

## 平滑筋からの myosin および調節タンパク質の精製法の改良

近藤 哲也・鈴木 亮・岡垣 壮\*

三重大学大学院生物資源学研究科

### Improved methods for preparation of myosin and its related regulatory proteins from smooth muscle tissues

Tetsuya KONDO, Ryo SUZUKI, Tsuyoshi OKAGAKI\*

Mie University Graduate School of Bioresources, 1577 kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8577, Japan

#### Abstract

Muscle tissues are generally classified into three types, skeletal, cardiac, and smooth muscle. Smooth muscle cells (SMCs) include all muscle cells other than skeletal and cardiac muscles. There are various types of smooth muscle tissues, and they play important roles in many physiological functions. SMCs are localized in digestive tract (such as esophagus, stomach, ileum, small intestine, large intestine), blood vessels, uterus, airway, and bladder. Response to agonists of these SMCs varied from one muscle type to other type. The main mechanism of activation of contraction is transient increment of cytoplasmic concentration of  $Ca^{2+}$ , followed by phosphorylation of myosin light chain. Some actin-binding proteins activate or inhibit the above actomyosin-based contraction. This regulatory mechanism of the contraction is thought to be universal among various SMCs. Since SMCs of these tissues are small and furthermore surrounded by large amount of extra cellular matrix or mucous membrane, we can isolate only a small amount of SMCs purely. For biochemical study of muscle proteins, selected SMCs, such as avian gizzard, bovine stomach, bovine aorta, are usually used for convenient starting materials. Most of genes of major muscle proteins in SMCs are isolated so far. Therefore, these genes can be expressed in bacterial, insect, or cultured animal cells. However, myosin or other muscle proteins have been purified from animal tissues still now, because of complexity of construction of expression vectors or economical reasons of these expression systems. In this report we describe improved and convenient methods to prepare myosin and related regulatory proteins.

**Key Words:** smooth muscle, myosin, MLCK, caldesmon, telokin

#### はじめに

平滑筋は骨格筋や心筋のように横紋構造をもたない筋組織をすべて含む広範囲な細胞の総称である。血管、気管、消化管、子宮、膀胱など各種臓器に分布していて種々の生理機能に参与している。平滑筋細胞は骨格筋細胞のように巨大な融合細胞ではなく単細胞のため、体積が小さいという特性

がある。そのため細胞外から細胞内への  $Ca^{2+}$  イオンの流入によって容易に細胞内カルシウム濃度が上昇し筋収縮をひき起こす。それらの細胞表面の受容体型イオンチャンネル（アドレナリン受容体、ムスカリン受容体など）の特性は細胞種ごとに極めて多様である。平滑筋は上記の組織における種々の疾患と密接な関係があるため、薬理的、生理学的な観点から様々な薬物の受容体への作用が研

究されている。これらの研究は胃腸薬、高血圧症や高脂血症の治療薬、尿失禁の治療薬、分娩促進剤、ぜんそく治療薬などの作用機序の解明や薬物のスクリーニングに大きな成果を果たしている。このように受容体は多様であるが、細胞内で筋収縮をひきおこす myosin と actin の相互作用の調節様式には平滑筋全般に共通点が多いと考えられている。すなわち平滑筋細胞においては myosin 軽鎖のリン酸化が主要な収縮開始のメカニズムであり、actin 線維に結合している tropomyosin, caldesmon, calponin などのタンパク質は収縮調節を補助的に作用していると考えられている。平滑筋組織は小さく、さらに結合組織等に囲まれている。従って生化学的実験ができる程度に均一な平滑筋細胞を大量に得られる材料が限定されてしまう。これまで myosin やその調節タンパク質を精製する材料として、主としてトリ砂囊、シチメンチョウ砂囊、ウシ第1胃、ウシ大動脈等が利用されてきた。

これらのタンパク質の遺伝子クローニングがすでになされているので、原理的には種々のベクターを使って大腸菌、昆虫細胞、あるいは培養動物細胞でこれらの遺伝子を発現することが可能である。しかし収量やコストの点から課題が残っているため、これらのタンパク質は未だに平滑筋組織から生化学的手法で単離されて利用されることが多い。またこれらのタンパク質は細胞内で他のプロテインキナーゼによってリン酸化などの翻訳後修飾をうけるため、平滑筋以外の細胞で発現したタンパク質が生理機能を保持しているかについても問題が残る。これらのタンパク質の調製に関しては様々な報告があるが、いずれも古い文献しかなく収量や再現性に問題があるため、研究者がそれぞれ独自に改良を加えた方法で精製をおこなっているようである。

本稿では myosin, myosin light chain kinase (MLCK), caldesmon, 及び telokin の精製法について筆者らの改善点を含めて詳細に実験手法を紹介する。ここで紹介する方法は再現性が良く、生理活性を保持した精製タンパク質が十分な量得られている。平滑筋 actin は骨格筋 actin とアミノ酸配列のホモロジーが高く、その生化学的性質はほぼ同様と考えられているため、ほとんどの研究者は平滑筋 actin の代わりに骨格筋 actin を生

化学的な実験に使用している。

## I Myosin およびその調節タンパク質の生理機能と性質

### I-1 ミオシンの生理機能と性質

平滑筋 myosin は調節軽鎖 (LC 20) がリン酸化されることによって、その構造が変化する。脱リン酸化された myosin は頭部と尾部が接近して折れ曲がった 10 S 構造で、生理的な溶液条件では重合ができず、actin との相互作用もおこらない。リン酸化された myosin は尾部が直線上に伸長した 6 S 構造となり、重合して myosin 線維を形成する。リン酸化された myosin は ATP 依存的に actin と相互作用し滑り運動をひきおこす。骨格筋 myosin は塩濃度のみに依存して重合、脱重合をするのに対して、平滑筋 myosin は塩濃度のみならず  $Mg^{2+}$  や ATP の濃度によっても重合能が影響を受けて複雑な挙動をする。myosin の重合性を巧みに利用した myosin 精製法は Ebashi によって開発され<sup>1)</sup>、その後種々の改良が加えられた<sup>2,3,4)</sup>。基本的には myosin を重合させて沈殿させ可溶性タンパク質と分離する操作、myosin を脱重合させて凝集したタンパク質と分離する操作をくりかえす。すでに平滑筋 myosin の塩基配列が明らかにされており、actin との相互作用をする myosin 頭部の断片である heavy meromyosin の部分をバキュロウィルスベクターを使って昆虫由来細胞 Sf9 で発現することができる<sup>5,6,7)</sup>。しかし重鎖と2種類の軽鎖、合計3つのポリペプチドの遺伝子を同時に昆虫細胞にトランスフェクションしなくてはならないこと、培地のコストが高いことなどの課題がある。

