B413

滑り運動活性化エネルギーの低いミオシンアイソフォーム

○茶園 茂¹、岩井 草介¹、須藤 和夫²、渡部 終五³ (¹日大・文理・応用物理、²東大院・総合文化、³東大院・農学生命科学)

変温動物である鯉は、冬の温度の低い環境においても、夏と同様の速度で泳いでいる。低い温度で高い酵素活性を示すのは、鯉は冬には夏とは違うミオシンを発現させて、遊泳運動の恒常性を維持しているからであることが知られている。実際、夏に発現するミオシンと冬に発現するミオシンを用いて、その上を滑走するFアクチンの滑り速度の活性化エネルギーを調べたところ、冬のミオシンは63 kJ/mol、夏のミオシンは111 kJ/molの値を示した(Chaen et al. J. Biochem. 120, 788-791. (1996))。つまり、鯉は冬に熱ゆらぎの大きいミオシンを発現させ、活性化エネルギーを低くする構造を進化上獲得したといえる。そのアイソフォーム間のアミノ酸変異は、S1重鎖全長にわたって散在しているが、ループ1、ループ2にアミノ酸配列がまとまって異なっていることが、cDNA クローニング解析によって明らかになった。(Hirayama & Watabe Eur.J. Biochem. 246, 380-387. (1997). Watabe et al. J. therm. Biol. 22, 375-390. (1998))。そして、このループ構造の違うミオシンを粘菌で発現させたところ、冬のミオシンのタイプは夏のタイプよりアクチン活性化MgATPase 活性は高かった。しかし、in vitro motility assay でのアクチンフィラメントの滑り速度(温度: 25度)は両者のタイプで顕著な違いはみられなかった(Hirayama et al. B.B.R.C. 269, 237-241. (2000))。今回、我々は、この平山らの実験でなされなかった「ミオシンの上を滑走するFアクチンの滑り速度の活性化エネルギー測定」を調べているのでその結果を報告する予定である。

S.Chaen, S.Iwai, K.Sutoh and S.Watabe : Myosin isoform having lower activation energy for sliding of F-actin

B415

電子分光クライオ電子顕微鏡法によるナノメータ分解能のアクチン・ミオシン硬直複合体の構造

○安永 卓生¹、若林 健之² (¹九工大・情報工・生物化学システム、²帝京大・理工・バイオサイエンス)

我々は、 α ヘリックス構造を認識できる0.8 nmの分解能を実現をめざして、冷電界放出型銃、エネルギーフィルタ、高分解能/高感度CCDを備えた電子分光クライオ電子顕微鏡と画像処理法の開発を進めてきた。これまでカタラーゼなどのモデルタンパク質を使って、十分な分解能を達成できることを示してきた。本会では、アクトミオシン複合体に適用し、ナノメータレベルの構造が解明されたので、報告する。

アクトミオシン硬直複合体をらせん対称性を用いて三次元再構成したところ、1.5 nmを超え、0.8 nm周辺でも相関を持つ三次元構造を再構成することができた。ミオシン頭部の表面に近い α ヘリックスに関しては、峰として観察され、その位置を同定することができた。その結果、結晶モデルと同じ位置にある α ヘリックスもあれば、ずれているものも有ることが分かった。本会では、硬直複合体におけるアクチン・ミオシン結合部位、ミオシン活性部位などの構造の詳細を議論する。さらに平均に寄与するデータの個数を増やすとともに、原子モデル構築を行うので、得られた原子モデルに関して報告する。

現在のアクトミオシン三次元マップに対してFSCによる分解能検定を行うと、1.2 nm周辺ではほとんど相関を持たないが、1 nm辺りから再び相関を持つ。これは、構造因子による可能性もあるが、らせん対称性をもちいた三次元再構成法によるアーティファクトの可能性もある。タンパク質内部に存在している並んだ α ヘリックスについて、現在のマップでは一つのマスとして観察され、同定することが難しい。それに関して検討した結果についても報告する。

T. Yasunaga and T. Wakabayashi : Structure of actin-myosin rigor complexes at a nanometer resolution by electron cryo-microscopy

B414

Enhanced fluctuation of actin filament copolymerized with acto-S1dC chimera protein upon ATP hydrolysis

