B473

ミオシン V の双頭構造は、運動の連続性を高める

○渡邊 朋信^{1,2}、田中 裕人²、岩根 敦子³、眞木 さおり⁴、本間 和明⁵、池辺 礼子⁵、池辺 光男⁵、柳田 敏雄^{2,3} (¹ 阪大院・基礎工・生物工、² 科技振・ソフトナノマシン Pj、³ 阪大院・生命機能・ナノ、⁴ 科技振・ダイナミックナノマシン Pi、⁵ Dept. of Physiol., Univ. of Massachusetts Medical School)

ミオシン V は、アクチンフィラメントから解離することなく 36 nm という大きなステップを伴い連続運動する。田中らは、遺伝子工学的手法を用いてネック部位を短くしたミオシン V を 1 分子ナノ計測法により観測し、ミオシン V はネック部位の長さに関わらず ~35 nm のステップを連続的に生成することを示した。さらに、昨年度我々は、単頭ミオシン V が双頭ミオシン V と同様に大きなステップを連続的に生成することを示した。この二つの実験結果は、ミオシン V の連続運動がネック部位の構造変化や双頭構造によらないことを示唆し、我々が提唱している【ホットスポットモデル】を支持している。今回、我々は、単頭ミオシン V の運動を詳細に解析し、双頭ミオシン V の運動特性と比較した。

単頭ミオシン V のステップサイズは、前方向、後ろ方向共に、~35 nm であり、双頭ミオシン V と一致した。単頭ミオシン V のステップ間の平均時間、ATP 濃度依存性もまた、双頭ミオシン V とほぼ一致した。単頭ミオシン V と双頭ミオシン V のメカニカルな相違は、ステップの連続性と、負荷依存性において観られた。単頭ミオシン V は、双頭ミオシン V に比べてアクチンフィラメントから解離しやすく、運動の連続性が低かった。単頭ミオシン V の最大力 (ステップの前後比が 1 となるときの負荷) もまた、双頭ミオシン V のその約半分であった。これらの結果は、ミオシン V の連続運動は、二つのモーター部位の協同性から生まれるのではなく、1 つのモーター部位の持つ基本的な運動であり、双頭構造は運動の連続性・安定性を高めているということを示唆している。

T. M. Watanabe, H. Tanaka, A. H. Iwane, S. Maki-Yonekura, K. Homma, R. Ikebe, Mitsuo Ikebe, T. Yanagida : The two-headed structure of myosin-V stabilizes its processive movement.

B475

Subtilisin 処理したアクチン線維上におけるミオシン V 一分子運動

○久保田 寛頭、上村 想太郎、石渡 信一 (早大院・生命理工)

Subtilisin はアクチン分子の domain2 内にある Met47-Gly48、Gly42-Val43 間を特異的に切断する protease であることが知られている。アクチン分子の domain2 はミオシン II の結合部位の一部であり、subtilisin 処理する (以後これを sub アクチンと呼ぶ) ことにより、ミオシンとの相互作用が阻害されることが推測される。事実、岡部らの実験 (第 35 回年会: 生物物理 Vol.37, p.S213, 1997) によると、sub アクチン線維をミオシン II 上で滑り運動させた所、滑り速度が 20 % に減少した。そこで processive motor であるミオシン V でも同様に sub アクチンとの相互作用を調べることに意義があると考えた。[結果]: 今回、100 % sub アクチン線維に加え、sub アクチンを 50 % 含む共重合体について、ATP 濃度 2mM、27 °C でミオシン V の gliding assay を行った。滑り速度はいずれの線維も約 0.6 μ m/sec となり、未処理のアクチン線維との差は見られなかった。ところが、ミオシン V と結合したアクチン線維の本数は、sub アクチンの割合によらず未処理の線維の半分に減少し、しかも短時間で解離する傾向にあった。これらの結果から、sub アクチンはミオシン V の滑り速度には影響を及ぼさず、結合能と run length を減少させることが示唆された。さらに、光ピンセットを用いてミオシン V 一分子結合ビーズを、ガラス面に固定したアクチン線維と相互作用させる実験を行った所、sub アクチンを 25 % 含むアクチン線維において結合確率が有意に減少した。この結果は gliding assay から得られた結論と合致する。現在ミオシン V 一分子結合ビーズを用い、sub アクチン上においてステップ運動を観察するための実験を進めている。

