1N1430

哺乳類 clipin/coronin ファミリーの極性を持ったアクチン再編成における機能

○渡辺 紀信¹、武内 恒成¹、楠見 明弘^{1,2} (¹ 名大院・理・生命理学、² ERATO, JST)

clipin/coronin ファミリーの蛋白質はアクチン線維の側面に結合し、細胞極性形成などのアクチン骨格の大きな再編成に重要な働きをすると考えられている。例えば、細胞性粘菌の coronin は、貧食・細胞運動・分裂に、線虫ホモログの POD1 は上皮細胞の極性決定に関与すると報告されている。我々は、哺乳類細胞における極性の決定やファゴサイトーシスの初期過程でのアクチン再編成における coronin/clipin ファミリーの果たす役割を明らかにするために本研究に着手した。coronin は粘菌で最初にクローニングされ、clipin はその哺乳類ホモログである。哺乳類では、我々がクローニングした clipin C (coronin 5)、clipin E (coronin 6) を含む 6 種類の分子がファミリーを形成しており、これらの分子は臓器、組織によって発現を棲み分けている。clipin ファミリーの中で筋肉に強い発現を示す clipinE では他の clipin 分子には見出されなかったオルタナティブスプライシングが認められ、分子間相互作用に関わる WD40 ドメインに 4 種類の多様性が生じていた (Type A ~ Type D)。筋肉系培養細胞による発現解析では、細胞の融合と同期して Type B の発現が飛躍的に増加し、それと対照的に Type D の発現は劇的に減少する事が明らかになった。このことから clipin E Type B と Type D は筋管形成における筋芽細胞の融合過程に関わることが示唆された。また、筋芽細胞内での分布を GFP 融合タンパク質を用いて調べたところ、Type A, B はストレスファイバーに局在し、Type C, D は細胞質に均一に存在しているのが観察された。これは clipin E のサブタイプのいくつかは細胞内の異なる部位において協同的に働き、筋芽細胞の融合部位や方向の決定に関与している可能性を示している。現在、特に Type B と Type D に着目し、それらのアクチン以外の結合分子の検索を進めている。

N. Watanabe, K. Takouchi and A. Kusumi : Function of clipin/coronin family proteins in polarized reorganization of actin filaments.

1N1500

アクチン繊維のゆらぎの増加と運動様式の変化

○羽鳥 晋由¹、菊池 健治¹、本多 元¹、嶋田 勝彦²、松野 孝一郎¹ (¹ 長岡技科大・生物系、² 名市大・芸工)

細胞活動にとって重要なアクチン繊維の動的な構造変化や柔軟性、モーター蛋白質との相互作用による運動にも関与している可能性がある。もし、ミオシン分子群の ATP 加水分解によって得られた駆動力が繊維にわたって能動的に伝達されるならば、繊維の極性によって運動の様子が異なるかもしれない。In vitro motility assay を用い、2 次元平面においてミオシン分子上を ATP 存在下で運動するアクチン繊維の単位時間当たりの変位「速度 (nm/0.1sec)」を進行方向とその横方向に分け、それぞれの変動 (ゆらぎ) を解析した。その際に、繊維の P 端側と B 端側それぞれについて比較した。進行方向と横方向それぞれの速度ゆらぎの大きさは、ATP 濃度の増加と共に増加したが、100 μ M ATP 以上で横方向のものは低下した。そして、速度の増加とゆらぎ強度の増加とは一致しなかった (図 1)。さらに、100 μ M より低い ATP 濃度では、P 端側より B 端側のゆらぎが大きく、それ以上の高い ATP 濃度では、P 端側より B 端側が小さくなった。このことから繊維の動きは繊維にわたって一様ではなく、さらに ATP 濃度に応じて運動の様式を変えていることがわかった。

図1 滑り速度(a)とそのゆらぎ(b)のATP濃度依存性

K.Hatori, K.Kikuchi, H.Honda, K.Shimada and K.Matsuno : Increase of fluctuations of an actin filament and mode change of its sliding motion.

1N1445

トロポミオシン・トロポニン複合体を結合した単一アクチンフィラメント重合・脱重合過程の顕微解析

○藤原 郁子、佐々木 大輔、石渡 信一 (早大・理工・物理、生命理工)

アクチンは生理的環境下で自発的に重合しフィラメントを形成するが、細胞内では ATP や無機リン酸、ADP やアクチン結合タンパク質の調節機能によって重合・脱重合を繰り返し、柔軟に細胞骨格機能を担う。アクチン結合タンパク質の一つであるトロポミオシン・トロポニン複合体 (nTM) は、アクチンフィラメントのヘリックス構造の溝に沿うように結合し、Ca²⁺ のシグナルを受けてアクチンフィラメントとミオシン間の相互作用を制御していることが知られている。しかし、その結合様式のみならず、アクチン重合過程における nTM の作用の詳細は解明されていない。そこで本実験では、エバネッセント照明蛍光顕微鏡法を用いて、nTM 存在下における単一アクチンフィラメントの重合過程をリアルタイムで観察し、重合過程及び定常状態での nTM の作用を検討する。なお、重合過程だけでなく脱重合過程も観察可能にするため、tetramethyl-rhodamine-5-maleimide で Cys374 に直接ラベルしたアクチンを 10% 加える。ところで、nTM が結合するとアクチンフィラメントの硬さに違いが現れることが知られている。同様に nTM の作用で重合・脱重合の速度が変化することが期待される。これを詳細に検討するため、特に定常相でのアクチンフィラメントの長さ揺らぎを計測し解析した。また単独のアクチンフィラメントでその存在が証明されたトレッドミル過程 (I.Fujiwara et al. Nature Cell Biol. Sept. 2002) についても解析する。

I.Fujiwara, D.Sasaki and S.Ishiwata : Regulation of polymerization and depolymerization of single actin filaments through the troponomyosin-troponin complex

1N1515

アクチンフィラメントの浸透圧活性の熱力学 (2)

○伊藤 忠直 (京大院・理・生物物理)

以前我々は、図 1 のオスモメーター内部の F-アクチンが、内外の浸透圧の不均衡、 P_f に伴う水の流れ J_w を、実験式 1 : $J_w = L_p(1 - \epsilon)P_f$ 、($0 < \epsilon < 1$) に従い、濃度依存的に遅らせることを見出し (図 2)、前回の年会でこの効果には浸透圧の不均衡のもとでの F-アクチンの configuration energy の増加が寄与することを発表した (Biophys.J., 61, 1301, '92; 生物物理 41, S 55, '01)。しかし、実験式 1 がどのような「熱力学の原理」によって与えられるのかは、これまで不明であった。今回、Landau による非平衡定常状態を使った「熱力学の不等式」の導出方法に従って解析した結果、実験式 1 に対応する関係式 : $J_w = L_p V_w (1 - m \epsilon_o) P_f$ 、($0 < m \epsilon_o < 1$, $m = \text{actin subunit 濃度}$, $V_w = \text{水のモル体積}$) を理論的に導くことができた。その結果、この関係式により表される F-アクチンの効果は、Le Chatelier の原理、即ち、系を平衡からひきはなす外部的作用は、この作用の結果を弱めようとするような過程を促進することより生じることが明らかになった。また、同様の効果が中間系フィラメントのビメンチンにおいても観測された。

T.Ito : Thermodynamical analysis for osmotic activity of actin filaments (2)