



Title	収縮および硬直状態における横紋筋細いフィラメントのX線構造解析
Author(s)	上野, 豊
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3110121
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

収縮および硬直状態における
横紋筋細いフィラメントのX線構造解析

大阪大学大学院基礎工学研究科

物理系生物工学分野

平成8年1月

上野 豊

博士論文

収縮および硬直状態における
横紋筋細いフィラメントのX線構造解析

大阪大学大学院基礎工学研究科

物理系生物工学分野

平成8年1月

上野 豊

要旨

張力発生時における筋肉タンパク質の機能を構造面から理解するために、収縮状態と硬直状態における細いフィラメントのX線構造解析を行った。シンクロトロン放射光を利用してカエル骨格筋の収縮状態およびカニ横紋筋の硬直状態から高分解能（ $\sim 13 \text{ \AA}$ ）のX線回折像を測定した。これら回折データをアクチンやミオシン頭部の結晶学的データを利用して解析した。

（1）収縮中の細いフィラメントの構造変化

アクチンの結晶データを利用して、弛緩状態の強度データを説明できるFアクチンの構造モデルを構築した。このモデルの位相を使って弛緩と収縮状態の強度データから差フーリエ合成を行った。その結果、収縮中の電子密度の変化は細いフィラメント内部にあり、ミオシン頭部の結合を示唆するような変化はなかった。このことから、収縮中ミオシン頭部の相互作用を受けて細いフィラメント自体に構造変化が起こされていることが明らかとなった。この構造変化をフィラメント内のアクチンモノマーの4つのドメイン構造の相対的な移動で解析すると、サブドメイン2がフィラメントの内側に、サブドメイン1と4が分子の中心から離れる方向に数 \AA 移動することで説明できた。また、トロポミオシンを導入した解析では、収縮中のトロポミオシンの移動は繊維軸からの距離を変えずに方位角方向に5 \AA 程度移動していた。この動きは従来の立体障害説で考えられているよりも小さく、アクチンの構造変化に伴う移動である可能性を指摘した。

（2）硬直状態の細いフィラメントの構造

ミオシン頭部がアクチンに強固に結合した硬直状態は、収縮過程の両タンパク質の反応素過程の一つと考えられている。細いフィラメント中のFアクチン、制御タンパク質、結合ミオシン頭部の周期が一致しているカニ横紋筋の硬直状態の構造を解析した。Fアクチンモデルを構築した後、ミオシン頭部の結晶データを利用してその結合モデルを探索した。その結果、アクチンのN末端領域に結合する、電子顕微鏡による解析報告に近いモデルでX線回折像の強度データを説明できた。次に、トロポニン α は結晶構造が未知であるが、低分解能の構造的知見からX線データをよく説明する形状と細いフィラメントにおける配置を提案した。トロポニン α は細いフィラメントに沿って長く伸び、Fアクチンとの結合周期の半分以上を占めていた。またミオシン頭部はトロポニン α のない所に結合するような相対的位置関係であった。

目次

要旨

第1章 X線回折法による筋肉の構造研究の概要	6
(1) 筋肉(横紋筋)の構造	
(2) X線回折と電子顕微鏡	
(3) タンパク質結晶解析による原子構造の決定	
(4) 研究の焦点とX線回折法の課題	
(5) 本研究の位置づけ	
第2章 等尺収縮中のカエル骨格筋細いフィラメントの構造解析	
要約	16
1. 序論	17
2. 試料と方法	19
(1) 試料	
(2) X線回折像の記録	
(3) データ処理	
(4) モデル計算	
3. 結果	23
(1) 回折像と層線反射	
(2) 収縮中の強度増大	
4. 構造解析	29
(1) 弛緩状態のFアクチンのモデル	
(2) Holmesモデルの検証	
(3) 差フーリエマップによる収縮中の構造変化の検討	
(4) 収縮状態のFアクチンのモデル	
(5) 差フーリエマップによるモデルの検討	
(6) トロポミオシンのモデル	
5. 議論	48
(1) Fアクチンのモデル	
(2) 差フーリエマップの解釈	
(3) トロポニンの影響	
(4) 収縮中のFアクチンの構造変化	
(5) 筋収縮と構造変化との関係	
6. 結論	53

第2章 硬直状態のカニ横紋筋細いフィラメントの構造解析

要約	55
1. 序論	56
2. 試料と方法	58
(1) 試料	
(2) X線回折像の記録	
(3) フィルムのデータ処理	
(4) 回折像と層線反射の強度分布	
(5) モデル計算の手順	
3. 結果	65
(1) Fアクチンのモデル	
(2) Fアクチン+ミオシン頭部複合体のモデル	
(3) トロポニンのモデル	
(4) アクチン+トロポニン複合体のモデル	
(5) トロポミオシンのモデルの導入	
(6) 硬直状態の細いフィラメントのモデル	
4. 議論	84
(1) アクチンとミオシン頭部の結合様式	
(2) Fアクチンの構造	
(2) トロポニンのモデルの妥当性	
(4) ミオシン頭部とトロポニンの位置関係	
5. 結論	88
謝辞	89
参考文献	90

第1章

X線回折法による筋肉の構造研究の概要

筋肉はアクチン、ミオシンをそれぞれ主成分とする細いフィラメントと太いフィラメントが滑るように引き合うことで力を発生する。この2つのタンパク質の組み合わせはATPの化学エネルギーを力学的なエネルギーに変換する巧妙な分子機械を構成している。筋肉の動作原理を明らかにする目的で進められてきたX線回折法による筋肉の構造研究は、これまでも数々の構造情報を提供してきた。そして、近年の様々な新しい実験事実は、筋収縮の分子機構の解明に着実に近づいているようである。はじめに、本研究の背景となっているそれらの現状について概説する。

(1) 筋肉（横紋筋）の構造

脊椎動物の骨格筋や甲殻類小動物の横紋筋は、サルコメアと呼ばれる単位構造の直列的な配列を持っている。サルコメアは、重なり合った2種類のフィラメントがすべることによって収縮する機能を持つ筋肉の分子機械としての単位構造である。それぞれのフィラメントもタンパク質分子が周期的に配列したものである。太いフィラメントから規則的に突き出ているミオシン頭部は、細いフィラメントと滑り運動をさせるモータ部分と考えられ、細いフィラメントに結合した状態はクロスブリッジと呼ばれる。

ミオシン頭部はATPを加水分解する酵素作用があり、ミオシンとアクチンの相互作用はATPのエネルギーを利用する反応サイクルであると考えられている。筋肉では個々のミオシン頭部は非同期的に反応するためアクチンとミオシンの反応サイクルの素過程における構造を特定するのは難しい。一方、死後の細胞ではATP消費に伴ってミオシン頭部がアクチンに強固に結合して硬直状態となる。単離したFアクチンにミオシン頭部を結合させると一様な矢じり構造をつくるのが電子顕微鏡によって観察され、この2つのタンパク質は特異的な結合部位を持っていることが示されている。硬直状態での結合様式は張力を発生するアクチン-ミオシン反応サイクルの一つの素過程であるという仮説もあり、その構造は筋収縮の研究に有効な手がかりであると考えられる。

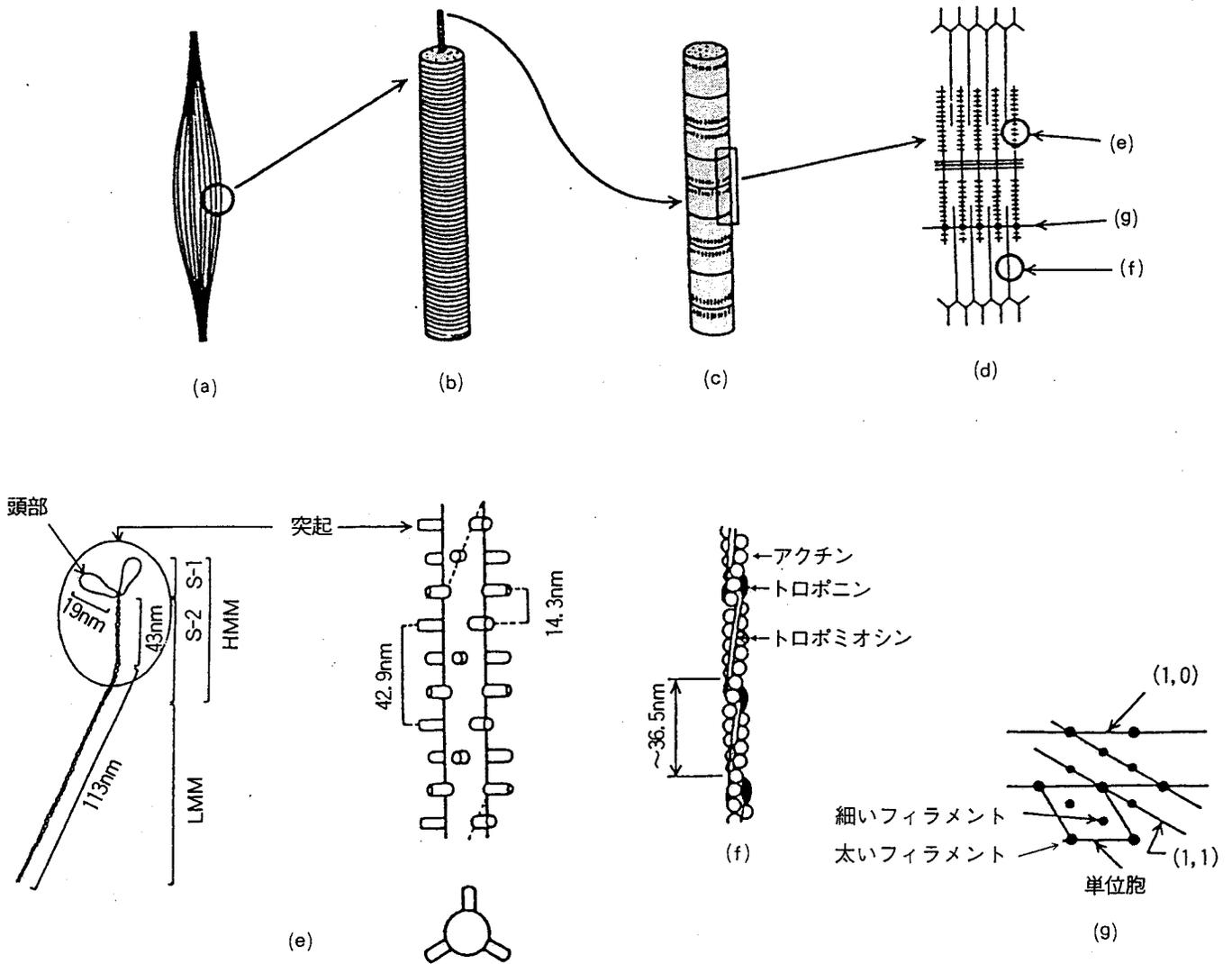


図 1-1 骨格筋（カエル）の構造模式図

(a) 全筋、(b) 筋繊維、(c) 筋原繊維、(d) サルコメア、と呼ばれる筋肉組織の単位構造。(e) 太いフィラメントとその成分であるミオシン分子の構造。酵素によって切断されるフラグメントのS-1がミオシン頭部である。(f) 細いフィラメント、アクチンのらせん構造に収縮制御タンパクであるトロポニンとトロポミオシンが結合している、(g) サルコメアの断面ではフィラメントが六方格子を形成する。

(引用：Ebashi, S. (1980). Regulation of muscle contraction. Proc.R.Soc.Lond. B207, 259-286.)

(2) X線回折と電子顕微鏡

筋肉フィラメントの構造は数十～百 Å程度の周期を持つため、筋肉は光学的な回折格子となっている。このような繊維構造から得られるX線回折像は繊維回折像と呼ばれ、DNAの2重らせん構造の決定など生体高分子の構造解析に威力を発揮してきたものである。X線回折法は生体試料の生理的条件下でデータを得ることができるのが最大の特長である。しかしながら位相問題のために、観測対象の電子密度分布を直接得ることができないという欠点がある。また、筋肉などの組織から得られる回折像は明瞭で再現性が高く、繊維組織の配向の良い試料では原子レベルの分解能の解析も可能である。

生体試料がその機能を発現している状態の構造データを得られるという特徴を生かして、筋肉の収縮におけるX線回折像の変化が多くの研究者によって観察された。それは、張力発生時にミオシン頭部が細いフィラメント側に移動し構造変化することを示唆していた。その結果、ミオシン頭部が首を振る、あるいは回転することによって力を発生するというモデルが提案された。その後、強力X線源であるシンクロトロン放射光を利用した時分割測定をすることによって、クロスブリッジの動きをとらえようとする実験も可能となった。しかしながらその結果は、ミオシン頭部の首振り運動が予測されるよりも小さく、首振りモデルによる張力発生の説明は成功していない。また、X線反射の強度変化の解釈も一義的ではなく、ミオシン頭部の動作の詳細はまだわかっていない。

電子顕微鏡による構造研究は、数十Åの分解能で試料を観察できる強力な方法であり、筋肉フィラメントの構造をより直接的に可視化してきた。X線では得られない散乱強度の位相を得ることができるので、ノイズを除去して周期構造を抽出する3次元再構成の手法が活用された。電子顕微鏡では試料を固定したり染色する必要があるため、機能している生体試料を直接観察することが難しいのが欠点である。また分解能を上げることも難しく、筋肉フィラメントでは20Å程度であった。最近では、無染色法（氷包埋）や、急速凍結法などで活性状態を固定する等の研究が進められ、これまでは観察が難しかったトロポミオシンを可視化した報告もされている。

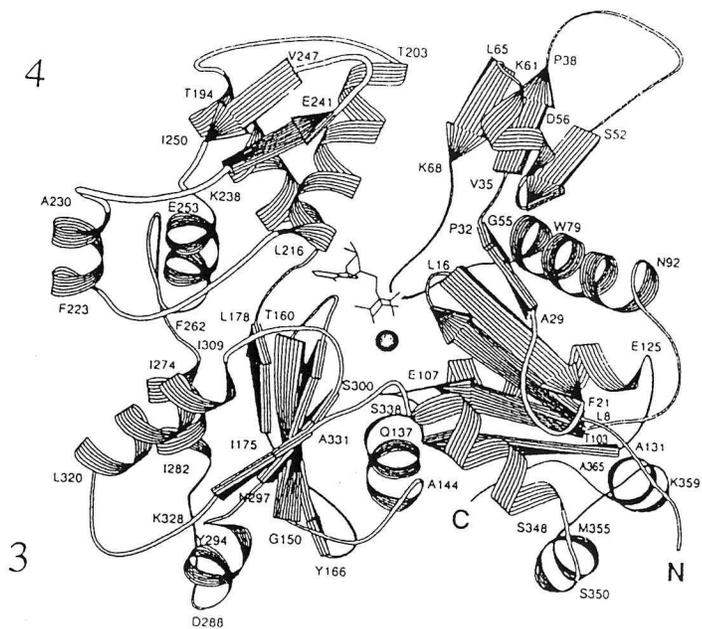
筋肉のような超分子システムの研究においては、X線回折法と電子顕微鏡による構造研究はそれぞれの長所を生かし、互いに相補的に活用され、共に発展している。

(3) タンパク質結晶解析による原子構造の決定

一方、X線結晶構造解析はタンパク質の原子座標を決定できる手法として確立されているが、良質の結晶を得ることの難しさがある。最近、長年の研究を経てアクチンの結晶構造解析が成功した。結晶はDNaseIやゲルゾリンとの複合体であった。そしてFアクチンのゲル状の濃厚試料を配向させた良質のX線繊維回折像が得られるようになり、そのデータに合うように結晶解析されたアクチンモノマーをらせん配列させたFアクチンのモデルも提案された。さらに、ミオシン頭部も結晶構造が解かれたが、結晶化にはリジン残基の化学修飾等が必要であった。ミオシン頭部がFアクチンに特定の向きで結合して矢じり構造を作っている複合体の電子顕微鏡による低分解能の3次元再構成像に、結晶構造を当てはめることによって、その結合様式も研究されるようになってきた。

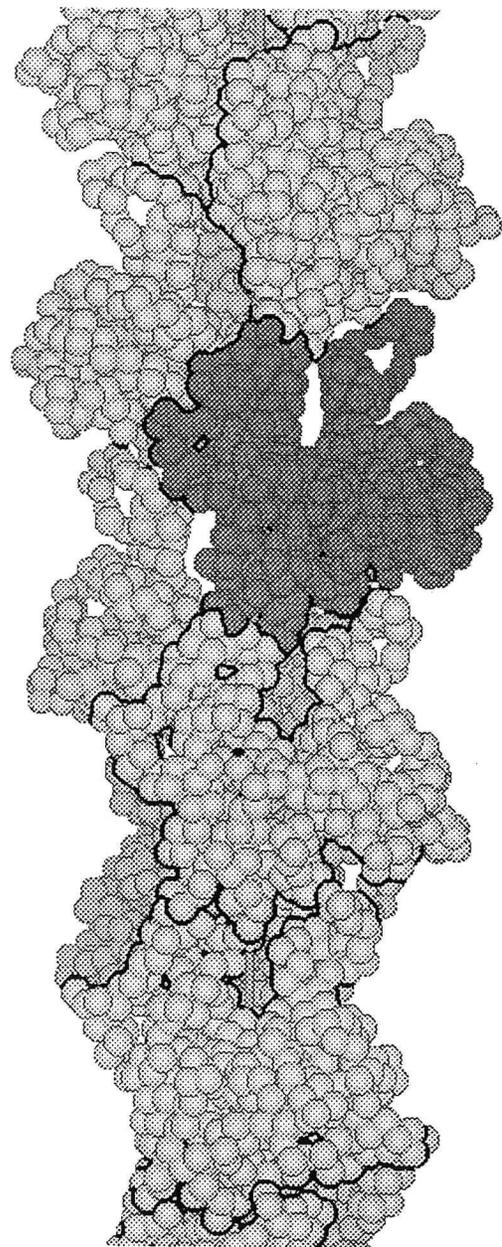
骨格筋では細いフィラメントに結合したトロポニンとトロポミオシンによって筋収縮の制御が行われている。神経系からの信号によって筋小胞体から放出された Ca^{2+} イオンがトロポニンに結合することで筋収縮が開始される。トロポニンはC, I, Tの3つのサブユニットからなり、トロポニンCとトロポミオシンについては結晶解析されているが、残りのタンパク質についての構造解析が望まれている。

結晶構造が解かれると、例えばタンパク質の機能に重要なアミノ酸の同定などの生化学的な研究は構造に立脚して進められる。それは、遺伝子工学的に特定のアミノ酸残基を置換するなどの手法によって効率的に行えるようになった。近年様々なタンパク質の構造が明らかにされる中で、その機能と構造の関係や、一般的な立体構造の構築原理といった新しい研究も始まっている。筋肉の研究においても結晶構造に基づいた新しい研究が可能になってきた。



2

1



(a)

(b)

図 1-2 (a) 結晶解析されたアクチンの原子構造。主鎖のリボン表示の中央に ADP と球で表した Ca^{2+} イオンがある。 Ca^{2+} 結合部位はその他に 3 つあると考えられている。アルファベット 1 文字のアミノ酸の名前と番号が加えられている。4 つのドメイン構造は番号で示されている。(b) Holmes らによって報告された F アクチンのモデルは、モノマーをらせん配置したものである。(引用: Kabsch, (1990), Holmes, (1990))

(a)

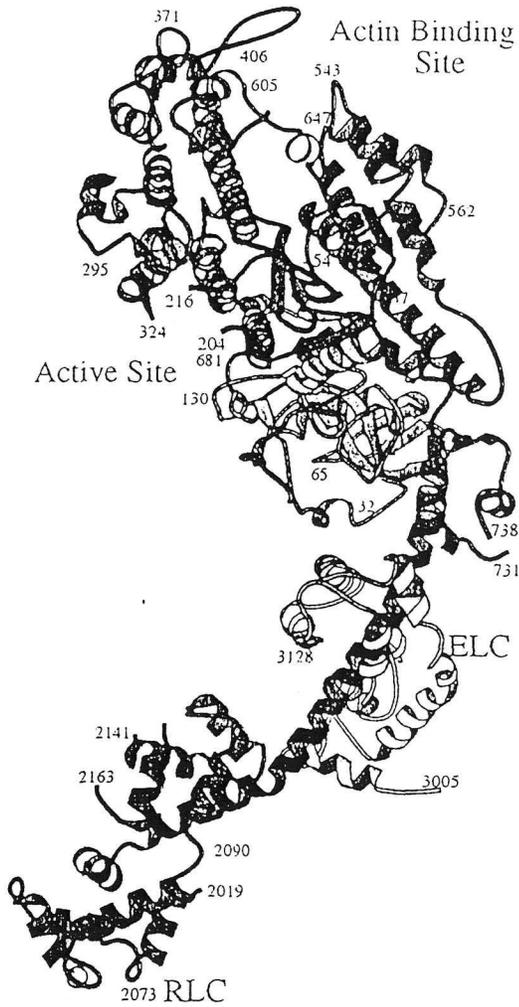
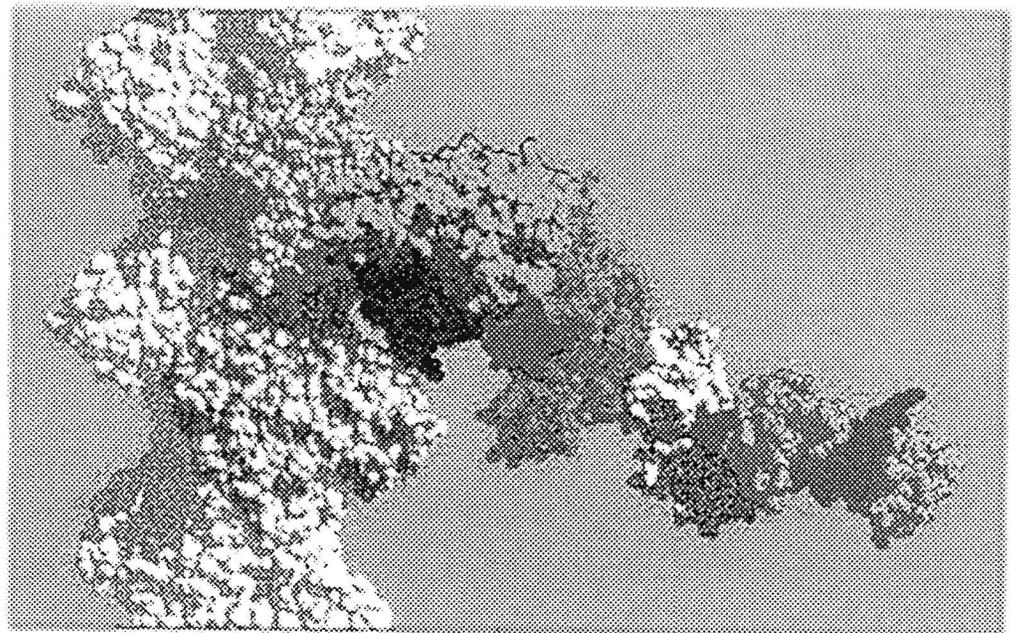


図 1-3 (a) ミオシン頭部の結晶構造の主鎖のリボン表示で、ATP を加水分解する部分が Active Site で、Regulatory Light Chain (RLC) と Essential Light Chain (ELC) を含んでいる。(b) アクチンとの結合様式のモデル。単離した Fアクチンとミオシン頭部の複合体の電子顕微鏡 3 次元再構成像に、これらの結晶構造を当てはめることによって求められた。アクチンと結合する部分は (a) で Actin binding Site と示されている。

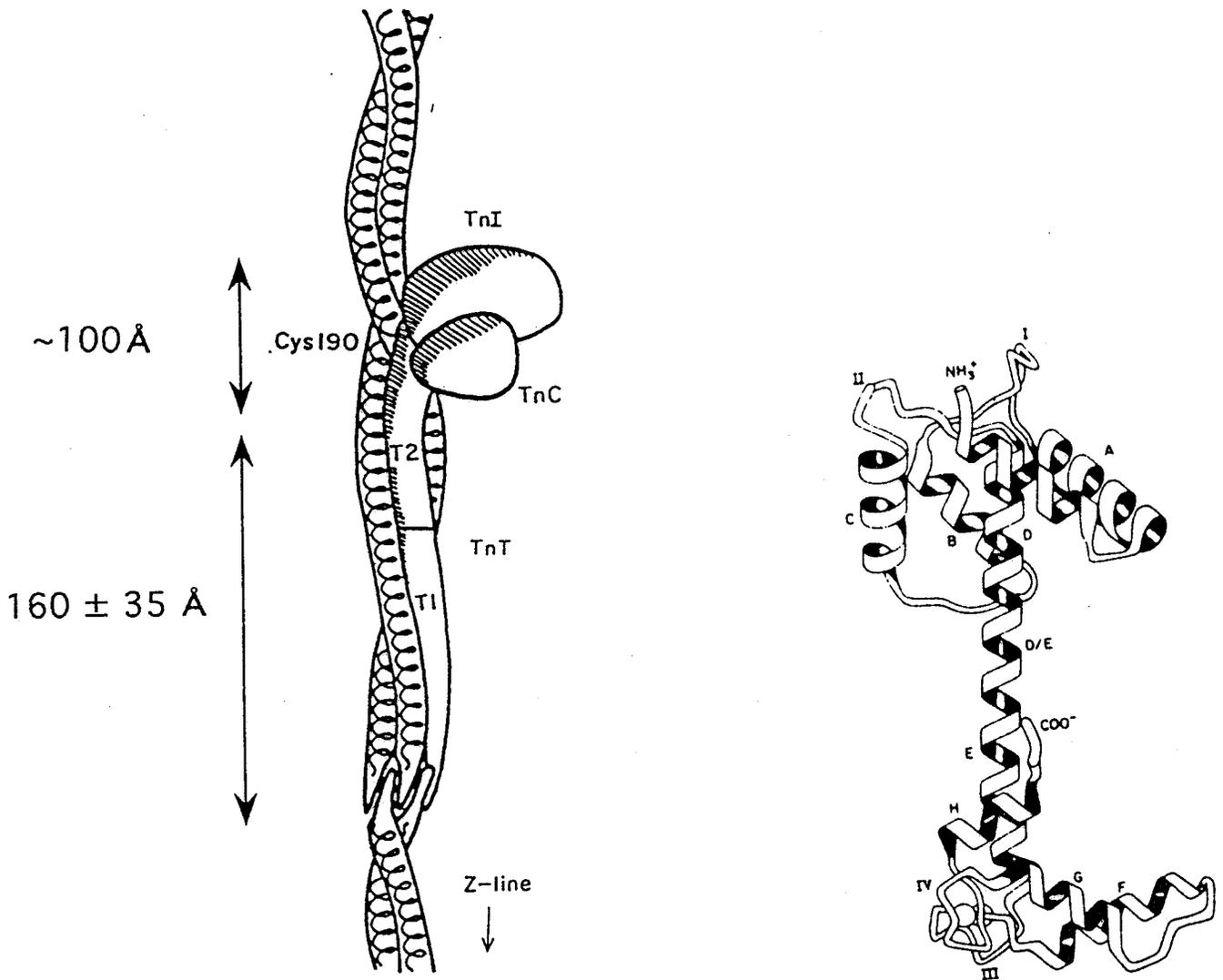
(引用 : Rayment, I. et.al. (1993))

(b)



The actomyosin complex, a molecular motor (1993, Rayment et al.)

