

氏名	小原 收 お はら おさむ
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第 808 号
学位授与の日付	昭和 58 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	架橋反応によるアクチンの構造研究

論文調査委員 (主査) 教授 大井 龍夫 教授 大西 俊一 教授 寺本 英

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は筋肉蛋白質アクチンの構造について種々の架橋試薬を用いて研究し、分子内に架橋されたものについての詳細な解析からアクチン分子のコンホメーションについての新しい知識を得たものである。

第 1 に申請者は分子内架橋が実現する条件を検討するため種々の鎖長をもつ架橋剤による生成物を分析したが、スベリミデイトを用いると、分子間架橋物は僅かで大部分が分子内に 1 個の架橋がかかったものであることを見出した。アクチン分子が単分散の G 状態にある塩のうすい環境で架橋したものは、アクチンの重合能等の性質に影響を与えないのに対して、生理的塩環境下で分子が重合している F 状態でアクチンを架橋したものは分子内架橋が 1 個であるにもかかわらず著しい性質の変化が認められた。すなわち通常ならば G 状態に分散する無塩の溶液中でも脱重合せずに粘度の高い重合状態を保っていた。

次に申請者はこの架橋による性質の変化と架橋物の構造との関係を生化学的、物理化学的方法でしらべた。この変化が単にリジン残基の化学修飾によるものでないことは単官能性のイミドエステルを反応させても効果がないことから確められ、また無塩状態での架橋アクチンが通常の F アクチンのもつ結合ヌクレチドである ADP を結合していることは分子が繊維状に重合していることを示唆した。実際電子顕微鏡によって無塩環境、生理的塩環境の分子を観察すると、重合して繊維状となった分子が見え、前者では曲がりやすい分子となっていた。そして重合状態から脱重合する速度がおそいため過渡現象でもないことは低塩濃度下の架橋アクチンを超音波処理する実験で明らかにした。F-アクチンは超音波処理によって小断片となる。架橋アクチンもこの処理によって一たん粘度が小さくなるが、減少した粘度は再び上昇し分子が重合してゆくことからそのように推論された。さらに円偏光二色性の測定によれば、G と F の 2 状態では 280 nm 附近のスペクトルに大きな差が認められるが、架橋アクチンは溶媒環境によらず常に F 状態のスペクトルを示した。すなわち以上の結果はアクチン分子のコンホメーションが F 状態に固定されるよう架橋が働いていることを示している。

なお架橋アクチンは生理的塩環境下で通常の F アクチンと区別がつかず、トロポミオシン、Hメロミオ

ンとの結合にも差が認められなかった。無塩状態でもF状態を保つため、低塩濃度下での他の蛋白質との結合が調べることが可能であり、トロポミオシンとは結合せず、Hメロミオシンと結合するという結果を得ている。さらにアクチンと結合して重合能を失わせる酵素蛋白質 DNase I との反応も調べている。架橋アクチンは長時間おかない限り DNase I と相互作用せず、超音波処理によってようやく脱重合することがわかった。架橋によってコンホメーションがF状態になっているため DNase I と相互作用しうるG状態は繊維状分子の端で時に実現するにすぎないと考えられる。

参考論文はそれぞれトロポミオシン、トロポニンに対する架橋実験の結果を述べたものである。

論文審査の結果の要旨

アクチンは筋肉の細いフィラメントを構成する主要蛋白質であって筋収縮の分子機構に直接関係する重要な蛋白質である。また近年原形質流動のような生体内の運動に関係する蛋白質として注目されている。このアクチンの特徴は低塩濃度下では単分散低粘度のGアクチンとして存在するのに対し、生理的な塩環境下では繊維状に重合し粘度の高いFアクチンとなることである。本論文はこの特徴とアクチン分子のコンホメーションとの関係を架橋剤を用いて明らかにしたものである。

主論文ではまず架橋反応の基礎的な検討を行っているが、この結果はどのような長さの架橋剤を用いばどのような生成物ができるかを検討しており有用なものとなっている。種々の試薬中スベリミデイトが分子内架橋に相当であるとの結果はアクチン分子内のアミノ酸残基の空間配置に制限があることを示し、またG状態の架橋がF状態の架橋と異なっていることはアクチン分子の立体構造の差異を示唆しいずれも興味深いものである。次にF状態での架橋アクチンの性質について詳しい検討を行っているが、この結果は主論文の価値ある内容となっている。すなわち低塩濃度下でも脱重合しないでF状態になっている架橋アクチンは、粘度的に高く、電顕写真でも繊維状に重合していること、円偏光二色性のスペクトルがFアクチンと同じであること、結合ヌクレオチドがFアクチンのもつADPであること、超音波処理後一たん下った粘度がふたたび上昇し重合することなどによって、架橋アクチンが低塩濃度溶液中でもF状態になっていることを明確に証明した。分子内にただ一個の架橋をかけることによって分子が一つのコンホメーションに安定化されるというこの発見は貴重なものである。従来このような状態もしくはコンホメーションの固定化が多く試みられながら実際ほとんど成功していなかったことからみて、架橋によるコンホメーションの固定化をはじめ示した貢献は大きい。またこの架橋アクチンが低塩濃度下でもF状態にあることを利用し、これまではかれなかった他蛋白質との相互作用を種々の塩環境下で調べられるようになったことも注目に値する。なおDNase I との複合体形成についての結果はこの架橋アクチンが最近注目されている各種アクチン結合蛋白質との相互作用の研究に有用であることを示唆している。以上主論文はアクチン分子の構造について重要かつ貴重な知見を与えた。

参考論文は架橋実験によってトロポミオシンおよびトロポニンの折りたたまれた鎖の近隣残基を同定しており、それぞれ貢献度の高いものである。

よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。