

学 位 論 文 題 名

大動脈平滑筋ミオシン重鎖リン酸化酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

平滑筋ミオシンはATPを加水分解することで収縮力を発生するタンパク質であり、200kDaの重鎖2つ、20kDaの制御軽鎖2つ、17kDaの必須軽鎖2つから成る6量体である。ミオシンのATPase活性は、制御軽鎖(LC20)が特異的なリン酸化酵素であるミオシン軽鎖リン酸化酵素(MLCK)でリン酸化されることで活性化される。MLCKは細胞外の刺激に応じてカルシウムをセカンドメッセンジャーとする情報伝達系で活性化され、LC20のSer19をリン酸化することで収縮系をonの状態にする。このような収縮制御を担うLC20のリン酸化のほかに、ミオシン重鎖のリン酸化が非筋型ミオシンIIや平滑筋ミオシンについて報告されている。下等真核生物であるDictyosteliumにおいては、重鎖のリン酸化はミオシン会合体を脱会合させる作用が知られており、細胞内でミオシンの分布を調節していると考えられている。哺乳動物の非筋型ミオシンIIや平滑筋ミオシンについては、カゼインキナーゼII(CKII)、プロテインキナーゼC(PKC)、カルシウム-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKII)が重鎖リン酸化酵素として機能しうることがin vivoおよびin vitroの実験結果から示唆されている。しかし、それらの酵素による哺乳類のミオシン重鎖リン酸化の役割は明らかにされておらず、また平滑筋では内在性重鎖リン酸化酵素の研究は皆無である。

我々は、これまでなされた研究のように既存のリン酸化酵素による平滑筋ミオシン重鎖のリン酸化を検討したのでは、重鎖リン酸化に関する全体像が把握できないとの考えから、まず大動脈平滑筋抽出液に含まれるミオシン重鎖をリン酸化する酵素活性の検索から始めた。大動脈平滑筋に含まれるタンパク質を0.6M KClを含む緩衝液で抽出後、抽出液をDEAE-Toyopearl 650S陰イオン交換カラムで分離して、溶出画分に含まれる重鎖リン酸化活性を測定した。その結果、カルシウムキレート剤であるEGTA存在下で2種類、さらにカルシウム-カルモジュリン存在下で2種類の活性が検出された。これらのうち、EGTA存在下で検出された2種類の活性(MKI, MKII)についてさらに精製を進めた後、それらの性質を調べた。MKIについてはさらに2段階のカラムクロマトグラフィーを用いて約130倍に精製した。MKIの未変性条件下の分子量は約40kDaであり、MKIにはミオシン重鎖リン酸化活性に加えてLC20リン酸化活性もみられた。MKIによるミオシン重鎖上のリン酸化部位はC末端領域に存在し、リン酸化されるSer付近のアミノ酸配列は平滑筋ミオシンに特異的であった。また、LC20はMKIによりSer1, Ser2がリン酸化されることが明らかとなった。平滑筋ミオシンの以上のような残基をリン酸化するリン酸化酵素の報告は今回が初めてである。一方、MKIIはさらに3段階のカラムクロマトグラフィーを用いることで高度に精製された。MKIIはMKIと異なり、平滑筋ミオシンの重鎖のみをリン酸化した。

MKIIの未変性条件下の分子量は約160kDaであり、43kDaと26kDaのサブユニットをほぼ1:1の割合で含むことが示された。また、MKIIは酸性タンパク質をよい基質とし、数 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のヘパリンで阻害された。これらの性質から、MKIIは既存のSer/Thr型プロテインキナーゼのCKIIであると考えられたが、抗体染色の結果からMKIIはCKIIであることが確認された。MKII/CKIIによるミオシン重鎖上のリン酸化残基はMKIによるリン酸化残基の19残基下流に位置することがわかった。リン酸化されるSerは、CKIIのリン酸化部位の共通配列によく当てはまり、平滑筋ミオシンと非筋型ミオシンIIについて保存されている領域に存在した。

