

ミオシン分子の構造変化とエネルギー変換機構に関する研究

学位論文内容の要旨

筋収縮はミオシンとアクチンの2つの蛋白質の相互作用により生じる。ミオシンはATP加水分解活性をもち、このATP加水分解によって得られた化学エネルギーを使ってアクチンフィラメントを動かす。ミオシン頭部はATP加水分解反応の各段階で2つの重要な仕事をする事が知られている。1つはアクチンとの結合解離で、もう1つはアクチンフィラメントに対する力発生である、この2つの仕事をうまく共役させることで、アクチンフィラメントを滑らかに動かしている。近年、この力発生はATP加水分解反応中にミオシン頭部の分子形状が大きく変わることによって引き起こされるというモデルが提唱され注目されている。特に、そのミオシン頭部の形状変化の中心は、反応性の高いシステインで知られるCys⁷⁰⁷ (SH1) または Cys⁶⁹⁷ (SH2) を含む領域、いわゆるSH領域で引き起こされることがX線結晶構造解析で示された。そこで、本研究ではミオシン頭部内のこの領域に注目し、その構造変化を生化学的に解明し、筋収縮機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では、ミオシン頭部に存在するシステイン残基Cys⁷⁰⁷ (SH1) 付近の構造変化を調べるため、骨格筋ミオシン頭部 (S1) のSH1の反応性を反応性蛍光試薬 5-(iodoacetamidoethyl)aminonaphthalene-1-sulfonic acid (I-AEDANS) を用いて測定した。SH1の反応性はATPまたはADP添加により大きく変化した。その反応速度はヌクレオチド非存在下に比べ、ATP存在下では約2分の1に減少し、ADP存在下では約6倍の高い値になった。また、ATP加水分解反応の2つの中間体、M・ATP状態とM・ADP・Pi状態のSH領域の構造を知るために、S1と幾つかのATPアナログ (adenosine 5'-(3-thiotriphosphate) (ATP_γS)、ADP-vanadate (ADPV_i), ADPBeF_x, ADPAIF₄) との複合体を作製しSH1の反応性を調べた。M・ATP状態のアナログと考えられているATP_γSまたはADPBeF_xとS1との複合体のSH1の反応性は非常に高く、M・ADP状態と同程度の反応性を示した。一方、M・ADP・Pi状態のアナログであるADPV_iまたはADPAIF₄とS1との複合体のSH1の反応性は、反応が観測されないほど低い値となった。このSH1付近の構造変化はATP加水分解反応中のATPのγ位リン酸結合部位付近の構造変化に共役して引き起こされたと思われる。ミオシンの力発生はリン酸放出の段階で引き起こされると考えられており、このM・ADP・Pi状態からM・ADP状態へのSH1の反応性の変化はパワーストロークと密接に関連していると思われる。また、これらの他にヌクレオチド非存在下、アクチン存在下の反応性の低い分子種を加え、SH1付近には3つの異なった構造が存在することを示した。これらの結果から、パワーストロークはミオシン頭部の2段階の構造変化で引き起こされる可能性が示唆された。

第2章では、SH1付近（SH領域）に存在する、多くの生物種間でよく保存されている芳香族性側鎖のクラスターの役割を調べた。この芳香族性側鎖のクラスターは細胞性粘菌（*Dictyostellium discoideum*）でも保存されており、細胞性粘菌のミオシン発現系を使ってそれらの側鎖をアラニンに置換した4つの変異ミオシン（F692A、Y737A、F739A、F745A）を作製した。もちいた細胞性粘菌のミオシン発現系では、発現しているミオシンのモーター活性を粘菌の表現型を観察することで予測することができる。そこで、粘菌の表現型として特徴的な子実体形成能を調べた。変異ミオシン、Y737A、F739A、F745Aを発現している粘菌の子実体形成能は、野生株と大きな違いが見られなかった。しかし、F692Aの場合、十分量のミオシンを発現しているにも関わらずミオシン欠損株（HS1）と同様に子実体の形成が観察されなかった。このことから、F692Aはミオシンのモーター活性に大きなダメージを与える変異であることが予想された。この予想が正しいことは、粘菌からこれら変異ミオシンを単離し、モーター活性をアクチン滑り速度解析法で直接測定することで明らかになった。ワイルドタイプミオシンではアクチンフィラメントの滑り速度は 1.66 ± 0.19 ($\mu\text{m}/\text{sec}$)であった。しかし、F692Aのアクチン滑り速度は 0.02 ± 0.01 ($\mu\text{m}/\text{sec}$)であり、ワイルドタイプミオシンのたった1%の滑り速度しか観察されなかった。このミオシンはATP加水分解能やアクチン結合解離能は保持しているの、このF692A変異は、ミオシンの力発生のステップに特に大きな欠陥を生じたと考えられた。この結果から、SH領域がミオシンのエネルギー変換に関係した機能領域である可能性がいっそう強められた。

