

学 位 論 文 題 名

魚類ミオシンの構造と機能

—ミオシンのフィラメント形成及び熱変性における
ロッドのドメイン構造の役割—

学位論文内容の要旨

ミオシンは筋肉を構成する筋原線維タンパク質の約半分を占める主要なタンパク質であり、分子量48万の巨大分子である。ミオシンは① ATP分解能、② アクチン結合能、③ 生理的な塩濃度下でのフィラメント形成能という3種の生理機能を有し、このうち①及び②はミオシン分子の頭部（S-1）部分が、また③は長い棒状の尾部（rod）が担っている。生体内では、ミオシンのフィラメント（機能③）がATPのエネルギーを利用して細いフィラメント（主にアクチンからなる）と相互作用する（機能①、②）ことによって筋収縮が起こるので、筋収縮の分子メカニズムをさらに解明するには、ミオシンの各種生理機能を詳細に理解する事が必須である。

また、筋肉を食品として捉えたと、その主要タンパク質もまたミオシンである。したがって、魚類ミオシンの構造安定性や変性機構を知る事は、魚肉の保蔵、加工処理中の製品の品質制御において不可欠なことである。これまでの魚類ミオシンの研究におけるサブフラグメントの研究はほとんどがS-1部分に関するもので、rodに関する分子レベルの研究はほとんど行われていない。

本論文では 魚類ミオシン rod に注目して、その内部構造と機能の関係、さらには構造安定性を知る事を目標とした。まず、第1章では rod の分子内構造について検討し、第2章では生化学的見地から、フィラメント形成における rod 分子内の各部分の役割について、更に第3章では食品生化学的見地から、ミオシンの加熱時に起こる rod 部分の構造変化について、それぞれ分子内構造と関連づけて検討した。

【第1章 コイ・ミオシン分子、特に尾部の分子内構造の解析】

魚類ミオシン rod の調製は哺乳動物（ウサギ）の方法が適用し難いため、まずその調製法を開発した。次に単離したコイ rod の分子内構造を キモトリプシン消化法によって検討したところ、ウサギ rod で知られている切断部位の他に、新たな切断部位が存在する事を発見し、95k S-2/40k LMM junction と命名した。ここでの切断により得られる 40k LMM は、フィラメントを形成するものとしてはこれまでに報告された断片のうちで最も短いものである。

この切断部位は 魚類ミオシンに普遍的に存在する事を確認した。また、ウサギ・ミオシンのこの部位は通常は切断されないが、加熱や尿素処理することにより切断を受ける様になった。そのため、動物種によらず rod のこの部位の構造は脆弱であり、魚類ミオシンの場合には、未変性状態でも既にこの構造はほぐれていてキモトリプシン消化を受けると結論した。

【第2章 ミオシン尾部のフィラメント形成に関わる分子内構造の研究】

第1章で単離した 40k LMM のフィラメント形成能について、rod や通常の 70 kDa のライトメロミオシン (LMM) と比較した。その結果、40kLMM は side-by-side に集合し易く、幅広いパラクリスタルを形成する特徴を持つ事を見いだした。また、もうひとつの特徴は Mg^{2+} 非存在下でもよく自己集合して、LMM や rod の様に Mg^{2+} 要求性を示さない事であった。そのため、 Mg^{2+} 作用部位は 40k LMM 部分ではなく、LMM の N 末端に存在する事を推定した。これらの結果を基に、rod をその機能から3つのドメインに分ける事ができた。すなわち、rod の C 末端から順に、①フィラメント形成ドメイン (40k LMM)、② Mg^{2+} によるフィラメント調節部分 (20kDa)、③ 分子の side-by-side の集合を物理的に防ぎ、フィラメントの形を整える S-2 部分 (65 kDa) からなると結論した。これらのドメイン構造及び、その機能分担は魚類ミオシンのみならず、哺乳類ミオシンにおいても共通していた。

