

平滑筋ミオシンにおける必須軽鎖の機能とリン酸化依存調節

1. はじめに

ミオシンは、ATPを加水分解し、得られるエネルギーを用いてアクチンフィラメントを動かす（または、自分自身がアクチンフィラメント上を動く）モータータンパク質である。平滑筋ミオシンは、ミオシンスーパーファミリーの中でのミオシンIIに属する分子で、平滑筋収縮を担って

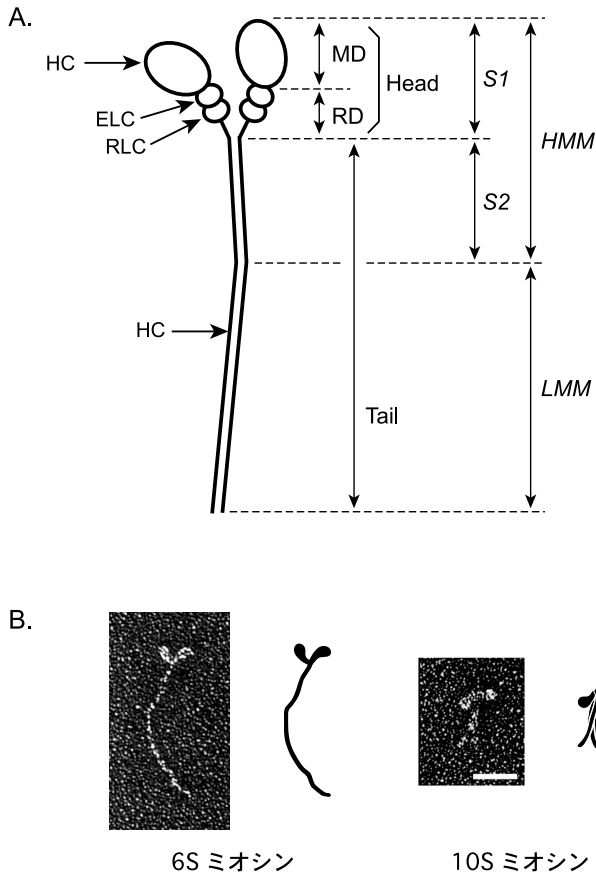


図1 ミオシンIIの分子構造

A, ミオシンII分子の模式図. B, 6Sミオシンと10Sミオシンの電子顕微鏡写真とその描写. スケールバーは50nm. HC, 重鎖; ELC, 必須軽鎖; RLC, 調節軽鎖; MD, モータードメイン; RD, 調節ドメイン (またはレバーアーム); Head, 頭部; Tail, 尾部; S1, サブフラグメント1; S2, サブフラグメント2; HMM, ヘビーマロミオシン; LMM, ライトメロミオシン; 6Sミオシン, 6Sコンホメーションをとったミオシン; 10Sミオシン, 10Sコンホメーションをとったミオシン.

いる。ミオシンIIは、各2本の重鎖（～200kDa）、調節軽鎖（RLC, ～20kDa）、必須軽鎖（ELC, ～17kDa）から構成された六量体で、二つの球状の頭部が1本の細長い棒状の尾部につながった分子形態を持っている（図1A）。軽鎖はいずれもカルモジュリンスーパーファミリーの一員で四つのEFハンド様ドメインから成る。重鎖は、N末端側から、ATPase活性部位とアクチン結合部位を含むモータードメイン（MD）、コンバーター領域、RLC結合部位とELC結合部位を含む調節ドメイン（または、レバーアーム）、および尾部を形成する¹⁾。頭部は、両軽鎖を含み、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（アクチン活性化ATPase活性とアクチンフィラメントを動かす運動活性）を持っている。頭部先端部にあるアクチン結合部位にアクチンが結合するとミオシンIIのATPase活性は著しく活性化される（アクチン活性化ATPase活性）。ATPの加水分解にともなうMDの構造変化が、コンバーター領域を介して、MDに対するレバーアームの傾きを変化させ、アクチンフィラメントを動かすと考えられている²⁾。一方、尾部は2本の重鎖から成る α -helical coiled-coil構造をとっている。ミオシンIIは尾部同士で会合しフィラメントを形成することができる。

