3P137

車軸藻ミオシンの力-速度関係

○平川 昇¹、岡本 圭一郎²、石島 秋彦²、藤目 杉江¹ (¹ 名大院・理、² 名大院・工)

車軸藻は淡水植物である。この車軸藻の節間細胞における原形質流動は、60 μ m/s と非常に速いことで知られている。この速い原形質流動はアクチン-ミオシンの相互作用による滑り運動に基づいている。車軸藻ミオシンは *in vitro* 運動アッセイ法においても、アクチン繊維を数十 μ m/s と非常に速い速度で滑り運動させる。この速度は現在知られているミオシンの中では最も速く、車軸藻ミオシンを特徴づけている性質である。高速で運動する車軸藻ミオシンは骨格筋ミオシンと比べ、力ほどの程度であろうか？そこで我々は車軸藻ミオシンの力-速度関係を測定することを目的とした。

まず2本のレーザー光により2個のビーズを捕まえ、両者の間にアクチン繊維を張り、ガラス表面上のミオシンのと相互作用させる実験を行った。しかし、このときの滑り速度は1~2 μ m/s と低い値であった。そこで我々は超音波により断片化したアクチン繊維をアビジニ-ビオチン結合により直径1 μ m のポリスチレンビーズに吸着させた。そして、このアクチンコート-ポリスチレンビーズは、ガラス上に吸着させた車軸藻ミオシンの上を *in vitro* 運動アッセイ法におけるアクチン繊維と同程度の速度で滑走することを見出した。

我々はこの系を用いて、アクチンコート-ポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉し、ガラス上の車軸藻ミオシンと相互作用させ、引き起こされたビーズの変位から速度を求め、滑り運動速度の負荷依存性を調べることを試みた。これまでの実験から0.01 pN/nm 程度の捕捉力のときでは、速度のばらつきはあるものの、負荷がないときと同程度の速度で滑走することが可能であることを確認した。今後捕捉力を変化させ、力-速度の関係を求めると共に、種々条件下での力-速度関係の変化から車軸藻ミオシンの力学的特性を検討し、報告したい。

N.Hirakawa, K.Okamoto, A.Ishijima and S.Higashi-Fujime : Force-velocity relationship of Chara myosin

3P139

キネシンのテールドメインによる運動制御過程の1分子観察

○渡邊 朋信¹、岩根 敦子²、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 阪大院・基礎工・生物工、² 阪大院・医学系・情報生理、³ 科技新・1分子過程プロジェクト)

キネシンのテールドメインは、小胞体や細胞内小器官などの輸送対象の識別、結合の他に、モータードメインの運動を制御していることが多分子系の実験から報告されている。しかし、その制御様式の詳細は不明のままである。本研究では、遺伝子工学的手法、1分子イメージング法を用いて、テールドメインによる運動制御過程を1分子レベルで可視化し、テールドメインによるモータードメインの運動への影響を定量化した。

ショウジョウバエのキネシンのテールドメイン (N末端から893~975 a.a.) とモータードメイン (N末端から3~411 a.a.) をそれぞれ、別々に大腸菌で発現、精製し、モータードメインの運動能へのテールドメインの影響を調べた。モータードメインの微小管に結合する頻度は、加えたテールドメインの濃度に依存して減少した。しかも、この結合頻度の減少の割合は、ATPase 活性の低下の割合とはほぼ一致していた。テールドメインが結合していないモータードメインのみが微小管に結合して、ATP加水分解や運動に貢献していると考えられる。この結果は、テールドメインがモータードメインと微小管の結合を阻害することで、モータードメインの運動を制御していることを示唆している。

Tomonobu WATANABE, Atsuko H. IWANE, Toshio YANAGIDA : The regulation of the Kinesin's tail domain by single molecule imaging

3P138

高速ビデオカメラを用いた車軸藻細胞内微小顆粒の画像解析

○大野 英司、毛利 知里、西尾 泉 (青学大・理工・物理)

車軸藻の葉緑体の内表面にはアクチン束が長軸方向に並んでおり、直径1 μ m 程度の細胞内微小顆粒に十数個ほど結合したミオシンがアクチンと相互作用することで原形質流動が生じている。我々は種々の条件のもと、細胞内微小顆粒の動きを高時間分解能 (2ms) で測定することでミオシンとアクチンの動的特性をを求めることを試みた。[実験方法]Chara australis を試料に用いた。試料の前処理としてUV光を試料に照射して観測域の葉緑体を除去し以下の3つの条件で正立顕微鏡 (OLYMPUS BX40) とハイスピードカメラ (500fps) を用いて画像解析を行った。1.電気刺激法により細胞内微小顆粒の流動を強制的に停止させた後の細胞内微小顆粒の流動回復過程の運動2.灌流法により原形質内質を除去した時の細胞内微小顆粒の運動3.灌流法により原形質内質を除去し、車軸藻ミオシンコート磁気ビーズを導入した時の磁気ビーズの運動

E.Ohno, T.Mouri and I.Nishio : Image analysis of Chara myosin by high speed video microscope

3P140

細胞性粘菌のキネシン様タンパク質のクローニング及び解析

○岩井 卓介、石地 睦、須藤 和夫 (東大院・総合文化・生命環境)

キネシンスーパーファミリー蛋白質による細胞内輸送の分子機構を包括的に解明するために、我々はモデル単細胞真核生物である細胞性粘菌のキネシンスーパーファミリー蛋白質の同定、解析を進めている。ゲノムプロジェクトより細胞性粘菌にキネシン様遺伝子は12種存在することが判明しているが、今回はその中の1種DdKin5について解析を行ったので報告する。DdKin5は予想分子量約110kDであり、conventionalキネシン重鎖と最も高い相同性を示す。N末端から順に、モータードメイン、coiled-coilを形成することが予想される柄部、そして尾部から構成されている。モータードメインは他のキネシン重鎖と相同性を示したが、モータードメイン以外の領域は他のキネシンと特に相同性を示さなかったことから、DdKin5は他のキネシン重鎖から離れた系統関係にあると考えられる。抗DdKin5抗体を作製し、細胞を0.5% TritonX-100で溶菌して細胞分画によって細胞内局在を調べたところ、約半分がTriton不溶性表層アクチン細胞骨格画分に局在した。また間接蛍光抗体法によって細胞内局在を調べたところ、運動中の細胞において表層アクチン繊維と共局在した。細胞内での機能を調べるために、DdKin5遺伝子破壊株とFLAG-DdKin5過剰発現株を作成した。遺伝子破壊株は野生株と変わらない増殖及び発生分化を示したが、過剰発現株は発生時の細胞集合における細胞流形成に遅れが見られた。以上の結果から、細胞性粘菌のキネシンDdKin5は、増殖や発生分化に必須ではないが、細胞運動においてアクチン繊維に関わる機能を担っている可能性がある。今後はDdKin5のアクチンとの相互作用や細胞内でのアクチン動態に与える影響などを調べることによって、DdKin5の機能を明らかにする予定である。

S. Iwai, A. Ishiji and K. Sutoh : Cloning and characterization of kinesin-related proteins in Dictyostelium