Osaka University Knowledge Archive

Title	ミオシンモータードメインの1分子機能アッセイ
Author(s)	岩根, 敦子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40915
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 12 】

氏　　名	岩根敦子（いわね あつこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　13340　号
学位授与年月日	平成9年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**ミオシンモータードメインの1分子機能アッセイ**
論文審査委員	（主査） 教授　柳田　敏雄 （副査） 教授　葛西　道生　　教授　村上富士夫

論文内容の要旨

近年，1分子イメージング，1分子ナノ操作，1分子スペクトロスコピーの技術が開発され，タンパク質の酵素反応，連動様式，構造・化学状態を1分子レベルで直接測定することが可能になっている。この1分子アッセイ技術に遺伝子工学を用いたタンパク質改変技術を組み合わせればタンパク質の構造と機能に関する研究に強力な手段になると期待される。本研究ではモータータンパク質であるニワトリ骨格筋のミオシンS1に関して遺伝子のクローニングを行い，1分子アッセイ技術を応用できるようにそれらの組換え体タンパクを改変しそれらの機能評価を行った。

酵素消化により切り出したミオシン頭部（S1）が元のミオシン分子と同程度のATPase活性を示すが，アクチンを動かす速度は数分の1であることからS1には重要な因子が欠落していると考えられてきた。しかし，人工的な基板の表面に結合させているので，表面との相互作用による影響が残されている。第1の研究は，S1がモータータンパクの最小機能単位であるかどうかを検証することである。そこで，S1を生理活性を保持したままで人工基板表面に導入する実験系を構築した。骨格筋のミオシンS1の調節軽鎖のところにビオチン化平滑筋調節軽鎖タンパクを導入し，ハイブリッドS1分子を作製した。調節軽鎖のN末をビオチン-アビジン系を介して基板に接着させる系を用いて，このハイブリッドS1によるアクチンフィラメントの運動速度を測定したところミオシンと同速度の値を得た。つまり，モーター機能の最小単位であることが示された。この方法を用いてS1の尾部を分子間力顕微鏡の探針に特異的に結合させ，1分子レベルで直接，力発生を測定することも可能にした。

第2の研究はニワトリ骨格筋ミオシンS1の1分子アッセイをおこなった。まず，未だ報告されていない親型ニワトリ骨格筋ミオシンS1をコードするcDNAのクローニングした。骨格筋ミオシンを大腸菌やバキュロウイルスを用いた従来の発現系で活性体として得ることは非常に難しい。そこで軽鎖結合部位の欠損した親型ニワトリ骨格筋ミオシン（S1dC）遺伝子をウサギ網状赤血球ライゼートを用いて試験管内発現させた。1分子をイメージするための蛍光ラベルとして，S1dCはグリーン蛍光タンパク(GFP)との融合タンパクとして発現させることにした。GFPのタグ，組換えタンパクの試験管内合成，低背景光全反射蛍光顕微鏡の3つの技術を組み合わせることにより1分子のイメージングを試みたところ，①今まで活性体の得られなかったニワトリ骨格筋ミオシンS1dCの発現，②S1dC-GFP融合タ

ンパクの1分子イメージング，そして，③S1dC-GFP融合タンパク1分子上での個々のATPターンオーバーの観察に成功した。

論文審査の結果の要旨

近年，1分子イメージンダ，1分子ナノ操作，1分子スペクトロスコピーの技術が開発され，タンパク質の酵素反応，運動様式，構造・化学状態を1分子レベルで直接測定することが可能になっている。この測定法の最大の利点は，個々の生体分子の機能をマクロな動態の平均値から類推するのではなく，1分子の機能を直接観察することにより，生体分子の機能評価ができる点である。

本論文は標的タンパク分子としてモータータンパクであるニワトリ骨格筋のミオシンS1を選んでミオシン遺伝子のクローニング，組換え体タンパク発現，生化学的評価並びに1分子アッセイを通じ，生体分子の微小的環境での機能を考察したものである。

本論文の内容は大きく3つに分けられる。まず，第2章では第3章，第4章で用いた組換え体タンパクを得るために必要不可欠なニワトリ骨格筋のミオシンS1重鎖遺伝子とニワトリ平滑筋ミオシン調節軽鎖遺伝子をクローニングしたことを報告している。

消化酵素により切り出したミオシン頭部（S1）が元のミオシン分子と同程度のATPase活性を示すが，アクチンを動かす速度は数分の1であるからS1には重要な因子が欠落していると考えられてきた。しかし，人工的な基板の表面に結合させているので，表面との相互作用による影響が残されている。第3章では，S1がモータータンパクの最小機能単位であるかどうかを検証することを目的として実験を行った。すなわち，S1を生理活性を保持したままで基盤表面に導入する実験系を構築した。骨格筋のミオシンS1の調節軽鎖のところにビオチン化平滑筋調節軽鎖タンパクを導入し，ハイブリッドS1分子を作製した。調節軽鎖のN末端をビオチン-アビジン系を介して基板に接着させる系を用いて，このハイブリッドS1によるアクチンフィラメントの運動速度を測定したところミオシンと同速度の値を得た。

また，第4章では通常の方法では不可能であった組換え型ニワトリ骨格筋ミオシンS1の1分子アッセイを行っている。軽鎖結合部位の欠損した親型ニワトリ骨格筋ミオシン（S1dC）をグリーン蛍光タンパク（GFP）との融合タンパクとして試験管内合成法で発現させ，低背景光全反射蛍光顕微鏡により1分子のイメージングおよびS1dC-GFP融合タンパク1分子上での個々のATPターンオーバーの観察に成功している。この研究により従来観察が困難であった分子でも，1分子レベルでの機能探索が，遺伝子操作法と，革新的な測定法である低背景光全反射蛍光顕微鏡を組み合わせることにより可能になることを示している。

以上のように，本論文では従来観察が困難であった分子でも1分子レベルでの機能探索が，遺伝子操作法と，革新的な測定法である低背景光全反射蛍光顕微鏡を組み合わせることにより可能にしている。得られた知見は近年めざましい進歩を見せている1分子レベルでのタンパクの機能評価技術と遺伝子工学技術を融合することにより，従来技術では達成できなかった問題を達成している。したがって，本論文は博士課程論文として価値あるものと認める。