

## §6. 利用実験

## 6-4. トリスタン主リングアンジュレーター光を利用した骨格筋の高分解能 X 線回折

若林 克三\*, 八木 直人\*\*†

\*大阪大学基礎工学部, \*\*東北大学医学部

**High Resolution X-Ray Diffraction of Muscle Using Undulator Radiation from the Tristan Main Ring at KEK****Katsuzo WAKABAYASHI\* and Naoto YAGI\*\***

\*Faculty of Engineering Science, Osaka University,

\*\*School of Medicine, Tohoku University

Results are reported of static and time-resolved X-ray diffraction studies on muscle fibers using a hard X-ray undulator installed in the Tristan main ring at KEK, as an innovative source of synchrotron radiation more intense and better collimated than that available with the Photon Factory bending-magnet beamline. The low divergence of the source made it possible to obtain high-quality diffraction patterns from static state of muscles, clearly resolving, with an angular resolution of ca. 700 nm, closely spaced diffraction peaks arising from the two symmetrical halves of the thick filaments centered on the M lines in a sarcomere. The detailed analysis of the meridional pattern lead to a more precise modeling of the complicated molecular packing of myosin molecules and C-proteins in the thick filaments. Time-resolved experiments using a focusing mirror aimed to prove crossbridge behaviors in muscle fibers by collecting X-ray diffraction data at a 185  $\mu$ s time resolution. When sinusoidal length changes at 500 Hz with an amplitude of 0.3% of the muscle length were applied to a bundle of several single fibers during active contraction, the intensity of the 14.5 nm meridional reflection changed out of phase with the tension change during the oscillating length change, contrasting to the response in the rigor muscle. The high time-resolved experiments provided an important insight to the molecular mechanism of force generation in muscle.

These studies yield a preview of the expected gains for muscle studies from the more widespread use of undulator radiation at third-generation synchrotron source.

## 1. はじめに

1995年10月-12月の3ヶ月の期間にトータル14日間のマシンタイムが配分され「骨格筋高分解能

X線回折」実験<sup>1)</sup>を行った。実験目的は、トリスタン主リング(MR)に挿入されたアンジュレーターからの高輝度X線を使って高分解能回折実

\* 大阪大学基礎工学部 〒560 豊中市待兼山町 1-3

TEL 06-850-6515 FAX 06-850-6557 e-mail waka@bpe.es.osaka-u.ac.jp

† 現在 高輝度光科学研究センター

験を行い、筋収縮の分子メカニズムに関する新しい構造的知見を得ることであった。又、挿入光源からの高輝度ビームの性格を把握し、第3世代放射光利用に向けて展望を計ることにもあった。

MR アンジュレーターからの極めて小さな発散ビームは骨格筋 X 線回折像の子午軸上に現れる 700–800 nm の長周期による干渉ピークを明瞭に分離した高分解能回折像の測定を可能にした。また全反射湾曲ミラーでビームを試料位置に集光させることによって PF のベンディングマグネットと集光光学系 (BL15A) より約 1 桁高いフラックスが得られ、単一筋線維束を使い収縮中の筋長摂動に対する応答をサブミリ秒 (185  $\mu$ s) の時間分解能で測定することができた。静的実験からは太いフィラメントの微細構造に関して、動の実験からは筋肉の力発生のメカニズムに対して興味ある知見が得られた。このように MR アンジュレーター放射光 X 線は高い平行性と輝度を持っていた。ここでは我々がトリスタン MR 放射光を使って行った筋肉の高分解能実験の結果<sup>2)</sup>を報告する。

## 2. ビームラインデザインと光学系

筋肉の回折実験に対して、トリスタン MR は 8 GeV で、8 ないしは 32 バンチモードで運転された。ビーム電流は最高 15 mA であった。アンジュレーターからの 8.5 keV の X 線ビームのエミッタンスは 5 nrad で、光源から 100 m 離れた位置でのビームサイズは 1.7 (V)  $\times$  6 mm (H)、フラックスは 10 mA の電流値でおよそ  $1 \times 10^{13}$  photons/s が期待された<sup>3)</sup>。図 1 に筋肉の X 線回折実験に使われたビームラインのレイアウトを示す。冷却された第 1 結晶は光源から約 87 m の位置に置かれ、第 2 結晶はさらに 5 m 離れ、4.5 m 下った位置に置かれていた。二つの結晶はシリコンの (220) 面が使われ、アンジュレーターの 1 次光 (8.5 keV) を通過させるようにセットされた<sup>4,5)</sup>。静的な筋肉の X 線回折像の測定には図 1(a) に示

すようなスリット系だけの光学系が使われた。遠隔操作可能な 4 象限スリットが二組使われ、一組は第 2 結晶直後に置かれビームサイズを絞る目的に、もう一組は第 1 スリットより 4.5 m 下流の試料位置直前に置かれ第 1 スリットからの寄生散乱を除く目的に使用された。二つのスリット間には He パイプを置きビームの減衰を避けた。静的な実験では高分解能の回折像を測定することを目的にしたため、第 1 スリットの上下サイズを 0.1 mm としたが、実測では 0.14 mm (V) ( $\times$  0.57 mm (H)) であった。このとき第 2 スリットのサイズは 0.16 (V)  $\times$  (0.60 mm (H)) となり、上下方向のビーム巾は 4.5 m の飛行距離で 20  $\mu$ m しか広がっていなかった。従って、ビームの発散はおおよそ  $2 \times 10^{-6}$  rad で、極めて平行性の高いビームであった。試料位置でのフラックスは電流 5 mA で約  $5 \times 10^8$  photons/s であった。試料の後に散乱 X 線を通させる真空パイプ (長さ 2 m) を置き、X 線回折像はイメージングプレート (IP) で記録した。後述するように 2 つのモノクロメータのオフセット配置とスリットだけの光学系は非常にバックグラウンドの低い回折像の測定を可能にした。

時分割実験では、図 1(b) のような 1 次元集光光学系が使われた。光源から約 95 m 地点 (第 2 結晶から約 3 m 下流) に 20 cm 長の白金蒸着全反射ミラーをおき、湾曲させて上下方向のビームを試料位置で 260  $\mu$ m 位 (試料サイズ ( $\sim$  300  $\mu$ m) にマッチするように) に集光させた。水平方向は試料の横巾の関係で約 2 mm に制限した。第 1 スリットはミラー直後に置き、さらにその下流 1.8 m の位置に第 2 スリットを置き寄生散乱を除いた。ミラーの上流部と、第 1 と第 2 スリット間の部分には He パイプを置き空気による散乱、吸収を避けた。このミラー光学系では全ビームの 40% 位の受光であったが、試料位置でのビームフラックスは 15 mA の電流で約  $1 \times 10^{11}$  photons/s であった。これは PF の BL15A のベンデ

