

0750

平滑筋ミオシンのフィラメント形成調節における必須軽鎖の機能部位

(研究課題番号 16570130)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究補助金

(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 加藤 剛志
(旭川医科大学・医学部・助教授)

はしがき

科学研究補助金（基盤研究(C)(2)）の助成のもとに平成 16 年度から 17 年度の 2 年間の予定で行われた「平滑筋ミオシンのフィラメント形成調節における必須軽鎖の機能部位」は研究期間を終了し、研究成果をまとめることとなりました。本研究によりいくつかの重要な新しい知見を得ておりますが、研究計画の全てを達成できたわけではなく今なお研究を継続中です。

研究組織

研究代表者： 加藤 剛志（旭川医科大学 医学部 助教授）

研究分担者： 谷口 隆信（旭川医科大学 医学部 教授）

研究分担者： 竹内 昌之（旭川医科大学 医学部 助手）

研究分担者： 石田 敦彦（旭川医科大学 医学部 助手）

研究協力者： 矢澤 道生（北海道大学大学院 理学研究科 教授）

研究協力者： 高橋 正行（北海道大学大学院 理学研究科 助教授）

研究協力者： 竹谷 浩介（北海道大学大学院 理学研究科 大学院生）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,000	0	2,000
平成 17 年度	1,500	0	1,500
総計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌等

1. Okada, Y., Taniguchi, T., Morishima, S., Suzuki, F., Akagi, Y., Muramatsu, I. (2006) Characteristics of acid extrusion from Chinese hamster ovary cells expressed different prostaglandin EP receptors. *Life Sci.* in press.
2. Kitani, T., Okuno, S., Takeuchi, M., and Fujisawa, H. (2006) Post-translational excision of the carboxyl-terminal segment of CaM kinase phosphatase N and its cytosolic occurrence in the brain. *J. Neurochem.* **96**, 374-384.
3. Ishida, A., Tada, Y., Nimura, T., Sueyoshi, N., Katoh, T., Takeuchi, M., Fujisawa, H., Taniguchi, T., Kameshita, I. (2005) Identification of major Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-binding proteins in brain: biochemical analysis of the interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **435**, 134-146.
4. Takeya, K., Takahashi, M., Katoh, T., and Yazawa, M. (2005) Asymmetric Photocross-Linking of Singly Phosphorylated Smooth Muscle Heavy Meromyosin. *J. Biochem.* **138**, 245-253.
5. Takayama, K., Yuhki, K., Ono, K., Fujino, T., Hara, A., Yamada, T., Kuriyama, S., Karibe, H., Okada, Y., Takahata, O., Taniguchi, T., Iijima, T., Iwasaki, H., Narumiya, S., Ushikubi, F. (2005) Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat. Med.* **11**, 562-566.
6. Sugiyama, Y., Sueyoshi, Y., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., Ishida, A., Taniguchi, T., and Kameshita, I. (2005) Generation and application of a monoclonal antibody that detects a wide variety of protein tyrosine kinases. *Anal. Biochem.* **347**, 112-120.
7. Shoji, H., Sueyoshi, Y., Ishida, A. and Kameshita, I. (2005) High level expression and preparation of autonomous Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in *Escherichia coli*, *J. Biochem.* **138**, 605-611.
8. Xiao, C.Y., Yuhki, K., Hara, A., Fujino, T., Kuriyama, S., Yamada, T., Takayama, K., Takahata, O., Karibe, H., Taniguchi, T., Narumiya, S., Ushikubi, F. (2004) Prostaglandin E2 protects the

heart from ischemia-reperfusion injury via its receptor subtype EP4. *Circulation* **109**, 2462-2468.

9. Taki, N., Tanaka, T., Zhang, L., Suzuki, F., Israilova, M., Taniguchi, T., Hiraizumi-Hiraoka, Y., Shinozuka, K., Kunitomo, M., Muramatsu, I. (2004) Alpha-1D adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *Br. J. Pharmacol.* **142**, 647-656.
10. Takeuchi, M., Taniguchi, T., Fujisawa, H. (2004) Identification and characterization of nuclear localization signals of CaMKP-N. *J. Biochem.* **136**, 183-188.
11. Kawakami, T., Zhang, C., Taniguchi, T., Kim, C.J., Okada, Y., Sugihara, H., Hattori, T., Reeve, A.E., Ogawa, O., Okamoto, K. (2004) Characterization of loss-of-inactive X in Klinefelter syndrome and female-derived cancer cells. *Oncogene* **23**, 6163-6169.
12. Kajino, H., Taniguchi, T., Fujieda, K., Ushikubi, F., Muramatsu, I. (2004) An EP4 receptor agonist prevents indomethacin-induced closure of rat ductus arteriosus in vivo. *Pediatr. Res.* **56**, 586-90.
13. Fujino, T., Nakagawa, N., Yuhki, K., Hara, A., Yamada, T., Takayama, K., Kuriyama, S., Hosoki, Y., Takahata, O., Taniguchi, T., Fukuzawa, J., Hasebe, N., Kikuchi, K., Narumiya, S., Ushikubi, F. (2004) Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I2 receptor IP. *J. Clin. Invest.* **114**, 805-12.
14. Kameshita, I., Kinoshita, S., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, N., and Ishida, A. (2004) Generation of a polyclonal antibody that simultaneously detects multiple Ser/Thr protein kinases. *J. Biochem. Biophys. Methods* **60**, 13-22.

