

学位 論文

ヘビーマロミオシンによって引き起こされる極性が反平行なアクチン線維間の
滑り運動

Heavy Meromyosin Induces Sliding Movements Between Antiparallel
Actin Filaments

名古屋大学図書	
和	1026612

瀧口 金吾

目次

要旨	2
序文	3
材料と方法	4
結果	7
考察	20
謝辞	24
参考文献	25
副論文及び参考論文	27

使用する略号

H M M	;	Heavy meromyosin
S - 1	;	Myosin subfragment 1
A T P	;	Adenosine 5'-triphosphate
I A F	;	5-Iodoacetamidofluorescein
E G T A	;	Ethyleneglycol-0,0'-bis(2-aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraacetic acid
D T T	;	Dithiothreitol
P E P	;	Phosphoenol pyruvate

《要旨》

鈴木らによって、F-アクチン溶液に高分子を添加すると浸透圧効果により多数のアクチン線維が互いにオーバーラップしながら並行に集まり、長く太い束を形成することが報告されている[1]。束内のアクチン線維の極性はランダムであるため、この束は極性を持たない[1]。高分子としてメチルセルロースを用いて形成させた束は、長さ数 $10\mu\text{m}$ に及びアクチン線維1本の長さの10倍以上になる。この束にATP存在下でヘビーマイオシン(HMM)あるいはミオシンサブフラグメント1(S-1)を加えて、その形状の変化を光学顕微鏡で観察した。HMMを加えた場合、まず束に収縮が起こる。収縮により、束は30秒程で初めの長さの約3分の1になり、同時に太くなる。この収縮を経た束は、やがて数本の小さな束に裂けて分かれる。但し、これらの束は各々の一端で結合し合うので、星型をした数本の束の集団が形成される。星型集団を構成する各束は、長さがアクチン線維より長い場合でも、HMMとATPの再添加によって収縮しなかった。これらの束を電子顕微鏡で観察したところ、束内のアクチン線維の極性は平行であった。従って、初め極性を持たなかった1本の束が、最後に極性を持つ束の星型集団に変化したことになる。一方、S-1を用いた場合には、束の収縮も星型構造の形成も起きなかった。

以上の結果を次のように解釈している。双頭構造を持つHMMは、極性が平行な2本のアクチン線維とのみならず極性が反平行な2本とも同時に相互作用することができる。反平行な場合は2本のアクチン線維間に滑りを引き起こす。平行な場合はHMM自身が2本のアクチン線維に跨って一方向に滑る。この場合、HMMは外からこの2本のアクチン線維間に加わる滑り力に対する抵抗を生む。

《序文》

筋肉の収縮は、ミオシン分子の頭部と呼ばれる A T P a s e 部位及びアクチン結合部位を有する部分がアクチン線維上を滑り運動することにより起こる [2-5]。更にその他の細胞運動も同じ機構によって生ずると考えられている [6]。様々な筋肉や非筋細胞から単離された多くのミオシン分子はこの頭部を 2 個持つ双頭構造をしている [5,6]。ところが近年、試験管内運動再構成系を用いた研究によって、消化酵素による限定分解で単頭にされたミオシンや 1 個の頭部だけからなる S - 1 が、元のミオシンや双頭構造を保持している H M M と同様にアクチン線維を滑り運動させることが明らかになり、アクチン線維の滑り運動にミオシンの双頭構造が必要ないことが示された [7-9]。このため、ミオシン分子が双頭構造を持つことの有利性が問題となった。これを解く手掛かりを得る方法として、双頭構造を持つミオシンや H M M では生ずるが単頭の S - 1 では生じない現象を見い出すことが挙げられる。

この研究では、A T P 存在下で 1 個のミオシン分子が、近接して並行する 2 本のアクチン線維と同時に相互作用する可能性を試験した。ミオシンの線維形成による結果への影響を除くために、実験には双頭構造を持つが線維を形成しない H M M を使用した。1 個の H M M 分子が相互作用できる範囲内に複数のアクチン線維を並行させることは、生理的な条件下均一な溶液中では困難である。しかし鈴木らによって、F - アクチン溶液にポリエチレングリコールなどの高分子を添加するとその浸透圧効果により、生理的 p H と塩強度下で多数のアクチン線維が互いにオーバーラップしながら並行に集まり、長く太い束を作ることが報告されている [1]。束内のアクチン線維の極性はランダムであるためこの束は極性を持たない [1]。この極性を持たない束を使用することにより、H M M によって引き起こされる 2 本のアクチン線維間の滑り運動が基礎になっていると考えられる現象を観察することに成功した。以下その結果を報告する。

《材料と方法》

〈蛋白質の単離精製〉

実験に使用した蛋白質はウサギの骨格筋より単離した。ミオシンはPerryの方法[10]の変法[11]で精製し、燐酸緩衝液(pH 6.7)存在下50%グリセリン中に-20℃で保存したものを使用した。HMMとS-1はWeeds & Popeの方法[12]に従い(但しNaClの代わりにKClを使用)、精製したミオシンを α キモトリブシンで限定分解して得た。アクチンはEbashi & Ebashiの方法[13]の変法[11]で精製した。アクチン線維及びその束を蛍光顕微鏡で観察する場合、アクチン線維をファロイジンローダミンで蛍光標識した[14]。アクチン線維の長さは広い範囲に分布したが、平均長は常にほぼ3 μ mであった。 α アクチニンはMasaki & Takaitiの方法[15]で精製した。

蛋白質の濃度は280nmの紫外光吸収率によって求めた。使用した吸光係数 ϵ は、ミオシンの場合が268,800、HMMが221,000、S-1が86,300、アクチンの場合が48,300である[16]。使用した分子量は、ミオシンの場合が480,000、HMMが340,000、S-1が115,000、アクチンの場合が42,000である。

精製した蛋白質の精度は、5%、7.5%及び15% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動[17]により確認した。特にHMMの場合、Coomassie Blue染色によるバンドの濃度をデンストメーター(LKB 2202, Ultrosan Laser Densitometer)で測定し、ミオシンの混入が0.05%(W/W)以下であることを確かめた。

〈アクチン線維束の形成及びHMMとATPの束試料への添加〉

この研究では、極性を持たないアクチン線維の束を作るためにメチルセルロース(1500cP)を高分子として使用した。メチルセルロースを使用した理由は結果の処で後述する。束を形成させるために、通常の実験の場合、F-アクチン(約30 μ g/ml)を含む 25mM Imidazole-HCl(pH 7.6)、1mM EGTA、5mM MgCl₂、50

mM KCl、25mM DTT溶液に最終濃度0.3%(W/V)のメチルセルロースを加えて静かに攪拌した後、室温で数分間放置する。束試料の観察は、光学顕微鏡下フローセルを用いて行った。このフローセルは、カバーガラスとスライドガラスで2本のスペーサー(厚さ約0.15mm)をカバーガラスの向かい合った2辺の処で挟みエナメルで固定して作ったものである。

HMMとATPの束試料への添加は、メチルセルロース0.3%(W/V)、2mg/ml HMM、2mM ATP、10mM PEP、20unit/ml pyruvate kinaseを含ませた25mM Imidazole-HCl(pH 7.6)、1mM EGTA、5mM MgCl₂、50mM KCl、25mM DTT溶液の適当量(10-20 μ l)を既に束試料(20-40 μ l)の入っているフローセル内に流し込むことにより行った。HMMとATPの添加によってフローセル内に液流が生じアクチン線維の束はあらゆる速度で動くが、遅く動くものは顕微鏡の試料台を操作することにより常に顕微鏡の視野の中に捉えておくことができる。これにより、HMMとATPを含む溶液がフローセル内を拡散していく中で、束の形状変化を継続して観察することができた。

〈蛍光標識したミオシンとHMMの調整〉

蛍光標識したミオシンやHMMを実験に使用する場合は、IAFでミオシン軽鎖を標識した。ミオシン軽鎖はMittalらの方法[18]に従い、精製したミオシンから遊離させた後IAFで標識した。以下の手順中、特に説明の無いものは全て4℃で行った。

標識ミオシンを得る場合、10mM磷酸緩衝液(pH 6.7)、0.6M KCl、1mM DTT存在下で標識軽鎖とミオシンを最終濃度各々2mg/mlと10mg/mlで混合し、ミオシンの軽鎖を標識されたものと交換するために1晩水中で放置する。次に混合液を7倍量の蒸留水で希釈した後遠心しミオシンを沈澱させる。最後に沈澱したミオシンを10mM磷酸緩衝液(pH 6.7)、0.6M KCl溶液に溶解させる。この試料におけるミオシン頭部1個当りのIAF修飾率は、Marsh & Loweyの方法[19]で求めた

結果0.2であった。

標識HMMを得る場合、25mM Imidazole-HCl(pH 7.0)、1mM DTT存在下で標識軽鎖とHMMを最終濃度各々2mg/mlと10mg/mlで混合し、HMMの軽鎖を標識されたものと交換するために1晩水中で放置する。HMMと遊離の軽鎖を分離するため、5mM MgCl₂、30mM KCl存在下でこの混合液にF-アクチンを最終モル濃度比がHMM頭部1個当たり1.5になるように加えてアクチン線維にHMMを結合させる。超遠心(100,000 x g、90分)によってHMMをF-アクチンと共沈させた後、アクチンに対してモル濃度で1.5倍以上のファロイジンを含んだ10mM Imidazole-HCl(pH 7.0)、1mM EGTA、1mM MgCl₂、0.15M KCl、1mM DTT溶液に沈澱を溶解させる。これに最終濃度10mMのMg-ATPを加えてHMMをF-アクチンから遊離させた後、15°C、200,000 x g、15分の遠心(Beckman TL-100卓上形分離用超遠心機)でF-アクチンを沈澱させる。この上清を硫酸分画し標識HMMを含む40-57%分画を集めて、5mM 燐酸緩衝液(pH 7.5)、0.5mM DTTに透析する。この試料におけるHMM頭部1個当たりのIAF修飾率は0.2であった。

以上の方法で調整した蛍光標識ミオシンと蛍光標識HMMの試料はアクチン線維を滑り運動させることができる。この試料を使用することにより、アクチン線維束に沿ってのミオシンやHMMの分布あるいは運動を蛍光顕微鏡下で観察することができた。但し蛍光標識されたミオシン分子やHMM分子の運動蛋白質としての性質に関しては更に別の詳細な研究が必要である。

〈光学顕微鏡による観察〉

蛍光標識したアクチン線維の束はOlympus BH-2型蛍光顕微鏡を使用して観察し[9]、未標識のアクチン線維の束はOlympus BH型暗視野顕微鏡を用いて[20]、あるいは上記蛍光顕微鏡の白色光で観察した。顕微鏡像はIkegami CTC-9000で撮影した後Panasonic AG-3800ビデオレコーダーで録画した[9]。顕微鏡の焦点はフローセルのほぼ半ばの深さで溶液中を漂う束に合わせる。観察は室温25°C

で行った。ミオシンあるいはHMMのアクチン線維束上における分布や運動は、ファロイジンローダミンで標識したアクチン線維の束にIAF標識したミオシンあるいはHMMを加えて蛍光顕微鏡で観察した。ミオシンあるいはHMMは青色励起光によりFluoresceinの蛍光で観察し、束は緑色励起光によりローダミンの蛍光で観察する。

