

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

2019 年 2 月

石井 秀弥

Shuya ISHII

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

2019 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
物理学及応用物理学専攻 実験生物物理学研究

石井 秀弥
Shuya ISHII

【目次】

【略字】	5
第 1 章 序論	7
1-1) はじめに	7
1-2) 研究の背景と目的	8
1-3) 本論文の概要	13
第 2 章 実験系の概要	18
2-1) 材料の調製	18
2-1-1) アクチンの調製	18
2-1-2) HMM の調製	21
2-1-3) Tm・Tn・ゲルゾリンの調製	23
2-1-4) ビーズ結合アクチンフィラメントの作製	24
2-1-5) Thin filament の再構成	26
2-1-6) フローセルの調製	27
第 3 章 垂直負荷がかかった時のトロポミオシン・トロポニン複合体のアクトミオシン力発生における役割	28
3-1) 要約	28
3-2) 研究の背景と目的	29
3-3) 実験方法	30
3-3-1) 溶液条件	30
3-3-2) 実験装置系の概要	31
3-3-3) 蛍光観察の焦点面からの捕捉中心の高さ計測	33
3-3-4) 光ピンセット バネ定数の較正	34

3-3-5) TIRF 観察を用いた <i>in vitro</i> motility assay における滑り力の計測.....	35
3-3-6) 統計処理.....	36
3-4) 実験結果と考察.....	36
3-4-1) 蛍光強度を用いた光ピンセット捕捉中心の高さ計測.....	36
3-4-2) アクトミオシン滑り力計測.....	39
3-4-3) 計測誤差の見積もり.....	40
3-4-4) 垂直負荷を受けた時の持続的な力発生.....	42
3-5) まとめ.....	45
第 4 章 肥大型心筋症特異的なトロポミオシン変異体を用いた一分子顕微解析.....	54
4-1) 要約.....	54
4-2) 研究の背景と目的.....	55
4-3) 実験方法.....	58
4-3-1) 溶液条件.....	58
4-3-2) 滑り速度の解析法の検討.....	59
4-3-3) Rigor 条件下で形成されたクロスブリッジ数の計測.....	60
4-3-4) カルシウム依存性の解析.....	61
4-3-5) 統計処理.....	62
4-4) 実験結果と考察.....	63
4-4-1) 滑り速度のカルシウム依存性への α -Tm 変異体の影響.....	63
4-4-2) 滑り力のカルシウム依存性への α -Tm 変異体の影響.....	64
4-4-3) 滑り力の角度(θ)依存性への α -Tm 変異体の影響.....	67
4-4-4) クロスブリッジ数のミオシン密度依存性.....	72
4-5) まとめ.....	76

第 5 章 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	91
5-1) 要約	91
5-2) 研究の背景と目的	92
5-3) 実験方法	93
5-3-1) 溶液条件	93
5-3-2) タンパク質の取り扱いについて	94
5-3-3) 実験装置系の概要	94
5-3-4) 温度の計測方法	95
5-3-5) 滑り速度の解析方法と統計処理	96
5-4) 実験結果と考察	96
5-4-1) IR レーザー加熱による温度上昇の計測	96
5-4-2) アクトミオシン滑り運動の熱励起	97
5-5) まとめ	101
第 6 章 まとめ	109
6-1) 本論文のまとめ	109
6-2) 課題と今後の展望	110
【参考文献】	113
【研究業績】	137
【謝辞】	140

【略字】

a	ミオシン一分子あたりの stall force
BSA	Bovine Serum Albumin
d	ステップサイズ
Eu-TTA	Bis[4,4,4-trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedionato]bis(triphenylphosphine oxide)europium nitrate
F	滑り力の時間平均
F_{act}	フィラメント単位長さあたりの滑り力のカルシウム活性上昇分
F_{av}	フィラメント単位長さあたりの滑り力の時間平均
F_{HC}	飽和カルシウム濃度における単位長さあたりの滑り力の時間平均
F.I.	Fluorescence Intensity
F_{LC}	弛緩条件における単位長さあたりの滑り力の時間平均
F_{vis}	粘性抵抗
fps	frame/s
h	光ピンセットで捕捉したビーズのカバーガラスからの平均距離
HCM	Hypertrophic Cardiomyopathy
η	分子摩擦係数
$H(Ca) \equiv \frac{1}{1 + \left(\frac{Ca_{50}}{Ca}\right)^n}$	
HC	飽和カルシウム濃度領域
IR	InfraRed
K_{cb}	クロスブリッジの平均の硬さ
L_a	アクチンフィラメントの HMM 分子と相互作用している部分の長さ
L_b	捕捉ビーズの中心と、HMM と相互作用するフィラメントの端部との間の距離
LC	低カルシウム濃度領域
M	ピアソン積率相関係数の計算における自由度
μ	水の粘性抵抗
n	Hill 係数。 $n_{(v)}$; 無負荷滑り速度, $n_{(f)}$; 滑り力
N	カルシウム依存的な Thin filament あたりの力発生クロスブリッジの数
N_{max}	フィラメント単位長さあたりに相互作用可能なクロスブリッジの最大数
N_{obs}	計測数

P	ピアソンの積率相関係数
pCa	$\equiv -\log [Ca^{2+}]$
pCa_{50}	$\equiv -\log Ca_{50}$:カルシウム感受性を表す。 $pCa_{50}(v)$; 無負荷滑り速度に関して、 $pCa_{50}(f)$; 滑り力に関して
r	ビーズの直径
$\rho(0)$	無負荷条件における duty ratio
$\rho(a)$	飽和カルシウム濃度における steady state での duty ratio
SE	Standard Error
SEM	Standard Error of the Mean
t_{cal}	ピアソンの積率相関係数における t 値
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
Tm	トロポミオシン
Tn	トロポニン
t_{off}	飽和カルシウム濃度におけるクロスブリッジの解離時間
t_{on}	飽和カルシウム濃度におけるクロスブリッジの結合時間
θ	滑りカベクトルの XY 平面からの角度
v	無負荷条件における滑り速度
v_0	無負荷条件における最大滑り速度
v_{act}	滑り速度のカルシウム活性上昇分
v_{HC}	飽和カルシウム濃度における滑り速度
v_{LC}	弛緩条件における滑り速度
v_{vis}	光ピンセット較正の際のステージ速度
WT	Wild Type

第 1 章 序論

1-1) はじめに

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(図 1-1)。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、Tm-Tn 複合体によるアクトミオシン相互作用の制御は筋肉においては普遍的で主要な機構の一つである。大きな動きを理解するためには、それを構成するもの一つ一つの働きを理解する必要がある。そのためには、筋肉であれば収縮を担うタンパク質がそれ自体でどういったメカニズムで働いているのか分子レベルから評価・分析すべきである。

特に制御系タンパク質と呼ばれる 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、同じアクチンフィラメントと相互作用する多数のミオシンの協同的(例えばカルシウム依存的なもの)な働きにも寄与していることが知られている。つまり多数の分子モーターが効率的に働くことためには制御系タンパク質が不可欠ということである。それを実現するメカニズムとはどういったものなのだろうか。

こういった疑問を解決するためにどのような研究手法が適切だろうか。近年では顕微鏡技術の発展によって、タンパク質一分子の働きを光学顕微鏡で直接観察・計測する手法が広く用いられるようになった。本論文では筋肉を構成するタンパク質を精製したものをを用いて光学顕微鏡下で筋収縮を再構成することで、制御に影響を与え得る要因それぞれに着目し、制御系タンパク質による収

縮制御のメカニズムに迫った。光学顕微鏡以外にも AFM や電子顕微鏡等といったタンパク質一分子階層を対象とした観察系は存在するが、リアルタイムにタンパク質の動きが観察出来ることや、力学計測とイメージングを同時に出来るといった明確な強みがあるため光学顕微鏡を用いて研究を行うことにした。

1-2) 研究の背景と目的

Bailey が Tm を 1946 年に発見して以来(Bailey, 1946)、Ebashi が Tn を介したカルシウム依存的な制御機能を発見した(Ebashi and Kodama, 1965, 1966)ことを皮切りに、両者は筋肉を研究するに当たって重要な位置付けをされてきた。Tm は分子量 33 kDa の、2 つの α -helix のコイルドコイルから構成されるホモダイマーまたはヘテロダイマーであり(本論文では前者)、アクチン 7 分子あたり 1 分子が結合する(Bai *et al.*, 2013)。また、Tm は隣接する分子同士が相互作用しており(head-tail 相互作用)、head-tail 相互作用によってお互いのフィラメント上の位置を協同的に変化させる。一方 Tn は複数のサブユニットからなる複合体であり、カルシウムと結合する TnC (分子量 18 kDa)、アクトミオシンの ATPase 活性を阻害する役割を持つ TnI (分子量 23 kDa)、Tm と相互作用する TnT (分子量 30.5 kDa)から構成されている(Katrakha, 2013)。特に TnC へのカルシウム結合がアクチンフィラメント表面に結合した Tm の位置を移動させてアクトミオシン相互作用を促進することが広く知られており(Lehman *et al.*, 1994; Solaro and Rarick, 1998)、制御機構を解き明かす為に例えばタンパク質複合体の立体構造を明らかにする試み(Behrmann *et al.*, 2012)や筋原線維を用いた研究(Fujita *et al.*, 1996)等、幅広い階層での研究が行われている。近年では、従来の筋肉における Tm 研究に加えて細胞質中の Tm 相同体の役割も新たに着目されている

(Gunning *et al.*, 2008)。筋肉中に見られる様な規則的な周期構造とは対照的に、細胞骨格構造の中に存在するアクトミオシン収縮系はよりダイナミックで連続的に変化し、筋肉中とは異なる役割を果たしている。このとき非筋 Tm は Tn との複合体を形成せず、アクトミオシンの ATP 加水分解速度や相互作用の負荷依存性を変調させる機能を持つものが既に報告されており、細胞骨格形成にも寄与している様である(Gunning *et al.*, 2008; Wang and Coluccio, 2010; Hundt *et al.*, 2016; Gateva *et al.*, 2017)。

アクトミオシンによる力発生は筋収縮、細胞分裂及び細胞運動を含む様々な細胞機能に寄与している(Murrell *et al.*, 2015)。例えば意外なところでは、近年細胞間の接着を維持するためにもアクトミオシンの収縮力が必須であることが示唆されている(Liu and Cheney, 2012)。多岐にわたる細胞機能との関わりがある為、アクトミオシン収縮力を制御する機構は大いに関心を集めるところであり、細胞生物学の主要課題としても組織、細胞、タンパク質一分子と階層を問わず広く様々な研究が行われている(Agarwal and Zaidel-Bar, 2018; Månsson *et al.*, 2018)。よって、収縮制御機構のメカニズムを明らかにすることは筋肉に留まらず、細胞生物学としてのより一般的な疑問を解決することが期待されている。筆者は特に Tm-Tn 複合体によるアクトミオシン収縮力の制御に着目し、研究を行った。本論文は、主に筋肉における収縮制御についての研究となるが、より一般的な視点で上記の様な細胞質中での Tm 相同体の働きについても考察を行う。

制御タンパク質を含めて、アクトミオシンの運動特性を調べるための手段として用いられている実験系として *in vitro* motility assay と呼ばれるものがある。光学顕微鏡を用いてガラス基板上でアクトミオシン収縮システムを再構成し、タンパク質一分子レベルで滑り運動の様子を観察する(Higashi-Fujime, 1986;

Kron and Spudich, 1986)ことで滑り運動の速さから各条件におけるアクトミオシンの活性を調べるのが主な用途である。蛍光観察技術のみならず、他の技術と組み合わせることが多く、例えば微細加工技術と組み合わせて試料の温度を自由にコントロールしているものがある(Brunet *et al.*, 2012)。本論文では赤外(IR)レーザーを利用する光ピンセットや局所熱パルス法(Kato *et al.*, 1999)を採用した。光ピンセットは非侵襲に捕捉した微視的な粒子の変位から数十 pN 程度の力を計測することが出来るため、分子モーターの発生力などタンパク質の力学特性を定量的に調べるために利用されてきた(Spudich *et al.*, 2011; Capitanio and Pavone, 2013; Norregaard *et al.*, 2014; Greulich, 2016)。単なる力の計測に留まらず、分子モーターの歩行メカニズム等を明らかにしてきた手法であるが、これまで行われてきた研究では一般的に高さ方向(光軸方向)を除いた二次元平面での計測のみに焦点を当てることが多く、特に細胞内の三次元ダイナミクスの中では収縮機構が垂直方向の負荷に曝され得るにも関わらず、三次元的に評価する試みはこれまでほとんどされてこなかった。二次元的計測においても高さ方向の捕捉位置の違いが計測結果に大きく影響を与えることも過去に示されている(Longyear *et al.*, 2017)ので、その影響を十分に加味した実験系を設計する必要がある。近年、光ピンセットを線形バネとして使用して高さ方向の力計測を行う際に問題となるレーザー光の球面収差と干渉のバネ定数への影響を補正して定量性を改善させた報告(Pollari and Milstein, 2015; Yehoshua *et al.*, 2015)がある。光ピンセットを適切に三次元的なバネとして扱い計測することは光ピンセットの計測技術を向上させる意味でも重要であるし、正しい計測結果を得るために必要不可欠である。筆者は従来二次元的な計測のみが適用されてきた実験系に三次元的な計測を適用し、適切な実験系へと発展させることを目的として系の開発を行った。

開発した実験系は、制御系タンパク質に変化が生じた際の収縮制御への影響を評価する研究へと応用した。心筋症と呼ばれる疾患に関連して、Tm の特定のアミノ酸変異によって筋収縮制御に関する機能が変調される。その医学的な観点において、タンパク質の変異による機能変調を解析することは非常に重要である。今回研究対象とした肥大型心筋症(Hypertrophic Cardiomyopathy: HCM)は、500 人に 1 人の割合で発症する心疾患であり、若年者や高齢者に関わらず 1 - 2%の割合で突然心臓死に至る(Spirito *et al.*, 1997; Maron *et al.*, 2003; Elliott and McKenna, 2004; Ho and Seidman, 2006; Poliac *et al.*, 2006; Ommen and Gersh, 2009; Marston, 2011; Redwood and Robinson, 2013; Marsiglia and Pereira, 2014)。病態として特徴的なのは左心室壁の肥大を始めとした形質変化とそれに伴う拡張機能障害を生じる点である。その 60%が家族性疾患であり、Tm を含むサルコメア構成タンパク質のアミノ酸変異が疾患の原因の一つとして挙げられる(Spirito *et al.*, 1997; Elliott and McKenna, 2004; Ho and Seidman, 2006; Marston, 2011)が、アミノ酸変異がどの様に病態に繋がるのかに関しては様々な主張がなされており、そのメカニズムは明らかになっていない。一般に Tm に関してはアミノ酸変異によって筋収縮系のカルシウム感受性が影響を受けること(Bottinelli *et al.*, 1998; Bing *et al.*, 2000; Karibe *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Ly and Lehrer, 2012)が注目されている一方で、アミノ酸変異がカルシウム感受性に影響していない報告もある(Bai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011)。つまりは変異の影響に関しては統一性のない報告がされているため、各変異に対して個別に調査することが重要であり、その上で病態との関連を明らかにするべきである。筆者は、Tm に変異が生じたとき Tn との複合体の収縮制御機能にどのような影響を及ぼすかという点に着目して研究を行った。変異によって Tm の物性(柔らかさ)が変化する(Li *et al.*, 2012; Ly and Lehrer, 2012; Zheng *et al.*,

2016)という報告もあり、そのような制御系タンパク質における物性変化がアクトミオシン収縮制御においてどのような影響を与えうるのかといった視点でも研究を行った。

タンパク質のアミノ酸変異の他に制御系タンパク質によるアクトミオシン収縮の制御機能に影響し得る因子を考えると一般に温度は生体反応全体において支配的な因子である為、筋肉の収縮制御においても温度は重要な役割を果たすはずである。もちろんミオシンがATPを加水分解し、力学的な仕事をする際も例外ではない(Barany, 1967; Barouch and Moos, 1971; de Tombe and ter Keurs, 1990; Fujita and Kawai, 2002; de Tombe and Stienen, 2007)。水中にIRレーザー光(1455 nm)を照射・集光することで水にレーザー光を吸収させるか(Oyama *et al.*, 2012)、金属粉塊に光ピンセットに用いるレーザー光(約1 μm)を照射・集光することで(Kato *et al.*, 1999)、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(40~50°C程度)を超えた温度まで加熱することが出来る。この手法を局所熱パルス法と呼ぶ。先行研究によって局所熱パルスを用いて加熱することで心筋単離細胞がカルシウム非依存的に収縮することが報告されている(Oyama *et al.*, 2012)。他にも骨格筋の筋原線維を用いた研究においても、加熱によるカルシウム非依存的な収縮力の発生が確認されている(Ranatunga, 1994)。何故カルシウム非依存的に筋収縮が誘発されるのだろうか？実際に筋収縮・弛緩を担うタンパク質だけが存在する状況で同様の現象を再現することが出来るのかを確かめ、温度によって制御系タンパク質のアクトミオシン制御がどういった影響を受けるのかを明らかにするべく研究を行った。タンパク質一分子階層における温度の効果を知る為に、構成要素(今回は制御系タンパク質とアクトミオシン)を限定することが出来る *in vitro* motility assay を用いた。

本論文の主たる目的は、Tm-Tn 複合体のアクトミオシン制御における機能をタンパク質一分子階層で明らかにすることである。第 3 章では一分子階層でのアクトミオシン制御を適切に評価するための実験系の提案、第 4 章では Tm のアミノ酸変異が制御系タンパク質のアクトミオシン制御に与える影響の評価、第 5 章では、カルシウムとは独立に温度が制御系タンパク質のアクトミオシン制御に与える影響の評価をそれぞれの目的とする。

1-3) 本論文の概要

本論文では、精製したタンパク質を用いて筋肉や細胞中において力発生を担う収縮システムを *in vitro* 実験系で再構成し、その特性を分析した。それぞれ 3 つのテーマ「垂直負荷がかかった時の Tm-Tn 複合体のアクトミオシン力発生における役割」、「HCM 特異的な Tm 変異体を用いた一分子顕微解析」、「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」の順に述べる。

第 1 章では、研究の背景や目的、博士論文の概要に関して記述する。

第 2 章では、本研究で用いたタンパク質試料の調製方法やフローセル作製方法についてまとめる。

第 3 章では一つめのテーマ「垂直負荷がかかった時の Tm-Tn 複合体のアクトミオシン力発生における役割」についてまとめる。まず、ここでは開発したアクトミオシン収縮を三次元的に評価する実験の概要を説明する。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、光ピンセット法を使用して力発生を計測した。蛍光ビーズの蛍光強度変化からビーズの捕捉中心のカバーガラスからの高さを計測することと、全反射照明蛍光(TIRF; Total Internal

Reflection Fluorescence)での観察を組み合わせることでフィラメントとガラス面の作用する角度を見積もり、幾何学的に三次元的な発生力を定量することが出来た。実験の結果、 $T_m \cdot T_n$ を用いて再構成した Thin filament の場合も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。カルシウム存在下の場合、制御系タンパク質($T_m \cdot T_n$)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 T_m 相同体のアクトミオシン収縮力を保持する役割を示唆している。

第 4 章では、「HCM 特異的な T_m 変異体を用いた一分子顕微解析」実験について説明する。筆者は HCM に関連した T_m におけるアミノ酸変異(V95A・D175N)に着目し、遺伝子工学的に発現・精製したヒト α - T_m を用いて実験を行い、アミノ酸変異に起因するタンパク質一分子階層における筋収縮機能への影響を評価した。実験系に関しては第 3 章で述べた計測系を活用した。HCM に関連する T_m のアミノ酸変異がもたらす影響として、一般的に着目されるのはカルシウム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カルシウム依存性を評価した。本研究では 2 つの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カルシウム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。低カルシウム濃度における滑り速度については健常型(WT; Wild Type)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カルシウム濃度における発生

張力の変化であった。特に興味深いのは V95A、D175N それぞれが反対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生化学的表現型を示したことで、HCM への影響については、統一的ではなく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、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、「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」実験についてまとめる。本研究では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。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の蛍光染色に用いたローダミンの 2 つの蛍光分子の熱消光を通じて温度勾配を求めたので、実験中の温度に関しては精度の高いものとなっている。過去にも報告がある通り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、タンパク質一分子階層においても加熱による Thin filament のカルシウム非依存的な滑り運動の活性化が確認された。つまりは、Tm-Tn 複合体によるアクトミオシン制御(この場合は阻害効果)がカルシウム非依存的に加熱によって変調されたという事である。本研究で最も興味深い結果は、人の体温近く(37°C程度)の温度で部分的ではあるが、弛緩条件下においても制御系タンパク質による阻害を越えて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、心臓の生体内でも熱によるアクトミオシン収縮の部分的な活性化は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、温度を利用してアクトミオシン制御が部分的に活性化することで比較的低い濃度のカルシウムでも心収縮を制

御することを可能にしているということである。実際、共同研究者らの報告によると心臓内の最大カルシウム濃度は従来考えられていた濃度よりも低いことが報告されており、高濃度のカルシウムが原因の不整脈等のリスクを軽減するのに温度による部分活性化が繋がっていることが期待される。

第6章では、本論文における総合的な考察と今後の展望について述べた。本論文において、制御系タンパク質によるアクトミオシン制御に関して内的要因(タンパク質の性質変化)と外的要因(溶液環境、温度)に着目し、それぞれがどのような効果を持つのか示した。

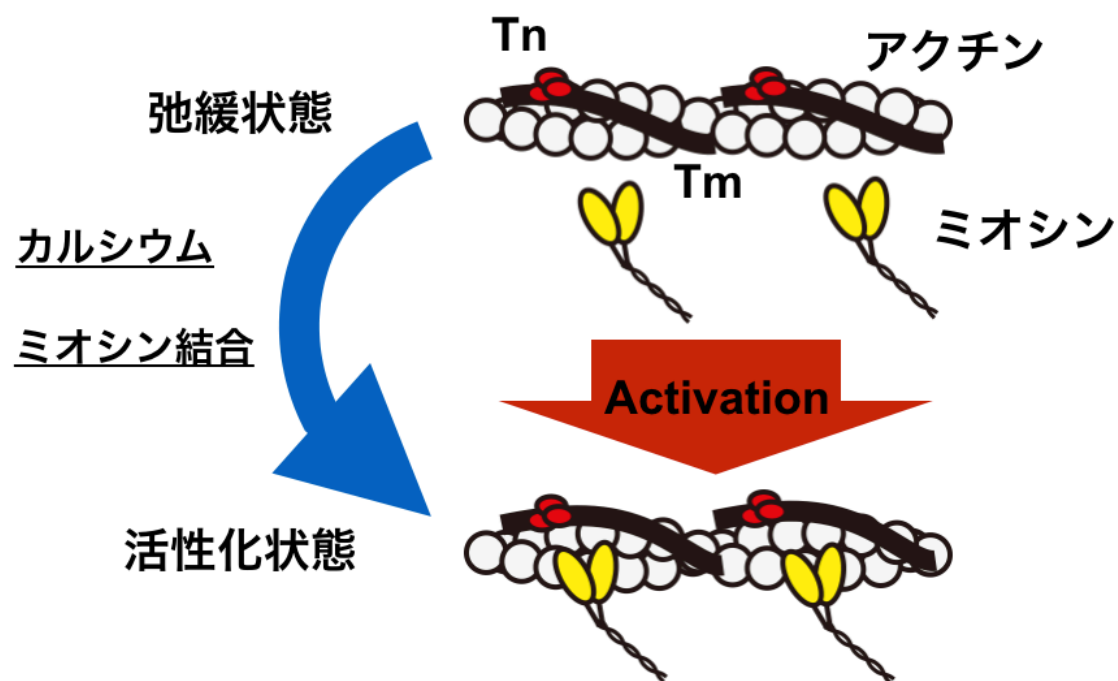


図 1-1 制御系タンパク質によるアクトミオシン相互作用の制御

アクチンフィラメントに制御系タンパク質の Tm-Tn 複合体が結合し、Thin filament を構成している。Tn は TnI、TnC、TnT の 3 つのサブユニットから成り、特に TnC にカルシウムが結合することでフィラメント上の Tm の位置がシフトし、アクトミオシンが相互作用し易くなる。また、ミオシンがフィラメントと結合することによって Tm の位置が更にシフトし、隣接した Tm にも head-tail 相互作用を介した位置のシフトが生じる。

第 2 章 実験系の概要

本研究で使用したタンパク質試料の調製等について記述する。また、用いた光学系に関する詳しい記述は実験結果と合わせて第 3、5 章に掲載している。

2-1) 材料の調製

アクチンおよびHeavy mero myosin(HMM; 全長ミオシンの α -キモトリプシン切断物)は、ウサギの骨格筋(日本医科学動物資材研究所から購入)から精製した。全ての実験手順は日本学術会議が承認し、早稲田大学の「生物実験安全管理規定」(承認番号; 2014-A053及び2015-A016)に従って実施された「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に準拠している。 α -Tmの肥大型心筋症特異的な変異体はフロリダ州立大のBryant Chase氏、ウシ血漿由来のゲルゾリンおよびウシ心筋Tnはアイオワ大学医学部河合正隆氏から提供されたものを使用した。尚、Tmは遺伝子工学的に大腸菌を用いて発現、精製され、ゲルゾリン及びTnはウシの食料過剰生産物を利用して精製された。試料それぞれの精製に関する詳細は以下に示す。

2-1-1) アクチンの調製

アクチンは、まずウサギ骨格筋を用いてアセトンパウダーを調製し、次にアセトンパウダーから抽出することで調製した。アセトンパウダーの調製はKondo and Ishiwata (Kondo and Ishiwata, 1976)による方法を採用した。また、アセトンパウダーからのアクチンの精製はSpudich と Wattの方法(Spudich and

Watt, 1971)と Kondo and Ishiwata の 1976 年の方法を組み合わせることによって行った。手順を以下に示す。

2-1-1-1) アセトンパウダーの調製

ウサギ(オス; 系統名 : J1a : JW, normal, ~2.5 kg, 日本医科学動物資材研究所飼育)を使用した。前日の準備として、ゴース(綿布)を MQ で煮沸した。

当日の準備として、氷に食塩を混ぜて温度を調整して Guba-Straub solution(0.3 M KCl, 0.15 M KH_2PO_4 , 室温で pH 6.4)を -4°C に冷やした。

次にウサギ解体の手順に関して説明する。ウサギを固定器具に入れ、耳の静脈に麻酔薬(ソムノペンチル、共立製薬)を注射した(注射針 ; 27Gx3/4 [0.40 × 19 mm]、TERUMO)。この時興奮させると、血液が筋肉に回ってしまい、タンパク質の質が落ちるので注意する。麻酔が効いた事を確認したらギロチンで断頭して、延髄を潰した。後足を両手で持って頭側を下にし、血抜きした。後足のかかと辺りに切り込みを入れ、皮全体を剥いだ。内臓を取り出し、肋骨を切断して心臓や肺を取り除いた。この際、膀胱等を傷つけない様に気をつけた。キムワイプを腹部に入れて氷付けにし、冷えるまで 30 min 程度置いた。十分に冷えたら背筋ともも肉の回収に移る。ウサギをまな板の上に置き、後足の関節を外した。背筋を取り、後足を外して氷上に置いた。無事に使用する筋肉が取り出せたらアセトンパウダーの作製に移る。背筋ともも肉から赤い肉(とくに遅筋)などを取り除き、残った白肉を包丁で細切れにした。ミンサー(National Meat Grinder #MK-GL20)でひき肉にした。ひき肉の重さを測った(X g, ウサギ 1 羽あたり 200 g くらい)。3X ml の Guba-Straub sol. をビーカーに残し、そこにひき肉をゆっくり入れた。 -4°C で 10 min やさしく混ぜた。サンプルを遠心分離

(TOMY GRX-220, No. 17N, 6.3k rpm, 10 min, 0°C)した。分離後、上澄み(ミオシン溶液)を計量した(Y ml)。ペレットのひき肉を金属バケツに入れて、冷やして置いた MQ を加えた($4 \times [4X - Y]$ ml)。ひき肉の入った溶液をゴースで濾して、残ったひき肉を金属バケツに戻した。ひき肉を室温の 0.4%(w/v) NaHCO_3 5 L で 2 回洗った。0.4%(w/v) NaHCO_3 を加えてから室温で 10 min 静置した。かき混ぜ、浮いてくる脂肪を捨てた。ひき肉を冷 MQ 5L で 3 回洗った。ひき肉を適量の 4°C の MQ でお汁粉程度の固さになるように溶かした。サンプルを遠心分離(5k rpm, 30 min, 0°C)した。ペレットのひき肉を金属バケツに入れた。ひき肉を予め冷やした acetone 3 L で素早く洗った。ひき肉を室温の acetone 1.5 L で 2 回洗った。acetone を加えてから室温でそれぞれ 10 min 静置した。Acetone に濁りがなくなるのを確認する。ドラフトで数時間から一晩乾燥させた。十分に乾燥したことを確認したら計量し(ウサギ 1 羽あたり 25 g くらい)、封筒に入れてシリカゲルを入れた容器に密閉し、-20°C の冷凍庫で保存した。

2-1-1-2) アクチンの精製方法

アセトンパウダーからアクチンを精製するための手順を説明する。-20°C に保存してあるアセトンパウダーを室温に戻し、量り取った(X g, 2 g 程度)。20 X ml Buffer A (2 mM Tris-HCl pH 8.0、0.2 mM ATP、0.2 mM CaCl_2 、0.5 mM β -ME) をビーカーに入れ、氷上に置いた。ビーカーにアセトンパウダーを加え、30 min 葉さじでやさしく混ぜた。ブヒャナロートと数枚の濾紙を用いて吸引濾過した。アセトンパウダーを加える前に、最初に少量の Buffer A のみを濾紙に染み込ませた上で吸引し、濾液を捨てた。次に Buffer A に懸濁したアセトンパウダーを吸引ろ過したのち、残渣に少量の Buffer A を加えて軽く吸引ろ過した。こうし

て得た濾過液を超遠心(日立 Himac 100R, P70AT, 50k rpm, 35 min, 4°C)した。上澄みをピペットで静かに回収し、50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.8 mM ATP を加える。室温で 1-2 hr 静置し、アクチンを重合させた。0.6 M KCl を加えて室温で 15 min、スターラーで攪拌。この時泡立てるなど、アクチン変性の要因に気をつけた。超遠心(40k rpm, 108 min, 25°C)した。ペレットの表面を 4°C の MQ で洗った後、Buffer A + 0.5 mM ATP で 1 hr 懸濁し、ペレットを溶解した。透析チューブに入れて、1 L の透析外液(2 mM Tris-HCl pH 8.0、50 μM CaCl₂、2 mM NaN₃、0.1 mM ATP、0.5 mM β-ME)で一晩透析した。3 hr おきに透析外液を 4 回交換した。透析チューブから遠沈管に移し、超遠心(P80AT3, 80k rpm, 30 min, 2°C)して上澄みを回収した。透析外液を対照として、吸光光度計(V-550ST, JASCO, 東京)で濃度を測定し(波長 290 nm, 1 mg/ml で吸光度が 0.63)、それぞれ 50 μl に分注して液体窒素で瞬間凍結させた。-80°C で保存した。

2-1-2) HMM の調製

アクチン同様、ウサギ骨格筋(白筋) から調製を行った(Perry., 1955; Holtzer and Lowey., 1959)。上記の過程でミオシン(ミオシンファミリーのIIのことを指す)をアクチンと分離・精製した後、一部をα-キモトリプシン(ウシ膵臓由来; Sigma-Aldrich)処理してHMMとした(Weeds and Taylor., 1975)。HMMはアクチン同様液体窒素凍結して-80°C保存する。手順を以下に示す。

2-1-2-1) ミオシンの精製

以下にミオシン精製の1日目の手順を説明する。

アセトンパウダーの調製で回収した上澄み粗ミオシン溶液をゴースで濾し、容量を計った(Y ml)。14Y mlの0.1 mM EDTA(4°C)を10 l容器に用意する。0.1 mM EDTA溶液をかき混ぜながら、その中に濾したミオシン溶液を入れた。低温室で一晩静置し、ミオシンを重合させた。

2日目の手順を以下に示す。遠心機(TOMY GRX-220)とローター(No. 17N)を予め0°Cに冷やした。

重合させたミオシン溶液の上澄みをアスピレーターで吸って捨て、遠心分離(6.3k rpm, 20 min, 0°C)した。ペレットをSolution A(1/15 Guba Straub solution、0.1 mM EDTA) 20 ml + K-Phosphate buffer(0.5 M KH_2PO_4 と0.5 M K_2HPO_4 を混合してpH 6.7に調整し、0.36 M KClを加えたもの) 42 ml + 1 mM DTT(final)で溶かし、500 mlビーカーに入れた。残ったペレットをSol. Aで溶かし、全量が252 mlになるようにした(final; 0.5 M KCl)。4°CのMQ 168 mlを加えた(final; 0.3 M KCl)。10 min 氷上に置いてスターラーで攪拌した。遠心分離(P45AT; CP70MX, 3.8k rpm, 40 min, 2°C)し、上澄みを回収した。アスピレーターで浮いている脂肪を吸い、ゴースで濾した。6.5倍量の4°C MQを加え(final; 0.04 M KCl)、氷上で5 min 置いた。遠心分離(No. 17N; GRX-220, 6.3k rpm, 25 min, 0°C)した。200 mlメスシリンダーを用意し、3 M KCl 23 ml + 1 M DTT 140 μl を入れた。ペレットをSolution B(1/75 K-phosphate buffer, 1/15 Solution A)で懸濁してメスシリンダーに移し、全量が140 mlになるように調製した (final; 0.52 M KCl, 1 mM DTT)。遠心分離(40k rpm, 180 min, 2°C)を行った。アスピレーターで上澄みを捨てた。

ペレット、ミオシン3層、油層の計5層に分かれるので、油層を取り除き、ミオシン3層の上の部分をHMM用に使用した。

2-1-2-2) 分解酵素を用いた HMM の調製

吸光度計(V-550ST, JASCO, 東京)を用いてミオシンの濃度測定をした。波長280 nmの吸光度が1 mg/mlあたりで0.563となる。15-20 mg/ml ミオシン、0.6 M KCl、10 mM MOPS-KOH pH 7.0、1 mM MgCl₂, 1 mM DTTとなるように調製し、0.05 mg/ml α-キモトリプシン(final)を加えて、25°Cで6、7 min程度静置した。0.05 mM PMSF(final)を加えて反応を止めた。5 mM MOPS (pH 7.0), 40 mM KCl, 1 mM DTTで透析。2回溶液交換する。遠心分離(Himac 100R, P70AT, 50k rpm, 30 min, 2°C)して、上澄みの濃度を測定する。波長280 nmの吸光度が1 mg/mlあたりで0.6となる。50 μlに分注して液体窒素で瞬間凍結し、-80°Cで凍結保存。第5章で用いたものは第3、4章とは精製ロットが異なり、凍結する前にスクロース濃縮したものをを用いた。

2-1-3) Tm・Tn・ゲルゾリンの調製

ヒトα-TmのWTおよびHCMに関連する変異体 (V95AおよびD175N) は組換えタンパク質としてフロリダ州立大学のChase研究室で大腸菌(*E. coli*)を用いて発現・精製された(Schoffstall *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011)。大腸菌で発現したタンパク質はN末端のアセチル化が欠損しているため、アセチル化を機能的に補う目的でN末端に2つのアミノ酸Gly-Serを付加している。アフィニティタグを切断除去した後もGly-SerはN末端に残る。バルクでの実験や再構成筋フィラメントにおける実験ではN末端のこれらの付加的なアミノ酸がアクチンフィラメン

トへの結合親和性、および連続するTm分子間のhead-tail相互作用にほとんど影響しないことが示されている(Urbancikova and Hitchcock-DeGregori, 1994; Kawai *et al.*, 2009)。ウシ心筋Tnとゲルゾリンに関しては、河合研究室において次の論文を参考に精製された(Potter, 1982; Kurokawa *et al.*, 1990)。

2-1-4) ビーズ結合アクチンフィラメントの作製

ビーズ結合アクチンフィラメントは、Suzuki らの報告と同様に調製した(Suzuki, N. *et al.*, 1996; Suzuki, M. *et al.*, 2005; Suzuki, M. and Ishiwata, 2011)。ポリスチレンビーズ(直径 1.0 μm , Blue-Fluorescent, Molecular probes, Oregon)にビーズ表面のカルボキシル基を用いて、ゲルゾリン、テトラメチルローダミン-マレイミド(Molecular Probes)を標識したウシ血清アルブミン(BSA : Sigma-Aldrich, St. Louis)および未標識の BSA、そして G-アクチンの混合物を架橋した(Suzuki, N. *et al.*, 1996)。予め重合しておいたアクチンフィラメントをローダミンファロイジン(Molecular Probes)で染色した後、B 端キャッピングの機能を持ちアンカーとして働くゲルゾリンを介してポリスチレンビーズに結合させた。こうすることでミオシンと相互作用して滑っていくフィラメントを光ピンセットで引き止める形で発生力の計測が可能になる。以下に詳細な手順を記述する。

