1P073

筋収縮過程における制御系タンパク質の時分割 X 線回折

○杉本 泰伸¹、武澤 康範¹、南方 志帆¹、小林 孝和²、田中 秀洋³、伊藤 和輝⁴、若林 克三¹（¹阪大院・基礎工、²帝京大・医・生理、³帝京平成短大・生理、⁴筑波大・応用生物化学）

骨格筋収縮の制御系タンパク質に関する構造的な研究のため、収縮過程における時分割 X 線回折測定をトロポニン由来の子午軸反射について行った。X 線回折実験はつくば市の物質構造科学研究所で行い、CCD を用いた 2 次元 X 線検出器により測定を行った。用いた試料はカエル骨格筋で電気刺激により収縮させ、15 ミリ秒の時間分解能で 2 次元時分割 X 線回折の測定を行い、38.5nm 周期のトロポニン子午反射の強度を全収縮過程において求めた。トロポニン一次反射は静止状態から等尺収縮状態でその強度を約 55 % にまで減少させた。二次反射も同様に約 85 % まで強度を減少させた。三次反射は収縮中に強度が 40 % 程度増大した。一方、これらの収縮初期過程における強度の時間変化を見てみると、最大変化量の半分が増大、あるいは減少するためにはトロポニン一次反射では約 120 ミリ秒必要であったのに対し、三次反射では 60 ミリ秒で変化した。張力は一次反射と同様の時間変化を示した。二次反射も一次反射と同様であった。また、刺激終了後のトロポニンの各反射はいずれもいったん強度減少を示したあと静止状態のレベルに回復する。このとき、刺激終了直後の強度減少の時間変化も一次反射と三次反射では異なっていた。

Y.Sugimoto, Y.Takezawa, S.Minakata, T.Kobayashi, H.Tanaka, K.Ito and K.Wakabayashi : Time-resolved X-ray diffraction studies of the troponin-associated reflections during muscle contraction

1P075

心筋 SPOC 周期を決定する因子について

○吉江 方史²、佐々木 大輔²、石渡 信一^{1,2}（¹早大・理工・物理、²生命理工）

心筋・骨格筋を除膜処理し、ATP・ADP・Pi 共存かつ Ca^{2+} 非存在下（或いは低 Ca^{2+} 濃度）という溶媒条件下に置くと、筋節長及び発生張力の自励振動（ADP-SPOC）を生じる。現在、心拍周期と心筋 SPOC 周期の相関等の研究がなされている。だが、SPOC 溶液における条件の違いが心筋 SPOC 周期に与える影響は未だ明らかではない。そこで今回は SPOC にとって不可欠であるリン酸の濃度とイオン強度（IS）の影響を調べた。試料としては、51%グリセリン中で保存したラットの左室乳頭筋を用いた。左室乳頭筋を、実体顕微鏡下でピンセットを用いて幅 100 μm 程度に線維に沿って注意深く裂き、実験に用いた。この試料を TritonX-100 を用いて除膜処理し、ガラス底シャーレ上に長さ約 1mm になるように両面テープで両端を固定した。これに蛍光ビーズを付着させ、顕微鏡下で SPOC を誘起し、観察した。試料に付着した蛍光ビーズは、筋節長振動を反映し同じ周期で往復並進運動する。この周期を解析することにより、心筋 SPOC 振動周期を調べた。そして様々なリン酸濃度・IS の SPOC 溶液を交換していき、それぞれの SPOC 周期を比較した。その結果、心筋 SPOC 周期はリン酸濃度（10~40 mM, IS180 mM）にほとんど依存しないことが分かった。そして IS が高いほど、SPOC 周期が短い（IS 150 mM で 2.6 s、IS 180 mM で 1.6 s）ことが分かった。イオン強度を高めると一般に発生張力が小さくなることが知られているが、このことと SPOC 周期には密接な関係があると我々は考える。即ち、平均の発生張力が小さくなるほど SPOC 周期は短くなると予想する。今後は、それを確認するために、様々な pH や Ca^{2+} 濃度、温度での SPOC 周期を、発生張力を計測しつつ測定する予定である。

M.Yoshie, D.Sasaki and S.Ishiwata : What factors determine the period of myocardial SPOC?

