

# 審査の結果の要旨

氏名 藤井 聡一郎

Actin は、全ての真核生物に遍く大量に存在する細胞骨格タンパク質であり、G-actin (globular-actin) と F-actin (filamentous-actin) の2種類の状態をとる。F-actin は、G-actin が重合して、時計回りの二本鎖フィラメントを形成したものであり、その両端は重合速度が大きく異なっており、速い端を **barbed end** (B端)、遅い端を **pointed end** (P端) と呼ぶ。actin の重合は、G-actin の濃度が臨界濃度である 100 nM 以上の場合にのみ起こることが知られており、その過程は、核形成過程、伸長過程、定常状態の3段階に分けられる。核形成過程では、重合の種となる安定な核が作られる。伸長過程では、形成された安定な核からフィラメントが伸び始め、G-actin の濃度が臨界濃度に達するまで伸長し続ける。臨界濃度に達すると、定常状態となり、重合と脱重合の速度が等しくなるため、フィラメントの長さは見かけ上、定常となる。

従来、actin の重合は monomer を単位として起こると考えられていた。しかし、先行研究における F-actin の長さゆらぎの測定から、定常状態における重合速度定数が伸長過程におけるその 30–40 倍であることが示された。その理由として、伸長過程では monomer が重合するのに対し、定常状態では oligomer が重合するか、あるいは monomer が重合すると次の重合が促進される協同性があるなどの可能性が考えられるが、その詳細は明らかになっていない。藤井は、1分子蛍光イメージング法を用いて、伸長過程と定常状態における actin の重合単位を決定することにより、actin の重合メカニズムを解明することを目指した。

本論文は、5章より構成されている。第1章「序論」では、本研究の背景と、目的および概要が記載されている。

第2章では「actin 重合過程の1分子蛍光イメージングに向けた試料の調製」について述べられている。藤井は、1分子の actin に1分子の蛍光色素を結合させ、F-actin の末端に結合する蛍光標識 actin の蛍光強度を測定することにより、重合の単位を決定しようとした。これを実現するためには、actin を 100% のラベル率で蛍光標識できること、および、その標識により重合が阻害されない必要がある。藤井は、この条件を満たす蛍光色素として BODIPY-FL iodoacetamide を選択し、これを用いて actin の Cys374 を標識した。また actin 重合の種として、Cy3 Maleimide Mono-reactive で 30%標識された actin フィラメントを調製した。

第3章では、「カバーガラス上および LZMW 内における actin の伸長」について述べられている。Actin の重合過程を1分子レベルで観察するためには、100 nM (臨界濃度) 以上の蛍光標識 actin 存在下で、その重合過程を1分子蛍光イメージングする必要がある。しかし、一般的な1分子蛍光イメージング法である TIRFM (全反射照明蛍光顕微鏡法) では、S/N比の問題から、上記のような高濃度下で観察することは困難である。これを解決するために、藤井は LZMW (線形ゼロモード導波路) を用いた1分子蛍光イメージング法を適用した。LZMW は、石英ガラスに蒸着したアルミニウム薄膜上に、可視光の波長よりも細い幅のスリットを多数配列した基板である。スリットの下側から光を照射すると、開口底面近傍のみに非常に局在化したエバネッセント場が発生する。これを励起光とすることで、100 nM 以上の蛍光標識分子が存在していても、1分子蛍光イメージングを行うことができる。Biotin 化 BSA および streptavidin を介して、Cy3 および biotin で

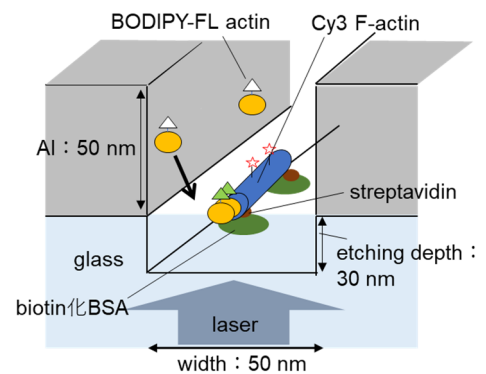


Fig.1 実験系の模式図

修飾した F-actin (Cy3 F-actin) を LZMW 内に固定し、観察溶液中に存在する BODIPY-FL actin が重合する様子を多分子レベルで観察した (Fig.1)。その結果、伸長したフィラメントの平均伸長速度は  $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SD) ( $n = 20$ ) と求められた。これはカバーガラス上における伸長速度  $0.30 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{min}$  と比較すると、約 6 分の 1 の値だった。この原因として、actin を LZMW 内に固定したため、カバーガラス上に固定した場合よりもその運動が妨げられた可能性や、actin の基板表面への吸着により、その実効濃度が減少した可能性などが考えられた。しかし、これらの要因を考慮すると、カバーガラス上での実験と比較しても、十分に BODIPY-FL actin が伸長していると言える。

第4章では、「LZMW 内における actin 重合過程の1分子蛍光イメージング」について述べられている。

藤井は、LZMW を用いて actin の重合過程を 1 分子レベルで観察し、定常状態における重合反応の協同性の検討、および、伸長過程と定常状態における重合単位の比較を行い、actin の重合メカニズムの解明を目指した。溶液中をブラウン運動する BODIPY-FL actin は、輝点として検出できないのに対し、固定された Cy3 F-actin に重合した BODIPY-FL actin は輝点として観察される。そこで、LZMW 内に固定された Cy3 F-actin の両端に ROI (region of interest) を設定し、重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルを検出した。また、この Cy3 F-actin の付近に参照 ROI を設け、バックグラウンドノイズ、および、非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルも測定した。

