

9730 モーター蛋白質のエネルギー変換機構に対する塩濃度の影響

助成研究者：岩本 裕之 (帝京大学 医学部・高輝度光科学研究センター)

筋収縮は、筋線維に含まれるモーター蛋白(アクチン・ミオシン)の相互作用によって起こり、その本質はアクチン・ミオシン複合体(アクトミオシン)によるATP加水分解の化学エネルギーの力学エネルギーへの変換である。この加水分解反応は多くの素反応から成り立ち、反応の進行の過程で収縮張力が発生する。この過程には、蛋白間、または蛋白内の静電的相互作用、疎水性相互作用などが関与していると考えられているが、その詳細についてはいまだに不明である。本研究では、静電的相互作用が特に塩濃度の影響を受けることを利用し、筋収縮特性に対する塩濃度の影響を調べることにより、モーター蛋白のエネルギー変換に関与する物理化学的メカニズムを調べた。

材料にはウサギ骨格筋の細胞膜を除いた筋線維を用い、種々の塩濃度で活性化して張力の絶対値、張力の上昇の速さ、硬さ(スティフネス：アクチンに結合したミオシン分子数の指標)、定速伸長に対する張力応答を測定した。張力の絶対値は塩濃度の上昇に伴って大きく減少した。しかし、張力上昇の速度定数とスティフネスに対する影響はそれほど小さくなく、塩濃度によって最も影響を受けるのはアクチンとミオシンの会合の過程ではなく、それ以降であることが示された。次に活性化後、張力がまだ上昇中である時点と、張力がピークに到達した以降に定速伸長を与え、張力応答の非線型性成分を調べた。アクチンとミオシンが結合すると、まず力を出さないアクチン・ミオシン複合体が形成され、それが力を出す複合体へと変化していくが、非線型性成分は力を出さない複合体の数の指標である。張力上昇中は非線型性成分が大きいですが、張力がピークに達するまでに非線型性成分はほぼ消失した。この状況は塩濃度を上げても全く変わらなかった。従って高塩濃度で張力が大きく減少するのは力を出さない複合体が増えるためではない、つまり塩濃度によって影響を受ける過程は力発生ステップ以降ということになる。力を出さない複合体が関係する反応ステップが塩濃度の影響を受けないことは、力を出さない複合体を増加させることが知られる燐酸を実験液に加えると、ピーク達成後の張力応答の非線型性成分が塩濃度にかかわりなく増加することによっても裏付けられる。

以上の結果は、従来静電相互作用的で、従って塩濃度の影響を強く受けると思われた力発生以前の過程は塩濃度の影響をそれほど受けず、むしろ従来疎水性相互作用的と考えられた力発生以降に塩濃度の影響を強く受ける静電相互作用的な物理化学過程があることを示唆する。

9730 モーター蛋白質のエネルギー変換機構に対する塩濃度の影響

助成研究者：岩本 裕之 (帝京大学 医学部・高輝度光科学研究センター)

研究目的

筋収縮は、筋線維に含まれるモーター蛋白(アクチン・ミオシン)の相互作用によって起こり、そのエネルギーはアクチン・ミオシン複合体(アクトミオシン)のATP加水分解反応によって放出される化学エネルギーである。この加水分解反応は Fig. 1 に示すような多くの素反応から成り立っている(文献 1)。要約すると、ATP 加水分解反応は次の順序で起こる。1)ATP 分解活性を持つミオシンの頭部がアクチンに結合する。このときミオシンは既に ATP 加水分解を終え、その分解産物 (ADP と無機リン酸 P_i) を結合している。2)ミオシン頭部に構造変化が起こり、収縮力が発生する (パワーストローク)。この時 P_i がミオシンから外れる。3)続いて ADP も外れ、次に分解されるべき ATP 分子がミオシンに結合したとき、ミオシン頭部はアクチンから解離する。

1)のアクチン・ミオシンの結合は、これら 2 種の蛋白間の静電的親和力に起因すると考えられている。一方 2)の構造変化以降の過程には、蛋白間の疎水的相互作用が深く関わっていると考えられている(文献 2)。従って蛋白を浸している溶液の塩濃度を上げると、静電的親和力のもとになっている蛋白表面の電荷が中和されるため、アクチン・ミオシンの結合が妨げられる(アクチン上で力を出すミオシン数が減少する)筈である。しかし、塩濃度はアクチンとミオシンが結合した後の過程には余り影響を及ぼさないと予想される。

