

コイ骨格筋アクチンの安定性に関する分子論的研究

2007 年度

大井 淳史

目次

	頁
序論	1
謝辞	7
略語	8
第1章 ウサギ骨格筋アクチンにおけるヌクレオチドおよび 2価陽イオンの結合スキーム	10
第1節 ヌクレオチドの交換反応	12
第2節 Ca^{2+} に対する結合親和性	18
第3節 ATPに対する結合親和性	22
第4節 リガンドに対する低親和性の平衡への影響	26
第5節 ヌクレオチドの相対親和性	29
第6節 考察	32
第2章 コイ骨格筋アクチンとヌクレオチド および Ca^{2+} の結合親和性	45
第1節 ATP および ADP に対する結合親和性	47
第2節 Ca^{2+} に対する結合親和性	53
第3節 ヌクレオチド結合のエネルギー論	56
第4節 考察	60
第3章 コイ骨格筋アクチンのリガンドに対する 低親和性の分子メカニズム	75
第1節 コイ骨格筋アクチンのリガンド結合 に及ぼすアミノ酸置換の影響	76
第2節 Ala/Ser-155 置換のヌクレオチド結合領域 への構造的影響	79
第3節 考察	83

第4章 コイ骨格筋アクチンの熱安定性	90
第1節 アクチン変性量の新規測定方法の開発	92
第2節 従来の熱変性速度測定方法との比較	98
第3節 コイ骨格筋アクチンの熱変性速度	102
第4節 ATP およびカルシウムの熱安定性に及ぼす影響	105
第5節 考察	108
第5章 総合的考察	125
参考文献	132

序 論

アクチンは 375 個のアミノ酸からなる球状タンパク質である。全ての真核生物に存在し、原形質流動、細胞分裂、筋収縮などの多くの細胞運動に関わっている。骨格筋においてはミオシンに次ぐ主要構成タンパク質であり、トロポミオシン・トロポニン複合体を結合して細いフィラメントを形成している。その生理的な役割は、筋線維内のカルシウム濃度に応じてミオシンの Mg^{2+} -ATPase を活性化し、また収縮の際にそれ自身がミオシンの発生する張力を支える支持台となることである。

アクチンは低イオン強度では単量体として存在するが、生理的イオン強度下で自発的重合を起こしフィラメントを形成する。アクチンの重合は物理化学的には一種の凝縮現象であり、フィラメントアクチンは一定量の単量体アクチンと平衡状態を保っている (Oosawa & Kasai, 1971)。したがってアクチンフィラメントは絶えず動的にサブユニットの交換を行っている。

アクチンの立体構造は 2 つのドメインからなり (Fig.0-1)、そのドメインを分けているクレフト領域にヌクレオチドと 2 価の陽イオンを強く結合している (Kabsch *et al.*, 1990; Otterbein *et al.*, 2000)。これらのリガンドもまた外部のリガンドと平衡状態にある。結合しているヌクレオチドは、細胞内の単量体アクチンでは通常 ATP であるが、アクチンがフィラメント形成をするときに加水分解され ADP に変わる。フィラメント中のアクチン分子においてはヌクレオチドの交換は殆ど発生しないが、上述のサブユニット交換によって単量体アクチンに戻ると直ちに交換反応が起きて ATP を結合したアクチンに戻る。アクチンの重合速度やアクチン結合タンパク質との親和性などの性質は、ATP を結合したアクチンと ADP を結合したアクチンでは異なる。したがってヌクレオチドの交換とサブユニット交換という 2 つの反応によってアクチンフィラメントには動的構造が形成される。この動的構造はアクチンの細胞内での生理的な役割に重要であることが知られている (Pollard & Borisy, 2003)。

アクチンの一次構造は生物種間で高く保存されていることが知られている。ヒトの細胞性アクチンと変形菌類の *Physarum polycephalum* の間においても僅か 18 残基の差

異しか存在しない。骨格筋アクチンに限れば、ヒト、ウマ、ウサギ、ニワトリなど恒温動物の間では、いかなるアミノ酸配列上の差異も見出されない。変温動物である魚類骨格筋のアクチンについては、Watabe *et al.* (1995)によって、初めてコイとキンギョについて報告され、恒温動物骨格筋アクチンのアミノ酸配列からの差異は5個と6個であることが明らかになっている。

このような一次構造上の高い保存性にも関わらず、異なる種のアクチン間では幾つかの生化学的な性質上のバリエーションが存在することが知られている。Swezey & Somero (1982)は平均体温の異なる14種の脊椎動物から骨格筋アクチンを抽出し、熱安定性や重合の熱力学的パラメーターを測定した。その結果、高圧下に棲息する特殊な魚類の骨格筋アクチンを除いて、熱安定性は平均体温が上昇するにつれて高まることが示されている。また重合の結合エネルギーには生物種間で大きな差異はないが、重合に伴うエントロピー変化には種間で20倍近い開きがあり、エントロピー-エンタルピー補償があることが示されている。これらの事実は変温動物においては骨格筋アクチンにも分子レベルの環境適応があり、それが少数のアミノ酸置換によって実現していることを示唆している。

地球上の様々な環境に生息する魚類においては、その環境適応の結果、分子レベルの多様なバリエーションが存在することが知られている。骨格筋アクチンについても、先述のコイ以外にもアミノ酸置換の異なる多くのバリエーションが報告されており、魚類は骨格筋アクチンの構造-機能相関を調べる上で最適な対象となると考えられた。

魚類骨格筋アクチンの研究は非常に古くから行われて来ている。初期の研究では電気泳動の移動度や沈降係数などの物理化学的性質上に恒温動物骨格筋アクチンとの差異は見出されていなかった (Connell, 1958; Watabe *et al.*, 1983) が、Kitao *et al.* (1973) は筋肉をアセトン処理したパウダーからアクチンを抽出する際に、ATPを含む溶液を使用しないと収量が大きく低下することを明らかにし、魚類骨格筋アクチンのATPとの結合に恒温動物骨格筋アクチンと異なる特性があることを示した。

そこで本研究では、コイ骨格筋アクチンを対象にヌクレオチド結合を調べ、対照と

なる恒温動物骨格筋アクチンとの差異を明らかにした。また、その特性が分子構造上のいかなる差異に起因するかを調べた。さらにヌクレオチドとの結合性がおよぼす熱安定性への影響を明らかにした。得られた研究成果の概要は以下の通りである。

第1章では恒温動物骨格筋アクチンに対して用いられているヌクレオチド交換のスキームが生化学的性質の異なるアクチンに適用可能か否かを検討した。恒温動物骨格筋アクチンでは、ヌクレオチドの結合は2価イオンによって制御されていることが知られている (Kuehl & Gergely, 1969; Kinoshian *et al.* 1993)。現在確立されている反応スキームでは、アクチンのヌクレオチド交換は、2価イオンがヌクレオチドと結合したまま複合体としてアクチンから解離する経路 (以下コンプレックスルートと略す) と、2価イオンが解離した後、ヌクレオチドが解離する経路 (以下シーケンシャルルートと略す) を通して行われる。この章では魚類骨格筋アクチンのモデル系としてタンパク質分解酵素であるズブチリシンによって限定分解したウサギ骨格筋アクチンを用いて、上述のスキームの検討を行った。

アクチンはズブチリシンによって Met-47 と Gly-48 の間を限定的に消化されることが知られている (Schwyter *et al.*, 1989)。この消化サイトはアクチン分子の表面上に存在する疎水性ループ (DNase I との結合領域であることから DNase I ループと呼ばれる) に属する。疎水性ループにおいて分子内に切断を受けたアクチンは、 Mg^{2+} 存在下で自発的に重合し、ミオシンの Mg^{2+} -ATPase を賦活し、また *in vitro* での運動活性も有している。それぞれの機能は本来のアクチンと比べて低いながらも骨格筋アクチンとしての活性の多くは維持されている (Schwyter *et al.*, 1990; Higashi-Fujime *et al.*, 1992)。これまでの生化学的研究から、疎水性ループはヌクレオチド結合領域と構造的に関連していることが知られており、これらの領域での構造的な摂動は互いに影響を及ぼし合う (Muhlrad *et al.*, 1994)。また切断によってアクチンの安定性が低下することも知られている (Kikumoto *et al.*, 2003)。したがって魚類骨格筋アクチンのよいモデルとなると考えられ、未処理のアクチンを対照にしてズブチリシン処理アクチンのヌクレオチド結合を調べた。

ATP の蛍光性アナログである ϵ -ATP を用いたヌクレオチドの交換速度の測定から、

ズブチリシンによる限定分解処理によって、アクチンからの ATP の解離はシーケンシャルルート、コンプレックスルートのいずれ経路においても影響が確認されたが、交換速度が Ca^{2+} によって著しく制御されるという上述の機構は維持されていることが示された。そこで従来の速度論的手法に基づいて ATP に対する親和性の測定を行った。その結果、ズブチリシン処理したアクチンでは親和性が約 1/2 に低下していることが明らかになった。また Ca^{2+} に対する親和性も低下していることが明らかになった。さらにヌクレオチド交換スキームの詳細な解析から、これらの低親和性がリガンドの結合速度定数の低下に起因することが明らかになり、ズブチリシン処理を受けたアクチンのヌクレオチド結合領域が速度論的には“フレキシビリティを欠いた”ものであることが推測された。以上のことから、ヌクレオチドの親和性や安定性の異なるアクチンを対象にした場合でも従来の解析方法が有効であることが確認され、ヌクレオチド結合領域の特性を明らかにする手段として使用できることが明らかになった。

第 2 章では第 1 章で有効性が確認された種々の方法を用いてコイ骨格筋アクチンのヌクレオチドおよび Ca^{2+} 結合の特性を明らかにした。コイ骨格筋アクチンにおいては ATP の結合定数は $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ であり、ニワトリ骨格筋アクチンの場合に比して親和性が低く、また Ca^{2+} の結合においても親和性の低下が見られた。またコイ骨格筋アクチンのリガンド結合の特徴として、リガンドの解離・結合速度が速いことが明らかになった。これは結合速度の低下によって低親和になっていたズブチリシン処理アクチンの場合とは対照的であり、コイ骨格筋アクチンのヌクレオチド結合領域は速度論的には、“緩い構造”を有することが示唆された。

さらにヌクレオチド結合に関する特性の構造学的な知見を得るためにエネルギー論的な考察を行った。ATP 結合に伴う自由エネルギー変化はコイ骨格筋アクチンにおいては -26.3 kJ/mol 、ニワトリ骨格筋アクチンでは -28.5 kJ/mol であった。自由エネルギーの差としてはわずか 2.2 kJ/mol の差であったが、ATP 結合定数の温度依存性から算出したエンタルピー変化ではコイ骨格筋アクチンで -65 kJ/mol 、ニワトリ骨格筋アクチンで -110 kJ/mol であり、大きく異なっていた。したがってコイ骨格筋アクチンにおいては ATP 結合によるエントロピー変化が小さく、ヌクレオチド結合による構

造的な安定化に関して両アクチンで大きな差異があることが明らかになった。上述のコイ骨格筋アクチンのヌクレオチド結合領域の構造的“緩さ”は熱力学的にも支持されることが明らかになった。

第3章ではコイ骨格筋アクチンのリガンドに対する低親和性の分子メカニズムを検討した。魚類骨格筋の ATP 結合に影響するアミノ酸置換として Ala/Ser-155 が報告されているが (Morita, 2003)、その他の置換の寄与を確かめるために、これまでに研究報告のある ATP 結合能とアミノ酸置換の相関を調べた。その結果、Ala/Ser-155 以外の置換は ATP 結合に影響を与えないことが示された。

そこで Ala/Ser-155 の周辺構造を分子モデルから推定することを試みた。現在までのところ Ala-155 を有するアクチンの結晶構造は解かれていないので、Ser-155 のウサギ骨格筋アクチンの原子座標を用いてモデリングを行った。Ser-155 はヌクレオチドを保持する3本のヘアピン構造のひとつ (Asp-154-His-161) に存在する。このヘアピン構造における水素結合の検出を行ったところ4本の水素結合が検出された。そのうちの1本は Ser-155 と Thr-160 の側鎖間に形成されており、Ala/Ser-155 のアミノ酸置換によって消失すると考えられた。この水素結合の欠損によって、コイ骨格筋アクチンでは Asp-154-His-161 ヘアピンに構造的な摂動がかかることが示唆された。

ヘアピンの構造的摂動がヌクレオチド結合にどのようなメカニズムで影響を及ぼすかを明らかにするために、155番のアミノ酸周辺の水素結合を検出したところ、Ser-155 は隣接するヘアピン (Met-299-Tyr-306) と2本の水素結合を形成していることが明らかになり、このヘアピンとの結合を通じてヌクレオチド結合に影響を及ぼす可能性が示された。

第4章においては第2章で明らかになったコイ骨格筋アクチンにおけるヌクレオチドおよびカルシウムの低親和性がアクチンの熱安定性に与える影響を調べた。先述したようにアクチンは低イオン強度では単量体として存在するが、イオン強度を上昇させると自発的重合を起こす。この重合反応は吸熱反応であり、高温下では重合を起こしやすい。重合したアクチンの熱安定性は単量体に比べて著しく高いことが知られているため (Bertazzon *et al.*, 1990)、単量体アクチンの熱安定性を調べる場合には、

高温下での重合が起きていないことを示すことが重要となる。本研究では ATP や Ca^{2+} の熱安定性への影響を調べるため、イオン強度の異なる条件下で熱変性を定量化することが必要になる。そこで新たに熱変性速度測定方法の確立を行った。さらにその方法を用いてコイ骨格筋アクチンの熱変性速度の解析を行った。その結果、コイ骨格筋アクチンの熱変性はニワトリ骨格筋アクチンと比して著しく速いが、その熱変性反応の活性化エネルギーは両アクチンの間に有意な差は認められなかった。またコイ骨格筋アクチンの熱変性速度は溶液中の ATP と Ca^{2+} 濃度に依存し、特に Ca^{2+} の増加によって熱変性が著しく抑制されることが明らかになった。したがってコイ骨格筋アクチンの熱変性速度の大きさは Ca^{2+} や ATP の結合・解離速度に関係した変性反応の頻度因子の大きさによるものであることが示唆された。

最後に第5章では以上の結果を総括し今後の研究課題について考察を行った。

なお、以上の結果は下記の通り発表済みである。

Ooi,A. and Mihashi, K. (1996) Effect of subtilisin cleavage of monomeric actin on its nucleotide binding. *J.Biochem.* **120**, 1104-1110.

Ooi,A. and Soematsu, H. (2007) Insight into nucleotide and Ca^{2+} binding to carp α -actin. *Fish. Sci.* **73**, 684-693.

Ooi,A., Yano,F., Okagaki,T. (2008) Thermal stability of carp G-actin monitored by loss of polymerization activity using an extrinsic fluorescent probe. *Fish. Sci.* **74**, 193-199.

Ooi,A., Yano,F., Okagaki,T., Nakayama,T. (2002) Quantification of thermal denaturation of fish muscle actin. *Fish. Sci.* **68** (suppl.II) 1511-1514.

謝 辞

本論文を作成するにあたり、ご指導、ご助言を受け賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻渡部終五教授に慎んで深謝申し上げます。また同研究科応用生命化学専攻田之倉優教授、同研究科水圏生物科学専攻松永茂樹教授、同専攻連携教授、中央水産研究所室長山下倫明博士、同専攻落合芳博准教授には大変有益なご助言を賜りました。ここに感謝の意を表します。また本研究をまとめる機会を与えていただきました三重大学大学院天野秀臣教授（現三重県科学技術振興センター特別顧問）に深く感謝いたします。

本論文は大学院生の頃からのテーマであるアクチンの構造変化に関する研究の応用として始めたもので、これまで長きに亘ってご指導を賜りました日本福祉大学御橋廣眞教授に感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたって、多大なご協力、ご助言を頂いた理化学研究所小田俊郎博士、情報通信研究機構菊本真人博士に深く感謝いたします。また研究を進めるにあたり、ご助言と励ましを頂いた三重大学中山照雄元教授、同岡垣壮教授に深く感謝いたします。

略号

ADP	Adenosine 5'-diphosphate
AMPPNP	Adenylyl imidodiphosphate
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
DMF	N,N-dimethylformamide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase I	Deoxyribonuclease I
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycol bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
ϵ -ATP	1,N ⁶ -ethenoadenosine 5'-triphosphate
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperadiny] ethansulfonic acid
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PIAA	N-(1-pyrene)iodoacetamide
Quin 2	8-Amino-2-[(2-amino-5-methylphenoxy)methyl]-6-methoxyquinoline -N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetrapotassium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

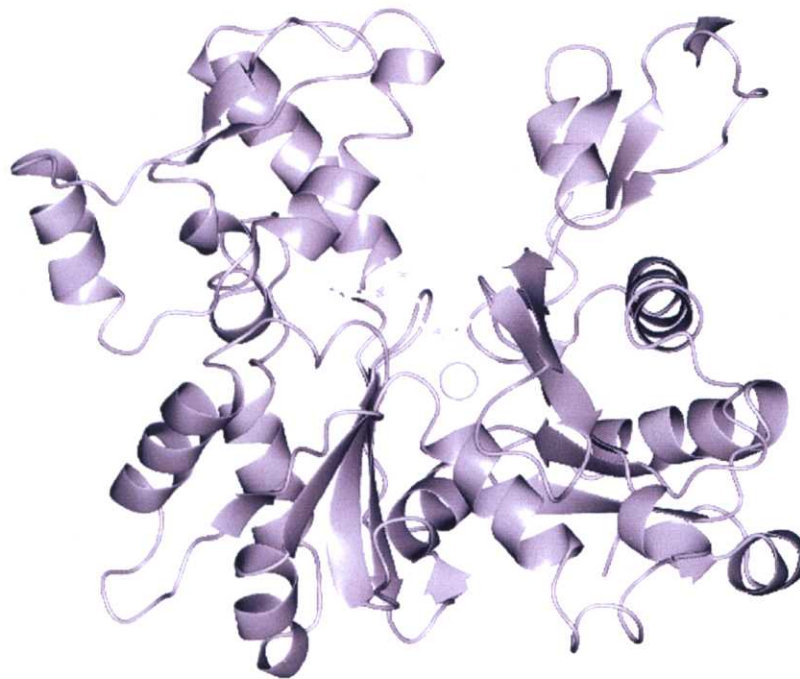


Fig. 0-1 Schematic representation of actin structure from Kabsch *et al.* (1990). Bound nucleotide and divalent cation are represented by stick model and by sphere model, respectively.

第1章 ウサギ骨格筋アクチンにおけるヌクレオチド および2価陽イオンの結合スキーム

アクチンは高イオン強度下では重合しフィラメントを形成する (Oosawa & Kasai, 1971)。形成されたフィラメントの末端においては重合・脱重合により、絶えずフィラメントを形成するサブユニットの交換が起きている。アクチンに結合された ATP は重合に伴い加水分解され、フィラメント内では ADP として存在し溶液中の遊離 ATP とは交換されない (Wang & Taylor, 1981)。アクチンのサブユニットがフィラメント末端から溶液中に放出されると直ちにヌクレオチドの交換反応が起き、再び ATP を結合したアクチンに変わる。ATP 結合アクチンと ADP 結合アクチンでは、フィラメント末端での重合や脱重合の速度定数が異なるため (Pollard, 1986)、この一連のサイクルがアクチンフィラメントの動的構造の形成に重要な役割を果たす (Wegner, 1982; Carlier, 1991)。

アクチンの溶液中でのヌクレオチドの交換反応は古くから研究され、交換速度が2価の陽イオンによって著しく影響を受けることが明らかになっていた (Barany *et al.*, 1961; Kuehl & Gergely, 1969)。その機構を説明するために多くのモデルが作られたが、アクチンの結晶構造が明らかになるまでコンセンサスの得られるスキームは確立しなかった (Kuehl & Gergely, 1969; Strzelecka-Gołaszewska *et al.*, 1978; Frieden & Patane, 1988)。アクチンは単体では結晶化が難しく、1990年になって初めて Kabsch らによって DNase I 複合体として構造が解かれた。その3次構造は2つのドメインからなり、そのドメインを隔てているクレフトに ATP または ADP ならびに2価イオンが結合していることが明らかになった (Fig.0-1)。ヌクレオチドの交換を制御する“tightly bound”の2価イオンがヌクレオチドに配位していることが構造的に明らかになったことにより、ようやく2価イオンによるヌクレオチド結合の制御機構のスキームが確定した (Valentin-Ranc & Carlier, 1989; Kinoshita *et al.*, 1993)。すなわちアクチンからのヌクレオチドの解離には、2価イオンが解離した後に起きるシーケンシャルな解離 (シーケンシャルルート) と2価イオンとの複合体のまま起きる解離 (コンプレックスルート)

があり、シーケンシャルルートでの解離速度はコンプレックスルートでの解離速度に比して著しく大きいというスキームである。

アクチンのヌクレオチドおよび2価イオンの結合特性を研究する際の障害の一つに、ヌクレオチドや2価イオンが解離するとアクチンが著しく不安定になることがあげられる (Asakura, 1961)。一般にヌクレオチドや2価イオンといった低分子のタンパク質への結合は、平衡透析法などスタティックな方法で測定することが可能である。しかしながら、アクチンの場合にはヌクレオチドを結合していない状態は極めて不安定であり、室温では数分以内に完全に不可逆的変性を起こしてしまう。したがって平衡法ではヌクレオチドの結合を正確に測定することが困難であり、結合・解離反応のキネティクスの解析から結合定数の測定が行われるのが一般的である (Kuehl & Gergely, 1969; Frieden & Patane, 1985; Strzelecka-Golaszewska *et al.* 1985)。キネティクスの解析は、その性質上、幾つかの近似または仮定を伴うことが多い。したがって大きく生化学的特性の異なる対象を用いる場合には、安易に同じ方法を適用することはできない。

本章では、すでに多くの生化学的研究が対象としてきたウサギ骨格筋アクチンを用いて、アクチンのヌクレオチド結合およびカルシウム結合の測定を行った。その際にアクチンをズブチリシンによって限定分解した試料を対象とした。ズブチリシンはアクチンの Met-47 と Gly-48 の間を限定的に消化することが知られており、その分子内切断された消化産物は重合能を有し、アクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase を活性化し、*in vitro* motility assay における滑り運動能も保持している (Schwyter *et al.* 1989 ; 1990)。一方、安定性に関しては未消化のアクチンと比して劣り、氷中保存でも数日で変性してしまう。すなわちアクチンの重要な生理的機能は保持されたまま、構造的な摂動によって安定性に影響を受けたものであり、ATP との結合性が異なり、安定性も低いとされている魚類骨格筋アクチンのモデルになると考えられる。そこでウサギ骨格筋アクチンとズブチリシンによって消化したアクチン対象にして、ヌクレオチド結合反応の解析およびカルシウムとの親和性測定を行うことによって、これらの方法の魚類骨格筋アクチンへの適用可能性を検討した。

第1節 ヌクレオチドの交換反応

アクチンに結合したヌクレオチドと2価の陽イオンは、溶液中の遊離の当該物質と平衡状態にある。したがって外部から標識されたヌクレオチドをアクチンに取り込ませることによって、平衡状態でのヌクレオチドの交換反応を調べることが可能である。この交換反応ではアクチンの変性を引き起こす可能性が小さいため、生化学的性質の不明なアクチンを対象にヌクレオチドの結合能の差異を探るには最適な方法である。

アクチンのヌクレオチド交換の実験には、標識されたヌクレオチドとして ϵ -ATP を用いることが多い。 ϵ -ATP は ATP のアデニン環を蛍光性の 1,N⁶-ethenoadenine に置換したもので、ATP の良質なアナログとして働くことが知られている (Secrist *et al.*, 1972; Onishi *et al.*, 1973; Miki & Mihashi, 1978)。また ϵ -ATP はアクチンに結合すると蛍光強度が増大するため (Miki *et al.*, 1974)、ヌクレオチドの交換過程を蛍光法で測定することが可能である。本節では ϵ -ATP を用いて、種々の濃度のカルシウム存在下での ATP の交換反応を調べた。

実験方法

タンパク質試料

ウサギの背筋から Pardee & Spudich (1982)の方法によってアセトンパウダーを調製した。アクチンの抽出および精製は Suzuki & Mihashi (1991)の方法を改変して行った。すなわち、1 mM Tris-HCl (pH8.0, 4 °C)、0.2 mM CaCl₂、0.2 mM ATP、1 mM NaN₃、1 mM 2-メルカプトエタノールからなる低イオン強度の緩衝液 (以下 G-バッファーと略す) を用いて抽出後、1 mM MgCl₂、0.1 M KCl になるよう塩を添加して重合させた。重合後、KCl 濃度を 0.6 M に上げ、遠心分離 (220,000×g, 60 min) によって重合アクチンを回収した。沈殿を 1 mM MgCl₂、30 mM KCl を含む G-バッファーでホモジナイズした後、遠心分離 (220,000×g, 60 min) によって再び重合アクチンを集めた。得られた沈殿を G-バッファーでホモジナイズ後、超音波処理を行い、G-バッファーを外液とし

て1晩透析した。透析終了後、遠心分離 (220,000×g, 60 min) を行い、上清をアクチン試料とした。

ズブチリシンによるアクチンの限定分解は Schwyter *et al.* (1989)の方法を次のように改変して行った。タンパク質濃度 2-3 mg/ml の G-アクチンを重量比 1:1000 のズブチリシンを添加して 20 °C で 30 分間消化し、1 mM PMSF を添加して反応を停止した。G-アクチンの限定分解産物 (以下ズブチリシンアクチンと略す) を、2 mM MgCl₂、60 mM KCl、1 mM ATP、10 mM HEPES (pH7.5) 中で 20 °C で 1 時間重合させた。超遠心分離 (220,000×g, 60 min) で重合アクチンを沈殿させた後、同バッファーで沈殿をホモジナイズし、220,000×g で再沈殿させた。沈殿を 0.4 mM CaCl₂ および 0.4 mM ATP を含む G-バッファー中でホモジナイズした。同緩衝液で透析後、遠心分離しズブチリシンアクチン試料とした。すべての実験は消化後 2 日以内に行った。ズブチリシンアクチンの安定性は未消化アクチンと比して著しく劣るが、重合の臨界濃度測定から少なくとも 3 日間はその重合能が変わらないことを確かめた。Kiessling *et al.* (1995) は、ズブチリシン処理によって Met-47 と Gly-48 の間消化された後、さらに Gly-42 と Val-43 の間切断され重合能が失われることがあると報告している。本実験においてはズブチリシン処理後、重合・脱重合サイクルを用いて精製を行ったため、Val-43-Met-47 のペプチドは保持された試料であると考えられた。

試薬

ATP はベーリンガーマンハイム (現ロッシュ) 社、ε-ATP はモレキュラープローブ (現インビトロジェン) 社、ズブチリシンはシグマ社から購入した。その他の試薬はすべて和光純薬工業の特級試薬を使用した。

タンパク質濃度の決定

アクチンのモル濃度は 290 nm のモル吸光係数 0.63 (Houk & Ue, 1974) を用いて決定した。ズブチリシンアクチンの濃度はアクチンを標準として Bradford 法で決定した (Bradford, 1976)。

蛍光測定

蛍光測定は日立製作所製蛍光光度計 F-4010 を用いて、励起波長 365 nm、発光波長 410 nm で行った。測定は蛍光光度計に備え付けた恒温槽 (NESLAB RTE-110) で 25 ± 0.5 °C に保持して行った。

アクチンにおけるヌクレオチドの交換反応の解析

G-アクチンの溶液中でのヌクレオチドおよび2価の陽イオンとの平衡は、Fig.1-1 に示すスキームで説明される (Waechter & Engel, 1969; Kuehl & Gergely, 1971; Kinoshian *et al.*, 1993)。先述したように、このスキームにおいてはヌクレオチドの解離には2つの経路が存在する。すなわち陽イオンが解離 (k_{12}) した後にヌクレオチドが解離 (k_{24}) する経路 (シーケンシャルルート)、陽イオンとヌクレオチドの複合体が解離 (k_{13}) する経路 (コンプレックスルート) である。したがって、ヌクレオチドのみかけの解離速度 k_{-ATP} は、各ルートの和となり、

$$k_{-ATP} = \frac{k_{12}}{1 + \frac{k_{21}[M]}{k_{24}}} + k_{13} \quad (\text{Eq.1-1})$$

または、

$$\frac{1}{(k_{-ATP} - k_{13})} = \frac{1}{k_{12}} + \frac{1}{k_{12}} \frac{k_{21}[M]}{k_{24}} \quad (\text{Eq.1-2})$$

で表される (Kinoshian *et al.*, 1993)。

Eq.1-1 の第1項はシーケンシャルルートでの、みかけの解離速度であり、第2項はコンプレックスルートでの解離速度である。2価イオンの濃度 [M] が、 k_{24}/k_{21} に比して充分大きい条件下では、 k_{-ATP} は陽イオンの濃度に依存しなくなり、その速度はコンプレックスルートの解離速度 k_{13} と一致する。また逆に2価イオンの濃度が低い条件下では、第1項のシーケンシャルルートからの解離が支配的になる。

実験的には k_{-ATP} はアクチン溶液に ATP の蛍光性アナログである ϵ -ATP を添加する

ことによって得られる蛍光強度変化から測定することができる。本章では以下のような手順で行った、アクチンを種々の濃度の CaCl_2 、2 mM Tris-HCl (pH7.5, 25 °C)、2 mM 2-メルカプトエタノールからなる緩衝液で 0.5 μM になるように希釈した。調製したアクチン溶液を蛍光セル内で 25 °C に平衡化した後、終濃度 200 μM になるように ϵ -ATP を添加してヌクレオチド交換反応を開始し、蛍光強度の増加をモニターした。この際に G-バッファーに由来する ATP 濃度を 0.5-1.0 μM になるように調製したため ATP の再結合は無視することができ、得られた蛍光強度の増加速度を k_{ATP} とした。遊離カルシウム濃度は ATP と Ca^{2+} の解離定数を 12 μM として算出した (Nowak *et al.*,1988)。

結果

コンプレックスルートでの ATP 解離速度

ウサギ骨格筋アクチンおよびズブチリシンアクチンを対象に、ATP に対して大過剰の ϵ -ATP を用いてヌクレオチドの交換反応を行った。得られたみかけの ATP の解離速度 k_{ATP} を溶液中の遊離 Ca^{2+} 濃度に対してプロットした (Fig.1-2)。Eq.1-1 から予想されるように、解離速度は Ca^{2+} 濃度に強く依存するが、高濃度の Ca^{2+} 存在下では一定値に達した。この傾向はズブチリシンアクチンにおいて同じであり、ヌクレオチド結合に対する Ca^{2+} の制御機構がズブチリシン処理後も維持されていることを示していた。したがって Fig.1-1 のスキームはズブチリシンアクチンにおいても有効であることが明らかになった。

Fig.1-2 において Ca^{2+} 濃度に対して一定値に達した k_{ATP} の値は、Eq.1-1 のコンプレックスルートでの ATP の解離速度定数 k_{13} に対応する。Fig.1-2 から k_{13} の値は、ズブチリシンアクチンにおいて $8.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であることが明らかになった。一方、未処理のアクチンにおいては $3.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった。すなわち、ズブチリシンによる限定分解によってコンプレックスルートでの ATP の解離速度が約 2.8 倍大きくなっているこ

とが明らかになった。

シーケンシャルルートでの Ca^{2+} の解離速度

ヌクレオチド交換速度の Ca^{2+} 濃度依存性の Eq.1-1 から、 Ca^{2+} 濃度を 0 に外挿した際のヌクレオチド交換速度は両ルートでの Ca^{2+} の解離速度の和 ($k_{12}+k_{13}$) になる。コンプレックスルートでの Ca^{2+} の解離、すなわち $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ 複合体の解離速度 k_{13} は既に前項で決定されているので、その結果を用いて k_{12} を算出できる。そこでシーケンシャルルートでの解離速度をより正確に測定するために、さらに低い Ca^{2+} 濃度でヌクレオチド交換実験を行い、 k_{-ATP} を測定した (Fig.1-3)。この図では実験的に得られたみかけの速度定数から k_{13} を減じた値の逆数をプロットしてある。Eq.1-2 より、このプロットの Y 軸切片の値からは 2 価イオンの解離速度定数 k_{12} が得られる。最小二乗法によって得られた値は、アクチンにおいて $2.0\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、ズブチリシンアクチンにおいて $2.6\times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。ズブチリシン処理によってシーケンシャルルートでの Ca^{2+} の解離速度も増大しているが、その影響は上述のコンプレックスルートの場合に比して大きなものではないことが明らかになった。また Eq.1-2 は X 軸切片から k_{24}/k_{21} というパラメーターが算出できることを示している。最小二乗法からアクチンで $1.3\times 10^{-6} \text{ M}$ 、ズブチリシンアクチンで $3.8\times 10^{-6} \text{ M}$ であった。この値は第 3 節で ATP の解離速度を算出する際に用いる。

要 約

ϵ -ATP を用いたヌクレオチド交換反応の解析からズブチリシン処理がアクチンのヌクレオチドおよび 2 価イオンの結合に与える影響を調べた。その結果、ズブチリシン処理の影響はコンプレックスルートおよびシーケンシャルルートでの ATP の解離速度を大きくするが、特にコンプレックスルートでの解離には大きな影響を与えることが明らかになった。2 価イオンによるヌクレオチド結合の制御スキームに関しては、

ズブチリシンアクチンにおいてもシーケンシャルルートにおける解離速度はコンプレックスルートでの解離速度に比して著しく大きく、 Ca^{2+} による ATP 結合の制御がズブチリシン処理後も成立していることが示された。

第2節 Ca^{2+} に対する結合親和性

前節においてズブチリシンによるアクチンの DNase I 結合ループの切断がヌクレオチド結合に影響を与えることが明らかになった。ヌクレオチドの解離はコンプレックスルートにおいてもシーケンシャルルートにおいても未処理のアクチンに比して速く、ズブチリシンアクチンのヌクレオチドとの低親和性が示唆された。そこで本節および次節においては、主にシーケンシャルルートでの Ca^{2+} および ATP の結合・解離に対するズブチリシン処理の影響を詳細に調べた結果を示す。アクチンに対する2価の陽イオンの親和性は、透析平衡や超遠心分析によって測定するとマイクロモルオーダーの解離定数となり正しく測定することが困難である (Martonosi *et al.*, 1964)。Gershman *et al.* (1986) は蛍光性キレート試薬である Quin 2 を用いて、アクチンの2価イオンに対する親和性がナノモルオーダーの解離定数を持つ強い結合であることを示した。本節では、この方法を用いてズブチリシンアクチン・ATP 複合体に対する Ca^{2+} の親和性を明らかにした。

実験方法

試料

アクチンは本章第1節の方法に従って調製した。

試薬

Quin 2 は同仁化学研究所より購入し、カルシウム標準液はナカライから購入した。MgCl₂ は和光純薬の高純度品を用いた。他の試薬は前節に準じた。

蛍光測定

前節に準じて行った。Quin 2 の蛍光は励起波長 339 nm、発光波長 492 nm で測定した。

緩衝液中のカルシウム濃度の測定

Quin 2 による親和性測定においては、溶液中の Ca^{2+} 濃度の絶対値が必要となるため、測定溶液中に混入している Ca^{2+} 濃度を求める必要があった。本実験においては、濃度既知の Ca^{2+} 標準溶液を用いた標準添加法により Quin 2 の蛍光強度から得た標準曲線から緩衝液中のカルシウム量を求めた。

Ca^{2+} 親和性の測定

アクチンと Ca^{2+} の結合定数は、Gershman *et al.* (1986) の方法を改変して行った。アクチン溶液に Quin 2 を添加すると、溶液中の遊離 Ca^{2+} 量が減少し、アクチンから Ca^{2+} の解離が起きるが、やがて平衡に達して Ca^{2+} の放出が止まる。その平衡での Ca^{2+} の結合量、遊離 Ca^{2+} 濃度を Quin 2 の蛍光強度から算出する。算出方法は以下の通りである。

Quin 2 添加後に系が平衡に達した際の蛍光強度増加量を FI ([Ca]diss) とする。平衡到達後に終濃度が 100 μM になるように MgCl_2 を添加すると、アクチンに結合していた全てのカルシウムイオンが放出され、溶液の蛍光強度が増加する。その際の蛍光強度増加量を FI ([Ca]bound) とする。またバッファー中の遊離 Ca^{2+} と結合した際の蛍光強度を FI ([Ca]solv) とする。予め作成した Quin 2 のカルシウム結合と蛍光強度の標準曲線を用いて、FI ([Ca]diss)、FI ([Ca]bound)、FI ([Ca]solv) のそれぞれの蛍光強度から濃度、[Ca]diss、[Ca]bound、[Ca]solv を算出した。

平衡に達した際の遊離 Ca^{2+} 濃度、[Ca]free は次式で求めた。

$$[\text{Ca}]_{\text{free}} = K_{\text{Quin2}} \cdot \frac{[\text{Ca}]_{\text{solv}} + [\text{Ca}]_{\text{diss}}}{[\text{Quin2}] - ([\text{Ca}]_{\text{solv}} + [\text{Ca}]_{\text{diss}})} \quad (\text{Eq.1-3})$$

ここで K_{Quin2} は Quin 2 とカルシウムの解離定数である。得られた [Ca]free を用いてアクチンと Ca^{2+} の結合定数 K を次式によって計算した。

$$K = \frac{[Ca]_{bound}}{[Ca]_{free} \cdot [Ca]_{diss}} \quad (\text{Eq.1-4})$$

K_{Quin2} の値には 38 nM を用いた (Estes *et al.*, 1987; Gershman *et al.*, 1991)。測定は 5 μM アクチン、0.6 mM ATP、2 mM Tris-HCl (pH7.5, 25 °C)、2 mM 2-メルカプトエタノール存在下で行った。

結果

Quin 2 によるカルシウム解離の時間変化

Quin 2 添加によるカルシウム解離の時間変化の例を Fig.1-4 に示す。ズブチリシンアクチンからの Ca^{2+} の解離量は未処理のアクチンに比して明らかに多く、 Ca^{2+} との親和性の低さが明らかになった。過剰の Mg^{2+} 添加 (Fig.1-4 矢印) によって全ての Ca^{2+} が解離するが、蛍光強度の最終値はアクチンとズブチリシンアクチンで一致しており、 Ca^{2+} 結合に対するストイキオメトリーには差異がないことが明らかになった。 Ca^{2+} の解離速度については、Quin 2 添加後および Mg^{2+} 添加後のいずれの場合においても、アクチンとズブチリシンアクチンの間で大きな違いは見出されなかった。この結果はズブチリシン処理が Ca^{2+} の解離速度 k_{24} に大きな影響を及ぼさないという前節の結果を支持していた。

