S3T51

原子構造から見たアクチンフィラメントの柔らかさ

○前田 雄一郎¹、武田 壮一²、小田 俊郎¹ (¹ 理研播磨、² 国立循環器病センター)

蛋白質複合体の働きのメカニズムを理解するためには、どうしても原子座標（結晶構造）を知る必要がある。しかしこれだけでは不十分で、得た原子座標を基に構造物の動きを理解する必要がある。アクチンフィラメントの場合、フィラメント全体の曲げの柔らかさ、捻れの柔らかさと同時に、それらの局所的な変化とか、変化の伝搬が方向に依存するなどの問題の解明が待たれる。私達は最近、一方でトロポニンの結晶構造を解明し、トロポニン内部の構造変化がトロポミオン・アクチンの柔らかさを制御するのではないかとの考えを提案した。他方アクチン重合体の主鎖の原子座標を得て、それに基づく計算機実験より構造の揺らぎを推測した。これらの結果を示し議論に供したい。トロポニンの機能的な中核部の結晶構造 (Nature, 2003) は、この部分がさらにコンパクトで“硬い”サブドメインとその間をむすぶ“柔らかい”ループからなることを示した。カルシウムイオン結合で惹起される構造変化は、分子内部の大きな構造変化と、外への“歪み”の伝搬とに区別できそうである。即ち、前者の結果、トロポニンとトロポミオン・アクチン結合部の一部が消失し、結合部間の距離が変化し、また結合部に歪みが生じると予想される。アクチン重合体の動きを予測するために、まず原子モデルを以下のように改良した（投稿準備中）。ガラス細管に配向したアクチン重合体のX線繊維回折強度から得た振幅情報と、クライオ電子顕微鏡像から得た位相情報を統合して外形を得た。これに適合するようにアクチン単量体の結晶構造を“変形”していった。こうして得られたアクチン重合体の構造（主鎖のみ）のゆらぎを計算すると、全体の湾曲の他に、2本のプロトフィラメント相互の捻れが変化し、かつ末端で間隔が広がるような動きのモードが予測された。

Y.Maeda, S.Takeda and T.Oda : Modes of motions of the actin filament based on the atomic structure.

S3T53

アクチン繊維上のホットスポットの可能性：変異ミオシンと電顕による観察から

○上田 太郎¹、片山 栄作² (¹ 産総研・ジーンファンクション、² 東大・医科研・分子構造解析)

Dictyostelium myosin II の G680 は reactive cysteine helices の屈曲点に位置し、この残基をピボットとする構造変化が力発生に重要だと考えられている。この G680 を V で置換した変異 S1 はアクチン存在下でもリン酸解離が非常に遅く、その結果 ATP 存在下では A.G680V-S1.ADP.Pi が主たる中間状態となる (Uyeda et al., 2002)。この A.G680V-S1.ADP.Pi クロスブリッジはライガーとは化学的に異なるので、これらをネガティブ染色後、電子顕微鏡観察したところ、ライガー様の伸びたクロスブリッジと、見かけ上球状のクロスブリッジの2タイプが観察された。4度で調製したサンプルには球状のものが多く、室温で調製した場合はライガー様のものが大半であるため、両タイプは温度感受性の平衡関係にあると考えられる（上田、片山、2001 年本会報告）。さらに、個々のアクチン繊維ごとにクロスブリッジの形状を検討したところ、球状のクロスブリッジが大半であるアクチン繊維と、ライガー様のクロスブリッジが大半なアクチン繊維に二分され、両タイプが混在するアクチン繊維はほとんど見られなかった。この結果は、アクチン繊維には軸方向に伝搬する二状態があり、それによって S1.ADP.Pi の構造が影響を受け、両タイプのクロスブリッジ間の平衡が変わるとも解釈できる。また、両タイプのクロスブリッジともにアクチン繊維の片側に約 35 nm 周期で並ぶ傾向が認められた。現時点ではこの周期的結合が電顕サンプル調製時のアーティファクトである可能性を排除できないが、アクチン繊維上に S1.ADP.Pi と結合しやすい「ホットスポット」が 35 nm 周期で出現するという可能性も考えられる。仮にこれが事実であれば、レバーアーム長の短いミオシンでも 35 nm ステップで運動できるという現象（たとえば Tanaka et al., 2002）を説明することができ、全く新規な力発生機構解明につながると期待される。

T. Q. P. Uyeda, and E. Katayama : Hot spots along actin filaments? Evidence based on electron microscopic observation of mutant myosin.

