The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure and Function of Two Heads of Myosin
Author(s)	村井, 晋
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39907
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	村井　晋（むらい　しん）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　12344　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻
学位論文名	Structure and Function of Two Heads of Myosin （ミオシン2つの頭部の構造と機能）
論文審査委員	（主査） 教　授　小倉　明彦 （副査） 教　授　福山　恵一　　講　師　井上　明男

論文内容の要旨

ミオシン分子は2つの頭部（S－1）を持っており，それぞれがアクチンフィラメントと結合し，ATPと反応する。すでに，ミオシン2つの頭部の間に構造的あるいは機能的な差異があることが示唆されている。すなわち，ミオシンにATPを加えると，一方の頭部（A）はM－ATP中間体を形成するが，他の頭部（B）はM－P－ADP中間体を形成する。また，それぞれの頭部に存在する活性リジン残基（Lys_{86}）周辺のアミノ酸配列が異なっていることが報告されている。そこで，2つの頭部A，B特異的な一次構造に対する抗体を作製した（それぞれanti－Aとanti－Bと呼ぶ)。

anti－A，anti－BともにS－1と強く結合し，その結合は抗原としたペプチドでは阻害されるが，もう一方のペプチドでは全く影響されなかったことから，それぞれのS－1に特異的であることが示唆された。不溶化抗体にS－1を結合させ，その非結合分画についてリン酸初期放出量（M－P－ADP量）を測定した。S－1は1molあたり0.5molのリン酸を放出する。anti－Aの非結合分画はリン酸の初期放出が約2倍（0.98mol Pi／mol S－1）になったが，anti－Bの非結合分画は大幅に減少した（0.15 mol Pi／mol S－1)。この結果からanti－Aでは頭部A（S－1A）のみが吸収されるため非結合分画にはM－P－ADP中間体を形成する頭部Bのみ（S－1B）が存在するが，anti－Bでは頭部B が吸収されるため，リン酸初期放出をしない頭部A のみが非結合分画に残ったと考えられ，抗体によって2つの頭部が分離できることを表している。このことはミオシンの2つの頭部の機能的差異と構造的差異が一致することを示している。また，ミオシンと抗体の結合はanti－A，anti－Bともにミオシンlmolあたり1molであった。また不溶化抗体とミオシンの結合から，ミオシンが頭部A とB を1つずつ持つヘテロダイマーであるという結果を得た。

S－1をトリプシンで限定分解すると，25KDa，50KDa，20KDaの3つのペプチドに分解される。抗体の認識部位は25KDaフラグメント上に存在し，anti－Aまたはanti－BによるWestern Blottingでは25KDaフラグメントのみが強く染色された。また限定分解の途中に，一過的に存在する75KDa（25KDa＋50KDa）と27KDa（25KDa＋2KDa）も抗体によるWestern Blottingで染色された。27KDaフラグメントはanti－Bで強く認識されたが，anti－Aでは弱い結合しかみられなかった。このことは，25KDa－50KDaの間の分解は，27KDaの産生を介するか否かで2つのルートがあり，頭部Aは27KDaの産生を介さないで分解されるのに対し，頭部Bは27KDaの産生を介して分解されることがわかる。

また，プロナーゼによってS－1を分解すると，約半分は速く分解されるが，残り半分はゆっくりとしか分解されず，また残ったS－1は分子量もほとんど変化しなかった。この分解産物について，リン酸初期放出とK^+－EDTE－ATPase活性を測定したところ，どちらもゆっくりとしか活性が減少しなかった。以前からの報告によりリン酸初期放出とK^+－EDTA－ATPase活性の両方ともが頭部B に特有の活性であることが示唆されているので，上記の結果はプロナーゼに対し頭部Bは頭部Aよりも耐性な構造を持っていることを示している。2つの頭部のこれらのプロテアーゼに対する認識部位や耐性の違いは，両頭部間で立体構造の違いが存在することを示唆している。

ミオシンと抗体を結合させ，低イオン強度にすると，抗体量の増加とともにフィラメントの形成が強く阻害された。しかし，抗体のFabフラグメントでは，フィラメント形成の阻害はみられなかった。この結果から，抗体は同じ頭部を結合するためIgG分子を介したミオシンのダイマーが形成され，このためミオシンのロッド部分がフィラメントを形成するように会合できなくなったと考えられる。

論文審査の結果の要旨

骨格筋の収縮において主役となるミオシン分子には，アミノ酸配列の異なる二種類の頭部があるが，それがどのような機能上の意味を持っているかは明らかではない。村井晋君はこの問題に取り組むに当たって，ウサギ骨格筋ミオシンの二種類の頭部A，Bをそれぞれ特異的に認識する抗体を作成することを試み，相違部分のペプチドを抗原として優れた抗体をえた。ついで同君はこの抗体を用いて以下の新知見をえた。①AとBは蛋白分解酵素による分解様式が異なる，②ミオシンATPase反応の初期リン酸放出はもっぱら頭部Bに由来する，つまり酵素反応の様式がAB間で異なる，③一つのミオシン分子はAとBのヘテロダイマーである，④二価抗体によってAまたはBを架橋してしまうとミオシン分子の線維形成ができない。

これらの結果は，筋収縮機構の研究に新しい視点を与えるものであり，博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。