(1) 口頭発表

1. 加藤剛志、竹内昌之、石田敦彦、谷口隆信. 平滑筋ミオシンのコンホメーション変換/フィラメント形成の調節に關与する必須輕鎖の機能領域. 日本生物物理学会第 43 回年会, 2005, 11.23 - 11.25, 札幌.
2. 木谷隆子、奥野幸子、中村泰尚、竹内昌之、藤沢仁. ラット脳 CaM kinase phosphatase N の細胞内分布. 第 78 回日本生化学会大会, 2005, 10.19 - 10.22, 神戸.

3. 二村貴樹、北村千枝美、末吉紀行、石田敦彦、茂里康、亀下勇. Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP)の変異体を用いた解析. 第78回日本生化学会大会, 2005, 10.19 - 10.22, 神戸.
4. 杉山康憲、末吉紀行、茂里康、達吉郎、湯元昇、石田敦彦、谷口隆信、亀下勇. チロシンキナーゼを網羅的に検出するモノクローナル抗体の作製と利用. 第78回日本生化学会大会, 2005, 10.19 - 10.22, 神戸.
5. 竹谷浩介、高橋正行、加藤剛志、矢沢道生. 単リン酸化平滑筋ヘビーメロミシンの非対称な光架橋. 日本生物物理学会第42回年会, 2004, 11.13 - 11.15, 京都.
6. 木谷隆子、奥野幸子、竹内昌之、藤沢仁. CaM kinase phosphatase N の核移行シグナルの翻訳後切断. 第77回日本生化学会大会, 2004, 10.13 - 10.16, 横浜.
7. 竹内昌之、谷口隆信、藤沢仁. ホスファターゼ CaMKP-N の核局在化配列の解析. 第77回日本生化学会大会, 2004, 10.13 - 10.16, 横浜.
8. 二村貴樹、末吉紀行、石田敦彦、徳光浩、野崎直仁、茂里康、達吉郎、湯元昇、亀下勇. 核に局在するゼブラフィッシュ CaM キナーゼホスファターゼの機能解析. 第77回日本生化学会大会, 2004, 10.13 - 10.16, 横浜.
9. 末吉紀行、石田敦彦、二村貴樹、亀下勇. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP)はゼブラフィッシュの正常な初期発生に不可欠である. 第77回日本生化学会大会, 2004, 10.13 - 10.16, 横浜.

研究成果

研究目的

脊椎動物の平滑筋ミオシンは、消化管や血管などの内臓筋の収縮を担うタンパク質分子モーターである。平滑筋ミオシンは、重鎖、調節軽鎖、必須軽鎖、各二つずつから成る六量体で、二つの頭部と一本の尾部から成る分子構造をとる。頭部には ATP を加水分解してアクチンフィラメントを動かすモーター活性があり、尾部には互いに会合するフィラメント形成能がある。平滑筋ミオシンのモーター活性とフィラメント形成は調節軽鎖のリン酸化により調節される。リン酸化はモーター活性を活性化し、フィラメント形成（重合）を促す。生体内ではミオシンとアクチンはともにフィラメント状態で相互作用し、筋収縮を起こす。したがって、平滑筋収縮はミオシンのモーター活性のみならずミオシンの重合・脱重合によっても調節されると考えられている。

平滑筋ミオシンのフィラメント形成はミオシンのコンホメーション変換を介して調節されることが知られている。平滑筋ミオシンは、脱リン酸化状態では尾部が折りたたまれた「折りたたみ型」コンホメーション（または 10S コンホメーション）をとり、モノマーとして存在するが、リン酸化されると尾部の伸びた「伸長型」コンホメーション（または 6S コンホメーション）をとり、会合してフィラメントを形成する。このコンホメーション変換/フィラメント形成のリン酸化依存調節にはリン酸化される調節軽鎖のみならず必須軽鎖も必要である。必須軽鎖は、従来は同調節において重要視されておらずその機能領域やはたらきはほとんど解析されていない。そこで、本研究計画では、平滑筋ミオシンのコンホメーション変換/フィラメント形成の調節における必須軽鎖の (1) 機能部位を明らかにし、(2) 同部位のミオシン分子内での相互作用を探ることを目的とした。

研究成果

(1) 必須軽鎖の機能部位の解明

生理的条件下では、脱リン酸化平滑筋ミオシンは 10S コンホメーションをとりモノマーとして溶解するが、リン酸化平滑筋ミオシンは 6S コンホメーションをとり会合してフィラメントを形成する。これら 10S および 6S コンホメーションはゲルろ過の溶出時間から区別することができる。この際 Mg^{2+} 濃度を低く抑えた条件(0.24-0.26 M NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1-1 mM EGTA, 0.02-0.1 mM ATP, 10 mM sodium phosphate (pH 7.2), 6-25 °C)を用いると、生理的条件下の平滑筋ミオシンのコンホメーションを反映し、かつゲルろ過で分析しやすい [Katoh & Morita, 1996]。本研究においても、この条件を用いて分析を行った。

さて、私はすでに、ブタ大動脈平滑筋ミオシンの必須軽鎖(ELC)をホタテ貝(*Patinopecten yessoensis*)閉殻筋ミオシンの ELC に置換すると、同脱リン酸化平滑筋ミオシンは上記条件

下で 10S コンホメーションを形成できなくなることを観察していた [Katoh & Morita, 1997]。そこで、平滑筋ミオシンの ELC の一部をホタテ貝閉殻筋ミオシンの ELC に置換したキメラ ELC を用いて脱リン酸化平滑筋ミオシン ELC の 10S コンホメーション形成に参与する（すなわちリン酸化依存フィラメント形成に参与する）ELC の機能部位を調べた。

