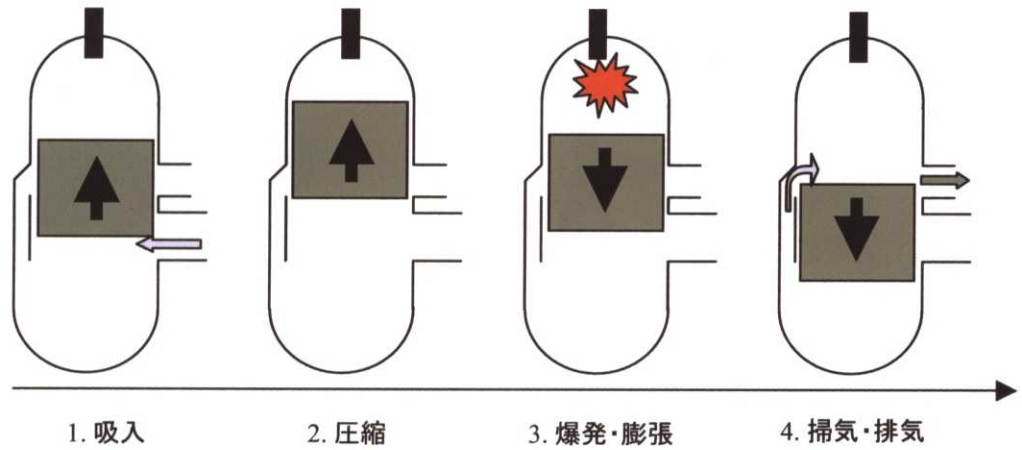


図及び表

a



b

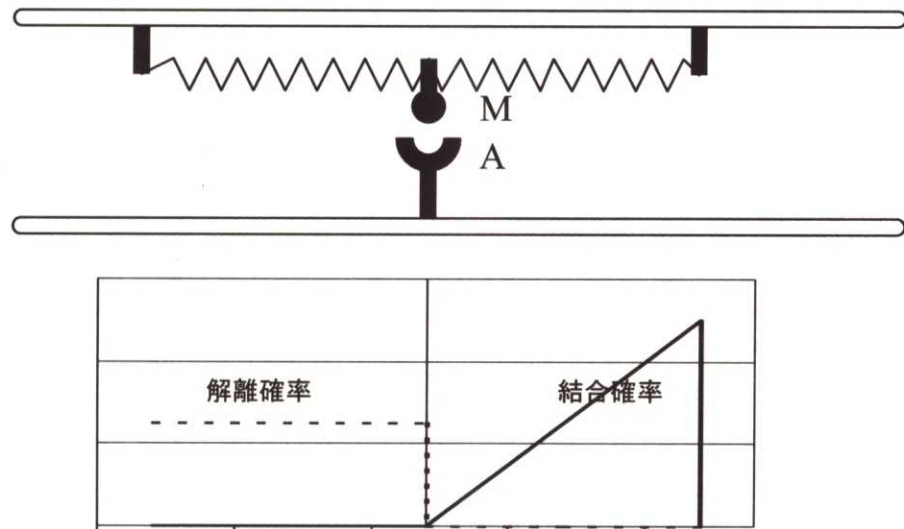


図1 モータータンパク質のエネルギー変換メカニズム。(a) マクロなエンジン型モデル。ガソリンエンジンのメカニズムと対応させて考える事ができる。1.ピストンが上がると、混合ガスが吸入されてくる。2.ピストンの上昇に伴って、混合ガスが圧縮される。1.2のステップはピストンの慣性使って動きが引き起こされる。タンパク質のレベルでは慣性は働かないので、ATPの結合により、構造変化が誘導されることに対応する。この時、クラッチが切られており、ピストンの動きが伝わらない。3. 点火により圧縮ガソリンが爆発・膨張し、それに対応してピストンが下がる。このステップが能動的なピストンの動きとなる。この過程では、クラッチがはいり、ピストンの動きが伝達される。4. 混合ガスが掃気され、それに伴って燃焼した排ガスが排気される。この場合、ピストンの上下運動(力学反応)とガソリンの爆発(化学反応)は正確に対応している。負荷に応じてトルクを変えるには、エンジンだけでは十分でなく、別にギアが必要となる。(b) マックスウェルのデーモン型モデル。ここでは、AF Hexleyの1957年モデルの形式を使って、マックスウェルのデーモンモデルとして解釈した場合について述べる。。右側でMとAの結合確率が高く、解離確率が低い。左側でMとAの解離確率が高く、結合確率が低い。Mは、バネで結合しており、熱浴により揺らぐ。結合・解離確率の空間的非対称性により、確率的にMはAを右から左に運ぶことができる。この時、Mの揺らぎをMとAの結合・解離確率の非対称性により一方向性の運動に転換している。したがって、この非対称性がマックスウェルのデーモンとして働いている。ATPのエネルギーはこの非対称性を維持するために使われている。この時、負荷に応じて、AとMが結合した時の力学的な釣り合い位置がずれるので、出力応答を変化させることが可能である。

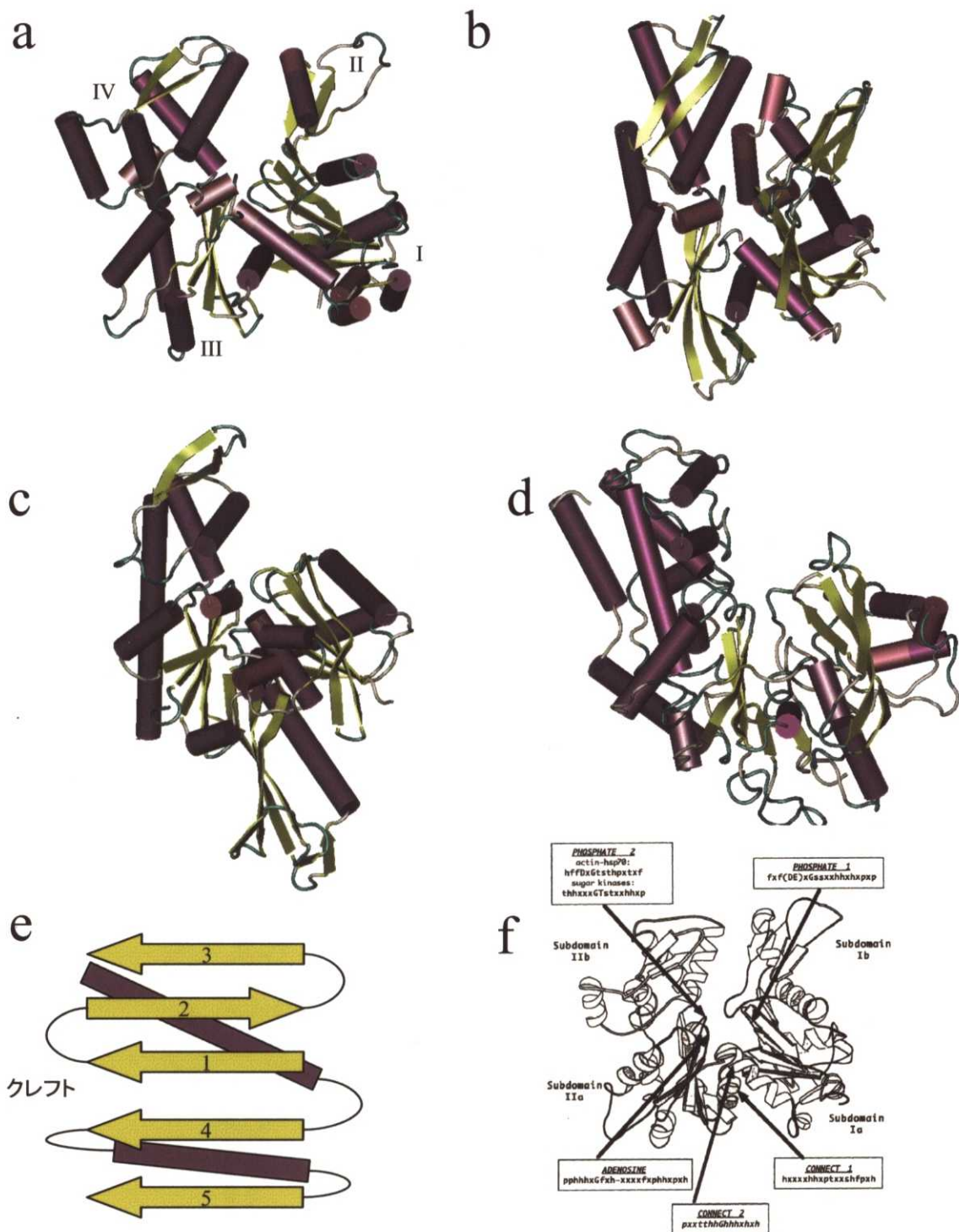


図2 アクチンとその類似タンパク質の構造比較。(a)アクチンの三次元構造。I-IVはアクチンのサブドメイン構造を表している。(b) Hsc70-ATPaseドメイン。(c) FtsA (d) Hexokinaseの構造。(c)(d)では第2サブドメインが存在しない。(e)アクチン型構造モチーフの超二次構造トポロジーマップ。3本の反平行 β ストランドと2本の α - β - α 構造の組み合わせからなる。第1ドメインと第3ドメインはこの構造の重複となっている。紫は α ヘリックス、黄色は β シートを示している。 β シートは、二本のストランドと3本のストランドの間がクレフトとなり、開閉等の動きをする可能性がある。(f)構造の類似性を考える上で重要な配列。ヌクレオチド結合部位の周辺の配列が良く保存されている。

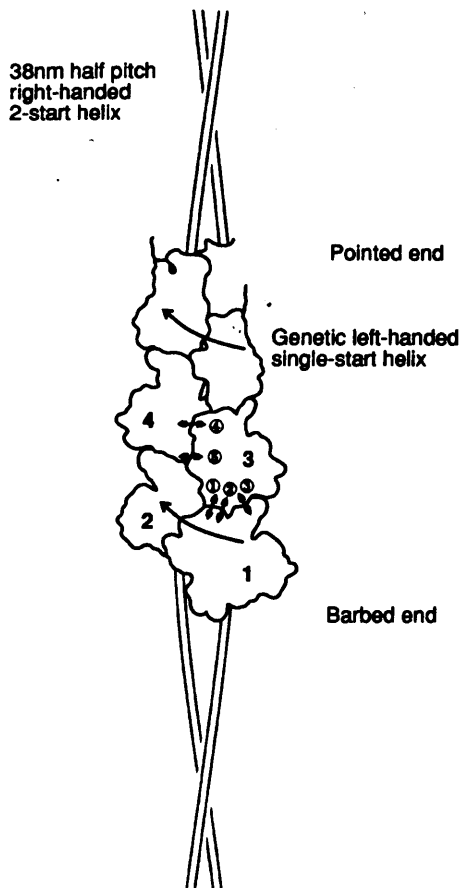
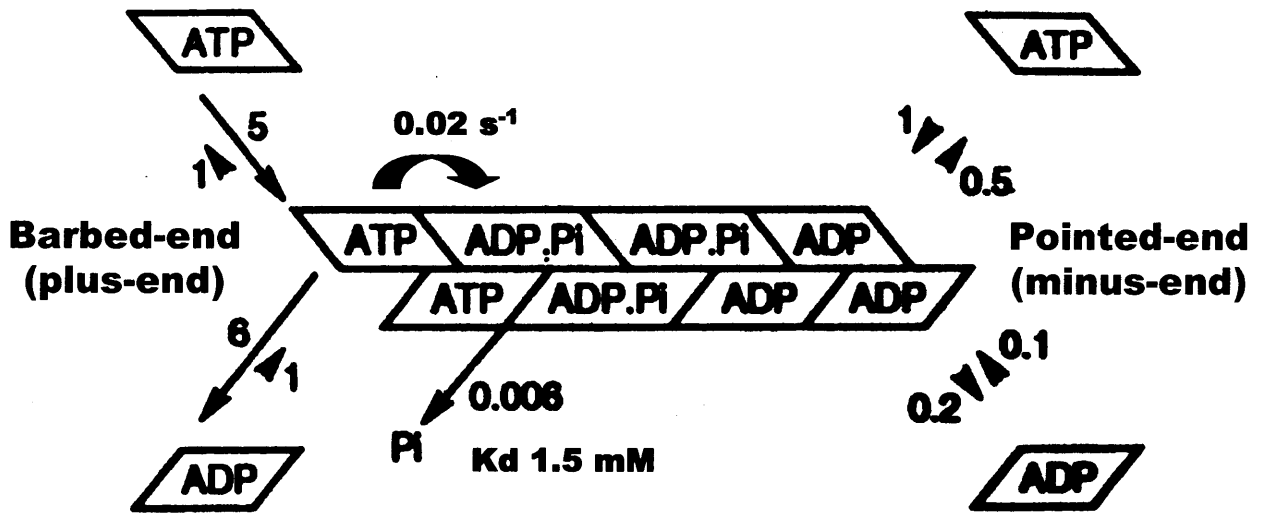


図3 (a)アクチンのATP加水分解反応の模式図。アクチンはフィラメント化するとATPの加水分解反応が加速される。(b)アクチンフィラメントの三次元構造の模式図。Protein Profile: Actinより改変。

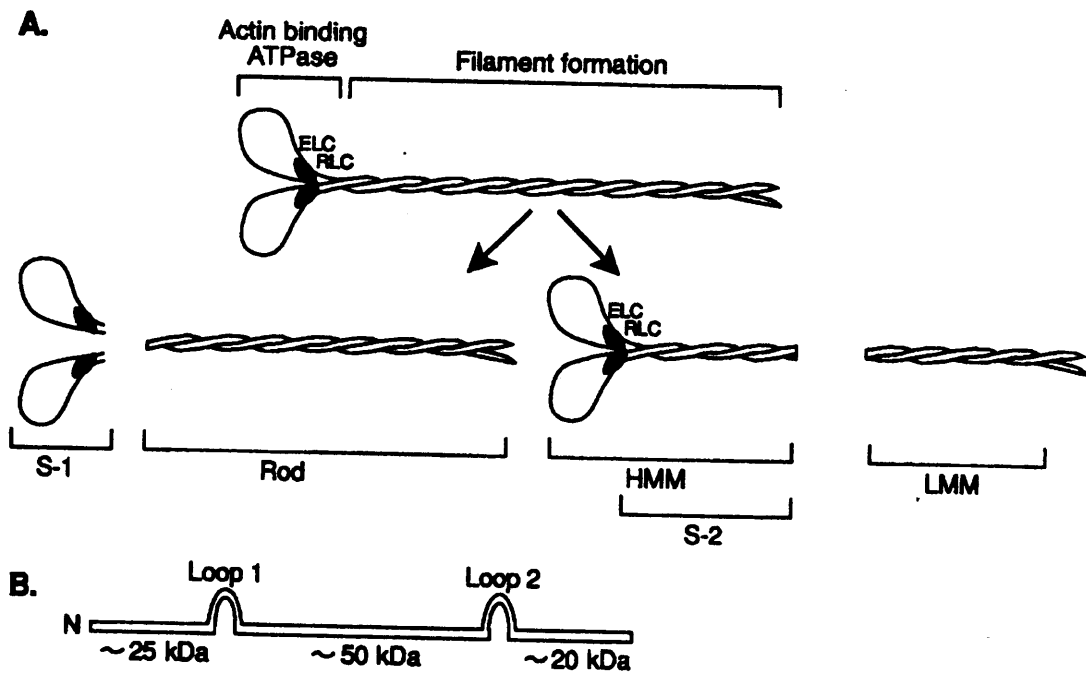
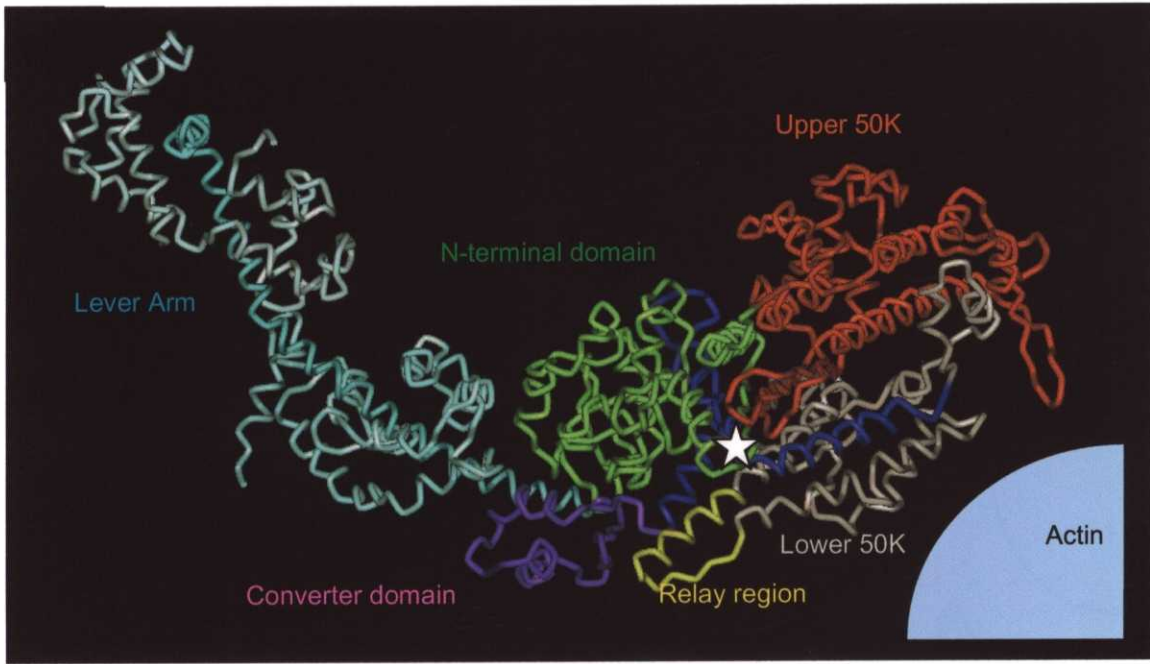


図4 ミオシンIIの構造。ミオシンは、2つの重鎖と4つの軽鎖(必須軽鎖(ELC) $\times 2$ +調節軽鎖(RLC) $\times 2$)からなる6量体である。Aは、タンパク質分解酵素による限定分解によって得られるミシンのフラグメントを示している。S1部だけでもモーター活性を持つ。LMM部は、ミオシンのフィラメント化を担っている。S2部は、LMMからなるミオシンフィラメントのバックボーンとミオシン頭部(S1)をつなぐ役目を果たす。Bはミオシン重鎖のS1部分の一次構造を示している。2つのLoopはそれぞれATP結合部位、アクチン結合部位の近傍に存在する。

a



b

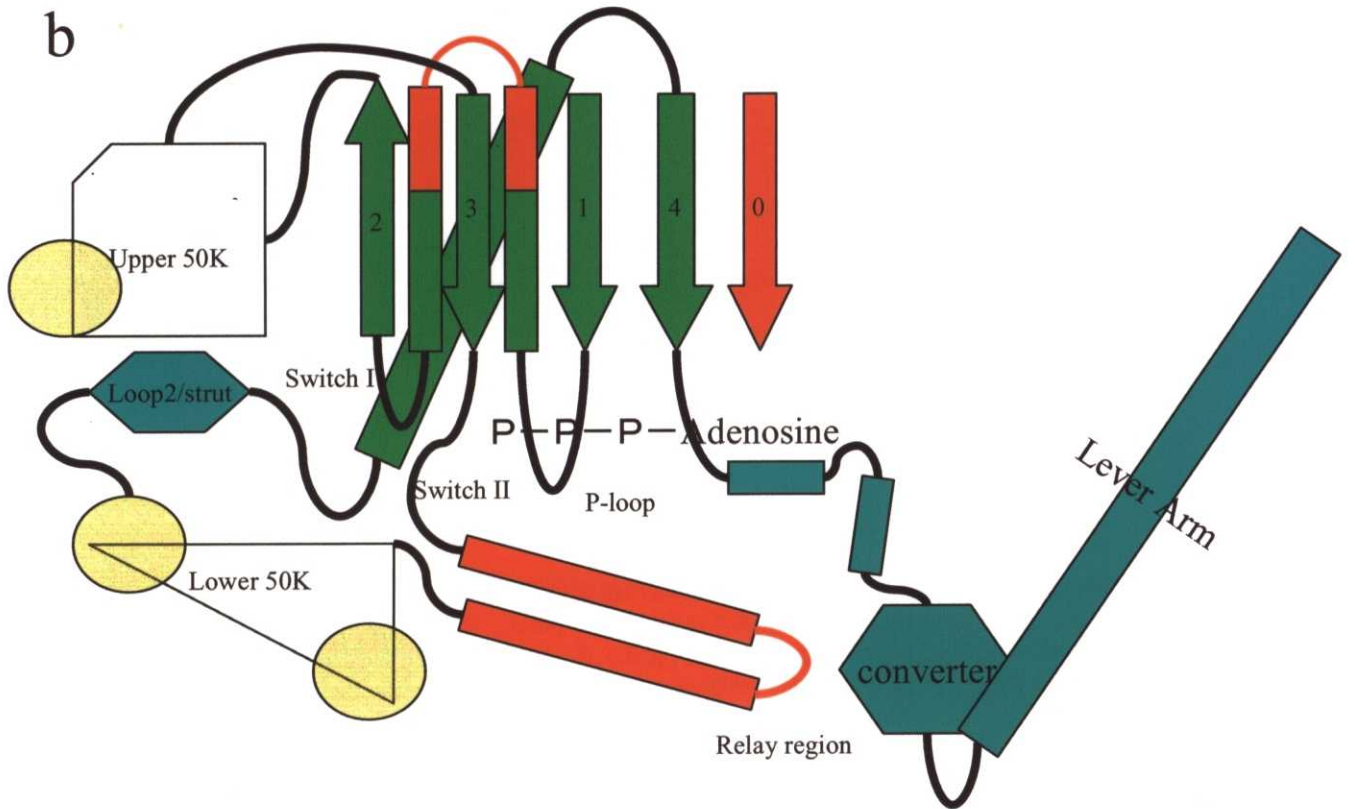


図5 ミオシンの三次元構造。(a)ミオシンのサブドメイン構造。☆印はATPを分解する活性部位。(b)ミオシン構造の模式図。緑はras等のGタンパク質に共通の構造、赤は、モータータンパク質に共通の構造を示している。Lever Armの手前までで滑り運動活性があることが示されており、特にモータードメインと呼ばれる。Lever Armはその長さに比例して滑り運動速度を加速する。これは、レバーアームの動きが直接滑り運動に関わっているという説により説明されてきたが、ミオシンが一回の構造変化で進むことのできるステップ(unitary step)はLever armの長さによらないが、ステップ数が増えるという一分子メカニクスの観測により、張力センサーであるという考え方が浮上している。

