

Title	X線溶液散乱法によるATP加水分解サイクルに伴ったミ オシンモータードメインの構造解析
Author(s)	杉本, 泰伸
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129141
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士論文

X線溶液散乱法による ATP 加水分解サイクルに 伴ったミオシンモータードメインの構造解析

大阪大学基礎工学部生物工学科 杉本泰伸

1997年1月

X線溶液散乱法による ATP 加水分解サイクルに 伴ったミオシンモータードメインの構造解析

大阪大学基礎工学部生物工学科 杉本泰伸

要約

X線溶液散乱法によって筋肉のエネルギートランスデューサー、ミオシン頭部(サブフラ グメント-1:S1)がATP加水分解中にグローバルな構造変化を起こしていることを明らか にした。構造変化をATP加水分解サイクルと対応させると、S1はヌクレオチドと結合して いない状態で最も大きな慣性半径を持ち、S1**.ADP.Pi(Pi:リン酸)の化学状態にあるとき に最もコンパクトになるような構造をもつ。Piを放出したS1*.ADPの状態ではこれらの中 間的な構造をとっていることが明らかとなった。また、リン酸アナログを用いた実験では、 S1.ADP.Vi(Vi:バナジン酸)、S1.ADP.BeF₃、S1.ADP.AlF₄のどれもがATP中のS1、すな わちS1**.ADP.Piと同様の構造をとっていることが分かった。このことはこれらアナログ と結合したS1はATP加水分解中の最も優勢な中間体の良い構造アナログにもなっている ことを示す。

詳細な構造変化を明らかにするために、S1の結晶構造解析による原子座標をもとにした モデル計算を行った。そのために、まず、ミオシン頭部の構造を複数のドメインに分割し、 それぞれのドメイン間のつながりを保ったまま相対的な位置関係を変化させるようにする ことで、分子のグローバルな構造変化を表現することができた。この時、各ドメイン内の 構造は変化させなかった。このようなドメイン化分子モデルについて散乱強度曲線を計算 し、実験値と比較することで最適なモデルを探索した。ミオシン頭部を残基番号でそれぞ れ1-204、216-464、465-626、647-710、711-843の5つのドメインに分割した。軽鎖は最 後のドメインに含めて扱った。ATP 加水分解中のミオシン頭部と、ADPと結合したミオ シン頭部について行った解析の結果は以下の通りである。まずATP加水分解中の構造モデ ルにおいて、最も顕著な構造変化が見られたのは710/711の残基間である。この部分での 変化は結果として軽鎖結合ドメインを動かすことになり、その末端での動きの大きさは約 50Åであった。電子顕微鏡によるアクチン-ミオシン複合体の三次元再構成に基づいた原子 モデルと同様の方向に分子を配置させると、この末端部分の動きには軸方向と繊維軸に垂 直な面内の動きの両方が含まれていることが分かった。また、頭部ドメインにある ATP 結 合部位やアクチン結合部位の構造変化が小さいことが予測された。一方、ADP 結合時のS1 構造モデルは、ATP加水分解中のモデルと比べた場合、710/711残基部分でのみ違ってい るという結果が得られた。すなわち、頭部ドメインの構造はATP 中のモデルと同等である が、軽鎖結合ドメインの構造変化は小さくて、約30Å程度の動きとなった。この場合も軸 方向の動きと繊維軸に垂直な面内の動きの両方が含まれていたが、軸方向の動きはATP 中 のものと比べて半分ぐらいであった。

i

目 次

	要約	i
1	 序論 1.1 ミオシン頭部の構造 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	1 3 4 5
2	 実験材料と方法 2.1 ミオシンの調製 ····································	7 7 9 10 13
3	実験結果3.1 小角散乱から決定された慣性半径と分子量3.2 散乱強度曲線と距離分布関数3.3 X線溶液散乱法により求められた構造パラメータ3.4 時分割X線溶液散乱法による解析	15 15 21 32 32
4	構造解析4.1 原子モデルによる散乱強度の計算4.2 構造変化のモデル構築4.3 最適モデル4.4 ATP加水分解中のミオシン頭部の構造解析4.5 ADPと結合したS1の構造解析	36 39 43 49 53
5	 考察 5.1 ATP加水分解反応とミオシンの構造変化	57 57 60 61 63 64 64 65 65 67
\mathbf{A}_{j}	ppendix	68

ii

Α	X線散乱の一般的な理論	68
	A.1 電子によるX線の散乱 ····	68
	A.2 単一粒子よるX線散乱 ····	69
	A.3 小角領域のX線散乱 ·····	70
	A.4 自己相関関数と距離分布関数 ·····	73
	A.5 分散系におけるX線散乱 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	74
в	モデル計算	76
	B.1 小球充填モデル ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	76
	B.2 タンパク質の水和を考えたモデル計算 ·····	77
	謝辞	78
	参考文献	79

1 序論

筋肉の収縮は繊維状に重合した二つのタンパク質、アクチンとミオシンが相互作用して 滑り合うような力発生をして起こる。図1-1に筋肉の構造の模式図を示す。ミオシンはATP の化学エネルギーを力学エネルギーに変換するトランスデューサーの役割を持ち、モーター 蛋白質のひとつに数えられている。ミオシン分子は非常に大きくて、2本の重鎖と4本の 軽鎖からなり、2個の頭部と長い棒状の尾部をもつ。このうち頭部はタンパク質分解酵素 で切断して単離することができ、サブフラグメント-1 (S1)と呼ばれる。S1にはATPase 部位やアクチン結合部位が保持されていて、筋肉の張力発生に関与する最小単位であるこ とが知られている。筋肉中では、ライトメロミオシン (LMM)と呼ばれる尾部がらせん状 に重合して太いフィラメントの骨格を構成し、S1部分はこの骨格から規則正しく突き出し ている。

一方、アクチンは平たい分子構造を持ち、筋肉中では重合して繊維状のF-アクチンとし て存在する。F-アクチンもらせん構造をとっていて、トロポニン、トロポミオシンと呼ば れる制御タンパク質と共に細いフィラメントを形成している。

これらの細いフィラメントと太いフィラメントが規則的に平行配列することでサルコメ ア構造を形成している。筋収縮はそれぞれのフィラメントを形成しているアクチンとミオ シンの相互作用の結果生じる。しかしながら、二つのタンパク質がどのような相互作用で 力を発生しているのか、特にその分子的な機構はどのようになっているのか、という問題 は依然解明されていない。ひとつの仮説として、いわゆる「ミオシンの首振り説」と呼ばれ るものが提唱されている。この仮説は、アクチンと結合したミオシン頭部が構造を変化さ せることによってレバーの操作に似た運動が生じて、力が発生するというものである。こ の時、ミオシン頭部の構造変化およびアクチンとの結合解離はATPの加水分解反応と共役 して起こるというのが、この仮説の本質であり、したがって様々な方法でミオシンの構造 変化を捉える研究が続けられてきた。

これまでにいくつかの実験事実から、ATP 加水分解中のミオシン頭部の構造変化が観測 されている。またその事実から、筋収縮の機構が解明されたともいわれている。しかしな がら一方で、まったく異なった解釈により、筋収縮の本質は別の部分にあるとする考え方 があり、議論は決着がついていない。これらのいずれの場合にしても、主要なタンパク質 について結晶解析が行われている現在、構造、あるいは構造変化を無視して議論を進める ことはできない。したがって筋収縮のしくみ、さらにはモータータンパク質の構造と機能 の関係を議論するために、化学反応過程の構造変化の詳細を明らかにすることが望まれて いる。



図 1-1: 筋肉の構造の模式図。筋肉は主にアクチンからなる細いフィラメント (thin filament) と主にミオシンからなる太いフィラメント (thick filamnet) が互いに滑りあうことで収縮す る。太いフィラメントからは周期14.3nm で二つの頭部からなる突起が出ている。

1.1 ミオシン頭部の構造

ミオシン全体は2つ重鎖と4つの軽鎖からなる分子量470kDのタンパク質であるが、この うちS1は重鎖の一部と軽鎖2つを持ち、ミオシンに2つ存在して、分子量はおよそ130kD である。電子顕微鏡などによる研究から、S1は西洋梨、あるいはおたまじゃくしのような 形であるといわれてきた。X線や中性子線を使った溶液散乱法による構造研究も行われ、 三次元再構成の結果をもとにX線溶液散乱のデータを説明するモデルでは、S1はドメイン 構造をとっており、輪郭長約190Åの折れ曲がった形をした分子であった¹⁾。1993年、X線 結晶構造解析によりミオシン頭部の原子構造が発表された²⁾。一部分の構造は解けていな い状態であり、またα-炭素の座標のみの発表であったが、原子構造からATP 結合部位に あるクレフト部分の構造変化が分子の末端に伝達されるような構造変化が収縮に重要な役 割を担っている可能性などが推測された³⁾。



図 1-2: Rayment ら²⁾ によるニワトリ骨格筋ミオシン S1の結晶構造モデル

図1-2にミオシンの原子構造のリボンモデルを示す。全体として非対称性の大きい、α-ヘリックスの多い構造で、特にC末端側の軽鎖結合部位は長さ85Åにおよぶ長いα-ヘリッ クスが走っている。主に生化学的な研究からS1には大きく分けて25kD、50kD、20kDと 呼ばれる3つのドメインが存在すると言われてきたが、構造解析の結果からはさらに50kD ドメインは大きなクレフトの存在により2つに分けられることが示された。ただしクレフ トの部分には20残基のループが見えていない。これらは上側50kDドメイン、下側50kDド メインと呼ばれ、アクチンの結合部位が含まれる。一方ヌクレオチドを結合する部位は3 つのサブドメインの境界近くのポケットに存在し、ヌクレオチド結合タンパク質に特有な P-Loopと呼ばれるモチーフを持っており⁴)、共通の様式でヌクレオチドを結合するものと 見られている。また構造的にも ras などのタンパク質と似ていることも議論されている。ヌ クレオチド結合部位とアクチン結合部位は分子内であるつながりを持つと言われている²)。

1.2 ミオシンの構造変化と ATP 加水分解反応

ミオシンはATP加水分解の化学エネルギーを利用して滑り運動を行っている。ATPの加水分解反応の経路にしたがって、結合するヌクレオチドによって区別されるいくつかの ミオシンの中間状態が平衡的にあるといわれている。図1-3には教科書等に記述されている ミオシンのATP加水分解反応サイクルを示す⁵⁾。



図 1-3: ミオシンによる ATP 加水分解反応サイクル⁵⁾。図中でMはミオシンを表し、*はミ オシンの状態が異なっていることを示す。

「ミオシン首振り説」によれば、ミオシン頭部はこれらの各状態に対応した構造を持ち、 ATPの加水分解と共役した構造変化がアクチンとの結合、解離を繰り返す中で起こり、こ の構造変化が収縮に直接関係する。この仮説を検証するために、様々な方法でATP加水分 解中のミオシン頭部の構造が調べられてきたが、期待されるようなグローバルな構造変化 を示す明確な結果は得られなかった。

しかしその後、電子顕微鏡による観測で、S1.ADP.Piのアナログとして知られている S1.ADP.Vi (Viはバナジン酸)を用いて急速凍結した試料の電子顕微鏡像はヌクレオチド を結合しないS1のものとくらべて、曲がった状態にあるS1が多く存在することが示された ^つ。さらに、我々の研究室のX線小角散乱による研究から、ATP 加水分解中のS1 にはっき りとしたグローバルな構造変化が初めて示された¹⁾。溶液中に ATP が十分に存在する場合、 定常状態では図1-3で示すスキームのうち(4)のステップが律速段階であり、このことによ り 21°(1では約87%のミオシンが M**.ADP.Piの状態にあることが生化学的に見積もられて きた¹⁰。したがって、X線溶液散乱でとらえられた構造変化はS1.ADP.Piの状態で生じてい るものであり、同時にS1.ADP.Viにおいて同様の構造変化が観測されたことによっても支 持された。また、本研究でS1.ADP の状態ではヌクレオチドを結合しないS1 と S1.ADP.Pi との中間的な構造をとることが示された。

ほかにも電気複屈折による hydrodynamic size の測定⁸⁾ や中性子線溶液散乱による解析¹⁰⁾、アクチンフィラメントと結合したミオシン頭部の三次元再構成^{11,12)}などの研究から も、加水分解反応中、あるいは加水分解中間体のミオシンの構造変化が観測されてきた。 このような研究の先駆けとなったのが、我々の研究室におけるX線小角散乱の研究であっ た¹⁾。

1.3 X線溶液散乱法によるミオシン頭部の構造研究

X線溶液散乱法は構造研究のための手法の一つである。長所として、溶液中で染色、固定を必要としないで観測できるためタンパク質の本来の構造を知ることができる。また、 基質との結合、分解、解離といった酵素反応中であっても構造を調べることができる。ー 方、まさに溶液中にあるという同じ理由で、観測されるX線散乱像は空間平均されたもの となる。すなわち、溶液中では物質の方向は無秩序でありかつ運動しているので、観測す る試料溶液中の物質の数量的な平均(個々の分子は無秩序な方向性を持っている)、および 観測する時間的な平均(分子の運動によりいろいろな方向を向く)によって、異方性に基づ く構造情報の多くの部分が引き出しにくくなる。したがって物質の微細構造を特定するこ とが困難である。これらのことから、X線溶液散乱では物質の巨視的な構造を観測し、主 として大きさに関するパラメータを知ることに用いられてきた。そのもっとも典型的な量 が慣性半径や分子量、分子のコード長である。

慣性半径は分子の二次モーメントを体積で規格化した量であり、したがって長さの単位 を持つ。同一の体積と密度を持つ物質であっても、その形(空間的な分布)が異なることで、 慣性半径は異なった値を持つ。このため、溶液散乱で観測する場合、構造変化のもっとも 基本的な指標となる。一方分子量は、観測された散乱強度から原点における散乱強度を求 めることで、原点散乱強度が(分子量)×(試料濃度)に比例することを用いて求めることが できる。これら二つの量は溶液散乱法で求められるもっとも基本的な構造パラメータであ る。これ以外にも、広い範囲の散乱強度分布の測定を行いこれをフーリエ変換することに よって距離分布関数が求められ、分子内ベクトル長分布や分子最大長を評価できる。

また、他の知見から構造に関する情報があるのなら、それらをもとにしてモデルを立て、 さらに詳細な構造を求めることも可能である。さらに、原子構造が分かっている場合には 空間平均された密度分布の情報などを計算することでより具体的な構造変化の解析が進め られる。

さて、ミオシン頭事の場合、収縮のエネルギーを ATP の加水分解による化学エネルギー

から得ているので、ATPの有無による結果を比較することにより、X線溶液散乱法で加水分 解中のミオシン頭部の構造を調べることができる。さらに、X線結晶構造解析によりATP 非存在下でのミオシン頭部の原子座標が発表されているので、これを利用して原子構造に 近いレベルで構造変化の解析が行える可能性がある。

