

Title	アクトミオシン系のエネルギー変換機構
Author(s)	原田, 慶恵
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1433
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

アクトミオシン系のエネルギー変換機構

博士学位論文

1988年2月

原田慶恵

目次

	要旨	
第 I 章	序論	1
第 II 章	双頭ミオシンと単頭ミオシンの滑り運動能	
	1. 序	5
	2. 材料と方法	8
	3. 結果	17
	4. 考察	26
第 III 章	アクチンフィラメントの長さとの滑り運動能	
	1. 序	31
	2. 材料と方法	33
	3. 結果	38
	4. 考察	55
第 IV 章	結論	58
	謝辞	62
	文献	63
	参考論文	

要旨

(1) ミオシン分子の双頭構造と機能

ガラス表面に固定したミオシンフィラメントに沿って滑り運動する一本の蛍光標識アクチンフィラメントを蛍光顕微鏡システムで直接観察するという運動機能アッセイにより、パパイン処理で得た単頭ミオシンが双頭ミオシンとほぼ同等の機能を有することを見いだした。これは、ミオシン分子の双頭構造は滑り運動機能に必須でないという直接的証拠である。

(2) アクチンフィラメントの長さとの滑り運動能

ミオシンモノマーをシリコンコーティングしたガラス、あるいは雲母の薄いフィルム表面に固定し、20 nm以下から5 μ m以上にわたるいろいろの長さを持つアクチンフィラメントの滑り運動を観察した。短いアクチンフィラメントは超音波処理によって調製し、それらの定量的観察は酸素を除去した溶液中で強力な励起光を用いて行った。滑り運動の速度は、5 μ m以上から約40 nmまでフィラメントの長さに依らずほぼ一定で、約40 nm以下では滑り運動は観察されなかった。この結果から、滑り運動に必要な最小の長さは約40 nm、すなわちアクチンフィラメントのらせんの約半ピッチに相当することがわかった。

(3) エネルギー変換に必要な最小単位

40 nmのアクチンフィラメントが常に相互作用できるミオシン頭部の数は、その大きさからして1~2個である。したがって(2)の結果は、1~2個のミオシン頭部と半らせんピッチのアクチンフィラメントによって筋肉と同じ滑り運動が実現されていることを示している。すなわち、最小単位は半らせんピッチのアクチンフィラメントと1~2個のミオシン頭部であることを示唆している。

(4) アクトミオシン系エネルギー変換における化学-力学結合

これまでサルコメアという大きな集合体を用いて、ATP分解量とアク

チンフィラメントの滑走距離との関係から、平均して1 ATP 分解反応中に引き起こされるアクチンフィラメントの滑走距離が最大60 nm 以上になるということが示されていた。それと同じことが、一本単独のアクチンフィラメントの運動においても起こっていることが確認された。

第 I 章 序論

筋収縮や非筋細胞の多くの運動は二種類のタンパク質、アクチンとミオシンの相互作用によっておこる。これらの運動は、主としてミオシンからなる太いフィラメントと主としてアクチンからなる細いフィラメントの相対的な滑りによっておこる（滑り説）（1、2）。フィラメントの運動を引き起こす力は、ミオシンフィラメントから突き出ている頭部（クロスブリッジ）とアクチンフィラメントが ATP の加水分解反応を伴って相互作用することによって発生する。しかし、長年多くの研究者によって膨大な研究がなされてきたにもかかわらず、最も基本である滑り運動中に、化学エネルギーの力学エネルギーへの変換が分子レベルでどのようになされているのか、その分子メカニズムが現在なおほとんど明らかになっていない（図 1）（3、4）。

一般的に生体内では、様々な運動様式を可能にするためアクチンとミオシンは複雑な集合体を形成し、その中で機能している。それゆえ、*in vivo* の系でエネルギー変換という筋収縮の素過程を研究することは非常に困難を伴う。分子メカニズムの本質に迫る一つの近道は、集合体から、最も単純化された必須部分のみを有する機能体、最小機能単位を見いだし、その機能を徹底的に研究することである。このような試みは、抽出タンパク質により、滑り運動を再現する *in vitro* モデル系の開発によって進められてきた。古くは超沈澱、アクトミオシン糸の研究が知られている。そして最近では、Fujime がアクチンフィラメントの束の上をミオシンフィラメントが滑走するのを暗視野顕微鏡で直接観察する研究を始めた（5）。Yano らは片面にアクチンフィラメントを結合させた羽根で矢車をつくり、これが Mg^{2+} -ATP とミオシン存在下で一方向的に回転するシステムを作り、化学エネルギーと力学エネルギーの結合について研究した（6）。次いで、Sheetz と Spudich はニテラ（*Nitella*）節間細胞を切り開き、葉緑体列上のアクチン繊維束のレールの上でミオシンを

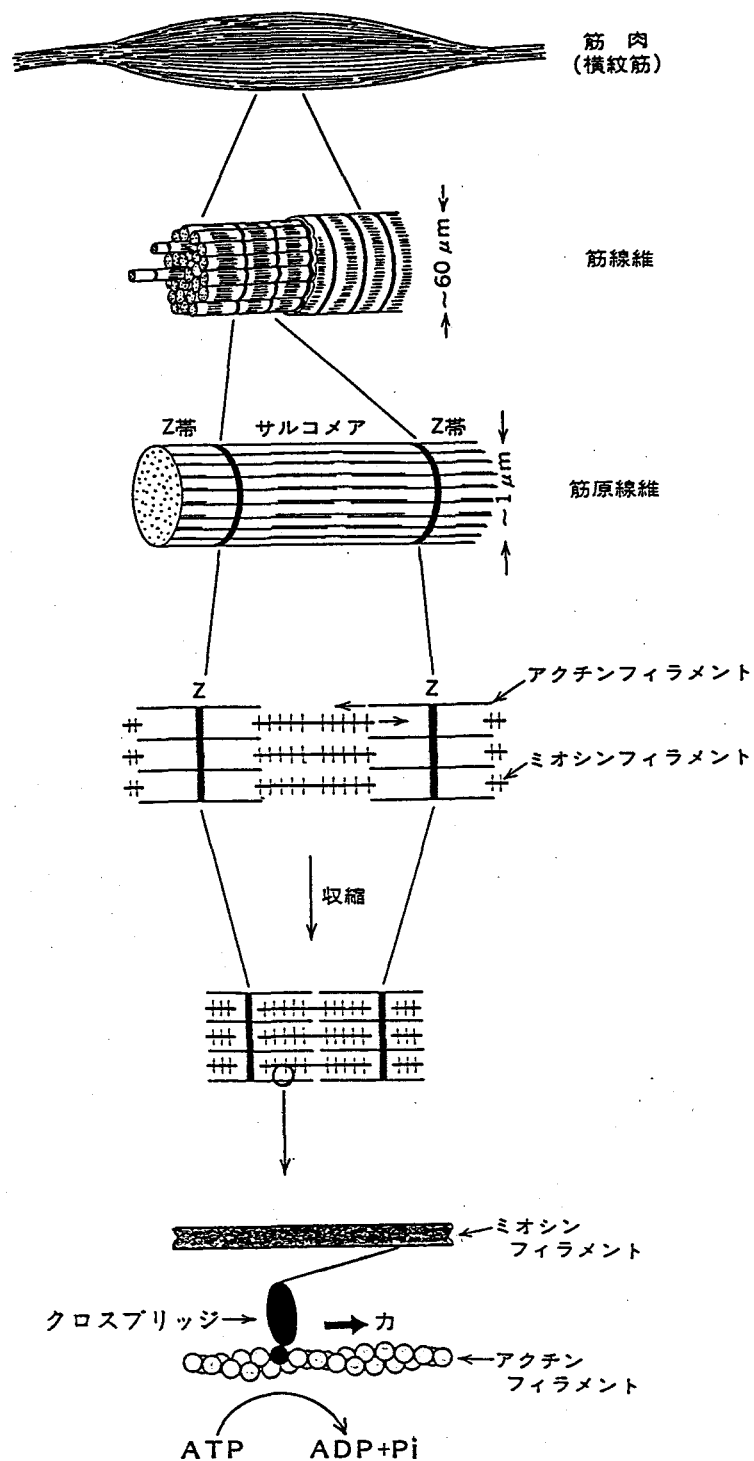


図1. 滑り説

筋収縮はアクチンフィラメントとミオシンフィラメント間に生ずる相対的な滑りによって起こる。このとき、両フィラメントの長さは変化しない、滑り運動は両フィラメントの極性が合致したとき起こり、その方向はフィラメントの極性によって決まる。

付着させたビーズを滑走させることに成功した(7)。最近、*in vitro*での運動アッセイ系でタンパク質分子の運動を直接検出できる光学顕微鏡システムの性能が飛躍的に向上し、強力な蛍光色素とアクチンフィラメントを安定化するキノコ毒であるファロイジンの複合体で蛍光標識することによりアクチンフィラメント一本を蛍光顕微鏡下で長時間安定に直接観察する方法が開発された(8)。この方法により一本のアクチンフィラメントの溶液中でのふるまいを条件をいろいろにコントロールしながら直接観察できるようになった。そしてさらに、単一のアクチンフィラメントのミオシンに沿った滑り運動を直接観察することもできるようになった(9、10)。この方法は、タンパク質分子を直接見ながらその運動機能をアッセイできる点で極めて重要である。このように*in vitro*の運動アッセイ系の開発によって、精製したタンパク質を用いて思いのままの条件下で、様々な集合体の段階でのアクチンとミオシンの運動機能を調べることができるようになってきた。

本研究では、個々のタンパク質分子の運動を直接観察できる強力な蛍光顕微鏡システムと滑り運動アッセイ系を組合せることによりエネルギー変換に必要な最小単位を探り、その機能を調べることにより化学-力学エネルギー変換における分子レベルのメカニズムについて検討を行った。

第 II 章 双頭ミオシンと単頭ミオシンの滑り運動能

- II-1. 序
- II-2. 材料と方法
- II-3. 結果
- II-4. 考察

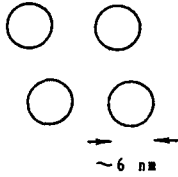
II-1. 序

ミオシン分子は双頭構造をしている(図2)。これら二つの頭部は各々 ATP分解酵素作用およびアクチン結合部位を持っている。太いフィラメントを構成したときは、二つの頭部はフィラメントの骨格から突き出し、ATP分解と共役してアクチンフィラメントと相互作用し、滑り運動を引き起こす。このとき、二つの頭部が独立に機能するのか、あるいは協同的に機能するのかは、筋収縮のメカニズムを解明する、また最小機能単位を決める上で、まず解決しなければならない重要な問題である。

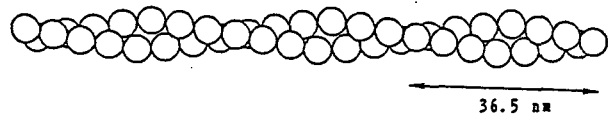
Margossian と Lowey は、DEAE-セルロースカラムを用いて、ミオシン分子をパepsin消化した試料から単頭ミオシンの分離を試み、85-90%の純度の単頭ミオシンを得、それを用いてATPase活性、超沈澱能を調べた(11)。その結果、ミオシン頭部当たりの Ca^{2+} -ATPase、 K^{+} -ATPase、アクチン活性化ATPase活性はどれもほぼ双頭ミオシンと同じであった。また速度は双頭ミオシンの場合と比べて遅いけれども、単頭ミオシンも超沈澱を起こすことを示した。さらに Cookeらは、アクチンに対する結合能の違いにより単頭ミオシンと双頭ミオシンを分離し単頭ミオシンの混入が5%以下の試料を調製し、この単頭ミオシンを使って力の発生について調べた(12)。アクトミオシン混合液から糸状の構造体(アクトミオシン糸)を作り、 Mg^{2+} -ATPaseを加え発生する力を測定した。単頭ミオシンから作ったアクトミオシン糸の発生するミオシン頭部当たりの力は、双頭ミオシンの糸の発生する力と同じであった。以上の結果は、ミオシン分子の各々の頭部は独立に機能することを示唆している。しかし、混入の双頭ミオシンが多いこと、前者は滑り運動能について測定しているわけではないこと、また後者では短縮速度が筋肉の百から千分の一にしかならない糸を使っていたため一般に受け入れられるほどには至らなかった。

一方、Tonomuraらはin vitroでのアクトミオシンATPaseの酵素反応を

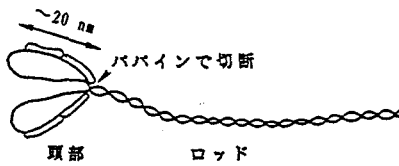
アクチン分子 (Gアクチン)



アクチンフィラメント (Fアクチン)



ミオシン分子



ミオシンフィラメント

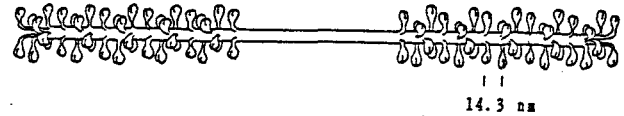


図2. アクチンとミオシン

アクチン分子は直径約 6 nm の球状タンパク質で、生理的塩条件下ではらせん状に重合してフィラメント (Fアクチン) を形成している。アクチン分子は、正確に球ではなく複雑な形をしており、フィラメントになったとき構造に極性がある。ミオシン分子は頭部を二つもっており、それぞれ ATP分解酵素作用、アクチン結合部位をもつ。生理的塩条件下では頭部を突き出した形でフィラメントをつくり、まん中を中心に双極性のらせん構造をとる。42.9 nm 周期の三重らせん構造をしており、14.3 nm 当たり三分子のミオシンが頭部を出している (ウサギ骨格筋)。

詳しく解析することによって、ミオシンの二つの頭部は機能が異なり、それぞれの頭部が異なる役割分担して滑り運動を引き起こしていると主張してきた(13)。さらに最近Chaenらは、グリセリン処理筋をp-フェニレンジマレイミド(pPDM)で化学修飾しATPase活性と張力の測定を行い、次のような知見を得た(14)。pPDMはミオシンのSH基に結合しATPase活性とアクチンに対する結合能を失わせる。ミオシンの双頭に等確率で結合するので、適度な修飾で、片方の頭部にのみ結合したもの、両方の頭部に結合したもの、結合していないものという三種類のミオシン分子が得られる。三種類の様々な比で修飾をうけたグリセリン筋の張力とATPase活性を測定すると、張力は双頭共に結合していないミオシン分子のモル数に、ATPase活性は結合していない頭部の数に比例した。このことから、張力発生はミオシンの双頭構造が必要であると結論している。このように研究者、用いているアッセイ系によって結果が全く逆転するというように明確な解答が得られていなかった。それは、用いたアッセイが直接的な結論を導くには不十分であったことに起因する。

そこで、この問題について、ミオシンフィラメントに沿った、蛍光標識単一アクチンフィラメントの滑り運動を観察するという直接的なアッセイを用いて検討した。広い範囲にわたって頭部の密度を変化させた単頭ミオシンフィラメントに沿った単一アクチンフィラメントの滑り運動を測定した結果、ミオシン分子の双頭間の協同性はアクチンフィラメントの滑り運動を引き起こすのに必須ではないという結論を得た。また、滑りを引き起こすのに必要な最少のミオシン数についても興味深い結果を得た。

II-2. 材料と方法

アクチンおよびミオシンの調製

アクチンはウサギ骨格筋のアセトン処理乾燥筋より抽出し、SpudichとWattの方法で精製した(15)。

ミオシンはウサギ骨格筋から Szent-Györgyiの方法(16)に改良を加え調製した。

蛍光標識アクチンフィラメントの調製

アクチンフィラメントをアクチンと特異的に結合するキノコ毒ファロイジン(分子量 800)の蛍光誘導体、ファロイジンテトラメチルローダミン(PHDTMR)で染色した。ファロイジンテトラメチルローダミンは Wieland 博士からいただいた。PHDTMR はアクチン分子と 1:1 に結合し、アクチンフィラメントの構造を安定化する(17)。しかし、アクチンのミオシンATPase活性の活性化能には影響を及ぼさない(18、19、20)。

染色方法は、0.1 M KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0)の緩衝液に懸濁した 2.5 μ M (モノマー)のアクチンフィラメントに当モルの PHDTMRを加え一晩0℃で静置した。滑り運動のアッセイに用いる場合、これを100倍に希釈し25 nMとした。

アクチンフィラメントの滑り運動の観察

エタノールで洗浄したカバーガラス(32 mm×24 mm)にミオシンフィラメントを含む緩衝液 1(50 mM KCl, 10 mM HEPES pH 7.0, 1 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol(DTT))を10 μ lのせ、その上に18 mm×18 mmのカバーガラスをかけ、しばらく待ってミオシンフィラメントをカバーグラ

スに吸着させる(図3)。暗視野顕微鏡での観察の結果、アクチンフィラメントの速い運動にはカバーガラス表面がミオシンフィラメントによって薄く一様におおわれていることが重要である。その様な表面を作るために暗視野顕微鏡で表面を観察(21)しながら、ミオシンフィラメントの濃度と静置時間をそれぞれ 2~0.5 mg/ml、1~30分(0℃)に変化させた。吸着しなかったフィラメントは緩衝液 2(10 mM HEPES pH 7.0、5 mM MgCl₂、0.2 mM CaCl₂、1% 2-mercaptoethanol、2 mg/ml牛血清アルブミン(BSA)) 50 μlで 2回洗い流した。次に、試験液(50 mM KCl、20 mM HEPES pH 7.8、5 mM MgCl₂、0.2 mM CaCl₂、3 mM ATP、1% 2-メルカプトエタノール) 50 μlで 2回で洗い流し、そこに試験液に懸濁した蛍光標識アクチンフィラメント(25 nM)を 2 μl加え運動を開始させた。

