

ミオシン頭部内のフレキシブル  
領域の分布と筋収縮エネルギー  
変換機構への関わり

(課題番号 05454617)

平成6年度科学研究費補助金  
(一般研究B)研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者

平塚 寿章

(旭川医科大学医学部助教授)

## は し が き

筋肉は生物のもつ化学-力学エネルギー変換器で一種の生物エンジンと言っても良い。ミオシンは筋肉運動の原動力を担うタンパク質であるが、その頭部にはアデノシン-5'-三リン酸(ATP)を結合して分解する酵素作用があり、この作用で得られる化学エネルギーを直接力学エネルギーに変換して筋肉を収縮させる。しかしながらこのエネルギー変換の分子機構については不明なことが多い。本研究では、ミオシン頭部内でアクチンやATPが結合すると構造変化が誘起されるフレキシブル領域の数とこれらの位置関係を知り、ミオシンで誘起される構造変化がタンパク質骨格の“柔らかさ”の変化に関与しているか否かについて検討する。これらの結果から、ミオシン分子がいかにしてタンパク質分子モーターとして働くのかを解明する端緒を得たい。

### 研究組織

研究代表者： 平 塚 寿 章  
(旭川医科大学医学部・助教授)

### 研究経費

平成5年度	5,200千円
平成6年度	1,600千円
計	6,800千円

# 研 究 発 表

---

## 1. 学 会 誌 等

- 1) 平塚寿章：4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABDF)のSH基反応性蛍光試薬としての有用性、生化学、65 (8)、1040、1993年8月
- 2) 平塚寿章：ミオシンのCys-707(SH1)に極めて近い領域におけるATPase反応に伴う構造変化の検出、生物物理、33 (9)、S76、1993年9月
- 3) 平塚寿章：4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABDF)のタンパク質の構造変化検出プローブとしての有用性、日本バイオイメージング学会誌、2 (1)、52～53、1993年10月
- 4) Toshiaki Hiratsuka：Behavior of Cys-707(SH1) in Myosin Associated with ATP Hydrolysis Revealed with a Fluorescent Probe Linked Directly to the Sulfur Atom, J. Biol. Chem., 268 (33), 24742～24750, 1993年11月
- 5) 平塚寿章：ミオシン頭部のATP結合ポケットはATP加水分解中は閉じているか固くなった構造をとる、生物物理、34 (9)、S115、1994年9月
- 6) 平塚寿章：筋収縮モータータンパク質ミオシン —構造・機能関連の新展開—、病態生理、13 (9)、731～739、1994年9月
- 7) 平塚寿章：ミオシン頭部のATP結合ポケットはATP加水分解中は閉じている、日本バイオイメージング学会誌、3 (1)、90～91、1994年10月
- 8) 平塚寿章：生物活性物質にランプをつける、現代化学、283 (10)、20～25、1994年10月
- 9) Toshiaki Hiratsuka：Nucleotide-Induced Closure of the ATP-binding Pocket in Myosin Subfragment-1, J. Biol. Chem., 269 (44), 27251～27257, 1994年11月
- 10) 平塚寿章：蛍光標識生物活性物質 —ライフサイエンス研究への新展開—、蛋白質・核酸・酵素、39 (14)、2322～2334、1994年11月

- 11) 平塚寿章：ミオシンATP結合ポケットの構造変化、日本生体エネルギー研究会誌、20、146～147、1994年12月
- 12) 平塚寿章：ミオシンのATP結合ポケットの構造変化と筋収縮、生物物理、34、印刷中、1995年

## 2. 口頭発表

- 1) Toshiaki Hiratsuka : Behavior of Cys-707(SH1) in Myosin Associated with ATP Hydrolysis Revealed with a Fluorescent Probe Linked Directly to the Sulfur Atom, 筋収縮タンパク質に関するゴードン会議、1993年7月20日
- 2) 平塚寿章：4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABDF)のSH基反応性蛍光試薬としての有用性、第66回日本生化学会、1993年10月4日
- 3) 平塚寿章：ミオシンのCys-707(SH1)に極めて近い領域におけるATPase反応に伴う構造変化の検出、第31回日本生物物理学会、1993年10月12日
- 4) 平塚寿章：4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABDF)のタンパク質の構造変化検出プローブとしての有用性、第2回日本バイオイメーキング学会学術集会、1993年10月15日
- 5) 平塚寿章：ミオシン頭部のATP結合ポケットはATP加水分解中は閉じているか固くなった構造をとる、第32回日本生物物理学会、1994年9月29日
- 6) 平塚寿章：ミオシン頭部のATP結合ポケットはATP加水分解中は閉じている、第3回日本バイオイメーキング学会学術集会、1994年10月15日
- 7) 平塚寿章：ミオシンATP結合ポケットの構造変化、生体エネルギー研究会第20回討論会、1994年12月20日

