1P089

磁場におけるアクチン繊維のゆらぎ

○羽鳥 晋由¹、高橋 一貴¹、本多 元¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ (¹長岡技術大・生物系、²名古屋市大・芸工)

外部から磁場を加えたとき、ミオシン頭部上を滑り運動するアクチン繊維の挙動について調べた。電磁石を観察台と平行に磁束が流れるように蛍光顕微鏡に取り付け、in vitro motility assay に従ってアクチン繊維の観察を行った。その結果、アクチン繊維の滑り速度は磁束密度によらず一定の値を示した。

アクチン繊維をまだら標識し、その変位を高精度 (15nm の位置検出能) で測定した。滑り運動するアクチン繊維の座標を 1/30 秒間隔で測定し、実際の座標とその平滑座標 (前後 10/30 秒間の平均座標) との差をゆらぎとした。そして軌跡に従って進行方向のゆらぎ成分とその横方向のゆらぎ成分に分けた。その進行方向のゆらぎについて、まだら標識点 (約 1 μ m 間隔) の間で相互相関を求めた。その相関強度 (I) は、外部からの磁束密度 (B) の増加に伴い増加し、65mT の磁束密度のときに最も強調された。

図1 磁束密度に対するアクチン繊維のゆらぎの相関強度

K. Hatori, K. Takahashi, H. Honda, K. Shimada and K. Matsuno : Enhancement of fluctuating displacements of an actin filament in the presence of magnetic field.

1P091

アクチンフィラメントの浸透圧活性の熱力学

○伊藤 忠直 (京大院. 理. 生物物理)

細胞皮質における filamin A で架橋されたアクチンネットワーク構造は、細胞が力学的ストレスに対して応答する際の力学的基盤であるばかりでなく、浸透圧ストレスに対する細胞応答にも重要な役割を果たしていると思われ、これを明らかにするために、以前我々は、オスモメーターを用いて、浸透圧ストレスにより誘起される半透膜を通じての水の流れに、アクチンフィラメントおよび filamin A で架橋されたアクチンネットワークがどのような影響を及ぼすかを調べ、(1) G-アクチンは、その水の流れには何の影響も及ぼさない。(2) F-アクチンは、mg/ml オーダーの濃度で、それを濃度依存的に遅らせ、(3) filamin A で架橋されたアクチンネットワークでは、水の流れは全く観測されなくなる、という興味ある結果を得た [Biophys. J. 61, 1301, 1992]。今回、我々は、この結果を熱力学的に解析し、F-アクチンの浸透圧活性の mechanism に関して、新たな次の知見を得た。(1) 浸透圧ストレス存在下では、F-アクチンは、モノマーの配置の熱的なずれ等により、その configuration エネルギーが増加する。このエネルギーの増加が、水のケミカルポテンシャルを下げ、それが浸透圧効果となる。(2) 水圧 20cm の浸透圧ストレス下では、2mg/ml でネットワークを形成する F-アクチンの configuration エネルギーの増加は、モノマー当たりほぼ一分子の ATP のエネルギーに相当する。(3) 浸透圧ストレスにより、アクチンネットワークからバルクの水が取り除かれた場合、そのエネルギーの増加は、先のエネルギーの増加に比べ、ほぼ 100 倍にもなる。従って、浸透圧ストレスによりバルクの水は取り除かれず、configuration エネルギー増加の浸透圧効果により、水はネットワーク内に保持される。このような浸透圧活性は、タンパク質の非共有結合からなる生体フィラメントの新規な物性と考えられる。

T. Ito : Thermodynamical analysis for osmotic activity of actin filaments

1P090

排除体積効果に起因する G-actin 間の長距離引力の拡張 scaled particle 理論による計算

○入佐 正幸 (九工大・情報工・生化)

