

博士論文（要約）

Doctoral Dissertation (Censored)

心筋ミオシン固有の1分子及び多分子特性の実測とシミュレーションを用いた心機能の理解

(Unique molecular and ensemble properties of cardiac myosin and simulation for understanding heart function)

令和2年 12月 博士(理学)申請

Dissertation submitted for Degree of Doctor of Philosophy

December 2020

東京大学大学院理学系研究科物理学専攻

Department of Physics, Graduate School of Science,

The University of Tokyo

黄 勇太

Yongtae Hwang

Abstract

ミオシンは ATP 加水分解エネルギーを利用し, power stroke と呼ばれる構造変化により力を生み出す分子モーターである. 特に心筋 β ミオシンは心臓の心室を構成するミオシンであり, 血液を身体中に送り出す収縮力を生んでいる. 心臓収縮の分子メカニズムを知るために心筋 β ミオシンを用いた様々な 1 分子実験が行われ, power stroke の大きさ, 発生する力などの 1 分子特性が解明されてきた. また, 心筋細胞内のミオシン分子の力発生のシミュレーションによって, power stroke の逆反応である reverse stroke の反応速度を骨格筋ミオシンモデルより高く設定することで, 心筋 β ミオシン集団が reverse stroke を連鎖的に起こし急速な弛緩が達成された. しかし, 心筋 β ミオシンの集団的性質や reverse stroke の重要性が説かれたものの, 集団的性質は未だ解明されていないだけでなく, 心筋 β ミオシンの reverse stroke の大きさや, 反応速度を正確に評価した研究はない. そこで本研究では, 心筋 β ミオシン集団における reverse stroke の役割を理解するため, ミオシン多分子及び 1 分子の力計測を行い, シミュレーションによって reverse stroke の役割を明らかにした.

心筋 β ミオシン約 15 分子の力を計測したところ, 骨格筋 (速筋) ミオシンに比べ大きい力と高頻度の逆向きステップが観測された. この逆向きステップの分子メカニズムを明らかにするために, ミオシン 1 分子に高負荷を加えたときのミオシンの動態を計測した. その結果, 心筋 β ミオシンは速筋ミオシンに比べ, reverse stroke を頻繁に起こすことが判明した. それだけでなく, これまで計測されなかった心筋 β ミオシンの power stroke, reverse stroke の大きさや反応速度と負荷の関係を定量的に求めることができた. Reverse stroke の役割をシミュレーションによって調べたところ, 高頻度の reverse stroke は心筋ミオシン集団の高い力発生と頻繁な逆向きステップを引き起こすことが解明された. さらに, reverse stroke の筋肉内の役割を理解するために, ミオシン分子数を筋肉内と同じ 75 分子に増やしてシミュレーションを行ったところ, reverse stroke は, 張力の維持, 急速な弛緩および低い ATP 消費率に貢献していることが示された.

本論文は, 7 つの章により構成される. 以下, 各章の概要と具体的な内容について記述する.

第 1 章では骨格筋・心筋の収縮メカニズムおよび心筋 β ミオシンを中心としたミオシンの運動メカニズムに関する研究背景と本研究の目的について述べた.

第2章では実験に必要なミオシン等の材料の調製, 光ピンセット装置や実験系の評価, また実験の手順について述べた. 心筋 β ミオシン多分子実験では, 豚の心室から精製した心筋 β ミオシンと機能頭部のないミオシンロッドを4:1のモル比で混合することにより, ミオシンフィラメントを作製した. ミオシンフィラメントにアクチンフィラメントを相互作用させ, 変位や発生力を光ピンセットを用いて計測した. 1分子実験では, 心筋 β ミオシンまたは速筋ミオシンとミオシンロッドを1:1500のモル比で混合することにより, ミオシン1分子がアクチンフィラメントと相互作用するように調整した. 1分子実験では光ピンセットでミオシンに負荷をかけ, その時のミオシンによる変位を計測した.

第3章では, 心筋 β ミオシン多分子の力計測の結果について述べた. 心筋 β ミオシン集団はアクチンをステップ状に変位させており, 心筋 β ミオシンは骨格筋ミオシンより, 高い力を発生し頻繁に逆向きのステップを示すことが判明した.

第4章では頻繁な逆向きステップの分子メカニズムを明らかにするために行った, ミオシン1分子の reverse stroke の直接観測の結果について述べた. 心筋 β ミオシンは1 mM ADP, 0-10 mM 無機リン酸の溶液で頻繁に power/reverse stroke を繰り返すステップ状の変位を示した. しかし, 速筋ミオシンはステップ状の動きをほとんど示さなかった. この結果から, 心筋 β ミオシンが速筋ミオシンより頻繁に reverse stroke を行うことが示された. さらに, 心筋 β ミオシンの2段階の power/reverse stroke size と反応速度と負荷の関係を計測することができた. また, Pi の結合と reverse stroke の関係を明らかにすることができた.

第5章ではミオシン多分子・1分子実験の結果の整合性や, 過去の実験結果との関係について考察を行った.

第6章では reverse stroke によって心筋 β ミオシン多分子がどのような力発生を行うのかを明らかにするために行ったシミュレーションの方法・結果・考察について述べた. ミオシン15分子が発生する力を, reverse stroke 速度が異なる2つのモデルに基づきシミュレーションを行ったところ, 多分子実験で得られた高い力発生と頻繁な逆向きステップといった心筋ミオシン集団の特性は心筋ミオシン1分子の高頻度の reverse stroke によって引き起こされることが判明した. 多分子実験における逆向きのステップは心筋 β ミオシン数分子が連鎖的に reverse stroke を起こすことで生じることがシミュレーションによって示された. さらに, 1本のアクチンフィラメントと相互作用するミオシンモデルを筋肉内と同じ75分子に増やしシミュレーションしたところ, reverse stroke は, 張力の維持, 急速な弛緩および低いATP消費率に貢献している可能性が示唆された.

第7章では本研究の結論として結果と意義をまとめた.

本研究では、心筋 β ミオシンの1分子実験を行うことにより、世界で初めて心筋 β ミオシンの reverse stroke の直接観測に成功した。心筋 β ミオシンの多分子実験より、心筋 β ミオシン集団は速筋ミオシン集団より高い力発生と頻繁な逆向きステップを示すことが解明され、この集団的性質には reverse stroke が鍵となっていることがシミュレーションから判明した。したがって、心筋 β ミオシンの分子特性として reverse stroke を明らかにし、さらにミオシン多分子の力発生への影響を計算した本研究は、心収縮の分子メカニズムに新たな知見を与えるだろう。

Abstract

Myosin is a motor protein that executes the power stroke and displaces an actin filament to produce force utilizing the free energy of ATP hydrolysis. Cardiac β myosin is located mainly in the ventricle and generates the contraction force of heart. To understand the heart contraction at the molecular level, numerous studies of single cardiac myosin have been conducted and revealed power stroke size and force of single cardiac β myosin. It is predicted by the simulation of force generation of cardiac muscle cell that the sequential reaction of reverse stroke of myosin head plays the key role of the rapid relaxation. However, ensemble properties and reverse stroke of cardiac myosin are still unclear. Here, in order to elucidate the contribution and importance of reverse stroke in cardiac myosin ensemble, we measured force generation of single- and multiple-cardiac myosin molecules by optical tweezers and simulated the force generation using the model with high and low execution rate of reverse stroke.

The thesis consists of the 7 chapters.

In Chapter 1, I described the contraction mechanism of skeletal and cardiac muscle and the research background about cardiac β myosin. Then I described the purpose and significance of my work.

In Chapter 2, I described the preparation method, experimental system, apparatus, the procedure of the experiment and method of data analysis. In the force measurement of cardiac β myosin filament, I mixed myosin and myosin-rod at the molecular ratio of 4:1 and synthesized myosin filament. I measured forces generated by 15 molecules of cardiac β myosin interacting with an actin filament by optical tweezers. In the single myosin experiment, I mixed myosin and myosin-rod at the molecular ratio of 1:1500, guaranteeing that single myosin molecule could interact with actin filaments. I applied high load to myosin by moving the trap position and measured the displacement of the myosin head.

In Chapter 3, I described the results of force measurement of cardiac β myosin ensemble. Cardiac myosin ensemble generated force of 55 pN and stepwise displacement of actin filament. Cardiac myosin generated higher force and more frequent backward steps than fast skeletal myosin.

In Chapter 4, I described the results of single myosin experiment to understand molecular mechanism of frequent backward step. The cardiac myosin executed power/reverse stroke and showed stepwise displacement in the solution containing 1 mM ADP and 0-10 mM phosphate. In contrast to this result, fast skeletal myosin stayed primarily in the single position, suggesting that cardiac myosin molecules execute the reverse stroke more frequently than fast skeletal myosin molecules.

In Chapter 5, I described discussion about the results obtained by single- and multiple-myosin experiments. Then I described the relation between the present results and the results of previous studies.

In Chapter 6, I described method, result and discussion of simulation, to understand how the reverse stroke affects force of myosin ensemble. The force generation of the myosin model with high and low reverse stroke rate showed reverse stroke is the key feature for high forces and frequent backward steps. Moreover, to understand the physiological role of reverse stroke, we simulated force generated by 75 myosin molecules. The reverse stroke in this simulation might contribute to maintenance of stable force, rapid relaxing and low ATP consumption.

In Chapter 7, I concluded my thesis.

In summary, I succeeded in the observation of reverse stroke of single cardiac β myosin. I also revealed that cardiac β myosin ensemble in myosin filament generates higher forces and takes frequent backward step. These were well explained by existence of the reverse stroke by simulation. The simulation showed that reverse stroke contributes to maintaining stable force, rapid relaxing and low ATP consumption. Therefore, the present study provided new insight into the understanding of heart contraction at the molecular level.

目次

第1章 序章	1
1.1 心臓と骨格筋.....	1
1.2 サルコメア	3
1.2.1 ミオシンフィラメントの構造	5
1.2.2 アクチンフィラメントの構造	6
1.2.3 ミオシンとアクチンの相互作用の制御.....	6
1.3 ミオシン	7
1.3.1 ミオシンの構造	7
1.3.2 ミオシンの ATP 加水分解サイクルについて	8
1.3.3 ミオシンの種類	10
1.4 心筋 β ミオシンと骨格筋ミオシンの過去の研究.....	11
1.4.1 ミオシンの <i>In vitro</i> 実験.....	12
1.4.2 ミオシン1分子のストロークサイズと力	12
1.4.3 ミオシンフィラメント内のミオシンの性質解明	14
1.4.4 心筋 β ミオシン集団の reverse stroke の連鎖反応	17
1.5 研究背景のまとめと本論文の目的.....	19
1.5.1 本研究の目的.....	19
第2章 実験材料・実験方法	20
2.1 実験試料の作製.....	20
2.1.1 心筋 β ミオシンの精製.....	20
2.1.2 蛍光ロッドの作製.....	21
2.1.3 合成ミオシンフィラメントの長さ評価.....	22
2.1.4 G-アクチンの精製.....	26
2.1.5 ビオチン化アクチンの作製.....	27
2.1.6 蛍光アクチンフィラメントの作製	28
2.1.7 アビジンビーズ, ゲルゾリンビーズの作製	28
2.1.8 グルタルアルデヒドコーティングガラスの作製	29
2.2 <i>In vitro</i> motility assay	29
2.3 実験装置.....	31
2.3.1 光ピンセット装置.....	31
2.3.2 trap stiffness の評価	32

2.3.3	光ピンセット装置の時間分解能.....	34
2.3.4	ピエゾミラーにかける電圧とトラップ位置の関係	35
2.4	実験方法.....	39
2.4.1	ミオシン多分子の力計測方法	39
2.4.2	アクチンと相互作用するミオシン分子数の評価	40
2.4.3	1分子実験の方法	42
2.4.4	心筋 β ミオシン 1分子が引っ張られた時の負荷とノイズレベルの関係.....	43
2.5	解析手法.....	45
2.5.1	ステップを抽出するアルゴリズム	45
2.5.2	分岐反応の遷移速度の計算	50
2.5.3	タンパク質に内在する弾性要素の補正.....	51
第3章	心筋 β ミオシン多分子の力計測.....	53
3.1	<i>In vitro</i> motility assay	53
3.2	分子数計測実験.....	54
3.3	心筋 β ミオシンフィラメントの力計測	56
3.3.1	滑り速度と負荷の関係について.....	58
3.3.2	ステップ状の力発生	61
3.3.3	Step size について	63
3.3.4	Dwell time について.....	67
3.3.5	Stepping ratio について.....	69
第4章	心筋 β ・速筋ミオシンの 1分子実験.....	71
4.1	1分子実験の生データの概要..... エラー! ブックマークが定義されていません。	
4.2	Step size と dwell time の負荷依存性 .. エラー! ブックマークが定義されていません。	
4.3	Pi の影響..... エラー! ブックマークが定義されていません。	
4.4	骨格筋の速筋ミオシンの 1分子特性.. エラー! ブックマークが定義されていません。	
第5章	実験結果に対する考察.....	72
5.1	ミオシンの power/reverse stroke の観測エラー! ブックマークが定義されていません。	

5.2 多分子・1分子実験で測定された step size の整合性 ..エラー! ブックマークが定義されていません。	
5.3 step size の過去の研究との比較 ... エラー! ブックマークが定義されていません。	
5.4 Pi 放出のタイミング	エラー! ブックマークが定義されていません。
5.5 速筋ミオシンの1分子特性	エラー! ブックマークが定義されていません。
第6章シミュレーション	73
6.1 シミュレーションの方法.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.1 心筋 β ミオシンモデルの構築.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.2 心筋 β ミオシンモデルのパラメーター値	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.3 Reverse stroke しにくいミオシンモデルの作製	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.4 モンテカルロシミュレーションの方法.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.5 熱効率の計算	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.1.6 サルコメア内のアクチン1本の力発生の計算..	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.2 シミュレーション結果.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.2.1 結果の概要とステップの特徴	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.2.2 滑り速度と力の関係について	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3 シミュレーションの考察	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.1 Second reverse stroke が多分子の力発生に及ぼす影響	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.2 1分子実験の結果との整合性	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.3 Backward step が増える理由.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.4 Stall Force が増える理由	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.5 ミオシンフィラメントが急激に力を落とすときのミオシンの反応	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.6 1 mM ATP で負荷に大きく依存しない dwell time. ..	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.7 Reverse stroke の心機能への貢献	エラー! ブックマークが定義されていません。
6.3.8 モデルの妥当性の評価	エラー! ブックマークが定義されていません。
第7章 結論.....	74

参考文献.....	76
謝辭.....	83

略語

MYH: ミオシン重鎖を発現する遺伝子.

HMM: ミオシンのドメイン. ヘビーメロミオシン.

LMM: ミオシンのドメイン. ライトメロミオシン.

MyBPC : Myosin binding protein-C

AM : no nucleotide 状態のミオシン (M)がアクチンフィラメント (A)と結合している状態.

AMD : ADP (D)と結合したミオシン(M)がアクチンフィラメント (A)と結合している状態の中でも second power stroke 後の状態.

AMD*: ADP (D)と結合したミオシン(M)がアクチンフィラメント (A)と結合している状態の中でも second power stroke 前で first power stroke 後の状態.

AMD**: ADP (D)と結合したミオシン(M)がアクチンフィラメント (A)と結合している状態の中でも first power stroke 前の状態.

MD : ADP (D)と結合したミオシン (M).

MDP : ADP (D)と Phosphate (P)と結合したミオシン (M)

MT : ATP(T)と結合したミオシン(M)

DTT : dithiothreitol

MB : Motility buffer

HRS rate model : High reverse stroke rate model. シミュレーションで用いた reverse stroke rate が高いミオシンモデル.

LRS rate model : Low reverse stroke rate model. シミュレーションで用いた reverse stroke rate が低いミオシンモデル.

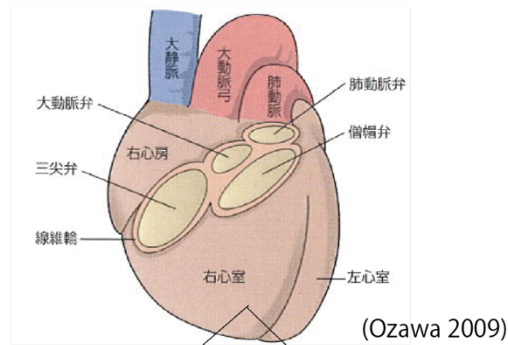
第1章 序章

1.1 心臓と骨格筋

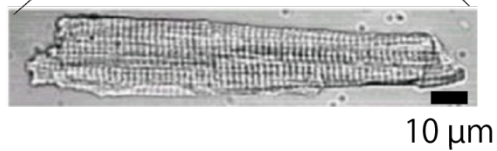
心臓は左心室, 右心室, 左心房そして右心房から構成される筋肉であり, 周期的に収縮することで体全体に血液を送り出す, 生命活動維持に最も重要な組織の一つである (図 1-1A). 右心房付近に位置するペースメーカー細胞が周期的に発生した電氣的興奮が刺激伝導系を伝わり心臓全体に伝達し, 電気刺激を受けた心筋細胞が細胞内にカルシウムを放出することで力を発生し, 心臓は周期的収縮を起こしている. ほとんどの心筋細胞は $100\text{--}150\ \mu\text{m} \times 30\text{--}40\ \mu\text{m}$ 程度の大きさの単核細胞であり(稀に2~4核) (図 1-1B), 心筋細胞同士は介在板を介して繋がり長い線維状になる(Bers 2001). 心臓は心筋細胞が介在板を通して連結した線維が非常に複雑に配列することで構成されており, この複雑な心筋細胞の配置は血液の拍出量を上げることに貢献していると考えられている(Washio et al. 2016). 心臓の1拍動における血圧の変化を図 1-1C に示す. 心臓は, 収縮期に安定した張力で血液を押し出すことで血液を体全体に送り出す. 一方, 収縮期末期には次の拍動で送り出す血液を左心房から多く取り込むために, 心臓は急速に弛緩し, 拡張する必要がある. 従って, この収縮機の安定した張力と急速な弛緩が崩れると, 血液の拍出量が減少する事が判明しており(Washio et al. 2018), 安定した張力と急速な弛緩は心臓機能の中で重要な性質である.

一方, 骨格筋は脳から刺激を受けると収縮して力を発生し, 身体を動かす随意筋である. 骨格筋線維は収縮速度の違いから, 速筋線維 (Type 2)と遅筋線維 (Type 1)に大分される(Schiaffino and Reggiani 2011, Talbot and Maves 2016). 骨格筋を構成する骨格筋細胞は多核細胞である心筋細胞と異なり, 人の骨格筋細胞には数センチメートルの長さの細胞も存在する. 骨格筋細胞は筋原線維が束になることで構成されている.

A

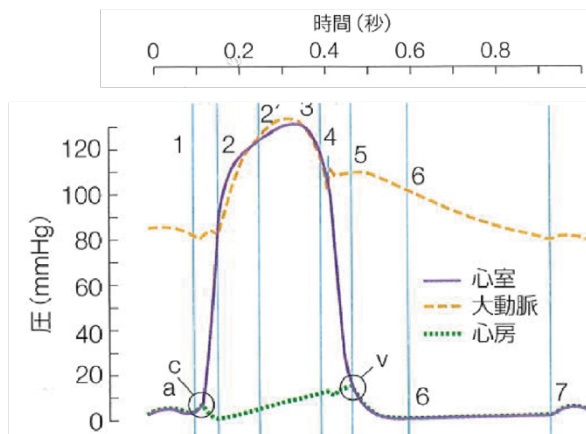


B



(Louch, Sheehan and Wolska 2011)

C



(Ozawa 2009)

図 1-1 心臓の構造と心筋細胞. (A)心臓の全体像. (Ozawa 2009)から引用. (B)心筋細胞を位相差顕微鏡で撮影した像. (Louch, Sheehan and Wolska 2011)から引用した. (C) 1心拍の間の心圧の変化. 紫の実線で示されているのが心室圧である. (Ozawa 2009)から引用.

1.2 サルコメア

心筋・骨格筋の横紋構造はサルコメアと呼ばれる周期的な構造が直列、並列につながることで形成され、このサルコメアが心筋・骨格筋の基本構造である(図 1-2 A,B,C). サルコメアの構造は電子顕微鏡や X 線回折技術を用いて分子レベルで解明され、中心には幅約 20 nm、長さ約 1.6 μm のミオシンフィラメントが束になって存在している。その両端には幅 7 nm、長さ 1 μm のアクチンフィラメントが並行に配列している(図 1-2 C) (Louch et al. 2011). サルコメア内では、ミオシンフィラメントは 6 本のアクチンフィラメントに囲まれ、逆にアクチンフィラメントから見れば、3 本のミオシンフィラメントに囲まれるような立体配置をしている(図 1-2 D). 以下それぞれのフィラメントのより詳細な構造、及びミオシンとアクチンの相互作用を制御する機構について紹介する。

A



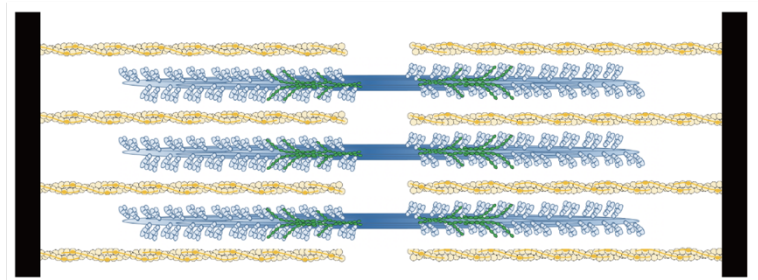
(Louch, Sheehan and Wolska 2011)

B



(Fawcett and McNutt 1969)

C



D

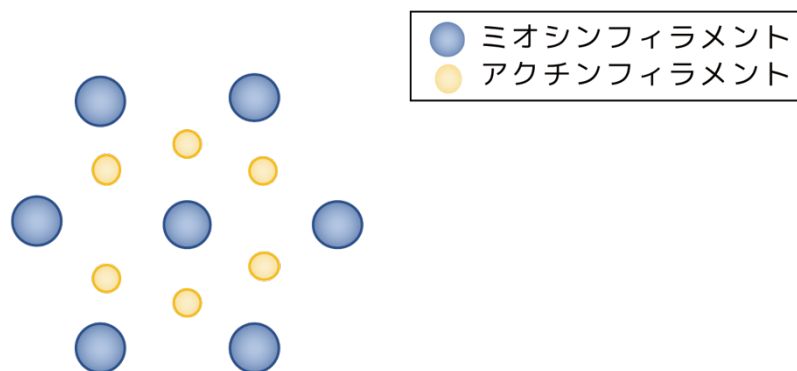


図 1-2 サルコメアの構造の写真と概要図. (A)単離した心筋細胞を位相差顕微鏡で撮影した図. (Louch et al. 2011)から引用した. (B) サルコメアを電子顕微鏡で撮影した画像. (Fawcett and McNutt 1969)から引用した. (C)サルコメアの概要図. (D) サルコメアの断面図.

1.2.1 ミオシンフィラメントの構造

ミオシンフィラメントの中心には bare zone と呼ばれるヘビーメロミオシン (HMM)が存在しない領域が 200 nm 程度存在し、それ以外の領域では HMM がミオシンフィラメントかららせん状に突出している(図 1-3) (Al-Khayat et al. 2008, Zoghbi et al. 2008). ミオシンヘッドは 14.3 nm 毎に 3 分子がミオシンフィラメントから突出しており、この 3 つのミオシンヘッドは放射状にそれぞれ 120° だけ離れて存在している(図 1-3). 14.3 nm 離れた場所に存在する 3 つのミオシンヘッドたちはそれぞれ 40° だけずれた位置に存在している. したがって $14.3 \text{ nm} \times 3 = 42.9 \text{ nm}$ だけ離れた場所では、 $40^\circ \times 3 = 120^\circ$ 回転するので、3 つのミオシンヘッドの位置は元のヘッドの位置に戻ってくる. 即ち、約 43 nm 毎に周期的な立体配置になっている. 天然のミオシンフィラメントには調節系タンパク質の Myosin Binding Protein-C (MyBPC)が Bare zone の終端から、ミオシンフィラメントの先端に向けて約 300 nm 程度の領域に結合しており、その領域は C-zone と呼ばれている(図 1-3). MyBBPCはミオシンヘッドやアクチンフィラメントと相互作用し、ミオシンとアクチンのアフィニティや滑り速度などの性質を調整していることが判明している(Previs et al. 2016).

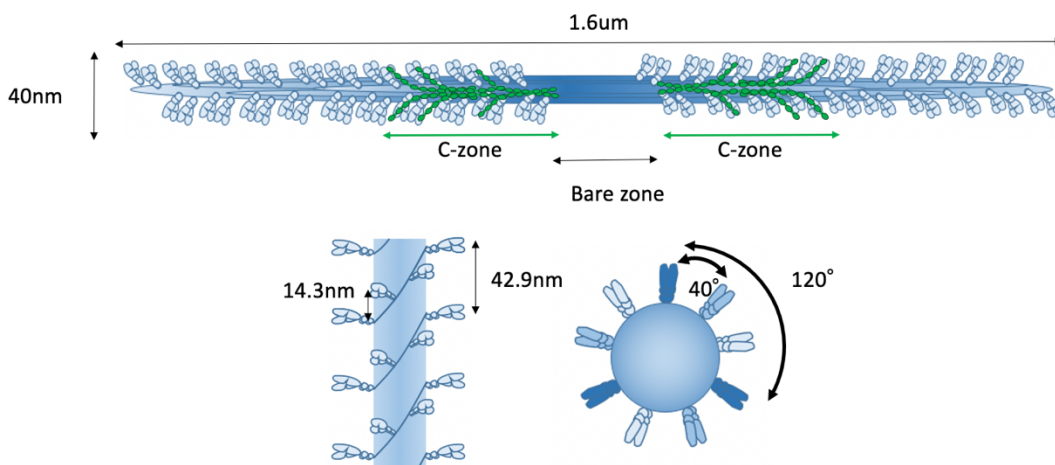


図 1-3 天然のミオシンフィラメントの構造 (上). ミオシンフィラメントから突出しているミオシンヘッドの配置(下). 同じ色のミオシンヘッドは同一平面に存在するミオシンヘッドを意味する.

1.2.2 アクチンフィラメントの構造

天然のアクチンフィラメントはアクチン分子が重合することで構成される 2 重らせん状のフィラメントの周りに調節タンパク質であるトロポニン，トロポミオシンが結合したものである。アクチンフィラメントには極性があり，プラス端は z 線に結合し，マイナス端はサルコメアの中央を向いている (図 1-4)。

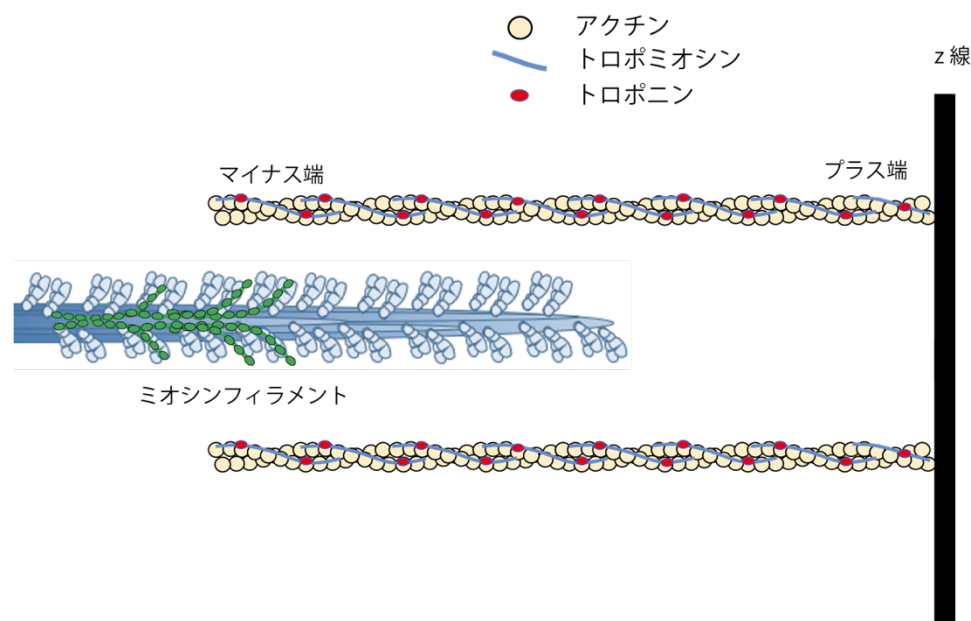


図 1-4 サルコメア内におけるアクチンフィラメント

1.2.3 ミオシンとアクチンの相互作用の制御

心筋・骨格筋細胞の収縮は細胞内にカルシウムが放出されることで生じる。ミオシンとアクチンの相互作用を制御する主なタンパク質はアクチンフィラメントに結合しているトロポニン，トロポミオシンである (図 1-4)。トロポニンは 1964 年に江橋によって命名されたタンパク質であり (Ebashi and Ebashi 1964)，カルシウムに対し解離定数 10^{-6} M という高い親和性を持つタンパク質である。一方，トロポミオシンはアクチンフィラメントに沿って結合しているタンパク質である (図 1-4)。カルシウム濃度が 10^{-7} M 以下のとき，トロポミオシンはアクチンとミオシンが相互作用する領域を覆い，ミオシンとアクチンの相互作用を妨害している。しかし，カルシウム濃度が 10^{-6} M を超えるとカルシウムに結合したトロポニンが構造を変化し，それに伴いトロポミオシンが変位し，ミオシンとアクチンの相互作用が促され，筋肉が収縮する。また，トロポミオシンはミオシンがアクチンに結合した際にも変位することが発見され，ミオシンがアクチンに結合することにより近隣のミオシンが相

相互作用する確率を高めることから、ミオシン分子間における力発生の協調性を生んでいると考えられている (Solaro and Rarick 1998). また近年, トロポニン・トロポミオシン 以外にもミオシンとアクチンの相互作用を制御する分子機構が発見されている. ミオシンフィラメントに結合している MyBPC は低カルシウム濃度でもアクチンと結合しトロポミオシンを変位させることでミオシンとアクチンの相互作用を促していることが判明した (Previs et al. 2016). また, ミオシンヘッドが自身の S2 領域に結合することで, ミオシンとアクチンの相互作用を極端に減らすような Super relaxing state と呼ばれる状態も発見されており (McNamara et al. 2015), ミオシン-アクチン間の相互作用の制御はトロポニン・トロポミオシンだけではないことが判明しているが, これらの制御に対する生理学的な機能の解明はまだ途上の段階にある.

