3P153

AFMを用いたウニ精子鞭毛軸糸における高速微小振動の検出

○榊原 肇¹、国岡 由紀²、山田 武範²、上村 慎治¹ (¹東大・総合文化・生命環境、²東京理科大・理・物理)

ガラスに付着し屈曲運動を抑えたウニ精子鞭毛では nm オーダーの高速微小運動を行う事が知られている。本実験ではこの現象を詳細に解析する目的で AFM を用いる事にした。従来は鞭毛軸糸にマイクロビーズを付着させ光学的に振動の検出を行っていた。しかし、鞭毛直径 (0.2 μ m) に対しマイクロビーズ (1 μ m) が大きいので、マイクロビーズが軸糸内のどの箇所の運動を反映しているのかなど、詳細を調べることはできなかった。AFM は一般的には試料表面を 2 次元走査しカンチレバーのたわみにより微細構造を得るために用いるが、ここでは軸糸の局所にカンチレバー (曲率半径 20nm 以下) を当てて、振動を検出するために用いた。得られるデータには、AFM 信号と LFM 信号が存在する。前者は一般に高さ方向の信号として画像作成に使われるシグナルであり、後者はカンチレバーのねじれに関わるシグナルである。この 2 つのシグナルをもちいて鞭毛軸糸内の振動方向のマッピング、および、鞭毛軸糸内の複数箇所での振動数の分布などを調べた。まず、実際に得られた振動が生体の振動であるかどうかを調べるため、溶液中の ATP 濃度に振動数が依存することを確かめた。さらに、鞭毛軸糸内の隣接する複数点で振動の検出を行ったところ、先の実験では得られなかった複数の周波数ピーク、特に 2 倍の周波数成分が観察されるケースが多かった。軸糸ダイニンの最大 ATP ターンオーバー速度と考えられる 100-150(1/s) 付近には該当する周波数成分のものは全く観察できなかった。ダイニン腕が ATP 加水分解反応とは直接カップルしているか否かは別問題として、微小管高速振動に同期して動いている可能性を強く示唆している。また AFM 信号に対して LFM 信号が得られないことも多く、これらをふまえて技術的な側面、高さ方向の振動についても議論する。

H.Sakakibara, Y.Kunioka, T.Yamada and S.Kamimura : AFM detection of the high-frequency vibration in sea-urchin sperm flagella

3P155

電子顕微鏡単粒子解析法および X 線溶液散乱法によるクラミドモナス鞭毛内腕ダイニン亜種 c の分子構造の解析

○大岩 和弘¹、Burgess Stan A²、Walker Matthew²、Trinick John²、藤沢 哲郎³、岩本 裕之⁴、榊原 斉¹ (¹通総研・生体物性、²リーズ大学、³理研播磨・構造生物、⁴JASRI・生物医学) クラミドモナス鞭毛の内腕ダイニン亜種 c は、単頭のプロセシブモーターである。(Sakakibara et al., Nature (1999) 400: 586-590)。力学的測定によって明らかになった機能特性と分子構造との関連を明らかにするために、電子顕微鏡負染色像の単粒子解析と X 線小角溶液散乱を用いて構造解析を行なった。単粒子解析法によって、ダイニン亜種 c がドーナツ状の頭部を一つ持ち、そこから微小管結合部位とされている柄(stalk)と幹(stem)が突出していることが確認された。Stem の先端には量高いドメインが存在し、頭部と合わせて 2 ドメイン構造を示した。また、stem は頭部に対して巻きつような形態を取り、stem に弾性成分の存在が示唆された。一方、柄(stalk)は頭部に対して常に垂直に突出していた。ATP-vanadate 存在下で高頻度で観察される分子形態と ATP 非存在下で高頻度で観察される分子形態は互いに排他的であり、ダイニン分子のカーボン支持膜への吸着方向にも差が見られた。ATP-vanadate 存在下では、ダイニン分子頭部中央の間隙は狭くなり、頭部にひずみが生じているように観察された。さらに、ダイニンの活性状態を固定することなく溶液状態でのダイニンの構造を捉えるために、溶液中に分散したダイニン分子の X 線小角溶液散乱を SPring8 小角散乱ステーション BL45 を用いて測定した。ギニエプロットから、慣性半径約 11nm、分子量 600kDa が求まり、距離分布関数からダイニンが溶液中においても伸展した 2 ドメイン構造を取ることがわかった。また、ATP-vanadate 存在下と rigor 状態での距離分布関数の比較から、各ドメインの収縮の可能性が示された。これらの結果は、電子顕微鏡観察結果を支持するものである。

