

|             |   |
|-------------|---|
|             | よこ やま けい いち   |
| 氏 名         | 横 山 慶 一   |
| 授 与 学 位     | 博士 (工学)   |
| 学位授与年月日     | 平成 15 年 3 月 24 日  |
| 学位授与の根拠法規   | 学位規則第 4 条第 1 項  |
| 研究科, 専攻の名称  | 東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 金属工学専攻  |
| 学 位 論 文 題 目 | 分子モーターにおけるタンパク溶媒和モデルとアクト S1dC<br>キメラによる相互作用モデルの構築                 |
| 指 導 教 官     | 東北大学教授 鈴木 誠   |
| 論 文 審 査 委 員 | 主査 東北大学教授 鈴木 誠 東北大学教授 杉本 克久<br>東北大学教授 栗原 和枝(多元研)<br>東北大学助教授 樋口 秀男 |

## 論 文 内 容 要 旨

### 緒 論

タンパク質の機能発現は、タンパク質の構造、あるいはその構造変化に起因すると考えられている。またこのような機能を詳細に理解することは、医療分野にとどまらず、生体物質をモデルとした材料設計にも有用であり、工学的アプローチを通して、それらのメカニズムを利用した生体材料の開発等、広い分野で応用が期待される。

生物の運動と一口に言っても筋肉による巨視的な運動から、細胞運動、そして細胞内の物質輸送まで様々な形態がある。筋肉だけ眺めても、骨を動かし個体の運動を司る骨格筋、心臓の心筋、内臓や血管にある平滑筋と、その機能、形態は多種多様である。ところがこのような多様性にもかかわらず、構成する分子を見ると、基本的にはアクチンとミオシンというタンパク質、そしてエネルギー源である ATP という分子でシステムは構成され、機能している。アクチンとミオシンから構成されるアクトミオシンの研究は、エネルギー的アプローチ、生化学的実験、遺伝子工学、構造解析、1 分子測定によってアクチンとミオシンそれぞれの振舞いが明らかにされつつある。しかし、いまだ ATP 加水分解によって得られる化学エネルギーを運動エネルギーに変換するメカニズムはわかっていない。

そこで本研究では、運動機能を有するアクトミオシン系での動作機構を、タンパク分子間の相互作用とタンパク分子とそれを取り巻く水との連携に注目し、アクチンが単なるレールとしての役目のみを持っているのか、あるいは動くという現象の中で、F-アクチンの動的構造変化が筋収縮のメカニズムに重要な機能を果たしているのか知るためのシステムの構築を行い、アクトミオシン系でのアクチンの役割について検討した。

### 本研究でのアプローチ方法

ミオシンの ATP 加水分解反応は中間状態で大きなエントロピー変化が起こっている。この大きなエントロピー変化は溶媒和効果が影響していることが報告されている。アクトミオシンでミオシンが力を出すのは中間状態であることが予想されており、アクトミオシンでも同様に大きなエントロピー変化と溶媒和効果が影響している可能性がある。エントロピー変化に影響する因子として水和や水構造の変化が考えられる。しかしアクトミオシン系で水和や水構造の変化についてはわかっておらず、水和や水構造の変化を捉え、エネルギー変化を理解することで、メカニズム解明の有用な情報が得られる可能性がある。そこで本研究では、最初に水和という観点からタンパク質界面の情報を得るために、誘電測定を用いて単純な構造を持つ球状タンパク質の水和特性を調べ、安定した実験結果を得るための実験手法、解析法を確立し、基本モデルとなる水

和構造を提示した。さらにその安定した測定系を用いて、アクチンの水和構造解析を行った。

このような誘電測定において緩和周波数、水和量といった全体的な値は得られるが、中間状態を含め、アクトミオシン複合体の原子構造がわかっていないこと、さらにアクトミオシン相互作用界面での現象を細かく調べるツールがないことから、水を含めたタンパク質間相互作用を詳細に捉えることが困難である。そこで相互作用界面に関するエネルギー移動や構造変化を捉えるために、アクトミオシン相互作用モデルの構築を行った。具体的にはアクチンとミオシンを遺伝子的に結合したキメラタンパク質を作製し、その生化学的特性について調べた。さらに作製したキメラタンパク質を用いて、ミオシンからアクチンへのエネルギー伝達の様子を揺らぎとして捉えることを試みた。

