

蛍光法による筋肉タンパク質アキチンの
動的性質の研究

三木 正雄

LIBRARY

目次

	ページ
I. 序論	
I-1. 筋肉の構造と機能について	1.
I-2. アクチン及びグアクチンとスクレオチド	1.
I-3. 蛍光プローブとL29E-ATP	2.
II. アクチンとE-ATPとの相互作用	3.
II-1. E-ATPとG-アクチンの結合定数	4.
II-2. アクチンのスクレオチド結合部位の性質	6.
III. F-アクチン中の"スクレオチド"結合の規則的な立体配置について	7.
III-1. ニッの吸収遷移モーメントの存在と そこから吸収遷移モーメント及び蛍光遷移モーメントの関係	7.
III-2. 吸収遷移モーメントとF-アクチンの長軸となす角度	10.
III-3. P_{\perp} 平面とF-アクチンとなす角度	13.
IV. アクチンにおけるスクレオチド結合部位はどれだけ内部にあるかについて—蛍光消光法をつかって	15.
V. F-アクチンの構造の熱的ゆらぎ	19.
VI. F-アクチンとミオシンの相互作用による、 生じるF-アクチンの構造変化	21.

I. 序論

すべての生命体は生きている限り合目的的な運動を行う。
この合目的的な運動こそは、生命体と無機界とを区別する最も大きな特徴の一つといえる。そしてこの最も分化した形態である骨格筋の収縮と弛緩がどのようなメカニズムで起るかを分子レベルで説明することは、生命現象を理解する上で非常に重要である。

I-1. 筋肉の構造と機能について

筋肉の微細構造は電子顕微鏡を用いて、ヘリスの H. Huxley 達の研究によつて、図1にみられるように明らかになった。⁽¹⁾ これによつて、筋肉はミオシン分子からなる太いフィラメントと主にアクトン分子からなる細いフィラメントが相互に規則正しく入り組んで構成されている。そして、筋収縮においては、これら二つのフィラメントが相互作用し ATP の化学エネルギーを力学的エネルギーに変換しながら、その各々の長さを変えることにより「スライド」するといふのが A. Huxley の提唱した、いわゆる「滑り説: Sliding Theory」である。⁽²⁾

更にこの細いフィラメントを詳細にみると、図2にみられるようにアクトン分子が二重らせん構造をとり、その上に筋収縮の制御を司るトロポニン及びトロポミオシンが規則的に配列されている。⁽³⁾

筋肉の収縮はまず神経からのパルスが筋小胞体膜を刺激することによつて膜電位を脱分極し Ca^{2+} を放出させる。これはトロポニンの結合することによつて、その構造変化を起し、その情報からトロポミオシンを介して、アクトンへと伝わり細いフィラメントと太いフィラメントの相互作用が強化し収縮が起る。これがいわゆる江橋の提唱した「 Ca^{2+} 賦活化」の理論である。⁽⁴⁾

生理学的なレベルでの筋収縮のメカニズムはこのような江橋らによつて、非常に明確な形で与えられた。しかしながら、

分子レベルでのメカニズムについては多くの重要な点不明が残っている。

この研究が 現在2つの状態であるといえる。従ってまず
この二つの状態の構造を分子的なレベルで明らかにして
いる事は筋収縮の機構を考へていく上で非常に重要な事だと
思われる。以上の見地を観点に立って、この論文では、蛍光プローブ
法によるアクチンフィラメントの動的なふるまいと静的構造とを
述べた。

I. - 2. アクチン及びアクチンとミオシン

水溶液中低イオン強度に於て、アクチンは分子量約43000
のモノマーの状態 (G-アクチン) で各1モルに対して1モルのMgイオン
及び1モルのATPを結合している。^[5] それに対してイオン強度を0.1に
すると、P_iイオンはリン酸の高エネルギー結合でありATPの末端
Phosphateを加水分解しADPとP_iとし、二重らせん構造の
F-アクチンの状態になる。(図を参照)

このG-アクチンとF-アクチンの変換 (G→F変換) は可逆的な
反応であるが、このG→F→Gの1サイクルを行うには、1モルの
ATPが不可逆的にADPとP_iとし加水分解される必要がある。^[6]

G-アクチンはATPを強く結合 ($\approx 10^6 M^{-1}$) しているが、
これは、新しいATPと容易に交換することによりできる。更に
G-アクチンから、ATPを無理に除去すると、G-アクチンはすぐの
変性し、その重合能力を失う。このようにATPはG-アクチンのNative
な構造維持に不可欠なものである。一方F-アクチンに結合
したADPは生理的条件下ではほとんど交換することはない。

I. - 3. 蛍光プローブとL295-ATP.

蛋白質の構造を調べていく上で、蛍光プローブを導入
することは、非常に有効な手段であり、数多くの光学的方法の
うちでも、蛍光法は、とくに多くの情報を与えてくれる。

(か)から蛋白質の構造を知ることが意味のある情報をうけるには
蛍光プローブとして次の条件をみたすことが望ましい。

- (1) 水溶性であること。
- (2) 量子収率の高いこと。
- (3) 励起波長が蛋白質の自然蛍光の波長からできるだけ
遠くにあること。
- (4) その蛋白質の特異的位置に結合すること。
- (5) その結合において蛋白質の構造を変えないこと。

近年 Sechrist 等による蛍光性 ATP プローブである ϵ -ATP が
合成された [7]。 ϵ -ATP はアクチンの蛍光プローブとして上述の条件
をほぼ完全に満たしていることが明らかにされた。図4(a)に示すように
 ϵ -ATP は ATP と非常に似た構造をもつ。その蛋白質のアマニック残基
の吸収帯 (270~290nm) とは離れた 300nm 以上の波長領域にも新しい
吸収帯をもつ。また 410nm 付近に単一の蛍光極大をもつ。(図4(b)参照)
又量子収率も 0.5 以上をもつ。吸収測定のみならず、蛍光測定のアナログ
として非常にすぐれた性質をもっている。更に重要なこととして、 ϵ -ATP は
アクチンに結合すると吸収が長波長側に移動する(図7(a))。又量子収率
も増加する。この励起波長を適当に選べるとアクチンに結合した ϵ -ATP
の蛍光をみることもできる。更にアクチンの特異的に結合し
図4(c)に示すように、アクチンに結合した ϵ -ATP は単一の比較的長い
蛍光寿命をもつことがあげられる。これはタイムドポル蛍光測定の結果
を解析すると非常に大振幅リットにあげられる。本研究においては、
この ϵ -ATP を合成し、アクチン分子に結合している ATP とこの ϵ -ATP で置き
かえることにより、アクチンの結合部位及びその周辺の構造の
動的、静的性質を蛍光及び吸収測定から調べてみた。

II. アクチンと ϵ -ATP の相互作用

おのづから、さまざまな種類のアクチンに対する結合定数が
求められている。(表1参照) その中で ATP は最も高い親和性
をもっている。アクトン乾燥筋から抽出された G-アクチンは通常

ATPを結合している。従ってこのままでは容易に ϵ -ATPと置きかえることはできない。そこでまず"ADPを結合した G -P₃₄-(ADP)を作り、次に ϵ -ATPを加えることにより ϵ -ATPと G -P₃₄との結合させることができた。[8] 上記のようにより得られた G -P₃₄-(ϵ -ATP)は通常 G -P₃₄-(ATP)と同じrateで $G \rightarrow F$ 変換を行い、その時末端phosphateを加水分解すること命令した。[8] (図5参照) 更にこのようにより得られた F -P₃₄-(ϵ -ADP)は、 F -P₃₄-(ADP)と同じようにミオシンのATP加水分解活性を増加させることも命令した。[8] 従って ϵ -ATPをATPと置きかえてもP₃₄のNativeな構造は変わらないといえる。

II-1. ϵ -ATPと G -P₃₄の結合定数

ϵ -ATPはATPと較べ、その構造が非常に似ている為ADPの較べでP₃₄への結合定数はずっと高いと予想される。Thames等は朝倉がATPの結合定数を求めたのと同じ方法[9]により、 ϵ -ATPの結合定数が $2 \times 10^6 M^{-1}$ と求められている。[10] ここで使った一つの方法として ϵ -ATPとATPとの拮抗結合を仮定することにより、ATPの結合定数とを比べることを行った。

まず G -P₃₄-(ADP)に定量の ϵ -ATPを加え、その種々の濃度のATPを加えて、 ϵ -ATPとATPを競争させ平衡状態に達させた。次に塩を加えて F -P₃₄とし結合した2つのADPを交換しおこす。したがって透折法によりfree ϵ -ATP及びfree ATPを取り除きP₃₄に結合した ϵ -ATPの量を蛍光強度で定量した。ここでADPの結合定数はATPの較べ1/4の小さく濃度も、この実験に使用した ϵ -ATPの濃度の較べ1/4近く少ないのでこの解析においてADPの影響は無視した。

G : G-アクトン(ADP)の濃度

A : ATP の "

A' : ϵ -ATP の "

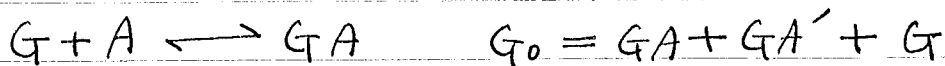
G_0 : 加えた G-アクトン(ADP)の濃度

A'_0 : 加えた ϵ -ATP の "

A_0 : 加える ATP の "

K_1 : ATPのアクトンに対する結合定数

K_2 : ϵ -ATPの " と表わすと



と表わされる。

ここで G の量は GA 及び GA' に較べ非常に少ない(無視し)と考へる。更に ATP を加えない時の蛍光強度($\propto GA' = G_0$)に対し任意の濃度の ATP を加えた時の蛍光強度($\propto GA'$)の比 Y を $Y = (GA')/(G_0)$ とおく。ここで ATP を加えない時には、G-アクトン(ADP)はすべて、G-アクトン(ϵ -ATP)になるとした。

従つて、(1)式の関係が得られる。

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{GA'}{GA} \cdot \frac{A}{A'} = \frac{Y}{1-Y} \cdot \frac{A_0/G_0 - 1 + Y}{A_0/G_0 - Y} \quad (1)$$

ここで実験条件より $(A_0)/(G_0) = 6.25$ とする。又 K_2/K_1 即ち ϵ -ATP と ATP とのアクトンに対する結合定数の比を c とすると加えた ATP の量を表わす $(A_0)/(G_0) - 1$ に対し次式が得られる。

$$\text{ここで } X = ((A_0)/(G_0) - 1) \text{ とすると}$$

$$(1-c)Y^2 + (X + 7.25c)Y - 6.25c = 0 \quad (2)$$

ここで c をパラメーターとして、もつと実験に適した c の値を求めると図6にみられるように $c = 0.3$ の時

もとも実驗桌上に適合した。従つて ϵ -ATP のアクチンへの結合定数は ATP に較べ 0.3 倍となり ADP と較べずと強くアクチンに結合するに適合した。

II-2. アクチンのスペクトル結合部位の性質

ある分子が蛋白質に結合した時その吸収が変化する場合その波長とそれからその結合部位の環境についてどの程度親水性があるかは疎水性を知ることから知ることが出来る。こゝではアクチンへの結合によつて起る ϵ -ATP の吸収変化を Double Cell 法で直接差吸収を求めた。

さて ϵ -ATP は G-アクチンに結合するとその吸収に赤色移動が起る。図 7 は差吸収より得られたスペクトル変化を示している。このスペクトルは ϵ -ATP が "ジオキサン" で示す波長 shift と (図 7 の参照) 非常に酷似していた。従つてアクチンのスペクトル結合部位はジオキサンと同程度 (誘電率 2.209 at 25°C) のかなり疎水性の強い領域であることが分る。

更にアクチンは塩を加えると G \rightarrow F 変換によつてその状態を大きくかえ、又その時結合したアクチンの ATP は ADP と P_i とに加水分解される。この G \rightarrow F 変換の時のアクチンの差吸収を求めたのが 図 8 に示されている。こゝで ϵ -ATP は ATP と吸収が異なるにもかかわらず G-アクチン(ATP) と G-アクチン(ϵ -ATP) の F-アクチンへの変換の時の差吸収は同一のスペクトルを示す。従つて G \rightarrow F 変換にあつては ATP が ADP と P_i とに加水分解されるが、結合したアクチンのアクチン部位の構造はほとんど変化しない事が分る。こゝでは、+1秒間ピルル蛍光測定によつて直接求めた G-アクチン(ϵ -ATP) と F-アクチン(ϵ -ADP) の蛍光寿命が同一であるという事とよく符合する。[11]

III. F-アクリン中でのヌクレオチド結合の 規則的な立体配置について.

F-アクリンはその特異的な部位にヌクレオチドを1分子結合している。従ってこのヌクレオチドはF-アクリンの二重らせん構造の中で規則的に並んでいるかと思われる。

以前東等は流動二色性の測定から、流動場でのF-アクリンの完全面定向を決定することになり、このP₂₂成分の部位の吸収遷移モーメント(260nm極大)は、F-アクリンの長軸に対し63°の角度をもつ規則的に並んでいることを報告した。[12]

しかしながら一軸方向が求められただけではP₂₂成分のどの方向を向いているかは分らない。ここにはP₂₂成分の方向を決定する為に、まず蛍光偏光度の波長依存性からε-ATPが、それぞれが異なる角度をもつたいくつかの吸収遷移モーメントを持つことを調べ、これらのモーメントのF-アクリンの長軸となす角度を流動二色性でもとめ、更に蛍光遷移モーメントの方向を流動場での蛍光測定によつて調べ、これらからF-アクリン中での結合P₂₂成分の立体的な配置を調べた。[13]

III-1: 二つの吸収遷移モーメントの存在と これらの吸収遷移モーメント及び蛍光遷移モーメントの関係.

蛍光分子は、それぞれの電子状態に対応して決った吸収及び蛍光遷移モーメントをもっている。一般に蛍光の発光と励起光の吸収が同一遷移に属する時には、これらの遷移モーメントの方向は一致していると考えられる。この場合分子のブラウン運動とためた状態で蛍光の偏光度(P)を測定すると、その最大値の0.5を得る。しかしながら通常存在する多くの蛍光分子では、これらの遷移モーメントは異なる角度をもつて存在している。その角度をβとあくと

$$\cos^2\beta = (1 + 3P_0) / (3 - P_0) \quad (3)$$

(3)式によつて、分子のブラウン運動がない状態で、蛍光偏光度 P_0 と関係づけられる。^[15]

ここで、蛍光の偏光度 P は次のように定義された量である。

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (4)$$

ここで I_{\parallel} は直線偏光した励起光に対し平行成分の蛍光強度であり、 I_{\perp} は直交成分の蛍光強度である。そして、この P はその絶対値 P_0 と最大

$$\left(\frac{1}{2} - \frac{1}{3}\right) / \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{3}\right) = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + \left(\frac{\eta V}{R T}\right)^{-1} \tau \quad (5)$$

の関係で与えられる。ここで θ は分子の回転緩和の時間であり、 η は溶媒の粘度、 τ は蛍光寿命、 V は分子の free volume である。従つて $(\eta/R T)^{-1}$ に対し P_0 の値をプロット (ペラゴロフ) すればよい。 P_0 の値及び分子の回転緩和の時間 θ の状態を決定するに役立つ。その大きさが決定される。(Appendix I 参照)

分子の回転緩和を直接測定する方法として近年パセコバリスを用いた蛍光の時間分解測定法が開発された。^[14] ここで P の代わりに

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (6)$$

で定義される Fluorescence Anisotropy r を導入する。Anisotropy r は回転緩和時間 θ と次の関係にある。

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} \quad (7)$$

この関係より $r(t)$ を直接ナノ秒時間領域で測定する

こゝによつて、これから直接回転緩和の時間を知りうる。
更に γ と P とは その定義によつて

$$P = 3\gamma / (2 + \gamma)$$

と関係づけられる。[15]

すなわち F-7742 に結合した ϵ -ADP の回転緩和時間は、その偏光解消度 ϵ + 1 セCOND パルス蛍光法で $\gamma(t)$ を直接測定することにより、数 μsec 以上の Order であることが分る。[11, 26] 従つて ϵ -ADP の蛍光寿命 τ (約 4 nsec) の数倍 θ がはるかに大きい値をもつため、式 5 から溶液中の F-7742 (ϵ -ADP) の偏光度 P を測定すると、それが P_0 の値を与へることになる。

F-7742 (ϵ -ADP) の偏光度 $P(P_0)$ の値を励起波長の対しプロットしたものが図 9 に示してある。220 nm 以下の波長領域で P_0 の値は負の値となり、250 nm 以上の波長領域では正の値となる。もし一つの吸収遷移モメントのみが関与するならば、 P_0 は波長に対し一定の値を与える。従つて明らかに 260 nm 付近及び 300 nm 以上の波長領域の少くとも二つの吸収遷移モメントが存在し、これらが中波長領域で重なり、その結果 P_0 の波長依存性があるものと思われる。この P_0 の値を用いて、これら二つの吸収遷移モメントと蛍光遷移モメントのなす角度が式 3 で求めらるが、今 260 nm での P_0 の値は Optical density が非常に高く、又内部での多重散乱による偏光度の減少が起り、更にこの領域では、蛋白質の 4032 及びトリプトファン残基の蛍光が混入するから測定上の ambiguity が入る。このことは粘性の高い 7% 水 (95%) 中の ϵ -ATP での蛍光を測定することによつて、溶媒の粘度を下げ、分子の自由回転を減少させ、式 5 によつて明らかになる P_0 の値を P_0 に近づけることにより、その偏光度を求めた。(図 9 参照。)

$\epsilon = 2^\circ$ の値から 260 nm における P_0 の値として、 -0.10 を採ることにした。
 280 nm 以下の領域及び 300 nm 以上の領域に存在する 2つの吸収遷移
 モーメントと 蛍光遷移モーメントのなす角度 β は、それぞれ 260 nm 及び 300 nm
 での P_0 の値を用いて、(3)式により $62^\circ (\beta_2)$ 及び $32^\circ (\beta_1)$ と求めた。

一般に励起分子が蛍光を発する一つの必要条件として少くなくは
 その分子が励起状態において平面構造に固定されることであり、この条件
 は最も簡単な場合としては、分子自身が化学構造として平面構造と
 もつ場合に満足されるという事を考慮すれば、この吸収遷移モーメントは
 P_0 平面にあると考へてよいであろう。この時 2つの吸収遷移モーメント
 のなす角度を ω とすると、

$$\omega = \beta_1 \pm \beta_2 \quad (8)$$

と与えられる。この ω の値として 90° を与える時は $(180^\circ - (\beta_1 \pm \beta_2))$ の値と
 なる。(8)式で (1) の場合は 2つの吸収遷移モーメントが 蛍光
 遷移モーメントの両側にある場合に対応し、この時 ω として 86° を
 与える。一方 (2) の場合は同じ側にある場合に対応し、この時
 ω として 30° を与える。(図10参照) どちらの場合が妥当かは
 決めただけでは決定できない。

