3PB037

ホタテ横紋筋トロポミオシンの新しい調製法とその性質
○東原美由紀、矢沢洋一（北海道教育大学大学院理科教専修）
上堂地美佳（北大・院理・生物化学）

Tropomyosin(TM)の調製法は、1948年にBaileyが報告した方法を基本にして改良がなされてきた。すなわち、ethanolとether処理により乾燥した筋肉粉末の1M KClによる抽出物を出発点として、等電点沈殿、硫酸分画を繰り返すことにより、調製していく方法である。今回私達はホタテ横紋筋 natural actomyosin(NAM)から出発する新しいTMの調製法を確定したので報告する。

まず、NAMを40~55%飽和硫酸で沈殿分画して得られたTMを含むmyosin溶液より硫酸を除いた後、遠心分離して得た上清の濃縮によりTMを調製した。

SDS-PEGEによりTMの純度を確認したところ、Baileyの方法により得られたものとよく似たTM以外の数種類の他成分が、少量含まれているのが観察された。このTMをさらにhydroxylapatiteカラムにかけることにより精製TMを単離・調製することができた。

NAMから調製したTMは、Baileyの方法で調製した場合と、同程度の純度のものが数倍の収率で得られることが分かった。

この新しい調製法は、従来の方法と比較して、非常に簡便であり、かつ、より短時間でTMの調製ができる利点を持つ。すなわち、Baileyの方法では、筋肉乾燥粉末の1M KCl抽出よりTMが調製できるまで、3~4日要するのに対して、わずか1日で済むという利点を持つ。その上に収量も数倍高い。

この方法で調製して精製した魚介類をはじめとする各種筋肉TMを用いて、合成 actomyosin の Mg^{2+} -ATPase 活性に対する影響を検討した。

M. Higashihara, Y. Yazawa, M. Kamidochi: The new preparation method of muscle tropomyosin

3PB038

収縮速度-荷重関係に対する摩擦論

○須田 斎（東海大・開発工・生物工）

一般に滑り合う2つの物体間には、摩擦が発生する。筋収縮は、言うまでもなく2つの相補的なタンパク質の滑り合いによっているので、その滑り合い時に否応なく摩擦が発生してしまう。昨年の年回では、荷重に比例するHillの短縮熱を摩擦熱と解釈すると、アクチン・ミオシン間におよぶ分子間結合力が容易に評価できることを述べた。短縮熱発生メカニズムを分子論的に明瞭に理解できる。

筋収縮のメカニズムを明らかにする上で、短縮中のアクチン・ミオシン間結合力がいくらかであるかが重要な物理量になる。短縮熱の摩擦論に基づく分子論的解釈はこれを理論的に評価する1つの糸口となる。本年回では、荷重に対する短縮速度の関係をHillのP-V relationとの比較において議論を行う。

そもそも固体間に作用する普段我々が経験で知っている摩擦は、真実接触面での接触面の結合・解離に依っている。接触面は、筋内ではアクチンとミオシンの界面と見なすことが出来る。筋収縮では、ATPの加水分解反応に伴ってミオシンが結合・解離を繰り返してアクチン上を滑るために、結合・解離の過程が滑り合うことに対する力発生のためだけの必要条件としてしか認識していないが、摩擦論からするとこの結合・解離過程は摩擦発生の根本的な過程なのである。特に解離過程では、その結合部での弾性エネルギーの消失にともなって摩擦力と同時に摩擦熱を発生する。

摩擦機構を考えて導いた分子モーターの滑走速度は、アクチン・ミオシン間の破断力と指数関係にある解離速度定数とユニタリーステップサイズとを掛け合わせたものに等しい。この結論は、筋収縮現象とはまったく異なる地震発生メカニズムの研究から得られた結論と偶然に一致している。地震は、ある結合面で剪断応力に耐えられなくなった瞬間に岩盤の接合面が破断して巨大なエネルギーを解放して大きな災害をもたらす。このとき破断面が滑り合うスビードは破断力と結合距離の関数として表わされ、筆者が得た関係式に一致する。これは、もちろん偶然の一致ではない。筋収縮と地震と同じ発生メカニズム、すなわち同じ摩擦現象として捉えると当然の帰結となる。

H.Suda: Load-velocity relation based on a friction theory.