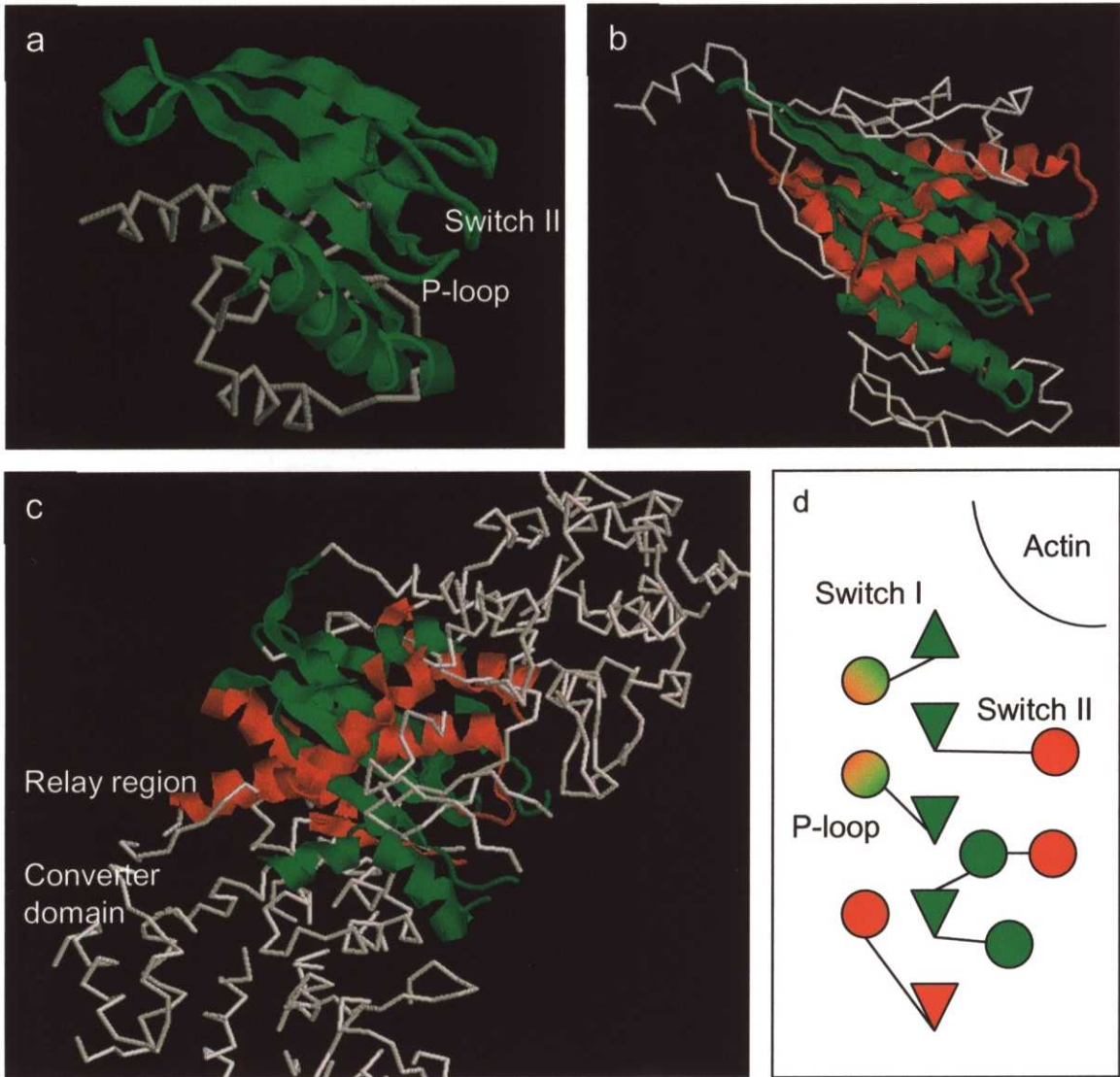


図6 ミオシンの構造の骨格。ミオシンの構造の骨格はsmall G-proteinと呼ばれるタンパク質と同じである。(a)H-Ras (small-G protein)、(b)キネシン、(c)ミオシン。(a)-(c)で共通の構造は緑で表示され、(b)と(c)のモータータンパク質に共通の構造は赤で示されている。(d)は、ミオシンの2次構造のトポロジー構造。緑と赤は(a)-(c)と同じ意味である。モータータンパク質では、いくつかの α ヘリックスが挿入されていることがよくわかる。

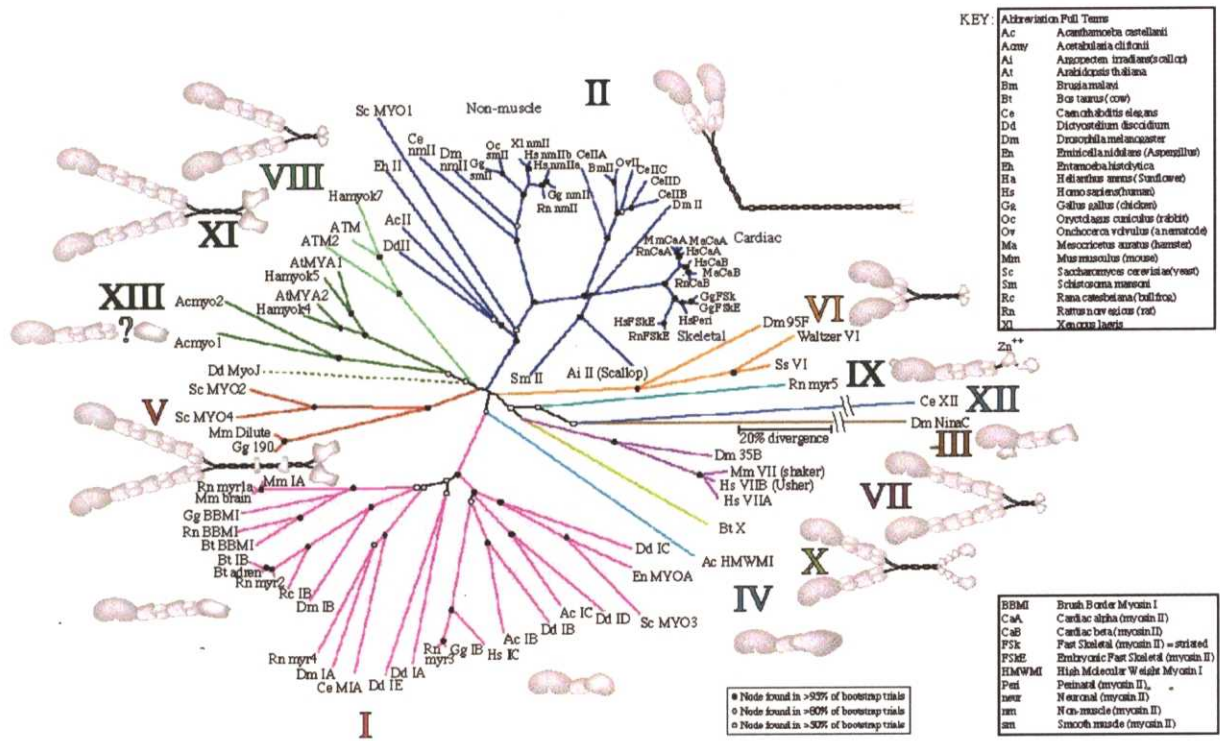


図7 ミオシンファミリー。多くのミオシン関連タンパク質が存在する。

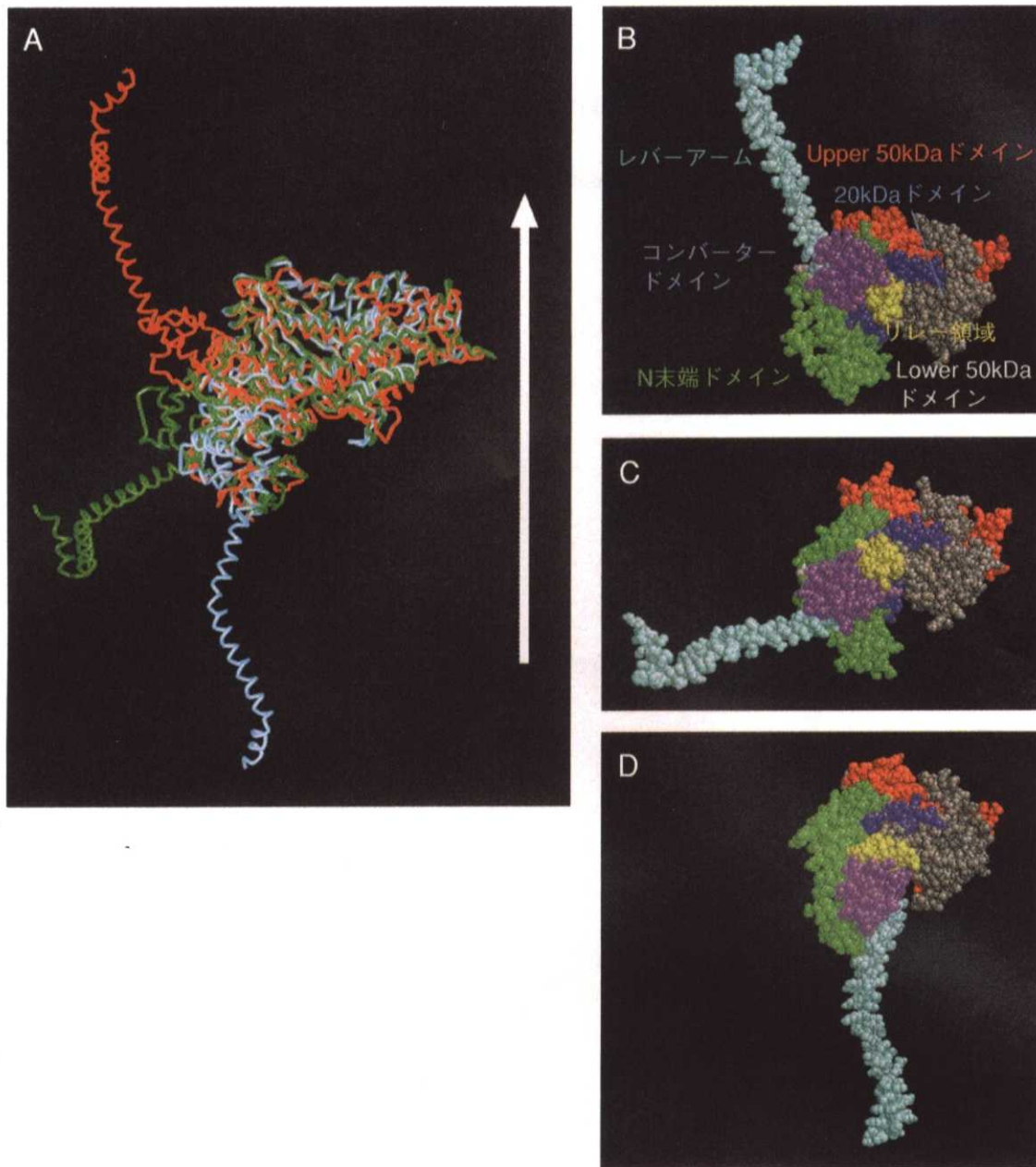


図8 レバーアーム説を支えるミオシンの構造変化。(A)X線結晶解析によって解かれた異なる三つの構造の重ね合わせ。(C)第1(ヌクレオチドを結合していないトリ骨格筋ミオシンの結晶構造)、(B)第2(ディクチオ型細胞性粘菌のMgADPVi結合型のモータードメインの結晶構造にトリミオシンのレバーアームをコンバータードメインの向きがあうように結合したもの)、(D)第3(ホタテ貝ミオシンのMgADP結合型の結晶構造)の構造がそれぞれ緑、赤、シアンで描かれている。Upper 50Kの向きがあうように三つの構造を重ねた。矢印はアクチンフィラメントのP端の向きを示している。レバーアームと呼ばれる構造が大きくその向きを変えていることが分かる。(B)－(D)では、Lower 50ドメインの回転がリレー領域、コンバータードメインと次第に構造変化を増幅させながら、最後にレバーアームが大きく回転している様子がわかる。(B)と(C)を比較すると、リレー領域とコンバーター領域の関係が、N末端ドメインに対して反転している。2つの構造を主としてとる起源はこの反転にあると考えられる。

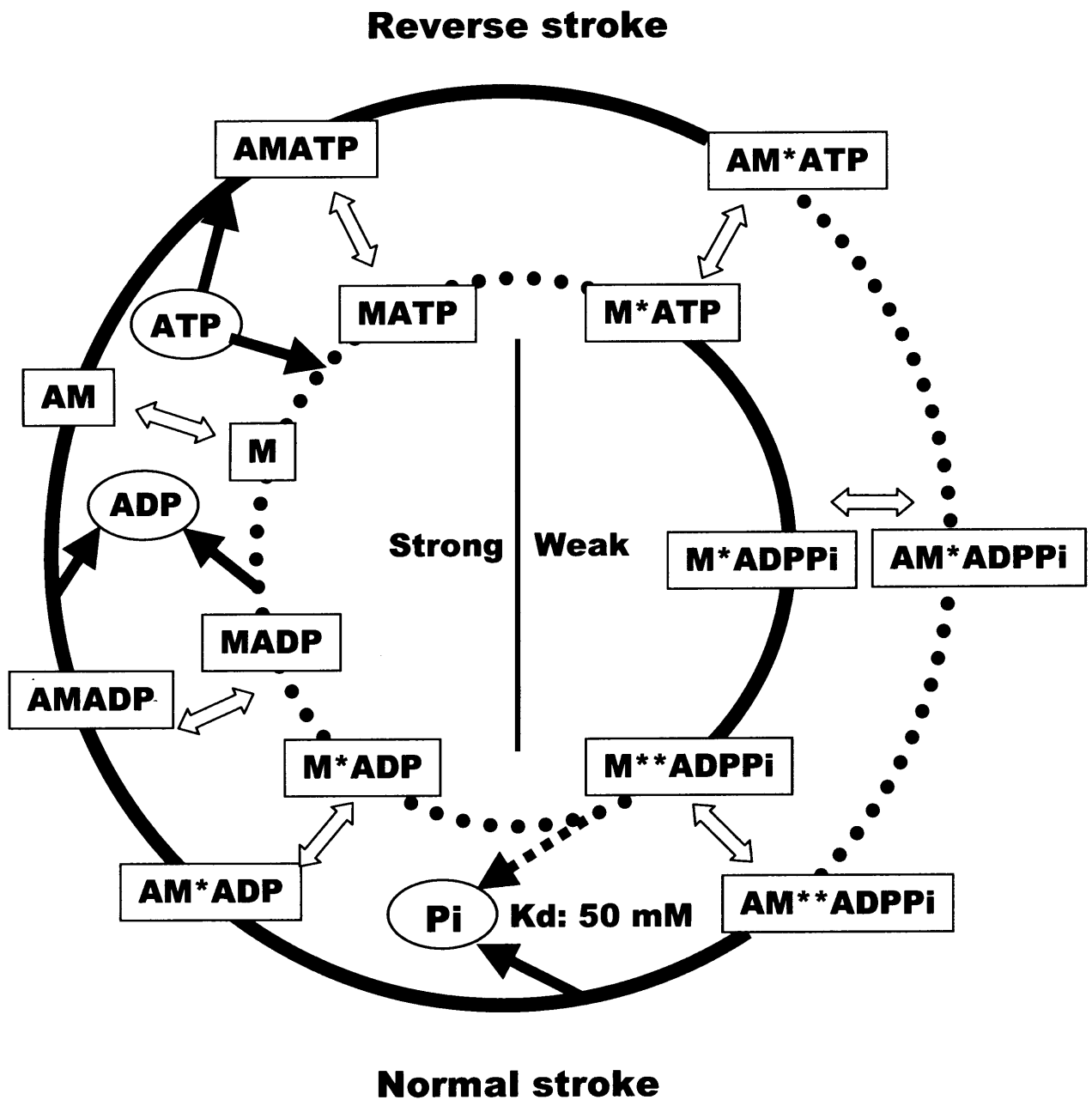


図9 アクトミオシンのキネティクス。ミオシンとアクチンがそれぞれM、Aとして記述されている。Piは無機リン酸を示す。ミオシンに付けられた*及び**は、ミオシンに内在するトリプトファン蛍光強度が増大することを意味している。四角で囲まれた状態は、現在観測されている、あるいは想定されているミオシン及びアクトミオシン(アクチンと結合したミオシン)の化学状態を示している。ATPが加水分解する場合には時計回りに反応が進行する。ミオシンだけの時には無機リン酸の解離が律速段階であり、ATP存在下でのATP加水分解反応の定常状態ではミオシンの化学状態は9割以上がM**ADPPi状態であり、他の化学中間状態は過渡的な状態であるといえる。律速段階であった無機リン酸のミオシンからの解離は、アクチンにより100倍以上活性化される。

右側の化学状態では、力学的状態としてアクチンとミオシンが弱く相互作用し、左側の化学状態では、力学状態としてアクチンとミオシンが強く相互作用する。従って、また、内在するトリプトファン蛍光の変化から、円環の上部(reverse stroke)と下部(Normal stroke)の遷移過程においてミオシンはその構造を大きく変えることが示唆されている。以上のことから、図10に示したLymn-Taylor型のモデルが現在も健在である。

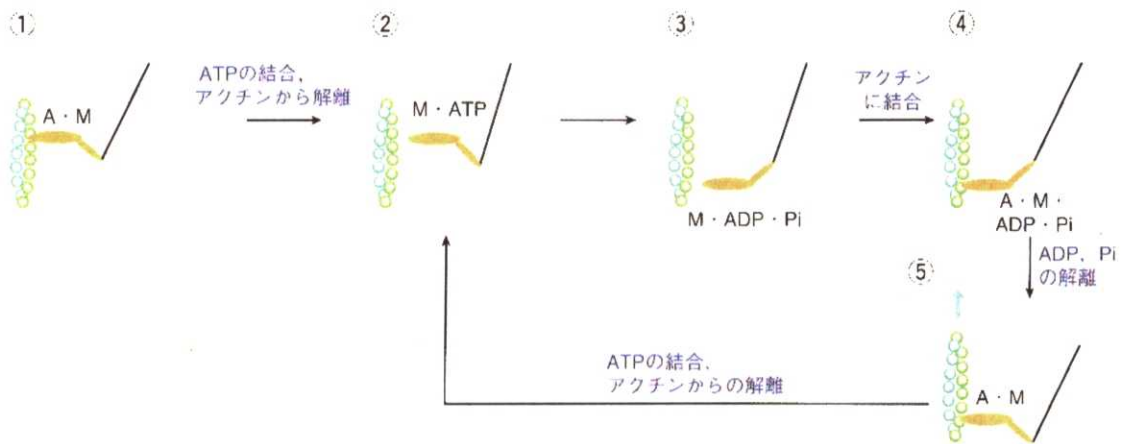


図10 レバーアームモデルを加味したLymn-Taylorモデル。アクチンが緑、ミオシンの頭部がオレンジで描かれている。①ミオシンがヌクレオチドを結合していないときには、アクチンとミオシンは強い結合(10^{6-8} : ATPが加水分解の際に解放するエネルギーの約半分程度: $10 k_B T$)をしているが、②ATPがミオシンに結合すると、ミオシンはアクチンと弱い結合(10^{2-4} : 約 $3 k_B T$)しかできなくなり、熱揺らぎ($k_B T$)により、ミオシンから外れてしまう。③ミオシンは加水分解反応を起こし、変形する。ミオシン単独では、加水分解反応により産まれた無機リン酸を放出することはできない。④ミオシンは再びアクチンと結合した際に、無機リン酸の解離が100倍以上に加速され、ほとんど不可逆的に無機リン酸が解離するのに伴い、ミオシンの変形が生じ、⑤アクチンとミオシンの結合が強い結合に移行し、力が発生し、滑り運動が引き起こされる。本来のLymn-Taylorモデルではミオシン結合角がアクチンに対して変化すると言われていたが、現在では、アクチンのミオシンに対する結合角が変わるのではなく、軽鎖結合部位であるレバーアームが角度を変えるという「レバーアーム仮説」が有力である。Aはアクチン、Mはミオシン、Piは無機リン酸を示している。

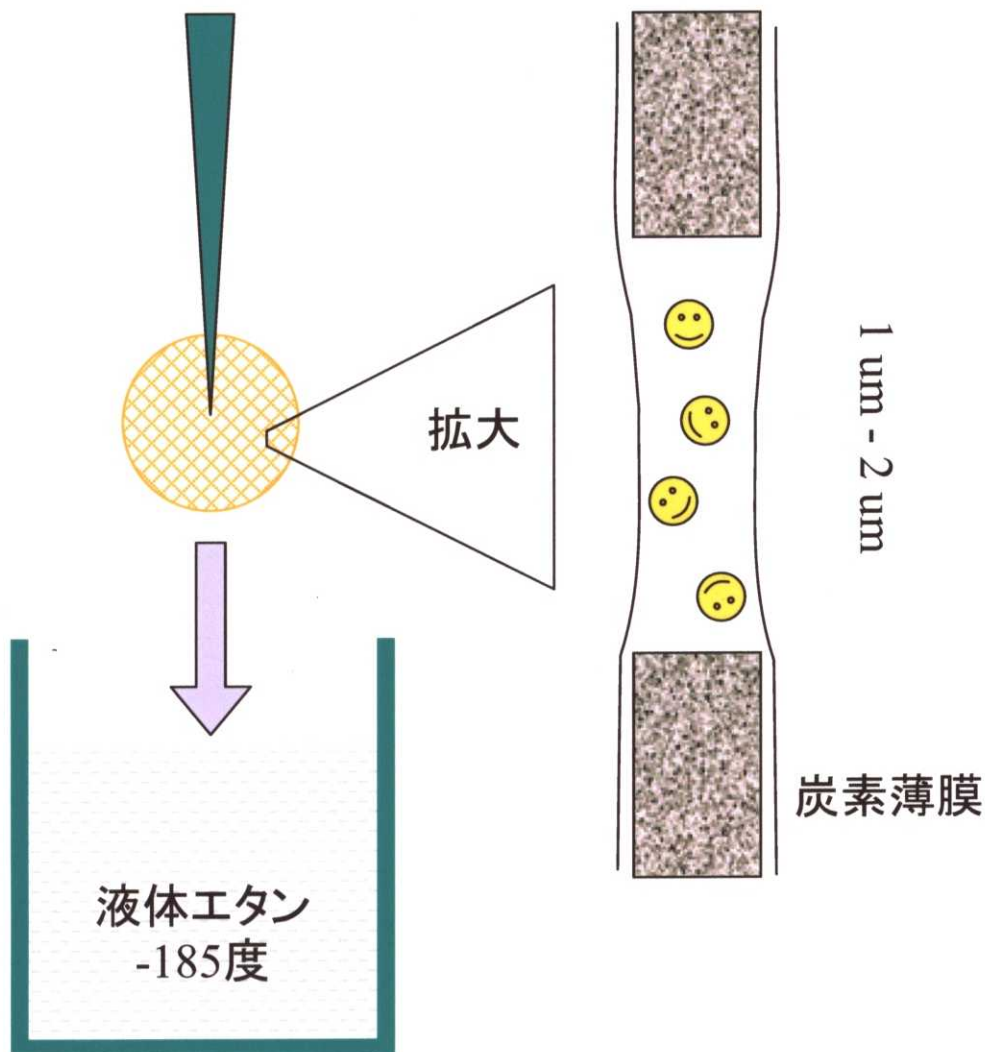


図11 クライオ電子顕微鏡法。約1-2 μm 程度の大きさの孔の開いた、約100 nm程度の薄い炭素薄膜に水の薄い膜を作成し、その中にタンパク質を閉じこめる。この状態で液体エタン中に落下させ、急速に凍結する。凍結は、1ミリ秒以下の速さで起こるため、氷は結晶とならず、非晶質の氷の中にタンパク質が包埋された状態(氷包埋)で固定できる。このまま、液体窒素温度に冷やした電子顕微鏡試料ホルダーにグリッドをのせ、電子顕微鏡で撮影する。従って、1ミリ秒以上の緩和時間をもつ構造はそれぞれ固定することができる。