これら各ドメインの機能はその分子表面の電荷と密接に関係している事を明らかにした。40k LMM はその分子表面の総負電荷量が少ないという特徴があったが、それがフィラメント形成に適した構造であるためにその会合能力は優れ、また Mg^{2+} の影響も受けないと結論した。また、EDC を用いた化学修飾法によって rod のカルボキシル基をブロックして負電荷量を減少させると、フィラメント形成能が改善し、40k LMM とよく似た機能へと機能転換

する事ができた。Mg²⁺ の添加や、pH の低下はフィラメント形成を促進するが、これらの作用機構はいずれも rod や LMM の負電荷を打ち消して、フィラメント形成し易くなるように電荷のバランスを整える事であると考えた。

【第3章 ミオシンの加熱変性時に起きる構造変化】

第1章で得た知見を基にして、ミオシンを加熱した時に起こる rod 部分の構造変化について検討した。その結果ミオシンは加熱のかなり初期の段階で凝集し、オリゴマーを形成する事を発見した。この凝集オリゴマーは Ca-ATPase 活性を有していたので、S-1 部分の変性が起きていないミオシン分子も凝集している事が示され、凝集反応は必ずしも Ca-ATPase の失活に続くような遅い変化ではない事が判った。しかも、このオリゴマーミオシンから得られた rod がオリゴマーとなっていたので、rod 間で凝集反応が起きている事を示した。既に、ミオシンの加熱初期にフィラメント形成能が劣化し、Mg-ATPase 活性が急激に低下する現象が報告されているが、これはミオシンが rod 部分で凝集オリゴマーを形成するために正常なフィラメント形成能を失う事が原因であると思われた。このように加熱初期に rod 部分で起こる凝集反応は、ウサギミオシンにおいても検出されたので、ミオシンの熱変性機構は基本的には魚類とウサギとで共通していると思われた。

凝集オリゴマーミオシンから得られた LMM は凝集していないのに対して、HMM は ATPase 活性を有したまま凝集体を形成して

いたので、rod 部分の凝集には LMM よりも S-2 が関与していると推測した。ただし、この凝集は単離した rod では起こらず、単離した HMM でも起こり難かったので、ミオシン分子の各ドメインが単独で存在する場合と、それらのドメインが互いに結合している場合とでは、変性の起こり方は全く異なる事が示唆された。言い替えると、ミオシンの変性には各ドメイン間の相互作用がかなり影響していると推測できた。また、これらの結果は基本的には哺乳類ミオシンにおいても共通していた。

以上のように、本研究によって魚類ミオシン分子の内部構造と機能の関係、更にその構造安定性に関して、総合的な理解が深められた。また、これらの結果はウサギ・ミオシンでも同様に見いだされたため、本研究によって、骨格筋ミオシン分子の普遍的な構造と機能の関係を明らかにできたといえる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 関 伸 夫

副 査 教 授 西 田 清 義

副 査 助 教 授 今 野 久 仁 彦

副 査 教 授 安 井 勉 (酪農学園大学)

学 位 論 文 題 名

魚類ミオシンの構造と機能

—ミオシンのフィラメント形成及び熱変性における

ロッドのドメイン構造の役割—

筋原繊維タンパク質の約半分を占めるミオシン分子は生化学的には筋肉収縮を担う主要タンパク質として重要な役割を占めている。ミオシンは分子量48万の巨大分子であり、多機能タンパク質である。その機能は①双頭の分子頭部 (S-1 と称する) が担う筋肉収縮の際のエネルギー生産に係わる ATP 加水分解能, ② もう一種の重要なタンパク質であるアクチンと結合, 相互作用能, 及び③ 尾部 (ロッドと称する) が担っている生理的な塩濃度下で自己集合してフィラメントを形成する能力の3種である。また, 筋肉を食品科学的にとらえた場合にも, やはりミオシンは重要なタンパク質であり, 魚肉の利用加工はこのミオシンの変性を適切に制御することが必要である。これまで魚類ミオシンに関する研究の歴史において, ミオシン分子全体をとらえる手段としてミオシンを各種プロテアーゼで切断し, 単純化した系を用いその内部構造と機能の関連を明らかにする方法が多用されている。しかし, その研究のほとんどがミオシン頭部のS-1部分に関するものであり, 分子の半分以上を占める尾部の分子レベルでの研究はほとんど見当たらない。

