2P161

新規2価性キラルスピラベルを用いたESRによるトロポニンCの分子回転動態と配向角の解析

中村 志芳³、茶谷 俊介²、山本 行男²、○荒田 敏昭^{1,4} (¹ 阪大院・理・生物科学、² 京大院・人間環境、³ ERATO/JST、⁴ CREST/JST)

たんぱく質ドメインの回転動態や配向試料における角度をESRで測定するために、たんぱく質表面の2点で結合する2価性スピラベルを開発した。光学異性体C2キラルの2価性5員環スピラベル(S,S)-1と(R,R)-1を合成・精製し、骨格筋トロポニンCのダブルシステイン置換変異体(セントラル・ヘリックスCys94とCys101)と反応させた¹。結合の仕様は電子スピン共鳴(ESR)スペクトルで調べた。ラベルしたトロポニンCをさらにSH-担体カラムを通した後、すべてのスピラベルは固く固定され、たんぱく質の回転時間に対応するスペクトルを示した。しかし、2つの異性体スピラベルを結合したトロポニンCのスペクトルにはわずかの差がみられた。このことは、結合したスピラベル異性体のスピン電子軌道の主軸とたんぱく質分子回転の主軸との角度において異なることを示唆している。

スピラベルしたトロポニンCをスキンド筋肉に交換により導入して再構成した。交換された筋肉のCa制御機能は維持されたままであった。硬直状態の筋肉標本を線維軸と磁場とを平行にセットしたときのESRスペクトル²は、ランダム試料のそれと殆ど同じであった。このことは、トロポニンCのセントラル・ヘリックスはアクチンフィラメントに対して広い角度分布をとっている可能性を示唆した。

1. S. Chatani, M. Nakamura, H. Akahane, N. Kohyama, M. Taki, T. Arata and Y. Yamamoto, Synthesis of C2-chiral bifunctionalised spin labels and their application to troponin C. *Chem. Commun.* 1880-1882 (2005)
2. T. Arata, Orientation of spin-labeled light chain 2 of myosin heads in muscle fibers. *J. Mol. Biol.* 214, 471-478 (1990).

M. Nakamura, S. Chatani, Y. Yamamoto and T. Arata : Dynamics and orientation of troponin C studied by ESR using bifunctional chiral spin labels

2P163

萎縮したラットひらめ筋における細いフィラメントの長さ制御機構の変化

○大森 伸太郎¹、宇高 潤²、栗原 敏²、石渡 信一¹、福田 紀男² (¹ 早大院・理工・物理応物、² 慈恵医大・生理学第二)

【背景・目的】筋萎縮は、整形外科疾患の治療法として汎用されるギプス固定の過程で発生する。この病態は古くから研究されているが、筋線維の収縮張力が低下する分子メカニズムはいまだに解明されていない。我々は、萎縮にともなって筋フィラメントが短くなり、筋フィラメント間のオーバーラップが減少するのではないかと考えた。

【方法】ラットの片側下肢をギプスにより約6週間不動化させた。固定側と健側の筋肉を切り出し、1%のTriton X-100を含む弛緩溶液でスキンド処理を行った。細いフィラメントの長さ測定は安田・石渡(1994)の方法に従い、単一筋線維を3%のホルムアルデヒドを含む弛緩溶液によって化学固定した後、Alexa488-Phalloidinによってアクチンを染色、共焦点顕微鏡を用いて細いフィラメントの長さを測定した。さらに、単一筋線維の力学的測定や電子顕微鏡によるサルコメアの形態観察も行った。

【結果】6週間のギプス固定によって、固定側のひらめ筋に顕著な萎縮が発生した。筋線維の単位断面積あたりの最大発生張力は約30%低下し、Ca²⁺感受性も低下した(pCa曲線が約0.2pCa右方移動)。電子顕微鏡観察では、萎縮筋のA帯の幅が変化していないこと、収縮中(pCa4.5)のサルコメア構造の乱れがコントロール筋とほぼ同程度であることが示された。ところが萎縮筋の細いフィラメントの長さは、コントロール筋と比較して約20%短くなっていた。この変化は、萎縮にともなう収縮張力の低下を説明できる。今後、筋原線維を用いてより厳密に細いフィラメントの長さを計測するとともに、細いフィラメントの長さを制御している各タンパク質の発現が萎縮にともなう変化するかを定量的に調べる予定である。

