

ガス雰囲気試料室による生きたミオシンフィラメントにおける ミオシン頭部の ATP に対する運動の電子顕微鏡下の研究 II. 骨格筋ミオシン頭部の ATP 加水分解と共役した 運動機構の解明

帝京大学医学部名誉教授 杉 晴夫

要 旨

本誌前号で、筆者は電子顕微鏡下に生きた〈水溶液中で生理機能を保持した〉生体高分子試料の動的構造変化を可能とするガス雰囲気試料室(gas environmental chamber, EC)の我が国における開発と、この装置を使用した筆者らのミオシン・パラミオシン複合フィラメント上のミオシン分子頭部の、ATP に対する運動の電顕下の可視化と記録の成功について説明した。今回は筆者の定年退職後の日本電子株式会社における EC による筋収縮機構研究の奇跡的な再開と、多くの研究協力者を得て、筆者が念願としてきた脊椎動物骨格筋ミオシンフィラメント上のミオシン頭部の ATP 加水分解と共役した運動機構に関する貴重な結果を得るに至る経過を、エピソードを交えつつ経時的に述べてみたい。

1. 脊椎動物骨格筋の筋フィラメントと筋フィラメント格子の構造

筆者らがミオシン頭部の ATP に対する運動の記録に成功したのは、取り扱いの容易なミオシン・パラミオシン複合フィラメントであった[1]。このため、生きたフィラメント試料上のミオシン頭部の運動の電子顕微鏡下の可視化と記録の独創性と先駆性は、Hugh Huxley 氏、Andrew Huxley 氏など何人かの大家には高く評価されたものの、筆者らの実験試料が、筋収縮研究者の主要な研究対象である脊椎動物骨格筋のミオシンフィラメントとかけ離れていたため、広く一般の筋肉研究者

の興味を引くには至らなかった。筆者は勿論このことを予期しており、1997 年の PNAS 誌への論文発表後、直ちに脊椎動物(ウサギ)骨格筋のミオシンフィラメントを研究対象とした予備実験を開始した。骨格筋から得られる native ミオシンフィラメントは、1 万倍の電子顕微鏡倍率で研究するにはそのサイズ(長さ、約 1.6 μ m; 中央部の直径、約 20nm)が小さく、また既に述べたように curl する性質があり、研究に適さない。従って筆者らは、筋肉から抽出したミオシン分子を低イオン強度下で長時間かけて重合させ、研究に適した合成ミオシンフィラメントを製作した。図 1 にこのような合成ミオシンフィラメント(この場合ミオシン分子尾部 light meromyosin のみから成る)の電顕写真を示す。フィラメントは紡錘型で、中央部の両側でフィラメント構造の極性が逆転している。後で述べるように、実験にはミオシン分子〈頭部 heavy meromyosin と尾部 light meromyosin の双方から成る〉とミオシン分子尾部を 1:1 で混合した合成フィラメントを実験に用いた。

図 2 はミオシン分子 (A)、ミオシンフィラメント (B)、アクチンフィラメント (C)、及び筋節 (D) の構造の模式図である。ミオシンフィラメントは、まず 2 個のミオシン分子が互いに尾部で結合して反平行に並び、ついでその両側に次々とミオシン分子が配列してミオシンフィラメントを形成する。この際、ミオシン分子の尾部(light meromyosin, LMM)は束となってフィラメントの軸となり、ミオシン分子の頭部 (heavy mero-



図1. ウサギ骨格筋から抽出したミオシン分子を重合させて製作した紡錘型の合成ミオシンフィラメントの電顕写真

myosin, HMM)は側方に突き出ている。このようなミオシン分子の重合様式により、ミオシンフィラメントの中央部にはミオシン分子頭部のないbare region (またはbare zone)があり、このbare regionの両側でミオシン分子頭部の側方に突き出る方向(極性)は逆になる。またミオシンフィラメントの直径は中央部で最大で、両端にゆくに従って直径が減少する紡錘型となる。これらのミオシンフィラメントの形状の特徴は、図1の合成フィラメントでも明らかに観察される。

筆者らは、予備実験で作製した合成ミオシンフィラメントの形状が紡錘型で、中央部で極性が逆転する双極性構造を持つことに満足し、このフィラメントを実験試料として、複合フィラメントでは得られなかった、bare region 両側でのミオシン頭部の運動方向の逆転が記録されるに違いないと、実験意欲を掻き立てられた。しかし残念なことに、この時点で筆者の研究条件が変化し、以後筆者が勤務先を定年退職する約5年間、ECを使用する実験は休止せざるを得なくなった。

2. 日本電子株式会社のご好意による研究再開のいきさつ

2004年の筆者の勤務先定年退職に際し、日本電子株式会社、江藤輝一社長、日本大学深見章教授らのご配慮により、ECを含む筆者らの研究装置一式を都下昭島市の日本電子株式会社開発館に移

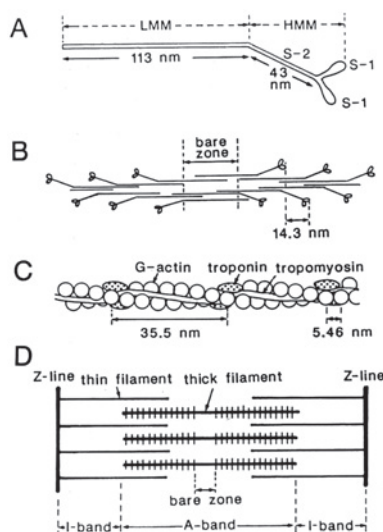


図2. ミオシン分子(A)、ミオシンフィラメント(B)、アクチンフィラメント(C)及び筋節(D)の構造の模式図 [2]。

転し、研究の拠点として頂けることとなり、筆者はこのご好意を有り難くお受けすることとした(図3)。残念なことに深見教授はその後間もなく逝去された。現在の筆者らの研究の進展を深見教授にご報告し、喜んでいただけないのは痛恨の極みである。

