

学位論文題名

平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼの
C末端ドメインの機能に関する研究

学位論文内容の要旨

平滑筋の収縮は、主としてミオシンの制御軽鎖(LC20)のリン酸化によって制御されている。 Ca^{2+} /カルモデュリン(CaM)によって活性化されたミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)がミオシンのLC20をリン酸化すると、ミオシンのアクチン活性化ATPaseが活性化されて平滑筋の収縮が起こる。平滑筋MLCKは、分子量約11万のタンパク質であり、そのC末端部分に分子量約1.7万の領域がある。その領域は独立した構造ドメインをつくっていると考えられるが、機能はまだ明らかにされていない。この研究は、MLCKのC末端ドメインの機能を調べることを目的におこなった。近年、MLCKのC末端ドメインと全く同じアミノ酸配列を持つタンパク質であるテロキンが、平滑筋細胞中に発現していることが見出された。テロキンは、平滑筋脱リン酸化ミオシンに結合し、そのフィラメントを安定化することが報告された。したがって、平滑筋MLCKはC末端ドメインでミオシンに結合するのではないかと考えられた。そこで、平滑筋MLCKのC末端ドメインをプロテオリシスによって除去し、それがMLCKのリン酸化活性に与える影響を調べた。また電子顕微鏡を用いた観察によりテロキンは、ミオシンの頭部-尾部連結部に結合することが明らかにされた。そこで同様に、HMMとMLCKの結合の様子を電子顕微鏡で観察し、MLCKがC末端ドメインでミオシンの頭部-尾部連結部に結合するかどうか調べた。

第1章では、まず、MLCKのC末端ドメインの除去を確認するために必要な抗テロキン抗体の調製について述べた。次いでMLCKのキモトリプシン消化に関する実験結果について述べた。MLCKをキモトリプシンを用いて限定消化すると、分子量約9.5万の断片と分子量約2.4万のテロキンとほぼ同じ大きさの断片が生成した。抗テロキン抗体を用いて、イムノブロットを行うと、後者のみが抗テロキン抗体によって検出され、キモトリプシン分解によりMLCKのC末端ドメインが切除されたことが確認された。また、このC末端ドメインが切除されたMLCKは、 Ca^{2+} /CaM依存性の酵素活性を維持していたことから、C末端ドメインのすぐN末端側で切断が起こったことがわかった。

第2章では、C末端ドメインを切除したMLCKの活性を測定し、C末端ドメインの機能について考察した。ミオシンを基質に用いるとMLCKの活性はC末端ドメ

インの切除に伴い減少した。またミオシン濃度を変化させて活性を測定したところ、C末端ドメインの切除にともなって K_m が増加した。よって、C末端ドメインを切断するとMLCKのミオシン結合が弱まることが分かった。また、基質を単離したLC20に変えて同様の実験をおこなった場合には、 K_m に変化は見られなかった。以上の結果から、MLCKのC末端ドメインはミオシンとの結合に関与することが示唆された。C末端ドメインは、酸性残基を多く含むので、ミオシンとの結合には静電相互作用が寄与すると考え、高イオン強度の条件下での同様の測定をおこなった。その結果、活性はイオン強度の増加とともに大きく減少した。また、高イオン強度での活性はC末端ドメインの切除やテロキンの添加による影響を受けなかった。よって、C末端ドメインは静電的にミオシンと相互作用していると考えられた。次に、C末端ドメインと全く同じ配列を持つテロキンを加えたときにMLCKの活性がどう変化するか調べた。ミオシンを基質としたとき、加えるテロキンを増すにしたがって活性は減少した。またミオシン濃度を変化させて活性を測定すると、テロキン量を増すにしたがって、 K_m が増加し、MLCKとテロキンが競争してミオシンに結合することが示唆された。基質にLC20やS1を用いた場合には、テロキンはMLCK活性に影響を与えなかった。これらの結果から、MLCKはC末端ドメインで、テロキンと同様にミオシン頭部-尾部連結部近傍に結合すると考えられた。

第3章では、HMM（尾部のC末端側2/3を欠くミオシン断片）、MLCK、キモトリプシンで限定分解したMLCK、HMMとMLCKの複合体をそれぞれ電子顕微鏡で観察した結果について述べた。MLCKは長さ約 40 nmの棒状の構造をとることがわかった。またN端やC端が折れ曲がり分子内で相互作用しているものもみられることから、その構造は柔軟性をもっていると考えられた。またATP、 Ca^{2+} /CaM非存在下でMLCKとHMMを結合させ、ゼロ距離架橋試薬であるEDCで架橋後、電子顕微鏡で観察した。その結果、HMMはミオシンと同様、2つの頭部と1本の尾部からなる双葉様の構造をとり、MLCKがミオシンの頭部-尾部連結部に結合することがわかった。前章の結果と合わせると、MLCKはそのC末端ドメインでミオシンの頭部-尾部連結部に結合することが明らかになった。

以上の結果をもとにミオシンとMLCKの相互作用と平滑筋の収縮調節機構について以下のような考察をした。MLCKは長さ約 40 nmでありC末端部でミオシンに結合する。一方、MLCKはそのN末端部分で細いフィラメントに結合することが報告されている。平滑筋の細いフィラメントと太いフィラメントの間の距離は約 15 nmであることが報告されているので、MLCKはN末端でアクチンフィラメントに結合しC末端でミオシンに結合することで弛緩状態の平滑筋の構造を維持するものと考えられる。外部からの刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加すると、MLCKは活性化され、複合体を形成しているミオシンを能率良くリン酸化することでミオシンを活性化し迅速に収縮が開始する。このときMLCKはミオシンフィラメントから解離するが、 Ca^{2+} 濃度が下がり筋肉が弛緩するとミオシンの脱リン酸化に伴い再結合すると考えられる。