平滑筋ミオシンのモーター活性はRLCのSer19のリン酸化・脱リン酸化により調節される。リン酸化はモーター活性を上昇、脱リン酸化は低下させ、平滑筋をそれぞれ収縮、弛緩に導く¹⁾。また、平滑筋ミオシンは尾部が伸びた6Sコンホメーションと尾部が三つに折り畳まれた10Sコンホメーションをとることができる¹⁾（両コンホメーションの名称はそれぞれの沈降係数に由来する）（図1B）。10Sミオシンでは、頭部は尾部側を向いており、尾部は2箇所折れ曲がるが、その一方のC末端側の折れ曲がり箇所辺りが頭部・尾部連結部位に結合しているように見える。また、6Sミオシンはフィラメントを形成できるが、10Sミオシンはできない。6S・10S間のコンホメーション変換も同じ部位（RLCのSer19）のリン酸化によって調節される。したがって、フィラメント形成もまたRLCのリン酸化により調節され得る。

以上のように、RLCは平滑筋ミオシンの活性やコンホメーション形成の調節に深く関与しており、その機能や機能領域が早くから調べられたが、もう一方の軽鎖であるELCはこうした調節には関与しないと考えられ、その機能は長い間ははっきりしなかった。本稿では、近年少しずつ明らかになってきたELCの機能について、平滑筋ミオシンのリン酸化依存調節と関連付けながら、紹介したい。

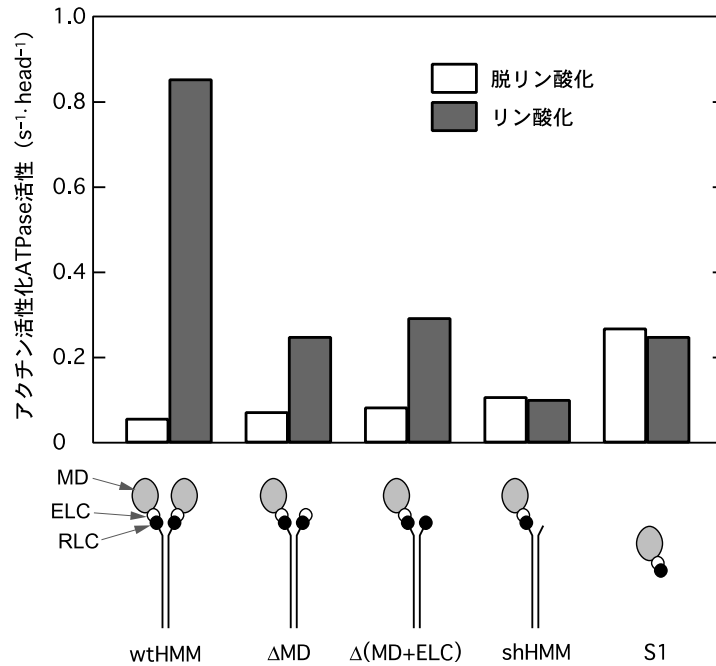


図2 頭部欠失変異体 HMM のアクチン活性化 ATPase 活性
ニワトリ砂のう平滑筋 HMM (wtHMM), ニワトリ砂のう平滑筋 S1,
およびニワトリ砂のう平滑筋頭部欠失変異体 HMM (Δ MD, Δ (MD+
ELC), および shHMM) のアクチン活性化 ATPase 活性を測定した。

2. モーター活性のリン酸化依存調節と必須軽鎖

平滑筋ミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性は, RLC がリン酸化されていない脱リン酸化状態では著しく低く (OFF 状態), リン酸化されると大きく上昇する (ON 状態). これは, アクトミオシン ATPase サイクルにおける アクトミオシン (AM) \cdot ADP \cdot Pi \rightarrow AM \cdot ADP + Pi のステップがリン酸化により活性化されるためと考えられている. 実際, 脱リン酸化ミオシンの ATPase 活性はアクチンが結合してもごくわずかしかなり上昇しない. また, ミオシンのみでの ATPase 活性 (アクチンが無いときの活性) も, ミオシンのアクチンに対する親和性も, リン酸化によってわずかに上昇するだけであり, これらの変化では, リン酸化によるアクチン活性化 ATPase 活性の著しい上昇は説明できない¹⁾.

