



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホタテ貝柱平滑筋ミオシンATPaseとキャッチ機構
Author(s)	高橋, 正行
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第2575号
Issue Date	1989-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32542
Type	doctoral thesis
File Information	2575.pdf



ホタテ貝柱平滑筋ミオシンATPaseと
キャッチ機構

学位論文

高橋 正行

北海道大学

1989年

目次

要約	1
略語	4
序	7
実験方法	11
第一部 Ca^{2+} によるホタテ貝柱筋ミオシンのフィラメントの安定化	22
結果	22
考察	31
第二部 ホタテ貝柱筋アクトミオシンの超沈殿活性化因子 (トロポミオシン)	35
結果	35
考察	53
第三部 ホタテ貝柱平滑筋オパーク部ミオシンATPaseの反応中間体とキャッチ収縮の分子機構	57
結果	
第一章 オパーク部ミオシンATPase反応の定常状態 中間体の Ca^{2+} 感受性	58
第二章 アクチン存在下におけるミオシンATPase反応の定常状態中間体	77
第三章 ミオシン制御軽鎖 (RLC-a)のリン酸化の影響	87
考察	93
引用文献	106
謝辞	112

要約

軟体動物の一種である二枚貝は、貝殻を閉じた後、そのまま収縮状態を保ち続けることができる。この持続的な収縮現象はキャッチと呼ばれ、ホタテでは貝柱平滑筋のオパーク部が特にキャッチ筋の性質をもつ。キャッチ状態における筋肉のエネルギー消費は低く、ミオシンがATPase活性の低い状態でアクチンと強く結合していると考えられる。ホタテ貝柱平滑筋を用いてキャッチ収縮の分子機構の研究をおこなった。

第一部

キャッチ筋においても他の筋肉と同様に活性収縮は細胞内の Ca^{2+} 濃度の増加により開始する。ホタテ貝オパーク部ミオシンの分子形態に及ぼす Ca^{2+} の影響を調べた。ミオシンは高イオン強度の溶液内ではモノマーとして存在するが、低イオン強度下においては会合してフィラメントを形成し溶解度が減少する。オパーク部ミオシンの溶解度のKCl濃度依存性は、ATPあるいはADP存在下において Ca^{2+} 感受性を示した。すなわち、0.2M以下のKCl濃度の範囲で、 Ca^{2+} 存在下(0.1mM CaCl_2 存在下；+ Ca^{2+})に比べて Ca^{2+} 非存在下(1mM EGTA存在下；- Ca^{2+})の方がミオシンの溶解度は増加した。

ミオシンが50%溶解しているイオン強度下で電子顕微鏡写真をとると、+ Ca^{2+} では尾部が伸長した形態をしているのに対し、- Ca^{2+} では尾部が2か所で折れ曲がり丸くなっていた。脊椎動物平滑筋のミオシンで見られた沈降定数が6Sと10Sの形態とそれぞれ似ている。

オパーク部ミオシンは活性収縮のシグナルである Ca^{2+} を結合すると、折れ曲がった分子形態からフィラメントを安定化させるような伸びた分子形態に転移することが明らかになった。

第二部

ホタテ貝柱平滑筋のThin filament 成分内にホタテのミオシンとウサギ骨格筋アクチンから再構成したアクトミオシンの超沈殿を活性化する因子が存在することを見出した。DE-32、CM-52 カラムクロマトグラフィーを用いてこの活性化因子を精製した。平滑筋に2種、横紋筋に1種存在しており、平滑筋のものをAF-1、AF-2、横紋筋のものをAF-3と命名した。

ウサギ骨格筋のアクトミオシンにトロポニン存在下において、これらの活性化因子を加えると、ATPase活性が Ca^{2+} 感受性を示し、活性化因子はホタテ貝柱筋のトロポミオシンと同定された。SDSあるいは尿素存在下の電気泳動における移動度はウサギ骨格筋のトロポミオシンと似ていた。この活性化因子（トロポミオシン）はいずれも、ミオシンとアクチンの親和性を高め、その結果、超沈殿を活性化するものと思われる。

3種の因子のうちAF-1がキャッチ筋の性質をもつオパーク部に特異的に存在する。

第三部

刺激停止後、細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少してからおこるキャッチ収縮の分子機構を明らかにするために、 Ca^{2+} 非存在下のオパーク部ミオシンATPaseの定常状態中間体を調べた。オパーク部ミオシンのATPase活性が Ca^{2+} 感受性を示す低イオン強度下において、ミオシン懸濁液の濁度を減少させるためにショ糖を1.5M加え、ATP添加による紫外部吸収差スペクトルを測定した。 $+\text{Ca}^{2+}$ においては、差スペクトルがはじめATP型を示した後、ATPが消費されるとADP型に減衰した。一方、 $-\text{Ca}^{2+}$ においてはATP添加後ただちにADP型を示した。この結果は、オパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体が Ca^{2+} 濃度によって変化し、 $+\text{Ca}^{2+}$ においてはATP型を示す分子種である $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ であり $-\text{Ca}^{2+}$ においてはADP型を示す分子種である $\text{E} \cdot \text{ADP}$ であるということを示している。同様の結果が

1.5Mショ糖非存在下におけるミオシンのTrp 残基のけい光スペクトルの測定からも得られた。

また、オパーク部ミオシンへの ADPの結合の強さを測定すると、 Ca^{2+} 感受性があり、 $+\text{Ca}^{2+}$ に比べて $-\text{Ca}^{2+}$ において ADPのミオシンへの親和性が約13倍増加した。さらに、 $-\text{Ca}^{2+}$ におけるオパーク部ミオシンの溶解度の KCl濃度依存性は、ATP存在下と ADP存在下で全く同様であった。これらの結果も $-\text{Ca}^{2+}$ におけるオパーク部ミオシンはほとんどが $\text{E} \cdot \text{ADP}$ になっているということを強く支持する。

アクチン存在下において、オパーク部ミオシンの重鎖のトリプシンによる限定分解のされ方が $-\text{Ca}^{2+}$ の時 ATP存在下と ADP存在下で同様であった。また、ミオシンに結合した ϵ -aza-ADPのけい光強度が ATP再生系を加えて ϵ -aza-ADPを ϵ -aza-ATPにしても変化しなかった。アクチン存在下でも $-\text{Ca}^{2+}$ 時の定常状態中間体は $\text{E} \cdot \text{ADP}$ であると考えられる。

オパーク部ミオシンの制御軽鎖の一つである RLC-aのSer-11をリン酸化すると、 $-\text{Ca}^{2+}$ においても定常状態中間体は $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ であることが、紫外部吸収差スペクトル、けい光スペクトル、ミオシンの溶解度の測定から判明した。この結果は、RLC-a がリン酸化されると中間体が $\text{E} \cdot \text{ADP}$ からアクチンと親和性の低い $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ に変わってキャッチが解除され、弛緩状態になるという機構と一致する。

以上の結果から、キャッチ状態においては、オパーク部ミオシンのほとんどは $\text{E} \cdot \text{ADP}$ 中間体でありアクチンと強い結合をして、ほとんどATPaseサイクルを回転せずエネルギー消費の低い状態で張力を維持しており、RLC-a のリン酸化によってミオシンが $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ 中間体になりキャッチ状態が解除されるというキャッチ収縮の分子機構を提出した。

略語

A T P ; adenosine 5'-triphosphate
A D P ; adenosine 5'-diphosphate
A B R M ; anterior byssus retractor muscle
a M K ; RLC-a myosin kinase
A P S ; ammonium persulfate
A T P a s e ; adenosine triphosphatase
 β - M E ; 2-mercaptoethanol
B P B ; Bromophenol Blue
c A M P ; cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
C B B ; Coomassie Brilliant Blue
D T T ; dithiothreitol
E D T A ; ethylenediaminetetraacetic acid
E G T A ; ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic
acid
H M M ; heavy meromyosin
L M M ; light meromyosin
M L C K ; myosin light chain kinase
M O P S ; 3-(N-morpholino) propane sulfonic acid
P A G E ; polyacrylamide gel electrophoresis
P M S F ; phenylmethanesulfonyl fluoride
P i ; 無機リン酸
R L C - a ; regulatory light chain-a of scallop adductor
smooth muscle myosin
R L C - b ; regulatory light chain-b of scallop adductor
smooth muscle myosin
S D S ; sodium dodecyl sulfate
S e r ; serine
T r p ; tryptophan

T y r ; tyrosine

T C A ; trichloroacetic acid

T E M E D ; N.N.N'.N'.-tetramethyl ethylenediamine

T P C K ; N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone

T r i s ; tris(hydroxyl methyl) amino methane

アミノ酸の一文字記号

A ; alanin

R ; arginine

N ; asparagine

D ; aspartic acid

Q ; glutamine

E ; glutamic acid

G ; glycine

I ; isoleucine

L ; leucine

K ; lysine

M ; methionine

F ; phenylalanine

P ; proline

S ; serine

T ; threonine

V ; valine

序

筋収縮は ATP をエネルギー源としてミオシンとアクチンが相互作用することによっておこる。筋肉が収縮している間は、ミオシンは常に ATP を加水分解し続けなければならない。収縮状態を長時間持続することは生体にかかなりの疲労をもたらすことになる。

ところが軟体動物の一種である二枚貝は、貝殻を閉じた後、長時間そのままの状態を続けることができる。この持続的な収縮現象はキャッチと呼ばれる。キャッチ状態においては、エネルギー消費が弛緩状態と同じくらいの低いレベルに抑えられている (1)。すなわち、キャッチ状態は、ミオシンが ATP をほとんど加水分解することなしに保たれている非常に不思議な収縮状態である。キャッチは古くから主に生理学的研究の題材として取り上げられてきた。しかし、生化学的な立場でのキャッチ収縮の機構の解明はほとんどなされていない。

ムラサキイガイの足糸牽引筋 (ABRM) の生筋を用いた生理学的研究によると、アセチルコリンによって筋肉が収縮し活性化状態になり、アセチルコリンを洗い流しても収縮状態が保たれる。すなわちキャッチ状態になる。キャッチ状態はセロトニンを添加することによって解除され弛緩状態に移行する (2, 3)。セロトニンは細胞内の cAMP 濃度を増加させる (4, 5)。

さらに、ABRM のスキンドファイバー (除膜筋繊維) を用いた研究によって、キャッチ状態に似た持続した張力が Ca^{2+} を洗い流した後におこり、cAMP を添加するとその張力が解除され弛緩することがわかっている (6, 7)。

以上の結果から、キャッチ状態は筋肉への刺激が停止し細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少した後にも持続する収縮状態であると考えられる。さらに、cAMP に依存したタンパク質のリン酸化がキャッチの解除に関与している可能性がある。

キャッチ機構にパラミオシンのリン酸化が関与しているのではな

いかという仮説が提出されている (8, 9, 10)。パラミオシンはキャッチ筋の Thick filament の芯部を形成しているタンパク質でキャッチ筋に含量が多いこと、また pH やイオン強度の変化で状態が変わることから、古くからキャッチ収縮に関与している可能性が示唆されている (パラミオシン説) (11, 12)。しかし、パラミオシンはキャッチ収縮をおこなわない筋肉にも含まれるし、また生筋内において大きな pH やイオン強度の変化がおこるとは考えにくいことから、パラミオシン自身がキャッチ機構の鍵をにぎっているとは思われない。一方、キャッチ状態における張力は、ミオシンとアクチン間のクロスブリッジがゆっくり切れることにより保たれるという説 (アクトミオシン説) が電子顕微鏡による観察によって提出されている (13, 14)。また最近、Castellani と Cohen はミオシンの尾部 (C 端付近) のリン酸化が、キャッチの解除に関与しているのではないかということを示唆している (15)。

しかし、これらの説ではキャッチ収縮の分子レベルでの機構を説明することはできない。すなわち、キャッチ状態において、なぜミオシン ATPase 活性が低いレベルにあるにもかかわらず、張力を発生することができるのかということは、結局謎のままである。

本研究では、アクチンとクロスブリッジを形成し実際に ATP を加水分解するタンパク質であるミオシンの性質が他の筋肉のものと異なりキャッチ収縮の鍵をにぎっているに違いないと考え、ホタテ貝柱平滑筋のミオシンを用いて、キャッチ収縮の分子機構の解明を試みた。

ホタテ貝柱平滑筋は、横紋筋と接触している内側のトランスルーセント部と外側のオパーク部からなりそのうちオパーク部が特にキャッチ筋の性質をもつことが Ruegg らによって示されている (11)。

オパーク部から精製したミオシンは、等モル量の二種類の制御軽鎖 RLC-a と RLC-b を含んでいることが近藤らによって明らかにされている (16, 17)。RLC-a には RLC-b より N 端に 5 残基余分にアミノ酸が存在し (18)、また鶏砂囊筋のミオシンの 20K 軽鎖のリン酸化され

る Ser 残基付近と同一のアミノ酸配列をもっている (19)。RLC-a の Ser-11 が鶏砂囊筋 M L C K によってリン酸化されることがわかり (19)、さらに、この Ser-11 をリン酸化する内在性のタンパク質リン酸化酵素 a M K と、その cAMP 依存性の制御因子 (41K タンパク質) が相馬らによって精製されている (20, 21)。

軟体動物の筋肉では、横紋筋と平滑筋の両方ともにミオシンへの Ca^{2+} 結合によって収縮が調節されていることが、Kendrick-Jones らによって明らかにされている (22)。再構成アクトミオシンの ATPase 活性は、 Ca^{2+} 存在下において非存在下の場合に比べて 100 倍以上も高い。 Ca^{2+} はミオシンの制御軽鎖に結合する (22)。さらに、Ashiba らによってアクチン非存在下でもミオシンのみで ATPase 活性に Ca^{2+} 感受性があることが報告された (23)。すなわち、軟体動物のミオシンは ATP を加水分解することのみならず、収縮の Ca^{2+} による制御の役割をもになっていることになる。

筆者は、キャッチ機構を分子レベルで解明するためには、筋肉の活性化、キャッチ、弛緩の三状態をしっかりと区別し、このことをいつも考慮に入れて、ミオシンに対する、ATP、 Ca^{2+} の影響を様々な方法で追跡することが必要であると考えた。キャッチ状態はミオシンとアクチンが強い結合をしていると考えられる。ミオシン自身がアクチンに対して強い結合と弱い結合の二つの状態をとることが知られているが (24, 25)、特にこのこととキャッチの関連性について議論し、新たなキャッチ収縮の分子機構を提案する。

第一部では、活性収縮のシグナルである Ca^{2+} がミオシンへ結合した時におこるキャッチ筋ミオシンの分子形態変化について述べる。ホタテ貝オパーク部ミオシンの分子形態を、ミオシンの溶解度および電子顕微鏡により調べた。生理的イオン強度下で、 Ca^{2+} 非存在下における尾部の折れ曲がったミオシン形態から、 Ca^{2+} 存在下では尾の伸びた分子形態に転移することを見出した (26)。この形態変化によりミオシンフィラメントが Ca^{2+} 存在下において安定に存在すると考えられる。

第二部では、キャッチ筋の活性収縮はトロポミオシンによって活性化されている可能性について論ずる。ホタテ貝柱筋には3種のトロポミオシンが存在し、そのどれもがミオシンとアクチンの結合を強め、そのことが原因で活性収縮の試験管内モデルであるアクトミオシンの超沈殿が活性化することがわかった(27)。3種のトロポミオシンのうちAF-1と命名したものはオパーク部に特異的に存在することがわかった。

第三部では、刺激が停止した後、 Ca^{2+} 濃度が低下してからおこるキャッチ状態においては、オパーク部ミオシンは、ATPase反応の中間体の一つでADPとの複合体であるE·ADPという分子種となっていることを提案する。この提案は、ミオシンのTrp由来の紫外部吸収差スペクトル、けい光スペクトル、基質として用いた ϵ -aza誘導体のけい光変化、トリプシンによるミオシン分子の限定分解、あるいはミオシン分子の溶解度測定などの実験結果に基づいている(28,29)。また、RLC-aのリン酸化によりキャッチ状態が解除される可能性について議論する。

実験方法

1. タンパク質の調製

a. ホタテ貝柱筋粗ミオシン；ホタテ貝柱筋の粗ミオシンは近藤らの方法（16）に従い以下のようにして調製した。まず生きているホタテ貝（*Patinopecten yessoensis*）より貝柱をはずし、横紋筋と平滑筋（キヤッチ筋）に分離した。平滑筋よりオパーク部とトランスルーセント部に分離して粗ミオシンを調製する場合は、この段階でカミソリの刃によって両部を分離した。6.7mM リン酸緩衝液（pH7.4）、40mM KCl、5mM $MgCl_2$ 、0.01% β -ME、0.1mM PMSF からなる洗浄液を肉重量の8～10倍容量加えてホモジェナイズして遠心する操作を5回繰り返した（横紋筋の場合は4回で充分）。次に6.7mM リン酸緩衝液（pH6.0）、50mM KCl、5mM $MgCl_2$ 、0.01% β -ME、0.1mM PMSF、5mM ATPからなる溶液でThin filament 成分を2回抽出した。沈殿から6.7mM リン酸緩衝液（pH6.4）、100mM ピロリン酸ナトリウム、1mM $MgCl_2$ 、0.01% β -ME、0.1mM PMSF でミオシンを抽出し、10倍容量の水で希釈して沈殿を集め0.5M KClに溶かした。同容量のグリセリンを加えて $-20^{\circ}C$ で保存した。

b. ホタテ平滑筋ミオシン；粗ミオシン1gから開始した場合について示す。粗ミオシンの50%グリセリン溶液を1mM $MgCl_2$ を含む1mM $KHCO_3$ 溶液で5倍に希釈し、10000rpm、10min、遠心分離し沈殿を集め、それを200ml の200mM $MgCl_2$ 、1mM EGTA、14mM β -ME、0.1mM PMSF を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で溶かした。5mM になるようにATPを加えた後、29000rpm、1hour、超遠心分離し、主にアクチンを沈殿させた。上清を冷水で10倍に希釈した後、5000rpm、10min、遠心分離し沈殿を集め、200ml の0.5M KCl、14mM β -ME、0.1mM PMSFを含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶かした。5mM になるようにATPを加えた後、すぐに飽和硫酸を38%となるように加えて、12000rpm、10min遠心分離した。主にパラミオシンを含む沈殿が

上清の上部に膜となり、これを除くことができた。上清にさらに飽和硫酸を55%になるまで加えた後、10000rpm、10min、遠心分離し沈殿を集めた。この沈殿を少量(10ml ~20ml)の水に溶かし、2リットルの水に対し1hour 透析した後、1mM $MgCl_2$ を含む 5mM Tris-HCl (pH7.5) で25倍希釈し、10000rpm、10min、遠心分離し沈殿を集めた。少量混在していたトロポミオシンは、ここで上清に残り除くことができた。沈殿を0.5M KClに溶かし、同容のグリセリンを加えて10000rpm、10min、遠心分離し上清を精製ミオシンとして-20℃に保存した(27)。図1に精製の各ステップのサンプルのSDS-PAGEパターンを示した。

c, RLC-a リン酸化ミオシン; オパークミオシンの制御軽鎖のひとつであるRLC-a を鶏砂囊MLCKによって以下のようにしてリン酸化した。反応混液の組成は、1mM $CaCl_2$ 、10mM $MgCl_2$ 、40mM Tris-HCl (pH7.5)、125mM KCl、25 %グリセリン、10mM ATP、15 μ g/mlカルモデュリン、約0.6mg/ml MLCK で、ミオシンの濃度は1.8 ~3.4mg/mlとした。反応は10℃において1.5 時間おこなった。インキュベーション後、KCl を 0.5M になるように加え、15000rpm 10min、遠心分離した。その上清を、0.5M KCl、2mM $MgCl_2$ を含む10mM Tris-HCl (pH7.5)、で平衡化したSephadex G-25 (course) カラムにアプライし、過剰な ATPを除いた。ミオシン画分を集め、1mM $MgCl_2$ を含む 5mM Tris-HCl (pH7.5) で 20 倍希釈した後、沈殿を0.5M KClに溶かし、同容のグリセリンを加えて、10000 rpm、10min、遠心分離し上清をRLC-a リン酸化ミオシンとして-20℃に保存した(28)。RLC-a のリン酸化は、8 M尿素存在下のポリアクリルアミド電気泳動によって確認した(20)。

d, その他のミオシン; ホタテ貝柱横紋筋ミオシンは近藤らの方法(16)により精製した。ウサギ骨格筋ミオシンは Perryの方法(30)に従い調整した。ブタ大動脈平滑筋ミオシンは長谷川 靖氏

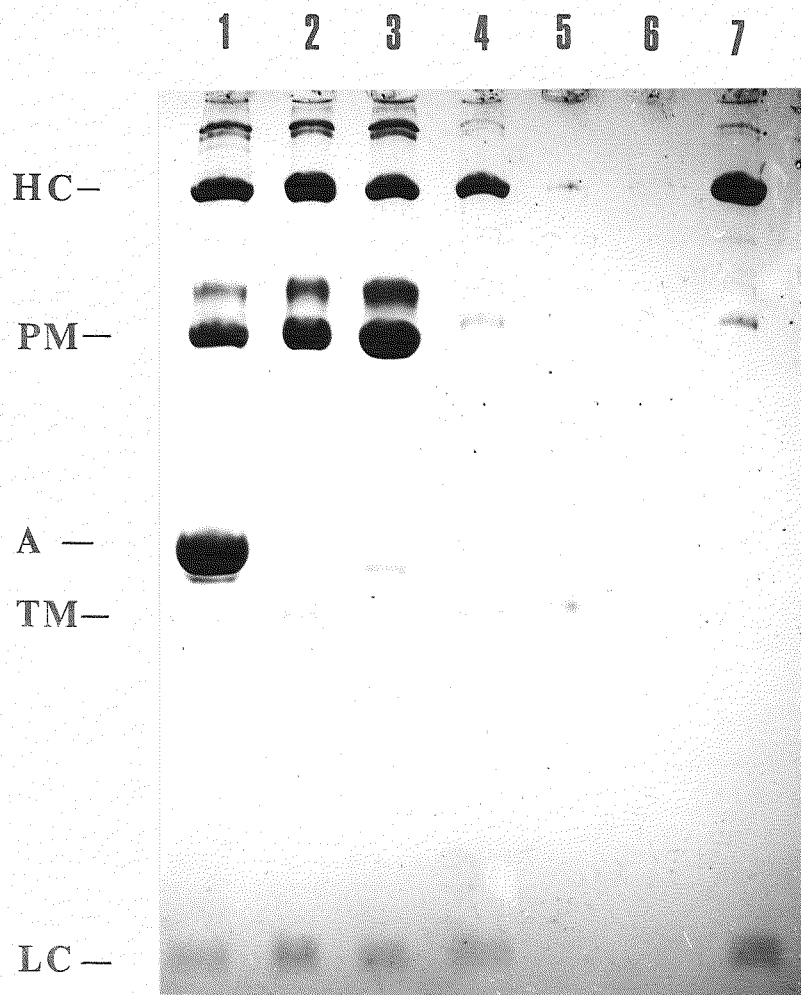


図1 ホタテ貝柱平滑筋ミオシンの精製各段階のSDS-PAGEパターン

1, 200mM $MgCl_2$ 懸濁液を、29000rpmで 1hour超遠心分離した後の沈殿、2, 10倍希釈後の沈殿で、0.5M KCl に溶けないもの、3, 38%飽和硫酸沈殿、4, 透析後の沈殿、5, 10倍希釈後の上清、6, 20倍希釈後の上清、7, 20倍希釈後の沈殿（精製ミオシン）。
 HC: ミオシン重鎖、PM: パラミオシン、A: アクチン、TM: トロポミオシン LC: ミオシン軽鎖。

これは初期の精製方法のもので透析後、2回希釈沈殿を繰り返しているが、後に25倍希釈1回のみで充分であることがわかった。

より頂いた。アワビ平滑筋ミオシンは浅川 哲弥博士（北海道教育大学旭川分校）より頂いた。

e, ホタテ貝柱筋 Thin filament成分: Thin filament 成分は洗浄筋ホモジェネイトから 2.5倍容量の 6.7mMリン酸緩衝液 (pH6.0)、50mM KCl、5mM MgCl₂、0.01% β -ME、0.1mM PMSF、5mM ATP からなる溶液で抽出した。10000rpm、10min、遠心分離した後、上清に飽和硫酸を80%となるように加え一晩放置した。沈殿を集めタンパク質濃度が約10mg/ml となるように 0.2mM ATP (pH8.2) 溶液に懸濁し同液に対して透析した。十分に透析した後、27000rpm、2hour、超遠心分離し上清に 0.1M となるようにショ糖を加え凍結乾燥し保存した。

f, その他のタンパク質: ウサギ骨格筋アクチンは、筋肉のアセトンパウダーから 0.3mM ATP、0.1mM CaCl₂、0.5mMアスコルビン酸溶液を Tris で pH8.2にあわせたもので抽出した後、SpudichとWattの方法 (31) にしたがって精製した。同トロポミオシンはアセトンパウダーから Bailey の方法 (32) を応用し精製した。同トロポニン江橋らの方法 (33) にしたがって精製し、さらに 1mM DTT を含む 20mM Tris-HCl (pH7.5) で平衡化した DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによって精製した。溶出は KClの直線濃度勾配 (0-0.4M) でおこなった (34)。鶏砂囊筋 MLCK は相馬 仁博士より頂いた。カルモデュリンは鶏砂囊筋のものを相馬 仁博士よりまた、ホタテ精巢のものを安部 泰彦氏より頂いた。ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼは石田 満理氏より頂いた。

2. タンパク質の定量

ミオシンとアクチンの濃度は 280nmにおける吸光度から、1mg/ml の溶液の吸収係数 (セルの光路長=1cm)をそれぞれ 1.1、0.53 として求めた。分子量はそれぞれ 480000、42000を用いた。鶏砂囊筋 MLCK、カルモデュリン、ピルビン酸キナーゼの濃度の測定には

Biuret法 (35) を用いた。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

SDS 存在下の PAGE は Porzio と Pearsonの方法 (36) に従って行なった。10%アクリルアミド (1/100 のビスアクリルアミドを含む)、0.05% SDS、0.4mM トリス-グリシン (pH8.9)、5%グリセリン、0.05mM EDTA、0.04 % TEMED、0.36% APS の組成のスラブゲルを用いた。緩衝液には、0.1 % SDS、0.2Mトリス-グリシン (pH 8.9)を用いた。

尿素存在下の PAGE は、6 %アクリルアミド (1/30 のビスアクリルアミドを含む)、8M尿素、0.02M Tris-HCl (pH7.5)、0.1% TEMED 0.36% APS の組成のスラブゲルを用いた。緩衝液 (pH7.0)は、0.1 %トリスを含む 0.03Mジエチルバルビタール酸を用いた (37)。ゲルは Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250 で染色した。

4. ミオシンの溶解度の測定

0.5mg/mlのミオシンを 30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM $MgCl_2$ 、7~8% グリセリン、種々の濃度の KClの溶液に溶かし、15℃において 100000rpm、5min、超遠心分離した後、上清を SDS存在下で電気泳動しCBB 染色したミオシン重鎖のバンドの濃さを、島津 CS-930 dual- wavelength TLC scanner (測定波長 = 600nm)より定量して溶解度を計算した。または上清のタンパク質濃度を Bradford の方法 (38)で定量して溶解度を計算した。

5. 超沈殿の測定

アクトミオシンの超沈殿は ATP添加後の濁度の変化を測定することによって追跡した。濁度の変化は島津 UV-350 自記分光光度計で 660nm における吸光度の変化で測定した。まずミオシン、アクチンその他のタンパク質因子を混ぜ、0.4M KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0) 10 %グリセリン溶液とし、0℃で1時間以上放置した。反応混液

の最終容積は 3mlとした。タンパク質溶液を含まない反応混液を、セル内で 15℃にしておき 1/8容量すなわち 0.375mlのタンパク質溶液を加え、テフロン製のミキサーで混ぜ合わせた。1分間 ATPのない状態で吸光度を記録した後、アダミキサーで ATPを加えよく攪拌し反応を開始した。

6. ミオシン ATPase 活性の測定

ミオシン ATPase 活性の定常状態における速度は放出された Pi 量の時間変化から決定した。Pi の濃度は Fiske と SubbaRow の方法 (39) に従って定量した。ショ糖存在下の場合は Lin と Morales の方法を用いた (40)。

7. 紫外部吸収差スペクトルの測定

ATP の添加によって起こるミオシンの紫外部吸収差スペクトルは盛田の方法 (41) に従いダブルセルを使用し温度制御セルホルダーのついた島津 UV-350 自記分光光度計で測定した。光路長の合ったセルをサンプル側とリファレンス側に 2 個ずつ置き、サンプル側の 1 個のセルにミオシンと ATP の混合物を入れもう 1 個のセルに溶媒のみを入れた。リファレンス側のセルにはミオシンと ATP を分けてそれぞれのセルに入れた。溶媒およびミオシンはホールピペットを使用してセルに入れた。ATP はマイクロピペットを使用しアダミキサーでセルに加え攪拌した。ATP を加えないセルには同容の水をマイクロピペット、アダミキサーを用いて加えた。サンプル側のミオシンの入ったセルに ATP を最後に加え反応を開始した。1.5M ショ糖存在下の場合はベースラインが下がることに注意して測定した。

8. けい光スペクトルの測定

けい光スペクトルは温度制御装置および攪拌装置のついた JASCO EP-770 けい光光度計で測定した。反応の途中に試薬 (ATP、ADP など) を添加するときは、装備されている穴からマイクロシリンジを

用いて加えた。トリプトファンのけい光スペクトルの時間変化を測定する場合は、励起および発光の波長はそれぞれ 293nm、335nmを用いた。 ϵ -aza-ADPのけい光スペクトルを測定する場合は、350nmで励起し 380nmから 580nmまでのけい光スペクトルを測定した。

9. ミオシンへの ADP結合の測定

ミオシンへの ADPの結合の強さは、種々の濃度の ADPをミオシン懸濁液に加えインキュベーションした後、15℃で 100000rpm、1hour超遠心分離し上清に残った ADP量から結合 ADP量を計算して求めた(42)。ADP の濃度は259nm における吸光度から求めた。モル吸光係数は、15400 を用いた。加えた ADP量 $[ADP]_t$ はミオシン懸濁液に加えたのと同濃度のミオシンを含まない ADP溶液を作りその 259nm における吸光度から求めた。

$[ADP]_f$ と r (ミオシン head あたりの ADP結合量) は以下のようにして求めた。上清に残った ADP量を $[ADP]'_f$ とすると、ミオシンに結合した ADP量 $[ADP]_b$ は、 $[ADP]_b = [ADP]_t - [ADP]'_f$ となる。この $[ADP]_b$ には非特異的に結合した ADP量も含まれる。非特異的な結合も含んだミオシンheadあたりの ADP結合量を r' とすると、 $r' = [ADP]_b / [head]$ となる。 $[head]$ はミオシンのheadのモル濃度を示す。

$[ADP]'_f$ を横軸に r' を縦軸にとってグラフを作成すると ADP高濃度側で一定の傾きをもって r' が増加する。この傾きは非特異的な結合によるものである。同じ傾きの直線をグラフ内に原点を通らせて引き各々の ADP濃度における非特異的な結合量を求め、 r' からその値を差し引いて特異的な結合量 r を求めた。また、 $[head]$ にその値を掛けて $[ADP]_b(\text{nonspecific})$ を求めた。 $[ADP]_b(\text{nonspecific})$ はミオシンheadあたりの非特異的な結合量を示す。

フリーの ADP量は $[ADP]_f = [ADP]'_f + [ADP]_b(\text{nonspecific})$ となる。

10. ミオシンの結合ヌクレオチドの同定

ミオシンATPaseの定常状態において活性部位に結合しているヌクレオチドの種類を井上と殿村の方法(43)を応用し以下のようにして同定した。反応混液には ATP再生系として十分量のピルビン酸キナーゼとホスホエノールピルビン酸を加えた。0.2ml のミオシン懸濁液を、15℃でインキュベートし、そこに種々の濃度の ^3H -ATP を加え反応を開始した。3分後に0.1ml の 5mM ATPと 5mM ADPを含む 10% TCAを加え反応を停止した。そこから 0.2mlを分取し 100000 rpm、10min超遠心分離した。上清の20 μ l を薄層プレート (PEI-cellulose ; Merck社) にアプライし、15分間メタノールに浸した後、4M ギ酸 (pH3.4) を溶媒として展開した。マナスランプをあて ATPと ADPのスポットを確認した後、それぞれのスポットをスパチュラを用いて薬包紙に掻き出しバイアルに入れて液体シンチレーションカウンターでカウントした。加えたヌクレオチド量は展開を行わない以外は全く同様の操作を行なって求めた。

11. ミオシンのトリプシンによる限定分解

1mg/ml のミオシンを 65mM KCl、3mM MgCl_2 、10%グリセリン、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、15℃の条件で、TPCK処理したトリプシンによって限定分解した。TPCK-トリプシンはミオシンに対して、100分の1重量加えた。決められた時間に反応混液から一定量を取り、あらかじめトリプシンの3倍重量のソイビートリプシンインヒビターを入れておいた試験管に移し入れ反応を停止した。アクチン存在下の場合は、0.9mg/ml のF-アクチンを加えた。60 μ l のサンプルに 20% SDSを5 μ l、 β -MEを5 μ l、倍に希釈した BPB溶液を10 μ l 加えた後煮沸し SDS-PAGE を行なった。CBB染色した後ミオシン重鎖のバンドの濃さを、島津 CS-930 dual-wavelength TLC scanner で定量しトリプシン消化による重鎖の減少速度を求めた。

12. ϵ -aza-ADPの合成

ATP から ϵ -ATP、さらに ϵ -aza-ATPを合成しようとしたところ合成中に加水分解をうけ、生成物のほとんどが ϵ -aza-ADPであった。 ϵ -化合物は尾西ら (44) および Secrist III ら (45) の方法を応用し合成した。 ϵ -aza-化合物は Yip ら (46) の方法を応用し合成した。

a. ϵ -化合物; 1.1gの ATPを 10ml の水に溶かして pH を 4.5 にあわせ、あらかじめ pH4.5にあわせておいた CH_2ClCHO 8ml を少しずつ加えていき、最後に 20ml にメスアップし 100mM ATPの 2M CH_2ClCHO (pH4.5) 溶液をつくった。この溶液を攪拌しながら 37°Cで 24 時間インキュベーションした。次に活性炭の粉末を加えて脱色し、Toyoろ紙 No.5 でろ過した後、容量が約 10ml になるまでエバポレーターで濃縮した。溶液を 20mM 重炭酸アンモニウムで平衡化した Sephadex G-10カラム (308ml) にアプライし、 A_{260} を測定してフラクションを集めた。このフラクションにUVランプをあてるとライトブルーのけい光を発した。エバポレーターで蒸発乾固した後、少量の水に溶かしエタノールを少しずつ加えて再沈殿させた。目皿にろ紙をのせて減圧ろ過し、空气中で乾燥した。収量は 656mg であった。

b. 3- β -D-Ribofuranosyl-4-amino-5-(imidazol-2-yl)imidazol 化合物 (中間体); ϵ -化合物の粉末 656mgを 0.1N NaOH 65ml に溶かし 25 °Cで 18 時間攪拌しながらインキュベーションした。ここでけい光が消失した。HClで pH を 7.5にあわせた後エバポレーションした。粉末を少量の水 (約 4ml) に溶かし前述のSephadex G-10カラムにアプライした。フラクションを集めエバポレーションした。粉末を少量の水に溶かしエタノールを少しずつ加えて再沈殿させ、15000rpm、1min、遠心分離した。沈殿をエーテルで洗い空气中で乾燥した。収量は 160mgであった。

c. ϵ -aza-ADP; 中間体 160mgを水 0.48ml に溶かし、酢酸 1.92ml を加え 80 %酢酸とした。それに 25 % NaNO_2 溶液を

