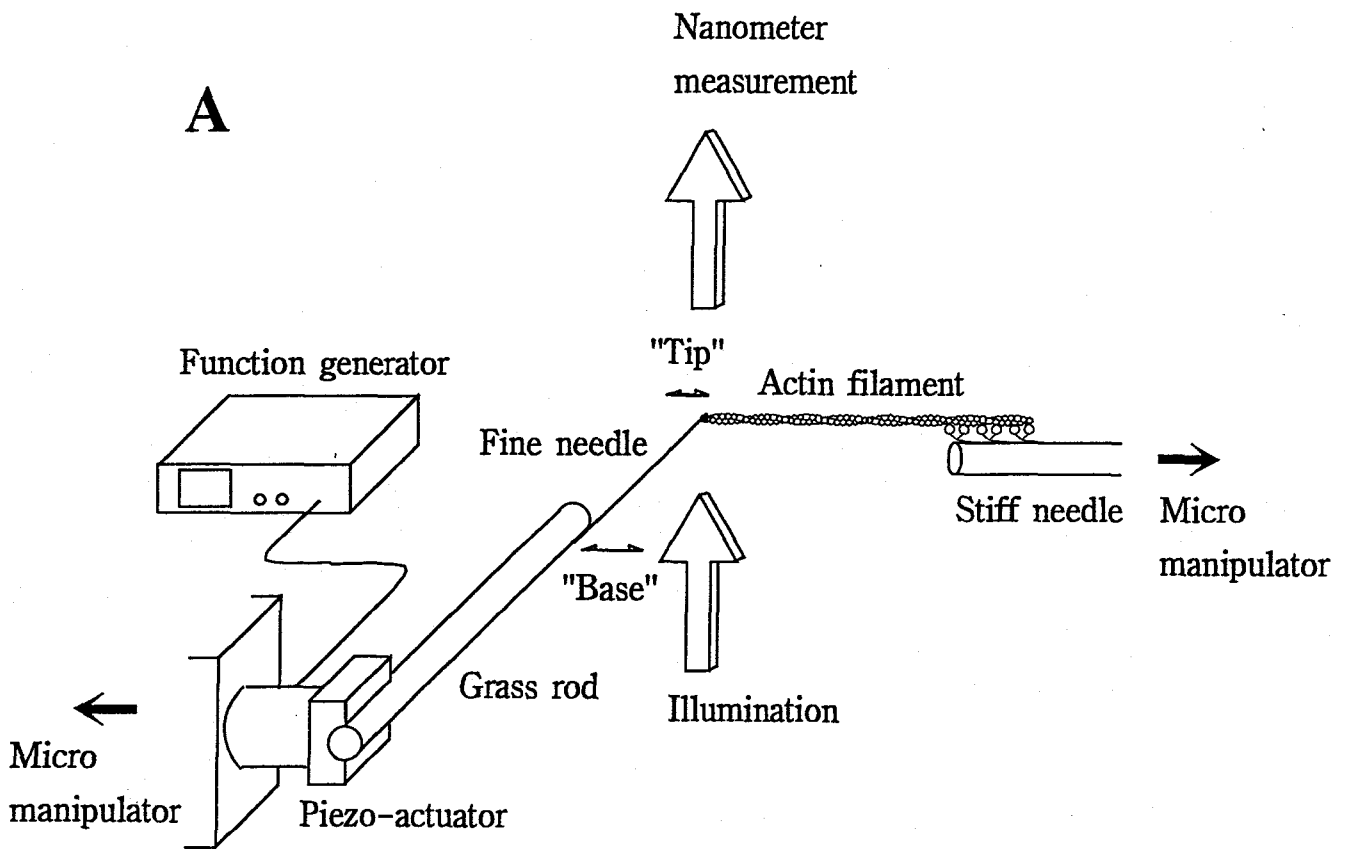


図1-2 測定の模式図

A) : 単一アクチンフィラメントの力学測定装置の模式図。詳細は本文参照。
 B) : 実験系のスティフネス分布の模式図。

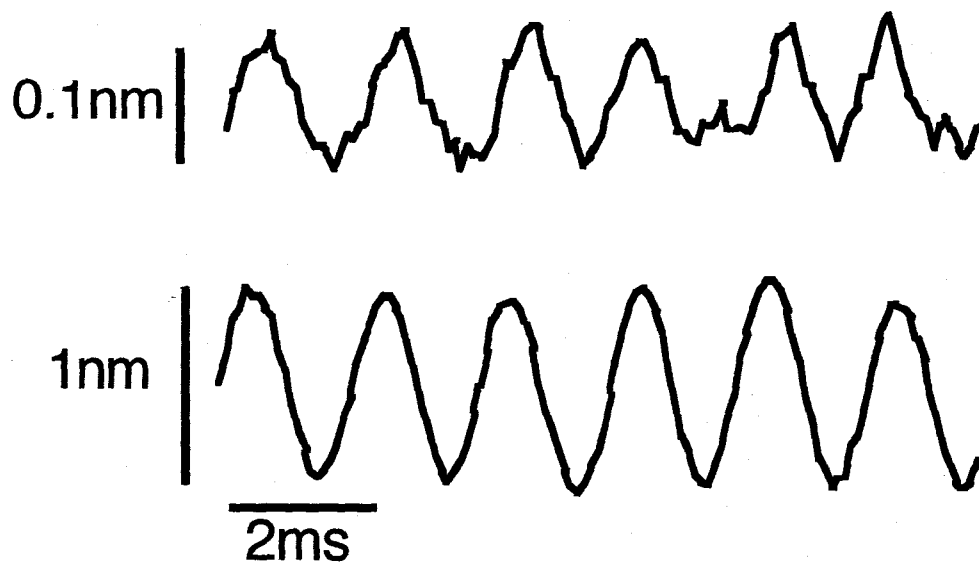


図1-3 センサーで検出したガラスニードルの変位

ガラスマイクロニードルを piezo 素子で表記の振幅だけ $f = 500 \text{ Hz}$ のサイン波状に振動させたときのセンサーの出力。光源は Green YAG レーザー、ニードルのステイフネスは $> 1 \text{ nN/nm}$ のものを用いた。

1-3 結果

1-3-1 アクチンフィラメントの弾性率の測定

アクチンフィラメントの弾性を測定するためには、PHDTMRによってラベルした1本のアクチンフィラメントの両端を、2種のガラスニードルによって同時に捕捉する。片方は力と変位を測定するための非常に細いニードル（直径約0.3 μm 、長さ70 - 100 μm ）によって捕捉し、もう一方はアクチンフィラメントを強固に固定できるような太いニードル（直径約2 μm ）で捕捉する。そして振幅peak-to-peakで10 nm、周波数20 Hzのサイン波状の変位を細いニードルの根元に piezo素子によって加える。図1-4には piezo素子に与えたサイン波状の電圧変化と、センサーによって検出した、ニードルがフリーの際 (x_0) 及びニードルにアクチンフィラメントを捕捉してそれを張った際 (x) のニードル先端の変位を示した。ニードルのサイン波応答の振幅はそのパワースペクトルのピークの高さより読みとった。ここで、 K_c をアクチンフィラメントとニードルアクチン間結合の合成スティフネスとすると、peak-to-peakでかかる力は $F_p = x \cdot K_c$ で与えられる。また、同時にニードルのバネにかかる力は $F_p = (x_0 - x) \cdot K_N$ で表される。これらの力は釣り合っているため、 $K_c = (x_0/x - 1) \cdot K_N$ となる。すなわち、入力信号の振幅 x_0 、出力信号の振幅 x 、ニードルのスティフネス K_N を知れば K_c を求めることができる。

アクチンフィラメントはミオシン分子を介してガラスニードルの表面に吸着される。したがって、アクチンフィラメントとガラスニードルの間には何らかのバネ成分が存在する。このバネ成分とアクチンフィラメントのバネ成分を区別するためには、さまざまな長さ (L) のアクチンフィラメントについて K_c を測定し、 L を横軸に、 $1/K_c$ を縦軸にしてプロットする。 K_a をアクチンフィラメント1 μm あたりのスティフネス、 K_b をアクチンフィラメントとガラスマイクロニードルの間のスティフネスとすると、これらの間には $1/K_c = (L/K_a) + (1/K_b)$ という関係が成り立っているはずなので、 K_a 及び K_b はそれぞれグラフの傾きと y 切片から求めることができる(図1-2B)。

図1-5に、トロポミオシンが存在する条件としない条件下における L に対する $1/K_c$ のプロットを示す。ここで用いたアクチンフィラメントの長さは 3 - 30 μm であった。予想した通りに L と $1/K_c$ の間には直線関係があった。 y 切片の値より K_b を計算すると、トロポミオシン非存在下と存在下における値はそれぞれ、 5.7 ± 1.2 、 5.3 ± 1.6 pN/nm (mean \pm SE) となった。また、グラフの傾きから、トロポミオシンなしとありの際のアク

チンフィラメント1 μm あたりのスティフネスを求めると、それぞれ 43.7 ± 4.6 (mean \pm SEM, n=74)、 $65.3 \pm 6.3\text{pN/nm}$ (n=116)となった。1/ K_c の値が大きく分散しているのは、アクチンフィラメントのガラスマイクロニードルへの結合のしかたにばらつきがあり、その結果 K_b の値が大きくばらつくためであると考えられる。

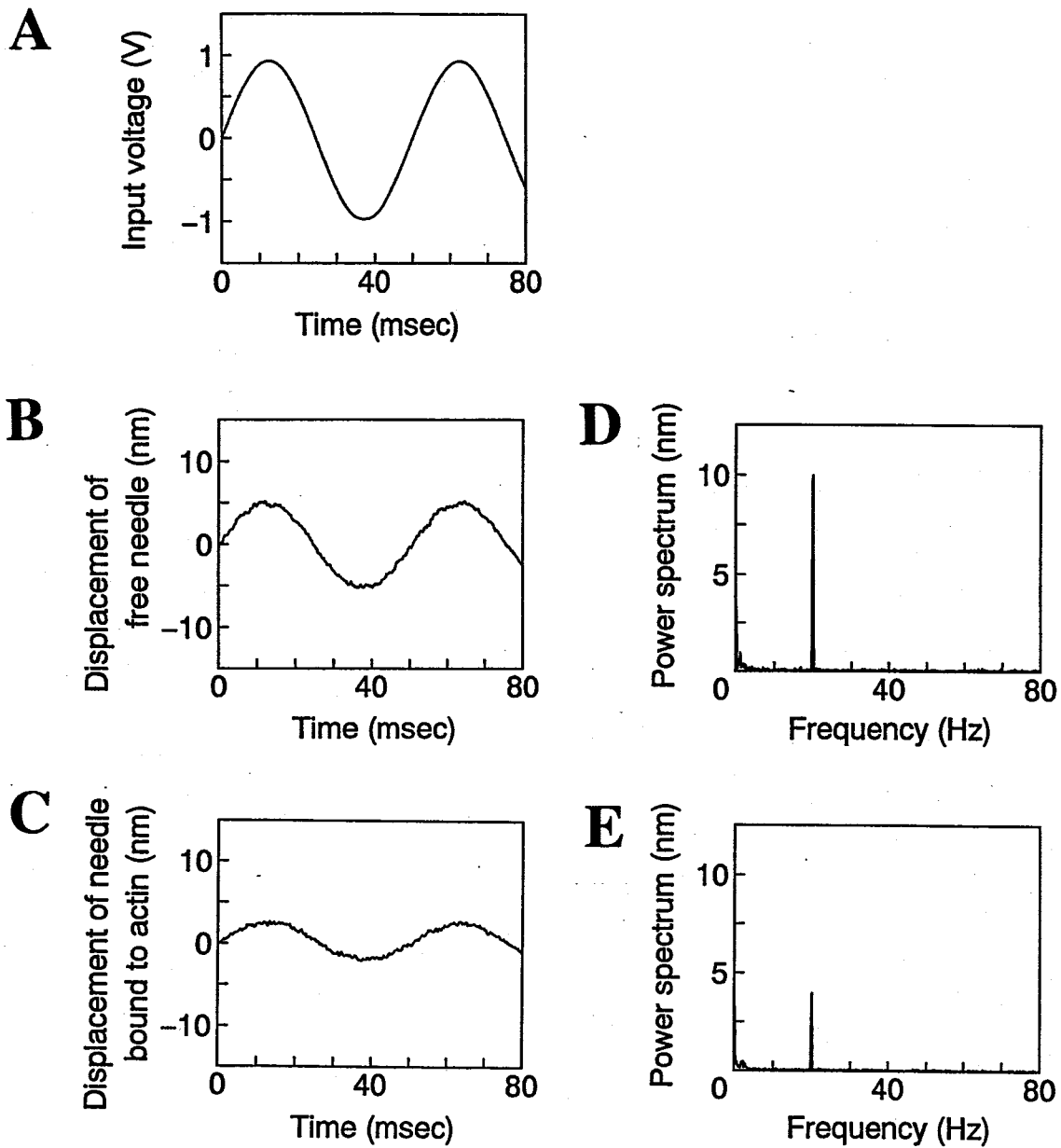


図1-4 ニードルの変位とそのパワースペクトル

A) ピエゾ素子に加えたサイン波状電圧変化($f=20\text{Hz}$)。B,C) アクチンフィラメントを結合しないとき(x_0 , 10 nm)としたとき(x)のニードル先端の変位。フィラメントは太いニードルをピエゾ素子によって引くことにより緊張させる。この図の測定では190 pNの力をフィラメントに与えて測定を行っている。使用したフィラメントの長さは $22\mu\text{m}$ 、ニードルのバネ定数は 1.7 pN/nm である。トレースは32回加算平均することにより平滑化している。D,E) B および C のパワースペクトラム。

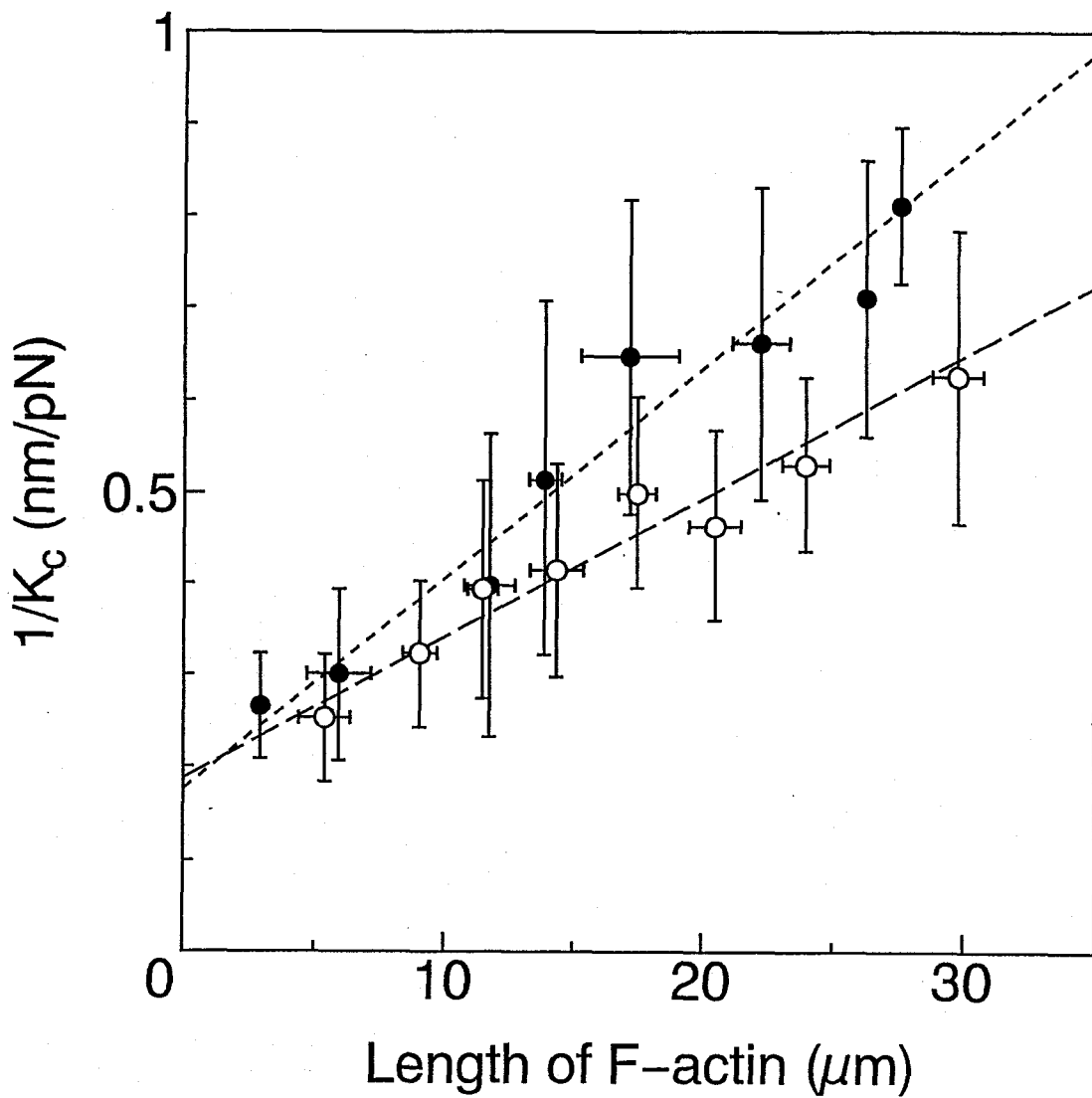


図1-5 アクチンの長さと合成バネ定数の逆数との関係

黒丸：トロポミオシン非存在下、白丸：トロポミオシン存在下。誤差棒は標準偏差を表す (n=4-26)。各点はフィラメントの長さ3μm毎の平均値である。直線はすべての点の最小二乗近似により得た(n=74 at -TM, n=116 at +TM)。

1-3-2 アクチンフィラメントの粘弾性

アクチンフィラメントの粘弾性を検討するために、ニードルの根元に加えたサイン波振動に対する、ニードルの先端のサイン波応答の位相を、ニードルがフリーの場合(ϕ_N)とアクチンフィラメントを捕捉して張った場合(ϕ)について測定し、これらの差の周波数依存性を調べた(図1-6)。ニードルの先端と根元の動きの間の位相のずれは、これらの信号のクロススペクトルの位相を検出することによって調べた。その結果、10 - 500 Hzのサイン波を与えたときには位相のずれは $\Delta\phi = \phi - \phi_N < 0.1$ radian であった。この測定で使ったニードルのバネ定数と、溶液中での緩和時間は $K_N \sim 5$ pN/nm、 $\tau_N \sim 0.03$ msであり、 $f = 500$ Hzでは、 $\phi_N = 2\pi f\tau_N = 0.09$ radian であるので、 $\phi = \Delta\phi + \phi_N < 0.1 + 0.09 = 0.19$ radian となる。長さ20 μ mのアクチンフィラメントを考えると、合成バネ定数が $K_c \sim 1.6$ pN/nm となるのでAppendixの(5)式を使うと $\tau_c < 0.1$ msとなる。(6)式にこの値と $K_a = 44$ pN/nm、 $K_b = 5.7$ pN/nmを代入すると $\tau_a < 0.2$ msが得られる。すなわち、 $L = 20$ μ mのアクチンフィラメントに急激な長さ変化を与えたとき、0.2 msよりも速く張力応答は追従することが分かる。もし、フィラメントの長さが骨格筋のもの程度(~ 1 μ m)であれば、 $\tau_a (= \xi_a L / K_a)$ は $\ll 0.2$ msとなるはずである。

Appendix

低周波のサイン波状の変位をニードルの根元に加えたとき、アクチンフィラメントを結合したニードルの先端の動きは

$$x = x_0 K_N / (K_N + K_c) \quad (1)$$

で与えられる。ここで x 及び x_0 はそれぞれニードルの先端と根元の変位、 K_N はニードルのバネ定数、 K_c はアクチンフィラメントとニードル-フィラメント結合との合成バネ定数である。

$$K_c = (x_0/x-1) \cdot K_N \quad (2)$$

実験においては、 x_0 はニードルがフリーのときのニードル先端の変位として求められる。なぜなら、低周波では溶液の粘性抵抗によるニードル先端の変位の減衰は無視できるからである。例えば $K_N = 0.5$ 及び 5 pN/nm のニードルを 20 Hz の周波数で振動させたとき、アッテネーションファクター

$\{1+(2\pi f\tau_N)^2\}^{-1/2}$ はそれぞれ 0.998 、 0.9999998 となる。

振動の周波数が高い場合、ニードル、アクチンフィラメント及びそれらの結合部の粘弾性が無視できなくなる。この場合、変位と粘弾性をフェーザ表示によって表すと、

$$x = x_0 K_N / (K_N + j2\pi f \xi_N + j2\pi f \xi_c) \quad (3)$$

となる。ここで $x_0 = x_0 e^{j2\pi f t}$ 、 ξ_N はニードルの摩擦係数、 ξ_c はフィラメントと結合部の合成粘性係数を表している。測定では、電気回路による位相のずれ ϕ_e をキャンセルするために (500 Hz において 0.09 radian)、フィラメントがある場合のセンサー出力の位相 $(\phi + \phi_e)$ からフリーのときの位相 $(\phi_N + \phi_e)$ を引いて $\Delta\phi = (\phi + \phi_e) - (\phi_N + \phi_e) = \phi - \phi_N$ を求め、 $\phi = \Delta\phi + \phi_N$ によって ϕ を見積もることができる。位相 ϕ は

$$\phi = \tan^{-1} 2\pi f (\xi_N + \xi_c) / (K_c + K_N) \quad (4)$$

で表される。この式より、合成バネ成分の時定数 $\tau_c (= \xi_c / K_c)$ は

$$\tau_c = (K_N / K_c) \{ [1 + (K_c / K_N)] (2\pi f)^{-1} (\tan\phi) - \tau_N \} \quad (5)$$