Tropomyosin



(a)

(b)

図1-4 (a) トロポニン+トロポミオシンの構造の模式図。トロポニンは図1-1に示したよりもずっと長く大きい。トロポニンI (TnI)は、アクチンとミオシンの相互作用を阻害する働きがあり、トロポニンT (TnT : T1とT2に切断できる) はそれを効果的にフィラメント全体に伝えるものと考えられており、トロポミオシンの190残基Cysと結合する。(b) トロポニンC (TnC)の結晶構造。トロポニンCはCa²⁺を結合することによって、トロポニンIの阻害作用を停止し、アクチンとミオシンの相互作用を開始させる。

(引用 : Fricker, P.F. et.al. (1982), Herzberg, O. et.al. (1986))

(4) 研究の焦点とX線回折法の課題

筋肉の研究の目的は、タンパク質がどのようにしてフィラメントを滑らせる力を発生するかというメカニズムを明らかにすることである。分子の動きを原子レベルの構造に立脚して説明し、力学的エネルギー発生仕組みを物理現象として理解することが最終目標である。構成タンパク質の結晶構造が解かれたことによって、この研究は大きく進むことが期待されている。そのようなタンパク質分子の動的な仕組みは、他の運動性タンパク質、例えば繊毛運動や細胞分裂などに関与するチューブリン、キネシン、ダイニンなどにも共通しているものと推測される。そのための直接的アプローチとして、張力発生時のこれらタンパク質の構造変化を実験的にとらえることが重要である。

その要請に対しては、生体試料を用いた実験の可能なX線回折法が再び有力な手段となっている。これまでに報告された筋肉のX線回折の実験結果は構造情報の取得が困難な場合もあったが、今日明らかとなった構成タンパク質の静的な原子構造をもとに解析を行い、より確実な実験事実として蓄積していくことが期待されている。

X線のデータを解析して得られるのは電子密度分布であるが、分解能の低さや情報の欠損を補うために、その他の多くの実験事実をあわせて構造解析を進める必要がある。結晶解析においても、タンパク質のアミノ酸配列の情報なくしては座標を決定することはできないのである。生化学的、物理化学的な研究は依然として重要な基礎的データを提供している。例えば、タンパク質の特異的な部分にラベルをつけ、ラベル間の距離を測定する蛍光エネルギー移動法 (FRET) や、結合しているADPのヌクレオチドの角度を測定する手法などによる構造情報は重要である。このようにX線回折法だけでは得られない様々な実験結果を総合的に考慮して解析を進めることで、より確実な構造情報を得ることが必要である。

(5) 本研究の位置づけ

本研究では、結晶データを利用した筋肉の細いフィラメントのモデルを構築し、X線回折データを説明するようなモデルの改良および、構造変化の解析を行った。アクチンは、筋肉以外の生体内運動系に広く関係しているタンパク質であり、これまでもアクチンを含む筋肉の細いフィラメントについての構造研究の蓄積がある。そして、結晶データに基づいたモデルを利用することによってより現実的な解析が期待できる。特に注目しているのは、張力を発生している時の構造変化をつかむことであり、これを第2章において論じた。

カエル骨格筋では、生筋を電気刺激することによって収縮中の筋肉回折像を得ることに成功している。しかしながら硬直状態ではミオシン頭部の結合の周期性が複雑で、X線回折像からミオシン頭部の結合様式を解析することが難しい。これは脊椎動物の骨格筋に共通している特徴である。

それに対し、カニなどの甲殻類の横紋筋では収縮状態の回折像を得ることは難しいが、硬直状態ではクロスブリッジが比較的単純な周期性を持ち、X線による研究に適していることがわかっている。このような理由から、第3章における硬直状態におけるミオシン頭部の結合した細いフィラメントの構造解析にはカニの筋肉のX線回折像を利用した。

本研究では扱わなかった太いフィラメントは、ほとんどミオシンだけで構成されているが、ミオシン頭部はかなり自由な向きを持つことが可能なため、平均構造をとらえようとするX線回折法での構造解析には難しさがある。ミオシン頭部の結晶データのモデルを利用することによって構造解析を進めていくことは今後の課題であると考えられる。

第2章

等尺収縮中のカエル骨格筋

細いフィラメントの構造解析

要約

張力発生時における筋肉タンパク質の構造変化を研究するため、シンクロトロン放射光を利用してカエル骨格筋の収縮状態のX線回折像を13Å分解能まで記録した。細かいフィラメント由来の層線反射には、収縮中のピークの分布は変わらず反射ごとに異なる割合の強度増大が観測された。この強度変化を説明するために、結晶データに基づく細かいフィラメントのモデルを構築して構造解析を行なった。

まず、細かいフィラメントの主成分であるFアクチンについて、結晶解析されたGアクチンの原子座標に基づくHolmesらのモデルを修正することで弛緩状態の強度データを説明する事ができた。観測された収縮中の強度増大の原因を調べるため、弛緩状態のFアクチンの構造をもとに差フーリエを計算し、対応する電子密度の変化を求めた。長いらせん周期の成分の反射を入れないで計算すると、トロポニンとトロポミオシンの成分は小さいと考えられる。その結果、硬直状態と弛緩状態の差フーリエではミオシン頭部の結合によると考えられる顕著なピークが見られたが、収縮状態と弛緩状態の差フーリエにはそれは見られず、Fアクチン内部の構造変化を示唆するものであった。このことから、収縮中に観測される細かいフィラメント反射の強度増大はミオシン頭部との相互作用によって細かいフィラメント内部に起こった構造変化によるものであるとして、アクチンの構造変化を解析した。

アクチンのサブドメインの相対的な移動であらわしたモデルでは、サブドメイン2がフィラメントの内側に移動し、サブドメイン1と4が離れるように変化することで説明可能であった。さらにこのモデルにトロポミオシンを導入した結果、収縮中のトロポミオシンの移動が5Å程度の大きさを観測データを良く説明でき、steric-block説で考えられているより小さい動きであった。

1. 序論

筋肉の張力発生時における筋肉フィラメントの構造変化をとらえることは、収縮のメカニズムを解明する重要な手がかりになると考えられる。X線回折法では生体試料の生理的条件下での実験が可能であり、これまでに多くの構造情報を提供してきた。収縮中の筋肉の回折像では、太いフィラメントの周期構造に由来する反射の多くが減少し、細いフィラメント由来の反射の強度の増大が見られる。シンクロトロン放射光の利用によって、張力の発生過程におけるこれらの強度の変化も観測された。注目している細いフィラメント由来の反射は、その構造因子を反映しているが、時分割測定の結果は1次元比例計数管によって測定した回折像中の部分的なデータであり、結晶学的な構造解析のためには十分ではなかった。そのため、張力の増大に先立って観測される変化は、トロポニンやトロポミオシンによる収縮制御に起因しており、張力と同じ変化を示すものはミオシン頭部クロスブリッジに起因すると解釈された (Kress,1986)。一方、イメージングプレートと呼ばれる高感度2次元X線検出器を利用することで、短時間に明瞭な収縮中の回折像を記録することが可能となり、回折像の2次元的な解析が可能になった (Amemiya,1987)。その回折像は、収縮中の細いフィラメント内部の構造変化を示唆するものであった。

細いフィラメント由来の反射の中で、第2層線と呼ばれる約180Åのスペーシングをもつ反射は、弛緩状態では観測されないが収縮中には現れるという顕著な性質がある。これは760Å周期の長い4重らせん構造に対応しており、収縮状態では収縮制御タンパク質であるトロポミオシンが移動するという steric-block 説によって説明されている (Huxley,1972; Heselgrobe,1972; Parry & Squire,1973)。弛緩状態ではトロポミオシンがアクチンとミオシンの相互作用を阻害する場所にあるが、トロポニンのCa²⁺結合における構造変化にともなってトロポミオシンの場所が移動し、ミオシンがアクチンと相互作用が可能な状態になるというモデルである。

その他の細いフィラメント由来の反射の強度変化の原因は、細いフィラメント自体の構造変化であるか、あるいはミオシン頭部によるものかは議論の余地が残っている。Kressらの報告では、59Åのスペーシングを持つ細いフィラメントの特徴的な層線反射のピーク位置が子午軸方向にシフトする傾向があることから、この強度変化がミオシン頭部の結合によるものであると説明した。Maedaらは、その強度変化が試料の温度に依存するものであるという報告 (Maeda,1988) の中でその変化の原

因は細いフィラメントの構造変化とミオシン頭部によるものとの2つの可能性があることを指摘している。

Gアクチンの結晶解析によって原子座標が発表されたのに続き、調整したFアクチンの配向ゲルのX線回折データにフィッティングしたモノマーのらせん配列によるFアクチンのモデルがHolmesら（1990）によって発表された。Shuttら（1993）はそれとは異なるモノマーの向きであるFアクチンの可能性を示しているが、Holmesらのモデルは他の生化学的な知見とも一致し、構造に立脚した研究の基礎として受け入れられている。Lorenzら（1993）はHolmesモデルを最適化し、立体化学的な考慮を含めてFアクチンの配向ゲルのX線のデータに合わせたFアクチンの原子座標モデルを報告した。

Fアクチンの動的な性質についてはこれまでに様々な報告がされており、収縮中の構造変化を示唆している。Yanagidaら（1980）は、筋肉組織中でアクチンの結合しているADP等のヌクレオチドの繊維軸となす角度を測定し、 Ca^{2+} による活性化やミオシン頭部のフラグメント（HMM）との相互作用でその角度が変化することを報告した。Orlovaら（1993）は、イオン種の異なる溶液中でFアクチンのやわらかさが異なるという事実について、それらの電子顕微鏡による3次元再構成像を比較し、Fアクチンの構造の違いで説明している。

X線回折法においても、発表されたアクチンの原子構造をもとにした構造解析が現実的となってきた。AL-Khayat（1995）らはドメイン構造を4つの球で近似したアクチンとトロポミオシンのモデルでsteric-block説のモデル計算を行なっている。彼らのモデル計算では、フィラメントのオーバーラップがなくなるまで引き延ばした筋肉を刺激したときに観察されるX線の強度の変化（Yagi,1989）を説明するためにはトロポミオシンの動きだけでは不十分で、アクチンのドメイン構造の変化が期待されることを報告した。

本研究では、カエル骨格筋の弛緩および収縮状態のX線回折像を13Å分解能まで記録し、発表されているアクチンの結晶座標を用いた細いフィラメントのモデルに基づいた構造解析を行った。回折像の中で71Åより広角の反射では、トロポニンやトロポミオシンの影響が小さいと考えられるので、Fアクチンのモデルを弛緩状態のX線データにフィッティングさせた。そして、収縮中に観測されている強度増大を説明する構造変化について解析し、さらにトロポミオシンもモデルに加えた細いフィラメントのモデルを構築した。

2. 試料と方法

(1) 試料

ウシガエル (*Rana Catesbeiana*) をピス棒で脊椎の活動を停止させた後、縫工筋 (sartrious) の片方に腱と骨を残すように注意深く切り取り、リンガー液 (115 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, pH 7.2 NaHCO₃) を循環したセルにとりつけ10 °Cに保った。セルには刺激用白金電極が約 5 mm 間隔で筋繊維に直角となるよう交互に配置されており、3 msec の刺激電位を30 Hz 矩形波でアイソレータを通して約 50 V とした電気刺激によって、約 1 秒の強縮状態とした (日本光電, SEN-7013)。硬直状態の筋肉は2mMヨードアセテートを含む10 °Cリンガー液に30時間浸して調製した。

(2) X線回折像の記録

X線回折像の記録は高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 BL15A で行った (1994年10月および1995年10月)。収縮状態の回折像の記録は電気刺激による1.2秒の強縮開始後に張力が最大値に達する100msec後から1秒間の露光を15回繰り返すことで合計15秒の露光時間となる回折像を記録した。X線波長は 1.504 Å カメラ長 750 mm で、散乱角約 6° (逆空間約 13 Å⁻¹) までを記録するように直径 220 mm の円窓にとりつけたイメージングプレートに記録した。試料の繊維軸を入射光に対して約 3° 傾けることで、約 27 Å の逆空間上の層面を効率よくエワルド反射球と交差させる設定となる。この時 27 Å 以上の子午軸反射を良好に記録させることができた。イメージングプレートに記録した回折像は読み取り装置 (富士写真フィルム, BAS2000) で sensitivity:10000、latitude:4、10 bit-data、aperture:100 μ m の最大感度の条件でデジタルデータとした。

(3) データ処理

イメージングプレートに記録されたデータは、グラフィックスモニタ上 (NIH-Image, Macintosh, Apple Computer Inc.) で回折像の中心と、画像の座標軸と画像データの走査軸とのずれを求め、それを補正する回転処理と解像度の調整を施し、画像分解能を子午軸方向 $200\mu\text{m}$ 、赤道軸方向 $400\mu\text{m}$ の画像データとした。同時にランダムノイズを除去するため、子午軸方向に $300\mu\text{m}$ 赤道軸方向に $1100\mu\text{m}$ のLowPassフィルターをかけた。それ以上の周波数を持つ成分はノイズとして半分以下にされる。層線反射の強度を測定する前に、中角領域での逆空間座標を正しく求めるために、エワルド球の補正を行って、逆空間座標の画像データに変換した。この時に試料の繊維軸の入射光に対する傾きを正確に求める必要があるが、回折像上の反射の散乱角の正負によるずれから求めた (Lorenz & Holmes, 1993)。

層線反射の積分強度の測定は、層線に垂直なプロファイルを表示し、バックグラウンドを差し引いた層線の広がり積分して得られる強度を層線に沿って次々に行い、層線全体の強度分布を得た。グラフィックスモニタ上で繰り返し確認しながら実行できるプログラムLLDMを利用した。(上野, 1987)

(4) モデル計算

原子座標にもとづいたモデルの繊維回折像の強度は逆空間の円筒座標 (R, ψ, Z) で計算する。構造因子 $F_n(R, Z)$ は角度 ψ についてフーリエ級数展開した n 次の成分であり、フーリエベッセル変換によって計算される。モノマーの原子座標を円筒座標 (r_j, θ_j, z_j) とすると、

$$F_n(R, Z) = \sum_j f_j(R, Z) J_n(2\pi R r_j) \exp[i\{-n(\theta_j - \frac{\pi}{2}) + 2\pi Z z_j\}] \quad (2-1)$$

ここで J_n は n 次のベッセル関数で、 j 番目の原子の原子散乱因子 f_j は、重さ w_j 、半径 rd_j の球に当てはめたガウス関数で近似する。 B は温度因子であり、熱ゆらぎのないときは 0 である。

$$f_j(R, Z) = w_j \exp\left(-\frac{rd_j}{10 \cdot u^2}\right) \cdot \exp\left(-\frac{B}{4 \cdot u^2}\right) \quad (2-2)$$

$$u^2 = (2\pi)^2 (R^2 + Z^2)$$

いくつかの原子をまとめて一つの球で近似する場合の半径 rd' は、原子 j と全体の重心との距離を c_j として次式で求める。

$$rd'^2 = \frac{5}{3} \left\{ \sum_j w_j (c_j^2 + \frac{3}{5} \cdot rd_j^2) \right\} / \sum_j w_j \quad (2-3)$$

アクチンの周期構造は p 回転 q 残基で周期 c の不連続らせんであるので、選択則によって与えられる層線の次数 L 、フーリエ成分 n を満たす整数 m によって決まるスペーシング Z の場所に層線反射が観測される。

$$cZ = L = pn + qm \quad (2-4)$$

繊維軸回りに ψ で回転平均されているモデルの層線反射の強度 $I_{\text{calc}}(R, Z)$ は、選択された n について和をとる次式で計算される。

$$I_{\text{calc}}(R, Z) = \sum |F_n(R, Z)|^2 \quad (2-5)$$

観測値 I_{obs} とモデル I_{calc} との一致度は結晶学的 R 因子であらわす。

$$(R \text{ 因子}) = \frac{\sum_{R, Z} \left| \sqrt{I_{\text{obs}}(R, Z)} - \sqrt{I_{\text{calc}}(R, Z)} \right|}{\sum_{R, Z} \sqrt{I_{\text{obs}}(R, Z)}} \quad (2-6)$$

溶媒効果は、溶媒によって試料の電子密度のコントラストが変化する現象であるが、溶媒分子が試料の体積分排除されていることとして取り入れられる。DNAの構造解析において、溶質による溶媒の体積排除効果を原子散乱因子の補正として取り入れる方法が、簡単で効果的であったと報告されている (Langridge,1960) 。Holmesらの報告ではFアクチンの配向ゲルのX線の観測データとモデルの低角と高角の反射の強度を同時に合わせるために必要であると報告されている (Holmes, 1990) 。その効果は分解能が 13 \AA^{-1} 程度の領域までは単調増加であるので、今回の計算ではより簡単な方法として、負の温度因子Bを使って注目している逆空間領域の溶媒効果を近似した。B/4 \sim -40程度で、逆空間座標で 0.1 \AA^{-1} 付近に期待される約50%程度の増加となる。有効原子散乱能率 w_j は文献 (Langridge,1960) より C : 1, N : 6, O : 6, P : 7, S : 8, Ca : 10 とした。

また、構成したモデルの繊維断面の慣性半径 R_c は、原子座標のXY座標だけを使って (1-3) 式で計算し全体に $5/3$ をかける前の値が R_c^2 となる。

計算するFortranプログラムは、UNIX ワークステーション (SiliconGraphics, Indy4400PC; SUN, Sparc1/330; NEC, EWS4800) で作成し、約300原子のモデルの反射強度を700点計算するのに数秒程度であった。最小二乗法によるパラメータフィッティングにはSALSパッケージを利用した (Nakagawa,1980) 。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および、大阪大学大型計算機センターを利用した。

3. 結果

(1) 回折像と層線反射の強度

27 Åまでの小角散乱の回折像はこれまでも様々な報告がされているが、本研究ではアクチンの繰り返し周期 27.3 Åの2次にあたる 13.7 Åを含む13 Åまでの中角領域の反射を測定した。反射のスペーシングから計算されるらせん周期はほぼ6回転13残基であった。

図2-1に回折像を示した。配向の良い試料では、子午軸から離れた所にいくつかの広がりを持つ反射が見られた。71 Åの第5層線の動径位置 $R \sim 0.05 \text{ \AA}^{-1}$ 、29 Åの第12層線の動径位置 $R \sim 0.04 \text{ \AA}^{-1}$ の2つは顕著である。やや弱いものは、15, 17, 20, 24次の動径位置 R の $0.04 \sim 0.07 \text{ \AA}^{-1}$ にも見られる。それらの領域では隣あう2つの層線反射の重なりも考えられる。それらの正確な分離は困難であったが、それぞれの積分強度を測定するときに子午軸方向の積分領域を限定することで分離を試みた。その結果、主要な層線反射の成分が大きく、それに近づいているもう一つの反射の成分は小さかったため、構造解析に大きな影響を与えるものではないと考えられた。

このようにして収集した27 Å以上のスペーシングを持つ中角領域に観測される細かいフィラメント由来の層線反射は、Fアクチンの配向ゲルから得られるX線回折像(Holmes, 1990)に見られる反射と同様の強度分布であった。また、細かいフィラメントの乱れに起因する反射の広がりはより少ないものであった。27 ~ 13 Åの中角領域の反射はほとんどFアクチンに支配されていることが確認された。

約360 Åのスペーシングの第1層線は強度が大きく、図2-1の回折像では疑似カラー領域で表されている。子午軸に近い部分では収縮中に減少し、離れた所では増加していることがわかるが、ミオシン由来の反射との重なるために正確な測定はできなかった。また、第2、3層線の子午軸に近い領域もミオシン反射との分離が困難であった。

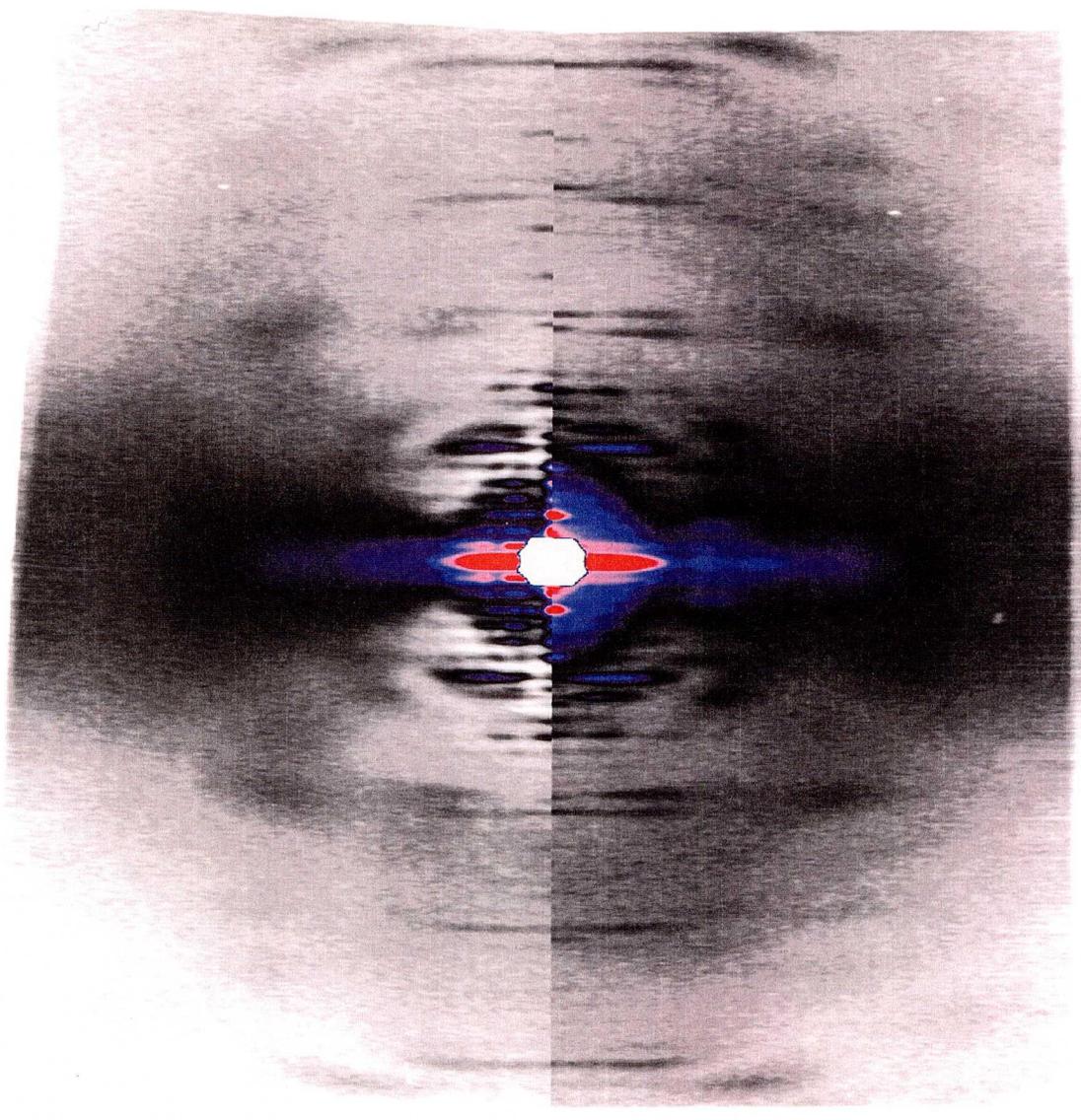
また、図2-1に示した回折像では等方的なバックグラウンドを除去して見やすくしているが、3状態とも同じバックグラウンドを差し引いたので小角領域の慢性散乱が状態によって変化していることも確認できる。

27
24
21
17
15

M

0.05

R (Å⁻¹)



13.7 Å

27 Å

51 Å

59 Å

— E

(a) Resting

Contracting

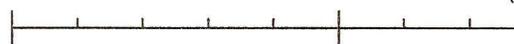
図2-1 カエル骨格筋のX線回折像。(a) 左が弛緩状態、右が収縮状態である。

(b) 左が収縮状態、右が硬直状態である。Mは子午軸、Eは赤道軸である。弱い反射を強調するために、等方的なバックグラウンドを除去した。強く観測されるいくつかの細いフィラメント由来の反射の位置を右に示した。中角領域の子午軸上に見られる15-27次のミオシン反射の位置を左に示した。繊維軸を傾けたため回折像の上下が異なっている。動径座標Rのスケールを上部に示した。

M

0.05

R (\AA^{-1})



27

24

21

17

15

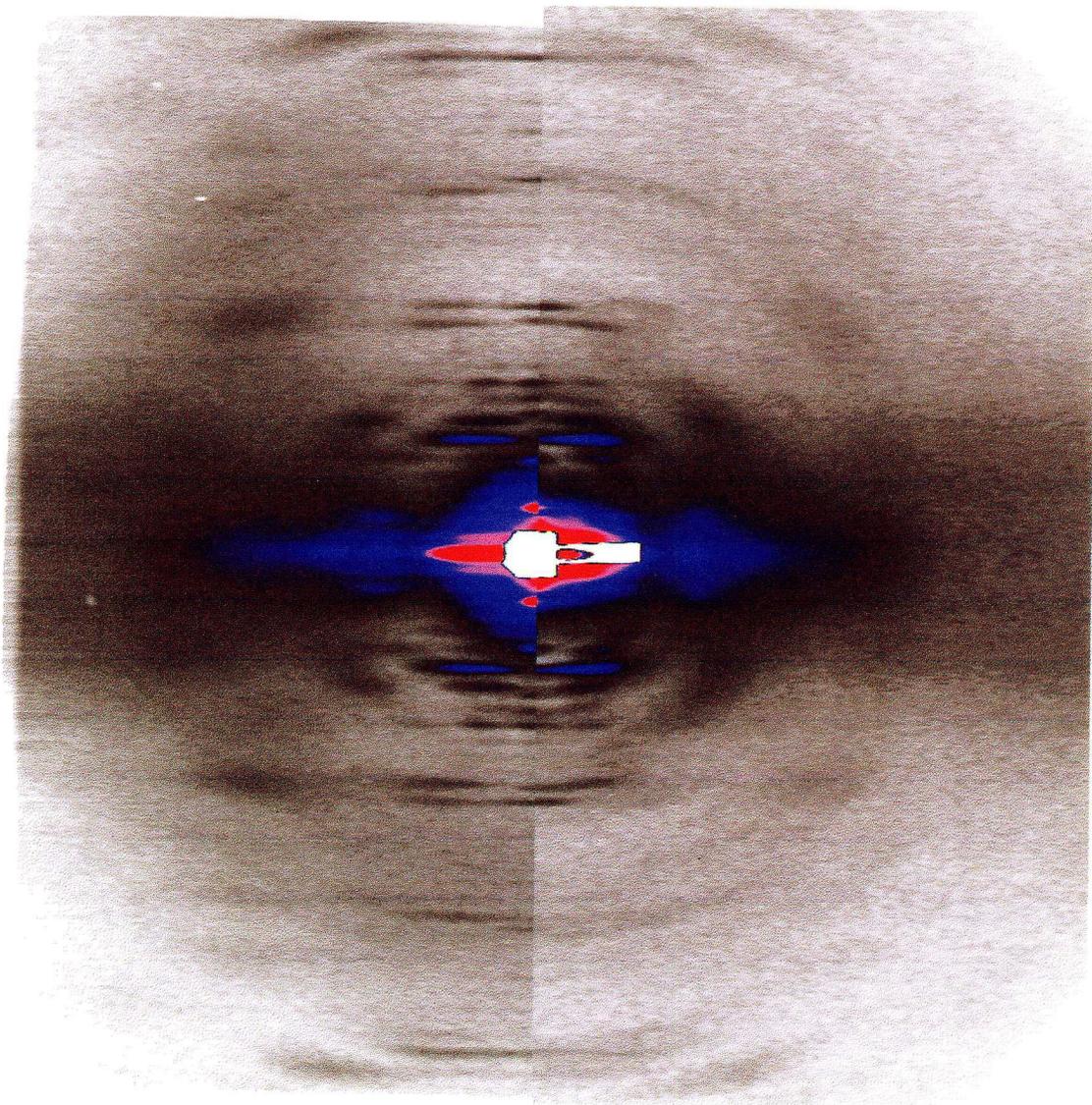
13.7 \AA

27 \AA

51 \AA

59 \AA

— E



Contracting

Rigor

(b)

myosin based

actin based

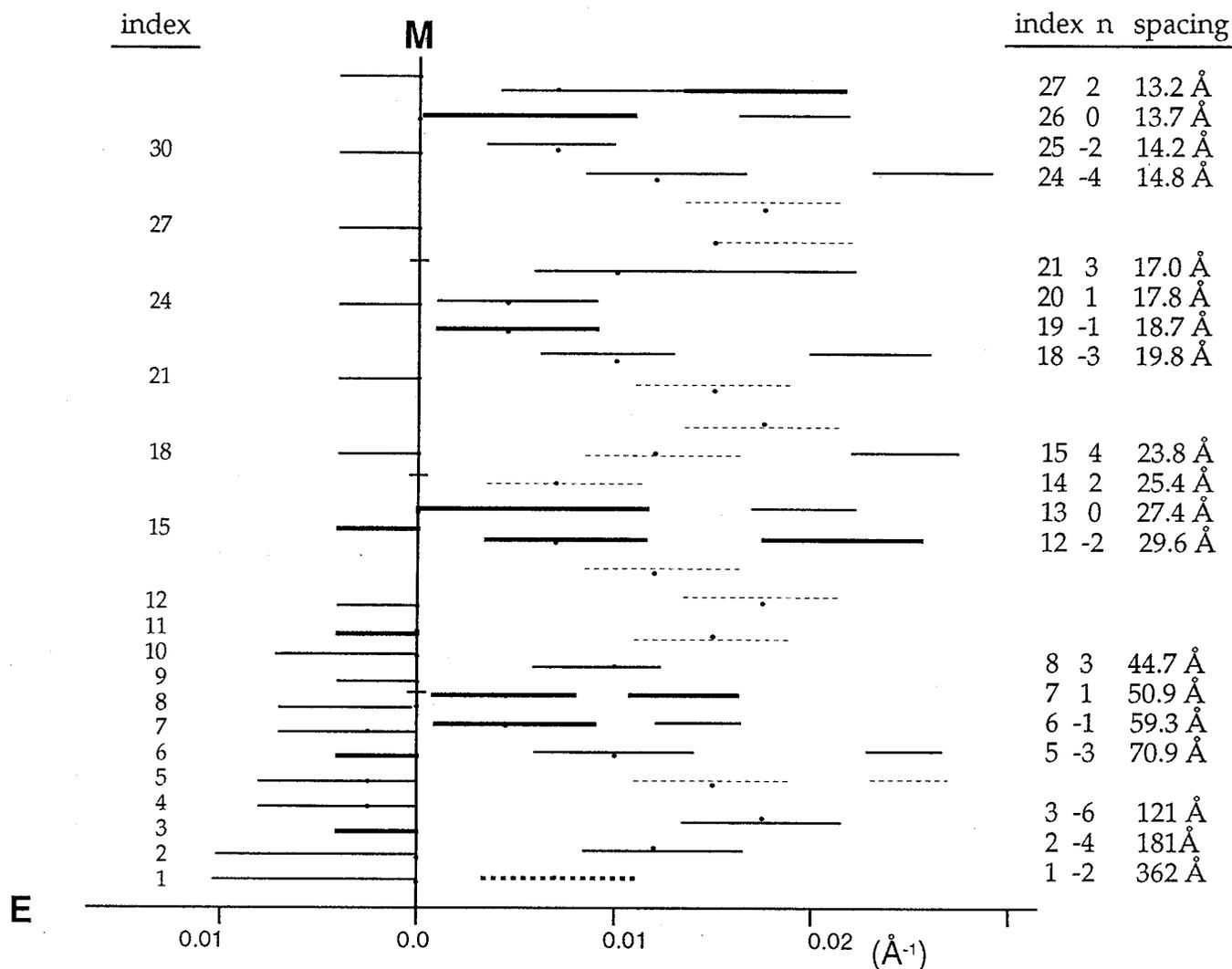


図 2-2 らせん対称性から決まる反射の位置と指数

右半分に指数付けした細いフィラメントの反射の位置で、太線は強く観察され、点線は観測されなかったものをあらわす。アクチンのらせんピッチ 27.4 Å、周期を 362 Å とすると、6 回転 12.983 残基のらせん対称性で計算した層線のスペーシングで観測値をほぼ説明できる。左半分はミオシンの周期構造から観測される反射の位置であり、その周期は弛緩状態では 143x3 Å、収縮状態では 145x3 Å である。動径位置 $R > 0.02$ では非常に小さくなり、高次では 3 の倍数の層線について子午軸上に観測されるのみである。

(2) 収縮中の強度増大

27 Åより低角の反射については、これまでの報告と同様の変化が再現性良く観察された。層線反射をすべて積分した値で、59 Åの層線では約30%、51および27 Åは約80%の強度増大であった。それに比べて、中角領域27～13 Åの反射では、収縮中の強度増大は約10%程度であり、比較的小さな変化であった。

中角領域のミオシン由来の反射については、弛緩状態では18, 21, 27次の反射が子午軸上に観測されるが、収縮中にそれらの強度は減少し、弛緩状態では非常に小さかった24次の反射が18 Å付近に非常に強く観測されていた。これらの結果は、太いフィラメントに関する新しいデータであったが、具体的な構造情報を得るにはさらに解析が必要である。