スキッチャードプロットによる結合定数の算出

Ca^{2+} に対する結合定数を求めるために、種々の Quin 2 濃度で遊離 Ca^{2+} の平衡濃度の測定を行い、スキッチャードプロットしたものを Fig.1-5 に示す。上述のようにズブチリシン処理によるカルシウム結合のストイキオメトリーに対する影響はないので、1対1結合を仮定して最小二乗法によって Ca^{2+} の結合定数を算出した。その結果、アクチンで $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、ズブチリシンアクチンで $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ となり、ズブチリシン

ン処理によって Ca^{2+} の親和性が大きく低下していることが明らかになった。

Ca^{2+} の結合速度定数

前節においてシーケンシャルルートにおける Ca^{2+} の解離速度定数 k_{12} の値が算出されているので、本節で求めた Ca^{2+} の結合定数 (k_{21}/k_{12}) を用いて、 Ca^{2+} の結合速度定数を計算することが可能である。計算結果はアクチンにおいて $6.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、ズブチリシンアクチンでは $6.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。ズブチリシン処理によってアクチンのカルシウム結合速度は約 1/10 に低下していることが明らかになった。

要 約

Quin 2 を用いた Ca^{2+} の親和性測定から、ズブチリシン処理はシーケンシャルルートにも重大な影響を及ぼしていることが明らかになった。 Ca^{2+} の結合定数は $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、未処理のウサギ骨格筋アクチンに比して約 1/13 に低下していた。前節の結果および本節の Quin 2 添加後の蛍光強度の増加速度から明らかになったように、 Ca^{2+} の解離速度定数にズブチリシン処理が与える影響は小さく、本節で明らかになった低親和性は主に Ca^{2+} の結合速度が著しく低下していることに起因することが明らかになった。

第3節 ATP に対する結合親和性

アクチン溶液に EDTA などの 2 価の陽イオンに対するキレート試薬を添加すると、2 価陽イオンの濃度低下に伴いアクチンからのイオンの解離が起き、続いてヌクレオチドが解離し、その後アクチンは速やかに変性する (Lehrer & Kerwar, 1972)。この過程におけるヌクレオチドの解離は、低い 2 価イオン濃度下での反応であるため、第 1 節に記したシーケンシャルルートでの解離に相当する。本節ではこの変性反応のヌクレオチド依存性を調べ、みかけの変性速度を解析することによってシーケンシャルルートでの ATP 結合に及ぼすズブチリシン処理の影響を明らかにした。

実験方法

試料

アクチンは本章第 1 節の方法に従って調製した。

蛍光測定

前節に準じて行った。アクチンの内部蛍光の励起波長 297 nm、発光波長 329 nm で測定した。

ヌクレオチドの親和性測定

2 価イオンのキレート試薬によるアクチンの変性反応は以下のように表すことができる (Strzelecka-Gołaszewska *et al.*, 1985; Valentin-Ranc & Carlier, 1991; Kinosian *et al.*, 1993)。



ここで $A_{denatured}$ は不可逆的に変性したアクチンを示す。 K_N はアクチン (A) とヌクレ

オチド (N) の結合定数であり、 k_d はヌクレオチドおよび2価の陽イオンを結合していないアクチン (以下リガンドフリーアクチンと略す) の変性速度定数である。この反応はシーケンシャルルートでの反応であるため、本章第1節の速度定数を用いて、この結合定数を表記すれば、 $K_N = k_{12}/k_{21}$ となる (Fig.1-1)。

$A_{denatured}$ の生成速度である、みかけの変性速度定数 k_{app} はヌクレオチド濃度に依存し、その依存性は次式で表される (Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1985; Kinoshian *et al.*, 1993)。

$$k_{app} = k_d / (1 + K_N \cdot [N]) \quad (\text{Eq.1-6})$$

または、

$$1/k_{app} = 1/k_d + K_N \cdot [N] / k_d \quad (\text{Eq.1-7})$$

よってキレート試薬添加によるアクチンの変性速度のヌクレオチド濃度依存性から、ヌクレオチドの結合定数 K_N が算出可能である。

みかけの変性速度の測定は Lehrer & Kerwar (1972)の方法に従った。未変性アクチンから変性アクチンへの移行は、分子内のトリプトファンの微環境を変えるためにタンパク質分子の内部蛍光の強度変化を伴う。Lehrer & Kerwar (1972)によればアクチンの変性と内部蛍光の減少は平行に進行するので、この過程中の残存アクチンの量は次式で定義される規格化蛍光強度に比例すると考えられる。

$$\frac{FI(t) - FI(\infty)}{FI(0) - FI(\infty)} \quad (\text{Eq.1-8})$$

ここで $FI(t)$ は反応開始後 t 時間の蛍光強度である。したがって $FI(0)$ は未変性アクチンの蛍光強度に、 $FI(\infty)$ は変性アクチンの蛍光強度に相当する。変性反応が単一分子の1次反応ならば (Eq.1-5)、この規格化蛍光強度は単一指数関数的に減少し、時間に対する片対数プロットの傾きから一次の速度定数 k_{app} を求めることができる。

実際の測定は以下の手順で行った。アクチンを氷温下で 1 mM EDTA によって処理し、蛍光セル内で 25 °C に保った緩衝液[種々の濃度の ATP、2 mM Tris-HCl (pH7.5, 25 °C)、2 mM 2-メルカプトエタノール]に希釈して反応を開始し、蛍光強度変化を測定した。

結 果

みかけの変性速度の ATP 濃度依存性

これまでに報告されているシーケンシャルルートでの ATP の結合定数は、全く同じ測定原理に基づいたものでも大きく異なり収束した値を得ていない (Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1985; Nowak *et al.*, 1988; Valentin-Ranc & Carlier, 1989)。Kinosian *et al.* (1993)は、その原因を異なる ATP 濃度範囲で実験を行ったことによるイオン強度の違いによるものであると指摘している。そこで本実験では ATP 濃度を可能な限り低くし、60 μ M 以下での実験データに限定して解析を行った。

得られたみかけの変性速度定数の逆数を ATP 濃度に対してプロットしたものを Fig.1-6 に示す。Eq.1-7 より、このプロットの Y 軸切片はリガンドフリーアクチンの変性速度定数の逆数を示す。最小二乗法のフィティングによって得られた値は、アクチンで 0.09 s^{-1} 、ズブチリシンアクチンで 0.25 s^{-1} であった。ズブチリシン処理によってリガンドフリーアクチンの安定性が著しく低下していることが明らかになった。

Fig.1-6 の X 軸切片は ATP の結合定数の逆数を示す。最小二乗法によって得られた結合定数の値は、ズブチリシンアクチンにおいて $1.6 \times 10^5 M^{-1}$ 、未処理のアクチンにおいて $2.7 \times 10^5 M^{-1}$ であった。ズブチリシンアクチンでは、前節のカルシウムと同様に ATP の親和性も低下していることが明らかになった。

リガンドフリーアクチンの ATP 結合のキネティクス

シーケンシャルルートでの ATP との親和性の低さの要因を明らかにするために、

ATP 結合反応の速度定数の算出を行った。第 1 節で決定した k_{24}/k_{21} 、および第 2 節で算出した k_{21} を用いて ATP の解離速度定数 k_{24} を算出した。計算結果はアクチンで 9.0 s^{-1} 、ズブチリシンアクチンでは 2.6 s^{-1} であった。これらの値と本節で求めた ATP の結合定数 (k_{42}/k_{24}) を用いて、シーケンシャルルートにおける ATP の結合速度定数を算出した結果、アクチンおよびズブチリシンアクチンで $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。ズブチリシンによる限定分解は、アクチンの ATP 結合に関して、解離速度を低下させるとともに結合速度も低下させることが明らかになった。

要 約

シーケンシャルルートの ATP 結合の解離定数を測定し、ズブチリシン処理によって ATP の親和性が低下していることを明らかにした。また前節までに得られたキネティクスのパラメーターを用いて ATP 結合の解離および結合の速度定数を算出したところ、ズブチリシン処理はリガンドフリーアクチンにおける ATP の結合・解離を遅くしていることが明らかになった。

第4節 リガンドに対する低親和性の平衡への影響

前節までにズブチリシンによる分子内切断を受けたアクチンのコンプレックスルートおよびシーケンシャルルートでの ATP 結合の特性を明らかにした。本節では、これまでの結果を総括し、各平衡における分子内切断の影響がアクチン、ATP、Ca²⁺の3体の平衡全体に及ぼす影響を俯瞰するために、複合体の平衡濃度のシミュレーションを行った。

実験方法

平衡濃度の計算

本章第2節および第3節で求めた 25 °C におけるリガンドの結合定数を用いて溶液中の分子種の平衡濃度を算出した。Ca²⁺と ATP の結合定数は Nowak *et al.* (1988) に従い、 $8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ を用いた。計算は 50 μM アクチン、100 μM ATP で行った。計算手法は Perrin & Sayce (1967) の方法に従った。

結果

コンプレックスルートの結合定数の算出

シーケンシャルルートの Ca²⁺ の結合定数を K_I 、ATP の結合定数を K_{II} 、コンプレックスルートの Ca²⁺・ATP 複合体の結合定数を K_{III} 、溶液中の Ca²⁺ と ATP の結合定数を K_{IV} とすると (Fig.1-1)、平衡状態では熱力学的関係式、

$$K_I \cdot K_{II} = K_{III} \cdot K_{IV} \quad (\text{Eq.1-9})$$

が成立する。本章第2節で求めた Ca²⁺ のズブチリシンアクチンに対する結合定数値 $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と本章第3節で求めた ATP のズブチリシンアクチンに対する結合定数値

$1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、ならびに K_{IV} の文献値である $8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ を用いて (Perrin & Sayce, 1967; Nowak *et al.*, 1988)、ズブチリシンアクチンにおける 3 体複合体の結合定数を $5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と算出した。同様にして計算した未処理のアクチンにおける結合定数は $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ であった。コンプレックスルートでの ATP 結合はズブチリシン処理によって著しく弱められることが明らかになった。

コンプレックスルートの結合定数が算出されたので、Fig.1-1 のすべての平衡定数および速度定数を明らかにすることができた。その結果を Table 1-1 および Table 1-2 にまとめた。ズブチリシン処理によって最も影響を受けたのはコンプレックスルートでの $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合定数とシーケンシャルルートの Ca^{2+} の結合定数であった。結合定数はリガンドの解離速度定数と結合速度定数の比として表される。Table 1-2 にまとめられた結果は、ズブチリシンアクチンにおいてはすべての平衡において結合速度定数が遅くなることを示しており、このリガンド結合の遅さによってリガンドの親和性が低下していることが明らかになった。

リガンド低親和性の平衡への影響

上述のように算出された Fig.1-1 の平衡定数を用いて、種々のリガンド濃度での平衡状態におけるアクチンの分子種の偏りをシミュレーションすることが可能である。Fig.1-7 は $100 \mu\text{M}$ ATP 存在下での $50 \mu\text{M}$ アクチン分子種の平衡濃度を Ca^{2+} 濃度に対してプロットしたものである。ズブチリシン処理されていないアクチンでは $100 \mu\text{M}$ 以上の Ca^{2+} が存在する条件下では、ほぼ全てのアクチンが ATP および Ca^{2+} を結合した状態で存在することが明らかになった (Fig.1-7A)。一方、ズブチリシンアクチンでは $100 \mu\text{M}$ の Ca^{2+} が存在下においても、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上のアクチン分子が 3 体複合体を形成していなかった。また $200 \mu\text{M}$ の Ca^{2+} 存在下でも $0.02 \mu\text{M}$ のリガンドフリーアクチンが存在し、ズブチリシン未処理のアクチンに比して約 20 倍も不安定な状態のアクチンが存在した。実際の溶液中においては、このリガンドフリーアクチンは速やかに熱変性を起こすため、溶液中のアクチンの安定性には大きな影響を及ぼすことが示唆された。

要 約

本章第2節および第3節で得られた結果をもとに、ズブチリシンアクチンのリガンド結合の全体像を明らかにした。ズブチリシン処理によって、 Ca^{2+} の結合速度定数および $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合速度定数が著しく低下することによって、リガンドとの親和性が低下していた。その結果、溶液中ではリガンドフリー状態のアクチン分子が存在し、安定性が著しく低下していることが示唆された。

第5節 ヌクレオチドの相対親和性

本節ではズブチリシンによる分子内切断がアクチンのヌクレオチド結合領域の構造にどのような影響を与えているかを調べるために、ヌクレオチドの相対親和性を測定した。アクチンに結合したヌクレオチドは、主にリン酸基部位においてヌクレオチド結合領域のアミノ酸残基と多くの水素結合を形成している。またアデニン部位はヌクレオチド結合領域の疎水性ポケットと呼ばれる構造に埋め込まれていることが知られている (Kabsch *et al.* 1990)。本節においては、 ϵ -ATP と ATP の相対的な親和性からアデニン部分を取り囲む疎水性ポケットへの影響を調べ、ATP と ADP の相対的親和性測定からリン酸基結合部位への構造的な影響を調べることを試みた。

実験方法

試料

アクチンは本章第1節の方法に従って調製した。 ϵ -ATP 結合アクチンは、F-アクチンを $220,000\times g$ で沈殿させ、1 mM $MgCl_2$ 、60 mM KCl、1mM Tris-HCl (pH8.0, 4 °C) を含む溶液で懸濁し、 $220,000\times g$ で再沈殿させ、その沈殿を ATP の代わりに 0.2 mM の ϵ -ATP を含んだ G-バッファーで懸濁後、同バッファーで透析して調製した。

試薬

ADP はベーリンガーマンハイム (現ロッシュ) 社より購入した。その他の試薬は本章第1節に準じた。

タンパク質濃度の決定

ϵ -ATP を結合したアクチンは、予め紫外吸収測定によって濃度を求めたアクチンを標準として Bradford 法で決定した (Bradford, 1976)。

蛍光測定

本章第 1 節に従って行った。

ヌクレオチドの相対的な親和性の測定

Neidl & Engel (1979)の方法に従って、蛍光性 ATP アナログである ϵ -ATP と ATP または ADP を種々の比で共存させアクチンに対する競合結合を行った。蛍光測定時のブランク値を一定にするため、予め ϵ -ATP を結合したアクチンおよびズブチリシンアクチンを調製し、その溶液に種々の濃度の ATP または ADP を添加して平衡状態の ϵ -ATP の結合量を測定した。溶液条件は 0.5 μ M アクチン、0.2 mM CaCl_2 、2 mM Tris-HCl (pH 7.5, 25 $^{\circ}\text{C}$)、2 mM 2-メルカプトエタノールとした。

結果

ϵ -ATP と ATP の相対親和性

ϵ -ATP を結合したアクチンに対して ATP を添加するとヌクレオチドの交換に伴って蛍光強度の減少が起きる。その蛍光強度の終値は ϵ -ATP と ATP の比で決まる。したがって ATP による滴定曲線からアクチンに対する相対的な親和性が求められる (Neidl & Engel, 1979)。 ϵ -ATP を結合したズブチリシンアクチンを調製し、ATP によって滴定を行った結果を Fig.1-8 に示す。ズブチリシンアクチンの滴定曲線は対照である未処理のアクチンの滴定曲線と一致していた。相対的な親和性 $K_{ATP/\epsilon-ATP}$ を各ヌクレオチドの結合定数の比 ($K_{ATP}/K_{\epsilon-ATP}$) で定義し、Neidl & Engel (1979)の方法によって非線形最小二乗法によってフィッティングを行った。その結果、相対的親和性の値はアクチンで 4.7 ± 0.3 、ズブチリシンアクチンで 4.2 ± 0.3 であり、ズブチリシン処理による影響はわずかであった。このことからズブチリシン処理がアクチンのアデニン部位の識別には大きな影響を与えないことが示唆された。

次に ADP を用いた滴定曲線を Fig.1-9 に示す。ズブチリシンアクチンの滴定値は対

照のアクチンに比して低い値をとったが、カーブフィッティングの結果はズブチリシンアクチンにおいて $K_{ADP/\epsilon\text{-ATP}}$ は 0.018 ± 0.003 であり、対照としたアクチンの 0.015 ± 0.002 に対して 95 %の信頼区間で一致し、有意な差は見出されなかった。

ATP ならびに ADP による滴定結果から、ADP に対する ATP の相対親和性 $K_{ATP/ADP}$ を算出することが可能である。ズブチリシンアクチンにおいては 230 ± 60 、アクチンにおいては 310 ± 60 であった。

要 約

ϵ -ATP を結合したアクチンの ATP による滴定の結果、相対的な親和性はズブチリシンにおいてわずかに減少していた。また ADP による滴定結果においても両アクチンに有意な差は見出されなかった。このことから、ズブチリシン処理はアクチンにおけるヌクレオチドのアデニンおよびγ位のリン酸基の識別に大きな影響を与えないことが示された。

第6節 考察

本章ではアクチンをズブチリシンによって分子内切断したズブチリシンアクチンを対象に、ヌクレオチドおよび Ca^{2+} の結合を調べた。その結果、ズブチリシン処理によって Ca^{2+} との結合親和性および $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ 複合体との結合親和性が大きな影響を受けていることが明らかになった。 Ca^{2+} の結合定数は $2.6\times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、対象とした未処理のアクチンの約 1/10 に低下していた (Fig.1-5)。 $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合定数はさらに影響が大きく約 1/20 に低下していることが明らかになった (Table 1-1)。ヌクレオチドや 2 価イオンの親和性の低下は、リガンドの解離速度の増加または結合速度の低下によって起きるが、ズブチリシンアクチンにおいては結合速度定数の低下が顕著であった (Table 1-2)。シーケンシャルルートでの ATP の結合速度定数および Ca^{2+} の結合速度定数は、ウサギ骨格筋アクチンに対して、それぞれ約 1/5、1/10 に減少していた。またコンプレックスルートにおいても $\text{ATP}\cdot\text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合速度定数は約 1/8 に低下していた。

これまでに報告されているアクチンの結晶構造の多くは、ヌクレオチドや 2 価イオンがアクチンのクレフトに深く埋め込まれている (Kabsch *et al.*, 1990; McLaughlin *et al.*, 1993; Otterbein *et al.*, 2001)。そのためにヌクレオチドの交換が起きるにはクレフトを開けるような何らかの構造変化が必要である。そのようなドメイン間の動きが起こりうることはノーマルモード解析によるコンピューターシミュレーションによって予測されており (Tirion *et al.*, 1993)、また X 線回折でも β アクチンとプロフィリンの複合体ではドメイン間が開いた“open state”の構造が解かれている (Chik *et al.*, 1996)。したがってアクチンのヌクレオチド交換は、“closed state”と“open state”のゆらぎによって制御されると考えられる (Wriggers & Schulten, 1997)。上述のようにズブチリシンアクチンのリガンドに対する低親和性は、解離速度の増大ではなく結合速度定数の低下によってもたらされていた。また本章第 4 節においてヌクレオチドの識別という機能からはヌクレオチド結合領域の構造に大きな影響が見出されなかった。これらの事実からズブチリシンによる分子内切断はアクチン分子のゆらぎの低下を引き起

こし、その結果リガンドに対する親和性を低下させると考えられた。Kikumoto *et al.* (2003) はズブチリシンアクチンの部分比容および断熱圧縮率を測定し、それらが未処理のアクチンに比して有意に小さいことから、ズブチリシン処理によるアクチンの熱力学的柔軟性の低下を指摘しており、上述の推論を支持している。

本章における ATP の親和性測定の解析から、リガンドフリー状態のアクチンの変性速度定数を求めることが可能であった (Fig.1-6)。変性速度定数の値はズブチリシンアクチンにおいて 0.25 s^{-1} であり、未処理のアクチンに比して 2.8 倍大きいことが明らかになった。この変性速度定数の違いは、ズブチリシンアクチンにおいてはリガンドとの親和性が低いため、特に深刻な影響を与えると考えられた。第 4 節における溶液内の分子種濃度のシミュレーションの結果は、本来のアクチンの場合には殆ど存在しないリガンドフリーの状態の分子種が、G-アクチンに関する実験においてしばしば用いられる G-バッファー (ATP 濃度 $100 \sim 200 \mu\text{M}$ 、 Ca^{2+} 濃度 $100 \sim 200 \mu\text{M}$) 中においてもズブチリシン処理アクチンにおいては約 20 倍も多く存在するからである (Fig.1-7)。

ズブチリシン処理はアクチンのヌクレオチドや Ca^{2+} との親和性を大きく変えてしまうが、ヌクレオチド結合の Ca^{2+} による制御は同じキネティクスで解析することが可能であった (Fig.1-2, Fig.1-3)。例えば、第 1 節で明らかになったズブチリシン処理がカルシウムの解離速度には大きな影響を与えないという事実は (Fig.1-3)、Quin 2 を用いた実験においても定性的に確認できた (Fig.1-4)。また定量的にも Quin 2 の蛍光強度の増加速度と交換反応から得られた速度定数との間に十分な整合性があることが明らかになった。したがって本章で用いた種々の解析手法は、変性速度やリガンド親和性が大きく異なるアクチンに対しても有効であり、比較生化学的実験に適用可能であることが示された。

Table 1-1 Comparison of overall equilibrium values between subtilisin-treated and intact actin
(pH7.5, 25 °C)

Actin	$K_I (\text{Ca}^{2+})$	$K_{II} (\text{ATP})$	$K_{III} (\text{Ca}^{2+} \cdot \text{ATP})$	K_{IV}^*
Subtilisin-treated	$2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	$1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$5.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	$8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
Intact	$3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	$8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

* Literature value (Perrin & Sayce, 1967; Nowak *et al.*, 1988)

Table 1-2 Kinetic parameters for nucleotide and cation bindings to actin

(pH7.5, 25 °C)

Actin	k_{12} (s^{-1})	k_{21} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{24} (s^{-1})	k_{42} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{13} (s^{-1})	k_{31} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Subtilisin-treated	0.026	6.8×10^5	2.6	4.3×10^5	8.5×10^{-4}	4.3×10^4
Intact	0.020	6.9×10^6	9.0	2.4×10^6	3.0×10^{-4}	3.6×10^5

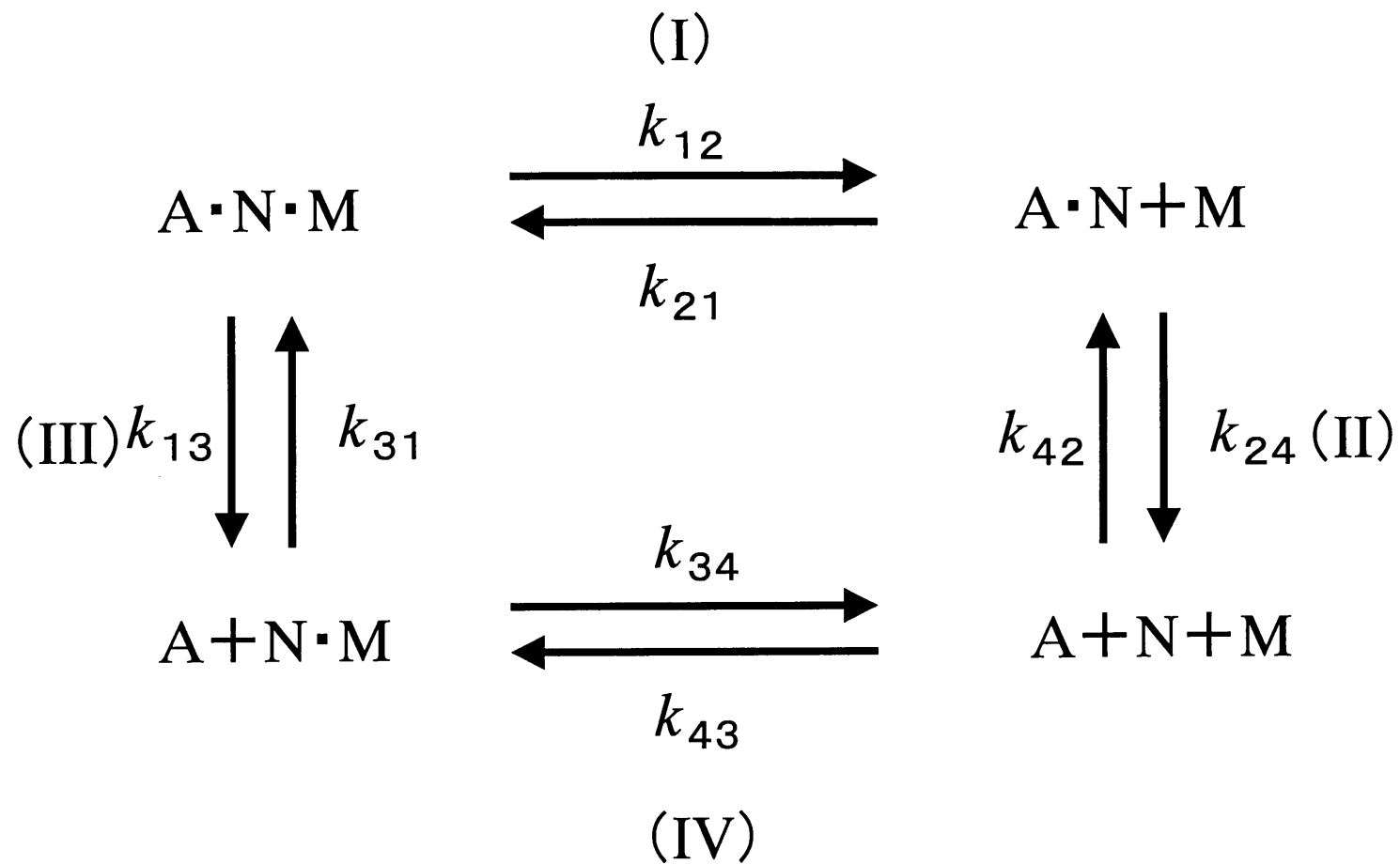


Fig. 1-1 Model of equilibria between free and bound nucleotide and divalent cation in G-actin solution.

Actin, nucleotide and divalent cation are denoted by A, N and M, respectively.

[1×10⁻³]

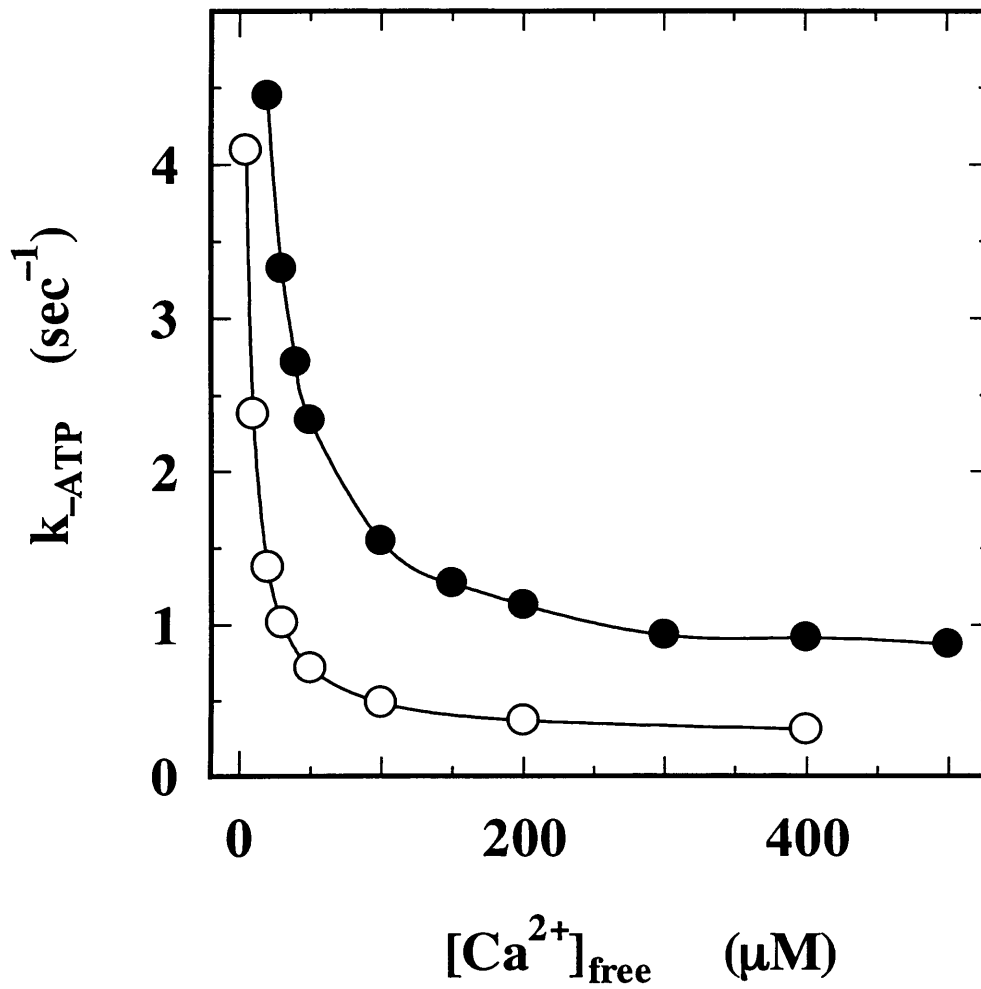


Fig. 1-2 The dependence of the apparent dissociation rate of ATP on free Ca²⁺ concentration. The apparent dissociation rates are plotted *versus* free Ca²⁺ concentration. Open circles represent data for intact actin. Closed circles represent those for subtilisin-treated actin. Conditions: 0.5 μM intact or subtilisin-treated actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 200 μM e-ATP, pH7.5 and 25°C.

$[\times 10^{+2}]$

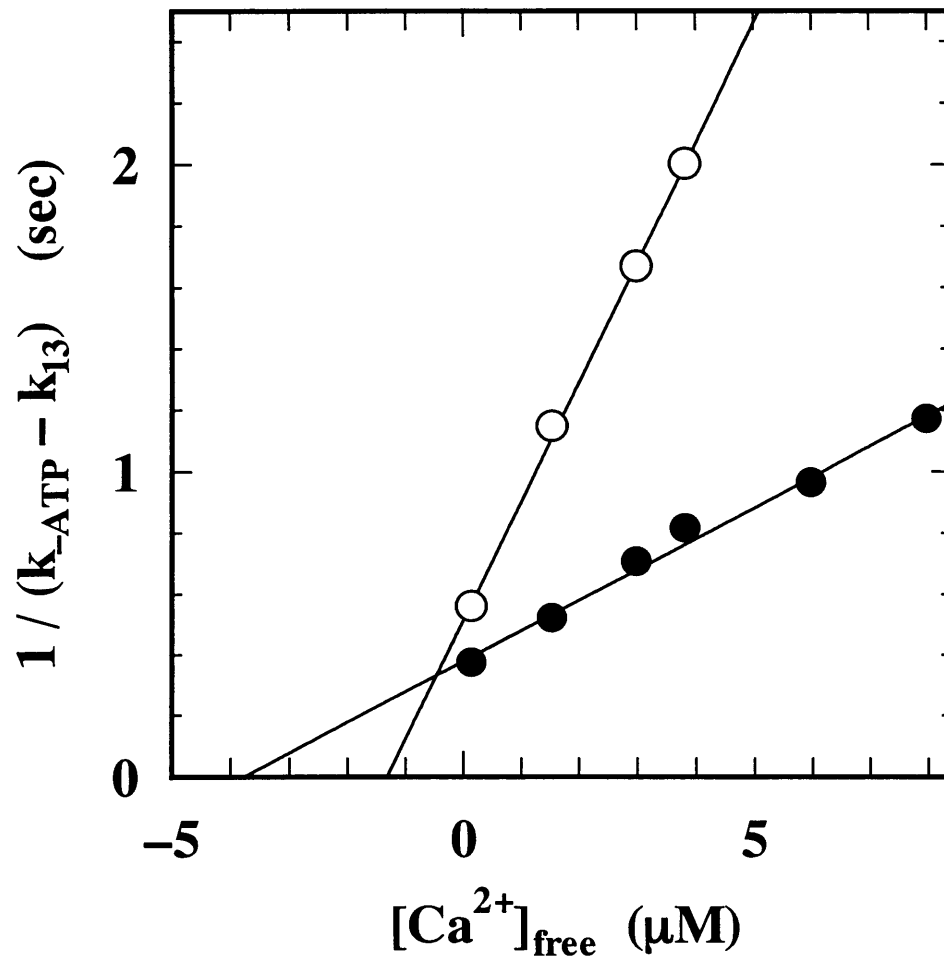


Fig. 1-3 The dependence of the rate of the sequential dissociation of ATP on free calcium concentration. The reciprocals of $(k_{ATP} - k_{13})$ are plotted *versus* free calcium Ca^{2+} concentration. open circles, intact actin; closed circles, subtilisin-treated actin. Solid lines show the results of linear least-squares analysis. Conditions are the same as in the legend to Fig.1-2.

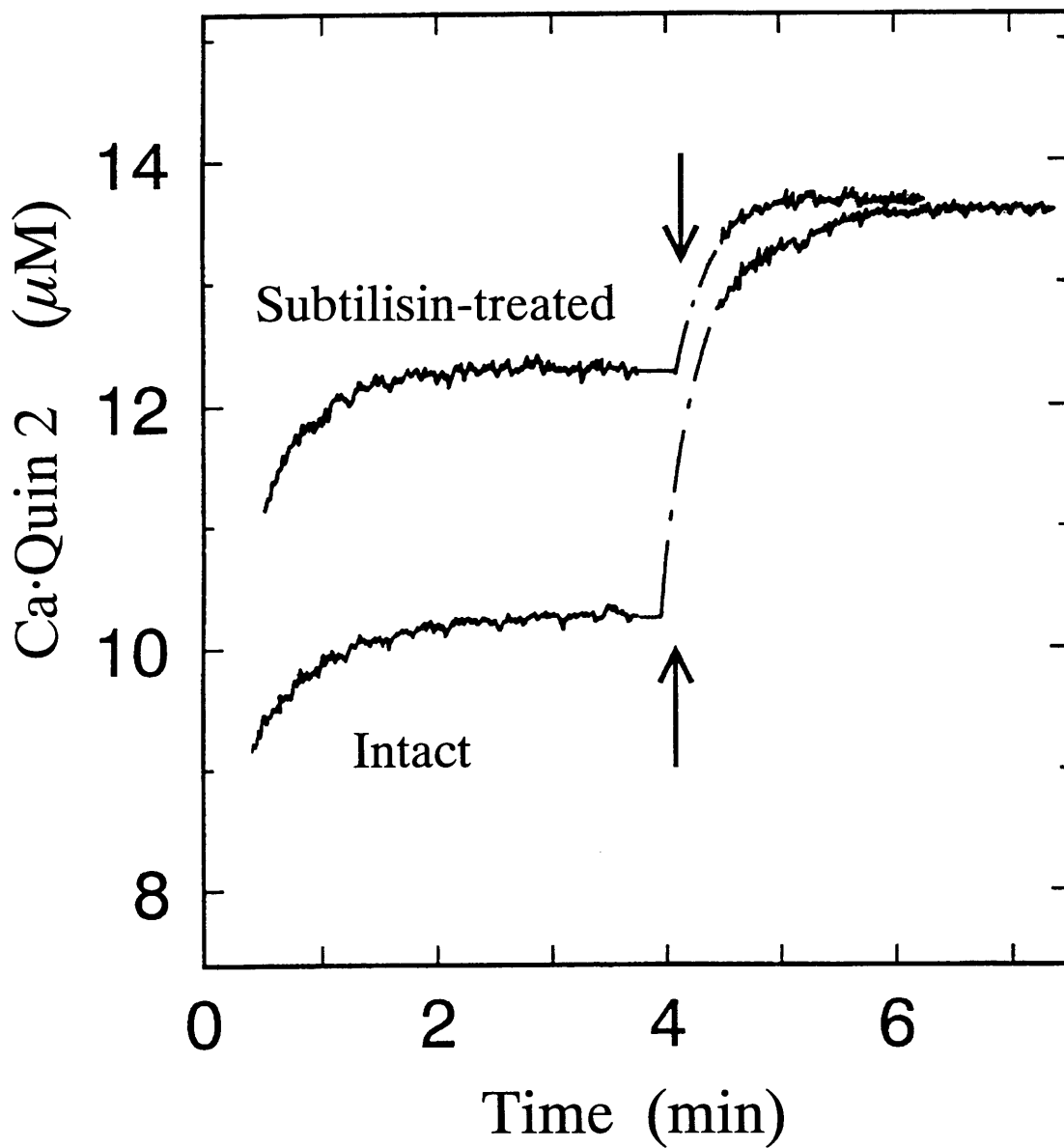


Fig. 1-4 Time course of Ca^{2+} dissociation induced by Quin 2. Time course of Ca^{2+} dissociation was monitored in terms of fluorescence of Quin 2. At time=0, Quin 2 was added to $5 \mu\text{M}$ G-actin solution. After the release of Ca^{2+} had reached a plateau, the remaining bound Ca^{2+} was replaced by the addition of $100 \mu\text{M}$ Mg^{2+} (indicated by the arrow). The ordinate represents Ca·Quin 2 concentration, which was converted from the fluorescence intensity of Quin 2 by using a calibration curve. The amount of Ca^{2+} derived from G-buffer was $8.5 \mu\text{M}$.
 Conditions: 5 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, $600 \mu\text{M}$ ATP, $50 \mu\text{M}$ Quin 2, pH7.5 and $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

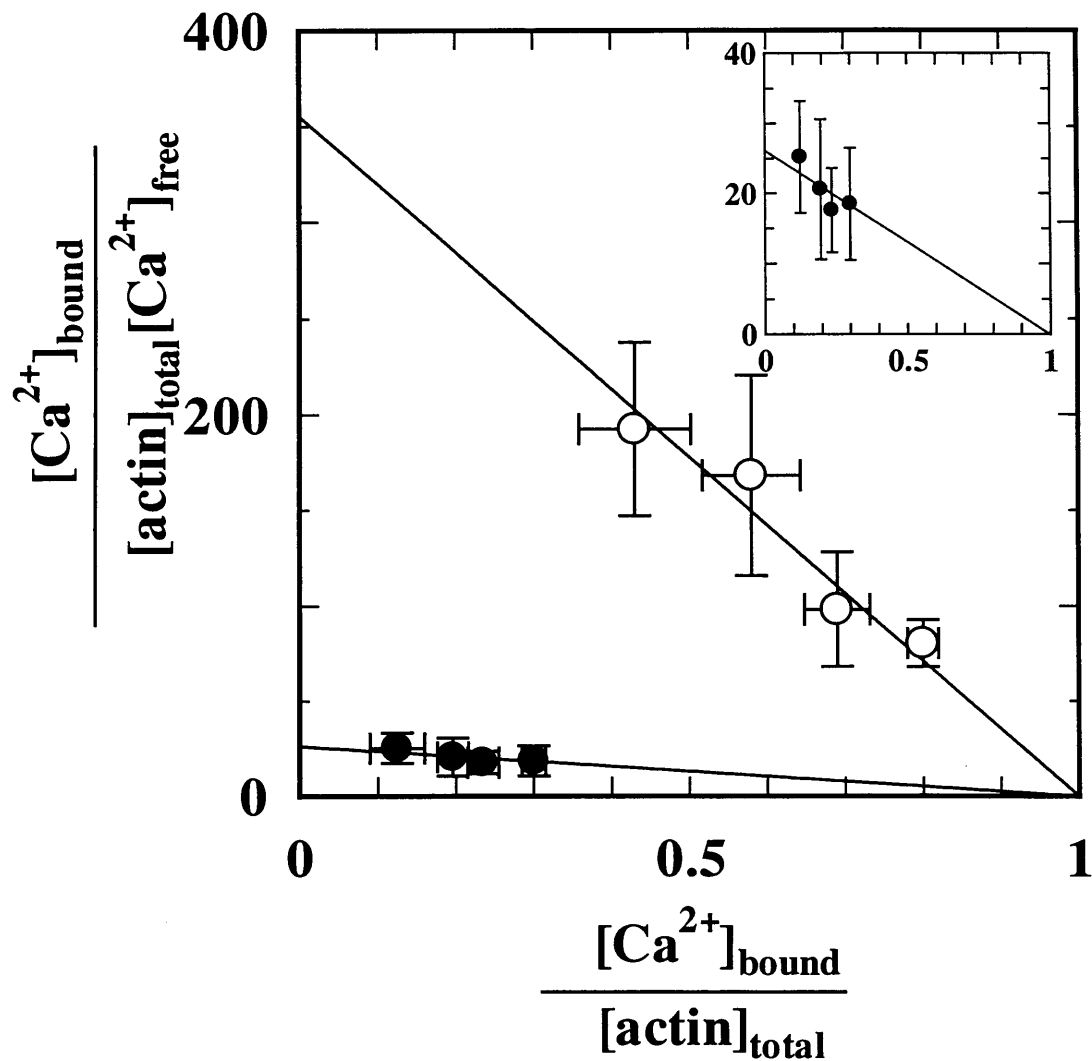


Fig. 1-5 Scatchard plots of equilibrium binding of Ca^{2+} . Scatchard plots of equilibrium binding to intact G-actin (open circles) and subtilisin-treated G-actin (closed circles) are shown. Error bars indicate standard deviation for 3-4 experiments. Solid lines show the results of linear least-squares analysis with the assumption of 1:1 binding. Conditions: $5 \mu\text{M}$ intact or subtilisin-treated actin, 5 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, $600 \mu\text{M}$ ATP, pH7.5 and $25 \text{ }^\circ\text{C}$. The inset shows the same data for subtilisin-treated actin with another scale of the ordinate.