となる。ここで $\tau_N (= \xi_N / K_N)$ はニードルの緩和時間である。

同様にして、アクチンフィラメントの緩和時間 τ_a は

$$\tau_a < [1 + (K_a/K_b L)] \tau_c \quad (6)$$

となる。

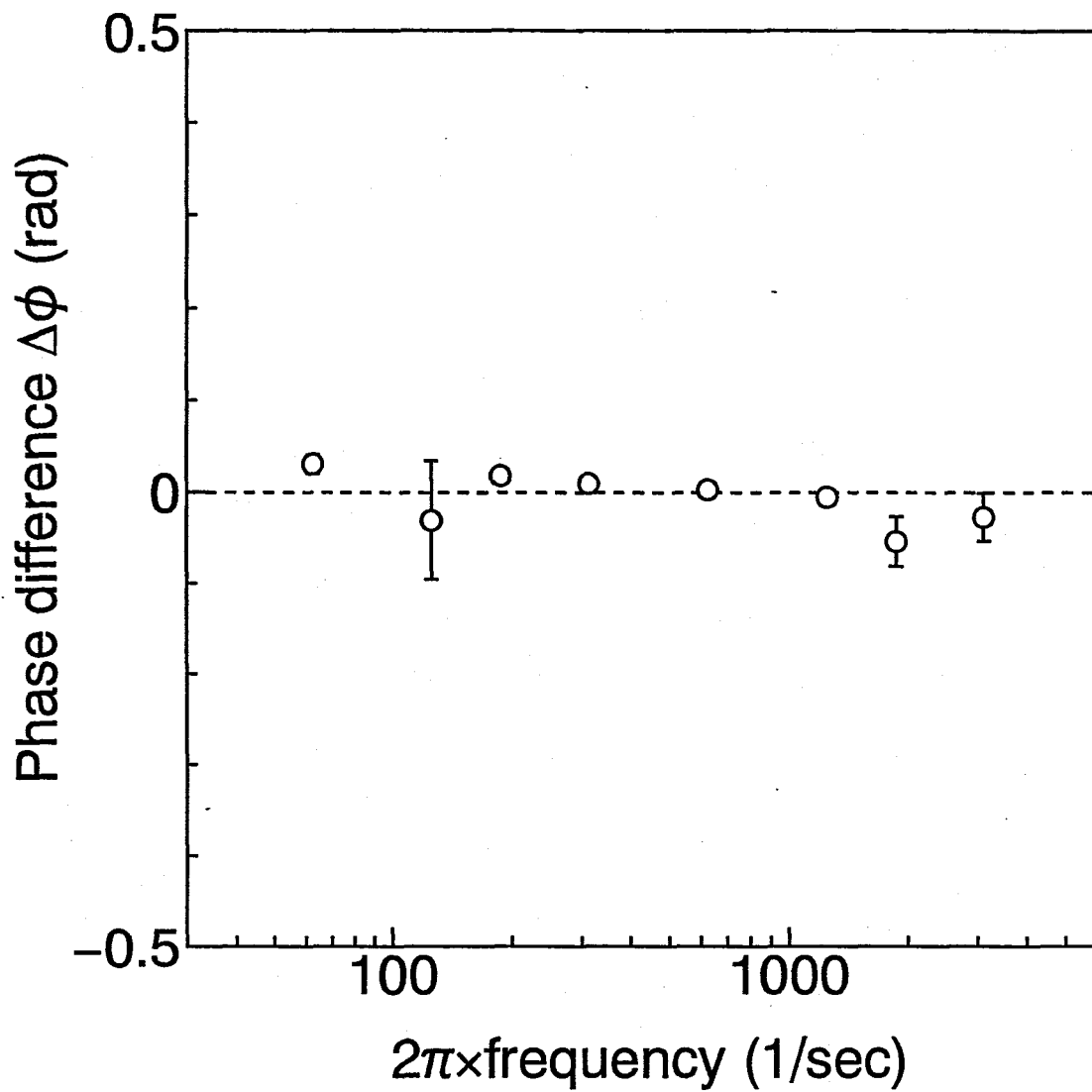


図1-6 アクチンフィラメント有り無しでのニードルの動きの位相差
 誤差棒は標準偏差を表す(n=5-8)。使用したアクチンフィラメントの長さは3.8-21 μm。

1-3-3 アクチン弾性の張力依存性

アクチンフィラメントとニードル-アクチン結合部位の合成バネ定数 K_c をフィラメントにかかる力が 35 - 170 pNの範囲において測定した。これはisometric収縮時にthin filament 1本にかかる力(230 pN)の15-70%に対応する。力は、太い方のガラスニードルをピエゾ素子で動かし、フィラメントを引っ張ることによって作用させた。図1-7に示したとおり、バネ定数はこの範囲ではほぼ一定であった。この測定ではアクチンフィラメント自体のスティフネスとニードル-フィラメント間結合のスティフネスは分離できないが、両スティフネスが相殺しあって合成バネ定数が一定となることは考えにくいので、アクチンフィラメント自体のスティフネスはこの力の範囲では一定であると考えられる。

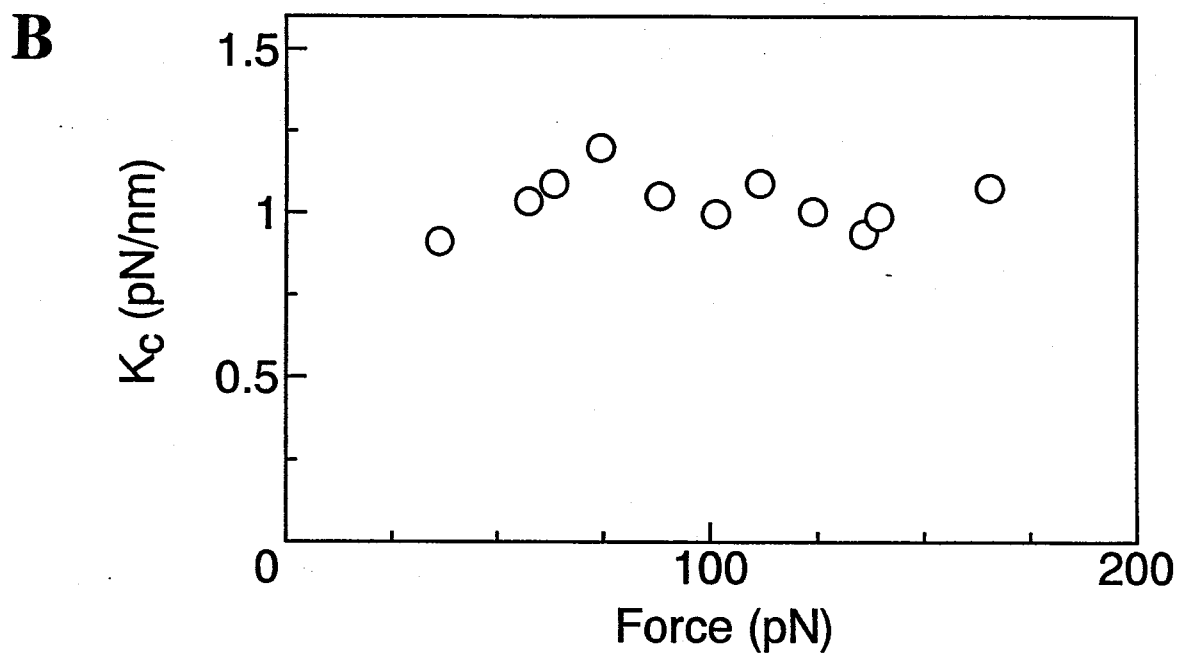
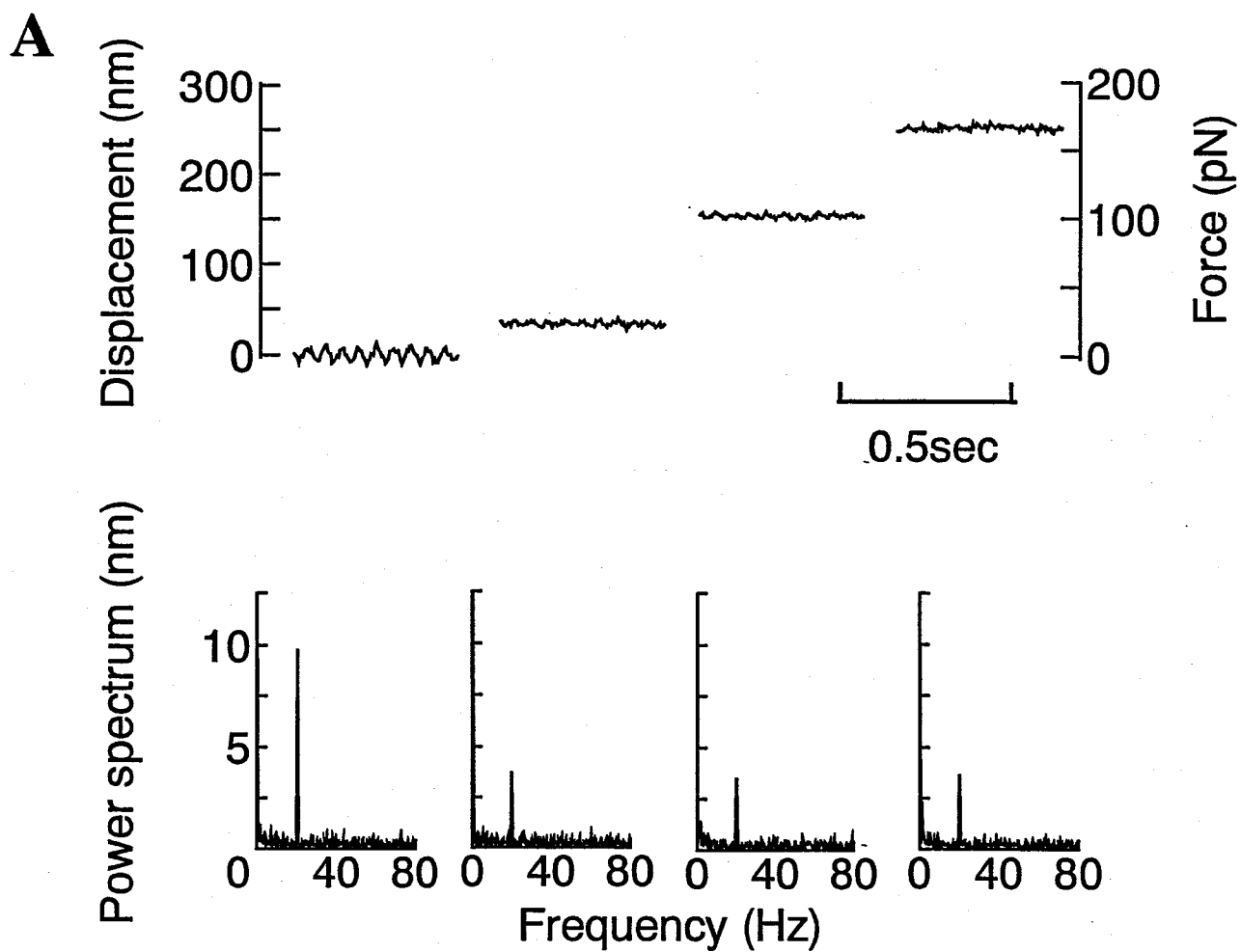


図1-7 アクチンフィラメントに与えた力と合成スティフネスとの関係

A) : ニードル先端の変位(上段)と、そのパワースペクトル(下段)。

B) : いろいろな力のレベルにおける、合成スティフネス。

使用したアクチンフィラメントの長さは、 $22\mu\text{m}$ 。

1-4 考察

1-4-1 他のタンパク質の弾性との比較

他のタンパク質との比較を行うために、アクチンフィラメントのヤング率の大ざっぱな見積もりを行っておく。ここでは簡単のために、モノマーが二重らせん状に重合しているアクチンフィラメントの構造を、一様なロッドとみなして扱う。一様なロッドに対しては、ヤング率 E は $E = K (L/S)$ で与えられる。ここで K はフィラメントのスティフネス、 L は長さ、 S はフィラメントの平均断面積である。 L が $1\mu\text{m}$ のときの K の値は $43.7 \pm 4.6 \text{ pN/nm}$ であり、平均断面積 S はX線解析によるアクチン分子の原子座標モデルを参考にすると、 $\sim 25 \text{ nm}^2$ となる(14,23)。したがって、 E は $\sim 1.8 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ と計算される。この値は溶液中でのPHDTMRラベルアクチンフィラメントの屈曲運動から見積もられた値 ($\sim 2.0 \times 10^9 \text{ N/m}^2$) (7,37)、あるいはレーザートラップによるアクチンフィラメントの回転ゆらぎから求められた値 ($\sim 2.5 \times 10^9 \text{ N/m}^2$) (32)とよく一致した。これらの値は他の種類のタンパク質であるsilk ($< 7 \times 10^9 \text{ N/m}^2$) (2)やcollagen ($< 5 \times 10^9 \text{ N/m}^2$) (13)のヤング率ともよく一致した。

トロポミオシン存在下での実験ではアクチンフィラメントのスティフネスが $65.3 \pm 4.6 \text{ pN/nm}$ に増加した。トロポミオシン分子は長さ約 40 nm であり、 α -ヘリックスのcoiled-coil構造をとっている(28)。これはアクチンフィラメントの周期構造に従ってフィラメントに結合し、トロポミオシン同士も分子の両端で互いに結合している。したがって、アクチンフィラメント $1\mu\text{m}$ あたりのトロポミオシン分子のスティフネスは、トロポミオシンが結合することによりアクチンフィラメントのスティフネスが変化することがないとすると、トロポミオシン存在下と非存在下におけるアクチンフィラメントのスティフネスの差分 21.6 pN/nm で与えられる。これより、 α -ヘリックスの半径は $0.4 - 0.5 \text{ nm}$ と言われているので(30)、トロポミオシン分子のヤング率は $\sim 1 \times 10^{10} \text{ N/m}^2$ となる。アクチンフィラメントのヤング率に比べてこの値が大きい理由は、分子の99%近くが α -ヘリックス構造を取っているためであると考えられる。この値は分子の屈曲から求められた

wool(4)やミオシンS-2の α -ヘリックス領域(12)のヤング率の値(それぞれ $1.2 \times 10^9 \text{ N/m}^2$ 、 $1.3 \times 10^9 \text{ N/m}^2$)よりも大きかったが、タンパク質構造の理論解析から予想される値($7 \times 10^9 \text{ N/m}^2$) (30)にはほとんど一致した。

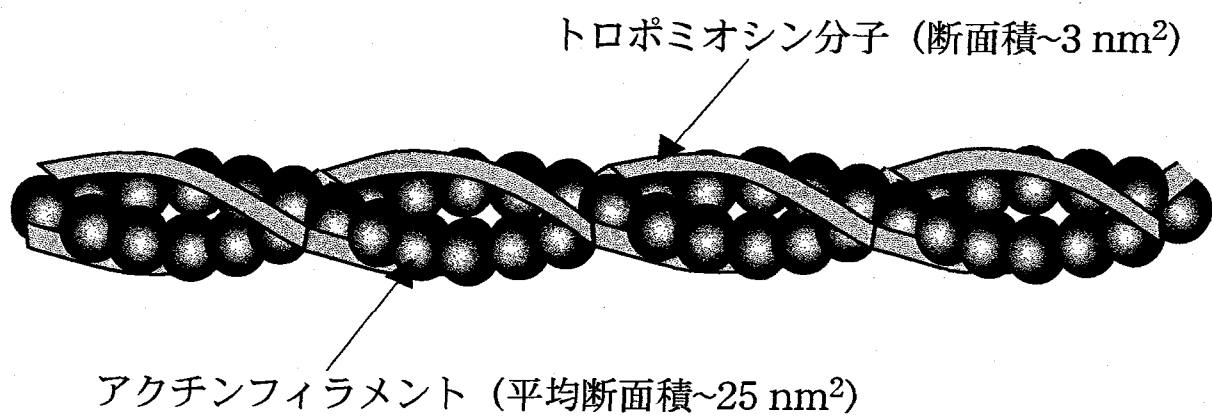


図1-8 トロポミオシン分子を結合したアクチンフィラメント

1-4-2 筋サルコメアのコンプライアンスの検討

isometric収縮時でのthin filamentの伸びは、本研究で求めたトロポミオシン存在下でのアクチンフィラメントのスティフネスより見積もることができる。クロスブリッジの結合解離サイクルが定常的に起こっているこの状態のときには、thin filamentにかかる力はthin filamentとthick filamentの重なる長さ l に比例するはずである (図1-9)。したがって、定常状態でのthin filamentの伸び ΔY は、

$$\Delta Y = (l_0 - l)F/K_a + (l/2) \times (F/K_a) = (1 - l_0/2)F/K_a$$

となる(35)。ここで K_a はトロポミオシンを結合したアクチンフィラメントのスティフネス、 l_0 はthin filamentの全長である。カエルの骨格筋においては、 $F = 230 \text{ pN}$ (6)、 $l_0 = 1 \mu\text{m}$ (27)、 $l = 0.7 \mu\text{m}$ (15)であるので、 ΔY は2.3 nmになる。

一方、クロスブリッジの力発生メカニズムを調べるためには、サルコメアの長さをnmオーダーですばやく短縮させて力応答をみるquick releaseの実験が行われてきた (図1-10)。このデータの解析の際には、thin filamentは無限に固いと考えられ、ほとんどすべての長さ変化はクロスブリッジの伸縮に起因するとされてきた。quick releaseの際には、thin filamentに結合しているミオシンヘッドが粘弾性をもつため(6,35)、先ほど見積もった ΔY はすぐには緩和されない。thin filamentにかかる力をゼロにまで落とすのに必要なreleaseの量 y_0 は筋線維を用いた研究により、半サルコメアあたり~3.9 nmと見積もられている(5)。本研究の結果からFordらの論文(6)に述べられている A 10 式をもちいて y_0 (3.9 nm)に対する thin filament の寄与を求めると、1.9 nmとなった。すなわち、quick releaseの際のサルコメアのコンプライアンスのうち49%はthin filamentに起因し、残りはクロスブリッジとthick filament のコンプライアンスによると考えられる。また、Fordらにより指摘されているような(6)、アクチンフィラメントの粘弾性によるquick releaseの際の実効弾性定数の増大の可能性は、本研究のフィラメントの周波数特性の結果よりmsオーダーでは否定される。

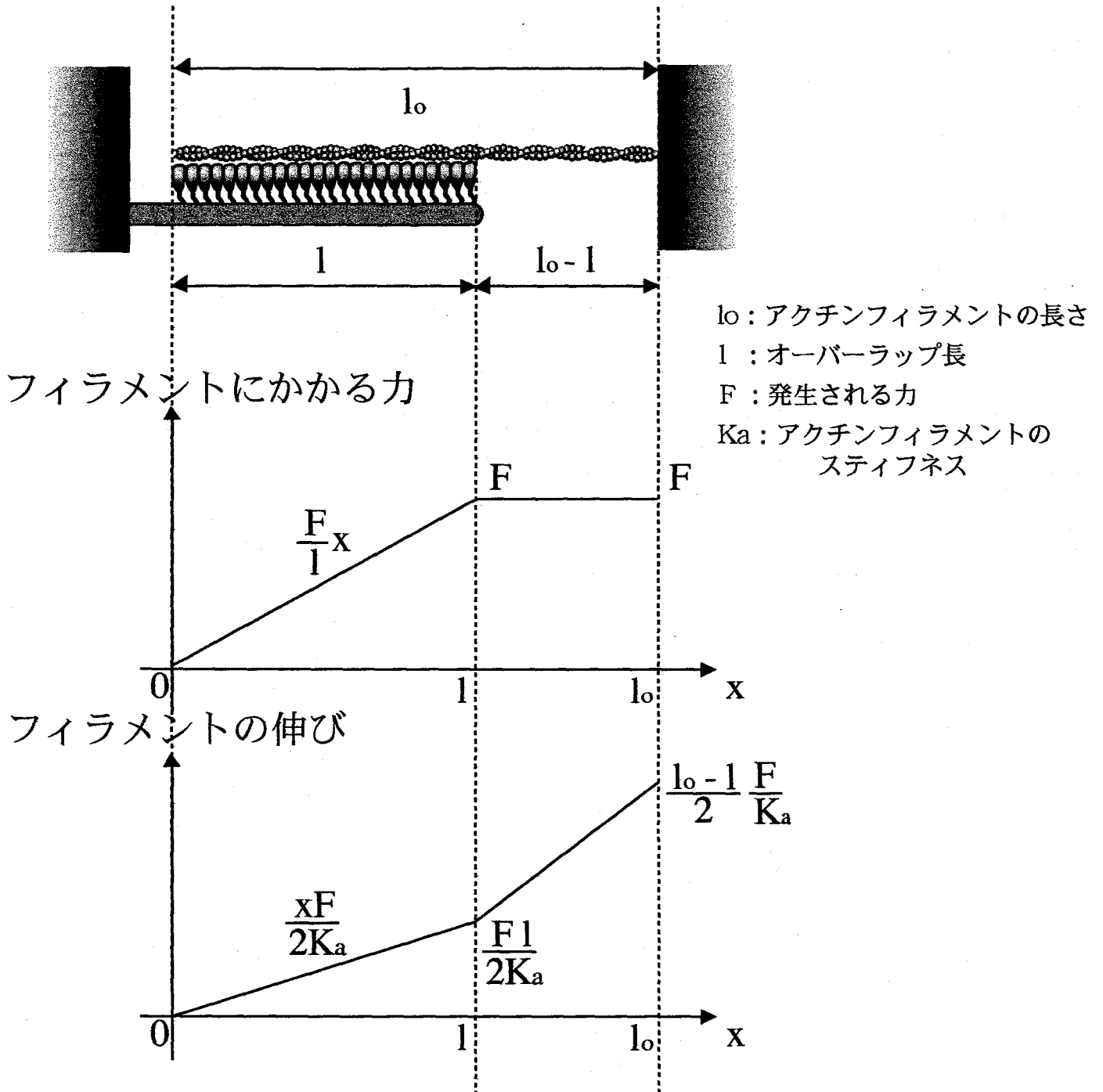
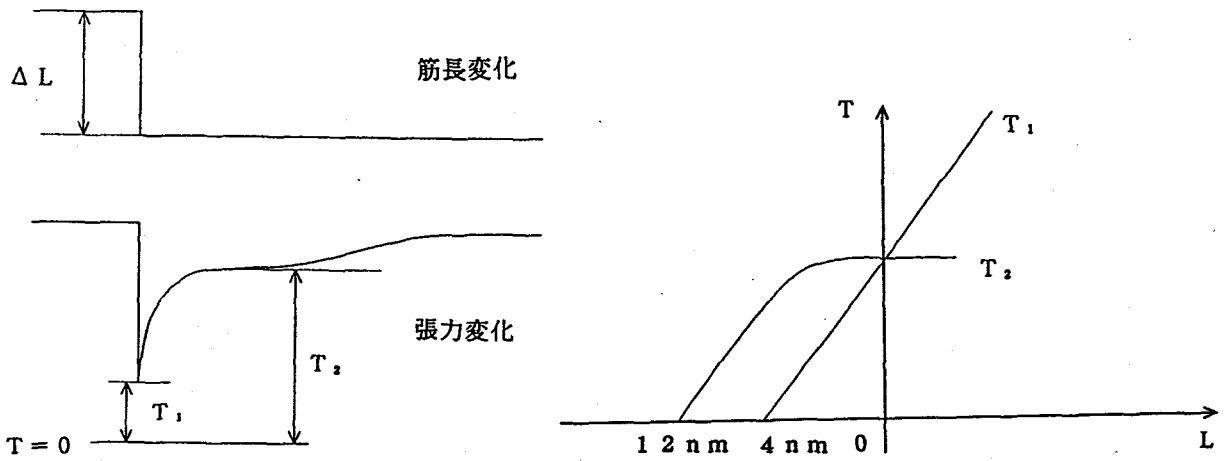
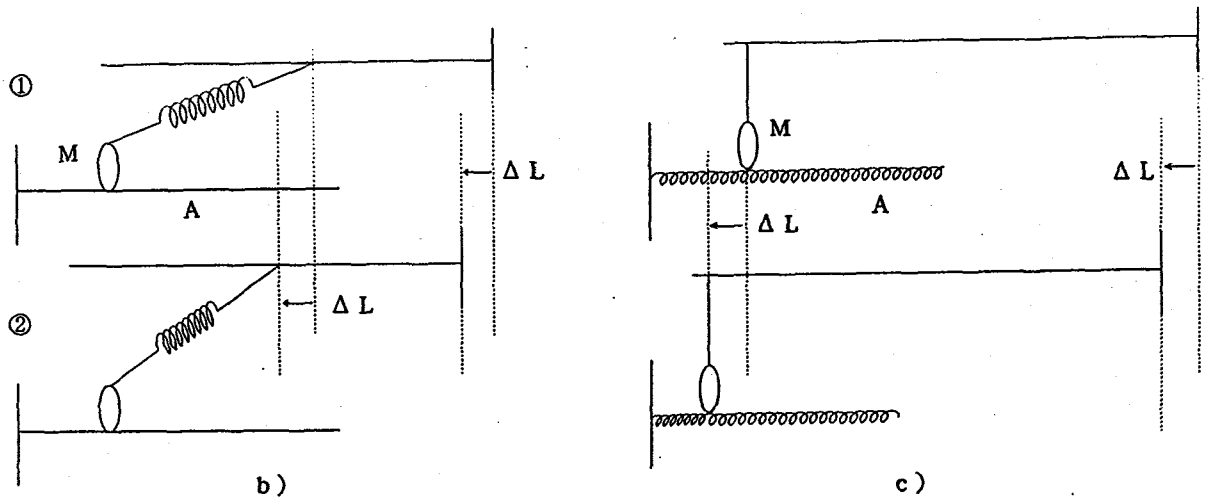


