

論文の内容の要旨

論文題目

構造から探るアクチン・ミオシン系エネルギー変換の分子機構

氏名

安永卓生

生物は、アデノシン 3 リン酸(ATP)が加水分解されアデノシン 2 リン酸(ADP)になる時に解放される化学エネルギーを使って様々な生物活性を実現する。そこで、化学エネルギーを、目的とするエネルギーに変換するメカニズムが必要となる。これを担うものはタンパク質である。筋収縮に関わるアクチン・ミオシン系タンパク質は真核生物に普遍的に存するタンパク質である。このタンパク質により、ATP の加水分解反応の化学エネルギーが「アクチンとミオシン間の滑り運動」の力学エネルギーに変換される。この化学-力学エネルギー変換能をもつタンパク質は分子モーターと呼ばれる。本研究では、「エネルギー変換」という興味深い物理現象を示す分子モーターを対象として、モーター機能を担うタンパク質構造の観点から、そのメカニズムに迫る研究を行った。

現在、滑り運動を考えるメカニズムには、モータータンパク質は、化学反応中間状態に応じてミオシンが構造を変化するという「マクロなエンジン」(爆発反応状態と車軸回転が直接カップルする)であるという考え方と、熱揺らぎを利用した「マックスウェルのデーモン型」(タンパク質構造の異方性と ATP のエネルギーがデーモン役を果たす)の熱機関であるという考え方の大きく 2 種の考え方がある。どちら場合にもミオシンあるいはアクチンの構造がエネルギー変換を行うのに重要な役割を果たす事は明らかである。

そこで、本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いて溶液中でのアクチン、ミオシン及びその複合体の構造研究を行った。また、蛍光エネルギー移動の情報と他の構造情報を結びつけて、タンパク質の特定部位の三次元的な位置を同定するための新しい解析法(確率的距離幾何学法: probabilistic distance geometry 法)を開発し、ミオシンの構造及びアクチンの構造に適応した。その際、電子顕微鏡像の解析法等の開発を迅速かつ容易に拡張でき、開発した処理法が有効に集積可能な画像処理システム (Eos) を構築した。このシステムは、国際的に他の研究機関でも用いられている。

第一に、クライオ電子顕微鏡法を用いて、アクチンがフィラメントを形成した際に放出される無機リン酸がアクチンフィラメント構造に与える影響を調べた。まず、マクロな量としてのアクチンの曲げ弾性を、非晶質の氷(vitreous ice)の中に急速凍結されたアクチンフィラメントの電子

顕微鏡像から *persistent length* を測定することにより決定した。その結果、無機リン酸濃度が上昇するにつれてアクチンが硬くなり、その見かけの無機リン酸の解離定数は 10 mM 程度であった。また、MgADP 結合型アクチンフィラメントに比べて、ATP 加水分解直前の状態のアナログである MgAMPPNP 結合型アクチンフィラメントでは非常に長い *persistent length* を持った。これらのことは、アクチンがフィラメント化した際に、ATP を加水分解し無機リン酸の放出を行うにつれて、次第に柔らかくなることを意味している。また、この曲げ弾性に影響を与えるのに必要な無機リン酸の濃度は、筋繊維で測定される最大張力の減少に必要な濃度とほぼ一致し、張力発生に対するアクチンの構造の影響を考える必要がある事が分かった。また、MgAMPPNP 結合型アクチンと MgADP 結合型アクチンの三次元構造を電子顕微鏡像から再構成し比較すると、アクチンの第2サブドメインに構造変化が限局していることが分かった。また、構造揺らぎの様子も変化していると推定され、こうした構造変化・構造揺らぎの変化がアクチンの曲げ弾性、アクチン・ミオシン系の張力発生に影響を与えていると予測できる。

こうしたアクチンの中での構造変化の可能性を吟味するためバイオインフォマティクスを用いた。即ち、Ambivalent 配列予測法を用いて、アクチン構造変化の *switch* 領域を検定したところ、アクチンの第三サブドメインから第四サブドメインにいたるループ領域と、アクチンのカルボキシル末端領域 (C末端領域) が候補となった。前者は今回得られた構造揺らぎモードの変化に対応する領域と一致する、今後、以下での述べる分解能の向上により、こうした配列構造からの予測と実際の三次元構造変化を結びつけることができるものと考えている。

C末端近傍に存在する Cys374(アミノ末端から 374 番目にあるシステイン残基)は、アクチンのランドマークとして使われてきた。しかし、Ambivalent 配列予測は、環境による構造変化がこの領域に生じやすい事を示しており、蛍光分子などによる化学標識の結果、Cys374 を含むC末端領域の構造変化が誘起される可能性を考慮する必要がある。一方で、X線結晶解析からも、Cys374 が重原子標識された場合に近傍の構造が大きく変わっていることが報告されている。

そこで、前述の *probabilistic distance geometry* 法を適用し、アクチンの Cys374 の位置を計算した。その結果、Cys374 の位置は、それが標識されていない結晶構造と、20 Å 以上異なっていた。この解析法は、後に述べるようにミオシンの構造変化や筋収縮制御機構の構造解析においても有効であった。このC末端構造の変化をクライオ電子顕微鏡法で確認するにも、電子顕微鏡像の分解能の向上が求められている。

