ミオシンの分子地図

東京大学理学部生物化学教室 須藤和夫

Three functionally important sites of myosin head, i.e. ATPase site, actin-binding site and SH₁ thiol, were identified in its three-dimensional structure by electron microscopy. These sites were also mapped along primary structures of myosin heavy and light chains by chemical methods such as affinity labeling, chemical crosslinking and "end-label fingerprinting".

myosin / ATPase site / SH₁ actin-binding site / avidin-biotin

I. はじめに

ミオシンはアクチンとともに筋肉や一般の細胞内の収縮装置を構成する主要なタンパク質である。ミオシン分子はATPaseであり、このATPase活性はアクチンによって著しく活性化される。アクチンとミオシンの相互作用とこれにともなうミオシンATPaseの活性化は収縮の原動力となる。ミオシンは分子量約50万の分子で、分子量20万の重鎖 (heavy chain) 2本と分子量2万前後の軽鎖 (light chain) 4本からできている。ミオシン分子の形は極めて特徴的で、rodと呼ばれる細長い棒状部分とその先についた2個の頭部 (head) と呼ばれる球状部分からできている。ミオシンを様々なタンパク質分解酵素で処理すると頭部は簡単にrodから切り放され、いわゆるミオシンサブフラグメント-1 (S1) が得られる。こほS1上にはATPase活性部位とアクチン結合部位というミオシンの最も重要な機能を担う部位が存在している。ミオシン重鎖および軽鎖の一次構造は、脊椎動物の骨格筋、平滑筋ミオシンから粘菌やアメーバのミオシンまでさまざまなもので決定されている。脊椎動物の骨格筋ミオシンからアメーバのミオシンまで、その重鎖 (特にS1部分の) の一次構造は極めて似通っている。本稿では、このようなミオシン分子の一次構造あるいは高次構造のどの部分がどのような機能を担っているか—ミオシンというタンパク質分子の地図—について筆者の仕事を中心に解説したい。

II. ミオシン分子上の

アクチン結合部位の位置

若林らのグループは電子顕微鏡の三次元再構成法を用いてアクチン-S1 rigor complex (ATPのない状態

図1. ミオシン頭部の三次元地図。電子顕微鏡像の三次元再構成で得られたミオシン頭部の三次元像を示す。左上が頭部先端に当り、右下がrodに近い部分に当たる。この頭部像の全長はほぼ10nmで、ミオシン頭部 (全長20nm) の先端部半分が見えている。頭部とrodの接合部 (head-rod junction) からほぼ10nmがこの再構成像では消えていることになる。頭部上でアクチン結合部位^{11,21}, ATPase部位⁶¹, SH1部位を含む領域を示す。破線で示したアクチン結合部位とSH1を含む領域は裏側 (アクチンに結合したS1を外側から眺めたとして) に位置し、実線で示したATPase部位をふくむ領域は表側に位置している。各領域間の距離 (中心間) はそれぞれほぼ5nmである。ここに示した各々の部位は図2に示す部位と対応できる。なお、ここに示したミオシン頭部は図2に図示した重鎖のほか軽鎖を含んでいる。

Molecular maps of myosin.

Kazuo SUTOH

Department of Biophysics and Biochemistry Faculty of Science, The University of Tokyo.

図2. ミオシン頭部の一次元地図. ミオシン頭部重鎖のポリペプチド鎖(分子量95,000, 約800残基)をN端からC端まで引き延ばした模式図を示す(N端からの距離は残基数に比例している). このポリペプチド鎖上にさまざまな部位の位置を記入してある. ACTINと記入してある2箇所のセグメントにはアクチン結合部位が存在している^{31,41}. アクチン-ミオシン複合体では, このセグメント中のリシン残基のどれかがアクチンN端の酸性残基側鎖と相互作用している. ATPと記入してあるのは, ATPase 部位に近い残基あるいはセグメントである^{77,81,111}. SH1, SH2, Trp130, Ser324などの残基の位置も示してある. また, 矢印でSH1, SH2と記入してあるのは, それぞれ立体構造中でSH1, SH2に近いセグメントである^{10,141}.

