

ミオシン頭部の SH1 に近い疎水領域の モーター機能への関わり

(課題番号：10480174)

平成 10 年度～平成 11 年度科学研究費補助金

基盤研究(B) 研究成果報告書

平成 12 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

総ての生物が生きてゆくために不可欠な、力を必要とする細胞内の動きには、さまざまな生物分子モーターが関与している。筋肉の収縮運動を担うミオシンはモータータンパク質の代表格であり X 線による結晶構造解析が 1993 年に発表されてからは、急速に研究が進展している。本研究では、ミオシン頭部がモーター機能を発現する時にレバーアームとして作用する部位に存在する、反応性の高い Cys 残基 (SH1) 付近の疎水領域の役割について検討した。

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 10 年度	6,100 千円
平成 11 年度	2,100 千円
計	8,200 千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) T. Hiratsuka: Prodan Fluorescence Reflects differences in Nucleotide-Induced Conformational States in the Myosin Head and Allows Continuous Visualization of the ATPase Reactions, **Biochemistry**, 37 (20), 7167~7176, 1998 年 5 月
- 2) 平塚寿章： ミオシン頭部の構造変化を利用した ATPase 活性の蛍光測定, 生体エネルギー研究会第 24 回討論会講演要旨集, 100~101, 1998 年 8 月
- 3) 平塚寿章： 蛍光色素 prodan とミオシン頭部(S-1)の相互作用, **生物物理**, 38 (9), S66, 1998 年 10 月
- 4) 平塚寿章： [総説] バイオ研究がさらに輝く蛍光標識法, **細胞工学**, 17, 1740~1745, 1998 年 12 月
- 5) 平塚寿章： [総説] 生体分子相互作用を蛍光標識法で見る, **細胞工学**, 17, 1746~1755, 1998 年 12 月
- 6) 平塚寿章： 生体分子を生かしたままで一分子可視化を目指す蛍光標識, **日本化学会第 77 秋季年会講演予稿集**, 241, 1999 年 9 月
- 7) 平塚寿章： ATP により誘起されるミオシン SH2 と SH1 の構造変化の違い, **生物物理**, 39 (9), S141, 1999 年 10 月
- 8) T. Hiratsuka: ATP-induced Opposite Changes in the Local Environments around Cys⁶⁹⁷ (SH2) and Cys⁷⁰⁷ (SH1) of the Myosin Motor Domain Revealed by the Prodan Fluorescence, **J. Biol. Chem.**, 274 (41), 29156~29163, 1999 年 10 月

2. □ 頭 発 表

- 1) 平塚寿章： ミオシン頭部の構造変化を利用した ATPase 活性の蛍光測定, 生体エネルギー研究会第 24 回討論会, 1998 年 8 月 29 日
- 2) 平塚寿章： 蛍光色素 prodan とミオシン頭部(S-1)の相互作用, 日本生物物理学会第 36 回年会, 1998 年 10 月 2 日
- 3) 平塚寿章： 生体分子を生かしたままで一分子可視化を目指す蛍光標識(招待講演), 日本化学会第 77 秋季年会, 1999 年 9 月 23 日
- 4) 平塚寿章： ATP により誘起されるミオシン SH2 と SH1 の構造変化の違い, 日本生物物理学会第 67 回年会, 1999 年 10 月 4 日

3. 出 版 物

- 1) 平塚寿章 (分担執筆)： シリーズ光が拓く生命科学 第 7 巻 「生命科学を拓く新しい光技術」 ～タンパク質を光らす～, 共立出版, 47～60, 1999 年 12 月 20 日