〈電子顕微鏡による観察〉

JEM 100C型電子顕微鏡を用いてネガテブ染色した束をSuzukiらの方法[1]により観察した。HMMとATPを添加後の束内のアクチン線維の極性は、メチルセルロースとATPを希釈するために、試験管内で束試料にHMMとATPを添加後30分間室温に放置し更に7倍量の25mM燐酸緩衝液(pH 6.7)を加えたものをSuzukiらの方法[1]に従い上記の電子顕微鏡で観察し決定した。但し固定にはタンニン酸の代わりに0.5%ホルマリンを使用した。

〈試薬類〉

ファロイジンローダミンはMolecular Probes社、メチルセルロースは和光純薬工業より購入した。IAF、 α キモトリプシン、ファロイジンはSigma社より、ATP、PEP、pyruvate kinaseはBoehringer Mannheim社より各々購入した。その他使用した試薬は全て高品質のものである。

《結果》

〈アクチン線維束の形成と構造〉

高分子メチルセルロース(1500cP)の添加によって形成させたアクチン線維の束は、10 μ m程度のものから100 μ mを越えるものまで長短様々である。形は主に

棒状で、中央が太く両端が細い傾向がある(Fig.1)。このことは束の中央ほど多くのアクチン線維が束ねられていることを示す。また束は長いものほど太い。後述するようにこの束試料にHMMとATPを添加すると束は収縮し形状を変えるが、この観察には長さが30から50 μm の束を対象に選んで行った。この程度の長さの束は、横断面当り平均して数十本のアクチン線維が束ねられてできていることが電子顕微鏡を用いて観察された。束は柔らかく容易に曲がる。このためフローセル内の不均一な液流によって多くの束は様々な形をとり、何本かの束は両端の接触と結合により環状になる(Fig.3a)。

束は、加える高分子の分子量や濃度及び溶液中のアクチンや塩の濃度が高い方が形成され易い[1]。従って加えるメチルセルロースを2倍の濃度に変えた場合、あるいは1500cPから4000cPのものに替えた場合、より長く太い束が形成される。しかしこの場合、溶液の粘性が大きくなり実験操作が困難になる。5%ポリエチレングリコール(平均分子量20,000)の添加によって形成させた束の大きさや形は、0.3%メチルセルロース(1500cP)で形成させた束とほぼ同じであった。なお電子顕微鏡で観察した結果、上記のいずれの方法で束を形成させた場合も、束内のアクチン線維の極性はランダムであることが確かめられた。

〈HMMによる極性を持たないアクチン線維束の収縮〉

アクチン線維束の試料にHMMとATPを添加すると束は直ちに収縮しその形を変化させていく。収縮速度は束によって異なるが、長さが40 μm 程度の棒状をした束は30秒程で初めの約3分の1の長さになり、同時に太くなる(Fig.2, a-d)。注目すべき観察結果として、環状をした束も収縮することが挙げられる。HMMとATPの添加後、環状をした束が収縮し且つ太くなっていくことにより環の直径は短くなっていく(Fig.3)。収縮速度は、同程度の長さの棒状をした束の場合と比較して顕著な差が無い。この環状をした束が収縮する様子は、細胞分裂の際に生ずる収縮環の収縮に酷似している。環状をした束のように端を



Fig. 1 ; アクチン線維の束

ローダミンファロイジンで標識したアクチン線維の束を蛍光顕微鏡で観察した写真。溶液条件は、F-アクチン $30\mu\text{g/ml}$ 、 25mM Imidazole-HCl(pH 7.6)、 1mM EGTA、 5mM MgCl_2 、 50mM KCl、 25mM DTT、 0.3% (W/V)のメチルセルロース。束内のアクチン線維の極性はランダムであるためこの束は極性を持たない。バーの長さは $10\mu\text{m}$ を示す。使用したアクチン線維の平均長は約 $3\mu\text{m}$ である。

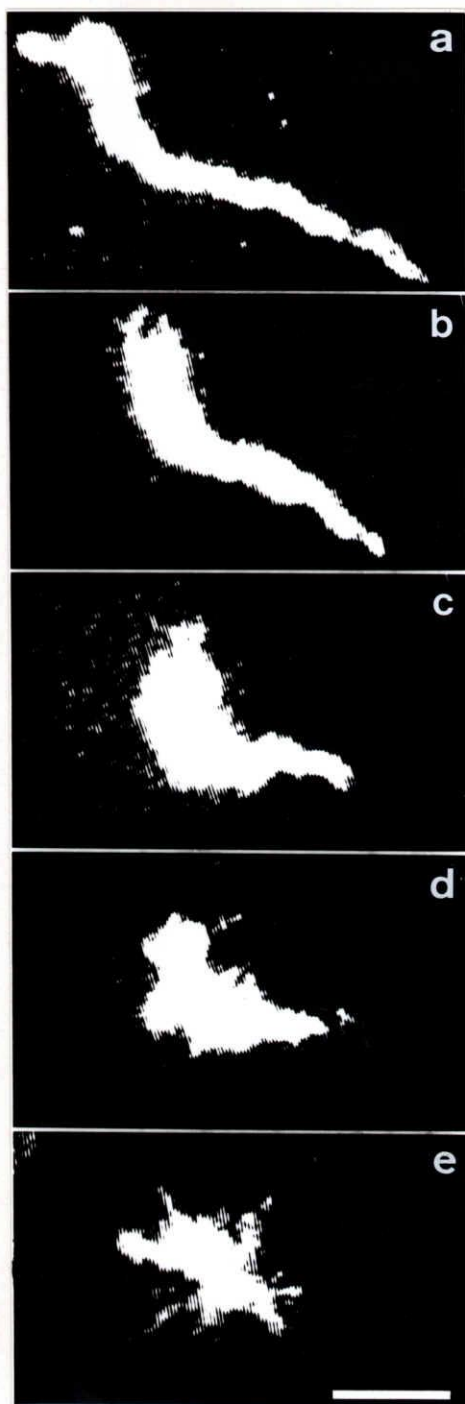


Fig. 2; 棒状をした極性を持たない束の収縮

極性を持たないアクチン線維束の収縮を暗視野顕微鏡で観察した連続写真。収縮の開始は束試料にメチルセルロース0.3%(W/V), 2mg/ml HMM, 2mM ATP, 10mM PEP, 20u/ml pyruvate kinaseを含む25mM Imidazole-HCl (pH 7.6), 1mM EGTA, 5mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 25mM DTT溶液を添加して行った。詳細については《材料と方法》を参照。a: 収縮開始から数秒後の束、b~e: 各々、aから7.5、15、30、40秒後の束。バーの長さは $10\mu m$ 。収縮開始直後の収縮速度は約 $1.6\mu m/s$ 。

束は収縮後星型をした束の集団になる(e)。星型集団を構成する各束は、アクチン線維より長い場合でもHMMやATPの再添加によって収縮しない。



Fig. 3 ; 環状をした極性を持たない束の収縮

環状をした極性を持たないアクチン線維束の収縮を蛍光顕微鏡で観察した連続写真。実験条件はFig.2に同じ。a～d：各々収縮開始から0、15、25、40秒後の束。バーの長さは $10\mu\text{m}$ 。収縮開始直後の収縮速度は約 $1.3\mu\text{m/s}$ 。

持たない束も収縮することから、アクチン線維が束の両端から滑り出て遊離していくために束が収縮しているように見えているのではなく、収縮が束の全長に渡って実際に起きていることが判かる。収縮に伴い束が太くなっていくことから、収縮の前後で同じ束を構成しているアクチン線維の本数はほぼ一定であると考えられる。

束の収縮は、加えるHMMの濃度を0.5mg/mlまで下げても観察された。但し収縮速度は非常に遅くなる。逆にHMMの濃度を倍以上にした場合($\geq 4\text{mg/ml}$)、束の収縮速度は変化しなかった。また束の収縮は、加えるMg-ATPの濃度を0.1mMまで下げても観察された。但しこの場合も収縮速度は極めて遅くなる。より重要な観察結果として、HMMを加えてもATP非存在下では束は決して収縮しなかった。この結果は、束の収縮がHMMによるATP加水分解反応を基に引き起こされていることを示している。遊離の MgCl_2 濃度を0から10mM、KCl濃度を0から100mMの間で変化させても収縮の様子は変わらなかった。また加えるメチルセルロースの最終濃度を0.15から0.6%(W/V)まで変えた場合、あるいはメチルセルロースを1500cPから4000cPに替えた場合も形成された束は同様に収縮する。

α アクチニンをF-アクチンに加えるとアクチン線維の束が形成される[21]。メチルセルロース有無の両条件下、F-アクチンに重量濃度比0.1の α アクチニンを加えて形成させたアクチン線維の束にHMMとATPを添加し束の様子を観察したが、束の収縮は起こらなかった。

〈アクチン線維束の形状変化〉

HMMとATPの添加後棒状の束は30秒もしくはそれ以上収縮を続けるが、この収縮を経て太くなった束はやがて不規則に数本の小さな束に裂けて分かれる。但し分かれた束は各々の一端で結合し続けるため、星型をした数本の束の集団が形成される(Figs. 2e, 5h, 6a)。星型集団を構成する各束は、長さがア

クチン線維より長い場合でも、HMMとATPの再添加によって収縮しなかった。これらの束を電子顕微鏡で観察したところ、束内のアクチン線維の極性は平行であった(Fig.4)。従って収縮しない束は極性を持つ。すなわちHMMとの相互作用により、極性を持たない束のアクチン線維が束内で各線維の極性に従いソーティングアウトされた結果、束が極性を持つに至ったことになる。

次に、星型集団を構成する各束の極性を決定するために、蛍光標識したミオシンとHMMを使用して2種類の実験を行った。一つ目は、ATP非存在下でIAF標識したHMMを極性を持たないローダミン標識したアクチン線維の束に加えて結合させた後、未標識HMMとATPを添加して束を収縮させる。このとき束に結合しなかった過剰な標識HMMは未標識のものに置き換えられるので、束に結合した標識HMMの蛍光のみを観察できる。最初束の全長に渡って観察されたHMMの蛍光は、収縮に伴い束の中央へ移動していき収縮終了後星型の中心に集中する(Fig.5)。二つ目は、IAF標識したミオシン20 μ g/mlを含む5mM ATP、25mM Imidazole-HCl(pH 7.6)、1mM EGTA、5mM MgCl₂、50mM KCl、25mM DTT溶液を使用する。あらかじめこの溶液を蛍光顕微鏡で観察した結果標識ミオシンの小さな塊が存在した。未標識HMMとATPを添加してローダミン標識したアクチン線維の束を星型の極性を持つ束の集団に変えた後、これに上記の溶液を更に添加する。標識ミオシンの塊は試料中を拡散していき、星型集団を構成する束の1本と接触するとその箇所から束に沿って滑り運動する(Fig.6)。標識ミオシンの塊は必ず束上を星型の中心へ向かって滑り運動した。筋収縮の際ミオシンの頭部がアクチン線維に沿ってポイントドエンド側からバーブドエンド側に向かって滑り運動する事実から、星型を構成する束のアクチン線維はポイントドエンドを星型の外側にバーブドエンドを星型の中心に向けていると結論される。

