3PB021

ミオシン頭部とアクチン単量体との複合体のADP依存的構造変化ならびにアクチン2量体との複合体構造のX線溶液散乱解析
○荒田敏昭、木村俊一、杉本泰伸*、武澤康範*、富田和法、若林克三*（阪大・院理・生物科学、*院基礎工・生物工）

GアクチンをMBS(Biochemistry,35,16061(99))とDHTで化学修飾し、全く重合しないがミオシンと結合するアクチンモノマーを調製し、ミオシン頭部S1との1:1複合体を形成させ、複合体のみのX線散乱強度曲線を得ることに成功していた。算出した慣性半径は50Å、分子量165kDa、最大分子コード長は180Å、アクチン-S1重心間距離72Åとなった。今回はこれらを指標にしてアクチン、S1の原子座標を用いて全散乱強度曲線を最適化するドッキング原子モデルを計算機により探索したところ、発表者の電顕写真観察(J.Struct.Biol.123,8(99))で予想されるように、S1先端近くにアクチンが結合することが確定した。しかしアクチンは対称軸を持つためS1がアクチンの4サブドメインそれぞれに結合する4つのモデルが残った。DNaseIを結合して非対称としたアクチンとS1複合体の実験により唯一のモデルが確定した。すなわちサブドメイン1に結合するとき推定分子量、慣性半径は実験値(180kDa、50Å)とよく一致した。さらに小さいドメイン間内部運動を考慮することにより完全にフィットできた。ADP中でも解離を最小限に抑えた条件で同様の実験すること成功し、分子量は変わらず慣性半径が約3-4Åだけ小さくなった。モデル計算ではS1が長軸のまわりに90度以上torsional回転した。この結果はS1の2つの主結合部位を回転中心とし第2の結合部位は隣接アクチンだけでなく主アクチンとも相互作用できることを示唆し、硬直筋肉でのADPによる微小バネアーム変位(Biophys.J.76,1770(99))とは異なり、ATP加水分解中のアクチン-ミオシンの弱い結合の本体を捉えたものと考えられる。

単量体アクチンとS1の結合は弱く、結合構造モデルもF-アクチン-S1複合体とはやや違っており、第2の結合部位の非関与が推定される。2量体アクチン-S1複合体の予備的解析も報告する予定である。

T. Arata, S. Kimura, Y. Sugimoto, Y. Takezawa, K. Sugata, K. Wakabayashi:
The ADP-dependent structural changes in the actin monomer-myosin head complex and the structure of the actin dimer-myosin head complex structure, as studied by X-ray solution scattering.

3PB023

X線回折によるカエル骨格筋トロポニンの収縮時における構造変化の研究

○成定潤子、武澤康範、松浦秀幸、若林克三（阪大、基礎工）
小林孝和（帝京大）、田中秀洋（平成帝京短大）

脊椎動物骨格筋の場合、トロポニンは筋収縮のCa²⁺による制御において重要な役割を果たしている。しかし、アクチンフィラメント上でトロポニンがどのような構造変化を起こしているのかはまだ良く分かっていない。カエル骨格筋からのX線回折像では、小角領域の子午軸上に約1/38.5nm⁻¹の間隔で層線反射が現れる。これらの反射は、アクチンフィラメント上に存在するトロポニンの線維軸方向の周期に由来するものである。

本研究では、筋肉の筋筋長をアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの活性部位がほぼ重なった状態（フルオーバーラップ、筋筋長約2.3μm）、約半分が重なった状態（ハーフオーバーラップ、同約3.3μm）、全く重ならず相互作用の出来ない状態（ノンオーバーラップ、同約4.0μm）に変え、それぞれの状態で弛緩状態と等尺収縮状態の回折像を測定した。また、硬直状態における筋肉のX線回折像も測定し、収縮中と比較した。

強度測定の結果、弛緩状態と収縮状態のトロポニン1次反射の強度を比較すると、ノンオーバーラップの場合活性化により強度が増大したが、フルオーバーラップの力発生中には逆に強度は減少した。ハーフオーバーラップの場合には強度減少が見られたが、フルオーバーラップの場合ほど大きい減少ではなかった。硬直状態ではフルオーバーラップの活性時の場合と同程度の強度減少を示した。このような強度変化において筋収縮時におけるトロポニンの構造変化について検討した。

図. カエル骨格筋のX線回折像

J. Narisada, Y. Takezawa, H. Matsuura, T. Kobayashi, H. Tanaka, & K. Wakabayashi: An X-ray diffraction study of the conformational changes of troponin in frog skeletal muscle during contraction

