ミオシンの ATP 結合ポケットの構造変化と筋収縮

旭川医科大学化学教室 平 塚 寿 章

Myosin is one of the key protein components of biological force generating systems. The globular head region of the myosin molecule, subfragment-1 (S-1), contains the site for ATP binding and hydrolysis and the site for actin binding. Although the open and closed conformational states of the ligand-binding pocket have been well established with various proteins other than myosin, such an operation of the ATP-binding pocket of S-1 is purely speculative at present. A hydrophobic fluorescent dye was found to bind to the ATP-binding pocket of S-1. Fluorescence study reveals that the ATP-binding pocket of S-1 is closed and/or tightened during ATP hydrolysis.

myosin ATPase/ATP-binding pocket/conformational changes/fluorescent dyes/muscle contraction

1. はじめに

筋肉は生物の運動のために特別に発達した器官であり生物エンジンといってもよい。筋収縮は、筋タンパク質のミオシン分子で構成される太いフィラメントとアクチン分子で構成される細いフィラメントとの間で起きる滑り運動である。ミオシンは、ATP を加水分解して得た化学エネルギーを力学エネルギーに変換してアクチンフィラメント上を動くので、「モータータンパク質」といわれている。

ATP などのヌクレチドを結合するさまざまなタンパク質の X 線結晶解析などから、ヌクレチドが結合するとタンパク質に空間的に大きな動きが誘起され、これが機能の発現に重大に関わっていることが明らかにされている¹⁾。モータードメインのあるミオシン頭部 (S-1) には ATP を加水分解する酵素作用 (ATPase) がある。S-1 の ATP 結合部位は比較的大きなポケット内にあり、触媒部位もここにあると考えられている²⁾。ATP 結合ポケットは、反対側に位置しているアクチン結合部位と立体構造変化を介して互いに“通信”し合う仕組みになっている³⁾。ミオシンの ATP 結合ポケットで起きる構造変化は、滑り運動を起こさない他の酵素やタンパク質の構造変化と同じなのだろうか。これが明らかになると筋収縮の化学—力学エネルギー変換の機構がより理解しやすくなるだ

ろう。

S-1 が ATP を結合して加水分解する時に ATP 結合ポケットでどんな立体構造変化が起きるのかについては、つい最近までは他の酵素を模して想像するしかなかった⁴⁾。ところが ATP 結合ポケットに特異的に結合する蛍光色素が見つかったことから、S-1 の ATP 結合ポケットの構造変化が初めて連続的に捉えられ、その機構もより明らかになったのである⁵⁾。

2. S-1 の三次元構造

骨格筋ミオシンの S-1 は、軽鎖と分子量約 9.5 万の重鎖よりなる。X 線結晶解析による S-1 の三次元構造²⁾ (図 1) を見ると、重鎖の大部分は α -ヘリックス含量が高く、モーターの駆動に必要なアクチン結合部位や ATPase 部位は S-1 の N-末端側約 1/3 のところに全部納められている。アクチンや ATP の結合部位は大きな裂け目 (クレフト) 内にあり、ATP 結合部位とその近くにある ATPase 部位を合わせて ATP 結合ポケットとよぶ。

3. ATP 結合による S-1 内部の構造変化

S-1 の ATP 結合ポケットとアクチン結合部位は互いに離れているにもかかわらず、ATP とアクチンの結合はそれぞれ互いに影響を与え合う。これは、両結合部位の一方に ATP やアクチンが結合するとポリペプチド鎖に立体構造変化が起き、この信号が他の結合部位に伝わるためと考えられている³⁾。

20-kD ドメインの Cys-697 (SH₂) や Cys-707 (SH1) および 50-kD ドメインの Trp-510 周辺のポリペプチド

Conformational changes of the ATP-binding pocket of myosin and muscle contraction

Toshiaki HIRATSUKA

Department of Chemistry, Asahikawa Medical College

図1. 骨格筋ミオシン頭部 (S-1) の三次元構造 (文献2より改変)

SH1, Cys-707. SH2, Cys-697. W, Trp-510. RLC, レギュラトリ軽鎖. ELC, エッセンシャル軽鎖.

Ⓝ, N-末端. Ⓢ, C-末端 (尾部に続く). 矢印はそれぞれATPとアクチンの結合部位を表す.

