2PD013

粘菌*Dictyostelium*ミオシン IIのアクチン結合面欠失変異(Δ519-524/+A)とその抑制性変異(L596S)の解析
○上田太郎、平塚祐一（工業技術院・産業技術融合領域研究所、Bruce Patterson（アリゾナ大学）

アクトミオシンの力発生結合状態に関する知見が不足している。さて粘菌ミオシンIIのアミノ酸残基508-535は、全体としてはアクチン結合領域側表面を長軸方向に走る長いαヘリックスだが、中央付近の519GRQPPG524が外側に突出したこぶ状の突起をもつ。Raymentら(1993)は、ドッキング解析からこのこぶがアクチンとの疎水的結合に関与すると推測した。そこでわれわれはこぶをAで置換し、前後のヘリックスをスムーズに連結した変異Δ519-524/+Aを作製した。in vivoでの形質から、この変異ミオシンが機能を失ったことが示された。次に形質に基づいてこれに対する抑制性変異を探索し、L596Sを得た。しかしL596はいわゆるアクチン結合部位ではなく、その抑制機構は自明ではない。そこでΔ519-524/+AとL596SのS1について生化学的解析を行った。まずアクチンとの共沈アッセイにおいてΔ519-524/+Aは、+ADPでの結合が特に高いイオン強度下で顕著に低下していた。またアクチンによるATPase活性化の程度は約2倍に低下していたが、活性化に必要なアクチン濃度は正常であった。従ってΔ519-524/+AにおいてはADP存在下の疎水的結合が低下しており、その結果弱い結合から強い結合への転移速度が低下したと推定した。ただしこぶをGで置換したΔ519-524/+Gはin vivoでの機能を部分的に回復したので、こぶ自身はアクチン結合部位ではなく、前後のヘリックスを柔軟に連結し特異的な構造変化を促進する機能をもつと考えた。一方L596Sは+ATPでもほとんどがアクチンと共沈し、+ATP+250 mM NaClや+ATPγSでもなお顕著な共沈が見られた。さらにL596S全長ミオシンはin vitroでアクチンを動かせず、混在する野生型ミオシンの運動を強く阻害した。従ってL596Sにおいてはアクチンとの強い結合が亢進しており、それはM.ATPやM.ADP.Pi状態でも疎水的結合部位が形成されるためだと考えた。同変異によるΔ519-524/+Aの抑制は、こうした疎水的結合の促進作用によると考えられる。なおホタテS1/ADPの新しい結晶構造(Houdusseら, 1999)では、L596が従来の構造よりアクチン結合部位方向に移動しており、この構造変化とわれわれが想定した疎水的結合部位形成の関連に興味をもたれる。

T. Q. P. Uyeda, Y. Hiratsuka, and B. Patterson: Characterization of a mutant *Dictyostelium* myosin II carrying a deletion in the actin binding face (Δ519-524/+A) and its suppressor (L596S).

2PD015

ミオシンの rigor 結合部位の破壊とモーター機能への影響
○佐々木直哉、大倉玲子、飛鳥川英郎、安田涼平¹、木下一彦¹、平塚寿章²、須藤和夫（東大院・総合文化、¹慶應義塾大学・理工、²旭川医科大学・化学）

ATP 存在下で見られるミオシンとアクチンの弱い結合は静電相互作用が担っていると考えられ、これに対してはミオシンの50K/20K junction loop の関与が推定されている。一方、rigor 状態で見られる強い結合は主として疎水相互作用が担っており、ミオシンの上部、下部の両 50K サブドメインの先端に位置する疎水性残基が疎水性結合部位として推定されている。

本研究では、細胞性粘菌のミオシン II 遺伝子を用いて、上部50K サブドメインの疎水性残基のクラスターを欠損させた変異ミオシン(Δミオシン)を作製し、その生化学的活性等を測定した。

疎水性クラスターを欠損したΔミオシンとアクチンの結合は、ATP非存在下でも極めて弱かった。また、ミオシン単独での Mg-ATPase 活性は野生型と変わらなかったがアクチン活性化 Mg-ATPase 活性は野生型の 1/6 に減少していた。さらに、In vitro motility assay では野生型の 1/6 の速度ではあるがアクチンを滑らせることができ、力学測定でも弱いながらも力を発生した。

これらの結果から、1)上部 50K サブドメイン先端部の疎水性クラスターはアクチンとミオシンの rigor 結合には必須であること、そして 2)rigor 複合体形成のステップは力発生には必須でないという可能性が示唆された。

N. Sasaki, R. Ohkura, H. Asukagawa, R. Yasuda, K. Kinoshita Jr, T. Hiratsuka, and K. Sutoh : Selective disruption of the rigor binding site of *Dictyostelium* myosinII and its impact on motor functions.

