

# 博士論文概要

## 論文題目

トロポミオシン・トロポニン複合体の  
アクトミオシン制御に関する一分子顕微解析  
Single-molecule microscopic analysis of the actomyosin  
regulation by tropomyosin and troponin complex

申請者

石井	秀弥
Shuya	ISHII

物理学及応用物理学専攻  
実験生物物理学研究

2018年 12月

トロポミオシン(Tm)は一般にトロポニン(Tn; TnI、TnCおよびTnTの複合体)と複合体を形成してアクチンフィラメントに結合し、カルシウム依存的にフィラメントと分子モーターであるミオシンとの相互作用を制御している。それらの相互作用は積み重なることで心筋や骨格筋を含む筋肉の収縮・弛緩といった大きな動きにつながっており、筋肉においては普遍的で主要な機構の一つである。この機構を、より生理的な状況で1分子レベルから評価・分析し、さらにこれを実際に生体中で起きている現象と比較評価することで、1分子からの理解を個体レベルでの疾患の発生を含めた生理的な理解に繋げることが可能である。特に制御系タンパク質 Tm・Tn は、アクトミオシン相互作用を単にスイッチするだけでなく、その協同的な働きにも寄与していることが知られているが、実際にこのような生理的機能に必要な不可欠な役割は分子レベルでどのような機構が鍵となっているのかを明らかにするには、生理的な状況で遺伝子疾患として広く知られている変異体 Tm タンパク質を比較評価のためのツールとして選び、正常な Tm タンパク質と変異体 Tm タンパク質の違いを1分子レベルで明らかにし、これを実際の個体レベルでの心疾患の原因と結びつけることで制御系タンパク質の制御メカニズムを明らかにすることが可能である。

本博士論文は、アクトミオシン制御タンパク質である Tm・Tn 複合体の筋細胞中における機能をタンパク質一分子レベルの階層で明らかにすることを目的として、精製タンパク質から、Tm・Tn 複合体を加えた筋細胞中で力発生を担う収縮システムの分子レベルモデルを *in vitro* 実験系で再構成し、その性質を定量的に分析した成果をまとめたものである。本論文の研究は、3つの研究から構成されている。まず1分子レベルでの力学解析系の定量的計測法について、光ピンセットが持つバネ弾性の特性を確認し、3次元での力発生量計測の妥当性を定量的に評価検証した「垂直負荷が加わった時の Tm・Tn 複合体のアクトミオシン力発生力の定量評価」である。次に、この正常な Tm タンパク質と変異体 Tm タンパク質の制御機能の違いに着目して制御タンパク質の機能的特徴の解明を目指した「肥大型心筋症(HCM)特異的な Tm 変異体を用いた一分子顕微解析」の研究を行った。さらに、正常な Tm タンパク質の機能変化が環境温度の変化によってどのように発生するのかを明らかにした「局所熱パルス法によって誘発される再構成筋収縮系の活性化」の研究である。上記の3つの研究の成果について、本論文は以下の6つの章でまとめている。

第1章では、研究の背景や目的、博士論文の概要について述べる。Tm・Tn 複合体が発見された歴史、この機能や心疾患との関わりなど本研究の意義を明らかにする現状の本分野の現状を説明している。

第2章では、本研究で用いた1分子計測に必要なタンパク質試料の調製方法や再構成法、実験のために用いたフローセル作製方法などについて述べている。

第3章では、第1の研究である「垂直負荷が加わった時の Tm・Tn 複合体のA

クトミオシン力発生における役割」についてまとめている。まず、アクトミオシン収縮 1 分子計測で発生する力を光ピンセットの 3 次元のバネ弾性の特性の違いを考慮して三次元的に評価する手法を考案した。倒立光学顕微鏡を土台として全反射照明蛍光 (TIRF; Total Internal Reflection Fluorescence) 観察系に光ピンセットを組み合わせ、アクチンフィラメントを付着させたポリスチレン微小球を光ピンセットで捕獲し、光ピンセットのバネ定数の特性を利用してポリスチレン球の 3 次元の微小変位から力発生を見積もった。従来手法では、2 次元のバネ定数のみを利用しており、今回の手法で高さ方向 (Z 軸方向) でのバネ定数を考慮したことが新規である。カバーガラスと捕捉ビーズとの間の距離については、試料ステージを高さ方向に移動させながら蛍光ビーズの蛍光強度変化を計測することで、この距離を計測した。ポリスチレンビーズにアクチンフィラメントを結合させて、ガラス表面に吸着しているミオシンと相互作用させることで筋収縮系を再構成し、力発生を計測した。計測した距離を利用して、フィラメントとガラス面との角度を見積もることで、幾何学的に三次元的な発生力を定量化した。実験の結果、Tm・Tn 複合体を用いて再構成した Thin filament の場合も純粋なアクチンフィラメントの場合も、角度 (高さ方向の負荷) 依存的に発生力が低下することが示された。Ca<sup>2+</sup> 存在下の場合、制御系タンパク質 (Tm・Tn) によって発生力が上昇することは既に報告されていたが、どの角度領域においても Thin filament はアクチンフィラメントの 1.5 倍の発生力を示した。このことは、筋肉中における三次元的な負荷依存性への影響は勿論、細胞内での三次元構造における Tm 相合体の役割を示唆している。