鎖は非常に柔らかい⁶⁾. 三次元構造でATP結合ポケットとアクチン結合部位をそれぞれコップの両側に見立てると、これら3残基をつなぐ領域はコップの底に相当する。おそらくこの領域は、ATPやアクチンの結合を直ちにキャッチし、両結合部位が通信し合うために機能していると思われる。

酵素の機能的動きの最も顕著なものに、基質結合に伴う動き (適合誘導) がある¹⁾. 基質を結合していない酵素と酵素・基質複合体のX線結晶解析の結果から、さまざまな酵素で基質結合により空間的に大きな動きが起きることが示されている。

しかしS-1では、ATPなどのヌクレオチドを結合した複合体のX線結晶解析の結果はまだ出ていない。ATPが結合するとS-1内部のポリペプチド鎖がどのように動くのかは、他の研究方法を使って知るしかない。たとえヌクレオチドを結合したS-1のX線結晶解析の結果がわかったとしても、得られる構造はスナップショットのようなものであり、S-1内部が溶液中で実際にどのように動いているのかを連続的に知ることは難しい。RaymentらはATPやアクチンの結合によるS-1の構造変化のモデルも提出しているが⁴⁾、このモデルは非常に大きな適合誘導が起きるアデニル酸キナーゼの動きを模した単なる想像である¹⁾。

4. 蛍光分光法によるタンパク質のヌクレオチド結合ポケットの構造変化の検出

蛍光標識ATPを天然のATPの代わりに使った実験から、S-1がATPと複合体をつくるとヌクレオチドはATP結合ポケット内に深く埋め込まれて結合し、この独特の結合様式が筋収縮に必須であることが示唆されている⁷⁾. しかしこの方法では、構造変化が起きる前のポケットの様子を蛍光スペクトル変化から知ることはできないので、ATPの結合に伴う構造変化を連続的に追跡するのは不可能である。

一方ヌクレオチドや補酵素と結合するさまざまな酵素が、一見これらのリガンドとはまるで構造の似ていない色素を化学量論的に強く結合することが知られている^{8)~17)} (図2). 結合は真のリガンドと競争的であるばかりか、酵素・色素複合体のX線結晶解析の結果から、本来のリガンドのアデノシン (Ado) 部分が結合する部位に、 $10^{-7} \sim 10^{-4} \text{M}$ という解離定数で強く結合することもわかっている (表1).

このような色素をS-1のATP結合ポケットに特異的に結合させることができると、ATPの結合による色素のスペクトル変化などからポケットの構造変化を連続的に追跡できる。例えば、ATPが結合してもそれ程大きな構造変化が起きない場合、ATPを加えると結合している色素は置換され、結合が弱くなってポケットから追い出される。しかし、ポケットが充分に

表 1. リガンド結合部位に色素が特異的に結合する酵素

色 素 ^a	酵 素	競争的に結合する真のリガンド	競争的結合の証拠 ^b	結合数 ^c	K_d, K_i^d (μM)	スペクトル変化 ^e	文献
DIF	ヘキソキナーゼ (単量体)	AMP	X 線結晶解析	1			8
TIF	乳酸脱水素酵素	NAD ⁺	X 線結晶解析 LB プロット	2 (1)	$K_d=45$ $K_i=15$	+	9
	クレアチンキナーゼ	ATP	LB プロット	2 (1)	$K_d=17$ $K_i=26$	+	10
	ヘキソキナーゼ (二量体)	ATP	LB プロット	1	$K_d=11$ $K_i=7$	+	11
RB	アルコール脱水素酵素	NAD ⁺	LB プロット 蛍光滴定	2 (1)	$K_d=2.9$	+	12
ASSO	乳酸脱水素酵素	NADH	LB プロット		$K_i=2.1$		13
	リンゴ酸脱水素酵素	NADH	LB プロット		$K_i=7.1$		
	グルコース-6-リン酸 脱水素酵素	NADP	LB プロット		$K_i=7.6$		
	ヘキソキナーゼ (二量体)	ATP	LB プロット		$K_i=13$		
IS	アルコール脱水素酵素	NAD ⁺	X 線結晶解析 蛍光滴定	2 (1)	$K_d=200$		14
DIS	フォスフォグリセリン酸 キナーゼ	ATP	LB プロット		$K_i=75$		15
ANS	グリコーゲンフォスフォ リラーゼ ^b	AMP	X 線結晶解析 LB プロット DX プロット	2 (1)	$K_d=50$		16
	アルコール脱水素酵素	NAD ⁺	LB プロット 蛍光滴定	2 (1)	$K_d=125$		12
	グリセルアルデヒド-3- リン酸脱水素酵素	NAD ⁺	LB プロット		$K_i=55$		17
PPBA	ミオシン S-1	ATP	LB プロット DX プロット 蛍光滴定	1	$K_d=26$ $K_i=0.8$	+	5

