総説

骨格筋ミオシンの新たな中間体の構造と滑り運動中のその役割

片山栄作 千葉大学大学院工学研究科

Utilizing quick-freeze deep-etch-replica electron-microscopy, we observed that actin-attached myosin during *in vitro* sliding was oppositely-bent, considering the direction of the putative pre-power stroke configuration. Since SH1-SH2-cross-linked myosin was a good candidate with a similar appearance, we devised a new procedure to define the relative angle of the catalytic-domain and the lever-arm from the averaged images, and built its 3-D model. The projection angle of the lever-arm in that model was compatible with actin-sliding cross-bridge structure. Introducing this conformer as the structural analogue of the transient intermediate, we propose a revised scheme of the crossbridge-cycle compatible with various experimental results.

in vitro sliding movement / Myosin head conformation / Freeze-replica electron-microscopy / Revised crossbridge-cycle / Lever-arm tilting / Morphological image-processing

1. はじめに

近代的な実験科学としての筋収縮のしくみの探求は、20世紀半ばに、張力発生が太いフィラメント（ミオシン）の間に細いフィラメント（アクチン）が滑り込むことによるとの「滑り説」^{1),2)}で始まった。引き続いて、生理学³⁾あるいは構造⁴⁾の見地から、その動きの実体が両フィラメントをつなぐ架橋構造（ミオシン頭部）の変形に由来するとの「クロスブリッジ説」が提案された。両説とも説得力に満ちた卓見であったが、生きた骨格筋のサルコメアの動きを光学顕微鏡で直接観察できるため前者は容易に実証されたのに対し、後者については、クロスブリッジ本体であるミオシン頭部があまりにも小さく、収縮中に起きる速い構造変化をその観察に必要な分解能で直接検出する手段が存在しないため、半世紀以上が過ぎた現在に至っても実証はできていない。ここ20年来、アクチン⁵⁾と、そしてさまざまなスクレオチドを結合したミオシンの結晶構造（最初は Rayment *et al.*⁶⁾）が解かれ、ATP結合によりミオシンの軽鎖結合部位（レバーアームと称される）が強く折れ曲がることが判明した。「収縮中にはアクチンに結合したモーター部位は動かない」との古典的な実験結果^{7),8)}に基づき、ATP結合、非結合の結晶構造の違いに関連付けていわゆる「レバーアーム

ム首振り説」が提唱され⁹⁾（文献付属の動画を参照）、多くの実験事実をよく説明できる有力な仮説として広く認められてきた。その説によれば、アクチン・フィラメントに強く結合した硬直複合体中のミオシン頭部にATPが結合するとアクチンとの親和性は一気に約1万分の1に下がって解離すると同時にATPは加水分解され、産物は保持される。その後、頭部はアクチンに再結合し、リン酸とADPの離脱を伴いながら最終的に硬直複合体に戻る。単純化すれば、クロスブリッジ・サイクルはATP結合・非結合の2種類の既知の構造間の遷移と言える。この説の検証には、滑り運動中のミオシン頭部の構造を可視化するのが理想であるが、一般的な構造解析法では同一状態の多数の粒子の平均化ができることが構造決定の必須要件であり、独立に動く個々のクロスブリッジの構造決定には適用できない。そのため、肝心の滑り運動中の中間体の構造は、研究開始から半世紀以上にわたる現在まで未知のままである。

2. 活性中間体捕捉のための試料作製と画像解析法

滑り運動中のクロスブリッジの構造を捉えるため、筆者は急速凍結フリーズ・レプリカ法¹⁰⁾により *in vitro* 滑り運動中のアクトミオシンの姿を電子顕微鏡で

Novel Structure of Skeletal Muscle Myosin's Intermediate and Its Role in Crossbridge-Cycle

Eisaku KATAYAMA

Graduate School of Engineering, Chiba University

※図1-図3は、電子ジャーナル (<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys-char/ja/>) ではカラー版を掲載しています。

直接観察し、滑り運動中のクロスブリッジの姿を捉えた。そこで観察されたミオシン頭部は、アクチン・フィラメントを抱き込むように丸まった形状を示し、首振り説で想定される ATP (実際には ADP/Vi) 結合構造では説明不能な奇妙な様式でアクチンに結合していた¹⁰⁾ (文献 Fig.5-7 参照)。ミオシン結晶構造中のアクチン結合部位を想定すればレバーアームの屈曲はむしろその説とは逆方向と考えざるを得なかった。一方、単独の ATP 結合ミオシンの画像は結晶構造と同様であった¹⁰⁾。これは広く信じられているクロスブリッジ首振り説の破綻、そしてその矛盾を説明する新たなコンフォメーションの存在を意味するかも知れない。そこで、中間体のアナログと目されるさまざまなミオシン頭部¹¹⁾の構造探索を始めた¹²⁾。

