

# 博士論文審査報告書

## 論文題目

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

申請者

石井	秀弥
Shuya	ISHII

物理学及应用物理学専攻  
実験生物物理学研究

2019年2月

生物固有の様々な機能は、生物を構成する生命システムの階層構造が連携した複雑な分子機能の統合として現れる。そして、その機能の多くは運動・運搬機能を必要とし、生体分子機械と呼ばれる化学-力学エネルギー変換制御を担う様々なタンパク質集合体によって担われている。本研究は、力学エネルギーを発生し制御する機能を担う代表的構成要素のひとつである生体分子機械の分子機構がどのように生物個体の機能と関連しているのか、実際の個体レベルでの疾患の発生と関連づけることで、巨視的な個体の応答の多様性を、その原因となりうる遺伝子多型や温度変化などの遺伝的要因・環境要因が1分子レベルでどのような変化をすることを詳細に分析することで明らかにすることを試みたものである。

本博士論文で申請者は、特にアクチン・ミオシンの力発生の制御タンパク質であるトロポミオシン (Tm)・トロポニン (Tn) 複合体の筋細胞中における力発生制御機能に着目し、疾患の原因となる遺伝的要因と環境要因による制御機能の変化をタンパク質一分子階層で明らかにすることで、ヒト個体の疾患の病態を1分子計測から説明できるかという命題について検証した。

まず、申請者はこの研究を進めるために必要な新しい計測技術の開発を行った。従来の1分子 *in vitro* 計測系では、生体分子機械の力発生が3次元の現象であるにもかかわらず2次元平面での変位情報から力発生を見積もってきた。そのため、3次元変位を直接測定して発生した張力を計測する手法を新たに開発した。このシステムは、倒立光学顕微鏡を土台として全反射照明蛍光観察と光ピンセット法を組み合わせたものであり、蛍光ビーズの蛍光強度変化を計測することで捕獲したビーズの3次元位置を正確に見積もることで幾何学的に三次元的な発生力を定量することを可能にした。この手法を用いて、アクチン・ミオシン系に Tm・Tn 複合体を修飾した「細いフィラメント」の力発生を3次元計測したところ、従来の2次元での力発生に比べて最大で1.5倍の力発生が観測された。これは力発生の機構において2次元で発生する力発生が3次元空間での力発生と同じではないことを示唆する重要な結果である。また、この結果を踏まえて、すべてこの新たに開発した3次元計測系を用いている。

次に、申請者は遺伝子疾患の原因について1分子計測レベルから解明を進めた。肥大型心筋症は遺伝病であり、遺伝子多型と呼ばれるヒト遺伝子の違いが心臓を構成する様々なタンパク質に組み合わされることで特定の組み合わせとなった時、疾患として発症するものである。タンパク質の構造に様々な小さな違いが生じていることは分子生物学的手法によって疾患患者の遺伝子解析から明らかになっている。しかし、その遺伝的要因の違いがどのように組み合わされた時に巨視的な疾患としてヒト個体に現れるのか、この疾患に対する遺伝的要因の1分子からの検証には、心肥大症の原因遺伝子として同定されている遺伝子変異を反映したタンパク質それぞれの定量的ダイナミクスからの解明が必要である。本研究では、特に力発生の制御タンパク質である Tm・Tn 複合体を対象として選び、遺伝子変異 Tm・Tn 複合体を再構成アクチン・ミオシン系

に加えた「細いフィラメント」の性質を定量的に分析した。この結果は、弛緩状態となるべき環境においても微弱な力発生が続いていることと、最大張力となるべきカルシウム濃度の環境において、遺伝変異の部位によって力発生の減衰をもたらす場合と力発生を増大させる場合があることも判明した。これらの結果は従来の筋線維を用いた生理的計測系では見いだすことができなかつたものであり、アクチンフィラメントに相互作用するミオシン分子の密度を自在に制御できる1分子 *in vitro* 計測系で初めて観測されたものである。このことは、制御タンパク質の構造の遺伝的要因に加えて筋線維の高次構造の影響を考慮する必要性を示唆するものであり、1分子計測から個体の病理の機構の解明を行うためには中間階層の理解が重要であることを明らかにしたという意味で大きな意義を持つ。