### I-2 MLCK の生理機能と性質

myosin の軽鎖をリン酸化するのは MLCK である。この酵素は  $Ca^{2+}$  を結合した calmodulin によって活性化される。原報<sup>8)</sup>では calmodulin-agarose を利用して MLCK を精製するが、本稿で紹介するようにイオン交換クロマトグラフィーの組み合わせだけでも精製が可能である<sup>9,10,11)</sup>。MLCK はすでにクローニングされていて、中央部に約 290 アミノ酸残基からなる触媒部位が存在する。その両端に続いて N 端側と C 端側それぞ

れにもポリペプチドをもっている。トリでは 972 アミノ酸残基 (GenBank M 31048.1), ウシでは 1176 アミノ酸残基 (GenBank NM\_176636.2) からなる比較的分子量の大きなプロテインキナーゼである。その触媒部位を大腸菌で発現した例はあるが, 発現した MLCK はリン酸化活性が低い, calmodulin に対する親和性が低いなどの問題がある<sup>12,13</sup>。我々も pET 21 d (Novagen) を使ってトリ MLCK の触媒部位を大腸菌で発現したが, 発現タンパク質が不溶性になりやすかった。また不溶性タンパク質を尿素で可溶化後に, 透析して尿素を除いても酵素活性が非常に低かった。溶液中で精製 myosin の軽鎖のリン酸化だけをおこなうことだけが目的であれば, 触媒部位の配列だけを大腸菌や昆虫細胞の発現系を使って発現して, myosin に対して高濃度加えれば良い。MLCK の平滑筋での存在量が他のプロテインキナーゼと比較するとかなり多く, 精製がさほど困難ではないこともあり, 現在でも MLCK を平滑筋組織から単離することが多い。

電子顕微鏡で MLCK を観察するとその立体構造は, ひも状の分子の両端が屈曲して接触しているように見える<sup>14</sup>。MLCK の N 端側には塩基性アミノ酸のクラスターが存在し, C 端側には酸性アミノ酸が多いことから, N 端と C 端が結合して複雑な立体構造をとっていることが予想される。MLCK はこのように触媒部位以外の配列をもっていて, キナーゼ活性以外にも actin や myosin と直接結合して生理活性の調節をすることが知られている<sup>15</sup>。そのような機能を調べたい場合には全長の MLCK が必要になる。最近ではウシ胃平滑筋の MLCK の全長を cold shock vector pCold I (TAKARA) にサブクローニングして大腸菌で発現する試みが行われており<sup>16,17</sup>, 以前の pOTS や pET vector 系を使った発現系<sup>12,13</sup> よりかなりキナーゼ活性が高い標品が得られている。

リン酸化された myosin 軽鎖の脱リン酸化をずる myosin light chain phosphatase は 3 量体で, 細胞内では 38 kDa の触媒部位と, 110 kDa, 20 kDa のポリペプチドとが複合体を形成している。触媒部位のみでも酵素活性を保持している。平滑筋細胞内の存在量が少なく, また精製法が煩雑のため遺伝子を大腸菌で発現して精製する場合が多い。詳細については別書を参照されたい<sup>18</sup>。

### I-3 caldesmon の生理機能と性質

caldesmon は Sobue らによって calmodulin 結合性のある actin 結合タンパク質として発見された<sup>19</sup>。caldesmon は actin と myosin の両方と相互作用し, actin と myosin の相互作用を阻害する<sup>20</sup>。この阻害効果は  $Ca^{2+}$  存在下で calmodulin によって解除されるので, 骨格筋 troponin 複合体と類似の生理機能をもつと考えられている。Sobue らによって calmodulin による actin 線維上の caldesmon 結合の立体的な位置が変化する flip-flop モデルが提唱されている<sup>21</sup>。caldesmon は, actin 線維に沿って結合するひも状のタンパク質 tropomyosin とともに相互作用する。caldesmon と actin 線維との結合は tropomyosin によって増幅され, caldesmon による actin-activated-myosin-ATPase 活性の阻害も tropomyosin によって増強される。また caldesmon は単独で脱リン酸化 myosin の重合を促進する。原報<sup>19</sup>では calmodulin-agarose を使った精製法が紹介されている。その後 Bretcher によって caldesmon の熱耐性を利用して, 平滑筋抽出液を熱処理する簡便な方法が開発された<sup>22</sup>。

### I-4 telokin の生理機能と性質

telokin は MLCK の C 端の 155 アミノ酸残基と全く同じ配列をもつ酸性タンパク質である<sup>23</sup>。砂嚢のような消化管平滑筋で発現量が多いが, 血管平滑筋などでは発現していない<sup>24</sup>。telokin は脱リン酸化 myosin の重合を促進し, myosin 線維形成を促すことが報告されている<sup>25</sup>。しかしリン酸化 myosin とは結合しない。そのため細胞内では弛緩時に脱リン酸化される myosin 線維の安定化に寄与していると考えられている。

## II myosin とその調節タンパク質の調製

### II-5 実験材料と試薬

我々の研究室では材料の入手が容易なトリ砂嚢を主な実験材料として用いている。名張市近食青山農場より生きたままの成鶏 (ブロイラー, 孵化後約 3 ヶ月) を購入し研究室に運ぶ。断首後に砂嚢を取り出し, 氷上で冷やす。このとき砂嚢から消化液がもれて混入しないように砂嚢の末端の消化管をキムワイプで包んで作業をおこなう。低温