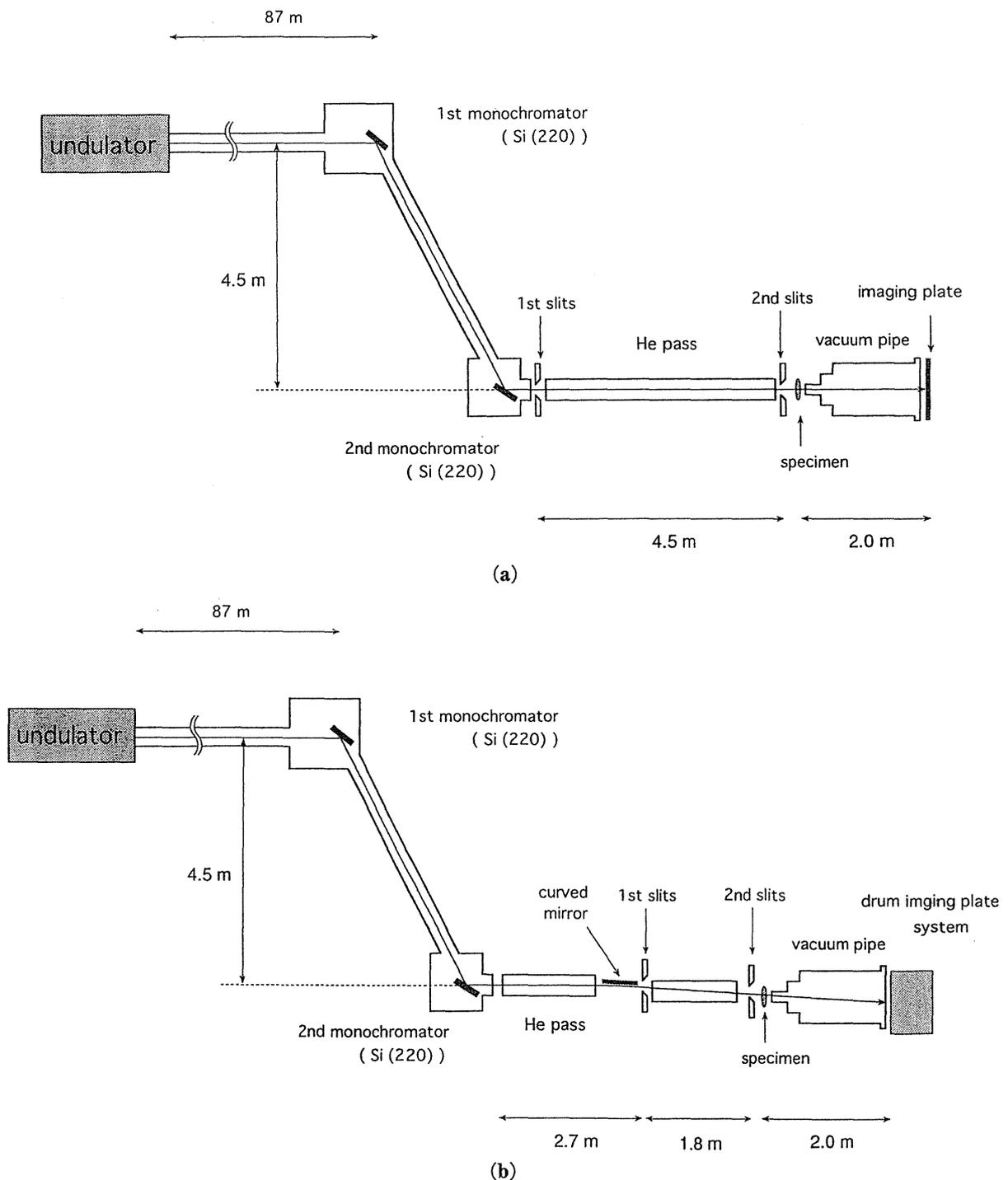


Figure 1. The beamline layout for the diffraction experiments on muscle. (a) For the high-spatial resolution measurements and (b) for time-resolved measurements. The crystals were adjusted to pass the first harmonic of the undulator beam. The first monochromator crystal was cryogenically cooled by liquid nitrogen. In (b) a 20 cm-long platinum-coated bent glass mirror is inserted at approx. 95 m from the source and 1.8 m upstream of the specimen position. The mirror was used to focus the X-ray beam vertically to ca. 0.26 mm at the specimen.

リングマグネットと集光光学系において、似たビームサイズで得られるフラックスより約1桁大きかった。時分割測定にはIPのドラム回転装

置<sup>6)</sup>を使い回折線を1次元のストリークパターンとして記録した。周長1080 mmのドラムにIPを巻き付け、20 rpsの速度で回転させた。使われ

た試料サイズと強度の兼ね合いで測定的时间分解能 ( $\Delta t$ ) を決めた。ドラム IP 装置の時間分解能は [1 回転の時間  $\times$  入射スリットの中 / ドラム周長] で決まる。本実験ではドラム前に入射スリットの中を 4 mm としたので時間分解能は 185  $\mu$ s であった。

### 3. カエル骨格筋高空間分解能 X 線回折

図 2 は食用ガエルの縫工筋の静止状態から 2 m のカメラ長 (試料-検出器間距離) で記録した X 線回折像で、非常に低バックグラウンドで、S/N の大変良い回折像となっている。中央の縦軸 (M) は筋肉の長軸に平行で子午軸と呼ばれる。それと垂直な中央軸 (E) は赤道軸と呼ばれる。両軸上に多数の回折線が観測されている (赤道上の反射は露光過多で見えない)。赤道軸上の反射は筋肉の構造を繊維軸に沿って投影した構造のフーリエ変換を表し、筋肉を構成する太いフィラメントと細いフィラメントの六方格子 (格子定数,  $\sim 40$  nm) 配列によるブラッグ反射となっている。一方、子午軸上に現れる反射は筋肉を繊維軸に対して垂直に投影したときの密度分布のフーリエ変換による。図 2 で最も注目すべき特徴は子午軸上に現れている非常に細かなフリンジ様回折線である。図 3 は子午軸上の回折線の強度分布を測定し、バックグラウンド強度を除いたものである。ピークの数 は図 2 の測定領域内でおおよそ 100 本に及んでいる。フリンジ様ピーク間の角度分解能としては  $\sim 2 \times 10^{-4}$  rad で、ブラッグスペーシングで 700–800 nm であった。このように非常に間隔の狭い回折ピークを分離して記録することは PF の光学系では無理で、MR アンジュレータービームの平行性の高さが今回の実験で示されたと云える。

これらのフリンジ様回折線は筋肉内の長周期構造による。一番長周期の構造は筋肉の構造的単位であるサルコメア (筋節) の直列的配列である。しかし、サルコメア長 ( $\sim 2.3 \mu$ m) は筋原繊維

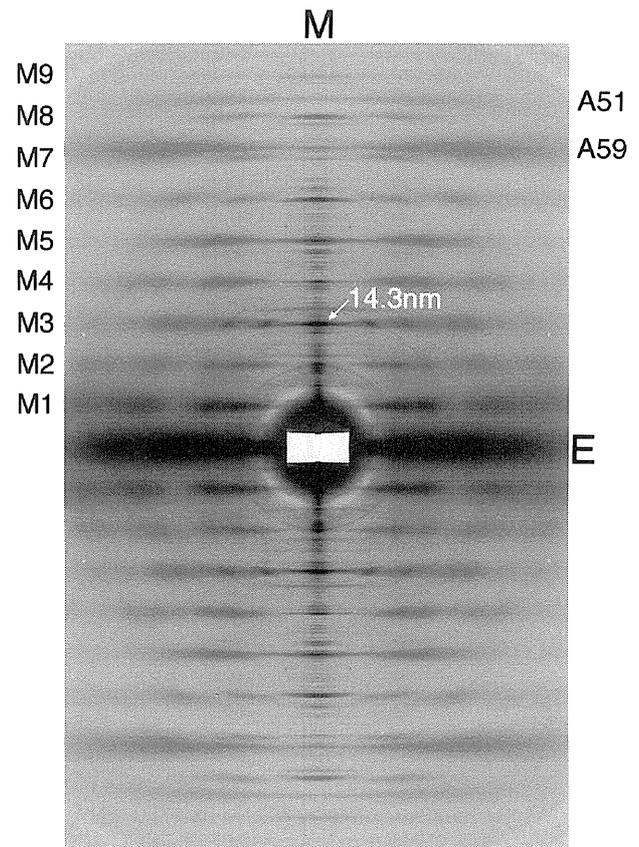


Figure 2. The X-ray diffraction pattern taken from a frog skeletal muscle in the living relaxed state. The pattern was recorded on an imaging plate in an exposure time of ca. 30 min at a camera length of 2 m with a ring current of 4 mA. The fiber axis of the muscle is vertical. M is the meridional axis and E is the equatorial axis. M1–M9: thick-filament-based reflections, A59, A51: 5.9 nm and 5.1 nm actin layer lines. An arrow indicates the 14.3 nm thick filament-based meridional reflection.