III-2. 吸収遷移モーメントとFADの長軸とのなす角度

さて、この2つの吸収遷移モーメントはFADの長軸に
 対してどの方向を向いているのかを知らねば、FADの(ε-ADP)の
 流動=色性の測定を行なった。

流動=色性は外側と内側の2つのCylinderに Sample
 を入れ、その一方のCylinderを回転させることにより速度勾配を付け
 高分子をこの流動場により配向させる。そして、Cylinderの軸の
 直交した方向から入射光を入れ、流動の方向に對する吸収の
 平行成分(ε_{||})及び直交成分(ε_⊥)の差 $\Delta\epsilon (= \epsilon_{||} - \epsilon_{\perp})$ を
 求めると、高分子中の励起した Chromophore の規則的配向
 配向を求めた。

流束に対する分子の両方向の方向及び吸収の遷移エネルギーの方向の関係を式(9)の表で示す。これらの方向の関係を式(9)で表わす。[16]

$$\frac{\Delta \epsilon}{\epsilon} = \frac{3}{4} (3K_1 - K_2 - 2) (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \Rightarrow \text{ } K_1 &= \iint \sin^2 \theta f(\theta, \varphi) d\Omega \\ K_2 &= \iint \sin^2 \theta \cos 2\varphi f(\theta, \varphi) d\Omega \end{aligned}$$

2'と2'は、更に2'を使うと、 $f(\theta, \varphi)$ は Angular distribution function と知られる。

9式において 完全配向した場合 $\theta = \frac{\pi}{2}$ $\varphi = \frac{\pi}{2}$ ($X=0$) とする

$$\frac{\Delta \epsilon}{\epsilon} = \frac{3}{2} (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad (10)$$

10式2'と2'は、更に流速一定の面内のみ配向する場合即ち $\varphi = \frac{\pi}{2}$ ($X=0$) の時は次の11式2'と2'は

$$\frac{\Delta \epsilon}{\epsilon} = \frac{3}{2} (2 \overline{\sin^2 \theta} - 1) (3 \cos^2 \alpha - 1) \quad (11)$$

$\Rightarrow \text{ } \overline{\sin^2 \theta} = K_1 = -K_2 = \int \sin^2 \theta f(\theta) d\theta$ は流動複屈折の配向因子 (orientation factor) と知られる。

図12(a)に F-PS42 (ϵ -ADP) の流動二色性 $\Delta \epsilon$ 及び吸収 ϵ を示す。300 nm 以上の波長領域では蛋白質の吸収は弱く、その大抵の負の $\Delta \epsilon$ は正の ϵ と結合して ϵ -ADP の寄与だけと考えられる。この領域での二色性値 $\Delta \epsilon / \epsilon$ は -0.52 と前報等から求めた ADP の二色性値とほぼ一致する。更に 300 nm 以下の波長領域では、285 nm の負の peak、280 nm の正の peak、260 nm の負の peak をもつ。

F-アクトン(ADP)の場合と非常に良く似ている。(図12.6参照) $\epsilon = \epsilon'$
F-アクトン(ϵ -ADP)の二色性 α 値を ϵ -ADPの寄与($\Delta\epsilon_1$)と蛋白質イプロマティック
グループの寄与($\Delta\epsilon_2$)とを合計したものと仮定すると(12式を与える)

$$\Delta\epsilon = \Delta\epsilon_1 + \Delta\epsilon_2$$

$$\epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2 \quad (12)$$

ここで吸収の分高値は 300nm以上の波長領域はすべて ϵ -ADPの吸収
と考へ、これから全波長領域を外押し ϵ_1 を求め、 $\epsilon - \epsilon_1$ から ϵ_2 を求めた。
又 260nm の二色性はすべて 結合ADPからの寄与とすると $\Delta\epsilon$ は 300nm以上の
波長領域ですべて求められた値と近い -0.55 ± 0.09 となる。従って、これから
280nm 295nm でのプロマティック残基の吸収遷移モーメントの存在する領域
(295nmはトリプトファン、280nmはトリプトファンとチロシン残基のSignalと考へらる。)で
 ϵ -ADPの流動二色性 $\Delta\epsilon/\epsilon$ の値が一定 (-0.55) とした時 $\Delta\epsilon_1 = -0.55 \epsilon_1$ と
なる。従って $\Delta\epsilon_2 = \Delta\epsilon - \Delta\epsilon_1$ と $\Delta\epsilon_1$ と $\Delta\epsilon_2$ の値を分離し前述した
ように求めた ϵ_1, ϵ_2 を使って $\Delta\epsilon_1/\epsilon_1$ と $\Delta\epsilon_2/\epsilon_2$ を求めた。表2のようになる。
蛋白質のトリプトファン及びチロシンからの寄与は F-アクトン(ADP)の場合と非常に
よく一致している。

さて一般の流動場で高分子を配向させる場合普通実験で行なわれる
速度勾配 ($\dot{\gamma} \leq$ 数千 sec^{-1}) では完全配向させることはできない。ゆえに
F-アクトンの場合には流れに対して非常に並ぶやすく、流動複屈折で
消光角 χ を測定すると 20sec^{-1} の速度勾配ですべて 3° 以下に位配向する。

更に配向因子 $\overline{\sin^2 \theta}$ は F-アクトンと軸比無限大の棒状高分子
(径 80Å 長 $\pm 1.0 \mu\text{m}$) とみれば Scheraga の理論 [17] を用いて
回転拡散定数を 20sec^{-1} と計算するとこの流動二色性の
測定に使われる速度勾配 ($\approx 1000 \text{sec}^{-1}$) ではほぼ一定値の
 0.70 を与えることが合っている。 [18]

従って実験から得られた $\Delta\epsilon/\epsilon$ の値を式(11)に代入し
 $\overline{\sin^2 \theta}$ を 0.70 と代入すると 2つの吸収遷移モーメントの
F-アクトンの長軸に対する角度 α が求められ、280nm以下の
領域に存在する吸収遷移モーメントの α は $80 \pm 6^\circ$ となり
300nm以上の波長領域での吸収遷移モーメント

α_1 の値は $78^\circ \pm 5^\circ$ とする。

以前東等が 260 nm の ADP の吸収遷移 π - x 軸の方向 α を求めた時完全配向を仮定して 63° の値を得たが

こゝで求めた α と同じ式により α を求めると $\alpha = 80^\circ$ とする。

異なった方向を向いてゐる吸収遷移 π - x 軸の対し
ほぼ同じ π - μ 軸の長軸の対する角度を与へるとは、

π - π' 平面が π - μ 軸の長軸の対し直交に結合
してゐると思はせるが、次に求める方向として、増光遷移
 π - x 軸の方向を決定してこのことを確認する。

III-3. π - π' 平面と π - μ 軸のなす角度

前述したように得られた値 $\alpha_1, \alpha_2, \omega$ を使って
 π - π' 平面と π - μ 軸の長軸のなす角度 K を求めたい。

図13に示されたように X, Y, Z 軸を決める。こゝで

π - π' 平面は X - Y 面に置かれてゐる。 $\alpha_1, \alpha_2, \omega, K$ の関係は

$$\cos \alpha_1 = \sin K \sin \phi$$

$$\cos \alpha_2 = \sin K \sin \phi \cos \omega + \sin K \cos \phi \sin \omega$$

となり 二つより (13) 式を得る。

$$\sin K = \sqrt{\cos^2 \alpha_1 + \cos^2 \alpha_2 - 2 \cos \alpha_1 \cos \alpha_2 \cos \omega} / \sin \omega \quad (13)$$

が得られる。 $\alpha_1, \alpha_2, \omega$ の各々それぞれ実験値を代入し、

K を求める。こゝで遷移 π - x 軸はベクトルとして扱う。

ω の値は 90° よりも小さい値を採用した。従つて、

$\omega' = \pi - \omega$ も考慮して、次の4つの場合を考へる必要がある。

(1) $\omega = 86^\circ$ の時

$K = 15^\circ \pm 2^\circ$

(2) $\omega' = 86^\circ$ の時

$K = 16^\circ \pm 2^\circ$

(3) $\omega = 30^\circ$ の時 $K = 12^\circ \pm 6^\circ$

(4) $\omega' = 30^\circ$ の時 $K = 90^\circ \pm 1^\circ$

(1)(2)(3) の場合は K とし "ほぼ" 同じ値を与えるが
(4) の場合は まったく逆の値を与える。 α と β から γ を
知る為には、更に β の方向での 蛍光遷移モーメント
の方向を知る必要がある。

$\beta = 2^\circ$ の流動場で 蛍光偏光度を測定できるような図14に
示されているような装置を作製した。光学系は同時に
図に示されている。 $\beta = 2^\circ$ の励起光は流れに対し直交した
線偏光を入射する。この場合蛍光分子の配向がランダム
な時は、流れに対し直交成分の 蛍光強度 I_{HH} 及び
平行成分の 蛍光強度 I_{HV} は等しくなる。

流動により、 β 蛍光分子が配向し、その 蛍光遷移モーメントが
流れに対し直交方向にあるとしたら、 I_{HH} は流動で配向
させるとして、増加し一方 I_{HV} は減少するはずである。

(4) の場合が起る それぞれの遷移モーメントの幾何学的関係
を考えると 図15に示されているように 蛍光遷移モーメントは
F-アクテンの長軸に対し平行方向にある。(1)(2)(3) の場合は、
すべて 蛍光遷移モーメントは F-アクテンの長軸に対し直交
方向にあることは明らかである。

図16に得られた結果が示されている。即ち流動により
F-アクテンを配向させると I_{HH} は増加し I_{HV} は減少する。
 $\alpha = 2^\circ$ から (4) の場合は否定されるが、今実験精度を
超える $\alpha = 2^\circ$ なる (1)(2)(3) のいずれの場合か已に決定する事は
できない。

いずれにしても アジニン平面は F-アクテンの長軸に対し
ほぼ直交し 結合していると結論する。

IV. アクテンにおけるヌクレオチド結合部位はどれだけ内部にあるかについて、一 蛍光消光法を使って。

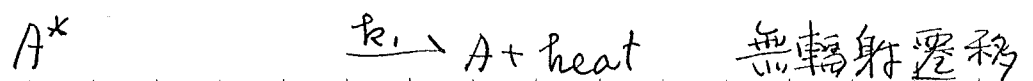
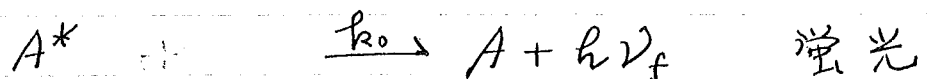
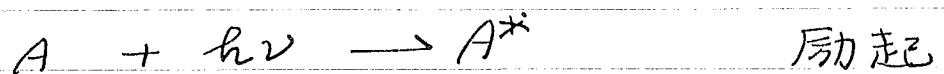
まず"蛍光の消光過程を考える。

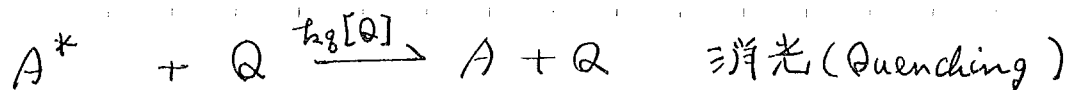
基底状態にある蛍光分子(A)が光を吸収すると、その分子は励起状態(A*)になる。このエネルギーは必ずしもすべて蛍光として放出されるとは限らず、一部は同一分子内で無輻射遷移により結局は熱の形で周りの媒体中に放散される。この分子内での無輻射遷移は基底状態の高い振動準位へのエネルギー移動を経て起る。いわゆる内部転換によることば"圧倒的"多いと考えられる。

更に消光剤として知られているもの外部から加えると、これら分子間の衝突により、蛍光を放出せず"励起状態から基底状態へと遷移する。この現象は動的消光として知られているものがある。

例えば"トリプトファン"の消光剤として、 I^- , O_2 , アクリルアミド等いくつかの分子が知られている。しかしこれらの分子を他の蛍光分子に適用した場合、蛍光を消光するとは必ずしも限らない。一般に消光作用は蛍光物質と消光物質の組合せに依存し、その材料構成も単純ではない。[19]

蛍光の消光が励起状態にある蛍光分子(A*)と消光剤分子(Q)との encounter によるとすれば、消光の起る過程は次のように表わすことができる。





これを蛍光強度及び蛍光寿命で表わしてみよう。
 今蛍光寿命が単一の τ だけの場合を考えよ
 時刻 t における蛍光強度 $f(t)$ は 14 式で表わされる。

$$f(t) = f_0 e^{-t/\tau} \quad (14)$$

従って定常状態における蛍光強度 F は 15 式で与えられる。

$$F = \int_0^{\infty} f(t) dt = \tau f_0 \quad (15)$$

従って蛍光強度と寿命とは比例関係にあることが分る。
 今 F_0, τ_0 を Quencher 分子 (消光剤) が存在しない
 時の蛍光強度及び蛍光寿命とし、 F, τ を Quencher 分子
 が存在する時の蛍光強度及び蛍光寿命とすると 16 式になる

$$\begin{aligned} F_0 &= k_0 / (k_0 + k_1) \propto \tau_0 \\ F &= k_0 / (k_0 + k_1 + k_q[Q]) \propto \tau \end{aligned} \quad (16)$$

従って 15 式の f_0 の値が Quencher 分子が存在するときと
 ない時とで変化する。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] = \tau_0/\tau \quad (17)$$

となり K_{sv} は Stern-Volmer 定数とよばれる

上式より明らかになるように

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \quad (18)$$

で与えられる。

従って Quencher 分子の濃度をかえり F_0/F をプロット
 すれば K_{sv} が得られ、更に蛍光寿命を知り
 べければ衝突の頻度が分る。

これら消光が2分子間の衝突によつて起るものであつたら、もし
蛍光分子が蛋白質の持つ高分子に結合しないか、組込まれて
いるならば、その蛍光分子が単独で存在する時と較べ
その消光作用はどうかとも言へる。よつて、その蛍光分子が
蛋白質内部でどこに外部から遮蔽されているか
を知ることが出来る。例へばもし蛋白質の表面に結合して
おれば、容易に Quencher 分子と衝突を起し消光され
る。又完全に内部に埋れてしまつておれば、外部から
Quencher 分子を加へても、それは蛋白質分子の構造やセグメント
により邪魔をされて蛍光分子と衝突する事は出来ず
消光はほとんど起らなかつたであろう。

従つて今 ϵ -ATP が P74 分子に結合する場合、その
消光過程を調べよつて、 ϵ -ATP (ϵ -ADP) が
G-P74 (F-P74) のどこに内部深く結合されて
いるかを知ることが出来る。即ち ϵ -ATP は 30 nsec 前後の
比較的長い単一の寿命を持つておる。その消光作用を
容易に蛍光寿命変化から知ることが出来る。

まず ϵ -ATP の Quencher 分子として I^- 及び u アクリルアミド ($CH_2=CHCONH_2$)
が作用するを調べる。

図内は KI 及び u アクリルアミドの濃度を横軸とし
 F_0/F (or τ_0/τ) をプロットしたものである。これら
 KI 及び u アクリルアミドは ϵ -ATP の Quencher 分子として
作用する事が分る。

この結果から式 17, 18 を使って k_q を求めると KI と ϵ -ATP
の場合 $2.7 \times 10^9 \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-1}$ となり、アクリルアミドと ϵ -ATP の
場合 $2.2 \times 10^9 \text{ sec}^{-1} \text{ M}^{-1}$ となり、これら分子の拡散定数を
考へると、消光の確率は非常に高い事が分る。

これら Quencher 分子を用いて G-P74 (ϵ -ATP) と F-P74 (ϵ -ADP)
の Quenching 実験を行つた。まず、これら Quencher 分子の

アクリンへの影響を調べる必要がある。これは Quencher 分子の存在のため、蛋白質の構造がかなり変化する場合には、Quenching の解釈を行う時の種々の因子が入り来り不明確になり得るのである。

前述したようにアクリンは低塩濃度の中性 pH 領域で G-アクリン状態をとり、これは中性塩として KCl 等を加えると F-アクリンに重合する。

一方アクリルアミドは非イオン性の低分子であり、これを 1M 迄 G-アクリンに加えてもアクリンの重合は起らない。もし更にこれに KCl を加えると G → F 変換が正常に起り、F-アクリンの量はアクリルアミドの存在量によらず一定である。(図 18 参照) 従ってアクリルアミドはアクリンの G-状態を「置き」又変性も起させない為 G-アクリン (ε-ATP) の Quencher 分子としてすぐれている。又これは F-アクリン (ε-ADP) についても勿論有効である。

一方 KI はイオン性の分子であり、その濃度によってアクリンに対し 2 面 の作用をもち、即ち 0.1M 迄の濃度では KCl の時と同じように、G-アクリンを F-アクリンに重合させるが、濃度を更に上げると F-アクリンを G-アクリンに脱重合させる効果がある。

図 19 に F-アクリンの量の KI による濃度依存性を示す。これらみると KI を Quencher 分子として使う場合には、G-アクリンには使わず、F-アクリンの場合に限る、それも 0.1M 迄の条件で使用した。

今述は G-アクリンは容易にその結合 ATP を溶液中の free ε-ATP と交換する為、アクリン分子の表面近くのアクリン分子と結合しているのは T₁IP と思われていた。しかしながら G-アクリンに結合した ε-ATP の Quencher による消光を測定してみると、free ε-ATP の場合に較べ 2 倍以上も衝突頻度が減少した。図 20 はアクリルアミドによる G-アクリン (ε-ATP)、F-アクリン (ε-ADP) 及び free ε-ATP の

消光を表わしている。この大きな消光頻度の減少は、 γ -ATPがどれ程外部から遮断されたかを考察する為に、この通報されている他の例についてみてもよい。

Weber等は、 γ -ATPの分子の Quencher として O_2 分子を用いて調べている。[20]

γ -ATPの分子は DNA の二重らせんの塩基平面間にもぐり込むことが知られている。[21] この時 free γ -ATP の場合に較べ、どれ程消光頻度が減少したかを調べてみると、 γ -ATP が G-アクトンに結合した時の変化の方がずっと大きいことが分る。従ってこの結合アクトンのアクトン結合部位は蛋白質内部深く裂け目の中にあり、そのアクトン部位がきつともぐり込むと思われる。このことは前述したように、アクトン結合部位が差吸収でみてジオキサン程度のかなり非水性の強い領域であるといふこととよく符合する。

