B521

超高温短時間での超好熱菌の熱死滅測定

○光澤 茂信¹、出口 茂¹、高井 研¹、辻井 薫^{1,2}、掘越 弘毅¹ (¹ 海洋科学技術センター・極限環境生物フロンティア、² 北大・電子科学研究所)

超好熱菌の高温環境への適応能力は、一般的にその生育温度で表現される。これとは別に耐熱性を表す指標として、生育温度より高い温度でどれくらいの時間生存できるかを考える必要がある。実際、超好熱菌が採取された場所の水温がその菌の生育温度より高いという報告例は少なくない。特に、海底熱水噴出孔では200℃以上の水からでも生菌が発見されることがある。では、生育温度以上の高温に熱せられる時間がどの位までなら生きていられるのか？このような問いは、超好熱菌の生理・生態学のみならず、生物とそれを構成する生体分子は一体どこまで高温で機能することができるのかを考えることにつながる。本研究では、超好熱菌を秒オーダーの短時間高温にして生存率の測定を行うことが可能なフローリアクター（耐温400℃、耐圧30MPa）を開発し、実験を行った。講演では、*Pyrococcus horikoshii*を用いた実験結果を示し、圧力やその他の要因の耐圧性への影響を議論する。本研究は（財）クリタ水・環境科学振興財団の助成を受けて行われた。

フローリアクターの概略図

S. Mitsuizawa, S. Deguchi, K. Takai, K. Tsujii and K. Horikoshi : Thermal death of hyperthermophiles at ultra high temperatures

B523

Actin 調節タンパク質 destrin の actin 脱重合活性に重要な領域

○下津 貴大¹、森山 初峰^{1,2}、有馬 一成³、小谷 享²、徳楽 清孝¹ (¹ 都城高専・物質工、² 九工大・情報工・生物化学、³ 鹿大・理・生命化学)

Destrin は cofilin/ADF ファミリーに属する actin 調節タンパク質で、165 アミノ酸残基から成り、見かけの分子量は19kDaである。Destrin は F-actin 切断、脱重合活性を持つ。Destrin をトリプシンで限定分解すると、9.2kDa 断片 (81-145or151) が生じることを我々は明らかにした (1)。この9.2kDa断片は actin 結合 helix (111-128) を有するため、actin と何らかの相互作用する事が期待された。しかし、9.2kDa断片は F-actin 結合性を持つものの、F-actin 切断、脱重合活性は持たないことが明らかになった (2)。

今回、我々はトリプシンによる限定分解の条件検討を行った。その結果、13.5kDa断片 (54-165) が生じた。我々は13.5kDa断片の F-actin 脱重合活性を紫外吸収法により調べた。すると、13.5kDa断片は destrin と比較し、弱いながらも脱重合活性を示した。この結果は、destrin の 54-80 残基または 145or151-165 残基が F-actin 脱重合活性に重要であることを示唆した。さらにトリプシンによる限定分解の条件検討を行ったところ、12.3kDa断片の生成も確認した。現在、この12.3kDa断片のアミノ酸配列および、F-actin 脱重合活性の有無について研究を進めている。また、大腸菌に様々な destrin 断片を発現させ、その F-actin 脱重合活性を調べ、脱重合活性に重要な領域の同定を試みる。

(1) Arima, K. et al. (1998) Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 215-220

(2) Tokuraku, K. et al. (2001) Biochem. Cell. Biol. 79, 773-778

T. Shimotsu, H. Moriyama, K. Arima, S. Kotani and K. Tokuraku : Essential region of actin-depolymerizing factor destrin

B522

HMM 存在下でのアクチンフィラメント重合・脱重合ダイナミクスの一分子顕微解析

○松縄 恵理子¹、西村 真紀²、藤原 郁子³、石渡 信一² (¹ 早大院・生命理工、² 早大・理工・生物物理、³ 岡崎・総合バイオ)

