B421

カエル骨格筋強縮中に伸長速度を変化させたときのX線回折像に与える影響

○小林 孝和¹、田中 秀洋²、若林 克三³、武澤 康範³、杉本 泰伸⁴、杉 晴夫⁴（¹芝工大・電気情報系・電子、²帝京短大・看護、³阪大院・基礎工・生物、⁴帝京大・医・生理）

骨格筋には拮抗的に働く筋があり、短縮中のみならず伸長中に対する張力応答機構を調べることは重要である。等尺性収縮張力発生中のカエル骨格筋線維を適度な速度で伸長し、途中で伸長速度を減少すると、伸長に応じて増大していた張力は顕著に減少することが知られる。我々はこの伸長に対し伸長速度感受性をもつ張力応答機構を調べるため、カエル骨格筋を用い高エネルギー加速器機構・放射光施設においてX線回折実験を行なった。ウシガエル縫工筋を、張力トランスデューサとサーボモータの間に接続し、強縮中の筋を定速度(0.15Lo/s)で1.5%Lo伸長した時点で伸長速度を1/2から1/10に減少(0.075-0.015 Lo/s)させ、さらに1.5%Lo伸長した時、およびこの伸張速度を逆にした時の張力応答とX線回折像の子午線反射をX線CCD検出器により15ms毎に記録した。強縮時骨格筋を速い伸張速度(0.15Lo/s)で伸長中に伸長速度を半分以下に減少(0.075-0.015 Lo/s)すると、伸長が継続しているにも関わらず張力が減少し、伸長後半中に再び増加し、その程度は伸長速度が減少するほど大きくなった。3次子午線反射の積分強度変化(I143)は、最初の速い伸張速度で伸長中は急速に減少し、伸張完了後に素速く回復した。続く遅い伸張速度で伸長中は徐々に減少し、伸張完了後は徐々に回復した。一方伸張速度の順序を逆にし、遅い伸張速度(0.015 Lo/s)で伸張中に伸張速度を増加(0.15Lo/s)すると、遅い伸張中には張力は除々増加し、続く速い伸張中には急速に増加し、伸張完了後には大きな応力緩和を示した。I143は、遅い伸張中には始め徐々に増加したが、伸張後半では徐々に減少し始めた。続く速い伸張速度で伸張中は大きく減少し、伸長完了後は半分ほど回復した。3次子午線反射の軸方向における間隔の増大は2%以下であり、両速度の伸長により影響を受けず、収縮が終了すると元の値に戻った。

T.Kobayashi, H.Tanaka, K.Wakabayashi, Y.Takezawa, Y.Sugimoto and H.Sugi：The effect of successive stretches on the X-ray diffraction pattern in tetanized frog skeletal muscle

B423

skinned fiber内水プロトンのNMR横緩和経過に対するPolyethylene glycol(PEG)の効果

○木村 雅子、山口 真紀、竹森 重（東京慈恵会医科大学 生理学第1）

骨格筋組織の水は核磁気共鳴法NMRの横緩和経過によって、少なくとも4つの指数成分に分解される（T2:>0.7, 0.09～0.2, 0.026～0.06, <0.025 sec）。生きた骨格筋ではT2：0.026～0.06 secを持つ成分が浸透圧活性を示し、同成分が収縮中には増加することをこれまでに報告した。以上の結果からこの成分が筋タンパク質間の相互作用に強く関わっていることが期待される。そこで筋タンパク質間の相互作用を高める(Chinn.et.al,2000)とされるpolyethylene glycol(PEG；MW3350,900,200)を用い、筋線維内水プロトンのNMR横緩和経過と張力に対する効果を調べた。ウシガエル縫工筋から作ったskinned fiberでの張力抑制では、PEGは分子量にはあまり依存せず5～10%の狭い濃度範囲でほぼ完全に収縮を可逆抑制した。水プロトンの横緩和経過（Varian Gemini 2000, 300BB, τ =0.25 msecのCPMGパルス）では張力抑制とはほぼ同濃度範囲のPEGが上記の水成分の量と緩和時間を減少させた。この効果は分子量の大きいPEGほど大きかった。以上よりPEG存在下では、張力の抑制に伴って筋線維内水構造に変化が生じること、それはPEGの分子量や濃度に依存することがわかった。PEGが水の構造だけでなくタンパク質そのものにも作用にしている可能性や分布の不均一性の可能性などを考慮する必要があるが、今回の結果は上記水成分の変化と収縮反応との相関を支持するものと考えられる。

M.Kimura, M. Yamaguchi and S.Takemori：Effect of polyethylene glycol on the transverse relaxation of 1H-NMR signals from water in skinned skeletal muscle fibers.