1.3 ミオシン

1.3.1 ミオシンの構造

ミオシンは頭部, 頸部, および尾部の各ドメインにより構成されており, タンパク質分解酵素を用いた解析からそれぞれ S1, S2, ヘビーメロミオシン (HMM) およびライトメロミオシン (LMM) と呼ばれている (図 1-5). ミオシン分子のアクチン結合部位と ATP 加水分解部位は S1 に含まれており, S1 とフィラメントバックボーンの間をつなぐコイルドコイルの構造が S2 であり, LMM 部分は他のミオシンと重合しミオシンフィラメントバックボーンを形成することに寄与している.

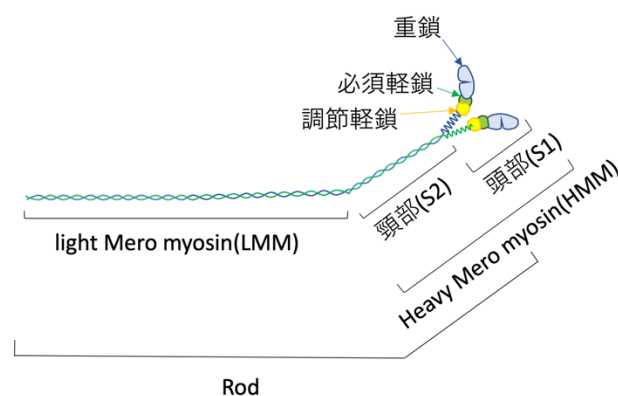


図 1-5 ミオシンの構成とそれぞれの部位の名称.

1.3.2 ミオシンの ATP 加水分解サイクルについて

ミオシンはアクチンフィラメントと相互作用し、アデノシン三リン酸(ATP)の加水分解エネルギーを、力学的エネルギーに変換することで筋肉の収縮力を生み出すことが出来る分子モーターである。筋組織の実験 (Huxley and Simmons 1971), ミオシンとアクチンを混ぜた溶液系の計測 (Lyman and Taylor 1971, Sleep and Hutton 1980), X線構造解析・cryo-EMの構造 (Mentes et al. 2018, Gulick et al. 1997, Rosenfeld et al. 2000), またはミオシンの1分子計測 (Finer, Simmons and Spudich 1994, Capitanio et al. 2006, Greenberg, Shuman and Ostap 2014)などから ATP 加水分解とアクチン・ミオシン相互作用が解明された。図 1-6A は一般的に考えられている ATP 加水分解サイクルにおけるミオシン・アクチンの化学状態を示した。ミオシン・アクチンの相互作用は、図 1-6A の灰色でハイライトされた反応経路は反応速度が高いため、このルートを主に進むと考えられている。この ATP 加水分解サイクルを具体的に説明すると、ヌクレオチドが結合していないミオシンはアクチンフィラメントと高いアフィニティで結合した状態 (AM)になり、ここで ATP と結合すると (AMT), ミオシンとアクチンフィラメントの結合能が下がり、ミオシンがアクチンフィラメントから解離する (MT)。ミオシンと結合した ATP が ADP と Pi (無機リン酸)に加水分解され、ミオシンの構造がアクチンと結合する前の構造へ変化する (MDP)。この状態で、ミオシンはアクチンフィラメントと弱結合しており (AMDP), Pi がミオシンから放出されるに伴って、ミオシンはアクチンフィラメントと強く結合し、ミオシンのヘッドを約 70° 回転する power stroke と呼ばれる構造変化を行い、力を発生する (AMD)。一方、power stroke の逆反応の構造変化は reverse stroke と呼ばれる。power stroke が終了すると、ミオシンは ADP を放出し、ATP 結合を待つ AM 状態に戻り、ATP の加水分解と力発生サイクルが一周する。ATP 加水分解サイクルが1周するまでに要する時間と、アクチンと結合している時間の割合は duty ratio と呼ばれており、筋ミオシンの duty ratio は 10%程度で、細胞内で物質輸送を担っているミオシン V やキネシン 1 のほぼ 100%に比べると非常に低い。

これまでの研究によってミオシンの ATP 加水分解サイクルの多くが判明したが、いまだに不明な点もある。特に power stroke と無機リン酸 (Pi) 放出の反応 (図 1-6A 波線で囲った反応)は、反応速度が 10^3 (s^{-1}) 以上と速く (Howard 2000), ミオシンの構造変化と同時に観測することが難しく、Pi の放出と power stroke のタイミングの関係に関しては、現在においても様々な論文で議論されているが結論には至っていない (Sweeney and Houdusse 2010, Smith 2014, Llinas et al. 2015, Muretta et al. 2015, Capitanio et al. 2006, Greenberg et

al. 2014, Burghardt et al. 2015, Rahman et al. 2018, Fujita et al. 2019, Woody et al. 2019, Sellers and Veigel 2010).

Power stroke に関しては、筋組織の実験から、ミオシンの power stroke は 1 段階だけでなく、多段階で起きることが予想されてきた(Huxley and Simmons 1971).また、筋ミオシンより変位量が大きく、速度も遅いため詳細な解析が可能なミオシン V の観測(Sellers and Veigel 2010)や、AFM を用いたミオシンの power stroke の直接観測(Fujita et al. 2019)などからミオシンは first power stroke の後、1 段階目より変位量の小さな second power stroke を行うと考えられている (図 1-7 B). また、溶液実験や cryo 電子顕微鏡の研究によって、ミオシンが ADP 結合時に 2 つの構造状態があり (Sleep and Hutton 1980, Deacon et al. 2012, Menten et al. 2018), ミオシンヘッドが 25° 回転していたことがわかった (Menten et al. 2018). ミオシンの全 power stroke に伴うヘッドの回転が 70° であることを考慮すると (Howard 2000), ADP 結合状態における 25° のミオシンヘッドの回転は second power stroke に対応した構造変化であると考えられる. こうした様々な実験系の結果を総合すると、ミオシンは ADP 結合状態において 2 段階の power stroke を実行している可能性が高いと考えられる.

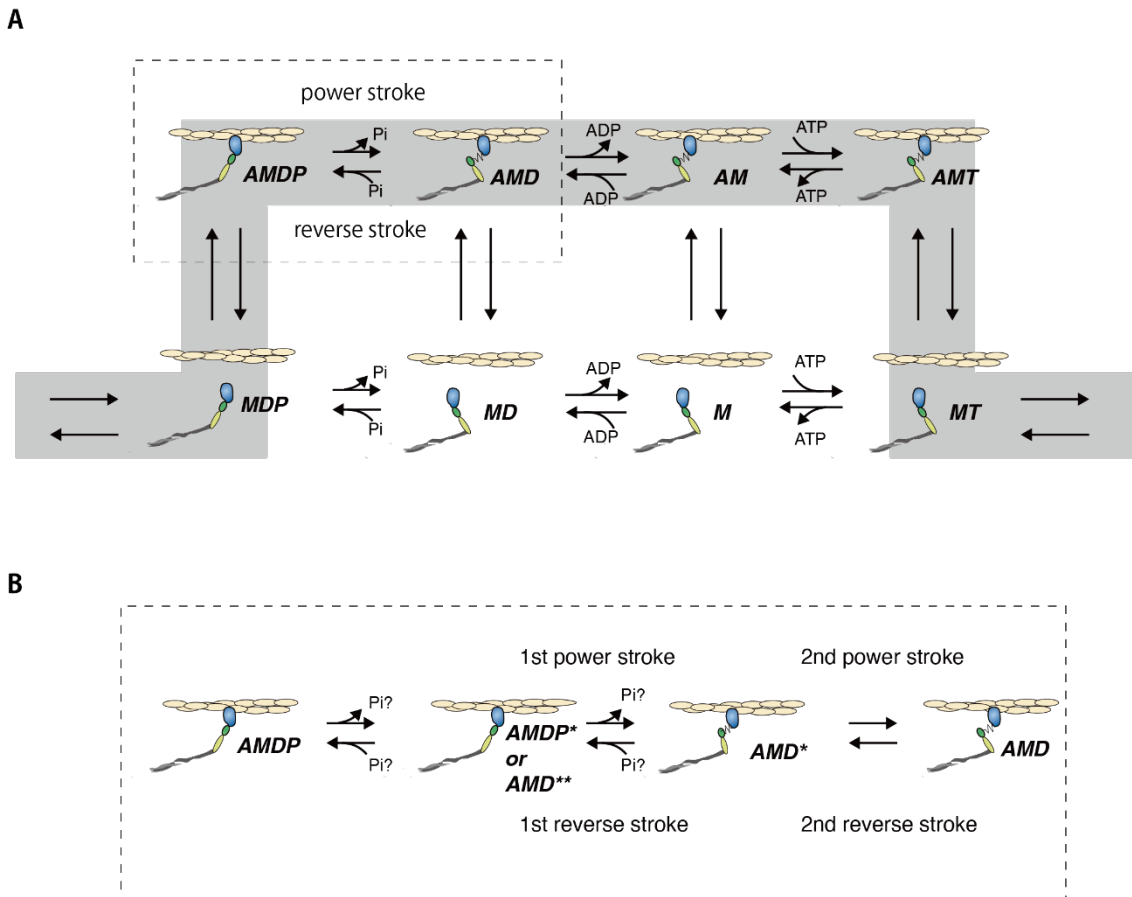


図 1-6 (A)ミオシン・アクチンの化学・力学反応の概要図。灰色でハイライトしている部分はミオシン・アクチンの主な化学反応ルートであり、ミオシンの ATP 加水分解サイクルと呼ばれている。波線で囲った部分はいまだに明らかではない反応を示している。A はアクチン, M はミオシン, T は ATP, D は ADP, P は Pi(無機リン酸)の略称である。(B) (A) の破線で囲った部分において、現在提唱されているモデル。ミオシンは first power stroke, second power stroke の 2 段階の power stroke を起こす。また Pi 放出のタイミングは現状においても様々な議論がなされており、明らかになっていない。

1.3.3 ミオシンの種類

ミオシンには筋ミオシンだけでなく、細胞の運動に必要な力を生む非筋ミオシンも存在している。ミオシンは大きく分けて 18 個のクラスに分けられており、筋ミオシンはミオシン II のクラスに属している(Hartman and Spudich 2012, Lee et al. 2019)。脊椎動物は横紋筋で 11 個のミオシン重鎖 (MYH) 遺伝子を発現する。しかし、発現レベルおよびパターンは、種や発達の度合い、また筋肉のタイプによって大きく異なることが知られている。速筋では MYH1, MYH2, MYH4 の遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構

成されるミオシンが主であり、これらのミオシンは速筋ミオシンと呼ばれている。遅筋では、MYH7 遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構成されるミオシンで構成されており、遅筋ミオシンと呼ばれる。一方、心臓に注目すると心房は MYH6 遺伝子から発現されたミオシン重鎖から構成される心筋 α ミオシンによって主に構成されている。また、心室は MYH7 遺伝子から発現したミオシン重鎖から構成される心筋 β ミオシンによって主に構成されている (表 1-1) (Reiser and Kline 1998, Lee et al. 2019)。したがって、遅筋と心室を構成する主なミオシンは軽鎖の違いはあるが、重鎖は同じ遺伝子から発現している。ミオシン重鎖のアミノ酸の相同性を比較してみると、速筋ミオシン間のミオシン重鎖は 90%以上の相同性があるものの、速筋ミオシンと心筋 β ミオシンは 80 % 程度の相同性しかない。

表 1-1 ヒトサルコメアミオシン重鎖タンパク質のアミノ酸配列の相同性. 各値は (Lee et al. 2019)より引用した。

	MYH 1	MYH 2	MYH 4	MYH 6	MYH 7
主に発現している筋肉	速筋	速筋	速筋	心房	遅筋 心室
MYH 1					
MYH 2	93 %				
MYH 4	96 %	92 %			
MYH 6	80 %	79 %	80 %		
MYH 7	81 %	80 %	81 %	91 %	

1.4 心筋 β ミオシンと骨格筋ミオシンの過去の研究

心室を構成する心筋 β ミオシンの点変異体が心機能を変化させていることが知られている (Spudich 2019)。このことは心筋 β ミオシンの性質は心機能に大きな影響を与えることを意味しており、したがって心臓の収縮を分子レベルでとらえるためには、心筋 β ミオシンの性質について詳しく知る必要がある。しかし、細胞環境下においては、制御系タンパク質の影響やその他細胞活動に伴う環境の変化によって、アクチンフィラメントに対するミオシンの結合能が変化する等の可能性がある。無論、こうした要素による影響は重要であるが、筋収縮分子メカニズム解明への最初のステップとして、収縮の最小システムであるミ

オシンとアクチンのみを抽出し、これらの相互作用の様子を観察する *In vitro* 実験が行われてきた。

1.4.1 ミオシンの *In vitro* 実験

1986年にKronとSpudichによってウサギの速筋から精製した速筋ミオシンをガラス面に固定し、蛍光染色したアクチンフィラメントの滑り運動を観察する実験 (*In vitro* motility assay)が行われ(Kron and Spudich 1986), 速筋ミオシンは最大で4 $\mu\text{m/s}$ の速度でアクチンフィラメントを滑らせていた。一方, 1993年にYamashitaらはウサギの心臓から精製した心筋ミオシンを用いて *In vitro* motility assay を行った。この実験により, 心筋 α ミオシンの滑り速度は0.7 $\mu\text{m/s}$, 心筋 β ミオシンの滑り速度は0.5 $\mu\text{m/s}$ と速筋ミオシンに比べ遅いことが判明した (Yamashita et al. 1993)。また, 2005年にSasakiらによって, さまざまな動物種の心筋 β ミオシンの滑り速度を評価した実験が行われ (Sasaki et al. 2005), それぞれの動物種の心拍数は心筋ミオシンの滑り速度に比例することが確かめられた。つまり, 心臓の心拍数は心筋ミオシンの収縮速度と密接につながっていることが示唆された。また, 心筋 β ミオシンのみならず α アクチニンや Utrophin などのアクチン結合タンパク質をガラス面に固定させた状態でアクチンフィラメントの滑り速度を計測する実験が行われた。この実験系において, アクチンフィラメントには心筋 β ミオシンからのアクチンフィラメントを滑らせようとする力とアクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントを留めようとする力の2種類の力がかかっている。心筋 β ミオシンがアクチンフィラメントを滑らそうとする力の方が強いと, アクチンフィラメントはガラス面を滑り, アクチン結合タンパク質がアクチンフィラメントを留める力が強いとアクチンフィラメントはガラス面に固定される。従って, 様々なタイプのみオシンでこの実験を行い, ガラス面に固定されず滑るアクチンフィラメントの割合を調べることでミオシンの相対的な力が評価された (Aksel et al. 2015, Greenberg and Moore 2010)。この実験の結果, 心筋 β ミオシンの動きを止めるためには, 心筋 α ミオシンの動きを止めるのに必要なアクチン結合タンパク質の5倍量が必要となることがわかった。従って, 心筋 β ミオシン集団は心筋 α ミオシン集団より大きな力を発生することが示された。

1.4.2 ミオシン1分子のストロークサイズと力

In vitro motility assay により, ミオシン集団の滑り速度や相対的な力を見積もることができたが, これらの実験からはあくまでミオシンの平均的な振る舞いしか知ることができない。

そこで、ミオシン1分子で実験をすることにより、ミオシン1分子のストロークサイズと発生する力が明らかにされてきた。

1994年、光ピンセットを用いて、骨格筋ミオシン1分子のステップサイズと発生する力の計測が行われ、骨格筋ミオシンは平均約11 nmのステップサイズを示し(Finer et al. 1994), 3-4 pNの力を発生することが判明した。心筋ミオシンの1分子計測は、1999年Palmiterによって行われた(Palmiter et al. 1999)。この実験により、心筋 β ミオシンは心筋 α ミオシンに比べ、アクチンフィラメントとの結合時間が長いという差がある一方で、平均的な力は約0.8 pNであり、power strokeサイズは7 nmで2つのミオシンに違いがないことが1分子レベルで解明された。また、Warshawらのグループによってマウスの心筋ミオシン1分子の力発生計測が行われ、心筋ミオシンのステップサイズには5 nm, 9 nmの2つのピークが見られたことから(Tyska et al. 2000), 心筋 β ミオシンは5 nm + 4 nmの2段階のパワーstrokeを起こしていることが示唆された。2006年にCapitanioらが速筋・遅筋ミオシンを用いて、2014年にGreenbergらが心筋 β ミオシンを用いて、ミオシンの変位のアンサンブル平均をとることでミオシンは2段階のパワーstrokeをしていることが予想され、power stroke sizeがみつもらえた。その結果、速筋ミオシンの1段階目のpower strokeは3 nm, 2段階目は1.1 nmと見積もられ、遅筋ミオシンはそれぞれ4.9 nm, 1.6 nmと見積もられた(Capitanio et al. 2006)。心筋 β ミオシンのステップサイズは1段階目のpower strokeは4.7 nm, 2段階目は1.9 nmと見積もられた(Greenberg et al. 2014)。また近年藤田らによって、AFMを用いて速筋ミオシンの4.0 nmと3.9 nmの2段階のpower strokeが観測された(Fujita et al. 2019)。藤田らのAFMの実験では、ミオシンヘッドをDNA origamiに化学的に結合させたミオシンフィラメントのストロークサイズを観測しており、ガラス面に結合したミオシンのpower strokeを計測したCapitanioやGreenbergらの実験系とは異なるため、ストロークサイズが大きくなったと考えられる。

2012年にCapitanioらによって、10 μ sという極めて短い時間の中で光ピンセットの位置を調整できる実験装置(Ultra-fast force clamp)が作られ、速筋ミオシンのpower stroke rateやアクチンフィラメントとの結合時間と負荷との関係が調べられた(Capitanio et al. 2012)。その後、心筋 β ミオシンにおいても同様にpower stroke rateの負荷依存性や、アクチンフィラメントとの結合時間に対する負荷依存性を調べるが実験された(Woody et al. 2019, Sung et al. 2015, Greenberg et al. 2014)。その結果、power stroke rateは負荷の上昇に伴い減少し、アクチンへの結合時間は負荷の増加に伴い増加する傾向が速筋、心筋 β ミオシンの両方で見られたが、負荷依存性の度合いは心筋 β ミオシンの方がより強いことが判明した。

2012年にDeaconらがC2C12細胞を用いてヒト由来の心筋 β ミオシンのS1部分の発現の成功した(Deacon et al. 2012). この研究をきっかけに天然型(WT)や心筋症を引き起こすミオシン変異体を発現させることが可能となり, C2C12から発現した心筋 β ミオシンの特性評価を目的とした研究が盛んに行われてきている(Aksel et al. 2015, Bloemink et al. 2014, Liu et al. 2018, Sommese et al. 2013, Spudich 2019, Sung et al. 2015). その結果, 肥大型心筋症を引き起こす心筋 β ミオシン変異体はWTに比べ大きな力を発生させる傾向があり, 一方で拡張型心筋症を引き起こす心筋 β ミオシン変異体はWTに比べ発する力が低い傾向にあることが判明した. 変異体の特性の解明だけでなく近年では, 心筋症の新たな治療薬として期待されているOmecamtiv mecarbilなど心筋 β ミオシンと結合し性質を変化させる小分子の効果も研究されている. これらの小分子が心筋 β ミオシンと結合したときのミオシン構造の変化(Planelles-Herrero et al. 2017), 力発生の性質がどのように変化するかについて調べられている(Aksel et al. 2015, Woody et al. 2018, Planelles-Herrero et al. 2017, Liu et al. 2018, Spudich 2019)

1.4.3 ミオシンフィラメント内のミオシンの性質解明

過去のミオシン1分子実験から, ミオシンの1分子特性(ステップサイズや発生する力)が計測されたものの, ミオシン1分子実験では確率的にガラス面に結合させたミオシンの力を計測しているため, ミオシンとアクチンフィラメントの相互作用の向きがランダムである. 一方, 1分子実験の実験系と異なり, サルコメア内ではミオシンフィラメントとアクチンフィラメントは平行に相互作用する. したがって, ランダムな向きのミオシン1分子実験では生体内のミオシンの性質を正確に計測できない懸念が生じた. この懸念から, ミオシンとアクチンフィラメントの向きが力発生に与える影響を調べる実験がTanakaらによって行われた(Tanaka et al. 1998). Tanakaらの実験では, ミオシンとロッドから作製された $\sim 10\ \mu\text{m}$ の長いミオシンフィラメントが用いられ, ミオシン分子とロッドを1:800 – 1:3000のモル比で混合し重合させることでアクチンフィラメントにミオシン1分子のみが相互作用できるように調整された. Tanakaらはミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを様々な角度で相互作用させ, ミオシンの力発生にどのような影響があるのか調べた.(Ishijima et al. 1996, Tanaka et al. 1998). その結果, ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが並行で相互作用している時, ステップサイズが最も大きく10 nmであったが, フィラメント間の角度が増加するに従いステップサイズは減少しており, この結果はミオシンとアクチンフィラメントの相互作用する角度は力発生に影響を及ぼすことを意味する. したがって, 筋収縮を分子レベルで理解するためには, 単離したミオシン1分子の実験だ

けでなく、ミオシンフィラメントを用い、よりサルコメア内に近い環境でミオシンとアクチンフィラメントの相互作用の性質を知ることが必要である。

2010年、当研究室の茅らの研究により、フィラメント内の骨格筋の速筋ミオシンの弾性の stiffness が計測され、ミオシンが引っ張られ伸ばされている時、ミオシンの弾性率は 2.8 pN/nm である一方、押し込まれている時の弾性率は 0.02–0.5 pN/nm と減少することが計測された (Kaya and Higuchi 2010)。この結果は、ミオシンが押し込まれている時、S2 部分が屈曲するため、stiffness が減少したと解釈されている (図 1-7A)。この非線形な stiffness は力を出し終えたミオシンがアクチンと解離するまでに、他のミオシンに power stroke によって押し込められた時の抵抗力を小さくする効果がある (図 1-7B)。

また、筋収縮はミオシン多分子がアクチンフィラメントと相互作用し力を発生することで起こされているため、ミオシン 1 分子の性質だけでなく、ミオシン多分子の力発生を性質を計測し、ミオシンの集団的性質を知ることにも筋収縮を分子レベルで理解するために重要である。茅らによって、速筋ミオシンフィラメント内のミオシン約 17 分子がアクチンフィラメントと相互作用する実験系を用いた力計測が行われ、速筋ミオシンの集団的性質の解明が行われた。その結果、速筋ミオシンフィラメントはアクチンフィラメントをステップ状に動かしており、ステップに必要なエネルギーは負荷×step size で計算したところ、高負荷で ATP 加水分解エネルギーを超えるステップが計測された。この結果により高負荷で速筋ミオシンが独立して力発生しているのではなく、速筋ミオシン多分子が協調して力を発生させていることが判明した (Kaya et al. 2017)。さらに、この実験結果とシミュレーションモデルを組み合わせることで、速筋ミオシンは低負荷では個々のミオシン分子が独立して力発生をしている一方、高負荷では力発生を同調させる傾向があることが判明した (図 1-8)。

このように、速筋ミオシンフィラメントを用いて、速筋ミオシンの 1 分子・多分子の性質が測定された結果、ミオシンの非線形な弾性率や力発生同調といった、単離したミオシン 1 分子では、計測することができない、フィラメントならではの性質が判明した (Kaya and Higuchi 2010, Kaya et al. 2017)。一方、心筋 β ミオシンフィラメントを用いた計測が行われていない。心筋 β ミオシンと速筋ミオシン重鎖のアミノ酸は 20%異なっており (表 1-1)、ミオシンの滑り速度や力発生を性質に差があることが、溶液実験 (Deacon et al. 2012, Ritchie et al. 1993)、筋組織 (McNamara et al. 2015)、*in vitro* 実験 (Greenberg et al. 2014, Woody et al. 2019, Capitanio et al. 2012) などから報告されている。したがって、心筋 β ミオ

シンの集団的性質には速筋ミオシンにはない、固有の性質があることが期待されるにもかかわらず、いまだに明らかにされていない。

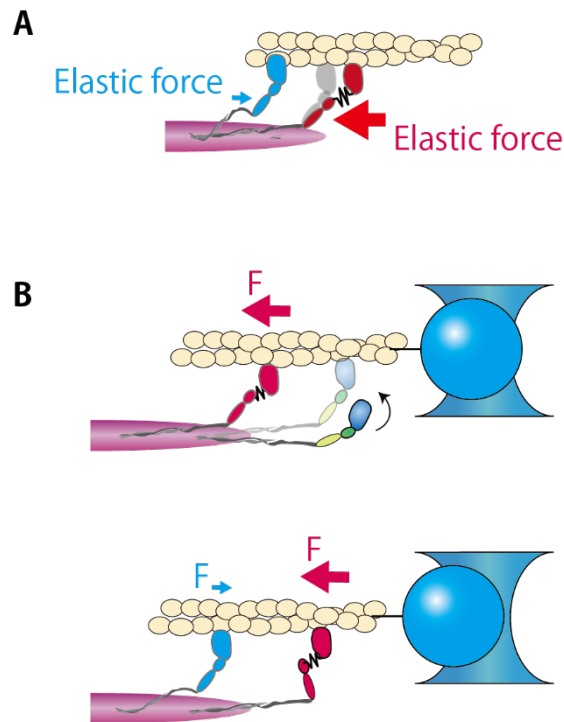


図 1-7 ミオシンの非線形な stiffness の概要図. (A) プラス端側に引っ張られたミオシン (赤) は 2.8 pN/nm の stiffness である一方、マイナス端側に押し込められたミオシン (青) は $0.02\text{-}0.5 \text{ pN/nm}$ 程度の小さな stiffness しか持たない (Kaya and Higuchi 2010). この結果は、マイナス端方向に押された時ミオシンの S2 部分が座屈するためだと解釈されている. (B) ミオシン多分子がアクチンと相互作用する時、力を出し終わったミオシン (左) は他のミオシン (右) の power stroke によりマイナス側に押し込まれても、小さな抵抗力しかうまない.

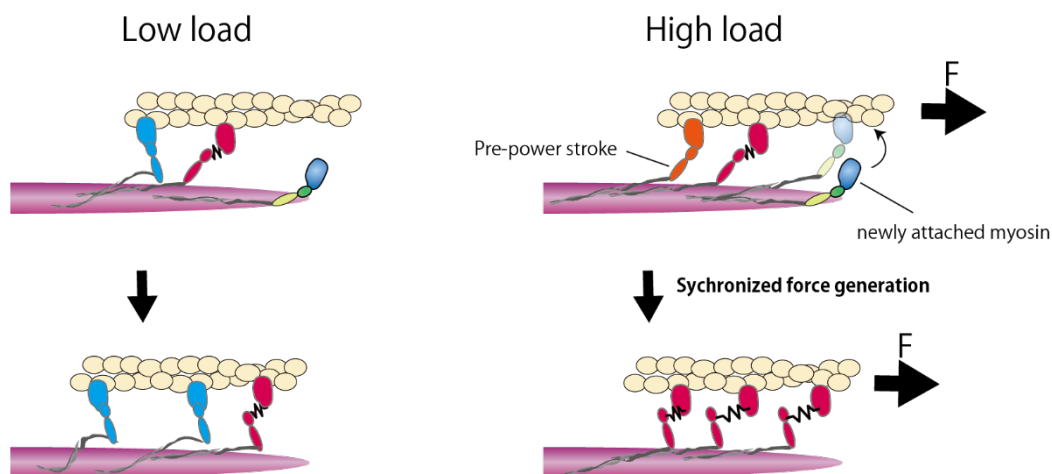


図 1-8 速筋ミオシンの低負荷, 高負荷における速筋ミオシンの協調性の概要図 (Kaya et al. 2017). 低負荷(左)では個々のミオシンが独立してランダムに力を発生する. 一方, 高負荷(右)ではミオシン分子が power stroke を同調して発生する.

