

新 制
理
431

京大附図

学位申請論文

京都大学大学院博士後期課程生物物理学専攻

小原 收

論文内容の要旨

報告番号	甲第号	氏名	小原 收
論文調査担当者	主査 大井 龍夫 大西 俊一	夫 一	寺本 英
(論文題目) 架橋反応によるアクチンの構造研究			
(論文内容の要旨) 本論文は筋肉蛋白質アクチンの構造について種々の架橋試薬を用いて研究し、分子内に架橋されたものについての詳細な解析からアクチン分子のコンホメーションについての新しい知識を得たものである。 第1に申請者は分子内架橋が実現する条件を検討するため種々の鎖長をもつ架橋剤による生成物を分析したが、スベリミデイトを用いると、分子間架橋物は僅かで大部分が分子内に1個の架橋がかかったものであることを見出した。アクチン分子が単分散のG状態にある塩のうすい環境で架橋したものは、アクチンの重合能等の性質に影響を与えないのに対して、生理的塩環境下で分子が重合しているF状態でアクチンを架橋したものは分子内架橋が1個であるにもかかわらず著しい性質の変化が認められた。すなわち通常ならばG状態に分散する無塩の溶液中でも脱重合せずに粘度の高い重合状態を保っていた。			

次に申請者はこの架橋による性質の変化と架橋物の構造との関係を生化学的、物理化学的方法でしらべた。この変化が単にリジン残基の化学修飾によるものでないことは単官能性のイミドエステルを反応させても効果がないことから確められ、また無塩状態での架橋アクチンが通常のFアクチンのもつ結合ヌクレチドであるADPを結合していることは分子が繊維状に重合していることを示唆した。実際電子顕微鏡によって無塩環境、生理的塩環境の分子を観察すると、重合して繊維状となった分子が見え、前者では曲がりやすい分子となっていた。そして重合状態から脱重合する速度がおそいため過渡現象でもないことは低塩濃度下の架橋アクチンを超音波処理する実験で明らかにした。F-アクチンは超音波処理によって小断片となる。架橋アクチンもこの処理によって一たん粘度が小さくなるが、減少した粘度は再び上昇し分子が重合してゆくことからそのように推論された。さらに円偏光二色性の測定によれば、GとFの2状態では280 nm 附近のスペクトルに大きな差が認められるが、架橋アクチンは溶媒環境によらず常にF状態のスペクトルを示した。すなわち以上の結果はアクチン分子のコンホメーションがF状態に固定されるよう架橋が働いていることを示している。

なお架橋アクチンは生理的塩環境下で通常のFアクチンと区別がつかず、トロポミオシン、Hメロミオシンとの結合にも差が認められなかった。無塩状態でもF状態を保つため、低塩濃度下での他の蛋白質との結合が調べることが可能であり、トロポミオシンとは結合せず、Hメロミオシンと結合するという結果を得ている。さらにアクチンと結合して重合能を失わせる酵素蛋白質DNaseIとの反応もしらべている。架橋アクチンは長時間おかない限りDNaseIと相互作用せず、超音波処理によってようやく脱重合することがわかった。架橋によってコンホメーションがF状態になっているためDNaseIと相互作用しうるG状態は繊維状分子の端で時に実現するにすぎないと考えられる。

参考論文はそれぞれトロポミオシン、トロポニンに対する架橋実験の結果を述べたものである。

架橋反応によるアクチンの構造研究

京都大学大学院博士後期課程 生物物理学専攻

小原 収

目 次

序 論	1. 蛋白質研究の現状	1
	2. 溶液中の蛋白質の立体構造—架橋反応による研究—	2
	3. 筋収縮の分子論—収縮蛋白質としてのアクチン—	3
	A. G—F 変換	
	B. アクチンに結合しているヌクレオチドの役割	
	C. アクチンに結合している二価イオンの役割	
	4. アクチンの存在状態の調節	8
	5. 本研究の目的	9
実験方法	1. 蛋白質の調製	10
	2. アクチンの架橋反応	10
	3. 修飾されたリジン残基数の決定	11
	4. ATPase 活性の測定	11
	5. DNase 活性の測定	11
	6. アクチンに結合したヌクレオチドの分析	11
	7. 修飾アクチンと他の蛋白質との相互作用	12
	8. SH 基の滴定	12
	9. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)	12
	10. 粘度測定	13
	11. 円偏光二色性 (CD) スペクトル	13
	12. アミノ酸分析	13
	13. その他	13
	14. 試薬	14
結 果	1. アクチンの架橋反応	15
	A. F—アクチンの架橋反応	
	B. G—アクチンの架橋反応	
	2. SA の諸性質	17
	A. SA の不均一性	
	B. SA の会合状態	
	C. 結合ヌクレオチド	
	D. 他の筋肉蛋白質との相互作用	
	E. 尿素 EDTA による変性	
	F. 重合の加速効果	
	G. 超音波処理の効果	
	H. 円偏光二色性 (CD) スペクトル	

	3. SA と DNase I の相互作用	31
	A. SA と DNase I の相互作用	
	B. SA と DNase I の結合	
	C. SA-DNase I 溶液における超音波処理の効果	
	D. SA への DNase I の結合様式	
	E. アクチン-DNase I 溶液の CD スペクトル	
考 察	1. F-状態の固定化	50
	2. SA の諸性質—分子内架橋の効果—	51
	3. アクチンの非脱重合性について	52
	4. SA の DNase I との相互作用	55
	5. 架橋による構造の固定化—DNase I による固定化効果の解除—	59
	6. 架橋反応の利用—架橋試薬の性質—	60
謝 辞		66
引用文献リスト		67

本論文中に使用した略号：

SA, スベリン酸イミドエステルで処理した F-アクチン：HMM, Heavy Meromyosin：
 EPR, Electron Paramagnetic Resonance：CD, Circular Dichroism：PAGE,
 Polyacrylamide Gel Electrophoresis： ϵ -ATP, $1, N^6$ -Ethenoadenosine Triphosphate：
 EGTA, Ethyleneglycolbis(β -aminoethylether)- N, N, N', N' -tetraacetic acid：
 DTBP, Dithiobispropionimidate：DTNB, Dithiobisnitrobenzoic acid：PBM, N, N' -p-
 Phenylenebismaleimide：SDS, Sodium dodecylsulfate：TNBS, Trinitrobenzene-
 sulfonic acid：トリス, Tris(hydroxymethyl) aminomethane：HA, 一価性イミド
 エステル (hexanoimidate) で処理した F-アクチン：HPLC, High Performance
 Liquid Chromatography：Pi, 無機リン酸。

序 論

1. 蛋白質研究の現状

「生命現象を理解する」と言ったとき、その理解という言葉の意味するところは実に多様である。そしてその「理解」というのがどの段階で達成されたと考えるかによって、おそらく生物学の分野を分類することができるだろう。例えば、筋収縮においてカルシウムイオンが収縮・弛緩の調節物質であり、トロポニン・トロポミオシンという調節蛋白質がその情報の受容蛋白質であるということが判明した時点で生理学的な意味での骨格筋収縮の調節機構は「理解」されたことになるであろうし、一方蛋白質化学的な意味ではそれはカルシウム受容蛋白質の機能の研究がやっと可能な段階に達したことを示しているにすぎない。そのような意味で言うならば、分子生物学というのは生命現象を分子レベルで実体としてとらえることを最終的な目標としている科学であると言えるかもしれない。そしてその実体を基礎として生命現象を統一的に記述し、その中からある生命現象を可能にしている分子機械が、我々が巨視的な意味で観察する非生命現象の機構と本質的にどのような差異を有するのかを明らかにしようとするのである。最初にしたように「生命を理解する」とは言わずに「生命現象を理解する」と述べたうらには、その生命現象に参与する分子機械の存在をまず想定し、「生命」ではなくその分子機械という実体を通してその機能が如何にして実現されているのかを現在得られている物理学的な諸原理からながめてみようという意図があり、そのような方向に認識をおし進めようとするところこそが「生物物理」の物理たる所以の一つであろう。

蛋白質の研究は、その意味では今世紀半ばを過ぎてからようやく実体として分子レベルで把握されるようになった。それは蛋白質のアミノ酸配列が決定可能になったことと、X線結晶解析によりその立体構造が明らかになったことに負うところが大きい。現在の蛋白質研究において「蛋白質機能の理解」とは、蛋白質の有する多様な機能をその一次構造やもっと高次の構造との関連の上で把握することを意味すると考えられるが、その「理解」への到達可能性はこれらの研究手段の確立によってはじめて保証された。それ故、蛋白質の構造をまず実体として把握することは非常に重要なことであり、それを抜きにしては上述した「理解」に到達することは絶望的ではある。これは現在の蛋白質研究における明白なパラダイムであり、蛋白質の一次構造や高次構造に依拠しない研究はこの「理解」にはほとんど意味がない。このように、蛋白質の構造と機能の関連を理解しようとするならば、一次構造や高

次構造に我々は固執する必要があり、そのような実体を把握することなしには蛋白質のもつ多様な性質を統一的にある原理で記述することができる段階に至ることなど望み得ないであろう。

このような意味での蛋白質研究におけるX線結晶解析の意義は非常に大きい。今もなお、蛋白質の高次構造を素朴な意味で実体として把握するためには、それ以上の方法はないであろう。しかし、高分解能のX線結晶解析がその蛋白質の高次構造を明らかにした後でも、その蛋白質の研究が終了するというわけではない。それは、蛋白質のもつ動的な挙動が深くその機能と結びついている場合が多いからである。X線結晶解析のもたらす静的な蛋白質構造の与える知見は非常に重要ではあるが、実際に得たい情報は蛋白質が溶液中で、実際に機能している状況下で、その構造が動的な側面をも含めてどのような挙動をしているのかなのである。また、蛋白質の高分解能のX線解析に用いるような結晶がどのような蛋白質に対しても得られるとは限らないし、むしろそれが絶望的な蛋白質も少なくない。これらの現実には、X線結晶解析以外の溶液中の蛋白質の高次構造を研究するための手段を要求している。それらの研究手段は、X線結晶解析の結果を補完して蛋白質の動的な構造に関する情報を与えるべきものである。

2. 溶液中の蛋白質の立体構造—架橋反応による研究

そのような蛋白質の高次構造の研究には、いくつかのアプローチが可能であろう。そこで蛋白質の機能と構造の関連を分子レベルで理解するための一つの試みとして、この研究では化学的に蛋白質へ架橋を導入するという方法を用いてみた。最も一般的なこの方法の利用のされ方は、化学架橋の生成物を変性剤の存在下でポリアクリルアミドゲル電気泳動などで分析し、もし蛋白質間またはサブユニット間に架橋が形成されていれば、そのことからそれらの蛋白質 サブユニット間の距離が用いた二価性試薬の反応基間距離よりも近いことを結論するわけである。本質的には全く同じ理由で、同一鎖内の残基間距離を測定することもできるはずではあるが、そうした方向の研究はあまり多くはなされていない。その主な理由は一次構造上で架橋形成部位を同定するのがやっかいなためであろうが、しかしもし溶液中である残基がどの程度の距離だけ離れているかという情報が得られれば、先に述べた蛋白質の高次構造を理解する上で、決定的なものではないにしても、重要な知見を与えるであろう。事実、RNase A でのこのような実験は、結晶中の蛋白質の三次構造が溶液中のものと大差ないということを示し、X線解析の結果を補完する役割を果たしている(1)。もう一つの化学架橋のもつ潜在的な可能性は、架橋

の導入に伴う蛋白質の構造の固定化である。一般的に言って、蛋白質はそのまわりの環境に依存してその三次構造を変化させ、それに伴って機能の発現が調節される。もしある条件下で導入した架橋が、外部条件の変化に誘導される蛋白質の構造変化（例えば、それが架橋された残基間距離の増加を要求した場合など）を抑制したとすれば、分子内に架橋をもった蛋白質は外部条件に依存しない機能発現をするのではないだろうか。例えば、RNase A においてS-S結合はその三次構造の維持のために必須であるが、この事実は人為的な分子内架橋によっても蛋白質構造の固定化・安定化という現象が現実起こり得る可能性を示唆する例だとも考えられる。そして、必ずしもすべての蛋白質においてS-S結合の開裂が変性を促さないように、分子内に導入された架橋が必ずしも蛋白質構造の固定化・安定化をひき起こすとは考えられない。むしろそのような現象が生じるためには、蛋白質中に特別な残基の空間的配置を要求するから、このような化学架橋の応用はあくまでも潜在的なものである。しかし、もし蛋白質構造の固定化が架橋の導入により生じたとすれば、先に述べた架橋部位の決定というのは単に残基間距離の測定という意味にとどまらず、機能発現に必須な構造変化の実体に関する知見をも与えることになる。

3. 筋収縮の分子論—収縮蛋白質としてのアクチン

本研究に先き立って、ウサギ骨格筋の細いフィラメントの構成成分であるトロポニン、トロポミオシン、アクチン、およびそれらの様々な複合体に対して架橋反応を試み、いくつかの知見を得ていた(2,3)。それらの結果の中で最も興味深いものがアクチンに関するものであったというのが実際のところではあるが、反応を試みた一群の蛋白質の中にアクチンを加えていたのは、この蛋白質が生体運動一般に重要な役割を果たしていることが知られているにも関わらず、アクチンの機能が分子レベルで十分には理解されないで残されていたことが大きな原因である。そこで、アクチン分子の構造と機能に関する研究の現状を簡単に展望して、どのような問題が残されているのかをまとめておく。

本研究で用いたのは、ウサギ骨格筋アクチンである。この蛋白質は筋肉中の細いフィラメントの主要構成蛋白質であり、このアクチンが太いフィラメントの構成成分であるミオシンと相互作用することが筋収縮の素過程である。この相互作用の結果として、ATP をエネルギー源として両フィラメントのすべりがひき起こされ、機械的な仕事をする。このようにアクチンは筋収縮における最も重要な蛋白質の一つ

であったため、以前から様々な研究がなされてきた。更に最近になって、筋肉以外のほとんどすべての真核細胞中にもアクチンが多量に（可溶性分画の蛋白質の10%にも達するという）存在することが確認され、この蛋白質の重要性はますます深く認識されている。興味深いことは、現在知られているいろいろな細胞から得たアクチンの一次構造がかなりよく保存されていることである。図1には、ウサギ骨格筋アクチンの全一次構造と他の細胞から得たアクチンの一次構造の比較を示してある。現在知られているアクチンのアミノ酸配列においては、最もよく置換が起こっている場合でも20%をこえるものは報告されていない(4)。蛋白質の様々な個性がすべて一次構造の中に内包されているのだとすれば、筋肉から得たアクチンの諸性質というのは、他の細胞から得たアクチンにおいても観察されると期待してもよさそうである。

A. G-F 変換

アクチンの有する最も特徴的な性質は、その可逆的な重合能である(5)。アクチンは低い塩濃度下では分散した球状の単量体の蛋白質(G-アクチン)として存在するが、この溶液に塩を加えると(例えば、KCl なら 50~100 mM、MgCl₂ なら 1~2 mM) 長い二重らせん状のフィラメント(F-アクチン)へと会合していく。このフィラメントは多数のアクチン単量体からなり、その長さは数 μ mにも達する。この重合過程は Oosawa らによって詳細に研究され、基本的には核形成とそれに続くフィラメントの伸長という二つの過程からなる一種の凝縮過程に他ならないことがわかった。つまり、アクチンの重合過程における律速段階は核形成であり、核が形成されればそれは速やかに伸長過程へと移行する。重合が始まるためには溶媒条件のみならずある量以上のアクチン濃度を必要とし、この濃度を臨界濃度と呼ぶ。この臨界濃度に相当するアクチンは、重合が完結した後も単量体として存在し F-アクチンと共存する。これらはまったく、結晶が析出する、または気体が凝縮する際の挙動と類似している。この重合過程の実体については、核が3~4個のアクチン単量体から形成されていることや(6)、フィラメントの伸長が一方向に起こること(7, 8)などが知られている。最近では、Wegnerによってアクチンフィラメントの両端が異なるように機能しているという「head-to-tail」モデルが提案され(9)、その観点からアクチン・フィラメントの性質をながめた研究も増えてきている。このように、巨視的な意味でのアクチンの重合はかなり明らかになってきているが、この過程を蛋白化学的な側面からながめると、明らかになっていることは想像以上に少ない。

アクチンが重合する、つまり G-F 変換に際して、何らかの三次構造の変化を伴なっ

A)

	10	20	30	40	50	
	
DEDETTALVC	DDGSGLVKAG	FAGDDAPRAV	FPSIVGRPRH	QGVMVGMGQK		50
DSYVGDEAQS	KRGILTLKYP	IEHGIITNDW	DMEKIWHHTF	YNELRVAPEE		100
HPTLLTEAPL	NPKANREKMT	QIMFETFNVP	AMYVAIQAVL	SLYASGRRTG		150
IVLDSGDGVV	HNVPYIEGYA	LPHAIMRLDL	AGRDLTDYLM	KILTERGYSF		200
VTTAEREIVR	DIKEKLCYVA	LDFENEMATA	ASSSSLEKSY	ELPDGQVITI		250
GNERFRCPET	LFQPSFIGME	SAGIHETTYN	SIMKCDIDIR	KDLYANNVMS		300
GGTTMYPGRA	DRMQKEITAL	APSTMKIKII	APPERKYSVW	IGGSILASLS		350
TFQQMWITKQ	EYDEAGPSIV	HRKCF				375

B)

Soybean pSac3	MADAEDIGPLVCDNGTGMVK
Yeast	MDSEVAALVIDNGSGMCK
Dictyostelium	XEGEDVQALVIDNGSGMCK
	D	
Drosophila-DmA-1	MCDDDAGALVIDNGSGMCK
Drosophila-DmA-2	MCDEEVAALVVDNGSGMCK
Muscle Specific	DEDESTALVCDNGSGLVK
	T	C
Cytoplasmic	DDDIAALVVDNGSGMCK
	EEE	I

図1 アクチンの一次構造

A) ウサギ骨格筋アクチンの一次構造. アミノ酸は一文字コードで表わしてある。最初は 374 残基と報告されたが (10)、その後一部訂正された (Ser 234A がつけ加えられ、一部配列も訂正された) (11, 12)。

B) 種々のアクチンの NH₂ 末端付近の一次構造の比較. これらはすべて遺伝子解析から得られたものである (4)。

ていることは、いくつかの物理化学的・蛋白化学的手段で検出される。その手段を表1にまとめる。最近の研究によれば、アクチンはまず溶媒条件が重合に好都合なものに変化すると会合に先き立ってある種の構造変化をする ($G-G^*$ 変換) (13,14)。そして、 G^* -アクチンが実際に会合することで、最終的な F-アクチン中のアクチン単量体の三次構造が完成される。換言するならば、 $G-G^*$ 変換は溶媒条件の変化により誘導され、 G^*-F 変換はアクチン-アクチン間相互作用で誘導される。つまり、二段階の過程から $G-F$ 変換は構成されているといえる。表1の中には、各測定手段が $G-G^*$ 、 G^*-F 変換のどちらを検出するものであるかも、わかるものについてはまとめてある。このようにいくつかの異なった側面からの測定が $G-F$ 変換におけるアクチン分子の構造変化を検出し得るということは、アクチン分子がその三次構造をかなり変化させていることを示唆する。しかし、遠紫外領域の円偏光二色性スペクトルからは二次構造の大きな変化は検出されないので (15)、その構造変化は α -らせん含量等が大幅に変化するという類のものではない。では、その三次構造の変化とは、実体としてどのようなものであるのか。これに関しては、ほとんど知られていない。いくつかの残基に関しては、それが $G-F$ 変換に際して動きが抑えられるとか、より疎水的な環境に移るとかの議論は可能であるが、アクチン-アクチン間の接触が単量体自身の構造変化と共役して起こるために、その意味するところはあいまいである。

B. アクチンに結合しているヌクレオチドの役割

アクチンには 1:1 のモル比でヌクレオチドが結合している。このヌクレオチドは通常 G -アクチンでは ATP であり、重合に際して加水分解されて F-アクチンでは ADP となっている。この ATP の加水分解は、 G^*-F 変換の際に起こる (13)。 G -アクチンに結合しているヌクレオチドは速やかに溶媒中のヌクレオチドと交換するが、F-アクチンに結合しているそれは交換速度が遅い。このアクチンに結合しているヌクレオチドの役割については議論が多い。一つの明らかな効果は、ヌクレオチドを結合していない G -アクチンが速やかに変性してしまうことから、アクチン分子が重合能を維持しつづけるための構造の安定化であると考えられている。更に、 G -アクチンに結合しているヌクレオチドが ATP であると重合が速やかに起こる (5)。このような重合速度と最終的な重合の程度を様々なヌクレオチドを用いて調べた結果が報告されており、それによれば重合には ATP の加水分解は必須ではないという (16)。ただし、ATP の加水分解と共役しない重合の場合には、その重合速度は遅くなる。この結果をそのまま解釈す

表1. アクチンの G-F 変換の検出法 a)

	G-F		文献
	G-G*	G*-F	
1. 粘度	-	+	
2. 流動複屈折	-	+	
3. 光散乱	-	+	
4. 電子顕微鏡観察	-	+	
5. 紫外吸収差スペクトル	+	+	14, 17
6. DNase 活性の阻害	-	+	18
7. 遠心操作による沈殿法	-	+	
8. 蛍光スペクトル ^{b)}			
蛍光団 蛋白質側鎖		?	19
1,5-IAEDANS ^{c)}	+	-	20
PIA ^{d)}	-	+	21
NBD-C1 ^{e)}	+	+	22
9. CD スペクトル	-	+	15
10. EPR スペクトル		?	23
11. ヌクレオチドの状態 (交換速度など)	-	+	
12. 化学修飾			
リジン残基		?	24
チロシン残基		?	25
ヒスチジン残基		?	26
システイン残基		?	27
13. 酵素による消化速度	+	-	13

a) 最近、Cooper and Pollard によってアクチンの重合の検出法に関する総説が書かれた (28)。

b) 蛍光団としては様々なものが知られているが、ここには代表的なもののみ示す。蛍光団のリストは、Tait and Frieden の論文中にかなりまとめてある (29)。

c) 1,5-IAEDANS : N-(iodoacetyl aminoethyl)-5-naphthylamine-1-sulfonic acid

d) PIA : N-(1-pyrenyl) iodoacetamide

e) NBD-C1 : 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole

れば、ATP の加水分解は重合過程に必須ではないけれども、その加速効果を有すると結論できそうであるが、同様な実験を行ない異なる結果を報告している研究者もあり (30)、この ATP の加水分解の意味もはっきりとは理解されていない。Wegner の「head-to-tail」モデルは、この ATP の不可逆な加水分解 (脱重合の際には、ADP が ATP にリン酸化されることは起こらない) を方向性のある重合のモデルの中にとりいれているし (9)、Hill もこのアクチンの ATP 加水分解に積極的な意味を見出そうとしている (31)。また、ヌクレオチドは、重合が平衡状態に達した後の重合体-単量体の交換速度に影響を与えることが報告されている (32)。ADP が溶媒中に存在しているときの方が ATP 存在下よりも、重合体中のアクチン分子と単量体のアクチン分子の交換速度が遅いという。これらのヌクレオチドのアクチンの重合状態におよぼす効果は、まだ現象論的にも調べつくされているとは言いがたく、その効果を分子レベルで議論する段階には至っていない。

C. アクチンに結合している二価イオンの役割

同様なことはアクチンに結合している二価イオンにも言える。むしろ、二価イオンの方が得られている知見は少ない。アクチンに結合している二価イオンは、普通には Ca もしくは Mg イオンであり、ヌクレオチドの場合と同様に G-アクチンでは溶媒中の二価イオンとの交換は速く、F-アクチンでは遅くなる。G-アクチンから適当なキレート剤で二価イオンを除くと、G-アクチンは速やかに変性する。このアクチンに結合している二価イオンがどのように作用しているかは不明な部分が多いが、最近になり興味ある現象が報告されている (33)。G-アクチン溶液へ Ca イオンのキレート剤である EGTA を加えると、低塩濃度にも関わらずアクチンは重合するという。これはアクチンのある部位から Ca イオンがはずれると低塩濃度下で重合を始めることを意味しており、そのようなアクチン分子上での微妙な変化が重合を可能にするというのは興味深い事実である。

