



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	豚大動脈平滑筋ミオシンLC20リン酸化によるミオシンATPaseの調節機構
Author(s)	渡部, 通寿
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第4519号
Issue Date	1998-06-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3142085
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51558
Type	doctoral thesis
File Information	000000327277.pdf



豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 リン酸化
によるミオシン ATPase の調節機構
(学位論文)

北海道大学大学院
理学研究科化学第二専攻

渡部 通寿

平成10年

①

豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 リン酸化
によるミオシン ATPase の調節機構
(学位論文)

北海道大学大学院

理学研究科化学第二専攻

渡部 通寿

平成 10 年

目次

要旨	iii
略語一覧	vi
序論	1
実験方法	4
1 豚大動脈平滑筋ミオシン制御軽鎖のアミノ酸配列の決定	24
1.1 序	24
1.2 結果	24
1.3 考察	40
2 抗リン酸化ミオシン抗体によるミオシンリン酸化部位のマッピング	45
2.1 序	45
2.2 結果	46
2.3 考察	60
3 リン酸化による LC20 の構造変化	64
3.1 序	64
3.2 結果	65
3.3 考察	75
総括	79
参考文献	80
謝辞	86

図目次

1 DE32 による LC20 の調製	25
2 P-LC20 の KEP 消化断片の分離	27
3 LC20 の CNBr 断片のゲルろ過によるグループ分離	30
4 CNBr 断片の HPLC クロマトグラム	31
5 N 末端ペプチド断片の HPLC による分離	37
6 LC20 断片のオーバーラップと全一次構造	41
7 LC20 の一次構造の比較	42
8 DE32 による P-ペプチドの分離	47

9	ホスホアミノ酸分析	49
10	APMAb の精製	51
11	ELISA による APMAb の検出	52
12	電子顕微鏡観察視野の全体像	54
13	ミオシン-APMAb 複合体の電子顕微鏡像	55
14	ミオシン-APMAb 複合体の電子顕微鏡像観察の結果	56
15	APMAb によるアクトミオシン ATPase 活性の増加	58
16	抗体とアクト-P-ミオシンとの共沈	59
17	REP による LC20 の消化	66
18	REP によるミオシン限定分解の初速度	68
19	アクトミオシンの化学架橋	70
20	ミオシンの化学架橋	71
21	高塩濃度での化学架橋	72
22	^{32}P -ミオシンを用いた架橋反応	73
23	^{32}P -ミオシンの化学架橋産物の出現と消失の様子	74

表 目 次

1	P-LC20 の KEP 断片のアミノ酸組成分析結果	28
2	P-LC20 の KEP 消化断片のアミノ酸配列分析結果	29
3	LC20 の CNBr 断片のアミノ酸組成分析結果	33
4	LC20 の CNBr 断片のアミノ酸配列分析結果 (1)	34
5	LC20 の CNBr 断片のアミノ酸配列分析結果 (2)	35
6	LC20 の N 末端アミノ酸分析	38
7	CN1 の消化断片のアミノ酸配列分析の結果	39
8	リン酸化ペプチドのアミノ酸組成分析の結果	48
9	REP によるミオシンの限定分解の初速度	67

要旨

ミオシンは種々の生物の細胞に広く存在するモータータンパクの一種である。脊椎動物では筋肉組織に多量に存在し、個体の維持、運動を担っている。ミオシンは ATPase 活性を持っており、ATP を加水分解するときに生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換してアクチン繊維を動かし、その結果、運動が起こる。この ATPase 活性の調節機構はミオシンの存在する組織によって異なっている。横紋筋では、アクチンとトロポニン複合体からなる細い繊維に Ca^{2+} が結合するとミオシン ATPase が活性化し (アクチン活性化 ATPase 活性 = アクトミオシン ATPase 活性)、細い繊維から Ca^{2+} が解離すると ATPase 活性は抑制される。一方、平滑筋や非筋細胞では、ミオシンのサブユニットである LC20 のリン酸化、脱リン酸化によってミオシン ATPase が調節される。LC20 がリン酸化されるとアクトミオシン ATPase が活性化され、LC20 が脱リン酸化されるとアクトミオシン ATPase 活性が抑制される。本研究は、豚大動脈平滑筋ミオシンを用いて、LC20 リン酸化による ミオシン ATPase 活性の調節機構を調べることを目的としておこなった。

第 1 章では、LC20 のアミノ酸配列を決定し、リン酸化部位を決定した。豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 は、N 末端がアセチル基で修飾された 171 残基からなり、これより算出された分子量は 19,738 であった。この一次構造を、既知の LC20 の配列と比較したところ、少なくとも 90 % のアミノ酸残基が同一であり、鶏砂囊筋ミオシン LC20 とは、99.4 % 同一であった。また、既知の LC20 で調べられたリン酸化部位 (Ser19) とその周辺の配列では置換が見られないことから、豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 のミオシン軽鎖キナーゼによるリン酸化部位も Ser19 であると判断した。このようにアミノ酸配列が高度に保存されていることから、豚大動脈 LC20 の役割は、運動の on/off と関連したミオシン ATPase 活性調節で

あると考えられた。

第2章では、電子顕微鏡法を用いて、ミオシン分子上のリン酸化部位の位置を明らかにした。まず、LC20のリン酸化部位を含む11残基を認識する抗リン酸化ミオシン抗体 (APMAb) を調製した。リン酸化ミオシンと APMAb とを混合し、形成されたリン酸化ミオシン-APMAb 複合体について電子顕微鏡像観察をおこない、ミオシン頭部先端から抗体の結合位置までの距離とミオシン頭部の長さとを測定して比較した。その結果、抗体は頭部-尾部連結部から頭部先端側におよそ 3.4 nm の位置に結合していることがわかった。Raymentらの結果 (*Science* 261, 50-58, 1993) を参考にすると、ミオシン頭部の ATPase 活性部位と LC20 のリン酸化部位とは 4.6 ~ 5.6 nm 離れていることが明らかになった。この結果から、LC20 のリン酸化部位がミオシン ATPase 活性部位と直接相互作用することはできないことが示された。リン酸化による LC20 の高次構造変化が必須軽鎖あるいはミオシン重鎖の高次構造変化を誘起し、最終的に ATPase 活性部位が活性化された構造に変わると考えられる。

また、APMAb 存在下でアクトミオシン ATPase 活性を測定したところ、APMAb の濃度の増加とともに活性は高くなり、モル比で 5 倍量の APMAb 存在下では約 1.3 倍に増加することがわかった。この結果から、ATPase の活性化に必要な LC20 のリン酸基を含む領域の高次構造はゆらいでおり、APMAb が結合すると、この ATPase 活性化に必要な高次構造が安定化することが示唆された。

第3章では、ミオシンに結合している LC20 のリン酸化による構造変化と溶媒への露出度の変化について調べた。まず、LC20 の構造変化についての知見を得るため、アルギニルエンドペプチダーゼを用いてミオシンを限定消化し、リン酸化の影響を調べた。その結果、アクチンが存在するとリン酸化ミオシンの LC20 は 2 倍以上消化されやすいことがわかつ

た。この結果は、アクチンが結合すると、リン酸化ミオシンの LC20 が、溶媒に露出することを示唆している。同様の実験から、脱リン酸化ミオシンではアクチンが存在しても LC20 の溶媒への露出度は変わらないことが示された。

次に、同様の目的で、水溶性カルボジイミド (EDC) を用いた化学架橋実験をおこなった。 ^{32}P で標識したリン酸化ミオシンの架橋産物を SDS-PAGE で解析した結果、LC20 の 2 量体に相当する約 40 kDa のバンドが観察された。同様のバンドはアクチン存在下のリン酸化ミオシンでも観察された。脱リン酸化ミオシンの架橋産物でも LC20 の 2 量体のバンドは観察されたが、アクチンを加えるとこのバンドの形成速度は大きく減少した。この結果から、アクチンが存在すると脱リン酸化ミオシンの LC20 は架橋されにくくなること、リン酸化によりこの効果は消失することがわかった。

これら 2 つの結果から、アクチンはミオシンに結合すると、2 つの LC20 の間の距離を大きくする、すなわち、ミオシンの 2 つの頭部を引き離すことが示唆される。一方、アクチンが結合したリン酸化ミオシンの LC20 は溶媒に露出し、互いに架橋される距離にある。この高次構造は、APMAb により特異的に認識される、アクトミオシン ATPase 活性化に必要な高次構造に相当すると考えられる。LC20 のリン酸化による高次構造変化は、アクチンが結合したときに LC20 を溶媒に露出させ、ミオシンの 2 つの頭部を近い距離に保ちつづけるものと考えられる。

以上の結果から、LC20 のリン酸化によるミオシン ATPase の活性化は、2 つのリン酸化 LC20 が互いに近接できるような LC20 分子内の高次構造変化により引き起こされ、この高次構造変化が重鎖の高次構造変化を誘起して ATPase 活性部位に伝わることによって起こると結論した。

略語一覧

AcOH	Acetic acid
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CaM	Calmodulin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DP-ミオシン	Dephosphorylated myosin
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	(Ethylenedioxy)diethylenedinitrilotetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCA	Freund's complete adjuvant
FIA	Freund's incomplete adjuvant
Gu-HCl	Guanidine hydrochloride
HPLC	High performance liquid chromatography
HSTBS	High salt (0.5 M NaCl) TBS
KEP	Lysylendopeptidase
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LC20	Smooth muscle myosin 20 kDa regulatory light chain
LC17	Smooth muscle myosin 17 kDa essential light chain
2-ME	2-mercaptoethanol
MLCK	Myosin light chain kinase
P-ミオシン	Phosphorylated myosin
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline ; 2 mM NaPi, 154 mM NaCl, pH 7.0 ~ 7.2
Pi	Inorganic phosphate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
P-Ser	Phosphoserine
P-Thr	Phosphothreonine
REP	Arginylendopeptidase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	PAGE in the presence of 0.1 % SDS
S-1	Myosin subfragment-1 ; a myosin head
TBS	Tris buffered saline ; 50 mM Tris, 154 mM NaCl, pH 7.5 ~ 7.6
TBS/Tw	TBS containing 0.05 % Tween20
TCA	Trichloroacetic acid
TFA	Trifluoroacetic acid
Tricine	N-((Trishydroxymethyl)methyl)glycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Urea-PAGE	PAGE in the presence of 8 M urea

序論

ミオシンはほとんどすべての生物の細胞に広くみられる、モータータンパク質である。モータータンパクは、細胞の運動や、細胞内のオルガネラ輸送に関与し、生体内の化学エネルギーを機械エネルギーに変換する役割をもつ。ミオシンには様々な種類が存在し、分子進化学的に、ミオシンスーパーファミリーと呼ばれるタンパク群を形成していることが近年明らかにされた [1-7]。そのうち、2 個の頭部と長い 1 本の尾部をもつミオシンはミオシン-II と呼ばれている。ミオシン-II (以後、簡単にミオシンと呼ぶ) は尾部で分子同士が互いに会合し、フィラメントを形成することができる。細胞内では、このようなミオシンフィラメントの形で働くと考えられている。

筋肉組織は、ミオシン-アクチン系のモータータンパクの濃度が極端に高く、個体の維持、運動に関与している。脊椎動物では、筋肉組織は大きく 2 種類に分類される。一方は骨格筋や心筋のように、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントとが規則正しく配列され、位相差顕微鏡で縞模様が観察される横紋筋、他方は心臓を除く内蔵組織に見られ、縞模様が観察されない平滑筋である。両者で異なるのは、縞模様の様な外観だけでなく、その収縮の仕方である。横紋筋では多量の ATP を使い短時間に高い張力を発生する。これに対し、平滑筋では、骨格筋に比べて ATP の消費量は小さく、低い張力を長時間持続させる。このように組織としての違いは、その収縮の特性として反映されている。

こうした筋肉組織による収縮活性の違いは、組織の構造によるだけでなく、収縮の根本となるモータータンパク、ミオシンそのものの違いによるところが大きいと考えられている。ミオシン分子は一般に、回転楕円形の頭部と細長い尾部からなる重鎖と 2 種類の軽鎖の、3 種類のサブユニットが 2 個ずつ組合わさった 6 量体である。ミオシン重鎖サブユニット

は分子量約 200 kDa で、頭部に ATPase 活性部位を持っている。細長い尾部はそのほとんどが α -ヘリックス構造をしており、2 個の重鎖は尾部で互いに巻き付きあって coiled-coil 構造を形成している。ミオシンの頭部と尾部との境界付近を 頭部-尾部連結部 (head-rod junction) と呼び、これより N 末端側 (頭部側) に、重鎖 1 個に 2 種類の軽鎖が 2 個ずつ結合している。2 種類の軽鎖は互いに隣接して重鎖上に結合しており、ミオシン頭部側に結合している方は必須軽鎖、必須軽鎖に対して C 末端側 (head-rod junction 側) に隣接して重鎖上に結合している方は制御軽鎖と呼ばれている。これらの軽鎖はカルモジュリン-スーパーファミリに属するタンパクで、カルモジュリンが、生物の進化の過程で変化したものと考えられており、骨格筋、心筋、及び平滑筋でそれぞれ特徴をもったアイソフォームが存在する [8]。各筋組織から得られるミオシンを電子顕微鏡で観察すると互いによく似た形態をしているが、それぞれのサブユニットごとにアミノ酸配列は少しずつ異なっており、それぞれの筋組織に固有のミオシンアイソフォームとして区別される。

本研究で用いた平滑筋ミオシンは、2 個ずつの約 200 kDa 重鎖、20 kDa 制御軽鎖 (LC20)、17 kDa 必須軽鎖 (LC17) からなる 6 量体のタンパク質である。平滑筋ミオシンはカルシウム-カルモジュリン (CaM) 依存性ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) による LC20 のリン酸化により、ATPase 活性が制御されている [9,10]。様々な平滑筋組織や非筋細胞のミオシンについて LC20 の一次構造が決定され、アイソフォームが存在する例も報告されている [8,11,12]。平滑筋の中でも、特に鶏や七面鳥の砂囊筋を使った研究が進んでおり、LC20 や LC17 のアミノ酸配列も早い時期に決定されている [8,13-16]。

平滑筋ミオシン ATPase 活性の制御が LC20 のリン酸化、脱リン酸化によって行われていることを述べたが、そのリン酸化はどのような機構で ATPase 活性を変えるのだろうか。Rayment らが報告した鶏骨格筋ミオシンサブフラグメント-1 の X 線結晶回折解析による

立体構造モデル [17] によれば, LC20 に相当する (骨格筋では 18 kDa) 制御軽鎖はその N 末端がミオシンの N 末端とは逆向きになるように (いわゆるアンチパラレルに) head-rod junction 付近に結合している。骨格筋と平滑筋との違いはあるが, サブユニットの構成など基本構造はほぼ同じで, 電子顕微鏡でのミオシン分子の全体像はほとんど見分けがつかないことを考えると, 平滑筋ミオシン頭部もよく似た立体構造をとると思われる。LC20 の N 末端が骨格筋のそれと同じようにミオシン頭部先端からは離れたところにあるとすると, LC20 のリン酸化部位が頭部に局在する ATPase 活性部位に対して直接作用することは考えられない。LC20 リン酸化の効果が間接的にミオシン ATPase 活性部位に伝わるならば, その経路を調べることでミオシン ATPase 活性の制御機構を解明できるに違いない。

本研究では, 豚大動脈平滑筋ミオシンを用いて, LC20 リン酸化による ATPase 活性の制御機構についての知見を得ることを目的とした。まず, LC20 のアミノ酸配列を決定し, LC20 の一次構造上のリン酸化部位を明らかにした。次に, LC20 リン酸化部位を特異的に認識し, リン酸化ミオシン (P-ミオシン) と脱リン酸化ミオシン (DP-ミオシン) とを判別することができる抗体を作製し, これを用いて電子顕微鏡像観察をおこない, ミオシン分子内でのリン酸化部位のマッピングをおこなった。さらに, P-ミオシンと DP-ミオシンとについて LC20 の消化酵素耐性や化学架橋反応を調べることにより, 両 LC20 の立体構造の違いを明らかにし, LC20 リン酸化によるミオシン ATPase 活性制御機構について議論した。

実験方法

タンパクの調製においては、断らない限り、温度条件は 4°C を、水は蒸留脱イオン水を使用した。

1 豚大動脈平滑筋ミオシン、リン酸化ミオシンの調製

ミオシンは Hasegawa らの方法 [9] を改変した方法で調製した。

豚大動脈洗浄筋の調製 豚大動脈は屠殺場から氷冷して持ち帰った新鮮なものを使用した。大動脈の外膜をはぎ取った後切り開き、内膜を実験室用ティッシュペーパーでふき取って除去し、筋肉組織である中膜を得た。中膜は細切りにして水洗した後、ミンチにして重量を測定した。これ以降の操作はすべて 4°C でおこなった。筋肉組織のミンチ 375 g あたり 4.8 ℓ の緩衝液 A (20mM MgCl₂, 2mM EGTA, 0.1% 2-ME, 0.1 mM PMSF, 10mM イミダゾール-HCl, pH7.0) を加えて、ミキサーで 15 秒ずつ、3 回ホモジェナイズした。この筋肉組織のホモジェネートを遠心分離 (4,500g × 20 分) した。大動脈洗浄筋の調製での遠心分離はすべてこの条件でおこなった。得られた沈殿に緩衝液 A を加えて懸濁し、ポリトロン (Type PT10/35, Kinematica) の最高出力で 15 秒ずつ、3 回ホモジェナイズし、筋肉組織を破碎、洗浄した。破碎した筋肉組織の懸濁液について遠心分離し、沈殿を得た。ポリトロンを用いた操作と遠心分離とを更に 2 回繰り返し、得られた沈殿に、中膜 100g あたり 400ml の緩衝液 A を加えてマグネティックスターラで 1.5 時間攪拌した。攪拌後、懸濁液を遠心分離して沈殿した洗浄筋を得た。洗浄筋を緩衝液 A に懸濁し、これに等容の冷グリセリンを加えて 50 % グリセリン溶液とした。このとき、洗浄筋の最終濃度は、300 g/ℓ になるように調整し、ミオシンの調製に使用するまで -20 °C で保存した。

豚大動脈平滑筋ミオシンの調製 洗浄筋のグリセリン溶液 1 ℓ に対して 2 ℓ の緩衝液 A を加え、ポリトロンを用いてホモジェナイズした後、遠心分離 (4,500g × 20 分) した。得られた沈殿に 2 ℓ の緩衝液 A を加えて同様にホモジェナイズした後、遠心分離して沈殿をとった。このようにしてグリセリンを除いた洗浄筋に 1 ℓ の緩衝液 B (40mM NaCl, 10mM EDTA, 2mM EGTA, 5mM ATP, 2mM 2-ME, 0.1mM PMSF, 25mM イミダゾール-HCl, pH7.0) を加えて懸濁し、マグネティックスターラを用いて約 1.5 時間攪拌してミオシンを抽出した。懸濁液を遠心分離 (4,500 g × 30 分) して上清をとり、抽出液とした。抽出液に 2 M CaCl₂ 溶液を最終濃度 30mM になるように加えてミオシンを沈殿させた。このとき、抽出液の pH をモニターし、必要ならば 6M NaOH 溶液を滴下して pH7.0 を保った。この溶液を約 20 分放置した後、遠心分離 (4,500 g × 15 分) し、得られた沈殿を粗ミオシンとした。粗ミオシンに緩衝液 C (0.2M MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, 20mM NaPi, pH7.4) を加えてホモジェナイズし、ミオシンを溶かした後、同緩衝液を加えて 260ml にメスアップした。このホモジェネートに 0.2 M ATP を加えて 5mM ATP とし、20 分後に超遠心分離 (110,000 g × 1.5 時間) をおこなった。ミオシンを含む上清を 2 枚重ねのガーゼを通して回収した。この上清に溶液 D (1mM NaHCO₃, 0.1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF) を加え、10 倍に希釈してミオシンを沈殿させた後、遠心分離 (4,500 g × 10 分) してミオシンの沈殿を集めた。ミオシンの沈殿に少量の溶液 D を加えて懸濁し、15 ml の 3M KCl 溶液を加えてミオシンを溶かした。これに溶液 D を加えて 90 ml にメスアップし 0.5 M KCl 溶液とした後、20 分間攪拌した。ついで、溶液 D を 135 ml 加えて計 225 ml にし、0.2 M KCl 溶液とした。このミオシン溶液を遠心分離 (22,000 g × 10 分) し、ミオシンを含む上清を得た。これに溶液 D を加えて 4 倍に希釈した後、2 M MgCl₂ 溶液を加えて 20mM MgCl₂ 溶液とした。2 時間、または一晩放置してミオシンを沈殿させた後、上

清の一部をデカンテーションで除き、残った液について遠心分離 ($10,000\text{ g} \times 10\text{ 分}$) して沈殿を集めた。沈殿に少量の水を加えて懸濁した後、 3 M KCl 溶液を加えてミオシンを溶かし、水を加えて 0.5 M KCl 溶液とした。この溶液を遠心分離 ($20,000\text{ g} \times 10\text{ 分}$) して変性ミオシンを除き、精製ミオシン (上清) を得た。このようにして得られた精製ミオシン溶液の濃度を測定した後、等容の冷グリセリンを加えて 0.25 M KCl , 50% グリセリン溶液とし、 -20°C で保存した。300g の大動脈中膜から、約 200mg のミオシンが得られた。

リン酸化ミオシンの調製 ミオシン溶液 ($5\sim 10\text{ mg/ml}$ ミオシン, $0.3\sim 0.5\text{ M KCl}$, 5 mM MgCl_2 , $0.1\sim 0.5\text{ mM CaCl}_2$, 1 mM DTT , 20 mM イミダゾール-HCl, $\text{pH}7.0$) にカルモジュリン (CaM), ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK), ATP を加えて $20\mu\text{g/ml}$ CaM, $20\mu\text{g/ml}$ MLCK, 5 mM ATP とし、 25°C , 20 分反応させてミオシン LC20 をリン酸化した。反応は氷冷して停止した。LC20 のリン酸化の程度は、リン酸化後の反応混液の一部について urea-PAGE をおこない、非リン酸化 LC20 とリン酸化 LC20 とのバンド強度比をデンストメトリで求めて算出した。続いて、リン酸化後の反応混液を 0.4 M KCl , 2 mM 2-ME , 20 mM イミダゾール-HCl, $\text{pH}7.0$ で平衡化した Sepharose CL-6B (Pharmacia) カラムに添加してゲルろ過をおこなった。溶出液の A_{280} を測定し、ミオシンのピークの前半部分を集めた。ミオシン画分に 10 mM イミダゾール-HCl, $\text{pH}7.0$, 2 mM DTT を加えて 10 倍に希釈した後、最終濃度が 20 mM になるように 2 M MgCl_2 溶液を加えてリン酸化ミオシン (P-ミオシン) を沈殿させた。P-ミオシンの沈殿は、ミオシンの調製で述べたのと同様にして回収し、濃度を測定後保存した。P-ミオシンの精製には必要に応じてヒドロキシアパタイト (生化学工業) カラムも用いた [18]。リン酸化反応後の反応混液を、 0.4 M KCl , 1 mM DTT , 0.1 M KPi , $\text{pH}7.0$ で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに添加した。同緩衝液をカラ

ム容積の 8~10 倍流してカラムを洗った後、緩衝液を 0.4M KCl, 1mM DTT, 0.3M KPi , pH7.0 に変えて P-ミオシンを溶出した。溶出した P-ミオシン画分を 30~40mM KCl, 1mM DTT, 10mM イミダゾール-HCl, pH7.0 に透析して Pi を除去した。この P-ミオシン溶液に、20mM MgCl_2 となるように 2M MgCl_2 溶液を加えて P-ミオシンを沈殿させ、上記と同様に保存した。

2 アクチンの調製

アセトン処理筋の調製 アクチンはウサギ骨格筋より抽出し、精製したものを用いた。まず、ウサギの骨格筋組織より Straub の方法 [19, 20] にしたがってアセトン処理筋を調製した。ウサギを断頭後、放血して解体し、筋肉組織を得た。筋肉をミンチにして重量を測り、筋肉 1g あたり 3 ml の Straub 溶液 (0.3M KCl, 0.1M KH_2PO_4 , 0.05M K_2HPO_4 , pH6.5 (4°C)) を加えてミンチを懸濁し、手で揉みほぐした。14.5 分後に遠心分離 (4,600 $g \times 20$ 分) して沈殿した肉を回収した。これに、10 倍容の冷水を加えて懸濁し、ナイロン製ガーゼの袋に入れて絞り、残渣をとった。アセトン処理筋の調製では、溶媒を除く操作はすべてこの方法でおこなった。次に、残渣に 5 倍容の 0.4 % NaHCO_3 溶液を加え、メカニカルスターラを使って室温で 15 分攪拌し、残渣を洗浄した。この懸濁液を袋に入れて絞り、回収した残渣について再度洗浄した。続いて、洗浄した残渣に、筋肉 100g あたり 1 l の冷水を加えて、30 分間強く攪拌した。懸濁液を袋に入れ、ろ液の色が透明から白色になり、粘性が高くなるまで絞った。最後に、アセトンを用いて残渣の水分を除いた。残渣に筋肉 100g あたり 300ml の冷アセトンを一気に加えて攪拌し、すぐに絞った。2 回目からは、筋肉 100g あたり 100~200ml の冷アセトンを加え、30 分間攪拌した後絞った。全部で 4 回操作した。アセトンで洗浄した残渣を室温で揉みほぐし、2 枚重ねのろ紙で挟んでドラフト中で乾燥し

た。このアセトン処理筋は、アクチンを抽出するまでデシケータ中、 4°C で保存した。

アクチンの抽出, 精製 アクチンの抽出, および精製は Spudich & Watt [21], および, Pardee & Spudich [22] の方法を改変しておこなった。アセトン処理筋 10g に対し, 300 ml の G 緩衝液 (0.2mM ATP, 0.2mM CaCl_2 , 0.005 % NaN_3 , 0.5mM DTT, 2mM Tris-HCl, pH7.5) を用意した。200ml の G 緩衝液をアセトン処理筋に加え, 氷冷しながら 30 分攪拌してアクチンを抽出した後, 遠心分離 ($22,000g \times 15$ 分) した。アクチンを含む上清を 4 枚重ねのガーゼを通して回収した。沈殿には 100ml の G 緩衝液を加えて再抽出した。これを 1 回目と同様に遠心分離して上清を回収し, 1 回目の上清と合わせて抽出液とした。抽出液を超遠心分離 ($168,000g \times 30$ 分) し, 4 枚重ねのガーゼを通して上清を回収した。この上清に 0.2M ATP, 3M KCl, 2M MgCl_2 の各溶液を加えて, 最終濃度が 1mM ATP, 0.1M KCl, 2mM MgCl_2 となるように調整し, 終夜放置してアクチンを重合させた。次いで, 3M KCl 溶液を加えて 0.8M KCl 溶液とし, 30 分攪拌した後, 超遠心分離 ($100,000g \times 3$ 時間) して重合したアクチン (F-アクチン) の沈殿を得た。この沈殿に 30 ml の G 緩衝液を加えてホモジェナイズした。ホモジェネートを 2l の G 緩衝液に対して 3 回透析し, F-アクチンを脱重合させた。透析後, 超遠心分離 ($100,000g \times 3$ 時間) をおこない, 脱重合したアクチン (G-アクチン) を含む上清を得た。得られた上清を G 緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 HR (Pharmacia) カラム ($2.6\text{cm} \times 120\text{cm}$) に添加してゲルろ過をおこなった。溶出液の A_{280} を測定し, G-アクチンのピーク画分を集め, 精製アクチン溶液とした。精製アクチン溶液の濃度をビウレット法で測定した後, スクロースを加えて 0.1M スクロース溶液としてから, 凍結乾燥してスクロースパウダとした。回収したスクロースパウダは, 重量を測定してアクチンの含有率 (w/w) を求めた後, デシケータ中, -20°C で保存した。

F-アクチン溶液の調製 スクロースパウダを秤量して必要量を取り、アクチン濃度が約 5mg/ml となるように G 緩衝液を加えて溶かした。この溶液を 30~50 倍容の G 緩衝液に透析した後、超遠心分離 (500,000g × 20 分) した。G-アクチンを含む上清に 3M KCl, 2M MgCl₂, 1M DTT, 1M イミダゾール-HCl (pH 7.0) の各溶液を加えて、0.1M KCl, 2mM MgCl₂, 2mM DTT, 10mM イミダゾール-HCl, pH7.0 になるように調整し、その後、2 時間以上放置してアクチンを重合させた。この F-アクチン溶液を超遠心分離 (500,000g × 20 分) して F-アクチンの沈殿を得た。F-アクチンの沈殿を、実験で使用する緩衝液を用いてホモジェナイズした後、同緩衝液に透析して F-アクチン溶液とした。F-アクチン溶液は、使用直前まで氷冷して保存した。

