3P117

ミオシン頭部50Kクレフトへの蛍光プローブの導入

○平塚 寿章 (旭川医大 化学)

ミオシン頭部50Kクレフトへの蛍光プローブの導入
○平塚寿章 (旭川医大 化学)

ミオシン頭部(S-1)50Kクレフトの開
口部付近にはアクチンが結合し、底部にはヌクレオチド結合部位(N
部位)の裏口が位置している。N部位のS181付近の一次構造がG
XSXAである点およびS181-R245とR245-E271の
二つの水素結合が形成される点に着目し、S-1の立体構造をセリン
系酵素と比較した。その結果R245をHis残基に置き換えるとS
181付近の構造はセリン系プロテアーゼとよく似ていて、これらの
酵素の阻害剤がS-1のS181にも結合する可能性が示唆された。
そこでさまざまな阻害剤について調べた結果、フェニルホウ酸にフェ
ニルピラゾリンベンゼンスルホン酸を蛍光団としてもつPPBAが
S-1に強く結合し、これが50Kクレフト内で起きる構造変化を検
出する蛍光プローブとなることがわかったので報告したい。結果と
結論;(1)PPBAはS-1に1:1で結合し、酵素-基質中間体
に類似した安定な複合体を形成した。(2)この複合体にヌクレオチ
ドが結合するとPPBAの結合は強められ、これに伴いATPase
活性が阻害された。(3)PPBAが結合するとヌクレオチドによる
W510の蛍光増大が起きなくなるが、これは蛍光エネルギー移動に
よる消光ではなく、スイッチ2ヘリックスの動きが妨げられたためと
思われた。T.Hiratsuka:The introduction of a fluorescent probe to the
50 K cleft of myosin head

T.Hiratsuka : The introduction of a fluorescent probe to the 50 K
cleft of myosin head

3P119

ミオシンのSH2システインの変異によりATP依存 的なアクチンからの解離速度が遅くなる

○鈴木 良和、須藤 和夫 (東大院総合文化)

ミオシンのSH2システインはSH1システインと並んで反応性の高い
システインとしてよく知られている。これら2つのシステインは1次
配列上10アミノ酸ほど離れているが、ミオシンのATP加水分解反応
中にその距離が大きく変化するということが架橋実験などの生化学的
な実験から古くから示唆されてきた。また近年ではミオシンの立体構
造も幾つか解明されてきたが、このことを裏付ける様に、あるヌクレ
オチド状態の時には実際にSH1とSH2の間のアルファヘリックスが
はどけている様子が観測されている。このようにSH1-SH2システイ
ンの近傍ではATP加水分解中にかなり大きな構造変化が起きると考
えられ、このことがミオシンの力発生に何らかの役割を果たしている
可能性がある。我々は以前、SH2システインをグリシン、アラニン、
セリン、スレオニンという4つの異なるアミノ酸に置換して、それ
らの全長ミオシンの活性を測定した。その結果、いずれもATPaseの
Vmaxはそれほど差はないが、アクチン滑り速度に大きな差が出るこ
とを発見した。今回は、それぞれの変異ミオシンのS1を用いてその
キネティックスを詳細に調べたのでその結果を報告する予定である。

Y.Suzuki and K.Sutoh : Kinetic analysis of SH2 mutants of myosin
S1

3P118

ミオシン構造変化におけるスイッチIIからコンバー ターへの情報伝達経路

○伊藤 光二¹、上田 太郎²、鈴木 良和³、佐々木 直哉^{3,4}、須
藤 和夫³、山本 啓一¹ (1千葉大・理・生物、2産総研・ジ
ンディスカバリー、3東大・院総合文化、4東北大・学際)

