

別紙 1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 乙 第 号
------	---------

氏 名 松崎 瑞季

論 文 題 目 組換え β -アクチンの発現精製系の構築と

D ループ変異体(G42A/G46A)の発現及び構造・機能解析

論文審査担当者

主 査	名古屋大学大学院理学研究科	准教授	博士(理学)	成田哲博
委 員	名古屋大学大学院理学研究科	教 授	博士(医学)	木下 専
委 員	名古屋大学大学院理学研究科	教 授	理学博士	本間道夫
委 員	名古屋大学大学院創薬科学研究科	教授	博士(薬学)	廣明秀一
委 員	京都大学大学院生命科学研究科	教授	博士(医学)	渡邊直樹

論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

アクチンはすべての真核細胞で発現し、細胞内にもっとも大量に存在する蛋白質の 1 つである。アクチンは、生理的な条件下で螺旋状に重合し、線維状の多量体 F-アクチンとなる。細胞はこのアクチンの重合・脱重合を制御することにより、細胞分裂や細胞運動などの動的変化の駆動力を生み出している。アクチンは単量体 G-アクチンと線維状の多量体 F-アクチンの 2 つの状態において、その構造が大きく異なる。大きな差異の 1 つに DNase I 結合ループ(D ループ)の構造の変化がある。D ループは結晶構造中では見えないことが多い。見えている少数の構造では、D-ループは他のアクチンサブユニットか他の蛋白質に結合した状態である。D-ループが観察される結晶構造や、標識アクチンを用いた実験から D ループは多様な構造をとっていることが知られており、その構造変化の自由度の高さから D ループは多くの局所エネルギーの最小状態を生むことができる高い **conformational freedom** を持っているとも表現できる。D ループは線維中のサブユニット間のインターフェイスの一部を担っていることから、切断・酸化すると線維中のサブユニット間の相互作用が影響を受け、アクチン線維の安定性が低下することが報告されている。しかし、D ループの **conformational freedom** がアクチンのダイナミクスにどのように寄与しているのかは明確に示されていない。松崎はアクチン D ループの **conformational freedom** とアクチンダイナミクスの関係について調べることを目指した。

まずは変異体を作成するためのヒト β アクチン発現系を、昆虫細胞を用いて構築するところから始めた。ヒト β アクチンは昆虫類、哺乳類、鳥類において 100% 同一のシーケンスを持ち、筋肉以外のあらゆる細胞で発現、筋収縮以外のほとんどのアクチン機能を担う。その重要性にもかかわらず、発現アクチンだけを完全な状態で分離精製する技術は確立されていなかった。松崎は以前研究室で構築された心筋 α アクチン発現系を改良、以前の発現系ではできていなかったタグの切断、宿主細胞アクチンと発現アクチンの完全な分離に成功し、精製されたアクチンは組織からの精製アクチンとほぼ同じ性質を示した。つまり松崎はヒト β アクチンの発現系を確立した。

つぎに、線維内のアクチン同士の相互作用に影響を与えずに D ループの **conformational freedom** を抑える二重変異体 G42A/G46A を設計、作成、これを発現、精製した。この変異体は天然型のアクチン線維と同じ構造を示し、線維・単量体間の自由エネルギー差にも変化は見られなかった。つまり、変異がアクチン分子間相互作用様式を変えていないことが示唆された。一方、アクチンの重合速度、脱重合速度は有意に低下した。また、アクチン線維分解を担うことで細胞内のアクチン動態を加速するコフィリンの結合も変異により大幅に低下した。つまり、分子間結合様式に直接影響を与えずとも、おおきな構造自由度を持つループの構造自由度を減らすことで、蛋白質の機能に大きな影響が出たことを示唆している。

この結果は蛋白質の機能には構造だけではなく、その自由度も重要であることを直接的に示唆しており、アクチン分子にとどまらない広い意義がある。また松崎はこの結果をまとめた筆頭著者の論文(Matsuzaki et al., 2020, *Biomolecules*)だけではなく、他に三本の共著の論文を発表している。以上のことから、博士学位を授与するのに十分なレベルに達していると判断した。