2-1-4-1) ゲルゾリンビーズの作製

1.5 ml エッペンチューブに 1 μm ビーズ懸濁液を 1 ml とり、そこに Carbonate buffer(0.1 M NaCO_3 と 0.1 M NaHCO_3 を混合して pH 9.6 に合わせた)を 450 μl 入れ、遠心分離(TOMY MX-305, 10k rpm, 5 min, 4°C)。上清みを捨て、新たに Carbonate buffer を 1.4 ml 入れ、沈殿したビーズをピペティングし、遠心分

離。この作業をさらに 2 回繰り返し、計 3 回行った。上清みを捨てて、新たに Phosphate buffer(0.02 M Na_2HPO_2 と 0.02 M NaH_2PO_4 を混合し、pH 4.5 に合わせた)を 1.4 ml 入れ、沈殿したビーズをピペティングして遠心分離した。この作業をさらに 2 回繰り返し、計 3 回行った。ただし、最後の遠心後、上清みを捨て 625 μl の Phosphate buffer を入れた。Sonication を 2 min 行い、分散させた。EDC(Ethylendichloride)溶液を希釈(2 M EDC in MQ 104 μl + Phosphate buffer 896 μl)してビーズ溶液に 625 μl 加えた。EDC 溶液は -80°C の冷凍庫に保存し、使う直前に準備した。室温にて 3 hr 転倒混和し、遠心分離した。上清みを捨て、Borate buffer(0.2 M Boric acid を pH 8.4 に調整)を 1.4 ml 加えて遠心分離(10k rpm, 7 min, 4°C)した。この作業をさらに 2 回繰り返し、計 3 回行った。Borate buffer で 3 回目の遠心をした後、上清みを捨て 700 μl の Borate buffer を加えた。2 min Sonication して分散させた。

ビーズ量を考え Borate buffer 250 μl 中に total protein 800 μg となるように以下のタンパク質を混合した。混合比はそれぞれ、BSA (重量比; 93%)、TMR-BSA (5%)、ゲルゾリン (1%)、G-アクチン (1%) in Borate buffer。ビーズ溶液 350 μl に対し、上記タンパク質 250 μl を混合。低温室にて 12 hr end to end mixer にかける。Ethanol amine を MQ で 0.25 M に希釈して 50 μl をビーズ溶液に加え、 4°C で 30min 転倒混和した。700 μl Borate buffer を加え遠心分離(10k rpm, 7 min, 4°C)。上清みを捨て、10 mg/ml BSA in Borate buffer を 1 ml 加えて 4°C で 30 min 転倒混和した。10 mg/ml BSA in Borate buffer に溶液交換した。遠心分離し、上清みを捨て、新たに 10 mg/ml BSA in Borate buffer を 1.4 ml 加え、遠心分離した。この作業をさらに 2 回繰り返し、計 3 回行った。上清みを捨て 10 mg/ml BSA in Storage buffer(0.1 M NaH_2PO_4 と 0.1 M Na_2HPO_4 を混合して pH 7.4 に合わせた後 5 倍に薄め、100ml に対して 0.88 g NaCl、5 ml glycerol、0.1 g NaN_3 を加えた) 500 μl を加えよく混合。 4°C の冷蔵庫に保存した。

2-1-4-2) ビーズへのアクチンフィラメントの結合

4°C で保存しているゲルゾリンビーズを 50 μ l とり、F-buffer (2 mM MgCl_2 、1.5 mM NaN_3 、100 mM KCl、1 mM dithiothreitol (DTT)、2 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)、室温で pH 7.0 に調整) 100 μ l と混合し、2 min Sonication する。遠心分離(10k rpm, 7 min, 4°C)して上澄みを取り除き、F-buffer を 200 μ l 入れ、ピペッティングする。3 回この作業を繰り返す。3 回目の遠心後、F-buffer を 10 μ l 入れて、2 min Sonication する。ローダミンファロイジンで染色したアクチンフィラメント(2.4 μ M) 10 μ l を混合する。On ice で一晩静置し、そのまま保存。

2-1-5) Thin filament の再構成

In vitro motility assay で使用する為の Thin filament を再構成する手法には試験管中で行うものやフローセル内で行うものがある(Liang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011)。ここでは 0.6 μ M Tm、0.6 μ M Tn 及びビーズ結合アクチンフィラメント(0.6 μ M)、もしくは 1.2 μ M Tm、1.2 μ M Tn 及びアクチンフィラメント(1.2 μ M)を試験管(20 μ l)中で混合することで Thin filament を再構成した。この混合物を氷上で 1 hr インキュベートする(Kawai *et al.*, 2006)。その後、フィラメントに沿って隣接する Tm 分子間の head-tail 相互作用を安定化して実験結果の再現性(再構成)を確実にする目的でアニーリング処理(45°C, 10 min)(Ishiwata, 1973)を行ってから顕微鏡実験に用いる。アニーリング処理を行うことによって再構成の再現性が改善された(未発表)。以上の処理を施した試料は実験に使用するまで

氷上に保存した。細胞内での非筋 Tm と同様にゲルゾリンとアクチンの相互作用に対して阻害効果があるためか、予め再構成した Thin filament をビーズに結合させようとしても上手くいかなかったのでアクチンフィラメントをビーズに結合させてから再構成を行なった。

2-1-6) フローセルの調製

カバーガラス(24×60 mm, 松浪硝子, 大阪)を KOH(0.45 M)、アセトン、100%エタノールを用いて、各溶媒で 15 min Sonication することで洗浄した。その都度 MQ ですすいでから溶媒を変えた。最後にもう一度カバーガラスを Milli-Q ですすぎ、50°C で一晩乾燥させ、シリカゲルと一緒に室温(24°C)で保存した。測定の 1 日前に、酢酸 3-メチルブチルでコロジオンを希釈した溶液(最終濃度 0.1%)にカバーガラスを浸し、室温で 10 min 乾燥させた。その後 50°C のインキュベータ内に一晩おくことで十分な乾燥を促し、不完全な乾燥による実験結果への影響を低減させた。ここでの乾燥が不十分であるとフィラメント動態の再現性が損なわれる。定量的な分析が必要となるため、こう言った点には十分に気をつけて準備を行った。実験に際して、両面テープを大きいカバーガラスの長軸方向の両側に 1.1 cm 離して貼って小さいカバーガラス(18×18 mm, 松浪硝子)を被せて、~18 μ l のフローセル容積を得た。常に一定の容積に、一定容量のサンプル溶液を流すことを心掛けた。

第3章 垂直負荷がかかった時のトロポミオシン・トロポニン複合体のアクトミオシン力発生における役割

3-1) 要約

In vitro motility assay と呼ばれる実験系は、光学顕微鏡下でカバーガラスに吸着したミオシン分子と相互作用するアクチンフィラメントの動態を解析することを通じて分子モーターの運動メカニズムを明らかにする為の一般的な手法である。フィラメントの滑り運動速度に着目されることが多いが、アクチンフィラメントの一端(滑り運動をする後端で、B 端と呼ばれる)を付着させたビーズを光学的に(光ピンセットで)捕捉することでアクトミオシンの力発生が測定されている。そういった計測においてはカバーガラスに垂直な高さ方向の力成分は、着目されることがほとんどない。高さ方向の力成分は、捕捉されたビーズとガラスとの間の距離によって生じる。本研究では、この距離を実際に計測することにより、ミオシンと相互作用している最中のアクチンフィラメントとガラスとの間の角度を見積もることを可能にした。今回採用した距離の計測法は、光ピンセットと組み合わせた標準的な落射蛍光顕微鏡と電動ステージのみを必要とするので非常に簡便である。今回アクチンフィラメントと再構成 Thin filament の両方を用いて力計測を行ってみたところ、フィラメントとガラスとの間の角度が大きくなるにつれて、活性化条件($pCa = 5$)におけるフィラメント単位長さ当たりの発生張力は低下することを示した。即ちカベクトル全体に対して高さ方向の力の割合が大きくなる(上向きの負荷がかかる)につれて全体の大きさが低下するということである。同時に、再構成 Thin filament における発生張力はどの角度領域においてもアクチンフィラメントの時と比較して約 1.5 倍

であった。この結果から、想像していた以上に、制御タンパク質が力発生の保持に寄与しており、細胞質 Tm 相同体が三次元的な細胞骨格構造におけるアクトミオシン発生力を維持することに寄与する可能性が示唆された。

3-2) 研究の背景と目的

アクトミオシン相互作用によって生み出される収縮力は、非常に多種多様な細胞機能に寄与しているため、アクチンフィラメントおよびミオシンが細胞内で取り得る組織構造は多岐にわたる(Murrell *et al.*, 2015)。筋肉における収縮系の構造は安定しており規則的に整列しているが、非筋細胞では細胞移動、細胞分裂および組織形態形成に際して構造および機能上の連続的な、あるいは不連続的な変化がしばしば起こる。一方で、*In vitro motility assay* はアクトミオシンの性質を研究するための有用な手段として用いられている実験系である(Higashi-Fujime, 1986; Kron and Spudich, 1986)。光学顕微鏡下の基板(一般的にはガラス)上で、精製したタンパク質アクチン及びミオシンの相互作用を再構成し、他の技術と組み合わせながらタンパク質一分子階層の相互作用を測定して観察する。蛍光一分子観察と組み合わせで使用される技術の中でも光ピンセットは最も有用な例の一つである。光ピンセットを使用することにより、ポリスチレンビーズおよび細菌などの微視的な粒子(サイズは 20 nm - 数十 μm の範囲)を非侵襲的に捕捉して操作することができ、粒子に加わる数十 pN 程度の力を計測することが出来る(Spudich *et al.*, 2011; Capitanio and Pavone, 2013; Norregaard *et al.*, 2014; Greulich, 2016)。このように光ピンセットは分子モーターの研究にも有効であり、物理的現象の解明にも利用されている(Finer *et al.*, 1994; Miyata *et al.*, 1994; Svoboda and Block, 1994b; Nishizaka *et al.*, 1995;

Ishijima *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1999; Kawaguchi and Ishiwata, 2001a; Gennerich *et al.*, 2007; Kaya and Higuchi, 2010)。特に、光ピンセットと組み合わせた *in vitro* motility assay は、アクトミオシン相互作用の詳細な特性を明らかにするのに成功している。例えば力発生や運動メカニズム(Finer *et al.*, 1994; Miyata *et al.*, 1994; Ishijima *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1999; Evangelista *et al.*, 2010; Capitanio *et al.*, 2012)、および分子間および分子内協同性が挙げられる(Uemura *et al.*, 2004; Oguchi *et al.*, 2008; Kaya and Higuchi, 2010)。一般的には高さ方向を除いた二次元平面内での計測のみに焦点が当てられるが、近年 Pollari と Milstein によって光ピンセットを使用した高さ方向の力計測を改善するために、高さ方向のバネ定数におけるレーザー光の収差と干渉の影響を補正する方法が報告された(Pollari and Milstein, 2015; Yehoshua *et al.*, 2015)。このように、光ピンセットの三次元的な計測への利用は広がってきている。細胞の収縮系が垂直方向の負荷にさらされ得る状況に関して研究するためには、三次元空間におけるアクトミオシン相互作用の力発生を計測することが不可欠である。

よって本章では *in vitro* motility assay に三次元的要素を取り入れ、生体内で起こりうる状況を再現して計測を行った。アクトミオシンによる収縮力を適切に定量し、評価することの出来る実験系を提案することを主な目的として研究を行った。

3-3) 実験方法

3-3-1) 溶液条件

F-buffer は第 2 章に記載した通りである。Rigor buffer は、4 mM MgCl₂、1 mM ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether) N, N'-tetraacetic acid (EGTA)、25 mM

KCl、10 mM DTT、25 mM Imidazole-HCl (Im-HCl)。Relaxing buffer は 4 mM MgCl₂、1 mM EGTA、13 mM KCl、6 mM KH₂PO₄、10 mM DTT、25 mM Im-HCl からなる溶液である。Activating buffer には、Relaxing buffer に添加した 1 mM EGTA の代わりに 1 mM CaEGTA(pCa = 5, pCa = $-\log_{10} [\text{Ca}^{2+}]$)を添加した。pCa 9.0 buffer は Relaxing buffer と Activating buffer との混合溶液であり、混合比は 99:1 である。F-buffer を除き、これらの溶液のイオン強度は 50 mM、室温で pH 7.4 に調整してある。最終的な実験溶液には、2 mM Na₂ATP(Roche Diagnostics, Indianapolis)、1 mg/ml BSA、25 mM Glucose、0.22 mg/ml Glucose oxidase、0.036 mg/ml Catalase を加えて活性酸素による蛍光色素の退色を防いだ。全ての化学試薬は、別段の記載がない限り、和光純薬工業(大阪)から購入したものを使用した。

3-3-2) 実験装置系の概要

本章で使用した顕微鏡光学系(図 3-2 に模式図を記す)は倒立光学顕微鏡 (IX71, オリンパス, 東京)を防振台(HA-189LY, HERZ, 神奈川)上にセットアップしたものである。対物レンズ(Apo TIRF 100X, 油浸, NA = 1.49, ニコン, 東京; 迷光を防ぐため瞳の周りに暗幕シールを貼った)の位置は固定してあり、試料ステージを 3 軸ステッピングモーター(MP-285, Sutter Instrument Co., California, USA)で操作することで実験を行った。

光ピンセットは Nd-YAG レーザービーム(T20-BL-106C, 1064nm, 1W, Spectra-Physics, California, USA)を高開口数の対物レンズによって試料面上に集光させることで構築し、ポリスチレンビーズを捕捉した。

落射蛍光および TIRF 照明用にそれぞれ、水銀ランプ(BH2-RFL-T3, フィル

ター透過波長 512-555 nm, オリンパス)および緑色レーザー(532 nm, Melles Griot KK, 埼玉)を用いた。それぞれの光源から得た光を対物レンズの直前に配置されたダイクロイックミラー(532 nm 反射)の反射を介して試料面に入射、照明した。これらの励起光源は、照明の目的(落射照明 or TIRF)に応じてミラーを用いて切り替えて使用した。明視野観察のための照明光源として、キセノンランプ(MAX-303, 710 - 900 nm にフィルター, 朝日分光, 東京)を使用した。蛍光および明視野像をバンドパスフィルター(400 - 900 nm)に通し、次いでダイクロイックミラー(反射波長, $R > 700$ nm)で分離した。

Electron Bombardment CCD カメラ(EB-CCD, MC681SPD-ROBO, Texas Instruments, Inc., Texas, USA)を用いて記録する直前に、蛍光像を 570 - 600 nm でフィルターし、イメージインテンシファイア(Video Scope International, Ltd., Inc., Texas, USA)を用いてシグナルを増幅することで一分子蛍光の微弱な光を検出した。明視野像は、ビームサンプラー(約 5% 反射, シグマ光機, 埼玉)を用いて分割し、2 つの独立した CCD カメラによって観察した。1 つ目のカメラ(MC-781P; Texas Instruments, Inc.)はビデオレート(30 fps)で動作させ、もう一方の高速カメラ(IMPERX, Inc., Florida, USA)は 200 fps で動作させた。

30 fps で観測された明視野像および蛍光像をマルチビューア(MV-40F, FOR-A, 東京)を用いて結合し、ビデオキャプチャボード(The Imaging Source LLC, North Carolina, USA)を介して PC に取り込んだ上で、LabVIEW(National Instruments Japan, 東京)をベースにして組んだプログラム(京都大学 宮崎牧人博士提供)を用いて記録した。視野内の蛍光強度(F.I.)分布を LabVIEW プログラムによってリアルタイムで追跡して、像の見た目に加えて強度分布の変化も参考にしてステージの高さ位置を調整し、カバーガラスを蛍光焦点面に合わせる様に心掛けた。記録した顕微鏡像をその後 PC(Apple Japan, 東京)上で Image

J ソフトウェアを用いて分析した。計測中のビーズの変位は、Image J ソフトウェアの Plugin(Particle Track and Analysis; 大阪大学 新井由之博士提供)を用いて明視野像ピクセル値の二次元分布を 2D ガウス分布として扱うことによって追跡した。高速カメラで撮影した顕微鏡像は、別のビデオキャプチャボード(NI PCIe-1430, ナショナルインスツルメンツジャパン)で PC に取り込んだ。ビーズの変位を LabVIEW プログラムによってリアルタイムで追跡し、PC 画面に表示して計測の助けとした。この時ビーズ像を二値化し、その重心からビーズの中心を決定した。但し、構築したセットアップ上高速カメラの明視野像は蛍光像と同時に記録することが出来なかったため、最終的な計測データには反映されていない。フィラメントの状況とビーズの変位を見比べながら解析する必要があるため、同一のフレームレートの顕微鏡像を結合した。

蛍光及び明視野観察の焦点面の相対位置および光ピンセットの捕捉中心の位置は、レンズおよびカメラの位置によって各々調整した(図 3-2 を参照)。実験温度を安定させ、顕微鏡の熱ドリフトを低減するために実験開始の 1 hr 前から全ての光学装置および空調を作動させた。顕微鏡室(作業スペース)及びフローセル周辺の温度を同時に室温計(アズワン)でモニターし、室温が $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ であることを確認して実験を行った。

3-3-3) 蛍光観察の焦点面からの捕捉中心の高さ計測

蛍光ポリスチレンビーズ(直径 1.0 または 2.0 μm , yellow-green, Molecular Probes)を 1000 倍希釈して Rigor buffer 中に分散させてフローセルに注入した。フローセルの両端を非蛍光マニキュアで密閉した後、直ぐに顕微鏡の試料ステージ上に置いた。この計測では、TIRF を使用する *in vitro* motility assay とは異

なり、落射蛍光観察を用いた。

試料ステージを操作して 200 nm ずつ段階的に上昇させ、その都度顕微鏡像を記録した。ステージの座標に関してはコントローラに表示されている値を用いた。X-Y 平面上でステージを動かした時の表示値の変化とガラス表面に吸着したビーズの変位を比較して表示値の精度を確認することで X-Y 平面での誤差を評価した(実際に動いた距離と表示値の差は 5%程度)。Z 軸方向にも同じステップモーターを用いていることから同程度の精度が見込まれる。

ビーズの F.I. は、ビーズ上に位置を固定した正方形 ROI 領域内ピクセルの平均値として計測し、5 s 分(150 frame)を平均した。ROI の大きさはそれぞれ 1.0 μm ビーズに対して 2.2 μm \times 2.2 μm もしくは 1.8 μm \times 1.8 μm 、2.0 μm ビーズに対して 3.4 μm \times 3.4 μm を適用した。詳細は図 3-3 参照。

3-3-4) 光ピンセット バネ定数の較正

光ピンセットのバネ定数は以下の様に較正した。ステージを速度 $v_{\text{vis}} = 500$ $\mu\text{m/s}$ で一方向に動かし、一定の流速 v_{vis} の下、光ピンセットで捕捉されたビーズの変位を測定した。粘性抵抗 F_{vis} を以下に示す式に基づいて計算した (Svoboda and Block, 1994)。

$$F_{\text{vis}} = \frac{6\pi\mu r v_{\text{vis}}}{1 - \frac{9}{32}\left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{64}\left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{4096}\left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{512}\left(\frac{r}{h}\right)^5} \quad (\text{式 3-1})$$

ここで、 $\mu = 0.89$ mPa \cdot s は 25 $^{\circ}$ C における水の粘度(National astronomical observatory of Japan, 2016)、 $r = 1.0$ μm はビーズの直径、 h は捕捉されたビーズの中心とカバーガラスの表面との間の距離である。カバーガラスからの距離に依存する球面収差(主にガラスと水の屈折率によって生じる)のバネ定数に対する寄与等を避けるために、較正は滑り力計測の時と同じ高さで行った(Felgner

et al., 1995; Deufel and Wang, 2006; Pollari and Milstein, 2015; Yehoshua *et al.*, 2015; Dutra *et al.*, 2016)。ガラス表面近傍であれば収差の影響を幾分避けられるが、そうすると流体の境界面での影響を加味しなければならないので、境界面からの距離(高さ)が分かっている条件で計測した。

レーザーパワーを調整することによりバネ定数を調整し、光ピンセットを線形バネとして扱えるようにビーズの変位が 200 nm よりも小さく維持されるようにレーザーパワー等を調整して実験を行った。

3-3-5) TIRF 観察を用いた *in vitro* motility assay における滑り力の計測

滑り力の計測は Oguchi らの報告を参考にして行った(Kawai *et al.*, 2000, 2006; Oguchi *et al.*, 2011)。

まず、フローセルの片側から 20 μ l の HMM 溶液(Rigor buffer で 30 μ g/ml 希釈)を流した。60 s 後、フローセルの反対側からさらに 20 μ l の HMM 溶液を流した。その 60 s 後、BSA(5 mg/ml)を含む Activating buffer または pCa 9.0 buffer 20 μ l を用いて、カバーガラス表面に吸着していない HMM 分子を洗い、カバーガラス表面をブロッキングした。5 min 後、ビーズ結合アクチンフィラメントまたは Thin filament を含む実験溶液 50 μ l を注入した。ビーズ結合 Thin filament については、ストックしているものをフローセルに流す前に実験溶液で 1/100 に希釈し、100 nM Tm および 100 nM Tn を加えた。ここで加えた Tm と Tn は計測中の解離を防いで制御を維持する目的で加えている(Gordon *et al.*, 1997)。

フィラメントの照明は TIRF を用いて行い、捕捉されたビーズの変位は、ビーズの二次元明視野像の強度を二次元ガウス分布にフィッティングさせることによって決定した。HMM と相互作用しているフィラメントの部分の長さ(= L_a)

を、F.I.の半値幅を利用して計測した(図 3-4 参照)。再構成 Thin filament およびアクチンフィラメントではそれぞれ L_a の平均値 \pm SD としては 2.7 ± 0.60 および $2.8 \pm 0.67 \mu\text{m}$ が得られた。

本研究で使用したフローセルの数は、再構成 Thin filament およびアクチンフィラメントそれぞれにおいて 10 枚および 15 枚であった。各フローセルにつき最大 15 回の測定を各条件で実施した。ガラス表面上の HMM 密度のバラツキを平均化するために、各カバーガラスで複数の場所を使って計測を行なった。全ての計測は、フローセル内の ATP の枯渇を避けるために、開始してから 30 min 以内に完了した。

3-3-6) 統計処理

計測した実験データは、平均 \pm SD として記載する。有意差の比較では、対応のない両側 t 検定を用いた。パラメータ同士の相関に関しては、ピアソン積率相関係数 (P) を用いて判定した。自由度 M から t_{cal} の値 ($t_{\text{cal}} = P\sqrt{((M - 2)/(1 - P^2))}$) が得られ、 p 値から相関の有意性を判定する。

3-4) 実験結果と考察

3-4-1) 蛍光強度を用いた光ピンセット捕捉中心の高さ計測

ビーズの F.I.から、捕捉ビーズの中心と蛍光観察の焦点面との間の距離(図 3-1 の h)を測定した(図 3-3 参照)。対物レンズの位置は固定されているので、焦点面の位置はおおよそ固定されている。焦点面や捕捉中心の位置はカメラやレンズの相対位置を変えることで調整した。

落射照明における観察中、試料ステージを高さ方向に移動させると、カバーガラスに吸着したビーズの F.I.が高さ方向(Z 軸)に沿ってガウス分布にほぼ従うように変化した(図 3-3 B, C, 実線)。この性質は物体の三次元位置を特定するために使用されることもある(Watanabe and Higuchi, 2007)。ここで、Z 軸上でこのガウス分布がピーク値を示す位置を蛍光観察の焦点面($Z = 0 \mu\text{m}$)とした。一方で、捕捉ビーズの F.I.はカバーガラスが近づくと少し増加して、カバーガラスと衝突した後は予め吸着しているビーズと一緒に減少し、ピークを形成した(図 3-3 B, C)。

今回使用した対物レンズは油浸レンズで TIRF 観察用に設計されたものなので、カバーガラス表面の標本を観察するために最適化されているはずであるからガラス表面近くで像のコントラストが最も良くなるはずである。光学レンズの特性としてレンズを通った光が焦点一点に収束せず、これを球面収差と呼ぶ。油浸レンズはカバーガラス表面の試料を観察する場合レンズの球面収差はほぼ完全に補正されているが、ガラス表面と観察試料までの間にガラスやイマルジョンオイルと異なる屈折率の媒質(今回の場合水)が含まれると、光の屈折によって球面収差の影響が出てくる。ガラス表面と試料との間の距離が大きくなるほどに球面収差の影響が大きくなる。よってカバーガラスが捕捉ビーズに近づくと、球面収差による影響が軽減し、カバーガラスと捕捉ビーズの衝突する直前に起こる F.I.の増加に寄与している可能性がある(Martini *et al.*, 2002)。

カバーガラスが捕捉ビーズと衝突したとき、捕捉ビーズは非特異的相互作用によってカバーガラスに吸着して、元々吸着していたビーズと共に移動するようになる。つまりこの時点で、捕捉ビーズは光ピンセットの捕捉から外れることになる。そのとき両方のビーズの F.I.は減少し始める。

2 つの異なる直径のビーズを用いてそれぞれ実験を行った。F.I.のピーク位

置は、直径 $1.0\ \mu\text{m}$ (図 3-3 B)および $2.0\ \mu\text{m}$ (図 3-3 C)のビーズについてそれぞれ $1.1 \pm 0.15\ \mu\text{m}$ および $1.3 \pm 0.18\ \mu\text{m}$ ($N_{\text{obs}} = 3$)と測定された。統計的な有意差は確認出来なかったが今回の $1.0\ \mu\text{m}$ と $2.0\ \mu\text{m}$ の様にビーズ径が異なった時の捕捉位置の違いは、直径の大きなビーズは小さなものに比べて光ピンセットのレーザーのより下流側で捕捉されるという過去に報告されたシミュレーション結果と矛盾しなかった(Nieminen *et al.*, 2007; Li, 2013; Dutra *et al.*, 2016)。

捕捉中心の高さ計測に関しては他にも方法が報告されており、Lang らはフォトダイオードによって検出された信号を用いている(Lang *et al.*, 2002)。また、後ろ焦点面干渉法やエバネッセント光の散乱の強度によってビーズの高さ方向の変位をリアルタイムに計測することも出来る(Deufel and Wang, 2006; Liu *et al.*, 2014; Pollari and Milstein, 2015)。他の実験手法である磁気ピンセットで捕捉した粒子の、焦点面に対する相対的な位置は、コヒーレント光を照明に使用して観察した回折リングのパターンによって決定される(Gosse and Croquette, 2002)。本研究の方法に比べるとそれらの方法は計測精度等で優れているが、本研究の方法の方が簡便であり特別なセットアップを用いないという点では極めて有用性があると言える。

カバーガラスが捕捉中のビーズに近づくと球面収差が原因でビーズが相対的に遠ざかるので、捕捉ビーズの中心とガラス表面との間の実際の距離は計測値の約 0.8 倍になる(Deufel and Wang, 2006; Pollari and Milstein, 2015)。したがって、 $1.0\ \mu\text{m}$ ビーズの h の値は $0.88\ \mu\text{m}$ ($= 1.1\ \mu\text{m} \times 0.8$)と見積もった。

最後に、その後の観察・計測のためにカメラ位置の調整によって明視野観察の焦点面の位置を捕捉ビーズの位置に合わせた。

3-4-2) アクトミオシン滑り力計測

一本のアクチンフィラメントもしくは Thin filament だけが結合したビーズを選び、光ピンセットで捕捉して計測に用いた。

試料ステージを X-Y 平面上の一方向に移動することによってフィラメントをカバーガラス表面に対して平行にさせた後、カバーガラスを蛍光観察の焦点面に合わせた。既述の通り、蛍光観察の焦点面は明視野観察及び光学ピンセットの焦点面の下に位置している。カバーガラスの高さを合わせる際、顕微鏡像の目視だけでなく PC ディスプレイ上にリアルタイムに表示される視野内の蛍光強度分布も基準にして調整した。しばらくすると、フィラメントの先端がカバーガラス表面に付着し、アクトミオシンの相互作用が確立するとその力発生によって捕捉ビーズが捕捉中心から変位し始める(図 3-4 A)。骨格筋ミオシンはアクチンと結合する時間が短いため、相互作用するミオシン分子の数が大きく変動するので、完全に釣り合った状態とはならないが、およそ平均的に安定した張力発生をするので、この状態をこの論文では定常状態と呼び、滑り力(F)は、定常状態における捕捉ビーズの変位の時間平均に光ピンセットのバネ定数を乗じたものから求めた。

再構成 Thin filament はカルシウム存在下において、アクチンフィラメントと比較して、力発生を増大することは過去にも報告されている(Homsher *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 2006; Oguchi *et al.*, 2011)。本研究でも、HMM と相互作用しているフィラメントの長さ(L_a , 図 3-1)で F を割ることで得られる単位長さあたり($1/\mu\text{m}$)の滑り力(F/length)を比較すると同様の結果が得られた。

力計測の間に TIRF 観察していると、HMM と相互作用しているフィラメン

トの部分、つまりカバーガラス近傍に存在するフィラメントの部分のみが照明される(図 3-4 B)。実際に Activating buffer 中の F/length はアクチンフィラメントで $2.6 \pm 1.0 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ($N_{\text{obs}} = 66$)、再構成 Thin filament で $4.0 \pm 1.7 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ($N_{\text{obs}} = 71$)であった(図 3-5 A)。一方で、再構成が上手くいっているかどうかは、弛緩条件(pCa 9.0)における発生力が小さいこと($0.17 \pm 0.081 \text{ pN}/\mu\text{m}$, $N_{\text{obs}} = 22$)によっても確認することが出来る。*In vitro* motility assay での弛緩条件における再構成 Thin filament の HMM への結合は、静電相互作用によって引き起こされると考えられている(Homsher *et al.*, 2000)。

捕捉されたビーズは、カバーガラス表面からの距離のために水平方向(X-Y)に加えて高さ方向(Z)に引っ張られると考えられる。フィラメントとガラス表面との間の角度 θ は、観察フィラメントのビーズ側末端部分と捕捉ビーズの中心との間の X-Y 平面上での距離を L_b とした時、幾何学的に $\theta = \arctan(h/L_b)$ として見積もられる。ここで HMM 分子自体の高さは、 h (1 μm のオーダー)よりはるかに小さい(10 nm のオーダー)ため、無視することができる(図 3-1)。したがって、補正されたカベクトル $F_{\text{av}}(F/\cos\theta/\text{length})$ は、再構成 Thin filament およびアクチンフィラメントにおいて、 4.3 ± 1.8 及び $2.8 \pm 1.0 \text{ pN}/\mu\text{m}$ と得られた(図 3-5 B)。

3-4-3) 計測誤差の見積もり

HMM と相互作用しているフィラメント部分の長さ(L_a)及びビーズ捕捉位置の高さ(h)を計測し、これらの値から推定される θ に含まれる誤差を見積もった(図 3-1)。

最初に、 L_a の測定における誤差の大きさを見積もるために、被写界深度について考察する。 L_a は、TIRF 顕微鏡下で F.I.の半値幅を利用して計測した。

Toyoshima はニトロセルロース(コロジオン)でガラス表面をコーティングした場合、HMM 分子は主に HMM の C 末端付近でガラスと相互作用することを示した(Toyoshima, 1993)。マイカフィルム上の電子顕微鏡を用いた観察ではミオシンヘッドが突き出た状態でその上をフィラメントが滑るのではなく、ミオシン同士の間で埋め込まれている形で相互作用することが示唆されている。これらの報告に基づいて、ミオシンヘッドの大きさ(19 nm)(Elliott and Offer, 1978)とアクチンフィラメントの半径($7/2 = 3.5$ nm)(Lodish *et al.*, 1999)からコロジオンコートカバーガラスからフィラメントまでの距離を $19 + 3.5 = 22.5$ nm と仮定した。ガラス面からの距離 22.5 nm におけるエバネッセント光強度は、計算の結果、距離 80 nm になると、その半分の強さになる(Fish, 2009; Liu *et al.*, 2014)(図 3-6)。したがって、点 P の近くにある L_b の一部分(図 3-1)、つまりカバーガラスから距離 80 nm 以内に入っている部分は照明されると思われる。被写界深度は ± 182 nm $= \pm \lambda \times n_3 / 2[\text{N.A.}]^2$ nm で与えられるが、ここで $\lambda = 532$ nm で、 $n_3 = 1.52$ はイマルジョンオイルの屈折率であり、N.A. = 1.49 は対物レンズの開口数である。高い開口数を有する対物レンズの被写界深度は波動光学を用いて計算出来る。この被写界深度内で蛍光を発するフィラメントは、同一の焦点面内で観察される(Inoue and Spring, 1997)。この余分に照明される部分を X-Y 平面上に投影すると $57.5/\tan\theta$ (57.5 nm $= 80$ nm $- 22.5$ nm)であり、 L_a の見掛けの値を増加させた可能性がある(図 3-1 参照)。実験における θ の範囲は $11 - 36^\circ$ (図 3-7 A; それぞれの平均。再構成 Thin filament : $23 \pm 5.6^\circ$; アクチンフィラメント : $21 \pm 5.9^\circ$)であるので、 $57.5/\tan\theta$ の値は $48 - 175$ nm の間で変動し得る。しかし、もし最大の 175 nm であっても、 L_a の平均の $\sim 6.4\%$ 程度にしかならなかった。従って、想定される誤差の L_a の計測結果への寄与は無視出来るほど小さいと結論付けた。アクチンフィラメントの太さは TIRF において 0.57 ± 0.10 μm (図 3-4

B の Y 軸に沿った F.I. の半値幅として計測、 $N_{\text{obs}} = 3$)として測定されたが、実際の太さは約 7 nm しかない。同様の効果がフィラメントの先端部分と点 P の両方で生じていると考えられるので、その結果 L_a は実際の長さより長く観測される(つまり、その分 L_b は短くなる)。従って、 L_a の値は 21%(= 0.57/2.7)程度過大評価され、 L_b は同程度過小評価されることになると考えられる。

捕捉位置の高さ h にも誤差が考えられる。捕捉ビーズの X-Y 平面における変位に加えて、高さ方向の変位が各計測データ間で異なると見積もられるので h はその都度異なる値になると考えられる。捕捉ビーズの高さ方向の変位は、カベクトルの Z 軸成分($F \times \tan\theta$)を Z 軸に沿ったバネ定数 (X-Y 平面の 1/5 と推定される) で割ることで求められた(図 3-7 B: ΔZ ; 再構成 Thin filament; 161 ± 78 nm, アクチンフィラメント; 147 ± 48 nm)。

全ての想定される誤差による寄与を考えると($L_b' = L_b + 0.57/2 \mu\text{m}$; $h' = h - \Delta Z$)、 θ の最大誤差は約 6° (= $\theta' - \theta$, $\theta' = \arctan(h'/b')$; 再構成 Thin filament; $6.0 \pm 2.3^\circ$, アクチンフィラメント; $5.1 \pm 2.0^\circ$)。この誤差も計測値に大きな影響を与えないと考えられる。

3-4-4) 垂直負荷を受けた時の持続的な力発生

Tm-Tn 複合体による再構成 Thin filament は、カルシウム存在下での力発生を増強するだけでなく、垂直負荷存在下でのアクトミオシン相互作用も安定化させた。角度補正されたカベクトルは、再構成 Thin filament およびアクチンフィラメントの両方において平均値の周りに広く分布した(図 3-5 A, B)。図に示すように、 θ はある程度の範囲を有していた。したがって、力の分布の広がりや θ の範囲の広がりやに起因すると推測した。この推測を確かめるために、計測された

発生力を θ に対してプロットした。この分析によって、 θ が大きくなるにつれて両フィラメントにおける発生張力が低下することが示された(図 3-5C, D)。 $0^\circ < \theta \leq 25^\circ$ と $\theta > 25^\circ$ に含まれるデータで統計的有意差が確認され、ピアソンの積率相関係数でも相関が確認出来た。このような発生力の θ 依存性は、カバーガラスを変えても常に存在していた(図 3-8)。さらに、再構成 Thin filament における発生張力は、 $0^\circ < \theta \leq 25^\circ$ および $\theta > 25^\circ$ の両方において、アクチンフィラメントの約 1.5 倍であった(図 3-5 D)。再構成 Thin filament のデータは、アクチンフィラメントのデータよりも大きなバラツキを示した。ここから考えられるのは Tm-Tn 複合体が再構成 Thin filament から計測中に一部解離し、その結果力発生に低下に繋がるといった可能性である。しかしながら、弛緩条件(pCa 9.0)において力が発生していないことから(図 3-5 A)、再構成の有効性は確認出来ているので、この推論は適当ではない。データのバラツキは、HMM 分子の密度がカバーガラス間でバラついていることを反映している可能性がある。そのため、この影響を防ぐ目的で測定に使用する場所を毎回変えて計測した(実験方法 3-3-5 を参照)。

