筋収縮の分子機構**

— 筋研究36年を顧みて —

Molecular Mechanism of Muscle Contraction

— on our 36 years' muscle research —

関 根 隆 光*
 TAKAMITSU SEKINE, M. D.

1950年著者によって同定されたミオシンの高反応性SH基・SH₁をめぐる、筋収縮の分子機構研究の歩みのうち、当教室のスタッフによって進められた重要な研究を紹介した。

まずSH₁を含むペプチド、続いてATPによって内部から露出してくるSH₂を含む一次構造が決定され、ミオシンの構造と機能研究の最初の一步が踏み出された。この両SH基はATPによって接近し、化学的に両者を架橋すると、ATPを活性中心に閉じ込めることが発見されたので(Yount), 光アフィニティATPアナログを合成して、光照射によってATP結合サイトに結合させ、その近傍の一次構造を決定した。

次いでビオチン・アビジン法、および電顕写真からの三次元像再構成法で、SH₁サイトの二次元・三次元局在が決定された。

筋収縮の分子機構の假説のうち、頭部の内部構造変化説を実証するため、SH₁にラベルしたDNPからの50 kDa断片への光架橋を調べた。その結果ミオシンの頭の先の1/3の部分の構造は収縮中も変わらず、20 kDa断片を欠いた“small S1”もアクチンとの相互作用が元のS1と変わらないことから、今後柄の部分の20 kDa断片の研究が重要になるであろうことを結論した。

索引用語：ミオシン、ATPaseの活性中心、SH₁、光架橋、アクチン

key words : myosin, active site of ATPase, SH₁, photocross-linking, actin

はじめに

私は昭和25年に有山会頭にお声をかけて頂いて、本学にやって参りました。初めてお会いした時に、仕事について何か特別な指示があるのではないかと

と恐る恐るお伺いしたところ、やりたいことを自由にやってよろしいと言われて、感激したことを今もはっきり憶えています。今日まで筋肉の仕事でなんとか頑張ってきたのも、先生の寛大なお心のお蔭と深く感謝しております次第です（当時は教授の意向が絶対でしたから）。ただ、着任早々暫くの間は、臨床検査を専門にやって欲しいということで、技術員2名とライツの光電比色計を与えられて、臨床化学検査を専門にやらなければならぬ破目となりました。しかし2～3年後には、検

* 順天堂大学医学部生化学講座

Department of Biochemistry, Juntendo
 University School of medicine

** 第240回順天堂医学会学術集会〔Mar. 25, 1987〕
 (June 10, 1987受付)

査で溜め込んだ試薬とご褒美に買って頂いたワールブルグ検圧計を使って、筋収縮に伴う代謝変化(機能・代謝連関)の仕事を開始することができたのです。電極を封入したワールブルグ容器の作製や、ドライアイスのアセトンに巧みに投入する手作りの冷却遠心器など、懐しい思い出が沢山ありますが、時間の関係で省略させていただきます。

教室の仕事

研究は田中公一の入室によって具体的に開始されました。さらに当医科大学一回生の山下・平野・飯島淳の3名および二回生の4名が加わって(いわゆる7人の侍)、教室は大変に活気に満ちたものになりました。その後多数の研究者、あるいは技術者に恵まれて、仕事も次第に軌道に乗ってまいりました。表-1 にその大要を示します。上段の『筋収縮の機構』以外に、下段に示したいくつかの筋以外の仕事があります。例えば『代謝および酵素の研究』のうち、倉富グループによる初期の有機酸の代謝経路の立派な業績を忘れることはできません。また、非筋細胞の細胞骨格・蛍光・臨床研究の分野で、大学内外の優れたグループの絶大なご協力を頂いてまいりました。特に蛍光試薬の合成を担当され、多くの有能な蛍光団を開発された北大 金岡教授、およびその協力者の方々に、この機会をお借りして心からお礼を申し上げたいと存じます。