そして最終的にこれらの実験を統合してアクトミオシン系でのアクチンの役割について検討を行った。

## 実験結果

### ・球状タンパク質の水和解析法の確立

単純な構造を持つと考えられる球状タンパク質を用いて水和構造解析を行った。タンパク質分子の水和特性は、2~10GHzの周波数領域において、水和した溶質の複素誘電率に対する単一-Debye近似とWagnerの混合理論の組み合わせに基づいて評価した。この計算により、弱く拘束された水和殻の緩和周波数とそれよりも低い緩和周波数を持つ強く拘束された水和数を求めることができた。これらの水和数は、タンパク質データベースに基づく各タンパク質の三次元構造における露出表面積から計算された疎水的、親水的原子団に対応する各露出原子団における露出表面積の単層水和量と比較すると、ほとんどのタンパク質溶液で、良い一致を示した。またこの方法によりほとんどの球状タンパク質は第一層の水和殻からなり、図1に示すように、露出表面積と水和量の関係は比例することもわかった。またこの実験により安定した測定系が確立され、水和量の絶対測定精度の平均誤差が6%で測定することが可能となった。さらに今までの測定では装置の大きなドリフトにより、状態の違うものを直接比較した場合に、

タンパク質の特性によるものか

装置の大きなドリフトによるものか  
議論することが困難であった。

しかし今回導入したタンパク質溶液の前後にベースラインとなる溶媒の測定を行うことで、大きなベースラインのずれを導くドリフトを検出することが可能となった。その結果、状態の違うものを直接比較することが可能となった。

これによりアクトミオシン系で  
アクチン、ミオシン、アクトミオシンの  
3状態を直接比較することが可能となった。

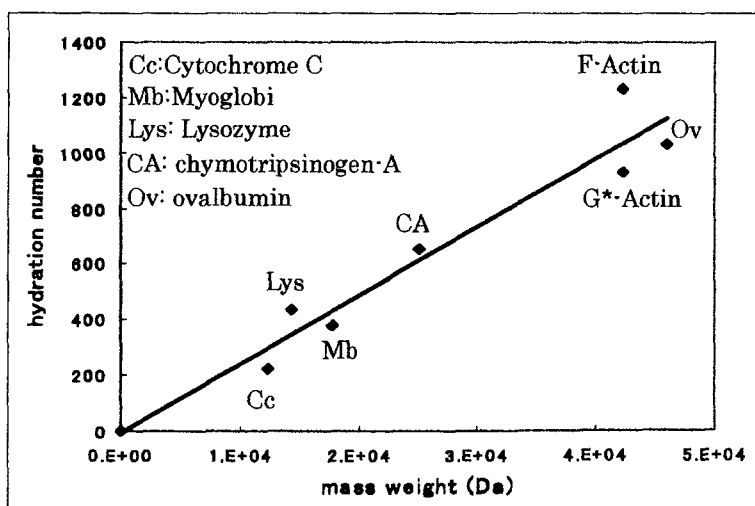


図1. 分子量と水和量の関係

そこで次にこの応用として、安定した測定系を用いてアクチンの水和構造解析を行った。

### ・アクチンの水和構造解析

アクチンの重合過程は $\Delta H > 0$ であることが知られている。 $\Delta H > 0$ の吸熱反応では脱水和の現象がおこることが予想される。さらにアクチンの重合によって露出表面積は減少することからも、水和量は減少すること

が予想される。しかし本研究において表 1 に示したように、F-アクチンの状態(high salt 状態)でアクチン(in G-buffer: low salt 状態)と比較して水和量は増加した。また図 1 に示したように F-アクチンの水和量は直線から外れている。水和量増加の 1 つ目の可能性としては溝の中に存在する水が前述したような球状タンパク質で見られる第 1 層の水に比べてより強く拘束されているために、その周りの水にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかしこの状態では水和量が増加し  $\Delta H < 0$  であり、 $\Delta H > 0$  であるアクチンの重合過程とは矛盾する。次に系全体として  $\Delta H > 0$  となる現象があるかどうかについて考察する。