0.16ml加え 25 °Cで 30 分間インキュベーションした。エバポレーターで蒸発乾固し粉末に水を加えて再びエバポレーションした。酢酸をとばすためこの操作を4回繰り返した。粉末を 0.05M KClを含む10mM Tris-HCl (pH8.0)溶液 10ml に溶かし、同液で平衡化した DEAE- セルロースカラム (15ml) にアプライした。KCl の直線濃度勾配 (0.05M — 0.5M) により溶出し、ライトグリーンのけい光をもつフラクションを集めエバポレーションした。粉末を少量の水に溶かし前述のSephadex-G-10カラムで脱塩した。収量は約 150mgであった。展開溶媒として 4 Mギ酸 (pH3.4) を用いた薄層クロマトグラフィーでシングルスポットであることを確認した。

13. 電子顕微鏡写真

電子顕微鏡写真は、農学部畜産学科の高橋興威助教授にお願いし Rotary shadowing法でレプリカを作成した後、日立11B電子顕微鏡でとっていただいた。

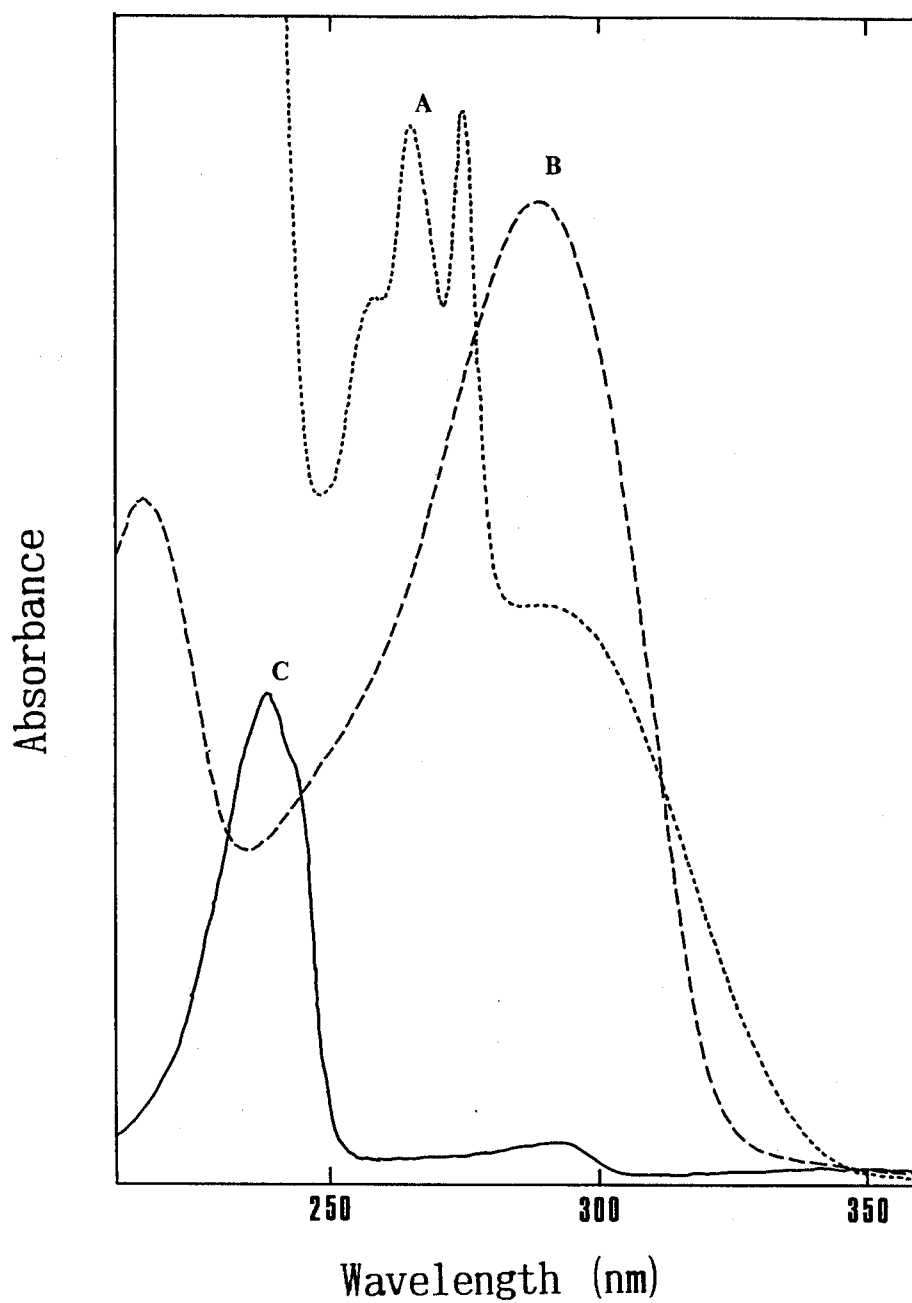
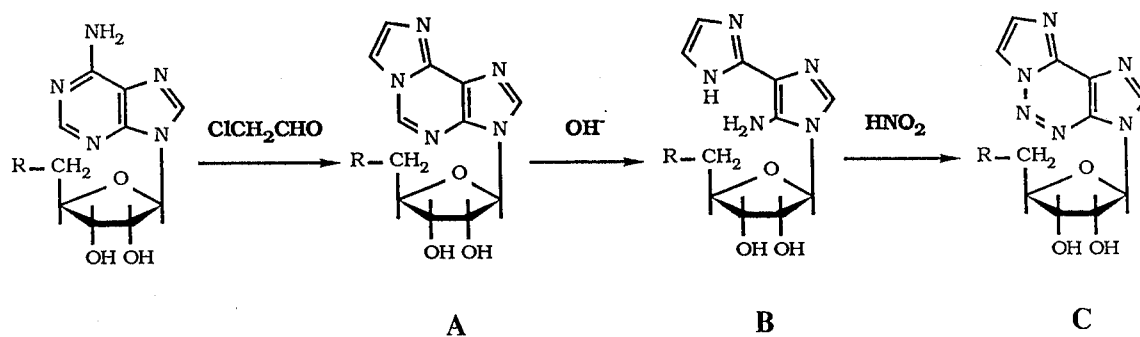


図2 合成ヌクレオチドけい光アナログの紫外吸収スペクトル

- A, ϵ -化合物 (ϵ -ATPと ϵ -ADPの混合物)、
 B, 3- β -D-Ribofuranosyl-4-amino-5-(imidazol-2-yl)imidazol化合物 (中間体)、
 C, ϵ -aza-ADP。

第一部 Ca^{2+} によるホタテ貝柱筋ミオシンの安定化

すでに述べたように、キャッチを行なう筋肉も他の軟体動物の筋肉と同様、ミオシンへの Ca^{2+} の直接結合により活性な収縮が開始されることが知られている。そこで、 Ca^{2+} がシグナルとしてオパーク部ミオシンへ結合した時に、ミオシン分子にいかなる変化がおこってアクチンとの結合解離が激しくなり、収縮が開始されるのかを明らかにしたいと考えた。

ミオシン分子はイオン強度を下げると会合しフィラメントを形成し、溶解度を減少させる。フィラメント形成能に対する Ca^{2+} 、ATP、ADPなどの影響をミオシンの溶解度を測定することにより調べた。また、ミオシン分子形態を電子顕微鏡で調べた。

結果

オパーク部ミオシンの溶解度の KCl濃度依存性に対する Ca^{2+} の影響を調べた。ヌクレオチド非存在下、ATP存在下およびADP存在下において測定した(図3)。図3-aに示したようにヌクレオチド非存在下においては、ミオシンの溶解度のKCl濃度依存性に対して、 Ca^{2+} は影響を示さなかった。50%の溶解度を与えるKCl濃度は0.175Mであった。しかしながら、ATP存在下で溶解度は Ca^{2+} 感受性を示した(図3-b)。0.2M KCl以下の範囲で、オパーク部ミオシンの溶解度は+ Ca^{2+} (0.1mM CaCl_2 存在下)の場合に比べて、- Ca^{2+} (1mM EGTA存在下)において増加した。以上の結果は、オパーク部ミオシンのフィラメント形成能が、ATP存在下において Ca^{2+} 感受性をもち、 Ca^{2+} がミオシンに結合すると溶解度が減少する、すなわちフィラメント形成能が増加することを示している。同様の Ca^{2+} 感受性をもった溶解度の変化がADP存在下でも見られた(図3-c)。

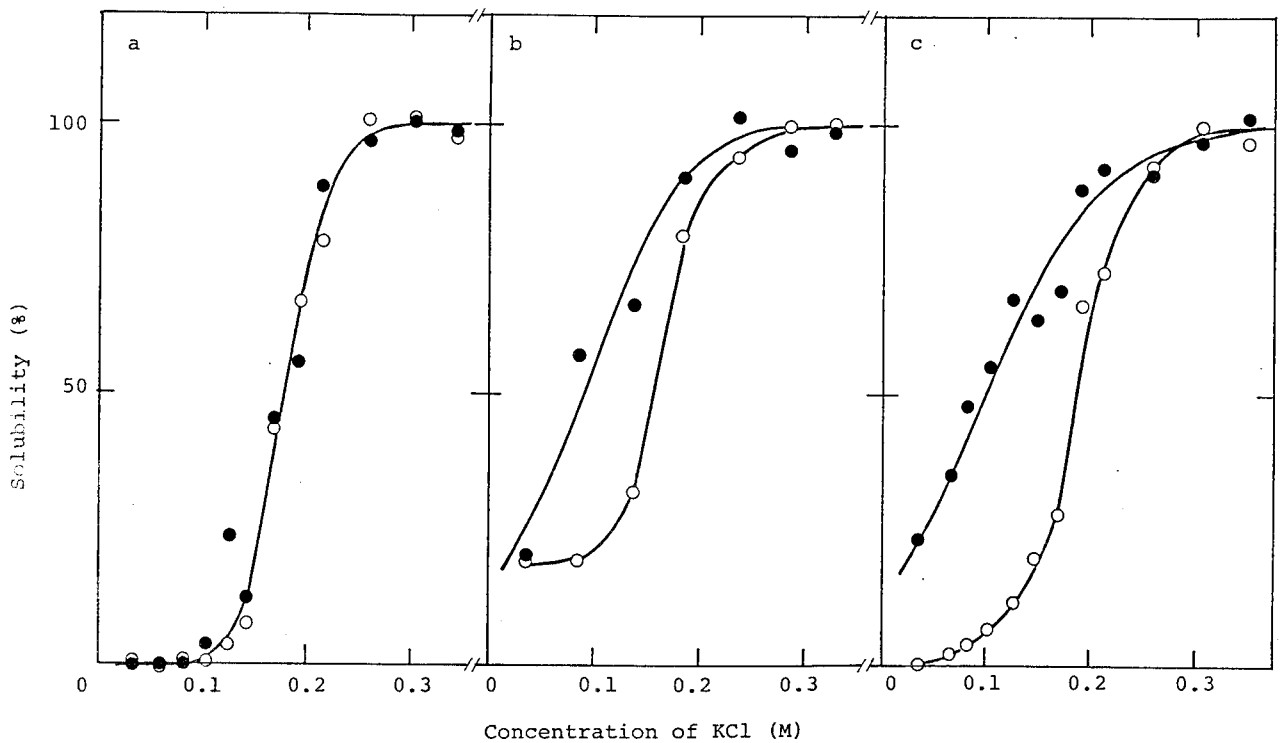


図3 オパーク部ミオシンの溶解度の KCl濃度依存性

測定は 0.5mg/ml オパーク部ミオシン、 30mM MOPS-KOH (pH7.0)、 3mM $MgCl_2$ 、 7~8 %グリセリン、種々の濃度の KCl で 0.1mM $CaCl_2$ ($+Ca^{2+}$) または 1mM EGTA ($-Ca^{2+}$) 存在下においておこなった。a, ヌクレオチド非存在下、b, 1mM ATP 存在下、c, 0.1mM ADP 存在下。 ○は $+Ca^{2+}$ 、●は $-Ca^{2+}$ における結果である。

オパーク部ミオシンの溶解度の、 $-Ca^{2+}$ における ADP濃度依存性を図 4 に示した。ミオシンの溶解度は ADP濃度をあげると増加し、ミオシン head と等しいモルの濃度（矢印で示した）で一定に達しそれ以上は増加しなかった。このことから、 $-Ca^{2+}$ におけるヌクレオチドによる溶解度の増加は、ミオシンのheadのヌクレオチド結合部位にヌクレオチドが結合したことによって起こる現象であることがわかった。

ヌクレオチド存在下のこの溶解度の Ca^{2+} 感受性はミオシン分子のコンホメーションの違いによるものではないかと考え、電子顕微鏡によって直接ミオシンの形態を見た。ATPはミオシンによって加水分解され一定の状態を保つのが難しいので 0.1mM ADP存在下でおこなった。塩は酢酸アンモニウムを用いた。図 5 -aは、ミオシンが

100%溶解している塩濃度での電顕図である。2 個の頭部と長い伸びた尾部からなるコンホメーションが見られた。 $+Ca^{2+}$ でミオシンが50%溶けている状態の塩濃度でも同様に尾部が伸長したコンホメーションをしていた（図 5 -b）。尾部が伸長したこのようなコンホメーションのミオシンの沈降定数は一般に 6 S である。しかしながら、 $-Ca^{2+}$ でミオシンが50%溶けている状態の塩濃度では、尾部が2 か所で折れ曲がり丸くなったコンホメーションをしていた（図 5 -c）。この尾部が折れ曲がったコンホメーションは、脊椎動物の平滑筋ミオシンまたは非筋細胞のミオシンで見られた沈降定数が10 S のものと似ている。 Ca^{2+} がミオシンに結合することにより、10 S から 6 S へのコンホメーション変化を起こしミオシンはフィラメントを形成しやすくなると考えられる。このことによって溶解度が減少すると思われる。

脊椎動物の平滑筋ミオシンまたは非筋細胞のミオシンでは、ATP 存在下において10 S から 6 S へのコンホメーション変化が、制御軽鎖（20 K 軽鎖）のリン酸化によって調節されている。図 3 および図 5 の結果から、オパーク部ミオシンでは、制御軽鎖のリン酸化ではなく Ca^{2+} の結合によって同様のコンホメーション変化がおこると

ということが示唆される。

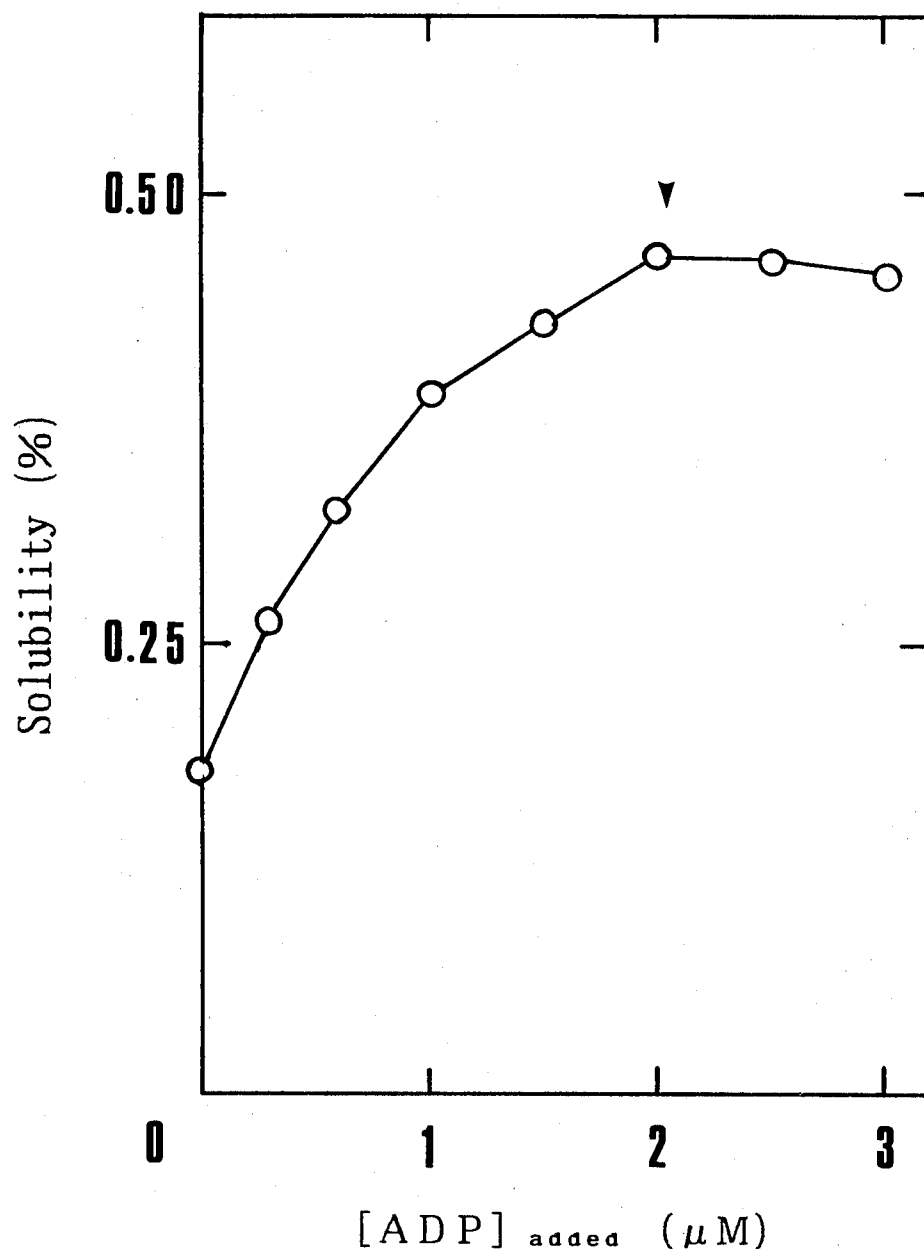


図4 オパーク部ミオシンの溶解度の $-\text{Ca}^{2+}$ における ADP濃度依存性

測定条件は 0.5mg/ml オパーク部ミオシン、125mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、1mM EGTA、7~8%グリセリン、種々の濃度の ADPである。遠心分離しないサンプルのミオシン重鎖のデンストメトリーを 100%として溶解度を計算して求めた。

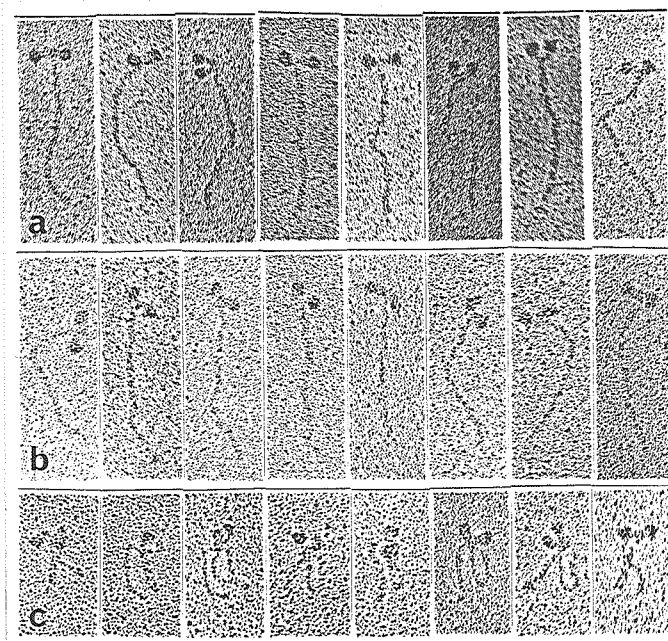


図5 オパーク部ミオシンの電子顕微鏡写真図 (ロータリーシャドーイング法)

シャドーイングは、0.1mM ADP、3mM MgCl_2 、0.3mM DTT、1mM EGTA または0.1mM CaCl_2 、と種々の濃度の酢酸アンモニウムを含む0.1mg/mlミオシン懸濁液を、同容のグリセリンと混合して行なった。倍率は 140000 $\times$ 。

50%グリセリン存在下における酢酸アンモニウムの濃度は、a, 0.25M、b, 0.17M、c, 0.13M。bとcにおける酢酸アンモニウムの濃度はミオシンが50%の溶解度を示す濃度である。

aとcは 1mM EGTA 存在下、bは 0.1mM CaCl_2 存在下。

このコンホメーション変化が、キャッチ収縮をおこなうと考えられているオパーク部のミオシンに特有な現象なのか、それとも、 Ca^{2+} がミオシンに直接結合して筋収縮が調節されているホタテ貝柱筋のミオシンに特有な現象であるのかをはっきりさせるため、ホタテ貝柱の平滑筋トランスルーセント部のミオシンおよび横紋筋ミオシンで同様の溶解度の測定をおこなった。図6に ATP存在下の結果を示した。これらのミオシンでもオパーク部ミオシンと同様に、溶解度の KCl濃度依存性に対して Ca^{2+} 感受性の変化が見られた。すなわち、ミオシンの溶解度は 0.2M 以下の KCl濃度範囲で、 $+\text{Ca}^{2+}$ の場合に比べて $-\text{Ca}^{2+}$ において増加した。また、ADP 存在下でもミオシンの溶解度は同様な Ca^{2+} 感受性を示したが、ヌクレオチド非存在下では全く Ca^{2+} 感受性を示さなかった。なお、アワビ平滑筋ミオシンでもホタテ貝ミオシンと同様の変化が見られた。

次に、ミオシンATPase自身が Ca^{2+} 感受性を持たないウサギ骨格筋ミオシンおよびブタ大動脈平滑筋ミオシンを用いて同様の溶解度の測定を ATP存在下においておこなった。図7にウサギ骨格筋ミオシンの結果を示した。ミオシンの溶解度の KCl濃度依存性に対して Ca^{2+} は影響を示さなかった。50%の溶解度を与える KCl濃度は、0.17M であった。ブタ大動脈平滑筋ミオシンは他のミオシンに比べて低い KCl濃度で溶けた。しかしながら、溶解度の KCl濃度依存性に対して Ca^{2+} は影響を示さなかった（図8）。50%の溶解度を与える KCl濃度は、0.06M であった。すなわち、ATPase活性が Ca^{2+} 感受性を示さないミオシンには、 Ca^{2+} 感受性のコンホメーション変化がないということがわかった。

以上の結果から、この Ca^{2+} によるコンホメーション変化は Ca^{2+} がミオシンに直接結合して筋収縮が調節されている筋肉のミオシンに特有の現象であると考えられる。軟体動物のミオシンのフィラメント形成能はミオシン制御軽鎖への Ca^{2+} 結合により調節されていると思われる。

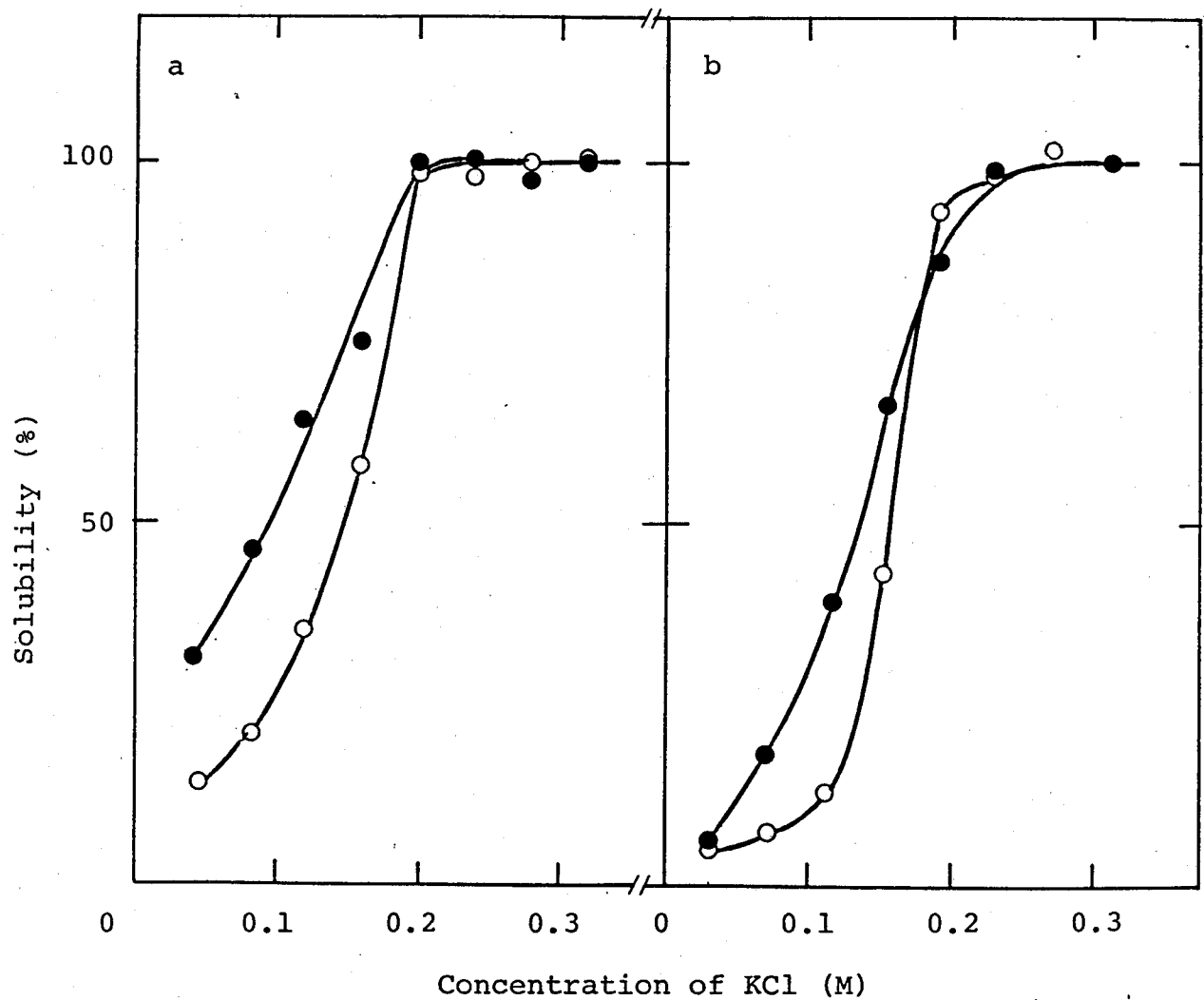


図6 トランスルーセント部ミオシンおよびホタテ貝柱横紋筋ミオシンの ATP存在下における溶解度

測定条件は図4のものと同様である。a, トランスルーセント部ミオシン、b, 横紋筋ミオシン。○は+Ca²⁺、●は-Ca²⁺における結果である。

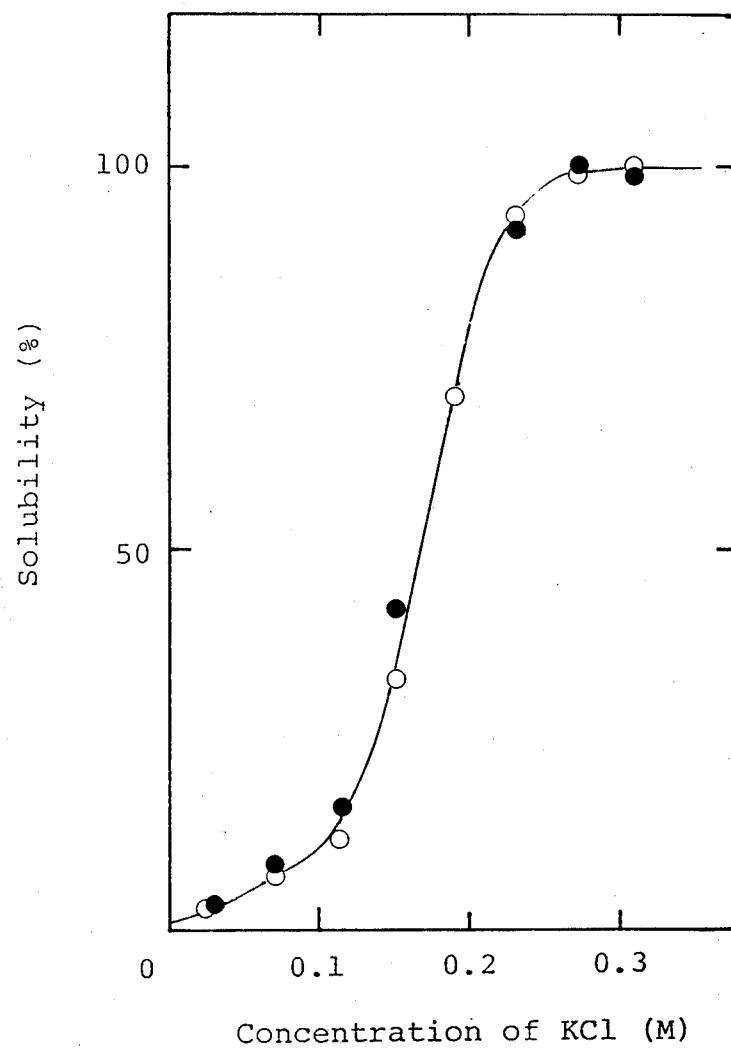


図7 ウサギ骨格筋ミオシンの ATP存在下における溶解度

測定条件はウサギ骨格筋ミオシンを用いた以外は図4のものと同様で、○は+Ca²⁺、●は-Ca²⁺における結果である。

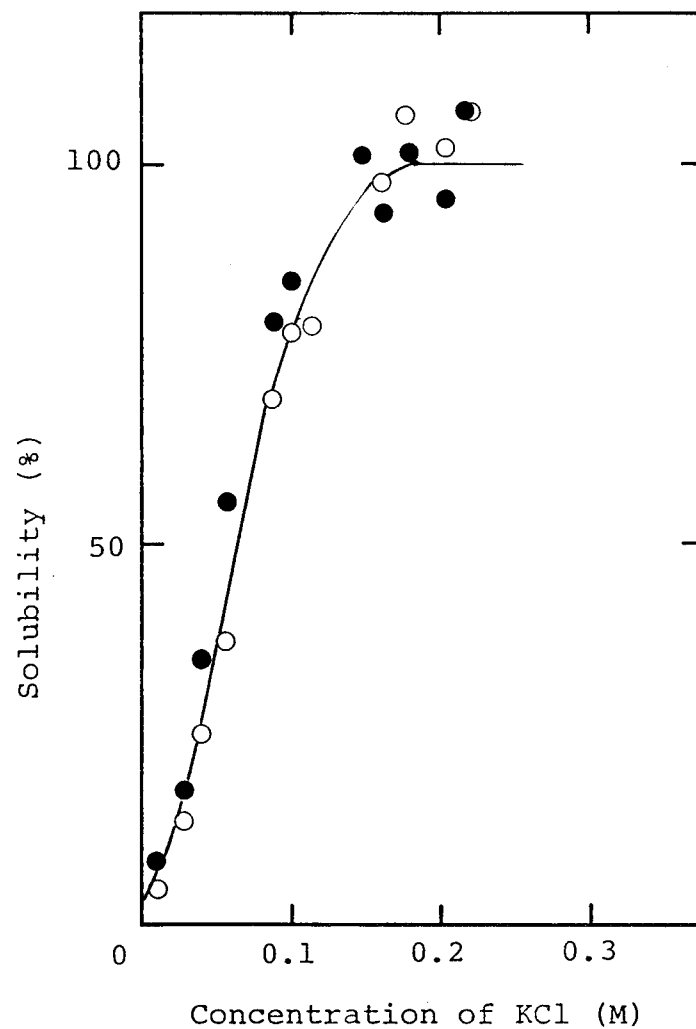


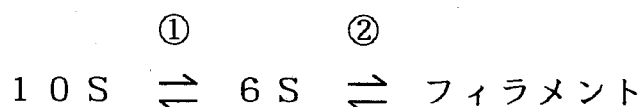
図8 ブタ大動脈平滑筋ミオシンの ATP存在下における溶解度

測定条件はブタ大動脈平滑筋ミオシンを用いた以外は図4のものと同様に、○は $+Ca^{2+}$ ●は $-Ca^{2+}$ における結果である。

考察

ホタテ貝柱筋ミオシンの溶解度すなわちフィラメント形成能が、制御軽鎖への Ca^{2+} 結合によって制御されていることがわかった。脊椎動物平滑筋で見られた 10 S ~ 6 S 変換がホタテのミオシンでも Ca^{2+} 濃度変化によって起こり、それがフィラメント形成能の Ca^{2+} 感受性の原因となっているということもわかった。10 S ミオシンは尾部が2か所で折れ曲がり丸くなったコンホメーションをしており6 S ミオシンは尾部が伸張し棒状のコンホメーションをしている。その形態から10 S ミオシンはフィラメントを形成しにくいと考えられる。

ホタテのミオシンの形態変化は、10 S、6 S コンホメーションのミオシンおよびミオシンフィラメントが次式のような平衡関係にあるとすると説明できる。



- Ca^{2+} の時、①の平衡は左にかたより、ミオシンはおもに 10 S のコンホメーションをとっている。+ Ca^{2+} の時は、①の平衡が右にかたよりミオシンはおもに 6 S のコンホメーションをとっている。②の平衡はイオン強度に依存しており、高イオン強度下で左にかたより、ミオシンは 6 S コンホメーションをとり単量体として存在する。イオン強度が低下すると、②の平衡が序々に右にかたより、ミオシンが会合しフィラメントを形成する。

ホタテミオシンは - Ca^{2+} の時 10 S コンホメーションをとり、制御軽鎖に Ca^{2+} が結合すると 6 S コンホメーションに変化しフィラメントを形成しやすくなると考えられる。ホタテを含む軟体動物の筋肉では、ミオシンの制御軽鎖への Ca^{2+} 結合で、収縮が調節されている (22)。ここで重要なことは、筋肉の収縮の引き金となる直

