

学位論文題名

Bio-Gel Mechines Constructed from Muscle Proteins

(筋肉タンパクによるゲルバイオマシンの創成)

学位論文内容の要旨

ゲルによるソフトマシンが開発されたことが契機となって世界的にもソフト&ウエットアクチュエーターが着目されるようになり、多くの研究チームがその開発に乗り出している。しかし、これらのソフトマシンはすべて合成高分子やカーボンナノチューブなどを材料とし、さらにエネルギー効率は生体マシンと比べるとまだまだ劣っているのに加え生体適合性に欠けているものである。生物の動きは筋肉という優れた生体マシンによってもたらされているが、その筋肉は、主にアクチン・ミオシンと呼ばれる分子から構成されており、これらの分子が高次に渡って秩序をもった階層構造を形成している。ダイナミックな動きはアクチン・ミオシンのミクロの変形がその階層構造を経由することにより実現されており、それは極めて高効率な動力システムである。さらに筋肉は水という媒体を含み柔軟性も備えている。明らかに従来のハード&ドライな人工マシンとは異なっている。

本研究では、筋肉という機能性高分子を分解・再構築し、独自の原理に基づいて作動する生体適合性のゲルバイオマシンの開発を目指している。このようなタンパク質特有の酵素活性を生かしながら人工的に再構築型のマシンを作るという試みはそれほど多くないのも現状である。これが実現されると非常に運動効率の高い“ゲルバイオマシン”ができると期待される。さらに生体マシン同様、無公害・生体適合性・広い応用範囲などの特徴を有しており、環境問題・エネルギー問題といった地球規模で抱えている問題に貢献することができると期待される。

一方では、現在、筋収縮の研究は一分子マニピレーションを用いた分子レベルのアプローチと生理学的な手法を用いたマクロスコピックレベルからのアプローチされている。しかし、アクチン・ミオシン滑り運動のメカニズム、階層構造の役割、収縮の協同性などに関する時空間的制御の問題については明らかにされていない点が多く、本研究のように筋肉タンパクゲルを用いてゲルバイオマシンを創製することにより筋収縮のメカニズムをメゾスコピックレベルから解き明かし、生命体機能発現の本質を明らかできるという可能性をもつ。

本論文は第一章の序論、第二章から第五章までの本論、および第6章の結論から構成されている。

第二章では、化学反応を利用したミオシingleの作製とその生理学的特性を検討し、さらにミオシingle上でのアクチン運動発現の試みについて述べている。ホタテ貝閉殻筋横紋筋部より抽出・精製したミオシンは2官能基性の架橋剤や縮合剤で化学架橋することによりゲル化することがわかった。10mm×10mm×1mmのサイズで得られたミオシingleは、高イオン強度下では高膨潤、低イオン強度下では収縮する。SEMによる構造解析からは、このミオシingleが多孔性で秩序をもたないことがわかった。

筋収縮はアクチン・ミオシンが互いに相互作用し滑り運動をすることで起こっている。ミオシンは ATP を分解する酵素活性を持ちこの ATPase 活性がその滑り運動に関与している。つまりミオシンを“ゲルバイオマシーン”として機能させるためには ATPase 活性の保持が必要となる。ゲル化に伴う酵素活性への影響を検討するためミオシンの ATPase 活性を測定した。架橋剤の種類によって ATPase 活性は異なるもののミオシンは高い活性を保持していることがわかった。特にグルタミン転移酵素を利用して作成したミオシンは native のミオシン ATPase 活性とほぼ同等の活性値を保持していることがわかった。これらの結果は、ミオシンがアクチンと十分に相互作用可能であることを示しており、同時にミオシン上でのアクチンの滑り運動発現の可能性を支持するものである。

そこでミオシン上でのアクチンの滑り運動を Motility assay という手法により評価した。滑り運動は ATP の添加後直ちに観察され、運動速度は添加する ATP 濃度に依存していることがわかった。さらに Lineweaver-Burk plot の概念を用いて算出した運動速度の V_{max} は、ミオシンの ATPase 活性と比例関係にあり、両者が強くカップリングしていることを明らかにした。

