B489

固定されたアクチン繊維上を動くミオシンコートビーズ

○本多 元¹、川口 友彰¹、今井 栄一¹、羽鳥 晋由¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ (¹長岡技大、²名市大・芸工)

顕微鏡下でアクチン繊維の運動を観察するシステムは確立しているが、アクチン繊維上を運動するミオシンビーズを観察するシステムは、1983年にSheetzとSpudichによって報告されて以来あまり注目されていない。最近、アクチン繊維をガラス表面にゆるく固定する方法が用いられることもあるが、これもターゲットはアクチンではなく、モーター蛋白質の運動を観察するためである。アクチン繊維は、単なるレールであると考えられているからである。

我々は、ビオチン化アクチンとインタクトなアクチンを混合し、均一な重合体を作り、ガラス表面上への固定度を調節した(図)。この上を動くミオシンビーズは、繊維の固定度が上がるにしたがって協同的に運動性を示さなくなった。これは、アクチン繊維が一定以上固定されると、モータータンパク質は、その上を運動することは出来ないことを示している。この事実はアクチンが滑り運動にとって単なるレールではない有力な証拠の一つである。

H. Hajime, T. Kawaguchi, E. Imai, K. Hatori, K. Shimada and K. Matsuno : Migration of myosin-coated micro-beads on a 'fixed' actin filament

B491

熱エネルギーによるアクチン繊維の一方方向性運動

○川口 友彰¹、本多 元¹、羽鳥 晋由¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ (¹長岡技科大・生物系、²名市大・芸術工)

滑り運動においてアクチン繊維は、ミオシンによるATP加水分解の化学エネルギーを使って一方方向に動く。エネルギーを利用して、アクチン繊維の構造的極性が一方方向性運動を実現させている。では、アクチン繊維はどのようにエネルギーを利用して一方方向に動くのだろうか？エネルギー源は化学エネルギーでなければならないのか？

我々は、thermal ratchet modelに基づいて、一方方向性の運動は構造的極性と外部からのエネルギーによって駆動されると考え、アクチン繊維が熱エネルギーによって一方方向性の運動を示すかどうかを調べた。熱エネルギーを与えるために、Cys-374に1.4 nmの金を結合した蛍光アクチン繊維を調製し、赤外レーザーを照射した。短時間照射(数十ミリ秒)によってアクチン繊維は一方方向に動き、照射を周期的に行うことでその動きは増幅された。一方、連続照射では一方方向性の動きは見られなかった。以上のことから、アクチン繊維はミオシン非存在下で、化学エネルギーではなく熱エネルギーによってでも一方方向性の運動ができ、その運動には、アクチン繊維と繊維周辺に生じる一過的な温度差が消失していく過程が重要であると考えられる。

Figure NANOGOLD-decorated actin filament was driven unidirectionally by thermal energy. A laser pulse of 30 ms duration was given every 0.17 s.

T. Kawaguchi, H. Honda, K. Hatori, K. Shimada and K. Matsuno : Short laser irradiation moves an actin filament unidirectionally.

B490

再構成 thin filament-HMM 分子間の滑り力に対する温度の影響

河合 正隆¹、○木戸 孝紀²、鈴木 団²、石渡 信一³ (¹Dept. Anat. Cell Biol., Coll. Med., Univ. Iowa, ²早大院・生命理工、³早大・理工・物理)