接の要因が、すなわちミオシンへの Ca^{2+} 結合がミオシンの 10 S ~ 6 S 変換をもたらしているということである。

脊椎動物平滑筋および非筋細胞のミオシンでは、10 S ~ 6 S 変換がミオシンの制御軽鎖のリン酸化によって調節されている (47-51)。脊椎動物平滑筋の収縮制御は、一般にこのミオシンの制御軽鎖のリン酸化によって行なわれていると考えられているが、他にもレオトニン (52) やカルデスモン (53) などがアクチン側の因子として収縮制御にかかわっているという説がある。10 S ~ 6 S 変換をもたらすものが筋肉の収縮の引き金となる直接の要因に相当するならば、脊椎動物平滑筋ではやはりミオシンの制御軽鎖のリン酸化がその要因であることを以上の結果は強く支持している。

図 8 に示したようにブタ大動脈平滑筋のミオシンは、他のミオシンに比べて溶解度が低イオン強度側にずれていた。この一因は、このミオシンがリン酸化して始めて 6 S コンホメーションをとることができるためと思われる。図 8 の実験条件下ではブタ大動脈平滑筋のミオシンは低イオン強度で 10 S コンホメーションをとっておりホタテのミオシンの $-\text{Ca}^{2+}$ 、 $+\text{ヌクレオチド}$ の状態に相当する。すなわち、弛緩に相当する状態を見ていることになる。

このミオシン分子のコンホメーション変化にはもうひとつの因子として、ヌクレオチドが必要である。すなわち、この分子形態変化はミオシンの制御軽鎖、ミオシン分子の尾部およびヌクレオチドが結合する ATPase 活性部位の三部位の相互作用によっておこる。制御軽鎖に Ca^{2+} が結合していなくて、かつ活性部位にヌクレオチドが結合している時に尾部が折れ曲がって、10 S コンホメーションをとることができる。ミオシンの頭部内で、制御軽鎖と活性部位が密接に相互作用をしていて、それによって頭部内に微妙なコンホメーション変化がおこっていると考えられる。どのようにして尾部にその変化の情報が伝わるのか非常に不思議である。10 S コンホメーションをとる $-\text{Ca}^{2+}$ 、 $+\text{ヌクレオチド}$ の条件下でも、イオン強度を上げると 6 S コンホメーションになるから、何か静電的な相互作用が

頭部と尾部の間でおこっているに違いない。

この 10 S ~ 6 S 変換は、あくまでも *in vitro* で見られた現象である。このミオシン分子のコンホメーション変化が、*in vivo* で実際におこっているとは考えにくい。脊椎動物平滑筋のミオシンでこの現象が見つかった当初は、筋肉が弛緩状態の時、ミオシンは 10 S コンホメーションをとり細胞内に溶解しているが、刺激がきて

MLCK によってミオシンがリン酸化されると 6 S コンホメーションをとり、はじめてフィラメントを形成するようになって筋肉が収縮すると考えられていた。しかし、その後 Somlyo らが脊椎動物平滑筋の弛緩状態でもミオシンのフィラメントが存在することを急速凍結技術を用いた電顕写真で証明した (54)。ホタテ貝柱筋でも、特に横紋筋においてはミオシンのフィラメントは常に存在する。よって、ミオシンのフィラメントが収縮状態にのみ形成されるということは起こりそうもない。しかし、この *in vitro* で見られた現象はミオシン分子の *in vivo* での何かの物理的变化を反映していると思われる。たぶんそれはミオシンのフィラメント内での微妙な構造変化でありこの変化は細胞内の Ca^{2+} 濃度に依存し、この微妙な変化によって筋肉が弛緩状態から収縮状態に移ると考えられる。

以上の結果は、いろいろな筋肉で、収縮をもたらす直接の要因によってミオシンのコンホメーション変化またはそのフィラメントの形態変化が起こる可能性があることを強く示唆している。ホタテを含む軟体動物では制御軽鎖への Ca^{2+} 結合、脊椎動物平滑筋や非筋細胞では制御軽鎖のリン酸化がその要因である。以上の筋肉はすべてミオシン側によって筋収縮が調節されており、単純な系であるから 10 S ~ 6 S 変換が *in vitro* で見ることもできたのだと思われる。脊椎動物の骨格筋や心筋ではアクチンフィラメントに結合しているトロポニン・トロポミオシンが調節因子であり、そのなかのトロポニン C への Ca^{2+} 結合によって筋収縮が制御されている (55)。これらのミオシンでは 10 S ~ 6 S 変換が見られていないが、レギュレイテッド・アクチン (トロポニン・トロポミオシンを含むアクチ

ン) を系に加えてミオシンのコンホメーションを見ることができれば、この変換を捕まえられるかもしれない。たぶん、脊椎動物の骨格筋や心筋のミオシンのフィラメントにおいても同様の形態変化が弛緩状態から収縮状態に移る際に起こっていると思われる。

第二部 ホタテ貝柱筋アクトミオシンの超沈殿活性化因子 (トロポミオシン)

アクトミオシンの超沈殿は、アクトミオシンの懸濁液に ATP を添加した際、透明化が起こった後に起こる白濁化現象で、筋収縮と同じ条件で起こるので試験管内の収縮現象と考えられている (56)。なお透明化は試験管内の弛緩に対応すると考えられている。この超沈殿を活性化する因子が、ホタテ貝柱筋に含まれていることを見出した。この活性化因子を精製しその性質を調べたところ、それはトロポミオシンでありキャッチをおこなう平滑筋オパーク部に 2 種のトロポミオシンが存在することがわかった。

結果

図 9 にホタテ平滑筋（オパーク部とトランスルーセント部両方を含む）のミオシンとウサギ骨格筋アクチンから再構成したアクトミオシンの Ca^{2+} 存在下での超沈殿の様子を示した（実線）。この系にホタテ平滑筋の Thin filament 成分を加えると超沈殿が著しく活性化された（点線）。この活性化は Thin filament 成分内に含まれているアクチンによるものではない。なぜならば、この系にさらにアクチンを加えた場合、逆に超沈殿の起こる速度が減少したからである。－ Ca^{2+} では ATP 添加と同時に濁度の減少（透明化）が見られ 10 分以内には超沈殿が起こらなかった。この結果はホタテ平滑筋の Thin filament 成分内に超沈殿を活性化する因子が存在することを示唆する。

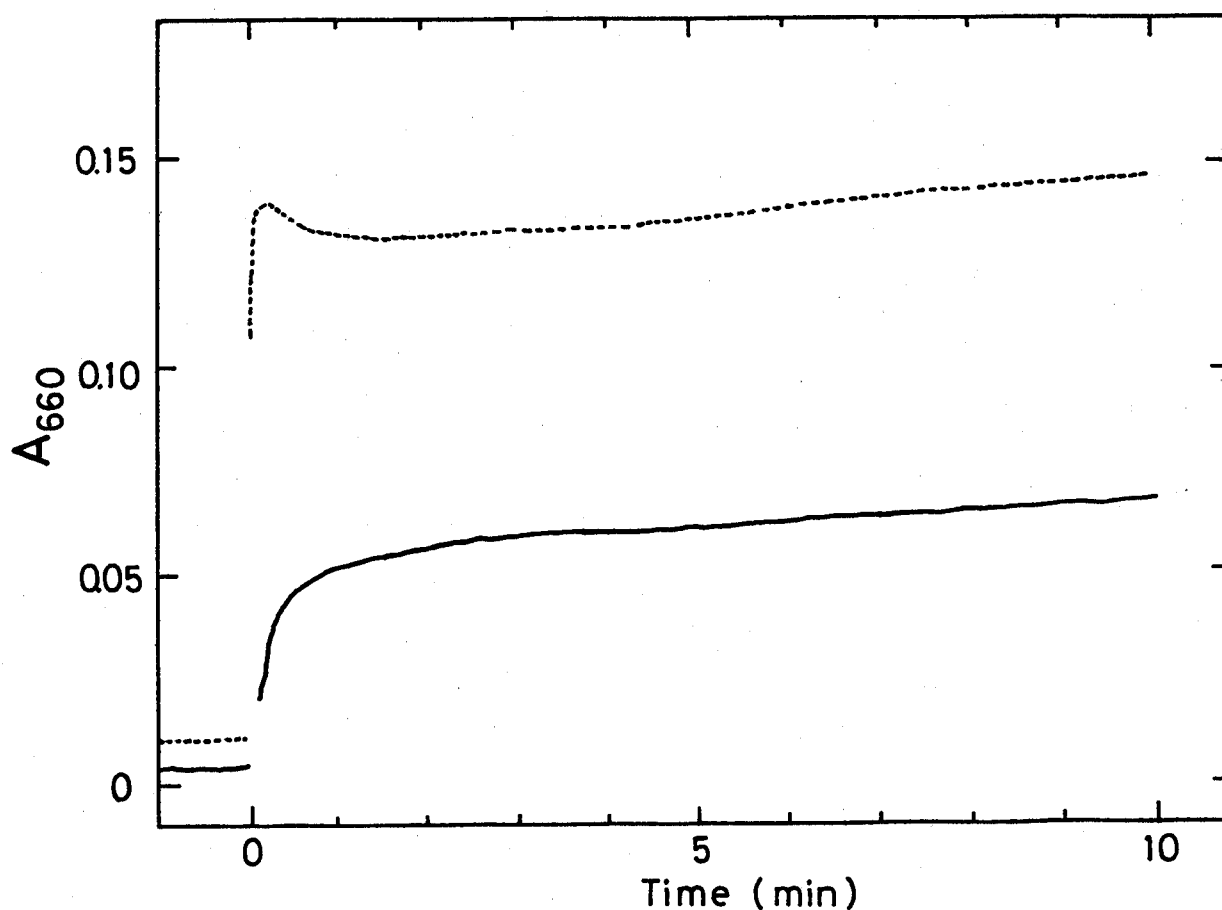


図9 ホタテ貝柱平滑筋 Thin filament成分による超沈殿活性化効果

測定条件は、0.05mg/ml ホタテ平滑筋ミオシン、0.02mg/ml ウサギ骨格筋アクチン、50mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、1mM $MgCl_2$ 、1mM $CaCl_2$ 、1.25%グリセリン、15℃である。0minに ATPを 0.1mM添加して反応を開始した。Thin filament成分は、凍結乾燥したショ糖パウダーを 0.1M KCl、10mM MOPS-KOH (pH7.0) 溶液に対して透析した後使用した。実線はアクトミオシンのみの場合、点線は 0.15mg/mlの Thin filament成分を加えた場合の結果である。

次に、Thin filament 成分からこの超沈殿活性化因子を単離精製することを試みた。Thin filament 成分の凍結乾燥物を 0.5M KCl を含む 10mM MOPS-KOH (pH7.0) 溶液に懸濁し、凍結乾燥物に含まれるショ糖を除くため同溶液に対し透析した。次に、サンプルのタンパク質濃度を 2mg/ml に合わせた後、硫酸分画を行なった。40%～60%飽和硫酸で沈殿したフラクションが、強い超沈殿活性化能を示した。このフラクションを 20mM リン酸緩衝液 (pH7.0) に対して透析し、同液で平衡化した DEAE-セルロースカラムにアプライした。溶出は KCl の直線濃度勾配 (0 - 0.3M) でおこなった。このカラムクロマトグラフィーのエリューションパターンを図10に示した。

KCl 濃度が約 0.25M のフラクション番号 146 付近のピークとして溶出された成分が強い超沈殿活性化能を示した。145 から 151 のフラクションを集め、その超沈殿活性化能を調べた。図11に示したように添加するフラクションの濃度を増加するにつれて超沈殿の速度が増加した。このフラクションの SDS-PAGE をおこなったところ、トロポミオシン付近の位置に2種のバンドが見られた(図10の挿入図)。次にこの2成分をさらに分離しようと試みた。8M尿素、50mM

KCl、1mM DTT を含む 40mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) で平衡化した CM-セルロースカラムを用い、KCl の直線濃度勾配によって溶出してこの2成分を分離することができた(図12)。78 から 88 までのフラクションに SDS-PAGE で見られた下のバンドが含まれ、93 から 98 までのフラクションに上のバンドが含まれていた。

SDS-PAGE で見られた上のバンドを AF-1 (Activating Factor-1)、下のバンドを AF-2 と呼ぶことにした。

次に、ホタテ貝柱の横紋筋にも同様の超沈殿活性化因子が存在するかどうか追跡したところ、8M尿素存在下の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによってひとつの因子を得ることができた。この因子は SDS-PAGE で AF-2 よりやや大きい移動度を示した(図18を参照)。平滑筋の活性化因子とは異なるので、この横紋筋から得られた因子を AF-3 と呼ぶことにした。

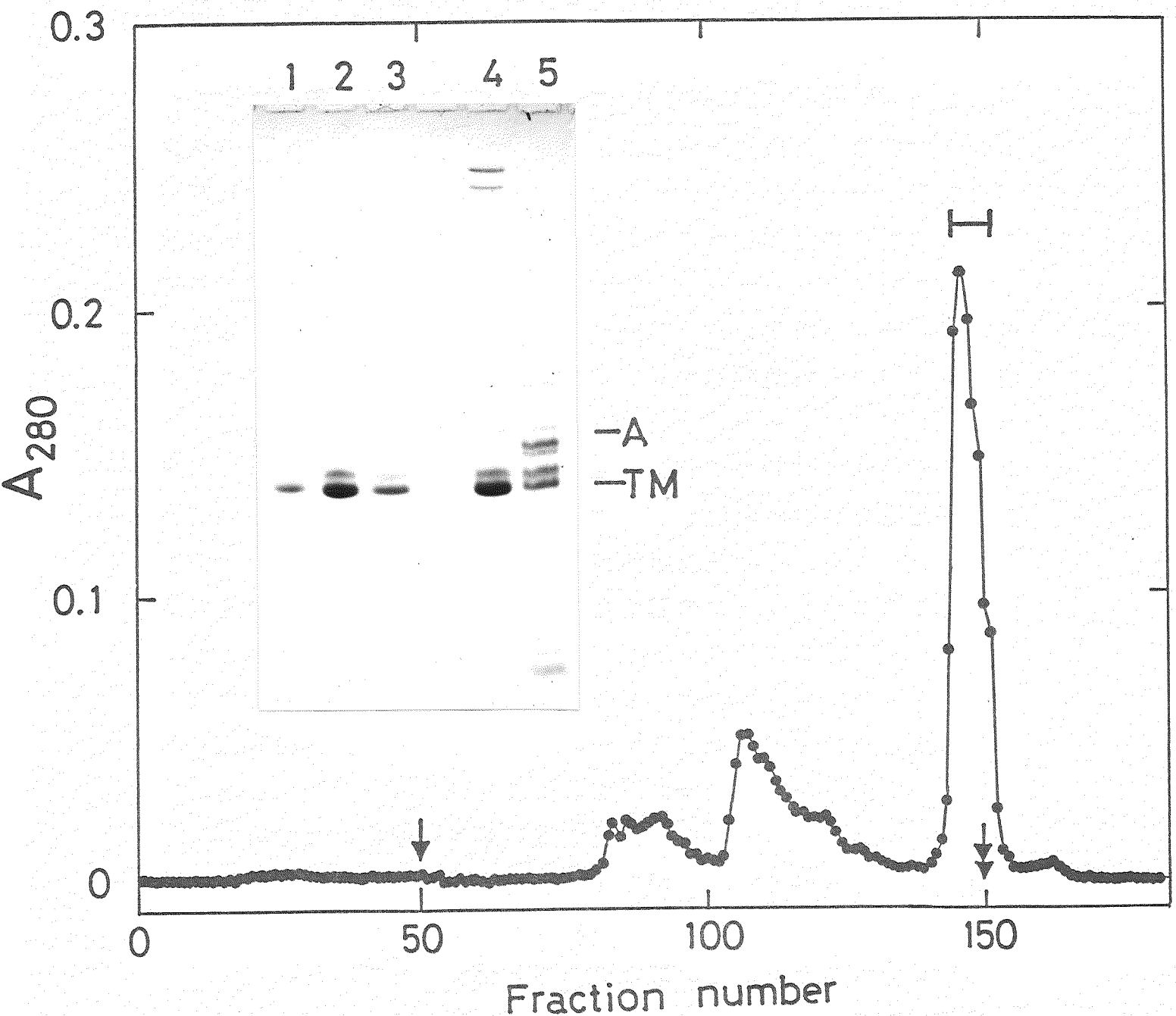


図10 超沈殿活性化因子の DE-32カラムクロマトグラフィー

40%～60%飽和硫酸で沈殿した Thin filament成分を20mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に対して透析し、同液で平衡化した DE-32カラム (1.2×38cm) にアプライした。KCl の直線濃度勾配 (0—0.3M) を矢印で示したフラクションからかけて溶出した。二重矢印のフラクションで KCl濃度を1 Mに増加した。流速は 10ml/h で 2mlずつフラクションを集めた。横棒で示した部分のフラクションを集め図11で示した実験に用いた。挿入図は各フラクションの SDS-PAGE パターンを示している。1, 2, 3, はそれぞれフラクション番号 144, 146 (ピーク), 151 で4と5はカラムにアプライしたサンプルでそれぞれ40%～50%および50%～60%飽和硫酸で沈殿した Thin filament成分である。Aはアクチン、TMはトロポミオシンの位置を示している。4に薄く見えているのがアクチンである。

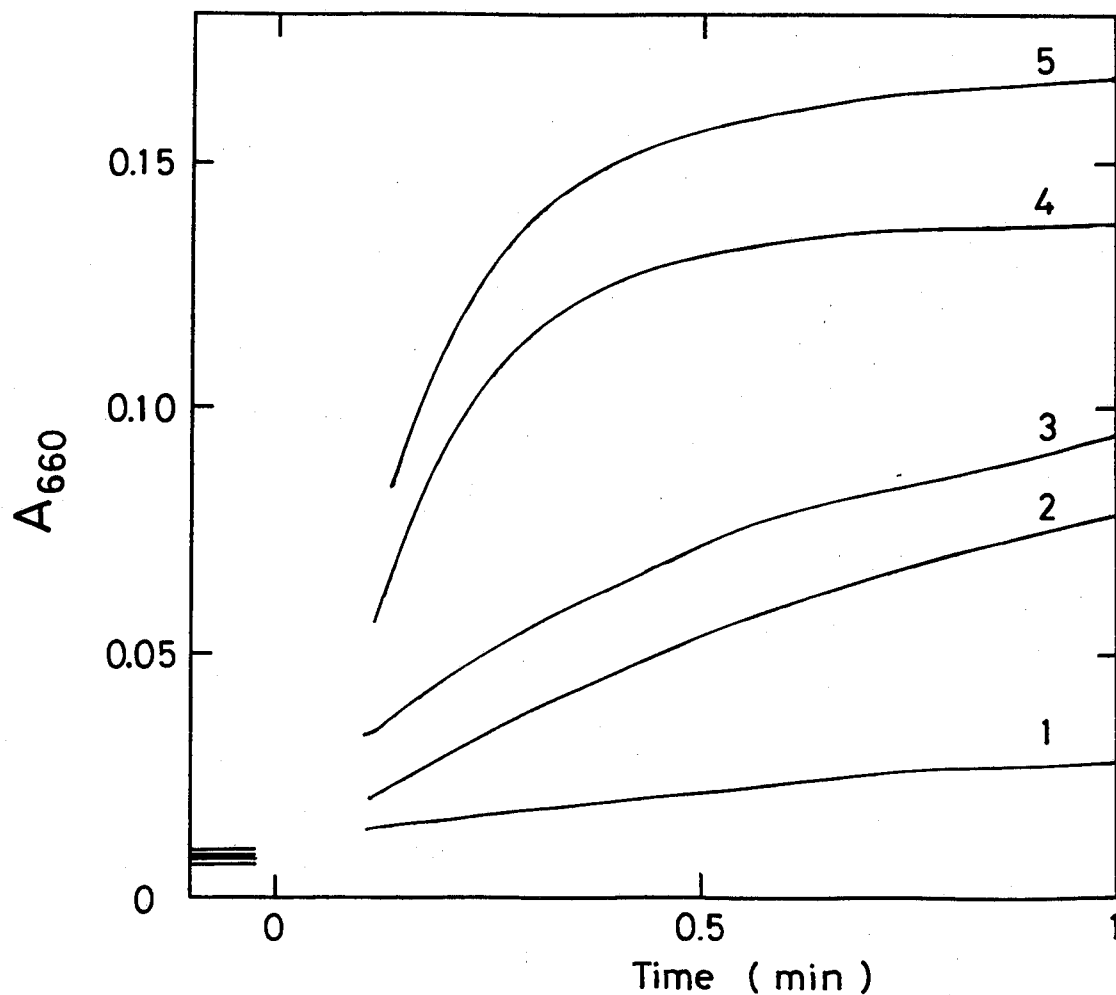


図11 アクトミオシンの超沈殿に対する活性化因子の影響

測定は、0.05mg/ml ホタテ平滑筋ミオシン、0.02mg/ml ウサギ骨格筋アクチン、50mM KCl 30mM MOPS-KOH (pH7.0)、1mM MgCl₂、1mM CaCl₂、1.25%グリセリン、15℃でおこなった。0minに 0.1mM ATPを加えて反応を開始した。図10で示した DE-32カラムクロマトグラフィーの横棒で示したフラクション 145から 151を集めて活性化因子として使用した。カーブ1,2,3,4,5 において加えた活性化因子の濃度は、それぞれ 0, 0.63, 1.3, 2.5, 25 μg/mlである。

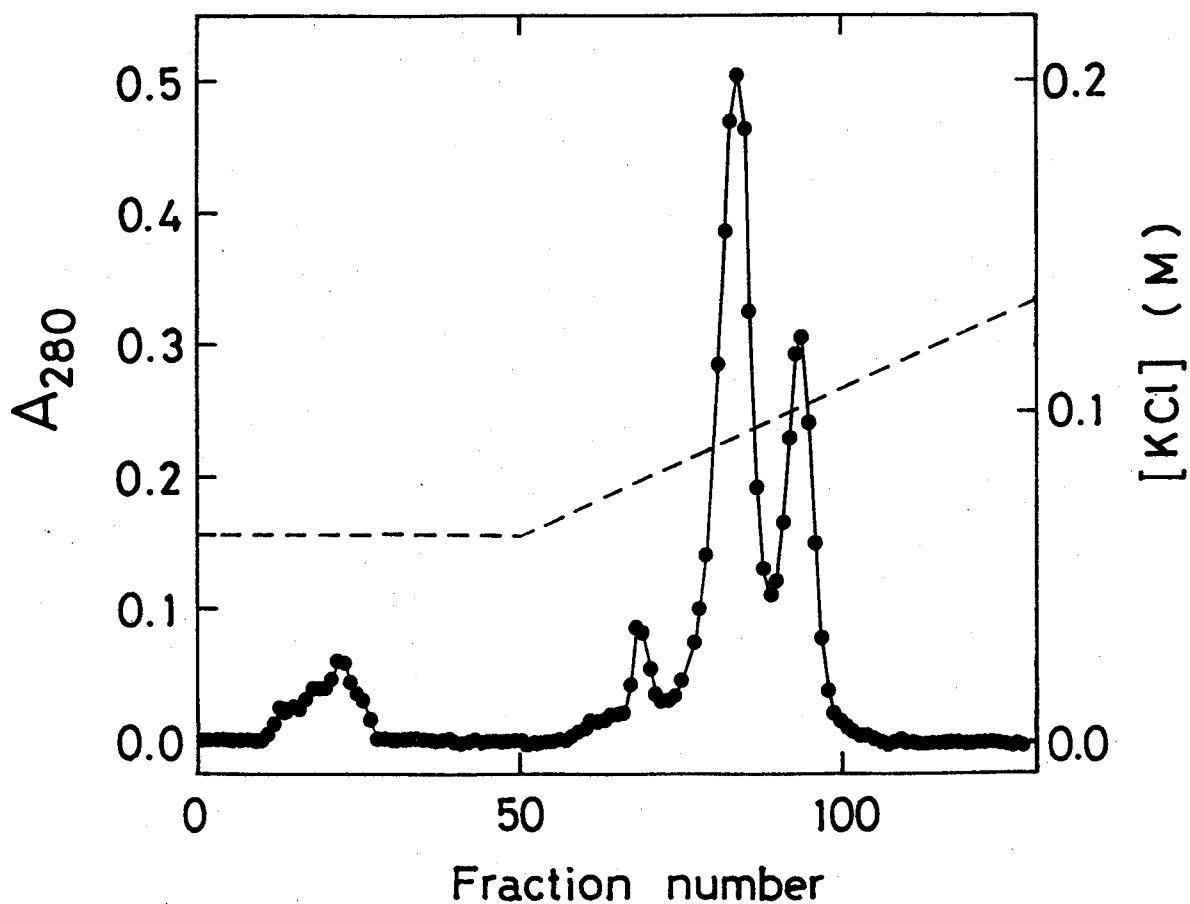


図12 活性化因子の CM-52カラムクロマトグラフィーによる分離

図10で示した DE-32カラムクロマトグラフィーのメインピーク (145—151) を集めて、10 mM重炭酸アンモニウムに透析した後凍結乾燥した。乾燥粉末を40mM酢酸緩衝液 (pH4.0)、50mM KCl、1mM DTT を含む8 M尿素溶液に溶かし同液に透析した後、同液で平衡化した CM-52カラム (2×21cm) にアプライした。流速は20ml/hで、4mlずつフラクションを集めた。破線は KCl濃度を示している。

精製した因子は 10mM 重炭酸アンモニウム溶液に対して透析し尿素を除いた後、凍結乾燥して -20°C で保存した。使用する前に、0.1M KClを含む 10mM MOPS-KOH(pH7.0) 溶液に溶かし、同液に対して一晩透析した。

精製したこれら 3 種の因子の超沈殿に対する影響を調べた。図 13 にホタテ平滑筋ミオシンとウサギ骨格筋アクチンから再構成したアクトミオシンの超沈殿に対する 3 種の因子の効果を示した。因子を加えない場合、ATP を添加した後、単調な濁度の増加が見られた

(図 13-4)。この系に 3 種の因子をそれぞれ加えると、いずれの場合も ATP 添加にともない濁度の急激な増加が見られ、超沈殿が活性化された。AF-1 を加えた場合は濁度の立ち上がりの状態を捕まえることができたが (図 13-1)、AF-2、AF-3 を加えた場合は濁度の増加が速すぎて、立ち上がりの状態を捕まえることができなかった。この場合は濁度が立ち上がった後のそれに続く濁度のゆっくりした減少が見られた (図 13-2, 3)。これは、超沈殿が急激に活性化されすぎた場合に、アクトミオシンが大きすぎる会合体を形成しその後落ち着く方向に反応が進むことによる現象であると思われる。

図 13 の結果は、3mM MgCl_2 の条件で測定をおこなった場合のものであるが、同様の測定を 1mM MgCl_2 の条件でおこなったら、濁度の増加の速度が抑えられて、活性化因子を加えた場合でも立ち上がりの状態を捕まえることができ ATP 添加後の単調な濁度の増加が見られた。図 14-1 に AF-2 を加えた場合の結果を示した。この条件下では、因子を加えない場合も、3mM MgCl_2 の場合に比べて濁度の増加の速度が抑えられた (図 14-2)。この系では、 Mg^{2+} が重要な役割をしている可能性がある。

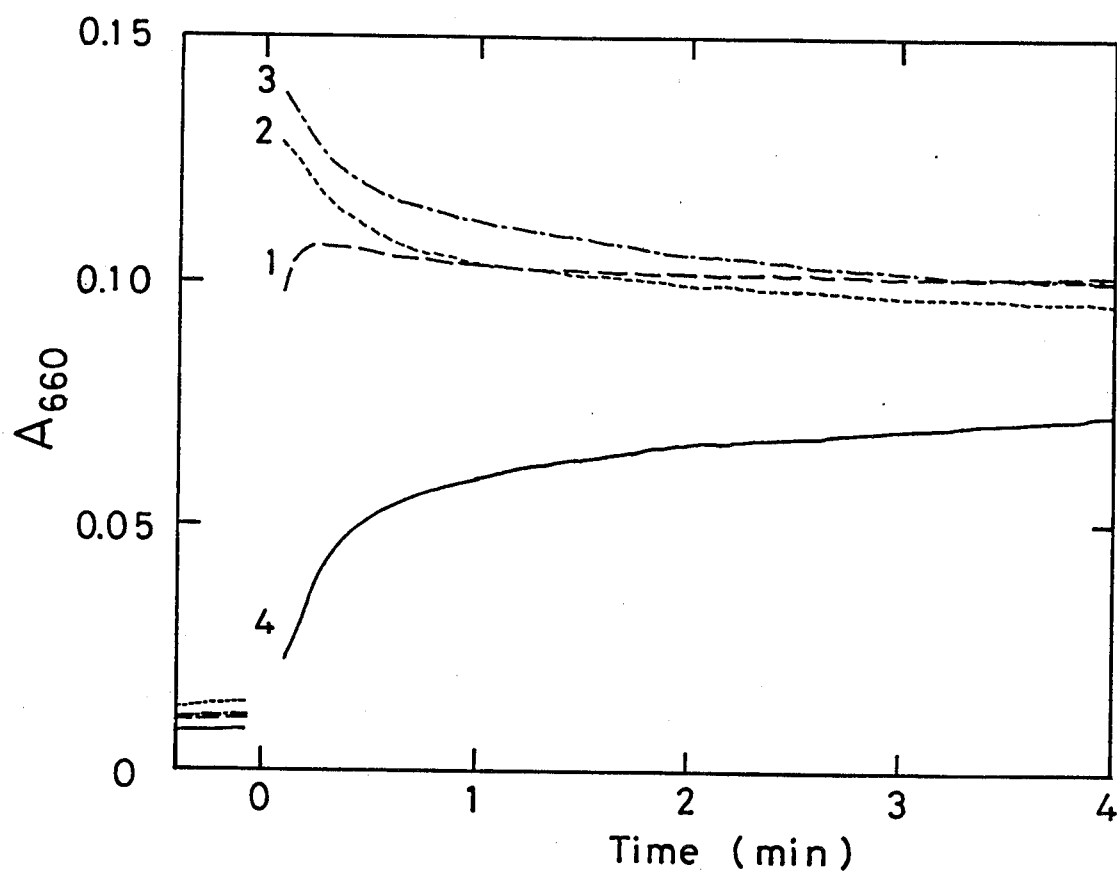


図13 ホタテ貝柱平滑筋ミオシンから再構成したアクトミオシンの超沈殿に対する
AF1、AF2、AF3 の効果

測定条件は 0.05mg/ml平滑筋ミオシン、0.06mg/ml ウサギ骨格筋アクチン、50mM KCl
30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl₂、0.1mM CaCl₂、1.25 %グリセリン、15℃である。
0minに ATPを 1mM添加した。活性化因子存在下のときは15μg/ml添加した。1, +AF1、
2, +AF2、3, +AF3、4, 活性化因子非存在下。

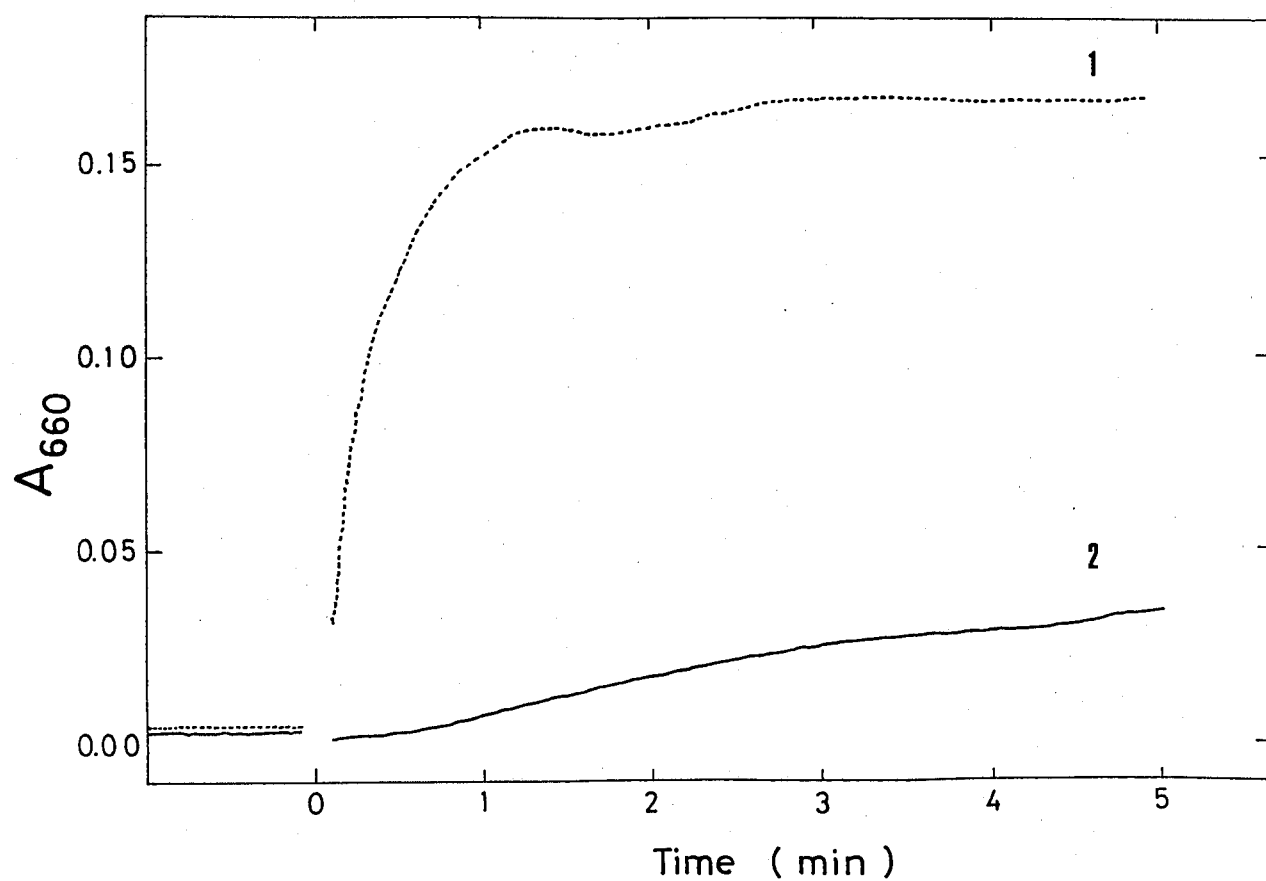


図14 平滑筋ミオシンから再構成したアクトミオシンの 1mM $MgCl_2$ 存在下における超沈殿
 測定条件は 3mM $MgCl_2$ のかわりに 1mM $MgCl_2$ を用いたことを除いて図13と同じである。
 1. +AF2、 2. 活性化因子非存在下。