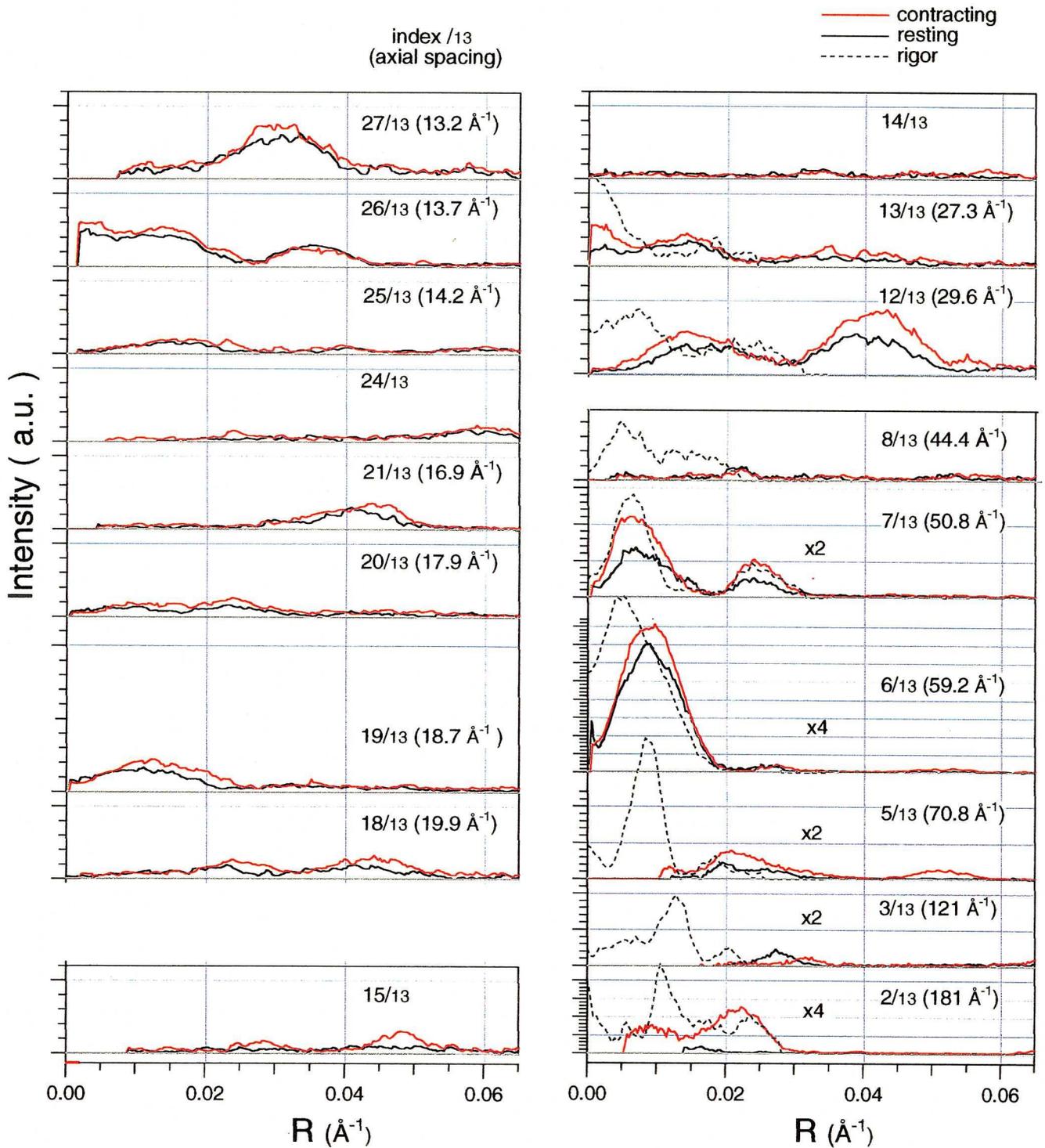
生筋を用いた実験では等尺収縮の条件は厳密には実現できず、組織の部分によって筋肉組織長の変化が生じ、X線を通過させている骨に近い部分では5%程度の短縮があることがわかっている。これは回折に関与するフィラメントの質量を増加させる。筋肉フィラメントのつくる格子構造は、短縮に伴って単位格子の体積を保存するように格子が広がることがわかっており、5%の短縮時には筋肉の断面積が5%増加することになる。この膨張は、赤道反射の $\sqrt{5} \cong 2.3\%$ 程度のスペーシングの変化として見られる。結局、有限幅の入射X線の通過する領域での散乱体の体積は2.5%程度の増加となる。

一方、実際の回折像では、中角領域のなにも反射がないと考えられる領域のバックグラウンドは、約8%程度の一様な増加があった。質量の増分に換算すると4%であるが、 $(1+0.04)^2 \cong 1.08$ バックグラウンドは周期構造の乱れによる増加分を含んでいる可能性もある。これらの結果から、散乱体の質量の増加を2.3%程度と見積もることは妥当であると考えられる。

図2-3 細いフィラメント由来の層線反射の強度分布

実線(—)が弛緩状態、赤線が収縮状態、点線(---)が硬直状態である。層線反射のスペーシングは弛緩状態の値を示しているが、収縮状態ではフィラメントの伸びによる0.3～0.5%程度の変化がある(Wakabayashi, 1994)。硬直状態ではらせん対称性が13回転28残基に近づくようなスペーシングの変化がある。

Layer Line Intensities of frog thin filament



5. 構造解析

(1) 弛緩状態のFアクチンのモデル

Gアクチンの原子座標はPDB データバンク (1ATN) よりATPを結合した側鎖を含む構造を利用できる。ADP 結合の結晶は登録されていないが、本解析の分解能ではその差は非常に小さい。ドメイン構造はKabschら (1990) の定義に従った (表 2-1)。

Holmesらのモデルは、Gアクチンの原子座標に行列をかけて得られる。そのモデルから計算した強度は、大まかには観測強度を説明できるものであった。そこで、モノマーの向きと4つのドメインの相対的を動かすことによってFアクチンのモデルを改良し、モデルから計算した反射の強度を観測強度にフィティングした。主鎖がつながっているドメイン間の距離を変えずに動かす場合は、ドメイン2と4のそれぞれの回転と相対的なねじれの3つのパラメータとモノマー全体の回転角3つとらせん半径位置の合計7つの自由度がある。

Holmesのモデルの散乱強度を計算し、我々の観測データと比較すると、51Åの反射の強度が大きく収縮中の強度分布に近かった。また、実際には観測されない層線の強度が大きいなどの違いがあった (図 2-7)。まず、各ドメイン間の距離を変えずに最小二乗法によってモノマーの向きとドメイン位置を最適化することで、弛緩状態の観測強度をほぼ説明できた。それは、ドメイン2をアクチンのATP結合サイトを閉じるような向きに移動させるモデルであった。このモデルでは、観測されていない反射の強度は小さくなり、R因子では43%の一致度であった。

更に良く合わせるためにはドメイン間の距離を束縛しないで最適化する必要があった。この場合には自由度が10となり、各ドメインごとのx y z座標での平行移動を最適化するもう一つのプログラムを利用した。最小二乗法による最適化では、ドメイン3と4をドメイン1と2より離れる方向に2Å程度移動させることによって中角領域の反射のピークを説明できるようになり、R因子は34%となった。図 2-4にモノマーの構造の違いを、図 2-5に最終的なモデルから計算した強度分布を示した。また、得られたモデルのドメイン構造の重心位置を表 2-1にまとめた。

結晶解析されているアクチンの側鎖を含めた2942原子のモデルから計算した反射の強度と比較すると、 α 炭素を球であらわしたモデルでは、27Å以上の強度を正し

く計算できないことがわかった。そのため、全原子の体積を充填する直径 0.7 Å 以内の球で近似した 225 球のアクチンのモデルで、全原子から計算した強度とほぼ等しくなることがわかった。以降の計算では、このモデルを用いて計算効率を上げた。

(2) Holmesモデルの検証

FアクチンのモデルとしてHolmesらの結果にとらわれることなく、我々のX線データに合うようなアクチンの向きの探索を試みた。Gアクチンのモノマーの向きとらせん半径を変化させて、観測強度とのフィッティングの良いパラメータの大域的な探索をHolmes(1990)らと同様な方法で検証した。計算は α 炭素の座標のみを使用し、27 Å までの反射を利用した。HolmesらはFアクチンの断面慣性半径が観測値(約 25 Å)になるようにモノマーの動径位置を決めていたが、その束縛はせずに動径位置もパラメータとして同時に求めた。その結果、観測データをよく説明できるもう一つのモデルが存在した。そのモデルは 59 Å のアクチンのらせん周期に沿うようにモノマーが繊維軸に垂直に積み重なるようなモデルである (Ueno, 1992)。

しかしながらそのモデルでは、モデルの位相を観測強度につけて電子密度分布を求めると強い負のピークが現れ、それをなくすようなモデルの改良は不可能と考えられた。Holmesのモデルではその様な異常なピークは現れなかった。また、蛍光 Energy Transfer の実験結果 (Miki, 1992) に合わないモノマーの向きであった。そのため、今回の解析ではこのモデルを採用しないこととした。

Mendelson (1994) は、電子顕微鏡の3次元再構成像に合う最適のFアクチンのモノマーの向きの大域的な探索を行なった結果、Holmesのモデルを支持している。彼らの計算では、今述べた様なもう一つのモデルは第2番目のモデルであり、フィットさせる電子顕微鏡データによっては一致度が良くなるため最終的な検討で採用されてない。

LorenzのFアクチンのモデルは、HolmesのモデルをFアクチンに最適化した原子座標のモデルであり、散乱強度は我々の観測値にも良く一致することが期待される。図 2-7 に示すように、Lorenzモデルから計算した強度分布では27 Å より高角の反射については良く合っていた。しかし、27 Å と51 Å の強度が大きくなりすぎ、ドメインの移動の最適化をしてもそれを合わせるようにはできなかった。そのため、

以降の解析は改良したHolmesのモデルをもとに行った。

表 2-1 Holmesのモデルと最終的に得られたFアクチン、
トロポミオシンのモデルのパラメータ

domain	residues	Holmes F-actin model centroid (x,y,z) (Å)		
1	1- 32, 70-144, 338-372	-27.99	4.60	-3.14
2	33- 69	-21.38	-1.36	20.62
3	145-180,270-337	-5.57	12.62	-11.91
4	181-269	2.76	14.85	11.67
overall		-11.09	10.89	4.08
Rc	23.83			

	resting model			contracting model		
domain	centroid (x,y,z) (Å)			movement (x,y,z) (Å)		
1	-25.93	3.58	-4.58	-0.36	-2.86	-1.82
2	-21.11	2.20	23.18	+3.91	-3.87	-1.70
3	-0.06	7.88	-12.22	+1.07	-1.27	+0.00
4	5.64	13.28	9.79	+1.48	+0.76	+0.19
Rc (Å)		22.42				22.31
overall	-11.22	6.82	-0.33	0.90	-0.30	-0.85

Tropomyosin	
R (Å)	35.0
θ	118.0°
angle to domain-1	54.1°
	68.5°

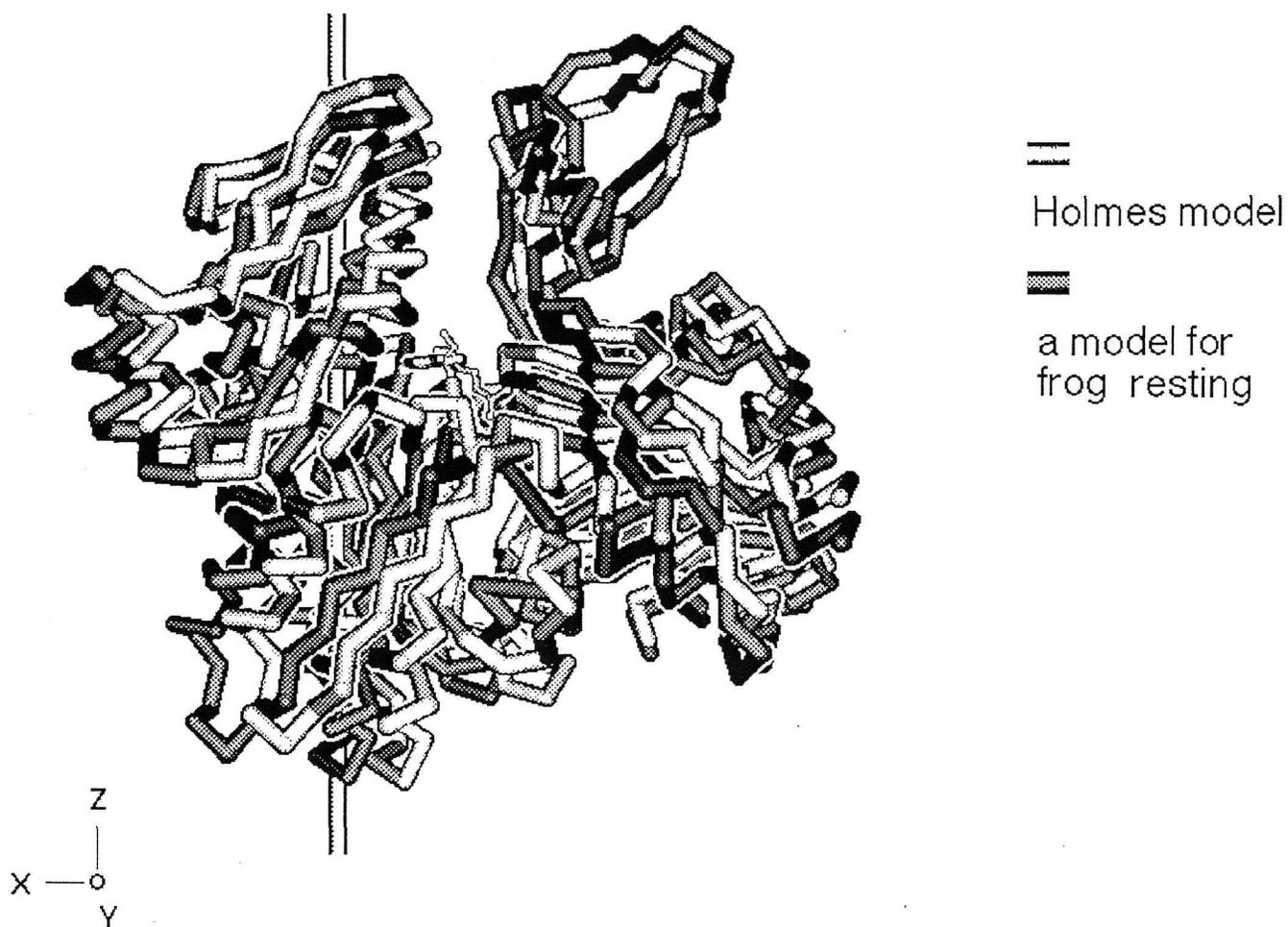


図 2-4 最適化したアクチンモノマーの構造を α 炭素のワイヤ表示（黒）であらわした。白であらわしたHolmesらのモデルは結晶構造をそのままらせん配置したものである。ドメイン構造を移動させたため、ドメイン1では隣のドメインとつながる主鎖がのびているが、局所的に構造を最適化すれば解決できると考えられる。中央のADPはドメイン1に含めた。

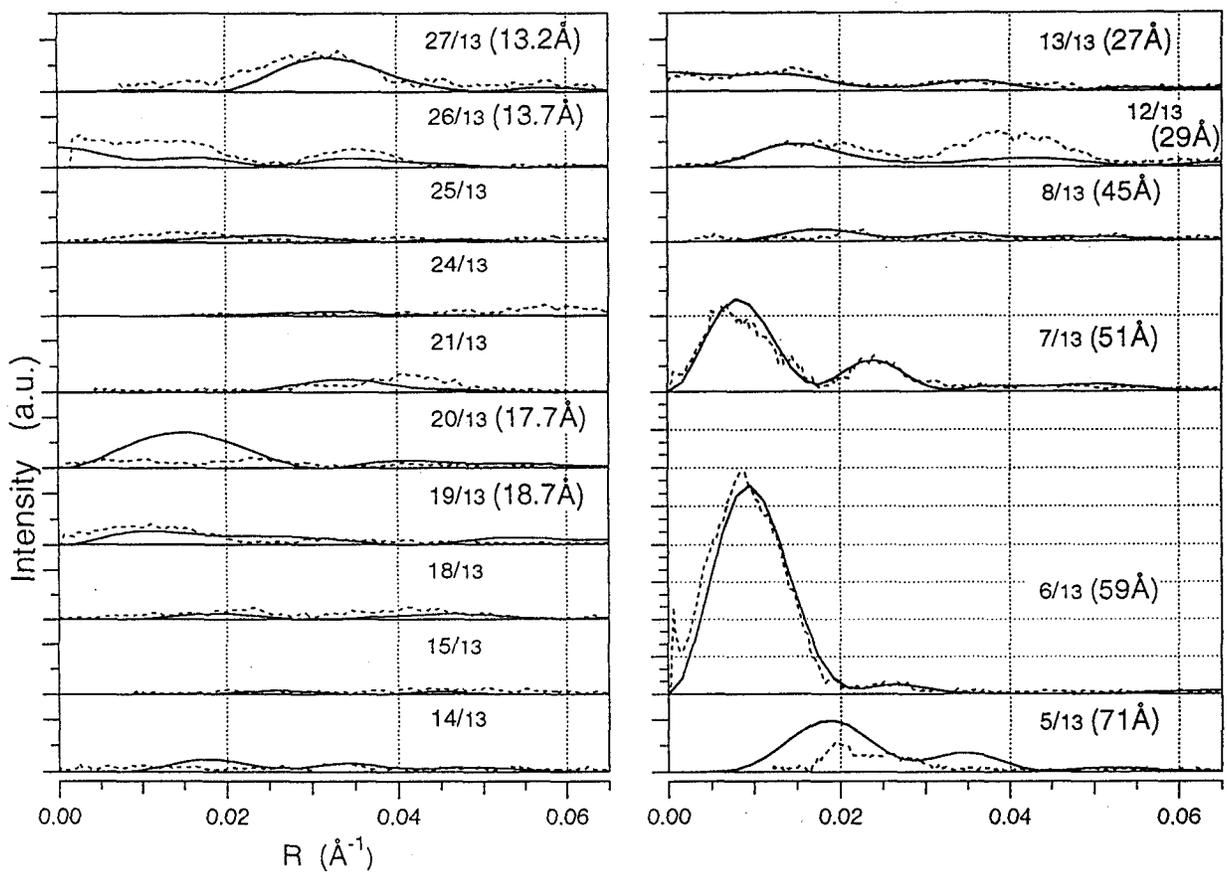
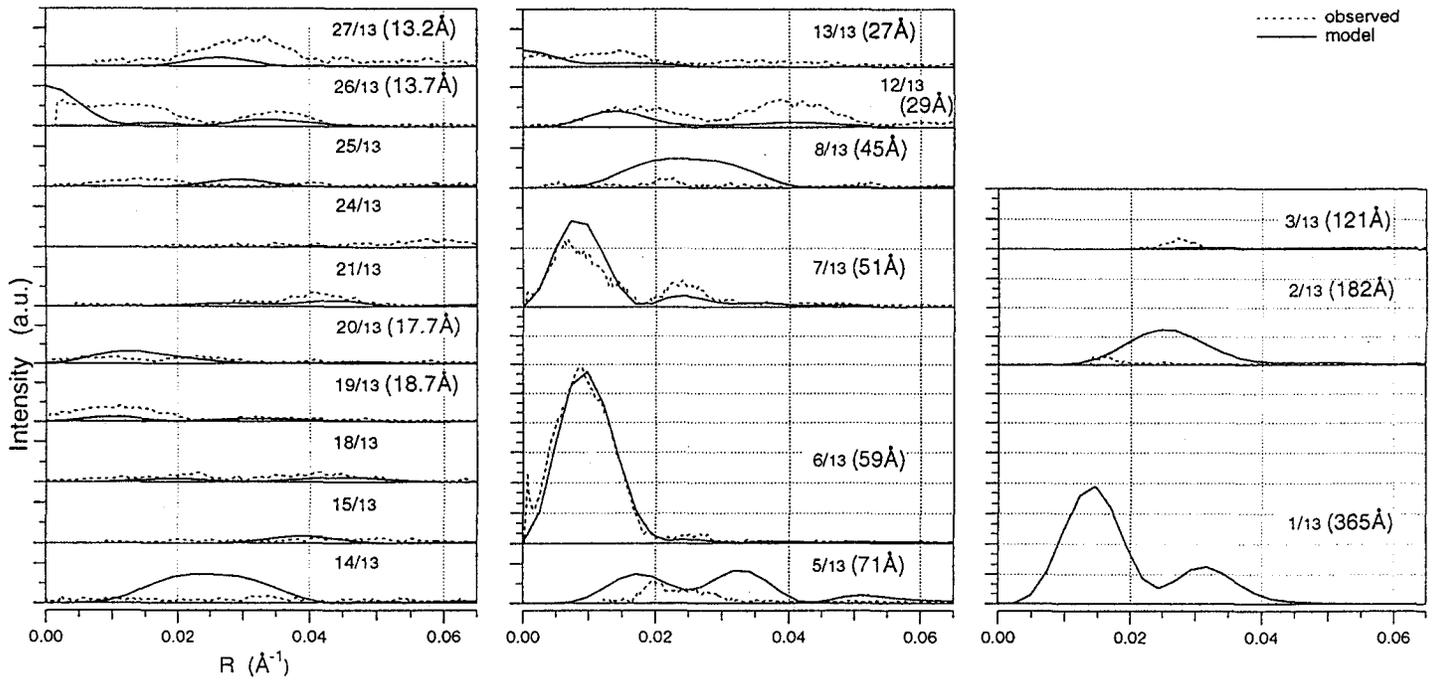


図 2-5 最適化したFアクチンモデルの層線反射の強度分布実線がモデル、点線が観測値をあらわす。Holmesのモデルと比べて、観測値では42Åの第8層線と、24Åの第14層線は非常に小さく、51Åの第7層線もより小さいという傾向が説明できるようになった。中角領域では17.7Åの第20層線など合っていない部分もあるが、最小二乗法で全体的に合わせるためにはそれらは合わせられなかった。観測値とフィッティングしなかった低角領域の第1～3層線は図2-12に示した。

(a)



(b)

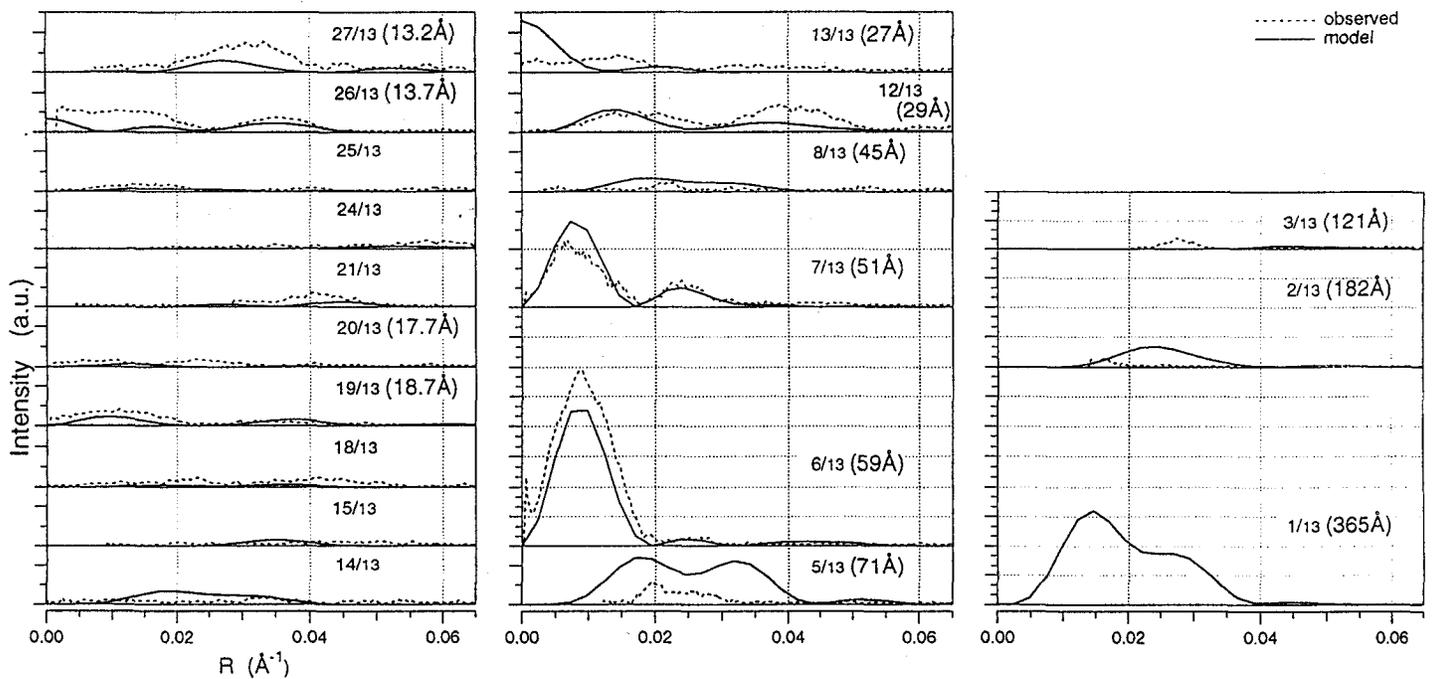


図 2-6 (a) Holmesモデルおよび (b) Lorenzモデルから計算した層線反射の強度分布。実線がモデル、点線が観測値（弛緩状態）である。R 因子は Holmes モデルが 47.4 %、Lorenz モデルが 44.0 % であった。

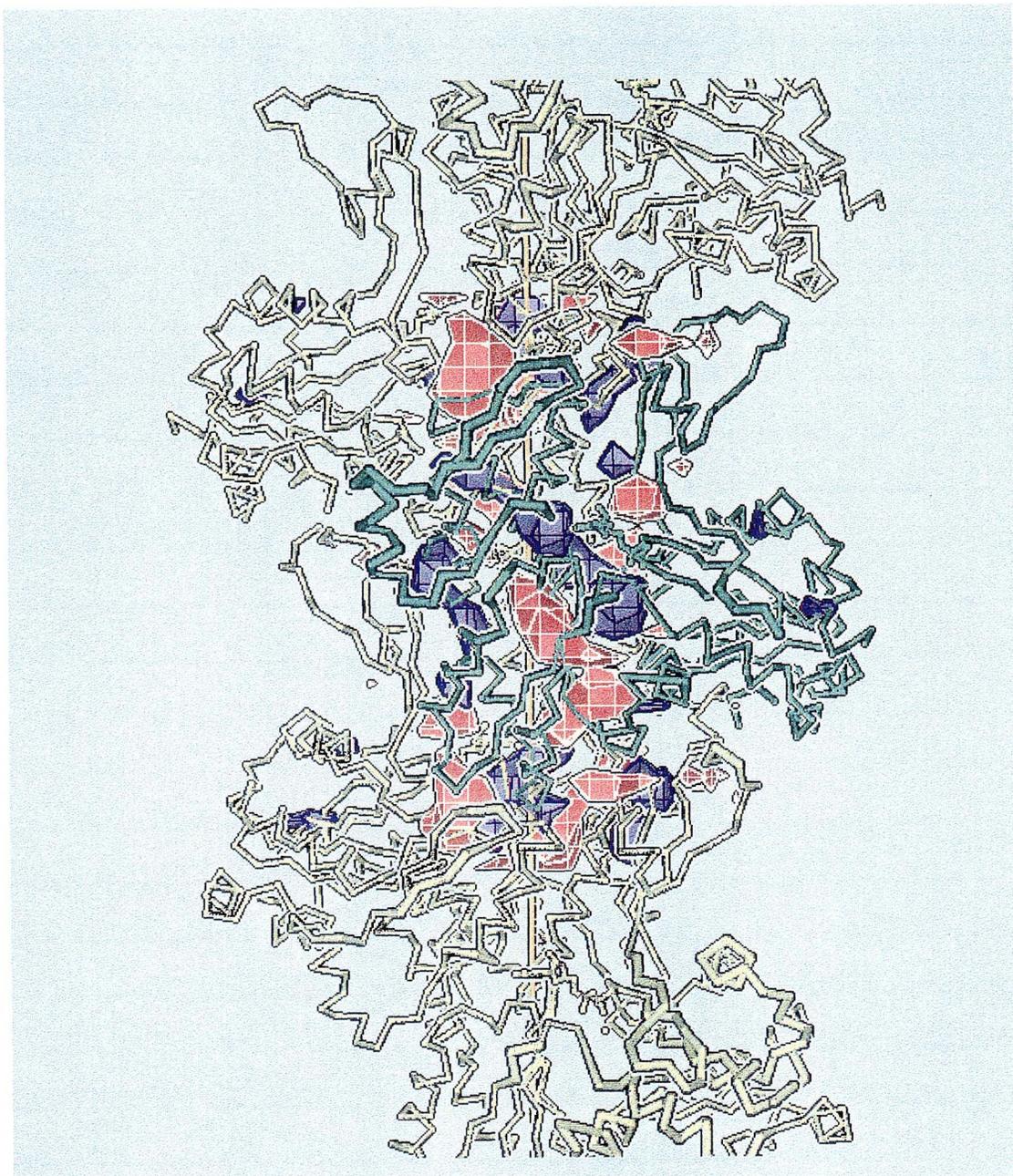
(3) 差フーリエ合成による収縮中の構造変化の検討

弛緩状態のFアクチンのモデルに基づいて収縮状態と硬直状態の構造の違いを検討する場合に、弛緩状態の反射の位相を使って、収縮状態または硬直状態の構造因子の変化を差フーリエ合成することで、実空間での電子密度の変化として求める事が可能である。(a) 硬直状態-弛緩状態 (b) 収縮状態-弛緩状態のそれぞれの差フーリエマップを図2-8に示す。硬直状態の差フーリエマップでは、ミオシン頭部によると考えられるピークが見られた。それに対し、収縮状態の差フーリエマップでは、大きなピークはFアクチンの分子内であった。

今回の計算では71Åより低角の反射が入っていないため、360Å周期の長いらせんに沿った変化の成分が欠損している。これは、差フーリエマップのゼロレベルを正しく反映しないことになる。しかしながら、ピークの存在は構造変化の成分であることは変わらず、すべての反射を含めた差フーリエマップに現れるピークの場所に対応している。

従って、この差フーリエマップにはトロポミオシンの変化の成分が含まれていないことに注意すべきである。約180Åの第2層線はトロポミオシンの構造因子に大きく関連しており、収縮中に大きな強度増大を示すことはよく知られている。それを計算からはずすことで、その成分以外のアクチンの細部の構造変化に注目することができる。結晶解析においても、細部の構造変化に注目する場合には低角の反射を差フーリエに含めないことはしばしば行われている。