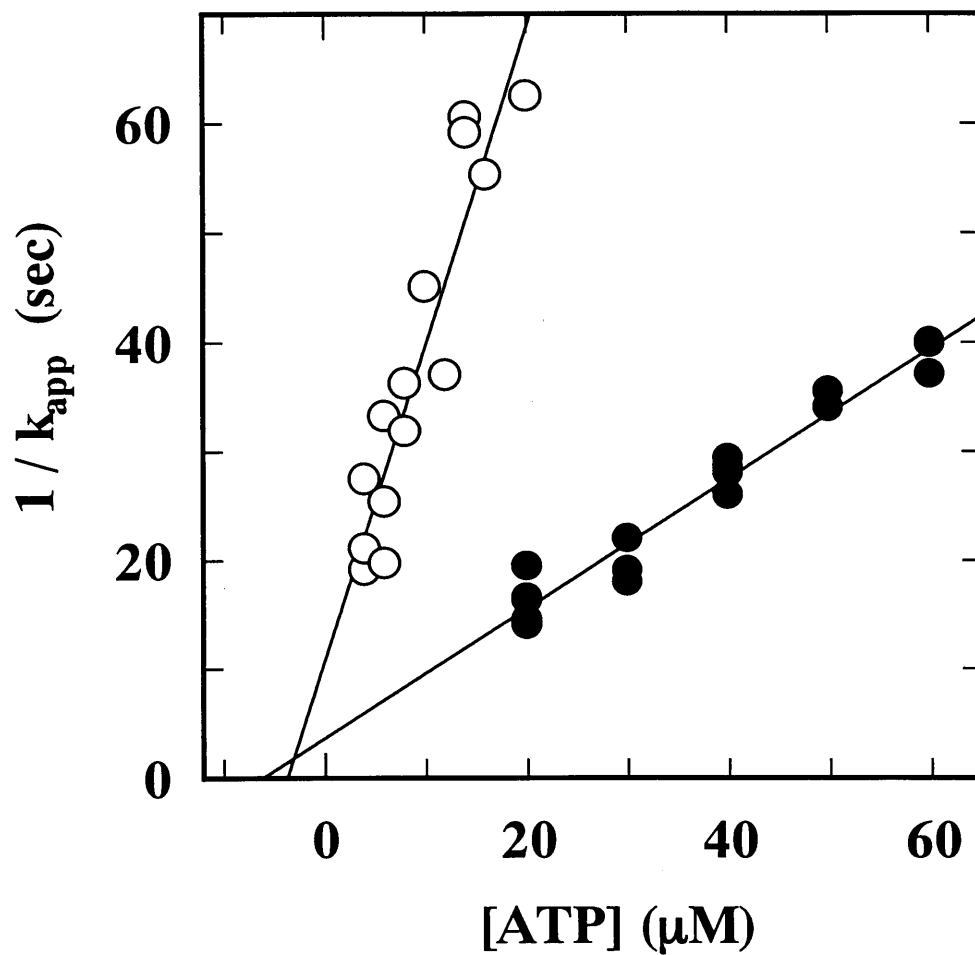


Fig. 1-6 The dependence of the denaturation rate on ATP concentration. The apparent rates of the denaturation induced by the removal of tightly bound cation was measured at various concentrations of ATP. The reciprocals of the rates are plotted versus ATP concentrations. (open circles, intact actin; closed circles, subtilisin-treated actin). Conditions: 2 μM intact or subtilisin-treated actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH7.5 and 25 °C.

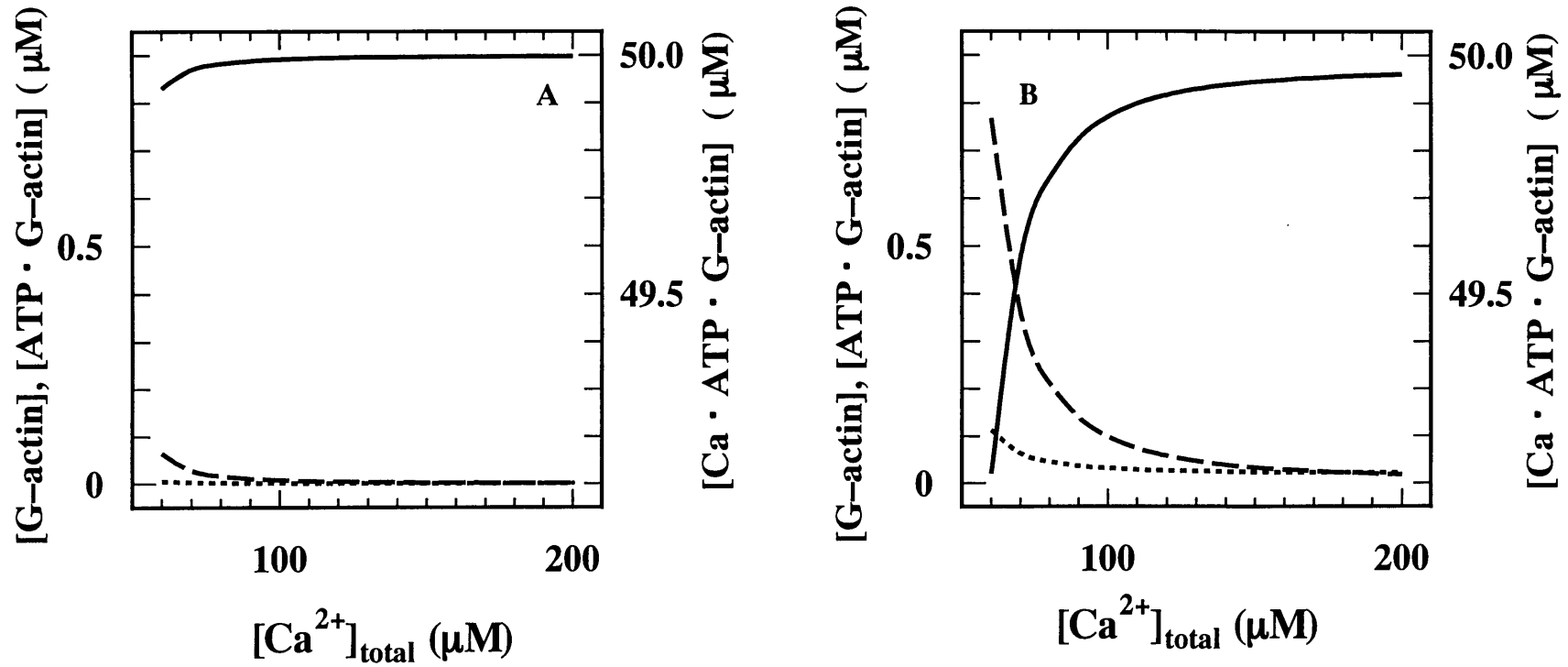


Fig. 1-7 Calculation of the equilibrium concentrations. The concentrations of G-actin species present at equilibrium were calculated at the desired amount of calcium. Concentrations of $Ca^{2+} \cdot ATP \cdot actin$ (solid line), $ATP \cdot actin$ (dashed line), and ligand free actin (dotted line) are plotted as a function of total calcium concentration. A, intact actin; B, subtilisin-treated actin. The concentration of $Ca^{2+} \cdot ATP \cdot actin$ is represented on the right-hand axis.

Conditions: 50 μM total actin, 100 μM ATP, pH7.5 and 25 $^{\circ}C$.

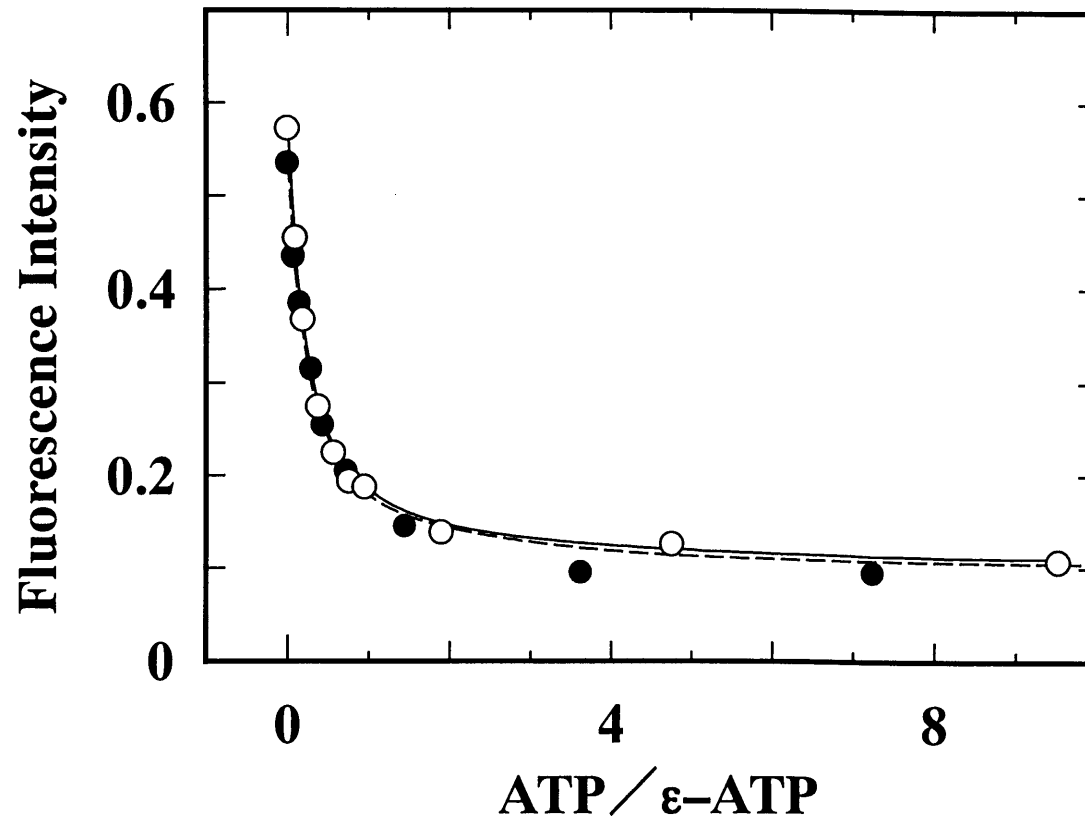


Fig. 1-8 Relative binding constant of ATP and e-ATP. The fluorescence intensity of e-ATP·actin complex is plotted versus ATP concentration ratio. Theoretical curves were calculated with $K_{\text{ATP}}/K_{\text{e-ATP}} = 4.7$ (solid line) and 4.2 (dashed line) for intact and subtilisin-treated actin.

Conditions: 0.5 μM actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 200 μM free Ca^{2+} , pH7.5 and 25 $^{\circ}\text{C}$.

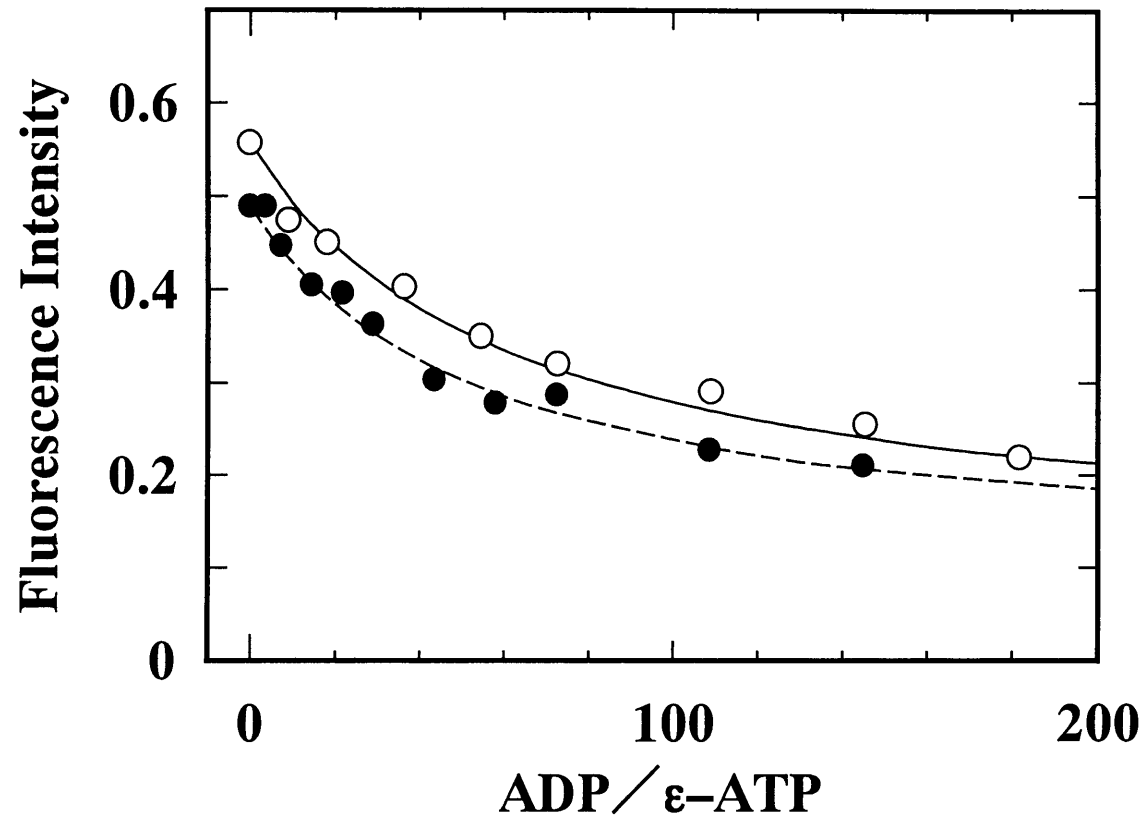


Fig. 1-9 Relative binding constant of ADP and e-ATP. The fluorescence intensity of e-ATP•actin complex is plotted versus ADP concentration ratio. Theoretical curves were calculated with $K_{ADP}/K_{\epsilon-ATP} = 0.015$ (solid line) and 0.018 (dashed line) for intact and subtilisin-treated actin, respectively.

Conditions: 0.5 μM actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 200 μM free Ca^{2+} , pH7.5 and 25 °C.

第2章 コイ骨格筋アクチンとヌクレオチドおよび Ca^{2+} の結合親和性

序論で述べたように、変温動物間では骨格筋アクチンにおいても熱安定性や重合に伴うエンタルピー変化などの生物物理化学的な性質が、広く異なっていることが知られている (Swezey & Somero, 1982; 1985)。魚類骨格筋アクチンにおいては、アクチン試料の調製の際に ATP を必須とする特徴があり (Kitao *et al.* 1973)、ヌクレオチドとの結合には恒温動物骨格筋アクチンとの大きな違いがあると考えられてきた。Morita (2003)は深海魚の高圧耐性を明らかにするために、ニワトリ骨格筋アクチンと数種の魚類骨格筋アクチンについてヌクレオチドおよびカルシウムの解離速度や重合能の比較を行った。その結果から、大気圧下においてもコイ *Cyprinus carpio* 骨格筋アクチンおよび非深海性のソコダラ科のイバラヒゲ *Coryphaenoides acrolepis* の骨格筋アクチンでは、ニワトリ骨格筋アクチンに比してヌクレオチドの解離速度が大きいことが明らかになっている。したがって魚類骨格筋アクチンの生物物理化学的な特性を明らかにするためには、ヌクレオチドならびに2価陽イオンとの結合の差異を調べることが有効だと考えられた。

第1章においてはズブチリンによって分子内切断したアクチンのヌクレオチド交換速度や2価イオンのキレート試薬による変性過程、およびカルシウムの親和性を解析することによってズブチリン処理の影響を詳細に明らかにすることができた。それらの結果からは、ヌクレオチドの結合親和性ばかりでなくリガンドフリーのアクチンの変性速度定数の算出、さらにはズブチリン処理によるアクチン分子のゆらぎへの影響を考察することも可能であった。

そこで本章では第1章と同様に、はじめに ϵ -ATP を用いて魚類骨格筋アクチンにおけるヌクレオチド結合のカルシウム制御のスキームを確認し、さらにヌクレオチドとカルシウムの結合親和性の測定を行った。また ATP 結合過程の熱力学的な解析を行い、次章において魚類骨格筋アクチンのヌクレオチド結合領域の構造を明らかにするための知見を得た。

魚類骨格筋においては恒温動物の骨格筋とは異なり、2種類のアクチンアイソフォームの発現があることが報告されている (Morita, 2000; 2003)。そこで本章ではアイソフォームの発現がないことが明らかになっているコイ骨格筋速筋のアクチンを対象とした (Watabe *et al.*, 1995)。

第1節 ATP および ADP に対する結合親和性

第1章では、変性速度定数が大きくリガンドとの親和性が大きく低下しているズブチリンアクチンについても従来のヌクレオチド交換反応のカルシウム濃度依存性、ヌクレオチドの結合定数、2価イオンの結合定数の測定方法が有効であることを示した。

本節ではコイ骨格筋アクチンを対象にして、ヌクレオチド交換反応における Ca^{2+} の影響を調べ、アクチンのヌクレオチドおよび2価イオンの交換スキームの妥当性を確認した。その際に第1章で用いたウサギ骨格筋アクチンと同じアミノ酸配列を有するニワトリ骨格筋アクチンを対照試料とした。

実験方法

試料

コイ *Cyprinus carpio* (体重 0.6-1.2 kg) は津市内の丸三商店より購入した。延髄刺殺し、背部骨格筋を採取し、Strzelecka-Gołaszewska *et al.* (1980)の方法によってアセトンパウダーを調製した。ニワトリ *Gallus gallus* 骨格筋は、津市内の小売店で精肉として胸筋を購入、もしくは生体を購入し、刺殺・脱血を行った後、胸筋を採取した。アセトンパウダーは Pardee & Spudich (1982)の方法によって調製した。第1章第1節の方法に従ってアクチンの抽出・精製を行った後、さらに Sephadex G-150SF (GE Healthcare)によりゲル濾過を行った。ADP 結合型アクチンの調製は、以下のように行った。ATP 型アクチンを、ATP を含まない高イオン強度の緩衝液で重合させ、遠心 ($220,000 \times g$) によって沈殿させた。沈殿を 0.5 mM ADP、0.1 M KCl、1 mM MgCl_2 、5 mM Tris-HCl (pH 8.0)からなる緩衝液に2時間浸漬した後、超音波破碎機を用いて水中でホモジナイズし、再び遠心分離 ($220,000 \times g$) によって沈殿させた。このサイクルをもう一度繰り返し、ATP の代わりに 400 μM ADP を含む G-バッファーに透析して

調製した。

アクチンの濃度決定

アクチンのタンパク濃度は、290 nm の紫外吸収を測定し、コイ骨格筋アクチン、ニワトリ骨格筋アクチンともに吸光係数 $0.63 \text{ cm}^2/\text{mg}$ を用いて決定した (Houk & Ue, 1974)。

ATP 濃度の測定

ATP の濃度は 259 nm での紫外吸収により、モル吸光係数 $15.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて決定した。

ATP 交換速度の測定

第 1 章第 1 節の方法に準じて Tris-HCl (pH8.0, 20 °C) で行った。

ヌクレオチドの結合定数およびリガンドフリーアクチンの変性速度の測定

第 1 章第 1 節の方法に従って行った。

結 果

ATP の交換速度

コイ骨格筋アクチンにおける $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の解離速度を求めるために、種々の Ca^{2+} 濃度のアクチン溶液に ϵ -ATP を添加し、蛍光強度の増加速度からヌクレオチドの交換速度を測定した (Fig.2-1)。コイ骨格筋アクチンにおいてもヌクレオチドの交換速度は Ca^{2+} 濃度によって強く依存し、恒温動物骨格筋アクチンのヌクレオチド交換スキーム (Fig.1-1) に従うことが確認された。ヌクレオチド交換速度は対照としたニワトリ骨格筋アクチンと同様に Ca^{2+} 濃度が $200 \mu\text{M}$ 以上では一定になった。この値は第 1 章第 1 節の Eq.1-1 の $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の解離速度定数 k_{13} に相当し、コイ骨格筋アク

チンにおいて $3.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった。すなわちコンプレックスルートでの解離速度はニワトリ骨格筋アクチンに比して約 6.6 倍速いことが明らかになった。また ATP 濃度を 0 に外挿した値は両アクチンで大きく異なり (Fig.2-1)、コイ骨格筋アクチンにおいてはシーケンシャルルートでの Ca^{2+} の解離速度定数 k_{12} が大きいこと示唆された。非線形最小二乗法による解析では、 k_{12} の値はコイおよびニワトリ骨格筋アクチンにおいて、それぞれ 0.233 s^{-1} 、 0.061 s^{-1} であった。

EDTA 添加による変性反応

第 1 章で 2 価イオンを EDTA によってキレートすることに伴うアクチンの変性過程を 297 nm 励起の内部蛍光によって解析した。アクチンの内部蛍光を 297 nm で励起した場合、その蛍光はトリプトファンに寄与が大きい (Lehrer & Kerwar, 1972)。コイ骨格筋アクチンのアミノ酸配列におけるトリプトファンの数および一次構造上の位置はニワトリ骨格筋アクチンと同じであるが、コイ骨格筋アクチンにおいても同法が適用できるかを確認するために、EDTA 添加によるアクチンの自然蛍光のスペクトル変化をコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンで比較した (Fig.2-2)。EDTA による変性前後の自然蛍光において、コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンとの間に差は見られず、トリプトファン周辺の微環境は未変性状態においても変性状態においても相違がないことが示された。

そこで EDTA 添加による変性反応を見た。Fig.2-3 に一例として ATP 濃度 $15 \mu\text{M}$ の蛍光強度変化を示した。蛍光強度の減少はコイ骨格筋アクチンにおいてより速やかに起きていることが明らかであった。その減少曲線の対数プロットは変性初期から終期まで一次式で近似可能であり (Fig.2-3 inset)、コイ骨格筋アクチンにおいても第 1 章の変性の反応式 (Eq.1-5) に従うことが示された。線形最小二乗法によってフィッティングを行い、みかけの変性速度を算出したところ、コイ骨格筋アクチンにおいて 0.038 s^{-1} であり、対照のニワトリ骨格筋アクチンにおいては 0.023 s^{-1} であった。

ATP との結合親和性

上述のようにコイ骨格筋アクチンはニワトリ骨格筋アクチンに比して EDTA によるみかけの変性速度が大きいことが明らかになった。そこで種々の ATP 存在下で見かけの変性速度を測定した。Fig.2-4 に 20 °C における、みかけの変性速度の ATP 濃度依存性を示した。いずれの ATP 濃度においてもコイ骨格筋アクチンの変性速度はニワトリ骨格筋アクチンに比して大きい、その差は高濃度側でより顕著であり、ATP 濃度が 0 に漸近するにしたがってニワトリ骨格筋アクチンの変性速度と一致する傾向が見られた。これはリガンドフリーアクチンの安定性が両アクチンで同じであることを示唆しており、コイ骨格筋アクチンの変性速度の大きさが主に ATP との低親和性に起因すると考えられた。そこで親和性の低下を第 1 章の Eq.1-7 によって定量化するために、みかけの変性速度の逆数プロットを行って解析した (Fig.2-5)。このプロットの X 軸切片から ATP の結合定数を算出したところ、コイ骨格筋アクチンにおいては $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20 °C)、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (20 °C) であった。また Fig.2-5 の Y 軸切片から求めたリガンドフリーアクチンの変性速度定数の値は、コイ骨格筋アクチンにおいて $0.062 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ 、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては $0.067 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$ であり、互いに 95 %信頼区間内であった。すなわちリガンドフリー状態のアクチンの安定性には両アクチンの間に有意な差がないことが明らかになった。

ATP との結合親和性の温度依存性

コイ骨格筋アクチンの ATP に対する結合定数および変性速度定数の温度依存性を調べるために、15 および 25 °C において同様の実験を行った (Fig.2-6)。得られた ATP に対する結合定数と変性速度定数を Table 2-1 にまとめた。いずれの温度においてもコイ骨格筋アクチンの ATP に対する親和性はニワトリ骨格筋アクチンに比して低いことが明らかになった。また変性速度定数については、いずれの温度においても実験誤差内でニワトリ骨格筋アクチンと一致することが明らかになった。また、この変性速度定数は測定温度の上昇に伴って大きくなり、これが熱変性速度定数であることを示

していた。

ADP との親和性

骨格筋アクチンの結晶構造は、ATP もしくはその構造アナログである AMPPNP を結合した ATP 型アクチンと ADP を結合した ADP 型アクチンについて解かれている (Kabsch *et al.*, 1990; Otterbein *et al.*, 2001)。両アクチンの構造は、サブドメイン 2 上の DNase I 結合ループのコンフォメーションが異なること除けば、その差異は小さい。特にヌクレオチド結合領域においては、 γ 位のリン酸基の部位と相互作用する水素結合の有無、および 2 価陽イオンの位置の変動のみが主たる差異であることが知られている。したがって ATP の結合と ADP の結合を比較することによって γ 位のリン酸基部位のアクチンへの結合に関する知見を得ることができると考えられた。

そこで ADP 型アクチンを対象にして、上述の EDTA 添加による変性の速度定数のヌクレオチド濃度依存性を調べた (Fig.2-7)。その結果、ATP 型アクチンの場合と同様に ADP 型アクチンにおいてもコイ骨格筋アクチンのみかけの変性速度はニワトリ骨格筋アクチンに比して大きいことが明らかになった。両アクチンの速度定数の ADP 濃度依存性における差異は、ATP 型アクチンの場合 (Fig.2-6) と類似していた。すなわち高濃度側で両アクチンの差が顕著であり、ATP 濃度を 0 に外挿することによって、みかけの変性速度が一致する傾向が見られた。このことから ADP 型アクチンにおいてもコイ骨格筋アクチンのヌクレオチドに対する低親和性が確認された。Eq.1-7 によって算出された ADP との結合定数は、コイ骨格筋アクチンにおいては $1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20 °C)、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては $5.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20 °C) であった。コイ骨格筋アクチンでは ADP に対する親和性も低下しており、ニワトリ骨格筋のヌクレオチド結合との違いは γ 位のリン酸基以外の部位にあることが示唆された。また変性速度定数はコイ骨格筋アクチンにおいて $0.070 \pm 0.011 \text{ s}^{-1}$ であり、ATP 型アクチンの実験結果とよく一致していた。

要 約

コイ骨格筋アクチンのヌクレオチドの結合親和性を測定した。その結果、ATP との結合定数は $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20 °C)、ADP との結合定数は $1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20 °C) であり、いずれも対照としたニワトリ骨格筋アクチンに比して小さいことが明らかになった。一方、リガンドフリーの状態の変性速度定数においては、両アクチンに有意な差はなく、この状態のアクチンの安定性は同じであることが示された。

第2節 Ca^{2+} に対する結合親和性

魚類骨格筋アクチンと Ca^{2+} の相互作用については、Quin 2 を用いた Ca^{2+} の解離速度を調べた報告がある (Morita, 2003)。Morita によればコイ骨格筋アクチンを含む 4 魚種のアクチンと対照としたニワトリ骨格筋アクチンでは大気圧下での Ca^{2+} の解離速度には差異はない。しかしながら第 1 章で明らかになったズブチリシンアクチンの例のように、 Ca^{2+} の解離において速度の差異がない場合においても結合速度定数の低下による親和性の変化が起きる可能性がある。そこで本節においては、第 1 章第 2 節の方法によってコイ骨格筋アクチンの Ca^{2+} の結合定数の測定を行った。

実験方法

試料

アクチンの調製および濃度決定は本章第 1 節に従った。

カルシウム濃度の測定

第 1 章第 2 節に準じ、Quin 2 の蛍光を用いて標準添加法によって求めた。

カルシウムの結合定数の測定

第 1 章第 2 節に準じて行った。但し、溶液中の ATP 濃度は $200 \mu\text{M}$ とした。

結果

Quin 2 との Ca^{2+} の競合結合

Ca^{2+} の結合定数を求めるために Quin 2 との競合結合実験を行った。Fig.2-8 に $200 \mu\text{M}$ ATP 存在下での、 $10 \mu\text{M}$ アクチンと $50 \mu\text{M}$ Quin 2 との競合結合における蛍光強度の時

間変化を示した。コイ骨格筋アクチンにおいては、Quin 2 添加後の平衡に達した際の蛍光強度値が大きく、 Ca^{2+} に対する親和性が低くなっていることが示唆された。 Mg^{2+} 添加による、すべての結合カルシウムの放出後の蛍光強度には、コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンで違いは見出されず、アクチンとカルシウムの結合のストイキオメトリーに差異がないことが明らかになった。

Quin 2 添加ならびに Mg^{2+} 添加後に平衡に到達するまでのコイ骨格筋アクチンでの蛍光強度上昇速度は、ニワトリ骨格筋アクチンの場合に比して速く、平衡に達するまでのハーフタイムはコイ骨格筋アクチンで 9 s、ニワトリ骨格筋アクチンで 30 s であった。これらのことからコイ骨格筋アクチンでは Ca^{2+} の解離速度定数が大きく、その結果、 Ca^{2+} に対する親和性が低くなっていることが示唆された。この結果は先述の Morita (2003) の報告とは一致していない。この不一致が Morita (2003) のデータが低温 (4 °C) で行われていることに対して、本実験での測定温度が 25 °C であることに起因する可能性はあるが詳細は不明である。

Ca^{2+} の結合定数の決定

コイ骨格筋アクチンにおける Ca^{2+} の結合定数を求めるために、20-300 μM の濃度範囲の Quin 2 存在下で Ca^{2+} の平衡濃度を求めた。Quin 2 混合の際に一過性の濃度不均一が生じるため、各実験によって得られた平衡濃度に大きな変動が生じた。Student's t 検定を行ったところコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンで 95 %以上の信頼度で有意な差が検出された。そこで結合定数を算出するためにスキッチャードプロットを試みた (Fig.2-9)。上述のように Ca^{2+} 結合のストイキオメトリーには両アクチンで差異がないのでアクチンと Ca^{2+} の 1 対 1 の結合が仮定できる。最小二乗法によって X 軸切片を求めたところ、コイ骨格筋アクチンにおいて $6.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、ニワトリ骨格筋アクチンの場合の $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ に比して小さいことが明らかになった。

要 約

Quin2 との Ca^{2+} の競合結合実験によってコイ骨格筋アクチンの Ca^{2+} に対する結合定数を求めたところ、 $6.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、 Ca^{2+} に対する親和性は同条件のニワトリ骨格筋アクチンの場合に対して約 1/2 になっていることが明らかになった。また親和性低下の要因として Ca^{2+} の解離速度が増加していることが考えられた。これは前章で同様の低親和性を示したズブチリシンアクチンの場合とは対照的であった。

第3節 ヌクレオチド結合のエネルギー論

前節までにコイ骨格筋アクチンのヌクレオチドおよびカルシウムの結合の特性を明らかにした。本節では分子構造レベルの知見を得るために、前節で得られた結果をもとにヌクレオチド結合の熱力学的パラメーターを算出した。

実験方法

ヌクレオチド結合に伴う自由エネルギー変化量の算出

自由エネルギー変化量 ΔG は Gibbs の式、

$$\Delta G = -kT \cdot \ln(K_{bind}) \quad (\text{Eq.2-1})$$

を用いて算出した。ここで K_{bind} は ATP または ADP の結合定数である。

ATP 結合のエンタルピー・エントロピー変化

異なる温度で測定した ATP 結合定数に対してファントホッフプロットを行い、その傾きからエンタルピー変化を算出した。またエントロピー変化の項については、熱力学的関係式、

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq.2-2})$$

より算出した。

結果

ヌクレオチド結合の自由エネルギー変化量

前節で求めた 20 °C における ATP および ADP の結合定数についてギブスの式を

用いて自由エネルギー変化量を算出したところ、コイ骨格筋アクチンの ATP 結合では -26.3 kJ/mol、ADP 結合では -24.0 kJ/mol であった。同様にニワトリ骨格筋アクチンの場合についても算出し Table 2-2 にまとめた。

ATP と ADP の結合に関して自由エネルギー変化量の差異を見るために、

$$\delta\Delta G = \Delta G_{\text{ATP}} - \Delta G_{\text{ADP}} \quad (\text{Eq.2-3})$$

を定義した。ここで ΔG_{ATP} 、 ΔG_{ADP} はそれぞれ ATP、ADP の結合の自由エネルギー変化である。自由エネルギー変化量は、結合によるエンタルピー変化と結合に伴う系の安定化（エントロピー変化）の和であるため、本来 $\delta\Delta G (= \Delta G_{\text{ATP}} - \Delta G_{\text{ADP}})$ に物理的意味を持たせることはできない。例えば結合する基質が ATP から ADP に代わることによって、結合領域に対するヌクレオチドの相対的な位置が大きく変わってしまえば、新たな結合の形成やそれに伴うエントロピーの低下が起こり、 $\delta\Delta G$ はそれらの計算結果の差を示すだけである。しかしながら先述のように ADP 型アクチンと ATP 型アクチンのヌクレオチド結合領域の構造は極めて類似しているため、 $\delta\Delta G$ は γ 位のリン酸基の結合エネルギー差と見なすことができると考えられた。

そこでコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンの $\delta\Delta G$ を算出したところ、 $\delta\Delta G_{\text{carp}}$ は -2.3 kJ/mol であり、 $\delta\Delta G_{\text{chicken}}$ は -2.1 kJ/mol となり、互いにほぼ等しい値となった (Table 2-2)。すなわち γ 位のリン酸基の結合に関しては、両アクチン間でエネルギー的に違いがないことが示唆された。

ATP 結合に伴うエンタルピー変化

ATP の結合の自由エネルギー変化に対して、コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンの差は $2.2 (= -26.3 - (-28.5))$ kJ/mol である。この値の大きさは、種々の変異タンパク質のリガンド結合に関する研究で見積もられている結合親和性に対する水素結合 1 本あたりの寄与に相当する 5 ± 2.5 kJ/mol に近い (Fersht *et al.*, 1985; Fersht, 1988; Connelly *et al.* 1994)。しかしながら先述の $\delta\Delta G$ とは異なり、コイ骨格筋アクチ

ンの分子構造に関する情報がないため、この値を直接、分子構造上の局在した結合に結びつけることはできない。そこで ATP 結合に伴うエンタルピー変化量を求め ATP に対する低親和性に関する知見を得ることにした。

本章第 2 節で求めた 15、20、25 °C の各温度における ATP の結合定数に対してファントホッフプロットを行った (Fig.2-10)。このプロットの傾きより ATP 結合に伴うエンタルピー変化を算出したところ、コイ骨格筋アクチンで -65 kJ/mol 、ニワトリ骨格筋アクチンで -110 kJ/mol であった。結合の自由エネルギー変化量における差異はわずか水素結合 1 本相当の値であったにもかかわらず、エンタルピー変化における差異は 45 kJ/mol という大きな値であることが明らかになった。自由エネルギー変化においてわずか 2.2 kJ/mol の差異でしか現れなかったのは、ATP 結合に伴うエンタルピー変化が ATP もしくはアクチン分子自体の安定化に伴うエントロピーの減少によって相殺されるためであった。熱力学的関係式から算出されるエントロピー項はコイ骨格筋アクチンの場合で -39 kJ/mol 、ニワトリ骨格筋アクチンの場合で -82 kJ/mol であった。これらのことからコイ骨格筋アクチンにおいては、ヌクレオチドの親和性が低下しているばかりでなく、ヌクレオチド結合に伴うアクチン分子の構造的な安定化が弱いことが示唆された。

要 約

本章第 2 節において、コイ骨格筋アクチンでは結合リガンドが ATP、ADP のいずれの場合においてもニワトリ骨格筋アクチンに比して親和性が低いことが明らかになっていた。本節における結合の自由エネルギー計算から、ATP の結合エネルギーと ADP の結合エネルギーの差は、両アクチンで差がないことが明らかになった。すなわち γ 位のリン酸との相互作用に関しては両アクチンで大きな違いがないと考えられた。

コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンではヌクレオチド結合の自由エネ

ルギー差はわずか水素結合 1 本程度のエネルギー差であった。しかしながら結合のエンタルピー変化は大きく異なっていた。したがって、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては、アクチンとヌクレオチドの相互作用は強いが、ヌクレオチド結合に伴う系のエントロピーの減少が大きく、エンタルピー変化量を相殺していることが明らかになった。

第4節 考察

第1章でズブチリシンアクチンのリガンド結合の詳細を明らかにした手法を用いてコイ骨格筋アクチンのヌクレオチドおよび Ca^{2+} の親和性を調べた。その結果、ニワトリ骨格筋アクチンにおける ATP の結合定数 $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ に対し、コイ骨格筋アクチンでは $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ に低下していた (Fig.2-5)。またカルシウムに対する親和性も $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ から $6.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ に低下していることが明らかになった (Fig.2-9)。第1章第4節で用いた熱力学的関係式 (Eq.1-9) を用いて、コンプレックスルートの $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合定数を算出したところ、コイ骨格筋アクチンにおいては $4.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、ニワトリ骨格筋アクチンでは $1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった。こうして得られた全ての結合定数を Table 2-3 にまとめた。

本章で明らかにしたコイ骨格筋アクチンのリガンド結合の特徴は、その速度定数の大きさである。コンプレックスルートにおける $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の解離速度定数は $3.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ であり、対照のニワトリ骨格筋アクチンでは $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ であった (Fig.2-1)。上述の結合定数を使って結合速度定数を計算すると、コイ骨格筋アクチンでは $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、ニワトリ骨格筋アクチンでは $8.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、 $\text{ATP} \cdot \text{Ca}^{2+}$ 複合体の結合速度はコイ骨格筋アクチンで約 1.6 倍大きい。

またシーケンシャルルートにおける Ca^{2+} の解離過程においても、Fig.2-8 から推定される解離速度がコイ骨格筋アクチンで約 3 倍であったのに対して結合定数の低下は約 60 % に止まっていた。したがってシーケンシャルルートにおける Ca^{2+} の結合速度もコイ骨格筋アクチンではニワトリ骨格筋アクチンに比して大きいことが示唆された。

コイ骨格筋アクチンにおけるリガンドの解離・結合速度の大きさは、第1章で記したズブチリシンアクチンのリガンド結合の場合と対照的である。ズブチリシンアクチンの場合にはリガンドの結合速度定数が小さいことが低親和性の主要因であり、アクチン分子の構造的なゆらぎにくさが考えられた (第1章第6節)。コイ骨格筋アクチ

ンリガンドの結合・解離速度はニワトリ骨格筋アクチンに比して大きく、ズブチリシンアクチンとは対照的にヌクレオチド結合領域のゆらぎが大きいと推論された。このことはコイ骨格筋アクチンにおいては ATP 結合に伴うエントロピー変化がニワトリ骨格筋アクチンの場合に比して小さいという熱力学的な解析の結果からも支持された (Fig.2-10)。

本章の解析から得られたもうひとつの成果は、リガンドフリーの状態でのコイ骨格筋アクチンの安定性についてである。EDTA 添加による変性速度のヌクレオチド依存性から求められたリガンドフリーアクチンの変性速度定数は、いずれの測定温度においてもニワトリ骨格筋アクチンとの有意な差は見出されなかった (Fig.2-5, 2-6)。また ADP を結合したアクチンの実験の場合も同様であった (Fig.2-7)。すなわちコイ骨格筋アクチンはリガンドを結合していない状態においてはニワトリ骨格筋アクチンと同等の熱安定性を有することが明らかになった。この事実は第 4 章においてコイ骨格筋アクチンの熱安定性の特性を明らかにする際に再び考察する。

Table 2-1 Obtained ATP binding constant to actin and thermal denaturation rate constant of actin

Temperature	K_{ATP} ($\times 10^5 M^{-1}$)		k_d (s^{-1})	
	Carp	Chicken	Carp	Chicken
15 °C	1.0 ± 0.1	3.6 ± 0.2	0.027 ± 0.001	0.025 ± 0.007
20 °C	0.50 ± 0.04	1.2 ± 0.1	0.062 ± 0.003	0.067 ± 0.003
25 °C	0.40 ± 0.08	0.76 ± 0.12	0.124 ± 0.025	0.096 ± 0.010

Table 2-2 Free energy changes associated with ATP or ADP binding to actin

(pH8.0, 20 °C)

Actin	ΔG_{ATP}	ΔG_{ADP}	$\delta\Delta G$
Carp	-26.3 kJ/mol	-24.0 kJ/mol	-2.3 kJ/mol
Chicken	-28.5 kJ/mol	-26.4 kJ/mol	-2.1 kJ/mol

Table 2-3 Comparison of overall equilibrium values between carp and chicken actins**(pH8.0, 20 °C)**

Actin	$K_I(\text{Ca}^{2+})$	$K_{II}(\text{ATP})$	$K_{III}(\text{Ca}^{2+}\cdot\text{ATP})$	K_{IV}^*
Carp	$6.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	$5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$4.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	$8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$
Chicken	$1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$1.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$8.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

* Literature value (Perrin & Sayce, 1967; Nowak *et al.*, 1988)

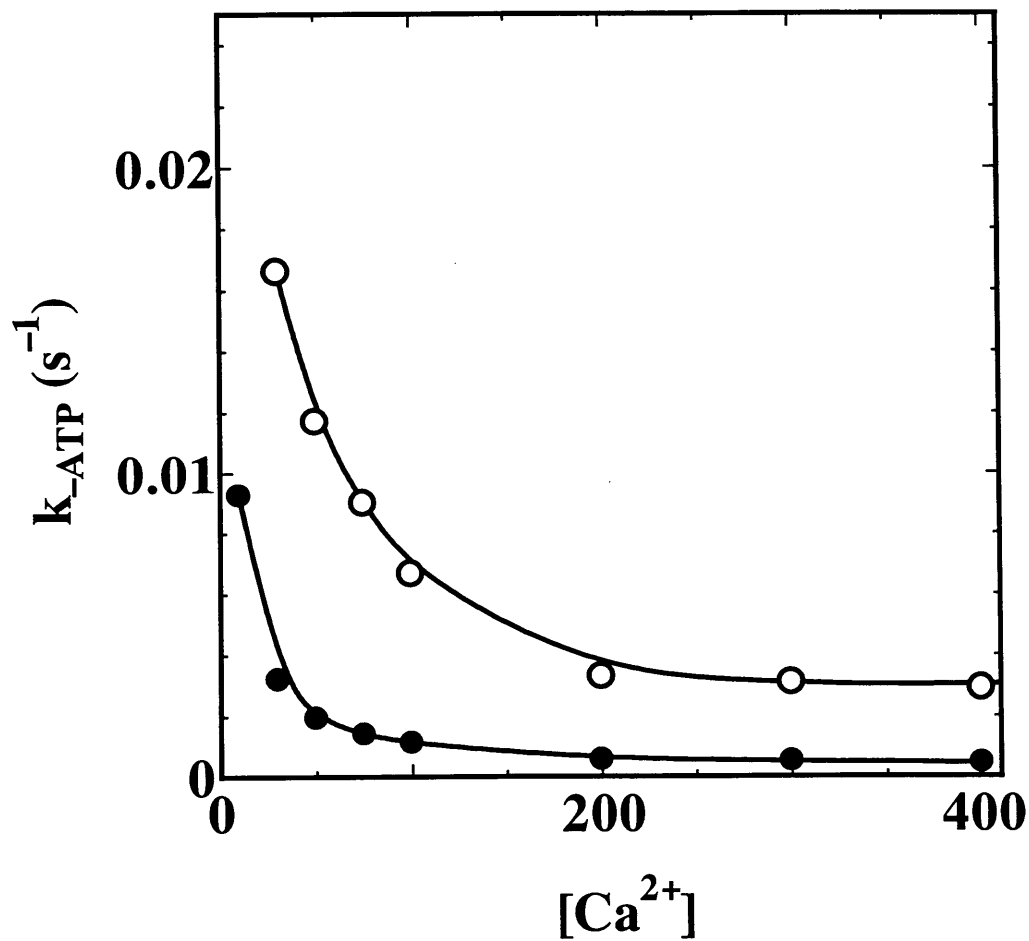


Fig. 2-1 Dependence of the apparent dissociation rate of ATP on free Ca²⁺ concentration. The apparent dissociation rates are plotted *versus* free calcium concentration. Open circles represent data for carp actin. Closed circles represent those for chicken actin. Conditions: 0.5 μ M carp or chicken actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 200 μ M e-ATP, pH8.0 and 20 °C.

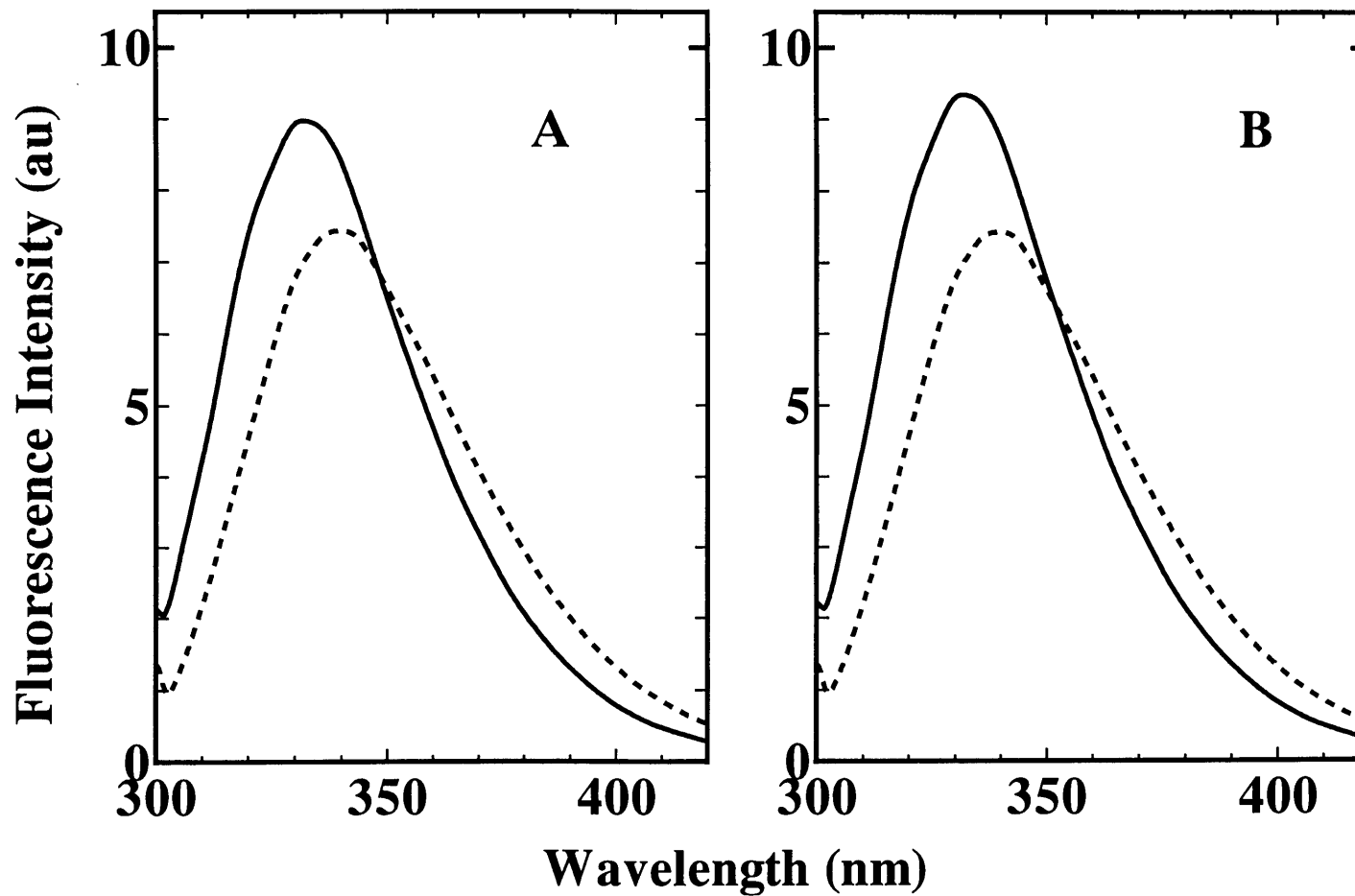


Fig. 2-2 Fluorescence spectra of carp and chicken G-actin A, carp actin; B, chicken actin. Solid lines show the spectra for intact actin. Short-dash lines show the spectra for denatured actin by EDTA.

Conditions: 4.0 μM carp or chicken actin, 2 mM Tris-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 200 μM ATP, pH8.0 and 20 $^{\circ}\text{C}$.

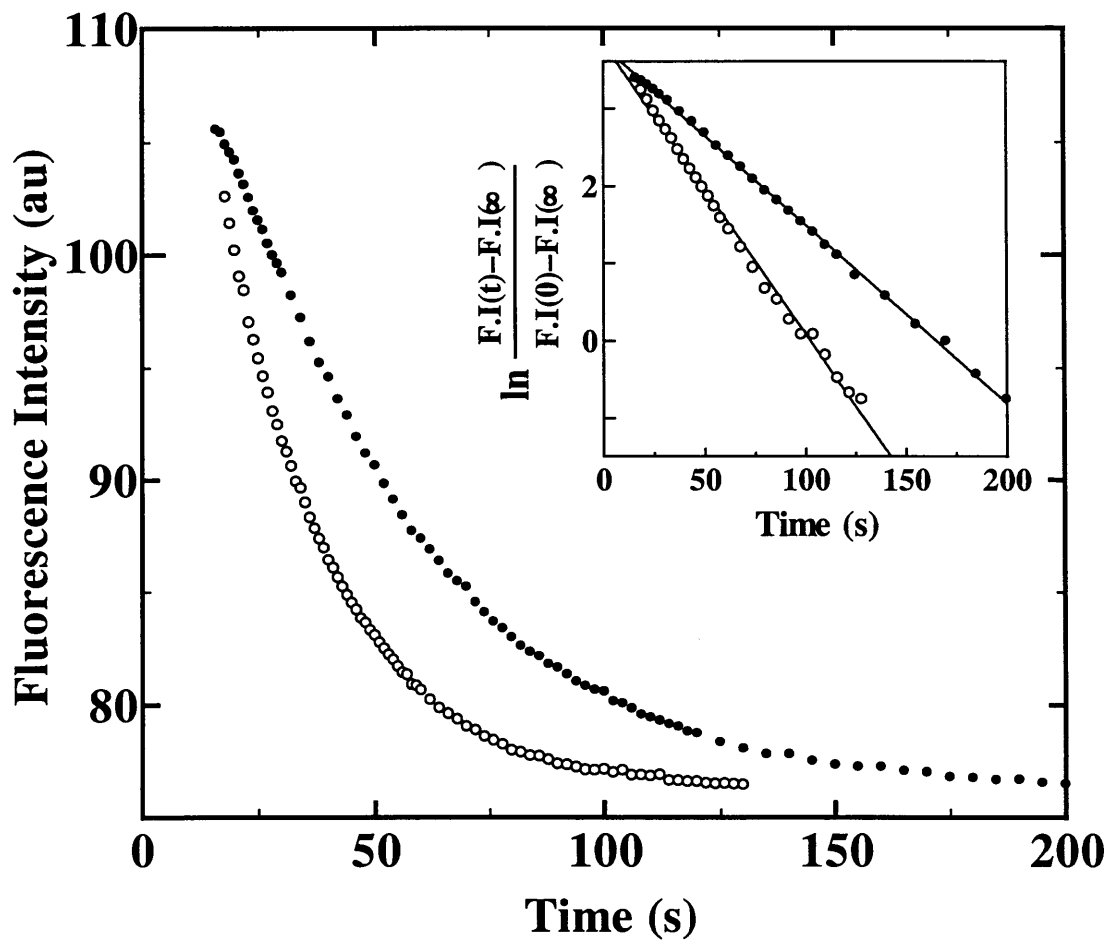


Fig. 2-3 Temporal intrinsic fluorescence changes of carp and chicken G-actins. After removal of bound Ca^{2+} with 1 mM EDTA on ice for 10 min, G-actin ($2 \mu\text{M}$) was immediately diluted with a buffer containing $15 \mu\text{M}$ ATP, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 2 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20°C) at $t = 0$. Then, fluorescence changes were monitored (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). The inset shows semi-logarithmic plots of fluorescence changes.

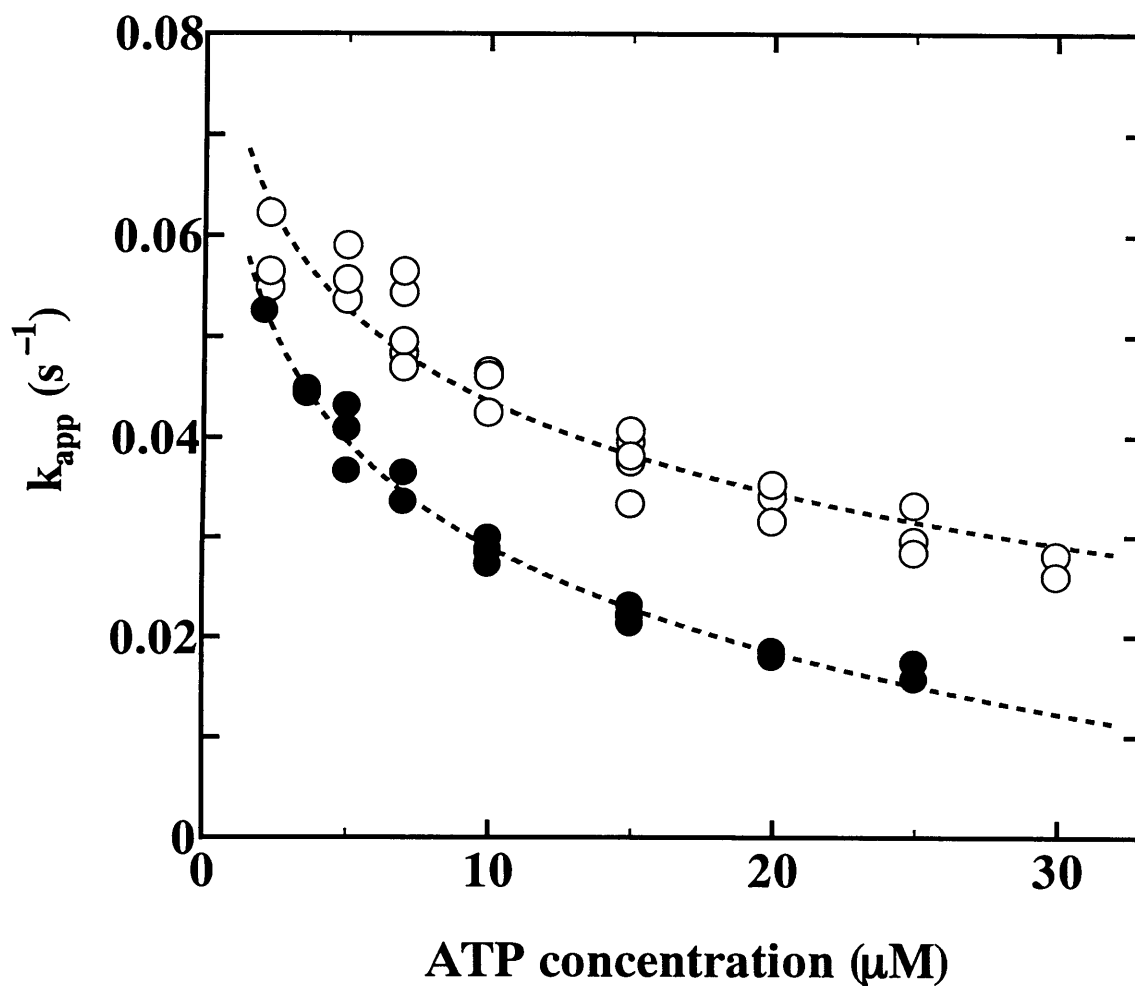


Fig. 2-4 The dependence of the apparent denaturation rate constant on ATP concentration.

The apparent denaturation rate induced by removal of bound Ca^{2+} was measured at various ATP concentrations. The obtained rate constants were plotted against ATP concentration (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin).

Experimental conditions: 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20 °C), and 2 μM actin.

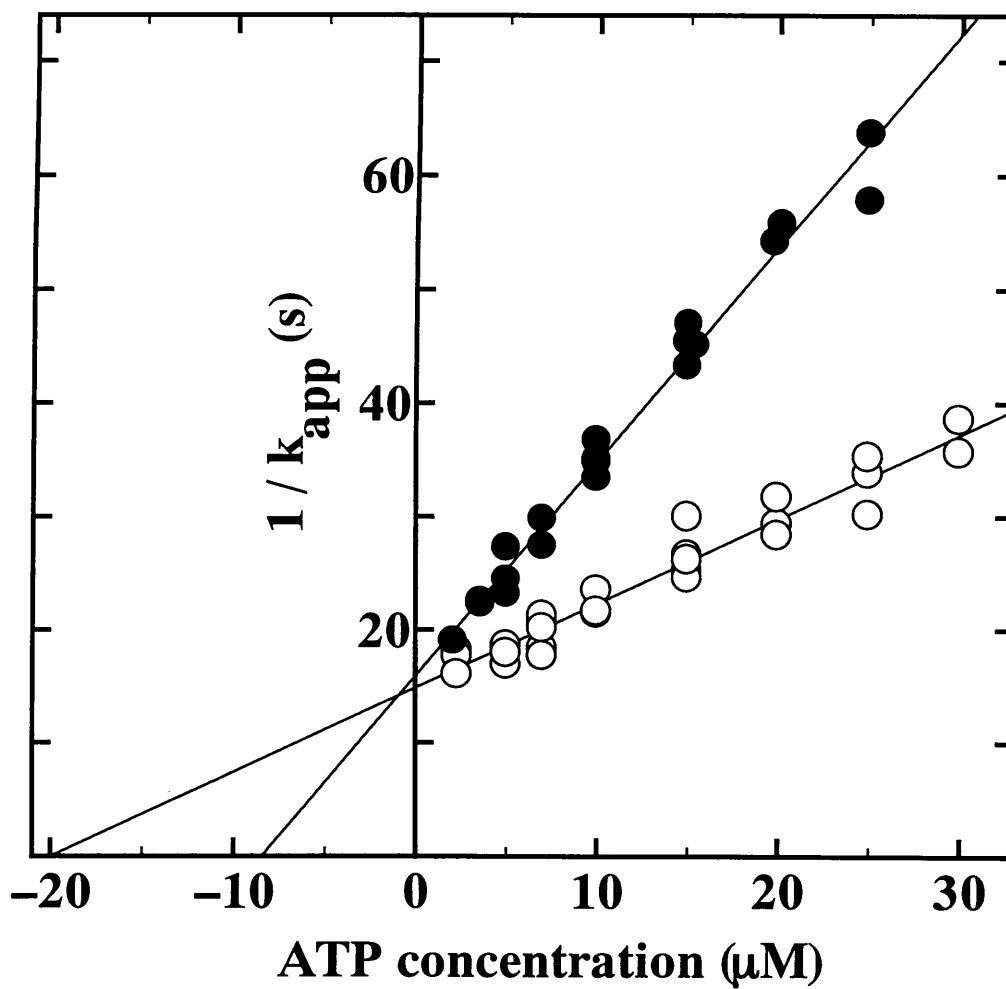


Fig. 2-5 The Reciprocal plot of the apparent denaturation rate constant.
 Reciprocals of k_{app} values in Fig.2-4 are plotted against ATP concentrations (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). Solid lines show the results of linear least squares fitting.

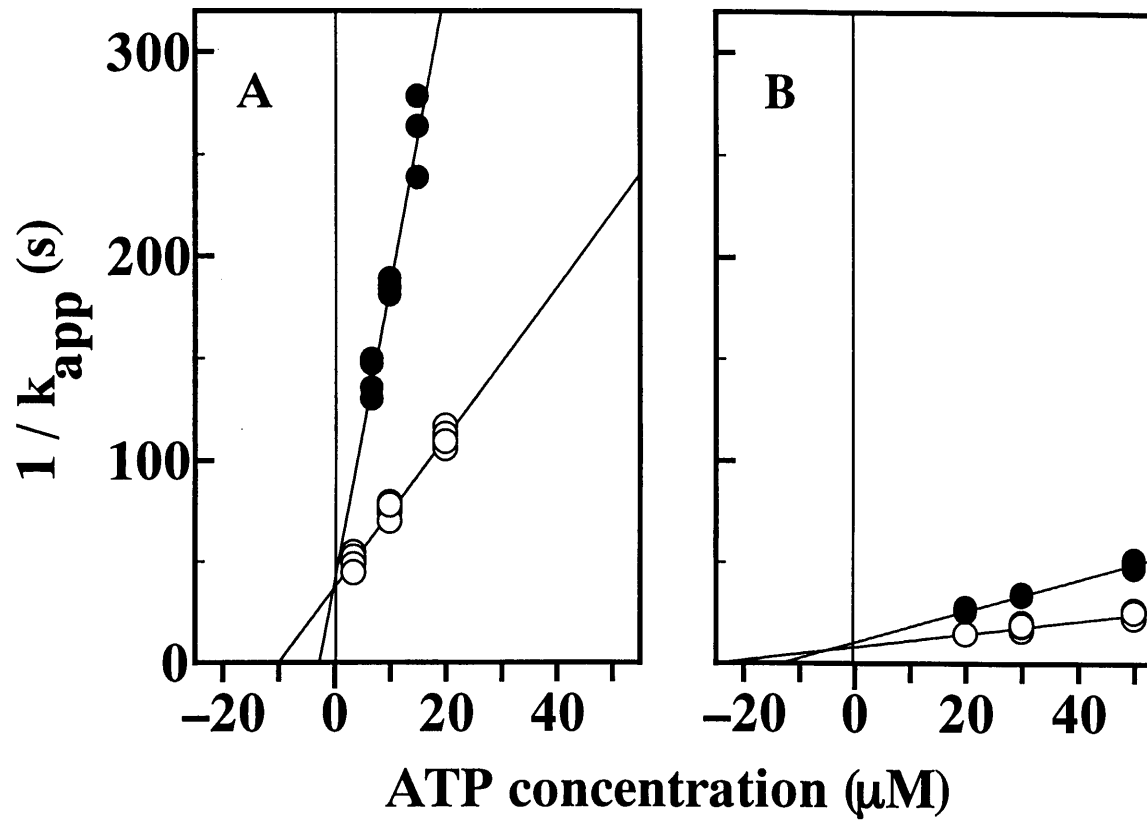


Fig. 2-6 The dependence of the apparent rate constant on ATP concentration at different temperatures.

The apparent denaturation rate induced by removal of bound Ca^{2+} was measured at temperatures of (A) 15 °C and (B) 25 °C. Reciprocals of k_{app} values are plotted against ATP concentration (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). Solid lines show the results of linear least squares fitting. Experimental conditions were the same as in Fig.2-5

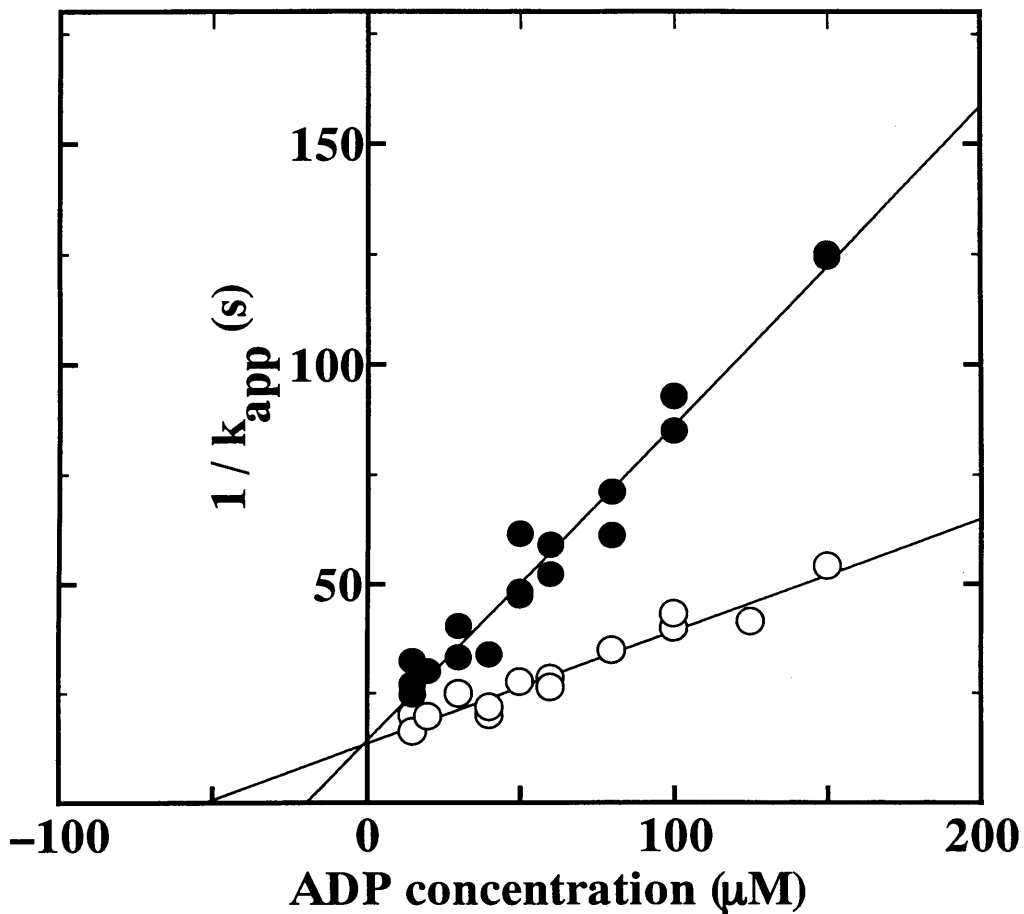


Fig. 2-7 The dependence of the apparent denaturation rate constant on ADP concentration.

After removal of bound Ca^{2+} with 1 mM EDTA on ice for 10 min, G-actin bound to ADP was immediately diluted with a buffer containing 2 mM 2-mercaptoethanol and 2 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20 °C), and various amounts of ADP. The obtained k_{app} values are plotted against ADP concentration (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). Solid lines show results of linear least squares fitting. Experimental conditions: 1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20 °C), 2 μM actin.

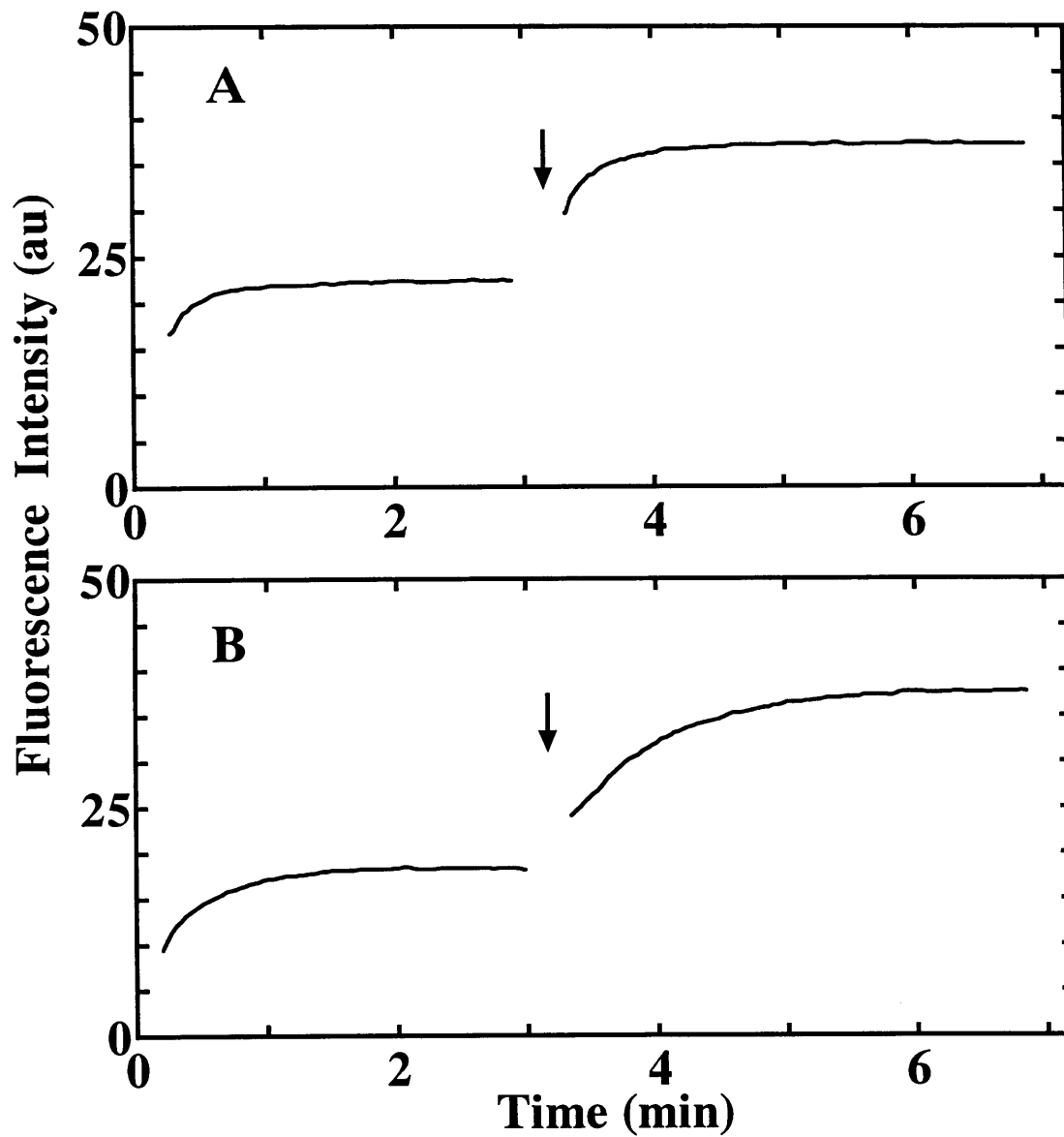


Fig. 2-8 Temporal intrinsic fluorescence changes of carp and chicken G-actins After removal of bound Ca^{2+} with 1 mM EDTA on ice for 10 min, G-actin ($2 \mu\text{M}$) was immediately diluted with a buffer containing $15 \mu\text{M}$ ATP, 2 mM 2-mercaptoethanol, and 2 mM Tris-HCl (pH 8.0, 20°C) at $t = 0$. Then, fluorescence changes were monitored (A, carp actin; B, chicken actin). After the release of Ca had reached a plateau, the remaining bound Ca^{2+} was replaced by the addition of $150 \mu\text{M}$ Mg^{2+} (indicated by the arrow).

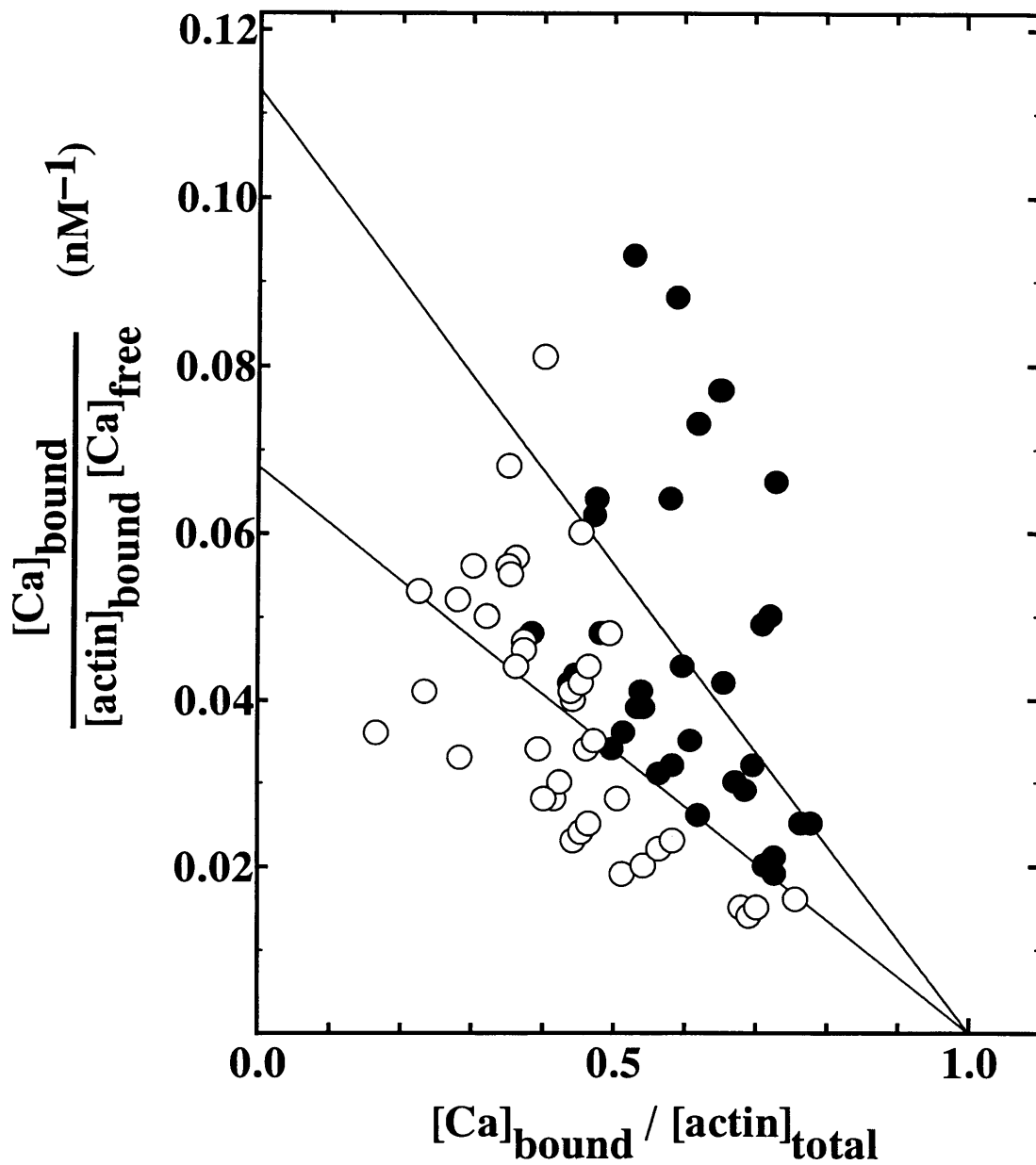


Fig. 2-9 Scatchard plot of Ca^{2+} binding to G-actin.