次に、ホタテ横紋筋ミオシンとウサギ骨格筋アクチンから再構成したアクトミオシンを用いて同様の測定をおこなった。図15に 3mM $MgCl_2$ の条件で測定した場合の結果を示した。横紋筋ミオシンは、平滑筋ミオシンに比べて ATPase 活性が高いので超沈殿の速度も速い。この条件下では、活性化因子を加えない場合でさえも濁度の立ち上がりの状態を捕まえることができなかった（図15-4）。しかしながら、活性化因子を加えた場合は、確かに超沈殿を活性化していた（図15-1,2,3）。同様の測定を 1mM $MgCl_2$ の条件でおこなったら活性化因子を加えない場合に、ようやく濁度の立ち上がりの状態を捕まえることができた（図16-2）。この条件下でさえも、活性化因子を加えた場合には、濁度の立ち上がりの状態を捕まえることができなかった。なお $-Ca^{2+}$ の条件では、因子の存在にかかわらずアクトミオシンの超沈殿は起こらなかった。

以上の結果から、ホタテ貝柱の平滑筋に 2 種、横紋筋に 1 種、合計 3 種の超沈殿活性化因子が存在することがわかった。

超沈殿を活性化することから、この因子が何かミオシンとアクチンの相互作用に影響を及ぼしている可能性が考えられる。次に、ミオシンATPaseの F - アクチンによる活性化に対するこの因子の影響を調べた。平滑筋ミオシンを用い、F - アクチンの濃度を変化させて、ATPase活性を測定した結果を図17に示した。F - アクチンの濃度が低いとき、3 種の因子のどれもが、ミオシンATPase活性を活性化した。しかし、F - アクチンが高濃度のときは逆に阻害した。同様な傾向が横紋筋ミオシンを用いたときにも見られた。ATPase活性と F - アクチン濃度の両逆数プロットから、ATPase の最大活性値 V_m と、アクチンとミオシンの見掛けの解離定数 K_{app} を求めその結果を表 1 にまとめて示した。 V_m 、 K_{app} の両方が、活性化因子存在下に減少した。 V_m は 1/4 から 1/9 の範囲で、 K_{app} は 1/30 から 1/110 の範囲で減少した。このことは、これらの因子がミオシンとアクチンの結合を強める働きをすることを示している。

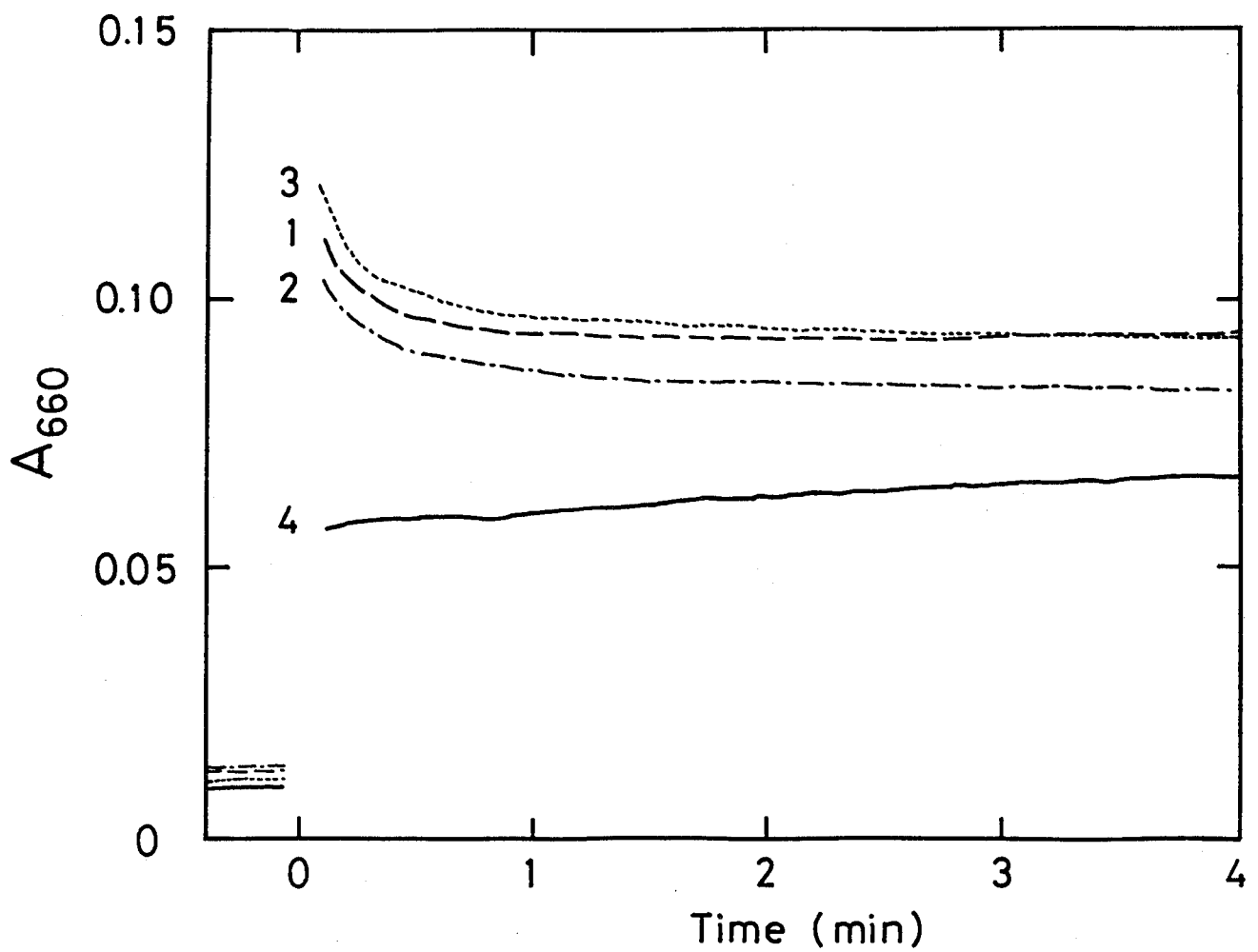


図15 ホタテ貝柱横紋筋ミオシンから再構成したアクトミオシンの超沈殿に対する
AF1、AF2、AF3 の効果

測定条件と記号は、平滑筋ミオシンのかわりに横紋筋ミオシンを用いたことを除いて図
13と同じである。

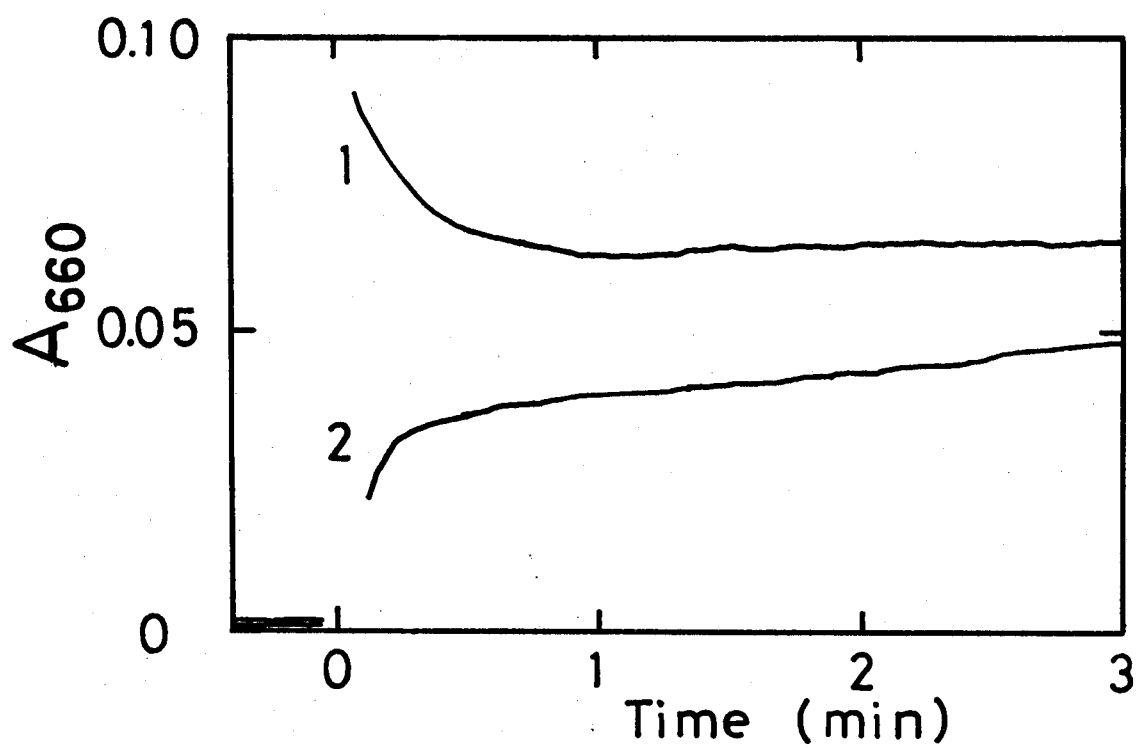


図16 横紋筋ミオシンから再構成したアクトミオシンの 1mM $MgCl_2$ 存在下における超沈殿
測定条件と記号は、平滑筋ミオシンのかわりに横紋筋ミオシンを用いたことを除いて図
14と同じである。

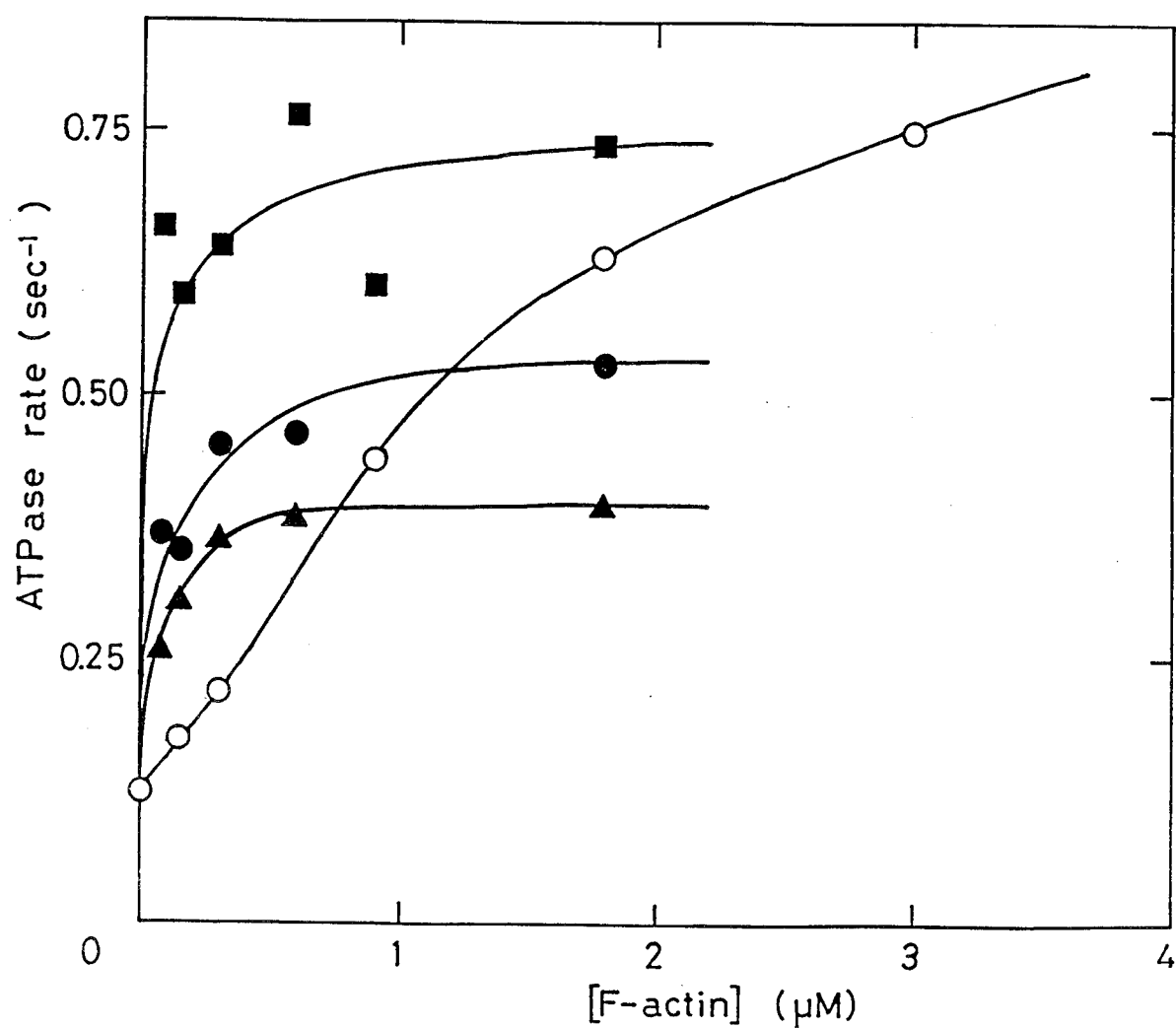


図17 F-アクチン存在下におけるホタテ平滑筋ミオシンATPase活性に及ぼす AF1, AF2, AF3 の影響

測定は、0.02mg/ml ホタテ平滑筋ミオシン、50mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl、0.1mM CaCl₂、1.25 %グリセリン、1mM ATP でF-アクチン濃度を変えて 15 °Cで行なった。○は活性化因子非存在下、●、■、▲はそれぞれ 0.04mg/mlの AF1、AF2、AF3 存在下。

Activating factor added	Actomyosin reconstructed from			
	Smooth muscle myosin		Striated muscle myosin	
	V_m (s^{-1})	K_{app} (μM)	V_m (s^{-1})	K_{app} (μM)
No addition	2.5	6.7	4.0	7.7
AF1	0.40	0.076	0.64	0.15
AF2	0.63	0.061	1.1	0.25
AF3	0.29	0.091	—	—

表1 アクトミオシンATPase活性の最大活性値, V_m とアクトミオシンの見掛けの解離定数, K_{app}

測定条件は、0.02mg/ml のホタテ平滑筋または横紋筋ミオシン、50mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM $MgCl_2$ 、0.1mM $CaCl_2$ 、1.25%グリセリン、1mM ATP、15 °C。F-アクチンの濃度は0.003mg/mlから 0.13mg/mlまで変化させた。活性化因子存在下のときは、0.04 mg/ml 添加した。 V_m と K_{app} はアクトミオシンATPase活性値対F-アクチン濃度の両逆数プロットから求めた。

図18に3種の活性化因子の電気泳動のパターンを示した。3種の因子は、SDS 存在下および尿素存在下の電気泳動で、マーカがゲルから流れ出てからさらに泳動をした場合、互いに異なる移動度を示した。SDS-PAGEの場合は、AF-1、AF-2、AF-3の順に移動度が小さかった。尿素-PAGE の場合には、逆にAF-1、AF-2、AF-3の順に移動度が大きかった。またこれらのバンドはウサギ骨格筋トロポミオシンの α 鎖および β 鎖のバンドの移動度と似ていた。なお、この尿素-PAGEは6%アクリルアミド(1/30のビスアクリルアミドを含む)を用いておこなった。

次にこれらの活性化因子がトロポミオシンであるかどうかを確かめるため、トロポニン・トロポミオシンを筋収縮の調節因子とするウサギ骨格筋のアクトミオシンに、トロポニン存在下においてこれらの活性化因子を加え、ATPase活性が Ca^{2+} 感受性をもつかどうかを調べた(55,57)。表2に示したように、アクトミオシンのみ、およびアクトミオシンにトロポニンを添加した場合は、ATPase活性が Ca^{2+} 感受性を示さないが、トロポニン存在下にこれらの活性化因子を添加した場合は Ca^{2+} 感受性を示した。トロポニン非存在下にこれらの因子を添加した場合は Ca^{2+} 濃度に関係なくATPase活性の阻害が見られた。これらの結果は、AF-1、AF-2、AF-3それぞれがホタテ貝柱筋のトロポミオシンであることを強く支持している。

ホタテ貝柱の洗浄筋のホモジェネイトを長時間 SDS-PAGE したところ興味深い結果が得られた。図19に示したように、平滑筋のトランスルーセント部と横紋筋には、トロポミオシンが1種しか存在しないのに対し、オパーク部には2種のトロポミオシンが存在している。SDS-PAGEで最も移動度の小さい AF-1 はオパーク部にしか存在せず、AF-2が平滑筋のオパーク部とトランスルーセント部の両部に存在する。一方、AF-3は横紋筋に存在する。この結果は、キャッチ収縮を行なうオパーク部に存在する AF-1 がキャッチ機構に関係している可能性があることを示唆している。

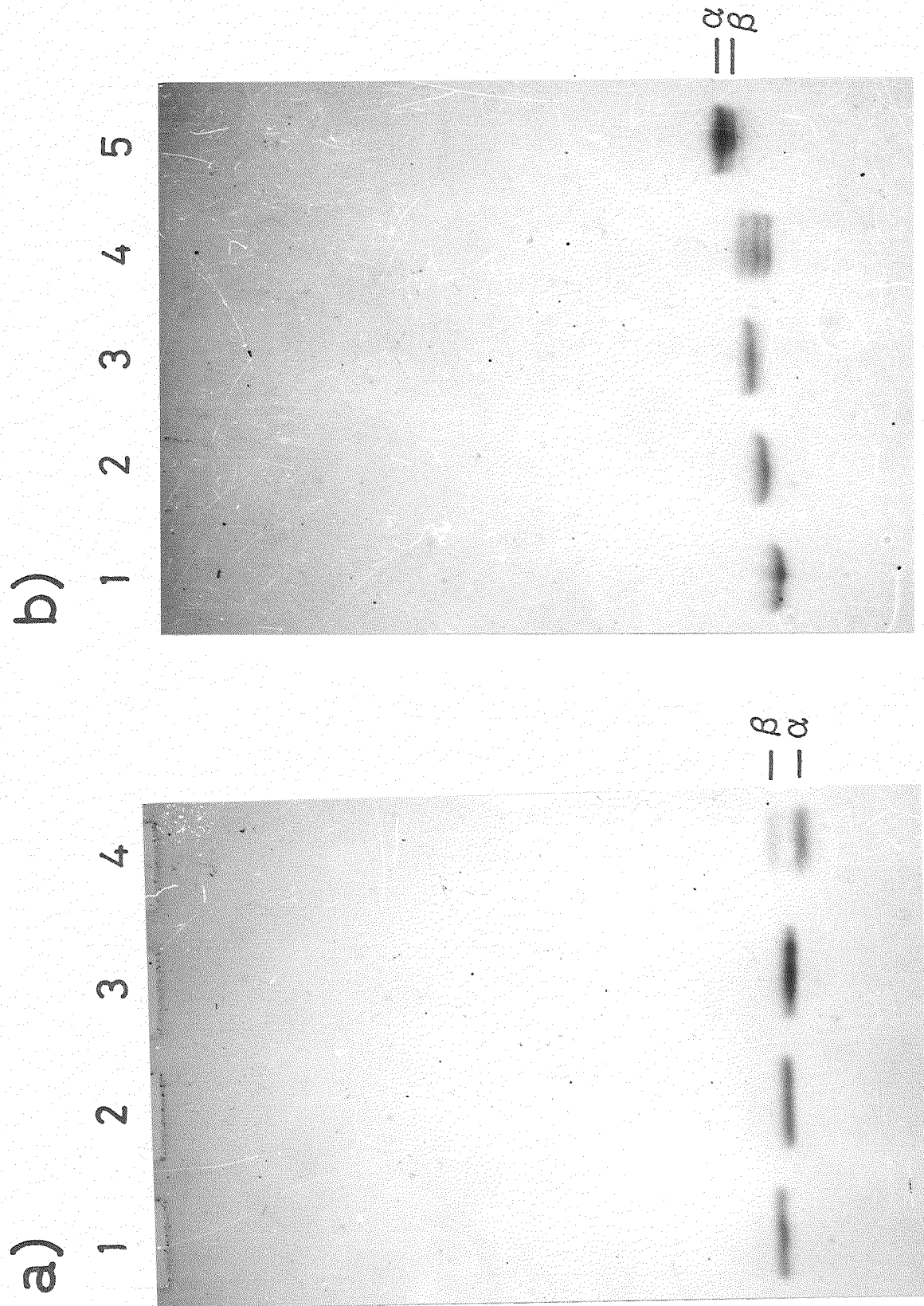


図18 活性化因子の SDS-PAGE と尿素-PAGE のパターン

a) SDS-PAGEパターン。1, AF1、2, AF2、3, AF3、4, ウサギ骨格筋から精製したトロポミオシン。

b) 尿素-PAGE パターン。1, AF1、2, AF2、3, AF3、4, AF1, AF2, AF3の混合物、5, ウサギ骨格筋のトロポミオシン。 α と β はそれぞれウサギ骨格筋トロポミオシンの α 鎖および β 鎖を示す。

	ATPase rate		Ca ²⁺ -sensitivity (%)
	In presence of 0.1 mM CaCl ₂ (s ⁻¹)	In presence of 1 mM EGTA (s ⁻¹)	
AM	4.24	4.16	1.9
AM+TN	4.50	4.08	9.3
AM+TN+AF1	6.54	0.71	89
AM+TN+AF2	6.93	0.86	88
AM+TN+AF3	7.35	0.78	89
AM+AF1	0.99	1.10	—
AM+AF2	1.52	1.31	14
AM+AF3	1.25	1.20	4.0

表2 ウサギ骨格筋アクトミオシンMg²⁺-ATPase 活性のCa²⁺感受性の回復

測定は、30mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl₂、1mM ATP、25℃において、0.1mM CaCl₂ または 1mM EGTA 存在下におこなった。ミオシンとF-アクチンの濃度は、それぞれ 0.02mg/mlおよび 0.2mg/ml である。トロポニンおよび活性化因子を添加する場合は、両方ともに 0.1mg/ml 加えた。Ca²⁺感受性は次式によって定義した。

Ca²⁺感受性 = {1 - (rate in presence of EGTA) / (rate in presence of Ca²⁺)} × 100。

AMはアクトミオシンを、TNはトロポニンを示す。

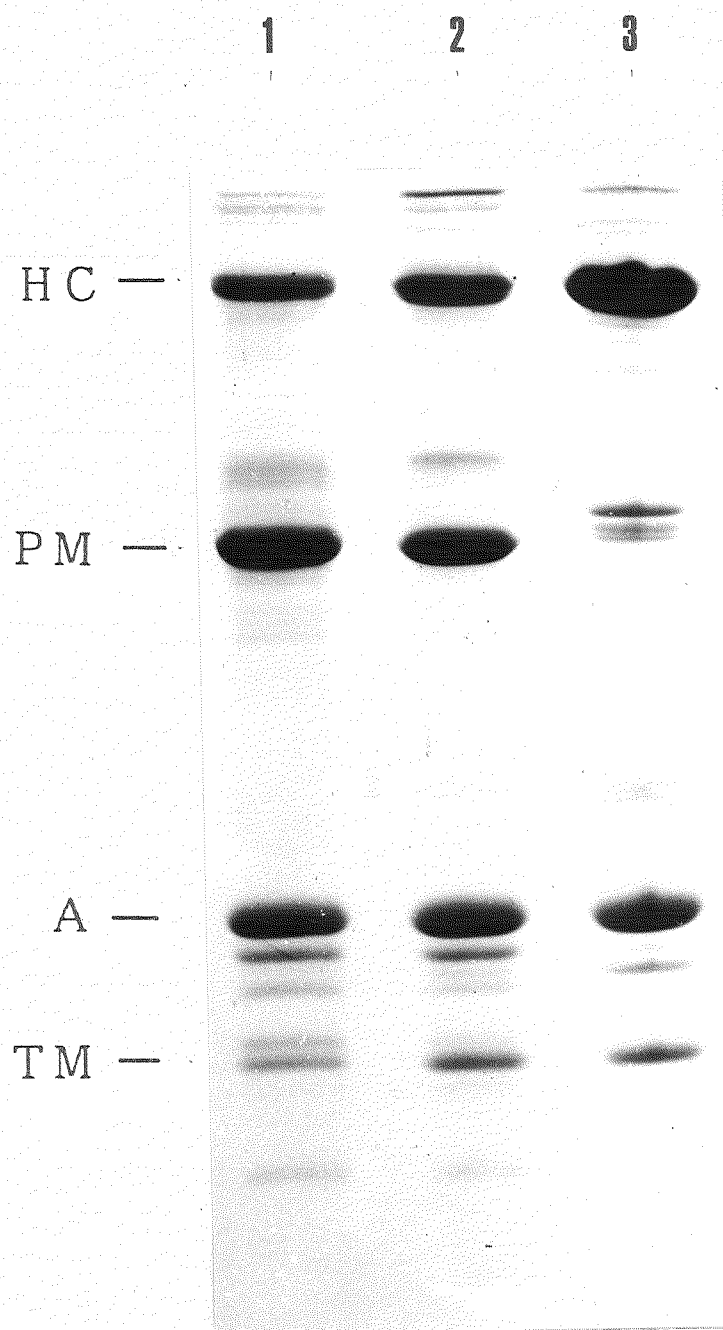


図19 ホタテ貝柱洗浄筋のSDS-PAGEパターン

1, 平滑筋オパーク部の洗浄筋, 2, 平滑筋トランスルーセント部の洗浄筋, 3, 横紋筋の洗浄筋。HC、PM、A、TM、はそれぞれミオシン重鎖、パラミオシン、アクチン、トロポミオシンを示す。電気泳動を長時間行なったのでミオシン軽鎖はゲルから流出している。

考察

ホタテ貝柱の平滑筋のミオシンとウサギ骨格筋アクチンから再構成したアクトミオシンの超沈殿を、ホタテ平滑筋の Thin filament 成分が著しく活性化した（図9）。このことから Thin filament 成分内に超沈殿を活性化する因子があることが予想される。硫酸分画とイオン交換クロマトグラフィーによってこの因子を単離精製することができた。電気泳動の移動度がウサギ骨格筋のトロポミオシンのものと似ていること（図18）、またこの因子を加えるとウサギ骨格筋から精製したアクトミオシンATPaseがトロポニン存在下で Ca^{2+} 感受性を示したこと（表2）から、この活性化因子はホタテ貝柱筋のトロポミオシンであることが判明した。

図13,14,15,16 に示したように、活性化因子すなわちトロポミオシンはアクトミオシンの超沈殿を著しく活性化した。また、ミオシンATPaseのアクチンによる活性化に対するトロポミオシンの影響を調べたところ、トロポミオシン存在下にミオシンとアクチンの見掛けの解離定数 K_{app} が減少した（図17, 表2）。すなわち、トロポミオシンはホタテのミオシンとアクチンの結合を強める働きをもっているということがわかった。このことによって、超沈殿が活性化されると考えられる。

この作用はホタテのトロポミオシンに特異的なのであろうか。Sobieszek が、鶏の砂囊および骨格筋、または環形動物であるミミズのトロポミオシンが、骨格筋アクトミオシンの K_{app} を減少させるということを報告している (58)。

Sobieszek らは、また骨格筋のトロポミオシンがアクトミオシンのATPase活性を阻害するのに対し、平滑筋および非筋細胞のトロポミオシンはアクトミオシンのATPase活性を活性化するということを報告している (58,59)。すなわち、トロポミオシンに横紋筋型と平滑筋・非筋細胞型の2種が存在すると言っている。しかしながら表1に示したように、ホタテ貝柱の平滑筋および横紋筋の両方のトロポミオシンが、アクトミオシンATPase活性の V_m および K_{app} を同

じように減少させた。また図17に示したように、単一のトロポミオシンが、アクトミオシンのATPase活性をアクチン濃度によって見掛け上活性化したり阻害したりした。この結果は、トロポミオシンに2種類の型があるのではなく、1種類のトロポミオシンが条件によってアクトミオシンのATPase活性に対して見掛け上異なった影響を与えるということを示唆している。

ウサギ骨格筋のアクトミオシンのATPase活性を、骨格筋および平滑筋の両方のトロポミオシンが、再構成アクトミオシンのミオシンとアクチンの存在比によって活性化したり阻害したりするという結果が、Lehrerら(60)およびWilliamsら(61)によって報告されている。彼らはトロポミオシンがミオシンとアクチンの結合に対してアロステリックな効果を及ぼす因子として働くと考えている。すなわち、アクチンにはミオシンに対して、結合の弱い状態(weak binding state)と強い状態(strong binding state)があり、トロポミオシンがこの状態変化に対してアロステリックな効果を示し、strong binding stateにあるアクチンがミオシンATPaseを活性化するという考え方である。平滑筋のトロポミオシンが骨格筋のトロポミオシンより強いアロステリック効果を示し、条件によっては平滑筋のトロポミオシンがアクトミオシンATPaseを活性化し骨格筋のトロポミオシンが阻害するように見えるということである。やはり、トロポミオシンに2種類の型があるというよりは、条件(ミオシンとアクチンの存在比など)によってトロポミオシンが見掛け上異なる影響を及ぼしていると考えられる。

骨格筋において、トロポミオシンはトロポニンと協同して、筋収縮の Ca^{2+} 制御をおこなうという重要な役割をになっている。しかしミオシン側に Ca^{2+} 制御の機構がある軟体動物の筋肉、脊椎動物の平滑筋、および非筋細胞では、トロポミオシンの機能がはっきり解明されていない(58-64)。本研究において、トロポミオシンによる超沈殿の活性化を顕著に見ることができたのは、軟体動物の筋肉がミオシンの制御軽鎖への Ca^{2+} 結合によって収縮を制御しており、他の

筋肉に比べて制御機構が単純であるからだと思われる。これらの筋肉を含めて、トロポミオシンの共通の機能のひとつとして、ATP 存在下においてミオシンとアクチンの結合を強めるという働きが考えられる。

表2に示したように、ウサギ骨格筋のアクトミオシンとトロポニンを含む再構成系に、ホタテ貝柱筋のトロポミオシンを加えると、ATPaseが見事に Ca^{2+} 感受性を示した。イカ (65)、アカザラ貝 (66) アワビ (67) にトロポニンがあることが判明してきた。Lehmanはホタテにもトロポニンが存在すると報告している (68) がはっきりしない。軟体動物の筋肉においては、やはりミオシン側の制御が大きく効いていてトロポニン・トロポミオシンによる制御はそれを補助する程度にしか効いていないと思われる。

ホタテのトロポミオシンはホタテの筋肉内では積極的に筋収縮の Ca^{2+} 制御に関わっていないに違いない。それなのに、ホタテのトロポミオシンがウサギ骨格筋の再構成系でウサギのトロポニンと共同して Ca^{2+} 制御をすることができたことは、トロポミオシンというタンパク質の進化について考えると非常に興味深いことである。トロポミオシンは軟体動物が生じた時点で、すでに完全なトロポニンとの結合部位とトロポニンとの共同作用による Ca^{2+} 制御機能を備えていることになる。骨格筋のように速い収縮をおこなう筋肉にとっては、トロポニン・トロポミオシンによる制御の方が都合良く、元来トロポミオシンに備わっている機能を利用するようになったのかもしれない。トロポミオシンが筋収縮の制御機構の進化の鍵を握っているかもしれない。

図19に示したように、平滑筋トランスルーセント部と横紋筋にはトロポミオシンが一種類しか存在しないのに対して、平滑筋オパーク部には二種の異なったトロポミオシン成分が存在する。ホタテ貝柱においてキャッチ収縮は、主に平滑筋オパーク部で起こると考えられている (11)。それゆえに、オパーク部にのみ存在するトロポミオシン成分 AF-1 がキャッチ機構に何か関係しているのではない

かと期待した。しかしながら、本研究においては、AF-1が他の成分と異なる特長を持っているという証拠を捕まえることはできなかった。さらに、平滑筋のミオシンから再構成したアクトミオシンのみならず、横紋筋のミオシンから再構成したアクトミオシンも同様にトロポミオシンによって影響を受けた。したがって、ここで述べたトロポミオシンの効果を直接キャッチ機構と結びつけることはできない。どちらかと言うと、トロポミオシンの一般的な性質を見ていたと考えられる。しかしながら、AF-1がキャッチ機構に関係しているのではないかという可能性を捨ててしまうことはできない。キャッチ収縮は細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少したときに起こる現象 (6,7) である。超沈殿は $-\text{Ca}^{2+}$ では起きないし、 $-\text{Ca}^{2+}$ の条件下でのホタテのミオシンのアクチンによるATPaseの活性化は制御機構を失ったミオシンのものを見ている可能性がある。このことにより、*in vitro*においてトロポミオシンのアクトミオシンに対する影響を $-\text{Ca}^{2+}$ の条件で見ることができなかった。しかし、もし何らかの方法でこれを調べることができれば、また、*in vivo*でキャッチ状態において直接トロポミオシンの効果を見ることができたならば、AF-1とキャッチ機構の関係を見出せるかもしれない。トロポミオシンは、キャッチ状態においてもミオシンとアクチンの相互作用を強めているかもしれない。

第三部 ホタテ貝柱平滑筋オパーク部ミオシンのATPase反応中間体 とキャッチ収縮の分子機構

筋肉がキャッチ収縮を起こすための可能性として次の二つが考えられる。もし筋細胞内の ATP量が減少して Rigorのような状態になると、ミオシンとアクチンは強く結合し、またミオシンのATPase活性は低くなって、筋肉はキャッチに似た状態になれると思われる。そこでキャッチ状態においては細胞内の ATP再生系のどこかにブレーキがかかっているのではないかと考えた。しかしこの状態は細胞にとって致命的である。キャッチ状態になれるとしても死に至る可能性も高い。

第二に、細胞内の ATP量は変化しないけれどもミオシンが Rigorのような状態になることはできないかと考えた。ミオシンにはアクチンとの結合が強い状態と弱い状態がある(24,25)。ミオシンの活性部位に ATPが結合するとアクチンに対する親和性が小さくなる。

ATP が ADPとリン酸に加水分解された後、リン酸が活性部位から放出されるとアクチンとの親和性が増加する。キャッチ状態では、ミオシンがアクチンとの結合が強い分子種になっていれば、細胞内の ATP量が減少しなくても、アクチンとミオシンは強く結合しているのではないか。

第二の可能性について検討を行なった。キャッチ状態におけるミオシンATPase反応の中間体が収縮状態や弛緩状態の中間体と異なっているという予想のもとに実験をおこなった。収縮状態およびキャッチ状態は、それぞれ高 Ca^{2+} 濃度および低 Ca^{2+} 濃度下で起こる現象であるので、 Ca^{2+} 濃度を変えてオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体を追跡した。その結果、中間体は Ca^{2+} 濃度によって変わり、 $-\text{Ca}^{2+}$ においてはアクチンと親和性の高い分子種の E·ADPであることを見出した。また、オパーク部ミオシンの制御軽鎖のひとつであるRLC-a がリン酸化すると、 $-\text{Ca}^{2+}$ においても中間体はアクチンと強く結合できない分子種に変わり、リン酸化が弛緩