本日は、私自身最も愛着のあるミオシンの化学修飾(表-1 のアンダーライン)に就いて、特にSH₁と呼ばれるシステイン残基の化学修飾を中心に据え、教室員の関連ある仕事を紹介させていただきます。

ミオシンの構造と機能

話の都合で、最初にミオシンに就いて簡単にお話します。図-1 に示したように、ミオシン分子は2コの頭(S1)を持った棒状分子(棒部分をロッドと呼ぶ)で、頭の付け根とロッドの中央近くに、

表-1 教室における研究一覧

筋収縮の機構

1. 収縮と代謝
2. 収縮の Ca^{2+} 調節
3. 収縮性タンパク質の構造と機能
 - 1) ミオシン a. 化学修飾. b. 軽鎖. c. 平滑筋.
 - 2) アクチンとアクチン結合性タンパク質
 - 3) アクチン-ミオシン相互作用
 - 4) 非筋細胞の細胞骨格 (浪久, 小出グループ)

代謝と酵素

1. 代謝および酵素研究 [倉富グループの有機酸代謝]
2. 蛍光測定 (金岡 - 関根試薬の開発と応用)
3. 臨床研究 (浪久, 小川秀, 古谷グループ)

図-1 ミオシン分子の構造模式図

岡本: 蛋白質・核酸・酵素. 32, 142~153, 1987

図-2 ミオシン ATPase 活性のSH₁修飾による変化 (亀山原図)

タンパク分解酵素で分解され易い部分があり、蝶番ちょうの役目を果たしていると考えられています。ロッドの蝶番より尾側はLMMと命名され、ミオシン

表-2 SH₁および SH₂ 近傍のアミノ酸配列

—ミオシンATPase 活性中心の一次構造 (I) —

ミオシン SH₁ (関根ら, 1962)SH₂ (山口ら, 1963, 66)ペプチドの一次構造; SH₁ (山下ら, 1964)SH₂ (山下ら, 1965)

フィラメントの形成に必須であり、頭部 S1には ATPase 活性が局在している。またロッドの頭側 (S2) はミオシン頭部がアクチンフィラメント上を滑走して張力を発生するときに、何らかの役割を果たしていると考えられています。また分子は六量体で、2本の重鎖と4本の軽鎖からなっています。この概念は、1950年の後半にはほぼ確立されていましたが、張力発生のためのエネルギー供給系である ATPase と、上記の構造との関連は全く不明のままでした。

ミオシン ATPase の一次構造

1960年, NIH の Dr. Kielley のところで、初めてミオシンに出合い一目惚れしてしまいました。生筋まるごとの生理化学ではすでに限界にきていたからです。分子生理の出発です。

アクチンとの相互作用を含めて、この筋収縮のエンジンであるミオシンには沢山の研究課題がありました。私は化学反応はあまり得意ではありませんでしたが、ミオシンの SH 基の化学修飾によって ATPase 活性が劇的に変化する事実に驚嘆しました。ATPase の2つの側面、二価金属イオン存在下のいわゆる Ca^{2+} -ATPase の劇的な活性化と、一価金属イオン存在下のいわゆる K^+ -EDTA-ATPase の不活性化—、しかも両者の美事な鏡像関係に深く魅せられてしまいました (図-2)。そして NEM という SH 試薬を用い、いろいろ条件を工夫して、極めて反応性の高い SH 基がミオシ

ンの S1 (頭) あたり1コ存在することを突き止めました。SH₁と名付けました。

帰国後、山下は NEM の代わりに DDPM という、同じマレイミド系の黄色の色素を用いて SH₁ を選択的に修飾し、黄色のトリペシンペプチドを分離、とうとうSH₁を含むトリペプチドの配列を決定しました (表-2, 網目)。

一方、NIH からの帰国直前に、SH₁の化学修飾について不思議なことに気が付きました。活性中心の反応基を化学修飾から保護するのに基質を咬ませる、すなわち、基質 ATP でSH₁の修飾が阻止されるのが常識なのですが、阻止されるどころか、条件によって逆に大きく促進されることに気が付きました。

