

滑り運動するアクチン繊維の破断と屈曲伝播の関係

○櫻沢繁、藤田雄人、國田樹

公立ほこだて未来大学システム情報科学（〒041-8655 北海道函館市亀田中野町 116-2）

【緒言】

筋肉の主要な構成タンパク質であるアクチンとミオシンは、生体内でそれぞれ繊維を構成し、互いに相互作用しながら滑り運動をする。その様子は *in vitro* 再構成運動系として光学顕微鏡で観察する事ができる[1-3]。しかし、運動しているタンパク質の相互作用に関する分子機構は、光学顕微鏡で直接観察する事ができないため、一般的に H. E. Huxley らが結晶構造解析の静的なデータから提唱したミオシンの首振り説[4]によって理解されている。一方で、ミオシンの首振りは独立に起きているにもかかわらず、*in vitro* 再構成運動系ではアクチン繊維全体が破断することなくスムーズに運動する様子が観察される。この事実から、運動中のアクチンはミオシンから受けた作用を繊維構造全体で調和するための機構を持っている事が推察される。我々はこれまでに、*in vitro* 再構成運動系で運動するアクチン繊維の映像を画像解析する事によって、サブミクロンオーダーで生じているアクチン繊維の屈曲の伝播を検出し、この屈曲や屈曲伝播が、アクチン繊維へのミオシンの作用やアクチン繊維の運動に関与していることを明らかにしてきた[5-6]。そこで本研究では、*in vitro* 再構成運動系で運動するアクチン繊維が破断する時に着目し、破断点周辺の屈曲伝播の様子を詳細に調べた。

【方法】

実験にはウサギ骨格筋から精製したミオシンとアクチンを用いた。ミオシンは Perry の方法[6]によって精製された後、キモトリプシン(Sigma Co.)によって処理され、ヘビメロミオシン(HMM; heavy meromyosin)として使用された[7]。アクチンは、筋肉のミンチをアセトン処理した後、Spudich と Watt の方法を用いて精製された[8]。得られたアクチンをローダミンファロイジン(Sigma Co.)によって重合及び蛍光標識して再構成アクチン繊維を構成した[1]。

蛍光標識されたアクチン繊維の滑り運動を観察するために、以下の操作によって滑り運動再構成系を構成した[3,10-13]。コロジオン(nacalai tesque)処理したスライドガラスで、溶液交換可能なフローセルを作成した。このフローセルに流す全ての物質は、緩衝液(buffer; 25mM imidazole-HCl (pH=7.4), 25mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.5% β-Me)に溶解した。まず、0.05mg/ml HMM 溶液をフローセルに流し、コロジオンとの疎水性相互作用によりスライドガラスに固定した後、1mg/ml 牛血清アルブミン(Sigma Co.)溶液を流して HMM の隙間に固定した。次に、蛍光標識したアクチン繊維を含む溶液を加えた。その後、実験条件に応じて 0.02~2mM の ATP (Sigma Co.)を含む溶液を加えた。

アクチン繊維の観察には、倒立顕微鏡(Olympus IX70、対物レンズ APO100X、532nm YAG レーザー、蛍光フィルタを用いた。顕微鏡像は、リレーレンズ(Olympus、IX2-SPT、UPMTV1X、PE2X、U-CMAD3)、高感度カメラ(Hamamatsu、C2400-97V)、キャプチャボード(I-O DATA、GV-BCTV5/PCI)を介してパーソナルコンピュータのハードディスクに非圧縮の avi 形式のファ

イルで記録された。観察画像は 30fps で 4~10 秒間記録された。記録されたアクチン繊維の画像を重ね合わせることで、アクチン繊維の運動軌跡を抽出した。濃淡を考慮した細線化をし、各時刻におけるアクチン繊維について運動軌跡上の相対的な位置を求め、進行方向を上 に時系列順に並べ、更に局所的な屈曲の様子によって各ピクセルを図 1 のように色分けた。

【結果と考察】

アクチン繊維の滑り運動中に破断が生じた記録動画について、上述の解析を行った時の典型的な結果を図 2 に示す。破断点近傍における屈曲伝播の様子を調べると、強い屈曲が伝播してぶつかったところで破断が生じていることが分かった。

屈曲はミオシンとの相互作用によって、滑り運動に関係して生じている。すなわち、屈曲伝播はミオシンの相互作用の結果生じた擾乱による不均衡を繊維全体で解消するプロセスと考えられる。破断点で屈曲の衝突が起きていることを考慮すると、破断はそれらの不均衡が無理な形で集中したため解消しきれなかったときに起きたものと推察できる。

このように考えると、アクチン繊維の滑り運動はミオシンとの相互作用の結果生じる不均衡を解消するプロセスとして起きている可能性が浮上してきた。

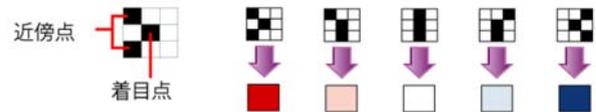


図 1. 細線化されたアクチン繊維画像の屈曲パターンによる色分け

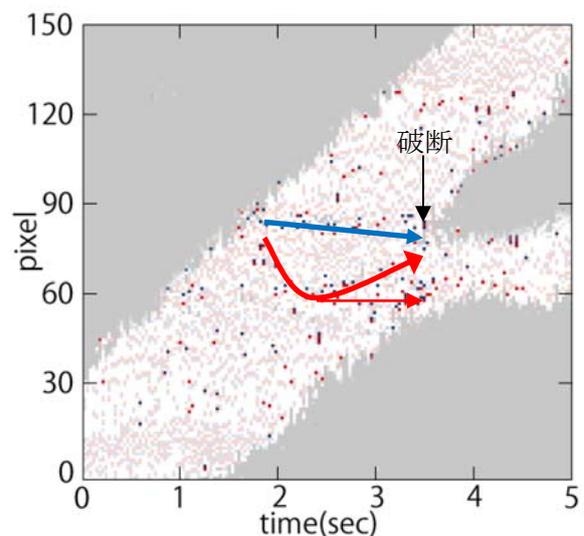


図 2. 細線化されたアクチン繊維画像の軌道上相対位置の時間推移と屈曲パターンの関係

参考文献

- [1] T. Yanagida et al., *Nature*, **307**, 58-60 (1984).
- [2] Y. Harada et al., *Nature*, **326**, 805-808 (1987).
- [3] S. J. Kron et al., *Methods Enzymol*, **196**, 399-416 (1991).
- [4] H. E. Huxley, *Science*, **164**, 58-65 (1969).
- [5] 國田 樹, *Journal of Computer Chemistry, Japan*, **9**, 3, 127-134 (2010).
- [6] 櫻沢 繁, 坂田 花, 國田 樹, *Journal of Computer Chemistry, Japan*, in Print
- [7] D. A. Perry, *Methods Enzymol.*, **2**, 582-588 (1955).
- [8] Y. Okamoto et al., *J. Biochem.*, **98**, 1143-1145 (1985).
- [9] J. Spudich et al., *J. Biol. Chem.*, **246**, 4866-4871 (1971).
- [10] K. Hatori et al., *Biophys. Chem.*, **58**, 267-272 (1996).
- [11] K. Hatori et al., *Biophys. Chem.*, **60**, 149-152 (1996).
- [12] K. Hatori et al., *Biophys. Chem.*, **75**, 81-85 (1998).
- [13] H. Honda et al., *Biophys. Chem.*, **80**, 139-143 (1999).