1P133

BDM存在下におけるアクチン-ミオシン相互作用の再検討

○大槻 美里¹、秋山 直生¹、島本 勇太²、石渡 信一²、国岡 由紀¹、山田 武範¹ (¹東京理科大・理・物理、²早大・理工・物理)

【始めに】2,3-ブタンジオンモノオキシム (BDM) には筋線維を弛緩状態にする作用があると考えられてきた。また、脱膜筋線維の張力発生はBDMによって可逆的に阻害され、その作用点はアクトミオシン系であることが報告されている (Horiuti.K *et al.* 1988, Higuchi.H & Takemori.S 1992)。一方で、「BDMの作用を受けたミオシン頭部はアクチンフィラメントの対称性に従わずに結合をするために運動を阻害する」ということが筋線維のX線回折実験 (Yagi.N *et al.* 1992) により示唆された。そこで我々はBDMがアクトミオシン相互作用に与える影響を検討するために以下の実験を行った。

【結果】

(1) 原子間力顕微鏡による測定：原子間力顕微鏡を用いて、グリセリン処理したウサギ腸腰筋筋原線維の横弾性を測定した。横弾性の大きさは硬直>収縮≒BDM存在下の収縮>弛緩となり、BDM存在下でミオシンはアクチンに結合していることが示唆された。
(2) *In vitro motility assay*：希薄ミオシン濃度において、20mM BDM存在下ではアクチンの滑り速度は半減したものの、アクチンフィラメントはミオシン頭部に結合していることが示された。
(3) 光ピンセット法による測定：アクチンフィラメントの一端に結合したビーズ (直径2 μm) を光ピンセットで捕捉し、アクチンフィラメントとカバーガラス表面のミオシンとの間の力発生を観察した。BDM無添加の場合、変位は約10nm、発生力は約5pNに集中していたのに対し、20mM BDM存在下での変位は10~100nm、発生力は5~45pNと広範囲にわたって分布した。
以上の結果をもとに、アクトミオシン相互作用に対するBDMの影響を再検討する。

M.Ohtsuki, N.Akiyama, Y.Shimamoto, S.Ishiwata, Y.Kunioka and T.Yamada : Re-examinations of the Effects of BDM on the Actin-Myosin Interactions

1P135

分子モーター集合体における自律的状態制御—制御因子としてのミオシンADP複合体の役割—

○島本 勇太¹、鈴木 団²、石渡 信一^{1,3} (¹早大・院・生命理工、²早大・科健機構、³早大・理工・物理)

【背景・目的】横紋筋収縮系は、収縮と弛緩の中間活性化状態において周期的で安定な自励振動を生み出す (SPOC; サルコメア長振動の周期1-10秒、振幅200-500nm p-p)。分子モーター集合体が周期振動を発現する背景には、何らかの情報伝達を介した、分子間での確率的運動の制御機構が存在することが期待される。本研究は、滞在時間が負荷依存性であるミオシンADP複合体に注目した。この複合体は、中間活性化状態において力発生の活性化因子としての性質を顕著に現わす。そこで、ミオシンADP複合体によって誘起される力発生の性質を調べることで、負荷依存的な滞在時間の調節と、それによる自律的な活性化状態制御のしくみを明らかにする。【方法】顕微鏡下で、除膜処理したウサギ骨格筋筋原線維の両端をガラス微小針で保持し、張力発生をガラス針のフォトダイオード投影像から、サルコメア長を筋原線維の位相差像から計測した。溶液交換は、層流を用いて筋原線維周囲の溶液を高速にスイッチングすることで行った。これにより、ADP収縮条件下 (1mM MgATP, 2-15mM MgADP, 2mM freeMg²⁺, 4mM EGTA, 20mM MOPS, pH 7.0, I.S. 150mM) において、発生張力とADP結合・解離定数のサルコメア長依存性を単一サルコメアレベルで計測した。【結果と考察】通常の収縮条件においては、発生張力は分子モーター数に比例して大きくなる。これに対し、ADP収縮条件における発生張力は、アクチンミオシン間のオーバーラップ長、つまり相互作用可能な分子モーター数が減少するほど大きくなることがわかった。この結果は、ミオシンADP複合体が協同的な力発生の制御器として働いていることを示唆する。現在、力発生、弛緩速度の計測からサルコメア長依存的なADP結合・解離のキネティクスを調べており、この結果と併せてミオシンADP複合体による張力発生の自律的制御機構について報告する。