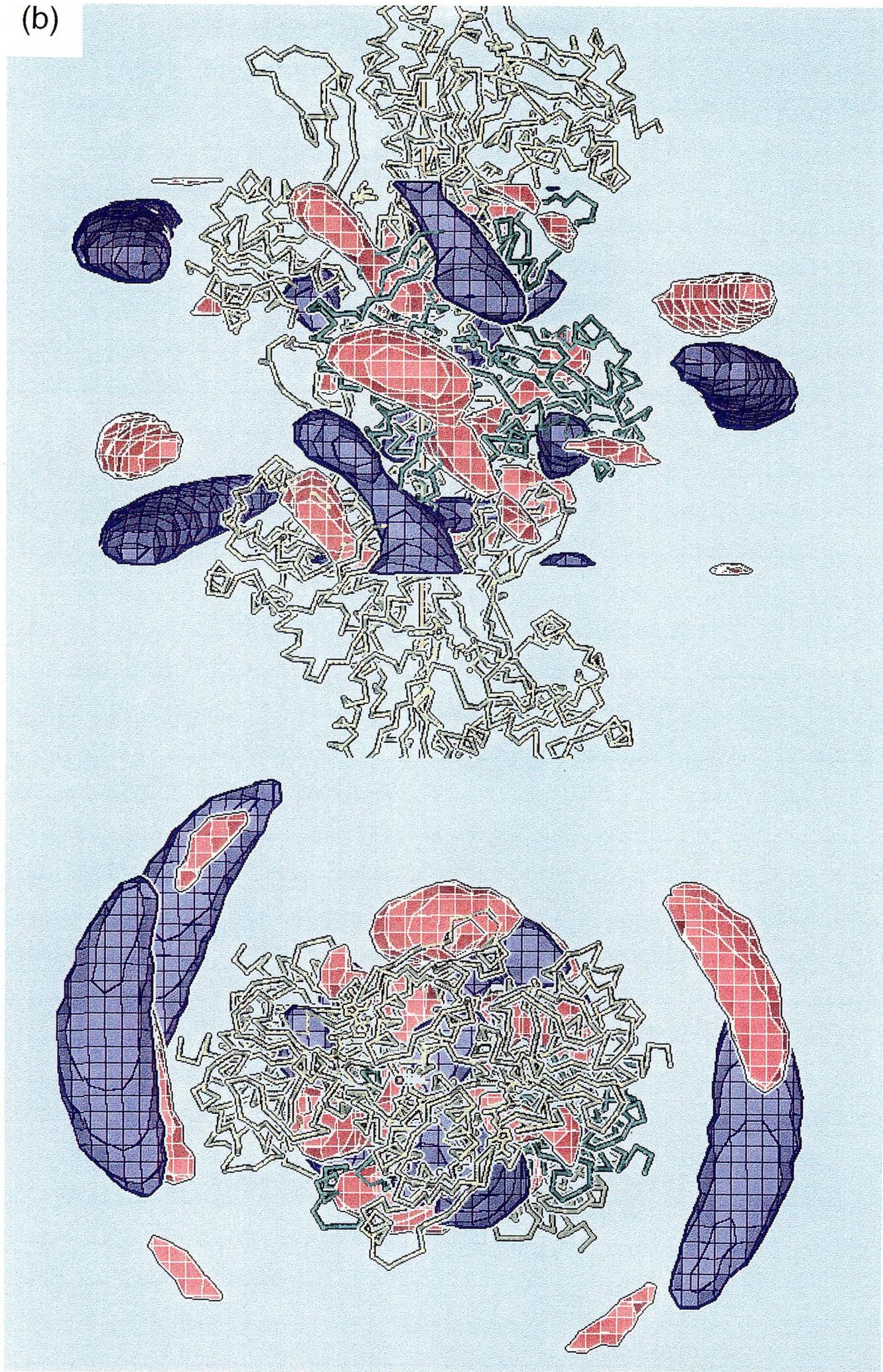
トロポニンとトロポミオシンの構造因子が71Åより低角の反射で大きな値を持っていることは第3章におけるモデル計算でも確認されている。実際、広角の反射の強度はFアクチンのモデルでほぼ説明できている。観測強度にFアクチン以外の成分がある場合は、計算した差フーリエは一部分が削除されたモデルの位相でフーリエ合成したオミットマップになると考えられる。それゆえ、硬直状態の差フーリエではミオシン頭部のモデルが必要であることが示されている。しかし、削除部分の大きいオミットマップでは、ピークの定量的な解釈が難しくなることがわかっているので(Namba, 1987)、モデルにミオシン頭部を含める必要性の指針を得るにとどめた。硬直状態のマップ上に見られるミオシン頭部と考えられる強いピークはアクチンのドメイン1のN末端付近にあり、Raymentら(1993b)の発表したミオシン結合部位とほぼ一致していることが確認された。



(a)

図2-7 2状態の構造の違いをあらわす差フーリエマップ (a) 収縮状態-弛緩状態、(b) 硬直状態-弛緩状態。差フーリエ合成を、一つのアクチンモノマー全体を含むように $180 \times 180 \times 75 \text{ \AA}$ の領域について 3 \AA 間隔で計算し、その等値曲面表示を示した差電子密度マップである。図の青が正、赤が負の領域である。等値曲面のレベルは、マップの最大値の約40%で正負の領域がよくわかるように選択した。隣接する上下2個ずつの対称なモノマーとともに、アクチンの α 炭素のワイヤー表示を重ねた。

(b)



(4) 収縮状態のFアクチンモデル

差フーリエの結果から、収縮状態の細いフィラメントの構造解析として、まずFアクチンだけで収縮状態の強度に合うモデルを求め、モデルを最適化する過程においてミオシン頭部の影響を考察することとした。弛緩状態と同様にして、収縮状態の観測された強度分布にFアクチンのモデルをフィッティングさせた。モデルと観測値の相対的なスケールのパラメータは散乱体の質量に対応し、弛緩状態と大きく変わることはないと考えられる。まず、これを変化させない場合のモデルを検討した。

71 Å以上の反射で収縮中の強度変化の大きな特徴は、51 Åの第7層線の強度が大きく増加することである。27 Åの第13層線の変化も大きいが強度自体が小さい。弛緩状態のモデルのドメインを束縛せずに移動させて、観測されている収縮状態の強度分布に合わせるように最小二乗法で最適化した。その結果、サブドメイン2を繊維軸の方向に約6 Å移動し、サブドメイン1をアクチンの中心から離れてATP結合サイトを広げるように約3 Å移動した。サブドメイン4は繊維軸の外側に約2 Å、サブドメイン3は内側に1 Åであった(表2-1)。

このモデルではスケールを自由パラメータとして変化させてもそれほど大きくなり、弛緩状態に比べて2%程度増加する値で収束した。最終的に得られた収縮状態のFアクチンのモデルの構造変化を図2-8に、強度分布を図2-9に示す。

ドメイン間の距離を束縛して弛緩状態と収縮状態のモデルを最適化した場合に、弛緩状態から30%程度のスケールの増大が必要となった。質量の増加に換算すると約11.3%となるが、このスケールの増加に対応する物理的な原因が不明であり、現実的なモデルとはいえなかった。

ドメイン間の距離を変化させたモデルで、収縮中の強度の変化を説明することが可能となった。しかし、ドメイン構造の変化というパラメータはよりよい一致を得るためには十分な自由度ではない可能性もある。

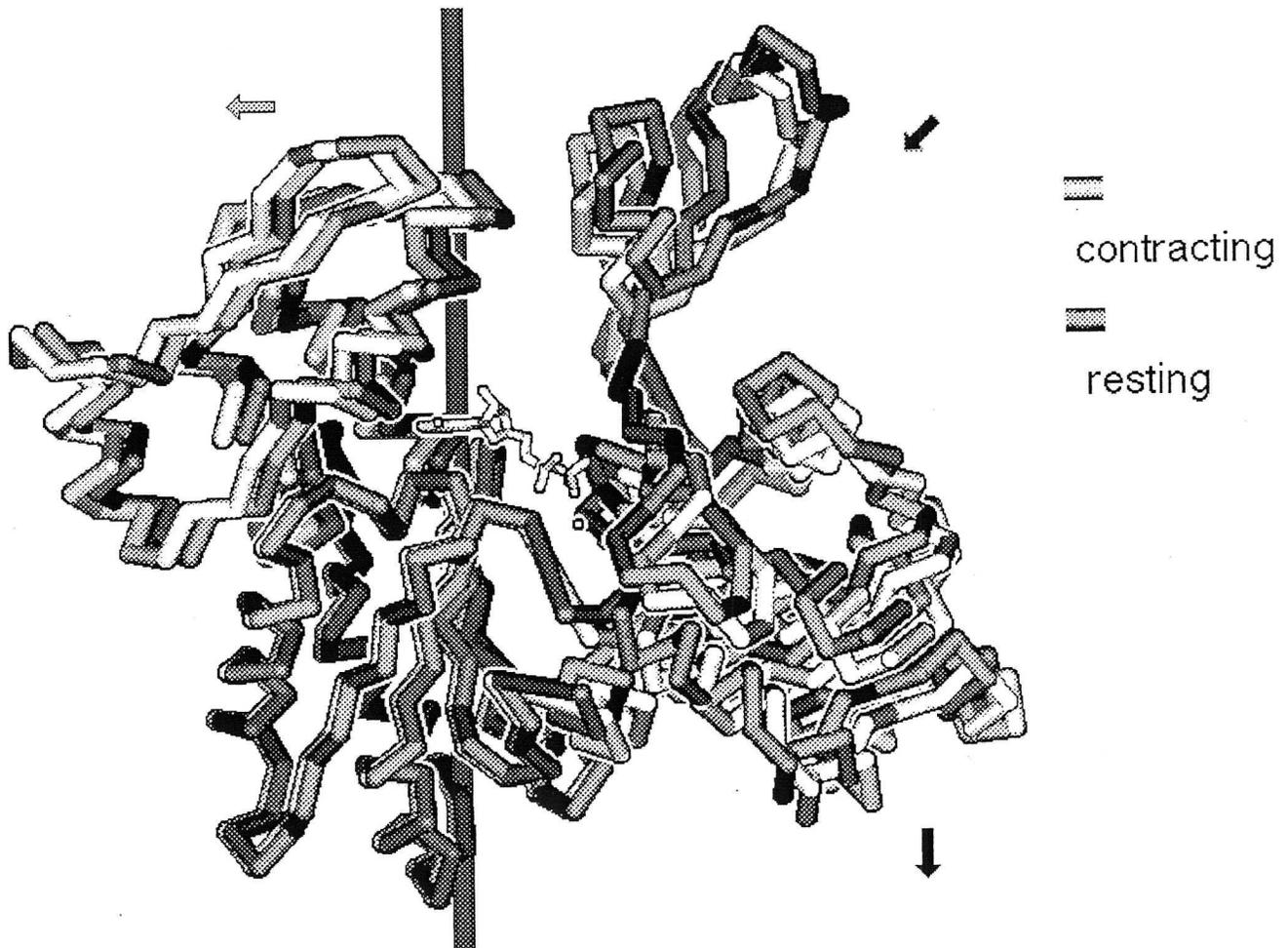


図 2-8 α 炭素座標であらわしたFアクチンの構造変化。白が収縮状態で、黒が弛緩状態である。ドメイン2が繊維軸の内側に移動する動きがいちばん大きく約6Å程度である。図はx-z面に向かっており、ドメイン1、2の動きを示す黒の矢印は紙面の奥に向かって傾いており（y成分が負）、ドメイン3の矢印はほぼ紙面に平行である（y成分が0）。ドメイン1は下に、ドメイン4は外側に移動する。ドメイン3の動きは小さい。

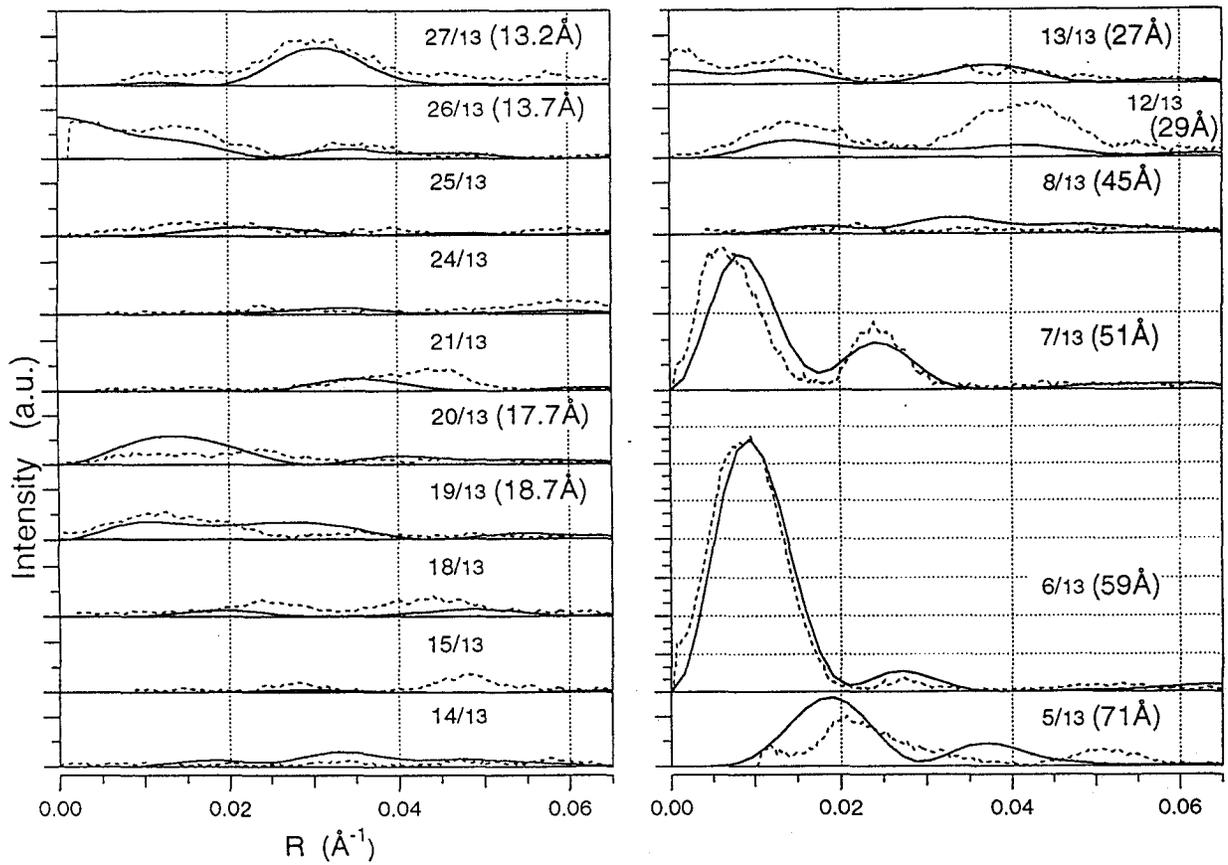


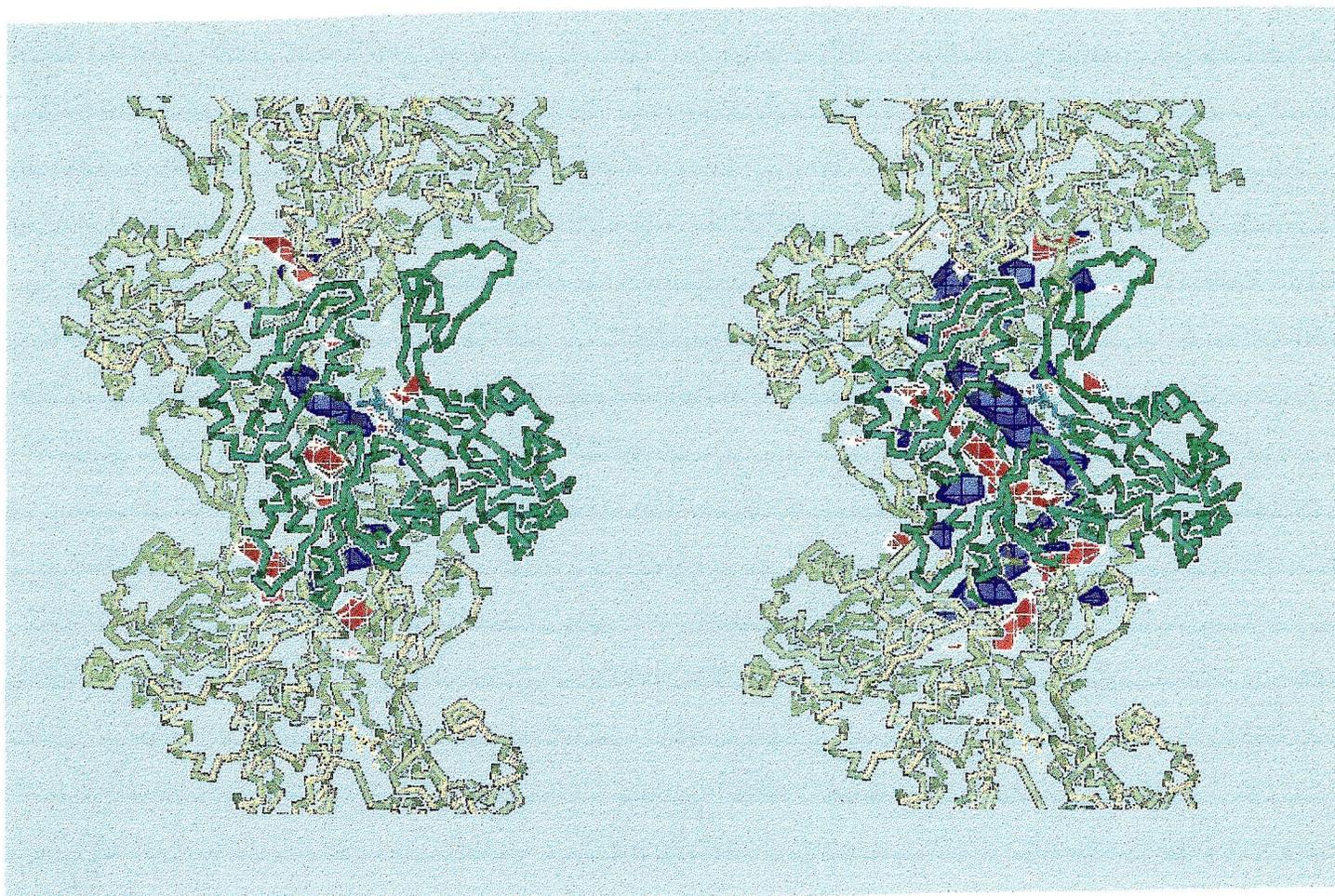
図 2-9 収縮中のFアクチンのモデルから計算した層線反射の強度分布。実線が計算値、点線が観測値である。収縮状態に特徴的な 59 Å と 51 Å の反射の強度増大はよく説明できている。それらのピーク位置の違いは弛緩状態においても同程度であり、トロポニンの影響ではないかと推測された。

(5) 差フーリエマップによるモデルの検討

Fアクチンのモデルを精密化するためにどのような改良が必要かを調べるため、モデル (Fc) と観測データ (Fo) との差フーリエ $2|Fo| - |Fc|$ を計算した。図 2-10 (a) に示したマップでは、アクチン内部のいくつかのピークの他に、図 (b) に示すようなフィラメントの外にピークが見られた。これは、逆空間である層線反射の動径座標 R の小さい所での不一致成分に対応するが、強度が大きく重要な反射である 59 Å, 51 Å の反射におけるピーク位置より子午軸側の不一致に起因すると考えられる。これらのピークは繊維軸半径約 50 Å 付近に見られ、弛緩状態、収縮状態のどちらでも同程度であることから、ミオシン頭部によるとは考えにくい。したがってトロポニン等の制御タンパクに起因するものと考えられる。

トロポニンの周期構造はアクチン 7 分子に 1 つであるので、このフーリエ合成では実際の正しいらせん対称性が考慮されておらず、アクチンの繰り返し周期で平均化したものになっている。そのため、ピークの大きさや形状はトロポニンの構造を正しくあらわしていない。また、365 Å 周期のゆるやかならせんに沿った成分を計算に含めていないため、トロポニンの結合部位にいくつかの凹凸を示す結果になるはずである。

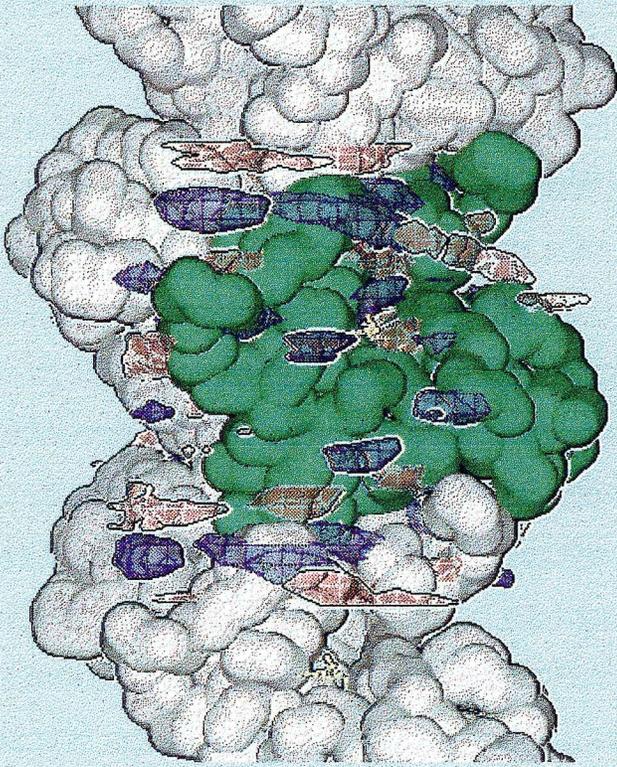
これらの事から、フィラメント外部に見られているピークはトロポニンに由来すると考えられる。それらは弛緩、収縮状態ともに小さい成分であり、収縮状態のモデルを精密化する上においてミオシン頭部の影響はそれよりさらに小さいことが示された。



(a)

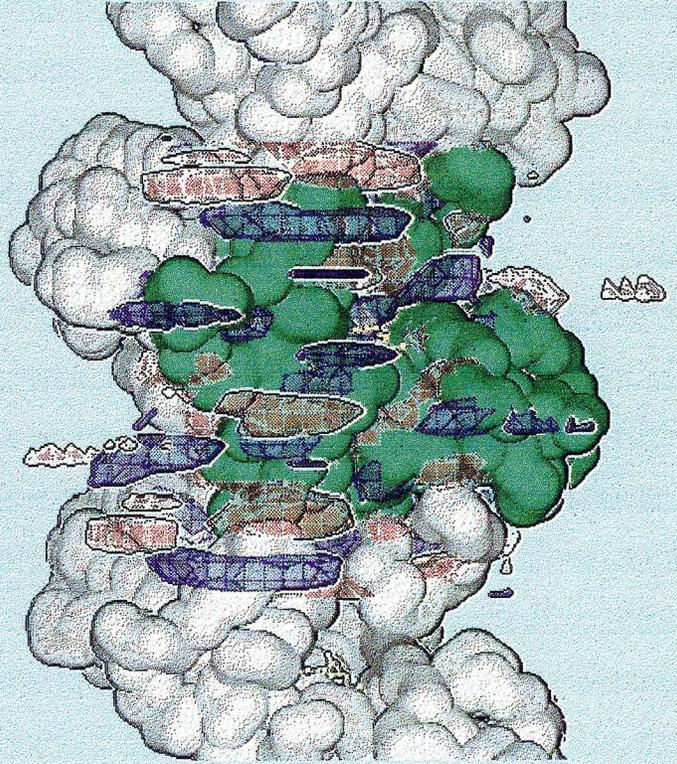
(b)

図 2-10 モデルと観測の差をあらわす差フーリエマップを (a) 弛緩状態 (b) 収縮状態について示した。図 2-7 と同様の差フーリエ合成であり、青で示した正の領域の電子密度を上げ、赤で示した負の領域を下げるようなモデルの修正を示唆している。繊維回折での差フーリエ合成における係数については、Nambaら(1987)によって妥当な係数を選択すべきであることが示された。Fアクチンの場合は各層線反射ごとのフーリエ成分は一つずつで重なりがないため、 $2F_o - F_c$ が妥当となる。 $6F_o - 5F_c$ などの係数を使用してもほぼ同様の結果となった。また、 α 炭素の主鎖を太くし等値曲面のレベルを下げ、Fアクチンの外部にある弱いピークだけを可視化したものを (c) 弛緩状態 (d) 収縮状態について示した。



rest

(c)



cont

(d)

(6) トロポミオシンのモデル

トロポミオシンは分子量約 67,000 で coiled-coil の α -helix 構造をとる 2 本鎖の長さ約 400 Å の鎖状タンパクであり、アクチン 7 分子に 1 つの割合で結合している。らせん周期構造はトロポニンと同じで、脊椎動物の場合は約 360 Å 周期でアクチンの大きな 2 重らせん構造に沿って結合している。低分解能の構造は長いロープ状であり、連続的な構造と考えた近似的なモデルを構築できる。それゆえ、トロポミオシンの構造因子は 71 Å より低角の反射で大きな成分となっている。収縮状態においては 182 Å の第 2 層線の強度は測定可能であるが、弛緩状態では観測されないほど小さいという事実を手がかりにして、長いロープ状のトロポミオシンをモデルに導入し、第 2 層線の観測強度の変化を説明できるようなモデルを検討した。

16 個の半径 7 Å の球を繊維軸の座標をらせん配列したロープの 1 部分をアクチンと同じ周期構造で加えることで連続的なロープを表したモデルで (円筒座標で $\theta = 1.73$, $z = 3.41$ Å ずつずらした)、観測値の傾向を説明できるようなトロポミオシンの場所を探索した。第 2 層線だけを説明するようなトロポミオシンの場所は 2 カ所が可能であるが、その時に第 1 層線の強度が小さくなるものを選択することとした。細いフィラメントの第 1 層線の観測強度は 59 Å の第 6 層線の強度より小さいことがわかっているが、F アクチンだけから計算した 365 Å の第 1 層線の強度はそれより大きいからである (Tajima, 1983)。

その結果、弛緩状態では動径位置 35 Å でアクチンの中心よりドメイン 1、2 の方に少しずれた位置で、第 2 層線の強度を小さくすることができた。収縮状態では動径位置 35 Å で 3、4 ドメインの方に 8° 程度変化し、距離にして 5 Å 程度移動する位置で、ほぼ観測されている強度分布に近くすることができた (図 2-12)。

120 Å の第三層線では F アクチンの構造因子が非常に小さいため、ほとんどトロポミオシンの構造因子を反映しており、トロポミオシンの位置を変化させても変化が小さい。これは Holmes のモデルと今回修正したモデルに共通しており、弛緩状態での反射の強度と収縮中に下がる傾向が説明できていない。しかしながら、この反射ではトロポニンの構造因子も考慮する必要があるため、これについてはモデルの改良は行わなかった。

表 2-1 に示したトロポミオシンのパラメータは、16 個の球の中で z 座標が 0 のものの円筒座標 (R , θ) である。得られたアクチンおよびトロポミオシンの構造変

化の模式図を図 2-1 1 に示す。

トロポミオシンのモデルとして、PDB に登録されている座標データ (1TMA) より得た α 炭素の座標を利用したモデルを作成した。coiled-coil 構造の中の 81 個の α 炭素 (A120 - A160, B120 - B161) を細いフィラメントの長いらせん周期構造に沿うように傾け、これをアクチンと同じ周期構造で並べるとほぼ連続した coiled-coil 構造を表現できた。このモデルから計算した散乱強度は、16 個の球の場合とほとんど変わらなかったが、51 Å と 27 Å の反射に少し関与していた。これは正確には無視できない成分であるが、モデルのフィッティングにおいては小さい成分であることも確認した (第 3 章の図 3-6 (a) を参照)。モデルの外観を図 2-1 3 に示した。

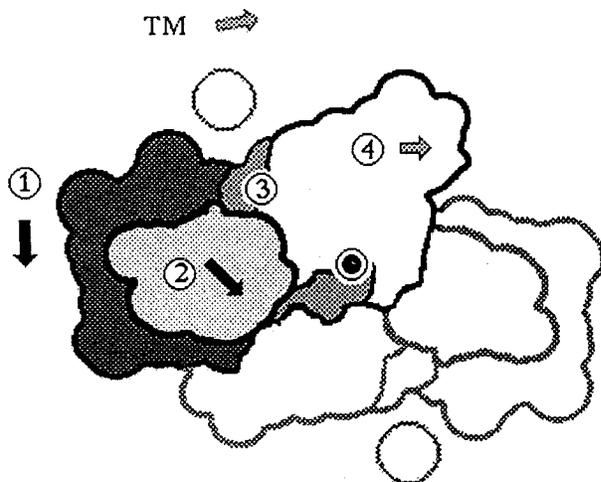
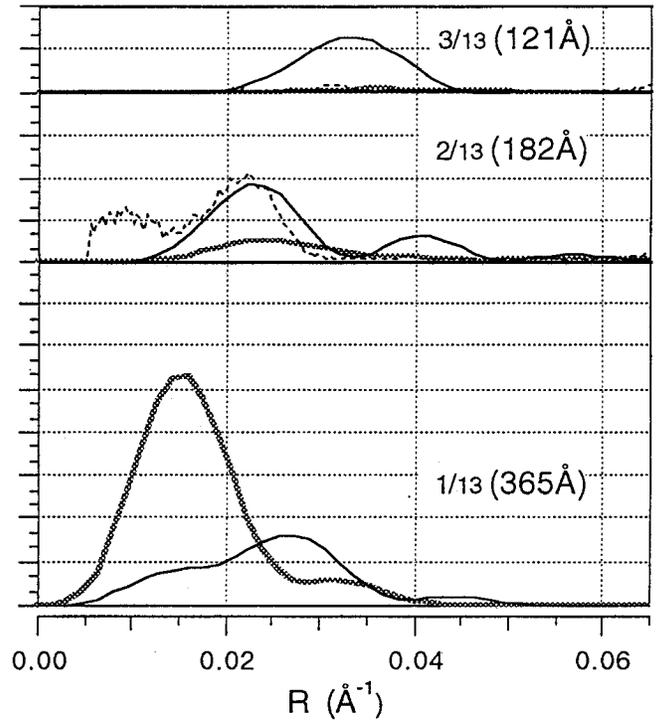
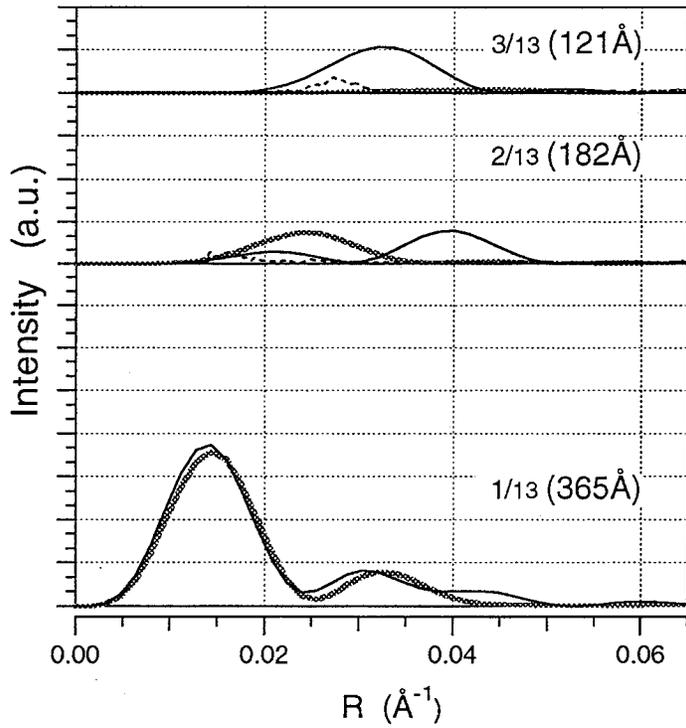


図 2-1 1 F アクチンの構造変化の模式図。細いフィラメントの Z 膜を見おろす断面図で 2 つのアクチンモノマーおよびトロポミオシンの位置を示す。ドメイン 1、2 の動きを表す黒い矢印は紙面の奥に向かっており (z 成分が負)、ドメイン 4 の矢印はほぼ紙面に平行である (z 成分が小さい)。トロポミオシンは繊維軸からの動径距離を変えずに約 8° の移動があるが、ドメイン 1 との相対的な角度は 14° 程度の变化となる。