4. アクチンの存在状態の調節

このように、アクチンはその重合能のみをとり上げては様々な問題を残している蛋白質であるが、他の蛋白質との相互作用という面からながめても非常に興味ある挙動を示す。例えば、骨格筋においても、アクチンと相互作用する蛋白質はミオシン、トロポミオシンなど数種類ある。更に一般の細胞中のものまで含めると、非常に多くのアクチン結合蛋白質が知られている。特に非筋肉細胞におけるアクチン結合蛋白質は、アクチンの重合能・会合状態に影響を与える因子である場合が多く、近年のアクチン結合蛋白質

の報告があまりに多いために、それらをうまく分類・整理しようといくつかの総説が発表されている(34, 35, 36)。これらのアクチン結合蛋白質には、脱重合を促すもの、重合を促すもの、アクチン・フィラメントを断片化するもの、アクチン・フィラメントの束を形成するものなどがあり、実に多様な機能をもつ。これらは、アクチンが細胞中でどのような状態で存在しているかがその機能をも規定してしまうことを考えると、細胞生物学的な意味からも重要である。とりわけ、アクチンが非筋肉細胞中で、収縮蛋白質としてばかりでなく細胞内骨格として細胞の構造蛋白質としても機能していることが明らかになっている現在、アクチンの存在状態(単量体、フィラメント、もしくはフィラメント束)の調節が如何にしてなされているかは重要な問題である。しかし、アクチンの重合能自体が巨視的な現象論の域からあまり進んでいないために、これら一群のアクチン結合蛋白質が如何にしてアクチンの存在状態の調節因子として機能しているのかの分子機構はほとんどわかっていない。この意味でも、アクチンが重合に際して行なう構造変化の実体を分子レベルで把握することは、不可避の問題である。

5. 本研究の目的

以上述べてきたように、アクチンの G-F 変換に伴なう構造変化を理解することは、蛋白質化学的な意味のみならず細胞生物学的な意味でも、重要な問題である。このアクチン分子の結晶構造解析は、アクチン-DNase I 複合体の結晶を用いて進められているが(37, 38)、その結晶から得られるアクチン分子の三次構造は G-アクチンのそれに相当すると考えられる。F-アクチンに対しては、その結晶構造解析というのは絶望的である。このような現状を鑑みると、最初に述べたような X 線結晶解析以外の、その情報を補完するような研究の重要性は一層増してくる。本研究では、こうした蛋白質の構造に関する知見を得るための手段として架橋反応を応用して、その有用性をアクチンの場合について明らかにしようとした。

実験方法

1. 蛋白質の調製 アクチンはウサギ骨格筋のアセトン処理物より、Spudich and Watt の方法により調製した (39)。ウサギ骨格筋ミオシンは Perry の方法により調製し、heavy meromyosin (HMM) はミオシンをトリプシン処理して調製した (40,41)。ウサギ骨格筋トロポミオシンは、Ebashi et al. の方法により調製し (42)、粗トロポミオシンに混入しているトロポニン¹はハイドロキシアパタイト・カラムクロマトグラフィーにより除いた (43)。牛 すい臓の deoxyribonuclease I (DNase I) は、市販のもの (Worthington, DP-grade) をハイドロキシアパタイトを用いて精製した後使用した (44)。

2. アクチンの架橋反応

a) F-アクチンの架橋反応 G-アクチン溶液 (0.1 mM ATP, 2 mM NaHCO₃, 0.2 mM CaCl₂, pH 8.0, 以下 G-バッファーと呼ぶ) へ、KCl・MgCl₂ をそれぞれの最終濃度が 50 mM、2 mM となるように加えて、F-アクチンへと重合させる。F-アクチンの架橋反応は、F-アクチン溶液 (F-アクチン 1 mg/ml, 50 mM トリエタノールアミン塩酸バッファー, pH 8.5, を含む) へ、イミドエステル溶液 (20 mg/ml, 1M トリエタノールアミン塩酸バッファー (pH 8.5) に溶かしたもの) を最終濃度が 2 mg/ml となるように加えることで開始した。室温でゆっくりかくはんを続けながら、四時間反応を行なった。その後、高速遠心 (100,000 X g, 90 分間) で修飾 F-アクチンを沈殿させて、反応をとめた。回収した修飾アクチンは、G-バッファーに溶かした後に、更に G-バッファーに対して透析した。十分に透析したサンプルを十秒間超音波処理した後、ただちにミリポア・フィルター (0.45 μm) でろ過した。未修飾アクチンは以上の操作で完全に脱重合する。修飾したアクチンは、冰箱中で保存し、一週間以内に使用した。

b) G-アクチンの架橋反応 G-アクチン溶液 (1 mg/ml, G-バッファー) へ、0.2 N NaOH で中和したイミドエステル塩酸塩を最終濃度が 2 mg/ml となるように手早く加えることで、反応を開始した。反応は 2~4 °C で四時間行ない、この間反応溶液の pH が 8.5~9.0 の間であるように 0.2 N NaOH で調節した。修飾した G-アクチンは十分に G-バッファーに対して透析をし、その後ミリポア・フィルター (0.45 μm) でろ過した。これらの一連の操作中には、G-アクチン溶液の粘度上昇は見られなかった。

修飾 G-アクチンも冰箱中で保存し、調製後一週間のうちに使用した。

c) N,N' -phenylenebismaleimide (PBM) による修飾 F-アクチンは二価性イミドエステル他に、PBMでも架橋反応を試みられた。架橋反応の条件は、Knight and Offer に従ったが (45)、必要な場合には架橋反応を pH 7~8 で行なった。

3. 修飾されたリジン残基数の決定 これは、以下に述べる三通りの方法を用いて行なったが、これらの方法は互いに矛盾しない結果を与えた。

a) 修飾蛋白質を加水分解した後、アミノ酸分析装置の上で回収されてくるリジンの量を測定した。未修飾アクチンの加水分解物との比較から、減少したリジンの数がアミジン化されたリジンの数であるとする。

b) Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) でアミノ基の数を滴定し (46)、減少したアミノ基がアミジン化されていると考える。

c) アジピン酸ジイミドエステル、スベリン酸ジイミドエステルの場合には、直接に各イミドエステルとリジン残基の反応生成物をアミノ酸分析装置上で、Ohara and Takahashi の方法で同定 定量した (47,48)。

4. ATPase 活性の測定 アクチン・HMM 溶液 (HMM 0.2 mg/ml, アクチン 0.1~0.5 mg/ml, KCl 60 mM, MgCl₂ 1 mM, トリシュー塩酸バッファー (pH 7.0) 20 mM) へ ATPを最終濃度 2 mM となるように加えて、反応を開始した。遊離した無機リン酸 (Pi) の量は、LeBel et al. (49) または Lin and Morales (50) の方法に従って定量した。

5. DNase 活性の測定 DNase 活性は、Lindberg の方法に従って 260 nm における DNAの断片化に伴う吸収の増加から求めた (51)。基質として用いた溶液は DNA (40 µg/ml), 4 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.1 M トリシュー塩酸バッファー (pH 7.5) を含んでいた。

6. アクチンに結合したヌクレオチドの分析 まずアクチン溶液に含まれる遊離ヌクレオチドをアニオン交換樹脂 (Dowex 1 X 2, 200-400 メッシュ) でとり除いた。この後、アクチンを過塩素酸 (最終濃度, 1%) で沈殿させ、遠心により除去した。この操作により、アクチンに結合していたヌクレオチドは遊離し、上清に存在する。この上清中のヌクレオチドの分析は、単にヌクレオチドの総量のみを問題とするときは上清の紫外吸収を測定し、その他の場合は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離 定量した。HPLCは Lichrosorb NH₂ (5 µm, Merck) を詰めたカラム (0.45 X 15 cm) の上で、

JASCO Trirotar III 液体クロマトグラフィーシステムを用いて行なった。溶出は 1 mg/min の流速で、0.5 M KH_2PO_4 を用いて行ない、検出は SIC 5000E 型 積分計 (System Instruments Inc.) を接続した JASCO UVIDEC III 紫外吸収モニターを用いて、260 nm の吸光度測定で行なった。Lichrosorb NH_2 は使用時間の増加に伴って各ヌクレオチドの保持時間が少しずつ減少してくるので、溶出に用いる KH_2PO_4 の濃度を適当に調節して保持時間の変動がなるべく小さくなるようにした。

7. 修飾アクチンと他の蛋白質との相互作用 HMM、トロポミオシンの修飾アクチンへの結合は共沈実験により確めた。修飾アクチン (0.8 mg/ml) とトロポミオシン (0.2 mg/ml) を 0.1 M KCl の存在下もしくは不在下で混合し、高速遠心 (100,000 X g 90 分間) でアクチンを沈殿させ、沈殿中にトロポミオシンが存在するかどうかを SDS 存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で調べた。HMM の結合もほぼ同様にして確めたが、異なる点は溶液中に ATP が存在すると HMM は未修飾アクチンに対しても非常に弱くしか結合しないので、遊離 ATP を Dowex 1 で除去した後更に遊離 ATP がもし混入していても加水分解されてしまうように、アクチン-HMM 溶液を遠心に先立って一晩 4°C で放置しておいたことである。

DNase I は F-アクチンの脱重合因子として知られているので、その性質を利用して修飾アクチンの重合能に関係した性質を調べた。そのときには、上述した共沈実験の他に、変性剤を含まない PAGE によっても DNase I の結合を観察した。

8. SH 基の滴定 アクチン中の SH 基は、dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) を用いて滴定した (52) 。変性剤存在下の滴定は、滴定する前にアクチンを室温で 15 分間処理した。

9. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) PAGE は、自作の小型化したスラブ型泳動装置を用いて行なった。ゲルの大きさは、8.0 x 4.5 x 0.1 cm であった。ゲルのふるいの程度はアクリルアミドの濃度 (w/v) で表現し、アクリルアミドと $\text{N,N}'$ -methylenebisacrylamide の濃度比は常に 30/0.8 であった。SDS 存在下の PAGE は、Laemmli の系 (53) または Weber and Osborn の系 (54) を用いて行なった。ただし、Weber and Osborn の系の場合には、泳動に用いる緩衝液は 40 mM トリス-酢酸 (pH 7.4) へと変更した。Laemmli の系の時には、濃縮ゲル・分離ゲルの高さは各々 1.5 cm、3.0 cm であった。SDS 不在下の PAGE は Laemmli の系を用いて、ただしすべての緩衝

液には SDS を加えなかった。

二次元の PAGE においては、まず一次元目の PAGE をスラブゲル上で行ない、蛋白質のバンドを含むゲルを泳動方向に沿って短冊状に切りとり、この一次元目のゲルを別に用意しておいた二次元目のスラブゲルの上に水平にのせ、その後二次元目の泳動を行なった。この際、一次元目のゲルを二次元目の泳動条件にあわせて平衡化するという事は行なわなかった。二次元目に Laemmli の系で PAGE を行なう限り、このような簡便な方法でも実用的にはまったく問題がなかった。

ゲルの染色は、0.25 % クマージープリリアントブルー R 250 (45 % CH₃OH, 10 % CH₃COOH, 45 % H₂O) 中で 30~60 分間行なった。脱色は、ゲルを 7 % CH₃COOH 中で 60 °C にあたため、色素の拡散により行なった。脱色後のゲルのデンストメトリーは、Gelman DCD-16 型 デンストメーターを用いて行なった。

10. 粘度測定 粘度の測定は、オストワルド型粘度計を用いて、25 °C に温度制御された水槽中で行なった。粘度は、比粘度 (η_{sp}) または還元粘度 (η_{red} , $\eta_{red} = \eta_{sp}/C$ C: 蛋白濃度 (g/dl)) であらわした。

11. 円偏光二色性 (CD) スペクトル CD スペクトルは JASCO J-20 改良型円偏光二色計で測定した。遠紫外領域の CD スペクトルは光路長 0.2 mm のセルで、近紫外領域のスペクトルは 10 mm のセルを用いて測定した。

12. アミノ酸分析 蛋白質の加水分解は、定沸点の塩酸中 (0.15% フェノールを含む) を用いて、脱気した封管中で 30~36 時間 110 °C で行なった。蛋白質の加水分解物は、JEOL JLC-3 クロマトグラフィーシステムと JEOL LCR-BC₂ 検出計を用いてアミノ酸分析した。通常のアミノ酸は、2-カラムシステムで分析を行ない、架橋反応のリジン誘導体は、特に短い 5 cm のカラム (i.d. = 0.3 cm) を用いて分析した (47, 48)。

13. その他 超音波処理は、5~10 W の出力 (20 kHz) で、超音波細胞破砕器 (大岳製作所, Type 5201) を用いて行なった。蛋白質の濃度は Lowry 法で決めるか、または次のような紫外吸収の報告された値をもとにして蛋白質溶液の吸光度から決定した。 ($A_{1\%, 290nm} = 6.3$, G-アクチン (55) 、 $A_{1\%, 277nm} = 2.5$, トロポミオシン、 $A_{1\%, 280nm} = 6.5$, HMM (56) 、 $A_{1\%, 280nm} = 12.3$, DNase I (57)) 。

14. 試薬 Dithiobispropionitrile は、Wang and Richards の方法に従って調製した (58)。イミドエステル塩酸塩は、対応するニトリルから McElvain and Schroeder の方法に従って合成した (59)。1,N⁶-ethenoadenosine triphosphate (ε-ATP) は、Secrist らの方法により合成した (60)。尿素は、試薬特級のものを再結晶してから用いた。ヒドロキシアパタイトは、Bernardi の記述に従って調製した (61)。その他のすべての試薬は供給元の言うところの特級のものを用了。

結 果

1. アクチンの架橋反応

A. F-アクチンの架橋反応 まず F-アクチンに対して、種々の架橋試薬を用いた架橋反応を試み、その修飾アクチンの粘度、分子間架橋生成物の量、リジン残基の修飾の程度を調べた。その結果を表 2 にまとめてある。粘度は、特にことわらない限り、未修飾アクチンなら完全に脱重合しているような低塩濃度の溶媒（G-バッファー）中で測定したものである。二価性ジイミドエステル（コハク酸イミドエステルを除く）の修飾により得たアクチンは、G-バッファー中でも G-アクチンよりかなり高い粘度を示すことが見られた。一価性のイミドエステルであるカプロン酸イミドエステル（methyl hexanoimidate）の修飾では、アクチン中のリジン残基の半分以上が修飾されているにもかかわらず、このような現象はみられず、G-アクチンと同じ程度まで修飾アクチンの粘度も低下した。この実験に用いた二価性ジイミドエステルの中で、dithiobispropionimidate（DTBP）は、両端のイミドエステル基の間に S-S 結合を含み、dithiothreitol や 2-mercaptoethanol などの還元試薬で架橋を切断することができる。この DTBP は、リジン残基の修飾の程度、脱重合の抑制、分子間架橋物の生成のどの面から見ても、最もよく F-アクチンと反応している試薬であった。ところが、DTBP で処理したアクチンを dithiothreitol で還元して架橋を切断してやると、分子間架橋物の消失と G-バッファー中の粘度の減少が平行して観察された。二価性ジイミドエステルよりも効果的に F-アクチン中のアクチン分子間に架橋を形成させる PBM を用いると、共有結合で結ばれたアクチンの多量体が全体の 60%以上も生成した。しかし、このように多量に分子間架橋物を含んだ修飾アクチンは脱重合条件下で、未修飾の G-アクチンよりはいくらか高いが、しかしほぼ脱重合したと見なせる程度の粘度を示した。すべての修飾したアクチンは、重合条件下では通常の F-アクチンとほぼ等しい粘度を示した。

これらの二価性ジイミドエステルで処理した F-アクチンの中に、分子間架橋だけでなく分子内架橋も存在していることは、スベリン酸イミドエステルとアジピン酸イミドエステルで修飾したアクチンについては確認された。つまり、分子間架橋物を除いた後のサンプル（8 M 尿素存在下のゲルろ過で得られた）の加水分解物中でも、アクチン分子当たりほぼ一個の架橋されたリジン誘導体が検出された。

この F-アクチンの架橋反応の結果は、その反応の際にアクチンに結合している二価

表 2. 様々の試薬で修飾したアクチンの溶液の粘度、分子間架橋の程度、
 リジン残基の修飾された数の比較.

試薬	粘度 a) (η_{red} , dl/g)	分子間架橋 の程度 (%) ^{b)}	修飾された ^{c)} リジン残基の数 (モル/アクチン)
F-アクチンの修飾			
Succinimidate	0.1	0	4.6
Hexanoimidate ^{d)}	0.1	0	11.0
N,N'-p-Phenylene- bismaleimide	0.8	58	----
Adipimidate	2.7	4	4.6 ^{e)}
Suberimidate	3.9 (9.0 ^{f)})	15	5.7 ^{e)}
Dithiobis- propionimidate	5.2 (1.6 ^{g)})	28 (4 ^{g)})	11.5
G-アクチンの修飾			
Suberimidate	0.1 (6.6 ^{f)})	0	10.3
未処理アクチン			
G-アクチン	0.1	--	----
F-アクチン	9.3	--	----

a) G-バッファー中での測定 (25°C)。

b) SDS-PAGE のゲルのデンシトメトリーより求めた。

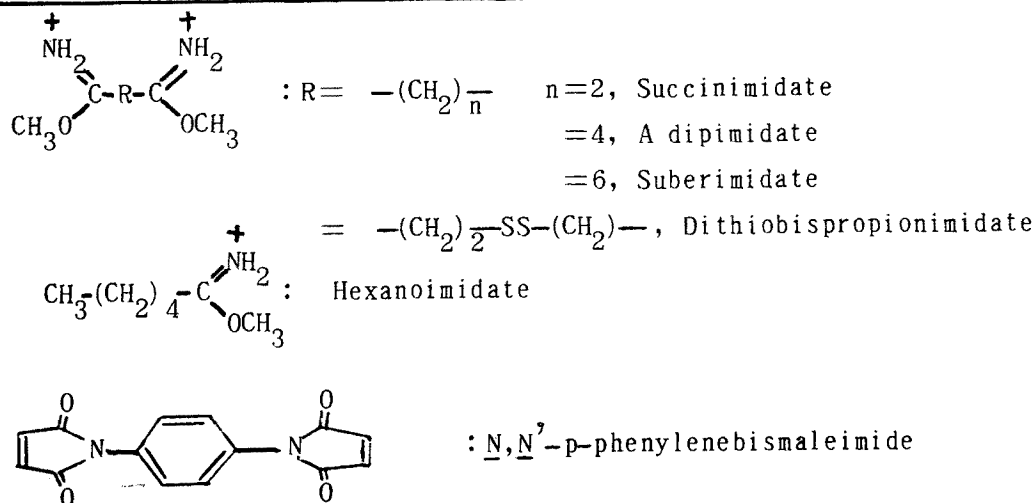
c) TNBS の滴定より求めた。

d) hexanoimidate (4 mg/ml) で 6 時間処理した。

e) アミノ酸分析の結果より。

f) 50 mM KCl 存在下。

g) dithiothreitol (40 mol/mol of actin) で 37°C, 2 時間還元した後。



イオンが Ca イオンであるか Mg イオンであるかによっては、まったく影響をうけなかった。

B. G-アクチンの架橋反応 G-アクチンの架橋反応は 4°C で行なったが、これは試薬が塩であるため、室温で反応させると反応中にアクチンが重合してしまったからである。G-アクチンの架橋反応後の性質は、表 2 にまとめてある。スベリン酸イミドエステルは F-アクチンの修飾ではアクチンの性質を大きく変化させたが、G-アクチンに対しては、リジン残基が F-アクチンの場合同様もしくはそれ以上に修飾されているのにも関わらず、その重合能には影響を与えなかった。塩を加えた後の粘度が通常の F-アクチンより低いのは、修飾反応中に変性した蛋白質が生じたためだと思われる。これらの重合しないアクチン（全体の 20%弱）を高速遠心（100,000 x g, 90 分間）した上清として除いた後、沈殿として得られたアクチン（全体の約 80%）の重合条件下での粘度をもう一度測定してやると、それは未修飾 F-アクチンの粘度と同じくらいになった。全体の 20%弱の非重合性の蛋白質が変性したアクチンであることは、近紫外領域の CD スペクトルがアクチンの特徴的なバンドを示さないことから判った。変性していない修飾 G-アクチンでは、|G→F 変換した後に、再び低塩濃度下に移してやると、F→G 変換を行なうことが粘度と CD スペクトルの測定から判明した。つまり、G-アクチンの架橋反応で得られる主な生成物は、一部の変性アクチンを除けば、通常のアクチンの可逆的な重合能を完全に保持していた。この修飾アクチンの加水分解物をアミノ酸分析してみると、架橋されたリジン誘導体が検出され（アクチン分子当りほぼ一個）、SDS-PAGE で分子間架橋物が観察されなかったことと考えあわせると、分子内架橋が導入されていることが判った。

このように、二価性ジイミドエステルによるアクチンの架橋反応は、特に重合状態のアクチンの場合に、興味ある挙動を示す架橋反応物を与えることが判ったので、以下では F-アクチンの架橋反応で脱重合できなくなった修飾アクチンの典型的なものとして、スベリン酸イミドエステルで処理した F-アクチン（SA）に関して詳細な性質を調べる。

2. SA の諸性質

A. SA の不均一性 SA は低塩濃度下でも高い粘度を有するので、この性質を利用して未修飾アクチンと分離することが可能である。なぜなら、SA の低塩濃度下の粘度は G-アクチンとの混合比に応じて減少するという結果から、未修飾の G-アクチンと SA は低塩濃度下で独立に挙動すると思われるからである。そこで、SA を G-バッファー中で高速遠心（100,000 x g, 90 分間）してやることで、非脱重合性のアクチンのみを回

取することを試みた。この操作によって、全体の 50~60%の蛋白質が沈殿として回収されたが、これは同条件下の F-アクチンの回収率 (90%をこえる) と比較すると、かなり悪い回収率である。また、こうして一度 G-バッファー中の遠心操作で回収した SA を、再び G-バッファーに溶かして同じ操作をくり返しても全部が沈殿することはなく、沈殿物の収量はやはり 50~60%であった。このように遠心分離で回収した SA と、この操作をはぶいて調製した SA の間には、本論文で述べる結果に関しては、ほとんど差がなかった。

SDS-PAGE で SA を分析してみると、未修飾アクチンとは区別されるいくつかのバンドが観察された。図 2 に、SA を二次元 SDS-PAGE した結果を示す。この系では、一次元目は Weber and Osborn の系で、二次元目は Laemmli の系で SDS-PAGE を行なった。この図から判るように、SA の単量体に相当するバンドも Laemmli の系では二本のバンドとしてあらわれるし、架橋された二量体、三量体 (これらの分子間架橋物は全体の 15% 弱存在する) のバンドも Laemmli の系では分裂したバンドとして観察された。このような架橋反応物が SDS-PAGE で分裂したバンドを与える現象は、架橋反応一般においてしばしば観察されることであるが (62, 63, 64) 、おそらく反応生成物の不均一性を反映しているのであろう。先に述べた脱重合条件下の遠心操作では、上清 沈殿に含まれる蛋白質の SDS-PAGE のパターンがまったく同じであったことから、ここでいう不均一性を減らすことができないことが判った。

SA は変性させることなしには脱重合した状態とならなかったもので、ゲルろ過などの精製手段を用いることができなかった。それ故、ここでいう不均一性が SA のサンプル中にあることを認めながらも (分子間架橋物も少量ながら存在している) 、そのまま以下の実験に用いた。

