

学 位 論 文 題 名

平滑筋ミオシンのリン酸化依存調節機構に含まれる
分子内相互作用部位の解明

学位論文内容の要旨

筋収縮は、主にATP加水分解酵素活性（ATPase）をもつミオシンとそれを活性化
するアクチンという2つの蛋白質の相互作用によっておこる。ミオシン分子は、各2つ
つの重鎖、必須軽鎖（ELC）、調節軽鎖（RLC）からなり、2つの頭部が1本の尾部に連
結した形態を有する。頭部はATPase活性部位やアクチン結合部位をもつモータードメイ
ン（MD）と2種類の軽鎖を結合する調節ドメインとそれらを連結するコンバーター領域
からなる。尾部は重鎖の α ヘリックスのコイルドコイル構造で、頭部側の1/3はサブフラ
グメント2（S2）、残りの部分はライトメロミオシン（LMM）と呼ばれている。ミオシ
ンはLMM領域で互いに会合してフィラメントを形成する。このLMM領域を欠いたミオシ
ン断片はHMMと呼ばれモノマーとして存在するが、フィラメント形成能以外はミオシ
ンの機能を維持している。アクチンは球状蛋白質で、生理的条件下では会合して2重螺旋状
のフィラメントを形成する。ミオシンはATPを加水分解して得られる化学エネルギーを
使ってアクチンフィラメントを動かし、その結果筋収縮は起こる。平滑筋では、ミオシ
ン軽鎖キナーゼによるRLCのリン酸化によって、ミオシンのactin-activated ATPase活
性を調節することで筋収縮が調節される。脱リン酸化状態では同活性は低い、リン酸化
により活性は著しく上昇し、ミオシンはアクチンフィラメントを動かせるようになる。一
方、平滑筋ミオシン分子は尾部が二カ所で曲がった形態の10S型と尾部が伸びた形態の6S
型の2つのコンホメーションをとる。両コンホメーション間の平衡もRLCのリン酸化に
よって調節され、リン酸化されると平衡は6S型に傾き、ミオシンは尾部同士で会合して
フィラメントを形成する。ミオシン頭部のRLCのリン酸化部位とATPase活性部位とは
100 Å以上離れており、両部位の直接の相互作用は考えにくく、平滑筋ミオシンのリン
酸化による活性やコンホメーションの調節の分子機構はまだ解明されていない。そこで、ミ
オシンの分子内相互作用を介するリン酸化依存調節機構を想定し、どの部位の相互作用が
リン酸化による調節機構に必要なのかを明らかにすることを研究目的とした。

第一章では、ミオシン分子の頭部間相互作用に着目した。V8プロテアーゼを用い
た限定分解によりブタ大動脈平滑筋ミオシンの片方の頭部を除去して単頭ミオシンを調製
した。ゲル濾過HPLCの溶出時間の変化と電子顕微鏡観察から、単頭ミオシンでも6S型と
10S型間のコンホメーション変化が起こり、それがリン酸化によって調節されることがわ
かった。しかし、単頭ミオシンモノマーのコンホメーション間の平衡は6S型に大きく傾

いていたため、リン酸化状態に関わらずフィラメントを形成した。さらに、単頭ミオシンのactin-activated ATPase活性は脱リン酸化状態でも高く、リン酸化による活性化はほとんど見られなかった。したがって、平滑筋ミオシンのフィラメント形成に共役したコンホメーションの調節や、actin-activated ATPase活性やフィラメント形成の調節には、ミオシン分子内での頭部間の相互作用が必要であると考えられた。