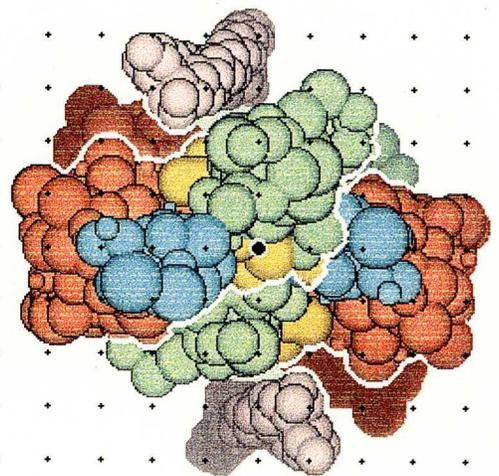
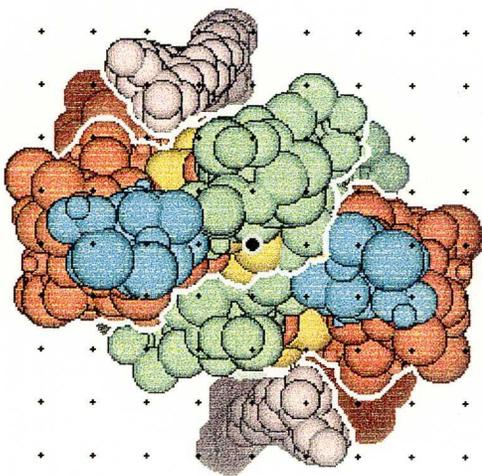
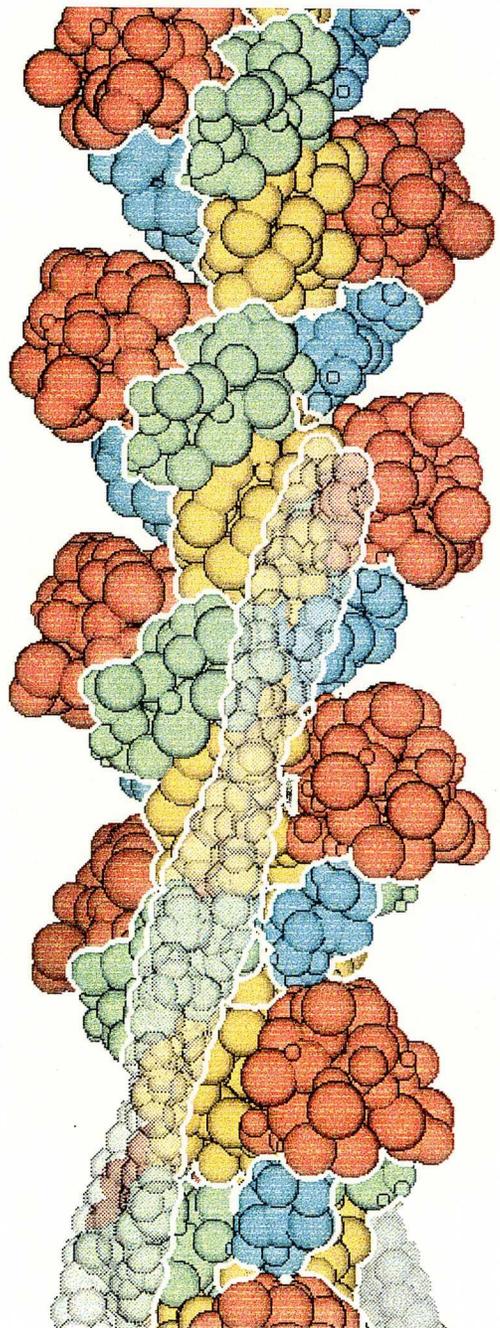
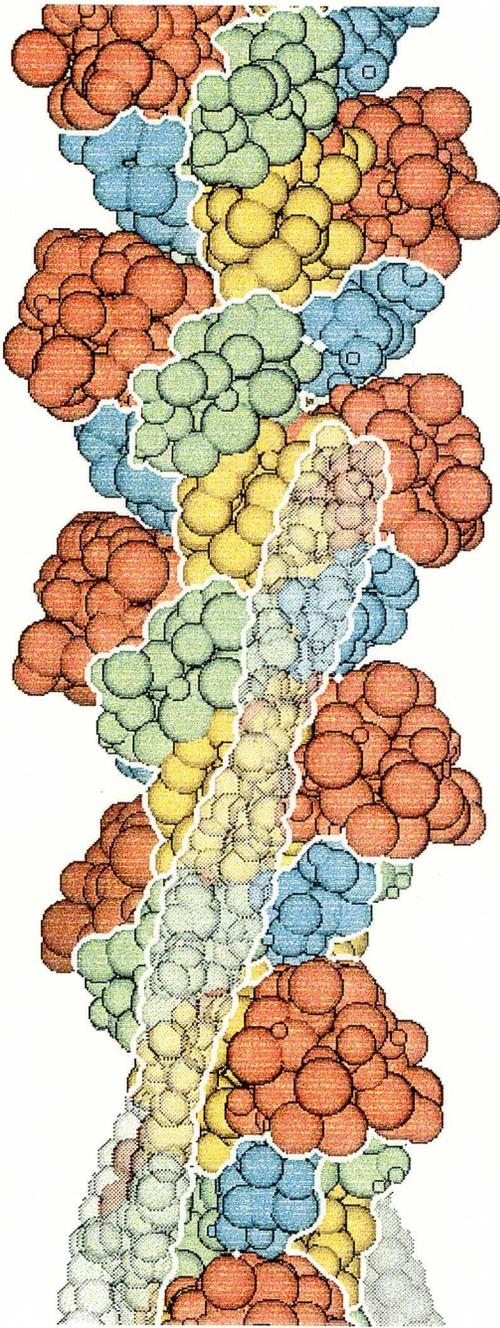


(a)

(b)

図 2-12 最適化したFアクチン+トロポミオシンの強度分布(a)弛緩状態と(b)硬直状態。ここに示した第1～3層線以上はFアクチンから計算した図2-5、図2-9と同じとなる。灰色の太線(—)はアクチンの構造因子だけから計算した強度で、実線(—)がトロポミオシンを含むモデルである。点線が(---)が観測値である。

図 2-13 Fアクチン+トロポミオシンのモデル (a) 弛緩状態 (b) 収縮状態。アクチンはドメインごとの色分けで、ドメイン1:赤、ドメイン2:青、ドメイン3:緑、ドメイン4:橙、トロポミオシンは白の半透明表示で、途中まで表示した。アクチンの体積をよく近似する225個の球であらわしたモデルで示した。下には、フィラメントを上からz膜に向かって見たx-y平面の断面図で、網目は10Å間隔である。トロポミオシンの位置関係がわかるように上図で途中まで表したトロポミオシンと4つのアクチンを表示した。



(a) resting

(b) contracting

5. 議論

(1) Fアクチンのモデル

Fアクチン内でのアクチンモノマーの向きについては、Holmesらのモデルが広く受け入れられている。Shuttらの報告したFアクチンのモデルはHolmesらのFアクチンとは異なった配置をしている。これはプロフィリンとの複合体で結晶解析されたGアクチンのパッキング構造をもとにしている。本研究ではShuttらの提唱するモデルに近いものは見つからなかった。その他の生化学的な知見から考えても現在はHolmesのFアクチンモデルを基本として問題ないと考えられる。

Holmesらのモデルは、高角の反射に合う唯一のモデルであるという報告であったが、我々のデータをもとにして実施したモノマーの向きの探索の結果では、Holmesタイプのモデルともう一つのモデルが同程度のR因子を与え、モデルを決定する明確な結論に至らなかった。Holmesらがモデル解析に利用したFアクチンゲルのX線回折像では赤道軸上の0次の層線反射と低次の層線も含まれている。それに対して今回利用した筋肉の回折像では、太いフィラメントの反射との重なりのためそれらが利用できない。それら低次の層線反射を含めることがモノマーの向きの決定には重要な要素であったことが推測される。

観測値とモデルの差フーリエ合成の結果から、これ以降のモデルの精密化には原子座標をパラメータとした構造の精密化が必要であることが示された。原子構造の立体化学的な制約を導入して各座標を最小二乗法で最適化するプログラムが開発されているが、立体化学的なエネルギー障壁のために大きな構造変化は探索できないことがある。そのために、本研究のようにして初期構造を求めてから立体化学的なエネルギーの束縛を導入することは有効な手段であると考えられる。また、高分解能パラメータの自由度も減らすことも有効で、Lorenzら(1993)は新しいアルゴリズムを考案しているが、分子動力学法なども検討すべきである。

また、電子顕微鏡による3次元再構成像ではドメイン2の一部が構造が乱れていることが報告されている。今回のモデルにおいても、ドメイン2の原子だけに大きな温度因子を付加すると、59Åの反射の強度が増大した。また、Fアクチンに結合しているADPは、通常交換が行われているが、これをモデルから除去することは

59 Å の反射の強度の減少となった。原子のゆらぎや占有率が 1 でない可能性も検討すべきである。しかしながら、通常の結晶学的方法論では、13 Å 分解能の観測データではこれらの多くの自由度となるパラメータの最適値を得るのは難しい。構造に関する多くの観察、生化学的事実を考慮して、見通しのよい順序で解く必要があると考えられる。

(2) 差フーリエマップの解釈

細いフィラメントの長い緩やかならせん構造をあらわしている低角の反射は、トロポミオシンの位置の変化などに注目して研究されてきた。しかし、それらの低角の反射は、ミオシンの周期構造を反映する反射との重なるのために、層線反射の強度を測定するのは難しくなっている。また収縮中のミオシン頭部との相互作用が、それらの低角の反射には大きな影響を与えている可能性も否定できない。今回計算した差フーリエマップは、低角の反射を含めないことによってそれらの不確定な議論を避け、アクチンの構造変化に注目することになっている。

今回得られている差フーリエにミオシン頭部のピークがないことは、相互作用しているミオシン頭部の周期構造がアクチンの繊維軸方向の周期構造と相関がないことを示している。それはミオシン本来の周期を持つか、ランダムであるかのどちらかである。その点が、rigor 状態とは大きく異なることが示された。しかしながら、ミオシン頭部がトロポミオシンのような 360 Å 周期の大きな 2 重らせん成分に沿って連続的にアクチンと相互作用しているならば、ミオシン頭部は低角の反射だけに関与することになる。それは、この差フーリエマップには現れない。今回解析に入れなかった低角の反射の解析には、その考慮も必要となる。

Maedaら (1988) の観測では、59 Å および 51 Å の強度分布にピークのシフトが見られている。そこで、我々の観測値をピークのシフトするように修正した収縮中のデータで、収縮と弛緩の差フーリエマップを求めたが、硬直状態のようなミオシン頭部によると考えられるピークは現れなかった。このことは、硬直状態のようなヘッドのピークを与えるためには、59 Å と 51 Å 以外の反射にも変化が必要であると考えられるのが妥当である。

(3) トロポニンの影響

トロポニン (TN) の構造に関する様々な報告がされてその形状も徐々に明らかになってきている。トロポニンは、細いフィラメントの動径位置が大きな場所に重心を持つので、逆空間に対応する層線反射では、動径座標の小さな所に構造因子を持つことが予想される。しかしながら、それは必ずしもそうではないことに注意すべきである。第3章においてカニのトロポニンについての解析を試みたが、トロポニンの構造因子の導入によって 59 Å と 51 Å の反射の強度分布のピーク位置を動径座標のどちらにずらせるかは、トロポニンのアクチンとの相対的な位置関係に依存するものであった。そして、実測値に合わせるために、ピーク位置を動径座標の小さい方向にシフトする位置を選択することができた。カエル等の脊椎動物のトロポニンは分子量が7万でカニより小さいが、同様の手法で解析できる。

ムラサキイガイの平滑筋はトロポニンを含まない細いフィラメントを持っており、Tajimaら (1983) によって記録されたX線回折像の 59 Å と 51 Å の強度分布は、ピーク位置がカエルなどの脊椎動物で観測されるよりも動径座標の大きなところに観察される。このことは、トロポニンが 59 Å と 51 Å の強度分布のピーク位置を動径座標の小さい方向にシフトさせている可能性を裏付けている。さらに、ムラサキイガイでは 51 Å の反射の強度が非常に小さいという特徴もある。これらの事実を考慮すると、トロポニンのない試料に基づいてFアクチンのモデルをさらに検討し、脊椎動物の筋肉回折像の解釈にはトロポニンの正しい構造因子を取り込んだモデルを考える事が必要となる。そのようなモデルの解析のためには、トロポニンの周期に由来する低角の反射データに基づいて解析する必要である。

steric-block 説ではFアクチンに結合しているトロポミオシンが移動するモデルを考えるが、トロポミオシンに結合しているトロポニンの成分も考慮すべきである。特にトロポニンTは、トロポミオシンに長く結合しているので、見かけ上トロポミオシンを大きく見せていることに相当することになる。トロポニンの構造にゆらぎがあるため電子顕微鏡による観察で見えにくいとしても、平均構造を見るX線回折では無視できない可能性があり、注意が必要である。

(4) 収縮中のFアクチンの構造変化

AL-Khayatら (1995) のモデル計算では、細いフィラメントの活性化に伴う層線反射の強度変化を与えるアクチン+トロポミオシンのモデルを求めている。彼らの結果の中でドメイン2に関する構造変化は、今回求めたモデルに近いものであった。彼らの説明しようとしている対象はミオシン頭部との相互作用のない条件での活性化されたFアクチンの構造変化であり、より小さな反射の強度変化である。今回解析した強度変化は収縮状態で観測されるより大きな変化であるが、変化の傾向は同じである。従って、程度の異なる同じ構造変化を求めている可能性もある。

また、彼らの計算は観測強度に対するフィッティングでなく、強度の変化分についてを説明するモデルの探索であり、球で近似したドメイン構造の相対的な移動のパラメータとしてよく説明できている。このことは、このドメイン構造の変化のモデルが、観測されている強度変化に対するよい記述であることを裏付けている。

また、トロポニンの構造因子の変化が、収縮中の強度増大に関与している可能性についても検討すべきである。第3章において計算したトロポニンの構造因子では 59 Å、51 Å および 27 Å の反射の成分は小さく、依然としてFアクチンの構造因子が強度の主体であった。観測されている強度の増大で一番大きい 51 Å の反射では 100 % 近い増大があるので、これをトロポニンの構造変化で説明するのは無理があるうえに、強度増大がフィラメントのオーバーラップのないときには非常に小さいことから、トロポニンの収縮制御に起因するとは考えにくい。しかし、成分としては無視できない可能性は残る。それは、モデルと観測値の差フーリエ合成の結果においてトロポニンと考えられるピークが大きく変化しなかったことから妥当な解釈と考えられる。

いずれにしても、アクチンのドメイン構造の変化によって、細いフィラメント由来の強度変化を説明することが可能で、ミオシン頭部の影響を直接考える必要はないことが示された。収縮中に起こる強度変化は、フィラメントのオーバーラップの程度に比例していることから、ミオシンとの相互作用によって引き起こされていると考えるのが妥当である。

(5) 筋収縮と構造変化との関係

Huxley らの提唱したミオシン頭部の首振りモデルでは、力を発生する過程でのアクチンの役割は明確になっていなかったが、収縮中のX線データから求めたアクチンの構造が変化して見えるという結果から、アクチンの動的な性質が張力発生において何らかの役割を担っていることが推測される。例えば、収縮中にアクチンのドメイン2の動きが、ミオシン頭部の運動に関係している可能性もある。電子顕微鏡の3次元再構成像においてはドメイン2の一部が見えにくくなっており、フィラメントが柔らかいときにはさらにドメイン2の構造が変化していることを報告している (Orlova & Egelman, 1993)。ミオシン頭部が結合したFアクチンでは柔らかさが増すことから、ミオシン頭部との相互作用によって少なくともアクチンのドメイン2に構造変化が起ることが推測されているが、それは今回の解析結果と一致する。この構造変化がアクチン-ミオシン系のどのような相互作用に対応しているのか原子レベルでより具体的に調べるのが次の課題となる。

steric-block 説ではトロポミオシンの立体的な障害によってアクチンのミオシン頭部との相互作用を阻害すると考えている。トロポミオシンのないFアクチンにおいても、トロポニンIの存在によってFアクチンがミオシン頭部と相互作用しないoffの状態となることがわかっているが、それがどのような仕組みでアクチンのミオシン頭部との相互作用を阻害するのかはわかっていない。トロポニンを持たない筋肉においてもトロポミオシンは存在し、何らかの役割を担っている。さらに、ATP非存在下や低イオン強度においてミオシン頭部とアクチンの相互作用が起こるという事実は、単なる結合部位のブロックでは説明できない可能性を示唆している。トロポニンによる阻害はアクチン自体に及ぼされたもので、トロポミオシンはそれを伝達するものであり、アクチンがoff状態になった結果受動的にその場所が移動したと考えることも可能である。ドメイン4とトロポミオシンが結合しているとする、今回得られた収縮中のアクチンの構造変化のモデルでトロポミオシンも移動することができる。今後トロポニンの構造研究が進むことで、steric-block 説の詳細が明らかになっていくものと期待される。

6. 結論

収縮中のX線回折像に見られる強度増大を解析した結果、収縮中の細いフィラメントには硬直状態に見られるような強固なミオシンの結合は見られなかった。収縮中のミオシンとアクチンとの相互作用は、硬直状態とは異なっているか、あるいはそれは非常に短い時間であり、X線回折像には現れないことがわかった。そして、収縮中にはミオシンとの相互作用によって引き起こされたFアクチンの構造変化が起こっていることを示した。

結晶構造に基づくFアクチンのモデルを構築した結果、収縮中にドメイン2が繊維軸の内側にドメイン4が外側に移動するような変化で観測強度の増大を説明することができた。構築したモデルは構造のゆらぎやトロポニンの影響を考慮して改良する余地があるが、トロポミオシンの移動は5Å程度であり、アクチンの構造変化に伴って受動的に場所を移動している可能性があった。

第3章

硬直状態のカニ横紋筋

細いフィラメントの構造解析

要約

カニなどの甲殻類の横紋筋の細いフィラメントは骨格をなすアクチンフィラメントとそれに結合した制御タンパク質の周期が一致しているため、細いフィラメントの構造研究に適している。グリセリン処理の後に硬直状態に調製したカニ横紋筋では、配向の良い明瞭なX線回折像が記録されており、ミオシン頭部を含んだ細いフィラメントの構造研究が可能である。本研究では、カニ硬直状態のX線回折の強度データを説明するような細いフィラメントモデルを結晶データを利用して構築した。

細いフィラメントは、アクチン、トロポミオシン、トロポニンによって構成されており、硬直状態ではこれにミオシン頭部が結合する。これまでの解析で、回折像の反射の特徴から決まる構造の対称性とミオシン頭部とトロポニンの結合位置が求められている。その結果をもとに、まずアクチンとミオシン頭部の結晶解析による原子座標のデータを利用したモデルを構築した。ミオシン頭部の結合様式をパラメータとし、構築したモデルから計算されるX線の散乱強度が観測データに合うようなモデルを探索した結果、X線回折データだけからミオシン頭部の結合様式を一意に求めることはできなかったが、アクチンのN末端の近くに結合して矢じりを形成するモデルで電子顕微鏡による3次元再構成の結果に近いものが得られた。次に、トロポニンについては結晶解析されていないので、様々な報告の知見を考慮して低分解能の形状モデルを推定した。そしてトロポニンCとIの複合体を、球を平たくのばしたようなモデルであらわし、その長軸フィラメント軸に沿ってトロポミオシンとともにモデルに導入することで強度データを良く説明できた。トロポニンTを含めるとトロポニン全体で細いフィラメント上に配列している半分以上のアクチンの近隣にあり、硬直状態ではミオシン頭部はトロポニンのないところに結合していることが示唆された。

1. 序論

硬直状態の筋肉では、細胞内ATP濃度の低下に伴いミオシン頭部がアクチンに結合したクロスブリッジによって細いフィラメントと太いフィラメントが固定されている。単離したFアクチンとミオシン頭部は1:1に結合することができるが、筋肉組織中ではミオシン頭部の数が限られているために、ある間隔で結合している。脊椎動物では、クロスブリッジの結合は周期構造の異なるアクチンとミオシンの立体配置によって決まる間隔をもって現れるが、それは一様ではなく、全体としては極めて複雑な周期で結合していることがわかっている (Squire, 1988)。一方、昆虫の飛翔筋 (Taylor, 1993) やカニの横紋筋 (Maeda, 1978) では細いフィラメントの周期に従っており、X線回折像においては細いフィラメントの周期構造に由来する反射から構造解析が可能である。

カニの横紋筋は、筋繊維の単位構造当たりの細いフィラメントの数が多く、また、長さも2.2 μm と脊椎動物の2倍であるため、X線回折法による細いフィラメントの構造解析に適している (Maeda, 1978)。硬直状態においては、周期性の良いことを反映した明瞭なX線回折を再現性良く得られるため、ミオシン頭部の結合様式の解析に有効である。Nambaらは、グリセリン処理の後に硬直状態に調製したカニ横紋筋からの回折像をもとにミオシン頭部および収縮制御タンパク質を含んだ細いフィラメントの構造解析を行なった (Namba, 1978)。回折像の反射の特徴から決まる構造の対称性と、観測データから直接計算される差円筒対称パターン関数が示すベクトル分布に基づいて、ミオシン頭部とトロポニンの結合位置が求められた。提案されている硬直状態の細いフィラメントの低分解能のモデルでは、2つの双頭のミオシン頭部が並んでFアクチンの両側から結合している。

Kabschら (1990) のアクチンの結晶解析に続いて、Raymentら (1993) はミオシン頭部サブフラグメント1 (S1) の結晶構造解析に成功し、原子座標が報告された。さらに、単離したFアクチンとミオシン頭部の複合体の電子顕微鏡による3次元再構成像にそれぞれの原子モデルをあてはめることによって、2つのタンパク質の硬直状態での結合様式が明らかになってきた (Rayment, 1993b)。硬直状態の細いフィラメントでは、ミオシン頭部のアクチンとの結合は一様ではないが、個々の結合様式は同様と考えられるので、原子座標モデルに基づいて硬直状態の筋肉の回折像から構造解析をすることが可能になってきた。

本研究では、アクチンおよびミオシンS1の原子座標を利用した硬直状態の細いフィラメントのモデルを構築し、得られているカニ横紋筋のX線回折像の強度を説明するようなモデルの構築を試みた。細いフィラメントのモデルには、収縮制御タンパク質のトロポニンとトロポミオシンを含めて解析する必要がある。トロポミオシン (TM) はcoiled-coilの α -helixであることが知られており (Phillips, 1986)、低分解能では長いロープ状のモデルで近似できる。トロポニンについては、Nambaらの解析では桿状 (のびた球) としてモデルに導入していたが、最近の構造研究の報告から、低分解能のトロポニンのモデルを構築してモデルに導入することを試みた。

トロポニン (TN) はC、I、Tの3つのタンパク質の複合体であり、TN-Cについては結晶解析されている (Herzberg, 1988)。TN-Tが長くトロポミオシンに沿って結合していること、TN-Iは球状であることは知られている (reviewed by Zot & Potter, 1987; Leavis & Gergely, 1984)。Phillipsらによる単離したTNの電子顕微鏡による観察で、それはより明確となった。また、TNを結合させたトロポミオシンの結晶解析から、TN複合体の低分解能の解析を行い、TN-Tがcoiled-coilの α -helixを持ち、長さ約190Åにわたってトロポミオシンに結合していることが示された (White, 1987)。一方、中性子線小角散乱によると、TN-Iは長さ約110Å程度のダンベル型であり、TN-Cをその中央に結合していることが示されている (Olah & Trewella, 1994)。

電子顕微鏡による筋肉繊維の観察では、トロポニンを明瞭に観察することはできず、3次元再構成においても困難であった (Wakabayashi, 1975)。最近、昆虫の飛翔筋の3次元再構成において、トロポニンの存在を認める報告がされているが

(Tayer, 1993)、筋繊維中でのトロポニンの構造を示すほどの分解能は得られていない。一方、X線回折像においてはトロポニンによる反射が観測されているので、これらの最新の構造情報を手がかりにトロポニンの低分解能のモデル構造を検討できる可能性がある。

2. 試料と方法

(1) 試料

海産のカニであるガザミ (*portunus trituberculatus*) のヒレ状の後ろ脚の付け根部分の横紋筋を取り出し、糸で硬質ガラス棒に固定し、グリセリン溶液 (glycerine 50%, KCL 100 mM, MgCl₂ 1mM, imidazol 10mM, EGTA 10mM) に 0 °C で 24 時間浸した後、溶液を交換して -15 °C で保存した試料を利用した。X線回折用セルにとりつけた試料は、硬直溶液 (KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 1 mM, His buffer 10 mM, pH 7) および、弛緩溶液 (硬直溶液 + ATP 5 mM) に浸すことで各状態に調整した。

(2) X線回折像

本研究で解析した回折像のうち、硬直状態については若林克三 助教授によって記録された配向の良い回折像を解析した。これは高輝度X線発生装置 (株)理学電気, FR-B) とミラーおよびモノクメータの集光光学系による回折計で、露光時間 72 時間でサクラ宇宙線フィルムに記録されている (1980 年 7 月)。弛緩状態については、グリセリン処理した試料からの回折像では、27 Å の反射が精度よく記録できなかったため、比較的明瞭な反射を記録できた生筋の回折像を利用した。第 2 章と同様にして高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 (BL-15A) でイメージングプレート (富士フィルム(株), BAS2000) を用いて露光時間 20 秒で記録した (1995 年 9 月)。

(3) フィルムのデータ処理

X線フィルムに記録された回折像は、2次元デンストメータ (株)阿部設計 2605 型) によって黒化度を 2次元デジタル画像データに変換した。散乱X線強度 I を求めるために、校正曲線によってX線強度 I に変換した後、イメージングプレートによって記録したデータと同様に処理した。校正曲線はOD値 3.6までは測定値に基づいて変換し、OD値 3.6~4は特性曲線の γ 値 (黒化度と強度対数値との比例計数、メーカ発表値 4.45 : サクラ宇宙線フィルム) で変換した。フィルムのダイナミック

レンジは限られているため、OD値が4以上では飽和する。そのため重ねたフィルムのデータから飽和した領域のデータを得ることも可能であり、その場合は換算したX線強度にフィルム因子F（メーカ発表値2.88：サクラ宇宙線フィルム）をかけた後にバイアスを調整した値を利用した。

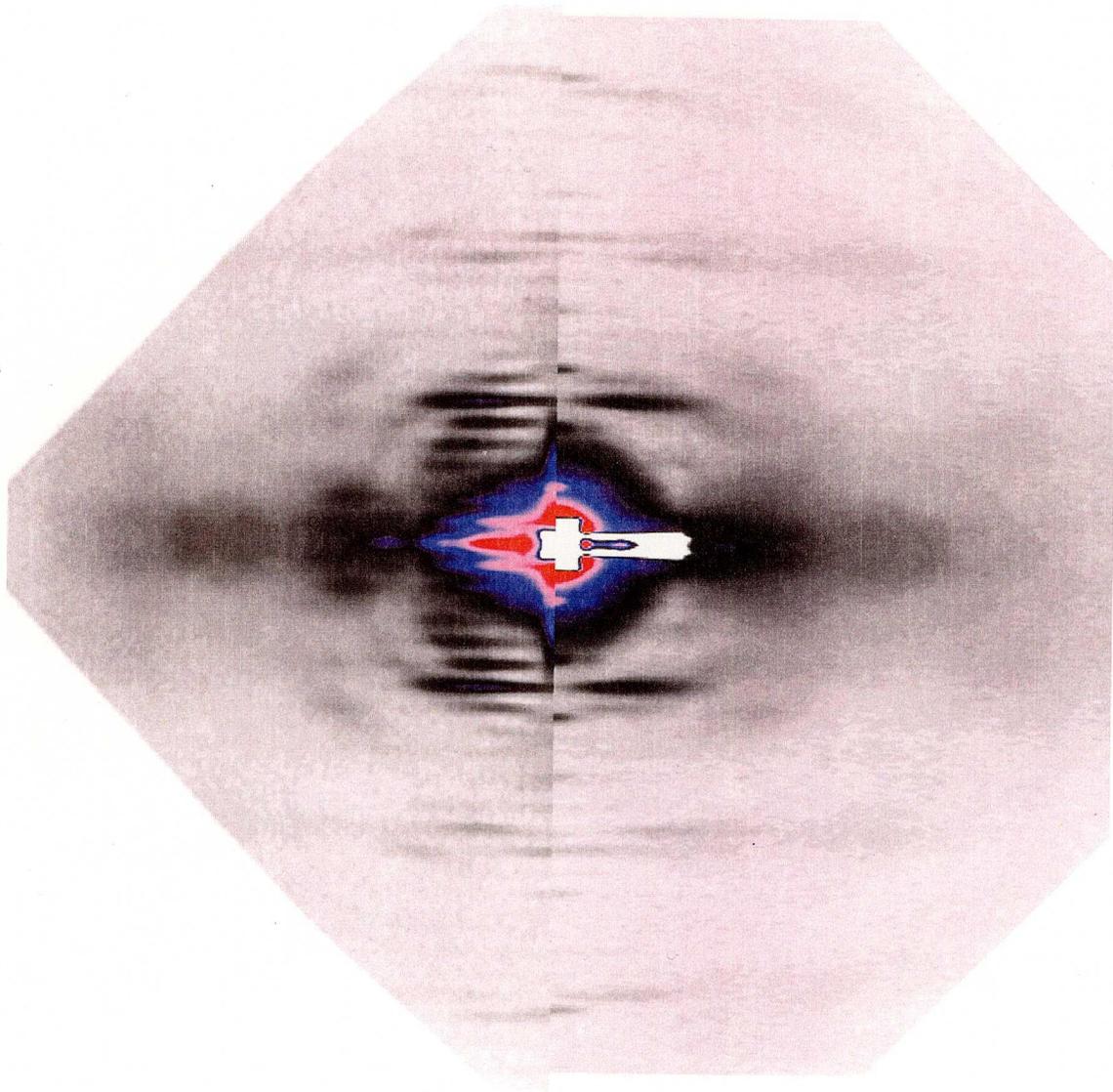
（4）回折像と層線反射の強度分布

解析に使用した硬直状態および弛緩状態のX線回折像を図3-1に示した。強度データの測定は第1章と同様に実施し、その結果を図3-2に示した。アクチンの周期構造を、13回転28残基らせん周期765Å（ピッチ27.3Å）として、層線反射を指数づけできる（Namba, 1980）。偶数次数の層線反射では子午軸上に強度をもつことからミオシン頭部とトロポニンは2回らせん軸対称性を持つように周期的に結合することがわかる。

硬直状態の強度分布はフィルムに記録した配向の良いデータから収集したが、第1層線については子午軸上に現れている光学系の寄生散乱のために正しいデータを得られなかったため、イメージングプレートで記録した別の回折像から測定した。

弛緩状態の強度分布は、59, 51, 29, 27Åの各層線について測定した。それより低角の反射は測定が困難であったため、Nambaら（1987）のデータを利用した。380Åの第2層線についてはフィルムに記録した回折像から測定したもので、第4、6、8、9層線については標準のグレイスケールとの比較で目で推定した値である。

M



$1/27.3 \text{ \AA}^{-1}$

E

Rigor

Resting

図3-1 カニ横紋筋のX線回折像。左が硬直状態で右が弛緩状態である。Mは子午軸、Eは赤道軸を表す。硬直状態の回折像には光学系の寄生散乱が子午軸上に存在するため小角で子午軸上が強く見えている。弛緩状態の赤道軸の中心付近には銅のアブソーバがある。