アクトミオシン相互作用に課される垂直力は、 θ の上昇に伴う滑り力の低下の主な原因として考えられる(図 3-5 C, D)。Isambert らはカルシウム存在下で、再構成 Thin filament およびアクチンフィラメントの持続長がそれぞれ $12 \mu\text{m}$ および $9 \mu\text{m}$ であることを報告している(Isambert *et al.*, 1995)。一方、Fujime と Ishiwata も同様にレーザー光の準弾性散乱によって得られたデータをもとに、持続長を報告している(Fujime and Ishiwata, 1971; Ishiwata and Fujime, 1972)。持続長はその値が大きいほど、高分子が硬いということを表す。本研究において、測定に使用されたフィラメントの長さ(平均; 再構成 Thin filament; $4.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$, アクチンフィラメント; $5.0 \pm 1.2 \mu\text{m}$)は、持続長よりも短い。したがって、フィ

ラメントはある程度硬いものとして扱うことが出来るはずで、XY 平面に垂直な負荷はフィラメント全体にわたって加わると考えることが出来ると思われる

再構成 Thin filament における力発生がアクチンフィラメントのものよりも大きい理由は、HMM の Thin filament との結合がアクチンフィラメントとの結合よりも安定しているためであろうと考えられる。事実、アクトミオシンの Rigor 条件における破断力は、アクチンフィラメントよりも再構成 Thin filament の方が約 1.2 倍大きいことが報告されている(Suzuki, M. and Ishiwata, 2011)。再構成筋線維における実験で確かめられた様に、再構成手法によってクロスブリッジサイクルの各基本ステップの速度定数を復元することが出来るはずである(Fujita *et al.*, 2002, 2004)。Z 軸方向の負荷は再構成 Thin filament (4.4 ± 2.0 pN, 図 3-7 C)の方がアクチンフィラメント(2.7 ± 0.84 pN)のそれよりも大きかったが、Tm-Tn 複合体によるアクトミオシン相互作用の安定性の向上は角度に依らず見られた。

Takagi らはフィラメントに課せられた外力負荷に依存してアクトミオシンの力発生が変化し得るというミオシン分子の力学感受特性を示した(Takagi *et al.*, 2006)。本研究における結果から、Tm-Tn 複合体は、フィラメントの長軸に垂直な方向の負荷に対するアクトミオシン相互作用の安定性を増強することが推察される。一方で非筋の細胞質において、Tm の相同体がアクチンフィラメントとミオシンを含むアクチン結合タンパク質との間の相互作用を制御することが知られている(Gunning *et al.*, 2008; Wang and Coluccio, 2010; Hundt *et al.*, 2016; Gateva *et al.*, 2017)。Tm の制御機能は収縮機構の一部として集中的に研究されてきたが、Hundt らは細胞内 Tm が外力負荷の存在下で非筋ミオシンのプロセシブ性を増強することによって、細胞骨格再構成において重要な役割を果たすことを示唆している(Hundt *et al.*, 2016)。これらの結果は、アクチン調節

タンパク質存在下でのアクトミオシンによる三次元力発生の詳細な測定がこれからの研究における一つの重要なターゲットであることを示唆している。筋肉中に存在するような安定な格子構造は、非筋細胞質には存在しない。力発生の持続性のオン/オフを切り替えることにより、Tm などの調節タンパク質は、アクトミオシンの化学力学応答を最適化し、細胞機能を柔軟に調節するために重要な役割を果たす可能性があると言える。

3-5) まとめ

本研究では、*in vitro* motility assay における力計測の垂直方向成分を評価した。アクチンフィラメント、または Tm と Tn を加えて再構成した Thin filament にビーズを結合し、そのビーズを光学的に捕捉した。捕捉ビーズの中心とカバーガラスとの間の距離(h)は顕微鏡像を観察しながら光学系(瞳投影レンズの位置)を調整することで、力計測に適切だと思われる位置に決めた。その結果、カベクトルの角度(θ)と、力発生の θ 依存性が求められた。アクトミオシンの力発生は θ が大きくなるにつれて低下したが、一方で制御系がない時と比べて Tm-Tn 複合体存在下では、 θ の全範囲において発生力が上昇した。

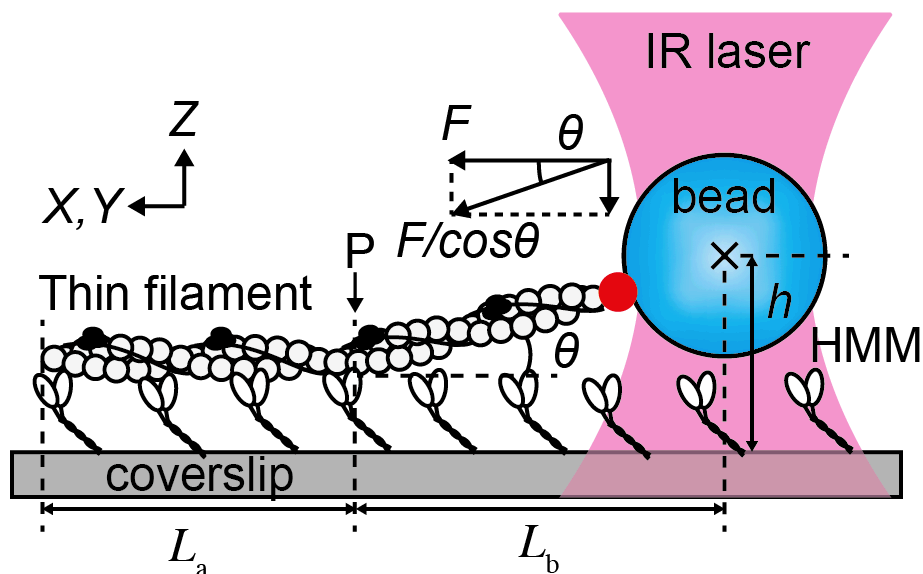


図 3-1 *in vitro* motility assay の概略図

ゲルゾリン(赤色で塗りつぶした丸)を介してポリスチレンビーズ(直径 $1.0 \mu\text{m}$)に結合した再構成 Thin filament(アクチン分子は白丸、Tm はフィラメントに巻きつく細い曲線、および Tn は黒丸で示されている)を光ピンセットで捕捉し操作した。ATP 1 mM 存在下で、Thin filament をコロジオンコートしたカバーガラスの表面に付着した HMM 分子と相互作用させた。 L_a で示される領域はガラスのごく近傍で TIRF 照明によって蛍光を発する部分で、HMM 分子と相互作用している Thin filament の部分であるとみなされる。 L_b で示される領域は落射蛍光顕微鏡で位置を確認した捕捉ビーズの中心と、HMM と相互作用する Thin filament の端部(P)との間の距離の X-Y 平面への射影である。 θ は P におけるカバーガラスと Thin filament の間のなす角度であり、 $\theta = \arctan(h/L_b)$ として幾何学的に見積もられた。ちなみに HMM の実際のサイズは h と比較すると無視できるほど小さい($\sim 20 \text{ nm}$)。滑り力(F)は、光ピンセットのバネ定数および X-Y 平面におけるビーズの変位から計算した。補正されたカベクトルは、 $F/\cos\theta$ として計算した。

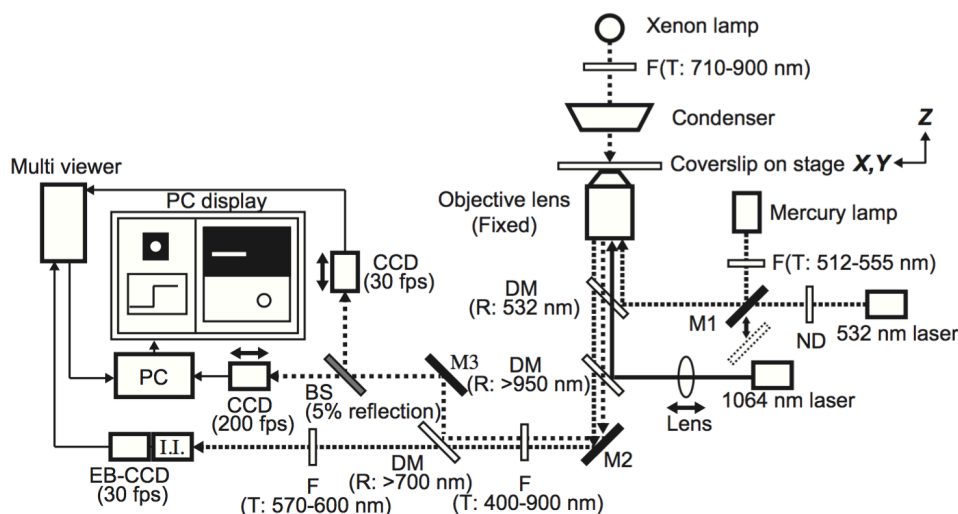


図 3-2 光学顕微鏡システムの概略図

光ピンセット、明視野観察および蛍光観察のための光学装置は、倒立顕微鏡を基に構築した。対物レンズの位置は固定されていて、試料ステージは3軸のステッピングモーターで操作する。光ピンセット用の1064 nmレーザーの焦点面の高さは、光路に沿ってレンズ(1064 nmレーザーの光路に配置された両頭の矢印で示されるレンズ; Lens)を移動することによって調整できる。ビーズの明視野像を得るために、キセノンランプを光源として使用し、710 - 900 nmにフィルターした。明視野像をビームサンプラー(BS)で分割し、2台のCCDカメラに投影した。1つ目のCCDカメラは200 fpsで作動させ、計測中にリアルタイムで捕捉ビーズのXY位置を追跡するために用いた。もう1台のCCDカメラはマルチビューアに接続し、30 fpsで作動させた。これらの2つのCCDカメラの焦点は、光路に沿ったカメラの位置(両頭の矢印で示される)によって個別に調整した。蛍光観察では、532 nmレーザー及び水銀ランプをTIRF及び落射蛍光顕微鏡のための光源としてそれぞれ使用した。これらの2つの照明方法は、ミラーを前後に動かすことによって切り替えることができる(M1、両頭の矢印)。蛍光像はイメージインテンシファイア(I.I.)接続のEB-CCDカメラで観測し、カメラはマルチビューアに接続した。マルチビューアで合成された明視野像と蛍光像は記録と分析のためにPCに取り込まれ、PCディスプレイに並べて表示される様にした。F: フィルター、M: ミラー、DM: ダイクロイックミラー、BS: ビームサンプラー、ND: ニュートラルデンシティフィルタ、T: 透過波長、R: 反射波長

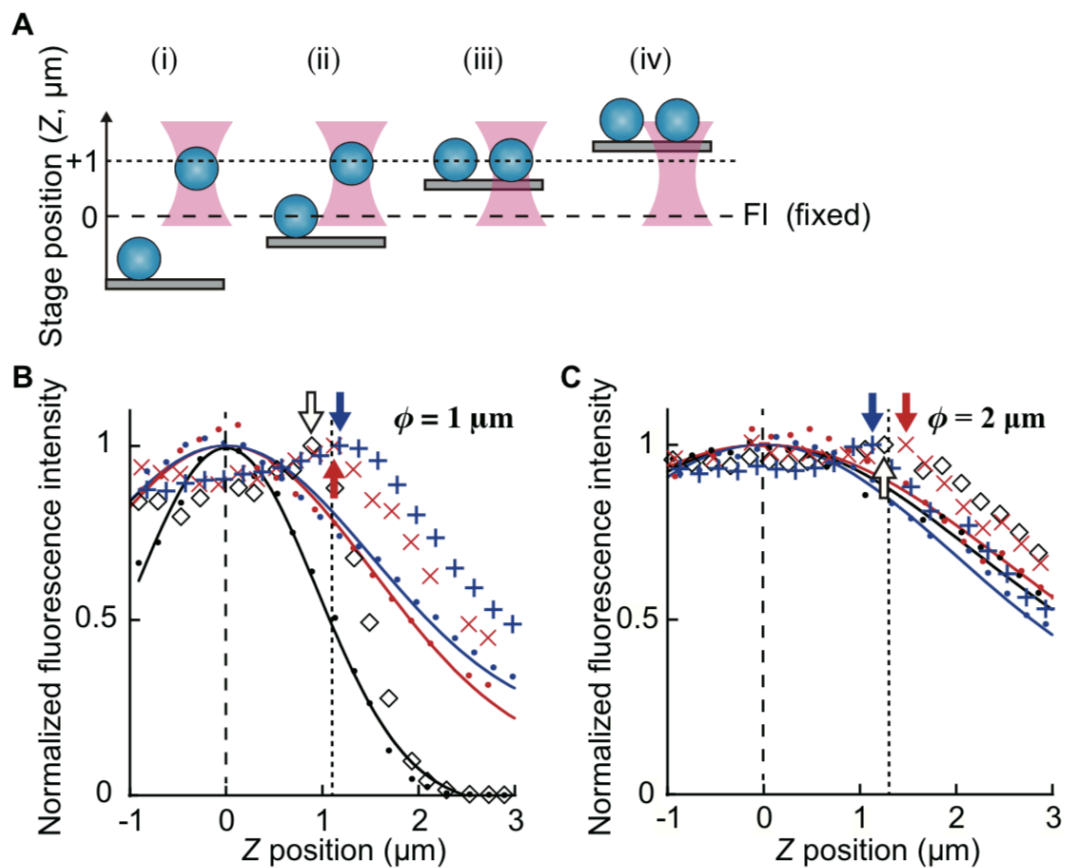


図 3-3 蛍光観察の焦点面から捕捉中心への高さを測定する手順

(A) 捕捉中心のカバーガラスからの高さを計測する手順を示す概略図。明視野観察の焦点面(点線)は、蛍光顕微鏡の焦点面(破線)の約 $1 \mu\text{m}$ 上に調整した。(i) 水中で浮いているビーズを光ピンセットで捕捉した。(ii) 一方で試料ステージすなわち、カバーガラスに吸着しているビーズを 200 nm ずつ段階的に上昇させた(対物レンズは固定)。(iii) 捕捉ビーズがカバーガラスと衝突し、カバーガラスに吸着した。(iv) 両方のビーズが試料ステージと共に上昇する。(B、C) 捕捉中心の高さを測定中の直径(B) $1.0 \mu\text{m}$ または(C) $2.0 \mu\text{m}$ のビーズの F.I. の変化を示す。3 回の試行を、3 つの異なる色によって表した。点は、カバーガラスに予め吸着しているビーズの F.I. の変化を表す。その Z 軸に沿った F.I. の変化は、ガウス分布(対応する点と同じ色の細い曲線)にフィッティングした。ガウス分布のピーク位置を蛍光観察の焦点面とみなし、 $Z = 0$ (垂直破線)とした。記号(+, ×, ◇)は、捕捉ビーズの F.I. 変化を示す。捕捉ビーズの F.I. は Z 軸上およそ $1 \mu\text{m}$ でピークに達した後(対応する記号と同じ色の矢印)、カバーガラスに吸着されたビーズと共に減少し始めた。これは捕捉ビーズがカバーガラスに吸着され、それが予め吸着されたビーズと共に移動するためである。ピークの位置は、直径 $1.0 \mu\text{m}$ および $2.0 \mu\text{m}$ のビーズについてそれぞれ $1.1 \pm 0.15 \mu\text{m}$ および $1.3 \pm 0.18 \mu\text{m}$ (平均 \pm SD、垂直点線)であった。捕捉された $1.0 \mu\text{m}$ ビーズの高さは、球面収差の影響を補正すると $Z = 0.88 \mu\text{m}$ となる。

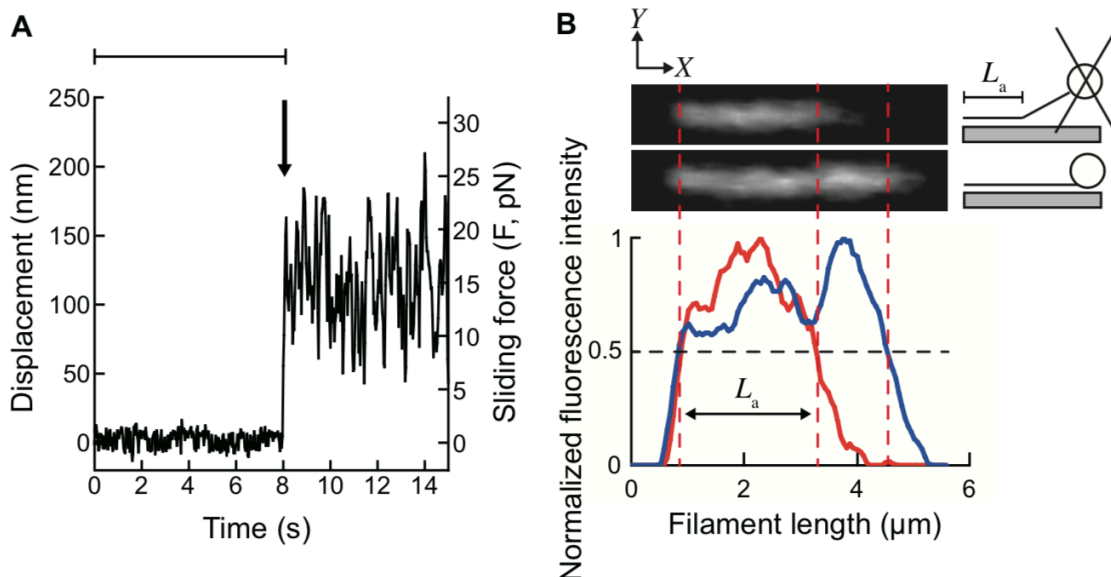


図 3-4 滑り力とフィラメントの長さの解析

(A) カ計測タイムコースの典型例を示す。再構成したビーズ結合 Thin filament を Activating solution 中で捕捉し、捕捉直後のビーズの位置を捕捉中心とした。その時点では、Thin filament と HMM はまだ相互作用していない。次にカバーガラスを蛍光観察の焦点面に合わせた。蛍光焦点面は、明視野観察および光ピンセットの焦点の下(対物レンズ側)にある。Thin filament がカバーガラス上の HMM と相互作用し始めたとき、ビーズは捕捉中心から離れるように変位する(矢印の時点)。この変位の時間平均に光ピンセットのバネ定数を掛けて、X-Y 平面における滑り力を計算した。(B) 捕捉されたビーズ結合アクチンフィラメント(上)と捕捉を外したもの(下)の蛍光像およびそれらの F.I.分析の結果を示す。ビーズが捕捉されている間、TIRF 観察するとカバーガラス上の HMM と相互作用するアクチンフィラメントの部分のみが観察出来る。したがってアクチンフィラメントは、ビーズを捕捉した時(上)より外した時(下)の方が長く見える。示されている F.I.は ROI を Y 軸に沿って平均し、X 軸上の一軸プロファイルを求めたものである(赤色および青色の曲線は、それぞれ上側および下側の蛍光像に対応する)。バックグラウンドは、アクチンフィラメントのないところに設定した同じ大きさの ROI から決定した。適切に TIRF 観察を行なった為、背景の値は基本的にほとんどゼロであった。図 3-1 で定義されたパラメータ" L_a "は、F.I.の半値幅を基準として計測した($L_a = 3.3 \mu\text{m}$)。

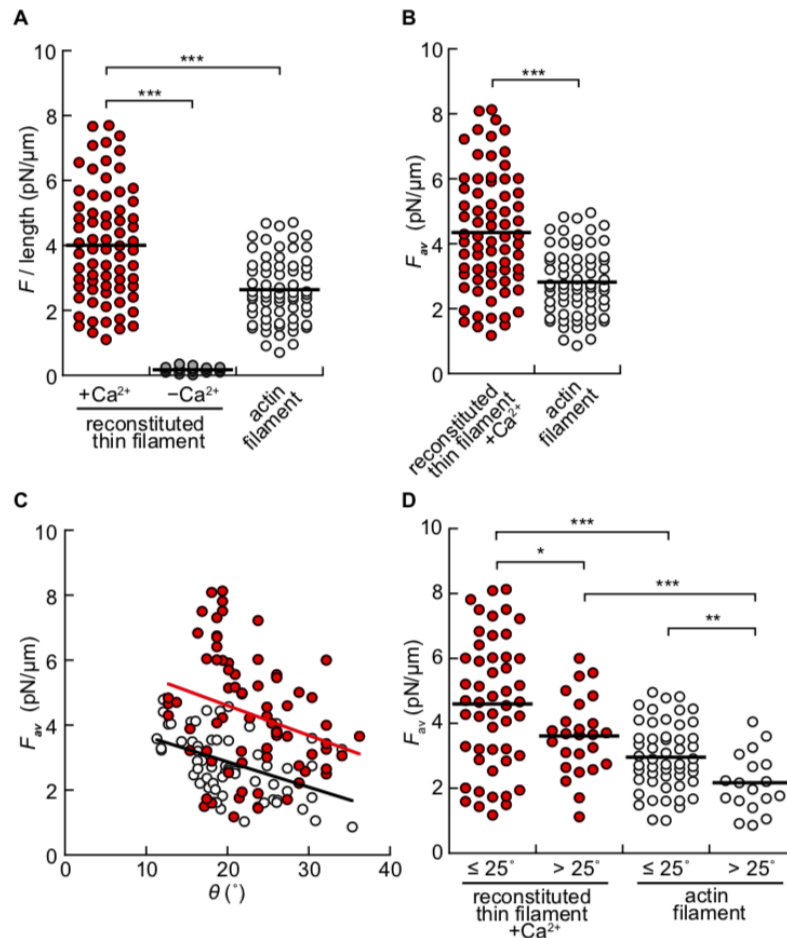


図 3-5 単位長さ当たりの滑り力とカベクトルの角度との相関

(A) フィラメント単位長さ当たりの滑り力(F/length)の分布。横棒はそれぞれの平均値を示す。平均値は、再構成 Thin filament(赤丸); カルシウム存在下: 4.0 ± 1.7 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 71$); 非存在下: 0.17 ± 0.08 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 22$), アクチンフィラメント(白丸); 2.6 ± 1.0 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 66$)。 (B) フィラメントの単位長さあたりの F を角度補正したもの(F_{av})の分布。横棒は平均値を示す。再構成 Thin filament; 4.3 ± 1.8 pN/ μm 、アクチンフィラメント; 2.8 ± 1.0 pN/ μm 。 (C) F_{av} と、フィラメントとガラス表面との間の角度(θ)との相関。 回帰直線(再構成 Thin filament の場合は赤; $y = -0.092x + 6.4$, $R = 0.28$, アクチンフィラメントについては黒; $y = -0.078x + 4.4$, $R = 0.45$)は、相関の傾向を見やすくする為に表記した。ピアソンの相関係数はそれぞれ Thin filament; $P = -0.28$, $p < 0.05$ 、アクチンフィラメント; $P = -0.45$, $p < 0.001$ 。 (D) $\theta \leq 25^\circ$ または $\theta > 25^\circ$ における F_{av} の分布。再構成 Thin filament; $\theta \leq 25^\circ$, 4.6 ± 2.0 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 48$); $\theta > 25^\circ$, 3.7 ± 1.1 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 23$), アクチンフィラメント; $\theta \leq 25^\circ$, 3.0 ± 1.0 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 50$); $\theta > 25^\circ$, 2.2 ± 0.91 pN/ μm ($N_{\text{obs}} = 16$)。赤丸およびグレーの丸はそれぞれ、カルシウムの存在下 ($N_{\text{obs}} = 71$) および非存在下 ($N_{\text{obs}} = 22$) で再構成 Thin filament から得られたデータを示す。白丸は、アクチンフィラメントから得られたデータを示す ($N_{\text{obs}} = 66$)。データは対応のない両側 t 検定を用いて統計的に比較した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

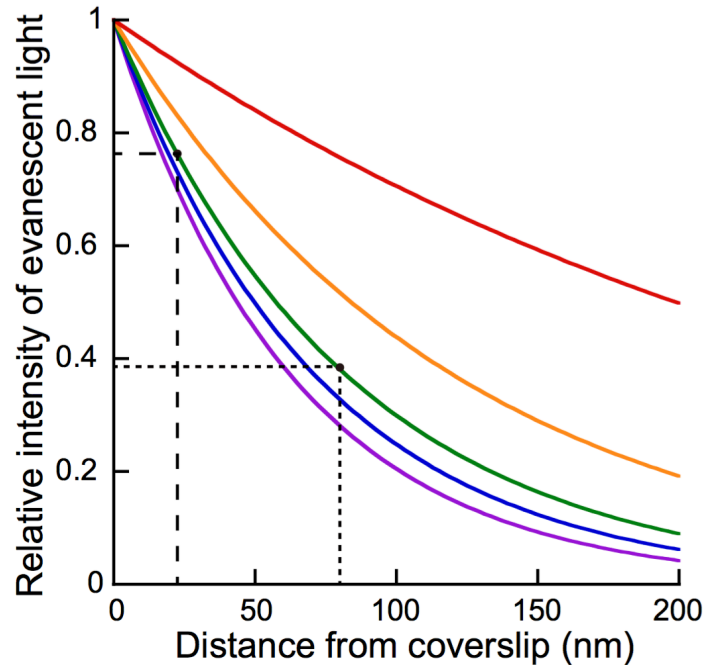


図 3-6 カバーガラス表面からの距離に対するエバネッセント光強度の依存性

エバネッセント光の相対強度はレーザー入射角に依存し、カバーガラス表面からの距離の関数として表される。ガラスの屈折率を $n_1 = 1.53$ 、水の屈折率を $n_2 = 1.33$ とすると、カバーガラスでの全反射の臨界角は 60.4° (赤線; $\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1) = 60.4^\circ$) と求められる。オレンジ線は 64° の時、緑で示される 68.6° は今回実験に適用したと考えられる角度である。破線は、測定中のフィラメントが位置すると考えられるカバーガラスから 22.5 nm の距離における相対強度を示す。エバネッセント光の強度が 22.5 nm の強度から半減するまでの距離を点線で示す。青線は 60.4° 。エバネッセント光を生じさせる最大角度 (θ_{\max}) は 76.9° である (紫線; $\theta_{\max} = \sin^{-1}(\text{N.A.}/n_1)$; N.A. = 1.49 は対物レンズの開口数)。

エバネッセント光の強度 $E(z)$ は水溶液に接するガラス表面からの距離 (z) の関数であり、距離に依存して減少する。

$$E(z) = E_0 e^{-\beta z} \quad (\text{式 3-2})$$

$$\beta = \frac{4\pi}{\lambda} \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_i - n_2^2} \quad (\text{式 3-3})$$

E_0 , 水溶液に接するガラス表面における強度. $\lambda = 532 \text{ nm}$, レーザー波長.

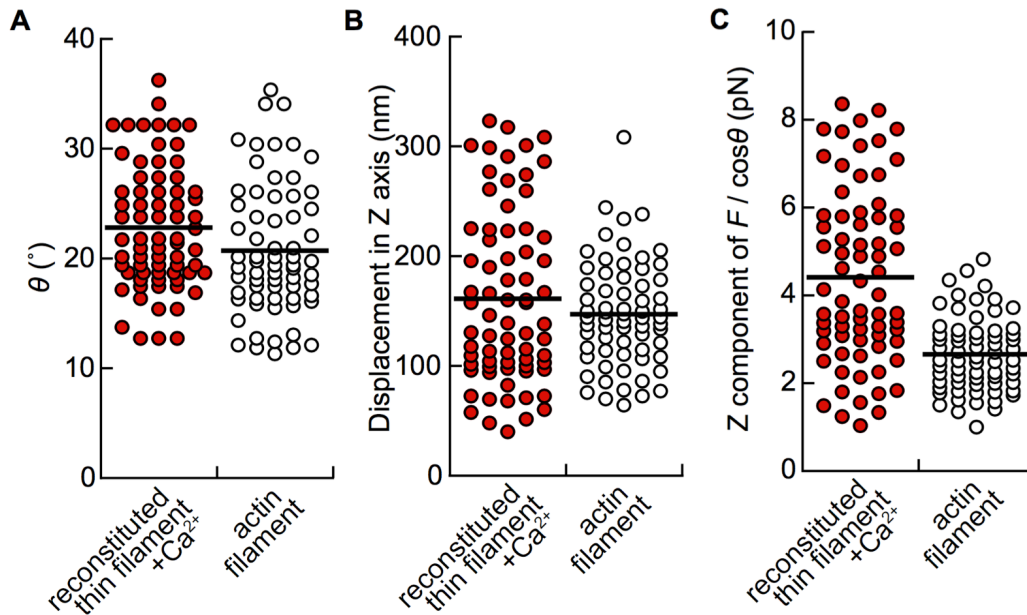


図 3-7 θ の分布、捕捉ビーズの Z 軸上の変位、およびカベクトルの垂直成分。

(A) θ の分布。再構成 Thin filament、アクチンフィラメントそれぞれの平均値は $23 \pm 5.6^\circ$ 、 $21 \pm 5.9^\circ$ 。(B) 過去の報告を参考に、Z 軸上のバネ定数を XY 平面の 1/5 と仮定した時、計算される Z 軸上におけるビーズの変位。再構成 Thin filament; 161 ± 78 nm。アクチンフィラメント; 147 ± 48 nm。(C) カベクトル($F/\cos\theta$)の垂直成分の分布。再構成 Thin filament; 4.4 ± 2.0 pN/ μm 。アクチンフィラメント; 2.7 ± 0.8 pN/ μm 。

赤および白の記号は、再構成 Thin filament($N_{\text{obs}} = 71$)およびアクチンフィラメント($N_{\text{obs}} = 66$)それぞれから得られたデータを示す。横棒は平均値を示す。

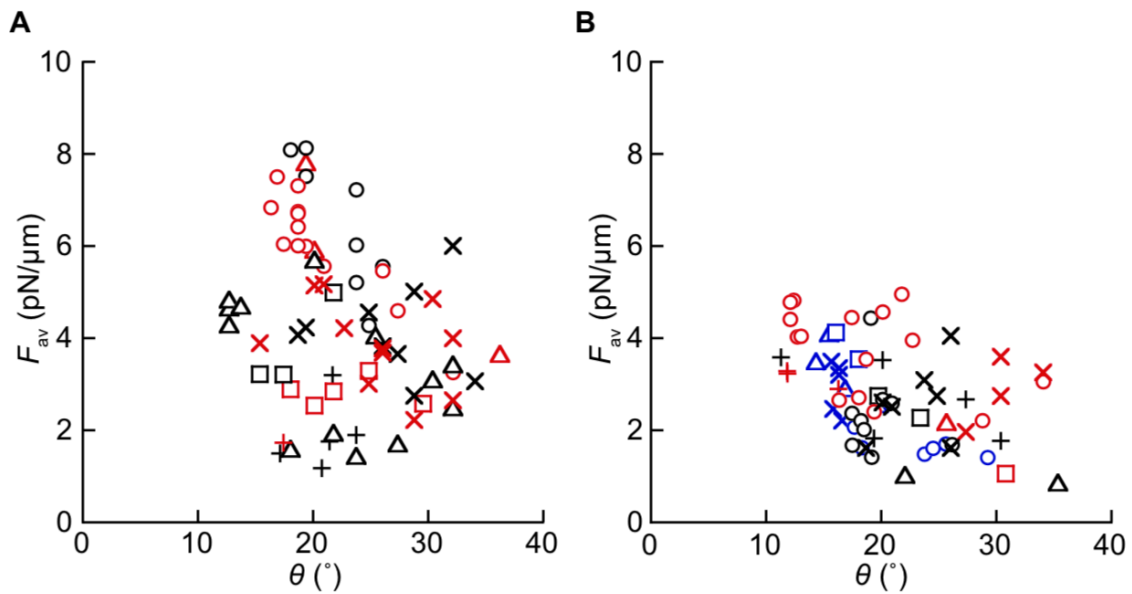


図 3-8 フィラメント単位長さ当たりの F (角度補正あり) と θ との間の相関のカバーガラスごとのバラツキ

再構成Thin filament(A)およびアクチンフィラメント(B)について、データをカバーガラスごとに区分けした。同じスタイルと色のプロットは各カバーガラスを表す。フローセルの数は(A)10枚と(B)15枚である。

第 4 章 肥大型心筋症特異的なトロポミオシン変異体を用いた一分子顕微解析

4-1) 要約

HCM の大部分は、サルコメア構成タンパク質に生じた変異によって引き起こされる。HCM 病態が起因する分子メカニズムの包括的な理解を目的として、様々なタンパク質変異体を用いた様々な階層における研究が行われてきた。筆者は HCM に関連した Tm 変異体(V95A および D175N)のタンパク質一分子レベルにおけるアクトミオシン相互作用に対する影響を評価するために光ピンセットと組み合わせた *in vitro* motility assay を用いて実験を行なった。WT または変異体を用いて Thin filament を再構成し、それらの無負荷滑り速度および滑り力を様々なカルシウム濃度で定量した。結果として、Tm 変異体の場合には、弛緩条件における滑り速度(pCa 8.0-9.0)が有意に上昇し、HCM に特徴的な拡張期の問題に繋がる可能性を示した。飽和カルシウム濃度における滑り力では、2つの変異体と同じ病態をもたらすにも拘らず V95A において低下し、D175N においては上昇するという結果が得られた。これらの結果は、収縮不全に対する代償性として心筋肥大が生じるという一般に受け入れられている学説とは異なる傾向を示している。さらにアクトミオシンの結合・解離の割合やクロスブリッジ形成頻度にも影響を与えており、HCM の分子メカニズムを理解する上で新たな提案につながると考えられる。

4-2) 研究の背景と目的

HCM は、500 人に 1 人の割合で発症することが知られている(Spirito *et al.*, 1997; Maron *et al.*, 2003; Elliott and McKenna, 2004; Ho and Seidman, 2006; Poliac *et al.*, 2006; Marston, 2011; Redwood and Robinson, 2013; Marsiglia and Pereira, 2014)。HCM を発症している人々における突然心臓死 (SCD; Sudden Cardiac Death) は、若年者および高齢者に関係なく、1~2%の割合で発生する (Maron *et al.*, 2003; Elliott and McKenna, 2004; Ommen and Gersh, 2009; Marston, 2011)。基本的な病態としては左心室壁および心室中隔の肥厚を引き起こすことが特徴であり(図 4-1; Cardiac Inherited Diseases Group の web site より抜粋)、結果として拡張機能障害をもたらす (Redwood and Robinson, 2013)。HCM の約 60%は家族性疾患であり、主にサルコメア構成タンパク質の変異に起因する(Spirito *et al.*, 1997; Elliott and McKenna, 2004; Ho and Seidman, 2006; Marston, 2011)。1990 年に Seidman らによって家族性 HCM に心筋ミオシンの点変異が見られることが発見されたことがアミノ酸変異を病因として扱った始まりである(Tanigawa *et al.*, 1990)。変異が確認されているのはミオシン重鎖 (MYH7)、ミオシン必須軽鎖(MYL3)、ミオシン制御軽鎖(MYL2)、ミオシン結合タンパク質 C(MYBPC3)、TnC(TNNC1)、TnI(TNNI3)、TnT(TNNT2)、 α -Tm(TPM1)、 α -アクチン(ACTC)、タイチン(コネクチン)(TTN)をコードする遺伝子配列である (Spirito *et al.*, 1997; Marian and Roberts, 2001; Ho and Seidman, 2006; Marston, 2011; Redwood and Robinson, 2013; Marsiglia and Pereira, 2014)。それらの発現レベルは各々患者ごとに個体差があり、アミノ酸変異を有する人でも無症状のままのこともあるが、一方で重篤な症状を経験する人もいる(Spirito *et al.*, 1997; Barron, 1999; Marian and Roberts, 2001; Maron *et al.*, 2003; Elliott and

McKenna, 2004; Poliac *et al.*, 2006; Marsiglia and Pereira, 2014)。結果として、発病の閾値及びその表現率は、変異や個体によって異なる。また、変異が同じ遺伝子または同じ遺伝子領域にあっても発病の仕方が異なることがあり、逆に異なるアミノ酸変異が同程度の発病を示すこともある(Spirito *et al.*, 1997; Marston, 2011)。よって臨床においては、各変異や各患者は個別にケアしなければならない。

HCM に関連した変異体のアクトミオシン収縮特性への影響を理解するために、心臓の階層ごとにいくつかのアプローチが試みられている。(i) タンパク質一分子を用いた *in vitro* motility assay、(ii) 筋原線維、(iii) 筋線維、(iv) トランスジェニック動物モデル、および (v) 臨床研究、と順に複雑さが増す。(i)は精製されたタンパク質から再構成された系を使用し、(ii)および(iii)はタンパク質の選択的除去および精製タンパク質による置換を行なっている(Kawai and Ishiwata, 2006; Terui *et al.*, 2008)。(iv)は遺伝子を変異させた動物モデルであり、この階層では、筋細胞の肥大や配向異常、および間質性線維症が注目される(McLeod *et al.*, 2009)。(v)は最も難しく複雑であるが、心臓疾患に関する研究の中で最も重要である。それぞれのアプローチには各々固有の長所と短所があり、疾患の原因究明やその治療法の確立はこれらの総合的な調査の結果によるところであると考えられる。本研究は、第一のアプローチ(i)に基づいており、変異による分子イベントの変化を直接的に理解することを目的としている。

