

論文の内容の要旨

論文題目

Mutational Analysis of Motor Functions of *Dictyostelium* Myosin II
(遺伝子工学を用いた細胞性粘菌ミオシン II の機能解析)

総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系
佐々木直哉

ミオシンはモータータンパク質の一種であり、ATP の加水分解により得られるエネルギーを用いてアクチン繊維上を滑走する。ミオシン II は数多くのミオシンファミリータンパクの一つであり、最も多くの生化学的研究が行われてきたミオシンである。ミオシン II の ATP 依存的なアクチン繊維上での滑走はN端領域の球状ドメイン(モータードメイン; S1dC)が担っている。ミオシン II では軽鎖が結合する α -ヘリックスがモータードメインに続き、軽鎖結合部位(レバーアーム)とモータードメインをあわせてサブフラグメント 1(S1)と呼ぶ。ATP 加水分解に伴ったモータードメインの構造変化により、レバーアームが振られて力発生するというモデルは「首振り説」として知られている。しかし、モータードメインの結晶構造は既に解かれているが、ATP の加水分解と構造変化、そして力発生の詳細なメカニズムは解明されていない。

結晶構造ではモータードメインは 25K、50K、20K のサブドメインからなり、さらに 50K サブドメインが大きな溝 (50K クレフト) で上部・下部のサブドメインに分割されている。細胞性粘菌ミオシン II の S1dC とさまざまなヌクレオチド、あるいは ATP 加水分解中間体アナログとの複合体の結晶構造から、モータードメインはタイプ I とタイプ II という二種類の構造をとりうる事が明らかになった。この二種類の構造は各サブドメイン自体の構造でなく、各サブドメインの相対的位置が大きく異なっている。すなわち各サブドメインを繋ぐループがミオシンの機能の鍵であると考えられる。本研究ではこのような各サブドメインを繋ぐループのうち以下の3本のループに着目した。

- 1) スイッチ II ループ; ATP 結合部位において ATP の γ 位リン酸を囲む三本のループ (p ループ、スイッチ I ループ、スイッチ II ループ) の一つである。
- 2) ミオパシーループ; 上部 50K サブドメインの先端にあり、アクチン結合部位と推定されている。
- 3) ストラットループ; 上部・下部 50K サブドメインを繋ぐ短いループ。

細胞性粘菌のミオシン II の上記ループに変異を導入し、各変異ミオシンの生化学的性質を決定することで、各ループの役割と力発生機構の解明を試みた。

1) スイッチ II ループ

ミオシンの ATP 結合部位周辺の立体構造はGタンパク質の Ras 等の多くのヌクレオチド結合タンパク質に類似している。これらのタンパク質ではヌクレオチド結合部位に P-ループ、スイッチ I ループ、そしてスイッチ II ループという三本のループが配置されている。粘菌

のミオシン II では⁴⁵⁴DISGFE⁴⁵⁹という配列のスイッチ II ループの構造は、タイプ I とタイプ II の間で大きく異なっている。タイプ II では Gly⁴⁵⁷ は γ リン酸に水素結合しているが、タイプ I では Gly⁴⁵⁷ は結合ヌクレオチドから遠ざかっている。そこで、このグリシンは ATPase 活性部位に結合したヌクレオチドの γ リン酸基の状態を感じる“γ リン酸センサー”として機能し、分子全体の構造変化の起点であると推測される。このことは Gly⁴⁵⁷ をアラニンに置換した G457A 変異ミオシンの生化学的性質から明らかになった。この変異ミオシンは ATP と正常に結合したが、これを加水分解できなかった。また、野生型ミオシンでは ATP 結合直後に、内在性トリプトファン⁴⁵⁷の蛍光強度の変化を伴う構造変化(異性化)がおこる。この異性化はミオシンレバーアームの動きを反映していると考えられる重要な構造変化である。G457A ではトリプトファン⁴⁵⁷の蛍光の変化は観測されず、異性化が起こっていないことが分かった。このことから、ATP 加水分解に伴う Gly⁴⁵⁷ でのスイッチ II ループの構造変化が、レバーアームの動きや ATP 加水分解に必須であると結論できた。

また、Glu⁴⁵⁹ をアラニンへと置換した E459A 変異ミオシンは ATP を結合して異性化を起こすが、ATP を加水分解できなかった。つまり、E459A は ATP をほとんど不可逆的に結合したまま ATP 加水分解直前の状態に安定に保持されていた。この E459A は構造変化はできるが、ATP の加水分解はできない変異体であった。タイプ II の構造では、Glu⁴⁵⁹ の側鎖が水分子と水素結合している。野生型では、タイプ I からタイプ II への構造変化に伴って、Glu⁴⁵⁹ 側鎖に結合した水分子が ATP γ リン酸基近くに配置されるが、水分子を結合できない E459A では構造変化しても加水分解が起こらないのかもしれない。

さらに F458A 変異ミオシンは非常に高い MgATPase 活性を示すが、野生型に見られるアクチンによる MgATPase 活性の活性化は観測されなかった。結晶構造中では Phe⁴⁵⁸ の疎水性側鎖は下部 50K サブドメインの疎水性ポケットに埋まっており、アクチンによる野生型ミオシンの ATPase 活性の活性化は、アクチン結合に起因する下部 50K サブドメインの構造変化、そしてこれに伴う Phe⁴⁵⁸ を介した ATP 結合部位での構造変化が原因であると考えられる。Phe⁴⁵⁸ のアラニンへの置換によって下部 50K サブドメインの構造変化と ATP 結合部位の構造変化が脱共役したために、アクチンによって MgATPase 活性が活性化されないのかもしれない。

