B417

粘菌変異ミオシン G680V - S1 を灌流した骨格筋線維の X 線回折

○岩本 裕之¹、上田 太郎²、片山 栄作³、若山 純一⁴、田村 巧⁴、大岩 和弘⁵、藤澤 哲郎⁴ (¹Spring-8・JASRI、²産総研・ジーンディスカバリー、³東大・医科研、⁴理研播磨研・構造生物化学、⁵通信総研・生体物性)

粘菌ミオシンの変異体 G680V は野生型に比べてアクチン存在下の燐酸解離速度が遅く、ATP 存在下でもアクチンに対し高い親和性を示す。この G680V の S1 を引き伸ばした骨格筋線維に硬直条件下で灌流し、X 線回折像を記録した。この操作により露出した骨格筋線維のアクチン線維に外来の S1 が立体特異的に結合し、各アクチン層線反射を増強する。この強度プロファイルを解析することでアクトー-外来 S1 複合体の構造に関する情報を得ることができる。まず野生型 S1 の場合は第 6 層線反射 ($1/59\text{nm}^{-1}$) がダブルピークで、ADP 添加により回折像が大きく変化するなど、平滑筋 S1 とよく似た特徴が見られた。一方 G680V - S1 の場合は第 6 層線反射がシングルピークで ADP 添加の影響が小さいなど、野生型とは異なる特徴を示した。硬直状態から 0.1 mM ATP を添加すると野生型 S1 はアクチンから速やかに解離し、層線反射の増強が消失した。一方 G680V - S1 の場合、層線反射強度は野生型よりかなり遅く、2 つの指数関数で記述される時間経過で減少した。生化学実験によれば ATP 結合に伴うアクトー G680VS1 の解離過程そのものは速いので、ATP 加水分解後に生じる MADPPi 中間体のアクチン親和性が高いために立体特異的結合が速やかに再形成されることが見かけ上反射強度減少を遅くする原因になっている可能性がある。遅いほうの成分は恐らく解離した S1 が繊維格子外に拡散する過程を反映するのであろう。また温度を 0℃ から 20℃ に上げると反射強度の減少がさらに遅くなり、いつまでも層線反射が残るという一見奇妙な現象が起こるが、これも再形成の速度定数が高い温度依存性を持つと仮定すると説明できる。この現象は高温で硬直状態の S1 が多数見られたという電顕観察とも一致する (第 39 回年会)。

H.Iwamoto, T.Uyeda, E.Katayama, J.Wakayama, T.Tamura, K.Oiwa and T.Fujisawa : X-ray diffraction from skeletal muscle fibers with diffused *Dictyostelium* G680V myosin subfragment-1

B419

ノンオーバーラップ時の骨格筋太いフィラメント由来の X 線子午反射の強度解析：ミオシンクラウン周期の摂動とミオシン双頭構造

○大島 勘二、武澤 康範、清利 麻耶、杉本 泰伸、若林 克三 (阪大院・基礎工)

骨格筋の X 線回折像の子午軸上に観測される 42.9 nm で指数付けされる太いフィラメント由来の反射は、42.9 nm 周期内でクロスブリッジ配列が摂動を受けることによって生じるとされている。これらの反射は太いフィラメントが M 線を中心とする中心対称構造を持つことによってサンプリングを受けている。カエル半腱様筋ノンオーバーラップ時、弛緩状態の筋回折像のこれらの反射に観測されるサンプリング間隔を計測し摂動を受けた領域 (摂動領域) の中心間距離を求めた結果、 $660 \pm 100 \text{ nm}$ となった。ノンオーバーラップ時の生筋の X 線回折像の太いフィラメント由来の子午反射の強度を測定し、太いフィラメントに沿ったクロスブリッジ配列の摂動-規則領域の混在構造とクロスブリッジの双頭構造をモデル化し、モデル計算を行った。最適モデル (図 A) では、フルオーバーラップ時 (図 B) と比べると、摂動領域が約 86 nm 長くなり、内側、外側の規則領域が約 43 nm 短くなった。クロスブリッジの投影電子密度は摂動領域では似ていて、規則領域ではフルオーバーラップ時と違って非対称な分布となった。学会ではミオシンクロスブリッジの原子構造を取り入れて各領域のクロスブリッジの投影電子密度を説明する構造モデルを報告する予定である。

K.Oshima, Y.Takezawa, M.Kiyotoshi, Y.Sugimoto, K.Wakabayashi : Modeling analysis of myosin-based meridional reflections in X-ray patterns from frog skeletal muscles at non-overlap filament length

B418

骨格筋の力発生時におけるミオシンフィラメントの伸びとらせんの捻れ

○武澤 康範¹、大島 勘二¹、清利 麻耶¹、杉本 泰伸¹、小林 孝和²、若林 克三¹ (¹阪大院・基礎工、²芝浦工大・工)

