

# リニアモーター（ミオシン）の場合

安藤敏夫・吉田賢右・遠藤斗志也

安藤 最初に用語の説明をします。図1を見て下さい。ブラウンアンラチェットとパワーstrokeという言葉(Kolomeisky, CRC Press 2015)。連続体のラチェットというのは、化学状態に依存してエネルギー地形図が変動する。例えば化学状態1と化学状態2があって、化学遷移とともにポテンシャルが動くと、変動したエネルギー地形図に沿って物が動く。これがいわゆるブラウンアンラチェットというもので、理論家によっては興味のある対象なんでしょうけれど、実際にはこれで運動が起こることはない。というのは、理論的な解析から、負荷に弱いとか、エネルギー効率が悪いことが知られているので(Wagoner & Dill, J. Phys. Chem. B 2016)、実際の生体分子モーターではこういうことは起こりません。

例えばももとのアイデアでは、横軸がアクチン線維の場合、モノマーごとの結合サイトが飛び飛びにあって、各々が図のようなポテンシャルを持っている。そしてポテンシャルに沿って、物が滑って動くということだけど、実際にはそういうことは成り立たなくて、滑って動くというよりは結合部位から結合部位に飛びってことですね。今は皆、そういうように考えているんじゃないかと思います。

もう一つのモデル(右)は、パワーstrokeモデルよりもちょっと上位に位置する概念なんですけど、結合サイトがとびとびにあって、そこに結合しているときに化学反応が進展する。化学反応の進展のどこかで飛びが起こるという考え方です。これがパワーstrokeモデルの上位モデルなんですけども、この化学状態のいずれかの遷移のどこかで物理的な変位が起こると。変位が構造変化によるとするのがパワーstrokeモデルです。ただし上位の概念では、構造変化ではなく化学遷移(トランジション)という言い方をします。化学遷移によって物理的には変位が起こると。

次に、ルースカップリングとタイトカップリングという言葉で

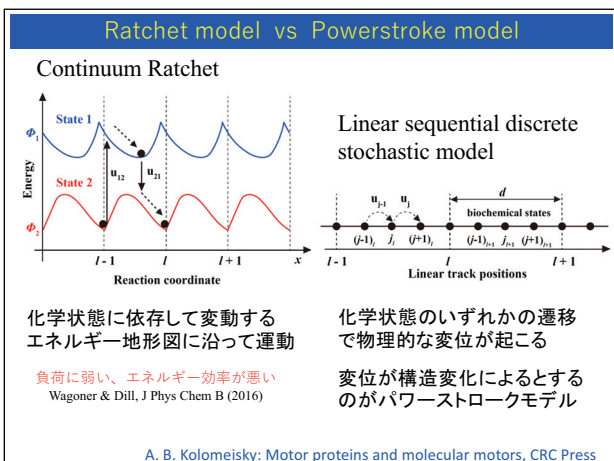
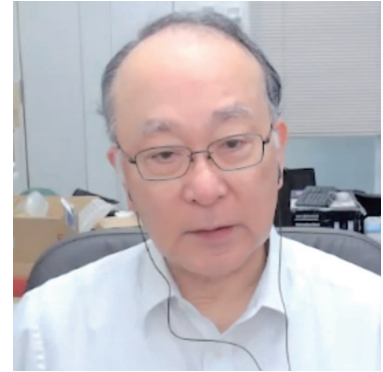


図1 ラチェットとパワーstroke

す(図2)。最近はまだあまり使われなくなっていますが、というアイデアかというところ、ルースカップリングではATPase反応と運動、もしくは変位が1対1に対応しない。ミオシンの場合で言えば、ATP1分子の分解ごとに運動する



安藤敏夫 (金沢大)

ステップ数は1とは限らず、複数回ステップし得るとするのがルースカップリングモデルです。ももとは大澤文夫先生の発想ですけど(Oosawa & Hayashi, Adv. Biophys. 1986)、負荷なしの条件でも1ステップ動くのにATP1分子を消費するのはもったいない、無駄ではないかという発想からきているんだと思います。だから1ATPで何歩も動くことがあり得ると。筋肉では1ATPでミオシンが600nm動くという論文が、以前出ました。しかし私のところの学生だった坂本武史君が、蛍光ATPとミオシンVの両方を可視化して、ATP1分子の分解ごとに一歩歩いてることが証明された(T. Sakamoto et al., Nature 2008)ので、このアイデアは今では成り立たないと思います。

**Loose Coupling Model**

ATPase 反応と変位(運動)が1:1に対応しないとするモデル

例: Myosinの場合、ATP 1分子の分解毎に運動するステップ数は1とは限らず、複数回ステップし得る

**Myosin Vの実験により完全に否定された**

T. Sakamoto et al. Nature (2008)

Loose couplingのアイデアは、負荷なし条件下でも1ステップするのにATP 1分子を消費するのは無駄ではないか、という発想から来ている。

図2 ルースカップリングとタイトカップリング

そこで、パワーstrokeモデルです(図3)。パワーstrokeモデルも、狭義の定義と広義の定義があるんですけど、ここでは狭義の厳密な定義をします。構造変化そのものが前方への変位力発生であるとするのがパワーstrokeモデルだと定義すると、ミオシンVの場合はパワーstrokeモデルは厳密には成り立たないと言えるかと思いますが。以下、詳しく説明します。

生体分子モーターもしくは生体エネルギー変換ということ考えたときに、ATPないしはGTPの加水分解で供給されるエネ

### Powerstroke Modelは完全に正しいか？

構造変化そのものが前方への変位（力発生）であるとするのがパワーstrokeモデルだと定義すると、

パワーstrokeモデルは、Myosin Vの場合、正確ではない（高速AFMによる観察結果から）

以下、詳しく説明する

図3 パワーstrokeは正しいか？

ルギーが仕事に変換されるというのが一般的な考え方ですよ。例えば ATP 分解反応ですと、反応サイクルが回っていて、各ステップでギブスエネルギー変換がある。そのうちのどれかが仕事に使われる、仕事に直接変換されるという考え方です（図4）。ですから、生体分子モーターの研究者の多くは、どの $\Delta G$ が直接仕事に使われているのだろうか、そういう問いかけをするわけです。

それに対してわれわれの問い方は、ATP、GTP 以外のエネルギー、つまり、ATPase、GTPase の反応サイクルの $\Delta G$ 以外の所から来るエネルギーが仕事に直接使われることもあり得るのではないかと。ATP、GTP 分解酵素のモーターであっても、仕事に使われるエネルギーは加水分解反応のステップではなく、他の場所から来ている、他から来たエネルギーを使っていることもあり得るのではないかと、というのがわれわれの問いです。

### 力学的仕事に変換される直接のエネルギー源は何か？



$\Delta G \approx -20 k_B T$

は 100% もしくはそれ以下が力学的仕事 (W) に使われる  
100%より少ない場合、 $\Delta G$  は部分的に熱になるか他の形の自由エネルギーに変換される

ATPase/GTPase反応は複数のステップを経て進行する

- ・どの $\Delta G$ が直接Wに使われるのか？
- ・ATP/GTP駆動のモーターでATP/GTP以外のエネルギーがWに直接使われることはあり得るか？