B. SA の会合状態 SAの低塩濃度下での粘度は、G-バッファーに対して透析を更に続けても変化しないことや、超音波処理して一度減少した粘度が時間とともに徐々に上昇し、最後には超音波処理する前の値にまで回復することから考えて、単に脱重合が非常に遅くにしか進行しないからではなく、平衡状態として高い粘度を示す状態にあると考えられる。未修飾アクチンは ATP 存在下で 0.6 M KI を加えると速やかに脱重合することが知られているが (65) 、SA は 0.6 M KI 中でもほとんど粘度の減少を示さず、G-アクチンのそれよりはずっと高い値を維持した。

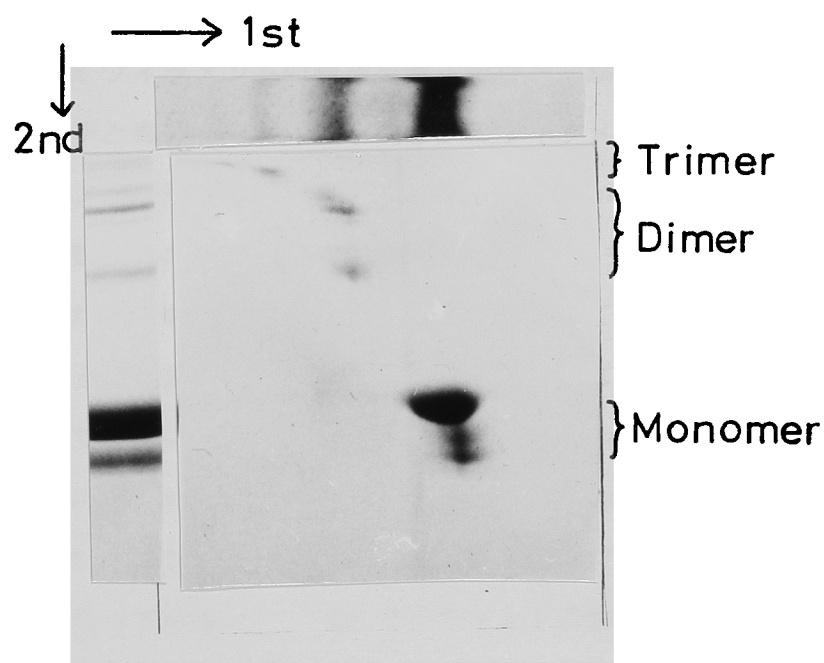


図 2 二次元電気泳動でみた SA の不均一性。

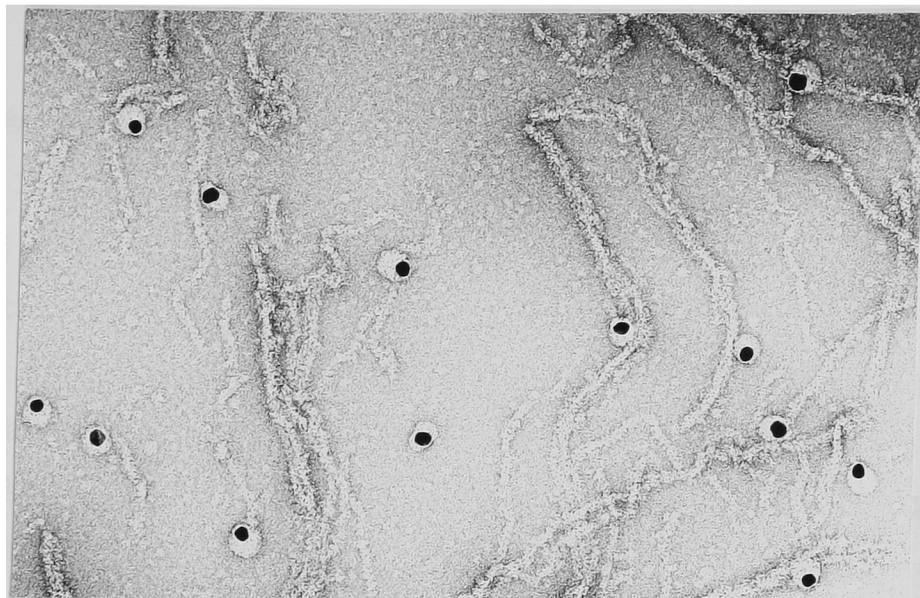
一次元目は Weber and Osborn の系 (5% ゲル) で SDS-PAGE を行ない、二次元目は Laemmli の系 (13% ゲル) で SDS-PAGE を行なった。一次元目で一つのバンドとして観察されたものが、二次元目で複数のバンドを与えることが判る。

SA の低塩濃度下の会合状態を調べるために、G-バッファー中での SA の臨界濃度を測定した。SA の G-バッファー中での粘度と濃度との関係から、G-バッファー中で単量体として存在している SA 分子の濃度は $35 \mu\text{g}/\text{ml}$ と求められた。この値は、重合条件下（例えば、 $50\sim 100 \text{ mM KCl}$ 存在下）の F-アクチンの臨界濃度とほぼ等しかった。

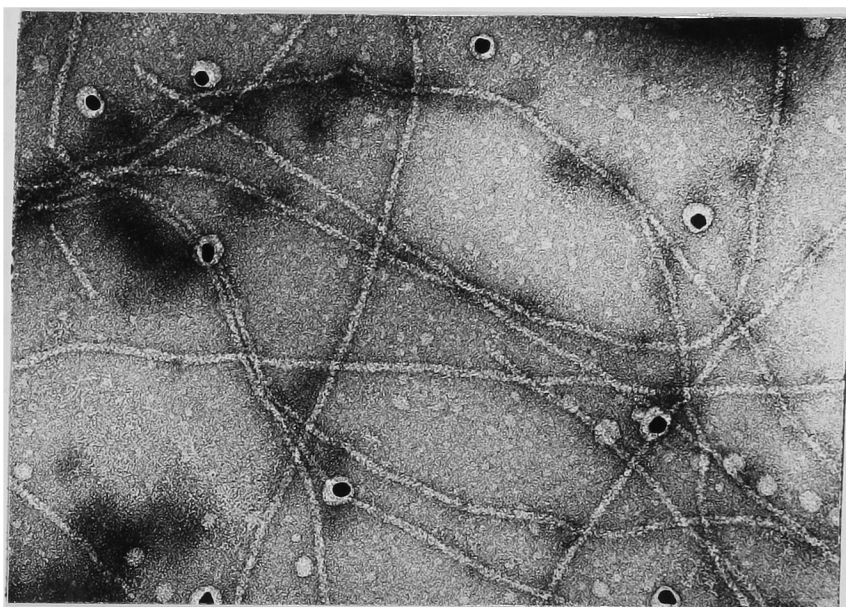
電子顕微鏡観察によれば、F-アクチンはアクチン単量体が二重らせん状に会合したフィラメント構造をもち、半ピッチが 36 nm で 13 個の単量体を含む (66)。そこで、塩の存在下・不在下での SA フィラメントの構造を電子顕微鏡観察で調べてみた。図 3 から判るように、低塩濃度下と高塩濃度下では、明らかにフィラメントの構造は異なった。50 mM KCl 存在下では、SA は通常の F-アクチンと区別のない二重らせん状の長いフィラメントとして観察されたが、低塩濃度下では、F-アクチンよりゆるんだようなそしてぐにゃぐにゃした印象をうけるフィラメント構造をしていた。フィラメントの長さ分布については、電子顕微鏡像を統計的に調べたわけではないが、低塩濃度下ではフィラメントが短くなっているように思えた。SA がまわりのイオン強度に対応してその粘度を変化させることは既に述べたが、塩による粘度変化は塩の添加・除去に応じてくり返し可逆的に起こすことができた。その際には、電顕像で観察されたようなフィラメントの構造変化が起こっている。SA フィラメントの構造変化は、PBM を用いた架橋反応の結果からも支持された。PBM は F-アクチン中のアクチン分子に対するよい分子間架橋試薬であるが、この分子間架橋には Cys 373 とあるリジン残基の特別な空間的配置が必須である (45)。それ故、もし SA フィラメントが塩濃度に依存して構造変化するならば、その PBM の反応によって生じる分子間架橋物の量も変化するだろう。SA の塩存在下・不在下の各々の状態 (pH 8.0) で PBM を反応させたところ、低塩濃度下では分子間架橋物が 30% 生成し、塩存在下 (50 mM KCl 存在下) ではそれが 70% 生成していることが、SDS-PAGE 後のゲルのデンストメトリーにより判った。この結果は、上述したフィラメントの構造変化でうまく説明できるし、電顕像から予想される SA フィラメントの性質と矛盾しない。

C. 結合ヌクレオチド SA に結合したヌクレオチドを分析すると、低塩濃度下で、ほぼ化学量論的な量の ADP (SA 分子当たり 0.91 個) を結合しており、ATP は SA 分子当たり 0.09 個しか結合されていなかった。同じ条件下で G-アクチンに結合しているヌ

a)



b)



—|—|—|
200 nm

図3 塩の存在下・不在下における SA の電子顕微鏡像。

試料は、塩の不在下 (a) および 50 mM KCl 存在下 (b) で調製した。写真中に見える金の粒子は、焦点をあわせるのを容易にするために加えた。

クレオチドは、96%以上が ATP であった。SA のヌクレオチド交換速度は次のようにして調べた。まず、SA または アクチンを重合条件下で遠心し、得られた沈殿を 0.5 mM ϵ -ATP を含む G-バッファー (ATP は加えない) に溶かして、30 μ M の ϵ -ATP を含む G-バッファーに対して 12 時間透析をした。その後、蛋白質に結合しているヌクレオチドを HPLC で分析した。つまり、アクチン中の ADP が ϵ -ATP に置換していく速さを測定することになる。この条件で未修飾アクチンはほぼ完全に ϵ -ATP を結合するようになったが、SA はまだ ADPを主なヌクレオチドとして結合していた (ADP 86%, ATP 1%, ϵ -ATP 10%, ϵ -ADP 4%) 。

次に重合条件下のアクチンと SA のヌクレオチド交換速度も比較した。室温では、F-アクチンは非常にゆっくりとしたヌクレオチドの交換しかしないが、温度を 40°C前後に上げてやるとその交換は速くなり、定常的な ATP の加水分解が観察される (67) 。そこで、アクチンと SA を 2 mM $MgCl_2$ 存在下で重合させ、その後溶媒中のヌクレオチドを Dowex 1 を用いて ϵ -ATP へ置換し、45°C で 30 分間放置した後、蛋白質に結合しているヌクレオチドを分析した。この高温処理後も蛋白質は化学量論的にヌクレオチドを結合しており、そのヌクレオチドは ADP と ϵ -ADP であった。このとき、 ϵ -ADP の全体のヌクレオチド (ADP + ϵ -ADP) に対する割合は、蛋白質のヌクレオチド交換速度の示標となる。この高温処理後、F-アクチンは 44%の ϵ -ADP を含み、SAはわずか 7%の ϵ -ADPしか含まなかった。この結果は、重合条件下で SA がフィラメントの構造としては F-アクチンと見かけ上区別できないのに、そのヌクレオチド交換速度は未処理の F-アクチンよりも遅いことを示している。

未修飾アクチンが G \rightarrow F 変換をする時には、G-アクチンに結合している ATP は加水分解され ADP となり、アクチンと等モルの P_i が放出される (68) 。ところが、SA 溶液へ塩を加えて粘度の上昇が観察されても、このような P_i の放出は見られなかった。

D. 他の筋肉蛋白質との相互作用

(i) トロポミオシン SAは低塩濃度下でも高速遠心で沈殿として回収することができるので、低塩濃度下でもトロポミオシンとの結合を共沈実験により調べることができる。トロポミオシンと SA を重量比で 1:4 に混合し、0.1 M KCl の存在 不在下で高速遠心し、得られた沈殿を SDS-PAGE で調べた。その SDS-PAGE の結果を図 4 に示す。図 4 は明らかに SA へのトロポミオシンの結合には塩の存在が必要であることを示しており、こ

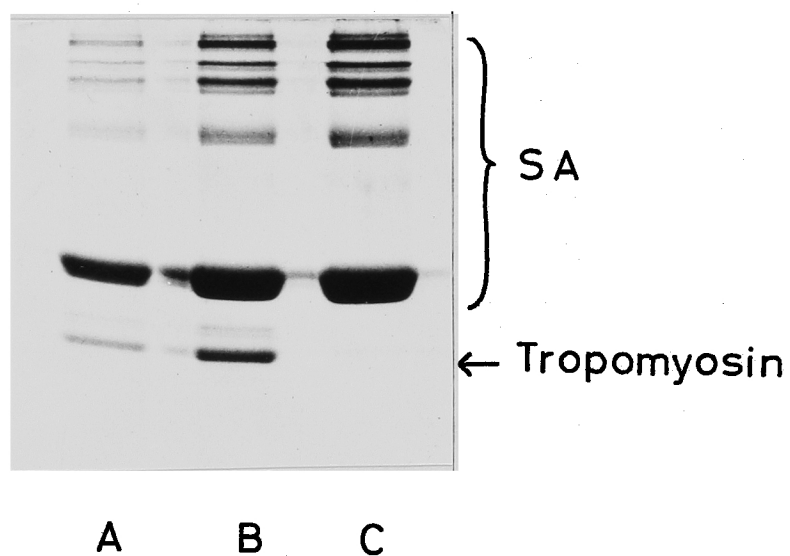


図4. SA とトロポミオシンの共沈実験結果を示す SDS-PAGE パターン。

SA とトロポミオシンの混合溶液を高速遠心し、そして得た沈殿を Laemmli の系 (13% ゲル) で SDS-PAGE を行ない観察した。

A: 遠心操作する前の SA-トロポミオシン溶液. B: 50 mM KCl 存在下で得た沈殿.

C: 塩不在下の遠心で得た沈殿.

の結果は Tanaka and Oosawa の報告と一致する (69) 。SA はトロポミオシンの結合能を完全に保持していた。

(ii) HMM HMM の SA への ATP 不在下での結合は、トロポミオシンの場合と同様に、共沈実験で調べた。HMM と SA は重量比で 8:1 で混合した。SA に結合して共沈した HMM の量は上清の蛋白質濃度の減少から見積った。低塩濃度下で SA が約 60%しか沈殿として回収されないことを考えにいければ、HMM と SA の結合比は塩の有無に関わりなく一定で、未修飾の F-アクチンと HMM の結合比と同じく、0.7~0.8 モルの HMM がアクチン一分子当りに結合した。つまり、SA は HMM の ATP 不在下での結合能を完全に保持していた。この共沈実験で得られた沈殿を電子顕微鏡で観察すると、塩の有無によらずに SA が HMM を結合していることが判った (図 5) 。ただし、よく知られているようなアクチンと HMM の複合体の矢じり構造は、塩存在下の SA と HMM の複合体でのみ観察され、低塩濃度下の SA と HMM の複合体ではこのような規則構造は見られなかった。おそらく、低塩濃度下で SA フィラメントが通常の F-アクチンのような規則的なフィラメント構造をとっていないからだろう。

HMM と SA の相互作用は、SA の HMM ATPase の活性化という面からも調べた。図 6 に、ATPase 活性とアクチン濃度の両軸逆数プロットを示す。これから判るように、SA も確かに HMM の ATPase の活性化能を保持していた。但し、その活性化の程度は未修飾のアクチンよりは低い。この活性化の程度の低さは、SA のリジン残基の修飾による効果なのか、もしくは分子内架橋の形成によるのかは不明である。

E. 尿素・EDTA による変性 アクチンは、G-状態でも F-状態でも、DTNB で滴定される SH 基を一個だけ持ち、このシステイン残基は N-ethylmaleimide で修飾すると失われることから Cys 373 と考えられる (70) 。しかし、変性状態では、アクチン中の五個のすべての SH 基が DTNB で滴定可能になる。それ故、DTNB で滴定されるアクチン中の SH 基の数は、アクチンの変性状態に関する簡便な示標となり得る。図 7 には、たて軸に滴定された SH 基のアクチン分子当りの数を取り、横軸には尿素の濃度を目盛っている。図 7 に示した結果は、SA が未処理アクチンよりも尿素変性に対して抵抗性があることを示している。

EDTA はアクチン分子に結合している二価イオンを奪い、アクチンを変性させる。この変性は、G-アクチンでは速やかに起こり、F-アクチンでは遅い (71) 。G-アクチン、

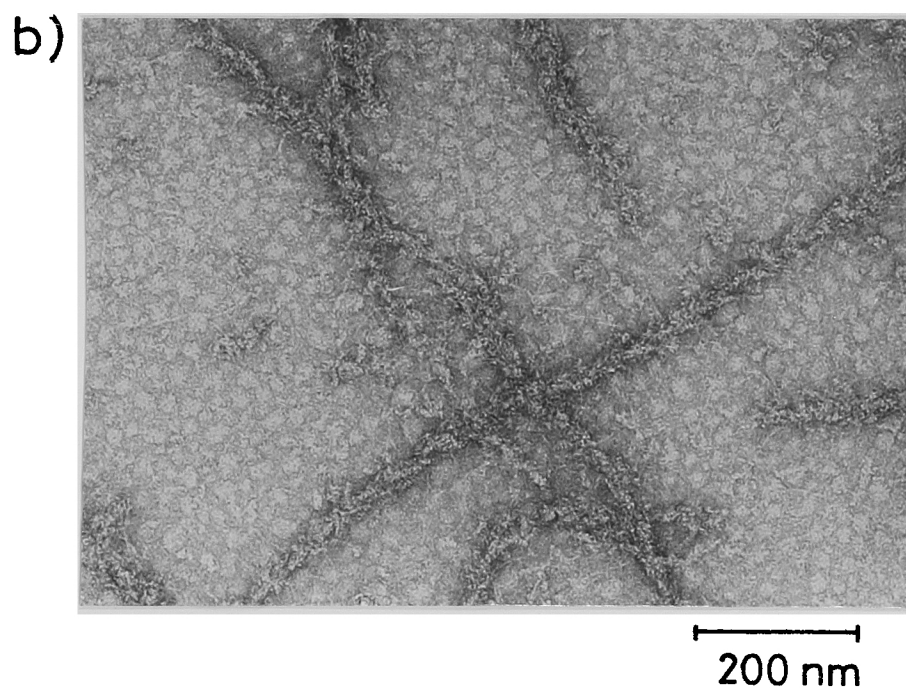
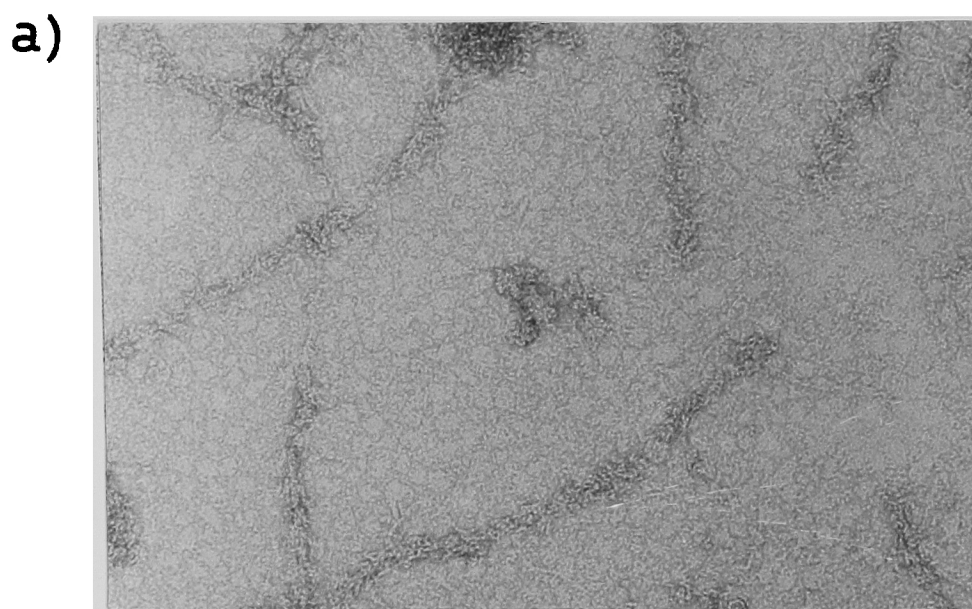


図 5. 塩の存在下・不在下における SA-HMM 複合体の電子顕微鏡像.
(a) 塩不在下 (b) 60 mM KCl 存在下

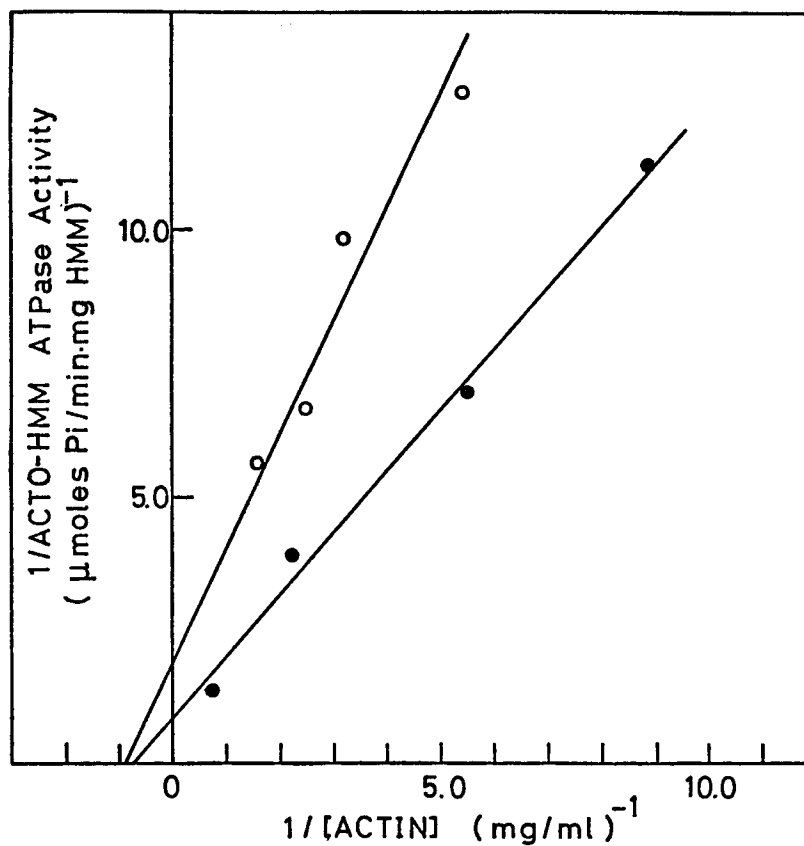


図 6 . ATPase 活性とアクチン濃度の両軸逆数プロット.

