

学位論文題名

アクチンフィラメントにおけるアクチン間接触部位の研究

学位論文内容の要旨

アクチンは、1942年、Straubによりうさぎ骨格筋より発見され、その後の研究で真核細胞に広く存在することが明らかにされたタンパク質である。うさぎ骨格筋のアクチンは375個のアミノ酸残基からなる一本のポリペプチド鎖で分子量は約42,000である。アクチン一分子に一分子以上の2価カチオンと一分子のATPまたはADPを結合している。また、アクチンはその一次構造が様々な生物種で高度に保存されており、非常に保守的なタンパクである。

アクチンは低イオン強度下では単量体（G-アクチン）として存在するが、高イオン強度下または Mg^{2+} 存在下では重合し二重らせん様フィラメント構造をとる多量体（F-アクチン）になることが広く知られている。アクチンは筋細胞中では常にフィラメントを形成しているが、非筋細胞中ではその多くがG-アクチンとして存在しており、アクチンの重合、脱重合が細胞の運動またはその形態の維持に重要な働きをしている。また、筋細胞のもう一つの重要なタンパク質であるミオシンのサブフラグメントをG-アクチンに加えるとアクチンは重合してF-アクチンになることから、アクチンフィラメントにおいてアクチン分子上のアクチン-アクチン接触部位とミオシン結合部位は密接な関係にあると考えられる。

本研究ではアクチンフィラメントにおけるアクチン間接触部位に注目しその結合部位の同定をアクチンのペプチドを用いて行った。その結果、アクチンフィラメントにおけるモノマー間の結合はその右巻き二重らせんヘリックスより左巻きジェネティックヘリックス方向の結合の方が強いことが示された。アクチンの重合を阻害するアク

チン自身のペプチドを見いだしたのは本研究が初めてである。

まず、アクチンのペプチドの調整法について検討を行った。F-アクチンを6 M 尿素存在下で1/10重量比のキモトリプシンで処理したところ、主に分子量11 k、7 kからなる低分子量ペプチドの生成が確認された。これらのペプチドを逆相HPLCカラム及びSephadex G-50によるゲル濾過で精製したのち、アミノ酸組成分析及びN末端配列分析によりペプチドの同定を行った。その結果、アクチンのN末端からTyr²⁷⁹の間を構成していた9種の低分子量ペプチドが得られた。特にその内の2種のペプチド、Arg¹⁷⁷-Tyr¹⁹⁶ (2.6-kDa ペプチド) と Ser¹⁹⁹-Tyr²⁷⁹ はこれまで得られていないアクチンのサブドメイン4中のペプチドで、両者でこのサブドメインを完全に包括していた。

次にこれらのペプチドのアクチン重合に対する効果を検討した結果、2.6-kDa ペプチドでのみアクチンの重合阻害がみられた。添加する2.6-kDa ペプチド濃度の増加にともないアクチンの重合は遅くなり定常状態の重合度も減少した。この結果から2.6-kDa ペプチドはアクチンに結合することによりその重合を阻害していると考えられた。この阻害効果はMg²⁺存在下でのアクチン重合に対しても見られたことから、2.6-kDa ペプチドはアクチン分子の「反矢じり端」側に結合していることが示唆された。

次にこの2.6-kDa ペプチドによるアクチンの重合阻害をコンピューターシミュレーションを用いて解析した。その結果、2.6-kDa ペプチドがアクチンモノマーとフィラメントの端の両方に結合すると仮定したとき測定値にもっとも良く合うシミュレーションカーブが得られ、また2.6-kDa ペプチドはアクチンフィラメントの伸長のステップはその濃度に依存して阻害するが核形成の段階はむしろ活性化する傾向を示した。

実際、G-アクチンに対して2.6-kDa ペプチドを加えたところ、2.6-kDa ペプチドによるアクチンの重合誘起効果が観察された。2.6-kDa ペプチドがアクチンモノマーに結合しその構造をF-アクチン様に変えているため、その重合が誘起されたものと思われる。また2.6-kDa ペプチドをF-アクチンに加え電子顕微鏡で観察したところ、ペプチドによるアクチンフィラメントの切断が観察された。この結果は2.6-kDa ペプチドはアクチンモノマーやフィラメントの端のみならずフィラメント中のモノマーにも結合しそのフィラメントを切断したためであると考えられる。

2.6-kDa ペプチドがアクチンに結合しその重合に影響を与えるというこれまでの結

果は、2.6-kDa ペプチドを含むアクチン分子上のセグメントがアクチンフィラメントにおけるアクチン間接触部位を構成することを示しているものと思われる。

次に 2.6-kDa ペプチド上のアクチン結合部位をさらに限定するため 2.6-kDa ペプチドの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルに及ぼすアクチンの影響を観察した。その結果、同定されたシグナルのうちアクチン添加により影響があった残基はペプチドの C 末端側に位置する Ile¹⁹² と Tyr¹⁹⁸ で Ala¹⁸¹, Tyr¹⁸⁸, Met¹⁹⁰ はほとんど影響を受けなかった。よって 2.6-kDa ペプチドのアクチン結合にはその C 末端側の Ile¹⁹²-Tyr¹⁹⁸ 付近が重要であることが示唆された。しかし 2.6-kDa ペプチドの中心部に位置する Leu¹⁸⁵-Leu¹⁸⁹ にある L-T-D-Y-L というアミノ酸配列が様々なアクチン結合タンパクにも存在することがわかった。従って 2.6-kDa ペプチドにおいてその C 末端部に加え中心部の L-T-D-Y-L 部分もアクチン結合に何らかの寄与をしていると思われる。