にすると脂肪が固まってくるので、砂嚢の外側の脂肪をペーパータオルで取り除く。砂嚢の白い結合組織と鮮血色をした平滑筋層の境目に沿って小型の解剖ばさみで切れ目を入れる。平滑筋層のみを解剖ばさみで切り取る。平滑筋層は砂嚢全体の重量の 1/3 程度である。砂嚢 10 個から約 80~100 g の平滑筋が得られる。砂嚢を小型のミンチ機ないしはフードプロセッサで 1 mm 角になるように細断する。小分けにして液体窒素で凍結して -80°C で保存する。かつてはニワトリを解体する食肉処理場から新鮮な砂嚢が得られたが、トリインフルエンザの流行 (2005~2006) 以降は処理場から新鮮な臓器が入手できなくなったため、我々は成鶏から新鮮な臓器をとって使っている。動物の処理は三重大学動物実験規定に準じておこなっている。Leupeptin はペプチド研究所、phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) は Sigma, DEAE-toyopearl および SP-toyopearl は トーソーより購入した。それ以外の一般試薬は WAKO の特級試薬を使用している。

## II - 2 実験方法

### II - 2 - 1 ミオシンの調製

平滑筋と骨格筋では細胞内のアクチンとミオシンの割合が大きく異なる。actin: myosin の重量比が骨格筋では 1:2, 平滑筋ではこの比が 10:1 になっており、平滑筋は actin に比べて myosin の含有量が少ない。そのために平滑筋から myosin を精製するときには、途中のステップで actin をどれだけ除去できるかが重要である。混入した actin は myosin と強固に結合し、遠心すると一緒に沈殿してしまうため、myosin の収量が減ってしまうからである。動物の死後平滑筋細胞内の myosin light chain kinase 活性が低下し、相対的に myosin light chain phosphatase 活性が優位になり、筋肉中では myosin は脱リン酸化された状態で存在する。従って以下の重合の性質を利用して、遠心を繰り返すことによって myosin を精製することができる<sup>10,11)</sup>。脱リン酸化 myosin は試験管内では不安定で折れ曲がった 10 S 構造になり重合できないが、低イオン強度溶液中で 10~20 mM Mg<sup>2+</sup> が存在すると重合して myosin 線維を形成する。逆に 1~2 mM の ATP の添加

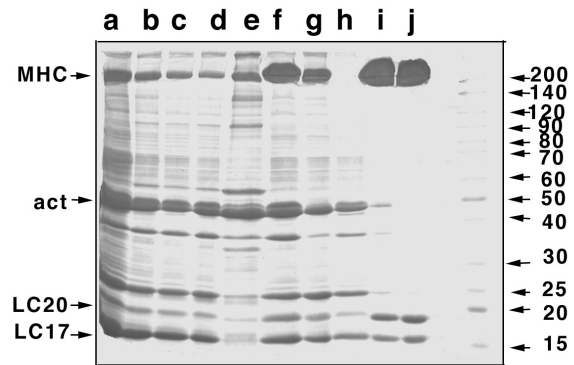


図 1. myosin 精製各段階の SDS-PAGE パターン。

washing buffer で洗い出される可溶性画分。1, 2, 3, 4 回目の上清 (a, b, c, d)。2 mM ATP により抽出した myosin の上清 1 回目 (e)。10 mM MgCl<sub>2</sub> を加えて遠心後のアクトミオシンの沈殿 (f)。5 mM ATP, 0.14 M MgCl<sub>2</sub> を加えて actin 線維束と分離する遠心後の上清 (g) と沈殿 (h)。0.1 M NaCl, 10 mM Mg (CH<sub>3</sub>C O O H)<sub>2</sub> を加えて遠心して沈殿させた myosin (i)。最終の myosin 標品 (j)。左端の矢印はミオシン重鎖 (MHC), actin (act), ミオシン軽鎖 (LC 17 と LC 20) の位置を示す。右端の矢印は分子量マーカーで、数字は分子量 (kDa) を示す。

により myosin 線維は脱重合してモノマーとなる。

実験操作はすべて氷上ないしは 4°C で行う。砂嚢 100 g に 3 倍量の washing buffer (30 mM NaCl, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を加え、3,000 g で 10 分遠心して上清を捨てた。この操作で、gelsolin のようなアクチン線維切断因子により断片化された短い actin 線維と可溶性タンパク質とを除去する (図 1, レーン a~d)。この操作を 4 回繰り返した後に myosin を抽出した。上記の洗った砂嚢に 3 倍量の extraction buffer (30 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 0.5 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol (DTT)) を加え時々スパーテルでかき混ぜながら 40 分氷上で静置後、3,000 g で 10 分遠心して上清をとった (図 1, レーン e)。このときビーカーの上にガーゼを 4 重に置いて上に浮いた脂肪を取り除いた。さらに沈殿の砂嚢に extraction buffer 2 (extraction buffer 1 にさらに 30 mM NaCl を追加したもの) を加えて再度 myosin を抽出した。1 回目と同様に遠心して上清を集めた。この 2 回分の上清を冷した deionize and distilled water (DDW) で 2 倍に希釈してか

