

## 論文の内容の要旨

心筋ミオシン固有の1分子及び多分子特性の実測とシミュレーションを用いた心機能の理解

(Unique molecular and ensemble properties of cardiac myosin and simulation for understanding heart function)

氏名 黄 勇太

ミオシンは ATP 加水分解エネルギーを利用し, power stroke と呼ばれる構造変化により力を生み出す分子モーターである. 特に心筋 $\beta$ ミオシンは心臓の心室を構成するミオシンであり, 血液を身体中に送り出す収縮力を生んでいる. 心臓収縮の分子メカニズムを知るために心筋 $\beta$ ミオシンを用いた様々な1分子実験が行われ, power stroke の大きさ, 発生する力などの1分子特性が解明されてきた. また, 心筋細胞内のミオシン分子の力発生のシミュレーションによって, power stroke の逆反応である reverse stroke の反応速度を骨格筋ミオシンモデルより高く設定することで, 心筋 $\beta$ ミオシン集団が reverse stroke を連鎖的に起こし急速な弛緩が達成された. しかし, 心筋 $\beta$ ミオシンの集団的性質や reverse stroke の重要性が説かれたものの, 集団的性質は未だ解明されていないだけでなく, 心筋 $\beta$ ミオシンの reverse stroke の大きさや, 反応速度を正確に評価した研究はない. そこで本研究では, 心筋 $\beta$ ミオシン集団における reverse stroke の役割を理解するため, ミオシン多分子及び1分子の力計測を行い, シミュレーションによって reverse stroke の役割を明らかにした.

心筋 $\beta$ ミオシン約15分子の力を計測したところ, 骨格筋(速筋)ミオシンに比べ大きい力と高頻度の逆向きステップが観測された. この逆向きステップの分子メカニズムを明らかにするために, ミオシン1分子に高負荷を加えたときのミオシンの動態を計測した. その結果, 心筋 $\beta$ ミオシンは速筋ミオシンに比べ, reverse stroke を頻繁に起こすことが判明した.

それだけでなく、これまで計測されなかった心筋 $\beta$ ミオシンの power stroke, reverse stroke の大きさや反応速度と負荷の関係を定量的に求めることができた。Reverse stroke の役割をシミュレーションによって調べたところ、高頻度の reverse stroke は心筋ミオシン集団の高い力発生と頻繁な逆向きステップを引き起こすことが解明された。さらに、reverse stroke の筋肉内の役割を理解するために、ミオシン分子数を筋肉内と同じ 75 分子に増やしてシミュレーションを行ったところ、reverse stroke は、張力の維持、急速な弛緩および低い ATP 消費率に貢献していることが示された。

本論文は、7 つの章により構成される。以下、各章の概要と具体的な内容について記述する。

第 1 章では骨格筋・心筋の収縮メカニズムおよび心筋 $\beta$ ミオシンを中心としたミオシンの運動メカニズムに関する研究背景と本研究の目的について述べた。

第 2 章では実験に必要なミオシン等の材料の調製、光ピンセット装置や実験系の評価、また実験の手順について述べた。心筋 $\beta$ ミオシン多分子実験では、豚の心室から精製した心筋 $\beta$ ミオシンと機能頭部のないミオシンロッドを 4:1 のモル比で混合することにより、ミオシンフィラメントを作製した。ミオシンフィラメントにアクチンフィラメントを相互作用させ、変位や発生力を光ピンセットを用いて計測した。1 分子実験では、心筋 $\beta$ ミオシンまたは速筋ミオシンとミオシンロッドを 1:1500 のモル比で混合することにより、ミオシン 1 分子がアクチンフィラメントと相互作用するように調整した。1 分子実験では光ピンセットでミオシンに負荷をかけ、その時のミオシンによる変位を計測した。

第 3 章では、心筋 $\beta$ ミオシン多分子の力計測の結果について述べた。心筋 $\beta$ ミオシン集団はアクチンをステップ状に変位させており、心筋 $\beta$ ミオシンは骨格筋ミオシンより、高い力を発生し頻繁に逆向きのステップを示すことが判明した。

第 4 章では頻繁な逆向きステップの分子メカニズムを明らかにするために行った、ミオシン 1 分子の reverse stroke の直接観測の結果について述べた。心筋 $\beta$ ミオシンは 1 mM ADP, 0 -10 mM 無機リン酸の溶液で頻繁に power/reverse stroke を繰り返しステップ状の変位を示した。しかし、速筋ミオシンはステップ状の動きをほとんど示さなかった。この結果から、心筋 $\beta$ ミオシンが速筋ミオシンより頻繁に reverse stroke を行うことが示された。さらに、心筋 $\beta$ ミオシンの 2 段階の power/reverse stroke size と反応速度と負荷の関係を計測することができた。また、Pi の結合と reverse stroke の関係を明らかにすることができた。

第 5 章ではミオシン多分子・1 分子実験の結果の整合性や、過去の実験結果との関係について考察を行った。

第6章では reverse stroke によって心筋 $\beta$ ミオシン多分子がどのような力発生を行うのかを明らかにするために行ったシミュレーションの方法・結果・考察について述べた。ミオシン15分子が発生する力を, reverse stroke 速度が異なる2つのモデルに基づきシミュレーションを行ったところ, 多分子実験で得られた高い力発生と頻繁な逆向きステップといった心筋ミオシン集団の特性は心筋ミオシン1分子の高頻度の reverse stroke によって引き起こされることが判明した。多分子実験における逆向きのステップは心筋 $\beta$ ミオシン数分子が連鎖的に reverse stroke を起こすことで生じることがシミュレーションによって示された。さらに, 1本のアクチンフィラメントと相互作用するミオシンモデルを筋肉内と同じ75分子に増やしシミュレーションしたところ, reverse stroke は, 張力の維持, 急速な弛緩および低いATP消費率に貢献している可能性が示唆された。

第7章では本研究の結論として結果と意義をまとめた。

本研究では, 心筋 $\beta$ ミオシンの1分子実験を行うことにより, 世界で初めて心筋 $\beta$ ミオシンの reverse stroke の直接観測に成功した。心筋 $\beta$ ミオシンの多分子実験より, 心筋 $\beta$ ミオシン集団は速筋ミオシン集団より高い力発生と頻繁な逆向きステップを示すことが解明され, この集団的性質には reverse stroke が鍵となっていることがシミュレーションから判明した。したがって, 心筋 $\beta$ ミオシンの分子特性として reverse stroke を明らかにし, さらにミオシン多分子の力発生への影響を計算した本研究は, 心収縮の分子メカニズムに新たな知見を与えるだろう。