1.4.4 心筋 β ミオシン集団の reverse stroke の連鎖反応

近年, Washio らによって, 心筋細胞や心臓全体の動態をミオシン・アクチンの相互作用といった分子レベルのモデルから再現しようとするシミュレーション研究がなされている (Shintani, Washio and Higuchi 2020, Washio et al. 2016, Washio et al. 2017, Washio et al. 2018, Washio et al. 2019). Washio らの研究では心臓や心筋細胞の動態をうまく再現するミオシンのシミュレーションモデルを構築することで, 心筋 β ミオシンの性質や収縮期, 弛緩期におけるミオシンの状態遷移の流れを推測している. 彼らの研究によると, 骨格筋ミオシンモデルを設定するとシミュレーションの心臓の弛緩速度は実際の心臓の弛緩より遅かった. しかし, reverse stroke rate を増加させることで, 心筋ミオシン集団が連鎖的に reverse stroke を起こし心臓の急速な弛緩が達成された (図 1-9)(Washio et al. 2017, Washio et al. 2018, Shintani et al. 2020).

このように心臓のシミュレーションから reverse stroke の重要性が説かれた. しかし, ミオシンの reverse stroke の実測については, 筋ミオシンより変位量大きいミオシン V(Sellers and Veigel 2010)では観測されているものの, 心筋 β ミオシンでは 2019 年の Woody らの 1 分子実験による観測だけであり, 観測はされたが測定装置のノイズが大きく, reverse stroke の正確な step size や rate は求められていない (Woody et al. 2019). もし Pi 放出が first power stroke と共に生じるならば, first reverse stroke rate は Pi の濃度に依存す

ると考えられるが, P_i の濃度と reverse stroke の関係もわかっていない. また, 心筋 β ミオシンが reverse stroke を連鎖的に起こすといった心筋 β ミオシン集団的性質に着目し, 計測した実験はない.

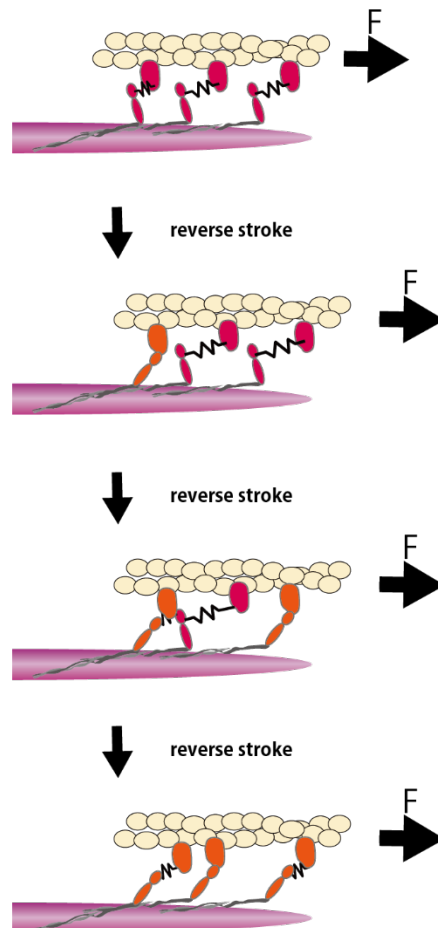


図 1-9 ミオシン集団の連鎖的な reverse stroke. ミオシン分子集団が連鎖的に reverse stroke を起こすことで急速な弛緩が起きることがシミュレーションから示唆されている (Shintani et al. 2020, Washio et al. 2017, Washio et al. 2018).

1.5 研究背景のまとめと本論文の目的

心筋 β ミオシンは心室を構成するミオシンであり、血液を身体中に送り出すための収縮力を生んでいる。心臓収縮の分子メカニズムを知るために心筋 β ミオシンの1分子実験が行われ、心筋 β ミオシン1分子のステップサイズ、発生する力などの性質が解明されてきた。また、心筋細胞のシミュレーション研究において、心筋 β ミオシンの reverse stroke rate を高く設定すると心筋 β ミオシン集団が reverse stroke を連鎖的に起こし、急速な弛緩が達成された。このように reverse stroke の重要性が心臓シミュレーションから説かれ、心筋 β ミオシンが reverse stroke を起こすことは判明しているものの、reverse stroke size や反応速度と負荷の関係等の reverse stroke の特性はわかっていない。さらに心筋 β ミオシン集団の力発生を高時空間分解で計測した実験はないため、心筋 β ミオシン集団の性質と reverse stroke の関係は不明である。以上を踏まえ、本研究の目的は以下のとおりである。

1.5.1 本研究の目的

心筋 β ミオシン集団における reverse stroke の役割を理解するため、ミオシン多分子及び1分子の力計測を行い、心筋 β ミオシンの集団的性質と reverse stroke を明らかにし、さらに、シミュレーションによって reverse stroke の役割を明らかにすることを本研究の目的とした。

第 2 章 実験材料・実験方法

2.1 実験試料の作製

2.1.1 心筋 β ミオシンの精製

豚の心室を構成するミオシンの内、95 %以上が心筋 β ミオシンであるため (Reiser and Kline 1998), 本研究では速筋と同じ抽出方法で豚の左心室から心筋 β ミオシンを抽出した (Harada et al. 1990). 精製日の早朝に食肉業者 (東京芝浦臓器株式会社) から得た豚の心臓を発泡スチロールに詰めた水中にいれ, それから約 1 時間後研究室にて左心室部分をドラフトチャンバー内で切り出し, ミンチ機にかけ重さをはかった(重さを $A\text{ g}$ とする). $3 \times A\text{ ml}$ の Guba-Straub (GS) 溶液 (0.3 M KCl , $0.1\text{ M KH}_2\text{PO}_4$, $0.05\text{ M K}_2\text{HPO}_4$ pH 6.8) とミンチした心筋を氷の中に置いたビーカーで混ぜ, 葉さじを用いて心筋をビーカーの壁ですりつぶすようにしながら 10 分間かき混ぜた. この際, ミオシンが溶液に溶け出すため, 溶液の粘性が上がった. この溶液を 15 krpm ($34300 \times g$) 1 分 4°C の条件で超遠心機にかけ, 残った組織から分離する (遠心機: HITACHI CP70MX / ローター: P19A). 上澄み液を回収し計量した. この上澄み溶液の 7 倍量の 0.2 mM EDTA (in H_2O) を加え, 8 倍に希釈にした (この溶液を B と呼ぶ). これにより塩強度が下がりミオシンが重合するため, 溶液が白濁した. EDTA はプロテアーゼインヒビターとして入れた. B の容量が極めて多く, 遠心機ローターに 1 回で収まりきらないため, 本実験では以下の要領で段階的に遠心した. B の一部を 12 krpm ($22000 \times g$) 1 分 4°C (遠心機: HITACHI CP70MX / ローター: P19A) で超遠心した. ミオシンが重合しているため, ミオシンフィラメントは遠心で沈殿した. 遠心ボトル内の上澄み液を捨て, 新たに B の溶液を入れ同条件で超遠心した. この作業を B がなくなるまで行う. 上澄みを捨て, 沈殿物に KP/30 溶液 (0.1 M KCl , 30 mM PIPES pH 6.8) で懸濁し計量した. 計量した重量 100 g に対して 8 mL の KP 溶液 (3 M KCl , 0.1 M PIPES pH 6.8) を加えた. この工程で塩強度が 0.3 M KCl 程度になる. これによりミオシンをモノマー化させる一方で, 不純物として残ったアクチンにはミオシンが結合する. この溶液を 50 krpm ($257400 \times g$) 20 分 4°C で超遠心 (遠心機: HITACHI CP70MX / ローター: P70AT) する. 上澄み液を回収し計量した. 沈殿は主にアクトミオシンが, 上澄み液は主にミオシンが含ま

れており, 0.2 mM EDTA で 8 倍に希釈にすることで, ミオシンが重合し溶液が白く濁った. 12 krpm (22000×g) 10 分 4°C (遠心機: HITACHI CP70MX /ローター:P19A)で超遠心をかけ, 上澄み液をすて沈殿物を KP/30 溶液で懸濁し計量した. 塩強度が 0.6 M KCl になるよう KP 溶液を加えた. 溶液を 50 krpm (257400×g) 30 分 4°Cで超遠心(遠心機:HITACHI CP70MX /ローター:P70AT)した. 上澄み液を回収し等量の 70 % Sucrose (in 0.6 M KCl, 0.01 M PIPES pH 6.8)を加えゆっくり攪拌し, 濃度定量, および分注して液体窒素で急速冷凍し -80 °Cの冷凍庫で保存した. 本実験では, 心臓一つから 10 mg/ml の心筋 β ミオシンが 30 ml 程度精製された. この方法で精製したミオシンの SDS-PAGE の結果を図 2-1 に示す. 1 本のミオシン重鎖と 2 本のミオシン軽鎖のバンドを確認することができた.

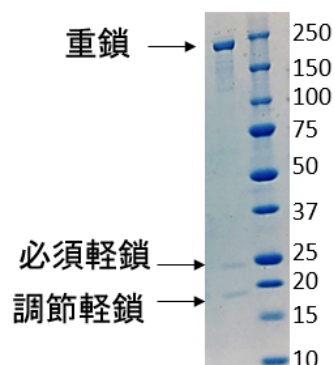


図 2-1 心筋 β ミオシンの SDS-PAGE. アクリルアミドの濃度が 7%~20%のグラディエントゲルを用いて, 電気泳動を行った. 左のレーンが本研究によって抽出された心筋 β ミオシン, 右のレーンがマーカである. 図の左の文字はミオシンの各ドメイン (分子量; 重鎖: 220 kD, 必須軽鎖: 22 kD, 調整軽鎖: 17 kD)を, 右の数値はマーカの分子量 (単位:kD)を示す.

2.1.2 蛍光ロッドの作製

ミオシンフィラメントを蛍光顕微鏡で可視化するために, ローダミンで染色したミオシンロッドを作製した. その際, ロッドを重合させた状態でローダミン NHS と反応させることでミオシンとミオシンロッドが重合する際にロッド同士が接触する側のアミノ基にローダミン NHS が反応しないように配慮し, ミオシンロッドの重合能を阻害しないようにした. 具体的な方法として, 10 mg/ml の心筋 β ミオシンストック 100 μ l に 10 mM PIPES (pH 7.0) 900 μ l を加えミオシンを重合させ, そこに 1 M $MgCl_2$ 2.5 μ l, 1 M dithiothreitol (DTT) 1 μ l を加えた. 10 mg/ml パパイン (papain (Cat # LS003124, Worthington Industries,

USA))を 15 μ l 入れ室温 (25.5°C)で 25 分おいた。パパインの酵素反応を止めるために、10 mM ヨード酢酸を 10 μ l 入れ 15 krpm (23200 \times g) 10 分、4°Cで遠心した。沈殿物を S1 溶液 (10 mM PIPES pH 8.0, 50 mM KCl)で懸濁し 10 mM ローダミン-NHS を 3 μ l 入れ、30°C のインキュベーターで 30 分転倒混合させた。その後、パパインで切れなかったミオシンを除去するために 99.5 % エタノールを 600 μ l 加え、0°Cで 2 時間待機した。その後 15 krpm (23200 \times g) 15 分、4°Cで遠心した。沈殿物を 0.6 M KCl 100 μ l で懸濁し 100 krpm 20 分 4°C で超遠心し上澄みを分注保存した。本実験では 1.2 mg/ml の蛍光ロッドを 100 μ l 作製することができた。

2.1.3 合成ミオシンフィラメントの長さ評価

筋肉ミオシンはイオン強度が 300 mM 以上の時、モノマーとして存在しているが、イオン強度が 300 mM 以下になると互いに重合し、双極子構造をとったミオシンフィラメントを形成する。このように一度筋肉から精製し、イオン強度を下げることで人工的に合成したミオシンフィラメントを本研究では合成ミオシンフィラメントと呼ぶ。本研究で精製した心筋 β ミオシンと蛍光ロッドから作られる合成ミオシンフィラメントの長さを電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の 2 種類の顕微鏡を用いて評価し、結果を比較した。

2.1.3.1 蛍光顕微鏡

本研究ではミオシンフィラメントの蛍光像から長さを評価するため、ミオシンフィラメントの蛍光像について以下のようなモデルを立てた。ミオシンフィラメントに蛍光体 (ローダミン) が面密度 C' で一様に存在し、この中の一つの蛍光体からはガウス関数型の強度分布 ($I=Ae^{-\frac{|r|^2}{2\sigma^2}}$) を持つ光が発せられていると仮定した (図 2-2 A)。このような条件下において、座標 (a,b) における光の強度 $I(a,b)$ は以下のように、それぞれの蛍光体からくる光の足し合わせで表現できる。

$$I(a,b) = \iint C'(x,y)Ae^{-\frac{|r|^2}{2\sigma^2}} dydx \quad (2-1)$$

ここで、積分区間は全領域であり、 r は (x,y) と (a,b) 間の距離であり、 $C'(x,y)$ は蛍光体の面密度を、 σ は蛍光分子が発する光の範囲の分散を表している。今回のモデルではミオシン

フィラメントに蛍光体が一様に存在していると仮定しているため $C'(x,y)$ は定数 C_0 を用いて以下のように表現できる。

$$C'(x,y) = \begin{cases} C_0 & ((x,y) \text{にミオシンフィラメントが存在している場合}) \\ 0 & ((x,y) \text{にミオシンフィラメントが存在していない場合}) \end{cases} \quad (2-2)$$

ここで、ミオシンフィラメントの幅は約 20 nm であり、期待されるミオシンフィラメントの長さ(500 nm~1000 nm)や σ (~250 nm)に比べると非常に小さいため、ミオシンフィラメントの幅を無視して非常に細い棒として考え、(2-1)式において蛍光体の面密度 $C'(x,y)$ の y 依存性がデルタ関数のようであると近似すると、(2-1)式は以下のように 1 次元の積分で表現することが出来る。

$$I(a,b) = \int_{-L/2}^{L/2} C e^{-\frac{(a-x)^2+b^2}{2\sigma^2}} dx \quad (2-3)$$

ここで、 L はミオシンフィラメントの長さ、 C は定数である ($C=AC'$)。

本研究では力計測の際に撮影したミオシンフィラメントの蛍光強度分布 (図 2-2 B)と(2-3)式で計算される像の蛍光強度の 2 乗残差が最小になるような C, L, σ の値を計算し、ミオシンフィラメントの長さを評価した (図 2-2 C-E)。

2.1.3.2 電子顕微鏡

電子顕微鏡を用いてネガティブ染色した合成ミオシンフィラメントの長さを調べた。本研究では東京大学微細構造解析プラットフォームの共同利用機器、電子顕微鏡(JEM-1400:日本電子)を利用し撮影した。グリッド(支持膜付きグリッド Cu400, JEOL)を親水化処理した。1 mg/ml の心筋 β ミオシン 1 μ l と 1 mg/ml の蛍光ロッド 1 μ l を混合した (ミオシン : 蛍光ロッド = 4 : 1 (モル比))。この溶液を 0.5 μ l と 0.1 M CH_3COOK 9.5 μ l を混合し、2 分待った。この溶液を 0.5 μ l と 0.05 M CH_3COOK 9.5 μ l を混合し、2 分待つ。グリッドの上面にミオシンサンプル溶液を 2 μ l 垂らし 1 分待ち溶液を濾紙で吸い取った。ミオシンフィラメントの濃度を上げるため、ミオシンサンプル溶液グリッドに載せるこの行程を 3 回行った。その後、酢酸ウラン溶液をグリッドに垂らしネガティブ染色を行った。上記の要領で作製したグリッドを電子顕微鏡 (JEM-1400:日本電子)で撮影した。図 2-2 F は電子顕微鏡 (JEM-1400:日本電子)によって撮影された合成ミオシンフィラメントの典型的な画像である。電子顕微鏡では分解能が高く、ミオシンフィラメントをはっきり観測することができ、全長の観測が可能である。本研究では、ImageJ でミオシンフィラメント両端を手入力で選択し長さを求めた。

2.1.3.3 2つの顕微鏡から評価したフィラメントの長さの比較

図 2-2 G は蛍光像および電子顕微鏡から評価された合成ミオシンフィラメントの長さのヒストグラムである。蛍光像と電子顕微鏡で評価した人工ミオシンフィラメントの平均の長さはそれぞれ、 $480 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ (mean \pm S.E., $N = 298$), $490 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ (mean \pm S.E., $N = 338$)であり、蛍光像に基づくミオシンフィラメントの長さの推定方法は精度が高いことがわかった。合成ミオシンフィラメントの長さは約 500 nm 程度にピークを迎えているが、1000 nm を超えるミオシンフィラメントも存在していた。本研究ではミオシンの集団的性質を調べるため、なるべく多くのミオシンがアクチンフィラメントと相互作用するように、800 nm 以上の長いミオシンフィラメントを用いて力計測実験を行った。

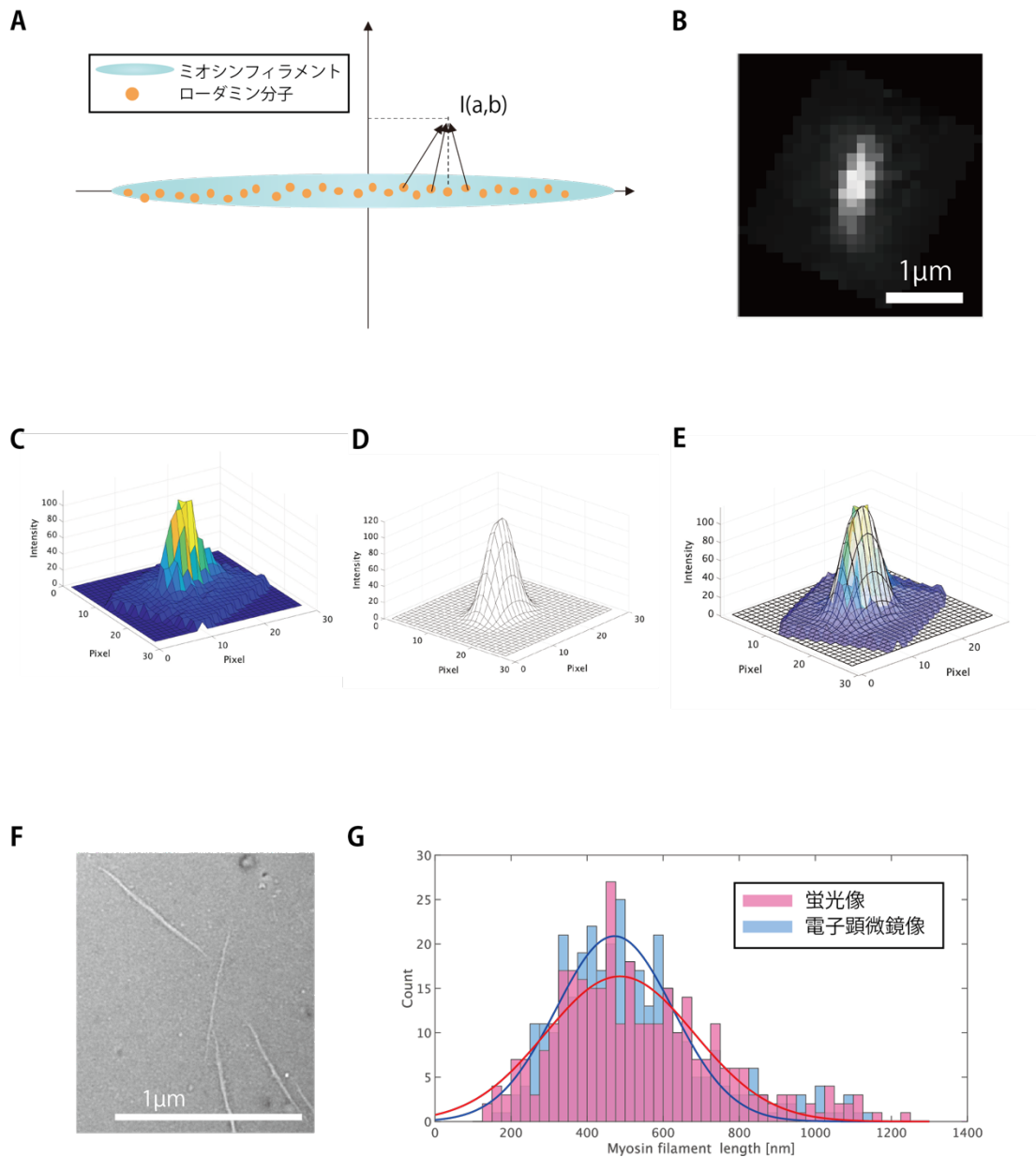


図 2-2 蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で評価した人工ミオシンフィラメントの長さ。(A) 蛍光像からミオシンフィラメントの長さを推定する方法の概要図。ミオシンフィラメントには一様に蛍光体が存在していると仮定する。座標 (a,b) での光の強度 $I(a,b)$ は各蛍光体からの蛍光の重ね合わせとして考え、(2-3) 式で計算できる。(B) 蛍光顕微鏡で撮影された典型的なミオシンフィラメントの蛍光像。スケールバーは $1\ \mu\text{m}$ を表す。(C) (B)の蛍光像を3次元プロットしたもの。(D) (C)のデータを式(2-3)式でフィッティングによって求められた蛍光強度分布を3次元プロットしたもの。(E) 実験データとフィッティングデータを重ね合わせた図。(F) 電子顕微鏡で撮影した合成ミオシンフィラメントの典型的な像。

(図 2-2 続き)スケールバーは 1 μm を表す。(G) 蛍光像 (ピンク)および電子顕微鏡(水色)から評価した合成ミオシンフィラメントの長さのヒストグラム. 赤と青の実線はそれぞれ, 蛍光像または電子顕微鏡のヒストグラムの結果にガウスフィットした時の曲線である. 蛍光像, 電子顕微鏡で評価した人工ミオシンフィラメントの平均の長さはそれぞれ, 480 nm \pm 20 nm (mean \pm S.E., $N=298$), 490 nm \pm 20 nm (mean \pm S.E., $N=338$)となり, 蛍光像でのミオシンフィラメントの長さの推定方法は十分な精度があると考えられる.

2.1.4 G-アクチンの精製

ウサギの速筋線維から作製したアセトンパウダーから, 以下の方法でアクチンを抽出した (Harada et al. 1990). -80°C 冷凍庫に保存してあるアセトンパウダー1 g を取り出し室温で 1 時間放置し, 室温に戻した. 氷の中で冷やしたビーカーに, 室温に戻したアセトンパウダーを入れ, BufferA (2 mM HEPES pH 7.5, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl_2 , 1 mM β メルカプトエタノール)を 20 mL 入れ, スプーンで壁に押し当てながら 5 分間ゆっくり攪拌した後, 攪拌子をスターラーで 30 分間, 回転させ溶液を混合した. 濾過瓶に真空ポンプ, ブフナー漏斗を装着し, ブフナー漏斗に濾紙(No3)を 2 枚置き, 純水を用いて真空を引いた. サンプルを濾紙の上に置き吸引濾過する. 濾液を回収し, 23.3 krpm ($39700 \times g$) 15 分, 4°C で超遠心した (遠心機: HITACHI CP70MX/ローター:P70AT). 上澄み液を回収し, 最終濃度が 0.1 M になるよう KCl を加え, 室温で 10 分待った. 最終濃度が 0.6 M になるよう 3 M KCl を更に加え, 室温で 30 分待った (この時トロポニンとトロポミオシンがアクチンから外れる). 48.1 krpm ($169700 \times g$) 120 分, 8°C で超遠心した (遠心機: HITACHI CP70MX/ローター:P70AT). 沈殿物を G-Buffer (2 mM HEPES pH 7.5, 0.1 mM CaCl_2)で十分に懸濁した. SONICATION (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, Power 6, 1 秒 10 回) をかけた. 透析チューブ(セルロースチューブ: 8/32 (積水メディカル株式会社))に懸濁したサンプルを入れ, 500 ml の G-Buffer で 24 時間透析を行った. この際, アクチンに結合しているイオンが抜け, アクチンが脱重合する. 透析が終わったサンプルに SONICATION (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, Power 6, 1 秒 10 回) をかけ, アクチンの脱重合を促した. 脱重合しなかったアクチンフィラメントを除去するために 100 krpm ($415000 \times g$) 60 min, 4°C で超遠心した. (遠心機: HITACHI CP70MX/ローター:S100AT4). 上澄みを回収し濃度を測定, 分注し, 液体窒素で急速冷凍した後に -80°C 冷凍庫に保存した. 本研究では約 8 mg/ml のアクチンが 1.5 ml 精製できた. SDS-PAGE を行い, アクチンだけが精製されていることを確認した (図 2-3) .

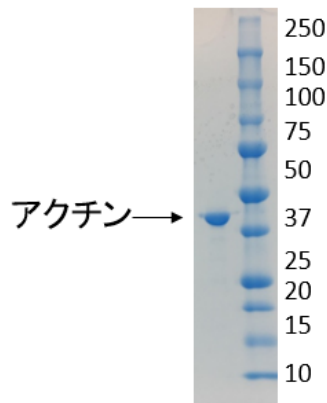


図 2-3 アクチンの SDS-PAGE. アクリルアミドの濃度が 7%~20%のグラディエントゲルを用いて、電気泳動を行った。左のレーンが本研究によって抽出されたアクチン（分子量 42kD）、右のレーンがマーカーである。右の数値はマーカーの分子量（単位:kD）を示す。

2.1.5 ビオチン化アクチンの作製

本研究における心筋 β ミオシン多分子の力計測では 60 pN を超える力を観測するために解離定数が 10^{-15} M という非常に affinity が高いアビジン - ビオチン結合を利用して、ビーズとアクチンを結合させた。以下、ビオチン化アクチンモノマーの作製方法についてまとめる (Takagi et al. 2006)。ビオチンとアクチンモノマーをヨードアセチル反応により結合させた。ヨードアセチル反応は DTT で阻害されることが知られているため、利用するアクチンモノマーは DTT がふくまれていないものを利用する必要がある。-80°C に保存してある 8 mg/ml アクチンモノマーを、Reaction Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂) で 1 mg/ml に薄め、30 分待った。10 mM Iodoacetyl Biotin 水溶液を作る (EZ-Link™ Iodoacetyl-PEG2-Biotin (Thermo Fisher) 1 mg を Reaction Buffer 200 μ l で溶かす)。Iodoacetyl Biotin をアクチン分子のモル比の 10 倍量 (1 mg/ml アクチン 1 ml に対し、10 mM Iodoacetyl Biotin 24 μ l を入れ、室温で暗中に置き 1 時間インキュベートした。最終濃度が 1 mM になるよう DTT を入れた (ヨードアセチルの架橋反応を止める)。100 krpm (415000 \times g) 60 分、4°C で超遠心し、アクチンフィラメントを沈殿させた (遠心機: HITACHI CP70MX / ローター: S100AT4)。その後、沈殿物を G-Buffer で十分に懸濁した。SONICATION (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, Power 6, 1 秒 10 回) をかけた。透析チューブにサンプルを入れ、500 ml の G-Buffer で 24 時間透析した (この際、アクチンに結合しているイオンが抜け、アクチンが脱重合する)。その後、SONICATION (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, Power 6, 1 秒 10 回) をかけ、脱重合しなかったアクチンフィラメントを除去するために 100 krpm

(415000×g) 60 分, 4°Cで超遠心した(遠心機:HITACHI CP70MX/ローター:S100AT4). 上澄み液を回収し濃度を測定, 分注し, 液体窒素で急速冷凍した後に-80 °C冷凍庫に保存した. 本研究ではこの手法で 2.3 mg/ml のビオチン化 G-actin が 300 µl 精製できた.

2.1.6 蛍光アクチンフィラメントの作製

本研究で用いたアクチンフィラメントは全て, 下記の要領で Rhodamine-Phalloidin を用いて染色した. -80 °C冷凍庫に保存してあるモノマーアクチン stock を F-buffer (10 mM PIPES pH 8.0, 100 mM KCl, 1 mM DTT)で 0.21 mg/ml になるように希釈し 2 時間待った. ビオチン化アクチンフィラメントを作製する際は, ビオチン化モノマーアクチンを目的の量を加えた. その後, メタノールに溶かした 100 U Rhodamine-Phalloidin 3 µl, F-Buffer 13.6 µl 加え室温で一晩待待つことで蛍光染色されたアクチンフィラメントを作製することができた.