急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法においては、**回転シャドウイング**により試料表面に重金属を蒸着して透過型電子顕微鏡で観察するため、一見、走査型顕微鏡で撮ったような表面像の、しかしそれよりはるかに微細な凹凸が可視化される。その最大の利点は、1 ミリ秒以下の一瞬に凍結固定した「個々のタンパク質粒子」表面の凹凸プロファイルを「高いコントラスト」で可視化できることである。それにより、結晶構造既知のタンパク質試料の場合、原子モデル表面の凹凸は仮想空間内の物体に光を当てるレイ・トレーシングによるコンピュータ・シミュレーションで画像化でき¹³⁾実際に観察された画像をさまざまな向きのモデル像と比較すれば、分子をどちらの向きから見ているのかその角度を定量的に求めることが可能となる^{14)*1}。個々のミオシン (実験には、尾部を除いた「重メロミオシン」を用いた) 分子についてモーター部位の向きとレバーアームの位置関係を調べればその大まかなコンフォメーションを推定できる。

3. 新たに見出したミオシン中間体

これまでの生化学的知見から、ミオシンのクロスブリッジ・サイクルの中間体アナログと目されるいくつかの分子種を上記の手法により観察した。その結果、モーター領域とレバーアームの結合部の α -ヘリックス (SH1ヘリックス)の両端に位置し、ヌクレオチドのない状態では互いに逆方向を向く2個のチオール基 (SH1

図 1

ヌクレオチド非結合状態のホタテ・ミオシン S1 の結晶構造と、SH1ヘリックス中の SH1, SH2 および Lys705 の配置:ヌクレオチドが結合していない場合には2個のチオール基は逆方向に突出するが、ヌクレオチドが結合すると SH1ヘリックスの構造が崩れてその間の架橋が可能となる。ただし pPDM 処理ミオシン¹⁶⁾では、Lys705-SH2 間が架橋された分子種 (図 2f) のみが結晶化した。

および SH2:図 1 参照)をさまざまな2価性試薬で化学架橋した産物に共通して、頭部が丸まった特異な構造が生じていることが示唆された。われわれはミオシンを DTNB [5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 処理してジスルフィド結合を形成させ、純粋に SH1-SH2 間のみで架橋された分子種¹⁷⁾を上記レプリカ法により観察したところ、それまでに観察した大多数の中間体候補分子種とは異なり、強く丸まった特徴を呈する頭部の画像が検出された (実は、類似の反応性を有する2価性試薬 p-PDM [N,N'-1,4-PHENYLENE-DIMALEIMIDE] による架橋処理を施したミオシンの結晶構造¹⁶⁾が報告されているが、その結晶において架橋された残基は SH1 (ホタテミオシンでは Cys-703) ではなくその2つ隣の Lys-705 のアミノ基と SH2 (Cys-693) であり、レバーアームの向きを含めた全体の結晶構造も他のコンフォマーと大きく異なるものではなかった)。そこで、多数の粒子の像を集めてクラス分け、平均化の後に、新たに開発した**モルフォロジー処理**による手法^{15), 18)}を用いてモーター部位とレバーアームに分離し、原子モデルから作成したシミュレーション画像と前記マッチング手法により比較してそれぞれの部位の向きを決めた。その結果、観察の向きが異なる各クラス平均化画像中におけるミオシンのモーター部位とレバーアームの相対角度はすべてのクラスで一致した。それは、各クラスの画像が、特定の形状の粒子を別方向から観察した投影像であることを示す。そこで、それぞれの画像中のモーター部位とレバーアームの相対的な角度と距離を算出し、両構造をつなぎ合わせて SH1-SH2 架橋ミオシンの特異な構造を推定した。その一方で、レプリカ像では表面プロファイルに由来す

*1 蛋白質複合体の表面に形成された重金属被膜を透過型電子顕微鏡で撮影するレプリカ像と、原子モデルの形状を模した仮想空間の物体に光を当てた画像とは一見類似するが、まったく異なる原理で描出されたものである。しかしモルフォロジー処理などの適切な処理を施せば、同等の画質として相互に比較できることは確認済みである (引用文献 14, 15 参照)。