状態を誘導する可能性が考えられた。

結果

第一章 オパーク部ミオシンATPase反応の定常状態中間体の Ca^{2+} 感受性

ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は、紫外部吸収の差スペクトルを測定することによって追跡できる(41,69)。ミオシンに ATPを加えると、290nmから 310nm付近にかけて肩のある差スペクトルが得られる。このスペクトルは試験管内に ATPが存在する間持続するので ATP型と呼ばれ $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ の分子種に特異的である。

ATPがミオシンによって加水分解され、試験管内の ATPが時間とともに消失していくにつれて 290nm付近のピークが減少し 300nm付近の肩が無くなった差スペクトルに変化して落ち着く。この差スペクトルはミオシンに ADPを加えたときにできるものと同様なので ADP型と呼ばれ $\text{E} \cdot \text{ADP}$ の分子種に特異的である。ATP型の差スペクトルは Trpと Tyrの動きによるもので、ATPがミオシンに結合すると、

Trpと Tyrがタンパク質の内部に埋もれるようなコンホメーション変化が起こっていることを示す。これにたいし ADP型の差スペクトルは主に Tyrの動きによるものである。すなわち、埋もれていた

Trpがもとの状態にもどっていることを示す。ホタテ貝柱の横紋筋と平滑筋のミオシンでも同様の紫外部吸収差スペクトルを示すことがわかっている(70)。

図20は 0.5M KCl におけるオパーク部ミオシンの紫外部吸収差スペクトルを Ca^{2+} のあるなしで測定した結果である。 Ca^{2+} のあるなしにかかわらず、ATPを加えると差スペクトルは ATP型を示した後時間がたつと ADP型を示した。この結果は、0.5M KClの条件下ではオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は ATP型を示す分子種である $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ であることを示す。しかしながら、この条件下ではミオシンのATPase活性に Ca^{2+} 感受性がほとんど見

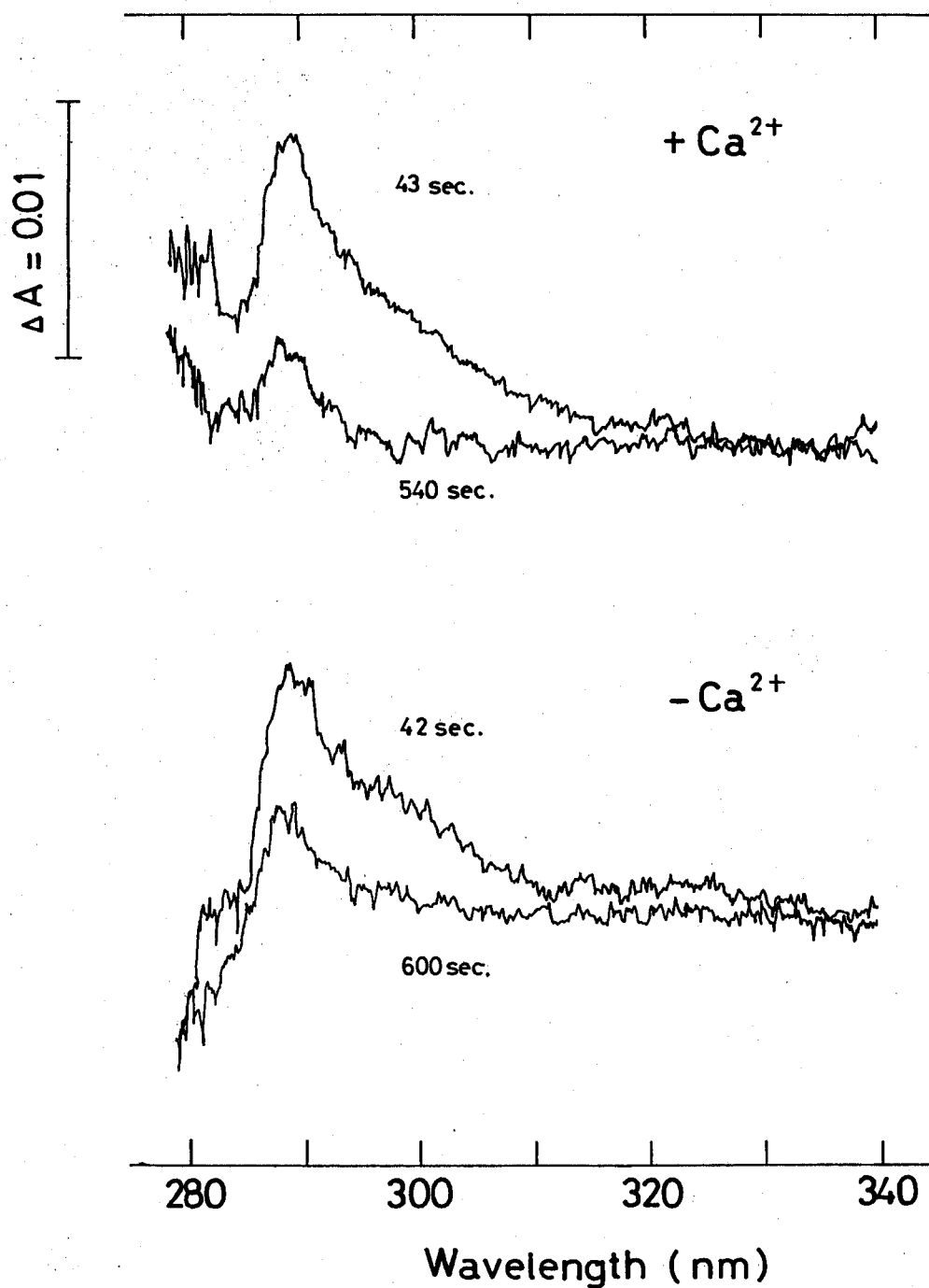


図20 オパーク部ミオシンの ATP添加による紫外吸収差スペクトル (0.5M KCl存在下)
 測定は、2.6 μ M ミオシン、0.5M KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM MgCl、15℃で、
 +Ca²⁺の場合は 0.1mM CaCl₂、-Ca²⁺の場合は 1mM EGTA 存在下においておこなった。
 ATPは 122.4 μ M (+Ca²⁺)、123.4 μ M (-Ca²⁺) 添加した。図に示した時間は ATP添加
 後にスキャンが 290nmに到達した時間である。

られなかった。そこで、オパーク部ミオシンATPase活性の Ca^{2+} 感受性に対する KCl濃度の影響を調べた。表3に示したように、オパーク部ミオシンの Mg^{2+} 存在下におけるATPase活性の Ca^{2+} 感受性は KCl濃度に強く依存している。

Concentration of KCl (M)	ATPase activity (sec^{-1})		Ca^{2+} - sensitivity (%)
	In the presence of 0.1 mM CaCl_2	In the presence of 1 mM EGTA	
0.03	0.118	0.016	86
0.08	0.139	0.013	91
0.15	0.152	0.033	78
0.30	0.226	0.065	71
0.50	0.200	0.128	36
0.80	0.157	0.153	3

表3 オパーク部ミオシンATPase活性の Ca^{2+} 感受性に及ぼす KClの影響

測定条件は、 $0.21\mu\text{M}$ ミオシン、 30mM MOPS-KOH (pH7.0)、 3mM MgCl_2 、 1mM ATP、 15°C 。
 Ca^{2+} 感受性は表2に示したものと同様に求めた。

0.15M KCl より高濃度側で、急激に感受性が減少している。高い Ca^{2+} 感受性は KCl の低い濃度範囲で見られた。ミオシンに直接 Ca^{2+} が結合して収縮の制御をおこなっているホタテのミオシンの ATPase の生理的に意義のある性質をつかまえるためには高い Ca^{2+} 感受性を示す低 KCl 濃度の条件下で実験をおこなう必要がある。しかしながら、この条件下では、ミオシンは会合しフィラメントを形成していて溶液が濁っているので、紫外部吸収差スペクトルを測定できない。そこで、低 KCl 濃度でもミオシンが溶解していてかつ ATPase 活性が Ca^{2+} 感受性をもっている条件を探した。Pollard が非筋細胞のミオシンがショ糖に溶解することを報告している (71)。オパーク部ミオシン懸濁液にショ糖を加えて濁度の変化を調べたところ、ショ糖濃度の増加にともなって濁度が直線的に減少し、1.5 M ショ糖存在下においては、もとの値の24%になった (図21)。すなわちオパーク部ミオシンもショ糖に溶けることがわかった。図22にオパーク部ミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性に対するショ糖の影響を調べた結果を示した。1.5 M ショ糖存在下において、ATPase 活性の値は Ca^{2+} のあるなしにかかわらず約5分の1になったが Ca^{2+} 感受性は保存されていて約77%あった。

1.5 M ショ糖存在下において、紫外部吸収差スペクトルを測定した。図23に Ca^{2+} 存在下における差スペクトルの時間変化の様子を示した。ATP 添加後すぐに 289nm にピークがあり 295nm 付近に肩をもつ差スペクトルが見られた (図23-a)。この差スペクトルの形はショ糖非存在下において見られた E·ADP·P の分子種に特異的な ATP 型の差スペクトルと良く似ている。ベースラインが低波長側に向かって下がっているのは、サンプル側とリファレンス側のミオシン溶液の濁度の若干の違いによるものと思われる。たぶんミオシン溶液に ATP が共存していないリファレンス側の方が濁度が大きいと思われる。この差スペクトルは時間がたつにつれて 293nm 付近が減少して、最終的に E·ADP の分子種に特異的な ADP 型の差スペクトルになった (図23-d)。

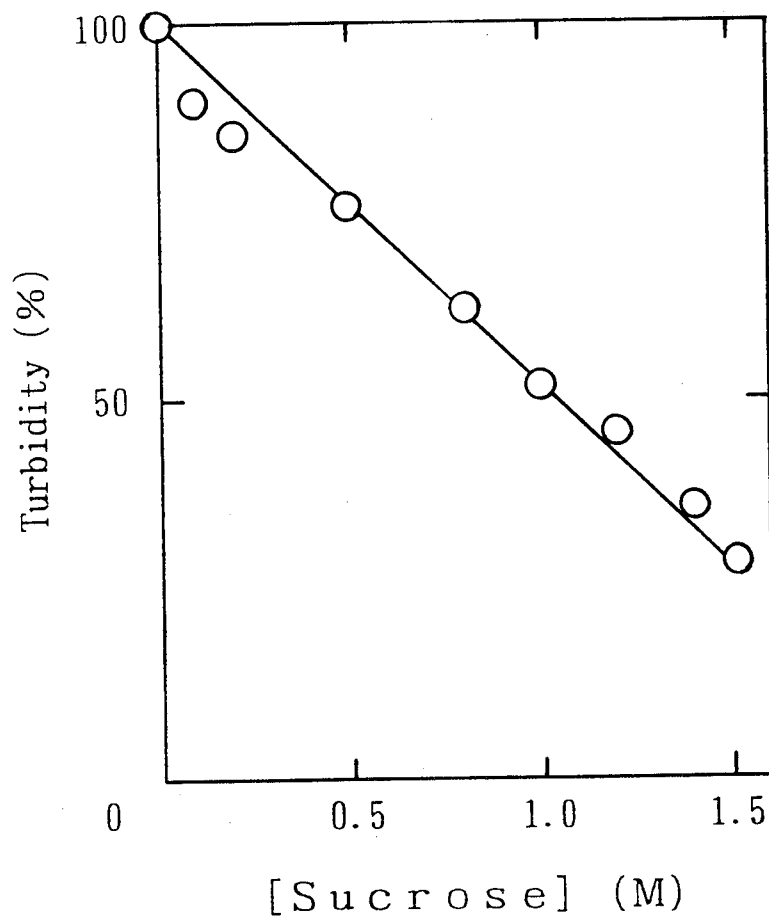


図21 オパーク部ミオシンの濁度のショ糖濃度依存性

測定条件は、0.4mg/mlミオシン、30mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 。
 ショ糖の濃度は0から1.5Mまで変化させた。濁度は A_{360} で測定し、ショ糖を加えないときのミオシン懸濁液の A_{360} の値を100%として求めた。

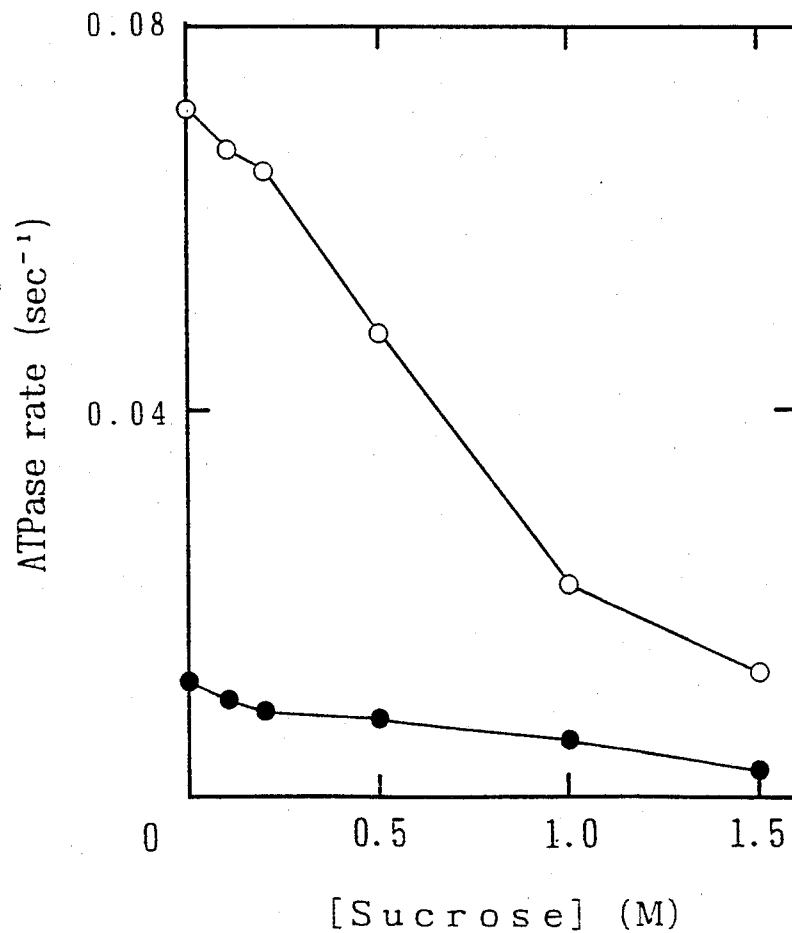


図22 オパーク部ミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性のショ糖濃度依存性

測定は、0.3mg/mlミオシン、30mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM MgCl_2 、1mM ATP、15℃でおこなった。ショ糖の濃度は0から1.5Mまで変化させた。○は0.1mM Ca^{2+} 存在下、●は1mM EGTA存在下。Piの濃度は Rin と Moralesの方法 (40) によって決定した。

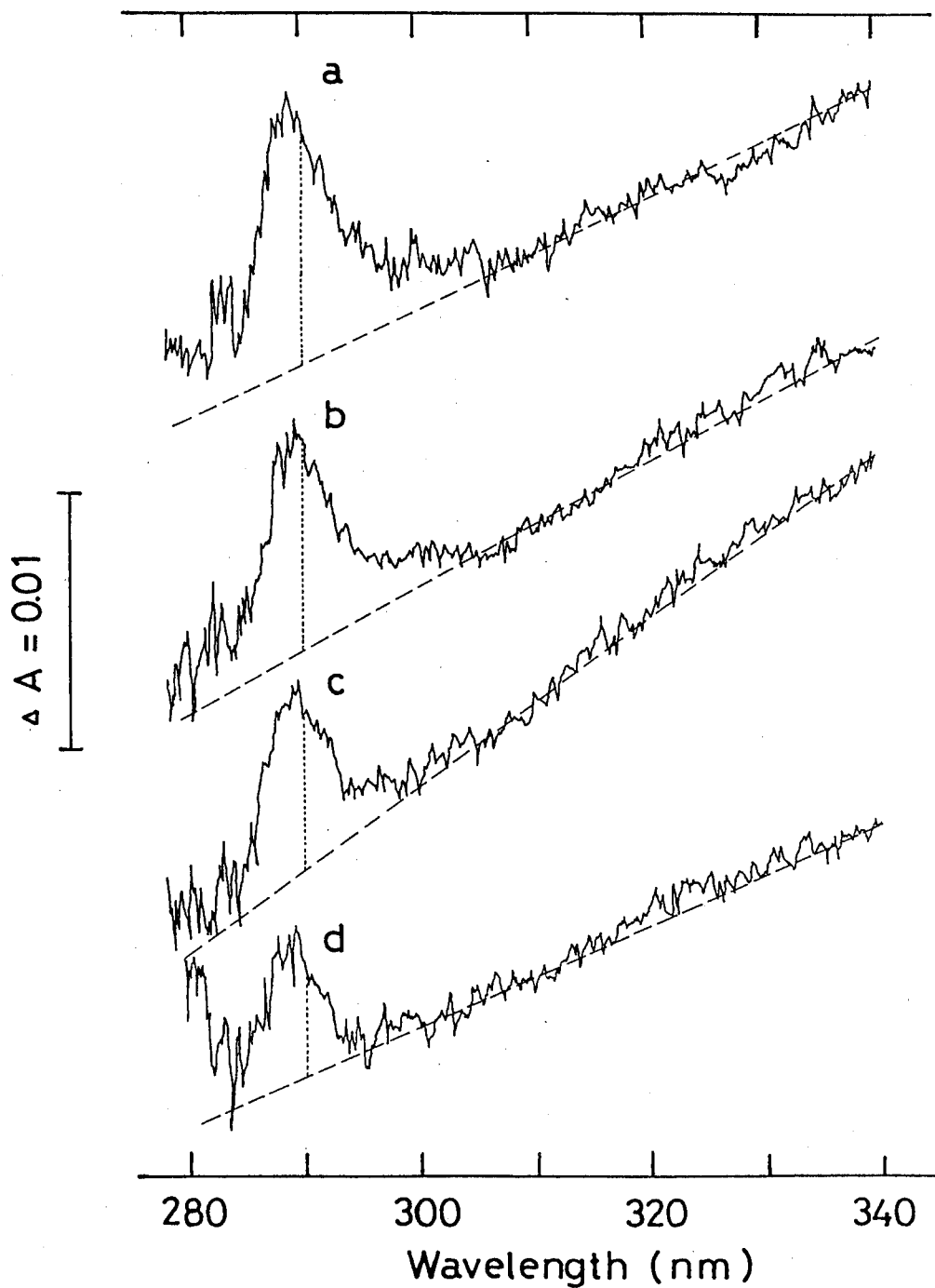


図23 オパーク部ミオシンの ATP添加による紫外吸収差スペクトル
(1.5M ショ糖存在下)

測定条件は 1.5M ショ糖、2.5 μ M ミオシン、40mM KCl、20mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM $MgCl_2$ 、0.1mM $CaCl_2$ 、15°C。差スペクトルはそれぞれ、77.3 μ M の ATP を添加後、290nm に到達した時間が、a, 2min、b, 5.8min、c, 25.5min、d, 82.3min のものである。破線はベースラインで、点線で示した 290nm における ΔA を決定するために引いた。a の差スペクトルが ATP 型、d の差スペクトルが ADP 型に相当する。

この差スペクトルの減衰を 290nmの ΔA の時間変化として表わした (図24-A)。ATP添加後の初期に、大きな ΔA_{290} の減衰が見られた。この減衰はいつも見られて、たぶん ショ糖が1.5 M も入っているので溶液の粘度がかなり高いことによるアーティファクトと思われる。なぜならば、この減衰はショ糖非存在下においては決して見られなかったからである。この初期の大きな減衰の後、二重矢印で示したレベルで一度減衰がおさまった。その後再び減衰が半減期 1800secで起こった。この半減期の値からChanceの式 (72.41) を用いて、定常状態におけるATPaseの速度定数を求めることができる。Chanceの式から求めた速度定数は $0.017s^{-1}$ であった。同じプレパレーションのミオシンを用いて同じ条件のもとにおいてATPase活性の測定をおこないリン酸の放出速度からATPase活性を求めたところ $0.019s^{-1}$ であった。両者の値は良く一致している。この結果は二重矢印で示したレベルが ATP型を示し、これが定常状態の間持続し ATP の消費とともに矢印で示した ADP型のレベルに減衰することを示している。以上のことから、 Ca^{2+} 存在下においてはオパーク部ミオシンの ATPase反応の定常状態における中間体は、ATP型を示す分子種 $E \cdot ADP \cdot P$ であると考えられる。

一方 Ca^{2+} 非存在下においては、図24-Bに示すように、 ΔA_{290} は全く異なる時間変化を示した。ATP 添加後初期に半減期120secの早い減衰のみが見られ、ATP の消費にともなう減衰は見られなかった。反応初期の減衰はショ糖溶液の粘性によるアーティファクトと考えられるので、この条件では差スペクトルが ATP型を示さず、いきなり ADP型を示したことになる。この結果から $-Ca^{2+}$ における定常状態の中間体は $E \cdot ADP$ であると考えられる。なお、リン酸の放出速度から求めた定常状態のATPase活性は $0.004s^{-1}$ であった。 Ca^{2+} 存在下と非存在下の ΔA_{290} のこのような差異は、表4に示したように ATP濃度を変えても同様に観測された。

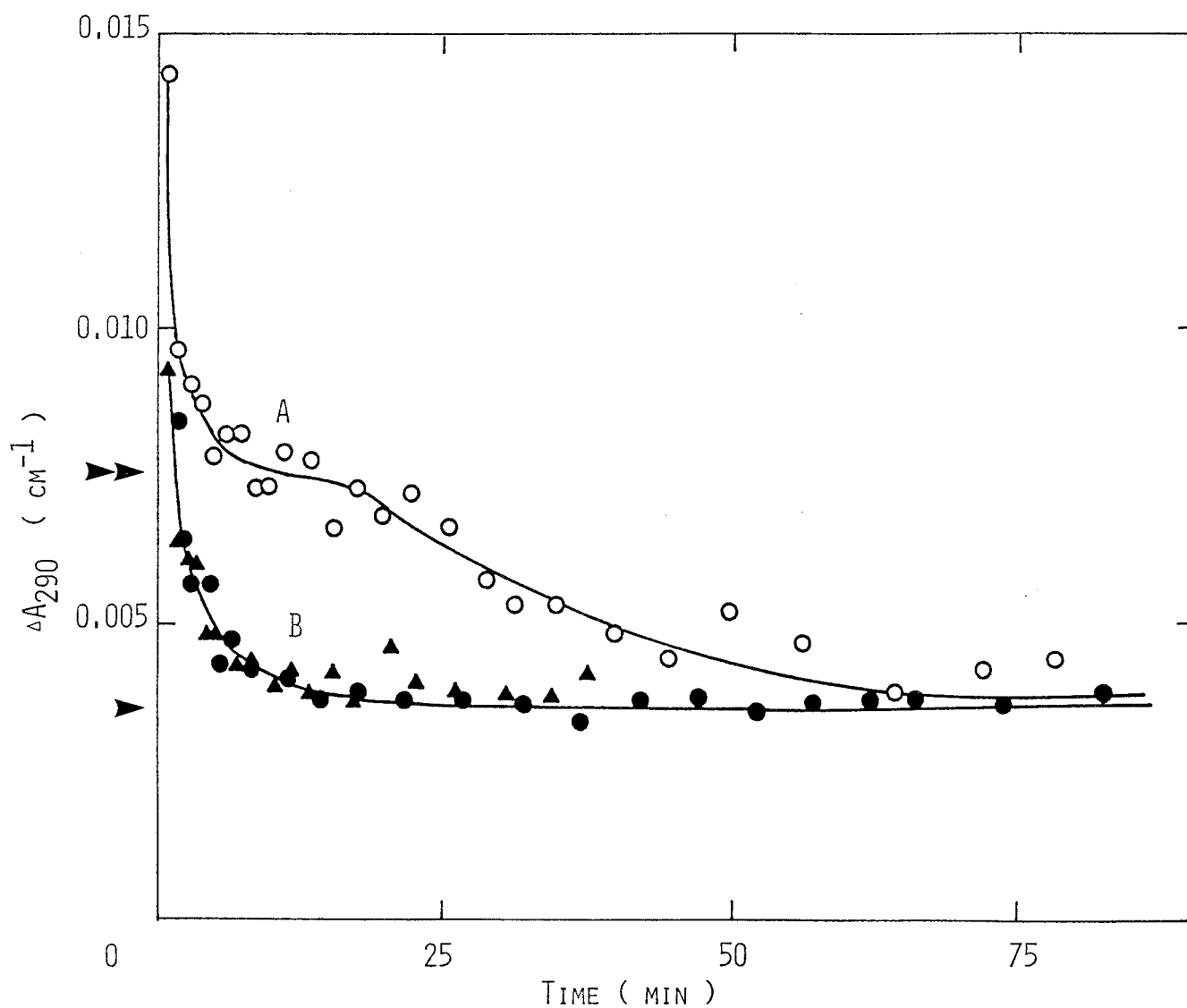


図24 オパーク部ミオシンの紫外吸収差スペクトルの ΔA_{290} の時間変化

測定条件は 1.5M ショ糖、2.5 μ M ミオシン、40mM KCl、20mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM $MgCl_2$ 、15°C。Aは0.1mM Ca^{2+} 存在下、Bは1mM EGTA存在下。ATPの添加量は、77.3 (○)、78.6 (●)、10.0 (▲) μ M。 ΔA_{290} は図23で示した点線の高さから求めた。二重矢印と矢印はそれぞれ、ATP型とADP型に相当する ΔA_{290} の値のレベルを示している。

	[ATP] (μM)	[myosin] (μM)	τ (sec)	Rate constant determining the steady state ATPase (sec^{-1})	
				From τ^a	From Pi^b
+Ca ²⁺	34.7	3.06	600	0.019	0.018
	57.5	3.03	1170	0.016	0.018
	77.3	2.50	1800	0.017	0.019
-Ca ²⁺	10.0	3.00	D	-	0.004
	78.6	2.50	D	-	-
	79.2	3.08	D	-	0.004
	90.3	2.98	D	-	0.004

表4 オパーク部ミオシンの紫外吸収差スペクトルの測定結果のまとめ

測定条件は、1.5Mショ糖、40mM KCl、20mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM MgCl₂、15°C。

半減期 τ は図24に示したような ΔA_{290} の時間変化の ATP型から ADP型への減衰から決定した。Dは差スペクトルが反応の初期に減衰して ATP型が認められず、 τ が決定できなかったことを示す。+Ca²⁺, 0.1mM CaCl₂ 存在下、-Ca²⁺, 1mM EGTA 存在下。

a ; Chanceの式 $k = S_0 / (P\tau)$ から計算して求めた値。S₀ と P はそれぞれ添加した ATP量とミオシンの濃度を示す。

b ; 1mM ATP添加によって測定した P_i 放出の速度から決定した値。

次に、1.5Mショ糖非存在下においても、 Ca^{2+} 濃度によってオパーク部ミオシンATPase反応の定常状態における中間体が変わるかどうかを、ミオシンの Trpのけい光強度を測定することによって調べた。ウサギ骨格筋ミオシンを用いた研究からミオシンに ATPが結合するとけい光強度が増加し、ADPが結合した場合はそれより小さい増加をすることが知られている(73,74,75)。ホタテ貝柱筋のミオシンも同様のけい光変化を示す(76,77)。低イオン強度下でミオシンが溶けていない状態すなわち溶液が濁っている状態で攪拌装置を用いて測定した。 $+\text{Ca}^{2+}$ において ATPを加えるとけい光強度が図25-aに示したように増加した。しかし、 $-\text{Ca}^{2+}$ において ATPを加えた場合は、 $+\text{Ca}^{2+}$ の時の半分程度しか増加しなかった(図25-b)。このけい光の増加の程度は、 $-\text{Ca}^{2+}$ において ADPを加えたもの(図25-c)と同じであった。この結果から、1.5Mショ糖非存在下においても、 Ca^{2+} 濃度によってミオシンATPase反応の定常状態における中間体が変わり、 $-\text{Ca}^{2+}$ においてはE·ADP が中間体であると考えられる。このことから紫外部吸収差スペクトルの測定結果はショ糖によるアーティファクトではないといえる。

次にオパーク部ミオシンへの ADPの結合を Ca^{2+} のあるなしで直接測定しその結果を図26に示した。ADPの結合量はミオシン懸濁液に ADPを加えた後、超遠心分離して上清に残った ADP量から計算して求めた。その結果、 Ca^{2+} 非存在下で ADPのオパーク部ミオシンへの親和性が増加することがわかった。非直線回帰プログラムを使ってミオシンのヘッドへの ADPの最大結合数 $R_{\max}$ と ADPの解離定数 K_d を求めて表5に示した。 $+\text{Ca}^{2+}$ の時 K_d は $3.46 \mu\text{M}$ 、 $-\text{Ca}^{2+}$ の時は $0.27 \mu\text{M}$ となり、 Ca^{2+} 濃度が減少すると、ADPのオパーク部ミオシンへの親和性が約13倍増加している。なお最大結合数 $R_{\max}$ は Ca^{2+} 濃度で変化せず、ミオシンのヘッドあたり1モル結合しているものと思われる。

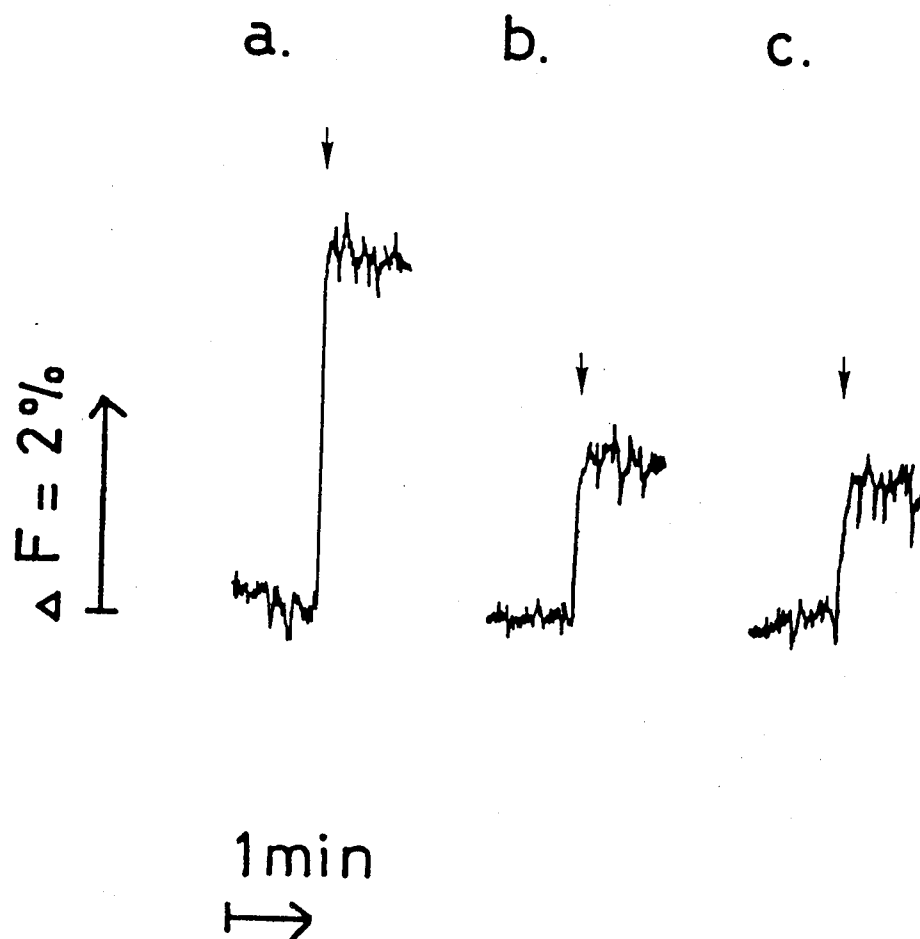


図25 ATP添加によるオパーク部ミオシンの Trpのけい光スペクトルの増加

測定条件は、0.83 μM ミオシン、40mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、6% グリセリン、15°C。矢印で示した時間に20 μM の ATP (a, b) または ADP (c) を添加した。aは 0.1mM CaCl_2 存在下、bとcは 1mM EGTA 存在下。

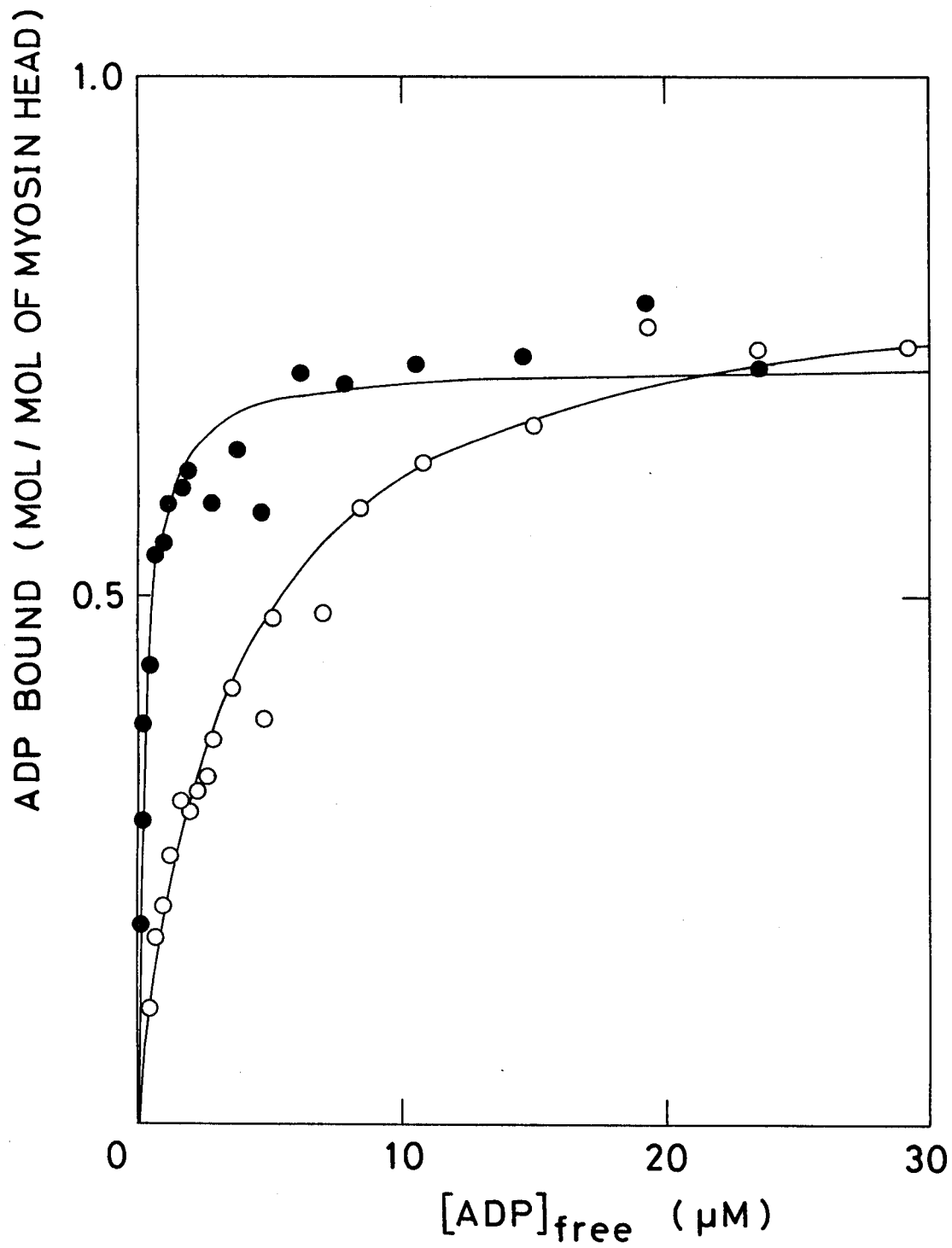


図26 オパーク部ミオシンへの ADP結合のCa²⁺感受性

測定条件は 1mg/ml ミオシン、38.3mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl₂、15°C である。○は0.1mM Ca²⁺存在下、●は1mM EGTA存在下。

