

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570154

研究課題名（和文） 筋肉ミオシン頭部の協同性の研究

研究課題名（英文） Cooperativity of muscle myosin heads

研究代表者

山本 啓一（YAMAMOTO KEIICHI）

千葉大学・大学院融合科学研究科・教授

研究者番号：70053361

研究成果の概要（和文）：二つの頭が分岐する尾部 coiled-coil 構造の開始部位のアミノ酸配列はクラス II ミオシンの中で高度に保存されており、LL（ロイシン-ロイシン）となっている。この LL の配列が二つ頭の協同性に何らかの役割を果たしているのではないかと考え、“LL”を欠失した変異体、del LL を作製し、活性を測定したところ、アクチン滑り運動速度は野生型とあまり変わらなかったが、アクチン活性化 ATP 加水分解活性は非常に低い値を示した。ストップフロー装置を用いて測定した結果、LL を欠く事でアクチンと協同的に相互作用する事ができなくなり、アクチン存在下での効果的なリン酸の放出が妨げられている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Class II myosins have conserved Leu-Leu sequence at the beginning of the tail domain. When I deleted the Leu-Leu, the actin activated ATPase activity dropped significantly while its motility was almost the same as that of the wild type myosin. Results of stopped flow measurements suggested that the loss of Leu-Leu impaired cooperative interaction of the two heads of myosin with actin filaments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：筋収縮、ミオシン

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは ATP を加水分解して得られた化学エネルギーを運動に変換するモータータンパク質であり、筋収縮、細胞運動、膜輸送、シグナル伝達などの様々な生命現象に関わっている（Mermall et al., 1998）。ミオシンは、ATP 加水分解活性やアクチン結合部位を持つモータードメイン、軽鎖 2-6 個が結合し

モータードメインの構造変化を増幅し大きな動きに変えるレバーアーム、ミオシンの細胞内での機能に大きく関わる尾部領域の大きく 3 つの領域で構成されているミオシンは現在 24 のクラスが確認されており、そのほとんどは尾部領域で coiled-coil 構造を形成して二量体を作り二つのモータードメインが並んだ二頭構造をとる。この二頭構造を

とるミオシンの中でいくつかのミオシン、例えばクラス V のミオシンやクラス VI のミオシンは、二つ頭の一方のモータードメインがアクチン繊維から解離している間もう一方のモータードメインは解離せず、常に結合状態を保つことによってアクチン繊維上を長い距離移動する。これらのミオシンは、二つ頭構造をとることによって常にアクチン繊維に結合した状態を保つことができる。しかし、伝統的ミオシンとも呼ばれて古くから研究されているクラス II に属するミオシン(その中には骨格筋ミオシン、平滑筋ミオシン、さらに細胞分裂や細胞運動に働いている細胞質ミオシンなどが含まれる)はどれもそのように常に結合状態を保ち、長い距離を移動することはない。では、何故これらのミオシンは二つ頭構造をとっているのだろうか。

2. 研究の目的

平滑筋ミオシンや細胞性粘菌ミオシンでは一方の頭が弱い結合状態でアクチンと相互作用し、アクチンの向きをそろえる結果、もう一方の頭が方向性を持って相互作用しやすくなるという二つ頭の協同性が見られる。このような協同性にとっては二つの頭のアクチンに対する相対的な位置関係が重要であると考えられる。また、平滑筋ミオシンは、調節軽鎖がリン酸化されることによりアクチン滑り運動や ATP 加水分解活性が調節されることが知られている。脱リン酸化状態の平滑筋ミオシンでは二つ頭の一方の頭頂部にあるアクチン結合部位付近が他方の頭の首の付け根にあるコンバータードメイン付近と結合する事でアクチン滑り運動やアクチン活性化 ATP 加水分解活性が低く抑えられている。さらに、脱リン酸化状態の平滑筋ミオシンは尾部開始領域で折れ曲がり、尾部領域と頭部が相互作用をする事で不活性化をより確実なものとしている。クラス II のミオシンの尾部開始領域には LL (ロイシン-ロイシン) という保存性の高い配列が存在する。本研究では、この保存性の高い LL の配列が二つ頭の協同性に関与しているのではないかと考え、トリ平滑筋ミオシンの“LL”を欠失した変異体 (del LL)、LL の配列の直後に存在する QV (グルタミン-バリン) という配列を欠失させた変異体 (del QV)、さらに二つのロイシンをアラニンに置換した変異体 (AA)、一方のみをアラニンに置換した変異体 (AL、LA) 等を作製し、これらの変異体のアクチン滑り運動速度と ATP 加水分解活性を測定することにより、LL は協同性に役割を担っているのか、LL のうち両方が協同性に役割を担っているのか、片方のみが担っているのか、さらには軽鎖のリン酸

