OPINION

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 I. 実験条件の設定とミオシン頭部の運動の可視化

帝京大学医学部名誉教授　杉　　晴夫

要　旨

高倍率の電子顕微鏡下の生きた細菌などの微生物の観察は医学・生物学者の多年の夢であった．この目的のため，電顕内の試料室に水蒸気を循環させて試料を湿った〈生きた〉状態に保つガス雰囲気試料室が考案され，世界各国で研究が試みられた．しかし細胞の機能の電子線による損傷のため，生物試料の細胞レベルでの電顕観察は不可能であることが分かり，これらの研究は不成功に終わった．筆者は生体を構成する，生きた（水溶液中でその生理的機能を保持した）生体高分子の機能研究にはガス雰囲気試料室が使用できると考え，1980年代から，我が国で隔膜型ガス雰囲気試料室を開発した日本大学深見研究室と共に研究を開始した．研究目標は筆者のライフワークである筋収縮機構の研究の延長として，生きた骨格筋ミオシンフィラメント・クロスブリッジのATP加水分解にともなう運動の電顕下の記録であった．筆者らは約10年の試行錯誤を経て，まず取り扱いの容易なミオシン・パラミオシン複合体フィラメント上のクロスブリッジの運動記録に成功した［1］．この研究は学内事情により中断したが，筆者が勤務先定年退職後，日本電子株式会社で研究を再開し，脊椎動物骨格筋の生きたミオシンフィラメント・クロスブリッジのATP加水分解にともなう可逆的な変化の電顕下記録に成功し，多くの画期的な成果を得ることができ，現在も得られつつある[2, 3]．これらの成果は世界にさきがけて，生きた生体高分子の機能を電顕下に研究する道を開拓したものである．ここではまずガス雰囲気試料室について説明し，ついで筆者らの試行錯誤を含む研究の過程のそれぞれの時点での，筆者らの研究に対する国内外の反応についても言及したい．本文が若い研究者の方々に刺激を与えることができれば，望外の幸せである．

1. ガス雰囲気試料室（gas environmental chamber）の構造

電子顕微鏡下に生きた微生物を観察する医学・生物学者の多年の夢の実現のために世界各国で考案されたのが，ガス雰囲気試料室（gas environmental chamber，略称EC）あるいは水和試料室（hydration chamber）である．ここではもっぱらECという略称を使用する．生物試料は，電子顕微鏡中にマウントされたEC中にガス（水蒸気）を循環させることにより，湿った（生きた）状態に保たれる．このECの開発に関しては広汎な総説[4]がある．

ECには二つの型がある．一方は隔膜型（film-sealed）ECで，electron beamを通過させるECの上下の開口部（aperture）に張られたsealing filmによりEC内部は電子顕微鏡内部の高真空から絶縁されている（図1A）．他方はaperture-limited ECと呼ばれ，EC内部は電顕の高真空と絶縁されておらず，試料は水蒸気を吹き付けることにより生きた状態に保たれる（図1B）．これらのECを用いて生きた単細胞生物を電顕下に観察する試みが数多く行われたが，細胞の発生，成長，分化，増殖等の生理機能は電子線照射によって急速に損傷されることが判明し，このような試みは

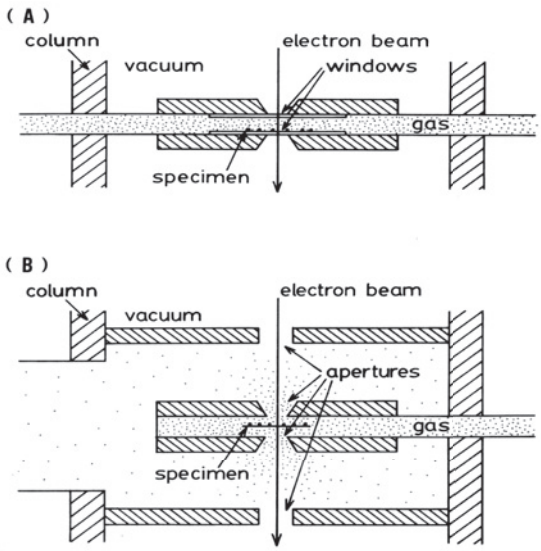

図 1．EC の二つの型

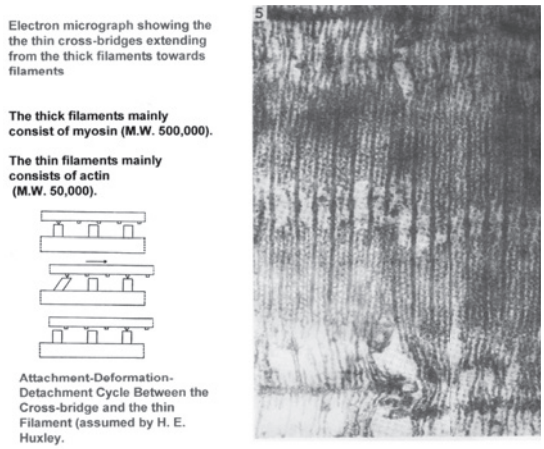

図 2．Hugh Huxley の滑り機構の発見．図の左はミオシンフィラメントから突き出たミオシン頭部とアクチンフィラメント間の非同期的な結合・変形・解離サイクルの模式図．右は筋肉内のアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが形成するフィラメント格子構造を示す電子顕微鏡写真［5，6］．