○Siddique Md. Shahjahan Parvez¹、横山 慶一¹、佐々木 嶺一¹、児玉 孝雄²、鈴木 誠¹ (¹東北大院・工・金属、²九州工大・情報工)

In 1984 Yanagida et al. observed large amplitude fluctuation of F-actin in solution in the presence of HMM (Heavy Meromyosin) and ATP, suggesting F-actin undergoes a structural change upon ATP hydrolysis. Since HMMs must have repeated to attach to and detach from the F-actin in their observation system, it is not clear whether or not the fluctuation is caused by the energy exchange between HMM and actin. In this study we observed the motion of actin filament copolymerized with acto-S1dC chimera protein (Yokoyama et al., 2002) in the presence of ATP. The actin-chimera filaments were labeled with phalloidin-rhodamine, fixed to the glass surface using FLAG tag antibody, and observed under a fluorescence microscope. ATP was released from caged ATP by UV irradiation. Sequential video frames were taken by every 1/60 sec. The contour lengths of filament images were measured after enhancing their contrast. This analysis was made on more than one hundred of images. Neither the length change of actin filament nor apparent higher-order bending were observed, but a clear increase in contour length was observed after UV irradiation for actin-chimera filament, indicating that high speed fluctuation was enhanced. The contour length of pure actin filament did not change significantly. The results suggest that some energy of ATP hydrolysis may be transferred from S1dC to adjacent actin molecules or the solvent environment around S1dC may be changed on ATP hydrolysis. Ref. K. Yokoyama et al. BBRC 299 (2002) 825-831.

S.Md.S.Parvez, K.Yokoyama, R.Sasaki, T.Kodama, M.Suzuki : Enhanced fluctuation of actin filament copolymerized with acto-S1dC chimera protein upon ATP hydrolysis

B416

筋線維内のミオシンネック調節軽鎖ドメインは2つの角度がある

○荒田 敏昭(阪大院・理・生物科学)

これまで site-directed spin-label ESR を用いて活動骨格筋のミオシンネック調節軽鎖ドメイン(RLCD)の角度解析をおこなってきた。スピンラベル 4-maleimide TEMPO (MSL) を RLC の C 末近く cys156 に特異的に結合させ交換によりウサギ骨格筋スキンドファイバーに導入した。ESR スペクトルは、弛緩、硬直、活動時とも RLCD のラベル配向は鈍くゆるいことを示し、以前報告された ESR (Arata, 1990; Hambly ら, 1991; Roopnarine ら, 1998) や蛍光偏光 (Irving ら, 1996, 1998) の結果を支持した。これまでゆるいラベルの配向から2つの角度の混合によるものと考えていたが、今回、各生理状態でのスペクトルが同じ2つの角度成分に分離され、存在比のみが生理状態に依存するという決定的証拠を得た。すなわち弛緩スペクトル a × 硬直スペクトルおよび硬直スペクトル b × 弛緩スペクトル (a, b 定数) で引き算することにより、それぞれ単一角度分布でシミュレートされる2つの単純スペクトル $50^\circ \pm 20^\circ (p1)$ および $75^\circ \pm 20^\circ (p2)$ が得られた。弛緩スペクトルは $0.5p1 + 0.5p2$ で表され、2つの頭部のネックは太いフィラメントに2つの角度で固定されていることを示唆している。硬直スペクトルは $0.63p1 + 0.37p2$ で表され、頭部主体とアクチンとの強い結合で一部(〜13%)のネックRLCDの角度が一方へシフトすることを示唆している。活動筋のスペクトルは活動スペクトル a × 硬直スペクトルにより p2 スペクトルを得たが分散が小さくなっていた ($75^\circ \pm 13^\circ$)。しかし活動スペクトルは弛緩時とはほぼ同じ存在比 $0.5p1 + 0.5p2$ で表され、測定精度から強い結合へのシフトは多くとも 20-30% と見積もられた。RLCD の2つの角度は scallop muscle での報告 (Baker ら, 1998) に合致するが、弛緩から活動への転移で回転したネックは scallop muscle に比べ非常に少なく、ネック回転以外のメカニズムが骨格筋で働いている可能性を示唆した。

T.Arata : Two largely-separated angles of myosin light chain domain in muscle contraction