更に F-アクトンの場合には、図 20 の見方のように、ほぼどの向きが正しいから、少なくともその実験条件 (15°C) では、ほぼ完全にその結合アクトンは外部と隔離されていると考えられる。

V. F-アクトンの構造の熱的ゆらぎ

室温付近の温度では F-アクトンは、その結合アクトンとほぼ完全に交換しないことが知られている。[6]

一方温度を上げると、F-アクトンはその結合 ADP と外部の ATP と交換し、再び ATP を ADP と P_i とに加水分解し、ADP の形でもぐり込む。即ち ATP の加水分解活性をもつことが知られている。[22] そして種々の温度での ATP の加水分解速度を測定することにより求めた活性化エネルギーは、ほぼ 30 kcal M⁻¹ の大きな値を

もつことが報告されている。^[22]

従って、F-アクトンは決して剛体分子として存在するのではなく、かなり熱的にゆらぎを持つ flexible polymer として存在しているものと思われる。そこで F-アクトン(ε-ADP)の蛍光減光の測定により、F-アクトンが熱的にゆらぎ(ヌクレオチド結合部位のゆらぎ)を、ナノ秒時間領域でのアクトン分子内のセグメント構造のゆらぎとしてとらえてみた。

前述したように F-アクトンは室温付近の温度(15°C)では Quencher 分子をアデニン結合部位に近づけないが、温度をあげることで、Quencher 分子は F-アクトンの内部に入り込むことができるようになる。即ち、図 21 に示されているように、温度をあげることで、Quenching 過程がみられるようになる。これは熱的平衡反応であり、F-アクトンの変性によるものではないことは、任意の温度をくりかえし測定すると同じ値を与えるという事から証明された。

これを定量的に解析する為、式(17.18)を変形した次の式を使う。

$$\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right) = k_q [Q] \quad (19)$$
$$k_q \propto \text{Exp}(-E_a/RT)$$

ここで E_a は衝突の Quenching 過程の活性化エネルギーである。従って、 $\ln\left[\left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0}\right)/[Q]\right]$ をプロット (Arrhenius plot) すると、その傾きから、活性化エネルギーの大きさがわかる。

図 22 に F-アクトン(ε-ADP) の τ に対する Quenching の速度定数を式(19)を使って求めたものが Arrhenius plot されている。同時に free ε-ATP の場合の Arrhenius plot も示されている。

これらより明らかになるように、F-アクトンの結合している ϵ -ADP の消光の活性化エネルギーは明らかに free ϵ -ATP と KI との diffusion control な消光過程の活性化エネルギー ($\approx 4 \text{ Kcal M}^{-1}$) よりも大きな値 ($\approx 12 \text{ Kcal M}^{-1}$) を持っている。

これは、 ϵ -ADP を外部と隔離しているアクトン分子内のセグメントが 12 Kcal M^{-1} の活性化エネルギーでゆらぎがあり、ナノ秒時間領域内でこれに対する通過穴を作り、塞いぢりしているものと思われる。

蛋白質固有の燻完分子トリプトファン⁹の消光の実験でもやはり蛋白質分子内のセグメント構造が熱的に大きくゆらいでいることが既にいくつか報告されている。^[20, 23]

そして、このアクトン分子内のローカルな領域でのセグメント構造のゆらぎが、F-アクトンが ATP 加水分解活性をもつようになるというマクロな領域での構造変化の前駆現象になっているものと思われる。

VI. F-アクトンとミオシンの相互作用による生じる F-アクトンの構造変化

今迄主にアクトンの構造とその結合ヌクレオチドを通してみしてきた。筋収縮を理解する上でアクトンの構造とその変化を知ることは非常に重要なことと考えられる。一方アクトンがミオシンと相互作用した時どのような構造的ゆらぎが生じるかを知ることは大変興味ある事である。今迄述べてきた実験結果は、この問題に対し接近していく上でその基礎となるものと思われる。そこで次に一つの応用例として、ミオシンとの相互作用による F-アクトンの

構造変化とF-アクトンの結合比、 ϵ -ADPの偏光偏光度の変化とF指標
について試みることを試みた。

① 筋肉はその収縮時においてはATPをADPと P_i とに分解し
その化学的エネルギーを力学的エネルギーに変えて張力を発生する。この時
ATPを分解するのはミオシン分子が荷っているが、このミオシン分子のATP
分解活性はアクトン分子が存在すると著しく増加する。これはこの
アクトンの活性化効果はアクトン単量体が協力的に働くことによる
かという説が出されている。[27]

② 図23に示されるようにF-アクトンとミオシンの生理的活性が
存在する頭部(HMMコア部分)を加えていくと、その散乱光変化
を見ると、アクトン分子2にHMM分子1が結合して飽和に達する迄
直線的に増加していくが、偏光偏光度 P の値は、最初大きく減少し
後にHMM量が增加すると再び P は元の値近く回復するという
Biphasic現象を呈する。その変化の最大量はアクトン分子9個に対し
HMM分子1個結合することによって生じる。この現象は先に坂和田が
流動複屈折の変化による[24]、更に藤自等が準弾性光散乱
による現象[25]と平行関係にある。この最大変化が
HMMとF-アクトンの結合が飽和に達する前に起るということは、
この構造変化にアクトン-アクトン分子間の相互作用が強くなること
による協同現象であることを強く示唆している。

更にアクトン分子の構造上にはトポミオシン分子が結合している時には
この変化の最大量と異なるアクトンとミオシンの比が30:1の構造
変化する。(図22参照) このことはトポミオシンがアクトン分子の
上に結合することによりアクトン-アクトン間の相互作用が増加し
協同現象が増強されると思われる。このアクトン間相互作用の
存在が筋収縮におけるアクトン分子の重要な働きを荷っている
ことと思われる。

一方この偏光度 P の減少は何の由来するかと調べると
これは「偏光法」 $\gamma(t)$ を直接測定することにより
調べた。それによると $\gamma(t)$ の減衰は見られるが、 P が
減ることは「領域」 ϵ -ADPがF-アクトン分子内

References

- 1) a) Hanson, J. and Huxley, H.E. (1955), *Sym. Soc. Exp. Biol.*, 9, 228
b) Huxley, H.E. (1957), *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 631
- 2) Huxley, A.F. (1957), *Prog. Biophys.*, 7, 255
- 3) Ebashi, S. (1972), *Nature*, 240, 217
- 4) Ebashi, S. and Endo, M. (1968), *Calcium Ions and Muscle Contraction. in Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol.18, 123
- 5) Straub, F.B. (1942), *Actin II. Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3, 23
- 6) Oosawa, F. and Kasai, M., in *Subunits in Biological Systems*, p. 261 (eds. A. Timasheff and G.D. Fasman) Marcel Dekker, N.Y., (1971)
- 7) Secrist, A.J., Barrio, J.R., Leonard, N.J. and Weber, G. (1972), *Biochemistry*, 11, 3499
- 8) Miki, M., Ohnuma, H. and Mihashi, K. (1974), *FEBS Lett.*, 46, 17
- 9) Asakura, S. (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, 92, 140
- 10) Thames, K.E., Cheung, H.C. and Harvey, S.C. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 1252
- 11) Mihashi, K. and Wahl, Ph. (1976), *FEBS Lett.*, 52, 8
- 12) Higashi, S., Kasai, M., Oosawa, F. and Wada, A. (1963), *J. Mol. Biol.*, 7, 421
- 13) Miki, M. and Mihashi, K. (1977), *Biophys. Chem.*, 6, 101
- 14) a) Yguerabide, J., *Nonosecond Fluorescence Spectroscopy of Macromolecules. in Methods in Enzymology*, Vol. XXVI, part C (eds. C.H.W. Hirs and S.N. Timasheff), p. 498, Academic Press, New York, (1972)
b) Wahl, Ph., *Nanosecond Pulsefluorometry. in New Techniques in Biophysics and Cell Biology* (eds. R. Pain and B. Smith), p. 233, Wiley, U.K. (1975)

- 15) Jablonski, A., Luminescence of Organic and Inorganic Materials.
(eds. H.P. Kallmann and G.M. Spruch) p. 110, Wiley, New York,
(1962)
- 16) Wada, A. and Ozawa, S. (1964), J. Polymer Sci. A2, 853
- 17) Scheraga, H.A., Edsall, J.T., and Gradd, Jr., J. O. (1951),
J. Chem. Phys., 19, 1101
- 18) Kasai, M. and Oosawa, F., Flow Birefringence, in Methods in
Enzymology, Vol. 26, Enzyme Structure, Part C, p. 289, Academic
Press, New York, 1972
- 19) a) Förster, Th., "Fluoreszenz Organischer Verbindungen",
Vondenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 1951
b) Pringsheim, P., "Fluorescence and Phosphorescence",
Interscience, New York, 1949
- 20) Lakowicz, J.R. and Weber, G. (1973), Biochemistry, 12, 4161
- 21) LePecq, J.B. and Paoletti, C. (1967), J. Mol. Biol., 27, 87
- 22) Asai, H. and Tawada, K. (1966), J. Mol. Biol., 20, 403
- 23) Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. (1975), Pro. N.A.S., 72, 3290
- 24) Tawada, K. (1968), Biochim. Biophys. Acta, 172, 311
- 25) Fujime, S. and Ishiwata, S. (1970), J. Phys. Soc. Japan, 29, 1651
- 26) Miki, M., Kouyama, T. and Mihashi, K. (1977), FEBS Lett., 66, 98
- 27) Bremel, R.D., Murry, J. M., Watan, A. (1973) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 268

SKELETAL MUSCLE

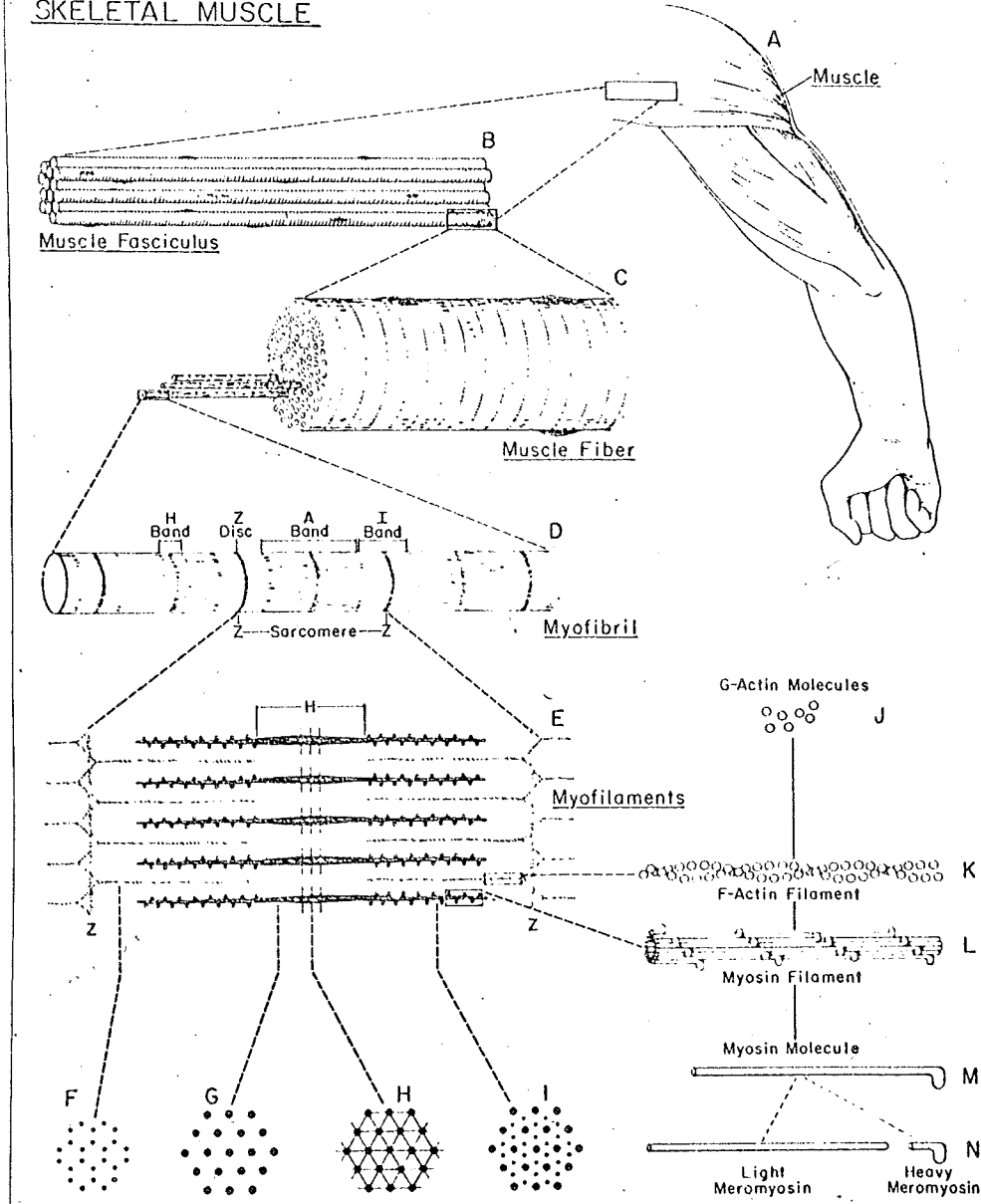


図 1 (a)

筋肉の模式図

Bloom, W., and Fawcett, D. W. (1968)
"A Textbook of Histology," 9th ed. Saunders,
Philadelphia, Pennsylvania

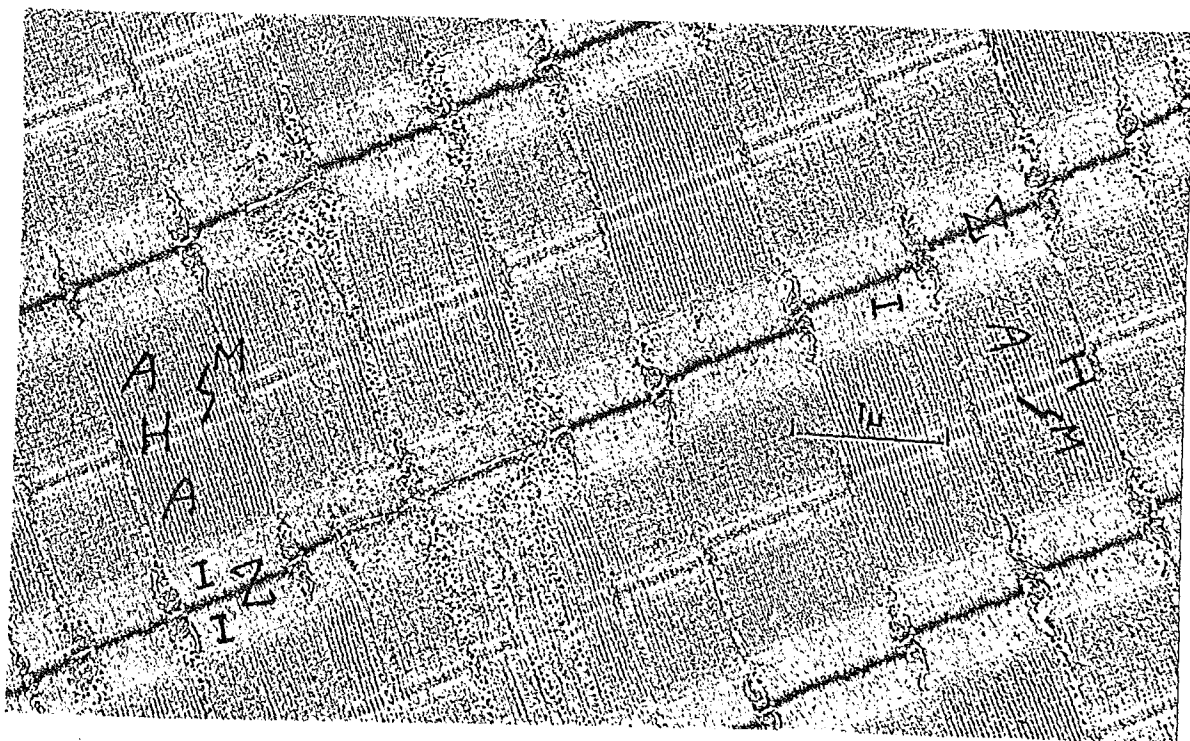


図 1 (b)

カエル^{ウツ}筋肉の微細構造の電子顕微鏡写真 (David Smith 氏)

Myofibril の軸に平行に切断

A: A-band I: I-band H: H-band

Z: Z膜 M: M line

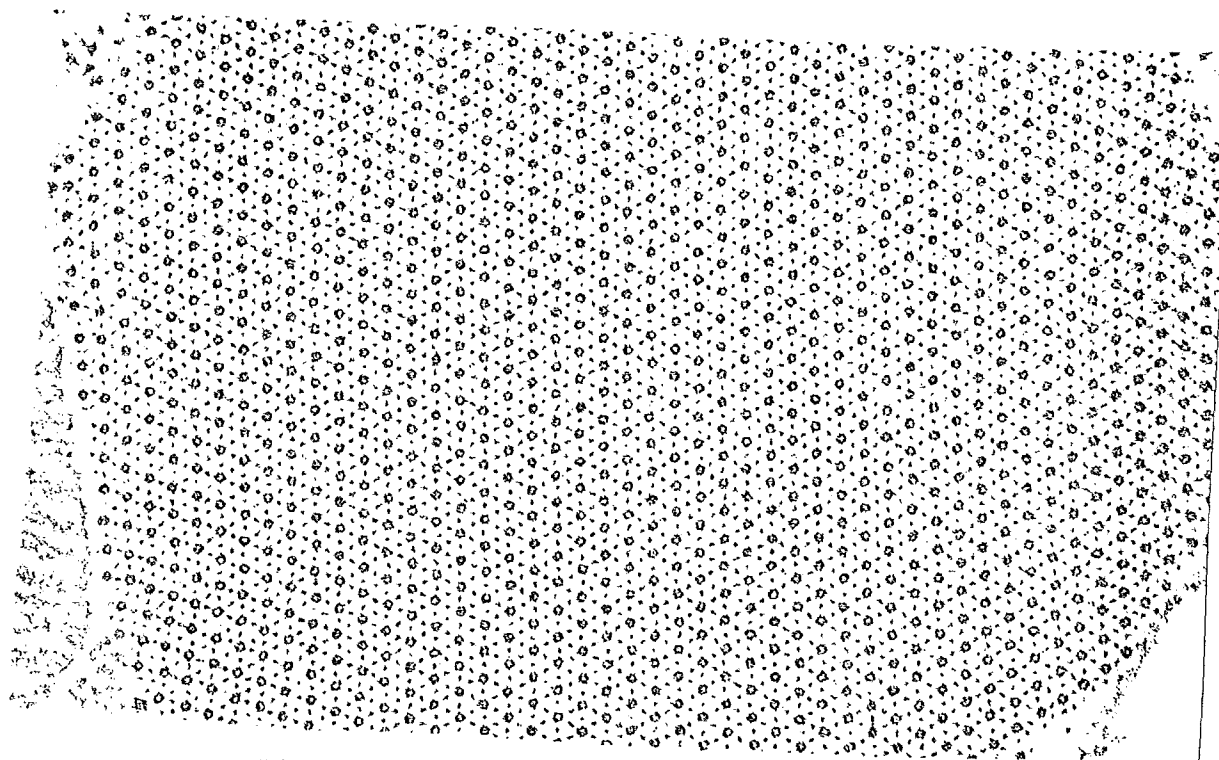


図 1 (c)

