2P149

培養ラット心筋細胞のカルシウム振動に対するミオシン ATPase 抑制剤の作用

○青山 祥一郎¹、石渡 信一² (¹ 早大院・生命理工、² 早大理工・物理)

N-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) は、myosin II の ATPase 活性を特異的に阻害し、アクチン・ミオシン間の相互作用を抑制する有機低分子として知られている。また、心筋細胞では細胞内カルシウムイオンの反復性濃度変化 (カルシウム振動) によりアクチン・ミオシン間相互作用が on-off 制御をうけ、拍動が起こる。そこで、我々は新生児ラット由来の培養心筋細胞に対して BTS を作用させ、ミオシン ATPase 活性の抑制によって拍動やカルシウム振動がどのように影響を受けるかを、蛍光・位相差顕微鏡観察によって調べた。まず、拍動している培養心筋細胞シートに対して BTS ($100 \mu\text{M}$) を作用させると、拍動は弱まり、作用後 10~20 秒以内には停止した。次に、蛍光カルシウム指示薬である fluo-4 を負荷した培養心筋細胞シートに BTS ($100 \mu\text{M}$) を作用させて、拍動特性とともにカルシウム振動に与える影響を調べた。すると、BTS 作用直後にカルシウム振動の間隔が長くなるか、あるいは振動が停止するが、作用後 40 秒程で、作用前とは間隔と周期性が異なるものの、カルシウム振動が再び観察されるようになった。しかし、BTS の作用によって拍動は停止し、その後も拍動は観察されなかった。こうした結果は、心筋細胞拍動のシグナリング機構にアクチン分子モーターによる力発生がフィードバック機構として関与している可能性を示している。今後は BTS 作用前後におけるカルシウム振動の平均間隔の変化や、間隔のゆらぎ等について詳細に解析し、アクチン分子モーターが心筋細胞における拍動シグナリング機構に果たす役割についてより深く検討していく予定である。

S.Aoyama and S.Ishiwata : Effects of myosin-ATPase inhibitor on self-oscillatory properties of embryonic cardiac muscle cells

2P150

アクチンフィラメントの重合・脱重合ダイナミクス—HMM による制御—

○松縄 恵理子¹、石渡 信一^{1,2} (¹ 早大院・生命理工、² 早大理工・生物物理)

アクチンの重合・脱重合ダイナミクスは、ミオシンと相互作用することにより様々な細胞機能に関与する。その基本的性質を知るため、ミオシンがアクチンの重合能に及ぼす作用を検討した。[方法]：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。重合相の観察は重合開始 (塩添加) 直後から行い、各フィラメントにつき最初の 6 分間のデータを採用した。1 分毎の長さ変化を追うことで重合速度の平均値と揺らぎを解析した。また定常相でも同様に、長さ変化を 1 分ごとに計測した。定常相でのフィラメントの長さゆらぎの時間相関解析から、重合・脱重合の素過程に関与する平均のアクチン分子数を見積もった。それに必要な臨界濃度は、重合相の結果を用いた。[結果]：昨年の年会で、HMM 添加によりアクチンの重合速度が増加することを報告した。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 (モル比でアクチン：HMM が 8 : 1 の範囲で)。この関係から、重合相における臨界濃度と見かけの脱重合速度も求められるが、臨界濃度は HMM の存在に拠らずほぼ一定であった。従って、アクチン濃度ゼロへの外挿値から求めた脱重合速度は HMM 添加とともに増加した。このことから、HMM はアクチン重合の平衡には影響せず、重合・脱重合の速度を加速する制御因子といえる。一方定常相の測定において、HMM の添加量を過剰にすると (アクチン：HMM が 4 : 1)、アクチンだけのときよりも重合速度が低下した。しかしこれは ATP が枯渇した為である可能性があるため、現在溶液系の実験などにより多角的に検証している。

E.Matsunawa and S.Ishiwata : Polymerization and depolymerization dynamics of actin filaments-Regulation by HMM-

2P151

filamin A 架橋 F-actin・ネットワーク構造の力学・浸透圧特性

○伊藤 忠直¹、山崎 昌一² (¹ 京大・低温・物質科学研究センター、² 静大・理・物理)

細胞周囲の細胞皮質を構成する filamin-A により架橋された F-actin・ネットワークは、細胞膜を介するシグナル伝達の「足場」を提供するとともに、細胞に加わる力学的、浸透圧ストレスに対して、細胞内環境の恒常性を維持するための構築物としての働きがある。また下図にあるように、このネットワークは *in vitro* における力学的および浸透圧なストレスに対し、通常のゴム状高分子ネットワークには見られない、生理的に合目的と考えられる特異な応答を示す。即ち、比較的小さい力学的ストレスに対しては「弾性体」として振舞う一方、閾値以上のストレスでは可逆的なゲル-ゾル転移を生じ (図 a の白丸)、さらにネットワーク内部の水のケミカルポテンシャルを体積変化を伴わずに増減 (図 b の $\Delta\mu_w$) させ、浸透圧ストレス (P_f) を中和する。このような特有の力学的・浸透圧的応答の基礎となるのは、「曲げ」に対してはエンタルピックに、「引っ張り」に対してはエントロピックに応答する「semi-flexible」フィラメントとしての F-actin の性質、および「引っ張り」による架橋タンパク質の可逆的な folding-unfolding 転移である。

T. Ito and M. Yamazaki : Characteristic responses of filamin A-crosslinked F-actin networks to mechanical and osmotic stresses

2P152

カルモジュリンによる平滑筋 IQGAP1 の構造変化と機能調節

○山田 いずみ、吉永 直樹、巖 麗娟、皆川 圭紀、○岡本 洋 (室蘭工大・工・応化)

細胞運動ではアクチンフィラメントの再編成が重要な働きをすることが周知である。その調節を行う様々なしくみと担当分子が同定されている。平滑筋は横紋筋と異なり、サルコメアの様な安定な収縮装置を持たないので、張力発生に至るアクチンフィラメントとミオシン ATPase の配向形成については、よく分かっていない。我々は、血管平滑筋に非筋細胞で存在が知られている足場タンパク質 (Scaffolding Protein) の IQGAP1 が存在することを明らかにした。 (L-J.Yan et al. 2003) IQGAP1 は F アクチン、カルモジュリン、Rho ファミリー G タンパク質の cdc42、Rac1 などと相互作用することが知られており、GTP 存在下に F アクチンを架橋ゲル化する。ところが IQGAP1 にはアクチン結合部位としてカルポニンホモロジー (CH) ドメインが一つしか存在しない。この性質から想定される IQGAP1 オリゴマーの存在を、二価性架橋試薬による化学架橋で調べた結果、二量体の存在が示された。一方、平滑筋 IQGAP1 と F アクチンの結合はカルシウムイオン非依存的にカルモジュリンによって阻害されることが明らかになった。そこで今回、この二量体架橋産物の生成に対するカルモジュリンの作用を調べた結果、二量体架橋産物の生成を低下させることが判明した。以上の結果を、F アクチンのゲル化反応に対するカルモジュリンの作用を調べた結果と併せて IQGAP1 の構造と機能調節について考察する。

I.Hatakeyama, N.Yoshinaga, L-J.Yan, K.Minagawa and Y.Okamoto : Calmodulin alters the dimer structure of smooth muscle IQGAP1