平滑筋ミオシンの ELC としてニワトリ砂の平滑筋ミオシン ELC (cDNA は Dr. K. M. Trybus からいただいた) とホタテ貝 (*Aquiptecten irradians*) 閉殻筋ミオシン ELC (cDNA は Dr. A. G. Szent-Györgyi からいただいた) を用いた。これらの cDNA を用い、まず平滑筋ミオシン ELC の四つのドメインのうち一つまたは二つをホタテ貝の配列に置換したキメラ ELC を構築した (Fig. 1)。

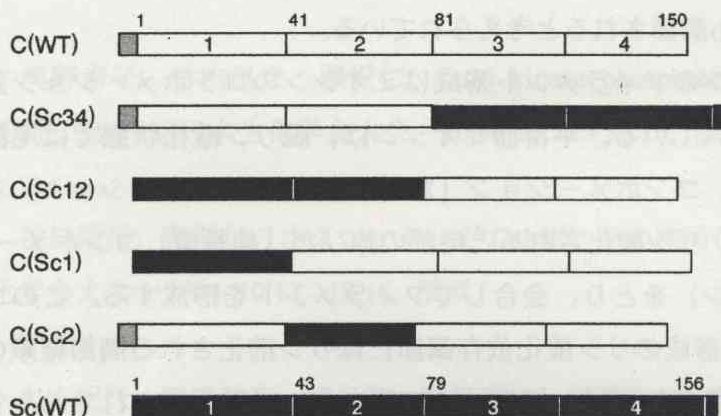


Fig. 1. キメラ ELC の模式図。

白抜きのパールはニワトリ砂の平滑筋ミオシン ELC の配列を、黒塗りのパールはホタテ貝閉殻筋ミオシン ELC の配列を表す。パール内の数字はドメイン番号を、パール上の番号はネイティブ ELC における各ドメインの始まり乃至終わりのアミノ酸残基番号を示している。灰色のパールはネイティブ ELC と区別するために付けたタグ (淡灰色パール, ARIL; 濃灰色パール, EDE) である。構築した ELC 名は、野生型ニワトリ砂の平滑筋ミオシン ELC を C(WT)、野生型ホタテ貝閉殻筋ミオシン ELC を Sc(WT) とした。キメラ ELC については、ニワトリ砂の ELC のうちホタテ貝 ELC の配列に置換したドメイン番号を括弧内に付して示した。

これらのキメラ ELC の DNA は遺伝子工学的的手法 (overlap extension 法) を用いて構築し [Katoh *et al.*, 2002]、同タンパク質は大腸菌発現系 (*E. coli* BL21(DE3)) を用いて発現し、封入体より可溶化後、アニオン交換 HPLC により単離した。これらのリコンビナント ELC をもつ平滑筋ミオシンは、すでに報告しているトリフルオロペラジン-塩化アンモニウム法 [Katoh & Morita, 1996] により調製したブタ大動脈平滑筋ミオシン重鎖 (HC)、単離したリコンビナント ELC、別途調製したニワトリ砂の平滑筋ミオシン調節軽鎖 (RLC) から再構成した。再構成

ミオシンは SDS-ゲルのデンシトメトリーの結果から、HC、RLC、ELC のモル比がいずれも 1.0 : 0.9-1.1 : 0.8-1.0 であり、化学量論的に再構成されたことを確認した (Fig. 2)。

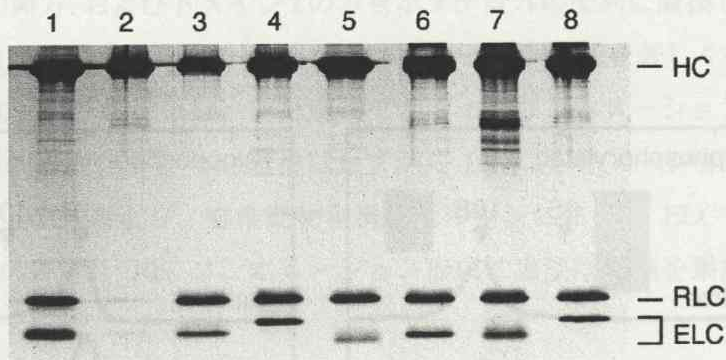


Fig. 2. リコンビナント ELC を用いて再構成した平滑筋ミオシン。

ブタ大動脈平滑筋ミオシン HC、リコンビナント ELC、および脱リン酸化 RLC をモル比 1 : 2 : 2 で混合し数時間氷上に置いた後、遊離の ELC と RLC を Sephacryl S-300HR スピニングカラムで除去し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)をおこなった。ネイティブブタ大動脈平滑筋ミオシン (レーン 1); ブタ大動脈平滑筋ミオシン HC (レーン 2); 再構成ミオシン (レーン 3-8) : C(WT) (レーン 3); C(Sc34) (レーン 4); C(Sc12) (レーン 5); C(Sc1) (レーン 6); C(Sc2) (レーン 7); Sc(WT) (レーン 8)。脱リン酸化 RLC の代わりにリン酸化 RLC を用いても本質的に同じ結果が得られている。