HCM のメカニズムについては、分子および細胞レベルの仮説が多数提案されており、張力の低下(Marian, 2000; Bai *et al.*, 2011)や筋原線維構造の形成異常(Marian *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998)、ATP 加水分解速度および発生力の上昇(Tyska *et al.*, 2000)、カルシウム感受性の変化(Bottinelli *et al.*, 1998; Bing *et al.*, 2000; Karibe *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Ly and Lehrer, 2012)や弛緩期にお

ける弛緩不全 (Bai *et al.*, 2011, 2013)および弛緩速度の低下(Kim *et al.*, 1999)等が挙げられる。しかし、未だに統一した見解が得られていないのが現状である。特に α -Tm の場合、17 のミスセンス変異が HCM を引き起こすことが知られている(Redwood and Robinson, 2013)。また、Tm は 7 つの領域または Period からなることが知られている(McLachlan and Stewart, 1975)。遺伝子組替えによる局所的欠損/置換を行った研究によって、Tm の各 Period が特定の機能と関連していることが示されている(Hitchcock-DeGregori *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003, 2006; Kawai *et al.*, 2009; Oguchi *et al.*, 2011)。Period 1 および 7 は、隣接する Tm 分子の head-tail 間の相互作用、Period 2 および/または 3 はアクトミオシンのアロステリック活性化(Kawai *et al.*, 2009; Oguchi *et al.*, 2011)、Period 4, 5, 6 は完全な弛緩に必須であることが示されている(Hitchcock-DeGregori *et al.*, 2002; Oguchi *et al.*, 2011)。

本研究では HCM に関連した α -Tm における変異 V95A 及び D175N について研究を行った。V95A は Period 3 に位置し、D175N は Period 5 に位置する(図 4-2)。タンパク質の特定の機能を司る部位に変異が生じたからと言って必ずしも対応する機能に変異が影響するわけではなく、アクチンの場合では変異の生じた部位から予測された影響が実験結果で確かめられた結果とほとんど一致しないことも報告されている(Feng and Marston, 2009; Marston, 2011)。この事実は、変異体の影響を実際に直接測定し、Tm については、変異の位置する Period の該当する機能と比較する必要性を示唆している。*in vitro* motility assay で得られた 2 つのパラメータ、無負荷滑り速度および光ピンセットを使用して測定された滑り力を用いて、変異に起因する収縮機能への影響を評価した。

本研究では Tm におけるアミノ酸変異が制御系タンパク質のアクトミオシン相互作用の制御に対してどのような影響を与えるのか明らかにするべく研究

を行った。

4-3) 実験方法

滑り力の計測に関しては、第 3 章と同様である。本章における滑り力は全て角度(θ)補正されたものを扱う。

4-3-1) 溶液条件

F-buffer、Rigor buffer、Relaxing buffer、Activating buffer は第 3 章と同じ構成で準備した。ここでは、それ以外で用いた溶液について説明する。pCa 4 buffer は 2 mM Na_2ATP 、4 mM MgCl_2 、1 mM CaEGTA 、0.15 mM CaCl_2 、12.6 mM KCl 、6 mM KH_2PO_4 、10 mM DTT 、25 mM Im-HCl から調製した。pCa 5.5-9 の範囲の溶液(pCa 5.5, 5.8, 6, 6.3, 6.5, 6.8, 7, 7.5, 8, 9)は、Relaxing buffer と Activating buffer との混合溶液であり、pCa 4.5 buffer は pCa 4 buffer および Activating buffer の混合溶液である。F-buffer を除いて、これらの溶液のイオン強度は 50 mM、pH は室温で 7.4 に調整してある。全ての化学物質は、別段の記載がない限り、和光純薬工業(大阪)から購入した。測定中に低密度の HMM から Thin filament が完全に解離してしまうのを防ぐため、HMM の密度を 15、22.5、および 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の間で変化させた場合は実験溶液に 0.4%の 4000 cP メチルセルロース(Sigma-Aldrich)を混合した(Uyeda *et al.*, 1990; Miyata *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 1997)。

4-3-2) 滑り速度の解析法の検討

カバーガラス上を滑っているビーズが結合していない再構成 Thin filament 及びアクチンフィラメントを追跡して、無負荷における滑り速度を計測した(図 4-3、4-4 参照)。アクチンフィラメントの滑り速度は相互作用するミオシンの数に依存するので(Uyeda *et al.*, 1990)、長さが 2 - 4 μm のフィラメントに限定して解析対象とした。特に中間活性領域(pCa 7.0-7.5;図 4-4 B, (iv)-(vi))において動きが比較的滑らかなフィラメントと遅いフィラメントが観察視野内に混在した。更に個々のフィラメントは、これら 2 つの状態の間で頻繁に切り替わることもあった。したがって、滑り速度を個々のフィラメント毎に計算して求めることはしなかった。代わりに、フィラメントを一定時間間隔(以下の記述を参照)で連続的に追跡し、設定したインターバルごとの滑り速度を計算した。次に、全てのインターバルを平均して、任意の条件における滑り速度を決定した。

本研究においては、200 ms をインターバルとして採用した。Hilbert らによるとインターバルが短すぎるとフィラメント先端のブラウン運動によって生じる誤差のために、滑り運動の速い状態と遅い状態とがしっかりと区別できないことが示唆されている(Hilbert *et al.*, 2013)(図 4-4 A)。彼らは、解析において適切なインターバルを設定することが必要であると結論付けた。本研究の実験条件における適切な値を決定するために、D175N から再構成した Thin filament の pCa 4.0(図 4-4 B, (i)-(iii))及び pCa 7(図 4-4 B, (iv)-(vi))の条件において 66 ms(= 1/15 s)ごとに手動で追跡し、(i)と(iv) 66 ms、(ii)と(v) 200 ms(= 3 \times 1/15 s)および(iii)と(vi) 400 ms(= 6 \times 1/15 s)と計算に採用するインターバルを変えてそれぞれにおける滑り速度の分布を求めた。

pCa 7.0 の分布においては速い分布と遅い分布が見られる(図 4-4 B, (iv)-(vi))。200 ms よりも長いインターバルでは、ヒストグラムはガウス分布によくあてはまる(速い分布の中央値 \pm SE; (iv) 66 ms; $4.76 \pm 0.19 \mu\text{m/s}$, (v) 200 ms; $4.78 \pm 0.07 \mu\text{m/s}$, (vi) 400 ms; $4.58 \pm 0.07 \mu\text{m/s}$)。しかし、あまり長いインターバルで追跡すると軌跡の曲率を拾ってしまう可能性がある。この影響は、長いインターバルにおける見かけの平均速度の低下に見られる(平均値 \pm SEM; (iv) 66 ms; $4.18 \pm 0.08 \mu\text{m/s}$, (v) 200 ms; $3.91 \pm 0.07 \mu\text{m/s}$, (vi) 400 ms; $3.76 \pm 0.07 \mu\text{m/s}$)。したがって、速度は 200 ms で計算した。

カバーガラス表面上の HMM 密度の不均一性に対応するために、各フローセルにおいて2つ以上の領域で解析した。各条件に於いては7-48フィラメント(インターバル数; 400-2100)を解析した。カバーガラス表面に対するフィラメントの非特異的相互作用は BSA によって防いだが、フィラメントの先端がおそらく不活性化した HMM に捕まり、クルクルと回ってしまうものも確認出来た。これらのフィラメントは解析から除外した。

4-3-3) Rigor 条件下で形成されたクロスブリッジ数の計測

カバーガラス上に存在するフィラメントの単位長さあたりの HMM の数は Nishizaka らが報告したのと同様に Rigor 条件の下で測定した(Nishizaka *et al.*, 2000)(図 4-5)。5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈した HMM 溶液を用いてフローセルを調製した。ここでフローセルに注入する HMM の濃度が高すぎると、直接的な計測が難しくなってしまう。何故なら、HMM 分子間の距離が短すぎるために、クロスブリッジが解離した瞬間一つ一つを区別出来なくなってしまうからである。

まず、捕捉したビーズ結合アクチンフィラメントをガラス表面の HMM と相

相互作用させるためにステージを近づける。アクチンフィラメントが HMM と結合したのを確認した後に、カバーガラスを捕捉中心近傍から徐々に降ろしていくと(対物レンズは固定されている；したがって捕捉中心もおおよそ固定位置にある)、ビーズは結合した HMM に引っ張られて捕捉中心から徐々に変位する。つまり、アクチン・HMM 間の Rigor 結合に加わる負荷を上昇していくと、捕捉ビーズの最も近くに位置するクロスブリッジが解離する。この時、ビーズの変位が急激に減少する。そのような減少の生じた回数をアクチンフィラメントに結合した HMM の分子数とみなした。計測の結果は、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の条件において、フィラメントの単位長さ当たり、 1.35 ± 0.15 heads/ μm (分子数)であった($N_{\text{obs}} = 14$, フローセル 4 枚)。ここで、カバーガラス表面に吸着する HMM 分子の数は、フローセルに注入した溶液中の HMM 濃度に比例することが知られている(Nishizaka *et al.*, 2000; Guo and Guilford, 2004)。したがって、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HMM に対するフィラメントの単位長さ当たりのクロスブリッジの数は $8.1(= 1.35 \times 30/5)$ heads/ μm と推定された。計算を簡単化する為に 8 heads/ μm とする。よって HMM 濃度が 15 および 22.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合のフィラメント 1 μm あたりのクロスブリッジの最大数は、それぞれ $4(= 8 \times 15/30)$ および $6(= 8 \times 22.5/30)$ heads/ μm であると推定した。

4-3-4) カルシウム依存性の解析

カルシウム濃度(pCa)に対する滑り速度(無負荷)または滑り力(定常状態)の依存性を以下のように分析した。

$$v = v_{\text{LC}} + v_{\text{act}}H(Ca) \quad (\text{式 4-1})$$

$$F = F_{\text{LC}} + F_{\text{act}}H(Ca) \quad (\text{式 4-2})$$

$$H(Ca) \equiv \frac{1}{1+10^{n(pCa-pCa_{50})}} \quad (\text{式 4-3})$$

計測したデータに Hill の式 4-3 をフィッティングする(Bai *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011)。 n は協同性を表す Hill 係数である。 pCa_{50} は、半飽和時の pCa 値であり、カルシウム感受性を表す。ここで、 $H(Ca)$ における定数を滑り速度(v)、滑り力(f)で区別するために $pCa_{50(f)}$ および $n_{(f)}$ のように(v)または(f)を下付きの添字としておいた。特に滑り力の場合、

$$H(Ca) = \frac{F_{av}-F_{LC}}{F_{act}} \quad (\text{式 4-4})$$

F_{LC} は pCa 8.0 - 9.0(弛緩条件; LC)の範囲に含まれるデータの平均値から求め、 F_{HC} は pCa 4.0 - 5.8(飽和カルシウム濃度; HC)の範囲、つまり滑り力がプラトーに達した範囲に含まれるデータの平均値から求めた。 F_{act} は、カルシウムで活性化した時の滑り力の増分に対応する($F_{act} \equiv F_{HC} - F_{LC}$)。次に、 $H(Ca)$ の値を式 4-4 の様に求めた。すなわち、 $H(Ca)$ は規格化された滑り力の変化である。実験データの非線形回帰分析には Levenberg-Marquardt アルゴリズムを用いた(KaleidaGraph、HULINKS)。滑り速度についても同様の処理を施す。規格化を行う理由としては、回帰分析の精度を改善する目的もある。

4-3-5) 統計処理

計測した実験データは、平均 \pm SEM として記載する。有意差の比較では、対応のない両側 t 検定を用いた。回帰パラメータの値は上記の通り、Levenberg-Marquardt 法によって決定した最適値 \pm 標準誤差(SE; フィッティングエラー)によって表される。非線形回帰分析で得られたパラメータに関しては、パラメータ数値が一意に定まることから母集団を得ることが出来ず残念ながら統計的に比較検討することが出来なかった。パラメータ同士の相関に関し

では、ピアソン積率相関係数(P)を用いて判定した。

4-4) 実験結果と考察

4-4-1) 滑り速度のカルシウム依存性への α -Tm 変異体の影響

滑り速度(v)を測定するために、ビーズ非結合フィラメントを解析した(図 4-3 A)。滑り速度の平均値を pCa(pCa 4.0 - 9.0 の範囲で)に対してプロットした(図 4-3 B,C; エラーバーはシンボルサイズよりも小さい)。pCa-速度関係は、WT Tm と変異 Tm との間の差異を調べるために式にフィッティングする(表 4-1)。

拡張機能不全(不完全な弛緩)は最も着目される HCM の特徴である (Redwood and Robinson, 2013)。弛緩条件における滑り速度(v_{LC})は、WT に比べ変異体の方が有意に大きな値を示した($p < 0.001$)。 v_{LC} の上昇は生体内での弛緩期における収縮力の発生につながると考えられ、この結果は Thin filament 再構成筋線維を用いた 2 つの変異体に関する先行研究の傾向と一致した(Bai *et al.*, 2011)。 Bai らによると弛緩条件で活発にサイクルするクロスブリッジの数が変異体によって増加し、不完全な阻害を引き起こすと主張されている。変異 D175N が位置するのは、弛緩機能に関連する Tm の Period 5 である(Oguchi *et al.*, 2011)。つまり、変異が Period の機能に影響を与えている可能性も考えられる。しかしながら、*in vitro* motility assay を用いた先行研究で 2 つの変異体に関して弛緩不全に対応する結果が得られていないケースもある(Karibe *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011)。結果が異なる理由としては実験に採用した溶液のイオン強度が違うことが挙げられる。本研究の条件はイオン強度が低く、アクトミオシンの静電相互作用に顕著な差が生じた可能性が高い。

一方、飽和カルシウム濃度における滑り速度(v_{HC})に関しては、WT と変異体

とで有意な差は見られなかった。この結果は過去の報告と一致する(Bing *et al.*, 2000; Karibe *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011)。滑り速度は ATPase rate を反映したものであると考えられるが、V95A はカルシウム存在下で Actin activated Mg^{2+} -ATPase rate を低下させることも報告されている(Karibe *et al.*, 2001)。しかし、この低下は小さく(10%未満)本研究の結果と矛盾していないように思われる。 v_{act} は、変異体では WT より有意に小さな値を示した($p < 0.01$)。カルシウム感受性($pCa_{50(v)}$)と協同性($n_{(v)}$)の両方が変異体で上昇したが、その上昇は小さく有意な差を主張するには至らなかった(表 4-1)。

4-4-2) 滑り力のカルシウム依存性への α -Tm 変異体の影響

HCM 変異体の力発生に及ぼす影響に関する Thin filament 再構成筋線維を用いた先行研究を参考に、変異体によって引き起こされる力発生 of 分子メカニズムへの影響をタンパク質一分子レベルで分析した。無負荷での滑り速度の解析と同様に、ミオシンのつり合い力を反映すると考えられる角度(θ)補正した単位長さ当たりの力(F_{av})を図 4-6 A, B において pCa に対してプロットした。滑り力を測定するためには、ビーズを結合したフィラメントを使用した。ここで単位長さあたりとしたのは滑り力の大きさはフィラメントの長さに比例するからである(Kishino and Yanagida, 1988)。実験結果に式をフィッティングし(図 4-6 A, B の実線)、得られた回帰パラメータはまとめて表 4-1 に示す。

滑り速度 (v_{HC})においては、変異体の与える影響はほとんど無視できるものであったが、最大滑り力(F_{HC})は、変異体によって大きく影響された。V95A では 2.39 ± 0.10 pN/ μ m($N_{obs} = 58$)、D175N では 3.54 ± 0.12 pN/ μ m($N_{obs} = 59$)であり、WT (2.95 ± 0.15 pN/ μ m, $N_{obs} = 60$)と有意差($p < 0.01$)が示された(図 4-6 C)。

Thin filament を再構成した心筋線維においても示唆されている通り(Bai *et al.*, 2011)、予想では2つの変異体が収縮機能不全に至ると考えられているにも関わらず、ここに示された様に、2つの変異体において反対の効果が示された。つまり、V95A で低下を示したのに対して、D175N では上昇した。V95A による影響は心臓の駆出率が低下し、収縮期にポンプで汲み上げられる血液量が減少することにつながると考えられ、HCM に繋がり得る結果である。D175N については収縮期の即時の問題を引き起こすことはないと考えられるが、別の問題を引き起こす可能性がある。D175N に関して言えば、カバーガラスに α -アクチンを吸着することで、滑り運動するアクチンフィラメントに分子摩擦を起こさせ、そのような抵抗力を導入した *in vitro* motility assay(Bing *et al.*, 2000)やトランスジェニックマウスを用いた生検(Bottinelli *et al.*, 1998)においては、力発生に影響がないといった報告もされている。何故この様に実験系によって結果が違い得るのか？まずガラス面上に吸着したタンパク質(例えば α -アクチニン)を用いて間接的に stall force を見積もる実験と比較すると、光ピンセットを用いた本実験はより直接的な測定法であるし、より優れた定量性を有していると思われる。第三者のタンパク質(α -アクチニン)が介在しているので、それが結果に影響する可能性もゼロではないと考えられる。次にトランスジェニックマウスに関して言えば、生検組織では変異体の発現レベルが 100%に達しておらず、WT と変異体との混ざりあった状態そのものが例えば隣接した Tm 同士の相互作用のミスマッチを引き起こし、どちらか一つで構成されている場合とは異なる影響を筋収縮に及ぼすと予想される(Heald and Hitchcock-DeGregori, 1988; Urbancikova and Hitchcock-DeGregori, 1994; Maytum *et al.*, 2001)。将来的には再構成を行う過程で一定の割合で WT を混合した条件で変異体に関する *in vitro* 実験を行なっていくべきなのかもしれない。先行研究と異なる結果が得られた原因としても

う一つ挙げられるのは今回相対的にイオン強度が低い(マウス実験は生理イオン強度=200 mM)ことであり、D175Nがこの様な結果を与える理由としては、変異によって Asp(-1)から Asn(0)への電荷変化に伴い、アクチンと Tm、またはアクチンとミオシンとの間の静電相互作用を変化させることが挙げられる。低イオン強度では ion atmosphere が大きくなるという報告(Wang *et al.*, 2015)もあるので、D175N の効果はより大きくなったものと考えられる。

一方で弛緩条件における滑り力(F_{LC})は値自体が小さく、WT と変異体との間で統計的な有意差は見られなかった(表 4-1)。今回の条件で形成されたクロスブリッジの数は、ビーズを変位させるためには十分ではなかった可能性がある。その代わりに、Hill 曲線を見ると変異体によって比較的低カルシウム濃度で力発生が生じ始めるので滑り速度の阻害不全と合わせて拡張機能不全に寄与すると推測される。

カルシウム活性増分($F_{act} \equiv F_{HC} - F_{LC}$)に関しては、V95A で低下し(2.27 ± 0.10 pN/ μ m)、D175N(3.43 ± 0.12 pN/ μ m)では上昇した。両者とも WT(2.81 ± 0.15 pN/ μ m)に対して有意差が認められた($p < 0.05$)。これらの効果は F_{HC} と同様である。

カルシウム感受性($pCa_{50(f)}$)と協同性($n_{(f)}$)の両方が変異体で変化したがる、その変化は小さく、統計学的に有意ではなかった(表 4-1)。カルシウム感受性の上昇は、一般的に HCM の特徴であると考えられている(Bing *et al.*, 2000; Karibe *et al.*, 2001)。本研究の結果はこの考えを支持しない。 pCa_{50} の変化は、イオン強度、ATP 濃度、および P_i 濃度などの実験条件に依存し(Bai *et al.*, 2011)、実験方法の違いもその要因であり得る。さらに逆の効果を示すものもあるため、 pCa_{50} の変化は HCM の直接的な原因ではない可能性がある(Bai *et al.*, 2013)。

本研究における limitation は心筋ミオシンの代わりに骨格筋ミオシンを用い

ている点であろう。両者における主な違いは ATPase の turnover rate (Mijailovich *et al.*, 2017) と ATP、ADP の結合親和性 (Shimizu *et al.*, 1992; Ishiwata and Yasuda, 1993; Yamashita *et al.*, 1994; Fukuda *et al.*, 1998, 2000) であると考えられるが、カルシウム感受性はミオシンの相同体に依存しない (Schoffstall *et al.*, 2006; Fujita *et al.*, 1996) ことと飽和 ATP 濃度で ADP を加えていない環境で実験を行ったことから問題はないと考えている。あくまで、変異の影響を相対的に比較しており、得られた結果の意義を失うものではないと考えられる。

詳しく見てみると、WT と D175N に関する滑り力の Hill 係数 ($n_{(f)}$) は、滑り速度 ($n_{(v)}$) のときとほぼ同じ値であったのに対して、V95A の $n_{(f)}$ は最も低い値を示した (WT の値から -0.4) 一方で、 $n_{(v)}$ の時は最も大きな値を示した ($n_{(f)}$ と $n_{(v)}$ の差は 1.1 もある)。SE が大きいため、これらの相対的な差が有意であるとは言い切れないが、Hill 係数の変化は変異体が滑り運動における協同性に影響を及ぼすことを示唆していると考えられる。

4-4-3) 滑り力の角度 (θ) 依存性への α -Tm 変異体の影響

滑り力の角度依存性については、第 3 章と同様に F_{av} を θ に対してプロットすることで評価した (図 4-7, 表 4-2)。 20° 未満とそれ以上の時の平均値がそれぞれ、WT ($\theta < 20^\circ$; 3.3 ± 1.3 pN/ μ m, $N_{obs} = 22$; $\theta \geq 20^\circ$; 2.7 ± 1.0 pN/ μ m, $N_{obs} = 38$, $p < 0.05$) と V95A ($\theta < 20^\circ$; 2.7 ± 0.79 pN/ μ m, $N_{obs} = 27$, $\theta \geq 20^\circ$; 2.2 ± 0.68 pN/ μ m, $N_{obs} = 31$, $p < 0.05$) において有意に異なっていたのに対して、D175N の場合は有意差を示さなかった ($\theta < 20^\circ$; 3.7 ± 0.91 pN/ μ m, $N_{obs} = 38$, $\theta \geq 20^\circ$; 3.3 ± 1.0 pN/ μ m, $N_{obs} = 21$, $p = 0.11$)。ピアソンの積率相関係数に関しても同様の傾向が得られた (WT; $P = -0.28$, $M = 58 =$ 自由度; $p < 0.05$, V95A; $P = -0.30$,

$M = 56; p < 0.05, D175N; P = -0.15, M = 57; p = 0.25$)。D175N は高さ方向に負荷がかかっているにもかかわらず力発生を比較的維持していることが分かる。

4-4-4) 無負荷条件と釣り合い条件における duty ratio の見積もり

発生力変化の分子プロセスを調べるために duty ratio に着目した。duty ratio はクロスブリッジの結合時間と解離時間の割合で表される; $t_{on}/(t_{on} + t_{off})$; t_{on} = クロスブリッジ結合時間, t_{off} = クロスブリッジ解離時間)。 t_{off} は外力の負荷に依存して変化するので(Bell, 1978)、duty ratio は負荷の関数であり本研究では定常状態及び無負荷時の duty ratio を推定した。そこで、定常状態における duty ratio を得るために、単位長さ当たりの滑り力を記述するために立てられたモデルを採用した (Stam *et al.*, 2015)。

ミオシン分子の stall force(a)は以下の様に与えられる。

$$a = dK_{cb} = 5.4 \text{ nm} \times 0.58 \text{ pNnm}^{-1} = 3.1 \text{ pN} \quad (\text{式 4-5})$$

stall force とはバネと繋がれた際の釣り合いの力のことである。ここで、 d は計測時の光ピンセットのバネ定数が 0.1 pN/nm の場合のステップサイズ(5.4 nm)であり、 K_{cb} はクロスブリッジの硬さ(0.58 pN/nm)である(Miyata *et al.*, 1995; Nishizaka *et al.*, 1995)。 d および K_{cb} は、ミオシン分子自身の構造由来の特性を反映しており、Tm 変異体の影響は受けないと考えられる(但し、ミオシン一個のみと相互作用した時の変異体の影響は将来解析されるべきである)。V95A と D175N は調べられていないが、Shchepkin らは d が Tm の変異によって影響を受けないことを報告している(Shchepkin *et al.*, 2017)。したがって、WT 及び変異体については同じ a を仮定した(表 4-1)。

飽和カルシウム濃度における滑り力(F_{HC})は、相互作用可能なクロスブリッ

ジの最大数(N_{\max})と、 a および定常状態における duty ratio($\rho(a)$)の積として表せる。 $\rho(a)$ が大きければクロスブリッジが形成される時間的割合が大きくなるので、それに比例して発生する力が大きくなる。

$$F_{\text{HC}} = N_{\max} a \rho(a) \quad (\text{式 4-6})$$

N_{\max} は 8 heads/ μm と計測された(図 4-5)ので、 $\rho(a)$ は式から以下の様に計算される。

$$\rho(a) = F_{\text{HC}} / (N_{\max} a) = F_{\text{HC}} / (8 \text{ heads}/\mu\text{m} \times 3.1 \text{ pN}) \quad (\text{式 4-7})$$

$\rho(a)$ を試料ごとの F_{HC} から計算すると、それぞれ WT、V95A、および D175N について 0.118、0.096、および 0.143 となった(表 4-1)。これらは、 F_{HC} の値が統計的に有意に異なるため、WT と変異体との間で有意に異なると言える。つまり、 $\rho(a)$ において二つの変異で反対の影響が示されたということである。V95A では WT よりも 19%小さく、D175N では WT よりも 21%大きくなっている。電荷を変化させずに疎水性を変化させる V95A の場合とは異なり、D175N の $\rho(0)$ の値が WT と同程度であったにも関わらず、 $\rho(a)$ は WT のものよりも大きな値を示した。この結果は、D175N がクロスブリッジの負荷依存性に影響することを示唆している。

一方で、滑り力の時間平均のカルシウム依存性は式 4-3,4 で定義した $H(Ca)$ を用いて以下の様に表せる。

$$F_{\text{av}} = F_{\text{HC}} H(Ca) \quad (\text{式 4-8})$$

故に式 4-6 から

$$F_{\text{av}} = N_{\max} a \rho(a) H(Ca) \quad (\text{式 4-9})$$

この様に Stam らの定義を参考に滑り力の大小を線形的に定め(duty ratio に比例する)、それに非線形的に変化するカルシウム依存的要素を加える形で新しく定義した。 F_{av} が duty ratio に比例するという仮定は他にも報告がある(Tyska *et al.*,

2000; Rao *et al.*, 2009; Stam *et al.*, 2015)。

次に、無負荷時の duty ratio ($\rho(0)$)に関する見積もりを行った。Uyeda らは滑り速度(v)の力発生クロスブリッジ数依存性を以下の様に定義している(Uyeda *et al.*, 1990)。

$$v = v_0 \times \{1 - (1 - \rho(0))^N\} \quad (\text{式 4-10})$$

v_0 は最大滑り速度であり、本研究では N をカルシウム濃度と共に変化するフィラメントあたりの力発生し得るクロスブリッジの数と定義する。 N が多くなる程、クロスブリッジが形成される確率が大きくなり右辺が v_0 に収束する。 v_0 は d と t_{on} から、 $v_0 = d/t_{on}$ と表せる(Harada *et al.*, 1990; Uyeda *et al.*, 1990)。さらに本研究においては $v_0 = v_{HC}$ とみなせる。長さ 2 - 4 μm のフィラメントを解析対象とした為およそ 3 μm の長さとし、フィラメントあたりの相互作用可能なクロスブリッジの最大数は $N = 8 \text{ heads}/\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m} = 24 \text{ heads}$ (クロスブリッジ)と見積もられる。Longyear らは T_m と T_n がカルシウム濃度依存的にクロスブリッジ形成頻度を調節することを示唆している(Longyear *et al.*, 2017)。式中でカルシウム依存的に変化する唯一のパラメータは $H(\text{Ca})$ であり、今回は形成頻度の指標として定義することとする。Homsher らはフィラメントの単位長さあたりに得られる滑り力の相対値として、 F_{av}/F_{HC} は力発生クロスブリッジの数の指標として考えられるとした(Homsher *et al.*, 2000)。これらのことを整理すると、 N はクロスブリッジ形成のカルシウム依存的な頻度を反映したものとしてみることが出来、滑り力の結果から得られたパラメータから $24H(\text{Ca})$ として推定することとする。カルシウム依存的な滑り速度(図 4-3)のデータを $24H(\text{Ca})$ の関数としてプロットし直し、式 4-10 を用いて分析することで $\rho(a)$ を得る(図 4-8)。変異体の $\rho(0)$ は、WT との間で有意差を示さなかった(表 4-1)。この傾向は D175N に関する Wang らの報告と一致している(Wang *et al.*, 2011)。 t_{on} ($v_{HC} =$

d/t_{on} が変異の影響を受けないので、 t_{off} も変異の影響を受けないことを示唆している。

4-4-4) 分子摩擦に関する検討

滑り速度と滑り力との間の直接的なカップリングに関しては、Sato らのモデル(Sato *et al.*, 2011) を参考にし、Oguchi らの報告をもとにデータを取り扱った(Oguchi *et al.*, 2011)。同じミオシン密度において WT Tm 結合 Thin filament とアクチンフィラメントの両方で実験した場合、滑り速度と滑り力が比例関係にあり、滑り速度と滑り力が直接的にカップリングしていることが示唆されている(Oguchi *et al.*, 2011)。無負荷での滑り速度は Sato らによって与えられた通り、(クロスブリッジ一つあたりの力発生)/(分子摩擦係数)で表される。すなわち、分子摩擦係数は滑り速度と滑り力の傾きの逆数で定義される。この関係が Tm 変異体によってどのような影響を受けているのか評価した。図 4-9 は、表 4-1 に示す滑り速度(v_{HC})と滑り力($F_{av} = F_{HC}$)との関係をまとめたものである。図から分かるように、分子摩擦(図 4-9 の勾配の逆数)は、アクチンフィラメントと D175N で同様の結果を示し、WT では小さく、V95A では最も小さな値を示した。アクチンフィラメントの計測値は $v_{HC} = 4.23 \pm 0.04 \mu\text{m/s}$ ($N_{obs} = 12$)、 $F_{HC} = 2.37 \pm 0.15 \text{ pN}/\mu\text{m}$ ($N_{obs} = 33$)であった。

分子摩擦に関する解釈について以下に補足する。

アクトミオシン間の分子摩擦は Sato らのモデルにもある通り以下の式で表せる。

$$v = a'/\eta \quad (\text{式 4-11})$$

a' を myosin 一個あたりの平均張力とすると、 $v = d/t_{on}$ と $a' = \rho(a) \times a$ から

$$\eta = \frac{t_{on}}{d} \times \rho(a) \times a \quad (\text{式 4-12})$$

$a = d \times K_{x\text{-bridge}}$ より

$$\eta = K_{x\text{-bridge}} \times t_{on} \times \rho(a) \quad (\text{式 4-13})$$

このように分子摩擦(η)が相関するパラメータを考えると、本研究における Tm 変異体の分子摩擦への影響は $\rho(a)$ の変化に起因するものであると考えることが出来る。本研究ではアクトミオシンの滑り運動に関して無負荷の時と定常的に釣り合っている時の 2 つの条件のみであるが、生体内ではアクトミオシンは変化する外部負荷を受けながら連続的に滑り運動をしているので、分子摩擦の違いによる影響はかなり反映されると考えられる。

4-4-5) クロスブリッジ数のミオシン密度依存性

Hill 係数への変異の影響に関する検討から、個々のクロスブリッジ間の協同性に関心を持ち、ミオシン密度を変えた実験も行った。pCa 5 の条件で 8 heads/ μm に加えて、 N_{max} を 4 heads/ μm から 6 heads/ μm と変化させることにより(4, 6, 8 heads/ μm)、ミオシン密度依存性を介してクロスブリッジ間の協同性を評価する(図 4-10 A)。実験溶液(Activating solution)へのメチルセルロースの添加を除いては、カルシウム依存性分析と同じ方法で実験した。また、Tm-Tn 複合体の機能を評価するために、再構成 Thin filament に加えてアクチンフィラメントでも実験を行った。

滑り速度、滑り力ともにミオシン密度依存性に関して、試料ごとに異なる傾向が見られた(図 4-10 B, C)。例えば、変異体と比較すると、WT Thin filament は低い密度で最大値に達した。特徴的だったのは滑り力に関してで、カルシウム依存性分析の飽和カルシウム濃度における結果($N_{\text{max}} = 8$ heads/ μm)と比較して強い滑り力(WT; 5.92 ± 0.34 pN/ μm , $N_{\text{obs}} = 12$, メチルセルロースを含まない時に比べて 201%, V95A; 5.56 ± 0.26 pN/ μm , $N_{\text{obs}} = 13$, 233%, D175N; $8.97 \pm$

0.33 pN/ μm , $N_{\text{obs}} = 10$, 254%, アクチンフィラメント; 4.64 ± 0.46 pN/ μm , $N_{\text{obs}} = 10$, 195%)が得られたが、おそらくメチルセルロースの存在により排除体積効果によってアクチンの高さ方向の熱揺らぎが抑えられ、アクトミオシン相互作用が維持されやすくなったことの影響であろうと考えられる。カルシウム依存性分析でのデータと同様に、D175N($p < 0.001$)およびアクチンフィラメント($p < 0.05$)は WT と比較して有意に異なっていたが、一方で V95A は有意差を示さずメチルセルロースを含まない時(有意差がある)とは異なる傾向を示した。この傾向の違いは考慮されるべきではあるが、あくまで今回は同一条件における相对比较に注目することとする。ミオシン密度に対して各データをプロットしただけでは変異体による影響の本質的な部分は掴めない。よって滑り速度と滑り力それぞれにおいて工夫を凝らし、以下に示すアプローチをとった。

まず滑り速度に関して図 4-8 B の時と比較する目的で、今回も相互作用可能なクロスブリッジ数に対する依存性を評価した。フィラメント当たりの力発生クロスブリッジの数 N は、相互作用可能なクロスブリッジの最大数(= 24)に $F_{\text{av}} / F_{\text{max}}$ を掛けたものによって見積もられた(Homsher *et al.*, 2000)(図 4-10 D)。得られた結果は、図 4-8 B とは異なる傾向を示した。WT と D175N との間の相対的な位置関係は、およそ図 4-8 B と同じであるが、V95A は WT より低い位置にあった。これはカルシウム依存的にクロスブリッジ数を変化させた場合とミオシン密度を変化させた場合での条件の違いによって、滑り運動におけるクロスブリッジ間の協同性が異なる傾向を示すという解釈が出来る。

続いて滑り力のデータに対するアプローチを記述する。 F_{av} は N_{max} が増加するにつれて上昇した(図 4-8 C)。ミオシンの密度を変えた時にも F_{av} と N_{max} との関係が常に線形である場合、すなわちクロスブリッジ間に協同性がない場合においては、単一クロスブリッジが発生する張力(= $F_{\text{av}}/N_{\text{max}}$)は、 N_{max} とは無関係

に一定の値をとるはずである。アクチンフィラメントでは N_{\max} に対する F_{av}/N_{\max} の変化は小さかったのと対照的に、再構成 Thin filament の F_{av}/N_{\max} は N_{\max} に相対的に大きく依存する様に見えた(図 4-10 E)。この結果を解釈するために以下の式を定義した。

$$F_{\text{av}}/N_{\max} = \rho(a)' \times a \times g(N_{\max}) \quad (\text{式 4-14})$$

$g(N_{\max})$ は式 4-9 における $H(\text{Ca})$ と同様の役割を果たすことが期待される、 N_{\max} 依存的なクロスブリッジの形成頻度を示す係数として定義する。つまり、定常状態における duty ratio ($\rho(a)'$) を新たに定義し規格化することで、非線形的な変化を取り出そうという試みである。

$\rho(a)'$ を用いて規格化したデータの傾向を掴むために Hill の式を $g(N_{\max})$ に対して以下の様に当てはめた。

$$g(N_{\max}) = \frac{b \times (N_{\max})^n}{K^n + (N_{\max})^n} = \frac{b}{1 + (K/N_{\max})^n} \quad (\text{式 4-15})$$

回帰パラメータとして K と n を定義し、 b の数値は手動で決定する。 $g(N_{\max})$ は $H(\text{Ca})$ と同様に、0 から 1 の間の値をとる。つまり、 $N_{\max} = 8$ のときに、 $g(N_{\max}) = 1$ となる。因みにここでも $a = 3.1$ pN を採用した。Thin filament のデータに関して回帰分析を行った(図 4-10 F)。回帰パラメータは表 4-1 にまとめる。 b は一意に求まらないので、一定の範囲で値を変更しながら代入し、その都度フィッティングを行って SE の大きさを比較することで最適値を見積もった(図 4-11)。最小の SE を与える b の値は、WT および V95A においてそれぞれ $b = 1.0$ および 1.1 と与えられたのに対して、D175N に関しては最適な値が定まらなかった。図 4-11 C, F に示すように相対的にはあるが SE の小さい $b = 2.4$ のときに最適であると考えられる。 b を 2.4 以外にも任意の範囲で変化させても曲線は互いに十分に重なっていたので曲線の一意的な決定は出来ているものと期待される(図 4-11 G)。図 4-10 F における結果から、カルシウム依存的なクロスブリッジ