化による調節、すなわち脱リン酸化状態で尾部開始領域が折れ曲がる事に LL がどう関与するのかについても調べた。

3. 研究の方法

(1) ミオシンコンストラクトの作成
作製したコンストラクトは五つ。
ニワトリ平滑筋重鎖遺伝子を昆虫細胞での発現ベクターに乗せたものは尾西博士からいただいたものを用いた (pFastBacHMMhis-myc)。
pFastBacHMMhis-myc は N 末端に His-tag などの 25 AA の挿入が入ってから平滑筋ミオシンの配列がつづき、C 末端に myc-tag が挿入されている。配列は N 末端の MSYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGA (His tag) のあと平滑筋重鎖の 1 から 1315 番目までのアミノ酸がつづき、C 末端に EQKLISEEDL (myc tag) が続く。

トリ平滑筋重鎖の *Xba I* 断片 (pFastBacHMM の 1975 - 4103) を Litmus28 (Invitrogen™) の *XbaI* サイトに挿入したものを作った (LM28*XbaI* HMM 1975 - 4103)。
これを ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いて site-directed mutagenesis によって目的の配列を改変し、増幅した。増幅した遺伝子は Applied Biosystems 社の BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンスを読み、挿入した塩基配列に誤りがないことを確認した。

(2) リン酸化されない調節軽鎖 (RLC-AA) の作製

ニワトリ平滑筋調節軽鎖遺伝子を昆虫細胞での発現ベクターに乗せたものは尾西博士からいただいたものを用いた (pFastBacRLC)。pFastBacRLC の *BamHI*、*XbaI* 断片を Litmus28 (Invitrogen™) の *BamHI*、*XbaI* サイトに挿入したものを作った。これを ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いて site-directed mutagenesis によって 18 番目のトレオニン、19 番目のセリンをアラニンに置換するように配列を改変し、増幅した。増幅した遺伝子は Applied Biosystems 社の BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いてシーケンスを読み、挿入した塩基配列に誤りがないことを確認した。その後、再び *BamHI*、*XbaI* の切断断片を pFastBac の *BamHI*、*XbaI* サイトに挿入した。

(3) ミオシンコンストラクトの精製
ミオシンコンストラクトの精製は Homma らの方法を改変した方法で行った。(Homma et

al. , 2000)

(4) ストップドフロー装置を用いた解析

ミオシン 1 μ M, actin 5 μ M, 200 μ M ADP 溶液と 6 mM ATP 溶液を stopped-flow 装置 (Applied Photophysics, SF-2001) で瞬時に混合し, 散乱を 310nm の波長で測定し, single exponential にグラフフィットした。Buffer 組成は 5mM KCl, 3mM MgCl₂, 1mM DTT, 10mM Hepes pH7.4 である。

