B457

kinesin thick filament の作成

○田場 登志希¹、今福 泰浩¹、豊島 陽子²、枝松 正樹²、山田 章³、太和田 勝久¹ (¹九大・理・生物、²東大院・総合文化・生命、³通信総合研究所関西先端研究センター生物物性グループ)

最近当研究室の野田らが行った二枚貝の天然筋肉繊維を用いた滑り運動揺らぎ解析において、筋肉繊維中の個々の myosin 分子は独立に actin filament に作用しておらず、myosin-actin 間に滑り運動が起こっている場合に myosin 分子間に協同性がある事が示された。また以前にも kinesin を用いた in vitro motility assay において、kinesin 分子間に協同性がある事が示唆されている。しかし、後者の実験において滑り運動を起こすモーター分子の kinesin head の向きがランダムであるため、実験結果の解釈に問題があった。そこで向きのそろった kinesin を用いて揺らぎ解析を行うことを目的に、我々は kinesin head-myosin rod のキメラタンパク質を大腸菌内で発現し、筋肉繊維様の kinesin thick filament の作成を試みた。二枚貝の筋肉繊維には catchin と呼ばれる、myosin 遺伝子から選択的スプライシングにより翻訳される myosin rod 様のタンパク質がある。この catchin タンパク質は互いに重合し filament を形成する。この性質を利用して大腸菌内から精製してきた kinesin キメラタンパク質と混ぜて共重合させることによって kinesin filament を作成する。その予備実験として、別々に精製してきた myosin と catchin の共重合体の作成に成功している。同様の方法を用いて kinesin-catchin の共重合体の作成を試みている。結果については当日に発表する。

T. Taba, Y. Imafuku, Y. Toyoshima, M. Edamatsu, A. Yamada, K. Tawada : Construction of kinesin thick filament

B459

熱ラチェット系の揺らぎと応答に対する Green-Kubo の関係

○原田 崇広 (京大院・理)

化学エンジンとしての分子モーターの特性をきちんと捉えようとする場合、著しい非平衡条件下で作動する分子モーターに対して平衡熱力学がいかに拡張されるかという問題を考えなくてはならない。ところで熱平衡系における物理量の揺らぎと微小な外力に対する応答との間には、よく知られた Green-Kubo の関係が成立する。ブラウン運動するコロイド粒子の拡散係数と移動度の間に成立する Einstein の関係はその一例である。従って分子モーターにおいて Einstein の関係がどうなっているかを調べることで上述の疑問への端緒をつかむことが出来ると考えられる。そこで本講演では分子モーターのモデルとして熱ラチェットを採用し、その拡散係数と移動度との関係を調べた。Rocking Ratchet と呼ばれるモデルに対する Langevin 方程式を数値的および理論的に解析し、その拡散係数と移動度との関係を求めた結果、両者の間には正の相関関係が見られたが、Einstein の関係からずれていることが分かった。これは熱ラチェットの実効的な温度が環境よりも高くなることを意味している。本公演では解析の詳細および関連する実験の結果について述べる。

T. Harada : Green-Kubo relationship between fluctuation and response of thermal ratchets

B458

ヘテロダイマーキネシンを用いた二足歩行モデルの直接検証

○加世田 国与士^{1,2}、樋口 秀男³、広瀬 恵子¹ (¹産総研・ジーンファンクション、²学振・科技特、³東北大・金属工)

従来型キネシンは1次配列上同一な2つの機能頭部を持ち、微小管上を連続的に運動する。このプロセッシビリティは、一般に2つの頭部が交互に力発生を行う「二足歩行モデル」で説明されているが、これを直接証明するデータはない。一方、二足歩行モデルでは説明できない事例もあり、片方の頭部が常に前方にある尺取り虫モデルも提唱されている。一分子ナノ計測により、運動の素過程 (8nm ステップ) が検出できる現在でもこれらのモデルの是非の検証が困難なのは、キネシンの二頭が相同であり、観察された 8nm ステップがどちらの頭部によるものかわからないためである。一方の頭部が他より遅く進むようなヘテロダイマーを作成すれば、二足歩行の場合、早いステップと遅いステップが交互に見え、尺取り虫モデルでは同等なステップが繰り返されるはずである。

我々は、既に、一方の頭部だけに変異を入れたヘテロダイマーキネシン (Wt/Mut) の作成に成功している (K. Kaseda et al., PNAS 99, 16058 (2002)). 一方の頭部の微小管結合領域に変異を入れた Wt/Mut の i) ATP 分解活性は野生型 (Wt/Wt) と変異体ホモダイマー (Mut/Mut) の平均値であり、ii) 運動速度は Mut/Mut より少し早いのみで、iii) 最大力は、Wt/Wt と Mut/Mut の中間であった。これらの結果は、2つの頭部が密接な協力関係にあることを示唆している。しかしながら、これまでに作成した Wt/Mut は微小管結合活性が弱い為に大きな力を発生せず (8nm ステップの検出ができない)、二足歩行モデルの議論には至っていない。モデルを議論するには、滑り速度は遅い (野生型の~1/5倍) が、十分な力 (> 3pN) を発生するヘテロダイマーキネシンが必要である。現在、ATP 加水分解の反応速度論的パラメーターに影響を及ぼすヘテロダイマーの作成に取り組んでいる。年会では、その1分子ナノ計測の結果を報告する。

K. Kaseda, H. Higuchi and K. Hirose : Testing hand-over-hand models using heterodimeric kinesins

B460

格子モデルによる、モータータンパク質の自由エネルギー構造

○崎崎 博生¹、菊池 誠² (¹阪大院・理学・物理、²阪大・サイバー)

分子モーターは ATP の加水分解による自由エネルギーを用いてすべり運動を行うが、具体的にどのようにエネルギーを変換しているかはまだよく分かっていない。X線結晶構造ではモータータンパク質が ATP 加水分解の各段階で異なる構造をとることが分かっている。しかし、生体内での熱ゆらぎの大きさを考えると単純に ATP 加水分解とカップルして構造変化しているのではなく、熱ゆらぎをうまく利用してすべり運動を行っているのではないかと推測できる。そして、それを実現する手段としてタンパク質の自由エネルギー構造がうまくデザインされているのではないかとということが考えられる。

そこで、最小のモータータンパク質であるキネシン (アミノ残基数323) の自由エネルギー構造を、ハイブリッド格子上で郷-like モデルによりシミュレーションを行い求めた。シミュレーションは拡張アンサンブル法の1つである MSOE (Multi-Self-Overlap Ensemble) を用いて、全エネルギー範囲でサンプルを取りさまざまな温度での熱平衡量を計算した。

その結果、キネシンは比熱のピークを2つ持つことが分かった。高温側のピークは疎水コアが壊れ、慣性半径も大きく変わるピークである。一方、低温側のピークでは疎水コアは保たれ慣性半径もあまり変化しないが、スイッチ領域が大きく壊れるピークである。このスイッチ領域というのはX線結晶構造の ATP 加水分解の各段階で大きく構造変化する領域である。当日はこのような構造変化が ATP や微小管との相互作用とどのように関係しているかを議論したい。

H. Kenzaki and M. Kikuchi : Free energy landscape of motor protein in a lattice model