3PB033

In Vitro で滑るアクチン繊維の伸び縮み

○本多元、羽鳥晋由、五十嵐義昌、嶋田勝彦¹、松野孝一郎、
(長岡技術科学大学・生物系、¹名古屋市立大学・芸術工学部)

蛍光顕微鏡による *in Vitro* 運動活性測定システムで観察されるアクチン繊維の運動は滑らかで、生体中の滑り運動の再構成と考えられている。我々は、この滑り運動を力学的に詳細に測定・解析することによって、アクチン滑り運動の分子機構に関する知見を得ようとしている。既に、低 ATP 濃度(1.5 μ M)の時にアクチン繊維は ATP 濃度に依存した横ゆれを示す事⁽¹⁾、この横ゆれが繊維の進行方向に伝播する事⁽²⁾を見出している。滑り運動中のアクチン繊維内の各部分がどのような運動をしているかを知るには、繊維を部分標識する必要がある。この目的のため、我々は「まだらアクチン」を作製した。充分な滑り速度で運動している繊維では、繊維各部に作用する力の変動が、繊維後方に伝播している事を見つけた⁽³⁾。今回、この「まだらアクチン」を用いて、繊維の曲がり具合(W)と、見かけの長さ(L)を定量的に評価する事によって、低 ATP 濃度(20 μ M)の時にアクチン繊維が著しく長さをえている事を見出した。その変化は X 線を使った測定(0.3% をはるかに超えて、10%にも及ぶ事)がわかった⁽⁴⁾。この事実は、アクチン繊維が(モーター-蛋白質に対する)単なるレールとして機能しているだけではなく、繊維の伸び縮みが滑り運動にとって不可欠である事を示している。

- (1) K. Hatori et al.: Biophys. Chem. 58, [267-272] (1996)
- (2) K. Hatori et al.: Biophys. Chem. 60, [149-152] (1996)
- (3) K. Hatori et al.: Biophys. Chem. 75, [81-85] (1998)
- (4) H. Honda et al.: Biophys. Chem., in press (1999)

H. Honda, K. Hatori, Y. Igarashi, K. Shimada, & K. Matsuno: Contraction and protrusion of an actin filament during sliding.

3PB035

斑蛍光標識によるアクチン繊維の内部運動の相関

○高橋一貴、羽鳥晋由、本多元、嶋田勝彦¹、松野孝一郎
(長岡技術科学大学・生物系、¹名古屋市立大学・芸術工学部)

1 本のアクチン繊維の各部分の運動が観察できるように、部分的に蛍光標識した斑模様アクチン繊維を作成し、運動中のアクチン繊維の内部運動を観察した。観察後の解析時にアクチン繊維の位置決めをより正確に行うため、正規分布を用いた位置決めプログラムを使用し、15nm の精度を実現した。さらに、それぞれの標識の軌跡を平滑化する事で、軌跡の広域的に見たマクロな運動と、ミクロなゆらぎを独立に測定した。ゆらぎは、進行方向に平行なものと、垂直なものを求め、それぞれについて相関の有無を調べた。

図1:斑蛍光標識アクチンの運動の軌跡
4つの蛍光標識について、2秒間、1/30秒ごとにプロットした。

K. Takahashi, K. Hatori, H. Honda, K. Shimada, and K. Matsuno: Correlation of movements with a 'madara' actin filament.

3PB034

まだらアクチン繊維滑り運動中の繊維長変化

○五十嵐義昌、羽鳥晋由、本多元、嶋田勝彦¹、
松野孝一郎
(長岡技術科学大学・生物、¹名古屋市立大学・芸工)

In vitro アクチンミオシンの滑り運動系において、アクチン繊維をまだら模様蛍光標識すること「まだらアクチン」で、1本の繊維において複数箇所の運動が観察できるようになった。このまだらアクチン繊維を用いて ATP 濃度を変えて滑り運動を観察し、繊維の変形を調べた。

[実験] 滑り運動中のまだらアクチン繊維の各蛍光標識箇所の蛍光輝度を求めることで座標データとして、蛍光箇所間の距離を求め、この見かけの繊維長とその揺れ(標準偏差)を求めた。

[結果] 10 μ M ATP 濃度でアクチン繊維長の揺れはその長さによらず一定である。250 μ M ATP 濃度では繊維長が大きくなるに従い揺れも大きくなることが認められた。

図1 ATP濃度による繊維長と揺れ

Y. Igarashi, K. Hatori, H. Honda, K. Shimada, K. Matsuno : Length fluctuation of a speckled actin filament on myosin molecules.

3PB036

不均一な ATPase 活性を持つアクチン繊維の運動

○斎藤圭史、羽鳥晋由、本多元、¹嶋田勝彦、
松野孝一郎(長岡技術科学大学・生物、¹名古屋市立大学・芸工)

アクチンをミオシン頭部(S1)へ EDC によって架橋した時 ATPase 活性の増加が見られる事が既に報告されている。そこで我々は、この ATPase 活性の増加がアクチン繊維の運動に対してどのような影響を及ぼすのかを調べる事にした。

F-actin と myosin-S1 を EDC で架橋し、acto-S1 複合体を精製した。こうして得た acto-S1 を G-actin と混合させた後、再重合させる事により繊維の長さにそって ATPase 活性が不均一なアクチン繊維を再構成した。この繊維の ATPase 活性は最大で通常の約5倍まで高まることが確認された。この繊維をローダミン・ファロイジンで標識した後、HMM 分子上における繊維の運動を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

その結果、通常のアクチン繊維に比較して acto-S1 を含む繊維は長さが短く、その数が著しく少なかった。この事から acto-S1 は繊維を形成し難い、もしくは不安定であると推測される。これが繊維に沿って起こる ATP の分解によるものかを検討し、また、繊維中の ATP 分解がどのように運動に反映されるかを調べている。

K.Saitou, K.Hatori, H.Honda, K.Matsuno : Movement of actin filaments with inhomogeneous ATPase activation.