しかし既に筆者の教室員は、筆者の講座の消滅に伴いすべて他大学に勤務しており、新たな研究拠点で研究を行うことは不可能であった。筆者の念願とする研究の再開は挫折するかと思われた。しかし思いがけないことに、日本電子株式会社営業部の伊東秀博氏から、東京農工大学応用物理学科の准教授、箕田宏喜さんが筆者らの論文 [1] を読まれ、更に伊東氏から筆者が農工大から距離的に比較的近い場所に研究装置一式を移動させたことを知り、筆者に共同研究を申し込まれたのである。筆者は喜んでこの申し出を受け、以後約2年間の準備期間を経て、箕田氏とその研究室の大学院生諸君により、ECを使用する研究体制ができあがった。この間、電顕及びECの操作、炭素絶縁薄膜の製作などは日本電子株式会社、福島研究員に指導していただいた。なお、深見、江藤、福島



図3. 筆者の研究装置の日本電子への移設が決まった際の会合。左より江藤社長、伊東営業課長、深見教授、筆者

の諸氏はいずれもかつて日大深見研究室で炭素薄膜を使用する EC の開発に関わられた同窓生である。

さて箕田研究室の方々によって EC を使用する体制が整いつつあった頃、今ひとつの問題は、研究に使用するミオシンフィラメントを定期的に製作し、EC 実験の現場に供給してくれる研究室が是非必要なことであった。筆者が研究室を持っていた時代は、EC 実験に必要なすべての準備は教室員の分担により行われていたが、今や筆者は研究費の申請もままならない一介の定年退職者に過ぎない。しかしこの問題は、東京大学農学生命科学研究科の田之倉優教授が筆者のお願いを快諾してくださったことで解決した。田之倉教授は現職に就任される以前、順天堂大学医学部及び大分医科大学の生理学教室に勤務し、筋収縮に関する論文を多数発表されており、筆者の共同研究者として最も相応しい方である。

このようにして幸運にも、筆者、箕田研究室(図4)、田之倉研究室(図5)の間の研究協力体制が出来上がり、これに筆者の教室出身の芝浦工業大学小林孝和教授、日本大学茶園茂教授、筆者と多くの共同研究を行ってきた鶴見大学三枝木泰丈教授、および東京大学新領域創生科学研究科杉浦清了教授などが適時協力して頂けることになった。

なお、上記の体制を作るに際し、早稲田大学木



図4. 箕田研究室のメンバーの方々。左より岡部達弘、筆者、箕田弘喜、稲吉悠里



図5. 田之倉研究室のメンバーの方々。左より田之倉優、宮川卓也、宮内由美子、筆者。

下一彦教授、東京大学片山栄作教授には物心両面のご援助をいただいた。さらに脱線を承知で書かせていただくと、東京医科歯科大学故勝木保次教授がよく筆者に『杉さん、以前に随分世話をしあげたつもりでも、お返しをしてくれる人などまじないものですよ』と言っておられたことを思い出す。木下、片山両氏はこの稀な人々に属する貴重な方々であった。

3. 脊椎動物骨格筋ミオシンフィラメントの実験

3.1 ATP 非存在下でのミオシン頭部の位置の安定性

多くの方々のご好意により EC による研究体制が整ったので、筆者らはかねての念願であった脊椎動物骨格筋ミオシンフィラメント上のミオシン頭部の、ATP に対する運動記録の実験を開始した。

実験試料は、ウサギ骨格筋から抽出したミオシ

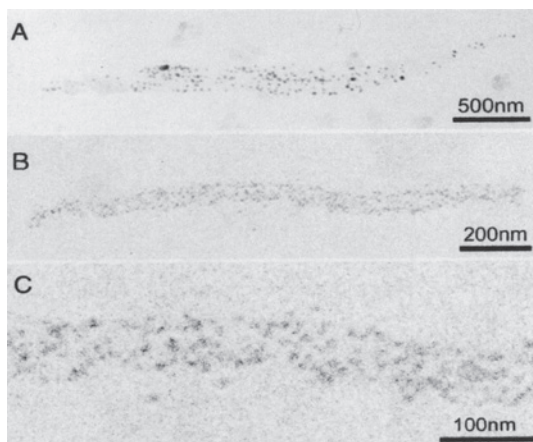


図6. (A, B) 紡錘形合成ミオシンフィラメントのイメージングプレート (IP) 画像, (C) ミオシンフィラメントの拡大 IP 画像. フィラメント上に多数のミオシン頭部標識金粒子が見られる [3].

ン分子とミオシン分子尾部 (LMM) を 1:1 で混合した myosin-myosin rod copolymer である. 既に筆者らの行った予備実験により, この合成ミオシンフィラメントは紡錘形 (長さ, 1-3mm; 中央部の直径, 50-250nm) で, また中央で極性が逆転する双極性であることが明らかになっていた. 図6はEC中にマウントした無染色の紡錘形ミオシンフィラメントの典型的なIP像である. フィラメント上に多数のミオシン頭部標識金粒子がみられる. この双極性ミオシンフィラメントにより, 筆者の念願であるフィラメント bare region の両側でのミオシン頭部の運動方向に逆転が起こるか否かの疑問には明確な答えが得られることが期待された.

図7に, ATP非存在下で5-10分の間隔で記録した2個のIP記録を重ね合わせ, 個々の金粒子の重心位置の変化を調べた結果を示す. 図7Aに見られるように, 2個のIP記録での個々の金粒子 (従って個々のミオシン頭部の位置) は, 時間とともに殆ど変化せず一定であった. また図7Bのヒストグラムが示すように, 130個の金粒子のうち93個は位置の変化が2.5nmあるいはそれ以下で, IPのpixel size (2.5×2.5nm) からみて有意差はなかった. 以上の結果は, 1997年の筆者らの使用し

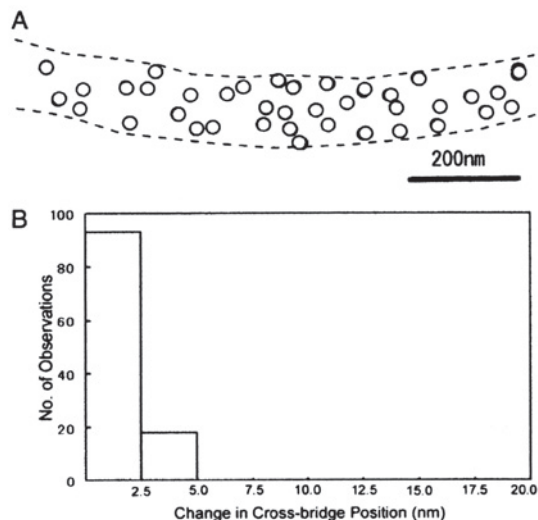


図7. (A) ATP非存在下に同一のフィラメント像を2回記録し, IP座標軸上で各々の金粒子重心位置の変化を比較した結果. 金粒子重心を中心に直径20nmの円を描いてある. ○が1番目の, ●が2番目の記録. (B) 個々の金粒子の重心位置の変化のヒストグラム [3].