アクチンフィラメントの運動は23℃で観察した。

蛍光顕微鏡システムとデータ解析

単一蛍光アクチンフィラメントは、図4に示すような蛍光顕微鏡システムで観察した。倒立型落射蛍光顕微鏡(Zeiss IM35)、対物レンズ(Zeiss Neofluoar×100 (oil immersion; NA 1.3))、光源として100 W水銀灯、Zeiss ローダミンフィルター (excitation~554 nm; emission >580 nm)を使用し、超高感度ビデオカメラ(池上 SITカメラ CTC-9000)とビデオレコーダー(ビクター CR 6650L)で録画し、テレビモニターに映し出した。またデータ解析のためにビデオタイマー(朋栄 VTG-33)で画面上に1/100秒ごとの時間間隔で記録した。さらに必要に応じて、画像処理装置(日本アビオニクス ImageΣ、TVIP 2000、パーソナルコンピュータ NEC PC9801E)で解析を行った。

速度は、テレビモニター画面上のアクチンフィラメントの動いた距離とその時間をトレースし、パーソナルコンピュータで計算した。その

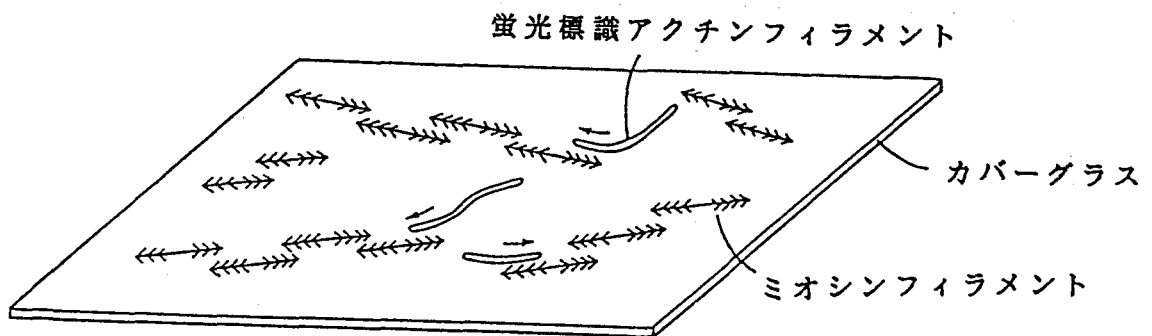


図3. アクチンフィラメントの滑り運動の観察方法

表面をエタノールで洗浄したカバーガラスにミオシンフィラメントを全体に吸着させ、PHDTMRで蛍光標識したアクチンフィラメントをATPとともに加え、それら一本一本の運動を蛍光顕微鏡システムで観察する。

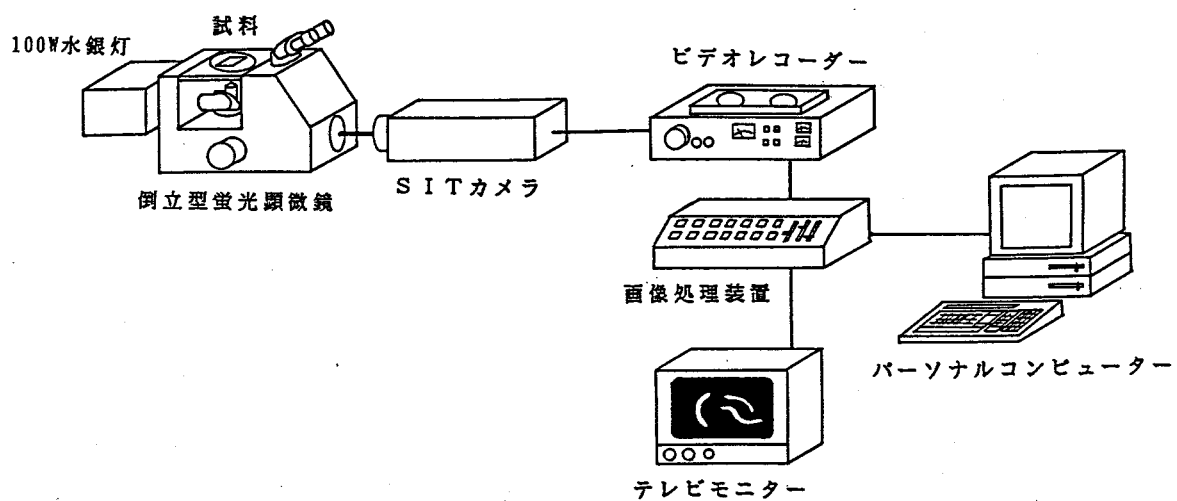


図4. 蛍光顕微鏡システム

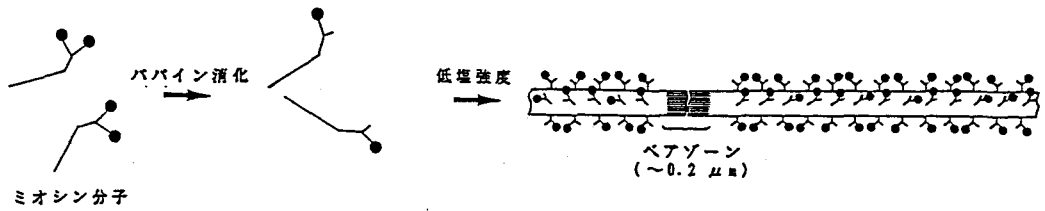
際、モニターの歪の補正も行った。

単頭ミオシンフィラメントの調製

単頭ミオシンフィラメントは二つの方法によって調製した(図5)。

第一の方法(SHM-1)は、ポリアクリルアミドゲルのクーマジープルー染色によってほとんど検出されないくらいまでミオシンフィラメントをパパインによって消化し、単頭ミオシンを精製しフィラメントを作った。ミオシンフィラメント(10 mg/ml)を緩衝液1(50 mM KCl、10 mM HEPES pH 7.0、5 mM MgCl₂、1 mM DTT)に懸濁し、0.008 mg/mlのパパインを加え、20 °Cで時間を追って消化の程度をモニターしながら消化した。消化の程度は、少量のサンプルをとり、遠心し、その上澄中のサブフラグメント-1(S-1)の濃度を測定することによってモニターした。90~95%程度のみオシン頭部が消化された段階で速やかに0 °Cにし、1 mM N- α -p-Tosyl-L-Lysine Chloromethyl Ketone (TLCK)を加え、パパインの反応を止める。ここに10倍量の蒸留水を加え、遠心(700 rpm、10分)し、上澄中のS-1を除去する。沈澱を緩衝液(0.22 M KCl、20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM MgCl₂、0.2 mM DTT)に溶かし、再び遠心(10000 rpm、15分)し、上澄をとる。この上澄にはロッド(LMM)、単頭ミオシン、双頭ミオシンが混合している。ここからCookeらの方法(12)にしたがって単頭ミオシンを精製した。残っているミオシン頭部のモル数の3~4倍のアクチンフィラメントを加え、30分以上静置後、遠心(44000 rpm、2.5時間)し、その沈澱に同じ溶液を加え、ホモゲナイズする。再び遠心(44000 rpm、2.5時間)し、沈澱をとる。これらの操作により、アクチンと結合しないロッドを取り除く。この操作をもう一度繰り返し、得られた沈澱に、今度は10 μ M NaPPiを含む同じ緩衝液を加えホモゲナイズする。低濃度のNaPPiを加えることによって、単頭ミオシンだけアクチンから解離しやすくなる。これを遠心(44000 rpm、2.5時間)し、

SHM-1



SHM-2

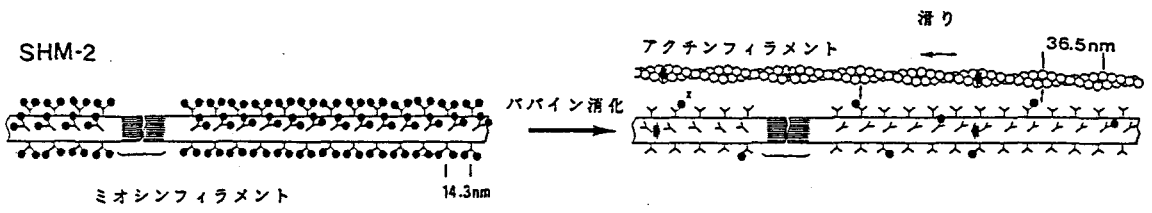


図5. 単頭のみオシンフィラメントの作り方

SHM-1 では、パパイン消化で調製した単頭みオシン分子を精製し、塩強度を下げフィラメントを作らせる。SHM-2では、フィラメントから直接パパイン消化により93%の頭部を除去し、そのまま用いる。

上澄として純度の高い単頭ミオシンが得られた。

短いミオシンフィラメント ($\sim 0.6 \mu\text{m}$) は、この精製した単頭ミオシンを急速に緩衝液 1 に懸濁することによって作った (22)。純度は、20 mM PPI存在下で3.3 %ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって調べた。デンストメトリーで調べた典型的なゲルパターンは、そのサンプルがモル比で90 %の単頭ミオシンと8 %のロッドと1 %、あるいはそれ以下の双頭ミオシンからなっていることを示す (図6)。ゲル電気泳動によって決定したおのおののミオシンの濃度は電子顕微鏡によっても調べた結果とよい一致を示した (12)。

第二の方法 (SHM-2) は、0.6 M KClから急速に希釈することによって作ったミオシンフィラメントからパパイン消化によってミオシン頭部を90 %以上取り除き、そのフィラメントを再び溶かしたりフィラメントを作らせたりということをせずそのまま用いた。SHM-2 の典型的なサンプルのゲル電気泳動は、モル比で15 %単頭ミオシンと85 %ロッドを示した。双頭ミオシンの量は定量できない程少なく、サンプルを過剰にのせたゲルからみて、その含量は0.5 % 以下であった。

ATPase活性の測定

ATPase活性は、ホスホクレアチンとクレアチンキナーゼを共役させ、クレアチンの解離の速度によって決定した。

0.5 mg/ml アクチン、0.05 mg/ml ミオシン (双頭ミオシンあるいは単頭ミオシン) を15 mM KCl、2 mM ホスホクレアチン、0.5 mg/ml クレアチンキナーゼ (Sigma; 160 U/mg at 30 °C) を含む試験液中に懸濁し、0~1 mM の範囲の様々な濃度の ATPを加えることによって反応を開始させた。

クレアチン濃度の測定は、Eggletonらの方法に従った (23)。上記のサンプル液1 mlに4 %のSDSを加え反応を止め、そこに300 μl の1 % α -

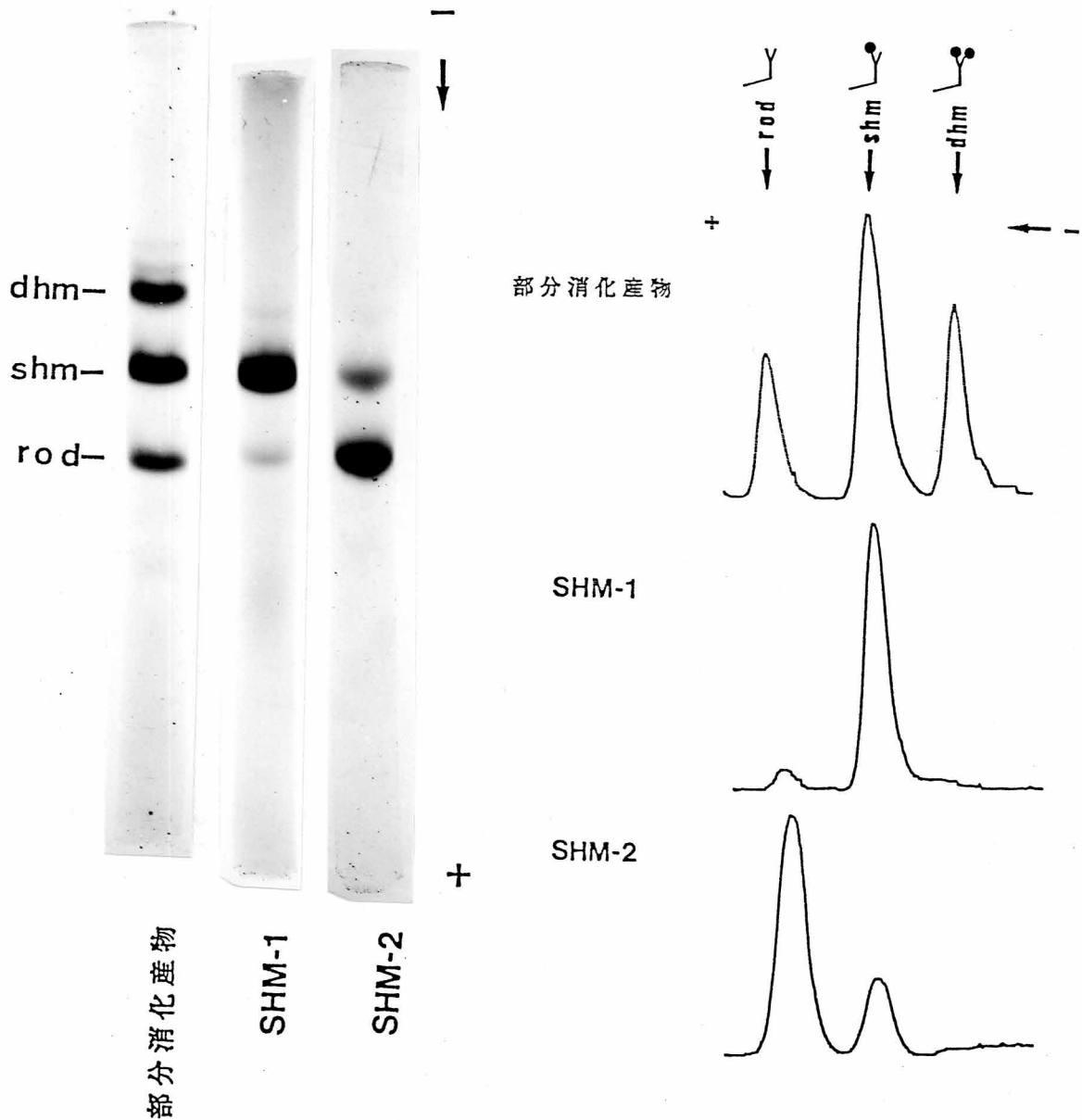


図6. 単頭ミオシンのPPI-PAGEゲルパターンとデンストメトリーパターン

SHM-1とSHM-2の方法による典型的な試料の単頭ミオシンの純度を、20 mM NaPPi 存在下で3.3 % PAGEで調べた。SHM-1では、モル比で90 %の単頭ミオシンと8 %のロッドと少量の双頭ミオシンを含んでいた。双頭ミオシンの量は、0.5~2 %の双頭ミオシンを加えた試料のゲルパターンとの比較から1 % 以下である。このゲルによるミオシン濃度の決定は電子顕微鏡からの結果と一致した。SHM-2 ではモル比で15 %の単頭ミオシンと85 %のロッドを含んでいた。双頭ミオシンに対応するバンドは試料を過剰に載せたゲルパターンから判断して0.5 %以下であった。dhm、shm、rodはそれぞれ双頭ミオシン、単頭ミオシン、ロッドを示す。

ナフトール (in alkali soln: 30 g NaOH and 80 g Na₂CO₃ in 500 ml H₂O) と 150 μ l の 0.05 % ジアセチルを加え、室温で 30 分静置し分光器で 525 nm の吸光度を測定した。吸光度は、1 mM クレアチンがおよそ 8.0 である。

そのクレアチンの濃度から、単位時間、ミオシン頭部当たりの ATPase 活性を算出した。

ピロリン酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PPI-PAGE) 法

双頭ミオシン、単頭ミオシン、ロッドを分離検出するために非変性条件下で電気泳動を行った (12)。

ゲルは、3.3 % アクリルアミド、0.09 % N,N'-メチレンビスアクリルアミド、40 mM NaPPI (pH 8.8)、10 % グリセロール、1 mM NaEDTA (pH 8.8)、0.15 % N,N,N',N'-テトラメチレンジアミンを混合し、pH 9.0 にあわせ 0.5 % の過硫酸アンモニウムを加えてカラム (内径 4.8 mm、高さ 70 mm) 内で重合させ一晩置く。泳動緩衝液は 40 mM NaPPI (pH 8.8)、10% グリセロール、1 mM NaEDTA、0.025 % システインを用いた。試料は、40 mM NaPPI (pH 8.8)、40 % グリセロール、1 mM NaEDTA (pH 8.8)、3 mM DTT にタンパク質を 0.1 mg/ml になるように加え、各々のカラムに 50 μ l ずつのせた。泳動はまず試料をのせずにカラム一本につき 1.5 mA で 1~2 時間 (4 $^{\circ}$ C) 行い、その後試料をのせカラム一本につき 3 mA で 15~20 時間 (4 $^{\circ}$ C) かけ分離した。泳動の際、陰極と陽極の泳動槽の液を絶えずポンプで循環させておいた。

50 % メタノール、7 % 酢酸、0.2 % クーマジューブリリアントブルー R で 30~35 $^{\circ}$ C で一時間固定-染色し、脱色は 7 % 酢酸、5 % メタノールで行った。

II-3. 結果

双頭ミオシンと単頭ミオシンに沿ったアクチンフィラメントの滑り運動

蛍光標識したアクチンフィラメントをミオシンフィラメントでコートしたカバーグラスに加えアクチンフィラメントの運動を直接観察した(図7)。双頭ミオシンフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの最も速い運動は 50 mM KClと3 mM ATPを含んだ緩衝液中で観察された。平均速度は7.2 $\mu\text{m/s}$ であった(図8、9)。

