筋肉の細いフィラメントの高次構造の諸問題

東京大学・理学部
物理学教室 若林 健之

はじめに

筋肉の細いフィラメントに筋収縮の制御蛋白があることが指摘され¹⁾、それがラセン対称性をもつべきであることが論ぜられ²⁾、実際に二重ラセンであることが電子顕微鏡法によって示されて³⁾から既に15年以上になる。

細いフィラメントの主構成蛋白であるアクチン、トロポミオシン、トロポニンは精製され、分子量や分子数比が決定され、ラセン対称性や周期が精密に議論され、細いフィラメントの三次元構造が解かれ、ミオシン・サブフラグメント S_1 との相互作用の様式も見出された。最近になり、甲殻類の筋肉が美しいX線回折像を与えることが見出され、細いフィラメントの構造や硬直状態でのミオシンの結合の様子が詳細に議論されるようになった。

本稿では、これまでの論文のレビューと批判を試み、今後の研究の指針としたいと考える。そこで引用する文献に偏りがあることを予めお断りしておきたい。

I. 細いフィラメントの対称性

大沢と葛西²⁾は、アクチンの重合を解析し、F-アクチンが多重ラセンであることを予見したが、HansonとLowy³⁾はそれが実際に二重ラセンであることをネガティブ染色による電顕像から示し、一例として一周期(約 $360 \text{ \AA}$)に直径 $55 \text{ \AA}$ のアクチン分子が13個～15個あるとした。この結論はそれまでのX線回折像⁴⁾⁵⁾ともほとんど矛盾しないが分子の数、周期など定量的には不一致の点もある。

KlugとBerger⁶⁾による光回折法の導入により、電子顕微鏡像のラセン対称性の解析は飛躍的に進歩した。

Hanson⁷⁾は細いフィラメントが $50 \sim 100 \text{ mM}$ MgCl_2 により準結晶となり、その電顕像の質は画期的に向上した。この準結晶に光回折法が適用され⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ F-ア

クチンが極めて正確に13分子を貫く左巻きの6回転ラセンで表現されることが見出された。しかしこの結果はX線回折像と完全に一致した訳ではなかった。

筋肉の電顕像には古くから長軸方向に約 $400 \text{ \AA}$ の周期が観察され¹¹⁾、細いフィラメント上の周期と考えられてきていた¹²⁾¹³⁾。この周期はX線回折法では約 $385 \text{ \AA}$ の子午線上の反射として観察されていた¹⁴⁾が、それが江橋と児玉¹⁵⁾によって発見されたトロポニンによるものであることは大槻ら¹⁶⁾によって免疫電顕法により証明された。

光回折法によりアクチンとトロポニンの周期性からトロポニンは正確に7分子のアクチンと対応していることが示された⁹⁾¹⁰⁾。更にCa濃度の変化によりトロポニンの周期は $385 \text{ \AA}$ で一定であるが、アクチンの周期は $10 \text{ \mu M}$ 以上では $385 \text{ \AA}$ 、 $1 \text{ \mu M}$ 以下では $360 \text{ \AA}$ に減少する¹⁷⁾。このような変化はアクチンの二重ラセンのひねり方がわずかに変わることによるがその意味は不明である。

周期が $360 \text{ \AA}$ 又は $385 \text{ \AA}$ の場合の選択律はそれぞれ

$$l = 7n + 13m, \quad c \cong 360 \text{ \AA} \quad (1)$$

$$\text{または、} \quad l = 15n + 28m, \quad c \cong 770 \text{ \AA} \quad (2)$$

と表現され、ここで c は真のピッチである。

この選択律の意味はX線回折像または電顕像のフーリエ変換において原点から l/c の距離の所に第1層線が現われ、第 n 次のベッセル函数 J_n でフーリエ係数を表現できるということである。

一つの層線に絶対値の近い次数のベッセル函数が寄与する場合、電子顕微鏡像からの三次元再構成¹⁸⁾は困難さを増す。式(1)の場合、第3層線上では J_6 と J_{-7} が重なり合い、第11層線上では J_{-6} と J_7 が重なり合うが、式(2)の場合はそのようなことは生じないので、高Ca濃度でのアクチンの対称性の方が構造解析には好都合であろう。

II. トロポミオシンのシフト

トロポミオシンのシフトはステリックブロック仮説

On the quaternary structure of thin filament of muscle

*Takeyuki Wakabayashi (Department of physics, Faculty of Science, University of Tokyo)

とは同時に予想されたので同一視されやすいが別の事柄である。これはX線回折像の解析とモデル計算によって提起され、^{20) 21) 22)} 電顕像からの三次元再構成からもっと直接的に証明された²³⁾ がその内容は実はかなり異なっているのではや詳しく述べたい。