たミオシン-パラミオシン複合フィラメント [1]と同様に, 今回使用した合成ミオシンフィラメントでも, (1) フィラメント本体は炭素絶縁薄膜上に安定に固定されており, また(2) 個々のミオシン頭部の熱運動は安定した平行位置を中心として起こるため, 時間平均 (IPの露出時間, 0.18s) したミオシン頭部位置は時間と共に殆ど変化せず安定に保たれることが分かった.

なお, 本実験のミオシン合成フィラメントは互いに集まって凝集する傾向が著しく, 当初は個々のフィラメントの観察が困難であったが, 観察を続けるうち, 凝集したフィラメントの外側に紡錘形のフィラメントが見出せるようになり, 実験結果が得られるようになった.

3.2 ミオシン頭部のATPに対する運動の振幅の測定

合成ミオシンフィラメントのミオシン頭部の位置が時間と共に変化せず安定であること (図8) から, 筆者らは1997年の研究 [1]と同様に, 同一のフィラメント像をATP投与前とATP電極へ

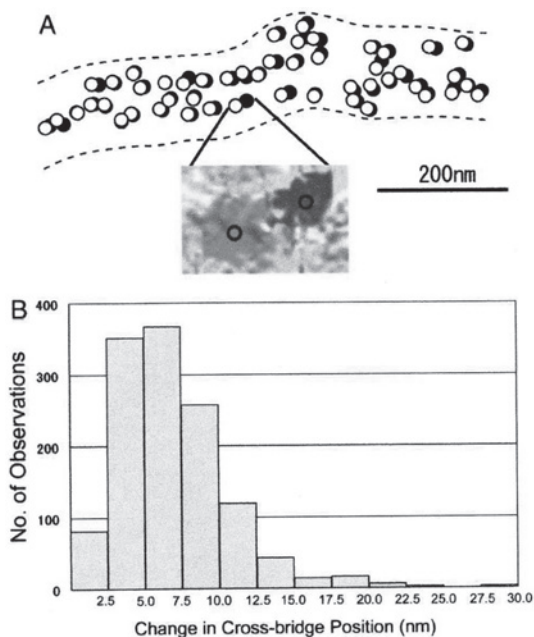


図8. (A) ATP 投与前 (○) 及び投与後 (●) の個々のミオシン頭部の位置の変化. Inset に特定の金粒子の ATP 投与前後の IP 記録像 (各々の重心位置を円で示す). (B) ミオシン頭部の ATP に対する運動の振幅のヒストグラム [3].

の通流開始後に記録し、フィラメント上の金粒子 (つまりミオシン頭部) の位置変化を測定し、ATP に対するミオシン頭部の運動の方向及び振幅を求めた。

結果を図8に要約する。倍率1万倍の電顕視野にフィラメント中央部の bare region が含まれない時、フィラメント上のミオシン頭部の ATP に対する運動は常にフィラメント長軸にはほぼ平行で一方のみ (unidirectional) におこった (図8A)。またミオシン頭部の運動の振幅のヒストグラムは5-7.5nm にピークがあり (図8B)、IP の pixel size (2.5×2.5nm) 以下の0-2.5nm の値を除外した振幅の平均値は $6.5 \pm 3.7\text{nm}$ (mean $\pm$ SD, $n=1,210$) であった。この値は、筋収縮時にミオシン頭部がアクチンフィラメントと結合してフィラメント間の滑りをおこすパワーstrokeの振幅の間接的な推定値 (5-10nm) [4] の範囲内である。

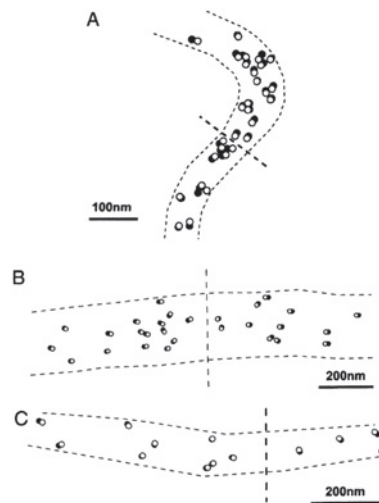


図9. 骨格筋ミオシンフィラメント bare region の両側における、ATP に対するミオシン頭部の運動の IP 記録例。○は ATP 投与前、●は ATP 投与後のミオシン頭部の位置を示す。ミオシン頭部が bare region (フィラメントと直交する破線) から遠ざかる方向に動くことに注意 [3]。

3.3 ミオシンフィラメント bare region 両側でのミオシン頭部運動方向の逆転

更に筆者らは努力の末、フィラメント中央部 bare region の両側での、ATP に対するミオシン頭部の運動記録に成功した。図9に見られるように、ミオシン頭部の運動方向は bare region の両側で逆転しており、いずれも bare region から遠ざかる方向におこった。この結果は筆者が1978年以來念願としてきたものであり、20 数年を経て遂に念願どおりの結果が得られたのである。

筆者らの実験はアクチンフィラメント非存在下に行われている。したがってミオシン-パラミオシン複合フィラメントの実験 [1] と同様に、記録されたミオシン頭部の運動は、ミオシン頭部 (M) が ATP と結合しこれを加水分解して長寿命の反応中間体を形成する反応、 $M + \text{ATP} \rightarrow M \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ にともなって起こるものである。つまり IP に記録される ATP 投与後のミオシン頭部の位置は反応中間体の位置に相当し、従ってこの運動は、ミオシン頭部のパワーstrokeに先行するリカバリースtrok に他ならない。

Dear Professor Sugi,

Detailed Experimental Results

I fully appreciate that these are extraordinarily difficult experiments to do, especially in your circumstances, and I fully believe that you are seeing a real phenomenon and a very interesting one. You deserve great commendation for pressing on and getting the system to work. I think the most convincing evidence is of course in Figure 5, showing clear reversal of the direction of movement on either side of what is presumably the midpoint of the myosin filament.