^a構造式と正式名は図 3 に示してある^bLB は Lineweaver-Burk, DX は Dixon を表す。^cサブユニット当たりの結合数を () 内に示してある。^d K_d, K_i はそれぞれ色素と酵素の複合体の解離定数と、真のリガンド存在下で求められた競争的阻害定数を表す。^e色素と酵素の複合体に真のリガンドを加えた時の構造変化を、スペクトル変化で検出できるものを + で示してある。

フレキシブルで、ATP が結合したり加水分解されるのに伴ってポケットが閉じるような構造変化が起きる場合は、ATP を加えても色素は ATP 結合部位のすぐ近くにトラップされて外へは追い出されなくなる可能性も生じてくる。この時疎水性のアミノ酸残基が色素の近くに来ると色素と酵素の疎水性相互作用も強められ、色素の結合はより強くなるだろう。このような情報は色素の吸収や蛍光の変化から経時的に得られる。

5. S-1の ATP 結合ポケットの構造変化 —著者の研究結果—

S-1に特異的に結合する色素を多数検索した結果、最終的に選ばれた PPBA (図 2) は非常に疎水性が高く、360nm で励起すると 450 nm 付近に極大をもつ強

い蛍光を発する。光安定性も高く、蛍光量子収率はジオキサン中で 0.71 であった。溶媒のジオキサン濃度を 2 から 100% に変えてみると、蛍光強度は 4.3 倍に増大し極大波長も 35nm 青方移動した。この結果は、PPBA がタンパク質の環境プローブとしても使えることを示している⁵⁾。

図 3A に示したのは、一定濃度の PPBA 存在下で ATP 濃度を変えて測定した S-1 の Ca^{2+} -ATPase 活性を Dixon プロットしたものである。グラフは横軸の負の領域の上方で一点に交わるので、PPBA は ATP と競争的に S-1 に結合する阻害剤であると分類される¹⁸⁾。

しかしこの“競争的阻害”をさらに詳しく解析すると、“完全競争阻害”と“部分的競争阻害”の二種類

図2. 酵素のアデノシン結合部位に特異的に結合する色素とアデノシンの構造*

* 正式名: DIF, diiododifluorescein; TIF, tetraiododifluorescein; RB, rose bengal; ASSO, 1-amino-4-(4'-aminophenylamino)-anthraquinone-2,3'-disulfonic acid; IS, 5-iodosalicylic acid; DIS, 3,5-diiodosalicylic acid; ANS, 1-anilino-8-naphthalene sulfonic acid; PPBA, 3-[4-(3-phenyl-2-pyrazolin-1-yl)benzene-1-sulfonylamido]phenylboric acid; Ado, adenosine.

がある。前者では基質と阻害剤が全く同じ結合部位を奪い合うのに対して、後者では阻害剤は基質結合部位のすぐ近くに結合する。両者の阻害型は、Dixon プロットなどによる通常の解析法では全く区別できない。しかし部分的競争阻害は、(1)阻害剤の結合は基質の親和性に影響を与える、(2)一定基質濃度で測定した場合どんなに阻害剤濃度を増しても活性は完全に阻害されない、(3)阻害物質定数 (K_i) は酵素・阻害剤の二元複合体の解離定数 (K_d) と一致しない、(4)酵素・基質・阻害剤の三元複合体を形成することができる、などの点で完全競争阻害と区別できる¹⁸⁾。PPBA の S-1 に対する作用は(1)~(4)の基準を総て満たしている⁵⁾、この色素は ATP に関して部分的競争阻害剤として S-1 に結合すると思われる。