研究成果

研究目的

ミオシン分子の頭部(S-1)は、ATPを加水分解して得た化学エネルギーを使ってアクチンフィラメント上を動くので「モータータンパク質」と言われている。S-1を他のモータータンパク質のダイニンやキネシンと比べてみても、分子全体の構造はそれほど似ていない。しかし最近明らかにされたX線結晶解析による立体構造を見ると、それぞれのモーター機能に参与しているドメインの構造は互いに非常によく似ている。このことは、“ミオシン、ダイニン、キネシンのモーター駆動の機構は本質的な共通性があるらしい”という期待を抱かせる。そうだとすると、ミオシンのモーター駆動の機構の解明はモータータンパク質全体の統一的な説明をも可能にする。しかしながら、ミオシンが分子モーターとして働く機構については、現在でも不明なことが多い。この理由の大半は、S-1内部の構造変化に関するデータが不足しているために、アクチンの結合やATPの結合・加水分解に伴う立体構造変化がどのように伝播されるのかを具体的にイメージできないことによる。

S-1の立体構造を見ると、ATPが結合して加水分解されるヌクレオチド結合部位はアクチン結合部位の反対側のクレフト内にあり、大きなポケットを形成している(図1)。両部位は互いに離れているにもかかわらず、ATPとアクチンの結合はそれぞれ互いに影響を与え合う。これは、ATPやアクチンが結合するとポリペプチド鎖に立体構造変化が誘起され、この“信号”が他の結合部位にも伝わるためと考えられている。これらの部位から出される信号が行き来する経路とその通信機構が明らかになるとミオシンのモーター駆動の機構も非常に理解し易くなるが、この機構についてはあまりよくわかっていない。

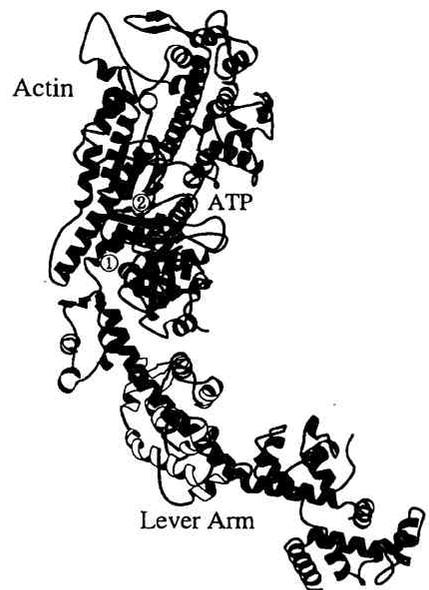


図1. S-1の構造

①、②はそれぞれ Cys707 (SH1) と Cys697 (SH2) を表す

S-1の重鎖には8個のCys残基が存在する。Cys-707(SH1)はさまざまな化学

試薬に対して最も高い反応性を示すが、ATP の結合・加水分解やアクチンの結合には直接関与していない。S-1 をグラスに見立てこれを手でもったとすると、アクチン結合部位と ATP 結合部位の位置関係はそれぞれ親指と薬指の位置に、SH1 はグラスの底部に相当する。一方 SH1 から 9 残基離れたところに別の Cys 残基 (Cys697, SH2) が存在し、この周辺には Trp、Tyr、Gly、Phe などの残基が配置され独特の疎水領域を形成している。SH1 と SH2 は Gly699 で隔てられている 2 つの α -ヘリックスにそれぞれ含まれている。

現在ミオシンの化学-力学エネルギー変換の分子機構を説明する上で、「レバーアーム仮説」が広く支持されている。この仮説では、S-1 の尾部がレバーのアームとして働き、ATP 加水分解反応に伴って尻尾を振るような動きをする。その結果、ミオシンはアクチン上を滑り運動すると説明される。レバーアームの支点は SH1 と SH2 をつなぐ領域にあると考えられている。しかしながら、ATP が加水分解されると、SH1-SH2 領域にどのような構造変化が誘起されるのか、とりわけ SH2 を取り囲む疎水領域の構造変化についてはほとんどわかっていない。

本研究の目的は、SH1 近傍の疎水領域に含まれる SH2 に構造変化に鋭敏に感応する蛍光団を標識し、これから発信される蛍光シグナル変化を解析して SH2 を取り囲む疎水領域のモーター機構への関わりを解明することである。