I really do think it is a superb piece of work and a triumph in the face of great experimental difficulties.

With best wishes, and hoping you are well,

Best Regards

Hugh Huxley

図 10 左. Hugh Huxley から筆者宛てのメール (2008 年) の抜粋.

筆者は論文発表に先立ち, 上記の実験結果を London の National Institute for Medical Research (D. Trentham 教授), University College London (R. Woledge 教授, M. Ferenczi 氏, D. Luther 氏, N. Curtin 氏), Berlin の Max-Delbruck 研究所 (I. Morano 教授) 等で講演し, いずれも [You visualized the myosin head recovery stroke. Congratulations !] との賛辞を得た. また Hugh Huxley 氏は筆者の論文原稿を読んだ後, 以下のように筆者らの (逆境にも拘わらず) 達成した成果を賞賛してくれた (図 10 左).

更にアクトミオシン ATPase の水溶液中での反応を研究し, 現在広く教科書にも引用される Lymn-Taylor scheme の発見者, Edwin Taylor 教授も, 論文発表後, 筆者のミオシン頭部運動の振幅測定に対し賛辞を与えてくれた (図 10 右).

3.4 ATP に対するミオシン頭部の運動の可逆性

更に筆者らは, 同一のミオシンフィラメント IP 像を (1) ATP 投与前, (2) ATP 投与後ばかりでなく, (3) 投与した ATP が分解され消失した後, にも記録し, ミオシン頭部の ATP に対する運動が可逆的であるか否かを検討した. (3) の記録は, ATP 投与のための ATP 電極への通流完了後 5 分, あるいは実験液中で ATP の scavenger として働く hexokinase, D-glucose の存在下では通流

送信者: <ewt1@uchicago.edu>
宛先: <sugi@kyf.biglobe.ne.jp>
送信日時: 2008年11月19日 4:54
件名: Myosin filament paper

Dear Prof. Sugi

Thank you for sending me a copy of this very interesting paper. It is perhaps of interest that you obtain 7 to 8 nm for the movement. This might agree with inference from Lombardi of sliding of 6 to 7 nm (recent Cell paper) although you state that your value may be an under estimate. I think there has been too much emphasis in trying to make the stroke come out to 10 nm to fit crystal structure results.

Regards

Edwin Taylor

図 10 右. Edwin Taylor 教授からの筆者宛てのメール (2008).

完了後 2-3 分後におこなった [6].

上記方法はよって調べた金粒子の位置の経時的変化を, 9 例の実験 (a-f) について図 11 にまとめて示す. a-f の各々の IP 記録に於ける色をつけた正方形は, 金粒子の重心位置を含む pixel (2.5×2.5 nm) の IP 画像に於ける位置の変化を示している. 灰色の pixel は ATP 投与前, 黒色の pixel は ATP 投与後, 白の pixel は投与された ATP の消失後の, pixel の IP 画像中の位置を示す. なお, 記録の順序は矢印で示されている.

ミオシン頭部の ATP に対する運動の振幅が 5-10nm の場合 (記録 A, B, C, I) には, ATP の消失と共に金粒子重心位置はほぼ正確に ATP 投与前の位置にもどった. つまりミオシン頭部の運動は可逆的であった. 一方ミオシン頭部の運動の振幅がこれより大きい場合には, ATP 消失後ミオシン頭部の位置は ATP 投与前の位置にむかって戻るが, 可逆性はやや不完全であった.

筋線維中の筋フィラメント格子の三次元構造によるミオシン頭部の運動に対する制約 [5] からみて, ミオシン頭部の運動の振幅のヒストグラム (図 8B) に見られる, 12.5nm 以上のミオシン頭部運動の振幅は生理的収縮機構とは無関係であり, 合成ミオシンフィラメントの不規則的な構造による, ミオシン分子サブフラグメント 2 (myosin S-2) の短縮による可能性が考えられる. この点について

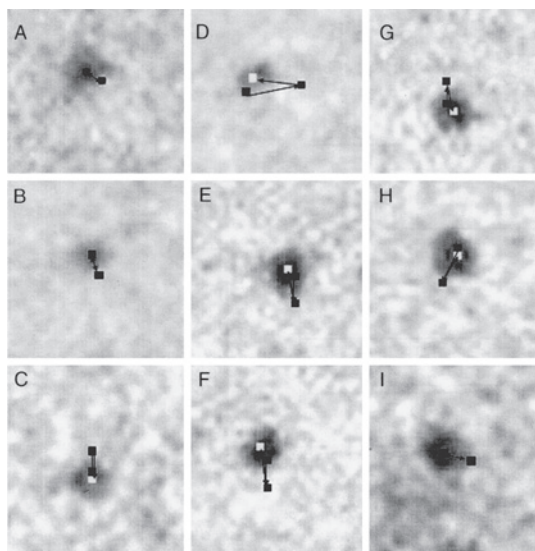


図 11. ATP に対するミオシン頭部の運動の可逆性. フレーム A-I 中の正方形 (2.5×2.5nm) は金粒子の重心を含む pixel の位置を示す. 灰色の pixel は ATP 投与前, 黒色の pixel は ATP 投与後, 白色の pixel は ATP 消失後の pixel 位置を表す [2].

はこれ以上立ち入らないことにする.

3.5 得られた結果の解釈

図 12 は一般に受け入れられているミオシンフィラメントから突き出たミオシン頭部とアクチンフィラメント間の結合・解離サイクル [6] の模式図である. まずミオシンと ATP の反応中間体 $M \cdot ADP \cdot Pi$ がアクチンフィラメント (A) と結合し (図 12A), ついで ATP の加水分解産物 Pi と ADP を放出しつつパワーストロークをおこなう. このパワーストロークの際, ミオシン頭部はミオシンフィラメント中央の bare region に向かって運動する (図 12A→B). パワーストロークを完了したミオシン頭部 M はアクチンフィラメント A と硬直 (rigor) 結合し AM となる (図 12B).