すべて失敗に終わった．

以後 EC は国外では材料科学，環境科学等の分野の研究者により，種々の無機化学反応のその場観察（in situ observation）にしばしば使用されているが，EC による医学・生物学分野の研究は現在に至るまで国内外で，筆者らの研究を除き全く行われていない．しかし，生体を構成し重要な生理機能を担う生体高分子の機能は，生きた細胞の機能より遥かに電子線に対する抵抗力があり，このような分野の研究に EC は威力を発揮すると考えられる．この期待はわが国で行われた筆者らの研究により実現された．

2. Hugh Huxley らによる筋フィラメント格子と筋フィラメント間の滑りの発見

筋収縮の分子レベルの機構に関して偉大なブレークスルーを成し遂げたのは，周知のように Hugh Huxley らによる，2 種の筋フィラメント間の滑り機構の発見であった［5, 6］．Hugh Huxley は筋肉のアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの 6 角格子構造を電顕により示すと共に（図 2），更に洞察を飛躍させてミオシンフィラメントから側方に突き出た突起（ミオシン分子の頭部，ここではクロスブリッジと呼ぶことにする）がアクチンフィラメントの結合サイトと結合―変形―解離サイクルを繰り返すことにより筋肉の短縮あるいは張力発生を行うと考えた（図 2）．Hugh Huxley が 1978 年に筆者と交わした会話では，彼がこのサイクル仮説を考えついたのは彼が電顕下に 2 種の筋フィラメントを観察した瞬間だったという．人類の叡智の頂点とも言うべき洞察と言わねばならない．この筋収縮滑り機構の記念碑的発見からすでに半世紀が過ぎたが，この分野の研究は未だに図 2 左の仮説のレベルから発展を遂げたとはいいがたい．一般に，ある天才により飛躍的に開拓された研究分野は，その後飛躍のない状態の続く normal science の期間に入る傾向がある．筋収縮の研究分野はまさにこの normal science状態が続いているのである．

筆者はかねて Hugh Huxleyの偉業に感服すると共に，図 2 のクロスブリッジ運動サイクルを電顕下に可視化したいと思っていた．1978 年に Hugh Huxleyが筆者の主催する国際シンポジウムに参加のため来日した際，彼にこの考えを話したところ，「そんなことが出来るものか」と一笑に付されてしまった（図 3）．しかし現在，種々の幸運

図 3. Hugh Huxley と筆者

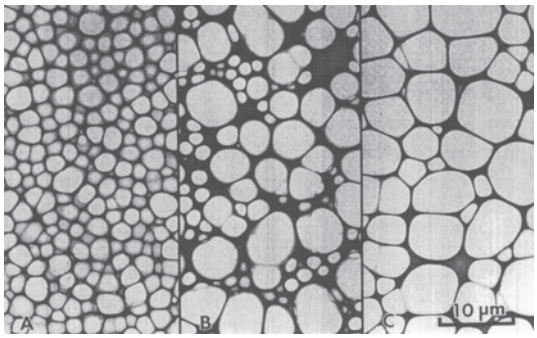

図 4. EC に使用する炭素絶縁薄膜

とよい共同研究者に恵まれ筆者の夢は実現し，さらに未知の領域に進展しつつある．本稿ではまず筆者らが使用した EC の構造と作動について説明し，ついで筆者らがこの EC を使用して成功した，電子顕微鏡下のミオシン頭部の運動の可視化に至る研究の道筋を説明したい．

3. 我が国に於ける隔膜型（film-sealed）EC システムの開発

3・1 日本大学深見研究室による炭素隔膜（carbon sealing film）の開発

EC システムの最重要部は 1 気圧の圧力差に耐える絶縁隔膜である．筆者らの使用する EC の絶縁薄膜は，日本大学文理学部の深見章教授が開発された炭素薄膜である．

EC により記録される試料電顕画像の解像力とコントラストは，絶縁薄膜の厚さの減少とともに増大する．深見らの研究によると，電顕画像解像力 1nm を得るには薄膜の厚さが 15—20nm でなければならない．一方薄膜の耐えうる圧力差は，薄膜表面積の増大と共に急激に減少する．例えば EC の開口部（直径 50μm）をカバーする薄膜が 1 気圧の圧力差に耐えるには，その厚さが 100μm 以上なければならず，電顕画像の解像力は著しく低下する．また EC の外壁を構成する金属ブロックに 50μm 以下の直径の開口部を穿つことは技術的に困難である．