KClの濃度を50 mMから0 mMに下げた時、それらの平均滑り速度は 7.2 $\mu\text{m/s}$ から 5.1 $\mu\text{m/s}$ (23 $^{\circ}\text{C}$)に減少した(図8)。この傾向はスキンドファイバーで得られた結果と一致する(24)。KCl濃度が75 mM以上では、動くアクチンフィラメントの数が非常に少なくなった。そして、KCl濃度 100 mM以上では、アクチンフィラメントの滑り運動は観察されなかった。これは、アクチンフィラメントとミオシンの親和性が下がるためである。

精製した単頭ミオシン(SHM-1)から作ったミオシンフィラメントと、双頭ミオシンフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの滑り速度は、0から30 mM KClで同じであった(図8)。KCl濃度が30 mMよりも高い場合、3 mM ATP存在下では、アクチンフィラメントはほとんど太いフィラメントと相互作用しなかった。しかし、ATPの濃度を100 μM に減らすと、75 mM KClでも滑り運動が観察された(図10)。この実験に用いた単頭ミオシンは、モル比で最大1%の双頭ミオシンを含んでいる(図6)。未消化の双頭ミオシンがアクチンフィラメントの滑り運動を引き起こしているかもしれないという可能性を検証するために、以下のような方法で調整したミオシンフィラメントでコートしたカバーグラス上でのアクチンフィラメントの運動について観察した。1) ミオシンのパパイン消化によって得られた頭部の二つともないロッドと、双頭ミオシン

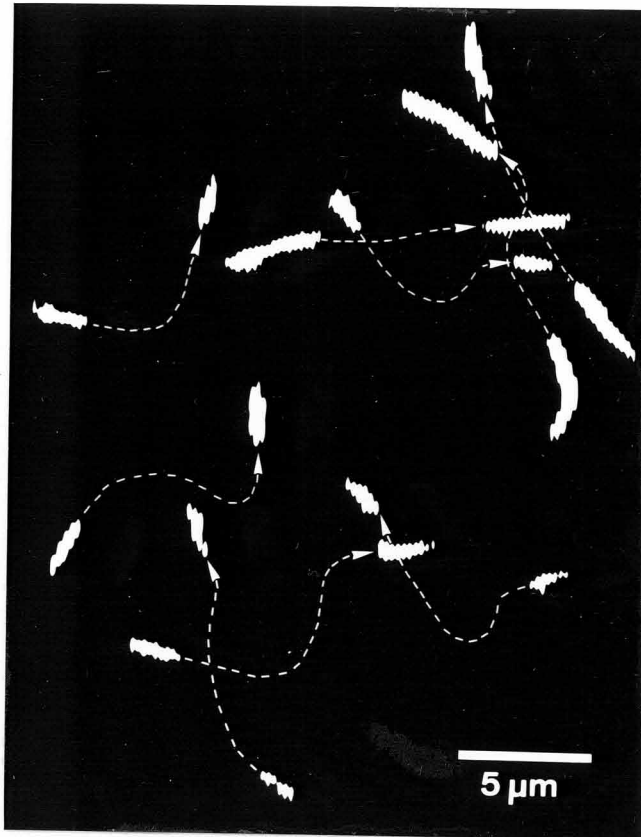


図7. ミオシンフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの滑り運動の軌跡
テレビモニターに映し出されたミオシンフィラメントに沿ったアクチンフィラメン
トの滑り運動を示すため、時間の異なる二枚の写真を、一枚のフィルム上に重ね撮
りしたもの。時間間隔は、1.5 秒。ミオシンフィラメントは蛍光標識されていない
のでモニター上には映っていない。

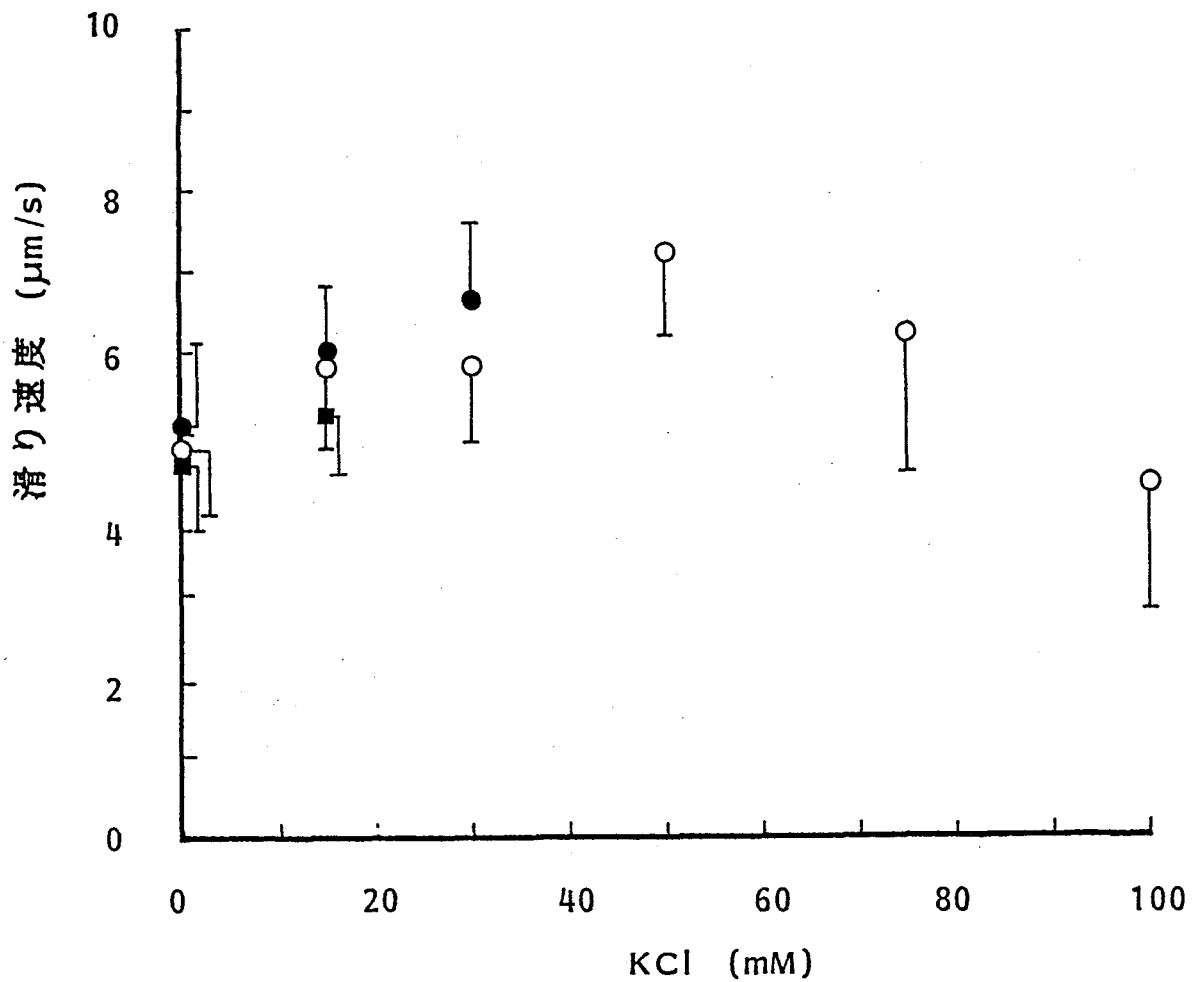
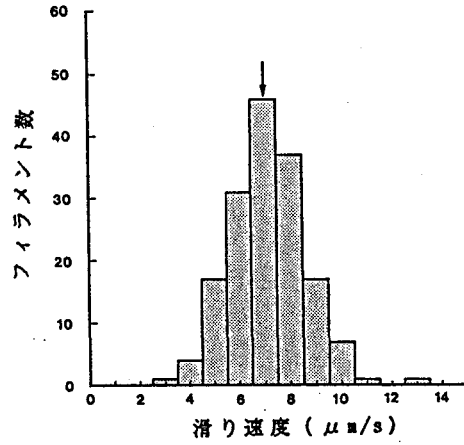


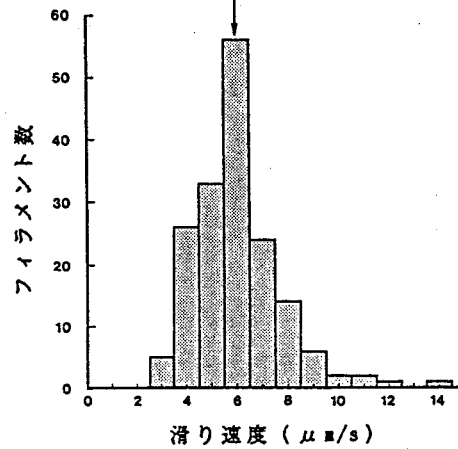
図8. アクチンフィラメントの滑り速度のKCl濃度依存性

アクチンフィラメントの滑り速度は、0~100 mMの範囲の様々な濃度のKClを含んだ試験液 (20 mM HEPES pH 7.8、5 mM MgCl₂、0.2 mM CaCl₂、3 mM ATP、1 %2-メルカプトエタノール) 中で測定した (23°C)。双頭ミオシン (○)、単頭ミオシン (SHM-1) (●)、単頭ミオシン (SHM-2) (■)、を用いた時、5 μm 以上滑走したアクチンフィラメントについて速度を測定した。エラーバーは、50本の異なるアクチンフィラメントの標準偏差である。

a) 双頭ミオシン (KCl 50 mM)



b) 単頭ミオシン (SHM-1) (KCl 15 mM)



c) 単頭ミオシン (SHM-2) (KCl 0 mM)

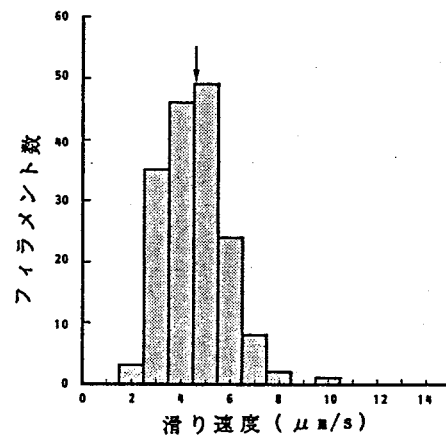


図9. 双頭ミオシンフィラメントと、単頭ミオシンフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの滑走速度分布

双頭ミオシン、50 mM KCl (a)、単頭ミオシン (SHM-1) 15 mM KCl (b)、単頭ミオシン (SHM-2) 0 mM KCl (c)、アクチンフィラメントの滑り速度のヒストグラム。矢印は平均の速度を示す。実験条件は図8と同じ。

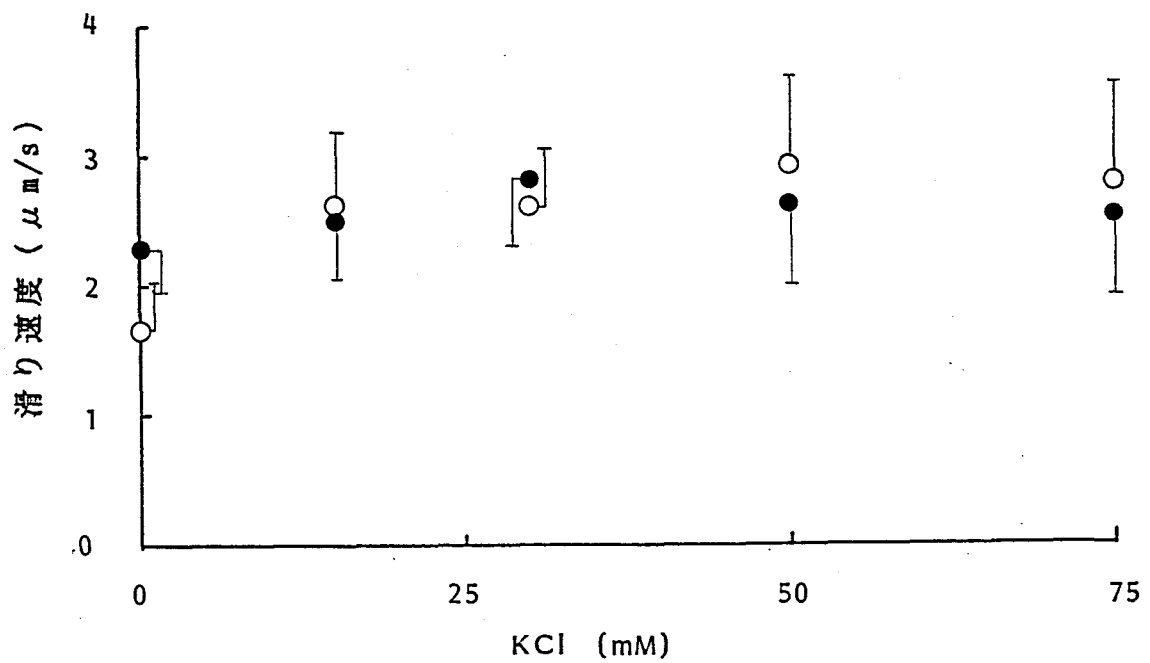


図10. 100 μM ATPでのアクチンフィラメントの滑り速度の KCl濃度依存性
 アクチンフィラメントの滑り速度を、0~75 mM KClを含みATP濃度を100 μM にした
 試験液中で測定した (23 $^{\circ}\text{C}$)。双頭ミオシン (○)、単頭ミオシン (SHM-1) (●)
)を用いたとき5 μm 以上滑走したアクチンフィラメントについて速度を測定した。
 エラーバーは、50本の異なるアクチンフィラメントの標準偏差である。

をモル比 98:2 で混合し、イオン強度を下げて、ハイブリッドフィラメントを作りカバーグラスにのせる。2) ロッドと双頭ミオシンの高イオン強度混合液をカバーグラスにのせ、カバーグラス上でフィラメントを作る。3) ロッドだけから作ったフィラメントと双頭ミオシンフィラメントをモル比 98:2 で混合し、カバーグラスにのせる。どの場合も、アクチンフィラメントの運動は観察されなかった。この事実は、混入双頭ミオシンがアクチンフィラメントの運動を引き起こしたのではないということを示す。さらに、以下に述べられているように、単頭ミオシンとロッドの混合に双頭ミオシンが 0.5 % 以下しか含まない試料 (SHM-2) でもアクチンの運動が観察された。これらの結果は、ミオシンの双頭構造はアクチンとミオシンの親和性を増すために必要なのかもしれぬが、滑り力を発生するには必須ではないということを示唆する。

低密度の単頭ミオシンからなるフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの滑り運動

単頭からなるミオシンフィラメント上の頭部の密度は非常に高いので、二つの近傍の単頭間の相互作用が、本来の双頭間の相互作用にとってかわっているという可能性は除外できない。この可能性を検討するために、低い密度の単頭を持つミオシンフィラメントを作りそれに沿ったアクチンフィラメントの滑り運動を観察した。低密度の単頭をもつフィラメントは、ミオシンフィラメントから、パパイン消化によって90 %以上頭部を除去して得た (図5)。このように処理して得られたミオシンは、大部分が、頭部を持たないロッドと少量の単頭ミオシンからなり、双頭ミオシンの量は検出できない程度にしか含まれていなかった。93 %の頭部を除去したミオシンのゲルパターンは、モル比で85 %のロッドと15 %の単頭ミオシンを含んでいることを示し、双頭ミオシンに対応するバンドはほとんどみられなかった (図6)。その含量は正確に測定できなかつ

たが、過剰にタンパク質を重層したゲル泳動パターンから0.5 % 以下であった。そのようなフィラメントに沿ったアクチンフィラメントの滑り速度は、0~15 mM KClの範囲で頭部を除去する前とほとんど同じだった(図8)。このことから、今のフィラメント上で近傍の頭部間の平均距離は約34 nmと見積られる(考察参照)ので、フィラメント上の近傍の単頭がペアを組んで協同的に相互作用する可能性はほとんど除外される。単頭ミオシンの含量が15 %以下に減少すると、アクチンフィラメントの滑り速度と滑るフィラメントの数の両方が減少し、5 %以下ではフィラメントの運動は観察されなかった。この結果は、上の双頭ミオシンとロッドをモル比 2:98 で混合した時、アクチンフィラメントの運動が観察されなかったという前述の結果と一致する。これらの結果は、ミオシンの二つの頭部間の協同的相互作用はアクチンフィラメントの滑り運動を引き起こすのに必須でないという結論に導く。

ATP濃度依存性

単頭ミオシンフィラメント(SHM-1)と双頭ミオシンフィラメントをコートした場合のアクチンフィラメントの滑り速度とATP濃度依存性についてさらに調べた。また、滑り運動を観察した時と同じ条件下で、単頭ミオシンと双頭ミオシンのATPase活性を調べた。

アクチンフィラメントの滑り運動は双頭ミオシン、単頭ミオシン共に4 μ M ATP以上で観察され、滑り速度は1 mM ATPで最大に達した。また、そのATP濃度依存性も最大の速度の半分を示すATP濃度が、双頭ミオシン、単頭ミオシン共に、双頭ミオシンで以前報告された60 μ M ATPであった。一方、一頭部当たりのアクトミオシンATPase活性は、双頭ミオシンでは最大の半分のATPase活性を示す濃度がおよそ4 μ Mで、20 μ Mで最大に達した。しかし、単頭ミオシンでは2 μ Mで最大の半分のATPase活性を示し、10 μ Mで最大速度となり、双頭ミオシンの場合と比べ低濃度に