アクチンの重合・脱重合ダイナミクスは、細胞質分裂やアメーバ運動を初めとして、様々な細胞機能に関与していることが知られている。細胞内には、このダイナミクスを調節する多種類のアクチン結合タンパク質が存在する。ミオシン分子も、モーターとしての機能だけでなく、収縮環などでは、アクチンフィラメントの重合・脱重合ダイナミクスに関与している可能性がある。我々は、単一フィラメント蛍光イメージング法によってこの問題にアプローチする。[方法]：蛍光イメージングのために、ウサギ骨格筋より精製したアクチンの Cys374 に tetramethyl-rhodamine-5-maleimide をラベルした。その重合過程を、エバネッセント照明蛍光顕微鏡を用いて観察した。ミオシンの作用を見るため、観察時の溶液中にウサギ骨格筋から精製した HMM を加えた。観察は重合開始約3~6分後から15~20分間ほど行ったが、重合初期過程の解析には、各フィラメントにつき観察開始後6分間のデータを採用した。6分間の長さ変化を1分毎に追うことで重合速度とその揺らぎを解析した。定常状態でも同様に、長さ変化を1分間隔で解析した。このときの溶液条件は、既に報告した条件に等しい (I. Fujiwara et al. Nature Cell Biol. Vol 4, 666-673, 2002)。[結果]：その結果、HMM 存在下では、アクチンの重合速度は増加することがわかった。重合速度はアクチン濃度に比例したが、その傾きから求めた重合速度定数が、HMM 添加によって増加したのである。この関係から、臨界濃度と見かけの脱重合速度が求められるが、その詳細を検討中である。さらに、HMM 存在下でのトレッドミル機構と、重合・脱重合ダイナミクス機構を明らかにする目的で、定常状態に達した後アクチンフィラメントの長さゆらぎを計測し、詳細な解析を進めている。

E. Matsunawa, M. Nishimura, I. Fujiwara and S. Ishiwata : Microscopic analysis of polymerization and depolymerization dynamics of single actin filaments in the presence of HMM

B524

平滑筋アクチン架橋タンパク質の同定とその機能構造

吉永 直樹、巖 麗娟、○岡本 洋 (室蘭工大・応化・生物工学)

血管平滑筋細胞は血圧や血流に応じて収縮・弛緩することにより血管壁の弾性を変えて血液循環の恒常性を保っている一方、動脈硬化発症の際には、収縮型形質から遊走性の合成型形質に転換することが知られている。これらの性質を支える分子モーターやアクチン調節因子を探索した結果、190 K のアクチン結合タンパク質を見出すとともに、そのカルモジュリンによる結合阻害を観測した。190K タンパク質の部分一次構造および抗体を用いた分析結果は非筋細胞で存在が知られている IQGAP1 の特徴と一致した。IQGAP1 は低分子量 G タンパク質依存的に F アクチンを架橋し、ゲル化することが知られている。Falling Ball 法を用いて 190 K タンパク質の F アクチンゲル化活性が確認されたので、筋細胞における IQGAP1 の存在が判明した。従来、非筋細胞由来 IQGAP1 については、1 分子あたりアクチン結合部位 (CH ドメイン) は1か所しか存在しないため、F アクチン間の架橋には IQGAP1 の多量体構造が想定されてきたが、その実体は明らかではない。そこで IQGAP1 の機能を明らかにする手がかりとして、二価性架橋試薬による化学架橋法によって IQGAP1 多量体の存在を検証した。その結果、平滑筋 IQGAP1 の2量体構造を示す架橋産物を検出した。架橋分子長の異なる複数の架橋試薬のいづれを用いた場合にも2量体と思われる架橋産物生成の至適反応条件が共通していたことから、反応は IQGAP1 分子の特定の環境部位に生じていると考えられる。アクチンの架橋ゲル化反応が平滑筋細胞で生じているとすれば、筋収縮と弛緩における役割を明らかにする必要がある。その調節制御のしくみが低分子量 G タンパク質の影響下にあるとすれば、ミオシン軽鎖リン酸化の調節機構との関連が興味深い。

N. Yoshinaga, L.-J. Yan and Y. Okamoto : Identification and functional structure of an actin binding protein from smooth muscle