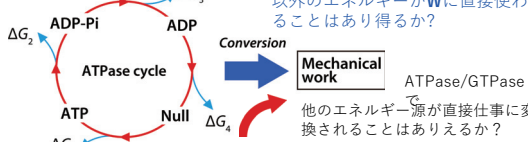


図4 力学的仕事に使われるエネルギーはATP/GTPから来るのか？

ご存じのように、ミオシン（図5はミオシンV）は筋肉の分野ですごく多くの人によって長く研究されてきており、そこでは広く受け入れられている説があります。それによれば、ATPの加水分解反応のATPがADP+Piに分解されるステップ（図6のA+M-ATPからA+M-ADP+Piになるステップ）で、足のモータードメイン（頭部）とネックの間の角度がかくんと変わる（リカバリーストローク）。この曲がった構造はブレパワーstroke構造といわれます。これがアクチン線維に結合してリン酸が外れるとパワーstrokeが起こる（図6のA-M-ADP+PiからA-M-ADPになるステップ）。つまり、リカバリーストロークで起こった構造変化が元に戻るという考え方です。リカバリーストロークのときはアクチンに結合していなかったので何もしないわけですが、今回はアクチン結合しているので、アクチンを後にキックす

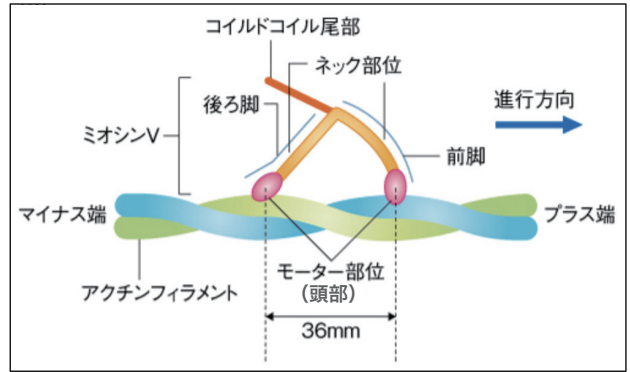


図5 ミオシン V

ることになります。アクチンをキックして、一步、動く。この考え方に従えば、リン酸で放出されるエネルギーが仕事に変換されると考えるわけです。図6下に  $10 k_B T$  と  $2 k_B T$ 、 $8 k_B T$  って書いてありますが、これは測定の仕方によって多少変わってくるので必ずしも正確ではないですが、いずれにしても、このリン酸の放出で解放される $\Delta G$ が直接、仕事に使われているというふうに皆さん考えているわけです。そんなにおかしくはないですよ。おかしくはないんですけど、われわれは、これはおかしいというふうに言っているわけです。

### 筋収縮のエネルギー利用に関する一般的な考え方

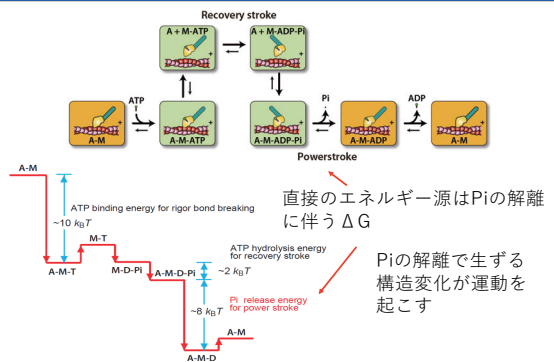


図6 ミオシン歩行におけるギブスエネルギー変化

というのは、この考え方に反すると思われる現象をわれわれは捉えてるからなんです。そのうちの一つが、ミオシンの足はそのままで尻尾（尾部）の半分を切ったフラグメント、よく HMM (heavy meromyosin) っていうんですけど、これをアクチンにADP存在下で結合させて、高速AFMで観察します（図7）。ここで一つ注目したいのは、ミオシンの二足歩行で前足と後ろ足が同時にアクチンに結合するためには、前足にリカバリーストロークが起こっていないと行けない（図6）。ところが加水分解が起こらないADP存在下でも二足結合が起こるので、リカバリーストロークは熱的揺らぎでも起こるんじゃないかということが示唆されます。このAFM観察では、尻尾の部分のコイルドコイルがほどけて、その後に前足がパワーstrokeのように回転してる（これをレバーアームスイングと言う）わけです（図7）。これはAFMの探針によるアーティファクトだ、分子を壊してるんじゃない

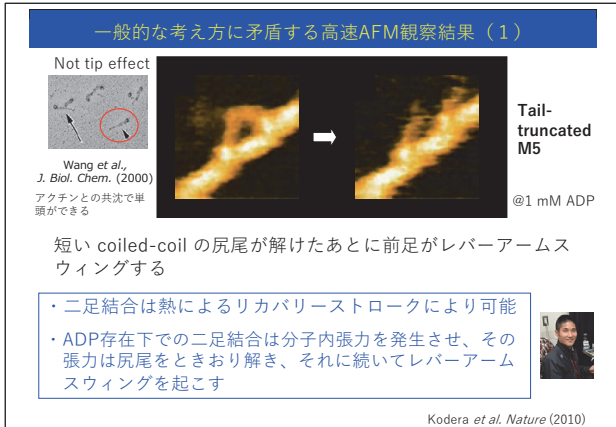


図7 ADP存在下でも尻尾がほどけて前に進む

ないか、ということも言われるんですけど、生化学的な証拠からも、こういう単頭ミオシンができるということが報告されています (Wang et al., JBC 2000)。いずれにしても短い coiled-coil の尻尾がほどけるほど、この二足結合しているミオシン分子には、分子内張力が発生するという事なんです。尻尾がほどけた後に前足がスウィングする、ということは、レバーアームスウィングのエネルギーは、二足結合だけで生じ得るということを示唆してるんだと言えます。

もう一つは、低濃度 ATP 存在下で観察される前足の足踏み (ストンピング) という現象があります (図8)。これは、一度前足がアクチンから解離して再着地して、その後一步前進するという現象です。これを断定はできないんですが、リン酸の放出はすごく速い。すなわち ADP リリースが律速で、リン酸リリースは律速ではないということが知られているので、ミオシン V がアクチンに結合をした直後には既にリン酸が放出されているはずで、前足にはリン酸が結合していない。しかし、それが再着地した後にレバーアームスウィングするということは、リン酸放出が起こらないヘッドでパワーstrookが起こることです。これは従来説に矛盾するということになると思います。たとえば、リン酸の解離に伴う  $\Delta G$  が構造歪みに使われたとしても、頭部がアクチンから解離すると構造歪みのエネルギーは素早く熱の形で散逸し

