

学位論文題名

The Relationship between Structure and Motility of Actin Bundle formed with Polycation

(高分子間相互作用により得られたアクチンバンドルの構造と運動性の相関)

学位論文内容の要旨

これまでに本研究室では、筋肉タンパク再構成による運動素子の創製を目標に研究を行ってきた。生物は極めて効率的な動力システムを有する。そのシステムを構成する主要成分は動植物界に広く分布しているアクチン・ミオシンと呼ばれるタンパク質分子である。筋肉の収縮はこのアクチンとミオシンがそれぞれフィラメント→フィブリル→サルコメアといった階層構造を作ることによって、ナノオーダーのアクチン-ミオシンフィブリル間の滑り運動をマクロの運動に集積することで実現されている。本研究室では生物よりアクチンとミオシンを抽出し、人工的に再構築することで生物様運動素子の作成に成功している。作成された運動素子は天然系のアクチン・ミオシンに比べ高い運動を発現することから今までに例の無い生物と同様の原理を基とした人工筋肉への応用が期待される。この運動素子において、アニオン性高分子電解質であるアクチンはカチオン性高分子を導入することで束状集合体として再構築されている。このアクチン集合体の構造を評価し、その運動性との関係を理解することは運動素子の運動性能の制御に繋がり、その応用への可能性に寄与する。また上記の様なアクチン集合体は細胞内に広く存在し、その細胞骨格の形成、及び運動に深く関わるということが知られている。本研究で得られる知見はこのような細胞内におけるアクチン集合体の形成メカニズムに関する知見も与えると期待される。

本学位論文は第1章の序論、第2章から第4章の本論、第5章の結論から構成され、アクチン集合体の構造と運動特性の相関を理解するために有用な知見を与えている。以下が得られた研究結果である。

第2章ではアクチン集合体の極性と運動性の相関を検討した。今までの研究においてアニオン性高分子電解質の性質を持つアクチンがカチオン性高分子との静電的相互作用により束状の集合体を形成することを発見している。様々なカチオン性高分子を導入することで得られたアクチン集合体はATP添加によりミオシン表面上で運動を発現した。またその運動速度は導入するカチオン性高分子の種類により異なる。ミオシン上を運動するアクチンフィラメントの運動方向を決定するのはアクチン分子の極性である。我々はこの極性が運動に影響を及ぼすと考え、アクチン集合体の極性を調べるためにミオシンのアクチン結合部(HMM)で修飾した後、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。その結果全ての

集合体内のアクチンフィラメントで極性の向きを示す矢じり構造(Arrowhead structure)が観察された。これらの TEM 写真より集合体内の一本のアクチンフィラメントはすべて極性が揃っていることが分かり、さらに集合体を形成するフィラメント同士の極性は揃っているとは限らないことが明らかになった。そこでアクチン集合体の極性をファイバー内における個々のアクチンフィラメントの極性から評価したところ、集合体を形成させる条件の違いにより極性が大きく異なることが判明した。さらにアクチン集合体の極性が高いほど運動速度が大きくなる傾向が見られることから、アクチン集合体の運動速度は自身の極性により決まることが示唆された。

第3章ではアクチン集合体の極性を決める要素を解明した。集合体の極性はアクチンに導入するカチオン性高分子濃度の増加に対し減少することが分かった。カチオン性高分子の濃度の上昇はアクチンと高分子の衝突頻度(反応確率)の増加に繋がると考えられることから、集合体形成速度の高分子濃度依存性を検討したところ、高分子濃度増加に伴い集合体形成速度の上昇が見られた。またカチオン性高分子のサイズ増加により集合体形成速度が減少し、同時にその極性も増加するという結果も得られた。以上よりアクチン集合体形成のキネティクスがその極性を支配することが示唆された。ここから、我々は集合体形成時におけるアクチンの再配向の頻度が極性に影響を及ぼすと考えた。そこで集合体形成におけるアクチンの大きさを減らすことで極性の制御を試みたところアクチンのサイズ減少に伴い極性の増加が見られた。以上の結果よりアクチン集合体形成時におけるアクチンの再配向可能性がその極性に影響を及ぼすことが分かった。

第4章ではアクチン集合体の三次元構造を明らかにした。これまでにアクチン集合体の構築過程の理解、及びそれを基とした構造制御を目的に TEM を用いて集合体の構造を系統的に調べている。その結果集合体はアクチンフィラメントの束であり、その形状はアクチンとカップリングさせるカチオン性高分子の種類・濃度、及び集合体形成時の溶液中イオン強度によって大きく異なることを明らかとしている。TEM による像は電子線の透過像であるので通常はサンプルの二次元的な構造しか評価できないことから、本項では三次元電子顕微鏡法(Transmission Electron Microtomography: TEMT)を用いて、剛性に大きく関与すると考えられるアクチン集合体の三次元構造を検証した。TEMT 観察結果からアクチン集合体の断面構造は形成条件(カチオン性高分子の種類・濃度やイオン強度)により扁平・円・三角形と多様に変化することが分かった。この結果からアクチン集合体の構造はアクチン-アクチン間、及びアクチン-カチオン性高分子間に働く静電的相互作用力やカチオン種によるアクチンへの特異的相互作用力の違いで変化することが示唆された。

