3P161

単頭ミオシン VI への Cargo の結合が運動の連続性を制御する

○岩城 光宏^{1,4}、片山 栄作²、池辺 光男³、柳田 敏雄^{1,4} (¹ 阪大院・基礎工・機能創成、² 東大・医科研・分子構造解析、³ Univ. of Massachusetts Medical school、⁴ 阪大院・生命機能)

ミオシン VI は細胞内において、～100nm の小胞を tail に結合してアクチンフィラメント上を連続的に 1 方向運動する分子モーターである。しかしながら、アミノ酸の構造予測などから当初、双頭構造であると考えられてきたミオシン VI は単頭構造で存在することが示され、その連続的な運動能が疑問視されている (Lister 2004)。単頭ミオシン VI はどのようにして生体内において連続的な 1 方向運動を行うのであろうか？

今回我々は、GFP 単頭ミオシン VI の 1 分子イメージングおよびレーザートラップを用いた 1 分子操作によって単頭ミオシン VI 1 分子の運動解析を行った。その結果、GFP ミオシン VI においては、連続的な運動が観察されなかったが、ミオシン VI の tail 先端に 200 nm のポリスチレンビーズを結合してアクチンフィラメントと相互作用させるとビーズの連続的な運動が観察された。連続的な運動はステップ状変位から構成され、無負荷条件下では平均 40 nm のステップが 4 歩程度観察された。負荷を加えた条件下でも連続的な運動が観察され、平均で 1 pN 程度の力を発生した。単頭ミオシン VI の運動特性 (運動方向・ステップサイズの負荷依存性) は双頭構造を持たせたミオシン VI 変異体の特性と比べて負荷依存性が大きく、最大発生力も双頭ミオシン VI の半分程度であった。

tail 先端に結合したビーズは、ミオシン VI 頭部に比べて 20 倍程度大きく十分遅いブラウン運動を行う。ステップ生成時に、ビーズがミオシン VI をアクチン近傍に留めることで運動の連続性を可能にしていると考え、ミオシン VI とビーズとの間で拡散速度の異なる運動モデルを構築し検証したところ、結果をよく説明できた。

M.Iwaki, E.Katayama, M.Ikebe, T.Yanagida : Cargo binding regulates the processivity of single-headed wild-type myosin-VI.

3P163

シロイヌナズナミオシン MYA1 の運動活性と酵素活性の解析

○八久保 有、伊藤 光二、山本 啓一 (千葉大院・自然科学)

現在ミオシンはモータードメインのアミノ酸配列の違いから 18 のクラスに分類されており、植物特異的に発現するミオシンとしてクラス VIII、XI、XIII が見つかった。多数の植物ミオシン重鎖の塩基配列が明らかになっているが、軽鎖が何であるか分からないので全長の発現と機能解析は難しい。我々は最近、車軸藻ミオシンのモータードメインに人工的なレバーアームとして α -アクチニンの棒状ドメインを結合させた組換えミオシンの発現に成功したので、この方法でシロイヌナズナのクラス XI ミオシン、MYA1 のモータードメインを発現させ、その運動活性や酵素活性について解析を行った。組換え型 MYA1 は細胞性粘菌の発現系で発現させ、精製した。精製したミオシンを用いて in vitro motility assay を行った結果、組換え型 MYA1 の滑り速度は約 1.2 μ m/sec (23℃) であった。車軸藻ミオシンモータードメインに同じ人工的レバーアームをつけたものの滑り速度が 12 μ m/sec (22℃) なのでこの値は妥当なものであると考えられる。MYA1 の ATP 加水分解活性は V_{max} が 15Pi/head/sec、アクチンに対する K_m は 1mg/ml であった。MYA1 の Processivity を調べるために ADP による滑り運動の阻害効果を調べたところ強い阻害が見出されたので、MYA1 はクラス V ミオシンのような高い Processivity を持つことが予想される。現在、そのことを確認するため Landing assay を行っている。

Y Hachikubo, K Ito, K Yamamoto : Motility and enzymatic activity of Arabidopsis Myosin, MYA1