S-1 の ATP 結合部位のすぐ近くに PPBA が結合していると思われる二元複合体にヌクレオチドなどを加えると S-1・ヌクレオチド・PPBA の三元複合体が形成され、これを蛍光強度の変化から追跡できる (図3 B)。まず S-1 に PPBA を加えると速やかに二元複合体が形成される。これに ADP や ATP の非水解アナログである AMP-PNP を加えると三元複合体が形成されるが、この時 PPBA の蛍光強度は、元の 2~3 倍

図3. (A)PPBA の結合が ATP に関して競争的であることを示す Dixon プロット。(B)S-1・PPBA 複合体とヌクレオチドの結合による 400 nm における蛍光強度の時間変化。

に増大して一定になった。一方 ATP を加えた場合は、蛍光強度は約 4 倍になって一定となるが、やがて減少し ADP を加えた場合と同じ強度に落ち着いた。この蛍光減衰の速度定数は、 P_i の遊離から求めた ATPase 活性の速度定数とほぼ一致した。

三元複合体において PPBA が ATP 結合ポケット内の ATPase 部位のすぐ近くにトラップされていることは、ATPase 反応にカップルして PPBA の蛍光変化が起きることからも示唆される。一方ジオキサン中で PPBA の蛍光スペクトルを測定すると、415 と 425 nm に 2 つの極大が見られる。三元複合体のスペクトルも同じような 2 つの極大を示すので (図4), PPBA が結合している部位は非常に疎水性が高いことがわかった。一方 453 nm に等蛍光点が一つだけ現れることから、PPBA の結合部位の環境がヌクレオチドの結合により疎水性の高いものへと可逆的に変化したことを示している。

PPBA の結合数は複合体の種類によらず、S-1 当たり 1 モルであった (図4 挿入図)。しかし結合の強さは三元複合体になると強くなり、解離定数は 26 μ M から最大 0.80 μ M (+ATP) へと変わった。これは、

図4. PPBA・S-1複合体とヌクレオチドの結合による蛍光スペクトル変化
何れも一定値になった後のスペクトル。挿入図, PPBA・S-1・ヌクレオチド三元複合体における PPBA
の結合数と解離定数。

ヌクレオチドが結合して三元複合体になると PPBA が強く結合するような構造変化が起きることを示唆している。

タンパク質の Trp 残基や結合している蛍光色素の存在状態を知るためには、アクリルアミドなどによる蛍光の消光実験が有効である¹⁹⁾。この方法を使うと、問題とする蛍光団がアクリルアミドと接し難いタンパク質の内部にあるのか、または容易に接する表面にあるのかを比較的簡単に知ることができる。

PPBA と S-1 の複合体についても、この消光実験により PPBA の結合様式を検討した (表 2)。PPBA と S-1 の二元複合体の消光定数 (K_{SV}) は、ADP や AMP-PNP が結合して三元複合体が形成されてもほとんど変化しなかった。しかし、PPBA の解離定数は約 1/8~1/10 にも減少し、蛍光極大波長も 19nm 青方移動していた。一方 ATP を結合した三元複合体では、 K_{SV} は 1/2.7 に減少し、解離定数も約 1/33 に減少していた。これらの測定は定常状態の ATPase 反応中に完了しているので、得られた結果は S-1 が ATP を加水分解している最中のものと考えてよい。

以上の結果から、S-1 の ATP 結合ポケットの構造変化は、ポケットの開閉またはゆらぎ変化のどちらかのモデルで説明できる (図 5)。上のモデルでは、ATP の加水分解中はポケットが閉じ、これが終わる

表 2. リガンド存在下における PPBA・S-1 複合体の蛍光スペクトルの極大波長、複合体の解離定数およびアクリルアミドによる消光定数

サンプル	蛍光極大波長 nm	複合体の 解離定数 μM	アクリルアミド による消光定数 M^{-1}
PPBA (S-1 不在下)	452		6.1 ± 0.3
PPBA・S-1 複合体			
-リガンド	438	26	1.3 ± 0.1
+AMP-PNP	419	2.6	1.2 ± 0.1
+ADP	419	3.3	1.3 ± 0.1
+ATP (加水分解中)	419	0.80	0.48 ± 0.02