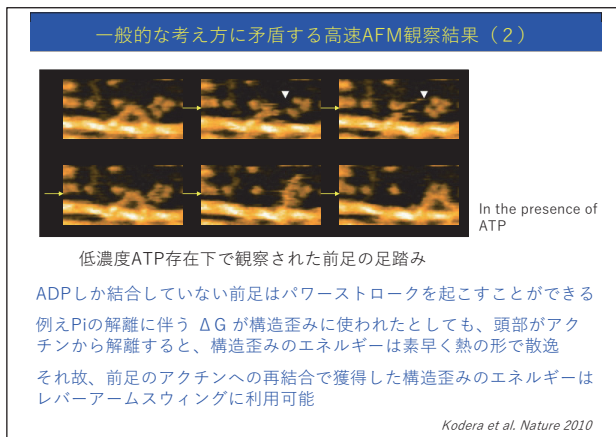


図8 リン酸放出後に前足が再結合してからでも、前に進む

てるわけで、足踏みした後の前足には、ATP 加水分解後のリン酸放出に伴うエネルギー、 $\Delta G$  はもうないはずで。しかしパワーstrookしているということになります。

以上、二つのことを考えると、前足のアクチンへの再結合、フットストンブの場合は、前足のアクチンへの再結合で獲得した構造歪みのエネルギーは、レバーアームスウィングに利用可能であると。つまり ADP 型でも、アクチンに結合していると構造歪みが生じて、後ろ足が解離すれば、あるいは尻尾が切れてコイルドコイルがほどければ前足は回転する、レバーアームスウィングするわけです。つまりレバーアームスウィングの直接のエネルギーは、ATP 加水分解から来るのではなく、アクチンとミオシン間の強い結合エネルギー、大きな結合エネルギーから来ているということになります。例えば ADP 存在下の場合、この結合エネルギーの  $\Delta G$  は  $14 \sim 16 k_B T$  と、かなり大きいです。ここに構造歪みが生じると、図9で示すようにエネルギーが一部使われて、その分結合が弱くなる、つまり構造歪みがあるときの結合エネルギーは小さくなる。だから、レバーアームスウィングという力学的な仕事の直接のエネルギー源は、ATP 加水分解とは無関係に、アクチン-ミオシン間の強い結合であるというのがわれわれの説です。それでは ATP 加水分解のエネルギーはどこに使われるかというと、力学的な仕事ではなく、後ろ足のアクチンからの解離に主に使われていると考えられます。

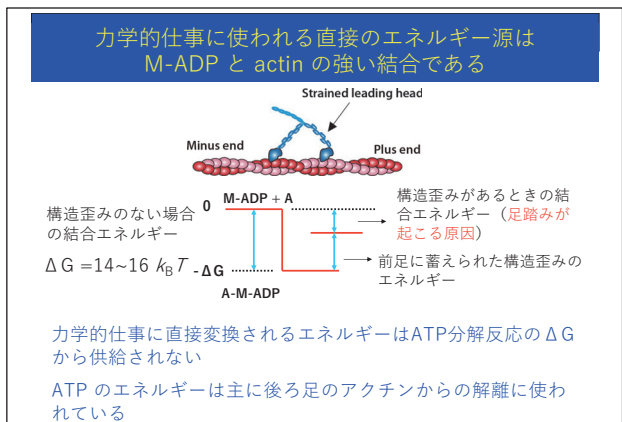


図9 前足の結合エネルギーは構造ひずみを生み出す

遠藤 すみません、力学的仕事というのは、前足の話をしてるんですか？でも、前進するのは後ろ足が前に来るから前進するのですよね？

安藤 そうです。だけど、それは前足が回転 (スウィング) するからです。前足が回転するから後ろ足は前に進めるわけです。前足のレバーアームスウィングによって一步前進する運動が力学的仕事になります。

遠藤 でも、そうするとストンピングをすると ATP の加水分解 1 回分の  $\Delta G$  は、1 回のストンピングでも使われてしまうんです

よね。

安藤 そうです。

遠藤 それで結合しますよね。結合して張力が蓄えられて、またスイングするのにその結合エネルギーが使えるということだと、永久機関になってしまいませんか？エネルギーなしに何回も力学的仕事をするっていうのはおかしいですよね？

安藤 いや、使われてるのは図9の結合のエネルギーです。もともと結合エネルギーが大きいので、構造が歪んだとしても、結合してしまうわけです。それで歪んでフットストンピングします。そうすると歪みのエネルギーはなくなりますね。それでまた再結合すると歪みのエネルギーを獲得します。だからフットストンピングというのは一度エネルギーを獲得したけど、それを熱の形で放出してしまって、再結合によってまたエネルギーを獲得して、その再結合で獲得したエネルギーを仕事に変換してるわけです。だから一度獲得したエネルギーを何回も使ってるわけではないです。

遠藤 なるほど。ちなみにこれは、後ろ足の話とは別ですね。

安藤 そうです。後ろ足は前足を引きとめておくっていうか。後ろ足が結合してなかったら、前足は結合に際して歪まないわけです。

遠藤 だから、これがモーターとして進むのは、前足のスイングによって後ろ足が解離して回って進むわけで、そっちはATPのエネルギーが進むのに使われてると。前のほうがくっ付いたり離れたりするときに仕事をしてるのは、くっ付いた時に獲得したエネルギーが単に放出されているだけだと、そういう解釈ですか。

安藤 そうです。これ、卑近な例ですけど、弓を想定していただくと、弓矢っていうのは引くわけですよね。離すと飛んでくわけですけど、それと似たようなことで、図9でこういうふうに前足が弓なりになってエネルギーを蓄えて矢を飛ばす、後ろ足を前に出すと。

遠藤 でも、くっ付いた状態ってのは、かなり無理な状態でくっ付いてるんですよね。無理な状態でくっ付くのは、単に結合のエンタルピーで補償されてるってことですよね。

安藤 そうです。それで補償されてるわけです。だけど、歪んで結合するので、実際の結合エネルギーそのものは小さくなってしまっているわけです。

吉田 仕事に使われるATPのエネルギーは、加水分解とは違ったところから来ると言ってるけれども、結局これは物理的過程、つまりATPが結合して分解して、酵素上にADPが出現することが必要なわけで。ミオシンの上でATPが加水分解される過程だけを見るとエネルギーが生じてない、図6でATPとADP+Piは平衡状態にあって、そこではエネルギー差が生じていないということですよね。要するに、ATPが大事なのは、ADPを生じるためにATPは必要なんで、結局のところ、ADPやPiの解離かな、そのところで仕事に使われるエネルギーが出てくるということですよね。

安藤 はい。

吉田 だから、全体として見れば、ATPで加水分解がもちろん動いているんだけど、もっと微視的に見たら、ATPの加水分解のステップでは仕事に使われるエネルギーは出てないということですね。

安藤 ほんのわずかであると。

吉田 それは分かります。大体、近頃の酵素学では、例えば、別にモーターでなくても、ピルビン酸キナーゼとかヘキソキナーゼとか、ああいう酵素も、酵素上でATP加水分解のところではほとんど平衡状態で、結局結合のアフィニティのところ、使われるべきエネルギーが出てるんですよね。で、安藤さんの主張は、無機リン酸Piの解離から仕事を取り出ししてるのではなくて、ADPの解離のところから仕事のエネルギーを取り出ししてる、そういうお考えですね？