図 2

われわれが新たに見出した分子内ジスルフィド架橋ミオシン頭部の構造の特徴、および他のコンフォーマーとの比較（文献 15 の図を改変）：(a)-(d)：急速凍結フリーズレプリカ像から再構成した分子内架橋ミオシンの表面殻（4 方向）およびそれにはめ込んだ原子モデル。これが活性複合体中の構造の有力な候補である。(e)-(h)：(a) の殻にモーター部位を合わせてはめ込んだ既知の結晶構造の原子モデル。新たな構造におけるレバーアーム突出の向きは既存の構造と大きく異なり、滑り運動中の画像に合致する。(e) ADP 結合型ミオシン、(f) Lys705-Cys693 間架橋・ADP 結合型ミオシン、(g) ヌクレオチド非結合型ミオシン、(h) ADP/Vi 結合型ミオシン。いずれもホタテ・ミオシンの結晶データ。

るコントラストが描出されていると想定し、新たな手法^{15), 18)}を工夫して表面の凹凸を適切につなぐことでごく少数の投影像から表面殻の 3 次元構造を再構成した。そのようにして作成した殻に既知のさまざまな原子モデルのモーター部位の向きを合わせて嵌め込んだ結果を図 2 に示す¹⁸⁾。分子内架橋ミオシンの構造は既知の構造の原子モデルとは大きく異なり、とりわけ

ATP 結合ミオシンとはほぼ逆方向にレバーアームが突出することが確認された。この構造がアクチンに結合すると仮定すれば、運動中のミオシン頭部のレプリカ像をうまく説明できる。

4. アクチン滑り運動中のミオシン頭部の構造

滑り運動中のミオシンはいくつかの異なる様式でアクチンに結合していた。それらの中には、レバーアーム部位が明瞭に見えるものと、モーター部位あるいはアクチン・フィラメントに隠れて見えないものとがあるが、大部分が新たな分子内架橋型コンフォメーションを取っていると思われる。アクチンとミオシン頭部の結合様式についてはまだ解析途中であるが、表面パターンとアクチン結合部位との相対関係により、1) 屈曲面をアクチン側に向けてアクチンを抱き込む向きの頭部と、2) モーター部位の長軸を中心に左回りに 90 度回転した向きでアクチンに結合する頭部の概ね 2 種類が存在していた。さらに前者では、アクチン・フィラメントの軸方向に対するミオシン頭部の傾きは直角方向を中心にさまざまな角度を取っていた。それらのミオシンの形状はいずれも新たな分子内架橋構造で説明でき、クロスブリッジ・サイクルの過程を反映するものと思われるが、われわれのレプリカ像は動的な現象のスナップショットであり、時系列に従う順序を決めるには別のアプローチが必要であった。

図 3

新たな構造を組み込んで改訂されたクロスブリッジ・サイクル（文献 18 の図を改変）：図中のそれぞれのアクトミオシン構造状態におけるアクチンの長軸方向（B-端）および側面から見たミオシン頭部の模式図を示す。灰色および白色のパッチは、それぞれ、アクトミオシンの第 1 および第 2 の化学架橋（接触）ペアの配置を示す。クロスブリッジ・サイクル中のコンフォメーションの大部分（矢印で Novel Structure と示す全過程）は新たな構造が占める。ヌクレオチド非結合状態（Rigor）から始まる一連の化学過程およびその順序を決定した根拠については本文を参照。サイクル図中の*および**のコンフォメーションは、図 2 の (d) および (c) の向きに該当する。

5. 新たなクロスブリッジ機構の提案

Andreev と Reshetnyak¹⁹⁾ は、アクトミオシンの時間分解化学架橋を行った。アクトミオシンの接触部位には水溶性カルボジイミドで架橋される2種類の残基ペアが存在する。彼らの実験によれば、第1ペア（図3: カラー版では黄色）と第2ペア（白色）の架橋速度はATPがない場合には同程度であるが、ATP存在下では後者が著しく遅れる。これは、ATP存在下でクロスブリッジ・サイクルが回っている場合、アクトミオシンはまず第1ペアで接触し、その後に第2ペアが結合することを意味する。上記のアクトミオシン複合体モデルにおける第1, 第2の接触部位の配置を考慮すればその理由が明らかとなる。1) では第1ペアのみが接しているのに対して2) では両ペアともに接している。さらに、2) ではアクチンに対するモーター部位の結合状態は硬直複合体と同一である。これは正にわれわれが見出したアクトミオシン結合状態の時系列を示している。つまり、ATP結合によりアクチンから解離したミオシン頭部のモーター部位は逆方向に反り返って今回新たに見出した中間体構造を取る。その構造を保ったままアクチンに接し、左右に揺れながら第1接触部位を探す。この時、第2接触部位はアクチンとは反対側に面しているため、結合はできない。第1部位が見つかったらそこで結合し、次に左向きに回転して第2ペアが結合し、2) の状態が実現する。そこではモーター部位は既に硬直複合体と同様の分子配置を占めており、アクチンに結合したままでレバーアーム部分のみが伸展すれば、それは正に「首振り」となるであろう。この首振りの前後におけるレバーアームの根元（S2部位との境界）の位置関係から想定されるパワーストロークの向きは、ATP結合型コンフォメーションを出発点とする従来の説による向きよりもアクチンの軸に平行であり、効率も高そうに思われる。

