3I1445

ミオシンと相互作用中のアクチンフィラメントの有効温度の直接測定

○西川 宗¹、喜多村 和郎²、田中 裕人²、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 阪大・基礎工、² 科技振・1分子過程プロジェクト、³ 阪大・医)

近年の1分子計測技術の進歩により、ミオシンの力発生とATP加水分解反応が、回数の面からも、タイミングの面からも1対1に対応していないことが明らかになってきた。これらの結果を説明する運動モデルの1つである「サーマルラチェット説」は、ATPの化学エネルギーによって、アクチン-ミオシン間に温度差(有効温度)を作り、ブラウン運動から1方向性の運動を取り出すというものである。我々は、これを実験的に証明することを目的として、ミオシンと相互作用中のアクチンフィラメントの有効温度を直接測定する系を構築した。直径0.2μmの蛍光ビーズを結合させた直径2μmのラテックスビーズ2つを、光ピンセット法により溶液中で捕捉し、この間に蛍光標識された1本のアクチンフィラメントを張る。ビデオレイトで測定した蛍光ビーズの位置変化からビーズの回転角度を求める。アクチン両端の2つのビーズの回転角の差から回転ブラウン運動を測定し、角度変化の2乗平均とブラウン運動の緩和時間から有効温度を定量する。ミオシン非存在下で得られた値は過去の報告とはほぼ一致しており、新しい測定系でもアクチンフィラメントの回転運動を正しく評価できることを確認した。現在、ミオシン存在下での測定を行っている。

S.Nishikawa, K.Kitamura, H.Tanaka, T.Yanagida : Effective temperature of an actin filament interacting with myosin

3I1500

滑り運動中のミオシンコートビーズの動き

○若山 純一、庄原 誠、八木 千春、小野 華子、国岡 由紀、山田 武範 (東京理科大学・理・物理)

アクチンフィラメントは、ガラス面上に固定したミオシンの上を並進方向に滑るが、その時、同時にその軸まわりに回転していることが知られている (Nishizaka et al., 1993; Sase et al., 1997)。昨年の年会で発表したように、我々は、これとは逆にアクチンフィラメントの上をミオシンフィラメントを滑らせて、その時ミオシンフィラメントが回転しているかどうかを検討するための実験系を開発した。

方法は、まず、NEM ミオシンを吸着させた二個の直径約3 μmのビーズにアクチンフィラメントの両端を結合させ、各々のビーズをガラス基板上に吸着させることにより、アクチンフィラメントを固定した。ついで、ミオシンフィラメントをビーズに吸着させたミオシンビーズを導入し、このミオシンビーズを光ピンセットを操作して固定したアクチンフィラメントに接触させた。こうしてミオシンビーズをアクチンフィラメントに沿って滑らせ、その過程をビデオ撮影し、ミオシンビーズの運動を詳しく解析した。昨年は、ミオシンビーズがアクチンフィラメント上を回転しないで滑る例を報告したが、今回ミオシンビーズがアクチンフィラメントの回りを回転しながら滑る例が見られた。これらの結果のちがいについて検討する。

J. Wakayama, M. Shohara, C. Yagi, H. Ono, Y. Kunioka and T. Yamada : Movements of myosin-coated beads sliding along actin filaments.

3I1515

DIG-DNAを用いた新しいレーザートラップナノメトリーの構築

○木村 祐史^{1,4}、岩根 敦子²、田中 裕人³、岡本 圭一郎⁴、石島 秋彦⁴ (¹ 阪大・基礎工、² 阪大・医、³ 科技振・1分子過程プロジェクト、⁴ 名大・工)

アクトミオシンのレーザートラップ法を用いた1分子力学測定では、ミオシンによって生じた変位の計測は、アクチンフィラメント(以降FA)を介してビーズの変位を計測することで実現する。そのため、正確な計測のためにはレーザートラップで捕まえたビーズにFAを強く結合させる必要がある。これまで、ビーズとFAの結合に用いられてきたNEM-ミオシンやアビジン-ビオチン系では、FAの側面にビーズが結合することによって、FAとビーズ間に非線形のバネ成分が生じ、正確な計測が困難となる(図1)。そこで、我々はDIGというDNAプローブを用い、FA-ビーズ間の非線形バネを解消することを試みた。図2のように、ビーズに抗DIG抗体-DIGオリゴDNA-ビオチン化DNA-ストレプトアビジンを順に結合させたものを作り、ビオチン標識したFAを捕まえることに成功した。さらに、1分子力学測定に

用いるビーズ-FA-ビーズというダンベル様の構造を作ると、この構造全体のバネ定数は理論通り2倍となった。この結果は、ビーズとFAが強く結合していることを示唆している。本年会では、さらに、1分子力学測定への応用について報告し、本測定系の有効性について議論する予定である。

Y.Kimura, A.H.Iwane, H.Tanaka, K.Okamoto and A.Ishijima : Laser trapping nanometry with DIG DNA probe.

3I1530

キネシン分子モーターの2足歩行モデル

○金田 亮、佐々木 一夫 (東北大・院工・応用物理)

キネシン分子モーターの動作様式について、「キネシンは丁度、人間が歩く様にして微小管の上を一方に進む」と言う説が有力である。その事を反映して、キネシンの「2足歩行モデル」がPeskin等[Biophys. J. **68** (1995) 202s]によって考案され、理論的に解析された。しかし、この理論モデルでは、キネシンの後ろ足がどのような機構で前に来るのかと言う点に関して、不自然な仮定が導入されている。そこで我々は、最近のRice等[Nature **402** (1999) 778]の実験により得られた知見を基に、Peskin等の理論モデルに以下の修正を加えた。

1. キネシンのhingeの位置は、その動作の最中に必ずしも二つの足の真中にある必要はない。(Peskinのモデルでは、hingeの位置を必ずキネシンの二つ足の真中にあるとしていた。)
2. 微小管から外れた後ろ足は、次に微小管のβチューブリンに束縛されるまでの間、キネシンネックの長さの範囲内で、自由な熱的拡散運動をする。

主に上記二つの修正を加えた上で、このモデルの解析を数値的に行った。その結果、Peskin等により得られたキネシンの運動特性と定性的に変わらない結果が得られた。(ここでいう運動特性とは、キネシンの平均移動速度の外力依存性である。)

この結果は、最近のより精度の高い実験[Visscher et al., Nature **400** (1999) 184]で得られたデータと次の点で定性的に一致しない。すなわち、実験では、キネシンのstall forceは、ATP濃度の減少に伴って小さくなる傾向があるが、Peskin等および我々のモデルでは、stall forceがATP濃度に依らず一定である。この問題を解消するために、理論モデルをどう改良すべきかについて、現在検討中である。

R. Kanada, K. Sasaki : Theory on the walking of a two-headed kinesin