

# 1 分子レーザートラップ顕微鏡によるアクチンとミオシンの物理化学的ダイナミクスの解析

茅 元司

1990年代から光ピンセットを使ったタンパク質1分子計測技術が目覚ましく発展し、これまでの長い筋収縮研究ではみえてこなかったミオシン1分子の力学特性がみえてきた。しかし、*in vitro* 環境においてミオシン分子を単離した実験系は、筋肉内での収縮状態からかけ離れており、1分子計測系の限界もわかってきた。そこで本稿では、これまでの1分子計測系の問題を克服した新しい実験系を紹介する。また光ピンセットの原理やミオシン分子の生化学的特性など、基本的な知見もあわせて解説する。この実験系により、ミオシンが集団で活動する際に、各分子どうしが邪魔することなく力を発生する仕組みが、ミオシン1分子に備わっていることが判明したので解説していく。

## 1. はじめに

骨格筋は身体を動かすために、収縮して力を発生する。眼球運動や指先を動かすような細やかな動作から、全速力で走り、跳ぶような爆発的な力発生を伴う運動に至るまで、実にさまざまな動作を筋肉が担っている。このような高性能アクチュエータを人工的に作ることは、最先端の技術を用いても現在は不可能である。高度な機能を有する筋収縮の源は、ミオシンとアクチンと呼ばれる2種類のタンパク質である。したがって、「筋肉内に存在するこれら無数のタンパク質がどのように機能して、高度な収縮機能を実現しているのか？」を理解することは、研究者にとって、魅力的で挑戦に値する課題である。筋肉研究の歴史は長く、分子レベルでの筋収縮機構の解明を目的とした研究が始まって半世紀以上が経つ。初期の研究では、筋線維を中心とした実験が主流であったが、1990年代半ばになると1分子計測技術が台頭し始め、遺伝子工学技術との組み合わせ

せにより、タンパク質1分子を直接操作して観察できるようになってきた。したがって、この1分子計測技術により、ミオシンとアクチンの相互作用時における力学的、化学的知見が分子レベルで大幅に解明されてきた。しかしながら、タンパク質1分子を単離した計測系での限界点もみえてきた。本稿では、こうした過去の筋収縮機構の研究の流れを簡単に紹介しながら、筋肉内におけるフィラメント構造を再構成した*in vitro* 環境下における1分子計測系を紹介し、その実験系で得られた新しい知見について解説していく。

## 2. 骨格筋ミオシン1分子計測に至るまでの歴史的背景

筋肉が収縮する分子的機構がみえてきたのは、1954年の二人のHuxleyによるそれぞれの研究である<sup>1,2)</sup>。二人が見いだしたことは、筋肉の周期的な構造であるサルコメアの中央にミオシンフィラメントが常に位置して、アクチンフィラメントと相互作用し、それによりアクチンフィラメントがミオシンフィラメント上を滑るように移動する収縮機構である。この分子機構はフィラメント滑り説と呼ばれ、筋収縮分子機構のようすが垣間みえてきた。さらに1960年代から70年代に入ると、X線回折による生体分子の構造解析技術、またサーボモータや光電子素子の発展に伴い高時空間分解能での筋線維長の制御や張力計測が可能になり、ミオシンの詳細な動態が明らかになってきた。同時に生化学分野でも発展が進み、ミオシンとアクチンを混

東京大学大学院理学系研究科物理学専攻 (〒113-0033 文京区本郷7-3-1 理学部1号館W416)

**Analysis of mechanochemical dynamics of actomyosin interactions revealed by single molecule optical trap microscope**

**Motoshi Kaya** (Graduate School of Science, Department of Physics, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