第二章では、頭部間相互作用が頭部のどの部位に起こるのかを調べるために、双頭構造の一方に変異を加えた①から③の変異体HMMを昆虫細胞発現系を用いて調製した。① Δ MD-HMM（一方の頭部のN末端からモータードメイン（MD）部分を欠失したHMM）② Δ (MD+ELC)-HMM（一方の頭部のN末端からMDと必須軽鎖（ELC）結合ドメインを欠失したHMM）③sh-HMM（一方の頭部をすべて欠失した単頭HMM）。コンホメーションに依存して変化する Mg^{2+} -ATPase活性から、変異体HMMのコンホメーションを推定した。3種類の変異体においても野生型HMM同様の7.5S型から9S型へのコンホメーション変化が推定された。しかし、変異体HMMのうちsh-HMMでのみ、リン酸化による9S型から7.5S型へのコンホメーション変換が見られなかった。actin-activated ATPase活性は、脱リン酸化状態ではいずれの変異体HMMも野生型HMMと同様に低い値を示した。 Δ MD-HMMと Δ (MD+ELC)-HMMの活性はリン酸化によって2-3倍に上昇したが、sh-HMMではリン酸化による活性上昇は見られなかった。一つの頭部に相当するサブフラグメント1（S1）はリン酸化状態に関わらずリン酸化 Δ MD-HMMやリン酸化 Δ (MD+ELC)-HMMの活性とほぼ同様の値を示した。したがって、S2部位は9S型コンホメーションを維持し、活性を低く押さえる阻害部位として働いている可能性が示唆された。さらに、この相互作用の解除には2つのRLCがリン酸化されることが必要であることが示唆された。また、S1やリン酸化 Δ MD-HMMとリン酸化 Δ (MD+ELC)-HMMのactin-activated ATPase活性がリン酸化野生型HMMの活性の約1/5しかなかったことから、リン酸化野生型HMMのように高い活性を示すためにはMDが2つ必要で、MD間には活性上昇を促すような相互作用があることが示唆された。また、第一章の結果と相反するように見える結果は単頭ミオシンのフィラメント形成による影響と考えられた。

平滑筋ミオシンのリン酸化による調節機構として、リン酸化にともなうRLCの構造変化が調節ドメインからコンバーター領域を介してMDに伝わるという可能性がある。そこで、第三章では、この可能性を吟味するため、調節ドメインの構造変化をMDへ伝えられないような変異体HMMの作成を計画した。調節ドメインとMDの間には3つのイオン性結合が存在する。このイオン性結合を形成しているアミノ酸残基をアラニンに変え、3つのイオン性結合を1から順に3つまで消失させた変異体を作成した。これらの変異体HMMのうち3つともイオン性結合を消失させた変異体では、アクチンフィラメントの滑り運動を起こすことができず、MDとコンバーター領域の連結を欠失していることを確認した。しかし、このような変異体HMMにおいてもactin-activated ATPase活性は野生型と大きく変わることはなく、リン酸化による調節も保持されていた。したがって、リン酸化は調節ドメインからコンバーター領域を介してMDを活性化するのではなく、S2-頭部間の阻害相互作用を解除することによって活性化が起こると考えられる。すなわち、2つのRLCのリン酸化によってRLC間の相互作用が変化し、それによってS2-頭部間の阻害相互作用が解除されてミオシンはONになる。アクチンフィラメントと結合したミオシン

の両頭部のMD間に活性化相互作用が起こり、ミオシンは最大に活性化され、アクチンフィラメントの滑り運動を引き起こすのではないかと考える。

これまで、平滑筋ミオシンのリン酸化による調節機構にはどのようなドメイン間の相互作用が必要なのか明らかになっていなかった。本研究では、3つの重要な相互作用（2つのRLCの間、S2と頭部の間、及び2つのMDの間）を特定することが出来た。これに基づき、平滑筋アクチン-ミオシン系調節におけるミオシンIIの双頭構造の意義を明らかにした。

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

副 査 助 教 授 加 藤 剛 志 (旭川医科大学医学部)

副 査 室 長 尾 西 裕 文

(国立循環器病センター研究所循環器形態部)

学 位 論 文 題 名

平滑筋ミオシンのリン酸化依存調節機構に含まれる

分子内相互作用部位の解明

筋肉の収縮の基本反応は、ATP加水分解酵素活性 (ATPase) をもつミオシンとそれを活性化するアクチンという2種のタンパク質分子の相互作用であり、ATP加水分解反応のエネルギーを使って進行する。細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇すると筋肉は収縮し始めるが、収縮を制御する分子機構は筋肉のタイプにより異なる。平滑筋では、カルモジュリン-カルシウムイオン複合体の結合によりミオシン軽鎖キナーゼが活性化されミオシンの制御軽鎖がリン酸化されるとATPaseが活性化され収縮が始まる。ミオシン分子は重鎖1、必須軽鎖1、制御軽鎖1のヘテロ3量体1対で構成され、重鎖N末端約1/2と2種の軽鎖が頭部を形成し、重鎖のC末側残りがコイルドコイル構造を形成してできる尾部と結ばれた双頭構造をとる。ミオシン頭部はATP結合部位、アクチン結合部位を含むモータードメイン (MD) と2種の軽鎖を含む調節ドメインとがコンバーター領域でつながれた構造をとる。筋肉は、アクチンに結合したMDとS2と呼ばれる領域を介して尾部につながる調節ドメインとの相対角度がATPase活性に共役して変化することで収縮すると推論されている。本研究では、ATP結合部位から100 Å以上はなれた位置にある制御軽鎖のリン酸化がどのような分子機構でATPaseを活性化し、平滑筋の収縮を引き起こすのかを解明する目的で行われた。平滑筋ミオシンモノマーは尾部の伸びた6S型と尾部が折りたたまれた10S型の2種の形態をとり、リン酸化により6S型が安定化してフィラメントを形成することが示されている。申請者は、リン酸化によるミオシン分子の形態変化が、ATPaseの活性化、筋収縮制御に結びつくと考え、リン酸化による調節に必須の分子内相互作用を同定することで平滑筋収縮制御の分子機構を解明する研究に取り組んだ。