私の帰国後、山口がこの現象を徹底的に分析して、ATP の存在によってタンパク質の内部から溶媒中に露出してきて、高い反応性を示す第2の SH 基が、やはりミオシン S1 あたり1コ存在することを発見しました。SH₂と名付けました。山下が早速SH₁のときと同じ手法で、SH₂を含むトリペシンペプチドの一次構造を決定しました (表-2, 網目)。SH₁およびSH₂を含むペプチドは、当時のタンパク質および酵素の一次構造についての綜説には、ミオシンの活性中心の最初の一次構造として収録されました。

現在、ミオシンの全一次構造が Elzinga や松田らによって殆んど決定され、ミオシンの機能が構造に基づいて議論できるようになりました。この20年を顧みて、本当に感無量であります。最近、遺伝子の解析から対応タンパク質の一次構造を推定する方法がミオシンにも応用され、これを加えていくつかのミオシンの全一次構造がほぼ決定されるに到りましたが、SH₂ (695番目) からSH₁ (705番目) までの11残基の一次構造が、見事に保存されています。このことは、この領域がミオシン分子の機能上何か重要な部分であることを強く示唆しています。

ミオシン活性中心の一次構造

このSH₁—SH₂領域は、ミオシン ATPase 活性

表-3 ミオシン ATP サイトの決定

—ミオシン ATPase 活性中心の一次構造 (Ⅱ) —

1. SH₁とSH₂との間の化学架線
“基質を閉じ込める”(Yount の Jaw モデル, 1982)

2. 光アフィニティ基質の合成 (岡本ら, 1985)

NANTP: [N-(4-azido-2-nitrophenyl)2-AE-P-P₃-P]

3. NANTPラベルペプチドの分離

(岡本 & Yount, 1985)

Val-Asp-Pro-Tyr-TML-~~133~~-Leu-Pro-Val-Tyr-Asn-Pro-Gln
125 130

の調節サイトと考えることができますが、活性中心に直接含まれていないことは明らかです。SH₁を完全に修飾しても ATPase 活性は決して0にはなりません。また基質の共存で修飾から保護されることもありません。SH₂の修飾でも同じことが言えます。本当の活性中心-ATP 結合サイトはどこにあるのでしょうか。また、SH₁-SH₂領域とはどんな関係にあるのでしょうか。

先にお話したように、SH₂を修飾するためには予めSH₁を修飾した上で、ATP あるいは ADP が共存することが必要です。ところがこのとき加えたヌクレオチドが、なかなか外れないことを山下は NIH で観察していましたが、その原因は不明のままでした。ところが Yount とその共同研究者は、SH₁とSH₂との間に化学的に橋を架けることを研究していたのですが、偶然、そのとき加えた ATP または ADP が活性中心に閉じ込められてしまうという、極めて興味ある事実を発見したのです。SH₁とSH₂を架橋でなく、別個に修飾しても基質が外れ難くなるのは確かですが、架橋するとヌクレオチドをがっちりと銜え込んでしまうのです (Yount の Jaw モデル, 表-3)。半減期が1週間以上というのですから、どうしようもなく安定な酵素・基質複合体といえます。さて、こういう安定な複合体ができたということは、ATP結合サイト決定のゴールに今一步というところに来たことを意味します。なぜなら、あとは光

図-3 ミオシン重鎖上の各サイトの一次元局在

(岡本原図)

GXXGXXGKT**はアデニンヌクレオチド結合タンパク質に共通して見出される配列。75kはS1' (後述)。K*は反応性リジン。

図-4 ビオチン・アビジン法の原理

アフィニティ ATP アナログを合成して、上述の化学架橋によってこれを活性中心に閉じ込め、光照射によって活性中心を構成するアミノ酸のどれかに、共有結合させればよいからです。