深見らはこの技術的難問を，高分子有機化合物（cellulose acetobutylate）から成る微細格子の使用により解決した［7］．図 4 に見られるように，この微細格子のうち格子中の hole の直径が小さすぎるもの（図 4A），hole の直径が不ぞろいなもの（図 4B）を除外し，hole の直径ほぼ均一（5〜8μm）なもの（図 4C）を使用する．この微小格子で炭素薄膜（厚さ約 20nm）を保持することにより，十分な解像力と耐圧性をもつ絶縁薄膜が得られる［8］．深見らは日本電子株式会社と共同でこの炭素絶縁薄膜を使用する隔膜型 EC を作製し透過型電子顕微鏡に装着し，無機化学反応のその場観察（in situ observation）を行うとともに，医学・生物学分野の共同研究者を探し求めていた．

丁度その頃，筆者は九州大学での生理学会大会で，故緒方道彦教授から「杉君そろそろ電顕で実験をする時代になったのではないかな」と言われてはっとし，帰京早々医科歯科大学の故石川春律教授に電話したところ，「私は今や電顕下での実験が可能になったと思います．しかし我々解剖学者にはとても手がでません．杉先生ならきっとお出来になるでしょう．是非やってください．」とのことである．この石川教授の言葉に勇気づけられてから間もなく，幸運にも日本大学の深見教授にお会いする機会を得ることが出来，意気投合して共同研究をスタートさせた．研究課題は筆者の長年の夢であった「ミオシンフィラメント上のクロスブリッジの ATP に対する運動の電顕下での記録・測定」である．

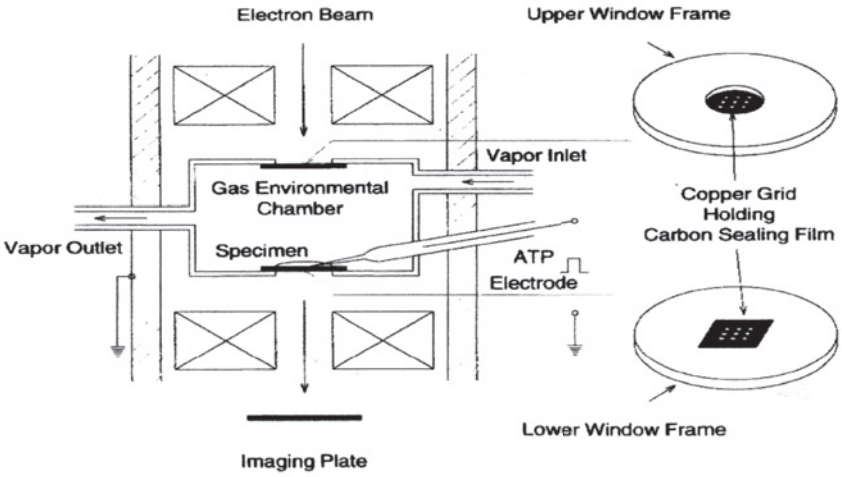

図 5. EC の模式図

3・2 生理学実験に適した EC システムの製作

深見研究室との共同研究は，EC による骨格筋筋原線維の ATP による短縮の低倍率での記録に成功し発表した [9] 後，日本電子株式会社伊藤一夫社長のご好意により筆者の研究室に筆者の設計した EC システムが設置されたのを機に，それぞれ独自に研究を進めることとなった．図 5 は筆者らが現在にいたるまで使用している EC システム [1]の模式図である．EC 本体は金属ブロックに穿たれた円筒形（内径 3.5mm，深さ 0.8mm）のコンパートメントである．EC 上下の電子線の通路となる開口部は，9 個の円形の hole（直径 0.1mm）を持つ銅板が取り付けられ，この銅板表面が既に説明した炭素絶縁薄膜（厚さ，15—20nm）で覆われている．

実験試料は下部の薄膜上にマウントされ，薄い実験液層で覆われる．実験液層の厚さ（0.5μm 以下）は，EC 内部に水蒸気（water vapor，温度，26—28℃）を適当な速度で循環させることにより一定に保たれる [10]．鮮明な試料像を得るため，EC 内部の気圧は 90torr とした．筆者が設計した EC では，試料（ミオシンフィラメントのクロスブリッジ）に ATP を投与するため，ガラス微小電極（ATP 電極，電極抵抗約 200MΩ）が組み込まれている．この微小電極は 100mM ATP で充填され，電気刺激装置からの電流を流すことにより，負に帯電した ATP ion が電極から放出され，実験液中を拡散して試料に達する [11]．この方法で電気泳動的（iontophoretic）に試料に与えられる ATP が試料に到達する時間は，EC 中にマウントされた筋原線維の ATP による収縮を光学顕微鏡下に記録することにより，20—30s を要することを確認した．

図 6 は透過型電子顕微鏡に装着する EC system全体の写真を，図 7 には EC 部分を拡大した写真を示す．

4. 実験試料像の観察と記録

4・1 収縮性蛋白質の機能を損傷する臨界的な電子線照射量の測定

筋肉を構成する収縮性蛋白質（アクチンとミオシン）の機能を損なうことなく電顕下に実験を行うためには，収縮性蛋白質がその機能を保持する臨界的な電子線照射量を決定する必要がある．この研究は，筆者の研究室から深見研究室に移った須田らによって行われた [12]．彼らは EC 中にマウントした筋原線維の EC 中に注入した ATP 溶液に対する収縮を低倍率の電顕下（倍率，2,500×）に観察し，筋原線維を構成するアクチンとミオシ

