ミオシンの「尻尾振り説」は正しいか？

(財) 高輝度光科学研究センター放射光研究所 岩本裕之

It is widely believed that myosin generates force by swinging its light-chain binding domain (lever arm) on the motor domain, which is affixed firmly onto actin via stereospecific hydrophobic interactions. However, recent results suggest that the events taking place at the actin-myosin interface are more dynamic than previously considered. This brief review discusses some of the results which suggest such dynamic nature of actin-myosin interface in relation to the conventional understanding.

Myosin subfragment-1 / lever-arm theory / X-ray diffraction / muscle fiber mechanics
actin-myosin interface / tight-coupling mechanism

1. はじめに

筋収縮のメカニズムとして長く信じられてきたミオシンの首振り説¹⁾は、ミオシン頭部 (S1) の立体構造 (図1) が決定された後はS1のモータードメインに対するレバーアームの首振り (尻尾振りと表現したほうが適切かと思う) と読み替えられて、現在でも定説として広く信じられている。一方、日本のグループからはこの「尻尾振り説」に疑問を投げかけるデータが数多く発表されている。ところが、これらのデータに対する海外での評価は高いとはいえず、最近の*Nature* 誌の記事²⁾でもその「技術」は高く評価されているものの、「科学」の面は西側の価値観とは異なる特殊な文化の所産というニュアンスでとらえられている。また私自身も、国際学会で聴衆の1人が “Everybody knows him, but nobody believes him...” と囁くのを耳にしたことがある。

日本人の研究成果が正当な評価を得るには何をしたらよいのだろうか。もとよりすべての筋研究は「定説を覆す」ことではなく、筋収縮時に「ほんとうは何が起きているか」を知ることを目的としているはずである。そこで、なぜ「尻尾振り説」がここまで広く信じられたのか、また「ほんとうは何が起きているか」を知り、説得力をもってその結果をアピールするにはどうしたらよいかを、私自身の研究成果も交えて考察してみたい。

図1 S1の立体構造

(a) ニワトリ胸筋S1⁴⁾. 50KC : 50Kクレフト, NBP : ヌクレオチド結合ポケット, ELC : 必須軽鎖, RLC : 制御軽鎖. (b) S1のアクチンへのドッキングモデル³²⁾. 結晶では見えないいくつかのループが加えられている。太い矢印はアクチン繊維の長軸。アクチンのN末端 (N) と, S1の50K-20K接合部ループ (ループ-2) の間がEDC (水溶性カルボジミド) により架橋される。

Reconsidering the Lever-Arm Theory of Myosin Action

Hiroyuki IWAMOTO

Japan Synchrotron Radiation Research Institute, SPring-8

図2 Holmes³⁾の考えに基づく尻尾振り機構

2. 「尻尾振り説」の概略

「尻尾振り説」の根幹を成すのはS1自身の構造変化と、S1とアクチンの界面で起こる現象の2つであり、これらは分けて解説する必要がある。

S1自身の構造変化はHolmesの総説³⁾に解説されたものが典型的である。図2に示すこのモデルは異なるヌクレオチドを結合させた数種のS1またはその断片の立体構造⁴⁾⁶⁾をつなぎ合わせて構成されたものである。これらの構造はレバーアームの向きが異なり、それらをATP分解サイクルの順に並べると力発生と矛盾しない動きになる。つまり、基本的に力学的サイクルとATP分解サイクルが1:1に対応する、いわゆるタイトカプリングモデルである。重要な点はS1モータードメインの50K部分にあるクレフトに「開」、「閉」の2状態があり、この開閉は結合したヌクレオチドの状態をアクチン結合部位に伝えたとともにレバーアームの動きとも連動していることで、開閉運動によりレバーアームの末端で約12 nmの動きが生じる。ATPの加水分解(図2b)にはクレフトが「閉」状態であることが必要で、次いでモータードメインがアクチンへ弱く結合(図2c)、追ってクレフトが「開」状態になることでATP加水分解産物の無機リン酸(Pi)がバックドアから放出され⁷⁾、モータードメインがアクチンと強い結合を形成すると同時にレバーアームの運動が起こる(図2d)ADP放出後(図2e)に再びATPが結合するとクレフトは「閉」状態になり、モータードメインとアクチンとの界面が壊されるのでS1はアクチンから解離する(図2a)た

