骨格筋アクトミオシン反応の「第三の中間体」と その役割

帝京大学医学部 岩本裕之

The low force actomyosin complex, formed prior to force generation in skeletal muscle, has characteristics distinct from those of conventional weak- or strong-binding complexes and therefore constitutes a third class of intermediate in the ATPase reaction. Its dual strain sensitivity enables the muscle to resist an externally applied stretch by isomerizing to a force-supporting form, while reducing excessive energy consumption during shortening by limiting the number of myosin molecules which enter the force-generating event.

Actomyosin / muscle contraction / low force complex / strain sensitivity / efficiency

1. はじめに

筋収縮とは何か？単に筋肉が力を出す、または短縮することだというのは正確な答えではなからう。筋肉は「力発生」モードと「短縮」モードをもち、この2つをうまく切り替えて、速く走ったり、物を持ち上げたり、姿勢を保ったり、外力に抗して大きな張力を発生したり等、生体の課さまざまな要求に対応しているように見える。このさい必要に応じて筋肉の硬さを変えたり、エネルギー消費速度を調節したりしている。しかも、2つのモード間の切り替えには10ミリ秒程度の時間しか要しない。この臨機応変の調節機能こそが筋収縮の大きな特徴であり、その機構の解明は筋研究の最も重要な課題の一つと言える。さらに、この迅速な調節機能がミオシン・アクチンというわずか2種類の収縮蛋白によって担われている点も見逃せない。筋肉の発生する力学エネルギーはミオシン・アクチン複合体（アクトミオシン）の営むATP加水分解反応に由来するが、調節機能の高さの秘密はどうやらその反応の複雑さにありそうである。実際この反応は多くのステップを含んでいる（文献1その他、図1a）。ステップの多いことは、それだけ調節の行われる機会も多いことを意味する。多様な要求に対応する上で、動物は筋肉に多数の蛋白を動員する代わりに蛋白の種類を限定し、その反応プロセスを複雑にする方向に進化したのであろう。

アクトミオシンのATP分解反応と収縮現象は、どう関連しているのだろうか？図1aのスキームに含まれる反応中間体は、従来ミオシン・アクチン間の親和性の違いから「弱く結合した中間体」と「強く結合した中間体」に大別されてきた。両者は親和性以外にも表1に示すような対照的な特徴を示す¹⁾。ミオシンのアクチンへの結合後、ATP加水分解産物の無機磷酸（Pi）はミオシンから離れていくが、このとき「弱く結合した中間体」が「強く結合した中間体」に転換され、同時に収縮力も発生すると考えられてきた。ミオシンが筋繊維の短縮を促す方向に変形して力学エネルギーを放出し、最終的にアクチンから解離すると一回の力発生イベントが終了する。この過程でミオシンはADPを放出してATPを再結合する。この考えではATP分解と力発生イベントが1:1対応している。ADPの放出は恐らくミオシンの短縮方向への変形とカップルしている。変形が許される条件（短縮中）では速い反応と考えられる。したがって短縮中のATP分解（エネルギー消費）速度は高く、時間平均したミオシン1分子あたりの力は小さい。一方変形が制限された状態（長さ一定＝等尺性条件下）ではADPの放出が抑えられ、ATP分解速度は低く、ミオシン1分子あたりの張力が大きくなる。前者が「短縮」モード、後者が「力発生」モードというわけだが、両者の間が連続的なのは言うまでもない。

Low force actomyosin intermediate of skeletal muscle and its role in contraction

Hiroyuki IWAMOTO

Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University

図1 アクチンATP加水分解反応スキーム。(a) 従来の反応スキーム。文献1その他のものを要約した。(b) 筆者の提唱する反応スキーム。A, M, Piはそれぞれアクチン、ミオシン、無機磷酸を示す。[]で囲ったのはそのステップを加速する因子。

表1 弱く結合した中間体と強く結合した中間体の性質の比較。

	強力をサポート	アクチン・ミオシン間の結合解離	regulated actinの活性化	ミオシン頭部のμsオーダーの回転
弱く結合した中間体	しない	速い	しない	示す
強く結合した中間体	する	遅い	する	示さない

さて、筆者は「弱く結合した中間体」が「強く結合した中間体」に変換される前に、両者のいずれとも異なる第三の中間体を経由すると主張している^{2), 3)} (図1b)。筆者はこれを「力を出さない中間体」と呼び、これが筋肉の機能を調節する上で重要な役割を演じると考えている。実際あとで述べるように、「力を出さない中間体」の存在を考えると従来説明が困難だった実験事実もうまく説明できるのである。以下に、「力を出さない中間体」の性質と筋収縮に対する意義を解説してみよう。