研究方法

- (1) ウサギ骨格筋より常法に従い、ミオシンを調製し、さらにキモトリプシン消化により、ミオシン頭部 (S-1) を単離してこれを実験に使った。
- (2) SH1 に近い疎水領域の構造変化を検出するために、この領域に含まれる SH2 を蛍光標識することを試みた。この目的のために、環境変化に鋭敏に感応して蛍光特性を変えるような蛍光団をもつ Cys 反応性蛍光試薬を十数種類候補として選び、さらにこの中から SH2 のみを特異的に標識する試薬と標識条件についてスクリーニングを行った。
- (3) SH2 を標識するのに最適な試薬が決まった後、これと同じ蛍光団をもつ Cys 反応性試薬の中から今度は SH1 を蛍光標識できるものとその標識条件をスクリーニングした。
- (4) SH2 が蛍光標識された S-1 を用い、ATP 加水分解反応に伴って起きる蛍光スペクトル変化を測定した。次に SH1 が蛍光標識された S-1 についても同様の測定を行った。

(5) (4)の結果から、SH2を含む疎水領域の構造変化を解析し、SH1周辺の構造変化との違いなどについて考察した。

研究結果

まず、反応基としてビニルスルホン、アクリロイル、アジリジン、エポキシド、プロモメチル基をもつ十数種類の蛍光試薬を候補として選択した。これらの標識条件として、温度、pH、S-1に対する試薬のモル比などについて検討した結果、6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (AD)を使うとSH2を特異的に蛍光標識できること、6-bromoacetyl-2-dimethylaminonaphthalene (BD)を使うとSH2と全く同じ蛍光団をSH1に標識できることがわかった。

得られたAD-S-1とBD-S-1を使うと、SH2とSH1に標識されている蛍光団は全く同じなので、蛍光団の物性や分子サイズの違いを考慮せずに両残基周辺で起きる構造変化を直接比較することができた。蛍光スペクトルの強度や半値幅の測定、KIによる蛍光消光実験から、ATP加水分解中のSH2周辺の構造変化の方向性はSH1周辺の変化に比べてほとんど正反対であった。SH1を含むヘリックスは安定な構造から不安定な構造へと変化するのに対し、SH1に近い疎水領域に含まれるSH2はタンパク質内部に埋められることが示唆された。

以上の結果をまとめると、ミオシン頭部のSH1に近い疎水領域は、ミオシンがモーター機能を発現する時にはより強固になり、レバーアームの支点を保持するための重要な役割を担うことが示唆された。

残された問題点

本研究の終了とほとんど同時に、アメリカの研究者グループがX線結晶解析によるSH1とSH2を含むそれぞれの α -ヘリックスの構造変化に関する論文を発表した。彼らは、① SH2を含むヘリックスはATP加水分解のどのステップでも安定な構造を保ち続ける、② 一方SH1を含むヘリックスはATP加水分解終了時にはむしろほどけてしまう、と結論している。本研究の結果と比べると、①についてはほとんど一致している。しかし②に関しては、本研究で使われた蛍光標識法だけからではX線結晶解析のような詳細な情報は得られない。今後、蛍光標識法の弱点をカバーするような手法(例えばフーリエ変換赤外分光法)などを相補的に使った新たな研究が望まれる。

研 究 論 文

- 1) T. Hiratsuka: Prodan Fluorescence Reflects differences in Nucleotide-Induced Conformational States in the Myosin Head and Allows Continuous Visualization of the ATPase Reactions, **Biochemistry**, 37 (20), 7167~7176, 1998 年 5 月
- 2) 平塚寿章： [総説] バイオ研究がさらに輝く蛍光標識法, **細胞工学**, 17, 1740~1745, 1998 年 12 月
- 3) 平塚寿章： [総説] 生体分子相互作用を蛍光標識法で見る, **細胞工学**, 17, 1746~1755, 1998 年 12 月
- 4) T. Hiratsuka: ATP-induced Opposite Changes in the Local Environments around Cys⁶⁹⁷ (SH2) and Cys⁷⁰⁷ (SH1) of the Myosin Motor Domain Revealed by the Prodan Fluorescence, **J. Biol. Chem.**, 274 (41), 29156~29163, 1999 年 10 月