2つの星型構造が溶液中を漂う間に、各々を構成している2本の束が先端部で接触することがある。この接触がHMMとATPの存在下で起こると束は融

合し、新たにできた束は直ちに収縮する。この結果2つの星型構造は大きな1つの星型構造に融合する(Fig.6)。このことは、HMMとATPの存在下でも極性を持つ束は構造的に安定であるが、これらの束が極性が反平行になる向きで接触すると不安定になることを示している。星型構造を液流で攪乱することにより各束に分離させることができる。分離した束も柔らかく、その中の何本かは閉じて環状になる。この環状の束は束内のアクチン線維の極性が平行であるために安定である。従ってHMMとATPを再添加しても収縮しない(Fig.7)。しかしこのとき、これらの束の一部でHMMが束に沿って一定の方向に周回するのが観察された。HMMの周回運動に従って環の形が少々変形することもある。この様子は、車軸藻ニテラからの細胞抽出液中における環状のアクチン線維の運動、いわゆるヤロシュの糸の運動を連想させるものであった[22,23]。

以上の現象は、メチルセルロースの替わりに5%ポリエチレングリコール(平均分子量20,000)の添加によって束を形成させた場合にも観察される。しかし、メチルセルロースで形成させたアクチン線維の束は実験操作中に構造をよく保ち、特に収縮後に形成される星型構造が他の高分子を使用した場合と比較して大きく観察が容易である。この理由からメチルセルロースを使用した。

使用したHMM試料へのミオシン混入量は0.05%以下である(《方法》参照)。2mg/ml HMMの替わりに0.02mg/ml ミオシンを使用した場合、束の収縮も星型構造の形成も起こらなかった。この結果から、HMM試料中に混入しているミオシンが極性を持たない束の収縮と形状の変化を起こすのではないと考えられる。

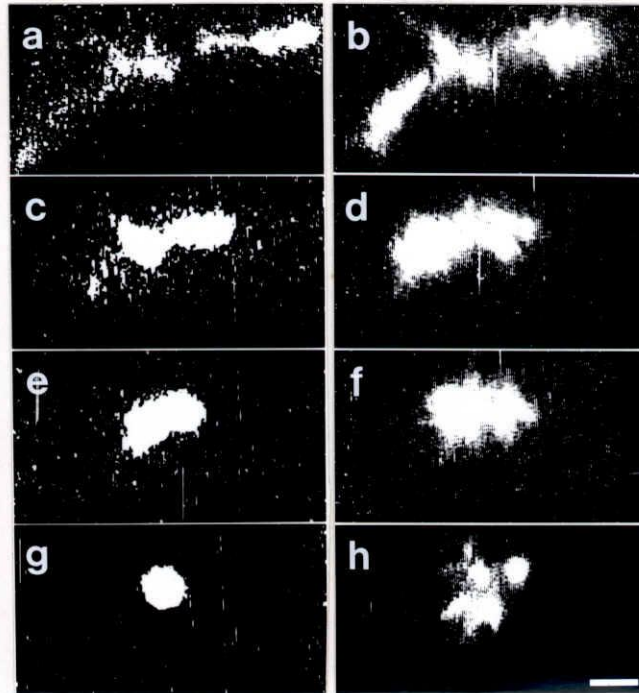
最後に、2mg/ml HMMの替わりに5から15mg/mlのS-1を使用して実験した場合、束の収縮も星型構造の形成も起こらなかった。ATP非存在下でS-1を加えて束に結合させた後HMMとATPを添加した場合は、添加から収縮の開始までに30分以上の時間が掛かり、また収縮速度はS-1を結合していない束に比べて極めて遅い。従ってS-1は、HMMが束の収縮や星型構造の形成

を起こすのを強く阻害すると考えられる。



Fig. 4 ; 収縮後の束内におけるアクチン線維の極性

星型集団を構成している各束の先端部を電子顕微鏡で観察した写真。HMMで修飾したアクチン線維のアローヘッド(矢尻構造)は同じ向き(写真の上方)を指している。バーの長さは $0.1\mu\text{m}$ 。



F i g . 5 ; 極性を持たない束の収縮後星型の中心に集中する蛍光標識HMM

A T P 非存在下で束に結合させたI A F 標識HMMは、ローダミン標識したアクチン線維の束が収縮し星型構造に変化した後星型の中心に集中する。実験方法は《材料と方法》を参照。a ~ h : 各々未標識HMMとA T P の添加による収縮開始から0、10、20、30、40、50、80、90秒後の束。バーの長さは10 μ m。観察には蛍光顕微鏡を使用し、a、c、e、gは青色励起光で標識HMMの蛍光を観察し、b、d、f、hは緑色励起光でアクチンの蛍光を観察したもの。

収縮開始直後、標識HMMは束全体に分布する(a)。しかし束の収縮(b、d、f)に伴い、標識HMMは束の中心に移行する(c、e、g)。束の収縮と星型への形状変化が終了後、標識HMMは星型の中心に集中する(g、h)。

なお束の収縮開始に未標識HMMを使用したのは、溶液中のI A F 蛍光のバックグラウンドを低く抑えて束に結合した標識HMMの蛍光を追えるようにするためである。

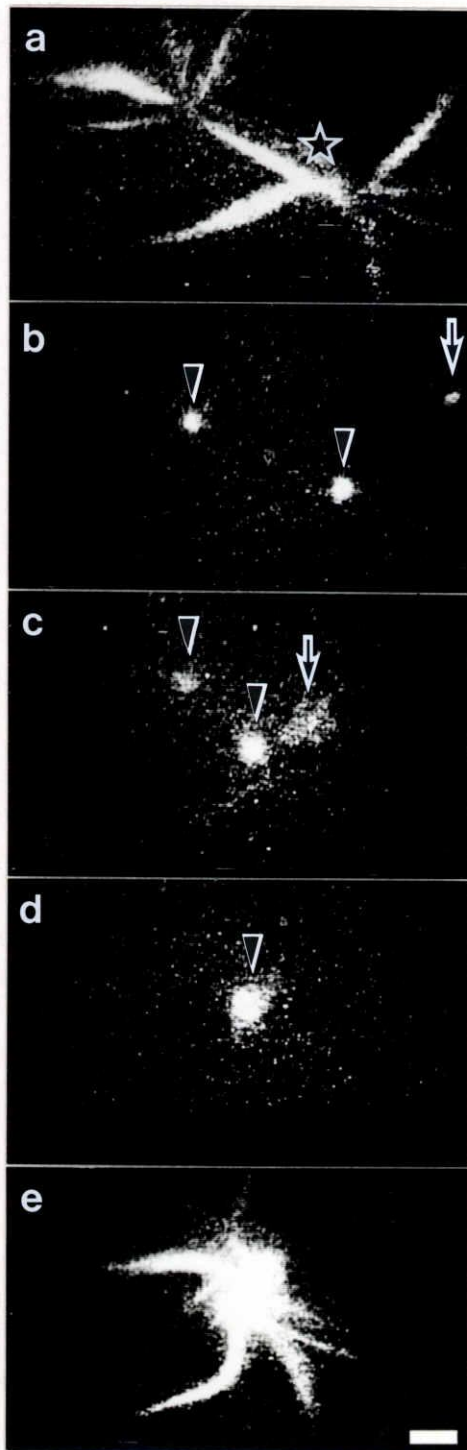


Fig. 6; 星型を構成する束の極性及び2つの星型集団間の接触と収縮

観察には蛍光顕微鏡を使用した。実験方法の詳細については《材料と方法》を参照。a、e: 緑色励起光によるアクチンの蛍光で星型の全体像を観察したもの。b~d: 青色励起光でIAF標識ミオシンの蛍光を観察したもの。バーの長さは $10\mu\text{m}$ 。a: 未標識HMMとATPの添加によってできた2つの星型。b: aで観察された星型と接触した標識ミオシンの塊(矢印)。矢尻は既に星型の中心に集められた標識ミオシンの蛍光、すなわち星型の中心の位置を示す。c、d: 各々bから10、30秒後における標識ミオシンの蛍光。標識ミオシンの塊(矢印)は星型を構成する束に沿って星型の中心(矢尻)に向かって運動していく(b~d)。この平均速度は約 $2\mu\text{m/s}$ 。cにおいてこの標識ミオシンの塊の蛍光が拡がって見えているのは、このときの塊の位置が顕微鏡の焦点面からはずれているためである。e: aから35秒後における星型。溶液中を漂う2つの星型が各々を構成する束の部分で接触し、接触した2本の束が融合することがある(a、星印)。このとき束の収縮に十分な量のHMMとATPが溶液中に残っている場合、融合して新たにできた束は融合した箇所から直ちに収縮を始める(a~e)。この結果2つの星型は互いに引き寄せられ、最後にはより大きな1つの星型になる(e)。

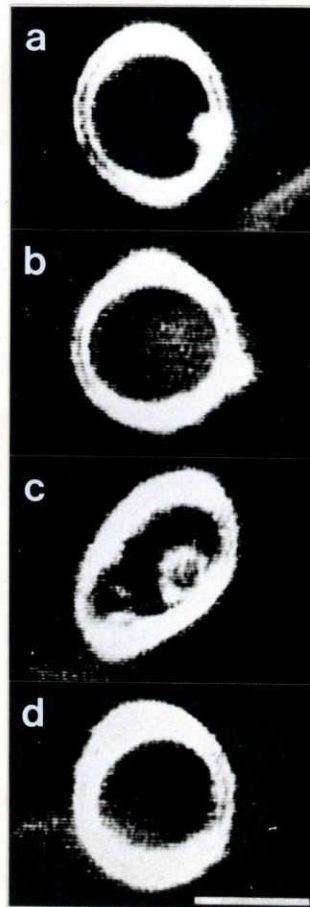


Fig. 7 ; アクチン線維の極性が揃った収縮しない環状の束

星型から分離し且つ環状になったアクチン線維の束をATP存在下暗視野顕微鏡で撮影した連続写真。a～d：各々HMMとATPの再添加から0、2、4、6分後の同じ環状の束。バーの長さは10 μ m。

星型から分離した束はアクチン線維の極性が揃っており、HMMとATPを再添加しても収縮しない。この星型から分離した束が環状になった場合も同様である(a～d)。しかし時間の経過に従い、環の形が変形することがある(c)。

《 考 察 》

高分子溶液中におけるアクチン線維束の安定性は、束内外間における局所的な高分子の濃度差によって生ずる浸透圧に基づいている[1]。この浸透圧は低く、アクチン線維は緩く束ねられて1本の束を形成していると考えられる。このためHMMは容易に束内に侵入でき内部のアクチン線維と相互作用できると推測される。束内部におけるアクチン線維とHMMとの相互作用は均一な溶液中におけるものより複雑であると考えられるので、実際に束に作用するHMMの濃度は単純な計算から求められないと思われる。なお、0.3%(W/V)メチルセルロース有無の両条件間で、2mg/ml HMM低塩濃度溶液の400nmにおける光吸収に差はなかった。これからメチルセルロースによるHMMのオリゴマー形成はないと判断される。

