1P157

DSC測定により見られたトロポミオシンのトロポニン球状領域結合部位内の変異の影響

○崎山 慶太、志鷹 裕司、佐久間 紹子、三木 正雄 (福井大・工)

横紋筋において、Tmはactin分子と1:7の割合で結合し、Tnが存在することでCa依存性の筋収縮制御の役割を担う。Tmは約40アミノ酸残基ごとの繰り返し類似配列からなる7つの領域に分けられる。領域2,3,4削除型Tm(D234Tm)で再構成された細いフィラメントはCa添加によるacto-S1 ATPase 阻害解除能を失う。TmのTn球状領域結合部位(150-180)に関して、D234Tmはこの領域のうち150-165の配列が存在せず、領域1に属する31-46が対応している。D234Tmで見られたCa依存の活性調節の阻害は、Tn球状領域結合部位内の配列の違いによるTnとTmの相互作用の変化に起因しているのではないかと考えた。そこで、野生型Tm(Wild Tm)、D234Tm、及びWild TmのTn球状領域結合部位内の14アミノ酸配列(152-165)を対応する領域1内のアミノ酸配列(33-46)で置換した14aaTmを用い、F-actin、Tnの存在下でこれらのTmの熱安定性がどのような影響を受けるかを調べるために示差走査熱量(DSC)測定を行った。DSC測定は蛋白質の三次構造や相互作用している蛋白質同士の熱安定性を直接的に測定でき、蛋白質-蛋白質相互作用により引き起こされる構造変化を研究する上で有用な測定法である。単体、フッ化アルミニウムで安定化されたF-Actin(stActin)の存在下、Tn/stActin/Ca存在下それぞれにおいてのDSC測定の結果はWild Tmと比較して14aaTmとD234Tmと良く似たDSC曲線形状及び遷移温度を示した。特に、Tn/stActin/Ca存在下においてはTnとの相互作用を反映していると思われるDSCピークに対しても同様の結果を示した。Tnによる影響をより詳細に調べる目的で、TnT/Tn/stActin/Ca存在下におけるDSC測定を行っている。これら条件を変えての測定及び詳細な解析を加え、Tm熱安定性の細いフィラメント上で受ける影響がTmのTn球状領域結合部位の配列の違いでどのように変化しているかを検討する。

K.Sakiyama, Y.shitaka, A.Sakuma, M.Miki : The Effect of Mutation at Troponin Binding Domain on Thermal Stability of Tropomyosin Observed by DSC

1P159

熱パルスによって駆動するアクチン繊維

○倉富 敏史^{1,2}、川口 友彰¹、羽鳥 晋由^{1,2}、本多 元^{1,2}、松野 孝一郎¹ (¹長岡技科大・生物、²ソフトナノ)

我々はアクチンのCys-374に1.4 nmの金粒子を結合させたアクチン繊維が、近赤外レーザー(波長1064 nm)を短時間照射することで矢張り端方向に動き、周期的に照射することで最大5 μ m/sの速度で運動することを見出している。これは、ATP加水分解なしで、外部からの熱エネルギーの供給とアクチンの構造的極性によって一方向運動が実現されるという興味深い結果である。我々はその一方向運動を詳細に調べるため、レーザーの光路に高速シャッターを導入して、レーザー照射の周波数(最大250 Hz)、Duty Ratio (0-100%)、レーザーの出力(最大10 mW)を変えることができる実験系を開発した。1 mg/ml 未標識アクチン繊維溶液中に、金粒子を結合させた0.3 mg/ml 蛍光標識アクチン繊維を混合したものを用いて観察を行なった。その結果、周波数10 HzでDuty Ratio 30%の条件のときに一方向運動が顕著であった。さらに、この二つの条件を変えて実験してみたところ一方向運動には外部から熱エネルギーが与えられた後にそれが発散する過程が重要であることがわかった。

T. Kuradomi, T. Kawaguchi, K. Hatori, H. Honda and K. Matsuno : Biased motion of actin filaments driven by heat pulse.

1P158

蛍光顕微鏡を用いたアクチンの折りたたみ機構の解析

○岡谷 実季¹、山岸 舞¹、船津 高志^{1,2} (¹早大、²東大・薬)

[目的] アクチンは自発的なfoldingをせず、シャペロンCCTなど他の介助因子が必要であるため、そのfolding機構については不明な点が多い。そこで、本研究ではこれを明らかにするため、CCTによる変性アクチンのrefoldingと、CCT存在下でのアクチンのin vitro合成を行い、アクチンフィラメントの形成を蛍光顕微鏡観察することによりアクチンのfoldingを解析した。アクチンのin vitro合成が可能になると、変異体アクチンを容易に作成して、アクチンの機能解析を迅速に行うことが可能となる。

[方法と結果] シャペロンCCTをウサギの網状赤血球ライセートより精製し、SDS-PAGEやNative PAGE等によりCCTと同定した。さらに1min⁻¹のATPaseを確認した。次に、鶏肉より精製したアクチンをグアニジン塩酸塩で変性させ精製CCT溶液の中に希釈させたところ、アクチン重合条件下においてアクチンフィラメントが観察された。これにより精製したCCTのみでアクチンのrefolding介助能があることがわかった。次に無細胞タンパク合成系「ピュアシステム」を用いてアクチンのin vitro合成を行い、ウェスタンブロットにて翻訳を確認した。このピュアシステムは精製した因子で再構成した反応系のため、転写・翻訳に無関係なタンパク質が含まれておらず、別に調製した要素を系に添加してfoldingに必要な最小限の因子を検索することができる。今後は精製CCTをピュアシステムに添加し、in vitro合成をしたアクチンのフィラメント形成能を検討する予定である。

M.Okatani, M.Yamagishi and T.Funatsu : Folding mechanism of actin analyzed by fluorescence microscopy

1P160

光ピンセットを使った骨格筋筋原線維の表面破断によるサルコメア分子構築の解析

○竹之内 富士子、大槻 美里、宮代 大輔、国岡 由紀、山田 武範 (東京理科大・理・物理)

【はじめに】 昨年の年会で我々は、筋原線維表面よりアクチンフィラメントを選択的に引き剥がすことで起こる破断の解析を報告した(三宅ら、B426)。今回は、筋原線維の硬直、弛緩、選択消化の条件において破断応答を比較し、筋原線維の分子構造を更に詳細に調べた。

【方法】 筋原線維はグリセリン処理したウサギ腸腰筋をブレンダーで粉碎して調製した。EDC処理によって α -アクチニンをカルボキシマイクロビーズに結合した。光ピンセットでこのビーズを捕捉し筋原線維に接触させ、ビーズを筋原線維から遠ざけた時に得られるビーズの変位をビデオ像をもとに詳しく解析した。

【結果】 硬直状態での実験において破断間隔は10, 40, 70及び250 nm近辺に、そして破断力は10,20,30及び70pN近辺に多くみられた。対して、弛緩状態では破断間隔は40,50,100nm近辺に、破断力は10,20,40pN近辺に見られた。更に各種の選択的消化により、破断応

破断応答の一例(硬直状態)

答に違いがみられた。特に、Z膜を特異的に壊すカルパイン処理した筋原線維では、破断力は小さかった。このような条件下で、得られた破断応答から破断間隔、破断力を比較検討しサルコメアの分子構築の解析を報告する。

T.Takenouchi, M.Ohtsuki, D.Miyashiro, Y.Kunioka and T.Yamada : Surface rupture analysis of sarcomere structure of skeletal muscle myofibrils by laser tweezer technique