

構造から探る
アクチン・ミオシン系エネルギー変換の
分子機構

安永卓生

概要

生物は、アデノシン 3 リン酸(ATP)が加水分解されアデノシン 2 リン酸(ADP)になる時に解放される化学エネルギーを使って様々な生物活性を実現する。そこで、化学エネルギーを、目的とするエネルギーに変換するメカニズムが必要となる。これを担うものはタンパク質である。筋収縮に関わるアクチン・ミオシン系タンパク質は真核生物に普遍的に存在するタンパク質である。このタンパク質により、ATP の加水分解反応の化学エネルギーが「アクチンとミオシン間の滑り運動」の力学エネルギーに変換される。この化学-力学エネルギー変換能をもつタンパク質は分子モーターと呼ばれる。本論文では、「エネルギー変換」という興味深い物理現象を示す分子モーターを対象として、モーター機能を担うタンパク質構造の観点から、そのメカニズムに迫る研究を行った。

現在、滑り運動のメカニズムには、モータータンパク質は、化学反応サイクルに対応してミオシンが構造を変化するという「マクロなエンジン」(爆発反応状態と車軸回転が直接カップルする)であるという考え方と、熱揺らぎを利用した「マックスウェルのデーモン型」(タンパク質構造の異方性と ATP のエネルギーがデーモン役を果たす)の熱機関であるという考え方の大きく 2 種の考え方がある。どちら場合にもミオシンあるいはアクチンの構造がエネルギー変換を行うのに重要な役割を果たすことは明らかである。

そこで、本論文では、クライオ電子顕微鏡を用いて溶液中でのアクチン、ミオシン及びその複合体の構造研究を行った。また、蛍光エネルギー移動の情報と他の構造情報を結びつけて、タンパク質の特定部位の三次元的な位置を同定するための新しい解析法(確率的距離幾何学法: probabilistic distance geometry 法)を開発し、ミオシン及びアクチンの構造解析に適用した。その際、電子顕微鏡像の解析法等の開発を迅速かつ容易に拡張でき、開発した処理法が有効に集積可能な画像処理システム (Eos) を構築した。このシステムは、国際的に他の研究機関でも用いられている。

第一に、クライオ電子顕微鏡法を用いて、アクチンがフィラメントを形成した際に放出される無機リン酸がアクチンフィラメント構造に与える影響を調べた。まず、マクロな量としてのアクチンの曲げ弾性を、非晶質の氷(vitreous ice)の中に急速凍結されたアクチンフィラメントの電子顕微鏡像から持続長を測定することにより決定した。その結果、無機リン酸濃度が上昇するにつれてアクチンが硬くなり、その見かけの無機リン酸の解離定数は 10 mM 程度であった。また、MgADP 結合型アクチンフィラメントに比べて、ATP 加水分解直前の状態のアナログである MgAMPPNP 結合型アクチンフィラメントでは非常に長い持続長を持った。これらのことは、アクチンがフィラメント化した際に、ATP を加水分解し無機リン酸を放出すると、次第に柔らかくなることを意味している。また、この曲げ弾性に影響を及ぼすのに必要な無機リン酸の濃度は、筋繊維で測定される最大張力の減少に必要な濃度とほぼ一致し、張力発生に対するアクチンの構造の影響を考慮する必要があることが分かった。また、MgAMPPNP 結合型アクチンと MgADP 結合型アクチンの三次元構造を電子顕微鏡像から再構成し比較すると、アクチンの第2サブドメインに構造変化が限局していることが分かった。また、構造揺らぎの様子も変化していると推定され、こうした構造変化・構造揺らぎの変化がアクチンの曲げ弾性、アクチン・ミオシン系の張力発生に影響を与えていると予測される。

こうしたアクチンの中での構造変化をアミノ酸レベルで吟味するため、Ambivalent 配列予測法を用いた。アクチン構造変化に関わるスイッチ領域を探索したところ、アクチンの第三サブドメインから第四サブドメインにいたるループ領域と、アクチンのカルボキシル末端領域(C末端領域)が候補となった。後者は今回得られた構造揺らぎモードの変化に対応する領域と一致した。今後、分解能の向上により、こうした配列構造からの予測と実際の三次元構造変化を結びつけることができるものと考えられる。

C末端近傍に存在する Cys374 (アミノ末端から 374 番目にあるシステイン残基)は、

アクチン構造研究において重要な情報を与えてきた。しかし、Ambivalent 配列予測は、環境による構造変化がこの領域に生じやすいことを示しており、蛍光分子などによる化学標識の結果、Cys374 を含むC末端領域の構造変化が誘起される可能性を考慮する必要がある。一方で、X線結晶解析からも、Cys374 が重原子標識された場合に近傍の構造が大きく変わっていることが報告されている。

そこで、前述の確率的距離幾何学法 (probabilistic distance geometry) を適用し、アクチンの Cys374 の位置を計算した。その結果、Cys374 の位置は、それが標識されていない結晶構造と、 20 \AA 以上異なっていた。この解析法は、後に述べるようにミオシンの構造変化や筋収縮制御機構の構造解析においても有効であった。このC末端構造の変化をクライオ電子顕微鏡法で確認するにも、電子顕微鏡像の分解能の向上が求められている。

第二に、モータータンパク質であるミオシンに関して、以下の研究を行った。

まず、ミオシンの構造変化を捉える為に、N末端及びC末端に蛍光性タンパク質を融合したミオシンを用いた (鈴木等との共同研究)。両末端に融合した蛍光性タンパク質間の蛍光エネルギー移動により、ATP 及び ADP 存在する時、それぞれ、ミオシンの溶液構造が異なることが分かった。この段階では、ミオシンのX線結晶構造として2つの異なる構造の存在が明らかとなっていたので、これらについて確率的距離幾何学法 (probabilistic distance geometry) により、それぞれ、溶液中での MgADP 及び MgADPPi を結合したミオシンの構造としてよく対応することがわかった。この時、加水分解反応に伴うミオシンの構造変化は滑り運動の向きと一致しており、「マクロなエンジン説」と無矛盾であった。その後、ミオシンの第三の構造が結晶構造により見出された。そこで、その第三の構造を検証したところ、MgADP 及び MgADPPi を結合したミオシンの蛍光エネルギー移動から得られた距離を説明できなかった。したがって、ミオシンの第三の構造は過渡的状态を捕捉したものであると考えられた。しかし、蛍光エネルギー移動から得られた構造は多数の分子の平均である点に疑問が残

った。

そこで、クライオ電子顕微鏡法を用いて溶液内での単一分子構造を明らかにするために、新しい画像解析法（ホログラフィック像再構成法）の開発を行った。このホログラフィック像再構成法を用いて、ミオシン頭部の像をクライオ電子顕微鏡法によりコントラストが高くかつ 2 nm 程度の分解能を確保しつつ撮影することに成功した。この時、ヌクレオチドが結合しない、同一化学状態でも、2つ以上の構造が混在していることが分かった。特に、軽鎖結合部位とモータードメインとの相対配置が変化していることが分かった。このことは、蛍光エネルギー移動の結果と合わせると、「ミオシンは二つ以上の構造の平衡にあり、この平衡が化学反応状態に応じてシフトする」と考えるべきであろう。

次に、同様の手法を用いて、アクチン・ミオシン硬直複合体の三次元構造を得た。分解能が 2 nm より良くなったので、ミオシンがアクチンと結合する際、ミオシン内の2つのドメイン構造（Lower 50K と Upper 50K と呼ばれる2つのドメイン）がその配置を変えることがわかった。この相対的な配置変化により2つのドメイン構造の間にあるクレフトがより大きく開くようになった。その結果、ATP の加水分解で生じた無機リン酸の放出が容易になる。この変化こそがエネルギー散逸（反応の不可逆性・滑り運動の一方向性）が生じる原因であり、エネルギー変換の鍵となると考えた。この時、現在の分解能では、ミオシンの2つのドメインは、それぞれ単独に吟味すると、X線結晶解析の結果得られた原子モデルと良く一致していた。このことは、ミオシンの原子モデルでも示唆されているように、Lower 50K と Upper 50K と呼ばれる2つのドメインはそれぞれ一つの構造体として働き、変化するのはそれらの相対的配置の変化であることを意味している。したがって、力学反応を説明するためには、二つのドメイン間を、化学状態などに応じて力学的特性が変化するバネでつないだモデルが有効であると考えられる。

現在の情報を使って、ミオシン・アクチン系がエネルギー変換を行う分子メカニズ

ムを以下のように考えられる。ミオシンは2つ以上の準安定的な構造をとることができ、それらの構造の間でミオシンは構造を可逆的に遷移する。それぞれの構造での滞在時間が、ミオシンの化学状態（特に結合したヌクレオチド、リン酸）やアクチンとの結合により変化し、構造の平衡がシフトする。この平衡のシフトをバネ定数の変化として、天秤棒の支点、力点、作用点の関係が変化すると考えることは有効であろう。また、アクチンとの結合による無機リン酸の放出は、ミオシンへの無機リン酸の再結合がほとんど不可能であるが故に、無機リン酸の結合状態の変化を伴う構造間の平衡のシフトを不可逆的なものとし、滑り運動の一方向性を確実に起こすことができると考えられる。2つの準安定的な構造を可逆的に遷移できるが、その2つの平衡のシフトに不可逆性をもたらすような「マックスウェルのデーモン型」の考え方が必要である。

今後、更に、ミオシン、アクチン及びその複合体の三次元構造を、二次構造（特に α ヘリックス）の配置が認識できる分解能(~ 0.9 nm)まであげることにより、原子モデルとより直接的に比較することができるようになり、詳細な分子メカニズムを明らかにすることができると考えられる。

目次

構造から探る アクチン・ミオシン系エネルギー変換の 分子機構.....	1
概要	2
目次	7
緒言	10
アクチンとミオシン	11
アクチン	11
ミオシン	13
滑り運動のメカニズム	15
これまでになされてきた研究	17
In vitro motility assay (滑り運動の再構成系) による実験	18
ミオシンの構造変化	19
本論文の概要	20
実験	22
試料	22
アクチン	22
ミオシン	22
アクトミオシン硬直複合体	23
方法	23
クライオ電子顕微鏡法	23
電子顕微鏡法を用いた構造解析のための画像処理システムの開発	24
アクチンフィラメントの硬さの測定	26
ホログラフィイク像再構成法の開発	26
確率的距離幾何学法 (Probabilistic distance geometry 法)	27
アクチン Cys374 の位置の同定	29

ミオシンの溶液中の構造と化学状態との対応.....	30
らせん対称性を用いた三次元再構成.....	36
らせん対称性を用いた三次元揺らぎ情報の抽出.....	38
第 I 章 アクチンフィラメントの構造.....	40
I-1 序.....	40
I-2 結果.....	41
無機リン酸の濃度の違いによるフィラメントの硬さの変化.....	41
アクチンフィラメントの構造情報.....	42
アクチンフィラメントの構造揺らぎの情報.....	42
アクチンの構造揺らぎと Ambivalent 配列.....	43
ラベル導入によるアクチンC端の構造変化.....	44
I-3 考察.....	47
アクチンの硬さと無機リン酸濃度.....	47
リガンドによるアクチン分子の構造変化及び揺らぎ.....	50
第 II 章 ミオシンの構造.....	52
II-1 序.....	52
II-2 結果.....	53
FRET により同定されたミオシンの溶液中での構造.....	53
ミオシン単一分子の構造.....	56
II-3 考察.....	58
ミオシン分子構造の多型性.....	58
第 III 章 アクチン・ミオシン複合体の構造.....	61
III-1 序.....	61
III-2 結果.....	61
アクトミオシン硬直複合体の研究.....	61

Upper 50K と Lower 50K の配置	63
アクチンC末端付近とミオシンの相互作用様式	64
III-3 考察	65
アクチンによるミオシンの無機リン酸放出の活性化	65
ミオシンとの結合によるアクチンC末端の構造変化	66
第IV章 アクチン・ミオシン系の分子機構	67
滑り運動のエネルギー変換の分子メカニズムは何か?	67
電子顕微鏡法の改良の必要性	70
残された構造解析の課題	70
結論	72
謝辞	73
参考文献	74
図及び表	96

緒言

生物は、自由エネルギーを使ってエントロピーの減少を起こし、それを「情報」と「構造」の形成に利用している。それらの「情報」や形成された「構造」をその進化の過程で発展させ、細胞内で「物質を輸送する」ための道具を手に入れた。原始的な輸送手段は、その後、効率的な物質の輸送や、情報の伝達、ひいては形態形成に至るさまざまな機能へと進化した。「エネルギー変換」は生物の持つ多様性発現の重要な機能の一つであると考えられる。そこで、本論文では、生物の実現した「ものを輸送する手段」の分子メカニズムを明らかにしたい。

この「輸送する手段」を担うタンパク質は「モータータンパク質」と呼ばれるが、この中では、「アデノシン3リン酸(ATP)」と呼ばれる分子が「エネルギーの貨幣」として、化学エネルギーを提供し、ものを動かすという力学エネルギーに変換される。この「化学-力学エネルギー変換の物理現象」は興味深い。

ATPの加水分解反応を支配する物理学は、量子力学・量子化学である。モータータンパク質は、その構造が作り上げる環境による摂動をATPに与えることにより、加水分解反応の素過程の反応速度を変化させる。この加水分解反応を通して解放された自由エネルギーは力学反応過程へ伝達され、力学的エネルギーへと変換される。そして、最終的に、力発生や滑り運動活性という生物活性を生じる。このエネルギー変換の過程は、「量子力学」、「非平衡統計力学」をはじめとして数多くの物理的な洞察が必要な過程である。「フェルマーの大予想」がその証明の過程を通して多くの新しい数学が必要であったのと同様に、この「エネルギー変換」過程のメカニズムを明らかにしていくには、多くの新しい物理学的観点が必要となると考えられる。

以上の観点から、本論文では、基本的な生物活性を担い、また、「エネルギー変換」という興味ある物理現象を担っているタンパク質であるモータータンパク質の研究を行うことにした。特に、筋肉は、モータータンパク質の機能発現の中心的活性である「物を動かす」という意味でもっとも特化した器官の一つである。ここでは、「ア

クチン」と「ミオシン」という二つのタンパク質が互いに滑り合うことにより、筋収縮という機能が発現している(A.F. Huxley and Niedergerke, 1954; H.E. Huxley and Hanson, 1954; A.F. Huxley, 1957; H.E. Huxley, 1969; Lynn and Taylor, 1971; Huxley and Simmons, 1971; Cooke, 1986)。本論文では、アクチン・ミオシン系というモータータンパク質系に焦点を絞って研究を行った。

アクチンとミオシン

アクチンとミオシンの研究は、生物学の研究において、単に筋収縮研究にとどまらない。これらは、真核生物に普遍的に存在するタンパク質であり、タンパク質合成、DNA 合成、細胞分裂、細胞運動をはじめとして多くの生物活性を担っている。また、最近では、原核生物においても、立体構造が類似しているタンパク質が見つかっており、生命の進化を考える上でもランドマーク的な存在であると考えられる。

また、滑り運動を考えるメカニズムには、モータータンパク質は、化学反応サイクルの化学状態変移に対応してミオシンが構造を変化するという「マクロなエンジン」(爆発反応状態と車軸回転が直接カップル：タイトカップリング)であるという考え方と、熱揺らぎを利用した「マックスウェルのデーモン型熱機関」(タンパク質構造の異方性と ATP のエネルギーがデーモン役：ルースカップリング)であるという考え方の大きく異なる2種の考え方がある(図1)。どちら場合にもミオシンとアクチンの構造がエネルギー変換を行うのに重要な役割を果たすことは明らかである。

アクチン

アクチンは、真核生物内で非常に良く保存されているタンパク質である(Protein profile: actin を参照)。通常、90%以上のアイデンティティ(一次配列の一致度)がある。50-60%のアイデンティティを持つものは、ARP (actin-related

protein) と呼ばれ、異なるタンパク質として分類されている。アクチンモノマーの三次元構造 (図 2) は、ヘキソキナーゼ (Fletterick *et al.*, 1975) や Hsc70 に似ている (Flaherty *et al.*, 1990; Flaherty *et al.*, 1991)。また、最近では、原核生物に存在する dnaK タンパク質 (Zhu *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1997) や FtsA (van Den Ent and Lowe, 2000) との構造の相同性が指摘されている (Bork *et al.*, 1992)。これらはすべて ATP を結合する。ヘキソキナーゼでは ATP の加水分解と関連した大きな構造変化 (2 つのサブドメイン間クレフトの開閉) が観察されている。したがって、ATP 加水分解サイクルに伴って構造変化を引き起こすことがその機能発現にとって重要なタンパク質ファミリーの一つを形成しており、アクチンはそのファミリーの一員である。

図 3 (a) に示すように、アクチンは生理的イオン強度下では重合し、フィラメント構造を形成する (Carlier MF, 1991)。細胞内ではプロフィリンやチモシン β などと結合することにより、脱重合状態 (G-form actin, actin-monomer, actin-protomer と呼ばれる) をとることができる。脱重合時には ATP の加水分解反応は非常に遅く、律速段階となっているので、ATP 結合型の構造をとっている。重合すると、加水分解反応は活性化され、リン酸を放出した ADP 型の構造をとる (Carlier MF, 1990)。ADP 型のアクチンは ATP 型のアクチンに比べて脱重合速度が速いことが知られており、微小管における GDP 型チューブリン (ヌクレオチドとして GTP) と同様な性質を示す。

アクチンフィラメント (F-actin) は、図 3 (b) に示す様に約 70-80 nm のピッチ (約 36 nm の half-pitch, クロスオーバーとも呼ぶ) をもつ二重らせん構造をしている (Hanson and Lowey, 1963; Moore *et al.*, 1970; Egelmen, 1985; Aebi *et al.*, 1986; Milligan *et al.*, 1990)。Holmes 等によって、アクチンフィラメントの配向ゲルの X 線散乱パターンとアクチンモノマーの原子モデルを組み合わせることによりアクチンフィラメントの原子モデルが提唱されている (Holmes *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 1993)。

アクチンは細胞骨格系を構成する主要成分であり、細胞の形態形成や細胞分裂・細

胞運動を行う際に重要な機能を担っている。ミオシンを相互作用の相手とするのみならず、細胞質に発現したタンパク質の50%は何らかの意味でアクチン結合タンパク質であるといわれるほど、多くのアクチン結合タンパク質が存在している。したがって、アクチンの構造情報を明らかにすることは、多くの生物活性に関わる反応の基礎構造の研究につながるため有効であると考えられる。また、物理学的には、アクチンは一次元周期性をもつ構造体として興味深く、ソリトンがアクチンフィラメントの様なタンパク質一次元周期性構造体上に形成する可能性も示唆されている(Jardetzky and King, 1983; Xiao-Feng, 2000)。この現象は生物がエネルギーや情報を伝達する際に重要な物理的背景を与え、また、生物はその現象を積極的に利用しているかもしれない。

ミオシン

本論文で対象としたモータータンパク質ミオシン(図4、5)では、その中核となる構造がGタンパク質などのPループ(GxxGxGKTの配列からなるATP, GTPを含むヌクレオチド結合タンパク質に共通のモチーフの一つ)をもつタンパク質群と共通である(図6)。したがって、一つのP-ループ構造ファミリーであり、また、アクチンと同様に、ATPの加水分解反応に関連してタンパク質の構造変化を引き起こすことのできるタンパク質ファミリーの一つである。この時、ATPの加水分解に伴う構造変化のメカニズムは、Pループ構造ファミリー共通のものであると考えられている。

ミオシンには、図7に示すように数多くの同類のタンパク質が存在する。共通点は、アクチンフィラメントと結合し、ATP依存的な結合解離・滑り運動を起こすということである。本論文では、筋肉を構成しているミオシンであるミオシンII (conventional myosin : 図4)を中心に研究を進める。

ミオシンIIは、図4に示すように、大きく分けると、モーター活性を持つS1(サブフラグメント・1: ミオシン頭部)と呼ばれる部分とフィラメント形成に必要なロッ

ド(ミオシン尾部：S2+LMM)と呼ばれる部分からなっている。本論文ではこのS1の構造に焦点をあてた。

Rayment 等により 1993 年にミオシンの X 線結晶解析による原子モデル (図 5 a) が発表された(Rayment et al., 1993a)。ミオシンの構造は、その活性部位がガン遺伝子として有名な ras(Milburn et al., 1990)やタンパク質延長因子 (Elongation Factor G) 等の G-protein と呼ばれるタンパク質の構造と似ている。特に、P-loop, switch I, switch II 及び switch II の C 末端側の α ヘリックスにつながる 4 つの β シート構造からなる α/β 型構造は酷似している (図 5 b, 図 6 a-d)。また、その後解かれたキネシン (Kull et al., 1996) や ncd と呼ばれる微小管上を動くモータータンパク質の構造とも似ていることが分かった (図 6 b, c)。モータータンパク質の進化をこれらの構造から議論する報告もなされた。(Kull et al., 1998)