in vitro 滑り運動系において、アクチンフィラメントの滑り速度は温度と共に大きく上昇するが、クロスブリッジ (HMM 分子) あたりの発力は温度によって影響を受けない (Kawai ら, 2000)。では制御系タンパク質が結合した再構成 thin filament と HMM 分子間の相互作用ではどうであろうか。コロジオンコートされたカバーガラスに HMM 分子 (30 μg/ml) を吸着し、HMM-thin filament 相互作用を 50mM のイオン強度、MgATP (2mM) の存在下で行わせた。アクチンフィラメントを 3-5% のゲルゾリンによってポリスチレンビーズにつけ、次にトロポミオシン・トロポニン複合体であるネイティブトロポミオンを加えた。全てのタンパク質はウサギ白筋から精製したものである。再構成 thin filament を蛍光顕微鏡下で観察可能にするためローダミンファロイジンでラベルした。Ca²⁺ 非存在下ではフィラメントは運動せず、Ca²⁺ 存在下 (pCa 5.0) では運動し、Ca²⁺ 感受性を示した。滑り力は光ピンセットにより 4 つの異なる温度 (20 度、25 度、30 度、35 度) で測定した。また各温度で形成された硬直結合のクロスブリッジ数を、光ピンセットを用いて破断させ数えた。測定された滑り力と硬直結合のクロスブリッジ数は共に温度と共に増加し、1 クロスブリッジあたりに換算した滑り力も、温度が高くなるほどわずかながら増加する傾向を示した。しかし、その増加の度合いは 200mM イオン強度下でウサギ腰筋のグリセリン処理筋繊維に見られた (Zhao and Kawai, 1994) ほどではなかった。この差はイオン強度の差によるものと考えられる。高イオン強度下では疎水相互作用が、低イオン強度下では静電相互作用が主要な力発生源となっている可能性がある。

M. Kawai, T. Kido, M. Suzuki, S. Ishiwata : The effect of temperature on gliding force between reconstituted thin filament and heavy meromyosin molecules

B492

クラミドモナス鞭毛内腕ダイニン c の遺伝子、軸糸内局在と機能的性質

○八木 俊樹¹、箕浦 逸史²、藤原 明子¹、斎藤 良³、安永 卓生³、広野 雅文¹、神谷 律^{1,2} (¹東大院・理学系・生物科学、²基礎生物学研究所、³九工大・情報工学・生物化学システム)

真核生物の鞭毛・繊毛には、内腕ダイニンとして少なくとも 7 種類のダイニン分子種 (a-g) が存在する。各分子種は鞭毛運動機構において固有の役割を持つと考えられるが、詳細はわかっていない。われわれは、各内腕ダイニン個別の機能を調べるために、さまざまな分子種を欠損したクラミドモナス突然変異株を単離する試みを行ってきた。最近、内腕ダイニン c のみを欠失している変異株 (*ida9*) を単離し (1999 年度年会)、その株の運動性から、このダイニンが野生株や外腕欠失株が高粘度溶液中で運動する際に大きな力を出していることを示した (2001 年度年会)。本研究では、この株の変異遺伝子を同定し、ダイニン c の軸糸内局在を決定した。クラミドモナスでは、内腕重鎖の遺伝子として 11 種類 (*DHC1-DHC11*) が同定されている。*ida9* 株の変異遺伝子を調べた結果、この株は *DHC9* に欠損があり、重鎖の大部分を欠失していることがわかった。次に、野生株、*ida9*、および *ida4* (内腕ダイニン a, c, d を欠失している株) の鞭毛軸糸の超薄切片電子顕微鏡像の比較から、ダイニン c の軸糸内局在を調べた。内腕ダイニンの各分子種は軸糸の軸方向に 96 nm の周期で並んでいるので、各周期ごとの電子顕微鏡像をクラスター分析し、平均化を行った。その結果、ダイニン c は、96 nm 周期中に 2 本存在するスポーク (S1 および S2) 構造のうち、S2 の根元に存在することが明らかになった。

Toshiki Yagi, Itsushi Minoura, Akiko Fujiwara, Ryo Saito, Takuo Yasunaga, Masafumi Hirono, and Ritsu Kamiya : CHLAMYDOMONAS FLAGELLAR INNER-ARM DYNEIN c: GENE, AXONEMAL LOCALIZATION, AND MOTILITY PROPERTIES STUDIED WITH THE MUTANT *ida9*