

論文の内容の要旨

論文題目 Purification and biochemical analyses of myosin VI isolated from
 sea urchin eggs

(ウニ卵ミオシン VI の精製、およびその生化学的性質の解析)

氏 名 坂田宗平

ミオシン VI は、ミオシンスーパーファミリーに属するタンパク質であり、重鎖と軽鎖(カルモデュリン) から構成される。その酵素的性質や分子形状について、これまでブタとマウスのミオシン VI のモーター部分を含む部分長の組み替え体タンパク質で調べられてきた。その Mg-ATPase 活性は F-アクチンにより活性化され、アクチン活性化 ATPase 活性はさらにカルシウムイオンや頭部(モーター部分) のリン酸化により活性化されるという報告がされてきた。ミオシン VI の特徴は他のミオシン(II, I, V, X)と異なり、F-アクチン上をマイナス端に向かって運動すること (Wells A.L., Lin A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain S.M., Hasson T., Carragher, B.O., Milligan, R.A. & Sweeney, H.L., 1999) である。生物学的な働きについては、細胞内膜系の輸送をはじめ、様々な活性が報告されている。しかしながらミオシン VI はこれまで細胞から単離されたことはなく、細胞中でどのように存在し、どのように機能するのかははっきり分かっていない。

当研究室での先行研究で、ウニ卵中の F-アクチン結合タンパク質の検索が行われた (Terasaki et al., 1997)。その結果、同定された F-アクチン結合タンパク質の一つにミオシン VI が見出された。そこで本研究では、ミオシン VI の F-アクチン結合特性を利

用することにより、細胞内に存在するミオシン VI を単離精製し、その生化学的性質を調べることを目的とした。

ウニ卵ミオシン VI は以下のようにして精製した。ウニ卵抽出液にウサギ骨格筋より精製した F-アクチンを混合し、約5分間、ゆっくりと攪拌すると無色透明、もしくは白いチリ状の沈殿が現れた。これを遠心により回収し、高塩濃度の緩衝液に溶解した。さらに超遠心を行い、沈殿した F-アクチンを回収して、最終的に高濃度の ATP 溶液に懸濁した。次に ATP 可溶化画分をゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、ミオシン VI を精製した。

ミオシン VI はその一次配列の情報よりコイルドコイル領域を持つことが予想されたため、2量体を形成すると考えられていたが、近年、単量体で存在しうることが報告された(Lister, I., Schmitz, S., Walker, M., Trinick, J., Buss, F., Veigel, C. & Kendrick-Jones, J., 2004)。本研究において、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置の解析により、得られたミオシン VI は単量体であることが示唆された。

ミオシン VI はその一次配列の情報よりコイルドコイル領域を持つことが予想されたため、2量体を形成すると考えられていたが、近年、単量体で存在しうることが報告された。本研究において、ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置の解析により、得られたミオシン VI は単量体であることが示唆された。

電子顕微鏡を用いた分子形態の観察により、精製したミオシン VI は4種類の構造をとっている様子が観察された。これらのうち、大きい球と小さい球が棒状の構造で繋がれて見える像については、大きい方の球はミオシン頭部、小さい方は尾部であると考えた。この分子の長さは 39.3 ± 5.2 nm であった。また、一つの球状の構造体で形成されている像については、頭部と尾部が相互作用して形成されたと考えた。カルシウムイオン濃度を変化させて、これらの像の存在比率を算出したところ、大きい球と小さい球が棒状の構造で繋がれた像は、カルシウムイオン濃度が減少するとその存在比率が下がり、一つの球状構造体で形成された像は、逆にその比率が高まった。このことはミオシン VI が、カルシウムイオン濃度に応じて、構造を変化させていることを示唆している。

Mg-ATPase 活性を測定したところ、F-アクチン濃度依存的に活性の上昇が見られた。また、カルシウムイオン濃度を 1mM まで変化させて ATPase 活性を測定したところ、カルシウムイオン濃度依存的に活性の上昇が見られた。この性質はこれまで報告されていなかったものである。次に、F-アクチンの滑り運動活性を測定したところ、1mM ATP 存在下で、平均 $0.16 \mu\text{m/s}$ の速度でマイナス端に向けた滑り運動をする様子が観察された。滑り運動

速度を様々なカルシウムイオン濃度で計測したところ、カルシウムイオン濃度の上昇とともに、速度が減少する様子が見られた。この結果は、他の生物種の組み換え体ミオシン VI を使用した研究報告と一致する。

滑り運動活性の測定の際、ニトロセルロース膜上のミオシン VI の密度を変えて F-アクチンの landing rate を求めた。その結果、F-アクチンが連続的に滑り運動するには、最低 2 つのミオシン VI 分子が必要であると算出された。また、ミオシン VI の密度を変えて F-アクチンの滑り運動速度を求めた。その結果、ミオシン VI の密度が低いと速度が低下する様子が観察された。これらの結果より、単量体ウニ卵ミオシン VI はノンプロセッシブモーターであることが分かった。

本研究では、ウニ卵を用いて、ミオシン VI を初めて細胞から単離することに成功し、その生化学的性質、分子モーターとしての性質を明らかにした。細胞から得られた全長分子のミオシン VI の諸性質が研究されたのはこれが初めてである。また、カルシウムイオンが、ミオシン VI の Mg-ATPase 活性を上昇させることを明らかにし、さらにカルシウムイオン濃度に応じて、ミオシン VI が構造変化を起こすことを示唆する結果を得た。これらの知見は、組み換え体を使用した研究では得られなかったものであり、細胞から単離したミオシン VI を用いた本研究においてはじめて明らかになったものである。