

氏 名	上 野 均 うえ の ひとし
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 488 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 11 月 24 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 化 学 専 攻
学位論文題目	トロポミオシンの構造と機能

論文調査委員 (主査) 教授 高浪 満 教授 香月裕彦 教授 大井竜夫 教授 川出由己

論 文 内 容 の 要 旨

筋収縮の分子機構の研究は構成タンパク質の分離・精製と共に近年著しい発展をみせている。骨格筋の主なタンパク質は、太い繊維を作るミオシンと、細い繊維を作るアクチン、トロポミオシン、トロポニンである。このうちトロポミオシンは分子量7万で、 α らせんのサブユニットが2本よりあわさった長さ400Åの棒状分子であるが、附加塩がない場合、棒状分子が次ぎ次ぎと重合して細長い分子となる。この分子はやはり繊維状のアクチン2重らせんの溝にはまる形で筋肉の細い繊維を構成する。そしてトロポミオシン1分子に対し1分子のトロポニンが結合しており、Caイオンがトロポニン分子に結合するか離れるかによって筋収縮の制御が行われる。本論文はこの制御機構に関係しているトロポミオシンの構造についての研究が述べられている。

トロポミオシンは α 、 β の2種類があることがウサギ骨格筋について認められており、申請者はアミノ酸配列順序の決定されている α -トロポミオシンを対象として研究を行った。 α -トロポミオシンは284残基からなり190番目にシスチン残基を1つだけもっている。2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸を作用させるとシスチン残基の所で選択的に切断される反応を利用し、トロポミオシン分子をN端側(1-189)、とC端側(190-284)の2つの断片にし、尿素存在下ゲルろ過を行ってこれらの断片を分離した。各断片鎖はゲル電気泳動法、ゲルろ過法によれば、それぞれ2本鎖分子として存在し、両鎖の複合体は生じないことを見出した。さらに円偏光2色性の測定から50%程度の α -らせんが各複合体に存在すること、また塩を加えることによってこの α -らせん含有率が増大する結果を得た。

トロポミオシンの構造の詳細を探るため、申請者はトリプシンによる限定分解を試み、やはり2種の断片を得るのに成功した。この断片はイオン交換樹脂カラムによって分離され、N末端、C末端のアミノ酸残基の同定、及びアミノ酸分析によるアミノ酸組成と一次構造との比較から、これらの断片は13番残基から149番残基までのものと、183番残基からC末端284番残基に到るものの2つと推定された。この結果は150番から180番残基までの部位は比較的柔軟性をもっていることを示している。

次にトロポニンとトロポミオシンとの相互作用部位を調べるため、得られた断片、およびそれらの混合物とトロポニンとの複合体形成の有無を、ゲル電気泳動法を用いて研究した。その結果各断片単独ではトロポニンと殆ど結合しないこと、またN端側の断片とC端側の断片が同時に存在するときのみトロポニンとの複合体が生じることを見出した。この結果はトロポニンがトロポミオシンの限られた150～190番目附近に結合すること、断片単独では殆ど結合がみられないことから結合様式が相加的でなく協同的なものであることを示している。申請者はこれらの断片を用いてアクチン繊維との結合を流動複屈折法で調べ、C端側の断片のみがよくアクチンと結合することを見出している。

なお参考論文はカルボキシペプチターゼによって重合できないトロポミオシンを作りその性質を調べたもの、 α トロポミオシンと β トロポミオシンの相同、相異についての結果を報告したもの、トロポミオシンのトリプシンの分解の初期の研究とアクチン2重らせんの解析について述べたもの、およびトロポミオシンについての紹介をしたものである。

論文審査の結果の要旨

骨格筋を構成する太い繊維と細い繊維の構造は電子顕微鏡による直接観察、および電子顕微鏡像の画像処理によってかなりくわしくわかっている。すなわちミオシン、アクチン分子がどのような集合体となっているのかその配置がわかりつつある。しかもアクチン、トロポミオシン、トロポニンなどの一次構造が決められて、これから更に詳細な相互作用の様式を知ることが要請されている。申請者の論文はこのような研究現状に応じた研究内容をもっている。

すなわち一次構造のわかっている α トロポミオシンを対象としトロポニンとの相互作用部位を決定しようとした。そして1個しかないシステイン残基に着目して2つの断片に切断した。この切断は分子のN端側から約2/3のところで行われるが、尿素存在下で分離した後、尿素を除くと各々がおのずから2本鎖となること、また両鎖を混合して同様な操作を行っても長短両鎖の複合体が出来ない事実は、分子が会合を起す場合相手を選択する新しい例として注目に値する。これら会合体のもつ50%程度の α -らせん含有率が低分子塩を加えることによって増大することも新しい知見である。

トロポミオシンは棒状分子とされているが、Caイオンによる制御が実現するためには、分子に何らかの柔軟性がなければならない。申請者はその部位の推定にトリプシンの限定分解を利用した。ゲル電気泳動とカラムクロマトグラフィーを並用して分解条件を探し、2種類の断片を分離精製することが出来たため、その位置が150番残基から190番残基にわたる部分であると推定された。トロポミオシン分子はこの部位で屈曲しうることになる。この知見はトロポミオシンの制御に関係する機構を考える上で新しい道をひらいている。

これまでトロポミオシンとトロポニンとの結合は電子顕微鏡による観察で推測され、およそその位置が報告されていたのみであるが、申請者は上の各種断片を用いてトロポニンとの結合部位の推定を行った。ゲル電気泳動法という単純な方法により各断片だけではトロポニンとの複合体が出来ないにもかかわらず、N端側とC端側の断片との混合物のみ明瞭な複合体を生ずるという重要な結果を得た。この結果は単にトロポニンとの結合が150～190残基附近で起るということ以外に、結合様式が単純な相加的結

合部位間相互作用でないことを示している。恐らくこのような結合様式が制御という高次機能に必要であろうことを示唆するものである。

申請者はさらにこれら断片とアクチンとの相互作用をしらべ、未処理トロポミオシンではわからなかったアクチンとの一様でない結合部位を見出した。すなわちC端側の断片の方がより強くアクチンと相互作用することである。このようにトロポミオシンの一次構造上特徴ある部位を、断片を利用して同定した。

以上申請者はトロポミオシンの分子上局在する屈曲部位、他のタンパク質分子との相互作用部位を決めることによって、これまで形態的な結合様式しかわからなかったタンパク質分子複合体の微視的な詳細について新しい知見を得た。このことは筋収縮制御の分子機構の解明に大きい貢献を与えるものと高く評価される。

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。