

シンクロトロン放射 X 線回折・散乱による筋収縮の分子メカニクスと構造変化

| | | |
|------|---------------------|---------------------------|
| 若林克三 | 大阪大学基礎工学部生物工学 | 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3 |
| 杉本泰伸 | 大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学 | 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3 |
| 武澤康範 | 大阪大学大学院基礎工学研究科化学工学 | 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3 |
| 大島勘二 | 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター | 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2 |
| 松尾龍人 | 大阪大学大学院基礎工学研究科生物工学 | 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町 1-3 |
| 上野 豊 | 産業技術総合研究所脳神経情報研究部門 | 〒305-8531 茨城県つくば市梅園 1-1-1 |

要旨 1990年に入って筋収縮を担う主要なモータータンパク質、アクチン分子とエネルギートランスデューサー、ミオシン分子頭部の結晶構造が明らかにされて以来、筋収縮というマクロな生理現象のメカニズム研究が一挙に原子レベルへと発展した。さらに2000年に入って筋収縮の制御を担うタンパク質トロポニン、トロポミオシンの結晶解析が進み、筋収縮における力の発生や制御メカニズムの研究が大きく進歩した。それには1980年に本格化した第2世代のシンクロトロン放射光の利用による X 線回折が重要な役割を果たし、筋収縮メカニズムへの構造的基礎を提供してきた。さらに、第3世代の放射光が利用できるようになって単一筋細胞 (single fiber, 太さ100 μm) を使った研究が本格的に行なわれ、数十 μs の時分割測定と数千 nm の角度分解能を利用した新規な測定が可能になり、生理学により密着した研究が進められてきた。しかしながら、より正確な理解のためには、全筋 (whole muscle) を使った空間分解能の高いデータによるアクチン、ミオシン両フィラメントの構造解析が依然重要である。この立場による我々の筋収縮の分子メカニクスとアクチン、ミオシンフィラメントの原子レベルでの構造変化の X 線研究を紹介し、細いアクチンフィラメントに注目した筋収縮の化学-力学エネルギー変換の分子メカニズムを考察する。

1. はじめに

「動く」ということは生物の最も本質的な機能の一つで、高等動物では筋肉の収縮と云う働きによって行われている。筋肉は、常温で ATP (アデノシン三リン酸) 分解の化学自由エネルギーを収縮と云う力学的仕事に高い効率で変換する、アクチンとミオシン (モータータンパク質) からなるタンパク質分子機械 (分子エンジン) である。そのエネルギー変換メカニズムの解明は生物が行っている種々のエネルギー変換の基本的理解につながる重要な課題であるとともに、それを応用したマイクロマシンやアクチュエーターの開発に展開をもたらすことが期待されている。さらには中間領域の科学技術「メゾスコピックメカニクス」の研究にも筋収縮システムは最も適したものの一つと考えられている。筋収縮メカニズムの解明に非常に長い時間を要してきたのは、結局のところ、筋収縮は、化学エネルギーというスカラー量から一方向性運動 (短縮) というベクトル量への変換であることによる。

二種類のモータータンパク質はそれぞれ筋肉中で自己集合してフィラメントの形で存在し、メゾスコピックな系

(2-3 μm 長) のサルコメア (筋節, 筋繊維の構造・機能単位) 中で液晶にも似た規則配列をとっている (Fig. 1A)。そのため、X 線回折に適し、筋収縮過程でのモータータンパク質や制御タンパク質の構造変化を動的に捉える X 線回折学的研究が精力的に行われ、収縮・制御に対する分子メカニズムを提供し、ナノ生理学なる分野を形成してきた。弱い散乱体の筋肉の構造研究には強力 X 線源としてのシンクロトロン放射光の利用は欠かせず、筋肉研究者の熱意と努力はシンクロトロン放射光や周辺技術の発展を促し、今日の構造生物学の隆盛をリードしてきた^{1,2)}。この点で構造生物学発展に果たしてきた放射光の役割について K. Holmes & G. Rosenbaum (1998) の解説²⁾の中から一文を引用させて頂く。「How X-ray diffraction with synchrotron radiation got started.-It started with muscle.」

ここでは、我々がシンクロトロン放射光を使って達成した筋収縮の高速 X 線回折による実験成果と構造解析について述べ、筋収縮の舞台である細いアクチンフィラメントに注目して筋収縮の分子メカニズム研究を概観する。

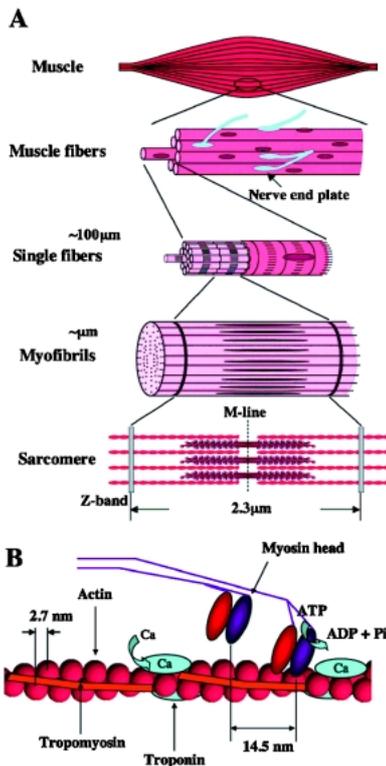


Fig. 1 A. The hierarchical structure of skeletal muscle. B. A schematic diagram of the interaction of two-headed myosin crossbridges and actin filament, coupled with the hydrolysis of ATP.

2. 筋収縮機構のあらすじ

筋収縮機構の解明を目指したタンパク質分子レベルの研究が始まって50数年が経過し³⁾, その間得られた事実をもとに, 次のような収縮機構の現象論的な像が描かれている。まず, 神経の刺激によって細胞膜が興奮し, 筋細胞内にCa²⁺イオンが放出される。このCa²⁺イオンが細いアクチンフィラメント上の制御タンパク質トロポニンに結合し, 収縮のスイッチをオンにする (Fig. 1B)。そのときミオシンも同時に活性化され, ミオシンフィラメントから突き出ているミオシン突起 (クロスブリッジ) がアクチンフィラメントに引き寄せられ, アクチンと相互作用する。その間にエネルギートランスデューサーであるミオシン突起の頭部でATPが加水分解され, その化学自由エネルギーが両フィラメントの滑り運動 (一方向性運動) を引き起こす力学エネルギーに変換される。相互滑りによる力や変位はアクチンフィラメントやそれが結合しているサルコメアのZ帯を経て筋細胞の末端まで伝えられる。問題はこの化学エネルギーから力学エネルギーへの変換がアクチンとミオシンの相互作用によって起されるどのような構造変化と共役して行われるのかを解明することである。

3. ミオシン頭部回転ないしレバーアーム屈曲仮説

筋収縮における力発生に対する最も先導的なモデルとして「ミオシン頭部回転」説がある。この仮説は, ミオシン頭部が立体特異的にアクチン分子と結合し, ATP加水分解の自由エネルギーを利用して結合角度を変化 (首振りないしは回転) させることで方向性ある変位や力を発生するというものである。これは1969年H. Huxley⁴⁾が提案した仮説である。後述するように, 1992年ATP加水分解中にミオシン頭部の尾部が大きく変形することが我々のX線溶液散乱実験ではじめて示唆され, 以後に行われたミオシン頭部の結晶解析により尾部部分の屈曲性が示され, 現在では頭部の結合角度を変える代わりに尾部部分がレバーアームのように屈曲するという説として言及されている⁵⁾ (回転説と本質的に同じである)。この仮説を検証するために, 1971年にA. HuxleyとSimmons⁶⁾は, 筋肉の長さを固定して電気刺激させ, 最大張力を発生 (等尺収縮) しているときに筋肉の一端を緩めて長さを急速 (1 ms 以内) に短縮させる (急速筋長開放) 実験を行った。短縮した長さに比例して張力は線形的に瞬時に減少し, 半サルコメアあたり約6 nmまで短縮させたとき, 発生張力はゼロになり, その後非線形的に張力の回復が起こることを示した (Fig. 2A)。これは物理で云う, 動的平衡状態にある系の性質を調べる「摂動-応答」法にあたる。Fig. 2Aの張力の時間経過は減衰型バネ要素 (Voigt型要素) とバネを直列に連結した粘弾性体モデルでその類似性が議論される。短縮した長さに比例して張力が減少したことから, サルコメア内には張力を担う弾性的なバネ (直列弾性要素) があり, 収縮中 (最大張力発生中) にこのバネ成分が半サルコメアあたり6~7 nm伸ばされていることが示された。H. Huxley⁴⁾とA. Huxleyら⁶⁾は, このバネ成分のすべてをミオシン頭部内ないしはその付け根 (S2部分) におくことで「ミオシン頭部回転」仮説を支持するモデルを提案した。すなわち, 6~7 nmの短縮によりミオシン頭部内 (または付け根) のバネは筋収縮前の自然長に戻って力はゼロになり (Fig. 2AのY), 張力の回復時には, もっぱらミオシン頭部が「アクチンフィラメントを足場としてその上で首を振る (あるいは尾部を屈曲させる) ようにアクチンフィラメント上を回転することによってバネを6~7 nm引き伸ばし, 力を発生するというモデルである (Fig. 2B(a))。つまり, 張力の回復過程における張力の筋長変化量の依存性から, この過程に関係する要素はpassiveな粘弾性要素でなくactiveな“force generator”であるとするモデルである。この場合前提として, アクチンフィラメントもミオシンフィラメントも固く, 変形することはないと仮定されている。その根拠は当時までのX線回折で収縮中両フィラメントの弾性的伸展を示す変化が捉えられなかったからである⁷⁾。バネ成分をミオシン頭部周辺に押し込めること

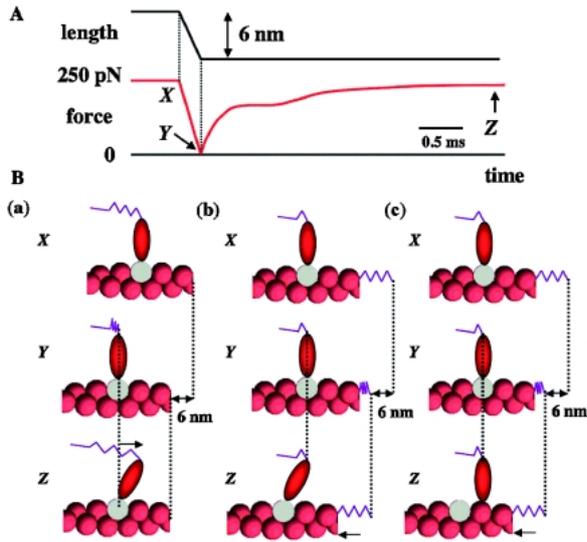


Fig. 2 A. Mechanical characteristics of muscle contraction. A schematic drawing of the tension change during a quick length change applied to an isometrically contracting muscle. B. Possible models to explain the tension transient of A. (a) Rotating myosin head on the stiff actin filament. (b) Rotating myosin head on the extensible actin filament. (c) Translational motion of a myosin head on the extensible actin filament.