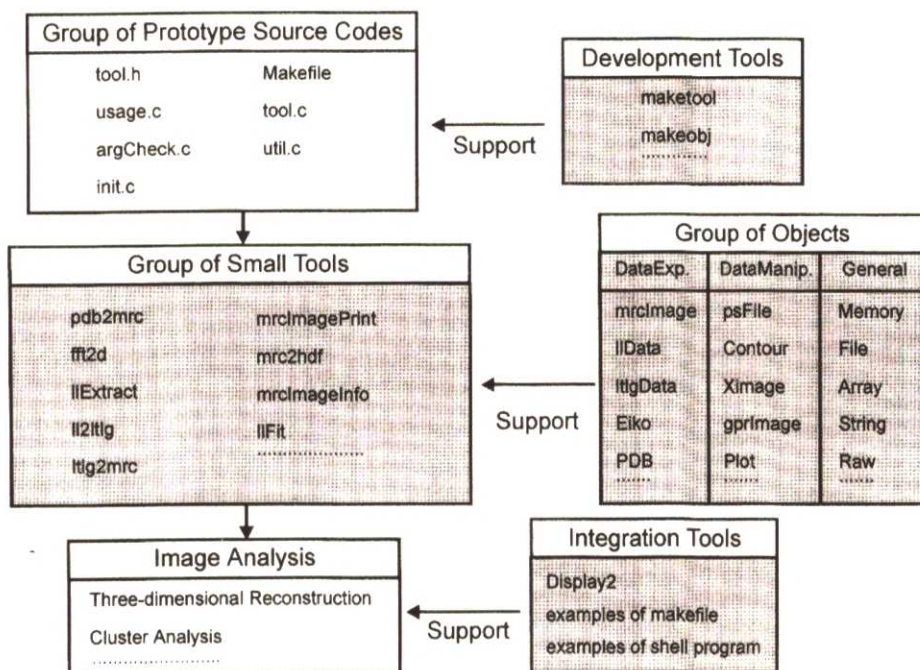


図12 画像処理システムEosの概念図とEosによって提供される4つのサポート。図で陰影がかかっているものは、Eosが提供する4つのサポートを示している。すなわち、一連の画像処理プログラム群(Group of Small Tools)、統合プログラム(Integration Tools)、開発ツール(Development Tools)、及び開発ライブラリ(Group of Objects)である。実際の画像解析は、Group of Small Toolsのものをを用いて行い、個々のプログラムはDisplay2をはじめとするIntegration Toolsで統合して取り扱うことができる。また、開発に際しては、Development Toolsにより、開発されるソフトウェアのプロトタイプ(Group of Prototype Source Codes)が生成され、Group of Objectsが提供するライブラリ群を使って、迅速な開発を行うことができる。

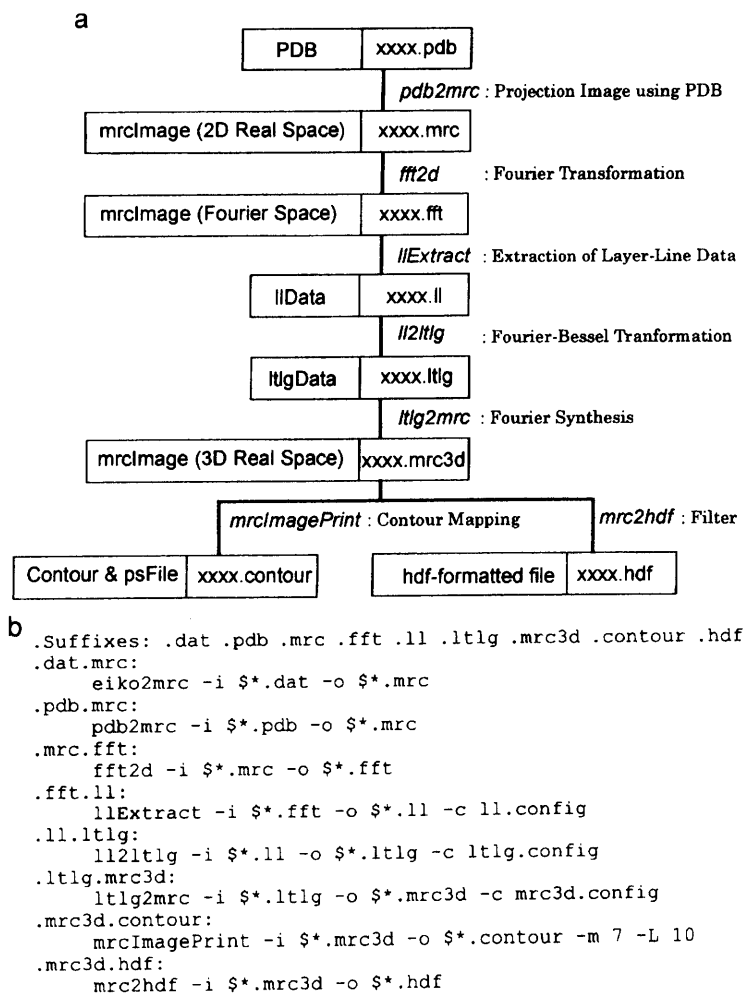


図13 らせん対称性を仮定した三次元再構成法の実際。らせん対称性の原理は、DoRosier and Moore (1970)、Moore et al.(1970)、Wakabayashi et al.(1975)とAmos and Klug (1975)に従っている。電子顕微鏡によって撮影されたらせん対称性を持った超分子構造 $f(x, z)$ は、fft2dによってフーリエ変換される $(F(X, Z))$ 。フーリエ変換された画像かららせん対称性に則った層線情報 $G(R, n, Z)$ をllExtractにより抽出する(n は展開したベッセル関数の次数)。これは、直交座標の空間を、円筒座標系の空間に変換することをあたる。ll2ltlgにより、動径方向の成分をフーリエベッセル変換し、実空間に戻す $g(r, n, Z)$ 。最後にltlg2mrcにより、三次現像 $f(x, y, z)$ を得る。らせんの選択律等を指定したいいくつかの設定ファイルと撮影増filename.mrcがあれば、make filename.mrc3dを実行すると三次元像を得ることができる。

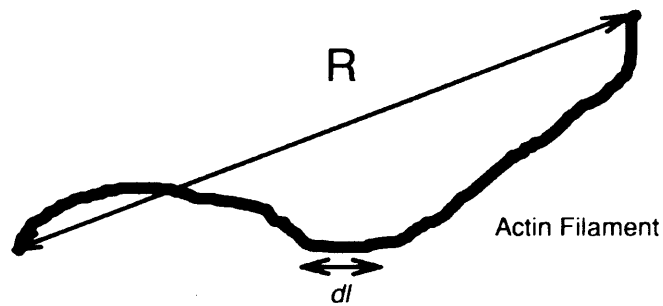
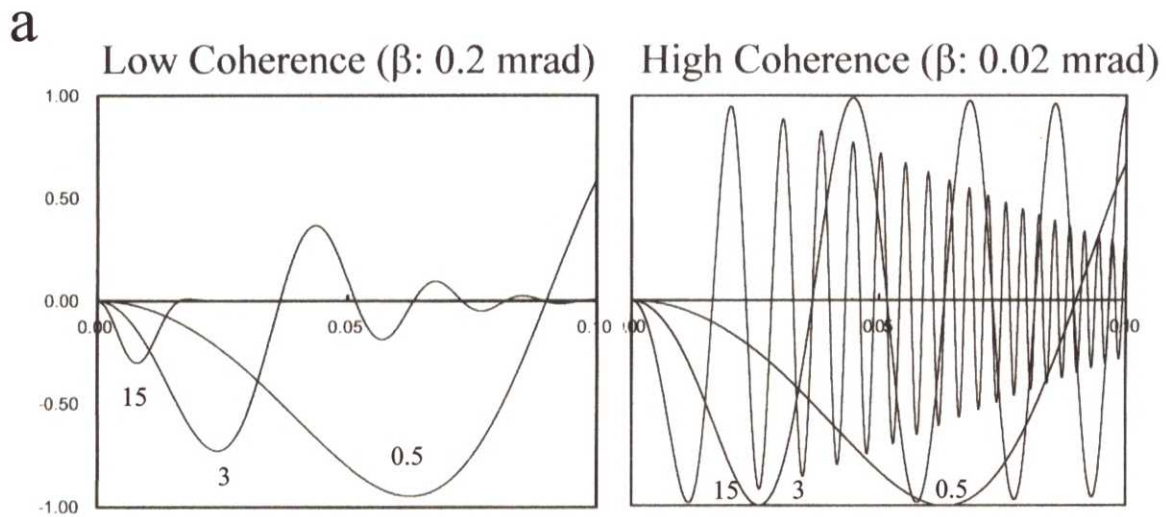


図14 アクチンフィラメントの硬さを測定するための持続長の測定法。アクチンの長さ($L=\sum dl$)と両端間の直線距離(R)を測定する。この時、両端間の直線距離の自乗の期待値($\langle R^2 \rangle$)とアクチンの長さ(L)は、 $\langle R^2 \rangle = 2(a/T)^2(LT/a - 1 + e^{-LT/a})$ という関係が成り立つ(Bresler & Frenkel, Landau & Lifschitz)。持続長(a/T)は、アクチンがどのくらい直線性を保っているかを示しており、アクチンの曲げ方向への硬さを表現している。持続長が大きいほど、直線的であり、曲げにくく、硬いフィラメントであることを示している。



b

| Defocus | Coherence | | | |
|-------------------|----------------|--|------------------|--|
| | Low (0.2 mrad) | | High (0.02 mrad) | |
| 0.5 μm | | | | |
| 3 μm | | | | |
| 15 μm | | | | |

Without Noise With Noise Without Noise With Noise

図15 ホログラフィック像再構成法の原理。(a)コントラスト伝達関数。横軸は空間分解能を示す。最大の空間周波数が、 $1/10 \text{ \AA}^{-1}$ である。縦軸は、コントラストを表し、-1から1となっている。1か-1に近いものほど、コントラストが良いことを意味している。ただし、コントラストの正負の違いは、像の黒と白を逆転するため、補正が必要である。図は左右どちらも0.5, 3, 15 μm の不足焦点での位相コントラストを示している。デフォーカス量が多いほど、最初のコントラストのピークが低い空間周波数成分へと移行する。従って、実体を観測しやすくなる。しかし、右図は左図に比べて、電子線の空間的コヒーレンスが高く、より平面波に近いが、左図では、空間的コヒーレンスが悪いために、ピークは低周波側に移行するが、ピークの値が0に近くなり、コントラストを生まなくなっている。従って、結局、像がぼけてしまう。それに対して、空間的コヒーレンスの良い右図ではピーク強度が高く、しかも高い空間周波数まで、そのコントラストを保っていることがわかる。(b)(a)のコントラスト伝達関数に従って観測されるミオシン分子のモデル計算。各カラムの右図はノイズのない場合、左図はノイズを加えた場合の画像である。コヒーレンスが高く、デフォーカスを15 μm かけた右下の図がもっともはっきりと観測できる。

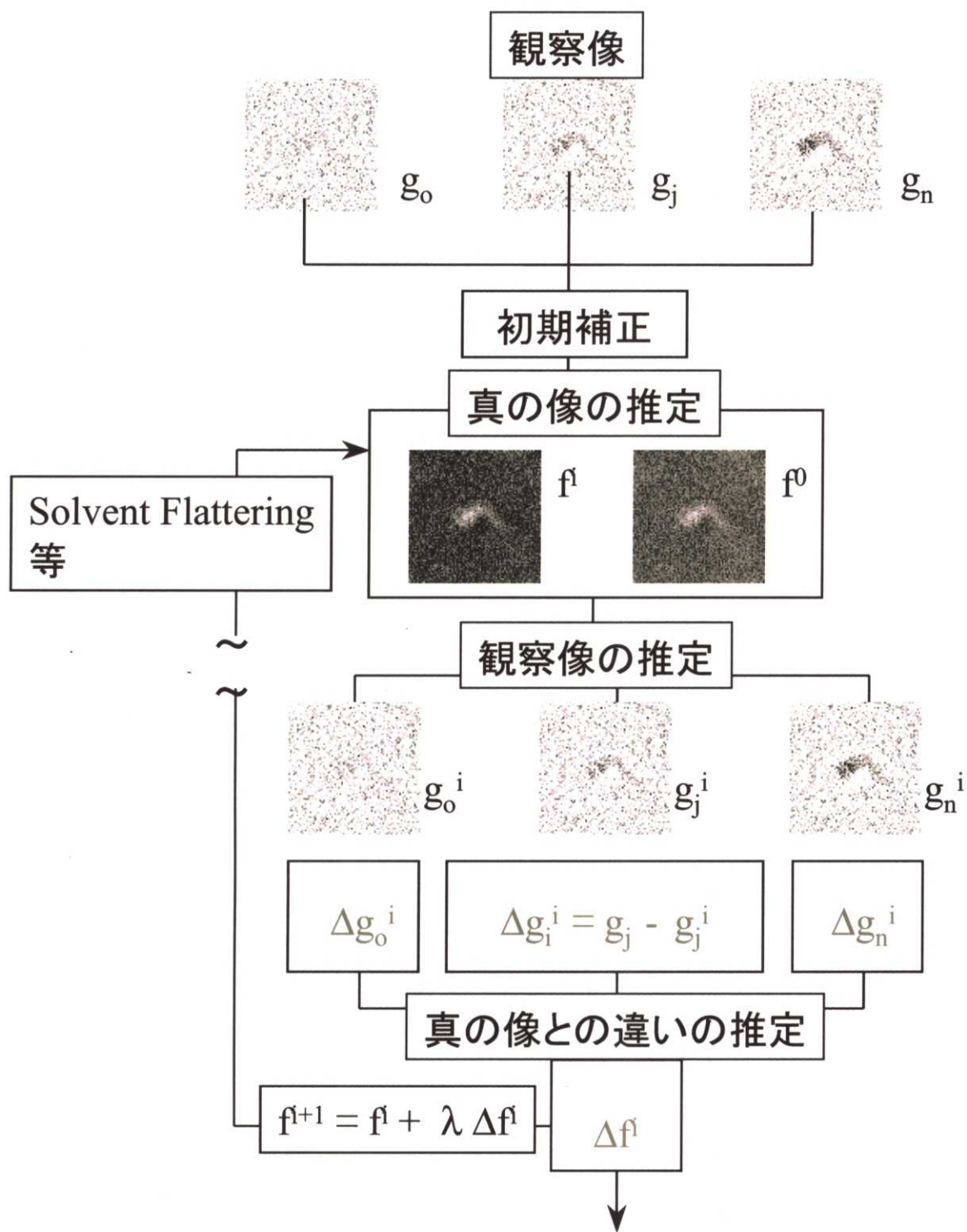


図16 ホログラフィック像再構成法のアルゴリズム。異なる不足焦点量で撮影された像 g から真の像 f を推定するためのアルゴリズムを示している。繰り返し法により推定することにより、非線形な演算である溶液濃度の平滑化(Solvent Flattening)等を組み込むことが容易である。