間はもとより、一本の線維に沿ってもその長さ に分布を持つ。その分布が第 2 種 的 乱 れ<sup>7)</sup> の 性 格 (約 1 % 程 度 の サ ル コ メ ア 長 分 散) を 持 つ た め、サルコメアの周期的配列によるサンプリング関数は観測角度領域では既に消失している。その次に長い周期を与えるものはサルコメア内でのフィラメントの構造である。図 4 に一個のサルコメアの構造模式図<sup>8)</sup>を示す。太いフィラメントは長さ約 1.6  $\mu$ m を持ち、サルコメア中央の M 線と呼ばれる部分で中心対称的な構造を持つ。一方、長さ約 1  $\mu$ m の細いフィラメントは Z 膜と呼ばれるサルコメアの敷居部分から左右に独立に伸びている。

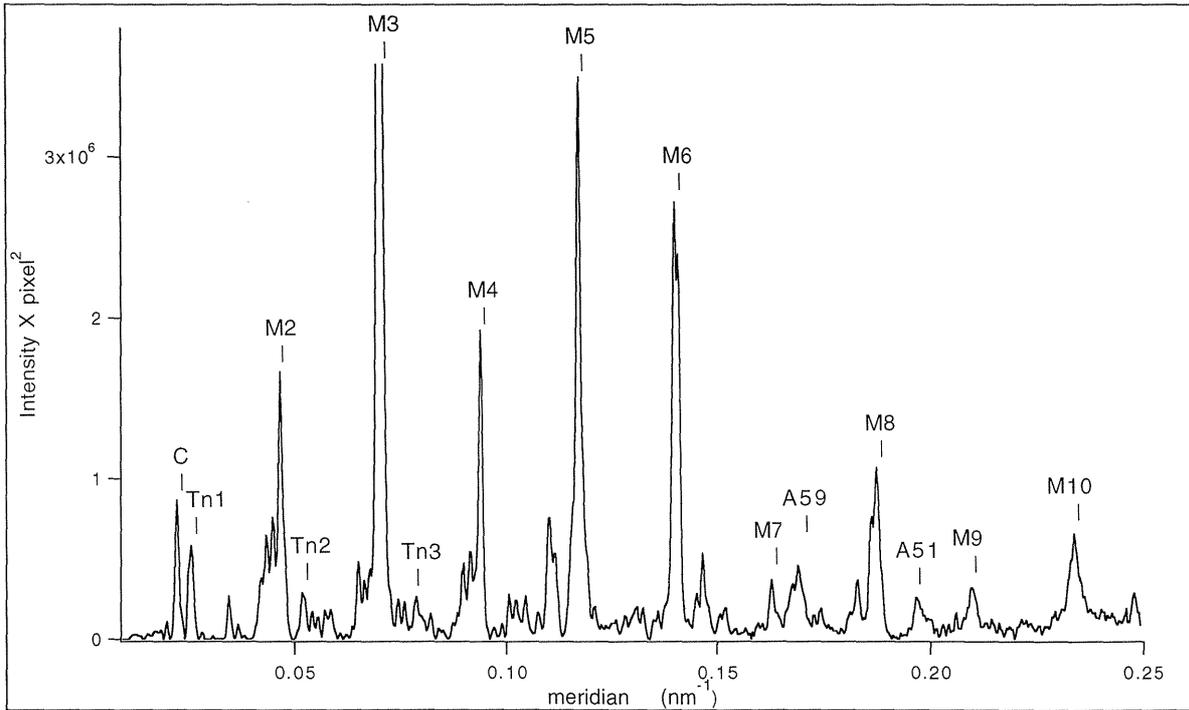


Figure 3. The intensity distribution on the meridian in the X-ray pattern from a live frog skeletal muscle. The intensities after subtraction of the background are shown by multiplying the square of the axial coordinate. M2-M10: thick filament-based meridional reflections with a basic repeat of 43 nm in which M3 (the third order) is the 14.3 nm reflection. C: a 44-nm reflection from C-proteins bound to the thick filaments. Tn1-Tn3: reflections with a repeat of 38 nm from troponin molecules on the thin filaments.

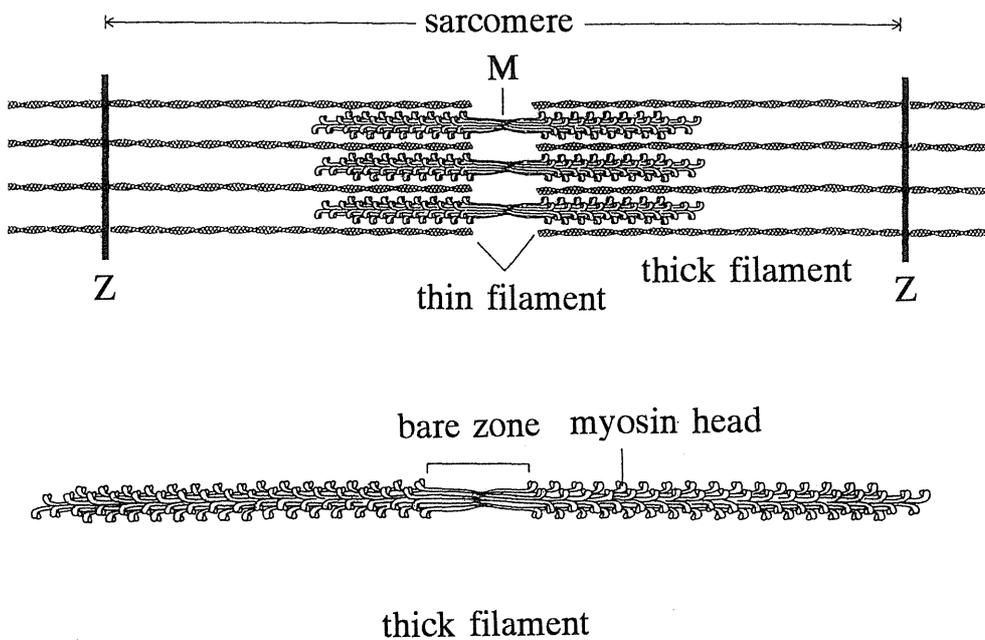


Figure 4. The schematic structures of a sarcomere and a thick filament in the vertebrate muscle<sup>8)</sup>.

(生体中では両フィラメントの長さは厳密に決まっている。)従ってサルコメアは全体としてM線を境に中心対称的構造を持つ。太いフィラメントは二つの頭部からなる突起を有する細長いミオシン分子が重合してできた集合体で、その骨格の表面から14.3 nm 周期で突起が並ぶ1回転9残基のらせん3本からなる。フィラメントの繊維軸は3回回転軸を持つので、太いフィラメントの結晶学的周期は43 nm(=14.3 nm×9/3)となる。この周期に由来する強い回折ピークが現れる。太いフィラメントにはいろいろなアクセサリ蛋白が結合している。とくにC蛋白は約44 nmの周期(ミオシン周期とは少し異なる)でフィラメントのある領域にわたって結合していると云われている<sup>8)</sup>。一方、細いフィラメントはアクチンと呼ばれる球状蛋白が二重らせん的に重合したもので、基本周期は約37 nm×2である。その上にトロポミオシンとトロポニンと呼ばれる制御蛋白が約38 nm×2の周期で結合している。トロポニンはフィラメント軸に沿って $2_1$ に近い対称性で結合しているのでこの蛋白に由来する( $n/38 \text{ nm}^{-1}$  ( $n=1, 2, \dots$ )) 反射が図2の観測領域の子午軸上に現れている。このように、二種類のフィラメントの構造周期が異なるため両フィラメントからの回折線は重ならないで観測されている。さらに、これら両フィラメントに由来する回折ピークがそれぞれのフィラメントの中心対称的構造や配列のフーリエ変換によって変調を受けている。低分解能においてはこのようなフィラメント構造を半サルコメア部分の構造のたたみ込み積分として表せる様にモデル化して考えることができる。その場合には、太いフィラメントの主要回折線( $n/43 \text{ nm}^{-1}$ などの反射)はM線を境にする対称構造によりCOS関数のサンプリングを受ける形になり、干渉ピークの間隔は $\sim 1/800 \text{ nm}^{-1}$ (太いフィラメント長の半分の逆数)に相当することが予想される。一方細いフィラメントのそれはZ膜を境とする対称配列によって $\sim 1/1000 \text{ nm}^{-1}$ 間