実際に、細胞膜を取り除いて蛋白の周りの溶液環境を自由に換えられるようにした筋線維試料(スキンドファイバー)を用いると、塩濃度を上げたとき張力が大きく減少することが報告されている(文献 3,4)。ところが筋線維の ATP 分解速度やアクチンに結合したミオシン分子数の指標であるスティフネス(筋線維の硬さ)は、塩濃度を上げて張力ほど減少しない(文献 3,4)。つまりアクチンに結合したミオシン分子数は塩濃度を上げて

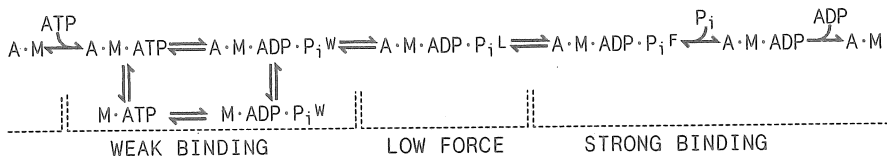


Fig. 1. 収縮時のアクトミオシン ATP 加水分解反応のスキーム。A はアクチン、M はミオシン、 P_i は無機リン酸を表わす。文献 1 より改変。

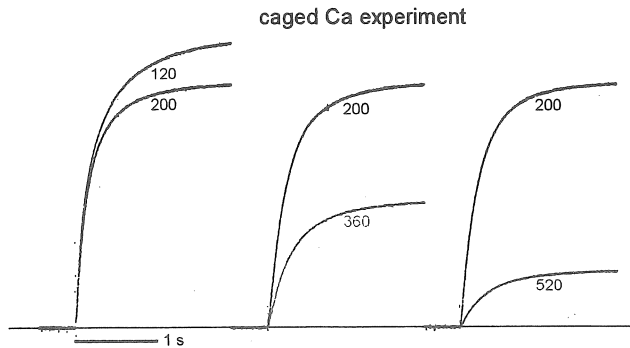


Fig. 2. ケージドカルシウムのパルス光分解後の張力上昇の大きさと時間経過に対する塩濃度の影響。イオン強度 200mM(標準)での張力に対して正規化した。

それほど減少していないということである。これは、塩濃度上昇の主な効果がアクチン・ミオシン間の結合の阻害だという上記の考えと矛盾する。それでは塩濃度を上げるとなぜ筋肉の収縮力が減少するのであろうか?これを明らかにするため、異なる実験条件(磷酸、ATP 濃度など)で塩濃度の筋線維収縮特性に及ぼす効果を調べた。

研究方法

材料には、ウサギの骨格筋(腸腰筋)より取り出した筋線維を用いた(文献 1,5-7)。まず、腸腰筋より筋線維の束(直径 1~2mm)を切り出した。それを 0.5% Triton X-100(界面活性剤)を含む弛緩液に浸し、細胞膜を取り除いた。筋線維束は 50%グリセリン中で冷凍庫に保存した。実験の際はこれから筋線維 1-3 本からなる細い筋線維束を作成し、使用した。

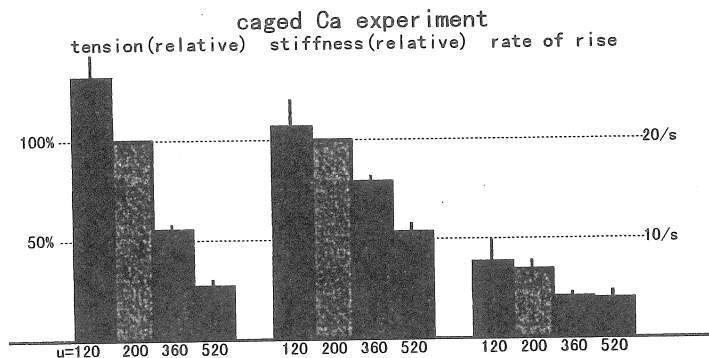


Fig. 3. ケージドカルシウム実験での各塩濃度における張力、スティフネスと張力上昇の速度定数。張力とスティフネスはイオン強度 200mM での値で正規化した。平均値 ± 標準偏差 (n=4-6)。

筋線維の一端は張力計に固定し、他端はサーボモーターのエクステンションに固定した。このサーボモーターは、筋線維を短縮させたり、振動を与えてスティフネスを測定したり、また定速伸長を与えて張力応答を記録するためのものである。