本研究では、また、ヒト個体の心機能に対する環境要因の検証を、張力発生に対する温度変化の影響という観点から分析している。近年の研究から、*in vitro* 系の実験結果から試算された必要量よりはるかに少ない分泌カルシウム量でヒト心臓中では十分な収縮張力が発生することが示唆されているが、この原因の解明が求められていた。本研究では本研究で開発した1分子計測系に局所熱パルス法を組み合わせた実験系を用いて、人の体温近く(37°C程度)の温度であってもアクトミオシン系の  $Ca^{2+}$  非依存的な滑り運動の活性化を確認することができた。この結果の意義は、弛緩条件下においても滑り運動の活性化が生じることを見出したことである。生理条件とは異なる1分子計測系であることは考慮すべきではあるが、心臓内の  $Ca^{2+}$  濃度は従来考えられていた以上に低いところで制御されている機構の仕組みについて1分子からの理解が進められた。

本博士論文は、上に述べた研究成果を3つのテーマ「垂直負荷が加わった時の Tm・Tn 複合体のアクトミオシン力発生における役割」、「肥大型心筋症(HCM) 特異的な Tm 変異体を用いた一分子顕微解析」、「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」として以下のようにまとめている。

第1章では、研究の背景と目的、博士論文の概要について述べられている。

第2章では、本研究で用いた1分子計測に必要なタンパク質試料の調製方法やフローセル作製方法について述べている。

第3章では、3次元での発生張力計測手法の技術開発と、この技術を用いた垂直負荷が加わった時の Tm・Tn 複合体のアクトミオシン力発生における役割について述べている。新たに開発したアクトミオシン収縮システムを三次元的に評価するシステムを用いて、どの角度領域においても Tm・Tn 複合体が修飾された Thin filament はアクチンフィラメントの1.5倍の発生力を示すことを明らかにした。このことは、筋肉中における三次元的な負荷依存性への影響と三次元構造における Tm 相同体の役割を初めて示唆したものである。

第4章では肥大型心筋症(HCM) 特異的な Tm 変異体を用いた一分子顕微解析について述べている。第3章で述べた実験系を用いて、HCMの遺伝子配列の変

異がもたらす影響を検証し、低  $\text{Ca}^{2+}$  濃度における滑り速度については健常型の  $\text{Tm} \cdot \text{Tn}$  複合体と比較して有意な上昇を見出し、また、変異体の飽和  $\text{Ca}^{2+}$  濃度における滑り力の変化では、変異の部位によって、張力の低下のみならず、想定に反して上昇を示す場合もあることを明らかにした。この結果は、1分子計測から病態を理解する上でタンパク質の特性だけでなく、その高次構造の寄与を含めた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ものとなった。

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について述べている。ここでは1分子蛍光観察系に局所熱パルス法を組み合わせた実験系を構築し、タンパク質一分子階層において、人の体温近く ( $37^{\circ}\text{C}$  程度) の温度で Thin filament の  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的な滑り運動の活性化を確認した。この結果は心臓が体温上昇を利用することで比較的低い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度域でも心収縮を制御することを可能にしている可能性を示唆するものである。

第6章では、上記3つのテーマの結果を総括し、1分子計測系での個体の疾患が発生する機構を解明するための遺伝的要因と環境要因からの解明の可能性と今後の課題を考察している。

以上が本論文の各章で述べられている研究の内容と、これらの研究についての学術的な意義である。要約すると、申請者は1分子レベルでの張力発生を3次元で計測する技術を新たに開発し、ヒト個体中での筋収縮制御系の機構を遺伝子疾患と環境要因の視点で1分子レベルから解明を目指し、新たに1)「細かいフィラメント」の力発生を3次元計測することの重要性を示し、2)肥大型心筋症の力発生制御機構は1分子の機能の理解に加えて分子の配置の高次構造の重要性を新たに示唆し、さらに3)  $\text{Ca}^{2+}$  非依存的に筋収縮制御系が温度によって制御されている可能性を実験的に示すことに成功した。これらの成果は、ヒト心臓の機能の遺伝的因子と環境因子を1分子計測から明らかにすることができることを示唆するものであり、高い学術的価値を持つものである。

よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。

2019年2月

審査委員

主査 早稲田大学教授 博士(理学)(早稲田大学) 安田 賢二

副査 早稲田大学教授 博士(学術)(東京大学) 高野 光則

早稲田大学教授 理学博士(東京大学) 上田 太郎