だしRaymentらのオリジナル論文⁸⁾では開閉の関係は逆で、平滑筋S1を用いたクライオ電顕の結果⁹⁾もそちらを支持する。その他、種々の状態の立体構造が平滑筋やホタテガイのS1についても決定されているが、いずれもレバーアームの動きは力発生と矛盾しないものである¹⁰⁾¹²⁾。

一方、S1とアクチンの界面をみると、S1がアクチンから解離した後の最初の会合はアクチンのN末端とS1の50K-20K接合部にあるループ(図1b)の間の非立体特異的な静電相互作用を介するものである⁸⁾。続いて起こる立体特異的相互作用は50K lower部にあるいくつかの疎水性残基とアクチン側の疎水性残基との間の疎水性相互作用を介するもので⁸⁾、これによりモータードメインがアクチンに強固に固定されてレバーアーム運動の足がかりを与える。このモータードメインの不動性は「尻尾振り説」の重要な要素である。骨格筋ではトロポミオシンが退いてアクチン側の疎水性残基がすべて露出した状態(オープン状態)で初めて立体特異的相互作用が可能となる¹³⁾。

3. ルースカプリングモデル

タイトカプリングモデルに対して、ルースカプリングモデルでは力学的サイクルとATP分解サイクルが1:1に対応しない。このモデルの端緒となったのは、カニの横紋筋の長い筋節中を無負荷で滑るアクチン繊維の滑走距離とATP消費量を比較した実験である¹⁴⁾。このときのATP1分子当たりの滑走距離は少なくとも60 nmと見積もられた。これはS1の長径の3倍にあたり、S1の首振り(1回あたり8 nm)がATP1分子の分解あたり何回も起きなければ説明できない量であった。このような観察を説明する機構としてバイアスされたブラウン運動が考えられており、それを可能にするのはS1のATP加水分解の結果生じるアクチン繊維上の非対称ポテンシャルである¹⁵⁾。このポテンシャルの存在はまだ実験的に立証されていない。

4. 「尻尾振り説」が広く受け入れられた理由

「尻尾振り説」が広く受け入れられた背景には、その基となった首振り説¹⁾がすでに広く受け入れられていたことがある。首振り説から尻尾振り説への移行も、S1修飾Fアクチンのクライオ電顕像にフィットさせたS1モデルにおけるレバーアームの移動方向がフィラメントの長軸に一致したためスムーズに行われた。また立体構造の解明以前、モータードメインに結合させたスピラベルの不動性が首振り説の反証として挙げられていたが¹⁶⁾、レバーアームのみが動くことでこの矛盾

も解消する。

タイトカプリングモデルはHuxleyの1957モデル¹⁷⁾以来の伝統で、首振りと化学反応との対応付けはLymnとTaylor¹⁸⁾による試みがよく知られている。立体構造の解明と前後してS1単独¹⁹⁾、²⁰⁾またはS1修飾Fアクチン²¹⁾、²²⁾で、レバーアームの向きのヌクレオチド依存性変化を示すデータが多数発表されたこともタイトカプリングモデルをさらに肉付けするのに寄与した。またレバーアームの長さを変えたS1を遺伝子操作で発現させたり²³⁾、軽鎖を蛍光ラベルしてレバーアームの回転を筋線維中で測定する実験²⁴⁾なども行われたが、多くの結果は「尻尾振り説」を支持するものであった。ステップ応答時の筋線維X線子午線反射強度の変化も「尻尾振り説」で説明できるという²⁵⁾。

対案であるルースカプリングモデルと比較したときのタイトカプリングモデルの優位性について、*Nature*誌の記事中でJustin Molloyは「タイトカプリング・レバーアーム説は性格がより限定的なので、単純で予測可能かつ本質的に検証可能だ」と述べている²⁾。確かに作業仮説を立て、実験的にそれを検証することは近代科学の根幹であり、仮説が単純で多くの研究者の手に届く検証手段が多数存在することはその作業を容易にする。こうしてルースカプリングモデルが立証も反証も困難な状況でタイトカプリング・レバーアーム説を支持するデータだけが量産されれば、流れが後者に傾くのは当然の帰結といえる。

ここで単純なモデルから出発し、より多くの現象を説明するためモデルを複雑化していくのは思考過程としてはよいが、検証の容易なモデルが必ずしも正しいわけではない点に注意すべきであろう。また科学は民主主義の世界ではなく、「ほんとうのこと」を多数決で決めることはできない。