藤井はまず、定常状態における重合反応の協同性を検討した。Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度変化のグラフ (Fig.2) に対して、自己相関を用いて解析を行った。1 分子のシグナルの検出限界である ( $\text{mean} + 3 \times \text{SD}$ ) を閾値として、値がそれ以上の場合を 1、それ未満の場合を 0 として、自己相関を求めた。また、Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin の退色時間も測定した。その結果、相関時間が短い場合にのみ相関が見られ、その相関が見られた時間が、重合した BODIPY-FL actin の退色時間とおおよそ一致していることが分かった。この結果から、定常状態における重合は、ランダムに起こっていると考えられる。次に、重合に由来する BODIPY-FL actin シグナルの時間間隔 (溶液中の actin が F-actin に重合するまでの待ち時間) の分布を調べた。その結果、その分布は、一次の指数関数で近似することができた。これより、定常状態における重合は、協同的ではなく、ランダムに起こっていると考えられる。以上の結果により、定常状態において monomer がフィラメントに結合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズムは否定された。

藤井はさらに、伸長過程と定常状態における重合単位の比較を行った。Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin の蛍光強度分布を Fig.3 に示した。これより、伸長過程では、蛍光強度 350 (a.u.) 付近をシングルピークとする分布となった。LZMW 基板に吸着した BODIPY-FL actin monomer の平均蛍光強度が、 $362 \pm 101$  (a.u.) ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) ( $n = 129$ ) であったことから、monomer のみが重合に関与していると考えられる。一方、定常状態では、蛍光強度 350 (a.u.) 付近だけではなく、700, 1050 (a.u.) 付近にもピークが現れた。この結果から、定常状態では、monomer だけではなく、dimer や trimer も重合していることが示唆された。

さらに、Fig.3 の定常状態における蛍光強度分布について、複数個のガウス分布でフィッティングすることにより、重合に関与した会合体の割合を概算すると、B 端では、monomer : dimer = 1 : 7.6、P 端では、monomer : dimer : trimer = 1 : 1.9 : 0.70 と求められた。この結果から、monomer、trimer と比較して、dimer の割合が多いことが分かった。先行研究において、Photon Counting Histogram 法により、溶液中における BODIPY-FL actin の明るさ分布が調べられている。それによると、定常状態において、monomer : dimer : trimer = 1 : 0.35 : 0.14 の割合で、存在していることが明らかにされている。本研究の結果は、溶液中における割合から予想されるよりも、はるかに dimer が結合しやすいことを示唆している。

第 5 章では、「総括および今後の展望」について述べられている。藤井は、LZMW を用いることにより、actin 重合過程の 1 分子蛍光イメージングに成功した。その結果、伸長過程では monomer のみが、定常状

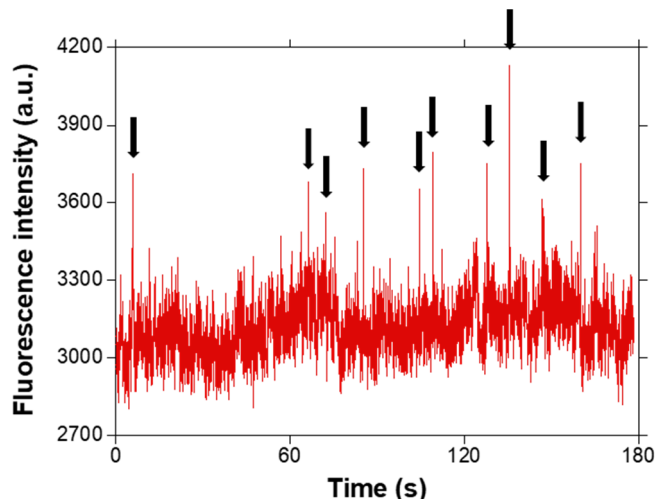


Fig. 2 定常状態における Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度変化

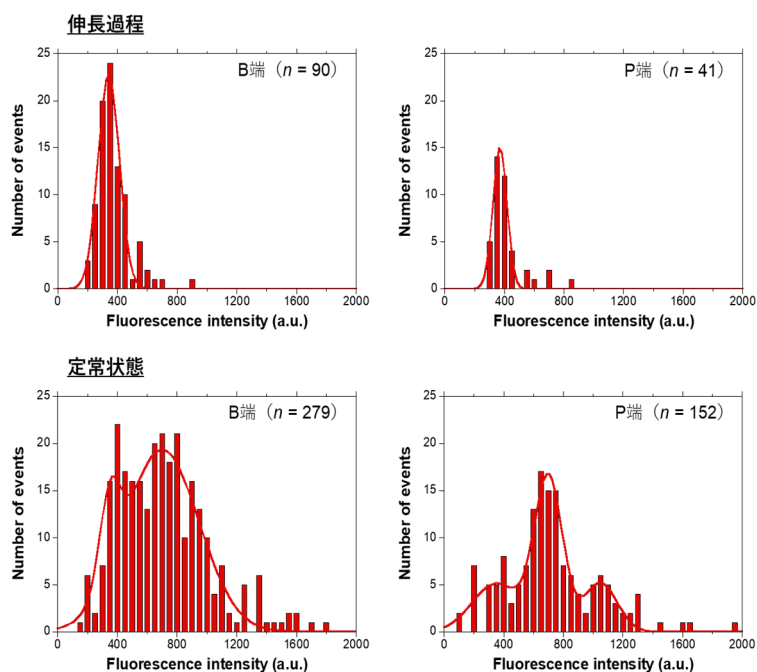


Fig. 3 Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin シグナルの蛍光強度分布

態では monomer だけではなく、dimer や trimer などの oligomer も重合していることを明らかにした。さらに、定常状態において、溶液中で monomer、dimer、trimer が平衡状態として存在している中で、特に dimer が結合しやすいことを示した。これは、1970 年代に提唱された大沢らによる actin の重合モデルに再考を迫るものである。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。