2PD005

非筋ミオシンⅡB2に特異的に挿入されたアミノ酸配列の役割
○高橋慶太¹、平塚祐一³、矢澤道生¹、内田恵司²、高橋正行²、
上田太郎²、山岸皓彦²
(¹北大・院理・化学、²北大・院理・生物科学、³工業技術院)

ミオシンは、ATPの加水分解と共役してアクチンフィラメントを滑らすモーター蛋白質である。脳には、非筋ミオシンⅡBと、頭部重鎖のループ2領域に21個のアミノ酸残基の挿入を持つ非筋ミオシンⅡB2の二種のミオシンが発現している。この21アミノ酸残基の挿入の機能的意義を調べるために、ミオシンⅡB及びⅡB2のループ2配列を細胞性粘菌のミオシンに置換導入し（以下これらのキメラミオシンをB、B2とする）、その機能を比較した。

まず、両キメラミオシン重鎖のDNAを組み込んだプラスミドをミオシン重鎖DNAを欠損した粘菌株に導入し、子実体形成の観察を行った。その結果、B導入株では野生株と同様の子実体形成能が観察されたのに対し、B2導入株では正常な子実体形成が観察されず、B2のモーター活性の変化が示唆された。そこでこれらのキメラミオシンを単離し、*in vitro*でアクチン滑り速度を測定した。その結果、Bの滑り速度は粘菌ミオシン(WT)と差がなかったが、B2の滑り速度はそれらの半分程度の値であった。次に、ミオシンのモーター活性を担うミオシン頭部断片(S1)を発現・単離し、ATPase活性を測定した。アクチン非存在下では、BとB2に差は見られなかった。しかしアクチン存在下のATPase活性を比べると、アクチンに対する見かけ上のアフィニティー(K_m)はBとB2に大きな差が認められなかったにも関わらず、B2の最大活性(V_{max})はBの半分程度しかなかった。また、共沈法を用いてS1とアクチンの結合を直接測定したところ、BとB2のアクチンに対するアフィニティーは、 K_m 場合と同様に大きな差が見られなかった。

以上の結果から、ループ2領域への21残基の挿入は、アクチンとの結合の強さに対する影響よりも、ATPase活性とアクチン滑り速度を低下させる影響が顕著であることがわかった。ループ2領域はアクチン結合部位近傍に位置しており、ここに21残基の挿入を持つミオシンⅡB2は、アクチンとの結合様式をさほど変えることなく、低いATPase活性でゆっくりとアクチンフィラメントを動かすことで脳に特異的な機能を果たすと考えられる。

K.Takahashi, Y.Hiratsuka, M.Yazawa, K.Uchida, M.Takahashi, T.Uyeda and A.Yamagishi : Effects of amino acid residues specifically inserted to non-muscle myosinⅡB2

2PD007

ミオシン繊維の上を滑るアクチン滑り距離の揺らぎ
○今福泰浩、豊田将史、高田聡、山田章、太和田勝久
(九州大学大学院理学研究科、通信総合研究所)

ムラサキイガイABRMのミオシン繊維上での、順方向(ミオシン繊維の中央に向かう方向)のアクチン滑り運動において、滑り距離の揺らぎから求めた拡散係数はアクチン繊維の長さ依存せず一定であることを私たちは以前に示した⁽¹⁾。また、微小管モーターの上を滑る微小管についても同様の結果を得ている^(2,3)。もし、複数の分子モーターが互いに独立に一本の繊維と相互作用していると仮定するならば、中心極限定理によって拡散係数は繊維の長さに反比例することが期待されるが、上に示した実験結果はこの期待に反する。

私たちは、Huxleyの筋収縮モデル⁽⁴⁾に基づいてアクチンを介した複数のミオシン頭部間の様々な相互作用を導入したモデル、およびDukeのモデル⁽⁵⁾に基づいた滑り運動の計算機シミュレーションを行った。このDukeのモデルはHuxleyのモデルと異なり、高張力条件下において多数のミオシン頭部が協同的な運動を引き起こす。シミュレーションの結果、分子モーター頭部の向きと間隔がランダムな条件、および分子モーター頭部の向きと間隔がそろっている条件では、拡散係数は繊維の長さに反比例することが示された。これは、上に示した実験の結果と矛盾する。したがって、HuxleyモデルやDukeモデルでは*in vitro*滑り運動の揺らぎの繊維長さ非依存性を説明できないことが分かった。

なお、ムラサキイガイとは異なった属のヒメイガイのABRMを用いた実験においても、拡散係数の繊維長さ非依存性は確認されており、現在、順方向と逆方向それぞれの滑り運動について同様の解析を行っているところである。

(1) 豊田ほか, 日本生物物理学会第35回年会, 演題番号 3T05, 1997.
(2) Imafuku, Y., Toyoshima, Y.Y., Tawada, K., *Biophys. J.*, 70, 878-886, 1996.
(3) Imafuku, Y., Toyoshima, Y.Y., Tawada, K., *Biophys. Chem.*, 67, 117-125, 1997.
(4) Huxley, A., *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, 7, 255-318, 1957.
(5) Duke, T.A.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 2770-2775, 1999.