2PD014

2 平面間に捕捉された変異性ミオシン S 1 の動的構造変化

○青木 史穂利*、平岡 七恵*、大石 昇（帝京大・医）、佐々木 裕次（SPring-8(JASRI)）、須藤和夫（東大・総合文化）、須田 斎*（*東海大）

変異性細胞性粘菌ミオシン S 1 を用いてミオシンの動的構造変化の有無を検出することを目的に、機能化された銀ないしは石英薄膜表面上に S 1 を単分子層状に配向固定し、A T P加水分解にともなう S 1 の層厚の変化を表面間力測定装置を用いてサブナノメートル精度で測定した。

我々は、ミオシン S 1 のサンプルとしてこれまでと同様に C 末に極めて反応性の高い S H 基を融合した変異性ミオシン S 1（N 末には His-tag）を細胞性粘菌から抽出・精製して用いた。この反応性の高い S H 基で単分子膜状に配向したマレイミド基表面に化学結合で固定することによって、安定な S 1 単分子層が形成される。マイカ面との吸着力によって S 1 の 2 点での捕捉を行った。

これまで、ATP の存在する液や無機液、あるいは ATP アナログ（ADP・Vi）溶液中での測定を行い、S 1 単分子層の厚さを測定することで、その厚さの変化として構造変化の検出を試みてきた。その結果、加水分解反応によって S 1 層の膜厚が 4 nm ほど変化することを結論した。しかしながら、この測定では、表面の凸凹などのために生ずる膜厚の不均質さによって定量性に曖昧さが残ってしまう。そこで今回この問題を解決するために、caged ATP を用いることにより改善を図った。さらにこの方法を用いると ATP 加水分解反応にともなう構造変化をリアルタイムで観測することができる。caged ATP は、強い UV 光を照射することにより活性化する。この時、UV 光による蛋白層へのダメージが懸念されるが、これまでの実験から、少なくとも UV 光によって層厚が変化した例はみられなかった。そして、これまで得た結論（膜厚が 4 nm ほど変化する）と矛盾しない結果を得ている。

現在使用している変異性 S 1 は N 末に His-tag が導入されているが、このサンプルとは別に His-tag をアクチン結合部位周辺に遺伝子組み換え法に基づいて作製中である。この試料を用いることによって 2 平面間に S 1 の両端を完全に捕捉して実験を行うことが可能となる。できれば、その結果についても報告する予定である。

S.Aoki, N.Hiraoka, N.Oishi, Y.Sasaki, K.Sutoh, H.Suda: Dynamic structural change of two-dimensionally arranged mutant myosin S1.

2PD016

ミオシンの ATP 加水分解機構の量子化学的研究
Lys185, Arg238, Glu459 の役割について
千葉大・薬 ○上野 純子、畑 晶之、星野 忠次、津田 穂

【目的】ミオシンは ATP の加水分解にともない構造変化をすることによって、筋収縮を起こすと考えられているモータータンパク質である。近年、様々なスクレオチド結合状態の X 線結晶解析構造が得られており、それぞれの状態における立体構造が明らかになった。また、ATP 周辺のアミノ酸残基の変異体を用いた実験により、ATP の加水分解反応や、運動性に関与する残基も特定されつつある。なかでも、1998 年の Xiang-dong Li らによる *Dyctiostelium* を用いた変異体の実験によると、ATP の加水分解には Lys185, Arg238, Glu459 が必要であることが明らかになった。特に、Arg238 と Glu459 の側鎖間の salt-bridge が重要であることが、その後の多くの研究によりわかっている。

本研究では、Mg₂VO₄ADP（遷移状態アナログ）が結合した *Dyctiostelium* ミオシンの X 線結晶解析構造（PDB code : 1VOM）をもとにして、モデルを構築し、水が ATP を加水分解するメカニズムを量子化学計算によって明らかにし、Lys185, Arg238, Glu459 の役割について考察した。

【方法】計算の際、反応系のモデルは分子力場計算で得られた構造をもとにして、ATP 加水分解反応に関与すると考えられる Lys185, Arg238, Glu459 および、Mg に配位している Thr186, Ser237 を取り出して構築した。モデルの構築の際、計算資源が限られているため、反応に関与する側鎖のみをとりいれた。計算には、ab initio 法（Hartree-Fock 法）を用い、基底関数系には 3-21G** を採用した。計算プログラムには Gaussian94 を使用した。

【結果・考察】計算の結果、水分子が ATP γ リン酸を求核攻撃して ADP と Pi に分解する過程が、一段階素反応で起こることがわかった。反応の出発点において水分子は Arg238 によって保持されており、反応が進むにつれて水分子が γ リン酸側に近づいていった。それにもなってエネルギーが上昇し、水分子の HO-H の結合が切断されて水素原子が ATP γ リン酸の酸素側に移動した状態で遷移状態となった（図参照）。遷移状態をすぎるとエネルギーが下降し、γ リン酸と β リン酸の距離が離れていき、γ リン酸が Arg238 の側鎖に引かれるかたちで切断される様子がわかった。反応の過程において、Lys185 の側鎖は γ リン酸と β リン酸の酸素と水素結合距離を保ち、Arg238 と Glu459 の側鎖は結合をつくったままであった。

ATP 加水分解のメカニズムの詳細は、本会にて報告する。

J.Ueno, M.Hata, T.Hoshino, M.Tsuda : Mechanism of ATP hydrolysis by a myosin ; Role of Lys185, Arg238 and Glu459