2P169

線虫の2つのトロポニンCと4つのトロポニンIとの分子間相互作用

Amin Ziaul, Ruksana Razia, 高谷 智英, ○香川 弘昭 (岡山大学院・自然科学・バイオサイエンス)

線虫の筋肉は食餌に使われる咽頭筋と運動に使われる体壁筋がある。体壁筋には刺激に応じて運動する骨格筋型斜文筋と産卵、排泄に使われる陰門筋、肛門筋がある。トロポニンCは咽頭筋と体壁筋それぞれ一つの計2個の遺伝子でコードされている。トロポニンIは咽頭筋型が一つで、体壁筋型は3つの遺伝子でコードされた3つのアイソフォームからなる。それぞれの遺伝子の発現場所は遺伝子上流と蛍光蛋白質GFP遺伝子を融合させたレポーター遺伝子の線虫個体への導入によって調べた。2つのトロポニンCと4つのトロポニンIの相互作用をそれぞれの蛋白質を大腸菌内で生産させてメンブレンにプロットした後、別途生産した蛋白質を反応させて解析した。検出には2つのトロポニンCと2つのトロポニンIの抗体で検出した。咽頭筋トロポニンCはすべての体壁筋型トロポニンIと反応したが、体壁筋トロポニンCは体壁筋トロポニンIとしか反応しなかった。アイソフォームのアミノ酸配列比較ではその原因は特定出来なかったが、体壁筋型トロポニンIには他の生物では見られない線虫特有のC末端の伸長が見られた。トロポニンIのN末端ペプチドとC末端ペプチドを大腸菌で生産して、トロポニンCやトロポミオンとの反応性を同様の蛋白質オーバーレイ法で検出しているためそれらの結果についても報告する。

Z. Amin, R. Ruksana, T. Takaya and H. Kagawa : Molecular interaction between two troponin C and four troponin I of *Caenorhabditis elegans*

2P171

高分解能単粒子追跡法を用いた細胞内におけるモーター蛋白質のステップ観察

○渡邊 朋信、樋口 秀男 (東北大・先進医工)

我々はこれまでに、小胞輸送のメカニズムを解明するため、*in vitro*におけるモーター蛋白質1分子の運動を観察してきた。しかし、細胞内には、塩強度、調節蛋白質、細胞骨格、細胞質の粘弾性など、*in vitro*とは異なる要素が含まれている。そこで、我々は、新しい計測装置、方法を開発し、細胞内における小胞輸送をnm,msの精度で直接観察した。まず、我々は、膜蛋白質(HER2; Human EGF Receptor 2)を抗体を介して、量子ドットによって蛍光標識し、その運動を三次元的に追跡した。その結果、HER2の輸送は、主に細胞膜に沿った運動と細胞核に向かう運動により構成されていることが明らかとなった。さらに、これら二種類の運動を新たに開発した μ s-FIONA法によって追跡した。 μ s-FIONAの時間空間分解能は、1.9nm/330 μ sであった。その結果から、我々は、細胞膜に沿った運動は、16nm,29nmのステップにより、細胞核に向かう運動は、連続した8nmのステップにより構成されていることを発見した。運動の局在、方向から、細胞膜に沿った運動はmyosin VI、細胞核に向かう運動はdyneinが担っていると考えられる。

TM Watanabe and H Higuchi : Observation of stepwise movements of motor proteins in living cells using new FIONA method

2P170

ブラウンモーターモデルのエネルギー消費率: 揺らぎと応答の測定から

○原田 崇広¹、佐々 真一² (¹京大院・理、²東大総合文化)

分子モーターの運動を一分子で解析する実験技術の発展はこれまで様々な知見をもたらしてきたが、一方で、そうした実験手法によって得られる情報は限られている。例えば線形モーターでは多くの場合、分子モーターに取り付けられたビーズの位置のみが主な測定データである。しかしこうした測定データから、例えば分子モーターの重心運動に使われているエネルギーの量などを直接評価する事はこれまで難しく、分子モーターのエネルギー論について、実験データに基づいた十分な議論が行われてきたとは言えない。本発表では簡単なモデル系としてのブラウンモーターモデルについて、一分子力学測定によって測定しうる物理量を元に、その重心運動において単位時間あたりに消費されているエネルギーを見積もる方法を提示する。ここで重要になる物理量は、モーターの重心の平均速度 v_0 、速度揺らぎの相関関数 $C(t)$ 、また時間変化する微小な外力に対する応答関数 $R(t)$ である。我々は、モーターの重心運動において単位時間あたりに消費されるエネルギー J は、これらの物理量と

$$J = \gamma \left\{ v_0^2 + \int_{-\infty}^{\infty} [\tilde{C}(\omega) - 2k_B T \tilde{R}(\omega)] \frac{d\omega}{2\pi} \right\} \quad (1)$$

という関係にあることを見いだした [1]。ここで γ はモーターの粘性係数であり、 $\tilde{C}(\omega)$ などはFourier変換である。これはモデルの詳細にはよらずに、普遍的に成立する関係式になっている。実際の分子モーターでもこのような関係式が成立するかどうかは今後さらなる検討が必要であるが、我々の結果が分子モーターのエネルギー論に対して実験的に切り込む足がかりを与えられることを期待する。

[1] T. Harada and S.-i. Sasa, *submitted*; cond-mat/0502505.

T. Harada and S.-i. Sasa : Rate of energy dissipation of Brownian motor models - estimation by quantifying the correlation and the response functions

2P172

1分子のF₁-ATPaseにおける触媒サブユニット β のコンフォメーション変化の検出

○政池 知子¹、吉田 賢右^{2,3}、大岩 和弘⁴、西坂 崇之¹ (¹学習院大・理、²東工大・資源研、³ERATO 吉田ATPシステム、⁴情報通信研究機構)

F₀F₁-ATP合成酵素はADPと無機リン酸からATPを合成する反応を触媒する。この酵素のF₁部分はそれのみでATP加水分解活性を持つためF₁-ATPaseと呼ばれる。F₁-ATPaseの部分複合体 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の中心軸である γ サブユニットは、触媒サブユニット β におけるATP加水分解反応に伴って回転することが知られているが、その駆動機構は未だ明らかになっていない。近年解かれたいくつかの結晶構造から、 β が複数のコンフォメーションを取りうる事が分かった。また、NMR、Cysteinクロスリンク、Tryptophan蛍光測定などの手法により、ATPase反応中に β のC末端ドメインが構造変化することが示唆された。しかし、実際に γ が回転中の β の構造変化を検出した例は報告されていない。それは、 β の構造変化に加え、 γ の回転も同時に検出する必要があるからである。又、順々に起こる3つの β の構造変化の重ね合わせではなくひとつだけを見分ける事も必須である。そこで、本研究では光学顕微鏡を用いて γ の回転と β の構造変化の同時観察を行い、活性を持った回転する1分子の β の構造変化を結晶構造と照らし合わせて議論することを試みた。 γ の先端にはポリスチレンビーズを結合し、明視野で120°おきのstep状回転を確認した。 β は3つのうち1つのみに蛍光分子を標識し、偏光したエパネッセント場により蛍光1分子の向きを検出した。その結果、 γ が120°おきの3箇所に滞在する時の β のコンフォメーションの違いが検出された。

T. Masaïke, M. Yoshida, K. Oiwa and T. Nishizaka : Visualisation of conformational changes of the catalytic subunit beta in F₁-ATPase at the single-molecule level