

Title	Single molecule measurement of the myosin V energy transduction process
Author(s)	藤田, 恵介
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60034">https://hdl.handle.net/11094/60034</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

【81】

氏名	藤田 恵介
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 26262 号
学位授与年月日	平成25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	Single molecule measurement of the myosin V energy transduction process (ミオシンVエネルギー変換素過程の1分子計測)
論文審査委員	(主査) 特任教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 河村 悟 教授 平岡 泰 特任准教授 岡本 浩二

#### 論文内容の要旨

ミオシンVは細胞内で二量体として存在し、細胞骨格であるアクチンフィラメントに沿って1方向に小胞輸送を行う。細胞内の高いタンパク質濃度条件下、また、アクチンの不均一な網目構造の中をミオシンVが小胞輸送を行う時、小胞には動的に変化する負荷が加わると予想される。ミオシンVは細胞内で、この動的な負荷に対処しながら、ATP1分子の加水分解エネルギー（1ATPあたり20-25 k<sub>B</sub>T）を機械

的エネルギーに変換し、最大で2-3 pNの負荷に逆らって36 nmの変位を生み出す。ミオシンVの力発生過程は、二つのエネルギー変換過程に分けることができる。一つは、レバーアームドメインの構造変化 (lever-arm swing) であり、もう一つは、Brownian search-and-catchと呼ばれるミオシンVモータードメインの拡散過程である。特に後者は、熱ゆらぎを利用したエネルギー変換過程であり、ノイズを許容した確率過程として興味深い。しかし、これらのエネルギー変換過程は無負荷においてのみ観察されていたため、ミオシンV二量体全体の仕事に対して、それぞれのエネルギー変換過程がどの程度エネルギー的に寄与しているか、明らかとされていない。申請者は、この疑問に答えるため、光ピンセット技術を用いた1分子力学計測系にDNAリンカーを組み込んだ実験系を構築した。新しく構築した実験系において、光ピンセットによって加えられる負荷は運動中のミオシンVの片方のモータードメインにのみ加わり、負荷が加わった条件下で二つのエネルギー変換過程を観察することに成功した。さらに申請者は、この実験系において、lever-armのpre構造からpost構造への構造変化 (lever-arm swing) だけでなく、post構造からpre構造への構造変化 (reversal) を観察することに成功し、それら二つの負荷依存的な反応速度定数を求めることによって、pre構造とpost構造の自由エネルギー差をおよそ3  $k_B T$ と見積ることに成功した。この結果はlever-arm swingによって生み出される仕事量は最大でもわずか3  $k_B T$ であることを意味している。さらに、この結果は、ミオシンVが負荷に応じてlever-arm swingとBrownian search-and-catchのエネルギー的寄与の比率を変えているということを示唆する。例えば、0.5 pNの負荷がミオシンV尾部に加わるとき、ミオシンVが36 nmの変位を生み出すためには、4.4  $k_B T$ の力学エネルギーが必要となる。一方で、lever-arm swingによって生み出すことのできる力学エネルギーは2.4  $k_B T$ となり、これらを見積りからBrownian search-and-catchのエネルギー的寄与は2.0  $k_B T$ であることを意味する。ミオシンV全体の仕事量は負荷に比例して大きくなり、2 pNの負荷のときで18  $k_B T$ に及ぶが、lever-arm swingの仕事量は3  $k_B T$ を超えることはできないことから、このときの差分15  $k_B T$ はBrownian search-and-catchによって補われることになる。つまり、ミオシンVは力発生を、低負荷においては構造変化に依っており、高負荷においては拡散過程に依っている。このことは、ミオシンVが、低負荷では決定論的に、高負荷では確率論的に動くというように、小胞に加わる負荷が動的に変化する細胞環境の中で、柔軟に駆動力を変化させながら小胞輸送を効率的に行っていることを示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

生体分子モーターであるミオシンVが力を発生する過程は、レバーアームドメインの構造変化 (lever-arm swing) とBrownian search-and-catchと呼ばれる熱ゆらぎを利用した過程の2つに分けることができる。申請者は、これら2つの過程の力学的性質を明らかにするため、光ピンセット技術を用いた1分子力学計測系と60 nmの二重らせんDNAを利用し、歩行運動中のミオシンVモータードメインに直接負荷を加えることができる実験系を構築した。申請者は、得られた実験結果から、レバーアームのpre構造とpost構造の自由エネルギー差は3.3  $k_B T$ であることを見積り、さらに、ミオシンVは負荷に応じて、lever-arm swingとBrownian search-and-catchによって生み出す仕事の比率を変えるという結論を得た。このことは、ミオシンVが、小胞に加わる負荷が動的に変化する細胞環境の中で、柔軟に駆動力を変化させながら小胞輸送を効率的に行っているという、これまで明らかにできなかった生体分子モーターの重要なメカニズムを示唆しており、学位に値するものと認める。