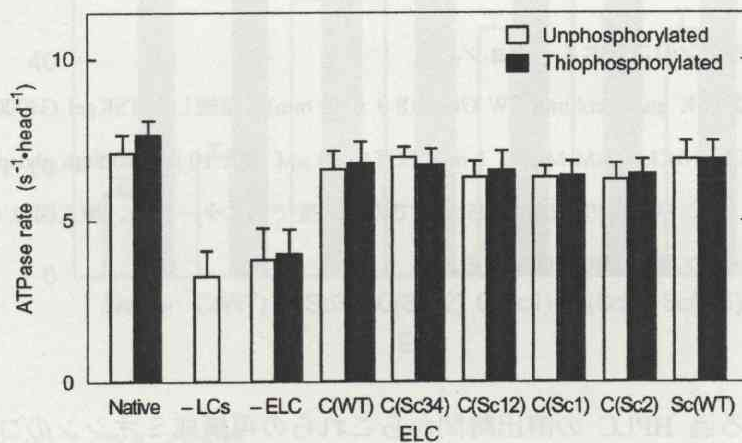


Fig. 3. 再構成ミオシンの NH₄⁺/EDTA-ATPase 活性。

活性測定は 0.02-0.04 μM myosin head, 0.6 M NH₄Cl, 20 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, and 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 °C で行った。

さらに、再構成ミオシンの NH_4^+ /EDTA-ATPase 活性を調べた。 NH_4^+ /EDTA-ATPase 活性は両 LC または ELC を欠いたミオシンではネイティブミオシンの活性の約半分と低かったが、再構成ミオシンの活性はいずれもネイティブミオシンの活性に匹敵するものであり (Fig. 3)、この結果からも化学両論的な再構成が示唆された。

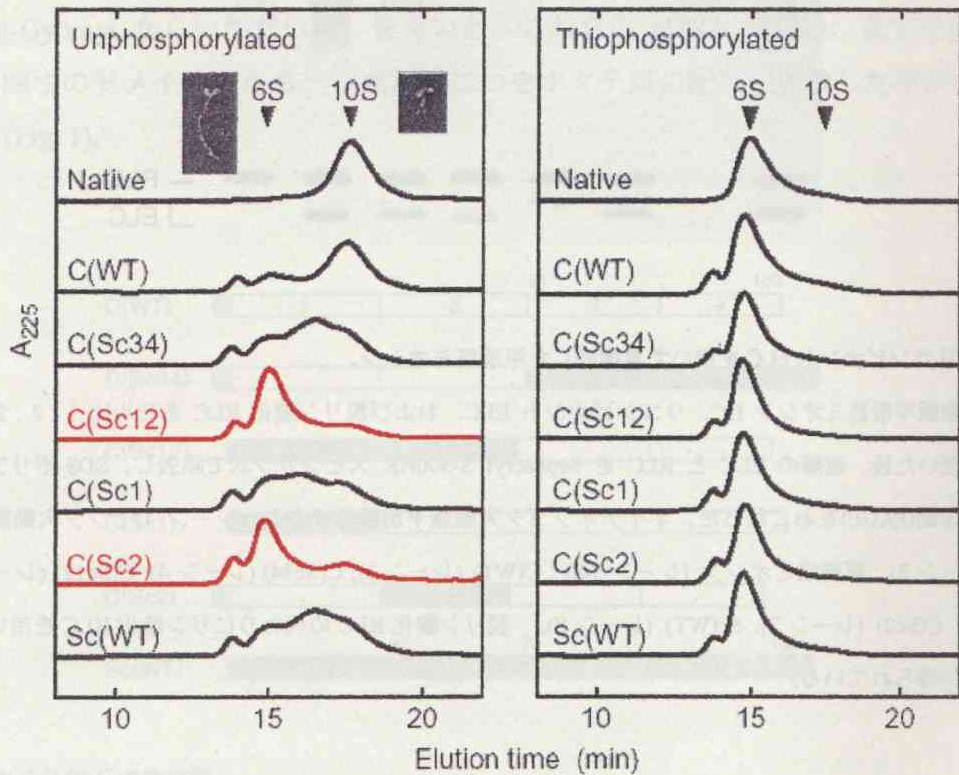


Fig. 4. 再構成ミオシンのコンホメーション。

ゲルろ過 HPLC は TSK guard column SW Glass (8.0 x 40 mm) を接続した TSKgel G4000SW Glass column (8.0 x 300 mm) を用い、0.24 M NaCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 μM ATP, 10 mM sodium phosphate (pH7.2), 6 °C, 流速 0.50 ml/min で行った。タンパク質の溶出は 225 nm での吸光度でモニターした。挿入図は 6S ミオシンと 10S ミオシンのロータリーシャドウ-電子顕微鏡像である。

次に、ゲルろ過 HPLC の溶出時間からこれらの再構成ミオシンのコンホメーションを調べた (Fig. 4)。リン酸化状態では、いずれの ELC をもつミオシンもネイティブミオシン同様、尾部の伸びた 6S コンホメーションをとった。一方、脱リン酸化状態では、C(WT) をもつミオシンのみがネイティブミオシン同様、尾部の折りたたまれた安定な 10S コンホメーションを形成した。Sc(WT) をもつミオシンでは、安定な 10S コンホメーションを形成することはできなかったが、安定な 6S コンホメーション形成には至らなかった。Sc(WT) (*Aquipecten*