2. 「力を出さない中間体」の基本的性質

X線赤道反射強度や筋肉の硬さ（スティフネスと呼べば、結合したミオシンの数の指標として用いられる）の測定結果^{4), 5)} から、張力発生に先立ってミオシンがまず力を出さない形でアクチンに結合することは以前から推測されていた。このアクチンミオシンの形態は筆者の主張する「力を出さない中間体」と恐らく同一のものである。しかし、このアクチンミオシンの形態は単に「弱く結合した中間体」そのものと見做されたり、あるいはスティフネスを示すだけの理由で「強く結合した中間体」と見做されたりして、その性質は十分に調べられていなかった。そこで、細胞膜を取り除いたウサギ骨格筋繊維を用いて「力を出さない中間体」が増加するような2つの条件で実験を行なった結果、この中間

体が「第三の中間体」と呼ぶにふさわしいユニークな性質を持つことが分かったのである。

「力を出さない中間体」が増加する条件とは、1つは無機磷酸 (Pi) の添加で、もう一つは短縮中である。前者は力発生のステップの平衡を逆方向に移動させ、後者は短縮が「強く結合した中間体」の解離を加速する結果、力発生前の中間体が蓄積すると予想される。スティフネスの測定結果は、これらの条件下で張力が下がる割には結合したミオシン数が減らないことを示している。

2.1 高周波粘弾性

このように「力を出さない中間体」が豊富に存在する条件では、筋繊維に500Hz程度の高周波の正弦波振動を加えたときの力学応答に粘性成分が増加する^{2), 3)}。高周波域の粘性は、「弱く結合した中間体」のようにミオシン・アクチンが速い結合解離を繰り返す⁶⁾ ときに観察される。しかしミオシン・アクチン間の解離は遅いので（後述）、粘性はむしろミオシンがアクチンに結合したまま速い構造揺らぎを繰り返すために生ずると考えた方がよい。電子スピン共鳴法を用いれば、ミリ秒以下の分子回転を観察できるだろう。

2.2 伸長に対する力学応答

Pi存在下または短縮中の筋繊維を突然引き伸ばすと、伸長前の張力レベルの割に大きな力学応答を示す^{2), 3)} (図2)。引っ張りに対しては「力を出さない中間体」も

図2 定速伸長に対する筋線維の力学応答。(a) コントロール、(b) 20mM Pi 存在下。伸長(上のトレース)の期間は10msで、振幅が筋線維長の0.3、0.6、0.9、1.2%の場合の記録を重ねた。張力応答(下のトレース)は伸長前の張力レベルで正規化した(文献2より許可を得て転載)。

「強く結合した中間体」並みの抵抗を示すようである。大きな力学応答とともに高周波の粘性成分は失われる。生筋を刺激直後、まだ張力の小さいところに数%引っ張ると突然大きな張力を発生するが(A.V. Hillの有名なactive stateの実験)、これは収縮初期に「力を出さない中間体」が豊富に存在することで説明できる⁷⁾。

興味深いことに、大きな力学応答は筋線維長の0.3%以上、ミオシン分子あたりにして約4nm以上の伸長で初めて観察され、それ以下ではコントロールと変わらないのである(図2)。したがって伸長の振幅に対し力学応答の大きさをプロットすると(伸長-応答曲線)、4nmのところに明瞭な屈曲点をもった非線型な曲線になる²⁾(図3a)。「力を出さない中間体」は遅い長さ変化に対しては柔らかいが、4nmの臨界変形を受けると力を支えるような構造に変化(isomerization)するのであろう。

2.3 解離の速度

上記の伸長実験で、伸長を次第にゆっくりに行えば「力を出さない中間体」は4nmの臨界変形を受ける前に解離し、非線型性は失われていくであろう。これから「力を出さない中間体」の解離速度が推定できる。Pi存在下では、伸長に100ms以上かけても非線型性は依然として残り、解離の速度定数は約 10s^{-1} と見積もられた²⁾。この値は「弱く結合した中間体」の場合($10,000\text{s}^{-1}$)⁶⁾より遥かに小さい。

一方短縮中は解離がここまで遅いと、「力を出さない中間体」はアクチンに結合したまま引きずられ、短縮を妨げてしまう。しかし「力を出さない中間体」の短縮方向への変形が一定の値に達したときに解離が起こればこの問題は回避できる。この一定値に達する速