The equilibrium amount of bound Ca^{2+} was obtained in the presence of various concentrations of Quin2. Scatchard plots of equilibrium binding to carp G-actin (open circles) or to chicken G-actin (closed circles) are shown. Solid lines show the results of linear least squares fitting.

Experimental conditions: $10 \mu\text{M}$ G-actin, $200 \mu\text{M}$ ATP, $20\text{-}300 \mu\text{M}$ Quin2, 2 mM Tris-HCl (pH 7.5, 20°C).

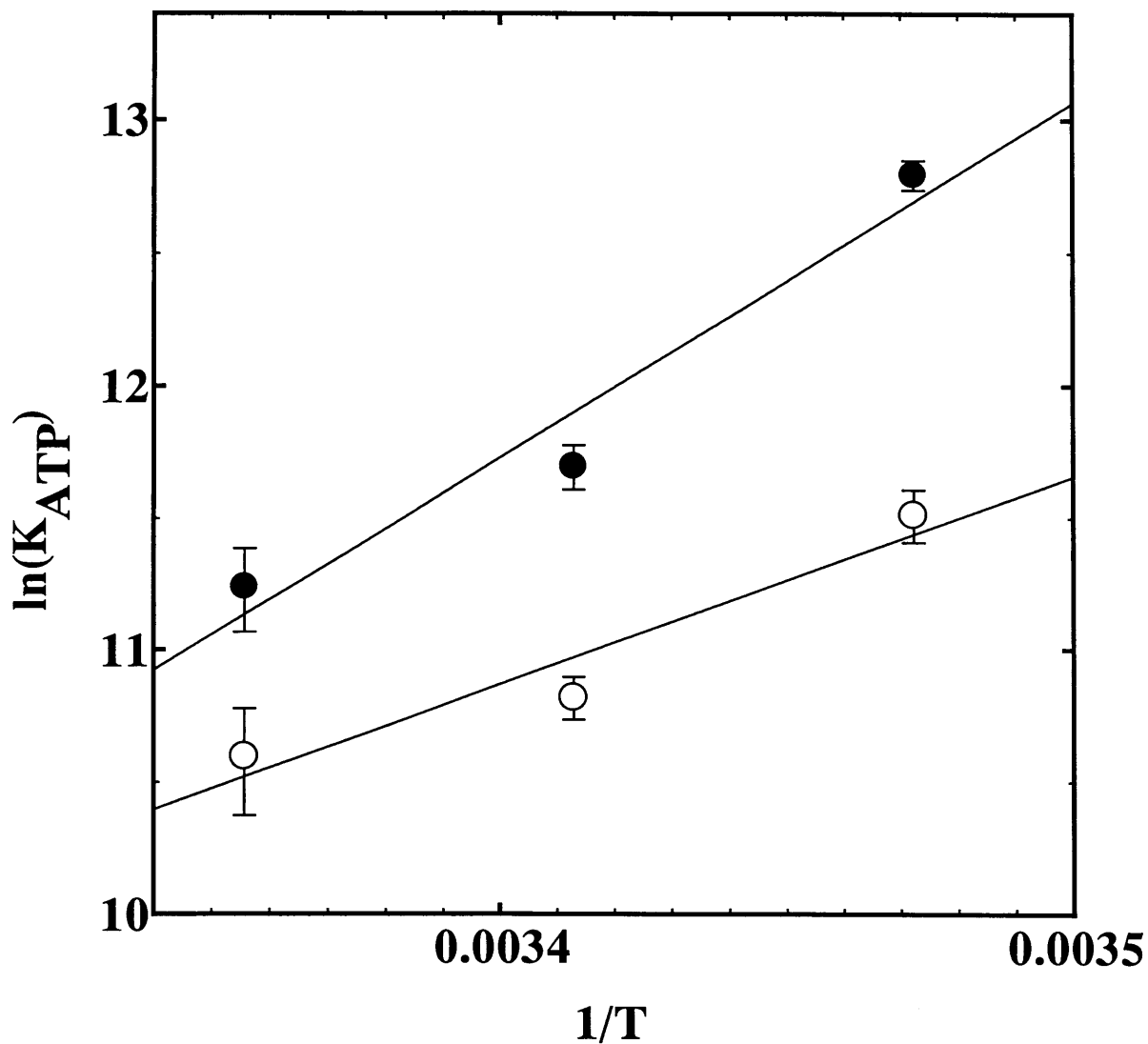


Fig. 2-10 The van't Hoff plot of the binding constant of ATP for actin.

Logarithms of the binding constants of ATP for actin are plotted versus the reciprocals of absolute temperature (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). Vertical lines represent analytical errors of the linear regression in Figs.2-5 and 2-6. Solid lines show the results of linear least squares fitting.

第3章 コイ骨格筋アクチンのリガンドに対する 低親和性の分子メカニズム

魚類の骨格筋アクチンの一次構造については、これまでにコイ *Cyprinus carpio*、キングギョ *Carassius auratus*、トラフグ *Takifugu rubripes*、マダイ *Pagrus major*、イバラヒゲ *Coryphaenoides acrolepis*、スケトウダラ *Theragra chalcogramma*、タイセイヨウサケ *Salmo salar* など十数種の魚類から骨格筋アクチンの cDNA が解析されている (Watabe *et al.*, 1995; Venkatesh *et al.*, 1996; Morita, 2000; Tanaka *et al.*, 2004; Mudalige *et al.*, 2007)。決定された演繹アミノ酸配列においては、恒温動物骨格筋アクチンを対照として、いずれも数残基以上の置換があり、魚類骨格筋アクチンの多様性が明らかになっている。コイ骨格筋アクチンの場合には、Asp/Glu-2、Ala/Ser-155、Val/Ile-165、Ala/Thr-278、Leu/Met-299 の 5 つの置換がある (Watabe *et al.* 1995)。この中で 155 番の Ala/Ser-155 の置換はアクチンのドメイン間にあるヌクレオチド結合領域近傍に位置し、ATP の結合性に影響を与えることが示唆されて来た (Watabe *et al.*, 1995; Morita, 2000)。先述したニワトリ骨格筋アクチンに比して ATP の解離速度が大きいコイ骨格筋アクチンやソコダラ科イバラヒゲの骨格筋アクチンのアイソフォームである actin 1 には、Ala/Ser-155 の置換が存在しており、この置換がヌクレオチドとの結合に影響することが報告されている (Morita, 2003)。

そこで本章では第 2 章で明らかになったコイ骨格筋アクチンの ATP およびカルシウムに対する低親和性やそれらのリガンドの結合・解離速度の大きさの分子論的な解明のために、Ala/Ser-155 のヌクレオチド結合領域の構造への影響を明らかにし、分子モデルの構築を試みた。

第1節 コイ骨格筋アクチンのリガンド結合に及ぼすアミノ酸置換の影響

コイ骨格筋アクチンに存在する5つのアミノ酸置換のうち、Ala/Ser-155がATPの結合・解離に影響を及ぼすことはすでに明らかにされている。しかしながら、その他のアミノ酸置換がATP結合にどの程度影響するかは不明である。155番の点変異アクチンを作成してATP結合の程度を調べることができれば望ましいが、骨格筋アクチンに関しては大量発現系は未だ確立していない。そこで本節では、これまでに報告されているATPに対する低親和性のアクチンのアミノ酸配列をまとめ、5箇所の置換のATP結合への影響を明らかにすることを試みた。

実験方法

アミノ酸配列

演繹アミノ酸配列はDDBJ/EMBL/GenBankから取得した。

結果

低親和性のアクチンにおけるアミノ酸置換

現在までに報告されているアクチンのヌクレオチド結合とそのアミノ酸置換との相関をTable 3-1にまとめた。恒温動物のアクチンのアミノ酸配列とATPの親和性との関係は、ウサギ骨格筋、ウシ心筋、ウシ平滑筋、ニワトリ平滑筋のアクチンについて比較実験を行った報告がある(Strzelecka-Gołaszewska *et al.*, 1985)。その結果から、Strzelecka-Gołaszewska *et al.* (1985)は、ATP結合に影響を与えるアミノ酸置換はCys/Val-17、Ser/Thr-89であり、N末端の酸性アミノ酸およびLeu/Met-299およびSer/Thr-358とATP結合能との相関はないと結論している。

魚類骨格筋アクチンに関するリガンド結合とアミノ酸置換との関連は、深海魚の高圧耐性に関する研究の中で明らかにされている(Morita, 2003)。Morita (2003)によれば、深海性のソコダラ *C.yaquinae* とヨロイダラ *C.armatus*、および非深海性のイバラ

ヒゲ *C.acrolepis* の骨格筋アクチンはそれぞれ2つのアイソフォームからなる。前2者については2つのアイソフォームのうち、主に actin 2b を発現している。したがって、これらの魚種から抽出・精製されたアクチン溶液の諸性質はソコダラ、ヨロイダラにおいては actin 2b の性質を反映していると考えられる。ε-ATP 添加による ATP の解離速度の測定結果は、大気圧下ではソコダラ、ヨロイダラのアクチンはニワトリ骨格筋アクチンと差異がないことを示していた (Morita 2003)。 *C.yaquinae* actin 2b および *C.armatus* actin 2b のアミノ酸配列には、Strzelecka-Gołaszewska (1985)が指摘した Leu/Met-299 が存在し、このアミノ酸置換が ATP との親和性に影響しないという彼らの結論を確認することができた。また Val/Ile-165、Ala/Thr-278 の置換は、広く魚類骨格筋アクチンに共通するアミノ酸置換であり、 *C.yaquinae* actin 2b および *C.armatus* actin 2b においても存在することから、これらの置換も ATP との結合に大きな影響を与えるとは考えられなかった。

上述の2魚種とは異なりイバラヒゲ骨格筋では、actin 2a に対する actin 1 の発現比は 0.67 と報告されており (Morita, 2003)、イバラヒゲアクチンから得られた ATP の解離速度に関する実験値については、直ちにどちらのアイソフォームの性質かを断定することはできない (Table 3-1 *C.acrolepis* actin 1, *C.acrolepis* actin 2a)。しかしながら、ε-ATP の蛍光強度から得られるみかけの解離速度は加算的であると考えられ、イバラヒゲアクチンの ATP の解離速度は actin 1 と actin 2a の平均値となることが予想される。Morita (2003)の実験データはまさにそのことを示しており、解離速度はニワトリ骨格筋アクチンとコイ骨格筋アクチンとの中間値を示していた。 *C.acrolepis* actin 1 と actin 2a とのアミノ酸配列は 155 番目のアミノ酸だけが異なっており、actin 1 ではアラニンであり、actin 2a ではセリンである (Morita, 2000)。イバラヒゲ骨格筋アクチンの ATP の解離速度はニワトリ骨格筋アクチンと同程度の actin 2a とコイ型の actin 1 の平均値になっていると推測された。

以上のことからコイ骨格筋アクチンの ATP との低親和性に関連するアミノ酸置換は Ala/Ser-155 であり、その他の置換は大きな影響を与えないことが示唆された。最近になって Mudalige *et al.* (2007)は、タイセイヨウサケの遅筋と速筋のアクチンの ATP

解離速度を調べ、Ala/Ser-155 置換を持つ遅筋アクチンにおいては、155 番にセリンを持つ速筋アクチンに比して ATP の解離が早いことを示した。現在までの研究報告においては、魚類骨格筋アクチンの中で 155 番目の位置にアラニンを持つものはすべて ATP との結合に影響を受けており、Ala/Ser-155 置換がコイ骨格筋アクチンにおけるヌクレオチドに対する低親和性の主要因であることが明らかになった。

要 約

コイ骨格筋アクチンに存在する 5 つのアミノ酸置換のうち Asp/Glu-2、Val/Ile-165、Ala/Thr-278、Leu/Met-299 については同じ置換を有するアクチンにおいても ATP との相互作用に影響を受けないものが存在することが明らかになった。一方、Ala/Ser-155 の置換を有するものは報告されている限り ATP との結合に影響があった。したがってヌクレオチドに対する低親和性の主要因を Ala/Ser-155 と同定した。

第2節 Ala/Ser-155 置換のヌクレオチド結合領域への構造的影響

第2章および本章前節までに明らかにしたように、Ala/Ser-155 はアクチンの ATP に対する結合親和性を低下させ、さらに分子全体の安定性にも大きな影響を与える。本節では、この置換のヌクレオチド結合領域の構造に対する作用を調べるために分子モデリングを行った。使用した原子座標はウサギ骨格筋アクチン (PDB コード: 1NWK) のものである (Otterbein *et al.*, 2001)。この原子座標は ATP の非加水分解アナログである AMPPNP を結合したアクチンから得られた。AMPPNP はアクチン結合タンパク質との相互作用や重合速度などにおいて、いわゆる ATP 型アクチンの性質を有することが知られているため (Cooke, 1975)、しばしば ATP 型アクチンの代替として用いられる。1NWK の解像度は 1.85Å であり (Graceffa & Dominguez, 2003)、これまでに報告されている骨格筋アクチンのなかでは最も分解能が高く、ヌクレオチド結合領域内の水分子の座標も多く含まれているため、本実験ではこの座標を用いた。

実験方法

分子モデリング

Protein Data Bank コード 1NWK のウサギ骨格筋アクチンの座標データを用いてモデリングを行った。N 末端の位置は、同じくウサギ骨格筋アクチンのコード 1ATN の座標から推定した。水素結合の解析は SWISS-PDB viewer v.3.7 (<http://www.expasy.org/spdv/>)を用い (Guex & Peitsch, 1997)、水素結合のドナー・アクセプター原子間の距離が 2.35~3.20Å、角度が 90 度以上のものを水素結合可能と判定した。分子構造の描画には CCP4、Rasmol および Rastop を使用した (Sayle & Milner-White, 1995)。

結果

分子モデリング

1NWK を用いたアクチン分子全体のモデルを Fig.3-1 に示した。アクチンは2つのドメインから成り、中央のクレフトがそのドメインを隔てている。2つのドメインはさらにそれぞれ2つのサブドメインに分けられる。サブドメイン1はアミノ酸 1-32、70-144、338-375 からなり、サブドメイン2はアミノ酸 33-69、サブドメイン3はアミノ酸 145-180、270-337、サブドメイン4はアミノ酸残基 181-269 からなっている。恒温動物骨格筋アクチンを対照とした場合のコイ骨格筋アクチンにおけるアミノ酸置換は主にサブドメイン3に偏在している。その位置を図中の矢印で示した。1NWK においては、N末端の数残基が実験的に見失われているため Asp/Glu-2 のアミノ酸置換は図中に示していない。

アクチンフォールドと呼ばれるアクチンとその類似立体構造を持つタンパク質はヌクレオチドと2価の陽イオンを結合し、その結合領域には共通して“Pループ”と呼ばれる3本のループ構造を持つことが知られている (Walker *et al.*, 1982)。骨格筋アクチンの場合は Asp-11-Lys-18 (P1)、Asp-154-His-161 (P2)、Met-299-Tyr-306 (P3) のヘアピン構造がそれらに対応する (本来はヘアピンのループ部分のみを指す言葉であるが、本論文では Vorobiev *et al.* (2003) に倣って β シート部位を含めてPループと称することにした)。3つのループ構造と AMPPNP の位置を Fig.3-2 に示す。ヌクレオチドのリン酸基は、P1 および P2 に挟み込まれるように位置し、ループ先端部分のアミノ酸と結合している。また P3 はアデニン部位が収まるポケットを形成している。

Ala/Ser-155 のヘアピン Asp-154-His-161 への影響

Ala/Ser-155 置換がヘアピン Asp-154-His-161 の構造に与える影響を調べるために、このヘアピン構造内の水素結合の検出を行った。得られた水素結合を Fig.3-3 に示す。このヘアピン構造の β シート部分は、Asp-154 と His-161 の主鎖間に形成される2本の水素結合と Gly-156 と Val-159 の主鎖間に形成される水素結合によって成り立って

いることが判る。さらに Ser-155 の側鎖の酸素原子と対向する Thr-160 側鎖の酸素原子間の距離は 2.64Å であり、これらの側鎖間にも水素結合が形成されることが明らかになった。コイ骨格筋アクチンにおいては 155 番目のアミノ酸がアラニンに置換されているので、この付加的な水素結合は形成されないと考えられる。したがって Ala/Ser-155 置換を有するコイ骨格筋アクチンでは、ヘアピン Asp-154-His-161 の β シートの構造安定性に影響を受けていることが示唆された。

ヌクレオチド結合への影響

上述のように Ala/Ser-155 置換による β シートの構造的摂動の可能性が示されたが、その摂動が ATP との相互作用部位にどのように伝播するかは不明である。ヘアピン Asp-154-His-161 とヌクレオチドのリン酸基の間には多くの水素結合があることが明らかになっている (Kabsch *et al.*, 1990)。例えば Asp-154-His-161 のヘアピン先端のループを構成する 3 残基、Asp-157、Gly-158、Val-159 は β および γ 位のリン酸と 5 本の水素結合を形成している。第 2 章第 3 節で明らかになったように Ala/Ser-155 置換は γ 位の結合を変えないため、この置換がループ部位の水素結合に直接的な影響を及ぼすとは考えにくい。そこで Ser-155 と周辺のアミノ酸および水分子との相互作用の検出を行った。その結果、ヘアピン Asp-154-His-161 と隣接するヘアピン Met-299-Tyr-306 の間には Gly-156 と Thr-303、Ser-155 主鎖と Ser-300 および Thr-303 の主鎖が水素結合を形成していることが明らかになった (Fig.3-4)。Ser-155 はヌクレオチド結合に関わる 2 つのヘアピンを繋ぐ働きをする分子構造的に重要なアミノ酸であることが明らかになった。

Ca²⁺結合への影響

第 2 章第 2 節でコイ骨格筋アクチンは Ca²⁺ との親和性が低いことを示した。アクチンのヌクレオチド結合領域において Ca²⁺ は水分子を配位していることが知られている (Vorobiev *et al.*, 2003)。Fig.3-2 には Ca²⁺ と水分子の距離から推定される 5 つの配位水分子を示した。そのうちの 1 分子は 154 番のアスパラギン酸の側鎖と水素結合を形

成していると考えられた。したがって Ala/Ser-155 置換の影響が Asp-154 を通して Ca^{2+} に伝播することが考えられた。

要 約

コイ骨格筋アクチンにおいてヌクレオチドとの結合親和性を低くしている主たるアミノ酸置換は Ala/Ser-155 であることが明らかになった。恒温動物骨格筋アクチンの場合、この位置のアミノ酸がセリンであることによって Asp-154-His-161 の β シートの構造は4本の水素結合によって保たれていることが明らかになった。一方、コイ骨格筋アクチンの場合には、Ala-155 は Thr-160 側鎖と水素結合を形成しないために、 β シートに構造的な摂動がかかることが推測された。また恒温動物骨格筋アクチンの場合の Ser-155 またはコイ骨格筋アクチンの場合の Ala-155 は隣接するヘアピン Met-299-Tyr-306 との間にも水素結合を形成していることが明らかになった。

第3節 考察

コイ骨格筋アクチンにおける5つのアミノ酸置換とこれまでに ATP 結合を調べられているアクチンのアミノ酸配列を比較した結果、ATP 結合に対する影響と相関あるアミノ酸置換は Ala/Ser-155 しかないことが確認された (Table 3-1)。

Ala/Ser-155 はヌクレオチド認識に関連する P2 ループ上に起きるアミノ酸置換である (Fig.3-2)。Chen *et al.* (1995a, 1995b) は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアクチンにおいて、P1 ループ上にある 14 番目のセリンをアラニンに置換した点変異体を作成するとアクチンの ATP に対する親和性が 40~60 倍低下することを示した。Ser-14 は P1 ループ先端に位置し、ATP の γ 位のリン酸基と 4 本の水素結合を形成することが明らかになっているため (Kabsch *et al.*, 1990)、このアミノ酸置換が ATP との親和性を低下させることは分子構造上、明らかだと考えられる。一方、155 番のアラニンもしくはセリンはループの β シートに位置し (Fig.3-3)、ATP との直接的な相互作用はなく、置換の影響を分子レベルで説明することできない。そこで本章ではウサギ骨格筋アクチンの原子座標を用いて 155 番のセリンの位置する P2 ループ (Asp-154-His-161) の構造を詳細に検討した。その結果、ウサギ骨格筋アクチンにおいて β シート構造を保持する 4 本の水素結合がコイ骨格筋アクチンでは 3 本しか形成できないことが明らかになった。この欠損は β シートの構造を決めている主鎖間の水素結合ではないため、 β シート構造を大きく変えることはないが、何らかの構造的摂動になることが考えられた。

水素結合の検索から 155 番のアミノ酸には、さらに構造的に重要な役割があることが明らかになった。本章における分子モデルの解析は P2 ループが隣接する P3 ループと 3 本の水素結合によって繋がっていること明らかにした (Fig.3-4)。このうち 2 本が Ser-155 の主鎖と P3 ループ上の Ser-300 および Thr-303 の間に形成されていた。この水素結合は主鎖間に形成されているためアラニン置換を有するコイ骨格筋アクチンにおいても存在すると思われるが、上述のコイ骨格筋アクチンの P2 ループにおける構造的摂動が Ala-155 から直接 P3 ループへ伝播する可能性がある。

P3 ループはアクチンフォールドにおいてはアデニン認識部位として知られている (Vorobiev *et al.* 2003)。アクチンの分子モデルからはアデニン部位と P3 ループの間に明確な結合は見出されておらず、疎水性ポケットを形成してアデニン部位を立体的に埋め込んでいると考えられている (Kabsch *et al.*, 1990)。Ala/Ser-155 置換が P3 ループの動きにまで影響を与えているとすれば、ヌクレオチドの結合・解離には大きな影響を与えると考えられる。

第 2 章第 2 節においてコイ骨格筋アクチンにおけるアミノ酸置換は γ 位のリン酸基の結合には大きな影響を与えないことが示されていたが、以上の考察は Ala/Ser-155 がリン酸基との結合に影響を与えない場合でも親和性の低下をさせ得ることを示している。

Table 3-1 ATP binding and amino acid substitutions in several actin isoforms

Actin	Residue No.															ATP binding	ref.
	1	2	3	4	5	17	54	67	89	137	155	165	278	299	358		
chicken skeletal	D	E	D	E	T	V	V	L	T	Q	S	I	T	M	T	control	this study
carp skeletal	*	D	*	*	*	*	*	*	*	*	A	V	A	L	*	weak	this study, Morita(2003)
<i>Coryphaenoides acrolepis</i> actin 1	*	D	E	*	*	*	*	*	*	*	A	V	A	L	S	weak†	Morita (2003)
<i>Coryphaenoides acrolepis</i> actin 2a	*	D	E	*	*	*	*	*	*	*	*	V	A	L	S	same as control†	Morita (2003)
<i>Coryphaenoides yaquinae</i> actin 2b	*	D	E	*	*	*	*	P	*	K	*	V	A	L	S	same as control†	Morita (2003)
<i>Coryphaenoides. armatus</i> actin 2b	*	D	E	*	*	*	A	*	*	K	*	V	A	L	S	same as control†	Morita (2003)
bovine cardiac	*	D	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	L	S	same as control	Strzelecka-Golaszewska et al. (1985)
chicken smooth	-	*	E	*	*	C	*	*	S	*	*	*	*	L	S	weak	Strzelecka-Golaszewska et al. (1985)
bovine smooth	E	*	E	D	S	C	*	*	S	*	*	*	*	L	S	weak	Strzelecka-Golaszewska et al. (1985)

Boxes show amino acid substitutions specific to actin that weakly bound ATP.

†We referred to data for *Coryphaenoides acrolepis*, *Coryphaenoides yaquinae*, and *Coryphaenoides armatus* from Morita (2003). Skeletal muscles of these fishes have two isoforms in each species. Morita (2003) showed that actin 2b was a major isoform in *Coryphaenoides yaquinae* and *Coryphaenoides armatus* muscles and that expression ratio of actin 1 to actin 2a was 0.67 in *Coryphaenoides acrolepis* muscle. Therefore, strength of ATP binding to *Coryphaenoides acrolepis* actin was an average for the two isoforms. We judged ATP binding strengths of *Coryphaenoides acrolepis* actin 1 and actin 2a from a consideration of amino acid substitutions in

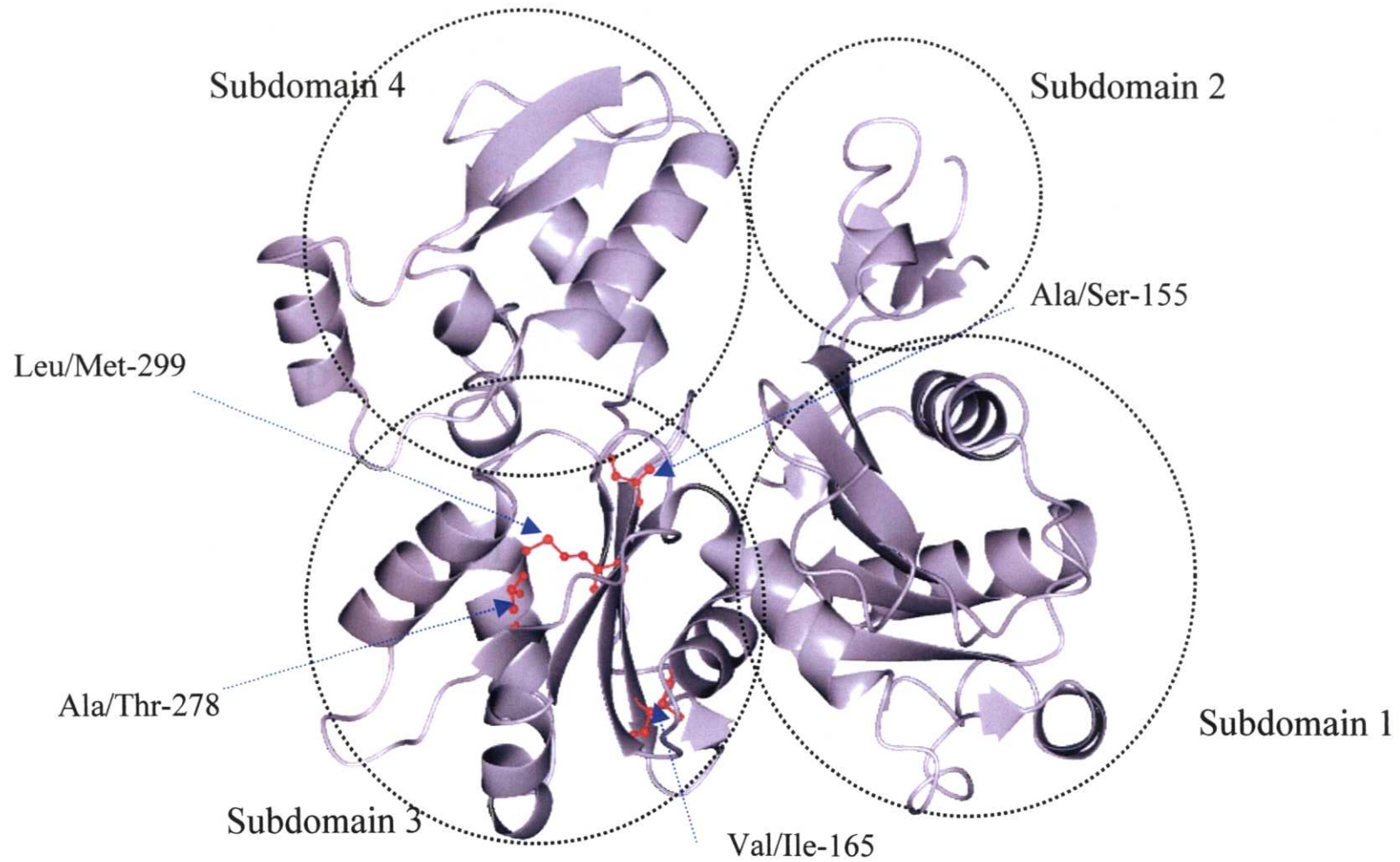


Fig. 3-1 Overall structure of skeletal muscle actin and the positions of amino acid replacement in carp skeletal actin in comparison with rabbit skeletal actin.

The figure is drawn using atomic coordinates of 1NWK (Protein Data Bank code). It is the highest resolution structure of mammalian α -actin in the ATP state, so far available. The arrows indicate the positions of amino acid replacements (ball & stick model) except for Asp/Glu-2 which was not depicted in the original coordinates. This image was created by using the CCP4 software.

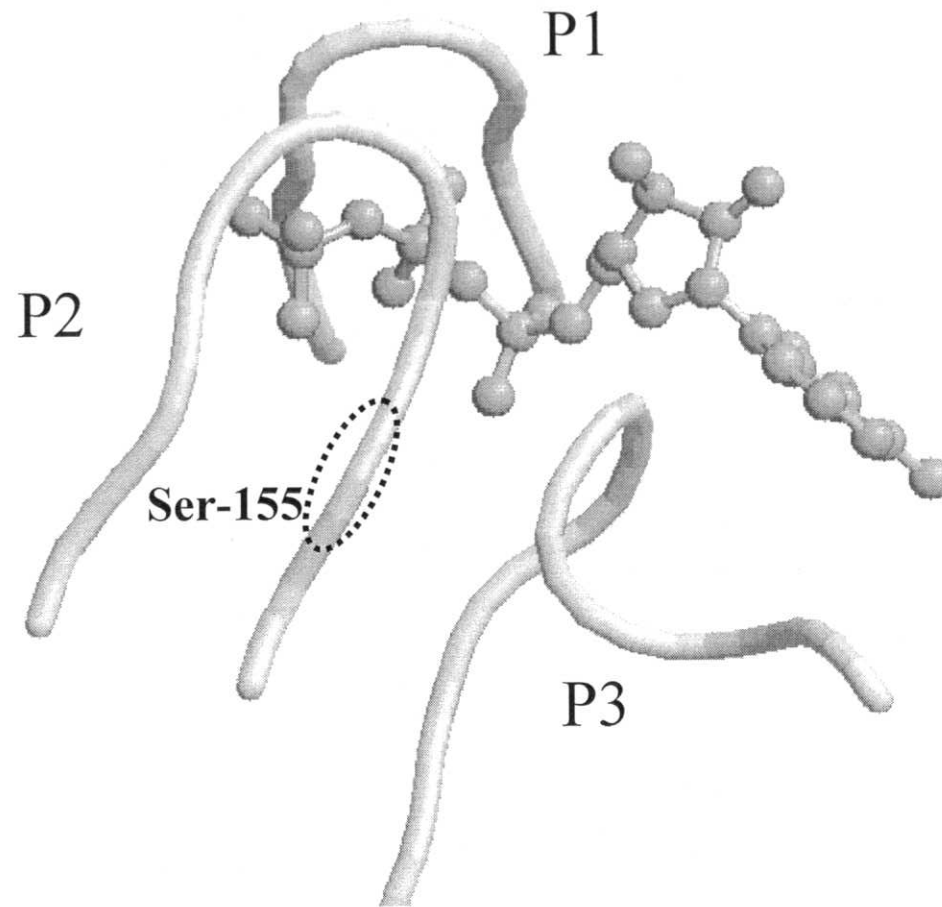


Fig. 3-2 P-loops in the nucleotide binding region of actin.

The β -hairpins at Asp-11–Lys-18 (P1), Asp-154–Met-161 (P2), Met-299–Tyr-306 (P3) are represented by tube model and the non-hydrolyzable ATP analog, AMP-PNP by ball & stick model.

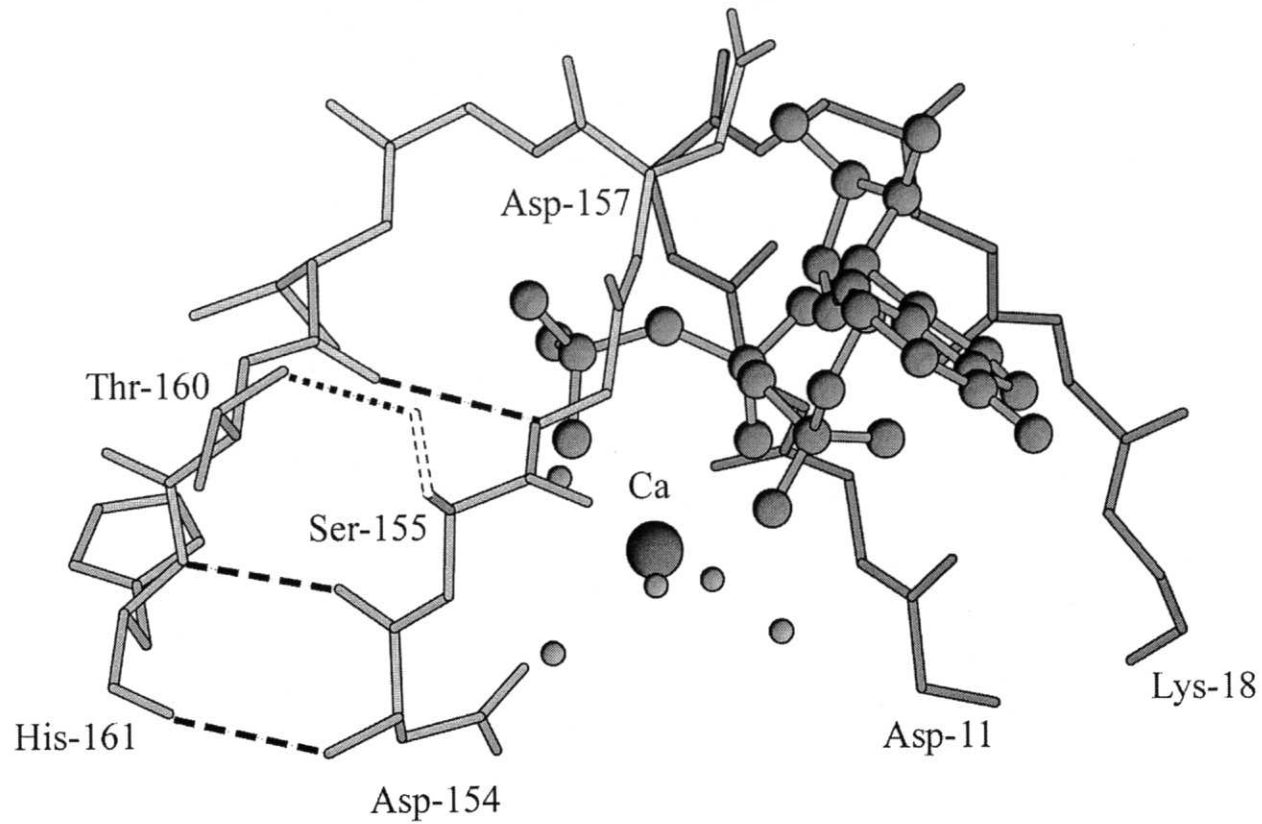


Fig. 3-3 Details of nucleotide and Ca^{2+} binding to the β -hairpin.

The β -hairpins at Asp-11-Lys-18 (dark grey) and Asp-154-Met-161 (light grey) sandwich AMP-PNP (ball-and-stick). Bound Ca^{2+} (large sphere) is coordinated with phosphates of AMP-PNP and water molecules (small spheres). Hydrogen bonds between the backbone atoms of the β -hairpin at Asp154-Met161 are shown by broken lines. A putative hydrogen bond between the side chain hydroxyls of Ser-155 and Thr-160 is shown by the dotted line. Due to a lack of the hydroxyl group (broken line) in Ala-155, the hydrogen bond is not formed in carp actin.

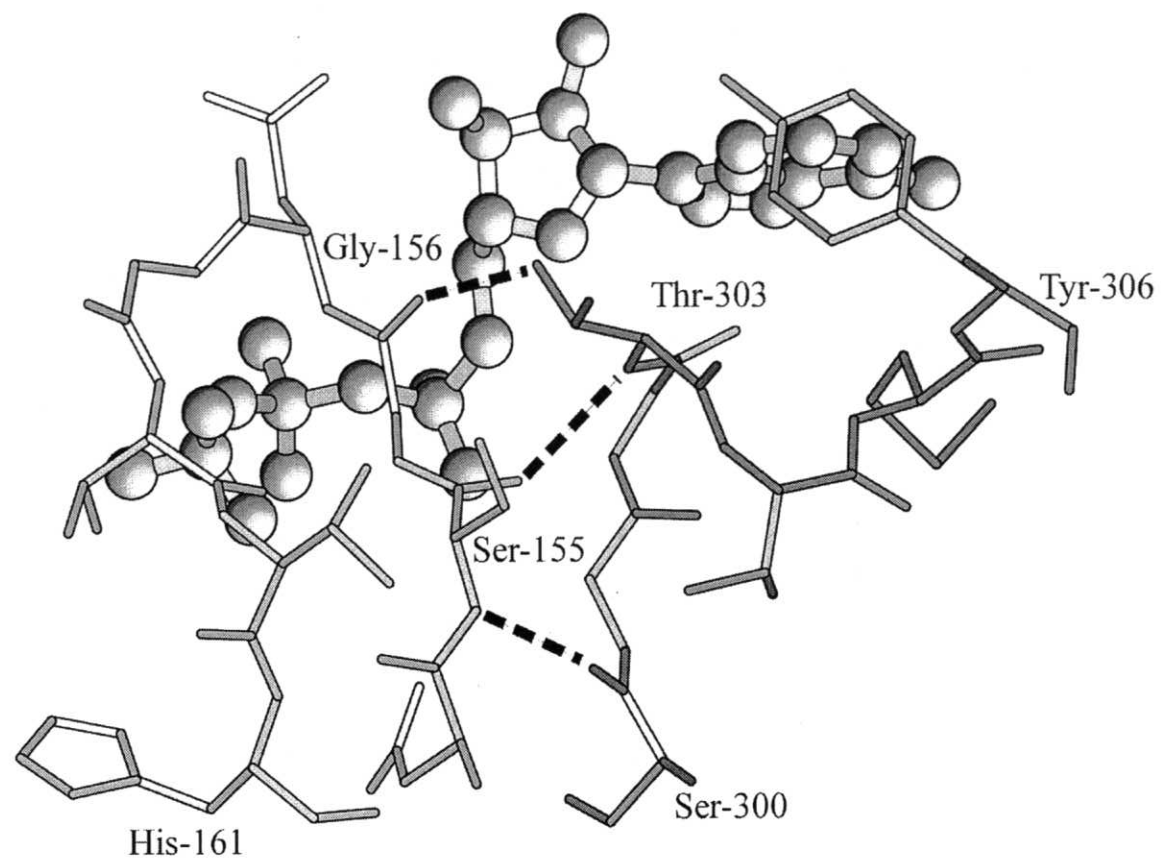


Fig. 3-4 Linkage between Asp-154 – His-161 and Met-295 – Tyr-306 β -hairpins

Hydrogen bonds between β -hairpins are shown by broken lines. The β -hairpins Asp154-Met161 and Ala295-Tyr306 are linked by three hydrogen bonds.

