

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14563

研究課題名(和文) イミダゾール化合物との相互作用によるミオシン分子機能への影響

研究課題名(英文) Effect of imidazole compounds on the function of myosin

研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Toru)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：20705173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスチジンによるミオシンの水溶化現象をモデルとして、ヒスチジンとミオシンとの相互作用の確認および相互作用によるミオシンの構造変化を確認することで、イミダゾール化合物のタンパク質への作用について明らかにすることを目的とした。ミオシンの水溶化は、金属イオンや塩基性アミノ酸などの陽イオン化合物の添加により濃度依存的に阻害された。特に金属イオンの場合低濃度の添加においても著しく水溶化が阻害された。ミオシンC末端領域のタンパク質断片を用いた検討では、水溶化条件下において表面電荷が変化することが示された。ヒスチジンの存在によってミオシンC末端領域に電荷の変化が生じ、その結果水溶化されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで水には不溶であるとされてきたミオシンがヒスチジンの添加によって低塩濃度条件下であっても溶解するメカニズムについて、詳細な相互作用部位の特定には至らなかったが、ヒスチジンと塩基性アミノ酸との間に相互作用が生じている可能性を示した。この結果は、アミノ酸の存在がタンパク質の特性に大きな影響を及ぼしていることを示唆し、細胞および組織におけるアミノ酸の重要性を示している。また、食品工業や薬品工業などでもアミノ酸の添加物としての利用の可能性を示唆し、社会的にも意義のある成果と言える。

研究成果の概要(英文)：To understand the effects of imidazole compounds on proteins, we determined the interaction between histidine and myosin and the structural changes of myosin caused by the interaction.

Water solubilization of myosin by adding L-histidine was inhibited by the addition of cationic compounds such as metal ions and basic amino acids in a concentration-dependent manner. Especially, divalent metal ions had great effect on inhibition of solubilization by L-histidine at low concentrations. The surface charge of myosin C-terminal region was changed by solubilization. This could be caused by interaction between L-histidine and basic amino acids. These results indicated that myosin could be solubilized by weakening electrostatic interaction between myosin molecules by which interaction between L-histidine and basic amino acids in myosin C-terminal region caused.

研究分野：食肉生化学

キーワード：ミオシン イミダゾールジペプチド 食肉 溶解度 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋を構成する主要なタンパク質であるミオシンは、骨格筋組織内では太いフィラメントと呼ばれる重合体を形成し、筋収縮の中樞を司っている。筋収縮を効率的に作動させるためには重合体を形成させる必要があり、また、骨格筋組織構造の維持のためにも重合体形成は重要な機能であると言える。そのため、長らく、ミオシンは生理的塩濃度以下の塩溶液には溶解しないとされてきた。しかし、申請者は、ヒスチジンを含む低塩濃度溶液に対し、ミオシンを透析することでミオシンが溶解することを発見した (Hayakawa, et al., 2009)。この低塩濃度溶液への溶解 (水溶化) の際、ミオシン重鎖 C 末端側の長いコイルドコイル領域において伸長していることを確認し、この領域の構造変化がミオシンの水溶化に関与している可能性を示唆した。

ミオシンの太いフィラメントの形成に関しては、C 末端付近の約 250 アミノ酸残基領域が関与しているとの報告が多数あり、この C 末端 250 残基領域における正もしくは負の電荷の集まり (電荷クラスター) が静電相互作用によって会合すると考えられている。このことから、ミオシンの水溶化にも、C 末端 250 残基領域の表面電荷が関与していると考えられた。

一方、ヒスチジンは必須アミノ酸の一つで、その側鎖にイミダゾール環と呼ばれる五員環構造を有する。このイミダゾール環は中性域への緩衝作用を持ち、金属イオンや陽イオン化合物との親和性が高いことも知られている。つまり、ミオシンの水溶化現象においては、このヒスチジンのイミダゾール環がミオシン C 末端領域の正電荷クラスターと作用することでこの領域の表面電荷を変化させ、ミオシン分子間の静電相互作用を弱体化させた結果、重合体形成がまもなくなくなり、溶解するものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、イミダゾール化合物による骨格筋タンパク質機能への影響について明らかにすることを目的とする。特に、ミオシンの水溶化現象をモデルとし、イミダゾール化合物であるヒスチジンがミオシンとの相互作用を介してミオシンの構造や機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討し、ミオシンの水溶化現象を解明する。

