

Title	1分子FRET法によるアクチンの動的多形性の検出
Author(s)	小塚, 淳
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46754">https://hdl.handle.net/11094/46754</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	小塚 淳
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 20429 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科システム人間系専攻
学位論文名	1 分子 FRET 法によるアクチンの動的多形性の検出
論文審査委員	(主査) 教授 若林 克三 (副査) 教授 柳田 敏雄 教授 山本 亘彦

#### 論文内容の要旨

近年の研究結果からタンパク質構造の柔軟性はその機能発現に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。本論文では細胞運動で重要な働きを担うアクチンフィラメントを構成するアクチン 1 分子の構造の動特性について報告する。本研究ではアクチン 1 分子の動特性を調べるために、1 分子蛍光エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 法を用いた。ドナー蛍光分子を DNase-I の結合サイト内の Gln-41 に、アクセプター蛍光分子を C 末端近傍の Cys-374 にそれぞれ修飾し、生理条件下でこの蛍光分子間の FRET の変化を実時間計測したところ、アクチンは大きく分けて 2 つのコンフォメーションを持ち、その間を秒オーダーの時間間隔で遷移していることが見出された。さらに、タンパク質モーターであるミオシンと相互作用した時、この二つの状態のうち一方 (活性状態) が支配的になった。一方、グルタルアルデヒド処理により運動活性のみを失う化学的架橋を施した場合、構造柔軟性が抑制された結果としてもう片方 (不活性状態) が支配的になった。これはアクチンが活性状態と不活性状態を自発的に行き来し、外部信号に対する応答の準備をしていると考えられる。つまり、アクチンは単なるレールではなく、構造柔軟性を利用した運動活性の制御機構を持つことが示唆される。この結果は、細胞内のアクチンのダイナミクスを理解する為の基礎となるであろう。また、構造の遅い揺らぎは他の酵素反応で観測されているメモリ効果やアクチン自体で示唆されている遅い (>sec) 緩和過程と関係があると考えられる。

本研究によって開発された技術によって、様々なタンパク質や基質との相互作用によるアクチン 1 分子の状態変化を生理条件下で直接計測することが可能になり、タンパク質が柔軟な構造を巧みに利用するメカニズムを解明する道が拓けたといえる。

#### 論文審査の結果の要旨

アクチンフィラメントは筋収縮、細胞移動・分裂、細胞骨格・形態形成といった様々な細胞運動において重要な働きを担っている。フィラメントの構造的な違いや重合の様式はどのようなアクチン結合タンパク質と複合体を作るかにより決まってくる。異なった構造間の遷移は細胞の機能に関与した重要な役割を担っていると考えられている。モータータンパク質・ミオシンはアクチンと相互作用し、アクチンフィラメント構造の熱揺らぎやアクチンフィラメン

トネットワークの流動性を変化させる。しかしながら、アクチンフィラメント上のアクチン分子構造の動的過程はまだよく理解されていなかった。本論文では、フィラメント上のアクチン1分子の DNase-I 結合ループと C 末端に導入された蛍光分子間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 計測を行い、アクチン分子構造が秒に及ぶ時間スケールで揺らいでいることを観測した。非修飾フィラメントから得られる FRET 効率の分布は少なくとも2つのガウス分布で記述された。そして、フィラメントを運動不活性化因子・グルタルアルデヒドで架橋した場合、低い FRET 効率状態が優位になった。逆に、ミオシンと ATP 存在下では高い FRET 効率状態が優位になった。このことから、非修飾フィラメントに含まれるアクチン分子は架橋フィラメント上で取る構造とミオシン複合体フィラメント上で取る構造の間を揺らいでいると結論している。架橋や変異、タンパク質分解といったアクチンに対する修飾は、ミオシンのアクチンへの結合とアクチンによるミオシン ATPase 促進活性を保持したまま、アクトミオシンモーターの運動活性のみを抑制できる。これはアクチンの内部ダイナミクスが重要であり、筋収縮メカニズムの理解に関係が深いことを意味している。また、観測されたアクチン構造のダイナミクスはアロステリック制御のための Monod-Wyman-Changeux モデルと一致する。アクチンの動的構造変化の証明と申請者の開発した1分子 FRET 顕微技術は、将来のアクトミオシンモーターの研究に貢献すると考えられ、博士 (工学) の学位論文として価値のあるものと認める。