

## 海外報告①

## 平滑筋のホスファターゼ

石下 真人

酪農学園大学・食品科学科

大学から1年間の留学許可を得て、1995年9月末に日本を後にした。目的地は東海岸のマサチューセッツ州立大学の予定であったが、出発直前になって急遽、最初の2カ月間は5大湖の最南端、エリー湖の南の畔にあるオハイオ州クリーブランドのケースウェスタンリザーブ大学に行くことになった。

クリーブランドの古びたホテルで2カ月間滞在し、アメリカの生活にも少し慣れた頃、マサチューセッツ州のウースターに引っ越すことになった。引っ越しといってもただ個人の荷物を運ぶだけではなく、研究室の機械や器具、試薬に至るまで全てを運ばなければならない。2週間ほど前から実験はすべて止め、荷造りの準備をはじめ、11月30日、いよいよ引っ越しの日がきた。荷物の搬出ため、朝7時には20数人ほどの大男が研究室にやってきて、片っ端から荷造りを始め、どんどんトラックに積み込んでいった。その速いこと、荒っぽいこと、はらはらしながら、ただただ呆然と眺めていた。10時頃、大学の放射線管理委員会の職員がやってきて、作業を中断させ何やらわめいている。その内に作業員を連れて、どこかへ行ってしまった。どうやら放射線管理区域の器具もトラックに運び込んでしまったらしい。放射線を扱うための講習を行うというのである。すったもんだの末、2時間の講習は30分に短縮された。しかし、その後作業員は全員手袋をして、「これは大丈夫か?」といちいち確認してから荷造りを始める。結局作業は大幅に遅れてしまった。午後の明るい内には我々も出発する予定であったが、実際に出発したのはすっかり暗くなった夜の6時であった。2時間ほど走ると雪が降り出し、仕方なく予定より早めにモーテルで一泊した。約1,000 kmの旅を終え、大学のあるマサチューセッツ州ウースターの町には翌日の夜7時に到着した。次の日、ウースター最初の日は非常に寒い、快晴のすがすがしい朝であった。早速、荷物の搬入が始まり、機械の据え付けや器具の整理などを行ったが、同時にアパート探し、家具の調達、銀行口座の開設、電気やケーブルテレビの契約など、生活するための用事もこなさなければならない。目の回る忙しさの中で、時間はどンドン過ぎていった。結局、本格的に実験ができるようになるのは翌年1月末であった。1年の内でほぼ2カ月のブランクは研究にとって大きな損失ではあったが、めったに経験する

ことのできない貴重な体験でもあった。

さて、留学中の研究であるが、平滑筋のホスファターゼについて実験を行った。骨格筋の収縮・弛緩の調節機構はすでに明らかにされているが、平滑筋では不明な点がまだ多く残されている。しかも現在では、生理学的には平滑筋のほうが重要視されている。そういった点から、平滑筋の筋収縮に関する研究はますます盛んになっており、競争も激しい。平滑筋の収縮はミオシン軽鎖がミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) によりリン酸化されて起こり、MLCKの活性はカルモデュリンを介してカルシウム濃度の変化によって調節されている。弛緩は、リン酸化されたミオシン軽鎖がホスファターゼにより脱リン酸化されることによって起こる。ところが、このホスファターゼの活性がどのようにして調節されているのかは解明されておらず、現在の大きな研究課題となっている。ホスファターゼは130 kDa、38 kDa および 20 kDa の3つのサブユニットから構成されている。38 k サブユニットは活性を、130 k はミオシンとの結合能を有している。20 k の機能はまだわかっていない。これまでの実験から、ある種のキナーゼを活性化するような条件では平滑筋線維の収縮が強められることが判明している。これはMLCKを活性化しているのではなく、ホスファターゼの活性を阻害しているのではないか。よってホスファターゼもまたリン酸化によって調節されているのではないかという予想のもとに、種々のキナーゼでリン酸化してみた。すると予想通り活性が低下することが判明した。中でも効果の高いキナーゼはA-キナーゼとC-キナーゼであった。リン酸化がホスファターゼの活性の調節に関与しているのであれば、このキナーゼも平滑筋に共存しているはずである。そこで部分精製したホスファターゼをリン酸化する条件で処理してみた(図1)。リン酸化にはATPの $\gamma$ 位のリン酸が使われる。ところがATPで処理しても活性は全く変化しない。もしかすると脱リン酸化も同時に起こっているのかもしれない。そこでリン酸化には利用されるが、脱リン酸化を受けないATPアナログ(ATP- $\gamma$ -S)を使って、同じ実験を行った。するとホスファターゼの活性は著しく低下した。この結果は、平滑筋に共存する内因性のキナーゼによってホスファターゼがリン酸化を受けてその活性が低下すること、