3. 研究の方法

(1) 材料

本研究では、鶏浅胸筋から調製したミオシン、およびそのミオシンから限定酵素分解によって調製した軽メロミオシン (LMM) を用いた。

また、ミオシン C 末端 250 残基領域に焦点を当てて検討を行うため、遺伝子組換え大腸菌を用いた強制タンパク質発現系より精製したタンパク質フラグメントも用いた。タンパク質フラグメントは鶏胚ミオシン重鎖 1C をもとに、そのアミノ酸残基 1700-1755、1756-1811、1813-1868、および 1869-1924 の各領域のみを有するよう作製した。アミノ酸残基 1813-1868 のフラグメントは発現量を上げるためにスレオニンおよびセリンを N 末端側に付与している。

(2) ミオシンの水溶化

ミオシンを 10 mM ヒスチジン溶液に対して透析し、その透析内液を超遠心分離 (100,000 G, 120 min) した。上清のタンパク質濃度から溶解度を算出した。

(3) 水溶化条件下における構造変化の確認

タンパク質フラグメントの表面疎水性の変化を疎水性環境下で蛍光を発するプローブである 8-アニリノナフタレン-1-スルホン酸 (ANS) の蛍光強度 (Ex 380 nm/Em 420-560 nm) を測定し、蛍光強度の最大値で評価した。

(4) 水溶化条件下における表面電荷の確認

タンパク質フラグメントの表面電荷は、ゼータ電位を測定することで検討した。ゼータ電位の測定にはゼータ電位測定装置 (ゼータサイザー ナノ ZEN2600, Malvern 社) を用いた。

(5) 水溶化阻害効果の確認

ヒスチジン溶液 (10 mM ヒスチジン) に対して透析し、水溶化したミオシンおよび LMM に候補となる化合物を終濃度で 0.01-10 mM となるよう添加し、4℃ で 30 分間インキュベーションした。その後、超遠心分離 (100,000 G, 120 min) した上清のタンパク質濃度から溶解度を算出し、化合物無添加における溶解度との差で化合物添加による影響を検証した。また、インキュベーション後のミオシン懸濁液の形態を、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

(6) ミオシンをタンパク質フラグメントとの共溶解

ミオシンおよび各タンパク質フラグメントを混合し、ヒスチジン溶液に対して透析した。透析後の内液を超遠心分離 (100,000 G, 120 min) し、得られた上清のタンパク質濃度から溶解度を算出した。

(7) アミノ酸の転移自由エネルギーの測定

水または 100 mM ヒスチジン溶液を溶媒とし、各アミノ酸を過剰量添加し、その溶媒に溶けたアミノ酸量を測定することで飽和溶解度を算出した。アミノ酸の溶解度は振動型密度計 (DMA4101, Anton Paar 社) を用いた。水およびヒスチジン溶液における各アミノ酸の飽和溶解度の差を転

移自由エネルギーとした。

4. 研究成果

(1) 水溶化条件下におけるミオシンC末端領域の構造および性状の変化

一般にミオシンは低塩濃度溶液もしくは塩を含まない純水中では重合体を形成するために溶解しないとされている。ヒスチジン存在下において水溶化したミオシンは構造変化または分子性状の変化が起きていると考えられる。そこで、本研究では水溶化によるミオシンの構造変化を表面疎水性の測定によって、性状変化をゼータ電位の測定によって検証することとした。ヒスチジンを含まない純水中においてミオシンの重合を避けるために、C末端領域のタンパク質フラグメントを試料として用いた。

各タンパク質フラグメントの表面疎水性を測定した結果、塩を含まない条件ではヒスチジンの有無による最大蛍光強度の値に変化はなく、水溶化処理によってこれらの領域における楕の変化は生じていないことが示された(表1)。

一方、ゼータ電位の測定では、ミオシン重鎖アミノ酸配列1700-1755および1813-1868を模するタンパク質フラグメントにおいて、ヒスチジンの存在によりゼータ電位が有意に低下した。しかしながら、ミオシン重鎖アミノ酸配列1756-1811および1869-1924を模するタンパク質フラグメントではヒスチジンの有無によるゼータ電位に差はなかった(表1)。