第 4 章では、第 2 の研究である、「肥大型心筋症 (HCM) 特異的な Tm 変異体を用いた一分子顕微解析」についてまとめている。申請者は HCM に関連した Tm における点突然変異 (V95A あるいは D175N) に着目し、遺伝子工学的に発現・精製したヒト  $\alpha$ -Tm を用いて実験を行い、突然変異に起因する筋収縮機能のタンパク質一分子階層における分子メカニズムへの影響を評価した。実験系に関しては第 3 章で述べた新たに考案した 3 次元解析系を用いた。HCM に関連する変異がもたらす影響として、一般的に着目されるのは Ca<sup>2+</sup> 調節機能における異常である。よって、無負荷におけるフィラメントの滑り運動速度と、光ピンセットで計測したフィラメント単位長さあたりの発生張力の Ca<sup>2+</sup> 依存性を評価した。本研究では両 Tm 変異体において滑り速度、発生張力ともに先行研究で示されている様な Ca<sup>2+</sup> 感受性の有意な上昇は見られず、実験条件が異なること (イオン強度) 等を考慮しても、感受性の上昇が HCM の要因として必須ではない可能性を示した。低 Ca<sup>2+</sup> 濃度における滑り速度については健常型 (WT; Wild Type) の Tm・Tn 複合体と比較して有意な上昇が見られたが、これは HCM の弛緩期における異常を生じる原因だと考えられる。一方で、本研究において最も顕著に現れた変異体の影響は飽和 Ca<sup>2+</sup> 濃度における滑り力の変化であった。特に興味深いのは V95A、D175N それぞれが真逆の結

果を示したことである。V95AはWTに比べて張力の低下を示し、一方D175Nでは上昇を示した。同じ病態に繋がるはずの変異が全く異なる影響を示したことで、変異T<sub>m</sub>のHCMへの影響については、複数の分子プロセスの存在が示唆されることとなった。その他にもクロスブリッジの結合時間の割合や、クロスブリッジ間の協同性等に関しても評価を行なったが、どちらも変異体ごとに特徴的な影響を示した。病態を理解する上で、タンパク質の変異ごとに詳細な分子メカニズムを調査することの必要性を示唆することとなった。

第5章では、第3の研究である、「局所熱パルス法によって誘発される再構成筋収縮系の活性化」についてまとめている。本研究では第4章までで用いた蛍光観察に局所熱パルス法を組み合わせた実験系を用いた。水中にIRレーザー(波長1455 nm)を集光・照射することで水にレーザー光が吸収されて、集光点を中心とした同心円状の温度勾配を形成することが出来る。照射時間が短ければタンパク質の変性を避けつつ、一般的な変性温度(40℃程度)を超えた温度まで加熱することが出来る(50℃程度まで2秒間程度)。ユーロピウム(Eu-TTA)を用いた温度感受性シートと、アクチンフィラメントに結合したローダミンの二つの異なる蛍光分子の蛍光強度の温度依存性(高温ほど可逆的に蛍光強度が下がる熱消光効果)をもとに温度変化を定量した。この結果、アクチンフィラメントの滑り運動が温度依存的に活性化される様子が見られたことに加えて、タンパク質一分子計測においても、加熱によるアクチンフィラメントのCa<sup>2+</sup>非依存的な滑り運動の活性化が確認された。本研究で最も興味深い結果は、人の体温近く(37℃程度)の温度で、部分的ではあるが、弛緩条件下においても滑り運動の活性化が生じたことである。勿論生理条件とは異なる(イオン強度等)ことは考慮すべきではあるが、心臓の生体内でも十分に起こり得ると考えられる。このことから示唆されることは、温度を利用して部分的に活性化することで比較的低いCa<sup>2+</sup>濃度域でも心収縮を制御することを可能にしているということである。実際、生理的条件下での先行研究で、心臓内のCa<sup>2+</sup>濃度は従来考えられていた以上に低いところで制御されているとの報告もあり、このことは、遺伝的要因等でCa<sup>2+</sup>の制御が不十分な遺伝性疾患の個体において原因不明の不整脈が発生する原因の一つを示唆している可能性がある。