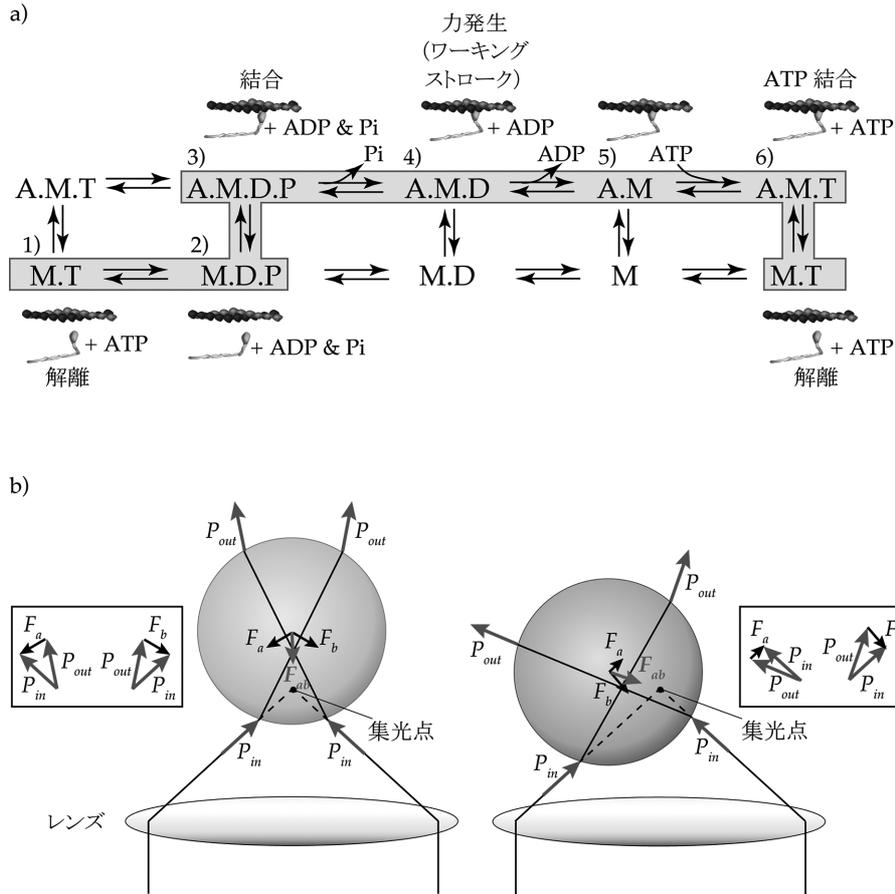


図1 骨格筋ミオシンの加水分解サイクル経路および光ピンセットの原理  
 a) ミオシンのATP加水分解サイクルとアクチンとの相互作用の対応。灰色のゾーン1)~6)が主な加水分解サイクルの経路：1) ATP結合後、アクチンから解離；2) リン酸とADPに加水分解；3) アクチンと弱結合；4) リン酸放出後、構造変化（ワーキングストローク）による力発生；5) ADP放出後、ヌクレオチドなし状態；6) ATP結合。記号A, M, T, D, Pは、アクチン、ミオシン、ATP、ADPそしてリン酸(Pi)の略。  
 b) 光ピンセットの原理説明図。粒子が光の波長より大きい場合(Mie粒子)、幾何光学によって説明できる。粒子の屈折率が、周辺媒質より高い場合を考える。入射光線は、粒子の表面で屈折するため、屈折の前後で光線の運動量が変化する。この運動量変化による高圧が、入射点と出射点に作用し、この合力が粒子の中心から集光点に向かって作用する捕捉力 $F_{ob}$ となり、粒子をレーザーの集光点に引きつける。

合した溶液系の計測により、ATP加水分解とアクトミオシン相互作用サイクルの関わりがみえてきた<sup>3)</sup>。図1aに現時点で考えられているATP加水分解サイクルをまとめた(解説は図1aにて)。しかし、こうした筋線維や溶液系実験で注意をしなければならないのは、分子の平均的な振る舞いをみている点である。分子レベルでの機構を知るためには、分子を直接みて、その特性を見いだす必要がある。さらに平均的な振る舞いではみえてこない、分子の特性もみえてくる。こうした考えのもと生まれてきたのが、分子を直接みる計測技術、すなわちタンパク質1分子計測技術である。

3. 1分子計測技術によりみえてきた分子特性

1990年代半ばになると、集光したレーザーが媒質よりも屈折率の高い微粒子を通り抜ける際に、光の入射方向と

出射方向が変化し光の運動量が変化するために、光の集光方向に向かって牽引力が作用するのを利用して粒子を捕捉する光ピンセット技術が、タンパク質1分子計測に応用され始めた(図1b)。この顕微鏡技術により、キネシンや骨格筋ミオシンといったモータータンパク質1分子が微小管やアクチン線維と相互作用する際に発する変位量と力が計測され始めた。こうした研究を皮切りに、その他のミオシンスーパーファミリー<sup>4)</sup>、ダイニン<sup>5)</sup>などの1分子計測が行われ、各分子の力学的な特性や生化学反応との対応が1分子レベルで明らかとなってきた。骨格筋ミオシンの1分子力学特性に関して着目すると、ミオシン1分子が発生する変位や力は5~15 nm, 2~10 pN程度ときわめて幅広く、その理由は研究グループ、若干異なるアッセイ系や測定技術に依存すると考えられる。こうした骨格筋ミオシン1分子の計測では、図2aに示すような1分子アッセイ系で計測が行われる。まず単離したミオシン分子をチャンバー内

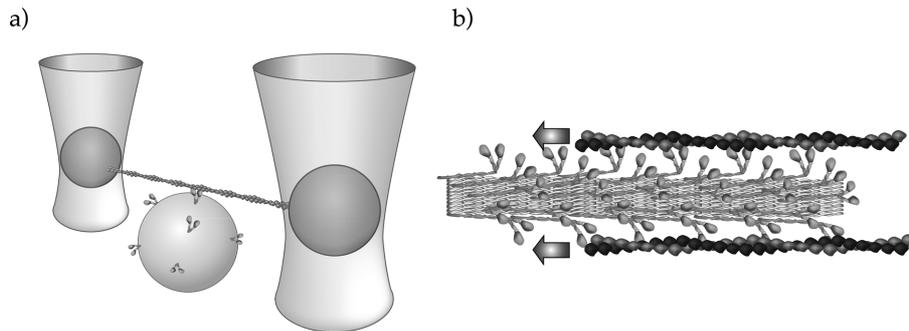


図2 光ピンセットを使った典型的なミオシン1分子計測および筋肉サルコメア構造内におけるミオシンとアクチンの相互作用

a) 光ピンセットを使ったミオシン1分子計測. 中央のビーズ上に結合したミオシンの向きはランダムであるため, アクチンフィラメントの極性に合うように頭部をねじって相互作用する.

b) 筋肉内のサルコメア内部において, ミオシンはアクチンのマイナス端 (矢印方向) に向かって力を出せる方向に配向しているため, 頭部を大きくねじってアクチンと相互作用することはない.

に流し込み, スライドガラス面に吸着させたビーズ上への結合を施す. 次にアクチン線維とビーズを流し入れ, アクチンの両端にビーズをつけ, 光ピンセットでつかんでミオシンがあるビーズ上に持っていき, ATP存在下でミオシンとの相互作用を計測する (ビーズには化学処理を施してATP加水分解不能にしたミオシン, あるいはストレプトアビジンをコーティングしたものをを用いる. アビジンビーズを使用する場合には, アクチンをビオチン化したものをを用いてビーズと特異的に結合させる). しかしながら, このアッセイでは図2aに示すようにミオシン分子の向きはランダムであり, 顕微鏡上では各ミオシン分子をみることができない. したがって, アクチンの下にミオシン分子が存在している場合, ランダムに向いたミオシン分子は頭部をねじることで, アクチン長軸上のマイナス端方向に向かって力を出す. これは, 図2bに示すようなサルコメア内のミオシンフィラメント上に位置するミオシン分子とは状況が大きく異なる. サルコメア内では, ミオシンはらせん状に配置しながらも, アクチン線維の長軸方向, マイナス端に力を出せる向きに配向しているため, 頭部を大きくねじって相互作用することは少ない. さらに骨格筋ミオシンの変位・力計測を難しくさせているもう一つの要因が, アクチンに対するミオシンの結合アフィニティの低さである. 光ピンセットでは, ガラス表面と平行な水平面 (XY) 方向における拘束力は強く, ビーズの揺らぎを数nm程度まで抑えることは可能であるが, 鉛直 (Z) 方向の拘束力には乏しく100~200nm程度揺らいでいる. したがって, 激しく揺らいでいるビーズの間にぶら下がったアクチンフィラメントも激しく揺らいでいる. サルコメア構造内では, ミオシンフィラメントはタイチン (コネクチン), アクチン線維はネブリンなどによって繋留されており, ミオシン-アクチンフィラメント間の間隔は10nm程度の範囲内に制約されていると予想される (図2b). したがって, アクチンとの結合アフィニティが低い骨格筋ミオシンではあるが, サルコメア内ではかなりの高頻度でアクチンと結