図1-9 定常状態でのアクチンフィラメントの伸び



a) 等尺収縮状態の筋長をステップ状に ΔL 変位させた時の張力 T の応答

ΔL が約4 nmのとき $T_1 = 0$ となる。



M : ミオシン分子

A : 細いフィラメント

b) a) の実験をもとに作られたHuxley-Simmonsのモデル

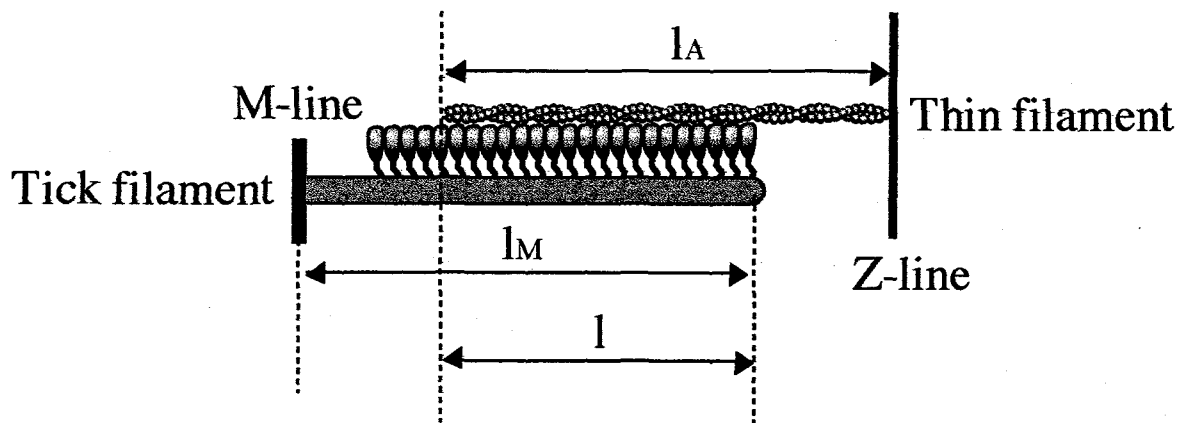
①張力はミオシンが首の部分のばねを引き伸ばすことにより発生する。

② ΔL の変位に応じてばねはゆるむ。

細いフィラメントは剛体と仮定されている。

c) 全ての弾性が細いフィラメントにあるという極端な例

図1-10 quick releaseの実験とHuxley-Simmonsのモデル



l_A : thin filament の長さ

l_M : thick filament の長さ

l : オーバーラップの長さ

C_A : thin filament 単位長さ当たりのコンプライアンス

C_M : thick filament 単位長さ当たりのコンプライアンス

k_c : 単位長さ当たりのクロスブリッジのスティフネス

C_z : Z-line のコンプライアンス

C_s : 半サルコメアのコンプライアンス

このとき

$$C_s = C_z + C_A \left(l_A - \frac{2}{3} l \right) + C_M \left(l_M - \frac{2}{3} l \right) + \frac{1}{k_c l}$$

なる関係が成り立つ。

Ford et al. (1981)の式 (A-10)の説明

1-4-3 他の研究との比較

Fordらによる筋線維を用いた力学測定により、thin filamentとthick filamentのサルコメアコンプライアンスへの寄与は $< 20\%$ とされてきた(16,6,31)。もしこの結果が正しいとすると、筋線維中のthin filament (ネブリンなどのタンパク質を結合している)は精製アクチンとトロポミオシンによって再構成されたthin filamentよりもずっと固いということになる。最近になって、筋線維中でのネブリンフィラメントのスティフネスが測定され、 $1\mu\text{m}$ あたり 1.03×10^{-2} pN/nmという値が得られている(38)。これはアクチンフィラメントのスティフネスと比較しても著しく小さいので、ネイティブフィラメントを固くする因子にはなり得ない。他の可能性として、PHDTMRが再構成フィラメントを柔らかくしていることも考えられるが、これはファロイジンがフィラメントを安定化することと矛盾するように見える(36)。収縮中に筋線維中のthin filamentのスティフネスを測定するためには、筋線維へ与えた長さ変化に応答するサルコメア長の変化を < 1 nmの精度で検出する必要があるが、これは非常に困難である。実際、Fordらとは別のグループのJulian and Morgan (22)やBagniら(1)の測定によると、サルコメアコンプライアンスへのthin filamentの寄与は、 $30 - 40\%$ に達するという結果が得られている。最近になって、樋口らによって、サルコメア長を白色光の回折を利用し、高精度で測定しながらrigorでの筋線維のスティフネスを測る研究が行われた(11)。その結果、rigor状態でのサルコメアコンプライアンスに対するthin filamentの寄与は、本研究による見積もりと同程度の $\sim 50\%$ であることが明らかにされた。

最近になって、筋肉中でのthin filamentの伸びは、X線回折の方法でも調べなおされた。X線回折の分野では、以前はthin filamentの伸びの指標として、 5.9 nmのらせん周期による反射が用いられていた(19,25)。しかしながら、 5.9 nm反射はアクチンフィラメントの長軸方向の変化以外の変化に対しても影響されること、また十分な空間分解能も得られていなかったことなどから、信頼度の高い結果は得られていなかった。ところが、近年になって、シンクロトロンから放射される強力なX線を利用することが可能となり、空間分解能、時間分解能共に著しく改善された。その結果アクチンフィラメントの長軸方向の長さ変化を正確に反映する 2.7 nm周期の反射を検出できるようになった(19)。この手法を用いることにより、2つのグループによって独立に測定された結果、isometric収縮時にthin filamentは全長の $0.3 - 0.4\%$ ($3 - 4$ nm)伸びていることが示された(20,33)。

以上の結果より、サルコメアのコンプライアンスの~ 50 % は thin filament による
と考えることができる。したがって、サルコメアのコンプライアンスの大半はクロスブ
リッジに由来するとして実験結果を解釈したモデルは、まだ検討の余地があるといえる。

第2章 キネシン分子の1分子力学測定

2-1 序

生物分子モーターを研究する上で最も我々の興味を惹きつける問題の一つに、モーター分子がどのように動くのかということがある。先に述べたA.F.Huxleyらによる研究では、ミオシン分子は力を発生するために、船のオールを漕ぐように、アクチンフィラメントに結合した頭部の角度を変化させるという首振りモデルが提案された。しかしながら、このモデルの根拠となった筋線維を用いた実験では、 10^{11} 個ものミオシン分子の振る舞いのアンサンブル平均を覗いているに過ぎない。すなわち、そこから得られる実験結果と分子1個の振る舞いとの間には、非常に大きなギャップがある。1分子の動作を知るためには、やはり1分子の動きを直接観ることが重要である。近年になってナノメーター計測技術を用いた *in vitro* 実験系の著しい進歩により、力発生に関与している分子の数を1個から数個のレベルにまで減らして、それらの動作を非常に高い分解能でとらえることが可能となった。アクトミオシン系では、石島らによってアクチンフィラメントと数個のミオシン分子の間の張力ゆらぎが測定され、分子レベルでの相互作用の情報が得られた。この実験を皮切りに *in vitro* 実験系は、Spudich、石島、Molloyらによって、ミオシン1分子による力発生過程を直接観るレベルにまで発展され、そこから1分子レベルでの様々な知見が得られてきた。ところが、アクトミオシン系での相互作用の時間は非常に短いので、1分子による力発生はパルス状に起こり、サイクルとして観測することが困難であった。一方、キネシン-微小管系では、キネシン分子が1個であったとしても、微小管から解離せずに長い時間に渡って相互作用し続けるので、力学サイクルを繰り返し観測することが可能である。この系については、1993年にはK.Svobodaらによって、微小管上を進むキネシン分子のステップ状の動きが初めて検出されたが、その力学サイクルについての詳細な解析は行われなかった。そこで本章では、モータータンパク質分子が力学サイクルを行う際に、どのような動きをしているのかを知るために、ATP加水分解に伴うキネシン分子の動作を1分子レベルで測定し、微小管上を進む際に分子内の2つの頭部がどのように影響しあって動いているのかについて解析を行った。

2-2 手法

2-2-1 サンプルの調製

A. キネシンの調製

キネシンは牛脳より微小管アフィニティー法により抽出し、DEAEクロマトグラフィーとシヨ糖密度勾配遠心により精製した(25)。まず、600gの牛脳を4. Cにおいて、等量のextraction buffer (100 mM Mes, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 4 mM DTT, pH 6.8) + protease inhibitors (0.2 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml TAME, 2 μg/ml Aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 7 μg/ml TPCK) 中で20秒間 blender によってホモゲナイズする。次にこれを4. C 12,000 × gで60分間遠心する。さらに、この上澄みを4 °C 180,000 × gで60分間遠心する。チューブリンを重合させるために、上澄みにfinal 0.5 mMとなるように GTPを加え、33 % v/vとなるようにglycerolを加える。これを33 °Cにおいて30分間 incubateした後、8 unitの apyraseと40 μMのAMPPNPを加えて30 °C、10分間 incubateする。ここでキネシンは重合した微小管に結合しているので、これを25 °C 180,000 × gで50分間遠心して沈殿におとす。この沈殿を、65 mlの Buffer-1 (100 mM NaCl, 100 mM Pipes, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 4 mM DTT, 20 μM Taxol, pH 6.8)+30% glycerolにサスペンドする。これを、等体積の Buffer-1 + 50% glycerol の上にのせて、25 °Cで180,000 × g 60分間遠心する。沈殿を20 mlのbuffer-1 + 10% glycerolでサスペンドし、キネシンを微小管からはずすために、これに10 mM ATPと10 mM MgCl₂を加えて25 °Cで20分間 incubateする。次に、微小管を除くために、20 °Cにおいて190,000 × gで50分間遠心する。そして、上澄みのキネシン粗分画を4 °CにおいてBuffer-2 (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, pH7.5) + 0.2 mM PMSF + 10 μg/ml leupeptin で平衡化した0.5 mlのFractogel EMD DEAEカラム(Cica-MERICK Co.)にロードする。カラムは280 nmでの吸光がベースラインに戻るまで 1-5 mlのBuffer-2 + 100 mM NaClで洗い、次にBuffer-2 + 250 mM NaClで溶出を行う。最もキネシンに富んだ分画 (2-3 ml)を5-20% (wt/wt)の sucrose密度勾配を持ったA-buffer (80 mM Pipes pH 6.8, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) (

含 0.1 mM EDTA, protease inhibitors, 1 mM DTT)によって分画する。分画は、4 °Cにおいて、210,000 × gで12時間遠心することによって行う。この操作の後、最も多くキネシンが含まれている分画ではタンパク質濃度は0.1 mg/ml に達し、キネシンの純度は98%になる。キネシンは10 μl ずつ分注し、液体窒素によって急速凍結して-80. Cで保存する。

B. ローダミン蛍光標識した軸糸の調製

実験で用いる軸糸は、蛍光顕微鏡下で1本が明確に観測できることが必要である。そこで、Witmanらの方法(26)に改変を加えて、*Chlamydomonas reinhardtii*よりフラジェラの軸糸を精製し、蛍光標識を行った。軸糸はダイニンやアクセサリータンパク質を除くために、0.1 % Nonidet P40で除膜し、0.6 M NaCl溶液(30 mM Hepes, 5 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 1 mM EGTA)によって2度抽出を行う(Kagami & Kamiya 1992)。この軸糸を1度 HME solution(50 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.4)によって洗浄し、さらにHME solutionにサスペンドする。これに 1 μMの tetramethylrhodamine succinimidyl esterを加え、25 °Cで10-30分 incubateする。顕微鏡下で軸糸が程良くラベルされたのを確認した後、0.1 M K-glutamate を加えることにより反応を停止する。フリーのrhodamine dyeを除去するために、軸糸をHME solutionによる遠心で洗う。最後の沈殿を、50 % glycerolを含んだ A-buffer によってサスペンドし、-20 °Cで保存する。

C. キネシンビーズの調製

キネシンビーズに要求されることは、1.キネシン分子を生きた状態で、まばらに表面に吸着できること、2. カバーガラスの表面に吸着されないこと、3.ビーズ同志が凝集しないこと、4. 蛍光顕微鏡下で適度に光って観察できることが挙げられる。これらの条件を満たすように、キネシンビーズはSvobodaら(1994)の方法(23)を改良して作製した。まず、最終濃度が 1 mg/mlとなるようにカゼインをA-bufferにとかし、遠心により溶液中のごみを取り除く(AC-solution)。10% (v/v) (= 280 pM)の蛍光ラテックスビーズ(1.0 μm in diameter, carboxylate modified latex, blue fluorescent, L5280 Molecular probe Co.) を等

体積のAC-solutionと氷上で20分間 incubateする。この操作により、ビーズ表面はカゼインによってコートされ、キネシン分子をマイルドに結合できるようになると同時に、ガラスや、ビーズに吸着しにくくなる。このビーズ溶液を等体積のキネシン溶液(キネシンをAC-bufferに溶かしたもの)と混合し、氷上で20分程度 incubateする。ビーズの最終濃度は70 pM、キネシンの最終濃度は35-685 pMとなるようにする。こうしてビーズはキネシンによってコートされる。

2-2-2 測定システム

装置はレーザートラップ、蛍光顕微鏡、ナノメーターセンサーを組み合わせることによって構成されている(図2-1)。システムは、建物の振動や外部の騒音の影響を受けないように、防音室の中の防振台(1810LA, HERTZ)の上に組んだ。サンプルステージは、水圧マイクロマニピュレーター(WR-3, Narishige)と piezo素子(NLA 5 × 5 × 9, Tokin)により 0.1 nm から 2 mm の範囲で操作できるようにした。nm ,pN計測のプローブであるビーズは、近赤外のYAGレーザー(Nd:YAG $\lambda=1064$ nm, 300mW; MYL-300, Santa Fe Laser Co., Arizona)を凸レンズと対物レンズ($\times 100$, N.A. 1.3; NCF Fluor, Nikon)を通すことにより、サンプル面で焦点を形成させ、そこで捕捉を行った。レーザーの強度は NDfilterによって調節した。標識された軸糸とビーズは、Green YAG laser (frequency doubled Nd:YAG : $\lambda = 532$ nm, mode = TEM₀₀, maximal power = 100 mW, rms ripple = 0.2 %; model 140-0532-100, Light Wave Electronics) を2枚の凸レンズを通してサンプル面全体を照射するように広げて励起した。蛍光像は SIT カメラ (C-2470, Hamamatsu Photonics)によって検出し、TVモニターに表示した。Green YAG laserによって照射されたビーズの明視野像は、対物レンズ($\times 100$, N.A. 1.25; NCF Plan, Nikon)と凹レンズ($f = 10$ mm)によって1000倍に拡大して4分割光ダイオードセンサー(S994-13, Hamamatsu Photonics; size of each pixel : 1.45 mm × 1.45 mm)上に投影した。トラップされたビーズの像は、コントラストを増すためにデフォーカスした。x および y 方向のビーズの変位は4分割光ダイオードのそれぞれのpixelに入る光の強度差としてI-V変換アンプと差動増幅アンプ(OP711A, Sentec, Osaka, Japan)により検出した。

キネシン分子が軸糸と相互作用している際のビーズとキネシン分子間のコンプライアンスを測定するために、測定中には常にレーザートラップの中心を振幅 5 nm, 50-100 Hz のサイン波状に振動させて、ビーズのサイン波応答を検出した。レーザートラップは piezo素子(NLA5 × 5 × 9, Tokin)にマウントしたミラーを光路に入れ、これに電圧を印加することにより行った。サイン波応答は、ロックインアンプ (SR830, Stanford Reserch Systems)により検出した。

センサーの出力、ロックインアンプの出力、印加電圧などの信号は、DATレコーダー(RD-120TE, TEAC)に24kHzのサンプリングレートで記録した。同時に200-1000 Hzのサンプリングレートで、その半分のカットオフ周波数を持つローパスフィルターを

通した信号をA-Dボード(Maclab, ADInstruments)を通してコンピューター(Macintosh PC7100, Apple)に取り込んだ。センサーの応答の時定数は0.016 ms(帰還抵抗 1 M Ω)であった。データのスペクトル解析はDOS/V互換機用波形解析ソフトウェア(DADisp, Astro design)によって行った。MaclabやDATに記録されたデータの内の幾つかは、キネシン分子のステップ状の変位をより明確にノイズから抽出するために15 msのメディアンフィルターを通して処理した。

ビーズの変位に伴うセンサーの出力は電圧の形で発生するが、これは測定時のビーズの像の状態や、その他の条件で変化する。そのため、測定する度にこれを実際の変位に換算しなければならない。そのための手順は以下のようである。

はじめに、対物マイクロメーターの像をセンサー面に投影し、そこでの像の拡大率が正確に1000倍となるように装置を調整する。次に、ビーズの像をセンサー上に投影し、この状態でセンサーをピエゾ素子により、x および y 方向に振幅 5 μm 、周波数20 Hzのサイン波状に振動させる。このときのセンサーの出力電圧はビーズがサンプル面で5 nmの振幅で振動しているときの出力に対応しているので、キャリブレーションが完了する。

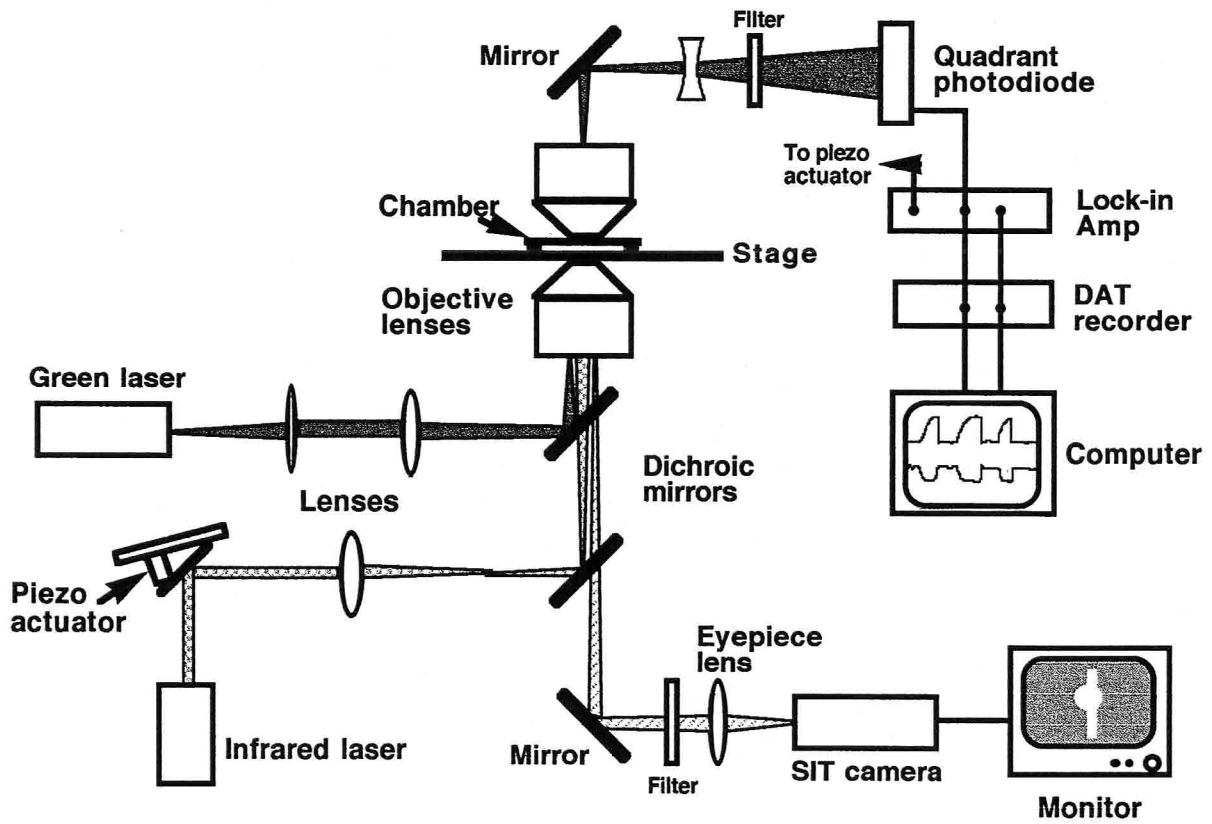
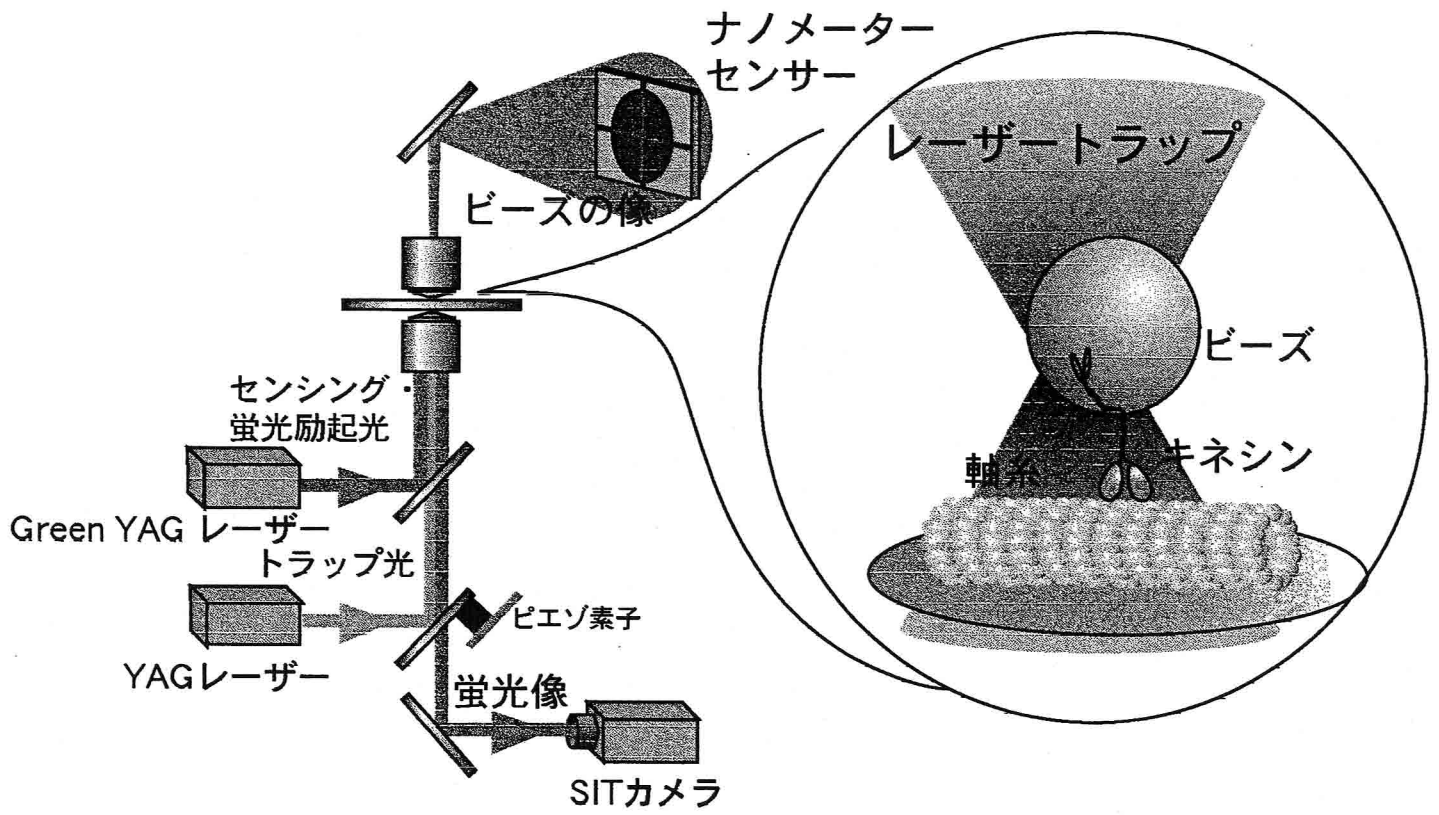


