

所属・資格 生命科学科・教授

申請者氏名 茶圓 茂

| | |
|--------------------------------|---|
| 研究課題 | ミオシン線維上を低速で滑り運動しているアクチン線維が突然に高速滑り運動に切替わる現象の解析 |
| 研究目的 および 研究概要 | 1990年,山田ら,Sellers & Kachar はミオシン線維,アクチン線維,ATP を用いた滑り運動再構成系において, 双極構造をしたミオシン線維に沿ってアクチン線維が滑るとき,その速度は, ミオシン線維の端から中央まで (forward track) を滑る際は速く, 中央から端 (backward track) を滑る際は遅いことを発見した. そして, 1992年, さらに興味ある実験が山田らによってなされた. それは以下のような現象である. backward track 上をゆっくり滑っていたアクチン線維の先端が別のミオシン線維の forward track に触れた瞬間, ほとんどのアクチン線維は backward track 上にあり, ゆっくり滑っていたものが, 突然に, 先端部分の短い部分と同様に速く滑った. このことはアクチン線維の短い領域のタンパク質の状態が全体のタンパク質の状態に変化をもたらしていることを意味していて, タンパク質間の長距離相互作用を考える上で興味深い. 今年度は, この実験が再現されるかどうかを調べた. |
| 研究の結果 | ミオシンは, 液体窒素中に保存しておいたウサギ背筋のミンチを 0.6M KCl 溶液に浸して, 粗抽出した. その後, 純水で希釈しミオシンを沈殿, 0.6M KCl 溶液でミオシンを溶解, を繰り返して精製し, 最後に 0.4M KCl 溶液に溶かして 20mg/ml を得, -80°Cに保存した. この保存試料はモノマーミオシンなので, 実験にはミオシン線維にしなくてはならない. 透析法と呼ばれる方法で, ゆっくりと時間をかけて 0.4M KCl から 0.12M KCl に KCl 濃度を下げてミオシン線維を形成させた. この際スタートのミオシン濃度は 50µg/ml, 同時に 0.5mg/ml の BSA を混ぜることで, 会合しない(ダマにならない)ミオシン線維を作成できた. そしてこのミオシン線維を顕微鏡観察用カバーガラス(24X32mm)に吸着させ, 上からカバーガラス(18X18mm)で蓋をし, その隙間に蛍光標識アクチンフィラメントと ATP の入った溶液を流し, 観察した. ミオシン線維はその双極構造の端どおしが重なっているものが, この実験には必要であり, さらにそこをアクチンフィラメントが滑って運動しなくてはならないので, 研究課題のような現象を観察できる確率は高くない. それでも1回の実験で 1, 2回見つけることができた. つまり backward track 上をゆっくり滑っていたアクチン線維の先端が別のミオシン線維の forward track に触れた瞬間, ほとんどのアクチン線維は backward track 上にあり, ゆっくり滑っていたものが, 突然に, 先端部分の短い部分と同様に速く滑った. このように研究目標であった再現性は確認できた. |
| 研究の考察・反省 | ミオシンは KCl 濃度が高い (0.4M 以上) とモノマーで存在するが, KCl 濃度が低いと(0.15M 以下)だとミオシンモノマーが寄り集まってきて線維を形成する. 今回の実験では, 比較的長いミオシン線維が必要となるが, 濃度を瞬間的に低くする, つまり単純に純水で 0.12M KCl になるように希釈すると, その長さは 0.5µm ほどにしかならない. しかし, ゆっくりと濃度を下げると長い線維が得られることがわかった. これはペリスタポンプを使い, 純水をゆっくり流しこむ方法である. 2時間半ほどかけると, 5 ~ 10 µm の線維が得られた. この実験ではミオシン線維が絡まり合ってダマ状になることがあって (会合), これでは顕微鏡観察が容易ではない. そこで, 最初のミオシンモノマーをできるだけ低い濃度にする, そして会合を避ける為に BSA(Bovine Serum Albumin)を適量入れると, うまくそれぞれのミオシン線維が絡まり合わないことが分かった. 今後, この確立した実験系を用いて, 上記の現象が起こるメカニズムを調べて行きたい. |
| 研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所 | ※この欄は, 本報告書提出時点で判明している事項についてご記入ください. 研究発表 1. 第 56 回日本生物物理学会 Single amino acid substitution for the fungal kinesin offers possible Cold-adaptation but impairs thermal stability. 2018. 9. 16. / 岡山大 |

| | |
|---|--|
| <p>研究成果物 テーマ 誌名 巻・号 発行年月日 発行所・者</p> | <p>研究 成果物</p> <p>1. Possible cold-adaptation for the fungal kinesin in compensation for thermal stability acquired by single amino acid substitution. <i>J. Biochem.</i> 2019; 1-7 doi:10.1093/jb/mvy109</p> |
|---|--|