2I1415

ダイニンの複数の P-loop による活性制御

○城口 克之、豊島 陽子（東大院・総合文化・生命）

ダイニンは、微小管と相互作用するモータータンパク質である。巨大なモータードメイン中には P-loop (ATP 結合部位) が複数 (4~6) 存在し、少なくとも一つの P-loop (P1) は ATP 加水分解を行っている。また、これらの P-loop に複数の ATP、ADP が結合するという報告はある。P1 以外の P-loop も、ダイニンの生体内での役割に重要な意味をもつと想像されるが、その機能的役割については明らかにされていない。そこで我々は、複数の P-loop の存在に注目してダイニンの ATPase 活性や運動性を調べ、その機能を明らかにしようと考えた。

複数の P-loop の機能を測定結果から単純に解析するにはモノマーのダイニンが必要である。我々は、複数のダイニンを含む *Tetrahymena* の 14S ダイニンから、モノマーのダイニンを単離、精製した。重鎖がモノマーであることは、SDS ゲル電気泳動、沈降分析、電子顕微鏡観察で確認した。

ADP 濃度を制御して ATPase 活性測定、gliding assay を行ったところ、ADP が存在すると ($> 20 \mu\text{M}$) 活性は Michaelis-Menten 型で表されたが、ADP が存在しないと ($< 0.1 \mu\text{M}$) 単純な Michaelis-Menten 型では説明できない結果となった。このときの活性は、1. P1 以外の P-loop に ATP が結合している、していない状態に応じて P1 の活性が変化する、2. P1 以外にもう一つ加水分解活性をもつ P-loop が存在する、という二種類それぞれのモデルで説明することができた。

以上の結果は、ADP に親和性の高い P-loop が存在すること、2ヶ所以上の P-loop に ATP が結合すること、そしてそれらが ATPase 活性や運動速度を調節していることを示唆している。

K.Shiroguchi and Y.Y.Toyoshima : Regulation of dynein activity by multiple P-loops

2I1445

クラミド モナス内腕ダイニン亜種 g による微小管滑り運動

○榊原 斉、小谷 則遠、坂井 由佳子、菊本 真人、大岩 和弘 (通信総研 関西先端研究センター)

クラミドモナス鞭毛軸糸の内腕ダイニンには7つの亜種 (a-g) が存在する。これらは、それぞれがモータ活性を持つ。鞭毛運動発生機構の解明には、それぞれのダイニンの力学特性を詳細に調べる事が重要である。内腕ダイニン亜種のうち亜種 b と亜種 g については、運動性を持つ欠失変異株が単離されており、鞭毛運動に必須である可能性が高い。そこで、亜種 g の運動特性を調べた。ダイニン亜種 g はネガティブ染色電子顕微鏡法により観察したところ、直径 12nm 程度の頭部を1個持ち、その頭部は、他のダイニン同様、中央の空間を数個のサブドメインが取り囲む構造をしていた。亜種 g 単一分子での微小管の滑り運動を確認する為、ガラス表面の亜種 g 分子の密度を下げて in vitro 運動アッセイを行った。ダイニンを吸着したガラス面に結合し滑り運動を示した微小管数は、ダイニン亜種 g 密度に依存しており、これは亜種 g が1分子単位で微小管滑り運動を発生できると仮定したモデルと良く一致した。亜種 g は、低密度でガラス面に吸着させた場合 ($0.1 \text{ 分子}/\mu\text{m}^2$ 以下) でも、微小管滑り運動を生じ、この時運動する微小管はピボットした。各亜種 g 密度における微小管滑りの速さを計測し、duty ratio (モーターサイクル中の微小管との強い結合の時間割合) を求めたところ、約 10% だった。以上の結果は、亜種 g も亜種 c 同様、単頭で duty ratio の低いプロセッシブモーターであることを示す。これまで、内腕ダイニン亜種 c、f、及び g についてアッセイした結果、そのいずれもがプロセッシブモーターであることが判った。内腕ダイニン共通の機能と内腕ダイニンがプロセッシブモーターであることは、屈曲波形成におけるダイニン活性の on/off 機構に関与すると考えている。

H.Sakakibara, N.Kotani, Y.Sakai, M.Kikumoto and K.Oiwa : Translocation of microtubules caused by inner-arm dynein subspecies g of *Chlamydomonas*.