2.1.7 アビジンビーズ, ゲルゾリンビーズの作製

400 µm ビーズ: 50 µl, 50 mM MES (pH 5.0) : 150 µl, 50 mg/ml EDC (in 50 mM MES (pH 5.0)): 50 µl を 1.5ml チューブに入れて, 15 分, 25°Cで待った. 110 mg/ml sulfo-HNS (in 50 mM MES (pH 5.0))を 25 µl 入れて 10 分 25°Cで待った. 15 krpm (20400 ×g), 16 分, 25 °C で遠心し (遠心機:TOMY MX-301), 沈殿物を 0.1 M HEPES (pH 7.8) 200 µl で懸濁した. Sonication (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, power 9, 1 秒×10times)して顕微鏡で確認した. ビーズ同士が凝集していたら sonication を繰り返した. アビジンビーズ作製の際は 10 mg/ml NeutrAvidin in 100 mM HEPES (pH 7.8) 150 µl を加え 45 分, 25°Cで待ち, ゲルゾリンビーズを作製する際はゲルゾリン-actin 複合溶液 (0.16 mg/ml ゲルゾリン, 0.08 mg/ml G-actin, 0.75 mg/ml BSA, 100 mM HEPES (pH 7.8))を 160 µl 入れ 4 時間待った (Suzuki et al. 1996). その後タンパク質とビーズの反応を止めるために, 50 mg/ml BSA を 50 µl を加えて 30 分, 0 °Cで待った. Sonication (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, power 9, 1 秒×10 times)して顕微鏡で確認した. ビーズ同士が凝集していたら sonication を繰り返した. 新しい 2 mg/ml のカゼインでコーティングしたチューブに移し, 15 krpm (20400 ×g), 8 分, 25 °Cで遠心した(遠心機:TOMY MX-301). 沈殿物を 0.6 M KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA で懸濁し, Sonication (ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-50 SMT company, power 9, 1 秒×10 times)して顕微鏡で確認した. ビーズ同士が凝集していたら sonication を繰り返した. 新し

い 2mg/ml のカゼインでコーティングしたチューブに移し 15 krpm (20400 ×g), 8 分, 25 °C で遠心した(遠心機 : TOMY MX-301). 沈殿物を 0.6 M KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA で懸濁し, 新しい 2 mg/ml のカゼインでコーティングしたチューブに移し 15 krpm (20400 ×g), 8 分, 25 °C で遠心した(遠心機 : TOMY MX-301). 沈殿物を 0.3 M KCl, 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA で懸濁し, 液体窒素で急速冷凍した後に -80 °C 冷凍庫に保存した. この手法で作製したゲルゾリンビーズをアクチンフィラメントと結合させるためには, ゲルゾリンビーズ 5 μl と Rhodamine-Phalloidin で蛍光標識された 100 μM アクチンフィラメント 5 μl を混合し, 一晩待した. 本研究ではゲルゾリンビーズとアクチンフィラメントを結合させたのち, 1 週間以内のビーズ -アクチンを 1 分子実験に用いた.

2.1.8 グルタルアルデヒドコーティングガラスの作製

グルタルアルデヒドコーティングされたガラスは Nicholas らの方法で作製した(Nicholas, Rao and Gennerich 2014). 24 mm × 32 mm スライドガラスをプラズマ洗浄した(PLASMA CLEANER PDC-32G : HARRICK PLASMA). その後, アミノシランの試薬の原液 (LS-3150 信越化学)を 25 μl ガラス面に垂らし, もう一枚のガラスで溶液を挟み, ガラス面全体をアミノシランでコーティングした. 45 分間常温で待ったのち, 純水で洗い落とした. その後, ブロワーでガラス表面の水分を取り除いたのち, 20 %グルタルアルデヒド原液 (Wako) を, アミノシランがコーティングされた面に垂らし, もう 1 枚のアミノシランでコーティングされたガラスで挟み 30 分待った. その後純水できれいに洗い流し, 純水中で保存した. 力計測の際は, 当日の朝純粋中に保存しているガラスを取り出し, ブロワーでガラスについた水分をなくし, グルタルアルデヒドコートしたガラスとして利用した.

2.2 *In vitro* motility assay

後述する力計測ではミオシンフィラメントを実験に用いたため, *In vitro* motility assay は一般的なミオシン分子をガラス面に固定させる方法ではなく(Kron and Spudich 1986), ミオシンフィラメントをガラス面に固定させてアクチンの滑り速度を算出した.

24 mm × 32 mm ガラスおよび 18 mm × 18 mm のガラスをプラズマ洗浄した. 図 2-4 のように 24 mm × 32 mm ガラスに厚さ 10 μm の両面テープ 2 枚を平行に貼り, その上に 18 mm × 18 mm のガラスをかぶせチャンバーを作った. チャンバーに Motility Buffer(1 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, 20 mM PIPES pH 7.2 :以下 MB と略す)で希釈した 0.2 mg/ml のカ

ゼインを流し入れた。その間、1 mg/ml の濃度の心筋 β ミオシン 1 μ l と 0.1 M KCl を 4 μ l 混ぜ 2 分 on ice で待ったのち 0.05 M KCl を 5 μ l 混ぜ 2 分 on ice で待つことで、ミオシンフィラメントのサンプルを作製した。チャンバーを MB で洗い流した後、ミオシンサンプルを流し入れ、2 分待った。蛍光標識されたアクチンフィラメント(約 25 μ M)を 500 倍希釈し、チャンバーに流し入れ 2 分待った。目的の濃度の ATP と蛍光退色を防ぐための脱酸化剤 (20 mM Glucose, 20 μ g/ml Catalase, 100 μ g/ml Glucose Oxidase, 140 μ M 2-mercaptoethanol (β))と 0.2 mg/ml のカゼインが含まれる MB をチャンバーに流し入れ、アクチンが滑る様子を蛍光顕微鏡で撮影した(図 2-4 D)。本実験では 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M の ATP 濃度で実験を行った。アクチンの滑り速度はアクチンの先端をソフトウェア (Mark2)を用いて追跡し、移動距離と移動時間から計算した。

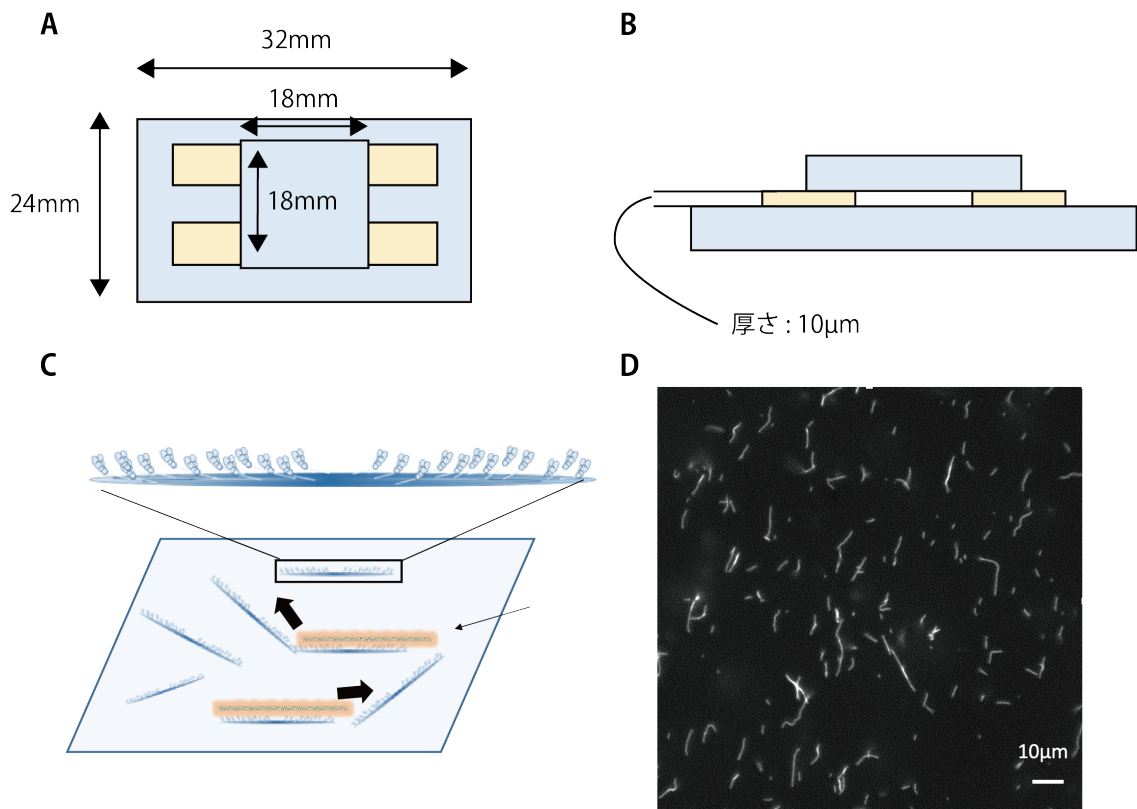


図 2-4 *In vitro* motility assay の概要図. (A-B) 本研究における *In vitro* 実験で用いたチャンバーの模式図 (A) チャンバーの上面図. 両面テープ(黄色)を 24 mm×32 mm ガラスお

よび 18 mm×18 mm のガラス(水色)で挟み込み, チャンバーを作製した. (B) チャンバーン側面図. 本研究では 10 μm の厚さの両面テープを用いた. 2 枚のガラス間に生じた空間にタンパク質やビーズを流し入れ, *In vitro* 計測を行った. (C) *In vitro motility assay* の概要図. 本研究では重合した心筋 β ミオシンフィラメントが滑らせるアクチンフィラメントを蛍光観測した. (D) *In vitro motility assay* の実験時の蛍光画像(bar=10 μm).

2.3 実験装置

2.3.1 光ピンセット装置

心筋 β ミオシンフィラメントの多分子・1分子計測に用いた装置の概要図を図 2-5 に示す (Kaya et al. 2017). 本装置ではサンプルの上下に 2 つの対物レンズが設置されており, 下の対物レンズは, 532 nm, 690 nm, 1064 nm レーザーの入射, および蛍光用に使用し, 上の対物レンズはビーズの散乱像を 4 分割フォトダイオードに投影するために使用した. 532 nm の Green Laser は蛍光物質を励起するために使用し, このレーザーにより発生した蛍光像は下の対物レンズを通して Electron Multiplying CCD カメラ(EM-CCD カメラ 512×512 ピクセル, Andor)に投影した. 690 nm の Red Laser はトラップしたビーズに斜光照明させ, その散乱光を上部に取り付けられた対物レンズを通して四分割フォトダイオードに投影するために使用した. 1064 nm のレーザーはビーズをトラップするために使用した. 1064 nm のレーザー強度は外部制御可能であり, レーザー強度を変更することによって光ピンセットのトラップ stiffness を多分子実験と 1 分子実験で調整した. また, 1064 nm レーザーの光路にピエゾ素子で角度を調整できるミラーを設けることで, トラップ位置を電子制御可能にした.

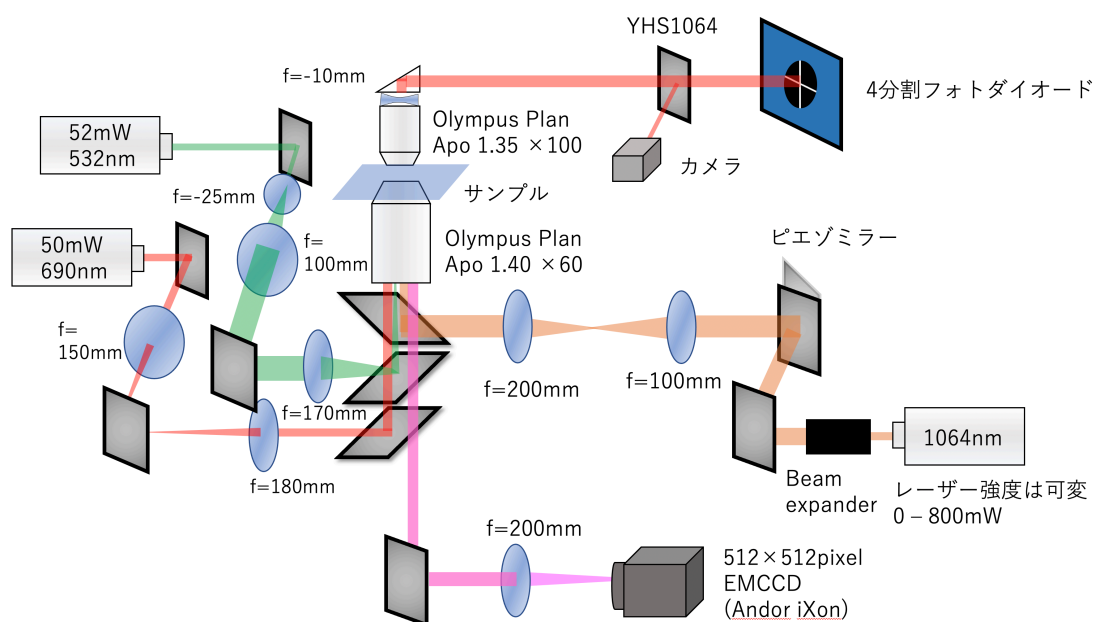


図 2-5 光ピンセット装置の概要図.

2.3.2 trap stiffness の評価

ミオシン多分子・1分子実験では直径 400 nm のビーズを用い, 1064 nm レーザーの強度を変更することで trap stiffness を調整した. 光ピンセットの trap stiffness と時間分解能の評価は, タンパク質や塵などのノイズになる要素のない純水中において, 直径 400 nm のビーズをトラップした時のビーズの揺らぎから求めた. 実験方法や trap stiffness の評価方法を以下に示す. プラズマ洗浄したガラスを用い, 図 2-4 の要領でチャンバーを作製し, 純水で薄めたビーズを流し入れた. 直径 400 nm のビーズを 1064 nm レーザーでトラップした. ビーズの変位から光ピンセットの trap stiffness (K_{trap})は以下のように求めた. 光ピンセットがビーズを捉える力は線形近似できるので (Svoboda and Block 1994a, Svoboda and Block 1994b), 結合したビーズのエネルギー等分配則を考えると

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}K_{trap} \langle x^2 \rangle \quad (2-4)$$

が成立する. ここで, k_B はボルツマン定数を意味する. x はトラップ中心からの距離であるから

$$\langle x^2 \rangle = S.D.^2 \quad (2-5)$$

と書き換えると trap stiffness は

$$k_{trap} = \frac{K_B T}{S.D.^2} \quad (2-6)$$

と表すことができる.

本研究では trap stiffness と 1064 nm のレーザー強度の関係を調べるために、一定時間ごとに 1064 nm レーザーの出力の設定値を変化させ、その時のトラップされたビーズの変位を計測した(図 2-6 A, B). 1064 nm のレーザー強度が減少するに従い、ビーズの変位のばらつきが大きくなっていった (図 2-6 A, B). trap stiffness は 1064 nm のレーザー強度の増加に伴い線形的に増加していた (図 2-6 C). 100 mW 以下では近似曲線は負の値を示すが、これは 1064 nm のレーザー素子が 100 mW 以下の設定値ではレーザーを発しないことが原因だと考えられる. ミオシン多分子の力計測では、1064 nm レーザーは 800 mW を用いており、trap stiffness は 0.28 pN/nm と見積もった. また、1 分子計測には校正曲線を基に、レーザー強度を調整することで trap stiffness を 0.05-0.1 pN/nm で実験を行った.

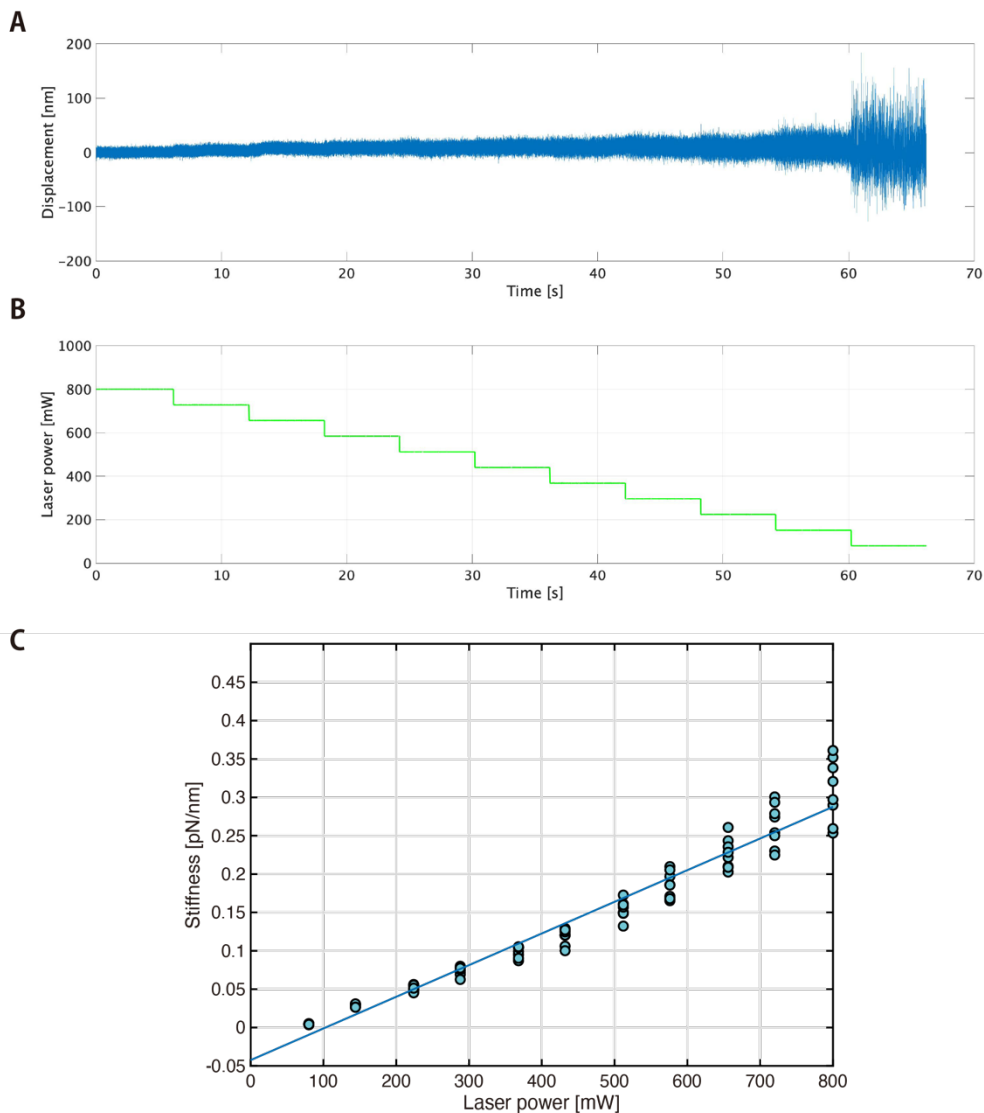


図 2-6 光ピンセットによる trap stiffness 計測. (A-B)6 秒間隔で 1064 nm のレーザー強度変更した時のビーズの変位 (A)と、1064 nm レーザーの強度 (B). (C) 1064 nm のレーザー

強度と trap stiffness の関係. 丸い点は実際に測定した個々のビーズの結果 ($N=8$ for each laser power) を意味し, 直線は近似直線である.

2.3.3 光ピンセット装置の時間分解能

光ピンセット装置の時間分解能はトラップビーズの変位のパワースペクトラムから評価することができる. トラップされたビーズに線形的な復元力が働くと仮定すると, パワースペクトラム PSD は周波数 f の関数として以下の様に表現できる.

$$PSD(f) = \frac{\varphi_0}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^2} \quad (2-7)$$

ここで $\varphi_0 = \frac{2K_B T \gamma}{k^2}$ であり, γ と k はそれぞれ粘性係数と trap stiffness を意味する. また, $f_c = \frac{k}{2\pi\gamma}$ はコーナー周波数と呼ばれている. トラップビーズの変位のパワースペクトラムを実験から求め, (2-7)式でフィットさせることでコーナー周波数を評価することができ, コーナー周波数を用いることで, 装置の時間分解能は

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_c} \quad (2-8)$$

で評価することができる (Howard 2000).

多分子実験と 1 分子実験ではそれぞれ 1064 nm のレーザー強度を 800 mW (trap stiffness = 0.28 pN/nm) と 240 mW (trap stiffness = 0.05 pN/nm) をそれぞれ主に用いていたので, その際の時間分解能をパワースペクトラムから求めた (図 2-7). レーザーパワーが 800 mW の時, コーナー周波数は 9080 Hz と見積もられ, この時の時間分解能は 18 μ s と評価した. また, レーザーパワーが 240 mW の時, コーナー周波数は 1890 Hz と見積もられ, この時の時間分解能は 80 μ s と評価した.

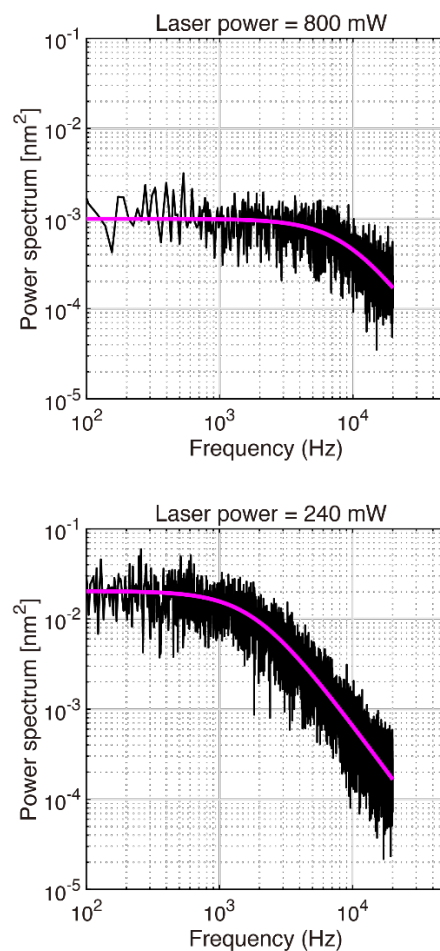


図 2-7, 1064 nm のレーザー強度を 800 mW にした時 (上)と 240 mW にした時 (下)のビーズ変位のパワースペクトラム(黒)とローレンツ関数でフィットした曲線 (ピンク).

2.3.4 ピエゾミラーにかかる電圧とトラップ位置の関係

本研究で用いた光ピンセット装置において, 1064 nm レーザーの光路上にピエゾミラーを配置することで, 光ピンセットのトラップ位置を電子的に制御できる様にした (図 2-5). そこで, ピエゾ素子に与える電圧とトラップ位置の関係をしらべるため, 2-3-2 節の実験と同様に純水中でビーズをトラップし, ピエゾ素子にかかる電圧とビーズの位置の同時計測をした (図 2-8). 1 分子実験では, トラップ位置を急速に変位させるため, ピエゾ素子に矩形的な電圧を与えた (図 2-8 B,C). しかし, 電圧の急激な変化後, 電圧は一定であるが, トラップの中心はゆっくりと変位し続ける結果が得られた (図 2-8 B,C). これはピエゾ素子にステップ状の電圧を与えた時, ゆっくりとピエゾ素子が変形するクリープ現象に由来すると考えられる.

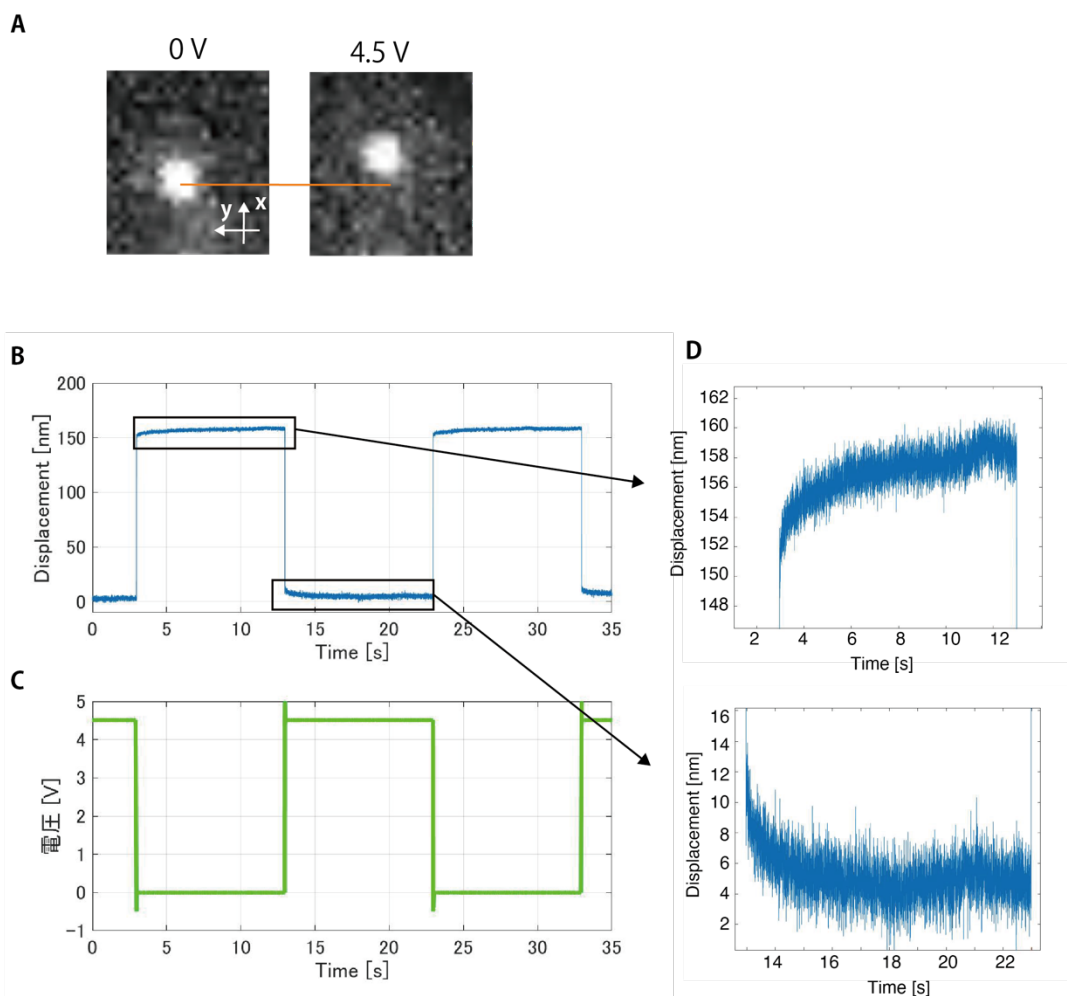


図 2-8 ピエゾ素子にステップ状の電圧を与えた時のトラップ中心の変位 . (A)ピエゾ素子に電圧をかけていない時のトラップビーズ (左)と 4.5 V の電圧をかけた時のビーズの蛍光像. ピエゾに 4.5 V を与えた時, 0 V での位置 (オレンジの線)からビーズが移動したことがわかる. 本研究では縦方向を x 軸, 横方向を y 軸に設定し, 個々の軸の変位を測定した. (B) トラップしたビーズの x 軸方向の変位. (C) ピエゾ素子に与えた電圧. (D) (B)で四角で囲った部分を拡大した図.

そこで本研究ではピエゾに与える電圧を

$$h_1 * e^{-\frac{T}{\tau}} + h_0 \quad (2-9)$$

の指数関数に従うように時間と共に変化させ (図 2-9 B), ピエゾ素子のクリープ現象を打ち消した. ここで, h_0 はベース電圧, h_1 , τ はクリープ現象を打ち消すために導入した指数関

数の比例定数と時定数であり，それぞれ $h_1 = 0.2 \text{ V}$ ， $\tau = 300 \text{ ms}$ とした時，クリーブ現象を打ち消すことができた (図 2-9 (A)).