3 大動脈平滑筋ミオシン LC20, およびリン酸化 LC20 の調製

LC20 の調製 豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 は、ミオシンの調製過程で得られる CaCl₂ による粗ミオシンの沈殿から、Perrie & Perry [23] 及び Hasegawa ら [9] の方法にしたがって精製した。粗ミオシンに湿重量の 3 倍容の 5M Gu-HCl, 0.1 % 2-ME, 0.1M Tris-Gly, pH8.9 を加えて一晩攪拌し、ミオシンを変性させた。次いで等容の冷水を加えて 2 倍に希釈した後、さらに等容の EtOH を加えて 50 % EtOH としてミオシン重鎖を沈澱させた。この溶液を遠心分離 (22,000g × 10 分) し、ミオシン軽鎖混合物を含む上清を得た。ミオシン軽鎖混合物中の EtOH を、ロータリーエバポレータを用いて 30°C で減圧蒸留して除去すると同時に軽鎖混合物を濃縮した。濃縮した試料溶液を、50 倍容の 50mM Tris-Gly, pH8.9, 0.1 % 2-ME に対して 2 時間以上 3 回透析して Gu-HCl を除いた後、50 倍容の 6M 尿素, 0.1 % 2-ME, 20mM KPi, pH6.0 に対して透析した。その後、室温で 8M 尿素, 0.1 % 2-ME, 20mM KPi, pH6.0 (イオン交換クロマトグラフィ開始緩衝液) に対して透析した。透析し

た試料を開始緩衝液で平衡化した DEAE-TOYOPEARL 650S カラム (2.2cm × 16cm) に添加し、室温で陰イオン交換クロマトグラフィをおこなった。カラムを開始緩衝液で洗った後、8M 尿素、0.1 % 2-ME 存在下で KPi, pH6.0 の直線濃度勾配 (20~100mM) によって展開し、軽鎖成分を分離、溶出した。溶出液は 6ml ずつ分画し、各分画の A_{280} を測定して軽鎖成分の溶出を追跡した。リン酸濃度は各分画の電気伝導度を測定して求めた。LC20 の溶出位置を urea-PAGE で確認し、このピーク成分を集めて精製 LC20 とした。精製 LC20 は、50mM NH_4HCO_3 に透析して尿素を除いた後凍結乾燥し、デシケータ中、 -20°C で保存した。500 g の大動脈中膜から約 15 mg の LC20 が得られた。

別法として、EtOH 分画の方法 [24, 25] も一部改変して用いた。この方法では、ミオシンの調製過程で、超遠心分離の上清を 10 倍希釈して得られる沈殿 (粗ミオシン) を出発物質とした。

粗ミオシン沈殿に、湿重量の 5 倍容の 7M 尿素、10mM EDTA、0.1 % 2-ME、0.2mM PMSF 溶液を室温で加えて沈殿を溶かし、ミオシンを変性させた。次いで、粗ミオシン溶液を氷温にし、6M NaOH 溶液を加えて pH11 に調整した後 30 分撹拌した。続いて 50mM になるように Tris を加えた後 6M HCl 溶液を加えて pH8.6 に調整した。その後、最終容積が、粗ミオシン沈殿の湿重量の 6 倍容になるように水を加えて希釈した。この溶液を 20°C で 1 時間撹拌した後、等容の冷 EtOH を加えて 50 % EtOH とし、ミオシン重鎖を沈殿させた。以後、冷 EtOH を用いる操作は 20°C でおこなった。EtOH を加えてから約 15 分後に遠心分離 ($4,500g \times 15$ 分) し、軽鎖混合物を含む上清を得た。上清に終濃度 75 % となるように冷 EtOH を加えて LC20 を沈殿させ、30 分後に遠心分離 ($4,500g \times 10$ 分) して LC20 の沈殿を集めた。得られた LC20 の沈殿を陰イオン交換クロマトグラフィ開始緩衝液 (8M 尿素、50mM KPi, pH6.0, 0.1 % 2-ME) に溶かして同緩衝液に透析した後、先に示したのと

同様の方法で DE32 (Whatmann) 陰イオン交換クロマトグラフィをおこない、LC20 を単離した。ただし、開始リン酸濃度は 50mM を、リン酸の直線濃度勾配は 50~120mM を用いた。

リン酸化 LC20 の調製 LC20 溶液 (2~2.5mg/ml LC20, 30mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 0.1% 2-ME, 20mM Tris-HCl, pH7.5) に CaM, MLCK, ATP を加えて 8.4μg/ml CaM, 10μg/ml MLCK, 1mM ATP 溶液とし、25°C, 20 分、リン酸化反応をおこなった。反応混液を氷冷して反応を停止させ、一部を取り出して urea-PAGE によりリン酸化の程度を確認した。上記の条件ではほぼ 100% のリン酸化が確認された。リン酸化の反応混液に、50% TCA 溶液を加えて 5% TCA とし、約 30 分攪拌して反応混液中のタンパクを沈殿させた。この沈殿を遠心分離 (10,000g × 15 分) によって集め、LC20 の調製と同様に陰イオン交換クロマトグラフィによりリン酸化 LC20 (P-LC20) を精製した。

4 MLCK と CaM

MLCK は鶏砂嚢平滑筋より抽出し、Yoshida らの方法 [26] に従って部分精製した。CaM は、鶏砂嚢平滑筋より抽出、精製したものを本研究室の福井康浩博士 (現在、三井製薬) より頂いた。

5 LC20 のアミノ酸配列分析

還元ピリジルエチル化 LC20 に含まれるシステイン残基を還元ピリジルエチル化した [27, 28]。1mg の LC20 につき、脱気した 7M Gu-HCl, 10mM EDTA, 0.5M Tris-HCl, pH8.5 の溶液 0.3ml を加えて LC20 を溶かした。1mg の LC20 につき 1mg の DTT を加えて溶かした後、容器内の気相を N₂ に置換して密封し、室温で 2 時間攪拌して還元した。還元後、

1mg の LC20 につき $2\mu\text{l}$ の 4-ビニルピリジン を加えた。再度、容器内の気相を N_2 に置換して密封した後、遮光して、室温で4 時間攪拌してピリジルエチル化した。その後、反応混液を 10mM AcOH に透析して過剰な試薬を除き、凍結乾燥した。

LC20 の CNBr 分解 10mg のピリジルエチル化 LC20 に 4ml の 70 % HCOOH を加えて LC20 を溶かした後、47mg の CNBr を加えた [29]。容器を密封および遮光し、攪拌しながら 40°C で 24 時間反応させ、LC20 を分解した。反応後、反応混液を水で 10 倍に希釈して反応を停止した。得られた LC20 の CNBr 分解物溶液を凍結乾燥し、デシケータ中、 -20°C で保存した。

リシルエンドペプチダーゼ消化 P-LC20 溶液 (2.5mg/ml P-LC20, 50mM Tris-HCl, pH7.5) に、重量比で 1/100 のリシルエンドペプチダーゼ (Wako) (KEP) を加え、 30°C で 6 時間消化した [30,31]。反応は氷冷して停止した。

また、LC20 の CNBr 断片の一部は KEP を用いて消化した [30,31]。この消化は、ペプチド断片の溶液 (2.5mg/ml ペプチド断片, 50mM Tris-HCl, pH7.5) にモル比で 1/600 の KEP を加え、 30°C で 30 分おこなった。

アルギニルエンドペプチダーゼ消化 LC20 の CNBr 断片の一部をアルギニルエンドペプチダーゼ (Takara) (REP) を用いて消化した。消化は、ペプチド断片の溶液 (2.5mg/ml ペプチド断片, 50mM Tris-HCl, pH8.0) にモル比で 1/300 の REP を加え、 37°C で 30 分おこなった。反応は 10mM PMSF を加えて停止した [32]。

ペプチドの分離 CNBr 断片についてはまず、ゲルろ過をおこなった。CNBr 断片の凍結乾燥物を 0.1M NH_4HCO_3 , 1mM 2-ME, に溶かし、同緩衝液で平衡化された Sephadex G-50

(Pharmacia) カラム (14mm × 105cm) に添加した。同緩衝液で溶出し、2 ml ずつ分画を集めた。各分画を Tris-Tricine 緩衝系 SDS-PAGE で分析した後、逆相 HPLC によりペプチドを分離した。KEP または REP による消化物は、直接 HPLC によって分離した。

HPLC カラムは TSK-gel ODS 120T (4.6mm × 250mm, Tosoh) または Cosmosil $_5C_{18}$ -AR (4.6mm × 150mm, Nacalai Tesque) を用いた。ペプチドは 0.1 %TFA 存在下で CH₃CN の濃度勾配を用いて溶出した。

質量分析 LC20 の断片の一部については、BioIon 20 システム (Applied Biosystems) を用いて質量分析をおこなった。

アミノ酸配列分析 アミノ酸配列分析は、北海道大学機器分析センターに依頼し、477A プロテインシーケンサおよび 120A PTH アナライザ (Applied Biosystems) により決定した。KEP ペプチドの一部は MilliGen/Biosearch に依頼し、Prosequencer MAXIMA 820 (Maxima/Millipore) により決定した。

アミノ酸組成分析 アミノ酸組成は、減圧乾固したペプチドを 6M HCl に溶かして減圧封管し、110°C で 24 時間加水分解した後、Amino Acid Analysis System OPA (Jasco) により決定した。

また、気相高速加水分解法を用いた分析試料の調製も試みた。試料をダーラム管 (6 mm × 40 mm) に入れて減圧乾固し、これを 10mm × 100mm の試験管の中に入れて減圧封管用に整形した。ダーラム管と外側の試験管との間に 200 μ l の酸混合液 (HCl : TFA : H₂O = 6 : 3 : 1, 0.1 % フェノール) を加えて減圧封管した。160°C で 30 分加水分解した後、上記の方法と同様にして分析をおこなった。

6 抗リン酸化ミオシン抗体 (APMAb) の調製

合成ペプチドのリン酸化, 分離 LC20 のリン酸化部位 (Ser 19) を含む 11 残基の配列 (S が Ser 19 に相当)

KRPQRATSNVF

を選び, これと同じ配列を持つ合成ペプチドを固相法により合成した (サイエンスタナカ (株) に依頼)。合成ペプチド溶液 (1mM 合成ペプチド, 0.35M KCl, 5mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, 40mM Tris-HCl, pH7.5) に CaM, MLCK, ATP を加えて, 125μg/ml CaM, 125μg/ml MLCK, 10mM ATP 溶液とし, 30°C, 16~24 時間反応させてリン酸化した [33-35]。反応混液を逆相 HPLC (Cosmosil ₅C₁₈AR (10mm × 250mm), Nacalai Tesque) に添加し, ペプチド成分を分取して減圧乾固した。その後, 5mM NH₄HCO₃ (開始緩衝液) に溶かし, 同緩衝液で平衡化した DE32 陰イオン交換カラム (1.2cm × 19cm) に添加し, 開始緩衝液で溶出されるペプチド成分を分取した。これらのペプチドは, 減圧乾固した後, 冷凍保存した。

ホスフォアミノ酸分析 P-ペプチドは部分加水分解の後, 薄層電気泳動 [36] をおこなってホスフォアミノ酸を分析, 同定した。減圧乾固した P-ペプチド 30 nmol を 200 μl の 6M HCl に溶かし, 減圧封管後, 110°C で 3 時間加水分解した。反応後, P-ペプチドの加水分解物を凍結乾燥し, HCl を除いた。非リン酸化ペプチドについても同様の操作をおこなった。

P-ペプチドおよび非リン酸化ペプチドの加水分解物を, それぞれ 5μl の試料緩衝液 (15.6 % AcOH, 5 % HCOOH) に溶かしてセルロース板 (12cm × 20cm) の原点に添加した。標準試料として P-Ser, P-Thr の混合溶液を調製し, それぞれ 20 nmol ずつを添加した。セルロース板の全面に泳動緩衝液 (7.8 % AcOH, 2.5 % HCOOH, pH2) を噴霧して湿らせた後, 試料側を負極とし, 定電圧 (1000V) で 105 分, 電気泳動した。泳動終了後, セルロース

板を風乾し、カドミウム-ニンヒドリン溶液を用いてホスフォアミノ酸のスポットを検出した [37]。

抗原の調製, 抗血清の調製 抗原には, P-ペプチドをスカシガイヘモシアニン (KLH) と化学結合 (カップリング) させたもの (コンジュゲート) を用いた。まず, 5mg の KLH を 1ml の 50mM ホウ酸ナトリウム, pH10 に溶かし, これに, 5mg の P-ペプチドを加えて混合した。P-ペプチドを溶かした後, 0.3% グルタルアルデヒド溶液 500 μ l を加え, 室温で 2 時間放置してカップリングさせた。その後, 1M グリシン溶液 125 μ l を加えて混合し, 室温で 30 分放置して反応を停止した。このようにして得られたコンジュゲートは, 1 ℓ の PBS に対して 4 $^{\circ}$ C で 2 回透析して過剰な試薬を除いた後, 凍結保存した。

抗体の作製にはウサギを用いた。初期免疫にはコンジュゲートと FCA を, 追加免疫にはコンジュゲートと FIA をそれぞれ用いた。免疫に用いるエマルジョンは, コンジュゲート : アジュバント = 4 : 6 (v/v) の割合で混合して調製した。まず, 2 羽のウサギを初期免疫し, 2 週間後に追加免疫した。更に 2 週間後に少量の血液 (0.5 ~ 1ml) を採取した。採取した血液を, 室温で 2 時間以上放置した後, 遠心分離 (5,000g $\times$ 20 分) して, 上清の抗血清を得た。得られた抗血清について, LC20, P-LC20, ミオシン, および P-ミオシンに対する抗体価を ELISA 法を用いて測定した。LC20 または P-LC20 に対する抗体価が 1,000 より高いことを確認した後, ウサギ 1 羽あたり 20~40ml 採血した。採取した血液を室温で 2~4 時間放置し, さらに 4 $^{\circ}$ C で一晩放置して血餅を沈殿させた。これを 4 $^{\circ}$ C で遠心分離 (2,000g $\times$ 40 分 または, 3,000g $\times$ 20 分) して上清の抗血清を得た。抗体の精製をすぐにおこなわないときは, 0.1% NaN₃ を加えて -20 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

抗リン酸化ミオシン抗体の調製 抗リン酸化ミオシン抗体 (APMAb) は、抗血清を IgG 画分とした後、P-LC20 または、LC20 をカップリングした Sepharose 4B ゲル (Pharmacia) カラム (P-LC20 カラム, LC20 カラム) を用いたアフィニティクロマトグラフィにより分離した。

まず、IgG を精製した。抗血清に等容の TBS を加えて 2 倍に希釈した後、得られた溶液に等容 (抗血清の 2 倍容) の飽和硫酸アンモニウム (硫安) 溶液を加えて 50 % 飽和硫安溶液とした。この溶液を 1 時間攪拌した後、遠心分離 ($10,000g \times 30$ 分) して、IgG を含む沈殿を得た。沈殿に TBS を加えて溶かし、もとの抗血清の容積にした後、飽和硫安溶液を加えて 40 % 飽和硫安溶液とした。上記と同様に攪拌、遠心分離して得られた沈殿に TBS を加えて溶かし、再び抗血清の容積とした。先と同様に飽和硫安溶液を加えて 35 % 飽和硫安溶液とし、沈殿する分画を得た。35% 飽和硫安溶液による分画をもう 1 度繰返して得られた沈殿を粗 IgG 画分とした。粗 IgG に少量の DE32 陰イオン交換クロマトグラフィ開始緩衝液 (50mM NaCl, 30mM Tris-HCl, pH8.3) を加えて溶かし、約 50 倍の同緩衝液に対して 2 回透析した後、遠心分離 ($17,000g \times 20$ 分) して上清を得た。この試料を開始緩衝液で平衡化した DE32 陰イオン交換カラム ($2.2\text{cm} \times 18.5\text{cm}$) に添加した。この条件では、IgG はカラムに吸着せず素通りするので、開始緩衝液で溶出される成分を分画した。集めた素通り画分に固型硫安を加えて 40 % 飽和硫安溶液とし、2 時間攪拌した後、遠心分離 ($15,000g \times 15$ 分) して沈殿を得た。沈殿に 0.05 % Tween 20, 0.02 % NaN_3 を含む TBS (TBS/Tw, NaN_3) を加えて溶かした後、同緩衝液に対して透析した。透析後、遠心分離 ($17,000g \times 15$ 分) して上清をとり、精製 IgG とした。

次に、精製 IgG について、LC20 カラム、及び、P-LC20 カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィをおこなって APMAb を精製した。IgG 溶液を、TBS/Tw, NaN_3 で平衡

化した P-LC20 カラム (2.2cm × 6cm) に添加した後、溶出口を閉じて 30~60 分放置した。TBS/Tw, NaN_3 でカラムを洗い、素通り画分の A_{280} が 0.01 より低くなった後、溶出液を 0.1M Gly-HCl, pH2.5 に変えてカラムに吸着した成分を溶出し、これを分画した。溶出画分には 2M Tris 溶液または、2M Tris-HCl, pH8.5 を適宜加えて pH を中性付近に戻した。溶出画分を回収した後、素通り画分についてリクロマトグラフィをおこなった。素通り画分に固型硫酸を加えて 40 % 飽和硫酸溶液とし、IgG を沈殿させた。遠心分離によって得られた沈殿に TBS, NaN_3 を加えて溶かし、同緩衝液に対して透析した。透析後、1 回目の試料と同様に操作してリクロマトグラフィをおこない、P-LC20 カラムの吸着成分を得た。

P-LC20 カラムから得られた溶出画分は限外ろ過法 (Immersible CX10, Millipore) をもちいて濃縮した。濃縮液を TBS/Tw, NaN_3 に対して透析し、LC20 カラム (6 ml) に添加し、P-LC20 カラムと同様に操作して素通り画分と溶出画分を得た。素通り画分と溶出画分とをそれぞれ限外ろ過法で濃縮し、TBS, NaN_3 に透析して精製抗体溶液とした。これらを ELISA 法で分析した結果、溶出画分が APMAb であることがわかった。

酵素免疫測定 酵素免疫測定 (ELISA) は 96 ウェルのマイクロタイタープレートを使用しておこなった [38]。抗原溶液として $2\mu\text{g}/\text{ml}$ LC20, または P-LC20 の PBS, 0.02 % NaN_3 溶液, および, $24\mu\text{g}/\text{ml}$ ミオシン, または P-ミオシンの HSTBS (0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH7.6) 溶液をもちいた。ブランクとして PBS, または TBS をもちいた。

各抗原溶液 $50\mu\text{l}$ ずつをウェルに添加し、室温で数時間、または、 4°C で一晩放置してタンパクを吸着させた。ウェル中の試料溶液を廃液した後 ウェルあたり $200\mu\text{l}$ の TBS/Tw を加えて廃液する洗浄操作を 3 回おこなって未吸着のタンパクを除いた。次に、各ウェルに $200\mu\text{l}$ の 0.1 % BSA, TBS/Tw を加えて室温で数時間、または、 4°C で一晩放置した

(ブロッキング)。洗浄操作を 3 回おこなった後、ブロッキングされたプレートのウェルに、一次抗体溶液を 100 μl ずつ加えて、室温で 2~4 時間、または 37°C で 1 時間インキュベーションした。一次抗体に血清をもちいるときは 10 倍から 1,000,000 倍まで 10 倍ずつの希釈系列、精製抗体をもちいるときは 25~0.008 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の希釈系列の溶液をそれぞれ TBS または TBS/Tw を用いて調製した。その後、プレートを 4 回洗浄した。次いで、二次抗体溶液 100 μl を各ウェルに加え、一次抗体と同様にインキュベーションした。二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼをカップリングしたヤギの抗ウサギ IgG 抗体溶液を使用した。プレートを 5 回洗浄した後、発色液 (0.04 % α -フェニレンジアミン, 0.006 % H_2O_2 , 0.1M クエン酸, 0.2M リン酸ナトリウム, pH5.0) を 200 μl ずつ各ウェルに加えた。適当な時間インキュベーションして発色させた後、2M 硫酸を 50 μl ずつ加えて発色を停止した。抗原抗体反応は各ウェルの発色の強さ (A_{492}) をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、定量した。

7 電子顕微鏡観察

電子顕微鏡観察試料の調製 ミオシン-抗体複合体の電子顕微鏡像観察試料は低角度ロータリーシャドー法 [39-41] を用いて作製した。APMAb 溶液 (TBS, 0.02 % NaN_3) と P-ミオシン溶液 (0.5M KCl, 1mM DTT, 0.02 % NaN_3 , 50mM Tris-HCl, pH7.5) とをモル比で 1:1 または 2:1 になるように混合し、氷温で 30 分から 60 分放置した。この P-ミオシン/APMAb 混合液 10 μl を 0.6M 酢酸アンモニウム, 50 % グリセリン溶液 500 μl に混合した後、25 μl をとり、雲母片の新しくはがした面に 45cm の距離から噴霧した。噴霧には、エア缶 (Piece Com Air Young model No.250-S, Olympos) を取りつけて加圧した絵画用エアブラシ (Richpen Apollo 112-A, Bonny.) を用いた。白金線 (直径 0.1mm $\times$ 2.5cm) を巻き付けたタングステン線 (直径 0.8mm) と炭素棒とを蒸着用チャンバの電極部に、試料溶液

を噴霧した雲母片を回転台にそれぞれ設置した。チャンバ内を約 2×10^{-6} Torr まで減圧した後、回転台を回転させ、電極に 45 A の電流を 60 秒間流し、白金を 6° の角度で雲母片に蒸着した。次いで、回転台を止め、30 ~ 40 A の電流を 20 秒間流して、炭素を 90° の角度で雲母片に蒸着した。蒸着後、雲母片を脱イオン水につけ、雲母片から剥がれて水面に浮かぶ白金製のレプリカを銅製のグリッド (400 メッシュ) ですくった。これをデシケータ中で乾燥し、電子顕微鏡観察の試料とした。

電子顕微鏡像観察 試料の電子顕微鏡 (H800, Hitachi) 像は、電子線の加速電圧を 75kV, 拡大率を 40,000 倍に設定して観察し、写真撮影した。撮影して得られたネガフィルムの像はイメージスキャナで計算機に取り込んだ後、画像解析ソフトウェア ImagePC release beta 1a (NIH image の Windows 移植版, Scion) を用いて、ミオシンの頭部の長さと、頭部先端から抗体の結合位置までの距離とを測定した。

8 アクトミオシン ATPase 活性測定

アクトミオシン ATPase 活性測定 アクトミオシン ATPase 活性は、0.025 mg/ml ミオシン、または P-ミオシン、0.5 mg/ml F-アクチン、0~0.04 mg/ml APMAb, 0.1 mg/ml BSA, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EGTA, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH7.5, $25^\circ C$ の条件で測定した。APMAb の対照として、正常血清から得た IgG を用いた。反応は、ATP 以外のすべての成分を含む反応混液を $25^\circ C$, 3 分間ブレインキュベーションした後、ATP を加えて開始した。反応混液 1ml から、一定量 ($175 \mu l$) を 3 分毎に 15 分までとりだして、24% SDS 溶液 $25 \mu l$ と混合して反応を停止した。反応速度 (リン酸の放出速度) は、各反応時間における遊離リン酸を定量し、ミオシン 1 モル当たり 1 秒間で遊離したリン酸のモル数を算出して求め、これを ATPase 活性とした (単位は sec^{-1})。

遊離リン酸の定量 ATPase 反応で遊離した無機リン酸は Chifflet ら [42], および, González-Romo ら [43] の方法で定量した。ミオシン ATPase 反応混液 $175\ \mu\text{l}$ を 24 % SDS 溶液 $25\ \mu\text{l}$ に混合して反応を止め, 混合試薬 (14.4% アスコルビン酸溶液, 6M HCl, 4% モリブデン酸アンモニウム-2M HCl を体積比 5 : 1 : 3 で混合したもの) $75\ \mu\text{l}$ を加えて攪拌した。7 分後に, 4% クエン酸ナトリウム, 4% *m*-亜ヒ酸ナトリウム, 4% AcOH 溶液 $75\ \mu\text{l}$ を加えて攪拌し, 30 分以上放置した後, A_{850} を測定した。検量線は, 0 ~ $100\ \mu\text{M}$ の KH_2PO_4 標準溶液を用いて作製した。

アクトミオシンと APMab との共沈実験 アクトミオシン ATPase 活性測定と同様の条件で, APMab 濃度を $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ として成分を混合した後, 反応混液を遠心分離 ($10,000g \times 20$ 分) してアクト P-ミオシン-抗体複合体を沈殿させた。沈殿に 10mM DTT を含む SDS-PAGE 試料緩衝液 (2 $\times$) を加えて沈殿を溶かした後, 試料緩衝液と等容の水を加えて 2 分間煮沸し, SDS-PAGE 試料とした。一方, 上清は更に超遠心分離 ($80,000g \times 20$ 分) して遊離 F-アクチンを沈殿させた。沈殿について上記と同様に操作して SDS-PAGE 試料とした。それぞれの沈殿に含まれる成分を SDS-PAGE で解析した。

9 LC20 の酵素消化耐性と水溶性カルボジイミドによる化学架橋

ミオシンの酵素消化 $1\text{mg}/\text{ml}$ ミオシンまたは P-ミオシン溶液 (50mM KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM EGTA, 5mM ATP, 2mM DTT, 20mM イミダゾール-HCl, pH7.0) に氷温で ATP を加えた後, 25°C で 1 分間ブレインキュベーションし, アルギニルエンドペプチダーゼ (REP) を加えた。REP とミオシンとの重量比は, 1/25, 1/50, 1/100, および 1/500 を用いた。アクチン存在下の実験ではそれぞれ最終濃度 $1\text{mg}/\text{ml}$ の F-アクチンを加えた。消化反応混液から経時的に一定量を取り, 10mM PMSF または DFP を含む等容の SDS-PAGE 試料

緩衝液 (2×) に加えて反応を停止した。反応時間 0 分の試料は消化酵素を加える前の反応混液を用いた。各時間の試料について SDS-PAGE を行い、CBB 染色したゲルの LC20 のバンド強度をデンストメトリにより定量した。LC20 の酵素消化速度は、各時間での LC20 のバンド強度を、時間 0 の LC20 のバンド強度を 1 とした相対値に換算して、減少速度から求めた。

水溶性カルボジイミドによる化学架橋 1~2.5mg/ml ミオシン、または P-ミオシン溶液 (50mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM ATP, 20mM イミダゾール-HCl, pH7.0) に 0~10mM になるように 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 溶液を加え、25°C で 2 時間反応させた [44]。EDC 溶液 (0.25~1M EDC, 15~20mM imidazol-HCl, pH7.0) は使用直前に調製した。0 mM EDC の実験では、20 mM イミダゾール-HCl, pH7.0 のみを加えた。EDC 溶液を加えて反応を開始し、経時的に一定量ずつ取り出し、終濃度が 0.4% になるように 2-ME を加えて架橋反応を停止した。反応停止後、得られた架橋生成物混合液に等容の、0.1% 2-ME を含む SDS-PAGE 試料緩衝液 (2×) を加えて 3 分間煮沸し、SDS-PAGE 試料とした。架橋反応の経時変化は SDS-PAGE のバンドのパターンによって観察した。アクチン存在下で化学架橋をおこなうときは、終濃度 1~1.5 mg/ml の F-アクチンを加えた。アクチンと ATP が存在する条件下では、アクトミオシンが超沈殿を形成し、一定量の反応混液を取り出すことが困難なので、EDC 以外のすべての成分を混合した反応溶液をあらかじめ分注しておき、それぞれについて異なる時間、架橋反応をおこなった。

架橋産物と LC20 との関係を調べるため、³²P-ミオシンを調製し、架橋反応後、SDS-PAGE をおこなった。CBB 染色をおこなった後、ゲルに含まれる放射活性のあるバンドをイメージングプレート (BAS2000, Fujix) をもちいて検出した。

^{32}P -ミオシンは $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてミオシンをリン酸化して調製した。ミオシン溶液 (5~10mg/ml ミオシン, 0.25M KCl, 0.1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 0.5mM DTT, 0.1mM PMSF, 20mM イミダゾール-HCl, pH7.0) に CaM, MLCK, および ATP を加えて, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CaM, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MLCK, および, 1mM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (100cpm/pmol) とし, 25°C で 20 分反応させてリン酸化した。反応は 0.5mM EGTA を加えて停止した。LC20 のリン酸化の程度は, リン酸化反応の前後で少量を採取し, urea-PAGE ゲルのデンストメトリ, および放射活性の測定により求めた。