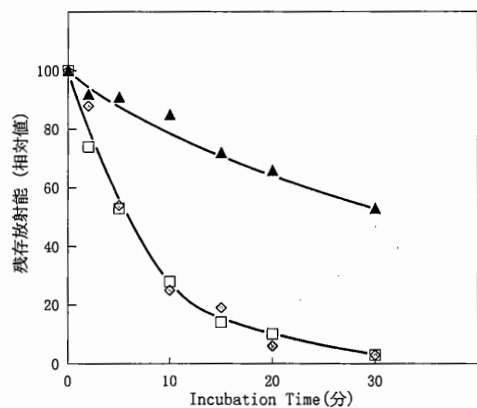


図1 部分精製したホスファターゼの活性に及ぼすリン酸化 (ATP および ATP- $\gamma$ -S) の影響

ホスファターゼ (0.1 M KCl, Tris-HCl, pH7.0) を 1 mM の ATP (□) または ATP- $\gamma$ -S (▲) と 25°C で 1 時間保持した後、 $^{32}$ P-LC<sub>20</sub> を基質として同温度で活性を測定した。 $^{32}$ P-LC<sub>20</sub> は脱リン酸化されて LC<sub>20</sub> となる。図の縦軸は LC<sub>20</sub> に残存する  $^{32}$ P の放射エネルギーを示す。残存放射エネルギーは経時的に減少し、減少速度が大きいほど活性は高い。対照 (◇) と比較して ATP- $\gamma$ -S では活性が大きく低下している。

そして同時に脱リン酸化も起こっていることを示す。ところが、このような実験を行うと、すぐにホスファターゼがなくなってしまう。しかもこれを分離・精製するには時間がかかり、取量も非常に低い。そこで調製した粗ミオシンを使うことにした。ミオシン標品にはホスファターゼが必ず混在しており、これを完全に取り除くのは困難である。おそらくミオシンに強く結合しているのであろう。まず粗ミオシン標品を使って、上記の結果の確認を行った。調製したミオシン

に ATP を加えてホスファターゼ活性を測定すると (図 2), ATP 濃度が低い場合には活性はほとんど低下しないが、高くするにしたがい低下していった。さらに今度は ATP- $\gamma$ -S を加えてみると、ホスファターゼ活性はほとんど消失した (図 3)。これらの結果は、先に述べた推定を支持するものと考えられる。さらに、いずれのサブユニットがリン酸化されるのかを、放射性リンを使って鶏気管支の平滑筋線維で調べると、130 k がリン酸化されていることがわかった。しかし内因性のキナーゼの同定はできなかった。ただ最初の実験で使用した既知のキナーゼ (A ならびに C-キナーゼ) とは違うようである。また脱リン酸化が自己脱リン酸化によるものかあるいは未知のホスファターゼによるものなのかも不明である。

アメリカではリンのような半減期の短い放射性物質であれば、特別な施設や設備もほとんど必要ない。私の行った実験にもふんだんに使うことができ、実験のスピードは日本と比較にならないほど速い。ところが、新しい発見ができて意気込んで実験をしているところに、同じような内容の報告がアメリカのアリゾナ大学のグループから J. Biol. Chem. 誌に発表されてしまい、しばし落ち込んでしまったこともあった。

気を取り直して、今度は平滑筋細胞中のホスファターゼの局在について調べた。鶏の受精卵を買ってきて 10 日間培養した後、卵の中のヒヨコから米粒の半分もない砂嚢を取り出し、これをメスで細かく切り刻んで 3 日間培養した。成長した砂嚢筋培養細胞を、蛍光標識した抗ミオシンおよび抗ホスファターゼ (130 kDa) モノクローナル抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。抗ミオシン抗体で染色した平滑筋細胞では、ミオシンフィラメントに由来する強い蛍光を発する多数の線が認められる (写真 1)。抗ホスファターゼ抗体の細胞の蛍光はミオシン抗体とは異なり、蛍光は弱い。

