

生化学的に重要な部位をブロック
したミオシンの in vitro 運動再
構成系での解析

(課題番号 03454555)

平成4年度科学研究費補助金
(一般研究B)研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 平 塚 寿 章

(旭川医科大学医学部)

は し が き

筋肉は生物のもつ化学ー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、生化学的に重要であると言われている部位が、真に筋肉運動に必須な部位であるか否かについて、in vitro 運動再構成系で解析することを意図して進められた。

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3年度	4,300千円
平成4年度	1,600千円
計	5,900千円

研 究 発 表

1. 学 会 誌 等

- 1) 平塚寿章：ミオシン頭部へのATP結合により構造変化を受ける領域の検出、生物物理、31 (9)、1991年9月
- 2) 平塚寿章：差蛍光ラベリング法に使える試薬の検索とミオシンATPase研究への応用、生化学、63 (8)、1991年8月
- 3) 平塚寿章：ATPase反応に伴うミオシン頭部のCys-697の"動き"、日本生体エネルギー研究会誌、17、1991年12月
- 4) Toshiaki Hiratsuka : Movement of Cys-697 in Myosin ATPase Associated with ATP Hydrolysis, J. Biol. Chem., 267 (21), 14941~14948, 1992年7月
- 5) Toshiaki Hiratsuka : Spatial Proximity of ATP-sensitive Tryptophanyl Residue(s) and Cys-697 in Myosin ATPase, J. Biol. Chem., 267 (21), 14949~14954, 1992年7月
- 6) 平塚寿章：筋収縮に伴うミオシンの構造変化を蛍光標識法を利用してリアルタイムで検出するための基礎研究、日本バイオイメージング学会誌、1 (1)、1992年10月
- 7) 平塚寿章：ミオシン頭部のSH2(Cys-697)とATP感受性Trp残基の距離の測定、生物物理、32 (10)、1992年10月
- 8) Toshiaki Hiratsuka : Specific Labeling of Cys-707 in Myosin ATPase with a Fluorophore Directly Linked to the Sulfur Atom to Monitor Structural Changes in the Immediate Vicinity of the Thiol, J. Biol. Chem. (発表予定)、1993年
- 9) Toshiaki Hiratsuka : Reactive Thiols Cys-707(SH1) and Cys-697 (SH2) in Myosin ATPase Behave in Opposite Manner upon Binding and Hydrolysis of ATP, J. Biol. Chem. (発表予定)、1993年

2. 口 頭 発 表

- 1) 平塚寿章：ミオシン頭部へのATP結合により構造変化を受ける領域の検出、第29回日本生物物理学会、1991年9月26日
- 2) 平塚寿章：差蛍光ラベリング法に使える試薬の検索とミオシンATPase研究への応用、第64回日本生化学会、1991年10月2日
- 3) 平塚寿章：ATPase反応に伴うミオシン頭部のCys-697の"動き"、生体エネルギー研究会第17回討論会、1991年12月16日
- 4) Toshiaki Hiratsuka : Nucleotide-Induced Conformational Changes around SH₂ of Myosin S-1, International Conference –Muscle as a Machine: Energy Transduction in the Contractile System–, 1992年4月13日
- 5) 平塚寿章：ATP結合によりミオシン頭部に誘起される立体構造変化の筋収縮エネルギー変換機構へのかかわり、第43回タンパク質構造討論会、1992年10月13日
- 6) 平塚寿章：筋収縮に伴うミオシンの構造変化を蛍光標識法を利用してリアルタイムで検出するための基礎研究、第1回日本バイオイメーjing学会学術集会、1992年10月16日
- 7) 平塚寿章：ミオシン頭部のSH₂(Cys-697)とATP感受性Trp残基の距離の測定、第30回日本生物物理学会、1992年11月5日

3. 出 版 物

- 1) Toshiaki Hiratsuka : Muscle as a Machine –Energy Transduction in the Contractile System– (M. F. Morales, ed.) pp. 70~74, Forgarty International Center, 1992年12月20日 (分担執筆)

研 究 成 果

【 研 究 目 的 】

筋肉の収縮は、各々が筋タンパク質のミオシンとアクチンで構成されている二種類のフィラメントが互いに滑り合うことによって起きる。ミオシンはアクチンと結合するのみならず、アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) を水解する酵素作用(ATPase)も合わせもち、この作用で得られる化学エネルギーを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。