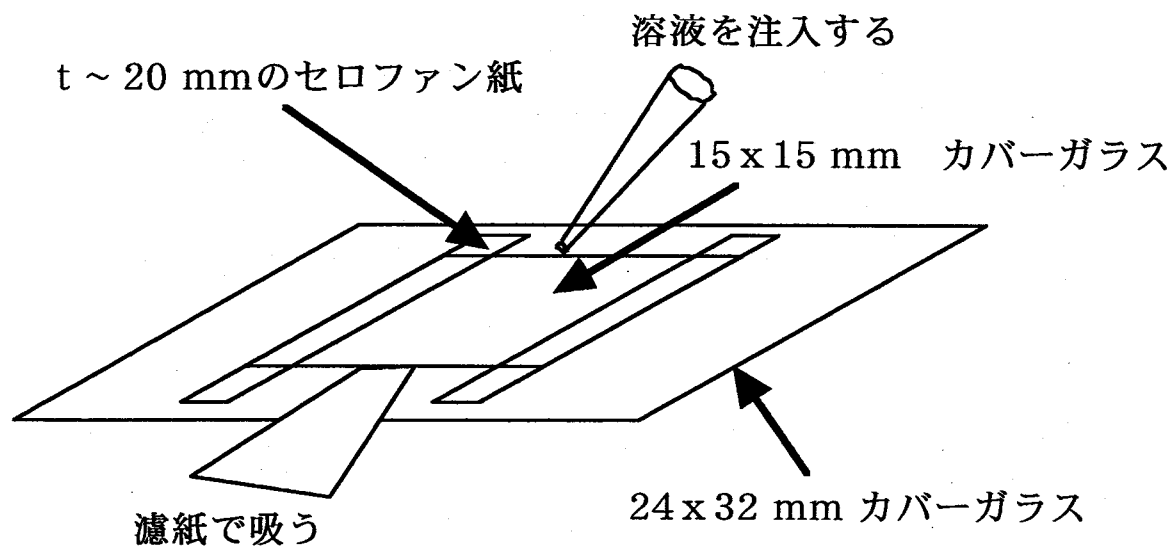
図2-1 測定及び装置の模式図 詳細は本文参照

2-2-3 *in vitro* サンプル作製の手順

サンプル作製は以下の手順で行う。

1. 図2-2に示すようなフローチャンバーを用意する。チャンバーは、2枚のカバーガラスを約20 μm の間隙を持つようにマニキュアで固定して作製する。
2. チャンバーに蛍光標識した軸糸を流し込み、ガラス表面に軸糸がしっかりと固定されるように3分間待つ。
3. ガラス表面をカゼインで処理するとともに、固定されなかった軸糸を取り除くために、AC-bufferによって2分間かけてチャンバーを洗う。カゼインで表面を処理することによってビーズはガラス表面に吸着しにくくなる。
4. このチャンバーに、約0.04 pM キネシンビーズ、0.01-1 mM ATP、および脱酸素のための酵素系(10 mMグルコース、9 $\mu\text{g/ml}$ カタラーゼ、50 $\mu\text{g/ml}$ グルコースオキシダーゼ、0.5% 2-メルカプトエタノール)を含んだ A-bufferを流し込む(8)。
5. チャンバーを顕微鏡のステージにセットして測定を開始する。

*すべての測定は、25-27 $^{\circ}\text{C}$ で行った。



両端をセロファン紙ごとマニキュアで固定した状態で溶液交換を行う。
測定時は残る辺もマニキュアでシールして密閉する。

図2-2 実験に用いたチャンバー

2-3 結果

2-3-1 測定系の性能

nm-sensorの性能

nm-sensorを検定する上での重要なチェックポイントは、センサーの時間分解能、空間分解能および、ダイナミックレンジと出力の線形性がある。時間分解能は、センサーに発光ダイオードによって矩形波状の光強度変化を与え、出力の立ち上がり時間から見積もった。その結果、0.016 msの時間分解能があることがわかった。また、空間分解能に関係するセンサーの電気ノイズは変位に換算すると、0.01 nm 程度であった。ダイナミックレンジと出力の線形性の2つを検定するために、直径 1 μ mのビーズをガラス表面に固定し、ピエゾステージに電圧を加えて10 - 300 nmの振幅でサイン波状に変位を与えた。図2-3にそのときのnm-sensorからの出力を示す。4分割光ダイオードからの出力は、<150 nmの範囲ではビーズの変位と比例したが、>200 nmの範囲では線形性がわずかに失われた。実際の測定の際には、このずれを補正して変位を見積もった。この方法により、 \pm 300 nmの範囲まで変位を正確に測定することが可能となった。

レーザートラップの性能

本研究においては、レーザートラップはビーズを捕らえてマニピュレートするためのピンセットの役割を果たすとともに、力を測定するためのプローブとしての役目も担っている。ここでは、そのプローブとしての性質を検証する。レーザートラップは、レーザーをレンズによって絞り込んだときに、光の放射圧による散乱力と、電場勾配による勾配力が釣り合う焦点付近に誘電体粒子が捕らえられる現象を利用したものである。この光源として、ガウス型の強度分布をもつTEM₀₀のレーザーを用いると、トラップの中心付近で形成されるポテンシャルは2次関数で近似できる形となる。すなわち、トラップされたビーズはフックの法則に従い、トラップ中心からの距離に比例した力を中心に引き戻す方向に受けることになる。このときのレーザートラップの中心付近でのバネ定数kは、トラップされたビーズの熱ゆらぎのパワー<x²>を測定し、熱平衡でのエネルギー等分配の原理 $(1/2)k\langle x^2 \rangle = (1/2)k_b T$ (k_b : ボルツマン定数、T: 絶対温度)を用いることによって決定することができる。レーザーの強度と、この方法で求めたトラップのバネ定数との関係は、図2-5に示したように比例関係にあった。つぎに、レーザートラップがどの程度の範

囲まで線形のパネとして扱うことができるのかを調べるために、トラップされたビーズに様々な大きさの粘性力を与え、そのときの変位を測定した(24)。粘性力は、ビーズがトラップされた状態で、ステージを様々な速度で駆動することにより変化させた。図2-6に幾つかのレーザー光強度での粘性力と変位の関係を示した。その結果、ビーズの変位は粘性力に比例して、 ± 300 nmの範囲で増加した。すなわち、この範囲ではレーザートラップを線形のパネとして扱える。

実験はカバーガラス表面のごく近傍で行うことになるが、このとき、ガラス表面がレーザートラップに何らかの影響を与える可能性がある。このことを検討するために、ビーズとガラス表面との間の距離を変化させて、レーザートラップのパネ定数がどのように変化するのかを調べた。その結果、 ~ 0.1 nm - 5 μ mの範囲ではトラップのパネ定数は一定であることが確認された(図2-7)。本研究においては、レーザートラップの性能を検討する際には、ガラス表面近くでの粘性抵抗の増加による影響を避けるために、すべて表面から 2 μ mの位置でビーズをトラップして測定を行った。

測定系のノイズとS/N比の改善

キネシン分子の力発生によってビーズに引き起こされる変位の大きさは、nmのオーダーである。このレベルになると、光源となるレーザー光の強度のゆらぎや、レンズ、フィルターといった光学素子の機械的なゆらぎ、ステージのゆらぎといった測定系自体のノイズがS/N比を著しく低下させる可能性がある。そこで、これらに由来するノイズの性質を検討しておくことは、非常に重要である。そこでビーズが存在しない状態で、サンプルをGreen YAG レーザーによって照射し、そのときセンサーで検出されるノイズを光ノイズと機械的なノイズの和として検討した。その結果、 > 1 Hzの範囲でのパワースペクトル密度は < 0.1 nm/Hz^{1/2}であった(図2-8)。また、 1 Hz - 10 kHzの範囲でパワースペクトル密度関数を積分することにより、この周波数範囲でのトータルのノイズの大きさを計算すると、 0.2 nmであった。すなわち、我々の目的である分子の動きをnmのオーダーで観ることに関しては十分低いノイズレベルであることが分かった。

今回の研究においては、光源として Green YAG レーザーを用いることができたため、ノイズレベルがハロゲンランプを光源として用いた測定と比べて > 10 Hzの周波数領域では $1/10$ となった(13)。その理由は、ハロゲンランプに比べて光強度が 100 倍近くあがったため、センサーの帰還抵抗を 100 倍小さくすることができたからである。さらに、レーザー光源は、ハロゲンランプよりも熱の発生が少ないので、これを用いることによ

り、装置の温度ドリフトも低く抑えることができた。その一方で、レーザーは干渉パターンを生じやすいので、低周波のゆらぎに対して非常に敏感である。そこで、これを克服するために、照射系のレンズの数を最小限にとどめ、ケーラー照明系からずらすことによって、センサー上に干渉パターンを生じないようにした。その結果、 <10 Hzにおいても、ノイズレベルをハロゲンランプの場合の半分以下に抑えることができた。

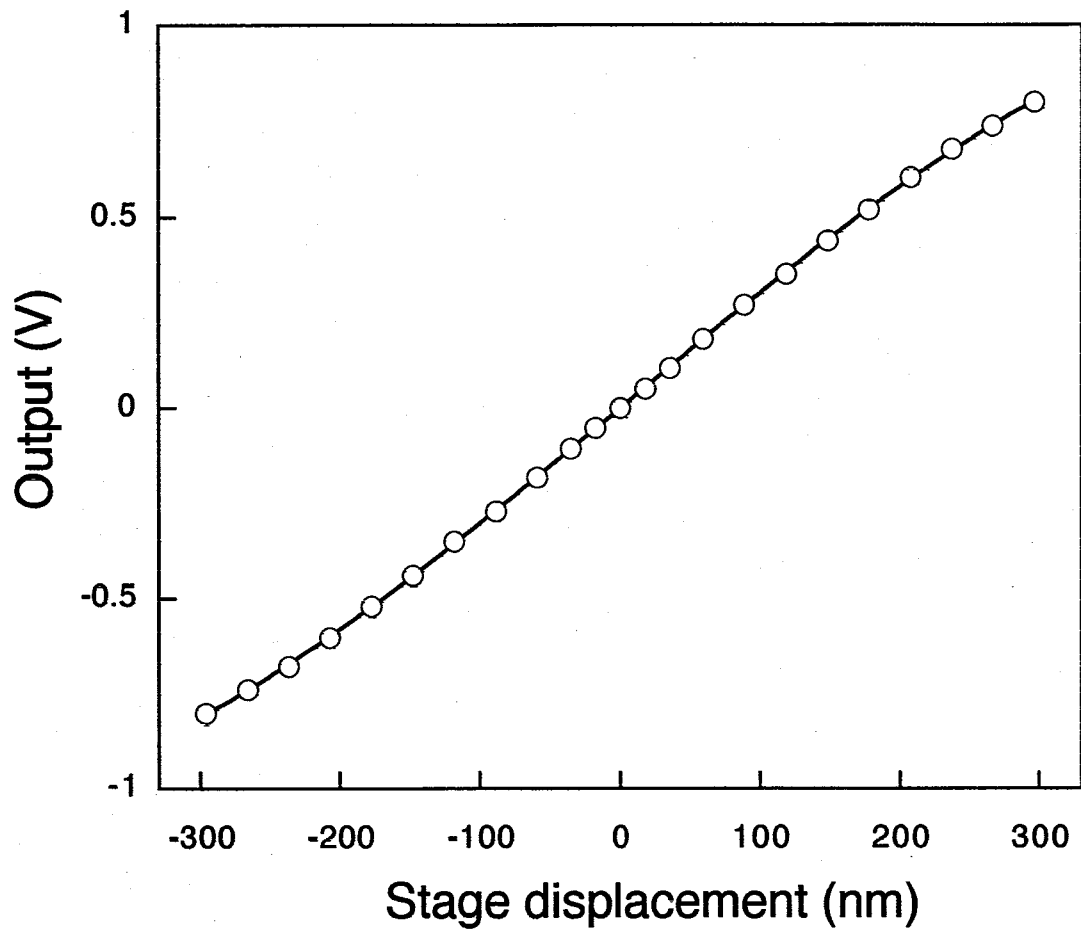


図2-3 ビーズの動きに伴うセンサーからの出力

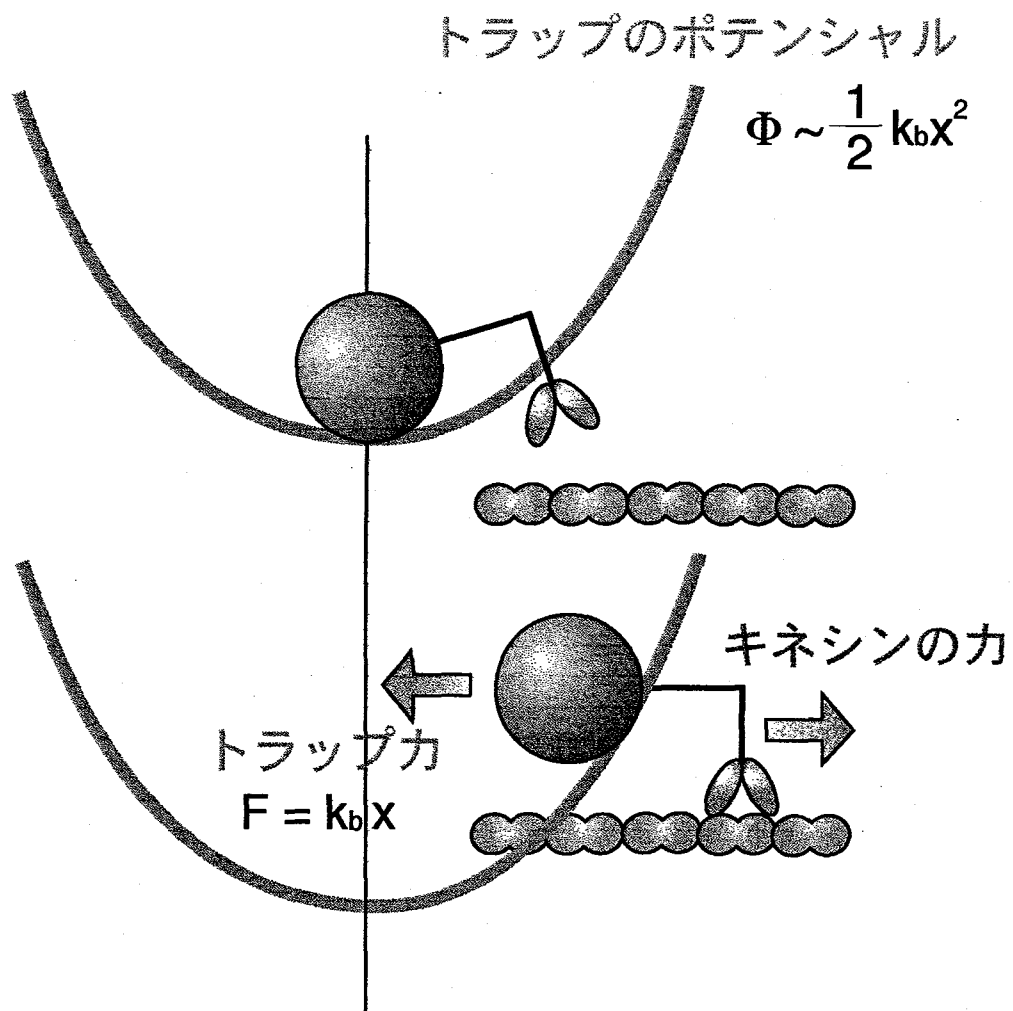


図2-4 レーザートラップのポテンシャル

ビーズはレーザーによる散乱力と勾配力の釣り合う焦点付近で捕捉される（上図）。レーザートラップのポテンシャルは2次関数で近似できるので、ビーズは変位に比例した力をトラップの中心方向に受ける（下図）。