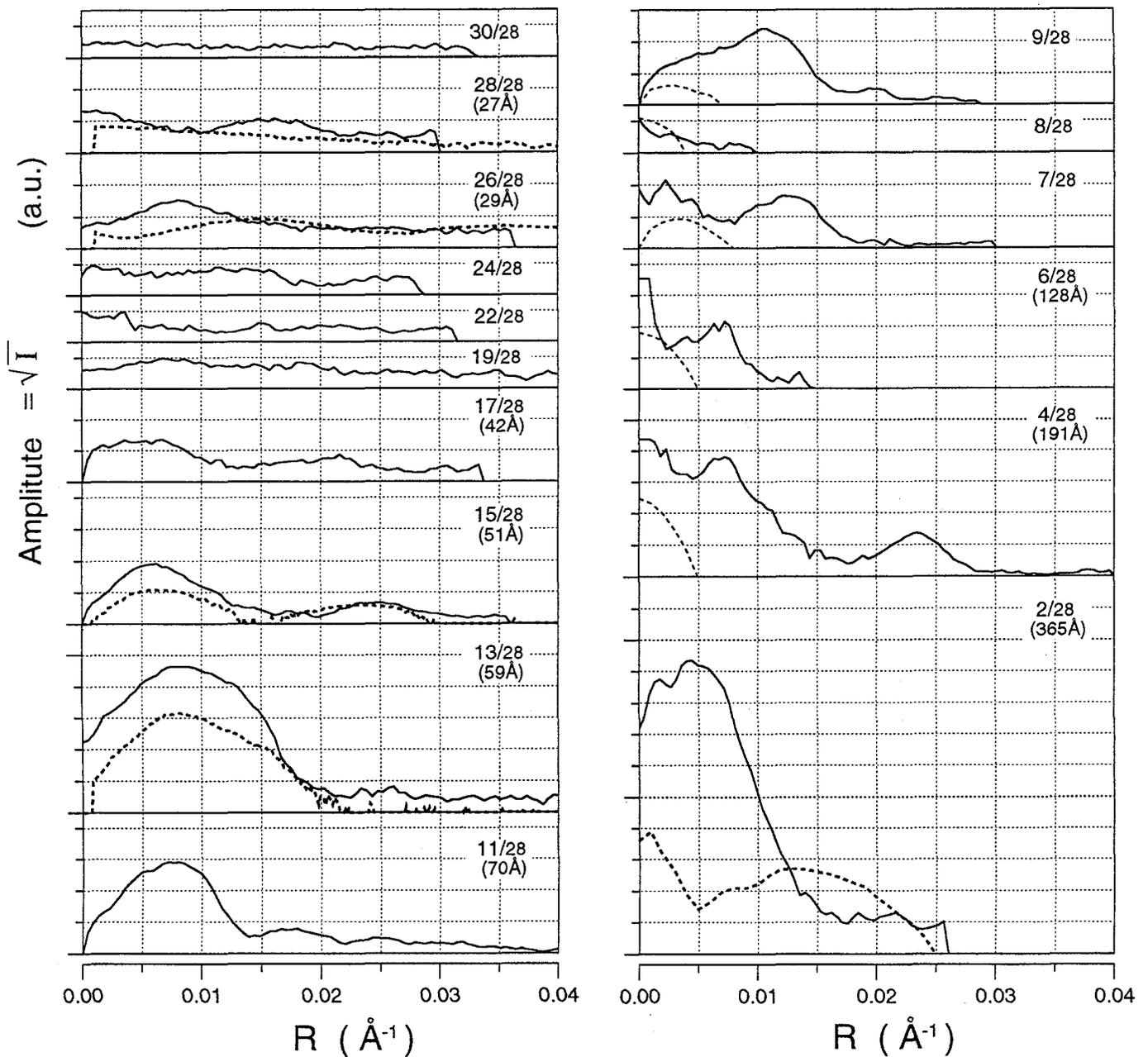


図 3-2 細いフィラメント由来の層線反射の強度分布。実線 (—) が硬直状態、点線 (---) が弛緩状態である。すべての反射を同じスケールでプロットするために縦軸は強度の平方根とした。層線の次数はアクチン28残基が1周期となるので、第2章における指数付けとは違ってくるため/28を併記した。右のグラフで、弛緩状態の第9層線より低角の反射は (Namba, 1978) のデータを示した。硬直状態と比べて強度が小さくまたミオシンの反射との重なりもあるため、測定は難しかった。

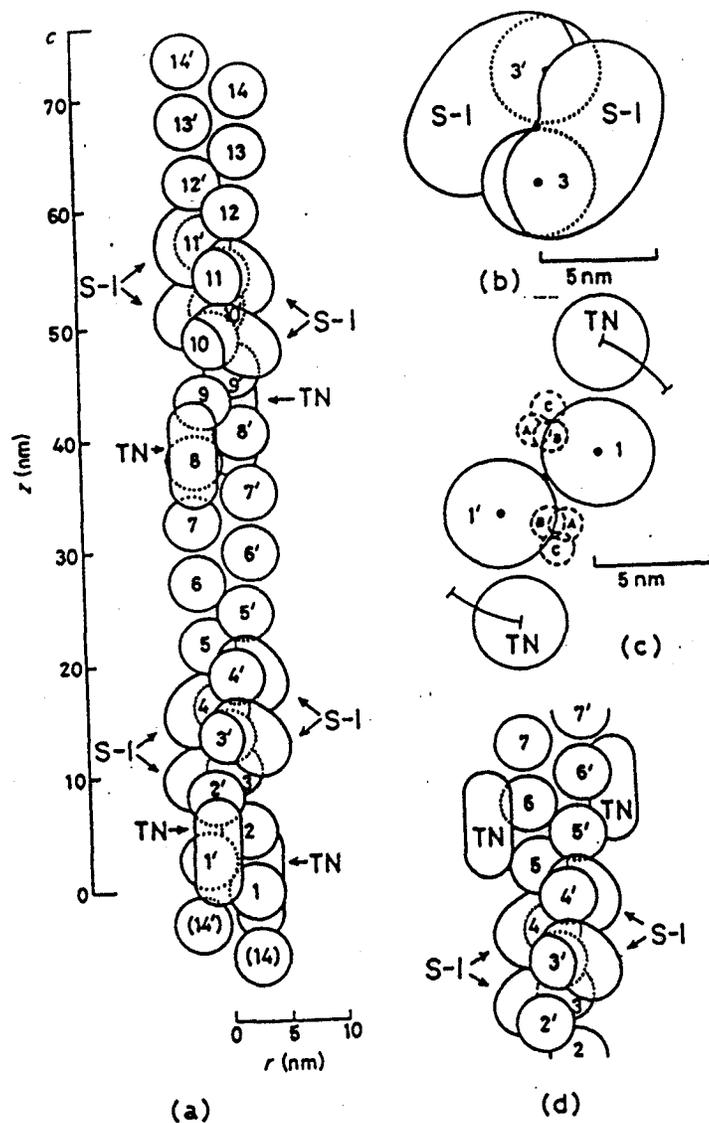


図 3-3 難波らによるカニ横紋筋細いフィラメントの硬直状態のモデル。

(Namba,1978) より引用。(a) フィラメントの側面図。番号のついた球がアクチン、S-1 がミオシン頭部、TN がトロポニンを表す。(b) 3 と 3' のアクチンの部分の断面図と、(c) 1 と 1' のアクチンの部分の断面図である。トロポニンの位置は円弧で示した範囲の可能性がある。破線の円で示したトロポミオシンの位置は、当時考えられていた A, B, C の可能性があった。

(5) 細いフィラメントモデルの構築

硬直状態の細いフィラメントはFアクチン (Ac)、トロポミオシン (TM)、トロポニン (TN) によって構成されており、硬直状態ではこれにミオシン頭部 (S1) が結合する。Nambaら (1978) による解析の結果、回折像の反射の特徴から決まる構造の対称性と観測データから直接計算される差円筒対称パターン関数が示すベクトル分布をもとにして、ミオシン頭部とトロポニンの結合位置が求められている (図3-3)。

アクチンは13回転28残基のらせん構造であり、それに他のタンパクの結合したモデルは760Åの周期構造である。繊維軸回りに180度回転して380Å並進する2₁らせん対称性を仮定すると、単位構造はその半分の長さ380Åでアクチン14個、ミオシン頭部4個、トロポニン2個、トロポミオシン2個で構成される。分子量はそれぞれ42,000、100,000、98,000、67,000である。2₁らせん対称では、偶数次の層線にはすべての偶数の構造因子 $F_n(R, Z)$ が寄与し、奇数次の層線ではすべての奇数の F_n が寄与するので、必要な分解能までのフーリエ成分として13次までをとり、式(2-5)で総和をとった。

表3-1にそれぞれの構成タンパク質の構造因子が大きな値を持つX線回折像上の領域の関係についてまとめた。この関係を利用してそれぞれのタンパク質の構造と結合様式を求めるように、以下の手順でモデルを作成した。

(step-1) 弛緩状態のデータを説明するモデルとしてFアクチンのモデルを求める。

(step-2) 硬直状態のモデルとしてFアクチン+ミオシン頭部のモデルを求める。

71Åより広角の反射ではトロポミオシンとトロポニンの構造因子は小さいと考えられるので、その領域のデータに基づいて第1近似のモデルを求める。Fアクチンの構造は硬直状態と弛緩状態で変わらないモデルとする。

(step-3) トロポニンのモデルを推定する。

(step-4) トロポニンのモデルを導入した弛緩状態のモデルを求める。

硬直状態のモデルを構築するにあたってトロポニンは無視できないため、まずトロポニンの低分解能モデルを推定する。弛緩状態と硬直状態

データからトロポニンを含んだ細いフィラメントのモデルを求める。トロポニンに由来すると考えられている子午軸上の反射の強度を良く説明するようにトロポニンのモデルを求める。

(step-5) トロポミオシンをモデルに導入する。

(step-6) ミオシン頭部のモデルを導入して硬直状態のモデルを完成させる。

低角の反射の子午軸以外では、すべての成分が関与している。すべてのパラメータを同時に変化させることは自由度が大きくなるため、最適解は初期値に依存してしまう可能性がある。そのためにも上述のような手順で一つのモデルを構築する必要がある。また、トロポニンのモデルによっては、第1近似であるアクチンとミオシン頭部のモデルは最適ではない可能性もある。すべての構成タンパク質を決めた後に、再びそれぞれの構造を検討することによってモデルを精密化することが理想的である。

PDB データバンク には、ミオシン頭部の結晶解析の座標データ (1MYS) は全アミノ酸 1157 残基のうち 1072 残基の α 炭素の座標が登録されている。今回の解析が 27 Å の分解能であることを考えて、 α 炭素の座標から近似して求めた電子密度を、45 個の半径 6 Å の球で近似したモデルを作成し、計算効率を上げた (図 3-4 を参照)。

表 3-1 細いフィラメントモデルを構成する
タンパク質の構造因子の分布

X線回折データ	構造因子			
	弛緩状態			硬直状態
	Ac	TN	TM	+ S1
70Å ⁻¹ より広角の反射	Ac (1)	tn (4)	tm	+ S1 (2)
低角の反射 (子午軸)	—	TN (4)	—	+ S1
(子午軸以外)	Ac	TN	TM (5)	+ S1 (6)

注) Ac : アクチン、TN : トロポニン、TM : トロポミオシン、
S1 : ミオシン頭部の略。小文字は成分が小さいことを表す。

3. 結果

(1) Fアクチンのモデル

第1部における解析結果から、修正したHolmesのFアクチンのモデルを基本として解析を行うこととした。カニの弛緩状態の回折像から測定した層線反射の強度分布の、70 Å以上の反射を良く説明するようなFアクチンのモデルを得るために、第2章と同じ方法で、アクチンのドメイン構造を変化させた。その結果、ドメイン3と4をドメイン1から離す方向に移動させることで観測データと良く一致した(表3-4)。このモデルではHolmesのモデルと比べて、51 Åの強度が小さく、観測値により近くなっている。この特徴は、カニの筋肉のトロポニンがカエルなどの脊椎動物よりも大きいことと関係している可能性もある。ここでは、トロポニンを導入する前にアクチンだけで近似したモデルを求めた。モデルと観測値の比較を図3-6(a)に示した。

(2) Fアクチン+ミオシン頭部複合体のモデル

Raymentら(1993b)によって報告されたミオシン頭部(S1)の結合様式は、原子座標のデータを幾何学的変換をする行列を公表していない。そこで、我々の観測データに合うようなS1の結合様式を探索した。

S1とアクチンの結合様式は、S1のアクチン結合部位と予測される領域の代表点Cを定義し、S1のC点の回りの回転と、C点とアクチンとの相対的な配置の合計6つのパラメータで表すこととした。これを可能な範囲ですべて変化させて大域的なパラメータサーチを行い、観測されている強度分布を説明できるようなミオシン頭部の結合様式を求めた(増加分は3 Åおよび10°)。

フィッティングする層線反射として、強度が大きい71, 59, 51, 42 Åの4つを採用した。これらの反射ではTMとTNの寄与が小さいと考えられている。特に59 Åの反射は硬直状態に特徴的な分布を持っているので、59 Åの反射だけのR因子が低くかつ他の層線のR因子も低いものを探索した。また、物理的に無理があるようなモデル、すなわち、S1が細いフィラメントの体積と交わっている、S1の尾の部分

が細いフィラメントの方を向いている、太いフィラメントから遠すぎる、等のモデルは棄却した。

その結果、図 3-5 に示したような 4 種類のモデルが得られた。アクチンの N 末端付近は S 1 と相互作用することがわかっているが、それを満たすものは 3 つであった。1 つは Rayment らの報告に近いものであった。もう一つは、ドメイン 3 も含む広い範囲でアクチンと結合していた。残りの 1 つはドメイン 1 と 3 の間に結合していた。X 線のデータだけからは、モデルを選択することができなかつたため、S 1 で装飾された細いフィラメントの電子顕微鏡の 3 次元再構成像に近いモデルとして、Rayment らのモデルに近いものを S 1 の結合様式のモデルとして採用した。大域的サーチで得られたパラメータは最小二乗法によって最適化させた。得られたパラメータを表 3-2 に示した。

S 1 の構造は、硬直状態では 2 つの S 1 が並んでアクチンに結合し、2 つの S 1 の尾はひとつに結合しているので、2 つの S 1 が同じ構造ではでないことが予想される。そのため、S 1 の細い側の 1/5 に相当する部分はモデルから除去した。それを入れたままでは、Rayment らに近いモデルは一致度が良くならなかつた。

Rayment らのモデルとの違いを検討するため、彼らの報告している図に合うようなパラメータを推定した結果を表 3-2 にあわせて表示した。最適モデルと比べるとオイラー角で 20° 程度の差があり、強度分布では、59 Å の強度分布を良く説明することはできなかつた。

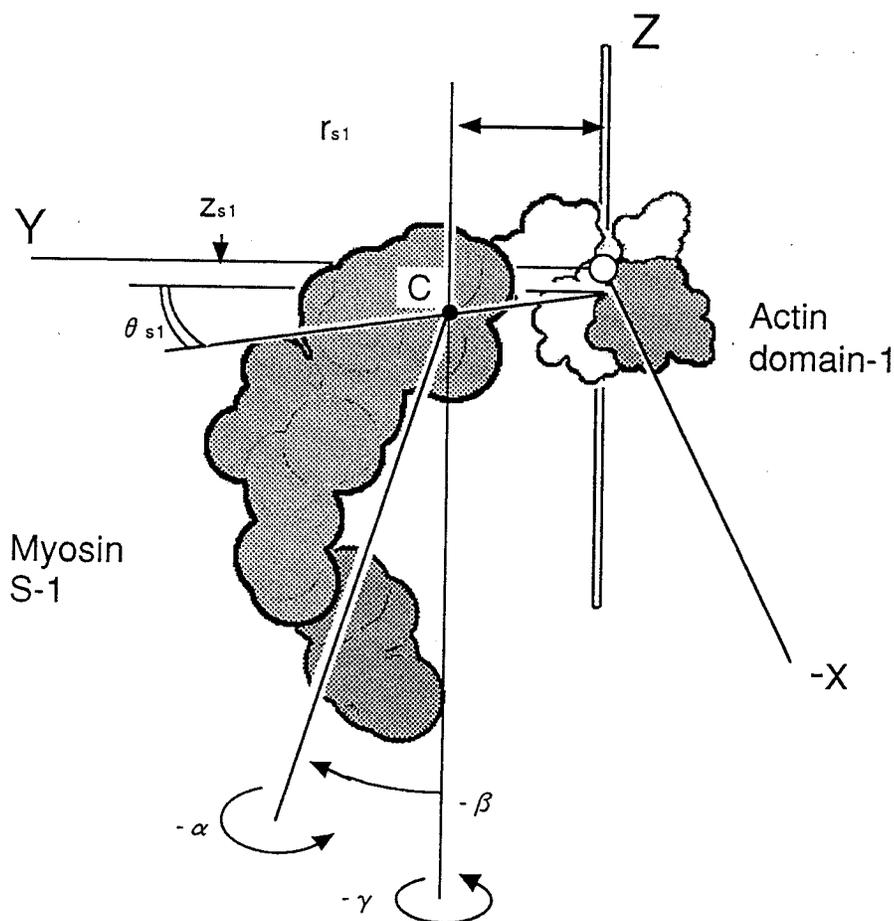
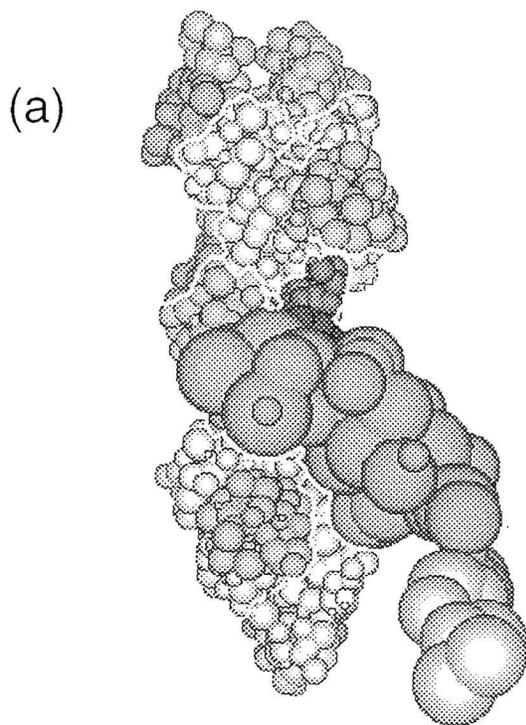


図3-4 ミオシン頭部の向きのパラメータ。Holmesらの報告しているPDBに登録されているGアクチンの座標からFアクチンの座標を求めるマトリックスを適用して得られるFアクチンのモノマーの重心位置を基準とするFアクチンのモノマー位置とした $(-15.8, 10.9, 0.3)$ 。Fアクチンの繊維軸はz軸と重なり、サルコメアのZ膜(フィラメントのbarbed end)はzの負の方向である。PDBに登録されているS1の座標は結晶の座標であり、座標の中心は $(25.4, 33.2, 91.9)$ でz軸方向にのびた配置である。アクチンと相互作用すると考えられる部分の中心点Cとして、PDB座標の中のz座標が110Å以上である原子座標の中心 $(2.7, 2.8, 12.8)$ を設定し、これをy軸上 $(0., 3.5, 0.)$ に移動させた。Cの回りの回転はオイラー角であらわすと、 α はS1の長軸(z軸)の回りの回転で、その軸の緯度経度の移動が β および γ となる。S1がz軸の負の方向に矢じりを作ると β は $0 \sim -90^\circ$ 、 γ は $-90 \sim 90^\circ$ となる。そして、アクチンは周期的に現れるのでC点の範囲は円筒座標で $\theta_{s1} = 0 \sim 170^\circ$ 、 $z_{s1} = -2.73 \sim 2.73$ Åの範囲をとればよい。 r_{s1} はアクチンと接触する位置を求められるので、その付近で数Åの変位が可能である。



(b) #201 #202 #255

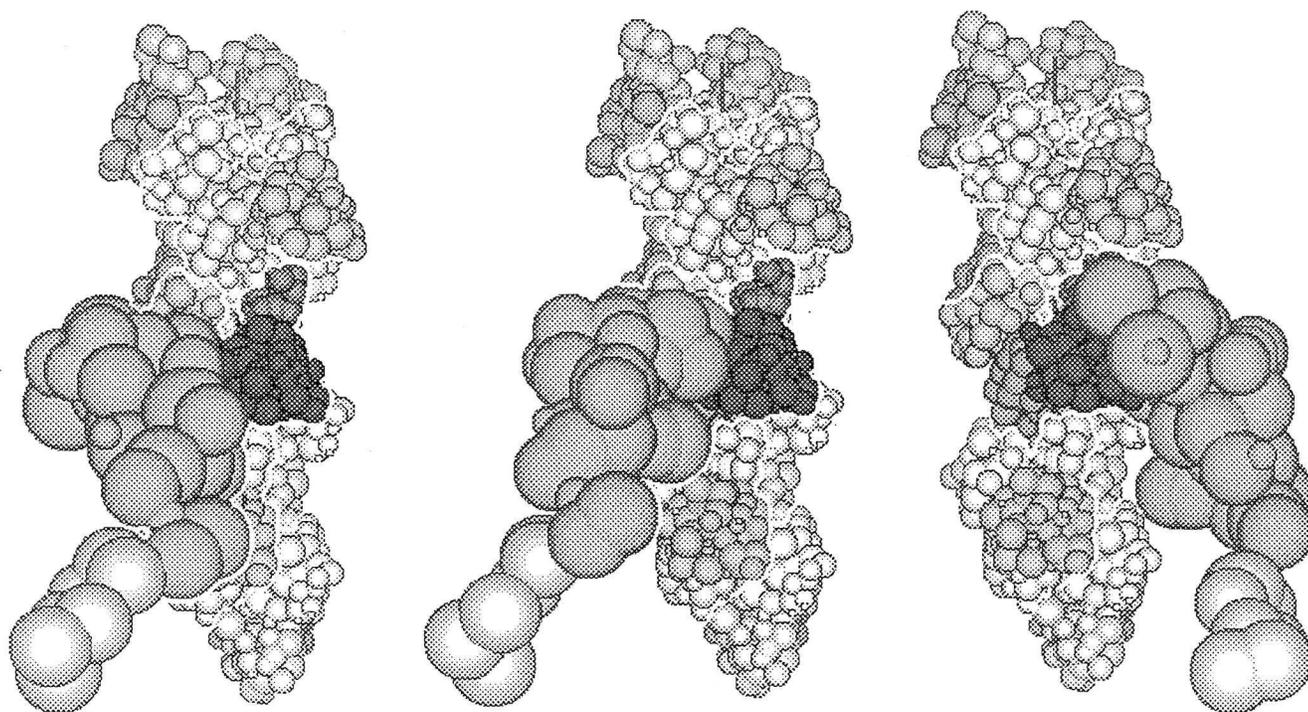


図 3-5 (a) 大域的なパラメータ探索の結果から得たミオシン頭部の結合様式の最適なモデル。(b) その他のモデルも同程度の一致度を与えたが、電子顕微鏡の結果と一致しない#201, #202, #255 の各モデル。ミオシン結合部位と考えられているアクチンのドメイン 1 は濃い灰色で表した。ミオシン頭部の尾の薄い色の部分が構造因子の計算から削除した部分である。

表3-2 ミオシン頭部のモデルのパラメータサーチの結果

#file	α	β	γ	r_{s1}	θ_{s1}	Z_{s1}	R因子	R因子 (59Å)	
#207	-100	-50	-50	40	70	-12	16%	23%	最適モデル
	-98	-43	-54	47.4	69.6	-13.4	15%	19%	最適化したモデル
#201	-80	-50	-50	50	10	-3	13%	22%	
#202	-70	-50	-10	50	20	0	16%	24%	
#255	-130	-30	-10	62	100	0	14%	23%	
	-122	-56	-21	49.4	58.4	-12.8	22%	23%	推定したRaymentモデル

(a)

Fアクチン

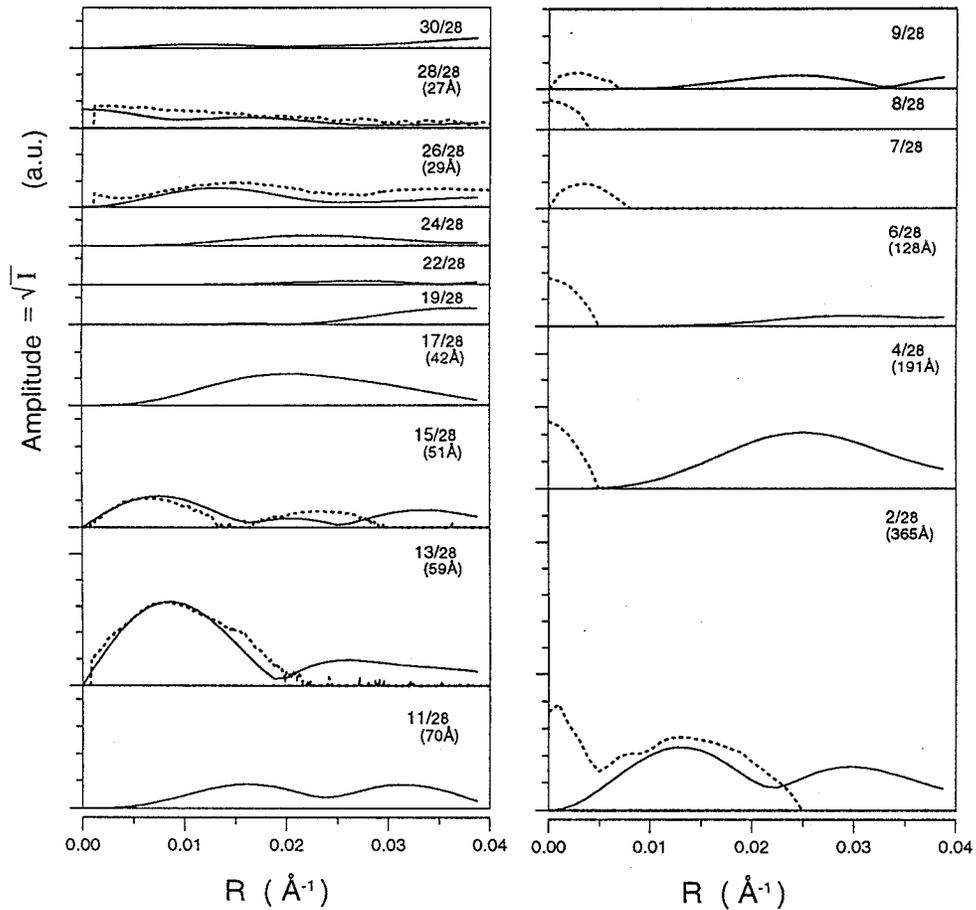
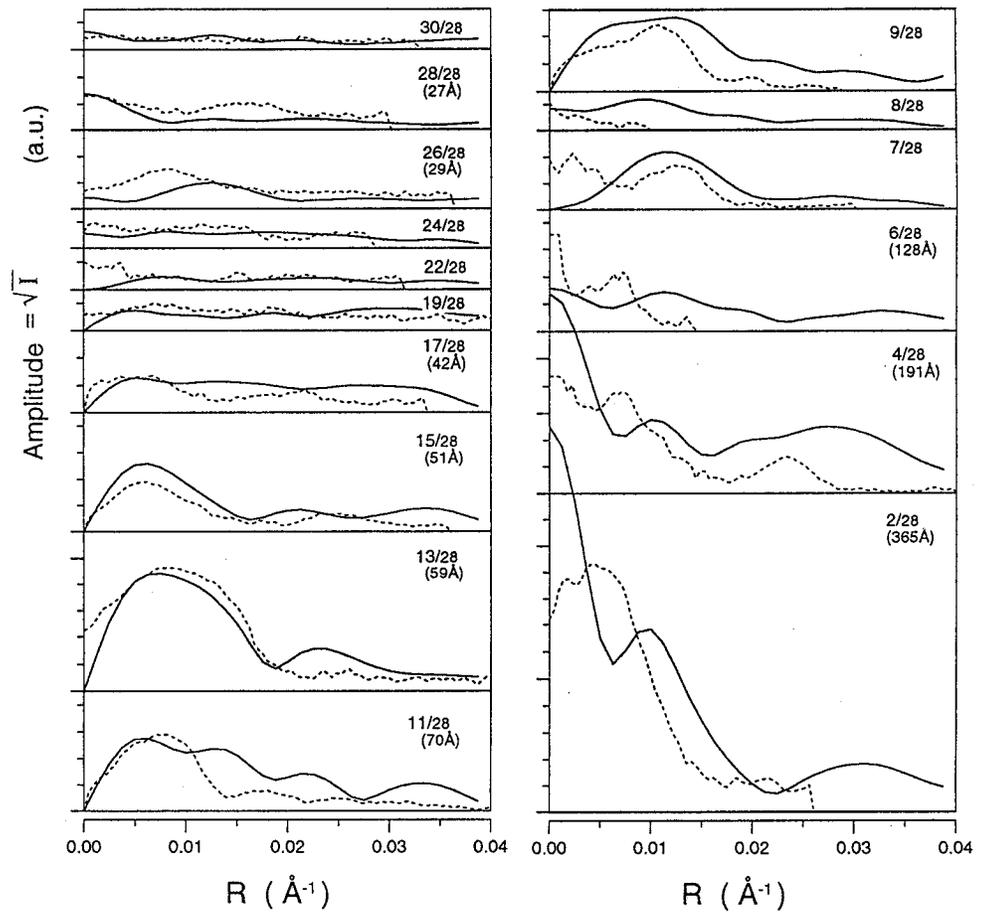


図 3-6 (a) 弛緩状態の第 1 近似としての F アクチンモデルの散乱強度。 実線 (—) はモデルから計算した強度で、点線が (---) が弛緩状態の観測値である。 (b) パラメータサーチの結果得られた最適の F アクチン + ミオシン頭部のモデルの散乱強度を硬直状態の観測値と比較した。 F アクチンモデルと同様に、左に表示した 70 Å 以上の反射についてはほとんどこのモデルで説明することになる。 (c) 推定した Rayment のモデルでは硬直状態の 59 Å 層線の強度分布を合わせることはできなかった。