第4章 コイ骨格筋アクチンの熱安定性

一般に魚類筋タンパク質は、陸棲の温血動物筋タンパク質と比して熱安定性に劣ることが種々の比較生化学的研究によって明らかになっている (Takashi R., 1973; Kimura *et al.*, 1988; Huang & Ochiai, 2005)。魚類の骨格筋アクチンの熱安定性に関しては、Swezey & Somero (1982)によってコイ骨格筋アクチンの熱変性がウサギ骨格筋アクチンに比して容易に進行することが報告されている。しかしながら、コイ、ニジマス、スケトウダラ骨格筋アクチンの熱安定性がウサギ骨格筋アクチンの熱安定性と実質的な差異はないという報告もあり (Torigai & Konno 1997)、その詳細は不明である。

一般にタンパク質の安定性とは、ポリペプチド鎖の3次構造を形成しているファンデルワールス力、水素結合、疎水結合、塩橋などの相互作用の強さで決定される。しかしながらアクチンの場合には、序論に記したようにヌクレオチドや2価の陽イオンの結合による安定化が著しいため、単純にポリペプチド鎖の3次構造の安定性のみで判断することはできない。すなわち、ポリペプチド鎖自身の安定性、ヌクレオチドの結合による3次構造の安定化の程度、ヌクレオチドの親和性の高さといった多様な要因から総合的にアクチン分子の安定性が決定される。魚類骨格筋アクチンの熱安定性の特徴を明らかにするためには、これらの要因を個別に検討する必要があると考えられる、そこで本章では、前章までに明らかになったコイ骨格筋アクチンにおけるヌクレオチドや2価の陽イオンとの低親和性およびヌクレオチドの結合に伴うアクチンの構造安定化の弱さがコイ骨格筋アクチンの熱安定性にどのように影響しているかを明らかにすることを目的とした。

アクチンは低イオン強度の溶液では球状のタンパク質モノマー (G-アクチン) として存在し、生体中や高い塩濃度条件下では重合してポリマーとなり、繊維状の形態をとる (F-アクチン)。G-アクチンとF-アクチンでは安定性に大きな隔たりがあり、熱に対してはF-アクチンの方が安定である (Lehrer & Kerwer 1972; Bertazzon *et al.*, 1990)。このことはアクチンの熱安定性を調べる上でひとつの問題になると考えられた。アク

チンの重合過程は吸熱反応であり高温条件では重合しやすい (Oosawa & Asakura, 1975)。したがって常温において低イオン強度下でモノマーとして存在するアクチンも、高温にさらされることによって重合し、熱安定性が上昇する場合もありうる。これまで一般的に行われてきたアクチンの熱変性速度の測定方法では、加熱によって高温条件下に移行した際のアクチンの重合をモニターすることは容易ではなく、ほとんど注意を払われてこなかった。そこで本章では加熱中の重合によるアーティファクトを排除することができる新規熱変性速度測定方法を示し、その方法を用いて種々の ATP および Ca^{2+} の濃度での熱安定性の測定を行った。

第1節 アクチン変性量の新規測定方法の開発

本節では新たにアクチンの熱変性速度を測定する方法の確立を行った。一般にタンパク質の熱変性を調べる手法としては、円二色性分光分析や示差走査熱量計を用いて2次構造の崩壊過程を解析する方法と、3次構造の崩壊に由来する活性の低下を解析する方法の二種類に大別できる。アクチンの熱安定性の研究においては種々の簡易測定法も用いられてきており、前者を原理とする DNase I 阻害活性測定法やタンパク質分解酵素(キモトリプシン)による限定分解を検出する方法と、後者を原理とするアクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性測定法の例がある。本研究では後者を原理とするアクチンの重合能の失活を指標とした。

重合能を測定するために蛍光色素 N-(1-pyrene)iodoacetamide (以下、パイレンと略す)を用いてアクチンの化学修飾を行った。パイレンによる化学修飾したアクチンを用いることによって、熱処理後の未変性アクチンの定量が容易になるばかりでなく、熱処理中の重合を検出することが可能となる。しかしながら、一般に熱によって劣化しやすい蛍光色素を用いることの問題や化学修飾を施すことによるアクチンの熱安定性への影響の可能性がある。そこで本節ではパイレンによる新しい熱変性速度測定方法の有効性を検証した。

実験方法

タンパク質試料

コイ骨格筋アクチンの抽出・精製は第2章の調製方法に従った。

試薬

N-(1-pyrene)iodoacetamide はモレキュラープローブ社(現インビトロジェン社)より購入した。

蛍光ラベルアクチンの調製

Kouyama & Mihashi (1981)の方法に準じてアクチンの蛍光ラベルを行った。G-アクチンを 20 μM に希釈し、F-バッファー (1 mM NaHCO_3 、1 mM MgCl_2 、100 mM KCl 、80 μM CaCl_2 、200 μM ATP 、1 mM NaN_3) を外液として透析によって重合させた。N-(1-pyrene)iodoacetamide を N,N-dimethylformamide で溶解し、339 nm でのモル吸光係数 26,000 を用いて濃度決定を行った。溶解した蛍光色素を F-アクチン溶液にモル比で 3 倍量になるよう少量ずつ水中で攪拌しながら加えた。その後、水中で 30 分間攪拌を続け、さらに 20 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間反応させた。終濃度 5 mM 2-メルカプトエタノールを加えて反応を止め、これを遠心分離 (10,000 $\times g$, 20 min) し、色素凝集物を分離した後、遠心分離 (220,000 $\times g$, 60 min) によって F-アクチンを回収した。沈殿を G-バッファー (1 mM NaHCO_3 、200 μM CaCl_2 、200 μM ATP 、1 mM NaN_3 、1 mM 2-メルカプトエタノール) でホモジナイズし、同溶液で一晩透析してアクチンを脱重合させた。透析終了後、遠心分離 (220,000 $\times g$, 60 min) を行い、上清を蛍光ラベルアクチンとした。

タンパク濃度の決定

蛍光ラベルアクチンの濃度は、ブラッドフォード法を用いて (Bradford, 1976)、濃度既知の未修飾アクチンを標準として決定した。またアクチンに修飾されている蛍光色素パイレンの濃度を 344 nm のモル吸光係数 22,000 から求めた (Kouyama & Mihashi, 1981)。アクチンに対するパイレンの修飾率は 82~95 %であった。

蛍光分光測定

蛍光分光分析は第 1 章の方法に準じて行った。但し、パイレンの蛍光は励起波長 365 nm (バンドパス 1.5 nm)、測定波長 407 nm (バンドパス 10 nm) で測定を行った。

蛍光法による G-アクチンの熱変性量の測定

パイレン蛍光を利用した新規熱変性量測定方法 (以下、パイレンアッセイと略す)

での定量の概略を Fig.4-1 に示す。(a) 蛍光ラベル率 10 % のアクチン溶液を調製する。(b) 熱処理を行うと一部のアクチン分子が変性する。(c) 重合能を失ったアクチンはイオン強度を上げてても重合しない。パイレンの蛍光は重合によって蛍光強度が 20-25 倍増大するため、(c) の溶液の蛍光強度から重合量を算出できる。

実際の実験は以下のように行った。蛍光色素ラベル率を 10 % になるように未修飾アクチンとパイレン修飾アクチンを混合し、総アクチン濃度が 20 μM になるように調製した。この際に G-バッファには、熱処理温度で pH7.5 になるように調製した HEPES を終濃度 2 mM になるよう添加した。加熱処理時間分のプラスチック製サンプルチューブに 100 μL のアクチン溶液を分注した。標準温度計 1 号 (0~50 $^{\circ}\text{C}$)、2 号 (50~100 $^{\circ}\text{C}$) を用いて校正した恒温槽 (Julab model F-10) にサンプルチューブを入れ熱処理を開始した。任意の時間の熱処理後、サンプルチューブを恒温槽より取り出し、氷中で冷却後、溶液条件を 2 mM MgCl_2 、100 mM KCl 、20 mM HEPES (pH7.5, 20 $^{\circ}\text{C}$) にして重合を開始した。室温 2 時間もしくは 4 $^{\circ}\text{C}$ において一晩重合させた後、蛍光強度の測定を行った。

蛍光法による F-アクチンの熱変性量の測定

パイレンアッセイでは試料が F-アクチンの場合においても変性量を測定することが可能である。但し、F-アクチンを加熱すると凝集体が生成するため (Taguchi *et al.*, 1979; Watabe *et al.*, 1983)、正確な定量には工夫が必要であった。F-アクチンの場合のアッセイ方法を示す (Fig.4-2)。(a) ラベル率 10 % の F-アクチンを調製する。(b) 熱処理を行い、大量の冷 G-バッファを加えて変性反応を停止させる。(c) 熱処理中に生成する凝集体の細分化および F-アクチンフィラメント内にある部分変性したアクチンを分離するために超音波処理を行う。(d) 氷中で脱重合させる。(e) 塩添加により未変性アクチンを重合させる。

実験手順は以下の通りである。ラベル率 10 % の 40 μM の F-アクチンを調製し、熱処理の直前に pH バッファのストック溶液を加え、溶液条件を終濃度 1 mM MgCl_2 、2 mM ATP、50 mM KCl 、2 mM 2-メルカプトエタノール、20 mM HEPES (pH7.5 熱

処理温度)にした。プラスチック製サンプルチューブに 100 μ L ずつ分注し、熱処理を行った。熱処理後、あらかじめ水中で冷却しておいた 0.9 mL の G-バッファーを加え、変性反応を停止させた。直ちに超音波ホモジナイザー (HEAT SYSTEMS INC., SONICATOR W-375) を用いて試料溶液の超音波処理を行った。水中に 1 晩静置し、脱重合させた。塩添加によって未変性アクチンを再度重合させ蛍光強度を測定した。

結 果

蛍光色素の熱安定性

蛍光色素パイレンヨードアセトアミドはアクチンの重合を感度良く簡易にモニターできることから、アクチンの研究において頻繁に用いられる蛍光色素である。しかしながら本研究のように高温下にさらされる実験における使用例がないため、色素自体の熱安定性を確認することは重要であった。そこで本研究で用いられる熱処理条件である 50、60、70 $^{\circ}$ C において蛍光色素パイレンを熱処理し、その蛍光強度に与える影響を調べた (Fig.4-3)。その結果、本章で用いる最も高い熱処理温度 70 $^{\circ}$ C、3 時間の熱処理によっても蛍光強度の低下は 6%以下であることが明らかになった。また 50 または 60 $^{\circ}$ C の熱処理においては蛍光強度への加熱の影響は見出されなかった。以上のことから本研究で用いられる温度範囲内では蛍光色素パイレンは熱に対して充分安定であるということが確認された。

そこでパイレンヨードアセトアミドで化学修飾したコイ骨格筋 G-アクチンに 50 $^{\circ}$ C の熱処理を行い、塩添加による重合後の蛍光強度を測定した (Fig.4-4)。加熱時間が長くなるにしたがって蛍光強度は速やかに減少し、熱処理によるアクチンの重合能の低下が測定できることが明らかになった。

アクチンの熱安定性へのパイレン修飾の影響

化学修飾によってタンパク質の安定性が影響を受ける場合があることはよく知ら

れている。パイレンアッセイにおいては、アクチンの 374 番のシステインをパイレンヨードアセトアミドによって化学修飾するため、アクチンの安定性に対する化学修飾の影響を明らかにする必要がある。そこで加熱処理の供試試料として異なる蛍光色素修飾率の試料を用いて蛍光強度の減衰速度に及ぼす影響を調べた (Fig.4-5)。本実験においてはパイレン修飾アクチンのみによる重合の可能性を排除するために、熱処理後のアクチンの重合には $MgCl_2$ を添加せず、 KCl のみで重合させた。同条件下での臨界濃度は $1.25 \mu M$ であった。

Fig.4-5A はラベル率 1 %の試料を用いた結果である。この条件下では試料中のパイレン修飾アクチンのモル濃度は $0.2 \mu M$ であり、上述の臨界濃度以下となるためパイレン修飾アクチンのみでは重合フィラメントを形成することはできない。すなわち得られた F-アクチンの蛍光強度はパイレン修飾アクチンと未修飾アクチンとの共重合フィラメントのものである。したがって得られた蛍光強度の減衰速度は未修飾アクチンの熱変性速度を反映していると考えられた。指数関数によるカーブフィッティングの結果から蛍光強度の減衰速度は 0.035 min^{-1} であった。また本章の実験全般に用いられるラベル率 10 %の試料の減衰速度は 0.033 min^{-1} であった (Fig.4-5B)。またラベル率 95 %の試料ではパイレン修飾アクチンの変性速度が反映されると考えられるが、その減衰速度は 0.029 min^{-1} であった (Fig.4-5C)。これらの結果からパイレン修飾によってアクチンは変性速度において約 10 %程度の安定化をもたらされることが、本実験からラベル率 10 %の試料を用いる場合には、未修飾アクチンの安定性を充分反映した変性速度が得られることが示唆された。

重合に伴うアクチンの安定化の検出

パイレン修飾による骨格筋アクチンの熱変性過程の解析に有効な方法であることが示された。そこでこのアッセイの応用例としてアクチンの重合に伴う熱安定性の上昇が検出可能かを検証した (Fig.4-6)。55 °C の熱処理を施された G-アクチン試料から得られた蛍光強度は、熱処理時間とともに急速に減少し、20 分後には完全に変性していることが蛍光強度の減少曲線から示唆された。これに対して F-アクチン試料では蛍

光強度は緩やかに減少し、180 分間の熱処理によっても蛍光強度の減少は約 60 %であった。この結果からパイレンアッセイを用いてアクチンのモノマーおよびポリマー間における熱安定性の違いを検出できることが明らかになった。

要 約

蛍光色素パイレンは 70 °C の熱処理でも安定であり、化学修飾の熱安定性に対する影響も大きくないことが明らかになった。この方法を用いて重合に伴うアクチンの安定化を確認することができ、アクチンの熱安定性を調べる際に有効な方法であると判断された。

第2節 従来の熱変性速度測定方法との比較

これまでに行われてきた魚類骨格筋アクチンの熱変性の簡易定量法としては、アクチンによる DNase I 阻害活性の低下を測定する方法 (Swezey & Somero, 1982) と、アクチンによるミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性を指標に定量化するものがある (Torigai & Konno, 1997)。先述したように、この2つの方法で行われた結果からは異なる結論が得られている。ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性法はパイレンアッセイと同じくアクチンの重合能の喪失を指標とするものであり、分子の3次構造の崩壊を検出すると考えられる。一方、DNase I 阻害活性測定法はアクチンの表面に露出している疎水性ループの構造破壊を検出するもので、2次構造の崩壊過程を検出すると考えられる。モニターされる変性過程の違いによって熱安定性の評価が異なる可能性が考えられたため、本節ではこれらの従来方法とパイレンアッセイとの比較を行い、パイレンアッセイの特性を明らかにした。

実験方法

タンパク質試料

コイおよびニワトリ骨格筋アクチン、それらのパイレン修飾アクチンの調製は前節の方法に従った。 Mg^{2+} -ATPase 活性測定に用いたミオシンはウサギ骨格筋より Margossian & Lowey (1982)の方法によって調製した。ミオシンサブフラグメント1は Okamoto & Sekine (1985)の方法に従って調製した。

試薬

サケ精子由来 DNA およびウシ膵臓由来 DNase I はシグマ社から購入した。その他の試薬はすべて特級レベルを用いた。

無機リン酸の定量

無機リン酸の定量は、マラカイトグリーン法を改変して行った。すなわち Kodama *et al.* (1986)の方法に従って無機リン酸とモリブデン酸との反応生成物モリブドリン酸生成させた後、終濃度 3.2 %のクエン酸で過剰のモリブデン酸を除去することによって ATP の分解を抑制した。

パイレンアッセイ

前節の蛍光法による熱変性量の測定に従った。

DNase I 阻害活性測定

DNA と DNase I 溶液の調製は Blikstad らの方法に従って行った (Blikstad *et al.*, 1978; Schüler *et al.*, 2000)。DNAase I の調製はウシ膵臓由来の DNase I を 50 mM、Tris-HCl(pH7.5)、0.01 mM PMSF、0.1M CaCl₂ に溶解し氷中保存した。サケ精子 DNA を 100 mM Tris-HCl (pH7.5 室温)、4 mM MgSO₄、1.8 mM CaCl₂ からなる溶液に微細に切断した DNA を加えて可溶化し、吸引濾過後、260 nm での吸光度が 0.621 になるように上記の緩衝液を用いて希釈して DNA 溶液とした。

DNase I 活性は 3 mL の DNA 溶液 (25 °C) に 3 μg の DNase I を添加し、260 nm における紫外吸収の増加 (濃色効果) 速度から算出した。アクチンの加熱処理後の残存活性は 3 μg の DNase I の活性を 40~60 %に低下させるのに必要な熱処理アクチン溶液量から求めた。熱処理は前節の蛍光法による熱変性量の測定の項に記した方法に従った。

アクチン活性化ミオシン Mg²⁺-ATPase 活性を用いたアクチン重合量の定量

前節の蛍光法による熱変性量の測定に記した方法に従ってアクチンの熱処理を行い、2 mM MgCl₂、100 mM KCl、20 mM HEPES (pH7.5, 20 °C)で重合後、ミオシン Mg²⁺-ATPase アッセイに供した。すなわち重合アクチン溶液に 0.1 μM ウサギ骨格筋ミオシンサブフラグメント 1 を添加し、放出された無機リンの定量はマラカイトグリー

ン法で行った。

結 果

アクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性方法との比較

50℃での熱処理によるアクチン重合能の変化を、パイレンアッセイとアクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase 活性測定法の2法で比較した (Fig. 4-7)。どちらのアッセイにおいても熱処理によって活性の低下が見られたが、残存活性の減衰はパイレンアッセイの場合より有意に遅いことが明らかになった。パイレンアッセイにおいて活性がほぼ0になる50分の熱処理時間においてもアクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase 活性測定法では25%以上の活性が残存していた。またアクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase 活性測定法に比してパイレンアッセイは測定精度ならびに単一指数関数によるカーブフィッティングの結果が良好であることが明らかになった。

DNase I 阻害活性測定法との比較

45、50℃におけるアクチンの熱失活をパイレンアッセイとDNase I 阻害活性測定法の両法で比較した (Fig. 4-8)。45℃の熱処理ではパイレンアッセイによって測られたアクチンの重合能の喪失は、DNase I 阻害活性の喪失よりも速やかに起きること明らかになった。100分間の熱処理によってすべてのアクチン分子は重合能を失っていたが、DNase I 阻害活性は約45%残存していた。残存活性が1/2になる時間はパイレンアッセイにおいては37分、DNase I 阻害活性測定法では100分であった。50℃においてはこの熱失活速度の差は小さくなり、熱失活のハーフタイムはパイレンアッセイにおいて15分、DNase I 阻害活性測定法で25分であった。反応温度を5℃上昇させることによって、パイレンアッセイで見た重合能の失活速度は約2.5倍、DNase I の阻害活性の失活速度は約4倍大きくなっており、これらの2法が活性化エネルギーの異なる2つの熱反応をモニターしていることが示唆された。

要 約

従来から用いられているアクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性測定法および DNase I 阻害活性測定法とパイレンアッセイの比較を行った。同じ重合能の喪失を指標とするアクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性測定法においても熱失活反応の進行速度には一致が見られなかった。パイレンアッセイにおいて完全に失活する熱処理時間において、アクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性の残存量が大きく算出された。このことから部分変性アクチンのミオシンによる重合促進の可能性が考えられた。また DNase I の阻害活性の失活速度は、パイレンアッセイでモニターされた失活速度より遅く、パイレンアッセイの変性状態に対する感度の高さが示された。

第3節 コイ骨格筋アクチンの熱変性速度

前節までに明らかになったように、パイレンアッセイは操作が容易なだけでなく、測定精度が高い。さらに DNase I 阻害活性測定方法などの従来の方法と比較して低温での失活に対する感度が高い。これらのアッセイの特徴から、熱安定性が類似していると予想される骨格筋アクチン同士の安定性を比較する際には、パイレンアッセイは有効な方法であると考えられる。

本節ではパイレンアッセイを用いてニワトリ骨格筋アクチンを対照としてコイ骨格筋アクチンの熱変性速度を測定した。

実験方法

試料

骨格筋アクチンは前章第1節の方法によって調製した。パイレンによる化学修飾は本章第1節の方法に従った。

パイレンアッセイ

本章第1節の方法に従って行った。

結果

コイ骨格筋 G-アクチンの熱変性速度

熱処理によるコイおよびニワトリ骨格筋アクチンの熱処理による重合能喪失過程の例を Fig.4-9 に示す。熱処理は 50、52.5、55 °C で行った。いずれの熱処理温度においても重合能の喪失はニワトリ骨格筋アクチンに比してコイ骨格筋アクチンにおいて速やかに進行し、コイ骨格筋アクチンの熱安定性の低さが明らかになった。両アクチ

ンにおいて熱処理による残存活性は指数関数的に減少していた。そこで未変性アクチンの残存量を対数プロットし変性速度定数を算出した (Fig.4-9 insets)。50 °C における変性速度定数はコイ骨格筋アクチンでは 0.087 min^{-1} (相関係数 ; 0.999)、ニワトリ骨格筋アクチンでは 0.035 min^{-1} (0.994) であった。また 52.5 °C においてはコイ骨格筋アクチンで 0.29 min^{-1} (0.975)、ニワトリ骨格筋アクチンで 0.054 min^{-1} (0.992) であり、55 °C においてはコイ骨格筋アクチンで 0.37 min^{-1} (0.989)、ニワトリ骨格筋アクチンで 0.15 min^{-1} (0.998) であった。相関係数の高さから判断して、いずれのアクチンの場合も熱変性反応が未変性状態から変性状態への一次反応であることが示唆された。

種々の温度で得られた重合能の喪失速度を Fig.4-10 に示す。コイ骨格筋アクチンにおいては 45 °C の熱処理によっても重合能の喪失速度を求めることが可能であったが、ニワトリ骨格筋アクチンについては 45、47.5 °C においては重合能の低下は見出されなかった。コイ骨格筋アクチンの変性速度定数はニワトリ骨格筋アクチンに比して明らかに大きいですが、温度依存性については両アクチンとも類似していた。そこで変性速度定数のアレニウスプロットを行った (Fig.4-11)。その結果、両アクチンの熱変性速度の対数値は温度の逆数に対してほぼ平行な直線上に分布することが明らかになった。この直線の傾きは変性過程の活性化エネルギーを示すが、最小二乗法によって算出された値はコイ骨格筋アクチンにおいては $258 \pm 18 \text{ kJ/mol}$ 、ニワトリ骨格筋アクチンにおいては $270 \pm 29 \text{ kJ/mol}$ であった。両者は 95 % の信頼区間内にあり、有意な差は見出されなかった。すなわちコイ骨格筋アクチンの熱変性の速さは活性化エネルギーによるものではなく、変性過程の頻度因子の違いによるものであることが示唆された。

F-アクチンの熱変性速度

パイレンアッセイでは F-アクチンの熱変性速度も測定することができることを前節で示した。Fig.4-12 はコイ骨格筋 F-アクチンとニワトリ骨格筋 F-アクチンの熱処理による重合能の低下をパイレンの蛍光強度で示したものである。測定は 57.5、60、62.5 °C で行った。コイ骨格筋アクチンの場合には、ほぼ指数関数的な減少が見られたが、

ニワトリ骨格筋アクチンにおいては2相性の減少曲線になり、このF-アクチンの熱変性反応が一次反応ではないことを示していた。

熱変性速度に関してはコイ骨格筋 F-アクチンの熱変性はニワトリ骨格筋 F-アクチンに比して明らかに速く、62.5 °C の熱処理でコイ F-アクチンは5分後にほぼ完全に重合能を喪失したのに対し、ニワトリ骨格筋アクチンでは30分後も約50%の重合能を有していた。F-アクチンの熱変性反応が一次反応ではないため、正確な変性速度定数を評価することはできなかったが、熱安定性の目安として線形最小二乗法を用いて速度定数を求めた。その結果、57.5 °C ではコイ骨格筋アクチンの速度定数は 0.042 min^{-1} であり、ニワトリ骨格筋アクチンでは 0.003 min^{-1} となった。また62.5 °C ではコイ骨格筋アクチンにおいて 0.96 min^{-1} であり、ニワトリ骨格筋アクチンでは 0.09 min^{-1} であった。57.5 °C では変性速度に約14倍の差があることが明らかになった。

要 約

パイレンアッセイによるコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンの熱変性速度の測定からコイ骨格筋アクチンの熱に対する不安定性の大きさが明らかになった。ニワトリ骨格筋アクチンが熱処理に対して重合能の低下を示さない45、47.5 °C においてもコイ骨格筋アクチンでは明らかな重合能の低下が見出された。熱力学的な解析から、この変性速度の大きさは活性化エネルギーの差異によるものではないことが明らかになった。またF-アクチンの変性速度定数の比較から、コイ骨格筋アクチンの熱不安定性は重合状態においても当てはまることが明らかになった。

第4節 ATP および Ca^{2+} の熱安定性に及ぼす影響

第2章においてニワトリ骨格筋アクチンに比してコイ骨格筋アクチンの ATP の親和性が約 60 % 低下していることを明らかにした。またカルシウムに対する親和性も約 40 % 低下していた。本節では、これらの低親和性が熱安定性に及ぼす影響を種々の ATP および Ca^{2+} 濃度での変性速度の測定から明らかにした。さらに得られた変性速度の熱力学的解析からコイ骨格筋アクチンの変性過程の特性を明らかにした。

実験方法

試料および試薬

本章第2節と同じ試料および試薬を用いた。

パイレンアッセイ

本章第1節に準じて行った。熱処理は蛍光光度計 (Hitachi F-4010) にセットした循環式恒温槽 (NESLAB RTE-110) で行った。温度の校正は標準水銀温度計1号 (0~50°C)、2号 (50~100°C) を用いて行った。熱処理中、重合能測定試料とは別に調製した試料を用いて、循環式セルホルダーの温度を熱処理温度に合わせた蛍光光度計によって発光スペクトルを測定し、加熱による重合促進をモニターした。

結果

熱変性速度の ATP および Ca^{2+} 濃度依存性

種々の濃度の ATP および Ca^{2+} 存在下で 50 °C の熱処理を 20 分間行い、残存する未変性アクチンの割合を ATP 濃度に対してプロットした (Fig.4-13)。ニワトリ骨格筋アクチンの場合、ATP 濃度に依存した残存アクチン量の変化は見られなかったのに対し

て、コイ骨格筋アクチンにおいてはいずれの Ca^{2+} 濃度においても 0.2 mM より低い濃度では安定性の低下が見られた。Torigai & Konno (1997) は魚類アクチンの熱安定性を調べる際に ATP 濃度は 0.2 mM で充分であることを記しているが、本実験の結果はそれを支持していた。

アクチンの熱安定性に対して Ca^{2+} はより顕著な安定化効果を示した。0.1 mM の Ca^{2+} 濃度においては ATP 濃度によらず、50 °C、20 分間の熱処理によってすべてのコイ骨格筋アクチンが失活したが、 Ca^{2+} 濃度を 0.15 mM に上昇させると約 20% の残存が確認された。 Ca^{2+} を増加させることによって溶液のイオン強度が必然的に増加し、重合によるアクチンの安定化が起きる可能性がある。パイレンアッセイでは熱処理中にパイレン蛍光のスペクトルを測ることによってイオン強度の増加に伴う重合のモニターが可能である。0.6 mM Ca^{2+} 存在下では、いくつかの試料において熱処理中に重合が起きていることが確認できたが、0.4 mM 以下の濃度では 50 °C という高温下においても重合に伴う蛍光スペクトルの変化は観察されなかった。したがってカルシウムによるアクチンの著しい安定化は重合促進によるものではないことが明らかになった。

高カルシウム濃度下での活性化エネルギー

上述のようにコイ骨格筋アクチンの熱安定性は Ca^{2+} の影響を強く受けていた。本章第 3 節において 200 μM ATP、200 μM Ca^{2+} 存在下でのアクチンの熱変性反応の活性化エネルギーを求め、コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンの活性化エネルギーに差は見出されないことを示した。この活性化エネルギーに Ca^{2+} 濃度がどのように影響を及ぼすか明らかにするために、400 μM ATP、400 μM Ca^{2+} 存在下で熱変性速度を測定し、アウレニウスプロットによる解析を行った (Fig.4-14)。その結果、この条件下ではコイ骨格筋アクチンの活性化エネルギーは 292 ± 8 kJ/mol であった。Student's t 検定では 95% の信頼度で、ATP および Ca^{2+} 濃度を上げることによって活性化エネルギーが有意に大きな値になることが明らかになった。しかしながら、この活性化エネルギーの上昇はニワトリ骨格筋アクチンにおいても見られ、その値は 312 ± 14 kJ/mol であった。同イオン強度下における比較ではコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋ア

クチンの変性の活性化エネルギーに有意さは見出されず、コイ骨格筋アクチンの高い熱不安定性はその反応の頻度因子に要因があることが示唆された。

要 約

本章第3節で明らかになったコイ骨格筋アクチンの低い熱安定性は、カルシウムの濃度を上げることによって著しく抑制されることが明らかになった。変性過程の活性化エネルギーにおいては、コイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンの間に有意な差は見出されず、コイ骨格筋アクチンの変性の速さは頻度因子の大きさによるものであることが示唆された。

第5節 考察

一般にタンパク質は熱変性によってその機能の失うため、活性の低下を熱変性の指標として用いることが多い。本章ではアクチンの最も重要な性質の1つである重合能の低下を熱変性の指標とした。アクチンの重合は、粘性や光散乱強度の増大、蛍光強度変化、ミオシン Mg^{2+} -ATPase の活性化などを用いて定量化することが可能である。その中でも蛍光法は感度が高く、蛍光強度が重合したアクチン分子の数のみに比例することから重合の定量にしばしば用いられている (Cooper *et al.*, 1983; Detmers *et al.* 1981)。本章ではパイレン蛍光の感度の高さ、熱に対する蛍光色素の安定性を利用し、外部蛍光プローブとして導入した。

熱処理による重合能低下の定量に外部蛍光を用いた利点のひとつにアッセイの容易さがある。熱処理後の試料に塩添加して重合させれば直ちに定量化が可能である。パイレンアッセイのもう1つの利点は加熱処理中の重合をモニターできることである。本章で行ったようにアクチンの熱安定性に及ぼす Ca^{2+} の影響を調べる場合には、イオンによる安定化がアクチンの重合によるものではないことを確認することが重要であった (Fig. 4-13)。したがって蛍光修飾されたアクチンの調製を要するという欠点はあるが、パイレンアッセイは有用な方法であると考えられた。

パイレン修飾がアクチンの重合の性質に影響を与えないことは、すでに明らかにされている (Kouyama & Mihashi, 1981; Cooper *et al.*, 1983)。アクチンの熱安定性への影響については、Halasi *et al.* (2006)がパイレン修飾によってアクチンの2次構造の転移温度が $66^{\circ}C$ から $68^{\circ}C$ にシフトすることを報告している。本章第1節で明らかにしたように、パイレンアッセイに用いるアクチンのラベル率を1~95%の範囲で変えた試験において、得られた変性速度に約10%の変化しか見出されなかった (Fig.4-5)。したがってパイレン修飾はアクチンの安定性に大きく影響を及ぼすことなく、パイレンアッセイで得られた熱安定性に関する知見は未修飾アクチンの熱安定性を反映していると考えられた。

従来用いられてきたアクチンの熱変性の測定法とパイレンアッセイを比較すると、同じ重合能を指標としたアクチン活性化ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性測定においても、変性速度の一致は得られなかった (Fig.4-7)。パイレンアッセイにおいて完全失活していること検出された試料においてもミオシン Mg^{2+} -ATPase の活性化が検出された。ミオシンは低イオン強度下でもアクチンの重合を促進することが知られている (Detmers *et al.* 1981; Miller *et al.* 1988)。変性アクチンの場合にも、塩添加では重合しないアクチンがミオシンによって重合促進された可能性が考えられたが、詳細は不明である。一方、DNase I 阻害活性測定で得られた残存活性とは大きく異なっていた (Fig.4-8)。DNase I はアクチンのサブドメイン 2 に存在する疎水性ループと強く結合し、その活性が阻害される。Schüler *et al.* (2000)は、アクチンの熱変性に伴う DNase I 阻害活性の喪失過程が円二色性分光や紫外吸収の差スペクトル分光で検出されるアクチンの 2 次構造の崩壊とよく一致することを示した。本章での実験結果は、疎水性ループ領域の 2 次構造が未変性状態と同じ構造に保たれたまま重合能を喪失した部分変性状態が存在することを示唆していた。

本研究で確立したパイレンアッセイによって測定されたコイ骨格筋アクチンの熱変性速度は対照としたニワトリ骨格筋アクチンと比して明らかに速く、Swezey & Somero (1982)の結果を支持していた。先述したようにアクチンの熱安定性には、1) リガンドを結合していない状態の分子の熱安定性、2) リガンドとの親和性、3) リガンドの結合に伴う分子の安定化の 3 要因があげられる。1) に関しては、第 2 章第 2 節においてコイ骨格筋アクチンとニワトリ骨格筋アクチンではリガンドフリーの状態の熱変性速度定数に違いは見出されなかったため、コイ骨格筋アクチンにおける熱安定性の低さの要因にはなり得ないと考えられた。

2) に関しては、本章第 3 節で変性速度が ATP および Ca^{2+} によって強く影響を受けたことから、リガンドに対する低親和性に起因する平衡状態 (Fig.1-1) のシフトが熱安定性低下のひとつの要因になっていることが明らかになった。2 価イオンとして Ca^{2+} を結合している場合には、ヌクレオチドの交換は主にシーケンシャルルートで行われることが知られている (Valentin-Ranc & Carlier, 1988; Kinoshian *et al.*, 1993)。第 2

章第2節および第4節で明らかになった Ca^{2+} の結合および解離速度定数は、コイ骨格筋アクチンにおいてもシーケンシャルルートでの解離が主であることを示していた。本章第4節においてコイ骨格筋アクチンの熱安定性が ATP よりも Ca^{2+} 濃度に対して感受性が高いという結果を得たが、これはシーケンシャルルートでの Ca^{2+} の結合を高めることがコイ骨格筋アクチンの熱安定性の増加に最も効果的であることを示していると考えられた。

3) に関しては、第2章第3節において ATP 結合に伴う3次構造の安定化がコイ骨格筋アクチンにおいてはニワトリ骨格筋アクチンに比して劣ることが示されていることから、コイ骨格筋アクチンの熱安定性の低さの要因になり得る。しかしながら本章第3節で得られた熱変性過程はすべて一次反応として解析可能であり、単一分子種の未変性状態から変性状態への移行を検出していることを示唆していた。したがってパイレンアッセイで検出される変性過程は最も熱安定性の低いリガンドフリーアクチンの変性であると考えられた。すなわちアクチン・ATP 複合体およびアクチン・ATP・ Ca^{2+} 複合体の安定性はコイ骨格筋 G-アクチンの速い変性速度には反映されていないと考えられた。

以上のことから、本章で明らかになったコイ骨格筋アクチンの熱に対する安定性の低さはリガンド結合との低親和性に起因する平衡状態のシフトによるものであると結論した。

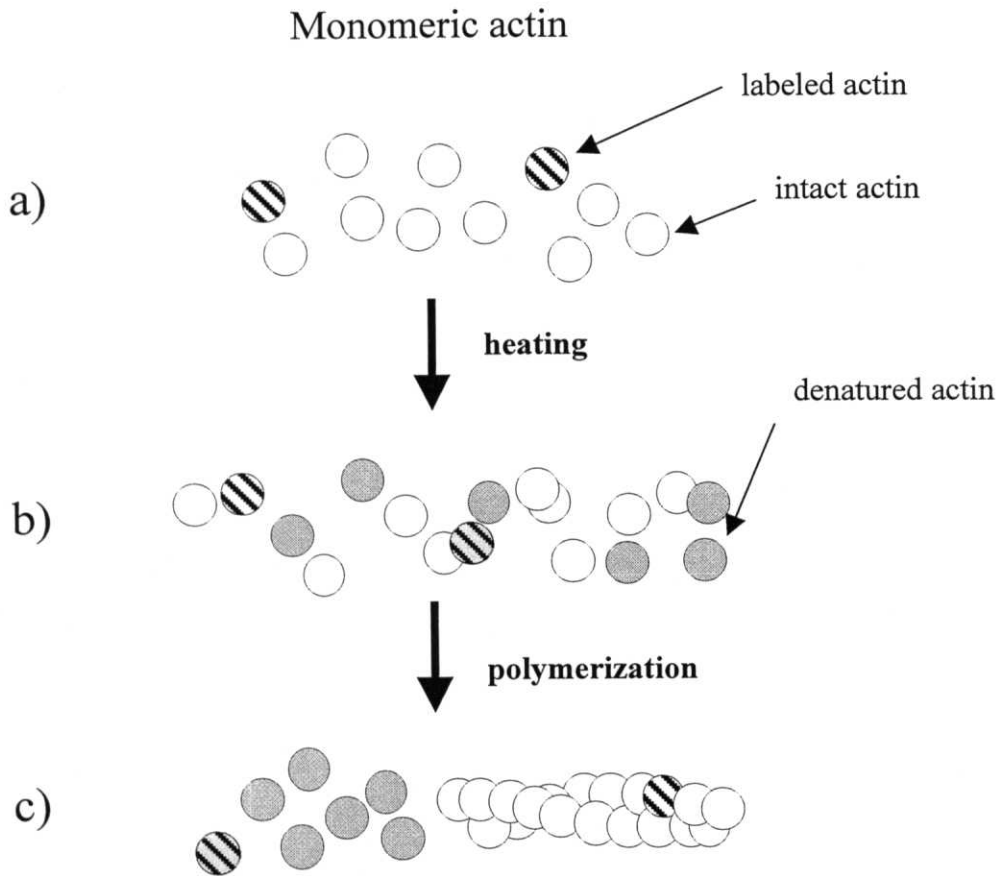


Fig. 4-1 Diagram of the quantification method for G-actin denaturation
 Intact and pyrene labeled G-actin are represented by open and shaded circles, respectively. When actin is treated by heat, actin denatures (closed circles). The denatured actin cannot polymerize by the addition of salt.