昆虫飛翔筋^{ウツ}の微細構造の電子顕微鏡写真 (David Smith 氏)

Myofibril の軸に直角に切断

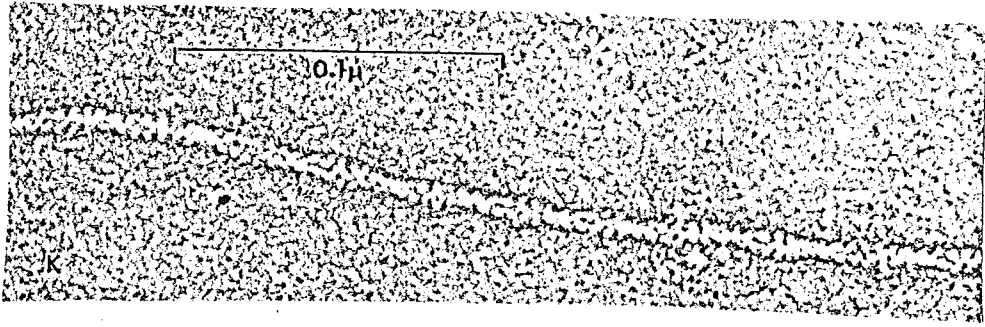


図2 (a) 細いフィラメントの電子顕微鏡写真
(Huxley, H.E から)

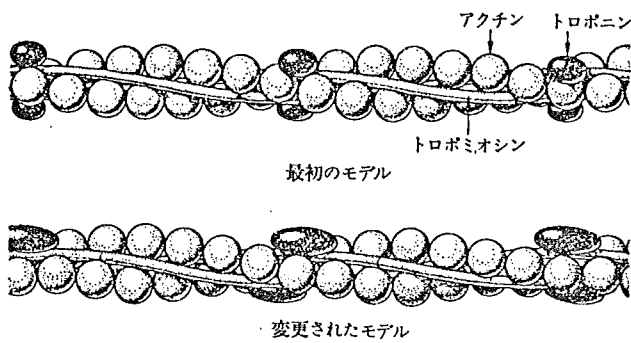
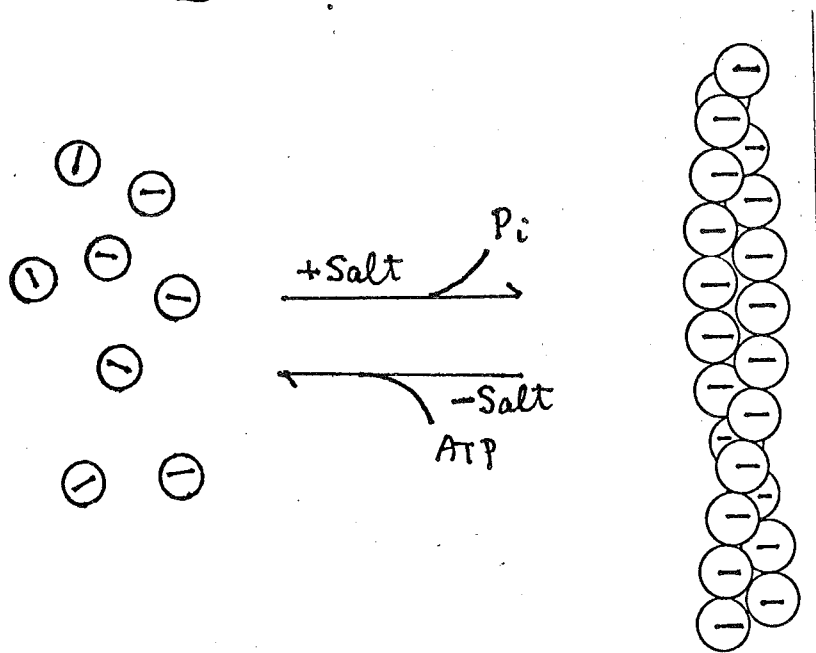


図2 (b) 江橋等により提出された
細いフィラメント上のトロポミオシントロポニンの
規則的配列のモデル^[3]

図 3



G-アクトン(ATP)

F-アクトン(ADP)

G-アクトン \leftrightarrow F-アクトンの模式図
 図で(→)は結合ヌクレオチド平面を表わす。

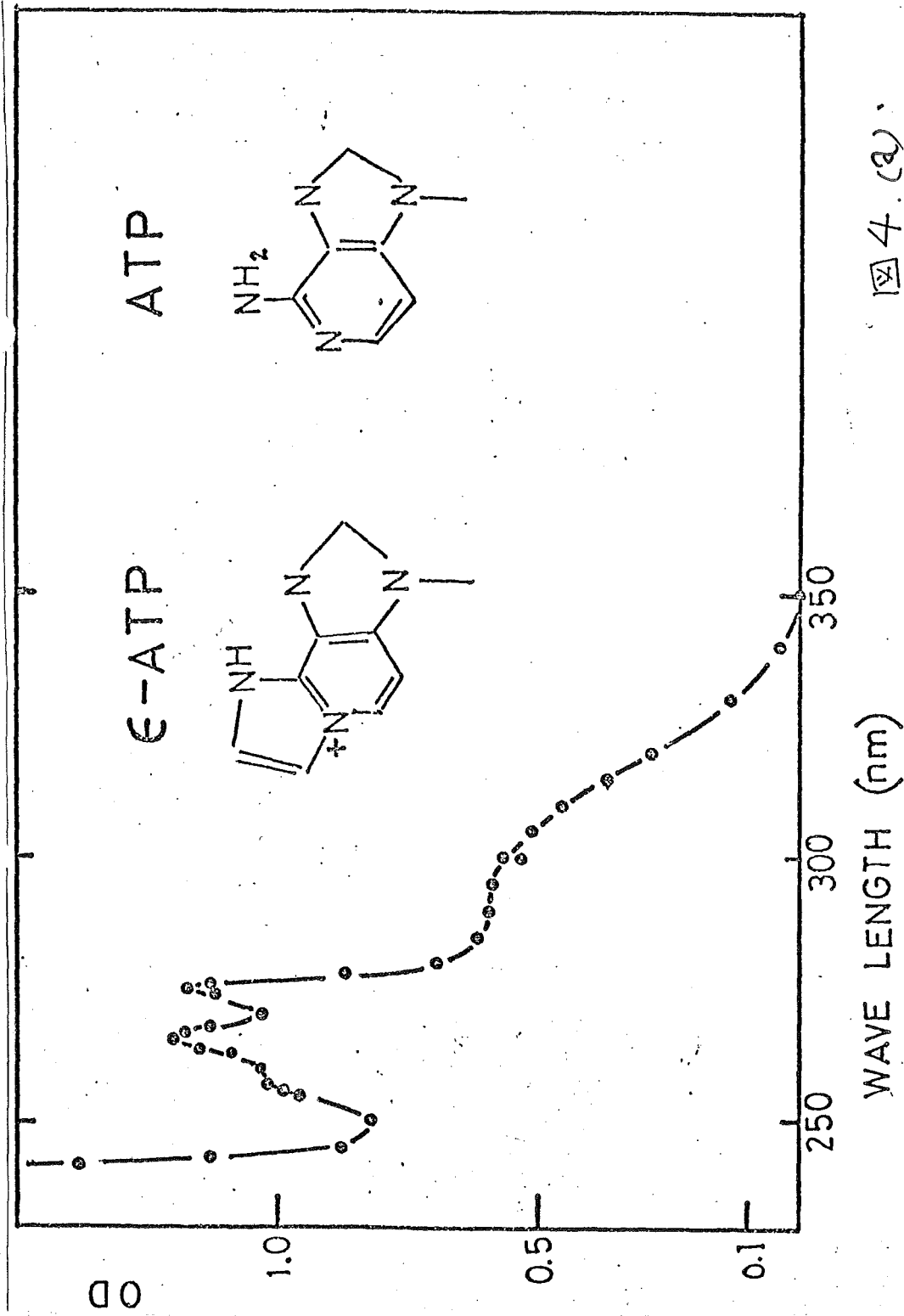


図4. (a)

ε-ATPの吸収及“ε-ATP, ATP
のP”部位の構造式

ε-ATP 209 μM in 20mM phosphate buffer (pH 5.0)

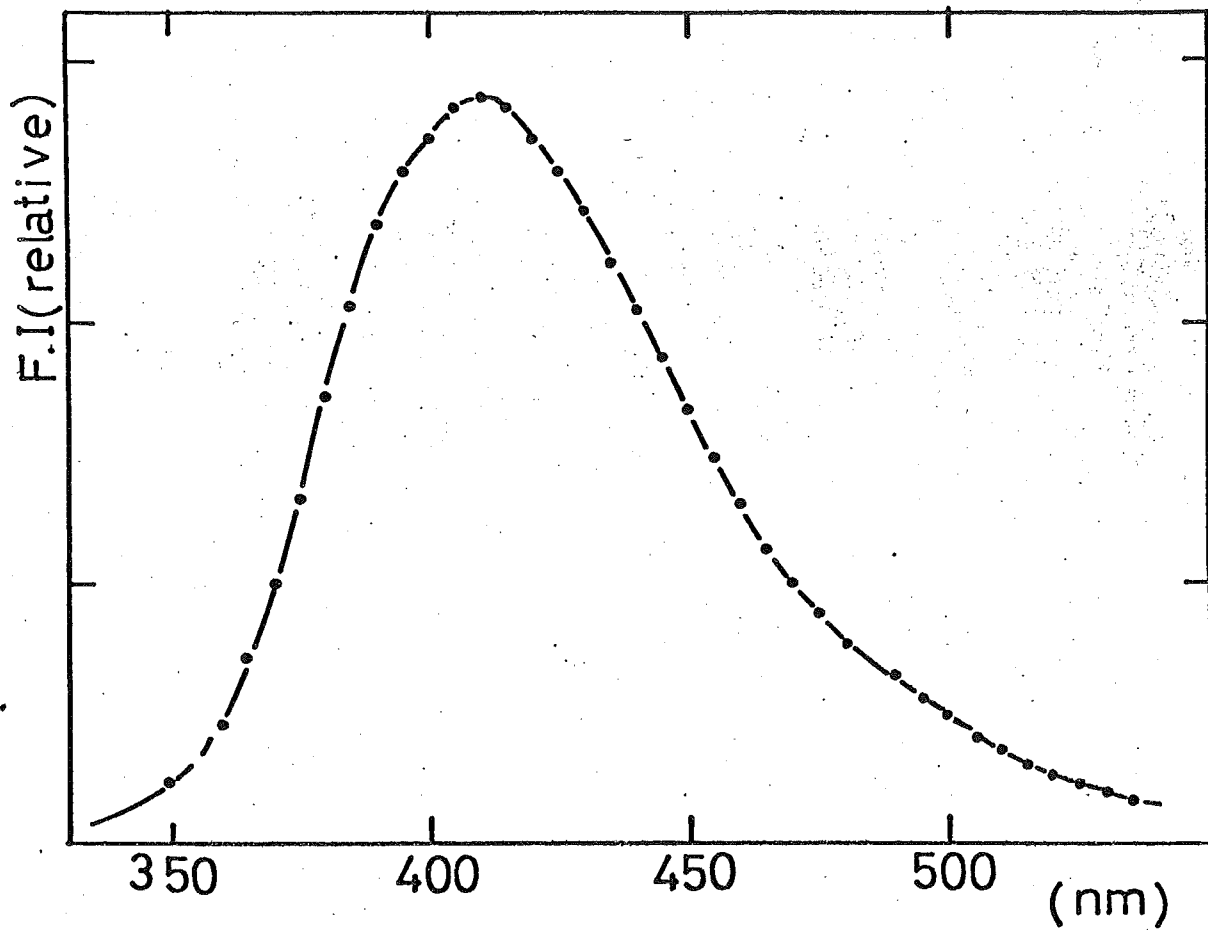


図 4 (右)

ε-ATP の 蛍光 スペクトル

Excitation 320 nm.

ε-ATP 30 μM in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0)

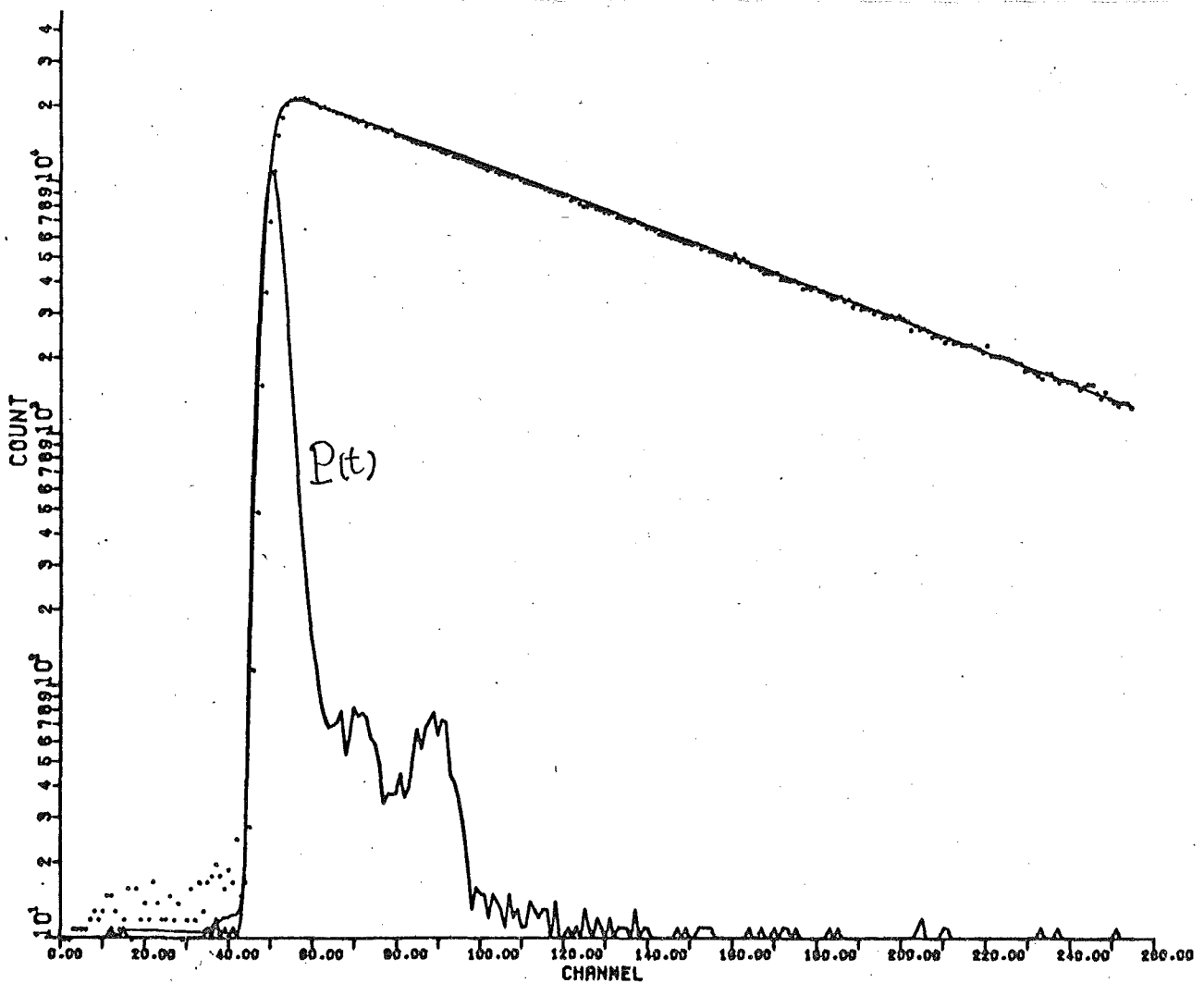


図 4 (d)

ϵ -ATP の寿命 (G-アクトンに結合した ϵ -ATP)