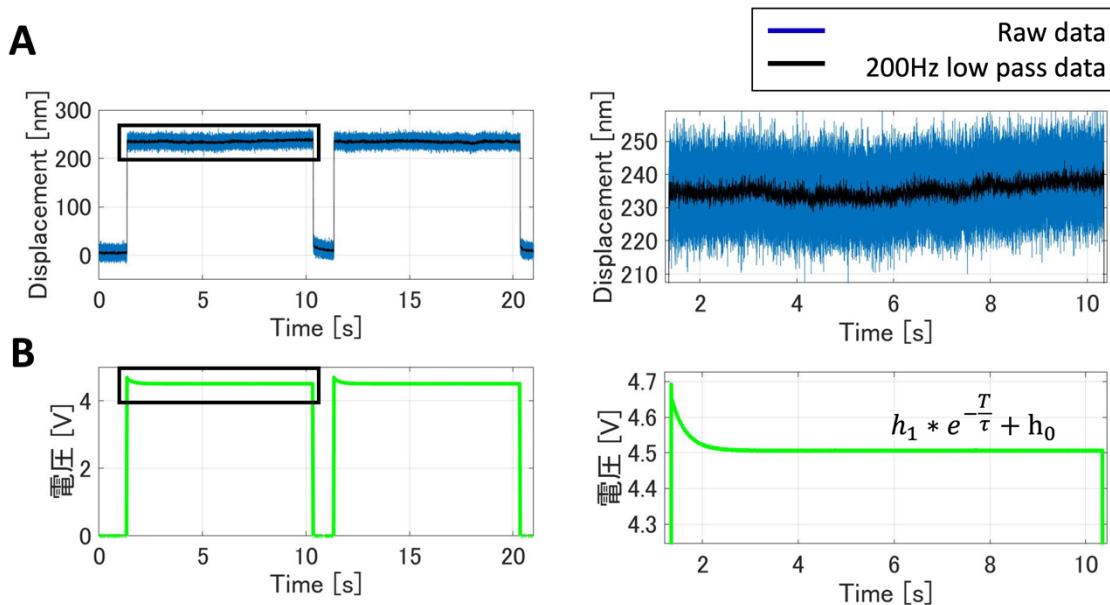


図 2-9 1 分子実験の際に piezoelectric 素子に実際与えた電圧波形とその際にビーズトラップされたビーズの変位。(A) piezoelectric 素子に電圧をかけた時のビーズの x 軸方向の変位の概要図 (左) と四角で囲った部分の拡大図 (右)。青い線は生データであり，黒い線は 200 Hz の low pass を通した時のデータである。(B) piezoelectric 素子にかけた電圧の概要図 (左) と四角で囲った部分の拡大図 (右)。piezoelectric 素子のクリーブ現象を打ち消すために，指数関数的な電圧を与えた。

h_0 はビーズの変位量を制御するパラメーターであり，piezoelectric 素子に与える電圧 (h_0) を 0.5 V ごとに変化させた矩形波状の電圧 (図 2-10 B) を与え，その時のトラップ位置の変位量と h_0 の関係をもとめた (図 2-10)。piezoelectric に与えた電圧に比例して，ビーズが変位していることがわかった (図 2-10 C)。電圧と変位量を線形近似すると

$$D_x = 58.6 V - 11.6 \quad (2-10)$$

$$D_y = 3.2 V - 2 \quad (2-11)$$

となった。ここで V は piezoelectric にかけた電圧， D_x, D_y はそれぞれ， x 軸， y 軸の変位量 (nm) の近似直線を意味する。 Y 軸への変位量は X 軸の変位量に対し，約 1/20 しかないため，本研究では piezoelectric ミラーによる Y 軸の変位は無視することにした。

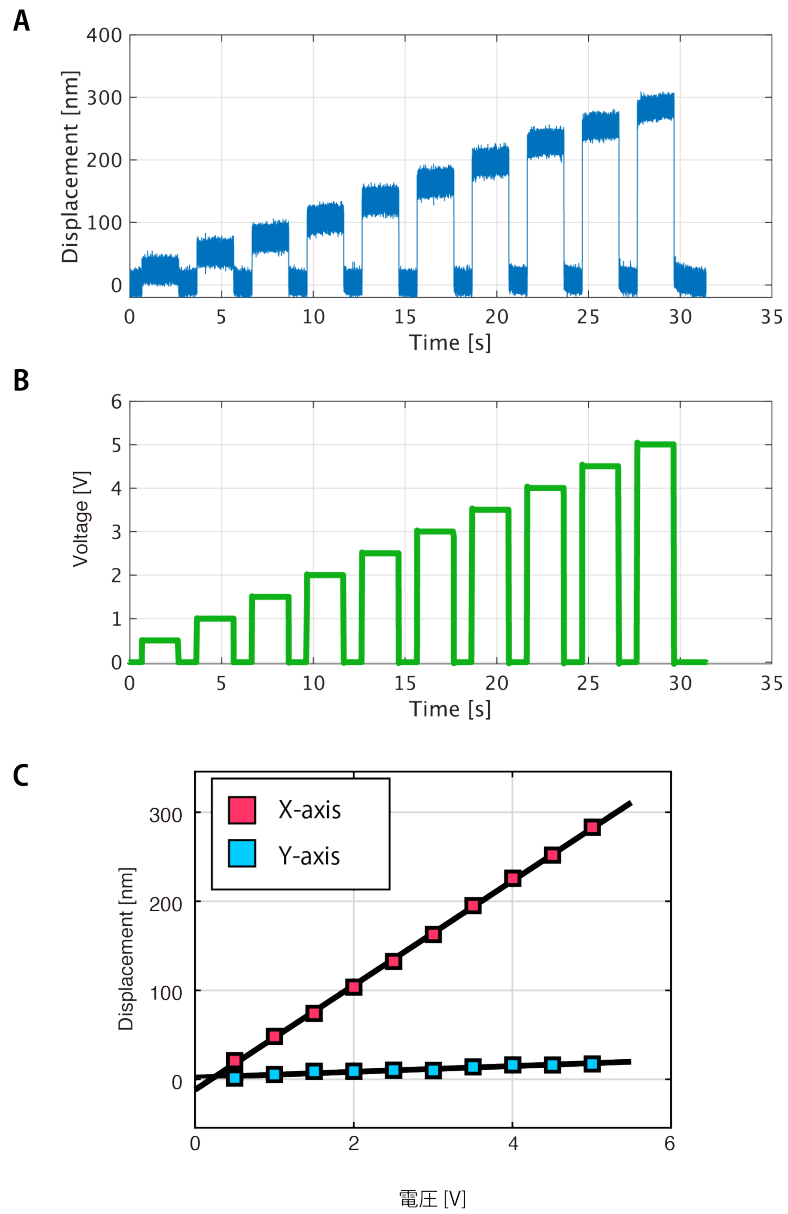


図 2-10 ミラーに設置したピエゾ素子にかかる電圧値 (h_0)とビーズの移動距離の関係.
 (A) ピエゾに電圧をかけた時のトラップビーズの x 軸方向の変位. (B) ピエゾに与えた電圧.
 (C) ピエゾに与えた電圧と変位量の関係.

2.4 実験方法

2.4.1 ミオシン多分子の力計測方法

当研究室で速筋ミオシンフィラメントの力計測に用いられた方法で心筋 β ミオシンフィラメントの力を計測した(Kaya et al. 2017). 0.6 M KCl で 0.2 mg/ml に薄めたミオシン 8 μ l と 0.6 M KCl で 0.2 mg/ml に薄めた蛍光ロッド 1 μ l を混合させたミオシンサンプルを作製した (ミオシンロッドの分子量は約 25,000 であり, ミオシンの分子量は約 50,000 とミオシンロッドの 2 倍なので, この分量で混合したときのミオシンと蛍光ロッドのモル比はミオシン:ロッド=4:1 となる). プラズマ洗浄したガラス(18 mm \times 18 mm と 32 mm \times 24 mm の大きさのガラス)と 10 μ m の両面テープを用いてチャンバーを作った. チャンバーに MB で薄めた 0.2 mg/ml のカゼインを流し入れた. ミオシンフィラメントを作製するためにミオシンサンプル 0.5 μ l と 0.1 M KCl 9.5 μ l を混合し, 2 分待った(この溶液名を A とする). その後 A を 0.5 μ l と 0.05 M KCl 9.5 μ l を混合し, 2 分待つことでミオシンフィラメントのサンプルを作製しチャンバーに流し入れ, 2 分待った. その後, MB でチャンバーを洗い流したのち, 400 nm アビジン化ビーズ, 2 nM ビオチン化アクチンフィラメント, 1 mM または 10 μ M ATP, および脱酸化剤 (20 mM Glucose, 20 μ g/ml Catalase, 100 μ g/ml Glucose Oxidase, 140 μ M 2-mercaptoethanol (β))と 0.2 mg/ml のカゼインを含んだ MB を流し入れた後, チャンバーの乾燥を防ぐためにマニキュアでチャンバーに封をした. 上記の要領で作製したチャンバーを光ピンセット装置にのせ観察すると, ガラスに張り付いたミオシンフィラメント, 水溶液中を浮遊するビオチン化アクチンフィラメント, アビジン化ビーズの蛍光像が観測できた. ビーズを光ピンセットでトラップし, アクチンとぶつけることでアクチンとビーズを結合させた. その後, 力計測に用いる長いミオシンフィラメントを選び, フィラメントの長さ評価のため蛍光像を撮影した. 実験では, アクチンフィラメントによるコンプライアンスの影響を極力減らしたかったので, ビーズとミオシンフィラメントの距離を 1000 nm 程度と短くした. この際, ビーズの半径 (200 nm) はミオシンフィラメントの高さ (~30 nm)より高いため, ミオシンフィラメントの先端でアクチンが折れ曲がることが予想される (図 2-11). その角度 ϕ を見積もると

$$\phi = \tanh\left(\frac{200 - 30}{1000}\right) \sim 9^\circ \quad (2-12)$$

となった.トラップされたビーズに 690 nm のレーザーを斜光照明し, その散乱光成分を上
の対物レンズで収集し 4 分割フォトダイオードへ投影することで, ビーズの変位を 50 μ s
のサンプリングレートで計測した (図 2-11).

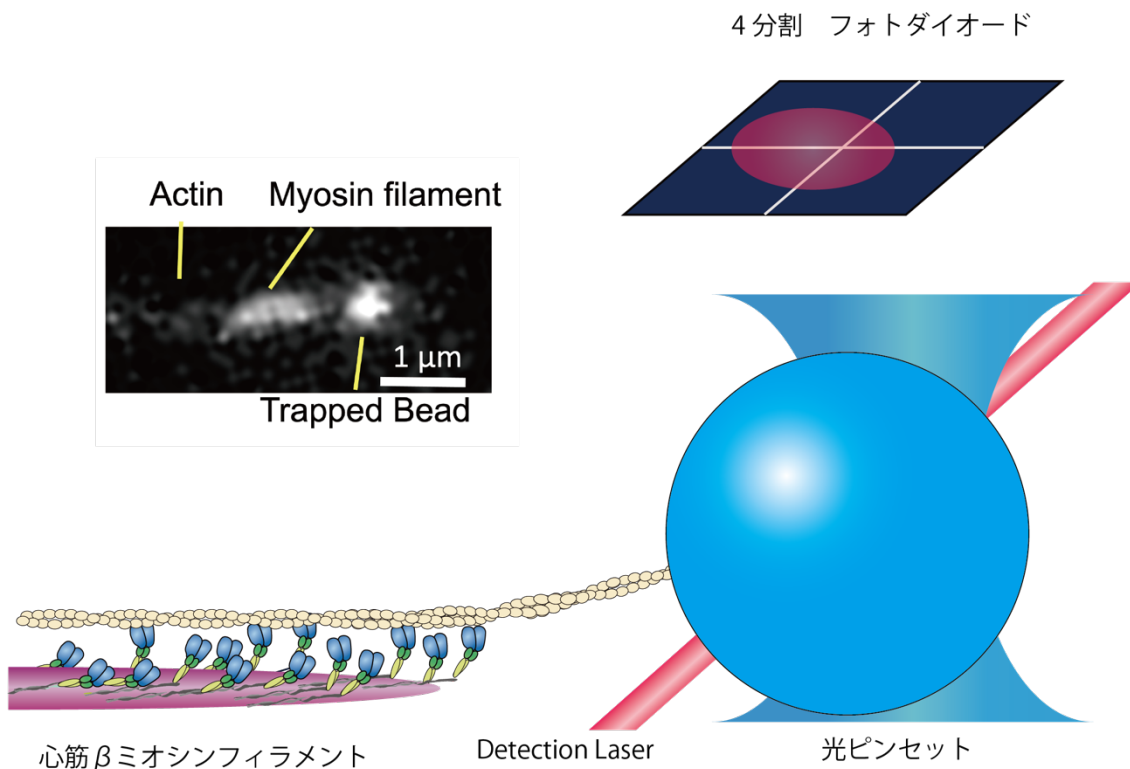


図 2-11 力計測実験概要図. ミオシンフィラメントが発生する力を光ピンセットを用いて計測した. ビーズの変位は4分割フォトダイオードを用いることで $50 \mu\text{s}$ のサンプリングレートで計測した. (内挿図)力計測実験中のミオシンフィラメント, アクチンフィラメント, ビーズの蛍光像. スケールバーは $1 \mu\text{m}$ を表す.

2.4.2 アクチンと相互作用するミオシン分子数の評価

心筋 β ミオシンフィラメント上において, アクチンフィラメントと相互作用できるミオシン分子数を調べるために, ミオシン分子をアクチンフィラメントから破断させる実験をおこなった (Kaya and Higuchi 2010). 力計測実験と同様のチャンバーを作製し, ミオシンとアクチンが相互作用できる実験系を作製した. ミオシンとアクチンを強結合させるために, 最後に流し入れる溶液には ATP を加えなかった. 力計測実験ではミオシンとロッドの混合比を4:1にしていたが, この条件では相互作用分子数が多くほぼ同時に破断する分子が存在し, 各ミオシン分子の破断を区別することが困難な可能性があったため, 分子数計測実験ではミオシンとロッドの混合比を1:7にまで下げることで各ミオシンの破断をはっきりと区別できるように工夫した. ATP 非存在下において, ミオシンとアクチンの相互作用を確

認した後、ビーズをほぼ真上に引っ張ることでミオシン分子がアクチンから解離するのを促すとともに、ミオシンの再結合を防止した (図 2-12). ビーズの波形が 5 ms 以内に 15 nm 以上変位したイベントの回数をミオシン分子の個数と仮定し、アクチンに結合するミオシン分子数を見積もった. この手法では, 図 2-12 に示すように, アクチンをマイナス端方向に滑らせる正しい向きに配置したミオシン (図では右側の 2 分子) と逆向きに配置したミオシン (左端のミオシン 2 分子) の両方の分子数をカウントすることになる. 従って実際の推定では, 見積もった分子数の半分が正しい向きに配置したミオシンとした (3.2 節).

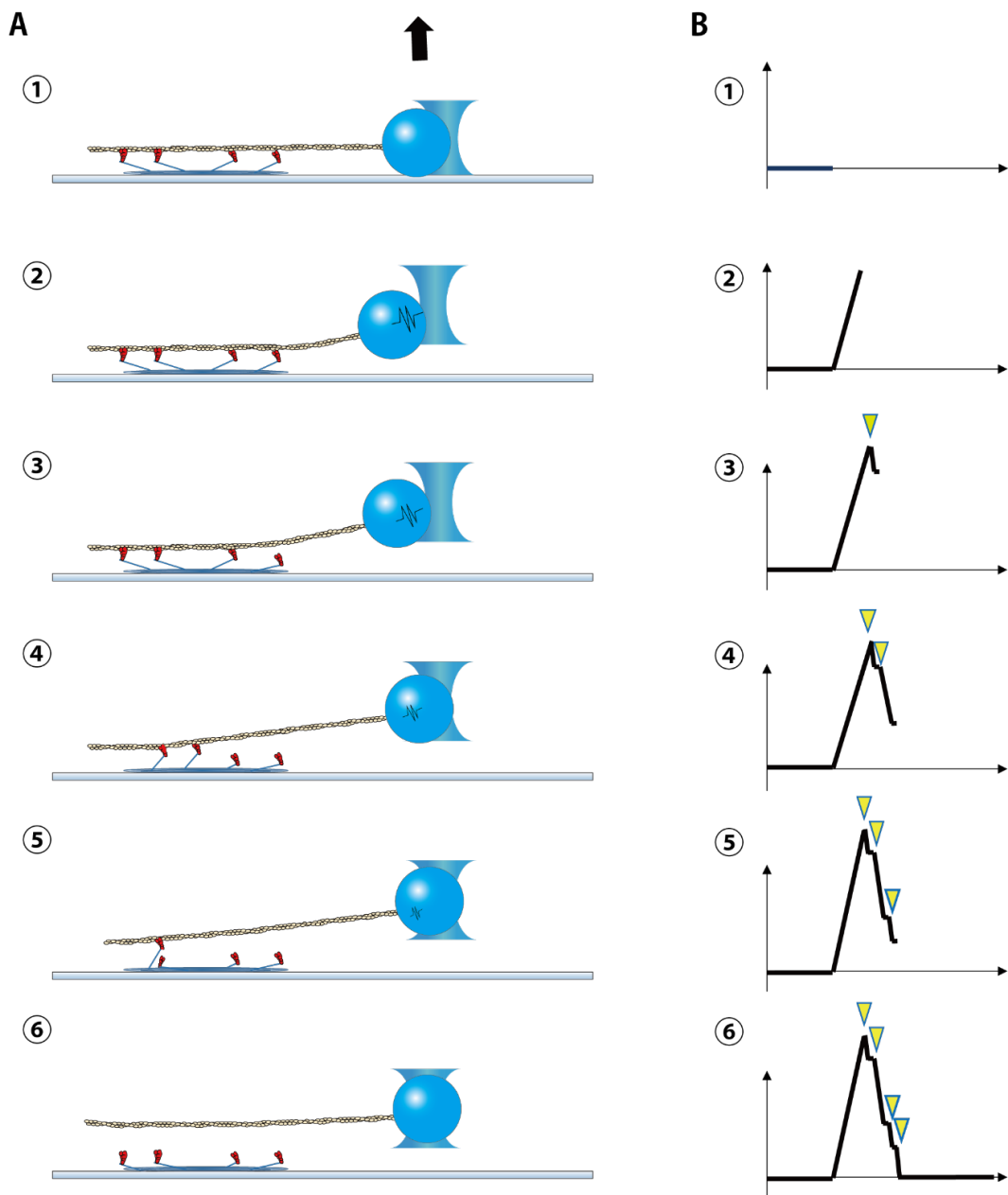


図 2-12 分子数測定実験の概要図と予想されるビーズの変位。(A) 実験の概要図。実験は①から⑤の順序で行った。①溶液中には ATP が存在していないため、ミオシンはアクチンフィラメントと強く結合している。②ビーズを斜め上に上げることでミオシンに負荷を与える。②～⑥ミオシンがアクチンから解離する。(B) 予想されるビーズの変位。ミオシンがアクチンから解離するたびに、ビーズはトラップ中心に向かうので、ビーズの変位はステップ状になると期待される。黄色の矢じりはミオシンがアクチンフィラメントから解離したタイミングを示す。

2.4.3 1 分子実験の方法

1 分子実験において、ガラスをグルタルアルデヒドでコーティングしてミオシンフィラメントとガラス面を化学結合で固く結合させることでノイズを極力減らす工夫をした。心筋 β ミオシンと蛍光標識した心筋ロッドの比を 1:1500 とすることで、最大でミオシン 1 分子がアクチンフィラメントと相互作用できる状態にした (図 2-13)。また、ゲルゾリンビーズを用いることで、常にアクチンのプラス端がビーズと結合するようにした (Suzuki et al. 1996)。具体的な方法として、心筋 β ミオシン : 心筋ロッドの混合モル比が 1:1500 となるように心筋 β ミオシンとロッドを混合した(この溶液名を B とする)。グルタルアルデヒドコートしたガラスを用いて、多分子実験と同様にチャンバーを作製した。そこへ 0.05 mg/ml のカゼインを流し入れ 2 分待つ。B 0.5 μ l と 0.1 M KCl 9.5 μ l 加え 2 分待ち(この溶液名を C とする)、C 0.5 μ l と 0.1 M KCl 9.5 μ l 加え 2 分待ちミオシンフィラメントを作製した。ミオシンフィラメントをチャンバーに流し入れ 2 分待った後、0.2 mg/ml カゼインで洗い流した。その後アクチンフィラメントと結合したゲルゾリンビーズ、1 mM ADP, 脱酸化剤, 10 U ml⁻¹ ヘキソキナーゼ, 5 mM MgSO₄, x ($= 0, 1, 5, 10$) mM Pi, (20 - x) mM PIPES を加え、マニキュアで封をした。ここで、PIPES の濃度は Pi の濃度に合わせて変化させることでイオン強度一定に保った。また、1 分子実験ではミオシンとアクチンの強結合を維持するために ATP を入れず、ヘキソキナーゼを入れることでコンタミした ATP が存在していても ADP に加水分解させた。1 分子実験では 1064 nm のレーザー強度を変更することで trap stiffness を 0.05 pN/nm~0.1 pN/nm に調整した。一度ミオシンとアクチンが相互作用していることが確認できると、ピエゾミラーの角度を急速に変化させることでミオシンを引っ張って負荷をかけ、その際のミオシンヘッドの動きをビーズの変位を通して計測した。計測の前後にアクチンと相互作用しているミオシンの分子数が 1 分子であることを確認するために、ビーズを上方向に変位させ、破断が一度しか起きないことを確認した。

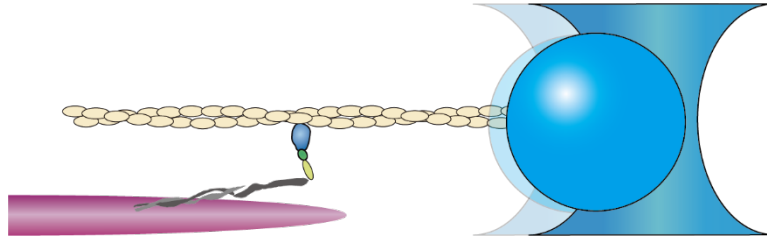


図 2-13 1分子実験の概要図. 1分子実験では, トラップの位置をピエゾミラーの角度を調整することで急激に変化させ, ミオシンをひっぱり負荷を与えた. ミオシン に負荷が与えられた時のミオシンヘッドの変位をビーズの変位を通して観測した.

2.4.4 心筋 β ミオシン 1 分子が引っ張られた時の負荷とノイズレベルの関係

ミオシン 1 分子実験において, ミオシンにかかる負荷とノイズ(ビーズ変位の標準偏差)の関係を調べるために, ステップが生じなかった no nucleotide の溶液条件で, 心筋 β ミオシン 1 分子がアクチンフィラメントと相互作用している時の負荷と, ノイズの関係を調べた(図 2-14). その結果, ノイズは負荷が増加するに伴い減少していることが判明した(図 2-14). 特に, 負荷が 7 pN を超えると, 標準偏差が 1.8 nm 以下になり, 最大で 1.4 nm まで減少した(図 2-14 C).

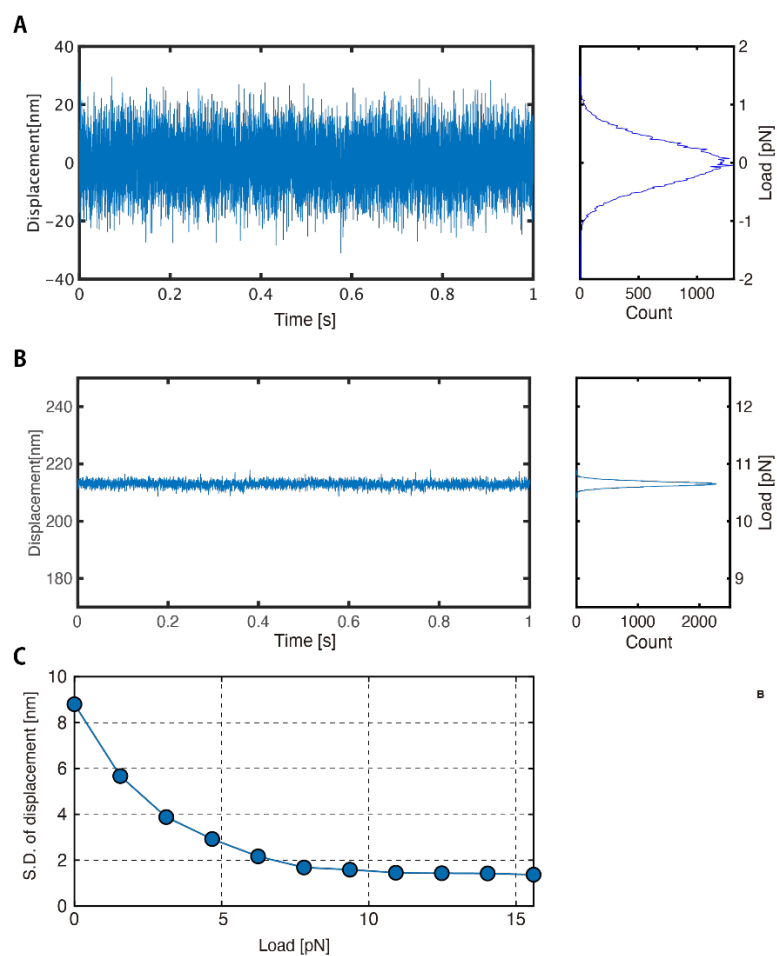


図 2-14 1分子実験でのノイズレベル (ビーズ変位の標準偏差)と負荷の関係. (A-B) ステップが生じない no nucleotide の溶液条件でミオシン1分子がアクチンと相互作用している時のビーズ変位. (A) ゼロ負荷でのビーズの変位 (左)と変位のヒストグラム (右). (B) 11 pN 程度の負荷でのビーズの変位 (左)と変位のヒストグラム (右). (A), (B)の縦軸のスケールは同じである. (C) 負荷とノイズレベルの関係.

2.5 解析手法

2.5.1 ステップを抽出するアルゴリズム

2.5.1.1 ミオシン多分子実験におけるステップ抽出アルゴリズム

力計測実験で得られたビーズの変位データは典型的にステップ状に変化しているため, Step Finding Algorithm を用いて個々のステップを抽出した. Step Finding Algorithm とは, ノイズの入ったステップ状のシグナルから, 真のステップシグナルを予測するアルゴリズムである. Step Finding Algorithm はいくつかの種類 (Carter 2005, Carter 2008, Vershinin and Gross 2008, Hua et al. 1997, Sadler 1999, Kerssemakers et al. 2006)が提案されているが, 本研究では, 速筋フィラメントの力発生のステップ抽出 (Kaya et al. 2017)で利用されていた Kerssemakers らの step finding algorithm (Kerssemakers et al. 2006)を用いることで step finding algorithm の違いによる差がないようにした. 図 2-15 は人工的に作製したステップデータ(図 2-15 緑)にランダムガウスノイズを足し合わせたシグナル(図 2-15 青)から step finding algorithm が推測した step(図 2-15 赤)を表示している. Step finding algorithm はステップ状のシグナルを抽出できていることがわかる.

