1H1700

軟体動物平滑筋のキャッチ状態に必要な構成要素の in vitro アッセイによる解明

○山田 章、吉雄 麻喜、小嶋 寛明、大岩 和弘（郵政省 通信総合研究所 関西先端研究センター）

軟体動物キャッチ筋はエネルギーをほとんど消費せずに張力を維持できる。我々は、このキャッチ収縮の機構を明らかにする為にムラサキイガイ足糸牽引筋から得た筋フィラメントを用いて、このキャッチ状態を顕微鏡下に再構成した。この方法によって、太いフィラメントと細いフィラメントの結合によってキャッチ張力が維持されることを直接証明した（1998 年、生物物理学会第 36 回年会）。今回は、各フィラメントの精製した構成要素を用いた in vitro 系によって、キャッチ収縮に必須な要素を特定した。

キャッチ筋から得た細いフィラメントの代わりにウサギの骨格筋から精製した F-actin を用いてもキャッチ状態は再現された。細いフィラメントの actin 以外の構成要素（tropomyosin など）はキャッチ状態には必要ではない。一方、太いフィラメントの主要要素は、myosin、paramyosin、twitchin、catchin である。このうち myosin と twitchin を精製し、myosin と twitchin からなるフィラメントと、myosin だけからなるフィラメントを得た。前者はキャッチ状態になるが、後者はキャッチ状態にすることができなかった。このことから、太いフィラメントの構成要素のうち、paramyosin と catchin はキャッチ状態には必要ではなく、また twitchin がキャッチ状態において重要な役割を果たしていることがわかった。また、キャッチ状態の結合が、アクトミオシンの結合を強く阻害するパナジン酸によって阻害されることから、キャッチ状態の結合もアクトミオシンの結合であることが示唆された。キャッチ状態の解除に伴って twitchin がリン酸化されるという報告（Siegman, et al., 1997, J. Muscle Res. Cell Motil., 18, 655-670.）を考慮すると、twitchin の脱リン酸化とリン酸化でアクトミオシンの結合が制御されることによってキャッチ収縮が起こるものと考えられる。

A. Yamada, M. Yoshio, H. Kojima and K. Oiwa : Identification of components necessary for the catch state of molluscan smooth muscles by an in vitro assay

1H1730

X 線回折による収縮過程における制御系タンパク質反射の時分割測定

○杉本 泰伸¹、武澤 康範¹、南方 志帆¹、小林 孝和²、伊藤 和輝³、若林 克三¹（¹大阪大・院基礎工、²帝京大・医、³筑波大・応用生物化学）

X 線検出器としてイメージインテンシファイアと CCD を組み合わせた TV システムを用いることで、優れた感度と時間分解能での測定を行うことが可能となってきた。われわれは主として筋収縮の制御機構に注目し、これらのシステムを用いることで特に制御系タンパク質由来の反射に関する二次元時分割 X 線回折実験を行い、その強度変化を調べた。TV システムは CCD の測定モードを変更することで時間分解能、空間分解能および測定領域をさまざまに設定できる。ここでは、50 ミリ秒または 15 ミリ秒での時分割測定を行った。このうち、15 ミリ秒での測定では CCD のサブアレイモードを利用し、筋肉の X 線回折像に対して、測定領域を子午軸近傍の測定だけに限定する代わりにこのようなやい時間分解能を実現した。子午軸上のミオシン、あるいはトロポニン反射について弛緩状態から等尺収縮、伸展という状態変化に対応する強度変化を捉えることができた。特に、筋収縮の制御に関係するトロポニンの反射は基本周期の 1、2、3 次反射の時間変化を測定する事ができた。さらに詳細な解析を行い、筋収縮の制御機構を構造的な見地から検討していく。また、TV システムにおける結果とともに、イメージングプレートを用いたドラム型検出器による同様の実験についても考察する。

Y. Sugimoto, Y. Takezawa, S. Minakata, T. Kobayashi, K. Ito and K. Wakabayashi : Time-resolved X-ray diffraction studies on the regulatory protein-associated reflection of contracting muscle