いずれの結果からも ATP 結合に伴う Switch II の構造変化がその後の分子全体の構造変化や加水分解に必須であることが明らかになった。

2) アクチン結合部位

ミオシンとアクチンの相互作用は、ATP 加水分解の各ステップに対応して「強い相互作用状態」と「弱い相互作用状態」が交互に変化する。アクチンとミオシンの相互作用には疎水性相互作用と静電相互作用の両者が関わっていると考えられているが、強い相互作用状態は疎水性相互作用が主として担っていると考えられている。50K サブドメインの先端には疎水性残基が露出しており、アクチンとの疎水性相互作用部位であると推定されている。そのひとつである上部 50K サブドメイン先端のループは、その根元に心筋肥大症 (Hypertrophic cardiomyopathy) の原因変異が見つかったことから「ミオパシーループ」と呼ばれている。このミオパシーループを欠損させた変異ミオシンはアクチン上を滑走できなかった。さらにこの変異ミオシンでは ATP 非存在下においてアクチンに対する結合能が著しく損なわれていた。このためこの変異ミオシンのモーター機能の喪失は、アクチンとの疎水結合に基づく強い相互作用が失われたためと結論できた。つまり、このミオパシーループは強い相互作用部位のひとつであり、かつ「強い相互作用状態」をとることがミオシンのモーター機能に必須であると言える。また、ミオパシーループに向き合うように突き出ている下部 50K サブドメインの疎水性領域にあるフェニルアラニン残基 (Phe⁵³⁵) をアラニンに置換しても、アクチンとの強い相互作用は失われた。このように上部・下部 50K サブドメイン先端のいずれの疎水相互作用領域も、アクチンとの強い相互作用に必須であることが明らかになった。ミオシンモータードメイン先

端のこれらふたつの疎水性結合部位はアクチンのサブドメイン1の上下をつまむようにして結合していることが電子顕微鏡像から予想されている。両者の協同的な結合が「強い結合状態」をもたらすのに必須であると結論できる。

3) ストラットループ

異性化以前で反応が停止する G457A ミオシンでも、ATP を加えると直ちに「強い結合状態」→「弱い結合状態」という状態変化がおこる。これはレバーアームの動きを引き起こすような大規模な構造変化なしにミオシンがアクチンから解離する可能性を示唆している。2)で述べた研究から、強い結合状態において上下両 50K サブドメインが協同的に機能していることが明らかになった。この協同性を何らかの形で崩しさえすれば、ミオシンモータードメインは「強い結合状態」から「弱い結合状態」に移行すると推測される。このような上部・下部、両 50K サブドメイン先端の疎水性結合部位をつなぐように、ストラット（支え）ループと呼ばれる短いループが存在する。このループの一次構造は各種ミオシン間で保存されており、重要な機能をはたしていることが予想される。タイプ I とタイプ II の構造を比較すると、両者でストラットループ自体の構造に変化はないが、その両端に位置する上部・下部 50K サブドメイン先端の疎水性結合部位が互いにすこし回転する。このようなわずかな疎水性結合部位の位置の変化が、アクチンとの強い結合を失わせるのに十分であることを示すために、ストラットループのいろいろな位置にさまざまなアミノ酸残基を 1 残基だけ挿入した変異ミオシン、及び 1 残基だけ欠失させた変異ミオシンを作成した。このような変異ミオシンはいずれもモーター機能を完全に失っていた。これらの変異ミオシンは、ATPase 活性に関してはほぼ野生型並の機能を維持しながら、アクチンと強く結合できなかった。このような表現型はミオパシーループの欠損変異ミオシンとほぼ同じだった。すなわち、わずかにストラットループの長さを変えただけで、アクチンとミオシンの強い結合が失われることが明らかになった。つまり、ストラットループ両脇にあるふたつの疎水性アクチン結合部位の位置関係がわずかに変わるだけで、「強い結合状態」→「弱い結合状態」という状態変化が起こることから ATPase 反応の途中でもこのようなわずかな構造変化によって「強い結合状態」⇔「弱い結合状態」という転移が実現されていると予想できる。

これらの結果から以下のようなアクトミオシンの ATPase サイクルと力発生の共役機構が考えられる。アクトミオシンへの ATP の結合は、速やかにミオシンのストラットループ両脇の疎水性アクチン結合部位のわずかな回転をもたらし、ミオシンは「弱い結合状態」に入る。その後、Gly⁴⁵⁷ の動き→スイッチ II ループの構造変化→トリプトファン蛍光強度の変化を伴うレバーアームの「振り上げ」が起こる。ATP 結合部位では Glu⁴⁵⁹ が加水分解が進行できる状態に配置される。ATP の加水分解、リン酸放出に伴い、疎水性アクチン結合部位の位置が戻る。同時に、ミオシンは「強い結合状態」に入り、アクチンと結合してレバーアームの「振り下げ」が起こる。こうして、レバーアームの動きとミオシン-アクチン相互作用変化が ATP 結合部位での加水分解ステップと対応して協同的に進行し、アクチンフィラメント上でミオシンが力発生するというモデルを立てることができる。