安藤 いや、違います。図6下のA-MからA-M-Tの $10k_B T$ というのは、アクチンとミオシンの強い結合を解離するのに使われてますよね。次にA-M-D-PiからA-M-Dの $8k_B T$ ですけど、これは確かに大きなエネルギードロップがあるんですけども、このエネルギーは力学的仕事には使われてないというのが私の考え方です。もちろんこのエネルギードロップは反応全体を1方向に進ませるには、絶対必要なんです。これが小さかったら反応が逆戻りしちゃうわけで。

ただ、ここで私が一番言いたいことは、A-M-ADP-Pi状態からA-M-ADP状態に行くところ(図6上)でパワーストロークという力学的仕事に使われる直接のエネルギー源は何かという問いです。私の答えは、Piの解離に伴う $\Delta G$ は、パワーストロークという力学的仕事の直接のエネルギー源ではありません。直接のエネルギー源はA-M-ADPからA-M-ADP with strainの状態(図9)に行くところの結合エネルギーであると。

吉田 そうするとPi解離のところから出る $8k_B T$ は反応を前に進

めるためのものであって、仕事ではなく熱になってしまっているということですか。そうするとエネルギー効率が悪い、6割とかになってしまうんですかね。

遠藤 そうすると Pi 解離の  $8k_B T$  には、前に進むと言った生理的意味はないんですね。

安藤 そうです。フットストップは低濃度 ATP でしか観察されない現象なわけです。われわれの高速 AFM 以外の方法でもフットストップは観察されているわけですが、それによれば、ATP 濃度を上げていくとフットストップは起こらない。だからフットストップそのものは生理的に意味があるということじゃなくて、どういふふうにしてエネルギーが使われるか、もしくはどういふふうにして運動が起こるかということ、その仕組みを示唆することができるというだけで、生理的な条件下でフットストップが起こっていると言っているわけではありません。

遠藤 それから、これ ADP が過剰な状態で見てるから、ADP がくっつきっぱなしだって言ってますけれども、離れてまたくっついてもいいわけですよね。だから、前足が結合しているときは ADP 型だけど、前足が離れたら ADP 離して、また ADP が前足にくっ付いたら前足がアクチンに結合するって、そういう解釈でもいいような気がするんですけど、そこは違うんですか。

安藤 いや、いいじゃないですか。ただし、ADP が過剰な状態では見ていません。フットストップは低濃度 ATP 下で観察しています。

遠藤 そういうほうが理解しやすいような気がします。

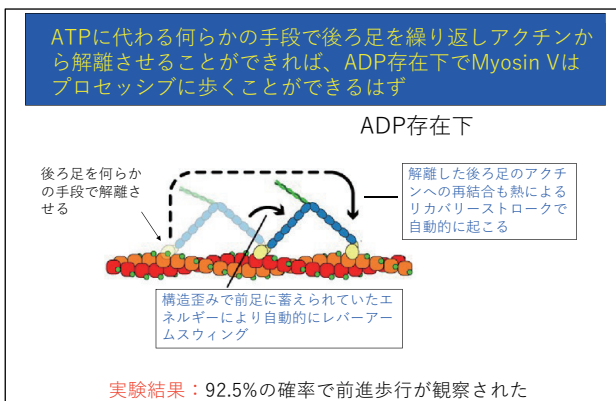


図 10 後ろ足を人為的に外せば、ADP 存在下でも前に進む

安藤 それでは先に進みます。図 9 の説が正しいかどうかというのが一番の問題で、これは、われわれの高速 AFM の観察結果から導き出した結論であって、証明はできてないんです。もし、われわれの説が正しければですけども、ADP 存在下で、後ろ足を ATP に代わる何らかの方法で離すことができれば、この分子

は絶対に一步進むはずであると (図 10)。なぜなら、この分子には既に分子内張力が蓄えられていて、後ろ足をアクチンから解離させれば、前足が自動的に回転するはずなわけです。前足が自動的に回転すると同時に、図 10 で「リカバリーストローク」がないとうまく結合できないわけですけども、ADP 存在下でも二足結合が起こっているということは、リカバリーストロークは熱エネルギーだけで起こり得るはずだと。

だから、われわれの説が正しければ、簡単に言えば、後ろ足をアクチンから解離させればこの分子は必ず一步前進するはずで、それを実験で示してあげればいいわけです。そこで、ここで AFM の探針で強くたたいて解離させるということ Interactive 高速 AFM でやればよいと考えました。これはミオシン V のために私が思い付いたアイデアなんですけど、実際にまだ論文にはなっていません (ただしこれを使った論文は既に出ています: Owa et al., Nat. Commun. 2019; Konno et al., J. Mol. Biol. 2018)。ユーザーが指定した場所に針を押し込むという、そういうアイデアで、技術的にはとても簡単なことなんですけど、それをこの ADP 存在下でやってみると、後ろ足をたたくと前に進んでいくのが観測されました。これを繰り返していくとミオシンはどんどん前に進んでいくので、分子が壊れてるんじゃないかと思う人もいると思うんですが、たたいた後に Caged ATP で ATP を放出させて、ATP で前進するかどうかを見ると、ちゃんと進む様子が観察できます。つまり、進んでいくミオシン分子は壊れていないというわけです。

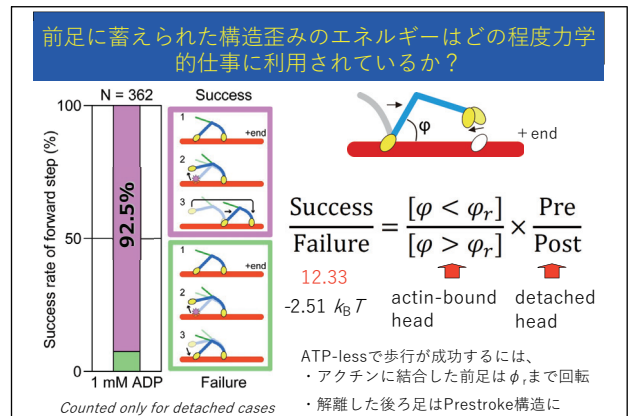


図 11 前足に蓄えらるる構造歪みエネルギーを見積もる

今の Interactive 高速 AFM の実験で、後ろ足をたたいて前に進むには何が起こらなければいけないかというと、図 11 でまずこの前足、ゆがんでいた前足が、ある程度以上、回転しなければいけないわけです。ある角度までスウィングするというプロセスと、解離した後ろ足が前の方に来たときに、リカバリーストロークのようにヘッドがプレ・ストローク・コンホメーションに変わらなければいけないわけです。そうして初めて、解離した後ろ足がこんどは前足となり得るわけです。この高速 AFM の実験を何回も繰り返して調べると、後ろ足をたたくとミオシンが前に進む成功率は 92.5%にも達します。それは、さっきの前足の回転がある角度以上起こること (図 11 の Success/Failure の式の右辺の角