以上のことをふまえ、ヌクレオチドを結合させたミオシン頭部についてシンクロトロン 放射光を使ってX線溶液散乱実験を行い、これらの構造を原子座標を用いたモデルで解析 を行った。その結果は結晶中では測定が困難なほど大きな構造変化が示された。構造的な 見地からミオシン頭部のATP加水分解反応の過程を理解し、さらに筋肉の収縮の仕組みを 調べていくことが本研究の目的である。

2 実験材料と方法

2.1 ミオシンの調製

ミオシンはニワトリの胸筋 (骨格筋)から得たもので、パパインを用いてサブフラグメン ト-1 を以下のように調製した¹⁾。

- 1. ニワトリの胸筋をとり、氷づけにする。低温室内でミンチにし、これに3倍量のGuaba-Straub solution (0.3M KCl、0.15M KPi、pH6.5)を加える。
- 2. ゆっくりと攪拌し、ミオシンが抽出される10分後に遠心する(9K、5分)。上清をさ らにナイロンゴースでこす。
- 3. こし分けた溶液に10倍量の再蒸留水を加える。ミオシンはフィラメントを形成する ので、遠心により沈殿させる。
- 4. 上清を除いて 0.3M KCl、5mM MgCl₂、1mM ATP、5mM PIPES (pH 7.0) の溶液を 加えてミオシンを溶かし、超遠心(45K、80分)を行う。
- 5. 上清をとり5倍量の0.3mM NaHCO₃溶液を加えて、遠心でミオシンを沈殿させる(8K、 10分)。沈殿を取り出し、cutting buffer (40mM NaCl、10mM imidazole、2mM MgCl₂ 、pH 7.0)で懸濁させる。
- 20mg/ml、20°Cでインキュベートしたミオシンに、パパインを加えて10分間反応 させる。この時、パパインはあらかじめ5mM cystein、2mM EDTA (pH 6.2) 溶液 で2mg/mlに希釈して30分間インキュベートしておき、ミオシンと混合することで 10µg/mlになるようにする。
- DMF (dimethylformamide)に溶かしたE64 *1 を5mM に希釈し、ミオシン反応液に 最終濃度50µM になるように加えて、反応を停止させる。
- 8. 遠心後、上清のS1を得る。

2.2 X 線溶液散乱実験

X線散乱溶液散乱実験はつくば市にある高エネルギー物理学研究所放射光実験施設ビー ムラインBL-15Aの小角回折計¹³⁾を用いて行った。タンパク質を構成する原子はもともと X線の散乱能が低い上、溶液との電子密度の差によって分子の散乱が生じるので、非常に 弱い散乱X線を効率よく記録するために、さらには反応中の分子変化をとらえるためには シンクロトロン放射光による実験が必須となる。放射光実験施設BL-15Aは筋肉の回折実 験を念頭に置いて設計されたもので、強力なX線と高性能の光学系および検出器が使用で きる。光源加速器は陽電子を蓄積するストレージリングで、陽電子エネルギー2.5GeV、電 流はおよそ250-350mAで運転されている。図2-1にはBL15Aの小角散乱用光学系を模式的 に示す。光源から取り出された白色光は全反射ミラーと湾曲結晶モノクロメータによって 収束、単色化される。このとき、焦点面は検出器位置となる。試料位置でのビームサイズ

7





は垂直方向約1mm、水平方向約2mmとし、X線の波長は約1.5Åとして実験を行った。また、試料の直前に置かれたイオンチャンバーで入射X線の強度をモニターする。

試料はステンレス製の試料セルに入れて測定を行った。試料セルの容量は約40μℓで、厚 さは1mm、X線入射窓の両側に厚さ約15μmのマイカ薄片を貼って窓材とした。試料セル は水を流したセルホルダに入れることによって温度を一定に保つように作られている。

X線は、試料部分と検出器直前では空気中を通過するが、それ以外のほとんどでは真空 パイプ内を通過する。試料セルから検出器位置までのカメラ長は約2500mmとした。この 場合、散乱ベクトル $|\mathbf{S}| = 2\sin\theta/\lambda$ で $0.002 \le S \le 0.02(\text{Å}^{-1})$ の範囲の散乱強度が得られ る。また、さらに広い範囲の散乱強度曲線を得るために、約1100nmのカメラ長でも実験を 行った。これらのデータを併用することで、散乱ベクトルでおよそ $0.002 \le S \le 0.05(\text{Å}^{-1})$ の範囲の散乱強度を観測できる。

X線検出器としては一次元位置敏感型比例計数管(one dimensional position sensitive proportial detector: 1D-PSD、理学電機社製)を用いた。比例計数管は、入射X線によっ て気体原子から電離した電子を陽極線の近傍でガス増幅させることにより、X線光子を電 気パルスとして検出する装置である。また、位置を決定する方式としては遅延線法が用い られている。位置情報はディジタル化されて、各チャンネル位置でのX線光子数としてメ モリ上に記録される。これらのデータは計算機 (SPARC station 4, サンマイクロシステム ズ)により制御されており、同時に蓄積リングの電流値、イオンチャンバーの電流値も記録 される。検出器の有効長や位置情報のサンプリングチャネル数、測定時間などもプログラ ム上で制御される。

測定時の検出との条件は有効長170mm、サンプリング数512chとし、検出器前面に開口幅 6mmのスリットを置いた。また、直接光が検出器に入射するのを防ぐため、約8mm×8mm の鉛のビームストップを設置すると共に、検出器前面に貼りつけた幅10mm 程度の鉛板で ビームの漏洩を防いだ。なお、X線溶液散乱の場合、散乱パターンは直射光の位置を中心と した等方的なものであり、したがって一次元の強度分布になる。二次元で散乱強度を積算 計測することで精度よい解析が可能となるが、現状では、位置的な不均一性/歪みや、個々 の検出器間での感度の違いなどにより、適当な二次元検出器が溶液散乱ように使用できて いない。

2.3 ミオシン頭部のX線溶液散乱

前述のような条件下で試料セルに入れたミオシン溶液にX線を照射し、その散乱强度を 1次元検出器により測定、記録した。照射時間は3分間とし、その間の散乱光子数を積分 して計測するような静的な測定モードで行った。試料セルの温度は18.5°Cに保った。

各試料は精製したS1を実験直前にカラム濾過して用いた。ヌクレオチドを含まない溶液、 およびMgATP、ADP、ADP.Vi(Viはバナジン酸)、ADP.BeF₃、ADP.AlF₄の溶液中のS1 についてX線散乱を計測した。S1の濃度は3-8mg/mlの間で3-5点の測定を行った。ATP、 ADPの濃度は5mMで、BeF₃、AlF₄は1mMである。また、ATPはS1により加水分解され

^{*1}L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidinobutane)

るが、測定中に完全には消費されないように ATP を実験直前に加えた。この場合の測定も 静的に行った。すべての溶液は10mM imidazole (pH7.0), 150mM KCl, 0.5mM DTT を含 んでいる。

2.4 時分割X線溶液散乱実験

静的な測定により MgATP 中のS1の構造には、S1のATP 加水分解サイクルのうちもっ とも優勢な S1.ADP.Piの構造がもっとも強く反映されているが、時間的に平均された構造 となっている。そのため、実際に構造変化が起こっているという時間変化を観測すること が望まれる。しかしながら、加水分解サイクルに伴った構造変化を直接追いかけるために は、X線散乱の時分割測定を行うと共に、溶液中でミオシンの ATP 加水分解反応を同調さ せる必要がある。この問題を解決するために、Caged ATP を用いた時分割 X線散乱実験を 行った。

CagedATPは光反応により分子内のATPを遊離させるので、S1は遊離されたATPと結 合して加水分解を始める。フラッシュ光で短時間に遊離させた場合、いっせいにS1とATP の結合が起こり、加水分解反応がすべてのS1で同様に進行する。またこの時遊離される ATPとS1の分子数の比を1:1になるようにしておけば、ATP加水分解反応1回分の構造変 化を観測できることになる。

これらの条件にしたがって、静的な測定時と同様に高エネルギー研究所放射光実験施設 のビームラインBL-15Aで実験を行った。基本的な光学系および検出器は静的な実験の場 合と同じであるが、一部分で異なっている。

まず検出器は静的な測定と同様に1D-PSDを用いたが、時分割測定のための制御プログラムを使って測定を行った。これにより、測定の開始と同期させてトリガー信号を取り出してフラッシュ光を発生させ、加水分解の過程を複数の時相区間に分割して記録することができる。自分かつ測定の方式を図2-2にあらわした。

また、試料セルには Caged ATP を用いるためのものを用意した (図2-3)。これは X線が入 射する方向とフラッシュ光が入射する方向の両方で光が通るようにしたもので、厚さと深 さが 1mm でありマイカ片を窓材とした液曹にマイカ片で上からふたをしたような形をして いる。上部のマイカ片にフラッシュ光源から伸ばされた光ファイバーを通してフラッシュ 光を溶液に照射する。フラッシュ光は水溶液中を進むことで減衰するので、光源から遠い 位置までは届かない。目的の濃度で Caged ATP を遊離させるフラッシュ光の強度が保たれ るような深さが 1mm である。



図 2-2: CagedATPによる時分割X線溶液散乱測定の方式。

11



図 2-3: CagedATPを用いた実験に使った試料セル。

2.5 データ解析

一次元板出器で測定された散乱強度は以下の手順で処理された。

- (1) 測定されたデータには目的のタンパク質試料の散乱とともに、溶媒となる溶液や、試料セルを含む光学系の散乱も含まれている。したがって、これとは別に試料を含まない溶媒の散乱強度を測定し、両者の差をとることで試料だけからの正味の散乱強度を得た。このとき、実験条件として光学系、用いた試料セル、温度、照射時間などは同一とし、できるだけ近い時間に両者の測定を行った。また、試料セル直前に置かれたイオンチャンバーにより試料に入射するX線の強度をモニターし、測定時間中の平均強度によって規格化したあと差をとるようにした。以下では溶媒による光学系の散乱をバックグラウンド散乱と呼ぶ。
- (2) 一次元の散乱強度データは中心対称を持つので、強度プロファイルの中心を決定した 後、折り返し加算することでS/Nを上げた。ただし、検出器の問題によって強度プロ ファイルが左右で非対称になる場合や、感度の不均一性が存在する場合があり、この ような時には折り返し操作をしない。データが非対称になる原因は、検出器のpoint spread function (PSF)の非対称性であることが分かったので、その影響がほとんど ないと思われる方向のデータだけを採用した。
- (3) ギニエプロットを行う。式(A.27)によれば、観測された散乱強度についてその対数値 を散乱ベクトルの絶対値 |S| の自乗に対してプロットすれば散乱曲線はSの小さい領 域において一次式で近似できる。その直線の傾きおよび切片から、慣性半径と原点散 乱強度が得られる。このようにして行うギニエプロットにより、各観測データについ て慣性半径、原点散乱強度を求めた。直線近似する領域を 0.0028 ≤ S ≤ 0.0047Å⁻¹ とし、この範囲で最小自乗近似を行った。慣性半径は Å 単位で求め、また原点散乱 強度はX線光子のカウント数を単位としX線の照射時間とイオンチャンバーの電流値 で規格化したものを求めた。
- (4) 複数の濃度によって行われた実験結果から、慣性半径および濃度で割った原点散乱強度の濃度依存性を調べた。これらを分散で重みをつけた最小自乗法で直線近似し、濃度が0における点での外挿値を求めた。この値が無限希釈溶液での真の慣性半径、また原点散乱強度である。さらに、原点散乱強度からは、同じ条件で測定したタンパク質、ウシ血清アルブミン(BSA)の原点散乱強度を求めこれを標準とし、相対的に分子量を求めた。
- (5) 各濃度で測定された散乱強度曲線を用いて、それぞれの散乱角で濃度0の外挿値を求 める。これにより無限希釈溶液での散乱強度曲線を得ることができる。
- (6) 短いカメラ長で測定した散乱曲線には、より大きな散乱角の領域までの強度データが 含まれている。長いカメラ長で測定した後濃度による補正を行った散乱曲線とあわせ ることで、広い領域にわたる正確な強度データを得た。このとき、短いカメラ長で測

定した広角のデータには濃度による補正は行っていない。これは有限濃度による干渉 は小角領域ほど顕著であり、逆に広角の領域では無視できる程度であるからである。

- (7) 散乱曲線から距離分布関数 *p*(*r*) を計算した。散乱曲線は広角側で有限であるので、 打ち切り効果を最小にするために本研究では *p*(*r*)の計算に最大エントロピー法、あ るいは減衰関数を入れて直接フーリエ変換する方法を用いた。
- (8)時分割測定を行ったデータについても上記の手順に準じて解析を進めた。ただし、1 回の測定では強度が弱いので、数十回の測定を繰り返してそれらを加算したもので解 析を行った。また、バックグラウンド散乱については静的な測定を行い照射時間(測 定時間間隔)に応じた係数をかけて差をとるようにした。これは散乱強度からバック グラウンド散乱を引くときの誤差の伝搬を最小限に抑えるためである。

以上の処理は主に、UNIX ワークステーションで開発しX-Window 上で作動するプログラ ムを用いて行った。

3 実験結果

3.1 小角散乱から決定された慣性半径と分子量

散乱強度は式(A.26)にしたがってギニエプロットをおこない、Sの小さな領域での散乱 曲線を直線近似することにより慣性半径 (Rg)と原点散乱強度(I(0))を求めた。このとき直 線近似の範囲は0.0028 $\leq S \leq 0.0047$ Å⁻¹ とした。これは検出器上では20チャンネル分 (30ch-50ch)に相当する範囲である。また、予想される Rg から見積もったギニエの基準値 (2πSRq < 1)を含む領域となっている。図3-1にギニエプロットの例を示した。

このようにして散乱強度のギニエプロットにより求められる慣性半径は、有限濃度での 見かけの慣性半径であり、粒子間の干渉による効果が含まれているため、複数の濃度にお いて散乱強度を観測して慣性半径を計算し、その濃度依存性を調べてゼロ濃度における外 挿値を真の値とする。式(A.48)にしたがって慣性半径の二乗を濃度に対してプロットした ものを図 3-2に示す。またその結果得られた真の慣性半径を図 3-3に示した。

もっとも重要な結果として、ATP 加水分解中のS1 の慣性半径がヌクレオチドを結合しないS1 とくらべて約3Å小さくなっていることがあげられる。また、ATP 中のS1 と同様の変化がリン酸アナログ物質である Vi や BeF₃との複合体である S1.ADP.Vi、S1.ADP.BeF₃でも見られた。一方、ADP と結合した S1.ADP の慣性半径は、ヌクレオチドを結合しないS1 と ATP 存在下でのS1(あるいはリン酸アナログと結合している S1.ADP.AlF₄ や S1.ADP.BeF₃)の中間的な値を示している。S1.ADP.Vi はどちらかというと S1.ADP に近かった。また、S1.ATP_γS や 2 価性の架橋剤 *p*PDM で SH1–SH2を架橋させて ADP をトラップさせた S1.ADP-*p*PDM などについてはヌクレオチドを結合しない S1 と同程度の慣性半径となった。