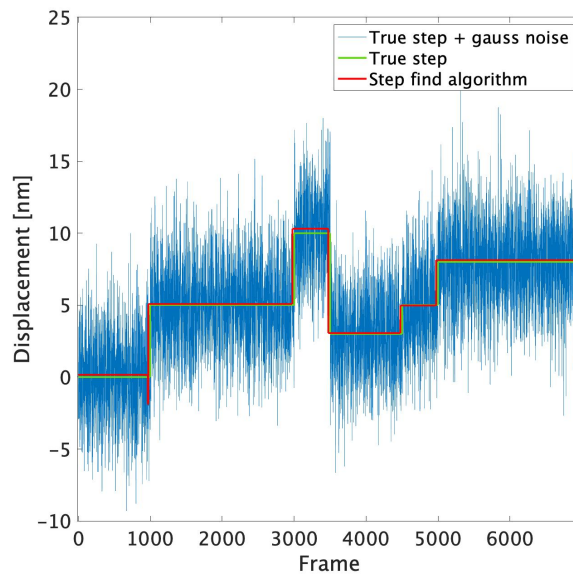


図 2-15 ノイズが加算された人工ステップシグナルと Step finding algorithm によって推測されたステップ。緑の線は人工的に作製されたステップ。青の線は人工ステップ(緑)にランダムガウスの渦を足し合わせたシグナル。赤い線は Kerssemakers らによって開発された step finding algorithm (Kerssemakers et al. 2006)が予想したステップ。

2.5.1.2 ミオシン 1 分子実験におけるステップ抽出アルゴリズム

後述するミオシンの 1 分子実験では、多分子実験で観測されるビーズ波形のような連続的なステップとは異なり、3つの安定した位置の間を繰り返しステップ状に変位する結果が得られた (図 4-1)。我々はミオシン 1 分子がこの 3つの安定状態をどの様に遷移するのかに興味を持った。しかし、多分子実験のステップ抽出に用いられた、Kerssemakers の step finding algorithm では安定な位置を仮定していないため、安定状態以外の状態への遷移も過剰検出し、我々の目的にかなうステップ抽出アルゴリズムではなかった。そこで、1 分子実験の解析には vbFRET algorithm (Bronson et al. 2009) をステップ抽出に用いた。vbFRET は元々 FRET 実験のデータ解析のために開発された解析手法である。そのため、分子が決まった状態を遷移することを前提として作製されたアルゴリズムであり、状態数を入力すればその状態間の変位やその状態にいた時間をベイズ推定を用いて推定するアルゴリズムである。

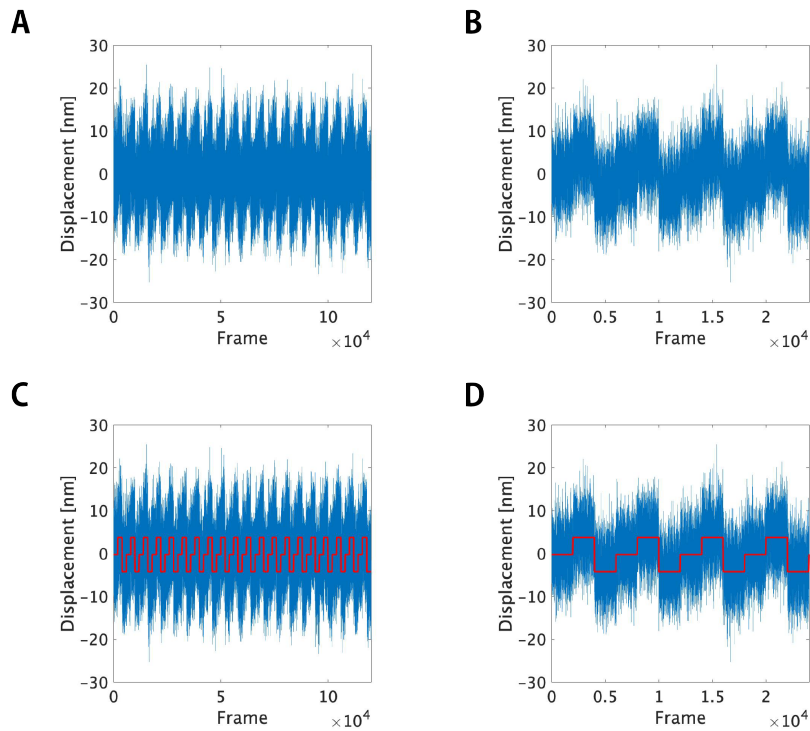


図 2-16 ノイズが加算された人工ステップシグナルと vbFRET によって推測されたステップ. (A-B) 人工的に作製したステップにガウスノイズを加えた全体像 (A)と拡大図 (B). (C-D)(A)の人工シグナル (青)と vbFRET から推測されたステップ (赤)の全体像 (C)と拡大図 (D).

2.5.1.3 vbFRET の検出性能の評価

ミオシン 1 分子実験では、ミオシンの遷移速度が早く、dwell time が数 ms の時もあった。したがって、vbFRET algorithm はどれくらいの早さのステップを検出できるのかを調べた。1 分子実験でのノイズを再現するため、no-nucleotide の条件でミオシンのステップが生じない時のビーズのノイズを利用した(図 2-17 A)。これに人工の矩形波を足し合わせることで、人工ステップデータを作製した。(図 2-17 B, E, H)。その際、ミオシン 1 分子実験で測定されたステップ幅は 3.5 nm, 6 nm であったので (図 4-3 参照)、人工的に生成した矩形波の高さも 3.5 nm, 6 nm に設定し、2000 ステップ作製した。人工的に生成したデータを vbFRET でステップ抽出させ、正答率を見積もった (図 2-17 B, E, H)。その結果、step size を 6 nm にした時、vbFRET algorithm はすべてのステップを正しく認識することができた。一方、ステップ幅を 3.5 nm にした時は、人工的に作製したステップはすべて検出しているが、ステップを過剰に検出 (overfit)する結果が得られた (図 2-17 B, C, E and F)。また、ステップ幅

が 3.5 nm, 6 nm の両方を含む人工データを作製し, vbFRET algorithm に適用させたところ, 6 nm のステップは正しく検出したにもかかわらず, 3.5 nm ステップに overfit したステップがあった(図 2-17 H, I). Overfit による誤認識ステップの dwell time (ステップ-ステップ間の時間間隔) は典型的に短く, ヒストグラムをみると (図 2-17 D, G), overfit した全てのステップ (8931 ステップ) のうち, 99.7%のステップ (8902 ステップ)の dwell time が 1 ms 以下であった. この結果から, 我々は vbFRET が抽出したステップのうち, dwell time が 1 ms 以下のステップは overfit の可能性が高いと判断し, 解析には 1 ms 以上の dwell time の結果のみを利用した.

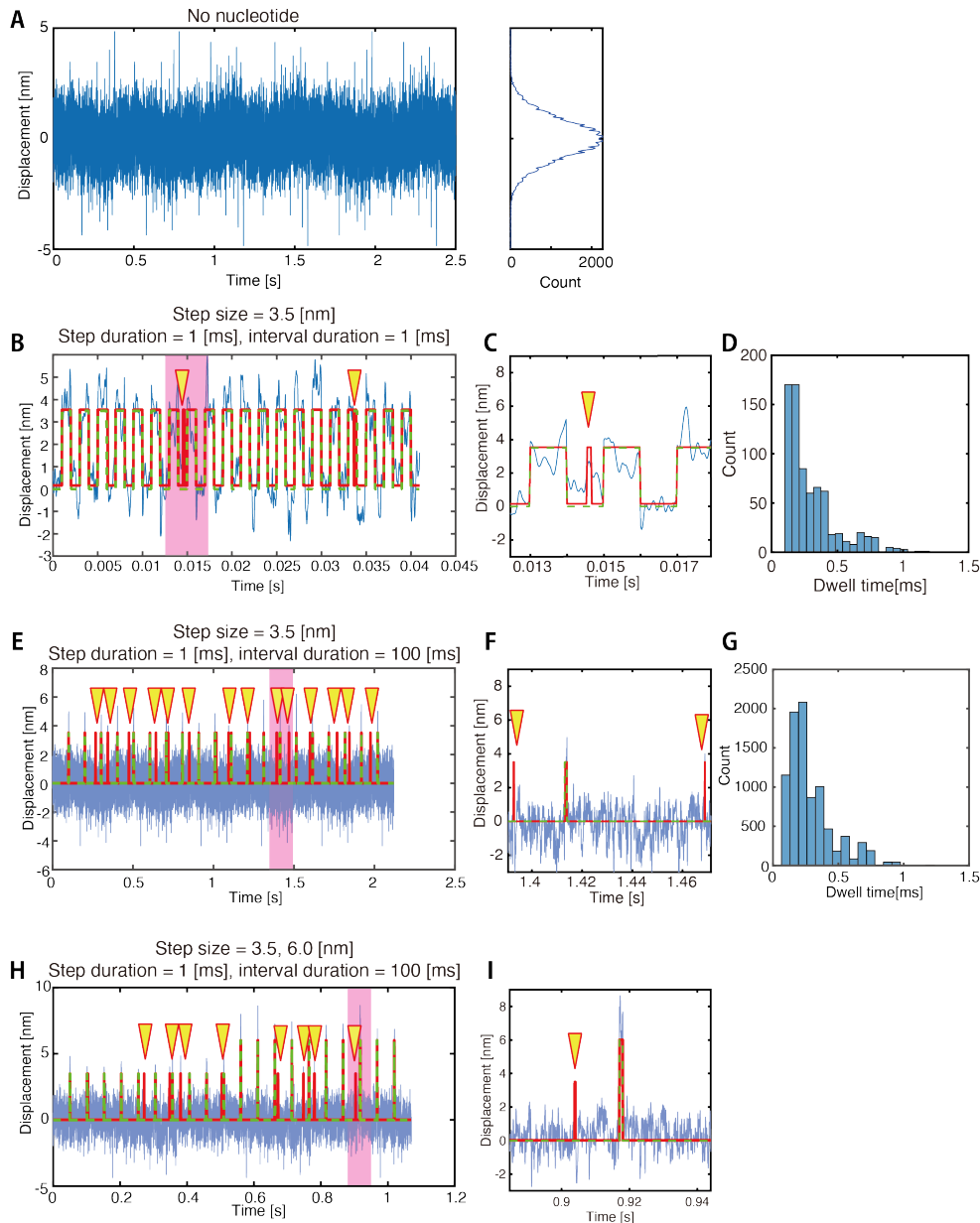


図 2-17 vbFRET algorithm のステップ検出能力の評価. (A) no nucleotide 状態のミオシン 1 分子に 10 pN の負荷がかかっている時のビーズの変位の時系列データ (左)とそのヒストグラム (右). no nucleotide 状態ではヒストグラムに single peak しか観測されず、ミオシンはステップ状の変位をしていないと考えられるため、vbFRET の性能評価に使う人工ステップデータのノイズとして利用した. (B, E, H) 実験ノイズ (A)に人工的に作製した矩形波 (2 状態間をステップ状に遷移)を足し合わせた人工ステップデータ (青). step size と、上の状態にいる時間 (step duration), 下の状態にいる時間 (interval time)は、(B)では 3.5 nm, 1 ms, 1 ms に設計し、1 分子実験の高負荷のビーズの振る舞いを再現し、(E)では 3.5 nm, 1 ms, 100 ms に設定し、1 分子実験の低負荷のビーズの振る舞いを再現した.

(図 2-17 続き) (H)ではステップ幅を 3.5 nm と 6.0 nm にして安定状態を 2 つから 3 つに増やしても, vbFRET が正確にステップを抽出できるのか検証した. 緑の破線は人工的に作製した真のステップを意味し, 赤の実線は vbFRET により検出されたステップを意味する. (C, F, I) (B), (E), (H)の図の中のピンク色の領域をそれぞれ拡大したもの. 黄色の矢尻は vbFRET algorithm が overfit により誤認識したステップを表している. (D, G) (B), (E)の条件にて overfit したステップの dwell time のヒストグラム.

2.5.2 分岐反応の遷移速度の計算

ミオシン 1 分子の実験の結果から, ミオシンの状態遷移速度 (rate)を見積もる際, 分岐反応に注意しなければならない. 分岐反応とは図 2-18 のように一つの状態 (図 2-18 の状態 A)から, 2 つ以上の状態 (図 2-18 の状態 B, C)に遷移可能な時の反応を意味する. 状態 A, B, C の各状態の濃度の遷移を表す微分方程式は

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_{AB}[A] - k_{AC}[A] = -(k_{AB} + k_{AC})[A] \quad (2-13)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_{AB} [A] \quad (2-14)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_{AC} [A] \quad (2-15)$$

とかける. ここで状態 A から, 状態 B, C への遷移速度を k_{AB} , k_{AC} それぞれとした. 初期条件として $t = 0$ で $[A](t = 0) = [A]_0$, $[B](t = 0) = [C](t = 0) = 0$ とし (2-13) - (2-15) 式の微分方程式を解くと

$$[A] = [A]_0 e^{-(k_{AB}+k_{AC})t} \quad (2-16)$$

$$[B] = [A]_0 \frac{k_{AB}}{k_{AB} + k_{AC}} (1 - e^{-(k_{AB}+k_{AC})t}) \quad (2-17)$$

$$[C] = [A]_0 \frac{k_{AC}}{k_{AB} + k_{AC}} (1 - e^{-(k_{AB}+k_{AC})t}) \quad (2-18)$$

となる. 1 分子実験では, A 状態から B, C 状態への Dwell time を計測することができるが, (2-17), (2-18) 式より

$$\tau_{AB} = \tau_{AC} = \frac{1}{k_{AB} + k_{AC}} \quad (2-19)$$

となり, τ_{AB}, τ_{AC} から k_{AB}, k_{AC} を直接求めることはできない. 一方, 時間 Δt の間に, 起きた全反応の数 (N_{total}) のうち, 状態 B に遷移した反応の数 (N_{AB}) の割合を求めると

$$\frac{N_{AB}}{N_{total}} = \frac{k_{AB}\Delta t}{(k_{AB} + k_{AC})\Delta t} = \frac{k_{AB}}{(k_{AB} + k_{AC})} \quad (2-20)$$

となる. したがって, (2-19) 式と (2-20) 式を組み合わせると k_{AB}, k_{AC} はそれぞれ以下のように求められ, dwell time と反応数の比から計算できることがわかる.

$$k_{AB} = \frac{1}{\tau_{AB}} \frac{N_{AB}}{N_{total}} \quad (2-21)$$

$$k_{AC} = \frac{1}{\tau_{AC}} \frac{N_{AC}}{N_{total}} \quad (2-22)$$

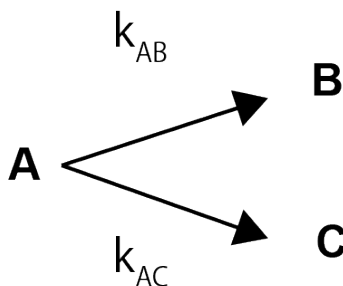


図 2-18 分岐反応の例として 2 つに分岐する分岐反応. 状態 A から, 状態 B, C の 2 つの状態に遷移可能でそれぞれの遷移速度 (rate) は k_{AB}, k_{AC} である.

2.5.3 タンパク質に内在する弾性要素の補正

本実験ではアクチンと結合したビーズの変位を観測し, その変位は心筋 β ミオシンの power/reverse stroke によって主に引き起こされたと考えている (図 2-11). しかし, ミオシンとビーズの間にはアクチン自身の持つ弾性やビーズとアクチン間の弾性等の様々な弾性要素が含まれるためミオシンの power stroke size や reverse stroke size をビーズの変位から正確に見積もるためにはそれら全ての弾性要素を見積もり, 検出したビーズの変位に対して補正する必要がある (Kojima et al. 1997). 図 2-19 はガラス面に固定されたミオシンが power stroke を起こした時, 実際に観測されたビーズの変位 (Δx_{bead}) からミオシンの power stroke size (Δx_{myosin}) を求める時の弾性要素補正の概要図である. ミオシンやアクチ

ン等すべての弾性要素を K_{protein} , 光ピンセットによる trap stiffness を K_{trap} とする. power stroke 前後で, ビーズに働く力の変化量を考えると,

$$\Delta x_{\text{bead}} K_{\text{trap}} = K_{\text{protein}} (\Delta x_{\text{myosin}} - \Delta x_{\text{bead}}) \quad (2-23)$$

$$\Leftrightarrow \Delta x_{\text{myosin}} = \frac{K_{\text{trap}} + K_{\text{protein}}}{K_{\text{protein}}} \Delta x_{\text{bead}} \quad (2-24)$$

となるが K_{protein} は直接計測することはできない. ところが, $K_{\text{system}} = K_{\text{trap}} + K_{\text{protein}}$ と置くと K_{system} はタンパク質の弾性まで含んだ系全体の弾性を意味するので, アクチンフィラメントとミオシンが相互作用しているときのビーズの S.D.から算出することができる. それゆえ, (2-24)式は実際に測定できる K_{system} を用いて以下のように書き換えることができる.

$$\Delta x_{\text{myosin}} = \frac{K_{\text{system}}}{K_{\text{system}} - K_{\text{trap}}} \Delta x_{\text{bead}} \quad (2-25)$$

従って, ミオシンとアクチンが相互作用しているときのビーズの S.D.を計算すれば K_{system} が求まり, ビーズの変位からミオシンの変位を算出することができる.

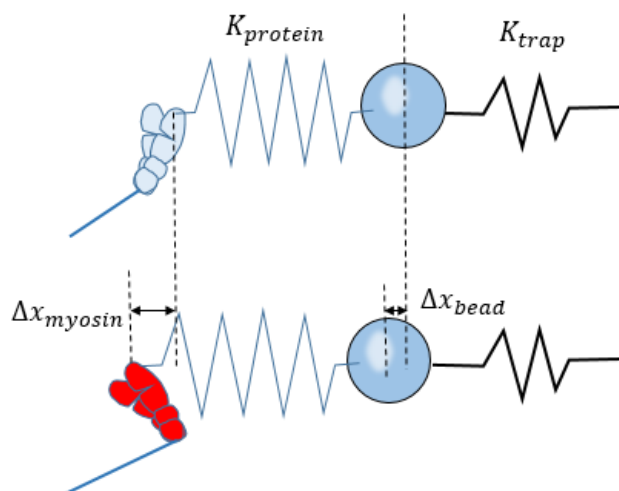


図 2-19 ミオシン-アクチン-ビーズ間における弾性要素および power stroke サイズとビーズの変位の関係図. ミオシンとビーズの間には, 様々な弾性要素が存在するので, ミオシンの power stroke サイズ (Δx_{myosin}) を求めるにはビーズの変位 (Δx_{bead}) に(2-25)式のように補正係数をかける必要がある.

第3章 心筋βミオシン多分子の力計測

3.1 *In vitro* motility assay

アクチンの滑り速度と ATP 濃度の関係を図 3-1 に示す。アクチンの滑り速度は心筋βミオシンの ATP 加水分解速度に比例していると考えられるので、ATP の濃度とアクチンの滑り速度との関係は以下に示されるミカエリス・メンテン式でフィットすることができる。

$$v = \frac{v_{\max}[\text{ATP}]}{K_M + [\text{ATP}]} \quad (3-1)$$

ここで v はアクチンの滑り速度, v_{\max} は最大速度, K_M は滑り速度が半分となる ATP の濃度を表す。ミカエリス・メンテン式でフィットさせたところ, $v_{\max}=930 \text{ nm/s}$, $K_M=74 \mu\text{M}$ となった。心筋βミオシンの力計測実験では, K_M より十分高い 1 mM ATP と, K_M より低い $10 \mu\text{M}$ ATP で力計測を行い, ATP 濃度依存性を計測した。

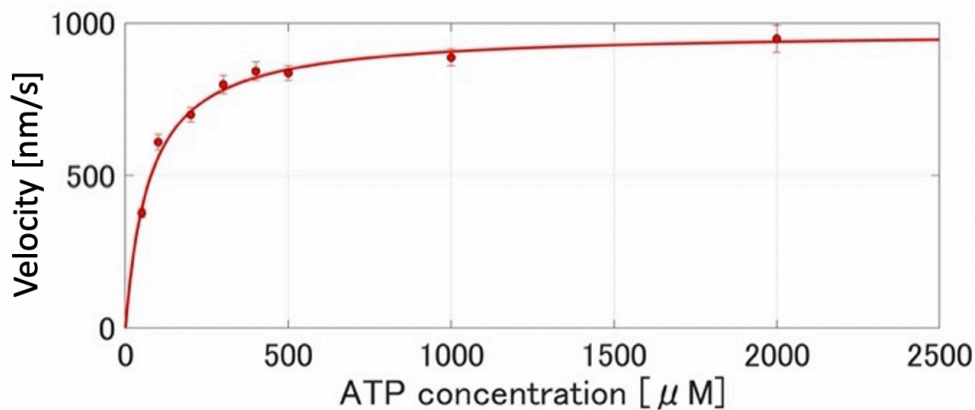


図 3-1 豚の心筋βミオシンの ATP 濃度とアクチンの滑り速度の関係。エラーバーは標準誤差を示している。曲線はミカエリス・メンテン式でフィットした近似曲線である。

3.2 分子数計測実験

ミオシンとアクチンを強結合させ、光ピンセットでビーズを上方向に移動させることでアクチンに相互作用できるミオシンの分子数を求めた(2.4.2 節) (Kaya and Higuchi 2010). ミオシンの破断数から見積もった分子数は、ミオシンフィラメントの長さとともに増加していることが判明した (図 3-2). この関係を線形フィットしたところ、近似直線は $0.0047L + 0.2$ 表示されることがわかった. ここで、 L はミオシンフィラメントの長さを意味する. 力計測実験と分子数計測実験のミオシンの割合の差を考慮すると、力計測実験で用いたミオシンフィラメントの長さは $960 \text{ nm} \pm 120 \text{ nm}$ (平均 \pm 標準偏差) であるので、アクチンに相互作用するミオシンの平均分子数は以下のように評価できる.

$$(0.0047 \times 960 + 0.2) \times \frac{8}{1} \times \frac{4}{5} \cong 30 \quad (3-2)$$

ここで、 $8/1$, $4/5$ はミオシンとロッドの混合比の補正を意味する. しかし、ミオシンフィラメントは双極構造を取っており、アクチンのマイナス端を向いていないミオシン(図 3-2 C: 赤い四角で囲まれたミオシン, *incorrectly-oriented side*)はアクチンと結合することは可能だが、マイナス端を向いているミオシン (*correctly-oriented side*) の 8% 程度の力しか出せないことが実験的に知られている (Ishijima et al. 1996, Tanaka et al. 1998). 本実験において、ミオシンフィラメント全領域にアクチンが重なっている場合、アクチンに結合している *correctly-oriented side* のミオシンと *incorrectly-oriented side* のミオシンの分子数は確率的に同じだと仮定すると、力計測実験で主に力を発生させているミオシン分子数は、この実験から推定されたアクチンに結合するミオシン分子数の半分であると考えられる. 従って、力発生に関わるミオシンの分子数は(3-2)式を半分にした約 15 分子と評価した. ミオシン分子数の標準偏差はミオシンフィラメントの長さの標準偏差から(3-2)式の誤差伝搬式を用いて求めた結果、標準偏差は 2 分子と評価できた.

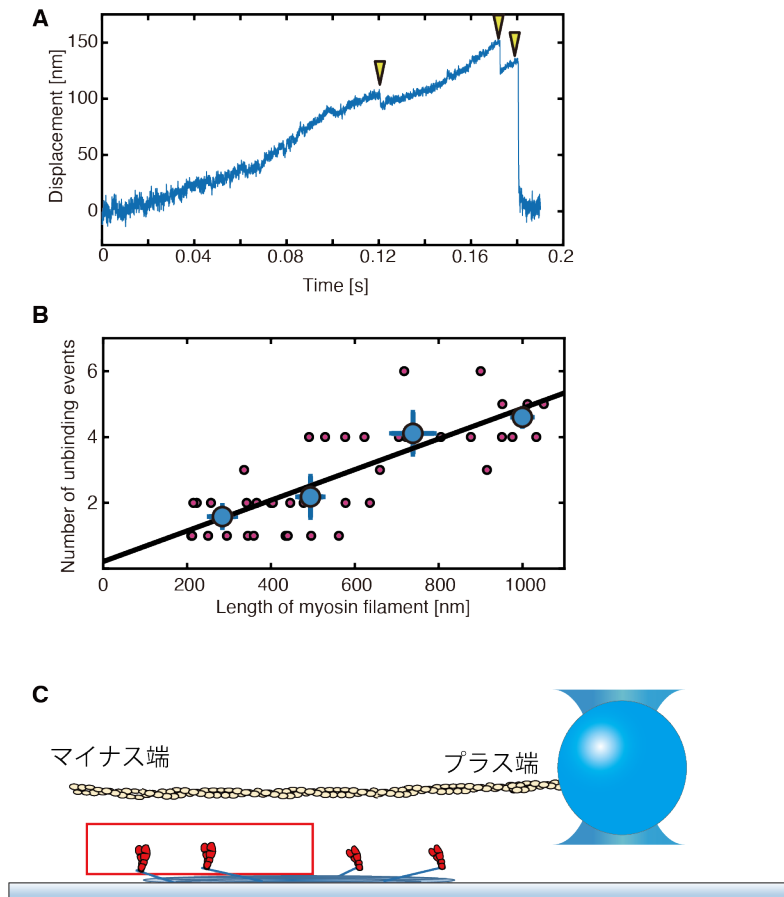


図 3-2 アクチンに相互作用できるミオシン分子数測定の結果. (A) ビーズ を上に引っ張った時のビーズの変位. 黄色い矢尻はビーズが急速に原点に向かう現象であり, ミオシンの破断 (5 ms 以内に 15 nm 以上変位したイベント)を表している. (B) ピンクの点は各ミオシンフィラメントの長さとおクチンに結合していたミオシンの分子数の関係を表している ($N=41$). 青い丸はピンクの点の平均を意味し, エラーバーは標準誤差である. 黒の直線は青い点にフィットする様に求めた近似曲線である. (C) 赤で囲った領域に存在するミオシンは, 図中のアクチンの向き (マイナス端が左) とは元来逆の向きに力を出す配向で位置しているため (incorrectly-oriented myosins), 反対側のミオシン (correctly-oriented myosins) と比較して, アクチンと結合するがほとんど力を発生できない (Ishijima et al. 1996, Tanaka et al. 1998).

3.3 心筋 β ミオシンフィラメントの力計測

心筋 β ミオシン固有の集団的性質を見出すために、豚の心室から精製した心筋 β ミオシンフィラメントの力発生を 1 mM ATP, 1 mM ATP + 10 mM Pi さらに 10 μ M ATP の溶液条件下で光ピンセット技術を用いて計測した。また、その結果をウサギの腸腰筋（速筋）から精製された速筋フィラメントの力発生の結果と比較した (Kaya et al. 2017)。本研究では、平均 960 nm \pm 120 nm (mean \pm s.d., $N=4$ for 1 mM ATP, $N=5$ for 1 mM ATP + 10 mM Pi そして $N=11$ for 10 μ M ATP) の長さの合成心筋 β ミオシンフィラメントを選んで力計測することで 約 15 \pm 2 ミオシン分子が相互作用するミオシンフィラメントの力計測を行った(3.2 節)。

心筋 β ミオシンフィラメントは 1 mM ATP において、連続的にアクチンを変位し続け、最大で約 40 pN – 60 pN の力を発生させたのち、急速に力を失いトラップ中心（変位=0）までビーズが戻る（図 3-3 A：緑の三角）、またはビーズが中心まで戻らず途中から力を発生し（図 3-3A：赤の三角）、再び 40 pN – 60 pN まで発生する力発生のサイクルを繰り返していることがわかった。1 mM ATP, 10 mM Pi では心筋 β ミオシンフィラメントが発生する力は減少し、最大で 10 pN – 20 pN 程度の力を発生していた（図 3-3 B）。また、10 μ M ATP では 1 mM ATP より大きな力を発生させていた(図 3-3 C)。1 mM ATP における心筋 β ミオシンフィラメントの力発生を骨格筋の速筋ミオシンフィラメントの実験で計測されたデータ(Kaya et al. 2017)と比較すると（図 3-3 A）、アクチンと相互作用するミオシンの分子数は骨格筋の実験では平均 17 分子と心筋 β ミオシンの分子数（15 分子）より若干多いにもかかわらず、最大で約 30 pN 程度と心筋 β ミオシンフィラメントより小さな力しか発生していないことが判明した。

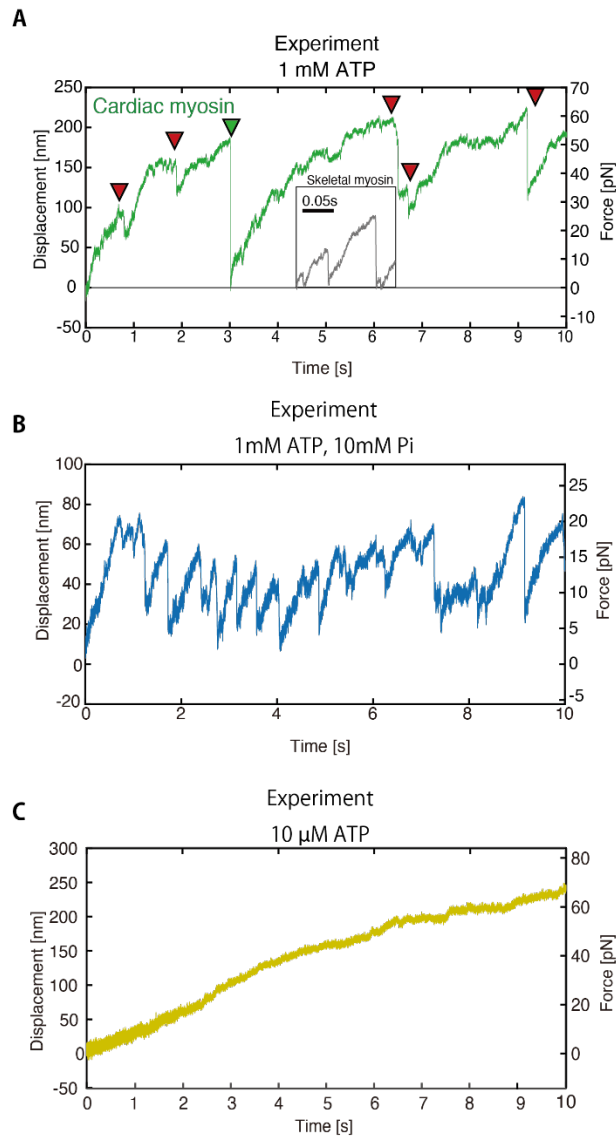


図 3-3 光ピンセットを用いた力計測実験で計測された心筋 β ミオシンフィラメントの力発生波形の例. (A) 1 mM ATP の溶液条件での力発生の概要 . 内挿している図は、同様の実験を速筋ミオシンを用いて行った実験の結果を示す (Kaya et al. 2017). 心筋 β ミオシンは急激に力を失ったのち、原点までビーズが戻る時 (緑の三角)と、原点まで戻りきらず、途中で再び力を発生させる時の両方が観測された (赤の三角). (B) 1 mM ATP, 10 mM Pi の溶液条件での力計測の結果. (C) 10 μ M ATP における力計測の結果. この ATP 濃度では、心筋 β ミオシンフィラメントの力が大きく、光ピンセットによる補足限界を超えてビーズが変位し続ける現象が頻繁に見られた.