硬直結合中のミオシン頭部 AM が別な ATP 分子と結合すると, $AM + ATP \rightarrow A + M \cdot ATP$ の反応により ATP と結合したミオシン頭部は $M \cdot ATP$ となってアクチンフィラメントから解離する (図 12C).

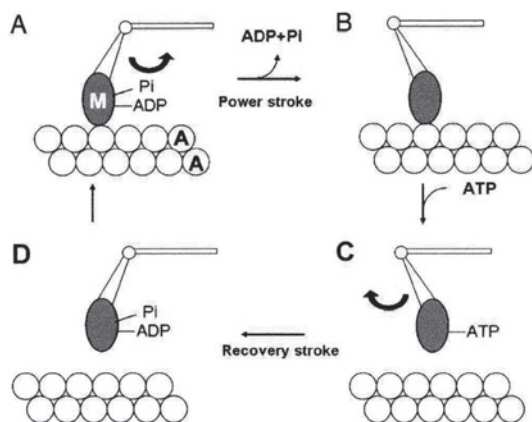


図 12. ミオシンフィラメントから突き出たミオシン頭部 (M) とアクチンフィラメント (A) 間の結合・解離サイクルの模式図. 説明は本文参照 [3].

筆者らの実験系はアクチンフィラメントを含まないので, 上記の模式図の上部の A→B の状態は実験の対象外で, ミオシン頭部の C 及び D の状態が筆者らの実験に対応する. まず ATP 投与前のミオシン頭部の状態 (C) は, それがパワーストロークを打ち終わった直後の状態 (post-power stroke state) に対応すると考えることにする. この考えに従えば, ATP 投与後, ミオシン頭部はまず ATP と結合して $M \cdot ATP$ となり (図 12C), ついで ATP を加水分解して長寿命の反応中間体 $M \cdot ADP \cdot Pi$ となる際, パワーストロークとは振幅が等しく, 方向が反対のリカバリストロークを行って (図 12D) パワーストローク以前の状態にもどる. つまり筆者らの記録した ATP に対するミオシン頭部の運動は図 12 の模式図の下半分 (図 12C→D) に対応している.

もし以上の筆者らの結果の解釈が正しければ, 図 11 に見られるミオシン頭部運動の可逆性は, 反応中間体 $M \cdot ADP \cdot Pi$ から ATP の加水分解産物 Pi と ADP が放出されれば, ミオシン頭部はアクチンフィラメントが存在しなくても, 図 12 の模式図の上半分の経路 (図 12A→B) を経由して ATP 投与前の状態 (図 12B) に戻ることが強く示唆される. つまりミオシンフィラメント上のミオシン頭部は, たとえアクチンフィラメント非存在

下でも、ATPと反応してミオシン頭部とアクチンフィラメント間の結合・解離サイクルと同様な状態変化を繰り返し得ると考えられる。

実は筆者らは最近、アクチンフィラメント存在下でのミオシン頭部のパワーストロークの記録に成功し以上の考えの正しさが支持されつつある。

3.6 論文の発表と国外の研究者の反応

以上説明した脊椎動物骨格筋のミオシンフィラメント上のミオシン頭部のATP加水分解に伴う運動は、ミオシン頭部のリカバリーストロークを電顕下に初めて可視化し記録したものとして国外の研究者から高く評価され、Hugh Huxleyの紹介により“Direct demonstration of the cross-bridge recovery stroke in muscle thick filaments in aqueous solution by using the hydration chamber”という表題でProc. Natl. Acad. Sci. USA誌に2008年発表された[3]。

この際何人かの国外査読者のこの研究に対する評価を知る機会があった。まず筋肉生理学者と思われる査読者は概してこの論文に好意的でpioneering workと賞賛してくれた。一方、筋ミオシンフィラメント構造のX線回折や、ミオシン頭部をアクチンフィラメントと結合させたacto-S1 complexの静的構造のヌクレオチド依存性変化などの研究者からは、筆者らの研究について多くの疑義が提出された。しかしこれらの疑義は、彼らの研究が試料の多数のミオシン頭部のサンプリングから得られる平均値であり、かつ静的なデータであるのに対し、筆者らの研究はそれまでだれも為しえなかった、生きた筋フィラメント上の個々のミオシン頭部の動的な運動に関する貴重なデータであり、全く質的に次元が違うのである。筆者はHugh Huxleyの忠告もあり、これらの構造学者の検討はずれと思われる疑義にも論文上では丁寧に応じた。しかしここでは、このような応酬については省略する。

現在でも筆者が国外で講演すると、しばしば筋構造学者から筋フィラメントの静的、平均的構造のorder-disorder transitionとの関係について（次元が違い、従ってかみ合わない）質問を受ける。筆者は、「我々のデータがあなたがたのデータと調

和しないように見えるのは、我々の研究試料があなたがたのそれよりも遥かに生きた筋肉に近いからである」と答えることにしている。しかし筆者のこの態度は筋肉構造学者の筆者に対する反感を増大させていたようで、このことは次に説明する研究結果発表の際に思い知らされることになった。

4. ミオシン頭部の運動のレバーアーム仮説の検証

4.1 ミオシン頭部の運動のレバーアーム仮説

Andrew HuxleyとSimmonsが1971年に提唱したHuxley-Simmons収縮模型[7]は、ミオシン分子頭部がアクチンフィラメントに対する結合角度を変化させることが筋フィラメント間の滑りを起こす原動力とするものであった[7](図13)。しかし、このミオシン頭部の回転はX線回折では検出されず、現在はミオシン頭部の回転は起こらず、ミオシン頭部とミオシンフィラメントを繋ぐ構造がレバーアームのように働いてミオシン頭部をアクチンフィラメントと平行に動かすことが、筋フィラメント間のすべりの原動力と考えられる。このレバーアーム仮説が一般に受け入れられ、広く教科書にも記載されている(図14)。