以上の結果から、S1がATP加水分解中に全体の構造としては分子の重心付近に質量が 集まってくるような変化を起こしていることが分かった得られた真の慣性半径の値を表 3-1 にまとめる。

sample	Rg (Å)
S1 No Nucleotide	47.80±0.40
S1 in MgATP	45.04±0.22
S1.ADP	46.68±0.50
S1.ADP.Vi	46.11±0.31
S1.ADP.BeF₃	45.24±0.52

表 3-1: ゼロ濃度に外挿した慣性半径の真の値

また、ギニエプロットの縦軸切片から求められる原点散乱強度は分子量と濃度に比例した量である。分子量と原点散乱強度の関係は式(A.29)にしたがって得られるが、X線の絶

対強度の測定が困難なので、標準試料として分子量既知のウシ血清アルブミン(BSA)を用いて相対的に分子量を求めた。

原点散乱強度は入射X線の強度や測定を行う光学系に依存する。同一の条件で測定した 試料について、入射X線強度とタンパク濃度で原点散乱強度を規格化した。また、慣性半 径と同様に原点散乱強度にも分子間の相互作用に由来する濃度依存性があるので、観測値 *l*(0,*c*)を濃度に対してプロットしたものを図3-4に示す。このような濃度に対するプロット からゼロ濃度における外挿値を求めて分子量を得た。得られた分子量を表3-2に示した。

sample	MW (kD)
S1 No Nucleotide	124.8±9.6
S1 in MgATP	127.6±12.1
S1.ADP	124.0±1.5
S1.ADP.Vi	124.2±3.8
S1.ADP.BeF3	127.2±5.6

表 3-2: 原点散乱強度から求められた S1 の分子量

٠



図 3-1: ギニエプロットの例。測定された散乱強度をもとにして、縦軸を強度の対数 ($\ln[I(S)]$)、横軸を S^2 でプロットするようなギニエプロットを行った。S1のギニエブロットに対して 0.0027 $\leq S \leq 0.0048$ Å⁻¹の範囲で直線近似を行った。図では各試料のギニエプロットに対して、垂直な2本の破線が直線近似を行った範囲を示し、近似された直線も同時に示してある。また、各試料での違いがわかりやすいように、縦軸はそれぞれの試料について分けてある。



c (mg/ml)

図 3-2: (a) 慣性半径(Rg)の濃度依存性。各測定濃度における平均と分散を求めて図示し、 これをもとに重み付きの直線近似を行った。試料に対応する記号は図中に示した。(b) 式 (A.48)にしたがって、慣性半径の二乗を濃度に対してプロットし、直線で近似した。a、b ともに濃度ゼロでの真の慣性半径の値はほとんど変わらなかった。



図 3-3: 図 3-2の濃度依存性から決められたいろいろなヌクレオチドを結合したミオシン頭部(S1)の真の慣性半径。



図 3-4: 原点散乱強度の濃度依存性。式(A.47) にしたがって c/1(0) を濃度(c) に対してプロットした。

3.2 散乱強度曲線と距離分布関数

散乱強度曲線のうち小角領域には分子全体的な大きさの構造情報が、広角領域には分子 の形態や内部の構造情報が含まれている。慣性半径等の決定にはできるだけ小角部分まで 正確に測定する必要がある一方、より詳細な構造解析には広角領域の散乱強度を得ること が不可欠である。光学系の制限から一つの実験ですべての散乱角度範囲を含めた測定は困 難であるので、カメラ長を変更することで目的とする散乱角度領域を限定した測定を行っ た。測定後、これらの散乱曲線をつなぎ合わせることで広い散乱角度範囲にわたる散乱強 度をもとめ、これを構造解析に用いた。

散乱強度は散乱角と濃度の関数であるので、観測された散乱強度I(S,c)からゼロ濃度散 乱強度I(S,0)を求める必要がある。有限濃度による分子間の干渉は小角領域ほど、また濃 度が高いほど顕著なので、各散乱角においてゼロ濃度散乱強度を外挿して求めていった。 このとき、広角領域では濃度効果が無視できると考えられるので、 $S \sim 0.015$ の強度で各濃 度における散乱強度曲線を規格化した。この様子を図3-5 に示した。こうして得られた小 角領域の散乱強度に、短いカメラ長で得た散乱強度データをあわせて用いることで、広い 角度範囲の散乱強度を正確に得ることができる。高角領域の散乱強度は小角領域に比べて 2 桁以上も弱いので、~50mg/ml 程度のタンパク質濃度の溶液で測定した。二つの散乱強 度をつなぐ様子を図3-6に示す。最小角側は得られた慣性半径を用いてギニエの近似式から 外挿して求め、つなぎ合わせた。両者の強度は $0.015 \le S \le 0.020$ で残差が最小になるよう に規格化して一致させた。

各試料について求めた散乱曲線を図3-7に示す。

これらの散乱曲線の変化をわかりやすくするために、横軸に観測された慣性半径をかけ てプロットしたものを図3-8(a)、3-9(a)、3-10(a)に示す。このようなプロットは、分子の大 きさの違いによる散乱強度の違いを補償する。すなわち、形が同じで大きさだけが違うよ うな相似形の分子の散乱強度は、このプロットで比較した場合に一致する。ヌクレオチド を結合しないS1とATP中のS1を比べた場合(図3-8(a))、このようなプロットでは散乱強 度曲線の違いがはっきり現れている。このことは、この場合の慣性半径の変化は分子全体 が相似形で小さくなるような構造変化ではなく、分子の形態が変化しているような構造変 化であることを意味する。同様な形態の変化を見るやり方として、散乱強度に散乱ベクト ルの大きさの二乗をかけたものを散乱ベクトルに関してプロットをする、いわゆる Kratky Plot と呼ばれるプロットがある。この場合も中角領域から高角領域にかけての散乱強度の 変化がよく分かる(図3-8(b))。

リン酸アナログとの複合体であるS1.ADP.BeF₃に関する2つのプロットを図3-9(a)、(b) に示した。同時にATP中のS1に関するプロットも示されているが、ADP.BeF₃と結合した S1はATP中のS1と似た変化をしていることが明らかである。

図 3-10(a)、(b)には ADP を結合した S1 に関する 2 つのプロットがヌクレオチドを結合していない S1、ATP 中の S1 のものと比較してある。S1.ADP に関するプロットは、大体において ATP 中の S1 のものと似ており、ATP 中の S1 と似た方向の形態変化を示唆している。



図 3-5: ゼロ濃度の散乱強度曲線の求め方。Sの小さな領域では干渉効果により散乱強度曲線も影響を受けるので、入射X線強度と濃度で規格化した散乱強度曲線から無限希釈溶液による散乱強度を求める。それぞれのSの位置で各濃度の散乱強度をもとにゼロ濃度の散乱強度を外挿する。



図 3-6: 小角領域のゼロ濃度散乱強度曲線と高角領域の散乱曲線の結合。



図 3-7: 様々な試料についての散乱強度曲線。2種類のカメラ長で実験して得られた散乱 強度をつなぎ合わせることで広い範囲の散乱強度曲線を得た。また、極小角領域では慣性 半径の値を用いて、ギニエの近似式にしたがって曲線を外挿した。縦軸はヌクレオチドを 結合しないS1を基準にして矢印の大きさだけそれぞれシフトさせて示してある。



図 3-8: (a) 強度の対数を縦軸にとり、横軸は散乱ベクトルの大きさに慣性半径をかけた S-Rg でプロットしたもの。(b) 縦軸は強度に散乱ベクトルの大きさの二乗をかけた $I(S) \times S^2$ 、 横軸は散乱ベクトルの大きさSでプロットした Kratky プロット。ヌクレオチドを結合しな いS1 と ATP 中の S1 の比較。



図 3-9: (a) $I(S) \sim S \cdot Rg$ プロット、(b) Kratky プロット。ヌクレオチドを結合しないS1、ATP 中のS1 とS1.ADP.BeF₃の比較。



図 3-10: (a) $I(S) \sim S \cdot Rg$ プロット、(b) Kratky プロット。ヌクレオチドを結合しない S1、ATP 中の S1 と S1.ADP の比較。

次に、ゼロ濃度に外挿し広い範囲で求めた散乱強度曲線をもとに、距離分布関数p(r)を計算した。ヌクレオチドを結合しないS1のp(r)はおよそr=40Åにピークを持ち、それより大きいrで緩やかに減少する、非対称なものであった。p(r)=0に落ちるrは約160Åであった。

また、ヌクレオチドを結合しないS1、ATP 中のS1 およびS1.ADP.Vi については、最大 エントロピー法による p(r) の計算¹⁵⁾を行った。この方法により、計算途中の artifact によ る振動を防ぐことができ、分子最大長も正確に求めることができる。最大エントロピー法 で計算した p(r)を比較して図3-12 に示した。

いずれの場合もヌクレオチドを結合することでr=85-90Åを境にしてそれより大きいrの 領域でp(r)の値が小さくなり、逆に小さいrの領域でp(r)の値が大きくなった。これらは 分子内ベクトルの大きさで、長い成分が減って短い成分が増えたことを意味する。分子最 大長(コード長)はヌクレオチドが結合していないときは約160Åで、ATP 中や ADP.Viと 結合すると約10Å減少した。



図 3-11: 種々のヌクレオチドを結合したS1のp(r) 関数とヌクレオチドを結合しないS1のp(r) 関数の比較。





図 3-11: p(r) 因数の比較(続き)。


図 **3-12**: 最大エントロピー法で求めた、ヌクレオチドを結合していないS1と ATP 中のS1、 ADP.Viを結合したS1の*p*(*r*) 関数の比較。

3.3 X線溶液散乱法により求められた構造パラメータ

X線溶液散乱実験の結果、主に小角領域のギニエプロットから慣性半径や分子量といった分子の大きさに関するパラメータが得られる。

式(A.48)、(A.47)にしたがって無限希釈溶液における慣性半径、原点散乱強度の真の値 を求めたが、一方で慣性半径の濃度依存性の傾きからは分子間干渉に由来する係数が求め られ、また c/I(0)の濃度依存性の傾きからは分子間相互作用に由来する第2ビリアル係数 が求められる¹⁶⁾。

また、パーセバルの定理に基づいた考察から逆空間全体の強度の積分をもとにして、散 乱粒子の体積を求めることができる。さらに、partial specific volume を用いることで分子 の水和量を得ることができる。

このようにして、X線溶液散乱から求められるさまざまな構造に関するパラメータを表 3-3にまとめた。partial specific volumeはTamuraら¹⁷⁾による。

	volume (ų)	pertial specific volume (cm ³ /g)	水和量 _(g/g)
S1 No Nucleotid	228915	0.713	0.33
S1 in MgATP	241916	0.739	0.36
S1.ADP.Vi	228044	0.739	0.30
S1.ADP	263172	0.710	0.49

表 3-3: X線溶液散乱データから得られた構造パラメータ。

3.4 時分割 X 線溶液散乱法による解析

CagedATPを用いた時分割実験を試みたが、それぞれの測定時間については静的な測定 法と同様の処理を行える。図2-2で示した時分割方式で測定した各測定フレームの露出時間 は非常に短時間なので、約20回の実験を行い、これらをフレームごとに加算して散乱強度 を得た。同時に、同様な実験系でCagedATPを含まない溶液を用いた対照実験も行った。 また溶媒の散乱強度は静的な測定によってデータを得た後、時分割測定の各フレームの測 定時間に応じた係数によって規格化して差をとった。これは、溶媒についても同様の時分 割測定を行い各フレームごとの差を取る方法よりも、少ないノイズのデータを得るためで ある。

このようにして得た散乱強度に対してギニエプロットを行い、三次元の鳥瞰図としてあ らわしたものを図3-13に、求めた慣性半径を時間の関数としてあらわしたものを図3-14に 示した。

32



図 3-13: CagedATPによる時分割X線溶液散乱によるミオシンS1のギニエプロット。散乱強度のギニエプロットを時間の関数として鳥瞰図で示した。



図 3-14: CagedATPによる時分割X線溶液散乱データのギニエプロットから得た慣性半径 を時間の関数としてプロット。●はCagedATPによる実験の結果を表し、〇は対照実験と して行ったCagedATPを含まない溶液の慣性半径を示す。(a)は実験全体の時間スケールで 結果を表し、(b)は最初の2秒間だけを示した。

Caged ATP を溶液中に含まない場合の実験は基本的には静的な実験をATP 非存在下で 行った場合と同じである。ここで得られた慣性半径はS1の濃度が5mg/mlの場合であり、 およそ45Åである。一方、Caged ATP を溶液中に含む場合、フラッシュの発光後の慣性半 径はおよそ2-3Å 小さくなっていることがわかる。

フラッシュ光の発光直後の様子は非常に雑音が多く、慣性半径の時間的な変化の振る舞いや、Caged ATPの有無による違いを判断するのは困難であった。一方で発光から2秒以後の、測定の時間間隔が長い領域では、Caged ATPの有無による慣性半径の差は見られるが、S1と Caged ATPの結合、加水分解のサイクルにともなった構造変化(慣性半径の変化) は観測することができなかった。

4 構造解析

4.1 原子モデルによる散乱強度の計算

Rayment ら²⁾によって結晶解析されたニワトリ胸筋パパイン処理ミオシン頭部(S1)の結 晶構造の原子座標はアメリカのブルックヘブン国立研究所のProtein Data Bank (PDB)に 登録されている^{*2}。このデータはヌクレオチドを結合していない状態のもので、S1全体と してはヌクレオチドを結合した状態での結晶解析はなされていない。細胞性粘菌のミオシ ンII では ADP.BeF₃、ADP.AlF₄、ADP.Vi などとの複合体としての結晶構造解析が行われ ており^{18,19,20}、ヌクレオチドとの結合による構造変化が観測されているが、これらはS1 のcatalytic ドメインだけの結晶解析で、軽鎖結合部位が切断されている。したがって、こ れらのデータから S1 全体の構造変化をとらえることはできない。

原子座標に基づいたモデル計算はヌクレオチドを結合していないS1をもとにして Debye の式(A.16)にしたがって行った。この式は分子を構成する原子の種類と位置から分子全体 の散乱強度を計算するものである。

