1P161

細胞質ダイニンの尾部とAAAリングの相互作用

○沼田 直己、昆 隆英、大倉 玲子、須藤 和夫（東大院・総合文化・生命環境）

ダイニンはATP加水分解により生じるエネルギーを利用して微小管のマイナス端に向かって動くモータータンパク質である。ダイニンのモータードメインである重鎖はAAA+ ATPaseファミリーに属し、特徴的なリング構造をしている。ダイニンが力を発生する機構は未知であるが、近年、電子顕微鏡を用いた構造解析研究から、軸糸内腕ダイニンcでは、リング構造から突出した尾部がATP加水分解時にスイングしている可能性が示唆され、この尾部のスイングがダイニンの力発生に重要であるというモデルが提唱された（Burgess et al., Nature, 2003）。また、同研究からは、尾部とAAAリングが相互作用している可能性も示唆された。

そこで本研究では、尾部とAAAリングが相互作用しているさらなる証拠を得るために、まず、AAAリングとの相互作用に必要と考えられる、尾部のN末端領域を除いた変異ダイニンを作製し、尾部に挿入したGFPとAAAリングに挿入したBFP間のFRET効率を測定した。野生型（HFG380B2）の場合、APO状態では5%、ATP状態では25%である（Kon et al., Nature structural & molecular biology, 2005）のに対し、この変異体はいずれのヌクレオチド状態でも、16%程度であった。この結果は、尾部がATPの有無に関わらずAAAリングの近傍に留まりスイングできなくなったことを示唆し、欠失したN末端部分がリングと相互作用することで尾部のスイングが生じていることを示唆している。

このことをさらに確かめるために、尾部とAAAリングの相互作用に特に関与している可能性のある、尾部において極めて保存された二つのアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換し、この変異体についても同様にFRET効率を測定することにした。現在、コンストラクトの作製を進めており、本会ではその結果も併せて報告する予定である。

N.Numata, T.Kon, R.Ohkura and K.Sutoh : Interaction between the tail and the AAA ring structure of cytoplasmic dynein

1P163

The binding and movement of single and two molecules of cytoplasmic truncated single-headed Dynein

○ Nguyen HoaAnh¹, Kon Takahide², Sutoh Kazuo², Higuchi Hideo¹ (¹Biomedical Engineering Research Organization, Tohoku University, ²Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, University of Tokyo)

Cytoplasmic dynein composes of two identical heavy chains and moves processively along a microtubule. Recently, a functional single-headed recombinant dynein has been expressed and purified successfully (Nishiura et al, 2004). To know whether this single-headed dynein could move processively on a microtubule or not, the movement of single-headed dynein was characterized using laser trap nanometry. Dynein was mixed with 0.2 μm beads at various ratios from 25 to 1250 (dynein/beads). At low concentration of ATP (2 10mM) and low mixing ratio, the beads only bind and dissociate from the microtubule without processive movement. The binding fraction of beads was fitted to a curve of (1- exponential), indicating that single molecule of single-headed dynein binds to and dissociates from a microtubule without processive movement. At high mixing ratio, most of the beads show their processive movement on the microtubule. Based on the recent simulation method (Kamei et al, 2005), these processive movements are supported by two or more of single-headed dynein. In conclusion, the single-headed dynein is not processively moved on the microtubule but two molecules of single-headed dynein, which are separately bound on a bead, move processively.

H. Nguyen, T. Kon, K. Sutoh and H. Higuchi : The binding and movement of single and two molecules of cytoplasmic truncated single-headed Dynein

1P162

細胞質ダイニン構造変化のキネティクス解析

○最上 聡文、昆 隆英、大倉 玲子、須藤 和夫（東大院・総合文化・生命環境）

ダイニンはATP加水分解にともない微小管上をマイナス端方向にすべり運動するモータータンパク質である。ダイニンのモータードメインである重鎖は、6つのAAAモジュールを含むAAAリング、テイルおよびストロークとよばれる各機能部位からなる。そのうちテイル部位がAAAリングに対しスイング様の構造変化をおこすことが、ダイニンの力発生に重要であると考えられている（Burgess et al, Nature, 2003）。我々が行った先行研究により、テイル部位のスイング様の構造変化をBFP-GFP FRET法を用いて溶液中で捉えることができ、その結果、この構造変化はAAAモジュール1におけるATP加水分解を反映していること、およびダイニンはATP加水分解サイクル中で少なくとも2つの構造状態（State IとState II）をとることがわかった。また、ヌクレオチドアナログやATP結合部位に変異を導入した組み換えダイニンを用いた実験から、State I→State IIという構造変化はATPの結合にともない、State II→State Iという構造変化はおそらくADPの放出にともなっておこることがわかった（Kon et al, Nat. Struct. Mol. Biol., 2005）。本研究では、BFP-GFP融合ダイニンを用いて、FRETにより検出されるテイル部位の構造変化について反応速度論的解析を行った。その結果、テイル部位がおこす2度の構造変化の反応速度定数をそれぞれ決定した。また、ダイニンの定常状態でのATP加水分解における各AAAモジュールの寄与に関して、新たな知見を得た。さらに、State I→State IIという構造変化は微小管で活性化されず、State II→State Iという構造変化が微小管によって活性化されることが分かった。以上の結果は、テイル部位の構造変化がダイニンのパワーストロークであるというモデルと矛盾しないものであった。

T.Mogami, T.Kon, R.Ohkura, K.Sutoh : Kinetic analysis of the conformational changes of cytoplasmic dynein

1P164

微小管に沿った粒子のブラウン運動を許す弱い静電結合

○箕浦 逸史、武藤 悦子（理研 BSI）

微小管の表面には負電荷を帯びたアミノ酸が多く存在し、この負電荷はキネシン、ダイニンなどのモータータンパク質との「弱い静電的結合」に寄与している。モータータンパク質に限らずEF-1αなどのタンパク質も、微小管に静電的かつ非特異的に結合することが知られている。

このような微小管が関与する非特異的な静電相互作用を理解するためのモデル系として、さまざまな電荷を持つ直径100 nmのポリスチレンビーズ（荷電粒子）と微小管との相互作用を観察した。その結果、アミノ基またはアミジンを持つ正に帯電した粒子は微小管に強く結合するのに対し、カルボキシル基を持つ負に帯電した粒子は微小管に弱く結合し、微小管に沿ってブラウン運動するのが観察された。いずれの場合も結合する粒子の数は溶液のイオン強度を上げると減少し、負に帯電した粒子では、溶液のイオン強度の上昇にともない拡散係数の増大も見られた（図）。これらの結果は、正に帯電した粒子のみならず、負に帯電した粒子も微小管に静電的に結合していることを示す。

以前報告した微小管表面の対イオンの挙動（第40回年会）をもとに、この負に帯電した粒子と微小管との結合のメカニズム、およびその生理的意義について議論したい。

I.Minoura and E.Muto : Weak electrostatic binding that enables Brownian motion of particles along microtubules