B477

アクトミオシンの粗視化モデルによる分子動力学計算

○寺田 智樹、笹井 理生（名大・院情報科学・複雑系科学）

一分子観測の結果によると、ミオシン頭部はアクチンフィラメント上に結合したまま、5.5nm ずつ連続的に複数回の一方向的なステップ状運動を行う (Kitamura *et al.*, *Nature* **397**, 129-134 (1999)). この単位ステップのサイズがアクチンのサイズと一致していることを考えれば、レバーアーム模型で仮定されるようにモータードメインの位置は固定されネックドメインだけが動いていると考えるよりはむしろ、モータードメイン自体がアクチンフィラメントとの結合を保ちながら、5.5nm 離れた結合部位へと動いていると考える方が自然である。われわれは以前、解離・ATP 加水分解・再結合によりアンフォールドしたアクトミオシン系の構造が自由エネルギー最小へ向かって disorder-order 転移を起こすものとみなし、多数の自由エネルギー障壁を越える際に、それに伴ってステップ状運動を起こすと考えるモデルを提唱した (Terada *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9202-9206(2002)). この中で構造変化を特徴付ける秩序パラメータに対して、ステップ状運動を起こす自由エネルギー面の形状を仮定したが、これと実際の分子構造との関係を議論する必要がある。そこでわれわれは現在アクチンフィラメント上に結合したミオシンの立体構造を用いて、タンパク質フォールディングの分野で一般的に用いられるアミノ酸を一つの粒子として粗視化した模型 (いわゆる Go-like model) を用いて Langevin ダイナミクスによる分子動力学計算を行い、将来的にはミオシンの一方向的なステップ状運動を再現するとともに、ステップ状運動を起こす際の構造上の特徴はどのようなものであるのかを明らかにしようとしている。今回の発表ではこの計算の現状を報告する。

T.P. Terada and M. Sasai : Molecular dynamics simulation of actomyosin system using coarse-grained model

B479

電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いたミオシン VI の可視化

○狩野 要介¹、佐藤 治²、池辺 光男²、安永 卓生¹（¹ 九工大・情報工・生物、²Univ. of Massachusetts Medical School）

ミオシンはアクチン上でものを輸送したり、アクチンのダイナミクスに関わるモータータンパク質である。ミオシンには多くのファミリーが存在し、それぞれ少しずつその性質と構造が異なっていることが知られている。この中でミオシン VI は他のミオシンファミリーと比べて、アクチン上での運動方向性が異なるという性質を持っている。また、ミオシン VI のプロセッパな滑り運動説が示唆されていることから、ミオシン VI の機能と構造の連関は興味有的であった。しかし、これまでミオシン VI は結晶構造が解明されておらず、かつ、ATP 加水分解中の電子顕微鏡による 3 次元構造もわかっていない。単一分子のタンパク質を直接観察することのできる構造解析手法として電子分光クライオ電子顕微鏡法が挙げられ、近年急速に進展している。そこで本研究では、ミオシン VI のモーター活性を産出する分子メカニズムを構造学の観点から明らかにすることを目的として、ATP 存在下において急速凍結したミオシン VI 試料の写真を電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて撮影した。得られた画像データに対して、デフォーカス（6 μm～9 μm 程度）による像のボケを補正するために計算機上で処理を行ったところ、ダブルヘッド構造や尾部構造を観察することができた。また、ヘッドとレバーアームを同定できた。更に、ヘッド表面の突起部、クレフト部等も観察できる充分な分解能をもつ事がわかったので報告する。さらに、これに付随してクラスター解析を行う予定であるので、追って報告したい。

Y.Kano, O.Sato, M.Ikebe and T.Yasunaga : Visualization of myosin VI by electron cryo-microscopy

B478

モーター分子ミオシン S 1 の構造変化・力発生の同時計測

○須田 斎¹、佐々木 直哉²、佐々木 裕次³、須藤 和夫⁴、後藤 顕也⁵（¹ 東海大・開発工・生物工、² 東北大学学際科学研究センター、³Spring-8/JASRI/CREST、⁴ 東大・総合文化・生命環境、⁵ 東海大・開発工・情報工）

