



Title	Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation.
Author(s)	津田, 祐里
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40082
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	津 田 祐 里
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 0 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by <i>in vitro</i> micromanipulation. (マイクロマニピュレーションによるアクチンフィラメントの弾性率およびタンパク質分子間結合破断力の測定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉矢 生人 (副査) 教 授 柳田 敏雄 教 授 高井 義美

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

アクチンは筋収縮をはじめ神経細胞の可塑性に重要とされる神経成長円錐の伸長およびシナプス形成、細胞の分裂増殖に伴う形態変化、免疫系細胞の走化性といった細胞運動、さらに細胞骨格系を介する情報伝達など、多岐にわたる細胞機能の発現において重要な役割を担っている。それゆえアクチンの性質、特にその弾性的性質を明らかにすることは、これら細胞機能の発現機構を理解する上で非常に重要である。これまで、長軸方向および曲げ方向の弾性率は各々測定されているが、回転弾性率の測定には未だ成功していない。本研究の目的は、分子イメージング技術と光ピンセットとよばれるレーザーによる微小物体捕捉技術、あるいはガラスニードルによる超微操作技術を用いて、アクチンフィラメント 1 本を直接観察下に操作し、回転に対する弾性率と分子間結合力を測定することにある。

【方法ならびに成績】

アクチンおよびミオシンは家兎骨格筋より抽出精製した。アクチンフィラメントはあらかじめ蛍光色素（テトラメチルローダミン）で標識しておいたファロイジン（天然に存在する茸毒ペプチドの一種）で重合安定化させたものを用いた。

以下、2つの測定系について説明する。まず、直径 2 ミクロンのポリスチレンビーズに直径 10 ナノメートルの極小蛍光ビーズを化学修飾により結合させて回転運動の標識とする。このビーズにアクチンフィラメントの一端を NEM（N-エチルマレイミド）処理ミオシンで固着させ、他端をカバーガラス上にまばらに固定した NEM 処理ミオシンフィラメントへ結合させる。光ピンセットでビーズを捕捉し、レーザービームを操作することにより下端に結合したアクチンフィラメントを垂直に張る。アクチンフィラメントおよび標識ビーズの蛍光像は高感度カメラを使ってモニターする。光ピンセットによる捕捉はビーズの回転運動に対して摩擦にならないことが分かっているため、アクチンフィラメントに垂直な 2 次元平面へ投影したビーズの回転像はアクチンフィラメントの 1 次元の回転ブラウン運動をそのまま反映する。ビーズの回転角度の時間変化の解析からアクチンフィラメントの回転弾性率やその動的性質を求める。

もう一方の系は、1 本のアクチンフィラメントの一端を自作の柔らかいガラスマイクロニードルに固着させ、他端を硬めのガラスニードルで捕捉する。硬い方のニードルに回転を加えてゆっくりフィラメントに沿って引っ張ると柔らかい方のニードルは既知であるそのバネ定数に応じてたわみ、やがてアクチンフィラメントが破断される。様々な

回転角度を与えて、その各々についてアクチンフィラメントが破断した時のニードルの変位から回転弾性率と分子間破断力を求める。

結果は、光ピンセット法からアクチンフィラメントの回転弾性率として $(8.0 \pm 1.2) \times 10^{-8} \text{ N m}^2$ が得られ、この値はニードル法の結果とよく一致していた。アクチンフィラメントの各サブユニット間の破断力は回転を与えない時で約600pNを示し、さらに長さ1ミクロン当たり9°の回転を与えると320pNにまで大きく減少した。

【総括】

今回求めたアクチンフィラメントの回転弾性率は、既に求められている長軸方向の弾性率と同程度であった。これまでの電子顕微鏡や蛍光分光法による間接的な方法では、アクチンフィラメントは回転方向に長軸方向の数10倍～100倍は柔らかいと見積もられていたが、本研究により、両方向に同程度の柔らかさを持つことが示された。また、アクチンモノマー当たりの結合角の換算では従来の数10～100分の1の捻れを与えるだけでその安定性が失われることが明らかになった。この結果は、アクチンフィラメントが小さな衝撃で短く切れる現象がよく観察され、これが何によるものかの説明がなされていなかったが、それが捻れひずみに因るものであることを強く示唆している。さらに現在は、この実験系を使って、ATP存在下でミオシンと相互作用中のアクチンフィラメントの回転運動を調べている。回転運動が増幅され、アクチンフィラメントがミオシンから何らかのシグナルを受けて能動的に状態変化を惹起しうる可能性を示唆する興味深い結果が得られている。

論文審査の結果の要旨

細胞内情報伝達系における効果器として、あるいは情報処理および変換装置として、アクチンを中心とした細胞骨格系は重要な役割を果たしているとされているが、そのしくみは未だよく分かっていない。その他にも、アクチンは筋収縮はもとより細胞の運動や分裂・増殖に直接、深く関わっている。それゆえ、アクチンの性質、特にその物理的性質を明らかにする事は、広く、細胞機能の発現機構を分子レベルで理解しようとする上で非常に重要であると考えられる。

これまで、アクチンフィラメントの長軸方向および曲げ方向の弾性率は既にさまざまな方法で測定されているが、回転弾性率については直接求める方法が無く、電顕観察や分光学的実験などの間接的方法で推定されてきた。本研究により、正確な値が初めて求められ、それが数十倍以上も違っていたことが示された。これは、アクチン-ミオシン分子間の運動メカニズムや細胞骨格の動態変化を考える時、考慮しなくてはならない重要な結果である。

そして、光ピンセット法と分子イメージング技術を組み合わせた自作の装置により、アクチンフィラメントの回転ブラウン運動を直接的に観測する方法を初めて見出し、実際にアクチン1本の動的構造変化を実時間で捉えることに成功した。計測方法の独創性も含めて、本実験システムは画期的であり、高い評価に値するものと思われる。今後、さらにいろいろな分野にも応用されることが期待される。

最後に、最近の興味深い実験結果は、ATP存在下でミオシンと相互作用しているアクチンが能動的な回転運動を行っているというものである。このような現象を実時間像として、しかも定量的に捉えた例はおそらく本実験が最初である。また、この結果は、これまでアクチンフィラメントは受動的な役割しか果たさないように考えられてきたのに対して、積極的にその役割を果たしていることを示唆する重要な結果である。そして、その生物学的意義は大きく、これをさらに発展させることにより得られる成果は、細胞情報伝達、処理に関する新たな知見をもたらすと期待される。