Imafuku, Y., Toyoda, M., Takada, S., Yamada, A., and Tawada, K. : Fluctuations in sliding distance of actin filament along a native thick filament of myosin

2PD006

アクチン-ミオシン結合における協同性
○徳楽清孝、上田太郎 (工技院・融合研)

これまで、ミオシンのアクチンへの結合に協同性があるのではないかとということがいくつかのグループにより報告されている。我々は協同性に方向性があるのか、すなわちアクチンフィラメントに結合したミオシンのプラス端マイナス端のどちら側に次のミオシンが結合しやすくなるのかに興味をもっている。今回、蛍光ラベルした粘菌 HMM を用いて、ミオシンとアクチンの結合における協同性について解析した。

結合条件は協同性が報告されている Orlova and Egelman (1997)の条件⁽¹⁾に従った。粘菌のHMMにGFPを融合させたHMM-GFPと、Ca²⁺存在下(Mg²⁺非存在)で重合させ少量のローダミン-ファロイジンでラベルしたアクチンフィラメント(アクチン:ローダミン-ファロイジン=20:1)を混合し、25℃でインキュベート後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、HMM-GFPがフィラメント全体に結合したアクチンフィラメントと、全く結合していないフィラメントが観察され、ミオシンのアクチンへの結合に協同性があることが確認できた。同サンプルを逆染色後電子顕微鏡で観察したところ、蛍光顕微鏡観察結果と同様に結合に局在が見られた。またこの協同性は0.5%アガロースゲル中に固定したアクチンフィラメントでも観察できた。現在、HMMにBFPを融合させたHMM-BFPを作成し、HMM-GFPを結合させたアクチンフィラメントにこれを加え、プラス端マイナス端のどちら側にHMM-BFPが結合するのかが解析している。さらに、アガロースゲル中で結合を継時的に観察出来ないか検討している。

1)Albina Orlova and Edward H. Egelman (1997) J. Mol. Biol. 265, 469-474.
K. Tokuraku, T.Q.P. Uyeda: Cooperative binding between actin and myosin

2PD008

光ピンセットを用いたアクトミオシン1分子力学測定
ーミオシンネックの役割ー

○田中裕人、岩根敦子、奥村隆、森本さゆり、楠本高寛、石島秋彦、柳田敏雄 (科技振・1分子過程プロジェクト、阪大・医、阪大・基礎工、科技振・柳田プロジェクト、名大・工)

ミオシンのモータードメインは、ATP、アクチン結合部位と α ヘリックスからなる軽鎖(LC)結合部位からなる。ミオシンの動作メカニズムとして、このLC結合部位がアクトミオシンの相互作用中にレバーアームとして働き変位を起こすという、いわゆる“レバーアームモデル”が提唱されている。本研究においては、このレバーアームモデルを検証するため、遺伝子工学的手法を用い、レバーアーム(LC結合)部分を欠損した細胞性粘菌のミオシンを作成し、レバーアームの有無でのミオシンの変位測定を行った。結果を要約すると、

- ①ミオシン1分子の変位の大きさは、14nm(レバー有り)、13nm(レバー無し)であった。レバーアームの有無で変位の大きさはほぼ同じであった。
- ②多分子ミオシンによるアクチンの滑り速度を測定した結果、レバーアーム無しの場合の速度は、レバーアーム有りの速度の約1/5で、上田らの結果(PNAS '96)と同様であった。
- ③飽和ATP濃度(2mM)条件下で、アクトミオシンの相互作用の時間を1分子測定した結果、レバーアーム無しの場合、レバーアーム有りの4-5倍長いことが分かった。

以上の結果より、ミオシンのLC結合部位はレバーアームとして機能し変位を増幅しているわけではなく、例えばストレインセンサーとして働き、アクトミオシンの相互作用の時間のコントロールに関わっていることが分かった。

H. Tanaka, A. Iwane, T. Okumura, S. Morimoto, T. Kusumoto, A. Ishijima, T. Yanagida: Single-molecule mechanics of actomyosin measured by an optical tweezers; Role of the neck region.