^{32}P -ミオシンに含まれる放射活性は Corbin & Reimann の方法 [45] を用いて測定した。2cm $\times$ 1cm のろ紙片にリン酸化反応の前後で採取した試料をそれぞれ一定量ずつスポットした。放射活性のバックグラウンドとして何もスポットしないろ紙も用意した。これらのろ紙を 100ml の冷 10% TCA, 2% NaPPi 溶液に浸し, 5~10 分攪拌した。次いで, 5% TCA, 2% NaPPi 溶液中で 5~10 分攪拌する操作を 3 回おこなって, 遊離の放射活性を除いた。ろ紙を 200ml の 95% エタノール溶液中で洗った後, 風乾して, アセトンを含むバイアルに移した。ろ紙に含まれる放射活性は液体シンチレーションカウンタを用いて測定した。

10 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE), その他

SDS-PAGE SDS-PAGE は Porzio & Pearson [46] の方法に従っておこなった。アクリルアミドの濃度は 10%, N, N' -メチレンビスアクリルアミドとアクリルアミドとの重量比 (ビス比) は 1/100, および 0.8/30 を用いた。泳動試料は, 試料溶液に, 10mM DTT を含む 2 倍濃度の試料緩衝液 (SDS-PAGE 試料緩衝液 (2 $\times$), 2% SDS, 20% グリセリン, 0.1% BPB, 0.25M Tris-HCl, pH6.8) を試料溶液と等容加え, 水浴で 2~3 分煮沸して調製した。

Tris-Tricine 緩衝系 SDS-PAGE 分離ゲル, 濃縮ゲルのビス比をそれぞれ 1/19 に, 分離ゲルの濃度を 15 % にした以外は Schagger & Von Jagow の方法 [47] に従っておこなった。試料の調製は SDS-PAGE と同様におこなった。

Urea-PAGE 8M 尿素 存在下の PAGE は, Perrie と Perry の方法 [9, 23] に従っておこなった。泳動試料は, 試料溶液に, 0.4% 2-ME を含む試料緩衝液 (20 % グリセリン, 0.1 % BPB, 0.25M Tris-HCl, pH6.8) を試料溶液と等容加え, この混合溶液 $10\mu\text{l}$ あたり 10mg の尿素を加えて調製した。

CBB 染色 PAGE 後のゲルは CBB 染色液 (0.5% CBB, 9% AcOH, 45% EtOH) で染色した後, 脱染色液 (7.5% AcOH, 5% EtOH) 中で振とうして脱染色し, タンパクのバンドを検出した。

濃度, 分子量 ミオシン, アクチン, LC20, 及び IgG の分子量はそれぞれ, 500,000, 42,000, 20,000, 及び 160,000 を用いた。また, ミオシン, アクチン及び抗体の濃度は, $A_{280}^{1\text{mg/ml}} = 0.48, 1.1$ 及び 1.43 をそれぞれ用いて決定した。LC20 の濃度は, 卵白アルブミンで検量線を作製した Bradford の方法 [48, 49] を用いて測定し, 決定した。ペプチドの濃度は Bradford の方法による測定, またはアミノ酸組成分析値より算出して決定した。

第 1 章 豚大動脈平滑筋ミオシン制御軽鎖のアミノ酸配列の決定

1.1 序

平滑筋の収縮, および非筋細胞の運動は, ミオシン制御軽鎖 (LC20) の Ser19 のリン酸化, 脱リン酸化によって制御されることが, 鶏砂囊筋や繊維芽細胞の研究から示唆されている。豚大動脈平滑筋でも, ミオシン ATPase 活性は MLCK による LC20 のリン酸化反応の後活性化される。LC20 のリン酸化部位の構造を明らかにすることが血管平滑筋収縮調節の分子機構を解明するための第一歩と考えられる。本実験は豚大動脈平滑筋ミオシン LC20 のアミノ酸配列を決定して, リン酸化部位の構造を明らかにすることを目的としておこなった。

試料の LC20 は豚大動脈平滑筋より単離した。LC20 について CNBr 分解と KEP 消化をおこない, ほぼ全配列についてオーバーラップペプチドを得ることができた。N 末端はブロックされていると思われたため別途解析をおこなった。N 末端を含むと思われる CNBr 分解のペプチドを調製し, さらに KEP, REP で消化し, 逆相 HPLC で消化して得たペプチド断片についてアミノ酸組成分析, アミノ酸配列分析, および質量分析をおこなった。その結果, N 末端はアセチル基でブロックされていることがわかった。全配列は 171 残基からなり, 他の LC20 の配列と比べると, 異なる動物種間でも非常によく保存されていた。リン酸化部位については他の LC20 と同じ, Ser19 であるという結論に達した [50]。

1.2 結果

LC20 の調製 図 1 に DE32 を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラムを示した。Satterwhite らの方法 [51] の変法によって得られた粗 LC20 画分を添加した後, 8 M 尿素存在下の KPi の直線濃度勾配で溶出することにより, LC20 は LC17nm, LC17gi [16, 52] から

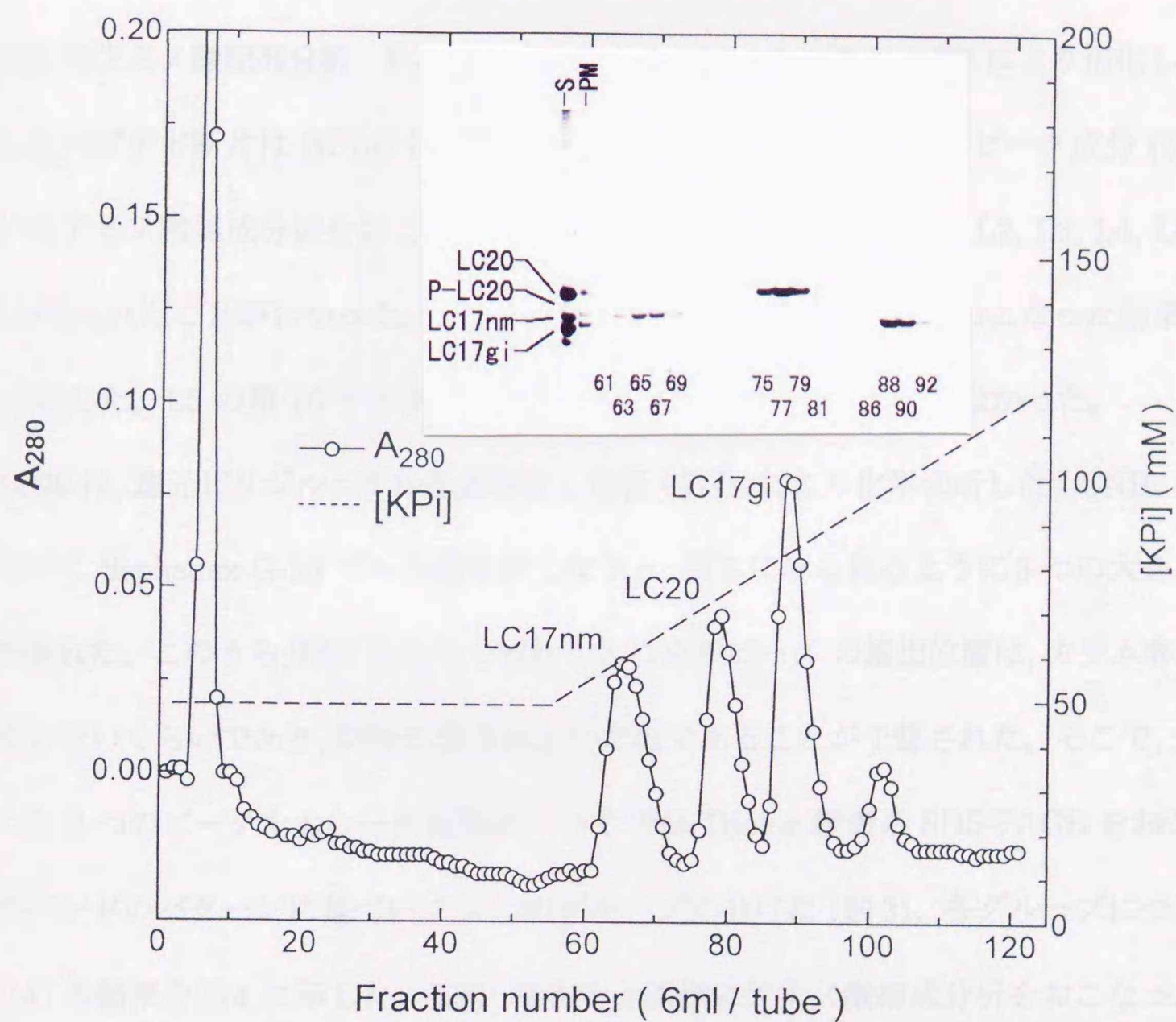


図 1: DE32 による LC20 の調製。8M 尿素存在下, 50mM KPi, pH6.0 で開始し, KPi の直線濃度勾配により溶出した。LC17nm, LC20, および LC17gi はそれぞれ 65 mM, 78 mM, 90 mM KPi で溶出された。図中の写真はクロマトグラム中の LC20 と LC17 との分離の様子を調べた urea-PAGE の結果。写真下の番号は分画番号を表す。S, カラムに添加した試料; PM, P-ミオシン。

分離された。また、図には示していないが、P-LC20 は LC17gi と同様の KPi 濃度で溶出された。これより、P-LC20 を調製するときは単離した LC20 をリン酸化した後、DE32 による陰イオン交換クロマトグラフィをおこない、リン酸化されなかった LC20 から分離し精製した。また反応に用いた MLCK, CaM もこれにより同様に除くことができた。

LC20 のアミノ酸配列分析 P-LC20 は実験方法で述べた方法で KEP により消化した。生成したペプチド断片は HPLC により精製した。HPLC で分離されたピーク成分 (図2) についてアミノ酸組成分析をおこなった結果 (表1)、ペプチド断片 L1, L2, L3, L4, L5, 及び L6 が得られたことがわかった。これらについてアミノ酸配列分析をおこなった結果を (表2) に示した。L5 の第 16 サイクルと L3 の第 1 サイクルは検出されなかった。

LC20 は、還元ピリジリエチル処理をした後 CNBr により化学切断した。CNBr 分解物について Sephadex G-50 ゲルろ過をおこなうと、図3 にみられるように3つの大きなピークが現れた。このうち分画 70 辺りで現れた3つめのピークの溶出位置は、カラム容量よりやや少ないくらいであり、試料に含まれていた塩であることが予想された。そこで、先に溶出した2つのピークを含む分画範囲について Tris-Tricine 緩衝系 SDS-PAGE をおこない、そのバンドのパターンに基づいて4つのグループに分けた (図3)。各グループについての HPLC の結果を図4 に示した。KEP 消化物と同様にアミノ酸組成分析をおこなった結果 (表3)、ペプチド断片 CN1, CN2, CN3, CN4, CN5, CN6, 及び CN7 を得たことがわかった。

CN1 を除くこれらの断片についてアミノ酸配列分析をおこなった結果を表4, 5 に示した。これらの結果から CN7 は CN6 の一部であることがわかった。また、CN5 の第 20 サイクルはピリジリエチルシステインとして検出された。他の断片ではピリジリエチルシステインは検出されなかった (表5)。

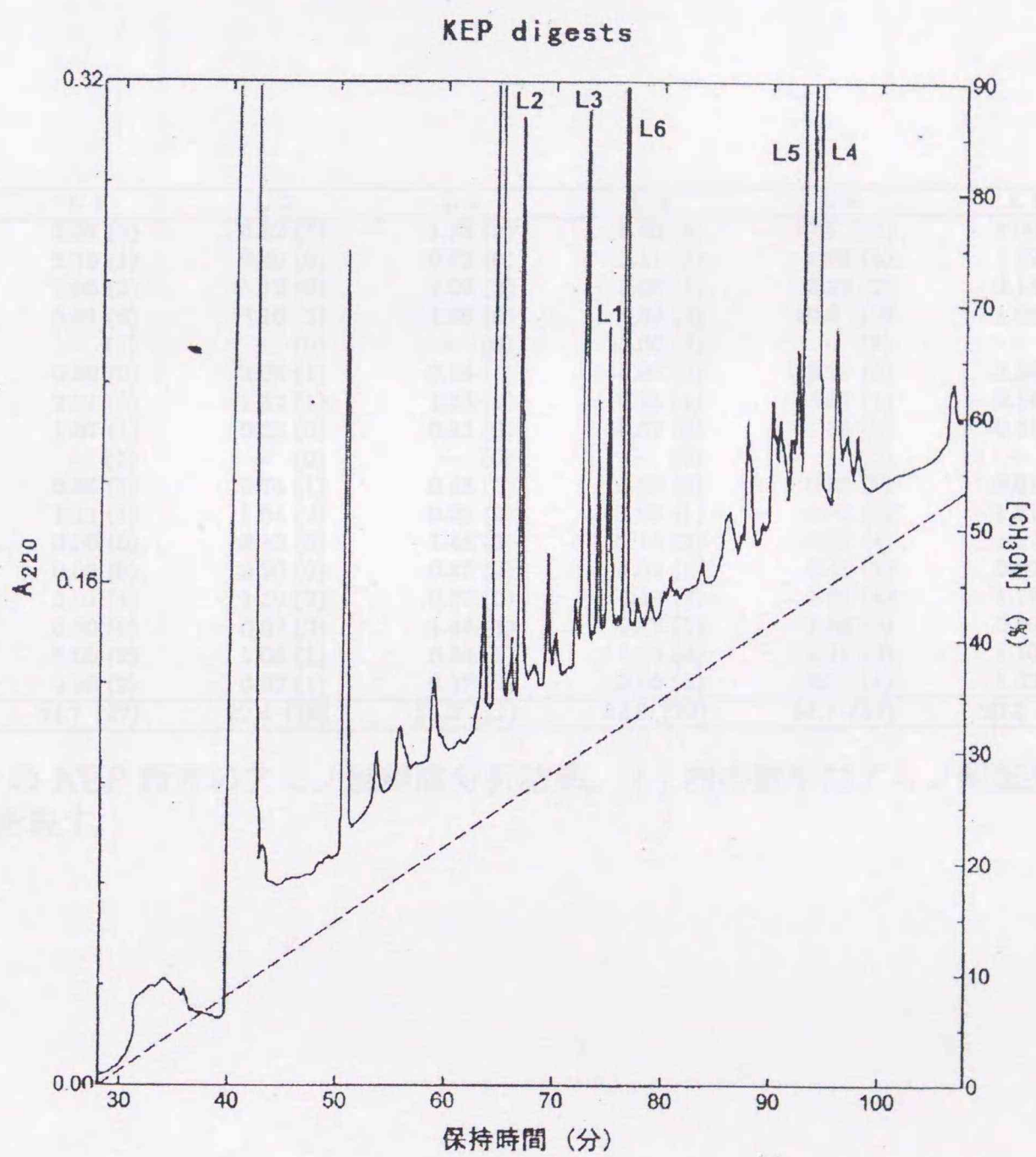


図 2: P-LC20 の KEP 消化断片の HPLC による分離。これらの断片は一部を除きほとんどリクロマトグラフィの必要はなかった。

A.A.	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5	L 6
Asx	2.57 (3)	6.82 (5)	1.78 (2)	3.40 (3)	10.4 (10)	3.00 (2)
Thr	1.19 (1)	0.40 (0)	0.52 (0)	3.11 (3)	4.06 (4)	1.22 (1)
Ser	2.05 (2)	1.12 (0)	2.02 (2)	1.06 (1)	5.23 (2)	2.14 (0)
Glx	5.81 (6)	3.16 (2)	1.83 (0)	4.32 (3)	10.0 (9)	1.98 (1)
Pro	- (1)	- (0)	- (0)	3.06 (3)	- (2)	- (0)
Gly	0.60 (0)	2.08 (1)	2.16 (1)	4.06 (3)	5.37 (3)	3.39 (1)
Ala	2.24 (3)	1.32 (1)	1.33 (1)	0.25 (1)	3.51 (4)	0.14 (0)
Val	1.07 (1)	0.33 (0)	0.43 (0)	0.07 (0)	1.54 (2)	0.31 (0)
Cys	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)
Met	0.85 (1)	0.74 (1)	0.46 (1)	4.26 (4)	0.28 (2)	0.01 (0)
Ile	1.11 (1)	1.54 (2)	0.25 (0)	1.08 (1)	1.67 (3)	1.71 (2)
Leu	0.00 (0)	0.43 (0)	1.46 (3)	2.18 (2)	3.55 (4)	1.22 (1)
Tyr	0.00 (0)	0.20 (0)	0.27 (0)	1.04 (1)	1.40 (1)	0.90 (1)
Phe	3.01 (4)	1.59 (2)	0.27 (0)	3.15 (3)	1.91 (4)	1.79 (2)
His	0.00 (0)	0.62 (0)	1.44 (1)	0.17 (1)	1.88 (2)	0.89 (0)
Lys	2.00 (2)	1.08 (1)	0.84 (1)	1.00 (0)	1.18 (0)	1.10 (1)
Arg	2.20 (2)	0.92 (1)	0.25 (0)	0.09 (0)	2.70 (4)	1.02 (1)
total	24.7 (27)	22.4 (16)	15.3 (12)	32.3 (29)	54.7 (56)	20.8 (13)

表 1: LC20 の KEP 断片のアミノ酸組成分析結果。 () 内の数字はアミノ酸配列分析から得られた値を表す。

Cycle	L1		L2		L3		L4		L5				L6	
	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol
1 (31)	K	79.3	E	308.2	-	-	N	7323.1	L	17.2	R	13.7	G	678.2
2 (32)	R	64.0	A	469.4	D	109.6	P	7803.0	N	170.7	E	23.3	N	418.2
3 (33)	P	95.6	F	389.0	L	193.1	T	8679.7	G	129.2	L	21.6	F	693.1
4 (34)	Q	62.2	N	314.4	H	58.8	D	5072.1	T	45.8	L	24.8	N	531.0
5 (35)	R	62.9	M	315.3	D	118.2	E	4759.0	D	200.5	T	6.0	Y	539.4
6 (36)	A	87.6	I	377.9	M	83.9	Y	7693.7	P	76.4	T	7.0	I	519.9
7 (37)	T	43.7	D	254.4	L	76.0	L	7574.4	E	119.9	M	20.4	E	269.9
8 (38)	S	16.5	Q	222.0	A	58.8	E	2862.9	D	127.3	G	16.7	F	334.8
9 (39)	N	32.6	N	212.3	S	27.3	G	5903.3	V	91.3	D	-	T	322.2
10 (40)	V	13.8	R	307.3	L	42.4	M	5823.3	I	73.4	R	9.6	R	224.7
11 (41)	F	24.4	D	203.2	G	31.8	M	5467.0	R	44.1	F	15.4	I	123.0
12 (42)	A	19.0	G	185.8	K	12.7	S	1422.9	N	90.6	T	4.3	L	84.5
13 (43)	M	9.0	F	152.3			E	819.4	A	85.2	D	16.7	K	36.7
14 (44)	F	14.1	I	142.2			A	2174.0	F	89.6	E	10.5		
15 (45)	D	14.1	D	91.4			P	1121.9	A	80.6	E	11.4		
16 (46)	Q	7.5	K	52.2			G	777.2	-	-	V	10.4		
17 (47)	S	2.6					P	436.8	F	59.3	D	14.9		
18 (48)	Q	2.4					I	509.2	D	64.9	E	8.2		
19 (49)	I	2.8					N	319.1	E	48.0	M	8.5		
20 (50)							F	448.1	E	54.3	Y	10.1		
21 (51)							T	297.3	A	44.1	R	6.9		
22 (52)							M	300.7	S	5.0	E	5.8		
23 (53)							F	281.3	G	30.8	A	8.2		
24 (54)							L	207.3	F	40.4	P	9.4		
25 (55)							T	141.3	I	27.0	I	6.3		
26 (56)							M	137.2	H	12.6	D	8.4		
27 (57)							F	139.3	E	29.8				
28 (58)							G	65.5	D	33.0				
29 (59)							E	2.4	H	11.7				
30 (60)									L	25.3				

表 2: LC20 の KEP 消化断片のアミノ酸配列分析結果。各サイクル (Cycle) で検出された PTH-アミノ酸 (A.A.) と回収量 (pmol) とを表した。L5 は 56 サイクルまで検出された長い断片であったので 2 列に分けて表した。サイクルの () 内の数字は L5 の 2 列目のサイクル (右側) を表す。- は検出, あるいは定量されなかったことを表す。

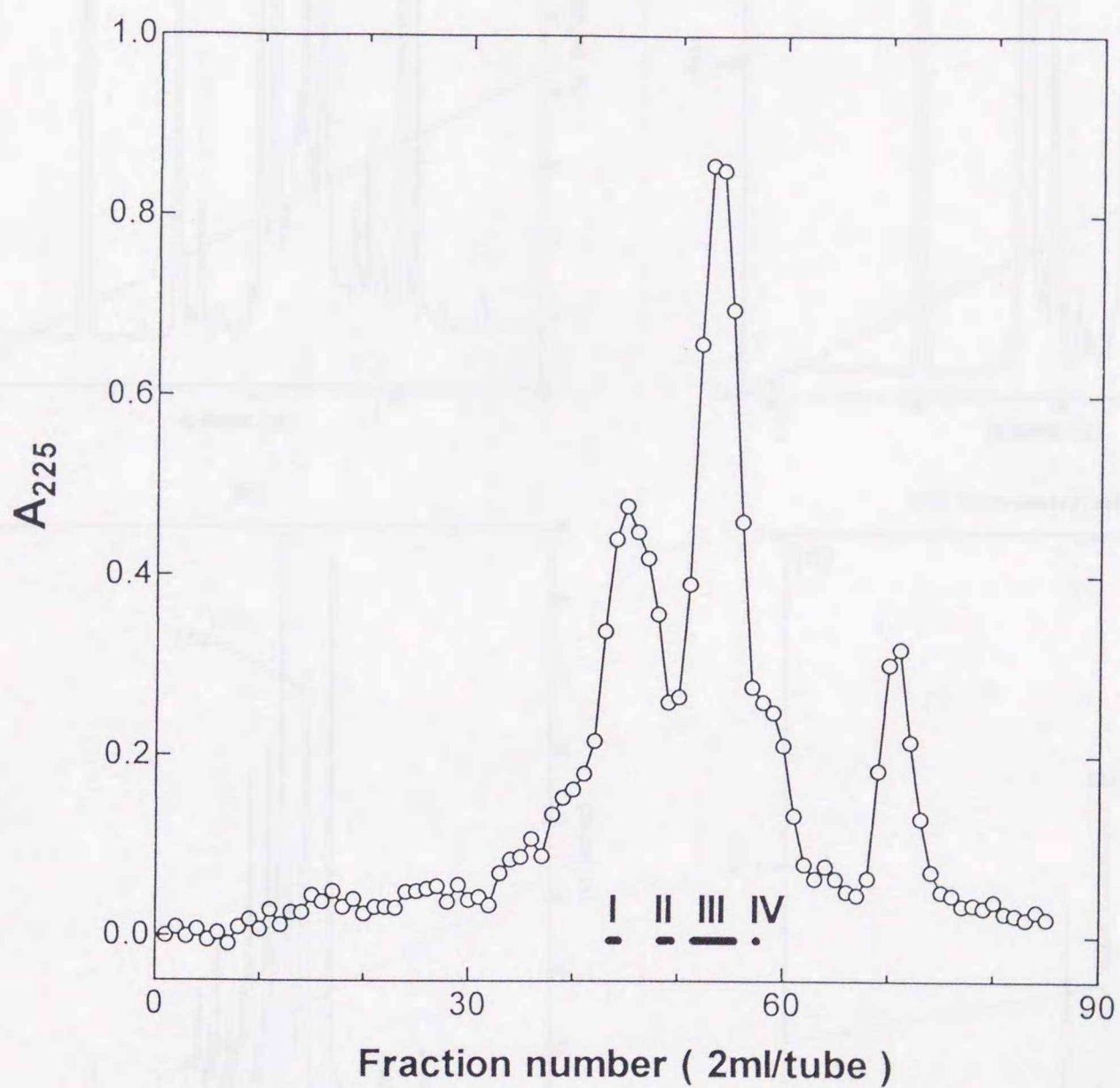


図 3: LC20 の CNBr 断片のゲルろ過によるグループ分離。図に見られるように 3 つの大きなピークが現れた。CNBr によるペプチド断片の混合物は SDS-PAGE の結果を参考にして 4 つのグループ (I ~ IV) に分けて集めた。