その後、10 種を超える構造が解かれたが、そのどれもが大きく 2 つの構造 (図 8 A:赤と緑) に分類されてきた。二つの構造 (図 8 B, C) を比較すると、N 端ドメインの側面をリレー領域の動きに応じて、コンバータードメインが回転し、それに伴ってレバーアームが動くことが分かる。このリレー領域は、ras 等では switch II という領域にあたり、ATP の γ 位リン酸のセンサーとして知られている。したがって、エネルギー変換の仕組みを考える上で興味深い領域である。

Houdusse 等により、最近、第三の構造 (図 8 A:水色,図 9 D) がホタテ貝ミオシンで解かれた(Houdusse et al., 1999)。この構造は SH1-SH2 ヘリックス (図 5 : 青色のヘリックスの一つ: SH1, SH2 はミオシンに存在する反応性の高い 2 つのシステイン) がほどけている。これまで、生化学的研究により、ATP 存在下において SH1-SH2 間の架橋がかかることが知られていたが、 α ヘリックスではそれらの距離が遠く、架橋は困難なはずである。第三の構造では α ヘリックスがほどけているので、架橋できる。したがって、Houdusse 等は、活性部位に ADP を結合しているにも関わらず、ATP 存在下において SH1-SH2 間の架橋が可能であるという生化学実験から、第三の

構造は ATP 型であると考察している。

更に、X線結晶解析により得られた構造を比較してみると、同一のリガンド（例えば MgADPBeFx）を活性部位に結合している場合でも、異なる構造をとっている場合がある(Gulick *et al.*, 1997; Gulick and Rayment, 1997; Dominquez *et al.*, 1998)。したがって、結晶の中にある分子同士の結合・束縛により構造が歪んでいる可能性を無視できない。また、最近、F1ATPase が回転モーター（それに対してミオシンはリニアモーター）であることが示されたが(Noji *et al.*, 1997)、F1ATPase もまた ras 型のヌクレオチド結合タンパク質である(Abrahams *et al.*, 1994; Leslie *et al.*, 1999)。この回転モーターの結晶構造から ATP 分解反応と構造変化のモデルが考えられている。そのモデルはミオシンにも通ずるものがある。

溶液中でのミオシンの構造に関して、若林らは、X線小角散乱法により、ATP の加水分解に伴ってミオシン分子の屈曲が変化することを報告している(Wakabayashi *et al.*, 1992, Tokunaga *et al.*, 1994)。一方で、徳永らは、ロータリーシャドウイング電子顕微鏡法を用いて、ミオシンを 1 分子毎に観察した結果、ミオシンが「曲がった形」と「のびた形」の平衡状態にあり、その平衡の比が溶液条件によって変わることを示した(Tokunaga *et al.*, 1991; Tokunaga *et al.*, 1994)。また、負染色法を用いて、ヌクレオチドを結合していないミオシンのレバーアーム領域が様々な向きをとることが観察されている(Burgess *et al.*, 1997)。以上のことは、化学状態とある特定の構造を 1 対 1 の関係で単純に関連付けることができないことを示している。タンパク質のエネルギー変換に関わる構造—機能連関を考えるためには新しい実験系と概念が必要であろう。

滑り運動のメカニズム

筋収縮はアクチンからなる細いフィラメントと、ミオシンからなる太いフィラメントの間の滑り運動からなることが知られている(A.F. Huxley and Niedergerke,

1954; H.E. Huxley and Hanson, 1954; A.F. Huxley, 1957; H.E. Huxley, 1969; Lymn and Taylor, 1971; Huxley and Simmons, 1971; Cooke, 1986)。ミオシンは、ATP を ADP に加水分解する時に解放される化学エネルギーを、アクチンとの滑り運動の力学エネルギーに変換する分子モーターである。そのメカニズムは、ミオシンの構造と密接に関連していると考えられてきた。図 9 は、アクチン・ミオシン系が ATP を加水分解する際に観測されている化学状態を示している。ミオシンとアクチンは、ミオシンの化学状態に依存して、互いに相互作用様式を変える。この性質を用いて滑り運動における化学-力学共役問題を説明しようとした図 10 の Lymn-Taylor のモデル (Lymn and Taylor, 1971) は、今なお色濃く筋肉研究者の間に根付いている。更に、X線結晶解析法によるアクチン及びミオシンの立体構造 (図 5) の解明以来、レバーアーム仮説 (Holmes *et al.*, 1997; Spudich, 1994) (図 8, 10) として具象化され、議論されている。

アクチンと相互作用しているミオシンは、ミオシン単独の構造と同一であるかどうかについて、電子顕微鏡法を中心に研究されてきた。X線結晶解析で得られた構造は、電子顕微鏡法から得られるアクチン・ミオシンの複合体とレバーアームの配置を説明できない (Mendelson and Morris, 1997)。また、Milligan らは、平滑筋ミオシンやミオシン I では、アクチンに結合した状態で、ADP の付加によりレバーアームが動くことをクライオ電子顕微鏡法により観察している (Whittaker *et al.*, 1995; Whittaker and Milligan, 1997)。したがって、化学反応サイクルに対応してレバーアームの動きがおこることは確からしい。ただし、これらの構造は、現実の滑り運動中には実現しないアクチンとミオシンが 1:1 のモル比で密に結合した時の構造であり、かつ、結晶中での歪みと同様の問題を無視できない。また、ADP では滑り運動が起こらないことから、生理的に意義のある動きであることに疑問を抱く人もいる。

一方で、アクチン・ミオシン系の電子顕微鏡による構造解析は、その分解能が低い
ため、レバーアームの動きをモータードメイン内部の活性部位周辺の構造変化と組み

合わせて論じることは難しい。クライオ電子顕微鏡像からの再構成された三次元像から、Holmes は、ミオシンのリン酸放出が活性化するメカニズムを、ミオシン内にある2つのドメイン (Lower 50K ドメインと Upper 50K ドメイン : 図 5 a の灰色と赤の二つのドメイン) の開閉にあるというモデルを提唱している (Holmes, 1997)。更に、片山らは、マイカフレーク法を用いて滑り運動中の構造を観察し (Katayama, 1998)、ミオシンの構造が X 線結晶解析の示す構造と異なっており、更に、アクチンとも、1 : 1 結合の時とは異なる相互作用様式をとっていることを提唱している。

更に、柳田グループの一連の研究 (Yanagida *et al.* 2000; Ishijima *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Ishijima *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 1987) や他のグループの一分子計測 (Molloy *et al.*, 1996) により、(1) ATP 加水分解反応一回でアクチンとミオシンが移動する距離は 30 nm を超えていること、(2) 力発生と ADP の解離という化学反応上のイベントが同時に起こる場合と、数百ミリ秒力発生が遅れる場合があること、(3) 力学反応において、単位ステップ (unitary step: 5.5 nm: アクチンのモノマー間の距離に相当) が見出され、一度に多数回のステップを行う様にみえる場合があることなどが観察された。これらの事実は、Lymn-Taylor モデルで仮定されている化学状態と力学状態が 1 : 1 に対応しているとの考え方に疑問を呈しており、Lymn-Taylor 型のモデルは少なくとも当初の単純なモデルではこれらを説明できない。この場合には、Lymn-Taylor 型のモデルの拡張を、Oosawa 等が唱えているルースカップリング (対して Lymn-Taylor 型モデルではタイトカップリング) メカニズム (Oosawa and Hayashi, 1986; Vale and Oosawa, 1990) を考慮しつつ行う必要がある。

これまでになされてきた研究

これまで、私は、滑り運動の分子メカニズムを捉えるために、下に示すような実験を行ってきた。

In vitro motility assay（滑り運動の再構成系）による実験

光学顕微鏡下でアクチン・ミオシン間の滑り運動を再構成する系（In vitro motility assay: 滑り運動の再構成系）を用いて、アクチン-ミオシン系に入力する自由エネルギーを変化させることを目的とし、反応産物である ADP 及び無機リン酸の濃度の滑り運動速度に対する影響を調べた。その結果、反応産物が存在する時には、加水分解時に開放される自由エネルギーが半分になるような低い濃度 ATP (ナノモラー程度)でもアクチン・ミオシン間の滑り運動が可能であることを見出した(Yasunaga *et al.*, 1996)。反応産物を結合したアクチン・ミオシン系は互いの結合が弱い結合であり、分子間の弱い摩擦として働くことが理解の鍵を握ると考えた。

柳田らは、ルースカップリング説を実験的に示し始めて以来、現在行われている一分子計測に至るまで、一分子の ATP 加水分解反応サイクルあたり数十ナノメートルにわたる滑り運動が観測されることを報告している。我々の実験の場合には、単純な計算からは、一分子の ATP 加水分解反応サイクルあたり数百ナノメートルを超える滑り距離を示した。様々な方法により、実験のアーティファクトの可能性を除去すべく努力してきた。もしもこれが真実であるならば、我々の系の場合、多数のミオシンとアクチンフィラメントの滑り運動系において観察しているので、多数のミオシン分子間のアクチンフィラメントを通じた協同的な振る舞いがあることを示している。すなわち、一分子の振る舞いと、多体系である筋繊維の実験を結びつける有効な実験系である。

次に、滑り運動の揺らぎ解析により、その移動量の分散が滑り時間に比例していることを見出した (Yasunaga and Wakabayashi, 1992)。これは、滑り運動過程がステップ量とその頻度をパラメータとする「ポアソン過程」と考えられることを示している。一方で、滑り運動過程は平均的な一方向性の滑りに乗った拡散と捉えることもでき、「動的拡散係数」という新しいパラメータを提唱した。

前述したように、滑り運動を考えるメカニズムには、化学反応中間状態に応じてミ

オシンが構造を変化するという「マクロなエンジン」類似（爆発反応状態と車軸回転が直接カップル）であるという考えと、熱揺らぎを利用した「マックスウェルのデーモン型」（タンパク質構造の異方性と ATP のエネルギーがデーモン役）の熱機関であるという2つの考え方がある（図1）。私が見出した滑り運動のもつ性質は、前者のメカニズムでは「ポアッソン過程」として、後者のメカニズムでは「動的拡散係数」として考えると理解し易い。前者の場合、ステップ量が 70 nm となり、ミオシン・アクチン構造から予測されるステップ量よりも大きい。したがって、純粋な「エンジン」ではなく、熱揺らぎを利用した「マックスウェルのデーモン」の要素を滑り運動モデルに加味する必要があるだろう。

ミオシンの構造変化

鈴木等との共同研究(Suzuki *et al.*, 1998; 安永、鈴木、1999)により、C 端及び N 端に蛍光性タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)を導入したミオシンモータードメインを用いて、蛍光エネルギー移動法(Fluorescent Resonance Energy Transfer : FRET)により、蛍光性タンパク質間の距離を測定した。その結果、ミオシンのミオシン頭部の構造が化学反応状態に応じて距離が変化することが明らかとなった。この時期(Suzuki *et al.*, 1998)までに、X線結晶解析により、ミオシンは大きく2つの異なる構造（図8の第1の構造と第2の構造）をとることが知られていた。新しく開発した確率的距離幾何学法 (probabilistic distance geometry 法 : Yasunaga *et al.*, 2000) により、この2つの構造と蛍光エネルギー移動法により求められた距離情報を組み合わせて、それぞれ、第1の構造が、溶液中では MgADP を結合した状態に対応し、第2の構造が MgADPPi を結合した状態に対応することを明らかにした。すなわち、加水分解反応に伴うミオシンの構造変化は、無機リン酸の解離により、第2の構造から第1の構造へと変化したことになる。この変化の向きは、滑り運動の向きと一致しており、「エンジン説」を支持した。しかし、この構造変化を捉えた蛍光エ

エネルギー移動法や、若林等の X 線小角散乱法(Wakabayashi *et al.*, 1992)では、得られる値が多く分子の平均値である点に留意すべきである。

本論文の概要

これまでの研究結果を考慮すると、現段階で確かなことは、ミオシンがいくつかの準安定な構造をとり、レバーアームが動くことであり、一方で、タイトカップリングでは説明できないような長距離を一回の ATP 加水分解の間に滑走できることであろう。また、滑り運動そのものに確率過程としての揺らぎの要素が含まれていた。したがって、モータータンパク質は、「マクロなエンジン」としての要素と「マックスのデーモン」の要素を共に持つのではないかと思いついた。そのため、タンパク質の実像を、一分子毎に、しかも高分解能で捉えることが、モータータンパク質の機能発現のメカニズムを真に理解する上で重要であると考えに至った。構造の類似性や進化論の立場から他のタンパク質の構造変化を考慮することも重要であり、ミオシンの研究が普遍的な意味でのモータータンパク質のエネルギー変換の原理解明につながるものと考えられる。

そこで、本論文では、タンパク質構造を実像として捉えることのできるクライオ電子顕微鏡法を用いて、モータータンパク質であるミオシン、アクチン、及びその複合体の構造解析を行った。また、電子顕微鏡法によって得られた結果と、我々の開発した確率距離幾何学法 (probabilistic distance geometry 法) や Ambivalent sequence prediction などの生物情報学的手法を使って解析した結果と比較を行った。

本論文では以下の章にわけて、実験結果を報告する。

1. アクチンフィラメントの構造とその揺らぎ
2. ミオシン分子の構造変化と単一分子の可視化
3. アクトミオシン複合体の構造解析

最後に、各実験結果を総合して、現在想定できる滑り運動の分子メカニズムについて

考察する。

実験

試料

アクチン

アクチンは、ウサギ骨格筋由来のものを用いた。基本的には、Spudich & Watt (1971)の方法にしたがって作成した。2価イオンとしてCaイオンではなくMgイオンを用いた。脱重合状態のアクチンとして、G-buffer(2.0 mM TrisHCl pH8.0, 0.5 mM ATP, 0.2 mM MgCl₂, 1.0 mM βメルカプトエタノール)に約2.0 mg/mlの濃度とした。

MgAMPPNPの解離定数は、15 nMであることが報告されており、また、MgATP/ADPの交換速度が 3.3×10^{-3} [s⁻¹]であることが報告されている。そこでMgATPの代わりに0.5 mMのMgAMPPNPを含むG-bufferに対して12時間以上透析することによりMgAMPPNP結合型のアクチンを作成した。

電子顕微鏡法により撮影する場合には、溶液条件は、100 mM NaCl, 4mM MgCl₂, 50 mM イミダゾール HCl (pH 7.4)のものを用いた。リン酸濃度を上げる場合には、100 mM NaClを調整し、NaClと併せて、100 mMのイオン強度を与えるように調整した。

ミオシン

ミオシンは、鶏骨格筋由来のものとディクチオ型細胞性粘菌(*Dictyostelium*)由来のものを用いた。鶏骨格筋ミオシン由来のS1は、鶏骨格筋から調製したミオシンを、20度10分間1/2000 w/wでタンパク質分解酵素パパイン処理することによって調整した。反応はシステインタンパク質分解酵素阻害剤(50 μM E-64-c: N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucine-3-methylbutylamide)を用いて停止した(Tamai *et al.*, 1986; Matsumoto *et al.*, 1989)。その後、67%飽和硫酸で沈殿させ、脱塩カラム(PD-10)を用いて、硫酸を除いた。

ディクチオ型細胞性粘菌のミオシン S1 は、His-tag が付いた調節軽鎖(RLC)、必須軽鎖(ELC)、重鎖(HC)の三つの遺伝子をディクチオ型細胞性粘菌に導入し、共発現させた。三者の複合体として発現したものをニッケルカラムに結合させた後、イミダゾールにより溶出させることにより精製した。

ミオシン単一分子を撮影する際には、ミオシン S1 を約 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で、25 mM イミダゾール塩酸(pH 7.4), 4 mM MgCl_2 , 25 mM KCl の溶液条件になるように調製した。

アクトミオシン硬直複合体

アクトミオシン硬直複合体は、以下のようにして作成した。まず、0.2 mM MgCl_2 、2 mM TrisHCl (pH 8.0), 0.5 mM ATP/AMPPNP の溶液に対して、約 2 mg/ml (47 μM)の濃度で透析されたアクチンモノマーを調製した。その後、4 mM MgCl_2 , 25 mM ImdHCl (pH 7.4), 25 mM KCl の条件で、25度で30分間インキュベーションすることにより、0.1 mg/ml (2.4 μM) のアクチンを重合させた。溶液に存在する ATP を取り除くために、超遠心(Beckmann TL100, 100K rpm x 10 min.)法により、フィラメントを沈殿させた後、4 mM MgCl_2 , 25 mM イミダゾール HCl (pH 7.4), 25 mM KCl の溶液で溶解した。そのアクチンを、アクチン濃度 0.02 mg/ml (0.47 μM)、ミオシン S1 濃度 0.2 mg/ml (1.4 μM)、4 mM MgCl_2 , 25 mM イミダゾール HCl (pH 7.4), 25 mM KCl の条件で、25度で15分間インキュベーションすることによって作成した。

方法

クライオ電子顕微鏡法

クライオ電子顕微鏡法は、Glaeser や Dubochet 等によって開発されてきた方法で、

図 1 1 に示したように、溶液中のタンパク質を急速凍結して氷包埋する。その後、そのままの状態電子顕微鏡用いて観察する手法である(Adrian *et al.*, 1984; Taylor and Glaeser, 1974)。この方法は、生理的条件に近い条件での電子顕微鏡観察が可能であり、溶液中の構造を観察するのに適している。また、タンパク質内部の構造情報も手に入れることができるために、高分解能の観察が可能である。しかし、一方で、水とタンパク質の密度の違いを使って、電子顕微鏡像のコントラストを生成するために、コントラストが低い。

本論文では、200 keV のエネルギーの電子線を用いて、試料面上に約 15 電子/Å² の電子線を照射し、SO163 フィルム(KODAK)で 2 万 5 千倍から 5 万倍の範囲で撮影した。デフォーカス量は、1 μm から 15 μm 位の広範囲の不足焦点量で撮影した。電子顕微鏡としては、冷電界放出型銃を備えた HF2000(日立製)を用いた。

電子顕微鏡法を用いた構造解析のための画像処理システムの開発

電子顕微鏡を用いて、生体高分子構造を研究するために、拡張性が高く、再利用性の高いオブジェクト指向性のライブラリを提供する Eos (Extensible and object-oriented system) という画像処理システムを開発した(Yasunaga and Wakabayashi, 1996)。このシステムは、4 部門に分かれたものを提供する(図 1 2)。第一に、画像処理システムを行うことのできるプログラム群 (small tools)、第二に、プログラム群を統合する為のツール(integration tools)、第三に、新しい画像処理プログラムを開発するための開発支援プログラム(development tools)、第四に、新しいプログラムを開発するためのオブジェクト指向を意識したライブラリ(objects)である。

本システムの目標としている拡張性とは、解析の為に作成されたプログラム群 (small tools)を統一された環境に容易に移行できること(easy integration)と新しいツールの迅速な開発(easy development)にある。

前者に関しては、Display2 及び Eos と呼ばれる統合化プログラムに対して small

tools が、開発者が意識しないうちに統合されるようになることが最終目標である。図 1 3 は、Eos システムを用いて、らせん対称性を仮定した三次元再構成法を行う場合に必要なプログラム群とそれを統括する Makefile であるが、こうした Makefile の集積により、より容易な画像解析が可能となる。最終的に Makefile のシステムと Display2 の様な統合化のためのプログラムを組み合わせることによって、更に容易な画像処理が可能となる。

後者に関しては、現在、プログラム開発においてアルゴリズムに関わるのではないデータの入出力に関係した部分に関して、自動ソースコードを作成する maketool というツールがすでに動いている。現在、自動生成に必要な入出力データのファイルを作成する必要があるが、ビジュアルな対話形式による自動ソース作成の方向へと改良を重ねている。

本システムを用いた電子顕微鏡を用いた構造解析の例としては、ロータリーモーターである F0F1-ATPase 類似の古細菌由来 V0V1-ATPase の構造解析(Yokoyama *et al.*, 2000)がある。ロータリーモーターの車軸にあたる γ サブユニットの位置について α 、 β サブユニットが作るリング状構造の内部に存在することを証明し、V0V1ATPase もまたロータリーモーターであることを示唆することができた。この際、 γ サブユニットの構造を統計学的に検定するために分散分析の手法を用いた。これらの解析の為にプログラム開発は、この Eos システム上の開発を行った。

この Eos システムは、インターネットを通して公開しており、(<http://tkyemghp.phys.s.u-tokyo.ac.jp/Eos>)、他の研究グループでも使用されている(Kikkawa *et al.*, 2000; Miyata *et al.*, 2000)。Linux (PC, Alpha), HP-UX と SGI 上で動作することが確認されている。