結晶解析は、結晶化のためにS1のリジン残基の多くをメチル化して行われた²⁾。また、 結晶構造と溶液構造は観測する条件や分子がおかれている物理的環境が異なるので、一致 するとは限らない。はじめに、結晶構造を変えないでモデルの散乱強度を計算し、同じ化 学状態であるヌクレオチドを結合していないS1の観測散乱強度と比較した。各アミノ酸残 基のα炭素を半径3Åの球で表し、各アミノ酸の分子量に比例する重みを付け、その集合体 として原子モデルの散乱強度を計算した。アミノ酸残基を球で表現したのは、溶液散乱の 分解能に対してあまり小さな要素、例えば個々の原子をモデルの構成要素の単位としても 意味がないことと、公表されている結晶構造の原子座標にはα炭素のデータしか含まれて いないことによる。このようにして計算した結晶モデルの散乱強度を観測値と比較した結 果を図4-1に示す。

モデル計算による結果、散乱強度は観測値と一致せず、また慣性半径も観測値が47.8Åで あるのに対して45.7Åと約2Å小さい結果が得られた。しかしながら、散乱強度を横軸に慣 性半径をかけたS·Rgでプロットした場合、観測値とモデル計算値は大体において一致した。 横軸をS·Rgでプロットすることは、大きさの違いを補償し形の違いだけを見ることになる ので、モデルと観測値では全体の大きさが異なっているが相似形であることが分かった。

この違いの原因として、溶液散乱で観測するタンパク質の構造は、その周囲に配位した 水分子も含めて観測されたものだという議論がある^{21,22)}。本研究においても、形状は変わ らずに大きさが変わっているという結果から、タンパク質表面に付いた水の層が見かけ上 タンパク質を大きくしているという可能性を考えた。そこで、表面に水分子を配位させる ような構造モデルを考えてその散乱強度を計算した。計算方法についてはAppendix Bに 記述した。

水の層を考慮し、それを含んだ構造モデルとそこから計算した散乱強度を観測値と比較 したものを図4-2に示す。このモデルと観測値との一致度(R)は約0.1%であった。水の層と してはおよそ1層分(約1.8Å)であった。このようにして得られたモデルは観測値を非常に

^{*21}MYS, ftp://ftp.pdb.bnl.gov/current_release/uncompressed_files/my/pdb1mys.ent

よく説明するものであった。したがって溶液構造と結晶構造は分子の体積を補正すること により一致させることができ、全体的な形状にはほとんど差が無く、結晶場にあることや リジン残基をメチル化した影響によるグローバルな構造変化が起こっていないという結論 を得た。



図 4-1: 結晶構造のα炭素を半径3Åの小球で充填してあらわし、その散乱曲線を計算した。 (a) 小球充填モデルの散乱強度と、ヌクレオチドを結合しないS1の観測散乱強度の比較。 (b) (a)の横軸に慣性半径Rgをかけてプロットしたもの。

37





図 4-2:水の層を考慮してモデル計算を行った。ミオシン頭部の構造(a)とそれから計算した散乱強度と観測されたヌクレオチドを結合しないS1の散乱強度の比較(b)を示す。一致度Rは0.1%であった。

4.2 構造変化のモデル構築

次にヌクレオチドの結合によるS1の構造変化をモデル解析するために、初期構造として ヌクレオチドを結合しないS1の原子座標を用いて、この構造を変化させて散乱強度を計算 し、観測値との一致度を評価しながら最適なモデルを求める。最適なモデルを与えるような パラメータは大域的な探索法により求めた。一般にパラメータの最適化を行う場合は目的 関数の差分を用いて最適値を求めることが多い。しかしながら本研究においてはパラメー タの収束が見られなかった。これはモデルのパラメータの変化に対して計算される散乱強 度の変化が非常に小さいことが原因であると考えられる。

構造変化の表し方および用いたパラメータは以下の通りである。

- もととなる S1 の構造はヌクレオチドを結合していない S1 の原子座標を用いた。構造 変化を考えるために、S1を便宜上5つのドメインに分割して考えた。ドメインに分け た様子を図4-3に示す。酵素による生化学的な実験結果などから、S1 重鎖のドメイン 構造については 25kD、50kD、20kDドメインという分け方が一般的であるが、さら に 50kD および 20kDドメインを二つに分けた。50kDドメインについてはクレフトを 境に上側ドメインや下側ドメインといった呼び方で二つに区別されているのと同様に 分割し、20kDドメインはSH1-SH2 領域と呼ばれる部位で二つに分けた。我々のドメ イン区分では第1ドメインがアミノ酸残基番号で1から204とし、以下第2ドメイン は 216 から464、第3ドメインは465から626、第4ドメインは647から710、第5ド メインは711から843とした。一部分抜けている数字は結晶構造解析で見えなかった 残基部分である。また2つの軽鎖、ELCとRLCは共に第5ドメインとして扱い、軽 鎖部分の構造変化および軽鎖の結合様式の変化は考慮に入れなかった。
- 分割したこれらのドメインのそれぞれを一つの単位とし、境界部分で結合角を変える ことにより、分子全体の構造変化を表現した。この時、ドメイン間のつながりは保っ たままとする。ドメイン間部分での構造変化の様子を図4-4に示す。二つのドメイン の間の一ヶ所のアミノ酸の結合する角度に自由度を与えるが、各々のドメイン内の構 造は変化させなかった。すなわち、各ドメインは一つの形を保ったまま、それぞれは のびないバネでつながっていると考えればよい。また結合角度については1ヶ所につ いて2つのパラメータで表すことができる。図4-4(b)に示したように、二つのドメイ ンのつなぎ目を原点にした xyz 空間を考えて z 軸から x 軸への角度をθ₁、 z 軸から y 軸 への角度をθ₂ と表せば、これら2つの角度でドメインの位置関係を記述できる。
- 5つのドメインの4ヶ所のつなぎ目に合計8個のパラメータが存在する。これらを 元々の結晶構造の位置から様々な方向への変化させて構造モデルを検討する。θ1、θ2 のパラメータは10°ごとに変化させ、大域的な探索を行った。

ここで行ったような扱いではドメインとドメインのつなぎ目のアミノ酸が現実のタンパ ク質では一般には許されないような構造を持つ可能性を含めることになる。しかしながら、 ーアミノ酸の局所的な構造はここで問題にしている散乱強度にはほとんど影響しないこと と、分子全体として実際にそのような構造をとる場合にはより大局的に構造変化を起こす のであってこのモデルはそれを単純化したものであるということを考慮に入れて、構造モ デルをあつかった。

構築したモデルの散乱強度を計算して観測値と比較するとき、モデルと観測値の一致の 尺度として

$$R = \frac{\sum S^2 \{ I_{\text{obs}}(S) - I_{\text{calc}}(S) \}^2}{\sum S^2 I_{\text{obs}}(S)}$$
(4.1)

を用いた。散乱曲線は原点付近の強度が非常に大きく、したがって分子の大きさが反映さ れるような小角領域の曲線だけでなく、分子の形を反映するより広角側の散乱強度につい ても考慮する形で求める一致度となっており、通常と違って観測値と計算値の差に*S²がか* けられている。これはLuzzatiら²³⁾によって使われた一致度のパラメータである。また、慣 性半径の値も判断の基準とした。大域的な探索を行い、これら散乱強度の一致度と、慣性 半径の一致性を束縛条件として入れて最適なモデルのパラメータを決定した。

以上のモデル計算についてはUNIX ワークステーション(日本シリコングラフィックス, Indy R4600PC)で主に開発、実行し、計算の量に応じて大阪大学蛋白質研究所結晶解析センターの計算機を利用した。



図 4-3: S1の構造を5つのドメインに分けた。本文中で記述されているとおりにドメイン を定義し、色分けして図示した。N端から順に青は第1ドメイン、水色は第2ドメイン、緑 は第3ドメイン、黄は第4ドメイン、赤は第5ドメインである。また2本の軽鎖は桃色で 示したが、構造変化を考えるときはC端の赤で示した第5ドメインと一つとして扱った。





図 4-4: モデルによる構造変化の記述。図ではS1の構造のうち、ここで定義した50kDの 2つのドメインを色分けして示した。これらの境界を細く黄色で描いているが、この残基 のまわりの相対的な回転によって構造を変化させる。(a)は結晶構造からのS1の構造。(b) 回転させる前後の残基を球で表し、傾きの角度をパラメータとして与える。

4.3 最適モデル

化学状態ではS1.ADP.Piにある ATP 加水分解中のS1の散乱強度およびS1.ADPの散乱 強度に対して最適モデルの探索を行った。パラメータを変化させたとき、式(4.1)で示され るモデルと観測値との一致度 Rについての変化の例を図4-5に示した。また同様のパラメー タの変化を与えたときの慣性半径の変化を図4-6に示した。これらの図に示したのは8個の パラメータのうち、第4ドメインと第5ドメインの間の2個の角度を変化させた場合のも のである。また一致度は ATP 中のS1の散乱強度と比較した。

これらの変化は比較的単調な関数となっており、一致度 R の極少点では慣性半径も観 測値と近くなっている。他のパラメータの場合もほぼ同様の傾向を示したが、最も変化の 度合いが大きかったのは第4ドメインと第5ドメインの間の角度であった。したがって、 S1.ADP.Piのグローバルな構造変化の支配的な要因はこの部分の変化である。

このようにして得られたS1.ADP.PiとS1.ADPの最適モデルについて、S1の最適モデル とともに、構造パラメータおよびそれぞれの観測値を表4-1に示した。いずれの場合もモ デルから得られた慣性半径は観測値と良い一致を示している。一方、モデルから計算した p(r)により求めた分子最大長は、観測値と比較していずれの場合も約10-15Å大きい値を示 している。観測値の分子最大長は最大エントロピー法によって求められたものである。こ れらの値は、しかしながらS1の分子最大長との差ΔDmaxでは観測値とほぼ一致している。 分子最大長の絶対値はモデルと観測値とで一致を見なかったがその変化の傾向は似ていた。 これはモデルの適、不適というよりも、観測された散乱強度からp(r)を計算して分子最大 長を求めることに含まれる困難さが原因であると考えられる。モデル計算と観測の散乱強 度の一致度はそれぞれ約0.1%程度である。構造変化をスタートさせる前の初期モデル、す なわちS1の構造モデルの散乱強度とATP中のS1の散乱強度で見た一致度は約0.45%であ るので、構造変化をよく表現していると言える。

それぞれ3つの状態のS1で最適モデルから計算した散乱強度と観測の散乱強度を比較したものを図4-7に、p(r)を比較したものを図4-8にそれぞれ示す。図示した散乱強度の範囲でよく一致している。p(r)も良い一致を見せており、分子最大長の絶対値が異なっていることはモデル計算において、頻度としては非常に少ない長い分子内ベクトルの成分を厳密に算定していることが原因であると分かる。

化学状態	Rg (Å)	Rg obs (Å)	Dmax (Å)	∆Dmax (Å)	一致度 R (%)*
S1	47.7	47.8	176		0.114
S1**.ADP.Pi	45.7	45.0	162	-14	0.099
S1*.ADP	46.7	46.7	168	-8	0.208

*参考

0.452

[S1 in MgATP]obs / [S1 No Nucleotide]calc

表 4-1: 最適モデルの構造パラメータ。Rg はモデルの慣性半径、Rgobs は観測された慣性半 径、Dmax は分子最大長、ΔDmax は分子最大長における S1 との差、一致度 R は式(4.1) に よって得られた値をそれぞれ示す。欄外に参考として示した一致度は、ヌクレオチドを結 合しない S1 のモデル(初期モデル) と ATP 中の S1 とで散乱強度を比較したもの。



図 4-5: モデル計算時の一致度評価の例。実際の計算には8個のパラメータを用いたが、このうちの2個について変化させた場合のR値の振る舞いを図示した。グラフが低いほどR 値が小さく、モデルと観測の一致度が高い。



図 4-6: モデル計算時の慣性半径の変化の例。図4-5と同じパラメータを変化させた場合。



図 4-7: 3つの状態のS1の最適モデルから計算した散乱強度と観測散乱強度の比較。



図 4-8: 3つの状態のS1の最適モデルから計算したp(r) 関数と観測散乱強度から計算したp(r) 関数の比較。

4.4 ATP 加水分解中のミオシン頭部の構造解析

5個のドメインに分けたミオシン頭部分子モデルを使って ATP 加水分解中のミオシン頭 部についての構造解析を行い、観測結果を最もよく説明するモデルを得た。

解析の結果得られたモデルを図4-9に示した。MgATP 中のS1の構造変化を解析した結果 得られたモデルでは、特に軽鎖結合ドメインでの構造変化が顕著にみられた。他の部分で はドメイン間の結合角度が10°程度変わっているだけなのに対して、第4ドメインと第5ド メインの境界(アミノ酸残基番号で710と711の間の部分)ではおよそ40°程度の変化が見ら れた。その結果、分子は全体として折れ曲がるように、あるいは元々曲がっていたものが さらに顕著に曲がるように変化していた。このとき、観測値との一致度を示すR値は、初 期モデルと比較して約70%良くなった。

図4-10には、得られたモデルをヌクレオチドを結合していないS1のモデルと比較して示 した。図中で示されたS1の方向は電子顕微鏡の三次元再構成によって求められたF-アクチ ンとの複合体の構造³⁾にならったものである。F-アクチンの繊維軸は紙面縦方向に沿って いて、S1の左側に存在する。2つのS1のモデルはN-端ドメイン(第1ドメイン)が重な るようにして図示してある。このような位置で示した場合、2つの状態のS1で末端部分の 位置は全体として約50Å移動する結果となった。繊維軸に沿った方向(図では上方向)では 約40Å、繊維軸に垂直な面内の動き(図では紙面奥の方向)は約20Åであることが分かった。 また、分子内の変化を見やすくするために、同様の図を2次構造のリボンモデルで書いた ものを図4-11に示した。この場合、第1ドメインから第4ドメインでも構造変化が起こっ ていることが分かる。この部分にはATP 結合部位やアクチン結合部位がクレフトとして存 在し小さな変化を示唆するが、我々の結果では特にクレフトの開閉のような顕著な変化は 見られなかった。

49



図 4-9: 解析の結果得られた ATP 加水分解中のS1のモデル。2次構造のリボン表示。

÷.,•



図 4-10: ATP 加水分解中の S1 のモデルを、ヌクレオチドと結合しない S1 の構造モデルと 比較した。 濃い青がヌクレオチドを結合しない S1 のモデルで、薄い青が ATP 中の S1 のモ デルである。図はa炭素のバックボーンをつないだ形で表示してある。



図 4-11: ATP 加水分解中のS1のモデルを、ヌクレオチドと結合しないS1の構造モデルと 2次構造のリボン表示で比較。濃い青がヌクレオチドを結合しないS1のモデルで、薄い青 がATP 中のS1のモデルである。

4.5 ADP と結合した S1 の構造解析

ADPと結合した状態のS1 (S1.ADP) についても ATP 中のS1 に準じた構造解析を行った。 その結果得られたモデルを図4-12に示した。軽鎖結合ドメイン以外の構造は ATP 存在下の S1の構造モデルと同じ結果となった。また第4ドメインと第5ドメインの間の角度はおよ そ20°の変化が見られ、ATP 中のS1と同様に図4-13のような方向に描くと、軽鎖結合ドメ インの先端部分で約 30Å の動きが見られた。また繊維軸に沿った方向(図では上方向)、繊 維軸に垂直な面内(図では紙面奥の方向)の動きはぞれぞれ約 20Å および 20Å であることが 分かった。これは繊維軸に垂直な面内では ATP 加水分解中のS1と同程度の動きであるのに 対して、繊維軸方向の動きが ATP 加水分解中のS1 にくらべて半分程度に小さいような構 造変化である。図4-14は、図4-13と同様の構造の比較をリボンモデルで示したものである。



図 4-12: 解析の結果得られたS1.ADPの構造モデル。2次構造のリボン表示で示した。

.