ら、最終濃度 10 mM の  $MgCl_2$  を加えた。これを 60 分間氷上で静置すると、10 分後から myosin が徐々に重合して溶液は白濁してくる。これを 12,000 g で 10 分遠心した。沈殿 (図 1 レーン f) に 10 ml の 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) を加えてコマゴメピペットで分散させ、そこへ最終濃度 5 mM になるように ATP を加える。12,000 g で 20 分遠心して、上清をビーカーに移し最終濃度 0.14 M になるように  $MgCl_2$  を加えた。ここで myosin は再びモノマーとなり、さらに ATP の作用により actin と分離される。このような高濃度の  $MgCl_2$  存在下では actin は Mg-パラクリスタルと呼ばれる actin 線維の大きな束が形成され、遠心で容易に沈殿させることができる。この溶液を 12,000 g で 20 分遠心して、actin 線維束を沈殿させて除去する (沈殿は図 1, レーン h)。上清 (図 1, レーン g) をビーカーに移し 3.7 倍量の dilution buffer (2 mM  $NaHCO_3$ , 1 mM DTT) で希釈し、 $MgCl_2$  を最終濃度 30 mM になるようする。氷上に 60 分静置すると徐々に myosin が重合する。これを 12,000 g で 20 分遠心し、沈殿 (図 1, レーン i) を少量の dissociation buffer (0.3 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT) で溶かし、myosin を脱重合させた。これをすぐに 12,000 g で 20 分遠心し、凝集したタンパク質を沈殿させる。上清をビーカーに移し 2 倍量の dilution buffer を加え NaCl の最終濃度を 0.1 M に下げた。氷上で 60 分静置し、アクトミオシンを凝集させた。12,000 g で 20 分遠心して、上清を回収した。上清にさらに 10 mM Mg ( $CH_3COO$ )<sub>2</sub> を加えて氷上で 2 時間静置した。時間とともに myosin が重合して溶液全体が徐々にうすうす白濁してくる (このとき混入している actin が多い場合には、粒状の塊が沈殿する)。この溶液を 12,000 g で 20 分遠心し、沈殿を dissociation buffer で溶かす。12,000 g で 20 分遠心し上清を回収する (図 1, レーン j)。上清を透析チューブ (20/33 インチ, WAKO) に入れ 50 % glycerol, 0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT に対して 24 時間透析した。この操作により体積が 1/3 程度に減少し myosin が濃縮される。そのまま分注して -20~30°C のフリーザーで保存する。調製した myosin は 2 ヶ月程度の期間は ATPase 活性測定、モーティ

リティーアッセイなどで生理活性を保持していることを確認している。豚大動脈からも同様な方法で myosin を精製することが可能である。

## II-2-2 MLCK の調製

MLCK は Adelstein and Klee の方法<sup>8)</sup>、その変法<sup>26)</sup>を基に改良を加えた。原報とその変法では calmodulin-agarose のアフィニティーカラムを用いるが、calmodulin-agarose (Sigma) が高価であるため我々はイオン交換クロマトグラフィー (DEAE-toyopearl および SP-toyopearl) の組み合わせで精製をおこなっている。トリ砂囊 100 g に 500 ml の wash buffer (40 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) を加え、ミキサーで攪拌した。このホモジェネートを氷上で 10 分間静置した。12,000 g で 20 分遠心し上清を捨てる。沈殿にさらに同量の wash buffer を加え、上記の操作を 3 回繰り返して可溶性タンパク質を除いた。沈殿した砂囊に 400 ml の extract buffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM  $MgCl_2$ , 2 mM EGTA, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) を加えて攪拌した。30 分間スターラーで攪拌して MLCK を抽出した。この抽出液を 12,000 g で 20 分遠心する。得られた上清はガーゼで濾してビーカーに保存した。この沈殿 (筋肉残屑) にさらに 400 ml の extract buffer を加え、上記と同様に MLCK の抽出をおこなう。12,000 g で 20 分遠心し、2 回目の上清を 1 回目の上清と合わせてメスシリンダーで体積を測る。100 ml あたり 25 g の硫酸を加えて溶かし、氷上で 30 分間静置させる。12,000 g で 20 分遠心し、上清にさらに 100 ml あたり 8 g の硫酸を加えて溶かし、氷上で 30 分間静置させてから 12,000 g で 20 分遠心した。大部分の上清を捨て一部の上清を遠心チューブに残す。MLCK は遠心チューブの底だけでなく壁面に沿って付着しているので、コマゴメピペットを使って内壁に付着した MLCK と残った上清とを一緒に混合させる。これを 12,000 g で 20 分遠心して上清を捨てた。この操作により次のイオン交換クロマトグラフィーに持ち込まれる硫酸の量を減らし、結果としてカラムにアプライするサンプルの体積を減らすことができる。硫酸分画後の MLCK の沈殿を column buffer A (20 mM Tris-HCl (pH