事の起りは、Hugh Huxley が蛙の骨格筋の“アクチン”層線を、静止筋と硬直筋で比較した際、後者では約180 Åのピッチの層線が強くなって観察できたが、前者ではみえないことを指摘したことである。^{24) 25)} Huxleyはこの強度変化を細いフィラメントの江橋モデル²⁶⁾に基づいて考察し、硬直時はトロポミオシンはアクチンの溝におさまっているが、静止時は溝から外へ出てくると考えた。更にVibertらは、^{27) 28)} 平滑筋からの美しいX線回折像を得て、その“アクチン”層線の強度が静止時は第3層線の方が第2よりも強く、硬直時はそれが逆転することを示した。このデータに基づきモデル計算をしてトロポミオシンがシフトするとしたのが前述の文献^{20) ~ 22)}である。

このモデル計算にはいくつかの暗黙の仮定があった。ミオシンの“アクチン”層線への寄与を無視したことである。これは静止筋ではアクチンとミオシンがおそらくは離れているので問題は少ないが、硬直筋ではミオシンのうちの有意の部分がアクチンと結合しているであろう。第二はトロポミオシンは滑らかなラセン状分子であり、アクチンを球と仮定したことであるが、これは大ざっぱにトロポミオシンの位置をみつめる目的には妥当な仮定といえよう。最近になって甲殻類の硬直筋のX線回折像が多く報告されているが、^{29) 30) 31)} 第2層線(約180 Åピッチ)の強度増加はとてもトロポミオシンの移動だけでは説明できないと思われる。X線回折像の質の向上のため、皮肉にもモデル計算が必要とする以上にデータの強度がふえてしまったのである。

一方、電顕像からの三次元再構成により細いフィラメントの江橋モデルを証明し、ひいてはトロポミオシン・シフトをも直接的にみようとする努力がHuxley研でなされた。まずMooreら³²⁾はアクチンと天然の細いフィラメントの構造を解き、後者には前者にない余分があることを見出し、おそらくトロポミオシンであろうとした。彼らは天然の細いフィラメントにミオシンのサブフラグメント1を結合させた複合体の構造も解いたがこれは後に述べたい。Spudichら¹⁰⁾はMooreらのアクチンの純度に疑いをもち、精製したF-アクチンの構造を解いた。分解能は向上したが本質的な違いはなかった。Spudichらは精製アクチンに活性トロポ

ミオシン(実はトロポミオシンとトロポニンの複合体のこと)を加えた複合体のCa存在下での構造をとき、Mooreらの余分を確認し、これはやはりトロポミオシンと解釈できると考えた。次にSpudichらはCa不在下での構造を解こうとしたが良い準結晶が得られず果たさなかった。若林ら²³⁾はMooreらの余分が本当にトロポミオシンでありトロポニンではないとを証明するため、精製アクチンと精製トロポミオシンの複合体の構造をとき、確かにそうであることを証明した。しかしこの証明にもまだ問題は残っている。それはアクチン-トロポミオシンとアクチンの構造の差を即ちトロポミオシンと解釈する際には、アクチンの構造がトロポミオシンにより変化しないことを前提にしていることや、トロポミオシンが加わった時構造がきちんと対称性がよくなり以前ばやけてみえなかったものが見えるようになった部分をトロポミオシンと誤認する可能性も零とは云えないからである。しかし、差構造をすべて上記のようなアーテファクトに帰するのも無理であり、トロポミオシンがアクチンの溝にあるとする江橋モデルの証明にはなるであろう。若林らは更にアクチン-トロポミオシン-トロポニンT-トロポニンIの複合体の構造を解き、トロポミオシンが約10 Åシフトしていることを示した。²³⁾

図1(a), (b)を比較するとトロポミオシンのシフト量は線維軸方向によって異なっており、上記の値はアクチンの重心よりやや上方での断面上での値である。実はアクチンと結合している断面ではシフト量は少なく、アクチンと結合していない高さで最も多くシフトしている点に注意したい。

このような事情はX線回折像からのモデル計算からは全く予想されなかったことであり、モデル計算ではアクチンとトロポミオシンの結合部位が変わることを考え、その変化量を推定しようとしていたのに対し、三次元像再構成法からの結果はむしろ結合部位はほとんど変わらず、非結合部位でトロポミオシンがシフトすることを示したのである。

Ⅲ. ステリック・ブロック仮説

Mooreら³²⁾が細いフィラメントにミオシン・サブフラグメント1を結合させたいわゆる“硬直”複合体の三次元構造を解いたことは既に述べたが、この結果は文献32の図版Ⅷにあるようにサブフラグメントはアクチンの外側にバナナのように結合している。Huxley²⁰⁾-Haselgrove²¹⁾-Parry & Squire型²²⁾のステリック・ブロック仮説は、このサブフラグメントの頭が、アク