図 **4-13**: S1.ADP の構造モデルとヌクレオチドと結合していないS1の構造モデルとの比 較。濃い青がヌクレオチドを結合しないS1のモデルで、緑がS1.ADP のモデルである。図 はα炭素のバックボーンをつないだ形で表示してある。



図 4-14: S1.ADPの構造モデルをヌクレオチドと結合していないS1の構造モデルと2次構造のリボン表示で比較。濃い青がヌクレオチドを結合しないS1のモデルで、緑がS1.ADPのモデルである

5 考察

ATP加水分解における反応中間体として、種々の化学状態にあるS1のX線溶液散乱実験の結果およびモデルの構造を、他の実験結果とともに検討する。

5.1 ATP 加水分解反応とミオシンの構造変化

ATP加水分解反応のスキームを図5-1に示す。

ATP

7311						
s1 ≿ s1.4	ATP ₹S1*.	ATP द251**./	ADP.Pi 	P+Pi द्यthat	DP+Pi ⋧S1+AI	DP+Pi∉S1
	2	3		5	6	\overline{O}

ADP+Pi

図 5-1: ミオシンによる ATP 加水分解反応サイクル。

観測したS1の状態と化学状態を対応させると、ヌクレオチドを結合していないS1は化学状態では図5-1の「S1」にあたる。ATP中のS1は反応サイクルが繰り返し進んでいる状態であるが、(4)のステップが最も遅く、律速ステップといわれているので⁶⁾、「S1**.ADP.Pi」が最も量的に優勢な化学状態であり(全体種の約90%を占めていると言われている)、これに対応している。ADPを結合させたS1は「S1*.ADP」あるいは「S1.ADP」という化学状態にあたる。また、Wakabayashiら¹⁾はATP_γSを結合したS1.ATP_γSはヌクレオチドを結合しないS1とほぼ同じ構造をとっていることを示した。ATP_γSは加水分解サイクルの(3)のステップが非常に遅く、したがってその化学状態はS1*.ATPであると考えられている。

一方、リン酸アナログやヌクレオチドアナログを用いた実験結果から、S1.ADP.Vi、 S1.ADP.BeF₃、S1.ADP.AlF₄はそれぞれATP中のS1とよく似た構造をとっていることが 本研究で明確となった。Vi、BeF₃、AlF₄がリン酸のアナログ物質であることとあわせて、 S1**.ADP.Piの構造的なアナログになっていると考えられる。

これらの結果を化学状態ごとに分けて、モデル解析による原子構造とあわせて示したものが図 5-2である。

X線溶液散乱実験の結果から得られた構造パラメータはS1**.ADP.Piの状態でS1に比べ て慣性半径で約3Å、分子最大長で約10Åそれぞれ小さくなっていることを示した。また S1*.ADP あるいはS1.ADP では慣性半径が約1.5Å、分子最大長は数Å小さくなっているこ とを示した。S1*.ATP とヌクレオチドを結合していないS1は、全体的な構造としては同じ であると考えられた。

S1	S1**.ADP.Pi	S1*.ADP	S1*.ATP(?)
S1 NoNucleotide	S1 in MgATP S1.ADP.Vi S1.ADP.BeF3 S1.ADP.AIF4	S1.ADP	S1.ATPγS
47.5~48.0 Ă	45.0~45.5 Ă -10Ă	46.0~46.5 Å -10 < ∆ < 0 Å	47.5~48.0 Å ~0 Å
	And the second s		A CALL AND

図 5-2: ATP 加水分解反応中間体と S1 の構造との対応。上段から順に S1 の化学状態による 分類、結合したヌクレオチドとの対応、慣性半径と分子最大長の変化、構造モデルを示す。 構造解析によって得られたモデルにおいて、ヌクレオチドの結合による構造変化の最も 大きな特徴は、第4ドメインと第5ドメインの間での角度変化が一番顕著であったことで ある。この部分の変化によりミオシン全体の構造が大きく変わり、結果として慣性半径や *p*(*r*) 関数の変化につながっている。またS1.ADP.PiのモデルとS1.ADPのモデルを比較す ると、両者の違いはこの部分だけで、特に図4-10、4-13に示した上下方向の動きがS1.ADP の場合S1.ADP.Piに比べて半分くらいであった。

一方、おもに25kD、50kDドメインからなる catalyticドメインは、ATP 結合部位やアク チン結合部位を含み、ミオシンの機能的に最も重要な働きをしていると考えられる。構造 解析の結果、catalyticドメイン内ではあまり大きな変化は見られず、全体の構造が大きく 変わるようなものでもなかった。最適なモデルを与えるパラメータは catalyticドメイン内 についてはSLADP.PiのモデルとSLADPのモデルで一致した。また、ヌクレオチドの結 合、加水分解によりクレフトが開閉し、その変化がSL全体の構造の変化を導くといった考 え方²⁾もあったが、クレフトに関する大きな動きはモデル解析からは得られなかった。

5.1.1 中性子線散乱実験との比較

Mendelson ら¹⁰は中性子線溶液散乱による実験の結果、ヌクレオチドを結合しないS1と 比較してS1.ADP.Vi、S1.ADP.AlF₄の慣性半径が約3%減少していると報告している。ま たS1.ADPの慣性半径は約1%しか減少しないと報告した。さらに、X線溶液散乱でATP中 のS1の慣性半径が約3%減少していることも報告した。これらは本研究の結果と比較する と変化の量としては小さい。またMendelsonらがX線散乱から得たヌクレオチドを結合し ないS1 の慣性半径は46.1Åであり、Wakabayashiら¹⁾や本研究の結果と食い違っている。 一方、MendelsonらはS1.ADP.BeF₃ではヌクレオチドを結合しないS1と比較しても慣性半 径の変化はほとんどないとしている。これはATP中のS1と同程度の構造変化を起こして いるとした本研究とは異なった結果である。このように、大筋においてはX線と中性子線 の結果は一致するが、細部において異なる点が見られる。特に、ADP.BeF₃を結合したS1 の構造変化の有無については異なった結果が得られている。これらの原因については今の ところはっきりしないが、S1.ADP.BeF₃については測定時の温度の違いが考えられる。本 研究はあらゆる測定を室温(19.5°C)で行ったが、Mendelsonらは低温(6°C)で測定してい るので、ATP加水分解の平衡がずれることで異なった結果になったのかもしれない。

Mendelsonらによる中性子線/X線溶液散乱実験の結果得られた慣性半径の変化と本研究で得られた慣性半径の変化を表5-1に示す。

sample	this work	Mendelson <i>et al.</i>
S1 in MgATP	-5.77±0.46	3.12±1.55
S1.ADP	-2.34±1.05	-0.86±1.04
S1.ADP.Vi	-3.54±0.65	-2.74±0.98
S1.ADP.BeF3	-5.36 ± 1.09	0.35 ± 0.74
ST.ADP.AIF4	-7.32±0.15	-2.79±0.03

表 5-1: ヌクレオチドを結合しない S1 に対する慣性半径の変化を比較したもの。Mendelson ら¹⁰⁾による。表中の数字はヌクレオチドを結合していない S1 を基準として $\Delta Rg/Rg \times 100$ で得られる慣性半径の変化の割合を%で示す。

5.1.2 ヌクレオチドアナログを結合した結晶解析との対応

ヌクレオチドを結合した骨格筋ミオシンS1結晶解析はなされていない。Fisher ら¹⁸⁾や Smith ら²⁰⁾による細胞性粘菌ミオシンのモータードメイン (S1Dc) と呼ばれる 25kD、50kD 部分の結晶構造解析で、ADP.Viや ADP.AlF₄との複合体の原子構造が発表されており、そ れらの構造変化が報告されている。特に ADP.Vi との複合体では C-端ドメインの構造変化 がはっきりと示されている。図 5-3(a) に構造変化の様子を示した。S1Dc.ADP.Vi での構造 変化は Val681 から Lys690 にかけての α へリックスを中心軸とした回転運動による。この回 転運動により C-端ドメインが図で手前の方向に倒れてくるような構造変化が生じている。 回転退動の軸となった α へリックスは、骨格筋においては SH1、SH2 と呼ばれる反応システ イン残基が存在する α へリックスに相当し、近くに ATP 結合部位もあって、機能的に重要 な部位だと言われている。

これらの結晶構造解析の報告と本研究で得られたモデルとを比較してみる。図5-3(b)に 溶液散乱から得たモデルをS1とATP中のS1で比較したものを示した。結晶構造で最も顕 著な変化が見られるC-端ドメインは溶液散乱の構造モデルにおいても同様の構造変化を見 せていて、やはり図手前方向への動きとなっている。ただし、変化量には違いがある。結 晶構造ではおよそ70°の動きをともなうが、溶液散乱の構造モデルでは半分程度の約30°で ある。

結晶構造と溶液構造で比較を行った場合、ATP加水分解中のこの部分の構造変化の方向 は同じであるがその変化量に違いがあるようである。これについては、軽鎖結合ドメイン の有無が構造変化に影響した可能性も考えられる。S1Dcでは本来あるべき軽鎖結合ドメイ ンがないことで実際以上に動きの自由度が増し、大きな構造変化が生じている可能性が大 きい。Snithらも、隣にある軽鎖によってこの部分の動きは影響されると予想している²⁰⁾。 溶液散乱から求めたモデルは軽鎖結合ドメインを完全に含むもので、筋肉中のミオシンと 同様の構造変化を起こしていると考えられる。この場合は立体的な構造の障害等もあって 変化の量が小さくなっていると思われる。

一方、ADP.BeF₃との複合体である S1Dcは、結晶構造解析からは構造変化は観測されな かった¹⁸⁾。S1Dcにリン酸アナログと ADP を結合したときの構造変化は、ATP 結合部位と C-端ドメインの動きで判断されているが、S1Dc.ADP.AlF₄と S1Dc.ADP.Vi が S1**.ADP.Pi 型であり、S1Dc.ADP.BeF₃は S1型であった。この違いの原因は分からないが、ADP.BeF₃ と S1 の複合体の構造は中性子線散乱でも S1 と変わらないという結果が得られているので、 同じ原因があるのかもしれない。測定温度の差によること、フッ化ベリリウムの配位構造 の違いによることなどが考えられる。



図 5-3: (a) Smith 6^{20} によるS1Dc.ADP.Viの構造解析の結果。C-端ドメインの構造変化がわかりやすいようにS1Dc.ADP.BeF₃の構造と比較してある。(b) 本研究で得られたS1.ADP.Piのモデルをaと比較がしやすいようにN-端からMet799までをリボン図で示した。濃い青色がヌクレオチドを結合しないS1、薄い青がS1.ADP.Piのモデルである。

5.1.3 ADPによる構造変化

Whittaker ら¹¹や、Jontes ら¹²はミオシンS1を修飾したF-アクチンの電子顕微鏡写真 による三次元再構成法で、MgADPの有無による構造の違いを調べた。その結果、軽鎖結 合ドメインの先端で約35-50Åの動きがあるという結果を得た。一方、本研究では、ADP を結合したS1の構造変化は、同様に軽鎖結合ドメインの先端部分が30Å 程動くようなもの であると結論づけた。

図4-12に示されたとおり、繊維軸方向に沿った動きはWhittakerらの結果と似ている。 いっぽう繊維軸と垂直な面内での動きについては三次元再構成ではほとんど見られなかっ たとあるので、完全に一致する構造変化ではない。また変化量はX線溶液散乱から求めた ものの方が小さく、とくにJontesらによるミオシン1に比べると半分程度である。これら の違いが何に由来するかは現状でははっきりとしないが、ミオシン単独の測定とアクトミ オシン系での測定の違い、ミオシンの種類が骨格筋と平滑筋で違うことなどが考えられる。 実際、骨格筋のミオシンを用いて同様の三次元再構成を行った場合、ADPによる構造変化 は確認できなかったということである。

5.2 構造変化のモデル解析

慣性半径やp(r) 関数の変化などから、ATP 加水分解中のS1の形態変化を伴うグローバ ルな構造変化が明らかにされた。また ADP と結合したS1の構造変化も観測された。この ような構造変化を具体的に明らかにするために、原始座標を用いたモデル解析によって、 S1.ADP.Pi および S1.ADP の2つの状態のS1 について構造を示した。これらの構造および 構造を求めるための手法について検討した。

5.2.1 ドメイン構造によるモデル解析

構造変化を考えるときに、ここでは我々が定義したドメイン構造によってモデルを表現 した。(Gerstein ら²⁴⁾らは多くのタンパク質がドメイン構造を持っており、ドメイン間が大 きく動きことによるタンパク質の構造変化を分類し、データベース化した。データベース に登録されたタンパク質の動きは主に"shere motion"と"hinge motion"2種類に分類され る。また現段階で完全にはその動きを分類できないタンパク質も含まれるが、ほとんどが ドメイン間の動きによる構造変化であるとしている。現在、彼らのデータベースはさらに 情報量を増やして公開されている^{*3}が、ここではミオシンは、「その詳細はまだ分からな いが、ドメインの動きを持つタンパク質」という分類に含まれている。したがって、モデ ル解析にドメイン構造を導入することは妥当な手法である。

実際に計算を行うにあたっては、ドメイン構造により条件を制限することは低分解能で ある溶液散乱のデータから解析するために適当である。多くの自由度の中で最適値を求め ていくには20Å分解能では分解能が低すぎて困難となる。同様の問題は繊維回折において も見られ、これを克服するための新しいアルゴリズムも開発されている²⁵⁾が、分解能でさ らに劣る溶液散乱にその方法を適用するのは難しい。

ドメインの決定については、S1では古くから25kD、50kD、20kDと呼ばれる3つのドメ イン構造が知られていたが、本研究においてはさらにいくつかのドメイン構造を定義して 用いてた。50kDドメインについては、クレフトにより2つのドメイン(上側ドメインと下 側ドメイン)に分けられることが、結晶構造解析で明らかとなっている²⁾。SH1–SH2の領域 についてはp(r)関数の変化から、末端からおよそ80–90Åの位置付近に構造変化のpivoting pointとなるような存在が予想され、反応システイン残基を含んだ短い α へリックスはこの 付近にあった。