で形成される強固なアクチン-SI 複合体)の三次元構造を明らかにした. その結果, 1)ミオシン頭部は単純な球状構造ではなく途中で大きく折れ曲がっていること, 2)ミオシン頭部はアクチンフィラメントの軸に対して垂直に結合していること, そして3)アクチン結合部位はミオシン頭部の先端部分に位置していることが判明した¹)²¹(図1).

一方, ミオシン重鎖および軽鎖一次構造上でどの部分がアクチン結合部位に寄与しているかは, アクチン-SI 複合体を水溶性カルボジイミド(EDC)で架橋し, この架橋部位をSI重鎖および軽鎖上で同定するという方法で決められた(EDCはタンパク質表面のカルボキシル基とアミノ基が接している場合にこれを直接架橋する zero-length crosslinker であり, タンパク質どうしがイオン結合で接触している面に共有結合を導入できる). この結果, SI重鎖上で少なくとも2ヶ所のセグメント中のリシン残基側鎖がアクチン分子のN端に存在するカルボキシル基と直接相互作用していることが判明した^{31,41}(図2の重鎖上でACTINと表示されている2箇所のセグメント). またミオシン軽鎖のN端部のリシン残基側鎖のN端部のリシン残基側鎖がアクチン分子のC端部のカルボキシル基と相互作用していることも明らかになった^{31,41}. これらミオシン重鎖および軽鎖のリシン残基は, 図1に示したミオシン頭部上のアクチン結合部位内に存在していることになる.

Ⅲ. ミオシン分子上のATPase 部位の位置

ミオシン分子上のATPase 部位の位置を電子顕微鏡を用いて決めるためには電子顕微鏡用プローブをここに結合させなければならない. 我々はこの目的のために図3に示すようなビオチン化光活性ADPアナログ

を開発した. 光化学反応でこのビオチン化アナログをSIのATPase 部位に共有結合で導入し, これにアビジン(分子量68,000のビオチン結合タンパク質)を結合させる⁶¹. このアビジン-SI 複合体を更にF-アクチンに結合させてアビジン-SI-アクチン複合体にする.

この複合体の三次元構造を電子顕微鏡像を用いて解くとミオシン頭部上でのアビジンの位置—即ちATPase 部位の位置—が決まる. 図1に示すように, このようにして決めたATPase 部位の位置はミオシン頭部のほぼ中央で, 頭部が大きく折れ曲がる場所にあっ

図3. ビオチン化光活性ADPアナログの構造.

ている⁶¹. また, このATPase 部位と前述のアクチン結合部位は頭部上でちょうど反対側に位置している⁶¹. ミオシンATPase 部位でのATP分解のさまざまな中間体に対応してアクチンとミオシンの相互作用が変化し, また逆にミオシン頭部へのアクチンの結合—解離によってATP分解の過程が変化することがアクチンフィラメントとミオシンフィラメント相互の運動の生化学的側面であるが, このようなミオシン頭部上でのアクチン結合部位とATPase 部位の相互作用は両者が

ミオシン頭部で重なっているためにもたらされる steric な効果ではない。むしろ図1に示すように、この両部位はミオシン頭部の反対側に存在しているの両者の communication は頭部内部の構造変化を介しているものと思われる。

ミオシンポリペプチド鎖のどの部分が ATPase 部位を構成しているかは、この部位に反応性の高い ATR アナログを取り込ませて、これの位置を一次構造上で同定するという方法で決められた。例えば、ミオシン重鎖の Trp130 はアデニン環の近傍にあり⁷⁾、また Ser324 はリボース環に近いことが知られている⁸⁾ (図2)。さて、電子顕微鏡用ブローグとして用いたビオチン化 ADR アナログはミオシンポリペプチド鎖のどこに結合しているのだろうか。この ADP アナログがビオチン化されていることを利用し、ビオチンの結合位置を SI 重鎖および軽鎖上で end-label fingerprinting という方法^{9),10),11)} を用いて同定すると、ADP アナログは Trp130 に続く短い疎水性セグメント (図2の重鎖上で黒く塗りつぶした部分) に結合していることが明らかとなった¹¹⁾。ここで用いた ADP アナログはリボース環にミオシンとの架橋部位を持っているので (図3)、Trp130 に続くセグメントは ATPase 部位に結合した ADP (あるいは ATP) のリボース環に近いことが分かる。一方、前述のように Trp130 自身は ADP (あるいは ATP) のアデニン環に近いので、Trp130 のまわりのセグメントはミオシン ATPase 部位の形成にかなり重要な寄与をしているものと思われる。