札幌で開かれた筋収縮のシンポジウムで、岡本は Yount に一目惚れされ、彼の研究室に留学することになりました。ここで岡本は、NANDP と呼ばれる ADP アナログ (放射性) を合成し、上記の手段によって NANDP 光誘導体を含んだ13残基のペプチドを得ることに成功したのです (表-3)。これには130番目のトリプトファンが含まれていました。以前から ATP の結合によって、トリプトファンの周囲の環境が大きく変わることが知られていたのですが、これでうまく説明

図-5 アビジンで直視化されたミオシン頭部上のSH₁の位置

K. Sutoh, K. Yamamoto and T. Wakabayashi (1984) J. Mol. Biol. 178, 323-339

図-6 SH₁の頭の付け根からの距離

できるようになったわけです。

今までお話したことを、ここで一寸まとめてみましょう。図-3 をご覧下さい。ミオシン重鎖のN末からC末までのペプチドを直線で示しています。2カ所にある小さいループはトリプシンで分解され易い部位を示し、限定分解によってN末側から分子量 25kDa・50kDa・20kDa の3つの断片が生じます (kDa=キロダルトン, 分子量1000)。SH₁-SH₂領域は 20kDa 断片に、活性中心(ATP サイト)である NADP ペプチドは 25kDa 断片にあることがわかります。別の光アフィニティ ATP アナログ (Bz₂ATP) を用いると、50kDa 断片に結合することが、やはり岡本によって確かめられました。このことから ATP サイトは、ある折りを持っていることがわかります。ATP 分子の大きさから考えて、むしろ当然でしょう。

SH₁の二次元局在

さて、図-3に示したミオシンの一次構造の模式図は、折り畳まれたペプチド鎖を直線状に伸展したもので、立体構造との関係は全くありません。

SH₁-SH₂領域は一次構造の上では、活性中心 (ATP サイト) から随分離れています、実際にはその化学修飾によって大きく ATPase 活性が変わるので、密接な構造上の連絡がある筈です。

そこで SH₁のミオシン頭部上の局在がどうしても知りたくなりました。適当な大きさのマーカを結合させて、電顕でその局在をみるのです。山本はマーカーとして、アルブミンやアクチンなどを用いて、化学架橋によってSH₁にぶら下げようといういろいろ試みましたが、どうしてもうまくゆきませんでした。

ところが須藤 (東大, 生物化学) は、ビオチン・アビジン法という大変うまい方法を電顕下直視に利用したのです。山本は共同してSH₁の局在に応用し、見事に成功しました。図-4に示すように、まずビオチンの一端にスペーサーを介して (SH₁はタンパク質内部に深く埋まっている、ノ), モノヨード酢酸をぶら下げてSH₁と共有結合させる。これにアビジン (分子量68,000) を加えると極めて強くビオチンに結合し、電顕で直視可能になりました (図-5)。これを多数例計測して、頭の付け根 (head-rod junction) からの距離のヒストグラムを作ります (図-6)。平均130 Åでした。頭の長さが約200 Åですから、付け根からほぼ3/4のところにSH₁が存在します。須藤・山本らはATPのビオチン誘導体を合成して、同じ方法で ATP サイトの局在を決めました。付け根から約120 Åでした。

SH₁の三次元局在

さて、SH₁も ATP サイトもミオシンの頭の付け根からほぼ同じ距離にあることがわかりましたが、頭部は円筒形をしているので、実際の両サイトの立体的な位置関係は不明です。若林 (東大, 物理) はアクチンフィラメントの電顕写真から、その三次元像を再構成するという素晴らしいお仕事を強力に展開されておられます。図-7にトロポミオシン添加アクチン線維の立体構造を示します。これにミオシンS1を加え、さらに各サイトにアビジンを結合させ、その三次元像上の瘤を検索する

図-7 アクチン・トロポミオシン・S1複合体におけるS1とアクチンの三次元相関

点線がS1を示す. C. Toyoshima & T. Wakabayashi (1985) J. Biochem. 97, 245-263

図-8 ミオシン頭部上の各サイトの三次元配置
(若林原図)
R. T. Treger (1986) Nature 321, 563に引用.