ミオシンはヌクレオチド依存的に大きな構造変化をおこなうが、これ
はヌクレオチド結合によるスイッチIIの動きがコンバーター部位へ
と伝達されるためと考えられている。種々のヌクレオチドを結合した
ミオシンの結晶構造をもとに考えると、スイッチII領域とコンバー
ターとの間のドメイン間の情報伝達の機構として、スイッチIIヘリッ
クスのF482(粘菌ミオシンIIのアミノ酸番号)がSH1-SH2ヘリッ
クスのG680と直接相互作用することによる機械的情報伝達が考えら
れる。この仮説を検討するためにF482を側鎖の小さなAに置換した変
異を作成した(F482A)。F482Aミオシン遺伝子をミオシン欠失細胞
株に導入したところ、ミオシンは発現しているのに機能回復はみら
れなかった。また精製したF482Aミオシンはin vitroでアクチン繊
維を動かすことができず、アクチン依存性ATP分解活性はほとんど
なかった。一方、分光学的、速度論的解析により、F482Aミオシンは
ATP結合にともなう異性化がおきていないことがわかった。ATP結
合にともなう異性化は、ネック領域の戻しスウィングを反映している
と考えられているので、側鎖を小さくしたことによりG680と相互作
用できなくなり、異性化(戻しスウィング)が起きなかったと予想さ
れる。もしそうだとしたらF482と相互作用するG680の側鎖を大き
くしたら機能が戻るはずである。そこでF482A/G680Fの二重変異ミ
オシンを作成したところ、このミオシンはミオシン欠失細胞の機能回
復能力、アクチン依存性ATP分解活性とも野生型ミオシンと近い性
質を示した。これらのことから、F482とG680の立体的相互作用が、
スイッチIIの構造変化をネック領域に伝達するうえで重要な役割を
果たしていると考えられる。F482Aにおいて実際に戻しスウィング
が起きていないことを検定するためにFRETによる測定を行う予定
である。

K.Ito, T.Q.P.Uyeda, Y.Suzuki, N.Sasaki, K.Sutoh and K.Yamamoto
: Intramolecular pathway of signal between switch II and converter
in myosin conformational change

3P120

ミオシンVのコンフォメーション変化の1分子観察

○和沢 鉄一¹、石井 由晴¹、杉原 弘一²、岩根 敦子²、本間
和明³、池辺 光男³、柳田 敏雄^{1,2} (1科技振・1分子過程プロ
ジェクト、2阪大院・医・情報生理、3マサチューセッツ大・医)

ミオシンなどの分子モーターはATP加水分解によって得られる自
由エネルギーを使って力学運動を行っている。ミオシンのATPase反
応サイクル中におこるミオシン分子内の状態変化を知ることはその化
学・力学エネルギー変換機構を解明する上で重要である。1分子計測
では個々の分子の経時変化について情報を得られるので、機能してい
るミオシンの状態変化を感度よく検出できる可能性がある。本研究で
は、1分子計測のための蛋白質工学的改変を行ったミオシンVを使っ
てミオシンの状態変化の1分子測定を行った。

ミオシンの状態の検出には蛍光エネルギー移動を用いた。N末端に
緑色蛍光蛋白質(GFP)が融合し、カルモジュリン(CaM)結合部位が
2個の単頭ミオシンV変異体を構築、調製した(GFP-M5IQ2)。また、
CaM変異体(N53C)のCys残基をCy3で蛍光修飾した(Cy3-CaM)。
GFP-M5IQ2に結合する2個のCaMのうち、1個をCy3-CaMに置換
したGFP-M5IQ2(GFP-M5IQ2-Cy3-CaM)を調製し、GFPとCy3の
間で起こる蛍光エネルギー移動の測定によりミオシンの状態変化を検
出することを試みた。

GFP-M5IQ2-Cy3-CaMにおいて、ドナーをGFP、アクセプターを
Cy3とする蛍光エネルギー移動が起こることが多分子系蛍光分光測定
で確認された。GFP-M5IQ2-Cy3-CaMのエネルギー移動効率、ヌ
クレオチド非結合状態からATP結合状態になると減少した。また、全
反射蛍光顕微鏡を使った1分子蛍光測定により、個々のGFP-M5IQ2-
Cy3-CaM分子内で起こる蛍光エネルギー移動の検出に成功した。ATP
アナログ結合GFP-M5IQ2-Cy3-CaMの状態や、そのATPase反応サ
イクル中の状態変化を1分子レベルで検討していく予定である。

T.Wazawa, Y.Ishii, K.Sugihara, A.Iwane, K.Homma, M.Ikebe,
T.Yanagida : Conformational changes of myosin V observed by single-
molecule fluorometry