(5) アクチン活性化 Mg²⁺ATP 加水分解活性の測定

アクチン活性化 ATP 加水分解活性の測定には マラカイトグリーン法 (Kodama et al, 1986) を用いた。

4. 研究成果

(1) アクチン非存在下での NH₄ATP 加水分解活性の測定

まず, アクチン非存在下での NH₄ATP 加水分解活性を測定した。NH₄ATP 加水分解活性を測定したのは活性が高く, データの比較がしやすいからである。

30°C で ATP 加水分解速度を測定した結果, 野生型はリン酸化状態で 15.4Pi/head/sec, 非リン酸化状態で 16.7Pi/head/sec, del LL はリン酸化状態で 16.1Pi/head/sec, 非リン酸化状態で 13.8Pi/head/sec, AA はリン酸化状態で 16.4Pi/head/sec, AL はリン酸化状態で 17.1Pi/head/sec, 非リン酸化状態で 18.5Pi/head/sec, LA はリン酸化状態で 17.6Pi/head/sec, 非リン酸化状態で 17.2Pi/head/sec, del QV はリン酸化状態で 15.4Pi/head/sec, 非リン酸化状態で 14.2Pi/head/sec であった (表 1)。この結果では各コンストラクト間やリン酸化による大きな差異は見られなかったことから, それぞれの変異は active site に直接影響を与えていない事がわかる。

(2) アクチン活性化 Mg²⁺ATP 加水分解活性の測定

平滑筋ミオシンコンストラクト (野生型, delLL, AA, AL, LA, delQV) のアクチンによって活性化される ATP 加水分解活性を調べた。測定方法は [材料と方法] に書いたとおりである。0~4.0mg/ml のアクチン濃度下で ATP 加水分解活性を測定した (図 3)。ミオシンの ATP 加水分解活性はアクチンフィラメント存在下で活性化され, そのアクチン濃度変化による活性曲線はミカエリス・メンテン型となる。最大活性である V_{max} の半分の活性をもたらすアクチン濃度 (K_m 値) をアクチンとの親和性の指標とした。この値が小さいほどアクチンとの親和性が高いと判断した。

野生型は V_{max}=4.2Pi/head/sec,

K_m=3.1mg/ml, LA は V_{max}=3.4Pi/head/sec, K_m=0.7mg/ml, del QV は V_{max}=3.6Pi/head/sec, K_m=3.1mg/ml であった。LA の K_m 値は野生型よりも小さく, del QV の K_m は野生型とほぼ同じであった。リン酸化状態の del LL, AA, AL は, 今回の実験で測定したアクチンの濃度範囲では変化が直線的でミカエリス・メンテン型の曲線にフィットさせる事ができず, V_{max} と K_m を求めることができなかった。

V_{max} と K_m を求めることのできなかったリン酸化コンストラクトと野生型や del LL とを比較するためアクチン濃度 4.0mg/ml で ATP 加水分解活性を表 2 に示した。野生型は 2.4Pi/head/sec, del LL は 0.16Pi/head/sec, AA は 1.0Pi/head/sec, AL は 0.81Pi/head/sec, LA は 3.0Pi/head/sec, del QV は 2.1Pi/head/sec であった。del LL は野生型の約 1/15 の活性しか示さず, AA や AL の活性は共に野生型の 1/3 であった。

一方, 野生型, del LL, LA に関しては非リン酸化時の Actin 活性化 Mg²⁺ATP 加水分解活性の測定も行った。全てのコンストラクトにおいて今回の実験で測定したアクチンの濃度範囲では変化が直線的でミカエリス・メンテン型の曲線にフィットさせる事ができず, V_{max} と K_m を求めることができなかった。

V_{max} と K_m を求めることのできなかった非リン酸化コンストラクト同士を比較するためにアクチン濃度 4.0mg/ml の点の ATP 加水分解活性を表 3 に示す。野生型は 0.11Pi/head/sec, del LL は 0.093Pi/head/sec, LA は 0.50Pi/head/sec であった。LA は野生型に比べ 4 倍程高い活性を示す事がわかった。

(3) ストップドフロー装置を用いた解析

del LL のアクチン活性化 ATP 加水分解活性が低い理由は, リン酸が放出される段階と ADP が放出される段階の両方, またはどちらかが遅くなったためと考えられる。

この可能性を検証するために stopped-flow 装置を用いて野生型と del LL において ADP がミオシンから放出され次の ATP が結合するまでの時間を測定した。実験の詳細は [材料と方法] に記したが, 簡単に説明すると stopped-flow の一方のシリンジにアクトミオシン ADP 複合体を入れ, もう一方のシリンジに過剰量の ATP を入れて高速で混合する。ATP はアクトミオシンから解離した ADP がアクトミオシンと再結合するのを防ぐために使っている。

