1P165

筋収縮系自励振動 (SPOC) における外力刺激応答のサルコメア長依存性

○島本 勇太¹、鈴木 団¹、安田 賢二³、石渡 信一^{1,2} (¹ 早大・院・生命理工、² 早大・理工・物理、³ 東大・院・総合文化)

筋収縮系自励振動 (SPOC) において各サルコメアが協調的に安定な振動周期を維持する機構を明らかにするため、外力刺激に対する応答性をサルコメアの振動位相ごとに計測した。

〔背景・目的〕：筋収縮系は、収縮と弛緩の2状態に加え、自励振動という第3の状態を取る。SPOCと呼ばれるこの自励振動現象は、各サルコメアの振動と、隣接サルコメア間での振動位相伝播の2要素から成る。振動周期は1-6秒、振幅 (p-p) は600nm程で、非常に安定に振動する。本研究の目的は、SPOC発現の分子メカニズムを明らかにすることによって、生体システムが個々の分子の確率的動作をいかに制御してマクロな協調機能を生み出すかを知ることにある。

〔方法〕：顕微鏡下で、除膜処理ウサギ骨格筋筋原線維の両端をガラス微小針で保持した。針はピエゾ素子に接続され、筋原線維に対して任意の力学刺激を入力することができる。溶液条件はADP収縮条件。この条件では、SPOCと同じ機構で細いフィラメントが活性化されて力発生し短縮するが、自励振動は生じない。この条件下で、サルコメア長を制御しながら外力刺激を与え、それに対する応答をサルコメアごとに観察・解析した。

〔結果〕：ADP収縮条件にあるサルコメアは、外力刺激に対して分子サイズ以上の急激な伸長転移を起こした。さらに、サルコメアの短縮距離を制御して外力刺激応答性を計測したところ、短縮距離に依存であった。短縮相初期は外力刺激に対してほとんど応答せず、短縮が進みサルコメア長が短くなると伸長転移 (~500nm) が生じた。すなわちADP収縮においては、短縮に伴って分子モーターシステムが不安定化する。通常の収縮条件での性質とは逆のこの特質こそが、SPOCにおいて各サルコメアが安定な振動周期を維持する基礎となっているものと推測される。

Y. Shimamoto, M. Suzuki, K. Yasuda and S. Ishiwata : Length dependence of sarcomeres against the mechanical stimuli in spontaneous oscillatory contraction (SPOC) of skeletal muscle

1P167

ヒト筋肉アクチン発現系の構築

○岩佐 充貞¹、佐野 健一²、前田 佳代¹、前田 雄一郎¹ (¹ 理研播磨・前田構造生物化学、² 癌研究所・蛋白創製研究部)

アクチンフィラメントの構造変化と機能発現の関係を深く理解するためには、アクチンを組換え蛋白質として大量に得ることが不可欠である。現在までに、粘菌や出芽酵母などを用いたアクチン発現系の報告はあるが、粘菌では粘菌由来のアクチン発現系しか確立されておらず、また出芽酵母では収量が少ないため、いずれの発現系も骨格筋由来アクチンの構造生物学研究には適していない。そこで本研究では、昆虫細胞を用いた系で、骨格筋由来アクチンを大量かつ高効率に得るための発現系の構築を試みている。前年会では、アクチンのC末端側にアフィニティータグを付加した組換えアクチンについて、N末端側はアセチル化システインが付加されたままの状態であること、His73は一部がメチル化されていることを報告した。またその後の解析で、C末端側にアフィニティータグを付加させることで、アクチンの重合能が著しく低下することが示唆された。そのため、アクチンのN末端側にアフィニティータグおよびこれらを除くためのプロテアーゼ認識配列を付加させた組換えアクチンを作製した。これらの組換えアクチンは、C末端側にアフィニティータグを付加させた組換えアクチンと比べて、重合能が改善されることが確認された。現在は、組換えアクチンの精製方法を検討し収量の改善を試みつつ、in vitro motility assayや電子顕微鏡解析などを行っている。本年会では、これらの進捗状況について報告する。

