1PA021

ゲルソリンの構造安定性

-pHとCaの影響-

○土居幸雄, 謝名堂昌信(京女大・食物栄養)

ゲルソリンはCa存在下でアクチンの重合・脱重合を通して細胞骨格を制御する調節因子として働くと同時に、アポトーシスや癌の抑制因子としても働いていることが最近明らかにされてきた。さらに、ゲルソリンの変異タンパク質は家族性アミロイドーシスを引き起こすことが知られており、その繊維化にはpH低下による構造変化が示唆されている。また、ゲルソリンはpH 5.5以下では、Ca非存在下でもアクチン切断作用を示すことが報告されており、今回は、ゲルソリンの構造安定性に及ぼすpHとCaの影響を調べた。

ブタ血漿から精製したゲルソリンを、pH 2-9の各種の緩衝液中に25℃保存した後、そのアクチン重合促進活性をpH 8で測定したところ、pH 3.5付近から活性が低下した。これは、多くの緩衝液でpH 4以下で不可逆的な変性が起こることと一致した。ゲルソリンの固有蛍光を測定したところ、Ca存在下ではpH 4.5、非存在下ではpH 4.0付近から蛍光極大波長のレッドシフトがみられ、pHによる高次構造の大きな変化が観察されたが、この変性に与えるCaの高次構造安定化の寄与は小さい事が確認された。同様の結果が円偏光二色スペクトルの観察からも得られた。

次にゲルソリンのセグメント4にあるGln393に蛍光を導入したダンシルゲルソリンを調製し、pH変化に伴う蛍光極大波長の変化を観察したところ、Ca非存在下pH 5~6でブルーシフトが見られた。この変化はCa非存在下での活性の変化域と一致していた。

示差走査熱量計による測定では、pH 4-9のいずれのpHでもCa存在下において熱変性の転移温度が8~10℃ほど高く、Caの構造安定化に大きな効果がみられた。熱による変性は、いずれのpHでも不可逆的に進行したが、見かけの変性に伴うエンタルピー変化はTmに対して直線的に変化し、pHによる影響はこの範囲では見られなかった。

これらの結果、Ca非存在下での活性化に伴うゲルソリンの構造変化は全体的ではなく、セグメント3を含む部分的な微小変化によって起こると推測した。

Y. Doi, M. Janado: The effect of Ca and pH on the structural stability of gelsolin.

1PA023

Non-muscle filamin (ABP-280) のリーディングエッジへの集積

○中川 裕之、宮本 茂昭(九州工業大学・情報工・生化学システム)

Non-muscle filamin (以後 ABP-280)は、アクチン繊維の側面に結合し細胞質中で立体的な網目構造を形成するゲル化因子として知られている。また、GPIb やディシュファクター等の細胞膜貫通タンパク質の細胞質ドメインに結合すること、リン脂質膜への結合能を持つことや ABP-280 欠失細胞表面に多数の半球状の突出が形成されることから、細胞膜とアクチン細胞骨格を結んでいると考えられている。

マクロファージや多くの培養細胞は基質に接着すると、移動の方向に葉状仮足を伸展し基質上を動いていく。葉状仮足先端部はリーディングエッジと呼ばれ、その細胞質には α -アクチニン等で架橋されたアクチン繊維の密な網目構造が存在している。この構造はスペクトリンを介して細胞膜骨格と結合している可能性が示されているが、そのような結合に ABP-280 も関与しているかどうかは明らかではない。そこで我々は、12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (以後 TPA) 刺激によって葉状仮足の形成を誘導した MDBK 細胞を用いて、リーディングエッジ領域における ABP-280 の細胞内局在を光学顕微鏡と電子顕微鏡によって観察した。