ADP がミオシンから放出され次の ATP が結合するまでの時間, すなわちアクチンとの強い結合時間を測定した結果, 野生型は 21ms, del LL は 36ms で del LL は野生型に比べ約 1.7 倍であった。アクチンとの強い結合時間が約 1.7 倍ということは ADP 放出速度が約

1/1.7 倍に低下したにすぎないという事であるから、del LL のアクチン活性化 ATP 加水分解活性が 1/15 に低下した理由は ADP の放出版階ではないと考えられる。

(4) *in vitro* motility assay

野生型も含めたそれぞれのコンストラクト (del LL、AL、LA、del QV) においてリン酸化時のアクチン滑り運動速度を測定した。

室温 25°C で測定した結果、野生型のアクチン滑り運動速度は 0.32 μ m/sec、del LL は 0.23 μ m/sec、AL は 0.22 μ m/sec、LA は 0.36 μ m/sec、del QV は 0.32 μ m/sec であった。よって、アクチン滑り運動速度についてはこれらのコンストラクトと野生型との間に有意な差はなかった。

考察

(1) del LL のアクチン活性化 ATP 加水分解活性、アクチン滑り運動速度

del LL と野生型のアクチン滑り運動速度は del LL の方が少し遅いものの大きな差はなかった。また、アクチン非存在下での ATP 加水分解においても del LL と野生型に差はなかった。しかし、del LL のアクチン活性化 ATP 加水分解活性は野生型に比べ 1/15 と非常に低い値を示した。これらの事から平滑筋ミオシンの尾部開始領域に存在する二つのロイシンを欠く事はアクチンによって活性化される ATP 加水分解活性の過程に大きく影響を及ぼす事がわかった。

アクチンが存在するとミオシンからのリン酸や ADP の放出が促進されるので ATP 加水分解活性が上昇する。よって、del LL のアクチン活性化 ATP 加水分解活性が低下した理由はリン酸の放出と ADP の放出の両方、もしくはどちらかが妨げられたためと考えた。そこで、del LL と野生型において、ストップドフロー装置を用いて ADP がミオシンから放出され次の ATP が結合するまでの時間、すなわちアクチンとの強い結合時間を測定したところあまり差がなかったため、LL を欠く事はリン酸の放出促進に影響を及ぼす事がわかった。

また、アクチン滑り運動速度はミオシンの首振りによる移動距離をアクチンと強く結合している時間で割る事により近似できる。ストップドフロー装置を用いて得たアクチンとの強い結合時間は、野生型では 21ms、del LL では 36ms であった。野生型のアクチンとの強い結合時間は del LL に比べ約 40% 短くなっているため、del LL のアクチン滑り運動速度は野生型に比べ約 40% 遅くなるはずである。実際、野生型と del LL の *in vitro* motility assay によるアクチン滑り運動速度はそれぞれ 0.32 μ m/sec、0.23 μ m/sec であり、del LL のアクチン滑り運動速度は野生型に比

べ 30% 遅い。よって、del LL はアクチン滑り運動速度が少し低下しているが、その理由は LL を失った事によりアクチンとの強い結合時間が野生型に比べ少し長くなったためであると言える。

さらに、野生型と del LL において、アクチンとの強い結合時間にあまり差はないが、アクチン活性化 ATP 加水分解活性が 1/15 に低下した事から、アクチン活性化 ATP 加水分解サイクル時間が 15 倍に伸びたと考えられる。アクチン活性化 ATP 加水分解サイクル時間のうちアクチンとの強い結合時間が占める割合は、ある瞬間においてミオシン頭部の総数のうちアクチンとの強い結合を行っている頭部の個数の割合である。ミオシンがアクチンフィラメントを連続的に動かすためには、常にどれかのミオシン頭部がアクチンフィラメントと強い結合状態にある事が必要である。del LL のアクチンとの強い結合状態の割合は野生型に比べ 1/15 であるため、del LL がアクチンフィラメントを連続的に動かすためには少なくとも野生型の 15 倍の数のミオシン頭部が必要であるとわかった。