本論文では魚類ミオシン分子のうち特に尾部 (ロッド) に注目し, 第1章ではコイ・ミオシンから未変性のままでロッドを調製する方法を開発し, その内部構造について α -キトリプシン消化法により分子内構造を明らかにした。さらに, 内部構造の違いを各種魚類を用いて比較検討した。第2章ではロッドのキトリプシン切断により生成した断片中に, 新たなフィラメントを形成する断片を見だし, 尾部の機能であるフィラメント形成における内部構造の役割を明らかにした。さらに第3章では食品学的見地から, 加熱に

よって引き起こされるミット分子に起こる構造変化を頭部、尾部に分け、さらに尾部についてはロッドの内部についてそれぞれ分けて検討し、ミットとして加熱したときに起こるその分子におこる内構造変化を総合的に解析した。

第1章ではコイ・ミットのキトリグッ消化後、塩溶性成分の分離、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーを用いる新調製法によってロッドを単離精製した。その全体的な構造はウサギのそれと非常に類似していた。しかし内部構造について、さらにキトリグッ消化により検討したところ、ウサギで知られている通常の切断部位 (HMM/LMM junction) の外にコイでは LMM 断片内に新たなキトリグッ切断部位 (95k S2/40k LMM junction) が存在し、かなり異なる構造を有していることを示した。この切断でロッドのカルキル末端に位置する非常に短い塩溶性断片 (40k LMM) が生成されることを見いだした。この部位での切断は魚類ミットで広く起こるが、その切断のされやすさは魚種によって異なっていた。これによって魚類ミット分子の尾部のドメイン構造を普遍化することができた。

第2章では第1章で単離した 40k LMM のフィラメント形成能について通常の LMM、ロッドのそれらと比較検討した。その結果、40k LMM は非常に集合しやすく、幅広いバクリスタルを形成し、 Mg^{2+} 非存在下での自己集合能に優れ、フィラメント形成に Mg^{2+} 要求性を示さない特徴があり、LMM やロッドのそれらとは異なっていた。それゆえ、200kDa のミット重鎖のうちフィラメント形成には分子のカルキル末端から1/5の 40k LMM 部分が担っていることを示した。また Mg^{2+} は 40k LMM ではなく通常の LMM のアミノ末端部分約 20kDa 部分に作用することが知られた。ロッドのカルキル基を化学修飾し負の電荷を減少させるとフィラメント形成能は上昇し、しかも Mg 要求性を示さなくなることから、40k LMM の優れた集合能は分子表面の少ない負電荷が原因であり、 Mg^{2+} は負電荷を減少させる作用をもつと推定した。

第3章ではミットを加熱した場合、その初期に頭部の機能である ATPase 活性を保持したままで会合し、オリマーを形成することを見いだした。このミットをキトリグッ消化することによりミットのロッド部分で、凝集反応が起こっていることを明らかにした。S-1 をもたない単離ロッドではそのような凝集体形成が認められず、LMM をもたない HMM ではその程度がかなり小さかったので、ミット分子の変性にはドメイン間の相互作用が強く影響していることが明らかとなった。

本研究の結果により、機能的なフィラメント形成機構およびミット分子内の構造安定性に関して総合的な理解が深められたものと思われる。これらの点を高く評価し、さらに提出された参考論文5編と本論文の公开发表に関わる審査を併せて、主査、副査一同は本論文の提出者は博士(水産学)の学位を授与される充分の資格があるものと判断した。