溶液の組成は以下の通りである(単位: mM)。弛緩液: イミダゾル、20; EGTA、10; ATP、4; $MgCl_2$ 、5; クレアチンリン酸、20; クレアチンキナーゼ、125U/ml、デキストラン、4% (pH = 7.2)。塩濃度は、これに種々の濃度のプロピオン酸カリウムを加えて調節した。生理的な(標準)塩濃度はイオン強度にして 200mM(プロピオン酸カリウム濃度 80mM)である。燐酸を加えたときにはイオン強度が一定になるようにプロピオン酸カリウム濃度を加減した。前収縮液は弛緩液の EGTA 濃度を 0.1mM にしたもので、収縮液は弛緩液に塩化カルシウム 10.1mM を加えて $pCa(=-\log[\text{カルシウムイオン濃度}])$ を 4.3 に調整したものである。またケージドカルシウム(強い紫外線パルス照射するとカルシウムイオンを遊離する物質)を用いた実験では EGTA を取り除き、ケージドカルシウムとしてニトロフェニル EGTA を 2mM、塩化カルシウムを 1.5mM 加えた。

筋線維は弛緩液に浸しておき、前収縮液を経て収縮液に浸すことにより活性化した。スティフネスを筋線維に 500Hz の正弦波振動を加えて張力応答を記録することによって結合ミオシン分子数を推定し、また低負荷での短縮後、あるいはケージドカルシウムのパルス光分解後の張力上昇速度を測定することによりアクチン・ミオシンの会合の速度を推

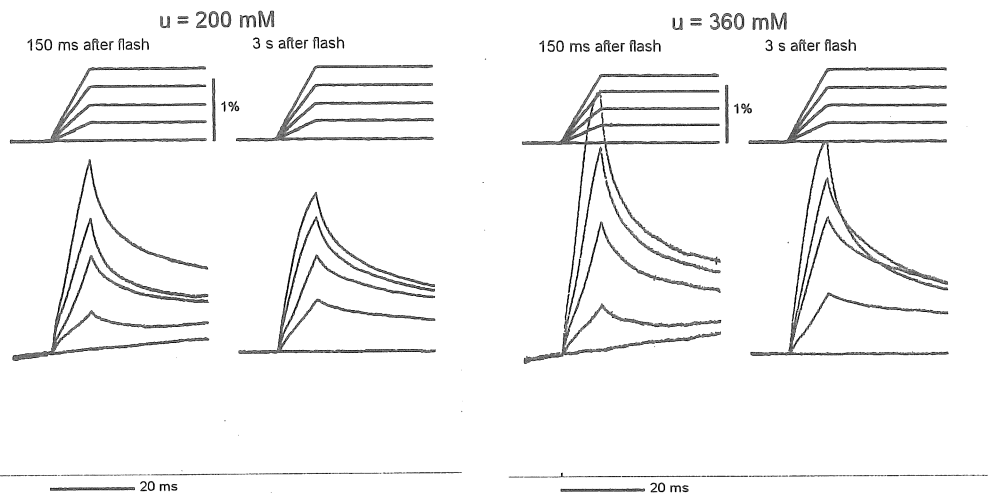


Fig. 4. ケージドカルシウムのパルス光分解後のいろいろな時点で定速伸長(最大筋線維長の1.2%)を行ったときの張力応答。上側が長さ、下側が張力で、下方の細い線は張力のベースラインを表わす。張力の値は伸長直前の値に対して正規化した。各塩濃度につき、左側が光分解後 150ms、右側が 3s で伸長を与えた場合を示す。

定した。実験は低温(5°C)で行った。

研究結果

1. ケージドカルシウム実験

Fig. 2 にケージドカルシウムのパルス光分解によって種々の塩濃度で活性化したときの張力上昇の程度と時間経過を示す。発生張力は塩濃度を上げるにつれて小さくなった。張力上昇は通常2つの exponential な成分で近似することができ、その速い方の成分が、アクチン・ミオシンの反応速度を反映すると考えられている。張力上昇の速度も塩濃度の上昇とともに低下したが、その程度は余り大きくなく、図のトレースからは余り明らかでない。

各塩濃度における張力、スティフネスと張力上昇の速度定数をまとめたのが Fig. 3 である。値は標準塩濃度(イオン強度 200mM)での値で正規化した。張力は塩濃度によって非常に強く影響されるが、スティフネスと張力上昇の速度定数の塩濃度依存性はそれほど高くないことが明らかである。すなわち、大きな張力の減少にもかかわらずアクチン・ミオシンの会合の程度と速度は塩濃度によってそれほど影響を受けないことを示している。

