

豚大動脈平滑筋ミオシン LC20リン酸化による ミオシン ATPase の調節機構

学位論文内容の要旨

ミオシンは種々の生物の細胞に広く存在するモータータンパクの一種である。脊椎動物では筋肉組織に多量に存在し、個体の維持、運動を担っている。ミオシンは ATPase 活性を持っており、ATP を加水分解するときに生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換してアクチン繊維を動かし、その結果、運動が起こる。この ATPase 活性の調節機構はミオシンの存在する組織によって異なっている。横紋筋では、アクチンとトロポニン複合体からなる細い繊維に Ca^{2+} が結合するとミオシン ATPase が活性化し（アクチン活性化 ATPase 活性 = アクトミオシン ATPase 活性）、細い繊維から Ca^{2+} が解離すると ATPase 活性は抑制される。一方、平滑筋や非筋細胞では、ミオシンのサブユニットである LC20 のリン酸化、脱リン酸化によってミオシン ATPase が調節される。LC20 がリン酸化されるとアクトミオシン ATPase が活性化され、LC20 が脱リン酸化されるとアクトミオシン ATPase 活性が抑制される。本研究は、豚大動脈平滑筋ミオシンを用いて、LC20 リン酸化によるミオシン ATPase 活性の調節機構を調べることを目的としておこなった。

第 1 章では、LC20 のアミノ酸配列を決定し、リン酸化部位を決定した。豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 は、N 末端がアセチル基で修飾された 171 残基からなり、これより算出された分子量は 19,738 であった。この一次構造を、既知の LC20 の配列と比較したところ、少なくとも 90 % のアミノ酸残基が同一であり、鶏砂囊筋ミオシン LC20 とは、99.4 % 同一であった。また、既知の LC20 で調べられたリン酸化部位 (Ser19) とその周辺の配列では置換が見られないことから、豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 のミオシン軽鎖キナーゼによるリン酸化部位も Ser19 であると判断した。このようにアミノ酸配列が高度に保存されていることから、豚大動脈 LC20 の役割は、運動の on/off と関連したミオシン ATPase 活性調節であると考えられた。

第 2 章では、電子顕微鏡法を用いて、ミオシン分子上のリン酸化部位の位置を明らかにした。まず、LC20 のリン酸化部位を含む 11 残基を認識する抗リン酸化ミオシン抗体 (APMAb) を調製した。リン酸化ミオシンと APMAb とを混合し、形成されたリン酸化ミオシン-APMAb 複合体について電子顕微鏡像観察をおこない、ミオシン頭部先端から抗体の結合位置までの距離とミオシン頭部の長さとを測定して比較した。その結果、抗体は頭部-尾

部連結部から頭部先端側におよそ 3.4 nm の位置に結合していることがわかった。Raymentらの結果 (*Science* 261, 50-58, 1993) を参考にすると、ミオシン頭部の ATPase 活性部位と LC20 のリン酸化部位とは 4.6 ~ 5.6 nm 離れていることが明らかになった。この結果から、LC20 のリン酸化部位がミオシン ATPase 活性部位と直接相互作用することはできないことが示された。リン酸化による LC20 の高次構造変化が必須軽鎖あるいはミオシン重鎖の高次構造変化を誘起し、最終的に ATPase 活性部位が活性化された構造に変わると考えられる。

また、APMAb 存在下でアクトミオシン ATPase 活性を測定したところ、APMAb の濃度の増加とともに活性は高くなり、モル比で 5 倍量の APMAb 存在下では約 1.3 倍に増加することがわかった。この結果から、ATPase の活性化に必要な LC20 のリン酸基を含む領域の高次構造はゆらいでおり、APMAb が結合すると、この ATPase 活性化に必要な高次構造が安定化することが示唆された。

第 3 章では、ミオシンに結合している LC20 のリン酸化による構造変化と溶媒への露出度の変化について調べた。まず、LC20 の構造変化についての知見を得るため、アルギニルエンドペプチダーゼを用いてミオシンを限定消化し、リン酸化の影響を調べた。その結果、アクチンが存在するとリン酸化ミオシンの LC20 は 2 倍以上消化されやすいことがわかった。この結果は、アクチンが結合すると、リン酸化ミオシンの LC20 が、溶媒に露出することを示唆している。同様の実験から、脱リン酸化ミオシンではアクチンが存在しても LC20 の溶媒への露出度は変わらないことが示された。

次に、同様の目的で、水溶性カルボジイミド (EDC) を用いた化学架橋実験をおこなった。³²P で標識したリン酸化ミオシンの架橋産物を SDS-PAGE で解析した結果、LC20 の 2 量体に相当する約 40 kDa のバンドが観察された。同様のバンドはアクチン存在下のリン酸化ミオシンでも観察された。脱リン酸化ミオシンの架橋産物でも LC20 の 2 量体のバンドは観察されたが、アクチンを加えるとこのバンドの形成速度は大きく減少した。この結果から、アクチンが存在すると脱リン酸化ミオシンの LC20 は架橋されにくくなること、リン酸化によりこの効果は消失することがわかった。

