1H1030

最小筋収縮系に見られる単一アクチンフィラメントのステップ状の動きと力発生

○鈴木 団¹、藤田 英明²、石渡 信一¹ (¹ 早大・理工・物理、² アイオワ大・医)

横紋筋筋原線維中において主にミオシンフィラメントの束からなるA帯と、一本のアクチンフィラメント間で発生する張力を計測するような新しい実験系の開発を試みている。この系の特徴と利点は、A帯がグリセリン処理されたウサギ腸腰筋筋原線維から調製されるために、ミオシンフィラメントが本来の周期構造、立体構造を保っていること、そして力計測が生体内に準ずるイオン強度でも行える点にある。このことは、生理的イオン強度ではミオシンヘッドがアクチンフィラメントから容易に解離してしまうために低イオン強度下での実験に制限されている *in vitro* 滑り運動系と対照的である。ローダミンファロイジンで蛍光染色したアクチンフィラメントの全長とA帯に入り込んだ部分の長さは、フィラメントの蛍光像とA帯の位相差像とから見積もった。力計測は、ゲルゾリンを介してアクチンフィラメントのB端(後端)に結合した直径1 μ mのポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉し、力発生に伴うビーズの変位を位相差像の解析から10-200 nm (光ピンセットのパネ定数が0.1pN/nmなので1-20pN)の範囲で求めることにより行った。

以上の方法により、収縮条件(100mM KCl, 2mM free Mg^{2+} , 2mM $MgATP$, 25mM Imidazole-HCl(pH7.4), 1mM EGTA, 0.5mg/ml BSA, 10mM DTT, ATP再生系、酸素除去酵素系)におけるクロスブリッジ一個あたりの出す平均力を約0.4pNと見積もった。また、10(あるいは5) nmのステップ状の変位が、力発生時の定常状態、そしてさらに顕著には、ステップ状に負荷を加え、フィラメントがA帯から引っぱり出されるときに観察された。このようなステップは、硬直条件下では見られないことから、力発生に共役したクロスブリッジの動き、あるいはA帯中のクロスブリッジの配列や、アクチンフィラメントの構造の周期性を反映している可能性がある。

M.Suzuki, H.Fujita and S.Ishiwata : Stepwise movement and force generation observed in an A-band motility assay system

1H1100

ATP アナログ存在下でのアクト ミオシン滑り運動

○羽鳥 晋由¹、本多 元¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ (¹ 長岡技科大・生物、² 名市大・芸工)

ATPとATPアナログの混合溶液中において、ミオシンヘッド上でのアクチン繊維の滑り運動を観察した。ADP存在下ではATP濃度の広い範囲にわたってアクチン繊維の滑り速度が著しく減少した。それに対してAMP-PNP存在下でのアクチン繊維の滑り速度は、ATPだけのときと比べてわずかに低下するにとどまった。ATPアナログによってヌクレオチドなしのミオシンヘッドを減少させても、滑り速度の増加はみられず、ライゴール結合の負荷が速度を直接遅くしているとはいえない。さらにまた、ATP濃度が低いときには、ATPの消費によってアクチン繊維の運動は短時間に急速に減少するが、AMP-PNP存在下では、比較的長時間にわたり運動を持続した。AMP-PNPにより生じる弱い結合は滑り速度を増大させるより、ATP分解のエネルギーを効率よく滑り運動に変換することに寄与する。

図1 AMP-PNP存在下でのATP濃度に対するアクチン繊維の滑り速度 (黒丸は2mM AMP-PNPを含むとき、白丸はATPのみのとき)

K. Hatori, H. Honda, K. Shimada, K. Matsuno : Sliding movement of actin filament on myosin heads in the presence of ATP analogue.

1H1045

SH1とSH2を化学架橋した骨格筋ミオシンの急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法による直接観察と蛍光プローブを用いた解析

○丸田 晋策¹、相原 朋樹¹、片山 栄作² (¹ 創価大・工・生物学、² 東大・医科研・微細形態)

骨格筋ミオシンには、非常に反応性の高い二つのシステイン残基SH1(707)とSH2(697)が存在しており、長さの異なる幾つかの二価性試薬(3-14 Å)で化学架橋されることから、これらの領域は極めてflexibleであることが示唆されている。またnucleotideの結合により大きく構造変化を起こすことが示されており、エネルギー変換に重要な役割をしていると考えられている。我々は以前、ミオシンATPaseサイクルにおいてM**・ADP・Pi stateを模倣するミオシン-ADP・フッ化金属複合体が大きく折れ曲がるような構造をしていることを、急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法で直接観察している。この全体的な折れ曲がりには、SH1-SH2での局所的な構造変化が直接関与して生じている可能性が考えられる。そこでSH1とSH2を長さの異なる3つの架橋試薬DTNB(2 Å)、F2DNB(5 Å)、pPDM(12-13 Å)で架橋した骨格筋ヘビメロミオシン(HMM)を調製して急速凍結ディープエッチレプリカ電子顕微鏡法で観察した。架橋反応は Ca^{2+} -ATPase活性の阻害でモニターを行い、いずれの試薬においてもHMMのSH1-SH2が90%以上架橋されていることが確認された。DTNBで架橋されたHMMでは、架橋されていないHMMと比較して大半が大きく折れ曲がった像として観察された。pPDMとF2DNBで架橋されたHMMにおいても一部折れ曲がったものが、観察されたがDTNBほど顕著ではなかった。またDTNBで架橋されたHMMに結合した蛍光プローブprodanのスペクトルはM**・ADP・Pi stateと同様に445 nmへ蛍光極大がblue shiftした蛍光スペクトルを示した。

S. Maruta, T. Aihara & E. Katayama : Direct observation of skeletal muscle myosin chemically crosslinked at SH1 and SH2 and their analysis using fluorescent probe

1H1115

蛍光標識ATPアナログNBD-ATPと骨格筋ミオシンとの相互作用およびミオシン・NBD-ADP・フッ化金属の形成

○水倉 良明、石井 亜紗美、梅木 伸久、丸田 晋策(創価大・工・生物学)

ミオシンATPaseサイクルにおいて、異なるステップを示すと考えられる幾つかのミオシン-ADP-フッ化金属複合体の形成のモニターとこれらの複合体の構造の違いを調べるために、蛍光標識ATPアナログ2'(3')-[6-(N-(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexanoic-ATP(NBD-ATP)を合成した。骨格筋ミオシンS1に対してNBD-ATPはregular ATPと同程度の Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、EDTA(K^{+})-ATPase加水分解速度を示した。またIn vitro motility assayによりregular ATPよりわずかに速い速度で、アクチンを滑走させることが観測された。NBD-ATPがミオシンに結合すると、その蛍光強度は約40%減少し、加水分解後、蛍光強度は回復した。この状態でリン酸アナログであるフッ化金属 AlF_4^{-} とBeFnを加えると、再び蛍光強度が見られた。この時の蛍光減少速度は報告されているS1-ADP- AlF_4^{-} とS1-ADP-BeFn複合体の形成速度とよく一致しており、複合体の形成をNBD-ADPの蛍光強度の変化でモニターできることが示唆された。また活性システインSH2(697)を蛍光試薬acrylodan(AD)で標識したAD-S1にNBD-ATPが結合するとNBD基とAD基の間で蛍光エネルギー移動が起こることが観察された。現在、構造の違いを明らかにするために各複合体の蛍光エネルギー移動の測定を試みている。

Y. Mizukura, A. Ishii, N. Umeki & S. Maruta : Interaction of fluorescent ATP analogue NBD-ATP with skeletal muscle myosin and formation of myosin-(NBD-ADP)-fluorometal complexes