移っていた。これらの結果を図 1 1 に示した。

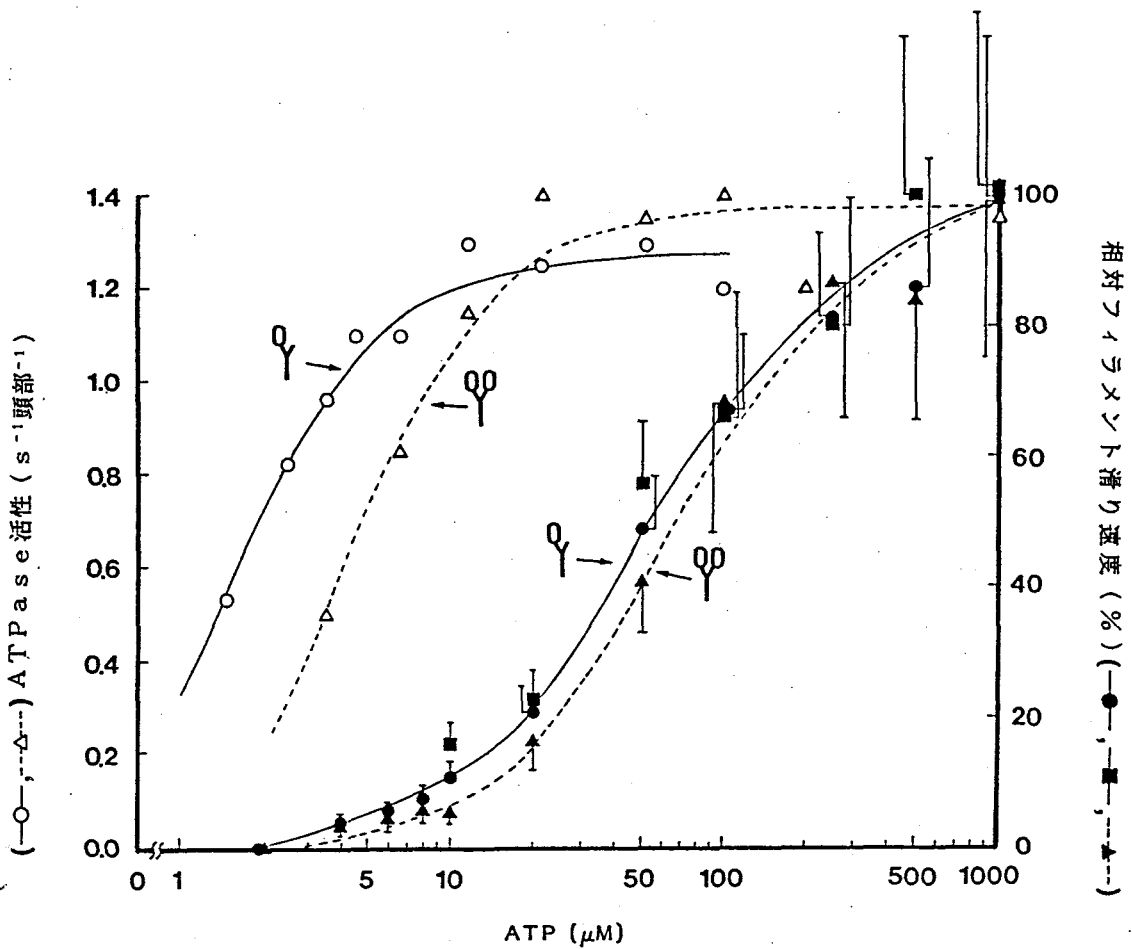


図 11. アクチンフィラメントの相対速度とアクトミオシンATPase 活性のATP濃度依存性

双頭ミオシン (▲) と単頭ミオシン (●、SHM-1; ■、SHM-2) に沿ったアクチンフィラメントの滑り速度は、0~1 mMの様々な濃度のATPと15 mM KCl、2 mM ホスホクレアチンと0.5 mg/mlクレアチンキナーゼを含む試験液中で測定した(23 °C)。エラーバーは、30本の異なるフィラメントの標準偏差である。ATPase活性は、同じ条件下でクレアチンの放出濃度によって決定した(△、双頭ミオシン; ○、単頭ミオシン)。ATPase活性測定に用いたタンパク質の濃度はアクチン、双頭ミオシン、単頭ミオシンそれぞれ0.5 mg/ml、0.05 mg/ml、0.05 mg/mlである。

II-4. 考察

今回、ミオシンフィラメントコーティングカバーグラスの上の蛍光標識アクチンフィラメント一本の滑り運動を観察するという、極めて直接的なモデル系を用いて単頭ミオシンの機能について検討した。得られた結果の第一の点は、高度に精製した単頭ミオシンからなるフィラメントによってアクチンフィラメントの滑り運動が引き起こされるのが観察された。このことから、少なくとも同一分子内での二つの頭部間の協同性は滑り運動に必須ではないことが明らかとなった。また、ミオシンフィラメントから90%以上のミオシン頭部を除去して非常にまばらにしか頭部をもたないミオシンフィラメントでもほとんど同じ速度でアクチンフィラメントの滑り運動が引き起こされることから、二つの近傍の単頭間の相互作用が、本来の双頭間の相互作用にとってかわっている可能性もない。したがって、ミオシンの双頭構造は滑り運動を引き起こすのに必須ではない。Hynesらはサブフラグメント-2 (S-2) 部分を含まない短いヘビーメロミオシン (HMM) でコートしたビーズが車軸藻のアクチンの上を動くことを示している (25)。この結果と我々の結果をあわせて考えると、ミオシン分子の滑り運動に必須な部分はミオシン分子の頭部の部分であることになる。実際その後、Yano-Toyoshimaらによって S-1 でも滑り運動が引き起こされることが実証された (26)。

しかし、ミオシンの双頭構造は効率よく大きな力を発生するために重要な役割を果たしているかもしれない。このアッセイ系でアクチンフィラメントに直接負荷をかけるのはむずかしいので、低い ATP 濃度でのアクチンとミオシンフィラメント間の相対的運動の性質を調べた。双頭ミオシンを用いた場合、最大滑り速度の半分を示す ATP 濃度は $60 \mu\text{M}$ だった。一方、最大アクトミオシン ATPase 活性の半分を示す ATP 濃度は $4 \mu\text{M}$ だった (図 11)。この大きな差は、低い ATP 濃度で ATP と反応できずアクチンと強い結合をしている硬直型のクロスブリッジが形成され、それが

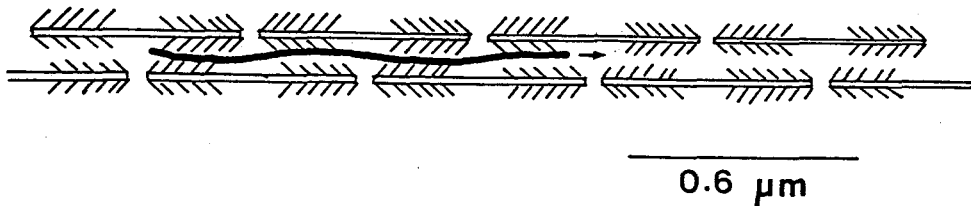
ATPと反応しているクロスブリッジによって発生した滑り力に対する抵抗になっていると考えられる。もしそうだとすると、滑り速度はこの抵抗と滑り力との間のバランスによって決められているであろう。たとえば60 μM ATPでは、硬直型クロスブリッジの割合はミカエリス定数 ($K_m \approx 4 \mu\text{M}$) (図11) から約7%と概算されるので、約7%の硬直クロスブリッジと約93%の活動クロスブリッジの間の抵抗力と滑り力との正味生まれた力が最大の半分の滑り速度を引き起こしたと解釈される。単頭ミオシンは、同様の滑り速度のATP濃度依存性を示す。この結果は、単頭ミオシンも硬直型クロスブリッジの抵抗力に打ち勝つだけの滑り力を発生することができることを示唆する。第二の点は、滑り運動に何個のミオシン頭部が必要であるかということである。SHM-2法を用いたデータは、アクチンフィラメントの滑り速度はミオシンフィラメントから93%の頭部を除去するまでほとんど変化しないことを示していた(図8)。この結果から最大滑り速度を達成するのに必要な頭部の最少数を次のように算出することができる。もし合成したフィラメントが本来のミオシンフィラメントと同様14.3 nmあたり6つの頭部(3ミオシン分子)を持つとすると、93%の頭部を除いたフィラメント上での頭部の平均距離はおよそ34 nmである。

$$6 \text{ミオシン頭部} \times 0.07 / 14.3 \text{ nm} = 1 \text{頭部} / 34 \text{ nm}$$

カバーガラス上でミオシンフィラメントがどのように並んでいるかは明らかでないが、今1 μm の長さのアクチンフィラメントが、連続的につながっているミオシンフィラメントのレールに沿って動く場合を考えてみる。頭部はフィラメント表面から、放射状に突き出ているので、それに対面するアクチンフィラメントの方を向いているものはそのうちの約半分と考えてもよいであろう。そして、0.6 μm のミオシンフィラメントの場合、その1/3の領域にある頭部のみアクチンと相互作用できる(半分ではその極性がアクチンフィラメントの極性と反対になる。そして、ベアゾーン(0.2 μm)には頭部がない)。走っている1 μm 長のアクチン

フィラメントと相互作用できるミオシン頭部の平均数を計算すると、
 $1/34 \text{ nm} \times 1/2 (\text{頭部}) \times 1 \text{ } \mu\text{m} (\text{FAの長さ}) \times 1/3 \doteq 5 (\text{頭部})$
となる。

(参考図)



アクチンフィラメントが交互に配置した二本のミオシンフィラメントの間を動くということはあることである。そのような場合、その数は $5 \times 2 = 10$ (頭部) になる。暗視野顕微鏡によるカバーガラス上のミオシンフィラメントの観察によれば、フィラメントの方向は一様でなく、密度も高くないため、アクチンフィラメントがさらに多くのミオシンフィラメントによって上下からはさまれて(筋肉中のように)滑走していたということはあるにない。また、偶然頭部が高密度で存在する所を選んでアクチンが動く時だけ $5 \text{ } \mu\text{m/s}$ という速度が達成されていた、という可能性もないようである。なぜなら、1) アクチンフィラメントは長い距離 ($>5 \text{ } \mu\text{m}$) にわたって連続的にかつカバーガラスの表面全体にわたって一様に最大滑り速度で動くことができる、2) 不均一な消化によって高密度で頭部が残っているミオシンフィラメントが偶然つながって長いレールを作り、カバーガラスの表面全体に均一に広がるということはあるにない、3) アクチンフィラメントの動きについては慣性力は無視できる(27)、からである。このようなことから、 $1 \text{ } \mu\text{m}$ のアクチンフィラメントが最大滑り速度で動くのに、最大10個のミオシン頭部が相互作用していれば十分であることを示唆する。

この数を用いて、1 ATP サイクル中のアクチンフィラメントの滑走距離を算出できる。滑走中のミオシンのATPase速度は直接測定することが

できない。しかし、最近、Honda らは溶液中でアクチン、ミオシンフィラメントが相互作用している時も、滑り運動が起こっており、その速度も5~7 $\mu\text{m/s}$ (27 °C) と報告し (9) ここで観察されたものと同じである。これは、溶液中で得られたATPase速度はin vitroのアッセイでのそれと大きくは変わらないことを示唆する。そこで、我々は同じ条件下でアクトミオシン溶液で得られた V_{max} (8/頭部/s) を滑走中のATPase速度に採用することにした。1 ATP サイクル中のアクチンフィラメントの滑走距離は、ATPサイクルが重複しないでおこるとして、

$5 \mu\text{m/s} / (10 \text{ 頭部} \times 8 \text{ ATPサイクル/頭部/s}) = 62 \text{ nm/ATPサイクル}$ と計算された。この計算ではATP サイクルは順次おこると仮定したが、現実には ATPサイクルはランダムに起こり重複すると考えられるので、真の値はもっと大きいはずである。滑走速度に時間平均の5 $\mu\text{m/s}$ を採用したが、仮定しているようにミオシンフィラメントが整然と配向している上をアクチンフィラメントが滑走した時は、その速度は本当はこれよりかなり速くなると考えられるので (実際、偶然ミオシンが数10 μm に及ぶレール状の束を作っていると思われるところでは、10 $\mu\text{m/s}$ 以上の速度が観察された)、ATPase 速度がたとえ V_{max} より速かったとしても、62 nm 以下になることはないであろう。この結果は、Yanagidaら (27) が以前、単一サルコメアを用いて得た結果を支持している。

第Ⅲ章 アクチンフィラメントの長さと滑り運動能

Ⅲ-1. 序

Ⅲ-2. 材料と方法

Ⅲ-3. 結果

Ⅲ-4. 考察

III-1. 序

本章ではアクチンの最小機能単位に焦点をあてて行った研究結果を述べる。アクチン分子は分子量約42000で、大まかに二つのドメインを有する球状タンパク質である(28)。一般に機能を発現するときにはフィラメント(Fアクチン)を形成する(図2)。Fアクチンは1ピッチ約76 nmの二重らせん構造をしており方向性を持っている。方向性があることはフィラメントの両端での重合速度が違ふこと(29)、ミオシンサブフラグメント-1(S-1)を結合させた時の矢じり構造(22)などから明らかにされている。第II章で見たように、この構造的な方向性が滑り運動の方向性を決める大きな因子と考えられる。酵素機能も持たず、一見単純な構造ではあるが、筋収縮だけでなく様々な細胞内での運動に関与して重要な機能を果たしている。アクチンの構造と機能に関する研究は、分光学的手法による構造のダイナミックスの研究、電子顕微鏡、X線回折法による研究、化学的手法による研究と幅広く行われてきた。例えば、アクチンフィラメントは動的な構造をしており、それはミオシン分子の結合によってさらに増幅され、ミオシン分子がアクチンモノマーに対しある比(例えば1:6)で結合した時、最もやわらかくなり、よりフレキシブルな構造になることが示されてきた(30、31)。また、ミオシン分子がアクチンに結合する際に極めて協同的に結合すること、さらに協同的に活性化することが示された(32、33)。

また、アクチンフィラメントの長さとおくチンとミオシンの相互作用については、ColemanとMoosekerによってATPase活性を指標として調べられている(34)。彼らは、 Ca^{2+} 濃度に依存的におくチンフィラメントの末端に結合しフィラメントを切断するピリンを用いて、20 nm以下から2.0 μm の範囲でフィラメントの長さを変化させATPase活性を測定した。おくチン活性化ミオシンATPase活性、アクト-HMM ATPase活性、S-1 ATPase活性は加えるピリンのモル比が1/25(おくチンフィラメントの

平均の長さが 150 nm) 以上になると阻害され始め、1/2 (アクチンフィラメントの平均の長さが 20 nm) になるとほとんどなくなってしまうことを報告している。この結果は、アクチンとミオシンの相互作用に必要なアクチンフィラメントの最小長があることを示唆している。しかし、この方法でははっきりした最小の長さはわからないし、また滑り運動という機能についても本当に最小の長さがあるのかどうかわからない。

このようにアクチンフィラメントがその長軸方向に強い協同性が広範囲にわたって存在すること、アクチンとミオシンの相互作用に必要な最小長があるらしいこと、そして第Ⅱ章で述べたように1 ATP サイクルでミオシン頭部がアクチンフィラメントの上を60 nm 以上滑走するということなどから、アクチンフィラメントの長さをどのくらい短くしたら滑り運動に変化が起こるのかということは非常に興味深い問題である。ここでは、ミオシン上のアクチンフィラメントの長さを20 nm から10 μ m 以上の広い範囲で変化させ、滑り運動アッセイを用いて滑り運動とアクチンフィラメントの長さとの関係について調べた。

III-2. 材料と方法

短いアクチンフィラメントの調製

アクチンフィラメントを、PHDTMRで染色することによって超音波処理や希釈による脱重合を防ぐ。染色は、5 μM フェロイジンテトラメチルローダミン (PHDTMR) を含む緩衝液 (100 mM KCl、10 mM HEPES pH 7.0) に 2.5 μM のアクチンを加え 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩静置することにより行った。アクチンに対して PHDTMR は最大モル比 1:1 に結合するが、アクチンを PHDTMR で完全に飽和させるため 1:2 で標識した。標識したアクチンフィラメントは緩衝液 (25 mM KCl、20 mM HEPES pH 8.0、5 mM MgCl_2) で 1 nM に希釈し、超音波処理によって長さ 20 nm 以下から 500 nm の小さな断片にした。短くなったアクチンフィラメントは、フィラメント濃度が非常に低いために互いに再結合することはなかった。そして、それらの蛍光強度は、超音波処理後 2 時間位は変化しなかった (PHDTMR の解離速度は $10^{-5}/\text{s}$ 以下)。また、結合した PHDTMR は超音波処理中にアクチンフィラメントから解離することはなかった。このことは 100 μM のアクチンフィラメントを超音波処理した後 1 μm 以上の長さに再結合させ、超音波処理しなかったアクチンフィラメントの単位長さ当りの蛍光強度と比較し確認した。

アクチンフィラメントの滑り運動の観察

SIGMACOTE (Sigma) でシリコンコーティングしたカバーガラス (32 mm \times 24 mm) あるいは雲母板を割断し非常に薄いフィルムにしたものに、緩衝液 1 (0.6 M KCl、10 mM HEPES pH 7.0) に溶けているミオシンモノマー 10 μl をのせ、その上に両端を少し曲げた 18 mm \times 18 mm のカバーガラスをのせしばらく置きミオシンを吸着させる (図 12)。吸着しな

