3PB045

ミオシン会合におけるスタッガー機構

○ 芥川 亨、畑 安雄 (京大、 化研)

筋肉中でミオシンが張力を発生させるときの機能単位は太い線維である。太い線維はミオシンが平行に並ぶことによって形成される。しかし単なる平行でなく隣合うミオシン分子はロッド部間で軸方向に14.3と43nmの2種類のずれを起こしている。これらのずれはアクシアルスタッガー(AS)として知られてきた。ASがロッド部のどこでそして如何にして引き起こされるかを解明することはミオシン会合の分子機構の中心課題であり、世界の競争になっている。以前、芥川らとNyitraiらはそれぞれ独立にLMM領域が特異領域(SDR)をもつことを示した。SDRはミオシンの会合に応答する領域である。最近われわれは、SDRのアミノ酸配列を決定し、LMM領域のC-末端側の316残基領域が43nmのASを指令する特定領域(ASCR)であることを示した。SDRはASCRのC-末端の26~29残基領域である。ASCRとSDRのアミノ酸配列が同定されるとスタッガー機構の研究は飛躍的に進展する。McLachlanらはロッド部表面荷電残基の分布がスタッガー機構に特に重要であることと、スタッガーが正と負の互いに相補的な電荷クラスター間で生じる強い静電的引力により起きることを示唆した。芥川らがおこなったLMMアミノ酸配列中の電荷分布を解析する方法は、これらの相補的電荷クラスターのアミノ酸配列上の位置を明確に現わした。実際、特定領域SDRは強い正の電荷クラスターとして現われている。今回、ASがLMM領域のどこで如何にして起きるのかを種々のデータによって示す。

T. Akutagawa, Y. Hata: Mechanism of axial stagger in myosin assembly.

3PB046

ミオシン ATPase 反応にクリティカルな塩架橋

○尾西裕文¹、孤嶋慎一郎¹、加藤一夫¹、藤原敬己¹、Martinez, Hugo M.、Morales, Manuel, F.² (¹国立循環器病センター・研・形態、²Pacific 大学)

Fisher らは、二つの異なる Dictyostelium ミオシンモータードメイン・ATP アナログ複合体の構造を比較して、ミオシン頭部の 50kDa ドメインにある二つのサブドメイン間の隙間が部分的に閉じることがミオシンに結合した ATP の加水分解に伴って起こる最も重要な構造変化であると結論した[Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., and Rayment, I. (1995) *Biochemistry* 34, 8960-8972]。ここでは、部位特異的人工変異の手法を使って、X 線構造解析で発見された構造変化が本当に ATP 加水分解過程で起こるかどうかを検討した。上部サブドメインの Arg247 と下部サブドメインの Glu470 間に起こる塩架橋形成が隙間の閉じた構造を安定化するので、この塩架橋の形成を阻害すれば、加水分解反応も起こらなくなるに違いないと考えたので、Glu470 を Arg に、或いは Arg247 を Glu に置き換えた変異平滑筋 HMM (E470R 及び R247E) を作成して、これらの蛋白質は確かに ATP を加水分解出来ないことを明らかにした。ところが、Glu470 と Arg247 をそれぞれ Arg と Glu に置き換えた二重変異 HMM (E470R/R247E) は野生型 HMM と同じように加水分解する性質を保持することを発見した。この結果は明らかに、電荷の方向に関係無く、塩架橋形成が ATP 加水分解に必要であることを示している。さらに、我々は二重変異 HMM の ATPase 活性のアクチンによる活性化は野生型 HMM に比べて非常に小さいことを発見した。この結果は、二重変異 HMM はアクチンとの相互作用においてどこかに欠陥があることを示している。ところが、最近 Manstein らは Dictyostelium 二重変異 (E459R/R238E) ミオシンがアクチンとの相互作用も含めて完全な機能を保持していると報告した。そこで、アクチン存在下の二重変異平滑筋 HMM の ATPase 活性を繰り返し、野生型 HMM の 100 分の 1 以下の活性しか示さないことを確認した。多分、平滑筋と Dictyostelium で観察されるこの違いは二つのミオシンの塩架橋の周りの構造の違いに由来するのであろう。

H. Onishi, S. Kojima, K. Katoh, K. Fujiwara, H. M. Martinez, and M. F. Morales: A salt-bridge critical for the structural changes in the hydrolytic transitions of myosin.