2PD001

アクチンの滑り速度決定因子
○網谷 一郎、坂本 武史、安藤 敏夫(金沢大・理・物理)

アクトミオシンの ATPase サイクル中にはアクチンに弱く結合している状態と強く結合している状態が存在する。力発生は弱い結合状態から強い結合状態への遷移もしくは強い結合状態で起こると考えられている。弱い結合状態から強い結合状態への遷移は律速過程であり、ミオシンは律速過程の前の状態に蓄積している。弱い結合状態ではアクチンとミオシンは速い平衡状態にあり何回も結合・解離を繰り返している。

アクチンが定常的に滑り運動を行っているとき、力を発生しているミオシンと力発生にかかわっていないミオシンが存在する。力発生にかかわっていない弱い結合状態のミオシンは、アクチンと結合したときに滑っているアクチンに引く張られて、滑り運動に対して抵抗力として働くと考えられる。

これを検証するために次に示す3種類の測定を行った。(1)NTP を基質としたときの actin-activated MgNTPase 活性、(2)溶液のイオン強度を変化させたときの actin-activated MgATPase 活性、(3)ATP と複合体を形成する二価金属イオンを変えた場合の actin-activated MeATPase 活性から $K_{0.5}$ 、 V_{max} を見積もり、またそれぞれの条件でアクチンの滑り速度を *in vitro* motility assay 系で測定した。

その結果、アクトミオシン間の $K_{0.5}$ とアクチンの滑り速度の間に強い相関があることがわかった。このことから弱い結合状態にあるミオシンが、アクチンが滑り運動を行うときの抵抗を生み出す主な原因になっていると考えられる。また、アクトミオシンの $K_{0.5}$ とアクチンの滑り速度の関係を説明するためのモデルの構築を試みた。このモデルからはアクチンが滑り運動を行っているときにミオシンが発生している力の大きさは一定になることが予想される。この予想を検証するため、ミオシンの中に N-ethylmaleimide 処理を行ったミオシンを混ぜた条件で *in vitro* motility assay を行い、そのときのアクチンの滑り速度の減少の様子からミオシンの発生している力の大きさを見積もった。

I. Amitani, T. Sakamoto, T. Ando : Effect of affinity between actin and myosin on the sliding velocity of actin

2PD003

ミオシン-ATP の 1 分子力学動態の AFM 計測
○芝田 健一郎、網谷一郎、安藤敏夫
(金沢大学・理・物理)

アクトミオシン系の力発生はミオシン頭部の ATP 加水分解中に伴う構造・形態変化が直接関わっていると言われていたが、これまでそれを直接観察したものはいない。

ATP を加水分解中もしくは $M \cdot ADP \cdot Pi$ 状態に起こるであろうミオシン頭部の力学的変化を AFM で 1 分子レベルの直接観察する研究を行っている。

HMM1 分子を結合した探針を上下させながら ATP 基板に近づけ、基板に接触させる。HMM が ATP に結合した後、探針を上に変位させると探針が下に跳び応答が見られる。この応答が現れた直後に探針の上下動を止め、その変位の時間経過を追跡していく。この計測で、ノイズでは説明できない探針の振動現象が現れた。この現象は基板からヘビームローミオシンが張った状態と思われる探針-基板間の距離で観測され、探針が基盤に接触した時にはこのような現象は見られなかった。つまり、緊張状態における基板の振動を探針が感知しているとは考えられず、HMM の構造変化を直接観測していると思われる。

振動中の 1 ストロークとする仕事は、1 ATP 化学エネルギー量にほぼ等しい。にもかかわらず数秒間振動現象が観測されるのはエネルギーが絶えず探針とミオシンとの間を行き来しているからだと考えられる。また、ATP を ADP で置き換えた場合には振動現象がまったく現れず、この現象が ATP と HMM の相互作用によって発生していることがいえる。

今回は、この現象がアーティファクトでないこと、実験の改善、定量的な解析を報告する。

K.Shibata, I.Amitani and T.Ando : Atomic force microscopy on the mechanical behaviour of a single molecule of Myosin - ATP

2PD002

S2 先端で見たヘビームローミオシン頭部の構造変化
○濱本 錦、安藤 敏夫(金沢大・理・物理)