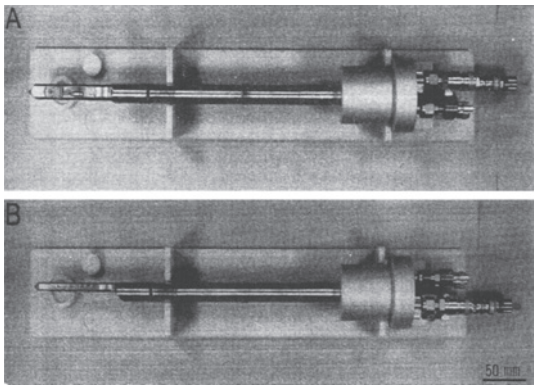

図6. EC system 全体の写真.（A）top view.（B）side view.

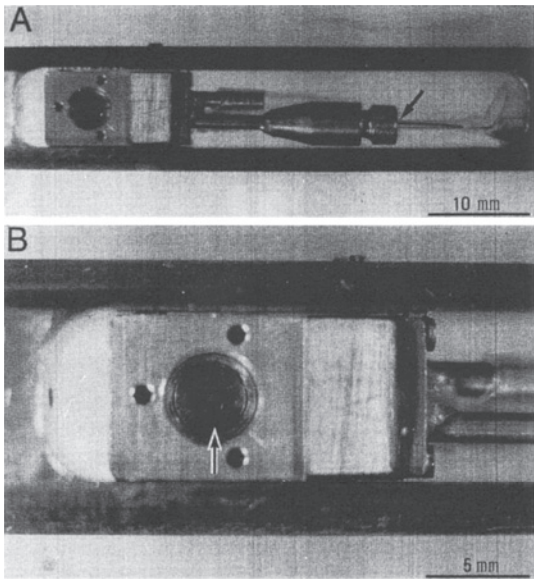

図7. EC 部分の拡大写真.（A）EC system 先端部. 左端に円形の EC 試料室，中央に ATP 電極装着部（矢印）が見える.（B）EC 試料室（矢印）を拡大したもの.

ンの収縮機能に及ぼす電子線照射量（ファラデーカップにより測定）の影響を調べた（図8）. 照射する電子線総量が 5×10^{-4}C/cm^{2}以下では，電顕視野中の全ての筋原線維が ATP により収縮したが，電子線総量がこの臨界的な値を越えると筋原線維の ATP に対する収縮は非可逆的に消失した. この時，筋原線維の外観にはなんの変化も認められなかった.

この臨界的な電子線総量は，後に筆者らの EC 中にマウントしたミオシンフィラメントのクロスブリッジの ATP による運動(電顕倍率, 10,000×）についても確認された. またミオシンフィラメントの ATPase activity も同じ電子線総量を越えると消失した. これらの結果に基づき，EC 中のミオシンフィラメント試料の観察及び記録の際の電子線総量は，ミオシンの生理機能の損傷を避けるため 10^{-4}C/cm^{2}以下とした. この電子線量の制限のため，電顕蛍光スクリーンに於ける電子線強度は 5×10^{-13}A/cm^{2}以下にする必要があり，極端に暗い電顕視野でのミオシンフィラメントの観察と焦点合わせには熟練と忍耐を要する.

4・2　試料像の記録

極端に暗い電顕視野でのミオシンフィラメント像の記録（倍率1万倍）は，X 線フィルムの 60 倍の感度を持つイメージングプレート（10.2×7.7 cm，以後 IP と略称)により行った. 記録時の電子線強度は $1\sim2\times10^{-12}$A/cm^2，露出時間は 0.18s である. 初期の実験では IP の画素（pixel）数は約 3 百万であったが，現在の IP の画素数は約千 2 百万に増加しており，その結果倍率 1 万倍での pixel size は約 5×5nm から 2.5×2.5nm となり，空間解像力が増大している. この IP system は，筆者らが EC を使用する直前に富士フィルム株式会社と日本電子株式会社の共同開発により製品化された. 既に述べた生体高分子試料に損傷を起こす電子線量の制約により，倍率 1 万倍でのミオシンフィラメント像の記録は 3～4 回が限度である.