ATPase 活性は 25°C で測定した。 (●) : 未処理アクチン (○) : SA

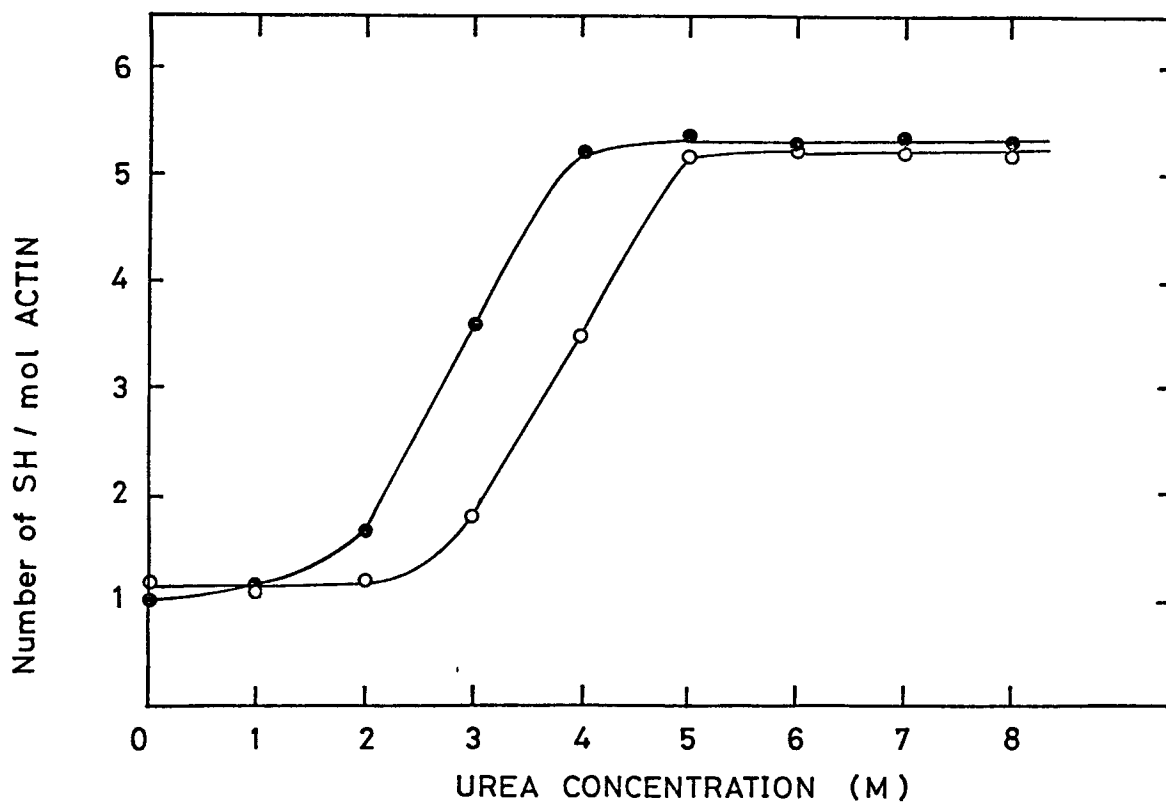


図7. 尿素存在下での未処理アクチンと SA の DTNB による SH 基滴定.

蛋白質は滴定に先立って、15 分間尿素と 0.1 M トリス-塩酸バッファー (pH 8.5) 中で室温で放置しておいた。この結果は、トリス-塩酸バッファーを G-バッファーに変えても影響をうけなかった。また、未処理アクチンを F-アクチンとして滴定しても G-アクチンとして滴定しても結果はまったく変化しなかった。

(●) : 未処理アクチン (○) : SA

F-アクチン、SA に対して、EDTA 処理後に SH 基を滴定した結果を表 3 に示す。SA は、G-アクチンはもとより、F-アクチンよりも少ない SH 基しか EDTA 存在下で露出しなかった。SDS で変性さすと SA の五個の SH 基はちゃんと滴定されるので、この結果は SA が EDTA 変性に対して F-アクチンよりも抵抗性をもっていることを示している。

F. 重合の加速効果 アクチンの重合は、核形成が律速段階となることが知られている。それ故、もし SA が不定形な会合体としてではなく完全なアクチンとしてふるまい得るならば、微量の SA を G-アクチンと共存させておくと G-アクチンの重合は著しく加速されるはずである。この効果を調べたのが図 8 である。G-アクチンのみでは重合の完結に 80 分間を要するような条件下で、G-アクチンに対して 1/10 重量の SA が存在すると重合はわずか 20 分間で完了した。この加速効果は、同じ量の超音波処理した F-アクチンのものと同程度であった。つまり、SA は未処理アクチンの重合の核として機能することができ、未処理アクチンは SA の核の上に伸長して SA と共重合体となることのできる。

G. 超音波処理の効果 この研究で試みた限りでは、SA の不可逆な変性を引き起こさずに、その溶液の粘度を下げることはできたのは、低塩濃度下での超音波処理だけであった。しかし、既に簡単に述べたように、この粘度の低下も一時的なもので時間とともに徐々に元の値まで回復した。持そらく、超音波処理で SA フィラメントの断片化が起こり、その断片がゆっくりと再会合していくのだと思われる。この粘度の回復過程で、SA は、溶媒中に ATP が存在すれば、それを加水分解して Pi を放出した。この ATP の加水分解は粘度の回復と共役して起こり、粘度が超音波処理する前の値に達し、一定の値をとるようになれば、Pi の放出も検出されなくなった。この超音波処理後の粘度の回復過程で見られる Pi の放出される総量は、SA のモル数の数倍にも達し、Pi のモル数と SA のモル数の間には化学量論的な関係は見出せなかった。これと似た現象は、低い KCl 濃度（例えば、20 mM）の下で F-アクチンを超音波処理した時に見られることが報告されている（72）。また、SA の超音波処理後の粘度回復時に見られるこの Pi の放出は、塩を加えて急速に完全な重合状態に変換してやると、重合の完結と同調して速やかに起こり、その時に放出された Pi の総モル数は SA のモル数とほぼ等しい程度であった。これらの結果は、SA に結合しているヌクレオチドが ADP であったことと考えあわせると、超音波処理によって SA は溶媒中の ATP をとりこめるようになり、

表 3. EDTA 存在下での SA と未処理アクチンの SH 基の DTNB による滴定.

試料	Number of SH/mol of actin
未処理アクチン ^{a)}	1.0
SA ^{a)}	1.0
G-アクチン ^{b)}	5.1
F-アクチン ^{b)}	2.9
SA + EDTA ^{b)}	1.4
SA + EDTA + SDS ^{c)}	4.9

a) 0.1 M トリス-塩酸バッファー中での滴定。

b) 各蛋白質は、滴定する前に 15 分間 1 mM EDTA 存在下で処理した。

c) 0.8% SDS と最終的になるように 20% SDS を加え、10 分後に測定した値。

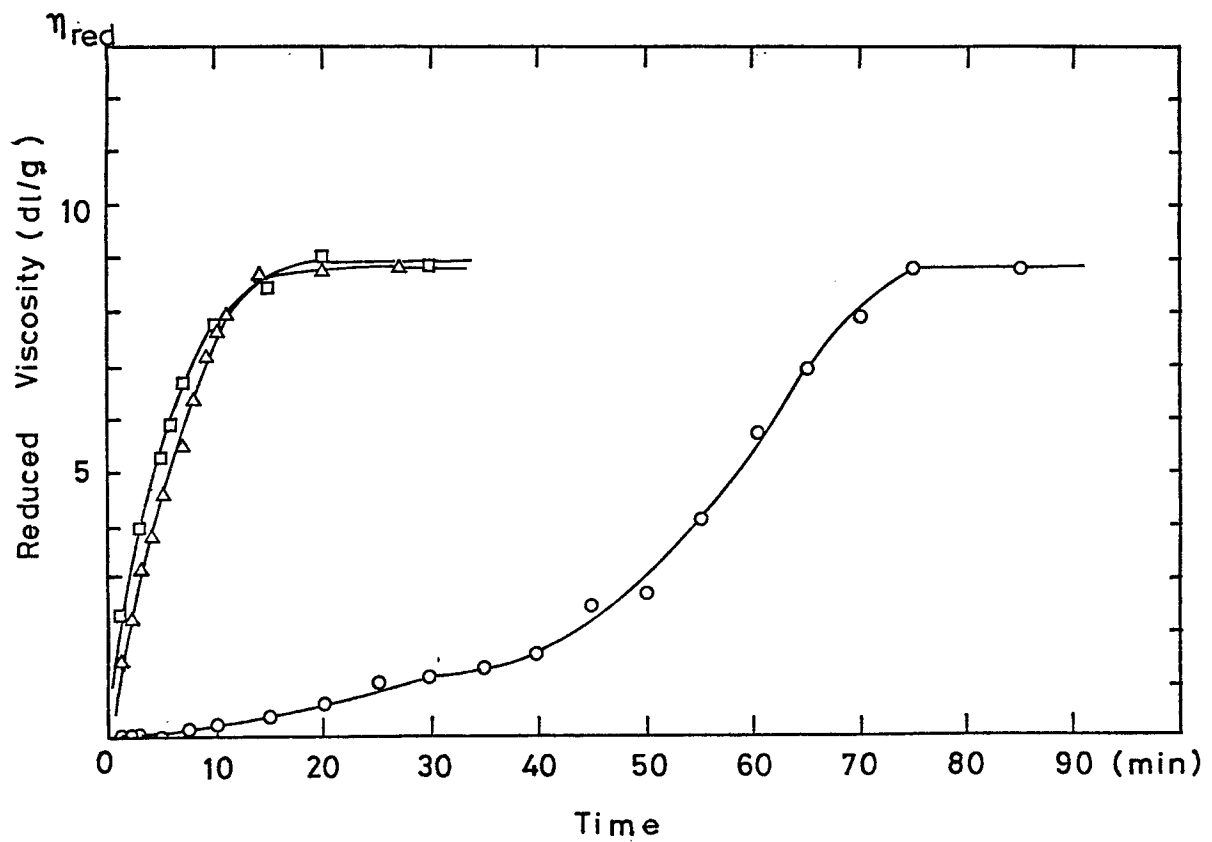


図 8. SA による G-アクチンの重合の加速効果.

G-アクチンの 1/10 重量の SA または超音波処理した F-アクチン (加える体積も G-アクチン溶液の 1/10 以下) を、最終濃度 20 mM KCl となるように塩を加える前に、G-アクチン溶液に加える。混合後、ただちに塩を加え、溶液の粘度を 25°C で測定した。G-アクチン溶液の濃度は 1.0 mg/ml。

(○) : G-アクチン単独 (△) : G-アクチン + SA (□) : G-アクチン + 超音波処理した F-アクチン

SA 断片の再会合と共役してその ATP を加水分解していくように見かけ上解釈できる。

更に興味ある現象は、この超音波処理後の粘度の回復に要する時間が溶媒中に含まれるヌクレオチドに依存していることである。図 9 に示すように、ヌクレオチドなし、または ADP の存在下ではこの回復には約 1 時間を要したが、ATP の存在下ではこの回復に要する時間は 12 時間以上も必要であった。ヌクレオチドなし、または ADP の存在下でも SA がほとんど変性していないことは、塩を加えてやるとほぼ完全に重合することで確かめられた。もちろん ATP の存在下では変性はほとんど起こらなかった。

H. 円偏光二色性 (CD) スペクトル アクチンの近紫外領域 (250~300 nm) の CD スペクトルは、G-F 変換で大きく変化することが知られている (15) 。図 10 に、SA のこの領域の CD スペクトルを示す。SA の CD スペクトルは溶媒中の塩濃度によらず常に F-アクチン型のスペクトルを示し、その平均残基分子楕円率の値もほとんど変化しなかった。また、この CD スペクトルは、SA が超音波処理をうけ一時的に低い粘度を示している場合でも、ほとんど変化しなかった。これらの結果は、超音波処理や低塩濃度下で SA が比較的低い粘度を示している時でも、SA 分子の大部分は F-状態の構造をとっていることを示している。

近紫外領域の CD スペクトルとは対照的に、遠紫外領域 (200~250 nm) の CD スペクトルは G-F 変換に際してほとんど変化しない (15) 。しかし、この領域のスペクトルは、蛋白質の二次構造を反映するので重要である。SA の遠紫外領域の CD スペクトルは、溶媒の塩濃度とは無関係に、未処理アクチンのものとはほぼ同一であった (図 11) 。これは、スベリン酸イミドエステルを用いた架橋反応では、アクチンの二次構造に大きな変化が生じなかったことを示している。

3. SA と DNase I の相互作用

DNase I は、G-アクチンとも F-アクチンとも相互作用して、その結果としてアクチンと DNase I の 1:1 複合体を形成する (73,74) 。この複合体は、DNase 活性をなくしただけでなく、もはや重合することもできない。つまり、DNase I は F-アクチンの脱重合因子としての機能をもつ。そこで、SA のもつ非脱重合性を更に詳しく調べるために、SA と DNase I との相互作用について調べた。

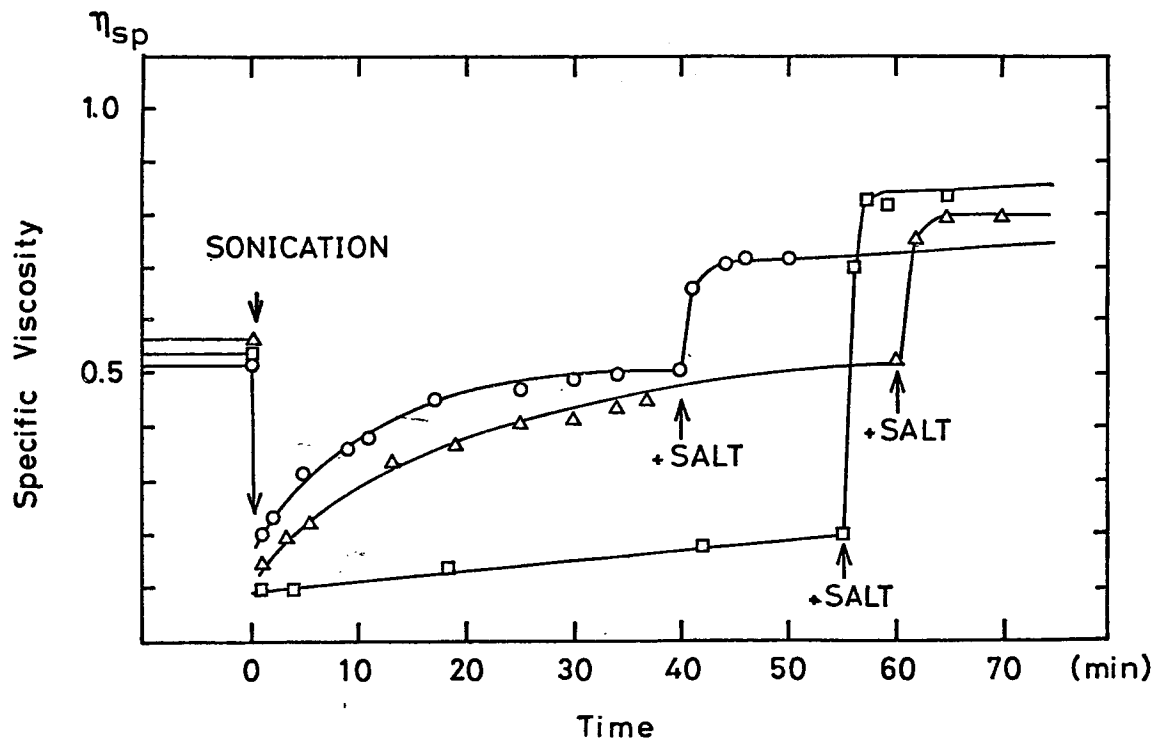


図9. 様々な溶媒条件下での超音波処理後の SA の粘度回復過程.

まず、溶媒中の遊離ヌクレオチドを Dowex 1 で除き、それから希望するヌクレオチドを加えた。測定は 25°C で行なった。

+ SALT: この時に KCl を最終濃度が 60 mM になるように加えた。

(○): ヌクレオチド不在下 (△): 0.5 mM ADP 存在下 (□): 0.5 mM ATP 存在下.

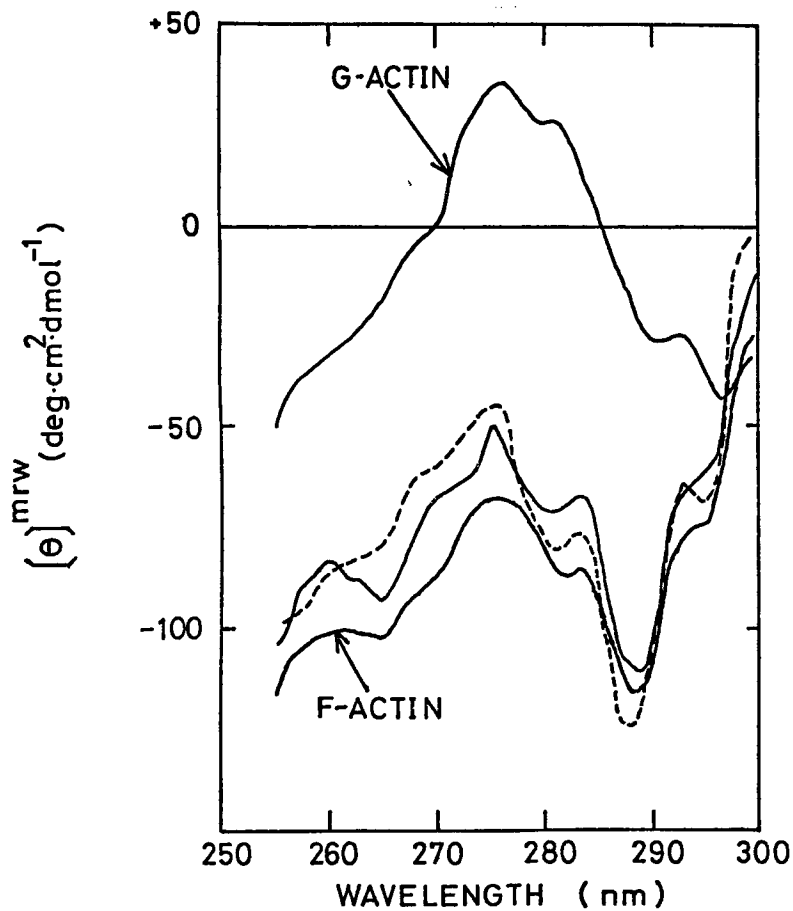


図10. SA の近紫外領域の CD スペクトル.

G-アクチンのスペクトルは、20 mM KCl 存在下で 7.5°C で測定した。測定後、温度を 35°C に上昇させセル中で重合を起こさせた。十分重合したことを確認した後、F-アクチンのスペクトルを測定した。このスペクトルは、溶媒中の ATP に由来するわずかな円偏光二色性については補正されていない。縦軸は、平均残基分子量当りの楕円率である。SA のスペクトルは室温で測定した。

溶媒条件：25 μM ATP, 0.2 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃.

(-----) : 20 mM KCl 存在下の SA (——) : KCl 不在下の SA

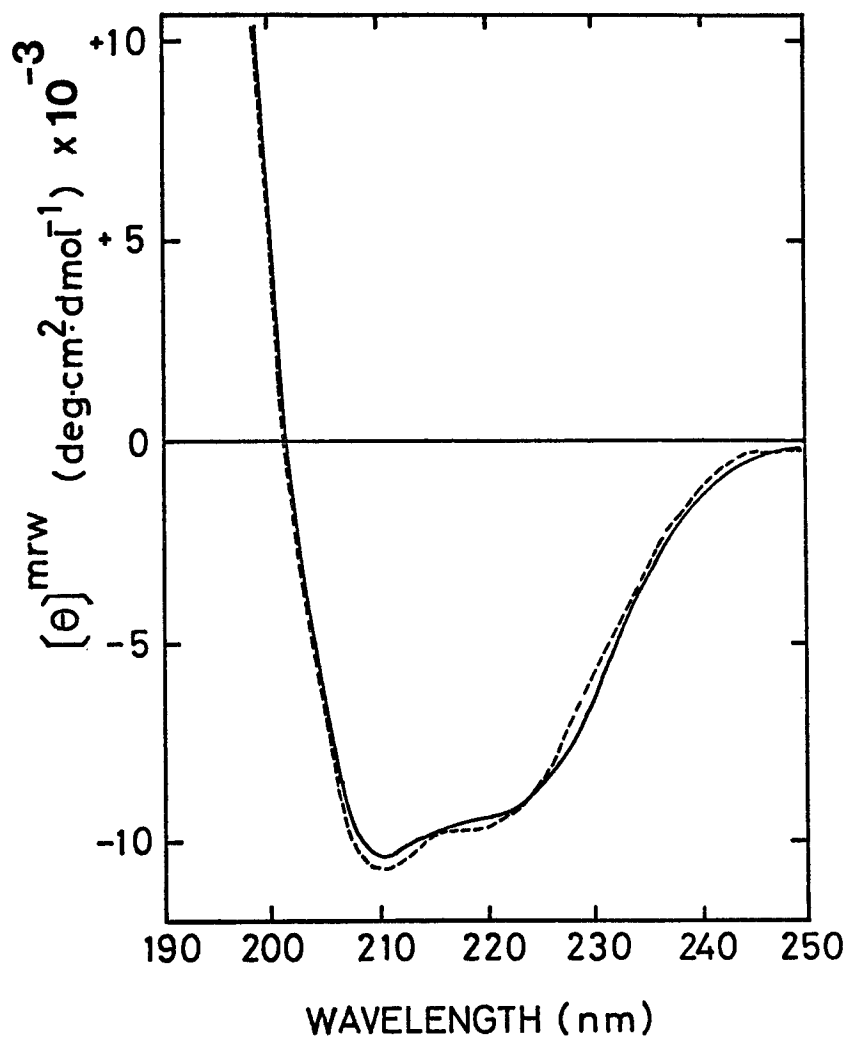


図11. SAの遠紫外領域のCDスペクトル。

G-アクチンのスペクトルは、F-アクチンのものとはほとんど変わらなかったし、SAのスペクトルも塩の有無でほとんど変化しなかった。室温で測定した。

溶媒条件：40 μM ATP, 0.2 mM CaCl_2 , 2 mM NaHCO_3 .