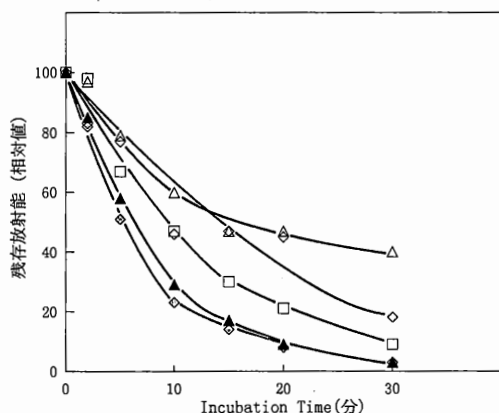


図2 粗ミオシン標品に含まれるホスファターゼの活性に及ぼす ATP の影響  
測定条件は図1と同じ ATP 濃度 (◇); 0mM, (▲); 1mM, (□); 3mM, (◇); 5mM, (△); 10mM

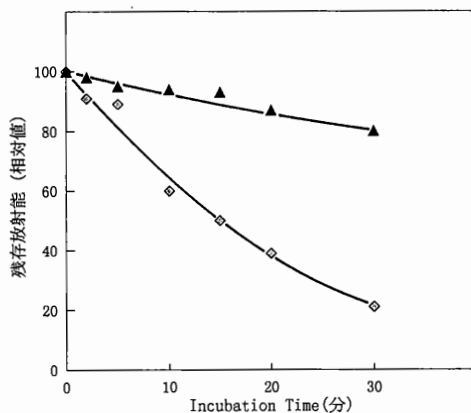


図3 粗ミオシン標品に含まれるホスファターゼの活性に及ぼす ATP- $\gamma$ -S の影響  
測定条件は図1と同じ (◇); 対照, (▲); 1 mM ATP- $\gamma$ -S

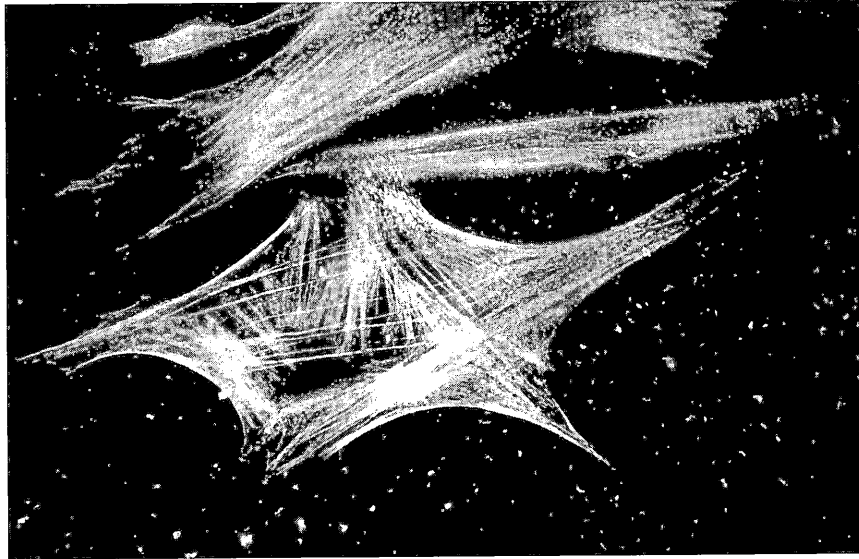


写真1 蛍光標識した抗ミオシン抗体で染色した砂囊筋培養細胞の蛍光顕微鏡像



写真2 蛍光標識した抗ホスファターゼ (130 kDa) 抗体で染色した砂囊筋培養細胞の蛍光顕微鏡像

ミオシンと比較して存在量が少ないためであろう。また写真でははっきりと見えないが、蛍光は点線状に連なり(写真2)、おそらくミオシンフィラメント上に点在しているものと考えられる。先にも述べたように、ホスファターゼはミオシン標品に必ず混在しており、ミオシンに強く結合しているため、このような局在を

示すのは妥当と思われる。残念ながら時間切れとなってしまい、実験はここで終了することになった。

最後に、今回の留学で貴重な経験をすることができました。このような機会を与えて戴いた酪農学園大学に感謝の意を表します。