S3T52

パネルディスカッション「活性化したアクチンフィラメント場の持つ意義」

○安永 卓生（九工大・情報工・生物化学システム）

アクトミオシンの運動は、ATP の加水分解に伴うミオシンの構造変化によるとする考えが広く受け入れられている。このモデルによれば、ATP の加水分解によって得られた化学エネルギーはミオシン分子の局所的構造変化を引き起こし、この局所的構造変化がミオシン分子のレバーアーム構造を通してさらに増幅され、その結果ミオシン分子の変位が起きる。このモデルでは、分子相互作用の相手であるアクチン繊維は、単なるレールに過ぎない。しかしミオシンの運動に伴い、アクチンもまたダイナミックに変化していることを示唆するデータは、古くは柳田らの溶液中アクチン分子のゆらぎ解析 (1984) を始めとして、本シンポジウム後半の本多、鈴木両氏の発表にもあるように、決して少なくない。もしも本当にアクチンの側にも構造変化/状態変化が起きているとしたら、それはミオシンの運動にどのような役割を果たしているのだろうか？パネルディスカッションの前半では、アクチンの構造変化に伴い、そのらせん構造の半ピッチごとに出現するホットスポットがミオシンの運動と関係していると考えられる上田、片山両氏、アクチンの状態変化に伴って発生した「場」が、フィラメント上にゆるく拘束された荷電粒子のブラウン運動を制御する可能性を考える安藤氏に登場頂き、各人の提唱する運動モデルをお話し頂く。続く後半ではこれらのモデルを下敷きに、構造研究、分子機能測定、物性研究の各視点から、アクチンの果たす役割としてどのようなモデルが妥当なのか、自由な議論を行いたい。話題提供、あるいは異なるモデルの提案など、発言を希望される方は、オーガナイザへの連絡を歓迎します (yasunaga@bse.kyutech.ac.jp)。今後どのような研究を進めることが問題を解く鍵になるのか、多くの参加者がインスピレーションを得る機会になることを期待する。

T Yasunaga : Panel discussion, "Physiological Role of Actin Activation in Actomyosin Motility"

S3T54

ミオシン結合によるアクチンフィラメント剪断のメカニズム

○片山 栄作（東大・医科研・分子構造解析）

われわれは、in vitro 滑り運動アッセイ法の条件下で滑り運動を起こしているアクト-HMM 複合体を急速凍結ディーブエッチ・レプリカ電子顕微鏡法で可視化し、その機能遂行中の構造を解析している。運動アッセイ中に蛍光観察を続けると、アクチン繊維が切断され、長さが確認できないほど短くなる現象がしばしば観察される。とりわけイオン強度が低い場合に著しい。レプリカ像においても、硬直複合体ではフィラメントが長く、ATP により運動を開始させると圧倒的に短くなることから同様の現象が起きていると推測される。その条件下でアクチンを支えるミオシン・クロスブリッジのレプリカ像はさまざまな形状を示すが、アクチンフィラメントが折れそうなほど曲がった部位を支えるクロスブリッジは、アクチンを抱き込む方向に屈曲した像を示す場合が多い。ミオシン頭部はヌクレオチド結合により強く屈曲することが知られ、その結晶構造も解かれているが、最近、機能中の上記の構造がX線結晶回折では見出されていない新たなコンフォメーションであり、ミオシン頭部にある2個の反応性SH基（SH1とSH2）を、ADP存在下に2価性試薬で架橋した時に得られる構造（アクトミオシン反応の中間体アナログと想像される）に酷似していることが判明した。この構造においては、頭部のレバーアームからS2につながる部分が従来のATP結合型とは異なる特徴的な曲がり方を示し、ATP分解のエネルギーを溜めた状態を反映している可能性を考えている。in vitro滑り運動系では、運動の推進力を担うミオシンは下の担体に強く吸着し、筋肉内に比べて頭部の可動範囲が狭く、柔軟性も低いであろうと思われる。アクチンによるヌクレオチド遊離の活性化とともにその構造が解消され、元のコンフォメーションに戻る際に、その向きによってはアクチンが切断されるのかも知れない。

E.Katayama : Molecular mechanism of actin-filament severing by myosin binding