(—) : F-アクチン (- - - -) : SA

縦軸は平均残基分子量当りの楕円率を示す。

A. SA と DNase I の相互作用 図 1 2 に、SA と DNase I の等モル混合溶液の混合後の粘度と DNase 活性の時間変化を示す。この実験では、粘度と DNase 活性を同一試料に対して平行して測定した。対照実験として、F-アクチンとカプロン酸イミドエステル (methyl hexanoimidate) で処理した F-アクチン (HA) に対しても同じ実験を行なった。この実験では、DNase I と混合する前にアクチンは十分に重合させておいた。未処理アクチンと HA の DNase I との混合溶液の場合には、時間とともに粘度・DNase 活性ともに大きく減少することが観察された。しかし、SA-DNase I 混合溶液では、1 時間後にも粘度・DNase 活性ともにほとんど減少しなかった。SA と HA ではリジン残基の修飾の程度はほとんど変わらないので (この実験に用いた試料では、両者ともに 3~5 残基がアミジン化されている)、SA と HA の DNase I との相互作用の仕方の違いは、単にリジン残基の修飾によってではなく架橋形成の結果と考えられる。SA-DNase I 混合溶液は 1 時間程度 25°C で放置しても粘度や DNase 活性において変化を示さなかったが、更に 4°C で一晩放置してやると粘度と DNase 活性の両方にある程度の減少が見られた。それ故、SA がまったく DNase I と相互作用できなくなっているわけではない。

B. SA と DNase I の結合 SA の DNase I の結合は、まず共沈実験により調べた。共沈実験の SDS-PAGE の結果を図 1 3 に示す。この図より明らかなように、SA はほとんど無視できるぐらいの DNase I しか結合しなかった。結合した DNase I の量をゲルのデンシトメトリーより求めると、沈殿として得られた蛋白質中のわずか 1%以下しかなかった。しかし、未処理の F-アクチンへの DNase I の結合も共沈実験ではほとんど検出されないという報告もあるので (75)、更に SDS 不在下の PAGE でも SA への DNase I の結合を調べた。その結果を図 1 4 A, B, C に示す。この PAGE の条件下では、DNase I は単一のバンドとして泳動されるし、重合したアクチンはゲル中へまったくはいれなかった。アクチン-DNase I 混合溶液を泳動すると、DNase I 単独のバンドとは区別できる濃いバンドが観察され、アクチン-DNase I 複合体が生じていることが判った。この結果は、DNase I を F-アクチンと混合するか G-アクチンと混合するかによっては、ほとんど影響をうけなかった。一方、SA-DNase I 混合溶液の場合には、このアクチン-DNase I 複合体に対応するバンドは非常にうすく、逆に DNase I のバンドがはっきりと観察された。この結果は、DNase I の多くは SA に結合していないことと、この条件下で DNase I が SA の脱重合を十分に引き起こせなかったことを示している。しかし、

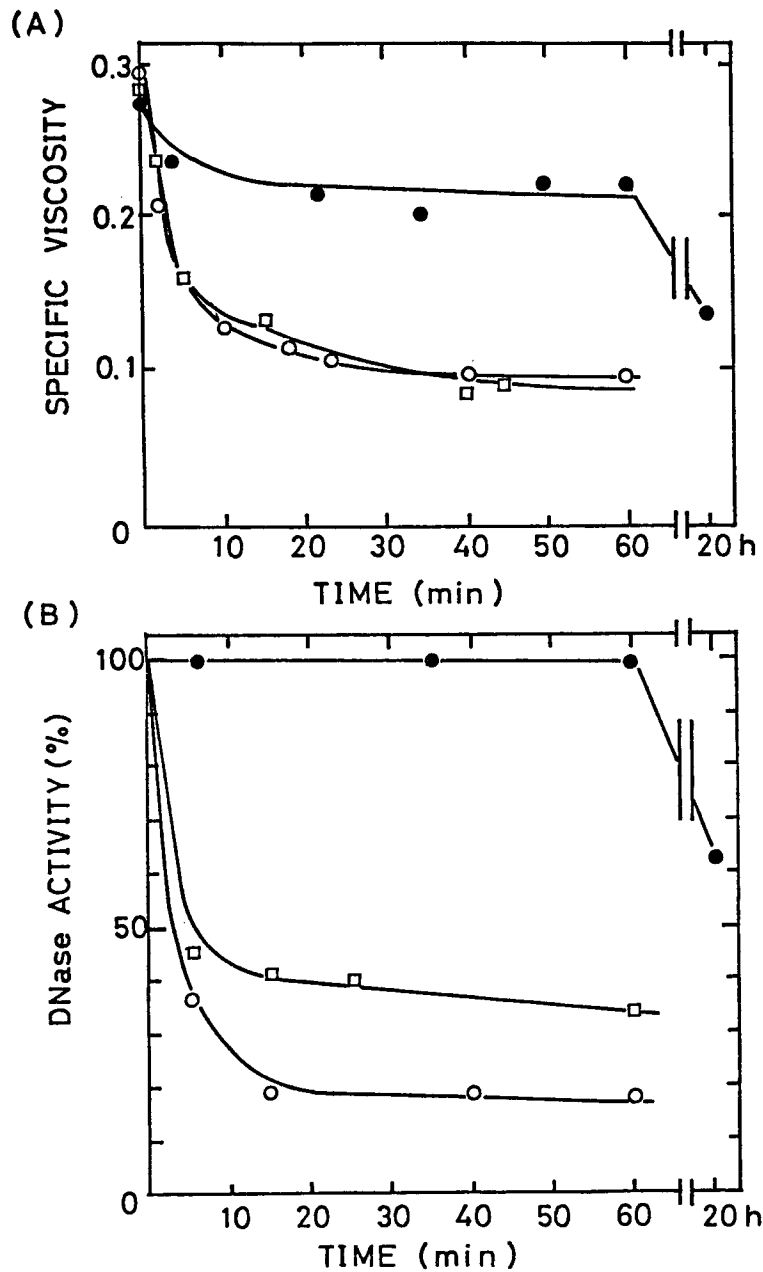


図 12. SA-DNase I 溶液の粘度 (A) と DNase 活性 (B) の混合後の時間変化.

混合に先立って、F-アクチン・HA・SA は十分に重合させておいた。アクチンと DNase I は等モルに混合した (アクチン、0.35 mg/ml : DNase I、0.26 mg/ml)。DNase 活性は同条件下でアクチンが不在の時の値からみた相対値で示してある。溶媒条件：5 mM トリス-塩酸バッファー (pH 8.5), 0.1 mM CaCl_2 , 50 mM KCl, 10 μM ATP.

(○) : F-アクチン + DNase I (□) : HA + DNase I (●) : SA + DNase I

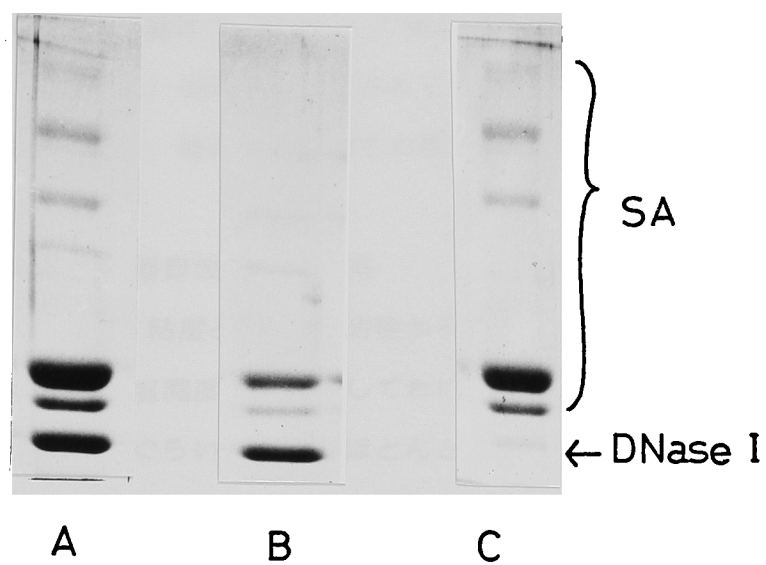


図 1 3 SA と DNase I の共沈実験の結果を示す SDS-PAGE パターン。
 SDS-PAGE は Laemmli の系を用いて、13% ゲルで行なった。SA-DNase I 溶液
 (SA, 0.56 mg/ml : DNase I, 0.42 mg/ml) を重合条件下で高速遠心した。
 (A) 遠心処理する前の SA-DNase I 溶液 (B) 遠心後の上清 (C) 遠心後の
 沈殿。この系では、SA 単量体のバンドは二本に見える。沈殿の中には、ほとんど
 DNase I はなかった。

SA-DNase I 溶液を PAGE に先立って超音波処理してやると、アクチン-DNase I に対応するバンドがはっきり観察されるようになり、逆に DNase I に対応するバンドがうすくなった。

図 14 の B, C には、二次元 PAGE の結果を示す。この系では、一次元目に SDS 不在下の PAGE を、二次元目に SDS-PAGE を行なった。図 14 の B から、前述したアクチン-DNase I 複合体に対応すると思われるバンド中には、実際にアクチンと DNase I をほぼ 1:1 のモル比で含むことが判った。図 14 の C には、SA-DNase I 溶液の超音波処理後の二次元 PAGE の結果を示してある。この図から、SA と DNase I が 1:1 複合体を形成し得ることの他に、架橋された二量体と DNase I の複合体や完全には脱重合していない SA フィラメントの断片と DNase I 複合体が形成されていることが判る。つまり、SA は DNase I の結合能を保持しており、超音波処理はその複合体の形成を加速するよう見える。

C. SA-DNase I 溶液における超音波処理の効果 上述した SA と DNase I との相互作用への超音波処理の影響を、粘度と DNase 活性から調べてみた。SA と DNase I の混合溶液（モル比 1:1）を低塩濃度下で放置しておいても、重合条件の溶媒中のときと同様に、溶液の粘度は 1 時間ぐらいの間にはほとんど減少しなかった。但し、このときの粘度の値は、SA の性質として F-アクチンの約半分でしかないことは既に述べた通りである。この混合溶液を超音波処理すると、粘度・DNase 活性ともに大きく減少し、その回復は見られなかった（図 15）。同条件下で DNase I のみを超音波処理しても、その活性は変化しなかった。これは、DNase I が超音波処理で生じた SA フィラメントの断片の再会合を阻止していることを示唆する。そこで、もっと直接にこの効果を調べるために、重合条件下で SA を超音波処理し、ただちにその溶液に DNase I を加えるという実験を行なった。その結果を図 16 に示す。SA を重合条件下で超音波処理すると、粘度は一度は減少し、しかしすぐに回復する。ところが、SA を同条件下で超音波処理後ただちに DNase I を加えると、溶液の粘度は超音波処理直後の値、つまり完全重合したアクチンと脱重合したアクチンの中間の値にとどまり、1 時間たってもほとんど変化しなかった。未処理のアクチンでは同様な操作は著しく DNase I による脱重合を加速してしまうので、そうしたアクチンフィラメントの断片の再会合の阻止が起こっているのかどうか不明であったが、この結果は DNase I がアクチンフィラメント断片の再会合

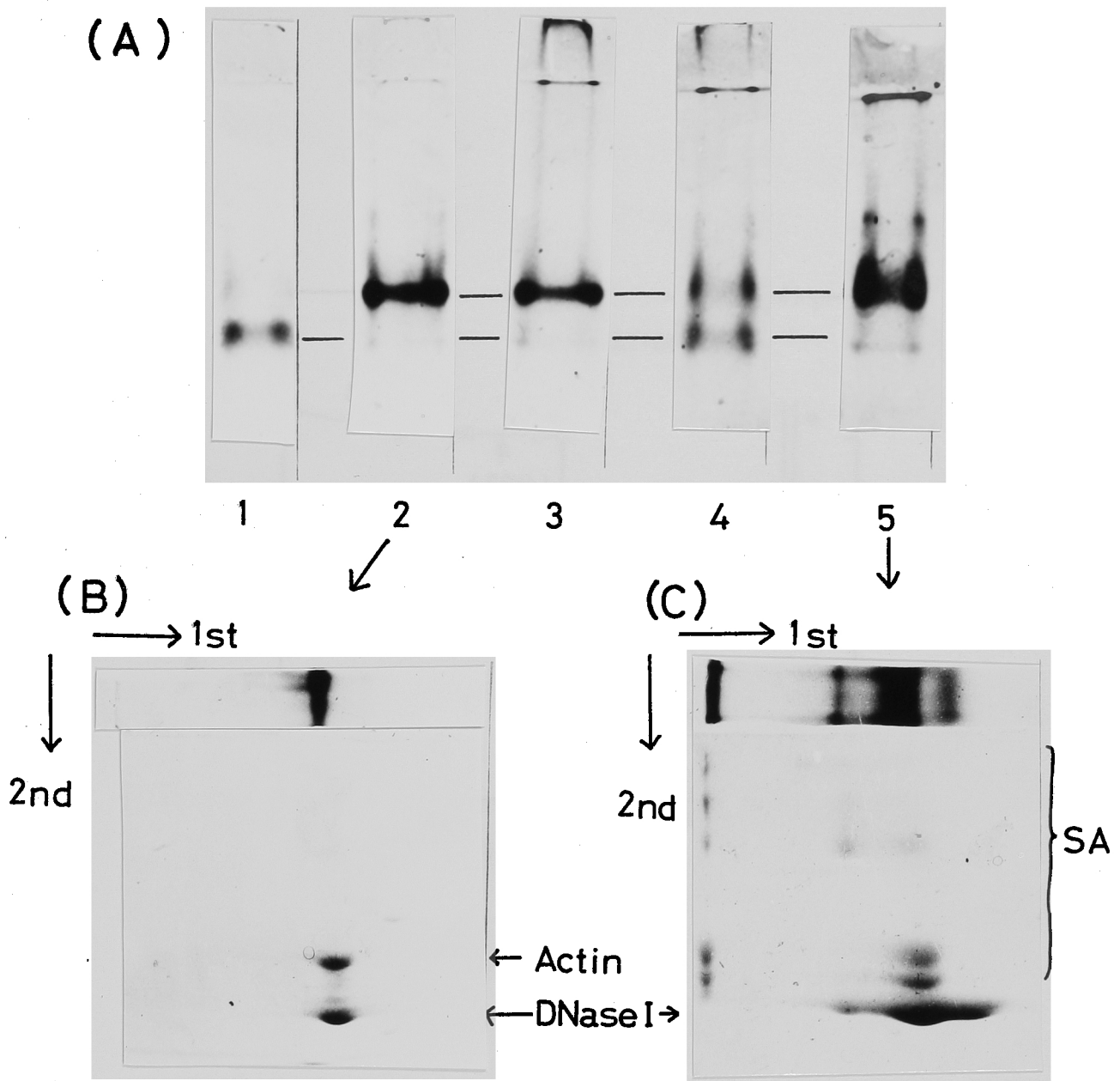


図14. PAGEによるSAとDNase Iの結合実験.

PAGEはLaemmliの系で分離ゲルに8% (SDS不在下) または13% (SDS存在下) を用いて行なった。すべての試料において、アクチンとDNase Iは等モルで混合してある。(A)のPAGEにおいて、ゲルに添加したDNase Iの量は一定である。

(A) SDS不在下のPAGE 1. DNase I, 2. G-アクチン + DNase I, 3. F-アクチン + DNase I, 4. SA (G-パップアー中) + DNase I, 5. 超音波処理した4と同じ試料。

(B)と(C)は、上述の2と5の試料を二次元PAGEしたもの。

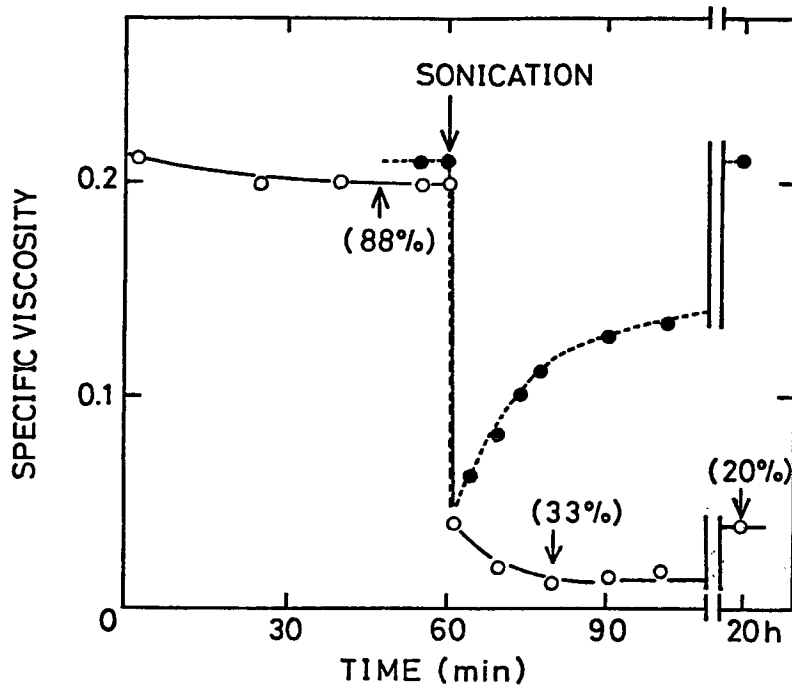


図15 SA-DNase I 溶液に対する超音波処理の効果。

G-バッファー中の SA を低塩濃度下で等モル混合し (SA, 0.4 mg/ml : DNase I, 0.3 mg/ml)、そして一時間放置した。その後、五秒間超音波処理した。()内の数字は、DNase 活性の相対値を示す。

(○) : SA-DNase I 溶液 (●) : SA 単独

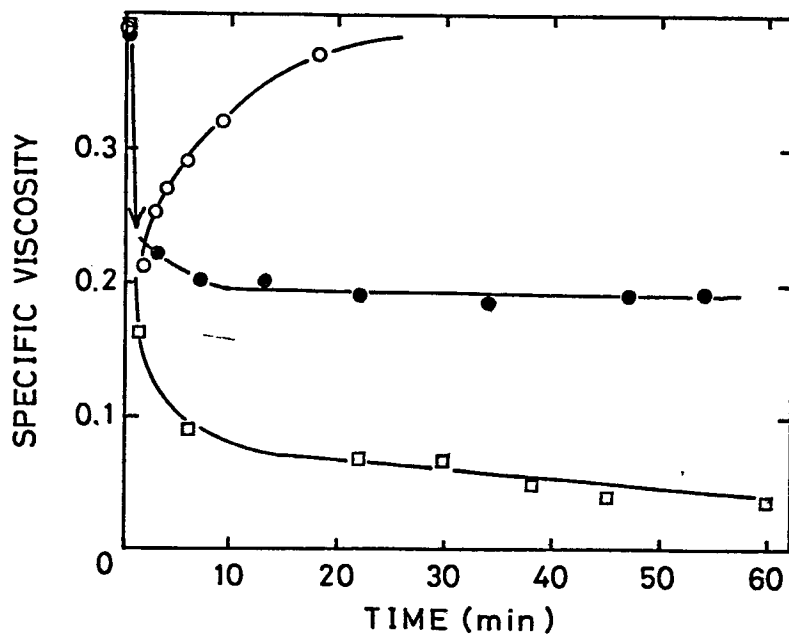


図16. DNase I による SA の超音波処理後の粘度回復の阻害。

重合条件下の SA を五秒間超音波処理し、ただちに等モルの DNase I と混合した。(アクチン, 0.50 mg/ml : DNase I, 0.37 mg/ml)。F-アクチンも同様に処理し、超音波処理自身は DNase I による脱重合を加速することを見た。

(○) : SA 単独 (●) : SA + DNase I (□) : F-アクチン + DNase I.

阻害因子として機能していると考えるところまゝ説明できる。

D. SA への DNase I の結合様式 低塩濃度下で SA と DNase I を混合しても見かけ上粘度・DNase 活性にほとんど変化がないことは既に述べたが、この溶液に塩を加えてももはや粘度の上昇が起こらないことが判った。これは、塩濃度を上昇させたときの SA フィラメントの構造変化というのがフィラメントの長さ分布の変化、つまりフィラメントの会合を伴うものであると考えるなら、前述した SA フィラメント断片の再会合を DNase I が妨害するという事実とまったく矛盾しない。SA フィラメントが（またはその断片が）末端で会合していくとするなら、DNase I が SA フィラメントの末端に結合し、それらの会合を妨害すると考えるところまゝ説明できそうである。もしそうなら、この塩濃度に依存した SA フィラメントの構造変化は、DNase I がアクチン分子のモル数よりもずっと少ししか存在しなくても、かなり阻害されてしまうだろう。それを確かめるために、塩濃度依存性の SA フィラメントの構造変化を、DNase I の量を変えて調べてみた。図 1 7 に示すように、SA の塩添加に伴う粘度上昇は、DNase I の SA に対するモル数が 0.5 ぐらいで完全に起こらなくなった。一方、未処理アクチンの G-F 変換の完全な阻害には、アクチンと等モルの DNase I を必要とした。また、DNase I と混合する前に SA を超音波処理しておくこと、塩による粘度上昇の完全な阻害には、アクチンとほぼ等モルの DNase I が必要になった。この結果は、定性的には上述の DNase I のフィラメント末端での結合という見方を支持するものである。

もし、DNase I で末端をふさがれてしまった SA フィラメントが生じたとすれば、それはアクチンの重合の種となることがもはやできないだろう、つまり重合の加速効果を消失していると期待される。図 1 8 は、SA-DNase I 溶液が G-アクチンの重合を加速することができなくなっていることを示している。図 1 8 の実験で、SA と DNase I のモル比は 1 : 0.6 であり、これは SA の塩による構造変化は完全に阻害されているが、しかし超音波処理した SA ではまだ塩を加えたときに粘度上昇が見られるような DNase I の量である。そこで、SA-DNase I 溶液を超音波処理してから G-アクチン溶液に加えると、DNase I の影響をうけていない SA フィラメントの断片末端が生じて、図 1 8 にみられるように重合の加速効果を回復したと考えられる。

以上述べた結果は、少なくとも SA フィラメントの末端は DNase I を結合していることを示している。

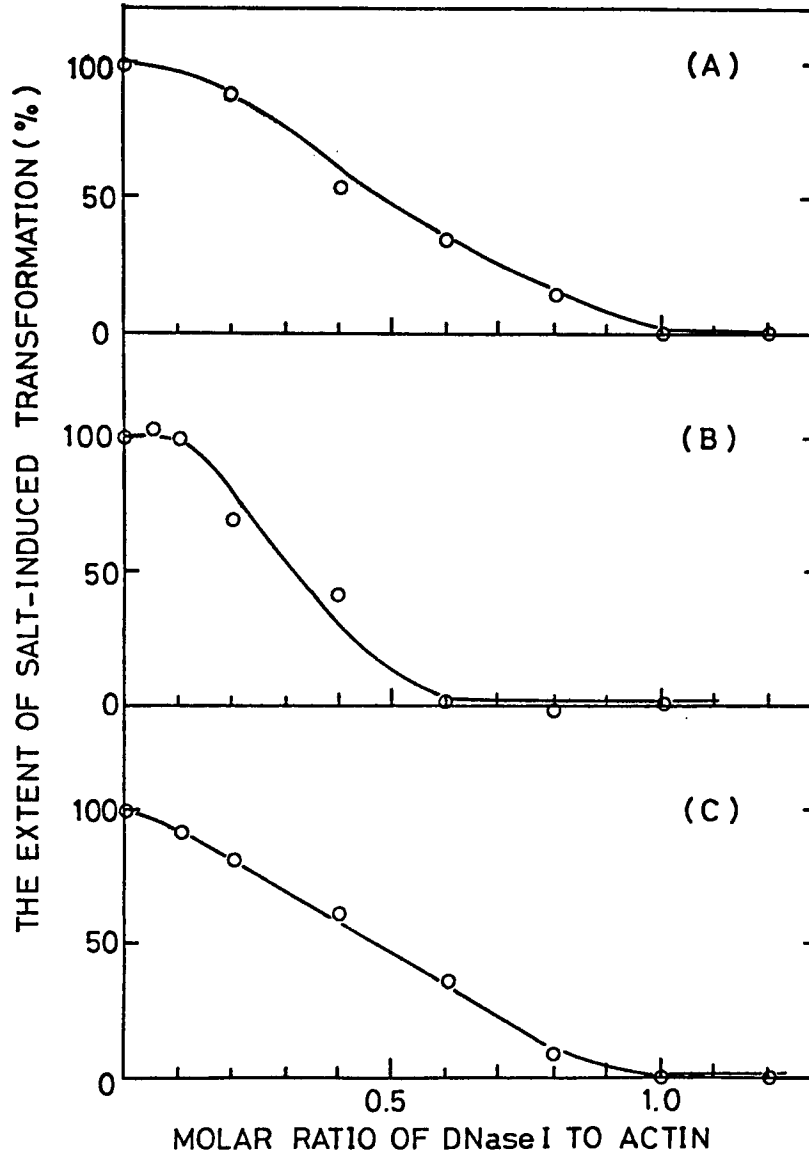


図 17 様々な量の DNase I 存在下での 未処理アクチン (A) SA (B) 超音波処理した SA (C) の塩により誘導される構造変化の阻害。

塩により誘導される構造変化の割合は、塩を加えた時に起こる粘度の上昇の DNase I 不在下の値を 100%として、粘度の変化から求めた。

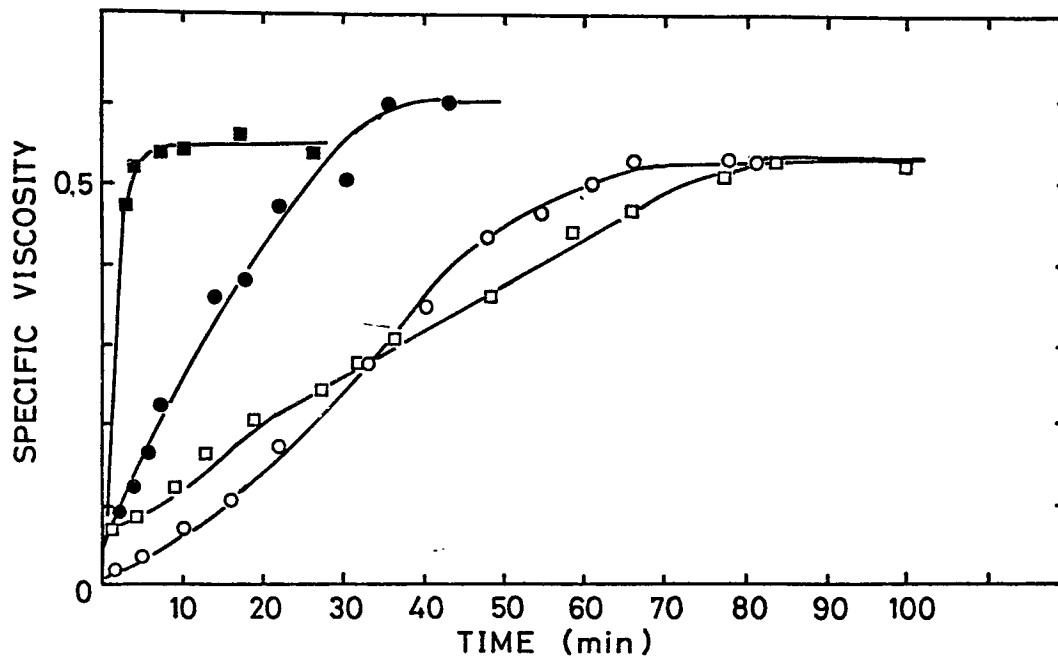


図18. DNase I 共存下での SA の重合加速効果の消失.