5. 「尻尾振り説」は正しいか

さて、「ほんとうのこと」を知る出発点の1つは、「尻尾振り説」の根拠となるデータや論理がほんとうに正しいのか、多くの研究者が見落としている落とし穴はないかと、考え直してみることだろう。例えば「尻尾振り説」は、種々のリガンドを結合して安定化したS1（しかも起源は脊椎動物から粘菌までさまざま）の結晶構造をつなぎ合わせたものである。「このように安定な構造同士をつなぎ合わせて、どうして力が出るのか？」という素朴な疑問から出発してもよい。各リガンドの存在下で安定化した状態を研究対象とするのは容易だけれども、このアプローチからはタイトカプリングモデルを補強するデータ以外は生まれにくい。実験手法

が結論を限定するケースである。

6. X線回折実験からの手がかり

収縮の原動力となりうる不安定性の候補は、構造変化が化学反応に追いつかないことにより生じる構造ひずみであろう。このようなひずみは化学反応速度が高いほど蓄積しやすいと想像される。その極端な例がFアクチンに化学架橋したS1のケースである。S1をEDCで架橋するとアクチンのN末端とS1の塩基性ループの間に共有結合ができる（図1b）²⁶⁾。上に述べたS1とアクチン双方の立体特異的疎水性相互作用部位はきわめて近傍に拘束されることになり、また制御タンパク質もEDCでオープン状態に固定されるようである²⁷⁾。これはS1とアクチンがエネルギー的に安定な立体特異的相互作用を形成する上でまさに最適の状態であり、実際S1のATPase活性は無限大のアクチン濃度に相当する値まで上昇する²⁶⁾、²⁷⁾。

それでは実際に立体特異的結合がどの程度形成されているだろうか。これをSPRING-8のBL45XU小角散乱ステーションで、X線回折法により検証した。骨格筋線維を伸張してアクチン繊維をミオシン繊維の存在するA帯から引出し、外からS1を灌流した後でEDC処理する。次にATPを加えて活性化し、X線回折像を記録する。活性化時に立体特異的結合が形成されるなら、ATP非存在下（図3b）のときのように5.9 nmのアクチン層線反射（図3aの矢印）が増強し、強度分布も大きく変化するはずである。ところが、記録された5.9 nmの反射はS1灌流前の裸のアクチンの場合（図3a）とまったく変わらなかった（図3c）²⁷⁾。すなわちS1-アクチン界面での立体特異的相互作用はほとんど生じていない。アクチンに拘束されているのにS1がその周期に従えないほど激しく揺動する様子は、強固な立体特異的結合をより所とする「尻尾振り説」のイメージとはかけ離れている。

S1が結晶中と同じ構造を保っているなら、激しく揺動するS1が立体特異的結合部位でアクチンと接触を保

図3 伸張した骨格筋のX線回折像
(a) S1灌流前（裸のアクチン）(b) S1架橋後（ATP非存在下）(c) S1架橋後（ATP存在下）

つのは不可能である。しかし、S1の界面付近で、結晶中ではしっかりとした構造をとる部分が機能中には大きく構造を変え、揺動中もアクチンと何らかの接触を保っている可能性も否定できない。タンパク質の相互作用の仕方により局所的な構造が大きく変わる例がアクチンで報告されている。さまざまなアクチンの結晶構造を比較すると²⁸⁾、いわゆる DNase-I 結合ループの構造が、DNase-I とプロフィリン複合体では β ターンを形成、ゲルソリン複合体では乱れて観察不能、アクチン単独の結晶中では α -ヘリックスを形成するという。これに類似した局所的構造変化がアクチンとS1の界面でダイナミックに起こっている可能性は検討する必要がある。