合し, 変位・力発生をしていると予想される. しかし図2aに示すような1分子アッセイでは, アクチンの激しい揺らぎによって, ミオシンが結合したとしても, ミオシンが十分な力を発生させる前にアクチンから解離してしまい, サルコメア内でのミオシンの動態を反映させた力学的計測が実現しているのか? という疑問が残る. 近年ではサブミリ秒での超高速フィードバックによりミオシンの相互作用によるアクチンの移動に伴って, 光ピンセットの位置を瞬時に移動して, アクチンに対するミオシンの結合アフィニティの減少を抑えながら, 一定の負荷をかけて計測する手法も開発されてきた. しかしながら, 筋肉内における自然な相互作用環境を十分に実現できている計測系か? という疑問はいまだに残る.

#### 4. 合成ミニミオシンフィラメントを用いた1分子計測

タンパク質は, 溶液のイオン強度やpHなどによって, 自己組織的にタンパク質複合体を形成する. 骨格筋ミオシンでは, イオン強度を200mM以下に下げると, ミオシンのLMM (light meromyosin) 領域どうしが重合してフィラメントを形成する (図3a). その特徴は, 筋肉内の天然ミオシンフィラメント同様に, 両端側にミオシン頭部が局在し, 中央にはベアゾーンと呼ばれる頭部が局在しない部分がある. 大きな特徴の違いは, フィラメント長である. 天然ミオシンフィラメントは1.6 $\mu$ m程度だが, 合成ミオシンフィラメントはイオン強度の下げ方により大きく異なる. 瞬時に600mMから200mM以下に下げると, 典型的に短いフィラメントを形成し, その長さは0.4~2 $\mu$ m程度までに分布する<sup>6)</sup>. 一方, 数時間をかけてゆっくり希釈していくと, 10 $\mu$ m程度にまでなる巨大なフィラメントが形成される<sup>7)</sup>. 特にrapid mixingによりイオン強度を瞬時に下げた場合, その長さは1 $\mu$ m以下に抑えることができ (図3b), 筋線維での最大収縮速度と同程度の速度が出る<sup>8)</sup>. そこで我々は, rapid mixingにより短いフィラメント

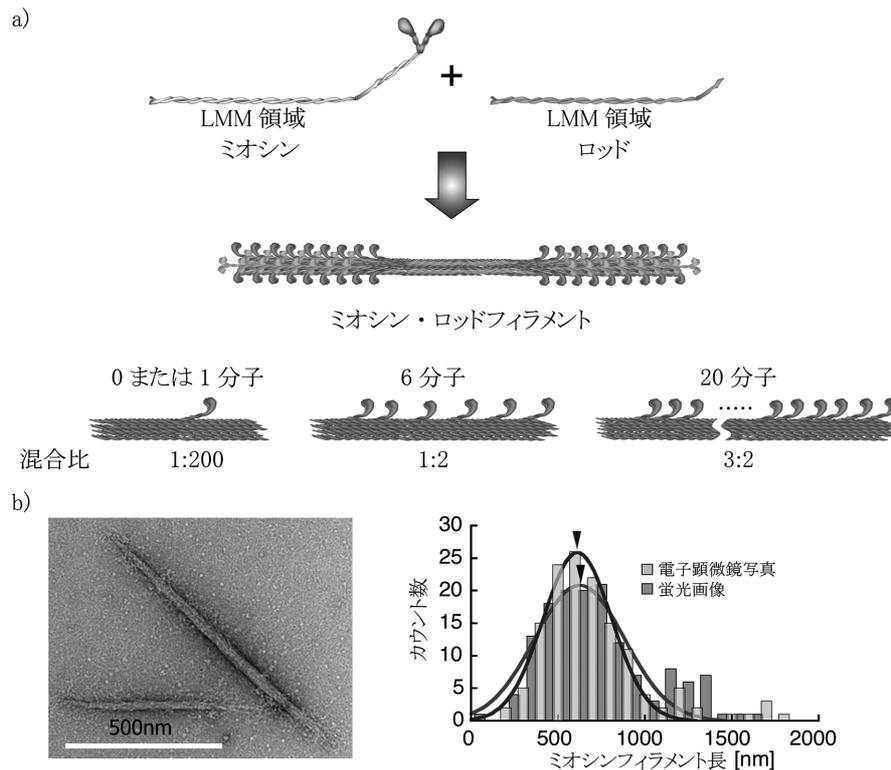


図3 ミオシン・ロッドフィラメント合成によるミオシン分子数の制御

a) ミオシン・ロッドフィラメントの合成。ミオシンとロッドのモル比を変えて合成することにより、アクチンと相互作用できる分子数を変えることができる。またロッドを蛍光色素で認識することにより、ミオシン・ロッドフィラメントを可視化できる。ミオシンとロッドのモル比が1:200では0または1分子、1:2では~6分子、3:2では20分子程度がアクチンと相互作用できるミニフィラメントが合成できる。図中では相互作用できる分子だけを強調して描いているが、実際にはアクチンにアクセスできない分子が存在する。b) ミオシン・ロッドフィラメントの電子顕微鏡写真および電子顕微鏡と蛍光顕微鏡画像から見積もった長さ分布。平均700 nm弱(矢じり部分)と天然ミオシンフィラメントの半分弱の長さである。

を合成し、その上をアクチンフィラメントが滑る状態での1分子計測系を開発した。

この合成フィラメントの利点を以下にまとめる。

- 1) 天然ミオシンと頭部をパパイんで除去したミオシンロッドを異なるモル比で混ぜ合わせるにより、アクチンと相互作用できる分子数をコントロールすることができる(図3a)。たとえば、モル比を1:2にすると、最大で4~6分子のミオシンがアクチンと同時に相互作用できるフィラメントが形成される<sup>9)</sup>。またモル比1:200程度まで天然ミオシンの量を下げると、アクチンと相互作用できるミオシンがあった場合、その分子数は確率的に1分子と考えられる<sup>9)</sup>。
- 2) ミオシンがフィラメントの長軸方向に沿って配向しているため、合成フィラメントの長軸に沿ってアクチンフィラメントを配置すれば、筋肉内でのサルコメア構造と同様に、配向のそろったアクトミオシンの相互作用を実現する再構成系を*in vitro*環境下で作ることができる。
- 3) ATP存在下での力・変位計測においては、ミオシン多分子がアクチンと結合できるモル比でフィラメントを