本論文における画像処理法及びデータ解析の為にプログラムはすべてこの Eos 上で開発されたものである。

アクチンフィラメントの硬さの測定

アクチンフィラメントの硬さの見積もりは、持続長を求めることによっておこなった(図14)。持続長は、アクチンフィラメントの長さ(L)とその両端の距離(R)を測定することにより求めることができる。両端の距離の二乗平均($\langle R^2 \rangle$)と、アクチンの長さ(L)および持続長(a/T)の間には、

$$\langle R^2 \rangle = 2(a/T)^2(LT/a - 1 + e^{-LT/a})$$

という関係が成り立つ(Bresler & Frenkel, 1939; Landau & Lifschitz, 1976)。両端の距離(R)とアクチンの長さ(L)を測定し、最小自乗法を用いた非線形フィッティングにより、持続長(a/T)を計算した。

ホログラフィック像再構成法の開発

クライオ電子顕微鏡法を用いて構造解析を行う際にもっとも問題となるのは、その像のコントラストの低さ、特に空間周波数の低いところでコントラストがないことである(図15a)。これは、電子顕微鏡法によるコントラスト形成機構に由来する問題である。電子顕微鏡法のコントラスト形成には大きく二つの方法、すなわち位相コントラストと散乱・強度コントラストである(安永 1997)。

タンパク質と水では、そのほとんどが低い原子番号の元素がその構成要素であるために、散乱コントラスト、強度コントラストによるコントラスト形成能が弱い。そこで、コントラストを形成する際には、隣り合う領域の位相の違いを強度へと転換して、コントラストとする位相コントラストを用いる場合が多い。

図15aはその位相コントラストの空間周波数成分依存性を調べたものである。グラフの横軸の最大は $1/10 \text{ \AA}^{-1}$ の空間周波数を示している。クライオ電子顕微鏡法の場合、水からなる溶媒と、タンパク質の密度差によって生じる電子の位相ずれの違いを、デフォーカスをつけることにより、コントラストを生じさせる位相コントラストがほ

とんどを占める。この位相コントラストは、図15aにあるように、通常、低い空間周波数成分では、あまりコントラストを生まない。低い空間周波数の成分を得たい場合には、デフォーカス量を大きくする必要がある。図15bの右下のミオシンがもつともはっきりと認識できるのはこのためである。

そこで、我々は高いコヒーレンス性を持つ電子銃である冷電界放出型銃を備えた日立社製 HF-2000 電子顕微鏡装置を用いることにより、電子顕微鏡コントラストの改善を行った。

得られたホログラフィック像は、高分解能までの情報を持つ一方で、そのコントラストが、図15aで示されているように、像を形成する波の空間周波数によって反転する。したがって、この反転を修正する必要がある。また、途中で伝達関数のゼロ点を持っており、回復できない情報も存在している。そこで、同一視野の画像を数枚、あるいは、同一条件の画像を多数撮影し、その後、Wiener型のフィルタと繰り返し法を用いて、正しい性質を持った画像を得るためのコントラスト変調を補正するためのプログラムを開発した。そのアルゴリズムは、図16に示している。繰り返し法を用いることにより、その補正を精密化した。初期補正像に比べ、10回の繰り返し計算により最終的に収束させた像は、像質の改善がみられる。本論文の場合には、溶液濃度の平滑化等の付加的な補正は行っていない。

確率的距離幾何学法 (Probabilistic distance geometry 法)

蛍光エネルギー移動法は、分子内、あるいは分子間の距離やその変化を決定する上で有効な手法であり、構造的知見を我々に与える(Stryer, 1978; Clegg, 1986, Taylor *et al.*; dos Remedios and Moens, 1995; Gordon *et al.*, 1998)。しかし、距離情報だけではタンパク質全体の構造との関係を考慮することが困難であり、構造決定の方法としては使用例が多くない。現在、GFP(Green Fluorescent Protein)などの蛍光性のタンパク質(Prasher, 1992)を使った系が、細胞生物学をはじめとして多くの分野で使わ

れるようになってきた(Heim and Tsien, 1996; Miyawaki *et al.*, 1997)。主として、細胞内のタンパク質の局在を明らかにするためのマーカーとして使われたり、また、蛍光エネルギー移動を使用する場合でも、カルシウム濃度などの細胞内セカンドメッセンジャー濃度の指示タンパク質として使われたりする機会が多い(Pollok and Heim, 1999, Pozzan, 1997; Brejc, *et al.*, 1997; Sagot, *et al.*, 1999)。しかし、試験管内あるいは細胞内でのタンパク質の構造変化を直接伝えることのできる系であるので、その情報を有効利用することにより更に多くの知見を我々に与えるだろう。しかし、蛍光性タンパク質を導入することのできる部位はタンパク質 N 端や C 端など特別な場所に限定されているために、蛍光エネルギー移動法による距離情報が少ない。このために、全体の構造変化につながる情報を得ることが困難であった(O'Donoghue, 1991)。しかし、X線結晶解析などによりタンパク質の構造モデルが存在する場合には、その構造情報と組み合わせることにより、より詳細な構造変化の情報を取り出すことができることが期待される。

そこで、確率的距離幾何学法 (Probabilistic distance geometry) という新しい解析法を開発した。これにより、蛍光エネルギー移動により得られたタンパク質特定部位間の距離情報と X線結晶解析により解明された原子モデルや電子顕微鏡法による低分解能構造情報などのタンパク質の構造情報を組み合わせることが可能となった。この解析法を用いると、蛍光性タンパク質や蛍光性小分子の蛍光団の三次元位置を確率分布として求めることが出来る。

この方法は、距離幾何学法(distance geometry)の拡張であるが、主として仮定するものは以下の二つの合理性ある仮定である。

第一に、蛍光エネルギー移動によって得られた距離情報の系統誤差や統計誤差などを考慮した上での解析を可能にするため、蛍光エネルギー移動によって求められた二つの蛍光標識部位間の距離は硬い棒ではなく、弾性をもったバネで結ばれていると仮定する。

第二に、既知のタンパク質構造情報を使って、蛍光分子が存在できる領域を空間的に制限する。

以上の仮定のもとに、蛍光団の位置を三次元空間全空間探索し、蛍光分子が可能な領域を決定する。最終的に、蛍光分子の存在場所を確率分布の形で求めることができるので、確率的距離幾何学と呼ぶ。また、距離情報が不足している場合にも第二の仮定を使うことにより領域を制限することが可能である。Suzuki *et al.* (1998) の中で、蛍光分子の位置が同定できたのはこのお陰である。

本論文では、アクチン及びミオシンの構造に関して、本システムを適用した例を示す(Yasunaga *et al.*, 2000; Yasunaga and Wakabayashi, 2001)。Suzuki *et al.* (1998) では、ミオシンの二つの原子モデルが明らかとなっていたので、それらの構造が溶液中でどの化学状態に対応するかを決定するのに用いた。本論文では、更にミオシンの第三の原子モデルが明らかとなったので、その第三の構造の評価を含め、第一、第二の構造と化学状態との関連性に関して、詳細に議論した(Yasunaga *et al.*, 2000)。特にミオシンの構造に関して、適用例として具体的なアルゴリズムを、数式を含めて詳細に述べる。開発したプログラムには一般性はあるので、計算したい条件に応じてプログラム自体を書き直す必要はなく、パラメータの変更で十分である。

アクチン Cys374 の位置の同定

アクチンのモデルとしては、profilin との結合した形で X 線結晶解析法により解かれた原子モデル (プロテインデータバンク ID: 2btf, Schutt *et al.*, 1993) を用いた。この原子モデルのうち、アミノ酸残基番号 1-350 の部分の構造は変化しないものとし、アクチン Cys374 に結合した蛍光分子は、アミノ酸残基番号 1-350 が占める空間を共有できないものとした。三次元空間を $2 \text{ \AA} \times 2 \text{ \AA} \times 2 \text{ \AA}$ の大きさを持つボクセルに切り分けた。アクチンの Cys374 に結合した蛍光分子は、直径 2 \AA の球であると仮定した。蛍光エネルギー移動法によって測定された距離としては、アクチンの Lys-61,

Try-69, ADP のアデニン環の C5 に標識された蛍光分子

(N-[4-[[4-(dimethylamino)phenyl]azo]phenyl]maleimide (DABMI),

N-[4-(dimethylamino)-3,5-dinitrophenyl]maleimide (DDPM),

5-[[2-(iodoacetyl)amino]ethyl]amino)naphthalene-1-sulfoic acid (1,5-IAEDANS))

及び蛍光性の二価イオンからの、アクチンの Cys374 に標識された蛍光分子までの距離を用いた(表 1; Miki, 1991; Miki *et al.*, 1992; dos Remedios and Moens, 1995)。

Lys-61, Try-69, ADP のアデニン間の C5 に標識された蛍光分子の位置はそれぞれ標識部位の原子モデルにおける三次元座標を用いた。また、蛍光性の二価イオンの位置は、原子モデル中の二価イオンカルシウムイオンの位置と同じであるとした。確率的距離幾何学に基づいて、4つの蛍光分子 (Lys-61, Tyr-69, C5 of an adenine nucleotide と二価イオンの位置にあると仮定した蛍光分子) が、アクチン Cys374 に結合している蛍光分子とバネ定数 $k_B T / (5 \text{ \AA})^2$ のバネでつながっているととした。これは、実験誤差を考慮に入れるためである。計算は、8回の繰り返し計算を行ったので、実効バネ定数は $k_B T / (1.8 \text{ \AA})^2$ となった。4種の仮定に基づいて、計算を行った。Case I と II では、4つの蛍光分子と Cys374 の蛍光分子までの距離を原子モデル(Schutt *et al.*, 1993)から計算された距離を用い、Case III と IV では、蛍光エネルギー移動法により測定された距離(表 1; Miki, 1991; Miki *et al.*, 1992; dos Remedios and Moens, 1995)を用いた。蛍光分子はアクチン分子の内部に入れないという相互排除の仮定を Case II と Case IV の場合には導入して計算を行った。この仮定は妥当な仮定であり、van der Waals コンタクトによる立体障害の要素を導入することができる。また、コントロールとして、Case I と Case III では、相互排除の仮定を導入しなかった。

ミオシンの溶液中の構造と化学状態との対応

S1dC と呼ばれるミオシンのモータードメインを用いた(Itakura, *et al.*, 1993)。このモータードメインに三つのグリシンをリンカーとして用いて、N端あるいはC端に、

蛍光性タンパク質(GFP: Green Fluorescent Protein)あるいは蛍光性タンパク質(BFP: Blue Fluorescent Protein)を融合させたものをディクチオ型細胞性粘菌で強制発現した(Suzuki *et al.*, 1998)。ADP 及び ATP 存在下での BFP、GFP、蛍光性 ADP(Cy3-ADP)もしくは 蛍光性 ATP(Cy3-ATP)間の距離を蛍光エネルギー移動法により測定した(図 2 9)。蛍光の配向係数を 2/3、屈折率を 1.4 としてそれぞれ計算した(Stryer, 1978; Clegg, 1992)。蛍光団が自由に回転できるものとして計算を行っているが、妥当であると考えられる(dos Remedios, 1995)。

図 2 9 に示した今回のミオシンへの確率的距離幾何学法を適用する場合に、以下の仮定をおくことにした。(i) GFP や BFP は融合したタンパク質(今回の場合はミオシン)とは、空間的に同じ位置は共有せず、それぞれの蛍光タンパク質は 20 Å の直径の球であると仮定した。(ii) タンパク質の N 端に結合した GFP の蛍光団と N 端との距離は 35 Å (L_1 : 図 2 9)、タンパク質の C 端に結合した BFP の蛍光団と C 端との距離は、25 Å (L_3 : 図 2 9)であるとした。これは、GFP 及び BFP の原子モデル(Ormo, *et al.*, 1996; Brejc *et al.*, 1997)から推定した値である。(iii)それぞれの蛍光分子間の距離はバネで結ばれているかのように変化するものとして、蛍光エネルギー移動測定の際の実験確率的あるいは系統的誤差の影響を考慮できるようにした。

第一の仮定は、分布領域を制限するためのものである。これにより、距離情報が足りない場合でも、蛍光分子が分布する範囲を制限することができる。今回は、排除効果であったが、電子顕微鏡等により逆に存在範囲を限定できる場合には、逆に領域のある範囲に選択することも可能である(Narita *et al.*, 2001)。今回の場合、GFP や BFP は、40 Å 長さで断面が 25 Å 程度の直径の円筒型分子であるため(Ormo *et al.*, 1996)、20 Å の直径の球として近似した。10 Å と仮定した場合にも収束結果はほとんど変化がなかった。

第二の仮定は、BFP や GFP が大きさを持っていることを考慮するために重要な仮定である。15 Å から 45 Å まで距離を 10 Å 毎に変化させたが、仮定した 35 Å と 25

Åでもっともエネルギー移動によって得られた距離を説明することができた。第三の仮定によりこの距離は変化できるとしているが、最終的に求められた距離の期待値はそれぞれ 33 Å と 29 Å であり、仮定が妥当であったことを示していると結論づけた。

第三の仮定にしたがって、確率分布関数を以下のように計算することができる。一本のバネのみを考える場合、確率分布関数はガウス分布として与えられる。一本のバネ長の分布 $q(x)$ は、バネ定数 k と自然長 L をそれぞれ与えた場合に、 $\exp(-k(x-L)^2/2k_B T)$ に比例する。このとき、 T は絶対温度、 k_B は Boltzman 定数である。したがって、バネの一方が固定されている場合には、もう一方の点の分布は $q(x)$ となり、その点の分布関数を示す。複数のバネでつながれている場合には、分布関数は積によって計算することができる。これにより、従来の三角法と矛盾なく接続できる。

さらに、蛍光分子 A の確率分布関数 $q_A(x)$ と蛍光分子 B の確率分布関数 $q_B(x)$ が与えられ、蛍光分子 A と蛍光分子 B の間の距離が蛍光エネルギー移動法により測定できるが、どちらも位置が同定できず、固定点として扱えない場合には、以下の方法により、蛍光分子 A の確率分布関数 $p_A(x)$ を求めるものとする。すなわち、 $p_A(x)$ は $q_A(x)p_{A,B}(x-x)q_B(x)$ を x に関して全空間にわたって積分することによって求める。ここで第二項である $p_{A,B}(x-x)$ は二つの蛍光分子間のバネ長分布を示している。第三項は、蛍光分子 B の分布による重み付けを意味する。これにより、二つの蛍光分子がバネで結ばれていると仮定したことになる。

バネ定数の導入は、蛍光エネルギー移動測定における距離の確率的かつ系統的誤差を考慮することになり、蛍光エネルギー移動測定の際に問題となる、蛍光分子同士の配向の問題も考慮することができる。ここでは、すべてのバネ定数を $k_B T / (5 \text{ \AA})^2$ とおいた。すなわち、分布関数は、5 Å の広がりを持つことになる。図 3 2 の場合の詳細な計算は後述する。Suzuki 等との共同研究の中で、測定することのできた距離は、表 5 に示している。

三次元空間は、 $4 \text{ \AA} \times 4 \text{ \AA} \times 4 \text{ \AA}$ のボクセルに分割され、ボクセル毎の確率を計算した。原子モデルにおいて N 端周辺の構造に変化がなく、表 5 に示したように蛍光性ヌクレオチドと N 端に結合した蛍光性タンパク質の距離は変化しなかった。そこで、N 端に結合した蛍光性タンパク質の分布関数は、結合しているヌクレオチドの状態に無関係に同じ分布関数をもつとして、 $q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r})$ だけを計算するものとした。実際、NFP の分布がそれぞれで異なっているとして計算した場合には、それぞれ 2 つの分布が得られるが、それらの分布は多くの重なりを持っており、その重なっている領域は、今回求めたものと同様であった。従って、今回の仮定は妥当であると考えられる。かくして、固定点からの距離情報を使って、NFP ($q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r})$)、ATP 存在下での CFP ($q_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r})$) 及び ADP 存在下での CFP ($q_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r})$) の分布関数は以下の式にしたがって計算された。

$$\begin{aligned}
 q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}) &= f_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \exp\{-k_1(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_N| \cdot L_1)^2 / 2k_B T\} \\
 &\quad \cdot \exp\{-k_{2,\text{ATP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ATP}}| \cdot L_{2,\text{ATP}})^2 / 2k_B T\} \\
 &\quad \cdot \exp\{-k_{2,\text{ADP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ADP}}| \cdot L_{2,\text{ADP}})^2 / 2k_B T\} / A_{\text{NFP}}^{(k)}, \\
 q_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}) &= f_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \exp\{-k_3(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_C| \cdot L_3)^2 / 2k_B T\} \\
 &\quad \cdot \exp\{-k_{4,\text{ATP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ATP}}| \cdot L_{4,\text{ATP}})^2 / 2k_B T\} / A_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}, \\
 q_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r}) &= f_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \exp\{-k_3(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_C| \cdot L_3)^2 / 2k_B T\} \\
 &\quad \cdot \exp\{-k_{4,\text{ADP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ADP}}| \cdot L_{4,\text{ADP}})^2 / 2k_B T\} / A_{\text{CFP,ADP}}^{(k)},
 \end{aligned}$$

ここで、 \mathbf{r}_N , \mathbf{r}_C , $\mathbf{r}_{\text{Nuc,ATP}}$ と $\mathbf{r}_{\text{Nuc,ADP}}$ はそれぞれ、N 端、C 端、ヌクレオチド結合部位の位置を表しており、それらは固定点として見つかった。また、 k_B は、Boltzman 定数、 T は温度、 $A_{\text{NFP}}^{(k)}$, $A_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}$, $A_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}$ は正規化のための因子を表している。さらに、 L_j と k_j ($j = 1, 2, 3, 4, 5$) は、バネの平均長と分布 (バネ定数) を表現している (図 2 9)。 L_1 と L_3 は、ヌクレオチドの状態に無関係であることは注意が必要であろう。すべてのバネ定数は、 $k_B T / (5 \text{ \AA})^2$ であるとした。計算は繰り返されるので、上付字である k は繰り返し回数を表している。初回の計算では、仮定(i)に従い、 $f_{\text{BFP}}^{(0)}$

と $f_{\text{GFP}}^{(0)}$ は、ミオシンの分子が存在している領域が 0、それ以外の領域は 1 とした。
 k 回目の繰り返しの時には、前回の繰り返し計算により求められた $p_{\text{BFP}}^{(k-1)}$ と
 $p_{\text{GFP}}^{(k-1)}$ を $f_{\text{BFP}}^{(k)}$ と $f_{\text{GFP}}^{(k)}$ した。次に、BFP と GFP の様に固定していない蛍光性タンパク質間の距離 (L_5) による情報を以下の式にしたがって、導入した。

$$p_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}) = q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \cdot \left[\int \exp\{-k_{5,\text{ATP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}}| \cdot L_{5,\text{ATP}})^2 / 2k_B T\} q_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}}) d\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}} + \int \exp\{-k_{5,\text{ADP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{CFP,ADP}}| \cdot L_{5,\text{ADP}})^2 / 2k_B T\} q_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{CFP}}) d\mathbf{r}_{\text{CFP,ADP}} \right] / B_{\text{NFP}}^{(k)},$$

$$p_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}) = q_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \cdot \int \exp\{-k_{5,\text{ATP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{NFP}}| \cdot L_{5,\text{ATP}})^2 / 2k_B T\} q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) d\mathbf{r}_{\text{NFP}} / B_{\text{CFP,ATP}}^{(k)},$$

$$p_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r}) = q_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}(\mathbf{r}) \cdot \int \exp\{-k_{5,\text{ADP}}(|\mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{NFP}}| \cdot L_{5,\text{ADP}})^2 / 2k_B T\} q_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) d\mathbf{r}_{\text{NFP}} / B_{\text{CFP,ADP}}^{(k)},$$

ここで、 $B_{\text{NFP}}^{(k)}$, $B_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}$, $B_{\text{CFP,ADP}}^{(k)}$ は規格化因子である。

q と p の計算は繰り返され、実効的なバネ定数が計算回数の平方根に比例して大きくなっていく。したがって、16 回の繰り返し計算後のバネ定数は、この場合、 $k_B T (1.25 \text{ \AA})^2$ となり、実験誤差として最大見積もられている $\sim 1.4 \text{ \AA}$ と同程度となる。求められた距離の期待値と蛍光エネルギー移動によって測定された距離との差の自乗和の平均を評価関数としてモニターし、繰り返しの毎の収束性を確認した。蛍光分子間の距離の期待値は以下の式にしたがって計算を行った。

$$\langle L_{2,\text{ATP}} \rangle^{(k)} = \int p_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) \cdot |\mathbf{r}_{\text{NFP}} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ATP}}| d\mathbf{r}_{\text{NFP}},$$

$$\langle L_{4,\text{ATP}} \rangle^{(k)} = \int p_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) \cdot |\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ATP}}| d\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}},$$

$$\langle L_{5,\text{ATP}} \rangle^{(k)} = \iint p_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) \cdot |\mathbf{r}_{\text{NFP}} - \mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}}| \cdot p_{\text{CFP,ATP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}}) d\mathbf{r}_{\text{NFP}} d\mathbf{r}_{\text{CFP,ATP}},$$

$$\langle L_{2,\text{ADP}} \rangle^{(k)} = \int p_{\text{NFP}}^{(k)}(\mathbf{r}_{\text{NFP}}) \cdot |\mathbf{r}_{\text{NFP}} - \mathbf{r}_{\text{Nuc,ADP}}| d\mathbf{r}_{\text{NFP}},$$

$$\langle L_{4,ADP} \rangle^{(k)} = \int p_{CFP,ADP}^{(k)}(\mathbf{r}_{NFP}) \cdot |\mathbf{r}_{CFP,ADP} - \mathbf{r}_{Nuc,ADP}| d\mathbf{r}_{CFP,ADP},$$

$$\langle L_{5,ADP} \rangle^{(k)} = \iint p_{NFP}^{(k)}(\mathbf{r}_{NFP}) \cdot |\mathbf{r}_{NFP} - \mathbf{r}_{CFP,ADP}| \cdot p_{CFP,ADP}^{(k)}(\mathbf{r}_{CFP,ADP}) d\mathbf{r}_{NFP} d\mathbf{r}_{CFP,ADP}.$$

NFP $d\mathbf{r}_{CFP,ADP}$.