3PB022

CCD型2次元X線検出器を用いたミオシン頭部のX線溶液散乱への適用—制御軽鎖部を除いたモータードメインの構造
○杉本泰伸、東俊一、武澤康範、伊藤和輝*、雨宮慶幸、若林克三（阪大院・基礎工、*筑波大・応用生物化学、¹東大院・新領域創成）

X線検出器の進歩により、生体試料のX線散乱・回折実験において高い分解能でデータを得ることが可能となってきた。近年、2次元検出器として用いられるようになってきた、X線イメージングセンシファイアとCCDカメラの組み合わせによる検出器も、従来の1次元検出器や、2次元積分型の検出器と比較してさまざまな利点がある。そこで、この検出器をミオシン頭部のX線溶液散乱実験に用いてその特性を調べ、高い信頼性のデータを得ることを目的とした実験を行った。そしてその適用例として制御軽鎖部を除いたミオシン頭部の構造を調べた。

測定した試料は調製時の酵素と種の異なる4種類の骨格筋由来ミオシン頭部単体で、ヌクレオチドは結合していない。それぞれの試料についてギニエプロットから求めた慣性半径は、これまでに1次元検出器を利用して得られてきた値と良く一致するものであった。一方、強度の弱い広角領域において散乱プロファイルと比較すると、1次元検出器で得られたものとCCD検出器で得られたものの間に差が見られた。この原因は明確にはできなかったが、検出器の特性として中心付近の強い強度が周辺部に影響を与えているものと考えられる。現在のところその定量的な補正はできていないが、簡便な方法として全体のプロファイルから一定の強度をひくことによって1次元検出器と一致するような強度プロファイルを得ることができた。これらは1次元検出器で得られたデータと比較して、非常に高いS/N比をもったデータである。

このようなX線溶液散乱実験により、調製時にパパインおよびキモトリプシンで処理したミオシン頭部の構造を調べた。過去に同様のX線溶液散乱実験が行われた結果、両者は同一の分子最大長を持ったという報告がある。今回このような結果は得られず、求められた分子最大長は両者の間で約30Å異なっており、結晶構造解析から予想されるものと近かった。

3PB024

アクチンに化学架橋したミオシンS1のヌクレオチド結合に伴う構造変化のX線解析

○岩本裕之、大岩和弘¹、鈴木拓、大石昇²、藤澤哲郎³

(SPring-8・JASRI・実験部門、¹通信総合研究所・生体物性、²帝京大・生物工学研究セ、³理研摩擦研究所・構造生物物理)

筋線維中のアクチンフィラメントにミオシンまたはミオシン頭部断片(S1)を結合させると、X線回折像においてアクチン周期由来の層線反射の強度が増大する。このときのアクチン層線の強度プロファイルは結合したミオシンの構造に関する情報を含んでいて、アクチンに結合したS1の構造変化を調べるのに役立つ。ヌクレオチド結合時のS1の構造変化を調べる際に問題になるのはアクチンに対する親和性の変化で、プロファイルの変化がS1の構造変化を正しく反映するのか、アクチンのS1飽和度が下がったため見かけ上構造変化が起こったように見えるのか、解釈に注意を要する。この問題を解決するためS1を筋線維中のアクチンにEDCを用いて化学架橋した。まず、rigorの状態では架橋した前後の強度プロファイルには殆ど変化がなかった。次にATPを加えて未架橋のS1を洗い流し、再びrigorにすると反射強度は減少したが、rigorの特徴的なプロファイルは保存された。これにADP、ピロリン酸を加えてもプロファイルに変化は認められなかったが、ATPを加えると弛緩状態に極めて近いパターンが得られ、それは弛緩・収縮条件下(+BDM or +Ca²⁺)でも基本的に変わらなかった。同時に散乱強度が増加し、S1の構造の乱れが示唆された。何れの場合もヌクレオチド等を除くとrigorのプロファイルが再出現した。Gold-EDA-ADP-AIF₃ (前回年会)結合時には59Åの子午線に最も近い部分が増強し、S1がアクチンの軸から遠ざかる方向に構造変化が起きたことを示唆する(パワーストロークと矛盾しない)。さらにsucroseを加えてgoldのみの反射を記録すると、59Åのピークはかなり外側(-100Å)にあり、goldはアクチンに近い位置にあることを示す。

以上のように、化学架橋法はS1のヌクレオチド結合・構造変化の能力を損わずに、親和性変化の影響なしに構造変化を調べるのを可能にすること、また金クラスター修飾法は蛋白全体の構造と特定部位の位置を独立に調べるのに有効であることが示された。

H. Iwamoto, K. Oiwa, T. Suzuki, N. Oishi, T. Fujisawa. X-ray diffraction studies of the structural changes of myosin S1 crosslinked to actin in muscle fiber.