第三章では、自己組織化と化学反応を利用した配向ミオシンの作成および得られた配向ミオシン上でのアクチン運動制御について述べている。第二章で示したミオシン上でのアクチン滑り運動方向は等方的であったが、これはミオシンの無秩序な構造に起因していると考えられる。ミオシン分子を自己組織化すると同時に Shear stress を印加すると数マイクロオーダーの秩序構造を持つミオシンが得られた。IR によりカルボニル基の二色比を分析するとミオシンは分子レベルで配向していることがわかった。ATPase 活性は Shear stress の強さに比例した単調減少を示していた。この配向ミオシン上でのアクチンの滑り運動を試みた結果、アクチンは配向軸方向に沿った運動つまり異方的な滑り運動（極性に関する異方性は確認できない）を発現することがわかった。その運動異方性および運動速度を解析したところ、IR で確認された配向レベルの傾向とよく一致していたことから、アクチンの滑り運動はミオシンの配向性から制御できることを明らかにした。

第四章では、自己組織化と化学反応を利用した巨大アクチンゲルの作成と機構について検討している。アクチンはカチオン性ポリマーの導入で巨大なファイバーを形成することがわかった。さらにアクチンとポリカチオン間の相互作用はある臨界濃度以上で起こり協同的に働くことがわかった。その成長様式は用いるポリカチオン種に依存しており、また最終生成物に多様なモルフオロジーを見ることができる。TEM を用いた観察によるとワイヤー状、バンドル状、ラテラル状のファイバー、そして時にはリング状と多様なコンプレックスが確認された。このように、アクチンにポリカチオンを導入することで積極的に分子設計が可能であることがわかった。

第五章では第四章で得られた巨大アクチンゲルの運動発現と運動特異性について検討している。本研究で初めて巨大アクチンゲルの滑り運動を配向ミオシン上で実現した。しかも native アクチンの滑り運動速度を越えるような巨大アクチンゲルの存在も確認された。巨大化に伴う運動特性への影響を検討するため、巨大アクチンの平均移動距離 (L) と観測時間の間隔 (τ) の観点から解析を行った。アクチンゲルの平均移動距離 (L) は、どの観測領域において Native アクチンより値が大きく、そして観測時間 (タイムスケール) に対する依存性も高いということが分かった。アクチンゲルの運動は Native アクチンに比べ非常に異方的であり、それがアクチンゲル高速運動にも起因していると考えられた。第六章では、以上の内容を総括して結論とした。

学位論文審査の要旨

主査	教授	長田	義仁
副査	教授	西村	紳一郎
副査	助教授	佐々木	直樹
副査	助教授	龔	剣萍

学位論文題名

Bio-Gel Mechines Constructed from Muscle Proteins

(筋肉タンパクによるゲルバイオマシーンの創成)

学位論文は第1章の序論、第2章から第5章までの本論、および第6章の結論から構成されている。本論について以下にその要旨を述べる。

第二章では、化学反応を利用したミオシンゲルの作製とその生理学的特性を検討し、さらにミオシンゲル上でのアクチン運動発現の試みについて述べている。ホタテ貝閉殻筋横紋筋部より抽出・精製したミオシンは2官能基性の架橋剤や縮合剤で化学架橋することによりゲル化することがわかった。10mm×10mm×1mmのサイズで得られたミオシンゲルは、高イオン強度下では高膨潤、低イオン強度下では収縮する。SEMによる構造解析によってこのミオシンゲルは多孔性でランダムなモルフォロジーを呈することがわかった。