Y.Shimamoto, M.Suzuki, and S.Ishiwata : Self-regulation mechanism in an assembly of molecular motors -Regulatory role of myosin-ADP complex-

1P134

アクチンの重合阻害のメカニズム

○小田 俊郎^{1,2}、前田 雄一郎^{1,2,3} (¹理研・播磨・構造生物化学、²前田プロジェクト・ERATO・JST、³名古屋大学大学院・理・分子生物)

X線繊維回折法を用いて、F-actinの構造モデルを作成した。G-actinからF-actinへの、一番大きな構造変化は、cleftが閉まることであった。この変化は、大友らがforminとの共結晶内で発見した2回対称のアクチンポリマーのアクチンと比較して、サブドメイン2は移動しないが、サブドメイン4はフィラメントの軸方向に移動したために起こった。これにより、サブドメイン4はサブドメイン2と強く相互作用し、上のサブユニットのVal287を含む突起を抱え込むことができるようになった。また、相手側ストランドのLys113を含む領域と結合できるようになった。つまり、このサブドメイン4の移動は螺旋構造をもったアクチンフィラメントの形成に必須である。このF-actinの構造モデルをもとにアクチンの重合阻害は、2つのメカニズムの混合により説明される。(1)Actin - Actin間の結合部位のsteric blockingメカニズムであり、(2)上記の構造変化を阻害する、あるいは、この構造の安定化を妨げるメカニズムである。2番目のメカニズムは多くの阻害に係っていると思われる。Latrunculinはcleftに結合し、2つのドメイン位置を固定する。また、Cys374のTETRAMETHYLRHODAMINE-5ラベルも、2つのドメイン位置を (helix333-351とhelix137-145) 新しい配置に固定することを阻害していると思われる。Gelsolin S1などの重合阻害は、基本的にはsteic blockingであろうが、2つドメインの固定効果も無視できないであろう。

T.Oda and Y.Maeda : Inhibition of actin polymerization

1P136

トロポミオシンの領域4のアミノ酸を置換した変異体のDSC測定

○尾上 敦洋、日下部 貴久、三木 正雄 (福井大院・工・生物応用)

骨格筋のTmは相同な7つの領域からなり、筋肉の細いフィラメントにおいて7つのアクチンと結合する。Tmの領域4のアミノ酸をそれに対応する領域1のアミノ酸に14あるいは7残基置換したTm変異体を作製した。Tnの球状領域結合部位内の14残基を置換した14aaTm (152-165→33-46)、その中心7残基を置換したc7aaTm (156-162→37-43)、更にTn球状領域結合部位以外の領域4での置換の影響を調べる為のs14aaTm (134-147→15-28)、また領域234を削除したD234Tmについて、ATPase活性を比較検討した。その結果、14aaTm、c7aaTm及びD234Tmは、カルシウムの有無にかかわらず常に阻害状態を示し、s14aaはwild Tmとほぼ同じようなカルシウムによる制御を示すことを昨年度の年会において発表した(1)。これら変異Tmのアクチン結合能を共沈実験で調べると、s14aaTmはアクチン結合能が著しく損なわれており、トロポニン添加により回復することが分かった。これら変異Tm、それにアクチンを加えたものの、更にトロポニンを加えたものを示差走査熱量計(DSC)で測定した。s14aaTmはwildtypeTmと同じように2つのピークをもつ吸熱カーブを示したが、c7aaTm、14aaTm、D234Tmは1つのピークしか示さなかった。一方、アクチン存在下では、wildtypeTmは48℃付近にTm-actin相互作用による新たなピークを示すが、s14aaTmはこのピークを示さなかった。一方、c7aaTm、14aaTm、D234Tmは、wildtypeTmよりも高い温度でこのピークを示した。更に、トロポニンを加えた、Tm/Tn/F-actin複合体のDSC測定を、カルシウム有無しの条件で測定し、これら熱安定性がカルシウムによる筋肉の細いフィラメントの制御機能とどのように関連しているかについて報告する。

A.Onoue, T.Kusakabe, M.Miki : DSC measurements of tropomyosin mutants and the complex with F-actin and troponin.