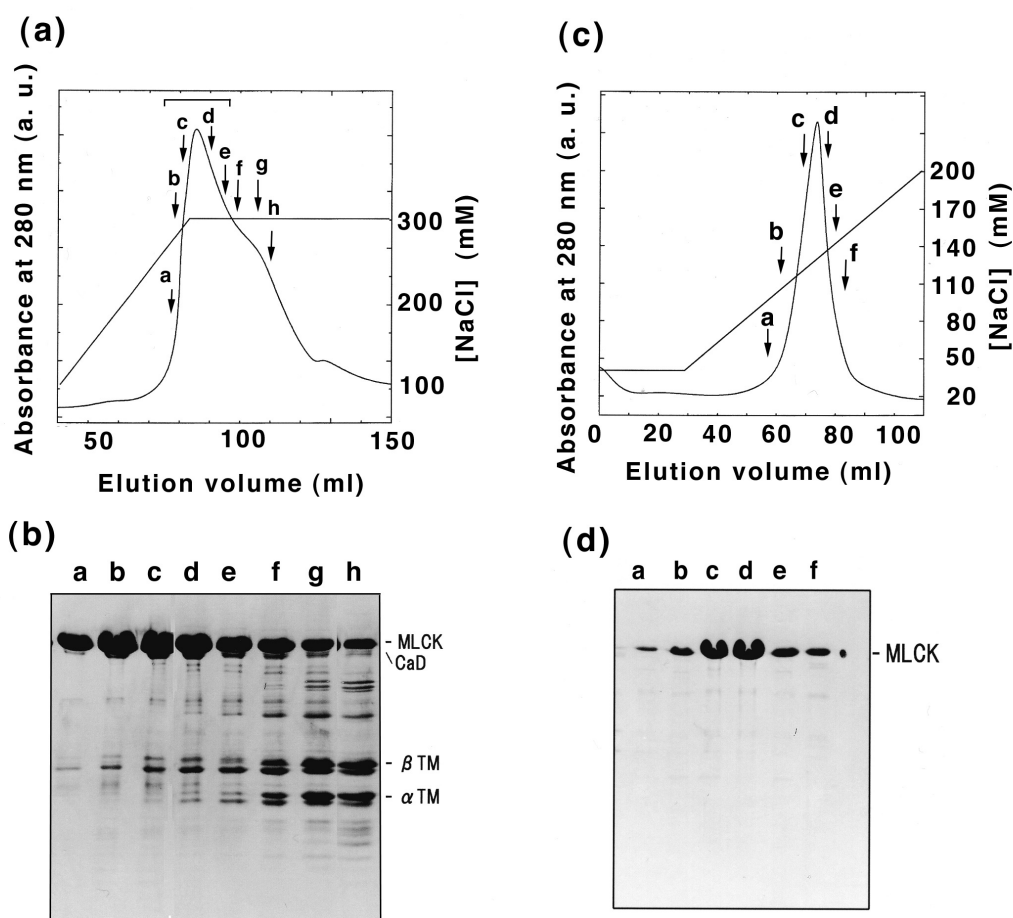


図2. MLCKのイオン交換クロマトグラフィーによる分離。

DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーの溶出パターン (a)。硫酸分画した MLCK を 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT で平衡化した DEAE-Toyopearl にアプライした。溶出は 100-300 mM NaCl 濃度勾配をかけておこなった。図中の直線は NaCl のグラジエントを示す。流速は 1 ml/min でおこない、各画分を 2 ml ずつ集めた。括弧はプールの画分を示す。一部の画分を SDS-PAGE に供した (b) a~h は溶出パターン中に矢印で示したそれぞれの画分の組成を示す。SP-Toyopearl クロマトグラフィーの溶出パターン (c)。DEAE-Toyopearl によって分離した MLCK 画分をプールしてイオン強度を下げた後、40 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT で平衡化した SP-Toyopearl にアプライした。溶出は 40-200 mM NaCl グラジエントをかけておこなった。図中の直線は NaCl の濃度勾配を示す。流速は 1 ml/min でおこない、各画分を 2 ml ずつ集めた。グラフ上部の括弧はプールの画分を示す。一部の画分を SDS-PAGE に供した (d) a~f は溶出パターン中に矢印で示したそれぞれの画分の組成を示す。

7.5), 2 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) で溶かし、さらに同じバッファーで希釈して conductive meter (HORIBA) を使って電気伝導度が 100 mM NaCl と同じになるようにした。これを 100,000 g で 60 分遠心して不溶性のタンパク質を除去し、上清をクロマトグラフィーに使用した。クロマトグラフィーは FPLC ポンプにカラムを接続しておこなう。100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT, 1 mM

PMSF で平衡化した DEAE-Toyopearl ( $\phi$  1.6 X 12 cm) に super loop (GE ヘルスケア) を使って上記の上清をアプライした。サンプル注入後カラムを buffer A で洗い未吸着のタンパク質を除く。A<sup>280</sup>がベースラインに戻るのを確認したら、100~300 mM の NaCl グラジエントをかけて溶出をおこなう (図 2 (a))<sup>10)</sup>。フラクションコレクターの画分を SDS-PAGE に供して MLCK を含む画分を確認する (図 2 (b))。MLCK は混入する caldesmon よりもやや低い塩濃度で溶出さ

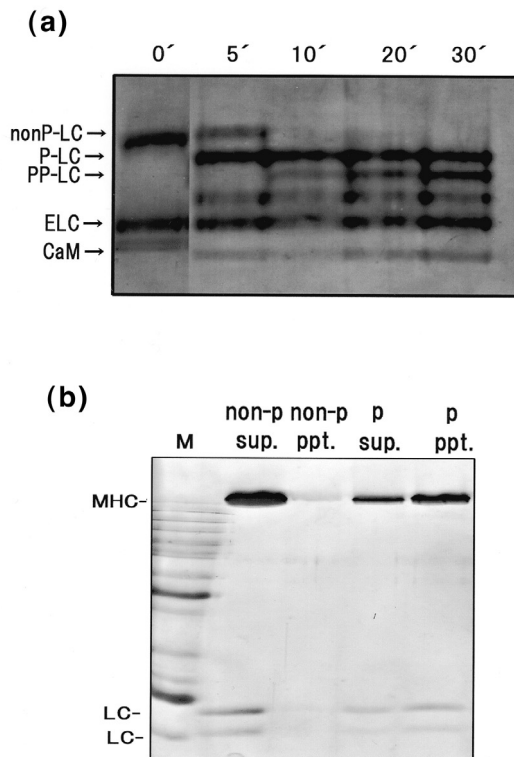


図3. 精製した MLCK による myosin 軽鎖のリン酸化。

myosin (2 mg/ml), MLCK (0.02 mg/ml), CaM (0.01 mg/ml) を 50 mM NaCl, 30 mM imidazole (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 中で 25°C において 0, 5, 10, 20, 30 分反応させてミオシン軽鎖をリン酸化させ、20 μl ずつ urea-glycerol PAGE に供した (a)。矢印は脱リン酸化軽鎖 (nonP-LC), 一重リン酸化軽鎖 (P-LC), 二重リン酸化軽鎖 (PP-LC), 主要軽鎖 (ELC), カルモジュリン (CaM) の位置を示す。myosin (0.5 mg/ml) を 0.1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mM ATP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 中で混合し氷上で 60 分静置後、100,000 g で 40 分遠心し上清 (sup) 沈殿 (ppt) を 20 μl ずつ SDS-PAGE に供した (b)。左端は分子量マーカーで、ミオシン重鎖 (MHC) と軽鎖 (LC) の位置を示す。脱リン酸化 myosin (non-p) では myosin が重合できずほとんどが上清に残ったが、リン酸化 myosin (p) では半分以上が重合して沈殿した。

