

Title	Transmission of Force and Displacement within the Myosin Molecule
Author(s)	大木, 高志
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46165
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おおき たか し 大 木 高 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19842 号
学位授与年月日	平成17年11月14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	Transmission of Force and Displacement within the Myosin Molecule (ミオシン分子内の力伝達機構)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 道行 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 柳田 敏雄

論 文 内 容 の 要 旨

[序 論]

筋肉の中にはミオシン、アクチンという2種類の収縮タンパクがあり、それぞれの多数の分子が集合して繊維を形成している。収縮力は、この2種類の繊維同士が互いに滑り合うことで生じる。ミオシンは ATP 加水分解によって得られたエネルギーをアクチン推進力に変換するモータータンパク質である。力発生に必要なのはミオシン頭部で、頭部はさらに ATPase 活性部位とアクチン結合能を持つモータードメイン、アクチン推進力を生むと考えられるレバーアーム、それらを連結しているコンバーターによって構成される。力発生時には ATP の加水分解に伴ってミオシンの ATPase 活性部位で小さな構造変化が起こり、その後レバーアームの回転により力が発生するという説がミオシン頭部の X線結晶構造解析の研究によって提唱されている。しかしながらミオシン頭部の ATPase 活性部位はレバーアームから遠く離れており、どのような仕組みでモータードメインがレバーアームを回転させるのか明らかになっていない。そこでモータードメインとレバーアームを連結しているコンバーターに着目した。ヌクレオチド存在下および非存在下のミオシン頭部立体構造を比較すると、コンバーターとレバーアームの相対的位置に変化はなくむしろモータードメインとコンバーター間の角度が大きく変化していた。そこでレバーアームはコンバーターに固定されておりモータードメインとコンバーター間の角度変化がレバーアームの回転を引き起こすという作業仮説を立て、これを証明するための実験を行った。すなわちモータードメインとコンバーターの連結部位に点突然変異 (F721A, F775A) を導入し、蛋白質構造とモーター機能を詳細に調べることで角度変化とモーター機能の密接な関連について明らかにした。

[方 法]

変異体平滑筋ミオシンヘビーメロミオシン (HMM) および FRET-サブフラグメント-1 (C/Y-S1) の調製: 変異体平滑筋 HMM を作成するため、培養昆虫細胞/バキュロウイルスの発現系を用いた。細胞は Sf9 株を、ウイルス作成には BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いた。ミオシン重鎖をコードしたウイルスと2本の軽鎖をコードしたウイルスを Sf9 に共感染させ発現したタンパク質を精製した。FRET: C/Y-S1 は、N 末端に yellow fluorescent protein (以下 YFP, Clontech, Palo Alto, CA) を結合させたミオシン重鎖をコードしたウイルス、N 末端に cyan fluorescent protein (以下 CFP, Clontech, Palo Alto, CA) を結合させた軽鎖をコードしたウイルスを Sf9 に共感染させ発現したタンパク質を精製した。C/Y-S1 を用いて ATP 存在下、非存在下で蛍光スペクトルを

測定した (ex. 430 nm, em. 450-600 nm)。 *In vitro* motility assay : ミオシンをガラスに貼り付けた後、蛍光アクチンと ATP を添加し、蛍光顕微鏡下でアクチンの滑り速度を測定した。変異体が発生させる力が弱いことが予想されるため、ガラスに貼り付けるミオシンの密度が低い場合と高い場合の2種類の条件で測定を行った。一分子力学測定 : アクチニン結合ビーズを両端に結合させた蛍光アクチンを光ピンセットで捕捉し、ミオシン分子を相互作用させた時に起こるアクチンの変位を測定した。光ピンセットの出力を調節し 0.03 pN/nm と 0.008 pN/nm の2種類の捕捉力で測定した。

[結果]