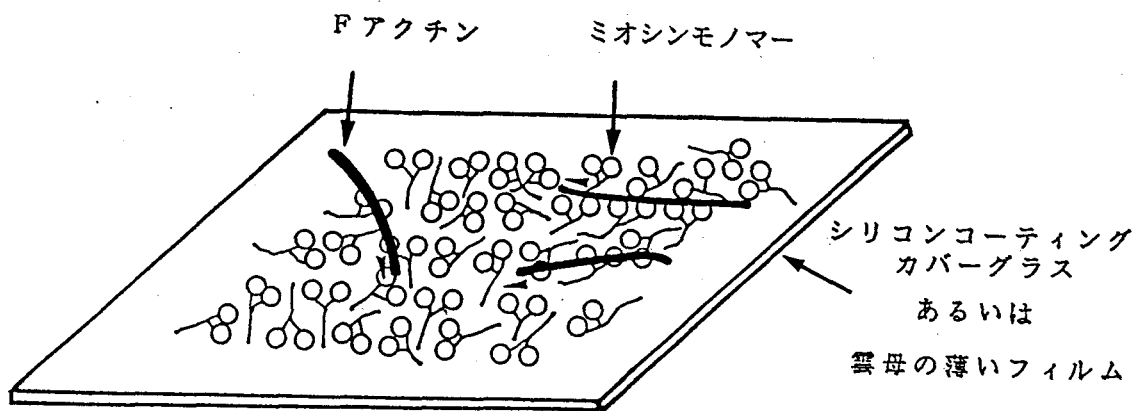


図12. 短いアクチンフィラメントの滑り運動の観察方法

シリコンコーティングしたカバーガラス、あるいはカバーガラスの上に雲母の薄いフィルムを置いたものにモノマー状態のミオシンを吸着させる。アクチンフィラメントを加え硬直複合体を作らせる。そこに酸素除去したATPを含む緩衝液 2(本文参照)を加え滑り運動を開始させる。

ったミオシンを緩衝液 1 (50 μ l、2回) で洗い流し、緩衝液 2 (25 mM KCl、5 mM MgCl₂、10 mM HEPES pH 8.0) (50 μ l、2回) で塩強度を下げる。そこに緩衝液 2 に懸濁したアクチンフィラメント (モノマー濃度で 1 nM) を 10 μ l 加え、アクチンとの硬直複合体を作らせる。そこにグルコースオキシダーゼ 0.216 mg/ml、カタラーゼ 0.036 mg/ml、グルコース 4.5 mg/ml を加え室温で数分置き、酸素除去した緩衝液 2 に 3 mM ATP と 1 % 2-メルカプトエタノールを加えた液 50 μ l を流し入れ、滑り運動を開始させる。

蛍光顕微鏡システムとデータ解析

アクチンフィラメントの滑り運動は図 4 に示した蛍光顕微鏡システムで観察した。

アクチンフィラメントの長さは、アクチンフィラメントに結合した蛍光色素の数、つまりアクチンフィラメントの蛍光強度から決定した。方法は、まず画面上で直接長さを測ることができる 0.5 μ m 以上のアクチンフィラメントについて、長さ と 蛍光強度 の 関係 を 調べ 単位 長さ 当り の 蛍光強度を求めた。蛍光強度はコンピューター画像解析システム (図 4) により次のように測定した。目的とするアクチンフィラメントの像を 4 フレーム加算平均しコンピューターにその画面を取り込む。そのアクチンフィラメントをちょうど囲む大きさのウィンドーを設定し、それをフィラメントを横切って移動させる。そのときウィンドーからの蛍光強度の変化分がアクチンフィラメントの蛍光強度を与える。

タンパク質定量法

カバーガラスに吸着されたミオシンモノマーの量は、載せたミオシンの量と緩衝液 1 (50 μ l、2回) で洗い流されたミオシン量から求めた (

図13)。タンパク質定量法は、Bicinchoninic Acid, Sodium Salt, Anhydrous (BCA) (PIERCE) を用い Micro Assay Protocol にしたがって行った。この定量法は感度が非常に高く (0.5~10 μ g/ml で測定可能)、今のガラス表面のミオシンのアッセイに十分であった。

電子顕微鏡観察法

アクチンの電子顕微鏡観察用試料は次のように準備した。0.5 μ l の50% (v/v) グリセリンに入った試料を切断した雲母板 (5 mm \times 10 mm) にはさみこむ。しばらくしてから同じ切断面であけ、すばやく蒸着装置の中に入れ真空中で乾燥させる。乾燥後、回転させながら白金を低角度 (2 度位) から蒸着する。

ミオシンの場合、アクチンフィラメントの滑り運動を観察するのと同様に、雲母板にミオシンをはさみ、緩衝液 1 で吸着しなかったミオシンを洗ったのち緩衝液 2 で塩強度を下げ、最後に緩衝液 2 とグリセリンを 1:1 に混合した 50% グリセリン溶液に置き換え、できるだけ液を吸い取り、あとはアクチンの場合と同様、切断面であけ乾燥後白金を蒸着する。

できたレプリカをグリッドの上に拾い、透過型電子顕微鏡 (JEOL, 100 C) 20000 倍で観察した。

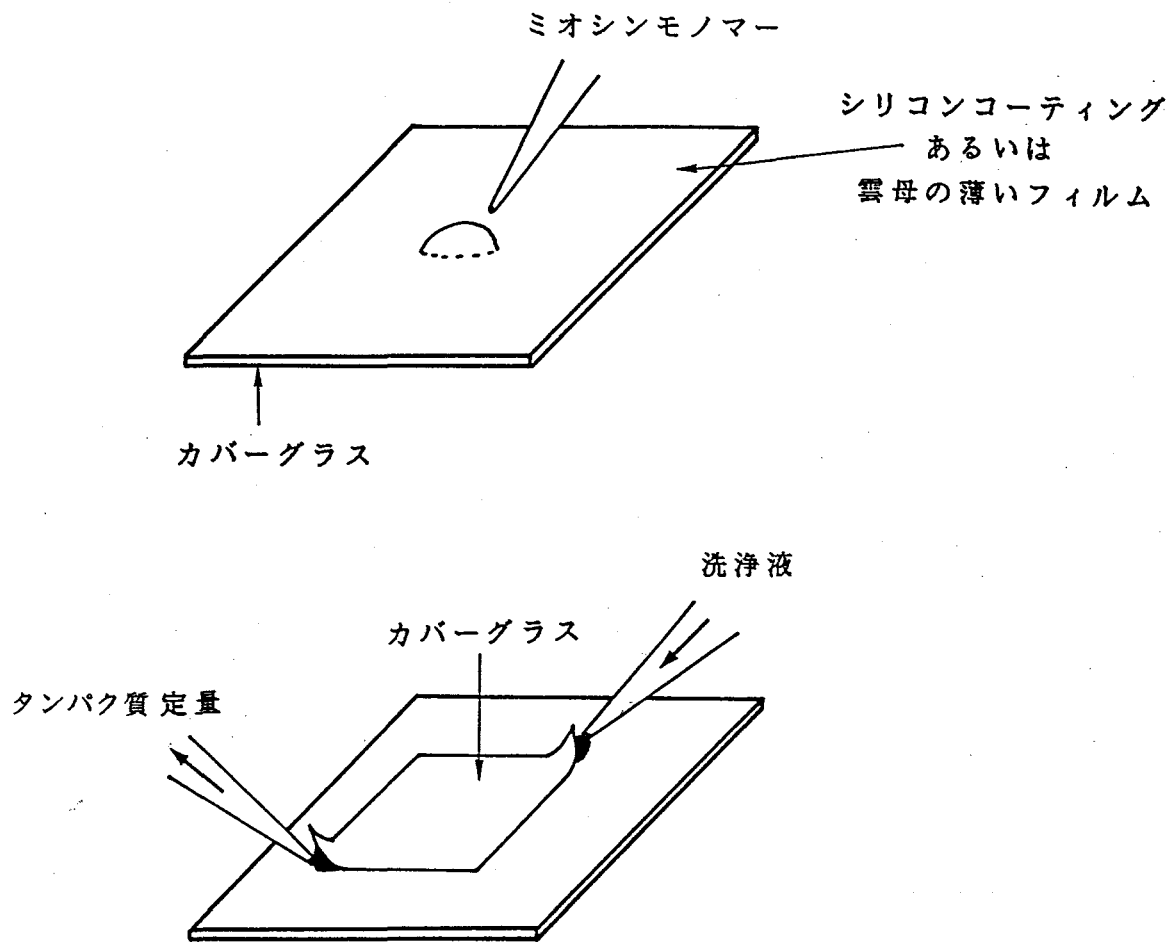


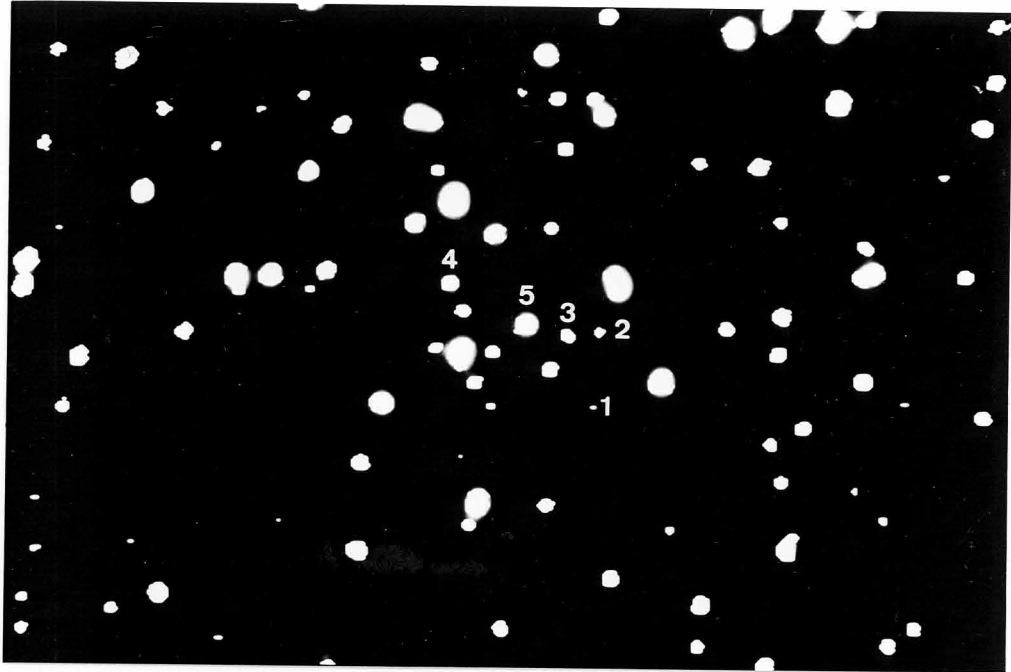
図13. ミオシンモノマーコーティング表面の調製法と吸着ミオシンの定量
 シリコンコーティングしたカバーグラス、あるいはカバーグラスの上に雲母の薄いフィルムを置いたものに緩衝液1に溶かしたモノマー状態のミオシンを載せる。その上に両端を曲げたカバーグラスをのせしばらく静置しミオシンを吸着させる。吸着しなかったミオシンの量は、緩衝液1を片側から流し込み、もう一方の端から回収した液中のタンパク質量を測定し求めた。

III-3. 結果

短いアクチンフィラメントの調製と定量的観察

アクチンフィラメントはPHDTMRで染色することによって、超音波処理や希釈による脱重合が防がれる。20 nm 以下から500 nm (7~180分子)の短いアクチンフィラメントは、PHDTMRで飽和したアクチンフィラメントを緩衝液 (25 mM KCl、20 mM HEPES pH 8.0、5 mM MgCl₂) で 1 nM (モノマー濃度) に希釈し、超音波処理することによって調製した。図14は短いアクチンフィラメントの蛍光像を示す。短くなったアクチンフィラメントは、フィラメント密度が非常に低いために互いに再結合することはなかった。そして、それらの蛍光強度は超音波処理後 2時間は変化しなかった (図15、PHDTMRの解離速度は 10^{-5} /s以下であった)。結合したPHDTMRは、超音波処理中にアクチンフィラメントから解離することはなかった。このことを確かめるために、100 nM (モノマー濃度) のアクチンフィラメントを超音波処理した後 1 μ m以上の長さに再結合させ、超音波処理しなかったアクチンフィラメントの単位長さ当たりの蛍光強度と比較した (図16)。再結合の時間は30分で、この間に遊離したPHDTMRの再結合はほとんど起こらなかった (結合定数Kaは約 10^7 M⁻¹で、結合速度k₊も小さい)。

このような短いアクチンフィラメントの長さは直接測定できないので、各々のフィラメントの蛍光強度の測定によってアクチンフィラメントに結合したPHDTMRの数から決定した。ビデオ蛍光顕微鏡で撮った蛍光像をコンピューター画像解析し、0.5 μ mより長いフィラメントで直接測定した長さとの蛍光強度の関係から単位長さ当たりの蛍光強度を求めた (図15、16)。この方法が妥当であることは、以下に述べることによって確認した。1) アクチンモノマーとPHDTMRをモル比 1:1~20:1に変化させた時、加えたPHDTMRとアクチンフィラメントの蛍光強度は比例した。



5 μ m

図14. 超音波処理した短いアクチンフィラメントの蛍光顕微鏡像
PHDTMRで飽和染色したアクチンフィラメントを再結合しないような非常に低い濃度で超音波処理し、ミオシンコーティングしたガラスに加え硬直複合体を作らせたものを、酸素を除去した溶液中で強力な励起光の蛍光顕微鏡で観察した像。写真中の数字をうったアクチンフィラメントの長さは、1) 19 nm 2) 36 nm 3) 60 nm 4) 109 nm 5) 300 nmである。

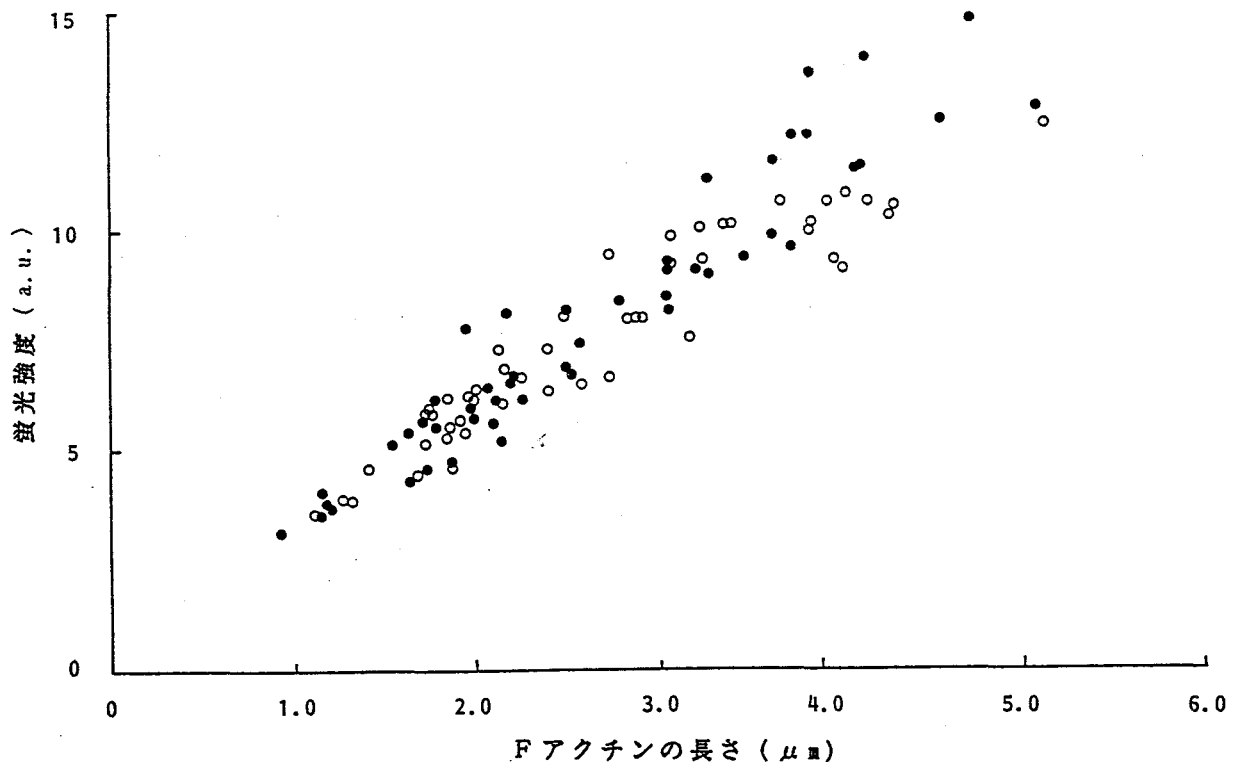


図15. Fアクチンの長さとう光強度の関係
 PHDTMRで飽和染色したアクチンフィラメントを1 nM (モノマー濃度) に希釈後 (0分; ○、120分; ●) のFアクチンの長さとう光強度の関係を示す。

