

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

大和証券ヘルス財団の助成による研究業績集(1991.03) 15号:1~6.

ミオシンATPaseを阻害するペプチドの研究と進行性筋ジストロフィーの治療法開発への応用

平塚寿章

ミオシンATPaseを阻害するペプチドの研究と 進行性筋ジストロフィーの治療法開発への応用

旭川医科大学医学部化学教室

助教授 平塚寿章

I はじめに

進行性筋ジストロフィーは主として四肢近位部をおかす疾患であるが、進行が速く予後も不良で患者はベッドに寝たきりで20歳前後で短い一生を終えるため社会的関心も高い。その発症機構の詳細は不明であるが、まず何らかの原因で1)筋細胞膜の透過性が増し、2)細胞外液 Ca^{2+} が細胞内に流入して、3) Ca^{2+} 依存性中性プロテアーゼ(CANP)が活性化され、4)筋タンパク質が分解されて崩壊してしまう、という“膜説”が現在最も有力な説として提唱されている。¹⁾

最近の分子遺伝学の目ざましい発展により、筋ジストロフィーの発症メカニズムの核心に触れる発見がもたらされた。それは膜関連タンパク質“ジストロフィン”の発見である。ジストロフィンは正常骨格筋や心筋ではその表面膜に局在しているが、Duchenne型筋ジストロフィー疾患筋では欠損している。ジストロフィンの役割は現在のところほとんど不明であるが、考えられる役割としては、細胞膜のタンパク質と結合して筋質膜直下にネットワークを形成し、筋線維の形質膜の保持および強化に重要な役割を演じていることが挙げられる。²⁾ 従ってジストロフィンが発見された現在でも、ジストロフィンの欠損が原因で筋細胞膜に異常が起り、上述した膜説の1)から4)のプロセスが引き起こされると考えると、依然として膜説が有力なまま残されている。

我々は筋収縮において中心的な役割をもつタンパク質ミオシンの構造と機能について研究し

ている関係上、この疾患でアクトミオシンATPase活性の低下が観察される点に興味をもった。しかしながら多くの研究者達の報告をみると、アクトミオシンATPase活性の低下は、少なくとも疾患の早期では必ずしもミオシンが分解されたためだけとは言えない。そうだとすると、ゲル電気泳動法等の手段で調べる限りでは構造的には正常筋と全く区別できないが、実際は活性の低下しているミオシンが早期の疾患筋では生じていると考えざるを得ない。そこで一つの仮説として、上述した膜説の3)で活性化されたCANPが、疾患の早期ではミオシンを分解してしまうというよりミオシン以外の筋タンパク質を分解して、その結果生成されたペプチド断片がミオシンATPaseの重要部位に阻害剤として結合してしまう、と考えた。

この考えが正しいか否かを確かめる一つの方法は、まず阻害剤等の結合によりミオシンATPase活性が影響を受けるようなそんな重要部位がミオシンには存在するのかということ、第二にミオシンATPase活性を阻害してしまうペプチドを見い出してその一次構造を決定し、これと同じか良く似ている一次構造をもつペプチドが疾患筋で出現しているか否かを検討することである。このようなペプチドが見つければ、これをウサギ骨格筋の生筋等に作用させて人為的な筋無力状態モデルを確立することができる。このようなモデルは、進行性筋ジストロフィー症早期での筋力低下の原因解明を助けるのみならず、ある薬物や治療法が本疾患に有効か否か

を簡便にテストすることも可能にしてくれる。

II 研究計画

研究は、以下のとおり4段階に分けて進めることとした。

- (1) ミオシンATPase, アクトミオシンATPase, 筋収縮等を阻害するペプチドの探索
- (2) ミオシンATPaseにおいて, リガンドの結合によりATPase活性の発現や筋収縮に必須な構造変化の誘起が妨げられるような重要部位の検出
- (3) (1)で見い出されたペプチドの一次構造の決定と, 筋タンパク質中でこれと同じか良く似た一次構造の探索
- (4) (1)で見い出されたペプチドの生筋への添加による筋無力状態モデルの確立

以上のうち, (1)に関しては沖縄産海綿から目的のペプチドを発見し単離することができた。(2)については蛍光標識法により, ミオシンATPaseにはATPが結合する部位以外に, 筋収縮におけるエネルギー変換過程に関連している重要部位が存在することをつきとめた。これらの結果は, 今後の(3), (4)の研究に目途をつけた。以下では, (1), (2)を中心として得られた結果を報告する。