合成した場合、ミオシン複数分子がアクチンと結合することで、前述した熱揺らぎによるアクチンの揺らぎが抑えられるため、ミオシンの結合頻度が上がり、筋肉内でのアクトミオシンの相互作用を反映するような筋収縮の*in vitro*再構成系が可能となる(図4a)。

光ピンセットを用いた1分子計測用のチャンパーは、サイズの異なるカバーガラス2枚の間に10~30 μm程度のスペーサーをはさみ、2枚のカバーガラスの間が空きすぎないようにする(図4a)。もしスペースを空けすぎると、チャンパー内上方のビーズが光ピンセット中心に吸い寄せられ、トラップ力の変化やノイズの原因となる。タンパク質に関しては、チャンパーへミオシンフィラメント溶液を最初に入れると、ミオシン頭部の多くがガラス面に吸着し、変性してしまう可能性がある。そこでまずはじめに表面をブロックするタンパク質として、カゼイン(0.1~0.2 mg/ml)を流す。その後、実験目的に併せてミオシンと蛍光標識したロッドの混合比を変えた蛍光ミオシンフィラメントを流し、最後にアクチン、ビーズ、蛍光退色防止用の脱酸素系酵素や還元剤(グルコース、グルコースオキシターゼ、カタラーゼ、2-メルカプトエタノール)、目的濃

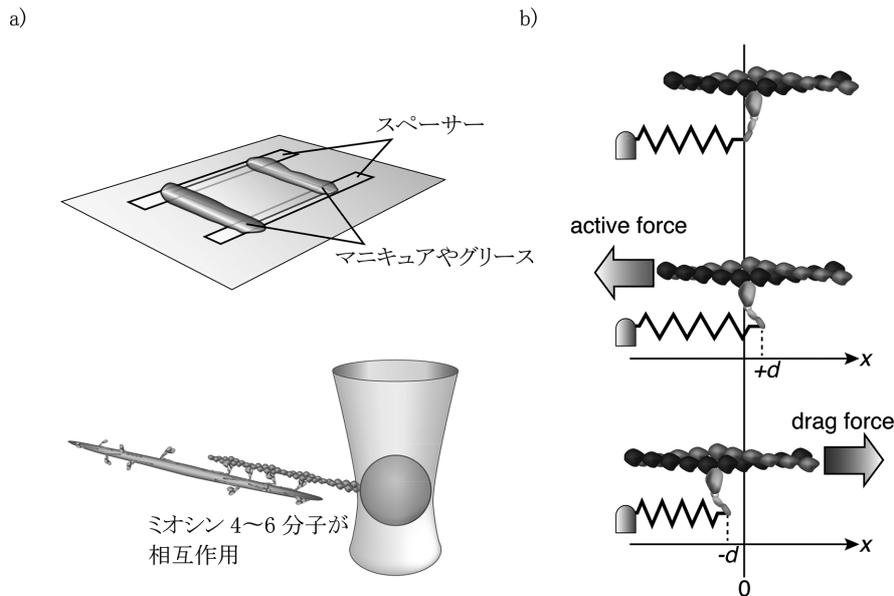


図4 ミオシン複数分子がアクチンと相互作用するときの力計測方法および active force と drag force の定義

a) 1分子計測用のチャンパーと光ピンセットを使った多分子ミオシンフィラメントの力計測. b) active force と drag force の概念図. ここでは便宜のため, 結合時にバネが自然長にあるとする ( $x=0$ ; 上段). ミオシンがワーキングストロークによりバネを伸ばし ( $x=+d$ ; 中段) 収縮方向に力を出している (赤矢印方向). このときの力を active force という. それに対して, ミオシンのバネが自然長より押し縮められた場合 ( $x=-d$ ; 下段), 収縮方向と反対の反発力を発する (青矢印方向). このときの力を drag force という.

度の ATP 入り溶液を流し, チャンパーの出入り口をマニキュアやグリースで封をして, チャンパー内溶液の蒸発を防ぐ.

顕微鏡上の操作においては, ビーズを光ピンセットで捕捉し, ステージ用マニピュレータの操作により浮遊するアクチンにビーズを接触させて, アクチン片端にビーズを結合させる. 次節で解説するミオシン頭部の弾性計測では, さらにもう一方のビームスポットにビーズを捕捉し, アクチンがこちらのビーズにも結合できるように, マニピュレータで操作する. 次にガラス面上に分布する蛍光ミニミオシンフィラメントのうち, フィラメント長軸方向がアクチンフィラメント長軸方向にそろったものを選び, アクチン-ビーズを近づけて, ミオシンとアクチンの相互作用を促す (図 4a). 計測の詳細については, 以降の各節を参照していただきたい.

## 5. ミオシン 1 分子の弾性計測

タンパク質が力を出すためには, その構造体内の弾性部位を歪ませる必要がある. 図 4b では, 骨格筋ミオシンが筋収縮中に力を出すことをイメージして, 弾性部位をバネに置き換えて描いてある (ただし, 実際にこの部分に弾性バネがあるという意味ではないので注意していただきたい). たとえば, 図 4b のようにミオシンが構造変化により力を左に向かって出す場合, この力の向きは収縮方向と一致するので active force と呼ぶ. 一方, このミオシンが力

発生後しばらくアクチンに結合し続け, ほかのミオシンがアクチンに相互作用して左に滑らせたとする (図 4b). このとき, 結合しているミオシンはバネを縮めて自然長より縮められる. この結果, このミオシンは収縮方向と反対の反発力を生む. この力を drag force と呼ぶ. この例からわかるように, ミオシンは収縮力の源となる active force と抵抗力となる drag force の両方を出しうる. また, これらの力の大きさは, ミオシンを伸ばしたとき, 縮めたときに発生する力を示す弾性特性に依存する. これまでの筋線維実験に基づくミオシンの弾性計測において, ミオシンの弾性特性は線形であると考えられてきた. しかしながら, 筋線維実験では筋線維を押し縮めたときの反発力 (すなわち drag force) を計測することはできないため, ミオシンを引っばるときの弾性特性しか評価されてこなかった. そこで筆者らは, 骨格筋ミオシン 1 分子の弾性特性を正負両方向の歪み領域に分けて計測し, その弾性特性から筋収縮機能への影響について考察した<sup>9)</sup>.