4・3　試料への ATP および ADP の投与

深見研究室の EC では，試料に投与する ATP は単に ATP 溶液を EC 中に注入することにより行われた. この方法では溶液注入により試料位置が変化してしまう. 筆者の研究室では EC 中に 100mM ATP 又は ADP を含む溶液を満たしたガラス毛細管微小電極を装填し，これに current clamp 回路を介して長方形電流（1s，10nA）を通流することにより，負に荷電した ATP 又は ADP イオンを電極から放出させた［11］. この ATP

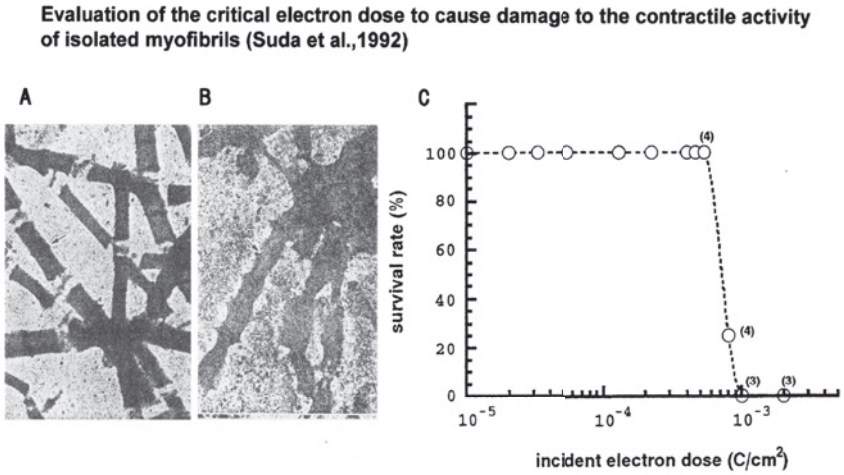

図 8.（A）ATP 投与前の弛緩した筋原線維，（B）ATP により収縮した筋原線維．（C）筋原線維の収縮に及ぼす電子線照射量の影響［12］．

の電気泳動的投与（iontophoretic application）法は，試料の位置を変化させることなく荷電した化学物質を投与しうる利点がある．電極から放出される ATP が EC 中の実験液層を拡散して試料に達する時間は 30s 程度と計算され，これは実際に EC 中にマウントされた筋原線維の ATP による短縮を光学顕微鏡下にビデオ記録することにより確認された．

4・4　個々のクロスブリッジの位置標識

生きた（つまり実験液中でその生理的機能を保った）ミオシンフィラメント上のクロスブリッジの運動を無染色状態で観察・記録するには，個々のクロスブリッジを標識する必要がある．筆者らは金粒子（colloidal gold particle，直径 15 又は 20nm）を抗体を介してクロスブリッジに結合させることにより，個々のクロスブリッジの位置標識をおこなった．使用した抗体はミオシン分子重鎖の 50kDa セグメントと 20kDa セグメントを繋ぐペプチド（EEGGGGKKGGKKKGSS）を抗原とする抗体（IgG）である［13］．この抗体の結合部位はクロスブリッジの actin filamentへの結合部位付近，つまりクロスブリッジの先端部分である．またこの抗体は，ミオシン分子の 2 個のクロスブリッジ（ミオシン頭部）のうち 1 個のみに結合する（Sutoh, Tokunaga and Wakabayashi, 1989）．クロスブリッジの金粒子標識の手順の詳細については既に詳細に説明されている［1］ので省略する．抗体と金粒子により標識されるミオシンフィラメント・クロスブリッジは，全クロスブリッジのごく一部に止め，これによりミオシンフィラメント上の金粒子間の間隔が十分に大で，個々の金粒子（つまりクロスブリッジ）の ATP に対する運動が隣接する他の金粒子の運動と明確に区別できるようにした．

4・5　実験結果の解析

EC による実験がおこなわれた電顕倍率 10,000×での pixel size は，後で説明する 1997 年の研究では 5×5nm，2008 年の研究では 2.5×2.5 nm である．ミオシンフィラメント像の記録（露出時間 1.8s）の際各 pixel に到達する電子数は，1997 年の研究では約 30 個，2008 年の研究では 7—8 個である．各々の IP 記録は多数の subframe に分割し，monitor screeen 上で観察する．この際個々のクロスブリッジ標識金粒子像は 2 値化してその輪郭を決定した後，その重心位置を computer により求めた［1，2］．金粒子の重心を含む pixel の縦，横の座標を 10 等分し，pixel 中の金粒子の重心位置を 2 桁の精度で表した．上記の方法により求めた金粒子の重心位置をクロスブリッジの位置とみなす．あとで説明するように，ATP 非存在下で

のクロスブリッジの位置は時間と共に殆ど変化しない．これは（1）EC 中にマウントしたミオシンフィラメントは炭素薄膜上に固く附着しており，（2）クロスブリッジの熱運動が安定した平衡位置を中心に起る［14］ため，個々のクロスブリッジの時間平均（露出時間，1.8s）位置が時間と共に変化しないためと考えられる．この事実は，ATP 投与によるクロスブリッジの運動の測定に大変好都合である．

ATP 投与によるクロスブリッジの運動（位置の変化）は，ATP 投与前および ATP 投与後の IP 記録を比較することにより測定される．この際 2 個の IP 記録に共通な座標軸が必要である．これは IP に記録される炭素薄膜の小孔（小さな輝点）を利用して得られた．この座標軸上の ATP 投与前および投与後の金粒子の重心位置を x^1，y^1，および x^2，y^2 とすると，金粒子重心位置の ATP による移動距離 D は，$\sqrt{(x^1-x^2)^2+(y^1-y^2)^2}$ となる．