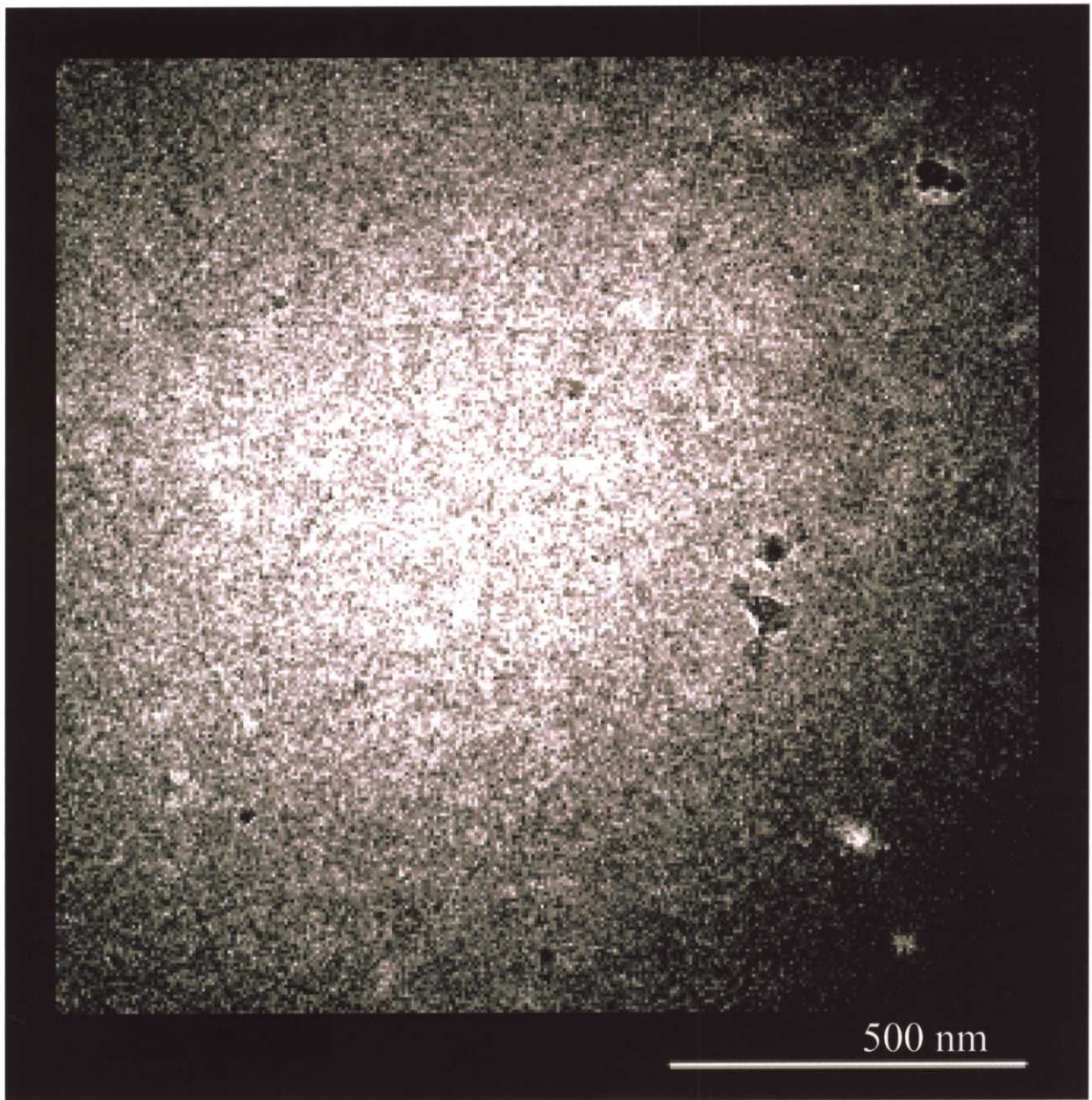


図17 クライオ電子顕微鏡法により撮影されたMgADP結合型アクチンフィラメント。黒がタンパク質。スケールバーは500 nm。

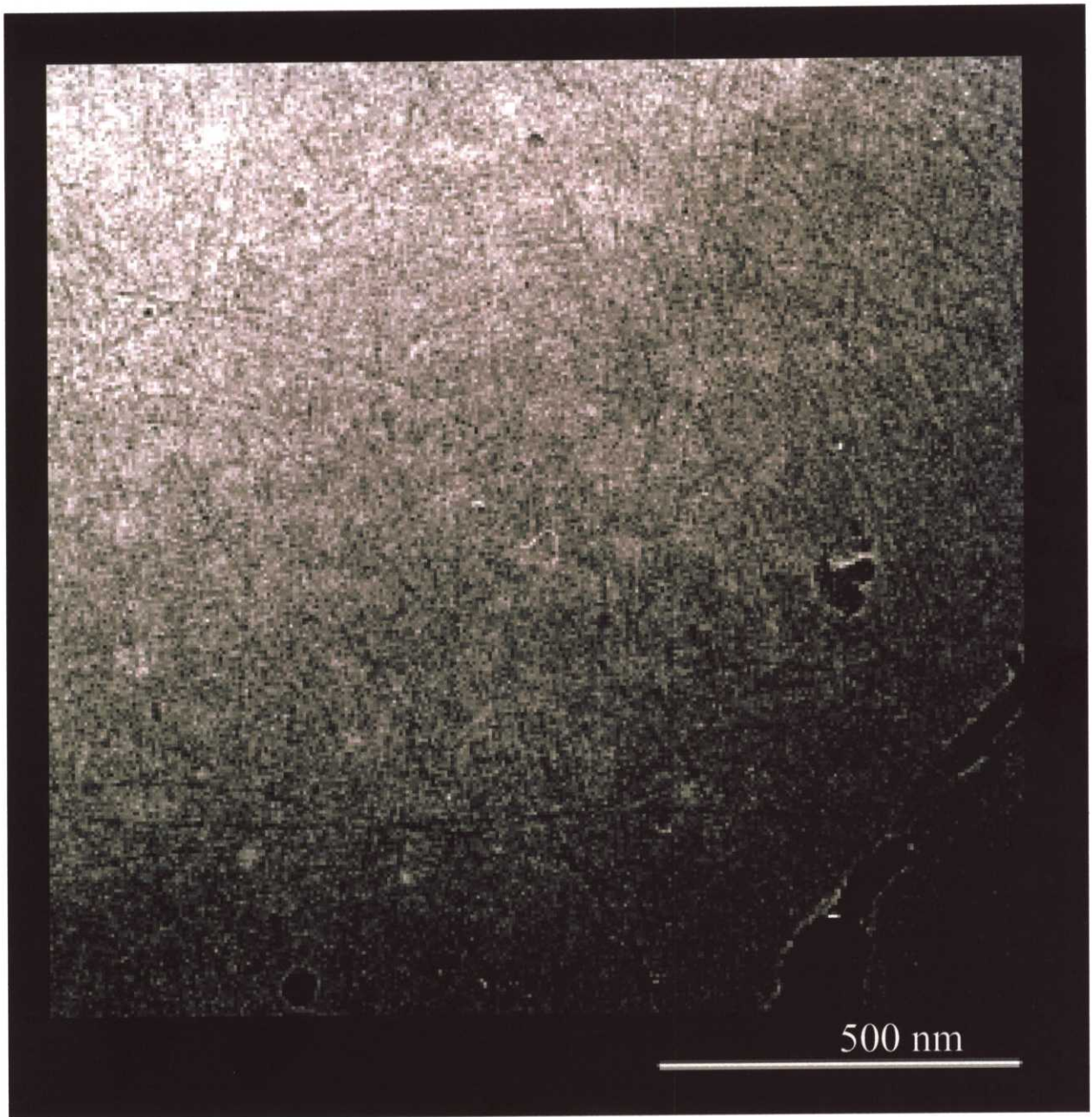


図18 クライオ電子顕微鏡法により撮影されたMgAMPPNP結合型のアクチンフィラメント像。黒がタンパク質。スケールバーは500 nm。

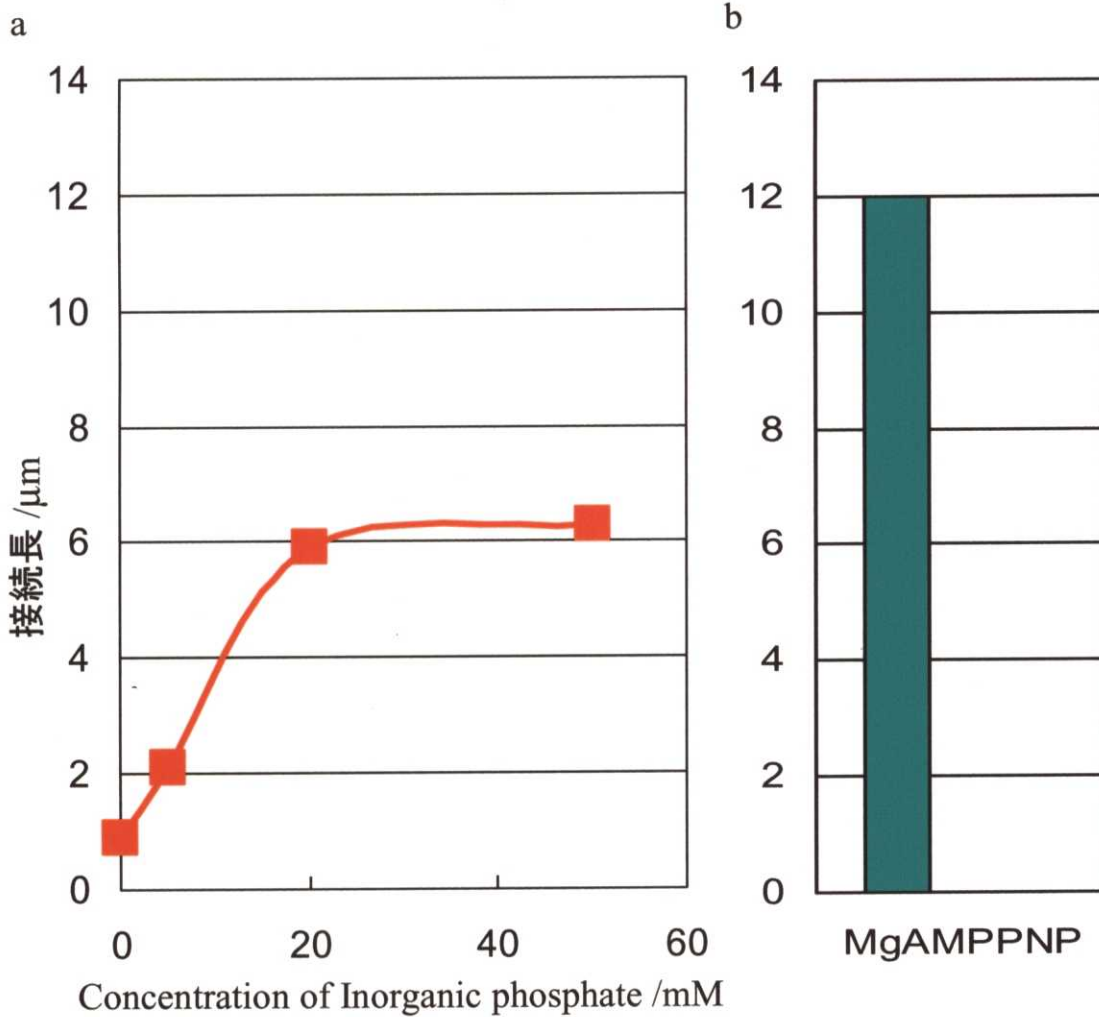


図19 アクチンに結合したリガンドの違いによるアクチンフィラメントの硬さの変化。縦軸は持続長を表している。(a) 無機リン酸の濃度と持続長の関係。無機リン酸濃度の増加につれて、持続長が長くなり、アクチンフィラメントが硬くなっていることが分かる。(b) MgAMPPNPを結合したアクチンの持続長。MgAMPPNPはMgATPのアナログであると考えられる。最長の持続長を示す。



図20 アクチンフィラメントのギャラリー。黒がタンパク質。

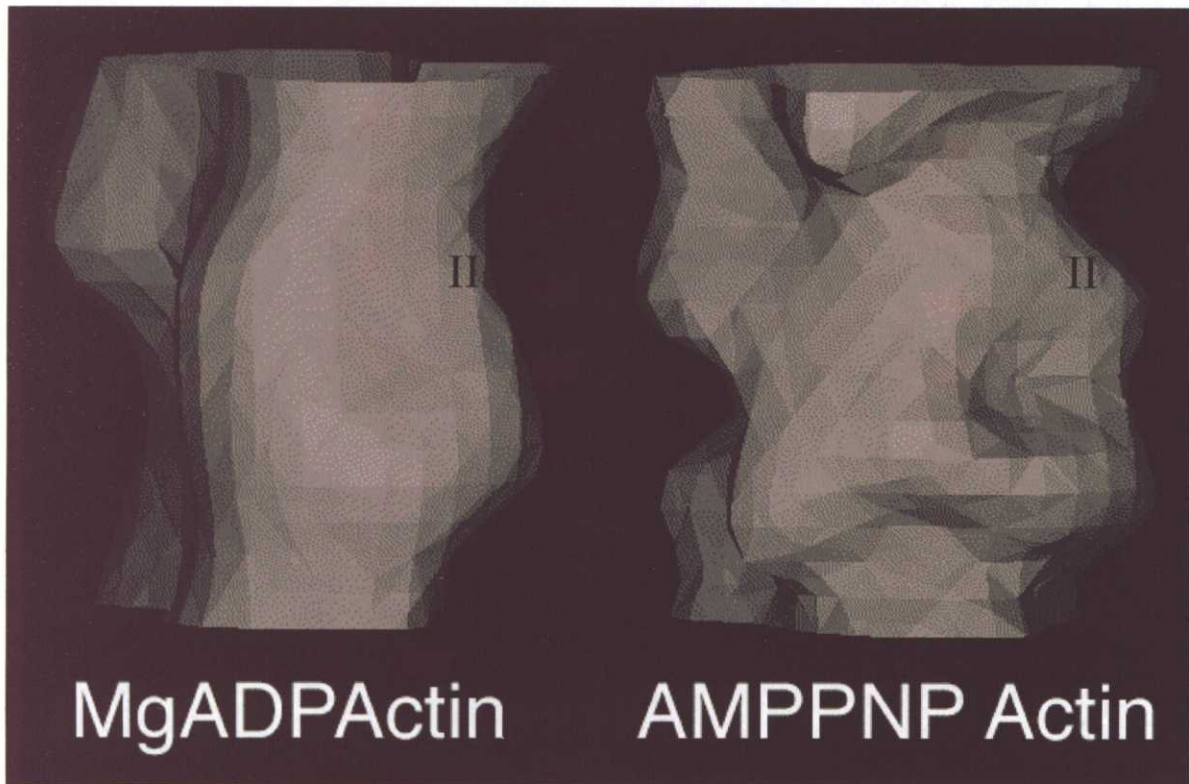


図21 アクチンフィラメントの三次元構造。(a)MgADP結合型及び(b)MgAMPPNP結合型のアクチンの構造。それぞれ168クロスオーバー(分子数として約2000個)、144クロスオーバー(分子数として約1800)のアクチン分子からの計算結果である。第二サブドメインと考えられる場所にそれぞれIIの印を記入している。すべて $l = -6n + 13m$ の選択律を持つものとして、三次元再構成を行った。

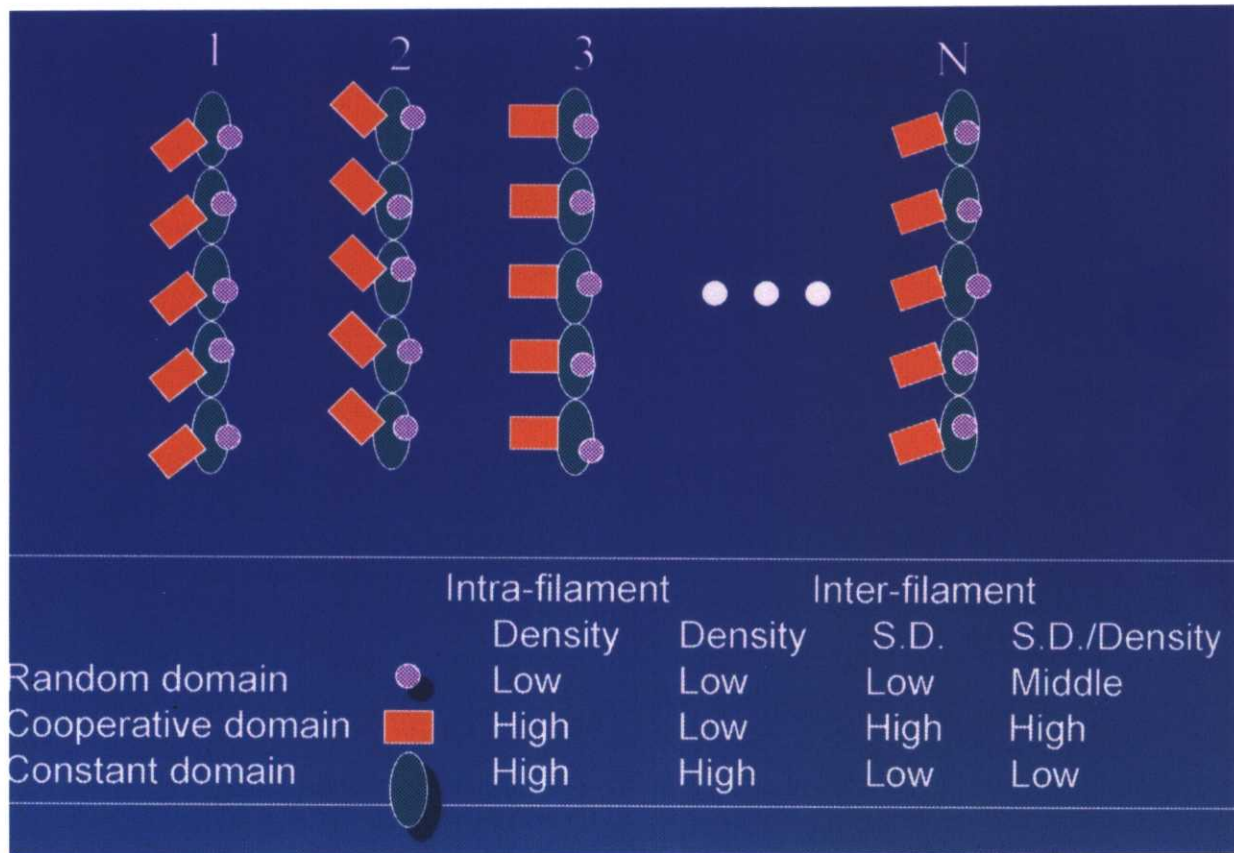


図22 アクチン分子の揺らぎの測定法。紫の○が示すように、フィラメント内で構造が異なっている (Random domainである) 場合には、一本からの再構成された三次元構造での密度が低くなる。従って、各フィラメントを平均した場合の平均密度も低い。この時、標準偏差(SD)は、一本から再構成された三次元密度が低いため、小さい値をとる。従って、標準偏差を平均密度で割ったものは中間的な値となる。赤の□が示すように、フィラメント内部ではそろっている(構造変化に協同性がある場合)が、フィラメント毎に違っている (Cooperative domainである) 場合には、各フィラメントを平均した時の平均密度は低く、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。構造変化をしない領域は、平均密度が高く、標準偏差は小さくなるので、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小さ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ることができる。

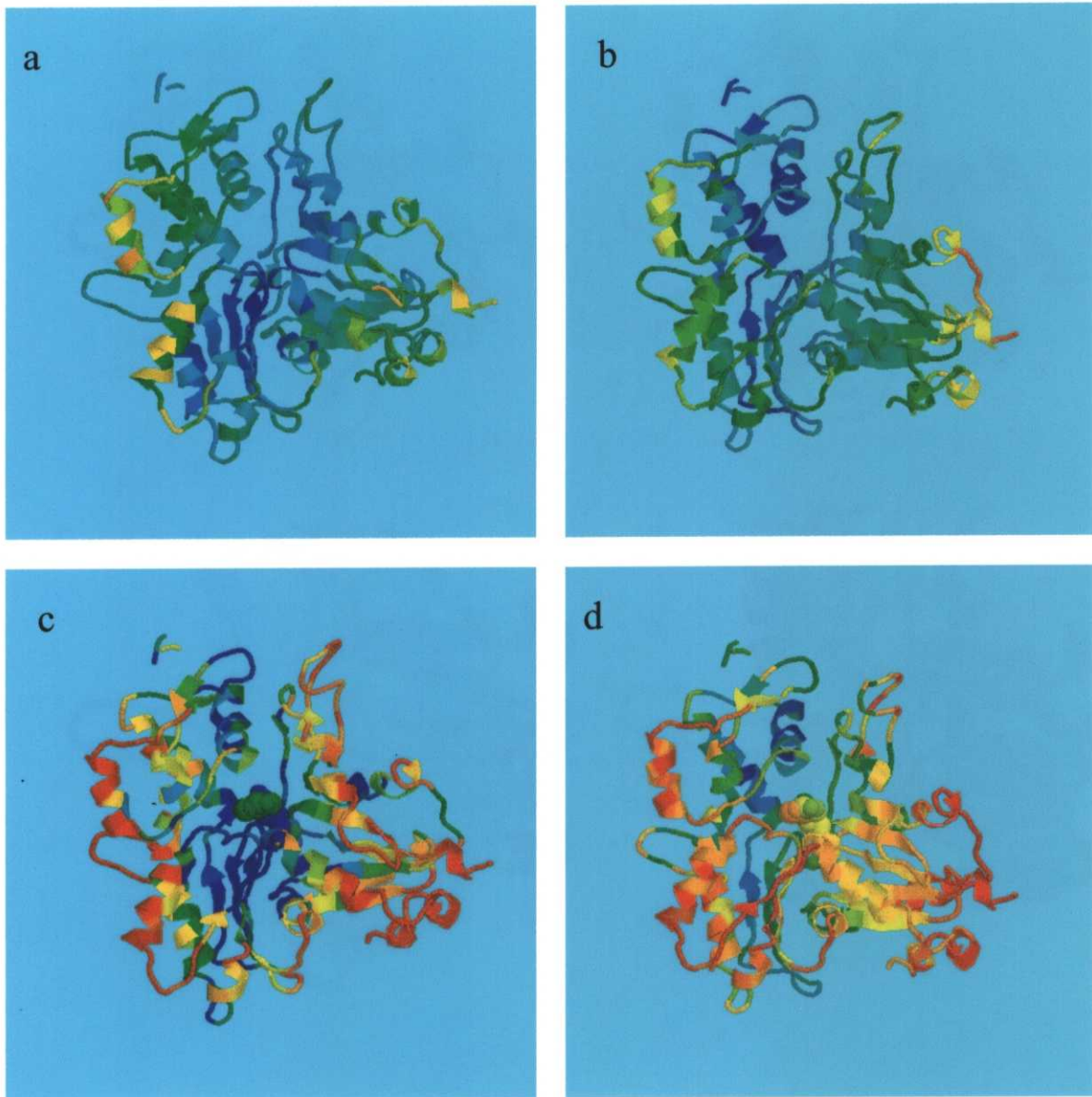


図23 アクチンフィラメント内でのアクチンの揺らぎ。(a)(c)MgADP結合型及び(b)(d)MgAMPPNP結合型アクチンの揺らぎ。(a)(b)は平均密度分布を示しており、赤は、平均密度が低く、揺らぎが大きいと推定される部分、青は平均密度が高く、揺らぎが小さいと推定される部分を示している。(c)(d)は、密度の標準偏差を平均密度で割ったものであり、協同的に構造変化を起こす領域であると考えている。赤は、密度により正規化された標準偏差が大きい部分で、協同的な構造変化を起こしていると考えられる場所、青は逆にほとんど構造変化を起こさない場所と考えることができる。それぞれ6クロスオーバーからなる28本と24本のフィラメントからの三次元再構成を用いた。

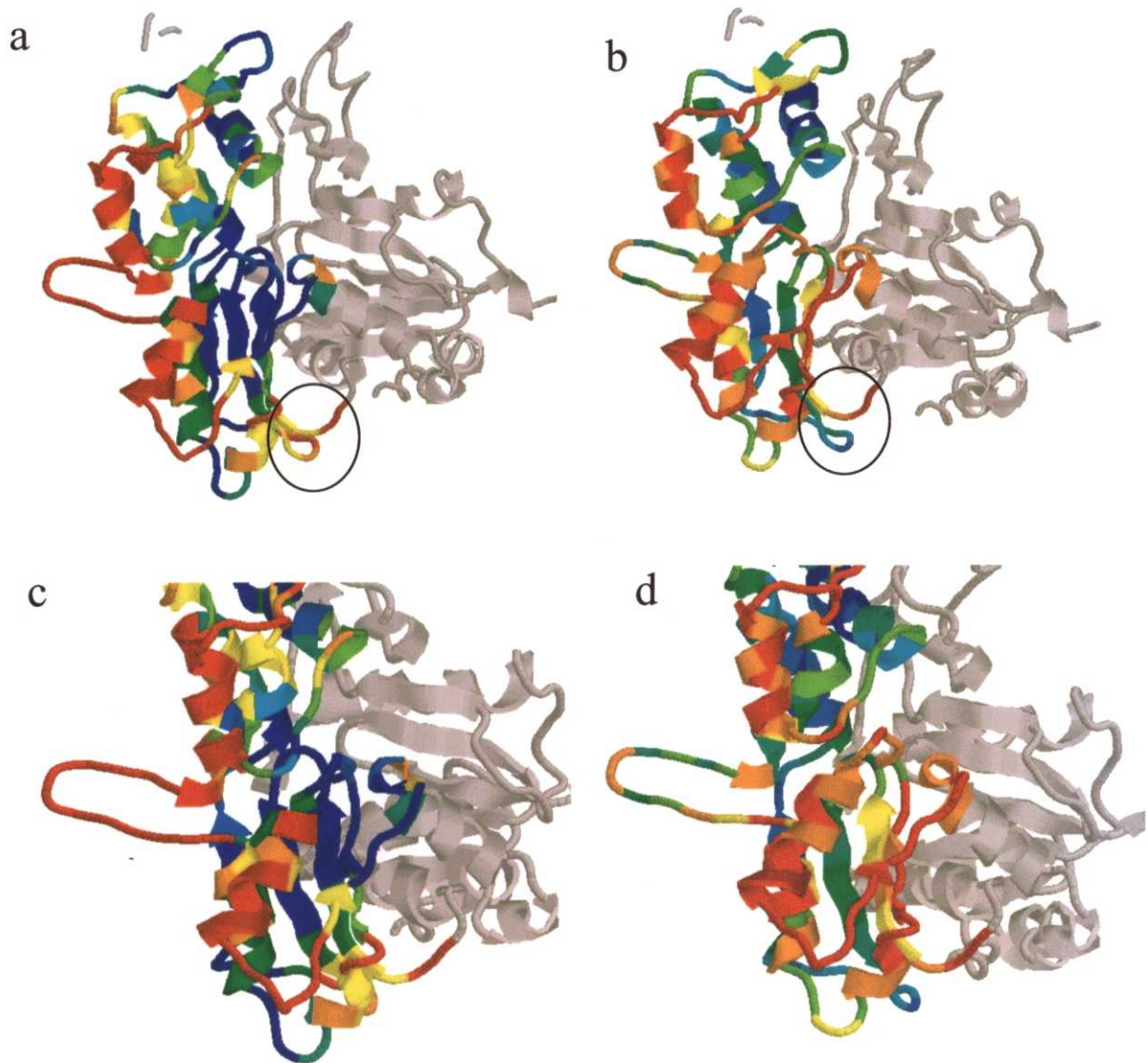


図24 アクチンフィラメントの超二次構造と揺らぎの相関。(a)(c)は、MgADP結合型のアクチン。(b)(d)はMgAMPPNP結合型のアクチン。第3第4ドメインに関して、密度で正規化した標準偏差を示している。(c)(d)は、(a)(b)をほぼ90度回転させた図。第三ドメインのコア構造である5本の β ストランドに特に注目してみるとその色のパターンに違いがある。特に、MgAMPPNP型では手前の二本のストランドが特に揺らぎが大きいことがわかる。丸印は、171-175のロープ部分にあたる部分であり、Ambivalent配列であるとされた部分である。揺らぎ強度が変化している。