H. Kubota, S. Uemura, and S. Ishiwata : Motility of single myosin V molecule on a subtilisin-cleaved actin filament.

B474

ミオシン V の尾部の Actin-activated ATPase 活性に与える効果

○柳浦 大志、木下 達也、安藤 敏夫 (金沢大大学院・自然科学研究科)

ミオシン V は ATP の加水分解エネルギーを使い、アクチン上をプラス端に向かって processive な運動をするモータータンパク質である。アクチンによって活性化されるミオシン V の ATPase 活性は組織から精製されたものと、遺伝子工学によって精製されたものとは値が異なる。また組織から精製されたものでは Ca^{2+} の有無によって ATPase 活性は異なり、プラス Ca^{2+} では高く、マイナス Ca^{2+} では低くなることが分かっている。ところが遺伝子工学的に精製されたミオシン V (尾部なし) の ATPase はマイナス Ca^{2+} 下でも高い。

我々はこれらの違いはミオシン V の尾部が関与している、つまり、マイナス Ca^{2+} 下では尾部が ATPase 活性を阻害しているのではないかと考えている。以前に類似のことがキネーシンで証明されている。さらに原子間力顕微鏡 (AFM) により、尾部が頭部付近に結合しているものも観察されている。しかし尾部が自分自身でなく、他の分子の頭部に結合し阻害していることも考えられる。

現在ミオシン V の尾部の精製にあたって、キモトリブシンおよびプロテイナーゼ K を用いて組織から精製したミオシン V の尾部切断を試みている。しかし電気泳動 (SDS-PAGE) により切断は確認される (分子量は約 80kDa) が、尾部だけ精製するにいたっていない。この結果は尾部が頭部に結合しているという仮説を支持していると思われる。

精製した尾部をミオシン V に加えることにより、どのような影響が生ずるかを ATPase 活性、1 分子運動アッセイの測定から調べた結果を報告する。

H.Yanagiura,T.Kinoshita,T.Ando : Effects of the tail part of Myosin V on the Actin-activated ATPase activity.

B476

微小ビーズを用いた actomyosin の 1 分子力学計測 — 光ピンセット法における時間・空間分解能の向上

○町山 裕亮、白井 啓介、石島 秋彦 (名大院・工・応用物理)

ミオシンの運動を 1 分子レベルで計測する場合、ガラスニードルや光ピンセット法がよく用いられる。ガラスニードルを用いた実験ではミオシン II の 5.5 nm のサブステップが検出されているなど、高時間分解能での計測が行われている [1]。しかしながら、光ピンセット法による計測では上記のような、サブステップを検出できていない。この理由としては、プローブであるビーズとアクチンフィラメントとの結合間に介在する非線形弾性要素が計測系の時間分解能の低下をまねいている。さらに、この非線形弾性要素によってミオシンの真のステップサイズを正確に計測することを妨げている。そこで本研究ではサブマイクロ程度の微小ビーズを用いて力学計測を試みた。ビーズ径を小さくすることで非線形弾性要素の影響を減らすことができ、さらには溶液中におけるビーズの粘性抵抗も減らすことができるため、時間分解能が向上すると考えられる。しかし、ビーズ径を小さくすると通常の照明系では計測できないので、我々は暗視野照明系を適用し、その散乱光の変化より高精度の変位計測を実現している [2]。

第一段階としてビーズ径を一般的に用いられる約 1.0 μ m から 0.5 μ m に小さくしたところ、アクトミオシン相互作用中における弾性定数が約 40 % 上昇し、粘性抵抗の減少分とあいまって、時間分解能が約 3 倍向上した。本年会においてはビーズ径を 0.5 μ m よりさらに小さくし、時間分解能及び空間分解能がより上昇した計測系でのミオシンの力学測定の結果を報告する予定である。

[1] K.Kitamura et.al *Nature*,**397**,129-134(1999)

[2] M.Nishiyama et.al *Nature Cell Biology*,**3**,425-428(2001)

H.Machiyama,K.Shirai and A.Ishijima : Single molecule mechanics of actomyosin used by submicro scaled bead-Time and spatial resolution enhancement about optical tweezer