次に 2.6-kDa ペプチドが結合する相手方のアクチン上の部位を検討した。2.6-kDa ペプチドを I¹²⁵ で放射性ラベルした後、ペプチドとアクチンをアミノ基とカルボキシル基間の架橋試薬である 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) で処理した。その架橋部位を求めるため、得られた架橋アクチンをさまざまなプロテアーゼで切断し、放射活性を持つ架橋ペプチドを分析した。その結果、2.6-kDa ペプチドはアクチン分子の反やじり端側に位置する Ala¹⁴⁴-Glu¹⁶⁷ の 24 残基内と架橋していることが示された。近年提出されたアクチンの立体構造及び EDC の反応特異性を検討するとその架橋位置は Glu¹⁶⁷ であると思われる。

本研究で得られた他のペプチドについてもアクチン重合に対する効果を検討したところ、2.6-kDa ペプチドほどの阻害効果を示すペプチドは他に存在しなかった。よってアクチンフィラメントにおけるアクチン間の主要な接触部位は 2.6-kDa ペプチドを含むセグメント、Arg¹⁷⁷-Tyr¹⁹⁸ とその相手方の部位である Ala¹⁴⁴-Glu¹⁶⁷、特に Glu¹⁶⁷ 付近とで構成されていると考えられる。この両者の結合を Holmes らが報告しているアクチンフィラメントの立体構造のモデルに当てはめた結果、これらの部位はアクチンフィラメントの「左巻きジェネティックヘリックス」方向の結合に寄与していることが示唆された。よってアクチンフィラメントはその左巻きジェネティックヘリックス方向の結合で維持され、右巻き二重らせんヘリックス方向の結合は二次的な役割でフィラメント形成に寄与しているのではないかとと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ
副 査 教 授 杉 本 和 則
副 査 教 授 谷 口 和 弥

学 位 論 文 題 名

アクチンフィラメントにおけるアクチン間接触部位の研究

アクチンモノマー（Gアクチン）は、分子量 42,000 のほぼ球状の蛋白で、条件によっては多数のモノマーが二重らせん状に重合して細長いフィラメント（Fアクチン）を形成する。筋細胞においてはFアクチンは細いフィラメントと呼ばれ、ミオシン分子から成る太いフィラメントと相互作用して筋収縮を起こす働きをする。また、アクチンは非筋細胞にも含量が多く、いわゆる細胞骨格の一員として細胞の形態変化や細胞が起こす様々なタイプの運動と深く係わっている。細胞内での運動は、GアクチンからFアクチンへの変換や、またFアクチン内でのアクチンモノマー間の相互作用の変化が重要な要因となっている。しかし、アクチン間の相互作用部位やその相互作用力の性質などについてはまだ余り研究されていない。

従来アクチン分子はコンパクトな構造をとるため、適当な大きさの断片に分解する事が困難であったが、申請者はFアクチンを6 M尿素存在下でキモトリプシン消化することにより、2.6-kDa から 9-kDa にわたる質量を持つ9種のペプチド断片に切断する事に成功した。次いでそれらの中で最も小さな 2.6-kDa ペプチドがアクチンの重合を阻害することを見出した。このペプチドは Arg 177 から Tyr 198 を構成していた 22 残基より成り全アクチン 375 残基の 1 / 17 に相当する。塩によるGアクチンの重合を粘度上昇或は、アクチンに共有結合させたパイレンの蛍光強度上昇で追跡で

きるがこのペプチドは濃度に依存して粘度や蛍光強度の上昇を阻害した。また電子顕微鏡によりこのペプチドはFアクチンを切断する能力を有する事も観察した。これらの結果からアクチンの Arg 177 から Tyr 198 残基間に、隣接するアクチンモノマーと接触する部位の存在することが示唆された。次にこのペプチドのプロトンNMRスペクトルのアクチン添加による変化を測定し、このペプチドの Ile 192 から Tyr 198 に相当するC末端部位がアクチンと相互作用する事が示された。また、Leu 185 から始まる Leu-Thr-Asp-Tyr-Leu の配列が様々なアクチン結合蛋白の持つアクチン結合部位の配列と高い相同性を持つ事を見出した。従って、Leu 185 からペプチドC末端 Tyr 198 の間がアクチン間接触部位を構成していると考えられる。

そこでこの部位と結合するアクチンの相補的な結合部位を明らかにする目的で、このペプチドの Tyr 残基を ^{125}I でラベルし、カルボジイミド誘導体を用いてアクチン分子に化学架橋反応で共有結合させた。架橋アクチンを様々なプロテアーゼで限定分解し、放射活性の導入部位をしらべた。また、別に架橋アクチンを6M尿素存在下でキモトリプシン分解し、放射活性を持つペプチド断片を精製した後、架橋部位を同定した。これらの実験結果に基き相補的なアクチン結合部位は Ala 144 から Gln 167 内に存在することをつきとめた。近年発表された結晶解析結果を参照すると、2.6 kDa ペプチド内に含まれる Leu 185 - Tyr 198 の部位と、相補的な Ala 144 - Gln 167 の部位は空間的には互いにアクチンモノマー分子のサブドメイン4とサブドメイン3に位置することになる。この二つの部位はダブルヘリックス状のアクチンフィラメントにおいて同一ストランド上の上下のモノマー間で結合する位置ではなく異なるストランド上に存在するモノマー間で互いに結合できる位置に存在した。単離した他のペプチド断片には重合阻害効果が観測されなかった事から本研究において同定した二つの相補的な部位がアクチンフィラメントにおける最も主要な接触部位と考えられた。以上の事よりアクチンフィラメントにおいては、同一ストランド上のモノマー間の結合よりも、二本のストランド間の結合の方が強いと結論した。

この論文はアクチン分子自身のペプチド断片を用いてアクチン間接部位を研究するという誠にユニークな方法で開始し、最終的に相補的な結合部位の決定までに至った優れた内容を持っている。よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判断した。