球状タンパク質で行った解析法で得られたフィッティングでは、10 GHz 以上で low salt 状態、high salt 状態の両方のアクチンで明らかにフィッティングが外れている。これはアクチン特有の 40 GHz 付近の緩和によるものであることがわかった。水構造を壊すことが知られているイオンの系列を示すものとして、ホフマイスター系列というものがある。ホフマイスター系列の高位のイオン(例えば  $K^+$  や  $I^-$  など)が水に溶解する場合、 $\Delta H > 0$  となることが知られており、この  $\Delta H > 0$  と水構造を壊すことが関係している。アクチンの測定で見られた高周波成分に関係しているものは、アクチン 1 分子に相当する体積を占め、さらにそのような高周波で動けるものから考え、水であることが予想される。そこでこれらを考慮して解析を行った結果、アクチン(in G-buffer: low salt buffer)の場合には高い運動性を持つ水が  $1430 \pm 270$ 、F-アクチンの場合には  $1850 \pm 350$  の値が得られた。このような水によって全体として  $\Delta H > 0$  となるアクチンの重合現象が起こることが予想される。

| Type of actin       | Concentration (mg / ml) | Nt        | Nt (高周波成分) |
|---------------------|-------------------------|-----------|------------|
| actin (in G-buffer) | 11.1 ~ 21.0             | 930 ± 86  | 1430 ± 270 |
| F-actin             | 10.7 ~ 20.4             | 1235 ± 76 | 1850 ± 350 |

表 1. アクチンの水和構造の解析結果

#### ・キメラタンパク質の作製とその生化学的機能及びキメラタンパク質を使った揺らぎ測定

ミオシンモータードメインのループ 2 にアクチンを挿入した 3 種のリンカー長を持つキメラタンパク質を作製し、アクチンで活性化される ATP 加水分解機能を持つキメラタンパク質を得ることができた。電気泳動、western blotting によりキメラタンパク質の発現を確認した。Pelletting assay、活性測定、電子顕微鏡観察からキメラタンパク質の actin part と S1dC part は正しく folding し、きちんと相互作用していると思われる。この結果からキメラタンパク質は生化学的機能を有しており、アクトミオシン相互作用界面での現象を捉えるツールになると考えられる。

前章で述べたように高い運動性の水が F-アクチンを取り囲んでいれば、水を含めた F-アクチンの構造はダイナミックに揺らいでいることが予想される。そこでこのキメラタンパク質を用いて ATP 加水分解反応と揺らぎの大きさの関係を調べた。表 2 に示したように、骨格筋アクチンのみでは ATP 加水分解前後で大きな揺らぎの差は見られなかった。キメラタンパク質と共重合させることで、ATP 加水分解後にフィラメントイメージの輪郭の乱れが増大し、キメラタンパク質の混合比が増えるほど、輪郭長が増加することを検出した。これは 1/60 秒以内で起こる小刻みな揺らぎの増大であると考えられる。輪郭長の測定において 3.1 % の見積り誤差があったが、骨格筋のアクチンとキメラタンパク質を共重合させたフィラメントでは、それ以上の揺らぎの増大が観察されており、これは有意な値であると判断した。このような現象はアクチンとその周辺の水を含めた構造変化に起因するものと予想され、そのような構造変化がアクトミオシンメカニズムの基本

になるのかもしれない。

|           | Actin           | Actin+Chimera    |                 |                 |
|-----------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
|           |                 | (1:1)            | (3:1)           | (10:1)          |
| 揺らぎの差 (%) | 2.8%<br>(n=140) | 16.4%<br>(n=126) | 9.2%<br>(n=130) | 7.4%<br>(n=144) |

← 重合前の混合比

表 2. ATP 加水分解前後でのアクチンフィラメントの揺らぎ変化量

### 総括

アクチンの誘電測定において、高周波側にアクチン特有の運動性の高い水が観測された。さらにキメラタンパク質を用いた揺らぎ測定において、ATP 加水分解後にキメラタンパク質が増加するほど、フィラメントの輪郭長が増加し、小刻みに揺らぐことが観測された。この揺らぎはアクチンの誘電測定で検出された運動性の高い水が関与している可能性が予想される。またキメラタンパク質のみでは比活性が 0.03/s であったのに、キメラタンパク質が骨格筋のアクチンと共重合しフィラメント内に取り込まれることで、約 40 倍活性化されるということからも、キメラタンパク質のモノマー状態とフィラメントの状態でキメラタンパク質のアクチン側の構造が変化し、フィラメントになることによって、ミオシンが活性化される環境ができると予想される。