以上の通り、滑り運動中のアクトミオシン複合体を電子顕微鏡で直接観察して得られた画像は、広く受け容れられている従来の首振り説では説明できないが、われわれが見出した新たな構造を取り込めば、解釈は一挙に容易となる。紙面の都合で省くが、他のさまざまな現象の説明も容易である。筋肉中で起きる張力発生が *in vitro* 滑り運動と完全に同じであるとの証拠はないが、恐らく生筋中でも類似の現象が起きているものと想像される。

柳田らのグループは、筋収縮の際の化学・力学連関が必ずしも1対1でない（ルースカプリング）との実験事実を根拠に、アクトミオシン間の張力発生は、ア

クチンに沿って方向性を有する、ミオシンのブラウン運動によるものと提唱している²⁰⁾。われわれの観察によれば、滑り運動の際にミオシンの構造変化が起きていることは確実であるが、新たなクロスブリッジ・サイクルに少々の仮定を加味することにより、ルースカプリングまで含めた統合的な説明が可能となるかも知れない。

6. おわりに

急速凍結フリーズ・レプリカ電子顕微鏡法は個々の高コントラストの蛋白質複合体の明瞭な像を与えるため、直接像は重用されてきたものの、それが詳細な構造解析に用いられた例は極めて少ない。われわれのユニークなアプローチ^{14), 18)}とそれにより明らかになった新知見が、今や古典的ではあるがあまり普及していない電子顕微鏡観察技術の有用性を見直していただけた契機となれば幸いである。

文 献

- 1) Huxley, A. F., Niedergerke, R. (1954) *Nature* **173**, 971-973.
- 2) Huxley, H. E., Hanson, J. (1954) *Nature* **173**, 973-976.
- 3) Huxley, A. F., Simmons, R. M. (1971) *Nature* **233**, 533-538.
- 4) Huxley, H. E. (1969) *Science* **164**, 1356-1366.
- 5) Kabsch, W. *et al.* (1990) *Nature* **347**, 37-44.
- 6) Rayment, I. *et al.* (1993) *Science* **261**, 50-58.
- 7) Yanagida, T. (1981) *J. Mol. Biol.* **146**, 539-560.
- 8) Cooke, R. *et al.* (1982) *Nature* **300**, 476-478.
- 9) Vale, R. D., Milligan, R. A. (2000) *Science* **288**, 88-95.
- 10) Katayama, E. (1998) *J. Mol. Biol.* **278**, 349-367.
- 11) Bobkov, A. A., Reisler, E. (2000) *Biophys. J.* **79**, 460-467.
- 12) Maruta, S. *et al.* (2004) *J. Biochem. (Tokyo)* **136**, 57-64.
- 13) Katayama, E. *et al.* (2003) *Adv. Exp. Med. Biol.* **538**, 295-304.
- 14) Kimori, Y. *et al.* (2007) *Ultramicroscopy* **107**, 25-39.
- 15) 木森義隆, 片山栄作 (2008) *生物物理* **48**, 125-148.
- 16) Himmel, D. M. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12645-12650.
- 17) Wells, J. A., Yount, R. G. (1980) *Biochemistry* **19**, 1711-1717.
- 18) Kimori, Y. *et al.* (2013) *Biochem. J.* **450**, 23-35.
- 19) Andreev, O. A., Reshetnyak, Y. K. (2007) *J. Mol. Biol.* **365**, 551-554.
- 20) Ishijima, A. *et al.* (1998) *Cell* **92**, 161-171.

片山栄作 (かたやま えいさく)

千葉大学大学院工学研究科特任研究員
2010年まで東京大学医科学研究所教授。
研究内容: フリーズ・レプリカ法による蛋白質構造解析
連絡先: 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33
E-mail ekatayam@restaff.chiba-u.jp

片山栄作