これらの結果から、水溶化条件下においてミオシンC末端領域では構造変化が生じていないものの、ある特定の領域においては表面電荷に変化が生じていることが示唆された。

表1. ミオシンC末端領域タンパク質フラグメントの性状評価

	a. a. 1700-1755		a. a. 1756-1811		a. a. 1813-1868		a. a. 1869-1924	
	Hisなし	Hisあり	Hisなし	Hisあり	Hisなし	Hisあり	Hisなし	Hisあり
最大蛍光強度*	172	168	426	443	306	298	236	223
ゼータ電位 (mV)	-19.7	-17.3	-20.8	-20.9	-18.5	-16.1	-22	-21.2

*励起波長380 nm、蛍光波長420-560 nmで蛍光スペクトルを得、そのうちの最大蛍光強度を示した。

(2) ミオシンの水溶化を阻害する化合物の探索

水溶化現象におけるヒスチジンの役割を理解するために、水溶化を阻害する化合物について検討した。ヒスチジンの側鎖であるイミダゾール環は、中性域への緩衝作用を有するほか、金属イオンなどの陽イオン化合物との親和性を有する。このことから、陽イオン化合物の存在下ではヒスチジンによるミオシンの水溶化は阻害されるのではと考えた。

まず、金属イオンとしてCaCl₂およびMgCl₂を添加し、ミオシンの水溶化を試みた。その結果、0~0.1 mMの添加ではいずれの化合物においてもミオシンは水溶化されたが、1 mM以上の添加ではミオシンの溶解度は有意に低下した(図1)。これらの条件でのミオシンの形態を、電子顕微鏡を用いて観察したところ、CaCl₂またはMgCl₂を0.1 mM添加した場合にはミオシンは分散していたが、1 mM以上の添加ではフィラメント様の重合体が観察され、ミオシンの水溶化が阻害されていることが示された。

続いて、中性域で陽イオンとなる塩基性アミノ酸であるアルギニンおよびリシンを添加し、ミオシンの水溶化を検討した。いずれのアミノ酸においても終濃度0.1 mM以下では溶解度の低下は見られなかったが、1 mMの添加では溶解度がおよそ半減し、10 mMの添加ではほとんどのミオシンが不溶となった(図2)。これらの条件でのミオシンの形態を電子顕微鏡で観察したところ、0.1 mMのアルギニンまたはリシンの添加では、大きな凝集体は確認できず、ミオシンは分散していると考えられたが、1 mM以上の添加では靄のような凝集体が確認された。つまり、1 mM以上の塩基性アミノ酸の添加ではミオシンの水溶化が抑制または阻害されることが示された。しかし、ここで見られたミオシンの凝集体は、上述の金属イオン塩化物の添加の場合のようなフィラメント様ではなく、塩基アミノ酸存在下ではミオ

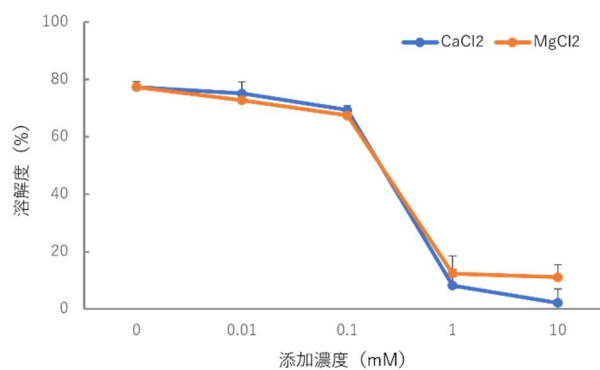


図1. ミオシンの水溶化に対する金属イオン化合物の影響

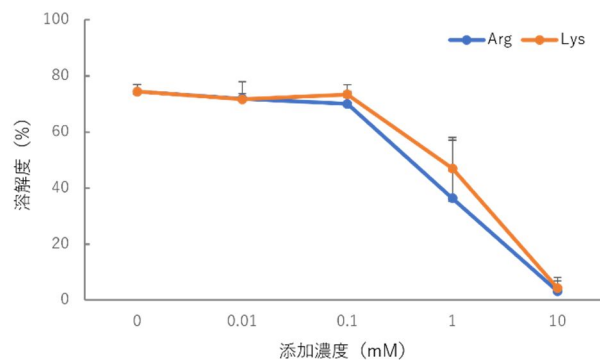


図2. ミオシンの水溶化に対する塩基性アミノ酸の影響

シンの凝集の様子も変化することが示唆された。また、他のアミノ酸（アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン）を用い、同様の実験を行ったが、ミオシンの溶解度の低下は見られず、これらのアミノ酸には水溶化の阻害効果はないことが示された（図3）。

