

光架橋法による平滑筋ヘビームロミオシンの 制御機構の解析

学位論文内容の要旨

平滑筋の収縮を担うミオシンは ATP の加水分解と共役してアクチンフィラメントを滑らせるモータータンパク質である。平滑筋ミオシンは骨格筋や心筋ミオシンと同じ II 型ミオシンに分類され、二つの球状頭部と一本の長い尾部を持つ双葉様の構造をしている。頭部にはアクチン結合部位と ATP 加水分解 (ATPase 活性) 部位があり、一つの頭部だけでアクチンフィラメントを滑らせる (モーター活性) ことができる。尾部はコイルドコイル構造を形成し、双頭構造を安定化するとともに、ほかのミオシン分子と相互作用し、ミオシンフィラメントを形成する。

平滑筋ミオシンの ATPase 活性やモーター活性は頭部の付け根に結合している制御軽鎖 (RLC) のリン酸化により調節されている。すなわち、RLC の Ser19 がリン酸化されると ATPase 活性が上昇し、アクチンフィラメントを滑らせることができるようになり (ON 状態)、逆に RLC が脱リン酸化されると ATPase 活性が著しく抑えられアクチンフィラメントを滑らせることができなくなる (OFF 状態)。

このリン酸化による ON・OFF のスイッチが分子レベルでどのように行われるかという問題を明らかにするため、これまでに多くの研究がなされてきた。現在では次のような分子機序が幅広く受け入れられている。脱リン酸化状態での OFF 状態の形成には双頭構造が必要であり、頭部間に阻害相互作用が働いている。RLC の Ser19 がリン酸化されると二つの頭部の配向や運動性が変化し、阻害相互作用から解放され活性化される。さらに、様々な変異体ミオシンを用いた研究などから制御に関わる機能領域が明らかにされてきている。しかし、頭部間の阻害相互作用が具体的にどのような構造で起こっているのか、また二つの頭部の協同的な働きについての理解は十分になされていない。

このような阻害相互作用における二つの頭部の協同的な働きを考える上で、リン酸化状態の中間段階にある片方の頭部の RLC のみがリン酸化されている単リン酸化ミオシンは重要な情報を与えてくれると期待される。これまで報告された活性についての研究では、相反する結果が得られており、単リン酸化状態の性質についてはさらなる議論が必要とされている。そこで、本研究ではこの単リン酸化状態の構造上の性質を明らかにすることを目指した。

本研究では光架橋試薬 (ベンゾフェノン) 標識した RLC を持つ単リン酸化ヘビームロミオシン (1P-HMM) を調製し、その架橋反応性から単リン酸化状態の頭部の構造を調べた。脱リン酸化状態 (0P-HMM) では RLC と重鎖 (N 末端側 68-kDa 領域) の架橋、および RLC 同士の

架橋が検出された。これに対して、両頭部がリン酸化された状態 (2P-HMM) では RLC と重鎖の架橋が見られなくなった。この結果は RLC のリン酸化によって RLC と頭部重鎖の相対的な配置が変化していることを示している。1P-HMM では、脱リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した場合、0P-HMM と同じように RLC と重鎖、および RLC 同士の架橋が見られたのに対して、リン酸化 RLC をベンゾフェノン標識した場合、2P-HMM と同じように RLC と重鎖の架橋が見られなくなった。これらの結果は 1P-HMM の二つの頭部はそれぞれ異なる架橋反応性を示し、異なる配向をとっていることを示唆している。従って、単リン酸化状態では脱リン酸化状態ともリン酸化状態とも異なる構造上の性質を持っていることが明らかとなり、活性化状態もほかのリン酸化状態とは異なる可能性が示唆された。このことを基に平滑筋ミオシンの非対称な活性制御機構モデルを提示した。

本研究によりミオシンのリン酸化に依存した活性制御に重要な二つの頭部の構造変化についての新たな知見が得られ、特に単リン酸化状態の構造に関する情報を初めて示すことができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 菊 池 九 二 三
副 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 鈴 木 孝 紀