れる。

我々の経験では硫酸分画後のサンプルや DEAE-Toyopearl から溶出後のサンプルを氷上で一晩放置すると、PMSF や leupeptin などのプロテアーゼ阻害剤を加えていても内在性のプロテアーゼによって MLCK が消化される。我々は MLCK の抽出から SP-Toyopeal への吸着と洗浄までの操作を一日で行っている (NaCl グラジエ

ントによる MLCK の溶出は翌日行っている)。このことから SP-Toyopeal の wash の段階でようやく MLCK と内在性のプロテアーゼが分離されると考えられる。

MLCK を含む画分を集めて column buffer A で 2 倍に希釈してから、100,000 g で 60 分遠心して凝集したタンパク質を除去した。このサンプルを 40 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 μg/ml leupeptin, 1 mM DTT, 1 mM PMSF で平衡化した SP-Toyopeal (φ 1.0 X 12 cm) にアプライした。同じバッファーで溶出し、A<sub>280</sub> がベースラインに戻るのを確認したら、40–200 mM NaCl グラジエントをかけて溶出をおこなった (図 2 (c))<sup>10)</sup>。フラクションコレクターの画分を SDS-PAGE に供し MLCK を含む画分を確認した (図 2 (d))。得られた MLCK 画分はセントリコン (Millipore) で濃縮し、分注して液体窒素で凍結して -80°C フリーザーで保存した。得られた MLCK は少なくとも 2 年間はキナーゼ活性を保持している。この MLCK 標品を使って myosin 軽鎖をリン酸化させて glycerol -PAGE で確認したのが図 3 (a) である<sup>11)</sup>。リン酸化したミオシンは重合能が高くなり、生理的な塩濃度で重合できるようになった (図 3 (b))<sup>11)</sup>。

## II - 2 - 3 caldesmon の精製

caldesmon はそのタンパク質の大半が α-helix からなり熱耐性があるため、精製の途中で加熱処理によって他の大部分のタンパク質を変性させることにより分離できる。熱処理以外の操作、遠心分離や硫酸分画はすべて 4°C でおこなう。

100 g の砂囊に 5 倍量の homogenization buffer (0.3 M NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM PMSF) を加えミキサーにかけてホモジナイズさせた。これを 18,000 g で 20 分遠心し、上清をガーゼで濾過して脂質を除いた。三角フラスコないしは小さな鍋に入れ沸騰した湯浴中で 15 分間熱処理をする。20 分間氷上で静置後、12,000 g で 20 分遠心し上清を回収した。上清の体積をメスシリンダーで測り、100 ml 当たり 15 g の硫酸をスターラーで攪拌しながら加えて溶かす。氷上で 30 分静置した後、12,000 g で 20 分遠心する。上清にさらに 13 g の硫酸を加えて溶かし、氷上で 30 分静置する。

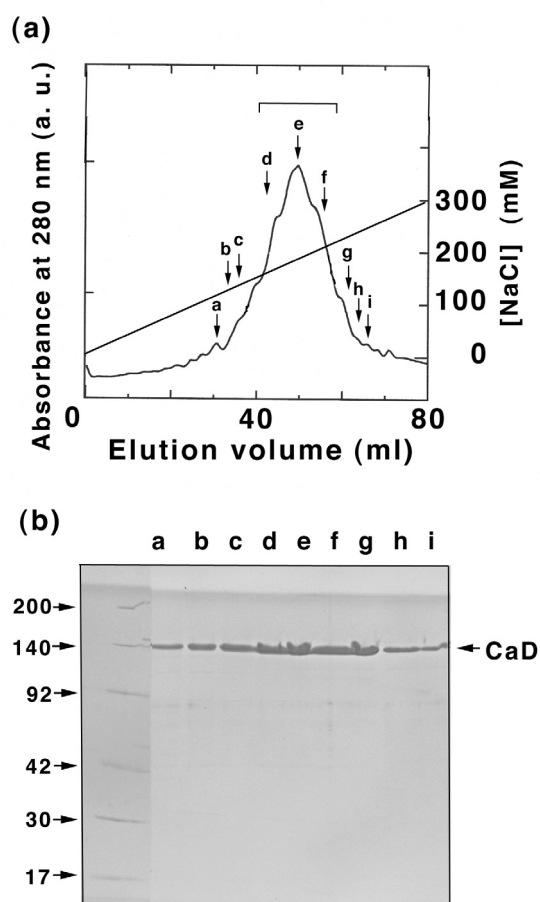


図4. DEAE クロマトグラフィーによる caldesmon の分離。

DEAE クロマトグラフィーの溶出パターン (a)。硫酸分画した MLCK を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT で平衡化した DEAE-Toyopearl にアプライした。溶出は 0-300 mM NaCl 濃度勾配をかけておこなった。図中の直線は NaCl のグラジエントを示す。流速は 1 ml/min でおこない、各画分を 2 ml ずつ集めた。グラフ上部の括弧はプールした画分を示す。一部の画分を SDS-PAGE に供した (b) a~i は溶出パターン中に矢印で示したそれぞれの画分の組成を示す。CaD は caldesmon のバンドの位置を示す。左端の矢印は分子量マーカーで、数字は分子量 (kDa) を示す。

12,000 g で 20 分遠心し沈殿を 10 ml の dialysis buffer -1 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) で溶かした。これを透析チューブに入れて 500 ml の dialysis buffer に対して、2 回透析外液を交換して一晩透析する。透析したサンプルを 100,000 g で 60 分遠心し、硫酸分画後

に凝集したタンパク質を除去して、上清をクロマトグラフィーにアプライした。20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT) で平衡化した DEAE-Toyopearl ( $\phi$  1.6 X 12 cm) にアプライした。上記の平衡化 buffer で洗浄して UV モニターがベースライン程度まで戻るのが確認したら、0~300 mM の NaCl グラジエントをかけて caldesmon を溶出した (図 4 (a))<sup>10)</sup>。一部の画分を SDS-PAGE に供し caldesmon を含む画分を確認した (図 4 (b))。caldesmon を含む画分 (~200 mM NaCl を含む) を集めて 1000 ml の dialysis buffer-2 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に対して、途中透析外液を交換し一晩透析した。精製 caldesmon のタンパク質濃度を測定し、分注して液体窒素で凍結して -80°C で保存した。この試料は少なくとも 2 年間は生理活性を保っていた。