の形成頻度($H(\text{Ca})$)に対する小さな影響とは対照的に、変異によるミオシン密度依存的なクロスブリッジ形成頻度が影響を受けることが示唆される。つまり結果からカルシウム依存的な要因を含んだ「協同性」の他に、カルシウムとは独立した「協同性」に対する影響が考えられる。一概にカルシウム依存的なアクトミオシン相互作用の制御といっても、制御のメカニズムにはカルシウムによる制御とミオシン結合による制御の相補的なやりとりが含まれる(McKillop and Geeves, 1993; Vibert *et al.*, 1997)。例えば、Tn へのカルシウムの結合がアクトミオシン相互作用を制御するのは勿論、ミオシンの結合が TnC とカルシウムの結合親和性に影響を及ぼすことも報告されている(Chung *et al.*, 2016)。カルシウム濃度を固定してミオシン密度依存的な変化を観測する目的は、それらの相補的な要因の影響を出来るだけ除くことにある。カルシウムによる制御の活性化とミオシンの結合による活性化を内包した 3 状態モデルを考慮し、 T_m を柔らかい梁の様に扱うモデルを採用して考えてみる(Smith and Geeves, 2003a, 2003b; Longyear *et al.*, 2017)(図 4-12)。つまり、カルシウム依存的な制御系の変化に加えてミオシンの結合によって T_m の梁が持ち上げられて近傍の相互作用に影響を与えるといった考え方である。今回扱った変異は T_m の柔らかさに影響を与えること(Li *et al.*, 2012; Ly and Lehrer, 2012; Zheng *et al.*, 2016)とアクチンとの相互作用を弱くすること(Golitsina *et al.*, 1997; Kremneva *et al.*, 2004; Mathur *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2016)が報告されているため、梁の性質を大いに変化させてクロスブリッジ同士の結合協同性を T_m の変異が変化させた可能性がある。アミノ酸変異による T_m の柔らかさの変化はタンパク質中の α -ヘリックスの安定性の低下が原因であり(Wang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2016)、特に D175N の場合はアミノ酸置換由来の電荷の変化から α -ヘリックスの安定性の低下が引き起こされると考えられている。さらに V95A は、アロステリック活性化に寄与

しているとの報告(Kawai *et al.*, 2009; Oguchi *et al.*, 2011)がある Period 3 に位置している。今回捉えられた「協同性」への影響は心機能を果たす上で重要であると思われるクロスブリッジ依存的な活性化(Kobirumaki-Shimozawa *et al.*, 2014)に影響を与えるのではないかと考えられる。本研究において見られた発生張力における 2 つの変異体の影響(上昇するものも含む)が他の階層での結果(低下もしくは変化なし)と異なった理由の一つとして、生理条件では本研究より高密度のミオシンが存在するためにクロスブリッジ協同性への変異の影響が反映された可能性がある。

4-5) まとめ

In vitro motility assay を用いて、HCM 特異的な Tm 変異体、V95A および D175N の機能的意義について研究を行なった。双方の変異体における弛緩条件における滑り運動(v_{LC})の阻害に対する影響は、Tm と関連した HCM の主要な病態であると考えられている拡張機能不全を誘発する可能性を示唆するものである。一方、V95A(低下)および D175N(上昇)における滑り力(F_{HC})の変化は、2 つの変異体が筋収縮に対して異なる影響を与える可能性を示唆している。一般に収縮不全を補うために代償性で左心室肥大が引き起こされるという学説が有力であるが、D175 における結果はそれとは一見相容れない結果を示した。一方で、ミオシン数依存的なクロスブリッジの協同的な形成への変異の影響が示唆されたため、生体内の様に本研究とはミオシン密度が全く異なる条件では本研究とは異なった制御への影響の可能性も考えられる。

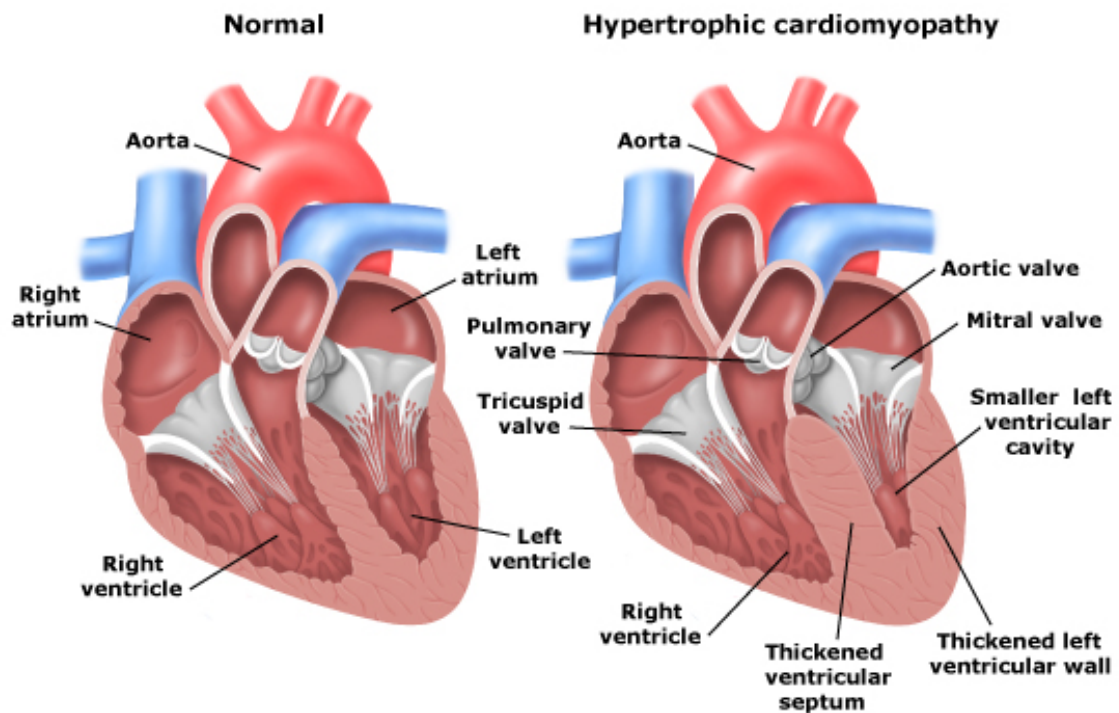


図 4-1 肥大型心筋症について

HCM の基本的な病態としては左心室壁および心室中隔の肥厚を引き起こす(右)ことが特徴であり、結果として拡張機能障害をもたらす。

図は Cardiac Inherited Diseases Group の Web site から抜粋

(<http://www.cidg.org.nz/patients-families/cardiac-inherited-diseases/hypertrophic-cardiomyopathy-hcm/>)

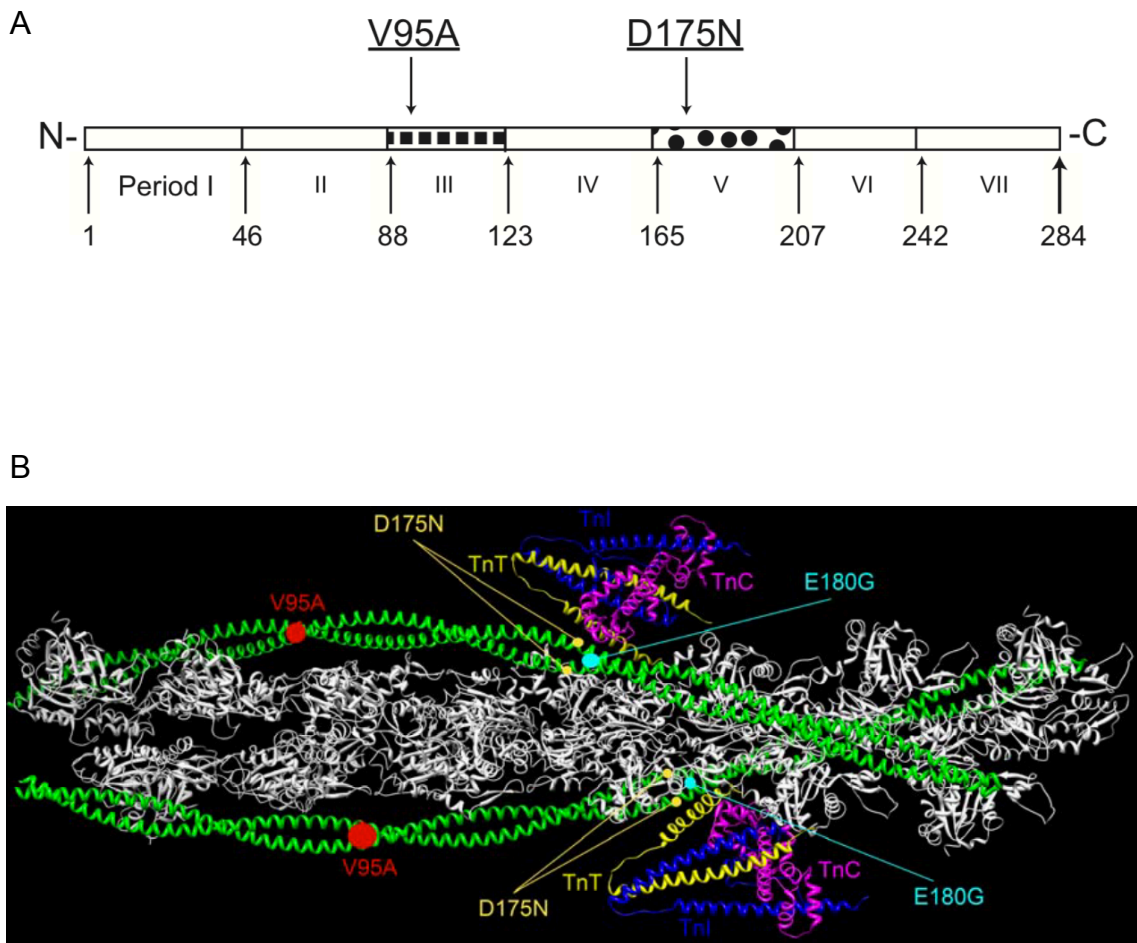


図 4-2 Tm の構造

(A) Tm の一次構造。Tm は 7 つの領域からなる。V95A と D175N はそれぞれ、Period 3(黒四角) および Period 5(黒丸)と呼ばれる領域に位置する。Period 3 は、アクチン上における Tm の協同的な働きに寄与するという報告がある (Kawai *et al.*, 2009; Oguchi *et al.*, 2011)。Period 5 は TnT との相互作用(Hitchcock-DeGregori *et al.*, 2002)とカルシウム依存的な弛緩(Oguchi *et al.*, 2011)に関して機能すると考えられている。(B) Thin filament の立体構造。Bai *et al.*, 2011 から抜粋。Wu *et al.*, 2009 (PDB ID: 2w4u)に変更を加えたもの。Tm(緑)は α -helix のダイマーでありコイルドコイルを形成している。白で示されるのはアクチンフィラメント。TnT は黄色、TnC はマジエンタ、TnI は青で示され、弛緩条件における構造である。

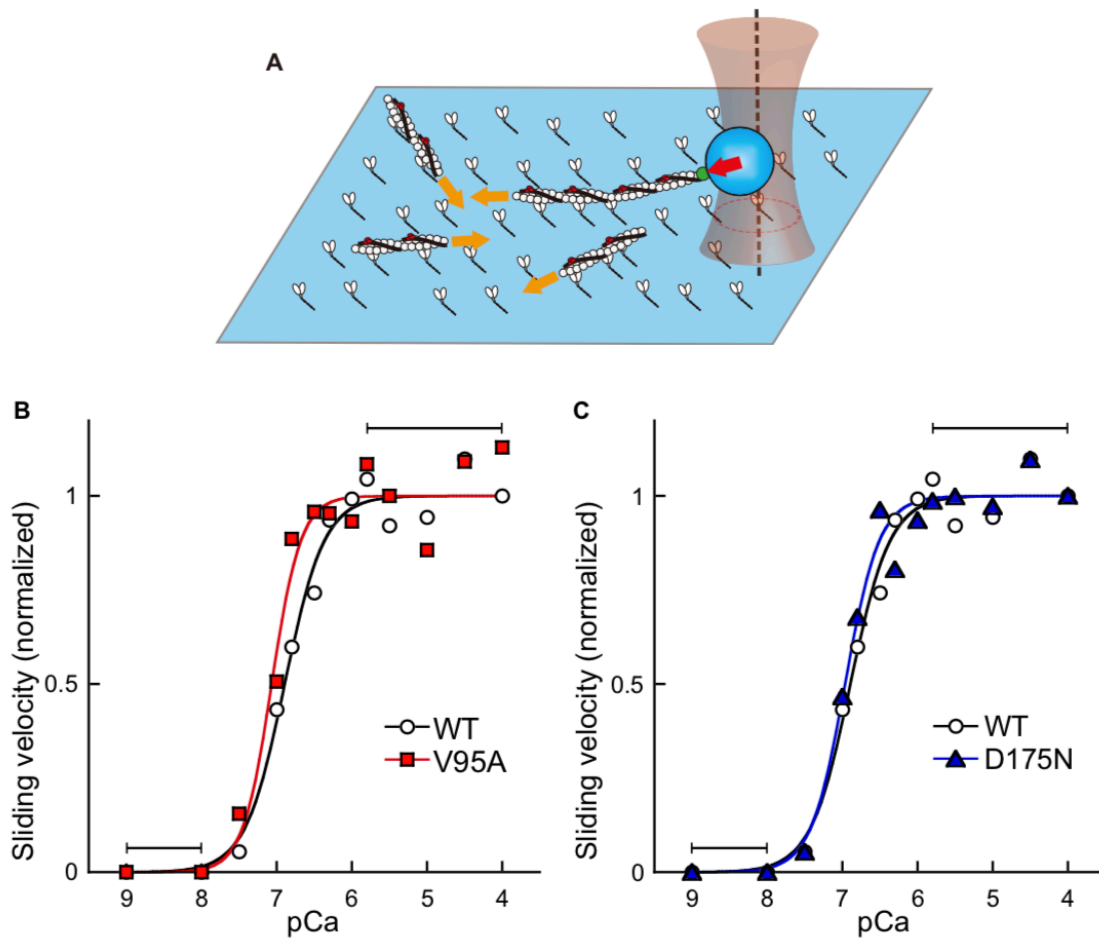


図 4-3 HCM 関連 Tm 変異体を用いた再構成 Thin filament の滑り速度のカルシウム依存性
 (A) 滑り速度はビーズが結合していないフィラメントを追跡して求める。同一のカバーガラス面上でビーズが結合したフィラメントは光ピンセットで捕捉し、滑り力の計測を行う。(B, C) WT Tm(白丸)および HCM Tm 変異体 (V95A; 赤四角, D175N; 青三角)を用いた再構成 Thin filament の滑り速度を各 pCa でプロットし、非線形回帰分析を行なった(飽和カルシウム状態と弛緩状態の間の変化分を規格化して表示)。記号およびエラーバーは、平均 \pm SEM (フローセル 2 枚, 各条件において $N_{\text{obs}} \geq 7$ および 400 以上の速度インターバル)を表す。黒、赤、青の曲線はそれぞれ WT、V95A、D175N に対する Hill の式のフィッティングカーブ。得られたフィッティングパラメータは表 1 に示す。上および下の実線の横線は、カルシウム依存滑り速度が飽和(pCa 4.0-5.8) および弛緩状態(pCa 8.0-9.0)と考えられるカルシウム濃度の範囲。

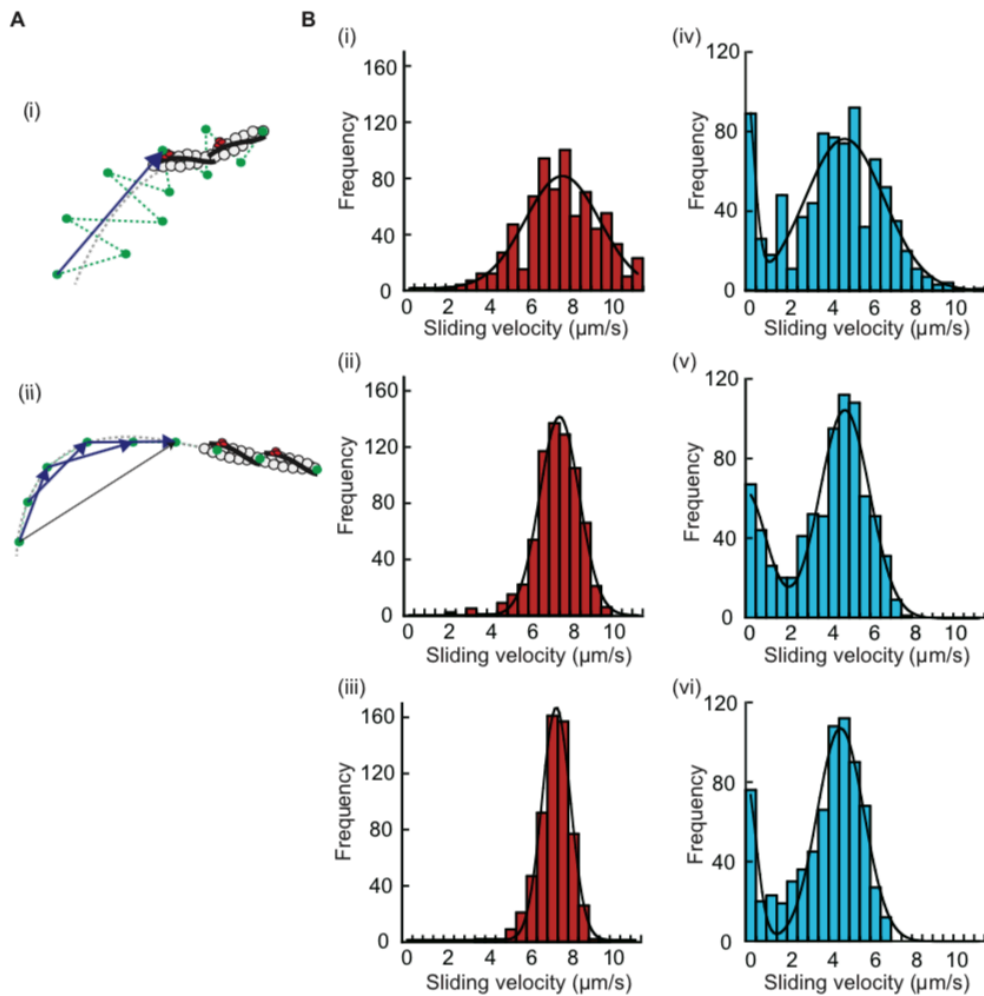


図 4-4 滑り速度解析の時間インターバル依存性

(A) フィラメントがゆっくりと移動する場合、インターバルが短すぎるとフィラメント先端のブラウン運動が過大評価され速度計算に影響する(破線で示す)。この影響を避けるには、より長い時間インターバルを選択する必要がある。しかし、滑らかに運動するフィラメントの場合、時間インターバルが長すぎると、軌跡からのずれが誘発される。(B) 特に中間活性領域(pCa 7.0-7.5)では、同じスライド上に速く動くフィラメントと遅いフィラメントが混在する。したがって、遅いフィラメントだけでなく、速いフィラメントに対しても適切な時間インターバルを選択する必要がある。(i) 66 ms、(ii) 200 ms、(iii) 400 ms はそれぞれ異なる時間インターバルを同じデータ(D175N、pCa4)に当てはめた時の速度分布である。一方、(iv)-(vi)は、中間活性条件において同じデータの速度分布を異なるインターバルで解析したものを示している(D175N、pCa 7.0)。本研究では、200 ms インターバルで速度解析を行った。

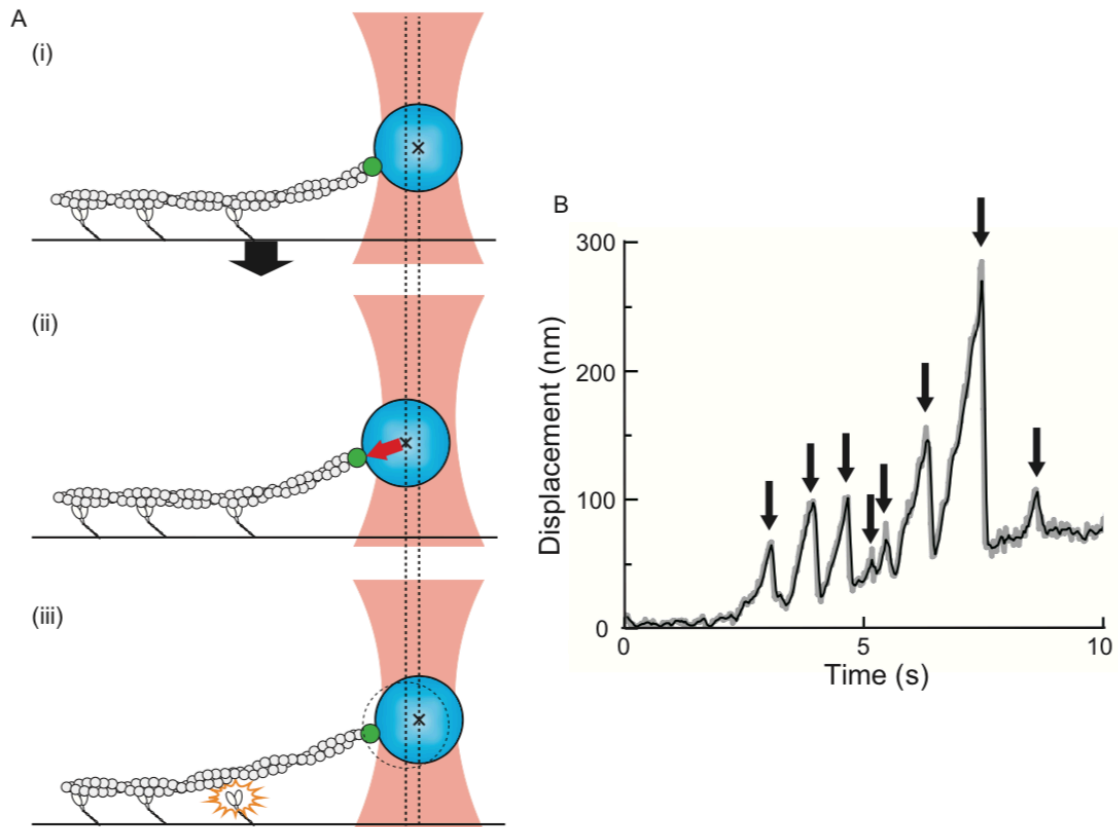


図 4-5 クロスブリッジの数をカウントする方法を示す概略図と実測データの 1 例

(A) (i) ビーズ結合アクチンフィラメントを光ピンセットによって捕捉した後、ビーズとカバーガラスとを近づけることによって、フィラメントとガラス表面上の HMM 分子との間でクロスブリッジを形成させた。アクチンフィラメント全長の約 3 分の 2 にクロスブリッジを形成させた後、カバーガラス(試料ステージ)をビーズからゆっくりと離れた。(iii) ビーズは捕捉中心から徐々に変位し、その結果捕捉ビーズに最も近いクロスブリッジに負荷がかかり結合が破断する。(B) アクチンフィラメントから HMM が外れると、ビーズ変位のタイムコースにおいて変位の大きさが突然小さくなる(矢印, 8 peaks/5.9 μm)。ピークの数、クロスブリッジの数を表すと考えられる。グレーで示すのがビーズ変位の生データで、黒い線がその移動平均を示す。移動平均はピークを見やすくする為に行っている。

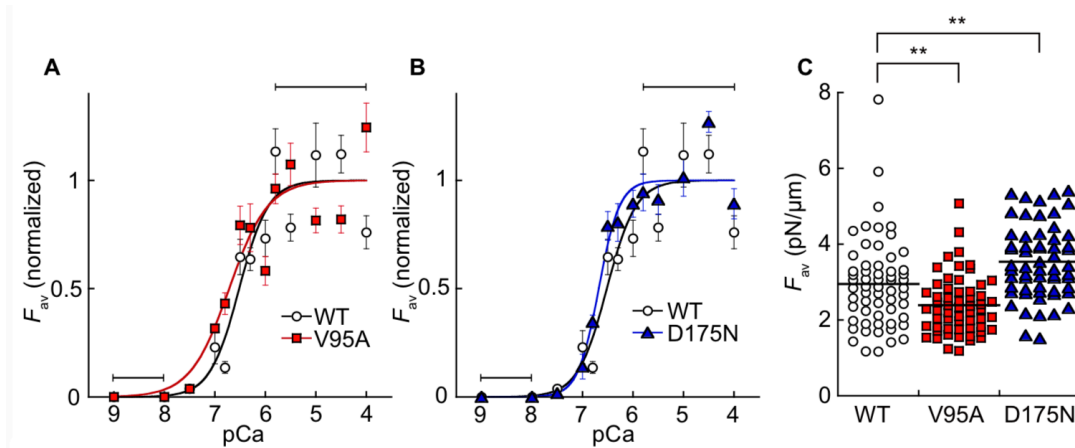


図 4-6 HCM 関連の Tm 変異体を用いて再構成された Thin filament の単位長さ当たりの角度 (θ) 補正された滑り力のカルシウム依存性

(A, B) WT Tm(白丸)および HCM Tm 変異体(V95A; 赤色四角, D175N; 青色三角)の単位長さ当たりの角度補正した滑り力(F_{av})を各 pCa 条件でプロットした。記号およびエラーバーは、平均 \pm SEM(フローセル 2 枚, $N_{obs} \geq 7$)を表す。黒、赤、青の曲線はそれぞれ WT、V95A、D175N のデータに Hill の式をフィッティングしたもの。得られたフィッティングパラメータは表 1 に示す。上および下の実線の横線は、カルシウム依存滑り力が飽和(pCa 4.0 - 5.8)および弛緩条件(pCa 8.0 - 9.0)と考えられるカルシウム濃度の範囲。(C) 飽和カルシウム濃度(pCa 4.0 - 5.8)における WT および変異 Tm の角度補正滑り力の分布。横棒はそれぞれの平均値を表す。WT; 2.9 ± 1.2 pN/ μ m($N_{obs} = 60$), V95A; 2.4 ± 0.77 pN/ μ m($N_{obs} = 58$), D175N; 3.5 ± 0.96 pN/ μ m($N_{obs} = 59$)。統計的分析として、対応のない両側 t 検定を実施した。** $p < 0.01$ 。

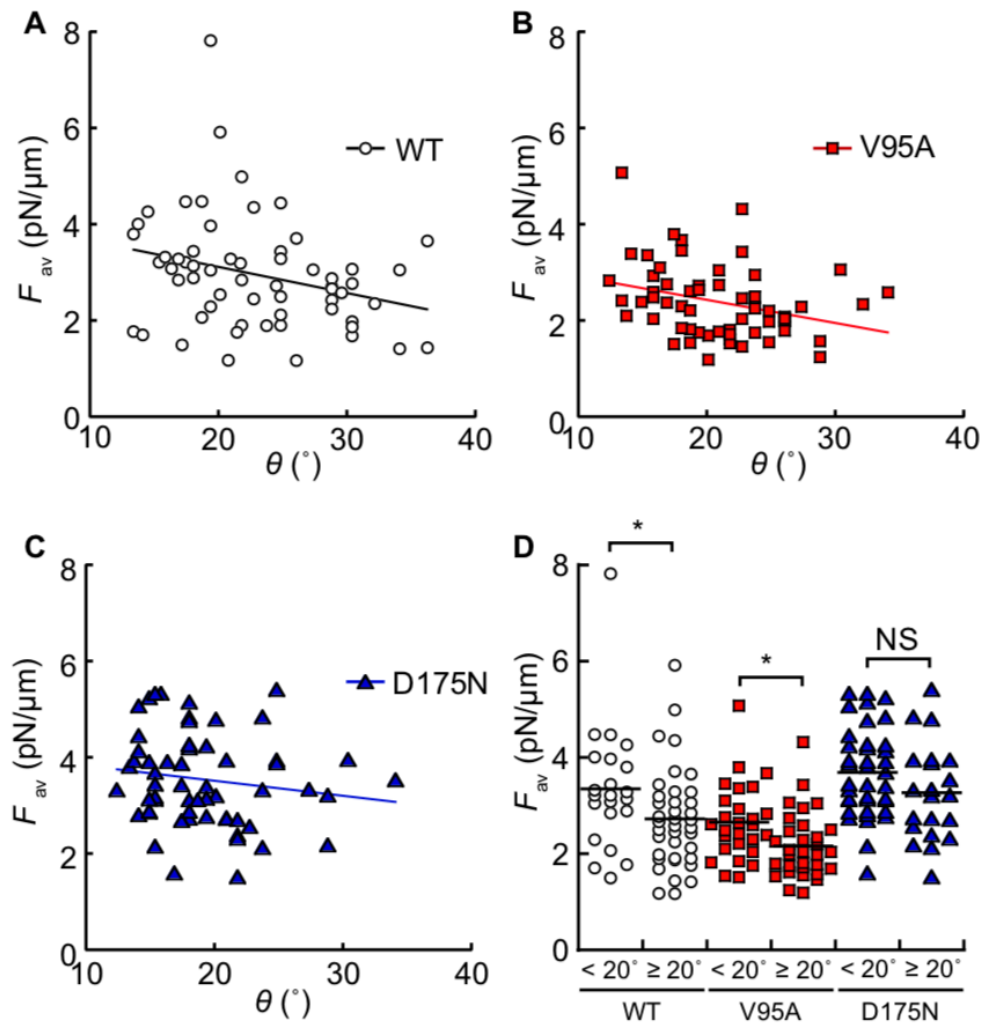


図 4-7 再構成 Thin filament の単位長さ当たりの滑り力とカベクトルの角度(θ)との相関
 (A-C) Thin filament の単位長さ当たりの角度補正滑り力(F_{av})と Thin filament とガラス表面との間の角度(θ)の相関。pCa 4.0 - 5.8 の範囲に含まれるデータを対象とした。WT(A, $N_{obs} = 60$)、V95A(B, $N_{obs} = 58$)および D175N(C, $N_{obs} = 59$)。相関の目安として回帰直線を加えた (A; $y = -0.054x + 4.2$, $R = 0.28$, B; $y = -0.048x + 3.4$, $R = 0.30$, C; $y = -0.031x + 4.1$, $R = 0.15$)。 (D) $\theta < 20^{\circ}$ 又は $\theta \geq 20^{\circ}$ における F_{av} の分布。WT; $\theta < 20^{\circ}$, 3.3 ± 1.3 pN/ μ m ($N_{obs} = 22$); $\theta \geq 20^{\circ}$, 2.7 ± 1.0 pN/ μ m ($N_{obs} = 38$), V95A; $\theta < 20^{\circ}$, 2.7 ± 0.79 pN/ μ m ($N_{obs} = 27$); $\theta \geq 20^{\circ}$, 2.2 ± 0.68 pN/ μ m ($N_{obs} = 31$), D175N; $\theta < 20^{\circ}$, 3.7 ± 0.91 pN/ μ m ($N_{obs} = 38$), $\theta \geq 20^{\circ}$, 3.3 ± 1.0 pN/ μ m ($N_{obs} = 21$)。データは両側 t 検定を用いて統計的に比較した(* $p < 0.05$, NS = 有意性なし)。

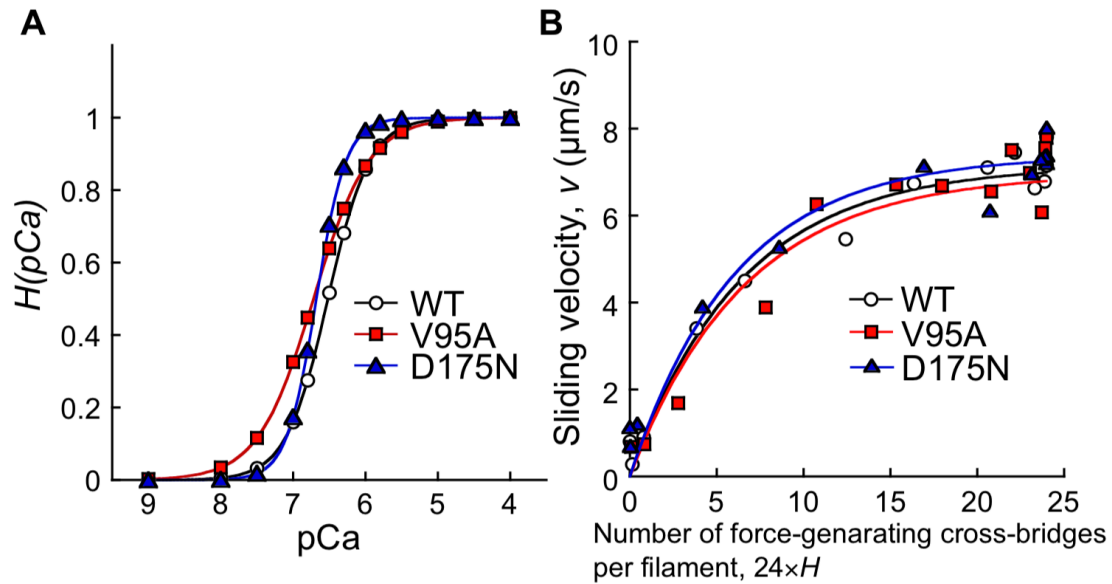


図 4-8 無負荷における duty ratio の見積もり

(A) 図 4-6 を規格化したもの。縦軸は係数 $H(Ca)$ で定義される。カルシウム依存的に変化するクロスブリッジ形成頻度を表している。(B) 図 4-3 に示される滑り速度のカルシウム依存分析の結果を、係数 $H(Ca)$ を用いて再評価した(本文参照)。係数 $H(Ca)$ は force-generating head を求め $(8 \text{ head}/\mu\text{m} \times 3 \mu\text{m} \times H(Ca) = 24 \times H(Ca))$ 、それに対する滑り速度の依存性を求めるために導入した。つまり、滑り速度を force-generating head の関数としてプロットし直し、回帰分析を行うことで無負荷の duty ratio を見積もった(WT: 白丸, V95A: 赤四角, D175N: 青三角形)。黒、赤、青の曲線はそれぞれ WT、V95A、D175N の回帰曲線である。

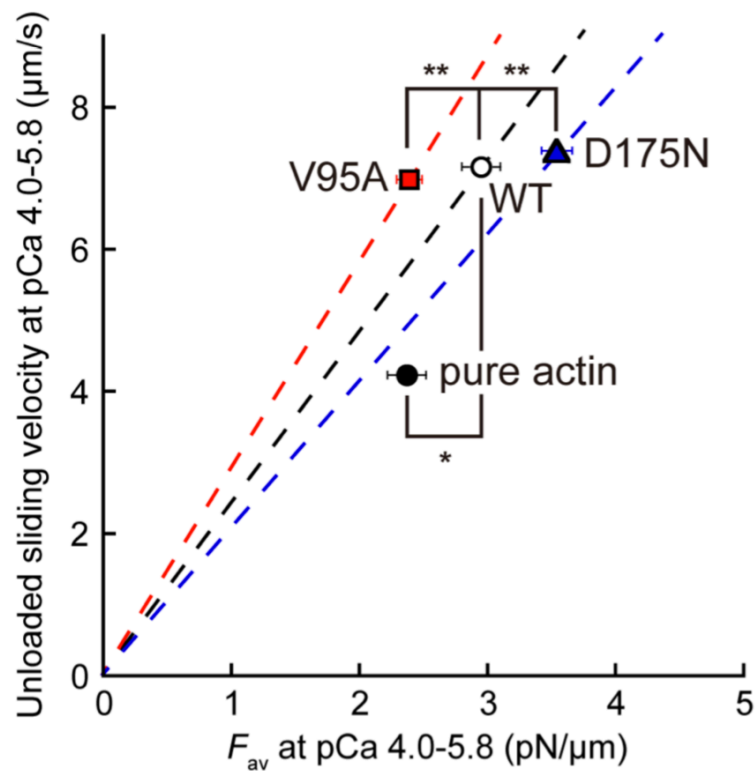


図 4-9 分子摩擦の評価

In vitro motility assay における分子摩擦を評価するために、飽和カルシウム条件での滑り速度を飽和カルシウム条件における滑り力に対してプロットした。この関係に対する直線近似の傾きの逆数は、分子摩擦係数を表すと考えられている。滑り速度は、カルシウム濃度(pCa 4.0 - 5.8)の範囲内に含まれる全ての速度インターバルの平均値であり、滑り速度が飽和すると考えられる。同様に、滑り力に関しても同じカルシウム濃度範囲に含まれるデータ全ての平均値である。Activating buffer (pCa 5.0)におけるアクチンフィラメントのデータをコントロールとして示す(黒丸)。統計分析には、*t*検定を実施した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。シンボルとエラーバーは、平均 \pm SEM を示す。