SI 重鎖上には、他のヌクレオチド結合タンパク質と非常に相溶性の高い部分が存在しており (図2において Lys184 を含む Gly に富む数残基—いわゆる Glycine Rich Loop)、ここが ATPase 部位の一部 (特にリン酸基結合部位) を形成していると想像されている^{12),13)}。しかし、この Glycine Rich Loop が ATP アナログで修飾された例はない。むしろ、この Loop 中の Lys189 が SH2 に非常に近いこと¹⁴⁾ から考えて、ここは後述の SH1-SH2 領域近傍に存在すると考える方が妥当であろう。

IV. ミオシン分子上の SH1 の位置

ミオシン頭部重鎖の C 端近くには SH1 と SH2 と呼ばれる極めて反応性の高い2個のシステイン残基がある (図2)。これまで一次構造の決まったミオシン (アメーバや粘菌ミオシンから脊椎動物骨格筋ミオシンまで) を比較してみると、この SH1-SH2 のまわりはもっとも変異が少ない領域である。このことは SH1-

SH2 のまわりの残基がミオシンの重要な機能を担っていることを示唆している。SH1 あるいは SH2 を修飾すると ATPase 活性が大きく変化したアクチンとの相互作用も影響を受けることから、このまわりの残基が直接 ATPase 部位やアクチン結合部位の形成に寄与しているという可能性が多く研究者によって示唆された。そこで我々はアビジン-ビオチン系を用いて SH1 の位置をミオシン分子上で同定することを試みた。まずシステイン残基側鎖に特異的に結合するビオチン誘導体を合成し、これを SH1 に導入した。このビオチンにアビジンを結合させれば、ATPase 部位の場合と同様の手続きで SH1 の位置をミオシン頭部で決定できる¹⁵⁾。図1に示すように、SH1 は頭部の中央部分の折れ曲がり点に位置し、ATPase 部位とは反対側、即ちアクチン結合部位とは同じ側面に存在している¹⁶⁾。SH1 を含む領域は明かにアクチン結合部位あるいは ATPase 部位とは重なってはいないので、SH1 のまわりの残基は直接これらの部位に寄与してはいない。SH1 あるいは SH2 の化学修飾が ATPase 活性やアクチン結合にもたらす影響は、これら化学修飾によって引き起こされる SH1-SH2 領域の構造変化が頭部内部の構造変化を介してアクチン結合部位や ATPase 部位に伝えられるものと考えるのが妥当であろう。SH1-SH2 領域の機能は依然不明である。

V. 電子顕微鏡用ブローグとしての site-directed antibody の利用

上述のようにアビジンを電子顕微鏡用ブローグとして、ミオシン頭部で機能上重要と思われるいくつかの部位を同定することができた。しかし、アビジン-ビオチン系を利用するには、ビオチンをミオシン分子の目的とする部位に導入しなければならないが、ビオチンを導入できる部位には限りがある。このような電子顕微鏡ブローグとしてのアビジン-ビオチン系の限界を補うため、我々は新たな電子顕微鏡ブローグとして site-directed antibody の利用を試みている。site-directed antibody は、ミオシンポリペプチド鎖上の特定の一次構造に対応する10残基程度の合成ペプチドを抗原として作成する抗体である。原理的にはミオシンの一次構造の任意の箇所に対して抗体を作成することが可能である。実際に、我々はミオシン重鎖 N 端の8残基に対応する合成ペプチドを抗原として抗体を作成し、これを電子顕微鏡ブローグとして重鎖 N 端がミオシン頭部中央に位置していることを明らかにした¹⁷⁾。現在、この N 端抗体以外にもミオシン頭部重

表1 ミオシン重鎖に対する site-directed antibody. 抗体作成に用いた一次構造とその重鎖上での残基番号を示す. Titre 数は SI を用いた ELISA アッセイにおいて half-saturation を示す希釈度. アミノ酸は一文字記号で示す.