1 : F721A と F775A の ATPase 活性の検討

コンバーターへの点突然変異導入がモータードメイン内の構造に影響を与えていないか調べるため、F721A と F775A の Mg^{2+} ATPase 活性およびアクチン活性化 ATPase 活性を測定した。また Stopped Flow 装置を用いて蛍光性 (mant) ATP 結合速度、mant-ADP 解離速度を測定した。さらに ATP 依存的な蛋白質内在性トリプトファン蛍光の変化量、およびその速度を調べた。その結果、これらの変異体は野生型 (wt) とほぼ同様の値を示した。これらの結果からコンバーターの点突然変異はモータードメインの機能には影響を与えないと結論した。

2 : FRET を用いた分子構造の検討。

変異体がレバーアームを動かせるかどうか調べるため、C/Y-S1 を用いて蛍光エネルギー移動 (FRET) を測定した。CFP (donor) の励起波長である 430 nm の光で C/Y-S1 を照射すると CFP が吸収する光のエネルギーは CFP から YFP (acceptor) に移動し YFP の蛍光を発する。野生型の C/Y-S1 (wt) に ATP を添加すると FRET 効率が上昇した。FRET 効率の測定結果から、ATP 添加後の CFP-YFP 間の距離を計算すると約 1 nm 減少することがわかった (7.4 ± 0.2 nm \rightarrow 6.2 ± 0.1 nm)。この距離の減少は、ミオシンの立体構造モデルから推定した距離の変化と一致したのでレバーアームの回転を反映しているものと思われる。C/Y-S1 (F775A) でも C/Y-S1 (wt) と同様なスペクトルが観測された。また ATP を加えると FRET 効率の上昇も見られた (7.5 ± 0.1 nm \rightarrow 6.1 ± 0.1 nm)。しかし C/Y-S1 (F721A) は ATP 添加前 C/Y-S1 (wt) と同様な蛍光スペクトルが観測されたにもかかわらず ATP を添加しても FRET 効率の変化は見られなかった (7.3 ± 0.1 nm \rightarrow 7.4 ± 0.1 nm)。

3 : *In vitro* motility assay と一分子力学測定

変異体ミオシンが実際にアクチンを動かせるか調べるため、*In vitro* motility assay を行った。野生型はミオシン濃度にかかわらず $0.51 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で動かした。一方 F721A はミオシンの密度にかかわらずアクチンを動かさなかった。F775A は高密度の場合はアクチンを動かさなかったのに対し、低密度の場合は $0.07 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{sec}$ の速度で動かした。

さらに一分子力学測定装置を用いてミオシンがアクチンと相互作用した時のステップサイズを測定した。野生型のステップサイズは 6.5 ± 0.6 nm (0.03 pN/nm)、 6.9 ± 0.7 nm (0.008 pN/nm) であった。F721A は 0.2 ± 0.4 nm (0.03 pN/nm)、 -0.4 ± 0.5 nm (0.008 pN/nm)、F775A は -0.1 ± 0.4 nm (0.03 pN/nm)、 5.5 ± 0.7 nm (0.008 pN/nm) であった。

これらの結果から F721A は高負荷および低負荷にかかわらず力が出せず、F775A は低負荷でのみアクチンを動かすことができることがわかった。

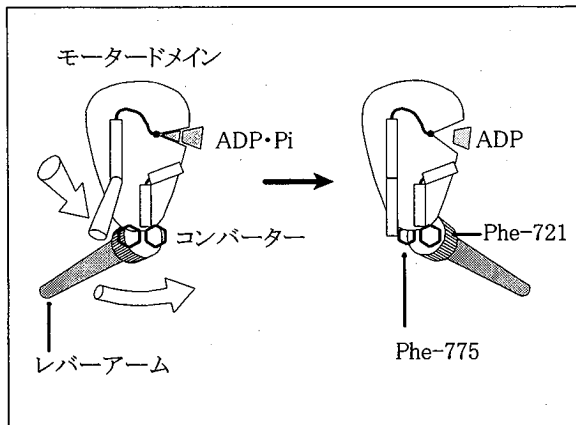
[考察]