irradians)による 10S コンホメーションの不安定化の程度は以前報告したホタテ貝 *Patinopecten yessoensis* の ELC による効果より低かったが、これは両者の間に存在する五アミノ酸残基の置換によるものかもしれない。キメラ ELC を導入したミオシンのなかでは、ドメイン1と2の両方、およびドメイン2のみをホタテ貝外の配列に置換したそれぞれ C(Sc12) および C(Sc2)は平滑筋ミオシンの 10S コンホメーション形成を著しく損傷し、両 ELC をもつミオシンは 10S コンホメーションを形成できず 6S コンホメーションをとった。一方、ドメイン1 およびドメイン3 と4の置換はわずかに 10S コンホメーションを不安定化したにすぎなかった。以上の結果より、脊椎動物平滑筋ミオシンにおいて ELC のドメイン2 が脱リン酸化ミオシンの安定な 10S コンホメーション形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに、リコンビナント ELC とブタ大動脈平滑筋ミオシンのネイティブ ELC との交換反応 [Kato et al., 1997] を行い、その交換率から ELC のドメイン置換による HC への親和性の変化を調べた。その結果、キメラ ELC および Sc(WT)の HC への親和性は C(WT)のおよそ 1/10 に低下していたが、キメラ ELC の間で差はなかった。したがって、C(Sc12)や C(Sc2)の効果は ELC の HC への親和性低下のために起こったことではないと考えられた。

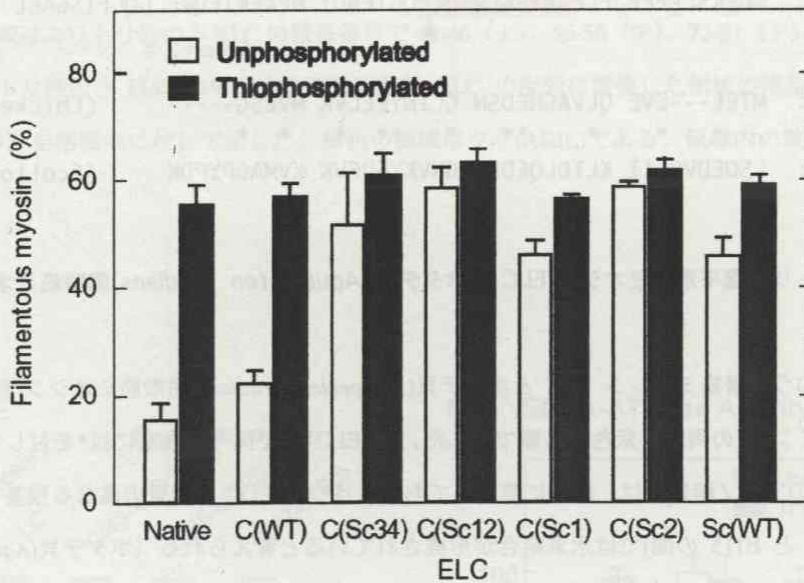


Fig. 5. 再構成ミオシンのフィラメント形成。

ミオシン(0.1-0.2 mg/ml)を0.15 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 mM imidazole (pH 7.0) で超遠心分離(160,000 x g, 10 min, 4 °C)し、フィラメントを形成したミオシンを沈殿させた。上清をSDS-PAGEし、デンシトメトリーにより上清に残ったミオシン(フィラメントを形成していないミオシン)量を求めた。

して以下の三つの領域が見出された ---- ニワトリ砂のう ELC の残基番号で、(i) 残基 43-46、(ii) 残基 56-58、(iii) 残基 72-81 (Fig. 6)。結晶構造より、(i)中のホタテ貝 ELC の N46 と E47 の α -アミノ基と E115 の δ -カルボキシル基の間で水素結合が形成されていると考えられる [Xie et al., 1994] が、これらの残基に相当するニワトリ砂囊 ELC の残基間では水素結合は見出されない [Dominguez et al., 1998]。また、(ii)の領域はホタテ貝 ELC では欠失しており、(iii)の領域には両 ELC 間には同一のアミノ酸は一つもない。そこで、ニワトリ砂囊 ELC の配列中のこれら三つの領域のいずれか一つをホタテ貝 ELC の配列に置換した三種の新変異体 ELC を作製した (Fig. 7)。

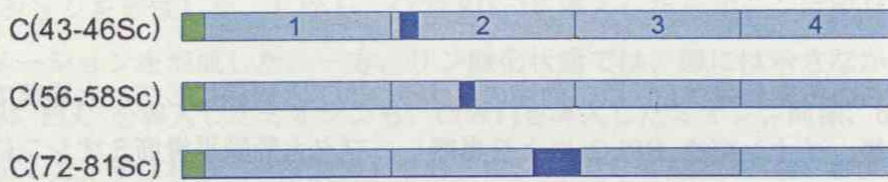


Fig. 7. 新たに作製した新変異体 ELC の模式図。

ニワトリ砂のう ELC の配列をもつ領域をシアンで、ホタテ貝閉殻筋 ELC の配列をもつ領域を青色で示した。青色で示した領域はニワトリ砂のう ELC の残基番号で 43-46 (上)、56-58 (中)、72-81 (下) である。各異体 ELC の名前は、ニワトリ砂のう ELC の中でホタテ貝閉殻筋 ELC の配列に置換した領域の残基番号 (ニワトリ砂のう ELC の残基番号) を括弧内に付して示した。緑色の領域はタグ (ARIL) である。領域内の数字はドメイン番号を示す。