1H1715

軟体動物平滑筋の活性化過程における 59 Å X 線反射強度の時分割測定

○田嶋 佳子¹、三島 久典¹、牧野 浩司²、若林 克三³（¹都立大・理・物理、²理研・播磨研、³阪大・基礎工・生物工）

等尺性収縮中のムラサキイガイ前足糸牽引筋（ABRM）では、脊椎動物骨格筋の場合とは対照的に、細いフィラメントから生じる X 線小角回折像の 59 Å 層線反射の強度が弛緩状態に較べて減少する。この点をさらに明らかにするために、ABRM の活性化の過程における 59 Å 層線反射強度の時間的変化を調べた。時分割実験は、フォトンファクトリー BL-15A の点収束カメラにイメージングプレート早送り装置をカメラ距離 75cm にセットして行った。ABRM をアセチルコリン溶液（10-3M）で刺激して張力を発生させ、刺激前に 1 コマと刺激開始後の張力上昇中に 7 コマの回折像をそれぞれ 1s の露出時間で 1 枚のイメージングプレート上に撮影した。回折像の強度データから 59 Å および 195 Å 層線反射の積分強度を求め、張力依存性を調べた。収縮状態を特徴付ける 195 Å 層線反射の強度は、張力が最大になったときに弛緩状態の 59 Å 層線反射強度の約 40% に達し、原料が十分に活性化されたことを示す。59 Å 層線反射の積分強度は刺激開始後張力の上昇よりも早く減少する。張力が最大値に達したときには、約 30% の減少が測定された。前回報告したように、等尺性収縮中の ABRM の X 線小角回折像には、硬直状態の X 線小角回折像と共通した特徴が見い出され、アクチンと相互作用するミオシン頭部が細いフィラメントの外側に細いフィラメントの構造周期に従った配置をとると示唆される。しかしながらこれらのミオシン頭部は、硬直状態の場合とは異なり、59 Å 層線反射の強度を減少させるような位置に、すなわち、ピッチ 59 Å の左巻きアクチンラセンの溝の中央付近にあると考えられる。アクチンとそれに結合したミオシン頭部のフィラメント軸方向の位置のずれは、少なくとも、ピッチ 59 Å の左巻きラセン上で隣接するアクチン間のずれ 27 Å よりも大きくなければならない。

Y. Tajima, H. Mishima, K. Makino and K. Wakabayashi : Time-resolved X-ray diffraction studies of the thin-filament 59Å layer-line reflection during activation of a molluscan smooth muscle

1H1745

カエル骨格筋等尺収縮中の細いフィラメント第 1、第 2 層線反射の強度変化

○武澤 康範¹、小林 孝和²、杉本 泰伸¹、若林 克三¹（¹阪大・院基礎工、²帝京大・医）

骨格筋の回折像には 36nm 層線（アクチン第 1 層線）と 43nm 層線（ミオシン第 1 層線）が互いに接近して存在する。高エネルギー研放射光 X 線の高輝度化に伴い収束性の向上したビームを用いて、フルオーバーラップにおけるカエル骨格筋収縮中の X 線回折実験を行った。第 1 層線をいくつかの領域に分けて動径積分して、ガウス関数を導入した最小自乗法によって両反射成分を分離し弛緩状態からの強度変化を測定した。両反射は顕著に分離した内側領域 1（R: 0.020-0.039nm⁻¹）では 38.5nm と 43.8nm の成分に存在した。前者は制御蛋白質の 1 次子午反射と同じ軸方向位置にあり収縮時 58% 強度増大した。後者はミオシン第 1 層線成分と考えられその強度は大きく減少した。次の内側領域 2（R: 0.039-0.063nm⁻¹）では少し高角の 37.4nm にアクチン成分があり収縮時 31% の強度増大を示した。この成分には制御蛋白質とアクチンの両方が寄与すると考えられる。この領域でもミオシン成分（43.6nm）は大きく減少し、内側領域 1 と 2 で減少量は約 90% であった。これらより外側のアクチン第 1 層線のメインピークを含むと考えられる領域（R: 0.063-0.163nm⁻¹）ではアクチン成分（36.7nm）、ミオシン成分（43.6nm）はそれぞれ 55%、71% 強度減少した。さらに外側領域（R: 0.163-0.283nm⁻¹）ではアクチン成分（36.7nm）は 64% 減少したがミオシン成分（43.6nm）は変化しなかった。以上より細いフィラメントの第 1 層線強度は子午軸近傍の狭い領域では増大するが主要な広い領域では減少し、硬直時のような全体的に強度が増大する傾向は観られなかった。メインピーク領域でのアクチン成分の強度減少はノンオーバーラップ筋の活性時にも観られたがその減少量（24%）はフルオーバーラップ筋の収縮時よりも小さい値であった。年会ではこれらの結果に加え細いフィラメント第 2 層線（18.5nm）の強度変化についても報告する。

Y. Takezawa, T. Kobayashi, Y. Sugimoto and K. Wakabayashi : Intensity changes of the first and second thin-filament layer-lines of a frog skeletal muscle during isometric contraction