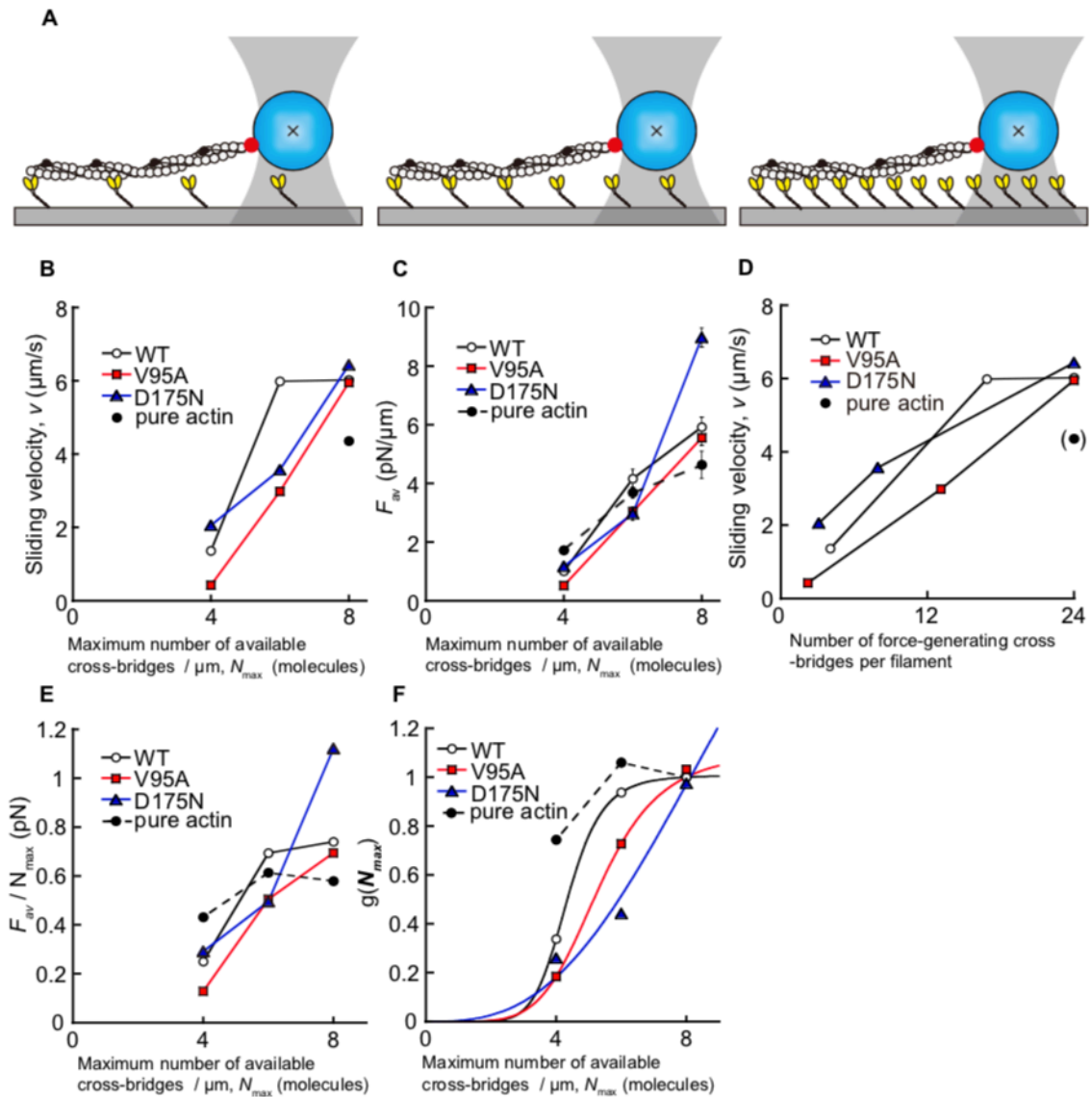


図 4-10 ミオシン密度を変化させた時のクロスブリッジ形成の変化

(A) ガラス表面上のミオシン (HMM) 密度を変えて実験を行った。(B, C) 滑り速度と単位長さあたりの滑り力のミオシン密度依存性。(B)と(C)におけるクロスブリッジの最大数は、クロスブリッジ数計測の結果から推定した(図参照)。横軸は、単位長さ当たりのクロスブリッジの最大数。記号および棒は平均 \pm SEM を表す。(D) 滑り速度を F_{av} の活性度を用いてプロットし直したもの。横軸は、分析された Thin filament (約 $3 \mu\text{m}$)におけるクロスブリッジの総数の最大値を表す。図 4-8 B に対応する。(E) クロスブリッジ当たりの滑り力を求める。(F) 定常状態における duty ratio を用いて E のグラフを規格化し、クロスブリッジの形成頻度を見積もった。

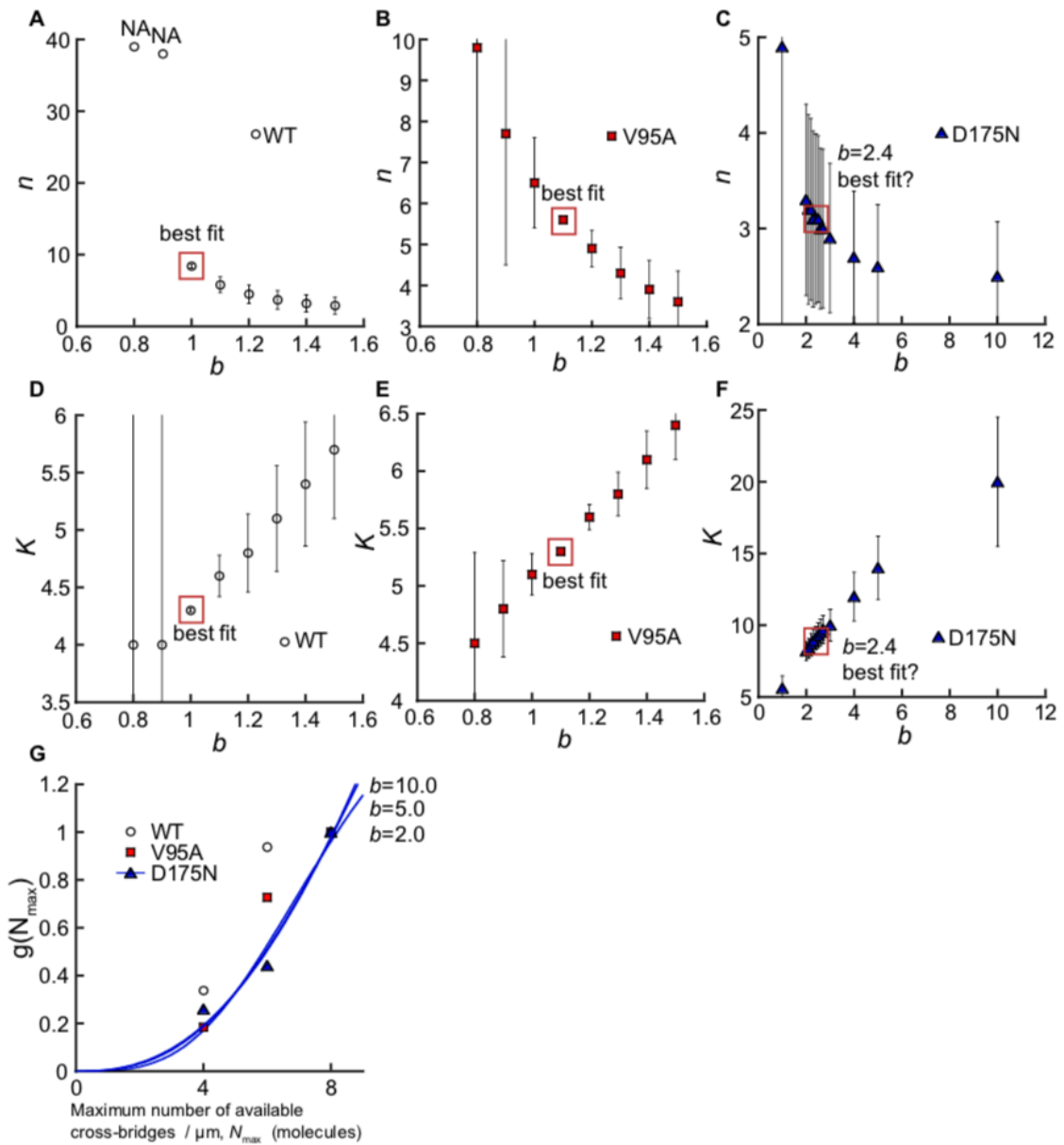


図 4-11 回帰分析の精度

(A-F) 回帰パラメータ(n , K)の値を、 b (式 4-15)を WT と V95A は 0.1 刻みで 0.8 から 1.5 まで、D175N は任意の幅で 1 から 10 まで変化させて求める。エラーバーは SE を表す。赤く囲ってあるのは最適値と思われる数値である。(G) 図 4-10 に示す D175N のデータについて、 b とし て 2.0、5.0、および 10.0 を与えたときの $g(N_{\max})$ に関する回帰曲線。

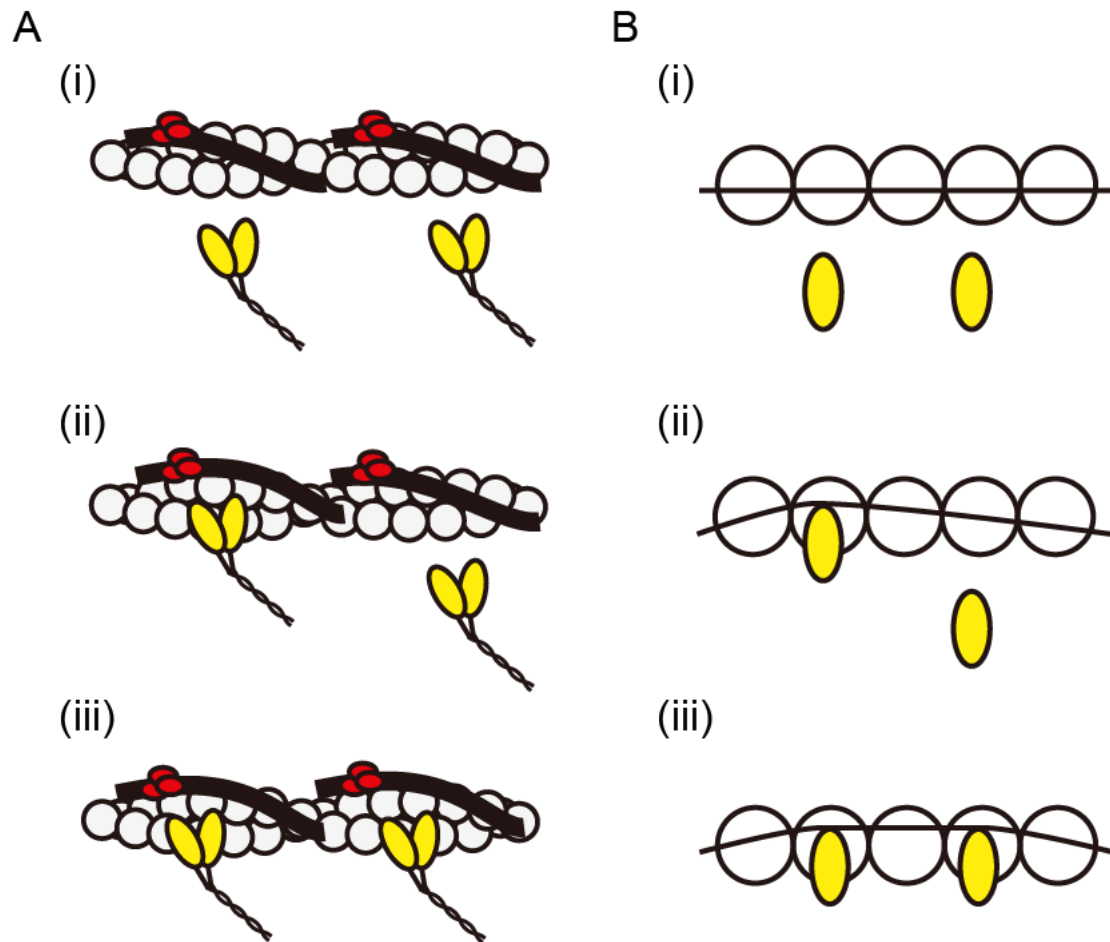


図 4-12 制御系タンパク質を介したクロスブリッジ同士の協同性

Thin filament にミオシンが相互作用する際の模式図(A)と、より簡略化してクロスブリッジ協同性の概念を表した図(B)。(A)と(B)の(i)-(iii)はそれぞれ対応しており、(ii)で左側のミオシンがフィラメントと結合し、(iii)で両方のミオシンが結合している。

(B)では Tm は(head-tail 相互作用を介してつながる)梁の様に表されており、ミオシンの結合によって梁が変形しながら変位することで、隣接するミオシンがフィラメントに結合し易くなる。この活性化はカルシウム依存的なものと相補的であるが、独立したものである。

表 4-1

Parameters	WT	V95A	D175N
v_{HC} , $\mu\text{m/s}$	7.16 ± 0.02 (141)	6.98 ± 0.02 (161)	7.39 ± 0.02 (166)
v_{LC} , $\mu\text{m/s}$	0.55 ± 0.02 (15)	$0.71 \pm 0.01^{***}$ (36)	$0.86 \pm 0.03^{***}$ (21)
v_{act} , $\mu\text{m/s}$	6.61 ± 0.02 (141)	$6.27 \pm 0.02^{***}$ (161)	$6.53 \pm 0.02^{**}$ (166)
F_{HC} , $\text{pN}/\mu\text{m}$	2.95 ± 0.15 (60)	$2.39 \pm 0.10^{**}$ (58)	$3.54 \pm 0.12^{**}$ (59)
F_{LC} , $\text{pN}/\mu\text{m}$	0.14 ± 0.02 (21)	0.12 ± 0.01 (21)	0.11 ± 0.02 (19)
F_{act} , $\text{pN}/\mu\text{m}$	2.81 ± 0.15 (60)	$2.27 \pm 0.10^{**}$ (58)	$3.43 \pm 0.12^{**}$ (59)
$n_{(v)}$	1.65 ± 0.23	2.25 ± 0.59	1.90 ± 0.33
$pCa_{50(v)}$	6.89 ± 0.04	7.07 ± 0.06	6.96 ± 0.04
$n_{(f)}$	1.50 ± 0.46	1.13 ± 0.35	2.11 ± 0.51
$pCa_{50(f)}$	6.52 ± 0.10	6.72 ± 0.12	6.68 ± 0.06
a , pN	3.1	3.1	3.1
$\rho(a)$	0.118	0.096	0.143
$\rho(0)$	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.02
t_{on} , ms	0.75	0.77	0.73
t_{off} , ms	4.6	4.7	4.1
$\rho(a)'$	0.24	0.22	0.36
b	1.0	1.1	2.4
N	8.38 ± 0.26	5.62 ± 0.02	3.09 ± 0.89
K	4.33 ± 0.02	5.32 ± 0.00	9.09 ± 0.82

データの平均値から求めた場合は、平均値 \pm 標準誤差(SEM)を()内のフィラメント数または計測数とともに示す。回帰パラメータについては、最適値 \pm 標準誤差(SE)を示す。WT と変異体との間の統計的有意差を記述するために、両側 t 検定を用いた。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

表 4-2

	$10^\circ < \theta \leq 20^\circ$	$20^\circ < \theta < 40^\circ$
WT	3.34 ± 0.28 (22)	$2.72 \pm 0.17^*$ (38)
V95A	2.65 ± 0.15 (27)	$2.16 \pm 0.12^*$ (31)
D175N	3.69 ± 0.15 (38)	3.27 ± 0.22 (21)

図 4-5 A-C の F_{av} の各角度(θ)領域における平均。単位は pN/ μ m。20°を区切りとし、それ以上以下を比較した。* $p < 0.05$. ()内は計測数。ピアソン積率相関係数はそれぞれ、WT($P = -0.28$, $M = 58$, $p < 0.05$)、V95A($P = -0.30$, $M = 56$, $p < 0.05$)および D175N($P = -0.15$, $M = 57$, $p = 0.25$)。

第5章 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

5-1) 要約

心臓の興奮-収縮カップリングの間にかかる筋小胞体からのカルシウムの放出に応答して、Thin filament の構造は弛緩状態から活性状態に変化する。本研究ではヒト α -Tm およびウシ心筋 Tn で再構成した Thin filament を用いて、IR 照射による急速加熱(熱パルス)の *in vitro* motility assay における滑り速度への影響を調べたものである。熱パルスの幅は 2 s 以内であり、室温 25°C から 46°C まで変化させた。加熱中の温度変化を高精度に分析するために、温度感受性色素 Eu-TTA を含む温度感受性シートとローダミン染色したアクチンフィラメントの蛍光温度消光を利用して二通りの方法から測定した。アクチンフィラメントの滑り速度は、温度が上昇するにつれて上昇した。一方で、弛緩条件(pCa 9.0)において室温では再構成 Thin filament の滑り運動は観察されなかったが、同じ条件下で IR を照射すると、再構成 Thin filament の滑り運動が誘発された。このカルシウム非依存的な熱活性化は哺乳類の体温(37°C)近くの温度でも部分的に生じることが確認出来たが、この発見は哺乳類の心臓内において Thin filament が活性状態に部分的にシフトし、収縮期における迅速かつ効率的な心筋動態を可能にすることを示唆している。

5-2) 研究の背景と目的

心筋の収縮は神経伝達による電気刺激とそれに続く心筋細胞の脱分極によって誘導される。この電気刺激は、筋小胞体(SR)からのカルシウムの放出を誘発し、Thin filament 上の TnC へのカルシウムの結合をもたらす(Solaro and Rarick, 1998)。TnC へのカルシウム結合は、アクチンフィラメント表面に結合した Tm の位置を移動させて、アクトミオシン相互作用を促進すると言われていいる。一方、収縮期のピークにおいても、細胞内カルシウム濃度が比較的 low (pCa 6)維持されているため、心筋筋フィラメントは生理的条件下では完全には活性化されていないと考えられている (Bers, 2001, 2002; Kobirumaki-Shimozawa *et al.*, 2014; Shimozawa *et al.*, 2017)。

弛緩期の間、TnI の C 末端ドメインがアクチンフィラメントに強く結合し、Tm はアクトミオシン相互作用をブロックしている(弛緩状態)。しかし、カルシウムが TnC のカルシウム結合部位に結合すると、TnI の C 末端ドメインがアクチンから解離し、TnC の N 末端ドメインに結合する(活性状態)。Thin filament の活性平衡は、強く結合したクロスブリッジの数にも依存している(Solaro and Rarick, 1998; Fukuda *et al.*, 2009; Kobirumaki-Shimozawa *et al.*, 2014)。

ミオシンはアクチンの存在下で ATP を加水分解し、化学エネルギーを変換して力を生じ、力学的仕事をする(Bloom, 2000)。このプロセスは周囲温度に大きく依存し、ATP 加水分解の速度は温度の上昇とともに上昇することは良く知られている(Barany, 1967; Barouch and Moos, 1971; de Tombe and Stienen, 2007)。それとともに、心臓の収縮力に関しても温度の上昇にともなって増強されるという報告がある(de Tombe and ter Keurs, 1990; Fujita and Kawai, 2002)。しかしながら、特に筋原線維を用いた筋肉研究においては、高温で増強した力

発生が筋肉試料に不可逆的な損傷を引き起こす(Ranatunga, 1994)為に、体温周辺の筋肉の温度依存性に関する情報がない。

共同研究者による報告で、1455nm の IR レーザーを用いた急速な温度上昇が、心筋細胞の可逆的かつ再現性のある収縮を引き起こすことが発見された(Oyama *et al.*, 2012)。加熱筋収縮は通常の興奮-収縮カップリングとは異なり、カルシウム非依存的に起こる為、カルシウムが収縮に必須ではないことを示唆している。更に加熱筋収縮は、アクトミオシン阻害剤である blebbistatin によってブロックされるものであり、つまり温度の上昇によってアクトミオシン相互作用が促進されて起こるものであると考えられる。この現象は心筋細胞に止まらず、骨格筋の筋原線維においても確認されているため(Ranatunga, 1994)、筋肉に一般的に起こるものと期待される。本研究では再構成 Thin filament を用いた *In vitro* motility assay 系に局所熱パルスを組み合わせて短時間加熱し、無負荷滑り速度の温度依存性から制御系タンパク質に起因する収縮機能の温度特性をタンパク質一分子階層にて評価した。

5-3) 実験方法

特記がない事項に関しては、第 3 章、第 4 章と同じ方法を採用する。

5-3-1) 溶液条件

溶液条件に関しては第 3、4 章から少し変更がある。第 3、4 章では生体を再現するために無機リン酸を加えていたが、本研究では加えていない。Relaxing solution (pCa 9): 2 mM Na₂ATP、4 mM MgCl₂、1 mM EGTA、25 mM KCl、10 mM DTT、25 mM Im-HCl. Activating solution (pCa 5): 2 mM Na₂ATP、1 mM Ca-EGTA、

4 mM MgCl₂、25 mM KCl、10 mM DTT、25 mM Im-HCl。これらの溶液のイオン強度は 50 mM、室温で pH 7.4 に調整してある。最終的な実験溶液には、1 mg/ml BSA、25 mM Glucose、0.22 mg/ml Glucose oxidase、0.036 mg/ml Catalase を加えた。

5-3-2) タンパク質の取り扱いについて

第 2 章で述べた様に、第 3、4 章とは HMM の精製ロットが異なる。濃縮した影響でストック溶液(100mg/ml)の粘性が高いため、ピペティングエラーを防ぐ目的で Relaxing solution で 10 倍に希釈し、実験前に吸光光度計(V-550ST, JASCO, 東京)で濃度を 3 回測定した。

5-3-3) 実験装置系の概要

本章において使用した蛍光顕微鏡に関して詳細を記述する(Oyama *et al.*, 2012)。基本セットアップは、倒立顕微鏡 IX70(オリンパス, 東京)に対物レンズ(PlanApo N 60x / 1.45 オイル, オリンパス)を取り付けたものである。蛍光励起には、Light Engine(549/15 および 377 / 50nm, Lumencor, Beaverton)を使用した。ダイクロイックミラー(FF562-Di02, Semrock, New York)と吸収フィルター(BA580IF, オリンパス)。IR レーザー($\lambda = 1455\text{nm}$, KPS-STD-BT-RFL-1455-02-CO, Keopsys, Lannion, France)を集光させることによって水を直接加熱した。レーザー出力は 33 mW であり、これはサーマルディスクセンサーとパワーメーター(LM-3 および FieldMaster, Coherent, Santa Clara)を用いて対物レンズの上部で測定した。加熱の ON/OFF は、IR レーザーの光路に配置されたシャッターシステム(SSH-C4B, シグマ光機, 東京)によ

て切り替えた。蛍光像は 33 frame/s で EM-CCD カメラ(iXon EM+897, Andor Technology, Belfast, 北アイルランド)を用いて記録し、ANDOR IQ ソフトウェア(Andor Technology)で PC に取り込んだ。実験系の模式図は図 5-1 A に示す。

5-3-4) 温度の計測方法

Rigor 条件(長い間高温に曝すと白濁するので BSA は入れない)中の 0.2 mM ローダミンファロイジンの F.I.を、蛍光分光光度計(F-4500, 日立ハイテック, 東京)を用いて様々な温度で測定した。キュベット内の温度は、精密サーモスタットサーキュレータ(AB-1600, ATTO, 東京)によって制御し、デジタル温度計(ASF-250T, アズワン)によって測定した。励起波長および蛍光波長は、それぞれ 550 nm および 570 - 580 nm である。

フローセル中で IR レーザーによって上昇した温度をローダミンファロイジンで染色したアクチンフィラメントを用いて測定した。フィラメントを室温で 30 min、Rigor 条件で HMM に作用させた。温度変化は、F.I.の相対的変化(加熱中の F.I.を加熱後の F.I.で割った相対値)に基づいて計算した。この計算では、IR レーザー照射の有無にかかわらず背景光強度を差し引いた。

温度感受性シートは、小型遠心機(PMC-060, トミー精工, 東京)を用いてアセトンに溶かした 5 mg/ml の Eu-TTA(Acros Organics, Pittsburgh, USA)および 10 mg/ml Poly(methacrylate)(Sigma-Aldrich)をガラスボトムディッシュ(AGC テクノグラス, 静岡)上にスピコートした。25°C で規格化すると、F.I.の温度依存性は $-2.8\%/^{\circ}\text{C}$ であった(Itoh *et al.*, 2014)。IR レーザーによって生じた温度変化を、温度感受性シートおよび蛍光ラベルしたアクチンフィラメントの両方で測定した。室温は $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

5-3-4) 滑り速度の解析方法と統計処理

本章における解析は第4章と少し異なる条件で行った。今回はフィラメントの直線的で滑らかな動きに限定して解析した。フィラメントの動きに関しては適切なインターバルで追跡し、各インターバルで滑り速度を計算した。次いで、全てのインターバルを平均して滑り速度を計算した。

各実験条件に対して2つのフローセルを使用し、各フローセルについて> 50フィラメントの解析を行った。レーザー中心からの距離を120 μm まで20 μm 幅で分割し、各領域(温度が異なる)で得られたフィラメントの滑り速度を比較した。統計的な処理は対応のない両側 t 検定を用いた。データは平均 \pm SEM で表される、“ n ”はインターバルの数を表す。

5-4) 実験結果と考察

5-4-1) IR レーザー加熱による温度上昇の計測

蛍光染色したアクチンフィラメントを用いて IR レーザー(1455 nm)照射による局所温度変化を較正した(Kato *et al.*, 1999)(図 5-1 B)。温度変化の分析に際して、蛍光分光光度計によって測定された F.I.の相対的な変化に基づいて計算を行った(図 5-2)。レーザー照射後、レーザーの集光点付近に存在するアクチンフィラメントの蛍光強度はベースラインに戻らず、反復して照射を行うとその都度低下した(図 5-1 C)。この低下は、温度の上昇によってアクチンからローダミンファロイジンが解離することによって引き起こされる可能性がある。事実、ローダミンファロイジンとアクチンフィラメントとの結合定数は温度とともに

減少することが知られている(De La Cruz and Pollard, 1996)。蛍光分光光度計を用いた測定(溶液中に浮かせた状態)では温度を 21.1°Cから 47.9°Cに上昇させた後 21.6°Cに戻したとき、ローダミンファロイジンの蛍光強度はベースラインに戻った(図 5-2)。したがって、~48°Cまでの温度上昇では、ローダミンの蛍光特性を不可逆的に破壊することはないと考えられる。顕微鏡観察下の F.I.の不可逆的な減少を規格化するために、加熱中と加熱後の F.I.の差から温度の上昇を計算した(図 5-1 D)。蛍光アクチンフィラメントによって測定された温度分布が蛍光温度感受性シートによって測定されたものと同様であることを確認した(図 5-3)。

5-4-1) アクトミオシン滑り運動の熱励起

まず、弛緩条件(pCa 9)において IR レーザーを照射した時の結果について述べる。先行研究における結果と一致して、アクチンフィラメントの滑り速度は加熱中に急速に上昇した(Kato *et al.*, 1999)(図 5-4 A)。他のタンパク質(微小管とキネシン)を用いた実験においても同様の結果が得られている(Kawaguchi and Ishiwata, 2001b)。また、温度の上昇によるアクトミオシン相互作用の平衡定数の上昇も報告されており(Highsmith, 1977, 1978)、実際に Rigor 条件における温度依存的なクロスブリッジ形成数の増加も報告されている(Kawai *et al.*, 2000)。加熱による効果は熱源付近でより顕著であり、滑り速度が温度に強く依存することを強く示唆した(図 5-4 B)。ATP 加水分解速度は温度上昇に伴って上昇するため(Bárány, 1967)、滑り速度の上昇はクロスブリッジサイクル速度の上昇によるものと推論される。滑り速度は、レーザー照射を止めると直ちに元の速度に戻った(図 5-4 B)。このことは、IR レーザーを用いて約 40°C まで急激に加熱させても、Kato らが主張している通りに加熱時間が十分に短ければタンパク質の

熱変性が起こらないことを示している(Kato *et al.*, 1999)。しかしながら本研究では、熱源の極々近傍(< 10 μm)に存在したアクチンフィラメントは、レーザー照射後に運動を止め、再開しなかった。熱源の非常に近い場所は高温に達していることを考えると、この不可逆性は HMM の熱変性と結びついていると考えられる(Shriver and Kamath, 1990)。

一方で、再構成 Thin filament が弛緩条件における急速加熱に対してどのように応答するかも調べた。Thin filament は室温(25°C)では運動しないが、レーザー照射すると運動が誘発され、熱源の近くでは約 30 $\mu\text{m}/\text{s}$ の速度を示した(図 5-4 A, B)。滑り速度は、熱源から約 20 - 100 μm の範囲内で、再構成 Thin filament よりもアクチンフィラメントの方が速い速度を示したが 20 μm 以内の領域、つまり十分高温では同程度の速度を示した(図 5-5 A, B)。滑り速度を温度でプロットすると、35 - 41°C の温度範囲内でアクチンフィラメントの方が再構成 Thin filament よりも有意に速い速度を示したが、温度の上昇とともにその差が小さくなる(図 5-5 C)。最高温度(約 46°C)では、滑り速度は両者共に 21 $\mu\text{m}/\text{s}$ 程度であった。更に弛緩条件における滑り速度の Q_{10} は、アクチンフィラメントおよび再構成 Thin filament についてそれぞれ 2.4 および 5.5 であった(図 5-5 D)。つまり、弛緩条件においては、Thin filament の方が高い温度感受性を示した。

体温周りの温度(36 - 38°C)において、弛緩条件にもかかわらず、36°C および 38°C でそれぞれ $8.3 \pm 0.7 \mu\text{m}/\text{s}$ ($n = 20$)、 $8.6 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{s}$ ($n = 26$)の速度で滑り運動が観察されたことは非常に興味深い結果である(図 5-5 C)。46°C での最大速度と比較すると約 40%にも達する。したがってこの結果は、哺乳動物の心臓内の Thin filament は、弛緩状態の下でも完全に阻害されている訳ではなく部分的に活性化されている可能性を示唆している。予め一定の割合のクロスブリッジが形成されているとカルシウム活性化がされやすいことは NEM-S1 を用いた

研究(Nagashima and Asakura, 1982)でも示されているし、温度が上昇すると筋のカルシウム感受性が上昇する(Ranatunga and Wylie, 1983)こととも相まって、相対的に低い濃度のカルシウムで活性化することが可能となる。

次に、活性条件(pCa 5)におけるレーザー照射の影響を調べた。弛緩条件と同様に熱源近くでは特に滑り運動の活性化が見られた(図 5-6 A, B)。室温(25°C)では、アクチンフィラメントと再構成 Thin filament についてそれぞれ $4.5 \pm 0.05 \mu\text{m/s}$ ($n = 461$)および $6.4 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$ ($n = 352$; $p < 0.001$)であり、再構成 Thin filament の方が有意に速い速度を示した(Oguchi *et al.*, 2011)(図 5-6 C)。しかしながら弛緩条件における実験結果とは対照的に、室温より高い温度においては両者の間で差があまり見られない様になった。特に Thin filament の結果に限定して弛緩条件における結果と比較すると、室温から体温近く(25 - 38 °C)にかけては活性条件における速度の方が速かったのだが、41°C 程度でプラトーに達し、41 - 45°C では同程度の速度を示した。Q₁₀ に関して言えばアクチンフィラメントについては 2.6 であり、活性条件における再構成 Thin filament の場合は 1.9 であった(図 5-6 D)。つまり、Thin filament の結果は弛緩条件の時よりも活性条件の方が温度依存性が低下した。クロスブリッジ形成の結合協同性に関して弛緩条件の方が高い協同性を示すとの報告(Greene and Eisenberg, 1980)もあり、弛緩条件下における加熱による変化は、単にアクトミオシン酵素活性サイクルの加速だけではなく、活性条件に比べて制御系タンパク質の構造変化やアクチンとの相互作用変化が大きい為に高い温度依存性を示したのではないだろうか。

そこで、弛緩条件で急速加熱が可逆的に Thin filament の滑り運動を誘発する分子メカニズムに関して考察する。まず、Thin filament の活性・弛緩状態の平衡が、温度の影響を受けるのだと考えた。すなわち、温度の上昇は平衡状態を弛緩状態から活性状態へシフトさせるということである。一般に、弛緩状態

から活性状態への移行は制御系タンパク質の構造やアクチンフィラメントとの結合状態の変化を伴う。今回温度依存的にそれらの変化は考え得るのか？ Tanaka and Oosawa は、40°C 以上で Tm がアクチンフィラメントから解離することを発見した(Tanaka and Oosawa, 1971)。その後 Ishiwata は、Tn がアクチンフィラメントに対する Tm の親和性を増強し、それによってカルシウム濃度に依存して Thin filament の構造を安定化することを確かめた(Ishiwata, 1978)。すなわち、Thin filament の構造は、カルシウムの非存在下(存在下)で安定化(不安定化)される。さらに Ishiwata は Tn サブユニットがアクチンフィラメントからの Tm の温度依存的な解離に及ぼす影響を調べ、TnI や TnC ではなく TnT が解離温度を著しく上昇させることを発見した。すなわち 36.5 - 46.5°C の温度範囲でカルシウムの有無に関わらず、再構成 Thin filament から Tm-Tn 複合体が温度依存的に解離することを示した。すなわち、複合体は、約 38°C でフィラメントから部分的に解離し始め、解離温度(半分の Tm-Tn 複合体が解離する温度)はカルシウムの非存在下および存在下でそれぞれ 48.8°C および 47.0°C であった。これらの研究はウサギの骨格筋から調製されたタンパク質のみを用いており、ミオシンの存在しない条件においてバルク実験で調べたものであるから本研究と実験的状況は異なるが、Tm-Tn 複合体の加熱による部分解離は、*in vitro* motility assay における加熱による弛緩条件での Thin filament の活性化を説明することが出来る。他に、温度の上昇によってアクチンフィラメント上の Tm に生じる現象としては α -helix の unfolding も挙げられる(Tanaka, 1972; Kremneva *et al.*, 2003)が、今回は簡単化の為タンパク質間の結合・解離を基本として議論した。

弛緩条件で加熱によって Thin filament の滑り運動を誘発する試みは過去にもある(Brunet *et al.*, 2012)ののだが、いくつか計測系に問題を抱えている様に考えられるので、それに関してここで考察したい。Brunet らは本研究と異なる手段

を組み合わせ、*in vitro* motility assay を行い、温度を 63°C まで上昇させて滑り運動を調べた。彼らの実験系では、室温(約 20 - 30°C)から微細加工した熱電制御装置(50 s 程度で定常状態に達する)によって温度を上昇させた。活性条件下でのアクチンフィラメントおよび再構成 Thin filament の滑り運動に関して、約 60°C までの温度範囲で常に滑り速度が上昇すると報告している。タンパク質(とくにミオシン分子)の変性温度を大きく上回る温度にも拘らず、である。弛緩条件では、再構成 Thin filament が約 45°C で運動を開始していた。Shriver と Kamath の報告(1990)によると、ウサギ骨格筋ミオシンの S1 および S2 は熱平衡状態においてそれぞれ 48°C および 41°C を超える温度で変性する(Shriver and Kamath, 1990)。したがって、彼らのように温度を 50 s 程度かけてゆっくり上昇させるとタンパク質変性が大いに影響し得ると考えられる。また、彼らの主張する温度の正確さに関して言及したい。彼らは、ニッケルフィルムヒーターで温度を上昇させ、フローセルの内面に微細加工された金抵抗温度計(計測を行う部位から実験試料までの距離が約 500 μm ある)で計測していた。したがって、金と水の熱伝導率の差が大きいことから(金と水についてはそれぞれ約 300 W/m/K と約 0.6 W/m/K)(National astronomical observatory of Japan, 2016)、実験試料周囲の温度が過大評価される可能性がある。よって、彼らの主張している計測温度は実際にはもっと低く、2 つの方法で計測した本研究における温度の方が信頼性の高いものであると考える。

5-5) まとめ

本研究は *in vitro* motility assay を利用して、制御系タンパク質を介したアクトミオシン相互作用への急速加熱の影響をタンパク質一分子レベルで調べる為

に行われた。本研究における最大の発見は、IR レーザーパルス照射法を用いて、アクチンフィラメントの温度依存的な滑り速度の上昇を定量化する共に、弛緩条件であっても体温付近になると、再構成 Thin filament の滑り運動が誘発され、40 数°Cになると、活性条件とほぼ同様の滑り速度に達することを発見したことである。今回得られた知見は、哺乳類の心臓の拡張期において、Thin filament の弛緩・活性状態の平衡が活性状態側にシフトしており、少量のカルシウムによってアクトミオシン相互作用を促進することを可能にしているといった解釈につながる。