学位論文は、3章からなっている。第1章では、ミオシン分子の頭部間相互作用の意義に着目してプロテアーゼによる限定消化法で単頭ミオシンを調製し、リン酸化による分子特性の変化から双頭構造の意義を検討している。単頭でも、分子形態の変化はリン酸化に依存したが、平衡は6Sタイプに大きく偏っていることから非リン酸化状態でもフィラメントは形成されることを明らかにした。また、アクチン活性化ATPaseは非リン酸化状態でも高く、リン酸化による調節を受けるためには双頭構造が必須であることを明らかにした。

第2章では、バキュロウィルス発現系を用いて一方の頭部重鎖をN末端側から順に部分的

に欠失させた単頭変異体を作成し、制御に必要な頭部間相互作用について検討している。ミオシンを発現させるシステムが完成していない都合上、尾部の2/3を欠きフィラメント形成を持たない点を除けばミオシンと同じ機能をもつHMMを用いている。このため、7.5S型と9S型の間の分子形態変化が観察されるが、単頭HMMのうちでMDから調節ドメインまでを欠失したもの（sh-HMM）だけは、残っている1個の制御軽鎖をリン酸化してもアクチン活性化ATPaseは低い値のままであった。一方、頭部1個に当たる活性フラグメントS1は、リン酸化状態に依存せず高いATPase活性を示した。sh-HMMとS1はどちらも単頭構造であるが、前者はS2部位を持ち後者にはこれが無いので、S2部位は9S型を安定化し頭部のATPase活性を低く抑える阻害部位として働き、この阻害相互作用は一对の制御軽鎖のリン酸化により解除されるものと考えた。さらに、リン酸化により活性化される単頭HMMやS1のアクチン活性化ATPaseは、リン酸化された野生型HMMの活性の約1/5しかないことから、双頭構造中の2つのMD間には活性化相互作用がはたらくと推論した。

第3章では、前章と同じ発現システムを使い、1対の制御軽鎖のリン酸化による調節ドメインの構造変化が、S2による阻害効果を打ち消す相互作用について検討している。この構造変化が、調節ドメインとMDの間にあるコンバーター領域を経由してMDに伝わる可能性を考えて、この部分の高次構造を維持する3つのイオン性結合を1つずつ、2つ同時に、または、3つとも同時に消失させるようAla置換した変異HMMを作成した。得られた変異体のアクチン活性化ATPaseは、いずれもリン酸化による制御を受け、S2のMDに対する阻害相互作用は、コンバーター領域を介して伝わるわけではないこと、一对の制御軽鎖のリン酸化による調節ドメインの高次構造変化もコンバーター領域を介さずに阻害相互作用を解除してミオシンをスイッチオンの状態にすることが明らかになった。一方、*in vitro* モーティリティアッセイの結果から、イオン性結合を3つとも失った変異体はアクチンフィラメントを滑らせることができないことを見出し、調節ドメインとMDをつなぐ領域の硬い構造はアクチン活性化ATPase活性を筋収縮に共役させるために必須であることも証明した。

このように、申請者は、平滑筋ミオシンのリン酸化による調節機構に関して3つの分子内相互作用（S2と頭部間、1対の制御軽鎖間、1対のMD間）の同定に成功し、同時に長い間未解決であったミオシン分子の双頭構造の生理的意義を明かにし、これらの結果からミオシン分子内相互作用に基づく新たな平滑筋収縮制御機構を提唱した。本論文で述べられた成果は、筋収縮制御機構にとどまらず、ひろくリン酸化に依存する生理機能の制御機構の解明にも貢献するものであり、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。