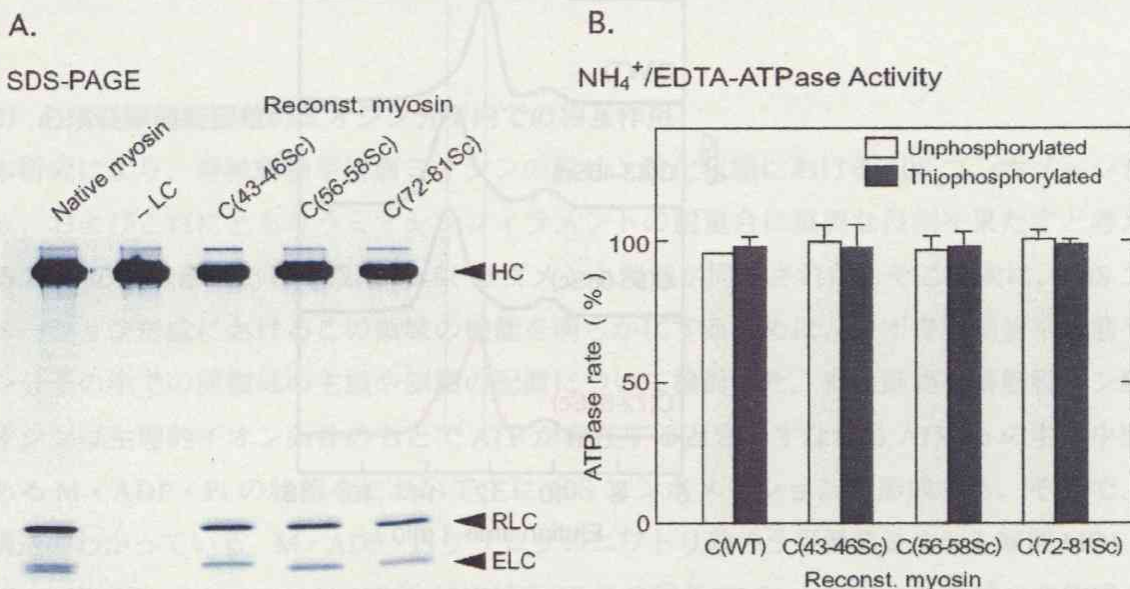


Fig. 8. 新変異体 ELC をブタ大動脈平滑筋ミオシンに導入して調製した再構成ミオシンの SDS-PAGE と NH_4^+ /EDTA-ATPase 活性。

新変異体 ELC をもつ再構成平滑筋ミオシンは、両軽鎖を除去して調製したブタ大動脈平滑筋ミオシン HC、ニワトリ砂のうチオリン酸化 RLC、新変異体 ELC をモル比 1 : 2 : 2 で混合、氷上で一晩静置して調製した。A, SDS-PAGE の試料については、遊離の LC を Sephacryl S-300HR スピカラムで除去した後、調製した。ネイティブブタ大動脈平滑筋ミオシン (レーン 1); ブタ大動脈平滑筋ミオシン HC (レーン 2); 再構成ミオシン (レーン 3-8): C(43-46Sc) (レーン 3); C(56-58Sc) (レーン 4); C(72-81Sc) (レーン 5)。チオリン酸化 RLC の代わりに脱リン酸化 RLC を用いても本質的に同じ結果が得られている。B, NH_4^+ /EDTA-ATPase 活性測定は 0.02-0.04 μM myosin head, 0.6 M NH_4Cl , 20 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mg/ml bovine serum albumin, and 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 °C で行った。

これらの新変異体 ELC は、前述のキメラ ELC と同様にして、大腸菌で発現、封入体より可溶化後、イオン交換 HPLC により単離し、ブタ大動脈平滑筋ミオシンに導入した。得られた再構成ミオシンは SDS-ゲルのデンストメトリーの結果から、HC、RLC、ELC のモル比がいずれも 1.0 : 1.0-1.1 : 0.9-1.1 であった (Fig. 8A)。また、再構成ミオシンの NH_4^+ /EDTA-ATPase 活性はいずれも C(WT)を用いて再構成したミオシンの活性に匹敵するものであり (Fig. 8B)、これらの結果から化学両論的な再構成が示された。