以上の結果より、アクチン集合体の極性はアクチン-カチオン性高分子の衝突頻度(反応確率)に関係する集合体形成のキネティクスに、断面構造はアクチンの表面電荷およびポリカチオンの化学種に関係するアクチンフィラメント同士に働く静電相互作用力に影響を受け、それぞれ異なる要素で決められることが分かる。これらの知見を基にアクチン集合体の構造、およびそれに起因する運動機能はコントロール可能であり、以上の結果は運動素子の設計、及びに生体内におけるアクチン集合体の機能発現メカニズムの理解に大きく寄与すると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 龔 劍 萍
副 査 教 授 佐々木 直 樹
副 査 教 授 川 端 和 重
副 査 准教授 古 川 英 光

学 位 論 文 題 名

The Relationship between Structure and Motility of Actin Bundle formed with Polycation

(高分子間相互作用により得られたアクチンバンドルの構造と運動性の相関)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

これまでの研究では、生体筋肉よりタンパク質分子であるアクチンとミオシンを抽出し、人工的に再構築することで生物様運動素子の作成に成功している。作成された運動素子は天然のアクチン-ミオシン運動系に比べ高い運動性を持つことから今までに例の無い生物と同様の原理を基とした人工筋肉への応用が期待される。この運動素子においてアニオン性高分子電解質であるアクチンはカチオン性高分子を導入することで束状集合体として再構築されている。今までにこのアクチン集合体の構造、及びその運動性との関係は未解明であった。

本研究はアクチン集合体の構造と運動性の相関、及びその構造形成メカニズムを理解することを目的とするものである。本学位論文は第1章の序論、第2章から第4章の本論、第5章の結論から構成され、以下の研究成果が得られている。

第2章ではアクチン集合体の極性と運動性の相関を検討した。様々なカチオン性高分子を導入することで得られたアクチン集合体はATP添加によりミオシン表面上で運動を発現した。またその運動速度は導入するカチオン性高分子の種類により異なる。ミオシン上を運動するアクチンフィラメントの運動方向を決定するのはアクチン分子の極性である。本研究ではこの極性が運動に影響を及ぼすと考え、アクチン集合体の極性を調べるためにミオシンのアクチン結合部(HMM)で修飾した後、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。その結果全ての集合体内のアクチンフィラメントで極性の向きを示す矢じり構造(Arrowhead structure)が観察された。これらのTEM写真より集合体内の一本のアクチンフィラメントはすべて極性が揃っていることが分かり、さらに集

合体を形成するフィラメント同士の極性は揃っているとは限らないことが明らかになった。そこでアクチン集合体の極性をファイバー内における個々のアクチンフィラメントの極性から評価したところ、集合体を形成させる条件の違いにより極性が大きく異なることが判明した。さらにアクチン集合体の極性が高いほど運動速度が大きくなる傾向が見られることから、アクチン集合体の運動速度は自身の極性により決まることが示唆された。

第3章ではアクチン集合体の極性を決める要素を解明した。集合体の極性はアクチンに導入するカチオン性高分子濃度の増加に対し減少することが分かった。カチオン性高分子の濃度上昇はアクチンと高分子の衝突頻度(反応確率)の増加に繋がると考えられることから、集合体形成時間の高分子濃度依存性を検討したところ、高分子濃度増加に伴い形成時間の減少が見られた。またカチオン性高分子のサイズ増加により集合体形成時間が短くなり、同時にその極性も増加するという結果も得られた。以上よりアクチン集合体形成の速度がその極性を支配することが分かった。

第4章ではアクチン集合体の三次元構造を明らかにした。これまでにアクチン集合体の構築過程の理解、及びそれを基とした構造制御を目的にTEMを用いて集合体の構造は系統的に調べられている。その結果集合体の形状はアクチンと相互作用するカチオン性高分子の種類・濃度、及び集合体形成時の溶液のイオン強度によって大きく異なることを明らかとなっている。TEMによる像は電子線の透過像であるので通常はサンプルの二次元的な構造しか評価できないことから、本項では三次元電子顕微鏡法(Transmission Electron Microtomography: TEMT)を用いて、剛性に大きく関与すると考えられるアクチン集合体の三次元構造を検証した。TEMT観察結果からアクチン集合体の断面構造は形成条件(カチオン性高分子の種類・濃度やイオン強度)により扁平・円・三角形と多様に変化することが分かった。この結果からアクチン集合体の構造はアクチン-アクチン間、及びアクチン-カチオン性高分子間に働く静電的相互作用力やカチオン種によるアクチンへの特異的相互作用力の違いで変化することが示唆された。

以上の結果から、本研究では次のような知見が得られた。

- 1) アクチン集合体の運動速度は極性に支配され、その極性は集合体形成の速度に依存する。
- 2) アクチン集合体の断面形状はアクチンフィラメント同士の静電相互作用の影響を受ける。

これらの知見はアクチン集合体の運動制御を可能とし、その運動素子の応用可能性に寄与する。またこの様なアクチン集合体は細胞内に広く存在し骨格の形成及び運動に深く関わるということが知られているので、本知見はこの様な細胞内におけるアクチン集合体の形成メカニズムに関する理解にも寄与すると期待される。

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。