$P(t)$: パルサーの分布

• : 実験値

— : G-アクトンに結合した ϵ -ATP の寿命を 34.5 μ sec

と計算した曲線。

+ 寿命は Moment 法で求めた。

$$F(t) = \int_0^t P(\tau) e^{-(t-\tau)/34.5} d\tau$$

条件. 0.2 μ g/ml G-actin- ϵ -ATP

in 1mM Tris-HCl (pH 8.5) at 5°C

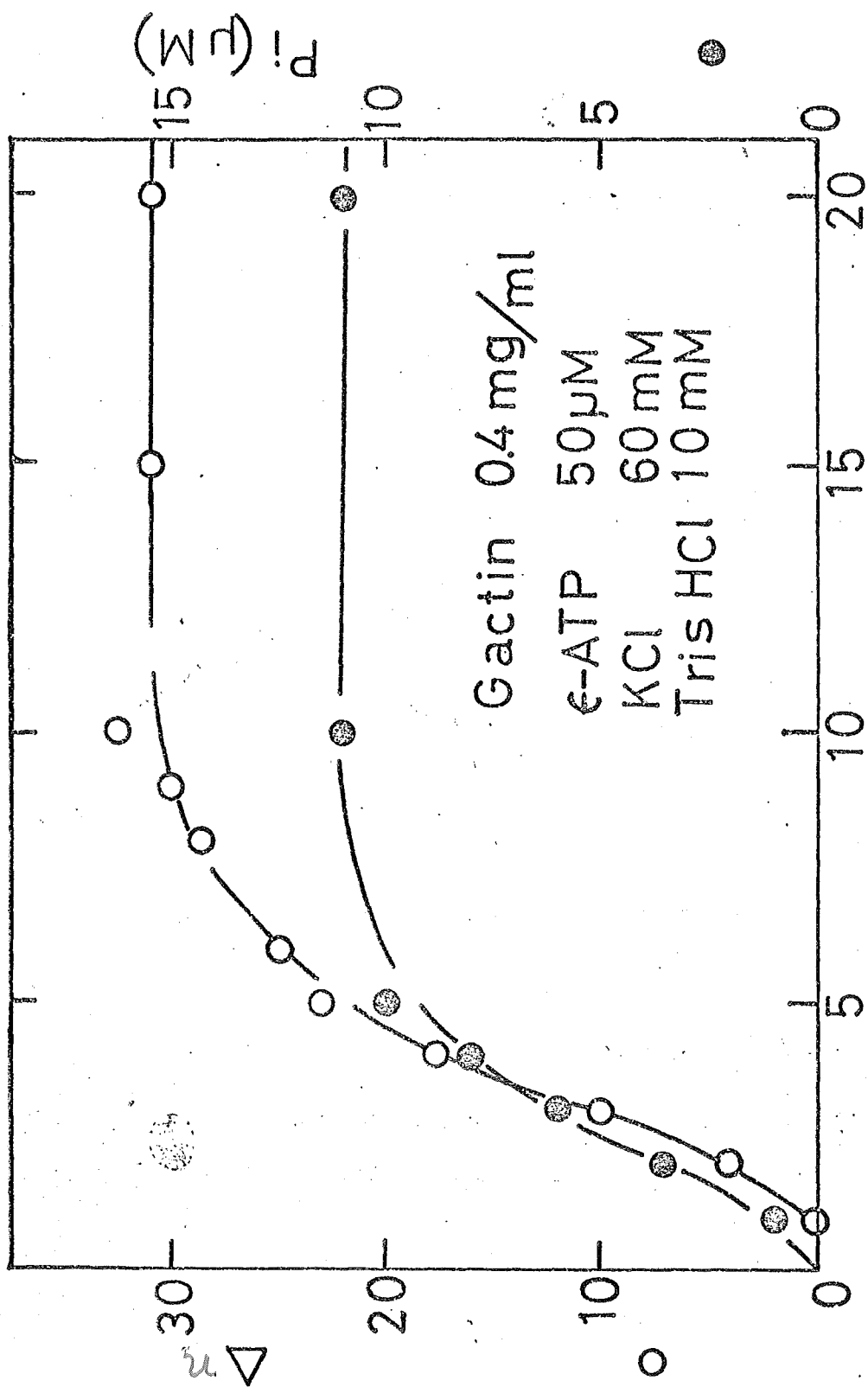


图5 (min)

G-PP4-(εATP)の Polymerization による Δn の増加 (○)

及 Pi の放出 (●)

Δn の増加と共に Pi の放出が起る。Δn の数は Pi の放出量と Pi の量と一致した。

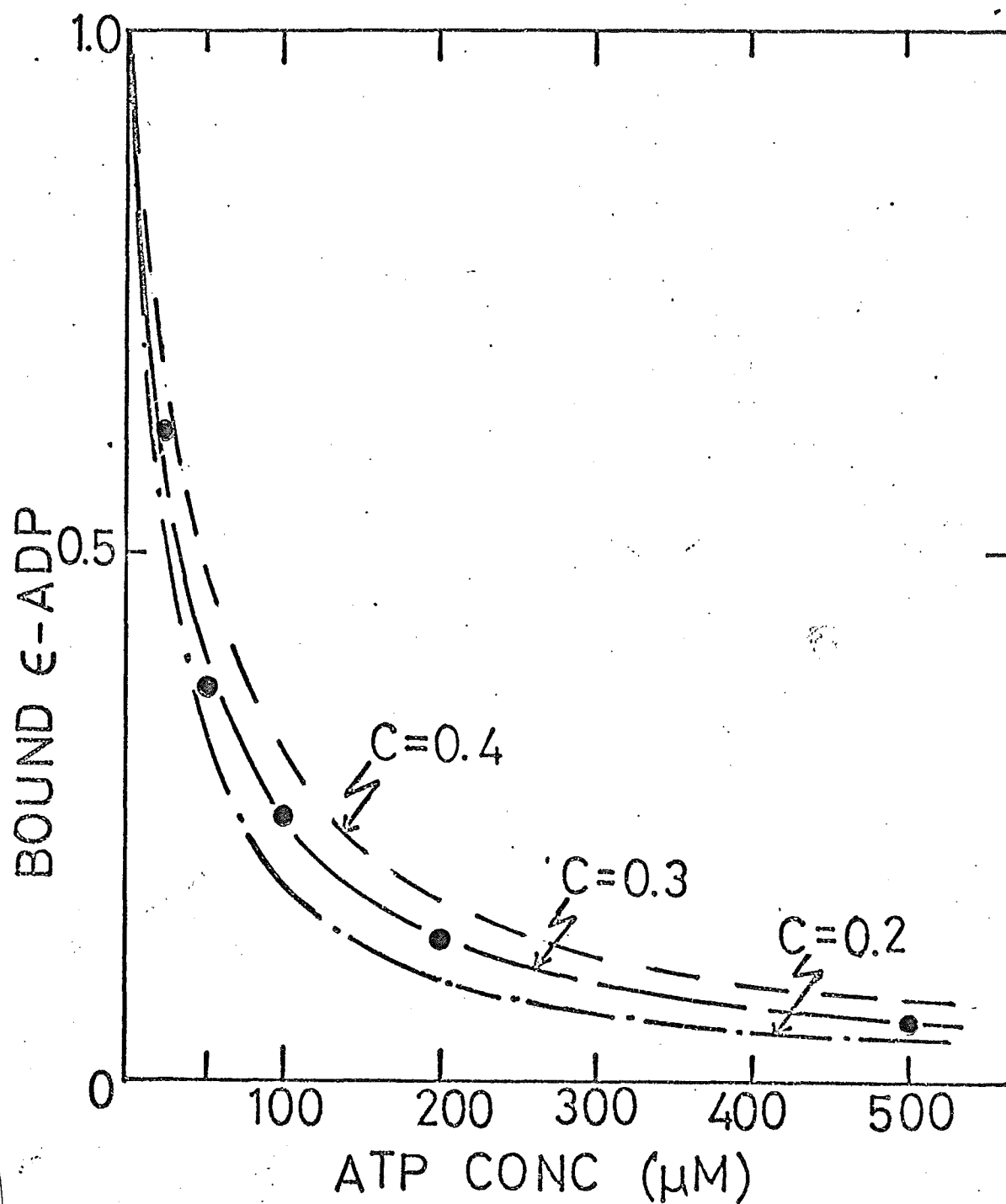


図 6.

ATP への結合した ϵ -ATP の量
 ATP=0 の時を 1 に normalize
 ● 実験点
 — C を parameter として計算曲線

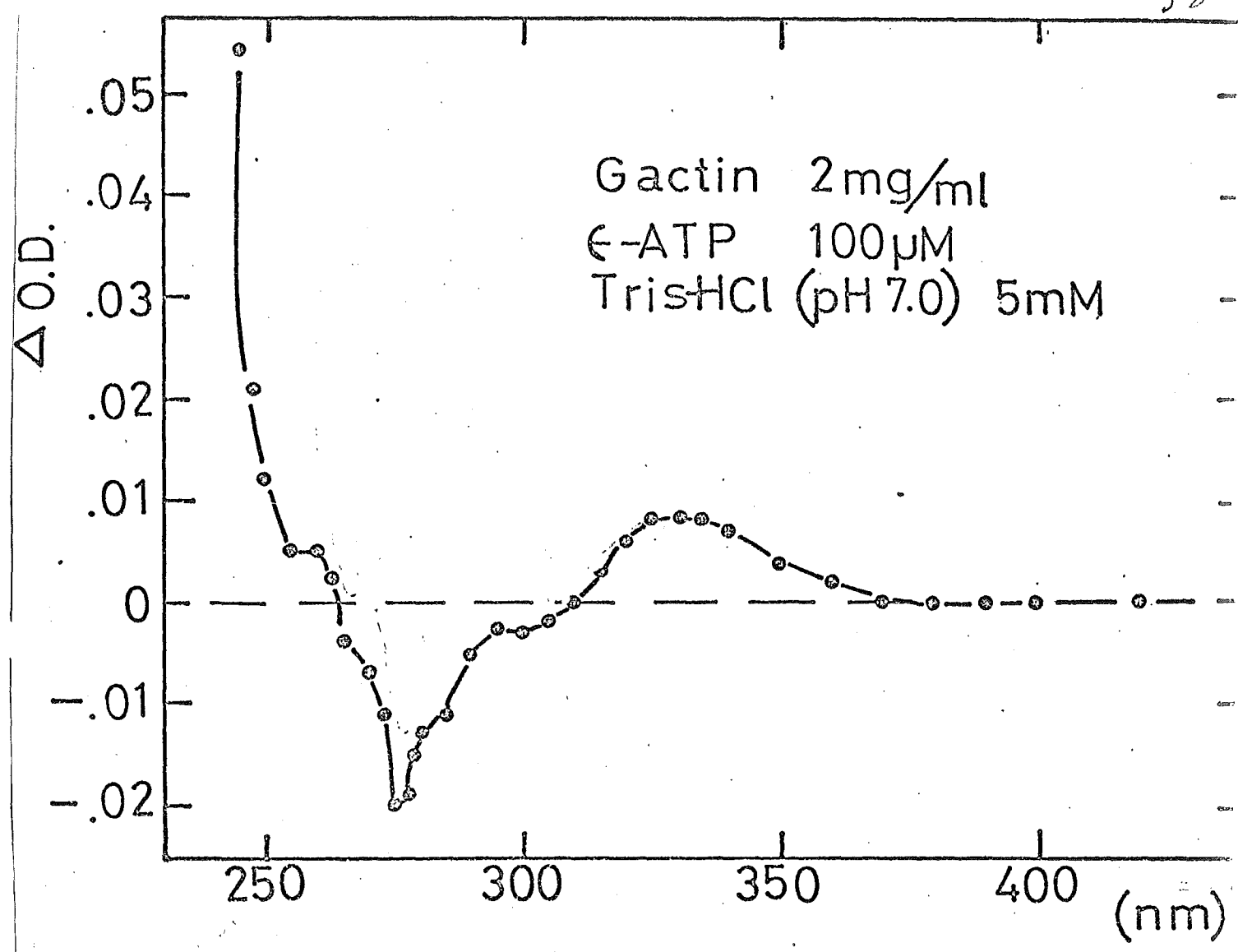


図 7.(2)

ε-ATP の G-P74 への結合した時の差吸収
Double Cell 法

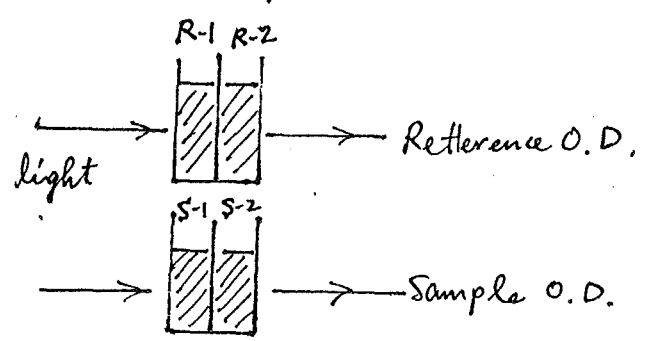
Reference Cell 1 G-P74-(ADP)
2 ε-ATP

Sample Cell 1 G-P74-(ADP) + ε-ATP
2 G-P74-(ADP) + ε-ATP

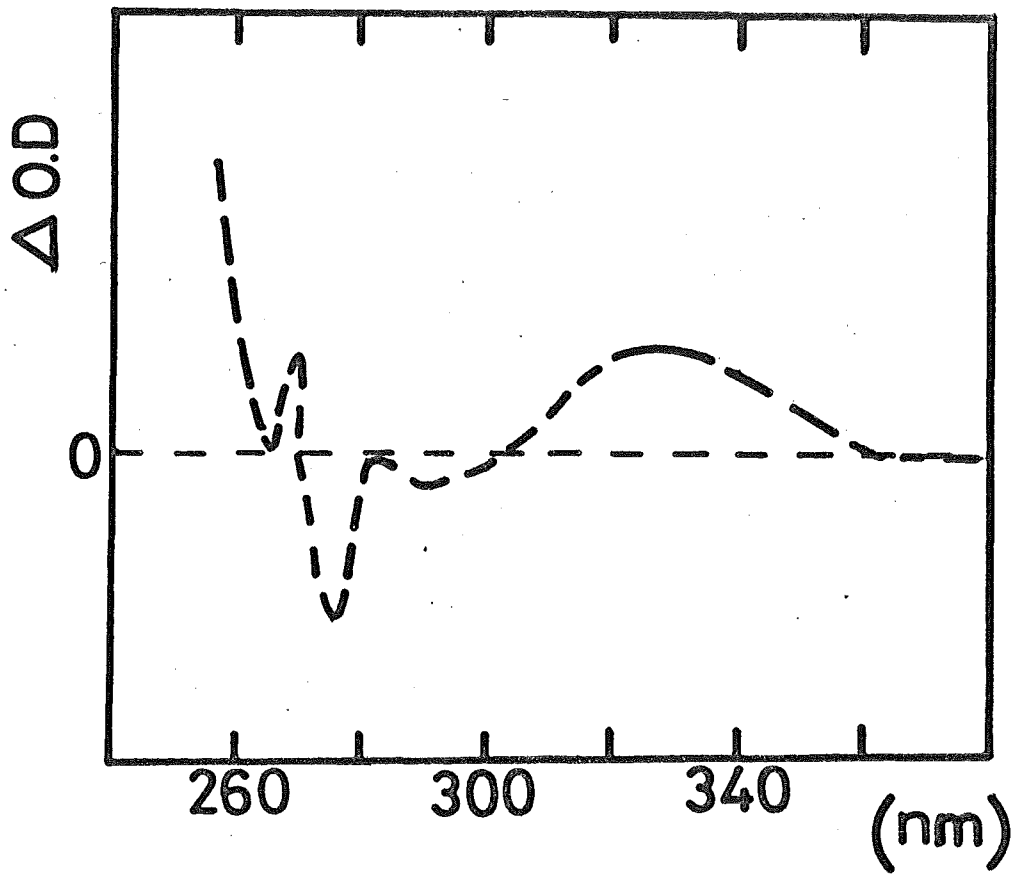
G-P74-(ADP) : 2.0 mg/ml
ε-ATP : 100 μM

in 5mM Tris-HCl (pH 7.0)

Cell の 光路幅 2mm.



$\Delta O.D. = \text{Sample O.D.} - \text{Reference O.D.}$



ε-ATP が水溶液からニオキサンに移動した時
 示す吸収変化。

[Secrist et al (1972), Biochemistry, 11, 3499]

図7. (b)

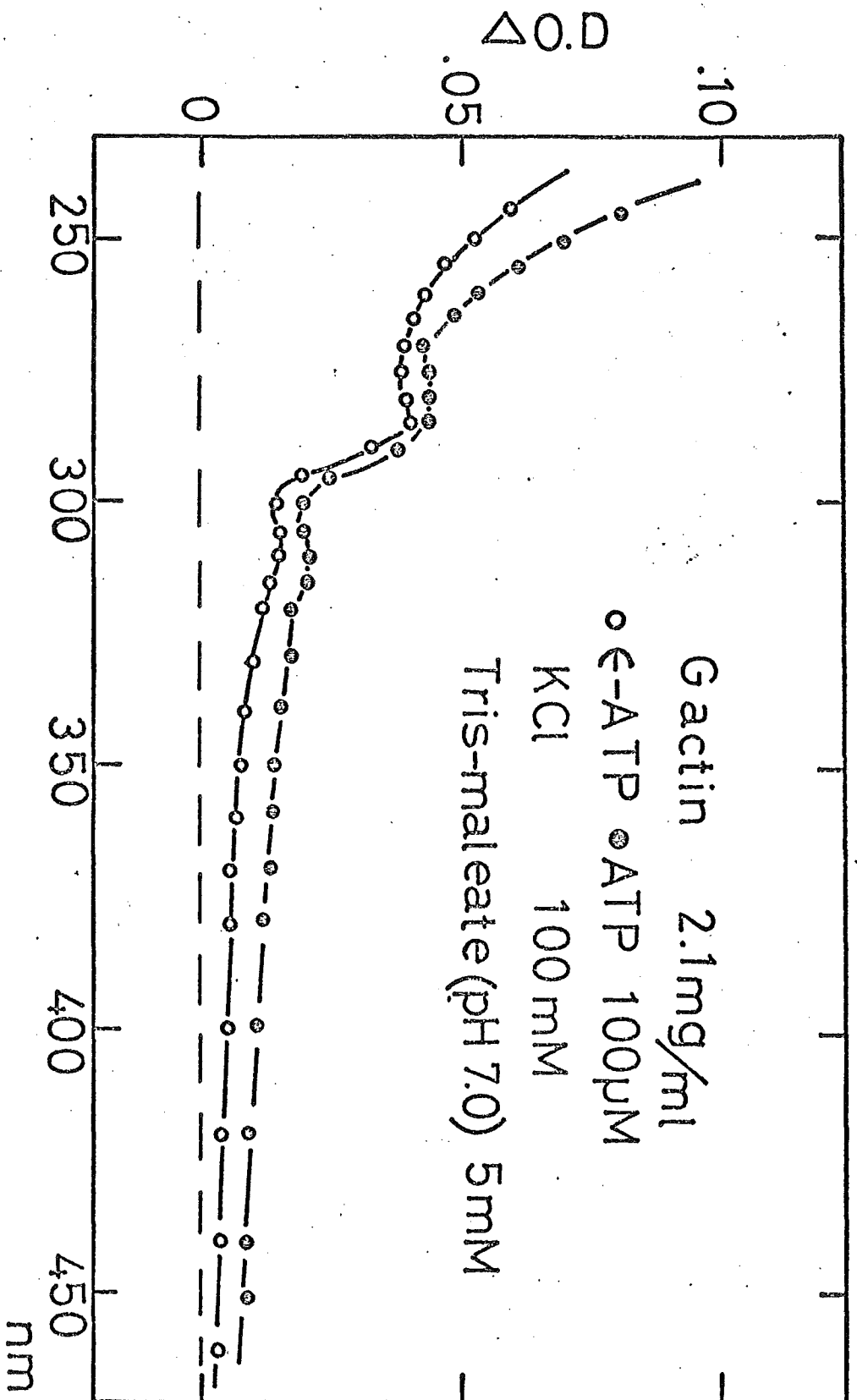


図 8

G → F 変換による P34 の差吸収

○ : G-P34 (ε-ATP) ● : G-P34 (ATP)

