2PD017

滑り運動中のミオシンクロスブリッジの3次元構造

○片山栄作、*大森剛毅、*小山智宏、*馬場則男

(東京大学医科学研究所・微細形態学研究所、

*工学院大学・電気工学科)

われわれは、マイカ細片の表面に吸着させたアクチン・重メロミオン(HMM)の硬直複合体にATPを加えてアクチンの*in vitro*滑り運動を起こさせ、その急速凍結ディープエッチ・レプリカ像を電子顕微鏡で観察することにより、滑り運動に伴うクロスブリッジの構造変化を直接観察する試みを続けている。昨年度の年会においては、それらが様々なコンフォメーションでアクチンと結合している様子を、ミオシンのサブドメイン構造が識別できるほどの高分解能で観察できることを報告した。

一方、アクチンに結合していないミオシンにATPやADP/無機バナジン酸(Vi)あるいはADP/AlF₄などを加えるとその頭部が強く屈曲することが知られており、X線結晶屈折により、平滑筋ミオシンS1/ADP/AlF₄複合体の精密な原子モデルも得られている。それと同等の構造をとるHMM/ADP/Viのフリーズレプリカ像から3次元像を再構成し、上記の原子モデルと比較することにより、レプリカ像から得られる構造情報の信頼性を検証した結果、個々のサブドメインの配置や屈曲の方向などの立体構造はわれわれの目的には十分なほどに良く保存されていることが判明した。そこで、アクチン滑り運動中の様々な形状のクロスブリッジの3次元構造を実際に再構成し、ミオシン頭部内でのどのような構造変化が起きているのかを調べる段階に進んでいる。モータードメインとアクチンの結合様式として、1) 上位50KDa部分で結合するもの、2) 下位50KDa部分で結合するもの、そして3) その両者で(あるいは更に別の部分で)結合するものの、少なくとも3種類の構造を見出した。前2者は“弱い結合状態”に、また後者は“強い結合状態”に対応すると考えている。“レバーアーム”部分の屈曲方向に関してはアクチンに結合しているか否かにより大きく変わり、実際にはアクチンの下に周り込んでいる場合が多いことは以前報告した通りである。1)では、上位50KDa先端部の小ドメインがアクチンに接触し50KDa本体と1本の α -ヘリックスでつながっている様子が鮮明に観察された。現時点までの観察結果を総合的にみると、“レバーアーム”の首振りにより滑り運動が起きているとは考え難い状況である。

E. Katayama, G. Ohmori, T. Koyama & N. Baba: 3D-structure of myosin crossbridges during actin sliding-movement.

2PD019

SPMによる単一ミオシン分子のATPase過程の研究

○国岡由紀、若山純一、大岩和弘*、山田武範

(東京理科大・理・物理、*通信総研・関西先端研究センター)

走査型プローブ顕微鏡(SPM)を利用すれば、溶液中で正常な活性を保った単一タンパク分子の構造、および相互作用力を測定することができる。また、最近開発された単一蛍光分子観察法により、タンパク分子の酵素反応が、1分子のレベルで観察可能になっている。我々はこれらの技術を組み合わせて、アクトミオンにおけるATP加水分解反応と、タンパク分子の構造変化あるいは相互作用力を単一分子のレベルで同時測定することを目指して研究を行っている。

原子間力顕微鏡(オリンパスNV2500)に、単一蛍光分子の観察が可能となるよう、エバネッセント光による照明系を組み込んだ。しかし、SPM観察に使われる「光てこ」のレーザー光の散乱成分や、カンチレバーによる散乱光が、エバネッセント光による蛍光観察を妨害することがわかった。これを解決するため、我々は自作のカンチレバーを用いることにした。カンチレバーの、試料に接する先端にはZnOウィスカーの結晶を用いた。このカンチレバーは、エバネッセント光による蛍光観察の邪魔にならないことを確認した。

ガラス基板にコートしたミオシンフィラメントにCy3-ATP(1nM)を加え、エバネッセント光による励起で、ミオシン分子にCy3-ATPが結合する様子を観察しながら、同時にミオシンフィラメントのAFM像を観察できることが確認できた。

この実験系を利用して、カンチレバー先端に固定したミオシンと、ガラス基板に固定したアクチンフィラメントの間の相互作用とATPaseとを同時に観察した結果を報告する。

Y. Kunioka, J. Wakayama, K. Oiwa, T. Yamada: ATPase process of single molecule of myosin studied by SPM

2PD018

発現単頭HMMを使った平滑筋ミオシン調節機構の研究

○小西 薫¹、孤嶋慎一郎²、加藤剛志¹、矢澤道生¹、
藤原敬己²、尾西裕文²(北大・院・理¹、国立循環器病センター研究部 循環器形態部²)