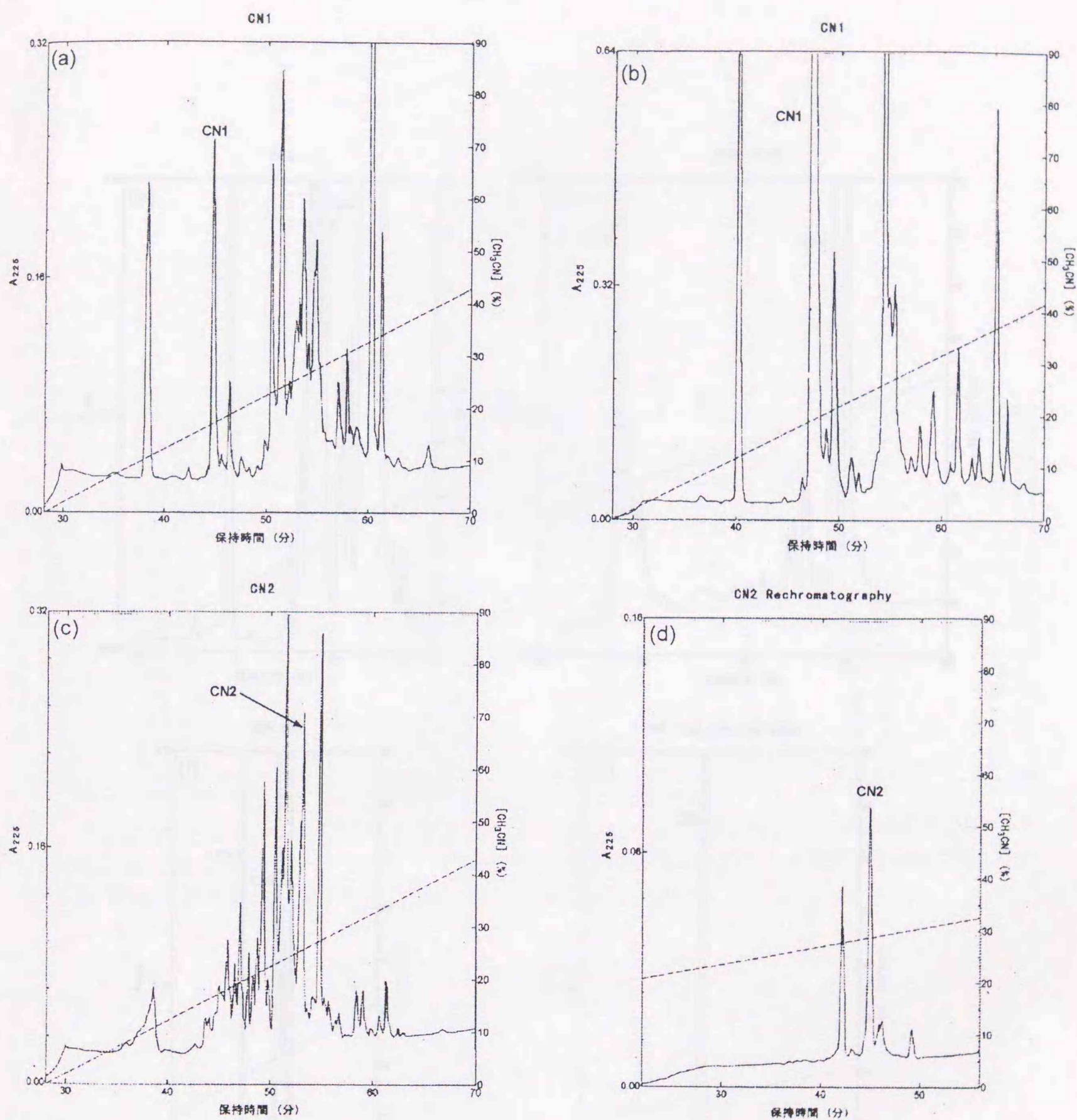
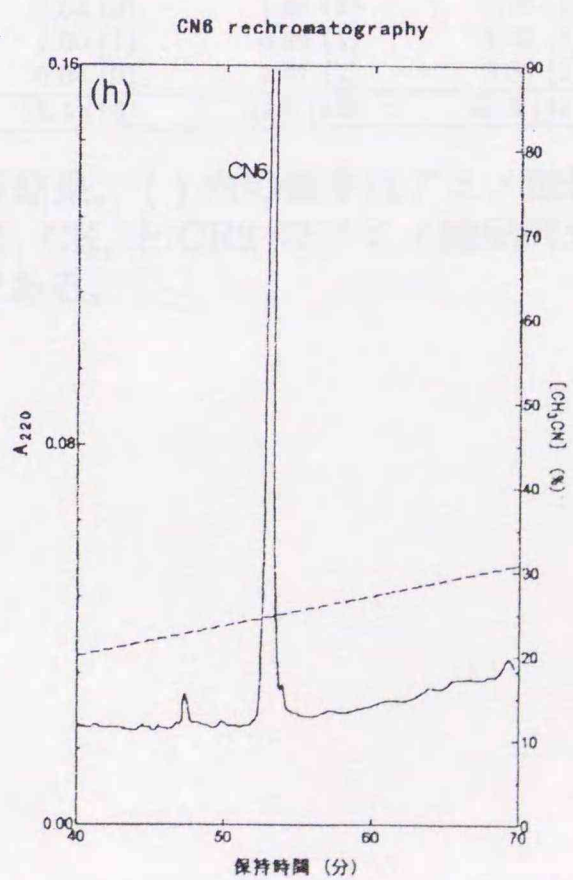
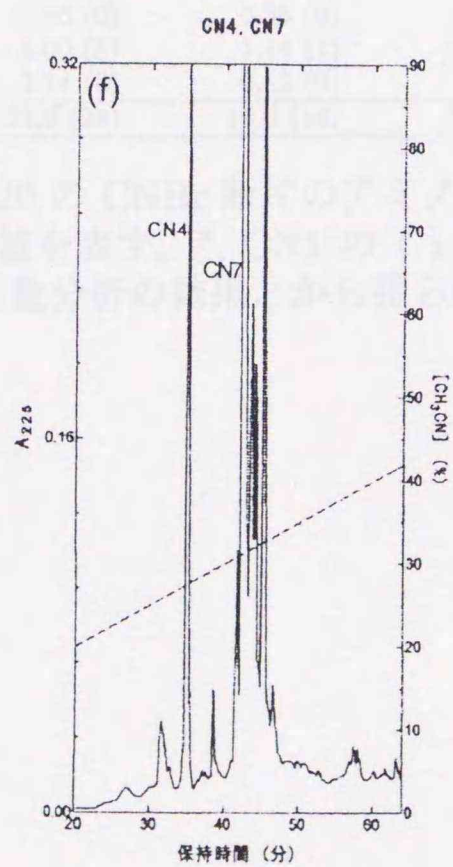
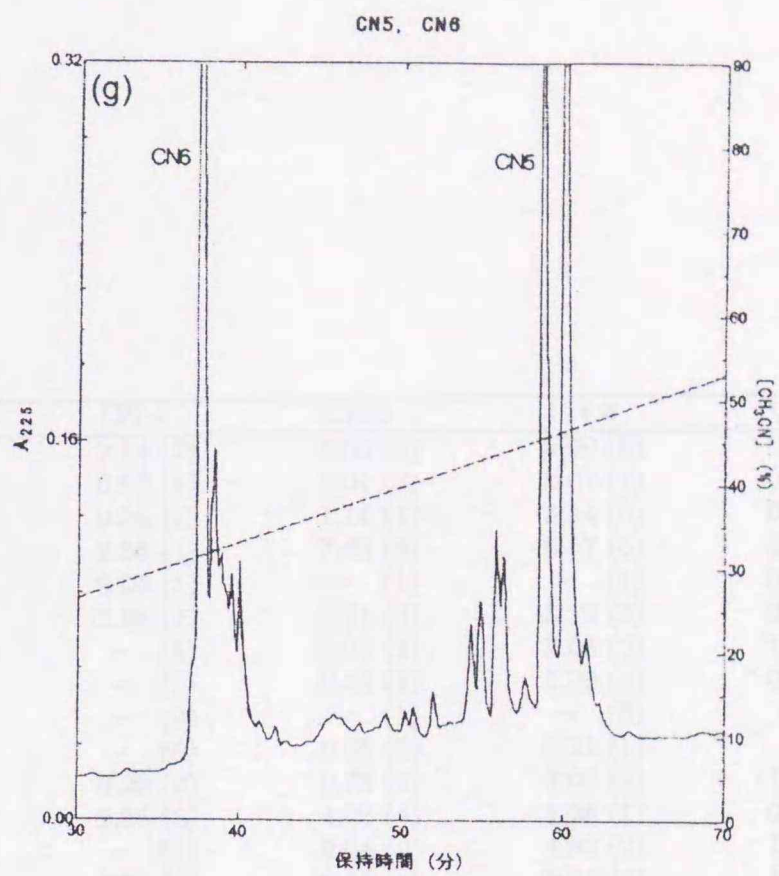
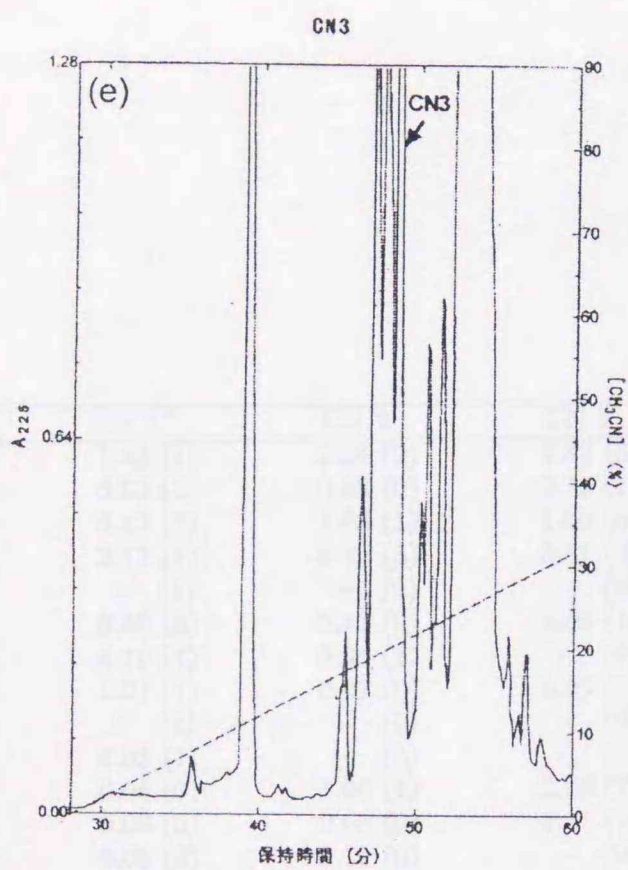


図 4: CNBr 断片の HPLC クロマトグラム。(a), (c), (f), および (g) はそれぞれ図 3 のグループ II, IV, III, I の HPLC クロマトグラム。これらからそれぞれ, CN1, CN2, CN4 と CN7, および, CN5 と CN6 が得られた。(b) と (e) は別の試料による Sephadex G-50 ゲルろ過から得られた, それぞれ図 3 のグループ II, および III に相当するグループの HPLC の結果。前者は N 末端分析のための CN1 の調製をおこなった。後者からは CN3 が得られた。(d) と (h) はそれぞれ CN2 と CN6 のリクロマトグラフィの様子である。



A.A.	CN 1*	CN 2	CN 3	CN 4	CN 5	CN 6	CN 7
Asx	1.23 (1)	2.04 (2)	5.82 (6)	2.14 (2)	6.00 (6)	9.00 (8)	6.00 (6)
Thr	3.03 (3)	0.08 (0)	0.35 (1)	0.99 (1)	3.01 (2)	2.07 (2)	0.93 (1)
Ser	3.13 (3)	1.03 (1)	1.00 (0)	0.95 (1)	1.14 (1)	0.44 (0)	0.12 (0)
Glx	2.17 (1)	5.79 (5)	3.31 (2)	2.58 (1)	7.66 (6)	6.57 (5)	2.01 (2)
Pro	- (1)	- (0)	- (0)	0.96 (1)	- (1)	- (1)	0.87 (1)
Gly	0.40 (0)	0.43 (0)	3.09 (1)	2.98 (1)	3.21 (3)	3.73 (3)	2.00 (2)
Ala	4.10 (4)	0.98 (1)	- (0)	- (1)	3.07 (3)	2.06 (2)	1.88 (2)
Val	1.01 (1)	0.07 (0)	0.29 (0)	- (0)	0.35 (1)	1.99 (2)	0.83 (1)
Cys	- (0)	- (0)	- (0)	- (0)	- (1)	- (0)	- (0)
Met	0.03 (1)	- (0)	- (0)	- (0)	0.05 (0)	0.21 (1)	- (0)
Ile	0.06 (0)	1.06 (1)	2.06 (2)	0.20 (0)	0.78 (2)	2.05 (2)	1.69 (2)
Leu	0.09 (0)	0.05 (0)	1.37 (1)	2.86 (3)	4.09 (4)	1.28 (1)	0.89 (1)
Tyr	0.05 (0)	0.10 (0)	- (0)	- (1)	0.04 (0)	1.82 (2)	1.69 (2)
Phe	0.96 (1)	2.77 (3)	1.11 (1)	0.04 (0)	3.83 (4)	2.94 (3)	1.79 (2)
His	0.46 (0)	0.35 (0)	1.38 (1)	0.64 (0)	1.86 (2)	1.76 (1)	0.98 (1)
Lys	5.00 (5)	1.14 (1)	1.35 (1)	1.00 (1)	0.89 (1)	4.78 (5)	3.80 (5)
Arg	3.14 (3)	0.12 (0)	1.27 (1)	0.04 (0)	1.91 (2)	3.05 (3)	1.86 (2)
total	24.9 (24)	16.0 (14)	22.4 (17)	15.4 (13)	37.9 (39)	43.8 (41)	27.3 (30)

表 3: LC20 の CNBr 断片のアミノ酸組成分析結果。() 内の数字はアミノ酸配列分析から得られた値を表す。*, CN1 の () 内の数字は, CK, と CR2 のアミノ酸配列分析の結果と CR1 の質量分析の結果とから得られた数字である。

Cycle	CN 2		CN 3		CN 4	
	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol
1	F	1540.5	I	1427.5	L	1804.9
2	D	750.8	D	905.8	A	1823.9
3	Q	1170.8	Q	909.4	S	653.9
4	S	454.3	N	846.3	L	1327.1
5	Q	946.2	R	2027.9	G	1153.1
6	I	1044.9	D	555.4	K	1071.6
7	Q	665.4	G	943.7	N	791.9
8	E	425.9	F	821.1	P	735.7
9	F	505.0	I	756.8	T	638.5
10	K	338.7	D	350.3	D	511.7
11	E	202.9	K	574.4	E	491.5
12	A	296.4	E	363.6	Y	424.4
13	F	235.4	D	272.1	L	289.8
14	N	138.4	L	495.1		
15			H	233.9		
16			D	154.7		

表 4: LC20 の CNBr 断片のアミノ酸配列分析の結果 (CN2, CN3, CN4)。各サイクル (Cycle) で検出された PTH-アミノ酸 (A.A.) と回収量 (pmol) を表した。

Cycle	CN 5				CN 6				CN 7	
	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol	A.A.	pmol
1 (31)	F	1388.5	E	37.3	G	1770.8	R	171.4	Y	11911.3
2 (32)	G	1079.8	D	47.1	D	1719.5	I	59.4	R	3877.2
3 (33)	E	926.0	H	30.3	R	2167.3	L	58.8	E	8354.6
4 (34)	K	1038.4	L	27.4	F	1344.0	K	26.9	A	13962.3
5 (35)	L	1161.2	R	10.7	T	1205.7	H	18.6	P	10477.2
6 (36)	N	431.6	E	66.9	D	1170.0	G	39.7	I	10126.4
7 (37)	G	513.5	L	9.8	E	948.0	A	32.5	D	6298.0
8 (38)	T	443.4	L	6.0	E	839.8	K	17.2	K	9512.7
9 (39)	D	481.3	T	2.2	V	1129.3	D	14.6	K	9110.2
10 (40)	P	406.1			D	926.5	K	12.2	G	7620.6
11 (41)	E	258.1			E	545.7	D	2.2	N	6202.6
12 (42)	D	370.0			M	336.8			F	8527.3
13 (43)	V	336.5			Y	441.1			N	5665.8
14 (44)	I	336.5			R	1025.0			Y	7397.5
15 (45)	R	668.4			E	238.5			V	8203.3
16 (46)	N	234.7			A	401.1			E	3162.6
17 (47)	A	205.5			P	250.8			F	6438.2
18 (48)	F	249.9			I	178.3			T	3909.8
19 (49)	A	253.5			D	172.8			R	3861.8
20 (50)	C	—			K	132.7			I	4921.3
21 (51)	F	211.9			K	134.5			L	4339.5
22 (52)	D	174.3			G	145.4			K	3291.4
23 (53)	E	117.7			N	110.9			H	1183.0
24 (54)	E	105.8			F	122.4			G	2964.7
25 (55)	A	123.6			N	109.4			A	3458.9
26 (56)	S	37.8			Y	106.4			K	2449.2
27 (57)	G	57.4			V	121.7			D	1648.8
28 (58)	I	116.1			E	29.1			K	2083.4
29 (59)	F	25.9			F	78.6			D	1043.6
30 (60)	H	32.9			T	66.9			D	178.6

表 5: LC20 の CNBr 断片のアミノ酸配列分析の結果 (CN5, CN6, CN7)。各サイクルで検出された PTH-アミノ酸 (A.A.) と回収量 (pmol) を表した。CN5 及び CN6 は 30 サイクルを越える長い断片であったので、結果を 2 列に分けて表した。サイクル (Cycle) の () 内の数字は CN5, CN6 の 2 列目 (それぞれ右側) のサイクルを表す。CN5 の第 20 サイクルの Cys は PE-Cys として検出されたが、定量されなかった。

豚大動脈平滑筋 LC20 のアミノ酸組成分析の結果 (表 1, 3) を他の平滑筋ミオシン LC20 のアミノ酸組成と比較したところ, これらは相同性が高かったこと, また, CN1 のアミノ酸組成はこれら LC20 の N 末端ペプチドと良く似た結果を示したことから, CN1 は LC20 の N 末端由来のペプチドであると予想された。そこで, CN1 を KEP 及び REP で消化し, それぞれについて HPLC をおこなった。その結果, KEP 消化によりペプチド断片 CK が, REP 消化によりペプチド断片 CR1 と CR2 が得られた (図 5)。これら 3 つの断片のアミノ酸組成分析結果を表 6 に示した。CK と CR2 についてのアミノ酸配列分析結果を表 7 に示した。CK の第 3 サイクルは検出されなかったが, CK のアミノ酸組成分析の結果よりこのアミノ酸残基は Lys であることがわかった (表 6)。CK, CR2, L1 をオーバーラップさせて一連の配列を組み立てると (図 6), L1 は Met を含んでおり, それに続く配列は CN2 とオーバーラップするので, この Met より N 末端側の配列が CN1 の配列であると考えられた。CK, CR2, および L1 から成る配列の中に, CR1 のアミノ酸組成分析値 (表 6) を満たす配列は含まれていなかった。したがって, CR1 は CN1 の N 末端由来であることが推定された。

質量分析の結果, CR1 の分子量は 519.4 であったので CR1 のアミノ酸組成分析値 (表 6) とから CR1 は 2 残基の Ser と 1 残基ずつの Lys および Arg を含む 4 残基 (分子量の計算値 476.57) のペプチド断片であることが判明した。CR1 の質量の計算値と実測値との差 42.83 は 4 残基以外にアセチル基 (43.06) の存在を示唆している。

CK が CR2 の N 末端とオーバーラップすること, 及び, CR2 の N 末端側に隣接する残基は Arg のはずであることを考慮すると, CR1 の C 末端は Arg であると予想された。この Arg は CK の N 末端であるので, その N 末端側に隣接する残基は, 消化酵素の特異性から Lys しかありえない。したがって, CR1 は, N 末端がアセチル基 (Ac) によってブロッ

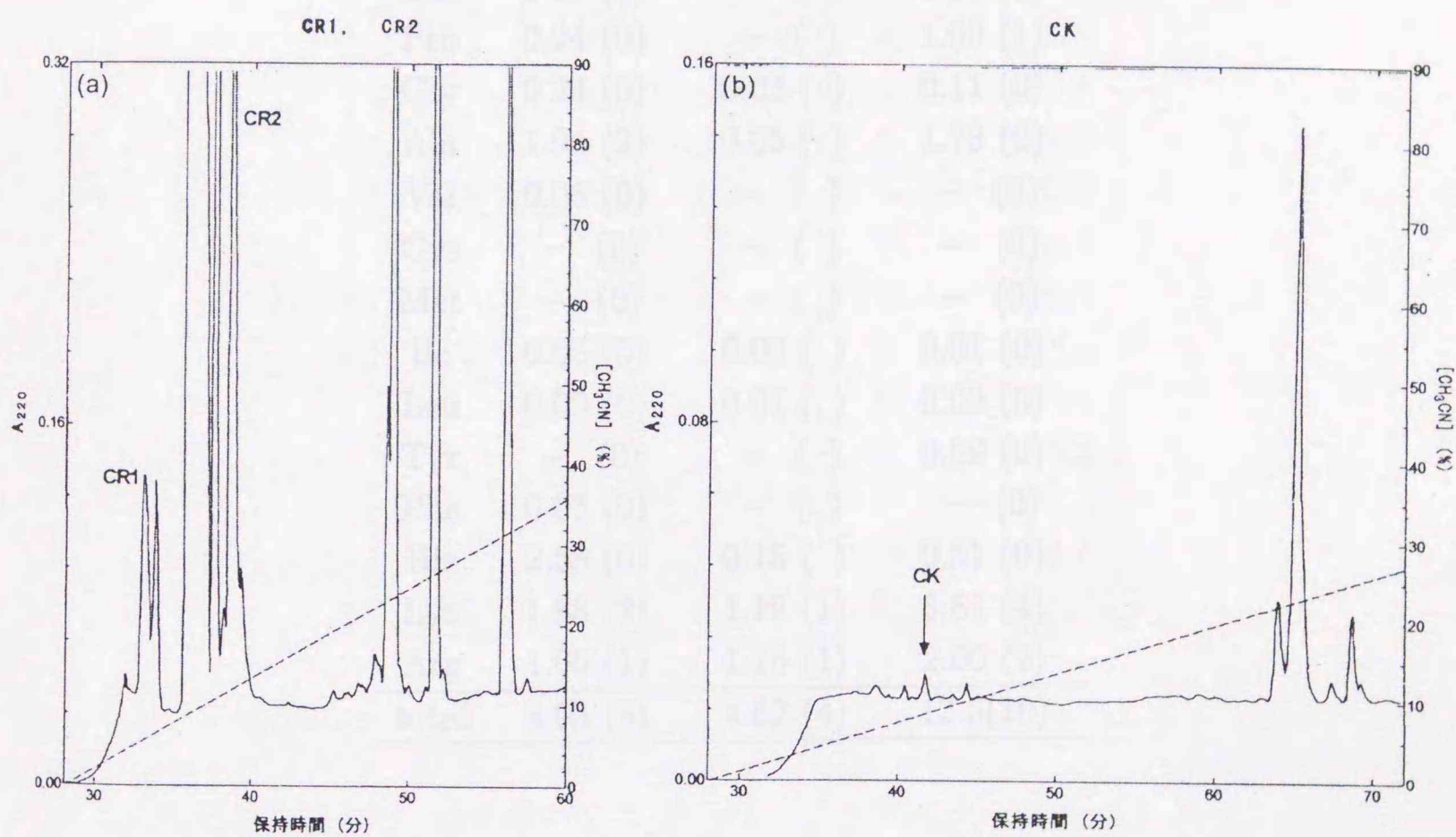


図 5: N 末端ペプチド断片の HPLC による分離。CN1 を KEP または REP によって消化した断片を HPLC によって分離した。(A), REP 断片の HPLC による分離の様子。これより CR1 と CR2 とが得られた。(B), KEP 断片の HPLC による分離の様子。これより CK が得られた。

A.A.	CK	CR1	CR2
Asx	0.17 (0)	0.02 ()	0.04 (0)
Thr	0.11 (0)	0.02 ()	2.08 (2)
Ser	0.25 (0)	2.00 (2)	— (0)
Glx	0.27 (0)	— ()	1.07 (1)
Pro	0.24 (0)	— ()	1.00 (1)
Gly	0.24 (0)	0.03 ()	0.11 (0)
Ala	1.94 (2)	0.05 ()	1.73 (2)
Val	0.06 (0)	— ()	— (0)
Cys	— (0)	— ()	— (0)
Met	— (0)	— ()	— (0)
Ile	0.05 (0)	0.00 ()	0.01 (0)
Leu	0.09 (0)	0.01 ()	0.02 (0)
Tyr	— (0)	— ()	0.09 (0)
Phe	0.03 (0)	— ()	— (0)
His	2.58 (0)	0.15 ()	0.51 (0)
Lys	1.88 (2)	1.19 (1)	3.81 (4)
Arg	1.05 (1)	1.15 (1)	2.00 (2)
total	8.95 (5)	4.62 (4)	12.5(10)

表 6: LC20 の N 末端ペプチドのアミノ酸分析結果。CN1 の KEP , または REP による消化断片を HPLC によって単離し, 分析した。分析値 の単位は nmol で表した。() 内の数字はプロテインシーケンサによって決定された配列から得られた組成比を表す。ただし, CR1 については質量分析とアミノ酸組成分析とから決定した。

Cycle	CK		CR2	
	A.A.	pmol	A.A.	pmol
1	R	27.0	A	2542.9
2	A	334.1	K	1900.6
3	—	—	A	2802.6
4	A	296.7	K	2436.3
5	K	145.1	T	1724.9
6			T	1376.6
7			K	1580.3
8			K	1406.8
9			R	1075.4
10			P	1421.3
11			Q	900.4
12			R	511.2

表 7: CN1 の消化断片のアミノ酸配列分析の結果。回収された PTH-アミノ酸と回収量 (pmol) を表した。— はシーケンサでは回収されず決定しなかったことを表す。この残基はアミノ酸組成分析及び、他の断片とのオーバーラップによって Lys と決定した (CK 第 3 サイクル)。

クされたアミノ酸配列,

Ac-Ser-Ser-Lys-Arg

をもつことがわかった。

以上のような配列分析の結果を図6にまとめた。ペプチドの配列から、豚大動脈ミオシン LC20 の全一次構造は、N 末端がアセチル基で修飾された 171 残基からなり、これより算出された分子量は 19,738 であった。

1.3 考察

豚大動脈平滑筋ミオシン制御軽鎖, LC20 のアミノ酸配列を決定した。この結果を鶏砂囊平滑筋 LC20 [13, 15] と比較したところ, 171 残基中 1 残基のみが異なっていた。鶏砂囊 LC20 の Met 60 は, 豚大動脈 LC20 では Leu に置換されており, 99.4 % が同一であった (図 7)。鶏砂囊 LC20 のリン酸化部位である Ser 19 とその周辺の配列は, 豚大動脈 LC20 においても完全に保存されていた。この結果から, 豚大動脈 LC20 でも Ser 19 が MLCK によってリン酸化され, ATPase 活性と収縮の制御に関連することが示唆された。鶏の胚の砂囊 LC20 では鶏砂囊 LC20 と比較して, 10 個のアミノ酸置換があり [53], 60 番目のアミノ酸は豚大動脈と同じ Leu である。Met と Leu とは DNA 塩基配列上, 1 塩基の置換で変わりうるのでこの置換は非常に起こりやすいものと考えられる。また, ヒトの臍動脈ミオシンの LC20 [12] と比較すると 2 残基の置換が見られた。臍動脈 LC20 の Tyr 80 と Ser 113 は豚大動脈 LC20 ではそれぞれ Ile と Ala に置換していた。豚 LC20 の配列が, 哺乳類のヒトよりも, 鶏と似ているという結果は興味深い。ラットの大動脈ミオシン LC20 のアミノ酸配列が大動脈培養細胞の cDNA 塩基配列より推定されているが [54], 豚大動脈

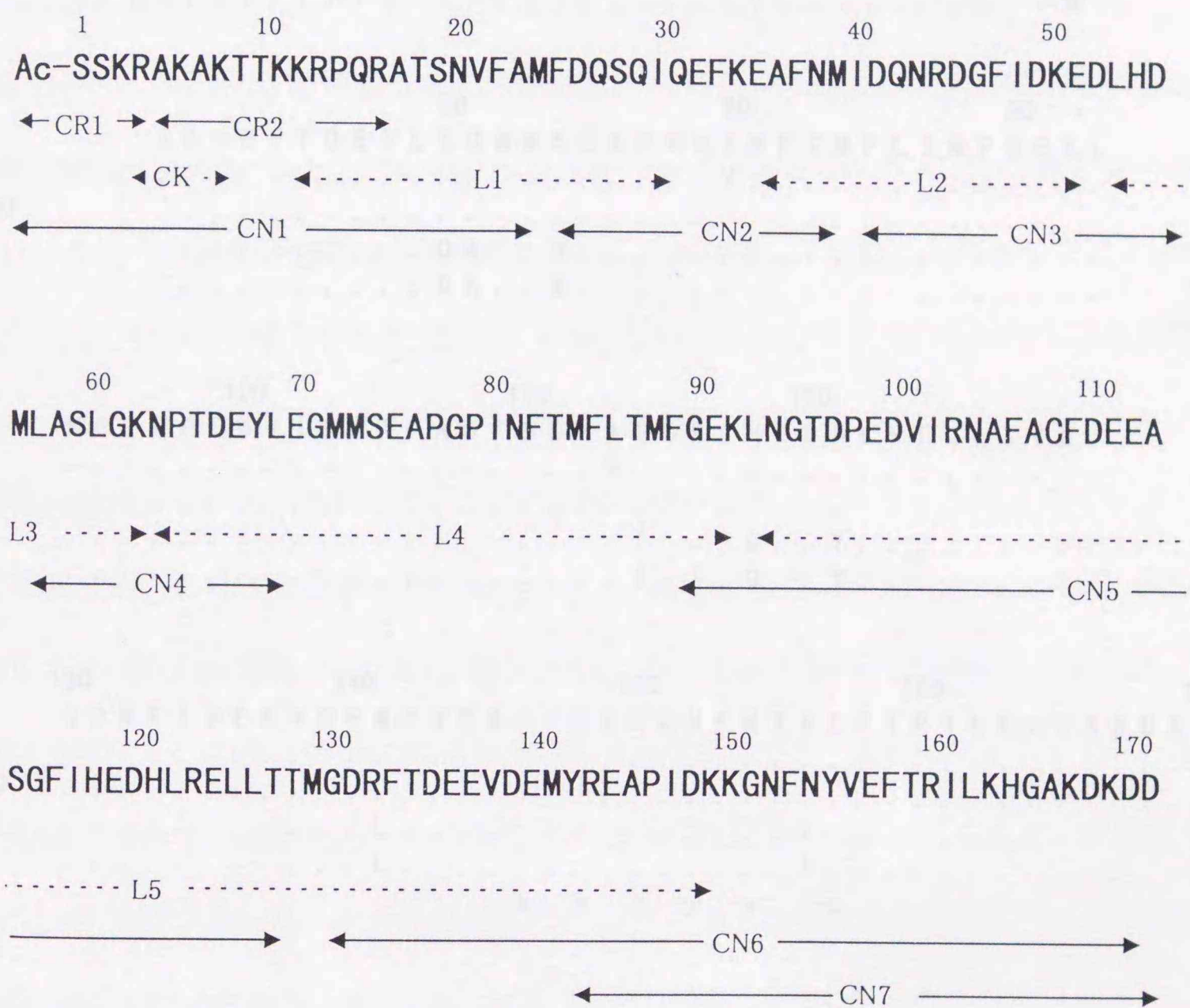


図 6: LC20 断片のオーバーラップと全一次構造。CNBr 断片, KEP 断片, および CK, CR1, CR2 のオーバーラップを表した。

	1	10	↓ 20
<i>Porcine Aorta</i>	Ac-S	S K R A K A K T T K K R P Q R A T S N V F A M	
<i>Human Vascular</i>	M		
<i>Chicken Gizzard</i>	Ac-		
<i>Embryonic C. G.</i>	M	 T	
<i>Rat Aorta</i>	M		