一方, モーター活性のリン酸化依存調節とミオシンの分子構造との関連についても多くの研究がなされた. 尾部の C 末端側約半分 (ライトメロミオシン, LMM) を欠いたヘビーメロミオシン (HMM) は, フィラメント形成能を失っているが, 尾部の N 末端側約半分 (サブフラグメント 2, S2) と双頭構造を保持しており, 完全なモーター活

性とそのリン酸化による調節能を保持している. ところが, 1 個のミオシン頭部に相当するサブフラグメント 1 (S1) は, モーター活性は保持しているが, リン酸化による調節能を失っており, RLC のリン酸化状態に係わらず ON 状態になっている¹⁾. したがって, 脱リン酸化による OFF 状態の形成には二つの頭部または頭部と S2 部分が必要であると考えられた. 我々は, そのいずれかをはっきりさせるために, 野生型 HMM (wtHMM) と S1 に加えて, 片方の頭部重鎖から MD, MD と ELC 結合部位, および MD と ELC 結合部位と RLC 結合部位を逐次欠失させた変異体 HMM (それぞれ, Δ MD, Δ (MD+ELC), shHMM, と呼ぶ) を昆虫細胞発現系を用いて調製し, それらのアクチン活性化 ATPase 活性のリン酸化依存調節について調べた³⁾ (図 2). これらのうち, S1 以外はすべて wtHMM と同様に脱リン酸化状態での活性が十分に低く, 脱リン酸化による OFF 状態の形成には頭部と S2 部分が必要であることがわかった. この結果は, OFF 状態形成には頭部 \cdot S2 間の相互作用が必要であるという Trybus らの結果と一致した⁴⁾. また, リン酸化による活性の上昇は, 片方の頭部の ELC までを欠失させても見られた (Δ MD, Δ (MD+ELC)) が, 片方の頭部全体を欠失させた shHMM では全

く見られず、RLCリン酸化によるON状態形成には二つのRLCが必要であることがわかった。OFF状態を形成する頭部・S2間相互作用を解除するためにはリン酸化にともなって起こる二つの頭部のRLC間での相互作用が必要なのであろう。さらに、リン酸化依存調節が見られた ΔMD 、 $\Delta(MD+ELC)$ でもリン酸化状態での活性がwtHMMの活性に比べて大きく低下しており、wtHMMのようなON状態での高い活性には二つのMDが必要であることがわかった。相前後して、他に二つのグループから同じような研究が報告されたが、残念ながら結果は必ずしも一致していない^{5,6)}。いずれの報告においても一致していたのは、モーター活性のリン酸化依存調節には少なくとも二つのRLCが必要であるということと、wtHMMに見られるようなリン酸化状態での高い活性には二つのMDが必要であるということであった。

同じ頃、二次元結晶の電子顕微鏡像から三次元再構成によって得られたHMMの分子モデルが提出された⁷⁾。これによると、リン酸化HMMでは二つの頭部に接触は見られないが、脱リン酸化HMMでは一方の頭部のアクチン結合部位が他方の頭部のコンバーター領域に接触している。残念なことに、頭部とS2の配置についてははっきりしてい

ない。これらの構造は、OFF状態の脱リン酸化HMMの低いATPase活性やリン酸化HMMよりわずかに弱いアクチン結合、リン酸化によるATPaseの活性化、およびリン酸化依存調節における双頭構造の必要性などをうまく説明できるものであったが、これまでに得られている生化学的研究の結果とは一致しない部分もある。この脱リン酸化HMMの二次元結晶構造はあくまでアクチンに結合していないときのものであり、アクチンに結合しても保持されるような強固な構造なのかどうかにも疑問が持たれる。実際、溶液状態での脱リン酸化HMMあるいは脱リン酸化ミオシンでは、これまでにこのような構造は観察されていない⁸⁾。

一方、ELCに関する研究はずっと遅れていた。1988年に、ELCにはC末端部の配列が異なる二種のアイソフォームがあることが見出された⁹⁾。その後、アイソフォームの存在比が動物や平滑筋の種類により異なり、それが筋収縮の速度と相関すること¹⁰⁾、それぞれのアイソフォームを持つミオシンのアクチン活性化ATPase活性が異なること^{11,12)}などが報告され、ELCが平滑筋ミオシンの機能に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