	Condition	$R_{\max}$	K_d (μM)
Opaque myosin	$+\text{Ca}^{2+}$	0.83	3.46
	$-\text{Ca}^{2+}$	0.72	0.27
R.s.myosin	25°C	0.87	3.50
	2°C	0.84	0.44

表5 ミオシンへの ADPの親和性

オパーク部ミオシンの結果は図26に示した曲線から、非直線回帰プログラムを使って計算した。 $R_{\max}$ と K_d はそれぞれミオシンの頭部への ADPの最大結合数、ADPの解離定数である。

ウサギ骨格筋ミオシン (R.s.myosin) の結果は、3mg/mlミオシン、55mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、の条件で25°Cおよび2°Cにおいて測定した。

ウサギ骨格筋ミオシンでも、温度が下がると ADPの解離がATPase 反応の律速段階になるということがわかっているが (69,75,78)、このミオシンを用いて同様の測定を行なったところ、ADPの解離定数は25℃で $3.5 \mu\text{M}$ 、2℃で $0.44 \mu\text{M}$ となり、低温で約8倍 ADPのミオシンへの親和性が増加した (表5)。これらの結果はウサギ骨格筋ミオシンの低温時と同様に、オパーク部ミオシンの $-\text{Ca}^{2+}$ の時も ADPの解離が律速段階になる、すなわち、 $\text{E} \cdot \text{ADP}$ が中間体であるということを強く示唆している。

次にATPase反応の定常状態の間にミオシンに結合しているヌクレオチドの種類を、井上と殿村の方法 (43) に従い ATP再生系としてホスホエノールピルビン酸とピルビン酸キナーゼを十分加えた系で同定した。すなわち、ATPase反応を TCAで停止し遠心分離後、上清を薄層クロマトグラフィーにかけヌクレオチドを分離して ATPと ADPの ^3H 量をカウントした。十分な ATP再生系存在下のもとに測定を行なっているのでフリーの ADPは存在しないと考えられる。よってカウントされた ADPはミオシンの活性部位に定常状態において結合していたものと考えられる。結果を図27に示したが、 Ca^{2+} のあるなしにかかわらず、ミオシンのヘッドあたり 0.7モルの ADPが定常状態の間に結合していることがわかった。薄層からヌクレオチドを完全に回収することは困難であり、それゆえ結合量は低めに見積もられる可能性が高いので、実際にはヘッドあたり 1 モル (ミオシン 1 モルあたり 2 モル) の ADPが結合してしていると思われる。このことから、 $-\text{Ca}^{2+}$ の時もATPase反応の定常状態において、ADPはオパーク部ミオシンに結合しており中間体は Rigor状のものではないということがいえる。

第一部で示したようにホタテ貝柱筋のミオシンの溶解度がヌクレオチド存在下において、 $+\text{Ca}^{2+}$ の時に比べて $-\text{Ca}^{2+}$ の時増加することを見出した。この現象はホタテ貝柱の平滑筋オパーク部およびトランスルーセント部、横紋筋のミオシンすべてについて見られたので、 Ca^{2+} がミオシンに直接結合して収縮制御を行なっている軟体

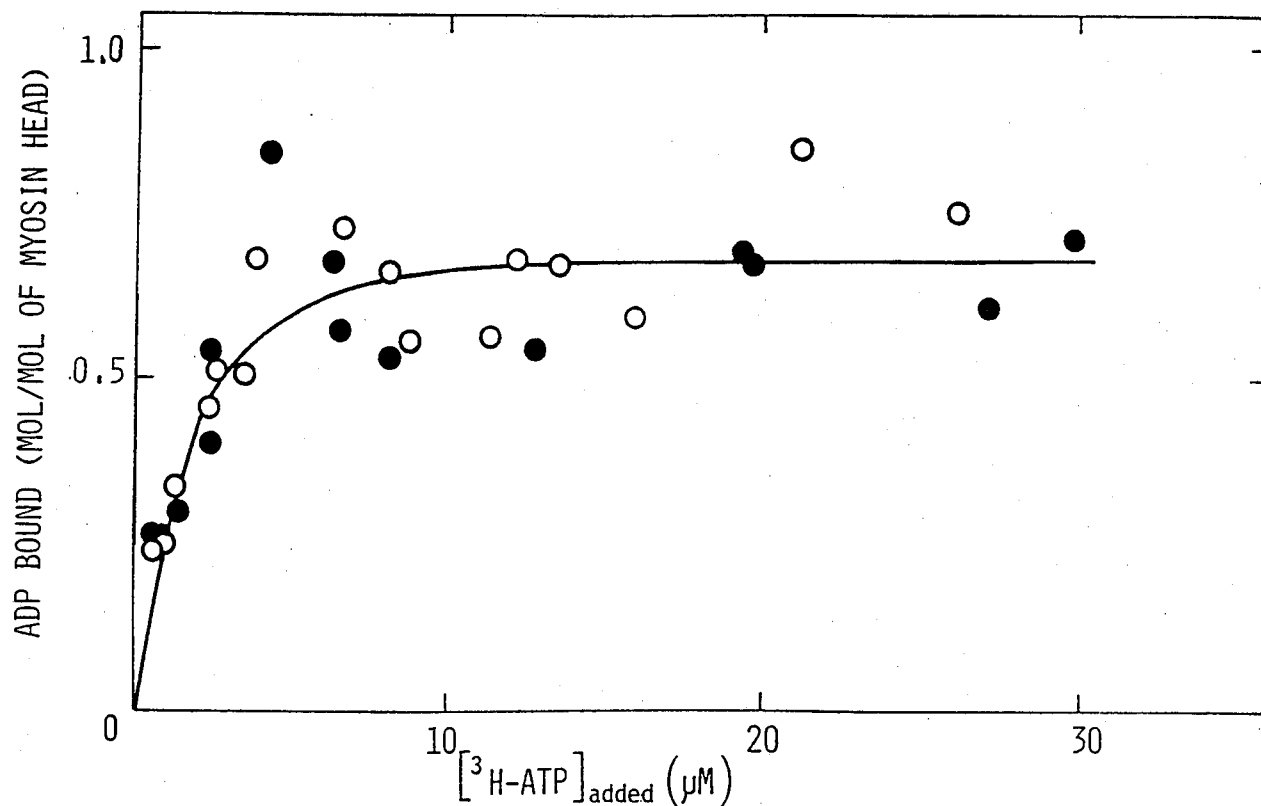


図27 定常状態においてオパーク部ミオシンの活性部位内に結合している ADPの量

測定条件は 2.1 μM ミオシン、70mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl₂、1mM ホスホエノールピルビン酸、0.024mg/mlピルビン酸キナーゼ、15℃。○は0.1mM Ca²⁺存在下
●は1mM EGTA存在下。

動物の筋肉のミオシンに特有のものであると考えられる。ここで、ATP と ADPの影響を追及したところオパーク部ミオシンは他のミオシンと異なっていることが判明した。実験はすべて Ca^{2+} 非存在下において行なった。オパーク部ミオシンの溶解度はヌクレオチド存在下において、非存在下すなわち Rigorに比べて増加した (図28)。また、ATPと ADPはまったく同じ影響を示した。ところが、トランスルーセント部ミオシンと横紋筋ミオシンの溶解度は ATPと ADPでは異なる増加の程度を示した (図29)。ATP存在下の方が高い溶解度を示した。この溶解度の変化はミオシンのコンホメーションのごくわずかの違いを表わしていると思われる。オパーク部ミオシンは $-\text{Ca}^{2+}$ において ATPと ADPが溶解度の変化に対して同様な影響を示すことから、ATPを加えても ADPを加えたときと同じコンホメーションをとっていると考えられる。すなわち、オパーク部ミオシンの ATPase反応の定常状態の中間体が $-\text{Ca}^{2+}$ において $\text{E} \cdot \text{ADP}$ であることをこの結果は示していると思われる。このことは、紫外部吸収差スペクトルやけい光スペクトルの測定結果と一致する。また、図29の結果は、トランスルーセント部と横紋筋のミオシンは $-\text{Ca}^{2+}$ において中間体は $\text{E} \cdot \text{ADP}$ と異なっていることを示している。 $-\text{Ca}^{2+}$ でキャッチ状態をとらず、直ちに弛緩状態に入るこれらの筋肉のミオシンでは、 $-\text{Ca}^{2+}$ 時の中間体は $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ であると考えられる。

以上の結果からオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は、 $+\text{Ca}^{2+}$ 下での $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ から、キャッチ状態になる $-\text{Ca}^{2+}$ の条件下で $\text{E} \cdot \text{ADP}$ に変化することがわかった。 $\text{E} \cdot \text{ADP}$ はアクチンとの親和性が高いので、キャッチ状態においてミオシンがこの分子種で存在するとすれば、アクチンと強く結合できると考えられる。

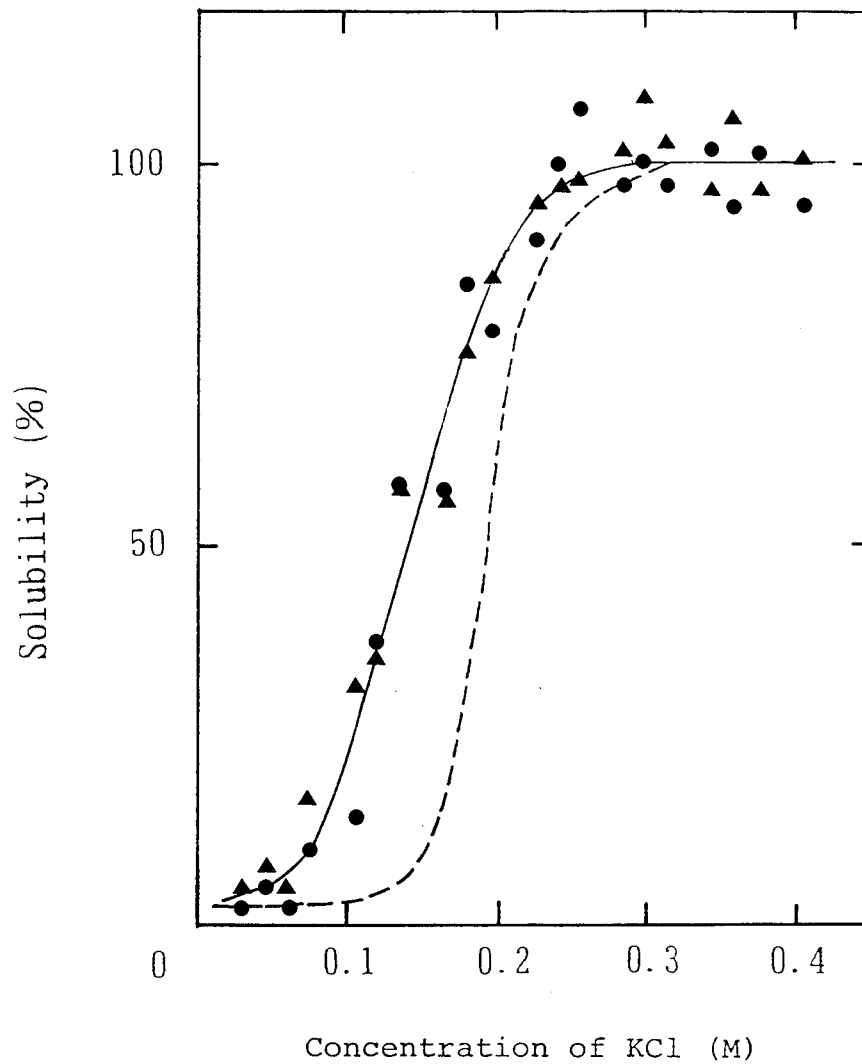


図28 Ca^{2+} 非存在下におけるオパーク部ミオシンの溶解度

測定条件は 0.54mg/mlミオシン、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、1mM EGTA、6.25% グリセリン、15℃。●は 1mM ATP存在下、▲は0.38mM ADP存在下、破線はヌクレオチド非存在下。

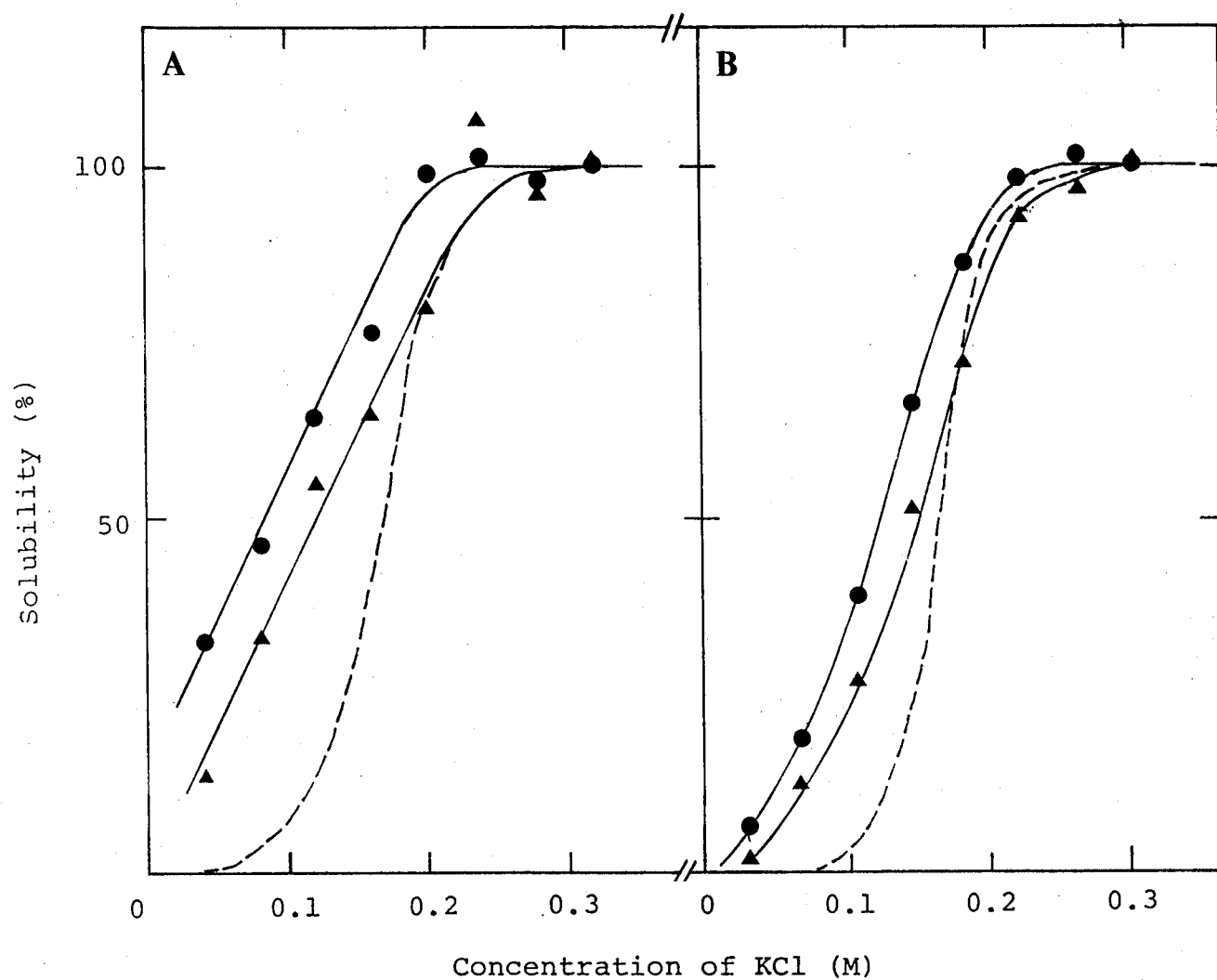


図29 Ca^{2+} 非存在下におけるトランスルーセント部およびホタテ横紋筋ミオシンの溶解度
 測定条件は 0.5mg/ml ミオシン、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、1mM EGTA、7～8%グリセリン、15℃。●は 1mM ATP存在下、▲は0.1mM ADP 存在下、破線はヌクレオチド非存在下。A、トランスルーセント部ミオシン、B、横紋筋ミオシン。

第二章 アクチン存在下におけるミオシンATPaseの反応中間体

アクチン存在下では超沈殿などの影響で、ミオシンの Trp残基の紫外吸収差スペクトルやけい光スペクトルの測定は困難になる。そこで、何か間接的にでもいいからミオシンのコンホメーションの違いを見分けることはできないかと考えた。

もし中間体が異なる分子種であれば、コンホメーションの違いによって、ミオシンのトリプシンによる限定分解のされ方の様子が違ってくるのではないかという予想のもとに実験を行なった。まず、はじめにミオシンのみについて調べた。限定分解はミオシンに対して百分の一重量のトリプシンで、15℃において行なった。図30に

ATP存在下における限定分解の様子を示した。消化時間5分までのサンプルにつき、それぞれ SDS-PAGEを行なった。時間がたつにつれて、ミオシン重鎖のバンドが減少し、それにともなって、125Kと74Kのバンドが増加した。限定分解のパターンは Ca^{2+} のあるなしにかかわらず同じであったが、 $-\text{Ca}^{2+}$ においてミオシン重鎖のバンドの減少の速度が抑えられた。ヌクレオチド非存在下においてはこのようなミオシン重鎖のバンドの減少速度の Ca^{2+} 感受性は見られなかった。よって、 Ca^{2+} はトリプシンに影響しているのではなくミオシンに影響していると考えられる。ATP存在下においてオーバーラップ部ミオシンは Ca^{2+} のあるなしで異なったコンホメーションをしていることによって、重鎖の消化される速度が異なるのだと考えられる。前章の結果から考えると、このコンホメーションの違いは、ATPase反応の定常状態における中間体の違いを表わしていると思われる。すなわち、 $-\text{Ca}^{2+}$ において中間体が $\text{E} \cdot \text{ADP}$ の分子種になると重鎖の消化される速度が、 $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ の分子種に比べて遅くなるのだと思われる。

次にアクチン存在下において同様の実験を行なった。アクチンはモル比でミオシンの10倍量加えた。図31に ATP存在下における結果を示した。トリプシンによる消化のされ方はミオシンのみの場合と

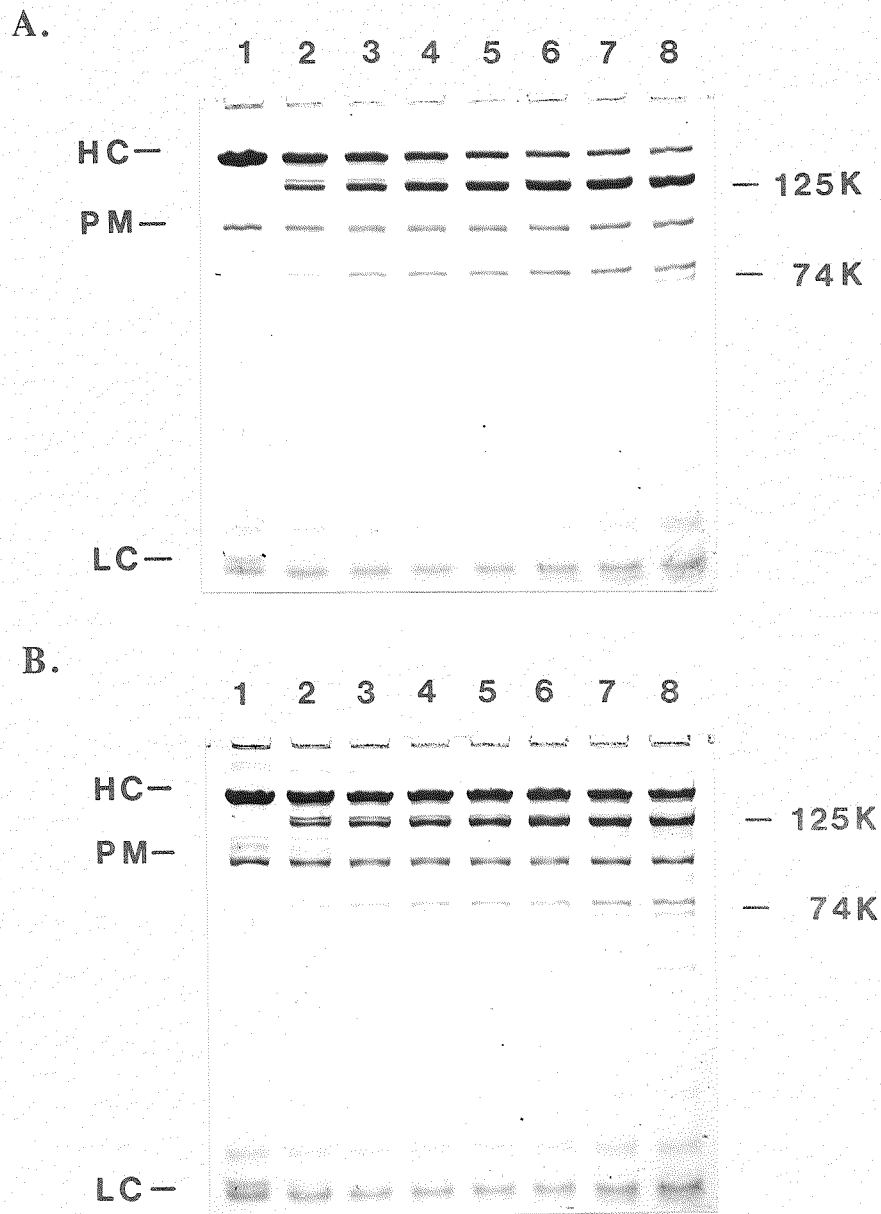


図30 ATP 存在下におけるオパーク部ミオシンのトリプシン消化のSDS-PAGEパターン

消化条件は、1mg/mlミオシン、65mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl₂、10%グリセリン、15℃。ATP は 2mM添加した。TPCK-トリプシンは 0.01mg/ml加えた。

A, 0.1mM CaCl₂存在下、B, 1mM EGTA 存在下。HC、PM、LCはそれぞれミオシン重鎖、パラミオシン、ミオシン軽鎖を示す。消化時間はそれぞれ、1;0min、2;0.5min、3;1min、4;1.5min、5;2min、6;3min、7;4min、8;5minである。

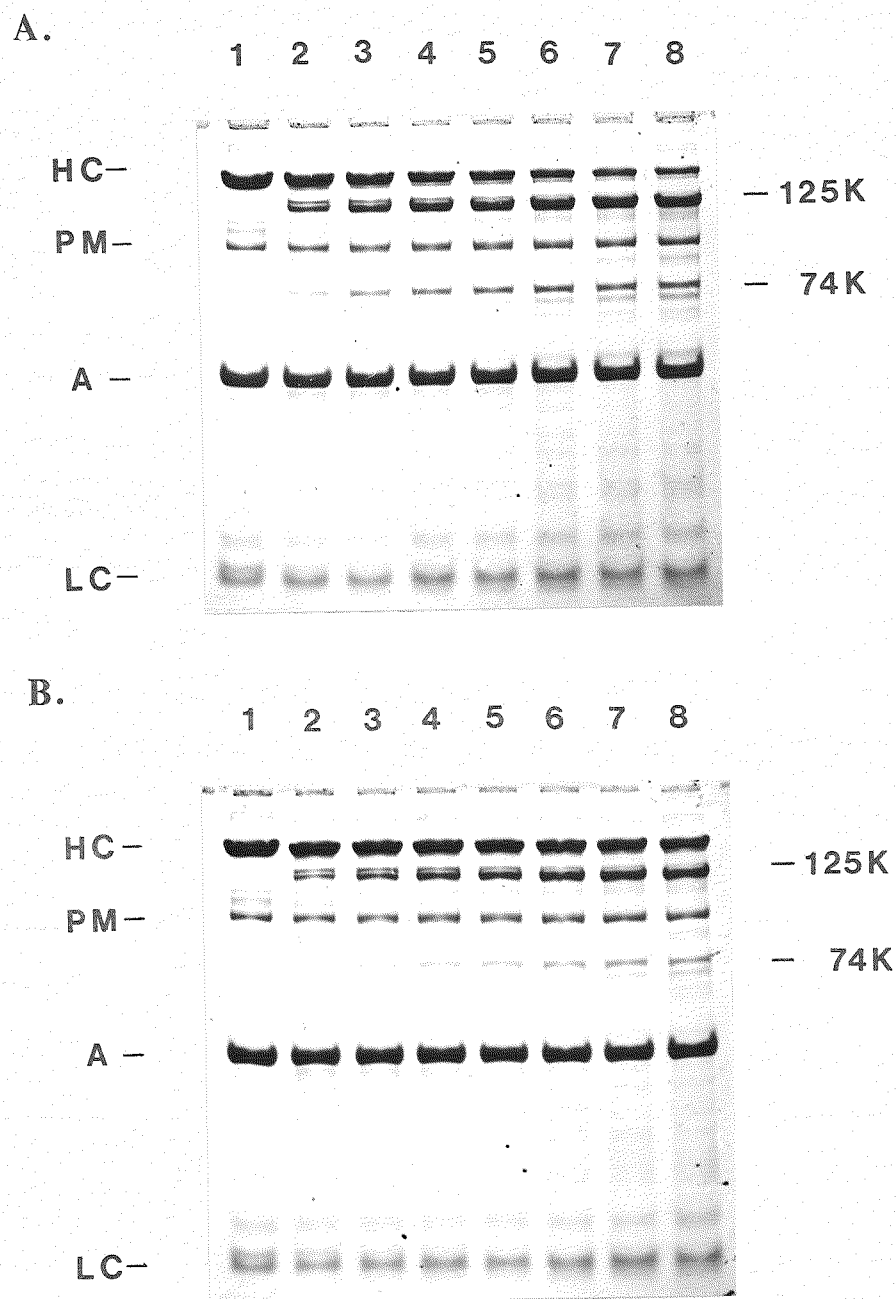


図31 ATP 存在下におけるオパーク部ミオシンのトリプシン消化のSDS-PAGEパターン（アクチン存在下）

消化条件と略語は0.9mg/mlのウサギ骨格筋アクチンを加えたことを除いて図30と同じである。

A, 0.1mM CaCl_2 存在下、B, 1mM EGTA 存在下。Aはアクチンを示す。

同様であった。ミオシン重鎖の減少する速度はミオシンのみの場合に比べて遅くなったが、 Ca^{2+} のあるなしで比較すると、やはり、 $-\text{Ca}^{2+}$ の時の方が減少速度が抑えられた。

ミオシン重鎖のバンドをデンストメーターで定量し減少速度を求めた。表6に種々の条件下における重鎖の減少の1次速度定数を示した。 $+\text{Ca}^{2+}$ では、Rigor に比べて ADP存在下でミオシン重鎖が消化されやすく、ATP存在下でさらに消化されやすくなる。しかし、 $-\text{Ca}^{2+}$ では、Rigor、ADP存在下、ATP存在下は、皆同様の値を示した。アクチン存在下の場合も、ミオシンのみの場合と同様に ATP存在下において Ca^{2+} のあるなしでトリプシンによる消化の速度が異なり、このことはミオシンの中間体が異なっていることを反映しているのではないかと考えられる。 $-\text{Ca}^{2+}$ で ATP存在下の消化の速度定数 0.10min^{-1} は ADP存在下の 0.11min^{-1} とほぼ同じであることはアクチン存在下でもATPaseの定常状態中間体は $\text{E}\cdot\text{ADP}$ であることを示唆している。

	$k (\text{min}^{-1})$	
	$+\text{Ca}^{2+}$	$-\text{Ca}^{2+}$
-	0.11	0.09
+ADP	0.18	0.11
+ATP	0.26	0.10

表6 オパーク部ミオシン重鎖の減少速度の一次速度定数 (アクチン存在下)

図31、図32のような SDS-PAGE のゲルのミオシン重鎖のバンドの濃さを、デンストメーターで定量し、その時間変化から重鎖の減少速度の一次速度定数を求めた。

$+\text{Ca}^{2+}$, 0.1mM CaCl_2 存在下、 $-\text{Ca}^{2+}$, 1mM EGTA 存在下。

$+\text{ATP}$, 2mM ATP 存在下、 $+\text{ADP}$, 2mM ADP 存在下。

さらに、図32に $-Ca^{2+}$ における ATP存在下、ADP存在下および Rigor状態でのトリプシン消化の実験結果を示した。よく見ると、Rigor ではミオシン重鎖のすぐ下に新たなバンドが生成し、5分後にはこのバンドは重鎖とほぼ同じ太さになっている（図32-3）。ADP存在下においても、このバンドは少し生成しているが、Rigor の場合に比べると、その生成量は明らかに少なくなっている（図32-2）。 $-Ca^{2+}$ における ATP存在下の場合にも重鎖のすぐ下のバンドの生成の仕方は少なく ADP存在下の場合と全く同じであった（図32-1）。このことから、アクチン存在下においてもオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は $-Ca^{2+}$ ではE·ADP である可能性が高いと思われる。

次に ADPのけい光アナログである ϵ -aza-ADPを用いてさらにアクチン存在下におけるミオシンATPase反応の中間体を追及した。

ϵ -aza-ADPと ϵ -aza-ATPはミオシンに結合すると異なるけい光強度を与えることが知られている(79,80,81)。 ϵ -aza-ATPの方が強いけい光を与える。図33に0.4mg/mlのオパーク部ミオシンに10 μ Mの ϵ -aza-ADPを加えて測定した結果を示した。A図が $+Ca^{2+}$ の場合で実線が ϵ -aza-ADPをくわえた結果で、この系に ϵ -aza-ATP再生系として十分量のピルビン酸キナーゼとホスホエノールピルビン酸キナーゼを加えるとけい光強度の増加が見られた。しかし、 $-Ca^{2+}$ においては（B図）実線が ϵ -aza-ADPを加えた時の結果であるが、それに ϵ -aza-ATP再生系を加えてもそれほどけい光強度は増加しなかった。すなわち、 $-Ca^{2+}$ においては、 ϵ -aza-ATP存在下でもミオシンの活性部位には ϵ -aza-ADPのみが結合していてリン酸は離れているのではないかと考えられる。この結果は、オパーク部ミオシンのATPase反応の中間体が E·ADPであるという紫外部吸収差スペクトルの測定結果と一致する。 Ca^{2+} のあるなしで ϵ -aza-ADPを加えた時のけい光強度が異なる理由ははっきりとはわからないが、たぶん Ca^{2+} のあるなしで活性部位の構造が微妙に違っていて、 ϵ -aza-ADPに異なった影響を与えているのだと思われる。重要なのは $-Ca^{2+}$ におい

て、 ϵ -aza-ADPと、 ϵ -aza-ATPが同じけい光強度を与えることである。

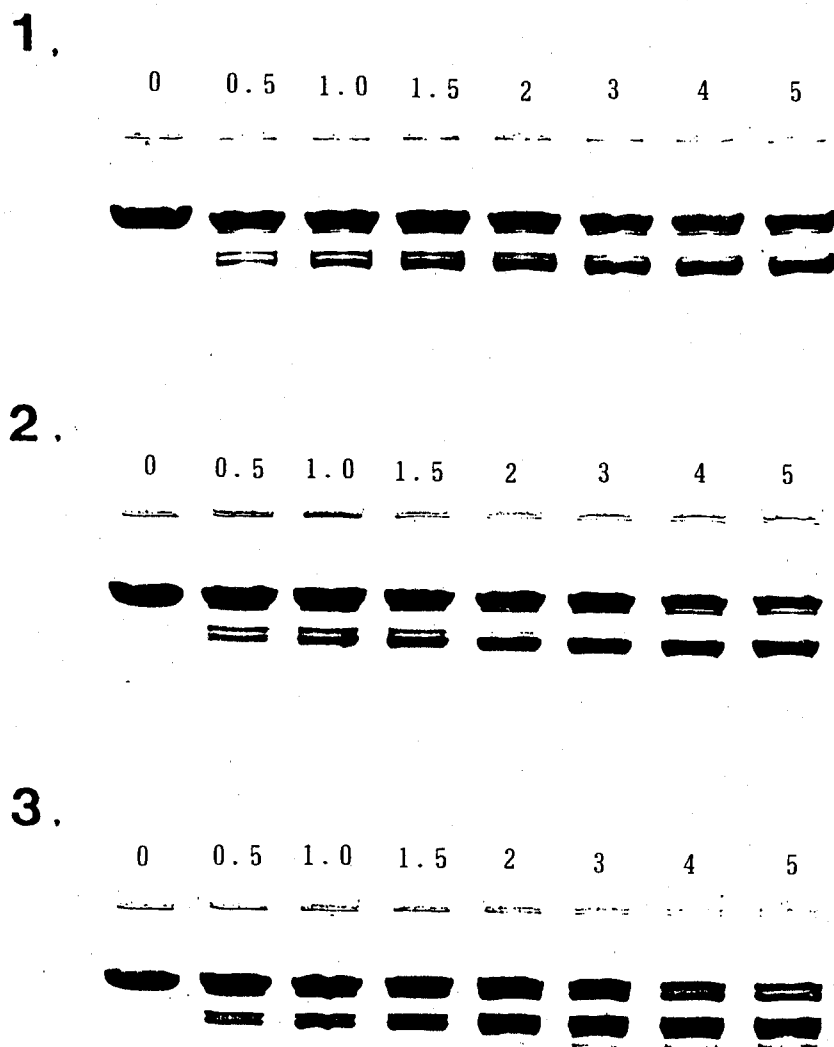


図32 Ca^{2+} 非存在下におけるオパーク部ミオシンのトリプシン消化のSDS-PAGEパターン
のミオシン重鎖部分の拡大図 (アクチン存在下)

消化条件は、1mg/mlミオシン、0.9mg/mlアクチン、65mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、
3mM MgCl_2 、10%グリセリン、0.01mg/ml TPCK-トリプシン、15°C。