# 研 究 成 果

---

## 【 研 究 目 的 】

筋肉は生物に備わっている化学-力学エネルギー変換器で一種の生物エンジンと言っても良い。このエンジンは化学エネルギーから直接力学エネルギーを産生しているため、エネルギー変換効率が非常に高い上に均一温度でも働き、自在にその効率を変調できるし、スイッチのON-OFFも0.1秒以内と非常に速い。他方人工エンジンは、化学エネルギーを熱または電気に変換した後でこれを力学エネルギーに変換するので筋肉よりもはるかに効率が悪く、そのエネルギーの大半は使われずに失われてしまう。もしも筋肉のようにエネルギーの直接変換で働くエンジンが開発されると、燃料の消費や廃棄物も減少するので、産業の発展のみならず地球環境保護にも貢献する。しかしこれを実現するためには、筋収縮エネルギー変換機構について解決しなければならない問題が山積している。

筋収縮の原動力を担うタンパク質であるミオシン分子の頭部(S-1)は、アデノシン-5'-三リン酸(ATP)を水解する酵素作用(ATPase)で得られる化学エネルギーを直接力学エネルギーに変換し、別の筋肉タンパク質であるアクチンと相互作用しつつ筋肉を収縮させる。ミオシンがタンパク質分子モーターと言われる理由はここにある。例えて言うならば、ミオシン分子はATPという燃料を燃やしながらアクチンフィラメントで作られているレールの上を走る機関車である。現在のところ、ミオシンという機関車がどのようなメカニズムで走るのかについては余り良くわかっていない。

筋収縮の分子機構を考える上で、アクチンやATPが結合した時にミオシン頭部内で起きるタンパク質の立体構造変化は重要な意味をもつ。ミオシンに結合しているアクチンはATPが結合すると解離し、また逆にアクチンが結合しているとミオシンのATPに対する親和性は著しく低い。アクチンとATPの結合部位はS-1上の異なった離れた場所に局在することがわかっている。従って、アクチンとATPの結合部位は各々一方で起きた構造変化を他方へ伝播させることによって互いに“通信”し合っていると考えなければならない。しかしながらこの考え方が必ずしも正しいかどうかは現在のところ不明である。それは、タンパク質の構造変化が“通信”の手段になるとしたら、それはかなり大規模な構造変化でなければならないのに、ミオシン

にアクチンやATPが結合してもそんなに大きな構造変化が検出されていないからである。

従来の考え方では、タンパク質をどちらかというところと剛体のように仮定し、その立体構造変化を検出する場合は、タンパク質の第二構造である $\alpha$ -ヘリックスの構造変化のみを問題とすることがほとんどであった。ところが最近、タンパク質はもっとフレキシブルな性質をもつのみならず、さまざまなモードの“揺らぎ”を示すことが多くの酵素などで明らかになってきた。ミオシン頭部について考えてみると、これが筋肉タンパク質の中でも際立って“柔らかい”ことが知られている。この事実を重視すると、ミオシン頭部にアクチンやATPが結合して誘起される構造変化の本質は、ミオシン頭部内の複数のフレキシブル領域で起きる“柔らかさ”の変化がもたらした“揺らぎ”のモードの変化であることも考えられる。

本研究ではこの点を重視して、ミオシン頭部内でアクチンやATPが結合すると構造変化が誘起されるフレキシブル領域の分布を探り、これらの領域に誘起される構造変化がどのようなタイプのものか、またそれがミオシンのモータータンパク質としての機能にどのように関わっているのか検討した。