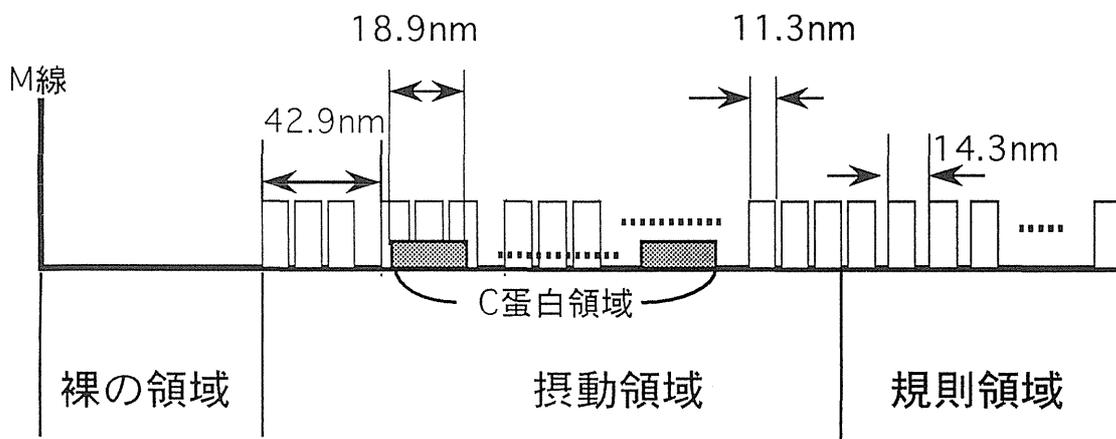
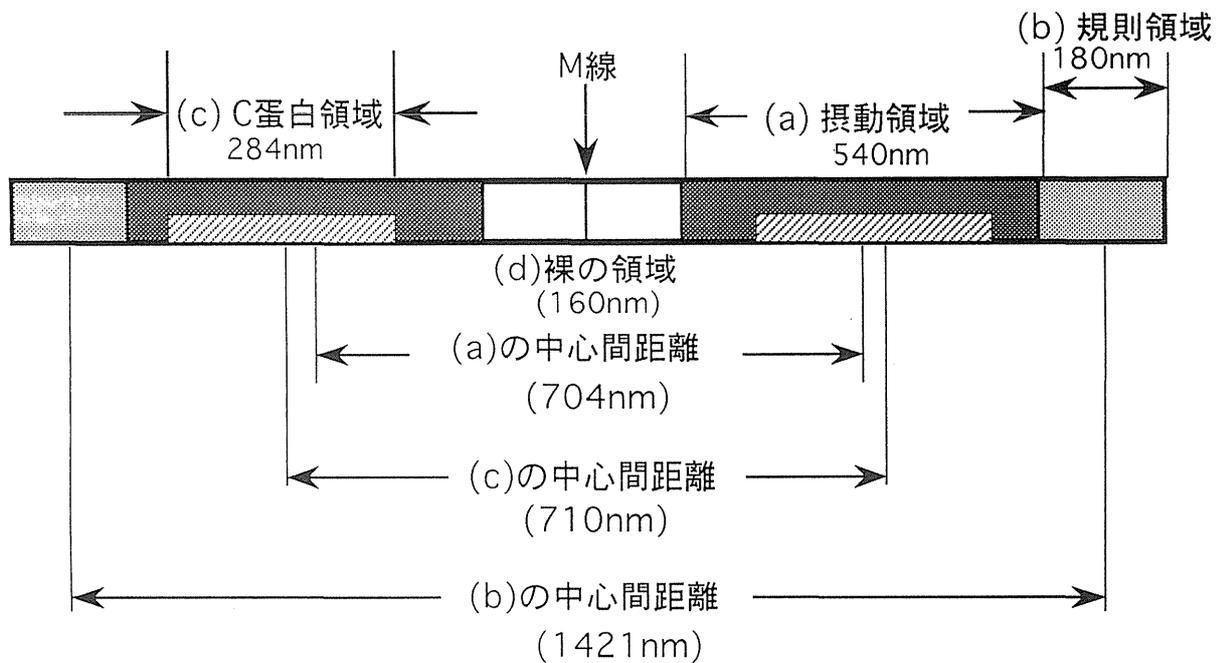
隔のサンプリングを受ける。実際に測定したところ(図3参照)、細いフィラメント由来の子午反射のフリンジ間隔は $1/1000 \text{ nm}^{-1}$ であったが、太いフィラメント由来の子午反射のそれは $\sim 1/704 \text{ nm}^{-1}$ であった。

さて、ここでは図3の多くの子午軸回折ピークを与える太いフィラメントの軸投影構造に着目する。太いフィラメントの結晶学的周期は43 nmであるので、この基本周期にミオシン突起の並ぶレベルが二つ含まれる。もしこのレベルの間隔がちょうど基本周期を三等分するようになっていると、このような規則構造からは $3n/43 \text{ nm}^{-1}$  ( $n$ :整数)で指数付けされる反射しか子午軸上には現れない。しかし、実際には $n/43 \text{ nm}^{-1}$ で指数付けされる反射が高次まで連続して現れている(ただし、1次は観測されていない)。このことは基本周期内でミオシン突起のレベルが14.3 nm 間隔からシステムティックに摂動を受けていることを示している<sup>9)</sup>。この摂動によって $1/43 \text{ nm}^{-1}$ の $3n$ 次以外にも子午反射が現れると考えられる。とくに $3n/43 \text{ nm}^{-1}$ 以外の反射を摂動反射と呼ぶことにする。このような構造がM線を境に反転して並んでいる。その結果、1本の太いフィラメントの軸に垂直に投影した構造のフーリエ変換は多数のフリンジ様回折線の子午軸上に与えることになる。摂動反射に現れているフリンジの間隔の実測値が $\sim 1/704 \text{ nm}^{-1}$ であった。このことはミオシン突起レベルの摂動を受けている領域(摂動領域と呼ぶことにする)がM線を境に約700 nm 離れて存在していることを示唆している(図5(a)参照)。M線のある部分はミオシン突起が存在していない裸の領域である。その長さは電子顕微鏡から約160 nmと云われている<sup>8)</sup>ので、片方の摂動領域の長さは約 $540 \text{ nm}$ ( $= (700 - 160)/2$ ) $\text{nm} \times 2$ )となり、フィラメントの裸領域以外の部分全部を占めていないことになる。電子顕微鏡測定はフィラメントの末端部までミオシン突起の存在を示しているため、摂動領域の外側

180 nm の長さ部分にはミオシン突起レベルが 14.3 nm 間隔で存在していると考えられる (この領域を規則領域と呼ぶことにする)。そのとき M 線を挟んだこの領域の中心間距離は約 1420 nm となるので、3n 次の子午反射には摂動領域から  $\sim 1/704 \text{ nm}^{-1}$  と規則領域から  $\sim 1/1420 \text{ nm}^{-1}$  の二つの周期の干渉が重ることになる。(実際には  $1/704 \text{ nm}^{-1}$  間隔のサンプリングが支配的になっている。) C 蛋白の結合周期は約 44 nm で、この周期によると思われる 1 次と 2 次の反射が観測されているが、2 次以上は非常に弱い。これらの反