3PB039

A帯中における単一アクチンフィラメントの張力発生
○鈴木 団、藤田 英明、石渡 信一（早大・理工・物理）

くはじめに> A帯とは筋節中におけるミオシンフィラメントの束のこと、格子構造を保っている。その点でin vitro滑り運動系と異なり、最小の筋収縮系ということができる。in vitro滑り運動系ではイオン強度を上げるとミオシンとアクチンが解離してしまうが、A帯中ではその格子構造故に解離せずに滑り運動する。

<方法>ウサギ腸腰筋をグリセリン処理し、実体顕微鏡の下、ピンセットで筋線維数本の束まで裂き、硬直溶液中でホモジナイズして単一筋原線維を調製する。その後アクチン切断capタンパクであるゲルソリンを用いて筋原線維中の細いフィラメントを選択的に除去する。スライドガラス上のセルに寄せ、ロードミン・ファロイジンラベルしたアクチンフィラメント付きのポリスチレンビーズ（直径1 μ m）を含む溶液（25mMimidazole HCl(pH7.4), 4mMMgCl₂, 75mMKCl, 1mM EGTA, 10mMDTT, 1mMATP, 1mg/mlBSA+酸素除去系、29±2°C）に交換し、光ピンセットを使って発生張力を計測し、蛍光観察した。

<結果と考察>生データを右下図に示す（a.フィラメントがA帯中に入る瞬間 b.ピンセットoff後に滑り込む瞬間）。力の釣合いの平均位置cから、クロスブリッジ1個あたりの平均の発生張力を約0.5 pNと見積もった。この値は筋線維中のものとほぼ一致する。一旦力が釣合ってから一瞬引き戻されたり、またパルス状に変位したりといった運動形態が見られた。今後は発生張力のイオン強度依存性をはじめ、格子構造特有の滑り運動機構を明らかにしていきたい。

M.Suzuki, H.Fujita, S.Ishiwata: Microscopic Measurement of Force Developed by Single Actin Filament in the A-band

3PB040

MgADP 収縮におけるトロポニンC、ミオシン調節軽鎖の制御作用
○藤田英明、福田賢司、佐々木大輔、石渡信一
（早稲田大学・理工学部・物理学科）

【始めに】弛緩条件下（+MgATP、-Ca²⁺）の筋線維にMgADPを加えていくと張力が発生することが知られている（MgADP収縮）。しかし、この張力発生の分子メカニズムやそこの制御タンパク質の調節作用については不明な点が多い。そこで、本研究では筋収縮調節タンパク質であるトロポニンC（TnC）とミオシン調節軽鎖（LC2）のMgADP収縮における役割を調べた。【実験方法】除膜した筋線維をCDTA（Ca²⁺のキレート剤）で処理することによってTnCをほぼ完全に、そしてLC2を部分的に除去することが出来る。今回、この手法を用いてウサギ骨格筋及びウシ心筋中のTnC・LC2の除去と再構成を行い、これらのタンパク質のMgADP収縮特性に及ぼす役割を調べた。【結果と考察】1）ウサギ骨格筋グリセリン筋に弛緩条件下（2mM MgATP、-Ca²⁺）でMgADPを加えていくとS字状に張力が上昇し、最大でCa²⁺収縮の7割程度の張力を発生した（右図：○）。ところが、CDTAで処理することにより張力上昇曲線は双曲線型に変化した（右図：△）。ここでウサギ骨格筋LC2を再構成すると、張力上昇曲線は元のS字型に戻った（右図：□）。同様の結果がウシ心筋でも得られたがMgADPに対する感受性は心筋の方が骨格筋よりも4倍程度大きかった。2）MgADP活性化によって発生した張力は無機リン酸（Pi）を加えることにより急激に減少する。ところが、CDTAで処理することにより張力減少の割合が小さくなった。そこでLC2を再構成すると、もとの減少率に戻った。このような、MgADP収縮特性に対してTnCの有無は影響を及ぼさなかった。これらの結果から、LC2の除去によってミオシンヘッドのMgADPに対する親和性が増加し、かつ、Piに対する親和性が減少していることがわかる。すなわち、LC2の除去によってアクトミオシンATPaseスキーム上のAM・ADP分子種が増加すると考えることができる。今後は筋線維の自励振動現象に対するLC2の役割を調べる予定である。

H.Fujita, K.Fukuda, D.Sasaki, and S.Ishiwata: Regulatory Roles of Troponin C and Myosin LC2 in MgADP-Induced Contraction