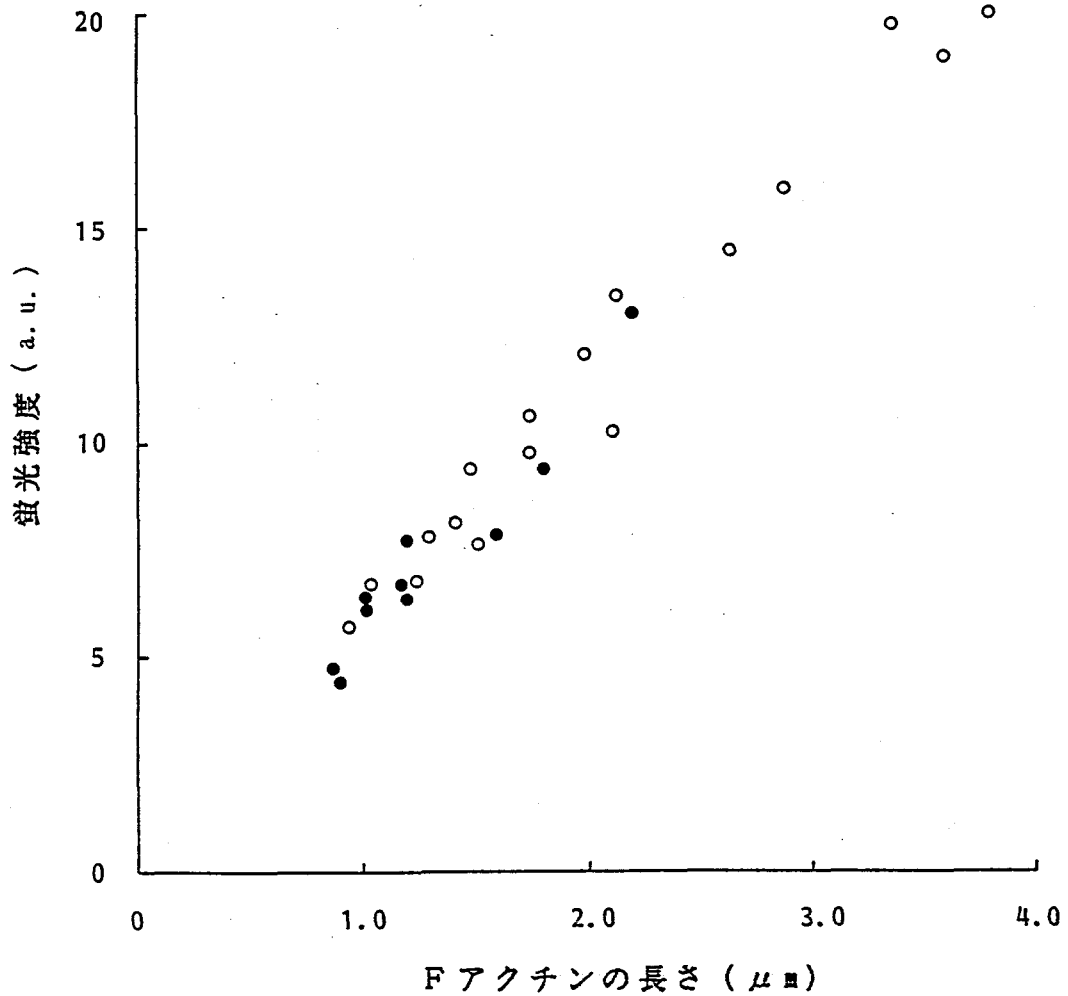


図16. Fアクチンの長さとう光強度の関係

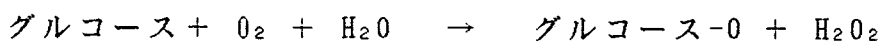
PHDTMRで飽和染色したアクチンフィラメントを100 nM (モノマー濃度) に希釈後、超音波処理後 30分静置しおよそ1 μmの長さに再結合させたもののフィラメントの長さとう光強度の関係 (●)。○は超音波処理前の対照。

2) アクチンモノマーにその1/20 のモル比でPHDTMR を加えた場合でも、アクチンフィラメントを蛍光顕微鏡で観察できた。アクチン20分子に1分子のPHDTMR が結合しているとする、光学分解能の 200 nmに4分子のPHDTMR結合していることになる。つまり、今のシステムでは4分子のPHDTMRを観察することができることを意味しており、したがって10 nmのアクチンフィラメントを検出するだけの感度がある。3) 励起光を、100 % から3 % に変化させた場合、アクチンフィラメントの蛍光強度はほぼそれに比例していた。4) ミオシンとの相互作用によって、蛍光色素がはずれたりして蛍光強度に変化がおこるようなことはないことを、ATP を加える前と加えてから5分後の蛍光強度を比較して確かめた (図 17)。

超音波処理後のフィラメントの長さの分布は40 nm 付近で最大になった。そして20 nm くらいからのひじょうに短いフィラメントがたくさんできていた。これは、同じサンプルを電子顕微鏡で観察した結果と一致した (図 18、19)。

蛍光顕微鏡で短いアクチンフィラメントの滑り運動を観察するためには、非常に強い励起光を用いる必要がある。しかし、励起光が強いと蛍光色素の光反応によってアクチンとミオシンが損傷を受ける。そのため観察の途中でアクチンフィラメントの運動が止まってしまうことがある。この影響は溶液中の酸素の存在が関与していることがわかり、溶液中の酸素を除くことによって除去することに成功した。そのため、非常に強い励起光でアクチンフィラメントの滑り運動を長時間観察することが可能になり、目的とする短いアクチンフィラメントの運動を定量的に調べることができるようになった。溶液中の酸素は、グルコースオキシダーゼ (0.216 mg/ml)、カタラーゼ (0.036 mg/ml) とグルコース (4.5 mg/ml) を加えることによって除去した。そのときの反応は以下に示す。

グルコースオキシダーゼ



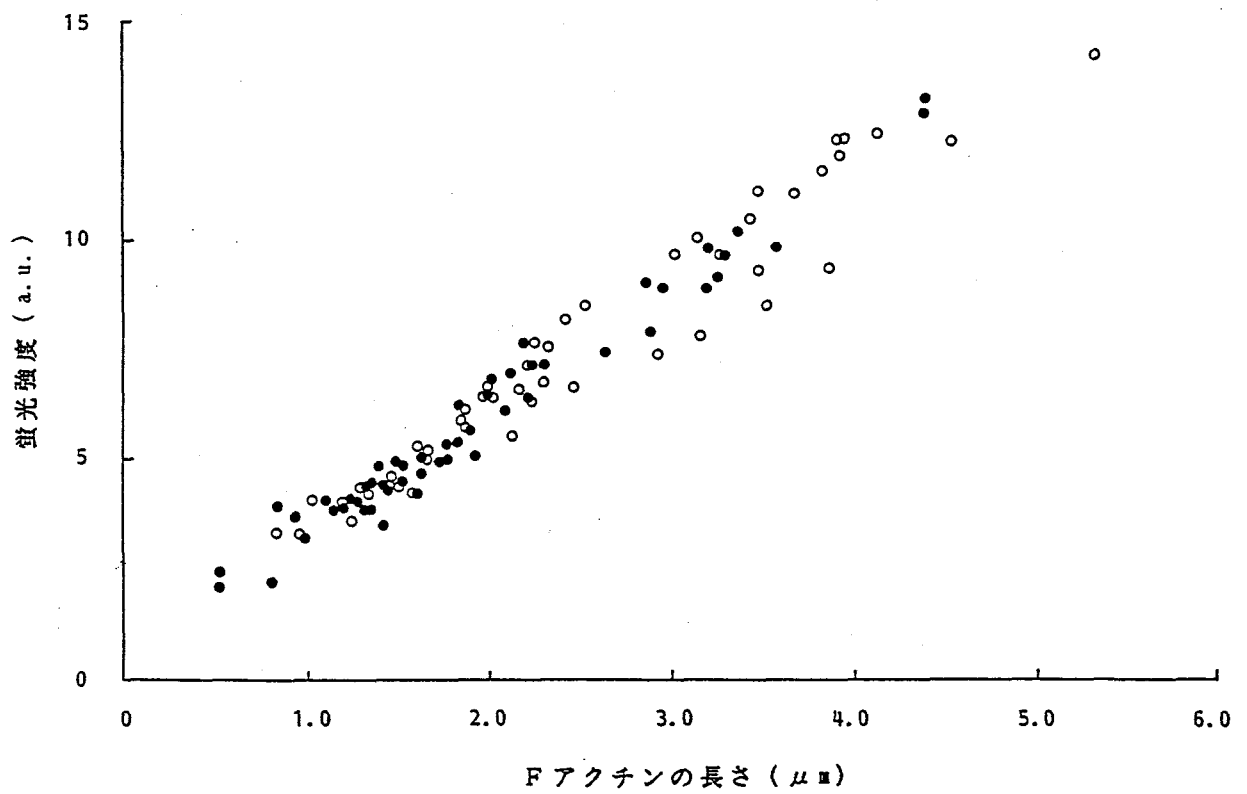


図17. Fアクチンの長さとう光強度の関係

ミオシンコートしたカバーグラスの上で5分間滑り運動させたアクチンフィラメントの長さとう光強度の関係(●)。○は滑り運動させる前の対照。

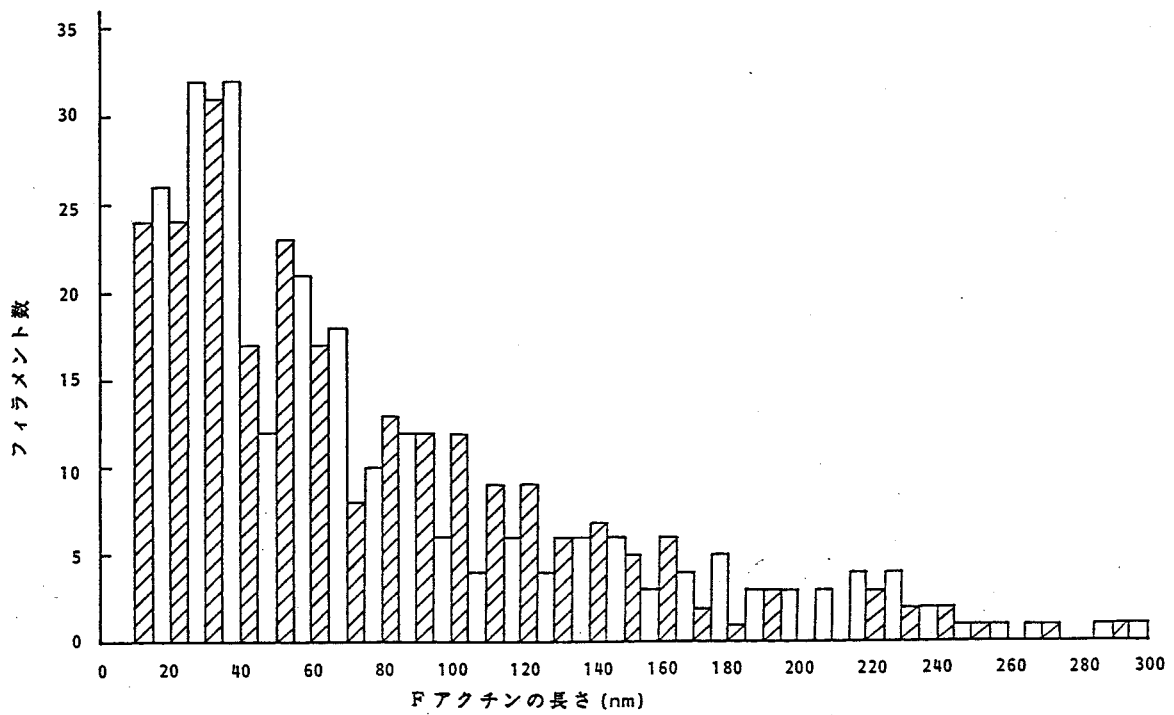


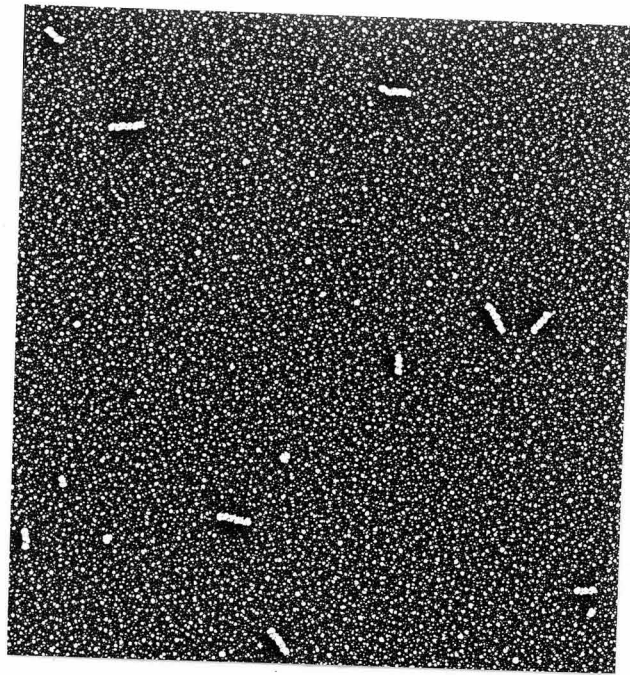


図18. 超音波処理したFアクチンの長さ分布

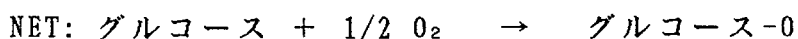
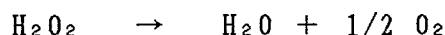
超音波処理したアクチンフィラメントの長さの分布を蛍光顕微鏡像の蛍光強度から求めたもの () と電子顕微鏡像から求めたもの () 。



500 nm

図19. 超音波処理したFアクチンの電子顕微鏡像

カタラーゼ

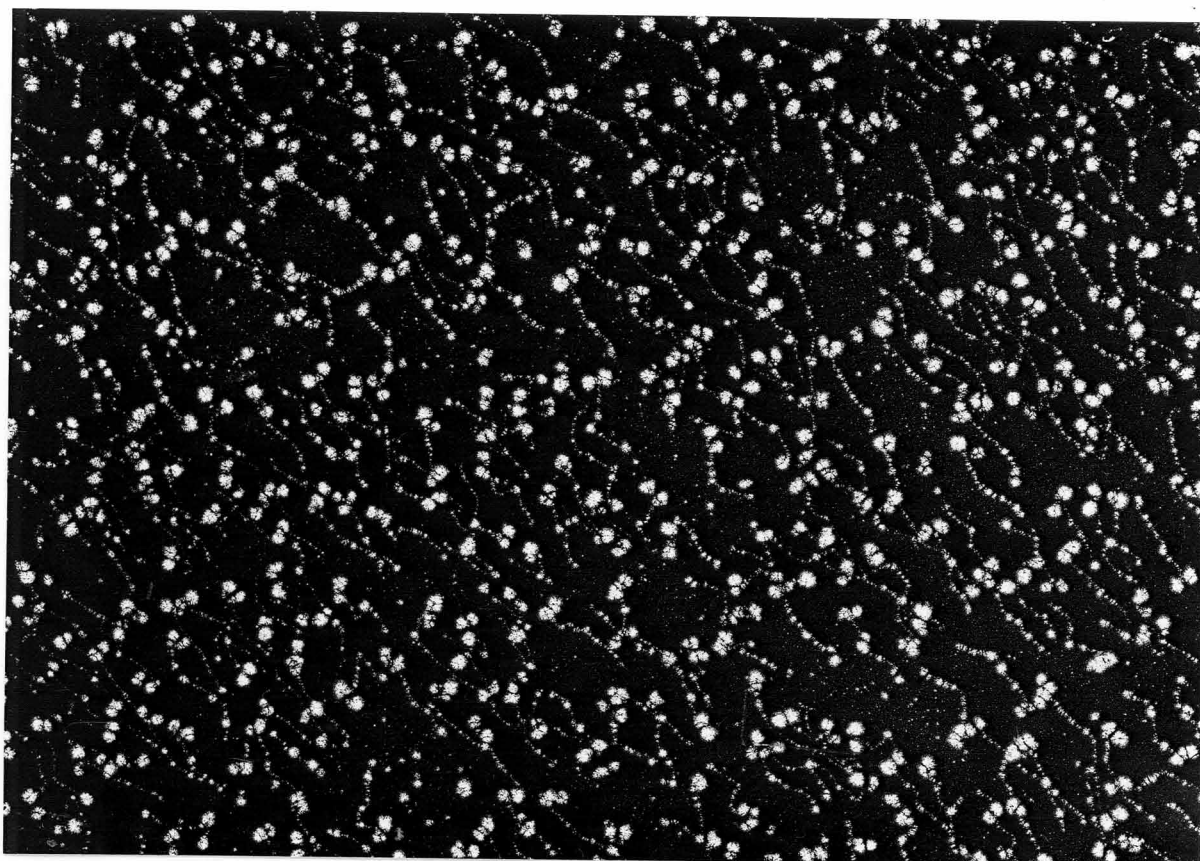


SITカメラより10倍以上高感度の ISITカメラを使って、励起光の強さを100 %から0.67 % に変化させアクチンフィラメントの滑り運動を観察したが、その滑り速度は変わらなかった。このことから、タンパク質が励起光からエネルギーを受け取ったり、局所的に温度が上昇することによって、滑り運動が影響されているということは考えにくい。