度の項)と、リカバリーが起こること(同式右辺のPre/Postの項)、この二つの比の積になります。詳細は未発表データなので省略しますが、リカバリーストロークを起こすのに必要なエネルギー(図11の右辺のPre/Postの項)は $3.18 k_B T$ と求まります。ATPによるリカバリーストロークよりも効率悪いので遅いのですが、約 $3 k_B T$ という値から、熱的にもプレ・ストローク・コンホメーションに変わるためのリカバリーストロークが起こり得ると言えますし、実際ADP存在下でも二足結合が観察されるわけです。そうすると、今、前進の成功比( $-2.51 k_B T$ )と、熱的なリカバリーストロークのエネルギーが $+3.18 k_B T$ と求まったので、今度は前足のスイング、ある角度以上スイングするのに使われるエネルギー(図11の右辺の角度の項)がどのくらいかを計算できます。その結果は $-5.7 k_B T$ となります。従って、負荷なしの条件で行われる力学的仕事は、このぐらゐの構造歪みのエネルギーが必要であるという見積りを行うことができました。

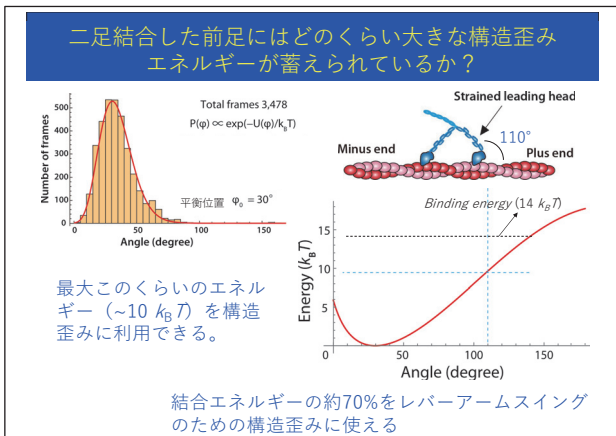


図12 実際に前足に蓄えられた構造歪みエネルギーは？

次に coiled-coil がほどけて単頭になったミオシンVとアクチンとの結合角度( $\phi$ )の角度分布を調べました(図12左上)。平衡のときの角度は $30^\circ$ ですが、広く分布しています。この分布、平衡からずれたときの分布からバネ定数、もしくは平衡点からずれたときのエネルギーを計算することができます。ここでさっきの $-5.7 k_B T$ を使うと、角度 $\phi$ が $76^\circ$ 以下になると結合できるということになります。 $76^\circ$ ってちょっと大きいんじゃないかと思われるかもしれないけれど、フレキシブルなので $60^\circ$ 以上あっても結合することはできるということになります。

まとめると、力学的仕事に使われる直接のエネルギーは、ATPの加水分解からは来ておらず、アクチンとミオシン間の強い結合から来ているというのがわれわれの結論です。だから、生体エネルギー変換で、いつも力学的な仕事はATP、GTPから来ると言われてきましたが、必ずしもそうでなくていいということが証明されたと思います。あと、この構造歪みによってどのくらいの大きさまでの仕事ができるかって計算してみたんですけど、結合エネルギー $14 k_B T$ に対して前足は $110^\circ$ まで歪んでるんですけども(図12右上)、このとき前足に蓄えられたエネルギーは $9.6 k_B T$ になります(図12右下)。したがって、結合エネルギー $14$

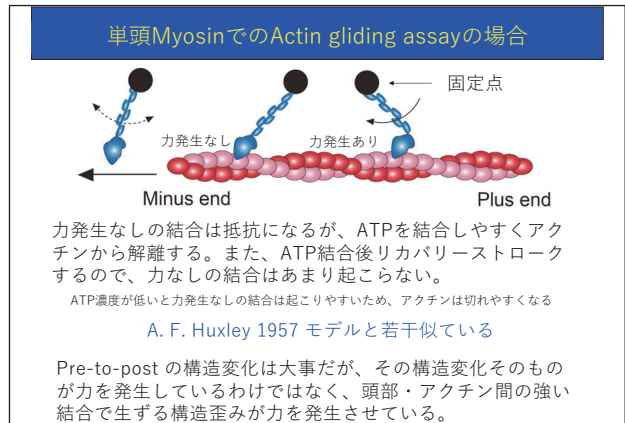


図13 単頭ミオシンが動く場合は？

$k_B T$ のうち約 $10 k_B T$ は構造歪みに使われている、つまりミオシンVができる仕事は結合エネルギーの70%、最大 $10 k_B T$ であるということを見積もることができました。

あと、これ前から言おうと思って、言う機会がなかったんですけど、双頭のミオシンVの歩行運動の他に、例えば単頭でもアクチン動くわけですよ(図13)。In vitro モテリティアッセイみたいに尾部のところを固定しておいてアクチンを加えると、アクチンが1方向に進むわけです。その現象とわれわれの観察結果をどういふふうに結び付けることができるかという問題があります。例えば図13左のように単頭ミオシンは尾部を固定してもぶらぶらして、ある程度いろんな角度で結合できるわけですが、図13中央のような角度で結合すると何も力は発生しない。一方で、熱的に頭部のところがゆがんでプレパワーストローク構造になって図13右のような角度で結合すると、構造歪みのエネルギーを使ってアクチンを押し出すことができるというわけです。もちろん、力発生なしの結合(図13中央)が頻繁に起こると、抵抗になって動けなくなっちゃうわけですが、図13中央のような角度で付いた頭部にはATPが結合しやすいというか、ADPは解離するので、ATPはすぐ結合する。一方で、図13右のような角度で結合すると、構造がゆがむとADPの解離ができなくなり、新しいATPやってくれないというわけです。したがって、図13中央の状態にはATPが付くので、力の発生なしで結合しても大きな負荷にはならない。熱的に揺らいでいて、図13中央のような角度で付いたり、図13右のような角度で付いたりして、図13右のような角度で付いたときにのみ力が発生すると、そういう考え方なんです。

これは、1957年のA.F. Huxleyのモデルと若干、似ているわけです。彼がどんなことを考えたかっていうと、図14が有名だと思うんですけど、アクチンフィラメントがあって、上側がミオシンフィラメントで、アクチン上のミオシン結合部位が右側にある。ミオシンは中央で左右にぶらぶらして、右に動いたときにアクチンに結合できる。したがって、アクチンに結合すると、左側に力を発生させるわけです。彼が考えたのは右に動いたときには結合する確率があり、左に動いたときには結合しないで解離して

しまう。こうやって右側で結合して、左に動いてきたときに解離するわけです。結局、平衡点からずれて結合して、それでエネルギーを蓄えて、そのエネルギーを使って運動が起こるとというのが彼の考え方なんですけど、非常に本質を突いてるんじゃないかなと、われわれの結論（図 13）とよく似ているというふうに思います。以上です。

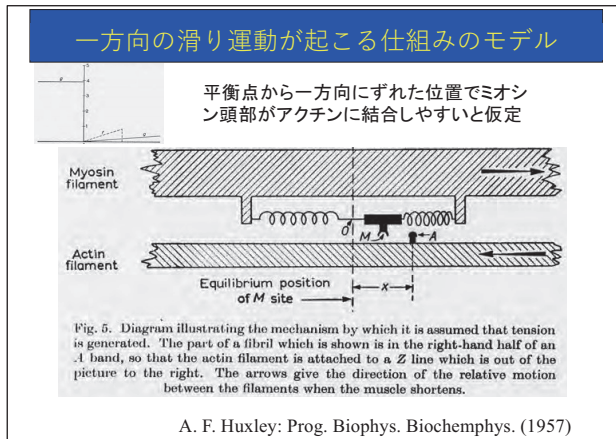


図 14 Huxley のモデルと似ている

吉田 図 13 の絵で見ると、何もエネルギーを与えなくても、ADP 結合したほうで動けば何もしないでも動いてしまうように見えるけども・・・そうか、ATP を加えてやらないと、「力発生なし」型の方が解離しないので動けなくなるということですかね。