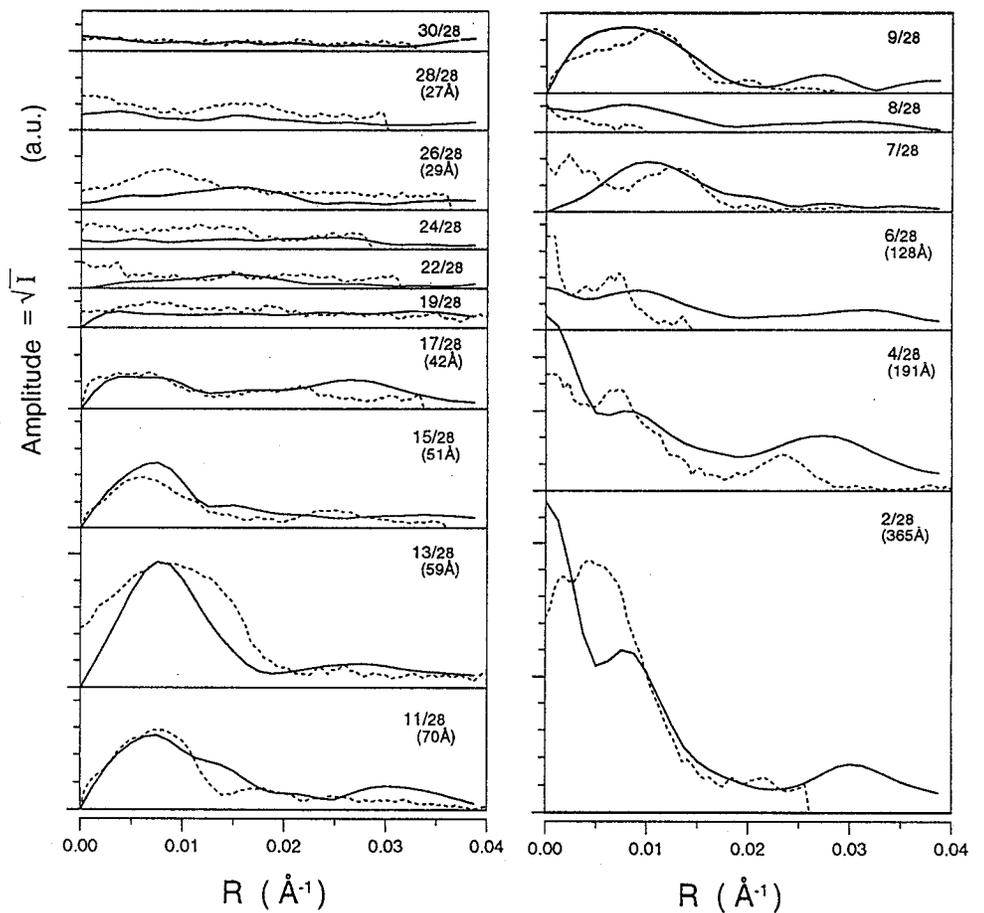
(b)

ミオシン頭部
+ Fアクチン
の最適モデル



(c)

推定した
Raymentモデル



(3) トロポニンのモデル

Flickerら (1982) の電子顕微鏡による単離したトロポニン分子の観察によると、トロポニン I と C の複合体はのびた球状で、長軸が 100 Å 程度の大きさである。それに結合するトロポニン T は長さ約 185 Å (± 25) で尾のような形状でトロポミオシンに長い範囲で結合する。脊椎動物のトロポニン T はキモトリプシンによって Leu157 で切断される N 末端側の T 1 とトロポニン I と結合する側の T 2 に分けられるが、ニワトリの場合では T 2 が大きくなっていることがわかっている (表 3-2)。T 1 フラグメントは coiled-coil を持つ細長いタンパク質であることもわかっている。トロポニン全体では 265 Å (± 40) の長さである (図 1-4)。

これらの情報から、まずトロポニン T は連続的な細長いロープ状に 9 個の球を配列したモデルとした。甲殻類のトロポニンは脊椎動物と比べて分子量が大きい。違うの詳細は不明であるが、ニワトリでの特徴から類推して T 2 の部分を大きく見積もり、末端となる T 1 部分の半径を 10 Å、C + T に結合する T 2 側を 14 Å と変化させた。

TN - I + C 複合体の構造については中性子による小角散乱で形状が調べられている。慣性半径 33.0 Å、粒子内ベクトルの最大長 $d_{\max} = 115$ Å、および電子密度の自己相関関数である $P(r)$ 関数が報告されており、これを満足するようなダンベル型のモデルも提案されている (Olah & Trewella, 1994)。我々の第 1 段階のモデルとして、8 個の球を平らに並べたモデルであらわした。観測されている慣性半径と最大長を実現するためには、モデルは細長く平たくする必要があった。平たくしなければ観測値の慣性半径では d_{\max} が大きくなる。様々な試行錯誤の結果、慣性半径 $R_g = 31$ Å、 $d_{\max} = 124$ Å となる図 3-7 (a) のような平たく細長い配列を採用した。平らな部分に角度をもたせたが、これはアクチンと結合するときなるべく密に結合する可能性を残すためであり、必ずしも必要な特徴ではない。また、TN - T と I の結合様式は不明であり様々な可能性が残っている。

表 3-3 トロポニンの分子量

	C	I	T	(T1 T2)	total	reference
脊椎動物						
ウサギ	17.8k	20.9k	30.5k	(19.0+11.5)	69.0k	
ニワトリ			45.0k	(26.0+19.0)		Ohtsuki(1980)
甲殻類						
カニ	16.0k	30.0k	50.0k		96.0k	Maeda(1978b)
カブトガニ	18.0k	29.0k	59.0k		106.0k	Lehman(1976)

(4) アクチン+トロポニン複合体のモデル

アクチン+トロポニン複合体のモデルではTNの向きと結合部位がパラメータとなる。

まず、弛緩状態において子午軸上に現れる反射はTNに由来すると考えられるので、この反射を説明できるようなTNの配置を求めた。構築したTNの低分解能モデルは、この段階での検討も含めて決定したものである。TN-Tはトロポミオシンにそって結合していると考えられるので、TN-C+Iの部分の配置が問題となる。TN-I+Cの長軸をフィラメント軸から外側に立てるように向けると、第6、8層線の子午軸上の強度が大きくなるうえに59Åと51Åの層線反射の強度を大きく変化させてしまった(図3-7(b))。また、その長軸をフィラメント軸と直角に配置させると、TNの子午軸反射の強度が大きくなり、観測値を説明できなかった。試行錯誤の後に、長軸をフィラメントのらせんに沿わせることで、ほぼ観測強度に近くなった。

次に、このTNモデルを導入した細いフィラメントのモデルで70Å以上の層線反射の変化を調べて、アクチンとTNの相対的な位置関係について調べた。第2章におけるFアクチンのモデルと同様に、59Åと51Åの層線反射のピーク位置が観測値

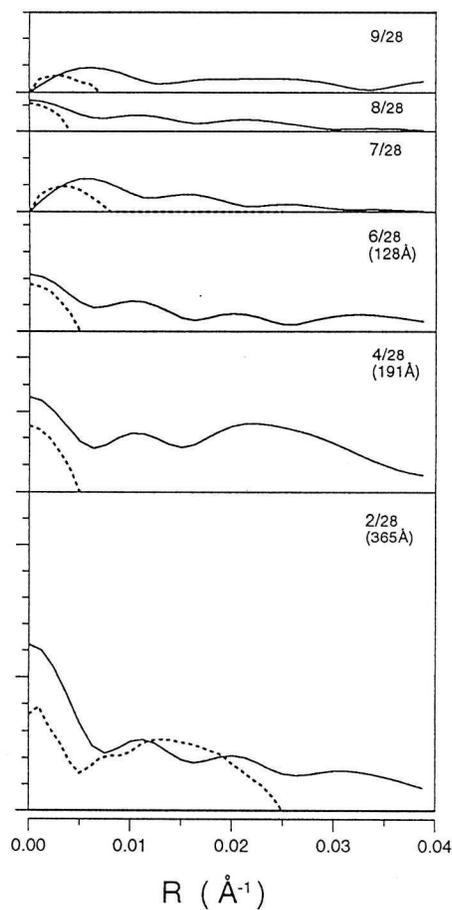
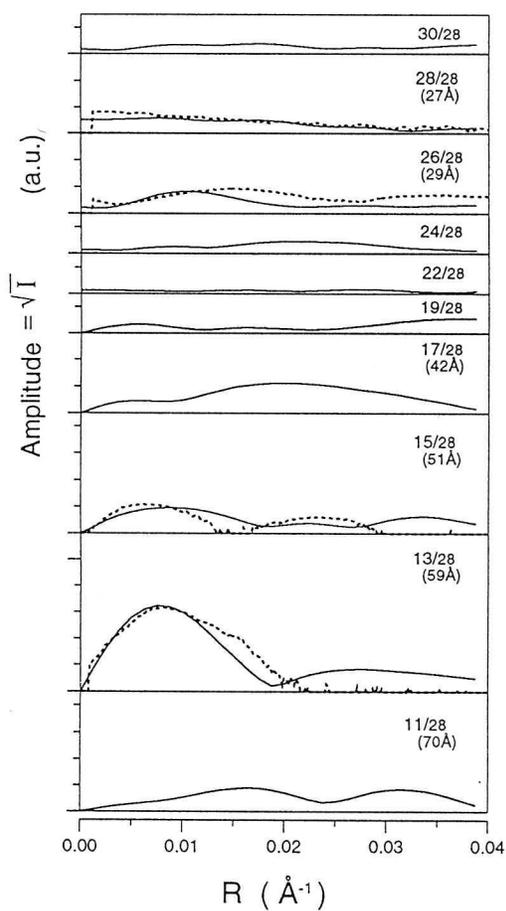
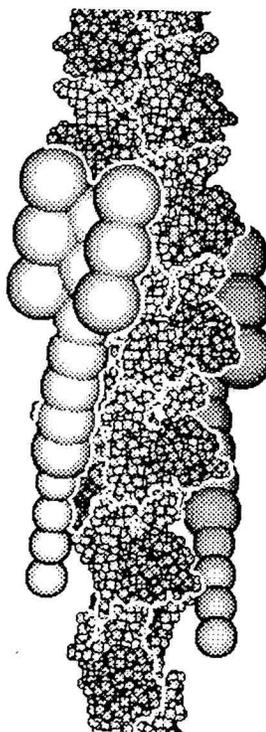
に合っていないことと、トロポニンを含まない筋肉からの回折像ではそのピーク位置が異なることから、トロポニンの構造因子によってそのピーク位置を子午軸方向にシフトさせていると考えられる。それを手がかりにトロポニンの細いフィラメント上の位置を移動して、そのような位置を探索した。その結果、アクチンのC末端側にTN-C+Iを配置させ、繊維軸方向のアクチンとの相対位置を変化させると観測結果を良く説明できる配置があることがわかった。場所によっては、ピークのシフト方向が逆になったり、59Åの反射の強度を下げたりする場合もあった(図3-7(c))。

電子顕微鏡による再構成フィラメントの観察では、トロポニンを含んでいる細いフィラメントと、Fアクチンだけのフィラメントの染色された画像から求めた層線反射では大きな強度の違いは観測されていない。また、3次元再構成像ではトロポニンの成分が認められない場合が多い。このことから、トロポニンは見えにくいような付き方をしていることが予想される。それを考慮して、TN-I+Cの平らな面をアクチンにぴったりつけるような配置のモデルを採用した(図3-7a)。モデルの座標値を表3-4に示した。

図3-7 トロポニンを導入した弛緩状態の細いフィラメントのモデルの層線反射の強度。実線(——)はモデルから計算した強度で、点線が(---)が弛緩状態の観測値である。(a)採用した最適モデル。(b)採用しなかったトロポニンの向きのモデル。(c)採用しなかったトロポニンの配置モデル。

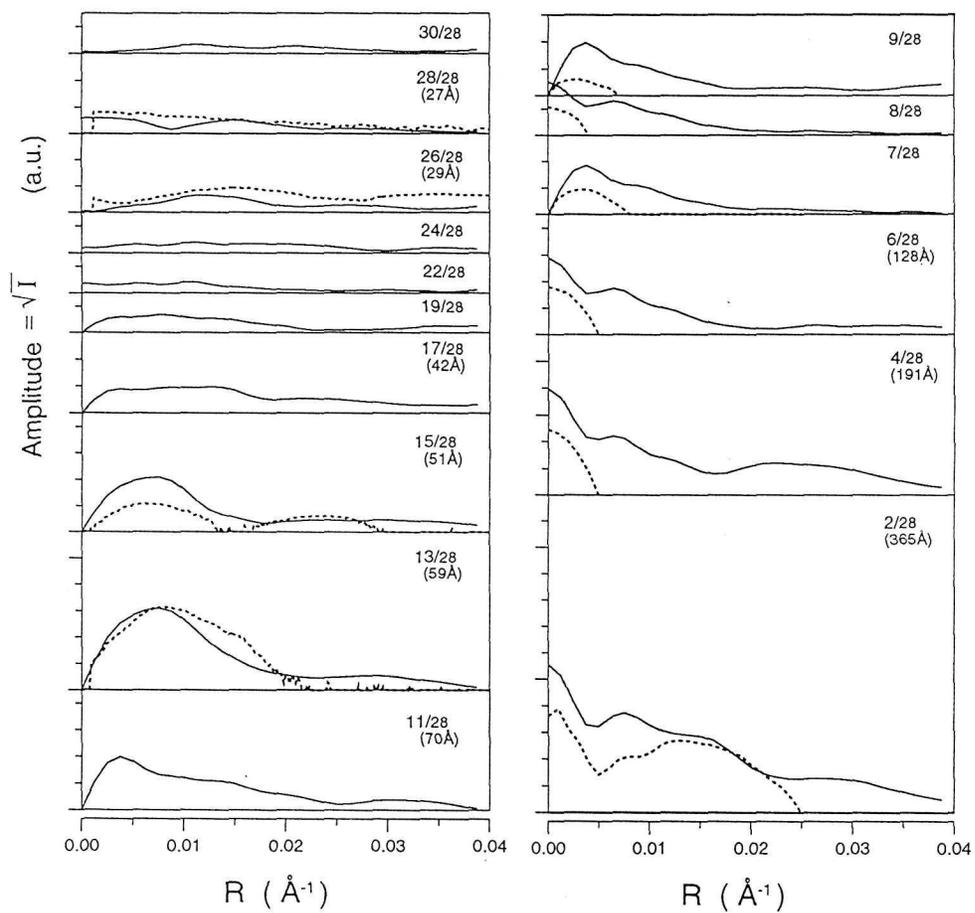
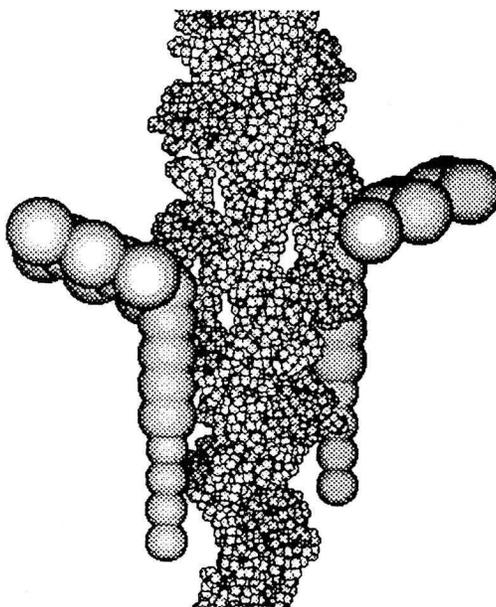
(a)

採用した
Fアクチン+トロポニン
のモデル



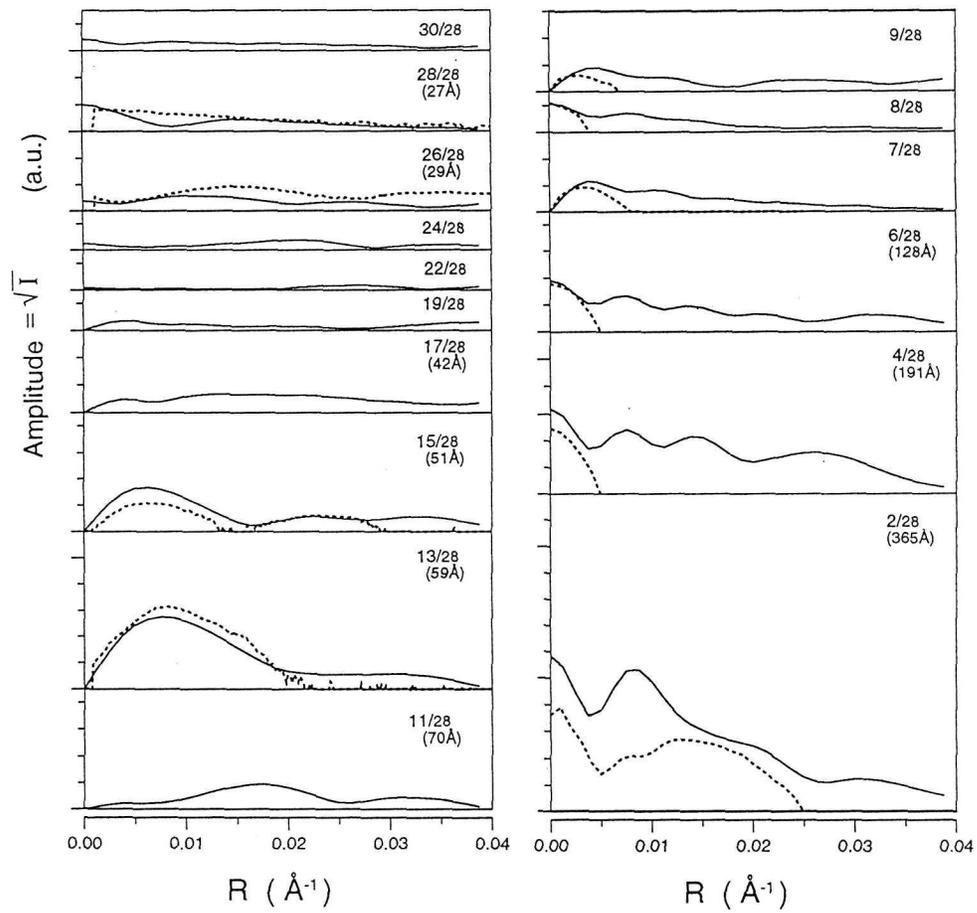
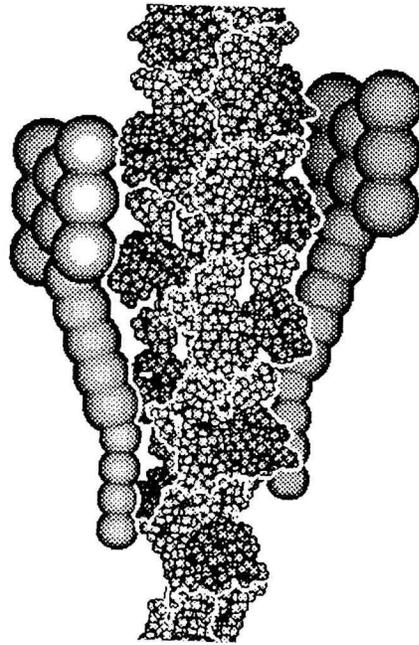
(b)

採用しなかった
Fアクチン+トロポニン
のモデル (#352)



(c)

採用しなかった
Fアクチン+トロポニン
のモデル (#301)



(5) トロポミオシンのモデルの導入

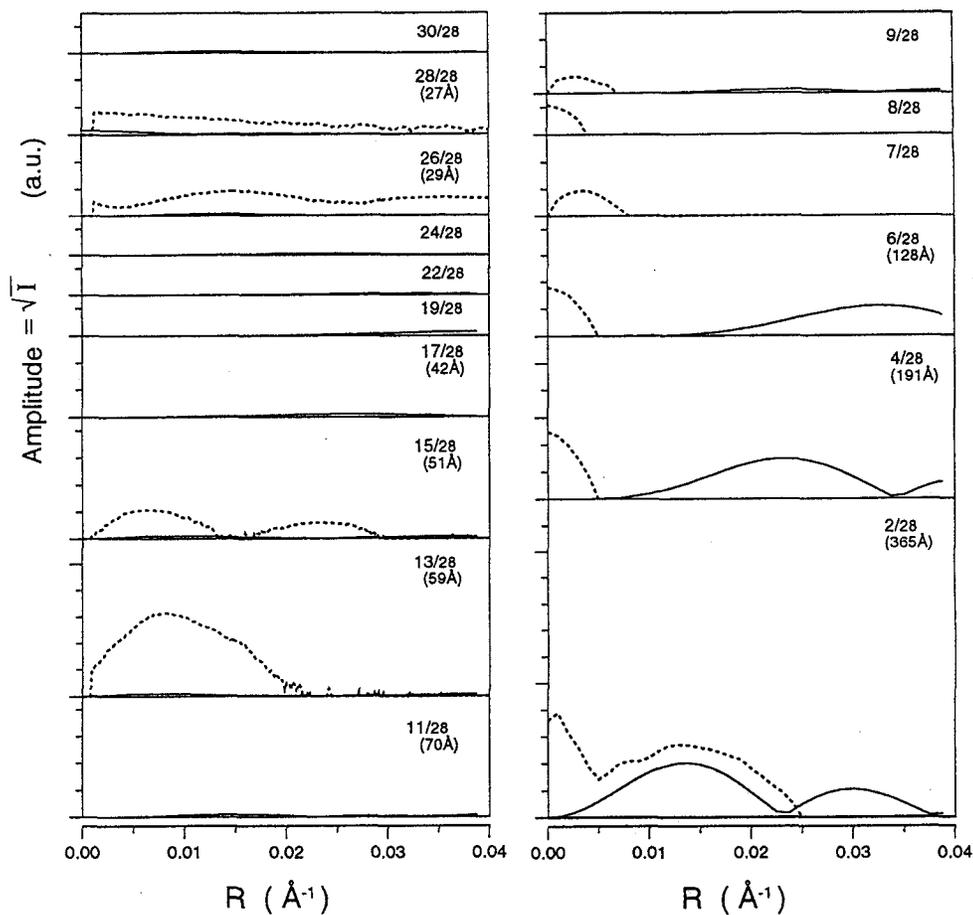
トロポミオシン (TM) は coiled-coil の α -helix 構造であり、Phillips らの結晶構造解析の結果の α 炭素の座標が PDB データベースから利用可能である。第 2 章と同様にして TM のモデルを導入した。アクチンと同じの周期構造を持つ 81 個の α 炭素で表した TM 1 分子の $1/7$ のモデルであり、繰り返すことで連続的な構造をあらわしている。硬直状態での TM の場所については S 1 と結合することから、第 2 章にて得られた収縮状態の場所を採用し、 $r = 35 \text{ \AA}$ 、 $\theta = 110^\circ$ とした。この位置ではミオシン頭部と衝突があり、最適化する余地がある。しかし、TN は TM に結合している必要があるため、その 2 つを同時に変化させる必要がある。低角の反射は今回のモデルのすべてのパラメータが関与するため、X 線データからこれらのパラメータを最適化することは困難であった。

トロポミオシンのモデルから計算した構造因子を図 3-8 (a) に示した。70 \AA 以上の反射では非常に小さいことが確認できた。また、第 3 層線は一致度が良くならなかったが、ここでは TM と TN の構造因子が大きく、トロポニンのモデルをさらに検討する必要があることを示していた。

図 3-9 構築したモデルの構造因子。実線 (—) はモデルから計算した強度で、点線が (---) が観測値である。(a) 連続的な構造で近似したトロポミオシンでは各層線ごとに 1 つの構造因子を持つ。(b) ミオシン頭部の構造因子は各層線に異なるベッセル関数の次数を持つ構造因子の重なりがあるが、それらの絶対値を加算して大きさを示したグラフである。最終的には、各成分ごとに他の構成タンパクの構造因子を加算してから絶対値を加算してモデルの散乱強度を求める。

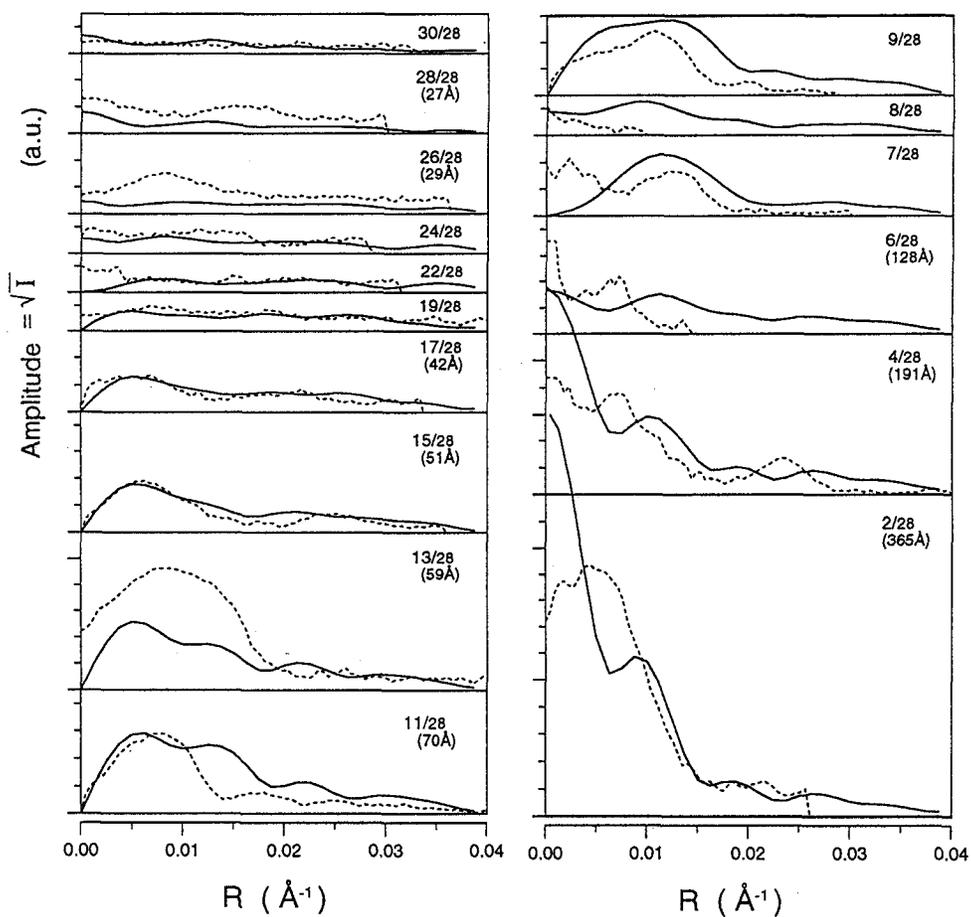
(a)

トロポミオシン



(b)

ミオシン頭部



(5) 硬直状態の細いフィラメントのモデル

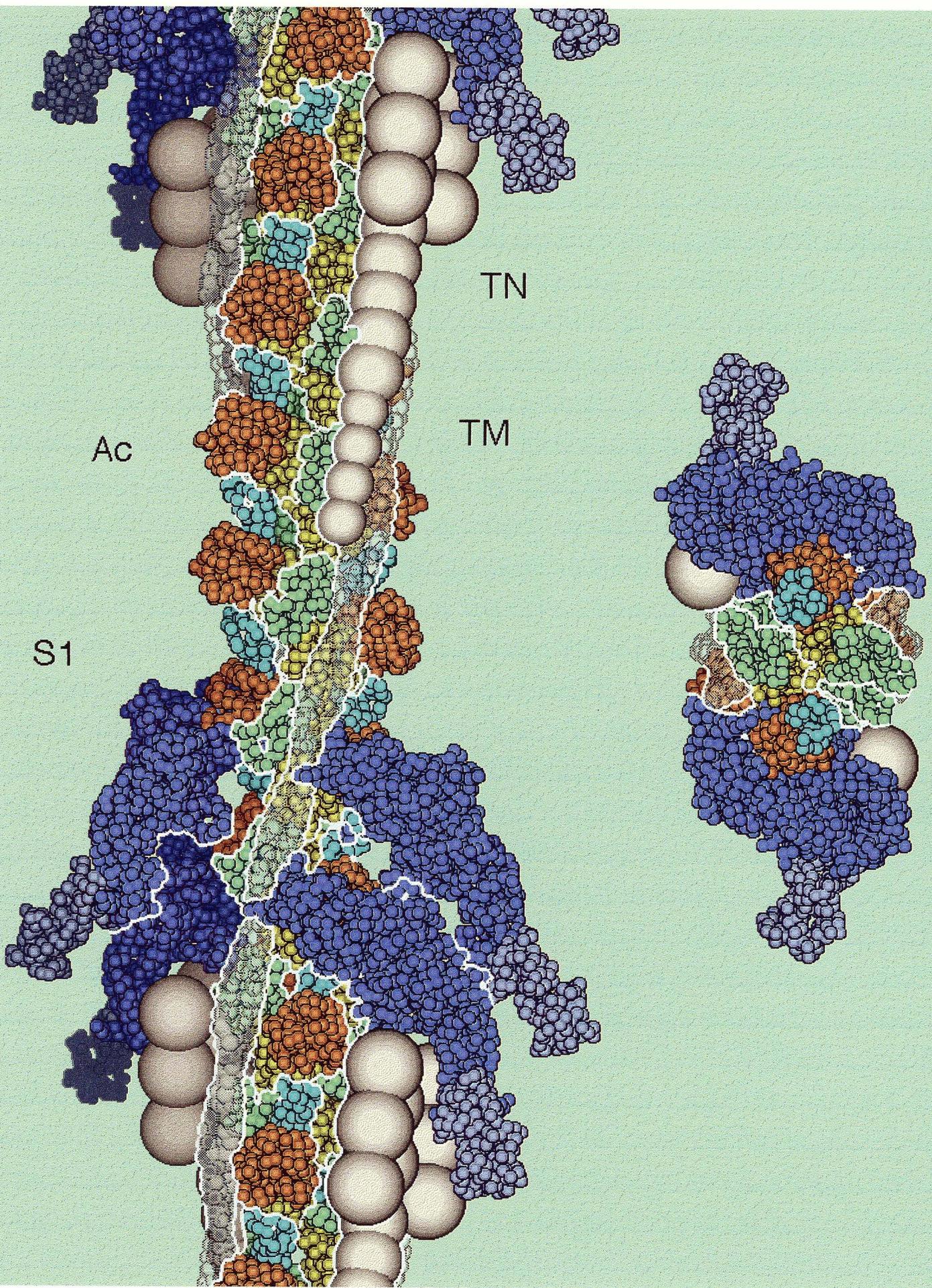
トロポニン (TN) とトロポミオシン (TM) を含んだ細いフィラメントのモデルにミオシン頭部 (S1) を結合させて硬直状態の細いフィラメントのモデルを完成させるには、TNとS1の相対的な位置関係を定める必要がある。すなわち、14個のアクチンからなる単位構造のどこに結合させるかを選択する。

回折像の子午軸上の反射は、繊維軸にそって投影した質量の分布のフーリエ変換をあらわしているが、385 Åの第2層線の強度が他の反射よりも圧倒的に大きい。それは、385 Åの周期を持つTNとS1の投影がお互いに近くに存在していることを示している。

TNとS1の構造因子はそれぞれ図3-7(a)と図3-8(b)に示した様な強度の成分を持つ。それぞれの位置関係によってそれぞれの構造因子の位相が変わり、合成したモデルの散乱強度が変わるので、観測強度に合うように位置関係を求めた。

Nambaらの解析では、細いフィラメントの上下方向性を反対にした2つの可能性があった。今回のモデルにおいては、S1とTNに異方性があるため、その2つのモデルは異なる散乱強度となる。より観測データに合うのは、TN-C+IがS1の尾の方向に位置するモデルで、細いフィラメント中のTNの結合のない部分にS1が結合することになっていた。強度分布については良く説明できなかったが、トロポニンの構造因子に依存するため、これ以上のモデルの改良は難しかった。こうして求めたAc-TN-TM-S1の複合体である硬直状態の細いフィラメントのモデルと強度データを図3-9および図3-10に示した。

図3-10 硬直状態の細いフィラメントのモデル。a炭素を半径2.7Åの球であらわした。S1：ミオシン頭部（青）、TN：トロポニン（桃）、TM：トロポミオシン（白）、Ac：アクチンはドメイン構造に応じた色（1：橙、2：青、3：黄、4：緑）である。左はフィラメントの断面を上から見た図で、2つずつのミオシン頭部とその近傍のトロポニンを表示した。トロポニンはミオシン頭部に隠れている。ミオシン頭部の矢じり部分で計算に含めなかった部分は色を薄く示した。



