1P181

骨格筋正常収縮時におけるミオシン結合が細いフィラメントの活性化に果たす役割

○岩本 裕之 (SPRING-8・JASRI)

骨格筋・心筋のトロポニンC(TnC)へカルシウム(Ca)が結合すると、細いフィラメントが活性化されてアクチンへのミオシンの結合が可能になり、収縮が開始する。逆に活性張力を担う active なミオシンのアクチンへの結合は TnC への Ca 結合を増し、細いフィラメントの活性化に貢献することが心筋とフジボ横紋筋で知られている。ところが骨格筋ではミオシンの Rigor 結合が細いフィラメントを活性化することはよく知られているが、active なミオシンの活性化作用については Iwamoto(1998) の報告にもかかわらず、Tesi ら (2002) の筋原繊維を用いた実験のように否定的な見解が多い。そこで骨格筋蛋白を用いた生化学実験からの知見を基にしたモデル計算を行い、骨格筋の active なミオシンの活性化作用の検証を行った。モデルは細いフィラメントにオンオフ、Ca 有無の組み合わせによる 4 種類の状態を仮定したもので新奇なものではない。各状態間の平衡定数から速度定数を決定し、活性化、弛緩、過渡応答時の筋線維の振舞いをシミュレートした。結果は (1) 低 Ca 濃度では TnC への Ca 結合自体が active なミオシンの結合に強く依存すること、(2) 高 Ca 濃度ではミオシン結合によらず TnC は Ca で飽和することを示した。このモデルを用いると Tesi らの実験結果を完全に再現できるほか、Brenner(1988)の張力上昇速度 (ktr) や Iwamoto(1998) の短縮速度の Ca 依存性、また caged ATP、caged Ca 実験など各種 X 線時分割回折実験におけるアクチン第二層線の挙動もよく説明できる。以上から、active なミオシン結合による細いフィラメントの活性化は骨格筋収縮においても重要な役割を担うと結論される。

H.Iwamoto : Role of myosin binding in the thin filament activation in skeletal muscle during normal contraction

1P183

A 帯滑り運動系と制御系タンパク質を用いた自動振動現象発生機構の解明

○鈴木 団、石渡 信一 (早大・理工・物理)

台地状に加工したガラス基板を用いた “*in vitro* 滑り運動系” と、“A 帯滑り運動系” を用いて、横紋筋収縮系で起こる自動振動現象 (SPOC) を調べた。アクチンフィラメント一本にかかる張力を計測し、張力発生の様式を比較した。さらに制御系タンパク質を添加した再構成フィラメントを用いて、制御系タンパク質の効果について検討した。このように筋収縮系の要素を一つ一つ再構成し、張力振動が各段階でどのように発現するかを調べることで SPOC の発生メカニズムを解明することを目的とする。我々の開発してきた A 帯滑り運動系は、筋原線維から直接調製される分子モーター集合体 (A 帯) と、光ピンセット技術・蛍光観察技術によって操作・計測される単一アクチンフィラメントにより構成される。これは、分子モーターがランダムに配置された *in vitro* 滑り運動系と、筋線維・筋原線維系との中間に位置づけられるものである。

まず *in vitro* 滑り運動系で調べたところ、発生張力が不安定で一見振動しているように見えるが、周期性は無かった。SPOC 特有のノコギリ波状の波形 (ゆっくりした収縮と素早い弛緩) も見られなかった。制御系タンパク質を再構成しても同様の波形だった。一方、制御系タンパク質を再構成していない A 帯滑り運動系では、ノコギリ波状の波形を持った張力振動が観察された。しかし振動周期は一定ではなく、広くばらついた。以上の結果から、制御系タンパク質の添加だけでは SPOC は現れないこと、ミオシン頭部の向きと規則的配列がノコギリ波状の波形発生に重要であること、一定の周期を持つ規則的な振動の発生にはアクチンフィラメント一本では不十分で、筋節構造・筋節の直列接続、といった要素が必要であることが示唆された (さらに制御系タンパク質を再構成した A 帯滑り運動系を用いて検討中)。

M.Suzuki and S.Ishiwata : Mechanism of spontaneous oscillatory contraction studied by A-band motility assay system and regulatory proteins