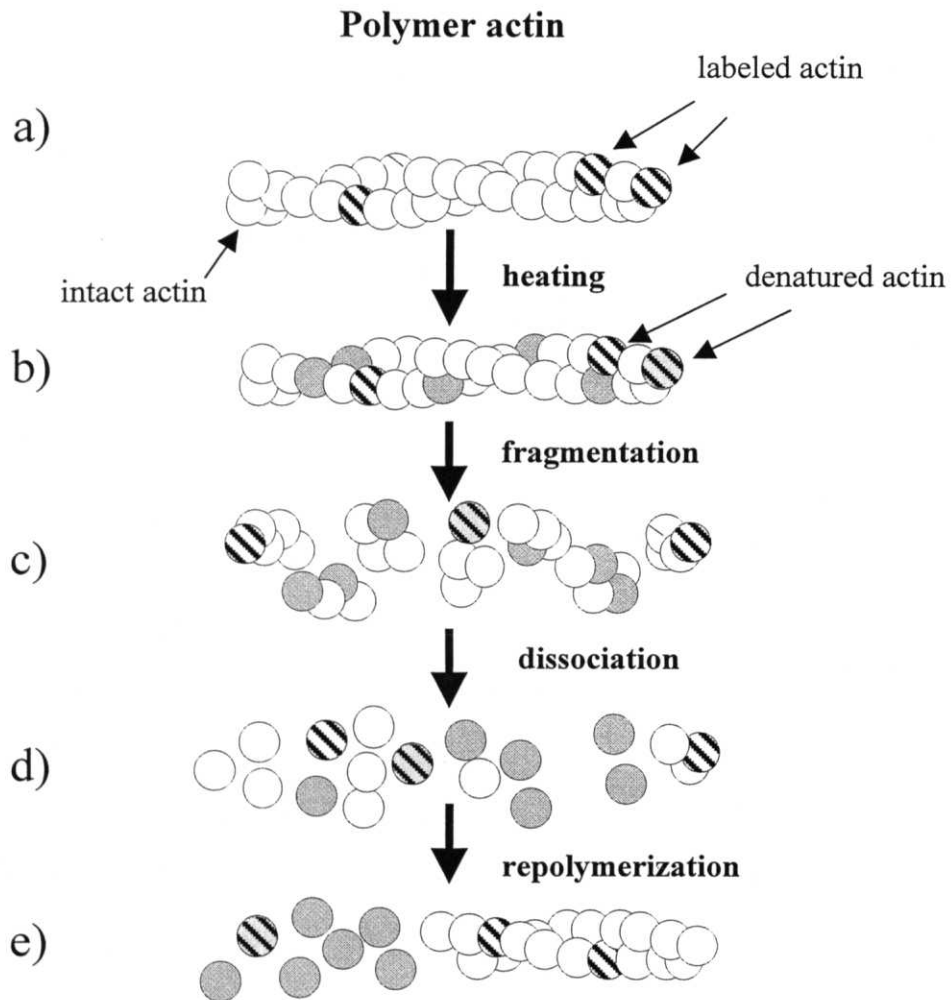


Fig. 4-2 Diagram of the quantification method for F-actin denaturation.

(a): Intact and pyrene labeled actins are represented by open and shaded circles, respectively. (b) :When actin is treated by heat, actin denatures in the filament (closed circles). (c)& (d): By a brief sonication in a low ionic strength solution, actin filaments are depolymerized rapidly. (e) :The denatured actin cannot polymerize even after the addition of salt.

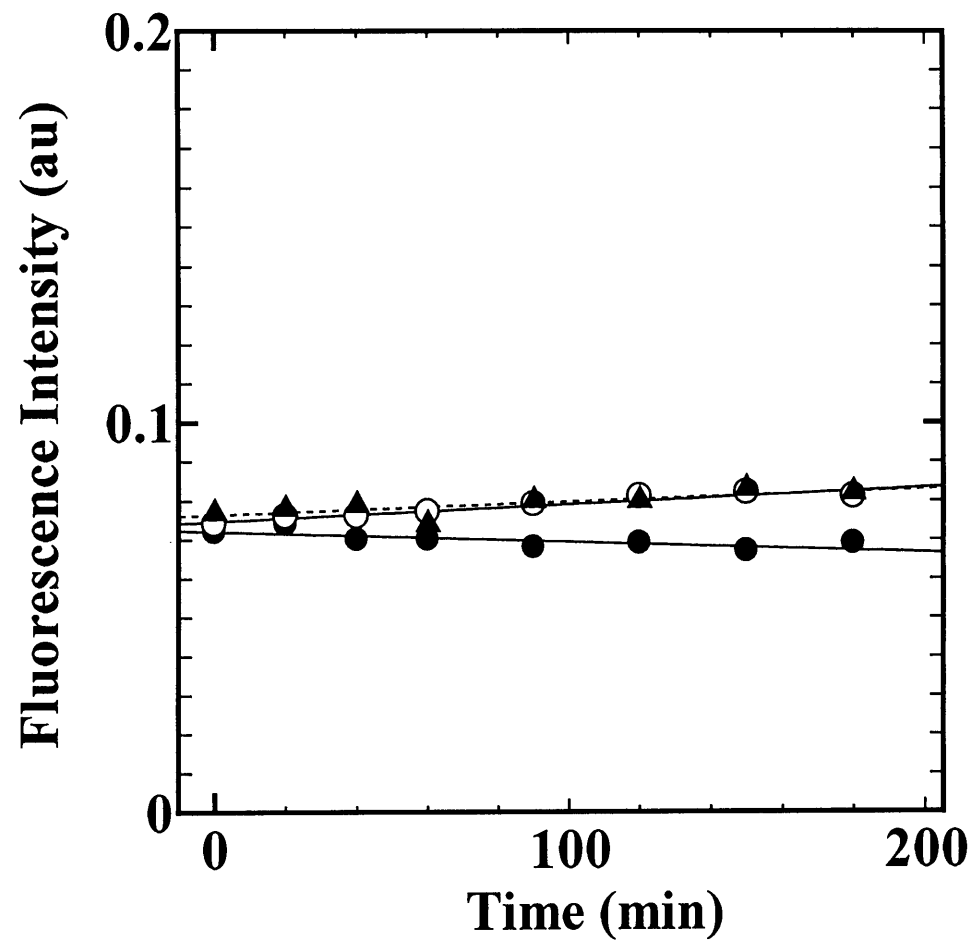


Fig. 4-3 Time course of pyrene fluorescence during heat treatment.
Pyrene iodoacetamide solution was treated by heat at 50 (open circles), 60 (closed triangles), 70 °C (closed circles). After the heat-treatment, the fluorescence intensity was measured.

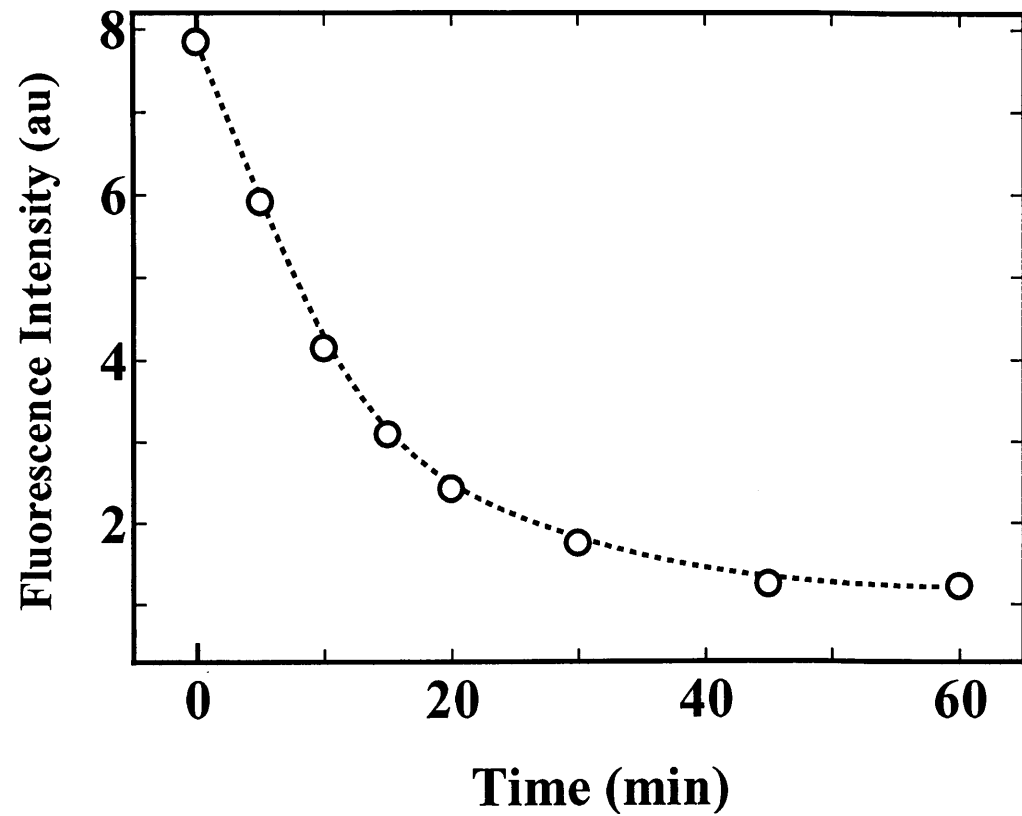


Fig. 4-4 Fluorescence intensity of heat-treated pyrene labeled actin.
Pyrene labeled G-actin solution was treated by heat at 50 °C. The G-actin solution was converted to F-actin by the addition of salt, then fluorescence intensity of the solution was measured. Other conditions: 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 2 mM HEPES, 2 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5.

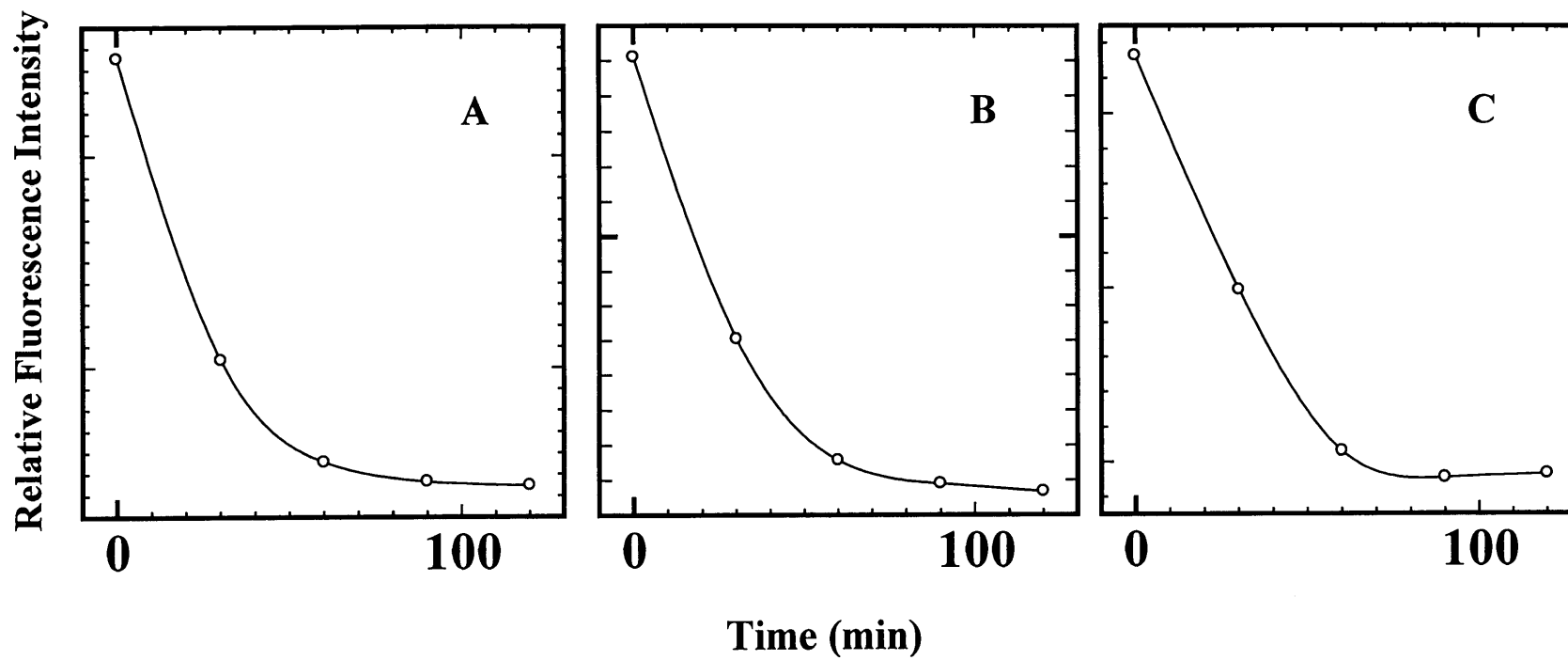


Fig. 4-5 Influence of the labeling ratio of pyrene to actin on the rate of fluorescence intensity decay.
The effect of labeling ratio was investigated. A, 1% labeled actin; B, 10% labeled actin; C, 95 % labeled actin.
Other conditions were the same as in Fig.4-4.

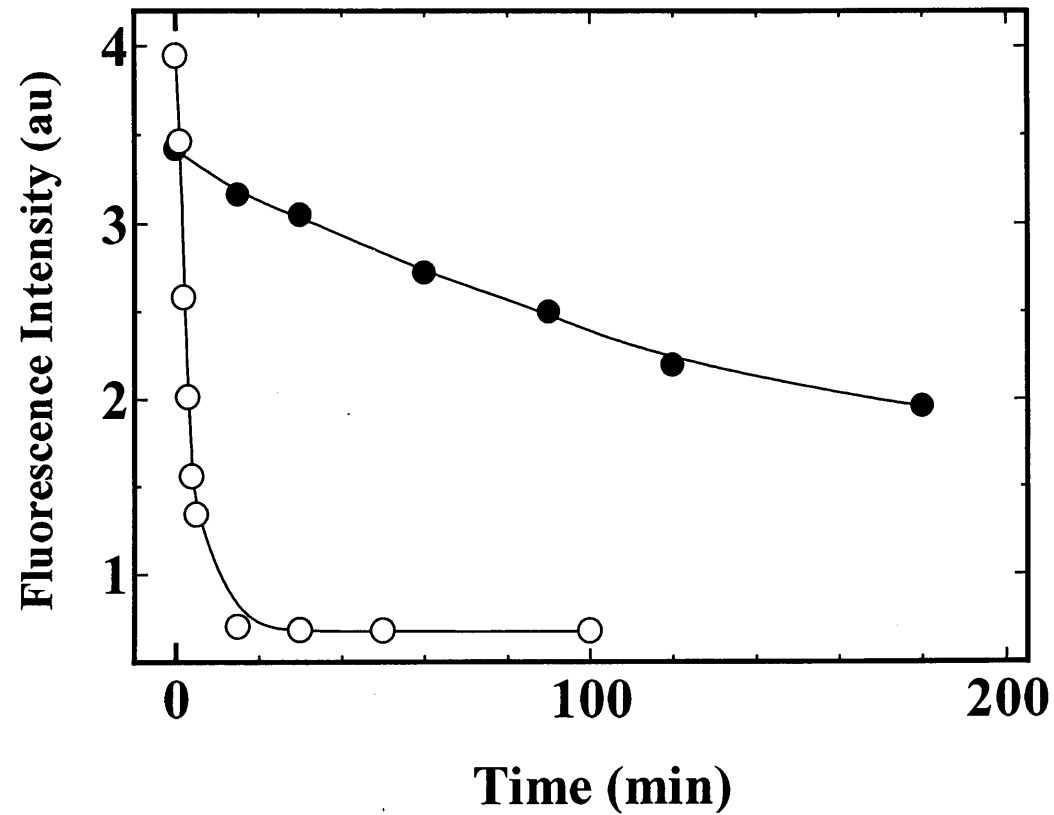


Fig. 4-6 Comparison of the rate of fluorescence intensity decay between G- and F-actin. Pyrene labeled G-actin and F-actin solutions were treated by heat at 55 °C. After the heat-treatment, the fluorescence intensity of the native actin remaining was measured. Other conditions: 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM ATP, 2 mM HEPES, 2 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5 (G-actin); 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM ATP, 20 mM HEPES, 2 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5 (F-actin).

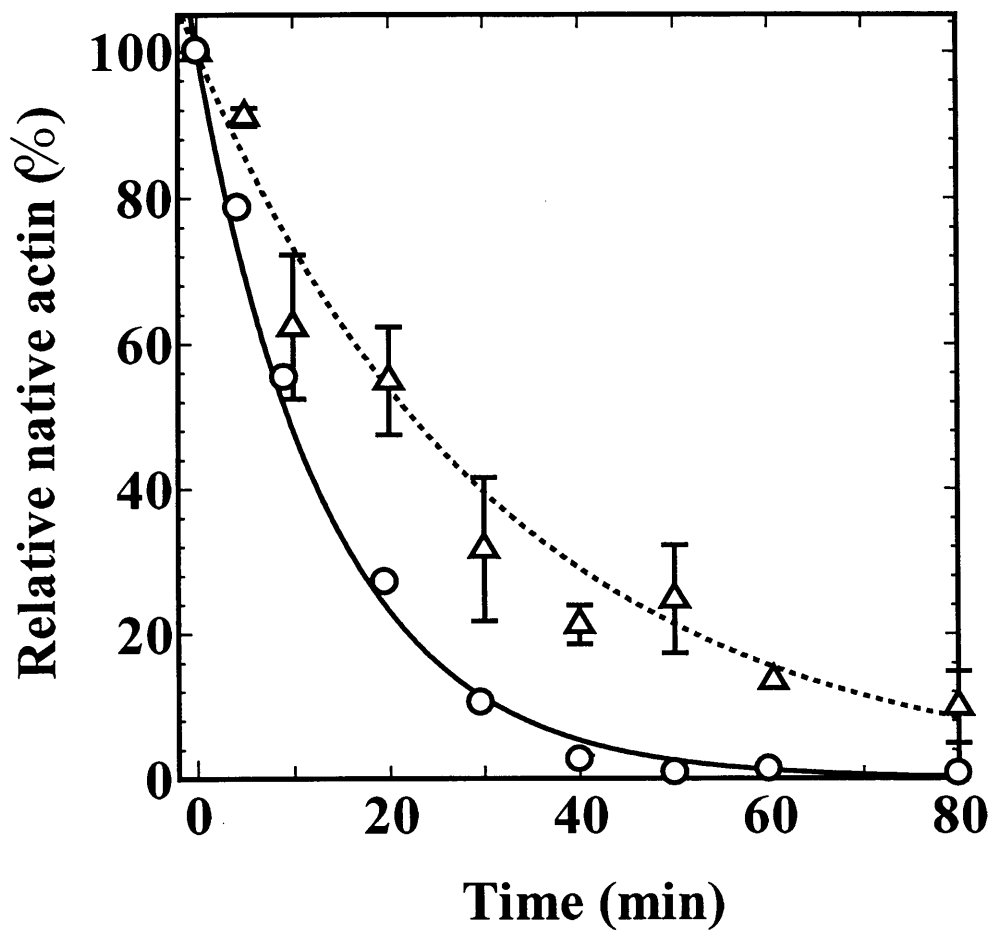


Fig. 4-7 Comparison of carp G-actin inactivation rates measured by two different assays. A solution of carp G-actin (20 μM) was incubated at 50 $^{\circ}\text{C}$. After the heat treatment, the amount of native actin remaining was determined using the pyrene fluorescence assay (open circles) and the actin activated myosin Mg-ATPase assay (open triangles). Solution conditions on heat treatment: 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM NaN_3 , 1 mM NaHCO_3 and 2 mM HEPES (pH 7.5 at 50 $^{\circ}\text{C}$).

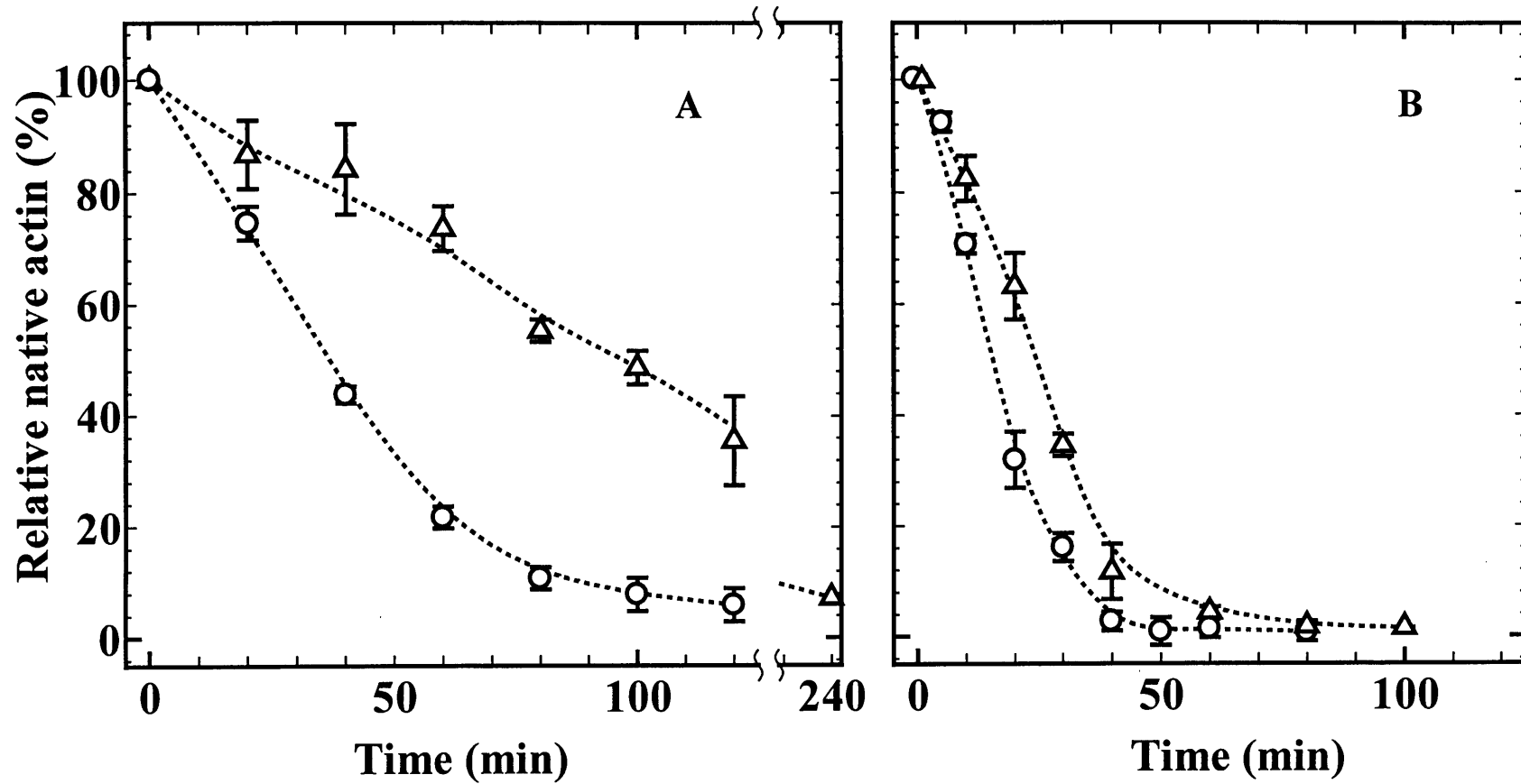


Fig. 4-8 Comparison of carp G-actin inactivation rates measured by two different assays.

A solution of carp G-actin (20 μ M) was incubated at 45 °C (A) and 50 °C (B). After the heat treatment, the amount of native actin remaining was determined using the pyrene fluorescence assay (open circles) and the DNase I inhibition assay (open triangles). Solution conditions on heat treatment: 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM NaN_3 , 1 mM NaHCO_3 and 2 mM HEPES (pH 7.5 at each temperature).

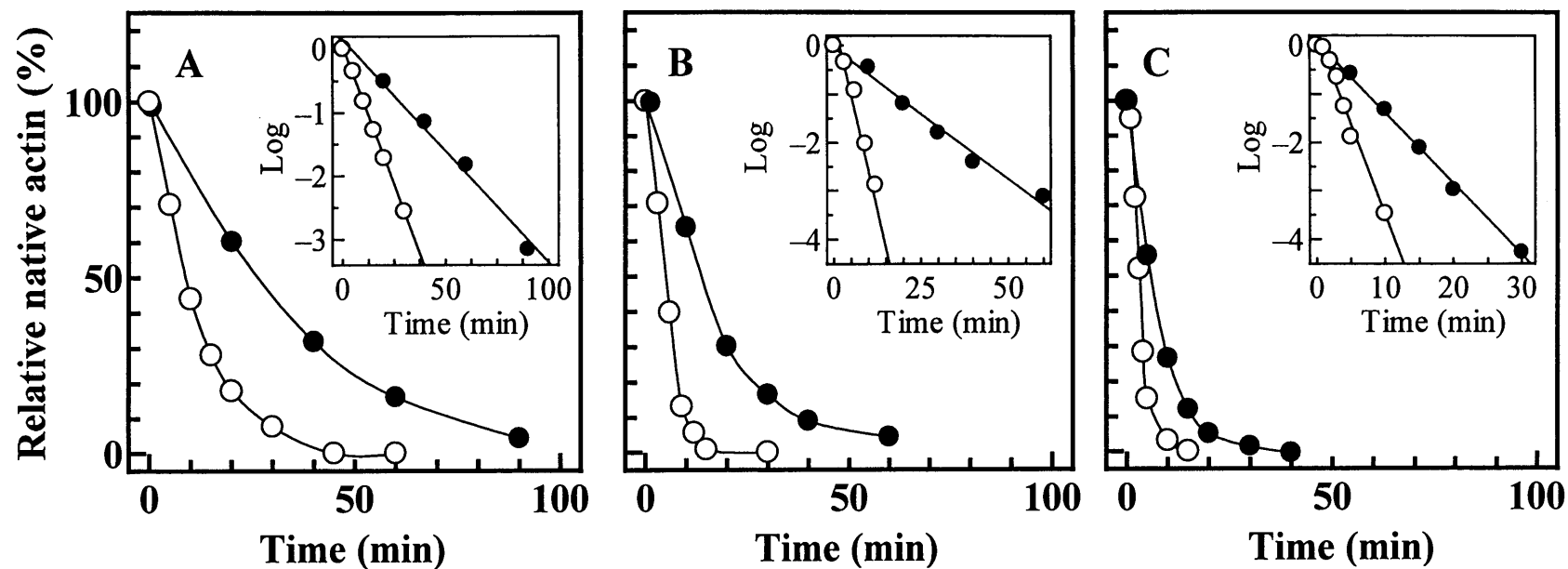


Fig. 4-9 Thermal inactivation of carp and chicken G-actins.

The amount of native actin remaining during heat treatment was measured by the pyrene fluorescence assay at 50 °C (A), 52.5 °C (B), and 55 °C (C). Open circles, carp actin; closed circles, chicken actin. Solution conditions on heat treatment were the same as in Fig.4-7. Insets show semi-logarithmic plots of the remaining native actin. Solid lines in the insets represent the linear regression lines.

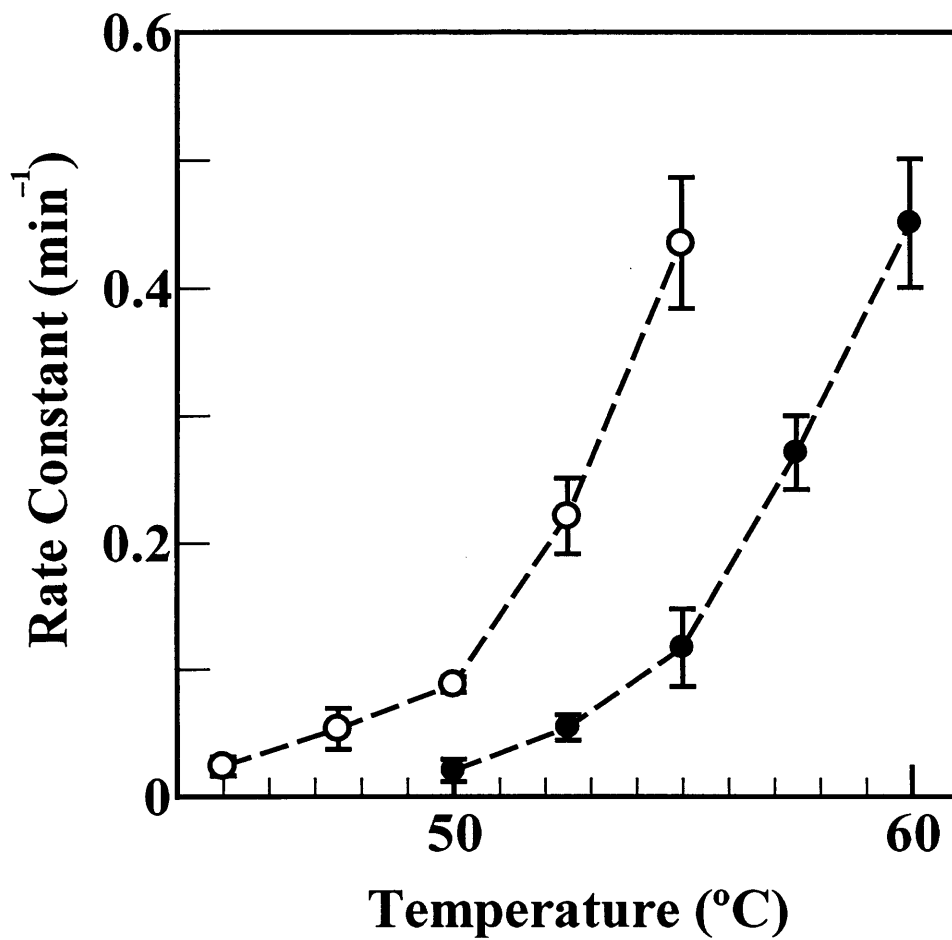


Fig. 4-10 Inactivation rate constants of carp and chicken G-actins obtained at various temperatures.

Inactivation rates were calculated for G-actin treated at various temperature of 45-60 °C. The rate constants obtained are plotted against the heat treatment temperatures (open circles, carp actin; closed circles, chicken actin). Solution conditions were the same as in Fig.4-9.

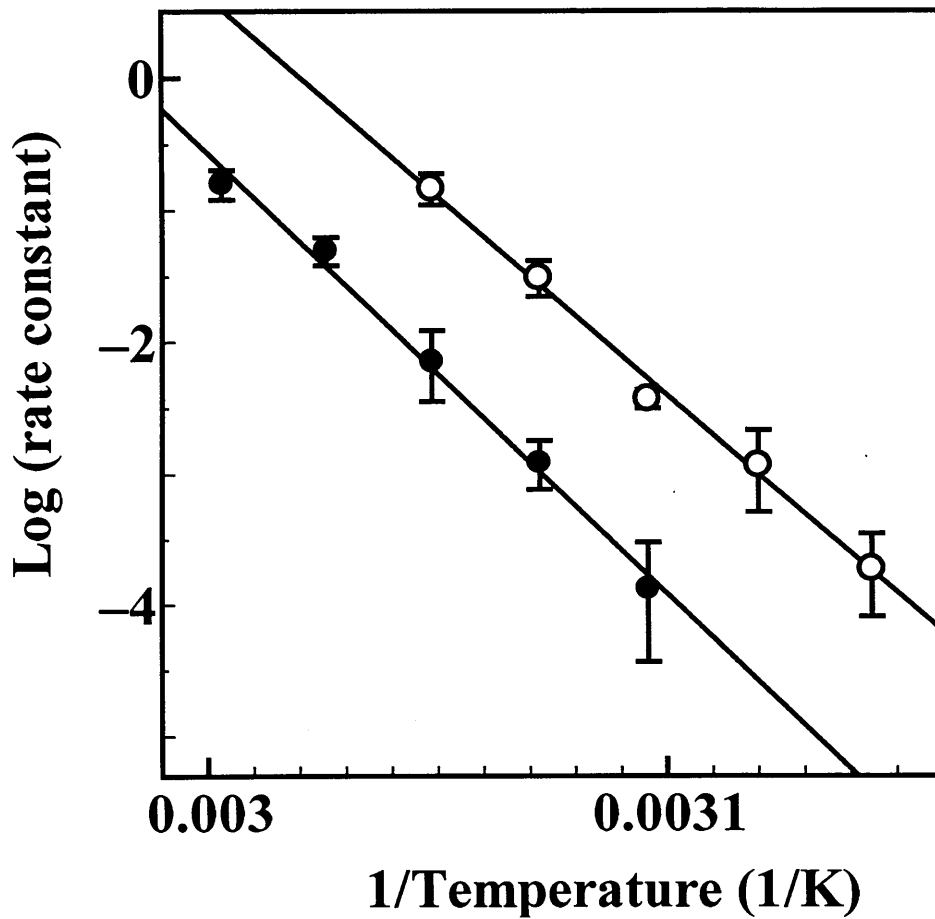


Fig. 4-11 Arrhenius plots of the inactivation rate constants of carp and chicken G-actins. The rate constants obtained from Fig. 4-10 are represented as Arrhenius plots (open circles, carp; closed circles, chicken). Solid lines show the results of linear least-squares analysis.

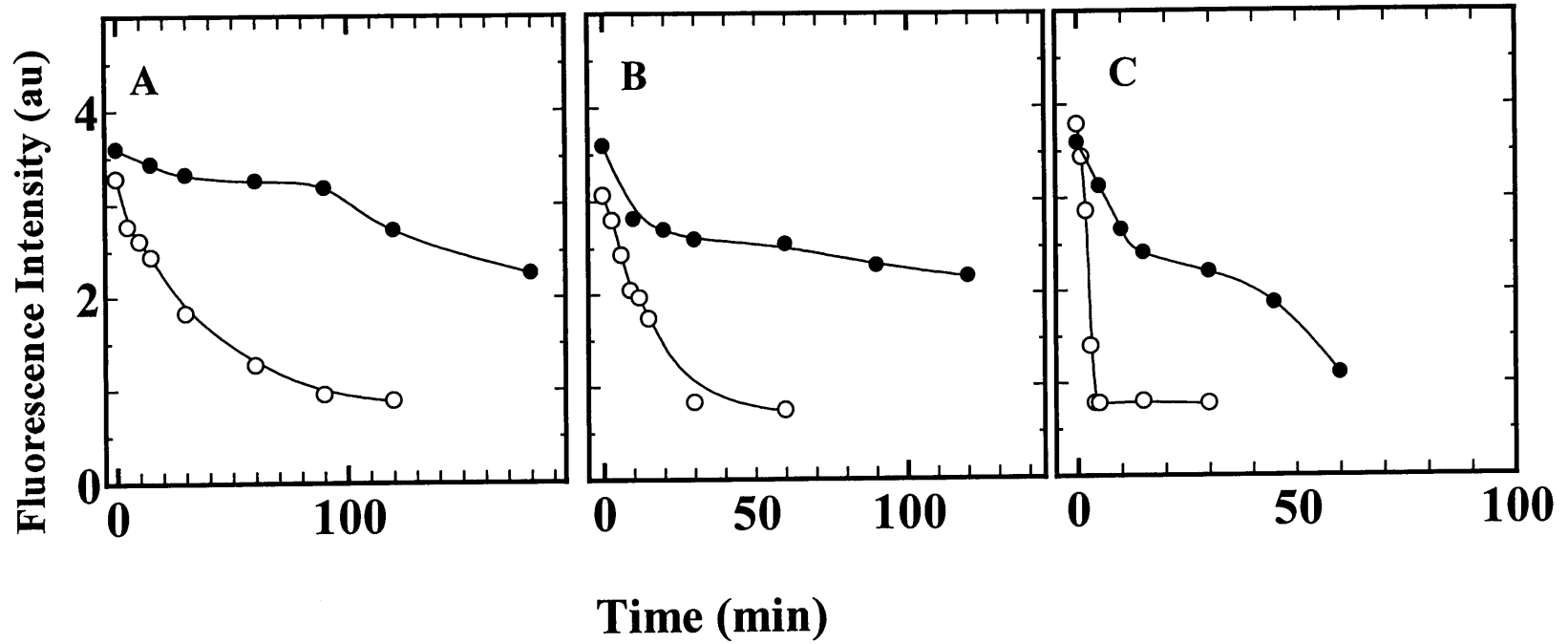


Fig.4-12 Thermal inactivation of carp and chicken F-actins. The amount of native actin remaining during heat treatment was measured by the pyrene fluorescence assay at 57.5 °C (A), 60 °C (B), and 62.5 °C (C). Open circles, carp actin; closed circles, chicken actin. Solution conditions on heat treatment: 1 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM ATP, 20 mM HEPES, 2 mM 2-mercaptoethanol, pH7.5 (at each temperature)..