計算によって、求められた距離の妥当性を検討するために、評価関数として、確率的距離幾何学により求められた距離と蛍光エネルギー移動によって測定された距離との差の自乗平均を、以下の式によって求めた。

$$\begin{aligned} \text{r.m.s.}^{(k)} = & \sqrt{\{(\langle L_{2,ATP} \rangle^{(k)} - L_{2,ATP})^2 + (\langle L_{4,ATP} \rangle^{(k)} - L_{4,ATP})^2 + (\langle L_{5,ATP} \rangle^{(k)} - L_{5,ATP})^2 \\ & + (\langle L_{2,ADP} \rangle^{(k)} - L_{2,ADP})^2 + (\langle L_{4,ADP} \rangle^{(k)} - L_{4,ADP})^2 + (\langle L_{5,ADP} \rangle^{(k)} - L_{5,ADP})^2\} / 6.} \end{aligned}$$

この r.m.s. の値は、最初の 4 回の繰り返し計算によって急速に減少し、16 回の繰り返し計算で、ほとんど収束した。最終的に得られる確率分布関数 ($p_{NFP}^{(15)}$, $p_{CFP,ATP}^{(15)}$ and $p_{CFP,ADP}^{(15)}$) は、蛍光分子の空間分布の確率を示すが、mrc 形式、AVS-field-形式あるいは CCP4 map 形式で保存され、O (Jones *et al.*, 1991) や AVS (Advanced Visual Systems Inc, U.S.A.) の様な X 線結晶解析などで使われるソフトウェア上で表示することが可能である。プログラムは、Eos (Yasunaga and Wakabayashi, 1996) で開発された。

3 種のタイプの結晶構造(プロテインデータバンク ID : 1mmd, 1vom, 1b7t)を用いて、ADP 存在下、ATP 存在下での距離がどの構造を選択した場合に妥当であるかを検討した。1mmd, 1vom, 及び 1b7t は、それぞれ MgADPBeFx 結合型ミオシン (*Dictyostelium* 由来の S1dC (Fisher *et al.*, 1995))、MgADPVi 結合型ミオシン (*Dictyostelium* 由来の S1dC (Smith *et al.*, 1996)) とホタテ貝由来の MgADP 結合型ミオシン S1 (Houdusse *et al.*, 1999) の三種である (図 6) 1mmd と 1vom に関しては、C 末端のコンバータードメインの原子座標が欠落しているが、トリのミオシン (2mys; Rayment *et al.*, 1993a) のコンバータードメインとの配列及び構造の類似性から、C $_{\alpha}$ がもっともよく重なるようにして、2mys のコンバータードメインと置き

換えた。1b7t の場合には、二つの軽鎖と軽鎖結合部位(778-835)を除去することにより、S1dC と一致する構造を作成し、比較した。また、構造の比較をする場合には、1vom 及び 1mmd の Upper 50K ドメインの 168-177, 315-344, 416-445 のアミノ酸と 1b7t の 171-180, 311-340, 411-440 のアミノ酸の C_αがもっともよく合う位置にフィットした。1vom の Phe5、1mmd の Asn2 の位置を N 端であると仮定した。また、1vom/1mmd では Arg761、1b7t では Arg777 を C 末端の位置とした。ヌクレオチド (ADP か ATP) の結合部位としては、P ループ(GxxGxGKT)の 3 番目の Gly(ディクチオ型細胞性粘菌ミオシンの Gly184, ホタテ貝ミオシンの Gly181)を選択した。これらの点は固定点として取り扱い、蛍光性タンパク質は固定化しない点として取り扱うことにした。したがって、図 29 に示したようなトポロジーマップとなる。ここでは、図 29b に示したトポロジーマップを使って計算を行った。

1vom 及び 1mmd のレバーアームはコンバータードメインをフィットした際に決定された配置で、2mys のものを用いた。レバーアームの向きを議論する際には、1mmd/1vom の Gly680 及び 1b7t の Gly695 の平均位置を中心とした。Upper 50K ドメインを、クライオ電子顕微鏡像から作成されたアクチン・ミオシン複合体の理論計算モデルである 1ALM(Mendelson and Morris, 1997)にフィットさせた。1ALM のアクチンフィラメント軸方向を z 軸とした。S1dC の回転モーメントに関する長軸を求め、長軸のうち z 軸に垂直な成分を x 軸として、座標系を決定した。レバーアームの角度(τ)は z 軸とのなす角とし、レバーアームの巻込角(α)は、x 軸に対してなす角として定義した。角度成分(τ, α)の分布は動径軸方向に積分して求めた。

らせん対称性を用いた三次元再構成

本論文では、らせん対称性を用いた三次元再構成を行っている (図 13)。らせん対称性を用いた三次元再構成とは、タンパク質がらせん対称性を持つフィラメント構造を形成している場合に有効な画像処理法である。電子顕微鏡により撮影された像は

タンパク質の投影像である。この時、一本のフィラメントの投影像には、様々な向きのタンパク質投影像を撮影することになる。また、らせん対称性を持つため、フーリエ空間が層線として離散化され、また、それぞれの層線はらせんの巻き数などにより、選択律に従ったベッセル関数によって記述することが出来る。この層線からフーリエ合成することにより、一本のフィラメントの投影像から三次元像を再構成できる

(DoRosier and Moore, 1970; Moore *et al.*, 1970; Wakabayashi *et al.*, 1975; Amos and Klug, 1975)。一次元の構造を三次元空間に形成した場合に、らせん対称性を持つ場合は多く、筋肉を形成しているアクチン・ミオシンフィラメントはもちろんのこと、微小管やアミロイドなどでらせん対称性を示すことが知られている。詳細は以下に述べる。

電子顕微鏡像から一本のアクチンフィラメントあるいはアクチン-ミオシン硬直複合体を $f(y, z)$ として抽出する。この像をフーリエ変換することにより $F(Y, Z)$ の情報を得る。

$$F(Y, Z) = \iint f(y, z) e^{-2\pi i(yY+zZ)} dx dz$$

この後に、層線の位置を決定し、その層線位置かららせんの選択律 ($l=tn+um$: 真の繰り返し周期中に t 回らせんが巻き、その間に u 個の分子があるらせん) を一本一本のフィラメントに対して決定する。決定されたらせんの選択律に応じて、図 13 の `llExtract` を用いて各層線を $G_{nl}(R)$ として帰属させる。

$$G_{nl}(R) \leftarrow F(Y, Z)$$

$F(Y, Z)$ を $G_{nl}(R)$ に帰属させることは、画像をらせん成分で展開することを意味し、数学的にはベッセル関数で展開することを意味する。この時、 n はらせんの巻き数を表し、ベッセル関数の次数に対応する。また、 l は、層線の位置 ($Z = l/C$, C は真の繰り返し周期) を表している。アクチンフィラメントの再構成では、 $l=6n+13m$ の選択律を用い、アクチン-ミオシン硬直複合体の三次元再構成では、 $l=25n+54m$ の選択律を用いた。次に、フーリエベッセル変換により、 $g_{nl}(r)$ を求める。

$$g_{nl}(r) = \int G_{nl}(R) J_n(2\pi rR) 2\pi R dR$$

この後、すべての n 及び l に関してフーリエ合成することにより、三次元像 $f(r, \phi, z)$ また $f(x, y, z)$ を得ることが出来る。

$$f(x, y, z) \leftarrow f(r, \phi, z) = \sum g_{nl}(r) e^{-i(n\phi - 2\pi z l / C)}$$

各々分子位置と向きは、Wakabayashi *et al.* (1975) と Amos and Klug (1975) らの方法に従って決定し、フィラメントの平均を行った。コントラスト変調関数の補正は、前述のホログラフィック像再構成法によって行った。

らせん対称性を用いた三次元揺らぎ情報の抽出

らせん対称性を使ってアクチン分子の揺らぎ情報を抽出するのは以下の論理による(図 2 1)。まず、らせん対称性を用いると一本のアクチンフィラメントの三次元像を得ることが出来る。ここでは、6クロスオーバーの長さからなるアクチンフィラメント一本に対して、選択律を決定し三次元像を再構成する。この時、一本のフィラメント内でもモノマー毎で構造が異なっているドメイン(ランダムに揺らいでいるドメイン)は、らせん対称性に従わないので、一本から再構成された三次元構造での密度が低くなる。更に、各々のフィラメントを平均した場合も、その平均密度は低い。この時、密度の標準偏差(SD)は、一本から再構成された三次元密度が低く、かつ、既に多くの構造が平均されているため、小さい値をとる。従って、標準偏差を平均密度で割ったものは中間的な値となる。一本のフィラメント内部では同じ構造をとっているが、その構造がフィラメント毎に違っているドメイン(協同的に揺らいでいるドメイン)の場合には、各フィラメントの三次元像の密度は高い。しかし、フィラメント毎に構造が異なっているために、各フィラメントを平均した時の平均密度は低く、標準偏差は大きくなる。従って、標準偏差を平均密度で割った量は大きくなる。また、全く構造変化をしないドメインは、平均密度が高く、標準偏差も小さくなるので、標準偏差を密度で割った量は小さくなる。

従って、フィラメント間の平均を取った際に、フィラメント密度が低くなる場所は構造揺らぎを起こしている場所であり、フィラメント間の密度の標準偏差を平均密度で割ったものが大きいものは、その中でも協同的に構造変化を起こし得る場所であると考えられる。

第I章 アクチンフィラメントの構造

I-1 序

アクチンは、monomer 状態では、ATP を結合しており、filament を形成後、ATP を加水分解し、無機リン酸を放出し、ADP は結合したままである。ATP の加水分解のエネルギーは、直接、filament 形成にとって不可欠ではない。しかし、アクチンフィラメントは、その結合しているリガンドの違いにより、その構造が異なっていることが、負染色を用いた電子顕微鏡法や生化学的手法により示唆されている。我々は、その構造変化検証するために、クライオ電子顕微鏡法を用いて、アクチンフィラメントの三次元構造へのリガンドの影響を調べた。更に、アクチンフィラメントの構造揺らぎの情報を抽出することを試みた。更に、アクチン内に存在する、Ambivalent 構造配列を、生物情報学的手法によって予測し、その配列位置と我々が得たアクチンフィラメントの構造揺らぎの情報との比較を行った。Ambivalent 配列(Young *et al.*, 1999; Kirshenbaum, 1999)とは、特定の二次構造をとりにくいと予測され、2つ以上の構造を環境に応じて転移すると考えられる配列である。

アクチンの Cys374 は、アクチンの C 端構造に存在しているが(図 2 6)、その化学修飾が容易であるため多くの種類の蛍光分子などを導入して、ミオシンとの結合をはじめとして様々な結合状態の reporter として用いられてきた。その意味で Cys374 の三次元的な位置は、アクチンの機能を研究する上で非常に重要である。

X線結晶解析、電子顕微鏡、蛍光エネルギー移動等で Cys374 の位置を同定する研究が行われてきたが、お互いにその位置が一致していない。Moens *et al.* (1994) は Cys374 がアクチンのフィラメント軸から 17 Å (S.D. 5 Å) 離れた所にあることを示しているが、アクチン配向ゲルの X線散乱から提起されている原子モデルでは、27 Å 離れたところに存在することが示唆されている。また、平滑筋由来のアクチンの結晶

構造では、他の結晶構造が示す位置と異なる位置に Cys374 があることが示されている。これらの違いは、生物種による違いではなく、Cys374 が化学修飾されているかどうかの違いであり、Cys374 の化学修飾が Cys374 周辺の構造に影響を与える可能性を考えた。

I-2 結果

無機リン酸の濃度の違いによるフィラメントの硬さの変化

無機リン酸の濃度の効果を吟味する際には、イオン強度が共通になるように NaCl の濃度を変化させた。アクチンフィラメントを含む溶液を、1-2 μm 位の直径をもつ孔の開いたカーボン薄膜を張ったグリッドに乗せた。濾紙で吸い取り、100 nm 程度の厚さをもつ水の薄膜を作成し、急速凍結した。その後、クライオ電子顕微鏡法を用いて、氷包埋したアクチンフィラメントを観察した。図 1 7 は、MgADP 結合型のアクチンフィラメントのクライオ電子顕微鏡像であり、図 1 8 は、MgAMPPNP 結合型のアクチンフィラメントのクライオ電子顕微鏡像である。200 keV のエネルギーの電子が 90% 以上透過していることから、100 nm 以下の薄い厚さをもつ非結晶の氷の中にアクチンフィラメントは包埋されていると見積もることができた。

アクチンフィラメントは基本的に直線様の構造をしているが、わずかに湾曲している。この湾曲程度がアクチンフィラメントの硬さの指標となる。この 100 nm の氷に包埋されたアクチンフィラメントの弾性を、持続長 (図 1 4) により評価した。その結果を図 1 9 に示している。無機リン酸の濃度が上昇するに連れて、持続長が長くなり、アクチンフィラメントが硬くなっていることが分かる (図 1 9 a)。また、MgATP 結合型あるいは MgADPPi 結合型のアナログであると考えられる MgAMPPNP 結合型のアクチンでは、持続長は長く、もっとも硬いアクチンフィラメントであることが分かった。(図 1 9 b) これらのことから、フィラメント形成した直後のアクチンフィラメントは ATP 型であり硬く、その後、ADPPi 型、ADP 型と次第に柔らかくな

っていることが示唆された。

アクチンフィラメントの構造情報

上記のアクチンの硬さの変化がどのような構造の違いに由来しているかを明らかにするために、もっとも硬いアクチンフィラメントであった MgAMPPNP 結合型のアクチンと MgADP 結合型のアクチンに関して、らせん対称性を仮定した三次元再構成法 (図 1 3) により、その三次元構造を明らかにした。

図 2 0 は、図 1 7 及び 1 8 から切り出した一本のアクチンフィラメントを示している。図 2 1 は、MgAMPPNP 結合型及び MgADP 結合型のアクチンフィラメントの三次元構造である。アクチンのヌクレオチド結合クレフトはどちらも観察することができる。その構造を指標にしてそれぞれのサブドメインを同定すると、第 2 ドメイン周辺のみ大きな構造変化が起きていることが分かった。この構造変化が曲げ弾性の変化につながっている可能性がある。

アクチンフィラメントの構造揺らぎの情報

アクチンフィラメントの構造揺らぎの情報を取り出した。これは、らせん対称性を用いた三次元再構成法と電子顕微鏡法を組み合わせで行った (図 2 2)。6 クロスオーバー (36 nm x 6) を構造基本単位として用いた。三次元再構成されたアクチンフィラメントの密度分布及び密度揺らぎの違いが揺らぎの情報を示しているので、構造揺らぎ情報の抽出を試みた。これは、X線結晶解析法における温度因子を見積もることに相当している。

図 2 3 は、その構造揺らぎを色により示している。赤く示したところが、アクチンフィラメント内でよく揺らいでいる部分を示している。この解析を、二つのヌクレオチド状態 (MgADP と MgAMPPNP をそれぞれ結合した状態) について行った。いずれ

の場合もアクチンの第一第二ドメインからなるアウトドメイン側は、よく揺らいでいる。これは、アクチンフィラメントの捻れ角方向に関して、アクチンフィラメントはよく揺らぐとした Egelman *et al.* (1982)の結果と一致する。

次に第三第四サブドメインからなる内部ドメインに関して、その構造に着目したのが、図 2 4 である。MgADP 結合型では 5 本の β ストランドが揃って揺らぎがないのに対して、MgAMPPNP 結合型のアクチンでは、ベータシート内で手前の 2 本と奥の 3 本が異なる揺らぎ方をしていた。この事は、アクチンサブドメイン内の超二次構造のクレフト(図 2 e)をはさんで、 β ストランドの構造揺らぎがそのヌクレオチド状態に依存して変化する示唆している。すなわち、X線結晶解析法などで、クレフトとして開閉が示唆されている構造(図 2 e)が、実際に動きの中心となっていることと考えられる。しかし、現在の分解能では、中央の一本のストランドの揺らぎの判断が難しい状況である。今後、分子数を増やし、また、単に平均化し、標準偏差をみるだけでなく、画像分類などの手法と組み合わせることにより、協同的な構造変化を起こしているかどうかを実証することができると考えられる。

アクチンの構造揺らぎと Ambivalent 配列

図 2 5 は、Young 等より提唱された Ambivalent な配列予測(Young *et al.*, 1999 ; Kirshenbaum, 1999)を、アクチンに対して適用したものである。彼等は、Ambivalent な配列がタンパク質の構造変化を引き起こすスイッチ領域となり得ることを示唆している。Window 幅を 21 としたとき (図 2 5 a) に、アクチンでは、二つの部位で Ambivalent な部位が予測されている。Window 幅 21 は、彼等が global switch region を探すために使用した Window 幅である。図 2 5 c はその部分をアクチンで図示したものである。

Global switch として予測されたもののうちの一つは、アクチン第三サブドメイン裏から第 4 ドメインへのループ(171-175)であった。この部分は、成田等の結果によ

ればアクチンとトロポニンの結合部位にあたることが示唆されている部位である。この部位はヌクレオチド結合部位にも近い。また、この部位は、MgAMPPNP型とMgADP型で構造揺らぎの違いを示した β シートの一番奥の β ストランドにつながる部分である。図24c,dを比較すると、揺らぎの強度が変わっており、MgADP構造でその揺らぎが大きかった。このスイッチ領域において、スイッチが切り替わることがMgADP構造では起こっているのかも知れない。また、もう一つの部位はアクチンのC末端部位(349-367)がAmbivalentな配列であると予測された。

Window幅を5としたときには(図23b)、アクチンでは、上述の2カ所を含む94-95, 173-178, 295, 355-361, 370-371の5つのアミノ酸配列の部位でAmbivalent配列が予測された。図23cの黄色のバックボーンはその部分をアクチンで図示したものである。ウィンドウ幅5はlocal switch regionである可能性を示唆している。新しく295が増えた以外はすべてglobal switchとして予測された領域の近傍である。但し、C末端部は二つのスイッチがあると予測された。370-371にもう一つ新たなスイッチがある可能性がある。このことは、アクチンC端の構造が環境に応じて変化しうることを示している。次節で示すラベルの導入によるアクチンC末端部の大規模な構造変化は、ここで予測したC末端の二つのスイッチによって生じている可能性がある。

ラベル導入によるアクチンC端の構造変化

上述したように、アクチンフィラメントC端は環境に応じて構造変化する可能性がある。これまで、蛍光エネルギー移動を用いた実験において、Cys374からLys61, Tyr69, アデノシンのC5及び二価の金属イオンの結合部位までの距離が測定されている(表1)。この情報と確率的距離幾何学法を用いて、4つの場合について、アクチンのCys374の位置の可能性を確率分布として計算した。

表1は、確率的距離幾何学法により計算されたCys374の三次元位置と推定された距離を示している。また、図23はCys374の確率分布関数を示している。Case Iで