3P162

軽鎖カルモジュリンは高等植物ミオシン (myosin XI) の大きな 35nm ステップに重要である

○富永 基樹¹、小嶋 寛明¹、横田 悦雄²、中森 鈴奈¹、倉富 敏史³、新免 輝男²、大岩 和弘^{1,2} (¹ 関西先端研究センター・生体物性、² 兵庫県立大院・生命理学・生命、³ 長岡技科大院・生物機能)

タバコ培養細胞 BY-2 から精製した高等植物ミオシン XI は、2 つのヘッドと長いネックを持ち、アクチン上をステップ幅 35nm でプロセッシブに運動する (Tominaga *et al.*, 2003 EMBO J. 22: 1263-1272)。ネック部位には 6 つの IQ モチーフがあり、軽鎖としてカルモジュリン (CaM) が結合している。このミオシン XI は、 Ca^{2+} により運動が阻害される。ミオシンを pCa5.5 以上の高濃度の Ca^{2+} で処理すると、軽鎖であるカルモジュリンが解離し、アクチンフィラメントとの相互作用が低下した。この時、ヘッドの ATPase 活性にほとんど変化は見られなかった。高濃度 Ca^{2+} 存在下 (pCa 4) でも、アクチンに相互作用できるミオシンの数を増やすか、ATP 濃度を下げることで、アクチンはミオシン上を連続的に運動できるようになった。これらの結果から、 Ca^{2+} による軽鎖 CaM の解離が、ミオシン XI のプロセッシブ運動能を低下させることが示唆された。Rigor 結合させたアクチンの熱運動による回転からミオシン 1 分子のねじれ弾性を見積ったところ、 Ca^{2+} 処理による増加が見られた。この結果は、CaM が解離したネックが短くなることを示唆している。光ピンセットによる 1 分子計測より、ミオシンは pCa4 でもプロセッシブ運動を示したが、その平均発生力は小さくなり、ステップサイズも 24nm に減少していた。また、このステップサイズは負荷依存性があり、低負荷 (0-0.5 pN) では 27 nm、高負荷 (0.5-1 pN) では 21 nm であった。一方、未処理のミオシン XI の 35nm ステップに負荷依存性は見られなかった。以上より、CaM の脱着によるネック部位の機械的な変化により、ミオシン XI のプロセッシブ運動が制御されていることが示された。

M. Tominaga, H. Kojima, E. Yokota, R. Nakamori, T. Kuradomi, T. Shimmen and K. Oiwa : Calmodulin light chain is essential for the large 35 nm step of higher plant myosin XI

3P164

粘菌ミオシン上を滑るアクチン繊維の AMP-PNP 存在下の運動とゆらぎ

○坂牧 潤一、羽鳥 晋由、今井 栄一、本多 元、松野 孝一郎 (長岡技科大・生物)

まだらアクチンを用いた繊維の局所運動解析により、ATP、AMP-PNP 共存下における骨格筋 HMM 上を滑るアクチン繊維の運動速度増加は、繊維の部分的ではなく全体で起こり、ATP 非存在下の繊維のゆらぎは、AMP-PNP 存在下で増大することをすでに報告した。そこで AMP-PNP による滑り速度増加のメカニズム解明を目的とし、アクチン繊維滑り運動活性や ATPase 活性が骨格筋とは異なる粘菌ミオシンを用いて実験を行った。AMP-PNP 存在・非存在下の滑り速度やゆらぎにミオシンによる特異性が存在するかを運動解析により調べた。ATP 非存在下における骨格筋 HMM 上のアクチン繊維のゆらぎは、AMP-PNP の存在により増大したが、粘菌ミオシンでは逆に減少した。次に ATP 存在下で粘菌ミオシン上を滑るアクチン繊維の運動を観察した。アクチン繊維の滑り速度は、骨格筋 HMM 上において AMP-PNP の存在により増加したが、粘菌ミオシン上では逆に減少した。また、AMP-PNP 存在下で滑り運動中の繊維のゆらぎを測定したところ、粘菌ミオシン上においてアクチン繊維は、減速と共にゆらぎの小さい運動をしていた。

Fig. 1 0.1秒間のアクチン繊維のゆらぎ

J. Sakamaki, K. Hatori, E. Imai, H. Honda, and K. Matsuno : Influence of AMP-PNP on movement and fluctuations an actin filament sliding on Dictyostelium myosin.