Reference Cell 1. G-P34 (ε-ATP) 2. KCl.
 or G-P34 (ATP)

Sample Cell 1. G-P34 (ε-ATP) + KCl 2. G-P34 (ε-ATP) + KCl
 or G-P34 (ATP) + KCl or G-P34 (ATP) + KCl

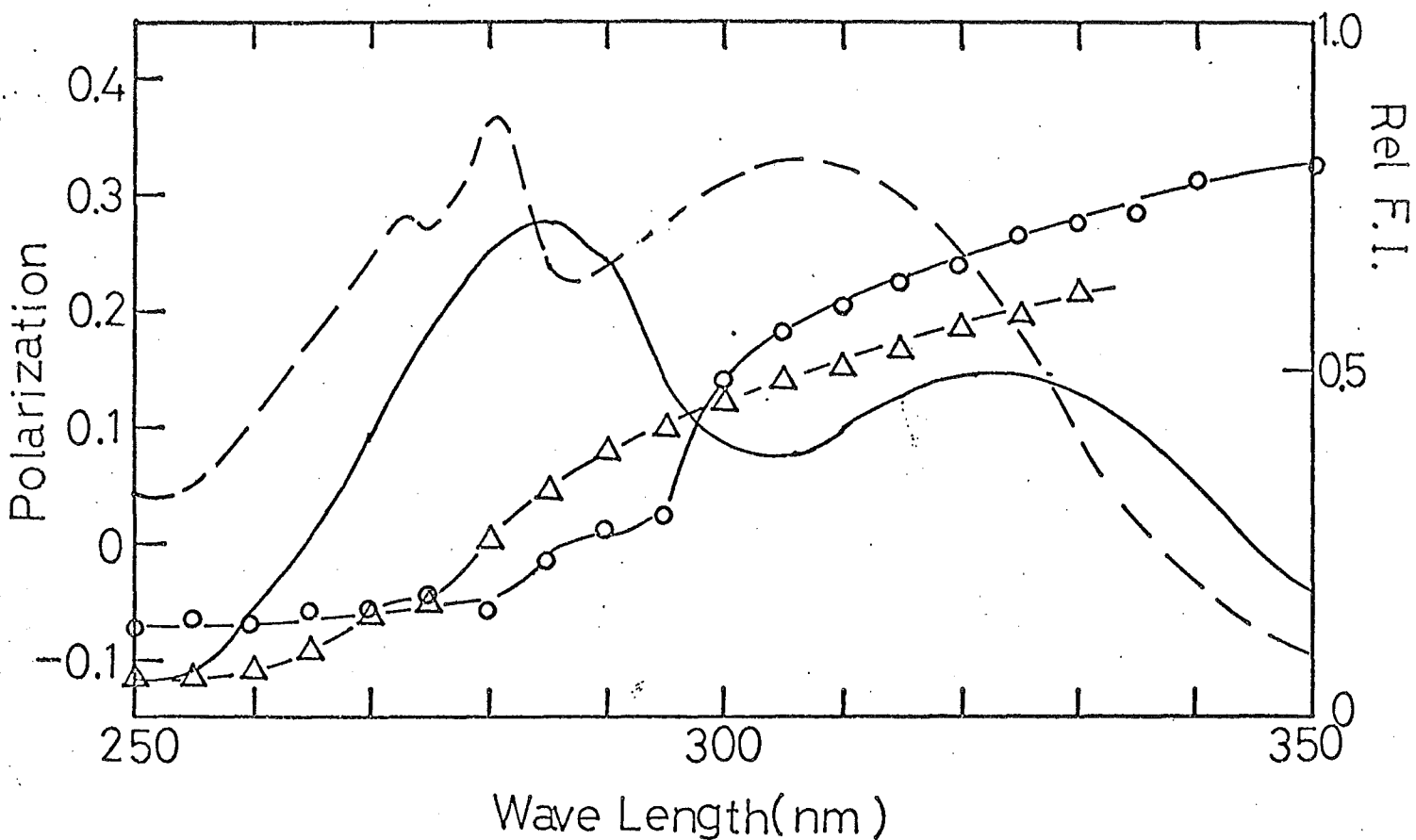


図 9.

free ε-ATP 及び F-774-(εADP) の 蛍光偏光度の波長依存性と 励起 Spectrum.

- F-774-(εADP) の 蛍光偏光度
- △ グリセリン(95%) 中の free ε-ATP の 蛍光偏光度
- F-774-(εADP) の 励起波長スペクトル (未校正)
- グリセリン(95%) 中の free ε-ATP の 励起波長スペクトル (未校正)

ε-ATP 30 μM in 95% glycerol, 20mM phosphate buffer (pH 7.0)
 F-774-(εADP) 1.0 mg/ml in 0.1M KCl, 2mM MgCl₂, 20mM phosphate-buffer (pH 7.0)

at 20°C
 fluorescence cell. 3 mm.

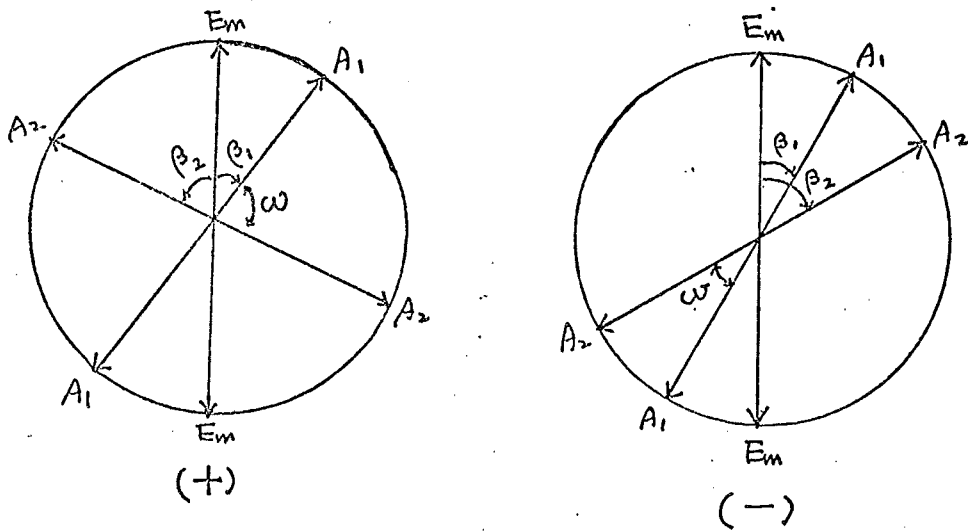


図 10

Γ 面平面上の 2つの吸収遷移モード
 及び増光遷移モードのなす角度

A_1 : 340 nm の吸収遷移モード

A_2 : 260 nm の "

β_1 : A_1 と増光遷移モードのなす角度

β_2 : A_2 と "

ω : 2つの吸収遷移モード (A_1, A_2) のなす角度.

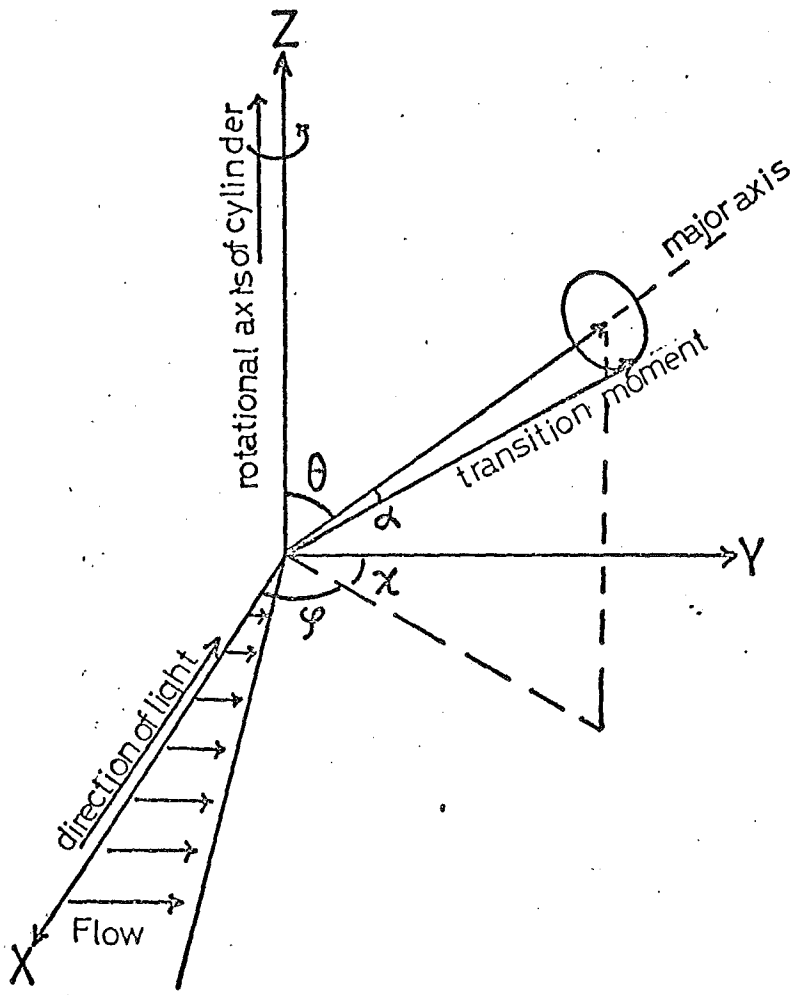


図 11.

流動 = 色性 z'' の 流の方向, 分子の配向,
 吸収遷移モーメントの方向. 及び入射光の方向
 の模式図.

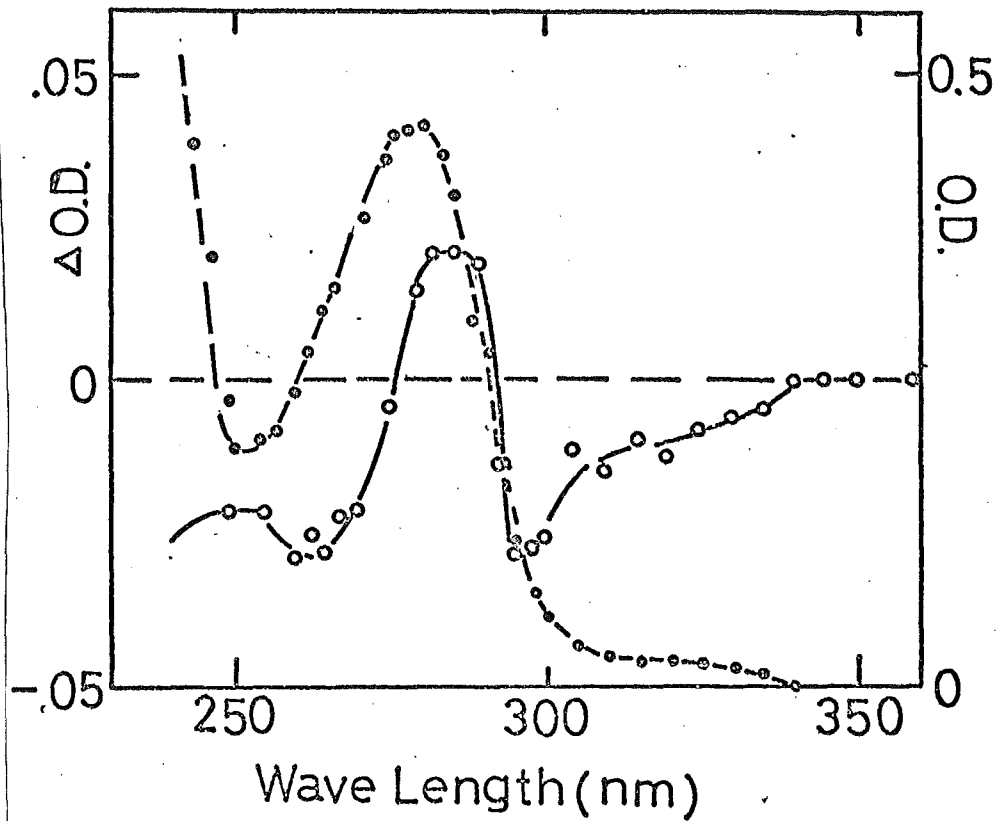


図 12.(a)

F-74-(ε-ADP)の吸収及 $\Delta\epsilon$ 流動二色性
 (●) (○)

F-74-(ε-ADP) 3.5 mg/ml

in 0.1M KCl, 2mM MgCl₂, 20mM Phosphate buffer (PH 7.0)

Optical path length 1mm.

温度; 室温.

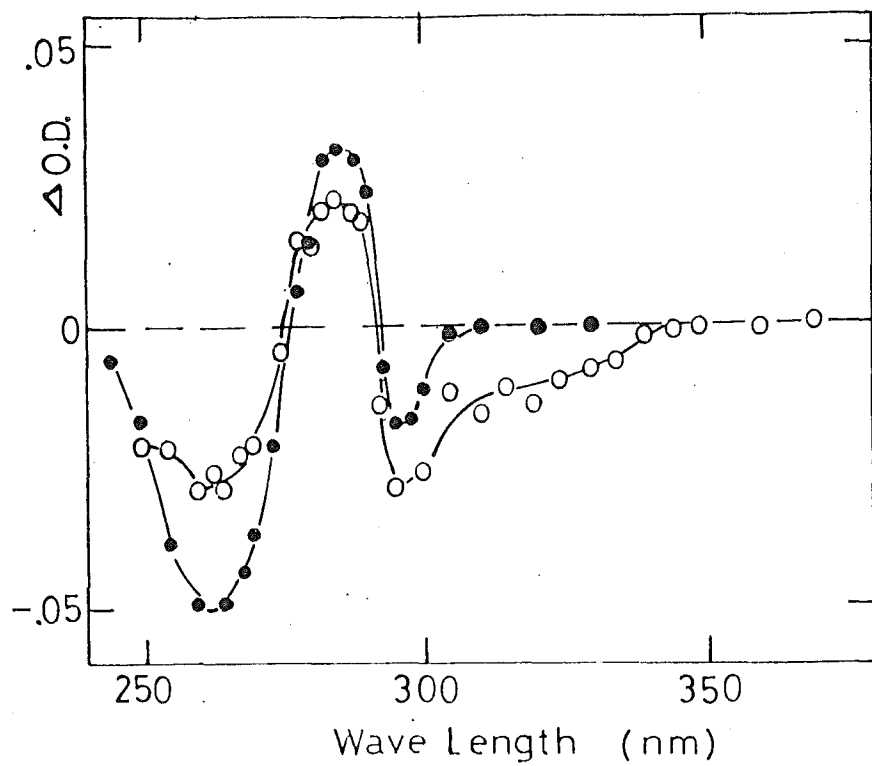


図 12 (b)

Fe-774 (ADP) ● と Fe-774 (ε-ADP) ○

の流動 = 色性

Fe-774 3.5 mg/ml

in 0.1 M KCl, 2mM MgCl₂, 20mM Phosphate buffer (pH 7.0)

Optical path length 1mm.