	30	40	50	60
	F D Q S Q I Q E F K E A F N M I D Q N R D G F I D K E D L H D M L A S L			
I				M
				M

	70	80	90
	G K - N P T D E Y L E G M M S E A P G P I N F T M F L T M F G E K L		
II		Y	
	 D A . . N		
	 D A . . N		

	100	110	120
	N G T D P E D V I R N A F A C F D E E A S G F I H E D H L R E L L T T M		
III		S	
		T . . . Q . . Y	
		I . T . Q . . Y	

	130	140	150	160	170
	G D R F T D E E V D E M Y R E A P I D K K G N F N Y V E F T R I L K H G A K D K D D				
IV					
		L	I		
		L	I		
		x y z -y -x -z			

図 7: LC20 の全一次構造の比較。豚大動脈, ヒト動脈 [12], 鶏砂嚢 [13, 15], 鶏胚砂嚢 [53], ラット大動脈 [54] の各アミノ酸配列を EF - ハンド構造 [55] に最も良くあうようにならべた [8]。- は欠損を表す。↓ で示された Ser がリン酸化部位。

LC20 と比べると 10 残基もの違いがみられる。Kumar ら [12] によると培養細胞は脱分化して、ミオシンは非筋細胞型アイソフォームへ変わってしまう可能性が強いとのことである。実際に、非筋細胞型 LC20 は未分化の筋組織細胞に存在する。確かに、鶏の胚の砂囊 LC20 のアミノ酸配列はラット大動脈培養細胞の LC20 のものと非常に良く似ている (図 7)。したがって、培養細胞から mRNA を単離して得た cDNA の塩基配列に由来するアミノ酸配列は、実際の分化した平滑筋の LC20 の配列とは異なっている可能性が高い。

Mougios と Bárány は、等電点電気泳動 (IEF) と SDS-PAGE の二次元電気泳動を用いて、豚大動脈ミオシンには、LC20 のアイソフォーム (LCa, LCb) が 85:15 の割合で存在しており、それぞれ異なる等電点 (それぞれ、5.06 および 4.73) をもつと報告している [11]。また、これらの LC が単リン酸化、および 2 重リン酸化されたミオシンについて二次元電気泳動をおこない、2 重リン酸化された LCa と リン酸化されていない LCb とがほとんど同じ等電点を持っていると報告している。本実験においては、LC20 の精製中にアイソフォームを確認することはできなかった。Mougios と Bárány の報告が正しいとすれば、多量に得ることができた本実験の LC20 は 85 の割合で存在する LCa の方であると思われる。15 の割合で存在する LCb が検出される機会があるとすればイオン交換クロマトグラフィの段階 (図 1) であったと思われる。この条件では、P-LC20 が LC17gi と同様のリン酸濃度 (80 ~ 90 mM) で溶出されたことから、LC20 (LCa) が 2 重リン酸化されていれば、リン酸濃度約 100 mM で溶出されると考えられ、LCb もこの位置に溶出すると考えられる。図 1 では確かに予想される位置に小さなピークがあらわれているが、このピーク成分を他のピークと同様に urea-PAGE で調べると、複数のバンドが検出され、個々のバンドを同定することは困難であった。また、図 1 で用いている条件では、ここにみられる 4 つのピーク以外にピークはあらわれず、LCb が分離された様子はなかった。もしかしたら、urea-PAGE で複

数のバンドがみられた小さなピークに LCb がふくまれているのかもしれない。

大動脈平滑筋ミオシンのアクトミオシン ATPase 活性は、鶏砂囊平滑筋ミオシンのアクトミオシン ATPase 活性に比べ $1/2 \sim 1/3$ 程度であることが知られている。これは臓器の果たす役割の差異によると考えられるが、その機能の違いには豚大動脈 LC17 の 2 つのアイソフォーム [16] が関与している。これらのアイソフォームは、C 末端 9 残基以内の 5 残基だけが互いに異なっており、この違いにより、一方は鶏砂囊ミオシン LC17 に、他方は非筋細胞ミオシン LC17 にそれぞれよく似ている [16]。Hasegawa らは、豚大動脈平滑筋ミオシンには、砂囊筋型と非筋型の LC17 が 6 : 4 の割合で含まれていることを示した。また、ミオシンへの LC17 の交換導入の実験によって LC17 アイソフォームの比率を変えると、アクトミオシン ATPase 活性が変わることを報告した [52]。砂囊型の LC17 が多いとき、ミオシン ATPase 活性は高くなりアクチンとの親和性は低くなるが、逆に、非筋細胞型の LC17 が多くなるとミオシン ATPase 活性が低くなり、アクチンとの親和性が高くなると報告している。したがって、LC20 はこのような ATPase 活性の大きさの変動には関与していないと考えられる。

図 7 に示したように、平滑筋ミオシン由来の LC20 のアミノ酸配列は、リン酸化部位とその周辺の配列が高度に保存されており、それ以外の違いについても 171 残基中、10 残基前後である。これらのことから、LC20 の役割について、筋収縮の on/off と関連したミオシン ATPase 活性の制御を中心に考察をすすめた。

第2章 抗リン酸化ミオシン抗体によるミオシンリン酸化部位のマッピング

2.1 序

前章で示した様に、平滑筋ミオシン LC20 のリン酸化部位は Ser19 であり、Ser19 がリン酸化されるとアクトミオシン ATPase 活性が著しく増加する。すなわち、筋収縮の on/off はミオシン LC20 のリン酸化/脱リン酸化に関連している。このため、ミオシン分子内の LC20 のリン酸化部位と ATPase 活性部位との間の立体構造上の距離を知ることは、LC20 リン酸化によるミオシン ATPase 活性化の機構を解明するための重要な出発点となると考えられる。

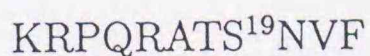
本研究では、LC20 のリン酸化部位を特異的に認識する抗体を調製し、これを用いて大動脈平滑筋ミオシン分子内における LC20 リン酸化部位の位置を同定した。まず、第1章で決定したアミノ酸配列に基づいて、LC20 のリン酸化部位とその周辺の配列をもつペプチドを合成し、これを用いてウサギを免疫して、リン酸化ミオシンを特異的に認識する抗体を得た。この抗体を用いて、ミオシン-抗体複合体の電子顕微鏡像観察をおこない、抗体の結合位置の測定結果からリン酸化部位の位置を同定した。その結果、リン酸化部位の位置は、ミオシンの頭部と尾部との境界である頭部-尾部連結部 (head-rod junction) よりも 3.4 nm 頭部側にあることが明らかになった。このことより ATPase 活性ドメインと LC20 リン酸化部位とは少なくとも 4.6 ~ 5.6 nm 離れていると推定され、LC20 のリン酸化部位が ATPase 活性ドメインと直接相互作用することはないことがわかった。

次に、リン酸化ミオシンのアクチン活性化 ATPase 活性を抗体存在下で測定した結果、ATPase 活性は抗体濃度に依存して 1.3 倍まで上昇することがわかった。これらの結果から、LC20 がリン酸化されると LC20 の N 末端の高次構造が変わって ATPase が活性化さ

れること、そして、抗体がリン酸化部位に結合すると、ATPase の活性化に必要な高次構造が安定化することが示唆された。

2.2 結果

合成ペプチドのリン酸化 P-ミオシンに特異的な抗体を作製するために、LC20 のリン酸化部位に当たる Ser19 を含む 11 残基からなるペプチドを合成した。合成したペプチドの配列は以下の通りである。



ペプチドを精製後、MLCK を用いて Ser19 をリン酸化した。このペプチドは MLCK の基質としては短いため、MLCK との親和性が低く [33-35]、そのため高濃度の MLCK を用いた条件 (1mM 合成ペプチド, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MLCK, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CaM, 0.35M KCl, 5mM MgCl_2 , 5mM CaCl_2 , 10mM ATP, 40mM Tris-HCl, pH 7.5, 30°C, 16~24 時間) でリン酸化をおこなった。リン酸化反応の反応混液を逆相 HPLC により分析したところ、合成ペプチドのピークの溶出時間よりも早い時間に、隣接して新しいピークが現れた (データは示していない)。リン酸化反応の進行とともにこのピークが大きくなることから、これがリン酸化されたペプチドであると推定された。逆相 HPLC でリン酸化ペプチドを大量に精製することは困難であったので、逆相 HPLC はリン酸化反応後の反応混液の脱塩のために用いた。脱塩したリン酸化、および非リン酸化ペプチドの混合物を遠心減圧濃縮した後、DE32 陰イオン交換クロマトグラフィによりリン酸化ペプチドを分離、精製した。結果を図 8 に示した。初期条件 (5mM NH_4HCO_3) で、2 つのピークが検出された。その後 0.1M NH_4HCO_3 まで NH_4HCO_3 の直線濃度勾配による溶出をおこなったが、新たなピークは検出されなかった。初期条件で溶出された 2 つのピーク画分についてアミノ酸組成分析と薄層電気泳動をおこ

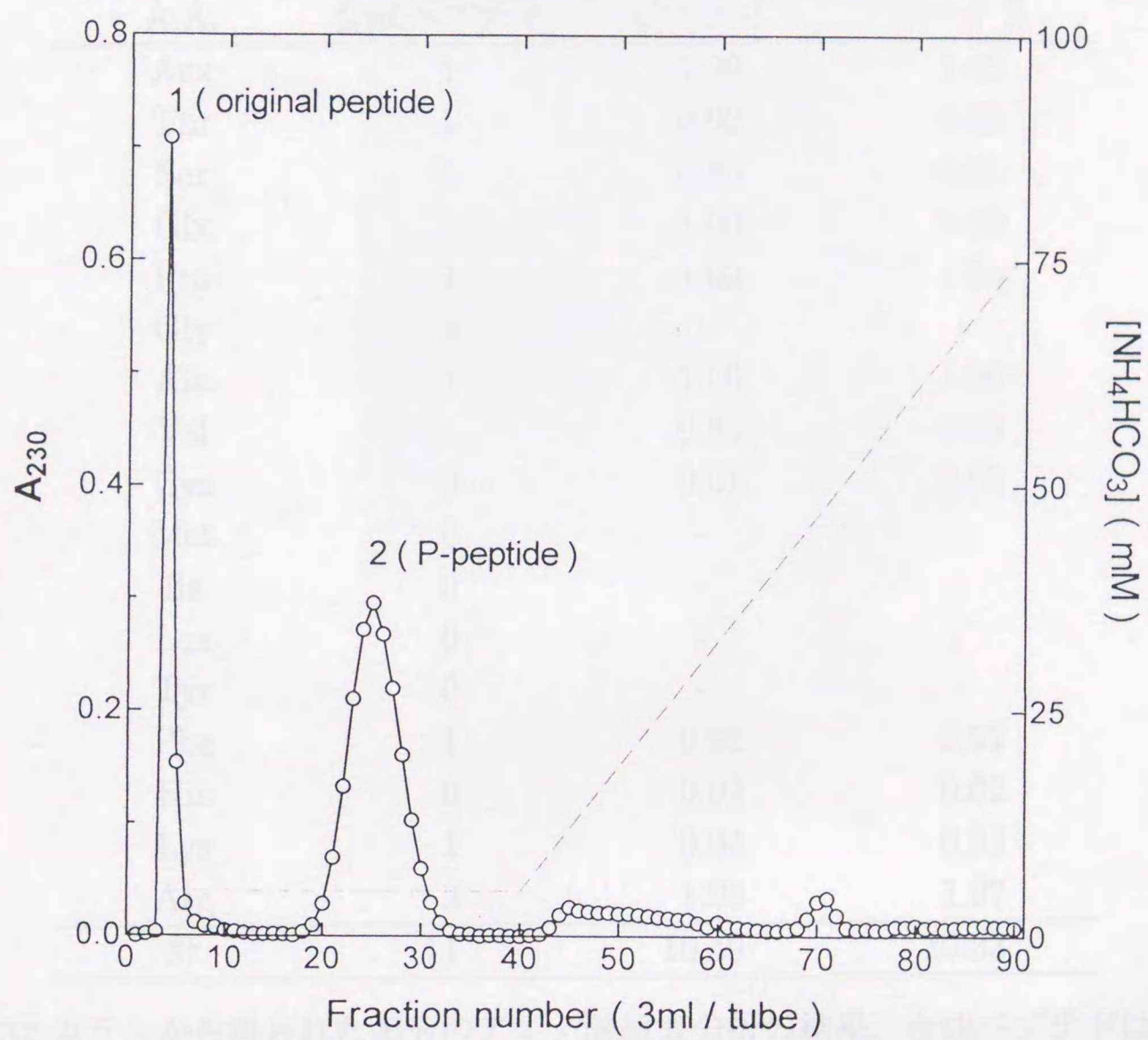


図 8: DE32 による P-ペプチドの分離。初期条件 5mM NH_4HCO_3 でカラムを平衡化後、試料を添加した。初期条件の緩衝液でカラムを洗浄するとピーク 1 が、続いてピーク 2 が検出された。破線に示すように NH_4HCO_3 の直線濃度勾配溶出を試みたが特に目立ったピークは現れなかった。

A.A.	合成ペプチド	ピーク 1	ピーク 2
Asx	1	1.00	1.03
Thr	1	0.92	0.88
Ser	1	0.85	0.62
Glx	1	1.00	0.99
Pro	1	1.03	1.06
Gly	0	-	-
Ala	1	1.00	1.00
Val	1	0.88	0.89
Cys	0	0.01	0.03
Met	0	-	-
Ile	0	-	-
Leu	0	-	-
Tyr	0	-	-
Phe	1	0.91	0.92
His	0	0.02	0.02
Lys	1	0.94	0.92
Arg	2	1.93	1.97
計	11	10.49	10.33

表 8: DE32 カラムから得られた画分のアミノ酸組成分析の結果。合成ペプチドはその配列から得られた組成を示した。ピーク 1, ピーク 2 については Ala を 1 として組成比を算出した。

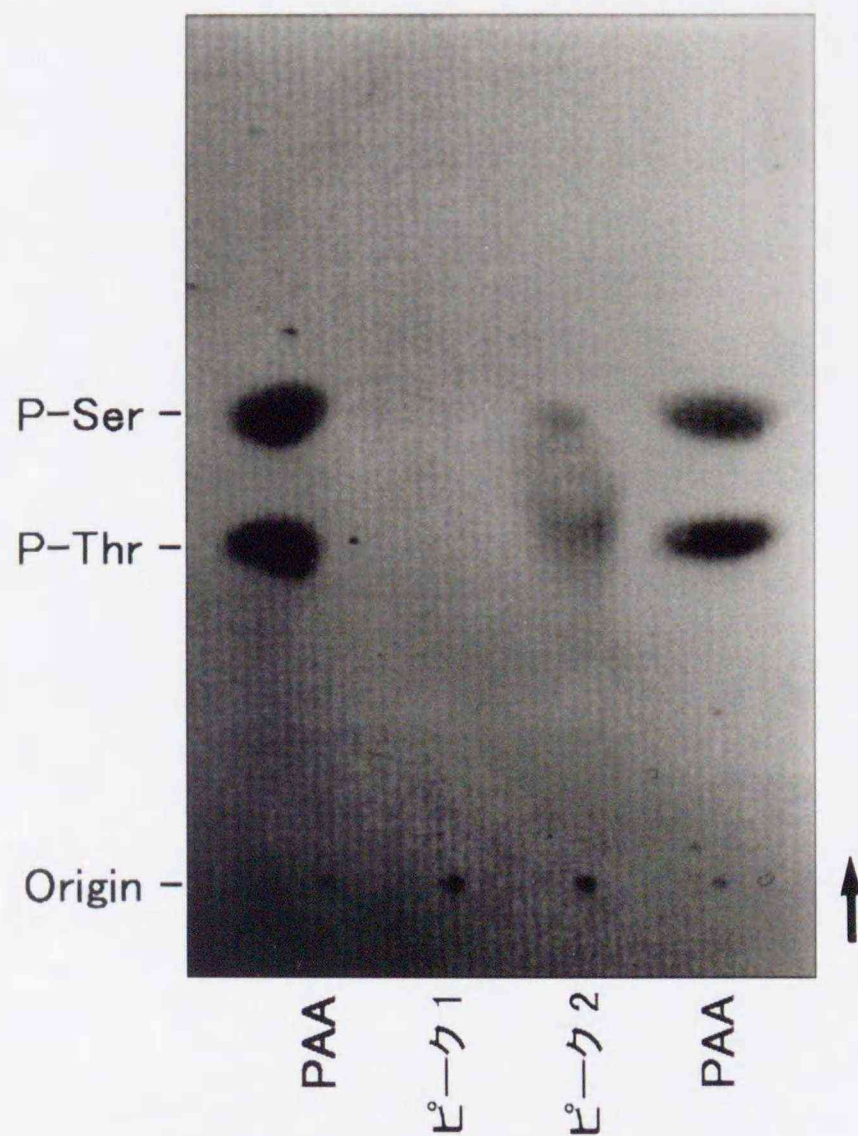


図 9: ホスホアミノ酸分析の結果。DE32 カラムクロマトグラフィによって得られたピーク 1 とピーク 2 とを部分加水分解した後、これらについて薄層電気泳動をおこなった。P-AA は P-Ser と P-Thr との混合物, Origin は泳動開始位置。ピーク 1 からは何も検出されず, ピーク 2 から 2 つのスポットが検出された。上のスポットは P-Ser であるが, 下の歪んだ形のスポットは, P-Thr より移動度が大きく, 部分分解物と判断した。

なった結果をそれぞれ表8と図9に示した。

表8に示したのは、図8の各ピーク成分について酸気相中で30分加水分解した後のアミノ酸組成分析の結果である。ピーク1の成分は合成ペプチドから計算される組成比にほぼ等しかった。ピーク2の成分の組成比でもほぼこれと同様であったが、ピーク2の成分がピーク1の成分よりも負電荷が多いこと(図8)を考慮すると、この成分がリン酸化ペプチドである可能性が高かった。図9はピーク1、ピーク2の成分を6M HCl中で3時間、部分加水分解した試料についての薄層電気泳動の結果である。部分加水分解によって生じたホスホセリンのスポットをニンヒドリンで検出した。その結果、ピーク1の成分からはスポットはなにも検出されなかった。一方、ピーク2では、ホスホセリンと等しい移動度のスポットが検出され、ピーク2成分がリン酸化ペプチドであることが示された。ピーク2成分には、この他に、移動度がホスホスレオニンよりやや大きい、部分分解物に相当するスポットも検出された。このようにして得られたピーク2成分をリン酸化ペプチドとして以後の実験に用いた。

抗 P-ミオシン抗体 (APMAb) の調製 精製したリン酸化ペプチドをKLHにカップリングした後、これを抗原として、2羽のウサギを免疫した。ウサギより得られた抗血清について硫安分画とDE32陰イオン交換クロマトグラフィをおこない、IgGを精製した(図10(A))。精製IgGについてP-LC20-Sepharose 4B及びLC20-Sepharose 4Bカラムを用いてリン酸化部位を特異的に認識する抗体を精製した(図10(B)(C))。P-LC20-Sepharose 4Bカラムに吸着し、Gly-HClで溶出した画分(図10(B))をLC20-Sepharose 4Bカラムに添加して、素通り画分と吸着画分とを集めた(図10(C))。LC20-Sepharose 4Bカラムの素通り成分と吸着成分それぞれについて、リン酸化部位に対する特異性をELISA法を用いて分析した。

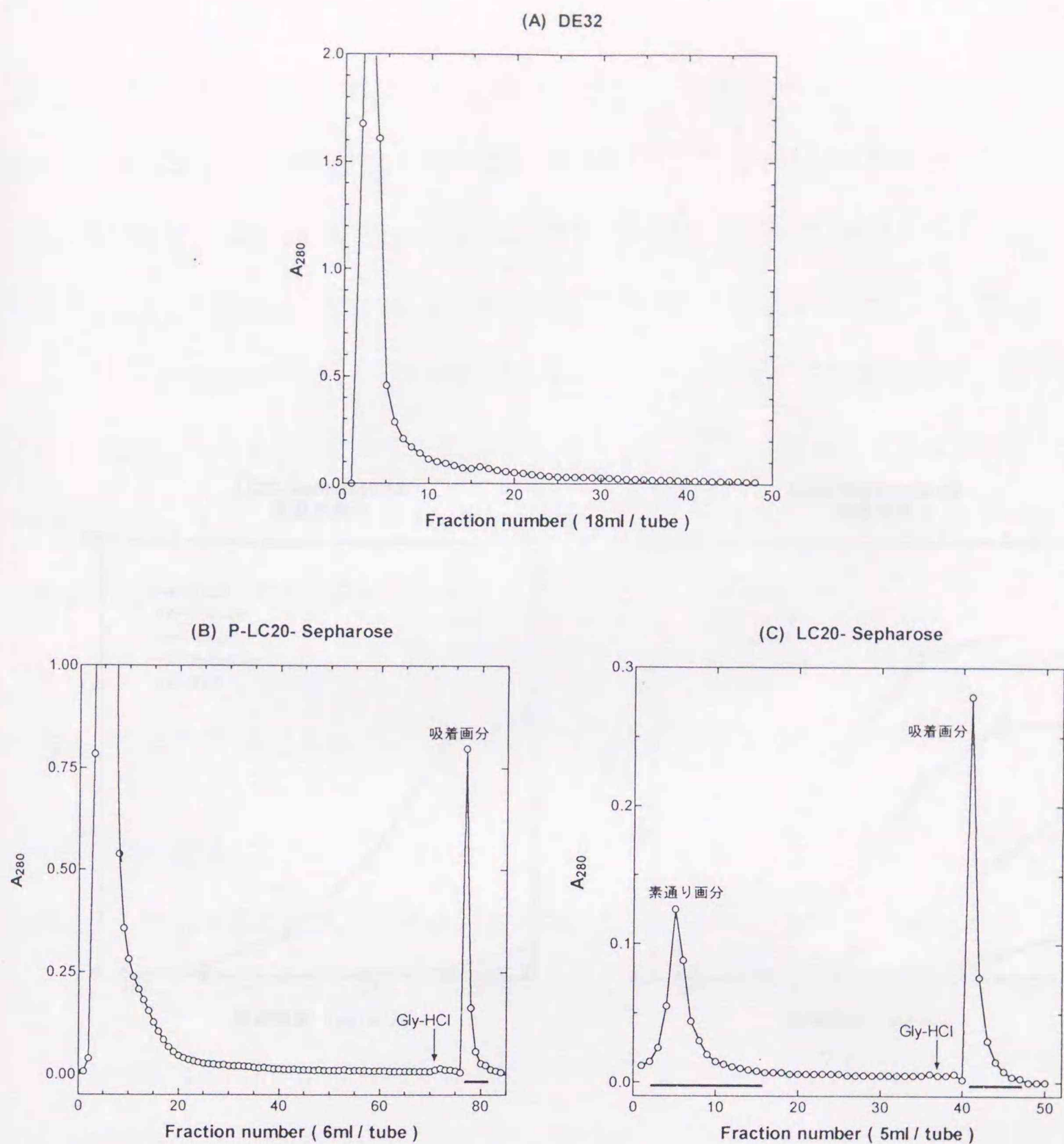


図 10: カラムクロマトグラフィによる APMab の精製。(A), DE32 による IgG 画分の調製。血清から調製した粗 IgG 画分を開始緩衝液 (50mM NaCl, 30mM Tris-HCl, pH 8.3) で平衡化した DE32 カラムに添加した。開始緩衝液でカラムを洗い、カラムの素通り画分として得られる IgG 画分(分画 2~48)を集めた。(B), (A) より得られた IgG 画分を P-LC20-Sephadex 4B カラムに添加した。カラムを TBS/Tw で十分に洗った後、矢印に示す位置で溶出液を 0.1M Gly-HCl, pH 2.5 に変えて吸着成分を溶出し、図中の横棒で示した画分を集めた。(C), (B) から得られた試料を LC20-Sephadex 4B カラムに添加した。(B) と同様にカラムを洗った後、矢印に示した位置で溶出を開始した。図中の横棒で示した素通り画分と吸着画分とを集めた。集めた画分をそれぞれ ELISA 法で分析した (図 11)。

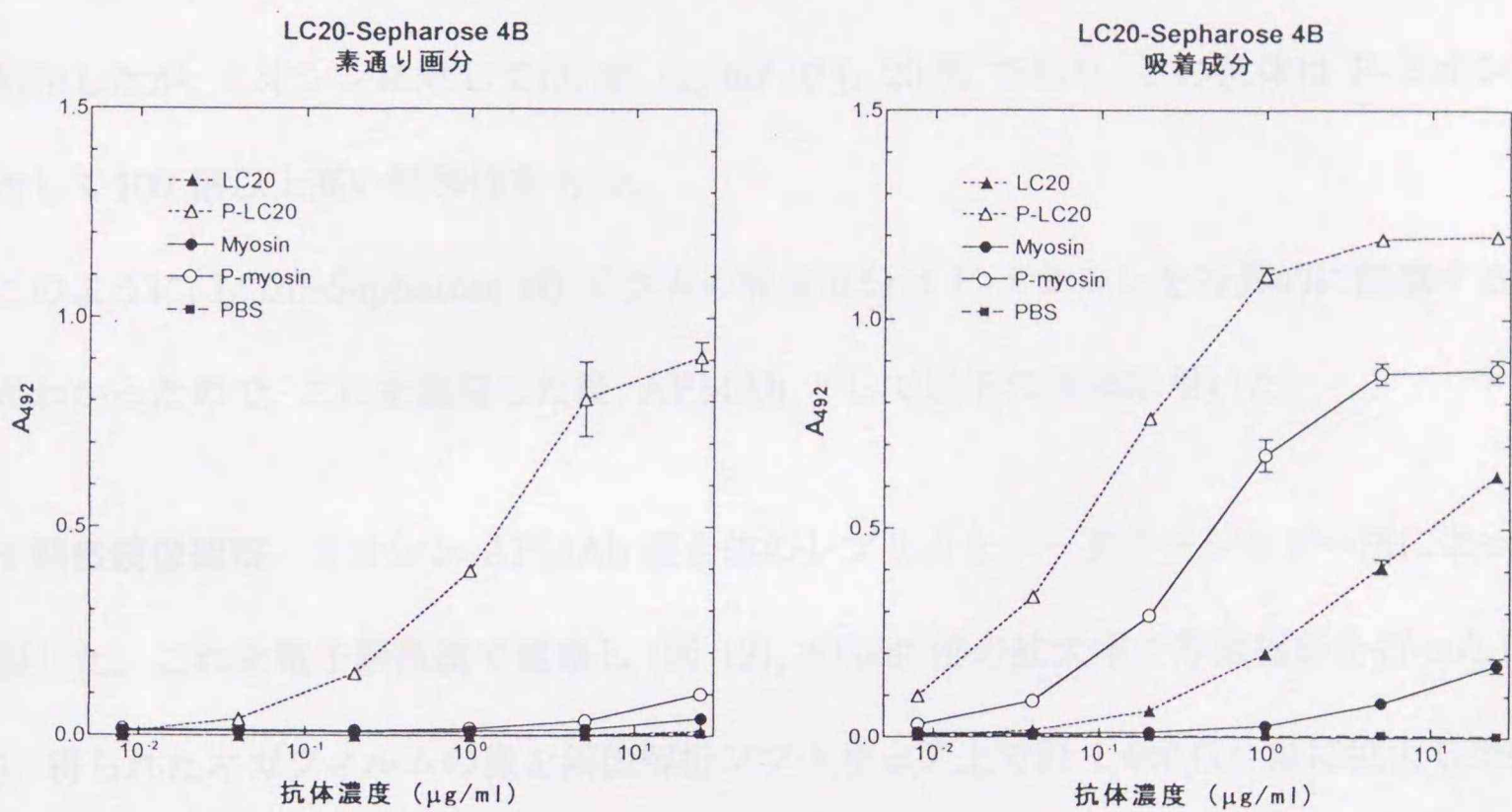


図 11: LC20-Sepharose 4B カラム (図 10) の素通り画分 (A) と吸着画分 (B) の特異性。それぞれの抗体画分について ELISA 法で分析した。吸着画分は P-ミオシンに対する特異性が高く、これを APMAb として用いた。一方、素通り画分は P-LC20 に特異的な抗体であった。