K. Oiwa, S.A. Burgess, M. Walker, J. Trinick, T. Fujisawa, H. Iwamoto, and H. Sakakibara : Single particle analysis and small-angle x-ray scattering measurements of the inner-arm dynein subspecies c of Chlamydomonas flagella

3P154

アデニンヌクレオチドに依存した鞭毛内腕ダイニンのモーター活性変化

○八木 俊樹¹、神谷 律^{1,2} (¹東大院理、²基生研)

クラミドモナス鞭毛の 7 種の内腕ダイニン (a-g) を単離して in vitro の微小管滑走活性を検定すると、いずれも ATP だけが存在する場合より ATP と ADP が共存する条件下のほうがよい運動性を示すことが見いだされた (Yagi, 2000)。この事実はダイニンにおける複数のヌクレオチド結合部位の存在との関連で興味深い。本研究では、ヌクレオチドの影響を詳しく調べるために、in vitro motility assay において時々刻々変化する溶液中のヌクレオチド組成を分析する実験を行った。ガラス表面に各種ダイニンを吸着させ、1 mM ATP 存在下で微小管を滑走させた。運動を記録しながら、適当なタイミングでフローセル内部溶液を回収し、陰イオン交換カラムを用いてヌクレオチドの組成と濃度を調べた。ダイニン a では、ATP 添加後に微小管はガラス面に結合したまま全く動かなかったが、50 分後、ヌクレオチド組成が ATP 0.25 mM, ADP 0.55 mM, AMP 0.20 mM となったときに、一部の微小管が運動を開始した。これは、ダイニン a は ADP があつてはじめてモーター活性をもつようになるという以前の結果と一致する。ダイニン c では、微小管は ATP 添加直後に動き始め、40 分後、ヌクレオチド組成が ATP 0.12 mM, ADP 0.55 mM, AMP 0.33 mM となったときに、停止した。このことから、ダイニン c による運動は ATP が枯渇する前に停止することが判明した。また、ダイニン a、c 両方において、ATP の分解産物として AMP が生じていることは興味深い。今後、ATP が枯渇する前に運動が停止する理由とともに、AMP が生じる機構と AMP のダイニンの運動性に対する効果を調べる予定である。

T. Yagi and R. Kamiya : Adenine nucleotide-dependent change in motor activity in axonemal inner-arm dyneins

3P156

タンパク質合成におけるリボソームに対する mRNA の移動を 1 分子イメージングする試み

○榊 直由^{1,2}、牧 泰史^{2,4}、鈴木 勉³、渡辺 公綱³、木下一彦^{2,4} (¹慶大院・理工・基礎理工、²CREST チーム 13、³東大院・新領域・先端生命、⁴岡崎共同機構・分子科学研)

リボソームは mRNA の塩基配列をアミノ酸配列へと変換するタンパク質合成装置である。アミノ酸を重合する過程においてリボソームは mRNA 上を 5' → 3' 方向に移動するが、そのためには駆動力が必要であると考えられる。しかし、その力は測定されておらず、力の発生メカニズムについてもほとんど分かっていない。そこで、リボソームを移動させる力の発生メカニズムを 1 分子レベルの測定によって解明することを本研究の目的とし、力を測定するための 1 分子観察系を構築することにした。

今回、RNA polymerase による DNA の引き込みを観察するときに用いられた tethered-particle 法を応用し、リボソームを固定した状態で mRNA の引き込みを 1 分子観察することにした。3' 末端をピオチン化したポリウリジン [poly(U)] を、アビジンを介してビーズに結合させた。この poly(U) を mRNA とし、ガラス表面上に吸着させたりリボソームにポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成を行わせることを試みている。これにより、poly(U) の 3' 末端に結合したビーズがリボソームの方にたぐりよせられ、ビーズのブラウン運動が次第に小さくなる様子を光学顕微鏡で観察できるはずである。poly(U) が引き込まれる力は、そのビーズを光ピンセットや磁気ピンセットで引っ張ることで測定する予定である。

poly(U) の 5' 末端にもビーズを結合させ、5' → 3' 方向だけでなく 3' → 5' 方向にも poly(U) を引っ張ることができるようにすれば、ポリフェニルアラニン合成の加速、減速、停止を力学的にコントロールすることも可能になると期待される。

N.Sakaki, Y.Maki, T.Suzuki, K.Watanabe, K.Kinosita Jr : Single-molecule imaging of the movement of mRNA relative to ribosome during protein synthesis