平滑筋ミオシンは、調節軽鎖のリン酸化によってATPase活性やモーター活性、コンホメーションを調節している。双頭構造を有するミオシンでは脱リン酸化されるとOFFになるが、単頭ミオシンやS1では脱リン酸化されてもOFFにならない。したがって、OFF状態を形成するには二つの頭部間の阻害相互作用が必要と考えられているが、その部位はわかっていない。そこで、この阻害相互作用部位を調べるため、バキュロウイルス発現系を用いて下図のような変異体平滑筋HMMと平滑筋S1を調製した。

これら変異体のactin-activated ATPase活性をリン酸化および脱リン酸化状態で測定したところ、 Δ MD HMMと Δ MD+ELC HMMでのみ脱リン酸化により2倍程度の活性の低下が見られた。したがって脱リン酸化によるOFF状態の形成には、二つの調節軽鎖間の相互作用が関与すると考えられた。

また、これらの変異体のアクチン非存在下でのMg²⁺ATPase活性の塩濃度依存性を調べた。活性は、S1では塩濃度の低下とともに単調に増加したが、3種の変異体HMMでは0.1 M KCl以下で、塩濃度の低下とともに減少した。したがって、頭部とS2間に10Sコンホメーション様構造形成に関与する相互作用があるのではないかと考えられた。また、 Δ MD HMMと Δ MD+ELC HMMでは脱リン酸化によって、塩濃度の低下にともなう活性の減少が増加した。よって、リン酸化による平滑筋ミオシンのコンホメーションの調節にも二つの調節軽鎖が必要であり、脱リン酸化状態での二つの調節軽鎖間の相互作用が頭部とS2間の相互作用を強化するのではないかと考えられた。

K. Konishi, S. Kojima, T. Katoh, M. Yazawa, K. Fujiwara, H. Onishi
A study of the regulatory mechanism of smooth muscle myosin using recombinant single-headed HMMs.

2PD020

ATPにより誘起されるミオシンSH2とSH1周辺の構造変化の違い

○平塚寿章(旭川医大・化学、東大・院・理・物理)

モータータンパク質ミオシンの頭部(S-1)にあるSH2(Cys697)とSH1(Cys707)は、Gly699で隔てられている2つの α -ヘリックスにそれぞれ含まれている。一方、ミオシンがモーター機能を発現する時にS-1の軽鎖結合領域が“レバーアーム”として働き、ATPとアクチン両結合部位で起きる構造変化を増幅して互いに伝えることが示唆されている。このレバーアームの支点はSH1-SH2領域の近くにあると考えられているが、レバーアームの動きにカップルして両残基周辺にどのような構造変化が誘起されるのかはほとんどわかっていない。とりわけSH2周辺で起きる構造変化については不明な点が多い。この理由の一つにSH2だけを特異的に標識できる高感度の蛍光プローブが知られていないことがあげられる。そこでSH2だけを特異的に標識できる蛍光プローブを検索し、これを標識したS-1の蛍光スペクトル変化を解析してSH2とSH1周辺で起きる構造変化の違いを検討した。

アクリロダニン(AD)はpH 8.0、7℃の条件下でSH2を特異的に標識した。得られたAD-S-1とSH1が全く同じ蛍光団で標識されたS-1(BD-S-1)について、ヌクレオチドを加えた時に起こる蛍光スペクトル変化を比較した。これまでのほとんどの研究では、SH1とSH2に標識されている蛍光団が異なるため蛍光団の物性や分子サイズの違いを考慮しなければならず、両残基周辺で起きる構造変化の直接的な比較は困難だった。しかしAD-S-1とBD-S-1では標識されている蛍光団が同じであるばかりか、その蛍光特性は高感度プローブのプロダンと同じである。このためデータの解釈が単純で、SH2とSH1に標識された蛍光団由来の蛍光変化を直接比較することができた。

AD-S-1とBD-S-1の蛍光スペクトルの強度や半値幅の測定、KIによる蛍光消光実験から、ATP加水分解中のSH2周辺の構造変化はSH1に比べてほとんど正反対であることがわかった。SH2を含むヘリックスは疎水性の残基に埋もれて補強されるのに対してSH1を含むヘリックスはむしろほどけてしまうことが示唆された。

T. Hiratsuka: Differences in ATP-induced conformational changes between environments around SH2 and SH1 of myosin.