(図 11)。LC20, P-LC20, ミオシン, および P-ミオシンを抗原として ELISA をおこなった結果, LC20-Sepharose 4B カラムの素通り成分は, 予想通り, P-LC20 にのみ結合する抗体であった (図 11 (A))。LC20-Sepharose 4B カラムの吸着成分も, 予想通りに P-LC20 と強く結合したが, LC20 とも結合し, リン酸化部位を認識する特異性は低かった (図 11 (B))。しかし, この成分は P-ミオシン を特異的に認識することがわかった (図 11 (B))。図 11 (B) に示した通り, P-ミオシンに対する反応性は, P-LC20 の場合と同様に抗体濃度約 $5 \mu\text{g/ml}$ で飽和したが, ミオシンに対しては, $25 \mu\text{g/ml}$ でも 20 % であり, この抗体は P-ミオシンに対して 100 倍以上高い親和性をもつ。

このように, LC20-Sepharose 4B カラムの吸着成分は P-ミオシンを特異的に認識することがわかったので, これを濃縮した後, APMAb として以下の実験に用いた。

電子顕微鏡像観察 ミオシン-APMAb 複合体のレプリカをロータリーシャドー法によって作製した。これを電子顕微鏡で観察し (図 12), 40,000 倍の拡大率で写真撮影を行った (図 13)。得られたネガフィルムの像を画像解析ソフトウェア上で計 1,440,000 倍に拡大した後, ミオシン-APMAb 複合体の像の分子形態を詳細に解析した。まず, ミオシン分子の頭部先端から頭部尾部連結部までの長さを測定し, 頭部の長さを求めた。次いで, 頭部先端から抗体結合位置までの長さを測定した。測定結果を図 14 にまとめた。白金-タングステンを用いたロータリーシャドー法で作製したレプリカの電子顕微鏡観察の解像度は約 2 nm であるので, 測定結果はミオシン頭部先端から 2 nm ずつに区切って示した。図 14 のヒストグラムの横軸はこうにして測定された距離を表し, 縦軸は観察されたミオシン頭部の個数を表した。測定の結果から導かれたミオシン頭部の平均の長さは $19.5 \pm 2.6 \text{ nm}$ ($n = 187$) で, これまで報告されている値, 約 20 nm [56] とほぼ等しかった (図 14 (B))。



図 12: ロータリーシャドー法によって得られたミオシン-APMAb 複合体の電子顕微鏡像。頭部が 3 つに見えるのがミオシン-APMAb 複合体。双頭の遊離ミオシンも見られる。点状の三角形の像は遊離している抗体分子である。右下の横棒は $0.2 \mu\text{m}$ を表す。

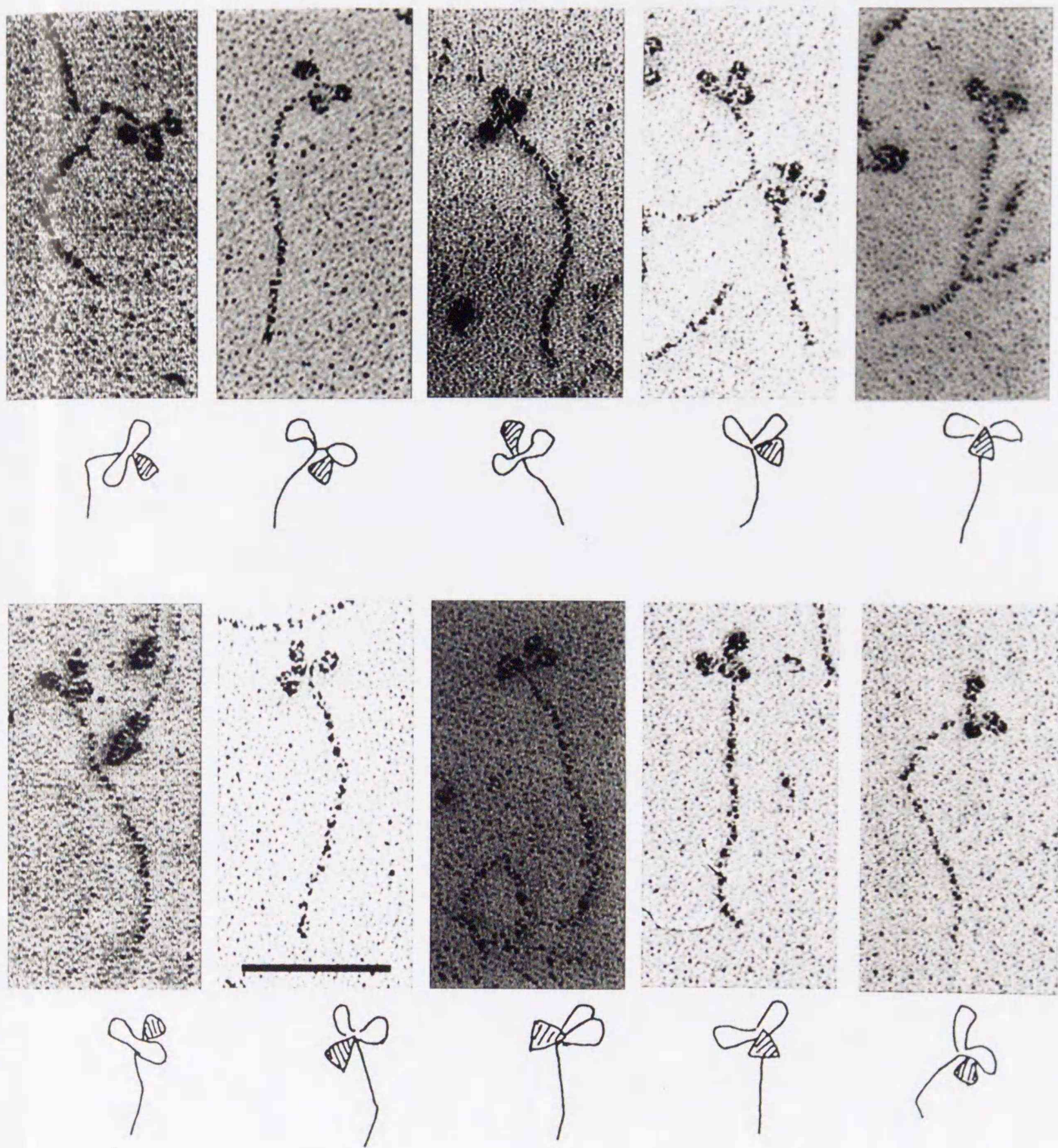


図 13: ミオシン-APMAb 複合体の電子顕微鏡像。それぞれの像の下に描いた絵のように抗体とミオシン頭部とを識別することができる。このように抗体とミオシン頭部とを明確に識別できる像をもちいて抗体の結合部位からミオシン頭部先端までの距離を測定した。写真中の横棒は $0.1\mu\text{m}$ の長さを表す。

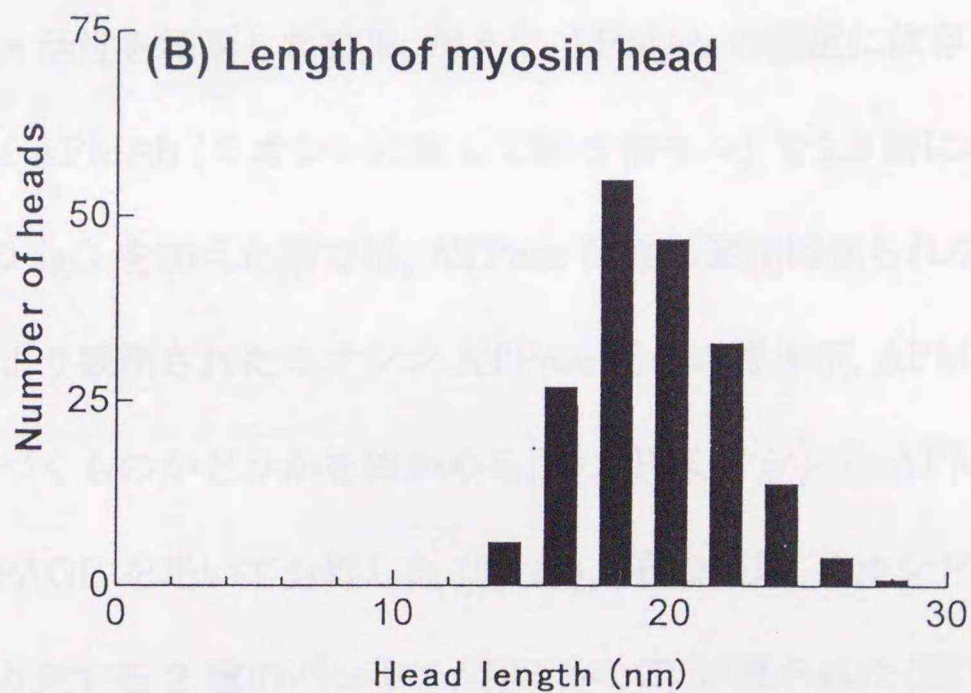
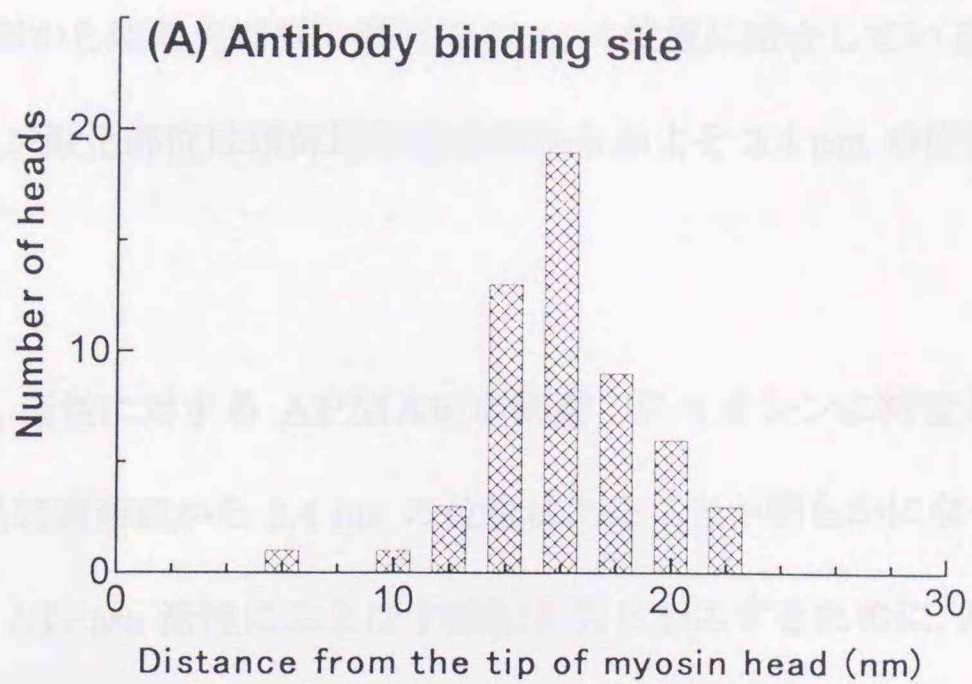


図 14: ミオシン-APMAb 複合体の電子顕微鏡像を観察した結果をヒストグラムに表した。
 (A), ミオシン頭部先端から抗体の結合している位置までの距離。(B), ミオシン頭部の長さ。
 横軸は 2nm 毎に長さを取り, 縦軸は測定したミオシン頭部の個数を表した。

一方、頭部先端から抗体の結合位置までの平均の距離は 16.1 ± 2.8 nm ($n = 55$), ヒストグラムのピークは, 15 ~ 17 nm であった (図 14 (A))。以上の結果から, 抗体はミオシン分子の頭部尾部連結部から頭部先端側に平均 3.4 nm の位置に結合していることがわかった。これより, LC20 リン酸化部位は頭部尾部連結部からおよそ 3.4 nm の位置にあることが示された。

ミオシン ATPase 活性に対する APMAb の影響 P-ミオシンに結合した LC20 のリン酸化部位は, 頭部尾部連結部から 3.4 nm の位置にあることが明らかになった。P-ミオシンのリン酸化部位が ATPase 活性におよぼす機能を明らかにするために, APMAb が結合したときのアクトミオシン ATPase 活性の変化を調べた。反応系に APMAb を加えてアクトミオシン ATPase 活性を測定した結果, 加えた APMAb の濃度に依存して ATPase 活性は増大し, $40\mu\text{g/ml}$ APMAb (ミオシンに対して約 5 倍モル) で 1.3 倍になった (図 15)。一方, 正常血清由来の IgG を加えた系では, ATPase 活性に変化は見られなかった。

APMAb 添加により観測されたミオシン ATPase 活性の増加が, APMAb の P-ミオシンに対する結合に基づくものかどうかを確かめるため, P-ミオシンと APMAb との共沈実験をおこない, SDS-PAGE を用いて分析した (図 16)。その結果, ミオシンフィラメントの沈殿からは, IgG に由来する 2 種のバンド (γ -HC, γ -LC) が見られた (図 16)。一方, 対照として正常血清由来の IgG を用いた試料ではこのバンドは検出されなかった。これによって APMAb が結合するとアクチン活性化 ATPase 活性は増加することが確認された。

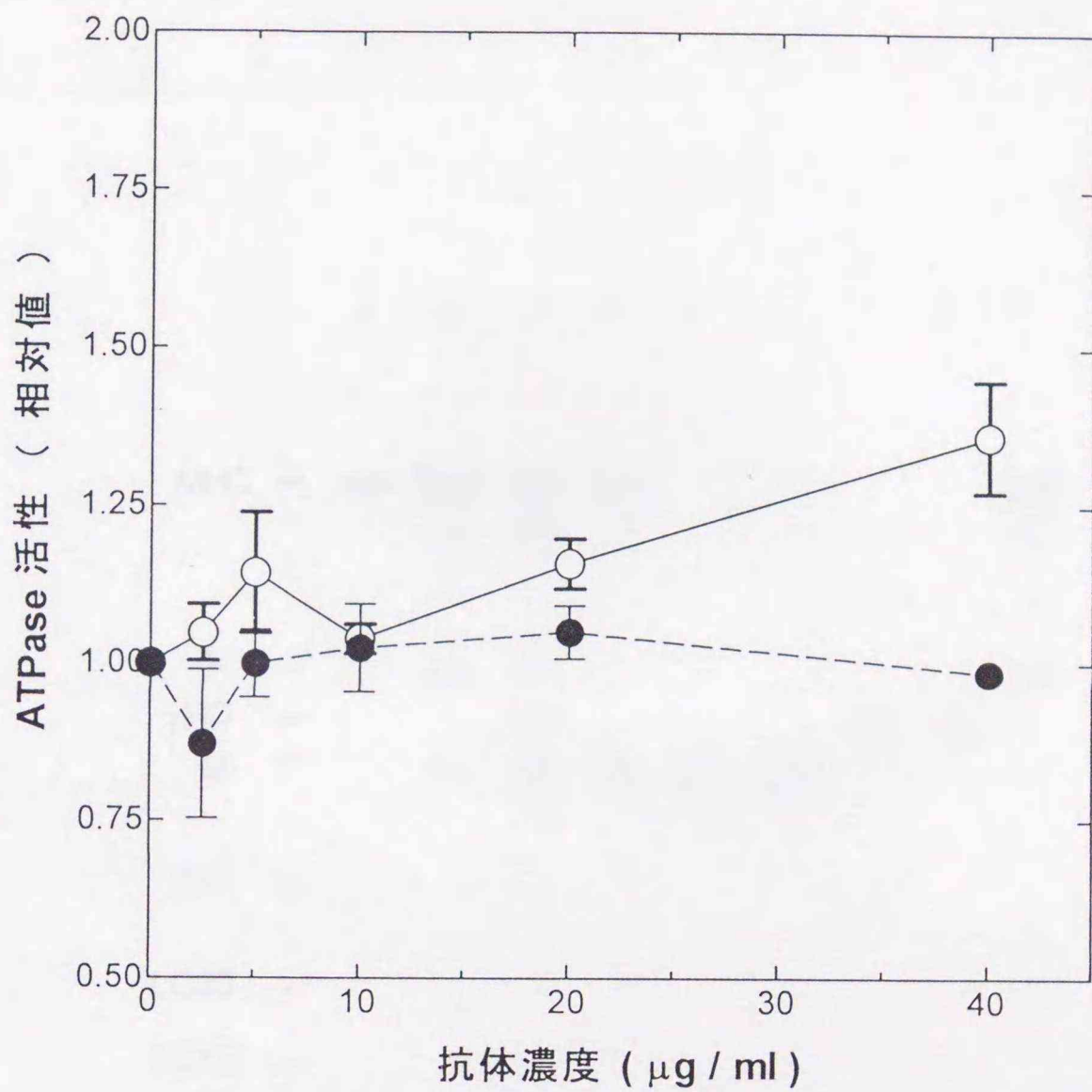


図 15: APMAB によるアクトミオシン ATPase 活性の増加。アクトミオシン ATPase 活性は, 反応混液に APMAB (○) または正常血清より得た IgG (●) を横軸に示す濃度で加えて, 25°C で 3 分プレインキュベートした後測定した。

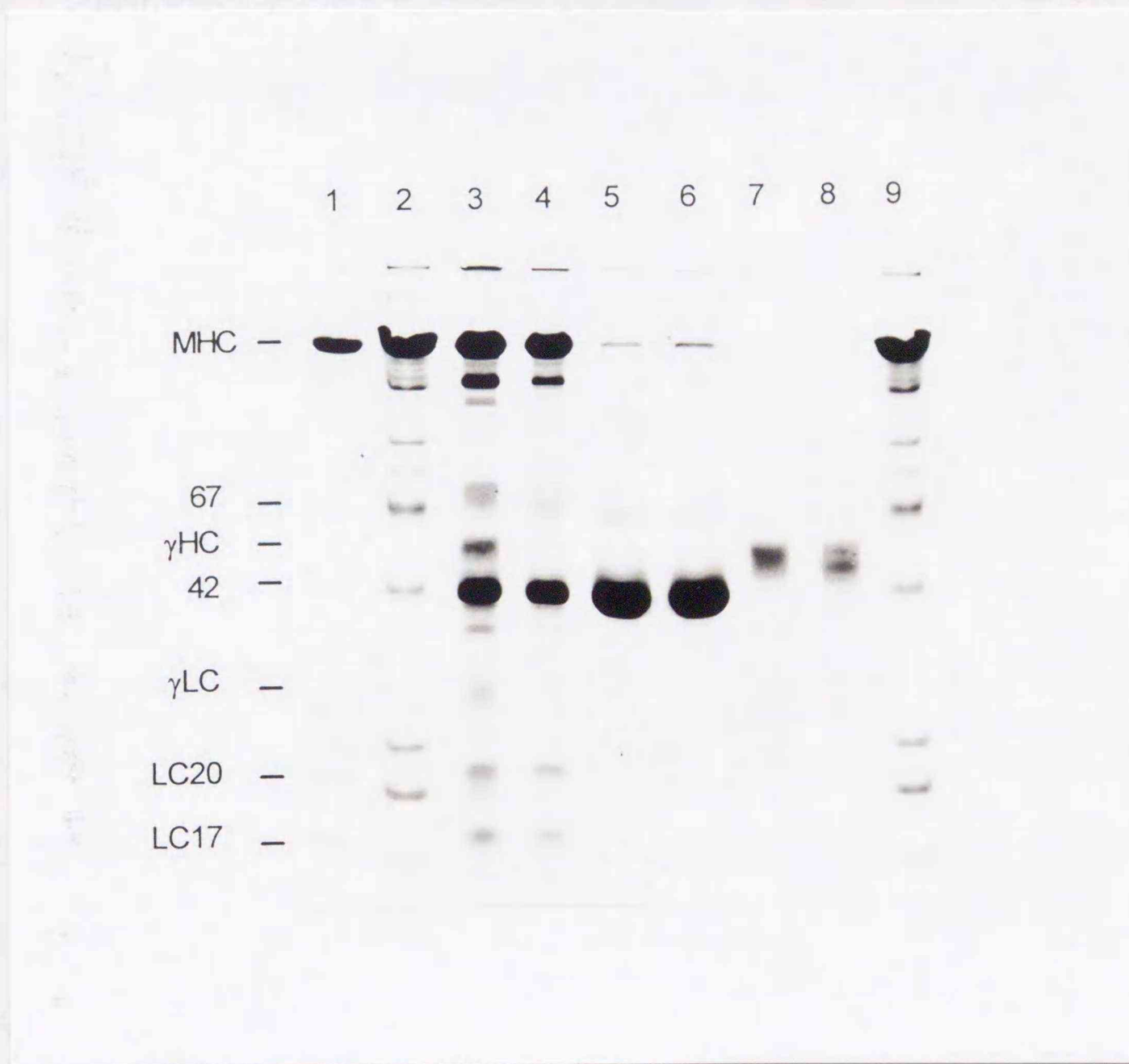


図 16: 抗体とアクト-P-ミオシンとの共沈。図 15 の ATPase 活性測定の下で、APMAB がアクトミオシンに結合しているかどうかを調べた。レーン 1, ミオシン。レーン 2, 9, 分子重量マーカー。レーン 3, 4, 40 μ g/ml の APMAB (レーン 3) または正常 IgG (レーン 4) 存在下の ATPase 反応混液を 10,000 g, 20 分, 遠心分離した沈殿。レーン 5, 6, それぞれレーン 3, 4, の上清を更に 80,000 g, 20 分超遠心分離した沈殿。レーン 7, 8, APMAB と正常 IgG。APMAB が P-ミオシンに結合して共沈した様子が見られる (レーン 3)。写真左の数字は分子重量マーカーに使用した標準タンパク質の分子質量 (kDa) を表わす。MHC, ミオシン重鎖 (200 kDa); γ -HC, IgG 重鎖 (55 kDa); γ -LC, IgG 軽鎖 (25 kDa)。

2.3 考察

リン酸化ミオシンのリン酸化部位に特異的な抗体を作成するために、LC20 の Ser19 を含む 11 残基の配列に相当するペプチドを合成した。このペプチドに MLCK を加えてリン酸化した。調製したリン酸化ペプチドの部分加水分解物について薄層電気泳動をおこない、Ser19 のリン酸化を示すホスホセリンのスポットを確認した。それに加えて、ホスホスレオニンより移動度がやや大きいスポットも検出された (図 9)。MLCK 濃度が高いと Ser19 とその N 末端側に隣接する Thr18 とが同時にリン酸化される二重リン酸化が起こる可能性も考えられるが、今回用いたペプチドは MLCK との親和性が低いので [33-35], 二重リン酸化が起るとは考え難い。ホスホアミノ酸分析で見られたホスホスレオニンに似たスポットはホスホセリンを含む部分分解物と思われる。

リン酸化ミオシンを特異的に認識する抗体, APMAb は 2 種のアフィニティカラムを用いることで得られた (図 10)。しかし、その結果は予想に反していた。実験前には、APMAb は P-LC20-Sepharose 4B カラムに吸着し、LC20-Sepharose 4B カラムは素通りすると予想していた。実際には、この様にして得られた抗体は P-LC20 に特異的な抗体であった (図 11)。この抗体が P-ミオシンを認識できなかったのは、ミオシンに結合した P-LC20 のリン酸基は、遊離の P-LC20 のリン酸基と異なる機能型の立体構造をもつためと考えられる。APMAb は P-LC20, および LC20-Sepharose 4B カラムに吸着した (図 10, 11)。このことは、抗原に用いた P-ペプチドとカラムに固定化された LC20 または P-LC20 との立体構造が異なっていることを示唆している。また、APMAb は P-LC20 にも LC20 にも結合できるにもかかわらず、ミオシンよりも P-ミオシンを強く認識する (図 11)。これは、APMAb がリン酸化部位そのものの立体構造に加えて、リン酸化部位を含む周辺の立体構造を認識していることを示唆しており、この立体構造の違いが、P-ミオシンの機能に本質的なものだ

と考えられる。APMAb は、ミオシンと結合した LC20 のリン酸基がとりうる機能型の立体構造を認識していると考えられる。

ミオシン分子上のリン酸化部位の位置を調べるため、P-ミオシンに APMAb を結合させ、電子顕微鏡を用いて抗体の結合位置を測定した。その結果、LC20 のリン酸化部位は頭部尾部連結部からおよそ 3.4 nm の距離に位置していることがわかった(図 14)。その結果、リン酸化部位は、ATPase 活性ドメインから 4.6 ~ 5.6 nm 離れていることが示された [17]。これにより、LC20 のリン酸化が直接 ATPase 活性ドメインへ影響をおよぼすことはありえないことが明らかになった。これまで、LC20 のリン酸化部位の位置は決定されていなかったもので、LC20 リン酸化による ATPase 活性調節機構を調べる上で、これは重要な情報であると思われる。骨格筋ミオシン [17] や、ホタテミオシン [57] では、制御軽鎖の N 末端側ドメインは頭部尾部連結部に、C 末端側ドメインは頭部先端方向に向いて結合している。平滑筋ミオシンでも同様の配置だとすると 3.4 nm は、LC20 の長軸方向の長さ(約 5 nm)の半分よりも長く、LC20 の長さより短いという結果になる。これは、LC20 のリン酸化部位が、LC20 の C ドメインに作用することができる位置にあることを示す。

Jancso と Szent-Györgyi はホタテミオシン制御軽鎖の変異体を用いた実験をおこなった結果、制御軽鎖の第 3 ドメインと第 4 ドメインとのつなぎ目にある Gly117 (平滑筋ミオシン LC20 では Gly130 に相当する) が必須軽鎖に接していて、ホタテミオシン ATPase 活性化に必要な Ca^{2+} の必須軽鎖への結合を安定化していると報告した [58]。この Gly は平滑筋ミオシン、非筋細胞ミオシン LC20 で保存されているが、横紋筋ミオシンでは Cys に置換されている。今回の電子顕微鏡による観察結果は、平滑筋ミオシン LC20 のリン酸基が LC20 の C -ドメインに作用しうる位置にあることを示しているので、リン酸化の効果は、この保存された Gly を通して発揮されているのかもしれない。Ikebe と Morita は、N 末

端領域を限定消化した LC20 を平滑筋ヘビーメロミオシンに交換導入した実験をおこない、LC20 の Ser19 リン酸化に依存したアクトミオシン ATPase 活性調節には LC20 の Arg13 から Arg16 の部分が必須であり、この部分が、LC20 の末端領域の位置を決定すると報告した [59]。Yang と Sweeney は、平滑筋ミオシン LC20 の C-ドメインの E, F, G, および H-ヘリックスに含まれる Arg のうち、骨格筋ミオシン制御軽鎖では失われているものに注目した。これらの Arg を導入した骨格筋ミオシン制御軽鎖の変異体を鶏砂囊平滑筋ミオシンに交換導入すると、リン酸化に依存したミオシン ATPase 活性調節が回復することを見いだした。そして、立体構造上の配置から、平滑筋ミオシン LC20 の Arg103, Arg123, Arg143, および Arg160 のうち、Arg103 (E-ヘリックス) か、または Arg160 (H-ヘリックス) がリン酸基の位置を決定するのではないかと報告した [60]。Ikebe と Morita, および Yang と Sweeney が提唱したモデルはいずれも LC20 の N 末端領域が LC20 の C-ドメインと接触し、N 末端領域が局在化するというものである。今回の観察結果でも、C-ドメインへの作用が示唆される点で、2 つの結果と一致する。

APMAb はリン酸化によって活性化されたアクトミオシン ATPase 活性をさらに増加した (図 15)。アクトミオシン ATPase 活性は、アクチン濃度に依存してミカエリス-メンテン型に増加し、最大活性に到達する。本実験では、本実験条件下で最大活性を得るのに十分なアクチン濃度を使用した。従って、APMAb によってみられた ATPase 活性の増加 (1.3 倍) は、LC20 のリン酸化で起きる活性化に必要なアクチンとミオシンとの相互作用を増強するかたちであらわれていると考えられる。アクチンと LC20 とが直接相互作用するという報告はないので、APMAb が結合した効果は、LC20 の N 末端領域を介して、結果的にアクチン-P-ミオシン複合体の活性化相互作用を増強したと考えられる。上述のように、P-LC20 の N 末端領域が局在化してリン酸化の効果があらわれるのだとすると、APMAb がもたらし