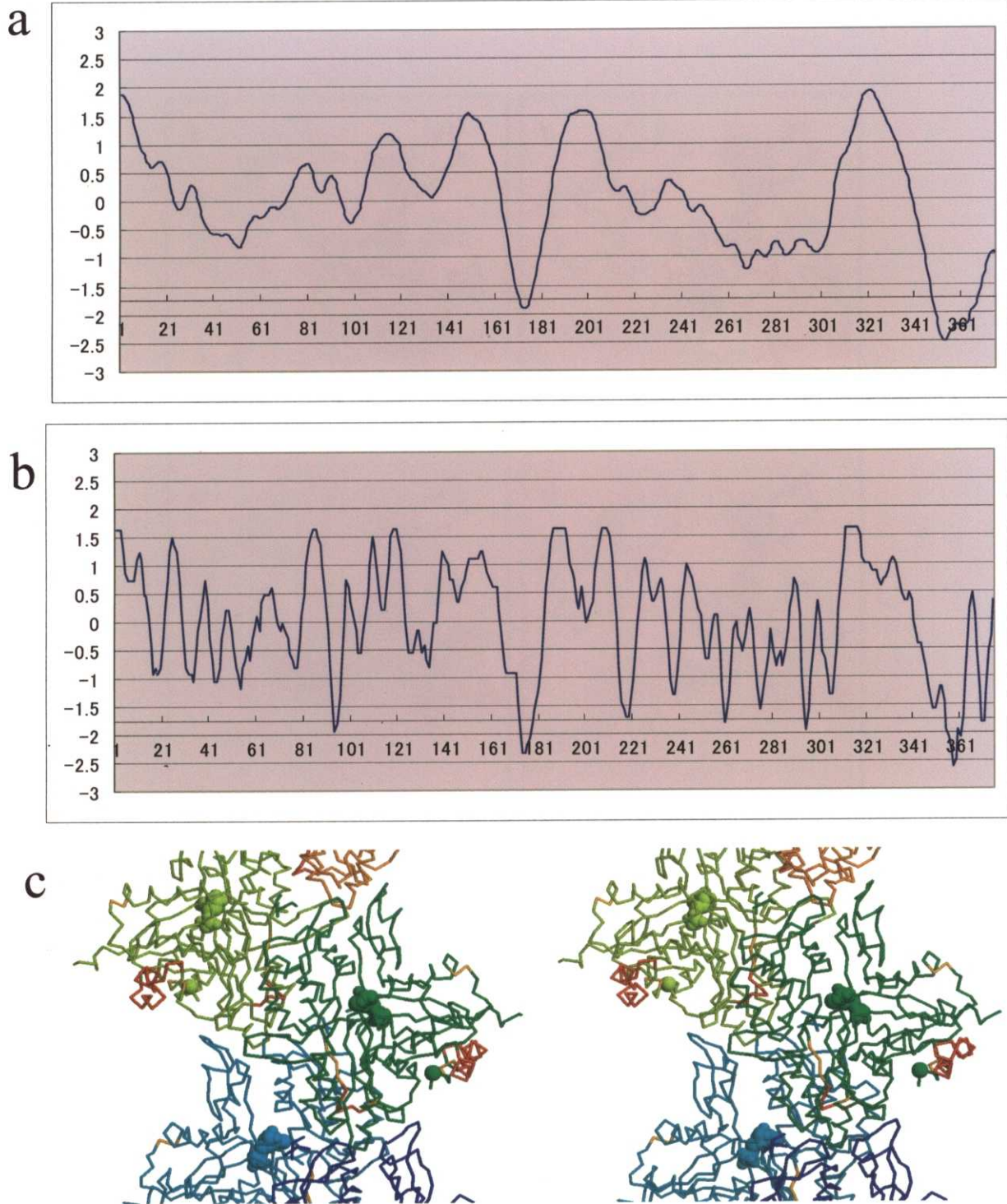


図25 アクチンの一次配列から予測されたAmbivalent配列。(a)(b)横軸は配列、縦軸はAmbivalent度を示している。(a)は21残基、(b)は5残基の平均から計算したもの。(a)は、大域的なスイッチ、(b)は、局所的なスイッチを示唆している。(c)その立体配置のステレオ像。赤は(a)でAmbivalent配列とされた残基、オレンジは(b)の場合を示している。赤はオレンジに上書きされている。球はADPとアクチンC端近傍のCys374の位置を示している。原子モデルとしてF-actinのモデルであるLorenz model (Lorenz *et al.*, 1993)を用いた。アクチンのプロトマー毎に青からオレンジへと色を変えている。

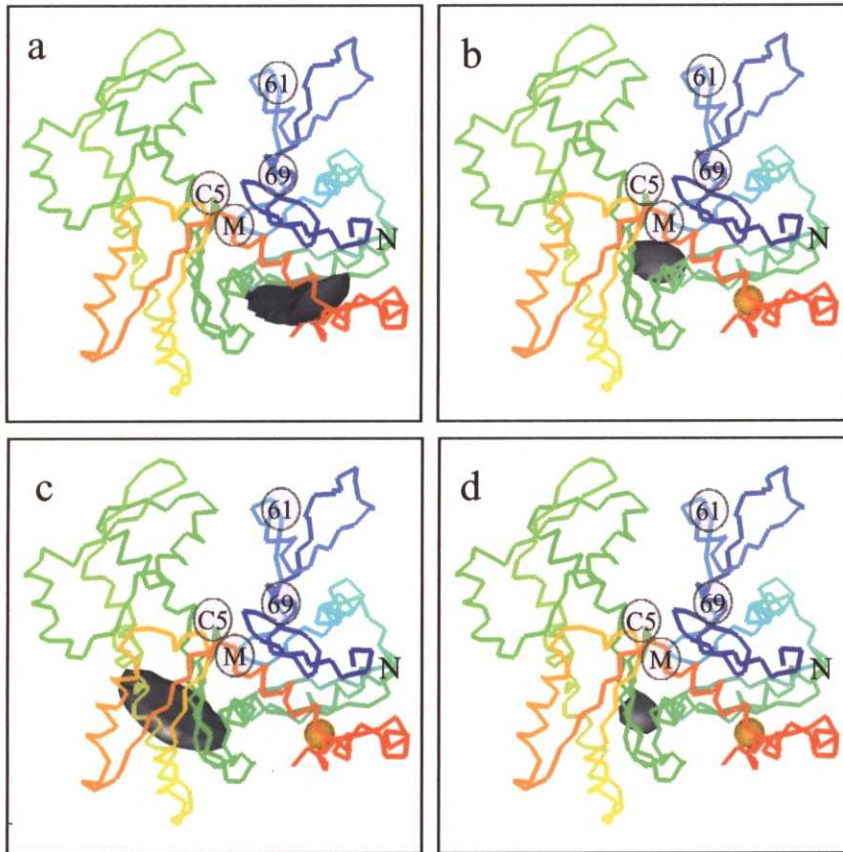


図26 アクチン内部のFRETによる距離情報と確率的距離幾何学法 (probabilistic distance geometry) による構造解析によって予測されたCys374の位置。(a)-(d)はそれぞれ表1のCase I-IVの仮定によって計算されたものである。灰色の等高面でアクチンのCys374が存在する確率が80%の領域を示している。61, 69, C5, Mはそれぞれ計算に用いられたK61, Y69, アデニン環のC5, 及び2価イオンの位置を示している。アクチンは主鎖のバックボーン表示を使って、N端からC端に向けて青から赤になるように表示している。黄色い球はCys374の位置を示している。

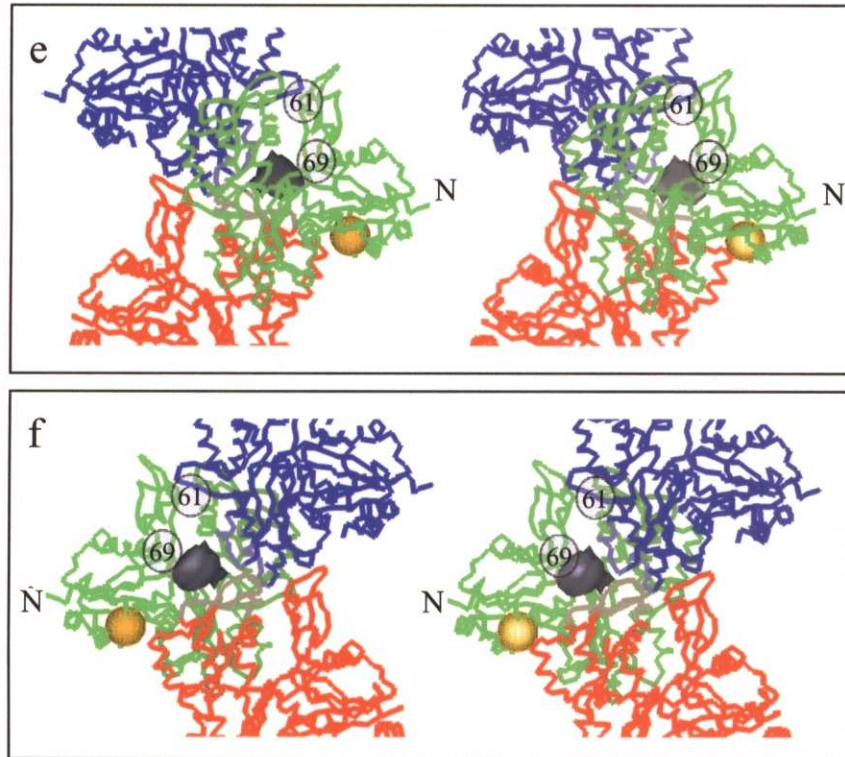


図27 アクチンフィラメントの構造を用いて相互排除効果を導入した時の、蛍光エネルギー移動による距離情報と確率的距離幾何学(probabilistic distance geometry法)による構造解析。三つのアクチンプロトマーに挟まれた領域の近くに収束した。80%の確率でCys374が存在する領域が、灰色の等確率面として表示されている。黄色い球はCys374の位置を示している。

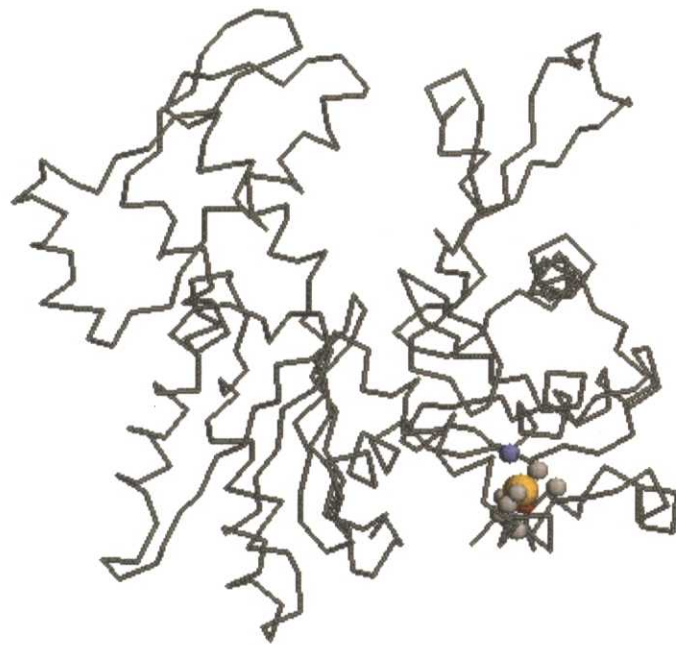


図28 アクチンCys374周辺の構造。アクチンCys374のS_γから4Å以内にその中心が存在する原子が球で表示されている。

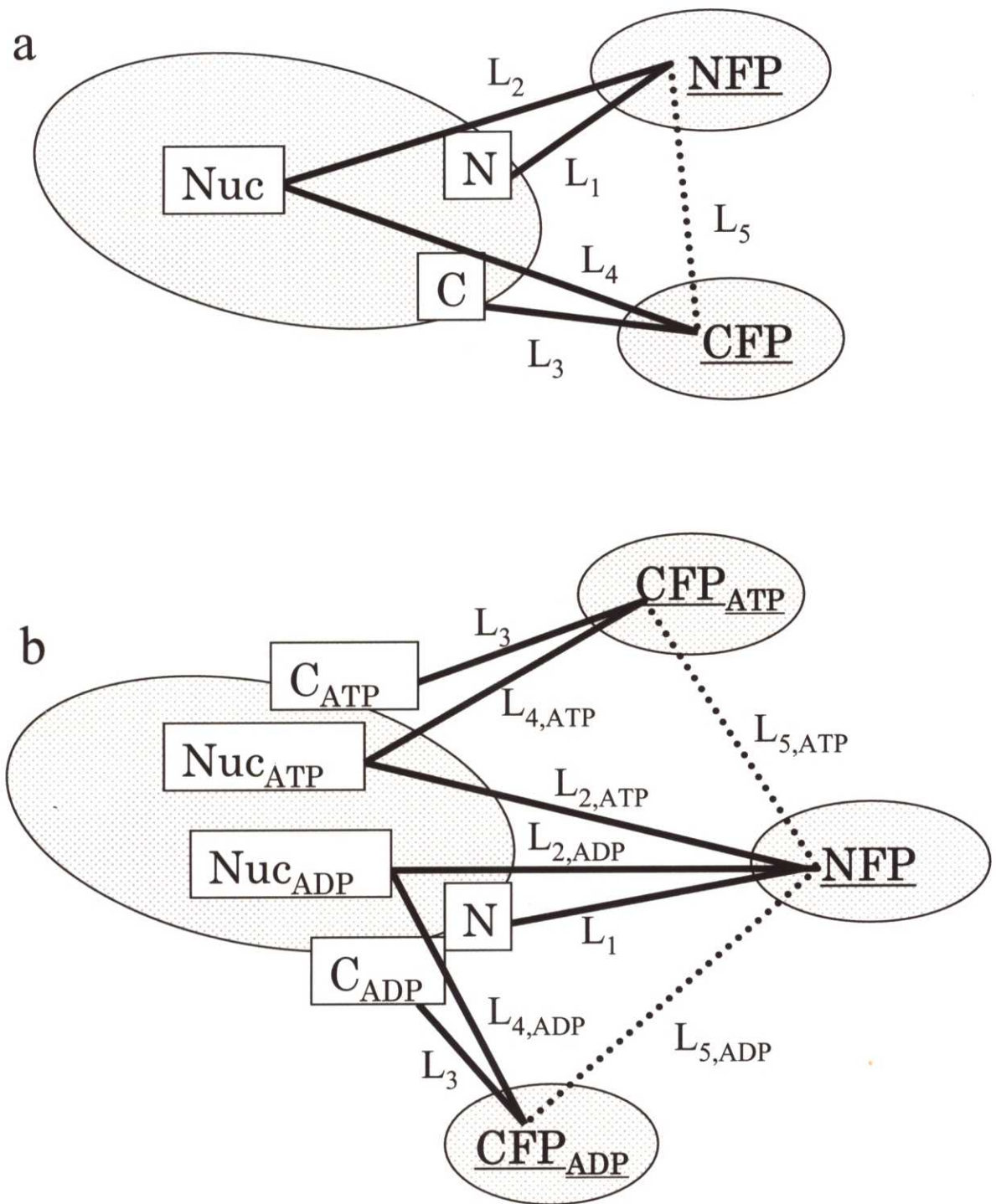


図29 ミオシンのN端及びC端に結合している蛍光性タンパク質、蛍光性ヌクレオチド間の距離を蛍光エネルギー移動法によって求めた場合のトポロジーマップ。N端(N)、C端(C)及びヌクレオチド結合部位(Nuc)は、結晶構造から求められた位置を使って固定点として取り扱う。実線はそれらの固定点と、確率分布が求められるべきN端に結合した蛍光性タンパク質(NFP)、C端に結合した蛍光性タンパク質((CFP)との距離を示している。波線はどちらも、確率分布を求めるべき蛍光分子間の距離を示している。(a)同一溶液条件の時のトポロジーマップ。NFP及びCFPの二つの確率分配関数を求めることができる。L2, L3, L5の三つの距離は蛍光エネルギー移動から求めることができる。また、L1とL3は、それぞれ、BFP,GFPの構造から、25 Åと35 Åと仮定した。(b)ADP存在下及びATP存在下の二つの条件で測定された距離情報を混在させる場合のトポロジーマップ。N端周辺の構造が変化しないことから、NFPの分布は2つの条件で変化しないと仮定した。L_{2,ATP}, L_{2,ADP}, L_{4,ATP}, L_{4,ADP}, L_{5,ATP}とL_{5,ADP}の6つの距離が蛍光エネルギー移動法により測定することができた。

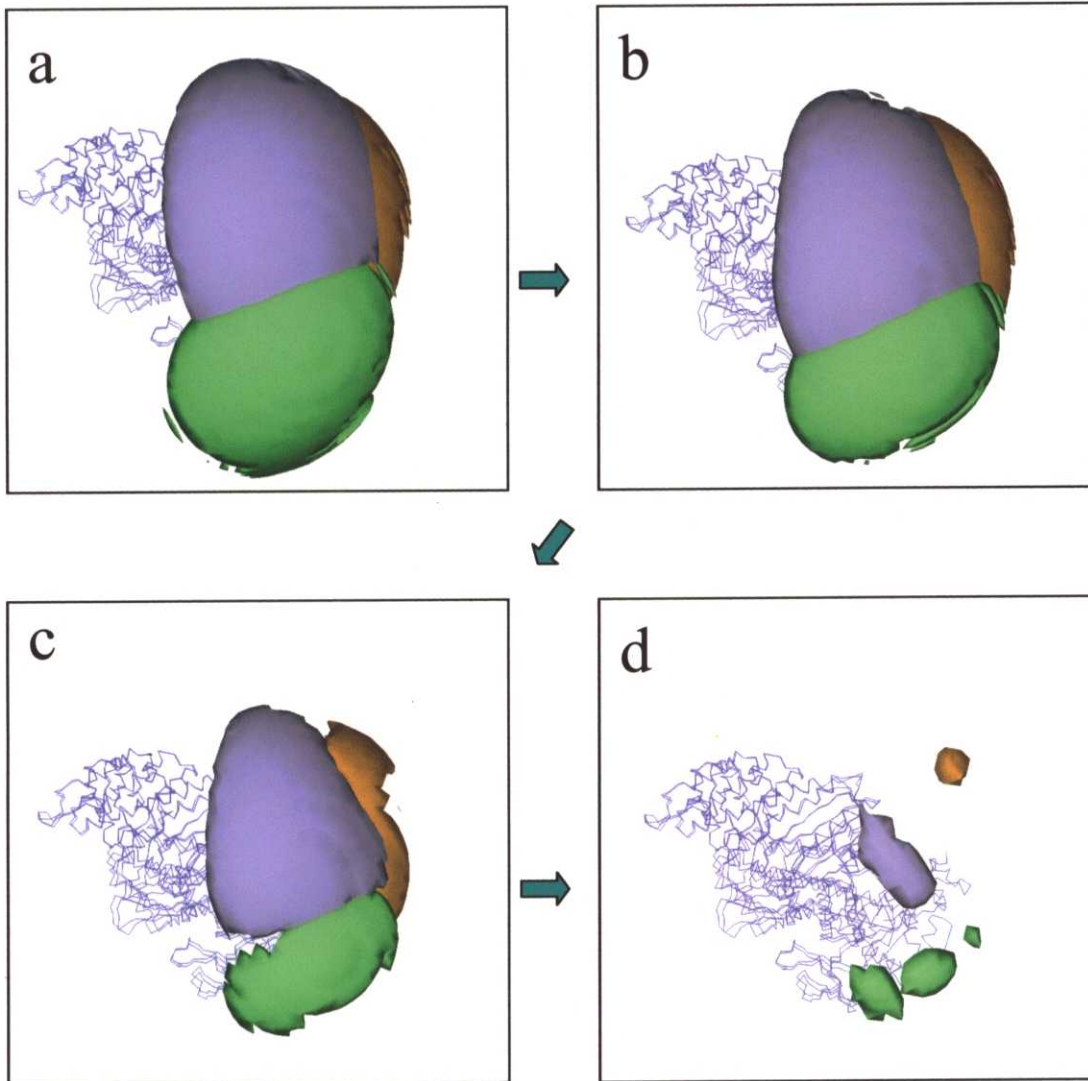


図30 繰り返し計算に伴うNFP, CFP_{ATP}, CFP_{ADP}の確率分配関数の収束の様子。ATP存在化のモデルとして、Ivom、ADP存在化のモデルとしてImmdを用いた時の、(a)初回の固定点からの距離情報のみにより限定された $q^{(0)}_{\text{NFP}}$, $q^{(0)}_{\text{CFP,ATP}}$, $q^{(0)}_{\text{CFP,ADP}}$ の分布、(b)初回の蛍光性タンパク質同士の距離情報を付加した時の $p^{(0)}_{\text{NFP}}$, $p^{(0)}_{\text{CFP,ATP}}$, $p^{(0)}_{\text{CFP,ADP}}$ の分布、(c)繰り返し計算が2回目終了時の $p^{(1)}_{\text{NFP}}$, $p^{(1)}_{\text{CFP,ATP}}$, $p^{(1)}_{\text{CFP,ADP}}$ の分布及び(d) 16回の繰り返し計算後の $p^{(15)}_{\text{NFP}}$, $p^{(15)}_{\text{CFP,ATP}}$, $p^{(15)}_{\text{CFP,ADP}}$ の分布。蛍光性タンパク質の存在確率が80%の等確率面をNFPに関して紫、ATP条件でのCFPがオレンジ、ADP条件でのCFPに関しては緑で表示している。



図31 ATP存在化のモデルとして、1vom、ADP存在下のモデルとして1mmdを用いた時の、NFP(紫)、 CFP_{ATP} (オレンジ) CFP_{ADP} (緑)の16回繰り返し計算後の確率分配関数。95%の確率でこのメッシュの中に存在している。ミオシンの構造としては1vomの構造が示され、Upper 50K及びSH1-SH2ヘリックスの二次構造が赤で表現されている。

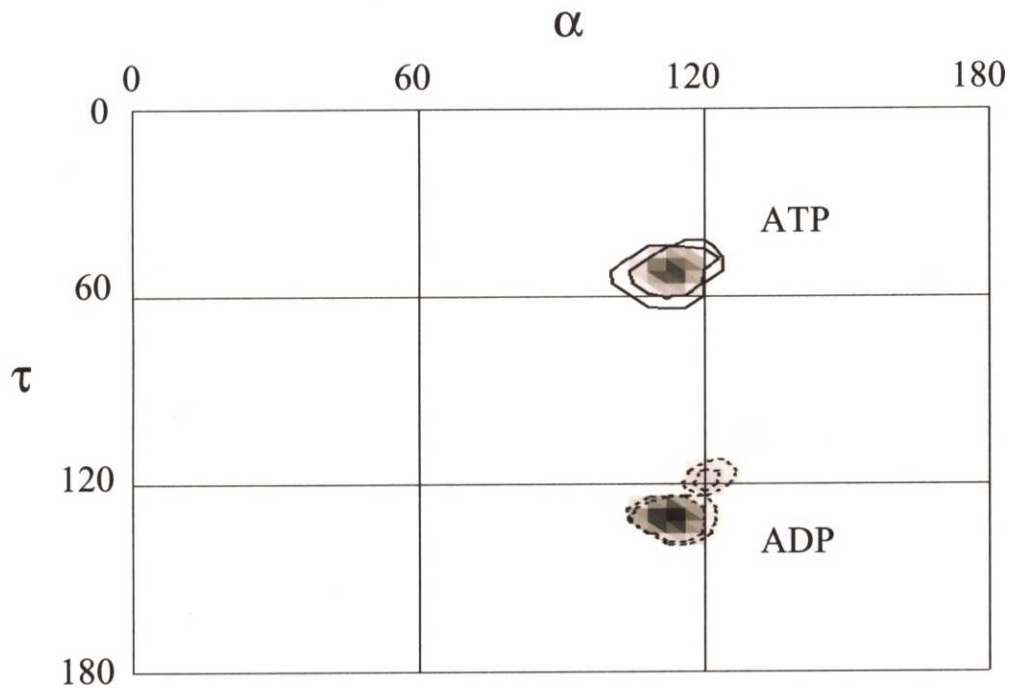


図32 CFP_{ATP} (実線)及び CFP_{ADP} (破線)の角度成分に関する分布。縦軸(τ)は、アクチン軸に対す角度であり、0度はアクチンのp端側を、180度はb端側を示している。横軸(α)はアクチン分子に対する巻込角を示している。2つの分布は十分に離れており、互いの分布は重ならない。等高線は、それぞれ、80%及び95%の確率を示している。

