3P157

単頭脳ミオシンVから再構成した擬似HMMの運動

○木下 達也、小出 博史、田中 祐介、安藤 敏夫（金沢大院・自然科学）

ヒヨコ脳ミオシンV(BMV)はアクチンフィラメント上をプロセッシブ運動するモータータンパク質である。その運動メカニズムを解明するために、我々は単頭脳ミオシンV(BMV-S1)を調製したが、それがプロセッシブ運動することはなかった。

BMV-S1はアクチンフィラメントとの親和性が低いため、その親和性を高める工夫が必要であった。そこで我々は2つのBMV-S1を繋ぐことでそれが実現できると考え、ストレプトアビジン(SA)を介して、紐状のポリエチレングリコール(PEG:分子量3400、長さ約35nm)によって、2つのBMV-S1を繋いだ(S1間70nm以上)。一見HMMに見えることからこれを擬似HMMと呼ぶことにした。このSAやBMV-S1頸部にCy3を導入してその運動観察を行ったところ、その運動はBMVと比較するとかなり遅いものの、確実にプロセッシブ運動を行っていた。そしてそのステップサイズは約70nmであった。

さらに分子量5000のPEG(長さ約50nm)を用いて擬似HMMの調製を行った(S1間100nm以上)。この擬似HMMもプロセッシブ運動が観察され、驚いたことに、そのステップサイズは約70nmで分子量3400のPEGの場合と一致した。

BMVは頭部を交互にアクチンに結合させ、まるで歩くかのような運動をすると広く考えられている。しかし、擬似HMMの運動はこの「歩行モデル」の基礎となっている頭部の構造変化のみでは説明はつかない。なぜならPEGは柔らかいために力が伝わらず、前方の頭部の構造変化により後方の頭部を前方に運ぶことは出来ないからである。そのため我々は、頭部が個々のアクチン分子と相互作用しながら「すり足」のように運動していると考えている。本年度では以上の実験及び解釈について報告する。

T.Kinoshita, H.Koide, Y.Tanaka and T.Ando : Motility of pseudo-HMM constructed from single-headed brain myosin Vs

3P159

ミオシンV・アクチン間相互作用の1分子顕微解析

○小口 祐伴¹、石渡 信一^{1,2} (¹早大・理工・生命理工、²物理)

ミオシンVは、アクチンフィラメントのB端方向へと連続的に数 μ m程度運動することができるprocessiveモーターである。ミオシンVの運動メカニズムは、2つのheadを交互にアクチンと結合・解離することで運動するというhand-over-hand modelにより説明される。このhand-over-hand modelを支持する直接証拠を得るためにも、ミオシンVが各条件でアクチンと単頭結合、双頭結合のいずれの結合様式をとるかを調べることは重要である。我々はこれまで、微小管と結合したキネシン1分子の破断力を、光ピンセット法を用いて測定し、各ヌクレオチド条件における結合様式を特定してきた。今回、ミオシンV・アクチン系においても同様の測定を行った。直径1 μ mのポリスチレンビーズに1分子のミオシンV(ひよこ脳)を吸着し、光ピンセットで捕捉する。そして捕捉位置を変えずにアクチンを固定したガラス表面を一定速度で移動させることで、アクチンと結合したミオシンVに負荷を徐々に加えていき、結合破断力を繰り返し測定した。また、B端capアクチン結合タンパク質であるゲルゾリンを結合した直径0.2 μ mのポリスチレンビーズを作成し、アクチンフィラメントB端にこれを結合した。こうしてアクチンフィラメントの方向性を特定し、負荷方向をB端、P端方向に分けて破断力の分布を測定した。その結果、1mM ADP存在下では単頭・双頭結合の平衡状態にあり、B端側負荷とP端側負荷とでは破断力の大きさと分布に差があることがわかった。さらにnucleotide free状態の結果と併せて、ミオシンVの歩行運動に関するhand-over-hand modelの妥当性を検証するだけでなく、その分子機構(力発生・歩行運動と酵素機能とのカップリング機構)に迫りたい。

Y. Oguchi and S. Ishiwata : Microscopic analysis of interaction of single myosin V molecule with an actin filament

3P158

Subtilisin 処理アクチン線維上でのミオシンVのプロセッシブ運動

○久保田 寛顕、石渡 信一（早大院・生命理工）

Subtilisinはアクチン分子(ウサギ骨格筋由来)のdomain2(ミオシンII結合部位の一部)内にあるMet47-Gly48、Gly42-Val43間を特異的に切断するプロテアーゼである。岡部らによると、subtilisin 処理アクチン(subアクチン)線維をミオシンII上で滑り運動させたところ、滑り速度が20%に減少した(第35回年会:生物物理 Vol.37,p.S213,1997)。本研究の目的は、subアクチン上におけるミオシン分子モーターの運動様式の違いを調べることでよりアクチン・ミオシン相互作用の特性を明らかにすることである。そこで我々は、processive motorであるミオシンVの運動様式に着目し比較検討することにした。

昨年の本年会では、1)ガラス面に吸着したミオシンV上での運動速度はsubアクチンと未処理アクチンとで差が見られないこと、2)ガラス面に固定したアクチン線維上でのミオシンV-分子結合ビーズの運動速度もsubアクチンと未処理アクチンとで差がなかったこと、3)しかし、run length(続けて歩く距離)が60%に減少することを報告した。今回、ガラス面にミオシンVをまばらに吸着し、ATP存在下で単位時間当たりにミオシンVと結合するアクチン線維の本数を調べたところ、subアクチンは未処理アクチンに比べて遥かに少なかった。昨年の結果と合せると、Subtilisin 処理はミオシンVのアクチン線維上での運動速度には影響しないが、結合能とrun lengthを減少させる(解離し易くなる)ことが示唆される。以上のことから、アクチンdomain2内のミオシン結合部位は、ミオシンVの結合・解離速度には寄与するが、運動速度そのものには重要な働きをしていないことが示唆された。

H.Kubota and S.Ishiwata : Processive movement of myosin V on a subtilisin-cleaved actin filament

3P160

電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いたミオシンVIのリガンド依存構造変化の検出

○狩野 要介¹、佐藤 治²、本間 和明²、池辺 礼子²、植山 崇¹、池辺 光男²、安永 卓生¹ (¹九工大院・情報工・情報科学、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のプロセッシブ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深いものである。しかし、ミオシンVIのATP加水分解中の電子顕微鏡法による3次元構造はわかっていない。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試料を電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて撮影した。2003年度年会では、デフォーカス(6 μ m~9 μ m)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が観察されたことを報告した。ミオシンVIがCa⁺⁺イオンの有無、イオン強度の異なる溶液中で、各々の溶液条件に固有の構造をとることが生化学研究から示唆された。そこで、各溶液条件でのミオシンVI構造を観察するために、急速凍結法で作製したミオシンVI試料を電子分光クライオ電子顕微鏡法を用いて撮影した。その結果、ミオシンVIの構造は各溶液条件で一定の傾向があることがわかった。一方で様々な構造もとっており、多型性を示すことがわかった。本会ではその構造を分類し、解析した結果を報告する。さらに分類した構造を平均化し、3次元像を再構成する過程を報告したい。

Y.Kano, O.Sato, K.Honma, R.Ikebe, T.Ueyama, M.Ikebe and T.Yasunaga : Observation of ligand-induced structural changes of myosin VI by electron cryo-microscopy