この研究で、ATP依存的にHMMが極性を持たないアクチン線維束を収縮させ星型をした構造に変えてしまうことが明らかになった。この現象について次のように解釈している。(I)双頭構造を持つHMMは極性が反平行な2本のアクチン線維(反平行な対)と同時に相互作用することができる。この相互作用によって2本の線維は、両者のバーブドエンド間の距離を縮める向きに滑り運動する(Fig.8a)。(II)HMMは極性が平行な2本のアクチン線維(平行な対)とも同時に相互作用することができる。この場合HMM分子は2本の線維に跨ってバーブドエンド側に滑り運動し、外からこの2本の線維間に加わる滑り力に対する抵抗を生む(Fig.8b)。(III)1個のHMM分子は、ある2本のアクチン線維の対から他の対へと相互作用する相手を替えながら運動していく。勿論HMM分子は1本のアクチン線維と相互作用しながら滑り運動することもできるが、この相互作用は以下の考察を簡単にするために無視する。

仮説(I)が正しいならば、反平行な対に作用するとき、HMM分子内で一方の頭部が他方に対し付け根の部分で180度回転できることが期待される(Fig.8a)。

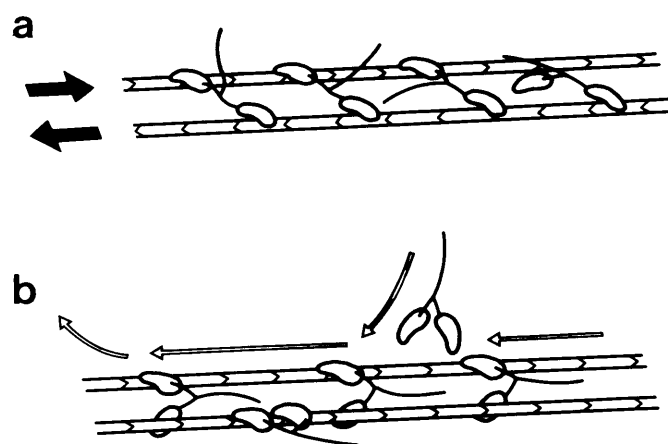


Fig. 8 ; A T P 存在下における束内での H M M とアクチン線維との相互作用の模式図

双頭構造を持つ H M M は並行する 2 本のアクチン線維と同時に相互作用できる。a : H M M が極性が反平行な 2 本のアクチン線維と相互作用した場合、2 本のアクチン線維の間には図中矢印で示した様な滑りが生ずる。b : H M M が極性が平行な 2 本のアクチン線維と相互作用した場合、H M M 分子自身が 2 本のアクチン線維に跨って矢印の示す方向へ滑り運動する。このとき、外からこの 2 本の間に加わる滑り力に対する抵抗が発生する。

最近の研究により、1本のアクチン線維が平滑筋ミオシンの双極性線維上をその全長に渡って一方向に滑ることが明らかにされた[24,25]。またニトロセルロース膜上に作られたHMM分子の列に沿ってアクチン線維が両方向に滑り運動できることも観察されている[26]。これらの試験管内運動系の実験結果や電子顕微鏡による観察結果[27]は全て、アクチン線維と正常な相互作用をするために、ミオシンの頭部がアクチン線維の極性に合わせて向きを180度まで回転できることを示唆している。以上ミオシンは分子内部に回転の自由度を持っているはずであるが、これに関する知識は未だ断片的である。しかし、HMMが分子内部の高い回転自由度によって反平行な対を滑らせることができると仮定した場合、この研究で決定されたアクチン線維間の滑りの向きは生体内におけるアクチン線維とミオシン間の滑りの向きと一致している。そこでHMMによるアクチン線維間の滑りと生体内における滑り運動とは同じ機構によって生じていると考えている。

HMM分子の両頭部は、1回のATP加水分解反応サイクル中に滑り力を発生する状態と力を発生しない状態との間を変移する[28-30]。従ってHMM分子が平行な対に跨って滑り運動している場合(仮説(II))、一方の頭部だけが滑り力を出している状態が存在する。しかしこの状態は2本の線維に対して全く対称に同じ確率で生じるはずである。このためこの状態による2本の線維間のずれは統計的に相殺されて全く起こらないと考えられる。両頭部が滑り力を出している場合、HMM分子は2本の線維に跨ってバードエンド側に滑る。両頭部が力を出していない場合、HMM分子は運動を止めて2本の線維と結合している。以上から、全体としてHMMは、平行な対に外から加わる滑り力の抵抗になると考えられる。この抵抗の強さは、平行な対がオーバーラップしている部分を両線維に跨って滑り運動するHMM分子の数に比例すると考えられる。

ATP存在下でHMMが極性を持たない束に作用すると、HMMが起こす反平行な対間の滑り力(仮説(I))のために束内のアクチン線維は束の軸方向に沿っ

て滑り運動するはずである。一方HMMの濃度が充分高い場合、平行な対の一端から遊離していく分子と他端から結合してくる分子は同数になり、両線維のオーバーラップを跨って滑るHMM分子(仮説(II))の総数は一定になると考えられる。この平行な対の外から加わる滑り力に対する抵抗(仮説(II))は、両線維のオーバーラップが長くなるほど作用するHMM分子の数が増すので強くなる。従って、オーバーラップが長くなるほど平行な対は外からの滑り力に対して安定になるはずである。すなわち、極性を持たない束の内部では、HMMが起こす反平行な対間の滑りによって平行な対に滑り力が働き、この滑り力が不規則に働く間に平行な対は統計的により安定なオーバーラップを長くする方へ変化していく。この変化は束を太くしていく。束を形成しているアクチン線維の本数が一定の場合、この束は太くなると同時に短くならねばならない。束の収縮はこのように束が太くなる結果生ずると解釈している。

環状をした束の収縮が細胞分裂における収縮環の収縮に似ていることを先述した。収縮環は多数のアクチン線維が並行に集まってできており[31,32]、内部にミオシンの双極性線維が存在すると考えられている[33,34]。収縮環の中でミオシン線維が平行なアクチン線維間の抵抗と反平行なアクチン線維間の滑りを同時に発生させることは充分予想される。この二種類の力は収縮環の収縮に必要である。一次構造がHMMに類似した変異ミオシンのみを生産する細胞粘菌の変異株は、分裂することができず多核大型の細胞を作る[35]。この変異ミオシンは試験管内ではアクチン線維束の収縮を起こすことができると予想されるので、正常なミオシンもしくはその双極性線維はアクチン線維の収縮環形成に決定的な役割を演じていると思われる。

束が星型構造に変わる機構は複雑で完全な解釈はまだであるが、次のように考えている。HMMと平行な対との相互作用(仮説(II))は反平行な対との場合(仮説(I))より統計的に強いため、極性を持たない束の収縮が進行し極性が平行なアクチン線維同士が集められると線維集団単位で束内を運動するようになる。

そして、極性が反平行な線維集団が互いに滑り合いまたは衝突し合うとき、線維集団が束からはずれることにより星型が形成される。以上の仮説の正否を確かめるための計算機による模擬実験が待たれる。

最後に、極性を持たないアクチン線維の束を使用することにより双頭構造に基づくHMMの新たな機能を見い出すことができた。同じ研究方法を用いることによりキネシンやダイニンによる複数の微小管の間の滑り運動が観察できると考えられる。

《謝辞》

本研究を行うにあたり懇切に指導激励をして頂きました朝倉 昌 教授に深く感謝致したいと思います。また実験計画、実験技術等に関し親切に指導をして頂きました神谷 律 助教授に感謝致します。また蛋白質の精製を初め実験を進めるにあたり多くの指導助言をして下さいました尾張部克志博士、藤目杉江博士、近藤博司博士に感謝致します。更に本研究を進めるにあたって親切に議論や相談に応じて下さった第三部門を初め本学科全ての皆様に深く感謝致したいと思います。

《参考文献》

1. Suzuki, A., Yamazaki, M. & Ito, T. (1989) Osmoelastic coupling in biological structure: formation of parallel bundles of actin filaments in a crystalline-like structure caused by osmotic stress *Biochem.* 28, 6513-6518
2. Huxley, H.E. (1969) The mechanism of muscular contraction *Science* 164, 1356-1366
3. Huxley, H.E. & Hanson, J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation *Nature* 173, 973-976
4. Huxley, A.F. & Niedergerke, R. (1954) Interference microscopy of living muscle fibres *Nature* 173, 971-973
5. Lowey, S., Slayter, H.S. Weeds, A.G. & Baker, H. (1969) Substructure of the myosin molecule I. Subfragments of myosin by enzymic degradation *J. Mol. Biol.* 42, 1-29
6. Clarke, M. & Spudich, J.A. (1977) Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination *Ann. Rev. Biochem.* 46, 797-822
7. Harada, Y., Noguchi, A., Kishino, A. & Yanagida, T. (1987) Sliding movements of single actin filaments on one-headed myosin filaments *Nature* 326, 805-808
8. Toyoshima, Y.Y. Kron, S.J. McNally, E.M. Niebling, K.R. Toyoshima, C. & Spudich, J.A. (1987) Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments *in vitro* *Nature* 328, 536-539
9. Takiguchi, K., Hayashi, H., Kurimoto, E. & Higashi-Fujime, S. (1990) *In vitro* motility of skeletal muscle myosin and its proteolytic fragments *J. Biochem.* 107, 671-679
10. Perry, S.V. (1955) Myosin adenosinetriphosphatase *Methods Enzymol.* 2, 582-588
11. Higashi-Fujime, S. (1983) Phosphorylation of myosin light chain modulates the *in vitro* movement of fibrils composed of actin and myosin filaments from skeletal muscle *J. Biochem.* 94, 1539-1545
12. Weeds, A.G. & Pope, B. (1977) Studies on the chymotryptic digestion of myosin. Effects of divalent cations on proteolytic susceptibility *J. Mol. Biol.* 111, 129-157
13. Ebashi, S. & Ebashi, F. (1965) α -actinin, a new structural protein from striated muscle I. Preparation and action on actomyosin-ATP interaction *J. Biochem.* 58, 7-12
14. Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K. & Oosawa, F. (1984) Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin *Nature* 307, 58-60
15. Masaki, T. & Takaiti, O. (1969) Some properties of chicken α -actinin *J. Biochem.* 66, 637-643
16. Greene, L.E. & Eisenberg, E. (1980) The binding of heavy meromyosin to F-actin *J. Biol. Chem.* 255, 549-554
17. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T₄ *Nature* 227, 680-685
18. Mittal, B., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. (1987) Visualization of myosin in living cells *J. Cell Biol.* 105, 1753-1760
19. Marsh, D.J. & Lowey, S. (1980) Fluorescence energy transfer in myosin subfragment-1 *Biochem.* 19, 774-784

