The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Simultaneous measurement of nucleotide occupancy and mechanical displacement in myosin-V, a processive molecular motor.
Author(s)	小森, 智貴
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/677
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【96】

氏　　名	小　森　智　貴（こ もり とも たか）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３０９１　号
学位授与年月日	平成21年３月24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	Simultaneous measurement of nucleotide occupancy and mechanical displacement in myosin-V, a processive molecular motor. （連続運動分子モーター　ミオシン５の化学サイクルと力学サイクルの同時計測）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　柳田　敏雄 （副査） 教　授　小倉　明彦　　教　授　八木　　健

論　文　内　容　の　要　旨

ミオシンは筋収縮や小胞輸送において中心的な働きを担う ATP 駆動型分子モーターである。本研究では小胞輸送を主に担うミオシン 5 に着目して私は研究を行った。筋収縮を担うミオシン 2 がアクチンフィラメントに沿って連続変位を生み出さないのに対して、ミオシン 5 はアクチンフィラメント上で連続変位を生み出す分子モーターである。生化学、構造解析及び一分子計測が行われ様々な連続運動モデルが提唱されたが、未だにミオシン 5 が連続変位を生み出す機構は完全には解明されていない。これは連続運動ミオシンにおける ATP 加水分解サイクルと変位発生過程の対応関係が未だ解明されていないことに大きく起因する。そこで本研究では、ミオシン 5 による ATP 加水分解サイクルと変位発生過程の対応関係を一分子レベルで直接かつ同時に計測することで明らかにすることを試みた。

まず私はミオシン 5 の ATP 加水分解サイクルと変位発生過程の同時計測を可能とする計測系構築を行った。ミオシン 5 への ATP 結合及び加水分解産物である ADP 解離は、蛍光性 ATP アナログ(2'-*O*-Cy3-EDA-ATP)及び全反射型蛍光顕微鏡を用いて可視化することにした。一方で、変位発生はレーザートラップを用いて検出することにした。変位発生過程はレーザートラップにより捕捉されたビーズの位置変化として検出される。そして ATP 加水分解サイクルは、ミオシン存在位置での蛍光強度変化として検出される。これら 2 つの計測系を 1 つの顕微鏡光学系内に組み込むことにより、両者の同時計測を可能とした。さらに新規に構築した計測系を用いて、2 量体形成部位を欠損させた単頭ミオシン 5 の ATP 加水分解サイクルと変位発生過程の同時計測を行った。今回の計測では「ATP 結合とミオシン解離」及び「ADP 解離と変位発生」の 2 つの対応関係に着目して解析した。ATP が結合するとすぐにミオシン 5 はアクチンフィラメントから解離した。続いてミオシン 5 は再びアクチンフィラメントと相互作用して変位発生を行う。ADP は変位発生時には解離せず、平均 69 ミリ秒の時間遅れを持ってミオシン 5 から解離した。これらの結果は、ATP 結合はミオシン 5 内部での瞬時の構造変化を引き起こしてミオシン 5 をアクチンフィラメントから解離させる一方で、ADP 解離過程はミオシン 5 の変位発生には関与せずに、変位発生から時間遅れを伴った遅い過程で ADP が解離することを示唆している。連続運動しないミオシン 2 はこのような長い ADP 状態を持たないことが報告されており、連続運動を示すミオシンにのみに見られる特徴的な過程である。

生化学計測より、ADP 状態のミオシンはアクチンフィラメントに対して強い結合状態をとることが知られている。その為、今回観察された変位発生後の長い ADP 結合状態を持つことで、ミオシン 5 は安定してアクチンフィラメントに結合でき、結果として連続運動が可能であると予測される。本研究により ADP 解離は、変位発生そのものに直接寄与する過程ではないことが明らかとなった。ADP 解離はミオシンの運動特性を決定する制御因子として働く過程ではないだろうか。また、連続運 動を示すミオシンファミリーはほぼ同様の機構で動作すると考えられている為、今回得られた結果は連続運動を示すミオシン広く適用できると期待できる。

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

ミオシンはATPを加水分解することでアクチンフィラメント上を運動する分子モーターである。今回研究対象としたミオシン5は、アクチンフィラメント上を連続運動することで生体内では小胞輸送を担っている。小胞輸送においてミオシン5の連続運動能は必須の機能であるが、ミオシン5が連続運動できる機構は未だに完全には明らかにされていない。この要因の一つはミオシン5のATP加水分解サイクルと変位発生サイクルの対応関係が直接明らかにされていなかったことに起因する。本論文において申請者は、ミオシン5の連続運動機構の解明を目的として、ATP加水分解サイクルと変位発生サイクルの対応関係を１分子レベルで直接明らかにすることを試みた。

ミオシン5のATP加水分解サイクルと変位発生の同時計測系は、変位計測を行うレーザートラップ法と、蛍光ATPと全反射顕微鏡を用いたATP加水分解サイクル可視化法を組み合わせた計測系を開発することで構築された。実際に構築した同時計測系を用いることで、加水分解されたADPが変位発生後に平均69ミリ秒の時間遅れを伴いミオシン5から解離することが直接明らかにされた。一方で、連続運動しないミオシンにおいてはこのような変位

発生後のADP解離の遅れは観察されておらず、時間遅れを伴ったADP解離は連続運動ミオシンに特異的な過程であった。ADP結合状態のミオシン5は強くアクチンフィラメントと結合できる状態であることが過去に他のグループにより報告されている。その為、変位発生後の長いADP結合状態を持つことでミオシン5は安定してアクチンフィラメントと結合可能となると考えられる。その結果としてミオシン5がアクチンフィラメントから解離する確率は低く抑えられ、1 μm以上に渡って連続運動が可能となる。本論文により得られた結果は、ミオシンにおいてADP解離過程は変位発生に直接関与する過程ではないが変位発生に対しての解離時間を変えることで、ミオシンの運動特性を決定付ける調節因子である可能性を強く示唆するものであった。

以上のように、本研究成果により直接明らかとなった変位発生後の時間遅れを伴ったADP解離はミオシン5が安定してアクチンフィラメントと結合できる仕組みを合理的に説明し、ミオシン5の連続運動機構の一端の解明に大きく寄与する過程であった。従って本論文は学位の授与に値するものと認める。