B481

高速プロセッシブモーター高等植物ミオシン (myosin XI) の運動特性とその制御

○富永 基樹¹、小嶋 寛明¹、横田 悦雄²、織井 秀文²、中森 鈴奈¹、片山 栄作³、Michael Anson⁴、新免 輝男²、大岩 和弘¹ (¹ 通総研・関西・生体物性、² 姫工大院・理・生命、³ 大医科研・分子構造解析、⁴ Div. Physical Biochem.・Nat'l. Inst. Med. Res.)

植物細胞の原形質流動は、アクチンミオシン系が関与する最も速い運動である。これに関わる 175kDa ミオシンをタバコ培養細胞 BY-2 から単離精製した。このミオシンは、ミオシン XI に属し、カルモジュリンを軽鎖に持つ。分子形態はミオシン V に類似している。運動速度は約 7 μ m/sec でミオシン V の 10 倍におよぶ。光ピンセットによる単分子運動計測の結果、このミオシンは 35nm ステップを刻みながらアクチンフィラメント上を連続的に運動できるプロセッシブモーターであることが明らかとなった。また、このミオシンは Ca^{2+} によって直接運動の制御を受ける。植物細胞の原形質流動は細胞内 Ca^{2+} の上昇により停止することから、この Ca^{2+} 制御は生理学的意味を持っているが、分子レベルでの詳しい制御機構は明らかになっていない。In vitro motility assay において、運動しているアクチンフィラメントは高 Ca^{2+} 濃度 (pCa5.5 <) では連続的な運動を行うことなくミオシンから解離した。この現象は 10 μ M CaM の添加によって回復した。また Actin activated ATPase 活性は (pCa5 <) で低下した。Rigor 条件では、 Ca^{2+} によるアクチンフィラメントの解離は見られなかったことから、ミオシンとアクチンのアフィニティーの低下は、ミオシンヘッド部位のアクチンとのアフィニティー低下よりもむしろ、CaM の構造変化によるミオシンネック部位の剛性低下と、これによって惹き起こされた processivity 低下に起因している可能性が考えられる。この可能性を検証するために、 Ca^{2+} 存在下において Landing assay を行い、175kDa ミオシンの processivity の評価を行うことを検討している。

M. Tominaga, H. Kojima, E. Yokota, H. Orii, R. Nakamori, E. Katayama, M. Anson T. Shimmen and K. Oiwa : Ca^{2+} regulation mechanism of higher plant myosin (myosin XI)

B483

車軸藻ミオシンによるアクチン繊維の運動は速度変化が大きい

○桶野 雄輔、羽鳥 晋由、本多 元、松野 孝一郎 (長岡技術科学大学・生物系)

アクチン繊維の局所的な運動を観察する為にスポット標識した「まだら」アクチン繊維を作製したところ、アクチン繊維上ではミオシン分子が協同的に働いていることを示してきた。そこで、骨格筋ミオシンより数十倍の速さでアクチン繊維を動かす車軸藻ミオシンについて実験を行い、骨格筋ミオシンと比較することで車軸藻ミオシンの速い滑り運動機構を調べた。

In vitro motility assay により観察したまだらアクチン繊維の速度変化を進行方向 (加減速成分) と垂直方向 (運動方向を変える成分) に分け、それぞれをアクチン繊維の変動とした。

約 5 μ m/sec で運動する車軸藻ミオシンの進行方向の変動は、骨格筋ミオシンの場合より約 2 倍大きい値を示した。また、骨格筋ミオシンの場合、ATP 濃度と共に進行方向の変動は変化がないのに対して、車軸藻ミオシンでは進行方向の変動は増加した。さらに、進行方向の変動は速い成分と遅い成分に分かれていた。(図参照) これらのことより、車軸藻ミオシンによるアクチン繊維の運動は単に速いだけでなく、速度変化が大きいことが分かった。

Y. Okeno, K. Hatori, H. Honda, K. Mastuno : Large fluctuations in velocities of an actin filament by *Chara* myosin

B482

車軸藻ミオシンの 1 分子力学計測—運動活性の低下を防ぐために—

○白井 啓介、町山 裕亮、石島 秋彦 (名大院・工・応用物理)