5. ミオシン・パラミオシン複合フィラメントの実験

5・1　複合フィラメント使用の理由

以上説明した EC を使用する実験系が完成した際，筆者らはまず最も一般的，普遍的な結果が得られる温血脊椎動物（ウサギ）骨格筋から分離した native ミオシンフィラメントを実験試料として用いることを計画したが，以下に述べる理由によりこの試料の使用を断念した．（1）Native ミオシンフィラメントは湾曲し凝集する強い傾向があるため電顕下の観察に不適当である．（2）ミオシンフィラメントは細い（直径 20nm 以下）ため，background から区別しにくい．（3）ミオシンフィラメントが細いため，フィラメントから側方に突き出たクロスブリッジに抗体を介して結合させた金粒子が炭素薄膜に接触し結合する可能性がある．このため ATP によるクロスブリッジの運動は著しく抑制されると予想される．したがって筆者らは，骨格筋から分離したミオシン分子を重合させた太い合成フィラメントの使用を試みたが，この合成フィラメントは強く凝集する傾向があり，この問題の解決には時間がかかると考えられた．

筆者らは既に EC systemの構築に数年間を要しており，早くクロスブリッジの ATP に対する運動の記録を試みたいと焦っていたので，実験に適した試料として軟体動物の筋肉から抽出した paramyosin を重合させた，太く長い合成 paramyosin filament（直径，50―200nm；長さ，10―30 μm）の周囲にウサギ骨格筋のミオシン分子を結合させた複合フィラメント（myosin-paramyosin core hybrid filament）を使用することにした．この複合フィラメントの構造は，ムラサキイガイの前足糸牽引筋（anterior byssus retractor muscle，略称 ABRM）の native thick filament と類似している［15］．ABRM のミオシン分子に対する抗体が得られないため，筆者らはウサギ骨格筋のミオシン分子を paramyosin filamentの周囲に結合させた［1］．

上記の hybrid filamentは実験試料として以下の利点がある．（1）この filament は湾曲せずほぼ直線状であり，また凝集する傾向が少ない．（2）直径が大なため容易にその輪郭を background から区別しうる．（3）ミオシン分子は太い paramyosin filament の周囲に平行な列をなして配列するため，paramyosin filament 上部に結合したミオシン分子のクロスブリッジの大部分は炭素薄膜に附着することなく自由に運動しうる．この複合フィラメントのミオシン分子の Mg-ATPase 活性は約 $0.13s^{-1}$（28℃）で，この値は抗体との結合により変化しない．

5・2　ATP 非存在下でのクロスブリッジ位置の安定性

図 9A は EC 中にマウントされた生きた複合フィラメントの IP 記録である．フィラメント上のクロスブリッジに結合させた金粒子が明瞭に見られる．図 9B はフィラメントを固定液で固定した後，negative staining と rotary shadowing 処理した通常の電子顕微鏡像である．フィラメントが実際に金粒子が付着したクロスブリッジで覆われていることがわかる．図 9C はフィラメントの IP 像を拡大したもので，金粒子像のサイズにばらつきのあることが分かる．これは限られた露出時間

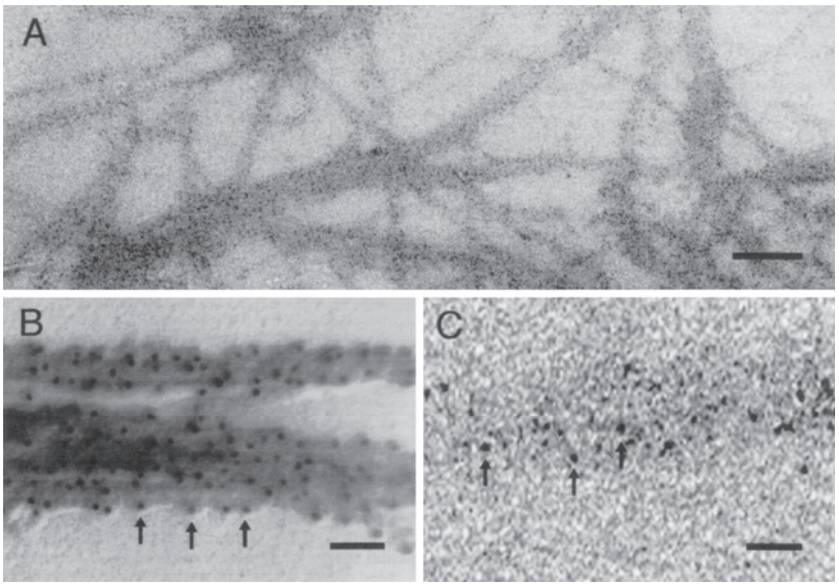

図 9．EC 中にマウントされた生きた複合フィラメント（myosin-paramyosin core complex filament）の IP 像．（A）クロスブリッジを金粒子で標識した複合フィラメントの IP 像（Bar, 500nm）．（B）Negative staining と rotary shadowing を行った複合フィラメントの通常電子顕微鏡像（Bar, 100nm）．（C）複合フィラメントの拡大 IP 像（Bar, 100nm）［1］．