Stone ら²⁶⁾は中性子線溶液散乱法を用いた構造解析で、結晶構造をもとにしたモデル計 算を行っている。ここでは明確にドメイン構造を定義していないが、S1.ADP.Vi について、 rigid-body rotation による構造変化を検討している。彼らはいくつかの位置でアミノ酸残基 間の回転運動を検討した結果、ILE706の位置を中心にもとの構造を回転させ、構造を変化 させることがもっとも観測結果に合致すると報告している。S1Dcの ADP.Vi との複合体の 結晶解析でも、構造変化の最も重要な部分はこの領域である²⁰⁾。また、直接構造変化やド メイン構造を調べた研究以外では、GLY699を置換して再構成系で運動を観察した結果、こ の部分のflexibility がミオシンの運動に大きな役割を果たしていることが示された²⁷⁾。これ

^{*&}lt;sup>3</sup> Protein Motions Database, http://hyper.stanford.edu/~mbg/ProtMotDB/

らのことは、SH 領域と呼ばれる部分でもドメインを定義することの妥当性を示している~

5.2.2 モデルの一意性

溶液散乱法では空間平均された散乱パターンしか観測できないために、もとの構造がまったく違っていてもその自己相関関数の空間平均が同じであれば散乱パターンは同じものを 与える。したがって溶液散乱法に基づいた解析においては、観測された散乱強度を満足す るようなモデルを得ても、それが唯一の解であるかどうかという問題が残る。

本研究において、モデル解析の出発点とした構造は結晶解析で明らかにされた同じニワ トリミオシンのS1の構造である。結晶化の条件、結晶中という特殊な条件における構造で あるが、一般に溶液中の構造が結晶構造と大きく異なるといった報告はまれである。実際、 ヌクレオチドを結合しないS1の観測X線散乱強度は、S1の結晶構造を変えることなしに説 明可能であった。

つぎに、このような結晶構造のドメイン構造を変化させてモデルを構築し、得られたモ デルの散乱強度を計算して観測値と比較し、それぞれの状態のS1について最適モデルを求 めた。パラメータを変化させたときにモデルの一致度は一つの極小値をもつ単調な変化を 見せた(図4-5)。したがって、局所的な解の中のひとつ(local minimum) である可能性はほ とんどない。

さらに、前述したように実際のタンパク質の多くがドメインの動きによる構造変化とい う特徴を持ち、ここでもそのような変化のモデルで構造変化の説明ができた。結局、通常 の条件で考えられるような構造のうち最も適当であると考えられるものを選び出している ことになっていると思われる。したがって、まったく異なった構造でかつ同じ散乱強度曲 線を与えるような構造の存在の可能性は完全に否定できないが、そのような構造が加水分 解中のS1の構造であるとは考えにくい。

以上のことから、本研究で導出したモデルは、

1. 実際のタンパク質の構造変化にならった現実的なモデルである。

2. 最適モデルは局所的な解ではなく、真に近いの解を求めている。

3. 他の構造が解として存在する可能性は低い。

言える。

5.3 時分割測定による ATP 加水分解サイクルの観測

これまでの実験は、ATP 加水分解中のもっとも優勢な化学状態を観測するためのアナロ グを使っての静的な条件での測定であった。そこでこの実験はまさに ATP 加水分解にとも なって構造変化が起きている様子をダイナミックにとらえようとしたものであった。しか しながらそのような変化を観測することはここではできなかった。

原因としていくつか考えることができるが、なによりもX線の強度不足があげられる。 非常に強力なX線源として用いられている放射光であるが、たとえば静的な実験をする場 合の露光時間180秒に対して、今回の時分割実験では最小で1フレーム50ミリ秒の露光と なる。およそ20回の実験を繰り返して加算しているが、それでも2桁弱い強度しか得られ ない。強度の不足はそのまま観測値(慣性半径)の精度を落としているので、観測される変 化が非常に小さいこのような実験においては致命的である。実際、特にはじめの1秒間は ClagedATPの有無による変化がまったく判別できていない。強度不足を補うためにはより 強力なX線を用いる、あるいは実験回数を重ねることで合計の露光時間を増やすといった 方法が考えられる。前者の解決法として、現在兵庫県に建設が進められている次世代のシ ンクロトロン放射光の利用も期待される。

また、フラッシュ光による Caged ATP の分解は完全ではないので、分解されない CagedATP による影響も無視できないといわれている。このことが、十分時間がたって遊離し た ATP が分解されたと思われる条件でも、その慣性半径は ATP 遊離直後とあまり違って いないことの原因かもしれない。
5.4 ATP 加水分解サイクルにともなったミオシンの構造変化と筋収縮との関連

ATP を加水分解している S1 の構造を観測できる手法としてX線溶液散乱法を用いて構造変化を明らかにすることができた。これまでに考察してきた S1 の構造変化とそのモデル 解析を図 5-1に示された ATP 加水分解サイクルと比較すると、反応中間体の構造について 以下のように特徴づけられる。

- 1. ヌクレオチドを結合しないS1は、X線溶液散乱の観測結果のうちで最も慣性半径が 大きく、「のびた」構造をしている。
- 2. ATP を結合した S1 は ATP の加水分解を行い、S1**.ADP.Piの状態へ移る。このとき、S1 は大きく「曲がった」構造へと変化し、X線散乱からは慣性半径やコード長が小さくなるという観測結果が得られた。N-端側を一致させた場合、このような構造変化によって約50Åの変位がC-端側の軽鎖結合部位にに見られる。
- リン酸(Pi)を放出した状態のS1*.ADPは曲がった状態から少しもとの構造へ「戻り」、 S1とS1**.ADP.Piの中間的な構造をとる。N-端側を一致させた場合のC-端側の変位 は、この場合約30Åである。
- 4. さらに ADP を放出することで S1 は構造的にも化学状態でももとへ戻る。
- 5. 以上のような構造変化は主にSH1-SH2領域の変化によって生じ、その変化は長くのびた軽鎖結合ドメインへ構造的に大きな影響をおよぼす。またアクチン結合部位やヌクレオチド結合部位においても構造変化が見られるが、それほど大きな変化ではなく、本研究により明らかになった構造変化の分解能においては明確なクレフトの開閉などは特に認められなかった。

一般に筋収縮のメカニズムとして考えられている、構造変化と収縮を直接結びつけたモデルでは、リン酸の放出時に起こる構造変化が"lever arm"の役割をして力を発生するというように考えられている。ここで得られたX線溶液散乱の解析の結果とこのモデルは矛盾するものではない。

しかしながらいくつかの疑問点も残る。その一つはX線で観測する構造は時間的、空間 的な平均構造である点である。ATP加水分解中、室温ではほとんどがS1**.ADP.Piの状態 にあると言われているが、いくつかの化学状態のS1が混在している可能性がある。さらに タンパク質には構造的に揺らぎが存在し、その揺らぎはATP加水分解中のS1ではヌクレ オチドを結合しない状態のS1と比べて大きくなるという研究がある。構造揺らぎが大きく なることでX線で観察する平均的な構造が変化しているにすぎない可能性がある。

もう一つの点として、本研究はすべてS1を単体で測定しているが、力発生時の筋肉内で は当然ながらアクチンと相互作用しているので、より詳細な力発生のメカニズムにまで言 及する場合にはその中での状態を規定して構造変化を調べていく必要があるだろう。

これらの疑問点から、S1の構造変化と筋収縮のメカニズムを直接結びつけることは現在 のところ早計である。構造面からの解析をアクトミオシン複合体、筋肉へとさらに進めて いけば、本研究で明らかになった構造変化の意味が理解されていくことと思われる。

Appendix

A X線散乱の一般的な理論

波長の短い電磁波であるX線は物質中の荷電粒子によって散乱される。しかしその強度 は荷電粒子の質量の自乗に逆比例するので、物質内の荷電粒子のうち電子からのみによっ て散乱されると考えてよい。タンパク質分子によるX線の散乱を解析するため、まず最初 に、1個の電子からのX線の散乱を考える^{28,29,30} ことから始めていく。

A.1 電子によるX線の散乱

入射するX線の方向ベクトルを s_0 、原点にある電子から散乱するX線の方向ベクトルを s でそれぞれ表す。 s_0 、sは共に単位ベクトルである。これら両者のなす角度を散乱角と 呼び、ここでは 2θ で表す。X線の波長を λ としたときに、散乱ベクトルSを次のように定義 する。

$$\mathbf{S} = (\mathbf{s}/\lambda) - (\mathbf{s}_0/\lambda) \tag{A.1}$$

敢乱ベクトルSの大きさ|S|は、

$$|\mathbf{S}| = (\mathbf{S} \cdot \mathbf{S})^{1/2} = \{(\mathbf{s}^2 + \mathbf{s}_0^2 - 2\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}_0)/\lambda\}^{1/2} = 2\sin\theta/\lambda$$
(A.2)

である。|S|は大きさとして0から2/λをとりうる量である。Sは単位として長さの逆数を 取り、このような座標系は逆空間と呼ばれる。

位置rに電子が存在する散乱体を考える。散乱体と検出器との距離はrの大きさに比べて 十分大きいものとする。この時、散乱角20は電子が原点に存在する場合と同じと考えてよ い。X線の行路の違いを考えると、その差は

$$\mathbf{r} \cdot \mathbf{s} - \mathbf{r} \cdot \mathbf{s}_0 = (\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \cdot \mathbf{r} \tag{A.3}$$

この距離は、波長λのX線の場合、波数にすると、

$$(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0) \cdot \mathbf{r} / \lambda = \mathbf{S} \cdot \mathbf{r} \tag{A.4}$$

の違いに相当する。したがって、原点にある電子が与えるX線散乱を $A_e(\mathbf{S})$ としたとき、 位置 r にある電子からの散乱は位相を S r だけ変えたもの、すなわち、 $A_e(\mathbf{S})e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}$ と表 すことができる。構造因子 $F(\mathbf{S})$ は原点に存在する電子1個の散乱との比で定義され、以 下のようになる。

$$F(\mathbf{S}) = A_e(\mathbf{S})e^{2\pi i(\mathbf{S}\cdot\mathbf{r})}/A_e(\mathbf{S}) = e^{2\pi i(\mathbf{S}\cdot\mathbf{r})}$$
(A.5)

A.2 単一粒子よるX線散乱

一般に、物質のX線による散乱を考える場合、物質は連続的な電子密度を持っているとして扱う。電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ を持つ物質中で、位置 \mathbf{r} にある体積要素 $dv_{\mathbf{r}}$ には $\rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}}$ の電子があると考えられる。この体積要素による X線の散乱は位相を考慮して、

$$F(\mathbf{S}) = \rho(\mathbf{r})dv_{\mathbf{r}}e^{2\pi i(\mathbf{S}\cdot\mathbf{r})}$$
(A.6)

で得られる。

連続的な電子密度分布を持つ物質に対しては、式(A.6)で表される項を積分することで、 物質全体の構造因子を得ることができる。すなわち、

$$F(\mathbf{S}) = \int_{V} \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})} dv_{r}$$
(A.7)

この積分は物質の体積全体について行われる。また、数学的にはこの積分は電子密度のフー リエ変換となっている。

次に、実際に実験を行った場合に観測される、散乱強度について考える。構造因子を示した式(A.7)から、電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ を持つ物質の散乱振幅は、

$$A(\mathbf{S}) = A_e(\mathbf{S}) \int \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})} dv_{\mathbf{r}}$$
(A.8)

となる。散乱強度 I(S) は散乱振幅の絶対値の自乗であるので、

$$I(\mathbf{S}) = A(\mathbf{S}) \cdot A^{*}(\mathbf{S})$$

= $I_{\epsilon}(\mathbf{S}) \int \int \rho(\mathbf{r}_{j})\rho(\mathbf{r}_{k})e^{2\pi i \mathbf{S}(\mathbf{r}_{j}-\mathbf{r}_{k})} dv_{\mathbf{r}_{j}} dv_{\mathbf{r}_{k}}$
= $I_{\epsilon}(\mathbf{S}) \int \int \rho(\mathbf{r}_{j})\rho(\mathbf{r}_{k})e^{2\pi i \mathbf{S}\mathbf{r}_{jk}} dv_{\mathbf{r}_{j}} dv_{\mathbf{r}_{k}}$ (A.9)

となる。ここで、 $\mathbf{r}_{jk} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k$ であり、 $I_e(\mathbf{S}) = A_e^2(\mathbf{S})$ である。また、 $I_e(\mathbf{S})$ は単一の電子 からのX線の散乱強度を示し、入射X線の強度を I_0 、物質と観測点の距離を p とすると、 次式で与えられる。

$$I_{\epsilon}(\mathbf{S}) = 7.90 \times 10^{-26} I_0 \times p^{-2} \times \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2}$$
(A.10)

さて次に、分子が溶液中に存在する場合について考察していく。このとき、分子は溶液 中であらゆる方向を向いて存在することができると考えられる。したがって、観測される X線散乱強度も、あらゆる方向を向いた分子による散乱の和と考えられる。すなわち、空 間的な方向が平均された散乱強度であり、これは次のように表すことができる。

$$\langle I(\mathbf{S}) \rangle = \langle I_e(\mathbf{S}) \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) e^{2\pi i \mathbf{S} \mathbf{r}_{jk}} dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k} \rangle$$

= $I_e(\mathbf{S}) \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) \langle e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_{jk})} \rangle dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k} = I(S)$ (A.11)

演算子 () は空間平均を行うことを示している。分子が溶液中にある場合、 $\rho(\mathbf{r})$ は溶媒の電 子密度 ρ_0 との差である。

$$\langle e^{2\pi i \mathbf{Sr}_{jk}} \rangle = \frac{\sin(2\pi Sr_{jk})}{2\pi Sr_{jk}} \tag{A.12}$$

であることを利用すると、(A.11)式は、

$$I(S) = I_e(S) \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) \frac{\sin(2\pi S r_{jk})}{2\pi S r_{jk}} dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k}$$
(A.13)

とすることができる。ここで S = |S|、 r = |r| を表す。したがって散乱強度はスカラー量 としての S だけの関数となり、散乱角 2 θ にのみ依存する。

式(A.13)は溶液中に存在する単一粒子による散乱強度を表す一般式といえる。なお以下 では、単一電子の散乱との相対的な値を考えることにし、 $I_e(S)$ は考慮に入れない。

ところで、物質が原子から成り立っていることから、電子密度を連続的な分布としてでは なく、有限個の原子の和として取り扱ってみる。原点にあって、電子密度分布 ρ(r) を持っ た原子を考えるとき、電子密度分布は球対称であると仮定できる。このとき、原子1個に よる構造因子は次のように表すことができる。

$$F(\mathbf{S}) = \int d\phi \int \sin\theta d\theta \int \rho(r) dr e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})}$$

