1P137

Dictyostelium Discoidium による mutant actin の精製と機能評価

○三浦 洋敬¹、小口 祐伴¹、石渡 信一² (¹早大院・理工・生命理工、²早大理工・物理)

本研究では、actin の myosin 結合部位を構成すると言われているアミノ酸を別のアミノ酸に置換する事で、myosin と actin の相互作用がどのように変化するかを調べる。それと同時に、Dictyostelium Discoidium actin (以下 D - actin と記す) と rabbit skeletal actin の性質を比較して、D - actin の機能を評価する。

Dictyostelium Discoidium (細胞性粘菌) を用いて、mutant actin の精製を行った。D - actin を含む Dictyostelium Discoidium 発現用 vector pB10TP2 を用いて、mutant actin を細胞内に発現させた。更に mutant actin と wildtype actin を電荷の違いを利用して、陰イオン交換カラムにより分離、精製を行った。

Mutation を導入した部位は、actin の subdomain1 に位置し、myosin 結合部位と言われている actin の塩基配列 352 番目のフェニルアラニンで、これをアルギニンに置換した (アミノ酸配列決定によってアミノ酸置換を確認し、二次元電気泳動によって等電点がアルカリ側にシフトした事を確認)。Phe352 を含む subdomain1 領域は、myosin II と強結合する部位であると言われ、この point mutation が、myosin の ATPase cycle や actin filament の滑り運動に影響を及ぼす事が期待された。

Myosin II を用いた in vitro sliding assay の結果、予想に反してアクチンの滑り運動速度には大きな影響は見られなかった。そこで現在、myosin II だけでなく myosin V による in vitro sliding assay を詳細に検討する一方、myosin (II, V) とアクチンとの結合・解離速度や myosin V のステップ運動の 1 分子解析などを、wildtype actin と比較しつつ検討している。

H.Miura, Y.Oguchi and S.Ishiwata : Characterization of mutant actin prepared from Dictyostelium Discoidium.

1P139

ミオシンホスファターゼを阻害するタンパク質 CPI-17 の構造基盤

○大木 進野¹、江藤 真澄²、横田 恭宣¹、松澤 史子³ (¹北陸先端大学院大、²バージニア大、³セレスターレキシコサイエンス)

よく知られているように平滑筋の収縮と弛緩はミオシン軽鎖のリン酸化と脱リン酸化によって制御されており、このうちの脱リン酸化反応はミオシンホスファターゼ (MP) によって行われている。3 種類のタンパク質の複合体である MP の機能は、サブユニットのプロテインホスファターゼ 1 (PP1) が担っている。PP1 の機能は、MP のサブユニット MYPT1 のリン酸化に依存して抑制されることが知られている。MP の機能は、その他にも小タンパク質 CPI-17 によって調節されている。CPI-17 は分子量が 17KDa のタンパク質であり、PKC をはじめとする複数のキナーゼによってその Thr38 がリン酸化される。リン酸化型 CPI-17 のリン酸基がサブユニット PP1 の触媒反応部位に直接結合することで、MP の機能が阻害されると考えられている。我々はこの CPI-17 の構造機能相関に関する研究をすすめており、現在までにその非リン酸化型と T38D 変異体の立体構造を溶液 NMR 法で決定した。今回はリン酸化型 CPI-17 の溶液 NMR 構造の決定に成功したので、これを報告する。また、リン酸化型と非リン酸化型の構造を比較し、CPI-17 のリン酸化による構造変化に関して議論する。さらに、最近報告された PP1 と MYPT1 の複合体構造を利用してこれとリン酸化型 CPI-17 の結合に関しても検討したので、この結果も合わせて発表する。以上を基に、構造の側面から明らかにされつつある CPI-17 の機能に関して議論したい。リン酸化スレオニンを含むタンパク質の溶液 NMR 構造は PDB にほとんど登録されていないので、この点からも本研究結果は興味深い。

S.Ohki, M.Eto, K.Yokota and F.Matsuzawa : Structural basis of myosin phosphatase inhibitor, CPI-17

1P138

ウサギ骨格筋ミオシンの重鎖 A B の構造

○井上 明男 (阪大院・理・生物)