第二に、モータータンパク質であるミオシンに関して、以下の研究を行った。

先ず、ミオシンと蛍光性タンパク質との融合タンパク質での蛍光エネルギー移動を用い、ミオシンの構造変化を捉えることに鈴木らとの共同研究により成功した。その際は、ミオシンのX線結晶構造として2つの異なる構造の存在が明らかとなっていたので、これらについて

probabilistic distance geometry 法により、それぞれ、溶液中での MgADP 及び MgADPPi の状態とよく対応することを明らかとした。この時、加水分解反応に伴うミオシンの構造変化は滑り運動の向きと一致しており、「マクロなエンジン説」と無矛盾であった。その後、ミオシンの第三の構造が結晶構造により見出された。本研究では、その第三の構造を検証したところ、MgADP 及び MgADPPi 条件での蛍光エネルギー移動から得られた距離を説明できなかった。従って、ミオシンの第三の構造は遷移状態を捕捉したものであると考えられた。しかし、蛍光エネルギー移動から得られた構造は多数の分子の平均である点に疑問が残った。

そこで、クライオ電子顕微鏡法を用いて溶液内での単一分子構造を明らかにするために、新しい画像解析法（ホログラフィック像再構成法）の開発を行った。このホログラフィック像再構成法を用いて、ミオシン頭部の像をクライオ電子顕微鏡法によりコントラストが高くかつ 2 nm 程度の分解能を確保しつつ撮影することに成功した。この時、ヌクレオチドが結合しない、同一化学状態でも、2つ以上の構造が混在している事が分かった。特に、軽鎖結合部位とモータードメインとの相対配置が変化していることが分かった。この事は、蛍光エネルギー移動の結果と合わせると、「ミオシンは二つ以上の構造の平衡にあり、この平衡が化学反応状態に応じてシフトする」と考えるべきであろう事を示している。

次に、同様の手法を用いて、アクチン・ミオシン硬直複合体の三次元構造を得た。分解能が 2 nm より良くなったので、ミオシンがアクチンと結合する際、ミオシン内の2つのドメイン構造（Lower 50K と Upper 50K と呼ばれる2つのドメイン）がその配置を変える事がわかった。この配置変換により2つの構造の間にあるクレフトがより大きく開くようになった。その結果、ATP の加水分解で生じた無機リン酸の放出が容易になる。この変化こそがエネルギー散逸（反応の不可逆性・滑り運動の一方向性）が生じる原因であり、エネルギー変換の鍵となると考えた。この時、現在の分解能では、ミオシンの2つのドメインは、それぞれ単独に吟味すると、X線結晶解析の結果得られた原子モデルと良く一致していた。この事は、ミオシンの原子モデルでも示唆されているように、Lower 50K と Upper 50K と呼ばれる2つのドメインはそれぞれ一つの構造体として一体であり、変化するのはそれらの相対的配置の転換である事を意味している。従って、力学反応を説明するためには、二つのドメイン間を、化学状態などに応じてコンプライアンスが変化するバネでつないだモデルが有効であると考えられる。

現在の情報を使って、ミオシン・アクチン系がエネルギー変換を行う分子メカニズムを考えると以下ようになる。2つ以上の準安定的な構造をミオシンはとることができ、それらの構造の間でミオシンは構造を可逆的に遷移する。それぞれの構造での滞在時間が、ミオシンの化学状態（特に結合したヌクレオチド、リン酸）やアクチンとの結合により変化し、構造の平衡がシフトする。この平衡のシフトをバネ定数の変化として、この支点、力点、作用点の関係が変化する

と考えることは有効であろう。また、アクチンとの結合による無機リン酸の放出は、ミオシンへの無機リン酸の再結合がほとんど不可逆的である故に、無機リン酸の結合状態の変化を伴う構造の間の平衡のシフトを不可逆的なものとし、滑り運動の一方向性を確実に起こすことができると考えられる。この意味で「マックスウェルのデーモン型」の考え方が重要である。

今後、更に、ミオシン、アクチン及びその複合体の三次元構造を、二次構造（特に α ヘリックス）の配置が認識できる分解能（ ~ 0.9 nm）まであげることにより、原子モデルとより直接的に比較することができるようになり、詳細な分子メカニズムを明らかにすることができると考えている。

本論文の論文の結論は以下の通りである。

1. アクチンは、ATP 型、ADP・Pi 型、ADP 型と次第に柔らかくなり、その構造と揺らぎのモードを変化させる。これは、筋収縮における力発生や細胞骨格系のスイッチなどに関連している可能性がある。
2. アクチンの C 末端近傍の Cys374 を化学標識すると、C 末端近傍の構造が変化する。このことは、アクチン C 末端近傍が環境に応じて構造を変え得ることを示唆している。
3. X線結晶解析によって報告されたミオシンの第三の構造は蛍光エネルギー移動法による距離情報と互いに矛盾する。従って、遷移状態であると考えられる。
4. ホログラフィック・クライオ電子顕微鏡法を用いて、ミオシン単一分子（分子重量 130kDa）の実像を捉えることに成功した。
5. 得られたミオシン単一分子像を、結晶構造と比較すると、溶液中で異なる構造をとっているものと同じ構造を取っているものがある。このことは、二つの構造の間の平衡があり、この平衡がリガンドによってシフトするとした徳永らの研究と矛盾しない。
6. ミオシン頭部はアクチンと強い結合をする際に、アクチン・クレフトを開く。このアクチン・クレフトの解放は無機リン酸の解離と関連していると考えられる。
7. ミオシン内に存在する熱揺らぎにより、分子内に想定された「てこ」がアクチン結合、ヌクレオチドの状態、張力の状態などに応じて、支点、力点、作用点などを変化させることが、滑り運動に結びついている可能性がある。
8. 確率的距離幾何学法は分子の構造変化を捉える際に有効である。
9. 新しく開発した画像解析支援システム(Eos)は電子顕微鏡像解析、確率的幾何学法のプログラム開発において有効であり、また、インターネットへの公開を通して広く使われている。