この仮説の根拠は動的な実験に基づくものではなく、ミオシン分子から分離したミオシン頭部(ミオシンサブフラグメント1)をアクチンフィラメントに結合させ、このacto-S1複合体の静的構造の、ミオシン頭部に結合するATPとその分解産物に依存する変化を調べた結果により考え出されたものである。実際にはATPを静的構造の研究に使用することは不可能なので、ミオシン頭部に種々の無機化合物を結合させたものを、M・ATPやM・ADP・Piなどの構造になぞらえるのである。率直に言えば、ジグソーパズルをやっているようなものである。この結果、アクチンフィラメントと結合したミオシン頭部がATPを加水分解する際、ミオシン頭部の尾部の角度が二通りに変化(ON状態とOFF状態)することが示唆される。これがレバーアーム仮説の根拠である[8](図15)。

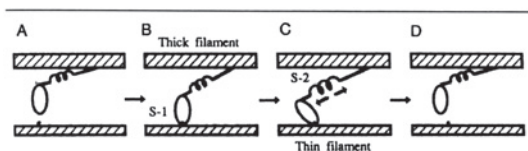


図 13. Huxley-Simmons 収縮模型. ミオシンフィラメントから突き出たミオシン頭部 (S1) が、まずアクチンフィラメントと結合し (A → B)、アクチンフィラメントに対する結合角度を変えて筋フィラメント間の滑りを起こした後、アクチンフィラメントから解離する (C → D) [9].

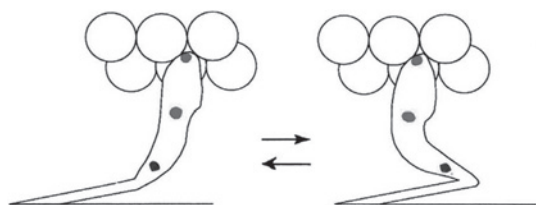


図 14. ミオシン頭部のレバーアーム仮説. ミオシン頭部のアクチンフィラメントに対する結合角度は変化せず、筋フィラメント間の滑りはミオシン頭部とミオシンフィラメントを結合する部分のレバーアーム状の運動により起こる [8].

この仮説の提唱に至るまでには、アクチンモノマーやミオシン頭部の静的構造の解明が不可欠であった、これらの結晶の作製に至るまでには、結晶学者の長年にわたる努力があり、彼らの信念「構造の解明がその物質の機能の解明に直結する」は理解できる。しかしミオシンフィラメントから分離されたミオシン頭部の尾部の動きが、実際にミオシンフィラメントから突出したミオシン頭部でも起こるであろうか。更にこの尾部の動きが、大きな加重下での筋フィラメント間の滑りを起こすに十分なトルクを発生しうるのであるか。

これらの疑問の解決に近づく最も直接的な方法は、筆者らがミオシンフィラメントから突き出たミオシン頭部の運動の可視化と記録に成功した EC システムを使用して、ミオシン頭部のレバーアーム仮説の当否を検証することである。このためには、個々のミオシン頭部の種々の部位を標識する必要がある。



図 15. アクチンフィラメント (上部) と結合したミオシン頭部 (S1) (下部) の ON 状態 (左) と OFF 状態 (右). 右と左で S1 の尾部のアクチンフィラメントに対する角度が異なる [10].

4.2 個々のミオシン頭部の異なった部位の抗体による標識

図 16 に示すように、ミオシン分子から分離したミオシン頭部 (ミオシンサブフラグメント 1) は以下の三つの領域 (domain) に分けられる。(1) Catalytic domain (CAD) : この domain はミオシン頭部の先端部で、アクチンフィラメント結合部位と ATP 結合部位を含む。この domain の構造は rigid で、変形を起こさないと考えられている。(2) Converter domain (CD) : この小さな domain は flexible な構造を持つと考えられている。(3) lever arm domain (LD) : この domain はミオシン頭部の末端部で、ミオシンサブフラグメント 2 を介してミオシンフィラメントに繋がっている。

筆者らはミオシン頭部の三つの domain を、以下の 3 種類のモノクローナル抗体により金粒子標識した。(1) 抗体 1 : 筆者らがこれまでミオシン頭部の標識に使用してきたもので、catalytic domain 中の 50K と 20K ミオシン重鎖セグメントを連絡するペプチドに対する抗体である。(2) 抗体 2 : converter domain 中の反応性の高いリジン残基に対する抗体である。(3) 抗体 3 : lever arm domain 中の調節軽鎖 (regulatory light chain) の二つのペプチドに対する抗体である。これら三種の抗体のミオシン頭部への結合部位を、図 16 中にそれぞれ 1, 2, 3 および 3' で示す。

これらの抗体のうち抗体 1 と抗体 2 は、既に須

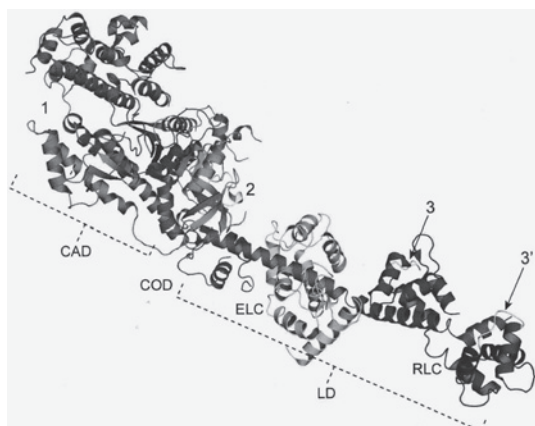


図 16. ミオシン頭部の構造. 説明は本文参照 [12].

藤ら [11] によって作製されており, 抗体 3 は筆者らが新に作製したものである. 図 17A, B, C は三種の抗体 (IgG) のミオシン分子への結合を示す電顕写真である. 抗体 1 と抗体 2 はそれぞれミオシン分子の膨らんだ頭部 (catalytic domain) の先端 (図 17A), 及びその基部 (converter domain) (図 17B) に結合することが分かる. 一方, 抗体 3 はミオシン分子の catalytic domain から離れたミオシン分子の lever arm domain に結合する. 抗体 3 が lever arm domain の調節軽鎖ペプチドに結合することは, SDS PAGE (図 17D) でも確認される.