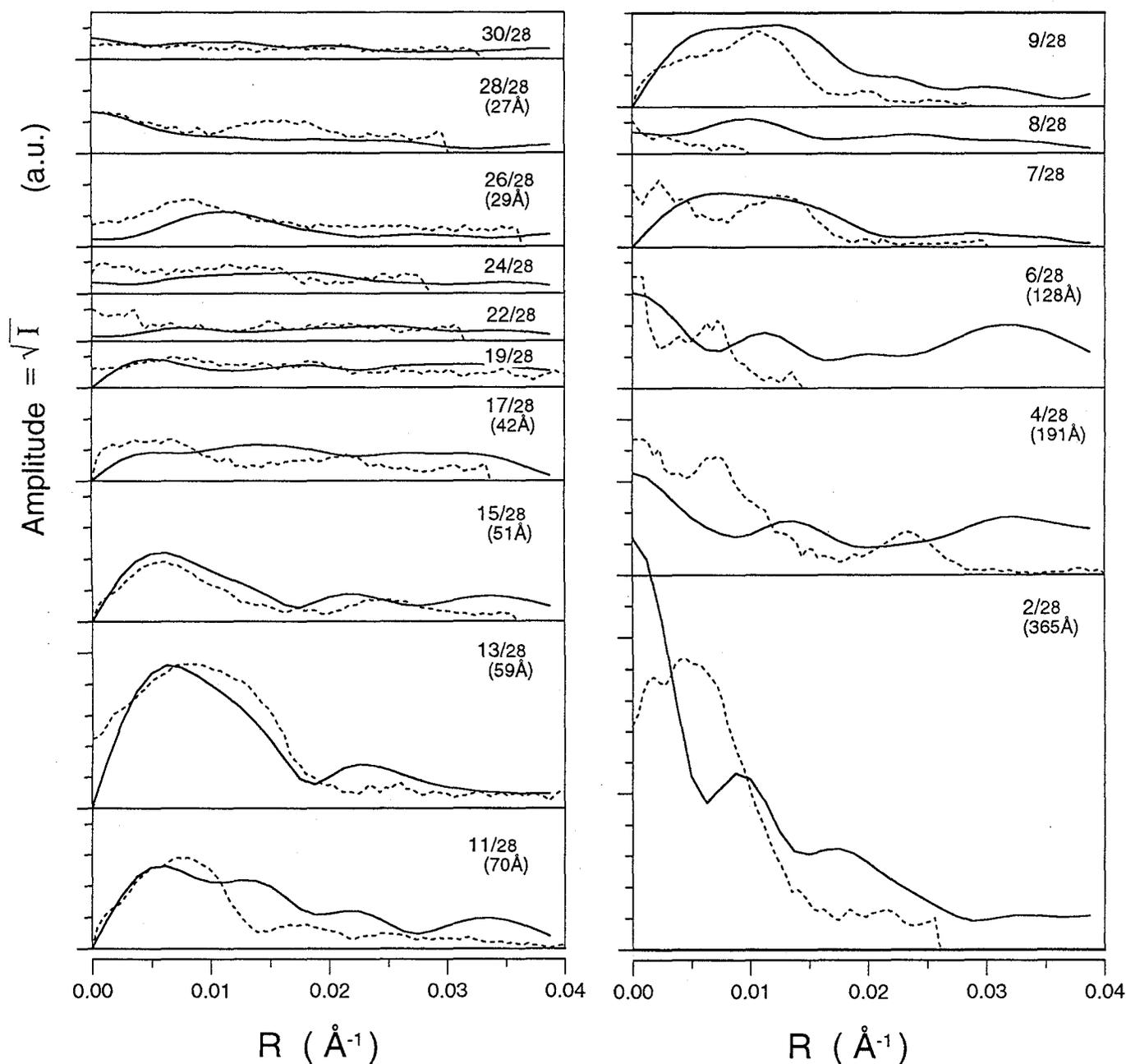


図3-10 硬直状態の細いフィラメントモデルの散乱強度。実線(—)はモデルから計算した強度で、点線(---)が観測値である。第2層線から第6層線の強度分布を観測値に合わせることは難しかった。それ以外は、ほぼ観測データを説明できている。

表 3-4 硬直状態の細いフィラメントモデルのパラメータ

(1) アクチン

Holmesらのモデルの4つのドメインの場所を修正する。PDBデータ(1ATN)から計算するには、Holmesらのマトリックスをかけたのちに平行移動する。

	-0.71034	0.16333	0.68465		-3.77
	-0.58180	-0.68369	-0.44053		131.21
	0.39614	-0.71126	0.58068		-37.97
[domain]	[1]	[2]	[3]	[4]	
	-2.22	-2.41	1.13	-0.27	
	0.94	0.35	-2.35	-5.32	
	0.00	-0.56	-1.57	0.19	

(2) ミオシン頭部

ミオシン頭部S1の最適配置のモデルをPDBデータ(1MYS)から求めるマトリックス。A鎖(Heavy Chain)のAsp4~Val801およびC鎖(Essencial Right Chain)のGlu5~Val149の合計900残基の α 炭素から構造因子を計算した。A鎖のGlu802~Lys843とB鎖(Regulatory Light Chain)全部の172残基は取り除いた。

	-0.520942	0.633636	0.571948		-66.59
	-0.520388	-0.766883	0.375615		43.34
	0.676620	-0.101961	0.729239		-9.82

(3) トロポニン

低分解能のモデルの座標

x	y	z	radius	weight (96kD)
-33.41	21.99	-254.70	10.00	.9
-35.12	19.14	-239.70	10.00	.9
-36.60	16.15	-224.70	10.00	.9
-37.81	13.05	-209.70	10.00	.9
-38.77	9.86	-194.70	14.00	4.4
-39.45	6.60	-179.70	14.00	4.4
-39.86	3.29	-164.70	14.00	4.4
-40.00	-.04	-149.70	14.00	4.4
-39.86	-3.36	-134.70	14.00	4.4
-52.28	12.28	-118.73	16.00	8.8
-47.72	-24.63	-126.67	16.00	8.8
-39.48	-6.43	-110.70	16.00	8.8
-53.07	8.21	-94.73	16.00	8.8
-45.68	-28.24	-102.67	16.00	8.8
-38.87	-9.46	-86.70	16.00	8.8
-53.55	4.09	-70.73	16.00	8.8
-43.36	-31.68	-78.67	16.00	8.8

(4) トロポミオシン

PDBデータ(1TMA)からモデルを求めるマトリックス。A鎖のAsp121~Lys161および、B鎖のAsp121~Arg160の81個の α 炭素に適用する。

	-0.073608	0.636289	-0.767931		-26.67
	-0.879870	-0.403926	-0.250346		-2.25
	-0.469480	0.657251	0.589584		-6.05

4. 議論

(1) アクチンとミオシン頭部の結合様式

Raymentら (1993) によって報告された S 1 に修飾された F アクチンの電子顕微鏡像の 3 次元再構成像ではミオシンの結合が明瞭にあらわれており、Holmes のモデルをフィラメントの中心部に合わせるように配置し、S 1 の原子座標のモデルをフィッティングさせることによって S 1 の結合部位を求めた。我々の X 線の強度データだけから今回のようなモデルのフィッティングによってそれを求めようとする、いくつかの異なる結合の向きでも説明できるモデルが存在した。しかしながら、幾何学的な配置とアクチンの N 末端の近くに結合するという条件を満たすモデルは一つであり、彼らの結果に近いモデルを得た。生体試料を用いた X 線の強度データは位相問題を克服する重原子置換法などの手法が適用できないため、このように構造を決定するといった場合には強力ではない。一方、X 線のデータは電子顕微鏡などと比べて S/N 比が良く再現性も高いという特徴があるので、モデルの最適化などのこれからの研究に重要になってくると考えられる。

ミオシンは通常 2 つのミオシン頭部をもっており、2 つ並んでアクチンと結合する場合は、ミオシンの構造がゆがむことは幾何学的に予想される。今回の解析でもそれを考慮することが必要になっていることが示唆された。

(2) F アクチンの構造

硬直状態でミオシン頭部と結合したアクチンが弛緩状態と異なる構造をとっている可能性は、今回の解析では考えていない。実際は S 1 の結合に伴う構造の変化は十分期待される。その場合は、対称と考えている 14 個のアクチンうちの 4 つが別の構造として扱う必要がある。しかしながら、今回の解析の分解能が 27 Å であり、トロポニンの構造が不確定であることを考えると、S 1 と結合しているアクチンの構造の変化を、今回得られている観測データから得るのは難しいと考えられる。

(3) トロポニンのモデルの妥当性

トロポニンの立体構造とアクチン系系の阻害のメカニズムについては多くはわかっていない。今回構築したトロポニンの立体構造は低分解能であるが、これまでの構造研究の報告をもとにしており、従来考えられていたよりも大きなものである。トロポニンの結合したトロポミオシンの低分解能結晶構造解析では、トロポニンの結合が 1:1 でなかったためにその全体像が明確ではなかったが、トロポニン T が長くのびている事は明らかとなった (White,1986)。アクチンとの結合様式について今回のモデルは、59 Å および 51 Å の強度データを合わせるように求めたが、精密な解析はできていない。トロポニンの立体構造が明らかになると、結合様式を決定することができるかと期待される。

T. Wakabayashi らの報告をはじめとして、これまでの電子顕微鏡写真にはトロポニンがみられない。様々な技術的な進歩に伴って、ごく最近の報告では、トロポニンの存在を示す報告もある (Tayer,1993)。いずれにしても、見えにくい物であることは確かであり、アクチンに薄くついているために見えにくい構造であることのほかに、構造がゆらいでいる可能性が考えられる。X線回折では、電子顕微鏡による解析と比べて S/N 比の良い反射の強度が得られ、弛緩状態においても TN に由来する子午軸反射が得られる。そのため今回の解析ではトロポニンを無視することはできず、何らかのモデルでトロポニンの質量を導入することが不可欠となっている。また、X線回折のデータは平均構造であるので、構造がゆらいでいても平均像を考えなければならない。それらの点で、今回のような低分解能のモデルを改良していくことも必要であろう。

最近、片山 栄作 氏の開発した急速凍結法では、固定した試料の高分解能の電子顕微鏡写真を得ることができるようになった。我々の実験に利用したのと同じカニのグリセリン筋試料を観察した結果を図 3-1 1 に示した。その結果、トロポニンらしいと考えられるものが、太いフィラメントのない I バンド領域の細いフィラメントに認められている。また、ミオシン頭部の結合しているところでは、トロポニンらしいものがみえていないことは、近傍に S 1 が結合することによって見えにくくなっていると考えられる。

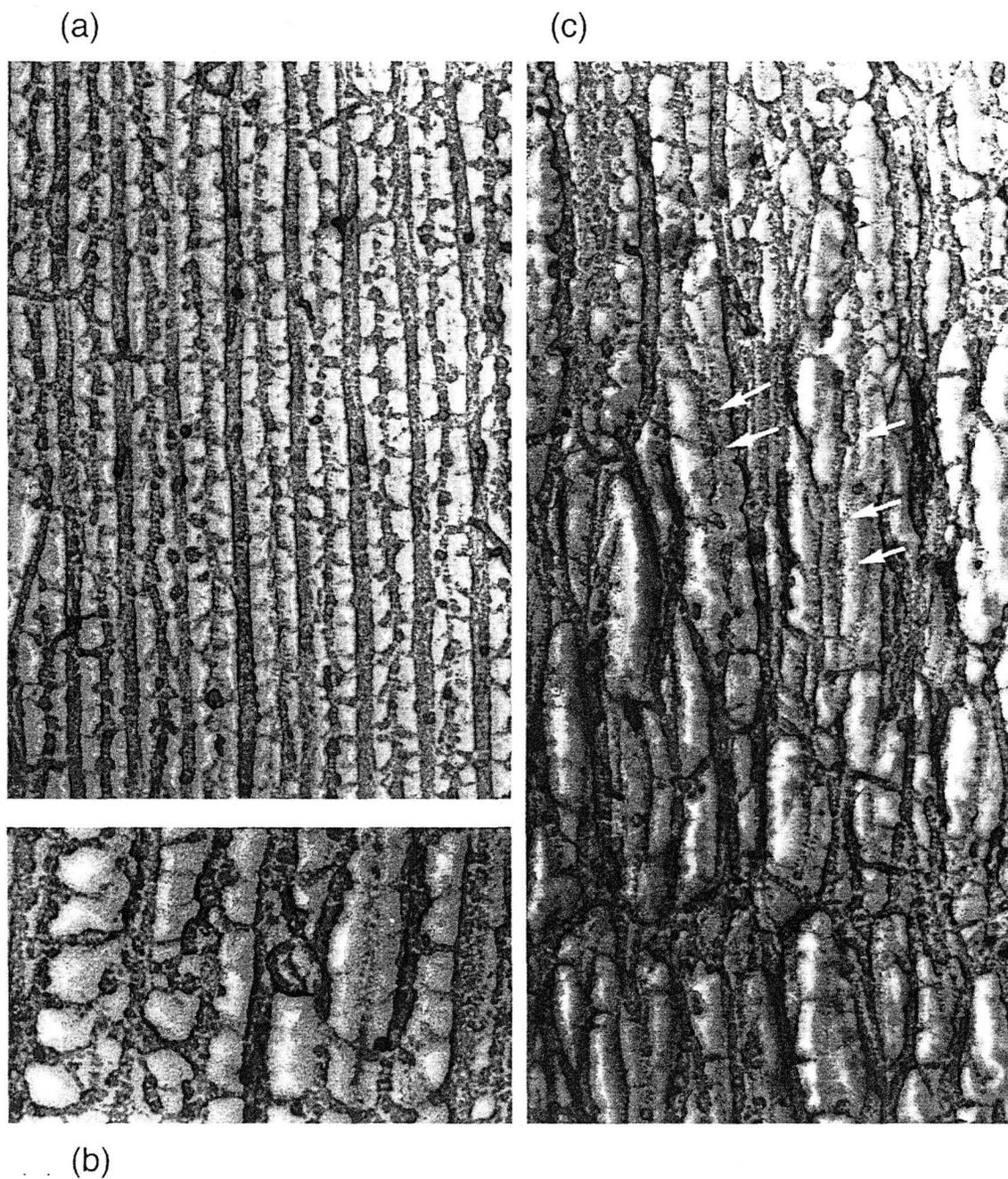


図 3-1 1 freeze-fracture deep-etch replica 法によるカニ横紋筋の電子顕微鏡写真。片山 栄作 氏の撮影による (1995 年 5 月 15 日)。(a) クロスブリッジの周期的な結合が観察される (b) 約 2 倍に拡大するとクロスブリッジでは 2 つのミオシン頭部が並んでいることがわかる。(c) 太いフィラメントとのオーバーラップのない I バンド領域。白の矢印で示したようにトロポニンと考えられるものが所々に見られている。

(4) ミオシン頭部とトロポニンの位置関係

グリセリン処理をした筋肉では、ATPの濃度によって弛緩状態と硬直状態との間を可逆的に移行できることを確認できるが、Ca²⁺存在下でトロポニン-トロポミオシンによってミオシンとの相互作用が阻害されているにも関わらず結合が起こるといふ事実から、比較的阻害の弱いアクチンと反応が始まることが推測される。観測されているX線の強度を良く説明できる今回のモデルでは、トロポニンのない所にミオシンが結合することは、それを裏付けている。また、硬直状態に見られる張力の説明に好都合である。

ATP濃度が減少した時に、何らかの理由によって細いフィラメントと相互作用するミオシン頭部が出現すると考えられている。そのミオシン頭部によって、部分的に活性化状態となった細いフィラメントとATPを獲得したミオシン頭部によって硬直状態の張力が発生すると考えられている。この時、細いフィラメントのなかで、強く阻害されているのがTNの近傍のアクチンであり、ここでミオシン頭部の動きが止められ、その段階でATPを獲得できなかったミオシン頭部が強固な結合を残すことで、硬直状態のミオシン頭部となる。その結果、トロポニンに対して特異的な位置にミオシン頭部があることを説明できる。

昆虫の飛翔筋では、硬直状態のX線回折像に観測される層線反射がトロポニン-トロポミオシンの周期に従っている(Taylor, 1993)。一方、脊椎動物の硬直状態では結合様式が単純ではなく、X線回折像から結合の対称性を解釈することも容易でない。そのため、ミオシン頭部の結合周期がトロポニンに支配されているかどうかは不明であるが、Squireは(1994)太いフィラメントと細いフィラメントの立体的な配置が結合様式を支配する大きな要因であると報告している。今回解析したカニのX線回折像を説明するためには、トロポニンに対して特異的な場所にミオシン頭部が結合している必要があった。

5. 結論

カニ硬直状態のX線回折像の強度分布を良く説明するアクチン-トロポミオシン-トロポニン-ミオシン頭部S1の複合体である硬直状態の細いフィラメントのモデルを構築した。モデルは結晶解析によって決定された原子座標に基づいているが、トロポニンについては様々な構造研究の情報から求めた低分解能の形状モデルを推定してモデルに導入した。その結果、

- ・ミオシン頭部がアクチンのN末端付近に結合するモデルは一意に決めることはできなかったが、電子顕微鏡の3次元再構成像による結果に近いモデルを得ることができた。
- ・トロポニンC+Iの複合体は、平たく細長い形状であると推定された。その長軸を細いフィラメントに沿うように結合することで観測X線強度を良く説明できた。
- ・トロポニン全体では細いフィラメント上に配列するアクチンの4/7以上に接するように配置し、トロポニンのないところにミオシン頭部が結合し、そのZ膜側にトロポニンC+Iが位置することが示唆された。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、ご指導いただきました若林克三 助教授に深く感謝いたします。柳田 俊雄 教授、葛西 道生 教授ならびに村上 富士夫 教授には論文審査におけるご指導のみならず、研究を続ける過程で何度か激励をしていただきましたことを深くお礼申し上げます。

松下電産株式会社国際研究所 難波啓一 博士には解析方法とプログラムの利用についてのご指導の他、数々の有用な議論をしていただきました。

大阪大学理学部 荒田敏昭 先生には硬直状態について有用な議論をしていただきました。

東京大学医科学研究所 片山栄作 先生にはカニ横紋筋の電子顕微鏡写真を撮影していただきました。

Dr. Michael Lorenzからは、最適化したFアクチンモデルの座標データを利用させていただきました。

高エネルギー研究所における共同実験では、大阪大学基礎工学部生物工学科 生物物理研究室 武澤康範 氏、岩本俊英 氏、ならびに高エネルギー研究所 雨宮慶幸 助教授、帝京大学医学部 小林孝和 先生、帝京平成短期大学 田中秀洋 教授にご協力いただきました。

生物物理研究室 杉本泰伸 氏にはデータ処理プログラムの作成や、ミオシン頭部の低分解能モデル作成に協力していただきました。

カニ硬直筋のX線回折実験とデータ処理は生物物理研究室 廣島道夫 氏の卒業論文の一部として共同して進めていただきました。

帝人株式会社システム技術研究所 所長 河西昭男 様および株式会社帝人システムテクノロジー・サイエンスシステム部 村井 俊彰 様、村上 武 様、南昌美 様には、研究に関するご理解とご協力をいただきました。

財団法人吉田育英会からは奨学金のご援助をいただきました。

このほかにも大阪大学基礎工学部生物工学科の方々、関連する方々の多大なご協力をいただきました。謹んで感謝申し上げます。

参考文献

- AL-Khayat, H. A., Yagi, N. & Squire, J. M. (1995) Structural changes in actin-tropomyosin during muscle regulation: computer modeling of low-angle x-ray diffraction data. *J.Mol.Biol.* **252**, 611-632.
- Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, H., Ueno, Y., & Miyahara, J. (1987). Laser-stimulated luminescence used to measure x-ray diffraction of a contracting striated muscle. *Science* **237**, 164-168.
- Flicker, P. F., Phillips Jr., G. N. & Cohen, C. (1982). Troponin and its interaction with tropomyosin. An electron microscope study. *J.Mol.Biol.* **162**, 495-501.
- Herzberg, O. & James, M. N. G. (1988). Refined crystal structure of troponin C from turkey skeletal muscle at 2.0 angstroms resolution. *J.Mol.Biol.* **203**, 761-779.
- Holmes, K. C. Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49.
- Huxley, H. E. (1972). Structural changes in actin and myosin containing filaments during contraction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **37**, 361-376.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F & Holmes K. C. (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**, 37-44.
- Klug, A., Crick, F. H. C. & Wyckoff, H. W. (1958). Diffraction by helical structures. *Acta Crystallography* **11**, 199-213.
- Kress, M., Huxley, H. E., Faruqi, A. R. & Hendrix, J. (1986). Structural changes during activation of frog muscle studied by time-resolved x-ray diffraction. *J.Mol.Biol.* **188**, 325-342.
- Langridge, R., Marvin, D. A., Seeds, W. E., & Wilson, H. R. (1960). The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. *J.Mol.Biol.* **2**, 38-64.
- Lehman, W., Regenstein, J. M. & Ransom, A. L. (1976). The stoichiometry of the components of arthropod thin filaments. *Biochemica et Biophysics Acta* **434**, 215-222.
- Leavis, P. C., & Gergely, J. (1984). Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **16**, 235-305.

- Lorenz, M., Popp, D., & Holmes, K. C. (1993a). Refinement of the F-actin model against x-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J.Mol.Biol.* **234**, 826-836.
- Lorenz, M. & Holmes, K. C. (1993b). Computer processing and analysis of x-ray fibre diffraction data. *J.Appl.Cryst.* **26**, 82-91.
- Lorenz, M., Poole, K. J. V., Popp, D., Rosenbaum, G. & Holmes, K. C. (1995). An atomic model of the unregulated thin filament obtained by x-ray fiber diffraction on oriented actin-tropomyosin gels. *J.Mol.Biol.* **246**, 108-119.
- Miki, M., O'Donoghue, S. I. & Dos Remedios, C. G. (1993). Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J.Mus.Res.Cell Motility* **13**, 132-145.
- Maeda, Y. (1978). Birefringence of Oriented Thin Filaments in the I-bands of crab striated muscle and comparison with the flow birefringence of reconstituted thin filaments. *Eur. J. Biochem.* **90**, 113-121.
- Maeda, Y. (1978b). Optical and x-ray diffraction studies on crab striated muscle. *Ph.D Thesis*, Nagoya University.
- Maeda, Y., Popp, D. & McLaughlin, S. M. (1988). Cause of change in the thin filament-associated reflections on activation of frog muscle — myosin binding or conformation change of actin. in *Molecular Mechanism of Muscle Contraction* (Sugi, H. & Pollack, G. H. eds.), pp.381-390, Plenum Press, New York and London.
- Mendelson, R. A. & Morris, E. (1994), The structure of F-actin: results of global searches using data from electron microscopy and x-ray crystallography. *J.Mol.Biol.* **240**, 138-154.
- Nakagawa, T. & Oyanagi, Y. (1980). Program system SALS for nonlinear least-square fitting in experimental sciences, in *Recent Development in Statistical inference and Data Analysis* (Matsubara, K. eds.), North-Holland publishing Co.
- Namba, K., Wakabayashi, K. & Mitsui, T. (1980). X-ray structure analysis of the thin filament of crab striated muscle in the rigor state. *J.Mol.Biol.* **138**, 1-26.
- Namba, K. & Stubbs, G. (1987). Difference fourier syntheses in fiber diffraction. *Acta Crystallography* (1987) **A43**, 553-539.
- Ohtsuki, I. (1980). Functional organization of the troponin-tropomyosin system. in *Muscle*

- Contraction: Its Regulatory Mechanisms* (Ebashi, S. et al., eds.) , pp. 237-249, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Orlova, A. & Egelman, E. H. (1993). A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament. *J.Mol.Biol.* **232**, 334-341.
- White, S. P., Cohen, C. & Phillips Jr., G. N., (1987). Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* **325**, 826-827.
- Olah, G. A. & Trewhella, J. (1994). A model structure of the muscle protein complex $4Ca^{2+}$ - Troponin C - Troponin I derived from small-angle scattering data: Implications for regulation. *Biochemistry* (1994), **33**, 12800-12806.
- Parry, D. A. D. & Squire, J. M. (1973). Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of the x-ray diffraction patterns for relaxed and contracting muscles. *J.Mol.Biol.* **75**, 33-35.
- Phillips Jr., G. N., Fillers, J. P. & Cohen, C. (1986). Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J.Mol.Biol.* **192**, 111-131.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelman, D. A., Wesenberg, G. & Holden, H. M. (1993). Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* **261**, 50-58.
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C. & Milligan, R. A. (1993b). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58-65.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C. & Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature*, **365**, 810-816.
- Squire, J. M. & Harford, J. J. (1988). Actin filament organization and myosin head labelling patterns in vertebrate skeletal muscles in the rigor and weak binding states. *J.Mus.Res.Cell Motility* **9**, 344-358.
- Tajima, Y., Kamiya, K. & Seto, T. (1983). X-ray structure analysis of thin filament of molluscan smooth muscle in the living relaxed state. *Biophysical Journal.* **43**, 335-343.
- Taylor, K. A., Reedy, M. C., Reedy, M. K., & Crowther, R. A. (1993). Crossbridges in the complete unit cell of rigor insect flight muscle imaged by three dimensional reconstruction from oblique sections. *J.Mol.Biol.* **233**, 86-108.

- Ueno, Y. & Wakabayashi, K. (1994) Modeling structural changes of the muscle thin filaments during an isometric contraction. in *Synchrotron Radiation in the Biosciences* (Chance et. al. eds.), pp. 443-450, Clarendon Press .
- Wakabayashi, K., Tanaka, H., Amemiya, Y., Fujishima, A., Kobayashi, T., Hamanaka, T., Sugi, H. & Mitsui, T. (1985) Time-resolved x-ray diffraction studies on the intensity changes of the 5.9 nm and 5.1 nm actin layer lines from frog skeletal muscle during an isometric tetanus using synchrotron radiation. *Biophysical Journal*. **47**, 847-850.
- Wakabayashi, K., Tanaka, H., H., Saito, H., Moriwaki, N., Ueno, Y., & Amemiya, Y. (1991). Dynamic x-ray diffraction of skeletal muscle contraction+ structural change of actin filaments. *Advances in Biophysics*. **27**, 3-13.
- Wakabayashi, K., Tokunaga, M., Kouno, I., Sugimoto, Y., Hamanaka, T., Takezawa, Y. Wakabayashi, T. & Amemiya, Y. (1992). Small-angle synchrotron x-ray scattering reveals distinct shape changes of the Myosin head during hydrolysis of ATP. *Science* **258**, 443-447.
- Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Tanaka, H., Ueno, Y., Takezawa, Y. & Amemiya, Y. (1994). X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophysical Journal*. **67**, 2422-2435.
- Wakabayashi, T. Huxley, H. E., Amos, L. A. & Klug, A. (1975). Three-dimensional image reconstruction of actin - tropomyosin complex and actin - tropomyosin - troponin T -troponin I complex. *J. Mol. Biol.* **93**, 477-497.
- Haselgrobe, J. C., (1972). X-ray evidence for a conformational change in actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. *J.Mol.Biol.* **92**, 139-144.
- Yagi, N. & Matsubara, I. (1989). Structural changes in the thin filament during activation studied by x-ray diffraction of highly stretched skeletal muscle. *J.Mol.Biol.* **208**, 359-363.
- Yanagida, T. & Osawa, F. (1980). Conformational changes of F-actin - ϵ -ADP in thin filaments in myosin-free muscle fibers induced by Ca^{2+} . *J.Mol.Biol.* **140**, 313-320.
- Zot, A.S., & Potter, J. D. (1987). Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **16**, 535-559.

上野 豊、若林 克三 (1987).” イメージングプレートによる筋肉のX線回折像（繊維
 図形）のデータ処理” 大阪大学蛋白質研究所「結晶解析センターだより」
 No. 8, pp.3-12.

前田 雄一郎、八木 直人、松原 一郎 (1977).” 筋肉の細いフィラメントの構造とその
 変化” 生物物理（日本生物物理学会） Vol.17, No.2, pp.96-108.

参考論文

1. Ueno, Y., Wakabayashi, K., Amemiya, Y., Tanaka, H. & Miyahara, J.
"Two-dimensional x-ray diffraction patterns from contracting frog skeletal muscles recorded by imaging plates. II. The cylindrically symmetrical difference patterson function calculated by using intensity data of actin layer lines"
Photon Factory Activity Report #4 (1986) pp.304.
2. Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, H., Ueno, Y. & Miyahara, J.
"Laser-stimulated luminescence used to measure x-ray diffraction of a contracting striated muscle"
Science **237** (1987) 164-168.
3. Wakabayashi, K., Ueno, Y., Amemiya, Y. & Tanaka, H.
"An interpretation of the intensity changes in the actin-based layer lines from a frog muscle during isometric contraction"
Journal of Muscle Research and Cell Motility **8** (1987) 276.
4. 上野 豊、若林 克三、" イメージングプレートによる筋肉のX線回折像（繊維図形）のデータ処理"、大阪大学蛋白質研究所「結晶解析センターだより」No.8 (1987) pp.3-12.
5. Wakabayashi, K., Ueno, Y., Amemiya, Y. & Tanaka, H.
"Intensity changes of actin-based layer lines from frog skeletal muscles during an isometric contraction"
in Molecular Mechanism of Muscle Contraction (Sugi, H. & Pollack, G.H. eds., Plenum Publishing Co.) (1988) pp.353-367.
6. Wakabayashi, K., Ueno, Y., Nishimura, K., Tanaka, H. & Amemiya, Y.
"Change in the small-angle x-ray diffuse scattering from frog skeletal muscle during an isometric contraction"
Journal of Muscle Research and Cell Motility **10** (1989) 255.
7. Wakabayashi, K., Tanaka, H., Saito, H., Moriwaki, N., Ueno, Y. & Amemiya, Y.
"Dynamic x-ray diffraction of skeletal muscle contraction: structural change of actin filaments"

Advances in Biophysics (Kotani, M. ed., Japan Scientific Societies Press), 27
(1991) 3-13.

8. Wakabayashi, K., Saito, H., Ueno, Y., Kobayashi, T. & Tanaka, H.
"Spacing changes of the thin filaments from live frog skeletal muscle during an isometric contraction"
Journal of Muscle Research and Cell Motility 14 (1993) 360.
9. Ueno, Y., Moriwaki, N. & Wakabayashi, K.
"Modelling structural changes of the muscle thin filaments during an isometric contraction"
in Synchrotron Radiation in the Biosciences (Chance, B. et al. eds., Oxford University Press) (1994) pp.443-450.
10. Wakabayashi, K., Sugimoto, Y., Tanaka, H., Ueno, Y., Takezawa, Y. & Amemiya, Y.
"X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction"
Biophysical Journal 67 (1994) 2422-2435.
11. Ueno, Y., Wakabayashi, K., Takezawa, Y., Kobayashi, T. & Tanaka, H.
"Medium-angle x-ray diffraction studies of live frog skeletal muscle during isometric contraction"
Photon Factory Activity Report #13 (1995) *in press*.
12. Ueno, Y., Takezawa, Y., Iwamoto, S. & Wakabayashi, K.
"Structural change of F-actin in muscle thin filament during an isometric contraction analyzed from x-ray diffraction."
(in preparation)