Fig. 4 はケージドカルシウムのパルス光分解後のいろいろな時点で定速伸長を行ったときの張力応答である。伸長時間は 10ms、伸長量は筋線維長の 0.3、0.6、0.9、1.2%である。Fig. 5 はまだ張力が上昇しつつある時点(光分解後 150ms)で伸長を与えたときの張力

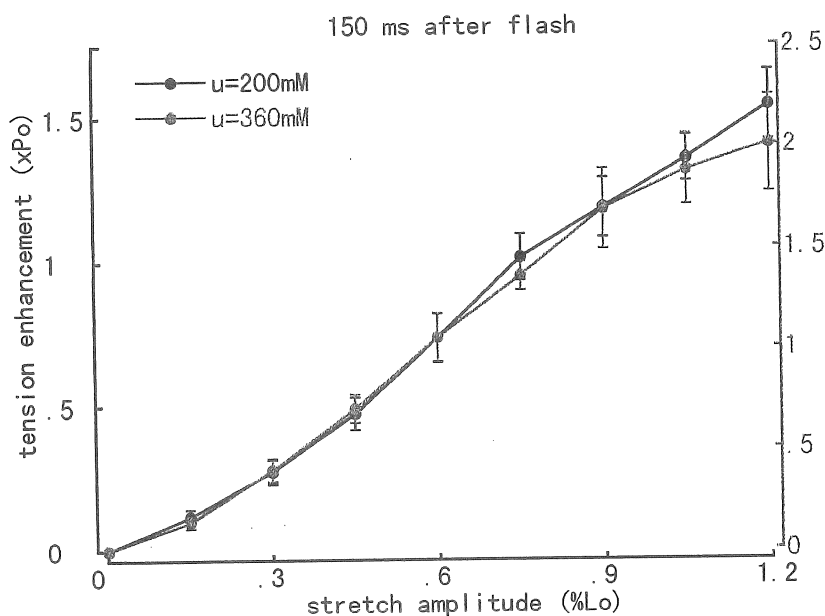


Fig. 5. 光分解後 150ms で伸長を与えたときの張力応答の大きさと伸長量の関係。平均値 ± 標準偏差 (n=6)。

応答の大きさを伸長量に対してプロットしたものである。カーブは非線型であり、その形は塩濃度によって影響されなかった。Fig. 6は張力がプラトーに達した光分解後3 sで伸長を与えたときの張力応答の大きさを、Fig. 5と同様に伸長量に対してプロットしたものである。カーブの非線型性は減少したが、その形が塩濃度に影響されないのは150msのときと同様であった。カーブの非線型性は、ミオシンがアクチンに結合はしたが張力はまだ発生していない中間体(A・M・ADP・Pi)が多く存在するときに顕著に現れる(文献1,5)。したがってこの結果は、力を出さない中間体が力を発生するようになる過程(パワーstroke)も、塩濃度によって余り影響されないことを示している。

2. 燐酸の効果

収縮液に加えた燐酸は Fig. 1 に示した A・M・ADP・Pi から燐酸が外れるステップ(パワーstroke)の平衡を左側に移動させるため、力を出さない A・M・ADP・Pi 中間体を増やして発生張力を減少させる。そこで、このステップに対する塩濃度の影響を調べた。筋線維の活性化は通常の溶液交換で行った。張力がピークに達した後に軽い負荷のもとで短縮させ、その後の張力の再上昇の速度定数を測定した。

Fig. 7 は発生張力、スティフネス、張力再上昇の速度定数を 20 mM 燐酸の存在下・非存在下で比較したものである。張力、スティフネスに対する塩濃度の効果は、燐酸存在下