ミオシンモノマーコート表面の調製とアクチンの滑り運動

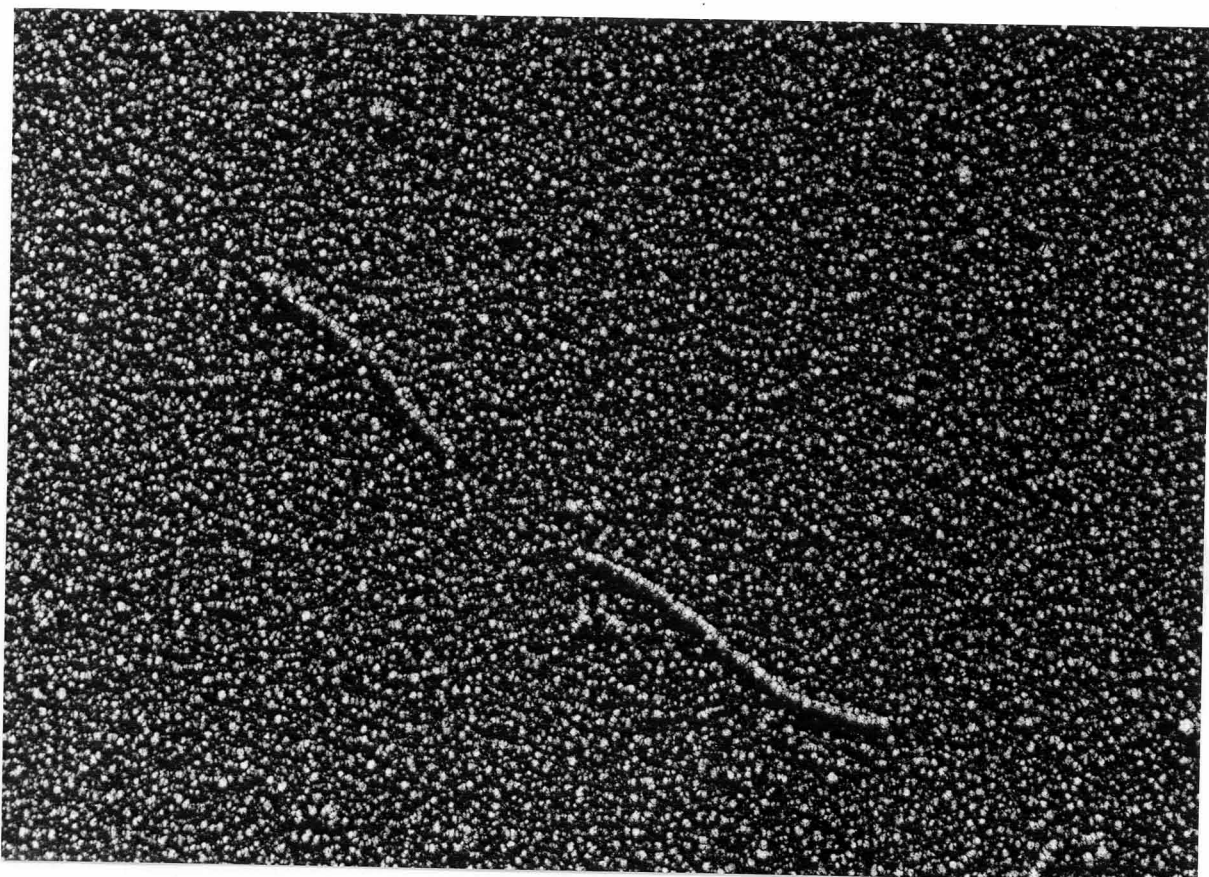
ミオシン上を動くアクチンフィラメントの能力を、二種類のミオシンコート表面上の単一アクチンフィラメントの運動を直接観察することによって調べた。一つはシリコン処理カバーグラスで、ヘプタンに溶けているシリコンにガラスをひたし乾燥させると非常に薄いフィルムがガラス上にでき、そのガラス表面は高い疎水性になる。カバーグラスをシリコンコーティングするとミオシンが非常によく吸着される。光学測定には雲母と比べて有利である。もう一つは雲母のフィルムで、電子顕微鏡によってその表面上のミオシン分子の観察が可能である。雲母はシリコンと対照的に非常に高い親水性であるが、雲母表面にもミオシン分子はよく吸着された。しかし、カバーグラスの上に雲母の薄いフィルムを載せるため高倍の光学測定にはやや不向きである。

表面はミオシンができるだけ均一に吸着されるように、モノマーミオシンでコートした。図20は、少量のミオシンを載せたときの雲母表面上のミオシン分子のロータリーシャドウ電子顕微鏡像を示す。ミオシン分子の全体像がはっきりみえた。しかし、これはミオシン分子の密度が低く(0.2 ng/mm²)アクチンフィラメントの運動を引き起こすことはできない。図21は、最大のアクチンフィラメントの滑り速度を引き起こ



500 nm

図20. 低濃度のミオシンでコートした雲母表面の電子顕微鏡像



500 nm

図21. ミオシンコートした雲母表面とミオシンと硬直複合体を作っているアクチンフィラメントの電子顕微鏡像

すのに十分な密度 (2.5 ng/mm^2) のミオシンでコートされた雲母表面を示す。表面はモノマーミオシンによって一様に高密度に充填されている。よく見るとミオシン分子の尾部もところどころ見え、モノマーの状態で載っていることがわかる。固定されたミオシン分子の平均の最近接距離 (NND) はおよそ 20 nm である。これはタンパク質定量によって得られた密度と一致した。それ以上の量のミオシンを載せても密度は飽和して、せいぜい平均 $\text{NND} = 16 \text{ nm}$ であった。ミオシン頭部の短軸はおよそ 10 nm であるので、飽和した密度での表面はミオシン分子が一層に最密充填されていると考えられる。図 2 1 の二本のアクチンフィラメントは、ミオシンコート表面に ATP 非存在下で後から加えたアクチンフィラメントで、ミオシンと硬直複合体を作っている。アクチンフィラメントの滑り運動は、あらかじめ緩衝液 2 の中でミオシンコート表面にアクチンフィラメントを加えたのち試験液 (緩衝液 2 + 3 mM ATP + 2-メルカプトエタノールから酸素を除去した溶液) を加えることによって開始させる。図 2 2 は、固定したミオシンモノマーの密度を変化させた時の $1 \mu\text{m}$ 以上のアクチンフィラメントの滑り速度を示す。下の横軸は、タンパク質定量によって得た固定されたミオシン分子の密度を示す。そして上の横軸は、それから算出した平均 NND を示す。 0.7 ng/mm^2 以下で大部分のアクチンフィラメントは表面から解離してしまうのが観察された。密度が 0.7 ng/mm^2 を超えると急激に動いているフィラメントの数と速度が増加した。そして、 2.0 ng/mm^2 で平衡に達した。ミオシン密度に対する滑り速度の依存性は、両方の表面でほとんど同じで、再現性もあった。滑りに必要なミオシンの最小密度は、 0 mM から 60 mM KCl の範囲で試験液中の KCl 濃度によらなかった。そして、ミオシンによってしめられていない表面を BSA の添加によってカバーしても影響されなかった。この最小密度 0.7 ng/mm^2 は、約 NND が 40 nm に相当する。アクチンフィラメントは約 38 nm の周期をもつらせん構造をしているので (図 2)、表面に固定されたミオシンは約 38 nm の周期で結合部位がちょうどミオシンの方に向いてい

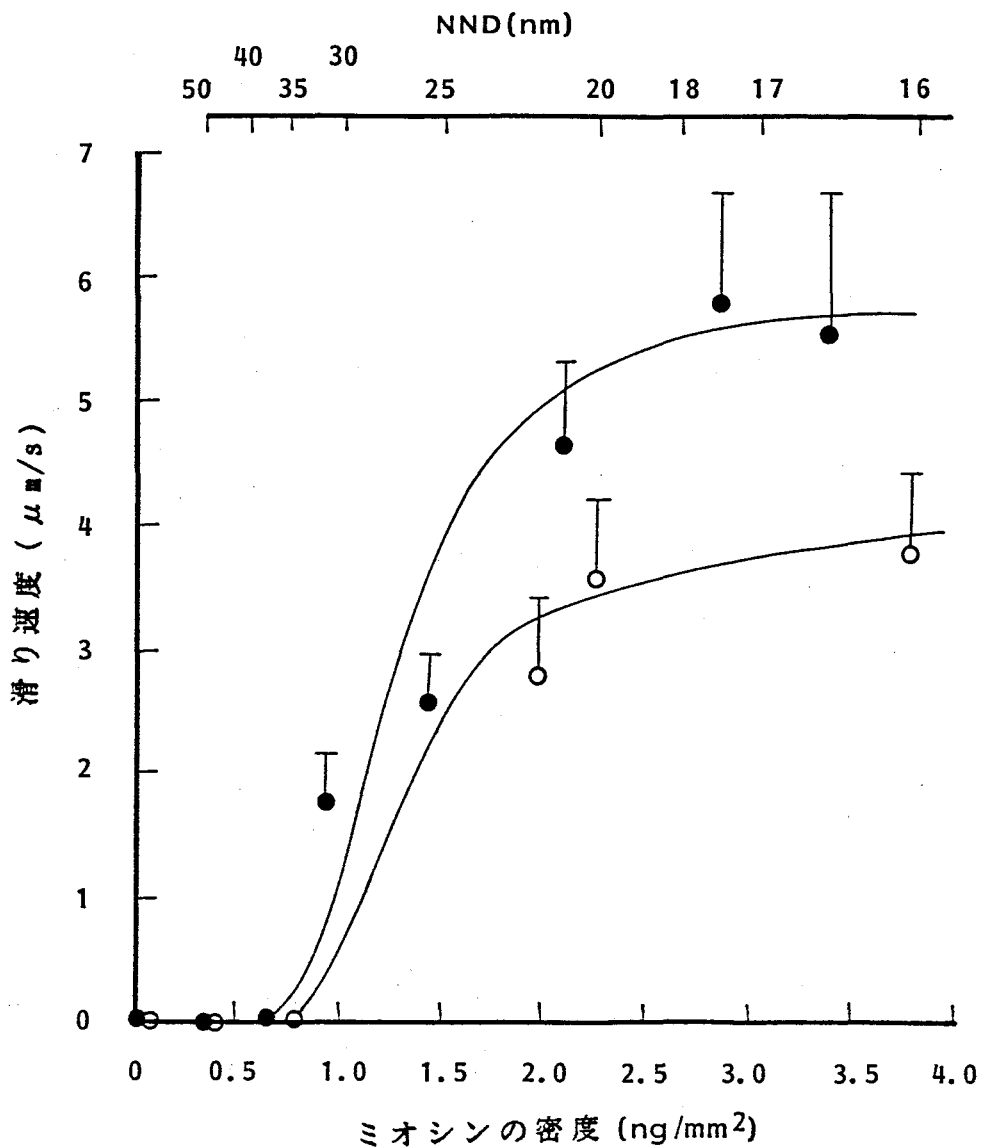


図22. アクチンフィラメント滑り速度のコートミオシンモノマー密度依存性
シリコンオーティングカバーガラス(●)と雲母(○)表面に固定したミオシンの密度を0~4.0 ng/mm²に変化させたときのアクチンフィラメントの滑り速度。上の横軸はミオシン密度から算出した最近接距離(NND)。エラーバーは、30本の異なるアクチンフィラメントの滑り速度の標準偏差である。滑り速度は、3 μm以上滑らかに運動したものについて測定した。(注)低い密度で速度が0になっているのは、滑走しているフィラメントが観察されなかった(ほとんどミオシンから解離した)という意味である。

るアクチンモノマーにしか結合できないと考えられる。それゆえ、NNDが38 nmを超えるとアクチンに相互作用できるミオシンの数が急激に減少するためではないかと考えられる。

短いアクチンフィラメントの滑り運動

次に、固定したミオシン分子の密度を変化させ、アクチンフィラメントの長さを変えて滑り運動を調べた。図23は、3.8 ngミオシン/mm²の密度（ミオシンのNND≒16 nmに相当）でミオシンモノマーコートしたシリコン処理カバーガラスの表面上の40 nmと200 nmの長さのアクチンフィラメントの運動を示す。示されているように、非常に短いフィラメントも、1 μm以上の長さのアクチンフィラメントと同じ様に数μmにわたって滑らかに動いた。アクチンフィラメントの動きは、長さによらず数μm動き、0.1~1秒間止まってから再び動き出すということを繰り返した。このような不連続な動きは、止まっている間に像をコンピューターに取り込めるので、定量的な蛍光強度解析に有効であった。図24は、3.8 ngと2.5 ngミオシン/mm²の密度でミオシンコートしたシリコン処理カバーガラスと、2.7 ng/mm²のミオシンでコートした雲母の表面上の、20 nmから300 nmの様々な長さのアクチンフィラメントの滑り速度を示す。アクチンフィラメントの長さが300 nmから40 nmに減少するまで、両方の表面上で平均滑り速度は基本的に一定であった。ミオシン密度、3.8 ng/mm²と2.5 ng/mm²のシリコン処理カバーガラス上での平均滑り速度は、それぞれ4.6 μm/s、3.3 μm/s、雲母表面上では2.9 μm/sであった。アクチンフィラメントの滑り速度は、1 μm以上の長さのフィラメントで観察される速度の方が40 nm~300 nmのフィラメントの速度よりよりわずかに速かったが、40 nm~10 μm以上の広い範囲でフィラメントの長さには、大体において依存していないという結果になった。40 nm以下ではフィラメントの滑り運動は観察されなかった。それらの大部

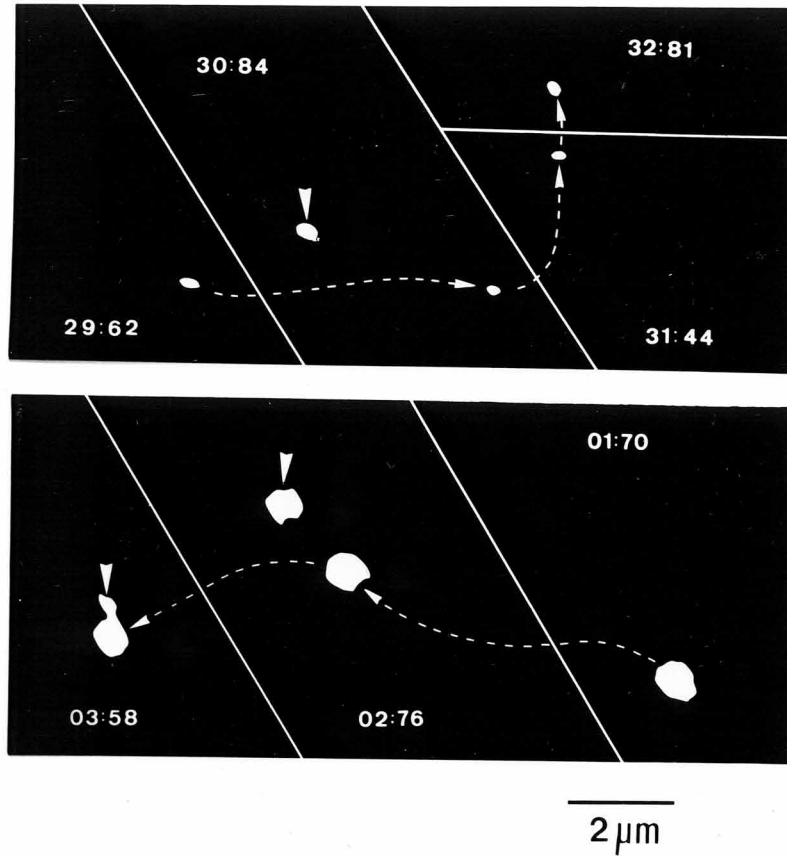


図23. 短いアクチンフィラメントの滑り運動
 ミオシンコートしたシリコン処理カバーガラス表面上の40 nm (上) と200 nm (下) の長さのアクチンフィラメントの運動を示す。テレビモニターに映し出されたアクチンフィラメントの滑り運動を示すため、時間の異なる四または三枚の写真を一枚のフィルム上に重ね撮りしたもの。写真中の数字は時間 (最小単位が1/100 秒) を示す。

分は表面から解離し、残っているものはその場に捕まったままであった。40 nm 以下の長さの短いフィラメントの滑り運動が見られない一つの可能性は、単純にミオシン頭部の数が相互作用をおこなうのには不十分である、あるいはアクチンフィラメント表面上のミオシンへの親和性が不十分であるということである。図 24 に示すように、ミオシン密度 3.8 ng/mm² (NND~16 nm) と 2.5 ng/mm² (NND~19 nm) の滑り運動に必要なアクチンフィラメント最小の長さは大体同じで 40 nm であった。さらに、KCl 濃度を 0 mM から 40 mM に変化させ (溶液中の HMM のアクチンに対する親和性は 10 倍近く減少する) フィラメントの滑り運動を観察した結果、その滑り運動に必要なアクチンフィラメントの最小の長さは KCl 濃度によらずやはり約 40 nm であった。これらのことを総合すると、約 40 nm の長さが、滑り運動に対するアクチンフィラメント自身のもつ性質からくる最小不可欠な単位であることを示唆する。

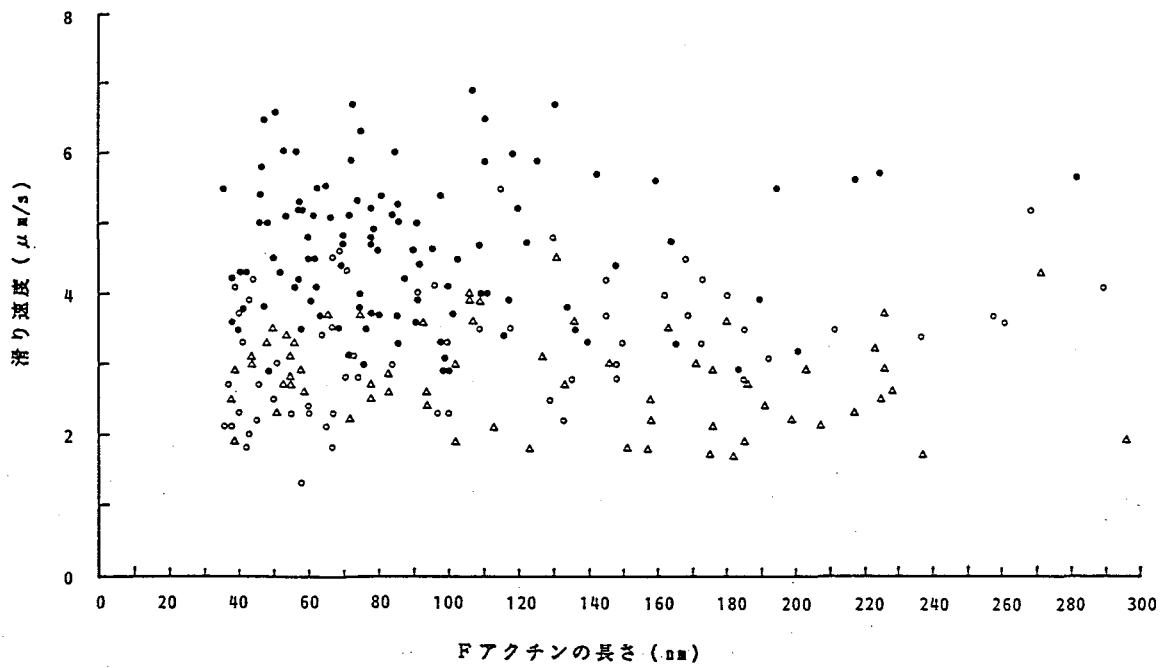


図24. アクチンフィラメント滑り速度の長さ依存性

シリコンオーティングカバーガラス (ミオシン密度 3.8 ng/mm^2 ; ●、 2.5 ng/mm^2 ; ○) と雲母 (ミオシン密度 2.7 ng/mm^2 ; △) 表面上のアクチンフィラメントの滑り速度とフィラメント長の関係を示す。