射に現れる干渉ピーク間隔を測定したところ  $\sim 1/710 \text{ nm}^{-1}$  であったので、M 線を境にこの領域が 710 nm 離れて分布しているとみなされる (図 5 (a) 参照)。一方、電子顕微鏡測定から C 蛋白の存在する領域の長さは C 蛋白の呈する縞模様の間隔から約 300 nm (=  $44 \text{ nm} \times 6 + \text{分子サイズ}$ ) と見積もられている<sup>8)</sup>。

そこで、それぞれの蛋白の投影密度分布 (巾, 高さ), ミオシン突起の摂動領域の摂動パターンとその領域の長さや位置, 規則領域の長さや位置, C 蛋白領域の長さや位置等をパラメータにし



(a)

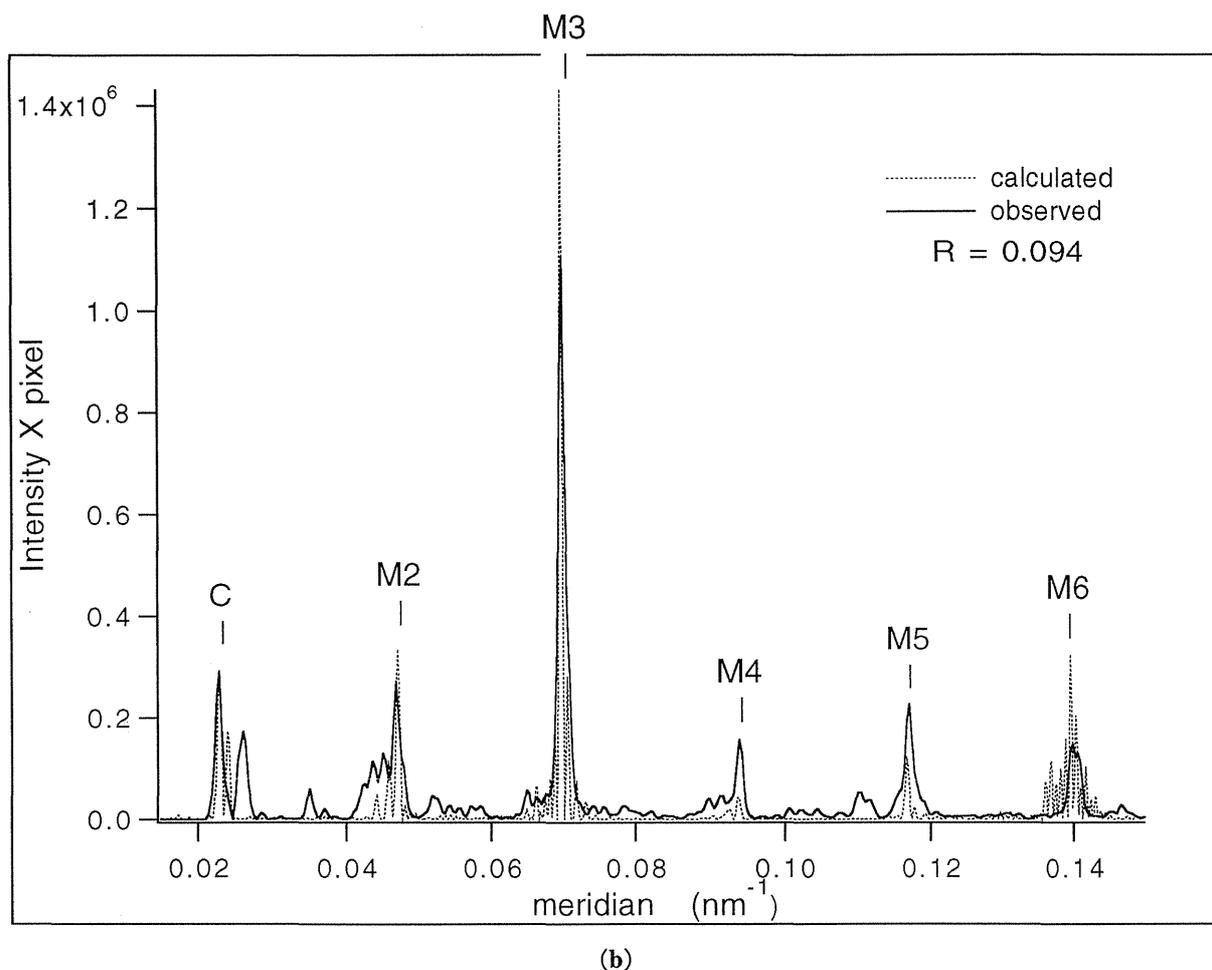


Figure 5. (a) The calculated model for the thick filament structure projected onto the fiber axis (left page). (b) Comparison of the calculated meridional intensities from the best-fit model and the observed ones (above). Discrepancy factor ( $R$ ) between them was ca. 0.1.

て計算し観測強度分布と最も良く一致するモデルをかなり精密に求めることができる。その例を図5に示した。(a)は太いフィラメントの投影構造の最適モデルである。(b)は最適モデルから計算した強度分布と観測データの比較を示す。このモデルによると、摂動領域と規則領域の長さは540 nmと180 nmとなり、図(a)に示すような位置を占める。つまり、静止状態の太いフィラメントにはクロスブリッジ周期に摂動を受けた領域と摂動のない規則的領域とが存在している。C蛋白領域の長さは約280 nmで、クロスブリッジ摂動領域のほぼ中央に位置し摂動領域の約5割を占めている。このことはC蛋白の存在がミオシクロスブリッジの摂動に関係している可能性がある。

摂動領域では43 nm基本周期内でのクロスブリッジレベルの間隔は12.2 nm, 18.5 nm, 12.2 nmとなっていた。1個のミオシン突起の投影密度巾は約11 nm, C蛋白のそれは約19 nmであった。計算結果と観測強度の間のR因子は0.1位であった。このようにMR放射光による高分解能X線回折像から、太いフィラメントの微細構造のかなり精密な解析が可能になり、収縮中の太いフィラメントの構造変化のメカニズムに有用な知見を与えるものであった。

#### 4. 高時間分解能X線回折

収縮中の筋肉に高周波筋長摂動を与えた時のミオシクロスブリッジの挙動を時分割X線回折

法によって調べた。この実験にはあらかじめ化学的処理し細胞膜を除いたウサギの腰腸筋(骨格筋)を使った(構造的にはカエルの骨格筋とほとんど同じである)。その理由は生きた筋肉では細胞膜が一番X線損傷を受けやすく高輝度X線に対しては多くの繰り返し実験が難しくなること、またATP(アデノシン三リン酸)の加水分解産物(ADP(アデノシン二リン酸)やリン酸( $\text{PO}_4$ ))等の化学的組成を変えた効果も調べたかったからである。この場合の筋肉の収縮はATPの存在下でCaイオンを付加することによって起こさせた。Caイオンを注入後筋肉が最大張力を発生して定常状態になった時、筋長の約0.3%(半サルコメア長にして約3.5 nm)の振幅で500 Hzの正弦波振動を与えた。図6に示すようにこの振動をIPのドラムの回転と同期させて、振動中の回折線の強度変化を1次元ストリークパターンとしてIP上に記録した。入射スリットの中を4 mm