高速滑り運動をする車軸藻ミオシンの運動メカニズムを明らかにするために、我々は車軸藻ミオシンの力学計測を行ってきた。その結果、車軸藻ミオシンのステップサイズは 18 nm であること、ADP 解離が律速段階になっているがそれは負荷に依存すること、などがわかった。これらの結果より、車軸藻ミオシンの速い滑り運動は多分子になって初めて実現されていることが示唆された [1]。ただ、この時点では車軸藻ミオシンの活性を保つために、純度の低い状態で計測を行っていた。今回我々は、より活性を保持した車軸藻ミオシンの運動を顕微鏡上で実現するために、純度が上がり、活性を保つ、調整法の確立を目指した。

そこで、まず、プロテアーゼから車軸藻ミオシンを守るために、抽出液にカゼインを加えた。これは、植物ミオシンを調整する際にカゼインを加え、ミオシンの活性低下を防いでいる例があったからである [2],[3]。実際に、カゼインの有無で車軸藻ミオシンの in vitro 滑り速度に変化が生ずるかを調べたところ、カゼイン存在下での調整の方が平均滑り速度が 10 % 大きくなる結果を得た。

本研究では、このカゼインの他にも抽出液の組成や調整方法を探り、またその一方、顕微鏡で計測する際のミオシンのカバーガラスへの固定条件などを模索している。そして、ガラス面上に存在する車軸藻ミオシン以外の物質を極力排除した状態で 1 分子力学計測を行ない、変位の大きさ、変位持続時間などを解析し、車軸藻ミオシンの運動メカニズムについて考えていきたい。

[1]Kimura et al. *J.Mol.Biol.* (2003) **328**, 939, [2]Yokota et al. *Protoplasma* (1994) **177**, 153, [3]Tominaga et al. *The EMBO Journal* (2003) **22**, 1263

K.Shirai, H.Machiyama, A.Ishijima : Single molecule mechanics of *Chara* myosin -to keep motile activity-

B484

Myo18A の機能解析

○五十川 泰史¹、昆 隆英¹、井上 毅¹、大倉 玲子¹、山川 央²、小原 収²、須藤 和夫¹ (¹ 東大院・総文・生命環境、² かずさ DNA 研究所)

MysPDZ(Myosin 18A) は、骨髄間質細胞由来の培養細胞から同定された、クラス XVIII に属するミオシンであり、N 末端に PDZ ドメインを持つ (Furusawa et al. 2000)。PDZ ドメインを持たないスプライズバリエーション (MysPDZ β) も存在し、PDZ を持つもの (MysPDZ α) とは発現細胞や細胞内局在などが異なる (Mori et al. 2003)。興味深いことに、MysPDZ は ATP 加水分解部位において、他のクラスのミオシン間で完全に保存されているアミノ酸残基に置換が起きている。このため MysPDZ は、ATP を加水分解できず、モータータンパク質としての活性を持たない可能性がある。そこで本研究では、MysPDZ の生化学的な性質を解析することを目的とした。

MysPDZ の全長、PDZ ドメイン+モータードメイン、モータードメインのみ、のそれぞれに GFP を融合し、培養細胞 COS7 で発現した。これらの細胞内で GFP の蛍光を観察した結果、全長の MysPDZ は一部がアクチン繊維と共局在し、モータードメインのみでは細胞質全体に分布した。PDZ ドメイン+モータードメインは細胞質全体に分布したが、一部は繊維状の構造に局在した。このことから、MysPDZ の少なくとも一部がアクチン繊維と相互作用し、その相互作用には PDZ ドメインが影響を及ぼしている可能性が示唆された。

以上を踏まえ、現在は MysPDZ とアクチン繊維の共沈降実験を行っている。これにより、in vitro における MysPDZ とアクチン繊維との相互作用の有無、相互作用がある場合は、それが ATP 依存的なものかどうかを検証する。また、PDZ ドメインを持たない MysPDZ に関しても共沈降実験を行い、相互作用に対して PDZ ドメインが及ぼす影響もあわせて検証する予定である。

Y. Isogawa, T. Kon, T. Inoue, R. Ohkura, H. Yamakawa, O. Ohara, K. Sutoh : Functional analysis of Myo18A