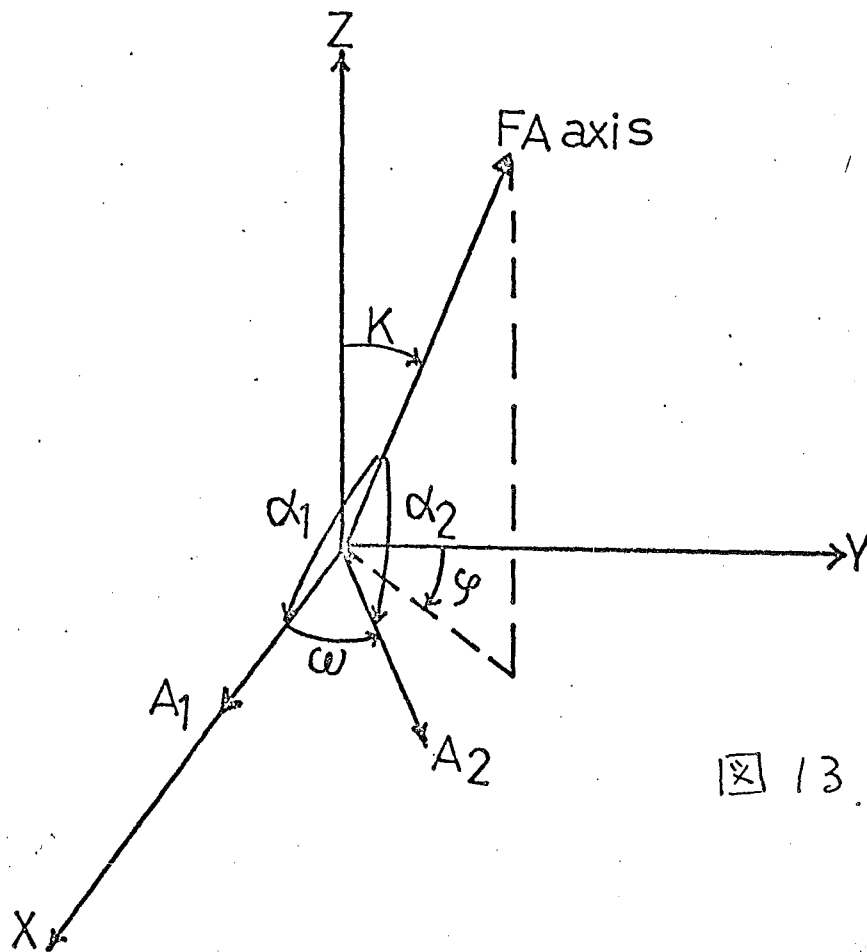


図 13

Γ 面 (X-Y plane) 上の 2つの吸収遷移モーメント (A_1, A_2)
 及 ω FA 面の長軸の関連図

A_1 : 260 nm の吸収遷移モーメント

A_2 : 340 nm の吸収遷移モーメント

ω : 2つの吸収遷移モーメントのなす角度

α_1 : A_1 と FA 面の長軸のなす角度

α_2 : A_2 と FA 面の長軸のなす角度

K : Γ 面 と FA 面の長軸のなす角度

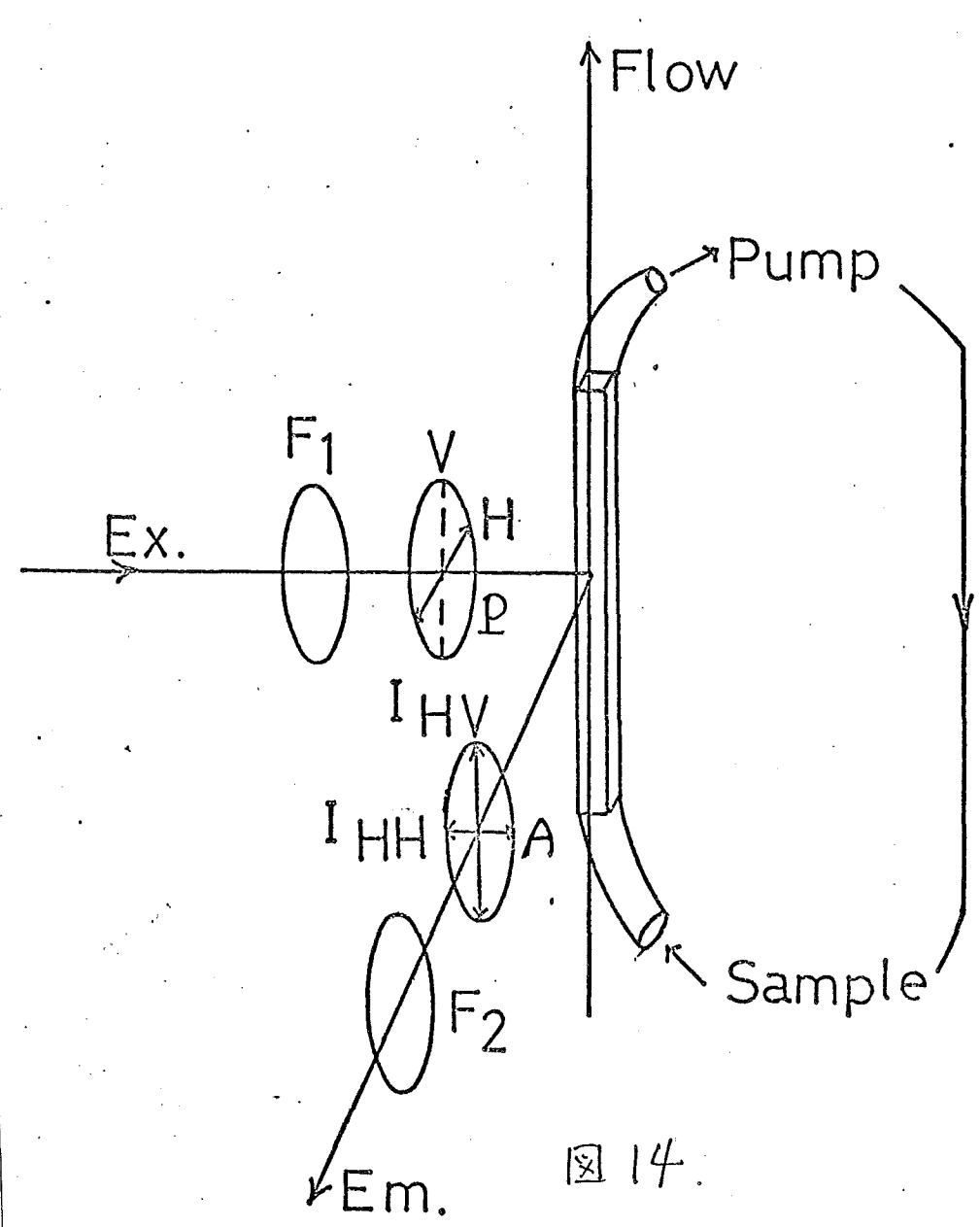


図 14.

流動場で蛍光偏光を測定する装置の模式図.

- F_1 : フィルター UVD25
- F_2 : フィルター UV39
- P : 偏光子 : 励起光は水平方向に偏光させる。
- A : 蛍光の流れに対する平行成分 (I_{HV}) 及び直交成分 (I_{HH}) を分離する。

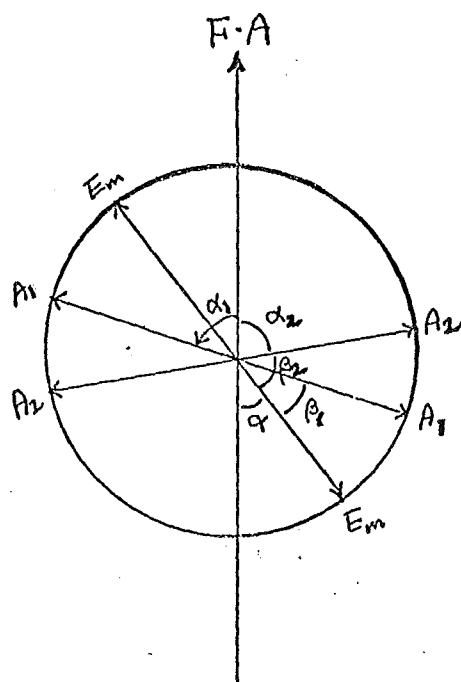


図 15

Case (4) のときの増光遷移モーメントと F -アキンの長軸
とが持つ角度 α

π -平面は F -アキンの長軸に平行にある。

$\therefore \alpha =$

$$\alpha = \pi - (\alpha_2 + \beta_2) = \alpha_1 - \beta_1$$

とより 明らかに

$$\alpha < \cos^{-1} \sqrt{1/3}$$

の関係が成り立つ。

(1)(2)(3) の場合は π -平面が F -アキンの軸に「ほぼ」直交して
いるが、明らかに増光遷移モーメントは F -アキンの長軸に直交
している。

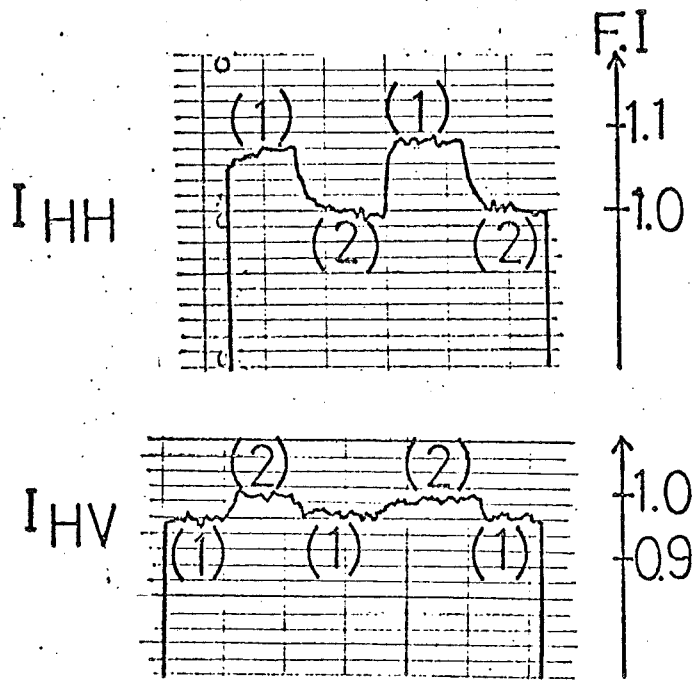


図 16

流水におよび配向させた時の F-774-(ε-ADP)
 の 流水に対して平行成分 (I_{HV}) 及び 直交成分 (I_{HH})
 の 蛍光強度の変化

- (1) 流水におよび配向した時
- (2) 流水を止め配向をランダムにした時

F-774-(ε-ADP) 0.2mg/ml
 in 0.1M KCl, 2mM $MgCl_2$, 20mM Phosphate buffer (pH 7.0)
 flow rate 20 ml/min
 励起波長 320 nm
 蛍光波長 440 nm

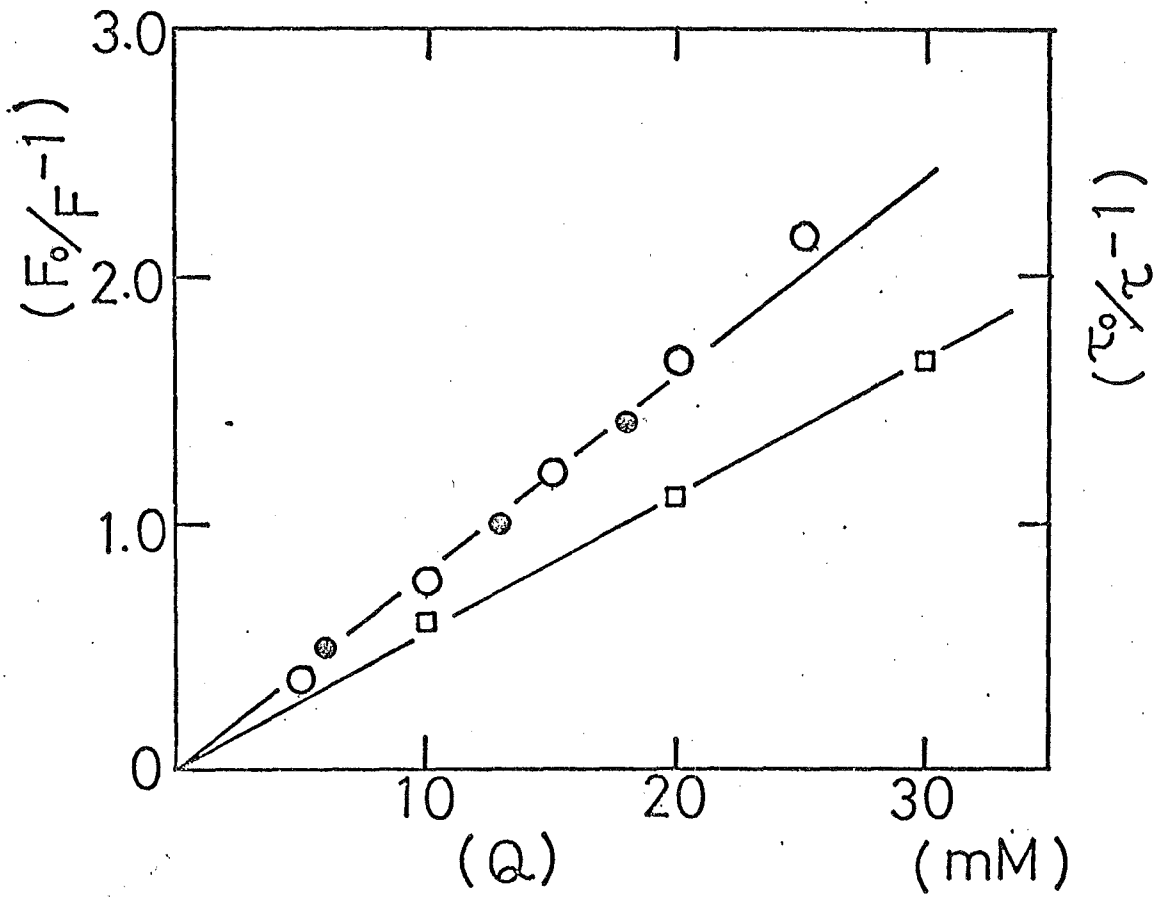
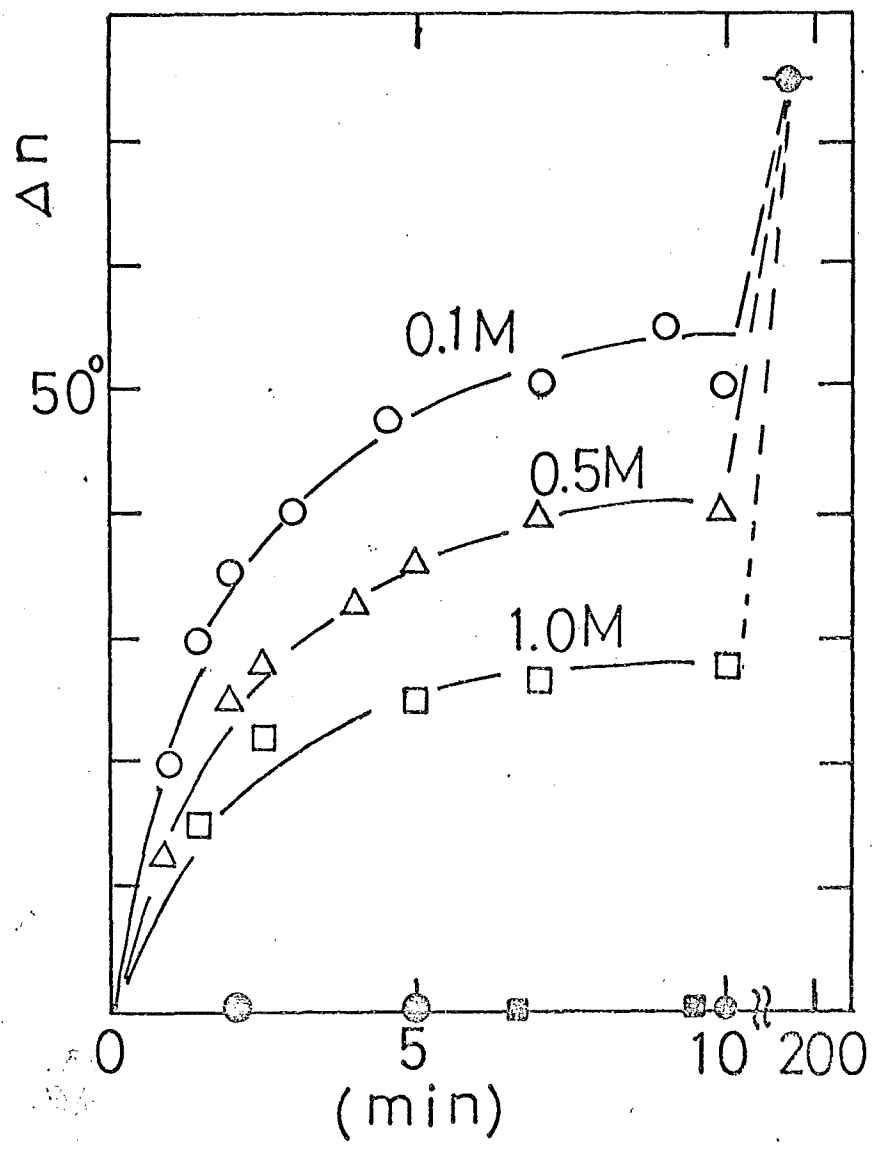


図 17.

ε-ATPの Quencher 分子による消光

- ε-ATP と KI の Quenching を 蛍光強度で測定 at 15°C
- ε-ATP と KI " 蛍光寿命で " at 10°C
- ε-ATP と KI の " 蛍光強度で " at 15°C

ε-ATP 100μM in phosphate buffer (PH 7.0)



アクリルアミドの G → F 変換に及ぼす影響

(●, ■) アクリルアミドを¹⁸O 標識した時 (0.1M, 1.0M)
 Δn の増加は見られない。

(○, △, □) アクリルアミドを (0.1M, 0.5M, 1.0M) に加え
 更に 0.1M KCl をした時の Δn の変化
 Polymerization の rate は acrylamide が 多く存在する程
 遅くなる。

● final の Δn の値
 アクリルアミドの存在量にかかわらず一定である。

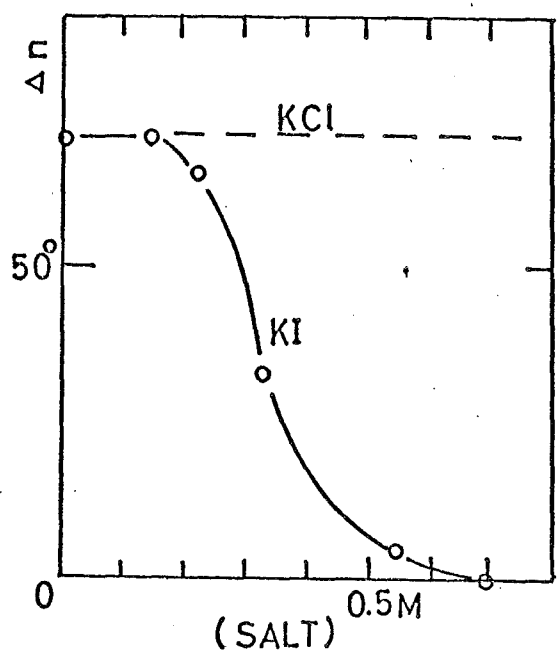
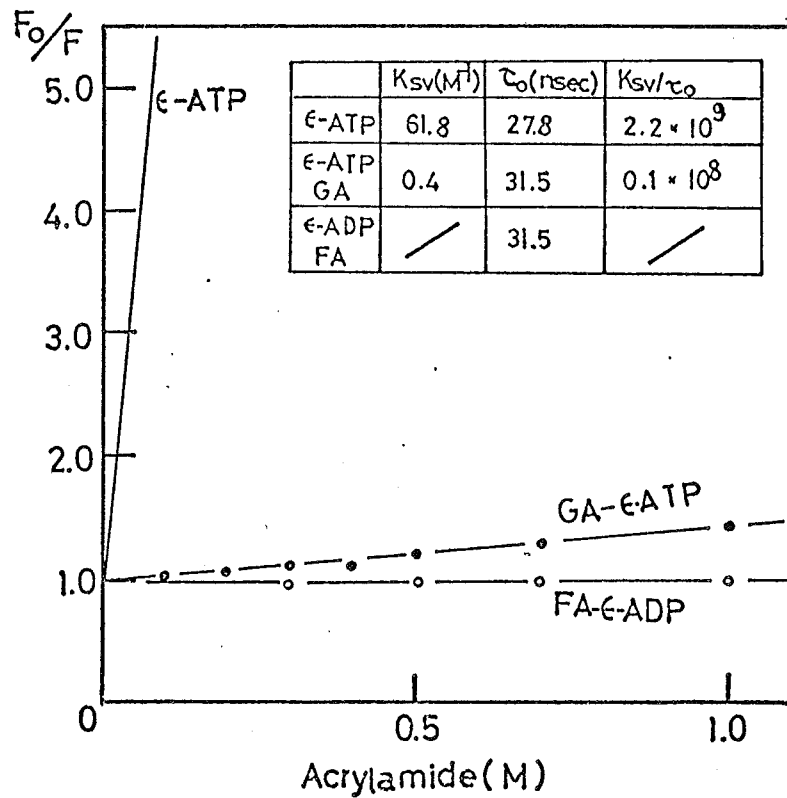


図 19.