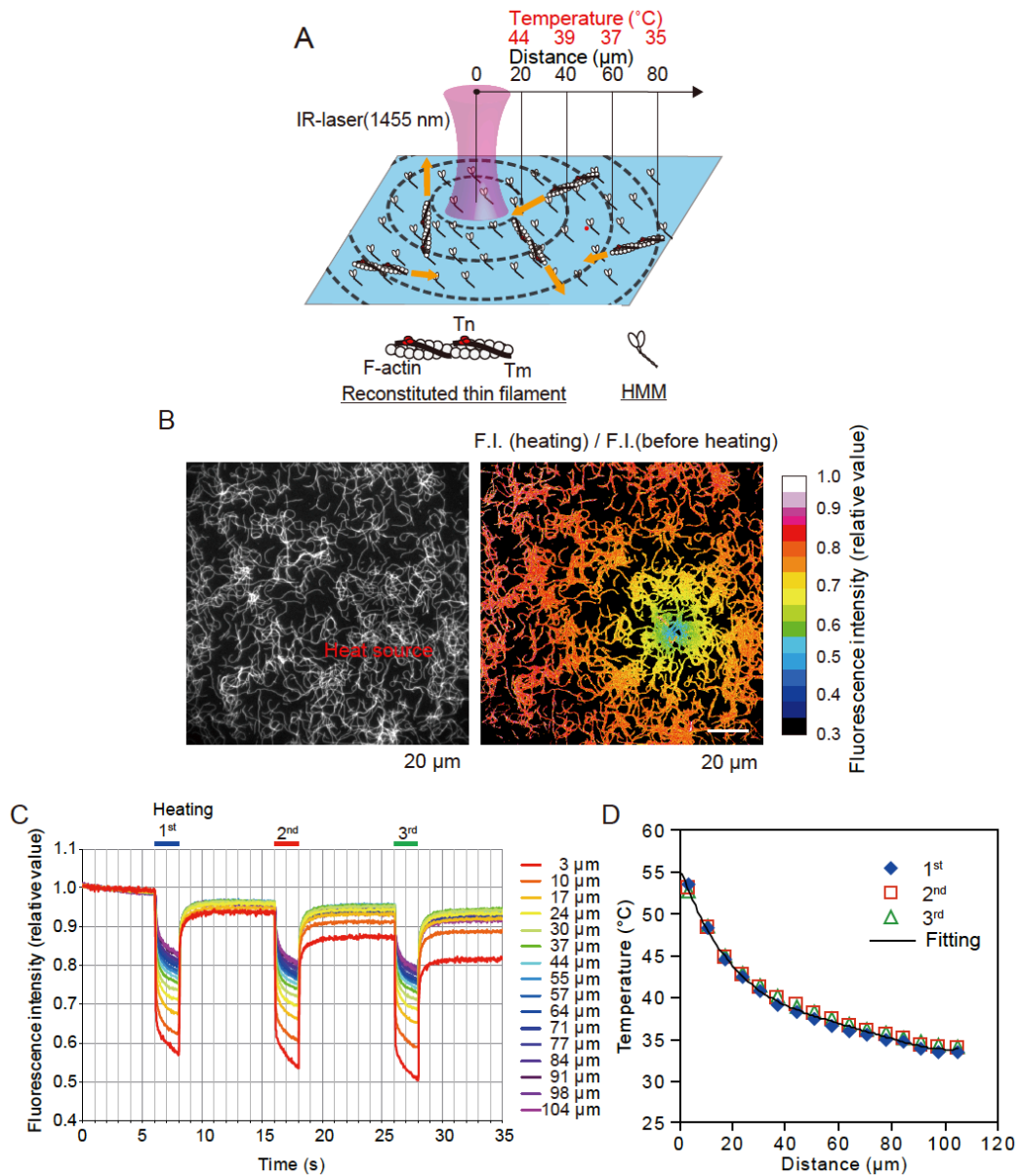


図 5-1 IR レーザー局所加熱および温度イメージングシステム

(A) 本実験系の模式図。IR レーザー($\lambda = 1455 \text{ nm}$)によって、温度を上昇させる。灰色点線の円で示される距離は $0 - 80 \mu\text{m}$ である。(B) 左: 加熱中のローダミン染色アクチンフィラメントの蛍光画像。IR レーザーの集光点は "Heat source" によって示される赤い点に合わせた (試料面上でのレーザービームの直径は、数 μm 程度。図 A の模式図では誇張して描いている)。右: 加熱前および加熱中のアクチンフィラメントの F.I. の変化を示す。右のカラーマップは変化の大きさを示す。(C) 熱源から様々な距離に位置するアクチンフィラメントの F.I. (距離は右に示す通り)。2 秒間の加熱を 10 秒間隔で 3 回連続して適用した。青; 1 回目の加熱、赤; 2 回目の加熱、緑; 3 回目の加熱。(D) 熱源からの距離(x)と温度(y)との関係。(C) のデータから求める。熱源からの距離の関数として、以下の多項式関数を用いてフィッティングした: $y = 6.39 \times 10^{-7} x^4 - 1.74 \times 10^{-4} x^3 + 1.76 \times 10^{-2} x^2 - 8.82 \times 10^{-1} x + 5.56 \times 10$ 。

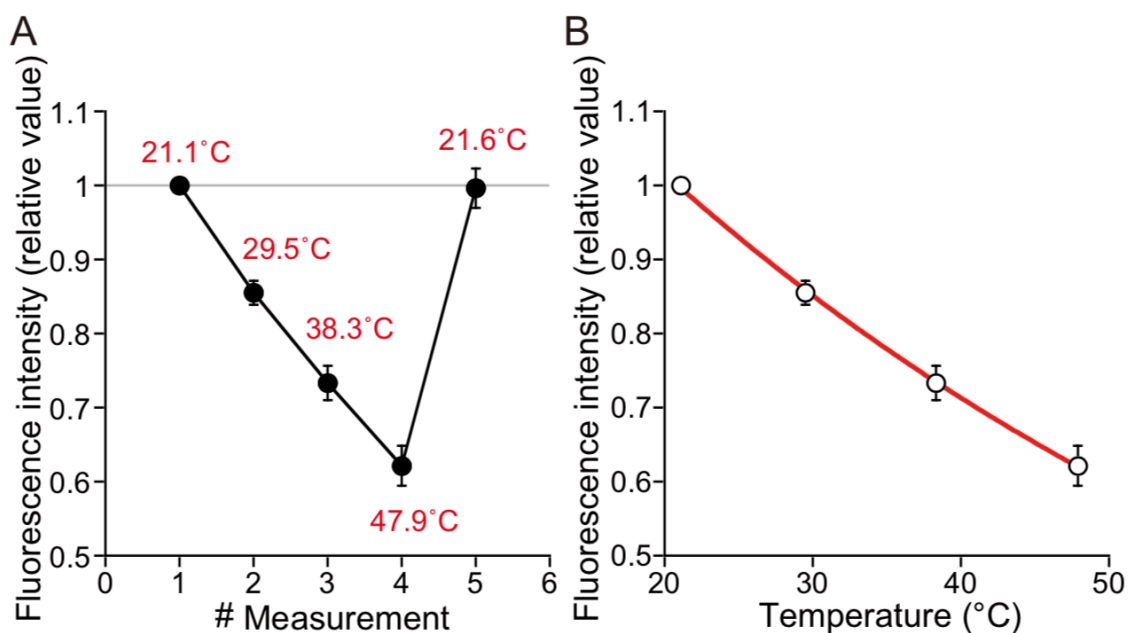


図 5-2 ローダミンファロイジンの蛍光強度の温度依存性

(A) ローダミンファロイジン F.I. の温度依存的な変化。キュベット内の温度を $21.1 \pm 0.3^\circ\text{C}$ から $47.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ まで上昇させ、その後元の温度 ($21.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$) に戻した。X 軸は温度測定の順序を示し、Y 軸は F.I. を示す。1 回目の測定値で規格化した。(B) 温度 (y) とローダミンファロイジン F.I. (x) との関係。赤線は、指数関数回帰曲線 ($y = 1.4478e^{-0.017704x}$) である。(A) における #1~#4 のデータを用いた。測定回数は 3。大山博士提供。

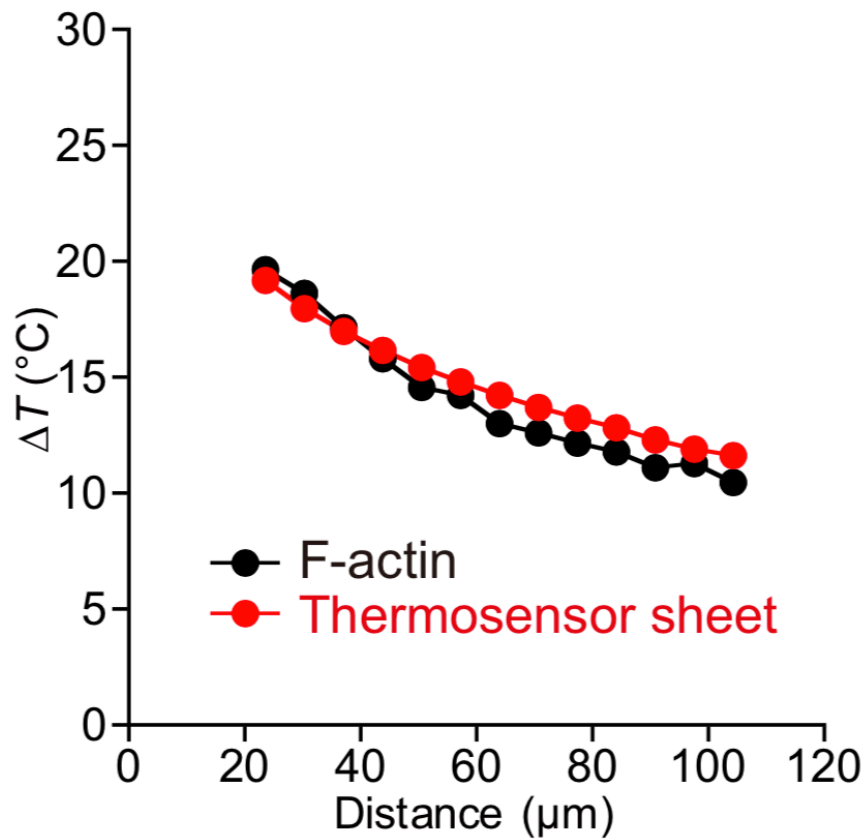


図 5-3 ローダミンファロイジン染色したアクチンフィラメント及び温度感受性シートによって計測された熱源からの距離と温度の関係の比較

2つの異なる方法によって20-100 μm までの距離における温度を計測した。 ΔT は25 $^{\circ}\text{C}$ からの温度上昇を示す。黒丸は、ローダミン染色したアクチンフィラメントの場合で赤丸が温度感受性シートにおける結果である。測定回数は3。エラーバー(SEM)はプロットに隠れている。

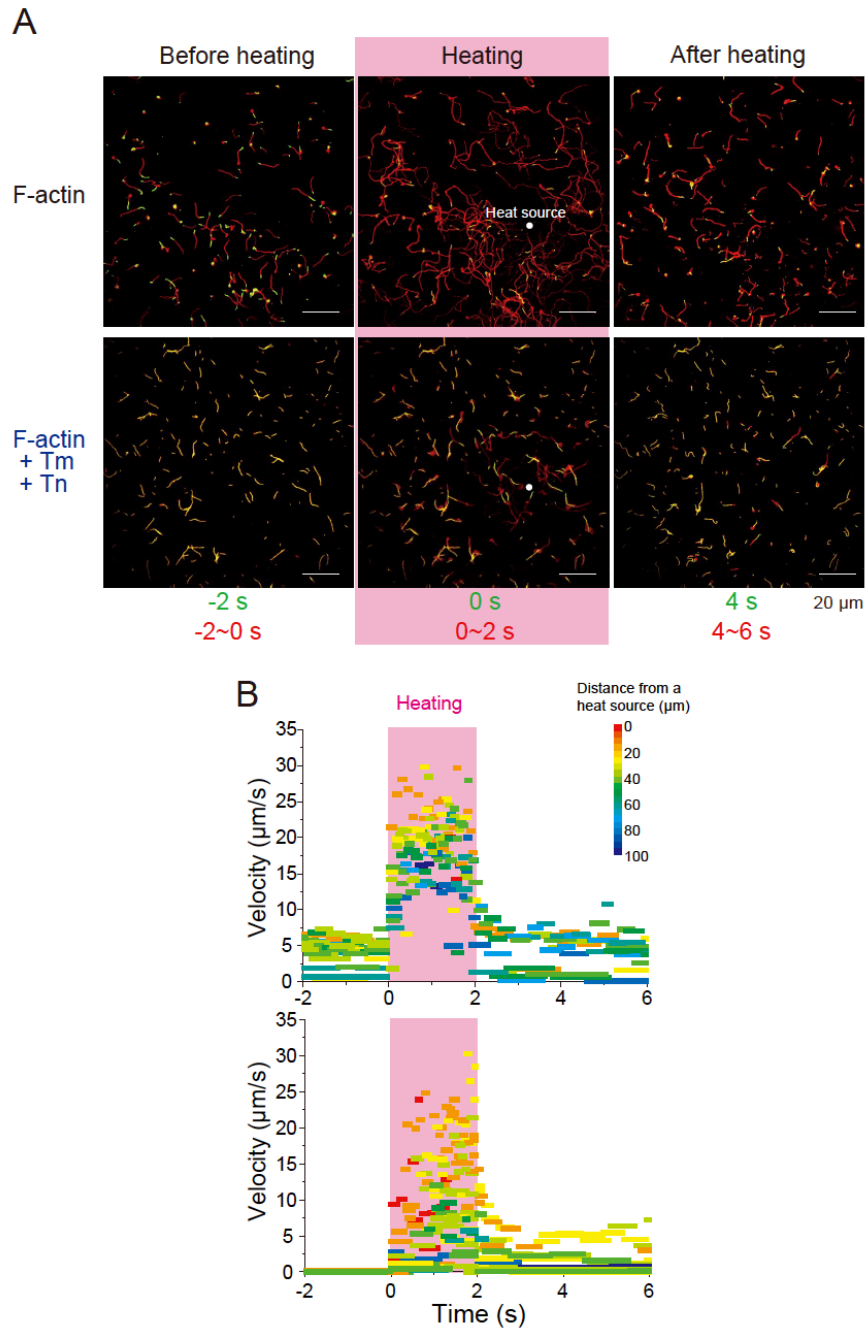


図 5-4 弛緩条件(pCa 9)における滑り運動の加熱励起

(A) アクチンフィラメント(上部)または再構成 Thin filament(下部)の滑り運動に対する IR レーザー照射の影響。照射前(左)、照射中(中央)、照射後(右)の蛍光像を示す。熱源の位置は、ピンクで囲った中央のパネルに白丸“Heat source”として示す。加熱前、加熱中及び加熱後のそれぞれの像は 2 秒間のフィラメントの軌跡を示す。赤は動いた距離、黄色は動いていないものを示す。(B) 加熱前、加熱中および加熱後の熱源から様々な距離にあるアクチンフィラメント(上部)または再構成 Thin filament(下部)の滑り速度のタイムコース (右のカラーマップを参照)。加熱は 2 秒間行った(ピンク色で示す)。

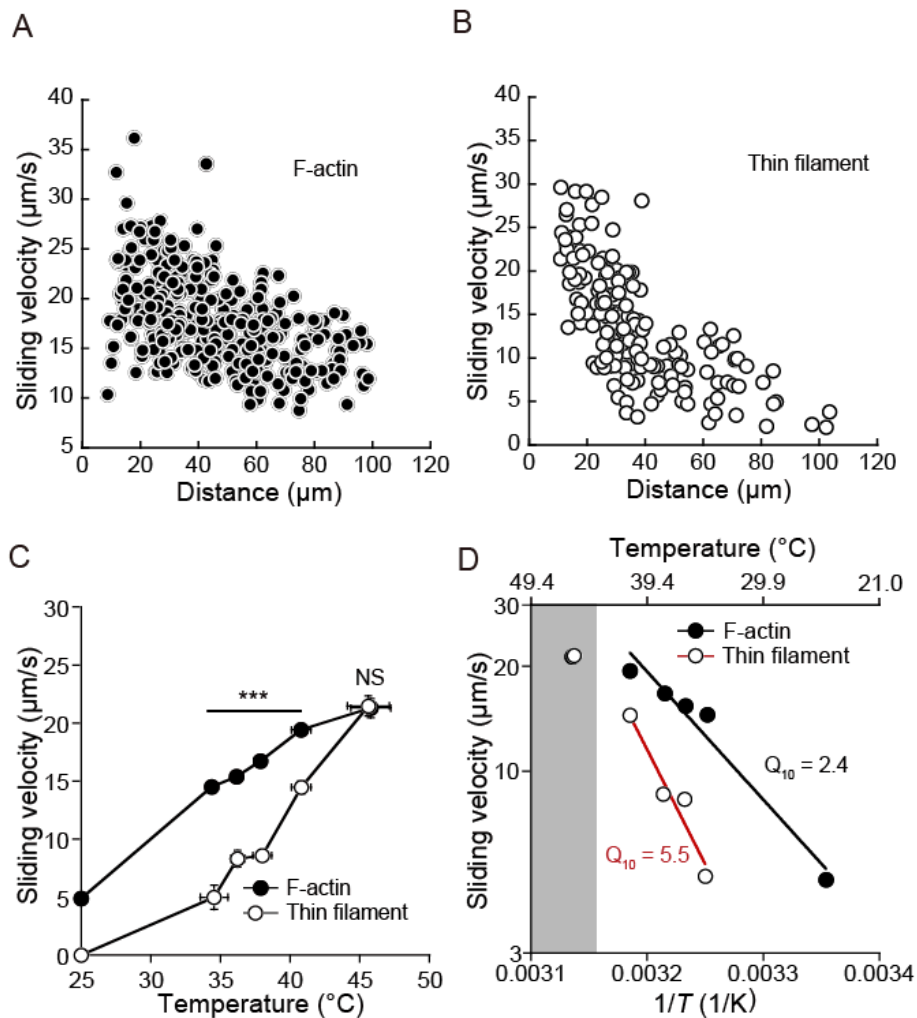


図 5-5 弛緩条件(pCa 9)における滑り速度の温度依存性

(A, B) 熱源からの距離と滑り速度との関係。閉じた黒丸はアクチンフィラメント。白丸は再構成 Thin filament。(C) 滑り速度を温度に対してプロットした。室温(25°C)を基準とし、IR レーザー照射により温度を上昇させる。データは、X 軸および Y 軸の両方に対する平均 \pm SEM を示す。***で示した温度領域においては Y 軸(滑り速度)について有意差がある; $p < 0.001$ 。(D) 滑り速度のアレニウスプロット。 T は絶対温度。各プロットは(C)の平均値を用いた。灰色で示されている温度範囲で得られたデータは、ミオシン変性の可能性等のために回帰分析には使用しない。アクチンフィラメント: $V = \exp(30.06 - 8468/T)$ ($R = 0.96$). 再構成 Thin filament: $V = \exp(50.96 - 15161/T)$ ($R = 0.98$). アクチンフィラメント及び再構成 Thin filament の Q_{10} についてはそれぞれ、2.4 ($25 - 41^{\circ}\text{C}$)及び 5.5 ($34 - 41^{\circ}\text{C}$)であった。

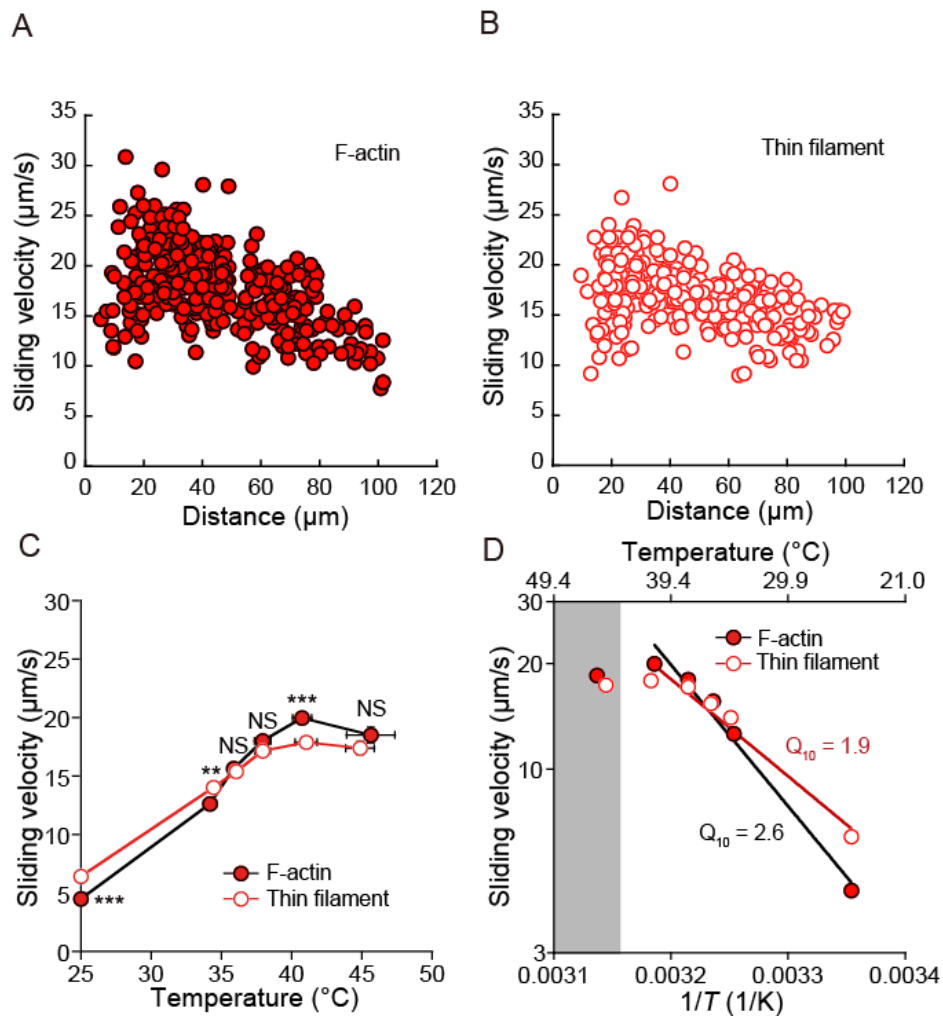


図 5-6 pCa5 における滑り速度の温度依存性

(A, B) 熱源からの距離と滑り速度との関係。閉じた赤丸はアクチンフィラメント。白丸は再構成 Thin filament。(C) 滑り速度を温度に対してプロットした。室温(25 $^{\circ}\text{C}$)を基準とし、IR レーザー照射により温度を上昇させる。データは、X 軸および Y 軸の両方に対する平均 \pm SEM を示す。Y 軸(滑り速度)について、有意差がない場合は NS、有意差がある場合は次の様に示した。** $p < 0.01$ および*** $p < 0.001$ (D)滑り速度のアレニウスプロット。 T は絶対温度。(C)における平均値をプロットした。灰色で示されている温度領域で得られたデータは、回帰分析に使用しない。アクチンフィラメント: $V = \exp(32.65 - 9269/T)$ ($R = 0.97$). 再構成 Thin filament: $V = \exp(23.24 - 6358/T)$ ($R = 0.96$). アクチンフィラメント及び再構成 Thin filament の Q_{10} についてはそれぞれ、2.6 および 1.9 (25 - 41 $^{\circ}\text{C}$)であった。

第6章 まとめ

6-1) 本論文のまとめ

本論文では、*in vitro* motility assay に IR レーザー(光ピンセット、局所熱パルス)を組み合わせた実験系を工夫して Tm-Tn 複合体の遺伝要因と環境要因に対するアクトミオシン制御における性質を明らかにすることが出来た(図 6-1)。第 3 章では光ピンセットにおける簡易な三次元計測の方法の提案を通して、アクトミオシンの持続的な力発生の方向性への制御系タンパク質による寄与を示唆することとなった。どの角度領域において垂直負荷がかかっているにもかかわらず制御系タンパク質によって常にアクチンフィラメントのみの時の 1.5 倍の力発生を示したことは驚くべき結果であり、細胞骨格の三次元的なダイナミクスを考えると重要な意義を持っている可能性がある。第 4 章について、第一に言えることは心筋症特異的な Tm 変異体に関して行われてきた研究の少なさにある。特に一分子階層においては、本研究において世界で初めて張力の計測を行なった。2 つの変異体(V95A、D175N)が筋収縮に対して異なる分子メカニズムで影響を与えることを示唆したことは医学的見知として全く新しい提案である。第 5 章において示された体温近くの温度における Thin filament の部分的活性化は、生体内でのカルシウム濃度の振動による心拍制御において、カルシウム濃度の変動域が狭いこと、骨格筋における収縮・弛緩の制御と比べて、最低カルシウム濃度が高い一方、最大カルシウム濃度が低いことの説明を可能にし、その生理的意義を示すこととなった。

Tm-Tn 複合体によるアクトミオシン相互作用制御に関して、主に注目されるのはそのカルシウム濃度依存性である。本研究においてもカルシウムによる

制御について実験・評価を行ったが、その他の要因によって制御が変調され得るのかといった視点でも捉えた研究である。例えば、第4章において示されるのは Tm の性質変化(電荷や柔らかさ)によって、アクトミオシン相互作用の負荷依存性や結合頻度に影響を与えることが示唆されており、第5章においては哺乳類の体温付近における温度依存的な制御の変調の可能性を示唆することとなった。勿論過去にも筋肉の構造に由来した制御機構の存在に関する報告等があるのでカルシウム以外の要因に着目すること自体は新たなものではないが、一貫して分子の立場から内的要因(タンパク質の性質変化)と外的要因(外力や溶液環境、温度)によって起こる現象を捉えた研究は多くない。今回は実験を行った階層的にも生体内で存在し得る収縮制御メカニズムの一端に触れたに過ぎない。限定的ではあっても各階層において研究を行うことの重要性を示唆することが出来たと考える。

以上のように本博士論文は、トロポミオシン・トロポニン複合体によるアクトミオシン相互作用(滑り運動)の顕微解析をもとに、その制御機構に関して得られた一分子レベルの新たな知見を提示するものである。

6-2) 課題と今後の展望

本研究はタンパク質一分子階層における筋収縮制御のメカニズムを明らかにしたものであるが、幾つかの課題が残されている。まず生理的な環境における研究との条件の違いが挙げられる。実際一分子階層においては溶液環境等、現実的に生理条件と合わせることが難しい部分がある。近年ではタンパク質の置かれている状況(実験に用いるクロスブリッジの数や間隔を人工的に揃える等)をより生理条件に近いものとする為の試みがされているが、やはり限界はあ

る。勿論細胞や組織における研究にもそれぞれ課題は残されており、それは結果に関与し得る要素の複雑さであったりする。筆者が採用した一分子階層における実験系には明確な利点もあり、その一つとして挙げられるのは要素を限定した上でタンパク質の濃度や混合比を自由に変えられることである。例えば、心筋症を考えた時に生体内では変異の入ったタンパク質とそうでないものが一様でなく混在した状況だと考えられているが、本研究で採用した実験系であれば混在比を変化させることが収縮系に直接どういった影響を及ぼすのかを直接定量的に評価することが可能である。心筋症に限らず、筋肉の収縮メカニズムを真に理解する為には階層ごとの実験系の利点・弱点をしっかりと把握し、それぞれの実験系の結果を比較・対照することが不可欠であるので、本研究での成果をもとに細胞や組織といった階層ではどういった知見が得られるのか確かめていきたい。

本研究で示唆されたことで筆者が特に関心を持ったのは、疾患特異的な遺伝変異が入り T_m の物性(電荷や柔らかさ)が変化したことでアクトミオシン制御に関して大きな変化が得られたことである。今回は主に疾患に関する考察を行ったが、こういったタンパク質の性質を深く追求することによってアクトミオシン制御のより詳しいメカニズムを理解することにもつながると期待される。というのも、変異を挿入して特定の物性を網羅的に変化させ機能を評価することでアクトミオシン相互作用を適切に制御するための、 T_m 分子の適切な柔らかさ等を決定することが出来るかもしれない。疾患特異的な変異に限らず、そういった視点で実験を行っていくことによって、より一般的な関心を満足させることが出来るだろう。現実には都合よく目的の物性のみを変化させることは難しく、やはり複合的な変化を含み得るので、単純化して評価することは出来ないかもしれないが、そういった物理的な視点で筋収縮を理解していきたい。

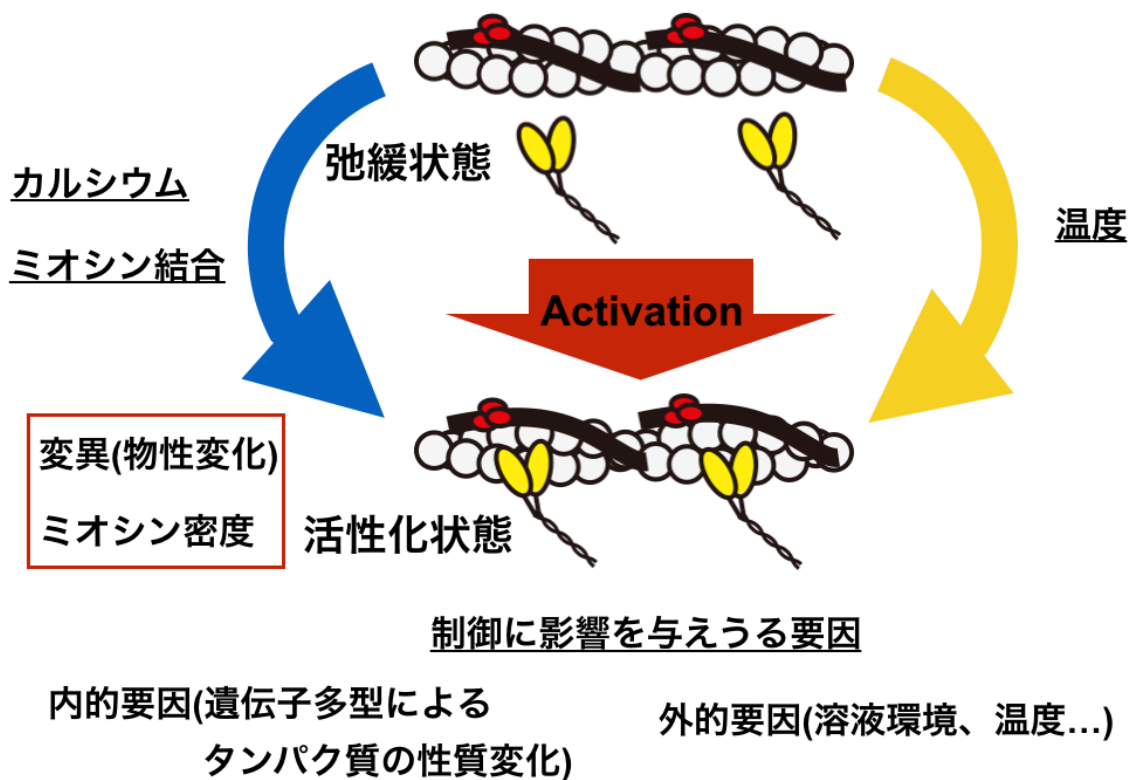


図 6-1 アクトミオシン相互作用の相補的な制御メカニズム

制御系タンパク質によるアクトミオシン相互作用は、複数の要因によって相補的に変調される。本研究ではアミノ酸変異による性質変化といったタンパク質の内的な要因や、カルシウム濃度や温度といった外的な要因のアクトミオシン制御に対する影響を評価した。

【参考文献】

- Agarwal, P. and Zaidel-Bar, R. 2018. 'Principles of actomyosin regulation in vivo', *Trends in Cell Biology*, 29, p. 150–163.
- Bai, F., Weis, A., Takeda, A. K., Chase, P. B. and Kawai, M. 2011. 'Enhanced active cross-bridges during diastole: molecular pathogenesis of tropomyosin's HCM mutations', *Biophys. J.* 100, p. 1014–1023. doi: 10.1016/j.bpj.2011.01.001.
- Bai, F., Wang, L. and Kawai, M. 2013. 'A study of tropomyosin's role in cardiac function and disease using thin-filament reconstituted myocardium.', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 34, p. 295–310. doi: 10.1007/s10974-013-9343-z.
- Bailey, K. 1946. 'Tropomyosin: a new asymmetric protein component of muscle', *Nature*, 157, p. 368–369. doi: 10.1038/157336b0.
- Barany, M. 1967. 'ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening', *J. Gen. Physiol.*, 50, p. 197–218. doi: 10.1085/jgp.50.6.197.
- Barouch, W. W. and Moos, C. 1971. 'Effect of temperature on actin activation of heavy meromyosin ATPase', *Biochim. Biophys. Acta*, 234, p. 183–189.
- Barron, J. T. 1999. 'Hypertrophic cardiomyopathy', *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, 1, p. 277–282. doi: 10.1148/radiol.10090526.
- Behrmann, E., Mirco, M., Penczek, P. A., Mannherz, H. G., Manstein, D. J. and Raunser, S. 2012. 'Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex' *Cell*, 150, p. 327–338.
- Bell, G.I., 1978. 'Models for the specific adhesion of cells to cells'. *Science*, 200,

p.618–627.

Bers, D. M. 2001. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*.

2nd ed. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Press.

Bers, D. M. 2002. 'Cardiac excitation-contraction coupling', *Nature*, 415, p. 198–

205. doi: 10.1016/B978-0-12-378630-2.00221-8.

Bing, W., Knott, A., Redwood, C., Esposito, G., Purcell, I., Watkins, H. and

Marston, S. 2000. 'Effect of hypertrophic cardiomyopathy mutations in

human cardiac muscle alpha -tropomyosin (Asp175Asn and Glu180Gly) on

the regulatory properties of human cardiac troponin determined by in vitro

motility assay.', *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 32, p. 1489–1498. doi:

10.1006/jmcc.2000.1182.

Bloom, G. S. 2000. 'Preface', *Biochim. Biophys. Acta*, 1496, p. 1-2.

Bottinelli, R., Coviello, D. A., Redwood, C. S., Pellegrino, M. A., Maron, B. J.,

Spirito, P., Watkins, H. and Reggiani, C. 1998. 'A mutant tropomyosin that

causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated

with an increased calcium sensitivity', *Circ. Res.*, 82, p. 106–115. doi:

10.1161/01.RES.82.1.106.

Brunet, N. M., Mihajlović, G., Aledealat, K., Wang, F., Xiong, P., von Molnár, S.

and Chase, P. B. 2012. 'Micromechanical thermal assays of Ca²⁺-regulated

thin-filament function and modulation by hypertrophic cardiomyopathy

mutants of human cardiac troponin', *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012:657523,

doi: 10.1155/2012/657523.

Capitano, M., Canepari, M., Maffei, M., Beneventi, D., Monico, C., Vanzi, F.,

Bottinelli, R. and Pavone, F. S. 2012. 'Ultrafast force-clamp spectroscopy of

single molecules reveals load dependence of myosin working stroke', *Nat. Methods*, 9, p. 1013–1019. doi: 10.1038/NMETH.2152.

Capitanio, M. and Pavone, F. S. 2013. 'Interrogating biology with force: Single molecule high-resolution measurements with optical tweezers', *Biophys. J.*, 105, p. 1293–1303. doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.007.

Cardiac Inherited Diseases Group
<http://www.cidg.org.nz/patients-families/cardiac-inherited-diseases/hypertrophic-cardiomyopathy-hcm/> (2018/10/15 参照)

Chang, A. N., Harada, K., Ackerman, M. J. and Potter, J. D. 2005. 'Functional consequences of hypertrophic and dilated cardiomyopathy-causing mutations in alpha-tropomyosin', *J. Biol. Chem.*, 280, p. 34343–34349. doi: 10.1074/jbc.M505014200.

Chung, J. H., Biesiadecki, B. J., Ziolo, M. T., Davis, J. P. and Janssen, P. M. L. 2016. 'Myofilament calcium sensitivity: role in regulation of in vivo cardiac contraction and relaxation', *Front. Physiol.*, 7, p. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2016.00562.

Deufel, C. and Wang, M. D. 2006. 'Detection of forces and displacements along the axial direction in an optical trap', *Biophys. J.*, 90, p. 657–667. doi: 10.1529/biophysj.105.065458.

Dutra, R. S., Neto, P. A. M., Nussenzveig, H. M. and Flyvbjerg, H. 2016. 'Theory of optical-tweezers forces near a plane interface', *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, 94(053848), p. 1–10. doi: 10.1103/PhysRevA.94.053848.

Ebashi, S. and Kodama, A. 1965. 'A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin', *J. Biochem.*, 58, p. 107–108. doi:

10.1016/S0006-291X(08)00430-0.

Ebashi, S. and Kodama, A. 1966. 'Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin', *J. Biochem.*, 59, p. 425–426. doi: 10.1590/S1555-79602011000300002.

Elliott, A. and Offer, G. 1978. 'Shape and flexibility of the myosin molecule', *J. Mol. Biol.*, 123, p. 505–519.

Elliott, P. and McKenna, W. J. 2004. 'Hypertrophic cardiomyopathy', *Lancet*, 363, p. 1881–1891. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16358-7.

Evangelista, A. M., Rao, V. S., Filo, A. R., Marozkina, N. V, Doctor, A., Jones, D. R., Gaston, B. and Guilford, W. H. 2010. 'Direct regulation of striated muscle myosins by nitric oxide and endogenous nitrosothiols', *PLoS One*, 5, p. e11209. doi: 10.1371/journal.pone.0011209.