一 次 構 造	残基番号	Titre 数
1) Ac-SSDADMAV	1-8	10,000
2) PMNPPKYDKIEDM	78-90	6,000
3) TGDKKKEEATSGK TGKKKKEEPTPGK	201-213	60,000
4) FQKPKPAKGKAEA	564-576	0
5) EEGGGGKGGKKKGSS	628-643	2,000

鎖のさまざまな部位に対する抗体を作成中であるが (表1), titre の強弱はあるもののほとんど全ての抗体がミオシン分子と反応した. このような site-directed antibody を用いれば, 特定の機能部位の位置の同定はもちろん, ミオシン分子上でポリペプチド鎖がどのように折り畳まれているかを粗くではあるが (電子顕微鏡の分解能の範囲内で) 解きあかすことも可能であろう.

本稿では, ミオシン重鎖上に存在する部位を中心に解説したが, 軽鎖上の部位についてもアビジン-ビオチン系やモノクローナル抗体を電子顕微鏡ブローグとして同定した例などがある^{18),19)}. 興味のある読者は原論文を参照されたい.

ここに引用した筆者の多くの仕事—特に電子顕微鏡を用いたミオシン頭部の地図作り—は, 東京大学理学部物理学教室若林研究室との共同研究による. 快く共同研究に応じてくださった同研究室の若林健之助教授及び徳永万喜洋博士に感謝します.

文 献

- 1) Toyoshima, C., Wakabayashi, T. (1985) *J. Biochem.*, **86**, 219-243.
- 2) Toyoshima, C., Wakabayashi, T. (1985) *J. Biochem.*, **86**, 245-263.

- 3) Sutoh, K. (1982) *Biochemistry*, **21**, 3281-3285.
- 4) Sutoh, K. (1983) *Biochemistry*, **22**, 1579-1585.
- 5) Sutoh, K., Yamamoto, K., Wakabayashi, T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 212-216.
- 6) Tokunaga, M., Sutoh, K., Toyoshima, C., Wakabayashi, T. (1987) *Nature*, in press.
- 7) Okamoto, Y., Yount, R. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1575-1579.
- 8) Yount, R. G., Okamoto, Y., Mahmood, R., & Grammer, J. (1985) The 11th Yamada Conference Abst. p41.
- 9) Sutoh, K., Mabuchi, I. (1986) *Biochemistry*, **25**, 6186-6192.
- 10) Sutoh, K., Lu, R. C. (1987) *Biochemistry*, **26**, 4511-4516.
- 11) Sutoh, K. (1987) *Biochemistry*, in press.
- 12) Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982) *EMBO J.*, **1**, 945-951.
- 13) Fay, D. C., Kuby, S. A., Mildvan, A. S. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 907-911.
- 14) Sutoh, K., Hiratsuka, T. (1987) submitted.
- 15) Sutoh, K., Yamamoto, K., Wakabayashi, T. (1984) *J. Mol. Biol.*, **178**, 323-339.
- 16) Toyoshima, C., Yamamoto, K., Sutoh, K., Wakabayashi, T., manuscript in preparation.
- 17) Sutoh, K., Tokunaga, M., Wakabayashi, T. (1987) *J. Mol. Biol.*, **195**, 953-956.
- 18) Yamamoto, K., Tokunaga, M., Sutoh, K., Wakabayashi, T., Sekine, T. (1985) *J. Mol. Biol.*, **183**, 287-290.
- 19) Tokunaga, M., Suzuki, M., Wakabayashi, T. (1987) *J. Mol. Biol.*, **194**, 245-255.

すどう かずお

昭和22年生まれ. 東大理学部生物化学野田研で大学院を過ごす. 卒業後, 米国ジョンスホプキンス大でポストドク (Harrington 研). ここでミオシンの仕事を始め, 帰国後もミオシンやアクチンをいじって10年になります.

連絡先: 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学理学部生物学化学教室.

☎03-812-2111 内線4382