なお caldesmon を硫酸沈殿させた後の上清から、同じく熱耐性のある tropomyosin を副産物として精製することが可能である。上記の caldesmon を沈殿させた後の上清にさらに 100 ml あたり 8 g の硫酸を加える。30 分氷上で静置後 12,000 g で 20 分遠心し、沈殿を少量の dialysis buffer で懸濁し、同じバッファーに対して透析する。これを 100,000 g で 60 分遠心し、上清を DEAE クロマトグラフィーにかけると、tropomyosin は 200 mM NaCl 以上の塩濃度で溶出される。

## II - 2 - 4 telokin の精製

砂囊 100 g に対して 4 倍量の extraction buffer (30 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM KCl, 1 mM EGTA, 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT) を加えた。数回に分けてブレンダーにかけて、8,000 g で 10 分遠心分離した。上清はガーゼで濾過してビーカーに保存しておき、再度沈殿に 4 倍量の extraction buffer を加えてホモジナイズした。上清をガーゼで濾過し、1 回目の抽出液と一緒にメスシリンダーで体積を測った。35 g/100 ml の固形硫酸を加えて溶かした。氷上で 30 分放置させ 12,000g で 30 分遠心した。上清にさらに 15 g/100 ml の硫酸を加えて溶かし、氷上で 30 分放置した。12,000 g で 30 分遠心した。上清の大部分を捨てて 20 ml 程度を



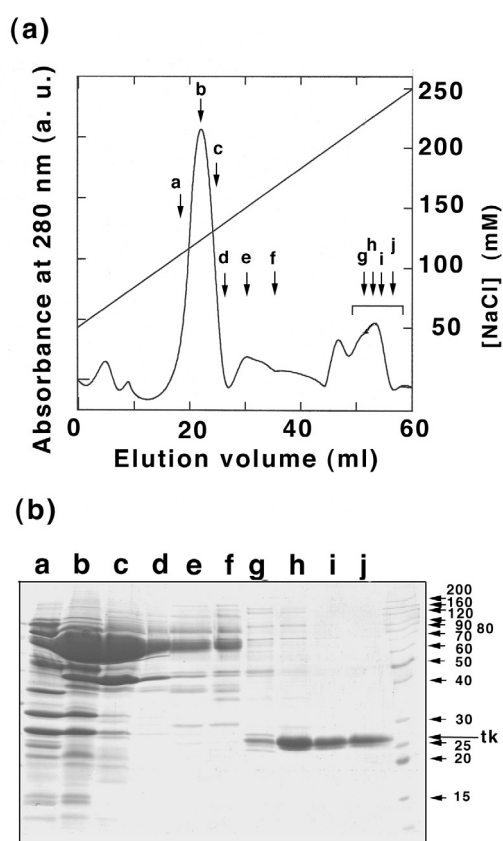


図5. DEAE クロマトグラフィーによる telokin の分離。

DEAE クロマトグラフィーの溶出パターン (a)。硫酸分画した telokin を 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM DTT で平衡化した DEAE-Toyopearl にアプライした。溶出は 50-250 mM NaCl グラジエントをかけておこなった。図中の直線は NaCl の濃度勾配を示す。流速は 1 ml/min でおこない、各画分を 2 ml ずつ集めた。グラフ上部の括弧はプールした画分を示す。一部の画分を SDS-PAGE に供した (b) a~j は溶出パターン中に矢印で示したそれぞれの画分の組成を示す。tk は telokin のバンドの位置を示す。右端の矢印は分子量マーカーで、数字は分子量 (kDa) を示す。

残す。沈殿を残った上清と一緒にコマゴメピペットで分散させ、遠心チューブ内の凝集したタンパク質をチューブの底に集めた。再度 12,000 g で 30 分遠心し、上清を捨て、沈殿を少量の dialysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT) で溶かし、透析チューブに入れ、500 ml の dialysis buffer に対して一晩透析した。透析後サンプルを回収し混入する actin や tropomyosin の等電

点沈殿を行う。少量の HCl を加えて pH を 4.9 に合わせ、30 分水上で静置してから、12,000 g で 30 分遠心した。上清に HCl を加え pH を 7.0 に合わせた。さらに 100,000 g で 60 分遠心して凝集したタンパク質を沈殿させた。

50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT で平衡化した DEAE-Toyopearl へ、上記の上清をアプライした。同じバッファーで洗浄し UV モニターで 280 nm の吸光度がベースラインまで下がったのを確認したら、50-250 mM NaCl のグラジエントをかけて telokin を溶出した (図 5 (a))<sup>10)</sup>。SDS-PAGE で telokin を含む画分を調べ (図 5 (b))、プールしてセントリコン (Millipore) で濃縮した。タンパク質濃度を決定した後に分注し、液体窒素で凍結して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。我々の経験では telokin にも熱耐性があることがわかったので、caldesmon 同様、始めの抽出液を熱処理することにより夾雑物を除いて効率良く精製することも可能である。

## 謝 辞

本研究の大部分は文部科学省科学研究費、三重大学学長裁量経費萌芽研究、上原記念生命科学財団、島原科学振興会の支援によっておこなわれた。近藤哲也、鈴木亮両名の修士論文審査をしていたいただいた本学の加納哲教授、梅川逸人教授、柿沼誠博士、船原大輔博士に感謝いたします。長年にわたり平滑筋の筋タンパク質の生化学的研究の指導を受けた群馬大学大学院医学系研究科の小浜一弘教授に深くお礼を申し上げます。ここで紹介した MLCK の精製法は同研究室の早川晃一博士、caldesmon の精製法は石川良樹博士にご教示いただきました。さらに中村彰男博士、吉山伸司博士には同研究室において近藤哲也が直接指導を受け、様々な助言をいただきました。実験の技術的な支援をしてくれた同研究室の六本木幸江さん、新井圭子さん、羽生田友紀さんにも感謝いたします。

## 引用文献

- 1) EBASHI S. (1976) A simple method of preparing actin-free myosin from smooth muscle. J. Biochem.