モータードメイン-コンバーター連結部位の変異導入は、モータードメインの機能には影響を与えなかったが、F721A 変異はレバーアームの回転、F775A 変異は力発生に致命的な影響を与えた。これらの結果から Phe721 と Phe775 は力の伝達にきわめて重要な位置にあるが、その役割は異なることが予想された。そこで2つの側鎖の役割について考察する。

コンバーターはモータードメインから突出した2つのヘリックス (SH1 ヘリックス、リレーヘリックス) と結合しており、SH1 ヘリックスの側とリレーヘリックスの側にそれぞれ Phe721 と Phe775 が存在する。すでに報告されているヌクレオチド存在下および非存在下のミオシン頭部立体構造を比較すると、コンバーターは SH1 ヘリックス端の Gly720 を基点として大きく角度を変えることがわかる。Phe721 は一次構造上基点の Gly720 の隣に位置する。さらに Phe721 は SH1 ヘリックス下でコンバーターと疎水性クラスターを形成している。従って F721A は基点付近の

構造が壊れ、SH1 ヘリックスの下端がコンバーター回転の基点として働かないためレバーアーム回転の ATP 依存性が無くなったと思われる。

リレーヘリックスは一次構造上コンバーターとは離れているが、その下端はコンバーターと接触し強く結合している。立体構造の検討から、ATP の結合に伴いリレーヘリックスは中心から折れ曲がり、下端に結合したコンバーターも付随して移動する。この移動によって、コンバーターは SH1 ヘリックスを軸にして約 70° 角度を変える。Phe775 はリレーヘリックスと疎水性結合する側鎖であることから、リレーヘリックスの構造変化をコンバーターに伝達するために必要な側鎖であると予想される。そのため F775A はリレーヘリックスとの疎水性結合が欠損するため弱い力しか出せないが、イオン性結合は存在するので全く結合力が無くなることはないと考えられる。以上の考察から申請者は、コンバーターはモータードメインのリレーヘリックスと SH1 ヘリックスに結合した 2 つの支点によってリレーヘリックスの小さな構造変化をレバーアームの回転に変える変換器であるという説を支持する。



力発生時のミオシンの力伝達機構モデル

リレーループの折れ曲がりによって Phe-775 を押し、Gly720-Phe721 を基点にコンバーターを 70° 回転させる。

論文審査の結果の要旨

ミオシンは ATP 加水分解によって得られたエネルギーを筋収縮時のアクチン推進力に変換するモータータンパク質である。力発生に必要なのはミオシン頭部で、頭部はさらに ATPase 活性部位とアクチン結合能を持つモータードメイン、アクチン推進力を生むレバーアーム、それらを連結しているコンバーターによって構成される。力発生時には ATP の加水分解に伴ってミオシンの ATPase 活性部位で小さな構造変化が起こり、その後レバーアームの回転により力が発生するという説がミオシン頭部の X 線結晶構造解析の研究によって提唱されている。しかしながらミオシン頭部の ATPase 活性部位はレバーアームから遠く離れており、どのような仕組みでモータードメインがレバーアームを回転させるのか明らかになっていない。そこでミオシン頭部立体構造の検討からモータードメイン-コンバーター間の角度変化がレバーアームの回転を引き起こすという作業仮説を立て、これを証明するための実験を行った。すなわちモータードメインとコンバーターの連結部位に点突然変異 (F721A、F775A) を導入し、蛋白質構造とモーター機能を詳細に調べることで角度変化と力発生の密接な関連について明らかにした。

F721A と F775A はモータードメインの機能は正常に保たれていたが、F721A はレバーアームの回転、F775A は力発生に致命的な影響を与えた。これらの結果はモータードメイン-コンバーター間の角度変化がレバーアームの回転に不可欠であることを示唆する。さらにミオシン頭部立体構造の検討から Phe721 と Phe775 がどのようにレバーアームに力を伝達するかモデルを提唱した。

以上、本論文はミオシン分子内の力伝達メカニズムに関して新たな知見を生み出したものであり、学位授与に値すると考える。