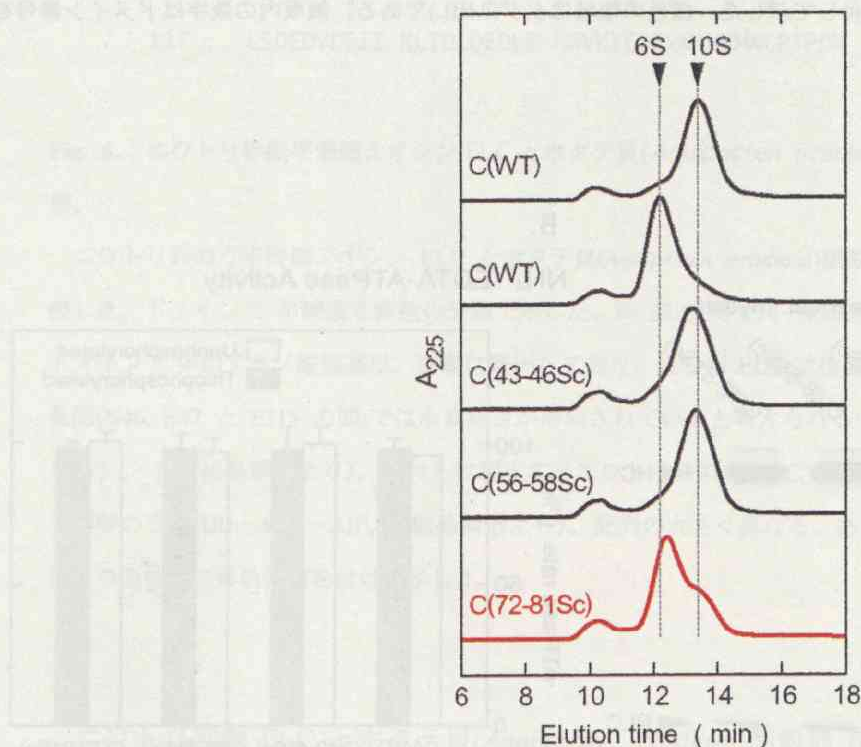


Fig. 9. 新変異体 ELC-再構成ミオシンの脱リン酸化状態でのコンホメーション。

ゲルろ過 HPLC は TSK guard column PW_{XL} (6.0 x 40 mm) を接続した TSKgel G5000PW_{XL} column (7.8 x 300 mm) を使い、0.26 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 20 μM ATP, 10 mM sodium phosphate (pH7.2), 25 °C, 流速 0.50 ml/min で行った。タンパク質の溶出は 225 nm での吸光度でモニターした。

次いで、再構成ミオシンのコンホメーションを調べた (Fig. 9)。C(WT) で再構成したミオシンでは、ブタ大動脈平滑筋ネイティブミオシン同様、脱リン酸化状態で 10S コンホメーション、リン酸化状態で 6S コンホメーションをとった。新変異体 ELC、C(43-46Sc) および C(56-58Sc)、を導入したミオシンは脱リン酸化状態では、C(WT) を導入したミオシン同様、10S コンホメーションを形成した。しかし、C(72-81Sc) を導入したミオシンは脱リン酸化状態で 6S コンホメーションを形成した。一方、リン酸化状態では、図には示さなかったが、いずれの新変異体 ELC を導入したミオシンも、C(WT) を導入したミオシン同様、6S コンホメーションを形成した。すなわち、脊椎動物平滑筋ミオシン ELC の残基 43-46、および残基 56-58 のホタテ貝 ELC の配列への置換は同ミオシンのコンホメーションに全く影響を与えなかったが、残基 72-81 の置換は同ミオシンの 10S コンホメーション形成を著しく阻害した。以上の結果から、脊椎動物平滑筋ミオシン ELC の 72-81 残基領域が同ミオシンの 10S コンホメーション形成に重要な領域であることがわかった。

さらにまた、新変異体 ELC とブタ大動脈平滑筋ミオシンのネイティブ ELC との交換反応 [Katoh *et al.*, 1997] から ELC の変異導入による HC への親和性の変化を調べた。その結果、C(43-46Sc) の HC への親和性は C(WT) のおよそ 0.7 に低下、C(56-58Sc) と C(72-81Sc) はおよそ 0.1 に低下していたが、後二者の間で差はなかった。したがって、C(72-81Sc) の効果が ELC の HC への親和性低下のために起こったことではないと考えられた。

(2) 必須軽鎖機能部位のミオシン分子内での相互作用

本研究により、脊椎動物平滑筋ミオシンの脱リン酸化状態における 10S コンホメーション形成、およびこれにともなうミオシンフィラメントの脱重合に重要な役割を果たすと考えられる ELC の機能部位として残基 72-81 セグメント領域が同定された。そこで次に、10S コンホメーション形成におけるこの領域の機能を明らかにするために、まず脊椎動物平滑筋ミオシン分子の中での同領域の主鎖や側鎖の配置について検討した。脊椎動物平滑筋脱リン酸化ミオシンは生理的イオン条件のもとで ATP が存在するとき、すなわち ATPase の主要中間体である M · ADP · Pi の状態をにおいて主に 10S コンホメーションを形成する。そこで、結晶構造のわかっている、M · ADP · Pi アナログのニワトリ砂のう平滑筋ミオシン頭部 MDE · ADP · AlF₄ [Dominguez *et al.*, 1998] における ELC の残基 72-81 セグメント領域の立体構造を

調べた (Fig. 10)。ELC の残基 72-81 セグメント領域はミオシン分子の中では、(1) 残基 72-77 セグメント領域、(2) 残基 78-81 セグメント領域、の二つの領域に分けて考えるのが良いように思われた。すなわち、(1) 残基 72-77 セグメント領域には疎水性側鎖をもつ残基が多く、側鎖は主に分子の内部に埋もれるように配置している。一方、(2) 残基 78-81 セグメント領域には親水性側鎖をもつ残基が多く、側鎖は主に溶媒に露出している。したがって、残