安藤 そうです。

吉田 だから ATP が必要な理由というのは、「力発生なし」型のほうの抵抗になる部分を解除するために必要だったことなのですか？

安藤 そうです。力を発生して「力発生あり」型から「力発生なし」型に移りますよね。しかしそれで結合したままになると動けない。結局 ATP のエネルギーは解離させるため使われてるわけです。

遠藤 これはパワーストロークのような、でもパワーストロークとも違う。これ、何て呼ぶんですか？

安藤 名前がないです。従来のパワーストロークモデルっていうのは、「力発生あり」型から「力発生なし」型へ構造変化すると。その構造変化そのものが変位を生み出す力であると言うわけです。それに対し、われわれのモデルでは、確かに構造変化は起こるけども、ATP は直接その構造変化、すなわち力学的な仕事もしくは力発生に使われていないということです。

遠藤 ATP は反応をマルチプルラウンドにするために使われて

るんですね。

安藤 そうです。

遠藤 だけど、さっきのストンピングのことを考えると、安藤さんの Nature 論文では、前足の方はストンピングしても動くということにはならないけど、後ろ足は 3 分の 1 くらいの頻度でストンピングするという話ですよ。

安藤 フットストンプというのはアクチンから離れてまた再結合する、これが正確な意味でのフットストンプです。それに対してアクチン上を滑るのはスライディングと言います。実はあの論文ではスライディングとフットストンプをごちゃまぜにして書いてしまっていて、後ろ足がフットストンプするって言うんですけど、あれは正確じゃなくて実はスライディングが起こってるんです。

遠藤 後ろ足は離れないで滑る。グルッと回らないんですか？

安藤 回らない。というのは、二足結合をしたときに、図 12 の右上の歩幅ですが、歩幅は少しばらつくわけです。少し遠い場合もあるし近い場合もあるわけです。でも一番安定な距離っていうのはあるんです。だから、大きめの歩幅でくっ付きちゃった場合は、後ろ足がズルッと動く、スライディングすると。

遠藤 でも、なんで離れないんですか。前足は離れるのに。

安藤 それは後ろ足が歪んでないからです。先ほどの話（図 9）に戻りますが、前足では歪みのエネルギーに結合エネルギーが使われるので、結合エネルギーは弱くなってしまふんです。だから前足ではフットストンプが起こるわけです。それに対して、後ろ足は歪みがないので、結合エネルギーが弱まることなく使われているので、離れることができないんです。滑ることはできるかもしれないけど。

遠藤 確率が 3 分の 1 くらいでも後ろ足が離れるんだったら、それでピュッと前に行ってしまうって、ADP だけでどんどん進んでしまうように思ったんですけど、それは起こらないんですね。つまり結合した足の歪みが結合、解離を支配してるんですね。

安藤 そうです。

遠藤 ただ、こういう話ってすべて  $\Delta G$  で議論してますけど、本当はエネルギー障壁、活性化エネルギー ( $E_a$ ) が支配するキネティクスで説明しなきゃいけないような気がするんですが、それは大丈夫なんですか。ある時間内に何が起こるかを考えるときには、

抵抗じゃなくてむしろ活性化エネルギーがどのくらいで起こるかを考えなければならないのに、今回はそういう話が全然出てこないですね。活性化エネルギーが低いんですかね。

安藤 例えば図9の前足は、もともとゆがんで高エネルギー状態にあるわけですよね。それが右側に倒れるっていうのは、別にエネルギーの山を越える必要はないですよね。山を越えずに、ズルッと下るだけでいいわけですよね。

遠藤 全部、ギブスエネルギーだけで話が成り立つ世界なんですね。

安藤 はい。もちろん、後ろ足が離れるにはエネルギー障壁を越えなければいけないんですけど、前足に関してはエネルギー障壁の山がないですね。

吉田 図9ですが、今のお話ですと、後ろ足のほうが結合が強そうなこと言われてましたけど、そうすると、後ろ足は離れることができないんですか。

安藤 後ろ足ではフットストンプは起こらないですね。

吉田 ATP が加水分解されると離れやすくなるということなんですか。

安藤 はい。実際、高速 AFM の観察結果によれば、後ろ足では本当にアクチンから解離するフットストンプという現象はめったに見えません。

吉田 そうすると、どうやって後ろ足が離れて前に出られるんでしょうか。

安藤 いまの話は ADP 存在下です。ADP 存在下では二足結合したミオシン V の後ろ足が、アクチンから離れるという現象はほとんどありません。フットストンプは唯一、前足でのみ起こる現象です。

吉田 ATP が来ると、ADP と ATP を交換して、それで後ろ足が離れるようになるんですか。

安藤 そうです。そこに ATP の結合エネルギーが使われるんです。

吉田 ADP の結合力はそんな強くないんですね、ATP と交換できるくらいだから。

安藤 そうです。ATP と ADP の親和性はかなり違いますよね。解離定数では nM のオーダーです。だから ATP のほうがはるかに強く後ろ足に結合する、ほとんど不可逆的に結合します。

吉田 そこで逆に言うと、後ろ足を離すというからには、ミオシンとアクチンの結合の状態、構造が変わっているわけですよ、わずかとはいえ。だから、そういう点では ATP の結合のエネルギーが後ろ足をアクチンから引き剥がすような、そういう構造変化に使われていると言ってもいいんじゃないんですか。



吉田賢右 (JT 生命誌研究館)

安藤 そうです。おっしゃるとおりです。

吉田 それで ATP が後ろ足に結合して、そうすると後ろ足がアクチンから離れるんだけど、離れてるあいだにその ATP を分解して ADP になって、前方のほうに着陸するということですね。

安藤 はい。ADP ではなく、ADP-Pi ですか。

吉田 ADP になるときに頭の角度が変わるといいますか、ぐっと曲がってしまう (図6のリカバリーストローク) ということですか。

安藤 いいえ、ATP が ADP-Pi になるときです。その方が効率がいいです。実際にわれわれの測定では、離れた後ろ足が前に着地するのがすごく遅いわけです。

吉田 そこが律速なんですか、全体の？

安藤 そうです。リカバリーストローク (図6) が熱的揺らぎだけで起こるには、ものすごく待たないといけないわけです。0.1秒ぐらいかな。ところが ATP があると、加水分解に伴ってほとんどミリ秒で進んでしまいます。だから ATP 加水分解のエネルギーは、一部効率を上げるために使われてるという言い方もできるかもしれません。