は、X線結晶解析の構造からの距離情報を使い、Cys374の蛍光分子がアクチンにより排除されることはないとした場合であり、Cys374の位置は2 Åの精度で本来のCys374の位置に同定することができた(case I: 図2 3 a)。このことは、ここで開発した確率的距離幾何学法が従来の三角測量法によって決定された方法と矛盾がなく、また従来の三角測量法を包含したものであることを示している。

しかし、実際のアクチンの構造の中では、Cys374のSH基の周りは多くの原子で囲まれている(図2 7)。例えばアクチン第1ドメインのβシートの一部であるチロシン133のC_δは、SH基から~4 Å以内に存在している。したがって、蛍光分子がSH基に結合した場合にはβシートにぶつかることが予想される。実際、X線結晶解析の構造からの距離情報を使った場合でも、アクチンによる排除効果を考慮した場合には、Cys374として計算される位置は、本来の位置ではなく、24 Åほどアクチンの後方にずれた位置となった(case II, 図2 6 b)。このことは、Cys374に蛍光ラベルが結合した場合には、Cys374の位置が結晶構造の示す位置に存在し得ないことを示している。

次に、蛍光エネルギー移動により測定された距離情報を用いるが、アクチンによる蛍光分子の排除効果を考慮しない場合は(case III)、蛍光分子の排除効果を考慮しないにも関わらず、X線結晶解析によって求められたCys374の位置から約28 Å離れた所にその存在確率が収束した(図2 6 c)。更に、排除効果を考慮すると、case IV(図2 6 d)に示されているように、更に制限された領域(< 6 Å)に存在確率が限定された。興味深い点は、距離情報として、X線結晶解析からの情報を用いつつ排除効果を入れたcase IIの確率分布に近い位置に収束している点である。このことは、蛍光ラベルにより修飾されたCys374は、蛍光ラベルが大きさを持つために、結晶構造が示すCys374の位置を占めることができず、その存在位置を変えることを示唆している。

我々の結果により得られたCys374の位置と、距離情報として用いなかったCys10の位置(2btfではVal10に相当する)との距離は、約31 Åであった。また、Sasaki等

により提唱されている原子モデル(Sasaki *et al.*, 1992)や蛍光エネルギー移動法による距離測定でも 30 Å 程度であることが示唆されており、我々の結果と矛盾しない。しかしながら、同様に計算に用いられなかったアクチンの Gln41 と Cys374 の距離は 42 Å となり、FRET により測定された 30 Å とは矛盾する。これは、Gln41 が含まれている DNase I ループと呼ばれる構造は結晶の温度因子等から非常にフレキシブルであることに起因しているかも知れない。また、この DNase I ループの構造は、アクチンゲルから求められたアクチンフィラメントの原子モデルと DNase I 結合型のアクチンの原子モデルとでは変化していることが報告されており、構造を変える Loop 構造であると考えられる(Kasprzak *et al.*, 1988)。

これまでの解析は、アクチンモノマー(2btf)の構造を仮定して計算してきた。この時、計算された Cys374 の位置は提唱されているアクチンフィラメント構造ではフィラメント軸から 10 Å (S.D. 3 Å)の位置に存在していた。それに対して、アクチンゲルによるアクチンフィラメントのモデルを仮定して計算した場合には、Cys374 の位置は、修飾された分子ではない別のアクチンモノマーにより蛍光分子の配置が排除されるために、更に領域が制限される。その結果、Cys374 の位置の期待値は、アクチンフィラメントの軸から 15 Å (S.D. 4 Å)の位置に移った(図 2 7)。この軸からの距離は、FRET 法を用いて Moens *et al.*により報告されている Cys374 のフィラメント軸からの距離(17 Å, S.D. 5 Å)と一致した。しかしながら、アクチンゲルにより提唱されている原子モデルの場合(27 Å)とは異なっている。両者の違いは、Cys374 が修飾されているかどうかにある。それ故、平滑筋アクチンの結晶構造の C 末端領域が他の結晶構造と違うのは、重原子同型置換の為に、Cys374 を重原子で化学修飾したためであると考えられる。実際、他の結晶構造では、C 末端がタンパク質分解酵素により限定分解されていたり(Kabsch *et al.*, 1990)、分子置換法により原子モデルが解かれていたりするために、Cys374 は化学修飾されていない(McLaughlin, *et al.*, 1993; Schutt *et al.*, 1993)。

これまで、リジン 61 (K61), チロシン 69 (Y69)を固定点として取り扱ってきた。このことに問題がないことを確かめるために K61, Y69 が、現在の固定点の周りに、10 Å の幅で揺らぐことができるように $k_B T / (10 \text{ \AA})^2$ のバネ定数で、原子モデルが期待する点からのバネでつながれているとして、計算を行ったものが表 2 及び表 3 である。表 2 をみると、K61, Y69 は動くことを許したにもかかわらず、2-4 Å 動いたのみであり、K61, Y69 の位置はほとんど原子モデルで説明できることがわかった。また、表 3 によれば、距離情報を用いていない、K61-NucC5, Cation-K61, K61-Y69, Y69-NucC5, Y69-Cation 間のそれぞれの距離は、X線結晶解析による結果とほぼ一致している。したがって、K61, Y69, NucC5, Cation の4つのサイトは、原子モデルと同じような配置をしていると結論することができた。したがって、K61, Y69 を固定点として扱ったことは妥当であったと結論した。

I-3 考察

アクチンの硬さと無機リン酸濃度

得られた持続長は、Isambert *et al.* (1995)によって、蛍光顕微鏡法により蛍光標識されたアクチンを直接観察することによって測定されたものに比べて全体的にやや短い。これは、10 μm 以上も長いアクチンフィラメントが 100 nm という薄い氷の中に包埋されているために、擬二次元空間内に束縛されていることになるため、あるいは、表面からの影響を受けているためかもしれない。したがって、三次元的に自由に揺らぐことができる場合と比較して、絶対的な量に意味を持たせることには問題がある。しかし、Ca 結合型アクチン(~4 μm)と Mg 結合型アクチン(~0.9 μm)を比べて前者がより硬いことがわかったが、これは、溶液中で他の方法により測定されたものと同様の傾向である。このことは、相対的な変化に関して議論することができることを示している。

更に Isambert *et al.* (1995)の実験では、Cys374 に蛍光標識したアクチンが用いられており、この事がアクチンフィラメントの堅さに影響を与えている可能性がある。確率的距離幾何学法によって、Cys374 に標識された蛍光分子は、ファロイジン結合部位の近くに、その存在位置を変えることが分かった。ファロイジンを結合したアクチンフィラメントでは、持続長が長くなることを Isambert *et al.* (1995)の中で報告しており、蛍光分子がファロイジンと同様の効果をアクチンフィラメントの堅さにもたらした可能性がある。

アクチンの硬さ変化は無機リン酸の濃度に依存し、その変化を生じさせる見かけの無機リン酸解離定数 (K_m) は、10 mM 程度であった。一方で、生化学的には、1.5 mM (pH 7) 程度の解離定数であることが示されている (Carlier, 1990)。したがって、無機リン酸の濃度が 10 mM では、80% 以上のアクチンに無機リン酸が結合していることになる。この時、マクロな弾性率の変化として捉えることができた。したがって、リン酸の結合が硬さの変化を引き起こしているが、ほとんどのアクチンに結合しないとマクロな弾性率の変化として捉えられないと考えられ、何らかの協同性を考慮する必要がある。

Wriggers and Schulten (1997, 1999)によれば、アクチンもまたバックドア酵素であることが示唆され、そのリン酸の解離には、アルギニン (R177) が重要であることが示されている。Ambivalent 配列予測 (図 2 4) によれば、この領域の上流はスイッチ領域である可能性が示唆され、図 2 4 によれば、MgADP と MgAMPPNP により構造揺らぎ変化を引き起こしていることが分かった。これらのことからリン酸の結合解離がこの R177 周辺の構造変化を通して、マクロな硬さの協同的な変化を引き起こす可能性が考えられる。以上のことから、このアクチンフィラメントの硬さ変化は、無機リン酸の結合によるものだと考えられる。

一方で、アクチンの構造変化と構造揺らぎが張力発生に影響を与えている可能性を考える必要がある。ここで我々が得たアクチンの硬さの変化の無機リン酸濃度への

依存性は、筋繊維が発生する張力が無機リン酸の濃度上昇に応じて減少するときに見られる依存性($K_d = \text{約 } 7 \text{ mM}$)に類似している (Pate and Cooke, 1989; Kawai and Halvorson, 1991; Kawai and Zhao, 1993; Pate *et al.*, 1998)。したがって、アクチンへのリン酸の結合が張力減少を引き起こしている可能性がある。

これまで、これはミオシンへの影響であることが示唆されているが、生化学的に得られているミオシンへの無機リン酸の解離定数は 50 mM を超えている。したがって、直接ミオシンへの無機リン酸の結合が張力の減少を引き起こすと考える場合には、アクチンとミオシンの結合によって無機リン酸の解離定数が下がることを考慮する必要がある。これは、後述したミオシンがアクチンと結合した場合に、バックドアが開くという観察と一致する (図 4 7)。しかし、生理的条件下での無機リン酸の濃度が数 mM である事を考慮すると、アクチン-ミオシン硬直複合体への無機リン酸の解離定数が 7 mM であるとする加水分解反応に対して非常に不利に働くことになる。ここで、無機リン酸濃度に対する張力と構造揺らぎの依存性が似ていることから、アクチンへ無機リン酸の結合の影響を再考の必要があろう。

アクチンのリガンドを交換したことによる、滑り運動再構成系を用いた実験 (Ohishi and Sugi, 1994) では、その滑り運動活性にアクチンのリガンドがほとんど影響がないことが報告されている。実際、筋繊維を用いた実験でも、無機リン酸の付加により、最大滑り速度の低下はそれほど見られていない。筋繊維を用いた実験では、現在の所、無機リン酸濃度を変えたときの張力測定の際、アクチンとミオシンへのそれぞれの影響を分離することは難しい。滑り運動の再構成系を用いた実験では、無機リン酸の付加により滑り運動中のアクチンフィラメントがミオシン表面からはがれやすいことが示されている。(Yasunaga *et al.*, 1996)。この事は、ミオシン-アクチンの結合力の低下を示唆している。今後、 MgAMPPNP アクチンなどの交換反応の遅い反応と張力測定の系を組み合わせることなどにより明らかにする必要があると考えられる。石渡らにより報告されている自発的振動現象(SPOC)でも同程度の無機リ

ン酸の必要性が言われている。したがって、SPOC 現象でもアクチンへの無機リン酸の結合が重要である可能性がある。

アクチンフィラメントの硬さが生物活性に与える影響に関しては、細胞骨格系のスイッチやタイマーの役割を果たしている可能性がある。MgADP 結合型のアクチンは、MgATP 結合型のアクチンよりも、その重合反応における臨界濃度が 10 倍高いことが知られている。以上のことから、細胞内においても無機リン酸の脱着及びそれに伴う構造の変化が生理活性に影響があると考えられる。

リガンドによるアクチン分子の構造変化及び揺らぎ

確率的距離幾何学法(probabilistic distance geometry)による解析の結果、アクチン C 末構造に含まれる Cys374 は、アクチンフィラメントのアクチンヘリックスに沿った溝に存在することが示された。図 2 6 に示されている様に、この位置は、三つのアクチン・プロトマーが出会う点でもある。計算された Cys374 の確率分布から 10 Å 以内にあるアミノ酸残基はそれぞれのプロトマーに関して、(i) Cys374 が蛍光ラベルされたアクチンの 72-77、112 及び 177-179、(ii) その b 端側(barbed-end side)アクチンの 193-206 及び 237-249、(iii) p 端側(pointed-end side)アクチンの 276-290 及び 316-327 であった。この位置は、アクチンフィラメントの脱重合を阻害するキノコ毒ファロイジンの結合部位に近い。このことは、ファロイジンが Cys374 と化学架橋することができるという報告 (Faulstich *et al.*) に一致している。また、この領域は、Ambivalent 領域(171-175)の近傍である。更に、C 末端構造の Ambivalent 配列

(349-367)に含まれている Gly366 と、計算により求められた Cys374 の位置は 30 Å ほど離れている。もし、Gly366 をスイッチとして 366-374 からなる 9 残基が伸びた構造をとるとすると、その長さは 27 Å となりうる。したがって、Cys374 がある大きさを持つ分子により化学修飾をされた場合には、このアクチンの C 端構造は伸びた構造をとると推定できる。実際、結晶中の構造はヘリックス構造をとるが、二次構造予

測によれば、C 端側の 12 残基はループかストランド構造をとると予測される。更に、Cys374 の化学修飾や C 末端である Phe375 を除去すると、アクチンフィラメントが、剪断力により不安定化し、また、フィラメント形成のために必要な臨界濃度が増加することが Drewes and Faulstich (1993) によって報告されている。細胞性粘菌アクチンの原子モデル(Matsuura *et al.*, 2000)は、分解能が高く、多くの水分子が観察されているが、その構造の中では、アクチンの C 末端のカルボキシ基は水や他の残基と水素結合を作り、C 末端領域が安定化されていることが示されている。それ故、Cys374 へ大きさを持った分子による化学修飾を導入することは、そうした水素結合を壊し、アクチンの C 末端領域の構造変化を引き起こしていると考えられる。

ミオシンの結合によってもこのアクチン Cys374 に結合した pyrene-maleimide の蛍光強度が変わることが Kouyama and Mihashi (1981) によって指摘されており、環境に応じたセンサーの役割を果たしている可能性がある。また、この伸びた C 末端構造はもう一方の Ambivalent 配列の近傍まで伸びると計算された。もう一方の Ambivalent 部位はアクチンの第三ドメインと第四ドメインをつなぐ役割を果たしており、アクチンのフィラメント方向の協同的な構造変化の源となっていることが想定される。したがって、ここで指摘した C 末端領域の構造変化がアクチンに対して協同的に構造変化を引き起こす可能性が示唆される。実際、Orlova ら(1995)により、200 分子に一個の phalloidin 結合により、アクチンフィラメントの構造が協同的に変化することが、電子顕微鏡法により示されている。

今後、電子顕微鏡法によって得られたアクチンフィラメントの三次元構造の分解能をあげ、20 残基ほどからなる C 末端構造を十分に区別して可視化できるようになれば、協同性の起源を明らかにできよう。

第II章 ミオシンの構造

II-1 序

ミオシンは、多型性を持つこと(Tokunaga *et al.*, 1991; Tokunaga *et al.*, 1994; Sellers, 1999)が知られている。ヌクレオチドの結合状態 (Lymn and Taylor, 1971; Bagshaw and Trentham, 1974; Goldman, 1987)や三次元構造 (Gulick and Rayment, 1997b; Holmes, 1997; Goldman, 1998)においても多くの状態を持っている。ミオシンの原子モデルが始めて報告 (Rayment, 1993a)されてから、10を超える原子モデルが報告されてきた。これらの構造は、大きく2つの構造 (type I と type II)に分けられてきた。Houdusse 等は第三の構造を報告した(Houdusse *et al.*, 1999)。そこで、本論文では、これらの三つの構造が溶液中でどの化学状態に対応しているかを明らかにするために、蛍光エネルギー移動法を用いて捉えることにより、ATP 存在下、ADP 存在下でのミオシンの構造を決定した。

柳田らは、ATP加水分解と滑り現象のカップリングの性質について一分子のレベルで明らかにしてきた(Yanagida *et al.* 2000; Ishijima *et al.*, 1998; Kitamura *et al.*, 1999; Ishijima *et al.*, 1991; Harada *et al.*, 1987)。ヌクレオチドの結合・解離を一分子レベルで、モータータンパク質群の出す力や移動距離の測定を一分子レベルで、行うことが出来るようになった。しかし、分子レベルで滑り運動を理解するために残されているのは、一分子レベルの構造解析である。電子顕微鏡法と蒸着法を組み合わせ、片山や徳永らは一分子構造を議論してきた(Katayama, 1998; Tokunaga *et al.*, 1991; Tokunaga *et al.*, 1994)。蒸着法による構造解析は、その試料作成時に生じるアーティファクトの議論から免れるのが困難である。また、他の染色法の場合も同様の問題がある(Burgess *et al.*, 1997)。

そこで、我々はもっともタンパク質にとってマイルドな条件であると考えられる氷

包埋法を用いて、解析を進めることにした。タンパク質が水和した条件で、そのまま温度を下げた状態を実現でき、タンパク質の計算機シミュレーションの世界では、温度を下げて、エネルギーの最小化を行ったことにあたると考えられる。凍結に要する時間は、サブミリ秒以内であることが知られており、ミリ秒以上の緩和時間を持つ構造変化や揺らぎを固定できる可能性がある。ところが、氷包埋したタンパク質試料を、電子顕微鏡法により観察する際に、タンパク質と溶液との密度の差が小さいことにより、コントラストが低いことが問題となる。これを解消するために、我々は冷電界放出型電子銃を備えた電子顕微鏡によって得られるコヒーレンスの高い電子線を使って、大きな不足焦点で、タンパク質を観察することにより、クライオ電子顕微鏡法によるミオシンの一分子観察に成功した。それにより得られた知見について、本論文にて報告する。

II-2 結果

FRET により同定されたミオシンの溶液中での構造

Suzuki *et al.* (1998) の解析結果を報告した後、ミオシンの第三の構造が報告されたので、その構造も含めて Suzuki 等との共同研究で報告した距離情報と合致するかどうかを、確率的距離幾何学法により検証した (Yasunaga *et al.*, 2000)。

図 3 0 は、表 4 に示したように最終的にもっとも良い rms を与えた ATP 条件でのミオシンの構造として 1vom を、ADP 条件での構造として 1mmd を選択したときの N 端蛍光タンパク質(NFP)及びC 端蛍光タンパク質(CFP)が収束していく様子を示したものである。図 3 0 a は、初期の NFP ($q^{(0)}_{\text{NFP}}$)、ATP 存在下での CFP ($q^{(0)}_{\text{CFP,ATP}}$)、ADP 存在下での CFP ($q^{(0)}_{\text{CFP,ADP}}$)の分布をそれぞれ、紫、オレンジ、緑で示したものである。固定された蛍光分子と固定されていない蛍光分子との距離情報 (図 2 9 b の L_1, L_2, L_3, L_4)だけが使われたときのものなので、評価された範囲は広い。タンパク質

との排除効果により、分布が許された領域は幾分制限されている。図 3 0 b は、初回の繰返計算後の確率分布関数 ($p^{(0)}_{\text{NFP}}$, $p^{(0)}_{\text{CFP,ADP}}$, $p^{(0)}_{\text{CFP,ATP}}$) を示している。NFP と CFP との間の距離(図 2 9 b の $L_{5,\text{ATP}}$, $L_{5,\text{ADP}}$)の情報が使われたので、分布は更に制限されたものとなった。蛍光エネルギー移動法 (FRET) により測定された距離と解析により求められた距離との差の最小自乗和の平方根は(r.m.s.)は、19.3 Å から 7.6 Å に減少した。図 3 0 c は、2 回目の繰返し計算後の分布関数($p^{(1)}_{\text{NFP}}$, $p^{(1)}_{\text{CFP,ADP}}$ and $p^{(1)}_{\text{CFP,ATP}}$)を示しており、その r.m.s.は 5.0 Å まで減少した。図 3 0 d は 1 6 回の繰返し計算後の結果を示しており、最終的な r.m.s.は、1.0 Å であり、FRET の測定が持つ誤差あるいは実効的なバネ定数 ($k_B T(0.125 \text{ nm})^2$)とほぼ同程度となった。このことは、1 6 回の繰返し計算で十分であることを意味しており、また、繰返し計算により、蛍光団の位置はより正確に求めることができ、また、自己矛盾なく収束したことを示している。

以前の共同研究の段階 (Suzuki *et al.*, 1998)では、MgADPBeFx 結合型ミオシン (1mmd; Fisher *et al.*, 1995)と MgADPVi 結合型ミオシン(1vom; Smith and Rayment, 1996)をそれぞれ type I、type II 構造の代表として、ATP あるいは ADP 存在下での構造に関して、どちらの構造をとっているかを FRET の測定結果を、4 つの組み合わせの可能性 ((1) ATP 条件、ADP 条件が共に 1vom 構造である、(2) ATP 条件、ADP 条件が共に 1mmd 構造である、(3) ATP 条件で 1vom 構造、ADP 条件で 1mmd 構造である、(4) ATP 条件で 1mmd 構造、ADP 条件で 1vom 構造である)それぞれを仮定して計算をおこない、第三の可能性がもっとも良い一致を与えたことを報告した(Suzuki *et al.*, 1998)。