ミオシン 1 分子の弾性特性を得るために, ミオシン 1 分子に作用する力およびミオシン頭部の変位を計測する必要がある. 図 5a に示すように, ミオシン頭部の変位は, アクチン上につけた量子ドットの蛍光重心位置から見積った. 元来, ミオシン頭部に直接標識をすることが好ましいが, アクチンとの結合に際して, この標識による立体障害や機能阻害が起こる可能性を避けるため, アクチン上に標識を行った. アクチンはミオシンに比べはるかに硬いため, ミオシン頭部とアクチン上の量子ドット間の変位は,

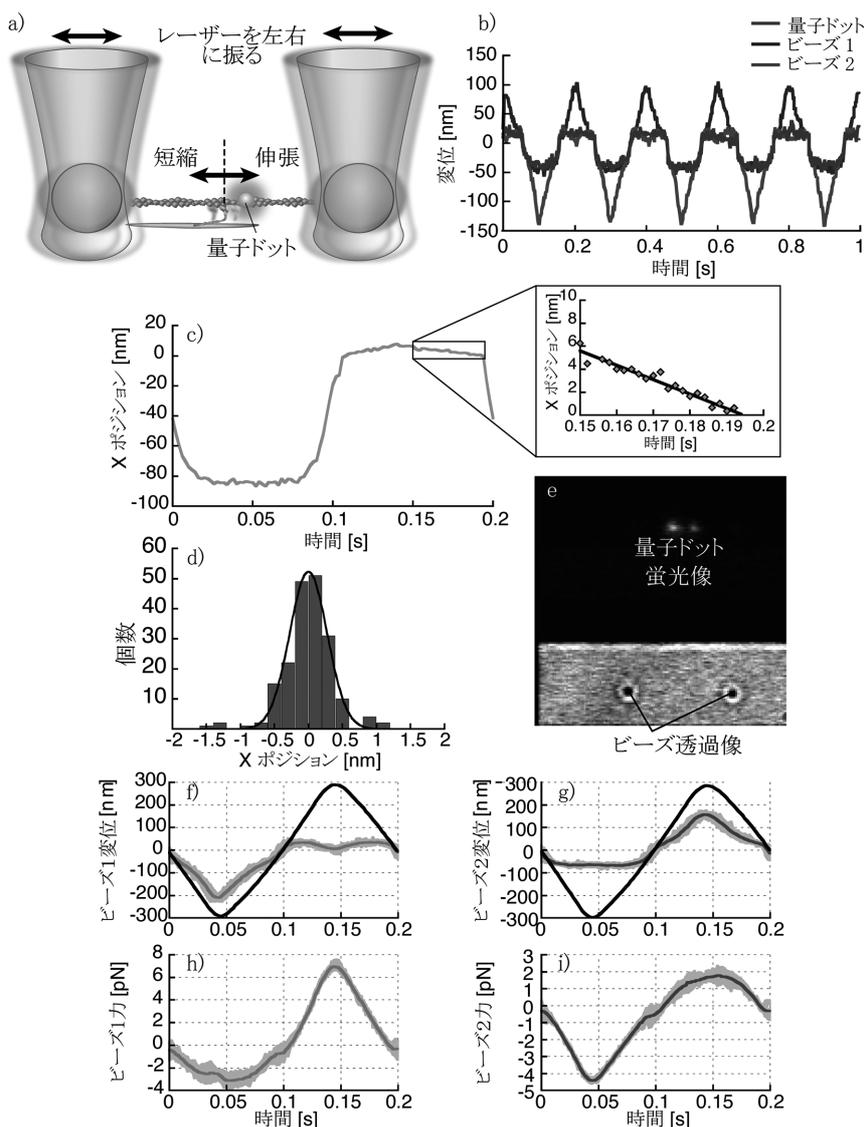


図5 ミオシン1分子の弾性計測

a) ミオシン1分子弾性計測の実験。量子ドットをアクチンにつけ、その変位からミオシン頭部の変位を計測し、ビーズの変位からミオシン頭部にかかる力を計測する。b) 量子ドットと各ビーズの変位波形。5 Hzの周期で左右にレーザーを振っている。各周期ごとの波形を切り出し、加算平均してノイズ成分を除去する。c) 量子ドットの加算平均波形。四角の枠内部分のデータに直線近似し、その直線に対するばらつきをヒストグラムにした(d)。ガウス関数フィッティングから計算した標準偏差は0.3 nmであり、測定精度が0.3 nmであることを意味する。e) アクチン上の量子ドットの蛍光画像と光ピンセットでトラップされたビーズの透過像。f, g) ミオシンと相互作用前のビーズの軌跡(黒線)とミオシン相互作用時のビーズの軌跡(青、赤線)。h, i) f, gにおいて、相互作用前後のビーズの軌跡の差分にトラップステイフネスをかけて力に換算したカーブ。

ミオシン頭部自身の変位に比べてわずかであることが予想でき、アクチン上の量子ドットからミオシン頭部の変位を見積ることは妥当であると判断した。ミオシンを伸張・短縮させるために、光ピンセットの位置を左右に5 Hzの周期で50回繰り返して動かした。このとき、正負の歪み領域に分けて弾性特性を計測するために、ミニミオシンフィラメント蛍光像の長軸方向とアクチンフィラメントの長軸方向を合わせて、レーザーを左右に振り計測した(図5a)。計測した波形を1周期ごとに切り出して加算平均を行うことで、ノイズ成分を削減させた。その結果、加算平均後の

量子ドット変位波形のノイズレベルは、量子ドットが凝集した明るいものを用いた場合は0.3 nmとなり(図5d)、理論計算上で与えられる値( $\sigma$ ) 0.5 nmと一致した( $\sigma = (s^2/N_p)^{0.5}/N^{0.5}$ ,  $s$ は蛍光輝点の点像分布関数の標準偏差=210 nm,  $N_p$ はフォトン数=4400,  $N$ は加算平均回数=50)。したがって凝集した明るい量子ドットを用いて加算平均することにより、ミオシン頭部の変位をサブナノメートルの精度で検出することができた(図5e)。ミオシンに作用する力は、光ピンセットのレーザー中心位置からアクチンにつけたビーズ位置までの変位にトラップステイフネ