G-アクチン溶液 (0.6 mg/ml) に加えた SA の量は、すべて一定であった (最終濃度, 40 μ g/ml) 。 SA または SA-DNase I 溶液 (モル比, 1:0.6) を加えた後、ただちに KCl を最終濃度 20 mM となるように加えた。重合は、25 $^{\circ}$ C で進行させた。

(○) : G-アクチン単独 (●) : G-アクチン + SA
 (□) : G-アクチン + SA-DNase I 溶液 (■) : G-アクチン +
 超音波処理した SA-DNase I 溶液

E]. アクチン-DNase I 溶液の CD スペクトル さて、SA は超音波処理をした後にはかなりの量の DNase I との 1:1 複合体を形成し得ることが判ったが、ではその複合体中で SA 分子はどのような構造をとっているのだろうか。未処理のアクチンでは、アクチン分子が複合体中で G-アクチン型の構造をとっていることが、EPR スペクトル (76) と結合ヌクレオチドの交換速度の実験 (77,78) から示唆されている。この研究では、複合体中でのアクチン分子の構造の示標として近紫外領域の CD スペクトルを用いた。一般的に言って、この領域の CD スペクトルは蛋白質中の側鎖 (Tyr や Trp など) に由来し、そのまわりの環境に対して敏感である。前述したように、この領域のアクチンの CD スペクトルは G-F 変換すると大きく変化するし、また尿素処理や EDTA 処理して重合能を失ったアクチンは G-アクチンとも F-アクチンとも異なり、ほとんど CD バンドを示さなくなってしまう。それ故、DNase I と複合体を形成した後の SA がどのような形のスペクトルを示すかは、その分子の構造をよく反映すると期待される。また、好都合なことに、DNase I 自身はこの領域にほとんど CD バンドを与えないので、スペクトルの解釈は比較的簡単である。

まず、G-アクチンと DNase I を等モル混合して、CD スペクトルを測定した結果が図 19 の A である。図 19-A には、DNase I と G-アクチンのスペクトルを単純に重ね合わせて計算したスペクトルも描いてある。これを見て判るように、G-アクチン-DNase I 複合体の CD スペクトルは、各々のスペクトルを単純に重ね合わせたものに非常に近かった。この CD パターンはアクチン分子からの寄与がほとんどであることを考えにいと、これは複合体中でアクチン分子が溶液中の G-アクチンとほぼ同じ三次構造をとっていることを示していると考えられる。このスペクトルは、溶液に塩を加えて重合条件にして測定しても変化しなかった。

F-アクチンと DNase I の混合溶液の CD スペクトルの測定には、少し注意を必要とする。Murphy が報告しているように、F-アクチンは CD 測定用のセルへ試料を入れた時におそらく配向してしまい、その配向に由来する二色性が観察される (15)。このフィラメントの配向が実際に生じていることは、偏光板を使えば簡単に確認できた。また、このフィラメントの配向が起こっていることは、CD 測定時にセルを回転すると大きく測定値が変化することからも判るので、実際の測定の際にはこのようなセルの回転に伴う測定値の変化が起こらなくなるのを待って行なった。通常この緩和には、F-アクチン (

図 19 G-アクチン-DNase I (A) F-アクチン-DNase I (B) SA-DNase I (C) 溶液の近紫外領域 CD スペクトル。

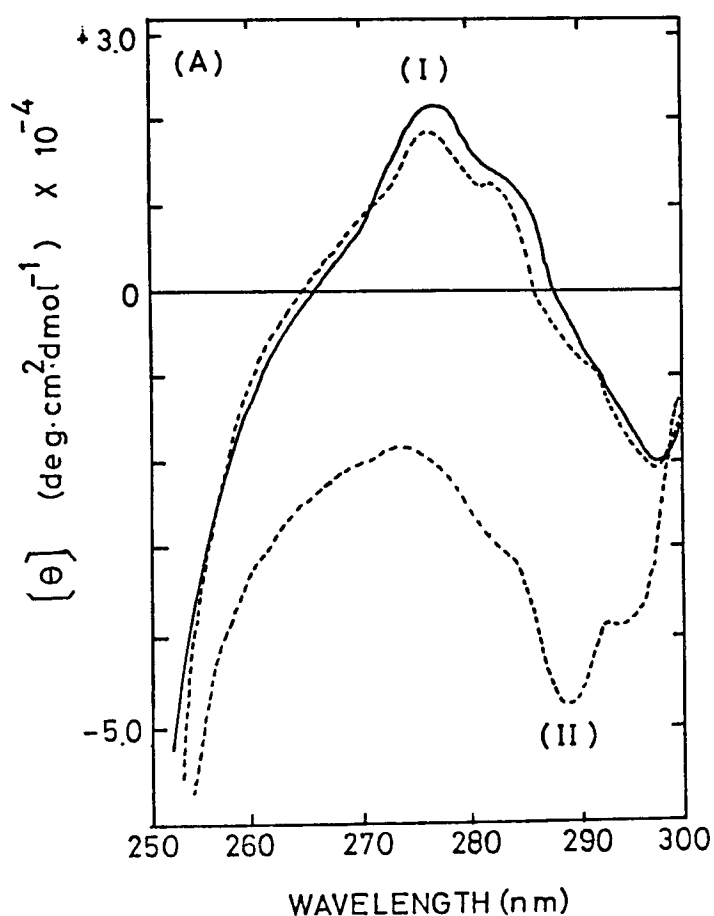
各測定は、等モル混合溶液 (20 μ M ATP 存在下) に対して行なった。このスペクトルでは、ATP 由来の円偏光二色性は補正してある。縦軸は分子楕円率、即ち、1:1 複合体当りの分子楕円率を表わしている。実測されたスペクトルは実線で、計算されたスペクトルは破線で示してある。

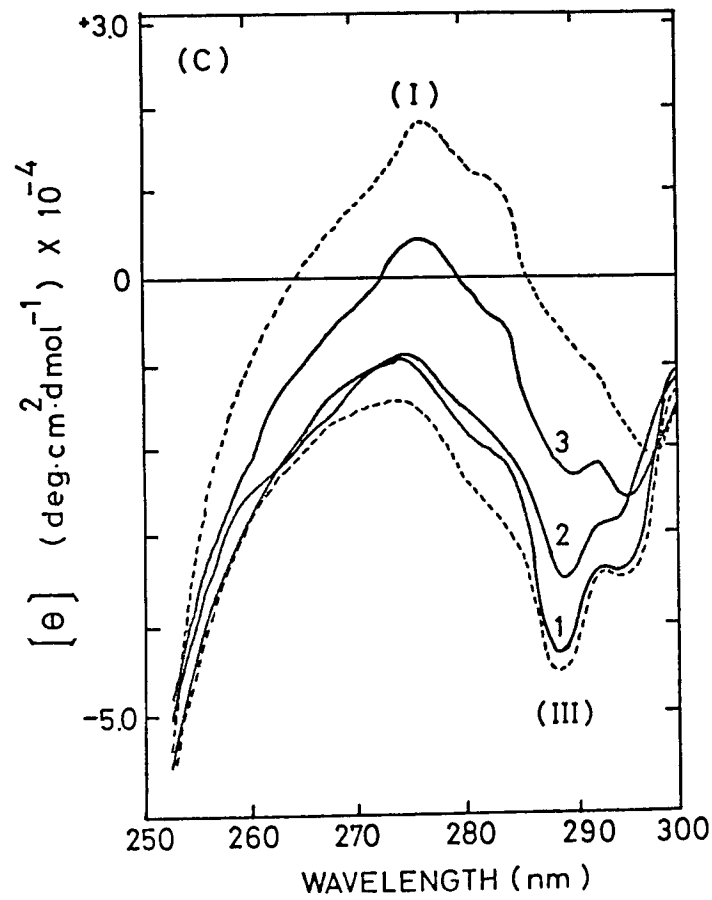
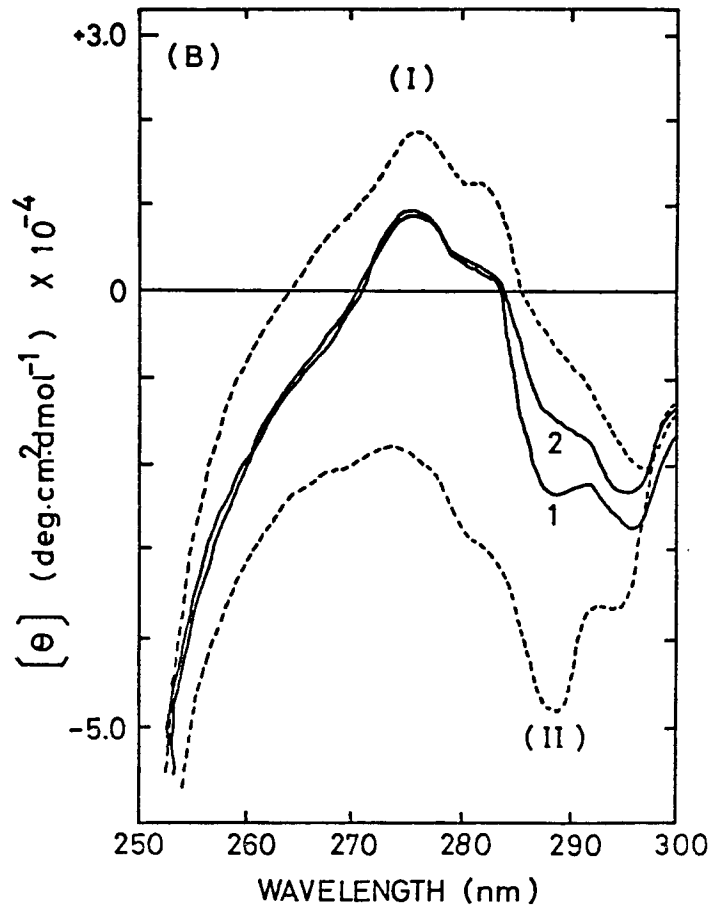
計算されたスペクトル: (I) G-アクチン-DNase I, (II) F-アクチン-DNase I, (III) 重合条件下の SA-DNase I.

(A): G-アクチン-DNase I 溶液

(B): 1. F-アクチン-DNase I 溶液, 2. 超音波処理した F-アクチン-DNase I 溶液.

(C): 1. SA-DNase I 溶液, 2. 混合に先立って重合条件下で超音波処理した SA と DNase I の混合溶液, 3. 超音波処理した SA-DNase I 溶液.





1 mg/ml 以下) をセルに移してから 2~3 時間を要した。もっと簡便には、セルに移す前に試料を超音波処理しておく、このフィラメントの配向効果を除くことができ、F-アクチン単独のスペクトルを測定した限りでは、測定結果はセル中で配向の緩和をさせたものとまったく同じであった。DNase I と F-アクチンの混合溶液の場合にも、2~3 時間セル中で放置するか、セルに移す前に超音波処理するかのどちらかの操作が必要だった。図 19-B にこうして測定した F-アクチン-DNase I 溶液のスペクトルを示す。図 19-A と同様に、計算した G-アクチン-DNase I、F-アクチン-DNase I 複合体に対応するスペクトルも描いてある。2~3 時間セル中で放置した後のスペクトルは、この間に DNase I は F-アクチンの脱重合を促すので、計算された F-アクチン-DNase I 複合体のスペクトルからはずいぶんとずれていた。実測のスペクトルは、ちょうど G-アクチン-DNase I 複合体のスペクトルと F-アクチン-DNase I のその中間のように見える。もう少し定量的に言うために 286 nm における分子楕円率を尺度とするならば、このスペクトルは 40% の F-アクチン型の構造をしたアクチン分子の存在を示している。なぜなら、G-アクチン-DNase I 複合体の計算したスペクトルはこの波長では分子楕円率がほぼ 0 なので、この値はすべて F-アクチン型をした分子からの寄与だと考えられるからである。この 40% という値は時間とともに減少していったが、5 時間放置しても 0%にはならなかった。F-アクチン-DNase I 溶液を超音波処理してから測定してやると、この F-アクチン型の分子の割合は 20%ぐらいであった。もし、アクチンが安定な構造として G-アクチン型か F-アクチン型の構造しかとり得ないものなら、この結果は F-アクチンの脱重合が完全には進行していないことを示しており、また F-アクチンの脱重合の結果生じたアクチン-DNase I 複合体中でアクチン分子は G-アクチン型の構造をとっていることを示唆する。しかし、現状ではアクチンが G、F-状態以外の構造をとることも否定できないので、F-アクチン-DNase I 溶液の CD スペクトルが G-アクチン-DNase I のそれと重ならないという結果の解釈は一義的ではない。事実、Hitchcock は G-アクチン-DNase I 複合体と F-アクチンの脱重合の結果として得たアクチン-DNase I 複合体において、アクチンに結合しているヌクレオチドの溶媒中のそれとの交換速度が、後者の方が同一条件で約四倍速いということを報告しており (77)、これら二通りの方法で得た複合体中でアクチンが違った構造をとっている可能性も十分にある。

SA と DNase I の混合溶液を、2 時間セル中で放置後、CD スペクトルを測定したの

が図19のCである。SA-DNase I 溶液の CD スペクトルは、F-アクチン-DNase I 複合体の計算したスペクトルにたいへん近かった。286 nm の分子楕円率から言うなら、90%以上の分子が F-アクチン型の状態にあると言える。このスペクトルは、更に 3 時間放置後に測定しても、ほとんど変化しなかった。超音波処理すると、スペクトルはほぼ 40%の F-アクチン型分子を含む程度にまで変化し、F-アクチン-DNase I 溶液において観察されたものと酷似していた。粘度測定によると、超音波処理した SA をただちに DNase I と混合すると、その粘度は完全重合と脱重合した状態の値の中間の値を保ち続けることが、既に述べたように、判った。それと同じように試料を処理し、その CD スペクトルを測定してみると、超音波処理を混合後に行なった SA-DNase I 溶液と超音波処理しないもののスペクトルの中間のものとなり、そのスペクトルは更に 3 時間たってもほとんど変化しなかった。

これらの CD スペクトルから得た結果は、既に述べてきた粘度 DNase 活性・SDS 不在下の PAGE の結果とまったく矛盾しない。

考 察

1. F-状態の固定化

まずこの研究では、二価性イミドエステルを F-アクチンに対して架橋試薬として用いることにより、アクチンの F-状態が塩濃度によらずに実現されることをみた。F-アクチンの状態でスベリン酸イミドエステルと反応させたアクチンは、もはや塩濃度を下げても脱重合を起こさず、普通の F-アクチンなら速やかに脱重合していく 0.6 M KI 中ですら重合状態を保持していた。このような現象は、一価性であるカプロン酸イミドエステルでリジン残基を修飾しただけでは起こらず、またコハク酸イミドエステルのような短い架橋試薬（反応基間距離は 0.5 nm 程度）で反応させても実現されなかった。このことは、この現象がコハク酸イミドエステルでは架橋できないような距離だけ隔たったりジン残基間の架橋が原因であることを強く示唆する。同様に、おだやかな還元条件で架橋の開裂が起こるような架橋試薬である DTBP で処理した F-アクチンの実験結果は、架橋の開裂で F-状態の固定化現象が失われていくことを示しており、架橋の導入がこの現象の原因であるという見方を支持する。SA は、分子間架橋生成物をゲルろ過で除いた後でもアクチン分子当たり約 1 個の架橋を分子内に含むので、この現象は特に分子内に導入された架橋の効果によるものと考えられる。なぜなら SA は実際には分子間架橋された分子種を全体の 15%弱含んではいるが、これらが残りの 85%のアクチンにまで非脱重合性を付与するとは考えにくいし、非常によく分子間架橋が形成される PBM で処理した F-アクチン（分子間架橋物は全体の 50%を越える）は、SA に比べればずっとよく脱重合したという結果から、分子間架橋物の存在は SA の脱重合性にはほとんど関係ないと思われるからである。それ故、この論文で述べた結果は、分子内架橋の導入によって蛋白質の三次構造がある一つの機能状態に固定化されたためであると、つまり序論で述べたような架橋反応の効果が実現されたのだと解釈される。このような架橋反応に伴う蛋白質機能（または構造）の固定化は過去にいくつかの報告があるが（79, 80, 81）、二価性イミドエステルを用いての例としては貴重なものである。スベリン酸イミドエステルを用いた例としては、*i*ヘモシアニンの状態の固定化の報告がある（82）。

F-アクチンのスベリン酸イミドエステルの修飾では、上述のように機能状態の固定化がみられたのであったが、同じ試薬による G-アクチンの修飾は、分子内架橋の生成やリジン残基の修飾が SA と同程度に検出されるのにも関わらず、機能状態の凍結をもた

らさなかった。架橋後の G-アクチンは、 $G \rightarrow F \rightarrow G$ という変換を行ない得た。これは、G-アクチンの中に導入された分子内架橋は、SA のそれとは部位が異なっていることを示している。なぜなら、もし同じ部位に架橋が形成されているとするなら、仮りにそれが $G \rightarrow F$ 変換を妨害することがなかったとしても、 $F \rightarrow G$ 変換は妨害されると期待されるからである。アクチンの中の 19 個のリジン残基の反応性が G-F 変換に伴って大きく変化することが報告されているので (24)、このような G-状態と F-状態の架橋反応で導入される架橋の部位が異なるということはあることである。

2. SA の諸性質—分子内架橋の効果—

この論文では、SA のもつ性質をいろいろな側面から調べてみた。まず、SA の低塩濃度下でのフィラメント構造が、よく知られている F-アクチンのものにくらべて、ずいぶんとくずれているように見えることが電子顕微鏡観察により判った。これは、アクチンの持つ電荷 (中性付近では負の電荷を持つ) がフィラメントの規則性を乱す原因となっているためだろう。つまり、アクチン上の同種の電荷がアクチン-アクチン間の反発力として働いており、塩を加えるとこの分子上の電荷がしゃへいされて通常観察されるような F-アクチンの二重らせん状のフィラメント構造へと転移するのだろう。事実、アクチン-アクチン間の結合には疎水結合としての性質がかなり存在していることが高圧化でアクチンが脱重合することから示唆されており (83)、たとえ少しぐらい静電的反発があっても、アクチン-アクチン間の接触が疎水結合で維持されることは期待される。SA が低塩濃度下で約 50~60%しか沈殿として回収されないという結果は、フィラメント間のからみあいの度合の小ささやフィラメントの長さ分布の F-アクチンとの違いから、SA の臨界濃度の小さいことと矛盾なく説明できる。それ故、SA へ塩を加えたときに起こるフィラメントの構造変化というのは、単にフィラメントがピンと伸びたものになるだけではなく、フィラメントの長さ分布が長い方にずれることも起こっているに違いない。

SA の性質を調べているうちに、SA はもしかすると完全な変性状態に転移することが分子内架橋により妨害されるのではないかと考えた。しかし、尿素を用いた SA の変性実験からは、未処理アクチンよりいくぶんか尿素による変性に対して抵抗性をもつことが判ったものの、最終的には尿素 6~8 M 存在下では未処理アクチンと同様に変性してしまうことが判った。この論文中に結果は示さなかったが、遠紫外領域の CD スペクトルの観察でも SA は濃い尿素の存在下で二次構造をほとんど失うことが判った。そして、未処理アク

チンがそうであるように、単に透析で (Ca イオン、ATP の存在下) で尿素を除いただけでは完全なアクチン分子の三次構造の再生はなされず、近紫外領域のアクチンの特徴的な CD バンドは回復しなかったし、遠紫外領域の CD スペクトルも尿素処理前のものまでとはもどらなかつた。つまり、SAに導入された分子内架橋は、わずかに尿素による変性に対して抵抗性を与えるものの、アクチン分子の三次構造の全体的な崩壊に対してはほとんど無効であり、またその再生を容易にもしない。分子内架橋をもった蛋白質の変性-再生に関する実験は、アジピン酸イミドエステルで修飾した RNase A での研究があるが (84)、この場合にも修飾 RNase A の再生速度は変わらず、かえって再生分子の収量の低下が見られた。蛋白質内部に一つの架橋が形成されたところで、その全体的な二次・三次構造の消失再生にはあまり影響を与えないのだろう。SA の架橋部位を決定するための予備的な実験では、架橋が比較的一次構造上で近接したリジン残基間に形成されていることを示唆する結果を得ている (本論文中には結果を示していない)。このような場合にはむしろ、アクチン分子の全体的な構造の安定化に分子内架橋が効果をもたないのが当然であろう。

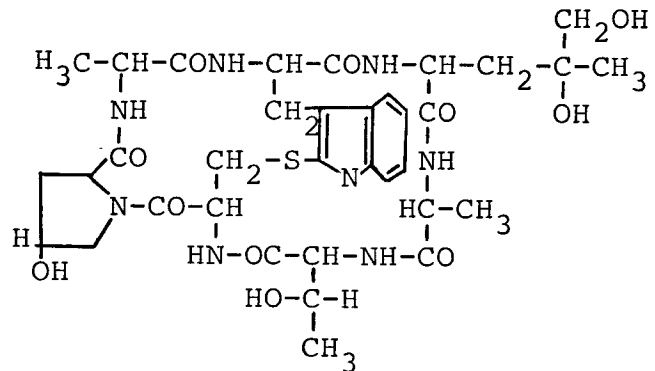
3. アクチンの非脱重合性について

脱重合条件にも関わらず脱重合しないアクチンの例は、過去にいくつかの報告がある。

- 1) アクチンを尿素により変性させた後、すべての SH 基をカルボキサミドメチル化してから再生させたアクチンは、低塩濃度下でも重合している (85)。
 - 2) 適当なキレート剤でアクチン溶液から Ca イオンを除くと、例え低塩濃度下でも完全に重合する (33)。
 - 3) ATP のアナログを用いて、G-アクチンにヌクレオチドを共有結合で結合させておくと、G→F 変換は可能だが F→G 変換はもはやできない (86)。
 - 4) キノコ毒のフアロイジンを F-アクチンに結合させると、0.6 M KI に対しても F-アクチンは安定になる (87)。
- 1) に対してはどこに原因をもとめればよいのかははっきりとしないが、アクチンのわずかな構造の違いがそのような現象を生じさせたとしか考えられない。2) と 3) はアクチンの重合に二価イオンやヌクレオチドが大きな影響を持つことを示している。2) の場合には、ごく微量の Ca イオンが重合の阻害因子として機能することを示しているし、3) の場合には F-アクチンにヌクレオチドが不可逆に結合しているともはや脱重合できなくなってしまうことを示している。4) は小さなペプチドがアクチンに結合するだけで、