第6章では、本研究の全体のまとめと将来展望を述べている。

本論文は、1分子計測システムを生理的条件下での個体(生体システム)の理解に直接、応用展開を目指したものであり、特に心肥大症という遺伝子疾患の原因をT<sub>m</sub>・T<sub>n</sub>複合体の1分子レベルでの力学的機能の変化という観点から説明を試みたという点で、1分子計測システムの応用範囲の広さを示唆している点で大きな意義がある研究である。また、計測法についても従来の光ピンセットの2次元のバネ弾性モデルを3次元モデルに発展させ、これによって3次元での評価では2次元評価時に比べた最大1.5倍の差が出たことも新規であり、学術的に十分に意義がある成果であると認められる。

## 早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 石井 秀弥 印

(2019 年 2 月 6 日現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
論文 査読あり	Improvement of the yields of recombinant actin and myosin V-HMM in the insect cell/baculovirus system by the addition of nutrients to the high-density cell culture. <i>J. Muscle Res. Cell Motil</i> , 33(5), 351-358, (09/2012). Takashi Ohki, Sergey V. Mikhailenko, Tomomi Arai, <u>Shuya Ishii</u> , and Shin'ichi Ishiwata.
○	Estimation of actomyosin active force maintained by tropomyosin and troponin complex under vertical forces in the <i>in vitro</i> motility assay system. <i>PLOS ONE</i> , 13(2), e0192558, 1-16, (02/2018). <u>Shuya Ishii</u> , Masataka Kawai, Shin'ichi Ishiwata, and Madoka Suzuki.
○	Functional significance of HCM mutants of tropomyosin, V95A and D175N, studied with <i>in vitro</i> motility assays. <i>Biophysics and Physicobiology</i> . 16, 28-40, (02/2019). <u>Shuya Ishii</u> , Madoka Suzuki, Shin'ichi Ishiwata, and Masataka Kawai.
講演 (国際会議)	(ポスター)Thermal Activation of Cardiac Thin Filaments Induces Contraction without Intracellular Ca <sup>2+</sup> Changes: Studies with Cardiomyocytes and an <i>In Vitro</i> Motility Assay. Biophysical Society 59th Annual Meeting, San Francisco, USA, (02/2014). Kotaro Oyama, <u>Shuya Ishii</u> , Tomomi Arai, Seine A. Shintani, Hideki Itoh, Norio Fukuda, Madoka Suzuki, and Shin'ichi Ishiwata
	(ポスター)Characterization of tropomyosin mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy (HCM): <i>In vitro</i> assays with optical tweezers and heat pulse. Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore, USA, (02/2015). <u>Shuya Ishii</u> , Kotaro Oyama, Madoka Suzuki, Bryant Chase, Masataka Kawai, and Shin'ichi Ishiwata
講演 (国内学会)	(口頭)Inhibition of actomyosin contractility by $\alpha$ -catenin, a component of adherens junctions. 第 50 回生物物理学会年会, 名古屋大学, (09/2012). <u>Shuya Ishii</u> , Takashi Ohki, Hiroaki Kubota, and Shin'ichi Ishiwata
	(口頭)Effect of HCM mutants of tropomyosin on actomyosin interaction by <i>in vitro</i> motility assay determining both horizontal and vertical forces. 第 56 回生物物理学会年会, 岡山大学, (09/2018). <u>Shuya Ishii</u> , Shin'ichi Ishiwata, Masataka Kawai, and Madoka Suzuki.

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>(ポスター)Inhibition of actomyosin contractility by <math>\alpha</math>-catenin, a component of adherens junctions. 第 51 回生物物理学会年会, 国立京都国際会館, (10/2013). <u>Shuya Ishii</u>, Takashi Ohki, Hiroaki Kubota, and Shin'ichi Ishiwata.</p> <p>(ポスター)Characterization of tropomyosin mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy (HCM): <i>In vitro</i> assays with optical tweezers and heat pulse. 第 52 回生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター, (09/2014). <u>Shuya Ishii</u>, Kotaro Oyama, Madoka Suzuki, Masataka Kawai, and Shin'ichi Ishiwata.</p> <p>(ポスター)Tropomyosin's HCM mutants (V95A, D175N) differently affect the actomyosin sliding velocity and force. 第 54 回生物物理学会年会, つくば国際会議場, (11/2016). <u>Shuya Ishii</u>, Shin'ichi Ishiwata, and Masataka Kawai.</p>