(a)

(b)

図1 (a) アクチン-トロポミオシンおよび(b) アクチン-トロポミオシン-トロポニンT-トロポニンIの三次元像。断面の間隔は5 Å, 分解能は動径方向に15 Å, 縦軸方向に45 Å。球状にまとまった部分をアクチンの主体と解釈し, 縦軸清にのびた部分の大半をトロポミオシンと解釈している。トロポミオシンのシフトがアクチンと結合していない部分で著明であることに注意。

チンの溝の方にまわりこんでいることに目をつけ、もしもトロポミオシンが、アクチンフィラメントをZ-膜から遠い側の端からみたとき反時計回りにシフトすればアクチン-ミオシンの安定な結合を立体障害的に妨害するだろうとするものである。この仮説にもいくつか問題がある。

一つはトロポミオシンがどちら回りに回るのかが未だ決定していないことである。我々はZ-膜に付いている天然の細いフィラメントの構造を解いて、トロポミオシンの位置の決定を試みているが一定なる結果は得られていない。またアクチンの分子の形に方向性があることに着目して、これを目標に方向性を求めこれからトロポミオシンの位置を間接的に決定しようとしており、予備的な結果はトロポミオシンが反時計回り（弛緩の時）に回ることを示すが、データの質が悪く、結論は保留したい。O'Brien³³⁾はトロポミオシンは反対側にあるので、ミオシンをブロックできないと報告しているが、データの質は不明である。

実はもっと重要な問題がある。それはMooreらが解いた構造は“硬直”状態に対応するものであり、その場合、Caの有無にかかわらずミオシンはアクチンに結合できるのである。そこで実はトロポミオシンが単にステリックにミオシンをブロックするのであれば、Caの不在下では“硬直”結合ができないはずであり、自己矛盾を犯していると思われる。そこでミオシン・ADP・ P_i がアクチンに結合するときは、別の結合の仕方をするのであり、その場合はトロポミオシンでブロックされると云いなおさなければならない。しかしこれには何の証拠もないのである。

もう一つの問題点はMooreらの三次元再構成像の質と結果の解釈であろう。

サブフラグメント付きの細いフィラメントの光回折像は線維軸方向は第6層線までしかみえていない。これは試料を膜孔の上で、負染色剤のみで包埋し、この負染色剤が破ぶれ線維軸方向に縮んでしまったことの結果かもしれないが、アクチンの場合には存在した第7および第8層線がみえなくなっていることは気にかかる。

三次元再構法の一つの泣き所はラセン対称軸の付近の構造、即ち半径の小さい領域の構造を明らかにするには外側の構造を明らかにするのに較べて高い分解能を必要とすることである。Mooreらの場合、F-アクチンの重心までの半径は20 Åであり、細いフィラメントはサブフラグメントの有無に関係なく約35 Åであり、その違いが単に後者におけるフラットニングの為と言

い切れるかどうか疑問が残る。X線回折像¹⁴⁾からのアクチンの重心までの距離は約25 Åである。そしてアクチンとミオシンが“硬直”状態では強く相互作用していることが予想される以上、それぞれを区別して解釈するには高い分解能が必要であろう。またサブフラグメントの解釈をする場合、細いフィラメントの構造と比較することになるが、その際二つのモデルをどのような方向において比較すべきなのかは現在細いフィラメントの方向性が不明なので分からないし、Mooreもそれを明記していない。

おわりに

ステリック・ブロック説は明快な魅力的な説ではあるが仮りにトロポミオシン・シフトを受け入れたとしてもいくつかの問題点があることを第3節で述べた。それではトロポミオシン・シフトは万全かというところではない。例えばアクチン-トロポミオシン-トロポニンにおけるトロポミオシンの位置がCaで変化するという証明はまだないからである。

ステリック・ブロック説に肯定的データも否定的データもかなりの量だとされているが、決定的なものはまだないようである。Hugh Huxley自身も作業仮説としての役割りを強調している。

振り返ってみると、知見の前進は新しい蛋白質の発見、新しい試料作成法そして新しい技術の導入の成功の時に生じている。電子顕微鏡法の改善、ストーレージングから放射されるX線ビームの利用などはその候補と云えよう。

我々は現在チャンネルプレートで電子顕微鏡内に組み込むことにより、電子照射による像劣化を最小化する努力を行なっている。電顕像の質の向上を図り、アクチン分子の向き、トロポミオシンのシフトの方向そしてアクチンとミオシンの相互作用の様式を明らかにし、これまでの説にとらわれない態度で結果を解釈する様に努めたい。