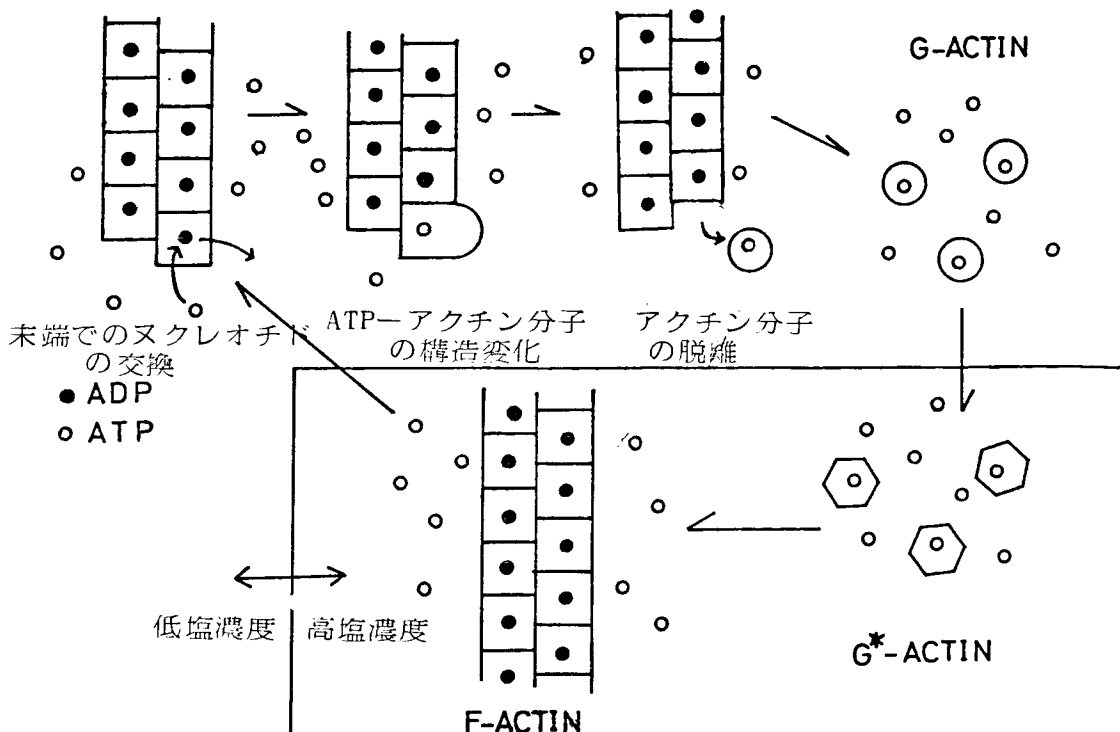
アクチンに非脱重合性が与えられることを示しており、非常に興味深い。ファロイジンの一次構造を右図に示す。

ファロイジンの一次構造



ここでは、特にヌクレオチドの重合における役割について、考察してみる。序論で述べたように、アクチンに結合している二価イオンやヌクレオチドの溶媒中のものとの交換速度が、G-F変換で大きく変化することが知られている。多くの場合、これは G-F 変換の結果として理解されるが、積極的な意味をもつとは考えられないだろうか。二価イオンの場合

を例にとれば、ごく微量の Ca イオンの存在で既に飽和してしまうような Ca イオン結合部位がアクチン分子にあって、この部位に Ca イオンが結合していれば G-アクチン型の構造をとり、その部位に Mg イオンや他のイオンが結合すると F-状態に転移することが可能になるとする。もしそうなら、その部位における二価イオンの交換速度が小さくなれば、同時にアクチン分子の状態も一つの機能状態にとどまり続けるのではないか。同様なことは、ヌクレオチドについても考えられる。その一つの解釈を図式化したのが下図である。



F-アクチンに結合しているヌクレオチドは ADP である。この F-アクチンの脱重合図式では、まず F-アクチンフィラメントの末端におけるヌクレオチドの交換を想定する。その結果生じた F-アクチン-ATP 複合体は 重合状態に存在することが不安定化され、フィラメントから解離していく。この図式では、脱重合できないアクチンの報告例の 3) の結果が、アクチンに結合したヌクレオチドがもはや交換できなくなっているからだとしうまく説明できる。この研究でも、SA に結合したヌクレオチドの交換速度が、溶媒条件によらず常に未処理のアクチンより遅いことを示した。同様に、SA の超音波処理後の粘度の回復速度が溶媒中のヌクレオチドによって影響されるという結果は、ここで述べた図式のフィラメントにおけるヌクレオチド交換を支持する。つまり、超音波処理によって SA フィラメントが断片化され、その結果末端の数が増し SA は外液中の ATP をとりこむことができるようになる。そして、SA-ATP 複合体はゆっくりと ATP を加水分解するが、ATP を結合している限り SA 断片の会合は非常にゆっくりとしか進行しない。それ故、溶媒中にヌクレオチドがない場合や ADP しかない時には、仮りに交換が起こってもそれは会合に不利な状態に SA 分子をしないので SA 断片の再会合は速やかに起こると考えられる。アクチンの重合の定常状態になってからの単量体と重合体の間のアクチン分子の交換速度が、やはり溶媒中のヌクレオチドに依存しているという報告は (32)、F-アクチンの末端に位置する分子のヌクレオチドの交換を想定するとうまく説明できる。ミオシンでは、分子内に導入した架橋がヌクレオチドの脱離を妨害することが報告されており (88)、SA でもそうしたヌクレオチドの交換速度の減少が起こったために非脱重合性を得たとも考えられる。

ヌクレオチドや二価イオンの重合の制御因子としての働きは、Oosawa and Asakura によって議論されている (5)。しかし、脱重合におけるヌクレオチドや二価イオンの効果はあまり考えに入れられていない。これはおそらくアクチンの脱重合過程を再現性よく、しかも定量的に調べることがむずかしいために、十分に現象が研究されていないからだろう。たとえば、F-アクチンが脱重合する際にはまず アクチン-ADP 複合体として解離が起こり、続いて溶媒中の ATP が結合 ADP と置換すると考えられる場合が多いが、その実験上のはっきりした証拠はない。特に、F-アクチンフィラメントの末端のアクチン分子に結合しているヌクレオチドの状態については議論が多い (89)。それ故、上述した図式も一つの可能性を示したものでしかないが、少なくともこの論文で述べた結果や

既に述べてきたようないくつかの結果を説明するには一番もっとうらしいものである。

アクチン分子の全体の構造が分子内架橋によって固定化されているわけではないということを考えあわせると、SA における非脱重合性は分子内架橋が重合の制御部位（つまり、二価イオン結合部位やヌクレオチド結合部位）の構造を局所的に固定化したために生じたものと思われる。

4. SA の DNase I との相互作用

SA はアクチン分子の性質を調べるための一つの有効な系となることが期待される。SA の利用方法としては、この研究で示したように SA が低塩濃度下でもフィラメントとして存在することを利用して他の蛋白質との相互作用をひろい塩濃度範囲にわたって調べることや、アクチンの脱重合因子との相互作用を調べるなどがあげられる。実際、DNase I と SA の相互作用の研究は、興味あるいくつかの知見を与えた。

SA は未処理のアクチンとくらべて DNase I による脱重合を非常にゆっくりとしか起こさないが、DNase I と結合しさえすれば重合能を失い CD スペクトルも G-アクチンのものに似たものとなった。DNase I の存在下で見かけ上 SA 溶液の粘度がほとんど減少していない状態で、既に SA が DNase I を結合していることがいくつかの実験から明らかになった。そして、その DNase I の SA フィラメント上の結合部位が少くとも末端を含んでいることを示した。この末端での結合を確認するために、いろいろな量の DNase I 存在下の SA の塩による構造変化を調べた。もし、理想的な状況が実現されているとすれば、SA の塩による構造変化を完全に阻害するのに必要な DNase I の量は SA フィラメントの末端の数に等しくなると考えたのである。実験結果は、アクチン分子と等モル必要なわけではないが、しかしその約 $\frac{1}{2}$ くらいのモル数の DNase I を必要とした。確かにこれは期待した結果とは異なるが、塩による構造変化に関与する部位、つまりフィラメント末端への DNase I の結合が 10^4 M^{-1} よりはずっと大きい結合定数をもつことを示しており、他の結果とを考えあわせると、SA フィラメントの末端はフィラメントの他の部位よりも DNase I に対して高い親和性を示すと結論できる。もっと定量的な解析は（例えば、その高親和性部位の個数やその結合定数の決定など）、対象とする系が平衡状態になく、しかも不均一な系であるために行なえなかった。

未処理の F-アクチンの DNase I による脱重合は、いくつかの段階からなると考えられている (75)。それをまとめてみれば、次のようになるだろう。

1) F-アクチンと共存する臨界濃度のアクチン単量体と DNase I が結合し、G-状態の分子を重合体-単量体間の平衡に加わることができなくすることで、脱重合させていく。

2) F-アクチンに直接結合し、フィラメント構造を不安定化して脱重合しやすくする。

特に、2) の経路は、F-アクチンの DNase I による脱重合が比較的速やかに進行することに大きな意味をもつ。何故なら、もし 1) の経路が主要なものなら、EDTA やプロフィリンといった G-アクチンの変性剤または重合阻害因子も F-アクチンの速やかな脱重合誘導因子となるはずだが、そのような現象は実際には観察されないからである。2) の経路が実際に起こることは、Hitchcock らによって報告されている (75,77)。即ち、

a) 電顕観察によれば、DNase I の存在下で F-アクチンのフィラメント構造が全体にわたってくずれてくることが判る。

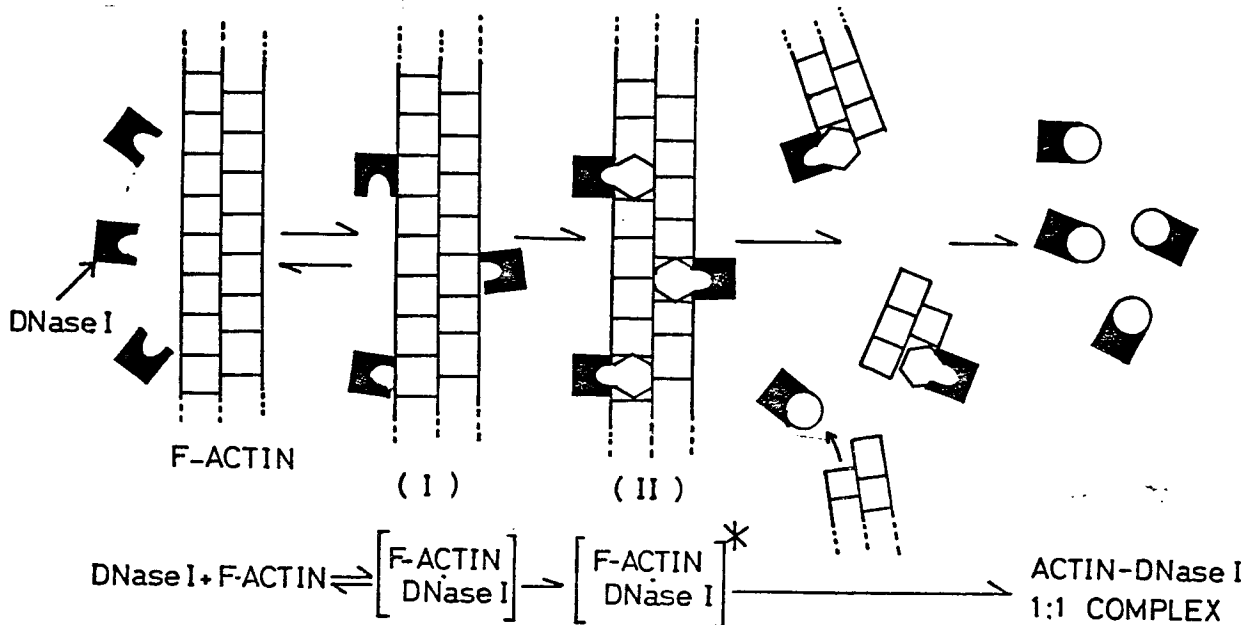
b) ゲルろ過で、アクチンと DNase I の 1:1 複合体が溶出されてくる位置よりも高分子量に対応するところにアクチンと DNase I が一緒に溶出されてくる。

c) この論文の結果ではその差がはっきりとしなかったが、F-アクチン-DNase I 溶液の粘度の減少より DNase I 活性の減少の方が先行する。

以上のような実験結果から、DNase I がまず F-アクチンのフィラメントに結合し、そのフィラメント構造を不安定化すると考えられている。しかし、この論文中で述べたように、SA は超音波処理などをしない限りは数時間の間は DNase I を結合しないかのようにふるまった。同様に、F-アクチン-ファロイジン複合体も DNase I による速やかな脱重合を起こさない。そのことを利用して、F-アクチン-ファロイジン複合体への DNase I の結合定数を共沈実験により測定すると、 10^4 M^{-1} であった (78)。この研究の共沈実験の結果は、SA フィラメントへの DNase I の結合定数もほぼそれぐらいであることを示している。それ故、このような DNase I のフィラメント状態の SA (または、F-アクチン-ファロイジン複合体) への低い親和性が、DNase I による脱重合がゆっくりとしか進まないことの原因であろう。換言するならば、先に述べた経路の 2) が起こらないために、SA の DNase I による脱重合は遅いのには違いない。

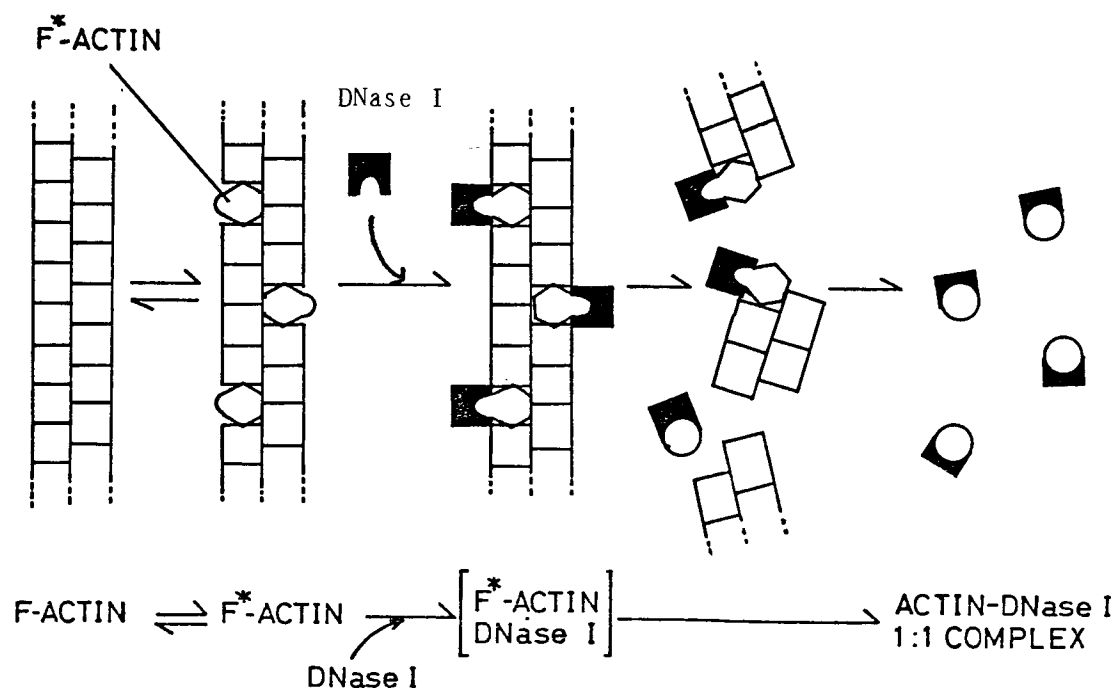
これらの知見と矛盾しないように、2) の経路の内容をもう少し詳しく考えてみよう。おそらく、それには二通りの図式を想定することができる。まず、その一つの図式を次のページに示す。

この図式は、DNase I のアクチンフィラメントへの結合には少なくとも二つ以上の状態があると仮定している。



まずアクチンフィラメント中のアクチン分子と DNase I は結合定数 $10^4 M^{-1}$ 程度の弱く、そして可逆的な結合をする。そして、通常の F-アクチンではある確率をもって DNase I との結合をもっと強く、實際上不可逆なものへと変化させる。この図式の上で、(II) の複合体中では DNase 活性は阻害されているし、そのときアクチン分子の構造も重合状態が不利なものとなっている。SA や F-アクチン-ファロイジン複合体では、(I) から (II) への遷移が非常に遅い速度でしか起こらないために、DNase I による脱重合に抵抗性を獲得しているのだろう。F-アクチン-ファロイジン複合体で得られた $10^4 M^{-1}$ という結合定数は (I) の複合体形成のものと考えられる。つまり、SA に導入された架橋は (I) から (II) への構造変化を妨げることで、DNase I の SA フィラメント中の分子への結合定数を見かけ上小さくしている。この図式で、実験結果はうまく説明することができる。

もう一つの図式は、F-アクチンが堅固な構造をもったフィラメントではなく、そのフィラメント中の各分子の構造も厳密な意味での F-状態のまわりをゆらいでいることを考えにいれる。つまり、DNase I は厳密な意味での F-状態の分子には小さな結合定数 ($10^4 M^{-1}$ 程度) をもつにすぎないが、その構造がゆらいだ分子 (F^{*}-アクチン) にはもっと大きな結合定数を持つと考える。この図式を次のページに示す。アクチン分子の F-状態の構造のゆらぎとフィラメントのやわらかさには不可分の関係があるので、アクチンフィラメントがやわらかいことがいくつかの異なった方法で確認されている以上

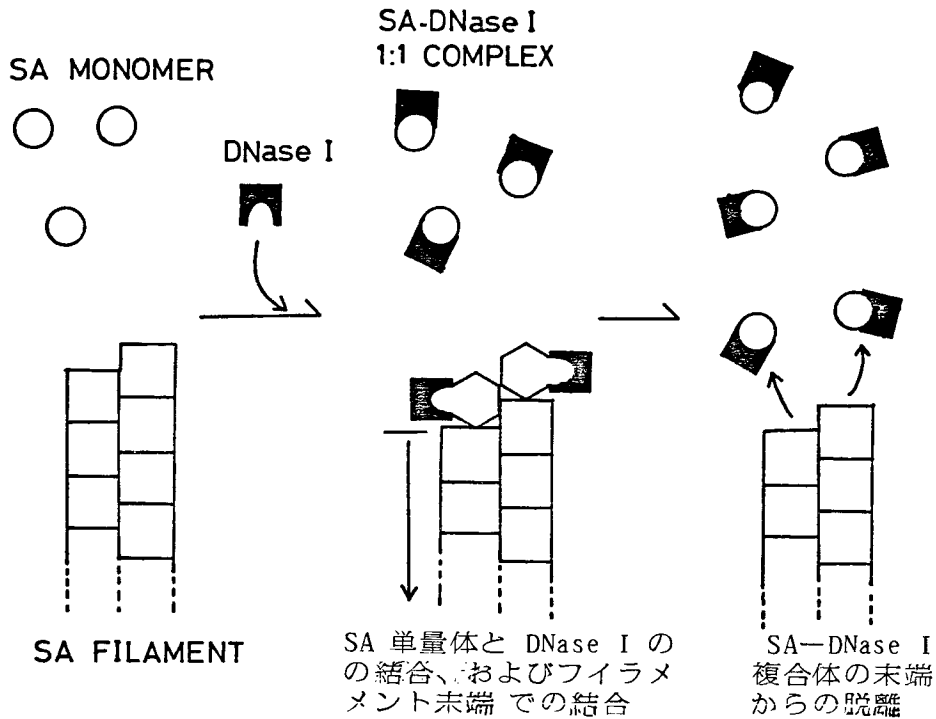


(90 91 92)、フィラメント中のアクチン分子の構造のゆらぎを想定することに無理はない。上の図式に示すように、F-アクチン中の一つの分子が DNase I によりその F-状態を不安定化されたとすれば、それはフィラメント中に協同的に F^{*}-アクチンで示される分子種の生成を促すだろうから、速やかな脱重合を説明することに定性的には無理はない。本研究では、SA フィラメントに結合しているヌクレオチドの交換速度が未処理アクチンのそれよりもかなり小さいことを見出した。このフィラメント中のヌクレオチドの交換速度がアクチン分子の構造のゆらぎと関係していることは Asai and Tawada により議論されており (67)、交換速度が遅ければ遅いほどフィラメント中のアクチン分子はゆらぎの小さな状態にあると考えられる。それ故、この結果は SA が DNase I の結合において不利な三次構造 (つまり、厳密な意味での F-状態) を F-アクチンよりも安定にとり得ることを示している。このような F-状態の安定化という現象は、SA が溶媒条件によらずに重合状態に存在することと同様に、分子内架橋の効果としてうまく説明できる。

どちらの図式が実際に起こっているのかは不明だが、どちらの図式であれ、SA に導入された架橋がその分子の構造を F-状態に固定化するという見方でうまく説明できることに変わりはない。

このように SA がフィラメント中に存在しているときに DNase I とうまく相互作用できないことが、DNase I による SA の脱重合が F-アクチンの場合よりずっと遅いことの原因である。しかし、SA フィラメントの末端の分子はフィラメントの他の部分とくら

べて大きな結合定数を DNase I に対して持つことが判った。このことと、一度 SA-DNase I 複合体が形成されると、SA の状態は G-状態になり F-状態にはもどらないという観察は、この二つの事実が SA が非常にゆっくりと、しかし定常的に脱重合することの原因であることを示している。 DNase I による SA の脱重合の機構を下に図式化しておく。



5. 架橋による構造の固定化—DNase I による固定化効果の解除—

DNase I が SA と強く結合して 1:1 複合体となりアクチン—アクチン間相互作用がなくなると、SA 分子も G-アクチンと似た三次構造をとるということが、本研究で示された。つまり、SA 中の架橋により結ばれたリジン残基間距離の制限は、不可逆的に SA 分子の三次構造を固定化してしまっているわけではない。 SA 分子の F-状態の固定化というのは、溶媒条件による摂動ぐらいいはゆらがないが、DNase I の結合によって F→G 変換を誘導されるようなものである。この知見は、架橋部位がアクチンの一次構造上で同定された後に、化学架橋による F-状態の固定化機構を解釈する上で重要である。既に述べたように、予備的な実験では架橋が一次構造上で比較的近接したリジン残基間に形成されていると思われる(本論文中に結果は示していない)。こうした局所的なアクチン分子の構造変化の抑制で、溶媒条件に反して F-状態をとり続けることは大変興味がある。その意味では、ファロイジンが F-アクチンに非脱重合性を付与する機構と SA 分子の非脱重合性の機構は起源を同じくしているのかも知れない。

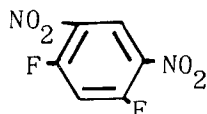
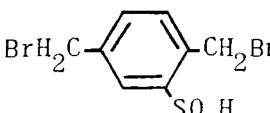
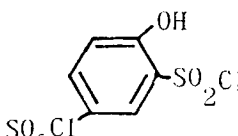
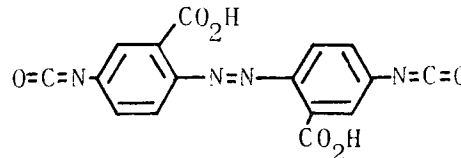
蛋白質の高次の複合体に架橋反応を応用し、その生成物の性質を複合体の構成要素が空間的にきっちりと固定された状態になった効果として解釈しようとする場合がある。例えば、PBM を用いてアクチン分子間に架橋を形成させ、その反応生成物がミオシンとの相互作用の点でまったく F-アクチンと変わらないことから、F-アクチンフィラメントの中の分子の動きがミオシンとの相互作用に無関係であると結論するような場合である。このような解釈はあいまいであるために、あからさまに議論されることは少ないが、しかしこの結論を消極的に支持するものとして利用される。しかし、PBM で処理したアクチンの場合にはアクチン分子間に一個の架橋が形成されるにすぎず、それがアクチン分子の配列をきっちりと固定化してしまうとは考えにくい。複雑な系に架橋反応を応用する場合には、その結果の解釈には十分な注意が必要である。