としたので、時間分解能は185  $\mu\text{s}$ である。IPの周長に沿って25周期(1周期2 ms)分の振動が記録されることになる。図7はデータの加算を行い1周期分のストリークパターンとして示したものである。1本の試料で平均3分の露光を行えたので、25回の振動の各々のイメージはそれぞれは3600振動分の和となっている(1周期あたり7 sの露光)。入射X線の強度が約 $10^{11}$  photons/sであったけれど数本の筋線維束の散乱強度は大変弱く、回折線の測定は子午線上の最も強い14.3 nm反射(図2参照)に限られた。前述したようにこの反射はミオシンクロスブリッジの繊維軸方向の周期に由来し、収縮中強度を上げる(スペーシングは14.5 nmにシフトする)。従って、収縮中はミオシンクロスブリッジがこの周期を維持した形で細いフィラメントのアクチンと相互作用していると考えられている。一方、硬直状態でのこの反射の強度変化を測定し比較した。ATP

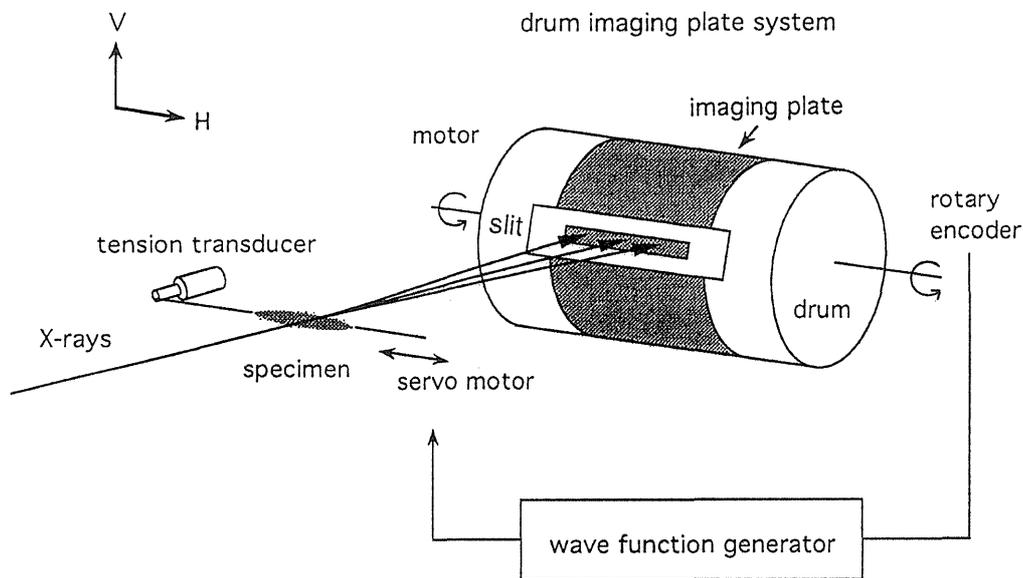


Figure 6. The rotating-drum imaging plate (IP) system used for the time-resolved X-ray experiments during the length oscillation of the muscle fibers. The IP ( $200 \times 1000$  mm) is attached on a drum with a 1080 mm circumference. The drum rotated at a speed of 20 rps. A one-dimensional X-ray pattern which passes through the receiving slit is recorded on the IP along the drum axis while intensity changes of the pattern as function of time are recorded along the circumference. The time resolution was 185  $\mu\text{s}$ . The length of the muscle fiber (set horizontally) was oscillated at 500 Hz by a fast-moving servo motor in synchronism with the rotation of the drum using a rotary encoder. Tension changes of the muscle were measured by a force transducer. The drum circumference accommodates the streak diffraction image of 25 complete 2 ms oscillations.

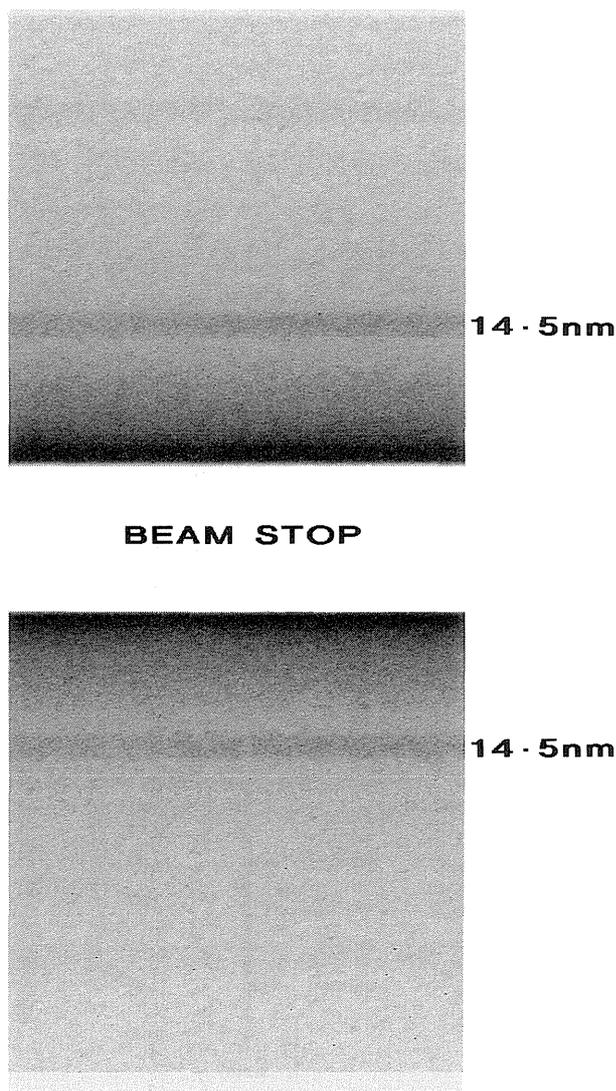


Figure 7. An example of the summed 2 ms-oscillation diffraction patterns from a muscle bundle (chemically skinned rabbit psoas) during steady-state Ca-activated contraction, recorded on the IP on the drum shown in Fig. 6. The streak diffraction image (25 complete 2 ms oscillations) represents the sum of the diffraction from 90000 oscillations in a total exposure of 3 min. One oscillation cycle corresponds to a length of 43.2 mm on the IP. The direction of rotation of the IP is horizontal. The streak of the 14.5 nm reflection was marked.

のない状態で実現される硬直状態ではミオシンクロスブリッジはアクチンと強固に結合している。この硬直状態では図2の回折像がすっかり変わる。静止状態で強かったミオシン層線反射が消え、弱かった細いフィラメント由来の反射が著しく強くなる。これはすべてのミオシンクロスブリッジが自分自身の周期性を崩して細いフィラメン

トのアクチン周期に従って結合することによると解釈されている<sup>10,11</sup>。その結果、ミオシン層線反射が消え、14.5 nm 周期の子午反射も弱くなる。従って硬直状態で観測される14.5 nm 反射は太いフィラメント骨格の重合周期による。しかし、脊椎動物の場合、この反射は硬直状態でも結構強く観測されているところから、結合しているミオシン頭部は太いフィラメントの周期の影響を受けこの反射の強度に寄与していると云われている<sup>12</sup>。

図8に収縮中と硬直状態にある筋肉に正弦波筋長摂動を与えた時の結果を示す。(a)は筋肉に与えた長さ変化で、ここでは示していないが張力はこの長さの変化に同期している(伸長によって張力は増大、弛緩(短縮)によって減少する)。(b)は収縮中の場合の14.5 nm 子午反射の強度変化である。強度は伸長相で減少し、弛緩(短縮)相で増大している。つまり、張力変化と全く逆位相で正弦波的に変化している。ATP加水分解の産物であるリン酸( $\text{PO}_4$ )を加えて、ATP加水分解の平衡反応を後側にシフトさせると筋長摂動による張力変化の振幅や強度変化の大きさが減少する。このような実験によって張力発生や構造変化のATP加水分解反応との共役性が調べられる。一方、硬直状態においては、この反射の強度は長さ—張力変化と同位相で変化している(c)。静止状態の筋肉に振動変化を与えた時には伸長、弛緩による厚み変化による僅かな強度変化しか観測されなかった。強度変化と張力変化の位相遅れはこの周波数(500 Hz)ではほとんどないことが確認されている。