- 79, 229-231.
- 2) IKEBE M, HARTSHORNE DJ. (1989) Effect of  $Ca^{2+}$  on the conformation and enzymatic activity of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **260**, 13146-13153.
  - 3) OKAGAKI T, NAKAMURA A, SUZUKI T, OHMI K, KOHAMA K. (2000) Assembly of smooth muscle myosin by the 38 k protein, a homologue of a subunit of pre-mRNA splicing factor-2. *J. Cell Biol.* **148**, 653-663.
  - 4) 野々村禎昭 (1993) 「平滑筋収縮タンパク質, およびその関連タンパク質・酵素の調製」, 日本生化学会編, 続生化学実験講座第10巻「血管-内皮と平滑筋-」(東京化学同人) pp 182-243.
  - 5) ONISHI H, MAEDA K, MAEDA Y, INOUE A, FUJIWARA K. (1995) Functional chicken gizzard heavy meromyosin expression in and purification from baculovirus-infected insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 704-708.
  - 6) LI XD, SAITO J, IKEBE R, MABUCHI K, IKEBE M. (2000) The interaction between the regulatory light chain domains on two heads is critical for regulation of smooth muscle myosin. *Biochemistry.* **39**, 2254-2260.
  - 7) LI XD, IKEBE M. (2003) Two functional heads are required for full activation of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* **278**, 29435-29441.
  - 8) ADELSTEIN RS, and KLEE CB. (1981) Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* **256**, 7501-7509.
  - 9) HAYAKAWA K, OKAGAKI T, Higashi-Fujime S, KOHAMA K. (1994) Bundling of actin filaments by myosin light chain kinase from smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 786-791.
  - 10) 近藤哲也 (2008) 「平滑筋 myosin 重合調節因子の相関性の解析」三重大学大学院生物資源学研究科修士論文.
  - 11) 鈴木亮 (2006) 「平滑筋ミオシン安定化因子 p32 のミオシン上での結合部位の解析」三重大学大学院生物資源学研究科修士論文.
  - 12) BAGCHI IC, KEMP BE, MEANS AR. (1989) Myosin light chain kinase structure function analysis using bacterial expression. *J. Biol. Chem.* **264**, 15843-15849.
  - 13) GUERRIETO JV, ROWLEY DR, MEANS AR. (1981) Production and characterization of an antibody to myosin light chain kinase and intracellular localization of the enzyme. *Cell* **27**, 449-458.
  - 14) NUMATA T, KATO T, YAZAWA M. (2001) Functional role of the C-terminal domain of smooth muscle myosin light chain kinase on the phosphorylation of smooth muscle myosin. *J. Biochem.* **129**, 437-444.
  - 15) NAKAMURA A, XIE C, ZHANG Y, GAO Y, WANG HH, YE LH, KISHI H, OKAGAKI T, YOSHIYAMA S, HAYAKAWA K, ISHIKAWA R, KOHAMA K. (2008) Role of non-kinase activity of myosin light-chain kinase in regulating smooth muscle contraction, a review dedicated to Dr. Setsuro Ebashi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 135-143.
  - 16) KOBAYASHI H, INOUE A, MIKAWA T, KUWAYAMA H, HOTTA Y, MASAKI T, EBASHI S. (1992) Isolation of cDNA for bovine stomach 155 kDa protein exhibiting myosin light chain kinase activity. *J. Biochem.* **112**, 786-791.
  - 17) XIE C, ZHANG Y, WANG HH, MATSUMOTO A, NAKAMURA A, ISHIKAWA R, YOSHIYAMA S, HAYAKAWA K, KOHAMA K, GAO Y. (2009) Calcium regulation of non-kinase and kinase activities of recombinant myosin light-chain kinase and its mutants. *IUBMB life.* **61**, 1092-1098.
  - 18) 盛田フミ, 大森敏弘 (1993) 「大動脈平滑筋ミオシン軽鎖フォスファターゼ」, 日本生化学会編, 続生化学実験講座第10巻「血管-内皮と平滑筋-」(東京化学同人) pp 236-243.
  - 19) SOBUE K, MURAMOTO Y, FUJITA M, KAKIUCHI S. (1981) Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 5652-5655.
  - 20) YAMAZAKI K, ITOH K, SOBUE K, MORI T, SHIBATA N. (1987) Purification of caldesmon and myosin light chain (MLC) kinase from arterial smooth muscle: comparisons with gizzard caldesmon and MLC kinase. *J. Biochem.* **101**, 1-9.
  - 21) 祖父江憲治, 林謙一郎 (1986) 「カルデスモン」, 日本生化学会編, 続生化学実験講座第6巻「細胞骨格の構造と機能 (上)」(東京化学同人) pp 241~243.
  - 22) BRETSCHER A. (1984) Smooth muscle caldesmon, rapid purification and F-actin cross-linking properties. *J. Biol. Chem.* **259**, 12873-12880.
  - 23) ITO M, DABROWSKA R, GUERRIERO JV, HARTSHORNE DJ. (1989) Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.* **264**, 13971-13974.
  - 24) GALLAGHER PJ, HERRING BP. (1991) The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein,

- telokin. *J. Biol. Chem.* **266**, 23945-23952.
- 25) SHIRINSKY VP, VOROTNIKOV AV, BIRUKOV KG, NANAEV AK, COLLINGE M, LUKAS TJ, SELLERS JR, WATTERSON DM. (1993) A kinase-related protein stabilized unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.* **268**, 16578-16583.
- 26) KUWAYAMA H, EBASHI S. (1988) Isolation from bovine brain of 155 kDa component exhibiting myosin light chain kinase activity. *J. Biochem.* **104**, 858-861.