アクチンモノマー分子の会合はアクチンフィラメント形成の初期段階と考えることができる。高分子モノマー間の引力の一つに排除体積に起因するものがある。広く知られている朝倉-大沢理論¹⁾は高分子の排除体積の幾何学的考察によって引力を見積もる方法である。この理論は非常に単純化されたモデルを使っているにも関わらず実験値と良く一致している。朝倉-大沢理論は、広く使われている溶液理論である scaled particle 理論を任意形状の溶質分子に拡張した拡張 scaled particle 理論 (XSPT)²⁾ と関係があることがわかった。XSPT における溶質分子が他の分子に比べて非常に大きな場合に支配的となる項は、極限式として朝倉-大沢理論と一致する。今回次の 2 点について考察した。

I) トポロジー要素によって決まる排除体積の解析的式が仮想的に溶質分子をスケールダウンした時にほとんど変化しないという仮定を XSPT では使っている。計算幾何学 (α -shape) を使った計算により、この仮定がアクチン分子のように大きな分子の場合でも有効であることがわかった。II) アクチンモノマー分子 (G-actin)、および、アクチントリマー分子 (F-actin, Lorentz model) について、次の組合せの場合の引力を計算した。a) G-actin が多く存在する溶液中の 2 個の G-actin 分子、b) G-actin が多く存在する溶液中の 2 個の小さな F-actin 分子 (trimer of single actin molecule) c) 小さな F-actin が多く存在する溶液中の 2 個の小さな F-actin 分子

注目する 2 個の高分子が接触している場合とすき間が 1 分子分空いている場合の引力ポテンシャルの値の差は a), b), c) ともに朝倉-大沢理論による結果とほとんど同じであった。

1. S.Asakura, F.Oosawa, J.Poly.Sci., 33, 183 (1958)

2. M.Irisa, T. Takahashi, K. Nagayama, F. Hirata, Mol. Phys., 85, 1227 (1985)

M.Irisa : Theoretical characterization of the long-range attraction between G-actin molecules through the excluded volume effect

1P092

1 分子 FRET 法によるアクチンの構造変化の検出

○横田 浩章¹、小塚 淳²、石井 由晴¹、柳田 敏雄^{1,2,3} (¹ 科技振・1 分子過程 Pj、² 阪大・基礎工・生物工、³ 阪大・医・第一生理)

我々は、蛍光単分子直視技術をもとに、1 分子蛍光エネルギー移動 (FRET) 法を用いて、1 分子のタンパク質の構造ゆらぎをイメージングすることを試みてきた。この方法を用いて FRET 効率をモニターすれば、タンパク質の構造を反映すると考えられる標識されたドナー・アクセプター色素間の位置関係を知ることができる。

サンプルとしてはアクチンを用い、ドナーとして Gln41 にテトラメチルローダミン等を、アクセプターとして Cys374 に IC5 等を 2 重染色した。蛍光標識したアクチンは 1 分子からの輝点が他の分子からの輝点と空間的に区別できるように多量の無標識アクチンと共重合させ F-アクチンとし、ビオチン-アビジン系で基板表面に固定した。アクセプターのプリンキングの影響やドナー・アクセプターの配向の影響をモニターしながら、FRET を同時に観察するために、プリズム型全反射照明で、アクセプターを直接励起する 633nm の 2 本の入射方向が直交する光と、ドナーを励起する 532nm の 2 本の入射方向が直交する光、計 4 本の入射光を、電子シャッターを用いて交互にビデオフレームと同期させて入射させた。得られた 1 分子の蛍光像は、Dual view 光学系を用いてドナー蛍光像・アクセプター蛍光像に分離され、アクチンフィラメント上のスポットとしてビデオレート ICCD カメラで同時に実時間録画し、画像解析により蛍光強度の時間変化を測定した。

このようにして、ミオシンや ATP の存在・非存在下でのアクチンの構造ゆらぎを解析したので紹介する。今後、現在すすめている滑走中のアクチン 1 分子の構造ゆらぎの解析などを通して、アクトミオシン系におけるアクチンの役割を明らかにしていきたい。

H. Yokota, J. Kozuka, Y. Ishii and T. Yanagida : Detection of actin conformational changes by single molecule FRET measurement