## 【 研究 方 法 】

- (1) ウサギ骨格筋より常法に従い、ミオシンとアクチンを調製した。ミオシンにはさらにキモトリプシンを作用させて、ミオシン頭部(S-1)を単離してこれを実験に使った。
- (2) S-1の20K部分にある反応性の高いCys-707(SH1)を、蛍光性試薬である4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABDF)で標識し、ABD-S-1を得た。
- (3) S-1のATP結合ポケットに選択的に結合する蛍光色素を探すために、60種以上もの色素について試してみた。その結果、3-[4-(3-フェニル-2-ピラゾリン-1-イル)ベンゼン-1-スルホニルアミド]フェニルホウ酸(PPBA)がこの目的に最適なことがわかった。
- (4) SH1に標識されているABD基やATP結合ポケットに結合しているPPBAの蛍光特性が、ATPやアクチンの結合によって変化する様子を解析した。
- (5) またこの時、これら蛍光団の周囲のポリペプチド鎖の柔らかさが変化したか否かも、アクリルアミドによる蛍光の消光実験で調べた。

## 【 研究結果と今後の展望 】

SH1を特異的に標識する蛍光試薬としては *N*-(ヨードアセチル) - *N'*-(5-スルホ-1-ナフチル)エチレンジアミン (IAEDANS) のみが知られ、現在までにこれを利用した研究が多数報告されている。本研究では、ABDFもSH1を特異的に標識する蛍光試薬であることが明らかになった。

IAEDANSとは異なり、ABDFを使うと蛍光団であるABD基をSH1のS原子のすぐ隣に標識することができる。そのためATPやアクチンなどの結合によるSH1近傍の構造変化を感度よく捉え、これを蛍光スペクトル変化として検出することができた。これらの変化を詳細に解析した結果、S-1にATPが結合するとSH1はタンパク質内部に埋もれるような構造変化を起こし、この変化の程度はATPの加水分解の各ステップに対応していることが明らかになった。本研究で得られた結果から、SH1周辺もフレキシブル領域の一つであり、ミオシンがモータータンパク質として機能するのに重要に関わっていることが示唆された。

一方PPBAを使った実験からは、ミオシンのATP結合ポケット自身も非常にフレキシブルであることが明らかになった。疎水性の高いPPBAはS-1のATP結合ポケットに1モルが特異的に結合し、この時蛍光強度の増大が観察された。

S-1とPPBAの二元複合体にATPなどのヌクレオチドを加えると、PPBAは置換されてしまうがATP結合ポケットからは追い出されずに、新しい結合部位に結合したままATP結合ポケット内部にトラップされてしまうことがわかった。PPBAとS-1の複合体についてアクリルアミドによる消光実験で調べたところ、本来揺らぎの大きな構造をとっているATP結合ポケットは、ATPの加水分解中だけ揺らぎの小さな硬い構造をとることが示唆された。

本研究では、ミオシン頭部のSH1周辺とATP結合ポケット自身がフレキシブルな性質をもつことが明らかになった。しかしこれらの結果だけから、S-1のフレキシブル領域で起きる構造変化が筋収縮運動へとつながってゆく様子をスムーズにイメージするのは難しい。今後の課題は、このようなフレキシブル領域で起きる構造変化が、どのようにしてより次元の高い筋肉の滑り力発生のための動きに連動してゆくかを別の方法を使って解明することである。

# 研 究 論 文

---

- (1) . . . 生化学、65 (8)、1040、1993年
- (2) . . . 生物物理、33 (9)、S76、1993年
- (3) . . . 日本バイオイメージング学会誌、2 (1)、52~53、1993年
- (4) . . . J. Biol. Chem., 268 (33), 24742~24750, 1993年
- (5) . . . 生物物理、34 (9)、S115、1994年
- (6) . . . 病態生理、13 (9)、731~739、1994年
- (7) . . . 日本バイオイメージング学会誌、3 (1)、90~91、1994年
- (8) . . . 現代化学、283 (10)、20~25、1994年
- (9) . . . J. Biol. Chem., 269 (44), 27251~27257, 1994年
- (10) . . . 蛋白質・核酸・酵素、39 (14)、2322~2334、1994年
- (11) . . . 日本生体エネルギー研究会誌、20、146~147、1994年
- (12) . . . 生物物理、34、印刷中、1995年