で、ミオシン頭部それぞれは他の頭部とは独立に力を発生できる。しかし、もしバネ成分がミオシン頭部になく、アクチンフィラメントやミオシンフィラメントにあるとすれば、アクチンに結合したミオシン頭部の動きはアクチンフィラメントを動かし、それによって軸方向に隣接する頭部の動きにも影響をあたえる。そのときには力発生のメカニズムは上述のものとは異なるものになる(**Fig. 2B(c)**) (後述)。このように筋肉の力発生のメカニズムは筋フィラメントの力学的性質に強く依存する。以下では筋肉のサルコメア内での弾性要素の所在を明らかにした我々の研究を述べる。

4. X 線回折によるアクチン、ミオシンフィラメントの分子メカニクス

4.1 フィラメントの弾性的伸展性

我々は筋フィラメントの伸展性を生筋(骨格筋)の X 線回折によって詳細に調べた。アクチンフィラメントの隣り合うアクチンモノマー間の繊維軸方向の間隔に相当する 2.7-nm 子午反射 (**Fig. 3, Fig. 5A** 参照) やミオシンフィラメントのミオシン頭部間の繊維軸方向の間隔に相当する 14.3-nm (or 14.5-nm) ベースの子午反射 (**Fig. 3, Fig. 13** 参照) の位置(スペーシング)を精確に測定した。とくにアクチン子午反射は大変弱く、またスペーシング変化があったとしても非常に小さいと予想され、平行性の高い放射光の強力 X 線と高感度-高空間分解能の 2 次元検出器の利

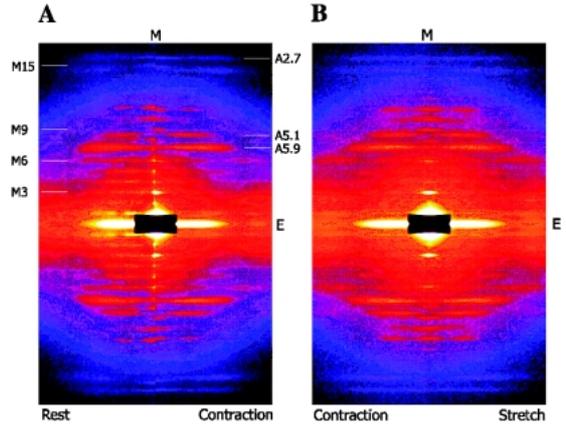


Fig. 3 X-ray diffraction patterns from muscles. A. A comparison of X-ray patterns at rest and during an isometric contraction. B. A comparison of X-ray patterns during an isometric contraction and upon stretch applied to a contracting muscle. The meridional axis (M) parallel to the fiber axis is coincided. M and A with numerical values denote myosin and actin reflections, respectively.

用なしには検出困難であった。我々はカエルの骨格筋を使って、弛緩→等尺収縮→伸長のサイクルを繰り返しながらイメージプレートの送り装置⁸⁾を使って 200 ms の時分割法で X 線回折像 (**Fig. 3**) を測定した^{9,10)}。アクチン反射のスペーシング変化の結果の例を **Fig. 4A** に示した。アクチン 2.7-nm 反射は、筋肉の弛緩状態から等尺収縮状態への移行時に平均 0.27% のスペーシングの増加を示した。また筋フィラメントの伸展性を調べるために、サルコメア長を変化させたり(両フィラメントのオーバーラップ量を変える)、等尺収縮筋を引っ張って伸長させたりまたは適当に長さを緩めて発生張力レベルを変えた条件下でアクチン由来の反射のスペーシング変化を測定した。その結果、2.7-nm 反射のスペーシング変化は力に対して線形であることが明らかとなった (**Fig. 4C**)¹¹⁾。アクチンフィラメントの相対的スペーシング変化 ($\Delta d/d(\%)$) ($d=2.7$ nm) と相対張力 (P/P_0) (P_0 ; 最大張力) の関係は次式で近似された。

$$\begin{aligned} \Delta d/d &= -0.08 + 0.36 P/P_0 \text{ (収縮筋)} \\ (\Delta d/d &= 0.02 + 0.32 P/P_0 \text{ (硬直筋)}) \end{aligned} \quad (1)$$

この直線の傾き (0.36) は 100% 張力変化 (P_0) を与えたときのアクチン 2.7-nm 反射のスペーシングの変化率に相当し、弛緩→等尺収縮のときに観測された変化より 0.1% 程大きかった。先に述べたように、弛緩から収縮状態への移行時には細胞内膜から放出された Ca イオンがトロポニンに結合し細いアクチンフィラメントを活性化する、またそれがミオシン軽鎖を活性化して太いフィラメントをオン状態にするプロセス (activation) がある。両フィラメントの重なりがなくなるまでサルコメア長を引き伸ばしたノンオーバーラップ筋(アクチンとミオシンの相互作用が出

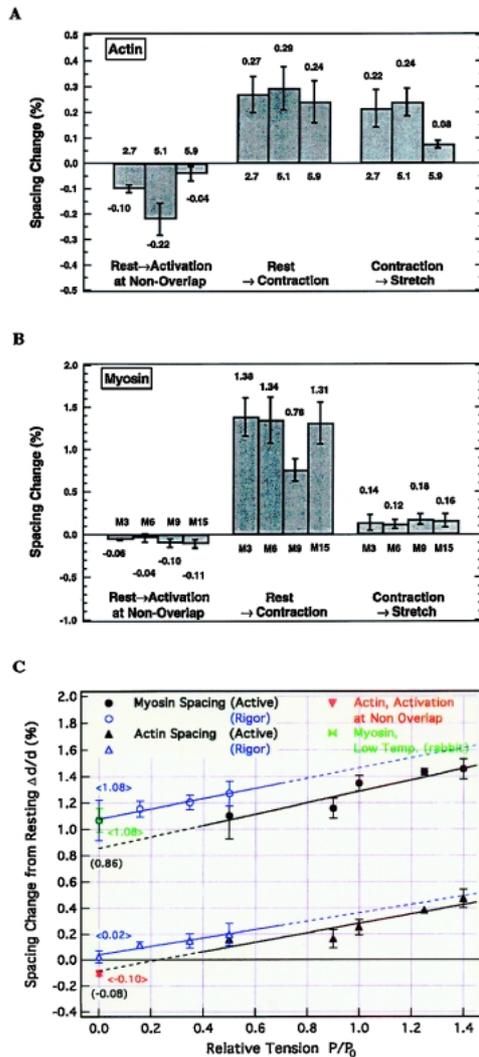


Fig. 4 A. Histograms of the fractional axial spacing changes of the 2.7-nm, 5.1-nm and 5.9-nm actin reflections in the transition from the resting state to activation of non-overlapped muscle, and the resting state to the contraction of fully overlapped muscle and the contraction of fully overlapped muscle to stretch ($\sim 1.3 P_0$). B. Those of the axial spacings of 14.3-nm (or 14.5 nm)-based myosin meridional reflections (M3, M6, M9 and M15) indexed to the basic period (42.9 nm or 43.5 nm) in the same transitions as in A. C. Spacing changes from their resting values of the 2.7-nm actin meridional reflection and myosin meridional reflections against the relative tension to the maximum tension (P_0). Data from the rigorized muscles by the different amount of the stretch and that (the red mark) obtained from the non-overlapped muscle upon activation are shown for comparison. The value (green) obtained from skinned muscle fibers (rabbit) at low temperature is also shown for myosin where actin and myosin interaction occurs without tension generation.

来ない)を電気刺激して筋フィラメントを活性化させて2.7-nm 反射のスペーシングを調べたところ、0.1%ほど減少した。この値はちょうど先に述べた差(100%張力変化を与えたときに相当するアクチン2.7-nm 反射のスペーシング変化($\sim 0.36\%$)と非伸長時の筋肉の弛緩から等尺収

縮への変化($\sim 0.27\%$)との差)に等しく、また(1)式の直線を相対張力0に内挿した値はノンオーバーラップを活性化したときの実測値と一致しているので(**Fig. 4C**), 上述の違いは活性化過程での変化によるものであることが明らかとなった。このように、弛緩→等尺収縮の過程で2.7-nm 反射のスペーシングの変化は約0.27%の増加、また活性化→等尺収縮の過程でのスペーシング変化は約0.36%であることが示された。

ミオシンフィラメントの14.5-nm ベース(収縮中、14.3 nm から14.5 nm に変化する)の子午反射変化と発生張力の関数としてのスペーシング変化の結果も **Fig. 4B** と **4C**¹¹⁾にそれぞれ示した。ミオシンフィラメントに関する **Fig. 4C**の直線は次式($d = 14.5$ nm)で近似された(表示法はアクチンの場合と同じ)。

$$\begin{aligned} \Delta d/d &= 0.86 + 0.43 P/P_0 \quad (\text{収縮筋}) \\ (\Delta d/d &= 1.07 + 0.38 P/P_0 \quad (\text{硬直筋})) \end{aligned} \quad (2)$$

ミオシン子午反射のスペーシングは筋肉が収縮すると約1%程度増加する。この相対的に大きなスペーシング変化は古くから知られ^{7,12)}, ミオシンとアクチンが相互作用する際に張力発生とは直接関係なく起こるフィラメント内のミオシン分子の配列構造の変化によると考えられている(**Fig. 4C**の説明参照)。**Fig. 4C**の直線の勾配から張力変化と比例して起こるスペーシングの変化は約0.43%と見積もられ、伸び率はアクチンフィラメントに近いものであった(但し、ミオシンフィラメントは、筋肉の単位断面積あたりの本数がアクチンフィラメントの数の半分であるので、アクチンフィラメントに比べて2倍近く硬い¹¹⁾)。つまり、両フィラメントともに力発生に伴い弾性的に伸展することが明らかになった。興味あることに、ミオシンフィラメントにも収縮初期の活性化に伴って短縮($\sim 0.1\%$)が起こることが示された。筋細胞内でATPが消費され、すべてのミオシン頭部がアクチンフィラメントに強く結合する硬直状態でも、**Fig. 4C**に示されているように両フィラメントの直線は活性筋の収縮時のものとほぼ平行であった(直線の近似式は(1), (2)式の下に括弧内に与えられている)。このことは両フィラメントの弾性的性質は筋肉の状態に依らず、もっぱら両フィラメントの固有の性質に依っていることを示している。半サルコメア内のアクチンフィラメントの長さは1 μm であるので、最大張力発生中約3.6 nm 伸びている。半サルコメア当り0.8 μm 長のミオシンフィラメントの伸びは約3.4 nm となる。フィラメント配向の乱れによる効果もあり、測定されたスペーシング変化は過大評価の傾向があるにしても、収縮中両フィラメントの伸びでサルコメア内の直列弾性要素の伸びの大部分が説明されることになった(後述)。

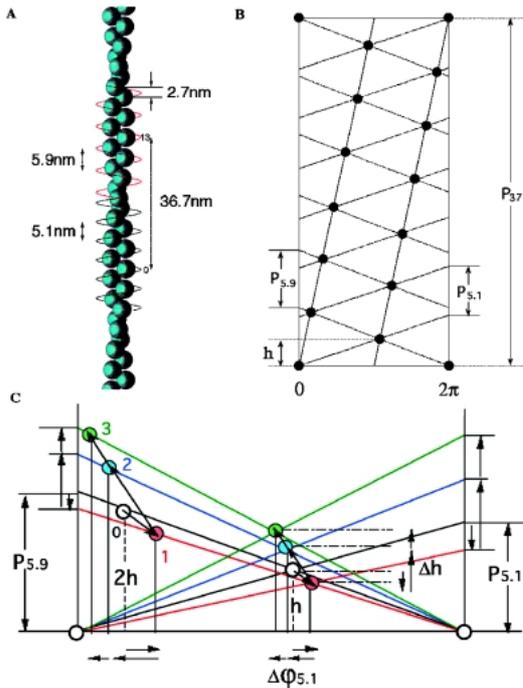


Fig. 5 A. A simplified model of the actin filament. The actin monomer is denoted by a ball. B. The radial projection of A. C. Enlarged part of B, in which movements of the center of gravity of the actin monomer are shown, 0→1; in the transition from the rest to initial activation, 1→2; from the initial activation to the contraction (force generation) and 2→3; from the contraction to stretch.

4.2 フィラメントの捻れ変化

両フィラメントのらせん構造に由来する層線反射の繊維軸方向のスペーシングの変化も調べられた。アクチンフィラメントもミオシンフィラメントもそれぞれアクチンモノマーやミオシンモノマーがらせん配列することにより形成されている。いま例として、アクチンフィラメント (Fig. 5A) を包む円筒を考え、すべてのモノマーの重心をフィラメント軸から垂直 (動径) 方向にこの円筒表面に投影して切り開くと、Fig. 5B に示すような平面格子配列が得られる。これを動径射影 (radial projection) と呼んでいる。この格子ではモノマーの繊維軸方向の変位 h (unit height と呼ばれる) は保存され、角度変位は横軸上に降ろした水平軸の変位で表される。このとき、すべてのアクチンモノマーを右巻きに辿るピッチ 5.1 nm の基本らせんは円筒の切り口を $P_{5.1}$ の高さで切る右上がりの直線列となる。また、左巻きに辿るピッチ 5.9 nm の基本らせんは円筒の切り口を $P_{5.9}$ の高さで切る左上がりの直線列になる。これらのらせんのピッチが Fig. 3 の X 線回折像に示す 5.1-nm, 5.9-nm 層線反射を与え、 h に相当する反射が 2.7-nm 子午反射である。Fig. 5B の一部を拡大した Fig. 5C から、 $P_{5.1}$, $P_{5.9}$, h との間には $h/P_{5.1} + h/P_{5.9} = 1$ の関係があるので、3 つのパラメータの変化が小さいとき、

$$\Delta h/h = (h/P_{5.1}) \cdot (\Delta P_{5.1}/P_{5.1}) + (h/P_{5.9}) \cdot (\Delta P_{5.9}/P_{5.9}) \quad (3)$$

が成り立つ。実験的に、3 つの反射のスペーシング変化は (3) 式を満足する形で起こっていた⁹⁻¹¹⁾。これらのらせん上で各々のユニットの隣接ユニットに対する相対的な角度変位 (unit twist と呼ばれる) は $\psi = 2\pi h/P$ で与えられるから、例えば 5.1-nm ピッチの右巻きらせんの ψ の変化は h や P の変化と次のように

$$\Delta \psi_{5.1} = (2\pi h/P_{5.1}) \cdot \{(\Delta h/h) - (\Delta P_{5.1}/P_{5.1})\} \quad (4)$$

関係づけられる。もしアクチンフィラメントがらせんの捻れを伴わないで伸びるならば、2.7-nm, 5.1-nm, 5.9-nm の三つの反射のスペーシングがすべて同じ割合だけ大きくなる。Fig. 4A に示されているように収縮中 (収縮初期の変化を考慮して) には 2.7-nm 反射は ~0.37%, 5.1-nm 反射は ~0.50%, 5.9-nm 反射は ~0.29% とそれぞれ異なるスペーシング変化 (増加) を示した。収縮中、 $\Delta \psi_{5.1}$ は約 -0.25° となり、5.1-nm ピッチの右巻きらせんが少し巻き戻される (緩む) ことになる。(らせんの場合、 $\psi_{5.1} + \psi_{5.9} = 2\pi$ の関係があるので左巻きらせんの巻き方がきつくなるという言い方もできる。) この変化は収縮筋を伸張させたときも同様であった。このことはアクチンフィラメントに力が掛かって伸びるときらせんの捻れ変化を伴っていることを示唆した⁹⁻¹¹⁾。しかし、今まで取り扱った中角反射の変化は小さく、測定誤差を受け易い事情もあり、統計的有意さに多少問題があった。低角の反射が精度良く測定できれば大きな変化として捉えられる。アクチンの第 1 層線はアクチンフィラメントを二重らせんとみたときの長さの半ピッチ (36-37 nm) に由来する反射で、そのスペーシング変化 ($\Delta P_{37}/P_{37}$ と表す) は、Fig. 5B の幾何学的関係から 5.1-nm 反射と 5.9-nm 反射のスペーシング変化と次のように関係づけられる。

$$\Delta P_{37}/P_{37} = \Delta P_{5.1}/P_{5.1} + 6.2 \times \{(\Delta P_{5.1}/P_{5.1}) - (\Delta P_{5.9}/P_{5.9})\} \quad (5)$$

上で示唆されたように、 $\Delta P_{5.1}/P_{5.1} - \Delta P_{5.9}/P_{5.9} > 0$ ならば $\Delta P_{37}/P_{37}$ は大きな変化として精度良く測定できることになる。PF マシンが高輝度化されたとき、角度分解能が上がり、回折像の低角に現れる接近したアクチンとミオシンフィラメント由来の反射を分離した形で測定することが可能となった¹³⁾。その結果、等尺収縮→伸長プロトコールにおいて、 $\Delta P_{37}/P_{37}$ は約 0.9% (100% 張力増加にスケールして) で (Fig. 6A), ノンオーバーラップ筋の活性時では -1.38% で、いずれも大きな変化であった (Fig. 6B)¹⁴⁾。これらのことから、収縮初期の活性時においても、その後の力発生時においても常に (6) 式の関係をもってスペーシングが変化し、

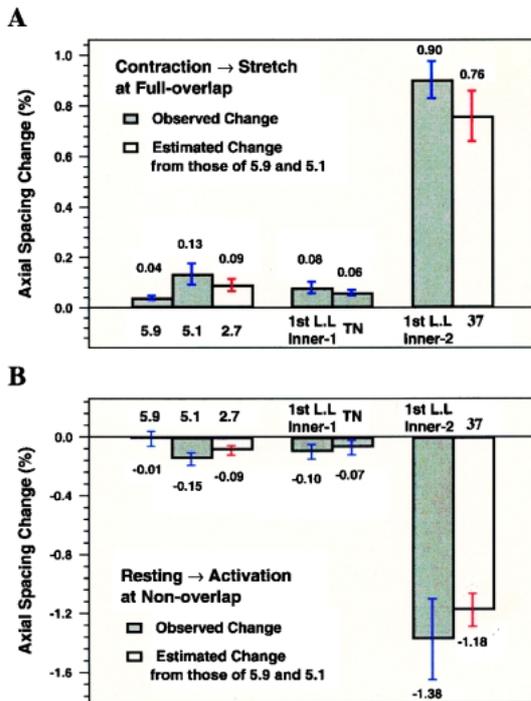


Fig. 6 Axial spacing changes of the first actin layer-line component. **A.** In the transition of the contraction of fully overlapped muscle to stretch ($\sim 1.3 P_0$). **B.** In the transition from the resting state to activation of non-overlapped muscle. In **A** and **B**, the shaded bar-graphs (1st LL inner 2) are the observed spacing changes and the white bar-graphs are the spacing changes calculated from the observed changes of the 5.1-nm and 5.9-nm spacings shown in the left side.

$$|\Delta P_{5.1}/P_{5.1}| > |\Delta h/h| > |\Delta P_{5.9}/P_{5.9}| \quad (6)$$

フィラメントの伸長はらせんの捻れ(らせん対称性の変化)を伴っていることが明確となった。収縮中、アクチンフィラメントは活性時のレベルから右巻きらせんを緩めるようにして伸びる。そのとき、 $1 \mu\text{m}$ の長さのアクチンフィラメントの先端がZ帯から見て反時計回りに約 90° 回転することになる(Fig. 8B参照)。Fig. 5Cの動径射影拡大図に伸展性と捻れの関係を示したが、アクチンモノマーが5.9-nmピッチの左巻きらせんに沿って(少し横切る方向に)動くことと関係している(Fig. 5Cで斜め矢印)。Fig. 7にはアクチンフィラメントのらせん対称性の変化(A)とらせんの半ピッチの変化(B)をまとめた。一方、ミオシンフィラメントは近似的にミオシンモノマーを右巻きに辿る9/1(1ターン9残基)らせんが3回回転軸で結ばれた三重らせん構造を持つ(Fig. 13参照)。ミオシンフィラメントの動径射影図(Fig. 8A)の幾何学的関係から、9/1らせんに沿ったunit twistの変化は

$$\Delta\psi_{43} = \{(2\pi/3) \times (c/P_{43})\} \cdot \{(\Delta c/c) - (\Delta P_{43}/P_{43})\} \quad (7)$$

で与えられる。ここで、 $\Delta c/c$ と $\Delta P_{43}/P_{43}$ はそれぞれモノ

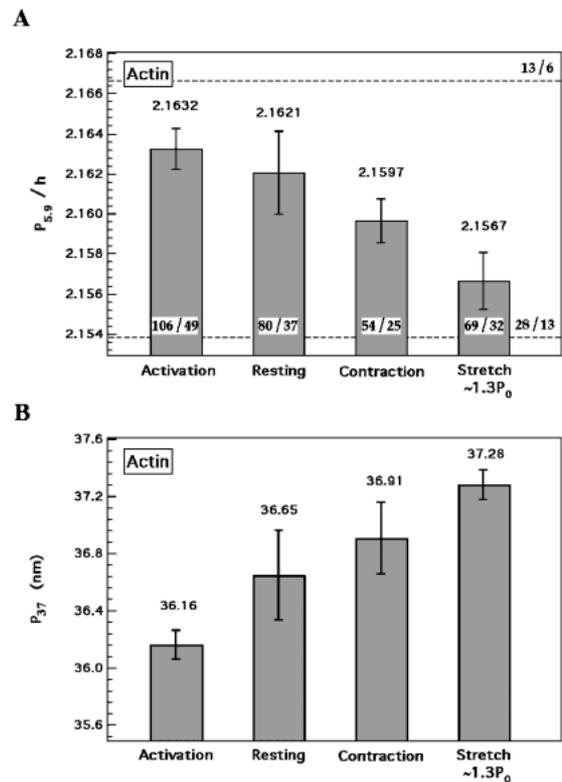


Fig. 7 The helical symmetry (A) and the half-pitch of long-pitched strand (B) of the actin filament in various states of muscle. In **A**, the helical symmetry expressed by residues/turns (the value within the bar-graph) is derived from the ratio (the value above the bar-graph) of the pitch of the 5.9-nm helix and the axial rise of the monomer in the filament. In **B**, the numerical value above the bar-graph denotes the value (nm) of P_{37} .

マーの繊維軸方向の間隔 c ($= 14.3 \text{ nm}$ or 14.5 nm) の変化と $9/1$ らせんの $1/3$ ピッチ P_{43} の変化である。実験的に $\Delta c/c < (\Delta P_{43}/P_{43})$ となり、 $\Delta\psi_{43} < 0$ であった¹⁵⁾。収縮中半サルコメア内でミオシンフィラメントの先端がM-lineから見て約 20° 反時計回りに回転する(Fig. 8B参照)。Fig. 8Aには動径射影図上でのミオシンモノマー重心の力発生に伴う動きを太い矢印で示す。従って、ミオシンフィラメントもアクチンフィラメントと同じ方向に捻れを伴って伸展していることが示された。

このように半サルコメア内で両フィラメントの捻れを伴った伸展性がクロスブリッジを介して共役するような形で(Fig. 8B)、サルコメア内の主要な弾性要素になっていることが明らかとなった。

さて、従来のクロスブリッジモデルでは、張力はサルコメア内で両フィラメントが重なっている部分で発生するとされている。その場合、ミオシンフィラメントもアクチンフィラメントも自由端に近づくにつれて掛かる力や伸びが小さくなる筈である(Fig. 9A参照)。この結果として両フィラメントの伸びに不均一性が生じ、子午反射の子午方向の強度プロファイルが非対称になることが予想された。実際

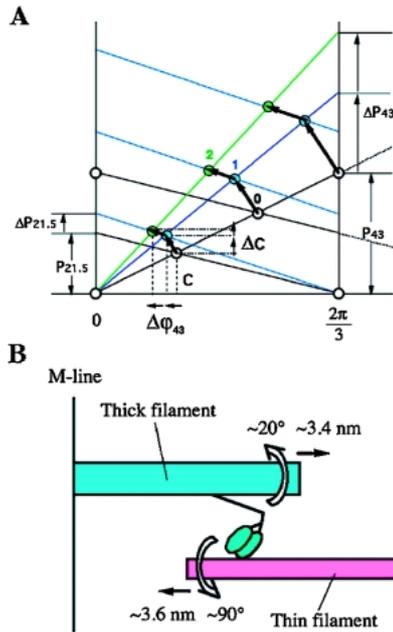


Fig. 8 A. The 1/3 part of the radial projection of the myosin filament. Changes of the center of gravity of the myosin molecule, 0→1; in the transition from the resting state to contraction, 1→2; from the contraction to stretch ($\sim 1.3 P_0$). During the force generation, the myosin molecules move azimuthally along the left-handed helical track with a 21.5-nm-pitch. B. A schematic illustration showing a possible coupling of twisting motions between the actin and myosin filaments via a crossbridge in the half sarcomere.

に、アクチンフィラメントについてモノマーを一次元的に連結させたモデルでシミュレーションしてみると、アクチン子午反射プロフィールに非対称性が現れ、高次反射ほどその効果が大きくなる。**Fig. 9B**に2.7-nm子午反射の4次反射の中心がEwald球に乗るように繊維軸（筋肉の長軸）を傾けて測定した広角のX線回折像を示す。実際の回折像においてはビームの形状やフィラメント配向の乱れ効果が畳み込まれているが、それらを考慮しても2.7-nm子午反射の4次反射プロフィールにも非対称性が予測された。しかし、実験で得られた4次反射プロフィールは単一ガウス関数で良くフィッティングされ、非対称性が現れている徴候はなかった(**Fig. 9C**)¹⁶⁾。このことは動的平衡状態ではフィラメントに沿っての伸びの不均一性を一様にするメカニズムが働いていることを示唆する。このようなこともアクチンフィラメントの柔軟な構造的性質と協同的な性質によるものと思われる。

収縮初期の活性時にはトロポニンへのCaイオン結合により制御タンパク質が構造を変え、その影響によりアクチンフィラメントの構造が変化する。その際アクチンフィラメントは捻れを伴って僅かに短縮する。実際にアクチン子午反射のスペーシングの時分割測定でも、収縮の初期に減少することが示された¹⁷⁾。つまり弛緩状態では制御タンパク質による抑制効果によってアクチンフィラメントは歪

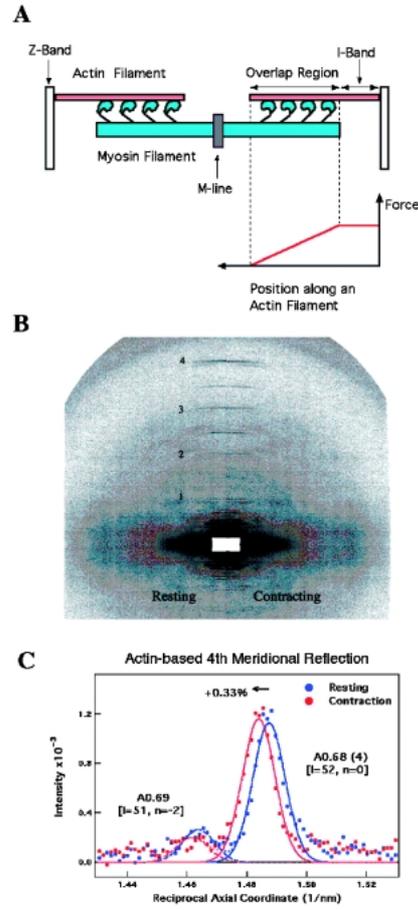


Fig. 9 A. A schematic representation of the tension distribution in the sarcomere of isometrically contracting muscle. B. High-angle X-ray diffraction pattern (tilted) involving the reflections until the 4th order actin-based meridional reflection. The meridional axis is coincided. C. The axial intensity profiles of the 4th order actin meridional reflection in the resting and contracting states. Solid curves denote the fits with an appropriate Gaussian function.

みを掛けられ少し伸びた形でオフ状態にあり、トロポニンへのCa結合で脱抑制され、右巻きらせんを捻って短縮すると云う形で情報伝達を行っていると考えられる。また、筋収縮の初期に潜伏弛緩 (latency relaxation) と呼ばれる張力の僅かな過渡的減少がある¹⁸⁾。上で述べた両フィラメントの初期短縮はその原因と関係しているように思われる¹⁹⁾。その後ATPでチャージされたミオシン頭部がアクチンと相互作用して力を発生する過程で、制御タンパク質はさらに変化し(後述)、ミオシン頭部はアクチンにトルクを及ぼすように働くか、あるいはアクチンフィラメント固有の性質としてミオシンとの相互作用によって歪みが誘起され、それがモノマー間の協同的な作用により伝播し、アクチンフィラメントを一様に伸展させる。これは、水溶液でアクチンフィラメント+ミオシン頭部の系にATPを加えるとアクチンフィラメントの曲げ運動が活性化されるメカニズム²⁰⁾と同様なメカニズムによると思われる。(筋

肉中ではアクチンフィラメント端がZ帯に固定されている。)つまりミオシンクロスブリッジの頭部内にADP・Pi(ATP加水分解の副産物, ADP; アデノシン二リン酸, Pi; リン酸)の形で貯えられたATP加水分解エネルギーの一部がアクチンに移動し, モノマーの内部構造やモノマー間の結合エネルギーを励起してアクチンフィラメントに捻れと伸展を起して弾性エネルギーとして貯えられたことになる。同様なことがミオシンフィラメントにも言えるであろう。

4.3 急速筋長開放時におけるアクチンフィラメントの伸展性の挙動

さて, 上で示した等尺収縮過程での両フィラメントのらせんの伸展性の変化が, 急速筋長開放時の張力変化とその後の張力の再発生の時間経過 (Fig. 2A 参照) とどのように対応しているかを調べる必要があった。この実験は我々より先に, イギリスのBordasのグループが第3世代の放射光を使って, 2.7-nm, 5.1-nm と5.9-nm アクチン反射のスペーシングと強度変化の時間経過を測定することによって実行した²¹⁾。ここでは, 彼等の結果を紹介する。急速筋長開放時にはスペーシングは張力変化と並行して瞬時に減少し, 張力0時ではマイナスつまり弛緩状態の値以下に減少した。そのときの三つの反射のスペーシング変化の絶対値は(6)式の関係に従っていた。まさにアクチンフィラメントは捻れを伴う純弾性的なバネを思わせる振る舞いを示した。さらに張力再発生の過程でもスペーシング変化は張力発生と並行して起こっていた。(ミオシン子午反射も調べられているが, その挙動は少し複雑でここでは省略する。)このようにアクチンフィラメントの伸展性は等尺収縮筋に急速筋長変化を与えた時にもそのらせん構造の変化と直結し, 張力変化と並行的に起こることがわかり, 力の再発生の過程においてもアクチンフィラメントの粘弾性的性質が直接的に関与していることが示唆された。興味あることにこれら三つのアクチン反射の強度変化は急速筋長開放時に張力と並行的に起こったが, 張力の発生時には張力に先行して起こっていた。張力発生に関わる構造変化はミオシンとアクチンの相互作用の2段階反応として起きているようである^{18,22)}。

5. 収縮中の細いフィラメントと太いフィラメントの構造変化

5.1 細いアクチンフィラメントの構造変化

筋肉の収縮中の高分解能X線回折像は, アクチンとミオシンが不整合な周期構造を保った形で相互作用していることを示した²³⁾。つまり, 硬直状態に見られるようなアクチンフィラメントのらせん対称性に支配されたstereospecificなアクチンとミオシンの結合パターンの出現はほとんどなく, むしろ相互作用が抑制されている弛緩

状態に似た回折像であった。その中でアクチン反射の強度が反射回数に依存して変化していることが示された。このような変化は筋収縮過程でのアクトミオシンの相互作用が, 酵素反応で知られる酵素と基質の立体特異的なものではないか, あるいはアクチンとミオシンのstereospecificな相互作用がフィラメントに亘って非同期的に起こり, 且つ収縮サイクルのほんの一部の時間しか占められていないなどの理由によると思われる。いづれにしても収縮中のミオシンとアクチンの相互作用はミオシンフィラメントの周期に支配された形で起こっている。実際, 細いフィラメントの反射強度データによる円筒対称パターン関数はアクチンフィラメントにミオシン頭部によるspecificな質量の付加を示さなかった^{23,24)}。このことは, 収縮中のアクチン反射の強度変化は細いアクチンフィラメント自身に起された構造変化によると考えることの妥当性を与えた。(不整合周期を持って相互作用する分子系の回折学的効果は興味ある問題である。)

1990年にアクチンモノマーが結晶構造解析され, それを用いてF-アクチン配向ゾルのX線回折像を良く説明するものとしてアクチンフィラメントの結晶モデルが作られた(Holmesモデル)²⁵⁾。我々はHolmesモデルを出発点として, アクチンモノマーの結晶モデルを適当に16分割にサブドメイン化し, 小さなドメインそれぞれを剛体的に動かして弛緩状態の筋肉の細いアクチンフィラメントのX線反射強度分布(軸方向に2.7-nm反射の2次まで考慮して)を最も良く説明するモデルを探索してきた^{11,26)}。筋肉の細いフィラメントはアクチンフィラメントを骨格としてそれに制御タンパク質トロポニンとトロポミオシンが周期的(アクチンフィラメントとは少し異なる周期で)に結合している。トロポミオシンの低分解能結晶構造はすでに出されている。トロポニンは最近その主要な部分(コアドメイン)が結晶解析された。それらの構造(トロポニンの尾部(T1)のcoiled-coil構造は近似した)を使ってフィラメント中での分子配置の最適化モデリングを進めている。モデリングの詳細は省略するが, 現在最適として出された細いアクチンフィラメントの弛緩状態のモデルをFig. 10Aに示した。次いで, 収縮中についても, アクチン由来の反射の強度変化は, アクチンフィラメント自身の構造変化によるとの観点で, 同様な解析が行われた。等尺収縮中の最適モデルをFig. 10Bに示した。まだ似たようなR値(0.13-0.14)を示すモデルが幾つか存在するが, 他の実験データからの知見と現段階で良く対応するものを示した²⁶⁾。小さな変化であるが, 収縮中アクチンモノマーのドメイン構造が変化し(Fig. 10C), またトロポニンのコアドメインの向きがフィラメント軸まわりで回転するように変化し, 分子の重心がアクチンフィラメントの外側に移動している。とくに興味ある点は, 長いストランドのトロポミオシンがトロポニンの長い尾部(T1)と結合したままフィラメントの中央部へ移動するモデルが低角の強度デー

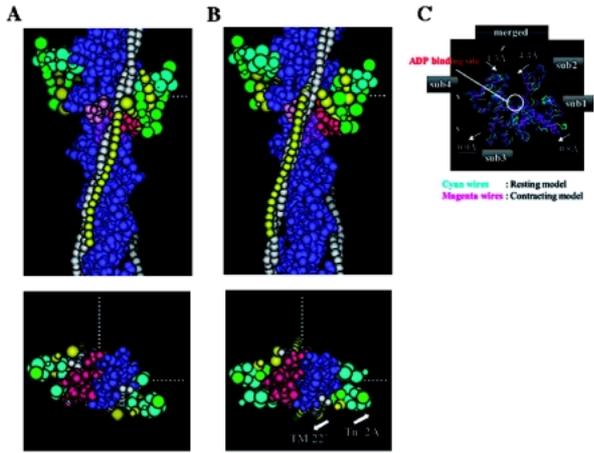


Fig. 10 Tentative best-fit models of the thin actin filament in the resting state (A) and contracting (B) states with their cross-section viewed from the M-line. The upper side is toward the M-line in the side-views. The actin filament is shown by blue balls, in which four main subdomains of an actin monomer are denoted by red, magenta, pink and orange. Tropomyosin(TM) is shown by the two strands of white balls and the troponin (Tn) subunits are shown by light blue balls (TnC), green balls (TnI) and yellow balls (TnT). In the cross-section, the movements of TM and Tn core domain during contraction were shown by arrows. C. Changes of an actin monomer (a wire model) showing the movements of subdomains (arrows) during contraction.

タを良く説明している。この動きはアクチン上のミオシン相互作用部位を開放とする筋収縮の制御モデル²⁷⁾と対応するが、トロポニン T1 のみが動くとする他の測定データもあるので今後のモデリングの課題として残されている。いずれにしても、トロポミオシンの配置変化とアクチンのドメイン構造の変化により細いフィラメントの骨格は収縮中に4回回転対称性を顕著にするような構造変化を起している。ここで示さなかったが、ノンオーバーラップ筋の活性時にはトロポニンコアドメインは力発生中とは異なる変化を示し、トロポミオシンとトロポニン T1 の移動量は等尺収縮中の移動量の半分程度であった。これは、アクチンの活性化が二段階プロセスの構造変化として行われることを示唆している。このように収縮中の細いフィラメント反射の強度変化の特徴は細いフィラメント自身の構造変化として無理なく説明されている。

5.2 太いミオシンフィラメントのクロスブリッジの構造変化

ミオシンフィラメントについても構造変化が調べられた。弛緩状態では個々のミオシンフィラメントの回りでクロスブリッジは3回回転軸を持ち、且つ結晶学的周期(42.9 nm)内での3つのクロスブリッジ間隔に摂動を持つ(後述)らせん配列をとっているため、ミオシンフィラメントのX線回折像は42.9-nm周期の一連の反射からなる梯子状の強度分布を持つパターンを呈している^{28,29)}

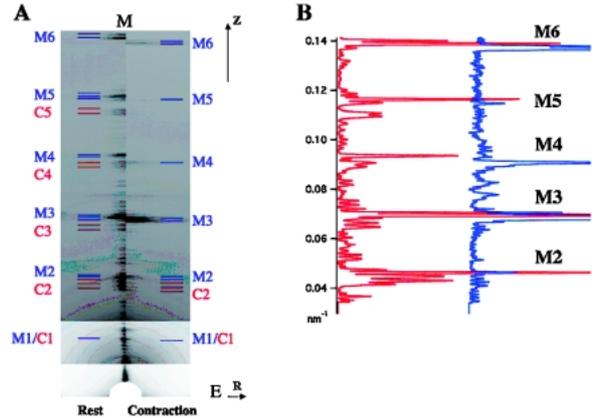


Fig. 11 A. High angular-resolution X-ray diffraction patterns in the resting and contracting states of live frog skeletal muscles with their meridional axes (M) coincident. M1 to M6 denote the first to the sixth order myosin-based reflections with a crystallographic period of 42.9 nm (the resting state) or 43.5 nm (the contracting state). M and E indicate the meridional and equatorial axes, respectively. B. Axial intensity distributions on the meridian in the resting (red) and contracting states (blue). Axial profiles of a series of myosin meridional reflections (M2–M6) are finely sampled (data recorded at the APS).

(Fig. 3A 参照)。収縮中、個々のミオシンフィラメントの周りでのクロスブリッジは六方格子の中で異なるアクチンフィラメントと相互作用するため、個々のフィラメントの周りのらせん配列を変えることになる。その結果、収縮中ミオシン由来の層線反射は著しく弱くなる。しかし、子午軸上では基本周期(～1%程増加する)を保った形で回折線が強く存在している。このことは前述したように、収縮中ミオシンフィラメントの周期構造を保持した形でミオシンクロスブリッジがアクチンと相互作用していることを示す。従って、硬直状態のときに実現されるミオシンクロスブリッジのアクチンフィラメントの対称性に支配された結合様式とは大変異なる。

これらミオシン子午反射はバックボーンとクロスブリッジの干渉によって決まっていること、M-lineを境にするミオシンフィラメントの中心対称構造(Fig. 1A 参照)によってサンプリングされていること、ミオシン突起の周期に摂動が掛かった領域と掛からない二つの領域が共存するなどミオシンフィラメント固有の複雑な構造によって変調されている。さらに厄介なことにはミオシン反射は部分的ではあるがフィラメントの六方格子による強い格子サンプリングを受けている。これらは収縮中に変わるので、収縮中のミオシン子午反射強度変化の一義的な説明を困難にしている。Fig. 11には第3世代の放射光(APS)で測定した子午軸近傍の高分解能のX線回折像を示した。上述のような複雑性を考慮して我々が行ってきた構造解析^{28,29)}の結果を以下に示す。

繊維軸方向に中心対称構造でサンプリングされた子午反

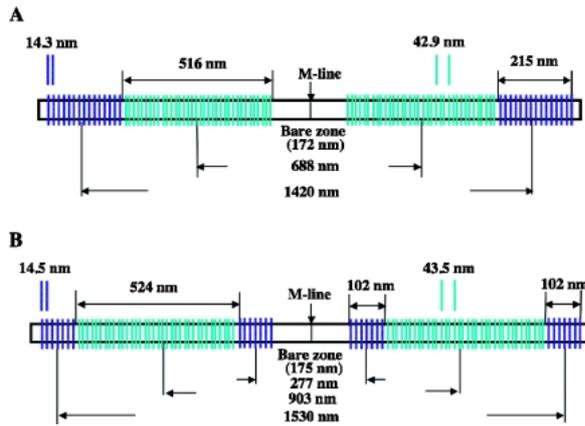


Fig. 12 Distribution of the triplet repeating region (blue) and singlet repeating region (cyan) of myosin crossbridge arrays along the thick myosin filament across the M-line in the sarcomere. A. The model in the resting state. B. The model in the contracting state.

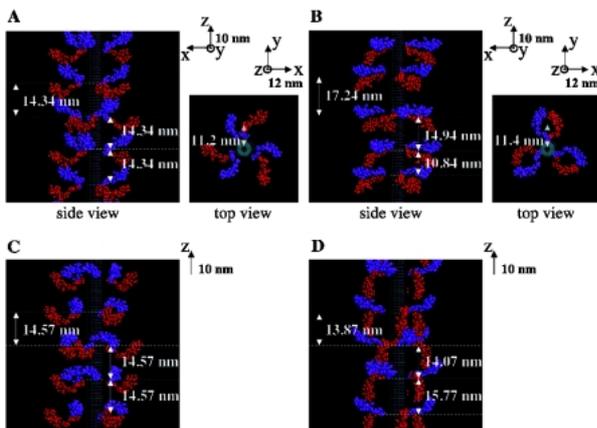


Fig. 13 Configurations of two-headed myosin crossbridges along the thick filament. A and B show the optimal models in the singlet and triplet repeating regions, respectively, in the resting state. C and D show those in the respective regions in the contracting state. In A–D, the z-axis is orientated in the direction of the Z-band in the sarcomere, and is parallel to the filament axis. The thick filament backbone (gray) is indicated as a structure-less cylinder.

射の強度分布のモデリングが行われた。その結果を Fig. 12 に示す。まず、弛緩、等尺収縮状態ともに摂動領域（クロスブリッジの三分の周期が単位となった triplet repeating region）が全クロスブリッジ領域の～70%を占めていた。弛緩状態ではフィラメントの両端部分に摂動のない領域（singlet repeating region）が存在するが、興味あることに収縮中には両側の規則領域が減少する一方、M-line 側でそれが成長し、全体として規則領域の長さは保存されていた。弛緩、収縮状態で摂動領域の3つのクロスブリッジレベルの間隔が異なる（Fig. 13 参照）。さらにミオシン頭部の結晶構造を使ってクロスブリッジの高分解能モデリングを進めた。（この際、バックボーンの寄与は少ない

として無視した。）得られた両状態のミオシクロスブリッジモデルを Fig. 13 に示した。ミオシクロスブリッジの二つの頭部は両状態とも摂動領域と規則領域で互いに異なる構造を持っていた。とくに弛緩状態では層線反射のデータを使うことによりミオシン双頭の方角方向の解析も可能であった。規則領域では上からみると1個のクロスブリッジの二つの頭部が開き、風車のような形の構造をもっていた（Fig. 13A）。また繊維軸方向では異なるレベルにあるクロスブリッジの一方の頭部が接触するような配置をとっていた。摂動領域ではこの接触が短い周期のレベル間でのみ起こり、上からみるとクロスブリッジの二つの屈曲した頭部の先端で相互作用できるような配置にあった（Fig. 13B）。一方、収縮中では、クロスブリッジの双頭の方角関係は解析できなかったが、とくに全体のクロスブリッジ領域の大きな割合を占める摂動領域では、一方の頭部が繊維軸により垂直に向き、他方の頭部は繊維軸に平行に向いていた（Fig. 13D）。Fig. 13C, D はフィラメント軸に投影した構造であるが、このような構造を持つ双頭のクロスブリッジが収縮中異なるアクチンフィラメントと相互作用している。収縮中の構造は時間的、空間的な平均構造を示すものであるが、おそらくクロスブリッジの二つの頭部は異なる役割を果たしている可能性を示唆する。フィラメント軸に並行な配置の頭部は非同期的にサイクリングしている頭部の平均構造に対応し、もう一つのより垂直に配置した頭部はアクチンに対して規則的に配置し、ADP と Pi を結合したアクチンに対する弱結合状態にある構造（力発生の前駆体の構造）と考えられる。また逆に、より垂直に配置している頭部が力発生と関係し、長軸をアクチンフィラメントに平行にして配置している頭部は、力発生に直接関係していないのかも知れない。一方、弛緩状態におけるクロスブリッジの頭部間の相互作用の可能性は、骨格筋において制御機構が細いフィラメント側にあるとする従来の考えに加えて、ミオシクロスブリッジにも考慮すべきであることを示唆する。

太いフィラメントの構造解析には非常に多くの構造的因子を考慮する必要があった。その中でも特に収縮中の 14.5-nm ベースの子午反射に強く関係する因子には、(1)ミオシクロスブリッジの双頭の構造、角度分布と頭部間干渉、(2)摂動領域の配置と摂動領域の長さ、(3)摂動周期の変化、(4)バックボーンの寄与³⁰⁾、(5)強い格子サンプリングの変化、があった。従って、収縮中の急速筋長変化の実験で一つだけの子午反射の干渉パターンに注目し、一つの構造因子で強度変化を議論するのは大変問題で、実際いろいろな説明が可能である³⁰⁻³²⁾。

5.3 ミオシクロスブリッジ頭部の ATP 加水分解中の構造変化

収縮中アクチンと相互作用しているミオシン頭部が ATP の加水分解反応と共役してどのように構造変化して

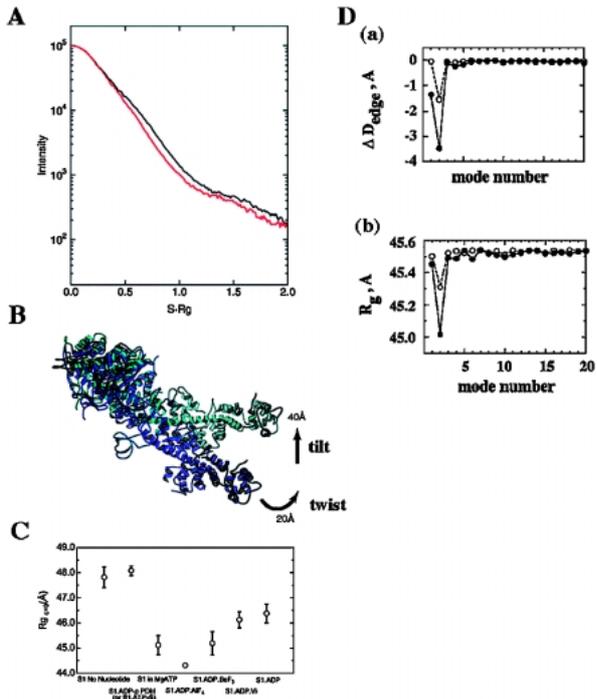


Fig. 14 Conformational change of the myosin head (S1) in the presence of ATP. A. Comparison of X-ray solution scattering curves taken in the absence (black) and presence of ATP (red). B. Modeling of the conformational change of S1 in solution using the crystallographic data in the presence (light blue) and the absence of ATP (dark blue). The imaginary actin filament axis is aligned vertically at the left-hand side of the models. C. The radius of gyration values (Rg) of various nucleotide-bound S1 samples. S1 in MgATP; S1 in ATP solution, S1.ADP-pPDM; S1 bound ADP crosslinked with pPDM, S1.ATPγS and S1.ADP, S1 bound ATPγS and ADP which mimic a myosin head bound ATP state and that bound ADP state, respectively in the ATP hydrolysis cycle. S1.ADP.AlF₄, S1.ADP.BeF₃ and S1.ADP.Vi (Vi, vanadate) denote S1 bound ADP and phosphate analogs which mimic the intermediate state (M.ADP.Pi) of the ATP hydrolysis cycle. D. Changes of ΔD_{edge} (corresponding to the end-to-end distance of the molecule) (a) and Rg (b) of S1 against the mode number given by collective mode analysis with two different strengths for the atom packing effect.

いるかを調べる目的で、ミオシン分子から頭部を酵素で切り出して ATP 存在下や ATP 加水分解過程の種々のアナログ状態を実現し、X 線溶液散乱法で調べた (Fig. 14)³³⁻³⁵。ATP 加水分解中、ミオシン頭部の慣性半径と分子最大長がそれぞれ ~ 0.3 nm と ~ 1 nm 小さくなった。広い角度範囲の散乱曲線 (Fig. 14A) の結晶データを使ったモデリングからミオシン頭部は分子の細長い尾部を大きく変形させていることが明らかとなった (Fig. 14B)。ヌクレオチドのアナログを使った実験から、ATP 中のミオシンの構造変化はいろいろな分子種の混ざりではなく、主として M.ADP.Pi (M; ミオシン) という中間状態 (律速段階)、つまり ATP をミオシン頭部内で分解し、プロダクト (ADP と Pi) を保持した状態で起きていて、次の Pi を放

出する過程と ADP を放出する過程でこの変化が元に戻った (Fig. 14C)。興味あることに、ミオシン頭部のアクチンフィラメントに対する結合様式を考慮すると、ATP 加水分解中の尾部の構造変化には繊維軸に対して尾部の tilt と twist が含まれていて、両者の変化の合成として尾部の末端が ~ 5 nm 程動くことが分かった。X 線溶液散乱データを制約条件として行った分子動力学の計算では運動の主成分モードが tilt (first mode) と twist 成分 (second mode) の二つで、とくにミオシン頭部の慣性半径や分子変形には twist 成分の寄与が大きいことが示された (Fig. 14D)³⁶。これらの結果から、ATP 加水分解反応と共役してミオシン頭部が加水分解過程に対応して特異的な構造変化を起していることが明らかとなった。尾部を変形する構造変化の分子内メカニズムは、種々のヌクレオチドアナログを結合させたミオシン頭部の結晶解析から議論されている。

以上のことはアクチンのない系で得られたもので直接力発生という力学系の筋肉中に対応させることはできない面もあるが、筋肉中では、アクチンと相互作用しているミオシン頭部から Pi が放出される過程が力を発生する過程 (大きな自由エネルギー変化を伴う) と云われている。(等尺収縮ではアクチンと相互作用しているミオシンから ADP を放出するステップが律速となっている。一旦、ADP を放出すると非常に速くサイクルが回り、最初のステップに移行する。) M.ADP.Pi 状態で加水分解エネルギーの一部を使って Fig. 14B のような尾部の大きな変形を起すと同時に、アクチンと弱い結合を形成する。そしてアクチンにより Pi 放出が加速され、ミオシンはアクチンとの強い相互作用状態に移行する。そのとき、加水分解自由エネルギーを使ってミオシン頭部の逆変形 (Fig. 14B の矢印と逆方向の変化) を起してアクチンフィラメントに歪みを誘導する。そうだとすると、in vitro 運動系における“ミオシン芝生”上でのアクチンフィラメントの捻れ運動が示唆するように、ミオシン頭部レバーアームの大きな運動モードであった twist 成分がアクチンフィラメントの捻れの誘起に関係しているように思われる。この場合、ミオシン頭部の構造変化もサルコメア内のバネ要素となっている可能性がある。これは観測されたミオシンフィラメントの伸展の中に含まれているのかも知れない。Active な筋肉中の例として、等尺収縮時の筋肉に速い正弦波筋長振動 (0.5 kHz) を与えたとき、クロスブリッジ周期の 14.5-nm 子午反射の強度変化が張力変化と逆位相で起こり、硬直状態にある筋肉では両者は同位相で起こることが示された³⁷。この結果は、説明が一義的でないにしても、active な筋肉ではミオシン頭部レバーアームの屈曲運動が主として筋長振動と同期して起こり、それがバネ的な振る舞いを示しているように思われる。(粘弾性的には先に述べた S2 部分はバネの性質を持たないことが示されている。) しかし、このような変化が受動的に起こっているのか能動的に起こっているかは明らかでない。

我々が示したミオシン頭部の ATP 加水分解中での構造変化はミオシン頭部の結晶解析がなされる少し前に出されたもので (ミオシン頭部におけるこのようなグローバルな変化が長い間捉えられなかったのである), 今日の欧米での「ミオシンレバーアーム屈曲仮説」の基礎となるデータとなったが, 今まで述べてきたように筋収縮の力発生はミオシン頭部の構造変化だけが主体ではない。

6. 筋収縮機構の新しい描像

フィラメントの弾性的性格が明らかになった以上, 「ミオシン頭部回転ないしはレバーアーム屈曲」仮説を考え直す必要がある。いまミオシンレバーアーム屈曲性も考慮に入れて考えると, 収縮中に半サルコメアを 6~7 nm 短縮させると, アクチンフィラメントの伸びとミオシンフィラメントの伸びとミオシン頭部の屈曲がなくなり力はゼロになる (Fig. 2B(b)-Y)。力が再発生するとフィラメントの伸びは短縮前と同じになるから, ミオシン頭部はアクチンの上を 6~7 nm 進まねばならない。バネ成分のかなりの部分がフィラメントにあるので, アクチンフィラメントに結合したミオシン頭部の屈曲運動はアクチンフィラメントの動きに影響され, 同期的に起こらざるを得なくなる (Fig. 2B(b)-Z)。そうならば, ミオシン頭部の角度変化はかなり大きなものとなり, 頭部につけた蛍光物質の偏光等の大きな変化として検出されるはずである。実際に急速筋長変化時に捉えられている蛍光変化は大きな変化ではないし, 同期的な動きが起きているという事実もない。

そこで, 次のような描像が描ける。ミオシン頭部はアクチン分子の特定の位置や特定の角度で強く結合しているのではなく, アクチンフィラメント上に何ヶ所か結合箇所をもち, これらの箇所をスムーズに乗り換えることができるという柔軟なものである (例えば, Fig. 2B(b) と (c) の組み合わせ)。このような描像からは, ミオシン頭部だけでは力発生の主体になり得なく, アクチンフィラメントが単なる力のトランスミッターでなくもっと積極的な役割を果たしていると言える。A. Huxley³⁸⁾ は 1974 年にクロスブリッジ回転説と同等なものとしてアクチンフィラメント内でアクチンモノマー間にバネとモノマーの回転を考慮したモデルを考察している。アクチンの積極的役割とは何か, アクチンとミオシン頭部の構造変化との共役を具体的に明らかにして行くことが今後の課題である。

7. まとめ

ここで示した収縮筋の X 線回折は, アクチンフィラメントのらせん構造の捻れを伴う伸展性の変化がミオシン突起の相互作用による ATP 加水分解エネルギー→力学エネルギー変換の最も顕著な啓示である。収縮初期の制御過程で起こるアクチンフィラメントの弾性的変化は力発生中に

起こる変化の方向とは逆方向に起きていた。トロポニンへの Ca 結合によって弾性歪み (障害) が解除され, アクチンフィラメントは安定な平衡状態 (オン状態) に移行する。次いで, ミオシンが相互作用してモーターのエネルギーの一部をアクチンフィラメントに渡す。その結果, 構造変化 (歪) が起こり, フィラメント上に一方向性のポテンシャル勾配が形成され, モーターはこの傾きによって一方向性の運動を実現すると云う物理的モデルが考えられている^{39,40)}。収縮中のアクチンの弾性変化は張力発生に並行し, 力発生と直接的に関係する。つまり, 細いアクチンフィラメントの伸びと云う形で内積された歪みが張力維持に関係している。ここで示してきたように, アクチンモノマー当りの構造変化はミオシン頭部のような大きな変化ではない。しかしアクチンフィラメントの伸展性に伴うらせん構造の変化はミオシン相互作用部位の構造やフィラメントに沿っての静電ポテンシャルなどの物性に重大な変化を引き起こしている可能性がある。アクチンが force generator としての active な一役を担うとするならばこのような物性的な変化であるかも知れない。一方, ミオシン突起は ATP 加水分解反応の素過程に対応して分子の尾部をレバーアームのように柔軟に変えている。ATP の加水分解エネルギーの一部はミオシン自身の構造を変えることに使われ, 一部はアクチンフィラメントの構造変化や弾性的変化のエネルギーとして使われる。このようなエネルギーのやり取りはアクチンやミオシンフィラメントの柔軟な構造に基づくもので, 硬いフィラメントでは実現できない。これまでのミオシン突起運動主体の機構にとって替わる, アクチンの弾性的性質とミオシン分子の動きを連結した筋収縮機構モデルの必要性を惹起している。激しい熱揺らぎにさらされている系の中で高い効率でエネルギー変換を実現するタンパク質分子機械の作動原理にはモータータンパク質の構造的に柔軟な性質がうまく働いているようである。筋収縮の作動原理の理解は深まり, 他のモータータンパク質系のメカニズムに一般化されてきた。結晶解析が大きく進歩し, それなくしては筋収縮の議論もできなくなってきたが, それでもより高いレベルでの理解が要求されている。筋収縮研究は X 線回折技術の進歩と相まって発展してきた経緯がある。次はどのような技術進歩と結びつくか興味あるところである。筋収縮に代表されるモータータンパク質系の構造研究は回折学的にも興味深く, 今後も大変チャレンジングな課題であり, それに放射光 X 線が果たす役割は今後も大きい。

謝辞

放射光 X 線小角回折・散乱による生物物理学的研究の解説を書くように薦めて頂いた前編集委員の伊藤和輝氏と現編集委員の高橋浩氏に感謝いたします。

PF の建設当時から小角散乱・回折装置設計, 検出器開発に尽力され, 我々の研究に協力し, 今日の発展に貢献し

ていただいた現放射光学会長の雨宮慶幸氏（東大）に、また当初から筋収縮の生理学実験に協力していただいた田中秀洋（帝京平成短大）、小林孝和（芝浦工大）の両氏に深く感謝します。また第3世代の放射光の先駆けとなったKEK-MR放射光の利用実験で共同研究した現SPring-8の八木直人、岩本裕之の両氏に、APSで第3世代の放射光を快く利用させていただき共同研究したTom C. Irving氏（イリノイ工科大、BioCAT）に感謝します。ミオシン頭部の初期SAXS実験に協力していただいた徳永万喜洋氏（遺伝研）、その後のミオシンモーターのSAXS実験の協力と筋収縮の議論を頂いた荒田敏昭氏（阪大）に感謝します。本研究のほとんどはPFのBL15Aの回折計を利用してなされたことを付記する。

参考文献

- 1) H. E. Huxley and K. C. Holmes: *J. Synchrotron Rad.* **4**, 366-379 (1997).
- 2) K. C. Holmes and G. Rosenbaum: *J. Synchrotron Rad.* **5**, 147-153 (1998).
- 3) H. E. Huxley: *Eur. J. Biochem.* **271**, 1403-1515 (2004).
- 4) H. E. Huxley: *Science* **164**, 1356-1366 (1969).
- 5) K. C. Holmes: *Curr. Biol.* **7**, R112-R118 (1997).
- 6) A. F. Huxley and R. M. Simmons: *Nature* **233**, 533-538 (1971).
- 7) H. E. Huxley and W. Brown: *J. Mol. Biol.* **30**, 383-434 (1967).
- 8) Y. Amemiya and K. Wakabayashi: *Adv. Biophys.* **27**, 115-128 (1991).
- 9) K. Wakabayashi, Y. Sugimoto, H. Tanaka, Y. Ueno, Y. Takezawa and Y. Amemiya: *Biophys. J.* **67**, 2422-2435 (1994).
- 10) Y. Takezawa, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi: *Adv. Exp. Med. Biol.* **453**, 309-317 (1998).
- 11) K. Wakabayashi, Y. Ueno, Y. Takezawa and Y. Sugimoto: *Nature Encyclopedia Life Sci.* pp. 1-12 (2001). Nature Publishing Group/www.els.net.
- 12) J. C. Haselgrove: *J. Mol. Biol.* **92**, 113-143 (1975).
- 13) Y. Takezawa and K. Wakabayashi: *Photon Factory News* **19**, 30-35 (2001).
- 14) Y. Takezawa: *KEK Proc.* **2001-24**, 171-182 (2002); Y. Takezawa et al.: manuscript in preparation.
- 15) Y. Takezawa et al.: manuscript in preparation.
- 16) K. Wakabayashi, Y. Sugimoto, Y. Takezawa, Y. Ueno, S. Minakata, K. Oshima, T. Matsuo and T. Kobayashi: *Adv. Exp. Med. Biol.* **592**, 327-340 (2007); Y. Takezawa et al.: manuscript in preparation.
- 17) H. E. Huxley, A. Stewart and T. C. Irving: *Biophys. J.* **78**, M-Pm-A6 (1998).
- 18) A. F. Huxley: *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **B355**, 433-440 (2000).
- 19) N. Yagi: *Biophys. J.* **92**, 162-171 (2007).
- 20) Y. Yanagida, M. Nakase, K. Nishiyama and F. Oosawa: *Nature* **307**, 58-60 (1984).
- 21) J. Bordas, A. Svensson, M. Rothery, J. Lowy, G. P. Diakun and P. Boesecke: *Biophys. J.* **77**, 3197-3207 (1999).
- 22) H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Takezawa, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi: *KEK Proc.* **2001-24**, 162-170 (2002).
- 23) Y. Amemiya, K. Wakabayashi, H. Tanaka, Y. Ueno and J. Miyahara: *Science* **237**, 164-168 (1987).
- 24) K. Wakabayashi and Y. Amemiya: *Handbook Synchrotron Rad.* **4**, 597-678 (1991).
- 25) K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch: *Nature* **347**, 44-49 (1990).
- 26) T. Matsuo, Y. Ueno, Y. Takezawa and K. Wakabayashi: *Photon Factory Act. Rep.* #24 (2007); 松尾龍人: 大阪大学大学院基礎工学研究科修士論文 (2006).
- 27) J. M. Squire and E. Morris: *FASEB J.* **12**, 761-771 (1998).
- 28) K. Oshima, Y. Takezawa, Y. Sugimoto, T. C. Irving and K. Wakabayashi: *Fiber Diffraction Rev.* **13**, 23-40 (2005).
- 29) K. Oshima, Y. Takezawa, Y. Sugimoto, T. Kobayashi, T. C. Irving and K. Wakabayashi: *J. Mol. Biol.* **367**, 275-301 (2007), and *Photon Factory Activity Rept. Highlights* #24, 45-47 (2007).
- 30) H. E. Huxley, M. Reconditi, A. Stewart and T. C. Irving: *J. Mol. Biol.* **363**, 743-761 (2006).
- 31) T. Mitsui, K. Wakabayashi, H. Tanaka, T. Kobayashi, Y. Ueno, Y. Amemiya, H. Iwamoto, T. Hamanaka and H. Sugi: in "Biophysics and Synchrotron Radiation", eds. A. Bianconi and A. C. Castellano, Springer, pp. 295-302 (1987).
- 32) M. Reconditi, M. Linari, L. Lucii, A. Stewart, Y.-B. Sun, T. Narayanan, T. C. Irving, G. Piazzesi, M. Irving and V. Lombardi: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 232-247 (2005).
- 33) K. Wakabayashi, M. Tokunaga, I. Kohno, Y. Sugimoto, T. Hamanaka, Y. Takezawa, T. Wakabayashi and Y. Amemiya: *Science* **258**, 443-447 (1992).
- 34) Y. Sugimoto, M. Tokunaga, Y. Takezawa, M. Ikebe and K. Wakabayashi: *Biophys. J.* **68**, 29s-34s (1994).
- 35) Y. Sugimoto: *KEK Proc.* **2001-24**, 183-193 (2002); Sugimoto et al.: manuscript in preparation.
- 36) J. Higo, Y. Sugimoto, K. Wakabayashi and H. Nakamura: *J. Comput. Chem.* **22**, 1983-1994 (2001).
- 37) N. Yagi, K. Wakabayashi, H. Iwamoto, K. Horiuti, I. Kojima, T. C. Irving, Y. Takezawa, Y. Sugimoto, T. Majima, Y. Amemiya and M. Ando: *J. Synchrotron Rad.* **3**, 305-312 (1996).
- 38) A. F. Huxley: *J. Physiol.* **243**, 1-43 (1974).
- 39) T. Mitsui: *Adv. Biophys.* **36**, 107-158 (1999).
- 40) K. Kitamura, M. Tokunaga, S. Esaki, A. Hikikoshi-Iwane and T. Yanagida: *Biophysics* **1**, 1-19 (2005).

● 著者紹介 ●



若林克三

大阪大学名誉教授，大阪大学基礎工学部
・非常勤講師

E-mail: waka@bpe.es.osaka-u.ac.jp

専門：生物物理学，X線繊維回折，X線
小角散乱，放射光科学

【略歴】

1971年北海道大学大学院理学研究科物
理学専攻博士課程修了，理学博士。大阪
大学基礎工学部助手，大阪大学大学院基
礎工学研究科助教授，教授を経て，
2006年3月定年退官，現在に至る。



杉本泰伸

大阪大学基礎工学研究科機能創成専攻・
助教

E-mail: sugimoto@bpe.es.osaka-u.ac.jp

専門：生物物理学，X線小角散乱・回折，
MD

【略歴】

1997年大阪大学大学院基礎工学研究科
物理系専攻博士課程修了，理学博士。日
本学術振興会特別研究員，理化学研究所
播磨研究所研究協力員，大阪大学大学院
基礎工学研究科特任教員を経て2004年7
月より現職。

武澤康範

大阪大学基礎工学研究科物質創成専攻・
特任研究員

E-mail: takezawa@cheng.es.osaka-u.ac.jp

専門：生体組織工学，構造生物学，生物
物理学

【略歴】

1998年大阪大学大学院基礎工学研究科
物理系専攻博士課程修了，理学博士。日
本学術振興会特別研究員，理化学研究所
播磨研究所協力研究員，大阪大学基礎工
学研究科特任教員を経て2005年4月よ
り現職。



大島勲二

大阪大学臨床医工学融合研究教育セン
ター・特任助教

E-mail: oshima@protein.osaka-u.ac.jp

専門：構造生物学，生物物理学，X線回
折

【略歴】

2006年大阪大学大学院基礎工学研究科
機能創成専攻博士後期課程修了，理学博
士。2006年4月より現職。



松尾龍人

大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専
攻博士課程（高輝度光科学研究センター
・研修研究生），理学修士。

E-mail: tatsu@spring8.or.jp

専門：生物物理学，X線回折，構造生物



上野 豊

産業技術総合研究所脳神経情報研究部門
・主任研究員

E-mail: uenoyt@ni.aist.go.jp

専門：構造生物学，単粒子解析，計算機
応用技術

【略歴】

1987年-1994年帝人株式会社，1996年大
阪大学大学院基礎工学研究科博士課程
修了，理学博士。1996年-電子技術総合
研究所，2001年より現職。2002年-奈良
先端科学技術大学院大学情報科学研究科
客員準教授。

Molecular mechanics and structural changes of the actin and myosin filaments in muscle contraction, studied by synchrotron X-ray fiber diffraction and solution scattering

- Katsuzo WAKABAYASHI** Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531
- Yasunobu SUGIMOTO** Division of Biophysical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531
- Yasunori TAKEZAWA** Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531
- Kanji OSHIMA** The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Institute for Protein Research, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871
- Tatsuhito MATSUO** Division of Biophysical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560-8531
- Yutaka UENO** Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki 305-8568

Abstract Since the crystal structures of motor proteins, actin and myosin head, have been solved in 1990s, the investigations on the muscle contraction have been going into atomic details. In 2000s, those crystal structures of regulatory proteins, tropomyosin and troponin and their complex have begun to be analyzed, and the understanding of the molecular mechanisms of muscle contraction has extensively deepened. X-ray fiber diffraction using synchrotron radiation as an intense X-ray source has played an important role for the progress in muscle research. The use of the 3rd generation synchrotron radiation source has made it possible to study molecular changes using a single muscle cell (fiber) with a 100 μm thickness under the precise control of physiological conditions in a time resolution of several tens μs and with much higher angular-resolution. Nevertheless, it is still important to study the molecular changes during contraction using a whole muscle with high spatial-resolution. We describe the molecular mechanics and structural changes of thin actin and thick myosin filaments in whole muscle during contraction under the isometric conditions, studied by X-ray fiber diffraction and solution scattering. The studies highlight the extensive involvement of the actin filaments in the force generation and regulation in muscle contraction.