4.3 ミオシン頭部各ドメインの ATP に対する運動の振幅

ミオシンフィラメント上のミオシン頭部を上記の抗体 1, 抗体 2, あるいは抗体 3 を介して金粒子標識し, ATP 投与に対するミオシン頭部各 domain の運動の振幅を記録, 測定した. 図 18A, B, C 各 domain の ATP に対する運動振幅のヒストグラムに見られるように, 抗体 1 によって標識されたミオシン頭部 catalytic domain の先端部の運動振幅のヒストグラム (A) と, 抗体 2 によって標識された converter domain の運動振幅ヒストグラム (B) は, 共に 2.5–5nm にピークがあり, 振幅の平均値はそれぞれ $6.14 \pm 0.09\text{nm}$ (mean $\pm$ s.e.m., $n = 1692$) 及び $6.14 \pm 0.22\text{nm}$ (mean $\pm$ s.e.m., $n = 1112$) で等しかった. Converter domain のサイ

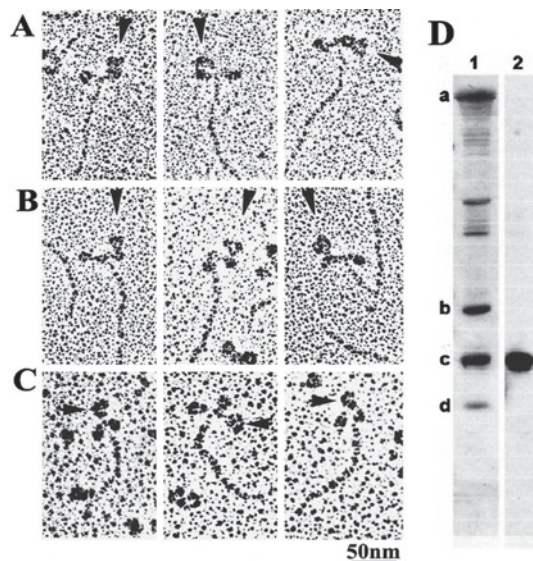


図 17. (A, B, C) ミオシン分子に対する抗体 1 (A), 抗体 2 (B), 及び抗体 3 (C) の結合を示す rotary shadow 電顕写真. IgG を arrowhead で示す. (D) 抗体 3 が調節軽鎖への特異的を示す SDS PAGE. D-1 はミオシンの全てのサブユニットの, D-2 はミオシンの調節軽鎖 (C) のみの SDS PAGE [11, 12].

ズは catalytic domain のそれに比べて遥かに小さく, 両 domain が隣接していることを考慮すると, converter domain は catalytic domain のミオシンフィラメント寄りの基部と看做することができる. 従って上記の結果は, catalytic domain の先端部と基部の運動振幅の間には有意差がなく等しいと看做される. この結果は ATP に対する運動中 catalytic domain 全体が rigid で, ミオシンフィラメント長軸に平行に動くことを示している.

一方抗体 3 で標識したミオシン頭部の lever arm domain 基部の運動振幅のヒストグラムは 0–2.5nm にピークがあり, 平均値は $3.55 \pm 0.11\text{nm}$ (mean $\pm$ s.e.m., $n = 981$) で, catalytic 及び converter domain の運動振幅より明らかに小であった (t -test, $p < 0.01$).

4.4 実験結果の解釈

本実験結果は, 筋フィラメント間の滑りを起こすミオシン頭部運動のレバーアーム機構を支持すると考えられる. 既に筆者らが 2008 年の論文 [10]

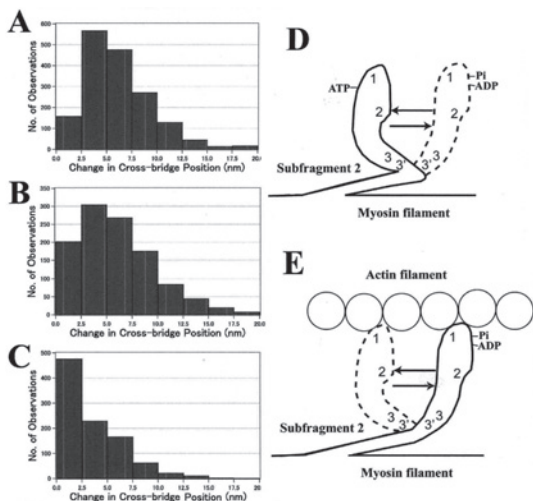


図 18. (A, B, C) ATP に対するミオシン頭部各ドメインの運動の振幅のヒストグラム. (A) 抗体 1 で標識されたキャタリティックドメイン先端部の運動振幅, (B) 抗体 2 で標識されたコンバータードメイン (キャタリティックドメイン末端部に隣接) の運動振幅, (C) 抗体 3 で標識されたレバーアームドメイン末端部の運動振幅. (D, E) 本研究結果を説明する, アクチンフィラメント非存在下 (D), 及びアクチンフィラメント存在下 (E) のミオシン頭部の ATP 加水分解と共役した運動サイクル [12].

で明らかにしたように, アクチンフィラメント非存在下に記録されるミオシン頭部の運動は, フィラメント中央の bare region から遠ざかる方向に動くリカバリーストロークである. しかしミオシン頭部がアクチンフィラメントと結合・解離サイクルを繰り返すためには, リカバリーストロークの運動振幅はパワーストロークの振幅と等しくなければならない.

従って, アクチンフィラメント非存在下でも, ミオシン頭部の ATP 加水分解と共役した運動サイクル (図 18D) は, アクチンフィラメント存在下のミオシン頭部とアクチンフィラメント間の, ATP 加水分解と共役した結合・解離サイクル (図 18E) と基本的に同様と考えられる. つまり両者とも, ミオシン頭部の運動の際, catalytic domain は rigid で変形を起こすことなく筋フィラメント長軸と平行に動く. このような catalytic domain の運動は lever arm domain の回転運動なしには

起こり得ない. 事実 lever arm domain 基部の運動振幅は catalytic domain の運動振幅に比して著しく小さく, lever arm domain がそのミオシン S2 との境界部の周囲を回転するという考えを支持する.