このような実験を行った目的はアクチンと相互作用しているミオシンクロスブリッジの運動(構造変化)が筋肉の力発生とどのように関係しているかという点を明らかにすることにある。この実験では等尺的に収縮している筋肉(最大張力を発生中の筋肉)に速い正弦波筋長変化(振幅0.3%, 周波数500 Hz)を与えた時のクロスブリッジの動きを14.5 nm 反射の強度変化を介して調べてい

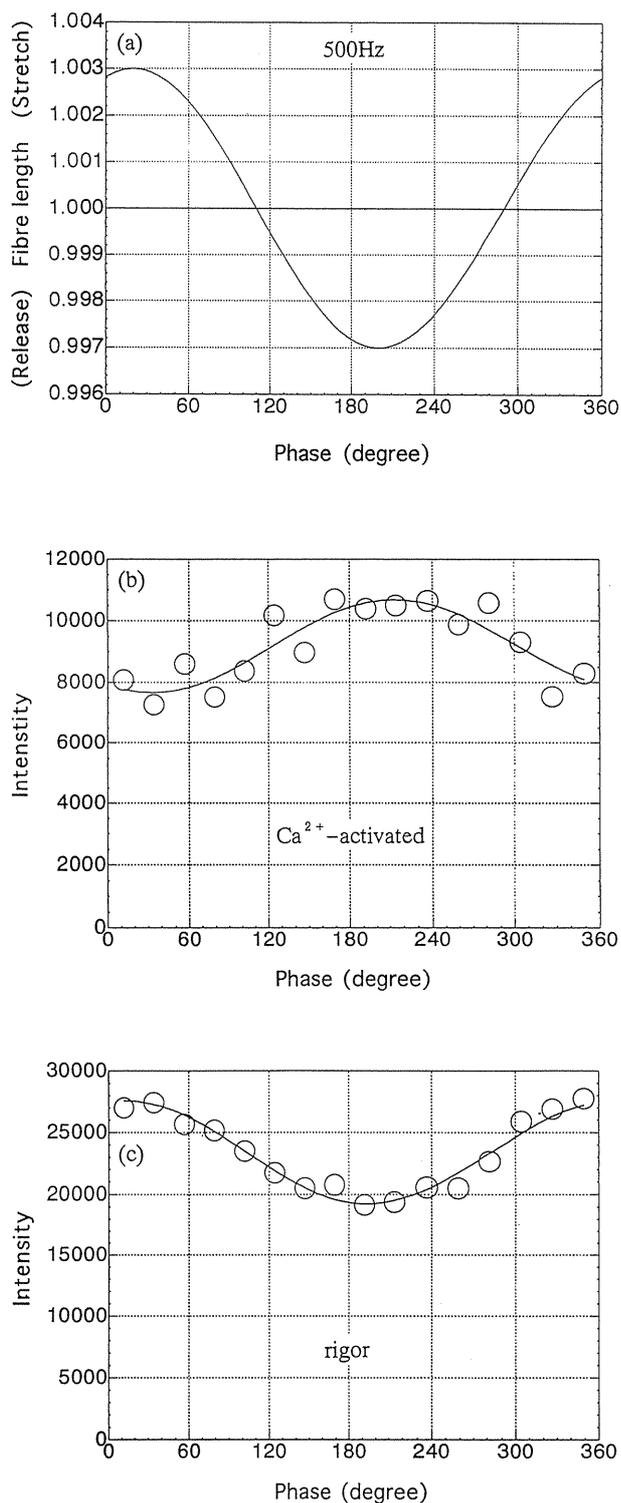


Figure 8. Length change of the muscle fibers and intensity changes of the 14.5 nm meridional reflection in one oscillation cycle. (a) Oscillatory length change from either active fibers or rigor fibers. The muscle bundle was oscillated at 500 Hz and with an amplitude of 0.3% of the fiber length. Tension changes occurred in synchronism with the length changes (not shown). (b) A change of the 14.5 nm intensity in the active state, and (c) a change of that in the rigor state. In (b) and (c) the data points were taken from the sum of ca. 90000 oscillations in a total exposure.

ることになる。この摂動—応答法は定常状態にある系の作動原理を調べる方法の一つである。この筋長変化 ( $\sim 0.6\%$ 筋長/ms) は半サルコメアあたり 6 nm/ms という非常に速い長さ変化に対応している。このような速さと大きさの変化を最大張力を発生している筋肉にステップ的に与えたときには筋肉の張力は瞬時にほとんど 0 レベルに落ち、その後張力を再発生し数 10 ms 以内にほぼもとのレベルに戻る<sup>13)</sup>。正弦波筋長変化を与える実験ではこのような過程を連続的に繰り返していることになり、力発生メカニズムと直接関係

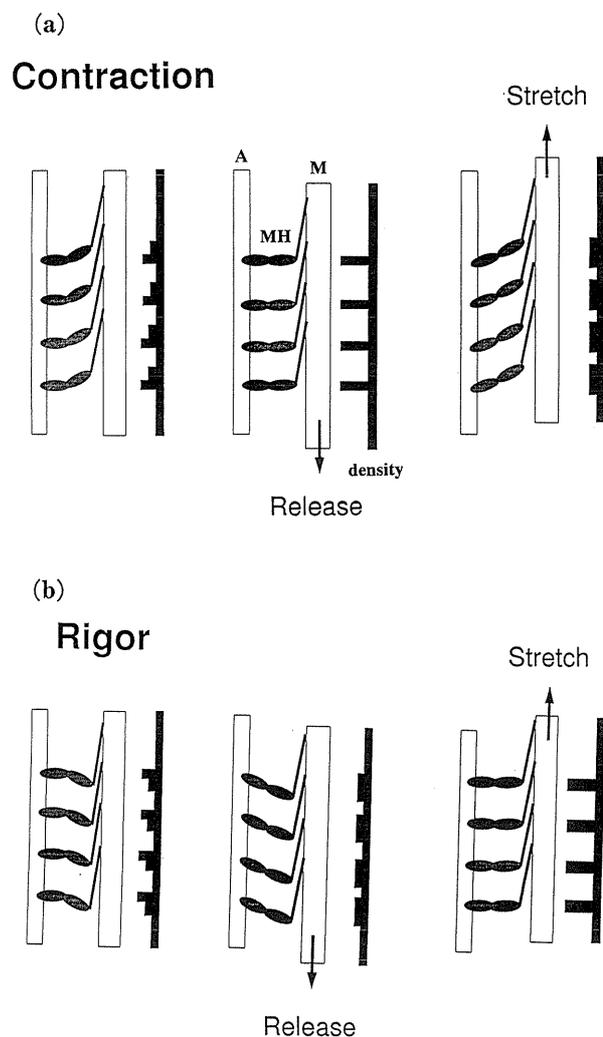


Figure 9. Schematic views of the possible behaviors of myosin crossbridges in response to sinusoidal length oscillation and their mass projection along the fiber axis (right). Although each myosin projection has two heads, it was represented here by single head. (a) In the active muscle, and (b) in the rigor muscle. M-line is upward. A: thin filament, M: thick filament, MH: myosin head.

