3P113

ミオシン分子によるアクチンフィラメントの切断

○芹沢 加洋子¹、樋口 秀男^{1,2} (¹ 東北大・院工・金属工学、² 東北大・学際)

〔目的〕in vitro で滑り運動中にアクチンフィラメントが切断され、非常に短くなることを観察した。この切断がミオシン分子の単純な引っ張り原因するならば、一本のアクチンフィラメントに最低でもミオシンが100分子/ μ m なければならないと見積もられる(切断力=400pN, ミオシン1分子の力=4pN)。しかしながら、明らかにミオシンが100分子に満たない場合にもアクチンフィラメントの切断が観察された。そこで我々は、アクチンフィラメントが切断されるメカニズムを解明するために、フィラメント長とミオシンやATP濃度の関係を調べた。

〔方法〕ニトリ胸筋からミオシンとアクチンおよびミオシン頭部S1を精製した。カバーガラスにミオシンまたはS1を結合させ、その上にファロイジンローダミンでラベルしたアクチンフィラメントを相互作用させ、滑り運動や長さを観察した。

〔結果〕ATPの濃度を1~1000 μ M、ミオシン濃度を0.13~1.3mg/mlまで変えてアクチンフィラメントを作用させた。ATP濃度が低い程、ミオシン濃度が高い程アクチンフィラメントは切断された。蛍光強度から長さを見積もったところ1 μ Mの時にはフィラメント長は0.1 μ m程度であった。また、caged-ATPを光分解して、ATPを放出した瞬間にフィラメントの切断が観察された。これにより、切断は長い反応時間を必要とせず、またガラス面上のミオシン濃度の不均一性によるものではないと考えられる。S1についてもミオシンと同じ傾向がみられた。

K.Serizawa and H.Higuchi : Fragmentation of actin filaments interacted with myosin molecules

3P115

ミオシンフィラメントをコートしたビーズのアクチンフィラメントに沿った非線形運動

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

Acto-myosin motorの滑り運動の研究のため、我々は単一アクチンフィラメントに沿ったミオシンコートビーズの動きについて調べた。光ピンセットを用い、フローセル中(22-25℃)で単一の蛍光アクチンフィラメントを2個のビーズの間に張った後、ビーズをカバーガラスに押し付け、固定した。そこにミオシンフィラメントをコートした直径1 μ mのビーズを光ピンセットで捕捉し、蛍光アクチンフィラメントに近づけると、アクチンフィラメントに沿って約1-3 μ mの距離を滑った。昨年の年会では、ミオシンフィラメントをぎっしりとつけたビーズは、少々ジグザグになりながらもほぼ直線的に滑り、一方ミオシンフィラメントをまばらにつけたビーズは複雑な回転運動を伴って滑ること、また、このようなパターンの違いによらず、全てのビーズは3-6 μ m/sの速度で滑ることについて発表した。今回、この結果をさらに詳しく解析した。ミオシンフィラメントをコートしたビーズの変位を3次的に解析し、ミオシンフィラメントがアクチンフィラメントに沿ってどのように動いたかを調べた。その結果、ミオシンフィラメントがランダムな熱揺らぎの影響のもとでアクチンフィラメントに沿ってアクティブに滑り運動をすること、ミオシンフィラメントがアクチンフィラメントと相互作用すると、熱揺らぎの影響はすぐに抑えられること等が示された。

H.Ono, J.Wakayama, M.Shohara, C.Yagi, Y.Kunioka and T.Yamada : Non-Linear Motions of Beads Coated with Myosin Filaments Sliding Along Immobilized Single Actin Filaments

3P114

重水中のアクチンミオシン滑り運動

○茶園 茂^{1,2}、山本 直人¹、白川 伊吹¹、杉 晴夫¹ (¹ 帝京大学・医・生理、² 現在、東京都臨床医学総合研究所)

重水の粘性、融点、熱容量などは水に比べて高いことから、重水どうしの水素結合は水の場合と比較して強いことが示唆されている。ミオシンの中のヌクレオチドはその結合部位で主に水素結合によって捕捉されていることがX線結晶解析で明らかになっている。したがって、もし溶液を水から重水に置換した場合、その結合部位からのADP遊離は遅くなり、そのADP遊離速度が律速していると言われていたアクチンミオシン滑り運動は遅くなることが予想される。このことをmotility assayで調べたところ、重水中でのアクチンフィラメントの滑り速度は水中の約60%に減少した。またアクトミオシンからのADP遊離速度をストップフローで調べたところ、6℃において、水中で512 $\pm$ 39 sec-1 (n=27)、重水中で361 $\pm$ 26 sec-1 (n=27)という結果が得られた。(Motility assayは25℃で、ストップフロー実験を6℃で行った理由は、25℃での遊離速度がストップフロー解析の限界値に近くなるため有意な差を検出できなくなるためと、5℃付近で重水溶液が氷るためである。)これらの結果はアクチンミオシン滑り運動がADP遊離によって律速されているという説を支持している。一方、actin-activated MgATP分解活性(25℃)のVmaxは重水中で9.4 s-1、水中で9.3 s-1と変わらなかったが、Kmは重水中で33 μ M、水中で50 μ Mであった。Amitaniらは滑り速度が弱い結合のクロスブリッジからの抵抗力とアクティブなクロスブリッジからの力のバランスから決まり、その速度をVmaxとKmで表す式を出しているが、我々のVmax, Km値を彼らの式にいれても矛盾しない。学会ではこのアクチンミオシン滑り運動速度を決めている因子について議論する。

S. Chaen, N. Yamamoto, I. Shirakawa and H. Sugi : Effect of deuterium oxide on actomyosin motility in vitro.

3P116

アクチン-ミオシン結合における協同性に方向性はあるか？

○友行 眞美子¹、上田 太郎²、徳樂 清孝^{1,2} (¹ 都城高専・物質工学、² 産総研・ジーンディスカバリー)

昨年の本会において、我々はミオシンのアクチンへの結合に協同性があることを報告した。我々はこの協同性に方向性があるのか、すなわちアクチンフィラメントに結合したミオシンのプラス側、マイナス側のどちら側に次のミオシンが結合しやすいのかに興味を持っている。今回、蛍光ラベルした細胞性粘菌HMMを用いて、ミオシンとアクチンの結合における協同性の方向性についてについて解析を試みた。まず、in vitro motility assayの要領でHMMにBFPを融合させたHMM-BFPをニトロセルロース膜上に低密度になるように固定した。これにローダミンファロイジンでラベルしたCa²⁺ - またはMg²⁺ - アクチンを加え、一本のアクチンフィラメントあたり数個のHMM-BFPと結合させた。ブラウン運動を抑制するために溶液中には0.5%メチルセルロースを加えた。これに粘菌HMMとGFPを融合させたHMM-GFPを加え、アクチンフィラメントに結合している様子を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。今回の実験結果では、アクチンフィラメント全体に次第に結合していくHMM-GFPしか観察されず、方向性の観察はできなかった。アクチンと数カ所で結合しているHMM-BFPがアクチンとの結合部位付近だけでなく全体に構造変化を与え、アクチンフィラメント全体にミオシン頭部が結合しやすくなったのかもしれない。このことも含め、現在どうやったら協同性の方向性が観察出来るのか?、またそもそも協同性に方向性は無いのか?ということについて、さらなる検討を行っている。

M. Tomoyuki, T.Q.P. Uyeda, K. Tokuraku : Polarity of cooperative binding between actin and myosin