但し, もし図 18D, E の考えが正しければ, 筋フィラメント間の滑りを起こすミオシン頭部の運動 (パワーストローク) はアクチンフィラメントによってガイドされる必要がなく, ミオシン頭部の構造中にプログラムされていることになる. この考えは, ミオシン頭部のアクチンフィラメントとの結合がパワーストロークの開始の前提条件であるとする, 従来の研究者の (暗黙の) 仮定に反する. この点を明らかにするには, 更に多くの研究が必要である.

さて筆者がこの結果を論文に書きあげ, 原稿をまず Hugh Huxley に送ったところ, 彼から大変明快で分かり易い論文であるとの賞賛の言葉が返ってきた. 一方筆者が論文原稿を二, 三の英国の友人に見せたところ, 興味ある研究だが図 18D, E の模式図は overinterpretation で, 考えの飛躍があるのでは, との意見であった. 筆者らの研究の弱点は, 実験系にアクチンフィラメントが含まれていないことであり, 彼らの批判はもっともである. しかし筆者は, 例え overinterpretation であっても, 将来の実験の計画に有用であるなら差し支えないと思っている. また筆者らの研究に期待を寄せておられた Andrew Huxley 氏は, 夫人が亡くなられてから急に衰えられ, もはや学問について語ることが不可能になられた. 残念なことである.

この研究の論文の学術雑誌への最初の投稿から, 最終的に “Electron microscopic evidence for the myosin head lever arm mechanism in hydrated myosin filaments using the gas environmental chamber” という表題で Biochemical and Biophysical Research Communications 誌での発表 [12] に至るまでには, 生理学者 (と思われる) 査読者の pioneering work であるとの賛辞にも拘わらず, 筋肉蛋白結晶学者 (と思われる) 査読者の理不尽な意見のためかなり不愉快な経験をし

た。筆者の若い頃は、ある査読者の理不尽な意見は Editor が取り上げなかったものであった。そうでなければ投稿者の論文は査読者にふみにじられてしまう。つくづく時代が変わったことを感じる。

なお最近筆者らはアクチンフィラメント存在下のミオシン頭部パワーストロークの記録・測定に成功しており、上記の論文結果の解釈の正しいことが判明しつつある。

5. 結 語

本稿は筆者らの研究について、エピソードなどをはさみながら自由な形式で書かせていただいた。本稿の締めくくりに、筆者が勤務先を定年退職後の研究再開後の研究費について述べさせていただきたい。まず日本電子株式会社は、筆者らに研究の場を提供してくださった。しかし研究の進行のための running cost は、共同研究者の研究室の乏しい予算から費用を支出していただくのは限度があり、筆者が執筆した教科書や啓蒙書の印税からも費用を支出している。

この間種々の研究費の申請を行ってきたが、いずれも事実上の門前払いを受けている。研究者の身分、研究条件に原則的に制限がないことを謳っている「さきがけ」研究などでも同様な扱いを受け続け、さらに近年は iPS 細胞など、既に軌道に乗っているプロジェクトに関する研究提案しか受け付けなくなった。何が「さきがけ」だか分からない。筆者は米国の NASA の研究所の一つに、日本電子製のガス雰囲気試料室が備えられており、研究員によって有効に使用されていないので、同研究所の所員と共同で NIH に高額の研究費を申請したことがある。勿論非採択に終わったが、NIH の審査結果の通知は single space で数ページにタイプされた懇切丁寧なもので、principal investigator は NASA の研究員では実績不足なので、また申請するときは Sugi を代表として申請せよとも書かれていた。

これに対し我が国の研究費申請の審査結果の通知は、滑稽なことにその文章の文字数が論文のタイトルの字数制限（スペースを含む）とほぼ同じである。これで真剣に審査したと言えるのであ

うか。ここにも我が国の科学行政に携わる人々の後進性と植民地根性が現れており、これから学問を志す若い人々のことを考えると寒心に耐えない。

筆者はかねて EC システムに caged 化合物のレーザー光分解技法を取り入れ、我が国で生まれたこの研究を飛躍的に進展させることを念願としていたが、もはやこれを断念している。但し筆者の救いは (1) この研究は高額の研究費なしでも進展しつつあること、(2) EC システムの構築には現在の価格で約 2 億円を要し、従って国内外の研究者からこの種の研究を出し抜かれる恐れがまずないこと、及びこれが最も重要であるが、(3) 筆者がこの研究により既に十分な精神的報酬を得ていること、である。

おわりに、本誌にこのような変則的な記事を掲載する機会を与えていただいた、東京医科大学小西真人教授に感謝いたします。

文 献

1. Sugi H, et al: Dynamic electron microscopy of ATP-induced myosin head movement in living muscle thick filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4378-4382, 1997
2. Sugi H, Ed: Muscle Contraction and Cell Motility, Molecular and Cellular Aspects. *Advances in Comparative & Environmental Physiology*, Springer, Berlin, Vol 12 pp 264, 1992
3. Sugi H, et al: Direct demonstration of the cross-bridge recovery stroke in muscle thick filaments in aqueous solution by using the hydration chamber. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17396-17401, 2008
4. Huxley AF: Support for the lever arm. *Nature* **396**: 317-318, 1998
5. Squire JM: The Structural Basis of Muscle Contraction, Plenum, New York, pp 698, 1981
6. Lymun RW & Taylor EW: Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* **10**: 4617-4624, 1971
7. Huxley AF & Simmons RM: Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature* **233**: 533-538, 1971
8. Geeves MA & Holmes KC: Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem* **68**: 687-728, 1999

9. Sugi H & Kobayashi T: Remaining mysteries about the sliding filament mechanism in muscle contraction. *Recent Res Devel Biophys* **5**: 167–186, 2006
10. Holmes KC: The molecular basis of cross-bridge function. In *Sliding Filament Mechanism in Muscle Contraction*. Sugi H ed, *Advances in Experimental Medicine and Biology* **565**: 13–23, 2005
11. Sutoh K, et al: Electron microscopic mappings of myosin head with site-directed antibodies. *J Mol Biol* **206**: 357–363, 1989
12. Minoda H, et al: Electron microscopic evidence for the myosin head lever arm mechanism in hydrated myosin filaments using the gas environmental chamber. *Biochem Biophys Res Commun* **405**: 651–656, 2011