7. 力学実験からの手がかり

アクチン-S1界面のダイナミックなようすを示唆するデータは他にもある。その一例が筋収縮に対するイオン強度の影響である。一般的な「尻尾振り説」では、アクチンとS1の会合は静電的・非立体特異的なプロセスで、それが力発生時には立体特異的疎水性相互作用に置き換えられるとされる。この考えに従えば、収縮の初期過程のほうが後期の力発生過程よりもイオン強度の影響を強く受けると予想される。しかし実際には、イオン強度を500 mM程度まで上げてアクチンとS1の会合はそれほど大きな影響を受けず、逆に会合後の力発生過程のほうがイオン強度の影響を強く受ける²⁹⁾。従って、塩橋形成などの分子間相互作用（分子内の可能性もある）が力発生メカニズムの一端を担っている可能性がある。また、このような高イオン強度では静電相互作用よりも疎水性相互作用のほうが長距離の分子間力を担うと思われる。F-アクチン上でS1が相互作用する疎水性残基は連続したトラックを形成しているように見え、高イオン強度下でもそれに沿ってS1がアクチンとの相互作用を保ったままかなり長距離を移動することは十分ありうる²⁹⁾。疎水性相互作用の性質は非特異的なものだからである³⁰⁾。また、以上の考察から、一般に言われる「ミオシンIIはノンプロセスなモーター（アクチンや微小管などのレールタンパクとの1回の遭遇につき、1回の化学力学サイクルしか行えないモーター）」という考えにも私自身は疑念を抱いている。

また、「尻尾振り説」では硬直状態のS1にATPが結合すると50Kのクレフトが閉じ（または開いて）、アクチンとの親和性が下がって解離することになっている³¹⁾。一方、力発生中のS1（A-M-ADPまたはA-M中間体、AとMはそれぞれアクチンとミオシン）が短縮方向に変位するとアクチンとの親和性が下がることは古く Huxley の1957モデル¹⁷⁾で提唱されており、それによって多くの

実験事実が説明できる。私は力を出さないA-M-ADP-Pi中間体（Piは無機リン酸）も短縮方向への変位により親和性が下がることを報告した³¹⁾。こうしてみると、ヌクレオチドの状態によらず短縮方向の変位が分子間相互作用を変え、アクチンへの親和性を下げているらしい。このような性質があるなら、ヌクレオチドの状態や力学的エネルギーの蓄積状態が異なっても、S1は短縮時には同様に〔短縮方向への変形〕〔解離〕〔再結合〕...の構造的サイクルを繰り返しているかもしれない。この場合、個々のS1の構造的サイクルとATP加水分解サイクルは当然一致しない。この辺がタイトカブリング、ルースカブリング両陣営の実験結果の矛盾を解くヒントになるかもしれないと空想している。

8. 「ほんとうのこと」を知るために

以上を総合すると、筋収縮時に「ほんとうは何が起きているか」を知る上でアクチン-S1界面にも光を当てることが重要になりそうである。これとS1またはアクチンの分子内で起きている現象（例えば構造ひずみの蓄積やその他の物理化学的ポテンシャルエネルギーの発生）を総合したとき、筋収縮時に「ほんとうに起きていること」はこれだと断言できるような統一的な理論ができるかもしれない。タンパク質界面に関する新しい研究対象として、タンパク質相互作用に伴う水和水の変化がある。X線回折・散乱法はこの分野の研究にも有効で、アクチン-S1複合体への応用も近い将来可能になるであろう。

このようにして「ほんとうに起きていること」はこれだと主張する理論ができたとする。またはそれほど大袈裟でない説でもよい。これらの仮説が科学のコミュニティに対して説得力をもつための要素は他の分野にも共通したことで、(1)異なる実験条件で結果が同じ仮説に収束すること、(2)今までに知られる現象をすべて説明できる（または矛盾しない）こと、(3)仮説が対象の構造と関連付けられていること、(4)アーティファクトの可能性が十分に検討されていること、の4点が含まれていよう。これらの要素のすべてに肯定的な答えを出せるなら、科学のコミュニティから不当な評価を受けることはあるまいと期待したい。しかし、その他に重要な要素(5)があり、それは自分の成果が広く知られるよう努力することである。私を含む日本人には地域性、言語、国民性などからハンディがある。このハンディを克服し、上に挙げた各要素を自らの研究の評価基準として科学のコミュニティにとって有益な情報を少しでも多く発信したいと思っている。

引用した研究成果のうち、X線回折に関するものは通信総合研究所の大岩和弘、高輝度光科学研究センター（現・北九州市立大学）の鈴木 拓、理化学研究所播磨研究所の藤澤哲郎の各氏との共同研究である。