1P182

骨格筋太いフィラメントの摂動構造とクロスブリッジ双頭構造の X 線解析

○大島 勘二¹、武澤 康範¹、杉本 泰伸¹、Thomas C. Irving²、若林 克三¹ (¹ 阪大院・基礎工、² BioCAT, Illinois Inst. Tech)

骨格筋の X 線回折像の子午軸上に観測される 42.9 nm で指数付けされた太いフィラメント由来の反射は、クロスブリッジ配列が 42.9 nm の周期内で摂動を受けることによって生じるとされている。これらの反射はサルコメア内の太いフィラメントの中心対称構造によって繊維軸方向にサンプリングされている。摂動反射のサンプリング間隔からクロスブリッジ配列が摂動を受けた領域 (摂動領域) の中心間距離を求めた結果、弛緩時 840 ± 40 nm、収縮時 1010 ± 40 nm となった。またこれらの反射は筋フィラメントの六方格子構造によって動径方向にサンプリングされている。各々の子午反射の強度に動径方向の反射幅をかけることで、弛緩から収縮時の格子構造の乱れを補正し、得られた補正強度に対してモデル計算を行った。モデルではクロスブリッジ配列の摂動・規則領域の混在構造を仮定し、クロスブリッジの投影構造を 2 つのガウス関数で近似した。最適モデルでは、収縮時摂動領域が約 80 nm

短くなり、内側の規則領域が約 100 nm 長くなった。クロスブリッジ配列の規則周期からのずれは小さくなった。クロスブリッジの投影電子密度は摂動領域では鋭い非対称な分布になるのに対し、規則領域では弛緩時とかなり似た対称な分布となった (図)。

K.Oshima, Y.Takezawa, Y.Sugimoto, Thomas C.Irving, K.Wakabayashi : Modeling X-ray analysis of a perturbed structure of the myosin filament and crossbridge disposition in the relaxed and contracting states

1P184

収縮中の筋に長さ変化を加えたときの x 線反射像の変化

○田中 秀洋¹、小林 孝和²、武澤 康範³、杉本 泰伸³、大島 勘二³、若林 克三³ (¹ 帝京平成短大、² 芝浦工大、³ 阪大基礎工)

カエル骨格筋を等尺性収縮させ、最大張力発生中に筋を非常にゆっくりと伸長した。伸長によって張力はゆっくりと、ほぼ伸張に比例して増大していった。この時の myosin filament 由来の子午線 3 次反射 (M3) の強度変化を調べた。x 線回折実験はつくばの放射光施設 (BL15A) で行った。反射像は 2 次元 x 線 CCD 検出器により 15 ms の時間分解能で記録した。ウシガエル縫工筋を張力 transducer と servomotor の間に接続し、強縮中の筋を非常にゆっくりとした一定速度 (0.015Lo/sec) で 3 % Lo (Lo, initial muscle length) 伸張した。伸張が 1 % Lo くらいまでは伸張に応じて M3 は増加したが、伸張が 1 % を超えるあたりから逆に M3 は減少に変わった。これまでの実験では筋を伸張しても、逆に緩めても M3 はいつも減少していた。そして、この結果に基づいて myosin head は actin filament にはほぼ垂直に結合すると考えられていた [1-3]。筋を伸張しても、開放 (release) しても M3 はいつも減少していたが、その理由は伸張の巾がいつも 1 % を超えていたためであった。そこで収縮筋に振幅が 1 % の正弦波振動を加えて M3 の変化を調べた。筋長の変化が 1 % 以内であるために M3 は加えた正弦波とはほぼ同じように、releasing phase では減少し、stretching phase では増加した。一方、振幅が 1 % 以上の正弦波振動を加えると M3 は releasing phase, stretching phase のいずれにおいても減少し、減少量は stretching phase の方が大きかった [4]。[1] N.Yagi & I.Matsubara, Biophys.J. 45 611 (1984)[2] N.Yagi & K.Wakabayashi, J.J.Physiol. 45 583 (1995)[3] V.Lombardi et al, Nature 374 553 (1995)[4] K.Wakabayashi et al, Biophys.J. 49 581 (1986)

H.Tanaka, T.Kobayashi, Y.Takezawa, Y.Sugimoto, K.Oshima and K.Wakabayashi : The effect of muscle length changes on the x-ray diffraction pattern from tetanized frog skeletal muscle