このような実験結果から、アクトミオシンの力発生機構には、周囲の水を含めアクチン側の協同的な構造変化が関与していると予想される。つまりアクチンは単なるレールとしての役目のみではなく、ミオシンさらにその周りの水を巻き込んだ協同的な構造変化をすることで運動をしていると考えられる。

# 論文審査結果の要旨

第1章ではこの研究の意義について述べている。タンパク質の機能発現のメカニズムを詳細に理解することは、医療分野にとどまらず、生体物質をモデルとした材料設計にも有用であり、それらのメカニズムを利用した生体材料の開発等、広い分野で応用が期待される。本論文は運動機能を有するアクトミオシン系の動作機構を、タンパク分子間の相互作用とタンパク分子とそれを取り巻く水との連携に注目し、F-アクチンの動的構造変化が筋収縮のメカニズムに重要な機能を果たしているのか知るための解析システムの構築を行い、それを応用してアクチンの物理的及び物理化学的役割を検討したものである。

第2章では、アクチンの水和構造を解析するための誘電測定システムの構築について述べている。エネルギー変換過程を理解する上で、タンパク質の溶媒和状態を知ることが重要なステップであると考え、まずマイクロ波誘電測定による信頼性の高い水和状態解析法の確立に取り組んだ。その結果、安定した測定系を構築し、2%程度の水溶液系で水和量の絶対測定精度の平均誤差が6%で測定することが可能となった。それにより、タンパク分子表面に弱く拘束された水和数と強く拘束された水和数を求めることができた。これらの水和水数は、タンパク質データベースに基づいた各タンパク質構造における露出表面積から計算された表面に接する単層の水和数と、ほとんどのタンパク質溶液で、良い一致を示した。これにより基本モデルとなる水和構造を提示することができた。この測定系を用いてアクチンフィラメントの水溶液中の誘電特性を調べた結果、非常に興味深い事実を明らかにすることができた。アクチンフィラメントの周囲には、バルクの水より高い運動性の水が存在していることである。この結果は従来浸透圧法で指摘されたフィラメント形成時に水和量変化がないという理解困難な問題に解答を与える重要な知見である。

第3章では、アクトミオシンの相互作用界面に関するエネルギー移動や構造変化を捉えるために、アクチンとミオシンを遺伝子的に結合したキメラタンパク質を作製し、その生化学的特性について調べた結果について述べている。ミオシンモータードメインのループ2にアクチンを挿入したキメラタンパク質を作製し、アクチンで活性化されるATP加水分解機能を持つキメラタンパク質を得た。電気泳動、western blottingによりキメラタンパク質が発現したこと、またPelletting assay、電子顕微鏡観察によりキメラタンパク質の骨格筋アクチンとの重合機能を保持していること、さらに天然のアクトミオシンに近いATP分解活性を有すること等を確認した。結果として、このキメラタンパク質はアクトミオシン相互作用による現象を調べるための有力なツールとなることを示した。

第4章では、キメラタンパク質と共重合したアクチンフィラメントの水中でのゆらぎ解析について述べている。蛍光色素で可視化したキメラタンパクを取り込んだアクチンフィラメントを蛍光顕微鏡下でゆらぎを観察しビデオ像を解析した結果、エネルギー源であるATPを投入した直後ゆらぎが増大することを見出した。骨格筋アクチンのみではATP加水分解前後で大きな揺らぎの差は見られなかった。このことは、ミオシンからアクチンへのエネルギー伝達の様子を揺らぎとして捉えた可能性が高くアクトミオシンのモーター機能を理解するうえで意義は高い。

第5章では総括としてアクトミオシン系でのアクチンの役割について検討し、運動機能を新しい観点から議論できる可能性を述べている。

以上より、本論文は理学的・工学的に有用な知見を提示している。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。