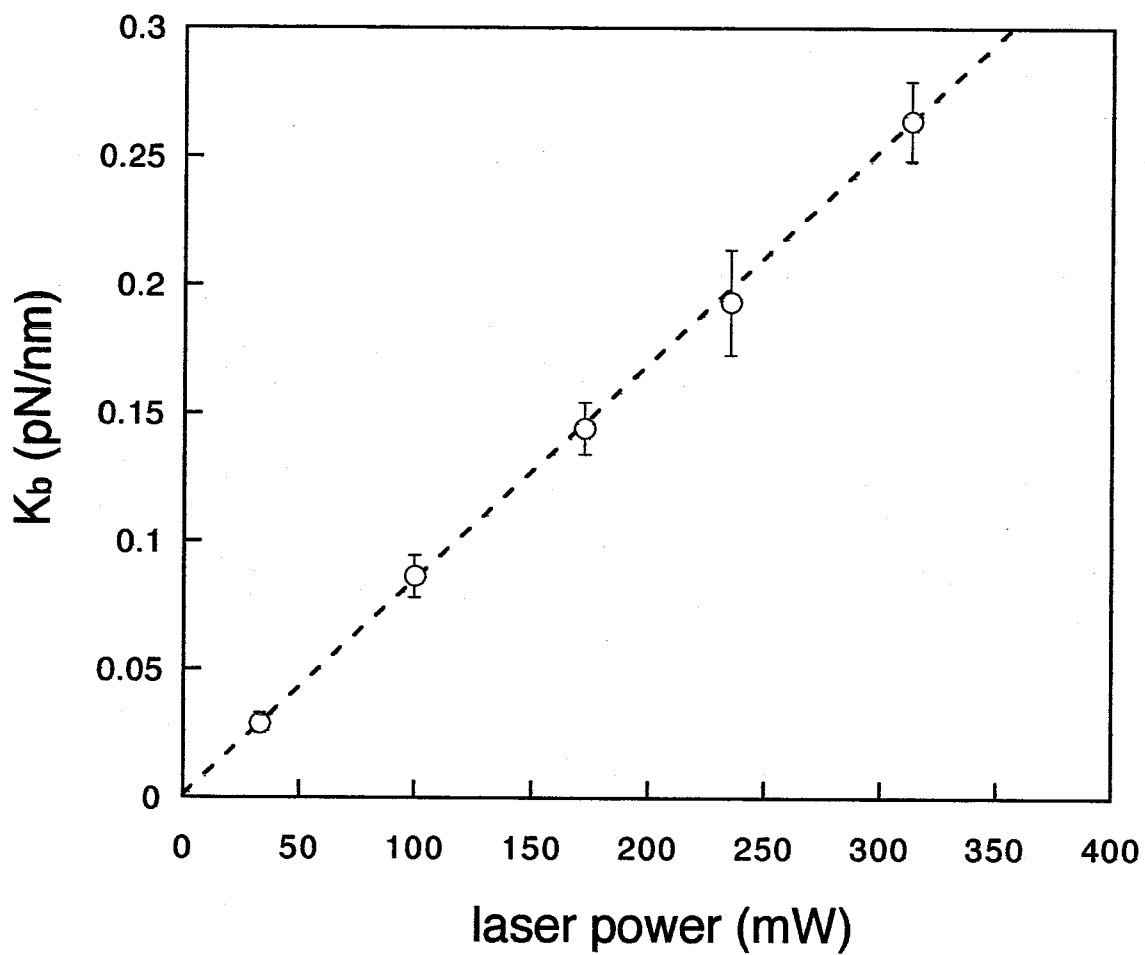


図2-5 レーザーパワーとレーザートラップのスティフネスの関係

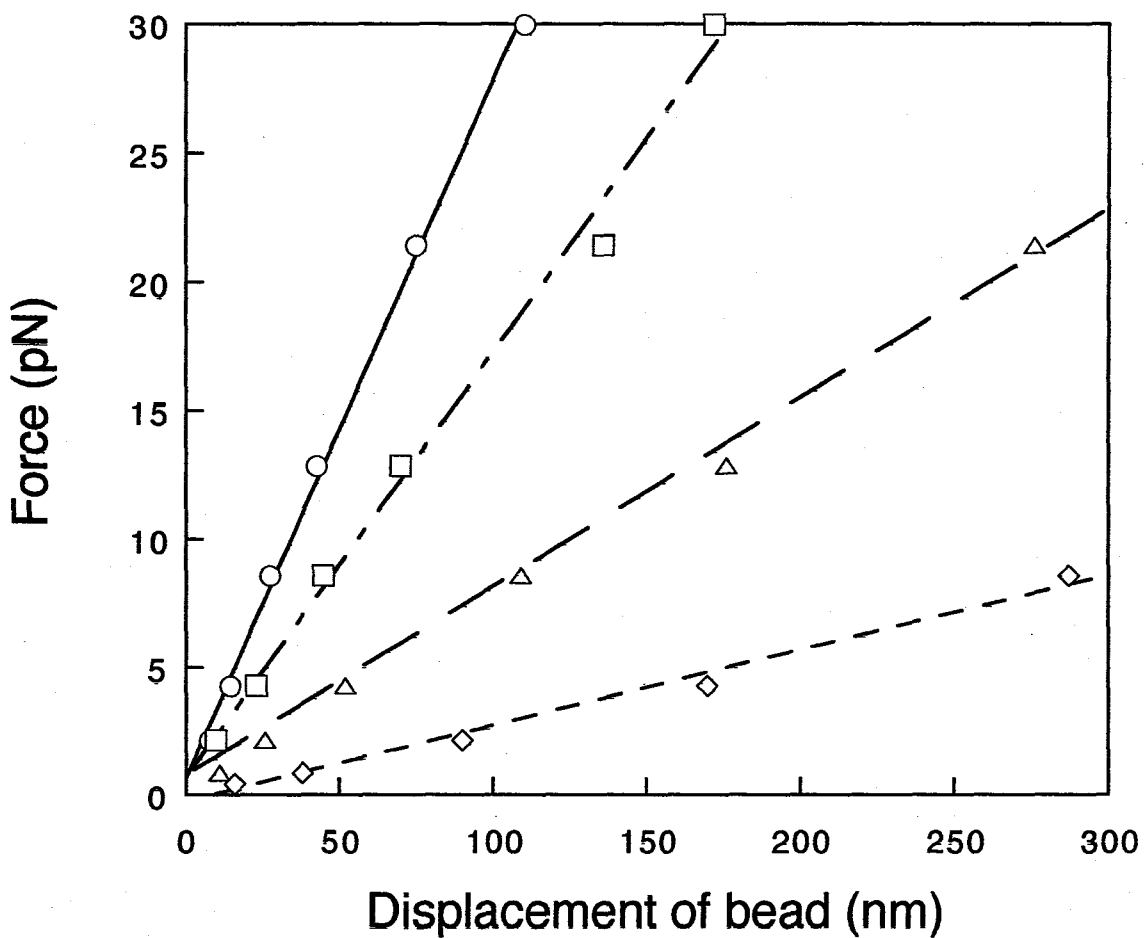


図2-6 様々なレーザー強度における粘性力とトラップされたビーズの変位との関係

ビーズに与える粘性力 $F = \gamma v$ (γ はビーズの粘性係数)は、ステージを動かす速度 v を変えることにより、変化させた。

異なるシンボルは異なるレーザーパワーの結果を表している。

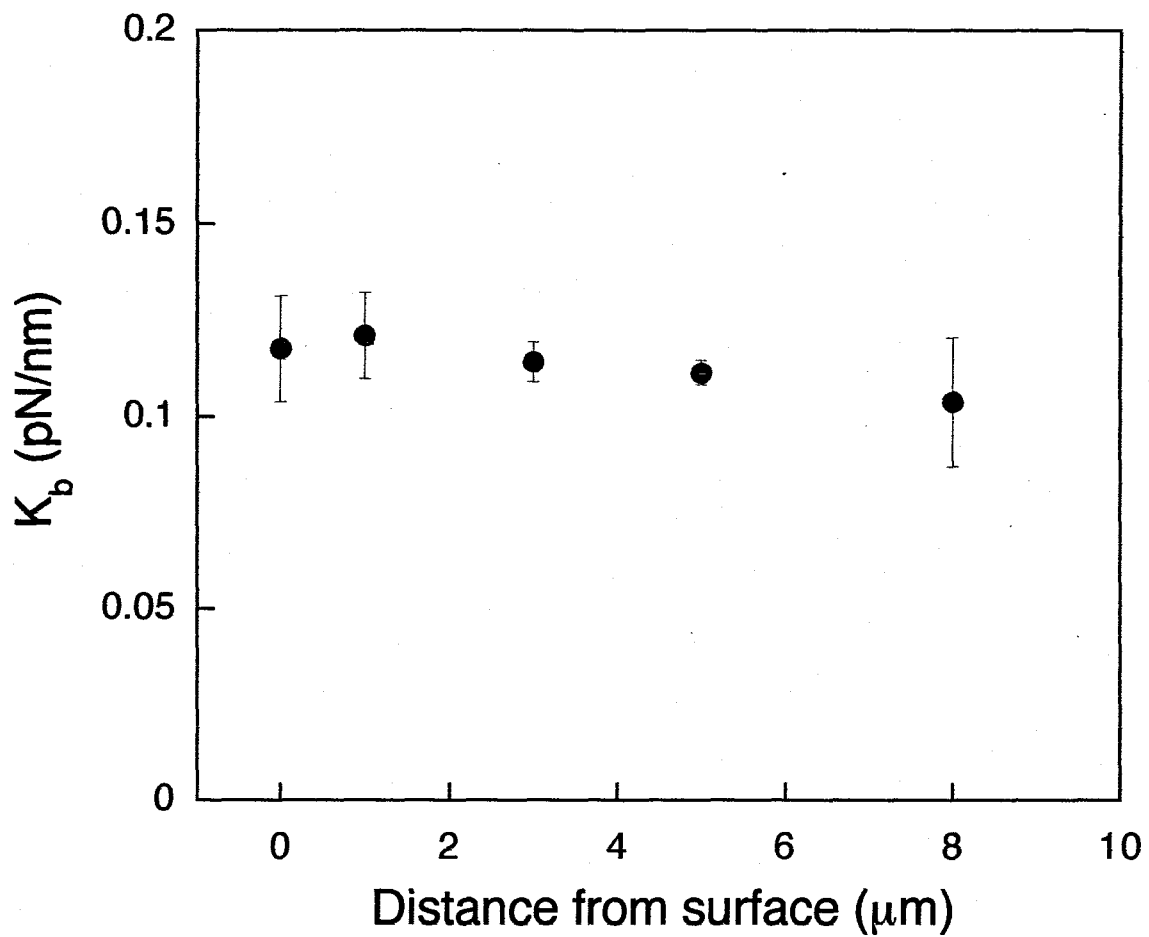


図2-7 ガラス表面からの距離とトラップスティフネスの関係

トラップスティフネスは表面からの距離によらずほぼ一定であった。
誤差棒はSDを表している。

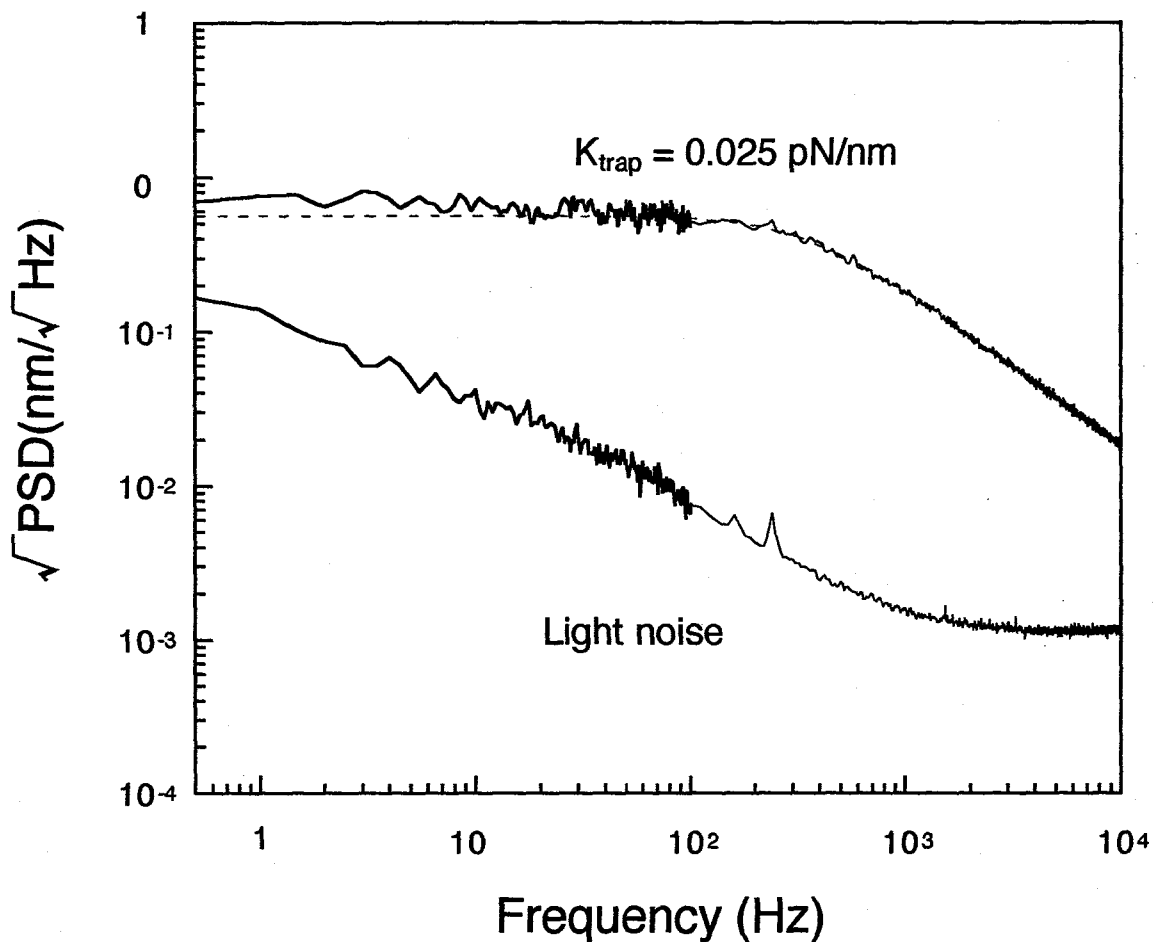


図2-8 ビーズの熱ゆらぎと装置ノイズのパワースペクトル密度関数

上のトレースはビーズの熱ゆらぎのスペクトルである。点線は、 >100 Hzの領域をコーナー周波数333 Hzのローレンツ型スペクトルでフィッティングしたものである。このスペクトルと、エネルギー等分配の原理からトラップスティフネスを計算すると、 $K_b = 0.025$ pN/nmとなった。下のトレースはGreen YAGレーザーの光ノイズ及び装置の振動ノイズのスペクトルである。

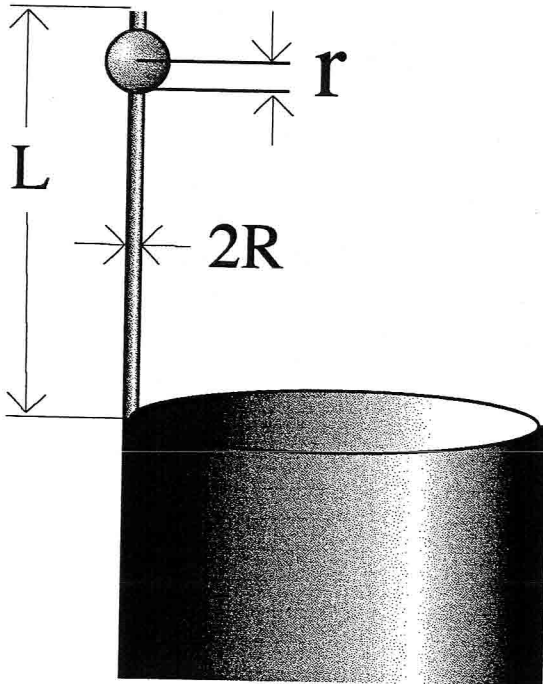
nm計測を行う際に、信号の検出精度に大きく影響を与える問題にプローブの熱ゆらぎがある。この熱ゆらぎの大きさは、S/N比に大きく影響を与える。等分配の原理からトラップのバネ定数と熱ゆらぎの2乗平均値は比例するので、固いバネ定数のレーザートラップを用いるとビーズの熱ゆらぎは小さく抑えられ、小さな変位まで追えるようになる。ところが力に注目すると、少しの変位で大きく力のレベルが変化してしまうので、力の分解能が悪くなり、キネシン分子の運動特性をいろいろな力のレベルにおいて検討することができなくなる。その一方で、柔らかすぎるバネ定数のトラップを使うとビーズのブラウン運動が大きくなり、変位のシグナルが検出できなくなる。そこでこれらを両立させる適切なトラップ力を選択することが重要となる。そこで検討の結果、本実験では0.025 - 0.3 pN/nmの範囲のバネ定数を持つレーザートラップを使用した。

この研究で使用したバネ定数の範囲では、主なノイズ源はビーズの熱ゆらぎとなる。このゆらぎの中から信号を抽出するためには、ローパスフィルターを用いるのがもっとも有効である。レーザートラップの系は、熱浴にさらされた調和振動子とみなすことができるので、この熱ゆらぎのパワースペクトル密度関数はローレンツ型となり、周波数領域では、コーナー周波数の付近までノイズレベルがほぼ一定で様に広がっている。そこで、シグナルの検出に必要な時間分解能を下回らない範囲でローパスフィルターを適用すると、実際のノイズレベルは表2-1に示したようになる。これを参考にして、実験に適したフィルターのカットオフ周波数を選択した。nm計測の手段としては、ガラスニードルを用いることもできる。この実験系でも同じタイプのパワースペクトル密度関数を持つ熱ゆらぎが現れるが、プローブが受ける粘性抵抗がビーズに比べて格段に大きいので低周波側のノイズのパワーがビーズの場合に比べて大きくなる（表参照）。したがって本研究の目的のためには、ビーズをプローブとして用いた系の方が適している。

本研究において、S/N比に影響を及ぼす他の要因としては、キネシン分子とビーズの間（厳密にはガラスの表面からビーズの表面に至るタンパク質とそれらの結合）に存在するバネ成分がある。後述するように、このバネが柔らかければ柔らかいほど、キネシン分子と微小管の間の変位は大きくダンピングされてビーズに伝わるので、センサーで検出される信号はノイズに比べて小さくなってしまう。したがって、できるだけこのバネを固くしておく必要がある。そこで、バネの一部を構成するカバーガラスと微小管の間の結合をより固いものにするために、微小管をそのままガラスの上にのせるのではなく、より表面積の大きい軸糸の構造をとったものをカバーガラスに吸着させた。その結果、バネ定数は平均で 0.34 pN/nm となり、微小管をそのままのせたときに比べて倍の固さとなった(22)。

力測定プローブの弾性定数と粘性係数

ガラスマイクロニードル



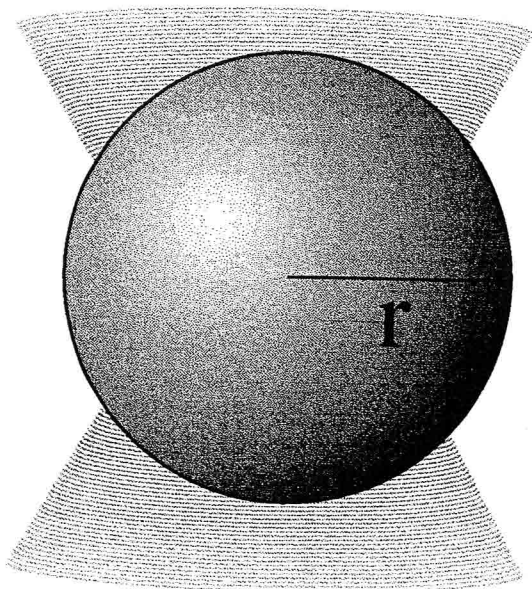
$$k = \frac{3\pi ER^4}{4L^2}$$

$$\gamma = \frac{4\pi\eta L}{\ln\frac{L}{R} + \frac{1}{2}} + 6\pi\eta r$$

η:水の粘度	1.0x10 ⁻³ Pa · s
r:ニッケル粒子の半径	0.5 μm
L:ニードルの長さ	100 μm
R:ニードルの半径	0.157 μm
E:ガラスのヤング率	7.1x10 ¹⁰ Pa

弾性定数0.1 pN/nm → $\gamma = 1.8 \times 10^{-7}$ kg/s

レーザートラップされたビーズ

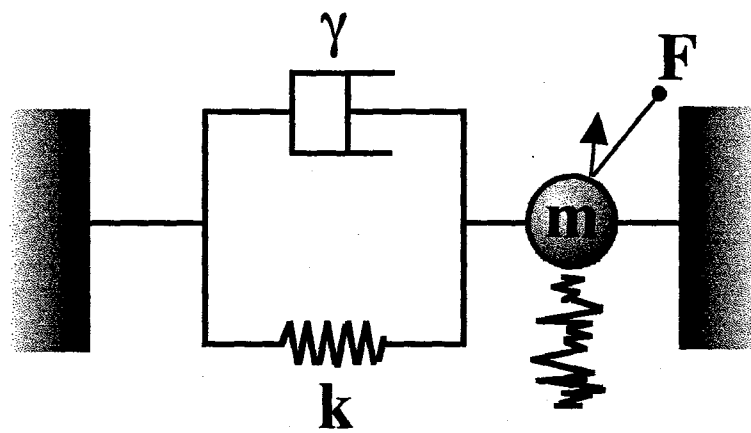


k: レーザーパワーで決まる

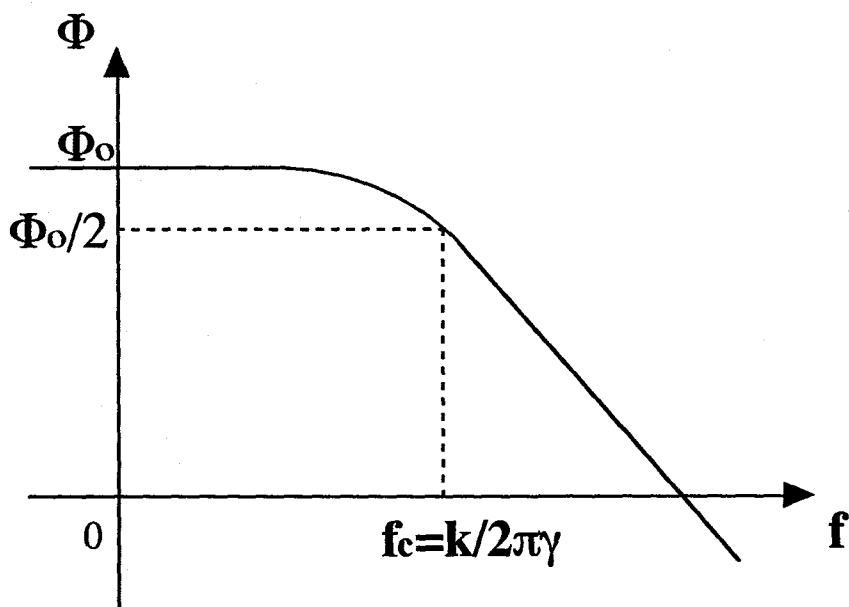
$$\gamma = 6\pi\eta r$$

η:水の粘度	1.0x10 ⁻³ Pa · s
r:ビーズの半径	0.5 μm

$$\gamma = 9.4 \times 10^{-9}$$
 kg/s



プローブの熱ゆらぎのモデル化



ローレンツ型スペクトル

nm, pN計測のためのプローブの熱ゆらぎ

溶液中でのトラップされたビーズ、あるいはガラスマイクロニードルは、次頁のようにモデル化できる。この系の運動方程式をたてると、

$$m\ddot{x} + \gamma\dot{x} + kx = F$$

となる。ここで m はプローブの質量、 γ はプローブが受ける粘性係数、 k はプローブのバネ定数、そして F は環境からプローブに与えられる熱揺動力である。これはナイキストの定理から示されるように、平坦なパワースペクトル密度関数

$$\Phi_F = 2\gamma k_b T$$

をもつ。ここで k_b はボルツマン定数、 T は絶対温度である。これらの関係式より、プローブのパワースペクトル密度関数は、

$$\Phi(f) = \frac{2\gamma k_b T}{(k - 4\pi^2 m f^2)^2 + 4\pi^2 \gamma f^2}$$

となる。われわれの実験系では $4\pi^2 m f^2 \ll k$ であるので、この式は

$$\Phi(f) = \frac{\frac{2\gamma k_b T}{k^2}}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2}, \quad f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}$$

となる。これはローレンツ型のパワースペクトル密度関数であり、コーナー周波数 f_c はバネ定数に比例し、粘性係数に反比例する。このスペクトル密度関数の面積を計算すれば、熱揺動のパワー $\langle x^2 \rangle$ がもとまる。周波数 f Hz までの信号を拾ったときの熱揺動のパワーは、

$$\begin{aligned} \langle x^2 \rangle &= \int_{-f}^f \Phi(f) df = \int_{-f}^f \frac{\frac{2\gamma k_b T}{k^2}}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} df \\ &= \frac{k_b T}{\pi k} \left(\tan^{-1} \frac{2\pi\gamma f}{k} - \tan^{-1} \frac{-2\pi\gamma f}{k} \right) \end{aligned}$$

によって計算できる。

	ガラスマイクロニードル ($f_c = 88.5$ Hz)	レーザートラップビーズ ($f_c = 1694$ Hz)
周波数レンジ	熱ゆらぎの大きさ (rms)	
∞	6.43 nm	6.43 nm
1000 Hz	6.25 nm	3.75 nm
100 Hz	4.72 nm	1.25 nm
10 Hz	1.72 nm	0.39 nm

表2-1弾性定数 0.1 pN/nm のプローブの予想される熱ゆらぎの大きさ

2-3-2 ビーズに吸着されたキネシン分子数の検定

本研究では、キネシン分子1個のメカニクスを行うことを目的としている。そこで、Svobodaらの手法(23)に改良を加えて、1個のビーズにキネシン分子が1個だけのもっているような系を確立し、これを用いて測定を行った。図2-9は、ビーズをキネシン分子でコートする際の、ビーズに対するキネシン分子の比を横軸にとり、それらを軸糸に接触させたときに、ビーズが動き出す確率を縦軸にしてプロットしたグラフである。このデータは、 n をビーズに対するキネシン分子の比としたときに、 $1-\exp(-n/1.9)$ という関数でうまくフィッティングできた。このことから、ビーズにコートされたキネシン分子の数はポアソン分布に従うことが分かった。ビーズが動き出す確率は、ビーズに対するキネシン分子の比さえ同じであれば、コートに要した時間(20分-10時間)に依存しなかった。実際の測定では、キネシン分子とビーズとの比が1となるように混合したビーズを用いた。このとき、上記のアッセイでビーズが動き出す確率は0.41となった。ビーズ上のキネシン分子の数はポアソン分布に従ったので、1個のビーズに2分子以上のキネシン分子が吸着されている確率は、 $1-\exp(-1/1.9)-(1/1.9)\exp(-1/1.9)=0.10$ で与えられる(23)。ビーズ上でのキネシン分子の配置を考えると、この条件で2個のキネシン分子が同時に軸糸と相互作用する確率はほとんどないと考えられる。すなわち、実験では1分子のキネシン分子による力発生を観測することになる。

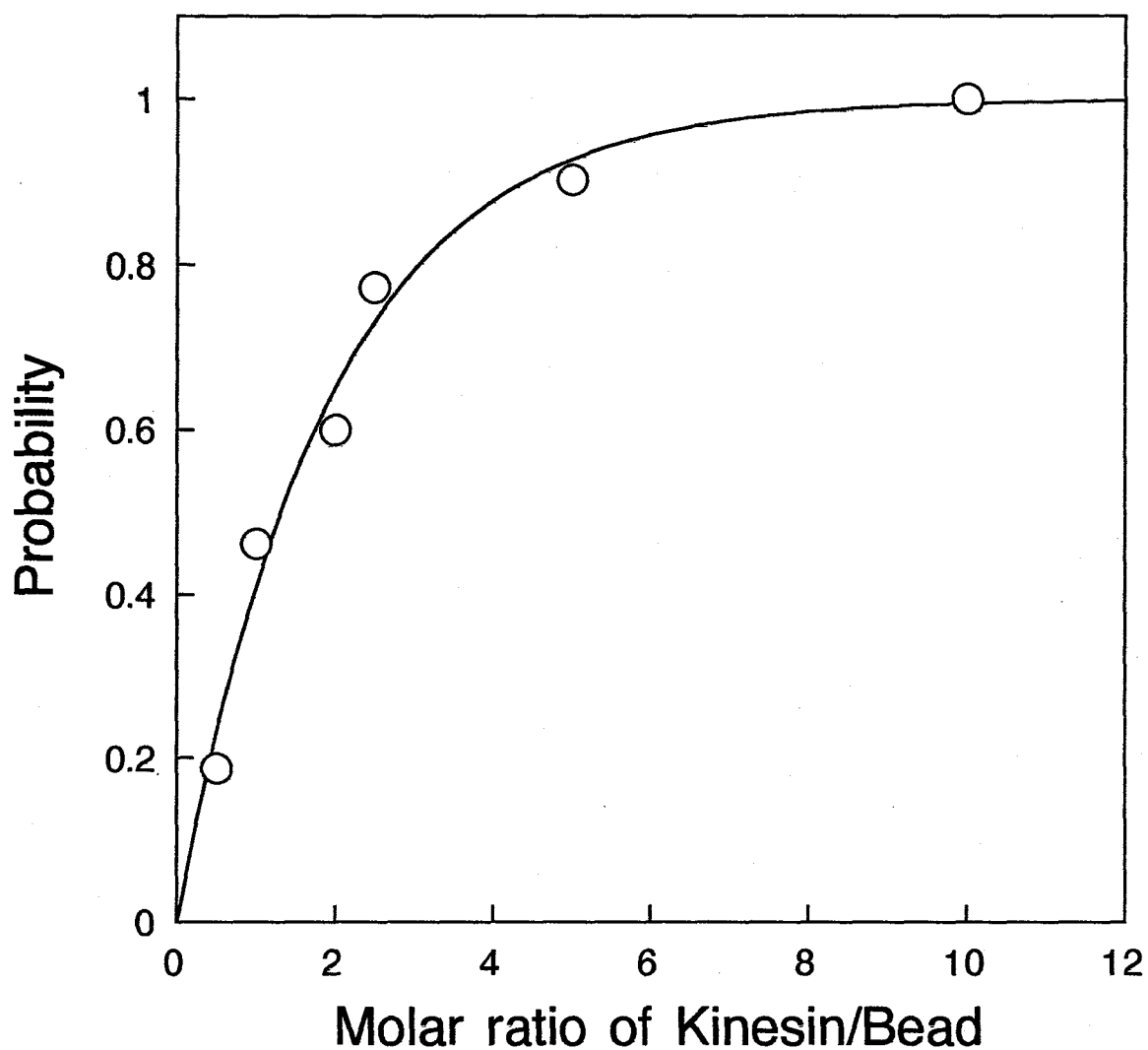


図2-9 キネシンビーズの動く確率

キネシンビーズが動くかどうかの検定は、ビーズをレーザートラップによって30秒間軸系に接触させることを3度繰り返すことにより行った。それぞれのキネシン/ビーズ比において7-22回試行を行っている。近似曲線は $1 - \exp(-x/1.9)$ である。