MDBK 細胞を 200 nM の TPA で刺激すると、30 分後にはほぼすべての細胞で葉状仮足が形成され、またストレスファイバーが消失していた。誘導された葉状仮足のリーディングエッジには、未刺激の細胞に比べアクチン繊維が顕著に集積していた。ABP-280 は未刺激の細胞では主にストレスファイバーに局在していたが、TPA 刺激細胞ではアクチン繊維と同様にリーディングエッジに顕著に集積していた。細胞膜剥離試料を用いた免疫電子顕微鏡法により、ABP-280 は細胞膜全体に分布しその密度は TPA 刺激によって変化しないことが観察された。リーディングエッジ領域の細胞質にはアクチン繊維と共に ABP-280 も集積していたが、同領域の細胞膜に存在する ABP-280 の分布密度は変化していなかった。これらの結果は、ABP-280 分布の制御が細胞質と細胞膜では異なっている可能性を示している。

H. Nakagawa and S. Miyamoto: Localization of non-muscle filamin to the leading edge of moving cell.

1PA022

細胞性粘菌の細胞運動と発生過程での形態形成におけるキメラアクチン発現の効果

○吉岡恭子¹、加々美修¹、北川義将²、広野雅文²、水野敬文¹
(¹工技院・生命研、²東大・院理・生物科学)

我々は、アクチンがアメーバ運動のいろいろな段階で具体的に果たしている役割を明らかにしていく目的で、細胞性粘菌のアクチンの一部をテトラヒメナのアクチンの配列に置き換えたキメラアクチンを細胞性粘菌の細胞内で発現させ、アメーバ運動やその他の形質に与える影響を解析している。その結果、細胞性粘菌アクチンの84番目の残基からC末側をテトラヒメナの配列に置き換えたD84Tキメラアクチンを発現した細胞では、発生過程での集合期における運動速度が野生株や他のキメラアクチン (T39D、T84D) 発現細胞にくらべ著しく低下していること、また、発生過程での形態形成が停止し子実体形成できないこと等が明らかにになり、今年の第36回年会で報告した。

今回は、発生過程での形態形成におけるキメラアクチン発現の影響についてより詳細な解析をするとともに、キメラアクチンの粘菌細胞内でのローカリゼーション、内在アクチンとの発現量比について報告する予定である。キメラアクチンの発現がこれらの表現型を生み出すメカニズムについて、その細胞内分布とアクチンの各ドメインの機能との関係から議論したい。

K. Yoshioka, O. Kagami, Y. Kitagawa, M. Hirono, T. Mizuno: Effects of Chimeric-Actin Expression on Cell Motility and Developmental Morphogenesis of *Dictyostelium discoideum*.

1PA024

細胞性粘菌のキネシン様蛋白質のクローニング及び解析

○岩井草介、須藤和夫(東大院・総合文化・生命)

細胞性粘菌キネシン様蛋白質の遺伝子断片(約 300bp)の塩基配列が既にいくつか報告されている。今回そのの一つ K2 遺伝子の全長(2376bp)をクローニングし、塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列から、K2 は N 末端から順に尾部、coiled-coil を形成する可能性が高い柄部、モータードメインという構成になっていた。モータードメインはシヨウジョウバエの ncd や出芽酵母の Kar3 と相同性が高く、全体の構成とモータードメインの相同性から、K2 は“C 末端タイプ”のキネシンに分類され、その中でも ncd/Kar3 サブファミリーに属していることが分かった。さらにモータードメインと neck 領域の接続部のアミノ酸配列から考えて、K2 は微小管のマイナス端方向に滑る可能性が高いと考えられる。しかしながら K2 の尾部には ncd や Kar3 の尾部に見られる特徴が、見られなかった。ノーザンブロットで細胞性粘菌の生活環における発現時期を調べたところ、飢餓による発生開始後 4 時間で一時的な発現の上昇が見られた。この結果は、K2 が細胞の集合に関与していることを示唆している。さらに K2 遺伝子破壊株を作成し、振とう培養中での成長速度・飽和濃度や子実体形成の最終表現型、溶液中での集合の様子を野生株と比較したが、両者にほとんど差は見られなかった。この結果から、K2 は細胞性粘菌の生育と発生分化に必須ではなく、その機能は他のキネシン等と重複している可能性がある。K2 の機能をさらに詳しく調べるために、現在 GFP 融合蛋白質の細胞内局在観察や大腸菌で発現させた蛋白質の生化学的解析を行っている。

S.Iwai, K.Sutoh: Cloning and Characterization of Kinesin-related protein in *Dictyostelium discoideum*.