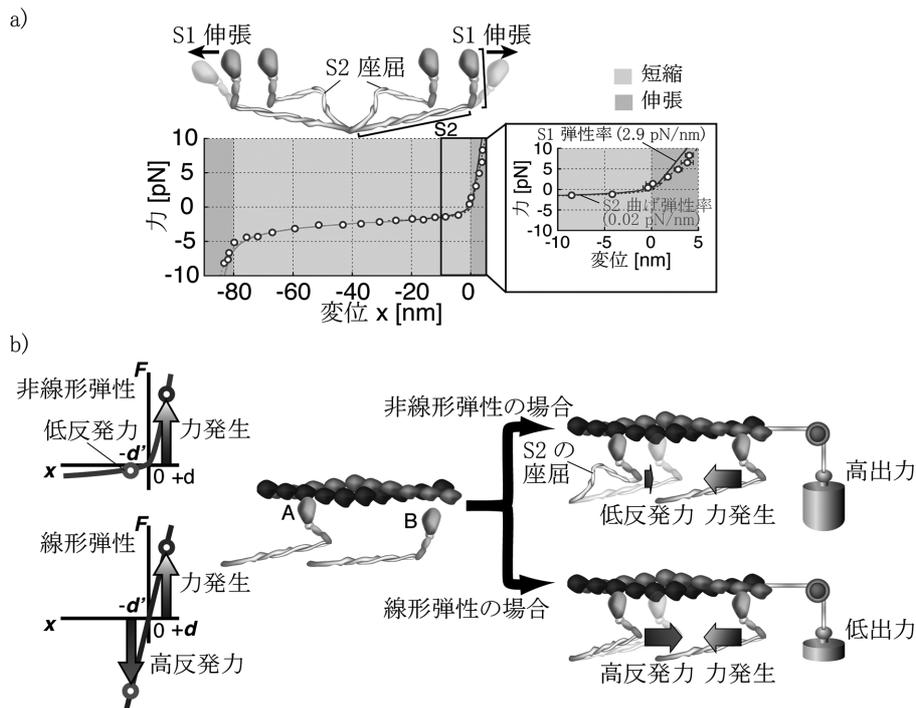


図6 ミオシン1分子の非線形弾性特性と力発生におけるそのメリット

a) ミオシン1分子の非弾性特性. ミオシンが伸張する領域 (ピンク) においては, カーブの傾き (弾性率) が急峻であり, 弾性率が高いことを示している. 一方, ミオシンが短縮する領域 (青) では, 弾性率がきわめて低い. これらの傾きから見積もった弾性率と理論計算による弾性率を比較すると, 伸張領域の弾性率はミオシン頭部 S1 部位の弾性率を示しており, 短縮領域の弾性率は S2 部分の曲げ弾性率を示していると考えられる. グラフの上部のイラストは, ミオシン頭部の状態をひずみ領域 ( $x$  軸) に対応させて示している. b) 非線形弾性と線形弾性の場合における, 力発生の比較. 分子 A が力を発生したとき (中央図), その大きさは, どちらの場合でも等しい (左図の青矢印,  $x = +d$ ). しかし, 分子 B が力を発生しミオシン A が押し縮められた場合 (右図), 反発力は線形弾性の場合の方が大きくなる (左図の赤矢印,  $x = -d'$ ). したがって, 非線形弾性の場合の方が, 力の損失なく, より大きな力を出力することができる.

ス (例  $k_{\text{trap}} = 0.015 \text{ pN/nm}$ ) をかけた値として求める. 左右に振るレーザーの中心位置は, ミオシンと相互作用させる前に光ピンセットを左右に振ったときのビーズの変位として求めた (図 5f, g の黒線). ミオシン相互作用時では, このビーム経路に対するビーズ変位のずれ (図 5f, g の赤, 青線) にトラップステイフネスをかけ合わせて力を計算し, 両方のビーズから得られた力カーブを足し合わせてミオシン頭部に作用する力を見積った (図 5h, i). 図 1a に示すように, ミオシンがアクチンに強く結合し力を出す状態は, ADP 結合かヌクレオチドなし状態と考えられるので, 1 mM ADP か ATP なしの 2 条件で計測を行った.

計測した力と変位のカーブから弾性カーブを描くとき極めて強い非線形弾性であることがわかった (図 6a). 正の歪み領域のみをみた場合は, これまでの研究で示唆されてきた線形弾性的のようにみえるが, 負の歪み領域をみるとカーブの傾き (弾性率) が極端に緩くなり, ミオシン頭部が急激に柔らかくなっていることがわかる. 非線形弾性の結果は, これまでに想像されてきた線形弾性とは大きく異なるものである. では, この正負の歪み領域で大きく変化する弾性率の由来は何であろう? 理論計算から予想されるミオシン頭部 S1 部位 (図 6a) の弾性率は  $2 \text{ pN/nm}$  程度<sup>10)</sup>

と正の歪み領域における弾性率 ( $2.9 \text{ pN/nm}$ ) とほぼ一致する. 一方, 負の歪み領域の弾性率 ( $0.02 \text{ pN/nm}$ ) は, コイルドコイルで構成される S2 部位の曲げ弾性率  $0.01 \text{ pN/nm}$ <sup>11)</sup> と一致することから, 次のようなシナリオが想像できる. ミオシンがアクチンと結合して伸ばされたとき, S2 部位はすでに伸びきっており, その引っぱり弾性率は  $50 \text{ pN/nm}$  程度と S1 部位よりはるかに硬いため, このときの弾性カーブは, S1 部位の弾性率 ( $2.9 \text{ pN/nm}$ ) を表している (図 6a 上部イラスト参照). 一方, ミオシンが負の歪み方向に押し込まれたとき, S2 は大きく湾曲し座屈する (図 6a 上部イラスト参照). したがって, この領域の弾性カーブは S2 の曲げ弾性率 ( $0.02 \text{ pN/nm}$ ) を表している. さらに興味深いことに, 歪みが  $-80 \text{ nm}$  を超えるあたりから再びカーブの傾きが, 正の歪み領域同様に急峻になっている. これはおそらく, 座屈した S2 が反対方向に倒れ,  $-80 \text{ nm}$  あたりで再び伸び切り S1 の弾性特性が現れていると解釈できる. S2 の長さは約  $40 \text{ nm}$  であり,  $-80 \text{ nm}$  がちょうど 2 倍長であることから納得がいく. ADP, ATP なしの両条件における結果に特に違いはなく, この結果はミオシンに ADP が結合してアクチンに強結合している状態と, その後 ADP が解離したあとの強結合状態に