文 献

- 1) Ebashi, S., (1963) Nature 200, 1010.
- 2) Oosawa, F., Kasai, M. (1962) J. Mol. Biol. 4, 10-21.
- 3) Hanson, J., Lowy, J. (1963) J. Mol. Biol. 6, 46-60.
- 4) Selby, C.C. & Bear, R.S. (1956) J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 71.
- 5) Worthington, C.R. (1959) J. Mol. Biol. 1, 398-401.
- 6) Klug, A., Berger, J.E. (1964) J. Mol. Biol. 10, 565-569.
- 7) Hanson, J. (1968). In Budapest Symposium on

- Muscle (Ernst, E. & Straub, F.B. eds) p. 99 Akademiai Kiado, Budapest.
- 8) O'Brien, E. J., Bennett, P.M. & Hanson, J. (1971) Phil. Trans. Roy. Soc. (ser. B) 261, 201-208.
 - 9) Ohtsuki, I. & Wakabayashi, T. (1972) J. Biochem. 72, 369-377.
 - 10) Spudich, J.A., Huxley, H.E., Finch, J.T. (1972) J. Mol. Biol. 71, 619-632.
 - 11) Hall, C.E., Jakus, M.A., Schmitt, F. O. (1946) Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole, 90, 32-50.
 - 12) Carlsen, F., Knappeis, G. G., Buchthal, F. (1961) J. Biophys. Biochem. Cytol. 11, 95-117. 1
 - 13) Page, S. G., Huxley, H. E. (1963) J. Cell Biol. 19, 369-390.
 - 14) Huxley, H. E., Brown, W. (1967) J. Mol. Biol. 30, 383-434.
 - 15) Ebashi, S., Kodama, A. (1965) J. Biochem. 58, 107-108.
 - 16) Ohtsuki, I., Masaki, T., Nonomura, Y. Ebashi, S. (1967) J. Biochem. 61, 817-819.
 - 17) Gillis, J. M., O'Brien, E.J. (1975) J. Mol. Biol. 99, 445-459.
 - 18) DeRosier, D. J., Klug, A. (1968) Nature 217, 130-134.
 - 19) Klug, A., Crick, F.H.C., Wyckoff, H.W. (1958) Acta cryst. 11, 199-213.
 - 20) Huxley, H. E. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 361-376.
 - 21) Haselgrove, J. C. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 341-352.
 - 22) Parry, D. A. D., Squire, J. M. (1973) J. Mol. Biol. 75, 33-55.
 - 23) Wakabayashi, T., Huxley, H. E., Amos, L. A., Klug, A. (1975) J. Mol. Biol. 93, 477-497.
 - 24) Huxley, H. E. (1971) Amer. Biophys. Abstr. p. 235
 - 25) Huxley, H. E. (1971) Biochem. J. 125, 85P
 - 26) Ebashi, S., Endo, M., Ohtsuki, I. (1969) Quarterly Rev. Biophys. 2, 351-384.
 - 27) Vibert, P. J., Haselgrove, J. C., Lowy, J., Poulsen, F. R. (1972) Nature New Biol. 236, 182-183.
 - 28) Vibert, P. J., Haselgrove, J. C., Lowy, J., Poulsen, F. R. (1972) J. Mol. Biol. 71, 757-767.
 - 29) Wray, J., Vibert, P., Cohen, C. (1978) J. Mol. Biol. 124, 501-521.
 - 30) Namba, K., Wakabayashi, K., Mitsui, T. (1978) 6th Int. Biophys. Cong. Abstr. p. 381.
 - 31) Maeda, Y., Matsubara, I., Yagi, N. (1979) J. Mol. Biol. 127, 191-201.
 - 32) Moore, P. B., Huxley, H. E., DeRosier, D. J. (1970) J. Mol. Biol. 50, 279-295.
 - 33) O'Brien, E. J., Morris, M. P., Seymour, J. V., Couch, J. (1968) 6th Int. Biophys. Cong. Abstr. p. 311 (1979年4月10日受理)

54年度 編集実行委員

委員長 浅 野 朗 (阪大・蛋白質研究所)
副委員長 森 島 績 (京大・工・石油化学)

飯 尾 隆 義 (名大・理・物理学)	奥 田 賢 三 (大阪工大・一般教育・数理生物)
池 村 淑 道 (京大・理・生物物理)	品 川 嘉 也 (京大・医・生理学)
今 井 清 博 (阪大・医・生理学)	中 岡 保 夫 (阪大・基礎工・生物工学)
今 本 文 男 (阪大・微生物病研究所)	中 西 守 (東大・薬・薬品物理化学)
植 木 龍 夫 (阪大・基礎工・生物工学)	丹 羽 太 貫 (京大・医・放射線基礎医学)
岡 村 圭 造 (京大・農・林産工学)	村 山 公 一 (滋賀医大・第二生理学)

(五十音順)