吉田 むしろ後ろ足を引き離すために ATP の結合が必要だったということですね。それで ATP の加水分解というのは、ATP の



縛りついていますか、それを打ち消すためにアクチンから離れている間に加水分解してしまうと。

安藤 はい。どんな ATP アーゼでも ATP 加水分解に伴う  $\Delta G$  は非常にわずかであるってことは知られていると思うんですが。

吉田 それはそう。F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP アーゼの世界でもそうなんですよ、酵素上での ATP、ADP の平衡（量比）ほとんど 1 対 1 に近いですものね。だからこの場合も結局、最初の ATP の結合で 10k<sub>B</sub>T、次に無機リン酸 Pi の解離で 8k<sub>B</sub>T。結局、結合解離の物理的過程で仕事をしてる、加水分解という化学的過程ではない。そこは F<sub>1</sub> とそっくりだと思うんだけど。これは無機リン酸 Pi が最初にはずれる、という順番になってるんですね？

安藤 そうです、それは間違いないです。

吉田 無機リン酸が外れたことによって、図 6 下の A-M-ADP-Pi と A-M-ADP の間の 8k<sub>B</sub>T という大きな  $\Delta G$  が出てくると。まだよく分からないのは、その  $\Delta G$  が仕事に使われてないということなんです。

安藤 その  $\Delta G$  は反応を後戻りできないようにしてるけど、力学的な仕事には使われていない。8k<sub>B</sub>T という  $\Delta G$  だと、図 6 下では深すぎて熱的には後戻りすることは不可能ですよ。

吉田 でもそれは溶液中の無機リン酸の濃度が低いからで、これ F<sub>1</sub> なんかで 100 mM くらい加えると後戻りするんです。

安藤 なるほど、 $\Delta G$  がぐっと浅くなってしまいうんですね。

吉田 ちなみに、図 6 上の最後の ADP を解離するところの前と後の構造、A-M-ADP と A-M ですが、これ本当に構造変化はないんですか？

安藤 図 6 下では、そのエネルギー差については、反応速度論とか熱測定から言われてる結果なんで、信じないわけにいかないかなと思うんですけど。

吉田 例えば、そこどころが、A-M-ADP-Pi と A-M-ADP の間には、実は大してエネルギー差がなくて、A-M-ADP から A-M に行くところで、大きな  $\Delta G$  が出ると考えてもいいんじゃないですか。

安藤 考え方はいいと思う。図 6 下は実験結果に基づいて描いてる絵なんで、何とも言えないです。根拠となる反応速度論と熱測定の結果はほぼ同じで、だいたい合ってます。

遠藤 さっきのフットストンピングっていうのは、前足で Pi が外れた後、起こる現象なんですか？そうするとそのとき、歪んだ頭部の向きはどうなっているんですか？

安藤 図 6 でも Pi が外れると、本当は後ろ足が前にでることで、前足だった方の頭部は元の状態にもどりたいたいけど、二足結合なんで、後ろ足がそれを止めてしまってるんです。

遠藤 この実験で吉田さんが言われたみたいに、Pi 過剰にすると、どういうところで止まりますか？

安藤 これ、なかなか前に進めないですよ、Pi 過剰だったら。

遠藤 そうするとフットストンブも起こらないんですか。

安藤 起こらないんじゃないですかね。

遠藤 そうすると、結論的に言うと、ATP 加水分解と前に進むという現象はタイトカップリングではあると。だけど、パワーstroークとは言えない。

安藤 そのとおり、おっしゃるとおりです。

遠藤 で、名前がまだないと。

安藤 ない。

吉田 そこで質問ですが、図 6 上の「一般的な考え方」では、パワーstroークと書いてある無機リン酸が外れるところ、A-M-ADP-Pi から A-M-ADP になるところでは頭の角度が変わってるわけですよね。このときにアクチンが動かされてるわけでしょう。

安藤 そこでパワーstroークという形でトランジションすればですね。

吉田 そう。それって仕事じゃないですか？熱ではなくて。

安藤 でもこれは動くというトランジションは起こらない。二足結合の場合は、後ろ足がアクチンにくっ付いてるから。

吉田 いや、動くときはミオシンの頭とミオシンの足の棒の部分（ネック）の角度が変わることによって仕事してるんだから、無機リン酸が抜けるときに、仕事してるんじゃないかと思う、熱ではなくて。

安藤 でもミオシンの頭とネックの部分の角度が変わるところのエネルギー差ってほんのわずかなんです。図 6 のリカバリーストロークのところでもわかるように  $2k_B T$  くらいです。

吉田 熱揺らぎでもいっちゃうぐらいと。

安藤 おっしゃるとおりです。だから、それが仕事するとは考えられないんです。

吉田 だけど、無機リン酸が抜けるときに、 $\Delta G$  としては  $8k_B T$  出てるわけですね。

安藤 そうです、おっしゃるとおりです。

吉田 だからそれが、仕事に使われないか。ちょっと変だな。

安藤 力学的仕事にはなってないけど、反応サイクルを進めるためにエネルギーは使ってるわけです。

吉田 反応サイクルを前に進めるぐらいだったら、 $\Delta G$  はもっと小さくてもいいと思うんだけど。

安藤 いや、そんなことないです。 $2k_B T$  くらいだと、行ったり来たりしてしまいますよね。

吉田 そうですか。 $\Delta G$  で 4 倍か。

安藤 8 と 2 はかなり大きな差なんです。

遠藤 それから、安藤さんの Nature 論文を見ると、その他のいろいろなるモデル、「inchworm」的な動きとか、「biased diffusion」とか、そういうものはもう一切、起こらないということですね。

安藤 起こりません。

遠藤 あと、ルースカップリングのエビデンスというのはどうなんですか？例えば ATP の加水分解が起こってだいたいぶたってから動いたりってというのは、ある意味これと似てるんですか。いや、でもあれは加水分解されてから、かなり後に動くから違うのかな。

安藤 かなり後だから、違いますね。ATP の加水分解と分子の動きを同時観察すると結局 1 対 1 だった言うことになっていると思います (Sanakamoto et al., *Nature* 2008)。

吉田 あと、柔らかい AFM のカンチレバーを使って、1 つの ATP の加水分解でも、かなり長い距離を走るという話もありました

が・・・。

安藤 うーん。

遠藤 それから、ルースカップリングのもう一つのエビデンスは、足の長さを短くしても長くても動く距離が同じだ、みたいな話があったと思いますが、それはどうなんですか。長さを変える実験はされてないんですか？

安藤 いや、されてます。足の長さを短くすれば歩幅は短くなります。坂本君も他の人もやっていますが、歩幅が足の長さによらず一定だっていう話は完全に否定されています。2008 年前後の論文で、大体みんな納得いく感じになったと思います。

遠藤 横山さんいかがですか、何かコメントあれば。

横山 どうも。興味深い話ありがとうございました。F1 なんかでは、ATP が ADP になると ADP がなかなか外れなくなるんですけども、この場合は ADP は勝手にはずれるんですか？