おける弾性特性に変化がないことを示している。以上の結果から、ミオシン1分子の弾性特性を正負の歪み領域に分けて厳密に計測した結果、その弾性特性は非線形であり、この非線形性はミオシン頭部S1とS2部位の弾性特性に由来すると考えられる。

次にこの非線形弾性のもつ機能的意味合いについて考えてみる。図6bにミオシンの弾性が線形の場合と非線形の場合について、筋収縮力に与える影響をまとめた。単純にミオシン2分子がアクチンと相互作用している状態を考える。はじめにミオシンAがアクチンに結合して、構造変化を起こしてバネを正方向に伸ばし( $x_A=d$ )、active force ( $F_A=k \cdot x_A$ )を発生させたとする。ここまでは、非線形でも線形弾性でも正の歪み方向のカーブ(弾性率 $k$ )が同じなので、発する力も等しい。次にミオシンBが相互作用してアクチンを左方向に移動させると、ミオシンAはバネを押し縮められ負の歪み領域まで縮んだとする( $x_A=-d'$ )。このときのdrag forceの大きさは、非線形と線形弾性では大きく異なる。非線形弾性の場合、負の歪み領域での弾性率は正の歪み領域の約1/100になるので、線形弾性のdrag forceの約1/100になる。したがって、非線形弾性を持つことにより、ミオシンBの発したactive forceをほとんど失うことなく、力をアクチンに伝えることができる。以上をまとめると、ミオシンはアクチンと結合するときは、S2の部分を伸ばした状態で結合する。このとき、S2は硬く伸びているのでミオシン頭部S1の構造変化による力が効率的にアクチンに伝わる。一方、力を出し終えたあと押し縮められた場合、S2が湾曲して紐のように柔らかくなるため、ほかのミオシンの力発生の邪魔にならない。以上、1分子レベルでの高精度弾性計測により、効率的な筋収縮力発生を実現する仕組みがミオシン分子に設計されていることが判明した。

## 6. ATP存在下でのミオシン1分子の変位・力計測

前説で述べたように、ミオシン1分子を単離した状態での変位・力計測では(図2a)、筋肉内でのミオシン分子の変位・力発生状態を十分に反映しているのか疑問が残る。そこで筆者らの研究では、天然ミオシンとミオシンロッドのモル比を1:2にして混合した溶液でミニフィラメントを合成し、最大で6分子程度がアクチンと相互作用できる条件で、低ATP濃度(20  $\mu$ M)における変位・力計測を行った<sup>9)</sup>。この条件で、アクチンの片端にビーズを結合させてミオシンフィラメントと相互作用させると、図7aに示すように12 pN程度まで連続的に力を出した。さらにビーズ変位カーブを拡大してみると、5 nm前後のステップ幅でステップ状に変化していることがわかった(図7b)。詳細は割愛するが、確率的にはアクチンに相互作用できる6分子中の約半分の3分子程度がアクチンに結合しており、そのうちのある1分子が構造変化によりアクチンを動かし、その動きがステップ状のアクチン変位として検出さ

れたと解釈できる<sup>9)</sup>。すなわちこのステップ幅は、ミオシン1分子が発生した変位に相当する。これまでの1分子計測では、大きく揺らぐアクチンに作用するミオシンの変位を測るため、ステップ幅を検出するためのノイズ除去が問題であった。しかしこの多分子フィラメントでは、アクチンに複数の分子が結合しているために、アクチンの揺らぎが抑えられて、SN比のよい状態でステップ幅を抽出することに成功した。さらに負荷の増加に伴うステップ幅の変化をみると、12 pN程度までの負荷の増加に伴いステップ幅が7 nmから4 nm程度まで減少していく傾向にあることがわかった(図7c)。いい換えれば、ミオシンによるアクチンの移動距離(ステップ幅)は負荷の増加に伴い減少することを示唆している。この原因として、以下の分子機構モデルを考える。ミオシン頭部の構造変化によるアクチン移動距離をワーキングストロークサイズ( $W$ )とすると、無負荷時に観測されるステップ幅( $S$ )に等しい(図7d,  $W=S$ )。しかし負荷が作用すると、ミオシン頭部の弾性部位が $dE$ だけ伸ばされたため、アクチンの移動距離はその分だけ減少する( $S=W-dE$ )。したがって、ステップ幅は負荷の増加に伴い減少すると解釈できる。では、これらのパラメータを実験データに当てはめてみる。バネの伸び量 $dE$ は、前節の弾性特性、正の歪み方向のカーブから見積ることができる(図6a)。したがって図7cにおいて、各負荷における $dE$ を見積り、これに観測されたステップ幅( $S$ )を加えてワーキングストロークサイズ( $W$ )を見積ったところ、負荷に依存せずほぼ8 nm程度になった。これは我々が提唱するモデルと一致する。すなわちワーキングストロークサイズは、ミオシン頭部の構造変化に依存した移動距離であり、負荷の影響を受けない。一方、アクチンの移動距離、ステップ幅は、外部負荷によりミオシン頭部の弾性部位が伸ばされる分だけ減少する。以上、筋肉内のフィラメント構造を再構成した多分子フィラメント上におけるミオシン1分子の力学計測により、ミオシン頭部の構造変化による移動距離、またこれらの負荷依存性について、詳細な理解が1分子レベルで初めて明らかになった。

1分子計測技術の進歩に伴い、これまでの筋肉研究ではみえてこなかったミオシン1分子の特性がみえてきたことは明らかである。しかし、多分子複合体の機能は1分子特性の単純和として理解できるほど単純ではない。また、組織レベルでの機能との関わりがみえてこないと理解できない1分子特性もありうる。今後は、ここを出発点に上位階層レベルでの機能とのつながりを明らかにすることが、生命科学の大きな飛躍につながるであろう。