のです。この仕事の一部に山本を参加させて頂きましたが、論文が未発表の関係で詳細はお話することはできませんが、図-8のスケッチに示すように、ミオシンの頭のこちら側にSH₁領域があり、その反対側に ATP サイトがある。SH₁領域の同じ側に近接して、その頭側にアクチン結合サイトがあります。このような三次元局在が正しいとすると、SH₁の化学修飾で引き起こされた構造変化が、恐らくタンパク質内部を伝って、反対側の ATP サイトの構造を大きく変えると考えてもよいのではないかと思います (SH₁がタンパク質内部に深く埋まっていることを想起してください)。同時にアクチンサイトの構造も大きく変えることも、またアクチンの結合によって、SH₁領域の構造が変わることも十分想像できます。事実、アクチンの結合によってSH₁とSH₂の修飾が速くなるし (山下ら)、亀山はアクチンと ATP の添加によって、SH₂の修飾が大きく促進される事実をみえています。今後、筋収縮機構の key protein であるミオシン頭部内での、ATP によって引き起こされる構造変化という情報が、どのようにタンパク質内部を伝わってゆくかの研究が、非常に重要性を帯びてくるものと思われます。

骨格筋収縮の分子機構

筋肉の収縮機構については、Huxley-Simons の古典的なミオシン首振り説を含めて5つばかりの説が提出されています (図-9)。今のところ、リニアモーター説を除くと、頭部内構造変化説が有力になりつつあります。多くの研究者が具体的に、どんな構造変化が起こっているのかを追求しているところです。SH₁を利用してこの問題に何らかの寄与ができないものであろうかと考えるのは、その発見者である私としてはごく自然の発想です。以下の3点について考えてみます。

1) 三角測量の原点としてのSH₁

SH₁は多くの試薬によって比較的選択的にラベルされるという利点があるので、これに適当な蛍光性試薬をラベルし、他の反応性残基に別の適当

首振り説

頸部短縮説

頭部内構造変化説

静電気

リニアモーター説

アクチンフィラメント

構造変化説

図-9 筋収縮の分子機構

図-10 エネルギー移動から求めた各サイト間の距離 (nm)

N site, ヌクレオチド結合サイト. RLR, 反応性リジン (図3のK*).

J. Botts *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2060-2064より.

な光受容団（多くは蛍光物質）を結合させて、両者間のエネルギー移動から、その間の距離を測定することができます。この距離変化を一つの構造変化のプロープとすることができます。図-10に Morales らが纏めたミオシン頭部の測量図を示します、中央に位する球が SH₁ です。この基が三角測量の重要な中心基点になっていることが、おわかり頂けると思います。しかし残念乍ら、方法上の制約もあって、今のところ ATP などの結合によって2点間距離の変化は認められていません。

2) SH₁からの化学架橋

われわれは数年前に、このSH₁を極めて選択的に DNP 化する方法を開発しました。偶然のことから、これに光を当てると架橋産物ができることを発見しました。武野は苦勞の末、このものが

SH₁から 50kDa 断片へ架橋されたものであることを突き止めました。図-11にごく概念的に矢印で示してあります。最近この架橋点の一次構造上での同定が進められ、今のところアルギニン (442) とグルタミン酸 (474) が有力候補になっています。ADP 存在下でも殆んど、同一の残基に架橋されている可能性が高いことも解かりました。須藤典は架橋速度の kinetics を展開し、ADP 添加で40%も架橋速度が落ちることをみていますから、SH₁と 50kDa 上の架橋点は ATP、あるいはADP 添加でSH₁から“離れる”ことはまず間違いないと思われます。ATP のミオシンへの結合 → ADP への分解 → ADP の離脱 → というサイクルの一回転ごとに、20および 50kDa 断片は少なくとも、SH₁付近で着いたり離れたたりしている

図-11 ミオシンの三断片——SH₁から50kDa断片への光架橋 (武野原図)