文 献

- 1) Huxley, H. E. (1969) *Science* **164**, 1356-1366.
- 2) Cyranoski, D. (2000) *Nature* **408**, 764-766.
- 3) Holmes, K. C. (1998) *Novartis Foundation Symp.* **213**, 76-92.
- 4) Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, B., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. and Holden, H. M. (1993) *Science* **261**, 50-58.
- 5) Fisher, A. J., Smith, C. A., Thoden, J. B., Smith, R., Sutoh, K., Holden, H. M. and Rayment, I. (1995) *Biochemistry* **34**, 8960-8972.
- 6) Smith, C. A. and Rayment, I. (1996) *Biochemistry* **35**, 5404-5417.
- 7) Yount, R. G., Lawson, D. and Rayment, I. (1995) *Biophys. J.* **68**, 44s-49s.
- 8) Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. and Milligan, R. A. (1993) *Science* **261**, 58-65.
- 9) Volkmann, N., Hanein, D., Ouyang, G., Trybus, K. M., DeRosier, D. J. and Lowey, S. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 1147-1155.
- 10) Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K. M. and Cohen, C. (1998) *Cell* **94**, 559-571.
- 11) Houdusse, A., Kalabokis, V. N., Himmel, D., Szent-Gyorgyi, A. G. and Cohen, C. (1999) *Cell* **97**, 459-470.
- 12) Houdusse, A., Szent-Gyorgyi, A. G. and Cohen, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11238-11243.
- 13) Vibert, P., Craig, R. and Lehman, W. (1997) *J. Mol. Biol.* **266**, 8-14.
- 14) Yanagida, T., Arata, T. and Oosawa, F. (1985) *Nature* **316**, 366-369.
- 15) 江崎誠治, 柳田敏雄：第38回日本生物物理学会年会（仙台, 2000年9月10-13日）.
- 16) Cooke, R. (1981) *Nature* **294**, 570-571.
- 17) Huxley, A. F. (1957) *Prog. Biophys. Biophys. Chem.* **7**, 255-318.
- 18) Lymn, R. W. and Taylor, E. W. (1971) *Biochemistry* **10**, 4617-4624.
- 19) Wakabayashi, K., Tokunaga, M., Kohn, I., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., Takezawa, Y., Wakabayashi, T. and Amemiya, T. (1992) *Science* **258**, 443-447.
- 20) Suzuki, Y., Yasunaga, T., Ohkura, R., Wakabayashi, T. and Sutoh, K. (1998) *Nature* **396**, 380-383.
- 21) Jontes, J. D., Wilson-Kubalek, E. M. and Milligan, R. A. (1995) *Nature* **378**, 751-753.
- 22) Whittaker, M., Wilson-Kubalek, E. M., Smith, J. E., Faust, L., Milligan, R. A. and Sweeney, H. L. (1995) *Nature* **378**, 748-751.
- 23) Uyeda, T. Q. P., Abramson, P. D. and Spudich, J. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4459-4464.
- 24) Irving, M., Allen, T. S. C., Sabido-David, C., Craik, J. S., Brandmeier, B., Kendrick-Jones, J., Corrie, J. E. T., Trentham, D. R. and Goldman, Y. E. (1995) *Nature* **375**, 688-691.
- 25) Irving, M., Piazzesi, G., Lucii, L., Sun, Y.-B., Harford, J. J., Dobbie, I. M., Ferenczi, M. A., Reconditi, M. and Lombardi, V. (2000) *Nature Struct. Biol.* **7**, 482-485.
- 26) Mornet, D., Bertrand, R., Pantel, P., Audemard, E. and Kassab, R. (1981) *Nature* **292**, 301-306.
- 27) Iwamoto, H., Oiwa, K., Suzuki, T. and Fujisawa, T. (2001) *J. Mol. Biol.* **305**, 863-874.
- 28) Otterbein, L. R., Graceffa, P. and Dominguez, R. (2001) *Science* **293**, 708-711.
- 29) Iwamoto, H. (2000) *Biophys. J.* **78**, 3138-3149.
- 30) Chothia, C. and Janin, J. (1975) *Nature* **256**, 705-708.
- 31) Iwamoto, H. (1995) *Biophys. J.* **69**, 1022-1035.
- 32) Lorenz, M., Popp, D. and Holmes, K. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 826-836.

岩本裕之

岩本裕之（いわもと ひろゆき）

（財）高輝度光科学研究センター放射光研究所 主幹研究員

東京大学大学院理学系研究科博士課程修了，帝京大学医学部講師を経て現職。最近は筋肉のメカニクスからX線回折に研究内容の重点を移しています。

連絡先：〒679-5198 兵庫県佐用郡三日月町光都1-1-1

E-mail: iwamoto@spring8.or.jp