本論文では、更に、新しい第三の構造 (type III : 1b7t (Houdusse *et al.*, 1999)) が報告されたので、9 つの組み合わせの可能性を検討した。その結果を表 4 に示したが、今回も、ATP 条件で 1vom、ADP 条件で 1mmd の組み合わせの時にもっとも良い r.m.s. (1.0 Å) を示した。ATP 存在下での主たる化学状態は M.ADP.Pi であるの

で、1vom が MgADPVi 結合型の結晶構造(Smith and Rayment, 1996; Gulick *et al.*, 1997a). である 1vom であることは理解しやすい。表 5 は、9 つの可能な組み合わせに対する計算結果における $p^{(15)}_{\text{CFP,ATP}}$ 及び $p^{(15)}_{\text{CFP,ADP}}$ から見積もられた距離を示している。1b7t を ADP 結合型であるとした時には、すべて計算が一致しなかった。これは、主として、ヌクレオチドの結合位置と CFP との距離 ($L_{4,\text{ATP}}$ and $L_{4,\text{ADP}}$) が FRET の実験により得られたものよりも大きいためである。ATP 状態の構造としたときも良い一致を示さなかった。それ故、type III 構造は、結晶構造の中では、ADP を結合しているが、過渡的状態の構造を結晶としてトラップしたと考えられる。

図 3 1 は、もっとも可能性の高い構造であった、ATP 条件で 1vom, ADP 条件で 1mmd を選択した場合の NFP, CFP_{ATP} 及び CFP_{ADP} の分布領域を示している。この分布の中に存在する確率は 95% 以上である。CFP_{ATP} 及び CFP_{ADP} の分布は、C 端のコンバータードメインの配置にしたがって十分に異なった位置に、その分布を持つことが分かる。更に図 3 2 はレバーアームの位置を CFP の分布で表現したときの角度分布を示している。図 3 2 a で示されているように互いの分布は十分に離れている。

図 3 3 a-f は、ミオシン分子を三つの直交する向きから観察したものである。メッシュは C 端に結合した蛍光団の位置を示している。蛍光団の位置は、レバーアームの方向を良く代表していることがわかる。この時、レバーアームの動きの中心はディクチオ型ミオシンの Gly680 としている。このアミノ酸は SH1-SH2 2 つのヘリックスをつなぐところに存在し、結晶構造の中では、この周辺を中心にヘリックス及びコンバータードメインが回転している。レバーアームは 48°(ATP) から 125°(ADP) へとその角度を変えた。この変化の向きは、パワーstroークの向きと一致している。一方、アクチンを巻き込む方向の変化 (アクチンのらせん軸に垂直な断面内での回転) は 113.2°(ATP) から 113.9°(ADP) であり、ほとんど変化しなかった。このことはパワーstroークがほとんどアクチン軸に平行であること一致している。

図 3 4 は、電子顕微鏡法 (Toyoshima and Wakabayashi, 1985b; Milligan and

Flicker, 1987) や X 線結晶解析法 (Rayment *et al.*, 1993b; Mendelson and Morris, 1997)等から理論計算されたアクトミオシン複合体のモデルに、今回の計算結果をあわせて表示したものである。軽鎖はレバーアームの動きをわかりやすくするために取り外してある。電子顕微鏡法 (Toyoshima and Wakabayashi, 1985a; Milligan and Flicker, 1987, Milligan, 1996)により示されたレバーアームの向きは ADP 存在下での CFP の分布によく似ている。ATP 存在下で主たる化学状態である $M^{**}.ADP.Pi$ 状態から $M.ADP$ 状態あるいは硬直状態への変化はクロスブリッジのストロークの向きに一致している。レバーアームの長さを 100 \AA とすると、観測された角度変化は約 75° であるので、 $M^{**}.ADP.Pi$ 状態から $M.ADP$ 状態へ変化したときのストロークは約 140 \AA となる。この値は、筋繊維を使った張力測定の実験で quick release を行った時に T_2 がほとんど 0 となるときの release 距離とほぼ一致した (Huxley and Simmons, 1971; Ford *et al.*, 1977; Hexley, 1998)。

ミオシン単一分子の構造

図 3 5 は観測されたディクチオ型細胞性粘菌ミオシン S1 の像を示している。同一視野を 2 つの不足焦点で撮影した。図 3 5 a では、ミオシン分子をはっきりと認識することはできないが、図 3 5 b でははっきりと認識することができる。これは、図 1 5 b の高い空間的コヒーレンスを持つ場合のモデル計算と一致している。実際、HF-2000 における照射半角を測定すると、 $30 \mu\text{rad}$ 程度であった。したがって、 10 \AA を超える高い分解能の情報も残っていると結論した。

図 3 6 は、図 3 5 a 及び b の二枚の電子顕微鏡像から、ホログラフィック像再構成法によって再構成したミオシン像である。総電子線量は $30 \text{ 電子}/\text{\AA}^2$ となっているが、より分子をはっきりと観察することができる。ぼけが解消され、分子の突起がよりはっきりと認識できるようになった。図 3 7 は、それぞれのミオシン分子を抽出したものである。様々な向きを向いた分子像が観察され、分子内のクレフトや突起がはつき

りと認識できる。図38では、図37の中でシアン枠により囲まれた2つのミオシンS1の像に関して、X線結晶解析により求められた2mys（ヌクレオチドを結合していないミオシンの結晶構造）と比較した。

図38は、結晶構造との比較の結果を示している。ミオシン分子は、X線結晶解析に似た構造(図38a)もとるが、軽鎖結合部位の異なっている構造(図38c)をとることが示された。この時、溶液にはヌクレオチドを付加していないので、同じリガンド結合状態であったとしても、異なる構造をとりうる可能性を示唆している。徳永らは、電子顕微鏡法・ロータリーシャドウイング法を用いてミオシンS1は、同一リガンド状態でも、2つの構造 (straight-type と bent-type) が常に存在し、その平衡にあり、平衡がリガンドの状態によって変化することを示している (Tokunaga *et al.*, 1991; Tokunaga *et al.*, 1994)。我々の結果は、より生理的条件に近いと思われる氷包埋試料をもちいたものであるが、現状では、徳永らが示したような統計的な処理を出来るほど分子数が多くないので平衡を議論することはできないが、異なる構造が共存することは示された。上述したように、氷包埋法は、ミリ秒以下の時間スケールで、液体窒素温度に凍結する手法である。したがって、サブミリ秒以上の緩和時間を持つ構造を固定することができる。それより速い緩和時間である場合には、液体窒素温度でエネルギー的に安定な構造を取ると考えられる。このことから、徳永等が示した、二つの構造は、ミリ秒以上の長い時間スケールで行き来している構造であることが推定される。

現在、得られたミオシン分子の構造は、そのアクチンクレフトや、軽鎖結合部位などをはっきりと認識することが出来る。100kDa程度の分子重量の「小さな」タンパク質が、クライオ電子顕微鏡法によりはっきりと観察された例はこれまで報告されていない。ここで、現在議論しているのは、軽鎖結合部位の10 nmを超える構造変化についてであるが、今後、更に多くの分子を取り扱い、構造分類を行い、同一構造について平均化、三次元像再構成等を行うことにより、ミオシンモータードメイン内部

のサブドメイン間の再配置や揺らぎをとらえることが期待される。

II-3 考察

ミオシン分子構造の多型性

ミオシンの構造は多型性を示すことが知られている(Tokunaga *et al.*, 1991; Tokunaga *et al.*, 1994; Burgess *et al.*, 1997; Katayama, 1998)。かくして、FRETの結果はいくつかの構造の平均的な構造を反映している可能性がある。それ故、今回の構造もまた、平均的な位置を示しているかもしれない。X線小角散乱(Wakabayashi *et al.*, 1992; Dobbie *et al.*, 1998)でも、構造が変化することが示されているが、この場合も平均像である。今回、幸運なことにレバーアームの平均位置の違いを検知することができた。また、その分布は、図3 2で示したように十分に限定された領域となった。したがって得られた位置の確度は高いと結論づけることができた。

Houdusse *et al.* (1999) は、第三の構造 (type III) は、MgADP を結合しているが、pre-hydrolysis ("ATP") を代表していると提言している。これは、SH1 あるいは SH2 を含む α ヘリックスが壊れており、ATP 存在下で(i)この α ヘリックスの両端にある SH1 と SH2 の間を架橋する短い架橋剤で架橋することができること(Reisler *et al.*, 1974; Well and Yount, 1980), (ii) この領域がフレキシブルである (Huston *et al.*, 1988)ことと一致するからである。ここで、最近、Kliche *et al.* (1999) らがこの SH1-SH2 間の架橋が架橋剤の長さに依存することを報告していることは興味深い。彼等は、15 Å 以上の長さの架橋剤では、MgADP でも、十分に架橋でき、また、15 Å 以下でも反応時間は遅いが、架橋可能であることを示した。様々な架橋剤の比較により、Nitao and Reisler (1998)は、ヌクレオチドが SH1-SH2 ヘリックス構造の平衡を変化させることを提唱している。電子顕微鏡法により、Tokunaga *et al.* (1991)もまた、ミオシンの構造が2つの構造の平衡からなっていることを示している。

ここで、第三のミオシン構造 (type III) は、FRET の結果と矛盾していた。したがって、この第三の構造は短時間滞在する過渡的状态であり、FRET によっては観測されないが、架橋反応や結晶化では捕捉することができる状態であると考えられる。

実際の N 端と C 端の距離の変化($-7 \text{ \AA} = 29 - 36$)と FRET での NFP と CFP の距離の変化($+12.8 \text{ \AA} = 51.2 - 38.4$)とが異なっていた。これは、溶液の条件が ADP 条件から ATP 条件に変わったときに、C 端融合蛍光タンパク質 (CFP) はそのサイズの為に、コンバータードメインの動きを拡大している為であるかもしれない。

アクチンフィラメントがミオシンのコートされた表面上を滑る際に、アクチンフィラメントが回転することが報告されている (Tanaka *et al.*, 1992; Nishizaka *et al.*, 1993; Sase *et al.*, 1997)。しかしながら、これらの結果もまた、滑り運動は主としてフィラメント軸方向であることを示唆している。これは、図 3 3, 3 4 で示された結果と一致している。すなわち、ほとんど巻込方向の角度成分がほとんどない。CFP の位置はほとんどアクチン軸周りに変化していない。しかし、必須軽鎖 (ELC) と調節軽鎖 (RLC) の間でレバーアーム自身が曲がっていることは注目すべきである。この ELC/RLC junction は、scallop ミオシンでは Ca^{2+} 制御にとって重要である (Kwon *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1994)。この曲がり、Sase *et al.* (1997) が示しているわずかなトルクの生成に関与していると思われる。

Corrie *et al.* (1999) は、収縮中の筋肉では、調節軽鎖 (RLC) 結合部位の配置は第 2 の構造 (Dominguez *et al.*, 1998) と第 2 の構造 (Rayment *et al.*, 1993) の間であることを測定した。レバーアームの角度(τ)の増加は、Corrie *et al.* (1999) での β (1999) の増大に対応し、収縮方向に一致している。Corrie *et al.* (1999) は、RCL の捻れも観察している。しかし、原子モデル (Dominguez *et al.*, 1998) によれば、RLC と ELC は互いに配置を換えず、ELC・コンバータードメインがモータードメインに対して回転する。かくして RLC に見られた捻れは、ELC・コンバータードメインの回転に由来したものであろう。すなわち、彼等が観測した捻れは、今回の解析の中で

RLC の巻き込み角に当たるものである。図 3 3 では、ELC と RLC の結合しているドメインがわずかに曲がっているために、RLC の巻き込み角の変化を生じている。変化の方向は、ミオシンが次の b 端側アクチンに結合するのに有利な方向であり、ミオシンがアクチンから離れたときに、次のアクチンの近くに位置することになる。

図 3 3, 3 4 の中で、ミオシンはアクチンと電子顕微鏡法によって決定された向き (Toyoshima and Wakabayashi, 1985b; Tokunaga *et al.*, 1987; Mendelson and Morris, 1997) と同じ向きに配置した。一方で、ヌクレオチドが存在しないときでもミオシンとアクチンは過渡的な結合様式をとりうることも示されている (Walker *et al.*, 1999)。したがって、ミオシンは硬直複合体形成時においても、構造の多型性を示すかもしれない。実際、アクトミオシン硬直複合体のなかでも調節軽鎖の密度が観察されにくい。このことは、調節軽鎖部位の構造変化を示しているかもしれない。また、ミオシンはアクチンと収縮中には様々なモードで結合することが知られている (Hirose and Wakabayashi, 1993; Hirose *et al.*, 1994; Katayama, 1998, Taylor *et al.*, 1999)。収縮中の筋肉では、ミオシン頭部は、アクチン軸の周りに回転することも観察されている (Hirose and Wakabayashi, 1993; Hirose *et al.*, 1994)。こうした多くの結合モードは、弱い結合状態 (Eisenberg and Greene, 1980; Geeves, 1992) であるかアクチンとミオシンの結合の過渡的状态を示しているのかもしれない。Taylor *et al.* (1999) は、筋収縮の間に 2 つの段階があることを提唱している。すなわち、弱い結合状態から強い結合状態への結合したままの遷移と、その後、第 2 の構造 (pre-stroke 状態) から第 1 の構造 (post-stroke 状態) への遷移の二段階である。我々が見出した遷移は後者のものに相当するかもしれない。

第III章 アクチン・ミオシン複合体の構造

III-1 序

ミオシンはアクチンと相互作用することにより、滑り運動を引き起こす。また、ミオシンは ATP 加水分解反応の際、その産物である無機リン酸の解離が、アクチンにより 100 倍以上に促進される(図 9)。この無機リン酸の解離の促進は、ATP 加水分解反応に不可逆性をもたらし、ひいては、滑り運動の一方向性につながるものと考えられている。

そこで、アクチンと相互作用したときのミオシンの構造を明らかにするために、ヌクレオチドがない時に形成されるアクチン-ミオシン硬直複合体の構造解析を行った。これは、モータータンパク質であるミオシンがアクチンに強い結合する時の、結合様式を明らかにすることによって、モーター機能の不可逆性につながる相互作用様式を明らかにすることが目的である。また、硬直複合体は、アクチンのらせん対称性に則ってアクチンとミオシンが 1 対 1 で結合する。このらせん対称性は、三次元構造を研究するのに適している。

III-2 結果

アクトミオシン硬直複合体の研究

図 3 9 は、ディクチオ型ミオシン S1 とアクチンがほぼ 1:1 に結合したアクチン・ミオシンの硬直複合体のクライオ電子顕微鏡写真である。異なる不足焦点量で、同一視野を撮影した(図 3 9 a 及び b)。また、ミオシン単一分子の時と同様にホログラフィック像再構成法を用いて補正を行った像が図 3 9 c である。個々のミオシン分子の構造を明瞭に観察することが出来た。らせん対称性を用いた三次元再構成を行う場合には、逆空間で層線情報をフィラメント毎に平均化するが、その平均化の作業でホログ

ラフィック像再構成を行った。これは、異なるフィラメント像であっても、らせん対称性を用いて平均化することが可能である為であり、同一視野のみの像でしか再構成ができない単一ミオシン S1 分子観察の場合よりも多くの異なるデフォーカス量の像から再構成できるので、有利である。Wiener 型フィルタにより、S/N 比を 0.1、強度コントラストを 0.05 として補正を行った。

図 4 0 a は、1 1 クロスオーバー(36 nm x 6)からなる一本のフィラメントを切り出したものである。図 4 0 b はそのフーリエパターンであり、何本かの強度の強い層線がよく見える様に表示してある。このフーリエパターンの動径方向の散乱強度分布を示したものが図 4 0 c である。赤はデフォーカス量に応じて推定したコントラスト伝達関数を示している。実際のコントラスト伝達関数は、図 3 9 で示したよりも広い視野全体から決定しているが、一本のアクトミオシン硬直複合体から、コントラスト伝達関数を見積もることができることがわかった。ただし、らせん対称性を持つために、いくつかのピークと谷を持つことには注意が必要である。

図 4 1 は、約 1,800 対のアクトミオシンの分子像からの 3 次元再構成像である。アクチンとミオシンの像をはっきりと分離して観察することができた。また、Double Arrowhead で示されているミオシン分子同士を結ぶ構造や、Single Arrowhead で示されている b 端側(barbed-end side)アクチンとのミオシンの構造も観察できた。X 線結晶解析によって得られた原子モデルと比較したのが、図 4 2 である。図 4 2 b に示した向きに置くと、ミオシンのドメイン構造をほとんど同定することができた。図 4 2 a にそのドメイン構造を色で塗り分けてある。ただし、軽鎖結合部位特に調節軽鎖結合部位はその密度がはっきりしなかった。これは、半径の大きい所を再構成できるだけの分解能に達していないかあるいは軽鎖結合部位が揺らいでいるかのどちらかであろうと考えられる。必須軽鎖までは認識可能であるが、その範囲では、レバーアームの角度は、第 1 の構造(2mys: Rayment *et al.*, 1993; 1mmd: Fisher *et al.*, 1995)に近いと考えられる。また、第 2 のアクチンへの結合が明らかに観測され、以前 X 線

結晶解析と電子顕微鏡像から予測されていた構造が存在することが分かった

(Rayment *et al.*, 1993; Mendelson & Morris, 1997)。

図 4 2 a で示されたように、モータードメイン (ミオシン S1 部のうち、必須軽鎖・調節軽鎖・軽鎖結合部すなわちレバーアームをのぞいたドメイン) に関しては、そのドメイン構造の同定が可能であった。そこでモータードメイン内部のドメイン構造に着目して観察を行うことにした。

Upper 50K と Lower 50K の配置

電子顕微鏡法により得られた構造 (図 4 0) をミオシンの結晶構造と比較したとき、ミオシンの Upper50K ドメインと Lower 50K ドメインを同時に説明できる向きにミオシンの結晶構造を配置することは出来なかった。それぞれお互いに異なる向きに置いた時に、結晶から決定された原子モデルは電子顕微鏡による構造を説明することができた。また、ミオシンとアクチンの相互作用部位として 4 カ所が明らかとなった。以下に詳細を述べる。

図 4 3 は、ミオシンの Upper 50K の形状がよく合うように置いた場合のアクチン・ミオシン原子モデルと電子顕微鏡法によって再構成された密度マップを示している。原子モデルとしては、ヌクレオチドを結合していないので化学状態として同じであると考えられるトリ由来のミオシンの結晶構造(2mys)を用いた。この時、青丸や黄丸で示されるような密度を説明する原子モデルの構造が存在しなかった。Upper 50K の構造はよく説明できた。三次元再構成を行う場合の層線情報としては 8 Å までのものを用いているが、実質的な分解能は 20 Å 程度である。この分解能までのコントラストはほとんど溶媒とタンパク質の密度の差によりコントラストが形成されているため、ミオシン内部の構造を議論することは難しい。この為、外部の形状で、向きを決定した。

図 4 4 は、Lower 50K が良くフィットできるように、原子モデルを配置した場合

である。結果として、N 端の β バレル構造もフィットでき、ミオシン-ミオシン間の相互作用が示された。このことは、Lower 50K と Upper 50K との相対的配置が、アクチンが結合した場合に変化することを示している。

ミオシンの第 1 の構造と第 2 の構造において、Lower50K と Upper50K はその相対配置が異なっている。この時、Lower50K 及び Upper50K はそれぞれ剛体的に振る舞い、図 5 b に示した switch II 領域にある二つのペプチド結合の回転によりその構造変化がおきていることが報告されている(Fisher, 1995)。ここで再構成されたアクチン-ミオシン複合体の三次元像でも図 4 3、4 4 によれば、Lower50K 及び Upper50K ドメインがそれぞれ異なる配置ではあるが、結晶構造で説明することができた。したがって、現在の分解能の範囲では、ふたつのドメインはそれぞれ剛体的に振る舞い、その相対位置を変えることができると考えられる。

図 4 5 は、図 4 3 のモデルをアクチン側から観察したものである。Lower 50K の原子モデルが、密度マップの等高面からはみ出していた。Lower 50K をよく説明できるように原子モデルを回転させると、赤で丸した 5 7 0 番前後の構造が、シアンの丸で示された領域に移動した。この時、Upper 50K を固定して、Lower 50K が動いた場合には、活性部位である星印の部分が開く。ミオシンは、バックドア酵素(基質の侵入口と、産物の放出口が異なる)であることが、分子動力学的手法により、指摘されている (Yount *et al.*, 1995)。これらを総合すると、図 4 7 に示したように、ミオシンがアクチンに結合するとバックドア (反応産物の放出口) が開くことがわかった。

アクチン C 末端付近とミオシンの相互作用様式

アクチンの C 末端ドメインは、その一部が、電子顕微鏡からの密度マップからはみ出していた一方で、その近傍に図 4 3 の説明できない緑丸の密度存在した。また、ミオシンの Lower 50K ドメインは図 4 5 に示されているようにアクチンの C 末端近く