とまた開く。一方、ヌクレオチドが結合しただけではポケットは閉じないが、構造変化により疎水性相互作用は強くなり、PPBA はポケット内にトラップされる。しかし結合している蛍光団の K_{SV} は周りのタンパク質のゆらぎが小さくなくても減少する¹⁹⁾。これを考慮した下のモデルでは、本来ゆらぎの大きな構造をとっているポケットが、ATP の加水分解中だけゆらぎの小さな硬い構造をとる。この時ポケットは閉じないが、構造は密になり PPBA の結合は強められる。

6. おわりに

ここに提出したモデルのどちらが、S-1 の ATP 結

図5. S-1のATP結合ポケットの開閉モデル(上)とゆらぎ変化モデル(下)
D, PPBA, A, アデノシン, P, リン酸エステル. ★★, 疎水性相互作用を表し, 大小は結合の強弱に対応する. 点線, ゆらぎの大きな構造, 太線, ゆらぎの小さな硬い構造.

合ポケットの真の構造変化をより正確に表しているのだろうか。残念ながら現時点ではどちらも言えない。しかしいずれにせよ, S-1のATP結合ポケットのきわだった特徴は, 大きなPPBAの他にATPも同時に結合できる程のフレキシブルな構造であることだろう。これがATPを結合する他の酵素との大きな違いかもしれない。この点に注目して研究を進めると, 筋肉の化学—力学エネルギーを変換機構の解明の糸口が見つかるかもしれない。

文 献

- 1) Gerstein, M., Lesk, A. M., Chothia, C. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6739-6749.
- 2) Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., Holden, H. M. (1993) *Science*, **261**, 50-58.
- 3) Hiratsuka, T. (1986) *Biochemistry*, **25**, 2101-2109.

- 4) Rayment, I., Holden, H. M. (1994) *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 129-134.
- 5) Hiratsuka, T. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27251-27257.
- 6) 平塚寿章 (1994) 病態生理, **13**, 731-739.
- 7) Hiratsuka, T. (1984) *J. Biochem.*, **96**, 155-162.
- 8) Fletterick, R. J., Bates, D. J., Steitz, T. A. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 38-42.
- 9) Wassarman, P. M., Lentz, P. J. Jr. (1971) *J. Mol. Biol.*, **60**, 509-522.
- 10) Somerville, L. L., Quiocho, F. A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **481**, 493-499.
- 11) Yip, B. P., Rudolph, F. B. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7157-7161.
- 12) Brand, L., Gohlke, J. R., Rao, D. S. (1967) *Biochemistry*, **6**, 3510-3518.
- 13) Beissner, R. S., Rudolph, F. B. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**, 76-80.
- 14) Einarsson, R., Eklund, H., Zeppezauer, E., Boiwe, T., Brändén, C.-I. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **49**, 41-47.
- 15) Larsson-Raznikiewicz, M., Wiksell, E. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 94-100.
- 16) Madsen, N. B., Shechosky, S., Fletterick, R. J. (1983) *Biochemistry*, **22**, 4460-4465.
- 17) Nagradova, N. K., Asryants, R. A., Ivanov, M. V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 622-628.
- 18) M. デイクソン, E. C. ウェブ (1970) 酵素 (江上不二夫, 田宮信雄, 八木達彦, 千谷晃一, 水島昭二, 別府輝彦, 矢追義人共訳), 293-311 白水社
- 19) Eftink, M. R., Ghiron, C. A. (1981) *Anal. Biochem.*, **114**, 199-227.

ひらつか としあき

1945年に生まれ, 北海道大学理学部(修士, 博士)を経て旭川医科大学化学教室の助手, 講師となり, 現在は助教授です。研究テーマは, 「蛍光性ATPなどを主とした蛍光標識生物活性物質の開発と生体系への応用」と「ミオシン分子の構造変化の筋収縮への関わり」の2つを手がけています。蛍光も含めて美しいものやヒトを観察するのが大好きです。

連絡先; 〒078 旭川市西神楽4線5号3-11

旭川医科大学 化学教室

TEL: 0166-65-2111 (内線2725)

FAX: 0166-66-0123 (直通)