B422

筋原線維近傍の水には、遠達する束縛力が及んでいる

○千葉 允文、竹森 重、大野 哲生、山口 真紀（慈恵医大・生理学第1）

骨格筋線維（タンパク濃度にして133 mg/ml）中の水プロトンのNMR信号の横緩和経過は大きく3つ以上の指数成分に分けられるが、各成分の局在は確立されていない。最も遅い緩和成分は骨格筋周囲の溶液量と共に増減することから線維外水分画を反映すると考えてきたが、線維外にはこの他に線維内にまたがる成分も存在することがこれまでの測定から期待されている。そこで、これらの線維外成分を筋原線維懸濁液のプロトン信号の横緩和から検討した。筋原線維はウサギの腸腰筋をスキンド後ホモジナイズして調製し、遠心により弛緩または硬直液中に1～30mg/mlで懸濁させた。この懸濁液を均一な状態でテフロンチューブに充填し、NMR装置(varian, Gemini 2000, 300BB)でCPMG法によりプロトン信号の横緩和経過を観測した。測定温度は7,20,34℃で行った。筋原線維では、筋線維同様に3つ以上の指数成分が観測された。低濃度では一番遅い成分(T2～0.9 s程)がほとんどだったが、濃度を上げるにつれて二番目に遅い成分(T2～0.2 s)が増し34℃では7mg/ml、7℃では14mg/ml付近で両者の成分が逆転した。濃縮につれて一番遅い成分のT2は短縮し、30mg/mlでは0.6秒(20℃)にまで低下したが、二番目に遅い成分のT2は、濃縮によってほとんど変わらなかった。弛緩液とウシアルブミン溶液5mg/mlのプロトン信号は、20℃でそれぞれ時定数(T2)1.8秒および1.3秒の単一の指数過程を示した。7mg/mlの懸濁液でも筋原線維間距離は2～4ミクロン程度と考えられるから、少なくとも二番目に遅い成分について、筋原線維標本からのクーロン力に由来する分子間力や斥力がほとんど及ばない距離にある水分子でも、温度に依存するかなり強い影響を受けることが分かった。緩和速度が水分子への束縛を反映するなら、筋原線維間にはクーロン力以外の遠達する束縛力が及ぶ事になる。

M Chiba, S Takemori, T Ohno and M Yamagucchi：Strong constraints imposed on water molecules surrounding myofibrils.

B424

原子間顕微鏡による骨格筋筋原線維の選択的分子破断

○萱森 泰輔、三宅 則人、浜崎 淳、秋山 直生、国岡 由紀、山田 武範（東京理科大・理・物理）

【実験目的】我々はこれまで、原子間力顕微鏡(AFM)を使って筋原線維から表面分子を引き剥がすことによって筋原線維の分子構築を調べてきた。その際、ZnOウィスカーをつけたカンチレバーを使うと、およそ数十pNから数千pNの大きさを持つ破断が約3um以内にわたり起こることを報告した。今回はアクチンフィラメントと α -アクチニンが強く結合することを利用して、 α -アクチニンビーズをカンチレバー先端に結合させ、前回と同様、筋原線維表面の破断計測を行ない筋原線維の分子構築をより詳しく検討する。

【実験方法】骨格筋筋原線維は、グリセリン処理ウサギ腸腰筋をブレンダーで粉砕して作成した。分子破断の測定は、原子間力顕微鏡を用い、そのフォースカーブから求めた。カンチレバー先端に α -アクチニンを付着したビーズを固着させた。光学顕微鏡下でカバーガラスに吸着している単一の筋原線維を選択して、カンチレバー先端の α -アクチニンビーズをこの筋原線維の表面に接触させたのち引き上げる。この時得られるフォースカーブから分子レベルでの破断過程を調べた。

【実験結果】フォースカーブには前回と同様な破断の繰り返しが見られたが、今回の破断力は1000pN以内に多くあり、破断が起こった間隔もおよそ1um以内であった。これらの破断がどのような分子破断に相当するのかを調べるために、硬直状態と弛緩状態にある筋原線維、そして筋原線維をCANP処理、トリプシン処理、ミオシンフィラメント溶解などの処理を行なって実験し、得られた結果を比較検討した。この結果から、約400pNの破断を示すものはアクチンフィラメントとZ膜の間での破断、160—300pNのものはコネクチンが関係した破断、また100pNより弱い破断はアクチンフィラメントとミオシンフィラメント間の破断によると考えられる。

T.Kayamori, N.Miyake, A.Hamazaki, N.Akiyama, Y.Kunioka and T.Yamada：Selective molecular ruptures in skeletal muscle myofibrils studied by atomic force microscopy