M. Iwasa, K. I. Sano, K. Maeda and Y. Maeda : An establishment of human muscle actin expression system.

1P166

近接したアクチン2分子間に働く排除体積起因の平均力の計算

嶋田 良美、○入佐 正幸 (九工大・情報工・生命情報)

我々はこれまで、遊離したアクチン単分子が存在する溶液中での、アクチン2分子間に働く排除体積起因の平均力について計算してきた。排除体積起因の平均力についてはAsakura-Oosawa理論が知られているが、我々が開発してきた拡張 scaled particle 理論は平均力を表す式式中にある条件下でAsakura-Oosawa理論に収束する項を含む。これまでの本年会での発表では、平均力が働いている2分子については形状を球形と仮定してきた。しかし、蛋白質分子の形状や蛋白質分子間の相対的な配置がどのように平均力に影響するかを調べるために、今回は注目する2分子の形状を非球形とし、空間充填モデルで表される形状とした。アクチンフィラメント重合の理解の第1段階として、遊離したアクチン単分子中にアクチン2分子を固定し、その2分子間に働く平均力を相対的配置を変えて計算した。今回は、配置の違いだけでなく、遊離したアクチン単分子の濃度依存性や、固定したアクチン分子内の立体構造の変化、アクチンフィラメントに作用するキノコ毒である phalloidin (小分子) の結合による影響についても調べた。その結果、相対的な配置を変化させた場合、フィラメントの螺旋方向に近接させて配置した場合のアクチン2分子間の平均力ポテンシャルが最も小さく安定な配置となった。固定したアクチン分子内の立体構造はF-actinの構造 (Lorenz モデル) と同じ場合、ポテンシャルは最も小さくなった。また、phalloidin が結合した場合はさらに小さくなり安定化した。すべての場合において、遊離したアクチン単分子の濃度を上げ体内の条件に近づけると、平均力ポテンシャルは単調に減少し配置を安定化した。

Y. Shimada and M. Irisa : Calculation of potential of mean force between two actin molecules making contact through excluded volume effect

1P168

ゲル表面におけるアクチン自己組織化による3次元ネットワーク成長

○浦 剛博¹、角五 彰¹、Gong Jian Ping^{1,2}、長田 義仁¹ (¹ 北大院理、² 科学技術振興機構)

当研究室では筋肉を構成する主要なタンパク質であるアクチン、ミオシンを材料としたゲルアクチュエータの創製を目指している。本研究では特にアクチンに注目した実験を行った。アクチンは細胞内に存在しており、その形状は細胞骨格やその移動において重要な役割を果たしていることが知られている。実験では、様々な種類の高分子ゲルを作成し、その表面にアクチン溶液を添加し、そのときのアクチンの形状を蛍光顕微鏡により観察した。その結果、3,3'-6,8'-6,10'-6,12'-ionene bromide, poly-L-lysine, poly (quaternized dimethylamino-propylacrylamide) (PDMAAPAA-Q) などのカチオン性高分子から作成したポリカチオンゲル表面にアクチン溶液を添加した場合のみ、アクチンはゲル表面上から自己組織化により巨大ネットワークを形成することがわかった。このゲル表面から形成される細胞骨格様のネットワークを共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察すると、アクチン溶液とゲルの界面から3次的にネットワークが成長する様子が確認できた。これは、アクチンとゲルはお互いの界面で平面的に接触しているにもかかわらず、アクチンは3次的に成長できることを示している。さらにカチオンゲル上から形成されるネットワークパターンをNIH imageを用いてフラクタルの概念による評価を行った。その結果、用いるカチオンゲルの種類により、アクチンネットワークの形状が異なることがわかった。さらに、ゲルのゼータ電位測定からネットワークパターンとゲルの表面電位との間には相関があることが分かった。すなわち、カチオンゲル表面はアクチンの3次的成長の基盤となり、ゲル表面ポテンシャルはアクチンネットワークのパターンを決定する。

T. Ura, A. Kakugo, J. P. Gong, and Y. Osada : Three-dimensional network formation by self-organization of actin on gel surface