## 文 献

- 1) Huxley, A.F. & Niedergerke, R. (1954) *Nature*, 173, 971-973.
- 2) Huxley, H. & Hanson, J. (1954) *Nature*, 173, 973-976.
- 3) Lynn, R.W. & Taylor, E.W. (1971) *Biochemistry*, 10, 4617-4624.
- 4) Mehta, A.D., Rock, R.S., Rief, M., Spudich, J.A., Mooseker,

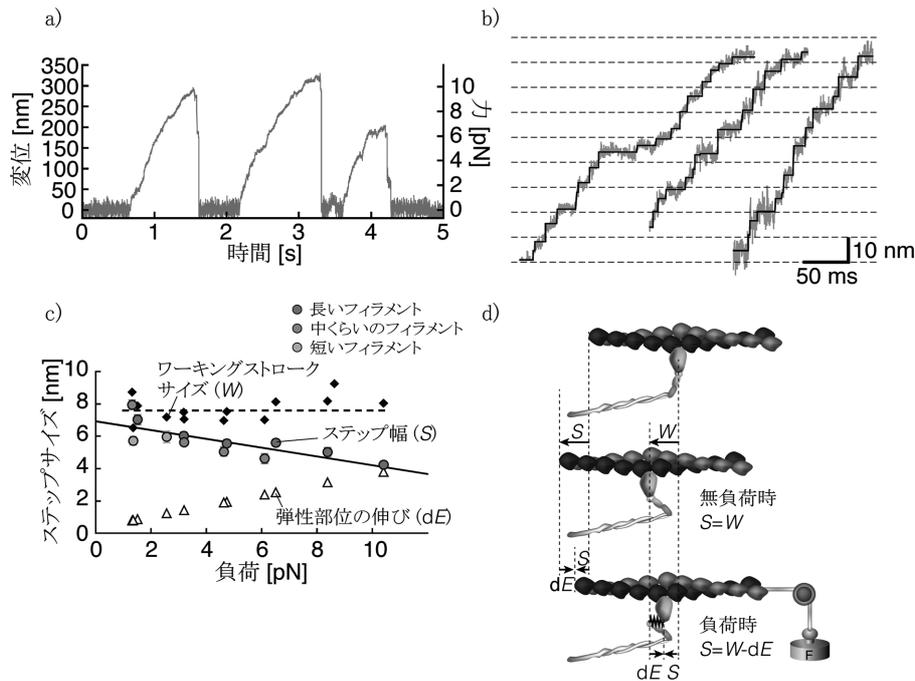


図7 アクチンとの相互作用時におけるミオシン1分子の構造変化

a) 光ピンセットで計測したミオシンフィラメントの力波形 (20 mM ATP). 光ピンセットのレーザー位置は固定されているので、ミオシンがアクチンビーズをレーザーの中心から引っぱる距離に比例して負荷が大きくなる。最大 12 pN 程度までの力が出た時点で、これ以上アクチンを引っぱることができないため、アクチンからミオシンが解離してビーズが光ピンセットの中心位置 (変位=0) に戻る。b) ビーズの変位波形を拡大すると、ステップ状に変位している (黒線は数学的なアルゴリズムで検出したステップ)。c) ステップ幅と負荷の関係。長さの違うミオシンフィラメント3種において、ステップ-ステップ間の距離 (ステップ幅) とそのとき作用している負荷の関係をみると、一貫してステップ幅が負荷の増加に伴って減少の傾向にある。d) ステップ幅の負荷依存性を説明するモデル。負荷に依存せず構造変化 (ワーキングストローク) による変位をワーキングストロークサイズ ( $W$ ) とすると、無負荷のときはステップ幅と等しい ( $S=W$ )。一方、負荷が作用するときは、ミオシン頭部のバネ弾性部位が  $dE$  だけ伸びるため、ステップ幅はワーキングストロークサイズから  $dE$  分差し引いた値になる ( $S=W-dE$ )。このモデルに基づき、c) の実験データプロットにおいてワーキングストロークサイズを見積もると ( $W=S+dE$ )、8 nm 前後で負荷によらず一定となった (黒点線)。これはワーキングストロークサイズが負荷に依存せず一定とする我々のモデルを支持する結果である。

- M.S., & Cheney, R.E. (1999) *Nature*, 400, 590–593. doi: 10.1038/23072.
- Toba, S., Watanabe, T.M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y.Y., & Higuchi, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 5741–5745. doi: 10.1073/pnas.0508511103.
  - Huxley, H.E. (1963) *J. Mol. Biol.*, 7, 281–308.
  - Ishijima, A., Kojima, H., Higuchi, H., Harada, Y., Funatsu, T., & Yanagida, T. (1996) *Biophys. J.*, 70, 383–400. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79582-6.
  - Saito, K., Aoki, T., Aoki, T., & Yanagida, T. (1994) *Biophys. J.*, 66, 769–777.
  - Kaya, M. & Higuchi, H. (2010) *Science*, 329, 686–689. doi: 10.1126/science.1191484.
  - Howard, J. & Spudich, J.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4462–4464.
  - Adamovic, I., Mijailovich, S.M., & Karplus, M. (2008) *Biophys. J.*, 94, 3779–3789. doi: 10.1529/biophysj.107.122028.

## 著者寸描

## ●茅 元司 (かや もとし)



東京大学大学院理学系研究科物理学専攻助教. 博士 (工学).

■略歴 1972年東京都に生る. 94年慶應義塾大学工学部電気工学科卒業. 96年同大学院理工学研究科生体医工学専攻修士課程修了. 2004年カルガリー大学 (カナダ) 工学研究科機械工学専攻博士号取得. 05~07年東北大学先進医工学研究機構研究員. 07年より現職. 11年より科学

技術振興機構さきがけ研究員 (領域「細胞の構成的な理解と制御」).

■研究テーマと抱負 2つの研究テーマ: 「分子から組織, 個体にいたる階層構造の変化に伴う機能発現の仕組みの解明」, 「筋肉の秩序だった構造を保つ仕組みの解明」を掲げて1分子計測からマウス *in vivo* イメージング計測まで幅広く研究を行っている.

■ホームページ <http://www.synbio.jst.go.jp/kaya>

■趣味 スキー, ラグビー, フラッグフットボール, workout, カメラ.