第3章では、ATP結合部位とSH領域の構造変化の関係について考察した。SH領域は、ATP加水分解反応中に3つの構造をとることを第1章で明らかにした。これらの構造は、SH1の反応性がほとんど見られない2つの分子種と、反応性が著しく高い1つの分子種からなる。これらの構造変化はATP結合部位内のどのような変化によって引き起こされるのかについて調べた。これらの構造変化のうち、反応性の高い分子種（M・ATP状態またはM・ADP状態）から反応性の低い分子種（M・ADP・Pi状態）への構造変化は、 γ 位リン酸結合部位の構造変化によって引き起こされる。一方、ヌクレオチド非存在下からM・ATP状態またはM・ADP状態になると、ともにSH1の反応性が上昇するが、これはATPのどの部分を認識して生じた結果なのかについて調べた。このSH1の反応性をあげる部位をつきとめるため、5種類のヌクレオチドアナログ（ADP、ATP γ S、AMP、ピロリン酸、硫酸イオン）を使ってSH1の反応性を測定した。これら、ヌクレオチドアナログのうち、AMPを除く4種類、ADP、ATP γ S、ピロリン酸、硫酸イオンはすべてSH1の反応性を高める働きをした。この4つのアナログはすべてATP結合部位の β 位リン酸結合部位内に結合すると思われ、SH1の反応性の上昇は β 位リン酸結合部位付近の構造変化によって引き起こされることが明らかになった。

パワーストロークに働くミオシン頭部の大きな形状変化は、SH領域の構造変化によって生じる可能性がX線結晶構造解析で示唆されてきた。本研究では、このX線結晶構造解析で見られた構造変化をSH1の反応性の変化からもはっきりと示すことができた。さらに、細胞性粘菌を用いた変異ミオシン解析より、このSH領域が実際にパワーストロークに働く機能領域であることを生化学的に証明することができた。また、このSH領域には異なった3つの構造が存在するという、新しい知見が得られた。この3つの分子種は、ATP結合部位の β 位また γ 位リン酸の付近の構造変化と連動して変化することを明らかにした。

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 田 村 守

学 位 論 文 題 名

ミオシン分子の構造変化とエネルギー変換機構に関する研究

筋肉の収縮は、エネルギー源となるATPの加水分解反応と、モータータンパク質ミオシンとアクチンの相互作用との共役により生じる。このタンパク質相互作用は、ミオシンのアクチンとの結合・解離反応と、アクチンフィラメントに対する力発生からなり、これらをミオシンによるATP加水分解反応とうまく共役させることでアクチンフィラメントはなめらかに動き、筋肉は収縮する。本論文は、ATP加水分解反応中でのミオシン分子頭部の高次構造変化を、反応性の高いシステイン残基(Cys707、またはSH1)を含む領域(SH領域)の構造変化に注目して生化学的に解析しこの共役の分子機構を明らかにしようとしたものである。

学位論文は3章からなっている。第1章では骨格筋ミオシン頭部SH領域の高次構造変化について、SH1の蛍光性試薬5-(iodoacetamidoethyl)aminonaphthalene-1-sulfonic acid (I-AEDANS)に対する反応性の変化から追跡した結果を述べている。ATP加水分解反応中間体のアナログとなる5種類のATPアナログとミオシンの複合体について反応性の差を検討し、SH領域の高次構造は、ATP加水分解過程で出現する3種のATP結合部位の構造に共役して変わることを明らかにした。さらに、反応性の高いM-ATPから反応性の低いM-ADP-Pi複合体への変化に伴うSH領域の構造変化は、ATP結合部位での γ 位のリン酸結合構造の変化により誘起されることを明らかにし、筋収縮のパワーストローク(力発生)はSH領域の2段階の構造変化で引き起こされる可能性を示した。

第2章では、SH領域に存在する、芳香族性側鎖のクラスターの機能について、細胞性粘菌のミオシン発現系を用いて検討した結果を述べている。クラスターに含まれる4つの芳香族性残基に注目し、それらを順にアラニン残基に置換した効果を見たところ、Phe692を置換した変異体ミオシンF692Aが興味ある結果を示した。F692Aを発現している粘菌は飢餓状態におちいっても子実体を形成できず、この変異ミオシンは、モーター活性に大きな欠陥を持つと予測した。このF692A変異ミオシンを単離してアクチンの滑り速度を測定し、そのモーター活性がワイルドタイプミオシンの1%程度しかないことを確認した。しかしながら、この変異ミオシンは、ワイルドタイプミオシンと同レベルのATP加水分解活性やアクチン結合・解離能を保持していた。これらの結果から、F692Aミオシンは力発生ステップに大きな欠陥を生じたと考えられ、SH領域は、ミオシンのエネルギー変換に関係した重要な機能領域であることを明らかにした。

第3章では、ATP結合部位とSH領域の構造変化の関係について総合的に検討している。第1章で明らかにしたATP加水分解過程で出現する3種のSH領域の高次構造のうち、ヌクレオチド非結合状態(M状態)からM-ATPまたはM-ADP状態への変化にともなうSH1の反応性の上昇について5種類のATPアナログを用いて検討した。その結果、SH1の反応性の上昇に伴うSH領域の高次構造変化は、ATP加水分解反応過程での β 位リン酸結合部位の構造変化により引き起こされることを明らかにした。

著者は、SH1の反応性の変化を解析して、SH領域の高次構造変化がミオシン頭部の大きな形状変化を引き起こしパワーストロークにつながることを示した。さらに、細胞性粘菌を用いた変異ミオシンの解析により、このSH領域が実際にパワーストロークに働く機能領域であることを生化学的に実証することに成功した。この解析結果に基づき、X線結晶構造解析により示されたミオシン分子の構造変化を筋収縮の分子機構に結びつけて考察することに成功した。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。