3P165

最速モーター蛋白質の車軸藻ミオシンはアクチンとの結合時間が短い

○伊藤 光二¹、櫻山 拓²、須藤 和夫³、山本 啓一¹ (¹千葉大・理・生物、²順天堂大・医・薬理、³東大院・総合文化・生命)

車軸藻ミオシンは50 μ m/s で動く最速の分子モーター蛋白質であり、その運動速度の大きさから、ミオシンの運動機構を解明する上で多くの知見が期待されている。しかし、車軸藻から精製して得られるミオシンは、ごく微量なため、これまで詳細な酵素化学的解析は行われてなかった。我々は、この問題を解決するために分子生物学的手法もちいた蛋白質発現系により車軸藻ミオシンを得ることに着手し、これに成功した (Ito, et al. 2003. BBRC 312: 958-964)。今発表では、発現させた車軸藻ミオシンの速度論的解析をストップフロー装置を用いて行ったので報告する。ミオシンの運動速度は、(ステップサイズ) / (アクチンとの結合時間) で近似される。(アクチンとの結合時間) は、(1) 1 / (アクトミオシンからのADPの解離速度定数) と、(2) 1 / (ATP結合によるアクトミオシンの解離速度定数) の和である。(1)を求めるために、ADPとアクトミオシンとの平衡解離定数を求めたところ、255 $\pm$ 17 μ Mであった。ADPのアクトミオシンへの結合速度定数は拡散の限界で定義されるので、10 μ M⁻¹s⁻¹となり、これから(アクトミオシンからのADPの解離速度定数)を求めると2550 s⁻¹となり、(1)は1/2550 = 0.4 msになる。(2)を求めるために、2次反応速度定数K₁k₊₂を求めたところ4.0 $\pm$ 0.33 μ M⁻¹s⁻¹だった。K₁はミオシンの種類によって変わらず5 $\times$ 10⁻⁴ μ M⁻¹程度なので、k₊₂つまり飽和ATP濃度での(ATP結合によるアクトミオシンの解離速度定数)は、9000 s⁻¹となり、(2)は1/9000 = 0.1 msになる。(1)と(2)からアクチンとの結合時間を計算すると、0.4 ms + 0.1 ms = 0.5 msとなる。これは、知られているミオシンのなかで最短のアクチン結合時間であり、車軸藻ミオシンの速さの秘密はここにあることが明らかになった。

K.Ito, T. Kashiyama, K. Sutoh and K. Yamamoto : Kinetic analyses of a recombinant motor domain of Chara corallina myosin

3P167

車軸藻ミオシンの1分子力学測定
—プロセッシブ運動の検討—

○野瀬 宏¹、町山 裕亮²、石島 秋彦^{1,3} (¹名大院・工・応用物理、²名大院・医・細胞生物物理、³科技振、さがけ21)

車軸藻ミオシンは、骨格筋ミオシンに比べ非常に速い滑り運動を示す。我々はその運動メカニズムを解明するために、レーザートラップ法を用いて車軸藻ミオシンの1分子力学計測を行ってきた。これまでは、ダブルトラップ系(ガラス上に固定した車軸藻ミオシンと両端を2個のトラップビーズで捕捉したアクチンフィラメントを相互作用させる系。両者共に固定されているため、ミオシンが引き起こす力の方向とアクチンフィラメントの向きが必ずしも一致しない。)において計測を行っていた。その中では、車軸藻ミオシンのプロセッシブ性を支持するデータは得られなかった(Kimura et al.2003.*J.Mol.Biol.*328,939)。しかしその後、シングルトラップ系(車軸藻ミオシンの付着したビーズをレーザートラップし、ガラス上に固定したアクチンフィラメントと相互作用させる系。トラップビーズには回転の自由度があるため、車軸藻ミオシンはアクチンフィラメントに対して変位しやすい最適な角度で相互作用できるようになる。)で計測を試みた結果、トラップビーズの変位は100 nm程度であった。これは、車軸藻ミオシンの構造から考えてプロセッシブな挙動を示唆するものだった。

今回シングルトラップ系においてさらに詳細な力学計測を行うために、ビーズ径を1 μ mから0.5 μ mにし、時間分解能及び空間分解能をより向上させて計測を行った。まず予備実験として、車軸藻ミオシン多分子が相互作用する条件で計測したところ、ATP濃度10 μ Mで、数百nmの変位を示した。また、その時の速度は約3 μ m/sであり、ガラス一面に付着した車軸藻ミオシン上を滑るアクチンフィラメントの速度と同程度であった。

今後、車軸藻ミオシン1分子が相互作用する条件で力学計測を行い、車軸藻ミオシンのプロセッシブ運動を考察し報告する予定である。

H.Nose,H.Machiyama,A.Ishijima : Single molecule mechanics of Chara myosin -investigation of processivity-