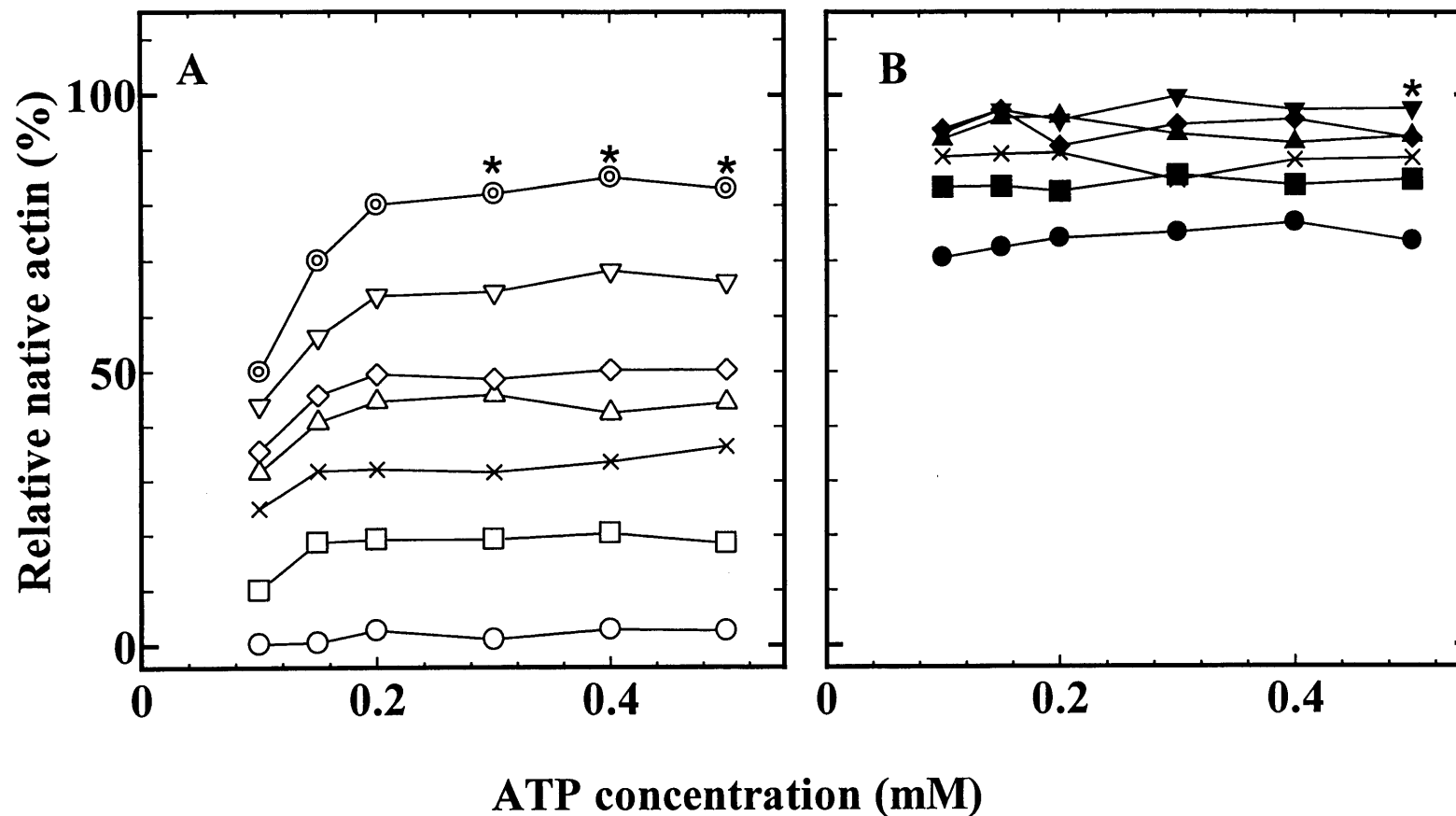


Fig. 4-13 Influence of ATP and Ca²⁺ on the thermal stability of carp and chicken G-actins.

The amount of actin native remaining after heat treatment for 20 min at 50 °C is plotted against ATP concentration ((A) carp actin; (B) chicken actin). Ca²⁺ concentrations were 0.1 mM (circles), 0.15 mM (squares), 0.2 mM (crosses), 0.3 mM (triangles), 0.4 mM (diamonds), and 0.5 mM (inverse triangles), 0.6 mM (doubled circles in (A)). Other solution conditions on heat treatment were the same as in Fig. 4-8. After the heat treatment, an aliquot of each sample was subjected to measurement of the fluorescence spectrum at 50 °C to detect actin polymerization. Data for the polymerized actin are represented with asterisks.

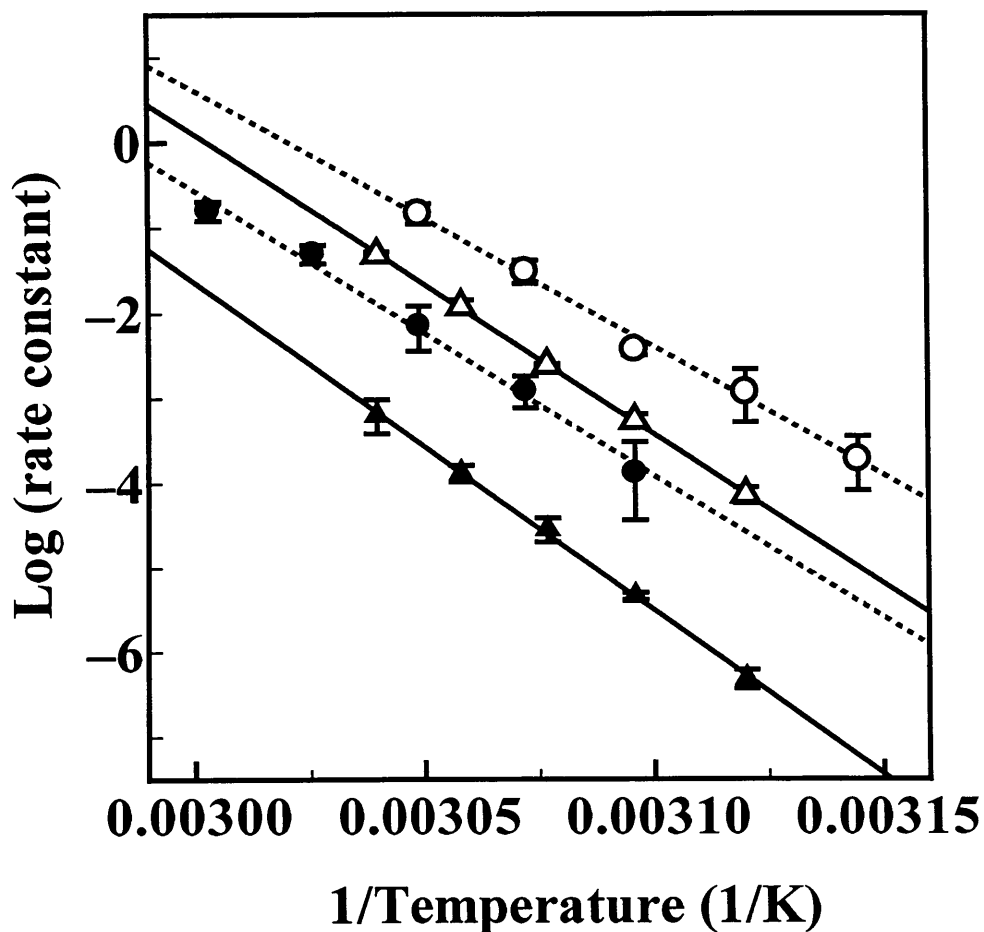


Fig. 4-14 Arrhenius plots of the inactivation rate constants at higher Ca^{2+} concentrations for carp and chicken G-actins.

The rate constants obtained here and those from Fig. 4-10 are represented as Arrhenius plots (open circles, carp (0.2 mM Ca^{2+} and ATP); closed circles, chicken (0.2 mM Ca^{2+} and ATP); open triangles, carp (0.4 mM Ca^{2+} and ATP); closed triangles, chicken (0.4 mM Ca^{2+} and ATP)). Other solution conditions on heat treatment: 0.2 mM ATP, 1 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM NaN_3 , 1 mM NaHCO_3 and 2 mM HEPES (pH 7.5 at each temperature).

第5章 総合的考察

アクチンはすべての真核生物に存在し、筋収縮や様々な細胞運動に関与するタンパク質である。その一次構造は生物間で高度に保存され、原生動物 *Acanthamoeba* とヒトの細胞性アクチンの間でも、わずか数%のアミノ酸置換しか存在しない。生物の運動機構として高度に発達した骨格筋のアクチンに限れば、さらにその一次構造上の変動は少なく、ヒト、ウサギ、ニワトリなどの恒温動物間でアミノ酸配列の違いはない。

魚類は多様な生息環境に適応するため、分子レベルでの適応機構があることが知られている。その結果、タンパク質のアミノ酸配列においても恒温動物には見られない多様性が存在する。骨格筋アクチンにおいても恒温動物との間には幾つかのアミノ酸置換があることが報告されている。したがって骨格筋アクチンの構造と機能の関係を調べる上で魚類は良い対象になると考えられた。魚類と恒温動物の骨格筋アクチンを比較して性質上の差異を研究した例は多くはないが、熱安定性や重合能および高圧耐性においてその違いが明らかにされている (Swezey & Somero, 1982, 1985; Morita, 2003)。本研究はこれらのことを背景に、コイ骨格筋アクチンを対象にしてヌクレオチドおよび Ca^{2+} の結合性を明らかにした。本章では前章までの成果を総括し、魚類骨格筋アクチンの安定性の分子論について総合的に考察する。

アクチンとヌクレオチドおよび2価の陽イオンは溶液中で平衡状態にある。アクチンに結合したヌクレオチドの交換は、解離速度が Ca^{2+} 濃度に大きく依存する“シーケンシャルルート”とヌクレオチドと Ca^{2+} が複合体を形成したまま解離される“コンプレックスルート”によって行われることが知られている (Kinosian *et al.*, 1993)。本研究では ϵ -ATP との交換反応を解析することによって、コイ骨格筋アクチンにおいては、コンプレックスルートでの ATP の解離が、ニワトリ骨格筋アクチンに比して約 6.6 倍大きいことを明らかにした。またシーケンシャルルートについては Ca^{2+} の結合親和性の直接測定および ATP とリガンドフリーアクチンの結合親和性の測定を行い、それぞれ対照としたニワトリ骨格筋アクチンに比して約 60 %、40 %に低下していることを

明らかにした。さらにアクチン、ATP、 Ca^{2+} 結合の詳細な解析から、コイ骨格筋アクチンにおいてはリガンドの結合・解離がニワトリ骨格筋アクチンに比して速いという特徴が明らかになった。本研究ではコイ骨格筋アクチンと同様にリガンドに対する低親和性を示すズブチリシン処理アクチンについても解析を行った。コイ骨格筋アクチンとズブチリシン処理ウサギ骨格筋アクチンのヌクレオチド、 Ca^{2+} 結合のキネティクスについての比較を Fig.5-1 にまとめた。この模式図から明らかなように、コイ骨格筋アクチンの ATP および Ca^{2+} 結合においてはすべての速度定数が、対照としたニワトリ骨格筋アクチンの場合に比して大きかった。これはリガンドの結合速度が減少することによって親和性が低下していたズブチリシン処理アクチンの場合とは対照的である。

アクチンに結合するヌクレオチドはクレフト内に深く埋め込まれている。したがってヌクレオチド交換には“closed state”からクレフトを開いた状態である“open state”へのコンフォメーション変化を必要とする。この事実を考慮するならば、コイ骨格筋アクチンはドメイン間の相対的な位置の変化が頻繁に起きる“揺らぎの大きな”アクチンであるという表現も可能であろう。タンパク質のコンフォメーションの揺らぎとタンパク質の硬さ（圧縮率）には強い相関があることが知られている(Cooper, 1976; Gekko & Hasegawa, 1986; Gekko, 2002)。Morita (2003)はコイ骨格筋アクチンの重合に伴う体積変化の圧力依存性がニワトリやソコダラなどの骨格筋アクチンとは異なることから、コイ骨格筋アクチンの圧力に対する“硬さ”の異常性を示唆している。このことは本研究で明らかになったコイ骨格筋アクチンの“柔らかさ”を支持するものであると考えられた。一方、ズブチリシン処理アクチンに関しては、すでに部分断熱圧縮率および部分比容の測定から物理的に“硬い”ことが明らかになっており (Kikumoto, *et al.*, 2003)、今後コイ骨格筋アクチンにおいても同様の測定をすることによって“柔らかさ”を検証することが可能だと考えられる。

コイ骨格筋アクチンにおけるリガンドとの低親和性は、G-アクチンの熱安定性にも大きな影響を及ぼしていた。新たに開発したパイレンアッセイによる測定ではコイ骨格筋アクチンの熱変性はニワトリ骨格筋アクチンに比して著しく速い。第2章に記し

たように、ATP との親和性測定によって得られたリガンドフリーでのアクチンの変性速度定数にはコイ骨格筋とニワトリ骨格筋との間に有意な差は見出されなかった。したがってコイ骨格筋アクチンでの熱変性速度の高さはリガンドとの低親和性による平衡のシフトに起因することが示唆された。そこで熱変性速度に対する ATP および Ca^{2+} の影響を調べた結果、コイ骨格筋アクチンの熱変性速度は ATP および Ca^{2+} に依存し、特に Ca^{2+} による抑制が顕著であることが明らかになった。これは Ca^{2+} を結合したアクチンの ATP 交換の性質を反映しており (Valentin-Ranc & Carlier, 1989; Kinoshian *et al.* 1993)、コイ骨格筋アクチンの熱安定性の低さはリガンドとの低親和性に起因することが明らかとなった。

アクチンは重合状態ではヌクレオチド交換をしないことが知られている。したがってリガンドとの低親和性に起因する熱安定性の低さは重合したフィラメントアクチンでは検出されないことが予想された。そこで F-アクチンの熱変性速度を比較したが、熱変性速度はニワトリ骨格筋アクチンに比して大きく、両アクチン間の熱安定性の差は G-アクチンの場合よりも顕著であることが明らかになった。第 2 章第 3 節に記した ATP 結合の熱力学的な解析からは、コイ骨格筋アクチンにおいてはヌクレオチド結合に伴うエントロピー変化が小さいこと示しており、ヌクレオチド結合による構造安定化の弱さが F-アクチンにおける変性速度の大きさの要因であると考えられた。

上述のようにコイ骨格筋アクチンではヌクレオチドや Ca^{2+} 結合能および熱安定性においてニワトリ骨格筋アクチンと大きく異なる物理化学的性質を有するが、アミノ酸レベルではニワトリ骨格筋アクチンを対照として僅か 5 残基の差異しかない (Watabe *et al.*, 1995)。リガンドとの親和性の低下やヌクレオチド結合領域の性質の大きな差異がどのような分子メカニズムによって実現しているかを明らかにするために、過去の研究報告に基づいて 5 つのアミノ酸置換と ATP 結合への影響を調べたが、これまでに指摘されてきた Ala/Ser-155 置換以外に原因となる置換は見出されなかった。

酵素の活性中心やリガンドとの結合サイトにおける点変異が酵素活性や結合親和性を大きく変えることは知られている。しかしながら、Ala または Ser-155 はヌクレ

オチド結合する P ループの 1 つ (P2) に属してはいるものの、ヌクレオチドとの直接的な相互作用部位ではない。したがって、この置換が低親和性を引き起こすというメカニズムの理解にはさらなる知見が必要であった。そこで 155 番がアラニンであるために予想される構造的影響をウサギ骨格筋アクチンの原子座標から得られる分子モデルを基に検討した。まず Asp-154-His-161 のヘアピンの β シート構造を形成している水素結合を調べたところ 4 本の結合が見出された。3 本は主鎖間の水素結合であり、 β シートの基本構造を作るものであった。もうひとつの水素結合は Ser-155 の側鎖と Thr-160 の側鎖の水素結合であり、 β シートの構造を補強していると考えられた。コイ骨格筋アクチンの場合には 155 番がアラニンであるため、この付加的な水素結合は欠損している。付加的な水素結合の欠損は β シートの構造を大きく変えることはないが、何らかの構造的な摂動がかかると予想された。

上述したようにアクチンがヌクレオチドを交換する際にはコンフォメーション変化を必要とする (Wriggers & Schulten, 1997)。結晶構造に見られるヌクレオチドがアクチンによって強く保持されている “closed state” では、ヌクレオチドは 3 つの P ループによって挟まれている (Fig.3-2)。したがってアクチンが ATP を解離する “open state” では、これらのループの相対的な位置が変わらなければならない。すなわち溶液中では P ループは絶えず熱揺らぎを受けており、ヌクレオチドの結合・解離速度はその揺らぎの頻度に影響されると考えられる。Ala/Ser-155 置換による生じる P2 ループにおける水素結合の欠損のための構造的な脆弱性が、P2 ループ全体の熱揺らぎを大きくする可能性が考えられた。

Ala/Ser-155 置換によってアクチンにヌクレオチド交換が早められるための構造的な要因は、155 番のアミノ酸の分子構造的な役割を調べることから明らかになった。155 番のセリンは P2 ループ内に水素結合を作るだけでなく、隣接する P3 ループとも 2 本の水素結合を形成する、構造的に重要なアミノ酸であった。これらの水素結合は主鎖間に生じる結合であるため、コイ骨格筋アクチンのようにアラニンの場合にも存在する。アラニンタイプのアクチンでの、上述の P2 における構造的摂動は、P3 ループとの相互作用を変え、3 つのループ間に発生する開閉ゆらぎの頻度が変わることに

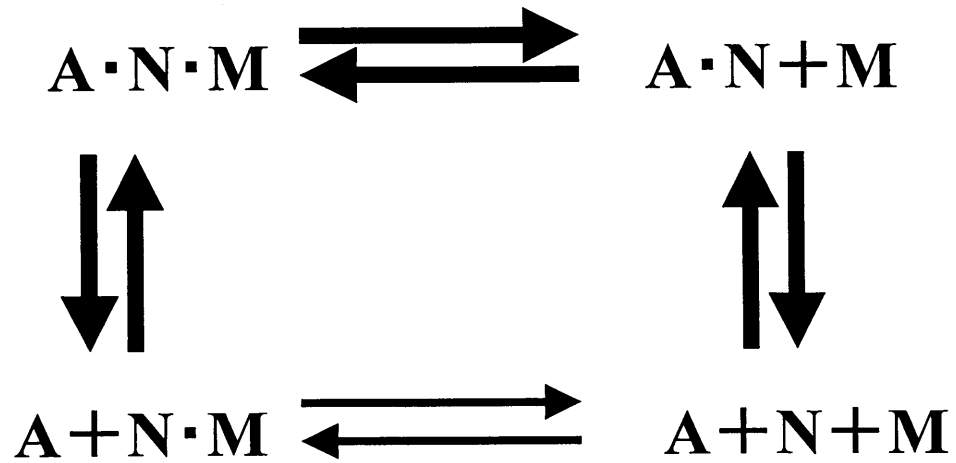
よってヌクレオチド結合に影響を及ぼしていると考えられた。第3章で記した、Ala/Ser-155 置換のヌクレオチド結合への影響を ATP の場合と ADP の場合で比較した実験では、Ala/Ser-155 置換は γ 位のリン酸基の結合に影響を与えないことを示した。これは置換の影響が単に P2 ループの構造変化を引き起こしてヌクレオチドの結合を弱めるのではなく、P2-P3 間のゆらぎに影響を与えているという説を支持していると考えられた。今後、155 番にアラニンをもつアクチンの結晶解析を行うことができれば、より詳細な分子メカニズムを明らかになると考えられる。その場合には静的な原子座標の差異のみでなく、温度因子などの動的な情報を詳細に比較検討する必要があると予想される。また基準振動解析によるドメイン間の運動性の比較 (Tirion & ben-Avraham 1993) や分子動力学の手法がアラニンタイプのアクチンの特徴付けには有効になると考えられる。

Morita (2003) は分子系統樹解析によって、魚類においては 155 番にアラニンを有する actin 1 からセリンの actin 2 が派生したことを示した。本研究によって示唆されたアラニンタイプのコイ骨格筋アクチンにおける揺らぎの大きさ、すなわち“柔らかさ”は、体温の高い恒温動物や深海に生息する魚類にとっては熱や圧力による変性を被りやすくなるため不利だと考えられる。ではアラニンタイプのアクチンは進化の過程で残されたものであろうか? Mudalige *et al.* (2007) は、サケの遅筋の機能的な特徴が、そのアクチンアイソフォームの性質上の差異に由来するものであることを比較生化学的研究から示した。また遅筋アクチンと速筋アクチン間のアミノ酸置換において、最も興味深いものが Ala/Ser-155 置換と Asp/Gln-360 置換であることを指摘している。これらのことは、155 番のアラニン/セリンのスイッチングが骨格筋の生理機能に重要な機構であることを示唆している。Morita (2003) も淡水に生息する魚類が報告されている限りすべてアラニンタイプであることから、環境適応するために 155 番にアラニンを持つことが生理的に意義があるのではないかと言及している。本研究結果からその意義を見出すのは困難である。しかしながら、第2章第3節で明らかにした ATP 結合定数の温度依存性からは、セリンタイプのアクチンでは ATP に対する親和性が温度に強く依存することを示していた。一方、アラニンタイプのコイ骨格筋アクチンで

は結合定数の温度依存性は弱い。したがってセリンタイプのアクチンは温度に対する非応答性を犠牲にして、分子の構造的安定化を選択したと考えることができるかもしれない。コイ骨格筋ミオシンには環境温度に適したアイソフォームを発現することが知られている (Imai *et al.*, 1997; Hirayama *et al.*, 1997; Watabe *et al.*, 1998)。アクチンには温度馴化にともなうアイソフォーム発現はないため、広い温度域でヌクレオチド結合能の変動や分子ゆらぎの頻度的な変動の少ないアラニンタイプを有することが生理的に望ましいという可能性がある。

近年、種々の生体分子の機能が熱ゆらぎを制御することによって発現していることが判りつつある (Yanagida *et al.* 2007)。生体分子モーターであるミオシンもその例のひとつである。アクチンはミオシンの ATPase を活性化し、張力発生の支持台になるばかりでなく、化学-力学共役反応において積極的な役割を果たすと考えられている。架橋試薬によってゆらぎを制限されたアクチンフィラメントは、ミオシンの ATPase を活性化するにも関わらず、完全な滑り運動を起こすことができないことが知られている (Prochniewicz & Yanagida, 1990; Kim *et al.*, 1998)。そしてフィラメントのフレキシビリティに対する、フィラメントを形成するアクチンモノマーのドメイン間の動きやモノマー間の結合様式の寄与も明らかになりつつある (Fujiwara *et al.* 2008)。今後、筋収縮におけるアクチンの役割がさらに明確になれば、コイ骨格筋アクチンの滑り運動などの生理機能に関する比較生化学的研究から、アラニン/セリンのスイッチングの分子進化的意味が明らかになると期待される。

(A)



(B)

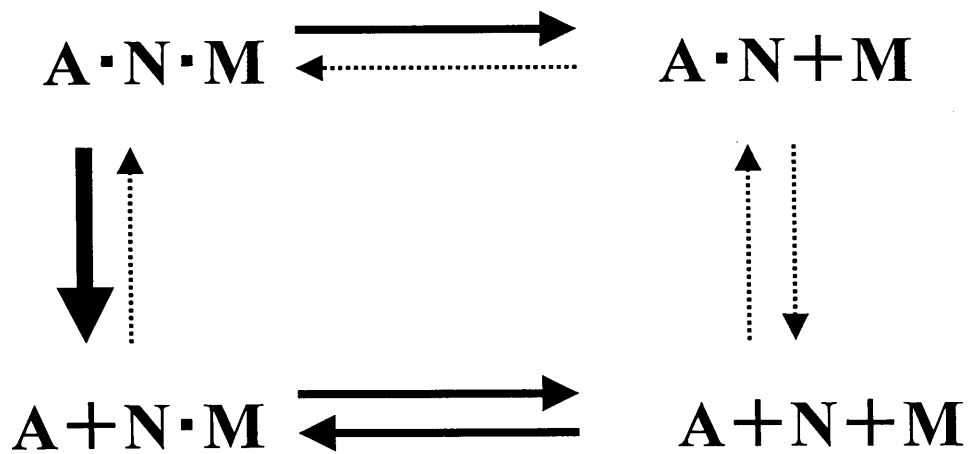


Fig. 5-1 Comparison of ligand binding between carp actin and subtilisin treated actin.

Actin, nucleotide and divalent cation are denoted by A, N and M, respectively. (A) carp actin; (B) subtilisin treated rabbit actin. Thick arrows represent fast reactions and thinner dotted arrows represent slow rate compared with those in the case of standard actin (rabbit skeletal actin).

参考文献

- Asakura, S. (1961) The interaction between G-actin and ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* 92,140-149.
- Barany, M., Nagy, B., Finkelman, F., Chrambach, A. (1961) Studies on the removal of the bound nucleotide of actin. *J. Biol. Chem.* 236, 2917-2925.
- Betazon, A., Tian, G.H., Lamblin, A., Tsong T.Y. (1990) Enthalpic and entropic contributions to actin stability: calorimetry circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium. *Biochemistry* 29, 291-298.
- Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T., Lindberg, U. (1978) Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. *Cell* 15, 935-943.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carlier, M.-F. (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266, 1-5.
- Chen, X., Rubenstein, P.A. (1995a) A mutation in an ATP-binding loop of *Saccharomyces cerevisiae* actin (S14A) causes a temperature-sensitive phenotype *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 270, 11406-11414.
- Chen, X., Peng, J., Pedram, M., Swenson, C.A., Rubenstein, P.A. (1995b) The effect of the S14A mutation on the conformation and thermostability of *Saccharomyces cerevisiae* G-actin and its interaction with adenosine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 270, 11415-11423.
- Chik, J.K., Lindberg, U., Schutt, C.E. (1996) The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 263, 607-623.
- Connell, J.J. (1958) Studies on the proteins of fish skeletal muscle. *Biochem. J.* 70, 81-91
- Connelly, P.R., Aldape, R.A., Bruzzese, F.J., Chambers, S.P., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Itoh, S., Livingston, D.J., Navia, M.A., Thomson, J.A., Wilson, K.P. (1994) Enthalpy of

hydrogen bond formation in a protein-ligand binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1964-1968.

Cooke, R. (1975) Role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochemistry* **14**, 3250-3256.

Cooper, A. (1976) Thermodynamic fluctuations in protein molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** 2740-2741.

Cooper, J.A., Walker, S.B., Pollard, T.D. (1983) Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **4**, 253-262.

Detmers, P., Weber, A., Elzinga, M., Stephens, R.E. (1981). 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole actin as a probe for actin polymerization. *J. Biol. Chem.* **256**, 99-105.

Estes, J.E., Selden, L.A., Gershman, L.C. (1987) Tight binding of divalent cations to monomeric actin: binding kinetics support a simplified model. *J. Biol. Chem.* **262**, 4952-4957.

Fersht, A.R, Shi, J.P., Knill-Jones, J., Lowe, D.M, Wilkinson, A.J., Blow, D.M., Brick, P., Carter, P., Waye, M.M.Y., Winter, G. (1985) Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering. *Nature* **314**, 235-238.

Fersht, A.R. (1988) Relationships between apparent binding energies measured in site-directed mutagenesis experiments and energetics of binding and catalysis. *Biochemistry* **27**, 1577-1580.

Frieden, C., Patane, K. (1985) Differences in G-actin containing bound ATP or ADP: the Mg²⁺-induced conformational change requires ATP. *Biochemistry* **24**, 4192-4196.

Frieden, C., Patane, K. (1988) Mechanism for nucleotide exchange in monomeric actin. *Biochemistry* **27**, 3812-3820.

Fujiwara, S., Plazanet, M., Matsumoto, F., Oda, T. (2008) Differences in internal dynamics of actin under different structural states detected by neutron scattering. *Biophys. J.* (in press).

Gekko, K., Hasegawa, Y. (1986) Compressibility-structure relationship of globular proteins.

Biochemistry 25, 6563-6571.

Gekko, K. (2002) Compressibility gives new insight into protein dynamics and enzyme function. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 382-386.

Gershman, L.C., Selden, L.A., Estes, J.E. (1986) High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 607-614.

Gershman, L.C., Selden, L.A., Estes, J.E. (1991) High affinity divalent cation exchange on actin: association rate measurements support the simple competitive model. *J. Biol. Chem.* 266, 76-82.

Graceffa, P., Dominguez, R. (2003) Crystal structure of monomeric actin in the ATP state: Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *J. Biol. Chem.* 278, 34172-34180.

Guex, N., Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

Halasi, S., Papp, G., Bugyi, B., Barko, S., Orban, J., Ujfalusi, Z., Visegrady, B. (2006) The effect of pyrene labelling on the thermal stability of actin filaments. *Thermochimica Acta*, 445,185-189.

Higashi-Fujime, S., Suzuki, M., Titani, K., Hozumi, T. (1992) Muscle actin cleaved by proteinase K: Its polymerization and *in vitro motility*. *J. Biochem.* 112, 568-572.

Hirayama, Y., Watabe, S. (1997) Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 246, 380-387.

Houk, Jr.T.W., Ue, K. (1974) The measurement of actin concentration in solution: A comparison of methods. *Anal. Biochem.* 62: 66-74.

Huang, M.C., Ochiai, Y. (2005) Fish fast skeletal muscle tropomyosins show species-specific thermal stability. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 141, 461-471.

Imai, J., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Kakinuma, M., Watabe, S. (1997) cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with

temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 200, 27-34.

Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., Holmes, K.C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.

Kiessling, P., Jahn, W., Maier, G., Polzar, B., Mannherz, H.G. (1995) Purification and characterization of subtilisin cleaved actin lacking the segment of residues 43-47 in the DNase I binding loop. *Biochemistry* 34, 14834-14842.

Kim, E., Bobkova, E., Miller, C.J., Orlova, A., Hegyi, G., Egelman, E.H. Muhlrad, A., Reisler, E. (1998) Intrastrand cross-linked actin between Gln-41 and Cys-374. III. Inhibition of motion and force generation with Myosin. *Biochemistry* 37, 17801-17809.

Kimura, S., Zhu, X.P., Matsui, R., Shijoh, M., Takamizawa, S. (1988) Characterization of fish muscle type I collagen. *J. Food Sci.* 53, 1315-1318.

Kinosian, H.J., Selden, L.A., Estes, J.E., Gershman, L.C. (1993) Nucleotide binding to actin: cation dependence of nucleotide dissociation and exchange rates. *J. Biol. Chem.* 268, 8683-8691.

Kikumoto, M., Tamura, Y., Ooi, A., Mihashi, K. (2003) Partial specific volume and adiabatic compressibility of G-actin depend on the bound nucleotide. *J. Biochem.* 133, 687-691.

Kitao, M., Seki, N., Arai, K. (1973) Extraction and polymerizing ability of crude G-actin from fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 39, 1263-1269 (in Japanese).

Kodama, T., Fukui, K., Kometani, K. (1986) The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *J. Biochem.* 99, 1465-1472.

Kouyama, T., Mihashi, K. (1981) Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur. J. Biochem.* 114, 33-38.

Kuehl, W.M., Gergely, J. (1969) The kinetics of exchange of adenosine triphosphate and calcium with G-actin. *J. Biol. Chem.* 244, 4720-4729.

Lehrer, S.S., Kerwar, G. (1972) Intrinsic fluorescence of actin. *Biochemistry* 11, 1211-1217.

Margossian, S.S., Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. in: *Methods Enzymol.* Frederiksen D.W, Cunningham L,W (eds). Academic Press, New York 85, 55-71.

Martonosi, A., Molino, C.M., Gergely, J. (1964) The binding of divalent cations to actin. *J. Biol. Chem.* 239, 1057-1064.

McLaughlin,P.J., Gooch,J.T., Mannherz,H.-G., Weeds, A.G. (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364, 685-692.

Miki, M., Ohnuma, H., Mihashi, K. (1974) Interaction of actin with epsilon-ATP. *FEBS Lett.* 46, 17-19.

Miki, M., Mihashi, K. (1978) Fluorescence energy transfer between ϵ -ATP at the nucleotide binding site and N-(4-dimethylamino-3, 5-dinitrophenyl)-maleimide at Cys-373 of G-actin. *Biochim. biophys. Acta* 533, 163-172.

Miller, L., Phillips, M., Reisler, E. (1988) Polymerization of G-actin by myosin subfragment 1. *J. Biol. Chem.* 263, 1996-2002.

Morita, T. (2000) Amino acid sequences of α -skeletal muscle actin isoforms in two species of rattail fish, *Coryphaenoides acrolepis* and *Coryphaenoides cinereus*. *Fish. Sci.* 66, 1150-1157.

Morita, T. (2003) Structure-based analysis of high pressure adaptation of α -actin. *J. Biol. Chem.* 278, 28060-28066.

Mudalige, W., Jackman, D.M., Waddleton, D.M., Heeley, D.H. (2007) A vertebrate slow skeletal muscle actin isoform. *FEBS J.* 274, 3452-3461.

Muhlrad, A., Cheung, P., Phan, B.C., Miller, C., Reisler, E. (1994) Dynamic properties of actin: Structural changes induced by beryllium fluoride. *J. Biol. Chem.* 269, 11852-11858.

Neidl, C., Engel, J. (1979) Exchange of ADP, ATP and 1:N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate at G-actin: equilibrium and kinetics. *Eur. J. Biochem.* 101, 163-169.

- Nowak, E., Strzelecka-Gotaszewska, H., Goody, R.S. (1988) Kinetics of nucleotide and metal ion interaction with G-actin. *Biochemistry* 27, 1785-1792.
- Okamoto, Y., Sekine T. (1985) A streamlined method of subfragment one preparation from myosin. *J. Biochem.* 98, 1143-1145.
- Oosawa, F., Kasai, M. (1971) Actin. In: Timasheff, S.N., Fasman, G.D. (Eds). *Subunits in Biological Systems* Dekker, New York 5, part A, 261-322.
- Oosawa, F., Asakura, S. (1975) *Thermodynamics of the polymerization of protein*. Academic Press.
- Otterbein, L.R., Graceffa, P., Dominguez, R. (2001) The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science* 293, 708 – 711.
- Pardee, J.D., Spudich, J.A. (1982) Purification of muscle actin. In: Frederiksen, D.W, Cunningham, L,W (eds). *Methods Enzymol.* Academic Press, New York 85, 164-181.
- Perrin, D.D., Sayce, J.D. (1967) Computer calculation of equilibrium concentrations in mixtures of metal ions and complexing species. *Talanta* 43, 833-842.
- Pollard, T.D. (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747-2754.
- Pollard, T., Borisy, G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Prochniewicz, E., Yanagida, T. (1990) Inhibition of sliding movement of F-actin by crosslinking emphasizes the role of actin structure in the mechanism of motility. *J. Mol. Biol.* 216, 761-772.
- Sayle, R.A., Milner-White, E.J. (1995) Rasmol: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* 20, 374-376.
- Schüler, H., Lindberg, U., Schutt, C.E., Karlsson, R. (2000). Thermal unfolding of G-actin monitored with the DNase I-inhibition assay. *Eur. J. Biochem.* 267, 476-486.

Schwyter, D., Phillips, M., Reisler, E. (1989) Subtilisin-cleaved actin: polymerization and interaction with myosin subfragment 1. *Biochemistry* 28, 5889-5895.

Schwyter, D.H., Kron, S.J., Toyoshima, Y.Y., Spudich, J.A., Reisler, E. (1990) Subtilisin cleavage of actin inhibits *in vitro* sliding movement of actin filaments over myosin. *J. Biol. Chem.* 111, 465-470.

Secrist III, J.A., Barrio, J.R., Leonard, N.J., Weber, G. (1972) Fluorescent modification of adenosine-containing coenzymes – Biological activities and spectroscopic properties. *Biochemistry* 19, 3499-3506.

Strzelecka-Gołaszewska, H., Pròchniewicz, E., Drabikowski, W. (1978) Interaction of actin with divalent cations. 2. Characterization of protein-metal complexes. *Eur. J. Biochem.* 88, 229-237.

Strzelecka-Gołaszewska, H., Venyaminov, S.Y., Zmorzynski, S., Mossakowska, M. (1985) Effects of various amino acid replacements on the conformational stability of G-actin. *Eur. J. Biochem.* 147, 331-342.

Suzuki, N., Mihashi, M. (1991) Binding mode of cytochalasin B to F-actin is altered by lateral binding of regulatory proteins. *J. Biochem.* 109, 19-23.

Swezey, R.R., Somero, G.N. (1982) Polymerization thermodynamics and structural stabilities of skeletal muscle actins from vertebrates adapted to different temperatures and hydrostatic pressures. *Biochemistry* 21, 4496-4503.

Swezey, R.R., Somero, G.N. (1985) Pressure effects on actin self-assembly: interspecific differences in the equilibrium and kinetics of the G to F transformation. *Biochemistry* 24, 852-860.

Taguchi, T., Kikuchi, K., Tanaka, M., Suzuki, K. (1979) Heat coagulation of fish actin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45, 639-642.

Takashi, R. (1973) Studies on muscular proteins of fish-VIII. *Nippon Suisan Gakkaishi* 39 197-205 (in Japanese).

Tanaka, H., Maezawa, Y., Ojima, T., Nishita, K. (2004) Cloning and sequencing of cDNA

encoding walleye pollack α -skeletal actin isoforms. *Fish. Sci.* 70, 198-200.

Tirion, M.M., ben-Avraham, D. (1993) Normal mode analysis of G-actin. *J.Mol.Biol.* 230, 186-195.

Torigai, M., Konno, K. (1997) Thermal stability of fish G-actin extracted from acetone-dried myofibril powder. *Fish. Sci.* 63 403-406.

Valentin-Ranc, C., Carlier, M.-F. (1989) Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin. Binding of the lambda isomers of beta gamma-bidentate CrATP to actin. *J. Biol. Chem.*, 264, 20871-20880.

Valentin-Ranc, C., Carlier, M.-F. (1991) Role of ATP-bound divalent metal ion in the conformation and function of actin: comparison of Mg-ATP, Ca-ATP, and metal ion-free ATP-actin. *J.Biol.Chem.* 266, 7668-7675.

Venkatesh, B., Tay, B.H., Elgar, G., Brenner, S. (1996) Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. *J. Mol. Biol.* 259, 655-665.

Vorobiev, S., Strokopytov, B., Drubin, D.G., Frieden, C., Ono, S., Condeelis, J., Rubenstein, P.A., Almo, S.C. (2003) The structure of nonvertebrate actin: implications for the ATP hydrolytic mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100, 5760-5765.

Yanagida, T., Ueda, M., Murata, T., Esaki, S., Ishii, Y. (2007) Brownian motion, fluctuation and life. *BioSystems* 88, 228-242.

Waechter, F., Engel, J. (1975) The kinetics of the exchange of G-actin-bound 1:N6-etheno-adenosine 5'-triphosphate with ATP as followed by fluorescence. *Eur. J. Biochem.* 57, 453-459.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951.

Wang, Y.L., Taylor, D.L. (1981) Exchange of 1,N6-etheno-ATP with actin-bound nucleotides as a tool for studying the steady-state exchange of subunits in F-actin solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 5503-5507.

Watabe, S, Itoh, Y., Hashimoto, K. (1983) Isolation and characterization of actin from mackerel dark muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 43, 491-497.

Watabe, S., Hirayama, Y., Imai, J., Kikuchi, K., Yamashita, M. (1995) Sequences of cDNA clones encoding α -actin of carp and goldfish skeletal muscles. *Fish. Sci.* 61, 998-1003.

Watabe, S., Hirayama, Y., Nakaya, M., Kakinuma, M., Kikuchi, K., Guo, X.-F., Kanoh, S., Chaen, S., Ooi, T. (1998) Carp expresses fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities to compensate for changes in environmental temperature. *J. Ther. Biol.* 22, 375-390.

Wegner, A. (1982) Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 161, 607-615.

Wriggers, W., Schulten, (1997) Stability and dynamics of G-actin: back-door water diffusion and behavior of a subdomain 3/4 loop. *Biophys. J.* 73, 624-639.