したクロスブリッジの構造変化を同期させた形で捉えることが期待される。

14.5 nm 子午反射の強度変化はミオシクロスブリッジの質量分布の繊維軸投影の変化に依存する。この周期を持つ投影分布が広がれば強度は下がるし、狭く鋭くなれば強度が上がる (図9参照)。従ってこのような分布の変化を伴う構造変化が筋長変化中にも起こっていることになり、力発生とカップルした構造変化が捉えられたことになる。構造変化の中味については、1)クロスブリッジの角度(傾き)変化、2)クロスブリッジの双頭の動き、3)太いフィラメント構造とミオシン頭部との干渉などが考えられる。図9に1)の場合の構造変化を模式的に図示した。この場合は等尺収縮中、繊維軸に対してある傾きを持ってアクチンと相互作用しているクロスブリッジ(細長い構造を持つ)が筋長緩和によって、より垂直な向きに(繊維軸への投影分布は鋭くなる)なり、伸長相でもとの傾き方向に戻るようになると考えられる。振動中正味の収縮はないので、弛緩相での変化はそれに次ぐ伸長相で反転すると考えられる。この場合、伸長相での張力増大はクロスブリッジが傾きを変えることでアクトミオシクロスブリッジやフィラメントに存在する弾性的バネ要素を引っ張ることによるのかも知れない。一方、硬直状態においては、この反射の強度の応答は収縮中の場合とは全く逆であった。同様なメカニズムで説明しようとする、硬直状態ではアクチンと結合したミオシクロスブリッジは繊維軸に垂直な面に関して収縮中とは反対側に傾いていることが要求され、この傾きが伸長-弛緩によって変えられると考える。この場合の張力増大はクロスブリッジの傾きがより垂直な向きになるときに起こる。いずれの場合にもこのようなモデルではクロスブリッジの傾きがサルコメアのM線(図4参照)の方に変化すると張力が増大する。

この説明は単純で尤もらしく、ミオシクロスブリッジ首振り説<sup>13,14)</sup>に都合の良い考え方である

が、この反射の強度変化の原因として考えられる上記2), 3)の場合も十分検討する必要がある。特に最近の急速電子顕微鏡観察<sup>15)</sup>やEPRによる運動測定<sup>16)</sup>によると、等尺収縮中ではミオシン突起の二つの頭部の内一方の頭部しかアクチンと相互作用していないという興味ある可能性を示唆している。またこのような振動時にクロスブリッジの傾きに変化があっても非常に小さいという報告もある<sup>17)</sup>。この反射強度は振動時に二つの頭部の相対配置に変化(解離, 再結合等によって)が起こればそれにかなり左右されるはずである。さらに、最初に述べた太いフィラメントのクロスブリッジ周期パターンや最近発見されたフィラメント自身の弾性的伸展性<sup>18,19)</sup>が筋長振動時にどのように変化するかが問題である。これらの変化によってもこの反射の強度が影響されるからである。また、硬直状態における14.5 nm 子午反射の由来に関しても必ずしも明確でない。もっと面白い解釈があるかも知れない。限られたマシンタイムで予定していた実験の一部しかできなかった。今後さらに弱いアクチン反射も含めて多くの反射について振幅, 周波数, 化学組成, 温度などの依存性を調べる必要がある。筋収縮メカニズムの構造的基礎を与えるX線回折に残された課題は大変多い。第3世代放射光に期待したい。

## 5. おわりに

ここで示したようにトリスタン主リングアンジュレーターの平行性の高いX線ビームは高分解能の回折実験にいかにか有効であったかが示された。短期間のスケジュールで強度, ビームサイズ等目標が達成されていなかったのは致し方ないことであった。それでもPFと比較して約1桁強いビームが利用でき、ドラム型IP装置との併用で200  $\mu$ sの時分割測定が可能になったことは飛躍的な進歩である。第3世代の放射光の最も重要な特徴は低エミッタンスと高輝度である。これらは非常に小さな試料による空間的, 時間的に分解

能の高い回折実験を容易にする。小さな試料を使って研究ができることは生物研究においては精度を上げた研究を可能にすることを意味する。またビームが細くなることで、光学系をコンパクトにすることが出来、これも測定の精度を上げる重要な因子となる。トリスタン主リングが放射光専用のマシンに転用されていれば第3世代を越えて第4世代のマシンになることは間違いないのに<sup>3)</sup>大変残念である。

短期間の実験を通じてトリスタン主リング挿入光源からの質の高い放射光の利用経験を積むことができた。安藤先生をリーダーとしたMR利用推進室の方々に深く感謝いたします。また我々の実験目的に合わせて、主リングを運転して頂いたマシングループの方々に深く感謝いたします。また実験中現場でいろいろなめんどろを見て頂いた、杉山、山本、鎌田、大隅、安藤氏に感謝いたします。実験に際して、スリット系は筑波大の青木先生から、全反射ミラー用ゴニオメータは東大の菊田先生からお借りしました。ビームサイズの測定では筑波大の竹内氏の協力を頂きました。御礼申し上げます。

MR実験のまとめとして課題申請者が筋肉グループの成果を報告させて頂いた\*。

\*本実験は岩本(帝京大・医)、堀内(大分医科大)、T. C. Irving(イリノイ工科大)、真島(電総研)、雨宮(東大・工)、安藤(PF-MR推進室)の各氏及び阪大・基礎工の大学院生(小嶋、武澤、杉本、岩本)の各氏との協力で行われた。また図5の計算は阪大・基礎工の飯野、荻野両氏の協力による。

## 参考文献

- 1) 若林克三, 八木直人: MR放射光使用実験申請書, 1994.
- 2) N. Yagi, K. Wakabayashi, H. Iwamoto, K. Horiuti, I. Kojima, T. C. Irving, Y. Takezawa, Y. Sugimoto, S. Iwamoto, T. Majima, Y. Amemiya and M. Ando: *J. Synchrotron Rad.* **3**, 305 (1996).
- 3) Tristan Super Light Facility Conceptual Design Report, KEK Progr. Rep. **92-1** (1992).
- 4) 杉山 弘, 東 保男編: MR放射光用モノクロメーター技術報告会報告書, KEK Proc. **96-7**, September (1996).
- 5) Proc. of Meeting on the MR Light Source Experiments, ed. K. Ohsumi, H. Fukuma and S. Kamada, KEK Proc. **96-8**, October (1996).
- 6) Y. Amemiya, Y. Satow, T. Matsushita, J. Chikawa, K. Wakabayashi and J. Miyahara: *Top. Curr. Chem.* **226**, 353 (1988).
- 7) B. K. Vainshtein: *Diffraction of X-Rays by Chain Molecules*, Chap. 5., Elsevier, Amsterdam, (1966).
- 8) J. Squire: *The Structural Basis of Muscular Contraction*, Plenum Press, New York (1980).
- 9) N. Yagi, E. J. O'Brien and I. Matsubara: *Biophys. J.* **33**, 121 (1981).
- 10) H. E. Huxley and W. Brown: *J. Mol. Biol.* **30**, 383 (1967).
- 11) K. Wakabayashi and Y. Amemiya: *Handbook on Synchrotron Radiation*, Vol. 4, ed. S. Ebashi, M. Koch and R. E. Rubenstein, Elsevier, Amsterdam, p597 (1991).
- 12) J. Squire and J. J. Harford: *J. Muscle Res. Cell Motility* **9**, 344 (1988).
- 13) A. F. Huxley and R. M. Simmons: *Nature* **233**, 971 (1971).
- 14) V. Lombardi, G. Piazzesi, M. A. Ferenczi, H. Thirlwell, I. Dobbie and M. Irving: *Nature* **374**, 553 (1995).
- 15) K. Hirose, C. Franzini-Armstrong, Y. E. Goldman and J. M. Murray: *J. Cell Biol.* **127**, 763 (1994).
- 16) C. L. Berger and D. D. Thomas: *Biochemistry* **32**, 3812 (1993).
- 17) M. Irving, T. S. Allen, C. Sabino-David, J. S. Craik, B. Brandmeier, J. Kendrick-Jones, J. E. Corrie, D. R. Trentham, Y. E. Goldman, *Nature* **375**, 688 (1995).
- 18) H. E. Huxley, A. Stewart, H. Sosa and T. C. Irving: *Biophys. J.* **67**, 2411 (1994).
- 19) K. Wakabayashi, Y. Sugimoto, H. Tanaka, Y. Ueno, Y. Takezawa and Y. Amemiya: *Biophys. J.* **67**, 2422 (1994).