20. Higashi-Fujime, S. (1985) Unidirectional sliding of myosin filaments along the bundle of F-actin filaments spontaneously formed during superprecipitation *J. Cell Biol.* 101, 2335-2344
21. Kawamura, M., Masaki, T., Nonomura, Y. & Maruyama, K. (1970) An electron microscopic study of the action of the 6S component of α -actinin on F-actin *J. Biochem.* 68, 577-580
22. Jarosch, R. (1956) Plasmaströmung und Chloroplastenrotation bei Characeen *Phyton (Buenos Aires)* 6, 87-107
23. Jarosch, R. (1958) Die Protoplasmafibrillen der Characeen *Protoplasma (Berlin)* 50, 93-108
24. Yamada, A., Ishii, N. & Takahashi, K. (1990) Direction and speed of actin filaments moving along thick filaments isolated from molluscan smooth muscle *J. Biochem.* 108, 341-343
25. Sellers, J.R. & Kachar, B. (1990) Polarity and velocity of sliding filaments: control of direction by actin and of speed by myosin *Science* 249, 406-408
26. Toyoshima, Y.Y. Toyoshima, C. & Spudich, J.A. (1989) Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads *Nature* 341, 154-156
27. Reedy, M.C. Beall, C. & Fyrberg, E. (1989) Formation of reverse rigor chevrons by myosin heads *Nature* 339, 481-483
28. Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D.D. & Yanagida, T. (1990) Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assay *J. Mol. Biol.* 216, 49-68
29. Eisenberg, E. & Green, R. (1980) The relation of muscle biochemistry to muscle physiology *Ann. Rev. Physiol.* 42, 293-309
30. Goldman, Y.E. (1987) Kinetics of the actomyosin ATPase in muscle fibers *Ann. Rev. Physiol.* 49, 637-654
31. Sanger, J.M. & Sanger, J.W. (1980) Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells *J. Cell Biol.* 86, 568-575 .pa
32. Maupin, P. & Pollard, T.D. (1986) Arrangement of actin filaments and myosin-like filaments in the contractile ring and of actin-like filaments in the mitotic spindle of dividing HeLa cells *J. Ultrastruc. Mol. Struc. Res.* 94, 92-103
33. Fujiwara, K. & Pollard, T.D. (1976) Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow, and mitotic spindle of human cells *J. Cell Biol.* 71, 848-875
34. Mabuchi, I. & Okuno, M. (1977) The effect of myosin antibody on the division of starfish blastmeres *J. Cell Biol.* 74, 251-263
35. Fukui, Y., De Lozanne, A. & Spudich, J.A. (1990) Structure and function of the cytoskeleton of a *Dictyostelium* myosin-defective mutant *J. Cell Biol.* 110, 367-378

副論文

1. Heavy Meromyosin Induces Sliding Movements Between Antiparallel Actin Filaments.

K. Takiguchi

J. Biochem., Vol.109, (1991) [in press]

参考論文

1. In Vitro Motility of Skeletal Muscle Myosin and Its Proteolytic Fragments.

K. Takiguchi, H. Hayashi, E. Kurimoto and S. Higashi-Fujime

J. Biochem., Vol.107, 671-679 (1990)

2. Measurement of ATPase Activity of Immobilized Myosin Heads.

H. Hayashi, K. Takiguchi and S. Higashi-Fujime

J. Biochem., Vol.105, 875-877 (1989)

3. Active Movement of Actin and Myosin Filaments In Vitro (Review).

S. Higashi-Fujime and K. Takiguchi

Bulletin of The Institute for Chemical Research (Kyoto University),
Vol.66, 469-480 (1989)

4. Stability Properties of Oxymyoglobin from Chicken Gizzard Smooth Muscle.

A. Matsuoka, H. Iwaasa, K. Takiguchi, N. Arakawa, L. Li, T. Takagi,
and K. Shikama

Comp. Biochem. Physiol., Vol.88 B, 783-789 (1987)

**Heavy Meromyosin Induces Sliding Movements between
Antiparallel Actin Filaments**

Kingo TAKIGUCHI

Department of Molecular Biology, School of Science,
Nagoya University
Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-01

Journal of Biochemistry Vol.109 (1991) [in press]

Running title: HMM Induces Sliding between Antiparallel Actin
Filaments

Abbreviations: HMM, heavy meromyosin; S-1, myosin subfragment-1;
PEG, polyethylene glycol; MC, methylcellulose; PEP, phosphoenol
pyruvate; IAF, 5-iodoacetamidofluorescein; DTT, dithiothreitol;
EGTA, ethyleneglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic
acid

SUMMARY

Suzuki et al. (1) have shown that, when F-actin is mixed with inert high polymer, a large number of actin filaments closely align in parallel with overlaps to form a long and thick bundle. The bundle may be designated non-polar, as the constituent filaments are random in polarity (1). I prepared non-polar bundles of F-actin using methylcellulose (MC) as the high polymer, exposed them to heavy meromyosin (HMM) in the presence of ATP under a light microscope, and followed their morphological changes in the continuous presence of MC. It was found that bundles several tens of micrometers long contracted to about one-third the initial length, while becoming thicker, in half a minute after exposure to HMM. Subsequently, each bundle was split longitudinally into several bundles in a stepwise manner, while the newly formed ones remained associated together at one of the two ends. The product, an aster-like assembly of actin bundles, was morphologically quiescent; that is, individual bundles never contracted upon second exposure to HMM and ATP, although they were still longer than the F-actin used. Bundles in this state consisted of filaments with parallel polarity as examined by electron microscopy. This implies that non-polar bundles were transformed into assemblies of polar bundles with ATP hydrolysis by HMM. Importantly, myosin subfragment-1 caused neither contraction nor transformation. These results are interpreted as follows. In the presence of ATP, the two-headed HMM molecule was able to cross-bridge antiparallel actin filaments, as well as parallel ones. In the antiparallel case,

HMM induced sliding forces between the two filaments, while, in the parallel case, HMM traveled along the pair directionally, producing resistance against external sliding forces acting upon the two filaments.

Muscle contraction results from active sliding of myosin heads along actin filaments (2-4), and the sliding mechanism may possibly underlie other types of cellular movements (5). The myosin molecule has two heads sharing ATPase sites and surface domains for actin binding (6). It has been shown by *in vitro* motility assay that one-headed myosin prepared by limited proteolysis was able to slide on F-actin as well as intact myosin (7), and that two kinds of myosin fragments, heavy meromyosin (HMM) possessing two heads and subfragment-1 (S-1) carrying one head, were equally able to slide on F-actin (8,9). These results indicate that two heads are not required for the myosin molecule to slide along an actin filament. Important as this finding is, it raises a problem as to the structure-function relationship in myosin: Does the two-headed structure confer on the protein any functional merits? A straightforward approach to this problem is to search for phenomena which can be induced by HMM but cannot be induced by S-1.

It is to be expected that, in the presence of ATP, the two-headed HMM molecule would be able to cross-bridge two actin filaments aligned in parallel at a short distance equal to the inter-thin filament distance in muscle. However, it is difficult

to realize such a parallel alignment of actin filaments in homogeneous solutions. Suzuki et al. (1) have reported that, when F-actin is mixed with an inert high polymer (for instance, polyethylene glycol (PEG)) at physiological pH and ionic strength, a large number of actin filaments closely align in parallel with overlaps to form a long and thick bundle, and that this alignment is brought about by the osmotic effect of the high polymer. The bundle may be designated non-polar, because the constituent filaments are random in polarity (1). The use of non-polar bundles has enabled me to observe an interesting phenomenon based probably on inter-actin filament sliding movements induced by HMM with ATP hydrolysis. The results are presented here.

MATERIALS AND METHODS

Proteins --- Rabbit skeletal myosin, chymotryptic HMM and S-1 were purified as described previously (9). SDS-PAGE assays (5 %, 7.5 % and 15 % poly(acrylamide) gels) (10) of the HMM preparation were made to estimate myosin contamination; however, it was difficult to detect a 220 kDa component corresponding to myosin heavy chain because of its low content. So, three samples were assayed in parallel; (I) 20 μ g HMM only, (II) 20 μ g HMM + 0.02 μ g myosin and (III) 20 μ g HMM + 0.04 μ g myosin. The densitometric data indicated that, while the peak area of myosin heavy chain in sample (III) was 2.2-fold that of myosin heavy

chain in sample (II), sample (I) showed no measurable peak corresponding to the myosin heavy chain. So, it is safe to say that the weight percent of myosin contained in the HMM preparation was less than 0.05%.

Rabbit skeletal actin was purified as described previously (9). F-actin was fluorescently labeled with phalloidin-rhodamine (11) for fluorescence microscopic visualization of single actin filaments. Actin filaments had a broad distribution of length, with the average value of 2.5 - 3.5 μm depending on preparations. In some experiments, rhodamine-labeled F-actin was used for fluorescence microscopic observations of bundles, and, in others, unlabeled F-actin was used for dark-field microscopic observations of bundles. α -Actinin was prepared from rabbit skeletal muscle by the method of Masaki and Takaiti (12).

Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm using ϵ values of 268,800 for myosin, 221,000 for HMM, 86,300 for S-1 and 48,300 for actin (13), and using molecular weights of 480,000 for myosin, 340,000 for HMM, 115,000 for S-1 and 42,000 for actin.

Formation of actin bundles and application of HMM to them
--- To produce non-polar bundles of F-actin, I used MC (1500 centi-Poise (cP)) as the inert high polymer, for reasons which will be described in RESULTS. Usually, a 0.6 % (w/v) MC solution containing 25 mM imidazole-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 and 1 mM EGTA was mixed with an equal volume of an actin solution containing 60 $\mu\text{g/ml}$ rhodamine-labeled or unlabeled F-actin, 25 mM imidazole-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 50 mM

DTT, and the mixture was left at room temperature for several minutes to produce actin bundles. For light microscopic observation of this specimen, I used a flow cell, which consisted of a slide glass and a cover slip which were firmly fixed with spacers (0.15 mm thick) on two parallel sides of the cover slip. To apply HMM and ATP to actin bundles, I prepared a 0.3 % (w/v) MC solution containing 2 mg/ml HMM, 2 mM ATP, 10 mM phosphoenol pyruvate (PEP), 20 unit/ml pyruvate kinase, 25 mM imidazole-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 25 mM DTT, and placed a drop of it on an open side of the cell which had been filled with the specimen of actin bundles. Then, viscous flow was induced in the cell and, thereby actin bundles were moved at various speeds in the field of the microscope. Slowly moving bundles were able to be placed near the center of the field by changing the position of the microscope stage. This technique enabled me to observe rapid contraction of bundles which were floating near the front of the MC solution containing HMM and ATP. Contraction started suddenly, the maximum velocity being attained within a second after the initiation of contraction. It was possible to define time zero within an error of 1 second.

Preparation of fluorescently labeled myosin and HMM ---

Some experiments were performed, using fluorescently labeled preparations of myosin and HMM. All species of light chains were dissociated from myosin and labeled with 5-iodoacetamido-fluorescein (IAF) by the method of Mittal et al. (14). To obtain fluorescently bright myosin, IAF-labeled light chains and myosin were mixed to final concentrations of 2 mg/ml and 10 mg/ml in 10

mM potassium phosphate buffer (pH 6.7) containing 0.6 M KCl and 1 mM DTT, and the mixture was left overnight on ice to exchange light chains of myosin with the labeled ones. Then, to remove free light chains, the mixture was centrifuged at low speed after dilution with 7 volumes of distilled water, and the fluorescently bright pellet was dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.7) containing 0.6 M KCl. This myosin preparation had a dye-to-head molar ratio of about 0.2 as estimated by the method of Marsh and Lowey (15): hence, the extent of labeling was rather low. To obtain fluorescently bright HMM, IAF-labeled light chains and HMM were mixed to final concentrations of 2 mg/ml and 10 mg/ml in 25 mM imidazole-HCl (pH 7.0) and 1 mM DTT, and the mixture was left overnight on ice for exchange. To separate HMM from free light chains, the mixture was mixed with F-actin to a final actin to head molar ratio of 1.5 in 30 mM KCl and 5 mM $MgCl_2$ to form acto-HMM complex. The complex was sedimented by high-speed centrifugation and resuspended in 10 mM imidazole-HCl buffer (pH 7.0) containing 0.15 M KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and a 1.5-fold excess molar concentration of phalloidin over actin. Then, Mg.ATP was added to the suspension to a final concentration of 10 mM, and F-actin dissociated from HMM was sedimented at 15°C by centrifugation at 200,000 x g for 15 min with a Beckman TL-100 centrifuge. The supernatant was further fractionated with ammonium sulfate. A fraction of between 40 and 57 % saturation, which contained fluorescent HMM, was separated and dialyzed against 5 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.5 mM DTT. The HMM preparation had a dye-to-head

molar ratio of about 0.2. The fluorescent preparations of myosin and HMM were both able to slide F-actin in *in vitro* assays (9); however, because of the low extents of labeling, this does not necessarily mean that labeled proteins themselves produced sliding forces. Systematic studies will be required to elucidate their properties as motor proteins.