2-3-3 スティフネスの測定

先にも述べたとおり、カバーガラスからビーズ表面に至るタンパク質やそれらの結合に存在するバネ成分を見積もることは非常に重要である。ここでは、本研究においてキネシン分子とビーズの間に存在するスティフネスをどのように扱ったかについて述べる。

図2-10はキネシン分子と測定系の模式図である。ここに示したように、キネシン分子が微小管に対して変位を行っても、キネシン分子とビーズの間に存在するバネによって、その変位はビーズには減衰して伝わる。今、微小管に対するキネシン分子の変位を ΔX_k 、そのとき引き起こされるビーズの変位を ΔX_b 、ビーズ-キネシン結合（厳密にはビーズとキネシン分子、キネシン分子と軸糸、軸糸とカバーガラス表面の間の結合の総和）の長軸方向ののびを ΔX_p とすると、 $\Delta X_k = \Delta X_b + \Delta X_p$ となる。ここで、レーザートラップのバネ定数を K_b 、ビーズ-キネシン結合のバネ定数を K_p とすると、トラップ力 $K_b \cdot \Delta X_b$ とビーズ-キネシン結合の弾性力 $K_p \cdot \Delta X_p$ とは釣り合っているため、 ΔX_k は ΔX_b から $(1+K_b/K_p) \cdot \Delta X_b$ と求められる。 K_b は既知なので、 K_p を求めれば、変位の減衰率が分かる。我々はこれを求めるために、レーザートラップのトラップ点を振幅 ΔX_t のサイン波状に振動させ、そのときのビーズのサイン波応答の振幅 ΔX をモニターしながら変位の測定を行った。このときのビーズ-キネシン結合の弾性力 ($K_p \cdot \Delta X$) とトラップ力 ($K_b \cdot (\Delta X_t - \Delta X)$) の釣り合いの式から、 K_p の値は $K_b \cdot (\Delta X_t - \Delta X) / \Delta X$ となる。したがって、キネシン分子の変位 ΔX_k はビーズの変位 ΔX_b から $\Delta X_k = \Delta X_b \cdot \Delta X_t / (\Delta X_t - \Delta X)$ と求めることができる。ここで $\Delta X_t / (\Delta X_t - \Delta X)$ はアッテネーションファクターである。本研究では、力測定時にトラップ点を振幅 $\Delta X_t = 5 \text{ nm}$ のサイン波で振動させ、ロックインアンプを用いることにより、ビーズのサイン波応答 ΔX をリアルタイムで検出した。このサイン波入力には影響を与えなかった。

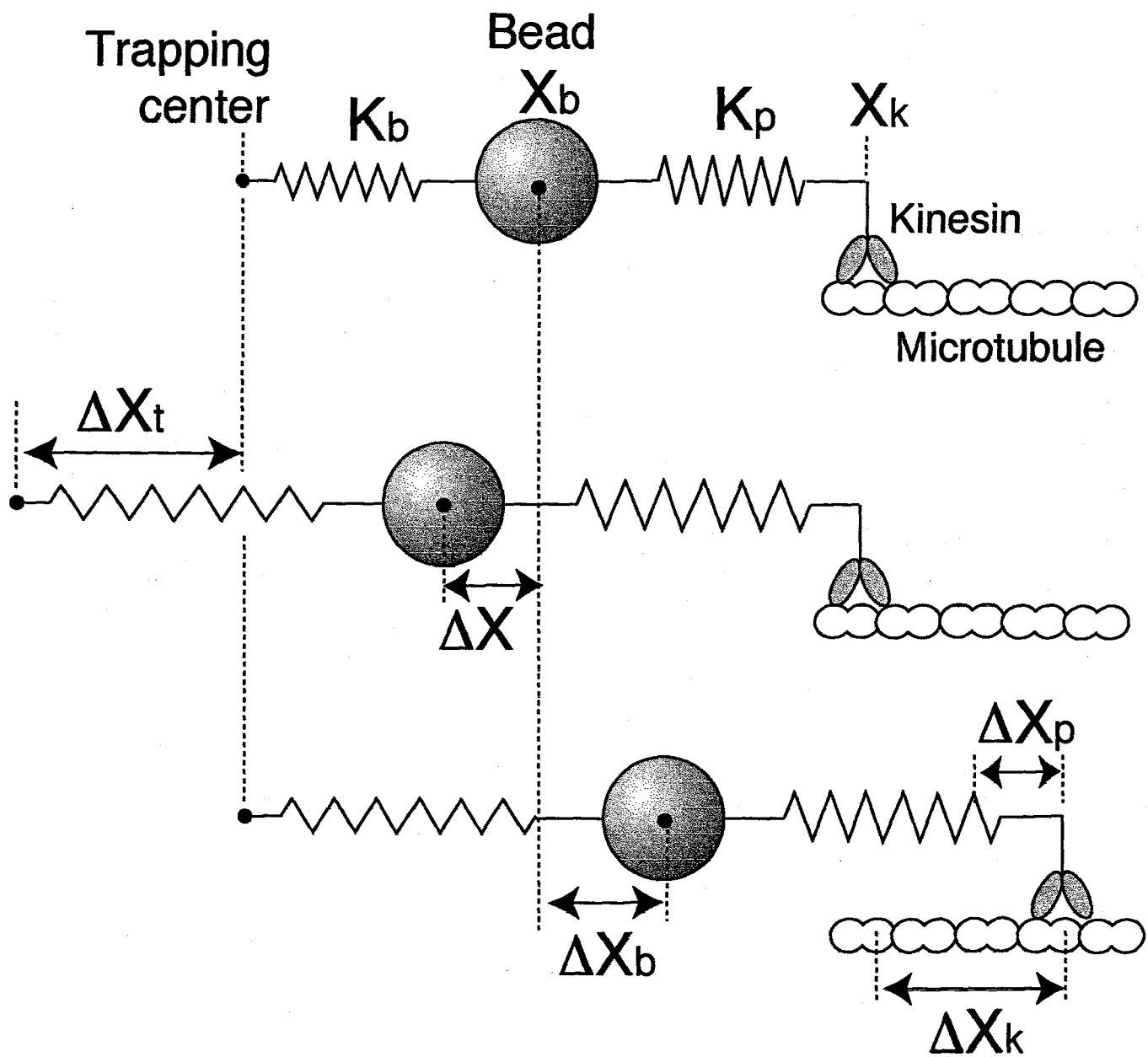


図2-10 系に存在するバネ成分とキネシン変位のダンピング

キネシンとビーズの間にバネ成分 K_p が存在するため、キネシンの変位 ΔX_k は減衰してビーズの変位 ΔX_b に現れる。 ΔX_b より ΔX_k を導く方法については本文参照。

2-3-4 キネシン1分子による変位と力

図2-11にはnm計測によって検出したキネシン1分子の力発生に伴うビーズの動きを示す。測定は、レーザートラップのバネ定数が0.025 - 0.30 pN/nmの範囲、ATP濃度 10 μ Mおよび 1 mMの条件下で行った。

キネシンビーズをレーザートラップによって操作し、ガラス表面に吸着した軸糸に接触させてしばらく待つと、キネシン分子と軸糸が相互作用を始めた。キネシン分子が力を発生すると、キネシンビーズはトラップの中心から離れる向きに動き始め、プラトーに達するまで徐々に速度を緩めながら変位し続けた。そして、しばらく一定の位置にとどまった後、キネシン分子が軸糸から離れることによって、トラップの中心に引き戻された(1列目のトレース)。トレースをよくみると変位は階段状に起こっていることが分かる。プラトーにおける力は、どのピークをみてもほぼ一定であった。図2-12にはこの力のヒストグラムを示した。力の平均値は 10 μ M ATP 条件下では 7.2 ± 1.3 pN、1 mM ATP条件下では 7.4 ± 1.4 pNであり、ATP濃度には依存しなかった。2列目のトレースはロックインアンプによって検出したビーズのサイン波応答の振幅である。キネシンによる力発生に伴い、ビーズ-キネシン結合のバネを反映して振幅が減少するのがわかる。また、キネシン分子が微小管から解離すると同時にサイン波応答の振幅は相互作用前のレベルにもどる。ここで注目すべきは、力が大きくなるほどサイン波応答の振幅も小さくなっていることである。すなわち、力のレベルが高くなればなるほど、ビーズ-キネシン結合のバネも固くなることがわかる。

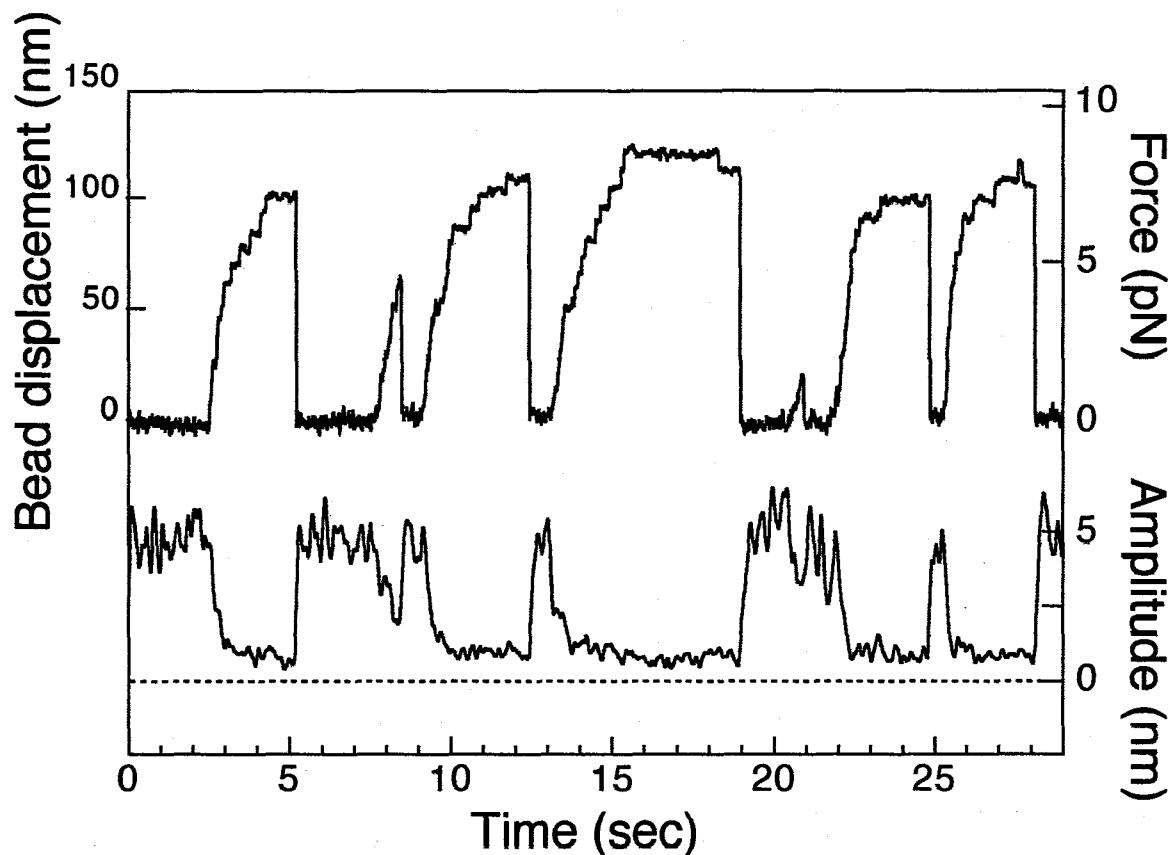


図2-11 力発生に伴うビーズの動作とサイン波応答

上：キネシン-微小管相互作用に伴うキネシンビーズの動き。ATP濃度は $10\mu\text{M}$ 、トラップのスティフネス： 0.070 pN/nm 、力はトラップスティフネスとビーズの変位との積によって求めた。

下：ロックインアンプによって検出したビーズのサイン波応答の振幅。トラップ中心は 100 Hz 、振幅 5 nm のサイン波状に振動させた。

ビーズの変位は 25 Hz のローパスフィルター、サイン波応答は 5 Hz のローパスフィルターを通してている。

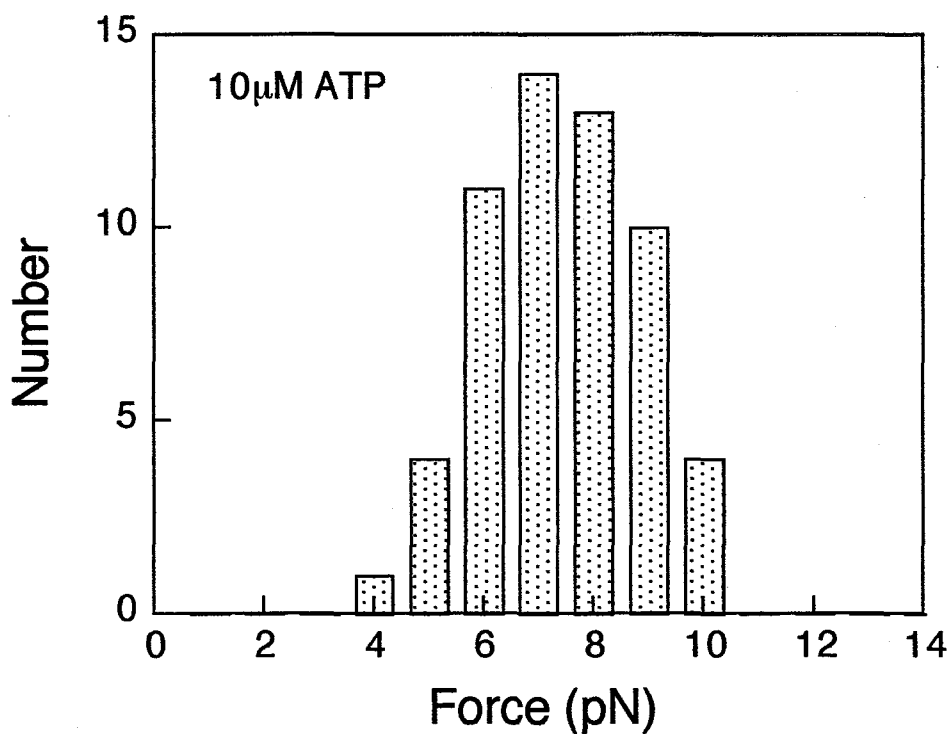
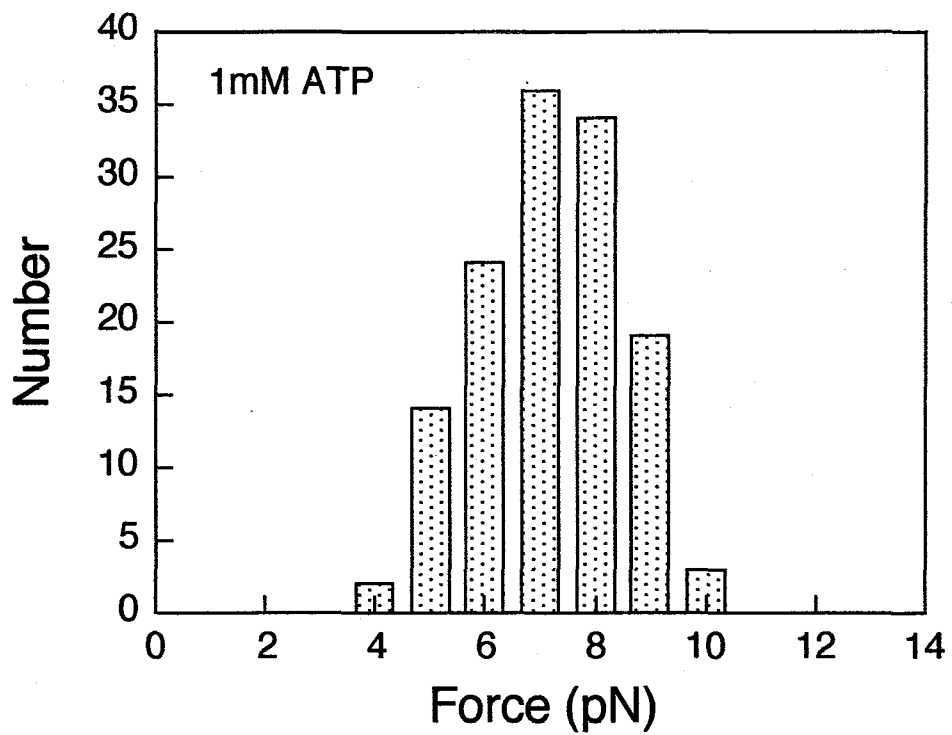


図2-12 カのヒストグラム

上：1 mM ATP条件、平均値 $7.4 + 1.4$ pN (mean+SD, n=57)
 下：10 μ M ATP条件、平均値 $7.2 + 1.3$ pN (n=132)

2-3-5 カ-速度関係

キネシン分子の運動メカニズムを提案したり、モデルを検証する際、キネシン分子の発生する力と速度の関係を調べておくと非常に有用である。本節では、キネシン分子の動きと弾性的性質の平均像を明らかにし、これらを用いてキネシン1分子のカ-速度関係を明らかにする。

図は10 μ M ATP条件下で得られたビーズの変位のトレースと、サイン波応答の振幅のトレースを加算平均することにより平滑化した結果である。さらにその下には、これらの結果を用いることによりビーズ-キネシン間結合のバネ定数 K_p 、及びアッテネーションファクター $\Delta X_d/(\Delta X_t - \Delta X)$ の平均値を求めて示した(3-3-3参照)。最下段には ΔX_k を積分することによって求めたキネシン分子の変位の平均値を示した。ビーズのサイン波応答の振幅は、 <3 pNまでは急激に減少し、それより大きな力のところでは徐々に減少している様子が見られる。これはビーズ-キネシン間結合が力に対して線形のバネではないことを示している。力のプラトーのところでのバネ定数の平均値は 0.34 ± 0.08 pN/nmとなり、 $0.025 - 0.30$ pN/nm のバネ定数のトラップの範囲では一定であった。このことは、系に並列のバネ成分が含まれていないことを示している。

次に、カ-速度関係をキネシン分子の平均トレースから求める。 < 0.5 pNの範囲ではノイズが大きかったので、解析は負荷が > 0.5 pNの領域で行った。図2-14にその結果を示した。負荷がかかっていないときの速度は、トラップによって微小管と相互作用させたキネシンビーズを、レーザーを遮断してリリースさせることにより測定した結果である。負荷なしのときの1 mM ATP条件下での滑走速度は、10 μ M ATP 条件下での速度の約3倍となった。どちらのATP濃度条件においても、力の増加に応じて速度は直線的に減少した。これは筋収縮の実験で観測される双曲線型のカ-速度関係とは異なっている。この違いは、キネシン-微小管系とアクトミオシン系のモータータンパク質自体の性質の違いに由来している可能性、あるいは、キネシンの結果は1分子での測定結果であり、ミオシン分子の場合は多分子が協同して力を発生している様子を見ているのでこの違いに由来するという可能性がある。

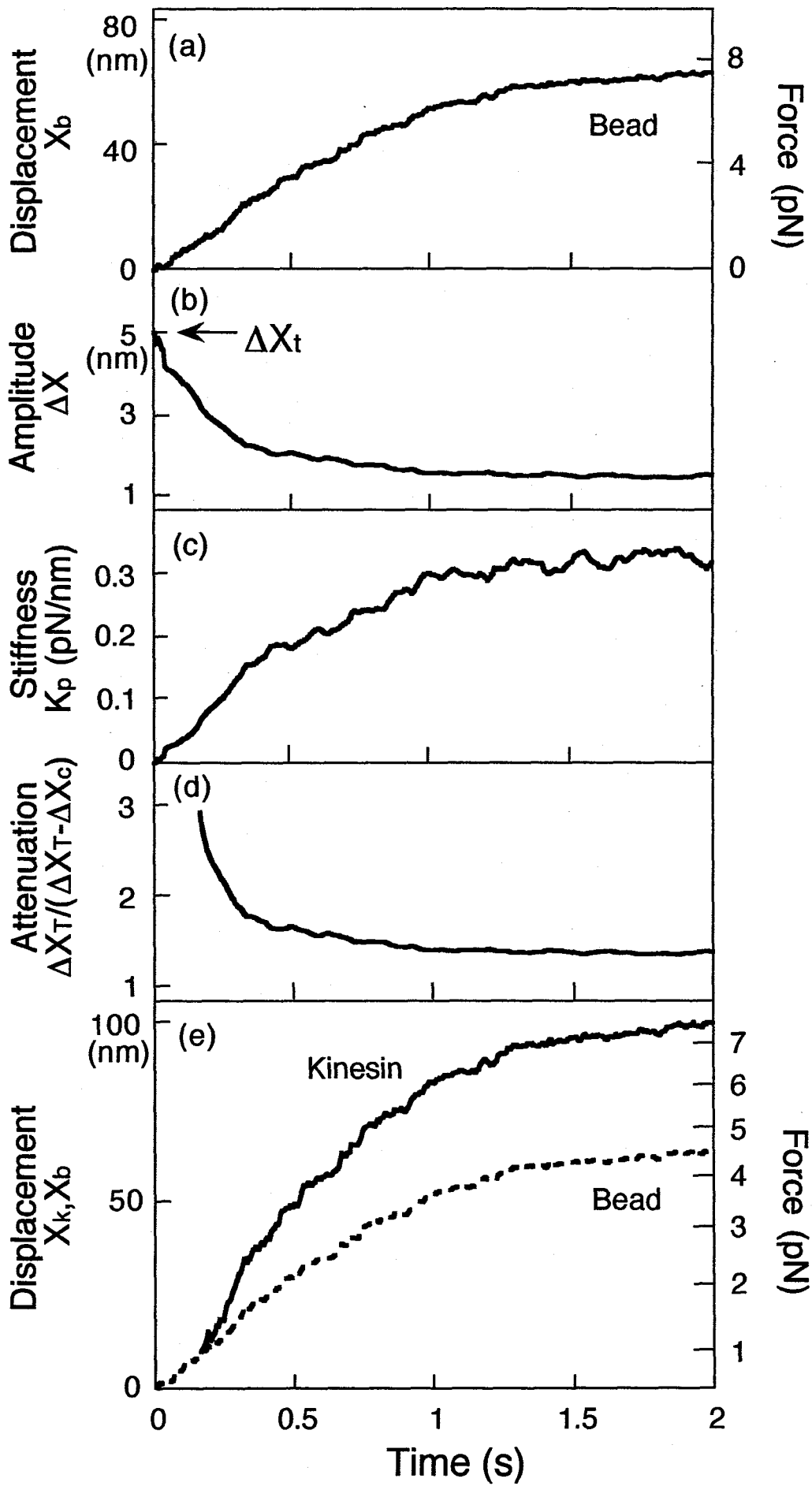


図 2-13 キネシン分子変位の平均化トレース

(a) 10μ MATP 条件下でのビーズの変位 X_b (17 トレースの平均、トラップのバネ定数 $K_b = 0.12 \text{ pN/nm}$)。力はビーズの変位とトラップ力の積から求めた。出力信号には 50 Hz のローパスフィルターをかけている。(b) ビーズのサイン波応答の振幅 (ΔX)。トラップ中心を 100 Hz , 振幅 $\Delta X_t = 5 \text{ nm}$ のサイン波で振動させたときの応答。サイン波応答は、ビーズの変位と同時に検出した。(c) (b) のトレースより求めた結合部位のスティフネス (K_p)。 K_p は $K_p = K_b(\Delta X_t - \Delta X) / \Delta X$ と計算される。(d) (b) よりもとめたアッテネーションファクター $\Delta X_t / (\Delta X_t - \Delta X)$ 。ファクターが > 3 のところはノイズが大きいので示していない。(e) 実線: キネシンの変位。区間 60 ms のアッテネーションファクターとビーズの変位の積を求めその値を積分することによって求めた。キネシン分子の変位は低負荷でのアッテネーションファクターのノイズの影響を避けるために、 $> 1 \text{ pN}$ の範囲で見積もった。