最近のミオシン頭部の構造研究から、ヌクレオチドの結合により頭部のコアダメインと軽鎖ドメインの境界付近で頭部が折れ曲がる可能性が示唆されている。実際に溶液中でこのような変化がダイナミックに起こっていることを追跡した実験はなされていない。

本研究ではそのような変化を HMM の S2 先端部の動きを観測することで捉えることを試みた。トランスグルタミナーゼを用いて S2 先端部分にビオチンを導入した HMM をガラス基板に付けた。その後ガラス基板の隙間を S1 でうめた。そこに蛍光性のニュートラアビジンビーズを流しビオチンと結合させる。ビオチン化 HMM 濃度を上げていくにしたがって吸着するビーズは増えていった。このことよりビーズは S2 先端に結合していることがわかった。このビーズの位置をナノメーターの精度で計測する。この実験では S2 とその先端に付けられたビーズは自由に動ける必要があるため、その確認のためビオチン化 HMM を *p*-バリンで消化した。これでできた S1 と S2 の混合物を基板に流し、S1 で隙間を埋めビーズを流した。この場合のビーズの基板への吸着は *p*-バリン処理していないビオチン化 HMM の 16% であった。ビオチン化 HMM は S1 で基板に吸着し S2 は基板に吸着していないことが確認された。示唆されているような屈曲が起これば S2 先端の位置は大きく変わるはずである。S2 の揺らぎはビデオレートよりはるかに速いため揺らぎの中心位置が観測されることになる。ATP を低濃度加えて、S2 先端の位置を時間を追って求める。これにより、ATP 加水分解に同期した S2 先端の動きがあるかどうかを検出する。ビーズの中心位置を高い精度で決定できる画像解析法を開発した。その精度は ± 2 ナノメータであった。揺らぎの中心位置が 2 ナノメータ以上動けば検出できる。

N.Hamamoto, T.Ando: The structural change of myosin heads monitored by the motion of the distal end of S2.

2PD004

脳ミオシン-V の酵素と運動特性
○坂本 武史、*横田 悦雄、安藤 敏夫
(金沢大学・理・物理、*姫路工業大学・理・生命科学)

ATP 存在中でウサギ骨格筋 HMM よりもアクチンへの親和性の高い Myosin-V を精製した。ひよこ脳から精製した Myosin-V は、N-末端側に 2 つの頭部と C-末端側に球状の尾部をもっている。2 つの頭部には、アクチン結合部位と ATP 加水分解部位がある。また、頸部には、6 個の IQ motifs が存在し、複数のカルモジュリンが結合する。したがって、Myosin-V は、 Ca^{2+} がカルモジュリンに結合することによって ATPase 活性や運動の制御をうける。

Myosin-V の運動活性を確認するために *in vitro* motility assay を行った。1mM EGTA と 1 μ M カルモジュリンを含む溶液でアクチンフィラメントは、滑り運動を行っていた。滑り速度は、およそ 0.3~0.4 μ m/sec であった。次に、同じ試料に 10 μ M Ca^{2+} と 1 μ M カルモジュリンを含む溶液で還流すると、アクチンフィラメントの滑り運動は、5 分でほぼコントロールの 10% 以下に滑り速度が遅くなった。ここで再び試料の溶液を、1mMEGTA と 1 μ M カルモジュリンを含む溶液に戻すと、アクチンフィラメントの滑り運動はもとに戻った。1 μ M カルモジュリンが、溶液に含まれていないとアクチンフィラメントの滑り運動は、回復しなかった。Myosin-V の濃度を低くしていくとアクチンフィラメントが、基板上に一点で結合した状態になった。このアクチンフィラメントが、ブラウン運動をしながら一方への滑り運動をする様子が観察された。Myosin-V も 1 分子で滑りをサポートする可能性がある。アミノ基またはシステイン基反応性の蛍光色素と Myosin-V を直接反応させたが、運動活性が失われてしまった。

本年会では、Myosin-V の生化学的性質を調べウサギ骨格筋との比較を行い、その結果を報告する。

T.Sakamoto, E.Yokota, T.Ando: Characterization of enzymatic and motility activities of Brain Myosin-V