ミオシンは、ATP の加水分解に際して大きな構造変化をすることが知られている。この構造変化に伴ってミオシン分子自体が力発生をしている可能性が考えられる。この可能性を確かめるために、遺伝子組み換えされた細胞性粘菌ミオシン S 1 のネック領域とアクチン結合部位周辺の 2 点を捕捉したミオシンが力発生をするかどうか、表面間力測定装置を用いて実験を行っている。これまでに次のような 2 つの結論を得た。(1) 捕捉されたその制限された空間内で 1nm の構造変化を行うこと。(2) 1 分子あたり少なくとも約 0.2pN の力を発生すること。まず、マイカ薄膜上にスパッタリングして形成された相対する石英薄膜の一方は NTA リガンドを、もう一方をマレイミド基が溶液表面側に出るような化学修飾を施した。実験条件として、石英薄膜の 2 平面間にミオシン S 1 を 1 0 万～1 0 0 万個捕捉した。S 1 の 2 点補足後、ATP の遊離を促すために溶液に含まれる caged-ATP（1 mM caged-ATP, 15 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 40 mM MOPS (pH 7.0)）に UV 照射した。用いた UV 光は 1 0 0 W キセノンランプから光ファイバーにより誘導し、ダイクロイックミラーを介して試料面に入射させた。2 0 秒の照射で ATP 濃度は約 0. 5 mM ほどに上昇した。本実験では、UV 光を使用するために UV 照射による試料ダメージや温度上昇に伴うアーティファクトが十分に考えられる。果たしてそのようなアーティファクトによる変化を観測しているのかどうかをあらゆる角度から検討してみた。caged-ADP 溶液中で同様の実験を行い、caged 基の遊離に伴うアーティファクトの可能性は排除されている。今回 cage-ATP その物の caged 基遊離に伴う温度上昇に対する検討を行ったので報告する。

Suda, H., Sasaki, N., Sasaki, C. Y., Sutoh, K., Goto, K. : Simultaneous measurement of structural change and force generation for motor protein myosin-S1

B480

レバーアームモデルでは説明できないミオシン (ミオシン VI) の 1 分子運動特性

○岩城 光宏¹、田中 裕人²、岩根 敦子³、池辺 光男⁴、柳田 敏雄^{1,2,3}（¹ 阪大院・基礎工、² 科技振・ソフトナノ、³ 阪大院・生命機能、⁴Dept. of Physiol., Univ. of Massachusetts Med. Sch.）

分子モーターであるミオシンは ATP 加水分解に伴って放出される自由エネルギーを利用して力学運動を行っている。ミオシン分子の中で運動機能を担う部位は頭部と首部であり、自由エネルギーを頭部-首部間での角度変化に用いることが原因となり力学運動を行うとするのがレバーアームモデルである。ミオシン VI は 5 nm の首部に対して 15～40 nm の変位を起こす。レバーアームモデルでは 5 nm の首部 (レバーアーム) によって引き起こされる変位は高々 5 nm 程度であるため、ミオシン VI はレバーアームモデルとは異なるメカニズムで運動している。今回、我々は光ピンセット法を用いてミオシン VI 1 分子の運動特性の詳細な解析を行った。その結果、(1) ミオシン VI は 1 回の ATP 加水分解に伴ってアクチンフィラメントの P 端方向もしくは B 端方向に 15～40nm の変位を起こす。(2) P 端方向への変位の大きさは一定ではなく 10～15 nm(S.D.) の分布を持ち、低負荷 (0～1 pN) では平均 30 nm であるが高負荷 (1.5～2 pN) では平均 18 nm に減少する。(3) B 端方向への変位は負荷に依らず一定で～20 nm である、ことが分かった。ミオシン V の変位の負荷依存性についても同様に計測して検証したところ、負荷にほとんど依存せず 30～36nm であった。この結果はミオシン VI の負荷依存性が計測系や解析で生じるアーチファクトでないことを示す。ミオシンの変位の負荷依存性はミオシン II においても観測されている (Kitamura *et al.*)。ミオシン II ではブラウン運動にバイアスをかけることで運動すると考えられているが、ミオシン VI においてもミオシン II 同様にブラウン運動が本質的に重要であり何らかのバイアスがかかることで一方向に運動している可能性が高い。

M.Iwaki,H.Tanaka,A.H.Iwane,M.Ikebe,T.Yanagida : Mechanical property of single myosin VI molecules which can not be explained by lever-arm hypothesis