と相互作用していることがわかった。この事は、ミオシンがアクチンに結合すると、アクチンの C 末端の構造が変化することを示している。

III-3 考察

アクチンによるミオシンの無機リン酸放出の活性化

Upper 50K と Lower 50K は異なる配置でのみフィットできることがわかった。この事は以下の事を示している。

この事は、先ず、今回得られた 20 Å 程度分解能の構造の範囲では、ミオシンの Lower 50K と Upper 50K はそれぞれ、結晶構造とほぼ構造を保っていることを示している。したがって、ミオシンのドメイン構造を同定することができ、X線結晶解析や NMR 等により原子モデルが分かっている場合には、結合部位の検討などに関してアミノ酸レベルの議論が可能であるといえる。

次に、異なる配置でのみフィットすることができたという事実は、Lower 50K と Upper 50K の間に存在するアクチンクレフトと呼ばれるクレフトが開くことを意味している。リン酸解放に伴い、アクチンとミオシンは強い結合に移行することが知られている。本論文で示された構造は、強い結合に移行後の構造である。一方で、ミオシンの結晶構造はアクチンが存在しないため、リン酸解放前の弱い結合状態を保っていると考えられる。これらのことを考慮すると、アクチンクレフトが開くことは無機リン酸の解放と関連していると考えられる。これまで、Holmes (1997)によってアクチンクレフトの開閉によるリン酸放出の活性化のモデルが提唱されていたが、本論文では、アクチンクレフトの開閉がリン酸放出の活性化に関与していることを電子顕微鏡像から示したといえよう。

ミオシンとの結合によるアクチン C 末端の構造変化

ミオシンとの結合によって C 末端ドメインの構造変化が生じていることがわかった。Kouyama and Mihashi (1981) がアクチンの Cys374 を pyrene ラベルしたときに、ミオシンと結合すると、蛍光強度が下がることを示した。我々もまた、ミオシンがアクチンに結合した場合には、滑り運動の再構成系及び蛍光強度の測定により、アクチン-cys374 にラベルした tetra-methyl-rhodamine-maleimide の蛍光強度が、硬直複合体形成時には減少し、ATP の付加により蛍光強度増大が見られることを観察している。また、Moens and dos Remedios(1997)は、ミオシンの結合によりアクチンの Cys374 のアクチン中心軸からの距離が変化することを示している。以上のことと FRET の際の蛍光ラベルの導入に伴うアクチン C 末端構造の構造変化を捉えた我々の解析や Ambivalent 配列予測を組み合わせて考えてみると、アクチン C 末端付近はミオシンとの相互作用によりその環境が変化していることが分かる。

しかし、一方で、たとえば、ミオシンと結合した場合に、アクチンの C 末端の 20 残基がどのように振る舞うかを議論しようとする、分解能が不足している。したがって、 α ヘリックスが可視化可能である 9 \AA を超える分解能が必要であることも一方で明らかである。今後、高分解能化を図る必要がある。

第IV章 アクチン・ミオシン系の分子機構

滑り運動のエネルギー変換の分子メカニズムは何か？

滑り運動のエネルギー変換機構の分子メカニズムに関して、現在のところでは、まだ、はっきりとしたモデルはない。A. F. Huxley がモデルを提唱した後 (A.F. Huxley 1957)、様々なモデル (Oosawa and Hayashi, 1986) が提唱されてきたが、そのどれもが十分ではない。これまで述べてきたように、化学反応と力学反応が 1 対 1 で対応する「マクロなエンジン」型の議論か、熱揺らぎを使った「マックスウェルのデーモン型」の議論が多い。

A.F.Huxley の 1957 年モデル (図 1 b) は、滑り運動に関しては、熱揺らぎを表に出さない「マックスウェルのデーモン」型のモデル (結合・解離の確率がアクチンとミオシンの相対位置によって異なっている) であり、化学反応との共役に関しては「マクロなエンジン」型の議論 (アクチンとミオシンが解離するとき ATP を一個消費する : 図 1 a, 図 1 0) となっている。Oosawa らのモデル (Vale and Oosawa, 1990) ではファインマンのサーマルラチェットモデルを使って滑り運動を説明した。このモデルは、滑り運動に関しては「マックスウェルのデーモン」型である。一方で、化学反応との共役に関しては、ATP の加水分解のエネルギーはラチェットと留め金との間に温度差をつくる際に使われている。しかし、具体的なアクチン-ミオシンの反応論や構造と組み合わせて議論することができない。一方で、構造学の観点からは、「Lymn-Taylor」モデル (Lymn and Taylor; 1971) を念頭におく場合が多い。Rayment が最初に結晶構造を解いた時 (Rayment et al., 1993a) 以来、結晶構造に基づいた考察の中では、化学反応状態と構造を 1 : 1 に共役させ、構造変化を直接滑り運動に結びつけようとするモデル (Holmens, 1997 など) が多い (図 1 0)。

現在、ATP 加水分解エネルギーの解放に伴うミオシン分子の力学反応過程が、今や一分子レベルで分かってきた。柳田グループを始めとした一分子計測実験を通して、

ATP加水分解反応に伴う滑り運動の生理学的性質が明らかになってきた。特に注目しているのは以下の点である。(1) ATP加水分解あたりの滑り運動距離(sliding distance)は20 nmを超え、これは、ミオシンがストロークするといわれている10 nmという距離を超えている。一方で、10 nm程度であるという報告もあり、未だ矛盾を含んでいる。(2) ATP加水分解後、ADPが解離した後に、力発生を起こす場合がある。これは、化学反応と力学反応が直接に共役していないことを示している。(3) 滑り運動はアクチンの構造で規定される5.5 nm程度のステップ(unitary step)からなっており、また、このステップの長さは軽鎖結合部位の長さに依存しないが、ステップの頻度は張力と軽鎖結合部位の長さに依存する(Harada, 1987; Ishijima *et al.*, 1998; Ishijima *et al.*, 1991; Ishijima *et al.*, 1996; Molloy, 1996; Yanagida *et al.*, 2000)。

さて、我々が得た結果や多くの他の実験事実からどのような分子メカニズムを思い浮かべればよいただろう。徳永等が示唆した、ミオシンに結合したヌクレオチドの状態に依存して「二つの構造間の平衡」がずれるという提起は興味深い(Tokunaga *et al.*, 1991)。本論文のミオシン単一分子可視化の実験でも、ヌクレオチド非結合型にも関わらず、モータードメインと軽鎖結合部位が異なる配置をしているものが共存していた(図3 8)。ミオシンの蛍光エネルギー移動の解析結果は、X線結晶解析によって明らかとなっている二つの構造(第1の構造と第2の構造)のいずれかをとりやすく、第三の構造に関しては、その構造が過渡的であることがわかった(表4、5)。アクチンの構造研究からは、アクチンの化学状態(無機リン酸の結合・解離)の変化に伴う構造変化が、滑り運動の際の力発生に関連している可能性を示唆した。また、その際にアクチンの中のスイッチ構造が重要であることを示唆した。その二つの構造変化を一定の方向に向けるものは、リン酸の放出であり、アクチンとの強い結合への移行であると考えられる。滑り運動系のもつ不可逆性、一方向性は、アクチンクレフトの開放に伴い、無機リン酸の放出確率が上がり、無機リン酸が放出された場合に、再結

合確率の低さ（ミオシン単独の場合の解離定数は 50 mM 以上）が故に、不可逆性をもたらすと考えられる。アクチンへの強い結合とこのアクチンクレフトの開放が関連していることを示した(図 4 7)。

レバーアームは変位を発生するのではなく、張力センサーであるという柳田らの提案は興味深い。一方で、Sasaki 等は、アクチンとの結合部位である R-site (変位により心筋肥大症を引き起こす β ターン β 構造で Upper 50K に存在していて、アクチン・ミオシン間の強い結合に関連している; Sasaki *et al.*, 1999), Lower 50K と Upper 50K をつなぐ構造である switch II (Sasaki *et al.*, 1998; Sasaki and Sutoh, 1998) や strut (Upper 50K-Lower 50K をつなぐループのうちもっとも先端にあるもの) の突然変異 (Sasaki *et al.*, 2000) が、ミオシンとアクチンとの結合様式に多大な変化を与えることを指摘している。

以上の観点からアクチン-ミオシン系の滑り運動のメカニズムを考慮すると、Lower 50K を形成する二本の α ヘリックスとコンバーター領域は、レバーアーム側からくる張力の情報と ATP 加水分解反応状態からくる情報、及びアクチンとの結合に伴う構造ひずみを総合する連結棒の役目をしていると考えられないだろうか (図 4 8)。

まず、ミオシンは、レバーアーム・コンバーター領域と N 端ドメインとの関係から、レバーアームの向きに関して二つの構造をとり、その二つの構造が平衡状態にあるとする。その平衡状態においてどちらの構造に平衡がずれるかは、コンバーター領域の歪みによろし、ここに滑り運動系の力学特性を集約する。この時、Lower 50K は、アクチンとの結合様式や Upper 50K との結合ループ (strut, switch II) の力学的状態に応じて、コンバーター領域を歪ませ、レバーアームの向きに関してどちらの構造をとりやすいかを決定するとする。switch II は、活性部位であり、化学反応状態に応じてその力学特性を変化させる。また、アクチンとの結合も Lower 50K と Upper 50K の相対的配置に力学的歪みを与えることになる。更に、レバーアームは

負荷に応じて、コンバーター領域に歪みを与える。この時、Lower 50K は熱に揺らぎながらも、天秤棒のように働くのと考ええる。この時、アクチンとの結合部位、strut、switch II、コンバーター領域の力学特性の変化に応じて、それぞれの部位が、天秤棒の力点、支点、作用点として振る舞い、結晶構造から想定されている2つの構造の平衡のシフトを引き起こし、最終的に滑り運動をひきおこすという分子メカニズムを想定できる(図48)。この時、ATPの加水分解反応と力学反応の共役は、Lower 50KとUpper 50Kをつなぐswitch IIが、異なる力学特性を持つバネ(異なる自然長、バネ定数)として振る舞うところに集約させている。これは、二つの構造の間は平衡状態にあると考える点で、Lymn-Taylorモデルにマックスウェルのデーモン型の観点を導入したものである。

今後、さらに構造を高分解能で観察することにより、これらの問題がはっきりしてくるものと考えられる。

電子顕微鏡法の改良の必要性

本論文で報告した成果に加え、更に高分解能化と高コントラストの電子顕微鏡像の撮影が必要であろう。2 nm程度の分解能までは、その像形成過程において、水(約1 g/cm³)とタンパク質(約1.3 g/cm³)の密度の違いが支配的である。したがって、タンパク質内部の構造を厳密に議論していくことは難しい。我々は、電子顕微鏡の改良を行い、電子分光クライオ顕微鏡法(electron spectroscopic cryo-microscopy)の技術を確立した。今後、この新たな電子顕微鏡技術を使って、2次構造(特に、 α ヘリックス)の可視化が可能な9 Åの分解能を目指して研究を進めることが必要となろう。

残された構造解析の課題

今後、行う必要のある研究は何であろうか。特に構造研究の面から、具体的な問題

点を列記しておく。

1. 構造揺らぎと機能の連関

タンパク質の機能発現の際に、構造の揺らぎが重要であることは、分子動力学的手法を用いた理論計算等により期待されている。一方で、構造揺らぎと機能発現の連関は未だ明らかではない。クライオ電子顕微鏡法は、個々のタンパク質分子の実像が捉えられるので、構造揺らぎに関連した情報をとりだすことができる重要な方法の一つである。本論文の中で、アクチンフィラメントの構造揺らぎに関する知見を得る研究結果を報告した。しかし、分解能が低いために、サブドメインレベルの揺らぎを捉える分解能しかなかった。一方で、アクチンフィラメントの協同的な構造変化の起源が **Ambivalent** 配列周辺にある可能性を示した。更に、残基レベルで、このことを明らかにするためには、更に分解能の高い像を得ることが必須であろう。

2. ミオシン単一分子の三次元像とその多型性

ミオシン単一分子の観察する分子数を増やして多くの分子を取り扱い、統計的な処理を行うことができるようにすることが重要である。また、画像分類等を行い、三次元像の再構成を行う必要があるだろう。その中で、いくつの準安定的な構造が存在するかが明らかとなる。

3. アクチン・ミオシン硬直複合体の高分解能三次元構造解析

アクチン・ミオシンの硬直複合体では、ミオシンのモータードメインの内部配置、アクチンのC末端構造などが認識できる分解能(9 Å)で解明することが必要であろう。X線結晶構造があるので、分子動力学的計算と組み合わせることにより、十分にアミノ酸残基レベルの議論をおこなうことが可能となろう。

結論

1. アクチンは、ATP 型、ADP・Pi 型、ADP 型と次第に柔らかくなり、その構造と揺らぎのモードを変化させる。これは、筋収縮における力発生や細胞骨格系のスイッチなどに関連している可能性がある。
2. アクチンの C 末端近傍の Cys374 を化学標識すると、C 末端近傍の構造が変化する。このことは、アクチン C 末端近傍が環境に応じて構造を変え得ることを示唆している。
3. X線結晶解析によって報告されたミオシンの第三の構造は蛍光エネルギー移動法による距離情報と互いに矛盾する。したがって、過渡的状態であると考えられる。
4. ホログラフィック・クライオ電子顕微鏡法を用いて、ミオシン単一分子（分子量 130kDa）の実像を捉えることに成功した。
5. 得られたミオシン単一分子像を、結晶構造と比較すると、溶液中で異なる構造をとっているものと同じ構造を取っているものがある。このことは、ミオシンは二つの構造間の平衡があり、この平衡がリガンドによってシフトするとした徳永らの研究と矛盾しない。
6. ミオシン頭部はアクチンと強い結合をする際に、アクチンクレフトを開く。このアクチンクレフトの解放は無機リン酸の解離と関連していると考えられる。
7. ミオシン内に存在する熱揺らぎにより、分子内に想定された「天秤棒」がアクチン結合、ヌクレオチドの状態、張力の状態などに応じて、支点、力点、作用点などを変化させることが、滑り運動に結びついている可能性がある。
8. 確率的距離幾何学法は分子の構造変化を捉える際に有効である。
9. 新しく開発した画像解析支援システム(Eos)は電子顕微鏡像解析、確率的幾何学法のプログラム開発において有効であり、また、インターネットへの公開を通して広く使われている。

謝辞

研究活動全般にわたりご指導いただきました若林健之先生に感謝いたします。佐伯喜美子博士には、生化学的技術一般を始めとして多くの研究活動に関しご指導下さり、かつ有効なご助言をいただいたことに感謝いたします。白木原康夫博士、徳永万喜洋博士には、研究生活を進めていく上での数多くのご助言をいただきましたことに感謝いたします。須藤和夫博士、鈴木良和博士、大倉玲子さんには、蛍光タンパク質を使った実験系での共同研究の機会をお与えいただいたことに多大な感謝を申し上げます。また、日頃から須藤和夫博士には、研究を進めていく上でのご助言をいただき、感謝しております。

東京大学理学部物理学教室若林研究室に所属していた全学生の皆様には、研究を進めていく中で、互いに切磋琢磨し、研究活動を行ってきたことに関して感謝いたします。また、数多くの研究者の方々に、多くのご助言をいただき、また、実験技術等を教えていただきました。皆様に感謝申し上げます。ここで、皆様のお名前を列記しないご無礼をお許し下さい。

また、私が研究者の道を歩むことを暖かく見守ってくれた父・母・妻・子を始めとし多くの関係者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*. **370**(6491):621-8.
- Adrian M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW. (1984) Cryo-electron microscopy of viruses, *Nature*. **308**(5954):32-6.
- Aebi, U., Millonig, R., Salvo, H., and Engel, A. (1986) The three-dimensional structure of the actin filament revisited. *Ann N. Y. Acad. Sci*, **483**, 100-119
- Amos, L.A. and Klug, A. (1975) Three-dimensional image reconstruction of the contractile tail of T4 bacteriophage, *J. Mol. Biol.*, **99**, 51-73
- Bagshaw, C. L. and Trentham, D. R. (1974) The characterization of myosin-product complexes and of product-release steps during the magnesium ion-dependent adenosine triphosphatase reaction, *Biochem. J.* **141**, 331-349.
- Bork P, Sander C, and Valencia A (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins, *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**(16):7290-4
- Brejc, K., Sixma, T. K., Kitts, P. A., Kain, S. R., Tsien, R. Y., Ormo, M. and Remington, S. J., (1997) Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2306-2311.

Bresler SE, and Frenkel YE (1939) *Acta Physicochimica* **11**, 487

Burgess, S. A., Walker, M. L., White, H. D., and Trinick, J. (1997) Flexibility within myosin heads revealed by negative stain and single-particle analysis, *J. Cell Biol* **139**, 675-681.

Carlier MF (1991) Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly, *Curr Opin Cell Biol.* **3**(1):12-7.

Carlier MF (1990) Actin polymerization and ATP hydrolysis, *Adv Biophys.* **26**:51-73

Clegg, R. M. (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids, *Methods in Enzymol.* **211**, 353-388.

Cooke, R. (1986) The mechanism of muscle contraction, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **21**, 53-118.

Corrie, J.E., Brandmeier, B.D., Ferguson, R.E., Trentham, D.R., Kendrick-Jones, J., Hopkins, S.C., van der Heide, U.A., Goldman, Y.E., Sabido-David, C., Dale, R.E., Criddle, S., and Irving, M. (1999) Dynamic measurement of myosin light-chain-domain tilt and twist in muscle contraction, *Nature* **400**, 425-430.

DeRosier, D.J. and Moore, P.B. (1970) Reconstruction of three dimensional images from electron micrographs of structures with helical symmetry, *J. Mol. Biol.*, **52**, 355-369.

Dobbie, I., Linari, M., Piazzesi, G., Reconditi, M., Koubassova, N., Ferenczi, M. A.,

Lombardi, V. and Irving, M. (1998) Elastic bending and active tilting of myosin heads during muscle contraction, *Nature* **396**, 383-387.

Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., and Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state, *Cell* **94**, 559-571.

Drewes, G., and Faulstich, H. (1993) Cooperative effects on filament stability in actin modified at the C-terminus by substitution or truncation. *Eur. J. Biochem.* **212**, 247-253

dos Remedios, C. G. and Moens, P. D. (1995) Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable "ruler" for measuring structural changes in proteins. Dispelling the problem of the unknown orientation factor, *J. Struct. Biol.* **115**, 175-185.

Eisenberg, E. and Greene, L.E. (1980) The relation of muscle biochemistry to muscle physiology, *Annu. Rev. Physiol.* **42**, 293-309.

Egelman, EH (1985) The structure of F-actin, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **6**, 79-81

Egelman EH. Francis N. DeRosier DJ (1982) F-actin is a helix with a random variable twist. *Nature.* **298**(5870):131-5

Faulstich, H., Zobeley, S., Heintz, D., and Drewes, G. (1993) Probing the phalloidin binding site of actin. *FEBS Letters.* **318**, 218-222

Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M., and Rayment, I. (1995) X-ray structures of the myosin motor domain of *Dictyostelium discoideum* complexed with MgADPBeFx and MgADPAIF₄; *Biochemistry* **34**, 8960-8972.

Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W., and Holmes, K.C., (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein, *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(11):5041-5.

Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* **346**, 623

Fletterick, R.J, Bates D.J., and Steitz, T.A. (1975) The structure of a yeast hexokinase monomer and its complexes with substrates at 2.7-Å resolution., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **72**(1):38-42.

Ford, L. E., Huxley, A.F. and Simmons, R.M., (1977) Tension responses to sudden length change in stimulated frog muscle fibres near slack length, *J. Physiol.* **269**, 441-515.

Geeves, M. A. (1992) The actomyosin ATPase: a two-state system, *Philos. Trans. R. Soc. London - Series B*, **336**, 63-71.

Goldman, Y. E. (1987) Kinetics of the actomyosin ATPase in muscle fibers, *Annu Rev Physiol.* **49**, 637-654.

Goldman, Y. E. (1998) Wang the tail: structural dynamics of actomyosin, *Cell* **93**, 1-4.

Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., and Herman, B. (1998) Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy, *Biophys. J.* **74**, 2702-2713.

Gulick, A. M., Bauer, C. B., Thoden, J. B., and Rayment, I. (1997) X-ray structures of the MgADP, MgATPgammaS, and MgAMPPNP complexes of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain, *Biochemistry* **36**, 11619-11628.

Gulick, A. M., and Rayment, I. (1997) Structural studies on myosin II: communication between distant protein domains, *Bioessays* **19**, 561-569.