筋収縮はアクチン・ミオシンが互いに相互作用し滑り運動をすることで起こっている。ミオシンはATPを分解する酵素活性を持ち、このATPase活性がこそが滑り運動に関与している。つまりミオシンゲルを“ゲルバイオマシーン”として機能させるためにはATPase活性の保持が必要となる。ゲル化に伴う酵素活性への影響を検討するためミオシンゲルのATPase活性を測定した。架橋剤の種類によってATPase活性は異なるもののミオシンゲルは高い活性を保持していることがわかった。特にグルタミン転移酵素であるトランスグルタミナーゼを利用して作成したミオシンゲルはnativeのミオシンATPase活性とほぼ同等の活性値を保持することがわかった。これらの結果は、ミオシンゲルがアクチンとの相互作用が十分に可能であることを示しており、同時にミオシンゲル上でのアクチンの滑り運動発現の可能性を支持するものである。

そこでミオシンゲル上でのアクチンの滑り運動をMotility assayという手法により評価した。滑り運動はATPの添加後直ちに観察され、運動速度は添加するATP濃度に依存していることがわかった。さらにLineweaver-Burk plotの概念を用いて算出した運動速度の V_{max} は、ミオシンゲルのATPase活性とほぼ比例関係にあり、両者が強くカップリングしていることを明らかにした。

第三章では、自己組織化と化学反応を利用した配向ミオシンゲルの作成および得られた配向ミオシンゲル上でのアクチン運動制御について述べている。第二章で示したミオシンゲル

上でのアクチンは全く等方的な滑り運動を示すことがわかった。これはミオシンゲルのランダムなモルフォロジーに起因しているものと考えられる。ミオシン分子を自己組織化すると同時に化学架橋する際に外部から水流による Shear stress を印加すると数ミクロンオーダーの秩序構造を持つミオシンゲルが得られることがわかった。IR により 1650cm^{-1} のカルボニル基の二色比を分析するとミオシンゲルは分子レベルで配向していることがわかった。ATPase 活性に関しては印加する Shear stress の強さに比例し単調減少を示した。次にこの配向ミオシンゲル上でアクチンの滑り運動を試みた。その結果アクチンは配向軸方向に沿った運動つまり異方的な滑り運動（極性に関する異方性は確認できない）を発現することがわかった。その運動の異方性および運動速度を解析したところ、それらは IR で確認されたカルボニル基の配向性と非常に高い相関性を示した。この結果からアクチンの滑り運動はミオシンゲルの配向性をコントロールすることで制御可能であることがわかった。

第四章では、自己組織化と化学反応を利用した巨大アクチンゲルの作成と機構について検討している。アクチンはカチオン性ポリマーの導入で巨大なファイバーを形成することがわかった。さらにアクチンとポリカチオン間の相互作用はある臨界濃度以上で起こり協同的に働くことがわかった。その成長様式は用いるポリカチオン種に依存しており、また最終生成物に多様なモルフォロジーを見ることができ、TEM を用いた観察によるとワイヤー状、バンドル状、ラテラル状のファイバー、そして時にはリング状と多様なコンプレックスが確認された。このように、アクチンにポリカチオンを導入することで積極的に分子設計が可能であることがわかった。

第五章では第四章で得られた巨大アクチンゲルの運動発現と運動特異性について検討している。本研究で初めて巨大アクチンゲルの滑り運動を配向ミオシンゲル上で実現した。しかも native アクチンの滑り運動速度を越えるような巨大アクチンゲルの存在も確認された。巨大化に伴う運動特性への影響を検討するため、巨大アクチンの平均移動距離 (L) と観測時間の間隔 (τ) の観点から解析を行った。アクチンゲルの平均移動距離 (L) は、どの観測領域において Native アクチンより値が大きく、そして観測時間 (タイムスケール) に対する依存性も高いということが分かった。アクチンゲルの運動は Native アクチンに比べ非常に異方的であり、それがアクチンゲル高速運動にも起因していることが考察された。

著者は、筋肉という機能性高分子を分解・精製した後、自己組織化を利用するとともに化学架橋によって全く新しい構造形態を有するアクチンゲル・ミオシンゲルの構築を行った。さらにこの再構築ゲルは ATP を加水分解する際に生じる化学エネルギーで作動するバイオゲルマシーンとして有用であることをつきとめた。このように筋肉タンパクの学術的・応用的に価値のある独創的な知見を得ている。よって著者は北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。