(2) 二つのアミノ酸を欠失させたことによる影響

del LL は二つのアミノ酸を欠失させているので、欠失させた事による構造の変化等がアクチン活性化 ATP 加水分解活性の低下を引き起こした原因である可能性がある。尾部開始領域の二つのロイシンの直後に存在するグルタミンとバリンを欠失させたコンストラクト (del QV) を作製し、アクチン活性化 ATP 加水分解活性、アクチン滑り運動速度を測定したところ、野生型との間に差はほとんどなかった。したがって、二つのアミノ酸を欠失させた事でアクチン活性化 ATP 加水分解活性が低くなったわけではなく、二つのロイシンが存在することがアクチン活性化 ATP 加水分解活性に重要な役割を担っている事がわかった。

(3) 二つのロイシンのうちどちらがアクチン活性化 ATP 加水分解活性に重要か

二つのロイシンがアクチン活性化 ATP 加水分解活性に重要な役割を担っている事はわかったが、その二つのうち両方が役割を担っているのか、どちらか一方が役割を担っているのかを検証するために二つのロイシンのうち両方、もしくは片方のみをアラニンに置換したコンストラクト (AA、AL、LA) を作製した。そして、これらのコンストラクトのアクチン活性化 ATP 加水分解活性、アクチン滑り運動速度を測定したところ、野生型と比べアクチン滑り運動速度に大きな差異はなかったが、アクチン活性化 ATP 加水分解活性は野生型と大きく違っていた。LA は野生型よりア

クチンに対する親和性が高く、最大活性は野生型とほぼ同じであった。AA、ALについては野生型よりアクチンに対する親和性が低く、活性も野生型より低いという結果を得た。この結果よりN末端側のLつまり最初のLが平滑筋ミオシンのアクチン活性化ATP加水分解活性に重要な役割を担っている事がわかった。

(4)後ろのLが担っている役割

LAのアクチン活性化ATP加水分解活性の最大活性は野生型とほぼ同じで、一方アクチンに対する親和性は野生型より高かった。

では、何故LAの親和性が高いのか、また何故平滑筋ミオシンはLAという形で存在せず、LLという形であるのかについて考察する。平滑筋ミオシンは、調節軽鎖がリン酸化されることによりアクチン滑り運動やATP加水分解活性が調節されることが知られている。脱リン酸化状態の平滑筋ミオシンでは二つ頭の一方の頭頂部にあるアクチン結合部位付近が他方の頭の首の付け根にあるコンバータードメイン付近と結合する事でアクチン滑り運動やアクチン活性化ATP加水分解活性が低く抑えられている。さらに、脱リン酸化状態の平滑筋ミオシンは尾部開始領域で折れ曲がり、尾部領域と頭部が相互作用をする事で不活性化をより確実なものとしている。

そこで、後ろのLが尾部開始領域で折れ曲がる、もしくは折れ曲がった状態を安定させるのに役割を担っているとしたら、後ろのLを失った事により軽鎖のリン酸化による調節が不十分なものとなり、脱リン酸化状態の活性は高くなるはずである。実際、非リン酸化状態の野生型とLAのアクチン滑り運動速度、アクチン活性化ATP加水分解活性を測定したところ、非リン酸化状態の野生型はアクチンを動かす事はできなかったが、LAはリン酸化状態の約1/3の速度だが、アクチン滑り運動を行う事が観察された。また、アクチン活性化ATP加水分解活性についても非リン酸化状態の野生型は低い活性であるのに対し、LAは野生型に比べ約4倍高い活性を示した。これらの結果から、後ろのLを欠く事で軽鎖のリン酸化による調節が部分的に崩れている事がわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計14件)

平成24年度

①伊藤 光二, 原口 武士, 松本 梨江, 中野明彦, 山本 啓一, 富永 基樹
シロイヌナズナで発現している17種類のミオシンの網羅的酵素解析

日本植物学会第76回大会 2012年9月16日
兵庫県立大学姫路書写キャンパス

②森川 高光, 岩城 光宏, 伊藤 光二, 木村篤, 富永基樹, 池崎 圭吾, 小森 智貴, 藤田 恵介, 中野明彦, 山本 啓一, 柳田 敏雄
ミオシンXIの1分子解析