我々はさらにELCの機能を調べるために平滑筋ミオシンを変性させることなくRLCとELCを除去・再結合させ

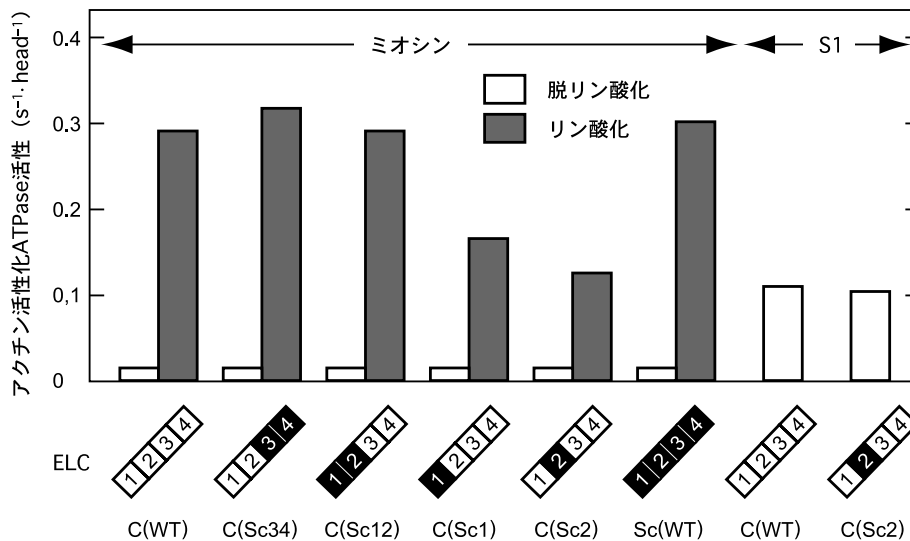


図3 キメラ ELC 導入平滑筋ミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性
ニワトリ砂のう平滑筋 ELC の一つまたは二つのドメインをホタテ貝閉殻筋 ELC の配列に置換したキメラ ELC を導入したブタ大動脈平滑筋ミオシンおよび S1 のアクチン活性化 ATPase 活性を測定した。図示した ELC 模式図中の白抜き部分はニワトリ砂のう平滑筋 ELC 由来のドメイン、黒塗り部分はホタテ貝閉殻筋 ELC 由来のドメイン、番号はドメイン番号を表す。キメラ ELC 名は、例えば C(Sc12) ならば、ニワトリ (Chicken) 砂のう平滑筋 ELC のドメイン 1 とドメイン 2 をホタテ貝 (Scallop) ELC のドメイン 1 とドメイン 2 に置換したキメラ ELC であることを表す。

る方法を開発した¹³⁾。この方法を用いて、RLC だけあるいは ELC だけを持つミオシンを調製し、それらの活性を調べ、ON 状態での高いアクチン活性化 ATPase 活性にはリン酸化 RLC だけでは不十分で ELC も必要であることを示した。また、同法により外来 ELC を平滑筋ミオシンに導入することができるようになった (全長の平滑筋ミオシンを実用レベルで発現させることは今なお容易ではないので、同法は現在でもなお外来 ELC を持った全長の平滑筋ミオシンを調製する効果的な方法である)。そこで、平滑筋 ELC のアミノ酸配列の一部をホタテ貝閉殻筋ミオシン ELC の配列 (脊椎動物平滑筋 ELC の配列とは大きく異なる) に置き換えたキメラ ELC を作成、これを同法によりブタ大動脈平滑筋ミオシンに導入し、配列の置換がアクチン活性化 ATPase 活性に与える影響を調べた¹⁴⁾ (図 3)。平滑筋 ELC のドメイン 1 またはドメイン 2 をホタテ貝 ELC の配列に置換したキメラ ELC を平滑筋ミオシンに導入すると、リン酸化状態でのアクチン活性化 ATPase 活性が大きく低下した。ドメイン 1 と 2 をまとめて置換したキメラ ELC やホタテ貝 ELC を用いてもこのような活性の変化が見られなかったことから、①平滑筋 ELC またはホタテ貝 ELC においてはドメイン 1 とドメイン 2 の間に相互作用が存在し、それがリン酸化状態での高活性に必要である、②このようなドメイン 1・ドメイン 2 間の相互作用が異種 ELC の配列間ではうまく行われず、と考えられた。また、ドメイン 2 の置換が 1 個の頭部に相当する S1 の活性には影響を与えなかったことから、ELC のドメイン 1・ドメイン 2 間の相互作用は二つの頭部間で起こると推定された。さらに、リン酸化状態での高い活性に二つの頭部の MD 間相互作用が必要であること (上述)⁶⁾ と考え合わせると、ELC のドメイン 1・ドメイン 2 間の相互作用がこの MD 間相互作用を導くのではないかと考えられた。したがって、完全な ON 状態の形成には、脱リン酸化状態で OFF 状態を形成させる頭部・尾部間相互作用がリン酸化にともなって起こる二つの RLC 間相互作用によって解除されるだけでは不十分であり、これに加えて ELC 間相互作用に導かれる MD 間相互作用が必要なのではないかと思われる。また、ホタテ貝 ELC においても ELC 間相互作用が示唆されたことからホタテ貝ミオシンにおいても同様の機構が存在する可能性も想定される。