3.3.1 滑り速度と負荷の関係について

滑り速度と負荷の関係を求めるために、各 ATP 濃度でのビーズの変位波形に 100 Hz のカットオフ周波数でローパスフィルターを通した後に、0.1 s ごとにデータを区切り、その区間の平均変位から平均滑り速度 (=平均変位/0.1 s) およびビーズにかかる平均負荷 (= $K_{\text{trap}} \times$ 平均変位) を算出した。この際、平均変位には弾性補正(2.5.3 節)を行っている。図 3-4 は上記の方法で求めたアクチンの滑り速度と負荷の関係を示す。内挿している曲線は A.V. Hill によって考案された筋肉の負荷と速度の関係を示すヒルの方程式

$$(F + a)(v + b) = b(F_{\text{max}} + a) \quad (3-3)$$

でフィットさせた曲線である (Hill 1938)。ここで F は負荷、 v は速度を表し、 F_{max} は最大負荷、 a と b は定数である。本研究では v, F を変数、 a, b, F_{max} をパラメーターとしてフィットを行った。この曲線から最大滑り速度と最大力を見積もることができる。最大速度は 1 mM ATP で約 940 nm/s、10 μ M ATP で約 100 nm/s となった。この最大速度は (3-1) 式で示したミカエリス・メンテン式から見積もられる速度 (1 mM ATP で約 900 nm/s、10 μ M ATP で約 110 nm/s) にほぼ一致していた。筋肉ミオシンは ATP 加水分解 1 サイクルの中でアクチンと結合している時間の割合 (duty ratio) が 10 % と低いため、アクチンと相互作用するミオシンの分子数が 1~数分子の時は、アクチンはミオシンフィラメント上を連続的に滑ることはできない、また、少数のミオシン分子がアクチンフィラメントを滑らせる時の滑り速度は最大滑り速度より低くなることが知られている (Uyeda, Kron and Spudich 1990, Harada et al. 1990, Howard 2000)。しかし本実験ではアクチンはミオシンフィラメント上を連続的に滑り、かつ最大速度はミオシンが十分濃い条件下での実験である *In vitro* motility assay の速度と一致したことから、多分子の力計測実験はミオシンの集団的性質を測定するのに十分な分子数であると考えられる。

また、心筋 β ミオシンと速筋の 1 mM ATP における滑り速度と負荷の特徴を比較すると、速筋の最大滑り速度 (約 4000 nm/s; 図 3-4A 内挿) は心筋 β ミオシンの最大速度 (約 940 nm/s) より速い事がわかる (図 3-4A)。これは無負荷における心筋 β ミオシンの ATP 加水分解サイクルの速度が速筋に比べ遅いためであると考えられる (Deacon et al. 2012, Ritchie et al. 1993)。最大滑り速度の影響をなくし、負荷依存性を評価するために心筋 β ミオシンと速筋の滑り速度を最大滑り速度で規格化した図が図 3-4 D である。心筋 β ミオシンフィラメントは負荷に大きく影響され、約 30 pN 程度まで相対速度は速筋より低い値をとっている一方、最大力は速筋より高い値を示した (図 3-4 D)。正規化された速度 (図 3-4 D) から、ミオシンフィラメントの単位時間あたりの仕事量 (power) を $Force \times velocity$ で求

めた図が図 3-4 E である。最大速度は正規化したものの、速筋ミオシンフィラメントの power の最大値は心筋 β ミオシンより高い値を示した。一方、心筋 β ミオシンは広い範囲で安定した power を発生していた。このことから、ATP 加水分解速度の差以外にも、速筋ミオシンは外力が加わっていても power が心筋 β ミオシンより発生できる性質がある事、一方、心筋 β ミオシンは外力が加われば、速度は落ちるものの、速筋ミオシンより幅広い力を発生できる性質が存在している事が考えられる。

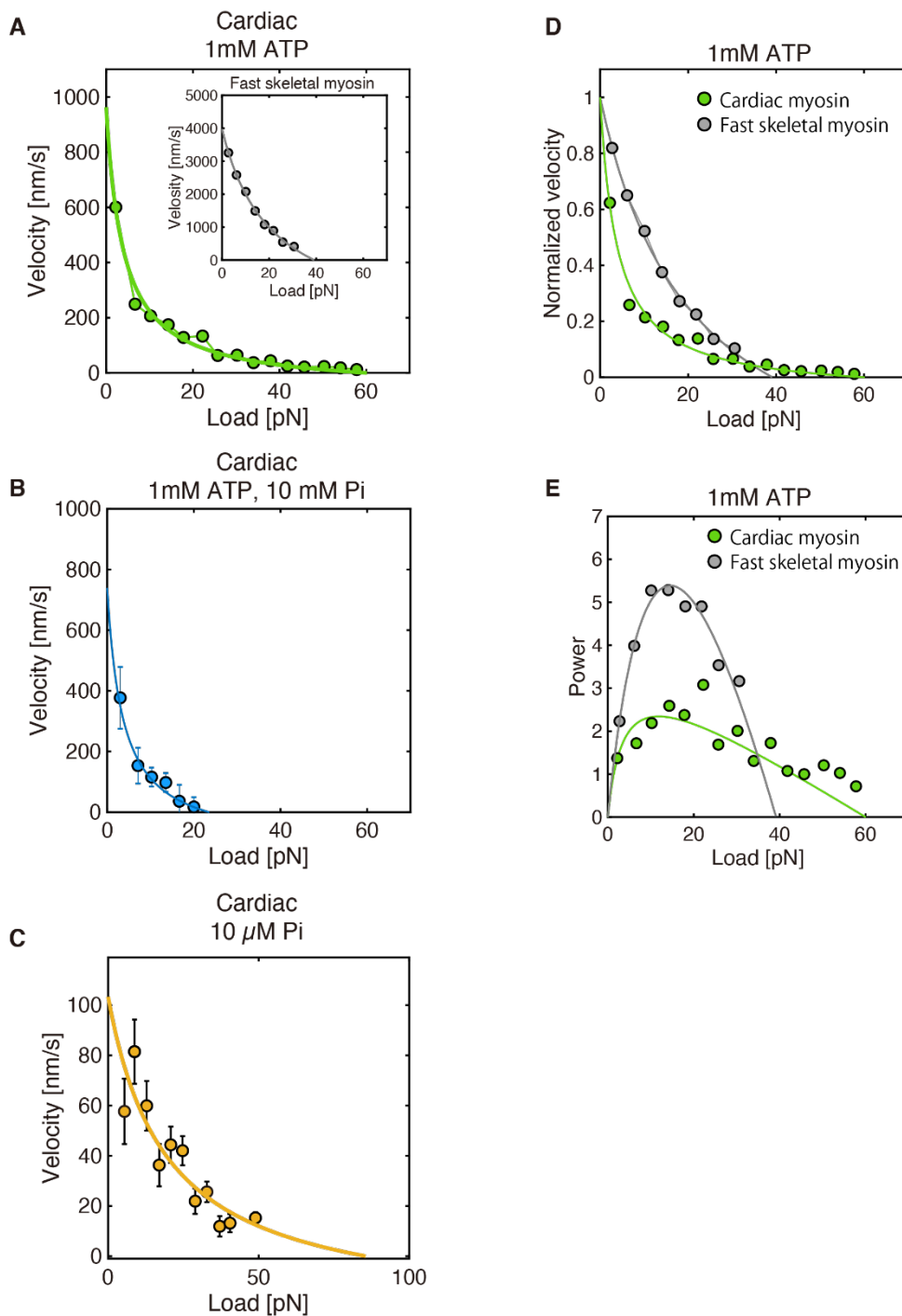


図 3-4 心筋 β ミオシンフィラメントのアクチンの滑り速度と力の関係. (A) 1 mM ATP. 内挿している図は速筋フィラメントの滑り速度と力の関係. (B) 1 mM ATP, 10 mM Pi. (C) 10 μ M ATP. (D) 最大滑り速度で正規化した, 心筋 β ミオシンと速筋ミオシンの滑り速度と力の関係. (E) (D)から計算した心筋 β ミオシンと速筋ミオシンの最大滑り速度で正規化した power と力の関係. エラーバーは標準誤差を意味する.

3.3.2 ステップ状の力発生

各溶液条件において、ビーズの変位を拡大したプロットを図 3-5 に示した。ミオシンフィラメントはビーズをステップ状に変位させていることが判明した (図 3-5)。ステップ状の変位は、ミオシン各分子がアクチンを変位させた結果起きる変位現象を示唆しており、分子の特徴が反映されていると考えられる (Kaya and Higuchi 2010, Kaya et al. 2017)。したがって、ステップの特性を明らかにすることで、心筋ミオシン集団の中の個々のミオシンの動態特性を推測できる。本研究では、Kerssemakers らが開発した step finding algorithm を用いて個々のステップの抽出を行った (図 3-5)。ステップの特徴として、ステップの大きさを表す step size とステップ間の時間間隔である dwell time の解析を行った (図 3-5 B)。また、力発生の方向と同じ方向のステップである forward step だけでなく、逆向きのステップである backward step も多く観測されたので (図 3-5 B 逆三角形), $\text{stepping ratio} = \frac{\text{number of forward step}}{\text{number of backward step}}$ の負荷依存性についての解析を行った。

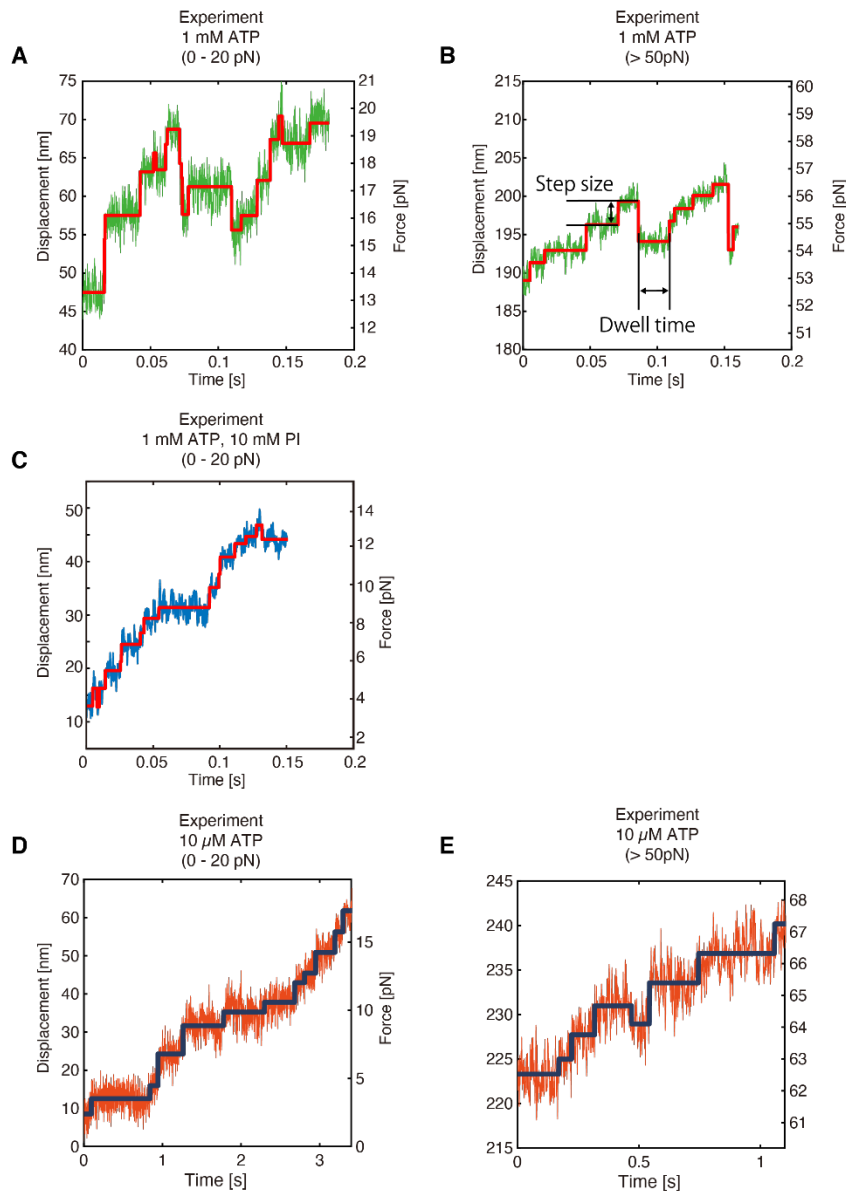


図 3-5 低負荷と高負荷における心筋 β ミオシンフィラメントの力発生の拡大図と step finding algorithm (Kerssemakers et al. 2006)で抽出したステップ. (A, B) 1 mM ATP の溶液条件での高負荷 (A), 低負荷 (B) における心筋 β ミオシンの力発生の拡大図(緑)と抽出したステップ(赤). (C) 1 mM ATP, 10 mM Pi の溶液条件での低負荷における心筋 β ミオシンの力発生の拡大図 (青)と抽出したステップ (赤). (D, E) 10 μ M ATP の溶液条件での高負荷 (D), 低負荷 (E) における心筋 β ミオシンの力発生の拡大図 (オレンジ)と抽出したステップ (黒). 本研究では(B)に示した通り, ステップの特徴としてステップの変位である step size, ステップと次のステップまでかかる時間である dwell time を解析した. また, ステップには力発生の方向と順方向のステップである forward step だけでなく, 逆方向のステップである backward step も観測された. 観測された backward step の例は(B)に三角で示した.

3.3.3 Step size について

1 mM ATP, 1 mM ATP + 10 mM Pi, 10 μ M ATP における各負荷での弾性補正後の step size のヒストグラムを図 3-6 に示す。ヒストグラムには 1 つ, または 2 つのピークが見られたため, 1 つまたは 2 つのガウス関数でフィットさせてそのピーク位置から平均 step size を求めた。ここで, フィットさせるガウス関数の数は AIC(赤池情報量基準)が最小になるように設定した (Akaike 1973)。その結果, 低負荷領域の forward step においては 2 つのガウス関数のフィットとなり, 1 mM ATP の時 5.0 nm と 9.0 nm にピークが, 1 mM ATP + 10 mM Pi の時 4.2 nm と 7.4 nm に, 10 μ M ATP の時 5.5 nm と 8.0 nm に各ガウス関数のピークが現れた (図 3-7)。低負荷で 2 つのガウス関数のフィットとなったが, データ数が少ないためノイズが 2 つ目のピークとして検出された可能性を排除するために, 計測したミオシンフィラメント毎の低負荷のステップサイズのヒストグラムに同様なフィットを行い少ないデータ数での再現性を確認した(図 3-7 G)。その結果データ数が 1/4 倍程度のデータでも 2 つのガウス関数でのフィットなり, そのピーク値の平均は 4.9 nm, 8.7 nm と再現性の確認ができた。

低負荷以外では 1 つのガウス関数でのフィットとなった。全ての溶液条件において, 負荷の上昇に伴い step size は減少の傾向にあった。30 pN 以上の負荷においては減少の割合は弱まり, 3 nm~2 nm の step size を示した(図 3-7)。Backward step の step size も負荷の上昇に伴い減少しており, 30 pN 以上の負荷では forward step と backward step の step size は同様な値を示した(図 3-7)。速筋では 35 pN を超える力を発生していないので, 心筋 β ミオシンと異なり, 高負荷の step size は存在していない (Kaya et al. 2017)。しかし, 心筋 β ミオシンと同様に負荷の増加に伴い, 減少する傾向があった(図 3-7)。

茅らは各ステップにおける仕事量を外力 \times step size で計算したところ, 高負荷時における仕事量は入力エネルギーである ATP 単分子の加水分解エネルギーを超えたため, このような負荷範囲におけるステップは, 複数のミオシン分子が同調して力発生をさせている可能性を示した (Kaya et al. 2017)。そこで本研究においても, 各ステップにおいて発せられる仕事量と ATP 単分子の加水分解エネルギーの大小関係を調べるために, 図 3-7 に ATP 加水分解エネルギー 100 % がステップに利用された場合に予想される step size と負荷の関係 (step size \times 外力 = ATP 加水分解エネルギー (28.5 $k_B T$)) を赤の曲線で示した。心筋 β ミオシンで観測された step size と, ATP 加水分解エネルギー 100 % 利用で予想される step size の関係を見てみると, 負荷 60 pN におけるステップは ATP 加水分解エネルギー 100 % 利用した場合を超えており (図 3-7 A), 心筋ミオシン複数分子が同調して力を発生してい

ることが示唆される。また、負荷 60 pN 以下の負荷におけるステップに必要なエネルギーも ATP 単分子の加水分解エネルギーの 80%~90% 程度である。心筋組織の熱効率の実測値が 30%であることを考えると、これらのステップが心筋ミオシン 1 分子ではなく、多分子によって引き起こされた可能性が高いと考えられる。したがって、心筋ミオシンでも速筋同様に複数分子間の力発生を同調させている可能性が示唆される (Kaya et al. 2017)。

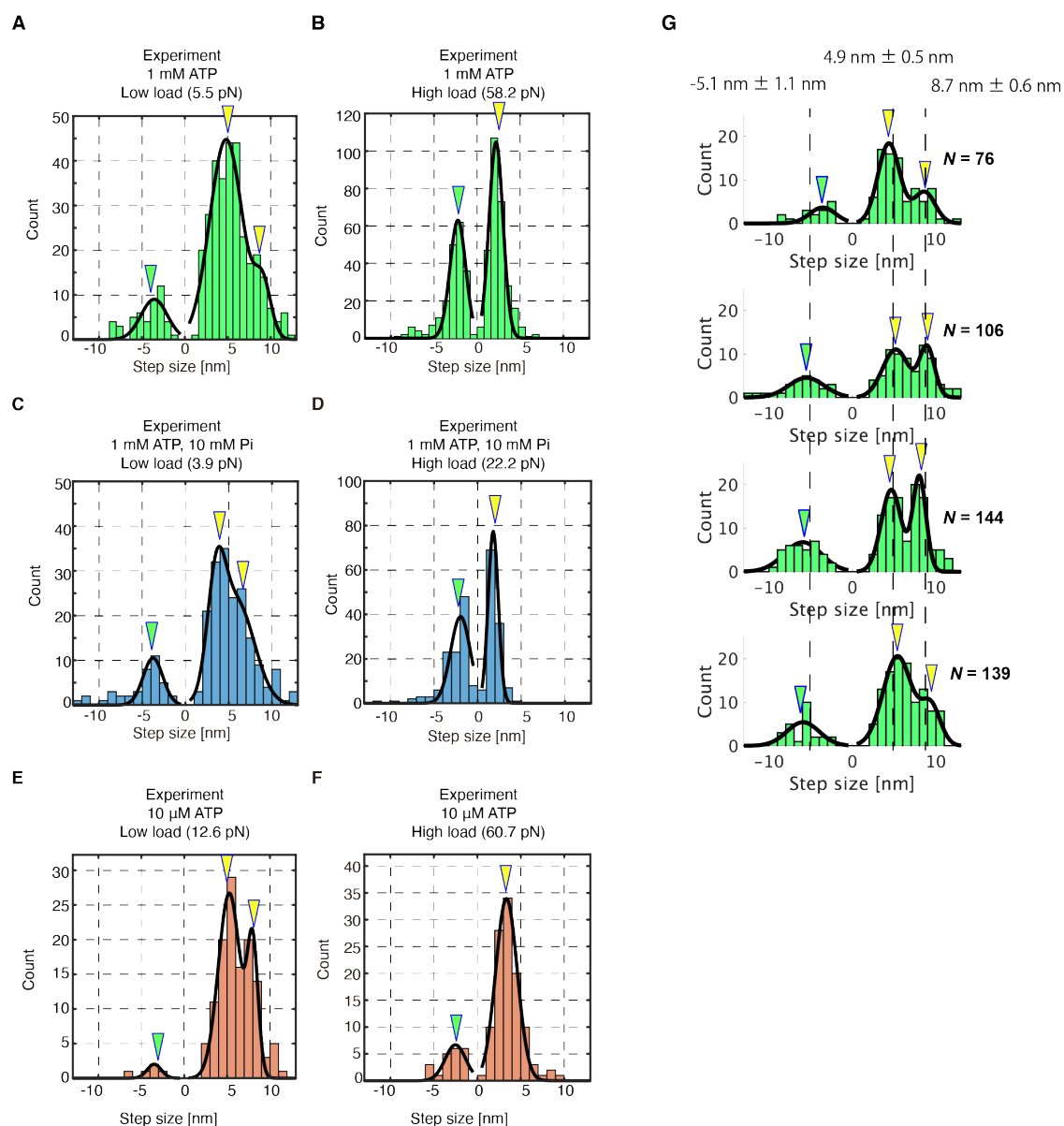


図 3-6 観測された step size の低負荷, 高負荷におけるヒストグラム. step size には弾性補正が施されている. (A, B) 1 mM ATP の実験における低負荷 (A, 平均 5.5 pN) と高負荷 (B, 平均 58.2 pN) の step size のヒストグラム. (C, D) 1 mM ATP + 10 mM Pi の実験における低負荷 (C, 平均 3.9 pN) と高負荷 (D, 平均 22.2 pN) の step size のヒストグラム. (E, F) 10 μM ATP の実験における低負荷 (E, 平均 12.6 pN) と高負荷 (F, 平均 58.2 pN) の step size のヒストグラム. 三角はガウスフィット時のピーク値を示している. (G) 計測したフィラメント毎の 1 mM ATP の低負荷のヒストグラム. 各ヒストグラムは3つのガウス関数のフィットとなり, ピーク値の平均と標準偏差を上部に示した. (G) のデータを累積すると (A) のヒストグラムになる.

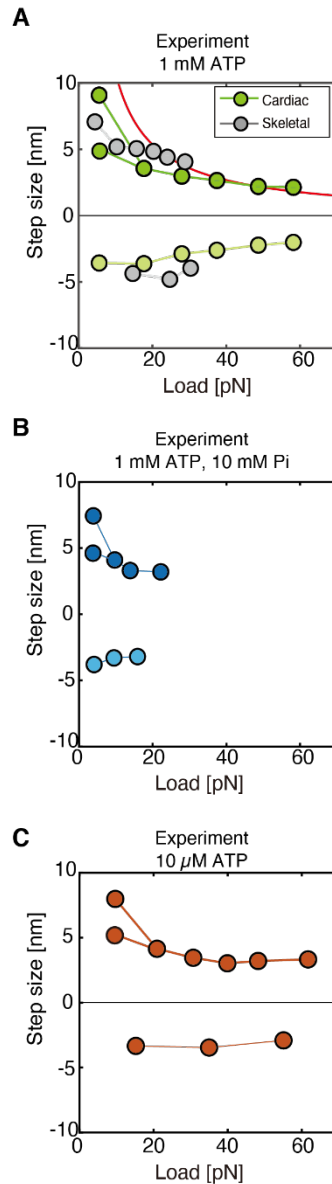


図 3-7 平均 step size と負荷の関係. 平均 step size は step size のヒストグラムのガウスフィットした時の, ピークの位置を意味する. 低負荷では 2 つのガウス関数でフィットしたので, 小さな方の平均 step size は菱形で示した. 正の符号の step size は forward step の step size を意味し, 負の符号の step size は backward step の step size を意味する. (A) 1 mM ATP におけるステップヒストグラムと負荷の関係. 緑のシンボルは心筋 β ミオシンの結果であり, 灰色は速筋ミオシンの結果である (Kaya et al. 2017). 赤い曲線は $\text{step size} \times \text{Load} = 28.5 k_B T$ (ATP 加水分解エネルギー) となる双曲線である. (B) 1 mM ATP, 10 mM Pi におけるステップヒストグラムと負荷の関係. (C) 10 μM ATP におけるステップヒストグラムと負荷の関係. エラーバーは標準誤差を意味するが, ほとんどシンボルに隠れてしまっている.

3.3.4 Dwell time について

図 3-8 は 1 mM ATP, 10 μ M ATP における dwell time の累積ヒストグラムと指数関数でフィットした曲線を表している。指数関数フィットに際しては、ヒストグラムのビン幅の影響を避けるために、累積ヒストグラムに累積指数関数をフィットさせた (図 3-8)。図 3-9 はフィットによって得られた平均 dwell time とその平均負荷をプロットしたものである。1 mM ATP, 1 mM ATP + 10 mM Pi の条件では dwell time は負荷に依存せず 8–10 ms 程度の一定の値を示した一方 (図 3-9 A,B), 10 μ M ATP では dwell time は負荷の上昇に伴い増加している傾向があった (図 3-9 C)。また、1 mM ATP で心筋 β ミオシンは負荷に依存しない dwell time を示したが、速筋では、負荷の上昇に伴い dwell time は増加していた (図 3-9 A)。

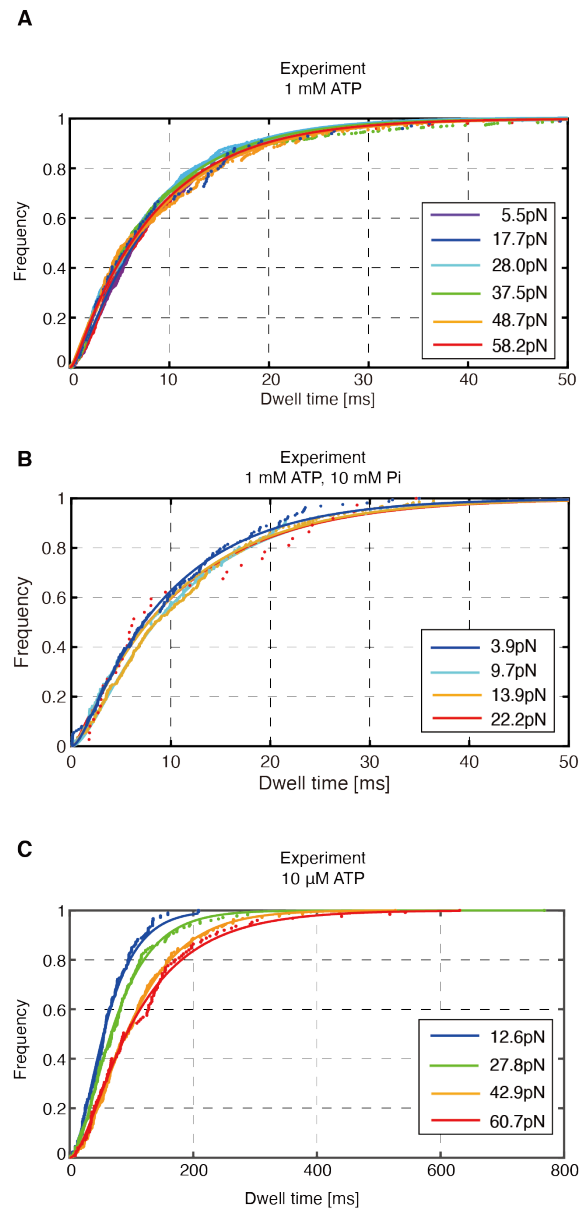


図 3-8 dwell time の各負荷における，累積分布関数と指数関数でフィットさせた曲線。
Legend は平均負荷を示す。(A) 1 mM ATP. (B) 1 mM ATP, 10 mM Pi. (C) 10 μM ATP.