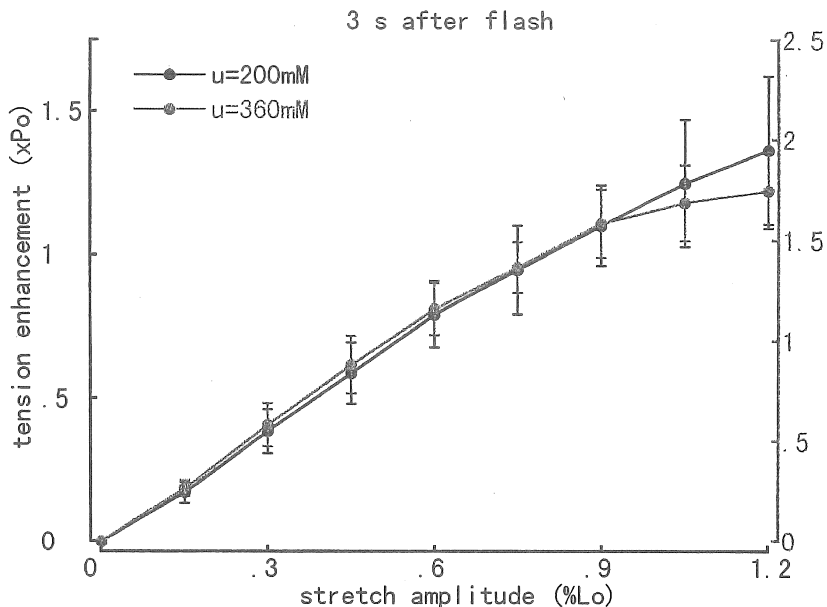


Fig. 6. 光分解後3 sで伸長を与えたときの張力応答の大きさと伸長量の関係。平均値 ± 標準偏差 (n=6)。

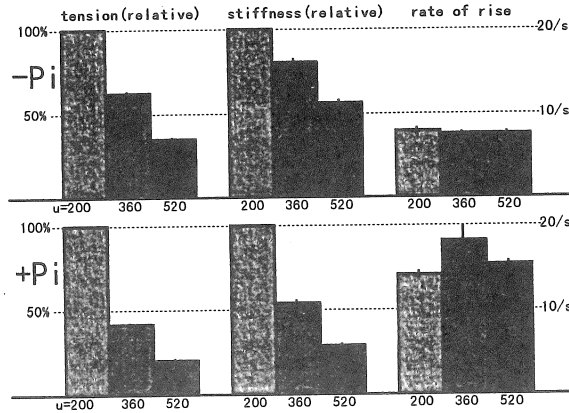


Fig. 7. 発生張力、スティフネス、張力再上昇の速度定数に対する磷酸 (20mM) の影響。表示の仕方は Fig. 2 と同様。

のほうが磷酸非存在下よりも大きいのが分かる。磷酸存在下のほうが短縮後の張力再上昇の速度定数が大きいのは反応スキーム (Fig. 1) から予想される通りであるが、ケージドカルシウム光分解後の場合と異なり速度定数が塩濃度の影響を受けない点は興味深い。張力がピークに達した後で Fig. 4 と同様に種々の大きさの定速伸長を与え、張力応答を伸長の振幅に対してプロットしたものが Fig. 8 である。高塩濃度でも、磷酸存在下で曲線が高い非線型性を示すのもケージドカルシウム実験の張力上昇時の場合 (Fig. 5) と同様に、 $A \cdot M \cdot ADP \cdot P_i$ の形成、また $A \cdot M \cdot ADP \cdot P_i$ からの磷酸の放出ステップ (パワーストローク) が塩濃度によって影響を受けないことを示している。

考察

本実験の結果は、塩濃度を上げると筋肉の張力は減少するが、アクチンに結合したミオシン頭部の数を示すスティフネスは張力ほどには減少しないという従来の結果をまず再確認した。またケージドカルシウム光分解後または軽い負荷で短縮後の張力上昇の速度が塩濃度の影響を余りあるいは殆ど受けないことも示した。塩濃度の上昇がアクチン・ミオシン間の結合定数を下げるというメカニズムだけでは実験結果を説明することはできず、アクチン・ミオシンの結合以降の何れかのプロセスに塩濃度が影響を与えると考え必要がある。

ミオシンがアクチンに結合するときに、まず力を出さない状態で結合し、続いて ATP の加水分解産物である無機磷酸 P_i を放出するときに異性体化が起こって力を出すようになるというのが一般に受け入れられた考え方である(文献 8)。そこでまず考えられる可能