III 実験

(1) ミオシンATPase阻害ペプチドの調製

ミオシンATPaseを阻害するペプチドを産生する海綿は, 約150種の沖縄産海綿の水溶性抽出物をスクリーニングした結果, 最初はケラマ諸島の水深約20mで採集されたものから単離精製された。³⁾ 今回同じ採集地ではほとんど採集できず, これより遠くの与那国島で同種類と思われるものを採集した。この海綿を原料として, すでに報告している方法により単離されたペプチドを調べたところ, 以前得られたのと同じ物と思われるミオシンATPase阻害ペプチドが得られたので, これを今回の実験に用いた。

(2) ミオシンATPaseとアクチンの調製

ミオシンとアクチンは常法によりウサギ骨格筋から調製した。ミオシンにさらにキモトリプシンを作用させて, ミオシンATPase部分を含むミオシン頭部(S-1)を調製した。

(3) ミオシンATPaseの蛍光標識

ATPやアクチンそして阻害剤等の結合によるミオシンATPase(S-1)の立体構造変化を実時間で追跡するにはS-1の3つのドメイ

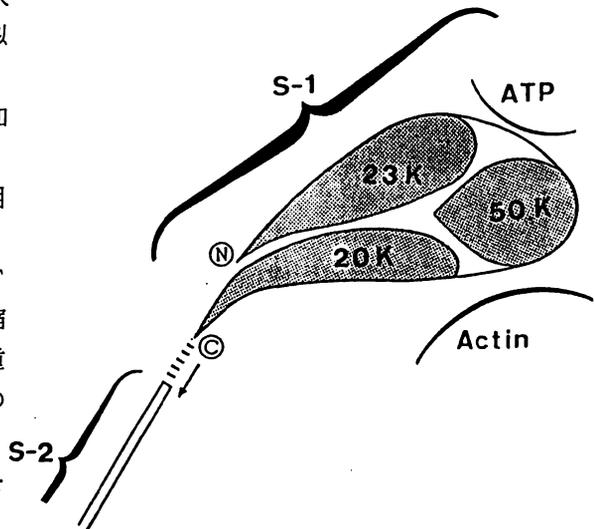


図1 ミオシンATPase部分を含むミオシン頭部(S-1)のドメイン構造

影の部分は23K, 50K, 20Kの各ドメインを, ⊗と⊙は各々S-1の一次構造におけるN末端とC末端を表す。本来のミオシン分子では, S-1部分はS-2部分と結ばれていてさらにミオシン尾部へと続いている。現在までにわかっているATPとアクチンの結合部位も示してある。

ン各々に適当なプローブを化学的に結合させると有効な場合が多い(図1)。種々の蛍光試薬

の中にはタンパク質の構造変化を鋭敏に反映してその蛍光特性を変えることにより有用な情報を与えてくれるものがあるので、まずこの目的に合った蛍光団を検索してこれらを各ドメインに特異的に化学結合させる方法を検討した。100種類以上の蛍光試薬を検討した結果、9-アントロイルニトリル(ANN)、4-フルオロ-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(NBD-F)、5-ヨードアセトアミドフルオレッセイン(IAF)が各々23K、50K、20Kドメインと特異的に反応し、ミオシンに種々のリガンドが結合した時の各ドメインの立体構造変化を感度良く知らせてくれることがわかった。以下、23K、50K、20Kの各ドメインの一つだけが蛍光標識されたS-1を各々AN-S-1、NBD-S-1、IAF-S-1と呼ぶ。

IV 結果と考察

(1) ミオシンATPase阻害ペプチドの性質

沖縄産海綿の水溶性抽出物をスクリーニングして単離されたミオシンATPase阻害物質は分

表1 ミオシンATPase阻害ペプチドのアミノ酸組成

アミノ酸	アミノ酸の数
アスパラギン酸	5
トレオニン	3
セリン	5
グルタミン酸	6
プロリン	3
グリシン	9
アラニン	4
シスチン(1/2)	2
バリオン	4
メチオニン	0
イソロイシン	3
ロイシン	4
チロシン	2
フェニルアラニン	2
リジン	4
ヒスチジン	1
アルギニン	3
トリプトファン	0
全残基数	60
分子量(アミノ酸組成より計算)	6,325