た効果は LC20 の N 末端領域が局在化することと何か関係があるのかもしれない。骨格筋 S-1 の X 線結晶解析 [17] で制御軽鎖の N 末端領域が決定されなかったことから、この領域の自由度は非常に高いと考えられるので、P-LC20 の N 末端領域は完全に局在化しているのではなく、局在化した状態と自由な状態との間で平衡になっているのかもしれない。もしそうなら、APMAb は、この平衡を N 末端領域が局在化する方へ傾けたのではないかと考えられる。しかし、P-LC20 の N 末端領域の構造に APMAb が結合したとき、P-LC20 の N 末端領域は、P-LC20 の C - ドメインと結合できなくなるはずである。このことから、P-LC20 の N 末端領域が、P-LC20 の C - ドメインに接することができるような構造、言い換えれば、APMAb の精製の結果から考察された機能型の立体構造をとって局在化すれば、リン酸化の効果があらわれると考えられる。APMAb は、リン酸化されて機能型の構造をとった N 末端領域のゆらぎを抑止することで、リン酸化の効果を増強したのかもしれない。

次に、このようなゆらぎを伴う LC20 の N 末端領域のリン酸化の効果が、ミオシン分子内にある 1 対の LC20 分子間の相互作用を通して働くのか、それとも LC20 分子内の相互作用を通して働くのかについて検討した。

第 3 章 リン酸化による LC20 の構造変化

3.1 序

抗体 (APMAb) を用いた実験の結果, P-ミオシンに結合した LC20 の N 末端領域は head-rod junction よりも頭部先端側にあることがわかった。また, LC20 N 末端領域の高次構造のゆらぎがアクチン活性化ミオシン ATPase 活性制御に関与していることが示唆された。

本実験では, LC20 の N 末端領域のリン酸化にともなって起こる LC20 の構造変化のゆらぎの詳細を調べるため, P-ミオシンと DP-ミオシンに対して消化酵素を作用させ, LC20 の消化に対する耐性を調べた。その結果, アルギニルエンドペプチダーゼ (REP) を用いたとき, リン酸化及び脱リン酸化に依存したアクトミオシンの消化速度の違いが検出され, リン酸化によりミオシンの LC20 の切断速度は大きくなった。N 末端領域のリン酸化により, LC20 は消化酵素へ接近しやすくなった, 言い換えれば, 溶媒への露出の程度が増したと考えられる。また, P-ミオシンまたは DP-ミオシンに対して, 水溶性カルボジイミドによる化学架橋実験をおこなった。化学架橋の経時変化を SDS-PAGE によって調べたところ, アクチン非存在下では P-ミオシン, DP-ミオシンともに約 40 kDa のバンドが一過的に生成する様子が観察された。しかし F-アクチンを加えると, P-ミオシンについてのみ 40 kDa のバンドの生成が観察された。 ^{32}P でラベルした P-ミオシンを用いて同様の実験をおこなった結果, 40kDa のバンドは, 2 分子の LC20 の分子間架橋産物であることが判明した。さらに, これ以外でも LC20 のバンドと LC17 のバンドとの間の移動度をもつバンドにも放射活性が検出された。このバンドは LC20 の分子内架橋産物であると考えられた。この様に化学架橋は LC20 の同一分子内, および 2 分子間の両方で進行しており, リン酸化に依存した LC20 の溶媒への露出度の増加と立体構造変化が架橋速度を大きくしていると考えられた。

3.2 結果

LC20 の消化耐性 P-LC20 と LC20 のミオシン分子内での立体構造の違いについて知見を得るため、ミオシンまたはアクトミオシン ATPase 活性が観察される実験系に、タンパク加水分解酵素であるアルギニルエンドペプチダーゼ (REP) を加えて LC20 の消失の速度を比較した。REP 消化の様子を SDS-PAGE で分析し、LC20 のバンド強度から求めた LC20 消化の経時変化を図 17 に示した。ミオシンに対する REP の重量比を 1/500, 1/100, 1/50 と増加すると、それにともなって、アクチン存在下での P-ミオシンの P-LC20 の消失速度が大きくなることがわかった。アクチン非存在下、80 分消化後では DP-ミオシン、P-ミオシンともに 80 % 程度の LC20 が消化を受けずに残存していた。これに対し、アクチン存在下では 1/50 量の REP を加えたとき、DP-ミオシンの LC20 はアクチン非存在下と変わらず 80 % 程度が残存していたが、P-ミオシンの LC20 は 40 % 程度にまで減少した。REP の濃度を更に上げ、ミオシンに対して 1/25 の重量を用いて消化したところ、P-ミオシン LC20 の残存量は REP 1/50 のときとほとんど変わらず約 40 % であったが、DP-ミオシン LC20 の残存量は約 60 % に低下し、P-ミオシン LC20 の残存量に近づいた (図 17)。アクチン非存在下でも LC20 の残存量が同様に減少する傾向が見られた。REP による LC20 消化の初速度の相対値を図 17 のグラフより求め、表 9 にまとめた。また、表 9 に示した P-LC20 消化の初速度の変化の様子を図 18 に表した。これより、アクト-P-ミオシンの P-LC20 の消化速度は、他の条件のときにくらべて常に 2 倍以上大きいことがわかった。

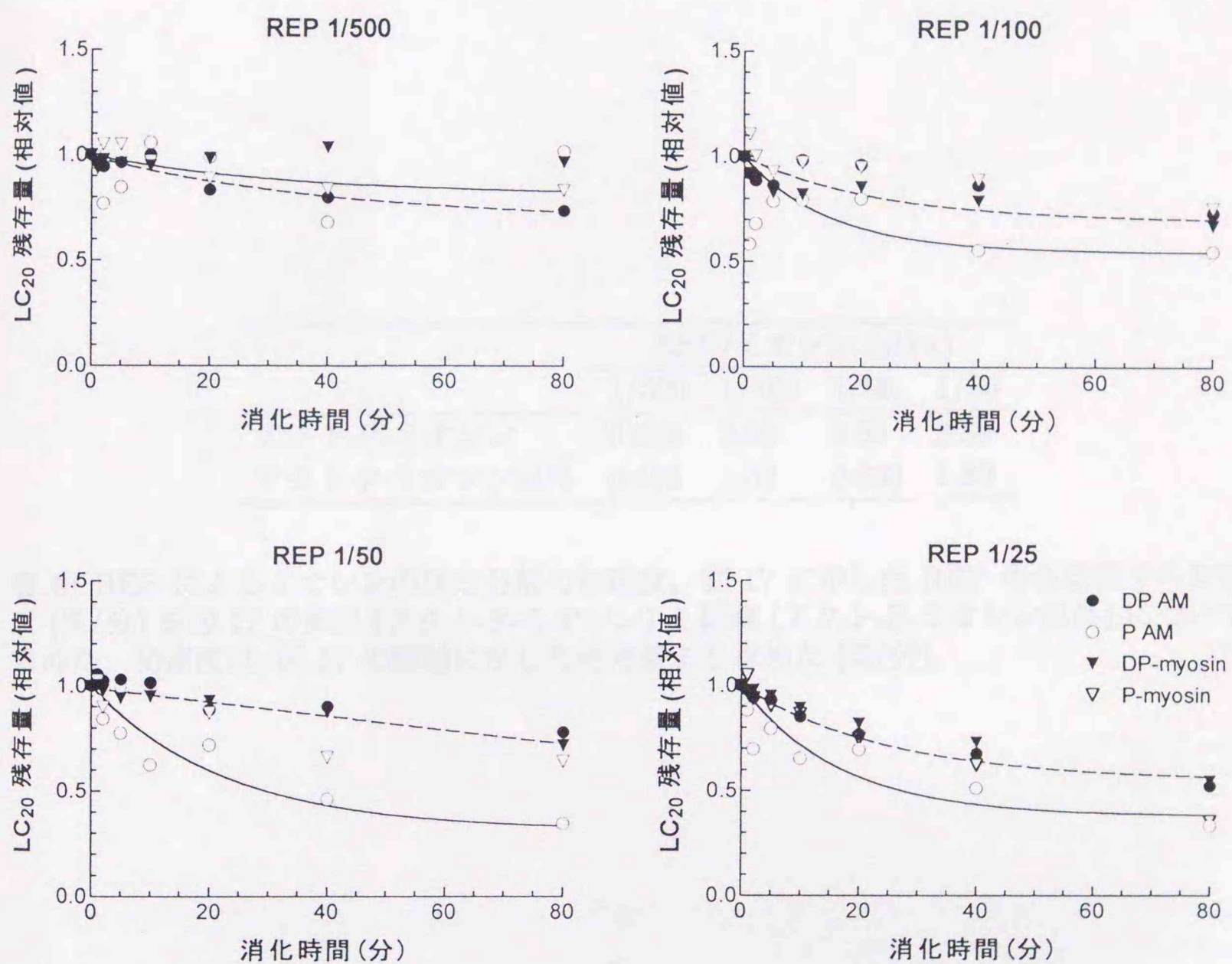


図 17: アルギニルエンドペプチダーゼ (REP) による LC20 の消化の経時変化。それぞれミオシンに対して重量比で 1/500 (REP 1/500), 1/100 (REP 1/100), 1/50 (REP 1/50), および 1/25 (REP 1/25) の REP を加えて, リン酸化 (P) または脱リン酸化 (DP) のアクトミオシン (AM) またはミオシン (M) を消化した。縦軸は LC20 の残存量を相対値で表した。実線は アクト P-ミオシン (○) の, 破線はそれ以外 (●, ▼, ▽) の経時変化に対して最小二乗法で線を引いた結果。アクト-P-ミオシンの LC20 は REP によって消化を受けやすいことがわかる。

	REP/ミオシン (w/w)			
	1/500	1/100	1/50	1/25
アクト-P-ミオシン	0.682	3.06	3.05	3.85
アクト-P-ミオシン以外	0.452	1.52	0.638	1.80

表 9: REP によるミオシンの限定分解の初速度。図 17 に示した REP の各条件での初速度 (%/分) を図 17 の実線 (アクト-P-ミオシン) と破線 (アクト-P-ミオシン以外) について求めた。初速度は、図 17 の縦軸に示した相対値より求めた (%/分)。

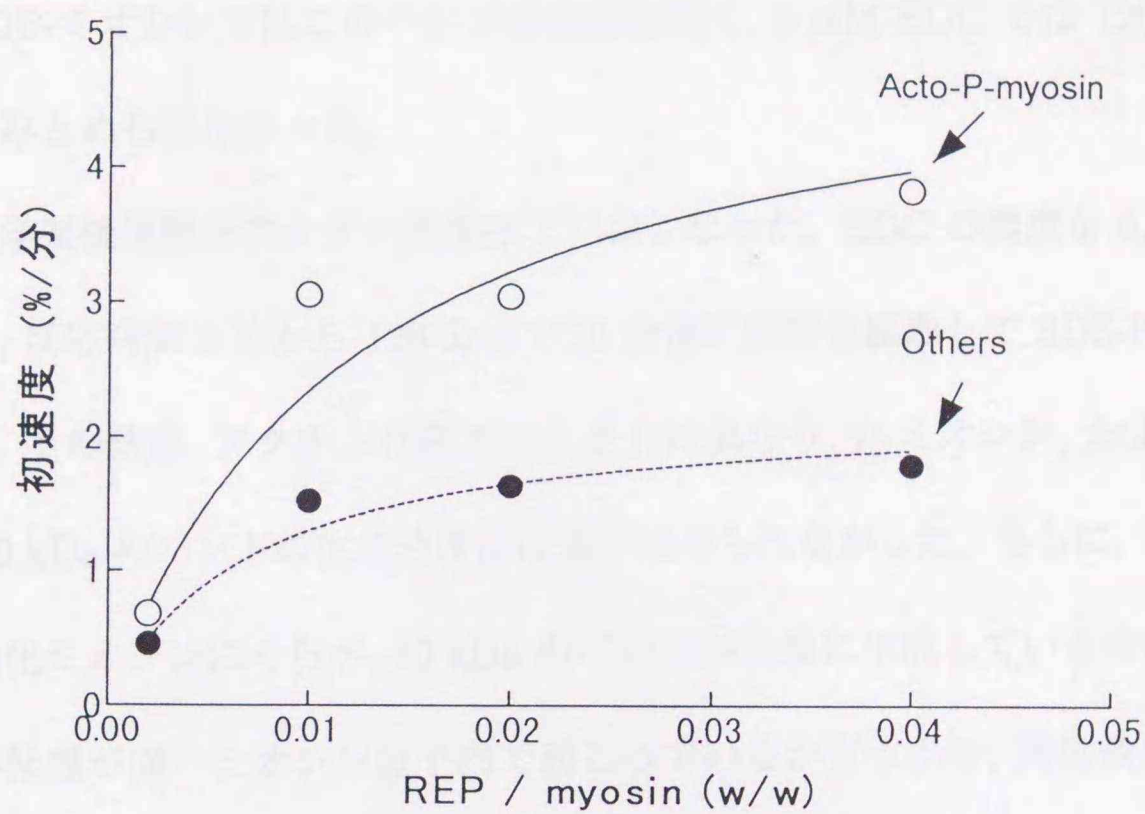


図 18: REP によるミオシン限定分解の初速度の変化。表 9 に示した数値をグラフに表した。○, アクト- P-ミオシン; ●, アクト- P-ミオシン以外。実線および破線は最小二乗法によるカーブフィットの結果を表す。

LC20 の 化学架橋 消化耐性とは異なる視点から LC20 の高次構造変化についての知見を得るため、アクトミオシンに、0, 5 および 10mM の水溶性カルボジイミド (EDC) を加えて化学架橋を試みた。架橋反応の進行を SDS-PAGE で観察したところ、40 kDa 付近に新しいバンドが生成するのが観察された (図 19, XL)。このバンドは P-ミオシンで顕著に見られ、5 mM EDC では 30 ~ 60 分、10 mM EDC では 30 分でもはっきり現れている。また、このバンドは単一ではなく、2, 3 本のバンドが重なって形成されている様であった。これに対し、DP-ミオシンではこのバンドの生成は遅く、5 mM EDC では 120 分でもバンドがはっきりみとめられなかった。

同様の化学架橋実験をアクチン非存在下でおこなった。EDC の濃度を 0, 5, 10mM と変えて反応し、反応時間 0 分から 120 分まで 20 分毎に試料を採取して SDS-PAGE で分析した (図 20)。その結果、アクチン存在下のときとは異なり、P-ミオシン、および DP-ミオシンの間で 40 kDa のバンドの生成速度には違いはみられなかった。さらに、アクチン存在化の脱リン酸化ミオシンにくらべ、40 kDa のバンドが多量に生成しているのが観察された。

この化学架橋が同一ミオシン分子内で起こっているかどうかを、高塩濃度 (0.5 M KCl) の条件下で図 20 と同様に化学架橋実験をおこなって調べた (図 21)。この塩濃度では、ミオシンは単量体として存在しており、その分子形態は 6S と呼ばれる尾部が伸びた形をとっている。その結果、高塩濃度でも低塩濃度条件下 (図 20) と同様に、DP-ミオシン、P-ミオシンの両方で、同じような速度で 40 kDa 付近のバンドの生成が観察された。ミオシンが単量体として存在する条件で同様の結果が得られたことから、約 40kDa のバンド成分が、ミオシン分子内での架橋産物であることがわかった。40 kDa の架橋産物は、見かけの分子量から LC20 の 2 量体であることが推定された。

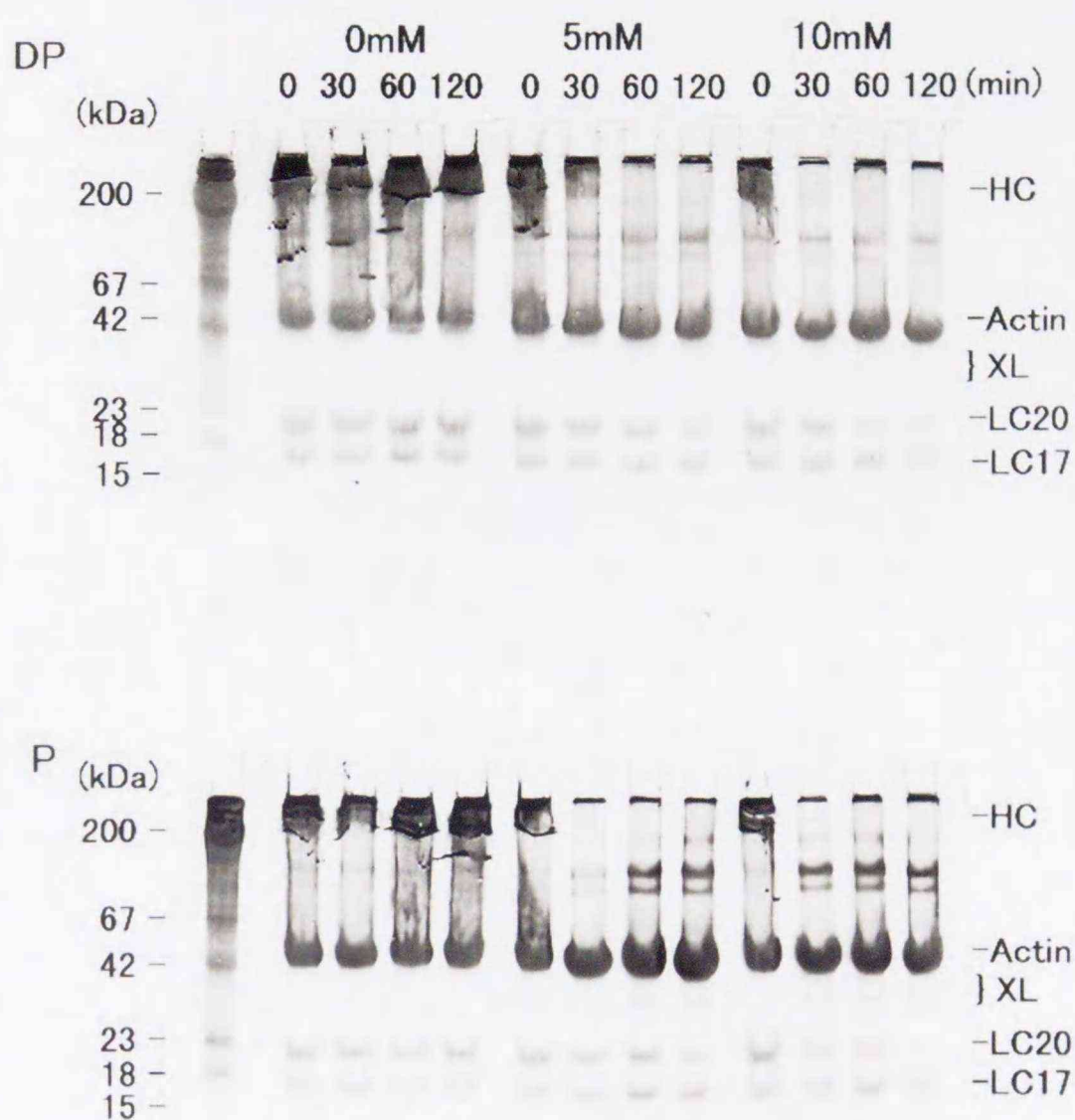


図 19: アクトミオシンを化学架橋したときの SDS-PAGE。DP-ミオシン (上), および P-ミオシン (下) に 0, 5, および 10 mM の EDC を加えて化学架橋をおこない, その経時変化を SDS-PAGE で調べた。左端のレーンは分子量マーカー, 図の左の数字は分子量を表す。HC, XL はそれぞれミオシン重鎖, 架橋産物を表す。時間とともに 40 kDa 付近に新しいバンド (XL) が生成した。この変化は P-ミオシンの方で顕著に見られた。

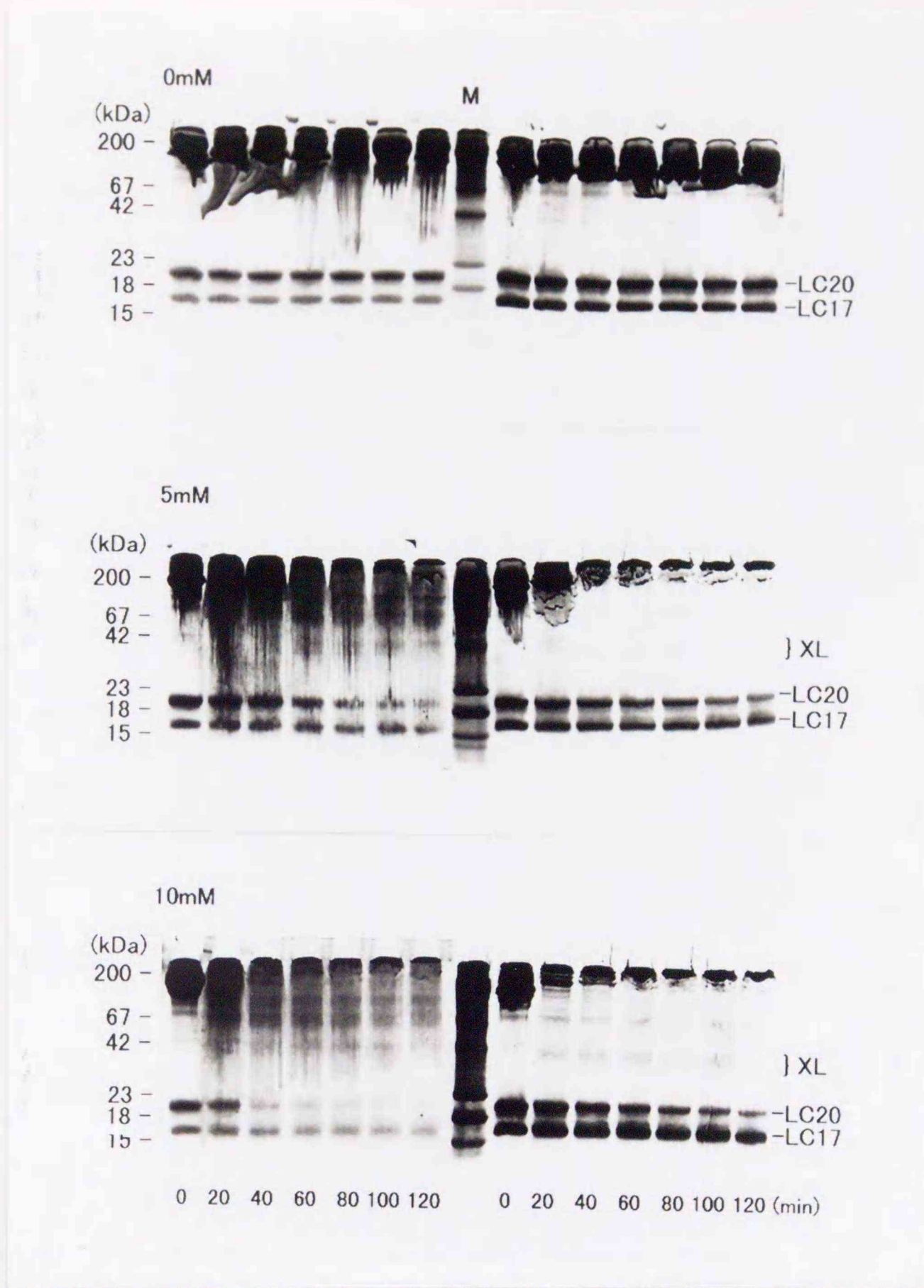


図 20: ミオシンを化学架橋したときの SDS-PAGE。DP-ミオシン (左半分), および P-ミオシン (右半分) について, EDC の濃度, 0 mM (上), 5 mM (中), 10 mM (下) で架橋反応をおこなった。反応開始後, 0 分から 120 分まで 20 分毎に試料を採取して SDS-PAGE をおこなった後, CBB 染色により検出した。レーン "M" は分子量マーカー, 図の左右の数字, 略号については図 19 と同様である。P-ミオシン, DP-ミオシンともに架橋反応の進行に伴い, 約 40 kDa のバンドが同様の速度で出現した。尚, この実験で用いた P-ミオシンは ^{32}P -ミオシンである (図 22)。

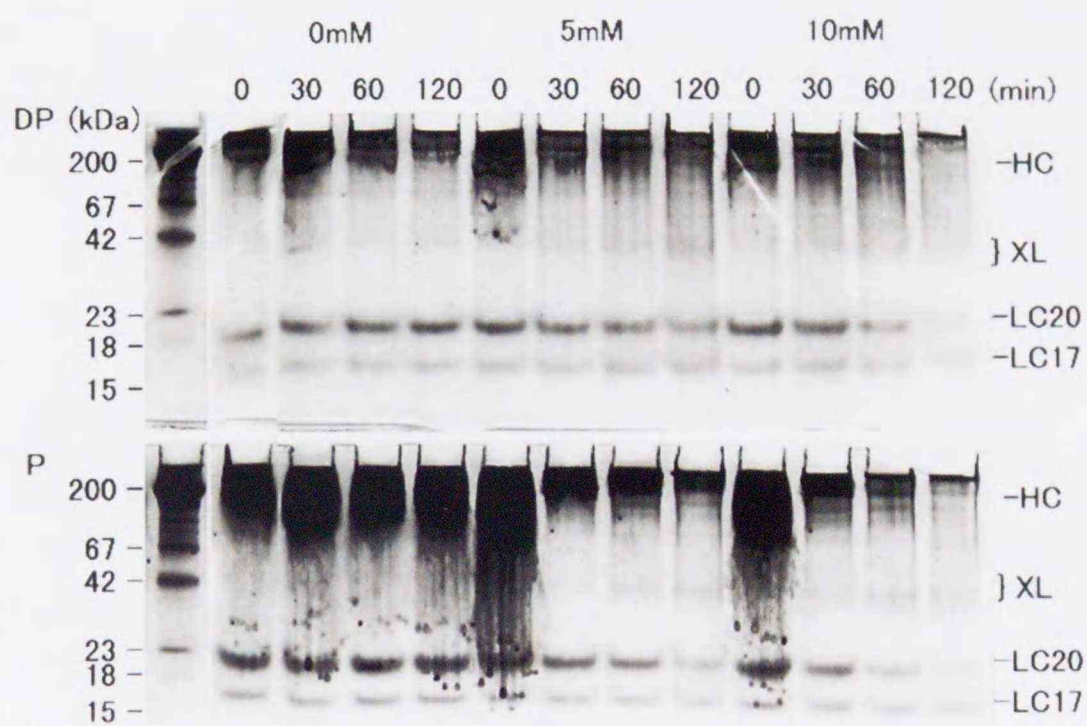


図 21: ミオシンを高塩濃度条件で化学架橋したときの SDS-PAGE。DP-ミオシン (上), および P-ミオシン (下) に 0, 5, および 10 mM の EDC を加えて化学架橋した。図の左右の数字, 略号については図 19, および 20 と同様である。図 19, 20 で見られた 40 kDa 付近のバンド生成は DP-ミオシン, P-ミオシン両者で同様の速度で観察された。

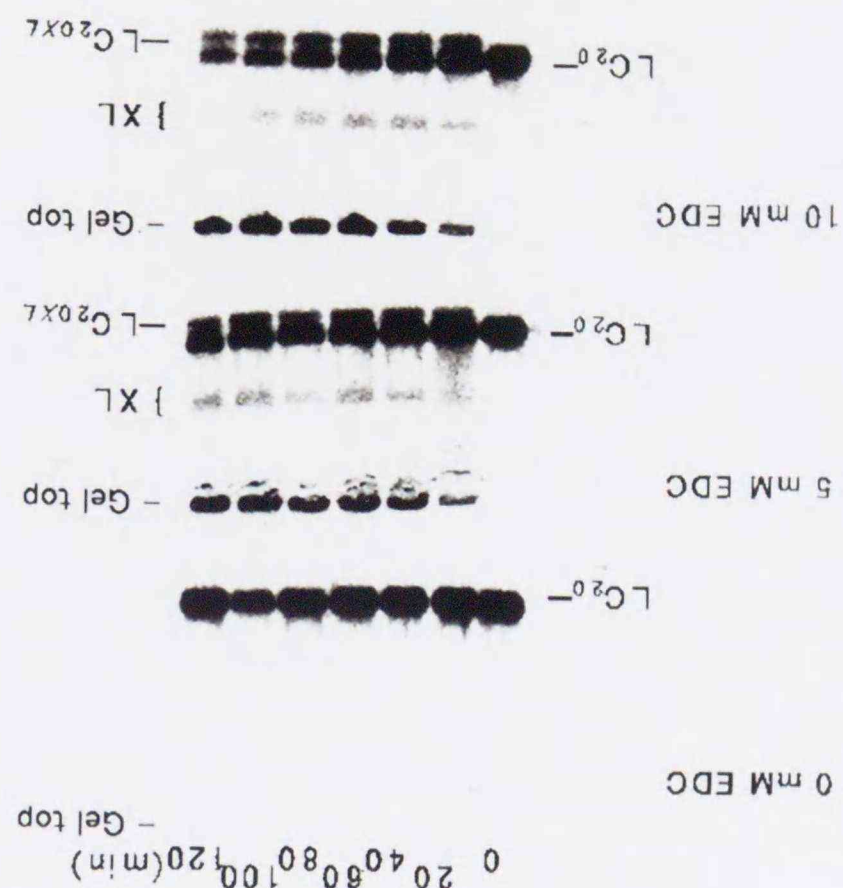


図 22: ^{32}P -ミオシンを用いた架橋反応による放射性生成物の解析。図 20 の P-ミオシンの SDS-PAGE ゲルについて、バンドの放射活性をイメージングプレート/イメージングアナライザ (BAS2000) により検出した。XL (40kDa) から放射活性が検出され、LC20 の分子間架橋産物であることが判明した。LC20_{XL}, LC20 の分子内架橋産物と思われるバンド。