図-12 S1'(75K)-ATPaseのアクチンによる活性化
 アクト S1-Mg²⁺ATPase 活性: ○ S1, ●トリプシン処理 S1, △ S1' (75k)
 Y. Okamoto & T. Sekine (1987) J. Biol. Chem. 262, 7951-7954

図-13 ミオシン頭部の収縮による変形 (Cooke のモデル)

左, 右はそれぞれ収縮のための頭部変形の初期と終期を示す。

R. Cooke (1986) CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 53-118より。

可能性があります。このことが収縮とどう結びつくかは今後の問題です。しかしわれわれの予想していた、両断片の接触面でのスライディングが起こることはまず否定されたと思います。

それでは *in vitro* の収縮モデルとしてよく用いられる, ATP・Hメロミオシン (図-1), アクチン・トロポニン・トロポミオシン複合体ではどうでしょうか。この系では ATP の存在下で筋収縮のトリガーである Ca²⁺イオンに应答して, 弛緩状態から収縮状態となることが知られています。須藤の実験では, 架橋速度は収縮・弛緩・強縮の三状態ではほとんど差が認められませんでした。つまり収縮によってSH₁近傍には認められるような変化がなかったことになります。先程述べたSH₁からのエネルギー移動による距離 (図-10) が変化しないということを考え合わせると, ミオシンの頭の先端に近い 1/3 (図-6) 位までは, 収縮中でも全体としてもとの構造を保っているという結論になりそうです。もっともこの完全系での架橋残基の同定が済んでいないので, 最終的な結論は差し控えますが。

そうすると, 頭部の下半身の構造変化が問題になります。三つの断片 (図-11) の立体配置は全くわかっていませんので, どのように攻めたらよいでしょうか。

3) small S1〔S1' (75K)〕

最近、岡本によって重要な発見がなされました。それはミオシンの頭部S1から、さらに小さな活性断片 (S1 (75). いわゆる small S1, あるいは Okamoto fragment) をうることに成功したのです。ミオシン分子からS1の切離しに成功してから30余年ぶりの快挙といえましょう。この活性小断片は ATP に対しても、アクチンとの相互作用についても、ATPase 活性でみる限り、もとの S1 と何ら異なりませんでした (図-12)。その構造は 20kDa 断片を欠いた 25kDa と 50kDa からなる、分子量 75kDa の部分でした。このことは、ミオシンとアクチンの結合と分解のサイクルで ATP が分解されるときに、肝心の SH_1-SH_2 領域の存在する 20kDa 断片は全く関与していないことを意味します。これには少しまいりました。

しかし、考えてみると 20kDa 断片は頭のN末部分 (25+50kDa) と尾を繋ぐ重要な柄にあたる部分です。Cooke のモデル (図-13) をみると、この柄の部分がひどく変化していることが解かります。したがって、今後 SH_1-SH_2 領域を含む 20 kDa 部分の大きな構造変化の研究が極めて重要になると思われます。しかし、もし small S1 自身に自走性 (S1 のようにアクチン線維上を

ATP のエネルギーを消費して滑走する性質-柳田) が認められるとすれば、柄の部分の変形と伸長は全く受身のものであって、積極的な意味を持たないのは当然でしょう。この危険性も十分考慮した上で、20kDa 断片の研究はやはり収縮の分子機構解明の上で、大いに野心的なテーマではないかと考えています。

結びに代えて

最後に申し上げたいと思うのですが、私の貧しい経験からすると、壁につき当たったときどうにもならずにあがいている時こそ、新しい展望が開けるのではないかと思います。やはり今までの知識で照しうる範囲は同じ平面であって、いわゆる徘徊の底を抜いて新しい一段上の平面の展望をうるには、その前提として大変な内部格闘が必要であると思います。創造的というのはそこを指すのではないのでしょうか。

私に与えられた講演時間も、また私の在任期間も、もう残りがありません。後続く新進の研究者の努力を信じて、この講演を終わらせて頂きます。ご清聴ありがとうございました。