2P189

微小管系超分子構造体における MAP2/MAP4/tau スーパーファミリーの機能

○徳楽 清孝¹、野口 太郎^{1,2}、西江 真希子¹、松島 一幸²、小谷 享³ (¹都城高専・物質工、²産総研・ジーン、³神奈川大・理・生物)

真核細胞では微小管と多種多様な微小管結合蛋白質との相互作用により、複雑で精巧な細胞機能が営まれている。微小管と単一の結合蛋白質のみで構成される細胞機能はほとんど無く、多くの場合、複数の結合蛋白質同士がお互いに影響し合うことで機能できる。従って、生命システムの原理を理解するためには微小管と複数の結合蛋白質によって構成される超分子構造体全体の性質や機能を解明する事が必要である。これまでに様々な微小管結合蛋白質が発見され、それらの構造や微小管との相互作用機構が明らかにされてきた。今後はこれらの知見を礎として、微小管結合蛋白質同士の相互作用を含めた超分子構造体としての研究が進むだろう。これまで我々は、微小管結合蛋白質の 1 グループである MAP2/MAP4/tau スーパーファミリーを材料に研究を行い、これらの微小管結合機構および重合促進機構について明らかにしてきた。最近では、選択的スプライシングによって生じる複数の MAP4 アイソフォームの単離に成功し、これらアイソフォームが結合した微小管表面の状態がお互いに異なることを明らかにした。微小管の表面状態の変化は当然他の結合蛋白質と微小管との相互作用にも影響するだろうという推測を元に、微小管に結合したアイソフォームの種類によってキネシンの運動に何らかの影響が生じるかどうか解析を行った。その結果、あるアイソフォームだけがキネシンの運動を阻害することが明らかになった(野口ら、西江ら、本大会で発表)。現在、キネシンの運動阻害機構の解明、さらにはダイニンの運動に与える影響について解析を行っている。本発表では、我々のグループによる従来の研究成果や最新の研究成果をまとめ、微小管系超分子構造体が関与する細胞機能に MAP2/MAP4/tau スーパーファミリーがどのように関与しているのか考察する。

K. Tokuraku, T. Noguchi, M. Nishie, K. Matsushima and S. Kotani : Function of MAP2/MAP4/tau superfamily in microtubular supramolecular-structure

2P191

アクトミオシンの分子間相互作用エネルギー地形

○高野 光則 (早大・理工・物理)

ミオシン分子がアクチンフィラメント上を 1 次元ブラウン運動的に、そしてアクチンモノマーサイズに相当する歩幅でステップ状に移動していることが 1 分子計測実験 (Kitamura et al. 1999) により示された。このメカニズムを探るため、我々は、アクチンおよびミオシンの立体構造を考慮した蛋白質モデルを用い、1 分子実験に対応するよう、アクチンフィラメントとミオシン 1 分子から成る系を構成し、分子動力学計算を行った。その結果、1 分子実験と同様、ミオシン分子のステップ状の運動が観測された。アクチンフィラメント-ミオシンの相互作用エネルギーの時間変化を追うと、静電相互作用によってミオシンがアクチンフィラメントに繋ぎとめられていることが分かった。ステップ時、すなわちミオシンが隣のアクチン分子に移るとき、静電エネルギーが一時上昇するが、それでもまだ負である(すなわち、弱く結合している)ため、ミオシンがアクチンフィラメントから解離することなく、ステップ状の連続運動が可能になっている。このように、1 次元のステップ状のブラウン運動がアクチン-ミオシン間の静電相互作用で実現できることが分子動力学計算でも示されたが、肝心の運動の一方方向性についてはさらなる考察を要する。相互作用の非対称性が必要条件であることは明らかだが、ではそれが具体的にどのようになっているのか? アクチンフィラメントのらせん構造のため、フィラメントに沿ってアクチン、ミオシンの相対配置が変化し、その結果、相互作用の非対称性が生じる (Kitamura et al. 2005) のか? そこには Folding も含む広い意味の構造状態変化 (Terada et al. 2002) も関与してくるのか? これらを探るべく、アクチン-ミオシン間の相互作用エネルギー地形を調べる。