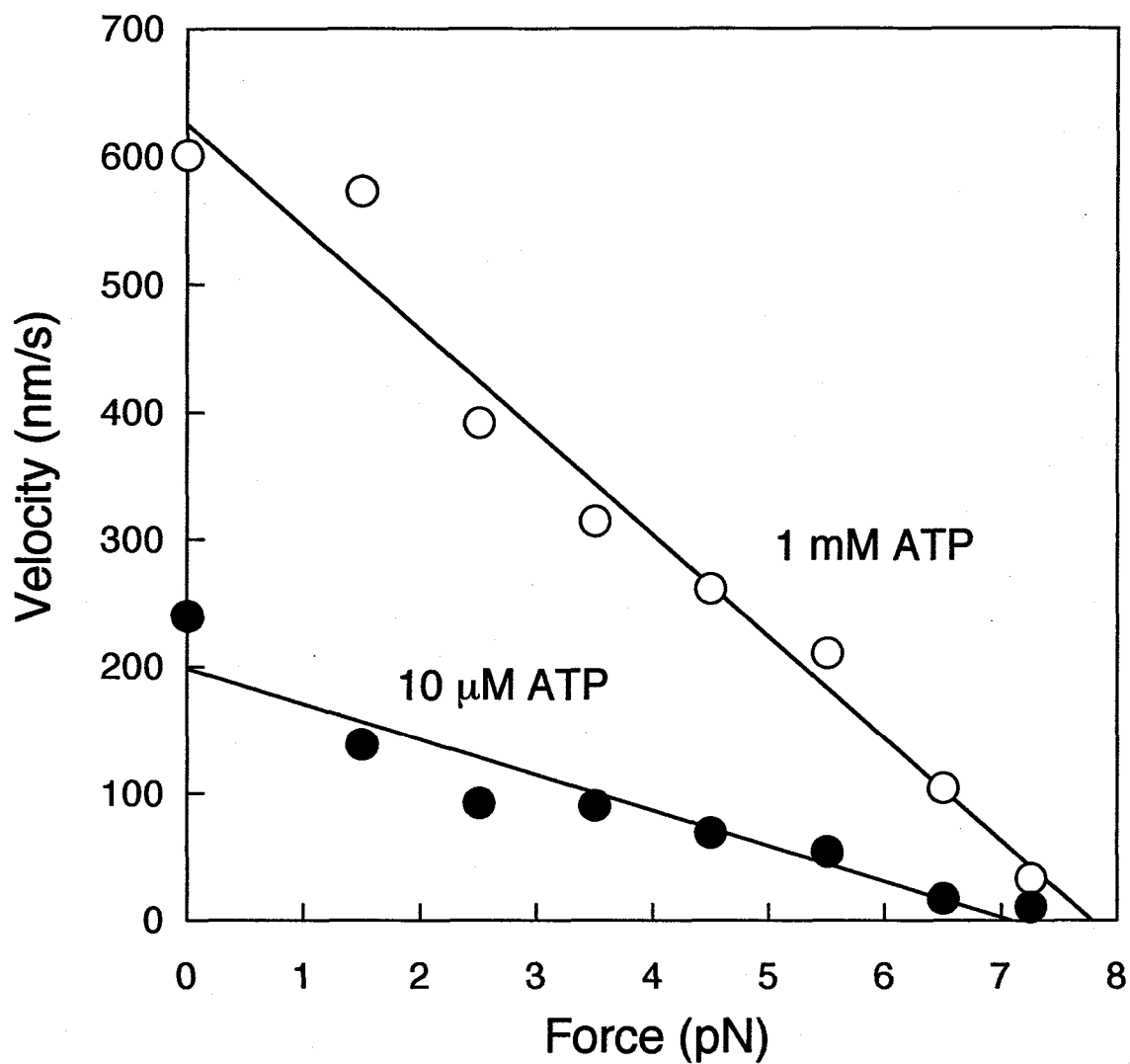


図2-14 カ-速度関係

速度は図2-13のキネシンの変位のグラフの傾きより求めた。白丸：1 mM ATP、黒丸：10 μM ATP条件。0 pNでの速度はトラップなしで測定した。それぞれの点は1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6, 6-7, 7-7.5 pNの範囲での平均値である。

2-3-6 キネシン1分子によるステップ状変位

図2-15に示した通り、キネシン分子は微小管上と相互作用して進む際、比較的サイズの揃ったステップ状の変位を行う。本節では力発生時におけるキネシン分子のミクロな動作を知るために、キネシン分子の動きの基本単位であるステップ状変位に焦点をあて、その性質を詳細に解析する。

キネシンビーズのステップ状変位は、キネシン分子が3 pNよりも大きな力が出しているときに明確に観測された。その理由は、このレベルの力がかかるとビーズ-キネシン間結合のバネ定数が十分固くなり、ステップ状変位が観測できるほどにビーズの熱ゆらぎが抑えられるためと考えられる。したがって本研究でのステップ状変位の解析は > 3 pN の領域で行った。また、ATP濃度依存性を調べるために、1 mM ATPおよび10 μ M ATP の2通りの条件下で測定を行った。

ステップ状変位の基本単位

キネシン分子のステップ状の変位の大きさは、カットオフ周波数50Hzのローパスフィルターを通しての解析では、~8 nm または ~ 16 nm のものが多くみられた(22)。これらのステップを、カットオフ周波数 250 Hz のローパスフィルターを用いることによってより高い時間分解能で解析すると、ほとんどの16 nm ステップは2つの8 nm ステップが連続して起こっていることにより生じていることがわかった。すなわち、キネシン分子の単位ステップサイズは8 nm 程度であると考えられる。このことをもう少しはっきりさせるために、統計的にキネシン分子のステップサイズのデータの処理をおこなった。図2-16はキネシン分子の変位を100 msおよび10 msごとにサンプリングし、その間に起こった変位量をヒストグラムに表した結果である。我々は、これらのヒストグラムを-8, 0, 8, 16, 24, 32, 40 nm付近を中心としたガウス型分布関数の和によって近似した。ヒストグラムにはATP濃度や負荷によらず、8 nm の整数倍の位置にピークがみられた。さらに、10 μ M ATP条件での速度の遅いデータを10 msの高い時間分解能で解析したヒストグラムでは、8 nm の位置にしかピークは現れなかった。これらの結果を考慮すると、キネシン分子が微小管上を進む際の単位ステップの大きさは ~ 8 nmであり、測定時にみられた16 nmより大きなステップは、それ自身が一步なのではなく、8 nm のステップが連続して起こったものであることがわかる。

ステップの中には、ときどき後退する方向に起こるものも存在した。これらのステップの大きさは ~ 8 nm であった。このようなステップが生じる頻度は負荷によって変化

し、3 - 6 pNの範囲では前進ステップが生じる頻度の8 %以下であり、キネシン分子がストールするレベルである6 - 8 pNのときは10 %程度であった。

8 nmステップ生起のDwell time

8 nm ステップがキネシン分子のどのような動作に伴って生じるのかを調べるために、ある8 nmステップが起きてから次の8 nmステップが起こるまでの時間 (Dwell time) を負荷が3 - 4 pN、10 μ M ATP 及び1 mM ATPの条件下において測定した。図2-17にDwell timeのヒストグラムを示す。どちらのATP濃度条件においても、ある長さのDwell timeが生じる頻度はそれが長ければ長いほど少なくなる。この結果を矛盾なく説明するためには、キネシン分子には2つの頭部があることを考慮して解析を行うことが重要である。後にこのヒストグラムを説明するためのキネシン頭部の動作モデルについて議論を行う。

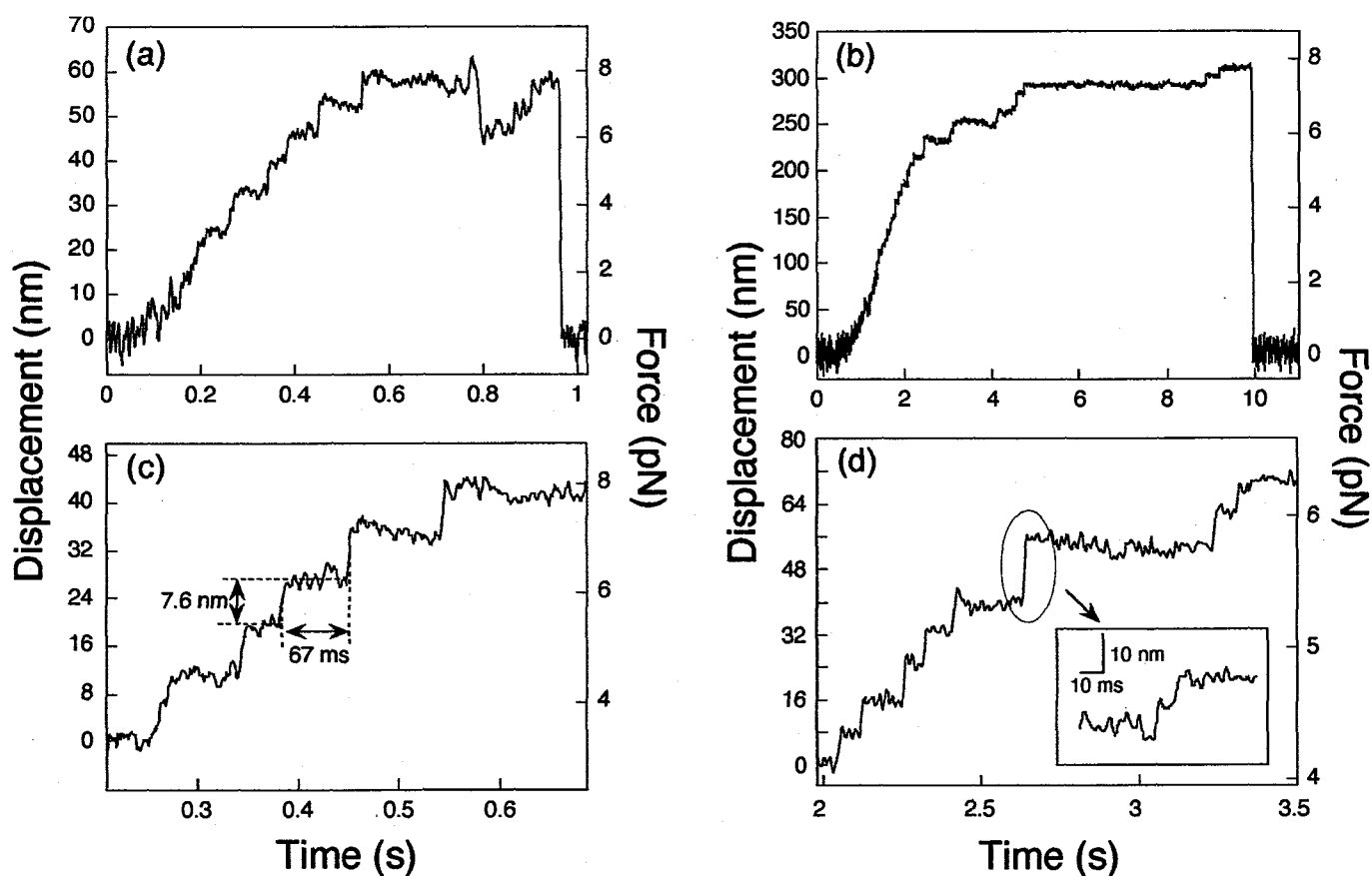


図 2-15 キネシン分子のステップ状変位

(a) 1mM ATP 条件下でのビーズの変位 (b) 10 μ M 条件下でのビーズの変位。 (c) 及び (d)のトレースは図2-13のアッテネーションファクターを用いることによって(a)と(b)のトレースをキネシン分子の変位に変換したものである。力はトラップのスティフネスとビーズの変位の積から求めた。(a)で用いたトラップスティフネスは 0.13 pN/nm、(b)は 0.025 pN/nm である。(a),(c)には 100 Hz のローパスフィルター、(b),(d)には 50 Hz のローパスフィルター、(d)の挿入図のは 250 Hz のローパスフィルターを適用している。(c)にはステップサイズと Dwell time を示した。

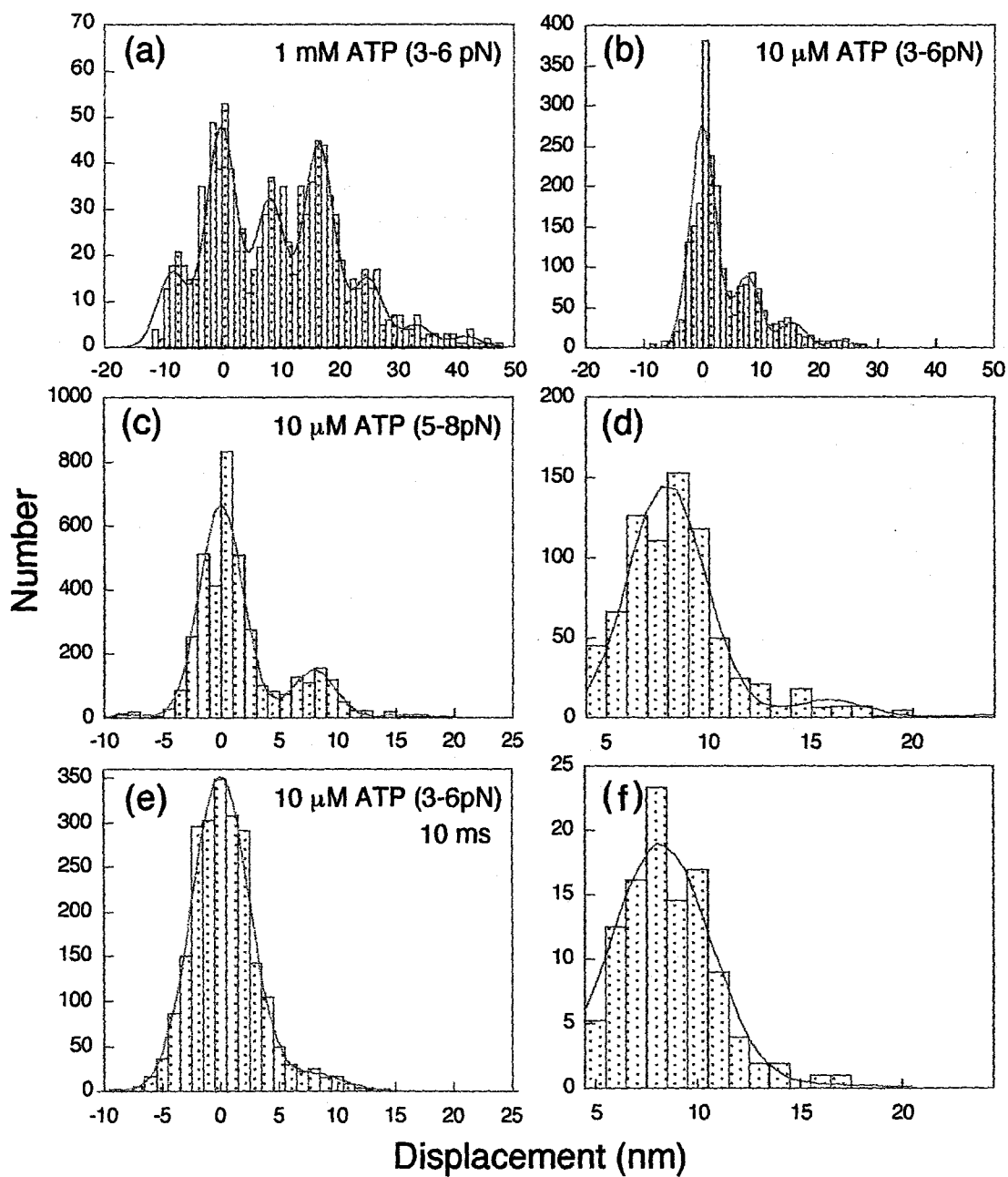


図2-16 ステップサイズのヒストグラム

(a-d) : 100 msのウィンドウサイズでのヒストグラム、(e, f) : 10 msのウィンドウサイズでのヒストグラム。区間内での正味の変位量をウィンドウを5 msずつずらしてサンプリングを行った。(a) : 1 mM ATP, 3-6 pN、(b,e,f) : 10 μ M ATP, 3-6 pN、(c,d) : 10 μ M ATP, 5-8 pNでの結果。ヒストグラムは下記に示したガウス型分布関数の和によって近似した。

$$\sum_{i=-1}^5 A_i \exp \left\{ -\frac{(x-iD)^2}{2\sigma^2} \right\}$$

ここで、D : 単位ステップサイズ、 A_i 、 σ : ガウス分布の振幅及び標準偏差である。D及び σ の値は(a)で8.4, 2.6 nm、(b) 7.7, 2.2 nm、(c) 7.9, 1.9 nm、(e) 8.2, 2.5 nmである。(d)と(f)は(c)及び(b)のヒストグラムより 0 nmを中心とするピークを除去して残りのピークを明確にしたものである。

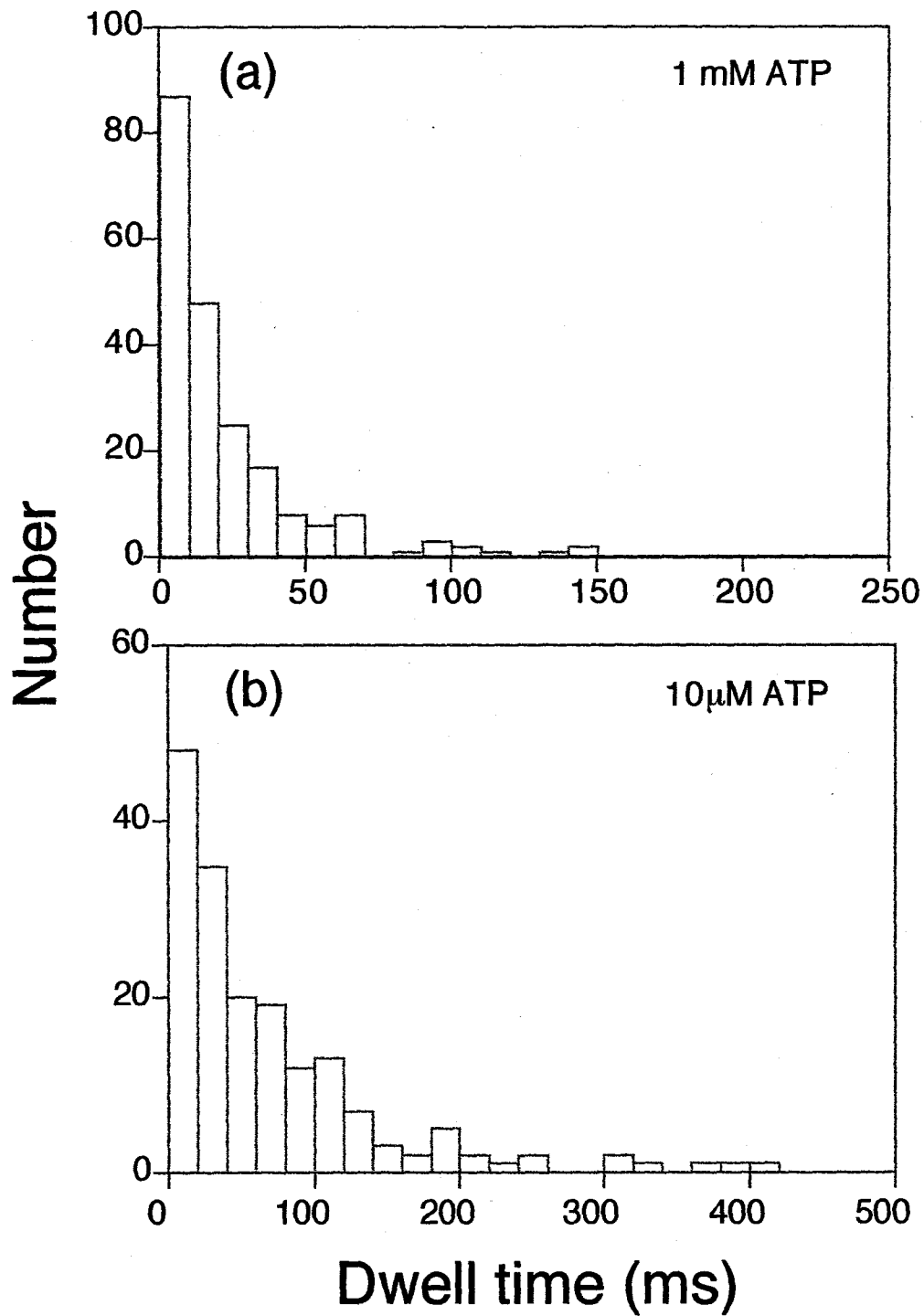


図2-17 Dwell timeのヒストグラム

(a) 1 mM ATP, (b) 10 μM ATPの結果。どちらの場合もDwell timeの増加に伴って頻度は単調に減少し、ピークは現れなかった。

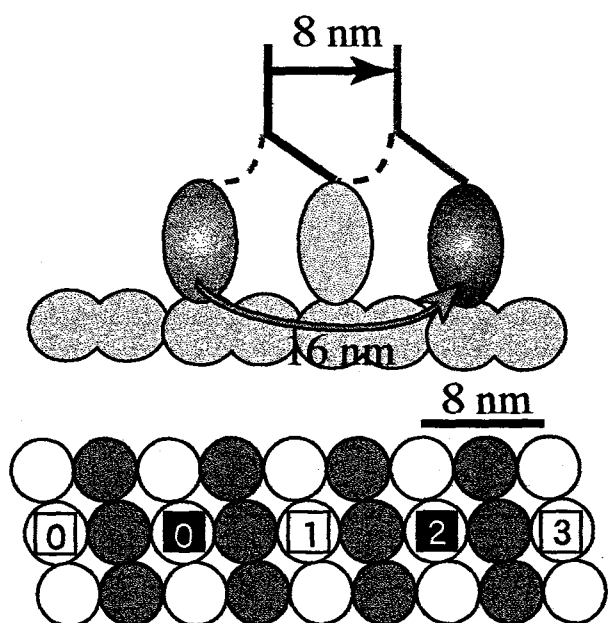
2-4 考察

2-4-1 単位ステップサイズと歩行モデル

本研究によって、キネシン分子の単位ステップサイズは 8 nm であることが明らかにされた。ここでは、2つの頭部を持つキネシン分子と 8 nm の周期構造を持つ微小管が相互作用するとき、8 nm のステップがどのようにして現れるのかを検討する。