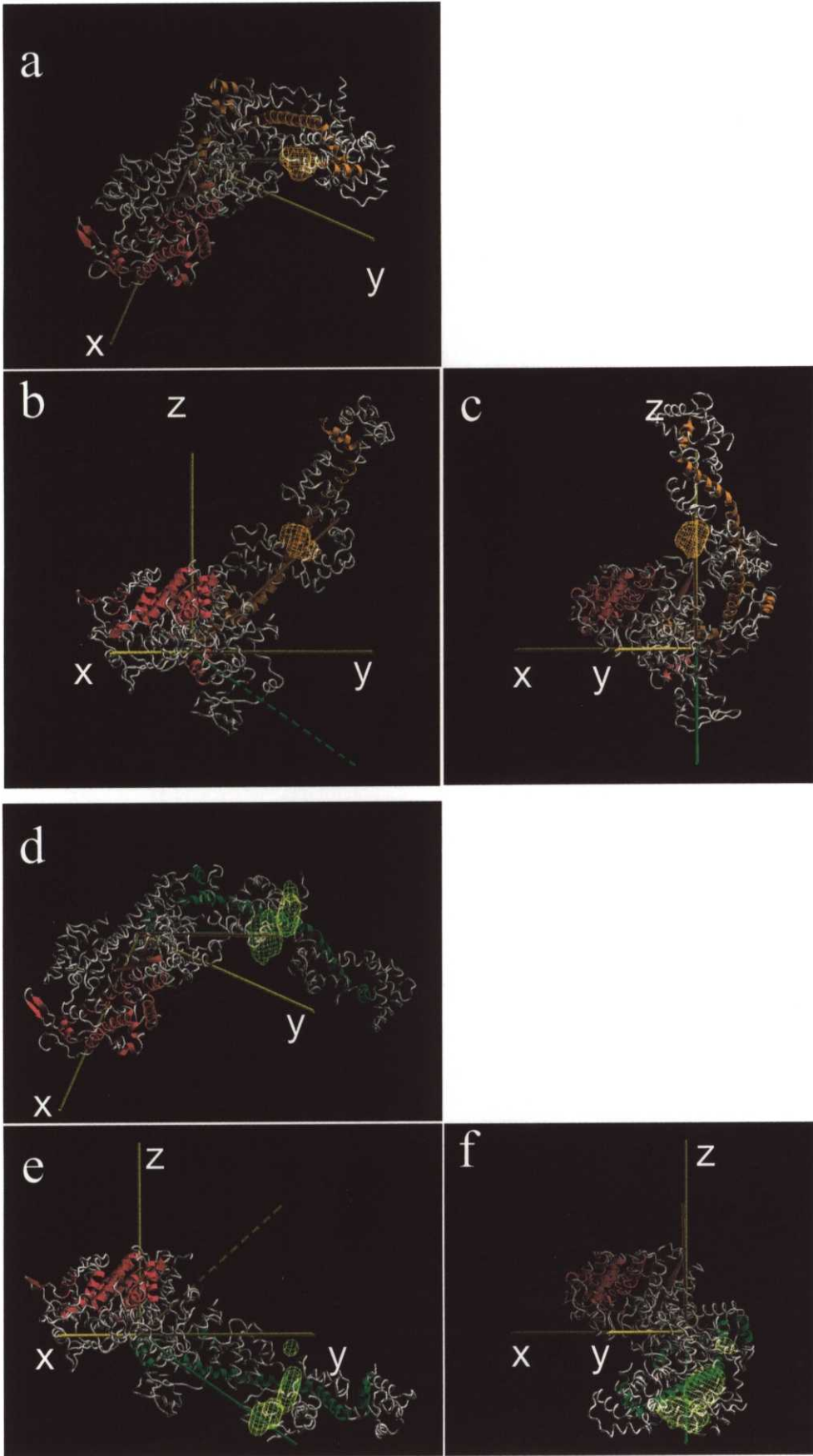


図33 直交する3つの軸の方向から観察したCFP_{ATP}及びCFP_{ADP}の分布。それぞれ(a)-(c)ATP存在下及び(d)-(f)ADP存在下におけるCFPの位置の分布を示している。オレンジの軸はATP条件でのCFPの角度分布の中心、緑の軸はADP条件でのCFPの角度分布の中心の向きを示している。オレンジ及び緑の α ヘリックスはそれぞれ、ATP及びADP状態でのSH1-SH2ヘリックスとレバーアームに当たる軽鎖結合部位を示している。メッシュは95%の等確率面を示している。

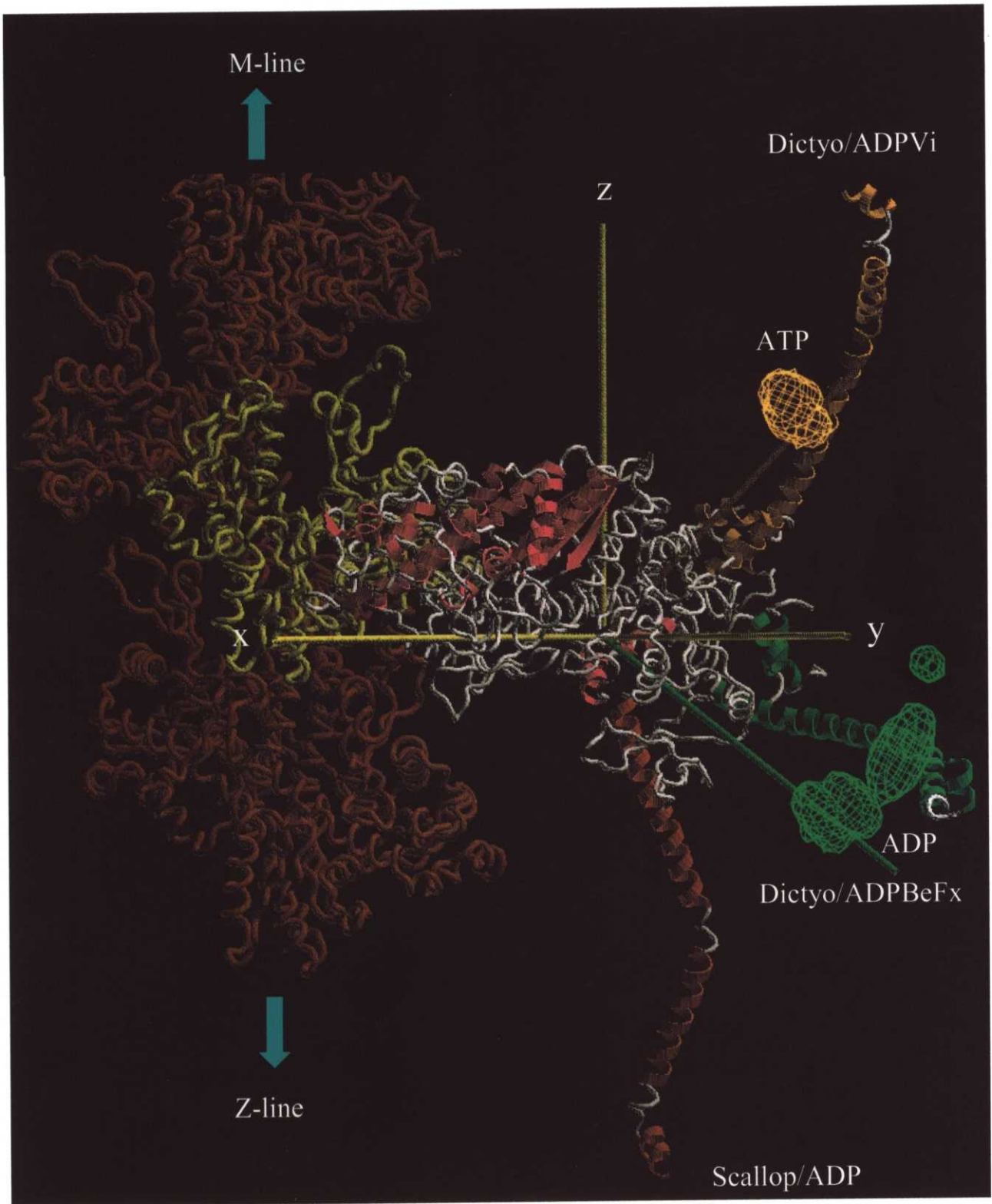


図34 レバーアームの動き。ADPPI結合状態のミオシンのレバーアーム(オレンジ)とADP結合状態のミオシンのレバーアーム(緑)が示されている。アクチンに対するレバーアームの動きを示しており、無機リン酸の放出にともなうレバーアームの動きは、滑り運動の向きと一致している。



不足焦点量
3.99 μm



12.9 μm

100 nm



図35 クライオ電子顕微鏡法によるミオシン単一分子像。図は、クライオ電子顕微鏡法により撮影されたミオシンである。黒がタンパク質を示している。a、bはそれぞれ、不足焦点量の違う同一視野の像。黄色円は、同一視野位置を示している。



100 nm

図36 クライオ電子顕微鏡像をホログラフィック像再構成法により再構成したミオシン単一分子像。○は、単頭ミオシン。□は双頭が近くに観察できるもの。黄色円は、前図での同一視野を示している。変調を受けてぼけていたタンパク質の形がはっきりとした事が分かる。タンパク質は黒である。

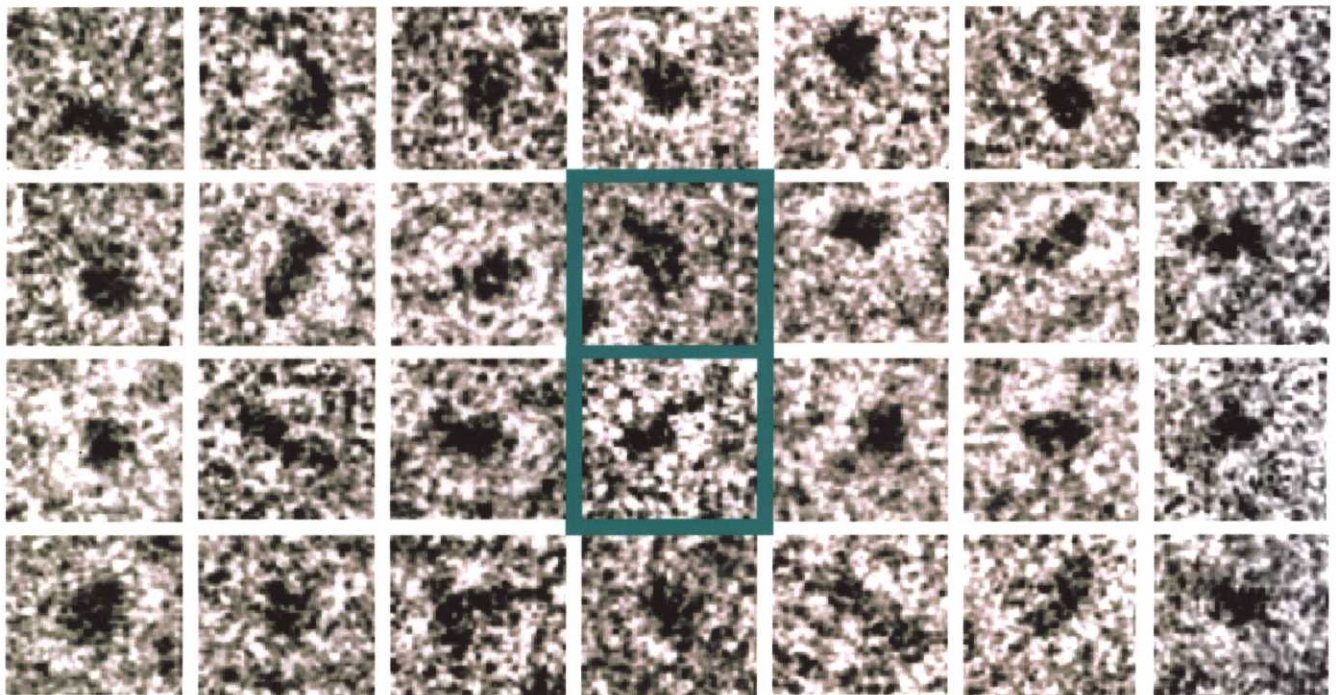


図37 ミオシン頭部のギャラリー。ミオシンから突起状に飛び出した密度や、頭部内のクレフトがみられる。これらのクレフトや突起のスケールは約2 nm程度であり、単一分子像としては、十分な分解能があることが分かる。タンパク質の周りが周りの溶液と比べて白い。これは、まだ、完全に像の補正が出来ていないためである。若干、高分解能が強調された像となっている。

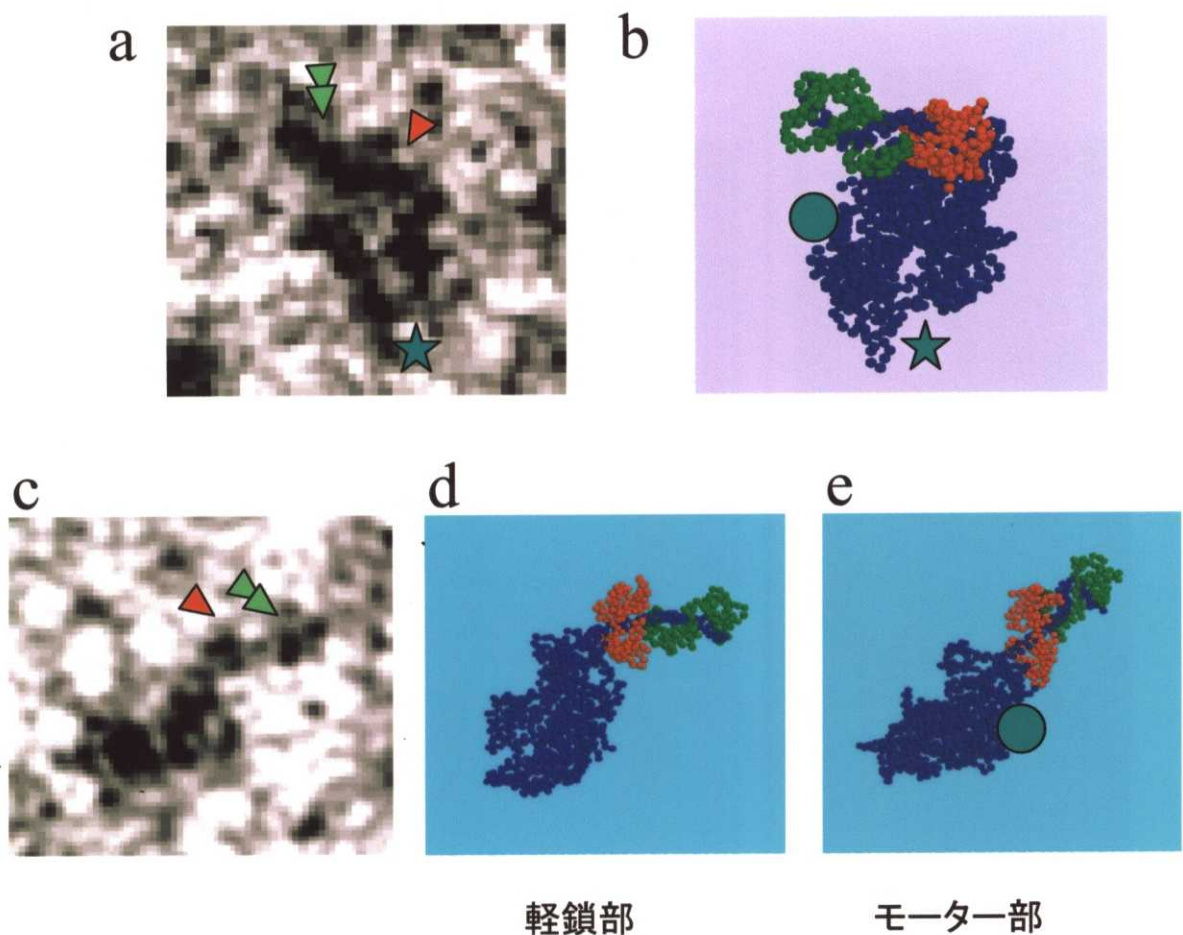


図38 単一分子像とX線結晶解析の比較。(a)(c)ミオシンS1単一分子の拡大図。(b)(a)のミオシン頭部と形状が類似するように、X線結晶解析によって得られた原子モデルを配置したもの。青が重鎖、赤と緑が二つの軽鎖を示している。軽鎖結合部位の形状やLower 50Kドメイン、アクチンクレフト（星印）等の構造が特に似ている。(d)(c)の軽鎖結合部の形状に注目して、同じ形状に見えるようにX線結晶解析によって得られた原子モデルをおいたもの。(e)(c)のモータードメインの形状に注目して、原子モデルを似るようにおいたもの。青が重鎖、赤と緑が二つの軽鎖を示している。(d),(e)を共に満足するミオシンの配置は見つからなかった。このことは、溶液内での軽鎖結合部位の動きを示唆しており、ヌクレオチドがない条件でも、2つ以上の構造を取りうる事を示している。丸印は結晶構造では見えないループ1の構造を加えている。

電子顕微鏡像

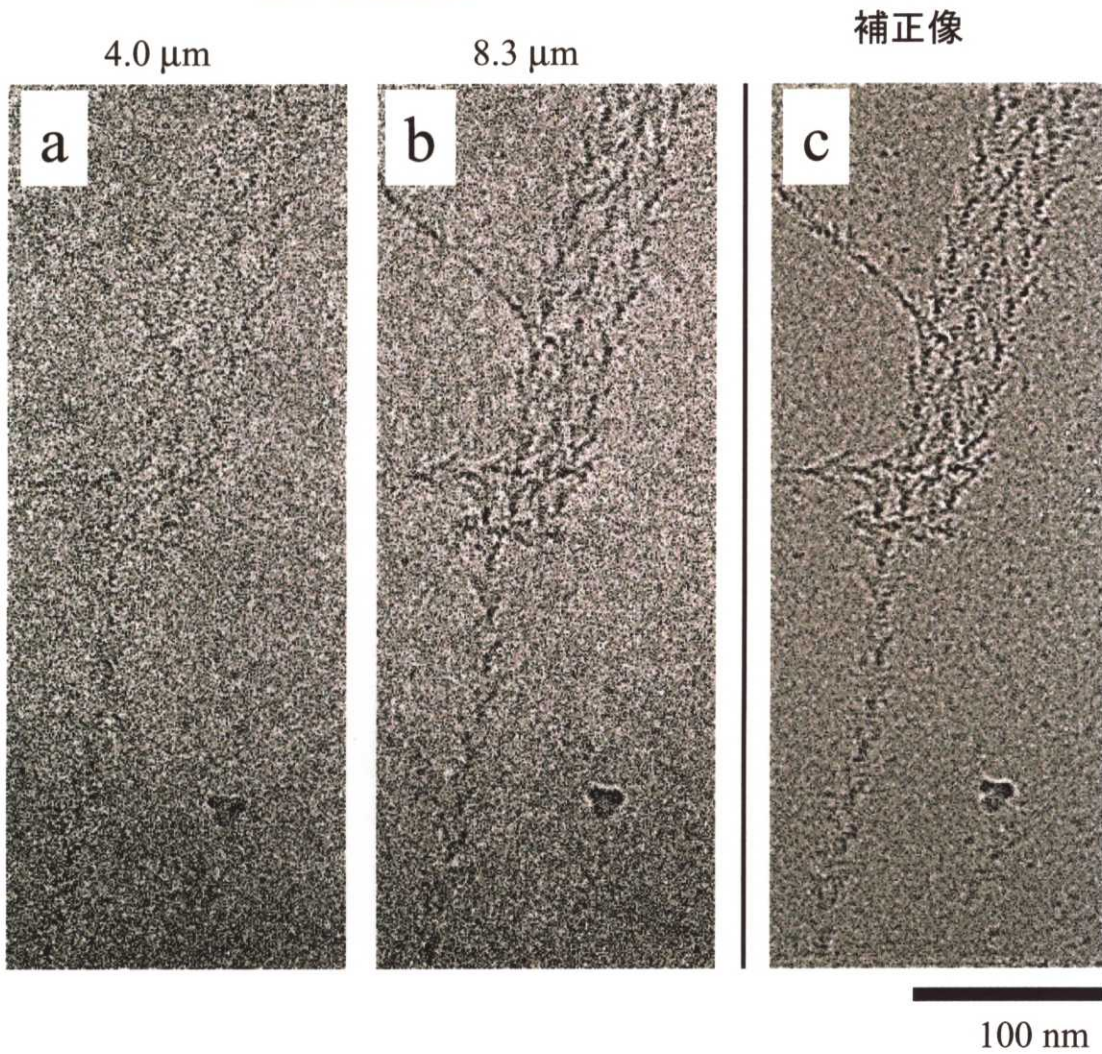


図39 アクチンと粘菌(*Dictyostelium*)由来のミオシンS1との硬直複合体のクライオ電子顕微鏡像。(a)(b)は、同一視野のクライオ電子顕微鏡像。それぞれ、4.0, 8.3 μmの不足焦点の写真である。撮影条件は、200 kV、直接倍率 $\times 50,000$ である。撮影電子線量は $15 \text{ e}/\text{\AA}^2$ である。(c)は、(a)(b)からホログラフィック像再構成法により再構成した像。総電子線量は $30 \text{ e}/\text{\AA}^2$ である。