金属イオン化合物および塩基性アミノ酸による水溶化の阻害効果が、ミオシンのふとフィラメント形成能への影響であることを確認するため、ミオシンのC末端側領域の限定酵素分解フラグメントであるLMMを用いて同様の実験を行い、検証した。その結果、ミオシンを試料とした場合と同様の結果となり、これらの化合物による水溶化阻害が、ミオシンN末端側領域の変性や凝集によるものではないことが確認された。

（3）水溶化条件におけるミオシンC末端領域の特定

ミオシンの水溶化にはC末端領域におけるヒスチジンとの相互作用が関与していると想定し、この相互作用領域を特定することで、そのメカニズムを解明できると考えた。そこで、C末端領域を模したタンパク質フラグメントをミオシンと混合し、水溶化条件下での溶解度を測定した。つまり、混入したタンパク質フラグメントがヒスチジンと相互作用する場合、ヒスチジンとミオシンの相互作用を阻害し、結果的に溶解度を低下させると考えた。しかしながら、ここで用いたタンパク質フラグメントではいずれもある程度の溶解度の低下をもたらすものの、タンパク質フラグメント間で差は見られなかった。

次に、個々のアミノ酸とヒスチジンとの相互作用について検討し、相互作用領域の特定への足掛かりを掴むこととした。ここでは、グリシン、アルギニン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸を相互作用の候補として用い、純水およびヒスチジン溶液に対する飽和溶解度の差を転移自由エネルギーとして算出し、この値が正であればヒスチジンとの相互作用はなく、負であればヒスチジンと相互作用していると判断した。その結果、アスパラギン酸およびグルタミン酸では転移自由エネルギーが大きく負となったが、これはこれらアミノ酸の水溶液が酸性を示すため、pH 7.5の測定条件ではヒスチジン存在下で溶解性が向上したものと考えられる。グリシンおよびフェニルアラニンでは、転移自由エネルギーは正の値を示し、これらのアミノ酸はヒスチジンとの親和性がないことが示された。一方、アルギニンでは転移自由エネルギーが負の値を示した。アルギニンは塩基性アミノ酸であるにも関わらず、ヒスチジンとの相互作用が示唆された。これは、アルギニンが溶液中で陽イオンとなり、ヒスチジン側鎖のイミダゾール間とカチオン- 相互作用を示したためであると考えられる。アルギニンは上述のように、ヒスチジンによるミオシンの水溶化を阻害するが、これもヒスチジンとの間にカチオン- 相互作用が働いたためであると考えられる。

以上の結果から、ミオシンC末端領域におけるヒスチジンとの相互作用部位の特定には至らなかった。しかし、アルギニンはヒスチジンと強く相互作用することが示され、ミオシンC末端領域中のアルギニン残基とも相互作用するものと考えられる。

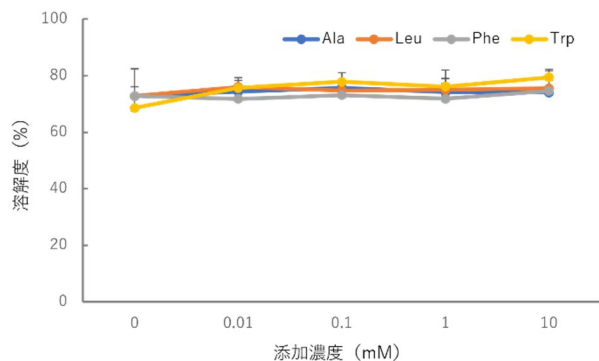


図3. ミオシンの水溶化に対する各種アミノ酸の影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2022年9月開催の日本畜産学会にて成果の一部を発表予定である。また、年度内の論文投稿を予定している。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------