子量が約6,300のペプチドであった。そのアミノ酸組成をみると、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシンに富み、極性アミノ酸と疎水性アミノ酸をほぼ1:1の割合で含む典型的な両親媒性ペプチドであった(表1)。このペプチドは、水、メタノール、アセトンに可溶であった。

(2) ミオシンATPase阻害ペプチドの作用

このペプチドはミオシンやアクトミオシンのATPase活性だけではなく、ミオシン頭部だけから成るS-1のATPase活性も同じように阻

表2 ミオシンATPase阻害ペプチドによる各種ミオシンATPase活性の阻害定数

阻害定数は各ATPase活性を50%阻害するのに必要なペプチドの濃度(ng/ml)で表してある。

タンパク質	Ca ²⁺ -ATPase活性	K ⁺ -EDTA-ATPase活性	Mg ²⁺ -ATPase活性
ミオシン	15	23	118
S-1	3.3	5.0	17
アクトミオシン	—	—	9.5

害した(表2)。この結果は、ペプチドがミオシン頭部に作用してそのATPase活性を阻害していることを示している。何れのアッセイ系でもペプチドが10~400ng/ml存在するだけでATPase活性が完全に阻害されるので、このペプチドはかなり強力なミオシンATPase阻害剤といえる。

アクトミオシンがATPと反応するとアクチンとミオシンが凝集し、次いで沈殿の形成がすみやかに起きることが知られている。この過程は660nmの吸光度変化を測定することにより追跡可能で、これを超沈殿反応と呼び筋収縮の試験管内モデルと考えられている。アクトミオ