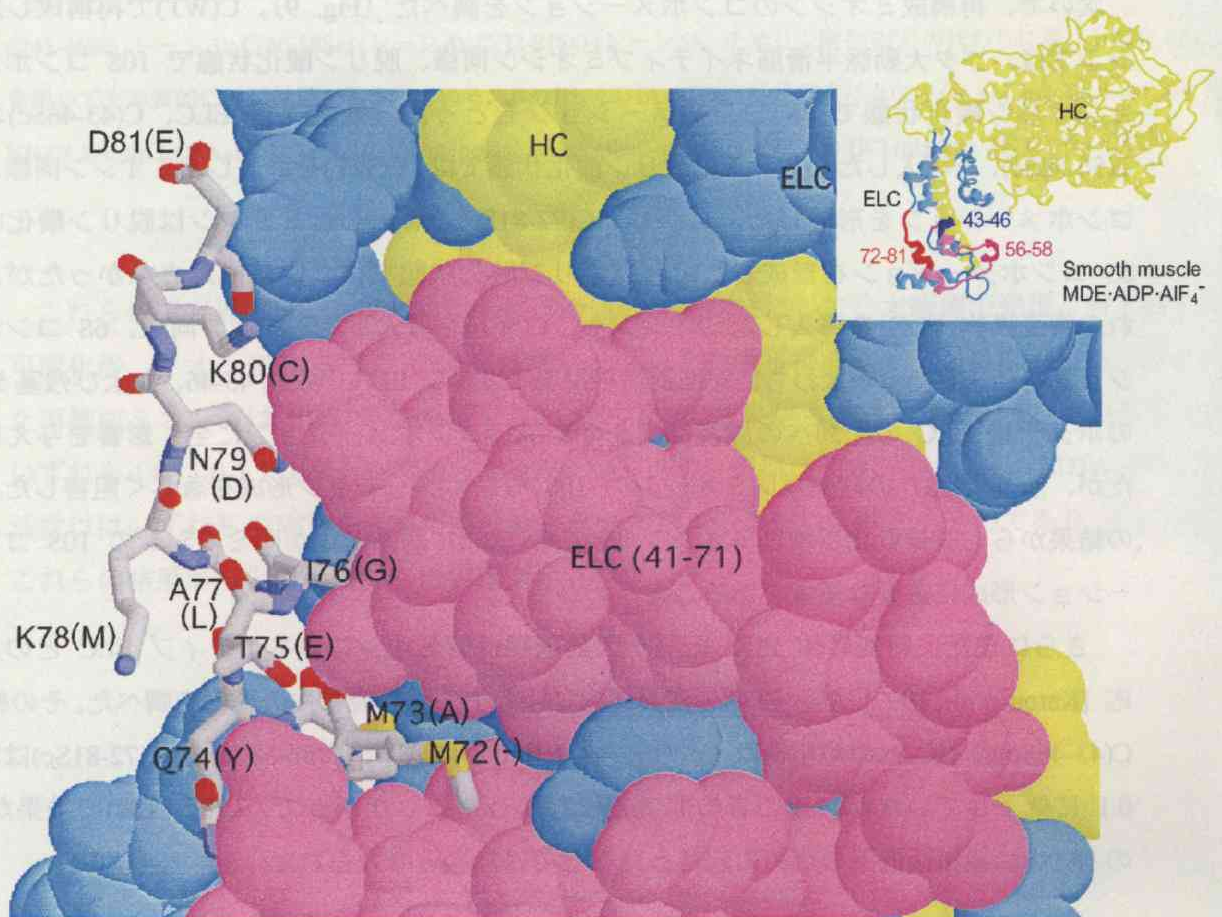


Fig. 10. 脊椎動物平滑筋ミオシン分子内における ELC の残基 72-81 の配置。

M・ADP・Pi アナログのニワトリ砂のう平滑筋ミオシン頭部 MDE・ADP・AlF₄ の結晶構造 [Dominguez et al., 1998] 中における ELC の残基 72-81 セグメント領域とその周辺を取り出した。ELC の残基 72-81 領域は sticks で、他の部分は spacefill で表した。ELC の残基 72-81 セグメント領域は CPK で、残基 41-71 はバイオレット、他の部分はシアンで、また HC は黄色で示した。ELC の残基 72-81 の各残基名と相当するホタテ貝 ELC の残基名を括弧内に示した。右上の挿入図は ribbons で示したニワトリ砂のう平滑筋ミオシン頭部 MDE・ADP・AlF₄ 全体の結晶構造である。HC を黄色、ELC の残基 43-46 領域を青色、残基 56-58 領域をマゼンタ、残基 72-81 領域を赤色で示した。

基 72-77 領域のホタテ貝 ELC の配列への置換が 10S コンホメーション形成に主に影響を与

えているのであれば、残基 72-77 領域と ELC 分子内の他の領域との相互作用が 10S コンホメーション形成に重要であると考えられる。一方、残基 78-81 領域の置換が 10S コンホメーション形成に主に影響を与えているのであれば、残基 78-81 領域はミオシン分子内の ELC 以外のサブユニット領域、例えば尾部の Subfragment 2 領域など、と相互作用し 10S コンホメーション形成に寄与する可能性が考えられる (10S ミオシンにおいて二つの頭部は共に尾部の方を向いており、尾部と相互作用しているように見えることが知られている)。

これらの二つの可能性のうちどちらが主要なのか、あるいは両方が必要なのかを明らかにするために、ニワトリ砂のう平滑筋ミオシン ELC の残基 72-77 をホタテ貝 ELC の配列に置換した変異体 C(72-77Sc)と残基 78-81 をホタテ貝 ELC の配列に置換した変異体 C(78-81Sc)を調製し、両変異体 ELC の 10S コンホメーション形成に与える影響を現在検討中である。

引用文献

- Katoh, T. and Morita, F. (1996) Role of light chains in the activity and conformation of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **271**, 9992-9996
- Katoh, T. and Morita, F. (1997) Conformation and activity of smooth muscle myosin probed by various essential light chains. *J. Biochem.* **121**, 56-62
- Katoh, T., Numata, T., Konishi, K., Furuya, K., and Yazawa, M. (1997) Essential light chain exchange in smooth muscle myosin. *Anal. Biochem.* **253**, 78-84
- Katoh, T., Konishi, K., and Yazawa, M. (2002) Essential Light chain modulates phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin. *J. Biochem.* **131**, 641-645
- Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M., and Cohen, C. (1998) Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: Visualization of the pre-power stroke state. *Cell* **94**, 559-571
- Xie, X., Harrison, D. H., Schulichting, I., Sweet, R. M., Kalabokis, V. N., Szent-györgyi, A. G., and Cohen, C. (1994) *Nature* **368**, 306-312