= $4\pi \int \rho(r) r^2 \frac{\sin(2\pi S r)}{2\pi S r} dr$
= $f(S)$ (A.14)

f(S) は原子散乱因子と呼ばれる。実際の原子では、ガウス関数に近い形である。N 個の 原子からなる分子を考える。それぞれの原子が原子構造因子 $f_j(S)$ をもち \mathbf{r}_j に位置してい る場合、分子全体の構造因子は位相を考慮して、

$$I^{r}(\mathbf{S}) = \sum_{j} f_{j}(S) e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_{j})}$$
(A.15)

で表される。このような分子が溶液中に存在している場合の散乱強度は次式で得られる。

$$I(S) = \sum_{j} \sum_{k} f_{j}(S) f_{k}(S) \langle e^{2\pi i (\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}_{jk})} \rangle$$

$$= \sum_{j} \sum_{k} f_{j}(S) f_{k}(S) \frac{\sin(2\pi S r_{jk})}{(2\pi S r_{jk})}$$
(A.16)

この式は Debyeの式と呼ばれ、物質中の原子の種類と位置から散乱強度を計算できる。

A.3 小角領域のX線散乱

式 (A.13) において、小角領域 ($S \rightarrow 0$) での散乱強度の振る舞いを考察する。(A.13) に おける $\frac{\sin(2\pi Sr_{jk})}{2\pi Sr_{ik}}$ の項は、次のように級数展開することができる。

$$\frac{\sin(2\pi Sr)}{2\pi Sr} \simeq 1 - \frac{(2\pi Sr)^2}{6} + \cdots$$
 (A.17)

このうち、最初の2項だけを考えると、(A.13)は以下のように近似できる。

$$I(S) = \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k} - \frac{(2\pi Sr)^2}{6} \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) r_{jk}^2 dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k}$$

$$= \{\int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \}^2 - \frac{(2\pi Sr)^2}{6} \int \int \rho(\mathbf{r}_j) \rho(\mathbf{r}_k) r_{jk}^2 dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k}$$
(A.18)

 \mathbf{r}_{j} と \mathbf{r}_{k} のなす角度を ϕ_{jk} としたとき、 r_{jk} は

$$r_{jk}^{2} = |\mathbf{r}_{j} - \mathbf{r}_{k}|^{2}$$

= $|\mathbf{r}_{j}|^{2} + |\mathbf{r}_{k}|^{2} - 2|\mathbf{r}_{j}||\mathbf{r}_{k}|\cos\phi_{jk}$ (A.19)

のように表すことができる。これを(A.18)式の第2項に代入すると、第2項は

$$-\frac{(2\pi S)^2}{6} \int \int \rho(\mathbf{r}_j)\rho(\mathbf{r}_k) \{|\mathbf{r}_j|^2 + |\mathbf{r}_k|^2 - 2|\mathbf{r}_j||\mathbf{r}_k|\cos\phi_{jk}\} dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k}$$

$$= -\frac{(2\pi S)^2}{6} \{\int \int 2\rho(\mathbf{r}_j)\rho(\mathbf{r}_k)r_j^2 dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k} - \int \int 2\rho(\mathbf{r}_j)\rho(\mathbf{r}_k)r_j r_k\cos\phi_{jk} dv_{\mathbf{r}_j} dv_{\mathbf{r}_k}\}$$

$$= -\frac{(2\pi S)^2}{3} \{\int \rho(\mathbf{r}_k) dv_{\mathbf{r}_k} \int \rho(\mathbf{r}_j)r_j^2 dv_{\mathbf{r}_j} - \int \rho(\mathbf{r}_j)r_j dv_{\mathbf{r}_j} \int \rho(\mathbf{r}_j)r_k\cos\phi_{jk} dv_{\mathbf{r}_k}\} (A.20)$$

となる。ここで、rの原点を分子内の電子密度分布の重心にとることにする。このとき、

$$\int \rho(\mathbf{r})\mathbf{r}dv_{\mathbf{r}} = 0 \tag{A.21}$$

である。また $\int \rho(\mathbf{r}_k) r_k \cos \phi_{jk} dv_{\mathbf{r}_k} = 0$ である。これは $\int \rho(\mathbf{r}_k) r_k \cos \phi_{jk} dv_{\mathbf{r}_k} \stackrel{\text{of}}{\to} \int \rho(\mathbf{r}_k) r_k dv_{\mathbf{r}_k}$ の $\mathbf{r}_j \sim 0$ 投影であることから導かれる。結局、式(A.18)は次のようになる。

$$I(S) = \{\int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \}^{2} - \frac{(2\pi S)^{2}}{3} \int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \int \rho(\mathbf{r}) r^{2} dv_{\mathbf{r}}$$
$$= \{\int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \}^{2} \{1 - \frac{(2\pi S)^{2}}{3} \frac{\int \rho(\mathbf{r}) r^{2} dv_{\mathbf{r}}}{\int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}}} \}$$
(A.22)

ここで、次の量を定義する。

$$Rg^{2} = \frac{\int \rho(\mathbf{r})r^{2}dv_{\mathbf{r}}}{\int \rho(\mathbf{r})dv_{\mathbf{r}}}$$
(A.23)

$$I(0) = \{ \int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \}^2$$
(A.24)

この時、式(A.22)は以下のように単純な形で表すことができる。

$$I(S) = I(0)\{1 - \frac{(2\pi SRg)^2}{3}\}$$
(A.2.)

この式は 2πSRg が小さいときには、さらに指数関数の形に近似できる。

$$I(S) = I(0)e^{-\frac{(2\pi SRg)^2}{3}}$$
(A.26)

式(A.26)は小角散乱において非常に重要である。この式は小角領域での散乱曲線は、物 質の形状のよらず Rg の幅を持ったガウス関数で記述できることを示している。いま、式 (A.26)の両辺の自然対数をとると次の式を得ることができる。

$$\ln[I(S)] = \ln I(0) - \frac{(2\pi S Rg)^2}{3}$$
(A.27)

したがって、 $\ln[I(S)]$ を S^2 の関数としてプロットした場合、散乱曲線は傾き $(2\pi Rg)^2/3$ をもった直線になることが分かる。すなわち、この直線の傾きから Rgの値を、また切片から I(0)の値を得ることができる。このような式 (A.27)に基づいたプロットの仕方をギニエプロット (Guinier plot) と呼ぶ。

式(A.23)で定義される Rgは慣性半径と呼ばれ、分子内電子密度の重心の周りの2次モー メントである。したがって慣性半径は重心の周りの電子密度の広がり方を示す量と考えら れる。また、小角散乱においては他の情報を用いずに、試料の散乱曲線のみから直接得ら れるものとして、唯一の量である。

一方、S = 0における散乱強度I(0)は原点散乱強度と呼ばれ、分子内に含まれる電子数の自乗に比例している。 すなわち、式(A.24)から、

$$I(0) = \{ \int \rho(\mathbf{r}) dv_{\mathbf{r}} \}^2 = (\bar{\rho}V)^2 = (Z_e M)^2$$
(A.28)

ここで、 ρ は分子内の平均の電子密度、 ρ は分子の体積、Mは分子量、 Z_e は1グラムあたりに含まれる電子の数をそれぞれ表している。ただし、分子が溶液中にある場合などは、 ρ や Z_e は溶媒との差を考える。分子量と原点散乱強度を関連づけたこの式は、しかしながら分子1個の散乱を考察したものであり、これを測定することは実験的には実現不可能である。有限濃度 c (mg/ml)の溶液による散乱を観察した場合、I(0)は次式のようになる。

$$I(0,c) = I_e \cdot (Z_e M)^2 \cdot c \cdot V_0 \cdot N_A \cdot \frac{1}{M}$$

= $I_e \cdot Z_c^2 \cdot M \cdot c \cdot V_0 \cdot N_A$ (A.29)

ただし V_0 はX線に照射される溶液の体積、 N_A はアボガドロ数、 I_e は1個の電子の散乱 強度を示している。結局、I(0) は濃度と分子量に比例する形となる。 I_e や V_0 などの実験 条件によって決まるパラメータを同じにし、 Z_e の等しい分子では原点散乱強度の比が分 子量の比になる。タンパク質のX線溶液散乱においては、分子量既知の標準タンパク質を 同一条件で測定して、相対的に分子量を求めることができる。

ところで、式(A.27)を求めるまでの考察で、 $2\pi SRg$ が小さいことが条件として加えられた。したがって、式(A.27) にもとづいてギニエプロットを行った場合、散乱強度が直線 として近似できるのは小さな S の領域に限られる。どの範囲まで有効なのかは分子の形状 によって異なるが、一般に近似直線を求めるのは $2\pi SRg \leq 1$ の範囲で行う。

A.4 自己相関関数と距離分布関数

電子密度分布の自己相関関数は次式で定義される。

$$\dot{\rho}^{2}(\mathbf{r}) = \int \rho(\mathbf{r}')\rho(\mathbf{r}'+\mathbf{r})dv_{\mathbf{r}'}$$
(A.30)

また、散乱強度は電子密度の自己相関関数 p²(r)のフーリエ変換で与えられて、

$$I(\mathbf{S}) = \int \dot{\rho}^2(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{S} \mathbf{r}} dv_{\mathbf{r}}$$
(A.31)

次に、空間平均された系について考えてみる。次式のように空間平均された自己相関関数 を γ(r) と定義すると、

$$\langle \hat{\rho}^2(\mathbf{r}) \rangle = \gamma(r) \tag{A.32}$$

式(A.31)を空間平均した散乱強度は式(A.12)、(A.32)および $dv_r = r^2 \sin \theta dr d\theta d\phi$ を用いて

$$I(S) = 4\pi \int \gamma(r) r^2 \frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} dr$$
(A.33)

のように表すことができる。さらに、この式の逆変換から

$$\gamma(r) = 4\pi \int S^2 I(S) \frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} dS \tag{A.34}$$

が得られる。

ここで、距離分布関数 p(r) を(A.32) を用いて次のように定義する。

$$p(r) = r^2 \gamma(r) \tag{A.35}$$

このとき、式(A.33)から散乱強度およびその逆変換は次のようになる。

$$I(S) = 4\pi \int_0^\infty p(r) \frac{\sin 2\pi S r}{2\pi S r} dr$$
(A.36)

$$p(r) = 2 \int_0^\infty SrI(S) \sin 2\pi SrdS \tag{A.37}$$

p(r)は、分子内で距離 r だけ離れた任意の体積素片の組の数に比例した量である。した がって、分子の最大長を D_{max} とすれば $r \ge D_{max}$ では p(r) = 0となる。したがって、実験 的に得られた散乱強度から p(r)を計算し、p(r) = 0になる rの位置から分子の最大長(コー ド長)を求めることができる。しかしながら式(A.37)で示されるフーリエ変換を正しく行 うためには、無限大の大きさまでの散乱強度の積分を含む演算を必要とするので、実際に は直接にフーリエ変換を行って p(r)を求めるのは困難である。これを克服する方法がいろ いろ考案されている。

また、 p(r) 関数の2次モーメントから、慣性半径を求めることができる。

$$Rg^{2} = \frac{\int_{0}^{D_{\max}} p(r)r^{2}dr}{2\int_{0}^{D_{\max}} p(r)dr}$$
(A.38)

A.5 分散系における X 線散乱

これまでは主に粒子1個による散乱を考察してきたが、実際の実験を行うのは有限の濃度の溶液であるので、以下では多数の粒子が存在する場合の散乱について考えていく。

N個の孤立粒子からなる系の散乱を考える。(1個の粒子は原子を考えてもいいし、分子であってもよい。) j 番目の粒子、 k 番目の粒子の散乱振幅をそれぞれ $F_j(\mathbf{S})$ 、 $F_k(\mathbf{S})$ と すると、粒子の集合体全体からの散乱強度は、

$$I(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^{N} \sum_{k=1}^{N} F_j(\mathbf{S}) F_k(\mathbf{S}) e^{2\pi i \mathbf{S}(\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)}$$
(A.39)

となる。ただし、 \mathbf{r}_i と \mathbf{r}_k はそれぞれ粒子の位置ベクトルを示す。等方的な系、すなわち 粒子の配列が方向によらない場合を考えると、上式を空間平均して次の式が得られる。

$$\langle I(\mathbf{S}) \rangle = \langle \sum_{j=1}^{N} F_{j}^{2}(\mathbf{S}) \rangle + \langle \sum_{j \neq k} F_{j}(\mathbf{S}) F_{k}(\mathbf{S}) \cos(2\pi \mathbf{S} \mathbf{r}_{jk}) \rangle$$

$$= \langle N \rangle \langle F^{2}(\mathbf{S}) \rangle + \langle F(\mathbf{S}) \rangle^{2} \langle \sum_{j \neq k} \cos(2\pi \mathbf{S} \mathbf{r}_{jk}) \rangle$$
(A.40)

ここで、 $\mathbf{r}_{jk} = \mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k$ を表し、また $\langle N \rangle$ は照射体積内の平均粒子数を表している。いま、 \mathbf{r}_j 、 \mathbf{r}_k の位置にある体積素片 dv_j 、 dv_k の両方に、同時に粒子の存在する確率を p_{jk} とする。このとき、(A.40)式の cos 項は、

$$\langle \sum_{j \neq k} \cos(2\pi \mathbf{Sr}_{jk}) \rangle = \int \int_{V_0} \frac{\sin(2\pi Sr_{jk})}{Sr_{jk}} p_{jk} dv_j dv_k$$
(A.41)

となる。 V_0 は照射される試料の体積を表す。さらに、1粒子あたりの体積を表す $v_1 = V_0/\langle N \rangle$ を用いて規格化した確率 $P_{jk} = p_{jk}/v_1^2$ を用いると、式(A.40)は次のようになる。

$$I(S) = \langle N \rangle \langle F^{2}(\mathbf{S}) \rangle + \langle F(\mathbf{S}) \rangle^{2} \int \int_{V_{0}} \frac{\sin(2\pi Sr_{jk})}{2\pi Sr_{jk}} \frac{dv_{j}}{v_{1}} \frac{dv_{k}}{v_{1}} - \langle F(\mathbf{S}) \rangle^{2} \int \int_{V_{0}} [1 - P(r_{jk})] \frac{\sin(2\pi Sr_{jk})}{2\pi Sr_{jk}} \frac{dv_{j}}{v_{1}} \frac{dv_{k}}{v_{1}}$$
(A.42)