1, 2mM ATP 存在下、2, 2mM ADP 存在下、3, ヌクレオチド非存在下。

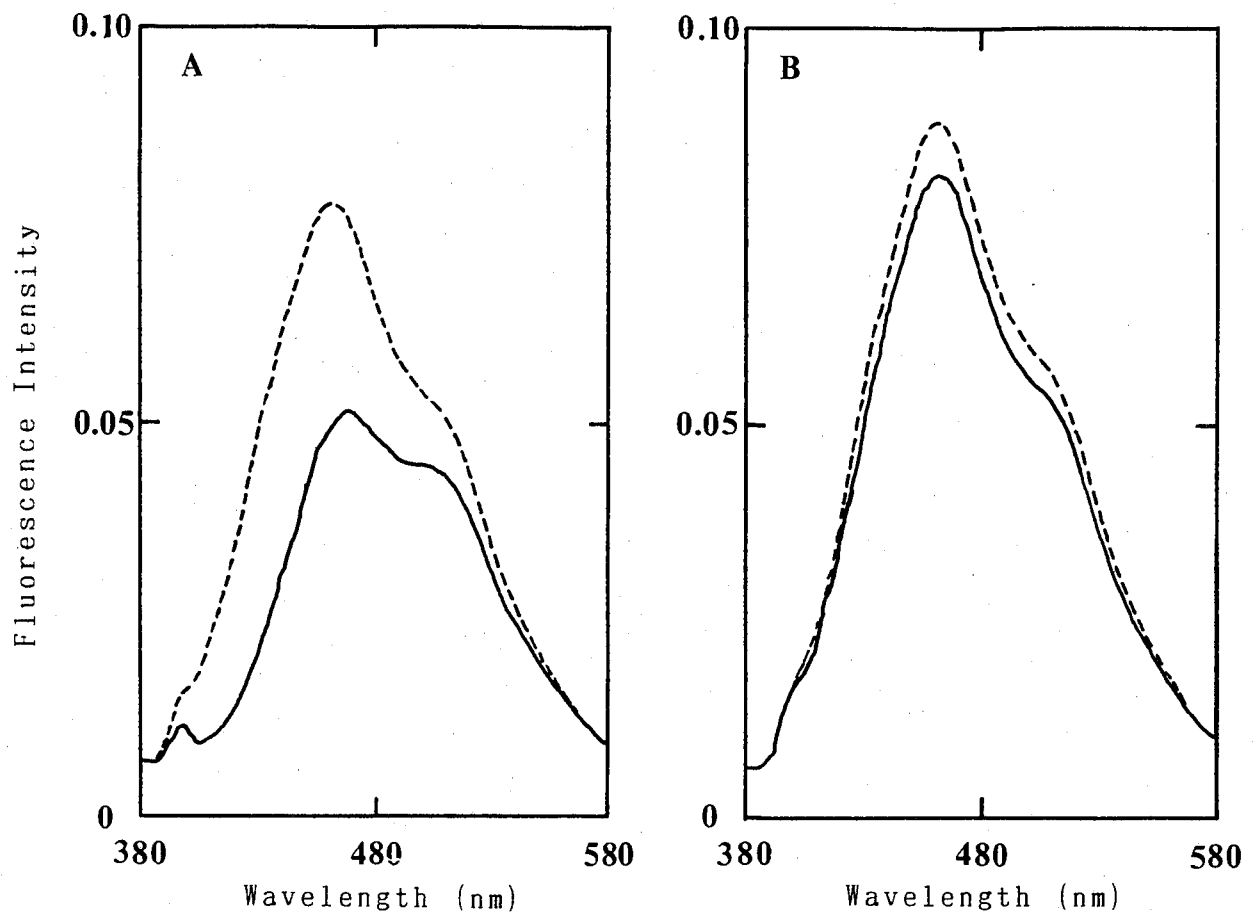


図33 オパーク部ミオシンに結合した ϵ -aza-ADPのけい光スペクトル

測定条件は、0.4mg/mlミオシン、35mM KCl、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、 $10\mu\text{M}$ ϵ -aza-ADP、 15°C (実線)。破線は、この系に ϵ -aza-ATP再生系として1mM PEPおよび0.1mg/mlのピルビンキナーゼを加えたものである。励起波長は350nm。

A, 0.1mM CaCl_2 存在下、B, 1mM EGTA 存在下。

次にアクチン存在下において同様の実験を行なった。アクチンはモル比でミオシンの10倍量加えた。ミオシンのみの場合と同様に、 $+Ca^{2+}$ においては ϵ -aza-ATP再生系を加えるとけい光強度が増加したが、 $-Ca^{2+}$ においては再生系を加えても、ほとんどけい光強度が変わらなかった(図34)。この結果から、アクチン存在下においても、オパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は $-Ca^{2+}$ では $E \cdot ADP$ であると考えられる。

図35にキャッチ筋ミオシンのATPase反応のpH依存性の測定結果を示した。A図は Ca^{2+} 存在下における Mg^{2+} -ATPase活性のものである。ミオシンのみの場合は、高いpH側で活性が増加した。このpH依存性の様子は、ウサギ骨格筋ミオシンの高温型とよく似ている(82)。よってこの結果からも $+Ca^{2+}$ の時の中間体はウサギ骨格筋ミオシンと同様に $E \cdot ADP \cdot P$ であると考えられる。アクチン存在下の場合はミオシンのみの時とは異なりpH8付近で活性の高いベル型のpH依存性を示した。B図はEDTA存在下のATPase活性の測定結果であるが、ベル型のpH依存性を示した。EDTA存在下のATPaseはリン酸の初期突発がないので、ATPが加水分解される前の $E \cdot ATP$ が中間体であると考えられている(83)。アクチン存在下のATPase活性のpH依存性もベル型を示したので、 $+Ca^{2+}$ におけるアクトミオシンATPase反応の定常状態における中間体は、この結果から間接的にはあるが $E \cdot ATP$ であると考えられる。 $-Ca^{2+}$ においても同様の測定を行なったが、はっきりした結果が得られなかった。たぶん、微量混在している Ca^{2+} 感受性を失ったミオシンが高いATPase活性をだして、正常なミオシンのATPase活性の様子が隠されてしまった可能性が高い。

以上の結果から、アクチン存在下におけるオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態の中間体は $+Ca^{2+}$ では $E \cdot ATP$ であり、 $-Ca^{2+}$ ではミオシンのみの場合と同様に $E \cdot ADP$ である可能性があることがわかった。

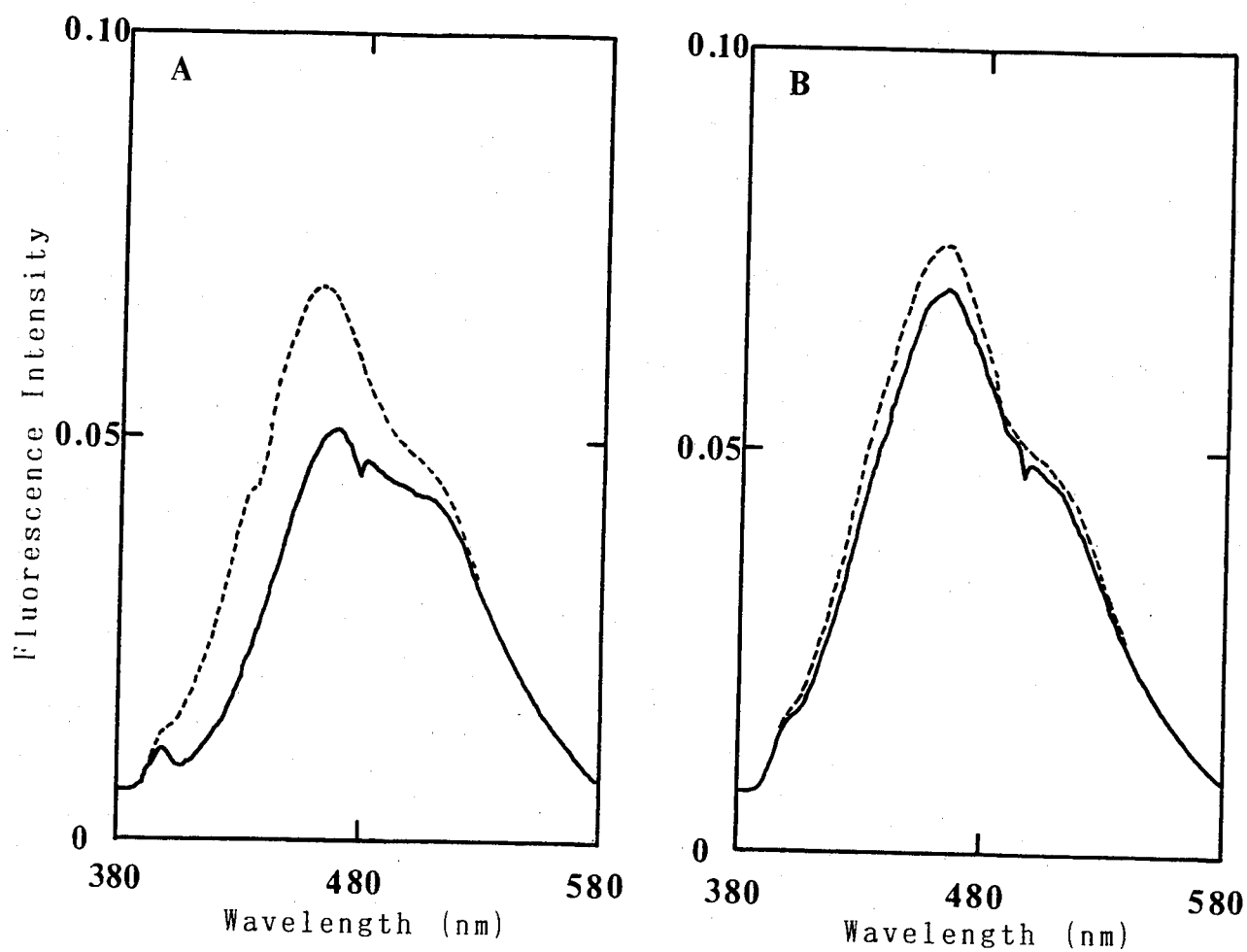


図34 アクチン存在下におけるオパーク部ミオシンに結合した ϵ -aza-ADPのけい光強度測定条件は図33と同じである。ただし、この場合は0.4mg/mlのアクチンを加えた。
A, 0.1mM CaCl_2 存在下、B, 1mM EGTA 存在下。

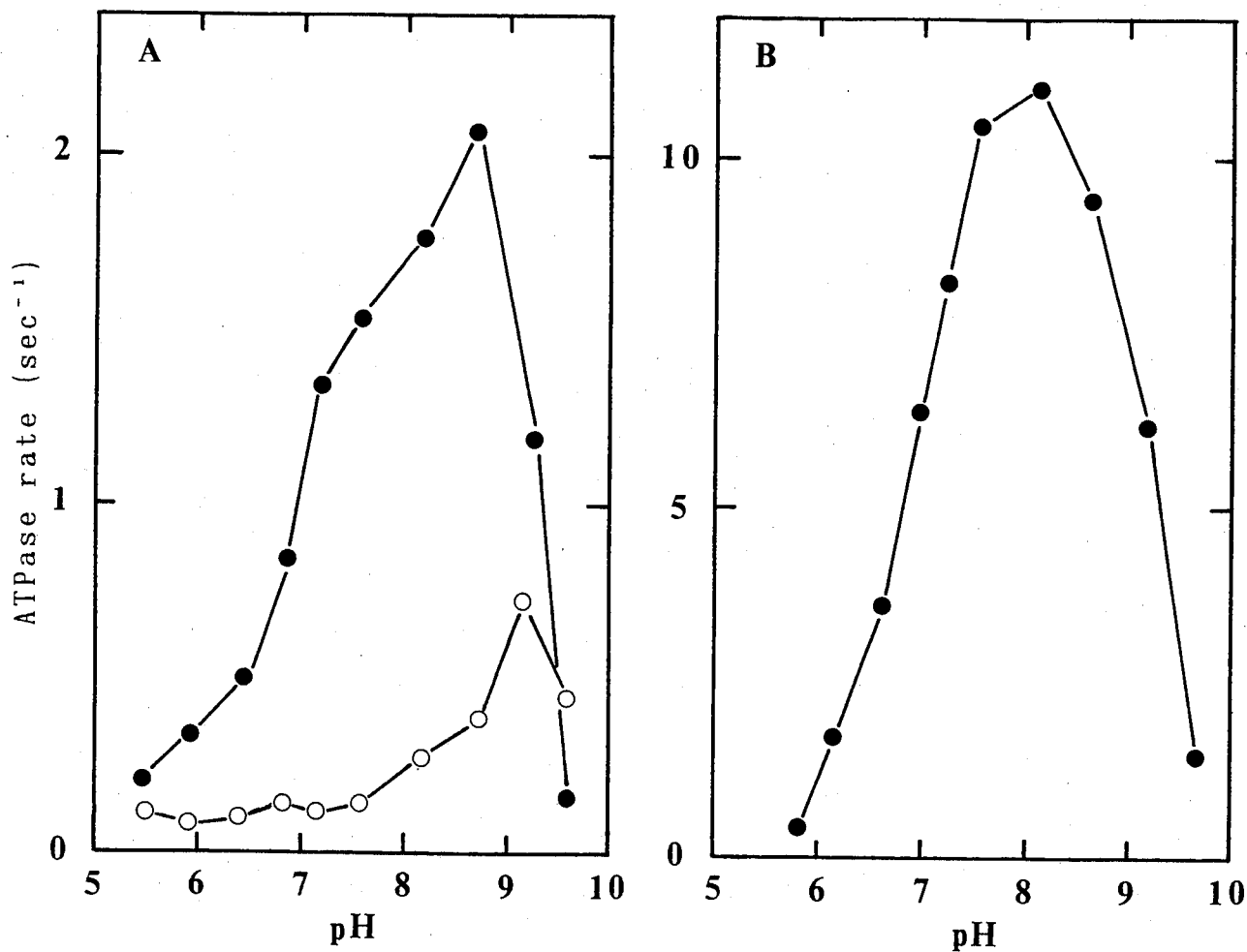


図35 ホタテ貝柱平滑筋ミオシンのATPase活性のpH依存性

A, Mg²⁺-ATPase 活性; アクチン非存在下 (○) のときの測定条件は、0.1mg/mlミオシン 30mM KCl、3mM MgCl₂、0.1mM CaCl₂、50mM緩衝液、1mM ATP、15℃。

アクチン存在下 (●) のときの測定条件は、0.05mg/ml ミオシン、0.21mg/ml アクチン 30mM KCl、50mM緩衝液、3mM MgCl₂、0.1mM CaCl₂、1mM ATP、15℃。

B, EDTA(K⁺)-ATPase ; 測定条件は、0.05mg/ml ミオシン、0.5M KCl、50mM緩衝液、5mM EDTA、1mM ATP、15℃。

緩衝液は高いpH側の3点については Gly-KOHを、残りの点は His-KOHを用いた。測定後に反応混液のpHを測定した。

第三章 ミオシン制御軽鎖 (RLC-a) のリン酸化の影響

オパーク部ミオシンの制御軽鎖の一つである RLC-aのSer-11を、鶏砂囊平滑筋のミオシン軽鎖キナーゼでリン酸化し、定常状態の中間体の分子種がどうなるかを検討した。

1.5 M ショ糖存在下における紫外吸収差スペクトルを測定した結果を図36に示した。図24で示した非リン酸化ミオシンの結果とは異なり、RLC-aをリン酸化したミオシンは $-Ca^{2+}$ の場合でもATP型を示し時間がたつにつれてADP型に減衰した。Chanceの式を用いて減衰の半減期の値から定常状態におけるATPase活性の速度定数を求めると $0.005s^{-1}$ であった。同じミオシンを用いてATPase活性を測定し、リン酸の放出速度からATPase活性の速度定数を求めたところ、 $0.004s^{-1}$ であり両者はよく一致した。

$+Ca^{2+}$ においても差スペクトルはATP型を示し、ATPが消費されるにつれてADP型に減衰した。減衰の半減期の値から速度定数を求めると $0.019s^{-1}$ で、リン酸の放出速度から求めた値と一致した。

同様の測定を行なった結果を表7にまとめて示した。いずれの場合においても、差スペクトルの減衰の半減期の値から計算した速度定数とリン酸の放出速度から求めた値がよく一致している。これらの結果は、RLC-a がリン酸化されたオパーク部ミオシンは $+Ca^{2+}$ の時のみならず、 $-Ca^{2+}$ においてもATPase反応の定常状態における中間体はATP型を示す分子種であるE·ADP·Pであることを示す。なおRLC-a をリン酸化しても定常状態のATPase活性の速度定数の値は、非リン酸化ミオシンのものと比べて変わらなかった。

次に1.5M ショ糖非存在下において、リン酸化ミオシンのTrp残基のけい光強度の測定を行なった。図37に示したように、 $+Ca^{2+}$ 、 $-Ca^{2+}$ どちらの場合も、ATP を添加するとけい光強度が約4%増加した。この増加の程度は非リン酸化ミオシンの $+Ca^{2+}$ の場合と同じであった(図25)。このことから、1.5 M ショ糖非存在下においてもリン酸化ミオシンは、 Ca^{2+} のあるなしにかかわらず、定常状態

における中間体が $E \cdot ADP \cdot P$ であると考えられる。

次に、リン酸化ミオシンの溶解度の測定を行なった。図38に $-Ca^{2+}$ における結果を示した。第一部で述べたようにヌクレオチド存在下の方がミオシンは溶けやすくなった。さらに ATP と ADP 存在下で比較すると ATP 存在下の方がより溶けやすくなった。この結果はトランスルーセント部ミオシンおよび横紋筋ミオシンの場合と同様である。非リン酸化オパーク部ミオシンについては $-Ca^{2+}$ において ATP と ADP が溶解度の変化に対して同様の影響を示したことから（図28）、このミオシンは $-Ca^{2+}$ において $E \cdot ADP$ の中間体をしていると考えた。RLC-a をリン酸化すると、キャッチ状態になれないトランスルーセント部および横紋筋のミオシンと同様に ATP 存在下と ADP 存在下の溶解度が異なってしまう、リン酸化オパーク部ミオシンの中間体が $E \cdot ADP \cdot P$ であるのではないかと考えられる。

以上の結果から、RLC-a がリン酸化されると、オパーク部ミオシンの定常状態における中間体はアクチンと親和性の低い $E \cdot ADP \cdot P$ になり、筋肉がキャッチ状態から弛緩状態に移る可能性があると考えられる。

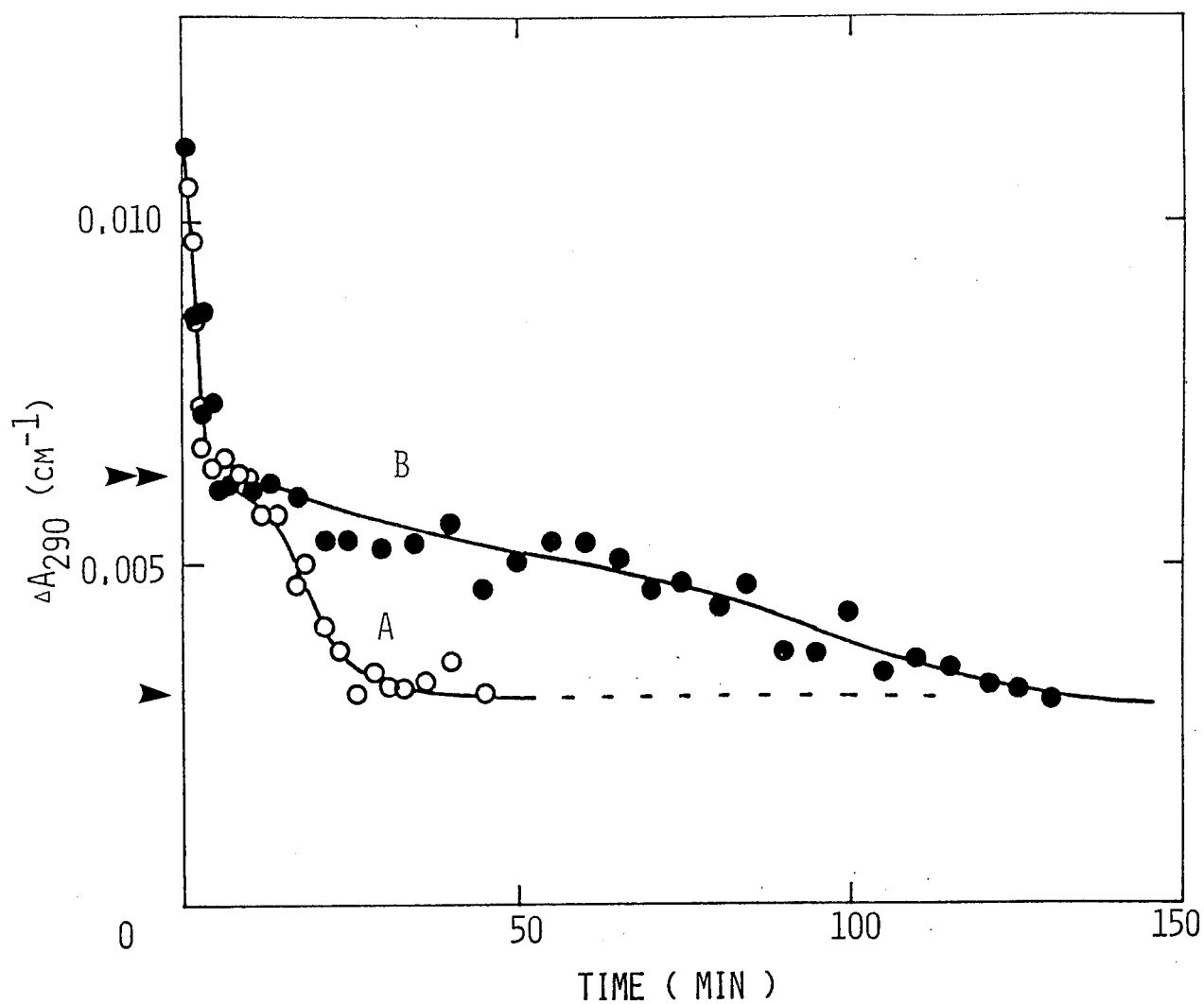


図36 RLC-a をリン酸化したオパーク部ミオシンの紫外外部吸収差スペクトルの ΔA_{290} の時間変化

測定条件は、1.5Mショ糖、2.4 μ M ミオシン、40mM KCl、20mM MOPS-KOH (pH7.0)、5mM $MgCl_2$ 、15°C。Aは0.1mM Ca^{2+} 存在下、Bは1mM EGTA存在下。ATP 添加量は、49.6 (○)、51.2 (●) μ M。

二重矢印と矢印はそれぞれ、ATP型とADP型に相当する ΔA_{290} の値のレベルを示している。

	[ATP] (μM)	[myosin] (μM)	τ (sec)	Rate constant determining the steady state ATPase (sec^{-1})	
				From τ^a	From Pi^b
+Ca ²⁺	49.6	2.48	1080	0.019	0.019
	58.6	3.12	900	0.021	-
-Ca ²⁺	21.5	2.77	940	0.008	0.008
	46.7	2.81	2260	0.007	0.008
	51.2	2.34	4300	0.005	0.004
	58.9	2.79	3420	0.006	0.004

表7 リン酸化オパーク部ミオシンの紫外部吸収差スペクトルの測定結果のまとめ
測定条件および記号等の説明は表4と同じである。ただし RLC-aをリン酸化したミオシンを用いた。

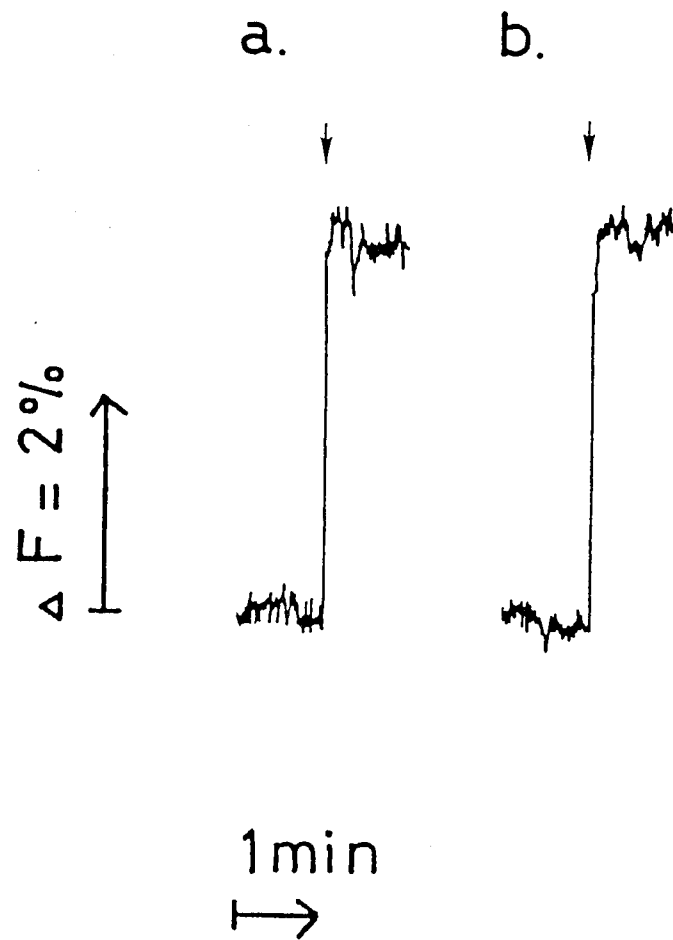


図37 ATP添加によるリン酸化オパーク部ミオシンの Trpのけい光スペクトルの増加
測定条件は図25と同じである。ただし RLC-aをリン酸化したミオシンを用いた。矢印で
示した時間に20 μM の ATPを添加した。aは0.1mM Ca^{2+} 存在下、bは1mM EGTA存在下。

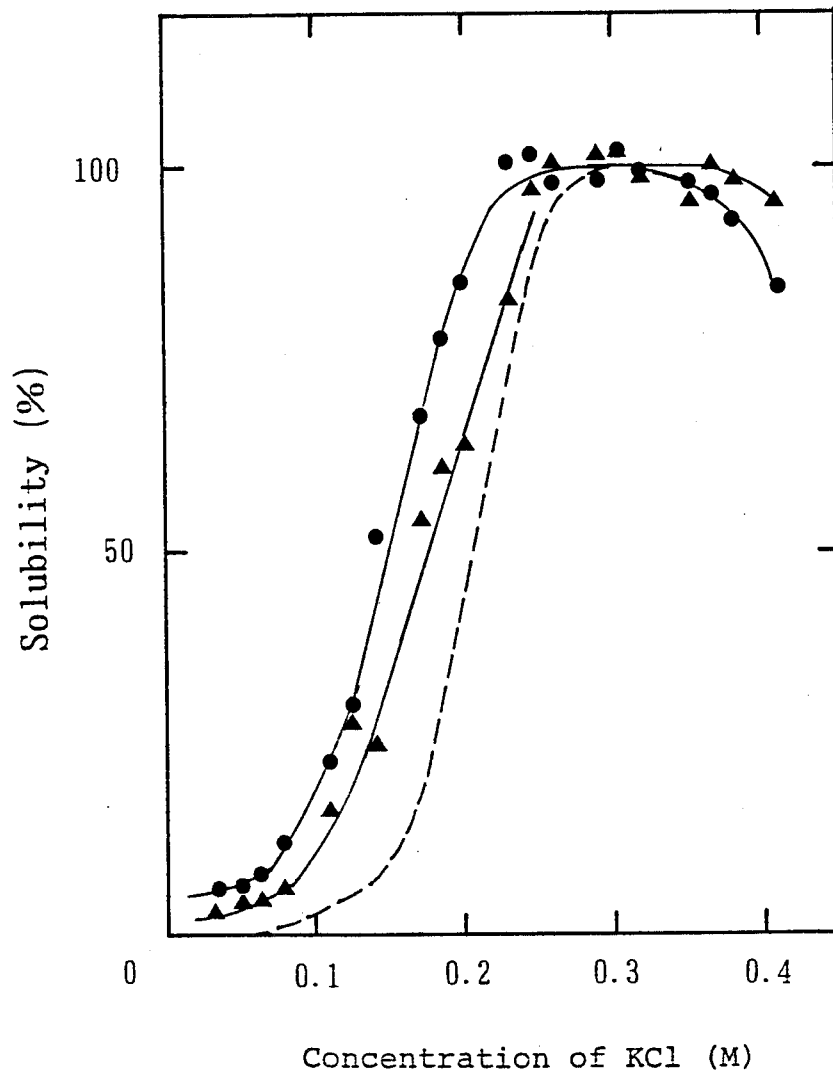


図38 Ca^{2+} 非存在下におけるリン酸化オパーク部ミオシンの溶解度

測定条件は、0.49mg/ml ミオシン、30mM MOPS-KOH (pH7.0)、3mM MgCl_2 、1mM EGTA、7.14%グリセリン、15℃。●は 1mM ATP存在下、▲は0.384mM ADP 存在下、破線はヌクレオチド非存在下。

考察

キャッチ収縮は細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少したときにおこる現象なので Ca^{2+} によって影響を受ける物質がキャッチ収縮の鍵を握っていると考えられる。またキャッチ状態ではエネルギー消費が少ないのに張力が維持されている。これらのことから、キャッチ筋の中で Ca^{2+} を結合しATPase活性をもつミオシンがキャッチ収縮の重要な役割をしているということが予想される。

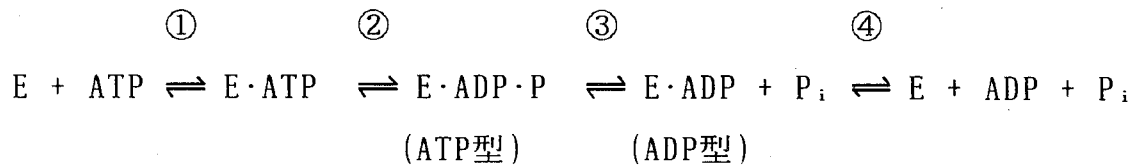
ホタテ貝柱平滑筋の特徴はキャッチ状態をとることができるということともう一つ収縮～弛緩の制御がミオシンの制御軽鎖への Ca^{2+} 結合によって行なわれているということである。ホタテのミオシンを用いて実験するときはミオシンATPase活性が Ca^{2+} 感受性を示す条件で行なわなければならない。表3に示したようにオパーク部ミオシンのATPase活性の Ca^{2+} 感受性はイオン強度に強く依存した。今野らは、イカの外套筋のミオシンATPase活性が0.4M以上のKCl濃度で Ca^{2+} 感受性を消失するということを報告している(84)。イオン強度を高くするとATPaseの Ca^{2+} 感受性が消失するという性質は軟体動物のミオシンの特徴かもしれない。

キャッチ状態においては、ミオシンとアクチンが強い結合をしていると考えられるので、ミオシンとアクチンの見掛けの解離定数 K_{app} がキャッチ状態になる $-\text{Ca}^{2+}$ において $+\text{Ca}^{2+}$ に比べて小さくなるのではないかと考えられる。 Ca^{2+} のあるなしでアクチン濃度を変えてATPase活性を測定し K_{app} を求めたところ、 Ca^{2+} のあるなしで変化しなかった。これは、たぶん微量混在している Ca^{2+} 感受性を失ったミオシンが $-\text{Ca}^{2+}$ においても高いATPase活性をだしてしまい正常なミオシンのATPase活性の様子を隠してしまっているせいだと思われる。WellsとBagshawはホタテのアクトミオシンのATPase活性を定常状態において測定すると Ca^{2+} によってたかだか10—25倍しか活性化されないように見えるけれども、実際にはアクト—HMMの場合でも Ca^{2+} によってATPase活性が650倍も活性化されるということを報告している(85)。このことから、定常状態法によって

-Ca²⁺におけるATPase活性の値を求めると実際のものよりかなり大きく見積もられてしまい、それはほんの少し混在しているCa²⁺感受性を失ったミオシンのせいであると言っている。これらのことからキャッチ収縮のおこる-Ca²⁺における情報を、ATPase活性の定常状態法による測定から得ることは難しいと考えられる。

混在しているCa²⁺感受性を失ったミオシンは微量であると考えられるので、直接ミオシンのコンホメーションを見る紫外外部吸収差スペクトルの測定の場合にはそれらの影響は無視できる。しかし、ミオシンはATPase活性がCa²⁺感受性を示す低イオン強度下においては会合してフィラメントを形成してしまい溶液が濁ってしまう。紫外外部吸収差スペクトルは溶液が濁っていると測定が困難になる。このような場合には、ミオシンの中のフィラメントを形成する部分であるLMMの部分を切り取って除き、HMMを調整して実験をおこなうのが定法であるが、オパーク部ミオシンからはCa²⁺感受性のあるHMMを調整することができなかった。そこで低イオン強度下でもミオシンが溶解していて差スペクトルが測定できる条件を探したところ、ショ糖を1.5M加えるとミオシン懸濁液の濁度が減少し、紫外外部吸収差スペクトルの測定が可能になった(図21)。この条件下ではATPase活性のCa²⁺感受性も保存されていた(図22)。なお1.5Mショ糖存在下における紫外外部吸収差スペクトルの測定結果は(図23, 24, 36, 表4, 7)、1.5Mショ糖非存在下におけるけい光スペクトルの測定結果と同様であったので(図25, 37)、ショ糖によるアーティファクトではないと思われる。

キャッチ収縮においてミオシンが重要な役割をしていると考えられるが、ミオシンのATPaseの反応機構は、ウサギ骨格筋ミオシンを用いた研究によって確立されている(83, 86)。実際はかなり複雑な反応であるが単純化すると次のようになる。



ミオシンに ATPが結合するとアクチンに対する親和性が小さくなる。ATPがミオシンによって ADPとリン酸に加水分解された後、リン酸が活性部位から離れると再びアクチンとの親和性が増加する。すなわち、ミオシンATPase反応の本質は ATPを分解する間にアクチンに対して弱い結合と強い結合の状態を繰り返すサイクルであるということだと考えられる。ミオシンは弱い結合の状態の時、アクチンに対して90°の角度で結合し、強い結合のときは45°の角度で結合しているという Eisenbergらの説がある(24,87)。ミオシンが

ATPを分解するときにミオシンのアクチンに対する結合角度が変りフィラメント間が滑りあうという、いわゆるミオシンのヘッドの首振り説(88,89)の分子モデルである。確かに Rigorや ADPが結合した状態のときミオシンは45°の角度でアクチンに結合しているという報告はあるが(90,91)、実際に筋収縮中に角度が変化している証拠は見つかっていない。この強い結合と弱い結合の様式を明らかにすることが、筋収縮の分子メカニズムの解明につながるに違いない。

