

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大井 淳史

アクチンの3次構造は2つのドメインで構成され、この間を隔てているクレフト領域にはヌクレオチドと2価の陽イオンが結合しており、アクチンの構造安定性を著しく高めている。アクチンにはいくつかのアイソフォームがあるが、アミノ酸配列はアイソフォーム間および生物種間で高く保存されている。しかしながら、アクチンの多様性が少数のアミノ酸置換によって実現されていることが示唆されている。魚類の骨格筋アクチン（以下、単にアクチンと略記）についても少ないながらアミノ酸置換の異なるいくつかのバリエーションが報告されている。このような背景の下、本研究では魚類アクチンの機能特性ならびに熱安定性を決定する分子機構を明らかにすることを目的とした。

まず、アクチンに対するヌクレオチド交換スキームの適用可能性を、タンパク質分解酵素であるズブチリシンによって限定分解されたウサギ・アクチンをモデルとして検証した。その結果、ズブチリシンによって内部切断を受けたアクチンは、シーケンシャルルートでのATPの結合定数が $2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ から $1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ へと約1/2に低下し、 Ca^{2+} の結合定数も $3.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ から $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ へと約1/10に低下し、ヌクレオチド交換に対する Ca^{2+} による制御機構はズブチリシン処理したアクチンにおいても成立した。

次に、コイ・アクチンのATP結合定数は $5.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (20°C) と、ニワトリ・アクチンの結合定数 $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ より小さかった。またADPとの結合定数もコイ・アクチンで $1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と、ニワトリ・アクチンの $5.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ より小さかった。一方、結合定数から算出されるATPとADPの結合の自由エネルギー差はコイ・アクチンで -2.3 kJ/mol 、ニワトリ・アクチンで -2.1 kJ/mol と、両アクチン間でATPの γ 位リン酸基の結合には差がないことが示唆された。次に、蛍光性 Ca^{2+} キレート試薬を用いて Ca^{2+} に対する結合親和性を解析したところ、コイ・アクチンの結合定数は $6.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と、対照のニワトリ・アクチンの $1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ より小さく、親和性が低かった。これらの結果から、ニワトリ・アクチンを対照とした場合の5箇所のアミノ酸置換(Asp/Glu-2, Ala/Ser-155, Val/Ile-165, Ala/Thr-278, Leu/Met-299)は、リガンドを結合していない状態のバックボーン自体の安定性は変えないが、ヌクレオチドおよび Ca^{2+} に対する親和性を低下させることによって、アクチンの安定性に影響を及ぼすことが示唆された。

さらに、コイ・アクチンのAla/Ser-155置換の立体構造への影響を調べるために、既報の恒温動物アクチンの原子座標を用いて分子モデリングを行った。その結果、Ser-155の場合には、ヘアピン上の対称位置にあるThr-160と水素結合して β シートを安定化させていた。一方、Ala-155の場合には水素結合が形成されず、 β シート構造に影響を及ぼした。さらに詳細に検討したところ、Ala-155またはSer-155は隣接するヘアピン構造Met299-Tyr306のSer-300およびThr-303と水素結合しており、Ala/Ser-155置換が2つのヘアピンに亘って広くヌクレオチド結合領域に影響を及ぼしている可能性が示唆

された。次に、ATP 結合に伴うエンタルピー変化はコイ・アクチンで -65kJ/mol と、ニワトリ・アクチンの -110kJ/mol に比して著しく小さかった。このことは Ala/Ser-155 置換が ATP とアクチン間に形成される多くの結合に影響を及ぼしていることを示唆しており、分子モデルの解析からの推論を支持した。また、結合に伴うエンタルピー項の変化はコイ・アクチンで -39kJ/mol 、ニワトリ・アクチンでは -82kJ/mol と、コイ・アクチンでは ATP 結合に伴う分子構造の安定化が脆弱であることが明らかになった。

アクチンを pyrene iodoacetamide で化学修飾し、 0.2mM ATP , 0.2mM Ca^{2+} 存在下、 50°C におけるコイ・アクチンの熱変性速度を測定したところ、 $1.5 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ と、対照としたニワトリ・アクチンの $3.4 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ と比べて著しく大きく、熱安定性が劣っていた。この速い熱変性は ATP および Ca^{2+} 濃度の上昇によって抑制され、特に Ca^{2+} の効果が顕著であった。また熱変性に伴うエンタルピー変化を算出した結果、コイ・アクチンで $252 \pm 18\text{ kJ/mol}$ 、ニワトリ・アクチンで $270 \pm 29\text{ kJ/mol}$ と、有意な差は見出されず、コイ・アクチンの熱変性の速さは変性反応の頻度因子によるものであることが示唆された。以上の結果から、コイ・アクチンにおける低い熱安定性はリガンドとの低親和性に起因するものであることが明らかになった。

以上、本研究において、コイ・アクチンを対象としたヌクレオチドおよび Ca^{2+} との親和性の定量的解析により、Ala/Ser-155 のアミノ酸置換がアクチンの構造ならびに熱安定性に影響することを明らかにした。従来から魚類アクチンが恒温動物アクチンに比べて不安定性であることが知られていたが、本研究により初めてその分子機構が明らかとなった。本研究の成果は、タンパク質の立体構造化学に基礎的知見を与えるのみならず、魚肉タンパク質の利用加工上の特異性解明にも応用できることから、食品化学にも資するところが大きく、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。