次に、MKIまたはMKII/CKIIでリン酸化したミオシンのアクチン活性化ミオシンMgATPase活性、自己会合能力、10S-6S形態変化を調べた。平滑筋ミオシンは、*in vitro*において溶媒条件を変えることで、会合体、10S単量体、6S単量体を形成する。会合体はミオシン分子が自己会合して繊維状の形態をとったもので筋収縮にはこの形態が必要である。10S単量体と6S単量体は沈降係数から名付けられたが、それぞれMgATPase活性が不活性または活性な状態で安定化したミオシン単量体である。MKIまたはMKIIどちらの酵素でリン酸化した場合も、アクチン活性化ミオシンMgATPase活性に変化はなく、これらのリン酸化は収縮系に直接関係しないと思われた。また、MKII/CKIIによってリン酸化したミオシンは、自己会合能力、10S-6S形態変化ともリン酸化しないミオシンと変わらなかった。これに対して、MKIによるリン酸化はアクチン活性化ミオシンMgATPase活性は変えずに、ミオシンの10S形態形成を阻害し、自己会合を促進することが見いだされた。この結果から、MKIによるリン酸化は、弛緩状態におけるミオシン会合体の安定化に寄与していると考えられた。以上のように、今研究では大動脈平滑筋に含まれるミオシン重鎖リン酸化酵素の精製を進めたことで、これまで報告のあったCKII以外の酵素が平滑筋に含まれることが新たに示された。また、CKIIによる重鎖リン酸化の意義が明らかにされていないのに対し、MKIによるリン酸化は平滑筋ミオシン会合体を安定化する作用があることが見いだされた。平滑筋ミオシンの性質が重鎖リン酸化に関連して変化することを報告したのは今回が初めてであり、ミオシン重鎖リン酸化の生理的な役割を検討する上で重要な結果であると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 谷 口 和 彌

学 位 論 文 題 名

大動脈平滑筋ミオシン重鎖リン酸化酵素に関する研究

ミオシンは、大動脈平滑筋において張力を維持するために作用する主なるタンパク質分子である。ミオシンは、その分子内にATPase活性部位を持ち、ATP加水分解で得られるエネルギーを消費して、張力を発生する。大動脈平滑筋ミオシン分子は重鎖と二種の軽鎖それぞれ二ヶづつが会合した6量体であり、二つの頭部と細長い一本の尾部を持っている。二つの重鎖のN末端部分は、ミオシン分子のそれぞれ異なる頭部を形成し、頭部付け根の部分から、ほぼ、100%ヘリックスとなった重鎖が互いにコイルドコイルとなって一本の尾部を形成している。二種類の軽鎖は各頭部において、尾部の付け根付近に結合し、制御軽鎖(LC20)のSer19は、カルシウムイオン濃度に依存して磷酸化され、平滑筋張力発生を制御している。

一方、大動脈ミオシン重鎖においても、ミオシン尾部先端に位置するC末端付近で磷酸化の起こることが認められている。しかし、その磷酸化の役割は全く解明されておらず、また、磷酸化酵素の分離精製や、キャラクターゼーションも、これまでほとんど、なされていなかった。申請者は、ブタ大動脈平滑筋を用いて、内在性のミオシン重鎖キナーゼの検索、ミオシン重鎖キナーゼの精製とキャラクターゼーション、ミオシン重鎖上の磷酸化部位の同定、および重鎖磷酸化に伴うミオシン分子の物性の変化、を追求した。

申請者は、まず、内在性ミオシン重鎖キナーゼを組織的に追跡するために、大動脈平滑筋抽出液をDEAE-Toyopearlカラムで展開し、各画分の重鎖キナーゼ活性を測定した。その結果、カルシウムイオンで活性化される二種類と、EGTA存在下で活性を示す二種類、合計四種のミオシン重鎖キナーゼの存在を認めた。申請論文では、EGTA存在下で活性を持つ二種類、即ち、DEAEカラムから0.15 および0.2 M KCl で溶出された画分、myosin kinase I (MKI) およびII (MKII)について詳しく調べた。MKIは、さらに、二段階のカラムクロマトグラフィにより、約130倍精製され、分子量は、4万と推定された。基質特異性は低く、プロタミンやカゼインの他に、ミオシンLC20のSer1およびSer2も磷酸化した。〔 γ - 32 P〕ATPを基質とし、MKIで磷酸化したミオシン重鎖をトリプシンで消化し、磷酸化ペプチドを単離した。ペプチドのアミノ酸配列分析から、磷酸化部位付近はRGNETSFVPの配列を持ち、6番目のSerが磷酸化されていることを明らかにした。この配列と、既に報

告されているミオシン重鎖のアミノ酸配列を比較すると、ペプチドC末端のProは、平滑筋ミオシン204-kDa重鎖アイソフォーム尾部先端の近くにある、ヘリックスを崩すProの位置に相当していた。一方MKIIは、ほぼ均一に精製され、カゼインキナーゼIIであると同定された。その磷酸化部位は204-kDa重鎖アイソフォームの尾部先端のヘリックスの崩れた部分に存在することが明らかになった。

MKIIによる大動脈ミオシン磷酸化は、ミオシン分子のATPase活性や溶解度に有意の変化を与えず、その磷酸化の意義は不明のまま残された。しかし、MKIで磷酸化すると、大動脈ミオシン分子の溶解度が減少し、ミオシンフィラメントが安定化されることが示された。また、それに伴い、ミオシンATPase活性が高くなることも見いだした。これらは、哺乳類由来のミオシン標品で初めて観測された変化である。

以上の研究結果は、大動脈のみならず、哺乳類平滑筋一般のミオシン重鎖磷酸化の生理的意義の解明に大きく貢献するものと評価される。よって審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判断した。