この式で第2項の積分が、電子密度が一定で体積 V_0 を持った粒子の散乱を表すことから、 $S > 1/V_0^{1/3}$ の領域では無視できる。また、 $v_1^{1/3} \ll r_{ij} \ll V_0^{1/3}$ において粒子の位置は独立 だから r_{jk} が大きくなると $P(r_{jk})$ は一定値を持つようになる。したがって、第3項における 積分は、

$$\int_{V_0} \frac{dv_j}{v_1} \int_{V_0} [1 - P(r_{jk})] \frac{\sin(2\pi S r_{jk})}{2\pi S r_{jk}} \frac{dv_j}{v_1} \approx \langle N \rangle \int_0^\infty [1 - P(r)] \frac{\sin(2\pi S r)}{2\pi S r} \frac{4\pi r^2}{v_1} dr \quad (A.43)$$

の様に近似することができる。したがって散乱強度 I(S) は、

$$I(S) = \langle N \rangle \langle F^2(\mathbf{S}) \rangle - \langle N \rangle \langle F(S) \rangle^2 \int_0^\infty [1 - P(r)] \frac{\sin(2\pi Sr)}{2\pi Sr} \frac{4\pi r^2}{v_1} dr$$
(A.44)

と表すことができる。さらに、粒子が球対称、あるいは球対称と近似できる場合は $(F^2(\mathbf{S})) = \langle F(\mathbf{S}) \rangle^2$ だから、(A.44) 式は次のようになる。

$$I(S) = \langle N \rangle F^2(S) \{ 1 - \frac{1}{v_1} \int_0^\infty [1 - P(r)] \frac{\sin(2\pi Sr)}{2\pi Sr} 4\pi r^2 dr \}$$
(A.45)

この式で、初項は個々の粒子からの散乱に対応し、第2項は粒子間の干渉に由来するもの である。十分に希薄な系では第2項が無視できて、全体の散乱強度は単一粒子の散乱強度 に粒子の数をかけたものと等しくなる。濃度が高くなるにつれて第2項は無視できなくな る。これが粒子間干渉効果で、特に小角領域の散乱強度を減少させるが、一方で広角領域 に与える影響はほとんど無視できる。また干渉効果のために (A.26) で表されるギニエ近似 式は濃度 c の関数となり、

$$I(S,c) = I(0,c)e^{-\frac{(2\pi SRg(c))^2}{3}}$$
(A.46)

のように表され、 $R_g \approx I(0)$ に濃度依存性が見られる。これらを濃度 cの関数とした場合、 一般に次の関係が得られる。

$$\frac{Kc}{I(0,c)} = \frac{1}{M} + 2A_2c + \cdots$$
(A.47)

$$Rq^{2}(c) = R_{0}^{2} - B_{if}c + \cdots$$
(A.48)

ここで M は分子量、 R_0 は無限希釈溶液での慣性半径を表す。また A_2 と B_{if} はそれぞれ 第2ビリアル係数、干渉効果の強さに関するパラメータを表し、(A.45)においては第2項 に由来する。分子間干渉効果による影響から、真の慣性半径や分子量を求めるためには、 これらの量の濃度依存性を調べて、その後濃度ゼロに外挿した慣性半径、分子量の値を得 る必要がある。

B モデル計算

観測された散乱強度から散乱体の構造を直接に得ることは非常に困難である。これはX 線散乱において一般的な位相問題によることと、さらに溶液散乱においては空間平均され た散乱しか観測できないことによる。したがって、他の方法による知見から形態をモデル 化してそこから得られる散乱を計算し、分子構造を予測する手法は有用な解析法となる。

B.1 小球充填モデル

式(A.16)にしたがえば、分子を原子の集合体として扱った場合、原子散乱因子を用いて 散乱強度を計算できる。同様に考えて、分子を小球の集合体としてモデル化した場合、原 子散乱因子の代わりに小球の散乱因子を用いてモデル全体の散乱強度を計算することがで きる。すなわち、n 個の密度が均一な球の集合体であるるモデルから得られる散乱強度は、

$$I(S) = \sum_{j=1}^{n} g_j^2 \phi_j^2(S) + 2 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{k=j+1}^{n} g_j g_k \phi_j(S) \phi_k(S) \frac{\sin(2\pi d_{jk}S)}{2\pi d_{jk}S}$$
(B.1)

で得られる。ここで、 d_{jk} は j 番目と k 番目の球の中心間の距離を表し、また g_j は j 番目の球の weighting factor、 $\phi_j(S)$ は j 番目の球の散乱因子で、それぞれ

$$g_j = \rho_j V_j = \rho_j \frac{4\pi}{3} R_j^3$$
 (B.2)

$$\phi_j(S) = 3 \frac{\sin(2\pi R_j S) - 2\pi R_j S \cos(2\pi R_j S)}{(2\pi R_j S)^3}$$
(B.3)

で与えられる。ただし rho_j 、 V_j 、 R_j はそれぞれ j 番目の球の電子密度、体積、半径を表す。また、このような小球充填モデルから得られる p(r) および慣性半径は次の式によって与えられる。

$$p(r) = \sum_{j=1}^{n} \rho_j^2 p_0(r, R_j) + 2 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{k=j+1}^{n} \rho_j \rho_k p(r, d_{jk}, R_j, R_k)$$
(B.4)

$$Rg^{2} = \sum_{j=1}^{n} f_{j}Rg_{j}^{2} + \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{k=j+1}^{n} f_{j}f_{k}d_{jk}^{2}$$
(B.5)

ここで、 $p_0(r, R_j)$ は電子密度が一定で半径 R_j の球のp(r)関数である。また $p(r, d_{jk}, R_j, R_k)$ は j番目と k番目の球 (半径はそれぞれ R_j, R_k でその中心間距離は d_{jk})の cross term distance distribution で、文献³¹)に詳しく示されている。また Rg_j は j番目の球の慣性半径で、 $Rg_j = \sqrt{3/5}R_j$ である。 f_j は $f_j = \frac{\rho_j V_j}{\sum \rho_j V_j}$ で定義される mass fraction である。

B.2 タンパク質の水和を考えたモデル計算

結晶構造解析による原子座標モデルをそのまま直接フーリエ変換することで得られる散 乱強度や慣性半径は、観測値と異なっていることが多い。これは、溶液散乱による結果では タンパク質に結合した水分子を共に見ているからであるといわれている²¹⁾。このような、 水和水を含めた散乱強度の計算方法についてはいくつかの方法が考えられているが^{22,32)}、 本研究ではモンテカルロシミュレーションを用いて散乱強度の計算を行った³³⁾。原子モデ ルから得られる構造に水による層を考え、これら全体の構造をランダムな点の集合で表す。 各々の座標から点と点の距離をあらゆる組について求めれば、その距離ごとの頻度を関数 として表したものが *p*(*r*) として得られる。

原子モデルをもとにしてランダムな点の集合で表したヌクレオチドを結合していないS1 の例を図B-1に示す。本文の以降の解析はこのS1モデルから出発した。



図 B-1: タンパク質に結合した水分子をランダムな点で表したモデル。

謝辞

本研究を直接ご指導くださいました若林克三助教授に心から感謝いたします。論文審査 だけでなく、研究を続ける上で様々な御指導、御助言をくださった柳田敏雄教授、葛西道 生教授、村上富士夫教授に深く感謝いたします。新技術事業団の徳永万喜洋先生には試料 調整から解析にいたるあらゆる点で様々にお世話になりました。深く感謝いたします。常 に有意義な議論をし続けてくださった研究グループの浜中俊明先生、猪子洋二先生に深く 感謝いたします。放射光実験施設では光学系の調整から検出器の利用まで様々な点で適切 な御助言と御協力をいただいた雨宮慶幸先生に感謝申し上げます。また試料調整や測定の 御協力だけでなく、いつも議論をしていただいた武澤康範さんに感謝いたします。有益な 御助言と御指導を下さった藤原悟さん、上野豊さんに感謝します。荒田敏昭先生には生化 学的な観点からの議論をしていただき、深く感謝いたします。最後に、本研究を進めるに あたり多大な御協力をいただいた生物物理研究室ならびに大阪大学基礎工学部生物工学科 のみなさまに謹んで感謝の意を表します。

参考文献

- 1. K. Wakabayashi, M. Tokunaga, I. Kohno, Y. Sugimoto, T. Hamanaka, Y. Takezawa, T. Wakabayashi, and Y. Amemiya, *Science* **258**, 443–447 (1992).
- I. Rayment, W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Bäse, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, G. Wesenberg, and H. M. Holden, *Science* 261, 50-58 (1993).
- I. Rayment, H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes, and R. A. Milligan, Science 261, 58-65 (1993).
- 4. C. A. Smith and I. Rayment, Biophys. J. 70, 1590-1602 (1996).
- 5. C. R. Bagshaw, Muscle Contraction, Chapman and Hall (1993).
- C. R. Bagshaw, J. F. Eccleston, F. Eckstein, R. S. Goody, H. Gutfreund, and D. R. Trentham, Biochem. J. 141, 351-364 (1974).
- 7. M. Tokunaga, K. Sutoh, and T. Wakabayashi, Adv. Biophys. 27,157-167 (1991).
- 8. S. Highsmith, and D. Eden, *Biochemistry* **32**, 2455–2458 (1993).
- 9. Y. Sugimoto, M. Tokunaga, Y. Takezawa, M. Ikebe, and K. Wakabayashi, *Biophys. J.*, 68, 29s-34s (1995).
- 10. R. A. Mendelson, D. K. Schneider, and D. B. Stone, J. Mol. Biol. 256, 1-7 (1996).
- M. Whittaker, E. M. Wilson-Kubalek, J. E. Smith, L. Faust, R. A. Milligan, and H. L. Sweeney, Nature 378, 748-751 (1995).
- 12. J. D. Jontes, E. M. Wilson-Kubalek, and R. A. Milligan, Nature 378, 751-753 (1995).
- 13. K. Wakabayashi, and Y. Amemiya, Handbook on Synchrotron Radiation(eds. S. Ebashi et al.) 4, 597-678 (1991).
- 14. Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushita, and H. Hashizume, Nucl. Instrum. Methods 208, 471 (1983).
- 15. S. Hansen, and J. S. Pedersen, J. Appl. Cryst. 24, 541-548 (1991).
- 16. Y. Izumi, M. Wakita, H. Yoshino and N. Matsushima, *Biochemistry* **31**, 12266–12271 (1992).
- 17. Y. Tamura, N. Suzuki, and K. Mihashi, Biophys. J. 65, 1899-1905 (1993).
- A. J. Fisher, C. A. Smith, J. B. Thoden, R. Smith, K. Sutoh, H. M. Holden, and I. Rayment, Biochemistry 34, 8960-8972 (1995).
- 19. C. A. Smith, and I. Rayment, Biochemistry 34, 8973-7981 (1995).
- 20. C. A. Smith, and I. Rayment, *Biochemistry* 35, 5404–5417 (1996).
- J. G. Grossmann, M. Neu, E. Pantos, F. J. Schwab, R. W. Evans, E. Townes-Andrews, P. F. Lindley, H. Appel, W-G. Thies and S. S. Hasnain, J. Mol. Biol. 225, 811-819 (1992).

- T. Fujisawa, T. Uruga, Z. Yamaizumi, Y. Inoko, S. Nishimura, and T. Ueki, J. Biochem. 115, 875-880 (1994).
- 23. V. Luzzati, A. Tardieu, and L. P. Aggerbeck, J. Mol. Biol. 131, 435-473 (1979).
- 24. M. Gerstein, A. M. Lesk, and C. Cthothia, Biochemistry 33, 6739-6749 (1994).
- 25. M. Lorenz, D. Popp, and K. C. Holmes, J. Mol. Biol. 234, 826-836 (1993).
- D.h B. Stone, D. K. Schneider, Z. Huang, and Robert A. Mendelson, *Biophys. J.* 69, 767-776 (1995).
- F. Kinose, S. X. Wang, U. S. Kidambi, C. L. Moncman, and D. A. Winkelmann, J. Cell Biol. 134, 895-909 (1996).
- 28. A. Guinier and G. Fournet, Small-Angle Scattering of X-rays, (John Wiley & Sons., New York, 1955).
- 29. O. Glatter, and O. Kratky, Small Angle X-ray Scattering, (Academic Press, 1982).
- 30. L. A. Feigin, and D. I. Svergun, Structure Analysis by Small-Angle X-rau and Neutron Scattering, (Prenum Press, 1987).
- 31. O. Glatter, Acta Phys. Austr. 52, 243–256 (1980).
- 32. D. Svergun, C. Barberato, and M. H. J. Koch, J. Appl. Cryst. 28, 768-773 (1995).
- 33. S. J. Henderson, Biophys. J. 70, 1618-1627 (1996).

本研究に関連した発表論文

- 1. Yasunobu Sugimoto, Makio Tokunaga, Yasunori Takezawa, and Katsuzo Wakabayashi : Conformational changes of skeletal muscle myosin subfragment-1 by binding of MgADPaluminum fluoride and MgADP-beryllium fluoride, *Journal of Muscle Research and Cell Mitility* 17, 286 (1996).
- 2. Yasunobu Sugimoto, Makio Tokunaga, Yasunori Takezawa, Mitsuo Ikebe, and Katsuzo Wakabayashi : Conformational Changes of the Myosin Heads during Hydrolysis of ATP as Analysed by X-Ray Solution Scattering, *Biophys. J.*, 68, 29s-34s (1995).
- Katsuzo Wakabayashi, Makio Tokunaga, Yasunobu Sugimoto, Mitsuo Ikebe, and Yasunori Takezawa : Effects of ADP-fluoroberyllate and -fluoroaluminate on skeletal and smooth muscle S1s studied by X-ray solution scattering, *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16, 344-315 (1995).
- 4. 徳永万喜洋, 杉本泰伸, 若林克三: X線溶液散乱でとらえたエネルギー変換中のミオシン頭部 の構造変化, 生物物理 34, 131-135 (1994).
- 5. Yasunobu Sugimoto, Makio Tokunaga, Yasunori Takezawa, and Katsuzo Wakabayashi : Conformational Changes of the Myosin Head During Hydrolysis of ATP and Upon Binding of Nucleotide Analogs by X-ray Solution Scattering, *Photon Factory Activity Report* 12, 297 (1994).
- Makio Tokunaga, Katsuzo Wakabayashi, Yasunobu Sugimoto, Toshiaki Hamanaka, and Takeyuki Wakabayashi : Structural change of the myosin head detected by electron microscopy and small-angle X-ray scattering, *in* Synchrotron Radiation in the Biosciences (*eds.* B. Chance *et al.*, Oxford University Press), 493–501 (1994).
- Katsuzo Wakabayashi, Makio Tokunaga, Izumi Kohno, Yasunobu Sugimoto, Toshiaki Hamanaka, Yasunori Takezawa, Takeyuki Wakabayashi, and Yoshiyuki Amemiya : Small-Angle Synchrotron X-ray Scttering Reveals Distinct Shape Changes if the Myosin Head During Hydrolysisi of ATP, Science 258, 443-447 (1992).

.