微小管に結合したキネシン分子を電子顕微鏡で観察すると、キネシン頭部は 8 nm の周期で微小管の β -チューブリンに結合している様子が見られる(21)。この 8 nm の周期は我々の観測した 8 nm ステップと、どのように対応づけることができるであろうか？キネシン分子は2本のキネシン重鎖と2本のキネシン軽鎖が会合することによって構成され、2つの運動活性がある頭部を持っている。キネシン重鎖は直径 7 nm 程度の球状の頭部と短いネックドメイン、他の重鎖と coiled-coil 構造をとってダイマーを構成する尾部、及びキネシン軽鎖を結合するC末端側の球状ドメインからなっている(12)。キネシン分子が微小管上を進む際には、ネックドメインによってその歩幅が制限されるはずである。本研究でのステップサイズの測定で、高時間分解能、あるいは速度の遅い条件においては、16 nm以上の長いステップがほとんど観測されなかったことを考慮すると、キネシン分子の2つの頭部は、同時に 16 nm以上離れた微小管上の β -チューブリンに結合することができないといえる。したがって、8 nm ステップが可能なモデルとして図2-18 に示したような2通りのモデルを考えた(2)。a)のモデルではキネシン分子の2つの頭部は1本のプロトフィラメント上を交互に 16 nm ずつ進むと考える (16-nm-stepping model)。b)のモデルでは2本のプロトフィラメントにまたがって、8 nmずつランダムに進むと考える (8-nm-stepping model)。どちらのモデルにおいても、キネシン分子の重心の位置は先行するヘッドの位置によって決まると考える。また、1分子であってもキネシン分子は微小管と長時間相互作用し続けるという実験結果から、2つのヘッドのうちの必ず片方は常に微小管に結合していると考えられる。16-nm-stepping model では、ヘッドが1ステップ動くとキネシン分子は必ず ~8 nm進むことになる。一方 8-nm-stepping modelでは隣同士のプロトフィラメントは互いに1 nmシフトしていることを考慮すると、ヘッドの1ステップに対してキネシン分子は8, 7, 1, 0 nmの4通りの動きをすることが考えられる。今回の測定では、1 nm程度のステップサイズの違いは、熱ノイズに埋もれて区別することはできないので、いずれのモデルも可能である。

(a) 16 nm stepping model



(b) 8 nm stepping model

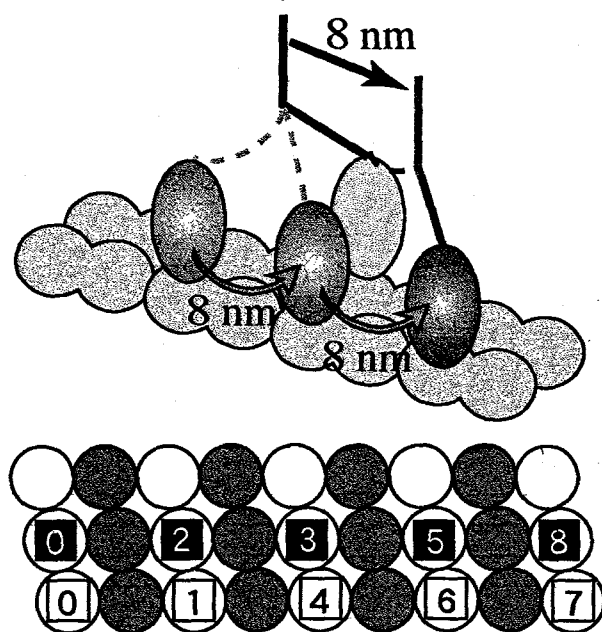


図2-18 キネシン分子の歩行モデル

上段：キネシン分子の動き、下段：微小管格子上的キネシン分子の足跡
(色分けはヘッドの区別を、番号は歩を進める順序を示す。)

- (a) 16 nm-stepping model :2つのキネシンヘッドは交互に16 nmずつ進む。
このときキネシン分子自体は8nm ずつ進む。
- (b) 8nm-stepping model : 2つのキネシンヘッドはランダムに8 nm ずつ進む。
キネシン分子はヘッドの動きに応じて8 nm進むときとほとんど進まないときがある。

2-4-2 Dwell timeでのキネシン分子の歩行モデルの検証

前節で述べた、8-nm-stepping modelと16-nm-stepping modelのどちらが実体に近いかを調べるために、両モデルでシミュレーションを行って Dwell time のヒストグラムが説明できるかどうかを検討した。シミュレーションを行うために、図2-19のようなキネシン分子の kinetic model を仮定した(5,18)。キネシン分子が微小管上を進む際、キネシンの2つのヘッドは 16 nm 以上離れた β -チューブリンに同時には結合できない。そこで、前ヘッドが後ヘッドより 8 nm 先行して結合しているとき、前ヘッドは後ヘッドが進むまでは、K·M·Nの状態で待っていると仮定する。シミュレーションでは t_α と t_β をパラメーターとして変化させ、Dwell time ヒストグラムの2乗誤差が最小となる場所を求めた。このとき、 t_β はATP濃度に依存しないパラメーターとして扱った。このようなモデルでシミュレーションを行った結果、どちらのATP濃度条件下でも16-nm-stepping modelによつては Dwell time ヒストグラムがよく説明できた(図2-20)。一方で、8-nm-stepping modelにはヒストグラムは説明できなかった。したがって、キネシン分子の2つのヘッドは交互に 16 nmずつ微小管に結合しながら前に進んでいると考えられる。

最近、広瀬らにより微小管にrigor結合したキネシン分子の電子顕微鏡像の3次元再構成が行われ、片方のヘッドが微小管に結合しているときに、もう一方のヘッドは進行方向に迫り出している像をがとらえられた(10)。彼らはこの結果より我々の16-nm-stepping modelと類似のhand-over-hand modelを提案している。

16-nm-stepping modelでのシミュレーションの結果、 $10\ \mu\text{M}$ ATPのヒストグラムより $t_\alpha = 100\ \text{ms}$ となった。したがってATPの結合の二次の反応速度定数は $10^6\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と計算される。また、 $t_\beta = 19\ \text{ms}$ となった。最近になって樋口らのcaged ATP を用いた実験により、負荷のかかった条件でのキネシン分子のATP結合レートと力発生のレートが求められた。その結果、ATP結合の二次の速度定数は $\sim 0.7 \times 10^6\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、力発生にいたる時間 t_β は $\sim 20\ \text{ms}$ となり、今回の我々の結果と非常によく一致した。また、溶液系でのATPase反応の測定によつてもATP結合の二次の速度定数は $1 - 3 \times 10^6\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、ATPaseのcycling rateも1ヘッドあたり $20 - 40\ \text{s}^{-1}$ と求められており、シミュレーション結果はこれともよく一致した(5,7,17,18)。

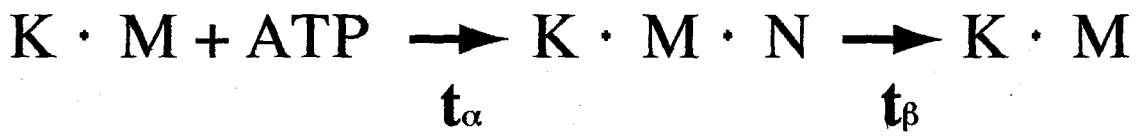
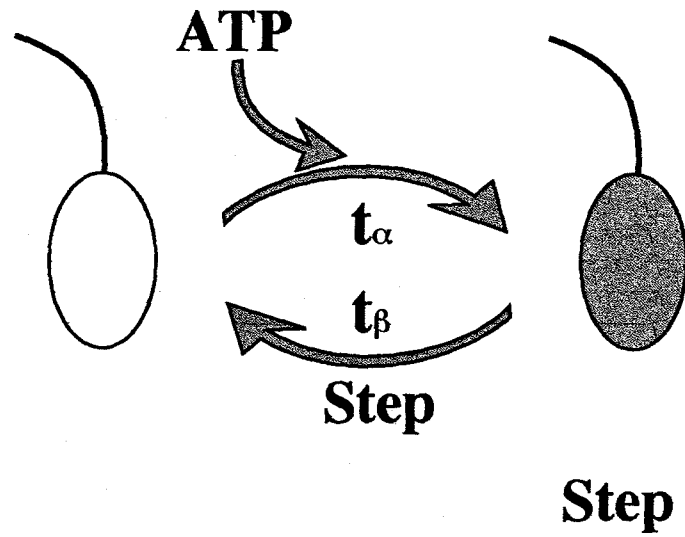


図2-19 キネシンヘッドのkineticモデル

K: キネシンヘッド、M: 微小管、N:ヌクレオチド、 t_α, t_β : 遷移時間

高ATP濃度下では、力発生段階のみが律速となり、低ATP濃度下ではそれに加えてATP結合反応も律速となる。

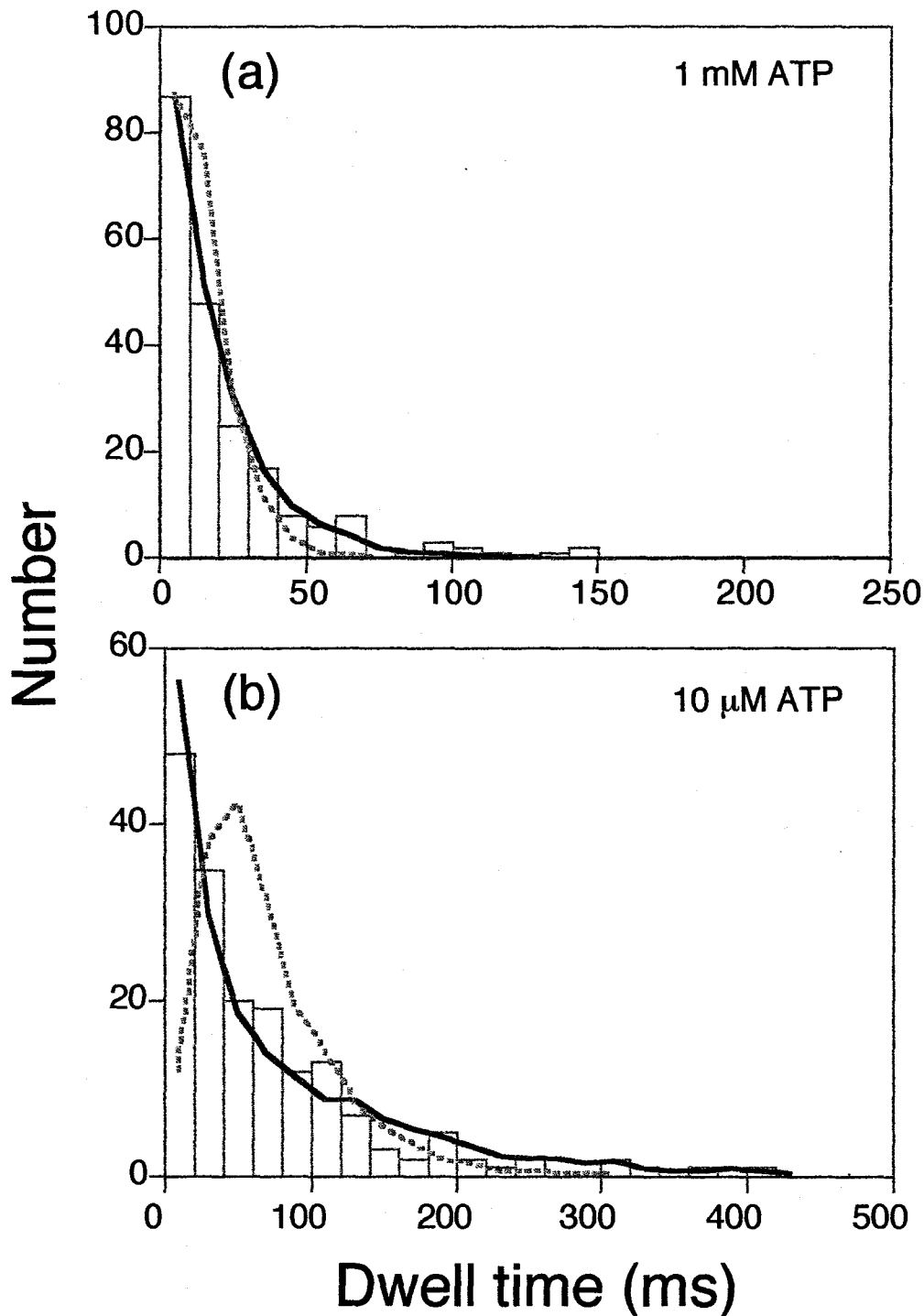


図2-20 シミュレーションの結果

実線：16 nm-stepping modelの結果、点線：8 nm-stepping modelの結果
 8 nm-stepping modelではピークが現れる。fittingは二乗誤差が最小となるようにパラメーター α , $t\beta$ を選んで行った。

16nm-stepping modelでは $\alpha = 100$ ms, $t\beta = 19$ ms、8 nm-stepping-modelでは $\alpha = 50$ ms, $t\beta = 8.5$ msとなった。

参考文献

(第1章)

1. Bagni, M.A., Cecchi, G., Colomo, F and C. Poggese. 1990. Tension and stiffness of frog muscle fibres at full filament overlap. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 11: 371-377.
2. Carter, G. B., and V.T.J. Schenk. 1975. in *Structure and Properties of Oriented Polymers*, ed. Ward, I.M. (Applied Science, London), p. 456.
3. Ebashi, S., Wakabayashi, T., and F. Ebashi. 1971. *J. Biolchem.* 69: 441-445.
4. Feughelmann, M. Danilatos, G. D., and D. Dubro. 1980. in *Fibrous Proteins : Scientific, Industrial, and Medical Aspects*, eds. Parry, D.A.D. and L.K. Creamer. (Academic, New York), pp. 198-202.
5. Ford, L.E., Huxley, A.F. and R.M. Simmons. 1977. Tension responses to sudden length change in stimulated frog muscle fibres near slack length. *J. Physiol.* 269: 442-515.
6. Ford, L.E., Huxley, A.F. and R.M. Simmons. 1981. The relation between stiffness and filament overlap in stimulated frog muscle fibres. *J. Physiol.* 311:219-249.
7. Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., and J. Howard. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actinfilaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120:923-934.
8. Goldmann, Y.E. 1987. Measurement of sarcomere shortening in skinned fibres from frog muscle by white light diffraction. *Biophys. J.* 52: 57-68.
9. Guba. F., and F.B. Straub. 1943. Extraction of myosin. *Studies* 3: 46-48.
10. Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D.D. and T. Yanagida. 1990. Mechano-chemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assay. *J. Mol. Biol.* 216: 49-68.

11. Higuchi, H., Yanagida, T., and Y.E. Goldman 1995. Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 69: 1000-1010.
12. Hvidt, S., Nestler, F.H.M., Greaser, M.L., and J.D. Ferry. 1982. Flexibility of myosin rod determined from dilute solution viscoelastic measurements. *Biochemistry* 21:4046-4073.
13. Hoffmann, H., Voss, T., Kuhn, K., and J. Engel. 1984. Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs. Comparison of interstitial, basement membrane and intima collagens. *J. Mol. Biol.* 172: 325-344.
14. Holmes, K.C., Popp, D., Gebhart, W., and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44-49.
15. Huxley, A.F. 1957. Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* 7:255-318.
16. Huxley, A.F. and R.M. Simmons. 1971. Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* 233:533-538.
17. Huxley, H. E. 1957. The double array of filaments in cross striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3:631-648.
18. Huxley, H.E. 1963 Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* 7: 281-308.
19. Huxley, H. E. and W. Brown. 1967. The low-angle x-ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during muscle contraction. *J. Mol. Biol.* 30:383-434
20. Huxley, H. E., Stewart, A., Hernando, S., and T. Irving. 1994. X-Ray diffraction measurements of extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys. J.* 67: 2411-2421.
21. Ishijima, A., Doi, T., Sakurada, K., and T. Yanagida. 1991. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin *in vitro*. *Nature* 352: 301-306.

22. Julian, F.J., and D.L. Morgan. 1981. Tension, stiffness, unloaded shortening speed and potentiation of frog muscle fibres at sarcomere length below optimum. *J. Physiol.* 319: 205-217.
23. Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and K.C. Holmes. 1990. Atomic structure of the actin:DNase1 complex. *Nature* 347: 44-49.
24. Kishino, A., and T. Yanagida. 1988. Force measurement by micromanipulation of a single actin filament by glass needles. *Nature* 334: 74-76.
25. Kress, M., Huxley, H. E., Farqui, A. R., and J. Hendrix. 1986. Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved x-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 188:325-342.
26. Oosawa, F. 1977 Actin-actin bond strength and the conformational change of F-actin. *Biorheology.* 14:11-19.
27. Page, S.G., and H.E. Huxley. 1963 Filament length in striated muscle. *J. Cell Biol.* 19: 369-390.
28. Phillips, G. N., Fillers, J.P., and C. Cohen. 1986. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation *J. Mol. Biol.* 192: 111-131.
29. Spudich, J.A. and S. Watt. 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction 1. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246: 4866-4871.
30. Suezaki, Y., and N. Go. 1976. Fluctuations and mechanical strength of α -helices of polyglycine and poly(L-alanine). *Biopolymers* 15: 2137-2153.
31. Tawada, K. and M. Kimura. 1985. Is S-2 portion of the cross-bridge in glycerinated rabbit compliant in the rigor state? *Biophys. J.* 45:593-602.
32. Tsuda, Y., Yasutake, H., Ishijima, A., and T. Yanagida. 1996. Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion

measured directly by *in vitro* micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12937-12942.

33. Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Tanaka, H., Ueno, Y., Takezawa, Y., and Y. Amemiya. 1994. X-ray diffraction evidence for extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys. J.* 67: 2422-2435.

35. White, D.C.S., and J. Thorson. 1973. The kinetics of muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 27: 173-255.

36. Wulf, E., Deboen, A. Bautz, F.A., Faulstich, H., and T. Wieland. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4498-4512.

37. Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K., and F. Oosawa. 1984. Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. *Nature* 307: 58-60.

38. Yasuda, K., Anazawa, T., and S. Ishiwata. 1995. Microscopic analysis of the elastic property of nebulin in skeletal myofibrils. *Biophys. J.* 68: 598-608.

(第2章)

1. Block, S.M., Goldstein, L.S.B. and B.J. Schnapp. 1990. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 348:348-352.

2. Block, S. M., and K. Svoboda. 1995. Analysis of high resolution recordings of motor movement. *Biophys. J.* 68:230s-241s.

3. Finer, J.T., Simmons, R.M. and J.A. Spudich. 1994. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* 368:113-119 .

4. Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and T. Yanagida. 1995. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374:555-559

5. Gilbert, S.P. and K.A. Johnson. 1994. Pre-steady-state kinetics of the

microtubule-Kinesin ATPase. *Biochemistry* 33:1951-1960.

6.Hackney, D.D. 1994. Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:6865-6869.

7.Hackney, D.D. 1995. Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains. *Nature* 377: 448-450

8.Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D.D., and T. Yanagida. 1990. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in Vitro movement assay. *J. Mol.Biol.* 216:49-68.

9.Higuchi, H., Muto, E., Inoue, Y. and T. Yanagida. 1995. Force transient of single kinesin molecules initiated by photolysis of caged ATP. *Jpn. J. Physiol.* 45:s89-90.

10.Hirose, K., Lockhart, A., Cross, R.A. and L.A. Amos. 1996. Three-dimensional cryoelectron microscopy of dimeric kinesin and ncd motor domains on microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* In press.

11.Howard, J., Hudspeth, A.J. and R.D. Vale. 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342: 154-158.

12.Huang, T-G., Suhan, J., and D.D. Hackney. 1994. Drosophila kinesin motor domain extending to amino acid position 392 is dimeric when expressed in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 269: 16502-16507.

13.Ishijima, A., Kojima, H., Higuchi, H, Harada, Y., Funatsu, T. and T. Yanagida. 1996. Multiple-and single -molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle; unitary steps and forces. *Biophys. J.* 70: 383-400.

14.Ishijima, A., Harada, Y., Kojima, H., Funatsu, T., Higuchi, H, and T. Yanagida. 1994. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 199:1057-1063.

15.Kull, F.J., Sablin, E.P., Lau, R., Fretterick, R.J. and R.D. Vale. 1996. Crystal

structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380: 550-555

16.Kuznetsov, S.A., Vaisberg, E.A., Shanina, N.A., Magretova, N.N., Chernyak, V.Y., and V.I. Gelfand. 1988. The quaternary structure of bovine brain kinesin. *EMBO*. 7: 353-356.

17.Lockhart, A., Cross, R.A., and D.F.A. McKillop. 1995. ADP release is the rate-limiting step of the MT activated ATPase of non-claret disjunctional and kinesin. *FEBS Letters* 368:531-535.

18.Ma, Y.Z., and E.W. Taylor. 1995. Mechanism of microtubule kinesin ATPase. *Biochemistry* 34:13242-13251.

19.Meyhoefer, E. and J. Howard. 1995. The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:574-578.

20.Ray, S., Meyhoefer, E., Milligan, R.,A. and J. Howard. 1993. Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. *J Cell Biol.* 121:1083-1093.

21. Song, Y. and E. Mandelkow. 1993. Recombinant kinesin motor domain binds to β -tubulin and decorateds microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1671-1675.

22.Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J. and S.M. Block. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365: 721-727.

23.Svoboda, K., and S.M. Block. 1994a. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* 77:773-784.

24.Svoboda, K. and S.M. Block. 1994b. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:247-285.

25.Vale, R.D., Reese, T.S., and M.P. Sheets. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.

26. Witman, G. B., Plummer, J. and G. Sander. 1978. *J. Cell Biol.* 76:729-747.
27. Vale, R.D., Funatsu, T., Pierce, D.W., Romberg, L., Harada, Y., and T. Yanagida. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. 1996 *Nature* 380:451-453.
28. Wakabayashi, K., Tokunaga, M., Kohno, I., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., Takezawa, Y., Wakabayashi, T., and Y. Amemiya. 1992 Small-angle synchrotron X-ray scattering reveals distinct shape changes of the myosin head during hydrolysis of ATP. *Science* 258:433-447.
29. Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E.M., Smith, J.E., Faust, L., Milligan, R.A. and H.L. Sweeney. 1995. A 35-Å movement of smooth muscle myosin on ADP release. *Nature*. 378: 748-751.

参考論文

Kojima, H., Ishijima, A., and T. Yanagida. 1994 Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by *in vitro* nanomanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12962-12966.

Ishijima, A., Kojima, H., Higuchi, H, Harada, Y., Funatsu, T. and T. Yanagida. 1996. Multiple-and single -molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle; unitary steps and forces. *Biophys. J.* 70: 383-400.

Ishijima, A., Harada, Y., Kojima, H., Funatsu, T., Higuchi, H, and T. Yanagida. 1994. Single-molecule analysis of the actomyosin motor using nano-manipulation. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 199:1057-1063.

謝辞

私に本研究を行うための素晴らしい環境を与えて下さるとともに、研究を指導して下さいました柳田敏雄教授に深く感謝致します。また、本研究の副査をしていただいた葛西道生教授、佐藤俊輔教授に感謝致します。本研究を進めるにあたって、厳しいながらも常に有益な議論をして下さった科技新の樋口秀男、武藤悦子両博士には非常にお世話になり感謝しています。最後になりましたが、科技振のメンバーの皆様、ならびに阪大生物物理研の皆様には非常にお世話になりました。深く感謝致します。