日本植物学会第76回大会 2012年9月16日
兵庫県立大学姫路書写キャンパス

③富永 基樹, 伊藤 光二, 小嶋 寛明, 横田悦雄, 山本 啓一, 新免 輝男, 大岩 和弘, 中野 明彦

分子レベルから眺める原形質流動

日本植物学会第76回大会 2012年9月16日
兵庫県立大学姫路書写キャンパス

④富永 基樹, 木村 篤司, 山本 啓一, 中野明彦, 伊藤光二

速度変型キメラミオシンXIによる原形質流動速度変化がシロイヌナズナに及ぼす影響

日本植物学会第76回大会 2012年9月16日
兵庫県立大学姫路書写キャンパス

⑤原口 武士, 富永 基樹, 中野 明彦, 山本 啓一, 伊藤 光二

シロイヌナズナミオシンXI-Iは、アクチンへの親和性が高く、アクチン滑り速度は低いユニークなミオシンである。

日本植物学会第76回大会 2012年9月15日
兵庫県立大学姫路書写キャンパス

平成23年度

⑥富永 基樹, 木村 篤司, 山本 啓一, 中野明彦, 伊藤 光二

シャジクモ・シロイヌナズナキメラミオシンXIによる原形質流動高速化はシロイヌナズナを大型化する

第53回日本植物生理学会年会 2012年3月16日 京都産業大学

⑦富永 基樹, 木村 篤司, 山本 啓一, 中野明彦, 伊藤 光二

高速型シャジクモシロイヌナズナキメラミオシンXIがシロイヌナズナ細胞内輸送および成長に及ぼす影響

第84回日本生化学学会大会 2011年9月22日 国立京都国際会館

⑧伊藤光二, 原口武士, 山本 啓一

最速ミオシンであるクラスXI車軸藻ミオシンの酵素機能解析

第84回日本生化学学会大会 2011年9月22日 国立京都国際会館

⑨富永 基樹, 木村 篤司, 山本 啓一, 中野明彦

彦, 伊藤 光二
高速型シャジクモシロイ ヌナスナキメラミ
オシン XI がシロイヌナズナ細胞内輸送お
よび成長に及ぼす影響
日本植物学会第75回大会 2011年9月18日
東京大学 駒場キャンパス

平成22年度

⑩原口武士, 伊藤光二, 山本啓一
シロイヌナズナミオシン XI-I は、アクチン
との親和性が高く、滑り速度は低い
第52回日本植物生理学会年会 2011年3月
22日 東北大学(仙台市)

⑪富永基樹, 木村篤司, 山本啓一, 中野明
彦, 伊藤光二
高速型シャジクモ・シロイヌナズナキメラミ
オシン XI がシロイヌナズナ細胞内輸送およ
び成長に及ぼす影響
第52回日本植物生理学会年会 2011年3月
22日 東北大学(仙台市)

⑫Takashi Haraguchi, Kohji Ito, Keiichi
Yamamoto
Analysis of enzyme properties of
Arabidopsis thaliana myosin XI-I
日本生物物理学会第48回年会 2010年9
月22日 東北大学(仙台市)

⑬Hiroaki Hidaka, Hiroshi Mine, Kohji Ito,
Keiichi Yamamoto, Takuo Yasunaga
クライオ電子顕微鏡法による車軸藻ミオシ
ンの高速移動分子メカニズムの解明
日本生物物理学会第48回年会 2010年9月
20日 東北大学(仙台市)

⑭富永基樹, 伊藤光二, 木村篤司, 山本啓
一, 中野明彦
高速型シャジクモ・シロイヌナズナキメラミ
オシン XI を用いた細胞内交通機構の解析
日本植物学会第74回大会 2010年9月9日
中部大学(春日井市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 啓一 (YAMAMOTO KEIICHI)
千葉大学・大学院融合科学研究科・教授
研究者番号: 70053361

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: