

シンクロトロン放射X線回折による 筋収縮の構造研究

若林 克三

大阪大学 基礎工学部 生物工学科

Synchrotron X-Ray Diffraction Studies on Muscle Contraction

Katsuzo WAKABAYASHI

Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University

Our recent X-ray diffraction studies on muscle contraction and muscle proteins using synchrotron radiation are described. Although unequivocal interpretation on changes in diffraction patterns observed during contraction has not yet been made, our explanation is introduced, emphasizing structural changes of the thin filaments induced by the interaction with myosin heads. Distinct shape change of the myosin heads during a hydrolysis of ATP was detected by small-angle X-ray solution scattering. Discussion is made in relation with energy transduction of muscle contraction.

1. はじめに

筋肉はATPの化学エネルギーを非常に高い効率($\geq 60\%$)で、短縮、力発生と云う一方向の力学エネルギーに変換する巧妙な分子機械である。それはアクチンとミオシンと呼ばれる蛋白質分子によって行なわれている。我々はこの分子機械における素子(蛋白)の動作の仕組み(相互作用)を構造的に明らかにしようとしている。

筋収縮の分子機構に関しては今までに幾つかの

仮説が提案されてきた。そのうち最も先導的であったものはH. HuxleyやA. Huxleyの「ミオシン頭部首振り説あるいは回転説」と呼ばれるものである¹⁾。この仮説によるとミオシンフィラメントから突き出た頭部がアクチンと結合した後角度を変え、この頭部の角度変化がミオシンフィラメントとアクチンフィラメントとの間に滑り運動を生じさせる。また筋肉が張力を発生する時にもミオシン頭部に大きな角度変化が起こり、この力学的

変化が1分子のATPの分解サイクルと1対1に共役するものであった。このような仮説に基づいて、その力学的変化やエネルギー変換の共役性を実験的に検証する試みが多くなされてきた。しかし短縮中や張力発生時にミオシン頭部が角度を変化させるという確固たる証拠は得られず、むしろ角度変化は起こらないとする事実が出されるに至ってきた²⁾。さらに最近の *in vitro* におけるミオシンとアクチンフィラメントの運動の分子計測はATP分解サイクルと力学反応との対応が筋肉が発生する力に応じて変わることを示すなど今までのような説では説明が困難な実験結果が多く出され、筋収縮の分子メカニズムの研究は新しい展開をみている³⁾。しかし「ミオシン首振り説」が否定的になったと云うことは筋収縮にアクチンとミオシンの分子変化が関係していないと云うことを示すものではない。最近アクチン分子とミオシン分子の個々の性質と両者の相互作用の性格が以前にも増して明確にされてきた。これからの筋収縮研究の課題はこれら蛋白質分子の性質が構造とどのように関係しているか、さらには筋肉という組織化された系の中でどのような分子変化を伴った分子間相互作用で力が発生されているかを明らかにすることである。そのためには蛋白質分子の構造的性格を知り、分子構造に基づいた筋収縮機構の詳細な検討が必要となっている。昨年開かれた「生物物理と放射光」国際会議 (BSR92) でアクチン分子とミオシン頭部の高分解能の結晶構造が発表され、そう云った研究が本格的に可能となってきた。筋肉の研究はこの二つの主要蛋白質のアトミックな構造解明でまさに新しい展開期を迎えている。ここでは我々の筋収縮と関係した構造研究を紹介する。

2. 張力発生時のX線回折像

Fig. 1 はカエル骨格筋の両端を固定し短い電気パルス刺激を繰り返し与え、筋肉が最大の張力 ($2.5 \sim 3 \text{ kg/cm}^2$) を発生している時のX線回折像

をイメージングプレートで記録したもので、張力を発生する前の弛緩状態にある筋肉からの回折像と比較して示した。このような収縮は等尺収縮と呼ばれ、ミオシン頭部によるATP分解のサイクルが迅速に進行しているが、あるステップが律速されATPのエネルギーが分子内に蓄積されて筋肉が活性化状態を持続し、強い力を発生している状態である。このときATP分解量に比例してアクトミオシン相互作用による熱発生が起こっている。筋肉の力発生におけるアクトミオシン相互作用を明らかにするためにはこの状態にある筋肉の構造を検討することである。しかしながらまだいろいろと解釈が進められている段階で明確に構造を記述するに至っていない。ここでは今まで行ってきた我々の研究に基づく解釈を述べる。

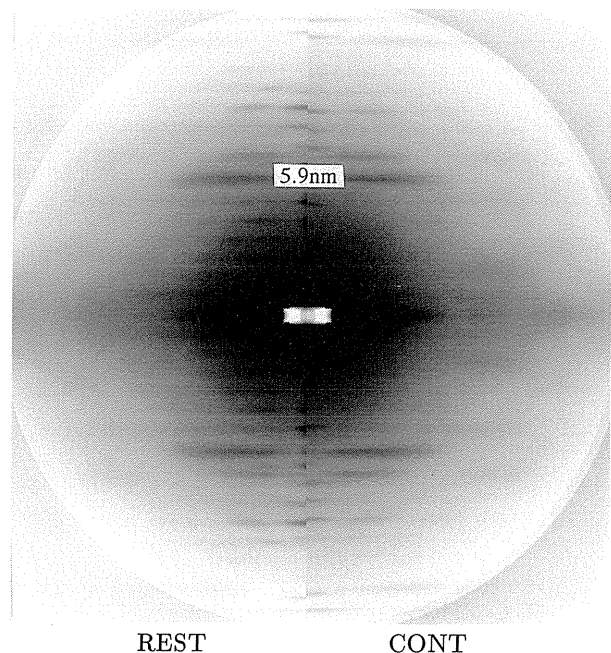


Fig. 1 Comparison of X-ray diffraction patterns in the resting (left) and during isometric contraction (right) from the same frog skeletal muscle recorded with imagig plates by using synchrotron radiation. Background intensities are appropriately subtracted. Half of each two-dimensional pattern is shown with its meridional axis coincided. Fiber axis, vertical. Numbers, spacings of the thin (actin) filament reflections in the axial direction.

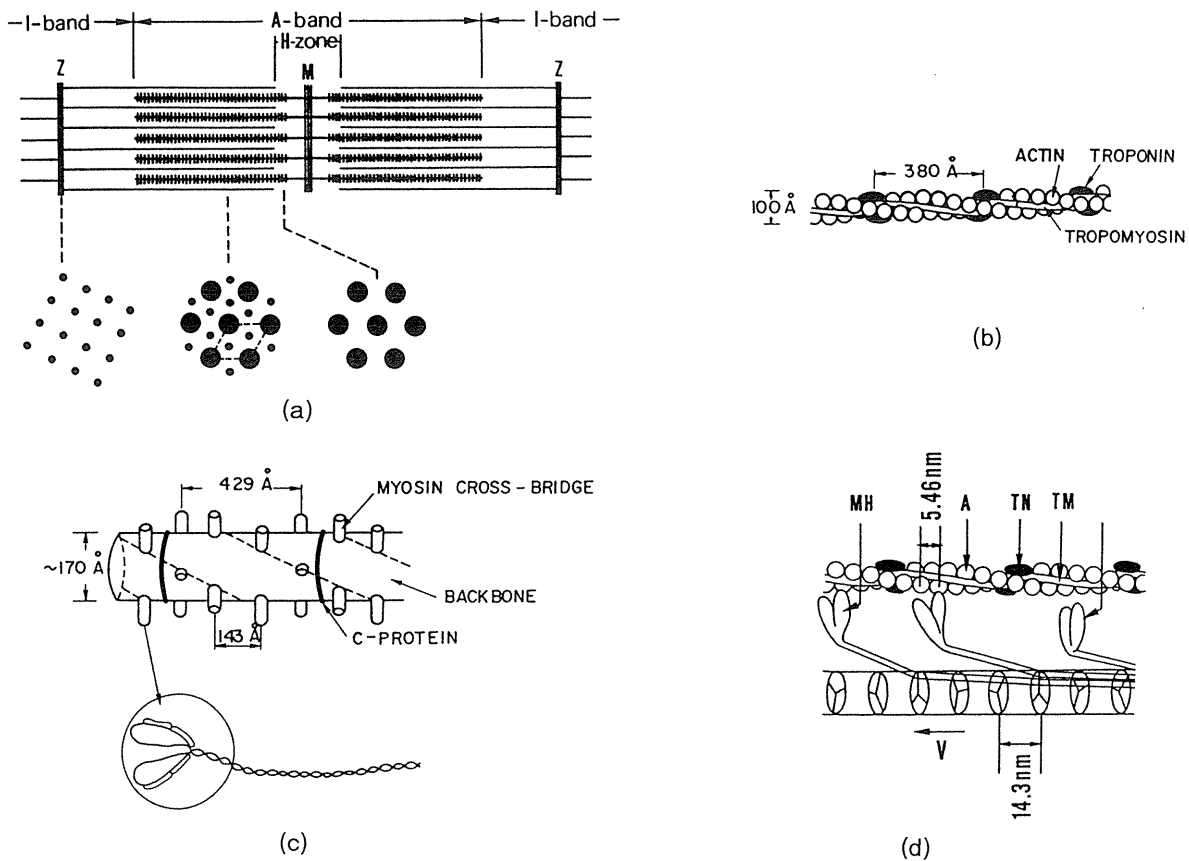


Fig.2 Structure of the sarcomere, the functional and structural unit of the muscle (a). The whole striated muscle is built up from thousands of muscle fibers, each of which has a diameter of $100\ \mu\text{m}$. A single fiber is a cell consisting of many long, thin elements, called myofibrils with a $1\ \mu\text{m}$ diameter. Each myofibril is made up of thousands of sarcomeres, in which two kinds of filaments, thin and thick ones lie in parallel in an interdigitating manner. The filament arrangement in the cross-section of each part of the sarcomere is shown in the lower side. (b) Structure of the thin (actin) filament. (c) Structure of the thick (myosin) filament. (d) Interaction of actin and myosin heads. (Note that the myofibril has a single crystal-like structure, but each myofibril in the single fiber has a different orientation. Thus, the diffraction pattern from muscle corresponds to a rotation diagram from the crystal.)

Fig. 1における弛緩状態の回折像はともにらせん構造をしたアクチンフィラメントとミオシンフィラメント (Fig. 2(b), (c)) のフーリエ変換像で、周期構造の違いから両フィラメントからの反射が分離して観測されている。筋肉の回折像は長軸の周りに円筒平均されている。収縮中の回折像はまさにアクチンとミオシンの相互作用中の構造のフーリエ変換像であるが、依然として両フィラメントに由来する反射が分離した形で観測されてい

る。しかし回折像の変化は著しい。5.9nmと印した反射の内側に存在していた強いミオシンフィラメント由来の層線反射が消え、アクチンフィラメントに由来する層線反射が強くなっている。ただし子午軸上(回折像の中央縦軸)には特に基本周期(43nm)の3n次のミオシン反射が残り、それらの位置を赤道方向(子午軸に垂直な中央軸)に変えて(軸方向の面間隔が長くなる)強度増大している。Fig. 2には両フィラメントの構造を模式的

に示した。弛緩状態ではミオシンフィラメントから軸方向に14.3nm周期の面上で3方向に突き出た頭部（ミオシン頭部）がその骨格の周りにきれいならせん配列をしている(c)。弛緩状態のミオシン由来の回折像はこのことを強く反映している。収縮中にはそのらせん配列を乱してアクチンフィラメントの方へ移動するためミオシンの層線反射は消失する。筋肉の横断面の構造(a)（正確には子午軸に沿って投影した構造）は赤道上に反映されているが、ミオシンフィラメントは六方格子上に配列し、ミオシンフィラメントのつくる三角形の中央にアクチンフィラメントが位置している。筋肉の縦断面の構造(a)はZ膜と呼ばれるしきいで仕切られた筋節と云う単位が直列に結合している。この筋節の中に両フィラメントがそれぞれ極性を持って平行に並んでいる。ミオシンフィラメントが中央に位置し、フィラメントの中央部を境に分子の極性が反転している。アクチンフィラメントは筋節の両側のZ膜から向かい合うように伸びている。アクチンとミオシンの相互作用は両フィラメントが互いに重なりあった部分で起こり、ATP分解反応を行なって互いに力を及ぼす結果(d)筋節が短縮し筋収縮が起こるとされている。収縮中1本のアクチンフィラメントはそれを取り囲む3本のミオシンフィラメントのミオシン頭部から相互作用を受けることになり、赤道反射（六方格子構造によるブラッグ反射）に大きな変化として観測される。その解析から収縮中すべてのミオシン頭部がアクチンフィラメントの周りに移動していることが示された⁴⁾。収縮中ミオシン由来の子午反射が強度を上げて存在している事実はアクチンフィラメントの近傍に移動したミオシン分子が弛緩状態におけるミオシン周期を保ち、フィラメント軸に対して14.5nmの周期でより鋭い分布を持って並んでいることを示す。ミオシン周期は1~1.5%長くなる。これら強度と周期の変化は張力発生の時間経過に先行して起こる。これは収縮中のミオシン分子がアクチンと特有な相互作用パターンを長

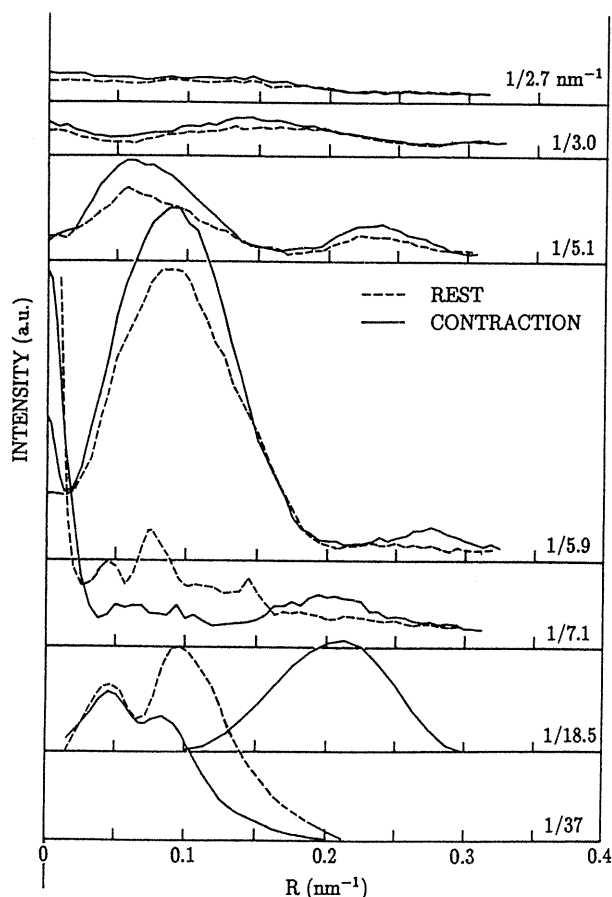


Fig.3 Comparison of intensity distributions of the thin (actin) layer-line reflections in the resting and contracting patterns in Fig.1. Solid line, contracting state. Dashed line, resting state.

周期に形成していることを強く示唆する⁵⁾。さてアクチン反射を見ると、収縮中基本的周期構造に大きな変化はなくまた反射の赤道方向に沿った強度プロファイルにも殆ど変化がない。しかしいづれの反射にも異なる程度に強度増大（1層線を除いて）が起こっている（Fig.3）。これは単にミオシン頭部の結合によるアクチンフィラメントの質量の増加によるものではない^{6, 7)}。これらが収縮中の回折像の特徴で、基本的にはアクチンとミオシンフィラメントの不整合な周期構造を保ったままミオシン頭部はアクチンと相互作用し筋肉の張力発生が起こっている。これは筋肉からATPを除くことによって作られる硬直状態と呼ばれるアクトミオシンの不活性な結合状態とは明らかに異なって

いる。硬直状態にあるアクトミオシンの構造は解析され^{8, 9)}, すべてのミオシン頭部はアクチンフィラメントの対称性に従ってアクチンに強固に(質量の移動を伴う)結合している。その結果硬直状態の回折像では殆どのミオシン反射が消え, アクチン反射はすべて著しく強度増大し, 結合によりフィラメントが太くなることを反映して, 反射の重心が子午軸方向に移動し全体として“梯子状”の回折像となっている。特に2重らせんのピッチに相当するアクチン1層線(～37nm)が子午軸近くで大きな強度を示すのはミオシン頭部がアクチンの2重らせんのピッチごとに単一構造で集団となって結合していることによる。後述するように収縮中には1層線のこのような強度増大は全くない。今まで硬直状態の回折像は収縮中の回折像を解釈する上で基本とされていた。それは等尺収縮における強い力の発生がアクトミオシンのtightな結合によることと, アクトミオシンのATP分解サイクルで硬直状態に対応する過程が含まれているため, 硬直状態に似たアクトミオシンの相互作用を想定していたことによる。そのため硬直状態と似た変化を収縮中の回折像に求められてきた。しかし収縮中アクチンフィラメントに由来する回折像は明らかに硬直状態の回折像とは異なっていて, その全体的様相はどちらかという言い方をすれば, むしろ弛緩状態のものに近いのである。このような違いから少なくとも収縮中のアクトミオシンの相互作用について(アクトミオシンの長周期のパターン形成を別にして)云えることは(1)アクチンとミオシンの相互作用は両者の不整合な構造周期の中で起こっている, (2)ミオシン頭部の相互作用はアクチンフィラメント内にその質量をくい込ませるような形のものでない, (3)相互作用しているミオシン頭部はアクチンフィラメントに対して単一のコンフォメーションをもって配置していない。これらの結果は最近の急速凍結電子顕微鏡による等尺収縮中の構造研究からも指摘されてきた¹⁰⁾。アクチンとミオシンという蛋

白質が相互作用して極めて大きな張力を発生しているにも係らず両者に強固な結合が起こっていると示唆を与えないことは収縮中には硬直状態とは何か本質的に異なる分子間相互作用が関与しているように思われる。

さて収縮中のアクチン反射の強度増大はどのような分子変化によるものであろうか。我々は以下のように考えている。等尺収縮中ミオシンによるATP分解反応と共役してアクチンとミオシン頭部の会合-解離のon-off反応が非同期的に起こっていることが示されている¹¹⁾。従ってミオシン頭部のアクチンフィラメントへの局所的かつ瞬時的な結合が生じていることは事実である。また急速凍結電子顕微鏡写真はミオシン頭部がアクチンの2重らせんにそっていろいろな角度で相互作用していることを示してきた。このことは硬直状態でのアクチンとミオシンの結合部位が収縮中にも使われているとすると, ミオシン頭部は場所的にも, 時間的にもいろいろな向きとコンフォメーションをとってアクチンフィラメントと会合, 解離の反応を繰り返していると思われる。これを回折学的にみると異なる周期を持ってランダムに相互作用しているミオシン頭部とアクチンから散乱されるX線が強く干渉し合っているとは考えにくい。ミオシン頭部がランダムな形(場所的にも時間的にも)で常に相互作用していることによりアクチンフィラメント全体が一様に活性化された状態(on状態の構造)に変わり反射の強度変化が起こされたと考えるのである。前述したようにアクチン反射の強度変化がミオシン頭部の結合そのものによるとする解釈も依然あり, その根拠を求める研究が続けられている。ミオシン頭部の結合は何等かの形でアクチンフィラメントの対称性に従って起こるとするとそれを反映した変化が観測されているはずである。その例として左巻の基本らせんに沿った結合がかなりあるとすると5.9nmアクチン層線反射の子午軸近傍での強度増大が期待される。(層線反射とはそのスペーシングで決まるピッ

チのらせんに沿って赤道面に投影した電子密度分布を反映する。) 我々の観測結果ではこの部分での有意な強度変化を観測していない。また少し異なる挙動を示す右巻基本らせんのピッチに相当する5.1nm アクチン層線反射に注目されてきた。この反射は硬直状態でも子午軸方向に重心のシフトなく強度増大する。収縮中も同様で、又他のアクチン反射に比べて相対的に大きな強度増大を示し、これが収縮張力発生の時間経過に平行して起こる。しかし硬直状態では層線に沿った反射巾が狭くなるのに対し、収縮中には巾に変化がみられない^{6, 7)}。頭部の結合が2重らせんに沿って起こっているとするとこのらせんのピッチに相当するアクチン1層線の強度増加がまた期待される。この反射は骨格筋の場合ミオシンの1層線と癒合した形で存在し、測定は困難であったが両者を分離して調べたところ収縮中強度増大はなく逆に減少していることが明らかとなっている¹²⁾。これは少なくともこのらせんに沿ったミオシン頭部は周期的でないことと単一な向きをもって配置していないことを示している。アクチンフィラメントを4重らせんと見たときのピッチに相当する2層線(~18.5nm)は子午軸からかなり離れた位置で大きな強度増大を収縮中に示す。この変化はアクチンフィラメントに結合しているトロポミオシンの場所的変化とも関係して、1層線の強度減少と相補的に起こる。この二つの低角のアクチン反射の強度変化は収縮中アクチンフィラメントの構造が全体として4回回転対称性を強めていることを示唆している¹²⁾。このような回折像の変化をミオシン頭部の特殊な結合様式によって説明する考えを否定するものではない(両者の干渉(位相関係)と云うことを考えると単純ではない)が現在その描像が浮かばない。我々は前述したようにミオシン頭部との相互作用によってアクチンフィラメントに構造変化が起こされているとして解析を進めてきた。

周知のようにアクチン分子はD Nase Iと云うア

クチン結合蛋白質との複合体の形で結晶解析された^{13, 14)}。我々はすでに公表されているドイツのグループの結果を利用した¹³⁾。それによるとアクチン分子は球状とされていたが4つのサブドメインからなるかなり平たい構造をしている。この構造を使ってアクチンフィラメントのゲル状試料のX線回折像を最もよく説明するアクチンフィラメントの構造モデルがHolmesらによって提案された¹⁵⁾。我々はこのモデルを基本にして、Fig. 3に示したカエル骨格筋からのアクチン反射の強度分布を説明するモデルを検討した。筋肉中のアクチンフィラメントにはトロポミオシン、トロポニンと呼ばれる収縮制御を担う蛋白質が周期的に結合している(Fig. 2)。それらの蛋白質の構造的な特徴から、まず第1近似で、7.2nm以上の広角反射に対してはアクチンフィラメントの構造だけを、低角の反射はトロポミオシンも考慮して最適モデルを構築した¹⁶⁾。(トロポニンは少し周期が異なるので除かれた。) それらをFig. 4に示す。アクチンゲルの回折像に比べて低分解能のデータであるので構成アミノ酸の α -炭素原子の座標だけを使ってそれを直径0.3nmの球で近似し、観測強度データに合うようにモデル計算した。弛緩状態の回折像を説明するモデルとして2つあった。その一つは詳細な構造パラメタは別にしてHolmesらのモデルと基本的に似たもので、アクチン分子の平たい面がフィラメント軸にそうようにしてフィラメントに組み込まれている(Fig. 4)。もう一つの可能なモデルはアクチン分子の平たい面が5.9nmらせんに沿うように配列し、左巻きの基本らせんが強く現われている構造となっている。これはSchuttら¹⁷⁾が別の蛋白質との複合体の低分解能の結晶解析から主張しているフィラメント構造に幾分似たものであった。どちらのモデルがより妥当かはもっと広角のデータをとって検討する必要がある。ここでは最初のタイプのモデルで収縮中の変化の説明を試みた。その結果はフィラメント内でアクチン分子のドメインのわづかな変化の組合せで説

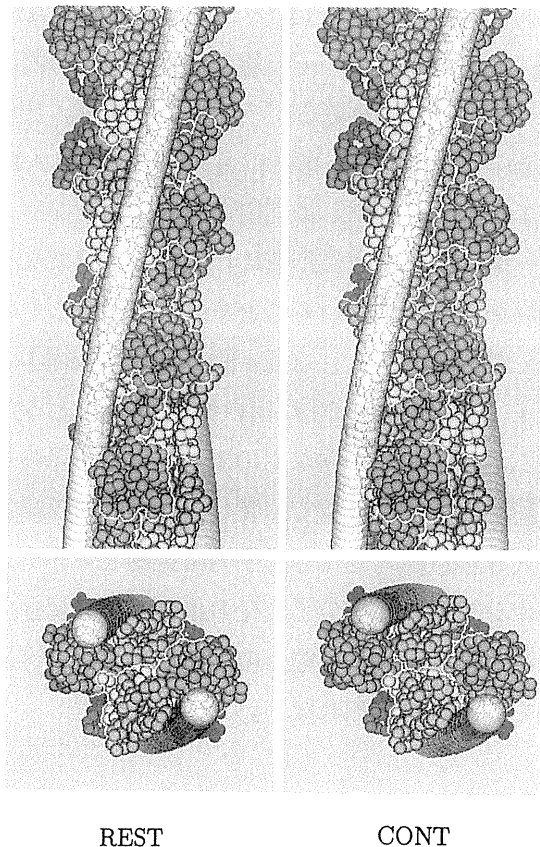


Fig.4 Preliminary models of the actin filaments derived from the rigid body transformation of the α -carbon coordinates of the G-actin crystal¹⁹⁾. Left, a resting model. Right, an active model. In each figure, two cylindrical ropes denote the tropomyosin molecules. Upper, a side view. Lower, a top view. Each actin molecule consists of four subdomains, shown by different colors. Red, subdomain 1; blue, subdomain 2; yellow, subdomain 3; green, subdomain 4. (The numbering of subdomain, after Kabsch et al.¹⁹⁾)

明可能であることがわかった¹⁶⁾。Fig. 4 のモデルではアクチンの1ドメインを約0.2nm下側に、2ドメインを0.3nm上側に、3ドメインを0.3nm外側に移動している。トロポミオシンの最適位置の検討はまだ不十分であるが、収縮中アクチンの変化とともにトロポミオシンはフィラメントの外側に0.5nm位移動し、フィラメント中心軸から少し回転した位置に移動する。それらの結果収縮中フィラメントの凹凸が大きくなり横断面で見るとフィラメントは4回回転対称性を強めている。このよ

うな計算はまだ始めたばかりでさらにいろいろと検討しなければならないが、我々の計算ではミオシン頭部結合による質量の寄与を積極的に考慮しなくても収縮中の変化を説明することが可能であった。

一方ミオシン頭部は等尺収縮中どのような構造変化を起こしているのだろうか。ATPの分解反応と共役してアクチンと相互作用しているのだから何等かの分子変化が起こっているであろう。X線回折像からは赤道反射や子午反射を解析する以外にない。残念ながら赤道の高次反射は収縮中乱れている。ミオシン子午反射はフィラメント軸に垂直に投影した構造を反映しているが、アクチンと相互作用しているミオシン頭部は弛緩状態に比べて平均として14.5nm周期でより鋭い分布になっていることを示す以外個々の頭部の構造については明らかでない。急速電顕によると丸まった構造がよく観察されているようである¹⁸⁾。

3. 短縮中のX線回折像

前節では筋肉が縮じまない条件下で最大の張力を発生している時の構造変化を考察した。一方筋肉が実際に短縮している過程の構造変化を調べることも重要である。短縮中のX線回折は八木ら¹⁹⁾によって最近行なわれた。ここでは上記の等尺収縮中の構造との比較において彼らの結果を少し述べることにする。短縮中のX線回折像は以下のようにして撮られた。まず筋肉に電気刺激を与え等尺収縮させ、発生張力が定常値に達したところで筋肉の一端の固定を瞬時に緩め筋肉が新しい長さで等尺張力を発生するまで無負荷で短縮させその過程からX線回折像を記録した。そのとき筋肉は約4 μ m/sのスピードで短縮している。(筋肉の短縮速度は筋肉にかかる負荷で決まる。)イメージングプレートをコマ送りして短縮前後の等尺収縮時と短縮中の回折像を二次元的に記録し比較した。その結果は短縮中の回折像の全体的な様相は等尺収縮の回折パターンを保つもので大きく変わるも

のではなかった。このことは最大張力を発生している筋肉が張力0で短縮に移行してもアクトミオシン相互作用の基本的パターンはそう大きく変わらないことを示している。しかし個々の反射には明確な変化が観測されている。それらの変化はすべて弛緩状態の方向へ移行するものであった。つまり等尺収縮に比べてアクチン反射の強度もミオシン子午反射の強度と面間隔も減少を示した。これらの変化は短縮が終わって再び等尺収縮(新しい筋長の)に移行すると等尺パターンに戻る。短縮中の赤道反射の変化は等尺収縮中にアクチンフィラメント周りに集まったミオシン頭部の2割位は近傍から離れるがそのほとんどがアクチンフィラメントの近傍に留まっていることを示している。ミオシン子午反射の強度と面間隔の変化は短縮中相互作用しているミオシン頭部はコンフォメーションを変えてアクチンフィラメントの周りで少なからず再配列していることを示す。これらのことは短縮中アクトミオシンの相互作用のモードが等尺収縮時とは少し変わっていることを示し、滑り運動をしていることによって相互作用が弱くなったように見える。これによってアクチンの構造もかなり解消される方向に変化するかあるいは別な方向(構造)に変化しているように思われる。短縮中のミオシン頭部の分子変化は等尺収縮時のミオシン子午反射の強度との違いを詳細に調べることによって見積られるかもしれない。短縮中の回折像の解釈も一義的には行かないが(八木らは少し異なる解釈を行なっている)滑り運動中のアクチンとミオシンの相互作用を考察する上で重要な知見を提供するものであった。急速電顕による短縮中の筋肉のアクトミオシン相互作用パターンは等尺収縮に見られたものとそれほど大きな違いを示していない点も大変興味深い²⁰⁾。これらの知見はミオシン頭部が大きな首振り運動を繰り返して筋肉の短縮を生じさせているのではないことを示唆する。短縮中の筋肉の熱発生²¹⁾(アクトミオシン相互作用そのものによる熱反応)は等

尺収縮におけるものを上回る速度で起こり、ATP分解による供給エネルギー量より大きい。短縮後の等尺収縮時では両者のバランスがとれる。これは短縮中にはミオシン頭部に蓄えられていたATPのエネルギーが小出しに利用されてアクチンパートナーを次々に変え長距離にわたるスムーズな滑り運動が実現されていることを強く示唆するものと考えられている¹¹⁾。X線回折像からも収縮中のアクトミオシンの相互作用は硬直状態のようなtightなものでなく柔軟なものであることを思わせる。前節のモデル計算で示唆したように筋収縮と云う大きな巨視的变化も分子的に見るとアクチンとミオシンの小さな分子変化の積み重ねで起き、これが等尺収縮から短縮へのスイッチングを容易にしているのかも知れない。

4. 筋収縮と関係したミオシン頭部の構造変化

収縮中のX線回折像の変化からミオシン頭部の具体的な構造変化を示すことは今のところ出来ない。最近の急速凍結電顕の技術的向上によりミオシン頭部の形態が見えるようになってきた。これらの研究によると収縮中ミオシン頭部は弛緩状態とも硬直状態とも異なった形をとっているようである。一方過去にX線や中性子線小角散乱法により溶液中でミオシン頭部の活性時の変化が調べられてきたが有意な構造変化がとらえられて来なかった。しかしミオシン頭部はATPを分解する酵素でかつアクチンと結合する蛋白質であり、活性時やアクチンと相互作用している時に構造変化が起こらないとするのは考えにくいことであった。我々は最近徳永らと協力してATP分解中のミオシン頭部(筋肉中のミオシン分子から酵素を使って頭部部分を切断したS1と呼ばれるフラグメントを使う)の構造変化を溶液X線小角散乱法で詳細に調べた²²⁾。散乱曲線のギニエプロット(散乱強度の対数と散乱角の自乗のプロット)の勾配から求まる慣性半径(0蛋白濃度外挿値)で約

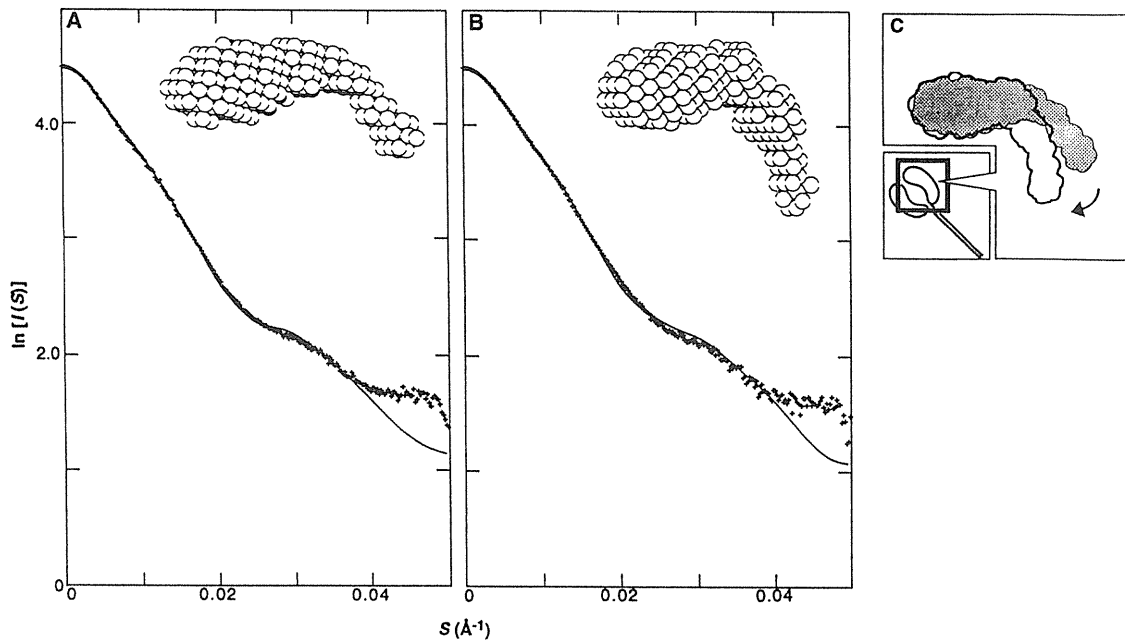


Fig.5 Small-angle X-ray solution scattering curves from nucleotide-free myosin heads (S1) (A) and myosin heads during an hydrolysis of MgATP (B). The best-fit model is shown in each figure. Solid curve in each figure denotes the scattering curve calculated from the model shown. (C) The two head moieties are drawn superimposed on each other by placing the center of the large domain of the (B) model over that of the (A) model. In the active state, the displacement of the small domain was about 4 nm.

0.3nm, 距離分布関数の計算から分子最大長にして約1nm短くなることがわかった (Fig. 6を見よ)。Fig. 5にそれぞれ非活性時(a)とATP分解中のミオシン頭部(b)の散乱曲線の違いを示した。一方結晶切片の電顕写真を使ってミオシン頭部(S1)の3次元再構成(2.5nm分解能)が発表されていたので²³⁾, これを使って観測散乱曲線の変化に一致するような構造のシュミレーションを行なった。その結果, Fig. 5(c)の中に示すように活性時に分子がさらにエビのように曲がってコンパクトになることがわかった。これは電顕で活性時のミオシン頭部が折れ曲がるように見えるといった知見²⁴⁾と対応しているかもしれないが, 筋肉中でどのように生じているかは今後の研究による。我々はこの構造変化がミオシン頭部のATP分解反応のどのステップで起こっているのかをATP分解反応のアナログを使って調べた。その結果を慣性半径

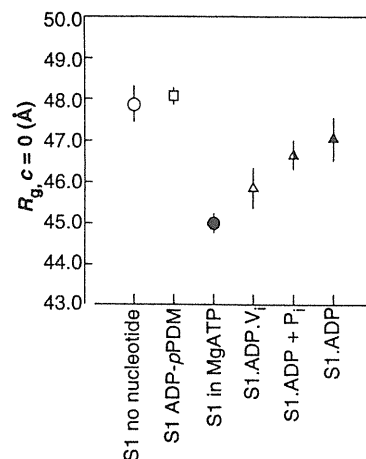


Fig.6 Changes of the radius of gyration (R_g) at zero protein concentration in various nucleotide-bound myosin heads (S1). The R_g denotes the root-mean-square distance of the electrons from the center of gravity of the molecule.) These nucleotide-bound myosin heads mimic the intermediate biochemical states of the ATP hydrolysis by the myosin head.

の変化で示したのが Fig. 6 である。S1.ADP-pPDM とは pPDM と云う試薬で二つのシステイン残基を架橋し分子内にヌクレオチド (ADP) をトラップさせたもので、ミオシン頭部が ATP を結合した直後の構造アナログと云われている。S1.ADP.Vi (Vi はオルソバナジン酸でリン酸と立体構造が良く似ている) はミオシンが ATP を分解しているが分解産物のリン酸 (Pi) を分子内に保持している状態 (S1*.ADP.Pi) のアナログで、S1.ADP とはそのリン酸を放出した状態である。ATP 分解中のミオシン頭部の慣性半径は S1.ADP.Vi のものに近かった。ミオシン頭部の ATP 分解反応の律速段階がリン酸を放出するステップにあるので ATP 存在下ではミオシン頭部は S1*.ADP.Pi の状態として圧倒的に多く存在している。従ってこの状態が他の状態とは大きく構造が異なっている。つまりミオシン頭部は ATP を結合した後分子内で分解するステップで構造変化を起こし、分解産物を放出する過程で元に戻ることを示唆している。これはアクチンがないときであるが、筋収縮に即して云えばミオシン頭部の構造変化はアクチンと強い親和力で結合してパワーstroke を起こすと考えられていたステップ (S1*.ADP.Pi → S1.ADP + Pi) ではなく、分子内で ATP 分解産物を結合したままアクチンと能動的に相互作用する過程で起っている。これらの構造変化をミオシン頭部の ATP 分解反応に伴う熱力学的パラメタの変化と照らし合わせてみることは大変興味深い。これについては別の機会にゆずる。

さて最初に述べたように昨年の夏の BSR92 国際会議でミオシン頭部の 0.3nm 結晶構造解析が Winkelmannらによって初めて公表された²⁵⁾。ミオシン頭部はいかにも力発生に関与する蛋白質らしく (?), α -ヘリックスと β 構造に富む重厚な構造を持つものであった。分子全体は大きな頭部分と少し小さな中央部分と細長い tail 部分からなるドメイン構造を持ち、中央ドメインの中央から tail 部分の末端まで1本の α -ヘリックスが骨格をなして

貫いていた。ADPの結合部位は大きな頭部分のクレフトに存在していると云う。彼らによると活性時のアナログである ADP.Vi 結合ミオシンの構造解析も進めていて、ADP結合ミオシンの位相データを使うと温度因子が大きくなりすぎることから比較的大きな構造変化が活性時に起こる可能性を指摘している²⁶⁾。我々の小角散乱でみた形態変化は ATP 結合部位のクレフトのグローピングないしはその周辺のドメインの動きに関係し、分子内に ATP 分解エネルギーを内部エネルギーとして貯えるのに都合のよい構造への変化に対応しているのかも知れない。S1の原子座標が使えるようになるとさらに詳細な解析が進められる。

5. おわりに

最近の運動アッセイ系を使った研究によると筋収縮を担う最少単位はアクチンとミオシン頭部1個1個の分子であることが示され、ミオシン分子に対するアクチンフィラメントの滑り運動は筋肉のような組織化された系を特に必要としないことも示された。しかし、力発生を有効に行なわしめるには筋肉という系が必要である。滑り運動や力発生と云ったエネルギー変換過程での分子変化を直接‘生のままでみる’には X線回折法が最も有効な手段である。X線回折を使う限りやはり筋肉と云う組織化された系で調べることが能率的である。筋肉はパラクリスタル構造を持ち、筋収縮はこのパラクリスタルの中で生じている。X線回折像はこのパラクリスタルがさらに円筒平均された形になっており、その解析は多くの困難を伴っている。しかしアクチンとミオシン頭部の原子構造が解明された現在それらを有効に利用することによりさらに筋肉の解析を進めていくことができる。収縮中の筋肉の回折像から長周期で形成されるアクトミオシン相互作用パターンとその変化を明確にし、もう少しすっきりした形で回折像の変化を記述することが急務である。アクチン結晶構造を基にしたアクチンフィラメント周囲の静電場

の計算はこれら分子間相互作用のパターンが静電相互作用と強く関係している示唆を与えている²⁷⁾。

一方、放射光を使ったX線回折法の技術も大きな進歩をみている。最近高速TVシステムにより収縮中の筋肉の2次元X線回折像を時々刻々ビデオ撮りに成功している²⁸⁾。マルチポールウィグラーからのさらに強いX線の利用²⁹⁾はここで述べたような研究を単一筋線維のレベルで可能にする。これからの筋肉研究の新しい展開にも放射光科学の発展が果たす役割は今まで以上に大きい。

文献

- 1) H. E. Huxley: *Science*, **164**, 1356 (1969). A. F. Huxley and R. M. Simmons: *Nature*, **233**, 533 (1971).
- 2) 例えば, 柳田敏雄, 松原一郎: *科学*, **53**, 515, 596 (1984).
- 3) 例えば, 石島秋彦, 柳田敏雄: *パリテイ*, **2**, 54 (1992).
- 4) I. Matsubara, N. Yagi and H. Hashizume: *Nature*, **255**, 728 (1975).
- 5) J. Bordas, G. P. Diakun, F. G. Diaz, J. E. Harries, R. A. Lewis, J. Lowy, G. R. Mant, M. L. Martin-Fernandez and E. Towns-Andrews: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.72 (1992).
- 6) Y. Amemiya, K. Wakabayashi, H. Tanaka, Y. Ueno and J. Miyahara, *Science*, **237**, 164 (1987).
- 7) K. Wakabayashi and Y. Amemiya: *Handbook on Synchrotron Radiation*, eds. S. Ebashi, M. Koch and E. Rubenstein, Horth-Holland, **4**, 597 (1991).
- 8) 難波啓一, 若林克三, 三井利夫: *日本結晶学会誌*, **21**, 261 (1979).
K. Namba, K. Wakabayashi and T. Mitsui: *J. Mol. Biol.*, **138**, 1 (1980).
- 9) K. C. Holmes, R. T. Tregear and J. Barrington Leigh: *Proc. Roc. Soc. London*, **B207**, 13 (1980).
- 10) K. Hirose and T. Wakabayashi: *Adv. Biophys.* **27**, 197 (1991).
- 11) 例えば, 柳田敏雄: *科学*, **58**, 477 (1988). 原田慶恵, 柳田敏雄: *日本物理学会誌*, **42**, 424 (1987).
柳田敏雄: *蛋白質核酸酵素*, 別冊「生体超分子システム」(1992)印刷中.
- 12) K. Wakabayashi, H. Tanaka, H. Saito, N. Moriwaki, Y. Ueno and Y. Amemiya: *Adv. Biophys.* **27**, 3 (1991). K. Wakabayashi, H. Saito, N. Moriwaki, T. Kobayashi and H. Tanaka: *Adv. Exp. Med. Biol.* (1993) in press.
- 13) W. Kabsch, H. G. Mannherz, D. Suck, E. F. Pai and K. C. Holmes: *Nature*, **347**, 37 (1990).
- 14) K. Sasaki, K. Sakabe, N. Sakabe, H. Kondo and M. Shimomura: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.29 (1992).
- 15) K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard and W. Kabsch: *Nature*, **347**, 44 (1990).
- 16) Y. Ueno, N. Moriwaki and K. Wakabayashi: *Synchrotron Radiation in Biosciences*, eds. H. E. Huxley et. al., Oxford Univ. Press, (1993) in press.
- 17) C. E. Schutt, U. Lindberg, J. Myslik and N. Strauss: *J. Mol. Biol.* **209**, 735 (1989).
- 18) E. Katayama: *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 751 (1989).
- 19) N. Yagi, S. Takemori and M. Watanabe: *Abstracts of BSR92*, p.76(1992) and *J. Mol. Biol.* (1993) in press.
- 20) S. Tsukita and M. Yano: *Nature*, **317**, 182 (1985). 矢野雅文, 月田承一郎: *現代化学*, **11**, 18 (1986).
- 21) 例えば, 山田武範: *生物物理のフロンティア* (日本物理学会編, 培風館) 第8章 (1989).
- 22) K. Wakabayashi, M. Tokunaga, I. Kohno, Y. Sugimoto, T. Hamanaka, Y. Takezawa, T. Wakabayashi and Y. Amemiya: *Science*, **258**, 443 (1992).
- 23) D. A. Winkelmann, T. S. Baker and I. Rayment: *J. Cell Biol.* **114**, 701 (1991).
- 24) M. Tokunaga, K. Sutoh and T. Wakabayashi: *Adv. Biophys.* **27**, 157 (1991).
- 25) D. A. Winkelmann, I. Rayment, H. Z. Holden and T. S. Baker: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.79 (1992).
- 26) I. Rayment: *Abstracts of International Conference: Muscle as a Machine*, NIH, Bethesda (1992).
- 27) H. Nakamura, S. Nagashima and T. Wakabayashi: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.141 (1992).
- 28) Y. Amemiya, N. Yagi and K. Wakabayashi, T. Oguchi and S. Kishimoto: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.145 (1992).
- 29) T. C. Irving: *Abstracts of BSR92, Tsukuba*, p.148 (1992).



K. Mizutani