により，IP の各 pixel に到達する電子数のばらつきによるものである．

我々の研究の目的は, ATP 投与に対する個々のクロスブリッジの運動を記録することである．この目的の成否は個々の金粒子，つまりクロスブリッジの位置が時間と共にどの程度変化するかにかかっている．この基本的に重要な点を明らかにするため，我々は EC 中の同一フィラメント像を ATP 非依存下において 3—5 分の間隔で 2 回記録し，フィラメント上の個々の金粒子の位置を比較した．図 10A は 1 番目及び 2 番目の IP 記録における個々の金粒子（直径 15nm）の位置を，その重心位置を中心とする直径 15nm の円〈●及び○〉によって重ね合わせて示したものである．図に見られるように，●と○はほぼ完全に重なり合っており，個々の金粒子の位置が時間とともに殆ど変化しないことを示している．

図 10B は同一の複合フィラメントの IP 記録により求めた金粒子（つまりクロスブリッジ）の位置変化測定値のヒストグラムである．141 例の測定のうち 87 例は, 位置変化の値は 5nm 以内, つまり pixel size，5×5nm からみて有意の変化ではない．また残りの 54 例の測定のうち 50 例で，位置変化の値は 5—10nm であった．この結果は，個々のクロスブリッジのランダムな熱運動は，ある安定した平衡位置の周囲に起るため，金粒子像の記録のためのシャッター露出時間（0.18s）で時間平均された金粒子位置は時間と共に変化しないことを示している．クロスブリッジが安定した平衡位置の周囲で熱運動を行っていることは，Andrew Huxley［14］の収縮模型の基本的仮定であり，我々の実験結果はこの仮定と矛盾しない．この ATP 非存在下のクロスブリッジ位置の安定性は, ATP 投与に対するクロスブリッジ運動記録の成功を保証すると考えられ，我々を大いに勇気づけるものであった．

5・3　ATP に対するクロスブリッジの運動記録の成功

我々は上記のクロスブリッジ位置の安定性（図 10A，B）に励まされて，EC 中にマウントされた

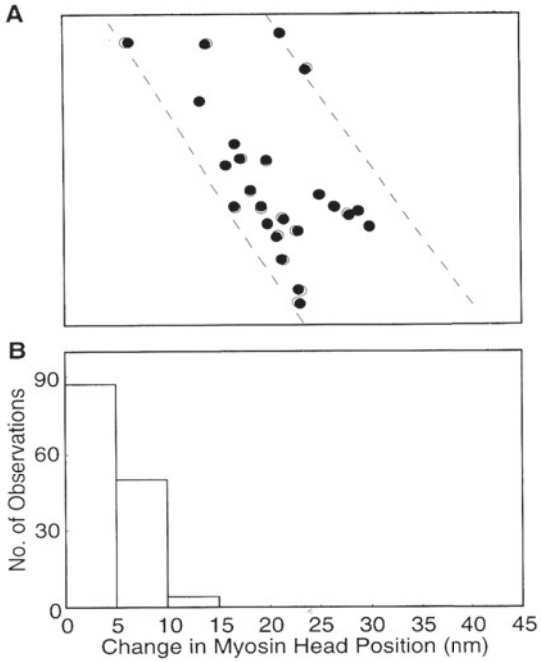

図 10．ATP 非存在下でのフィラメント上のクロスブリッジ位置の安定性．（A）3—5 分の間隔で記録した同一のフィラメント上のクロスブリッジの位置を重ね合わせたもの．●と○はそれぞれ 1 番目と 2 番目の IP 記録における，クロスブリッジに結合した金粒子の位置．点線はフィラメントの輪郭を示す．（B）1 番目と 2 番目のフィラメント記録間のクロスブリッジの位置変化のヒストグラム [1].

フィラメント上の個々のミオシン頭部が ATP 電極（図 5）から放出される ATP に反応して示す運動の電子顕微鏡下の記録を開始した．しかし ATP 電極への通流によるクロスブリッジへの ATP の電気泳動投与（iontophoretic application of ATP）は技術的に多くの困難があった．これらの困難を要約すると，(1) 電子線の水中の散乱によるフィラメント像の劣化を防ぐため，フィラメントをカバーする実験液の厚さは 500μm 以下に保たねばならない．このため EC を電顕に取り付ける際の振動で，電極先端が水溶液から離れ，電極への通流が不可能となる．(2) EC 内部の圧力が大気圧から約 90torr に低下するにつれて ATP 溶液中に気泡が発生する．この気泡が電極先端部に詰まると，やはり電極への通流が不可能となる．

これらのトラブルが生じると，その都度 EC を電顕から分離し，電極を交換しなければならない．このため現在に至るまで，実験の進捗が著しく阻害されている．我々はこの問題を解決するため，Nd YAG レーザー光パルスによる caged ATPの光分解の利用を考えた．しかし EC の炭素薄膜がレーザー光により容易に破壊されることが分かり，この試みは失敗した．さらに我々は，レーザー光により損傷されない SiO 膜の使用を試みたが，この膜は電子線の持続照射により損傷することが分かった．なお最近，米国で開発され市販されている SiN 膜が，レーザー光，電子線の両方によく耐えることが分かっている．