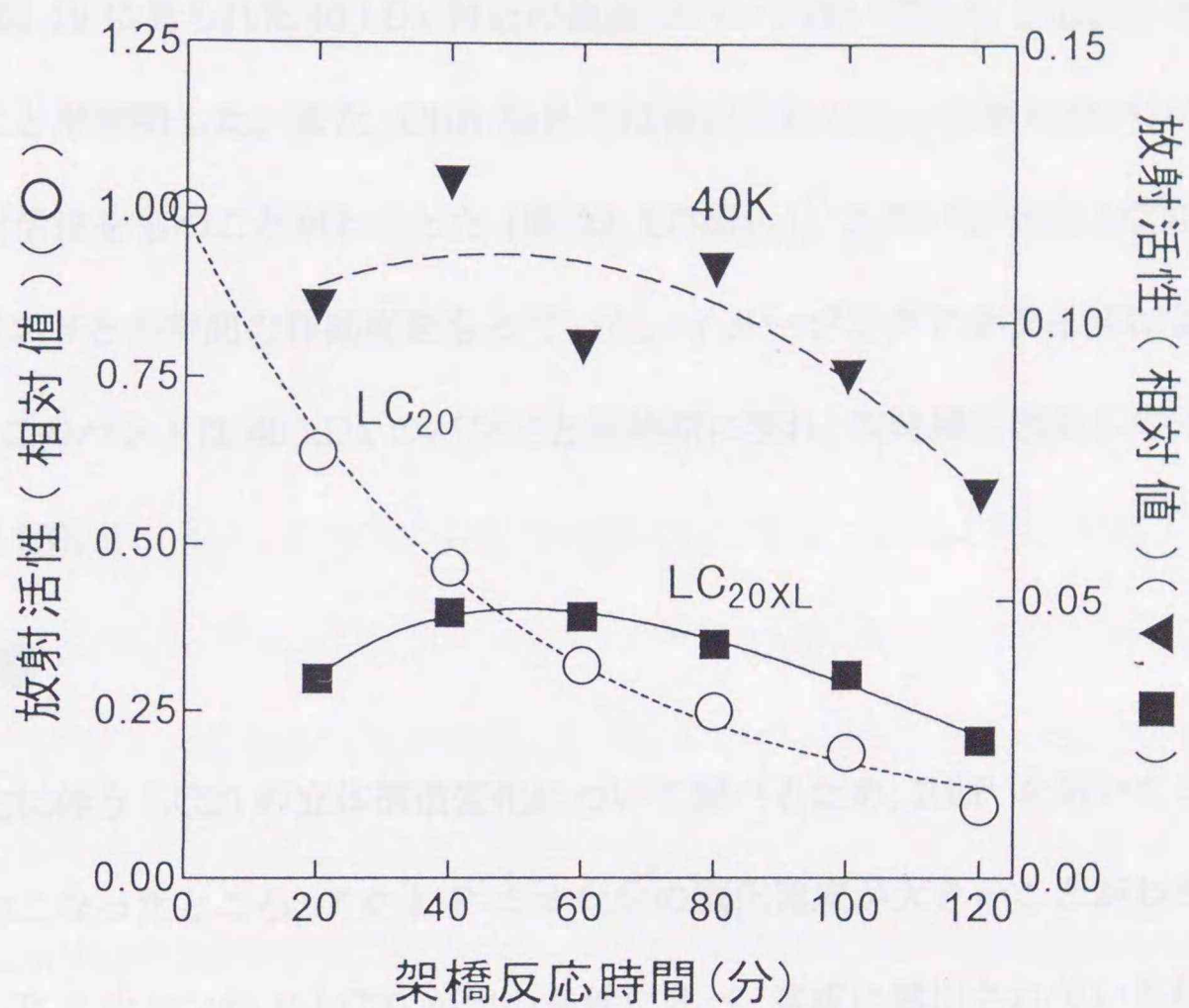


図 23: ^{32}P -ミオシンの化学架橋産物の出現と消失の様子。図 22 で放射活性が検出された LC20 (○), 40 kDa (▼), および LC20_{XL} (■) のそれぞれについて、測定された放射活性の経時変化を相対値で表した。架橋産物 (▼, ■) は LC20 に比べて極端に少ないため、右側の縦軸で拡大して表した。架橋産物の出現と消失は互いによく似た傾向を示した。

40 kDa 架橋産物が LC20 に由来するかどうかを確かめるため, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いて調製した P-ミオシンをもちいた。図 20 に示した結果は, この ^{32}P -ミオシンを用いたものである。図 20 の ^{32}P -ミオシンについての結果をイメージングプレートを用いて放射性バンドを検出した(図 22)。予想通り, 40kDa のバンドから ^{32}P の放射活性が検出され, 更にそのすぐ下にも放射性のバンドが検出された。したがって, 40 kDa のバンドは P-LC20 の 2 量体であり, 図 19 に見られた 40 kDa 付近の複数のバンドはいずれも P-LC20 を含む架橋産物であることが判明した。また, CBB 染色では検出されなかった新たなバンドが P-LC20 由来の放射活性をもつことがわかった(図 22, LC20_{XL})。このバンドは LC20 のバンドと LC17 のバンドとの中間の移動度をもっていた。イメージングアナライザによる定量的な解析から, このバンドは 40 kDa のバンドと同時期に現れ, 同時期に消失していくことがわかった(図 23)。

3.3 考察

リン酸化に伴う LC20 の立体構造変化について調べるため, REP を用いてミオシンの限定消化をおこなったところ, アクト-P-ミオシンの消化速度が大きいことがわかった。これは, アクト-P-ミオシンの P-LC20 が他の条件に比べ, 溶媒に露出されている程度が高いことを示している。

骨格筋ミオシン S-1 の X 線結晶回折解析の結果から, LC20 の N 末端領域は自由度が高いことが予想されている [17, 61]。また, ミオシンの尾部を限定分解によって除去したヘビーメロミオシンや S-1 を調製すると, LC20 の N 末端が切断されることが報告されている [59, 62]。これらのことを考慮すると, 本実験での LC20 の切断は N 末端領域から始まり, 次いで LC20 全体の消化が起こったと考えられる。

本実験では、アクト-P-ミオシンのとき REP による消化の初期速度が増加した (図 17, 18, 表 9)。このことより、アクチンはミオシンに結合することにより、P-LC20 をより露出させたと考えられる。いいかえれば、P-LC20 はより露出した構造をとっており、アクチンによって露出の効果を強められたと考えられる。リン酸化に伴うこのような LC20 の露出の程度の変化が、アクト-P-ミオシン ATPase 活性化に必要であると考えられる。

LC20 の立体構造変化についての知見を別の視点から得るため、ゼロ距離化学架橋剤である EDC をもちいて化学架橋反応をおこなった。SDS-PAGE によって解析を試みたところ、約 40 kDa のバンドが架橋産物として検出された。このバンドは 2 つの LC20 の分子間架橋産物であり、図 19, 20, および 22 の結果から、F-アクチン存在下で LC20 がリン酸化されているとき、より早く、より多量に生成することが判明した。これは、P-ミオシンが F-アクチンと結合すると、P-LC20 の露出の程度が増すか、または、P-LC20 が互いに接することを示している。また、アクチン存在下の非リン酸化ミオシンの化学架橋 (図 19) にくらべて、アクチン非存在下の化学架橋 (図 20) ではリン酸化、脱リン酸化に関わらず、40 kDa のバンドが多量に生成することが判明した。これは、アクチンがミオシンに結合すると、LC20 の架橋が妨げられることを示している。限定消化の実験の結果から、LC20 の露出の程度は、アクト-P-ミオシン以外は同様に低い。それにもかかわらず、アクチン存在下の非リン酸化ミオシンは架橋されにくいのは、アクチンによって LC20 と LC20 とが離されたためと考えられる。

図 22 の結果、40 kDa のバンドの他に、LC20 (20 kDa) と LC17 (17 kDa) との間の移動度を示し、P-LC20 由来の放射活性をもつバンドが検出された。図 23 に示すように、このバンドは 40 kDa のバンドと同時期にあらわれ、同時期に消失することがわかった。このバンドの SDS-PAGE で示される分子量が LC20 より小さいことから、はじめは、P-LC20 が、夾

雑するタンパク加水分解酵素によって部分的に消化されたと考えられた。しかし、図 22 に示した 0 mM EDC の結果ではこのバンドは検出されなかったので、このバンドは、P-LC20 が同一分子内架橋して、見かけの分子量が小さくなったものであると考えられた。以上のことから、EDC による化学架橋反応は、LC20 分子間、および LC20 の同一分子内の両方で進行しており、図 19 でみられた 40 kDa 付近の複数のバンドは、LC20 の分子内架橋産物が LC20 分子間架橋産物の成分になったためと考えられる。図 19 - 21 では LC20 の分子内架橋のバンドは検出されず、また図 22 に示すように 40 kDa のバンドに比べてより少ないので、分子間架橋の方がより起こりやすいと考えられる。

図 21 では、分子間架橋している LC20 について、2 つの LC20 が同一のミオシン分子に由来するものかどうかを調べた。図 21 でもちいた高塩濃度の条件では、ミオシンは、尾部が伸びた 6S 単量体として存在している。この条件で LC20 の架橋産物 (40K) が検出されたことは、LC20 の 2 分子間架橋産物が同一ミオシン分子内の LC20 に由来していることを示唆している。一方、他の実験で用いている低塩濃度の条件では、ミオシンは 6S コンホメーションをとっているが、単量体ではなく、フィラメントを形成している。そのため、隣接するミオシン分子の頭部間で相互作用する可能性があり、LC20 の分子間架橋産物が同一のミオシン分子に由来するかどうかは不明である。しかし、ミオシンが単量体となる高塩濃度の条件 (図 21) でも LC20 の分子間架橋産物が観察されたことから、同一のミオシン分子内で LC20 の分子間架橋が起こりやすいと考えられる。低塩濃度の条件でも、すべてではないにしろ、同一ミオシン分子内での LC20 の分子間架橋産物が多いと予想される。Offer と Knight はコンピュータを用いてホタテ貝ミオシンの head-rod junction のモデリングをおこない、同一のミオシン分子内で LC20 が分子内、および、分子間で相互作用する可能性を推測した [63]。本実験の結果は彼らの推測を支持するものである。

LC20 リン酸化によるミオシン ATPase 活性化は、ミオシン頭部の 2 種類の軽鎖を結合した領域の C 末端部分を含む長い α -ヘリックス構造部分、または、head-rod junction の構造変化と関係があると考えられており [56,64,65]、これは LC20 のリン酸化により起きると考えられる。Katoh と Morita は平滑筋ミオシンの 1 対の LC17 を同一ミオシン分子内で架橋することでミオシン頭部を互いに近接した状態に固定することに成功した [18]。その結果、アクチン活性化 ATPase 活性は LC20 の脱リン酸化状態でも大きく増加した。これは、ミオシンの軽鎖結合領域の構造が ATPase 活性の活性化と深く関わっていることを示唆したものである。本実験においても、EDC によるアクト-P-ミオシンの化学架橋が起こりやすく、Katoh と Morita の結果を支持するものと思われる。

以上のことから、アクトミオシン ATPase 活性制御は、ミオシン分子内の 1 対の LC20 の相互作用が変わることに起因していると考えられる。これはミオシン重鎖に結合した LC20 が脱リン酸化状態でミオシン ATPase を阻害すること、また、LC20 リン酸化によるミオシン ATPase 調節には、2 つのミオシン頭部が必要であること [66-68] と関係があるにちがいない。本研究で見いだされた構造変化は、ミオシン ATPase 活性を増大させる第 1 段階であると思われる。

総括

今回の研究から、血管平滑筋のミオシン ATPase 活性の LC20 リン酸化による調節は、以下のような機構で起きると考えられる。

1. ミオシン LC20 がリン酸化されていないときには LC20 は溶媒から遮蔽されており、この高次構造が ATPase 活性部位を不活性な構造に保つ。アクチンが結合すると 2 つの LC20 は互いに離れる。
2. ミオシン LC20 がリン酸化されるとリン酸化部位の高次構造が変化する。LC20 の高次構造変化は、アクチンがミオシンに結合したとき、LC20 を溶媒に露出させると同時に 2 つの LC20 の間を近い距離に保つ。その結果、ATPase 活性部位の高次構造は活性化構造に変わる。
3. その結果、アクトミオシン ATPase 活性が増加する。

このように、ATPase 活性の調節には LC20 の高次構造変化が重要な役割をもつことがわかった。今回、抗体を使った電子顕微鏡像の解析から、LC20 のリン酸化部位は ATPase 活性部位からおよそ 4.6 ~ 5.6 nm の位置にあることがわかった。今後、リン酸化による高次構造変化の詳細を明らかにすることで ATPase 活性化の分子機構の詳細を明らかにできるだろう。

参考文献

- [1] H.V. Goodson and J.A. Spudich. Molecular evolution of the myosin family: Relationships derived from comparisons of amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, pp. 659-663, 1993.
- [2] R.E. Cheney, M.A. Riley, and M.S. Moosker. Phylogenetic Analysis of the Myosin Superfamily. *Cell Motil. Cytoskel.*, Vol. 24, pp. 215-223, 1993.
- [3] J.A. Horowitz and J.A. Hammer III. A New *Acanthamoeba* Myosin Heavy Chain. *J. Biol. Chem.*, Vol. 265, pp. 20646-20652, 1990.
- [4] T.D. Pollard, S.K. Doberstein, and H.G. Zot. Myosin-I. *Annu. Rev. Physiol.*, Vol. 53, pp. 653-681, 1991.
- [5] J.A. Mercer, P.K. Seperack, M.C. Strobel, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. Novel myosin heavy chain encoded by murine *dilute* coat colour locus. *Nature*, Vol. 349, pp. 709-713, 1991.
- [6] C. Montell and G. M. Rubin. The *Drosophila ninaC* Locus Encodes Two Photoreceptor Cell Specific Proteins with Domains Homologous to Protein Kinases and the Myosin Heavy Chain Head. *Cell*, Vol. 52, pp. 757-772, 1988.
- [7] K. A. Kellerman and K. G. Miller. An Unconventional Myosin Heavy Chain Gene from *Drosophila melanogaster*. *J. Cell. Biol.*, Vol. 119, pp. 823-834, 1992.
- [8] J.H. Collins. Myosin light chains and troponin C: structural and evolutionary relationships revealed by amino acid sequence comparisons. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.*, Vol. 12, pp. 3-25, 1991.
- [9] Y. Hasegawa, K. Tanahashi, and F. Morita. Regulatory Mechanism by the Phosphorylation of 20-kDa Light Chain of Porcine Aorta Smooth Muscle Myosin. *J. Biochem.*, Vol. 108, pp. 909-913, 1990.
- [10] P.D. Wagner and N.D. Vu. Regulation of the actin-activated ATPase of aorta smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 261, pp. 7778-7783, 1986.
- [11] V. Mougios and M. Bárány. Isoforms of the phosphorylatable myosin light chain in arterial smooth muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 872, pp. 305-308, 1986.
- [12] C.C. Kumar, S.R. Mohan, P.J. Zavodny, S.K. Narula, and P.J. Leibowitz. Characterization and Differential Expression of Human Vascular Smooth Muscle Myosin Light Chain 2 Isoform in Nonmuscle Cells. *Biochemistry*, pp. 4027-4035, 1989.
- [13] R.B. Pearson, R. Jakes, M. John, J. Kendrick-Jones, and B.E. Kemp. Phosphorylation site sequence of smooth muscle myosin light chain ($M_r = 20000$). *FEBS Lett.*, Vol. 168, pp. 108-112, 1984.

- [14] A. Inoue, M. Yanagisawa, H. Takano-Ohmuro, and T. Masaki. Two isoforms of smooth muscle myosin regulatory light chain in chicken gizzard. *Eur.J. Biochem.*, Vol. 183, pp. 645-651, 1989.
- [15] T. Maita, J.I. Chen, and G. Matsuda. Amino-Acid Sequence of the 20 000-Molecular-Weight Light Chain of Chicken Gizzard-Muscle Myosin. *Eur.J. Biochem.*, Vol. 117, pp. 417-424, 1981.
- [16] Y. Hasegawa, Y. Ueda, M. Watanabe, and F. Morita. Studies on Amino Acid Sequence of Two Isoforms of 17-kDa Essential Light Chain of Smooth Muscle Myosin from Porcine Aorta Media. *J. Biochem.*, Vol. 111, pp. 798-803, 1992.
- [17] I. Rayment, W.R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D.R. Tomchick, M.M. Benning, D.A. Winkelmann, G. Wesenberg, and H.M. Holden. Three-Dimensional Structure of Myosin Subfragment-1: A Molecular Motor. *Science*, Vol. 261, pp. 50-58, 1993.
- [18] T. Katoh and F. Morita. The effect of cross-linking of the two heads of porcine aorta smooth muscle myosin on its conformation and enzymic activity. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 233, pp. 123-131, 1995.
- [19] F.B. Straub. Actin. *Stud. Univ. Szeged.*, Vol. 2, pp. 3-15, 1942.
- [20] F.B. Straub. . *Stud. Univ. Szeged*, Vol. 3, p. 23, 1943.
- [21] J.A. Spudich and S. Watt. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I.Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 246, pp. 4866-4871, 1971.
- [22] J.D. Pardee and J.A. Spudich. Purification of Muscle Actin. *Methods in Enzymol.*, Vol. 85, pp. 164-181, 1982.
- [23] W.T. Perrie and S.V. Perry. An Electrophoretic Study of the Low-Molecular-Weight Components of Myosin. *Biochem.J.*, Vol. 119, pp. 31-38, 1970.
- [24] R.J. Grand and S.V. Perry. Preparation of the Alkali and P Light Chains of Chicken Gizzard Myosin. Amino Acid Sequence of the Alkali Light Chain. *Biochem. J.*, Vol. 211, pp. 267-272, 1983.
- [25] M. Yoshida and K. Yagi. Two Kinds of Myosin Phosphatases with Different Enzymatic Properties from fresh Chicken Gizzard Smooth Muscle. *J. Biochem.*, Vol. 103, pp. 380-385, 1988.
- [26] M. Yoshida and K. Yagi. Purification and Characterization of a Phosphoprotein phosphatase that Dephosphorylates Myosin and the Isolated Light Chain from Chicken Gizzard Smooth Muscle. *J. Biochem.*, Vol. 99, pp. 1027-1036, 1986.

- [27] M. Friedman, L.H. Krull, and J.F. Cavins. The Chromatographic Determination of Cystine and Cysteine Residues in Protein as S- β -(4-Pyridylethyl)cysteine. *J. Biol. Chem.*, Vol. 245, pp. 3868-3871, 1970.
- [28] James F. Cavins and Mendel Friedman. An Internal Standard for Amino Acid Analysis: S- β -(4-Pyridylethyl)-L-cysteine. *Anal. Biochem.*, Vol. 35, pp. 489-493, 1970.
- [29] E. Gross. The Cyanogen Bromide Reaction. *Methods in Enzymol.*, Vol. 11, pp. 238-255, 1967.
- [30] 副島正美, 正木武治. リシルエンドペプチダーゼ. 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 29, pp. 1532-1537, 1984.
- [31] 網沢進, 正木武治, 広瀬正明, 副島正美, 崎山文夫. リシルエンドペプチダーゼ (続). 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 31, pp. 629-634, 1986.
- [32] 松下秀之, 加藤郁之進, 青山英幸, 網沢進, 崎山文夫. アルギニルエンドペプチダーゼ. 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 34, pp. 374-379, 1989.
- [33] R.B. Pearson and B.E. Kemp. Chemical modification of lysine and arginine residues in the myosin regulatory light chain inhibits phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 870, pp. 312-319, 1986.
- [34] R.B. Pearson, L.Y. Misconi, and B.E. Kemp. Smooth muscle myosin kinase requires residues on the COOH-terminal side of the phosphorylation site. Peptide inhibitors. *J. Biol. Chem.*, Vol. 261, pp. 25-27, 1986.
- [35] B.E. Kemp and R.B. Pearson. Spatial requirements for location of basic residues in peptide substrates for smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, pp. 3355-3359, 1985.
- [36] E. S. Noiman. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain by cAMP - dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, Vol. 255, pp. 11067-11070, 1980.
- [37] W.J. Dreyer and E. Bynum. High-Voltage Paper Electrophoresis. *Methods in Enzymol.*, Vol. 11, pp. 32-39, 1967.
- [38] K. Kobayashi, M. Yoshida, Y. Shinoda, M. Yazawa, and K. Yagi. Monoclonal antibodies toward scallop (*patinopecten yessoensis*) testis and wheat germ calmodulins. *J. Biochem.*, Vol. 109, pp. 551-558, 1991.
- [39] J.M. Tyler and D. Branton. Rotary Shadowing of Extended Molecules Dried from Glycerol. *J. Ultrastruct. Res.*, Vol. 71, pp. 95-102, 1980.
- [40] D.A. Winkelmann, S. Lowey, and J.L. Press. Monoclonal Antibodies Localize Changes on Myosin Heavy Chain Isozymes during Avian Myogenesis. *Cell*, Vol. 34, pp. 295-306, 1983.

- [41] T. Katoh and S. Lowey. Mapping Myosin Light Chains by Immunoelectron Microscopy. Use of Anti-Fluorescyl Antibodies as Structural Probes. *J. Cell. Biol.*, Vol. 109, pp. 1549-1560, 1989.
- [42] S. Chifflet, A. Torriglia, R. Chiesa, and S. Tolosa. A Method for the Determination of Inorganic Phosphate in the Presence of Labile Organic Phosphate and High Concentrations of Protein: Application to Lens ATPases. *Anal. Biochem.*, Vol. 168, pp. 1-4, 1988.
- [43] P. González-Romo, S. Sánchez-Nieto, and M. Gavilanes-Ruiz. A Modified Colorimetric Method for the Determination of Orthophosphate in the Presence of High ATP Concentrations. *Anal. Biochem.*, Vol. 200, pp. 235-238, 1992.
- [44] H. Onishi, T. Maita, G. Matsuda, and K. Fujiwara. Interaction between the heavy and the regulatory light chains in smooth muscle myosin subfragment 1. *Biochemistry*, Vol. 31, pp. 1201-1210, 1992.
- [45] J.D. Corbin and E.M. Reimann. Assay of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases. *Methods in Enzymol.*, Vol. 38, pp. 287-290, 1974.
- [46] M.A. Porzio and A.M. Pearson. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 490, pp. 27-34, 1977.
- [47] H. Schagger and G. Von Jagow. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, Vol. 166, pp. 368-379, 1987.
- [48] M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, Vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [49] T. Spector. Refinement of the Coomassie Blue Method of Protein Quantitation. *Anal. Biochem.*, Vol. 86, pp. 142-146, 1978.
- [50] M. Watanabe, Y. Hasegawa, T. Katoh, and F. Morita. Amino Acid Sequence of the 20-kDa Regulatory Light Chain of Porcine Aorta Media Smooth Muscle Myosin. *J. Biochem.*, Vol. 112, pp. 431-432, 1992.
- [51] L. L. Satterwhite, M. J. Lohka, K. L. Wilson, T. Y. Scherson, L. J. Cisek, J. L. Corden, and T. D. Pollard. Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell. Biol.*, Vol. 118, pp. 595-605, 1992.
- [52] Y. Hasegawa and F. Morita. Role of 17-kDa Essential Light Chain Isoforms of Aorta Smooth Muscle Myosin. *J. Biochem.*, Vol. 111, pp. 804-809, 1992.

- [53] A. Inoue, M. Yanagisawa, H. Takano-Omuro, and T. Masaki. Two isoforms of smooth muscle myosin regulatory light chain in chicken gizzard. *Eur.J. Biochem.*, Vol. 183, pp. 645-651, 1980.
- [54] M.B. Taubman, J.W. Grant, and B. Nadal-Ginard. Cloning and Characterization of Mammalian Myosin Regulatory Light Chain (RLC) cDNA: The RLC Gene is Expressed in Smooth, Sarcomeric, and Nonmuscle Tissues. *J. Cell. Biol.*, Vol. 104, pp. 1505-1513, 1987.
- [55] R.H. Kretsinger and C.E. Nockolds. Carp Muscle Calcium-binding Protein. *J. Biol. Chem.*, Vol. 248, pp. 3313-3326, 1973.
- [56] H. S. Slayter and S. Lowey. Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 58, pp. 1611-1618, 1967.
- [57] Xie, X. and Harrison, D.H. and Schlichting, I. and Sweet, R.M. and Kalabokis, V.N. and Szent-Györgyi, A.G. and Cohen, C. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8Å resolution. *Nature*, Vol. 368, pp. 306-312, 1994.
- [58] A. Jancso and A.G. Szent-Györgyi. Regulation of scallop myosin by the regulatory light chain depends on a single glycine residue. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 91, pp. 8762-8766, 1994.
- [59] M. Ikebe and J. Morita. Identification of the Sequence of the Regulatory Light Chain Required for the Phosphorylation dependent regulation of Actomyosin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, pp. 21339-21342, 1991.
- [60] Z. Yang and H.L. Sweeney. Restoration of phosphorylation-dependent regulation to the skeletal muscle myosin regulatory light chain. *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, pp. 24646-24649, 1995.
- [61] I. Rayment and H.M. Holden. The three-dimentional structure of a molecular motor. *TIBS*, Vol. 19, pp. 129-134, 1994.
- [62] J. C. Seidel. Chymotryptic heavy meromyosin from gizzard myosin: a proteolytic fragment with the regulatory properties of the intact myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 85, pp. 107-113, 1978.
- [63] G. Offer and P. Knight. The structure of the Head - Tail Junction of the Myosin Molecule. *J. Mol. Biol.*, Vol. 256, pp. 407-416, 1996.
- [64] R. A. Mendelson, M. F. Morales, and J. Botts. Segmental flexibility of the S-1 moiety of myosin. *Biochemistry*, Vol. 12, pp. 2250-2255, 1973.
- [65] A. Elliott and G. Offer. Shape and flexibility of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.*, Vol. 123, pp. 505-519, 1978.

- [66] C.R. Cremon, J.M. Sellers, and K.C. Facemyer. Two heads are required for phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, pp. 2171-2175, 1995.
- [67] M. Matsu-ura and M. Ikebe. Requirement of the two-headed structure for the phosphorylation dependent regulation of smooth muscle myosin. *FEBS Lett.*, Vol. 363, pp. 246-250, 1995.
- [68] Y. Harada, A. Noguchi, A. Kishino, and T. Yanagida. Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments. *Nature*, Vol. 326, pp. 805-808, 1987.

謝辞

本研究の機会を与えて頂き、実験研究について、終始、直接の御指導、御鞭撻を頂きました、盛田 フミ 教授 (現 酪農学園大学 酪農学科 教授) に感謝致します。

本研究論文の作製、発表に当たり、御指導、御尽力を頂きました、北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻 生命分子化学講座 矢澤 道生 教授 に感謝致します。

本研究論文の発表に当たり、御助言、御指導を頂きました、北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻 生命分子化学講座 谷口 和彌 教授、北海道大学 免疫科学研究所 生化学部門 菊地 九二三 教授、北海道大学 電子科学研究所 電子機能素子部門 田村 守 教授 に感謝致します。

本研究の遂行に当たり、実験技術を御指導頂きました、長谷川 靖 博士 (現室蘭工業大学工学部応用化学科助手)、北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻 生命分子化学講座 加藤 剛志 助手、江藤 真澄 助手 に感謝致します。実験動物の飼育に当たり御尽力頂きました、北海道大学 実験生物センター 坂根 藤子氏 に感謝致します。本研究の進行に常に御支援、御協力を頂きました、北海道大学大学院 理学研究科 化学専攻 生命分子化学講座 生物有機化学研究室 の皆様に感謝致します。

最後に、筆者に理解を示し、長きに渡って御援助頂きました、筆者の両親に感謝致します。

1998 年 3 月