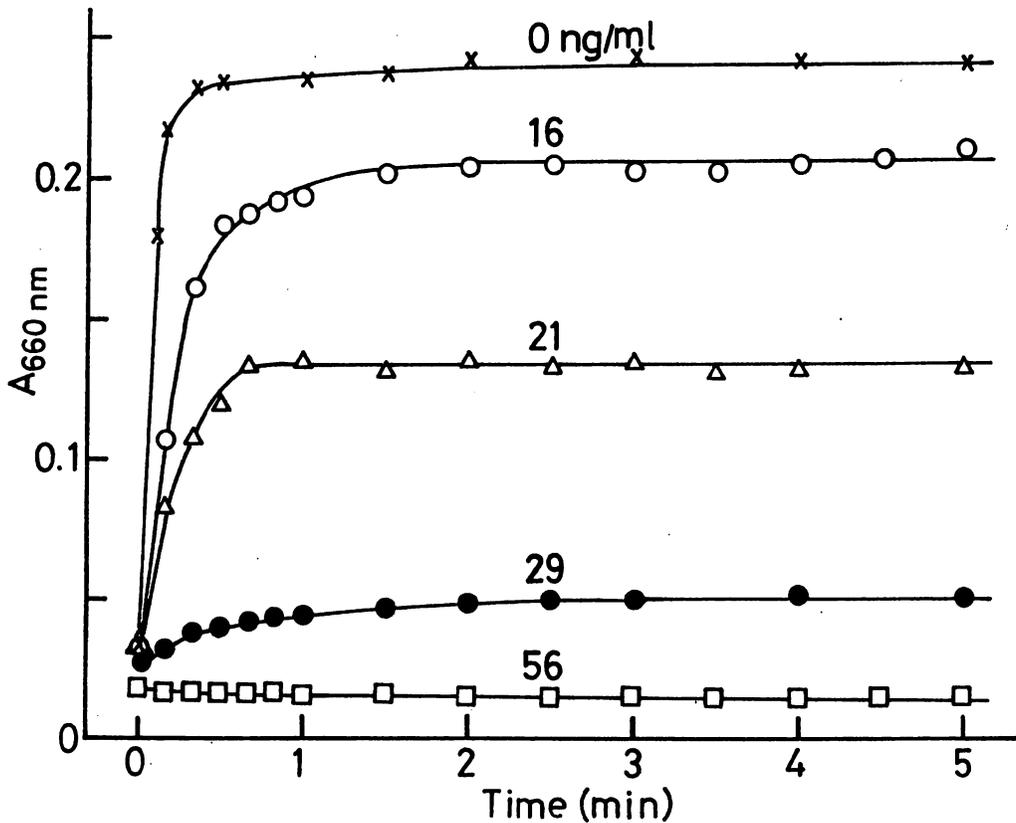


図2 アクトミオシン超沈殿反応に対するミオシンATPase阻害ペプチドの影響

データの上に共存するペプチドの濃度を示してある。

シンの超沈殿反応に対するペプチドの作用について検討した結果を図2に示してある。共存するペプチドの濃度が増すにつれて、アクトミオシンの超沈殿反応に対する阻害の程度も大になり、ペプチド濃度が56 ng/mlでは全く超沈殿反応は起きなかった。この結果は、海綿から単離されたペプチドがミオシンATPaseのみならず、筋収縮も阻害してしまうことを示唆している。

(3) ミオシンATPase上の活性部位以外の重要部位の検討

図1に示したように、ミオシンATPaseを含むS-1は現在3つのドメインに分けて研究されている。筋収縮の化学エネルギー源であるA

TPは23Kと50Kドメインの両方に、筋収縮時に起きる滑り運動においてミオシンのパートナーとなるタンパク質アクチンは20Kと50Kドメインの両方に各々結合すると考えられている。しかしながら我々の最近の研究では、ミオシンATPaseの基質であるATPが結合して加水分解される部位(活性部位)以外にも、ミオシンが筋収縮のエネルギー変換を行う過程で重要な役割を担う部位が存在することが示唆されている。⁴⁻⁷⁾

ミオシンATPase阻害ペプチドのミオシン上での作用部位は現在のところ余り良くわかっていない。最も高い可能性として、このペプチドが上述したような活性部位以外の重要部位に強

く結合してミオシンATPase 活性や筋収縮を阻害していることが考えられる。この可能性を検討するために、ミオシンATPase の3つのドメインを各々特異的に感度の高い蛍光プローブで標識することを試みた。

100種類以上もの蛍光標識試薬を使って検討を重ねた結果、目的に適したものとしてAN-S-1, NBD-S-1, IAF-S-1の3種類の蛍光標識S-1が得られた。⁸⁻¹⁰⁾ これらのS-1誘導体は各々23K, 50K, 20Kのドメインの一つだけに感度の高い蛍光プローブが各々導入されており、ATPや阻害剤が結合した時に各ドメインで起きる構造変化を実時間で蛍光スペクトル変化として知らせてくれる。これらのS-1のATPase 活性は何れも元の活性の約200%程度となっているので、蛍光プローブが標識されてもATPが結合して加水分解されるというミオシン本来の性質は変わっていない。

表3 ADPとオルトバナジン酸(V_i)の結合によるS-1の構造変化の各ドメインへの伝播

k_{obs}^{max} と KV_i は各々活性部位で生じた構造変化の伝播速度定数の最大値とこの半分速度定数を与えるのに必要な V_i の濃度を表している。

ドメイン	k_{obs}^{max} (S ⁻¹)	KV_i (mM)
23K	0.05	0.2
50K	0.03	0.3
20K	0.04	0.4

オルトバナジン酸(V_i)は無機リン酸と構造が良く似ているために、ADPと共にミオシンATPaseに加えると、真の基質ATPを加えた時と同じような反応中間体を生成する。しかし、V_iとADPで生成される中間体の寿命は、ATP

を加えて生成される真の中間体の8,000倍以上も長いので、中間体生成に伴う構造変化を観察するにはADPとV_iを使う方が便利である。AN-S-1, NBD-S-1, IAF-S-1についても、ADPとV_iが活性部位に結合すると構造変化が生じ、これを蛍光スペクトルの変化として追跡することができた。表3には各々の蛍光標識S-1を使って得られた構造変化の起きる最大速度(k_{obs}^{max})と最大速度の半分の速度を得るのに必要なV_i濃度(KV_i)を示している。表3から明らかのように、 k_{obs}^{max} もKV_iも3種類の蛍光標識S-1でほとんど変わらなかった。この結果は、ADPとV_iが活性部位に結合すると3つのドメイン総てにほとんど差がなく構造変化が伝播すること、そしてV_iの結合の仕方も3種類の蛍光標識S-1でほとんど変わらないことを示している。言い換えるならば、ミオシンには少なくとも3つのドメイン各々の一部を構成要素として含んでいる重要部位が活性部位とは別に存在し、ミオシンの活性部位にATPが結合して生じる構造変化は、この重要部位に一齐に伝播するということである。このような構造変化の伝播は筋収縮のエネルギー変換の機構にも重要にかかわっていると思われる。従って、このような重要部位にリガンドや阻害剤等が結合すると、ミオシン本来のもつATPase作用や筋収縮は阻害されるに違いない。海綿由来のペプチドがミオシンに結合してそのATPase活性や筋収縮を阻害する機構も恐らく同じように説明できると思われるが、これを明確にするにはさらに研究を進めなければならない。