3P166

人工ネック領域を持つ単頭車軸藻ミオシンの一分子運動解析

○小嶋 寛明¹、伊藤 光二²、木村 成輝¹、山本 啓一²、大岩 和弘¹ (¹情報通信研究機構・生体物性、²千葉大・理・生物)

淡水産藻類の車軸藻ミオシンは、現在知られているモーター蛋白質の中で最速の滑り運動を引き起こす能力を持つことから、ミオシンの滑走速度の決定要因を追求する上で非常に興味深い研究対象である。近年、伊藤らは、車軸藻ミオシンの単頭変異体として、軽鎖結合領域の代わりにアクチニンをモーター領域につなげたもの(レバーアーム長:15 nm)、およびモーター領域のみのもの(同:3 nm)の二種類を細胞性粘菌を用いて発現することに成功した。これらの変異体は非常に高い運動活性を示すが、レバーアーム説からの予測に反し、アクチニン部位無しものは有りのものに比べ、滑走速度が半分程度にしか低下しないことが分かっている。本研究では、これらの運動発生機構をさらに詳しく調べるために、レーザートラップナノ計測法によって、上記ミオシンによる力発生過程を一分子レベルで計測し、解析を行なった。実験では、末端にeYFPを導入した単頭車軸藻ミオシン変異体を、GFP抗体を介して直径200 nmのポリスチレンビーズ表面に固定し、レーザートラップによってアクチンフィラメントに作用させて、ミオシン分子による力発生を誘起した。その結果、アクチニン部位の有るもの無いもの共に、アクチンフィラメントとの結合解離を反映したパルス状の変位を発生した。結合の持続時間はATP濃度に依存して変化し、5 μ M ATP存在下においては、アクチニン部位の有無でそれぞれ平均39、45 msとなり、溶液系での実験結果(ATPの二次結合速度定数:5/ μ M/s)と矛盾しない値が得られた。ここから1パルスは1 ATP分解に対応すると考えられる。変位のステップサイズはアクチニンの有無でそれぞれ20 nm、15 nmとなり、レバーアーム長の差に見合うほどの違いは見られなかった。これは滑り速度の測定結果と一致する。

H.Kojima, K.Ito, S.Kimura, K.Yamamoto and K.Oiwa : Single molecule analysis of recombinant Chara myosin motor domain with and without an actinin neck region.

3P168

化学架橋したアクトミオシン複合体のATP分解中の立体構造解析

○片山 栄作¹、野中 和哉²、梅木 伸久^{3,4}、吉沢 強志³、小口 洋介²、木森 義隆¹、丸田 晋策³、馬場 則男² (¹東大・医科研・分子構造解析、²工学院大・電気工学、³創価大・院・生物工学、⁴新潟大・院・自然科学、⁵創価大・院・生物工学)

アクチン結合状態のミオシンの構造解析は滑り運動の分子機構の理解のため必須であるが、複合体の結晶化は望み難く、実像の得られる電子顕微鏡解析が中心となる。両者の親和性が高い硬直複合体では、らせん対称性を利用した数多くの解析が行われてきたが、一たびATPを加えると親和性が大きく低下するため、構造解析は再び困難を極める。現実的には、細かい刻み、広範囲の傾斜角度で撮影した多数の画像を逆投影するトモグラフィ法以外には術がない。それでも、電子顕微鏡の試料傾斜角度の制限に由来する強いゴーストのため高さ方向の分解能は著しく劣化し、滑り運動中ミオシン頭部の高分解能構造解析は事実上不可能であった。われわれはin vitro滑り運動アッセイ系を急速凍結ディープエッチレプリカ法と組み合わせることにより、機能中のアクトミオシンの表面構造を捉えて、その立体構造の解析を進めてきたが、その過程で、従来の逆投影法とは全く異なる新しい原理の3次元再構成法の開発に至った。さらに最近のアルゴリズムの改良により、その手法はレプリカ画像以外のネガティブ染色や樹脂包埋切片試料など興行きのある構造物にも応用できることが判明した。そこで今回はアクトミオシン複合体のネガティブ染色試料にそれを適用し、その立体構造の解析を試みる。水溶性カルボジイミドで架橋したアクトS1にATPを加えるとATPaseの超活性化が起き、硬直複合体では細長かったS1の形状が丸く短くなることが知られている。滑り運動こそ起きないが、その状態におけるS1の構造は、フリーズレプリカ法で示された滑り運動中の頭部の特徴的なコンフォメーションと類似しているように思われる。そのような材料のネガティブ染色像から3次元再構成すれば、レプリカ法では観察できない複合体内部の構造変化についての新たな知見が得られるのではないかと期待し、実験を進めている。

E. Katayama, K. Nonaka, N. Umeki, T. Yoshizawa, Y. Oguchi, Y. Kimori, N. Baba and S. Maruta : Three-dimensional structure of EDC-crosslinked acto-S1 under super-activatedATPase conditions