1P161

ADP 光遊離にともなうアクト-平滑筋 S1 複合体の構造変化の超高速時分割 X 線回折

○若山 純一¹、田村 巧¹、井上 勝晶²、八木 直人²、岩本 裕之² (¹ 理研播磨研・前田構造生物化学、² Spring-8・JASRI)

今まで我々は、外部から還流したミオシン頭部 (S1) をアクチン繊維に結合させた筋線維を標本とし、その X 線回折像中のアクチン層線を解析することによって、平滑筋 S1 のメクレオチド結合位置と、ADP によるアクト-平滑筋 S1 複合体の構造変化について調べてきた。今回我々はアクト-平滑筋 S1 複合体の構造変化と kinetics の関係を明らかにするために、Caged ADP 閃光分解により遊離した ADP によって引き起こされるアクト-平滑筋 S1 の構造変化の時間経過を超高速時分割二次元 X 線回折法で調べた。試料はウサギ骨格筋筋線維にニワトリ砂囊平滑筋 S1 を結合させたものを用い、超高速時分割二次元 X 線回折測定は Spring8 の高輝度ビームライン BL40XU で行った。Caged ADP 閃光分解後、X 線回折像中のアクチン第 5 層線の強度プロファイルは硬直状態である閃光分解前のダブルピークからシングルピークになり全体が子午軸より移動した。このことは、S1 は ADP と結合すると、アクチンに結合したまま、アクチンの外側方向に動くことを意味する。Whittaker らの電子顕微鏡による観察結果や今までの我々の結果から、この変化は ADP と結合することによって引き起こされる軽鎖部分の構造変化と思われる。また、この反射の積分強度は閃光分解から約 20 ms までは急速に立ち上がり、その後は緩やかに上昇した。生化学実験 (Cremona & Geeves, 1998) によれば平滑筋アクト S1 の ADP の結合過程は速いので、この速い成分は ADP 結合過程による構造変化であろう。遅い成分は、閃光分解していない Caged ADP が S1 に結合していて、その Caged ADP が閃光分解によって生じた ADP と入れ替わる過程である可能性がある。そこで現在、光遊離する ADP 濃度を上げて実験を行っており、その結果についても報告する。

J. Wakayama, T. Tamura, K. Inoue, N. Yagi and H. Iwamoto : Time resolved X-ray diffraction studies of the structural changes of actin-smooth S1 complex induced by the photolysis of caged ADP.

1P163

心筋 SPOC と心拍との相関を規定する因子

○佐々木 大輔¹、石渡 信一² (¹ 早大院・生命理工、² 早大・物理)

除膜心筋線維は、ATP・ADP・Pi 共存下で自発的に筋節長振動 (ADP-SPOC) を生ずる。ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシの心筋を用いて SPOC における筋節長振動特性を調べた結果、振動周期、筋節収縮速度、及び隣接筋節への振動位相伝播 (SPOC wave) の速度が、いずれも各動物種の安静時心拍数と強い相関を持つことが明らかとなった (第 39 回年会で発表)。本研究においては、この相関をタンパク質レベルで規定している因子を明らかにすることを目的としている。SPOC における筋節収縮速度と各動物の安静時心拍数は、ほぼ比例関係にある。筋の収縮速度はミオシンの特性に最も大きく依存することが予測されるため、各動物種の左心室からそれぞれ心筋ミオシンを精製し、これらを用いて通常条件での *in vitro* motility assay を行い、アクチンの滑り速度と SPOC における筋節収縮速度、及び心拍との関係を調べた (アクチンはウサギ骨格筋から精製)。その結果、ラット心筋ミオシンによるアクチン滑り速度は、ウサギ心筋ミオシンの 1.6 倍、ブタ心筋ミオシンの 2.6 倍、ウシ心筋ミオシンの 3.0 倍となった。一方、ラット心筋の SPOC における筋節収縮速度は、ウサギ心筋の 1.6 倍、ブタ心筋の 4.8 倍、ウシ心筋の 8.4 倍である。すなわち、ミオシンの滑り運動活性と SPOC における筋節収縮速度 (もしくは安静時心拍数) とは比例関係がなく、従って SPOC における筋節収縮速度と安静時心拍数との比例関係は、ミオシンの特性の相違からだけでは説明できない。この結果は、筋節の収縮速度がミオシンの滑り運動活性だけでは決まっていないことを強く示唆し、SPOC における筋節収縮速度と安静時心拍数との比例関係が、筋収縮系を構成するタンパク質複合体の性質として得られたものであることを示唆する。

D.Sasaki, S.Ishiwata : Factors determining the correlation between myocardial SPOC and heartbeat

1P162

車軸藻ミオシン上でのアクチン繊維の方向性をもったゆらぎ

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

極めて高速な運動能力をもつ車軸藻ミオシン上でのアクチン繊維のゆらぎの特徴を調べた。1 本のアクチン繊維の変位をナノ計測し、その進行成分と横成分の分布を評価した。車軸藻ミオシン上において、ATP 濃度の増加に伴いアクチン繊維の変位の変動 (ゆらぎ) が大きくなると共に速度が増加した。ATP 濃度を調整し、車軸藻ミオシンと骨格筋ミオシンの場合とで速度を同様にしてゆらぎの方向性について比較したとき、車軸藻ミオシンでは、明らかに進行方向の強度が大きかった。この進行方向のゆらぎ強度は速度と共役して増加した。この傾向は、骨格筋ミオシンの場合にはみられなかった。さらに骨格筋ミオシンをテフロンラックに結合させ、強制的にアクチン繊維を直線的に運動させたときでさえ、そのゆらぎに強い方向性はみられなかった。この結果から、車軸藻ミオシンが積極的に進行方向の変動を発生し、それが速い運動の実現に関与している可能性がある。

K. Hatori, Y. Okeno, H. Honda, K. Shimada, K. Matsuno : Amplification of longitudinal fluctuations of an actin filament on Chara myosin molecules

1P164

アクチンフィラメント上に見る HMM の結合状態

○田口 洋介、羽鳥 晋由、本多 元、松野 孝一郎 (長岡技科大・生物系)

アクチンフィラメントは ATP 存在下で骨格筋ミオシンを吸着させたスライドガラス面において、複数のミオシン分子が作用することで約 5 μ m/s の滑り速度で滑り運動することが知られている。我々は、逆にスライドガラス上に固定したアクチンフィラメントに ATP 存在下、非存在下で骨格筋 HMM を結合させ、アクチン-HMM の結合状態を協同性の観点から観察、解析することを目的とした。ビオチン化アクチンとインタクトなアクチンを混合し、FITC-ファロイジンを用いて安定化、可視化したアクチンフィラメントを調製した。これを、スライドガラスに吸着させたビオチン化 BSA にアビジンを用いて固定した。そこに蛍光物質 IC3 で蛍光標識した HMM を流してプリズム型エバネッセント場蛍光顕微鏡を用いて ATP 存在下、非存在下での条件で観察を行った。ATP 非存在下において、アクチンフィラメントに沿って HMM が結合した様子が観察できた (Fig. 1)。ATP 5 μ M では、HMM がアクチンから解離することがわかった。

Fig.1 アクチンフィラメントに結合した IC3-HMM

Y. Taguchi, K. Hatori, H. Honda and K. Matsuno : Observation of binding of HMM molecules to an actin filament fixed on glass surface