Felgner, H., Müller, O. and Schliwa, M. 1995. 'Calibration of light forces in optical tweezers', *Appl. Opt.*, 34, p. 977–982. doi: 10.1364/AO.34.000977.

Feng, J. J. and Marston, S. 2009. 'Genotype-phenotype correlations in ACTA1 mutations that cause congenital myopathies', *Neuromuscul. Disord.*, 19, p. 6–16. doi: 10.1016/j.nmd.2008.09.005.

Finer, J. T., Simmons, R. M. and Spudich, J. A. 1994. 'Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps', *Nature*, 368, p. 113–119.

Fish, K. N. 2009. 'Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) Microscopy', *Curr. Protoc. Cytom.*, 12(12.18). doi: 10.1002/0471142956.cy1218s50.Total.

Fujime, S. and Ishiwata, S. 1971. 'Dynamic study of F-actin by quasielastic

scattering of laser light', *J. Mol. Biol.*, 62, p. 251–265. doi: 10.1016/0022-2836(71)90144-6.

Fujita, H., Yasuda, K., Niitsu, S., Funatsu, T. and Ishiwata, S. 1996. 'Structural and functional reconstitution of thin filaments in the contractile apparatus of cardiac muscle' *Biophys. J.*, 71, p. 2307–2318.

Fujita, H., Sasaki, D., Ishiwata, S. and Kawai, M. 2002. 'Elementary steps of the cross-bridge cycle in bovine myocardium with and without regulatory proteins', *Biophys. J.*, 82, p. 915–928. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75453-2.

Fujita, H., Lu, X., Suzuki, M., Ishiwata, S. and Kawai, M. 2004. 'The effect of tropomyosin on force and elementary steps of the cross-bridge cycle in reconstituted bovine myocardium', *J. Physiol.*, 556, p. 637–649. doi: 10.1113/jphysiol.2003.059956.

Fujita, H. and Kawai, M. 2002. 'Temperature effect on isometric tension is mediated by regulatory proteins tropomyosin and troponin in bovine myocardium', *J. Physiol.*, 539, p. 267–276. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013220.

Fukuda, N., Fujita, H., Fujita, T. and Ishiwata, S. 1998. 'Regulatory roles of MgADP and calcium in tension development of skinned cardiac muscle' *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 19, p. 909–921.

Fukuda, N., Kajiwara, H., Ishiwata, S. and Kurihara, S. 2000. 'Effects of MgADP on length dependence of tension generation in skinned rat cardiac muscle' *Circ. Res.*, 86, p. 1–6.

Fukuda, N., Terui, T., Ohtsuki, I., Ishiwata, S. and Kurihara, S. 2009. 'Titin and

- Troponin : Central players in the Frank-Starling mechanism of the heart', *Curr. Cardiol. Rev.*, 5, p. 119–124.
- Gateva, G., Kremneva, E., Reindl, T., Kotila, T., Kogan, K., Gressin, L., Gunning, P. W., Manstein, D. J., Michelot, A. and Lappalainen, P. 2017. 'Tropomyosin isoforms specify functionally distinct actin filament populations in vitro', *Curr. Biol.*, 27, p. 705–713. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.018.
- Gennerich, A., Carter, A. P., Reck-Peterson, S. L. and Vale, R. D. 2007. 'Force-induced bidirectional stepping of cytoplasmic dynein', *Cell*, 131, p. 952–965. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.016.
- Golitsina, N., An, Y., Greenfield, N. J., Thierfelder, L., Iizuka, K., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Lehrer, S. S. and Hitchcock-DeGregori, S. E. 1997. 'Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy-causing mutations on alpha-tropomyosin structure and function', *Biochemistry*, 36, p. 4637–4642. doi: 10.1021/bi962970y.
- Gordon, A. M., Lamadrid, M. A., Chen, Y., Luo, Z. and Chase, P. B. 1997. 'Calcium regulation of skeletal muscle thin filament motility In vitro', *Biophys. J.*, 72, p. 1295–1307.
- Gosse, C. and Croquette, V. 2002. 'Magnetic tweezers: Micromanipulation and force measurement at the molecular level', *Biophys. J.*, 82, p. 3314–3329. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75672-5.
- Greene, L. E. and Eisenberg, E. 1980. 'Cooperative binding of myosin subfragment-1 to the actin-troponin-tropomyosin complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, p. 2616–2620. doi: 10.1073/pnas.77.5.2616.
- Greulich, K. O. 2016. 'Manipulation of cells with laser microbeam scissors and

- optical tweezers: a review', *Rep. Prog. Phys.*, 80(026601), p. 46pp. doi: 10.1088/1361-6633/80/2/026601.
- Gunning, P., Neill, G. O. and Hardeman, E. 2008. 'Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space', *Physiol. Rev.*, 88, p. 1–35. doi: 10.1152/physrev.00001.2007.
- Guo, B. and Guilford, W. H. 2004. 'The tail of myosin reduces actin filament velocity in the in vitro motility assay', *Cell Motil. Cytoskeleton*, 59, p. 264–272. doi: 10.1002/cm.20040.
- Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D. and Yanagida, T. 1990. 'Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by in vitro movement assay', *J. Mol. Biol.*, 216, p. 49–68. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80060-9.
- Heald, R. W. and Hitchcock-DeGregori, S. E. 1988. 'The structure of the amino terminus of tropomyosin is critical for binding to actin in the absence and presence of troponin', *J. Biol. Chem.*, 263, p. 5254–5259.
- Higashi-Fujime, S. 1986. 'In vitro movements of actin and myosin filaments from muscle', *Cell Motil. Cytoskeleton*, 6, p. 159–162.
- Highsmith, S. 1977. 'The effects of temperature and salts on myosin subfragment-1 and F-actin association.', *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, p. 404–408. doi: 10.1016/0003-9861(77)90054-6.
- Highsmith, S. 1978. 'Heavy meromyosin binds actin with negative cooperativity', *Biochemistry*, 17, p. 22–26. doi: 10.1021/bi00594a004.
- Hilbert, L., Bates, G., Roman, H. N., Blumenthal, J. L., Zitouni, N. B., Sobieszek, A., Mackey, M. C. and Lauzon, A.-M. 2013. 'Molecular mechanical

- differences between isoforms of contractile actin in the presence of isoforms of smooth muscle tropomyosin', *PLoS Comput. Biol.*, 9,10 e1003273. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003273.
- Hitchcock-DeGregori, S. E., Song, Y. and Greenfield, N. J. 2002. 'Functions of tropomyosin's periodic repeats', *Biochemistry*, 41, p. 15036–15044.
- Ho, C. Y. and Seidman, C. E. 2006. 'A contemporary approach to hypertrophic cardiomyopathy', *Circulation*, 113, p. 858–862. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.591982.
- Holtzer, A., and Lowey, S. 1959. 'The molecular weight, size and shape of the myosin molecule', *J. Am. Chem. Soc.*, 81, p. 1370-1377.
- Homsher, E., Lee, D. M., Morris, C., Pavlov, D. and Tobacman, L. S. 2000. 'Regulation of force and unloaded sliding speed in single thin filaments: effects of regulatory proteins and calcium', *J. Physiol.*, 524, p. 233–243.
- Hundt, N., Steffen, W., Pathan-Chhatbar, S., Taft, M. H. and Manstein, D. J. 2016. 'Load-dependent modulation of non-muscle myosin-2A function by tropomyosin 4.2', *Sci. Rep.*, 6, 20554. doi: 10.1038/srep20554.
- Inoue, S. and Spring, K. R. 1997. *Video Microscopy: The Fundamentals*. 2nd edn. Plenum Press.
- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D. and Carlier, M. 1995. 'Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins.', *J. Biol. Chem.*, 270, p. 11437–11444.
- Ishijima, A., Kojima, H., Funatsu, T., Tokunaga, M., Higuchi, H., Tanaka, H. and Yanagida, T. 1998. 'Simultaneous observation of individual ATPase and

- mechanical events by a single myosin molecule during interaction with actin', *Cell*, 92, p. 161–171.
- Ishiwata, S. 1973. 'A study on the F-actin-tropomyosin-troponin complex: I. Gel-filament transformation', *Biochim. Biophys. Acta*, 303, p. 77–89.
- Ishiwata, S. 1978. 'Studies on the F-actin · tropomyosin · troponin complex III. Effects of troponin components and calcium ion on the binding affinity between tropomyosin and F-actin', *Biochim. Biophys. Acta*, 534, p. 350–357.
- Ishiwata, S. and Fujime, S. 1972. 'Effect of calcium ions on the flexibility of reconstituted thin filaments of muscle studied by quasielastic scattering of laser light', *J. Mol. Biol.*, 68, p. 511–522. doi: 10.1016/0022-2836(72)90103-9.
- Ishiwata, S. and Yasuda, K. 1993. 'Mechano-chemical coupling in spontaneous oscillatory contraction of muscle' *Phase Transitions.*, 45, p. 105–136.
- Itoh, H., Oyama, K., Suzuki, M. and Ishiwata, S. 2014. 'Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts', *BIOPHYSICS*, 10, p. 109–119. doi: 10.2142/biophysics.10.109.
- Karibe, A., Tobacman, L. S., Strand, J., Butters, C., Back, N., Bachinski, L. L., Arai, A. E., Ortiz, A., Roberts, R., Homsher, E. and Fananapazir, L. 2001. 'Hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel alpha-tropomyosin mutation (V95A) is associated with mild cardiac phenotype, abnormal calcium binding to troponin, abnormal myosin cycling, and poor prognosis', *Circulation*, 103, p. 65–71. doi: 10.1161/01.CIR.103.1.65.
- Kato, H., Nishizaka, T., Iga, T., Kinosita, K. and Ishiwata, S. 1999. 'Imaging of

thermal activation of actomyosin motors', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96, p. 9602–9606. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22255&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.

Katrukha, I.A. 2013. 'Human cardiac troponin complex. Structure and functions' *Biochemistry*, 78, p.1447–1465.

Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. 2001a. 'Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin', *Science*, 291, p. 667–669. doi: 10.1126/science.291.5504.667.

Kawaguchi, K. and Ishiwata, S. 2001b. 'Thermal activation of single kinesin molecules with temperature pulse microscopy', *Cell Motil. Cytoskeleton*, 49, p. 41–47. doi: 10.1002/cm.1019.

Kawai, M., Kawaguchi, K., Saito, M. and Ishiwata, S. 2000. 'Temperature change does not affect force between single actin filaments and HMM from rabbit muscles', *Biophys. J.*, 78, p. 3112–3119. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76848-2.

Kawai, M., Kido, T., Vogel, M., Fink, R. H. A. and Ishiwata, S. 2006. 'Temperature change does not affect force between regulated actin filaments and heavy meromyosin in single-molecule experiments', *J. Physiol.*, 574, p. 877–887. doi: 10.1113/jphysiol.2006.111708.

Kawai, M., Lu, X., Hitchcock-DeGregori, S. E., Stanton, K. J. and Wandling, M. W. 2009. 'Tropomyosin period 3 is essential for enhancement of isometric tension in thin filament-reconstituted bovine myocardium', *J. Biophys.*, 2009:380967. doi: 10.1155/2009/380967.

- Kawai, M. and Ishiwata, S. 2006. 'Use of thin filament reconstituted muscle fibres to probe the mechanism of force generation', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 27, p. 455–468. doi: 10.3816/CLM.2009.n.003.Novel.
- Kaya, M. and Higuchi, H. 2010. 'Nonlinear elasticity and an 8-nm working stroke of single myosin molecules in myofilaments', *Science*, 329, p. 686–689. doi: 10.1126/science.1191484.
- Kim, S. J., Iizuka, K., Kelly, R. A., Geng, Y. J., Bishop, S. P., Yang, G., Kudej, A., McConnell, B. K., Seidman, C. E., Seidman, J. G. and Vatner, S. F. 1999. 'An alpha-cardiac myosin heavy chain gene mutation impairs contraction and relaxation function of cardiac myocytes', *Am. J. Physiol.*, 276, p. H1780–1787.
- Kishino, A. and Yanagida, T. 1988. 'Force measurements by micromanipulation of a single actin filament by glass needles', *Nature*, 334, p. 74–76. doi: 10.1038/334074a0.
- Kobirumaki-Shimozawa, F., Inoue, T., Shintani, S. A., Oyama, K., Terui, T., Minamisawa, S., Ishiwata, S. and Fukuda, N. 2014. 'Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism', *J. Physiol. Sci.*, 64, p. 221–232. doi: 10.1007/s12576-014-0314-y.
- Kondo, H. and Ishiwata, S. 1976. 'Uni-directional growth of F-actin', *J. Biochem.*, 79, p. 159–171.
- Kremneva, E., Boussouf, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M. a and Levitsky, D. I. 2004. 'Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in alpha-tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin.', *Biophys. J.*, 87, p. 3922–3933. doi:

10.1529/biophysj.104.048793.

- Kremneva, E. V, Nikolaeva, O. P., Gusev, N. B. and Levitsky, D. I. 2003. 'Effects of Troponin on Thermal Unfolding of Actin Bound Tropomyosin', *Biochemistry*, 68, p. 802–809.
- Kron, S. J. and Spudich, J. A. 1986. 'Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83, p. 6272–6276. doi: 10.1073/pnas.83.17.6272.
- Kurokawa, H., Fujii, W., Ohmi, K., Sakurai, T. and Nonomura, Y. 1990. 'Simple and rapid purification of brevin', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, p. 451–457.
- De La Cruz, E. M. and Pollard, T. D. 1996. 'Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species', *Biochemistry*, 35, p. 14054–14061. doi: 10.1021/bi961047t.
- Lang, M. J., Asbury, C. L., Shaevitz, J. W. and Block, S. M. 2002. 'An automated two-dimensional optical force clamp for single molecule studies', *Biophys. J.*, 83, p. 491–501.
- Lehman, W., Craing, R. and Vibert, P., 1994. 'Ca²⁺-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction' *Nature*, 368, p. 65–67.
- Li, T. 2013. *Fundamental tests of physics with optically trapped microspheres*, Springer Sci. Media New York. doi: 10.1007/978-1-4614-6031-2.
- Li, X. E., Suphamungmee, W., Janco, M., Geeves, M. a, Marston, S. B., Fischer, S. and Lehman, W. 2012. 'The flexibility of two tropomyosin mutants, D175N and E180G, that cause hypertrophic cardiomyopathy', *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, 424, p. 493–496. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.141.
- Liang, B., Chen, Y., Wang, C.-K., Luo, Z., Regnier, M., Gordon, A. M. and Chase, P. B. 2003. 'Ca²⁺ regulation of rabbit skeletal muscle thin filament sliding: role of cross-bridge number', *Biophys. J.*, 85, p. 1775–1786. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74607-4.
- Liu, K.C. and Cheney, R.E., 2012. 'Myosins in cell junctions', *BioArchitecture*, 2, p.1–13.
- Liu, L., Woolf, A., Rodriguez, A. W. and Capasso, F. 2014. 'Absolute position total internal reflection microscopy with an optical tweezer', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, p. E5609–E5615. doi: 10.1073/pnas.1422178112.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M. and Bretscher, A. 1999. *Molecular cell biology*. 4th Ed. Edited by S. Tenny. W. H. Freedman and Company.
- Longyear, T., Walcott, S. and Debold, E. P. 2017. 'The molecular basis of thin filament activation : from single molecule to muscle', *Sci. Rep.*, 7, p. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-01604-8.
- Lu, X., Tobacman, L. S. and Kawai, M. 2003. 'Effects of tropomyosin internal deletion $\Delta 23Tm$ on isometric tension and the cross-bridge kinetics in bovine myocardium', *J. Physiol.*, 553, p. 457–471. doi: 10.1113/jphysiol.2003.053694.
- Lu, X., Tobacman, L. S. and Kawai, M. 2006. 'Temperature-dependence of isometric tension and cross-bridge kinetics of cardiac muscle fibers reconstituted with a tropomyosin internal deletion mutant', *Biophys. J.*, 91, p. 4230–4240. doi: 10.1529/biophysj.106.084608.
- Ly, S. and Lehrer, S. S. 2012. 'Long-range effects of familial hypertrophic

- cardiomyopathy mutations E180G and D175N on the properties of tropomyosin Socheata', *Biochemistry*, 51, p. 6413–6420. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Månsson, A., Ušaj, M., Moretto, L. and Rassier, D. E. 2018. 'Do actomyosin single-molecule mechanics data predict mechanics of contracting muscle?', *International journal of molecular sciences*, 19, p. 1–37.
- Marian, A. J., Yu, Q. T., Mann, D. L., Graham, F. L. and Roberts, R. 1995. 'Expression of a mutation causing hypertrophic cardiomyopathy disrupts sarcomere assembly in adult feline cardiac myocytes', *Circ. Res.*, 77, p. 98–106.
- Marian, A. J. 2000. 'Pathogenesis of diverse clinical and pathological phenotypes in hypertrophic cardiomyopathy', *Lancet*, 355, p. 58–60. doi: 10.1016/S0140-6736(99)06187-5.
- Marian, A. J. and Roberts, R. 2001. 'The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy', *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 33, p. 655–670. doi: 10.1006/jmcc.2001.1340.
- Maron, B. J. *et al.* 2003. 'American college of cardiology/european society of cardiology clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy', *J. Am. Coll. Cardiol.*, 42, p. 1687–1713. doi: 10.1016/S0735-1097(03)00941-0.
- Marsiglia, J. D. C. and Pereira, A. C. 2014. 'Hypertrophic cardiomyopathy: how do mutations lead to disease?', *Arq. Bras. Cardiol.*, 102, p. 295–304. doi: 10.5935/abc.20140022.
- Marston, S. B. 2011. 'How do mutations in contractile proteins cause the primary

- familial cardiomyopathies?', *J. Cardiovasc. Trans. Res.*, 4, p. 245–255. doi: 10.1007/s12265-011-9266-2.
- Martini, N., Bewersdorf, J. and Hell, S. W. 2002. 'A new high-aperture glycerol immersion objective lens and its application to 3D-fluorescence microscopy', *J. Microsc.*, 206, p. 146–151. doi: 10.1046/j.1365-2818.2002.01016.x.
- Mathur, M. C., Chase, P. B. and Chalovich, J. M. 2012. 'Several cardiomyopathy causing mutations on tropomyosin either destabilize the active state of actomyosin or alter the binding properties of tropomyosin', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 406, p. 74–78. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.112.SEVERAL.
- Maytum, R., Konrad, M., Lehrer, S. S. and Geeves, M. A. 2001. 'Regulatory properties of tropomyosin effects of length, isoform, and N-terminal sequence', *Biochemistry*, 40, p. 7334–7341. doi: 10.1021/bi010072i.
- McKillop, D. F. and Geeves, M. A. 1993. 'Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament.', *Biophys. J.*, 65, p. 693–701. doi: 10.1016/S0006-3495(93)81110-X.
- McLachlan, A. D. and Stewart, M. 1975. 'Tropomyosin coiled-coil interactions: Evidence for an unstaggered structure', *J. Mol. Biol.*, 98, p. 293–304. doi: 10.1016/S0022-2836(75)80119-7.
- McLeod, C. J., Bos, J. M., Theis, J. L., Edwards, W. D., Gersh, B. J., Ommen, S. R. and Ackerman, M. J. 2009. 'Histologic characterization of hypertrophic cardiomyopathy with and without myofilament mutations', *Am. Heart J.*, 158, p. 799–805. doi: 10.1016/j.ahj.2009.09.006.

- Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S. and Cheney, R. E. 1999. 'Myosin-V is a processive actin-based motor', *Nature*, 400, p. 590–593. doi: 10.1038/23072.
- Mijailovich, S.M., Nedic, D., Svicevic, M., Stojanovic, B., Walklate, J., Ujfalusi, Z. and Geeves, M.A. 2017. 'Modeling the actin.myosin ATPase cross-bridge cycle for skeletal and cardiac muscle myosin isoforms' *Biophys. J.* 112, p. 984–996.
- Miyata, H., Hakozaiki, H., Yoshikawa, H., Suzuki, N., Kinoshita Jr., K., Nishizaka, T. and Ishiwata, S. 1994. 'Stepwise motion of an actin filament over a small number of heavy meromyosin molecules is revealed in an in vitro motility assay', *J. Biochem.*, 115, p. 644–647.
- Miyata, H., Yoshikawa, H., Hakozaiki, H., Suzuki, N., Furuno, T., Ikegami, A., Kinoshita, K., Nishizaka, T. and Ishiwata, S. 1995. 'Mechanical measurements of single actomyosin motor force', *Biophys. J.*, 68(4 Suppl), p. 286s–290s.
- Murrell, M., W Oakes, P., Lenz, M. and Gardel, M. L. 2015. 'Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, p. 486–498. doi: 10.1038/nrm4012.
- Nagashima, H. and Asakura, S. 1982. 'Studies on co-operative properties of tropomyosin-actin and tropomyosin-troponin-actin complexes by the use of N-ethylmaleimide-treated and untreated species of myosin subfragment 1', *J. Mol. Biol.*, 155, p. 409–428. doi: 10.1016/0022-2836(82)90479-X.
- National astronomical observatory of Japan 2016. *Chronological scientific tables*. Maruzen.

- Nieminen, T. a, Loke, V. L. Y., Stilgoe, A. B., Knöner, G., Brańczyk, A. M., Heckenberg, N. R. and Rubinsztein-Dunlop, H. 2007. 'Optical tweezers computational toolbox', *J. Opt. A Pure Appl. Opt.*, 9, p. S196–S203. doi: 10.1088/1464-4258/9/8/S12.
- Nishizaka, T., Miyata, H., Yoshikawa, H., Ishiwata, S. and Kinosita Jr., K. 1995. 'Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers', *Nature*, 377, p. 251–254. doi: 10.1038/377251a0.
- Nishizaka, T., Seo, R., Tadakuma, H., Kinosita, K. and Ishiwata, S. 2000. 'Characterization of single actomyosin rigor bonds: load dependence of lifetime and mechanical properties', *Biophys. J.*, 79, p. 962–974. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76350-8.
- Norregaard, K., Jauffred, L., Berg-Sørensen, K. and Oddershede, L. B. 2014. 'Optical manipulation of single molecules in the living cell', *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16, p. 12614–12624. doi: 10.1039/c4cp00208c.
- Oguchi, Y., Mikhailenko, S. V, Olivares, A. O., De La Cruz, E. M. and Ishiwata, S. 2008. 'Load-dependent ADP binding to myosins V and VI: Implications for subunit coordination and function', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, p. 7714–7719.
- Oguchi, Y., Ishizuka, J., Hitchcock-DeGregori, S. E., Ishiwata, S. and Kawai, M. 2011. 'The role of tropomyosin domains in cooperative activation of the actin-myosin interaction', *J. Mol. Biol.*, 414, p. 667–680. doi: 10.1016/j.jmb.2011.10.026.
- Ommen, S. R. and Gersh, B. J. 2009. 'Sudden cardiac death risk in hypertrophic cardiomyopathy', *Eur. Heart J.*, 30, p. 2558–2559. doi:

10.1093/eurheartj/ehp307.

Oyama, K., Mizuno, A., Shintani, S. A., Itoh, H., Serizawa, T., Fukuda, N., Suzuki, M. and Ishiwata, S. 2012. 'Microscopic heat pulses induce contraction of cardiomyocytes without calcium transients', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 417, p. 607–612. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.015.

Perry, S. V. 1955. 'Myosin adenosine triphosphatase', *Methods Enzymol.*, 2, p. 582-588.

Poliac, L. C., Barron, M. E. and Maron, B. J. 2006. 'Hypertrophic cardiomyopathy', *Anesthesiology*, 104, p. 183–192. doi: 10.1038/npg.els.0006098.

Pollari, R. and Milstein, J. N. 2015. 'Improved axial trapping with holographic optical tweezers', *Opt. Express*, 23, p. 1–11. doi: 10.1364/OE.23.028857.

Potter, J. D. 1982. 'Preparation of troponin and its subunits', *Methods Enzym.*, 85(Pt B), p. 241–263.

Ranatunga, K. W. and Wylie, S. R. 1983. 'Temperature-dependent transitions in isometric contractions of rat muscle', *J. Physiol.*, 339, p. 87–95.

Ranatunga, K.W. 1994. 'Thermal stress and Ca-independent contractile activation in mammalian skeletal muscle fibers at high temperatures.' *Biophys. J.*, 66, p.1531–1541.

Rao, V. S., Marongelli, E. N. and Guilford, W. H. 2009. 'Phosphorylation of tropomyosin extends cooperative binding of myosin beyond a single regulatory unit', *Cell Motil. Cytoskeleton*, 66, p. 10–23. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening.

Redwood, C. and Robinson, P. 2013. 'Alpha-tropomyosin mutations in inherited

- cardiomyopathies', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 34, p. 285–294. doi: 10.1007/s10974-013-9358-5.
- Sato, K., Ohtaki, M., Shimamoto, Y. and Ishiwata, S. 2011. 'A theory on auto-oscillation and contraction in striated muscle', *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 105, p. 199–207. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.003.
- Schoffstall, B., Brunet, N. M., Williams, S., Miller, V. F., Barnes, A. T., Wang, F., Compton, L. A., McFadden, L. A., Taylor, D. W., Seavy, M., Dhanarajan, R. and Chase, P. B. 2006. 'Ca²⁺ sensitivity of regulated cardiac thin filament sliding does not depend on myosin isoform', *J. Physiol.*, 577, p. 935–944. doi: 10.1113/jphysiol.2006.120105.
- Shchepkin, D. V., Nabiev, S. R., Kopylova, G. V., Matyushenko, A. M., Levitsky, D. I., Bershitsky, S. Y. and Tsaturyan, A. K. 2017. 'Cooperativity of myosin interaction with thin filaments is enhanced by stabilizing substitutions in tropomyosin', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 38, p. 183–191. doi: 10.1007/s10974-017-9472-x.
- Shimizu, H., Fujita, T. and Ishiwata, S. 1992. 'Regulation of tension development by MgADP and Pi without Ca²⁺; Role in spontaneous tension oscillation of skeletal muscle' *Biophys. J.*, 61, p. 1087–1098.
- Shimozawa, T., Hirokawa, E., Kobirumaki-Shimozawa, F., Oyama, K., Shintani, S. A., Terui, T., Kushida, Y., Tsukamoto, S., Fujii, T., Ishiwata, S. and Fukuda, N. 2017. 'In vivo cardiac nano-imaging: A new technology for high-precision analyses of sarcomere dynamics in the heart', *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 124, p. 31–40. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.09.006.
- Shriver, J. W. and Kamath, U. 1990. 'Differential scanning calorimetry of the

- unfolding of myosin subfragment 1, subfragment 2, and heavy meromyosin', *Biochemistry*, 29, p. 2556–2564. doi: 10.1021/bi00462a018.
- Smith, D. A. and Geeves, M. A. 2003a. 'Cooperative regulation of myosin-actin interaction by a continuous flexible chain I: actin-tropomyosin systems', *Biophys. J.*, 84, p. 3155–3167.
- Smith, D. A. and Geeves, M. A. 2003b. 'Cooperative regulation of myosin-actin interactions by a continuous flexible chain II: actin-tropomyosin-troponin and regulation by calcium.', *Biophys. J.*, 84, p. 3168–3180. doi: 10.1016/S0006-3495(03)70041-1.
- Solaro, R. J. and Rarick, H. M. 1998. 'Troponin and tropomyosin: Proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments', *Circ. Res.*, 83, p. 471–480. doi: 10.1161/01.RES.83.5.471.
- Spirito, P., Seidman, C., McKenna, W. and Maron, B. J. 1997. 'The management of hypertrophic cardiomyopathy', *N. Engl. J. Med.*, 336, p. 775–785.
- Spudich, J. A., Rice, S. E., Rock, R. S., Purcell, T. J. and Warrick, H. M. 2011. 'Optical traps to study properties of molecular motors', *Cold Spring Harb Protoc.*, 11, p. 1305–1318. doi: 10.1101/pdb.top066662.
- Spudich, J. A. and Watt, S. 1971. 'The regulation of rabbit skeletal muscle contraction', *J. Biol. Chem.*, 246, p. 4866–4871.
- Stam, S., Alberts, J., Gardel, M. L. and Munro, E. 2015. 'Isoforms confer characteristic force generation and mechanosensation by myosin II filaments', *Biophys. J.*, 108, p. 1997–2006. doi: 10.1016/j.bpj.2015.03.030.
- Suzuki, M., Fujita, H. and Ishiwata, S. 2005. 'A new muscle contractile system composed of a thick filament lattice and a single actin filament.', *Biophys. J.*,

89, p. 321–328. doi: 10.1529/biophysj.104.054957.

Suzuki, M. and Ishiwata, S. 2011. 'Quasiperiodic distribution of rigor cross-bridges along a reconstituted thin filament in a skeletal myofibril', *Biophys. J.*, 101, p. 2740–2748. doi: 10.1016/j.bpj.2011.10.040.

Suzuki, N., Miyata, H., Ishiwata, S. and Kinoshita Jr., K. 1996. 'Preparation of bead-tailed actin filaments : Estimation of the torque produced by the sliding force in an in vitro motility assay', *Biophys. J.*, 70, p. 401–408.

Svoboda, K. and Block, S. M. 1994a. 'Biological applications of optical forces', *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23, p. 247–285.

Svoboda, K. and Block, S. M. 1994b. 'Force and velocity measured for single kinesin molecules', *Cell*, 77, p. 773–784. doi: 10.1016/0092-8674(94)90060-4.

Takagi, Y., Homsher, E. E., Goldman, Y. E. and Shuman, H. 2006. 'Force generation in single conventional actomyosin complexes under high dynamic load', *Biophys. J.*, 90, p. 1295–1307. doi: 10.1529/biophysj.105.068429.

Tanaka, H. and Oosawa, F. 1971. 'The effect of temperature on the interaction between F-actin and tropomyosin', *Biochim. Biophys. Acta*, 253, p. 274–283. doi: 10.1016/0005-2728(71)90253-2.

Tanaka, H. 1972. 'The helix content of tropomyosin and the interaction between tropomyosin and F-actin under various conditions', *Biochim. Biophys. Acta*, 278, p. 556–566.

Tanigawa, G., Jarcho, J. A., Kass, S., Solomon, S. D., Vosberg, H. P., Seidman, J. G. and Seidman, C. E. 1990. 'A molecular basis for familial hypertrophic

- cardiomyopathy: an α/β cardiac myosin heavy chain hybrid gene', *Cell*, 62, p. 991–998. doi: 10.1016/0092-8674(90)90273-H.
- Terui, T., Sodnomtseren, M., Matsuba, D., Udaka, J., Ishiwata, S., Ohtsuki, I., Kurihara, S. and Fukuda, N. 2008. 'Troponin and titin coordinately regulate length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle', *J. Gen. Physiol.*, 131, p. 275–283. doi: 10.1085/jgp.200709895.
- de Tombe, P. and ter Keurs, H. 1990. 'Force and velocity of sarcomere shortening in trabeculae from rat heart. Effects of temperature', *Circ. Res.*, 66, p. 1239–1254.
- de Tombe, P. P. and Stienen, G. J. M. 2007. 'Impact of temperature on cross-bridge cycling kinetics in rat myocardium', *J. Physiol.*, 584, p. 591–600. doi: 10.1113/jphysiol.2007.138693.
- Toyoshima, Y. Y. 1993. 'How are myosin fragments bound to nitrocellulose film?', in Sugi, H. and Pollack, G. H. (eds) *Mech. Myofilament Sliding Muscle Contract. Vol. II. Advances* i. Springer, p. 259–265.
- Tyska, M. J., Hayes, E., Giewat, M., Seidman, C. E., Seidman, J. G. and Warshaw, D. M. 2000. 'Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy', *Circ. Res.*, 86, p. 737–744. doi: 10.1161/01.RES.86.7.737.
- Uemura, S., Higuchi, H., Olivares, A. O., De La Cruz, E. M. and Ishiwata, S. 2004. 'Mechanochemical coupling of two substeps in a single myosin V motor', *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11, p. 877–883. doi: 10.1038/nsmb806.
- Urbancikova, M. and Hitchcock-DeGregori, S. E. 1994. 'Requirement of

- amino-terminal modification for striated muscle alpha-tropomyosin function', *J. Biol. Chem.*, 269, p. 24310–24315.
- Uyeda, T. Q. P., Kron, S. J. and Spudich, J. A. 1990. 'Myosin step size estimation from slow sliding movement of actin over low densities of heavy meromyosin', *J. Mol. Biol.*, 214, p. 699–710. doi: 10.1016/0022-2836(90)90287-V.
- Vibert, P., Craig, R. and Lehman, W. 1997. 'Steric-model for activation of muscle thin filaments', *J. Mol. Biol.*, 266, p. 8–14. doi: 10.1006/jmbi.1996.0800.
- Wang, C.-L. A. and Coluccio, L. M. 2010. 'New insights into the regulation of the actin cytoskeleton by tropomyosin', *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, 281, p. 91–128. doi: 10.1016/S1937-6448(10)81003-2.New.
- Wang, F., Brunet, N. M., Grubich, J. R., Bienkiewicz, E. a, Asbury, T. M., Compton, L. a, Mihajlović, G., Miller, V. F. and Chase, P. B. 2011. 'Facilitated cross-bridge interactions with thin filaments by familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in α -tropomyosin', *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011(435271), p. 1–12. doi: 10.1155/2011/435271.
- Wang, L., Bahadir, A. and Kawai, M. 2015. 'High ionic strength depresses muscle contractility by decreasing both force per cross-bridge and the number of strongly attached cross-bridges', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 36, p. 227–241. doi: 10.1007/s10974-015-9412-6.
- Watanabe, T. M. and Higuchi, H. 2007. 'Stepwise movements in vesicle transport of HER2 by motor proteins in living cells', *Biophys. J.*, 92, p. 4109–4120. doi: 10.1529/biophysj.106.094649.
- Weeds, A. G., and Taylor, R. S. 1975. 'Separation of subfragment- I isoenzymes

- from rabbit skeletal muscle myosin', *Nature.*, 257, p. 54-56.
- Wu, S. Liu, J., Reedy, M. C., Winkler, H., Reedy, M. K. and Taylor, K. A. 2009., 'Methods for identifying and averaging variable molecular conformations in tomograms of actively contracting insect flight muscle', *J. Struct. Biol.*, 168, p. 485–502.
- Yamashita, H., Sata, M., Sugiura, S., Momomura, S., Serizawa, T. and Iizuka, M. 1994. 'ADP inhibits the sliding velocity of fluorescent actin filaments on cardiac and skeletal myosins' *Circ. Res.*, 74, p. 1027–1033.
- Yang, Q., Sanbe, A., Osinska, H., Hewett, T. E., Klevitsky, R. and Robbins, J. 1998. 'A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy', *J. Clin. Invest.*, 102, p. 1292–1300. doi: 10.1172/JCI3880.
- Yehoshua, S., Pollari, R. and Milstein, J. N. 2015. 'Axial optical traps: a new direction for optical tweezers', *Biophys. J.*, 108, p. 2759–2766. doi: 10.1016/j.bpj.2015.05.014.
- Zheng, W., Hitchcock-DeGregori, S. E. and Barua, B. 2016. 'Investigating the effects of tropomyosin mutations on its flexibility and interactions with filamentous actin using molecular dynamics simulation', *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 37, p. 131–147. doi: 10.1007/s10974-016-9447-3.

【研究業績】

論文 査読あり	<p>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, 351-358, (09/2012). Takashi Ohki, Sergey V. Mikhailenko, Tomomi Arai, <u>Shuya Ishii</u>, and Shin'ichi Ishiwata.</p> <p>○ 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, e0192558, 1-16, (02/2018). <u>Shuya Ishii</u>, Masataka Kawai, Shin'ichi Ishiwata, and Madoka Suzuki. 2018 年の Cell Biology 領域における PLOS Editor's Picks に選出。</p> <p>○ 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, (01/2019). <u>Shuya Ishii</u>, Madoka Suzuki, Shin'ichi Ishiwata, and Masataka Kawai.</p>
------------	--

<p>国際会議 (ポスター)</p>	<p>Thermal Activation of Cardiac Thin Filaments Induces Contraction without Intracellular Ca^{2+} 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</p> <p>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</p>
<p>国内学会 (口頭発表)</p>	<p>Inhibition of actomyosin contractility by α-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</p> <p>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.</p>

国内学会 (ポスター)	<p>Inhibition of actomyosin contractility by α-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>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>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>
----------------	--

【謝辞】

本研究を御指導して下さいました石渡信一先生に深く感謝致します。博士論文作成にあたり貴重な御助言・御指導を頂きました安田賢二先生、上田太郎先生、高野光則先生に感謝致します。

河合正隆先生、福田紀男先生、鈴木団さん、久保田寛顕さん、宮崎牧人さん、大山廣太郎さんの協力無くしては本研究を推進することはありませんでした。大変感謝致しております。また、旧木下研究室(早稲田)の方々にもお世話になりました。有難う御座いました。最後に、私に関与して下さいました石渡・安田研究室の皆様に感謝の意を記します。本当に有難う御座いました。

2019 年 2 月 石井 秀弥