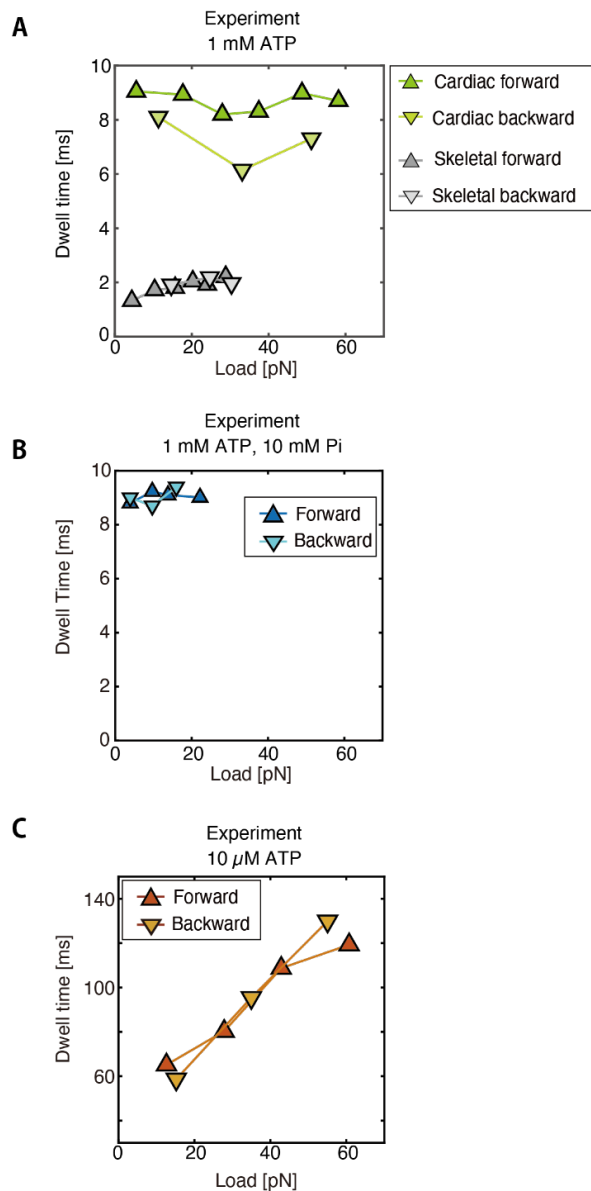


図 3-9 累積分布関数から求めた平均 dwell time と負荷の関係. (A) 1 mM ATP. (B) 1 mM ATP, 10 mM Pi. (C) 10 μM ATP. エラーバーは標準誤差を意味するが、ほとんどシンボルに隠れてしまっている。

3.3.5 Stepping ratio について

心筋βミオシンフィラメントの力発生では、backward step も頻繁に起きていた。したがって、ステップ状に変化するアクチン変位において、ステップの前進/後進の比率を理解するため、Forward step 数と backward step 数の比として定義される stepping ratio(=

$\frac{\text{forward step の数}}{\text{backward step の数}}$) についての解析を行った。図 3-10 は stepping ratio と負荷の関係を片対数グラフを用いて示したものである。内挿している直線は stepping ratio を指数関数でフィットした直線である。stepping ratio=1 となるとき, forward step の数と backward step の割合が一致していることを意味している。また高負荷での forward step と backward step の step size が同様の値を示すので(図 3-7), stepping ratio=1 となる負荷はアクチンの変位が定常状態になる負荷を意味し, 言い換えれば, ミオシンが出せる最大力を意味する。

1 mM ATP では心筋 β ミオシン集団は無負荷において stepping ratio が 7 程度であった。これは平均して forward step が 7 回起きるごとに backward step が 1 回起きることを意味する。また最大力 (stepping ratio=1 である負荷) は 55 pN 程度で滑り速度と負荷の関係から求めた値と同様である。1 mM ATP, 10 mM Pi では, 低負荷での stepping ratio は 1 mM ATP の結果と同様に 7 程度であった。一方, 最大力は 20 pN に減少している。10 μ M ATP の stepping ratio は無負荷で 40 程度となり, 全ての負荷範囲において 1 mM ATP より高い stepping ratio を示し, 最大力は 98 pN であった。速筋ミオシンの stepping ratio は無負荷では 20 程度で, 心筋 β ミオシンより高い値を示した。このように速筋ミオシンは低負荷で forward step の頻度が高いにもかかわらず, 最大力は 35 pN と心筋 β ミオシンより低い値を示した。以上の結果から 1 mM ATP において, 心筋 β ミオシンフィラメントは速筋ミオシンフィラメントに比べ, より高頻に backward step を起こす一方で, 最大力は 1.5 倍程度高くなる特徴が見えてきた。

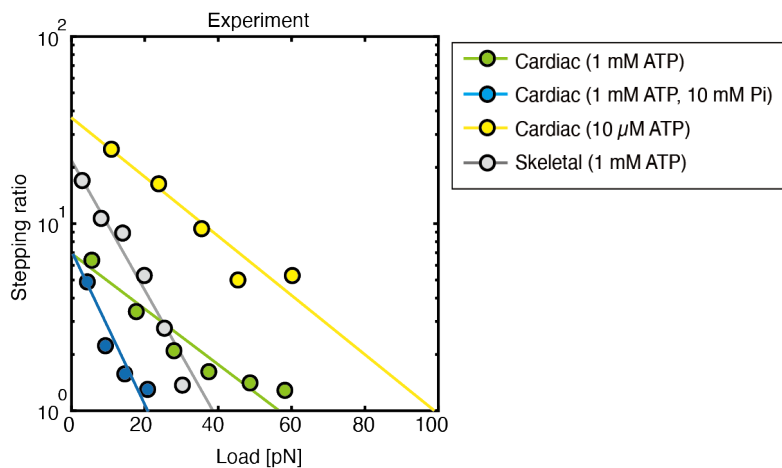


図 3-10 stepping ratio と負荷の関係。各点は stepping ratio と平均負荷の実測値を意味している。直線は stepping ratio と負荷を指数関数でフィットした直線である。

第4章 心筋 β ・速筋ミオシンの1分子実験

本章については、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開。

第5章 実験結果に対する考察

本章については、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開。

第 6 章 シミュレーション

本章については、5年以内に雑誌等で刊行予定のため、非公開。

S

第7章 結論

心筋 β ミオシンは心臓の収縮力を生む分子モーターであり、過去の様々な研究から power stroke size や発生する力など1分子特性が明らかにされてきた。近年、心筋細胞のシミュレーションで心筋 β ミオシンの reverse stroke rate を増加させると、心筋 β ミオシン集団が連鎖的に reverse stroke を起こすことで急速な弛緩が達成された。心筋 β ミオシン集団の reverse stroke の重要性が説かれたものの、心筋 β の集団的性質や reverse stroke を直接研究した研究はなく、不明確である。そこで、本研究は心筋 β ミオシン集団における reverse stroke の役割を調べるために、心筋 β ミオシン多分子・1分子計測を行い、reverse stroke の役割をシミュレーションで明らかにした。具体的な結果は以下の通りである。

心筋 β ミオシンの集団的性質を明らかにするために、心筋 β ミオシン15分子の力計測を行い骨格筋(速筋)ミオシンフィラメントの結果と比較した。その結果、心筋 β ミオシンはアクチンをステップ状に変位させ、55 pN を超える力を発生していた。力発生するミオシン分子数は同等にもかかわらず、心筋 β ミオシン集団は骨格筋ミオシン集団より大きな力を発生させており、頻繁に backward step を示すことが判明した。

頻繁な backward step の分子メカニズムを明らかにするために、心筋 β ミオシンと骨格筋ミオシン1分子に負荷を加えた時のミオシンヘッドの動きを観測する実験を行った。その結果、心筋 β ミオシンは頻繁に power/reverse stroke を繰り返すことでステップ状の動きをする一方、骨格筋ミオシンは reverse stroke を起こさず、ステップ状の変位を示さなかった。したがって、シミュレーションで予想されたように心筋 β ミオシンは骨格筋ミオシンより頻繁に reverse stroke が起こすことが判明した。それだけでなく、心筋 β ミオシンの power stroke size, reverse stroke の大きさや反応速度と負荷の関係を正確に求めることができた、first reverse stroke と Pi 結合の関係まで求めることができた。

心筋 β ミオシン集団の reverse stroke の役割を解明するために reverse stroke rate が異なる2つのミオシンモデルを構築しシミュレーションを行った。実験を再現するために、ミオシンモデル15分子が発生する力のシミュレーションを行ったところ、高い力発生と頻繁な逆向きステップは高頻度の reverse stroke によって引き起こされることが判明した。多分

子実験における逆向きのステップは心筋 β ミオシン数分子が連鎖的に reverse stroke を起こすことで生じることがシミュレーションによって示された。

筋肉内ではアクチン1本にミオシンが75分子相互作用しているため、ミオシンモデルを75分子に増やしシミュレーションしたところ、reverse stroke rate が高いモデルの力は心室圧と似た結果になり、高い reverse stroke rate は、張力の維持、急速な弛緩および低いATP消費率に貢献している可能性が示唆された。

以上のように、本研究では、心筋 β ミオシンの1分子実験を行うことにより、世界で初めて心筋 β ミオシンの reverse stroke の直接観測に成功した。心筋 β ミオシンの多分子実験より、心筋 β ミオシン集団は速筋ミオシン集団より高い力発生と頻繁な逆向きステップを示すことが解明され、この集団的性質には reverse stroke が鍵となっていることがシミュレーションから判明した。したがって、心筋 β ミオシンの分子特性として reverse stroke を明らかにし、さらにミオシン多分子の力発生への影響を計算した本研究は、心収縮の分子メカニズムに新たな知見を与えるだろう。

参考文献

- Akaike, H. (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle | SpringerLink.
- Aksel, T., E. Choe Yu, S. Sutton, K. M. Ruppel & J. A. Spudich (2015) Ensemble force changes that result from human cardiac myosin mutations and a small-molecule effector. *Cell Rep*, 11, 910-920.
- Al-Khayat, H. A., E. P. Morris, R. W. Kensler & J. M. Squire (2008) Myosin filament 3D structure in mammalian cardiac muscle. *J Struct Biol*, 163, 117-26.
- Albet-Torres, N., M. J. Bloemink, T. Barman, R. Candau, K. Frölander, M. A. Geeves, K. Golker, C. Herrmann, C. Lionne, C. Piperio, S. Schmitz, C. Veigel & A. Månsson (2009) Drug effect unveils inter-head cooperativity and strain-dependent ADP release in fast skeletal actomyosin. *J Biol Chem*, 284, 22926-37.
- Baker, J. E. (2004) Free energy transduction in a chemical motor model. *J. Theor. Biol*, 228, 467-476.
- Bers, D. (2001) Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force (2nd ed.). Springer Netherlands.
- Bloemink, M., J. Deacon, S. Langer, C. Vera, A. Combs, L. Leinwand & M. A. Geeves (2014) The hypertrophic cardiomyopathy myosin mutation R453C alters ATP binding and hydrolysis of human cardiac β -myosin. *J Biol Chem*, 289, 5158-67.
- Bronson, J. E., J. Fei, J. M. Hofman, R. L. Gonzalez & C. H. Wiggins (2009) Learning rates and states from biophysical time series: a Bayesian approach to model selection and single-molecule FRET data. *Biophys. J.*, 97, 3196-3205.
- Brunello, E., M. Reconditi, R. Elangovan, M. Linari, Y.-B. Sun, T. Narayanan, P. Panine, G. Piazzesi, M. Irving & V. Lombardi (2007) Skeletal muscle resists stretch by rapid binding of the second motor domain of myosin to actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20114-20119.
- Burghardt, T. P., X. Sun, Y. Wang & K. Ajtai (2015) In vitro and in vivo single myosin step-sizes in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 463-77.
- Capitanio, M., M. Canepari, P. Cacciafesta, V. Lombardi, R. Cicchi, M. Maffei, F. S. Pavone & R. Bottinelli (2006) Two independent mechanical events in the interaction cycle of skeletal muscle myosin with actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 87-92.
- Capitanio, M., M. Canepari, M. Maffei, D. Beneventi, C. Monico, F. Vanzi, R. Bottinelli & F. S. Pavone (2012) Ultrafast force-clamp spectroscopy of single molecules reveals load dependence of myosin working stroke. *Nature Methods*, 9, 1013-1019.
- Caremani, M., L. Melli, M. Dolfi, V. Lombardi & M. Linari (2013) The working stroke of the myosin II motor in muscle is not tightly coupled to release of orthophosphate from its active site. *J. Physiol*, 591, 5187-5205.
- Caremani, M., F. Pinzauti, M. Reconditi, G. Piazzesi, G. J. Stienen, V. Lombardi & M. Linari (2016) Size

- and speed of the working stroke of cardiac myosin in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 3675-80.
- Carter, B. C., M. Vershinin & S. P. Gross (2008) A comparison of step-detection methods: how well can you do? *Biophys J*, 94, 306-19.
- Carter, N. J. & R. A. Cross (2005) Mechanics of the kinesin step. *Nature*, 435, 308–312.
- Cecchini, M., Y. Alexeev & M. Karplus (2010) Pi release from myosin: a simulation analysis of possible pathways. *Structure*, 18, 458-70.
- Dantzig, J. A., Y. E. Goldman, N. C. Millar, J. Lacktis & E. Homsher (1992) Reversal of the cross-bridge force-generating transition by photogeneration of phosphate in rabbit psoas muscle fibres. *J Physiol*, 451, 247-78.
- Deacon, J. C., M. J. Bloemink, H. Rezavandi, M. A. Geeves & L. A. Leinwand (2012) Identification of functional differences between recombinant human α and β cardiac myosin motors. *Cell. Mol.*, 69, 4239-4255.
- Debold, E. P., J. B. Patlak & D. M. Warshaw (2005) Slip sliding away: load-dependence of velocity generated by skeletal muscle myosin molecules in the laser trap. *Biophys J*, 89, L34-6.
- Ebashi, S. & F. Ebashi (1964) A new protein component participating in the superprecipitation of myosin. *B. J. Biochem*, 55.
- Fawcett, D. W. & N. S. McNutt (1969) The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle. *J Cell Biol*, 42, 1-45.
- Finer, J. T., R. M. Simmons & J. A. Spudich (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368, 113-9.
- Fujita, K., M. Ohmachi, K. Ikezaki, T. Yanagida & M. Iwaki (2019) Direct visualization of human myosin II force generation using DNA origami-based thick filaments. *Communications Biology*, 2, 1-11.
- Goldman, Y. E., M. G. Hibberd, J. A. McCray & D. R. Trentham (1982) Relaxation of muscle fibres by photolysis of caged ATP. *Nature*, 300, 701-5.
- Greenberg, M. J. & J. R. Moore (2010) The molecular basis of frictional loads in the in vitro motility assay with applications to the study of the loaded mechanochemistry of molecular motors. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67, 273-85.
- Greenberg, M. J., H. Shuman & E. M. Ostap (2014) Inherent force-dependent properties of beta-cardiac myosin contribute to the force-velocity relationship of cardiac muscle. *Biophys. J*, 107, L41-L44.
- Gulick, A. M., C. B. Bauer, J. B. Thoden & I. Rayment (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATP γ S, and MgAMPPNP complexes of the Dictyostelium discoideum myosin motor domain. *Biochemistry*, 36, 11619-28.
- Harada, Y., K. Sakurada, T. Aoki, D. D. Thomas & T. Yanagida (1990) Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay. *J Mol Biol*, 216, 49-68.
- Hartman, M. A. & J. A. Spudich (2012) The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci*, 125, 1627-32.

- Hill. (1938). The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 126, 136–195
- Howard, J. (2000). *Mechanics of Motor Protein and the Cytoskeleton*. *Sinauer*
- Hua, W., E. C. Young, M. L. Fleming & J. Gelles (1997) Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature*, 388, 390-3.
- Huxley, A. F. & R. M. Simmons (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, 233, 533-8.
- Ishijima, A., H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funatsu & 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.
- Johnson, C. A., J. Walklate, M. Svcevic, S. M. Mijailovich, C. Vera, A. Karabina, L. A. Leinwand & M. A. Geeves (2019) The ATPase cycle of human muscle myosin II isoforms: Adaptation of a single mechanochemical cycle for different physiological roles. *J Biol Chem*, 294, 14267-14278.
- Kaya, M. & H. Higuchi (2010) Nonlinear elasticity and an 8-nm working stroke of single myosin molecules in myofilaments. *Science (New York, N.Y.)*, 329, 686-689.
- Kaya, M., Y. Tani, T. Washio, T. Hisada & H. Higuchi (2017) Coordinated force generation of skeletal myosins in myofilaments through motor coupling. *Nat. Commun*, 8, 16036.
- Kerssemakers, J. W. J., E. L. Munteanu, L. Laan, T. L. Noetzel, M. E. Janson & M. Dogterom (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*, 442, 709-712.
- Kojima, H., E. Muto, H. Higuchi & T. Yanagida (1997) Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys J*, 73, 2012-22.
- Kron, S. J. & J. A. Spudich (1986) Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 6272-6.
- Lee, L. A., A. Karabina, L. J. Broadwell & L. A. Leinwand (2019) The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skeletal Muscle*, 9, 7.
- Liu, C., M. Kawana, D. Song, K. M. Ruppel & J. A. Spudich (2018) Controlling load-dependent kinetics of β -cardiac myosin at the single-molecule level. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 25, 505-514.
- Llinas, P., T. Isabet, L. Song, V. Ropars, B. Zong, H. Benisty, S. Sirigu, C. Morris, C. Kikuti, D. Safer, H. L. Sweeney & A. Houdusse (2015) How actin initiates the motor activity of Myosin. *Dev Cell*, 33, 401-12.
- Lou, Q., V. V. Fedorov, A. V. Glukhov, N. Moazami, V. G. Fast & I. R. Efimov (2011) Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure. *Circulation*, 123, 1881-90.
- Louch, W. E., K. A. Sheehan & B. M. Wolska (2011) Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 288-98.
- Lymn, R. W. & E. W. Taylor (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.

- Biochemistry*, 10, 4617-24.
- McNamara, J., A. Li, C. G. dos Remedios & R. Cooke (2015) The role of super-relaxed myosin in skeletal and cardiac muscle. *Biophys Rev*, 7, 5-14.
- Mentes, A., A. Huehn, X. Liu, A. Zwolak, R. Dominguez, H. Shuman, E. Ostap & C. Sindelar. (2018) High resolution Cryo-EM structures of actin-bound myosin states reveal the mechanism of myosin force sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 1292-1297.
- Mijailovich, S. M., D. Nedic, M. Svicevic, B. Stojanovic, J. Walklate, Z. Ujfalusi & M. A. Geeves (2017) Modeling the actin.myosin ATPase cross-bridge cycle for skeletal and cardiac muscle myosin isoforms. *Biophys J*, 112, 984-996.
- Muretta, J. M., J. A. Rohde, D. O. Johnsrud, S. Cornea & D. D. Thomas (2015) Direct real-time detection of the structural and biochemical events in the myosin power stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 14272-7.
- Månsson, A. (2016) Actomyosin based contraction: one mechanokinetic model from single molecules to muscle? *J Muscle Res Cell Motil*, 37, 181-194.
- Nicholas, M. P., L. Rao & A. Gennerich (2014) Covalent immobilization of microtubules on glass surfaces for molecular motor force measurements and other single-molecule assays. *Methods Mol Biol*, 1136, 137-69.
- Nishiyama, M., H. Higuchi & T. Yanagida (2002) Chemomechanical coupling of the forward and backward steps of single kinesin molecules. *Nat Cell Biol*, 4, 790-7.
- Nishizaka, T., R. Seo, H. Tadakuma, J. K. Kinosita & S. Ishiwata (2000) Characterization of single actomyosin rigor bonds: load dependence of lifetime and mechanical properties. *Biophys J*, 79, 962-974.
- Nyitrai, M. & M. A. Geeves (2004) Adenosine diphosphate and strain sensitivity in myosin motors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359, 1867-77.
- Offer, G. & K. W. Ranatunga (2013) A cross-bridge cycle with two tension-generating steps simulates skeletal muscle mechanics. *Biophys J.*, 105, 928-940.
- Ozawa, S. (2009). 標準生理学 第7版. 医学書院
- Palmiter, K. A., M. J. Tyska, D. E. Dupuis, N. R. Alpert & D. M. Warshaw (1999) Kinetic differences at the single molecule level account for the functional diversity of rabbit cardiac myosin isoforms. *J. Physiol.*, 519 Pt 3, 669-678.
- Piazzesi, G., M. Reconditi, M. Linari, L. Lucii, P. Bianco, E. Brunello, V. Decostre, A. Stewart, D. B. Gore, T. C. Irving, M. Irving & V. Lombardi (2007) Skeletal muscle performance determined by modulation of number of myosin motors rather than motor force or stroke size. *Cell*, 131, 784-795.
- Planelles-Herrero, V. J., J. J. Hartman, J. Robert-Paganin, F. I. Malik & A. Houdusse (2017) Mechanistic and structural basis for activation of cardiac myosin force production by omecamtiv mecarbil. *Nat.*

Commun, 8, 1-10.

- Previs, M. J., J. Y. Mun, A. J. Michalek, S. B. Previs, J. Gulick, J. Robbins, D. M. Warshaw & R. Craig (2016) Phosphorylation and calcium antagonistically tune myosin-binding protein C's structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 3239-44.
- Rahman, M. A., M. Ušaj, D. E. Rassier & A. Månsson (2018) Blebbistatin effects expose hidden secrets in the force-generating cycle of actin and myosin. *Biophys J*, 115, 386-397.
- Reiser, P. J. & W. O. Kline (1998) Electrophoretic separation and quantitation of cardiac myosin heavy chain isoforms in eight mammalian species. *Am J Physiol*, 274, H1048-53.
- Ritchie, M. D., M. A. Geeves, S. K. Woodward & D. J. Manstein (1993) Kinetic characterization of a cytoplasmic myosin motor domain expressed in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8619-23.
- Rosenfeld, S. S., J. Xing, M. Whitaker, H. C. Cheung, F. Brown, A. Wells, R. A. Milligan & H. L. Sweeney (2000) Kinetic and spectroscopic evidence for three actomyosin:ADP states in smooth muscle. *J Biol Chem*, 275, 25418-26.
- Sadler, B. M. (1999). Analysis of multiscale products for step detection and estimation. *IEEE Transactions on Information Theory*, 45, 1043-1051.
- Sasaki, D., H. Fujita, N. Fukuda, S. Kurihara & S. Ishiwata (2005) Auto-oscillations of skinned myocardium correlating with heartbeat. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 93-101.
- Saupe, K. W., F. R. Eberli, J. S. Ingwall & C. S. Apstein (1999) Hypoperfusion-induced contractile failure does not require changes in cardiac energetics. *Am J Physiol*, 276, H1715-23.
- Schiaffino, S. & C. Reggiani (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*, 91, 1447-531.
- Sellers, J. R. & C. Veigel (2010) Direct observation of the myosin-V power stroke and its reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17, 590-595.
- Shintani, S. A., T. Washio & H. Higuchi (2020) Mechanism of contraction rhythm homeostasis for hyperthermal sarcomeric oscillations of neonatal cardiomyocytes. *Sci Rep*, 10, 20468.
- Sleep, J. A. & R. L. Hutton (1980) Exchange between inorganic phosphate and adenosine 5'-triphosphate in the medium by actomyosin subfragment 1. *Biochemistry*, 19, 1276-83.
- Smith, D. A. (2014) A new mechanokinetic model for muscle contraction, where force and movement are triggered by phosphate release. *J Muscle Res Cell Motil*, 35, 295-306.
- Smith, N. P., C. J. Barclay & D. S. Loiselle (2005) The efficiency of muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol*, 88, 1-58.
- Solaro, R. J. & H. M. Rarick (1998) Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res*, 83, 471-80.
- Sommese, R. F., J. Sung, S. Nag, S. Sutton, J. C. Deacon, E. Choe, L. A. Leinwand, K. Ruppel & J. A. Spudich (2013) Molecular consequences of the R453C hypertrophic cardiomyopathy mutation on human beta-cardiac myosin motor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 12607-12.

- Spudich, J. A. (2019) Three perspectives on the molecular basis of hypercontractility caused by hypertrophic cardiomyopathy mutations. *Pflugers Arch*, 471, 701-717.
- Stehle, R. (2017) Force responses and sarcomere dynamics of cardiac myofibrils induced by rapid changes in [Pi]. *Biophys J*, 112, 356-367.
- Straight, C. R., K. M. Bell, J. N. Slosberg, M. S. Miller & D. M. Swank (2019) A myosin-based mechanism for stretch activation and its possible role revealed by varying phosphate concentration in fast and slow mouse skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 317, C1143-C1152.
- Sung, J., S. Nag, K. I. Mortensen, C. L. Vestergaard, S. Sutton, K. Ruppel, H. Flyvbjerg & J. A. Spudich (2015) Harmonic force spectroscopy measures load-dependent kinetics of individual human β -cardiac myosin molecules. *Nat. Commun*, 6, 7931.
- Suzuki, N., H. Miyata, S. Ishiwata & K. Kinosita (1996) Preparation of bead-tailed actin filaments: estimation of the torque produced by the sliding force in an in vitro motility assay. *Biophys. J.*, 70, 401-408.
- Svoboda, K. & S. M. Block (1994a) Biological applications of optical forces. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23, 247-85.
- (1994b) Optical trapping of metallic Rayleigh particles. *Opt Lett*, 19, 930-2.
- Sweeney, H. L. & A. Houdusse (2010) Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys*, 39, 539-57.
- Takagi, Y., E. E. Homsher, Y. E. Goldman & H. Shuman (2006) Force generation in single conventional actomyosin complexes under high dynamic load. *Biophys J*, 90, 1295-307.
- Talbot, J. & L. Maves (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 5, 518-34.
- Tanaka, H., A. Ishijima, M. Honda, K. Saito & T. Yanagida (1998) Orientation dependence of displacements by a single one-headed myosin relative to the actin filament. *Biophys J*, 75, 1886-94.
- Tyska, M. J., D. E. Dupuis, W. H. Guilford, J. B. Patlak, G. S. Waller, K. M. Trybus, D. M. Warshaw & S. Lowey (1999) Two heads of myosin are better than one for generating force and motion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4402-7.
- Tyska, M. J., E. Hayes, M. Giewat, C. E. Seidman, J. G. Seidman & D. M. Warshaw (2000) Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*, 86, 737-44.
- Uyeda, T. Q., S. J. Kron & J. A. Spudich (1990) Myosin step size. Estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin. *J Mol Biol*, 214, 699-710.
- Washio, T., T. Hisada, S. A. Shintani & H. Higuchi (2017) Analysis of spontaneous oscillations for a three-state power-stroke model. *Phys Rev E*, 95, 022411.
- Washio, T., S. A. Shintani, H. Higuchi, S. Sugiura & T. Hisada (2019) Effect of myofibril passive elastic

- properties on the mechanical communication between motor proteins on adjacent sarcomeres. *Sci Rep*, 9, 1-17.
- Washio, T., S. Sugiura, R. Kanada, J. I. Okada & T. Hisada (2018) Coupling langevin dynamics with continuum mechanics: exposing the role of sarcomere stretch activation mechanisms to cardiac function. *Front Physiol*, 9, 333.
- Washio, T., K. Yoneda, J. Okada, T. Kariya, S. Sugiura & T. Hisada (2016) Ventricular fiber optimization utilizing the branching structure. *Int J Numer Method Biomed Eng*, 32.
- Woody, M. S., M. J. Greenberg, B. Barua, D. A. Winkelmann, Y. E. Goldman & E. M. Ostap (2018) Positive cardiac inotrope omecamtiv mecarbil activates muscle despite suppressing the myosin working stroke. *Nat. Commun*, 9, 1-11.
- Woody, M. S., D. A. Winkelmann, M. Capitanio, E. M. Ostap & Y. E. Goldman (2019) Single molecule mechanics resolves the earliest events in force generation by cardiac myosin. *eLife*, 8, e49266.
- Yamashita, H., S. Sugiura, M. Sata, T. Serizawa, M. Iizuka, T. Shimmen & S. Momomura (1993) Depressed sliding velocity of isolated cardiac myosin from cardiomyopathic hamsters: evidence for an alteration in mechanical interaction of actomyosin. *Mol Cell Biochem*, 119, 79-88.
- Zoghbi, M. E., J. L. Woodhead, R. L. Moss & R. Craig (2008) Three-dimensional structure of vertebrate cardiac muscle myosin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 2386-90.

謝辞

本博士論文を執筆するにあたり、お世話になりました全ての方々に心より感謝致します。

樋口教授には入学当初から実験やゼミを通して、分子モーターについて丁寧に教えていただきました。心から感謝申し上げます。また、私が研究の細かいところに集中して全体像が把握してない時に、全体を俯瞰しながら適切なアドバイスをしていただきありがとうございました。

茅元司助教には研究に関して、実験や解析の手法だけでなく、考え方や研究との向かい合い方についての的確なアドバイスをしていただきました。また、学会発表の時や修士・博士論文発表の時に、お忙しい中お時間を割いて私の指導をしていただきました。それだけでなく、私にアメリカ留学のチャンスを与えていただき本当にありがとうございました。

鷲尾先生、久田先生はミオシンモデル作製において、議論や実行方法を含め様々なアドバイスをしていただきました。本当にありがとうございます。

樋口研究室の皆さんには研究のことだけでなく私生活の様々なことまでお世話になりました。研究室で研究の進捗報告を発表する時、貴重な意見を述べていただき本当にありがとうございます。特に近藤さんには入学当初から実験装置について様々なことを教えていただき、光学顕微鏡について多くのことを知ることが出来ました。

本研究で電子顕微鏡の共同利用をさせていただいた東京大学微細構造解析プラットフォームの皆様にも感謝申し上げます。

研究室の皆で富士山の登山は本当にいい思い出です。

以上、述べた方々以外にも多大なるご支援、ご協力のもとで本論文を執筆する事ができました。心より深く感謝いたします。