1P074

ノンオーバーラップ筋節長におけるカエル骨格筋活性時のアクチン第 1 層線のスペーシング変化

○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。最近、高エネルギー放射光 X 線の高輝度化によるビームの収束性の向上に伴い、両層線反射は子午軸に近い動径領域では分離できるようになってきた。そこで、本研究ではアクチンがミオシン頭部と相互作用できないノンオーバーラップ筋節長で X 線回折実験を行い、アクチン第 1 層線のスペーシング変化を測定した。試料として食用ガエル半腱様筋を用いた。カメラ長は 2.4m で行った。弛緩状態において試料を筋節長 4 μm まで引き伸ばした。筋節長はレーザー回折により測定した。引き伸ばした試料について、弛緩状態と電気刺激した活性状態の 2 次元 X 線回折像をそれぞれ記録した。活性時、アクチンの左巻き基本らせん由来の 5.9nm 層線反射のスペーシングはほとんど変化しなかった（~0.01%）が、右巻き基本らせん由来の 5.1nm 層線反射のスペーシングは 0.14% 減少した。活性時に 5.1nm 層線のスペーシング減少量が 5.9nm 層線のそれより大きいという結果は以前の我々の報告に一致する（Wakabayashi et al. (1994) Biophys. J., 67, 2422-2435）。アクチンのクロスオーバー周期に対応する第 1 層線 ($R: 0.039\text{-}0.063\text{nm}^{-1}$) のスペーシング変化は -1.10% で、比較的大きい減少量であった。5.1nm, 5.9nm 層線のスペーシング変化から第 1 層線のスペーシング変化を計算すると -0.93 % となり、観測された変化に近い値であった。従って、ノンオーバーラップ筋節長で活性化されたとき、細いフィラメントは右巻らせんを捻るようなアクチンモノマーの角度変化を伴って短縮すると考えられる。

Y.Takezawa, T.Kobayashi, Y.Sugimoto and K.Wakabayashi : Spacing Change of the Actin-based First Layer-line Component of Frog Skeletal Muscles at Non-overlap Sarcomere Length during Activation.

1P076

骨格筋収縮系 SPOC は力学的な外部刺激に同調する

○島本 勇太²、鈴木 団²、安田 賢二³、石渡 信一^{1,2}（¹早大・理工・物理、²生命理工、³東大・院・総合文化）

筋収縮系は、アクチン・ミオシン分子モーターが集合して滑り運動を引き起こす生体運動システムである。筋収縮系は、通常の条件下では、収縮・弛緩の二状態のうちいずれかの状態をとるが、ATP に ADP と Pi が共存し、 Ca^{2+} 非存在下で、第三の状態である自励振動現象（SPOC）が生じる。SPOC は、速い伸長相と遅い短縮相からなる鋸波状のサルコメア長振動現象であり、一定の周期で安定に振動する。一分子では確率的に働く分子モーターが集合することで、自励振動という秩序だった現象を生じることとはとても興味深い。これまで我々は SPOC についての様々な性質を明らかにしてきたが、SPOC の自発的サルコメア振動と、その隣接サルコメアへの振動の位相伝播メカニズムについては解明できていない。SPOC 波の伝播メカニズムについて、SPOC 状態にある各サルコメアは周りからの変位、または張力変化に対して敏感であるために隣接サルコメアの急激な伸長に対して応答するのであるという予測のもと、今回、我々はグリセリン処理ウサギ腸腰筋より調製した筋原線維を用いて、次のような実験を行った。筋原線維の両端を硬さの異なるガラス微小針で保持し、硬い方の針をピエゾによって変位、振動させることで SPOC 振動中の筋原線維に対して変位刺激を与え、それに対する筋収縮系の応答を見た。外部刺激として、方形波、正弦波、ステップ波（立ち上がり時間を変えたもの）を、さまざまな周期、変位で与えた。その結果、SPOC 状態にある筋収縮系は、外部からの急激な伸長、短縮の両方に対して短縮相から伸長相に転移することを発見した。また、筋原線維が持つ固有の SPOC 振動数よりも速い振動刺激に対して、筋収縮系は同調して振動することを見出した。これらの SPOC 特性は、SPOC の分子メカニズム解明のための手がかりを与えるものと期待される。

Y.Shimamoto, M.Suzuki, K.Yasuda and S.Ishiwata : Synchronization of SPOC with external mechanical stimulation