ATPase 反応において、二つの頭部が同時にアクチンに結合し、同調して ATPase サイクルを回るとは考えにくい。したがって、アクチンに結合していない頭部が上述のような相互作用によりアクチンに結合したもう一方の頭部

の AM・ADP・Pi→AM・ADP+Pi のステップをさらに加速させるようなアシスト機構があるのではないかと考えている。

3. コンホメーション・フィラメント形成と必須軽鎖

平滑筋ミオシンは、*in vitro* では、 Mg^{2+} と ATP が存在する生理的塩濃度条件の下で、リン酸化されると 6S コンホメーションをとりフィラメントを形成するが、脱リン酸化されると 10S コンホメーションをとりモノマーとなって溶解する (フィラメントを形成できなくなる)¹⁾。したがって、フィラメント形成もまた RLC のリン酸化・脱リン酸化により調節されることになるが、弛緩時でも平滑筋内にミオシンフィラメントの存在が観察されており、リン酸化に依存したミオシンフィラメントの会合・脱会合は平滑筋収縮の主要な調節機構ではないと考えられている¹⁾。しかし、平滑筋の種類によっては、弛緩時にミオシンフィラメントの数が減ることが観察されており、主要ではないものの平滑筋収縮の調節への寄与が示唆されている^{15,16)}。

近年、この平滑筋ミオシンの 10S コンホメーション形成にも ELC が関与することがわかってきた。平滑筋 ELC の一部をホタテ貝 ELC の配列に置換したキメラ ELC の導入はブタ大動脈平滑筋ミオシンのコンホメーション変換とそれともなうフィラメント形成にも影響を与えることが観察された¹⁷⁾。すなわち、ホタテ貝 ELC、および平滑筋 ELC のドメイン 1 とドメイン 2、ドメイン 2 のみ、あるいは 72-81 残基をホタテ貝の配列に置換したキメラ ELC を導入した脱リン酸化平滑筋ミオシンは、いずれも 10S コンホメーション形成が阻害され、したがって、リン酸化ミオシンと同様のフィラメント形成が観察された (投稿準備中)。これらはいずれも 72-81 残基を含む領域であり、ELC のドメイン 2 中の 72-81 残基が平滑筋ミオシンの 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わかった。平滑筋ミオシン頭部断片の結晶構造²⁾における ELC の 72-81 残基領域の立体構造を調べたところ、N 末端側の 72-77 残基領域は ELC 内部に埋もれ、C 末端側の 78-81 残基領域は分子表面にあって露出していた。そこで、72-81 残基領域をこの二つの領域に分け、その一方のみを置換したキメラ ELC について 10S コンホメーション形成に対する阻害効果を調べたが、その効果はいずれも部分的なものであった。したがって、10S コンホメーション形成には 72-81 残基の全領域が必要であることがわかった。72-77 残基領域で自身の他の領域と正しく相互作用することによってできあがる 78-81 残基領域の立体構造が

10S コンホメーション形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。78-81 残基領域には Lys 残基が二つ含まれており (ホタテ貝 ELC では Met と Cys になっている), これらが例えば S2 の負電荷領域と相互作用することによって頭部が尾部側に向き, 露出した頭部・尾部連結部に尾部が結合して 10S コンホメーションが形成されるのかもしれない。

4. 終わりに

長い間はっきりしていなかった ELC の機能が少しずつ明らかになり, ELC も平滑筋ミオシンのモーター活性のリン酸化依存調節やコンホメーション変換・フィラメント形成において重要な役割を果たしていることがわかってきた。詳細な相互作用部位の解明がまだ残されているが, 平滑筋ミオシンに見られた ELC が導く活性化機構と同様の機構が軟体動物であるホタテ貝のミオシンの調節機構にも存在する可能性もある。また, 脊椎動物の骨格筋ミオシンではどうなのだろうか。今後の進展が期待される。