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 助教授 加 藤 剛 志 (旭川医科大学医学部)

学 位 論 文 題 名

平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼの C末端ドメインの機能に関する研究

脊椎動物平滑筋の収縮は、ミオシンの制御軽鎖のリン酸化・脱リン酸化により制御されている。カルシウムイオンを結合したカルモデュリン (CaM) がミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK、分子量約11万) を活性化し制御軽鎖がリン酸化されるとミオシンのアクチン活性化ATPaseが活性化され収縮が始まる。平滑筋MLCKのC末端にある分子量約1.7万の領域は、独立したドメインと考えられているがその機能は明らかではない。一方、平滑筋細胞にはこのドメインと全く同じアミノ酸配列をもつテロキンと呼ばれるタンパク質がMLCKとは独立に発現しており、非リン酸化状態のミオシンに結合してミオシンのフィラメント構造を安定化する性質をもつことが示された。このことから、MLCKもC末端ドメインでミオシンに結合して重要な機能を果たすと推論されるが、詳細は明らかではない。本研究は、C末端ドメインを除去したMLCKの性質を調べることを出発点にして、MLCKのC末端ドメインの生理機能を明らかにする目的で行われた。

学位論文は、3章からなっている。第1章では、単離したテロキンを抗原に用いて抗体を作成し、これがMLCKのC末端ドメインを特異的に認識することをまず示した。次いで、MLCKをキモトリプシンで限定消化し、分子量約9.5万の断片と、分子量約2.4万のテロキンとほぼ同じ大きさの断片に分断する条件を見出した。抗テロキン抗体を用いてイムノブロットを行った結果、抗体はMLCKおよび2.4万の断片とのみ反応したことから、この条件でMLCKはN末端ドメインとC末端ドメインに分断できることを明らかにした。また、このC末端ドメインを切除したMLCKはCaM依存性の活性を維持していたことから、切断部位はCaM結合ドメインの直後にあり、2.4万の断片は意図したC末端ドメインのほぼ全域を含むことを明らかにした。

第2章では、C末端ドメインを切除したMLCKの酵素活性を測定してC末端ドメインの機能について考察している。ミオシンを基質に用いた場合には酵素活性はC末端ドメインの切除に伴い減少すること、さらに、これはKm値の増加に由来することを酵素活性のミオシン濃度依存性の測定結果から明らかにした。単離した制御軽鎖、またはミオシン頭部1個にあたる活性フラグメントS1を基質に用いて同様の測定をしてもKm値には変化が見られなかったことから、MLCKはC末端ドメインでミオシンに結合すると推論している。同様の実験を高イオン強度でおこなった場合酵素活性は大きく減少し、C末端切除の効果も見られなかったことから、この結合は静電相互作用に依存するものであることを示した。これらの結果は、MLCK活性のテロキン濃度依存性を測定することで支持された。ミオシンを基質とした

場合、高濃度のテロキンは K_m 値を増加させたが、制御軽鎖を基質にした場合には影響は見られなかった。以上の、測定結果に基づき、MLCKは、そのC末端ドメインでテロキンと同様にミオシンの頭部-尾部連結部近傍に、主として静電相互作用により結合すると推論した。

第3章では、MLCK、C末端ドメインを切除したMLCK、およびミオシンの双頭構造を維持した活性フラグメントHMM（尾部のC末端側2/3を欠く）の各分子、およびHMM-MLCK複合体を電子顕微鏡を用いて観察して前章までの結果を実証している。MLCKが長さ40 nmの柔軟性に富んだ棒状分子であること、そのC末端ドメインでHMMの頭部-尾部連結部に結合することを証明した。MLCKはN末端ドメインでアクチンフィラメントと結合するという報告をあわせると、MLCKはC末端ドメインで非リン酸化状態のミオシンと結合してミオシンフィラメントを安定化するとともに、両フィラメントを架橋することで弛緩時の平滑筋の構造を維持すると結論している。申請者は、以上の結果に基づき、以下のような平滑筋収縮制御モデルを提唱した。すなわち、弛緩時には、MLCKは2つのフィラメントを架橋しているが、外部からの刺激により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇すると架橋しているミオシンの制御軽鎖を能率よくリン酸化し筋収縮を迅速に始める。リン酸化とともに、MLCKはミオシンから解離し収縮が始まるが、カルシウムイオン濃度が下がり筋肉が弛緩するときには脱リン酸化に伴い再結合し弛緩状態に戻るというものである。

以上のように、申請者は、平滑筋収縮制御機構におけるMLCKの新規な生理機能を明らかにした。平滑筋組織には収縮特性の異なるものがあり、それぞれでテロキンの発現量が異なることが知られている。申請者は、非リン酸化ミオシンに対するテロキンとMLCKの競争効果を考慮することで、これらの収縮特性の違いをも説明できる可能性を明らかにした。本論文で述べられた成果は、多様な生理機能に対する平滑筋の精巧な収縮制御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。