図3 伸長の振幅と力学応答の大きさとの関係。(a) 等尺性収縮時に伸長。20mM Pi 存在下(黒丸)と非存在下(白丸)。(b) 等尺性張力の30%の荷重で短縮時に伸長。伸長の振幅はミオシン1分子あたり、応答の大きさは等尺性張力レベルあたりで示す(文献3より改変)。

さは短縮速度に比例するので、「力を出さない中間体」の解離も短縮速度に比例して加速することになる。そして実験結果はこの考えを支持した。

短縮中には、この短縮方向の変形を上記の4nmに加えた大きさの伸長を加えたときに初めてミオシンが臨界変形に達する。したがって伸長-応答曲線の屈曲点にはこの変形の大きさが加算されてくる。等尺性張力の30%の荷重で短縮させた時の屈曲点は6.6nmのところにある(図3b)、等尺性時に比べ2.8nmの加算である。このときの滑り速度($260\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$)をこの値で割って求めた解離速度定数(90s^{-1})は、確かに等尺性条件下より大きい³⁾。そして変形の大きさは短縮速度にほとんど依存せず、「力を出さない中間体」の解離は短縮速度にほぼ比例して加速することが示された。無荷重短縮時には、解離速度定数は 300s^{-1} にも達する計算になる。解離が加速されるのは、短縮方向の変形がアクチン・ミオシンの各結合サイト間の距離を増すように働くためであろう。

以上を総合すると、「力を出さない中間体」が「弱く結合した中間体」や「強く結合した中間体」にはな

いユニークな性質を持つことは明らかである (表1参照). 疲労時 (P_i が蓄積する) や収縮初期で発生張力が小さいときでも外部から伸長を受ければ速やかにこれに抵抗し, 短縮時には速やかに外れて短縮速度を保証する, 一種のラチェットとして働くわけである.

3. 「力を出さない中間体」の筋収縮に対する意義

冒頭で述べたように, 従来の考えでは力発生イベントからの出口, すなわちADP放出が筋肉のパフォーマンスを決定する主な力学感受性ステップであった. しかしこれまでの議論で, 力発生イベントへの入り口において「力を出さない中間体」が二通りの力学感受性ステップを提供することを説明した (伸長に伴う構造変化と短縮に伴う解離: 図1b). このうち, 短縮に伴う解離はすでに力発生イベントに入った「強く結合した中間体」の起こす滑り運動によって, まだ力を発生していない他のミオシンの力発生イベントへの新規参入が制限されることなので, 一種の負の協同性ということができる. 以下に, 特にこの負の協同性のもつ意味について述べてみよう.

短縮速度を増すと張力とスティフネスはともに減少するが, 最大短縮速度 (無荷重; 通常数 μms^{-1}) でも等尺性収縮時の40%のスティフネスが残るといわれる⁸⁾. すなわち40%のミオシンがアクチンに結合しているわけだが, ミオシン頭部のサイズ ($\sim 20\text{nm}$) を考えれば一個のミオシンが結合してられる時間はわずかである. したがってミオシンの解離ごとにATPを壊していたら, ATP消費速度は非常に高くなってしまう. ところが実際の最大短縮速度でのATP消費速度は予想よりかなり低く, わずか数%のミオシンしか結合していない計算になる⁹⁾. この矛盾を説明するため, ATP分解なしに強く結合したミオシンの解離が起こる (一回のATP分解で力発生イベントが何回も起こる) という考えが提出されている⁹⁾. しかしこの矛盾は, 結合したミオシンがすべて「強く結合した中間体」であるとの暗黙の仮定から生じたもので, 負の協同性を考えれば矛盾は容易に解決する. すなわち最大短縮速度では「力を出さない中間体」は結合解離を繰り返し, なかなか力発生イベントに入れないだろう. すると結合したミオシンの大部分は「力を出さない中間体」のままで, 「強く結合した中間体」はわずかとなり, ATP消費速度も低下することになる³⁾ (図4, 5). 「強く結合した中間体」は実際に数%程度になると計算される. また「強く結合した中間体」の全ストローク (能動+受動) は約40nmと予想され, ミオシン頭部のサイズ (20nm) と矛盾しない. Brennerもまったく独立

図4 負の協同性を考慮に入れたときの中間体分布と収縮のエネルギー学. 各中間体の分布 (D, 弱く結合した; L, 力を発生しない; F, 強く結合した中間体), ATP消費速度 (en), 効率 (ef), 短縮速度 (v) の荷重依存性. 短縮が非常に速くなると, ATP消費速度が却って減少することに注意. もし負の協同性がなければ単調に増加する (文献3より許可を得て転載).