我々は力発生時における骨格筋フィラメントの力学的性質を放射光による 2 次元 X 線回折法を用いて調べている。これまでに力発生時のアクチンフィラメントの伸展性には右巻きらせんが緩むような捻れ変化が関与することを明らかにした。アクチンに捻れ変化が起こる時、ミオシンフィラメントにも捻れの変化が起こるかどうかが明らかにすることはアクトミオシン相互作用を考える上で重要である。本研究では、ミオシンフィラメントの捻れ変化を検出するためにミオシン由来の第 1 層線反射のスペーシング変化を子午反射の変化と共に測定した。弛緩状態で強く存在しているミオシン由来の層線反射は等尺収縮時には子午線上を除き著しく強度減少するが、43nm 層線 (ミオシン第 1 層線) は比較的強く残っており、特に子午線に近い動径領域 ($0.02\text{-}0.03\text{nm}^{-1}$) で軸方向の幅がシャープである。そこでこの領域で動径積分し 43nm 層線のスペーシング測定を試みたが、近傍には制御蛋白質由来 38.3nm 層線が存在するので、ガウス関数を導入したフィッティングによって両反射を分離し重心位置を求めた。弛緩時に比べ等尺収縮時はミオシン分子の軸方向の間隔に由来する 14.5nm、7.2nm 子午反射のスペーシングが平均として 1.3% 増大したのに対し、ミオシン分子を 3 重らせんで捻った時の 1/3 ピッチに相当する 43nm 層線反射のスペーシングはこれら子午反射よりも大きく変化し 2.0% 増大した。これは収縮時ミオシンの右巻きらせんが緩むような捻れ変化が起こっていることを示唆する。この弛緩状態から収縮状態への変化の中には、ミオシンフィラメントが活性化するための、力に依らない変化が含まれる (Takezawa, 1998) ので、力の変化に応じた捻れ変化を明確にするため、さらに収縮中の筋肉に伸長を与え張力を増大させる実験を行った。年会では、以上の実験から得られるミオシンの捻れ変化に関する結果を報告する。

Y.Takezawa, K.Oshima, M.Kiyotoshi, Y.Sugimoto, T.Kobayashi and K.Wakabayashi : Alteration of the helical twist associated with the extensibility of the myosin filaments during force generation of skeletal muscles

B420

Caged ATP 光分解に伴う遅筋型筋収縮蛋白の構造変化の超高速時分割 2 次元 X 線回折

○若山 純一^{1,2}、田村 巧^{1,2}、井上 勝晶²、岡 俊彦²、八木 直人²、岩本 裕之² (¹理研播磨研究所・構造生物化学、²Spring-8・JASRI)

硬直状態にある骨格筋筋線維内で Caged ATP を光分解すると最終的に弛緩するが、その過程はアクトミオシンの解離だけでなく active な張力発生も含んでいる。この active な張力は、ADP 存在下では ADP 非存在下に比べて長時間発生していることが知られている。前回、我々は遅筋型骨格筋筋線維を用いて超高速 2 次元 X 線回折 (時間分解能: 3.4 ms) を行った結果について報告した。今回、遅筋型筋線維を用いたところ、興味深い結果が得られたので報告する。試料はウサギひらめ筋を用い、実験は SPring8 の BL40XU で行った。以前報告したとおり、遅筋型において光分解後張力が硬直レベルから弛緩レベルに低下する時間は 0℃ では、ADP 非存在下で約 100 ms、50 μM ADP 存在下では約 200 ms であり、X 線回折像のうちアクチンに立体特異的に結合したミオシン頭部に由来するとされるアクチン第 1、第 5、第 6 層線の反射強度が弛緩レベルまで低下する時間は ADP 非存在下で約 30 ms、50 μM ADP 存在下では約 40 ms であった。一方、今回測定を行った遅筋型において、張力では弛緩レベルまで低下する時間は ADP 非存在下では約 2 s、50 μM ADP 存在下では約 8 s であったが、アクチン第 1、第 5、第 6 層線は、アクチン ADP 非存在下では約 60 ms、50 μM ADP 存在下では約 90 ms と遅筋型と比べてそれほど大きく変わらない結果となった。Deng ら (Deng et al. Biophys. J., 1994) は、骨格筋遅筋型や心筋など遅い収縮特性を示す筋肉は、ADP 存在下では AM-ADP 状態のクロスブリッジが長時間存在して、これらが細いフィラメントが活性化し、一度解離したクロスブリッジが再結合しやすくなり、この再結合したクロスブリッジが長時間 active な張力を発生すると解釈したが、この X 線回折測定の結果はこれとは異なる張力維持機構が存在する可能性を示唆する。

J. Wakayama, T. Tamura, K. Inoue, T. Oka, N. Yagi and H. Iwamoto : X-ray diffraction of the structural changes of contractile proteins of slow-twitch muscle induced by the flash photolysis of caged ATP