ホタテの貝柱筋のミオシンのATPaseの反応機構も本質的にウサギ骨格筋ミオシンのものと同様であることが判明している(70,76,77,92)。第一章で述べた結果、特に紫外吸収差スペクトルの測定結果(図23,24,表4)からオパーク部ミオシンの、ATPase反応の定常状態における中間体は+Ca²⁺においては E·ADP·Pであるが、-Ca²⁺においては E·ADPであることがわかった。すなわち、Ca²⁺濃度が減少するとATPase反応の律速段階がステップ③からステップ④に移動する。このようなCa²⁺濃度による律速段階の変化は、今まで報告されていないので、この現象はキャッチ収縮を行なうことのできるホ

タテ貝柱平滑筋オパーク部ミオシンに特有のものであると考えられる。これらのことから、細胞内の Ca^{2+} 濃度が減少したときに起こるキャッチ状態においてオパーク部ミオシンはアクチンと強い結合をする $\text{E} \cdot \text{ADP}$ の状態になっていると考えられる。ウサギ骨格筋を用いた研究から $\text{E} \cdot \text{ADP}$ は $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ に比べてかなり高い親和性を示すことがわかっている (93,94)。

第二章で述べた結果から、アクチン存在下におけるオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体は $-\text{Ca}^{2+}$ ではミオシンのみの場合と同様に $\text{E} \cdot \text{ADP}$ であり、 $+\text{Ca}^{2+}$ ではミオシンのみの時の一つ前のステップ②が律速段階になり $\text{E} \cdot \text{ATP}$ が中間体になっていると考えられる。

ウサギ骨格筋アクトミオシンのATPase反応の律速段階はステップ③であり、アクトミオシンの場合は、それより前のステップが律速になると考えられているが、それについては二つの異なった意見がある。一つはTaylorらによるもので、アクトミオシンATPaseはリン酸の初期突発がないことから ATPの加水分解のステップ②が律速段階で、 $\text{E} \cdot \text{ATP}$ が定常状態の中間体であるという説である (95)。もう一つは、Eisenberg らによるもので、リン酸の初期突発がアクトミオシンATPaseでも存在するという実験結果から、ステップ②とステップ③の間にもう一つ $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}(\text{I}) \rightleftharpoons \text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}(\text{II})$ というミオシンのコンホメーション変化のステップを考え、ここが律速であり $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}(\text{I})$ が中間体であるという説である (96,97,98)。どちらでも本質的に問題はないと思われるが、実験装置の精度があがる、すなわち反応を止めるための時間誤差が減少すると、リン酸の初期突発はない方向に結果がでると考えられるので、Taylor説が有力であると思われる。

ウサギ骨格筋のアクトミオシンATPaseはすでに活性化された状態にあり、ホタテのアクトミオシン ATPaseの $+\text{Ca}^{2+}$ の場合と同様であると考えられ、両者ともミオシンのみの時の一つ前のステップ②が律速段階になり、 $\text{E} \cdot \text{ATP}$ が中間体である可能性が高い。

オパーク部ミオシンには2種の制御軽鎖があり(16,17)、そのうちの RLC-aのSer-11がリン酸化されることがわかっている(19)。第三章で述べた結果から、RLC-a をリン酸化するとATPase反応の定常状態における中間体が Ca^{2+} のあるなしにかかわらずE·ADP·P になることがわかった。このことは、リン酸化によってオパーク部ミオシンが、 Ca^{2+} のあるなしにかかわらずステップ③が律速段階であるホタテ貝柱横紋筋ミオシンと同様の性質(76,77,92)に変化したということを示唆する。言い換えると、リン酸化していないオパーク部ミオシンのATPase反応の定常状態における中間体が Ca^{2+} 感受性を示すという性質は非常に独特であり、それが RLC-aのリン酸化によって解除されるのかもしれないということをこの結果は示唆している。

オパーク部ミオシンの2種の制御軽鎖 RLC-aおよび RLC-bのN端部分の一次構造を次に示す(18)。

RLC-a	x-A D K E R A Q R A T <u>S</u> N V F A R L P Q K L M
RLC-b	x-A D K A A S G V L T K L P Q K Q I

S はリン酸化される部位を示している。RLC-a には RLC-bまたはホタテ貝柱横紋筋ミオシンの制御軽鎖(99)と比較するとN端に余分に5残基のアミノ酸が存在する。この5残基の中に2残基の塩基性のアミノ酸 Lysと Argが含まれており、これらがオパーク部ミオシンに特有の性質を与えているのかもしれない。Ser-11がリン酸化されると、これらの塩基性残基のプラスの電荷が取り込まれたリン酸の2個のマイナスの電荷によって中和されて、オパーク部ミオシン独特の性質を解除するのかもしれない。制御軽鎖のN端が筋収縮の制御機能に重要な役割をしているということが、Photo-cross-linking 技術による研究(100)、トリプシン消化による研究(101)遺伝子操作による特定部位の突然変異誘発技術による制御軽鎖のミュータントを用いた研究(102)によって明らかになってきている。特に RLC-aのN端は RLC-bに比べてトリプシンによって消化されや

すいことからミオシンの頭部から外側に向かって突き出ているのではないかと考えられている(101)。

以上述べてきたことから考えられるキャッチ収縮の分子機構を提出する(図39)。刺激がきて細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加し、ミオシンの制御軽鎖に Ca^{2+} が結合すると、筋肉が活性化状態になり収縮する(Step I)。活性化状態では、 $-\text{Ca}^{2+}$ の時に比べてATPase活性が高く、ステップ③が律速段階である。実際の筋肉ではアクチンが存在しているのでステップ②が律速段階になっている可能性がある。刺激が停止し、 Ca^{2+} 濃度が減少すると、制御軽鎖から Ca^{2+} が解離してキャッチ状態になる(Step II)。キャッチ状態においてはATPase反応の律速段階がステップ④に変わり、またATPase活性は抑制される。言い換えるとADPがミオシンの活性部位内に閉じ込められてATPと入れ代わりにくくなっている。 $\text{E} \cdot \text{ADP}$ の分子種はアクチンと強く結合でき、またこの状態では Ca^{2+} 非存在下でATPase活性も低いのでエネルギー消費を抑えて収縮状態を保つことができるに違いない。オパーク部ミオシンのRLC-aがリン酸化されると、キャッチ状態が解除され弛緩状態になる(Step III)。リン酸化によってATPase活性の律速段階がステップ④からステップ③に変わり、定常状態の中間体が $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ になる。この分子種はアクチンとの親和性が低いので、弛緩状態になることができる。

図40に各状態の律速段階とATPase活性の関係についてモデルで示した。キャッチ状態においては、定常状態における中間体がアクチンと結合の強い分子種の $\text{E} \cdot \text{ADP}$ であるので、張力を保つことができる。ところが活性化状態においては、中間体が弛緩状態と同じくアクチンとの結合の弱い分子種の $\text{E} \cdot \text{ADP} \cdot \text{P}$ あるいは $\text{E} \cdot \text{ATP}$ である。活性化状態においても、もちろん大きな張力を出さなければならないが、それはATPase活性の回転を速くしてアクチンに対して強い結合を示す状態を頻繁につくることによって可能にしていると考えられる。逆に言えば、強い結合状態を頻繁につくり張力を出すために、活性化状態ではATPase活性が高くなるのだと考えられる。弛緩状態

では中間体がアクチンとの結合の弱い分子種でありATPase活性の回転も遅い。

キャッチ収縮に関して、古くから「パラミオシン説」(11,12)と「アクトミオシン説」(13,14)があるが、ここで提出した説はミオシンとアクチン間のクロスブリッジがゆっくり切れることによりキャッチ状態が保たれるという「アクトミオシン説」の考え方と一致しこの説の生化学的レベルの分子機構を提出したとも考えられる。

この分子機構によると、制御軽鎖 RLC-aのリン酸化によってオペラーク部ミオシンが他の一般的なミオシンと同様の性質を持つようになって弛緩状態になることになる。相馬らによって発見され精製された RLC-aをリン酸化する内在性のリン酸化酵素 a M K は、このことに関して非常に都合良い性質をもっている。脊椎動物のミオシン軽鎖リン酸化酵素 M L C K は、活性化に Ca^{2+} -カルモデュリンが必要であるが、a M K は Ca^{2+} -カルモデュリンを必要とせず、逆に高濃度の Ca^{2+} によって活性が阻害される (20,103)。さらに、cAMP に依存して a M K の活性を制御する内在性の因子 (41K タンパク質) も見つかっている (21)。スキンドファイバーを用いた研究によって、cAMP がキャッチ収縮を解除することがわかっている (6, 7)。a M K は活性化に Ca^{2+} を必要とせず cAMP によって制御され、そのような酵素がキャッチ筋内に存在することから、RLC-a のリン酸化によってキャッチ収縮が解除されるという可能性が大きいと考えられる。第二章において、アクチン存在下でもキャッチ状態において

ATPase 反応の中間体が E·ADP である可能性を示したが、RLC-a のリン酸化によってキャッチ状態が解除されるという証拠をつかまえることはできなかった。トリプシンによる限定分解の実験では、

RLC-a の N 端付近が反応の初期に切られてしまうことにより、また ϵ -aza-ADP を用いた実験では、たぶん ϵ -aza の部分が RLC-a のリン酸化による影響を反映できなかったことによると思われる。

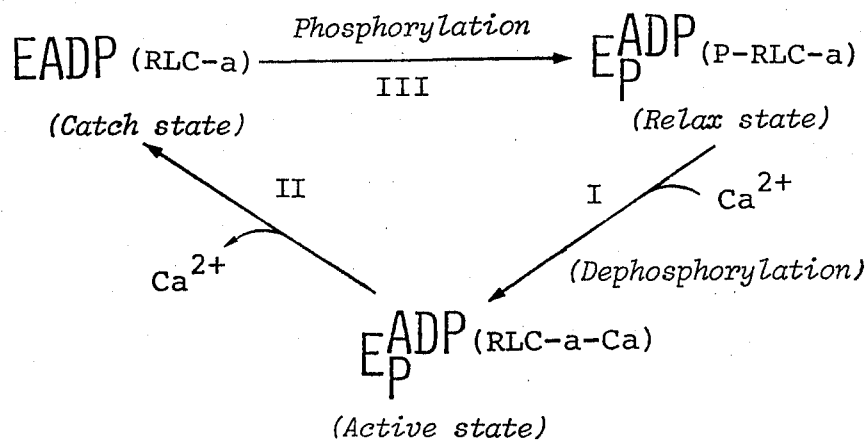


図39 RLC-a の状態およびオバーク部ミオシンのATPase中間体と筋肉の状態を示したスキーム

かっこ内に RLC-aの状態を示した。P-RLC-a および RLC-a-Ca はそれぞれリン酸化した RLC-aおよび Ca^{2+} を結合した RLC-aを表わす。E·ADP·P および E·ADPは考えられるミオシンATPase中間体の分子種を表わす。活性化状態の中間体は E·ATPである可能性もある。

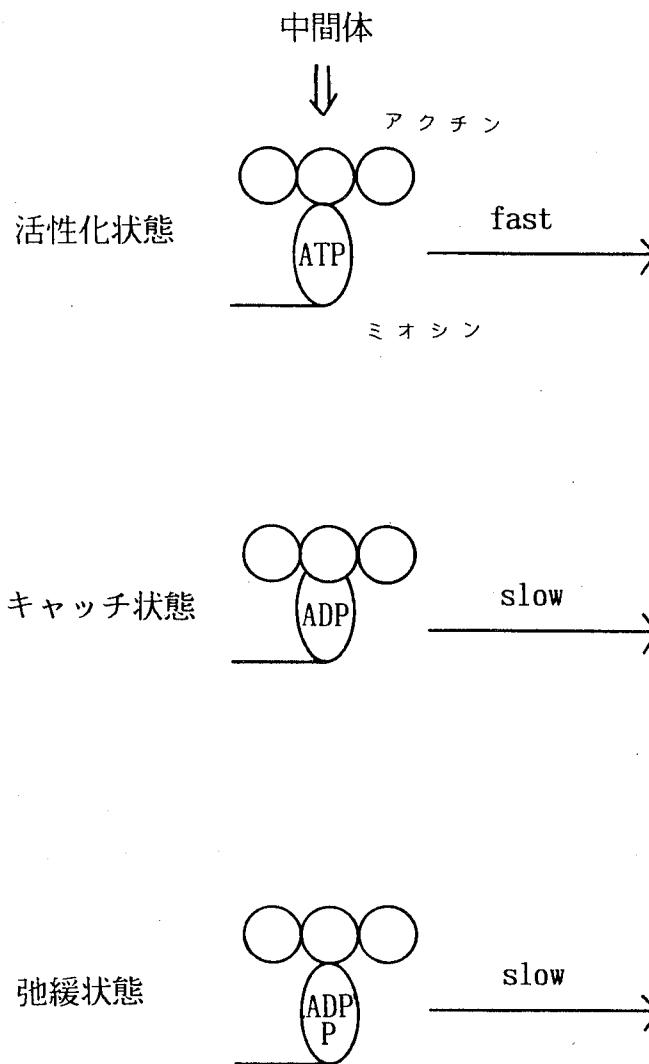


図40 筋肉の各状態におけるオパーク部ミオシンのATPase反応の律速段階と速度の関係

ミオシンの頭部内に結合しているヌクレオチドの状態を示している。ATP およびADP・Pが結合しているときはアクチンと弱い結合を、ADP が結合しているときおよび何も結合していないときはアクチンと強い結合をしている。活性化状態および弛緩状態における中間体はアクチンと結合の弱い分子種であるのに対し、キャッチ状態では結合の強い分子種である。

図39に示した分子機構のサイクルが完成するためには、キャッチ状態になる前までに、すなわちStep I またはStep II で RLC-aが脱リン酸化しなければならない。リン酸化ミオシンのATPase活性は、リン酸化していないミオシンのものとほとんど同じ値を示した(表4, 7)。ミオシンがリン酸化していても、活性化状態に必要なエネルギーを供給できるのかもしれない。しかし、もし Ca^{2+} によって活性化される脱リン酸化酵素、たとえばカルモデュリン依存性プロテインフォスファターゼ(2B)のようなもの(104)がキャッチ筋内に存在すると、Step I でミオシンは脱リン酸化し活性化状態になると考えられる。最近、井上らによって、キャッチ筋から Ca^{2+} -カルモデュリンに依存してミオシンに結合した RLC-aを脱リン酸化するフォスファターゼが精製された(105)。以上のことから脱リン酸化はStep I で起こると考えられる。

最近、Castellaniと CohenがムラサキイガイのABRMのミオシン重鎖のC端付近の部分が、c-AMP 添加によってリン酸化され、それによってキャッチ状態が解除されるのではないかと報告した(15)。リン酸化によってキャッチ状態が解除されるという点では、図39で示した説と同じである。aMKはRLC-aをリン酸化する酵素として発見されたが、オパーク部、トランスルーセント部及びホタテ貝柱横紋筋のミオシン重鎖、またパラミオシンまでリン酸化することがわかった(107)。重鎖のリン酸化はキャッチ筋のミオシンに特異的ではないので、直接キャッチに関係しているとは考えにくい。aMKはRLC-aをリン酸化するとき、すでにミオシン重鎖をリン酸化している可能性がある。これらの種々のリン酸化と生理機能の関係を明らかにすべきであると考えられる。本研究では、多量のリン酸化ミオシンを調整できるという理由で、aMKの代わりに、鶏砂囊筋MLCKによってRLC-aのSer-11をリン酸化した。MLCKはオパーク部ミオシンの重鎖をまったくリン酸化しなかった。本研究においてはRLC-aのリン酸化の効果のみを見ることができた。

図30.31.32. 表6の実験結果から考えられるオパーク部ミオシンのトリプシンにより消化されるサイトについて図41に示した。トリプシン消化はミオシンがフィラメントを形成している低イオン強度下でおこなったので、最初に切られるのはミオシンの頭部のどこかであり、それはN端から74KのAで示したサイトであると考えられる。このAサイトはATP存在下において Ca^{2+} 非存在下に切られにくくなる。またアクチン存在下においてミオシンのみの場合に比べて切られにくくなる。すなわちAサイトの消化される速度には、アクチン感受性とATP存在下における Ca^{2+} 感受性がある。またRigorのとき、ミオシン重鎖からごくわずかの部分が切られ重鎖のすぐ下に新たなバンドが生成したが、これはBサイトが切られたことにより生成すると考えられる。Bサイトはミオシンにヌクレオチドが結合しているときに切られにくくなったので、ATPase活性部位付近のサイトであると思われる。

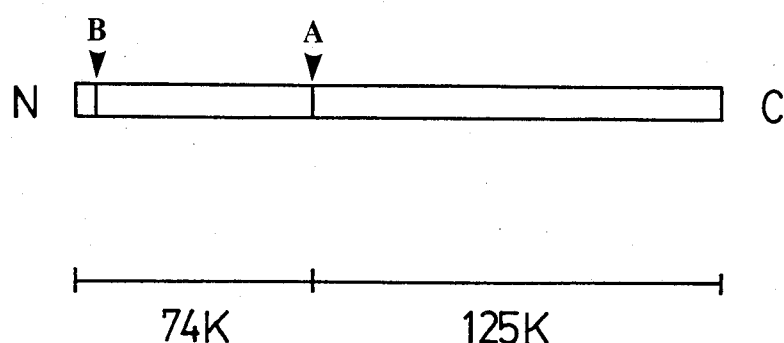


図41 オパーク部ミオシン重鎖のトリプシンによって消化されるサイト
NおよびCはそれぞれN端およびC端を表わす。

このようにオパーク部ミオシンは、 Ca^{2+} 、ATP、ADPの結合によって微妙にコンホメーションを変化し、アクチンに対する親和性を変えていると考えられる。 Ca^{2+} が結合するのはミオシンの制御軽鎖である。制御軽鎖は、ミオシン頭部の首ねっこ付近にあると考えられており(107)、その制御軽鎖への Ca^{2+} 結合の情報がどのようにしてATPase活性部位に伝わるのかを明らかにすることは、筋収縮の制御機構の解明に対して重要な意味をもっていると思う。最近、制御軽鎖ばかりでなく必須軽鎖も制御に重要な役割をしているらしいということが報告されている(100,108)。

オパーク部ミオシンの制御軽鎖にはRLC-aとRLC-bの2種があり(16)、RLC-aのリン酸化のみでキャッチ収縮が解除されるのは実に不思議な現象である。オパーク部におけるRLC-aとRLC-bの存在比は約1:1である。盛田と近藤は、ATPase活性とRLC-aおよび

RLC-bの存在比から、キャッチ筋にはミオシン(a,a)、ミオシン(a,b)、ミオシン(b,b)の3種のアイソザイムが存在するのではないかと予想した(17)。RLC-aのリン酸化によってすべてのミオシンの頭部がキャッチ状態から弛緩状態になる。すなわちすべての頭部において中間体がE·ADPからE·ADP·Pに変わることを用いてうまく説明するためには、オパーク部ミオシンにはミオシン(a,b)のヘテロダイマーしか存在せず、片方の頭部に結合しているRLC-aがリン酸化されると、その情報がもう一方の頭部にまで伝わるという仮定が一番考えやすいと思われる。

WellsとBagshawがホタテの横紋筋のHMMも、 Ca^{2+} 非存在下においてE·ADPからのADPの解離(ステップ④)の速度が遅くなるということを報告している(92)。しかしホタテ横紋筋のHMMの場合は、リン酸の放出すなわちステップ③がステップ④よりもっと遅くなるので、 $-\text{Ca}^{2+}$ における律速段階はステップ③である。ホタテのミオシンにおいては、ADPの解離(ステップ④)が多かれ少なかれ Ca^{2+} によって制御されていて、オパーク部ミオシンの場合はそれが極端になって、 $-\text{Ca}^{2+}$ においてステップ③より遅くなりキャッチ

状態をとることができるようになったのかもしれない。Bagshaw らの結果 (77,92) をもとにして、Ruegg もミオシンのATPase反応中間体とキャッチ収縮の関係について議論している (109)。

ウサギ骨格筋のミオシンも、低温状態において ADPの解離 (ステップ④) が律速段階になりうることは、盛田らによって報告されている (69,78)。低温状態においては、ウサギ骨格筋のHMMの差スペクトルが定常状態になる前に、すでに ATP型から ADP型に減衰した。MgCl₂ 存在下における転移温度は5℃であった (69,78)。同様の ADP解離速度の温度変化がウサギ骨格筋サブフラグメント-1の Trpのけい光強度の測定結果からも報告されている (75)。キャッチ状態におけるオパーク部ミオシンのコンホメーションと低温状態における骨格筋ミオシンのコンホメーションは似ているかもしれない。

脊椎動物の平滑筋も latchと呼ばれるキャッチと似た状態をとることが知られている (110)。キャッチはCa²⁺濃度が減少したときになる状態であるが latch はミオシンの制御軽鎖が脱リン酸化した後も張力が保たれる状態である。この latch状態においても、ミオシンはキャッチ状態と同様に E·ADPの中間体をとっているかもしれない。Sellers も Bagshawらの報告 (92) に触発されて同様のことを考えているようである (111)。最近、カルデスモンが E·ADPからの ADPの解離を抑制しているのではないかということを報告している (112)。

どのようなミオシンでも条件によっては、ATPase反応の中間体が E·ADP になることができるのかもしれない。これはミオシンが本来もつ重要な性質であり、キャッチ筋はこの性質を巧妙に生かしているのかもしれない。

キャッチ機構のことを日本語では止め金機構と呼ぶが、本研究はこの止め金の正体がミオシン活性部位に閉じ込められたADPであるということを提案するものである。

引用文献

1. Nauss, K.M. & Davies, R.E. (1966) *Biochem. Z.* 345, 173-187
2. Twarog, B.M. (1960) *J. Physiol.* 152, 235-242
3. Ruegg, J.C. (1971) *Physiol. Rev.* 51, 201-248
4. Achazi, R.K. (1974) *Pflugers Arch.* 349, 19-27
5. Twarog, B.M. (1979) in *Motility in Cell Function* (Pepe, F.A., Sanger, J.W., & Nachmias, V.T., eds.) pp. 231-241, Academic Press, New York, London, Sydney, Toronto, San Francisco
6. Cornelius, F. (1982) *J. Gen. Physiol.* 79, 821-834
7. Pfitzer, G. & Ruegg, J.C. (1982) *J. Comp. Physiol.* 147, 137-142
8. Achazi, R.K. (1979) *Pflugers Arch.* 379, 197-201
9. Cooley, L.B., Johnson, W.H., & Krause, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2195-2198
10. Cohen, C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 79, 3176-3178
11. Ruegg, J.C. (1961) *Proc. R. Soc. London Ser. B* 154, 224-249
12. Johnson, W.H., Kahn, J.S., & Szent-Gyorgyi, A.G. (1959) *Science* 130, 160-161
13. Hanson, J. & Lowy, J. (1959) *Nature* 184, 286-287
14. Lowy, J. & Millman, B.M. (1959) *Nature* 183, 1730-1731
15. Castellani, L. & Cohen, C. (1987) *Science* 235, 334-337
16. Kondo, S. & Morita, F. (1981) *J. Biochem.* 90, 673-681
17. Morita, F. & Kondo, S. (1982) *J. Biochem.* 92, 977-983
18. Miyanishi, T., Maita, T., Morita, F., Kondo, S., & Matsuda, G. (1985) *J. Biochem.* 97, 541-551
19. Sohma, H., Yazawa, M., & Morita, F. (1985) *J. Biochem.* 98, 569-572
20. Sohma, H. & Morita, F. (1986) *J. Biochem.* 100, 1155-1163
21. Sohma, H., Inoue, K., & Morita, F. (1988) *J. Biochem.* 103, 431-435
22. Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E.M., & Szent-Gyorgyi, A.G. (1976) *J. Mol. Biol.* 104, 747-775

23. Ashiba, G., Asada, T., & Watanabe, S. (1980) J. Biochem. 88, 837-846
24. Eisenberg, E. & Hill, T.L. (1985) Science 227, 999-1006
25. Morita, F., Katoh, T., Suzuki, R., & Yagi, K. (1987)
in Perspectives of Biological Energy Transduction (Mukohata, Y.,
Morales, M.F., & Fleischer, S., eds.) pp.73-80, Academic Press,
Japan
26. Takahashi, M., Fukushima, Y., Inoue, K., Hasegawa, Y., Morita, F.,
& Takahashi, K. (1989) J. Biochem. in press
27. Takahashi, M. & Morita, F. (1986) J. Biochem. 99, 339-347
28. Takahashi, M., Sohma, H., & Morita, F. (1988) J. Biochem. 104,
102-107
29. Morita, F., Sohma, H., Takahashi, M., Goshi, K., & Inoue, K. (1988)
in Calcium Signal and Cell Response (Yagi, K. & Miyazaki, T.
eds.) pp.107-117, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo /Springer-Verlag,
Berlin
30. Perry, S.V. (1955) in Methods in Enzymology (Colowick, S.P. &
Kaplan, N.O., eds.) Vol. 2, pp. 582-588, Academic Press, Inc.,
New York
31. Spudich, J.A. & Watt, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4866-4871
32. Bailey, K. (1948) Biochem. J. 43, 271-279
33. Ebashi, S., Wakabayashi, T., & Ebashi, F. (1971) J. Biochem. 69,
441-445
34. van Eerd, J.P. & Kawasaki, Y. (1973) Biochemistry 12, 4972-4980
35. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., & David, M.M. (1949) J. Biol. Chem.
177, 751-766
36. Porzio, M.A. & Pearson, A.M. (1977) Biochem. Biophys. Acta 490.
37. Williams, D.E. & Reisfeld, R.A. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121,
Art. 2, 373-381
38. Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254

39. Fiske, C.H. & SubbaRow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375-400
40. Lin, T.-I. & Morales, M.F. (1977) Anal. Biochem. 77, 10-17
41. Morita, F. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4501-4506
42. Johnson, R.E. & Adams, P.H. (1984) FEBS Lett. 174, 11-14
43. Inoue, A. & Tonomura, Y. (1974) J. Biochem. 76, 755-764
44. Onishi, H., Ohtsuka, E., Ikehara, M., & Tonomura, Y. (1973)
J. Biochem. 74, 435-450
45. Secrist III, J.A., Barrio, J.R., Leonard, N.J., & Weber, G. (1972)
Biochemistry 11, 3499-3506
46. Yip, K.F. & Tsou, K.C. (1973) Tetrahedron Letters 33, 3087-3090
47. Onishi, H. & Wakabayashi, T. (1982) J. Biochem. 92, 871-879
48. Trybus, K.M., Huiatt, T.W., & Lowey, S. (1982) Proc. Natl. Acad.
Sci. 79, 6151-6155
49. Craig, R., Smith, R., & Kendrick-Jones, J. (1983) Nature 302, 436-
439
50. Citi, S. & Kendrick-Jones, J. (1986) J. Mol. Biol. 188, 369-382
51. Kendrick-Jones, J., Smith, R.C., Craig, R., & Citi, S. (1987)
J. Mol. Biol. 198, 241-252
52. Mikawa, T., Toyooka, T., Nonomura, Y., & Ebashi, S. (1977)
J. Biochem. 81, 273-275
53. Sobue, K., Morimoto, K., Inui, M., Kanada, K., & Kakiuchi, S.
(1982) Biomed. Res. 3, 188-196
54. Somlyo, A.V., Butler, T.M., Bond, M. & Somlyo, A.P. (1981) Nature
294, 567-569
55. Ebashi, S. & Endo, M. (1986) Prog. Biophys. Mol. Biol. 18, 123-183
56. Szent-Gyorgyi, A. (1951) in Chemistry of Muscular Contraction, 2nd.
ed., Acad. Press, New York
57. Hayashi, J. & Hirabayashi, T. (1978) J. Biochem. 83, 341-348
58. Sobieszek, A. (1982) J. Mol. Biol. 157, 275-286
59. Sobieszek, A. & Small, J.V. (1981) Eur. J. Biochem. 118, 533-539

60. Lehrer, S.S. & Morris, E.P. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2070-2072
61. Williams, D.L., Jr., Greene, L.E., & Eisenberg, E. (1984)
Biochemistry 23, 4150-4155
62. Ikebe, M., Aiba, T., Onishi, H., & Watanabe, S. (1978) J. Biochem.
83, 1643-1655
63. Yamaguchi, M., Ver, A., Carlos, A., & Seidel, J.C. (1984)
Biochemistry 23, 774-779
64. Nosaka, S., Onji, T., & Shibata, N. (1984) Biochem. Biophys. Acta
788, 290-297
65. Konno, K. (1978) J. Biochem. 84, 1431-1440
66. Ojima, T. & Nishita, K. (1986) 100, 821-824
67. Asakawa, T., Azuma, N., & Morita, F. (1988) Seikagaku (in Japanese)
60, 727
68. Lehman, W., Head, J.F., & Grant, P.W. (1980) Biochem. J. 187, 447-
456
69. Morita, F. & Ishigami, F. (1977) J. Biochem. 81, 305-312
70. Kondo, S., Asakawa, T., & Morita, F. (1979) J. Biochem. 86, 1567-
1571
71. Pollard, T.D. (1982) Methods Enzymol. 85, 331-356
72. Chance, B. (1943) J. Biol. Chem. 151, 553-577
73. Morita, F. (1972) in Molecular Mechanism of Enzyme Action (Ogura,
Y., Tonomura, Y., & Nakamura, T., eds.) pp. 281-296, Univ. Tokyo
Press, Tokyo
74. Werber, M.M., Szent-Gyorgyi, A.G., & Fasman, G.D. (1972)
Biochemistry 11, 2872-2883
75. Bagshaw, C.R. & Trentham, D.R. (1974) Biochem. J. 141, 331-349
76. Shibata-Sekiya, K. (1982) J. Biochem. 92, 1151-1162
77. Wells, C., Warriner, K.E., & Bagshaw, C.R. (1985) Biochem. J. 231,
31-38
78. Morita, F. (1979) J. Biochem. 81, 313-320

79. Miyata, H. & Asai, H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 296-302
80. Nagano, H. & Yanagida, T. (1984) J. Mol. Biol. 177, 769-785
81. Smith, S.J. & White, H.D. (1985) J. Biol. Chem. 260, 15146-15155
82. Ishigami, F. & Morita, F. (1977) J. Biochem. 81, 297-303
83. Lynn, R.W. & Taylor, E.W. (1970) Biochemistry 9, 2975-2983
84. Konno, K., Arai, K., Yoshida, M., & Watanabe, S. (1981) J. Biochem. 89, 581-589
85. Wells, C. & Bagshaw, C.R. (1984) FEBS Lett. 168, 260-264
86. Tonomura, Y., (1972) Muscle Proteins, Muscle Contraction and Cation Transport. University of Tokyo Press.
87. Eisenberg, E. & Greene, L.E. (1980) Ann. Rev. Physiol. 42, 293-309
88. Huxley, H.E. (1969) Science 164, 1356-1366
89. Huxley, A.F. & Simmons, R.M. (1971) Nature 233, 533-538
90. Reedy, M.K., Holmes, K.C., & Tregear, R.T. (1965) Nature 207, 1276-1280
91. Craig, R., Greene, L.E., & Eisenberg, E. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 82, 3247-3251
92. Wells, C. & Bagshaw, C.R. (1985) Nature 313, 696-697
93. Greene, L.E. & Eisenberg, E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 543-548
94. Katoh, T. & Morita, F. (1984) J. Biochem. 96, 1223-1230
95. Rosenfeld, S.S. & Taylor, E.W. (1984) J. Biol. Chem. 259, 11908-11919
96. Stein, L.A., Schwartz, R.P., Jr., Chock, P.B., & Eisenberg, E. (1979) Biochemistry 18, 3895-3909
97. Stein, L.A., Chock, P.B., & Eisenberg, E. (1984) Biochemistry 23, 1555-1563
98. Stein, L.A., Greene, L.E., Chock, P.B., & Eisenberg, E. (1985) Biochemistry 24, 1357-1363

99. Maita, T., Konno, K., Ojima, T., & Matsuda, G. (1984) J. Biochem. 95, 167-177
100. Hardwicke, P.M.D., Wallimann, T., & Szent-Gyorgyi, A.G. (1983) Nature 301, 478-482
101. Morita, F., Kondo, S., Tomari, K., Minowa, O., Ikura, M., & Hikichi, K. (1985) J. Biochem. 97, 553-561
102. Reinach, F.C., Nagai, K., & Kendrick-Jones, J. (1986) Nature 322, 80-83
103. Sohma, H. & Morita, F. (1987) J. Biochem. 101, 497-502
104. Stewart, A.A., Ingebristen, T.S., & Cohen, P. (1983) Eur. J. Biochem. 132, 289-295
105. Inoue, K., Sohma, H., & Morita, F. (1988) Seikagaku (in Japanese) 60, 728
106. Sohma, H., Sasada, H., Inoue, K., & Morita, F. (1988) J. Biochem. 104, 889-893
107. Vibert, P., Szentkiralyi, E., Hardwicke, P.M.D., Szent-Gyorgyi, A.G., & Cohen, C. (1986) Biophys. J. 49, 131-133
108. Hardwicke, P.M.D., & Szent-Gyorgyi, A.G. (1985) J. Mol. Biol. 183, 203-211
109. Ruegg, J.C. (1986) Calcium in Muscle Activation, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo
110. Dillon, P.F., Aksoy, M.O., Driska, S.R., & Murphy, R.A. (1981) Science 211, 495-497
111. Sellers, J.R. (1985) J. Biol. Chem. 260, 15815-15819
112. Lash, J.A., Sellers, J.R., & Hathaway, D.R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 16155-16160

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始御指導いただいた八木康一教授、ならびに盛田フミ助教授に厚く感謝いたします。

多くの御教示、有益な御助言をいただいた矢沢道生講師、吉田幹晴博士、相馬仁博士に深く感謝いたします。

本研究を始めるにあたり、実験の御指導をしてくださった近藤修平博士に感謝いたします。

有益な討論をしてくださり貴重な御意見を述べていただいた、生物有機化学講座の皆様に感謝いたします。

ミオシンの電子顕微鏡写真を撮っていただいた北大農学部の高橋興威助教授に感謝いたします。

ミオシンの溶解度の測定を行なっていただいた福島由紀さんに感謝いたします。

ホタテ貝柱筋のタンパク質のプレパレーションを、一緒に夜遅くまで行なっていただいた峠茂樹君、郷司憲君、井上薫さんに感謝いたします。

本研究に際し、いろいろと御世話をしていただいた谷本澄枝様に感謝いたします。

化学第二学科移行時から、他学科の講義にまで共に足をはこび生化学を学び、本講座においても、貴重な討論をしていただいた篠田保彦君に感謝いたします。

本論文の作成にあたり、終始暖かく励ましてくださった花王城見寮の皆様、ならびに栃木第一研究所皮膚科学研究室の皆様に、感謝いたします。

最後に、著者の9年間の長きに及んだ学生生活に寛大な理解を示し、経済的な援助ならびに励ましをいただいた両親に感謝いたします。