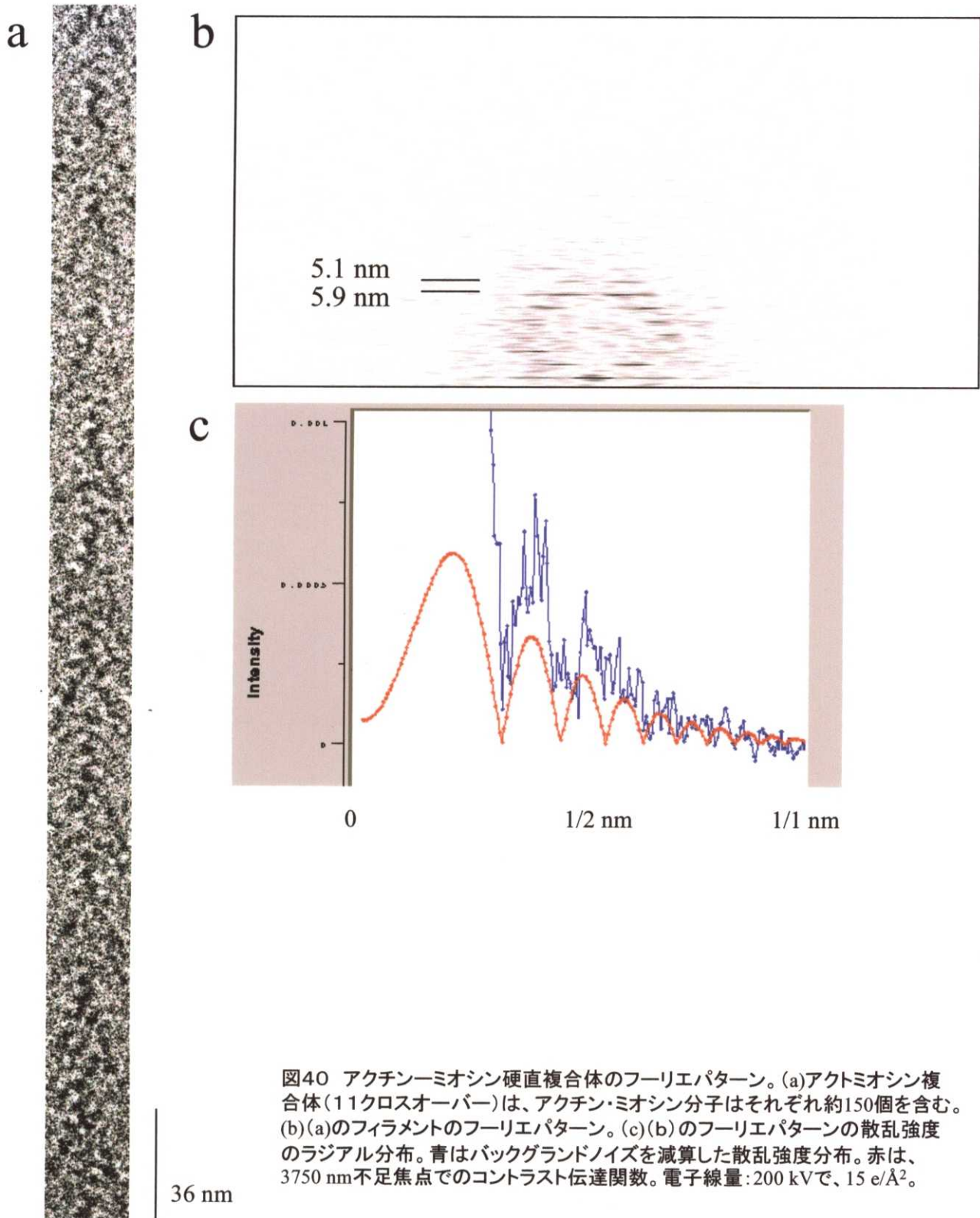
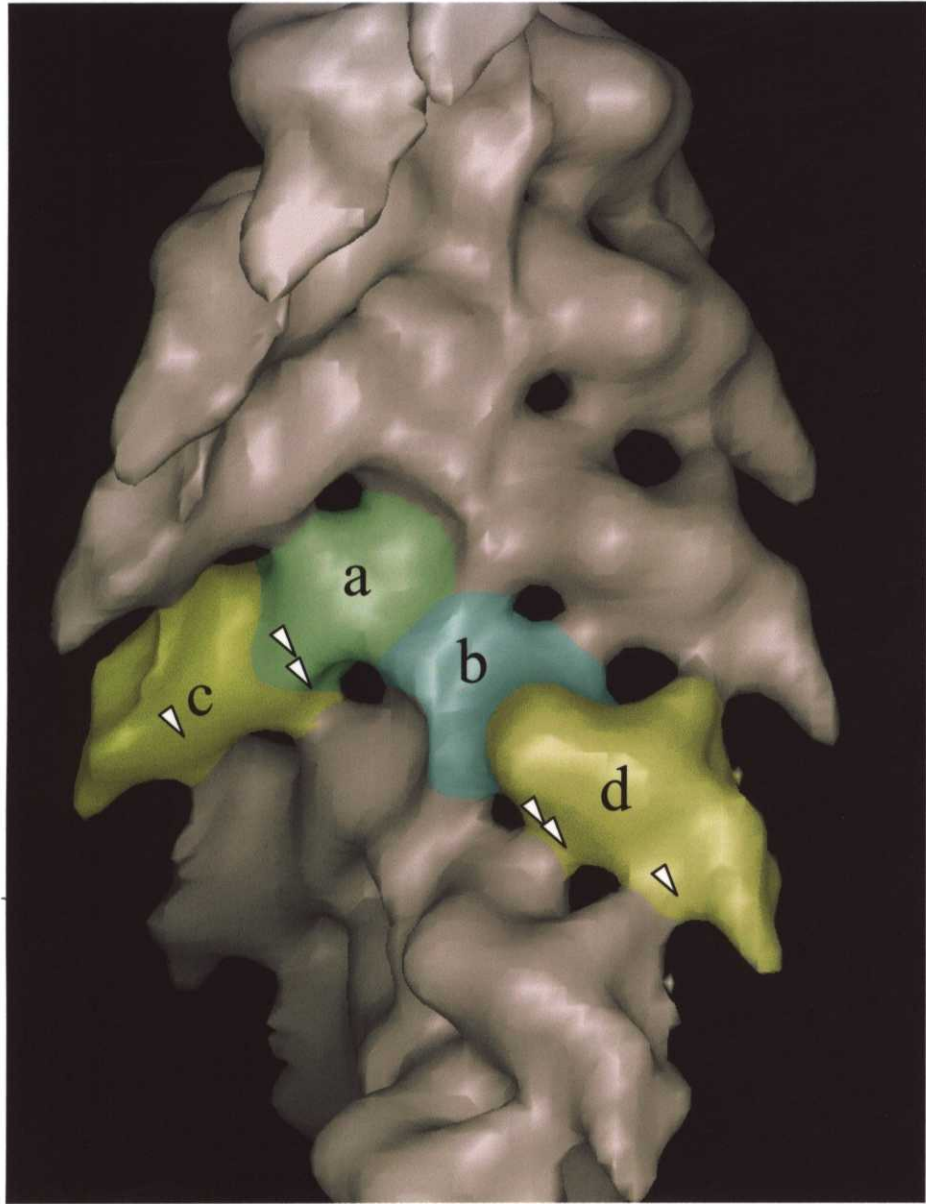
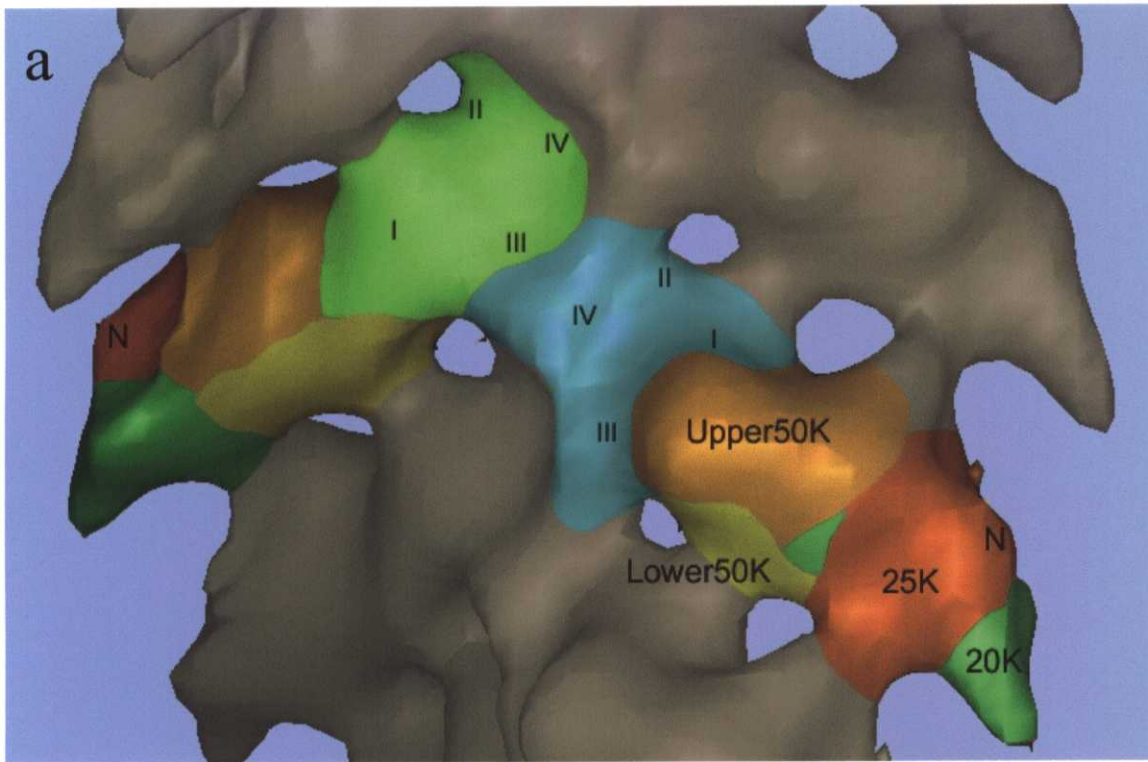


図40 アクチン-ミオシン硬直複合体のフーリエパターン。(a)アクチン複合体(11クロスオーバー)は、アクチン・ミオシン分子はそれぞれ約150個を含む。(b)(a)のフィラメントのフーリエパターン。(c)(b)のフーリエパターンの散乱強度のラジアル分布。青はバックグラウンドノイズを減算した散乱強度分布。赤は、3750 nm不足焦点でのコントラスト伝達関数。電子線量:200 kVで、15 e/Å²。



5 nm

図41 アクチン・ミオシン硬直複合体の三次元構造。黄色のパートがミオシン(c, d)、青と緑のパートがアクチン(a, b)。ミオシンは二つのアクチンと相互作用(double arrow heads)している。ミオシン同士も相互作用(single arrow heads)している。層線としては、8 Åまでのすべての層線を取り扱い、それぞれのフィラメント毎に選択律を決定し、層線を抽出した。平均する際には、 $l = -25n + 54m$ の選択律であると近似して平均を行った。P-value(位相量の残差)が45度以内になったフィラメントのみを用い、約1,800対のアクチン・ミオシン複合体から再構成された三次元像である。



b

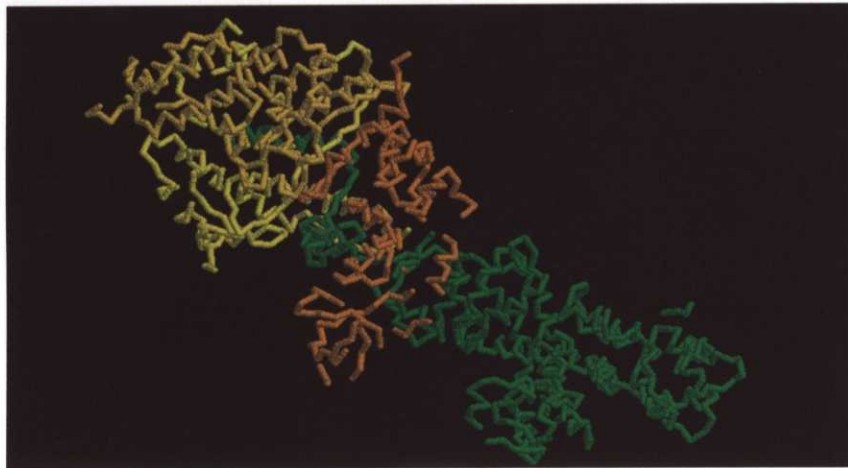


図42 アクトミオシン複合体のミオシン・アクチンのサブドメイン配置。(a)硬直複合体中でのアクチン及びミオシンの各ドメインをX線結晶解析により得られた原子モデルと比較する事により、同定した。アクチン(青と緑の構造)には、I/II/III/IVの各サブドメインが記されており、ミオシンはドメイン毎に色分けした。(b)同様の色づけをされたミオシンの原子モデル。向きは、Lower 50Kが回転した向きに置かれている。

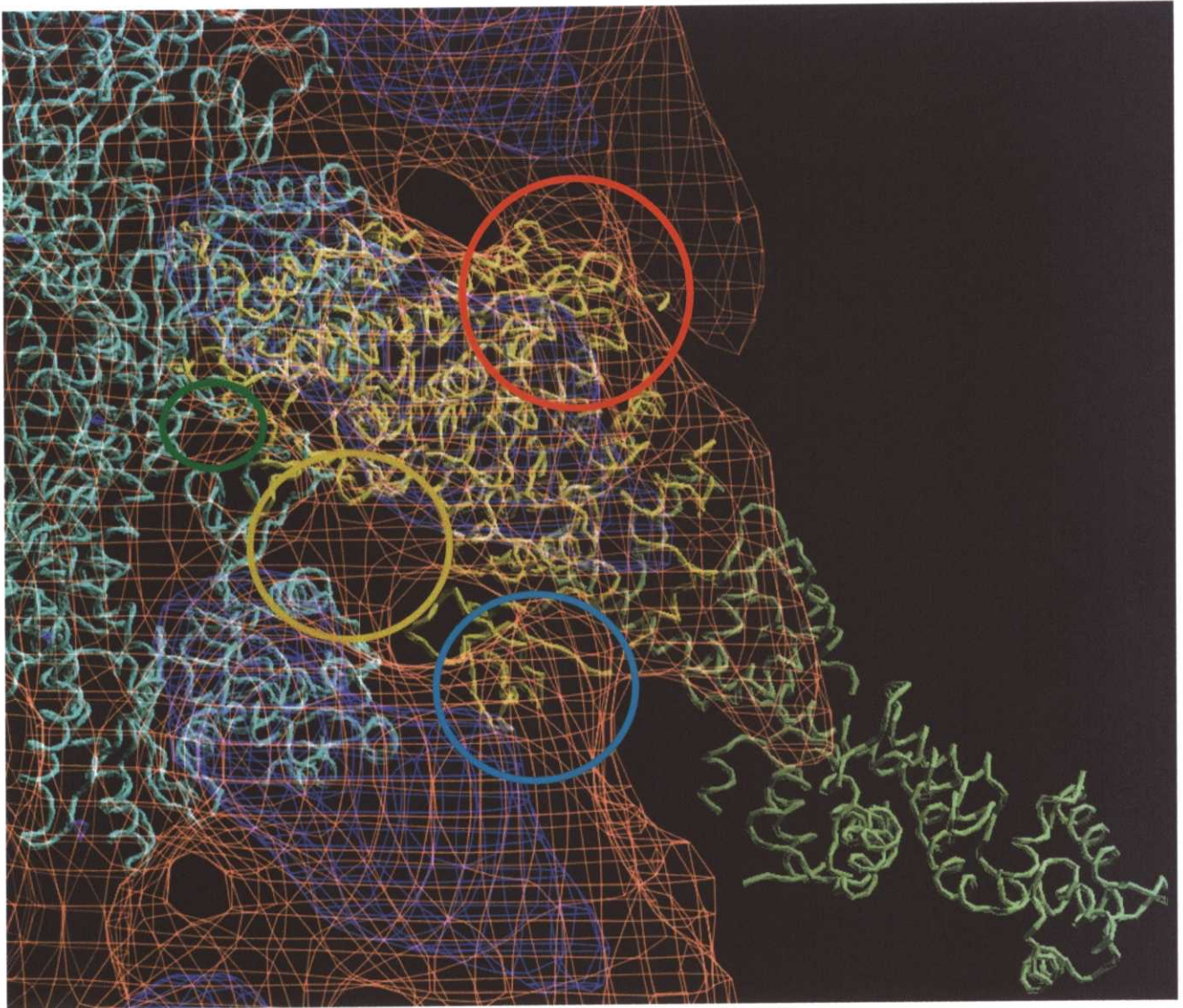


図43 電子顕微鏡像からの三次元像がオレンジと青(密度高)の等高面で表現されている。Upper 50Kドメインの形状に着目して原子モデルと比較した。25K-50K junction近傍(赤丸)とアクチン結合部位の形状から、配置を決めることができる。この場合、N端の β パレル(青丸)やLower 50Kドメイン(黄色丸)の配置が密度マップに合わない。緑の丸の密度も説明できないが、これはアクチンのC末端領域の構造変化によって説明できるかもしれない。

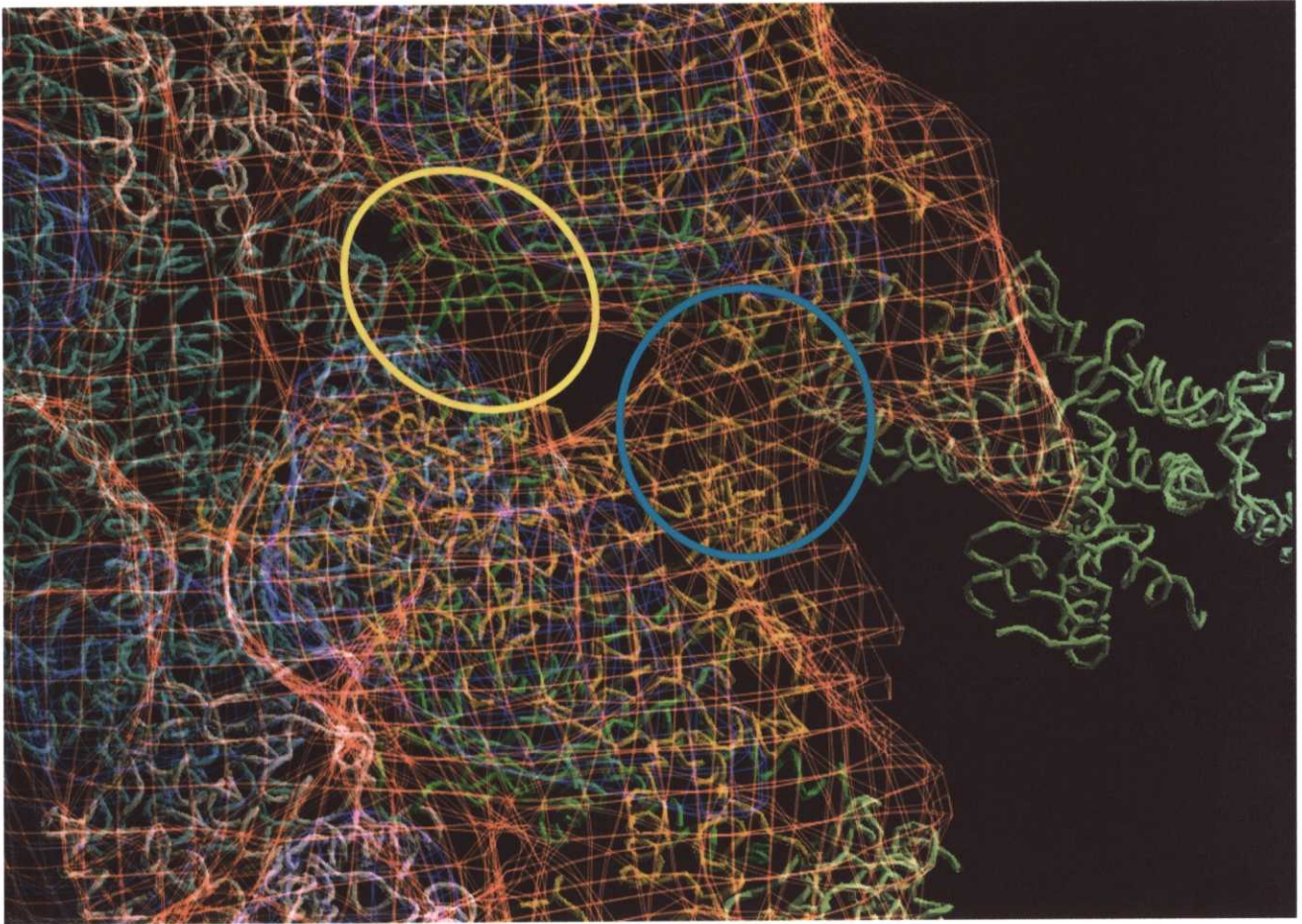


図44 ミオシンのLower 50Kをフィットした場合のX線結晶解析からの原子モデルとの比較。N端 β バレルが電子顕微鏡像の密度マップを説明できるようにミオシンを回転させると、Upper 50Kドメインは一致しなくなる。しかし、Lower 50Kドメインの密度を説明できる配置に近づく。また、軽鎖結合部位の角度もよく説明できるようになる。このことは、ミオシンがアクチンに結合したときに生じる構造変化を示めている。

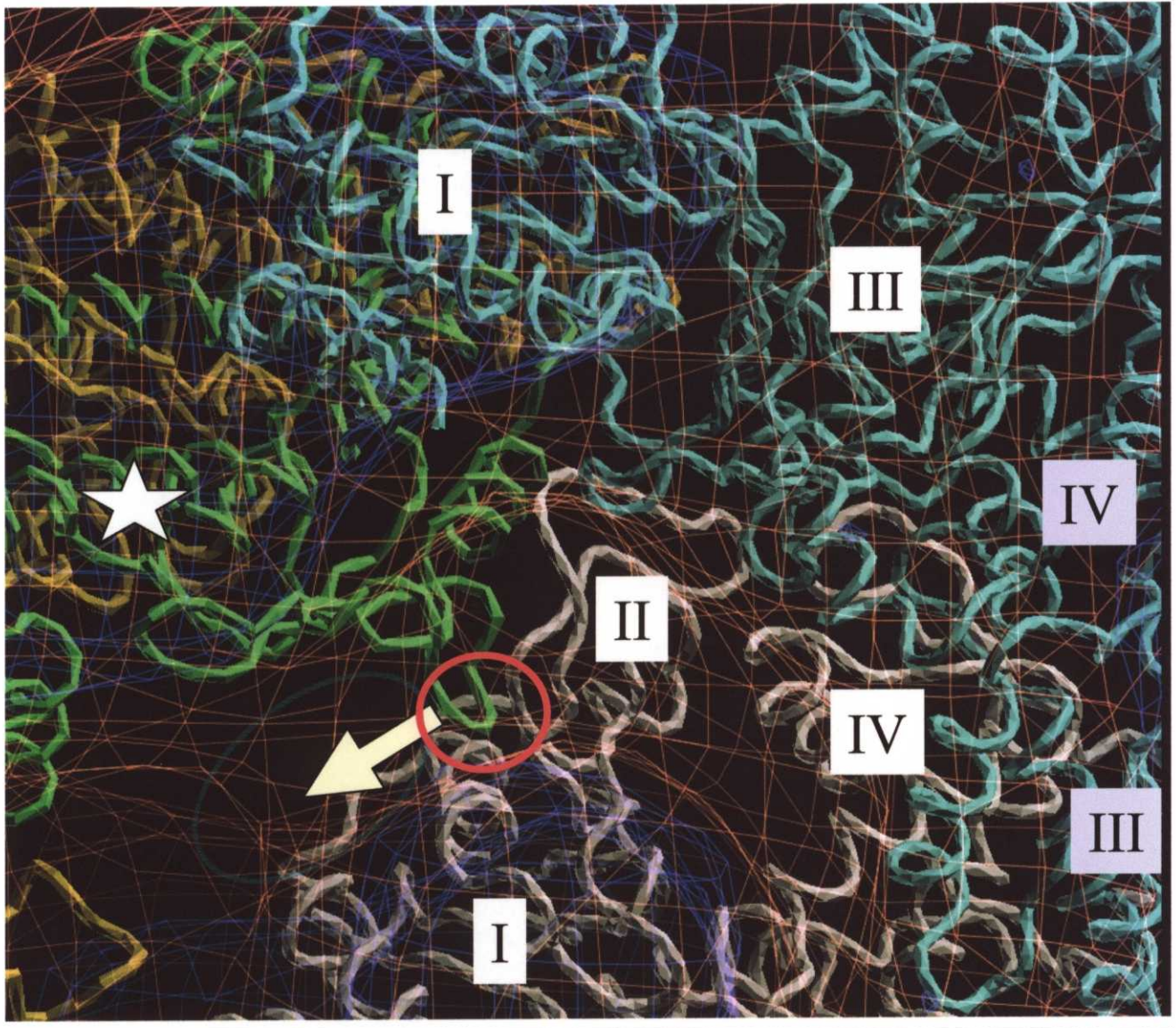


図45 アクチン側からのLower 50Kの相互作用部位。ミオシンが、黄色(Switch IIまで)と緑(Switch II以降)でバックボーン構造が示されている。また、アクチンは、シアン(第一アクチン)と白(第二アクチン)でバックボーン構造が示されている。Lower 50Kをシアンのパートへと回転させると、電子顕微鏡からの密度マップを説明する事ができる。この時、570付近のループ(赤丸)がb端アクチンの方へ向かう。星印は活性部位。この移動は、アクチン・クレフトを開き、リン酸放出の為のバックドアも開く。I-IVはアクチンのサブドメインを表す。紫のラベルは手前側のアクチンのストランド由来のものを示している。