ミオシン分子の頭部 (S-1) は重鎖と軽鎖より成っていて、重鎖はさらに20K、50K、23Kの三つのペプチド部分に分けられ、これら三つのペプチド部分が各々機能単位としてのドメイン構造をとっている可能性も指摘されている。最近、筋収縮の分子機構を考える上で、ATPやアクチンが結合する時にS-1内部に誘起される立体構造変化が重要視されてきている。それは、筋収縮の詳細な分子機構を説明するために長い間使われてきた「首ふり説」に否定的なデータが相次いで出されてきたからである。「首ふり説」に代わるいくつかのモデルの中で、最も可能性の高いモデルとして、「ミオシンは筋収縮中に首はふらないが、S-1の内部構造が一部変形してアクチンフィラメントに滑り込む」というものがある。

現在のところ、ATP が結合する部位はS-1の23Kと50Kペプチド部分に、またアクチンが結合する部位は20Kと50K部分に局在していると考えられている。一方、これらの部位とは別に、S-1の20K部分の反応性の高いCys残基であるSH1(Cys707)とSH2(Cys697)を含む領域は非常にフレキシブルで、この領域はさらに23K部分とも50K部分とも立体構造的には非常に近接していることを、我々は最近見出した。さらに、このペプチド-ペプチド接触部位を構成するアミノ酸残基について検討したところ、50K部分には反応性の高い2モルのLys残基が、そして23K部分には反応性の高い1モルのSer残基

が関与していることがわかった。非常に重要なことは、SH1やSH2も含めてこれらの残基は総て直接的なアクチンの結合や ATPase の触媒反応には関与していないにもかかわらず、ミオシンにATPが結合すると程度の差はあるが一様に“動く”ことである。従って、この三つのペプチド部分が総て近接している領域は、ATP やアクチンの結合部位とは異なる領域ではあるが、筋収縮の分子機構に係わっている第三の重要部位と思われる。

しかしながら現在までの研究では、この領域の重要性を生化学的に証明しているのに過ぎない。本研究計画では、問題とする重要部位を構成するアミノ酸残基を化学修飾試薬で特異的にブロックしたミオシンやヘビー・メロミオシンを調製し、これらを *in vitro* 運動再構成系で解析することを目的とする。この解析結果から、問題とする重要部位にあるアミノ酸残基が、筋収縮の分子機構を考える時に、真にミオシン分子に必須のものなのか否かが明らかになる。

【 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。ミオシンには更にキモトリプシンを作用させて、ヘビーメロミオシン(HMM)を得た。
- (2) HMM 頭部の20K部分にある反応性の高いCys-707(SH1)とCys-697(SH2)を、各々5-ヨードアセトアミドフルオレセインと2-(4'-マレイミジルアニリノ)ナフタレン-6-スルホン酸でブロックしたIAF-HMMとMIANS-HMMを調製した。対照サンプルとして、SH1をヨードアセトアミドでブロックしたIA-HMMも調製した。
- (3) ニトロセルロース膜にIAF-HMMとMIANS-HMMを吸着させ、次に血清アルブミン溶液を加えてHMMが吸着していない膜面をブロックした。さらにローダミンファロイジンで蛍光標識したアクチンを加えると、アクチンはニトロセルロース膜に吸着しているHMM

に結合した。ここにATPを加えると、アクチンが HMM と相互作用しつつニトロセルロース膜上を運動し始めた。この運動様式を観察し、SH1やSH2 が実際に筋肉収縮に関与しているか否かを判定した。

【 研究結果と今後の展望 】

IAF-HMMおよびMIANS-HMMについてその生化学的特性を調べたところ、各々目的通りにCys-707(SH1)とCys-697(SH2)が特異的にブロックされていることが示された。

これらのサンプルを *in vitro* 運動再構成系で解析したところ、どちらの HMM も著しくアクチンの運動を阻害していた。その阻害の程度は IAF-HMM の方がMIANS-HMMよりも大きかった。対照実験として、より分子サイズの小さなヨードアセトアミドを使ってSH1を特異的にブロックしたHMM(IA-HMM)を調製して同様の測定を行ったところ、アクチンの運動の阻害の程度は IAF-HMM より小さかった。

以上の結果だけからは、SH1やSH2 が真に筋収縮運動に必須なアミノ酸残基であるか否かについては結論することは出来なかった。SH1やSH2 をブロックしたことによるアクチン運動の阻害は、用いられた化学修飾試薬の分子サイズが大きいために誘起された、立体障害によるという可能性が残された。そこでこの点をより明らかにするために、IA-HMMとIAF-HMM の中間に位置する分子サイズをもつ化学修飾試薬によるSH1のブロック方法について検討した。数種類の試薬について検討したところ 3,4-(アミノスルホニル)-7-フルオロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾールがSH1を特異的にブロックすることが明らかになった。得られたサンプル(ABD-HMM)は、SH1にIA-HMMよりは大きく、IAF-HMMよりは小さな分子サイズの化学修飾試薬が結合しているので、今後 ABD-HMMを使った *in vitro* 運動再構成系での解析を行うと本研究計画の目的が達成されると期待される。