図5 アクトミオシン反応サイクルの時間配分. (a) 「力発生」 (等尺性) モード, (b) 「短縮」モード. 「力発生」モードでは「力を出さない中間体」 (網) はあまり解離 (白) することなく「強く結合した中間体」 (黒) に移行し, 結合時間の大部分を後者として過ごす. 「短縮」モードでは「力を出さない中間体」は「強く結合した中間体」に移行する前に結合解離を繰り返し, 結合時間の大部分を前者として過ごす.

の実験から最大短縮速度で「強く結合した中間体」が少ないと述べている¹⁰⁾.

以上の議論は, ミオシンをコートしたガラス面上をわずか40nmの短いアクチンフィラメントが高速で滑るというインビトロ系での観察¹¹⁾と矛盾するように見える. しかしこのような短いフィラメントでは負の協

図6 インビトロアッセイ系における負の協同性。アクトンフィラメントの滑りを低レイノルズ数の池でのボート競技に例えてみた。個々のクルーは一人でボートを高速で推進するのに十分な力を持つことにする。ボート（フィラメント）が長い場合は同時に一人だけ滑いでいればボートは高速で進むので他のクルーはサボり、ATP消費は少なくなる。しかしクルーが一人の場合は常に滑ぎ続けなければ（ATPを分解し続けなければ）ボートは止まってしまう。

同性は働かず、ATP消費速度は長いフィラメントの場合より高いと予想される（図6）。

また負の協同性は、筋繊維のATP消費速度と、可溶化した収縮蛋白（F-アクトンとミオシン頭部断片）の溶液系でのATP消費速度との関係にも示唆を与える。筋繊維中では上に述べたように、等尺性収縮時と無荷重短縮時は、いずれも収縮蛋白がフィラメント上に固定されているために生じる制限がATP消費速度を抑えることになる。一方溶液系ではそのような制限が存在しないので、ATP消費速度は系が取りうる最大値となるであろう。溶液系のATP消費速度は、ミオシンからのADP放出が促され、しかも負の協同性があまり働かない中間的な短縮速度での値に最も近いと思われる³⁾。

4. 結論

筋繊維中のアクトミオシンは、複雑なATP分解反応経路の特定のステップを調節することにより、その置

かれた力学条件に迅速に対応しているようにみえる。その調節は、従来考えられたように力発生イベントの出口だけでなく、入り口でも行われている。その重要な立役者として「力を出さない中間体」をクローズアップした。「力を出さない中間体」は、外的な伸長に対する迅速な抵抗を可能にし、短縮時にはATP消費速度を制限してエネルギー変換効率を上げるのに役立つと思われる。「力を出さない中間体」を考慮に入れば1:1対応型のモデルで特に矛盾は生じない。さらに「力を出さない中間体」は、カルシウムによる収縮弛緩の制御点でもあることが最近の結果から示されている¹²⁾。

文 献

- 1) Ostap, E. M., Barnett, V. A., Thomas, D. D. (1995) *Biophys. J.*, **69**, 177-188
- 2) Iwamoto, H. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 243-250.
- 3) Iwamoto, H. (1995) *Biophys. J.*, **69**, 1022-1035.
- 4) Cecchi, G., Griffiths, P. J., Taylor, S. (1982) *Science*, **217**, 70-72.
- 5) Huxley, H. E. (1975) *Acta Anat. Nippon*, **50**, 310-328.
- 6) Schoenberg, M. (1988) *Biophys. J.*, **54**, 135-148.
- 7) Iwamoto, H., Kobayashi, T., Amemiya, Y., Wakabayashi, K. (1995) *Biophys. J.*, **68**, 227-234.
- 8) Homsher, E., Irving, M., Wallner, A. (1981) *J. Physiol.*, **321**, 423-436.
- 9) Julian, F. J., Sollins, M. R. (1975) *J. Gen. Physiol.*, **66**, 287-302.
- 10) Stehle, R., Kraft, T., Brenner, B. (1993) *Biophys. J.*, **64**, A250.
- 11) Harada, Y., Sakurada, K., Aoki, T., Thomas, D. D., Yanagida, T. (1990) *J. Mol. Biol.*, **216**, 49-68.
- 12) 岩本裕之 (1995) 生物物理, **35**, S213.