V おわりに

以上の結果から、ミオシンATPaseに結合するとそのATPase活性や筋収縮を阻害してしまうペプチドが天然に実際に存在することが明らかとなった。一方、ミオシンATPase側にも、基質ATPが結合する部位以外に、阻害剤の結合により筋収縮のエネルギー変換のプロセスが妨

げられてしまうような重要部位の存在することも示唆された。今後、ミオシンATPase阻害ペプチドの原料となる海綿を大量に採集してそのアミノ酸一次構造を決定し、さらにミオシンATPase上でのペプチドの作用部位も決定されると、このペプチドを使った人為的な筋無力状態モデルを確立することが可能になり、これを進行性筋ジストロフィー症治療剤開発に応用できるようになるであろう。

最後に、海綿採集費用や旅費等の支出の多い本研究を遂行できたのは自由度の大きな使い方が許される大和証券ヘルス財団助成金の賜であることを思い、ここに心よりの感謝を表します。

参考文献

- 1) 寺澤健二郎, 杉田秀夫: 筋疾患治療剤の臨床薬理, *Pharma Medica* 2 : 81~86 (1984)
- 2) 石浦章一, 荒畑喜一, 塚原俊文, 杉田秀夫: 筋ジストロフィーの分子遺伝, *日本臨床* 48 : 1458~1463 (1990)
- 3) Toshiaki Hiratsuka : A Novel Peptide Inhibitor of the Myosin ATPase from an Okinawan Marine Sponge, *J. Biol. Chem.* 264 : 18162 ~ 18167 (1989)
- 4) Toshiaki Hiratsuka : Role of the 50-Kilodalton Tryptic Peptide of Myosin Subfragment-1 as a Communicating Apparatus between the Adenosinetriphosphatase and Actin Binding Sites, *Biochemistry* 25 : 2101 ~ 2109 (1986)
- 5) Toshiaki Hiratsuka : Involvement of the 50-kDa Peptide of Myosin Heads in the ATPase Activity Revealed by Fluorescent Modification with 4-Fluoro-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole, *J. Biol. Chem.* 261 : 7294 ~ 7299 (1986)
- 6) Toshiaki Hiratsuka : Nucleotide - Induced Change of the Interaction between the 20- and 26-Kilodalton Heavy-Chain Segments of Myosin Adenosinetriphosphatase Revealed by Chemical Cross-Linking via the Reactive Thiol SH₂, *Biochemistry* 26 : 3168~3173 (1987)
- 7) Toshiaki Hiratsuka : Cross-Linking of Three Heavy-Chain Domains of Myosin Adenosinetriphosphatase with a Trifunctional Alkylating Reagent, *Biochemistry* 27 : 4110~4114 (1988)
- 8) Toshiaki Hiratsuka : Nucleotide-Induced Specific Fluorescent Labeling of the 23-kDa NH₂-Terminal Tryptic Peptide of Myosin ATPase by the Serine-Reactive Reagent 9-Anthroyl-nitrile, *J. Biol. Chem.* 264 : 18188 ~ 18194 (1989)
- 9) Toshiaki Hiratsuka : Conformational Changes in the 23-kDa NH₂-terminal Peptide Segment of Myosin ATPase Associated with ATP Hydrolysis, *J. Biol. Chem.* 265 : 18786~18790 (1990)
- 10) Toshiaki Hiratsuka : Transmission of ADP•Vanadate-induced Conformational Changes to Three Peptide Segments of Myosin Subfragment-1, *J. Biol. Chem.* 265 : 18791~18796 (1990)