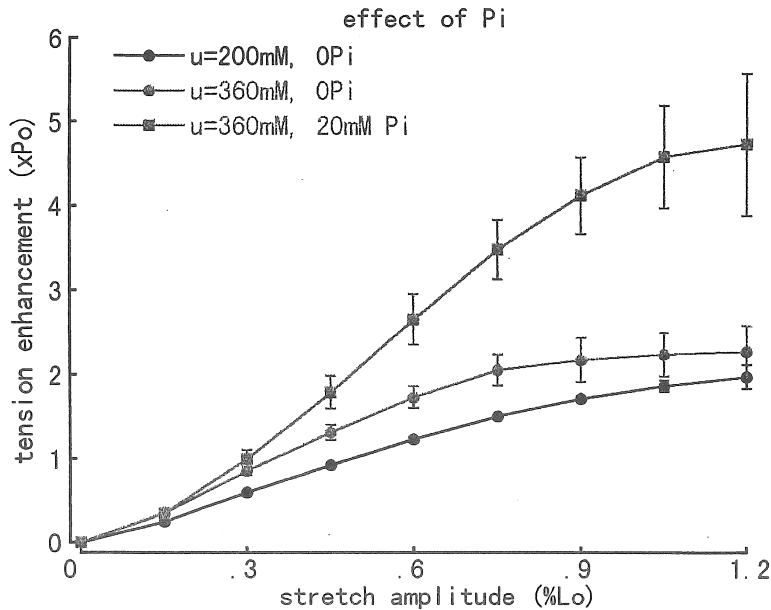


Fig. 8. 定速伸長(最大筋線維長の 1.2%)時の張力応答に対する磷酸の効果。平均値 \pm 標準偏差 ($n = 5-6$, 但し 200mM の場合は $n = 2$)。

性は塩濃度の上昇がこの異性体化の過程を阻害するということである。本実験では力をまだ出していないミオシンの中間体 ($A \cdot M \cdot ADP \cdot Pi$) が非線型な張力応答を示す性質を利用して、この考えが正しいか否かを試した。結果は、 $A \cdot M \cdot ADP \cdot Pi$ の形成は塩濃度の影響を全く受けないというものであった。したがって上記の可能性は否定され、磷酸放出後の異性体化の過程は高塩濃度によって阻害されないと結論される。

以上の考察から、アクチン・ミオシンの結合以降で塩濃度の影響を受けるプロセスは、 $A \cdot M \cdot ADP \cdot Pi$ の Pi 放出にともなう異性体化 (パワーストローク) 以降ということになる。1 番目の仮説は、実はアクトミオシン ATPase 反応は塩濃度の影響を全く受けないが、ミオシン一分子当たりの発生する力が塩濃度を上げると減少するというものである。2 番目の仮説は、異性体化が起こった後のミオシン ($A \cdot M \cdot ADP$) に更に 2 つの状態 (反応中間体) があり、1 つの状態での発生張力は他のものより高いというものである。高塩濃度は、より力の低い状態から高い状態へ変化するステップを阻害するということになる。

1 番目の仮説は磷酸の効果の説明できないことから否定される。2 番目の仮説については、実験結果を説明するためには更に次の仮定を置く必要がある。(1) 磷酸の放出によって形成されるのは力の低いほうの $A \cdot M \cdot ADP$ だけである。これは、磷酸の放出のステップは速い平衡反応なので、磷酸の放出によって 2 つの $A \cdot M \cdot ADP$ が形成されるなら、力の低い $A \cdot M \cdot ADP$ から力の大きい $A \cdot M \cdot ADP$ への変換ステップが高塩濃度で阻害されたとしても磷酸放出・再結合のルートでバイパスされてしまい、塩濃度の影響は見られない

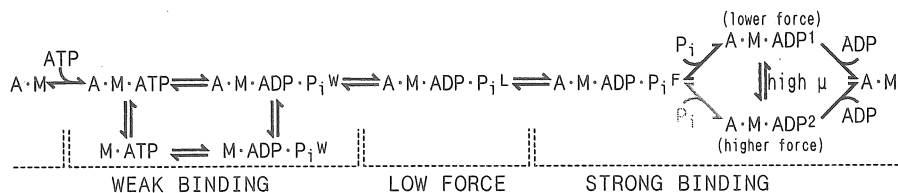


Fig. 9. 本実験結果を最もよく説明するアクトミオシン ATP 加水分解反応のスキーム。記号は Fig. 1 を参照。

筈だからである。(2)2種のA·M·ADPは共にADPを放出してA·M中間体に移行することができる。これは高塩濃度で高いATPase活性を保証するのに必要な仮定である。