Hanson, J and Lowey J. (1963) The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle, *J. Mol. Biol.*, **6**, 46

Harada Y, Noguchi A, Kishino A, Yanagida T. (1987) Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments., *Nature*, **326**(6115):805-8

Harrison, C.J., Hayer-Hartl, M, Liberto, M., Hartl F, and Kuriyan, J. (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK., *Science*. **276**(5311):431-5.

Heim, R. and Tsien, R. Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.* **6**, 178-182.

Hirose, K., Franzini-Armstrong, C., Goldman, Y. E., Murray, J. M. (1994) Structural changes in muscle cross-bridges accompanying force generation, *J. Cell Biol.* **127**, 763-778.

Hirose, K. and Wakabayashi, T. (1993) Structural change of crossbridges of rabbit skeletal muscle during isometric contraction, *J. Mus. Res. Cell Motil.* **14**, 432-445.

Holmes, K. C. (1997) The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction, *Curr. Biol.* **7**, 112-118.

Holmes, KC, Tirion, M., Popp, D., Lorenz, M, Kabsch, W., and Milligan, R.A. (1993) A comparison of the atomic model of F-actin with cryo-electron micrographs, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **332**, 15-22

Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G., and Cohen, C. (1999) Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: A novel conformation of the myosin head, *Cell* **97**, 459-470.

Huston, E. E., Grammer, J. C., and Yount, R. G. (1988) Flexibility of the myosin heavy chain: direct evidence that the region containing SH1 and SH2 can move 10 Å under the influence of nucleotide binding, *Biochemistry* **27**, 8945-8952.

Huxley A.F., Niedergerke, R. (1954) Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibre, *Nature*, **173**, 971-973

Huxley A.F. (1998) Support for the lever arm, *Nature* **396**, 317-318.

Huxley A.F. (1957) Muscle structure and theories of contraction, *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* **7**, 255-318

Huxley, A.F., Simmons, R.M. (1971) Proposed mechanism of force generation in striated muscle, *Nature*. **233**, 533-8.

Huxley HE. (1969) The mechanism of muscular contraction, *Science*. **164**(886):1356-65

Huxley, H.E., and Hanson, J. (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation, *Nature*, **173**, 973-976

Isambert H, Venier P, Maggs AC, Fattoum A, Kassab R, Pantaloni D, Carlier MF.(1995) Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem.* **270**(19):11437-44.

Ishijima A, Kojima H, Funatsu T, Tokunaga M, Higuchi H, Tanaka H, Yanagida T (1998) Simultaneous observation of individual ATPase and mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin, *Cell*, **92**(2):161-71.

Ishijima A, Doi T, Sakurada K, Yanagida T. (1991) Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro, *Nature*, **352**(6333):301-6.

- Ishijima A, Kojima H, Higuchi H, Harada Y, Funatsu T, Yanagida T. (1996) Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle: unitary steps and forces. *Biophys J*, **70**(1):383-400.
- Ishiwata S, Okamura N, Shimizu H, Anazawa T, Yasuda K. (1991) Spontaneous oscillatory contraction (SPOC) of sarcomeres in skeletal muscle. *Advances in Biophysics*. **27**:227-35
- Itakura S, Yamakawa H, Toyoshima YY, Ishijima A, Kojima T, Harada Y, Yanagida T, Wakabayashi T, Sutoh K. (1993) Force-generating domain of myosin motor, *Biochem Biophys Res Commun.*, **196**(3):1504-10.
- Jardetzky O, King R (1983) Soliton theory of protein dynamics. *Ciba Found Symp* **93**:291-309
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr A*. **47**, 110-119.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai E.F., and Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*. **347**, 37-44
- Kasprzak, A.A., Takashi, R., and Morales, M.F. (1988) Orientation of actin monomer in the F-actin filament: radial coordinate of glutamine-41 and effect of myosin subfragment 1 binding on the monomer orientation. *Biochemistry*. **27**, 4512-22

Katayama, E. (1998) Quick-freeze deep-etch electron microscopy of the actin-heavy meromyosin complex during the in vitro motility assay, *J Mol Biol.*

Kawai M, Halvorson HR. (1991) Two step mechanism of phosphate release and the mechanism of force generation in chemically skinned fibers of rabbit psoas muscle, *Biophys J.* **59**(2):329-42

Kawai M, Zhao Y. (1993) Cross-bridge scheme and force per cross-bridge state in skinned rabbit psoas muscle fibers., *Biophys J.*, **65**(2):638-51.

Kikkawa M, Okada Y, Hirokawa N. (2000) A resolution model of the monomeric kinesin motor, KIF1A., *Cell*, **100**(2):241-52

Kirshenbaum K, Young M, Highsmith S. (1999) Predicting allosteric switches in myosins, *Protein Sci.* **8**(9):1806-15.

Kliche, W., Pfannstiel, J., Tjepold, M., Stoeva, S., and Faulstich, H. (1999) Thiol-specific cross-linkers of variable length reveal a similar separation of SH1 and SH2 in myosin subfragment 1 in the presence and absence of MgADP, *Biochemistry* **38**, 10307-10317.

Kouyama T, Mihashi K.(1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin, *Eur J Biochem.* **114**(1):33-8.

Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin, *Nature*. **380**(6574):550-5.

Kull FJ, Vale RD, Fletterick RJ. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins, *J Muscle Res Cell Motil.* **19**(8):877-86.

Kwon, H., Goodwin, E.B., Nyitray, L., Berliner, E., O'Neill-Hennessey, E., Melandri, F.D., and Szent-Gyorgyi, A.G., (1990) Role of the essential light chain in calcium binding, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, **87**, 4771-4775.

Landau LD, and Lifschitz EM (1976) Statistical Physics, *Course of Theoretical Physics*, 5

Leslie AG, Abrahams JP, Braig K, Lutter R, Menz RI, Orriss GL, van Raaij MJ, Walker JE. (1999) The structure of bovine mitochondrial F1-ATPase: an example of rotary catalysis, *Biochem Soc Trans.* **27**(2):37-42.

Lorenz, M., Popp, D., and Holmes, K.C. (1993) Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Molec. Biol.* **234**, 826-836

Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin, *Biochemistry* **10**, 4617-4624.

Matsuura, Y., Stewart, M., Kawamoto, M., Kamiya, N., Saeki, K., Yasunaga, T., and Wakabayashi, T. (2000) Structural basis for the higher Ca⁽²⁺⁾-activation of

the regulated actin-activated myosin ATPase observed with Dictyostelium/Tetrahymena actin chimeras. *J. Mol. Biol.* **296**, 579-595

McLaughlin, P.J., Gooch, J.T., Mannherz, H.G., and Weeds, A.G.. (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature.* **364**, 685-692

Mendelson, R. and Morris, E. P. (1997) The structure of the acto-myosin subfragment 1 complex: Results of searches using data from electron microscopy and x-ray crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8533-8538.

Miki, M., O'Donoghue, S.I., and Dos Remedios, C.G.. (1992) Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Mus. Res. & Cell Motil.* **13**, 132-145

Miki, M. (1991) Detection of conformational changes in actin by fluorescence resonance energy transfer between tyrosine-69 and cysteine-374. *Biochemistry.* **30**, 10878-1088

Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, and Kim SH (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins, *Science*, **247**(4945), 939-45.

Milligan, R.A. and Flicker, P. F. (1987) Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryo-electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **105**, 29-39.

Milligan, R.A., (1996) Protein-protein interactions in the rigor actomyosin

complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 21-26.

Milligan R.A., Whittaker, M., and Safer, D. (1990) Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* **348**, 217-221

Miyata T, Yamada K, Iwasaki H, Shinagawa H, Morikawa K, Mayanagi K. (2000) Two different oligomeric states of the RuvB branch migration motor protein as revealed by electron microscopy, *J Struct Biol.* **131**(2):83-9.

Miyawaki, A., Liopis, J., Heim, R., McCaffery J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ base on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature* **388**, 882-887.

Moens, P.D. and dos Remedios, C.G.. (1997) A conformational change in F-actin when myosin binds: fluorescence resonance energy transfer detects an increase in the radial coordinate of Cys-374. *Biochemistry.* **36**, 7353-7360

Moens, P.D., Yee, D.J., and dos Remedios, C. G. (1994) Determination of the radial coordinate of Cys374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin on polymer assembly. *Biochemistry.* **33**, 13102-13108

Molloy JE. Burns JE. Kendrick-Jones J. Tregear RT. White DC. (1996) Movement and force produced by a single myosin head, *Nature.* **378(6553)**:209-12

Moore, P.B., Huxley, H.E., DeRoser, D.J., (1970) Three-dimensional

reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments, *J. Mol. Biol.*, **50**, 279-295.

Narita, A., Yasunaga, T., Ishikawa, T., Mayanagi, K., and Wakabayashi, T. (2001) Ca^{2+} -induced Switching of Troponin and Tropomyosin on Actin Filaments as Revealed by Electron Cryo-microscopy, *J. Mol. Biol.*, in press.

Nishizaka, T., Yagi, T., Tanaka, Y. and Ishiwata, S. (1993) Right-handed rotation of an actin filament in an in vitro motile system, *Nature* **361**, 269-271.

Nitao LK. Reisler E. (1998) Probing the conformational states of the SH1-SH2 helix in myosin: a cross-linking approach. *Biochemistry*. **37**(47):16704-10

Noji H, Yasuda R, Yoshida M, and Kinosita K Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase, *Nature*, **386**(6622):299-302.

Oishi N, Sugi H. (1994) In vitro ATP-dependent F-actin sliding on myosin is not influenced by substitution or removal of bound nucleotide, *Biochim Biophys Acta*. **1185**(3):346-9.

O'Donoghue, S. I. (1991) Structural interpretation of fluorescence resonance-energy transfer measurements, *CABIOS* **7**, 471-477.

Oosawa F, Hayashi S. (1986) The loose coupling mechanism in molecular machines of living cells., *Adv Biophys.* **22**:151-83.

Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J., (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science* **273**, 1392-1395.

Orlova A, Prochniewicz E, Egelman EH. (1995) Structural dynamics of F-actin: II. Cooperativity in structural transitions. *J Mol Biol.* **245**(5):598-607.

Pate E, Cooke R. (1989) A model of crossbridge action: the effects of ATP, ADP and Pi., *J Muscle Res Cell Motil.* **10**(3):181-96.

Pate E, Franks-Skiba K, Cooke R.(1998) Depletion of phosphate in active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke, *Biophys J.* **74**(1):369-80.

Pollok, B. A. and Heim, R. (1999) Using GFP in FRET-based applications, *Trends in Cell Biol.* **9**, 57-60.

Pozzan, T. (1997) Protein-protein interactions: Calcium turns turquoise into gold, *Nature* **388**, 882-887.

Prasher, D.C., Echenrode, V. K., Ward W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gen.* **111**, 229-233.

Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. (1993a) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction, *Science* **261**, 58-65.

Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., and Milligan, R. A. (1993b) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor, *Science* **261**, 50-58.

Reisler, E., Burke, M., Himmelfarb, S., and Harrington, W. F. (1974) Spatial proximity of the two essential sulfhydryl groups of myosin, *Biochemistry* **13**, 3837-3840.

Sagot, I., Bonneu, M., Balguerie, A., and Aigle, M. (1999) Imaging fluorescence resonance energy transfer between two green fluorescent proteins in living yeast, *FEBS Letters* **447**, 53-57.

Sasaki, K. Sakabe, K., Sakabe, N., Kondo, H., and Shimomura, M. (1992) Crystal structure of smooth muscle actin DNase I complex at 2 Å resolution. *The 4th international conference on Biophysics and Synchrotron radiation* Abstracts F1-03

Sasaki N, Ohkura R, Sutoh K. (2000) Insertion or Deletion of a Single Residue in the Strut Sequence of Dictyostelium Myosin II Abolishes Strong Binding to Actin, *J Biol Chem.* **275**(49):38705-38709.

Sasaki N, Asukagawa H, Yasuda R, Hiratsuka T, Sutoh K. (1999) Deletion of the myopathy loop of Dictyostelium myosin II and its impact on motor functions, *J Biol Chem.*, **274**(53):37840-4.

Sasaki N, Sutoh K. (1998) Structure-mutation analysis of the ATPase site of

Dictyostelium discoideum myosin II, *Adv Biophys.* **35**:1-24

Sasaki N, Shimada T, Sutoh K (1998). Mutational analysis of the switch II loop of Dictyostelium myosin II. *J Biol Chem.* **273**(32):20334-40

Sase, I., Miyata, H., Ishiwata, S., and Kinoshita, K, Jr. (1997) Axial rotation of sliding actin filaments revealed by single-fluorophore imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*, **94**, 5646-5650.

Sellers, J. R. (1999) Myosins second edition, Oxford University Press

Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C., and Lindberg, U. (1993) The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature.* **365**, 810-816

Smith, C., A., and Rayment, I. (1996) X-ray structure of the magnesium (II)-ADP-vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å, *Biochemistry* **35**, 5404-5417.

Spudich, J. A. (1994) How molecular motors work, *Nature* **372**, 515-518.

Spudich J. A. and Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871

Suzuki, Y., Yasunaga, T., Ohkura, R., Wakabayashi, T., and Sutoh, K. (1998) Swing of the lever arm of a myosin motor at the isomerization and

phosphate-release steps. *Nature* **396**, 380-383

Stryer, L. (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819-846.

Suzuki, Y., Yasunaga, T., Ohkura, R., Wakabayashi, T., and Sutoh, K. (1998) Swing of the lever arm of a myosin motor at the isomerization and phosphate-release steps *Nature* **396**, 380-383.

Tamai M, Matsumoto K, Omura S, Koyama I, Ozawa Y, and Hanada K. (1986) In Vitro and In Vivo Inhibition of Cysteine Proteinases by Est, a New Analog of E-64, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 672-677

Tanaka, Y., Ishijima, A. and Ishiwata, S. (1992) Super helix formation of actin filaments in an in vitro motile system, *Biochimica et Biophysica Acta.* **1159**, 94-98.

Taylor KA, Glaeser RM (1974) Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals, *Science*, **186**(4168):1036-7.

Taylor, K.A., Schmitz H., Reedy M.C., Goldman, Y.E., Franzini-Armstrong, C., Sasaki, H., Tregear, R.T., Poole, K., Lucaveche, C., Edwards, R.J., Chen, L.F., Winkler, H., and Reedy, M.K. (1999) Tomographic 3D reconstruction of quick-frozen, Ca²⁺-activated contracting insect flight muscle, *Cell*, **99**, 421-431.

Taylor, D.L., Reidler, J., Spudich, J.A., and Stryer, L. (1981) Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. *J. Cell Biol.* **89**, 362-367

Tokunaga, M., Sutoh, K., Toyoshima, C., and Wakabayashi, T. (1987) Location of the ATPase site of myosin determined by three-dimensional electron microscopy, *Nature*, **329**, 635-638.

Tokunaga, M., Sutoh, K. and Wakabayashi, T. (1991) Structure and structural change of the myosin head, *Adv. Biophys.* **27**, 157-167.

Tokunaga, M., Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., and Wakabayashi, T. (1994) Structural change of the myosin head detected by electron microscopy and small-angle X-ray scattering, *Synchrotron Radiation in the Biosciences*, Oxford Science Publications, 493-501.

Toyoshima, C. and Wakabayashi, T. (1985a) Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. IV. Reconstitution from minimal- and high-dose images of the actin-tropomyosin-myosin subfragment-1 complex, *J. Biochem.* **97**, 219-243.

Toyoshima, C. and Wakabayashi, T. (1985b) Three-dimensional image analysis of the complex of thin filaments and myosin molecules from skeletal muscle. V. Assignment of Actin in the Actin-Tropomyosin-Myosin Subfragment-1 Complex, *J. Biochem.* **97**, 245-263.

van Den Ent F, and Lowe, J. (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *thermotoga maritime*, *EMBO J.* **19**(20):5300-7.

Vale RD. and Oosawa F. (1990) Protein motors and Maxwell's demons: does mechanochemical transduction involve a thermal ratchet? *Advances in Biophysics.* **26**:97-134

Wakabayashi, K., Tokunaga, M., Kohno, I., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., Takezawa, Y., Wakabayashi, T., and Amemiya, Y. (1992) Small-angle synchrotron x-ray scattering reveals distinct shape changes of the myosin head during hydrolysis of ATP, *Science* **258**, 443-447.

Wakabayashi T, Huxley, H.E., Amos, L.A., and Klug A. (1975) Three-dimensional image reconstruction of actin-tropomyosin complex and actin-tropomyosin-troponin T-troponin-I complex, *J. Mol. Biol.*, **93**, 477-497

Walker, M., Zhang, X.Z., Jiang, W., Trinick, J., and White, H.D. (1999) Observation of transient disorder during myosin subfragment-1 binding to actin by stopped-flow fluorescence and millisecond time resolution electron cryomicroscopy: evidence that the start of the crossbridge power stroke in muscle has variable geometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*, **96**, 465-470.

Wells, J. A. and Yount, R. G. (1980) Reaction of 5,5'-dithiolbis(2-nitrobenzoic acid) with myosin subfragment one: evidence for formation of a single protein disulfide with trapping of metal nucleotide at the active site *Biochemistry* **19**, 1711-1717.

Whittaker M and Milligan RA (1997) Conformational changes due to calcium-induced calmodulin dissociation in brush border myosin I-decorated F-actin revealed by cryoelectron microscopy and image analysis, *J Mol Biol.*, **269**(4):548-57.

Whittaker M, Wilson-Kubalek EM, Smith JE, Faust L, Milligan RA, Sweeney HL. (1995) A 35-A movement of smooth muscle myosin on ADP release, *Nature*, **378**(6558):748-51.

Wriggers W, Schulten K. Investigating a back door mechanism of actin phosphate release by steered molecular dynamics., *Proteins*, 35(2):262-73.

Wriggers W, Schulten K. (1997) Stability and dynamics of G-actin: back-door water diffusion and behavior of a subdomain 3/4 loop. *Biophys J.* **73**(2):624-39.

Xie, X., Harrison, D.H., Schlichting, I., Sweet, R.M., Kalabokis, V.N., Szent-Gyorgyi, A.G. and Cohen, C. (1994) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 angstroms resolution, *Nature*, **368**, 306-312.

Xiao-Feng P (2000) Improvement of the davydov theory of bioenergy transport in protein molecular systems., *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* , **62**(5 Pt B):6989-98

Yanagida T, Esaki S, Iwane AH, Inoue Y, Ishijima A, Kitamura K, Tanaka H, Tokunaga M. (2000) Single-motor mechanics and models of the myosin motor, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **355**(1396):441-7.

安永卓生、鈴木良和 (1999) ミオシンの構造生物学: 構造機能関連の謎に迫る、細胞工学、**18**(11):1624-30.

安永卓生 (1997) 電子顕微鏡でなぜ“もの”が見えるのか、細胞工学、**16**(2) 303-316

Yasunaga, T., Suzuki, Y., Ohkura, R., Sutoh, K., and Wakabayashi, T. (2000) ATP-induced transconformation of myosin revealed by determining three-dimensional positions of fluorophores from fluorescence energy transfer measurements. *J. Struct. Biol.* **132**(1) (in press)

Yasunaga, T. and Wakabayashi, T. (2000) Relocation of Cys374 of actin induced by labelling of fluorescent dyes *J. Biochem.* in press

Yasunaga, T. and Wakabayashi, T. (1996) Extensible and object-oriented system Eos supplies a new environment for image analysis of electron micrographs of macromolecules *J. Struct. Biol.* **116**, 155-160.

Yasunaga, T., and Wakabayashi T. (1992) Stochastic characteristics of sliding movement of actin filament, The 4th international conference on biophysics and synchrotron radiation, F207, 326

Yasunaga T, Saeki K. and Wakabayashi T, (1996) Facilitating effect of ADP and phosphate on the sliding movement of actin filaments on the myosin-coated surface, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17**, 282

Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., and Yoshida, M. (2000) V-Type H⁺-ATPase/synthase from a thermophilic eubacterium, *Thermus thermophilus*. Subunit structure and operon, **275**, 13955-61.

Matsumoto K, Yamamoto D, Ohishi H, Tomoo K, Ishida T, Inoue M, Sadatome T, Kitamura K, Mizuno H (1989) Mode of binding of E-64-c, a potent thiol protease

inhibitor, to papain as determined by X-ray crystal analysis of the complex, *FEBS Lett.* 1989, **245**, 177-180.

Young M, Kirshenbaum K, Dill KA, Highsmith S. (1999) Predicting conformational switches in proteins, *Protein Sci.*, **8**(9):1752-64.

Yount RG, Lawson D, Rayment I.(1995) Is myosin a "back door" enzyme?, *Biophys J.* **68**(4 Suppl):44S-47S; discussion 47S-49S

Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA, (1996), Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK., *Science*, **272**(5268):1606-14