Light microscopy --- Bundles of fluorescence-labeled F-actin were visualized with an Olympus BH-2 fluorescence microscope (9), and those of unlabeled F-actin were visualized with an Olympus BH dark-field microscope (16), or with the above fluorescence microscope by white-light illumination. In both cases, images were recorded with a Panasonic AG-3800 video recorder after intensification with an Ikegami CTC-9000 image intensifier (9). The plane of focus was set near the half depth of the flow cell to observe bundles freely floating in the medium. The observations were made at 25°C. In an experiment, IAF-labeled HMM was applied to bundles of rhodamine-labeled F-actin: bundles were visualized by green light excitation, while the distribution of HMM along them was visualized by blue light excitation. The same technique was used for visualizing movements of myosin aggregates along actin bundles.

Electron microscopy --- Negatively stained preparations of actin bundles with and without bound HMM were observed with a JEM 100C electron microscope by the method of Suzuki et al. (1).

Reagents --- MC was purchased from Wako Pure Chemicals. IAF, α -chymotrypsin, and phalloidin were obtained from Sigma. ATP, PEP, and pyruvate kinase were obtained from Boehringer

Mannheim. Phalloidin-rhodamine was obtained from Molecular Probes. All other reagents used were of analytical grade.

RESULTS

Actin Bundles --- Bundles prepared by the procedure described in MATERIALS AND METHODS had various lengths in a range between 10 and 100 μm as judged from their microscopic images. Each image became dimmer toward both ends (Fig. 1), indicating that the maximum number of filaments was contained in cross-sections near the center of a bundle. Overall, longer bundles tended to be thicker. From bundles of various lengths, I selected those which were several tens of micrometers long for observations of HMM-induced morphological changes (see below). In a bundle of this length, the number of actin filaments/cross section would be of the order of 10, on average, as estimated by electron microscopy. Bundles were flexible. They were bent into various shapes when exposed to inhomogeneous flow of the medium. Strongly bent bundles were occasionally closed into rings by end-to-end association (Fig. 3a).

Longer and thicker bundles were produced when the MC concentration was doubled, and also when MC (1500 cP) was replaced with MC (4000 cP). However, those preparations of bundles were more viscous and less suitable for preparation of microscopic specimens. Bundles produced in 5 % (w/v) PEG 20,000 (1) were similar in overall shape and size to those produced in

0.3 % MC (1500 cP).

HMM-induced Contraction --- It was found that the morphology of actin bundles changed remarkably upon simultaneous application of HMM and ATP (see MATERIALS AND METHODS). Linear bundles, which were several tens of micrometers long, shortened to about one third the initial length in half a minute, while becoming considerably thicker (Fig. 2, a-d). It is interesting to note that ring-shaped bundles became smaller in diameter upon application of HMM and ATP, while becoming thicker, in a similar manner to the contraction of contractile rings in dividing cells (Fig. 3). The maximum velocity of contraction in a ring-shaped bundle was approximately equal to that in a linear bundle of the same length. Therefore, I consider that, not only in ring-shaped bundles but also in linear ones, contraction took place rather uniformly along the length. It is unlikely that linear bundles might have been shortened by dissociation of their constituent filaments from both ends. Because bundles became considerably thicker during contraction, I assume that the total number of filaments/bundle changed little during this process.

A two-fold increase in HMM concentration yielded no detectable increase in the velocity of contraction, while contraction became considerably slower as the HMM concentration was decreased to 0.5 mg/ml. A decrease in the Mg.ATP concentration to 0.1 mM decreased the velocity of contraction remarkably. Perhaps more important is the fact that bundles never contracted upon application of HMM in the absence of ATP, indicating that contraction was driven by HMM with ATP

hydrolysis. Contraction took place in a range of KCl concentration between 0 and 100 mM, and in a range of free MgCl_2 concentration between 0 and 10 mM. Bundles produced in PEG solutions contracted as well as those in MC solutions.

α -Actinin is known to cross-link F-actin into bundles (17). I confirmed by light microscopy that long and thick bundles were formed in mixtures of F-actin and α -actinin at a 1 to 0.1 weight ratio, irrespective of whether the mixtures contained MC or not. Bundles of cross-linked F-actin never contracted to any extent upon application of HMM and ATP in the presence or absence of MC.

Transformation --- In the case of linear bundles, contraction continued for half a minute or longer after application of HMM and ATP. After this period of time, each thickened bundle was longitudinally split into several bundles in a stochastic manner, while the newly formed ones remained associated together at one of the two ends (Figs. 2e, 5h, 6a). The product, an aster-like assembly of short bundles, was morphologically quiescent: that is, individual bundles never shortened to any extent upon second application of HMM and ATP, although they were still longer than F-actin used. Observing bundles in this state by electron microscopy, I found that they consisted of actin filaments parallel in polarity (Fig. 4). This implies that bundles in the non-contractile state were polar. It is interesting to note that actin filaments comprised in each non-polar bundle were sorted in terms of the polarity with ATP hydrolysis by HMM. To determine the polarity of polar bundles in the aster-like structure, two experiments were carried out using

fluorescently labeled proteins. In the first, IAF-labeled HMM was applied to non-polar bundles of rhodamine-labeled F-actin in the absence of ATP to decorate them with labeled HMM and, thereafter, unlabeled HMM and ATP were applied to the decorated bundles to initiate contraction in the fluorescently dark background. It can be seen from Figure 5 that labeled HMM initially distributed along a linear bundle finally accumulated near the center of an aster-like structure. The second experiment was performed, using a 0.3 % (w/v) MC solution containing 20 μ g/ml IAF-labeled myosin, 5 mM ATP, 25 mM imidazole-HCl, pH 7.6, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA and 25 mM DTT. Preliminary observations of this solution by fluorescence microscopy indicated that it consisted of small but visible aggregates of myosin. Linear bundles of rhodamine-labeled F-actin were transformed into aster-like assemblies of polar bundles with unlabeled HMM and ATP, and, thereafter, myosin aggregates and ATP were applied to these assemblies. Then, it was found that myosin aggregates trapped onto bundles moved along them (Fig. 6). This and many other observations indicate that the direction of movements was from the tip to the assembly center. Combining these results with the fact that myosin heads slide along actin filaments from the pointed end to the barbed end during muscle contraction, I conclude that, in the aster-like structure, individual bundles consisted of actin filaments whose barbed ends were localized nearer to the structural center.

Two aster-like structures freely floating in a MC solution occasionally came into contact at the tips of two bundles

belonging to the two structures. When such a contact happened in the presence of HMM and ATP, the two bundles fused into one, the newly formed bundle contracted rapidly, and, thereby, the two assemblies were fused into one (Fig. 6). This implies that, while polar bundles were structurally stable in the presence of HMM and ATP, they became unstable as they were brought into contact at the pointed ends. The aster-like structure often dissociated into constituent bundles upon application of rapid flow. These bundles were also flexible. Strongly bent bundles were occasionally closed into rings by head-to-tail association in themselves. The ring structure was stable: it never contracted upon second application of HMM and ATP (Fig. 7). It is presumed that HMM trapped in the ring structure would continue moving around it unidirectionally.

Linear bundles produced in PEG solutions were also transformed into aster-like assemblies of bundles. However, these bundles were always much shorter than those produced in MC solutions. Hence, I used MC. The final concentration of MC (1500 cP) could be changed within a range of 0.15 to 0.6 % (W/V) to observe contraction and transformation of bundles.

Myosin content of the HMM preparation used in this study was as low as less than 0.05 % (w/w) (see MATERIALS AND METHODS). I confirmed that neither contraction nor transformation took place when 0.02 mg/ml intact myosin was used in place of 2 mg/ml HMM. Therefore, it is highly unlikely that the contraction and transformation of non-polar bundles might have been brought about by myosin contained in the HMM preparation.

Finally, it should be mention that, when 5-15 mg/ml S-1 was used in place of 2 mg/ml HMM, neither contraction nor transformation took place. When HMM and ATP were applied to actin bundles which had been saturated with S-1 in the absence of ATP, there was a lag of about 30 min before initiation of contraction, the maximum velocity of contraction being about 10-fold smaller than that in S-1-untreated bundles. These results indicate that S-1 strongly interfered with HMM as regards inducing contraction and transformation.

DISCUSSION

The stability of actin bundles in high polymer solution is rooted in the osmotic pressure originating from the difference in local concentration of high polymer between outside and inside of the bundles (1). Since the osmotic pressure should be low, it is likely that the packing of actin filaments in a bundle is rather loose, and, therefore, HMM would be able to penetrate into it to interact with the constituent filaments. Acto-HMM interactions in this situation may be more complicated than those in homogeneous solutions; the effective concentration of HMM applied to bundles might be greatly different from that apparently present. A 0.3 % (w/v) MC solution containing 2 mg/ml HMM was closely similar in absorbance at 400 nm to a low-salt solution containing 2 mg/ml HMM. Hence, it is unlikely that HMM might have associated into oligomers in the MC solution.

It has been shown in this study that HMM causes ATP-dependent contraction of non-polar bundles of F-actin and their transformation into aster-like structures. A possible interpretation of these facts, involves the following assumptions. (I) The two-headed HMM molecule is able to cross-bridge two actin filaments antiparallel in polarity (antiparallel pair) to generate sliding forces between the two filaments in the direction to reduce the distance between their barbed ends (Fig. 8a). (II) The HMM molecule is also able to cross-bridge two actin filaments parallel in polarity (parallel pair). In this case, the HMM molecule travels along the pair unidirectionally, producing resistance against external sliding forces acting upon the two filaments. (Fig. 8b). (III) Both types of acto-HMM interactions are in dynamic equilibria; therefore, an HMM molecule can dissociate from a pair to associate with a different one. The HMM molecule can also associate with a single actin filament to travel along it; however, this type of interaction will not be taken into account for simplicity in the following discussions.