学 位 論 文 題 名

光架橋法による平滑筋ヘビーメロミオシンの 制御機構の解析

ミオシンは、ATPの加水分解と共役してアクチンフィラメントを滑らせ筋肉の収縮を引き起こすモータータンパク質である。ミオシン分子は、二つの球状頭部と一本の長い尾部を持つ双葉様の構造をしており、頭部にはアクチン結合部位とATP加水分解 (ATPase 活性) 部位があり、アクチンフィラメントを滑らせる (モーター活性) ことができる。尾部は、双頭構造を安定化するとともに、他のミオシン分子と相互作用してミオシンフィラメントを形成する。

平滑筋の収縮は、ミオシン頭部の付け根に結合している制御軽鎖 (RLC) のリン酸化により、ATPase活性やモーター活性を調節することで制御されている。すなわち、RLCのSer19がリン酸化されるとATPase活性が上昇し、アクチンフィラメントを滑らせることができるようになり (ON状態)、逆にRLCが脱リン酸化されるとATPase活性が著しく抑えられ、アクチンフィラメントを滑らせることができなくなる (OFF状態)。このリン酸化によるON/OFFのスイッチは、分子レベルで次のように考えられている。脱リン酸化状態では双頭構造の頭部間に阻害相互作用が働いてOFF状態を形成するが、RLCのSer19がリン酸化されると二つの頭部の配向や運動性が変化して阻害相互作用から解放され、活性化されるというものである。しかし、頭部間の阻害相互作用の構造的基盤や、二つの頭部の協動的な働きについての理解は十分ではない。これらの問題点を考えるとき、片方の頭部のRLCのみがリン酸化されている単リン酸化ミオシンは、リン酸化による活性化の中間体として重要な情報を与えてくれると期待される。本研究は、この単リン酸化ミオシンの構造的特性の解析からリン酸化に依存した収縮制御機構を明らかにすることを目的にして進められた。

学位論文は三章からなる。第一章では、平滑筋収縮制御機構に関する歴史と現状を整理し、未解決の問題点を提示した。これに基づき、ミオシンのリン酸化による平滑筋収縮の制御機構を解明するうえでの単リン酸化ミオシンの構造に関する研究の有用性を明らかにし、光架橋法を用いた研究法を立案・企画した。

第二章では、第一章の考察に基づいて進められた単リン酸化ミオシンの創製とその構造・機能研究の成果がまとめられている。遺伝子工学的に作製したRLC、およびリン酸化RLCのCys108を光架橋試薬 (ベンゾフェノン) で特異的に標識し、これをフィラメント形成能を持たない双頭フラグメントHMM (ヘビーメロミオシン) に50%交換導入後、クロマトグ

ラフィーにより脱リン酸化RLCが架橋標識された単リン酸化HMM、およびリン酸化RLCが架橋標識された単リン酸化HMMを単離する方法を確立した。ついで、これらの架橋反応性から単リン酸化状態の頭部の構造を調べた。脱リン酸化RLCをベンゾフェノン標識した単リン酸化HMMでは、非リン酸化HMMと同じようにRLCと重鎖N末端側68-kDa領域、およびRLC同士の架橋が見られることを見いだした。これに対して、リン酸化RLCをベンゾフェノン標識した単リン酸化HMMでは、リン酸化HMMの場合と同じようにRLCと重鎖の架橋が見られなくなった。つまり、単リン酸化HMMの二つの頭部はそれぞれ異なる架橋反応性を示し、非対称な異なる配向をとっていることを発見した。従って、単リン酸化状態は脱リン酸化状態ともリン酸化状態とも異なる構造上の性質を持つことが明らかになり、独自の活性化状態にある可能性を明らかにした。

第三章では、第二章で得た実験結果を基に、新規な平滑筋ミオシンの活性制御機構モデルを提唱した。非リン酸化状態でのRLCと重鎖の架橋反応性は、非対称な頭部間の阻害相互作用を反映するものと考え、これは非対称であるが故に単リン酸化では部分的にしか解除されず、二つの頭部がリン酸化されて初めて完全に解除されるという活性化機構は、第一章で述べられたこれまでの研究結果を満足するものである。

本論文で述べられたこれらの結果は、頭部間の阻害相互作用がリン酸化により解除される機構の構造的基盤をタンパク質化学的実験により明らかにしたものであり、X線結晶解析では得られなかった新たな知見として今後の平滑筋収縮機構解明の研究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）の学位を得るに十分な資格を有すると認めた。