- 1) 加藤剛志 (1999) 生化学, 71, 290-294.
- 2) Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M., & Cohen, C. (1998) *Cell*, 94, 559-571.
- 3) Konishi, K., Kojima, S., Katoh, T., Yazawa, M., Kato, K., Fujiwara, K., & Onishi, H. (2001) *J. Biochem.*, 129, 365-372.
- 4) Trybus, K.M., Freyzon, Y., Faust, L.Z., & Sweeney, H.L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 48-52.
- 5) Li, X., Saito, J., Ikebe, R., Mabuchi, K., & Ikebe, M. (2000) *Biochemistry*, 39, 2254-2260.
- 6) Sweeney, H.L., Chen, L-Q., & Trybus, K.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 41273-41277.
- 7) Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., & Taylor, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4361-4366.
- 8) Shen, S., Alexander, Y. G., Somlyo, A.V., & Somlyo, A.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 39892-39896.
- 9) Hasegawa, Y., Ueno, H., Horie, K., & Morita, F. (1988) *J. Biochem.*, 103, 15-18.
- 10) Malmqvist, U. & Amer, A. (1991) *Pflügers Arch.*, 418, 523-530.
- 11) Hasegawa, Y. & Morita, F. (1992) *J. Biochem.*, 111, 804-809.
- 12) Katoh, T. & Morita, F. (1997) *J. Biochem.*, 121, 56-62.
- 13) Katoh, T. & Morita, F. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 9992-9996.
- 14) Katoh, T., Konishi, K., & Yazawa, M. (2002) *J. Biochem.*, 131, 641-645.
- 15) Gillis, J.M., Cao, M.L., & Godfraind-De Becker, A. (1988) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 9, 18-28.
- 16) Xu, J-Q., Gillis, J.M., & Craig, R. (1997) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 18, 381-393.
- 17) Katoh, T., Takeuchi, M., Ishida, A., & Taniguchi, T. (2006) *Seibutsu Butsuri*, 46, S202.

加藤 剛志

(旭川医科大学学生化学講座 (細胞制御科学分野))

Function of essential light chain and phosphorylation-dependent regulation in smooth muscle myosin

Tsuyoshi Katoh (Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Midorigaoka Higashi 2-1-1-1, Asahikawa 078-8510, Japan)

ヒト細胞由来無細胞タンパク質合成システムの魅力

はじめに

無細胞 (セルフリー) タンパク質合成システムは組換えタンパク質を合成するための有用な手段であり, 大腸菌やコムギ胚芽の抽出液をベースにしたシステムはすでに商品化され多くの研究者に利用されている。一方, 哺乳類細胞, 特にヒト細胞由来のセルフリータンパク質合成システムも大腸菌やコムギ胚芽に無い特徴を生かしながら急速に発展してきている。本ミニレビューにおいてはヒト細胞抽出液由来のセルフリータンパク質合成システムの有用性について, そしてその魅力について解説したい。

1. なぜ動物細胞由来無細胞システム?

リコンビナントタンパク質を手に入れた場合, まず生きた大腸菌を考えるであろう。うまくいかない場合は, 酵母, 昆虫細胞そして動物細胞で発現させることを考える。それでもうまくいかない場合セルフリー系を使う, というのが一般的な順序であろう。生きた細胞での発現がうまくいかない理由は, [1]毒性があり細胞内で一定量を超えると細胞死に至る, または増殖が阻害される, [2]分解されやすい, などが考えられる。セルフリー系は細胞を一度殺し, 液体として都合よく生き返らせた系であり, 発現させるタンパク質が生きた細胞にとって毒性があってもセルフリー系で合成できる場合がある。また, 工夫次第では分解を避けながらタンパク質を合成できる。セルフリー系の価値はこれだけではない。[1]放射性同位元素や修飾アミノ酸の取り込みが容易であり, X線やNMRによるタンパク質の解析のための試料調製に威力を発揮する, [2]タンパク質のスクリーニング, 例えば cDNA ライブラリーからタンパク質を発現させて, cDNA 産物を網羅的にスクリー