If assumption (I) is correct, it is to be expected that, in the HMM molecule, a head would be able to rotate 180 degrees at the neck relative to the other in order to cross-bridge an antiparallel pair of actin filaments (Fig. 8a). In connection with this possibility, I should refer to the recent finding that, when a thick bipolar filament of smooth muscle interacts with an actin filament aligned in parallel, both the correctly and incorrectly aligned halves of the bipolar filament can slide

along the actin filament in the same direction, although there is a difference in sliding velocity between the two halves (18, 19; see also 20). This implies that myosin heads protruding from the incorrectly aligned half of the bipolar filament can swivel 180 degrees about their bases to interact correctly with the actin filament. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads observed by Toyoshima et al. (21) also indicates that HMM has rotational freedom. Important as these findings are, our knowledge regarding the rotational freedom in myosin is still fragmentary. If the HMM molecule can actually slide two antiparallel filaments along each other, by virtue of the internal freedom of rotation, the direction of inter-actin filament sliding determined in this study is in accord with that of the *in vivo* sliding between actin and myosin. So, it is assumed that the HMM-induced inter-actin filament sliding and the *in vivo* sliding are governed by common mechanisms. Suppose that each head of HMM alternates between an active, force-generating state and an inactive, force-nongenerating state in one ATPase cycle (22-24). Then, an HMM molecule simultaneously interacting with two parallel actin filaments would produce sliding forces between the filaments in one direction when one head is in the active state and the other head is in the inactive state. However, the HMM molecule has to produce sliding forces in the opposite direction at equal probability, for the reason of symmetry. The sum of sliding forces should be null statistically. An HMM molecule moves along a parallel pair of filaments unidirectionally when both heads are in the active

state, and it stops movement when both heads are in the inactive state. Overall, HMM simultaneously interacting with two parallel actin filaments would have to produce resistance against external sliding forces acting upon the filaments. The resistance increases with increase in the number of HMM molecules contained in the overlap between the two filaments.

When the non-polar bundle is allowed to interact with HMM in the presence of ATP, the constituent filaments would have to undergo bidirectional movements along the axis, due to HMM-induced sliding movements between antiparallel filaments (assumption (I)), although such internal movements of the bundle would be invisible by light microscopy. When the HMM concentration is high, the total number of HMM molecules travelling along the overlap in a parallel pair (assumption (II)) may be approximately constant at any moment, as dissociation of HMM from one end and its association to the opposite end will take place at equal rates. In this situation, the resistance against external sliding forces between the two filaments (assumption (II)) has to increase with increase in their overlap. That is, the pair has to become more stable against external sliding forces as the overlap increases. In the non-polar bundle, HMM-induced sliding movements between antiparallel filaments give rise to external sliding forces between parallel filaments. When sliding forces are randomly applied to parallel pairs, those pairs which have larger overlaps will survive longer statistically. This implies that the number of filaments contained in a cross-section of the bundle (or its thickness)

increases with time. These increases in thickness would have to cause decreases in length, when the bundle consists of a fixed number of filaments. In this interpretation of contraction, shortening is a consequence of thickening.

An *in vitro* simulation of the contraction of contractile rings in dividing cells has been described. Contractile rings consist of a number of actin filaments aligned in parallel with random polarity (25,26) and, presumably, thick bipolar filaments of myosin distributed among them (27,28). I suggest that, in this structure, thick bipolar filaments generate resistance against sliding forces acting on parallel filaments, as well as sliding forces between antiparallel filaments (as usually assumed), and that both kinds of forces generated in the structure are necessary to induce contraction. It has been shown that mutant *Dictyostelium* cells, which produce mutant myosin essentially identical in the primary structure to HMM, are defective in cytokinesis and become large and multinucleate (29). The mutant myosin is supposed to be able to induce the *in vitro* contraction of actin bundles. It is tempting to speculate that normal myosin (or its thick bipolar filament) might play a crucial role in the organization of actin filaments into contractile rings in wild-type cells.

The transformation of linear bundles into aster-like structures is a complicated process and has not been fully interpreted. Assume that cross bridges between parallel filaments (assumption (II)) are statistically stronger than those between antiparallel filaments (assumption (I)). Then, it is to

be expected that, when HMM and ATP are applied to a non-polar bundle, the constituent filaments will be sorted into several tight groups of parallel filaments during contraction, which groups slide along each other to produce an aster-like structure. Computer simulation of contraction and transformation is awaited.

In conclusion, the use of non-polar bundles of actin filaments has enabled me to reveal new functional properties of HMM based on the two-headed structure. The technique employed in this study may be applied to investigate inter-microtubule sliding movements induced by kinesin and dynein.

I would like to thank Professor Sho Asakura for his kind guidance and encouragement, without which this study would not have been completed, and for his patience in helping me to prepare the manuscript. I also thank Dr. Ritsu Kamiya for his valuable suggestions and advice on electron microscopy, and Dr. Katsushi Owaribe and Dr. Hiroshi Kondo for preparation of myosin and actin.

REFERENCES

1. Suzuki,A., Yamazaki,M. & Ito,T. (1989) *Biochem.* 28, 6513-6518
2. Huxley,H.E. (1969) *Science* 164, 1356-1366
3. Huxley,H.E. & Hanson,J. (1954) *Nature* 173, 973-976
4. Huxley,A.F. & Niedergengerke,R. (1954) *Nature* 173, 971-973
5. Clarke,M. & Spudich,J.A. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46, 797-822
6. Lowey,S., Slayter,H.S. Weeds,A.G. & Baker,H. (1969) *J. Mol. Biol.* 42, 1-29
7. Harada,Y., Noguchi,A., Kishino,A. & Yanagida,T. (1987) *Nature* 326, 805-808
8. Toyoshima,Y.Y. Kron,S.J. McNally,E.M. Niebling,K.R.
Toyoshima,C. & Spudich,J.A. (1987) *Nature* 328, 536-539
9. Takiguchi,K., Hayashi,H., Kurimoto,E. & Higashi-Fujime,S.
(1990) *J. Biochem.* 107, 671-679
10. Laemmli,U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
11. Yanagida,T., Nakase,M., Nishiyama,K. & Oosawa,F. (1984)
Nature 307, 58-60
12. Masaki,T. & Takaiti,O. (1969) *J. Biochem.* 66, 637-643
13. Greene,L.E. & Eisenberg,E. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 549-554
14. Mittal.B., Sanger,J.M. & Sanger,J.W. (1987) *J. Cell Biol.*
105, 1753-1760
15. Marsh,D.J. & Lowey,S. (1980) *Biochem.* 19, 774-784
16. Higashi-Fujime,S. (1985) *J. Cell Biol.* 101, 2335-2344
17. Kawamura,M., Masaki,T., Nonomura,Y. & Maruyama,K. (1970) *J. Biochem.* 68, 577-580

18. Yamada,A., Ishii,N. & Takahashi,K. (1990) *J. Biochem.* 108,
341-343
19. Sellers,J.R. & Kachar,B. (1990) *Science* 249, 406-408
20. Reedy,M.C. Beall,C. & Fyrberg,E. (1989) *Nature* 339, 481-483
21. Toyoshima,Y.Y. Toyoshima,C. & Spudich,J.A. (1989) *Nature*
341, 154-156
22. Harada,Y., Sakurada,K., Aoki,T., Thomas,D.D. & Yanagida,T.
(1990) *J. Mol. Biol.* 216, 49-68
23. Eisenberg,E. & Green,R. (1980) *Ann. Rev. Physiol.* 42, 293-
309
24. Goldman,Y.E. (1987) *Ann. Rev. Physiol.* 49, 637-654
25. Sanger,J.M. & Sanger,J.W. (1980) *J. Cell Biol.* 86, 568-575
26. Maupin,P. & Pollard,T.D. (1986) *J. Ultrastruc. Mol. Struc.*
Res. 94, 92-103
27. Fujiwara,K. & Pollard,T.D. (1976) *J. Cell Biol.* 71, 848-875
28. Mabuchi,I. & Okuno,M. (1977) *J. Cell Biol.* 74, 251-263
29. Fukui,Y., De Lozanne,A. & Spudich,J.A. (1990) *J. Cell Biol.*
110, 367-378

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. A fluorescence microscopic image of a non-polar bundle of rhodamine-labeled F-actin produced in 0.3 % MC solution. For experimental conditions, see MATERIALS AND METHODS. The bar indicates 10 μm . Note that the average length of F-actin used was about 3 μm .

Fig. 2. Dark-field light micrographs showing HMM-induced contraction and transformation of a non-polar bundle.

Contraction was initiated by the procedure described in MATERIALS AND METHODS. Images at a few seconds (a), 7.5 s (b), 15 s (c), 30 s (d), and 40 s (e) after initiation of contraction. The bar indicates 10 μm . The maximum velocity of contraction was about 1.6 $\mu\text{m/s}$.

Fig. 3. Fluorescence micrographs showing contraction of a ring-shaped bundle of rhodamine-labeled F-actin. For experimental conditions, see MATERIALS AND METHODS. Image before application of HMM and ATP (a), and images at 15 s (b), 25 s (c), and 40 s (d) after initiation of contraction. The bar indicates 10 μm . The maximum velocity was about 1.3 $\mu\text{m/s}$.

Fig. 4. Electron micrographs showing tip portions of bundles assembled in the aster-like morphology. The HMM-decorated actin filaments in each micrograph point upwards. The bar indicates 0.1 μm .

Fig. 5. Accumulation of IAF-labeled HMM near the center of an aster-like assembly after transformation of a non-polar bundle of rhodamine-labeled F-actin. For experimental conditions, see MATERIALS AND METHODS. Distribution of labeled HMM along the non-polar bundle in the absence of ATP is shown in a. Images at 10 s (b), 20 s (c), 30 s (d), 40 s (e), 50 s (f), 80 s (g) and 90 s (h) after simultaneous application of unlabeled HMM and ATP are shown. Images a, c, e and g, which were obtained by blue-light excitation, represent distributions of labeled HMM, while images b, d, f and h, which were obtained by green-light excitation, represent the actin bundle during contraction and transformation. The bar indicates 10 μ m.

Fig. 6. Fluorescence micrographs showing directional movements of an aggregate of IAF-labeled myosin along a polar bundle of rhodamine-labeled F-actin, and fusion of two aster-like structures initiated by brief contact. For experimental conditions, see MATERIALS AND METHODS. Images a and e were obtained by green-light excitation, and b, c and d by blue-light excitation. The bar indicates 10 μm . Two aster-like structures produced by application of unlabeled HMM and ATP are shown in a. An IAF-labeled myosin aggregate associated onto a bundle seen in a is indicated by the arrow in b. Changes in position of the aggregate along the bundle are shown in c and d: the interval of time between b and c was 10 s and that between c and d was 20 s. The average velocity of movement was about 2 $\mu\text{m/s}$. (The blurred image in c was due to the fact that the aggregate went out of the depth of focus at this moment). The two aster-like structures were floating near the front of a 0.3 % MC solution containing aggregates of IAF-labeled myosin and ATP (see MATERIALS AND METHODS). Hence, there remained free HMM near the two structures, although it would have been diluted to some extent. The two aster-like structures were brought into contact at the position indicated by the aster in a. Then, the two structures fused into a bigger one, as shown in e: the interval of time between a and e was 35 s. The two arrowheads in b and c indicate IAF-labeled myosin aggregates trapped at the two structural centers, and the arrowhead in d indicates IAF-labeled myosin aggregates accumulated at the center of the fused structure.