筋収縮の中心的な役割を担うミオシンはアクチンと結合し ATP と反応する頭部を 2 つ持っている。しかし、これら 2 つの頭部が筋収縮の際にどのように働いているのかは明らかにされていない。我々は ATP との反応によって、2 つの頭部のうち片方の頭部 A はミオシン-ATP 複合体を形成し、もう一方の頭部 B はミオシン-リン酸-ADP 複合体を形成すること、頭部 B の ATPase 反応のみがアクチンによって促進され、この ATPase 反応によって筋収縮が起こることを示した。もう一方の頭部 A は筋収縮をスムーズに引き起こす役割をしている。しかしながら、これまで頭部 A B がどのような構造の違いによるものかは明らかにされていなかった。今回我々はウサギ骨格筋ミオシンの重鎖 A B それぞれの cDNA をクローニングし、その構造を決定した。2 つの重鎖 cDNA はアミノ酸で 3 %、ヌクレオチドでは約 10 % 異なっており、異なる DNA から由来していることが明らかとなった。ウサギ骨格筋ミオシン重鎖のアミノ酸配列は Elzinga によって大部分が報告されており、重鎖全体にわたってマイクロヘテロジニティー (2 つのアミノ酸の存在) があることが示されている。上記の 2 つのアミノ酸は重鎖 A B の構造が異なる部分の 2 つのアミノ酸と一致していた。重鎖 A B はこれ以外にもアミノ酸の違いが見られた。特に、アクチン結合部とみなされている 50K-21K 連結部の N 末側、トリプシン分解パターンが頭部 A B で異なる 25K-50K 連結部に大きな構造の違いがあった。ミオシンは A B ヘテロダイマーをつくるのが頭部 A B に対して特異的な抗体を用いた実験等から示されている。我々はミオシンの首の部分にチャージの異なるアミノ酸の組み合わせが 8 残基離れて 2 組存在することを見出した。この部分がヘテロダイマー形成に関わっているものと考えられる。

A.Inoue : Structure of rabbit skeletal muscle myosin heavy chains A and B

1P140

単リン酸化平滑筋ヘビーメロミシンの非対称な光架橋

○竹谷 浩介¹、高橋 正行¹、加藤 剛志²、矢沢 道生¹ (¹北大院・理・化学、²旭川医・生化学)

平滑筋ミオシンは二つの球状頭部と一本の長い尾部を持つモータータンパク質で、その活性は各頭部の付け根に結合している制御軽鎖 (RLC) のリン酸化によって制御される。各頭部の RLC がリン酸化されると活性は上昇し、逆に脱リン酸化されると活性は著しく低下する。この脱リン酸化状態における活性の抑制には双頭構造が重要であることから、脱リン酸化状態には頭部間に活性を抑える阻害相互作用があると考えられている。ミオシンの二つの RLC のうち片方の RLC のみがリン酸化された単リン酸化状態はリン酸化による活性化機構を考える上で非常に興味深い。しかし、この単リン酸化状態における平滑筋ミオシンの性質は未だ十分に明らかにされていない。本研究では単リン酸化ミオシンの構造的な性質を光架橋法を用いて調べた。光架橋プローブ (ベンゾフェノン) 標識した RLC を導入したヘビーメロミオン (HMM) の架橋反応性はリン酸化状態によって異なることが報告されている。我々はベンゾフェノン標識した二種類の単リン酸化 HMM を調製し、その光架橋反応性を調べた。リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した単リン酸化 HMM と脱リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した単リン酸化 HMM の架橋反応性は、それぞれリン酸化 HMM 型および脱リン酸化 HMM 型であった。このことは単リン酸化状態では各頭部が非対称な構造をとっており、片方の頭部のリン酸化では両頭部を活性の高いリン酸化型の構造にするには不十分であることを示している。また、脱リン酸化状態では RLC とモータードメインとの間で架橋されることが明らかになった。従って、脱リン酸化状態では RLC がモータードメインに近接し、両頭部間に阻害相互作用が働くと考えられる。また、単リン酸化状態でも脱リン酸化 RLC はモータードメインに近接し阻害相互作用を保つと考えられる。

K.Takeya, M. Takahashi, T. Katoh and M. Yazawa : Asymmetric photocross-linking of singly phosphorylated smooth muscle heavy meromyosin