安藤 アクチンがないと解離しないですけど。アクチンと結合すると、(前足が前方回転して歪みが解消された場合ですが) ADP は勝手に解離します。

横山 図 6 でそのときの M-ADP から A-M-ADP のエネルギードロップで構造歪みが生じて、その構造ゆがみによって何か仕事が起こるということですね。

安藤 はい (フットストップした着地直後ですが)。

横山 そこだけ確認したかった。

吉田 安藤さんの図 6 の記述で、ATP の加水分解でエネルギーは使われてないという言い方をされてますが、M-ATP が M-ADP-Pi になるステップでは力学的仕事が行われてないということはそのとおりだと思うんですけど、反応サイクル全体として見れば明らかに ATP のエネルギーが駆動力として使われてるわけです。だからそういう点では、ATP、GTP の加水分解以外のところからエネルギーが来てるっていうのは、誤解を招くんじゃないかと思うんですが。

安藤 力学的に仕事するのはどこかっていうと、図 11 の前足の角度変化ですよ、レバーアームスイング。そこで力学的仕事してるわけです。この力学的仕事のももとのエネルギーはどこにあるのかっていうと、前足の頭部とネックのあいだの構造歪みにあるわけですよ。繰り返しになりますが、図 10 で紹介した

未発表の実験ですよ。これ、ADP 存在下での実験ですけど。既に構造歪みは生じてるわけです。けれども、それは力学的な仕事にはすぐには使えないわけです。なぜかという、後ろ足がアクチンから離れないから。後ろ足を離すのに ATP は本来必要なわけですよ。その代わりにここでは AFM の針でたたくということをやってる。だから、全体として見れば、ATP のエネルギーは後ろ足を離すのに必要なわけです。

吉田 それでいいんです。いいんだと思うんですけど・・・。

安藤 力学的な仕事を取り出すには ATP はどうしても必要だと。なので、取り出すには必要だけど、その取り出すエネルギーがどこにあるかっていうと、ATP ではなくて、構造歪みにあって、その構造歪みのエネルギーはどこから来てるかっていうと、アクチン、ミオシン間の強い結合エネルギーにあったわけです。

吉田 つまり、ATP の加水分解は反応サイクルを回すために使われてるんですよ。でもサイクルを回すことで力学的仕事をするわけなんです。

安藤 反応の個々のステップを見ずに、サイクル全体を見て、そこに ATP のエネルギーが使われてるって言われれば、それはそうです。

吉田 同じことを言ってるんですけどね、ATP の加水分解のステップとは共役しないっていうことになると、ATP、GTP 以外だったら何だろうってなりますよね。熱エネルギーから得てるわけじゃないし。

安藤 図 9 ですが、これは、構造歪みがなかったら絶対に動かないわけです。構造歪みにエネルギーが蓄えられているわけですよ。その構造歪みを起こしてる大本は何かっていうと、この強い結合エネルギーですよ。

吉田 それは F1 でも大事なんですけどね。要するに、強い結合エネルギーを、結局、構造の歪みに使ってトルクを生じてるんですけど。

安藤 ただ、確かにこういう、ゆがみエネルギーをこの ATP エネルギー以外からつくったとしても、それをどう利用するかというのが問題で、ATP 加水分解の反応サイクルが回らない限り利用できないわけですよ。だけど、ここで言いたいことは、構造歪みというもとの力学的仕事のエネルギー源は、ATP 加水分解から来てるわけではないですよ。

吉田 酵素上での ATP 加水分解から来てるわけではないと言え

ばいいんですよ。そういう断りがないから、天空からエネルギーが来たような感じに聞こえるわけです。

遠藤 蒸し返すようですが、図 9 で、構造歪みのエネルギーの見積もりはどうやって出してるんですって？

安藤 はい。左側の構造歪みがない場合の結合エネルギーは M-ADP とアクチンのアフィニティーから求められます。右側の構造歪みがある場合の結合エネルギーは、フットストンプの頻度から求められます。そうすると、前足に蓄えられる構造歪みエネルギーが求められます。

遠藤 なんとなく分かってきました。だいたいいいですか？吉田さん。

吉田 はい。ただ、反応を前に進めるためにあんなに大きなエネルギー必要なのかなって。ミオシンの場合、大きな負荷、でっかい荷物を付けると、前に進めるために必要な最後の  $8k_B T$  でしたっけ、これを維持するためには ATP の濃度が高くないといけなくなるのかな。今のところの実験では、大きな負荷を付けてないんですよ。

安藤 負荷はかけてないです。でも、構造歪みのエネルギーって、結構大きくて、さっきも言ったように。図 12 で実測した頭部の角度分布から見積もると、約  $10k_B T$  あるんです。

吉田 なるほど熱的揺らぎの 10 倍ですよ。わかりました。

#### 参考文献

- Kolomeisky. *Motor Proteins and Molecular Motor* (2015) CRC Press.
- Wagoner, Dill. *Molecular motors: Power strokes outperform Brownian ratchets* (2016) *J. Phys. Chem. B* 120, 6327–6336
- Oosawa, Hayashi. *The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells* (1986) *Adv. Biophys.* 22, 151-183.
- Kodera, Yamamoto, Ishikawa, Ando. *Video Imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy* (2010) *Nature* 468, 72-76.
- Sakamoto, Webb, Forgacs, White, Sellers. *Direct observation of the mechanochemical coupling in myosin Va during processive movement* (2008) *Nature* 455, 128-132.
- Wang, Chen, Arcucci, Harvey, Bowers, Xu, Hammer 3rd, Sellers. *Effect of ADP and ionic strength on the kinetic and motile properties of recombinant mouse myosin V* (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4329–4335
- Owa, Uchihashi, Yanagisawa, Yamano, Iguchi, Fukuzawa,

Wakabayashi, Ando, Kikkawa. Inner lumen proteins stabilize doublet microtubules in cilia and flagella (2019 Nat. Commun. 10, 1143 (2019))

Haruyama, Uchihashi, Yamada, Kodera, Ando, Konno. Negatively charged lipids are essential for functional and structural switch of human 2-Cys peroxiredoxin II (2018) J. Mol. Biol. 430, 602-610

安藤 敏夫 (あんどう としお)

金沢大学ナノ生命科学研究所特任教授

略歴 1951年東京に生まれる。80年早稲田大学大学院物理学専攻修了(理学博士)。80~86年カリフォルニア大学サンフランシスコ校心臓血管研究所ポスドク、助手。86年から現在まで金沢大学。2010~2015年バイオ AFM 先端研究センター長。2017年10月から現職。一貫してタンパク質の機能メカニズムに関する生

物物理学的研究を実施。現在の研究テーマ：高速走査型プローブ顕微鏡の開発とバイオ応用研究。

ウェブサイト：[http://biophys.w3.kanazawa-u.ac.jp/index\\_J.htm](http://biophys.w3.kanazawa-u.ac.jp/index_J.htm)

吉田 賢右 (よしだ まさすけ)

JT 生命誌研究館 顧問

略歴 1944年群馬県に生まれる。66年東京大学理学部生物化学科卒業。72年東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻課程博士課程修了。72年自治医科大学第一生化学助手。85年東京工業大学理学部天然物化学研究施設助教授。90年東京工業大学生命理工学部遺伝生化学教授。92年東京工業大学資源化学研究所生物資源部門教授。2009年京都産業大学工学部教授。2010年京都産業大学総合生命科学部教授。2014年京都産業大学シニアリサーチフェロー。2019年~現職。