以上をまとめると、Fig. 9に示したような反応スキームが実験結果を最もよく説明すると思われる。

結論

本研究により、筋収縮の分子機構に関する従来の基本的理解を変える以下のような結論が得られた。

- (1) 筋肉におけるアクトミオシンの張力発生は、従来考えられていたように1つのステップではなく、2つの物理化学的に性質を異にする2つのステップからなる。
- (2) アクチン・ミオシンの結合以降のプロセスには、むしろ疎水性相互作用が強く働いているものと考えられてきた。しかし上記の2つの張力発生ステップのうち、後に起こるもの(A·M·ADP間の変換)は塩濃度に強く依存することが示され、分子間または分子内の静電的親和力が大きく関係しているものと予想される。
- (3) 従来静電的であり、したがって塩濃度に強く依存すると考えられてきたアクチン・ミオシンの結合ステップの塩濃度依存性は、実はそれほど高くない。

この研究の成果は、1998年2月の米国生物物理学会(カンサス)で発表された(文献9)。

文献

- (1) Iwamoto, H. Evidence for increased low force cross-bridge population in shortening skinned skeletal muscle fibers: Implications for actomyosin kinetics. *Biophys. J.*, 69: 1022-1035. (1995).

- (2) Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C. & Milligan, R.A. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 261: 58-65. (1993)
- (3) Seow, C.Y. & Ford, L.E. High ionic strength and low pH detain activated skinned rabbit skeletal muscle crossbridges in a low force state. *J. Gen. Physiol.*, 101: 487-511. (1993).
- (4) Kawai, M., Wray, J.S. & Guth, K. Effect of ionic strength on crossbridge kinetics as studied by sinusoidal analysis, ATP hydrolysis rate and X-ray diffraction techniques in chemically skinned rabbit psoas fibres. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 11: 392-402. (1990)
- (5) Iwamoto, H. Strain sensitivity and turnover rate of low-force crossbridges in contracting skeletal muscle fibers in the presence of phosphate. *Biophys. J.*, 68: 243-250. (1995).
- (6) Iwamoto, H. Effect of a cardiotonic agent, MCI-154, on the contractile properties of skinned skeletal muscle fibers. *Eur. J. Pharmacol.*, 341: 243-252. (1998).
- (7) Iwamoto, H. Thin filament cooperativity as a major determinant of shortening velocity in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 74: 1452-1464 (1998).
- (8) Hibberd, M.G., Dantzig, J.A, Trentham, D.R. & Goldman, Y.E. Phosphate release and force generation in skeletal muscle fibers. *Science*, 228: 1317-1319. (1985)
- (9) Iwamoto, H. Effect of ionic strength on the kinetics of actomyosin interaction in skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 74: A266. (1998).

EFFECT OF SALT CONCENTRATION ON THE ENERGY TRASDUCTION MECHANISM OF A MOTOR PROTEIN

Hiroyuki IWAMOTO

Dept. Physiol., Sch. Med., Teikyo Univ; Experimental Research Div., SPring-8, JASRI

Summary

It is known that elevated salt concentration decreases isometric tension. To elucidate the mechanism by which salt concentration influences the chemo-mechanical energy transduction in muscle, we examined the contractile kinetics of skinned rabbit psoas muscle fibers activated either by the photolysis of caged calcium (nitrophenyl EGTA) or by conventional solution exchange at various salt concentration.

Increasing the salt concentration from 200 mM to 520 mM (in terms of ionic strength) decreased the rate constant for the rise of tension by 43% (from 6.8 to 3.9 s⁻¹ at 5°C), a decrease much smaller than that of steady-state isometric tension level (73%). To test whether the relative population of the low force A·M·ADP·Pi intermediate (Iwamoto, 1995) is affected by ionic strength, ramp stretches of various amplitudes were applied in the rising phase or at the plateau of isometric tension at salt concentrations of 200 and 360 mM. In the rising phase, the stretch amplitude-response curve showed a nonlinear feature characteristic of the low force A·M·ADP·Pi intermediate at both salt concentrations. At the plateau, however, the nonlinearity was not observed in either of the salt concentrations, suggesting that a relatively small amount of the low force A·M·ADP·Pi intermediate exists during steady state contraction. The nonlinearity was also observed in the presence of 20 mM Pi, which is known to increase preferentially the low force A·M·ADP·Pi intermediate. These results suggest that elevated salt concentration does not reduce isometric tension by affecting the transition between low force and force producing actomyosin intermediates. The results are best explained if there are two force producing A·M·ADP intermediates and the balance between them is affected strongly by salt concentration.