Fig. 7. Dark-field light micrographs of a non-contractile ring produced by head-to-tail association of a polar bundle. Images were obtained at 0 s (a), 2 min (b), 4 min (c) and 6 min (d) after the second application of HMM and ATP. For experimental conditions, see MATERIALS AND METHODS. The bar indicates 10 μ m.

Fig. 8. Hypothetical modes of acto-HMM interactions in the presence of ATP. (a) Simultaneous interactions of HMM with two antiparallel actin filaments, inducing sliding movements between the two filaments in the direction to reduce the distance between the two barbed ends as indicated by the arrows. (b) Simultaneous interactions of HMM with two parallel actin filaments. In this case, HMM slides along the pair in the direction indicated by the arrows, while generating resistance against external sliding forces acting upon the two filaments.

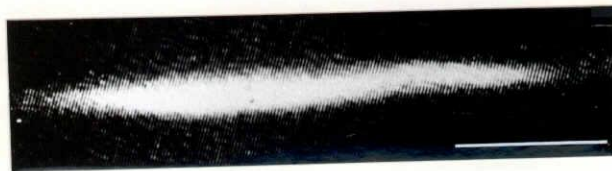


Figure 1

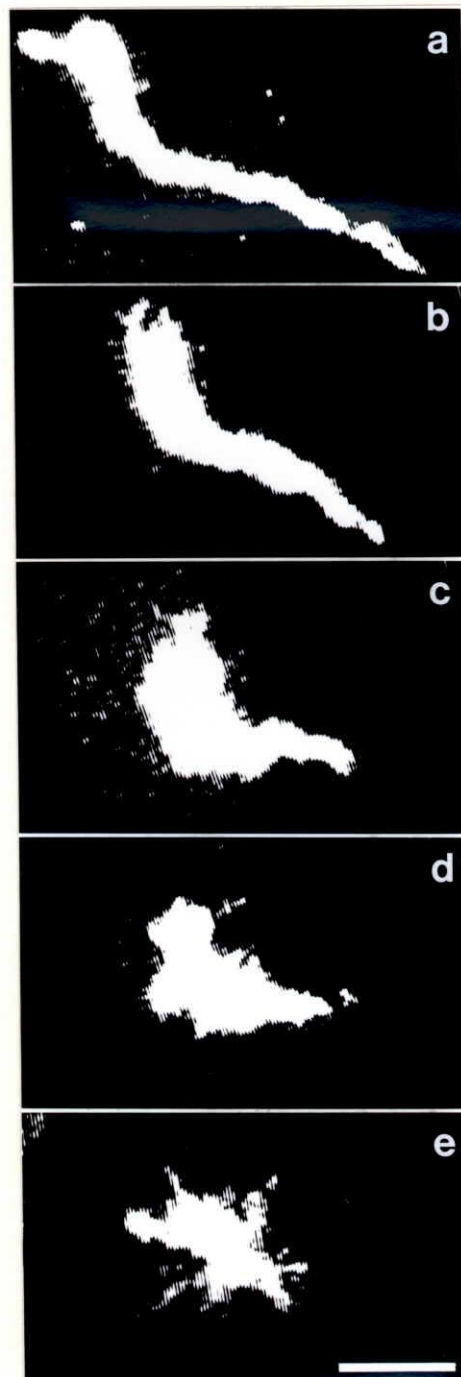


Figure 2

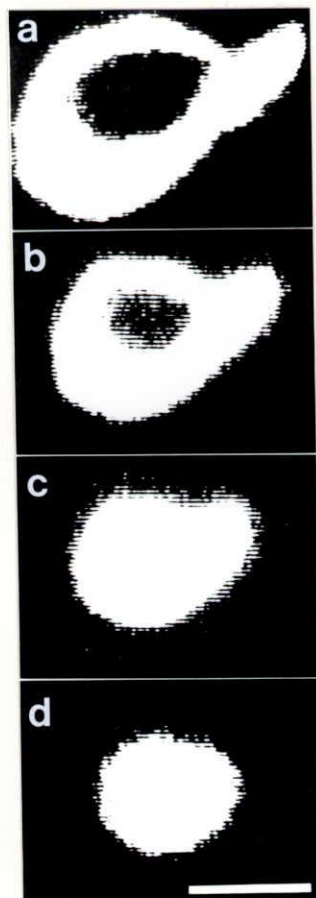


Figure 3

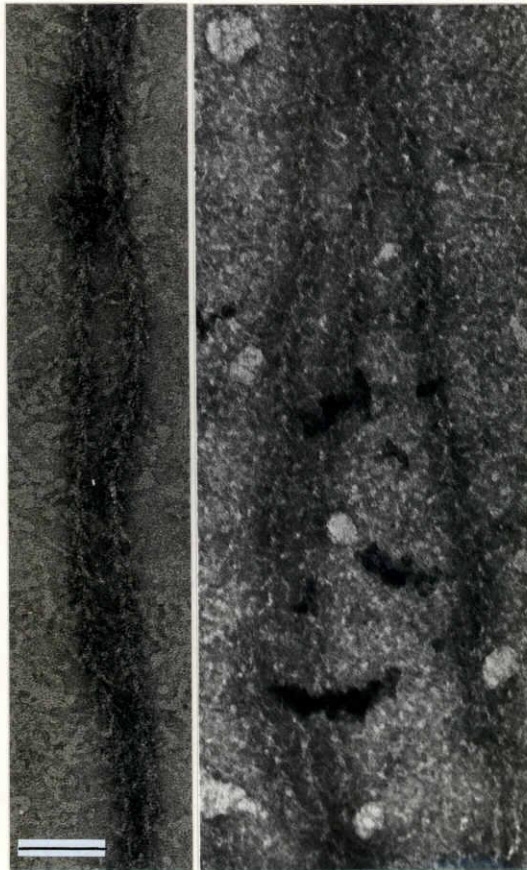


Figure 4

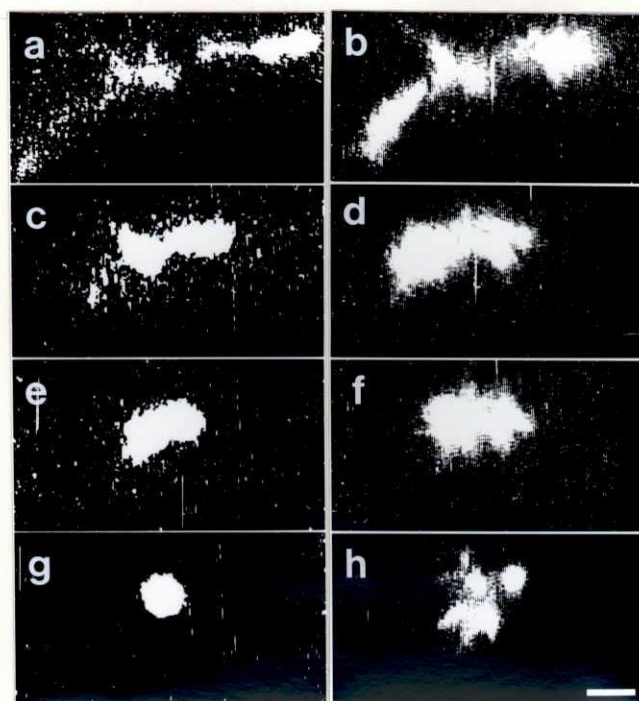


Figure 5

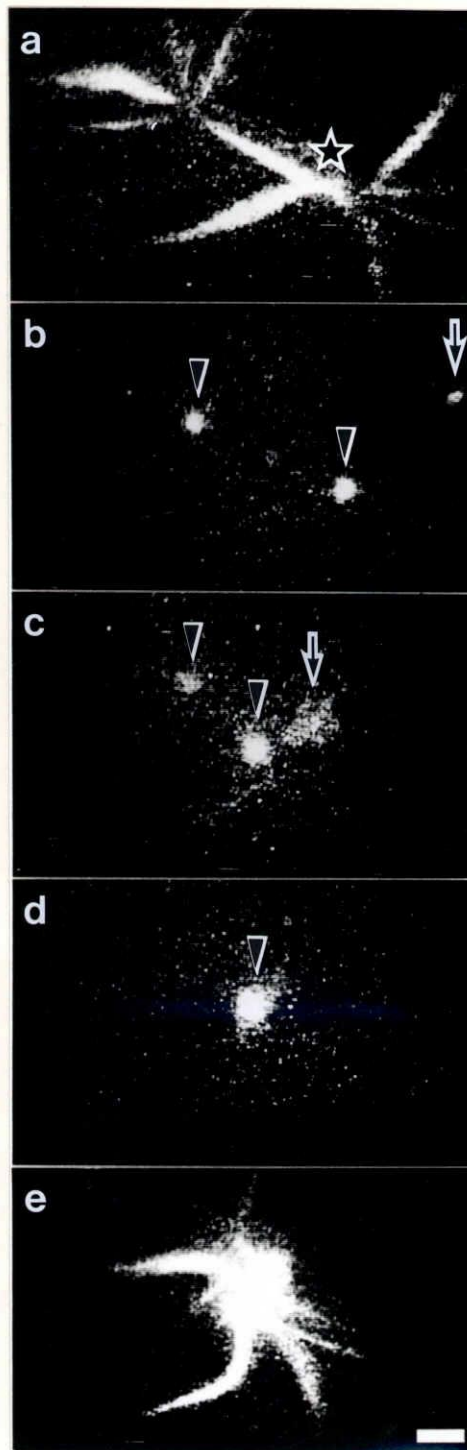


Figure 6

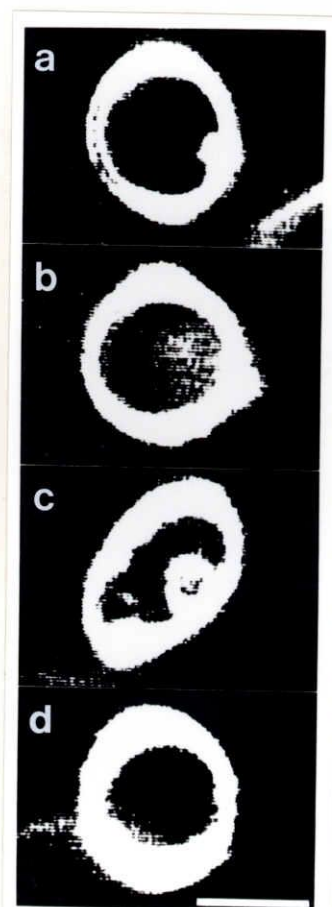


Figure 7

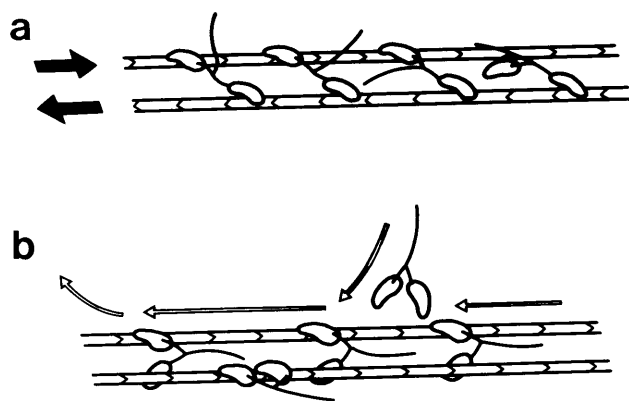


Figure 8