S. Ohmori, J. Utaka, S. Kurihara, S. Ishiwata, N. Fukuda : Alteration of thin filament length regulation in immobilized soleus muscle of the rat

2P162

アクチンフィラメント中のアクチン1分子イメージング

○田口 洋介、本多 元(長岡技科大・生物系)

近年の蛍光1分子イメージング技術により、個々の分子が動く様子や他分子と相互作用する様子を直接観察できるようになった。さらに、1分子からの蛍光強度を知ることにより、細胞内での分子分布や相互作用の程度を分子数で定量することも可能となった。この蛍光1分子イメージングのためには、高感度化とともに背景光を下げる必要がある。背景光は、照明用レーザー光を全反射させた時に生じるエバネッセント光を利用することで局所的な照明により下げることができる。しかし、高感度に1分子の蛍光を検出するためには高感度CCDカメラやイメージインテンシファイヤが必要である。今回我々は、ポリアミンの一種であるスベルミンまたはリジン5量体を蛍光標識して蛍光物質の集合体を作り出し、アクチンモノマーに架橋することでアクチンフィラメント中のアクチン1分子を高感度CCDカメラやイメージインテンシファイヤを使用せずに観察できる方法を考えてみた。スベルミンまたはリジン5量体をFITC、アクチンフィラメントをローダミン-ファロイジンで蛍光標識することでフィラメント中のアクチン1分子の観察を試みた。この技術に応用して斑アクチンを調整し、新たなゆらぎ解析が可能となるかもしれない。

fig. 蛍光リジン5量体と架橋したアクチンの確認

Y. Taguchi, H. Hajime : Imaging of single actin molecules within a filament

2P164

SPOCに伴う筋原線維の形状変化：顕微画像解析

○河野 史明、島本 勇太、石渡 信一(早大・理工・物理)

筋収縮系は、通常の条件下では、収縮・弛緩の二状態のうちいずれかの状態をとるが、ATPにADP、Piが共存しCa²⁺非存在下で自励振動現象(SPOC)が生じる。

【目的】筋原線維の発生張力が、条件によってはサルコメア長とともに減少しないという結果があり、その原因としてlattice間隔のサルコメア長依存性が考えられている。lattice間隔の変化はアクチン・ミオシン間距離が変化することを意味し、それは発生張力にも影響するだろう。このことはSPOCのメカニズムに関係しているかもしれない。これまでX線回折などで異なるサルコメア長でのlattice間隔は測定されているが、筋原線維ではlattice間隔が変化していく様子は観察されていなかった。本実験の目的は、SPOC振動に伴う筋原線維のサルコメア長とlattice間隔の関係を調べることである。

【方法】ガラス面に固定されたRigor状態のグリセリン処理ウサギ腸腰筋原線維のA帯・I帯それぞれの両側に光ピンセットを用いてポリスチレンビーズ(φ=0.5μm)を付着させ、SPOC溶液に置換した。SPOCは位相差顕微鏡下で観察し、ビデオレートでA帯・I帯の両側につけたそれぞれ2個のビーズ間隔を画像解析した。

【結果と考察】SPOCに伴いA帯ビーズ間隔がサルコメア長と逆位相で変化した。SPOC時のサルコメア長振動振幅が約0.3μmのときビーズ間隔の振動振幅は約0.04μmであった。一方、I帯ビーズ間隔についてはサルコメア長と相関を持つ結果は得られなかった。筋原線維幅がSPOC中に約0.04μm変化しているとすると、両フィラメント間隔は約0.66nm縮んでいることになる。これは両フィラメント表面間距離の約10%になり、アクチンとミオシンの相互作用に有意な影響を与えていると考えられる。今後収縮、弛緩条件下やサルコメア長を制御したもとのlattice間隔測定を予定している。

F. Kono, Y. Shimamoto, S. Ishiwata : Microscopic measurement of the cross-sectional area of a myofibril in SPOC