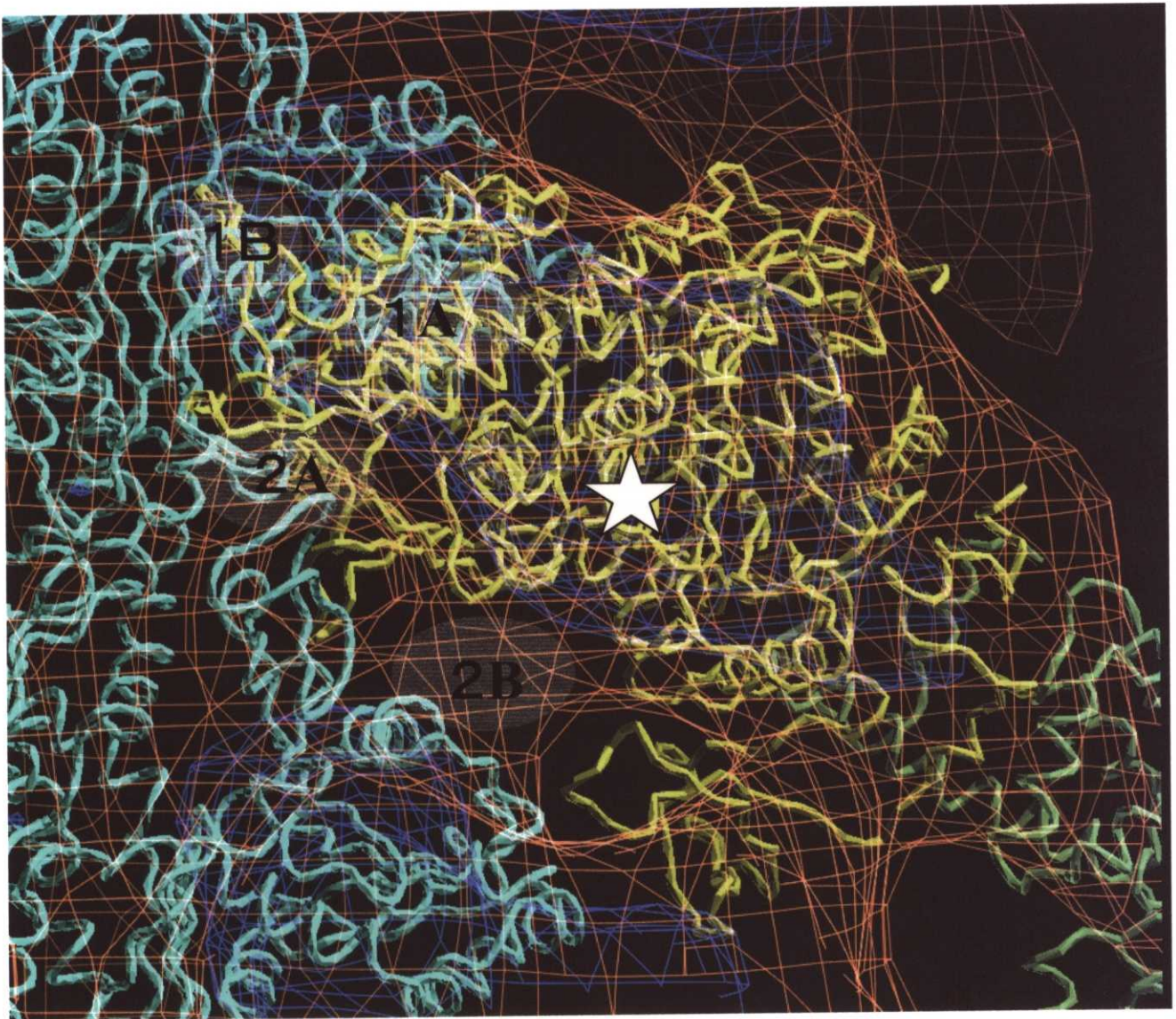


図46 アクチンとミオシンの結合部位。茶色の等高面は、100%体積、青は50%体積で密度の高いところを示している。ミオシンはUpper 50Kがよく説明できる向きに配置している。アクトミオシンの相互作用部位として4つの相互作用部位が想定される。(1A) アクチン第一ドメインとミオシン50K-20K junction。(1B) アクチンの疎水ポケットとミオシンUpper 50Kドメイン。(2A) アクチンのDNaseIとミオシンLower 50Kドメイン先端。(2B) アクチンの90-100ループ周辺とミオシンLower 50K下端ループ。星印は、ミオシンのATP結合位置(活性部位)を示している。

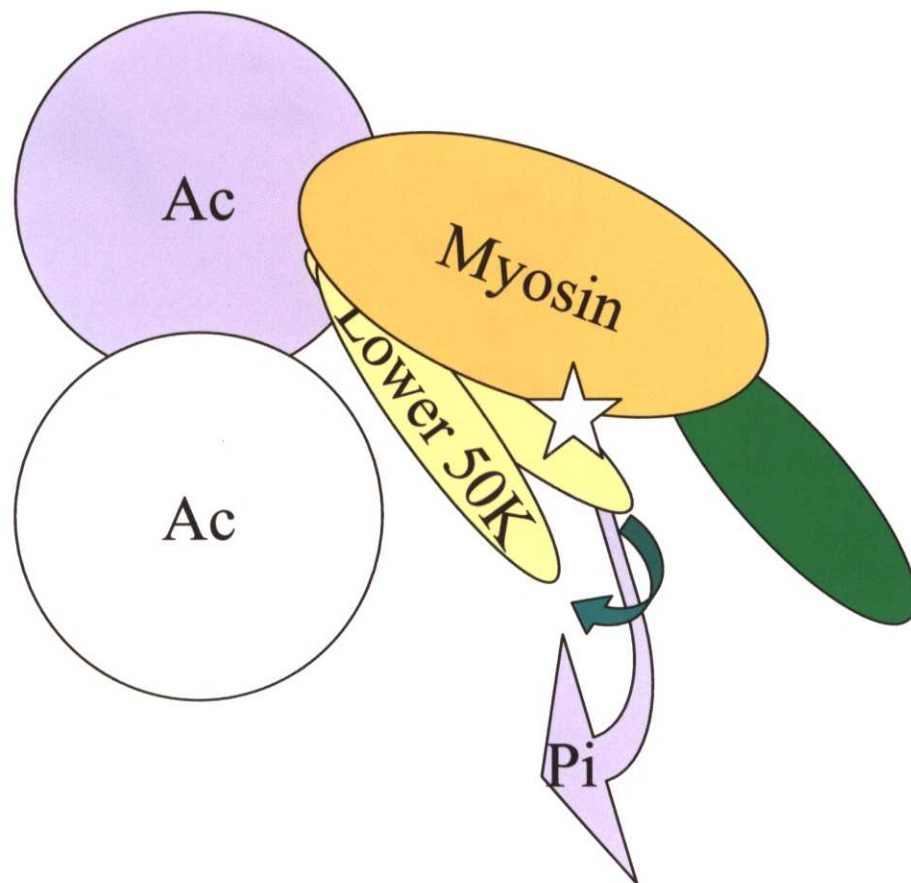
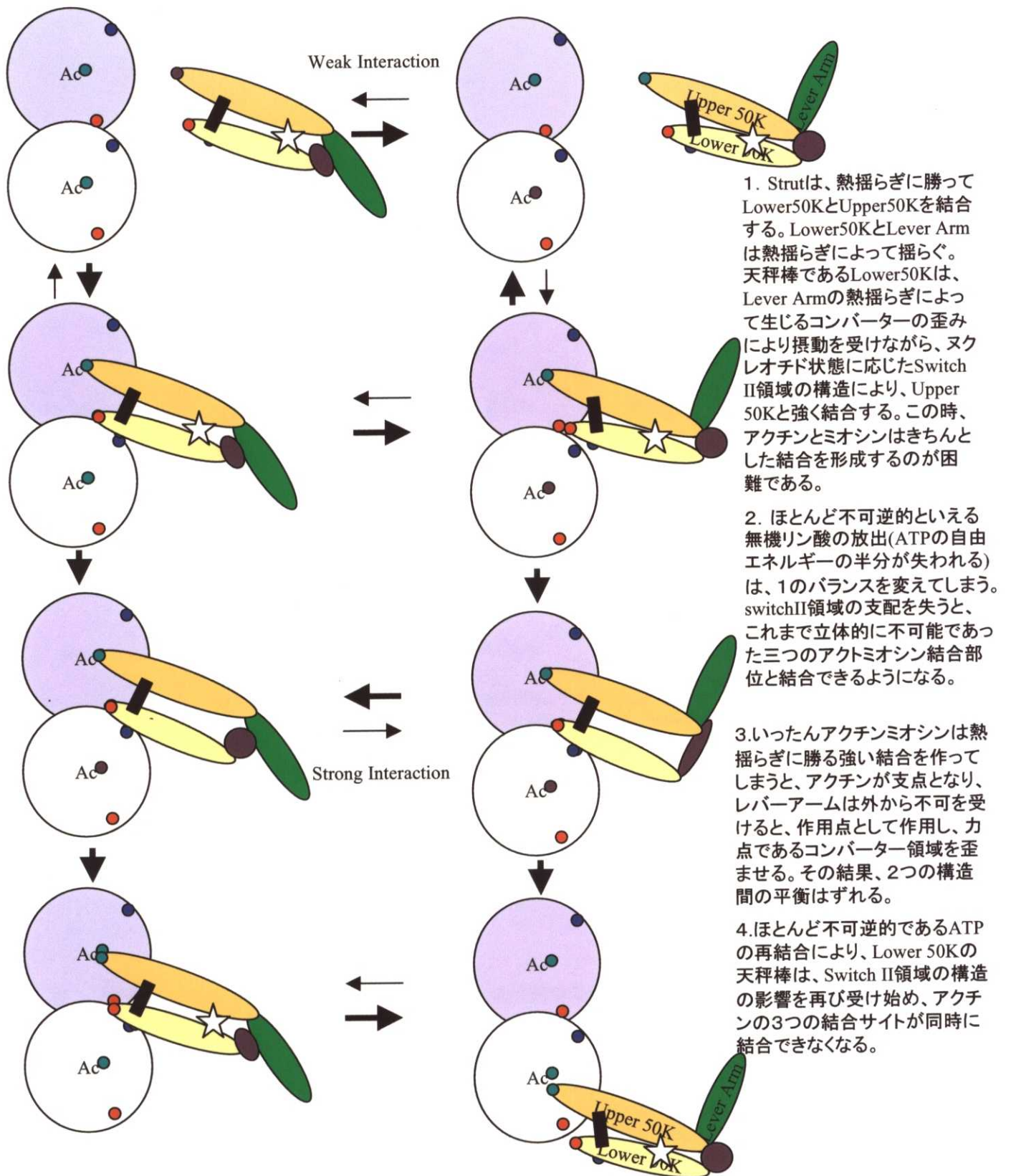


図47 ミオシンのアクチンによるリン酸の活性化のモデル。アクチンと結合することによりLower 50Kの配置が変化し、アクチンクレフトの構造が開く方向に移動する。これにより、ミオシンのバックドアが開き、リン酸放出が可能となる。これが、リン酸放出促進の引き金であり、不可逆性・滑り運動の一方向性をもたらすと考えられる。星印は、ATPの結合する活性部位である。バックドア酵素であるミオシンは、紙面の手前からATPが結合し、紙面の裏側へ産物である無機リン酸が放出される。



1. Strutは、熱揺らぎに勝って Lower50KとUpper50Kを結合する。Lower50KとLever Armは熱揺らぎによって揺らぐ。天秤棒であるLower50Kは、Lever Armの熱揺らぎによって生じるコンバーターの歪みにより振動を受けながら、ヌクレオチド状態に応じたSwitch II領域の構造により、Upper 50Kと強く結合する。この時、アクチンとミオシンはきちんとした結合を形成するのが困難である。

2. ほとんど不可逆的といえる無機リン酸の放出(ATPの自由エネルギーの半分が失われる)は、1のバランスを変えてしまう。switchII領域の支配を失うと、これまで立体的に不可能であった三つのアクトミオシン結合部位と結合できるようになる。

3. いったんアクチンミオシンは熱揺らぎに勝る強い結合を作ってしまうと、アクチンが支点となり、レバーアームは外から不可を受けると、作用点として作用し、力点であるコンバーター領域を歪ませる。その結果、2つの構造間の平衡はずれる。

4. ほとんど不可逆的であるATPの再結合により、Lower 50Kの天秤棒は、Switch II領域の構造の影響を再び受け始め、アクチンの3つの結合サイトが同時に結合できなくなる。

図48 Lower 50K天秤棒モデルによるミオシンモーターのメカニズム。ミオシンは、大きく2つの構造をとるとする。Acはアクチンであり、橙色、黄色はそれぞれUpper50K, Lower50Kを示す。アクチン及びミオシン上にある赤、青、緑青の小さい丸はお互いの結合部位を示す。黒の四角は、strut構造で、Upper50KとLower50Kの距離を適当に保つ。☆印はγ位のリン酸あるいは無機リン酸で化学状態に応じて、switch II領域を使って Upper 50KとLower 50K間の力学特性を変える。化学-力学共役反応の主役である。緑はレバーアームである。紫は、リレー領域、コンバーター領域を含めた領域で、strain-stress transducerの機能を果たす。円形から外れるほど歪みを感じている。

| | Distances calculated from 2btf [Å] | Distances measured by FRET [Å] | Expected distances calculated from the distances from 2btf [Å] | | Expected distances calculated from the distances from FRET [Å] | |
|----------------------|------------------------------------|--------------------------------|--|----------------------------|--|----------------------------|
| | | | No mutual exclusion (Case I) | Mutual exclusion (Case II) | No mutual exclusion (Case III) | Mutual exclusion (Case IV) |
| C374-K61(NZ) | 37 | 46 | 37(37) | 38(40) | 44(44) | 43(43) |
| C374-Y69 | 29 | 25 | 28(28) | 25(25) | 28(28) | 27(27) |
| C374-NucC5 | 30 | 29 | 30(31) | 32(32) | 29(29) | 32(31) |
| C374-Cation | 18 | 23 | 18(18) | 27(24) | 23(24) | 24(24) |
| Rms | | | 0.1(0.4) | 4.7(3.7) | 1.8(1.7) | 2.5(2.3) |
| C374 coordinates [Å] | (32,75,61) | | (34,73,60) [(36,74,60)] | (52,57,60) [(52,58,60)] | (49,54,70) [(50,52,70)] | (52,57,64) [(52,56,66)] |

表1 アクチンモノマーでのCys374の位置の同定。上の四つの行は、4つの既知の点からCys374の推定された位置の間の平均距離を示している。

() 中の値は、Cys374の存在確率が最大である点との距離を示している。Rmsの値は、解析により求められた距離と実験により求められた距離の差の自乗和の平方根を示している。一番下の行は解析により求められた座標を示している。Cys-374にFRETを測定する際に結合した蛍光分子は以下の通りであり、その蛍光分子の大きさは ~ 10 Åである。用いられた蛍光分子は、N-[4-[[4-(dimethylamino)phenyl]azo]phenyl]maleimide (DABMI), N-[4-(dimethylamino)-3,5-dinitrophenyl]maleimide (DDPM), and 5-[[2-(iodoacetyl)amino]]ethyl]amino]naphthalene-1-sulfoic acid (1,5-IAEDANS)である。

| The coordinates from atomic models | | The coordinates obtained by our analysis | Difference |
|------------------------------------|--------------|--|------------|
| K61 | (20, 48, 38) | (18, 47, 37) | 2 Å shift |
| Y69 | (31, 48, 51) | (30, 50, 54) | 4 Å shift |
| NucC5 | (22, 47, 64) | - | |
| Cation | (28, 58, 62) | - | |
| Cys374 | (32, 75, 61) | (46, 57, 68) | 24 Å shift |
| | | (52, 57, 64) | 27 Å shift |
| | | when K61 and Y69 were assumed to be fixed. | |

表2 システイン374(Cys374),リジン(K61)及びチロシン(Y69)が動くとしたときの、アクチンモノマーでのCys374, K61, Y69の位置。左のカラムは、原子モデルの位置、中央のカラムは、計算によって求められた位置。右のカラムは、原子モデルと計算によって求められた位置との距離。Cys374のみが非常に大きい移動量を持っていることがわかる。

| | K61 | | | Y69 | | |
|----------------|-------|------------------|---------------------------------------|-------|------------------|---|
| | X-ray | Our New Analysis | FRET | X-ray | Our New Analysis | FRET |
| K61 | 0 | 2 | - | 17 | 21 | - |
| Y69 | 17 | 21 | - | 0 | 4 | - |
| NucC5 (fixed) | 26 | 27 | 38 ^(a) | 16 | 13 | - |
| Cation (fixed) | 27 | 28 | 19 ^(b) , 28 ^(b) | 15 | 11 | 21 ^(c) , 11 ^(d) |
| Cys374 | 37 | 41 | 46 ^(a) | 29 | 22 | 25 ^(e) , 36 ^(d) , 39 ^(f) |

表3 アクチンモノマーでのリジン61(K61), チロシン69(Y69)の位置の妥当性。X線結晶解析の原子モデル、確率的距離幾何学法による計算結果、蛍光エネルギー移動によって測定されている結果をそれぞれ示している。
References: (a) Miki *et al.* (1987) *Eur. J. Biochem.*, **168**, 339-345. (b) Miki and dos Remedios (1988) *J. Biochem (Tokyo)*, **104**, 232-235. (c) Barden & Miki (1986) *Biochem. Int.* **12**, 321-329. (d) Barden and dos Remedios (1987) *Eur. J. Biochem.*, **168**, 103-109. (e) Miki (1991) *Biochemistry*, **30**, 10878-10884. (f) Barden (1985) *Biochem. Int.*, **11**, 583-589. The angstrom is the unit of distances.

| Combinations of Assignment adopted for Analysis | | r.m.s. Deviation (Å) |
|---|------|----------------------|
| ADP | ATP | |
| 1b7t | 1b7t | 8.3 ± 0.4 |
| 1b7t | 1mmd | 8.4 ± 6.0 |
| 1b7t | 1vom | 9.6 ± 6.7 |
| 1mmd | 1b7t | 5.2 ± 0.6 |
| 1mmd | 1mmd | 3.7 ± 1.1 |
| 1mmd | 1vom | 1.0 ± 2.3 |
| 1vom | 1b7t | 14.4 ± 7.6 |
| 1vom | 1mmd | 4.2 ± 4.0 |
| 1vom | 1vom | 2.7 ± 0.9 |

表4 r.m.s.は、FRETで測定した距離が選択した結晶構造で蛍光性タンパク質の位置を確率的距離幾何学法で計算した場合に、どのくらいつじつまが合って説明できるかを示している。Rmsの標準誤差は、誤差がガウス分布に従うとして、誤差伝搬の方程式に従って計算した。

| Atomic model adopted for myosin with ADP | Atomic model adopted for myosin with ATP | $L_{2,ADP}$ (57.9) | $L_{4,ADP}$ (62.7) | $L_{5,ADP}$ (38.4) | $L_{2,ATP}$ (57.2) | $L_{4,ATP}$ (53.2) | $L_{5,ATP}$ (51.2) |
|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1b7t | 1b7t | 58.2 ± 1.2 | 70.2*** ± 0.7 | 42.6* ± 2.3 | 58.2 ± 1.2 | 71.7*** ± 0.8 | 50.9 ± 2.6 |
| 1b7t | 1mmd | 57.8 ± 1.6 | 68.2*** ± 0.7 | 57.4* ± 15.9 | 58.1 ± 1.6 | 58.9*** ± 1.9 | 51.0 ± 3.1 |
| 1b7t | 1vom | 57.5 ± 1.7 | 70.0*** ± 0.9 | 60.6* ± 17.3 | 58.0 ± 1.7 | 53.9 ± 1.4 | 50.9 ± 3.6 |
| 1mmd | 1b7t | 57.9 ± 1.7 | 63.3 ± 2.4 | 39.4 ± 4.0 | 57.7 ± 1.7 | 64.8*** ± 0.8 | 56.2* ± 3.0 |
| 1mmd | 1mmd | 57.7 ± 2.0 | 64.7 ± 2.4 | 39.1 ± 4.3 | 57.7 ± 2.0 | 60.9*** ± 1.7 | 47.0 ± 4.5 |
| 1mmd | 1vom | 57.5 ± 1.7 | 62.7 ± 2.3 | 40.2 ± 7.2 | 57.7 ± 1.7 | 54.4 ± 1.3 | 50.6 ± 3.6 |
| 1vom | 1b7t | 58.0 ± 1.8 | 63.2 ± 2.1 | 37.6 ± 5.2 | 57.6 ± 1.8 | 70.3*** ± 0.6 | 82.0* ± 21.2 |
| 1vom | 1mmd | 58.1 ± 1.7 | 62.7 ± 2.1 | 39.0 ± 4.0 | 57.9 ± 1.7 | 57.5** ± 1.9 | 60.4 ± 10.8 |
| 1vom | 1vom | 58.1 ± 1.7 | 62.6 ± 2.1 | 38.9 ± 3.9 | 57.9 ± 1.7 | 59.4*** ± 1.2 | 49.2 ± 6.0 |

表5 蛍光エネルギー移動法により測定された距離と確率分配関数により計算された距離の比較。 $L_{2,ADP}$ などの距離の定義は図28に従う。蛍光分子間の距離の期待値は確率分配関数から計算した。最上段のかっこ内の数字は、蛍光エネルギー移動法により測定された数字である。”±”がついた数字は、分配関数から計算したその距離の標準偏差(SD)を示している。FRETで求められた距離と矛盾する場合に、その差が、それぞれ1xSD (68%), 2xSD (94.5%) and 3xSD (99.7%)である場合には、それぞれ、*、**、***の印がついている。従って、もっとも矛盾なく説明できているのは、1mmdと1vomを選択した場合である。