KIの F-アクトンに対する効果
 0.15M 迄は F-アクトンは一定であるが KI 濃度がそれ以上になると F-アクトン量は減少する。
 KCl は、その濃度領域では一定の F-アクトン量を与えるが 数M 以上の濃度では F-アクトン量を減少させる。

F-アクトン (SADP) 0.9 mg/ml
 in 2mM MgCl₂, 20mM Phosphate buffer (pH7.0) at 20°C



20

free $\epsilon\text{-ATP}$. G-774 ($\epsilon\text{-ATP}$) \circ , F-774 ($\epsilon\text{-ADP}$) \circ ,
 774IVP \equiv " \circ Quenching at 15°C

- G-774 ($\epsilon\text{-ATP}$) 0.25 mg/ml
 in 1 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- F-774 ($\epsilon\text{-ADP}$) 0.25 mg/ml
 in 0.1 M KCl, 2 mM MgCl_2 , 20 mM Phosphate buffer (pH 7.0)

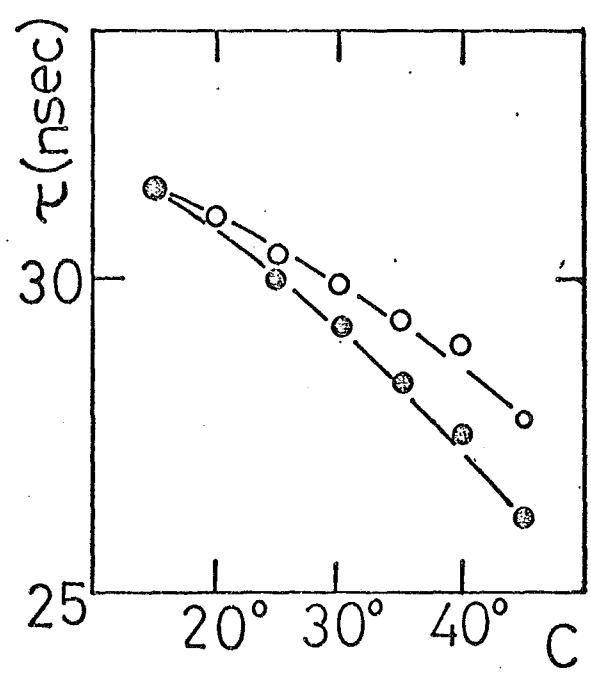
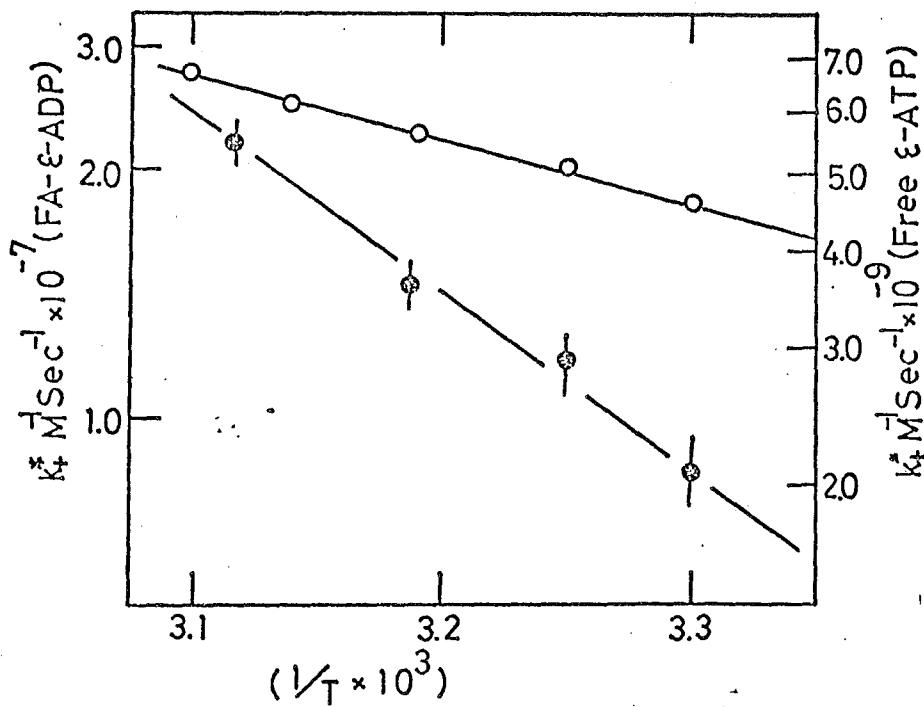


图 21.

- F-774-(εADP) の KI による Quenching の 温度依存性
- F-774-(εADP) の 蛍光寿命 の 温度変化
- F-774-(εADP) + KI の 蛍光寿命 の 温度変化

F-774-(εADP) : 0.2mg/ml
 in 2mM MgCl₂, 20mM Phosphate buffer (PH7.0)

- KI T_{1/2}
- 0.1M KI



⊠ 22.

free ϵ -ATP & " F-734-(ϵ ADP) & KI & F3 Quenching of rate a Arrhenius plot.

- free ϵ -ATP & KI
- F-734-(ϵ ADP) & KI

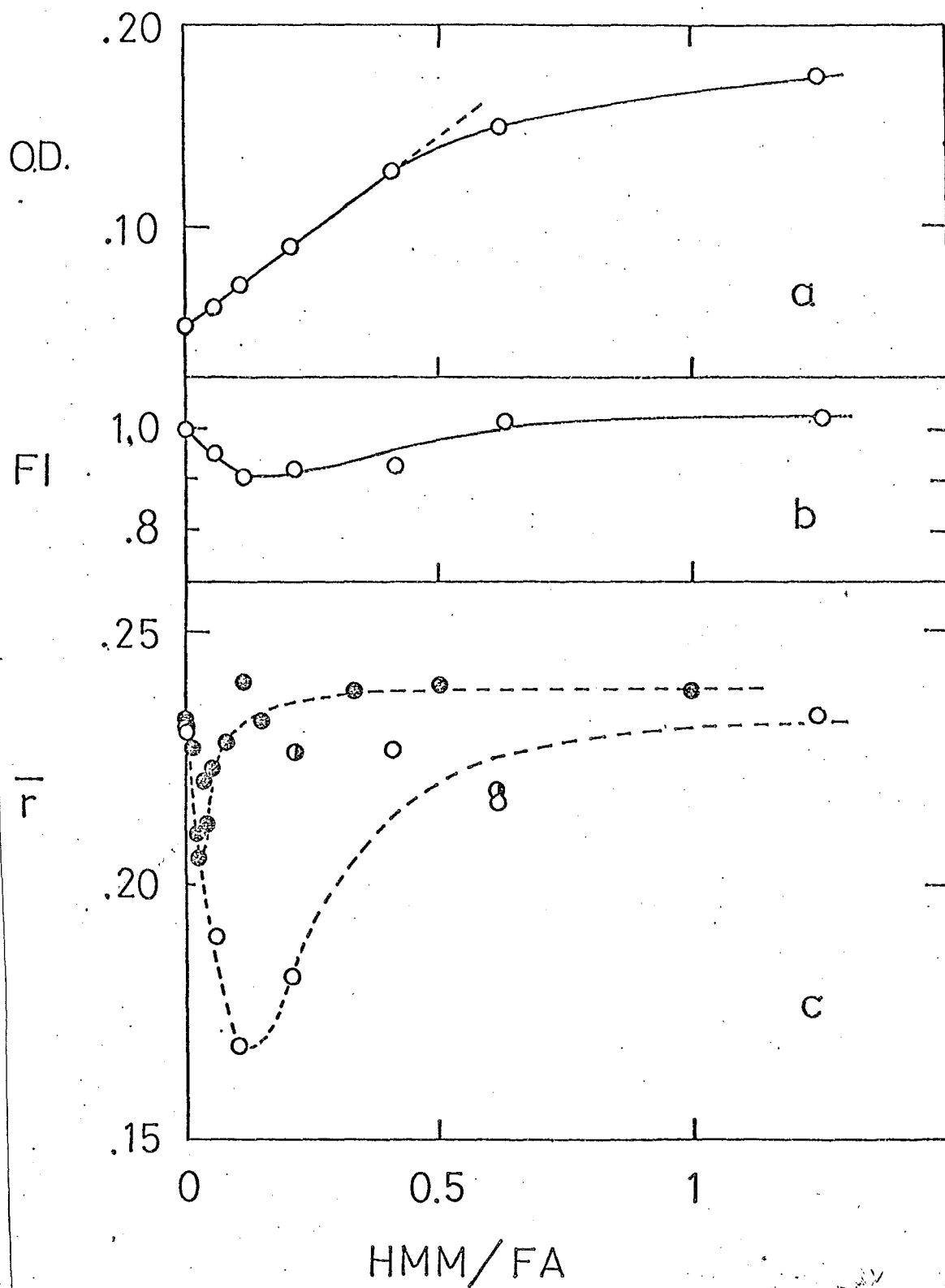


図 23.

F-アクトン(εADP)の ミオシン(HMM)が存在する時の 散乱強度 (a),
 蛍光強度 (b) 及び 蛍光偏光度 (c) の変化

F-アクトン(ε-ADP) 0.16 mg/ml, 0.1M KCl, 2mM MgCl₂, 20mM Phosphate buffer (PH 7.0)

- (c) ○ F-アクトン(εADP) ● F-アクトン(εADP) + ATP (3.5mM)
 ● F-アクトン(εADP) + トロポミオシン(TM)

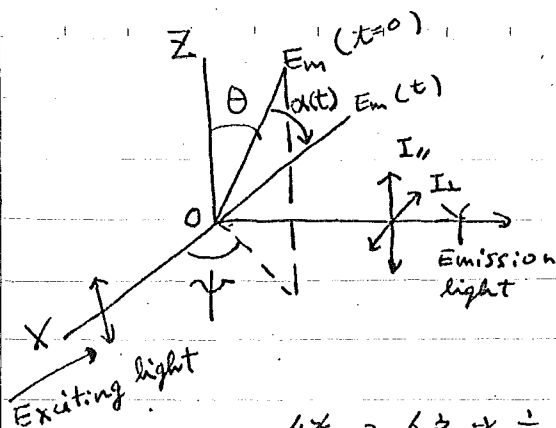
Table 1 アクチンとヌクレオチドの結合定数 (M^{-1})

	ATP	ITP	ADP	CTP	IDP	GTP	ζ -ATP
G-actin	4×10^6	4×10^6	4×10^5	4×10^5	10^5	5×10^4	1.2×10^6
F-actin	1.3×10^7	3×10^5	3×10^5	4×10^5	10^5	1.5×10^5	/

Table 2

λ (nm)	F-actin- ξ -ADP				F-actin-ADP			
	P	θ	$\Delta \epsilon_1 / \epsilon_1$	$\Delta \epsilon_2 / \epsilon_2$	Protein	ADP	Protein	$\Delta \epsilon_2 / \epsilon_2$
260	-0.08	62°	-0.55 ± 0.09	_____	_____	-0.52 ± 0.08	_____	_____
280	-0.05	-	_____	+0.08 ± 0.01	_____	_____	_____	+0.08 ± 0.01
295	+0.03	-	_____	-0.14 ± 0.02	_____	_____	_____	-0.14 ± 0.01
340*	+0.32	32°	-0.52 ± 0.07	_____	_____	_____	_____	_____

* averaged between 305~335 nm (at each 5 nm)



左図の如く、蛍光遷移を X 軸が置かれた
いざ時 偏光の各成分は次の如くなる。

$$I_x = I_y = I_z = \sin^2 \theta \omega^2 \psi = \frac{1}{2} \sin^2 \theta$$

$$I_2 = I_1 = \cos^2 \theta$$

従って、偏光度 P は

$$\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} = \frac{I_1 + I_2}{I_1 - I_2} - \frac{1}{3} = \frac{2/3}{(3 \cos^2 \theta - 1)/2}$$

2と与えられる。==2" theta のとり値について、平均偏光度 P は

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \frac{1}{\int_{\theta=0}^{\pi} \frac{f(\theta)}{\left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right)}} = \frac{2/3}{(3 \overline{\cos^2 \theta} - 1)/2}$$

$$\int f(\theta) = 1$$

励起された時からの時間 0 及び t の時の P の値は次の如くなる。

$$\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} = \frac{2/3}{(3 \cos^2 \theta_0 - 1)/2}; \quad \frac{1}{P_t} - \frac{1}{3} = \frac{2/3}{(3 \cos^2 \theta_t - 1)/2}$$

==2" 回転が等方位的であると時刻 t の蛍光遷移を X 軸の時刻 0 の時
と同等角度を alpha(t) とすると

$$(3 \overline{\cos^2 \theta_t} - 1)/2 = (3 \overline{\cos^2 \theta_0} - 1)/2 \cdot (3 \overline{\cos^2 \alpha(t)} - 1)/2$$

蛍光寿命を tau とすると、励起された時からの時間 t によつて出てくる

蛍光強度は

$$f(t) = \exp(-t/\tau) / \tau$$

一般に定常励起で観測される蛍光偏光度 P は次式で与えられる。

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \frac{1}{\int_{t=0}^{\infty} \frac{f(t)}{\left(\frac{1}{P_t} - \frac{1}{3}\right)}} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \frac{2}{\left(\int_{t=0}^{\infty} (3 \overline{\cos^2 \alpha(t)} f(t) - 1)\right)}$$

ここで今簡単の爲球形分子と考へる。一軸方向の回転緩和
時間 ρ_0 に対し $\overline{\cos^2 \alpha(t)}$ は、

$$\overline{\cos^2 \alpha(t)} = \frac{1}{3} + \frac{2}{3} \exp(-3t/\rho_0) \quad \text{と} \text{ する。}$$

従つて $\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{3T_0}{\rho_0}\right)$

ヘラマの式が得らる。

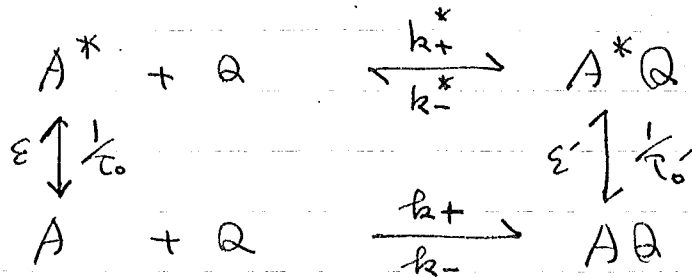
ここで $\rho_0/3 = \theta$ とおき 更に

$$\theta = \frac{nV}{kT}$$

とすると文中の(5)式が導かれる。

Appendix II

一般に蛍光の消光は消光剤と蛍光分子との衝突によつて起るもの(動的消光)と消光剤と蛍光分子が複合体(dark complex)を作つて起るもの(静的消光)とが考えられる。
こゝで一般的に消光過程として次の反応を考えこみる。



こゝで A, A^* は基底状態及び励起状態の蛍光分子であり AQ, A^*Q はそれぞれ基底状態及び励起状態の蛍光分子と消光剤との複合体である。

$\varepsilon, \varepsilon'$ は蛍光分子及び蛍光分子と消光剤の複合体の分子吸光係数であり、こゝではこれら $\varepsilon, \varepsilon'$ を等しいとする。
又 τ_0, τ_0' は A^*, A^*Q の励起状態の寿命である。

$$\frac{1}{\tau_0} = \lambda + k_0$$

$$\frac{1}{\tau_0'} = \lambda' + k_0'$$

こゝで λ, k_0 及び λ', k_0' は A^* 及び A^*Q の蛍光遷移と無輻射遷移の rate である。

又 k_+^*, k_-^* 及び k_+, k_- は $A^* + Q$ 及び $A + Q$ との association 及び dissociation の rate constant である。
 $A + Q$ との平衡定数は

$$K_0 = k_+ / k_- \text{ とする。量子収量は}$$

A^* の対し

$$g_0 = \lambda \tau_0$$

A^*Q の対し

$$g_0' = \lambda' \tau_0'$$

となる。

1) 定常励起法の光子消光

定常励起の光子強度 F は

$$F = \lambda[A^*] + \lambda'[A^*Q] \quad \text{と考へらる}$$

∴

$$(k_+^*[Q] + \frac{1}{\tau_0})[A^*] = \varepsilon[A] + k_-^*[A^*Q]$$

$$(k_+[Q] + \varepsilon)[A] = \frac{1}{\tau_0}[A^*] + k_-[AQ]$$

$$(k_-^* + \frac{1}{\tau_0'})[A^*Q] = \varepsilon'[AQ] + k_+^*[Q][A^*]$$

$$(k_- + \varepsilon')[AQ] = k_+[Q][A] + \frac{1}{\tau_0'}[A^*Q]$$

又 蛍光分子の全濃度 $[A_0]$ は

$$[A_0] = [A] + [AQ] + [A^*] + [A^*Q]$$

更に 励起分子は $[A_0]$ に較べ非常に少なりと考へらる

$$\text{即ち } [A^*] + [A^*Q] \ll [A_0]$$

∴ F は 次式で与へらる。

$$F = \varepsilon[A_0] \frac{\beta_0(\alpha + k_-^*\tau_0) + \beta_0'(1 - \alpha + k_+\tau_0[Q])}{1 + k_+\tau_0[Q] + k_-^*\tau_0}$$

$$\text{∴ } \alpha = \frac{1}{1 + K_0[Q]} \quad \text{と置こ}$$

消光率 α が 1 の時の 蛍光強度 F_0 は

$$F_0 = \varepsilon[A_0] \beta_0$$

更に A^*Q の 量子収量が A^* に較べ非常に小さい

(Strong quenching) 時には

$$\beta_0' \ll \beta_0$$

$$k_-^*\tau_0 \ll 1 \quad \text{と置こ}$$

$$F_0/F = (1 + K_0[Q])(1 + k_+\tau_0[Q]) \quad \text{と置こ} \quad (1)$$

∴ 右辺の 1 項は 静的消光と置こられる

2 項は 動的消光と置こられるとも置こる。

今 $[Q] \ll 1$ の時次式で表わされる。

$$F_0/F = 1 + (k_0 + k_t^* \tau_0) [Q] \quad (2)$$

(2) +1セコンドパルス蛍光測定による消光

+1セコンドパルス (数 μsec) で励起した時の蛍光強度 $S(t)$ は

$$S(t) = S(0) \cdot \exp(-t/\tau) \text{ とする。}$$

==> strong quenching の場合には

$$1/\tau = \lambda + k_0 + k_t^* [Q] \text{ とする}$$

又消光剤がない時の寿命を τ_0 とすると

$$1/\tau_0 = \lambda + k_0$$

従って

$$\tau_0/\tau = 1 + k_t^* \tau_0 [Q] \text{ とする} \quad (3)$$

==> $k_t^* \tau_0$ は Stern-Volmer constant K_{SV} と呼ばれることがある。

今図17で示されているように τ_0/τ と F_0/F の $[Q]$ に対するプロットが一致している。

従って、(1)式と(3)式を比較すると明らかのように

消光は動的消光によって起っているものと思われる。

従って本論文では動的消光だけの簡単な式で表わした。