2I1430

蛍光性 ATP アナログによるクラミド モナス鞭毛内腕ダイニン亜種 c の酵素活性計測

○菊本 真人、榊原 斉、坂井 由佳子、中森 鈴奈、大岩 和弘 (通総研・関西・生体物性)

クラミドモナス鞭毛の内腕ダイニン亜種 c (以下ダイニン c) は、1 個の球状の頭部を持つプロセッシブモーターである (Sakakibara et al. Nature (1999), 400:586-590)。その力学的特性に対応する反応速度論的基礎を明らかにするためには、蛍光性 ATP アナログの利用が有効である。我々は ATP の 2' あるいは 3'-水酸基を蛍光団で修飾した ATP アナログを合成してその特性を明らかにしてきた (Oiwa et al. Biophys.J. (2000), 78:3048-3071)。今回、ダイニン c を用いて、蛍光性 ATP アナログ (Cy3-EDA-ATP, BODIPY-FL-ATP, BODIPY558/568-EDA-ATP) の基質特性、加水分解速度、ATP 結合部位への結合量の測定を行った。定常状態におけるダイニン c による蛍光性 ATP アナログの加水分解速度は、ATP の場合 (3.2s^{-1}) の $1/5 \sim 1/300$ であった。蛍光団として BODIPY (Molecular Probes, Inc.) を用いた ATP アナログは、ダイニン c による微小管滑り運動の基質となった。基質濃度 $100 \mu\text{M}$ における微小管滑り速度は ATP で $1.9\text{--}2.0 \mu\text{m/s}$ 、BODIPY-FL-ATP で $0.2\text{--}0.3 \mu\text{m/s}$ であった。また、蛍光性 ATP アナログをバナジン酸と共にダイニン c に加えると、安定なダイニン c-ADP-Vi 複合体を形成した。エバネッセント光による単一分子観察系 (TIRFM) を用いて、この複合体単一分子の蛍光の褪色過程を解析したところ、観察された蛍光スポットは、85-90% が 1 段階、10-15% が 2 段階の量子的褪色を示した。これは解離定数の異なる ATP 結合部位が少なくとも 2 個あることを示している。これまで一次元構造の明らかになっているダイニンのモーター領域には 4 個の P ループが存在するが、この領域の保存性からダイニン c にも複数の P ループが存在すると予想される。我々の実験結果はこれらのうちの 2 個の P ループがスクレオチドを結合する可能性を示している。

Kikumoto, M., Sakakibara, H., Sakai, Y., Nakamori, R., and Oiwa, K. : Ribose-modified fluorescent ATP analogues: Their application to kinetics of the inner-arm dynein subspecies c of *AcAeChlamydomonas* *AcAe*.

2I1515

PLC β 4 遺伝子欠損マウスにおける瞬目反射条件付けおよび小脳第 6 小葉 LTD の障害

○岸尾 正博¹、廣野 守俊²、杉山 崇¹、岸本 泰司³、宮澤 隆仁⁴、川原 茂敬³、桐野 豊³、勝木 元也⁵、吉岡 亨^{1,2} (¹ 早大・人間科学・分子神経生物学、² 早大・理工総研、³ 東大院・薬、⁴ 防医・脳外、⁵ 東大・医科研)

小脳の関わる連合学習として、瞬目反射条件付けが挙げられる。リン脂質加水分解酵素のホスホリパーゼ C β (PLC β) は、小脳長期抑圧現象 (LTD) 形成に必須と考えられている代謝調節型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) の情報伝達の下流に位置している。この酵素には PLC β 1-4 のアイソザイムが存在することが知られているが、このうちどれが瞬目反射条件付けに重要な役割を担っているのかは明らかでない。そこで本研究では、小脳に様に強く発現する PLC β 4 の遺伝子欠損マウスを用い、瞬目反射条件付けと LTD の形成を調べた。瞬目反射条件付けは条件刺激 (CS) を音、無条件刺激 (US) をまぶたへの電気刺激とし 1 日 100 回の CS-US 組み合わせ提示からなる 8 日間の学習試行を行った。LTD 実験では小脳切片中のブルキン細胞にパッチクランプ法を適用し、平行線維への刺激とブルキン細胞への脱分極刺激を 1 Hz、300 回同時に与え、その前後での興奮性シナプス後電流を比較した。その結果、PLC β 4 遺伝子欠損マウスでは瞬目反射条件付け学習が障害を受けることが分かった。さらに、このマウスの吻側 (lobe1-6) では、LTD がほとんど形成されなかったのに対し、尾側 (lobe7-10) では正常に形成されることが明らかになった。以上の結果は、瞬目反射条件付けに小脳第 6 小葉が必要であるというウサギの脳組織破壊実験の報告を支持するものであり、さらに、瞬目反射条件付けには小脳吻側の PLC β 4 を介した LTD 形成が必須であることを示唆した。

M.Kishio, M.Hirono, T.Sugiyama, Y.Kishimoto, T.Miyazawa, S.Kawahara, Y.Kirino, M.Katsuki, and T.Yoshioka : Impairment of Eyeblick Conditioning and Lack of Long Term Depression in Rostral Cerebellum in Phospholipase C beta4 Deficient Mice