1P141

アクトミオシン系に於けるアクチン繊維の周辺環境

○島崎 雄介、本多 元 (長岡技術科学大学・生物系)

筋収縮の運動機構に於いてアクチン繊維はミオシンの首振り運動によりミオシン上を滑ることから運動が実現するとされている。これに加え細胞活動でみられるようなアクチン繊維の構造変化により、アクチン繊維も積極的に運動へ関与している可能性がある。もしミオシン分子のATP加水分解で得られた駆動力がアクチン繊維に伝わって能動的に伝達されるなら、そこにアクチン繊維の構造変化が関与しているかもしれない。

今回アクチン繊維の構造変化を観察するためにチオール (システイン 374) に結合し疎水環境下で蛍光するプローブ 2-(4'-maleimidylamino)naphthalene-6-sulfonic acid, sodium salt (MIANS) を用いた。これにより親水性であるとされているアクチン繊維がミオシンと総合作用することにより光るならば構造変化していると判断できる。

MIANSを用いた *In vitro* motility assay で運動観察をした結果 rigor 状態では MIANS が蛍光し、ATP を加えて滑り運動をさせたアクチン繊維は蛍光しなかった。このことから rigor 状態のアクチン繊維は構造変化して疎水性に成っており、滑り運動中のアクチン繊維は親水性で、アクチン繊維とミオシン繊維の rigor 状態と滑り運動中ではアクチン繊維の構造に違いがある事を示唆している。

Y Shimazaki, H Honda: The Environment around the Actin filament in Actomyosin

1P143

原子間力顕微鏡を利用した骨格筋単一筋原線維の直径計測

○浜崎 淳、宮代 大輔、秋山 直生、国岡 由紀、山田 武範 (東京理科大学・理・物理)

【はじめに】原子間力顕微鏡 (AFM) の特性を利用して、生理条件下で骨格筋単一筋原線維の直径の測定を試みた。本研究のAFMのピエゾシステムは、試料表面のnmレベルの凹凸計測用に調節されており、筋原線維のような μm の高さを持つ試料の精密な高さ計測に適していない。そこで、nm精度を持つピエゾシステムをステージに組み込んだ新しい計測系を作成した。この計測によって得られた筋原線維の直径を電子顕微鏡やX線回折による結果と比較検討する。

【装置概要】AFM (オリパス NV2500) を使用し、これに組み込むための超精密可動ステージを作成した。このステージは、ピエゾシステム (PI 社製) によって駆動でき、X 軸 (水平) 方向及びZ 軸 (垂直) 方向に可動距離 $10\ \mu\text{m}$ 、誤差 $\pm 2\text{nm}$ で移動できる。

【測定方法】AFM ユニットによって、試料の上方約 $5\ \mu\text{m}$ に探針を固定した後、ピエゾ駆動ステージによって試料を上方に動かし、探針が試料に接触するまでのピエゾの駆動距離を求めた。同様に、試料に隣接したカバーガラスについても、探針が接触するまでのピエゾの駆動距離を求めた。こうして求めた二つの駆動距離の差から、試料のカバーガラスからの高さを求めた。

【結果】カバーガラスのAFMイメージングによる表面の凹凸は4nm以下であることを確かめた上で、作成した計測系でこのカバーガラス表面の高さ変化を計測した所、表面の凹凸は5nm以下だった。したがって、本計測系の高さ測定誤差は5nm以下であることがわかった。本計測系を使って、弛緩状態での筋原線維の直径を計測したところ $1.212 \pm 0.153\ \mu\text{m}$ であった。この結果は、他の実験方法によって得られた値と近い。同様にして、硬直状態、収縮状態、BDM 存在下の収縮状態での単一筋原線維の直径を測定し、X線回折などの方法で調べられたアクトミオシンの格子間隔データと比較検討する。

A. Hamazaki, D. Miyashiro, N. Akiyama, Y. Kunioka and T. Yamada: Diameter measurements of single skeletal myofibrils by use of Atomic Force Microscope

1P142

骨格筋ミオシン反射の強度解析によるミオシンクロスブリッジの構造と動態

○大島 勘二¹、武澤 康範¹、小林 孝和²、Thomas C. Irving³、若林 克三¹ (¹ 阪大院・基礎工、² 芝浦工大・工、³ BioCAT, Illinois Inst. Tech)

弛緩、収縮中の骨格筋のX線回折像の中で両状態で共通に解析できるミオシン由来の子午軸上の反射の強度解析を行い、フィラメントから突き出たミオシンの突起部分 (クロスブリッジ) の構造とその配列様式の変化をモデル計算によって明らかにした。最適モデルでは、両状態でミオシンフィラメントがクロスブリッジの繊維軸方向の周期が異なる二つの領域からなり、収縮状態で周期の振動を受けた領域が振動のない規則領域に挟まれた。パラメータを細かく動かし、最適モデルの中から子午反射の正確な強度プロファイルに合う高分解能のモデルを探索した。クロスブリッジの構造をS1の結晶構造を用いて表現し、アトミックレベルでのクロスブリッジ構造を導いた。クロスブリッジは弛緩、収縮両状態で各ミオシン頭部が繊維軸に対して異なった方向を向き、投影電子密度が非対称な分布となった (図)。年会では、動径方向のサンプリングを落としたノンオーバーラップ時の層線反射の強度解析を行い、子午反射の強度解析で得られた最適モデルを元にして層線強度データに最適するミオシンフィラメントの3次元の構造モデルを合わせて報告する予定である。

K. Oshima, Y. Takazawa, T. Kobayashi, Thomas C. Irving, K. Wakabayashi: Configuration of Myosin Crossbridges in Relaxed and Contracting Muscles Determined by Intensity Analysis of Myosin-based Reflections

1P144

superfast myosin の構造解析

○山口 眞紀¹、木村 雅子¹、竹森 重¹、仲吉 朋子²、宮川 晋治¹、大野 哲生¹、馬詰 良樹¹、八木 直人³ (¹ 慈恵医大生理学講座1、² 慈恵医大外科学講座、³ Spring-8/JASRI)

superfast ミオシンは肉食動物の咬筋に特異的に発現し、張力は速筋の2倍弱、ATP分解活性は速筋の2~3倍と、獲物の捕捉に適応した高い収縮パフォーマンスを持つが、その構造は未解明である。このsuperfast ミオシンを発現するイヌ咬筋のX線 (Spring8 シンクロトロン放射光、BL45XU) 回折像を取得し、superfast ミオシンフィラメントの構造を解析した。弛緩状態では、イヌ咬筋線維のミオシン第一層線のピーク位置は対照とした速筋線維と比べて子午線に近く、superfast ミオシンでは頭部がロッドから突き出してアクチン側へ変位していることが示唆された。また、ミオシン頭部をATP分解前状態 (M・ATP状態) に固定するとされるNPM処理により、速筋ミオシン第一層線のピーク位置は咬筋のものに近づいた。また咬筋では速筋よりも筋フィラメントのつくる六方格子間隔が広く、筋節長依存性も小さかった。これらのことから、superfast ミオシン頭部はロッドから突き出してアクチン側に変位しており、その化学状態はM・ATP状態である可能性が示唆された。この構造的特徴が、高い収縮パフォーマンスの原因となっている可能性がある。

M. Yamaguchi, M. Kimura, S. Takemori, T. Nakayoshi, S. Miyagawa, T. Ohno, Y. Umazume, N. Yagi: Structure of superfast myosin filament revealed by X-ray diffraction