M. Takano : Energy landscape of the interaction between an actin filament and a myosin molecule

2P190

アクチン再結合に伴うミオシン S 1 の新たな中間体構造の検出: プロダン蛍光による経時的解析

○上田 太郎¹、梅木 伸久²、丸田 晋策²、片山 栄作³ (¹産総研・ジーンファンクション、²創価大・工、³東大・医科研)

アクトミオシンの力発生に伴うクロスブリッジ構造変化の実体は未解明である。われわれは in vitro 運動中の骨格筋ミオシンクロスブリッジを急速凍結電顕法で観察し、アクチンと相互作用する頭部の大半がアクチンを抱き込むように屈曲しているが、その屈曲方向は従来から知られていた ATP 結合型とは逆方向であり、pPDM による SH1-SH2 架橋ミオシンに酷似することを報告した。また、伸展すればそのまま硬直複合体に至る向きで結合した同じ構造の頭部も見出し、これが未知の pre-stroke クロスブリッジの構造であろうと示唆した (片山ら 2003)。トリ骨格筋 S1 による予備実験で、Prodan-S1 に ATP を添加すると蛍光は 454 nm から 6 nm blue-shift し、強度も約 7 倍増大するが、Prodan-pPDM-S1 では蛍光がさらに 5% 増大したので、Prodan 蛍光を指標に逆方向へ屈曲した新規中間体を追跡できる可能性を考え、以下の実験を行った。平塚 (1998) によれば、ウサギ骨格筋 S1 の Prodan-M.ADP.Pi は 445 nm をピークとする蛍光の強い状態にあり、生理的条件下でアクチンを添加しても Prodan-M.ADP.Pi の蛍光に影響しなかったという。そこでわれわれは、ATP 存在下のアクト S1 相互作用を増強したところ (2 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Hepes pH 7.4, 5 °C)、Prodan-ウサギ S1 の 445 nm 蛍光が 24 uM アクチン添加により 15% 上昇することを見出した (Prodan-アクチンの寄与補正済み)。Stopped-flow 解析により、この Prodan 蛍光上昇はトリプトファン蛍光上昇より遅れるので、A.M.ADP.Pi 状態のクロスブリッジの一部は Prodan 蛍光が特に強い状態にあることが示唆され、逆方向へ屈曲した新規中間体クロスブリッジの生理的意義が支持された。なお、生理的条件下ではアクチン結合 S1 の量比が低いことため蛍光増加が検出困難であったと思われる。

T.Q.P.Uyeda, N.Umeki, S.Maruta and E.Katayama : A novel structural intermediate of S1 during re-association with actin: time course analyses using prodan fluorescence

2P192

軽鎖カルモジュリンは高等植物ミオシン XI のプロセッシビティを制御する

○富永 基樹¹、小嶋 寛明¹、横田 悦雄²、中森 鈴奈¹、浅野 陽介²、倉富 敏史³、新免 輝男²、大岩 和弘^{1,2} (¹情報通信研究機構・生体物性、²兵庫県立大院・生命理・生命、³長岡技科大・生物機能)

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、Ca²⁺ 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 Ca²⁺ で処理すると、軽鎖であるカルモジュリンが可逆的に解離し、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 Ca²⁺ 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、Ca²⁺ 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回転弾性と電子顕微鏡による観察から、ネックから 1~2 個の CaM が解離し、さらにその部分がシェリリンクすることによってネックが約 30% 短くなることが示された。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、ステップサイズも低負荷 (0-0.5 pN) で 27 nm、高負荷 (0.5-1 pN) で 22 nm と負荷に依存して小さくなった。未処理のミオシン XI の 35nm ステップには負荷依存性は見られなかったことから、Ca²⁺ 存在下ではネックが負荷に対するセンサーとして機能していることが示唆された。以上より、CaM の解離によるネック部位の弾性や長さの変化が、ミオシン XI のプロセッシブ運動を制御していることが示された。

M. Tominaga, H. Kojima, E. Yokota, R. Nakamori, Y. Asano, T. Kuradomi, T. Shimmen and K. Oiwa : Calmodulin light chains regulate the processivity of higher plant myosin XI