III-4. 考察

本章では、アクチンフィラメントの滑り運動には半ピッチ（～40 nm）以上の長さが必要であるということが明らかになった。すなわち、半ピッチというのがアクチンフィラメントが機能を発現する際の最小機能単位と思われる。これは、アクチンフィラメントへのミオシン分子の結合にみられる協同性の及ぶ範囲（32、33）、ミオシンの結合によって動的構造変化を起こす単位（30、31）、ミオシンのアクチン活性化ATPase活性を活性化することができるフィラメントの最小長を求める（34）研究等によって間接的に追求されてきたアクチンの機能単位を探る問題に、直接的な知見を与える。

以上の結果は、ATP 分解反応（化学反応）と滑り運動（力学反応）の共役についても極めて興味深い内容を含んでいる。半ピッチ（～40 nm）の長さのアクチンフィラメントが同時に絶え間なく相互作用できるミオシン頭部の数は、1）ミオシン頭部はだいたい長軸が20 nm、短軸が10 nmの楕円体である、2）表面に固定したミオシンはアクチンの二重らせんの一方側としか相互作用できない、3）表面上のミオシンの向きは均一でない（図25）、ということらを考慮に入れて、時々最大4頭部が相互作用することもあり得るかもしれないが、おそらく1個、多くても2個であろう。それゆえ、アクトミオシンエネルギー変換における最小機能単位はアクチンフィラメント半ピッチと1個、多くても2個のミオシン頭部であるということになる。

40 nm のアクチンフィラメントが強い熱ゆらぎにさらされ、しかも、ほとんど完全に慣性力が働かない（27）にもかかわらず、平均1～2個のミオシン頭部によって、滑り力が多くのミオシン頭部によって絶え間なく確実に働かされている長いアクチンフィラメントと同様に滑らかにほぼ同じ速度で動くということは重要で、次のように我々は考察する。長いフィラメントと同じ滑り速度で、40 nm のアクチンフィラメントを滑

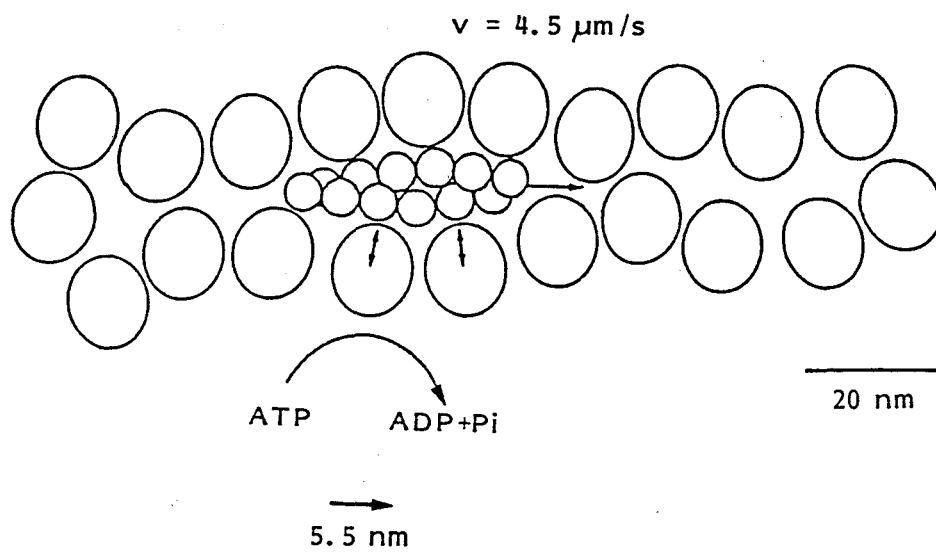


図 25. ミオシンコート表面を滑走する半ピッチのアクチンフィラメントの模式図

らかに動かすためには、滑り力がそれと常に相互作用している1~2個のミオシン頭部によって、アクチンフィラメントが通り過ぎる間、絶えずそれに与えられていなければならない。ミオシン頭部がフィラメント中のアクチンモノマーと、結合解離を繰り返して、アクチンフィラメントを次々送りだしていると考えれば、一回の結合解離サイクル中に送り出される距離は、モノマー間隔の5.5 nmになる。それゆえ、40 nm長のアクチンフィラメントがその長さ分滑走するのに要する時間、9 ms (=40 nm/4.5 μ m/s)に少なくとも、7回 (=40 nm/5.5 nm)の結合解離サイクルが起こっていなければならない。平均1~2個のミオシン頭部で、40 nm送り出している訳であるから、7回の結合解離サイクルを9 msの間に1~2つの頭部で行っていることになり、力発生を伴ったアクチンとミオシンの結合解離のサイクルのターンオーバー速度は1.3~2.6 ms (9 ms/7~3.5回)となる。一方、ATPの加水分解速度を同じ系で測定できないので、*in vitro*アッセイで用いたのと同じ条件下で測定した、最大短縮時(5~6 μ m/s)のウサギの骨格筋の筋原線維からのADPとPiの遊離速度、それぞれ10(\pm 4) ADP/s/頭部と11(\pm 5) Pi/s/頭部(桜田、柳田未発表)を採用して、ATP分解反応と滑り運動の関係を調べることができる。系は違っても、同じ条件で測定し、同じ速度の滑り運動が見られるので、*in vitro*でのATP分解反応が筋肉中と大きく異なることはないと考えられる。力発生を伴う結合解離のターンオーバー速度(1/1.3~2.6 ms)はATP加水分解サイクルのターンオーバー速度(1/100 ms)より40~80倍速くなければならないことになる。すなわち、無負荷条件下ではATP加水分解速度より速いアクチンとミオシンの力発生を伴った結合解離が何回も起こり、アクチンフィラメントは1 ATP分解中に長距離滑走することになる。この結果は、40 nmのアクチンフィラメントと1~2個のミオシン頭部という構造単位のレベルにおいても、第II章の結論同様1分子のATP分解中にアクチンフィラメントが、無負荷時には例えば60 nm以上といった長距離滑走するというを示している。

第IV章 結論

第II章、第III章の結果を要約すると、

- 1) アクチンフィラメントとミオシンフィラメントの滑り運動にはミオシン分子の双頭構造は必須ではない。
- 2) 滑り運動に必要なアクチンフィラメントの最小長は約40 nmである。
- 3) アクチンフィラメント半ピッチ(約40 nm)と1~2個のミオシン頭部がアクトミオシン系エネルギー変換システムの最小機能単位である。
- 4) 無負荷の条件下では、1分子のATPで、アクチンフィラメント一本単独でも60 nm、またはそれ以上も滑る。

ということになる。複雑な筋収縮の仕組みから、滑り運動に必要な構造を探り当て、その機能を調べることができた。その結果を基に滑り運動の可能なモデルを考えると、Fアクチンは一つのミオシン頭部の上を、最大では(無負荷のとき)1分子のATPが分解される間に60 nm以上も滑っていくことになる(図26)。この新しいモデルの特長は、ATPの分解とアクチン-ミオシンの結合-解離が1:1には対応しておらず、ATP1分子当たりの滑走距離が負荷におうじて0から60 nm以上に大きく変化できる点にある。大きな負荷がかかっているときはATPのエネルギーを一挙に放出して大きな力を発生し、負荷の小さいときはそのエネルギーを小出しにして長距離速く動くことができるというように、外部環境に柔軟に対応できるようになっていると考えられる。

次にこの考え方によって、筋肉以外の一つの例を検討してみる。この例は、首振り仮説では説明が困難として残されている問題である。

植物の車軸藻*Nitella*や*Chara*にみられる50 $\mu\text{m/s}$ に及ぶ小胞のアクチン束に沿った運動は、アクチンとミオシンで引き起こされていると考えられる(35)。もし、これまでの"首振り説"でこれを説明しようとする、例えば0.3 μm の小胞を運ぶのにATP1分子の分解に伴って8 nmの変

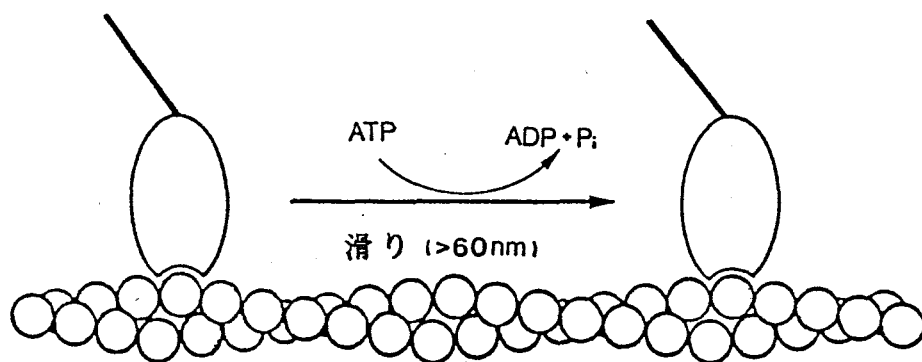


図26. 滑り運動のモデル

位を起こすパワーストロークが、1秒間に正確に重複することなく順次それが起こるとして、慣性が全く働かないことを考慮すると、

$$50 \mu\text{m/s} / 8 \text{ nm} = 6000 \text{ 回}$$

起こる必要がある。このように高頻度で起こるパワーストロークサイクルが全く重複することなく起こることはまず有り得ないので、この回数はこれよりずっと大きくなるであろう。すなわち、1秒間に6000よりかなり多くのATP分子の分解を必要とすることになる。一方、この小胞を運ぶのに必要なエネルギーは1秒間に、原形質の粘度 η を6 cPとして

$$\begin{aligned} 6\pi\eta av \times v &= (6 \times \pi \times 6 \text{ cP} \times 0.15 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m/s}) \times 50 \mu\text{m/s} \\ &= 8.5 \times 10^{-8} \text{ dyn} \times 50 \mu\text{m/s} \\ &= 4.2 \times 10^{-10} \text{ erg/s} \end{aligned}$$

と計算される。1分子のATPのエネルギーは 10^{-12} ergであるから、1秒間に必要なATP分子の数は420で、効率を40%と仮定して1000分子あれば十分である。また、ミオシン分子のATP分解速度はこれまで測定されたものでは最大で20 /s/頭部であるので、このATP分解速度を達成するためには、0.3 μm 直径の小胞に少なくとも150分子のミオシンが付着していなければならないことになる。これは、ミオシン分子の大きさからして考えられない。車軸藻のミオシンがウサギミオシンの何十倍ものATPase活性をもっているということは信じ難く、また1秒間に6000以上、おそらく数万分子のATPを使って0.3 μm 径の小胞を運んでいることも考えにくい。このような困難も、今のモデルのように1 ATP 当たり長距離滑走すると仮定すれば解決する。

以上、アクチン・ミオシンの滑り運動メカニズムを新しいエネルギー変換の考え方で説明されるべきであることを明らかにしてきた。そして、この考え方によってこれまで"首振り説"では困難とされてきたいくつかの現象もうまく説明される可能性が大きい。

次の問題は、ミオシンまたはアクチンにどのような形でエネルギーが蓄えられ、どのような機構で負荷に応じてそれが小出しに放出され、滑

り運動に変換されるかをつきとめることである。

謝辞

本研究を御指導下さいました柳田敏雄助教授に深く感謝いたします。

多くの有益な御指摘をいただいた若林克三先生に深く感謝いたします。

電子顕微鏡観察で大変お世話になった東京都臨床研の月田承一郎先生に感謝します。

多くの有益な示唆を与えてくださった大沢文夫先生に心から感謝いたします。

葛西道生教授をはじめ葛西研究室の皆様には大変お世話になりました。

文献

- 1) Huxley, A. F. & Niedergerke, R. (1954): Structural changes in muscle during contraction. Nature 173, 971-973.
- 2) Huxley, H. E. & Hanson, J. (1954): Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature 173, 973-976.
- 3) 柳田敏雄 & 松原一郎 科学 (岩波) (1983): 筋タンパクが収縮力を発生するメカニズム I. 53, 515-522.
- 4) 柳田敏雄 & 松原一郎 科学 (岩波) (1983): 筋タンパクが収縮力を発生するメカニズム II. 53, 596-603.
- 5) Higashi-Fujime, S. J. Cell Biol. (1985): Unidirectional sliding of myosin filaments along the bundle of F-actin filaments spontaneously formed during superprecipitation. 101, 2335-2344.
- 6) Yano, M., Yamamoto, Y. & Shimizu, H. (1982): An actomyosin motor. Nature 299, 557-559.
- 7) Sheetz, M. P. & Spudich, J. A. (1983): Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. Nature 303, 31-35.
- 8) Yanagida, T., Nakase, M., Nishiyama, K. & Oosawa, F. (1984): Direct observation of motion of single F-actin filaments in the presence of myosin. Nature 307, 58-60.
- 9) Honda, H., Nagashima, H. & Asakura, S. (1986): Directional movement of F-actin in vitro. J. molec. Biol. 191, 131-133.
- 10) Kron, S. J. & Spudich, J. A. (1986): Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 83, 6272-6276.

- 11) Margossian, S. S. & Lowey, S. (1973): Substructure of the myosin molecule IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin. J. molec. Biol. 74, 313-330.
- 12) Cooke, R. & Franks, K. E. (1978): Generation of force by single-headed myosin. J. molec. Biol. 120, 361-373.
- 13) Tonomura, Y. (1986): "Energy-transducing ATPases-structure and kinetics" Cambridge.
- 14) Chaen, S., Shimada, M. & Sugi, H. (1986): Evidence for cooperative interactions of myosin heads with thin filament in the force generation of vertebrate skeletal muscle fibers. J. biol. Chem. 261, 13632-13636.
- 15) Spudich, J. A. & Watt, S. (1971): The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J. biol. Chem. 246, 4866-4871.
- 16) Szent-Györgyi, A. G. (1951): "Chemistry of Muscular Contraction" 2nd Ed. New York:Academic Press.
- 17) Wieland, Th. & Faulstich, H. (1978): Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. CRC crit. Rev. Biochem. 5, 185-260.
- 18) Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W. & Wieland, Th. (1975): Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. Biochim. biophys. Acta. 400, 407-414.
- 19) Pröchniewicz-Nakayama, E., Yanagida, T. & Oosawa, F. (1983): Studies on conformation of F-actin in muscle fibers in the relaxed state, Rigor, and during contraction using fluorescent phalloidin. J. Cell Biol. 97, 1663-1667.

- 20) Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F. A., Faulstich, H. & Wieland, Th. (1979): Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4498-4502.
- 21) Nagashima, H. J. Biochemistry (1986): Active movement of synthetic myosin filaments observed by dark-field light microscopy. 100, 1023-1029.
- 22) Huxley, H. E. J. molec. Biol. (1963): Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. 7, 281-308.
- 23) Eggleton, P., Elsdon, S. R. & Gough, N. (1943): The estimation of creatine and of diacetyl. Biochem. J. 37, 526-529.
- 24) Thames, M. D., Teichholz, L. E. & Podolsky, R. J. (1974): Ionic strength and the contraction kinetics of skinned muscle fibers. J. gen. Physiol. 63, 509-530.
- 25) Hynes, T., Block, S. M., White, B. T. & Spudich, J. A. (1987): Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. Cell 48, 953-963.
- 26) Yano-Toyoshima, Y., Kron, S. J., McNally, E. M., Niebling, K. R., Toyoshima, C. & Spudich, J. A. (1987): Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro. Nature 328, 536-539.
- 27) Yanagida, T., Arata, T. & Oosawa, F. (1985): Sliding distance of actin filament induced by a myosin crossbridge during one ATP hydrolysis cycle. Nature 316, 366-369.
- 28) Kabsch, W., Mannherz, H. G. & Suck, D. (1985): Three-dimensional structure of the complex of actin and DNase I at 4.5 Å resolution. EMBO J. 4, 2113-2118.

- 29) Kondo, H. & Ishiwata, S. J. Biochemistry (1976): Uni-directional growth of F-actin. 79, 159-171.
- 30) Tawada, K. (1969): Physiochemical studies of F-actin-H-meromyosin solutions. Biochim. biophys. Acta. 172, 311-318.
- 31) Fujime, S. & Ishiwata, S. J. molec. Biol. (1971): Dynamic study of F-actin by quasielastic scattering of laser light. 62, 251-265.
- 32) Bremel, R. D. & Weber, A. (1972): Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. Nature 238, 97-101.
- 33) Loscalzo, J., Reed, G. H. & Weber, A. (1975): Conformational change and cooperativity in actin filaments free of tropomyosin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3412-3415.
- 34) Coleman, T. R. & Mooseker, M. S. (1985): Effects of actin filament cross-linking and filament length on actin-myosin interaction. J. Cell Biol. 101, 1850-1857.
- 35) Kamiya, N. (1981): Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. A. Rev. Pl. Physiol. 32, 205-236.

参考論文

1. 原田慶恵 柳田敏雄
アクチンとATP
遺伝 40 37-42 (1986)
2. Yoshie Harada, Akira Noguchi, Akiyoshi Kishino & Toshio Yanagida
Sliding movement of single actin filaments on one-headed myosin filaments.
Nature 326 805-808 (1987)
3. 原田慶恵 Ewa Pröchniewicz-中山 柳田敏雄
筋収縮メカニズムのなぞに迫る
Butsuri 42 424-432 (1987)
4. Toshio Yanagida & Yoshie Harada
Minimum structural unit required for energy transduction in muscle.
Molecular Mechanism of Muscle Contraction (Sugi, H. & Pollack, G. H. eds.) Plenum New York 11-19 (1988)
5. Yoshie Harada & Toshio Yanagida
Direct observation of molecular motility by light microscopy.
Cell Motility and the Cytoskeleton in press
6. Yoshie Harada & Toshio Yanagida
Minimum functional unit in actomyosin energy transduction system. in preparation