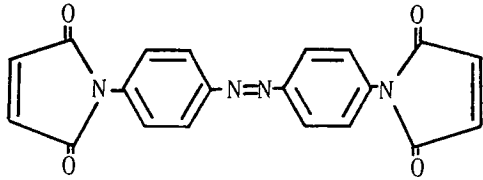
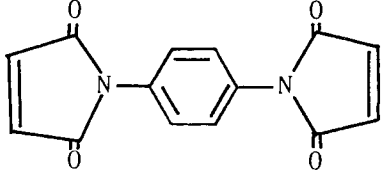
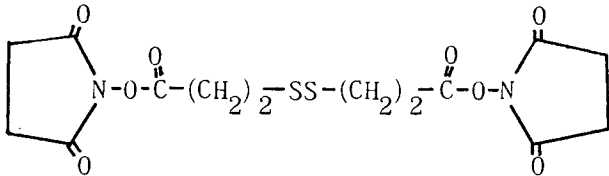
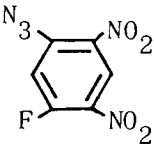
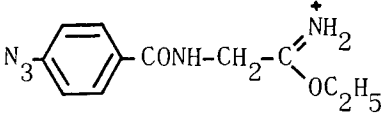
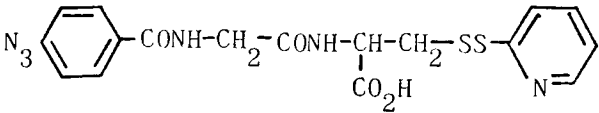
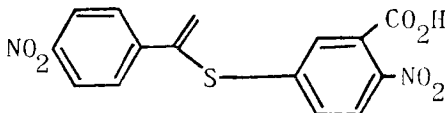
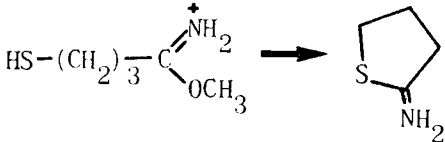
これまで、二価性イミドエステルで分子内架橋した F-アクチンの諸性質について述べてきたが、最後に蛋白質化学における架橋反応の利用という視点から少し論じてみたい。

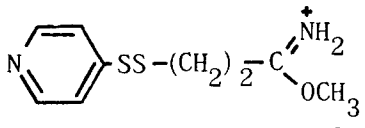
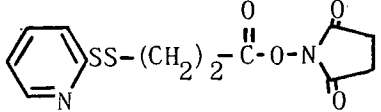
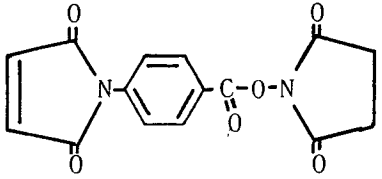
6. 架橋反応の利用—架橋試薬の性質—

架橋反応自体は今ではもう生化学における一般的な方法となっており、いくつかの総説も書かれている（**93,94,95**）。架橋試薬も現在では実に多種多様なものが報告されており、その代表的なものを表 4 にまとめてみた。この中のいくつかの試薬は手軽に入手することができる。例えば、Pierce Chemical Company のカタログを見れば、実に多種の架橋試薬が商品化されているのが判るだろう。序論で述べたように、架橋反応で蛋白質の四次構造やもっと高次の会合様式を調べるだけなら、SDS-PAGE でたいていの場合十分である。このことは、架橋反応が実に簡単に実行に移せる研究手段であることを意味している。しかし、蛋白質化学的な意味での架橋生成物の同定という目的のためには、表 4 にあげたすべての試薬が適しているわけではない。例えば、グルタルアルデヒドは顕微鏡観察の際の試料の固定化に利用されたりする一般的な架橋試薬である。グルタルアルデヒドを用いたアクチンの修飾も報告されているし（**96,97,98**）、筋肉の細いフィラメントの機能状態がこの試薬で凍結されるという報告もある（**99**）。このようにグルタルアルデヒドの応用は蛋白質に対して効果的なものであるが、不幸なことに水溶液中でのグルタルアルデヒド自身の重合も含めて、その蛋白質との反応機構には不明な点が多く、反応生成物が何であるのかもはっきりとしない（**93**）。そのために、この試薬は SDS-PAGE に

表 4. 代表的な架橋試薬*

試薬	構造式	特徴	文献
1. Bisimidoesters	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}^+ \\ \parallel \\ \text{C} \\ \text{H}_3\text{CO} \end{array} - \text{R} - \begin{array}{c} \text{NH}_2^+ \\ \parallel \\ \text{C} \\ \text{OCH}_3 \end{array}$		
	$\text{R} = -(\text{CH}_2)_n \quad n = 1 \sim 10$		100
	$-(\text{CH}_2)_2 - \text{SS} - (\text{CH}_2)_2 - \quad (\text{DTBP})$	a	58
	$-(\text{CH}_2)_2 - \text{N} - (\text{CH}_2)_2 -$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{DNS}^{***}$	b	101
	$-(\text{CH}_2)_2 \text{NHCOCH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH})\text{CONH}(\text{CH}_2)_2 -$	a	102
	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}^+ \\ \parallel \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array} - (\text{CH}_2)_2 - \text{SS} - (\text{CH}_2)_2 - \begin{array}{c} \text{NH}_2^+ \\ \parallel \\ \text{C} \\ \text{O} \end{array}$	a, c	103
2 Acyl Azides	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{N}_3 - \text{C} - \text{R} - \text{C} - \text{N}_3 \end{array}$		
	$\text{R} = -\text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH}) -$	a	104
	$-(\text{CH}_2)_2 \text{NHCOCH}(\text{OH}) - \text{CH}(\text{OH})\text{CONH}(\text{CH}_2)_2 -$	a	104
3 Aryl Halides, Alkyl Halides, and Sulfonyl Halides			105
			106
			107
4 Isocyanates		a	108

試薬	構造式	特徴	文献
5. Bisaldehydes	$O=CH-(CH_2)_3-CH=O$		109
6. Bismaleimides		a	110
		(PBM)	111
7. Condensing Reagents	$R_1-N=C=NR_2$	d	112
	$R_1 = -C_2H_5$ $R_2 = -(CH_2)_3-N(CH_3)_2$		
8 Active Esters		a	113
9 Photochemical Reagents			114
			115
		a	116
10 その他		e	117
		f	118

試薬	構造式	特徴	文献
		a, g	118
		a, g	119
		g	120

* : 一連の試薬の中の代表的なものについてのみ構造式を示す。

** : Dimethylaminonaphthalenesulfonyl 基

- a) 切断可能
- b) けい光団を持つ。
- c) 生体膜にしみこめない。
- d) 蛋白質の持つアミノ基とカルボキシル基を脱水縮合する。
- e) Equilibrium Transfer Alkylation
- f) 蛋白質中のアミノ基の位置に SH 基を導入し、その後に適当な方法で酸化して S-S 結合を生成させることで架橋する。
- g) 蛋白質中の SH 基とアミノ基の間に架橋形成

よる観察や酵素活性の変化のみを調べるのなら十分なものであるが、更につっこんだ蛋白質化学的な研究のためには適していない。同様な理由で、光反応で架橋を導入する試薬や他の試薬よりも、二価性イミドエステルが架橋部位の同定などの目的にはむいていると判断した。イミドエステル試薬の利点をあげれば、次のようになるだろう。

- 1) 試薬が水によく溶ける。
- 2) 蛋白質中の残基において、N 末端のアミノ基を除けばリジン残基の ϵ -アミノ基に反応は特異的で、その反応性も試薬自身の加水分解と競合しているために適当である。
- 3) 反応の結果生じるアミジン結合は、少なくとも蛋白質が機能し得るような条件下では安定であり、通常の蛋白質の塩酸加水分解の条件下でもあまり分解しない。
- 4) アミジン基は ϵ -アミノ基より少し高い pK をもつ。つまり、修飾に伴うリジン残基の側鎖の電荷の消失・逆転は起こらない。
- 5) アミジン化の反応機構は比較的良好に調べられている。
- 6) イミドエステルに対応するニトリルさえ準備できれば、様々の二価性イミドエステルを生化学者が容易に合成できる。

以上のような特徴は、この架橋試薬を単に SDS-PAGE で反応物の分子量変化を観察するためにだけ使うなら、十分には生かされない。架橋反応後に蛋白質がリジン残基に起こった修飾で大きく影響をうけないためには、1) 2) 4) の特徴は都合がいい。また、イミドエステルのリジン残基への反応性がむやみに高くないことも、蛋白質中にあまり多くの架橋が導入されるとその後の部位の同定が困難になることを考えると、むしろ利点である。3) は架橋されたリジン誘導体がアミノ酸分析装置で分析し得ることを意味し、5) はそのための標準物質を準備するにあたって便利である。6) は現実の問題として、試薬会社から供給される二価性イミドエステルがしばしば空気中の湿気のために分解していることがあるので、自分で合成できるというのは安心である。また、放射性同位元素でラベルした試薬や市販されていないようなものを新しく合成するためには、とても便利なことである。このように数々の利点を有するのにも関わらず、この利点が十分に生かされているとはいい難かった。その一つの障害であったのは、イミドエステル架橋試薬のリジン誘導体の分析手段であった。上に述べた特徴は、それが実現可能であることを示している。そこで本研究にあたり、この障害をとり除くためにアジピン酸イミドエステルとスベリン酸イミドエステルのリジン誘導体の分析方法を確立した (47, 48)。これに

より、50 pmol の架橋されたリジンまで定量的に分析することが可能になった。このことは、架橋生成物の化学的な同定を簡便に、そしてより確かなものとする。更にアミジン結合がメチルアミンを用いれば、従来用いられてきたアンモニアよりもずっと速やかにアミノ基を再生することが判った (121)。これらの手段は、架橋部位の同定をかなり簡便化するであろう。

このように、イミドエステル架橋試薬は蛋白質化学的な応用にむけて一通りの知見がそろっているといえるので、これからもっと深く蛋白質の研究に用いられると思われる。また、たこ足のようイミドエステル基を持つ多価架橋試薬やけい光団を有するイミドエステルの開発 分析方法の確立が実現されれば、更に魅力的な架橋試薬となるであろう。

謝 辞

本論文を終るにあたって京都大学化学研究所 大井龍夫教授に深く感謝いたします。大井教授からは、筋肉蛋白質の研究の現状や残されている問題点についての有益な御指摘をしていただき、また本研究に関する様々な御助言を賜りました。また、京都大学化学研究所 高橋 徹助教授には実験家としてあるべき姿とは如何なるものであるかを日常の生活の中からも学ばせていただきました。特に本研究の化学修飾については、高橋助教授の豊富な御経験に基づき有益な御助言をいただきました。京都大学化学研究所 藤吉好則博士には電子顕微鏡像を得るにあたり御指導していただきました。藤吉博士の御指導のおかげで、修飾アクチンのフィラメント構造に関するいくつかの重要な知見が得られました。深く感謝いたします。東京大学 三川 隆博士には、電気泳動装置の製作にあたり非常に有益な御助言をいただき、また本研究についての御批判をいただきました。大阪大学・柳田敏雄博士には、アクチン分子の収縮機構における重要性をくり返し御指摘いただき、本研究に対してもきびしい御批判をいただきました。京都大学化学研究所 大井研究室の皆様には、ややもするとくじけそうになる研究に対する気持を幾度となくはげましていただきました。考えてみれば、そのおかげで常に研究に集中し続けていられたのだと感謝しています。最後に、私を個人的にささえてくれた多くの人たちに対して、心から感謝の意を表します。

引用文献

1. Hartman, E.C. & Wold, F. (1976) *Biochemistry*, 6;2439.
2. Ohara, O., Takahashi, S., & Ooi, T. (1980) *J. Biochem.*, 87;1795.
3. Ohara, O., Takahashi, S., & Ooi, T. (1980) in "Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanism" (Ebashi, S. et al. eds.) pp 259. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.
4. Shah, D.M., Hightower, R.C., & Meagher, B.B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79;1022.
5. Oosawa, F. & Asakura, S. (1975) "Thermodynamics of the Polymerization of Protein", Academic Press, New York.
6. Kasai, M., Asakura, S., & Oosawa, F. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, 57;22.
7. Kondo, H. & Ishiwata, S. (1976) *J. Biochem.*, 79;159.
8. Woodrum, D.T., Rich, S.A., & Pollard, T.D. (1975) *J. Cell. Biol.*, 67;231.
9. Wegner, A. (1976) *J. Mol. Biol.*, 108;139.
10. Elzinga, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., & Adelstein, R.S. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70;2687.
11. Lu, R.C. & Elzinga, M. (1977) *Biochemistry*, 16;5801.
12. Vandekerckhove, J. & Weber, K. (1978) *Eur. J. Biochem.*, 90;451.
13. Rich, S.A. & Estes, J.E. (1976) *J. Mol. Biol.*, 104;777.
14. Rouayrenc, J.-F. & Travers, F. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 116;73.
15. Murphy, A.J. (1971) *Biochemistry*, 10;3723.
16. Cooke, R. (1975) *Biochemistry*, 14;3250.
17. Higashi, S. & Oosawa, F. (1965) *J. Mol. Biol.*, 12;843.
18. Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T., & Lindberg, U. (1978) *Cell*, 15;935.
19. Lehrer, S.S. & Kerwar, G. (1972) *Biochemistry*, 11;1211.
20. Frieden, C., Lieberman, D., & Gilbert, H.R. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255;8991.
21. Kouyama, T. & Mihashi, K. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 114;33
22. Detmers, P., Weber, A., Elzinga, M., & Stepens, R.E. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256;99.
23. Burley, R., Seidel, J.C., & Gergely, J. (1971) *Arc. Biochem. Biophys.*, 146;597.
24. Lu, R.C. & Sziglagyi, L. (1981) *Biochemistry*, 20;5914.

25. Bender, N., Fasold, H., Kenmoku, A., Middelhoff, G., & Volk, K.E. (1976) *Eur.J.Biochem.*, 64;215.
26. Hegyi, G., Permecz, G., Sain, B., & Muhlrád, A. (1974) *Eur.J.Biochem.*, 44;7.
27. Lusty, C.J. & Fasold, H. (1969) *Biochemistry*, 8;2933.
28. Cooper, J.A. & Pollard, T.D. (1982) *Methods Enzymol.*, 85;182.
29. Tait, J.F. & Frieden, C. (1982) *Arc.Biochem.Biophys.*, 216;133.
30. Mannhertz, H.G., Brehme, H., & Lamp, U. (1975) *Eur.J.Biochem.*, 60;109.
31. Hill, T.L. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77;4803.
32. Simpson, P.A. & Spudich, J.A. (1980) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 77;4610.
33. Avissar, N., Kaminsky, E., Leibovich, S.J., & Oplatka, A. (1979) *Biochim.Biophys.Acta*, 577;267.
34. Craig, S.W. & Pollard, T.D. (1982) *Trend.Biochem.Sci.*, 7;88.
35. Schliwa, M. (1981) *Cell*, 25;587.
36. Weeds, A. (1982) *Nature*, 296;811.
37. Suck, D., Kabsch, W., & Mannhertz, H.G. (1981) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78;4319.
38. Sugino, H., Sakabe, N., Sakabe, K., Hatano, S., Oosawa, F., Mikawa, T., & Ebashi, S. (1979) *J.Biochem.*, 86;257.
39. Spudich, J.A. & Watt, S. (1971) *J.Biol.Chem.*, 246;4866.
40. Perry, S.V. (1955) *Methods Enzymol.*, 2;582.
41. Yagi, K. & Yazawa, Y. (1966) *J.Biochem.*, 60;450.
42. Ebashi, S., Kodama, A., & Ebashi, F. (1968) *J.Biochem.*, 64;465.
43. Yamagushi, M., Greaser, M.L., & Cassens, R.G. (1974) *J.Ultrastruct. Res.*, 48;33.
44. Price, P.A., Liu, T.-U., Stein, W.H., & Moore, S. (1969) *J.Biol.Chem.*, 244;917.
45. Knight, P. & Offer, G. (1978) *Biochem.J.*, 175;1023.
46. Habeeb, A.F.S.A. (1966) *Anal.Biochem.*, 14;328.
47. Ohara, O. & Takahashi, S. (1980) *Anal.Biochem.*, 107;314.
48. Ohara, O. & Takahashi, S. 投稿中
49. LeBel, D., Poirier, G.G., & Beaudoin, A.R. (1978) *Anal.Biochem.*, 85;86.
50. Lin, T.-I. & Morales, M.F. (1977) *Anal.Biochem.*, 77;10.
51. Lindberg, U. (1964) *Biochim.Biophys.Acta*, 82;237.

52. Habeeb, A.F.S.A. (1972) *Methods Enzymol.*, 25;457.
53. Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 277;680.
54. Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J.Biol.Chem.*, 244;4406.
55. Houk, T.W., Jr, & Ue, K. (1974) *Anal.Biochem.*, 62;66.
56. Young, D.M., Himmelfarb, S., & Harrington, W.F. (1964) *J.Biol.Chem.*, 239;2822.
57. Lindberg, U. (1967) *Biochemistry*, 6;335.
58. Wang, K. & Richards, F.M. (1974) *Israel J.Chem.*, 12;375.
59. McElvain, S.M. & Schroeder, J.P. (1949) *J.Amer.Chem.Soc.*, 71;40.
60. Secrist, J.A., III, Barrio, J.R., Leonard, N.J., & Weber, G. (1972) *Biochemistry*, 11;3499.
61. Bernardi, G. (1971) *Methods Enzymol.*, 22;325.
62. Elzinga, M. & Trus, B. (1980) in "Methods in Peptide and Protein Sequencing Analysis" (Birr, C. ed.) pp 213. Elsevier, Amsterdam.
63. Mockrin, S.C. & Korn, E.D. (1981) *J.Biol.Chem.*, 256;8228.
64. Steel, J.C.H. & Nielsen, T.B. (1978) *Anal.Biochem.*, 84;218.
65. Guba, F. (1950) *Nature*, 165;439.
66. Hanson, J. & Huxley, H.E. (1963) *J.Mol.Biol.*, 6;46.
67. Asai, H. & Tawada, K. (1966) *J.Mol.Biol.*, 20;403.
68. Straub, F.B. & Feuer, G. (1950) *Biochim.Biophys.Acta*, 4;455.
69. Tanaka, H. & Oosawa, F. (1971) *Biochim.Biophys.Acta*, 253;274.
70. Elzinga, M. & Collins, J.H. (1975) *J.Biol.Chem.*, 250;5897.
71. Kasai, M., Nakano, E., & Oosawa, F. (1965) *Biochim.Biophys.Acta*, 94;494.
72. Nakaoka, Y. & Kasai, M. (1969) *J.Mol.Biol.*, 44;319.
73. Lazarides, E. & Lindberg, U. (1974) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 71;4742.
74. Mannhertz, H.G., Leigh, J.B., Leberman, R., & Pfrang, H. (1975) *FEBS Lett.*, 60;34.
75. Hitchcock, S.E., Carlsson, L., & Lindberg, U. (1976) *Cell*, 7;531.
76. Harwell, O.D., Sweeney, M.L., & Kirkpatrick, F.H. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255;1210.
77. Hitchcock, S.E. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255;5668.
78. Mannhertz, H.G., Goody, R.S., Konrad, M., & Nowak, E. (1980) *Eur.J. Biochem.*, 104;367.
79. Pennathur-Das, R., Vickery, L.E., Mentzer, W., & Lubin, B.H. (1979) *Biochim.Biophys. Acta*, 580;356.
80. Enns, C.A. & Chan, W.W.-C. (1978) *J.Biol.Chem.*, 253;2511.
81. Nucci, R., Raia, C.A., Vaccaro, C., Sepe, S., Scarano, E., & Rossi, M. (1978) *J.Mol.Biol.*, 124;133.

82. van Driel,R. & van Bruggen,E.F.J. (1975) *Biochemistry*, 14;730.
83. Ikkai,T. & Ooi,T. (1966) *Biochemistry*, 5;1551.
84. Takahashi,S. & Ooi,T. (1973) *Bull.Inst.Chem.Res.,Kyoto Univ.*, 51;329.
85. Mihashi,K. (1972) *Biochim.Biophys.Acta*, 267;409.
86. Faust,U., Fasold,H., & Ortanderl,F. (1974) *Eur.J.Biochem.*, 43;273.
87. Dancker,P., Low,I., Hasselbach,W., & Wieland,Th. (1975) *Biochim.Biophys.Acta*, 400;407.
88. Wells,J.A. & Yount,R.G. (1982) *Methods Enzymol.*, 85;93.
89. Brenner,S.L. & Korn,E.D. (1980) *J.Biol.Chem.*, 255;841.
90. Fujime,S. & Ishiwata,S. (1971) *J.Mol.Biol.*, 62;251.
91. Nagashima,H. & Asakura,S. (1980) *J.Mol.Biol.*, 136;169.
92. Takebayashi,T., Morita,Y., & Oosawa,F. (1977) *Biochim.Biophys.Acta*, 492;357.
93. Peters,K. & Richards,F.M. (1977) *Ann.Rev.Biochem.*, 46;523.
94. Wold,F. (1972) *Methods.Enzymol.*, 25;623.
95. 前田 浩 (1981) 蛋白質の化学修飾 (下) (生物化学実験法 13) pp 81, 学会出版センター
96. Lehrer,S.S. (1972) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 48;967.
97. Poo,W.-J. & Hartshorne,D.J. (1976) *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 70;406.
98. Gadashi,H., Oplatka,A., Lamed,R., Hochberg,A., & Low,W. (1974) *Biochim.Biophys.Acta*, 333;161.
99. Mikawa,T. (1979) *Nature*, 278;473.
100. Bickle,T.A., Hershey,J.W.B., & Traut,R.R. (1972) *Proc.Natl.Acad. Sci.USA*, 69;1327.
101. Schramm,H.J. (1975) *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.*, 356;1375.
102. Coggins,J.R., Hooper,E.A., & Perham,R.N. (1976) *Biochemistry*, 15;2527.
103. Staros,J.V., Morgan,D.G., & Appling,D.R. (1981) *J.Biol.Chem.*, 256;5890.
104. Lutter,L.C., Ortanderl,F., & Fasold,H. (1974) *FEBS Lett.*, 48;288.
105. Zahn,H. & Stuerle,H. (1956) *Biochem.Z.*, 331;29.
106. Hiremath,C.B. & Day,R.A. (1964) *J.Amer.Chem.Soc.*, 86;5027.
107. Herzig,D.J., Rees,A.W., & Day,R.A. (1964) *Biopolymers*, 2;349.
108. Fasold,H. (1965) *Biochem.Z.*, 342;288.
109. Korn,A.H., Feairheller,S.H., & Filachione,E.M. (1972) *J.Mol.Biol.* 65;525.
110. Fasold,H., Groschel-Stewart,U., & Turba,F. (1963) *Biochem.Z.*, 337;425.
111. Chang,F.N. & Flaks,J.B. (1972) *J.Mol.Biol.*, 68;177.

112. Carraway, K.L. & Koshland, D.E. (1972) *Methods Enzymol.*, 25;616.
113. Bragg, P.D. (1975) *J. Supramol. Struct.*, 3;297.
114. Wilson, D.F., Miyata, Y., Erecinska, M., & Vanderkooi, J.M. (1975) *Arc. Biochem. Biophys.*, 171;104.
115. Ji, T.H. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252;1566.
116. Chong, P.C.S. & Hodges, R.S. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256;5064.
117. Mitra, S. & Lawton, R.G. (1979) *J. Amer. Chem. Soc.*, 101;3097.
118. King, T.P., Li, Y., & Kochoumian, L. (1978) *Biochemistry*, 17;1499.
119. Carlsson, J., Drerin, H., & Axen, R. (1978) *Biochem. J.*, 128;471.
120. Kitagawa, T. & Aikawa, T. (1976) *J. Biochem.*, 79;233.
121. Dubois, G.C., Robinson, E.A., Inman, J.K., Perham, R.N., & Appella, E. (1981) *Biochem. J.*, 199;335.

參考論文

1. Cross-Linking Study on Tropomyosin.
2. Analysis of Adipimidate-Crosslinked Lysine.
3. A Study on Troponin-T and Troponin-C Interaction by Cross-Linking Reagents.