これら 2 つの結果から、アクチンはミオシンに結合すると、2 つの LC20 の間の距離を大きくする、すなわち、ミオシンの 2 つの頭部を引き離すことが示唆される。一方、アクチンが結合したリン酸化ミオシンの LC20 は溶媒に露出し、互いに架橋される距離にある。この高次構造は、APMAb により特異的に認識される、アクトミオシン ATPase 活性化に必要な高次構造に相当すると考えられる。LC20 のリン酸化による高次構造変化は、アクチンが結合したときに LC20 を溶媒に露出させ、ミオシンの 2 つの頭部を近い距離に保ちつづけるものと考えられる。

以上の結果から、LC20 のリン酸化によるミオシン ATPase の活性化は LC20 分子内の高次構造変化により引き起こされること、このとき 2 つのリン酸化 LC20 は互いに近接できる位置にあること、そして、この高次構造変化が重鎖の高次構造変化を誘起して ATPase 活性部位に伝わると結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 教 授 田 村 守

学 位 論 文 題 名

豚大動脈平滑筋ミオシン LC20リン酸化による

ミオシン ATPase の調節機構

筋肉は、基本的には収縮タンパク質ミオシンとアクチン、エネルギー源としてのATPが存在すると収縮する。モータータンパク質の一種であるミオシンは、ATPase活性を持ち、ATPを加水分解するときに生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換して、アクチン線維を動かし筋肉が収縮する。筋収縮の分子機構を考えると、エネルギー変換の分子機構を解明することと、もう一つ、エネルギー変換過程の調節の分子機構を解明することの2つの重要な課題がある。申請者の研究課題は後者にあたる。ATPase活性の調節機構は筋肉の種類によって異なり、平滑筋の場合、カルシウムイオン濃度が上昇すると、カルシウムイオンは調節タンパク質カルモジュリンに結合し、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化を通してミオシンの制御軽鎖がリン酸化されATPaseが活性化される。制御軽鎖のリン酸化が、ATPaseを活性化する過程の分子機構は明らかになっていない。申請者の研究目的は、血管平滑筋の収縮調節機構の解明であり、豚大動脈平滑筋ミオシンを用いて制御軽鎖 (LC20) リン酸化によるミオシンATPase活性の調節機構を生化学的に研究した。

学位論文は、3章からなっている。第1章では、豚大動脈平滑筋のLC20の一次構造上でのリン酸化部位の同定に関する実験結果が述べられている。豚大動脈平滑筋から調製したミオシンよりLC20を解離させ、精製後その全アミノ酸配列を決定した。質量分析法を用いた解析により、LC20のN末端はアセチル基で修飾されていることを明らかにした。LC20は、N-AcetylSerから始まる171アミノ酸残基からなること、ATPase活性の調節に必須のリン酸化部位は、鶏砂囊筋の場合と同様にSer19であることを明らかにした。

第2章では、ミオシン分子の立体構造上でのリン酸化部位の同定に関する実験結果が述べられている。第1章の結果に基づき、LC20のリン酸化部位を含む11残基の配列を持つリン酸化ペプチドを化学合成した。これを用いてウサギを免疫し、リン酸化ミオシンを特異的に認識する抗体を作製した。この抗体がリン酸化部位と強く結合できる性質を持つことを明らかにした後、免疫電子顕微鏡法によりミオシン分子上に結合した抗体の位置を同定することで、リン酸化部位の位置を同定した。統計的な解析により、リン酸化部位は、頭部一尾部連結部から3.4nmの位置にあることを明らかにした。同定されたリン酸化部位は、骨格筋ミオシンの原子構造に基づいて推定されるATPase活性部位から5nm以上離れた位置にあたり、LC20に取り込まれたリン酸基が、ATPase活性部位と直接相互作用することはあり得ないことを明らかにした。

第3章では、LC20リン酸化の効果がATPase活性部位に伝わる機構に関する実験の結果について述べられている。プロテアーゼによる限定消化と、水溶性カルボジイミドを用いた架

橋反応の実験結果から、アクチンが存在するとき、ミオシンがリン酸化されるとLC20が消化を受けやすくなること、分子間架橋されやすくなることを示唆する結果を得た。申請者は、以上の結果に基づき、リン酸化によりLC20の高次構造変化が起き、これが重鎖の高次構造変化を誘起しATPase活性部位に伝わるという仮説を提出している。

このように、申請者は、血管平滑筋ミオシンLC20のアミノ酸配列をタンパク質レベルの実験で初めて明らかにし、リン酸化部位の同定に成功した。さらに、リン酸化部位を特異的に認識し結合する抗体をもちいて、ミオシン分子の立体構造上でのリン酸化部位の同定に成功した。同定されたリン酸化部位は、推定されるATPase活性部位から5nm以上離れていることを明らかにした。LC20に取り込まれたリン酸基が、ATPase活性部位と直接相互作用することはあり得ないという結果から、リン酸化に伴うLC20、および重鎖の高次構造変化を介したタンパク質相互作用に基づくATPase活性調節機構を提案した。

本論文で述べられたこれらの成果は、血管平滑筋収縮調節の分子機構の解明に貢献するところが大きく、審査員一同は、申請者が、北海道大学博士（理学）の学位を得る十分な資格を有すると認めた。