さて我々は当時，ATP 電極への通流に手間取り何ヶ月か空振りを続けた挙句，ある日 EC 実験の担当者，秋元　剛君から，遂に ATP 電極への通流に成功したとの報告を受けた．早速フィラメント像を調べた結果，個々のクロスブリッジの位置が ATP 投与により明瞭に変化することが分かった．遂に生きたミオシンフィラメントのクロスブリッジの ATP に対する運動が電子顕微鏡下に捉えられたのである．以後，ATP 電極への通流にしばしば成功するようになり，データが徐々に蓄積された．結果を図 11 に要約する．図 11A，B の IP 記録例に見られるように，クロスブリッジの運動はフィラメント長軸に対しほぼ平行で，常に一方向にのみ起こる．図 11C に示すように，クロスブリッジ運動の振幅は予想外に大で，平均値は 19.6 ± 0.3nm（mean ± SD，n = 512）であった．

この研究で使用した複合フィラメントでは，太いパラミオシンフィラメントの周囲にミオシン分子が単分子層をなして結合しており [15]，このとき個々のミオシン分子の尾部はパラミオシンフィラメント長軸に平行に走っていると考えられる．つまりこの複合フィラメントに於いては，ミオシン分子はその尾部でパラミオシンフィラメント上に結合して複合フィラメントを形成しており，脊椎動物骨格筋のミオシンフィラメントのようにミオシン分子がその尾部で互いに結合してフィラメントを形成するのではない．ミオシン分子の頭部と尾部と結び付けているミオシン分子のサブフラ

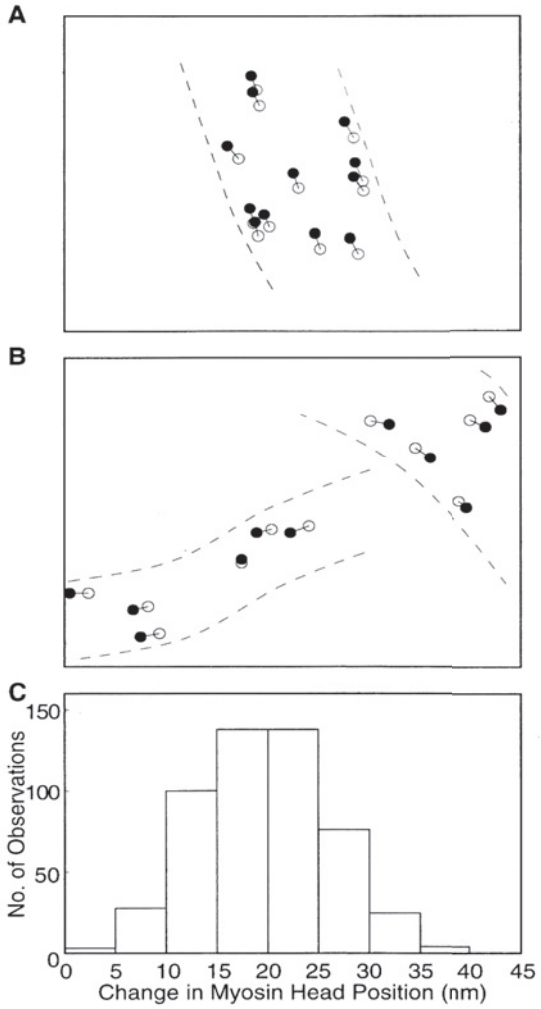

図 11．ATP 投与に対する複合フィラメントのミオシン頭部の運動．（A，B）ATP 投与前（●）及び投与後（○）の金粒子の重心位置の変化を示す IP 記録例．（C）ATP に対するミオシン頭部の運動の振幅のヒストグラム［1］．

グメント 2 部分は，ある条件下では頭部の ATP 分解と共役して構造変化（helix to random coil transition）をおこし著しく短縮する［16］．従って，ミオシン-パラミオシン複合フィラメントで記録された，ATP に対するミオシン頭部の運動は，ミオシン分子のサブフラグメント 2 の短縮によるものと考えられる．

複合フィラメント上のミオシン頭部の運動は常に一方向に向かっておこり，同一のフィラメント上で運動方向の逆転はみられなかった．フィラメント上のミオシン分子の配列の極性は，フィラメント中央の bare region の両側で逆転するので，ATP に対するミオシン頭部の運動方向もまた bare region の両側で逆転することが期待される．われわれはこのような記録を得るよう努力したが成功しなかった．この理由は複合フィラメントの長さが極めて長く（10μm 以上），このためミオシン頭部運動記録時の電顕倍率（1 万倍）で bare region が電顕視野に入る可能性が低かったためと考えられる．

ATP に対するミオシン頭部の運動は，その ATPase activity を N-ethylmaleimide で消失させると全く見られなくなった．また ATP の代わりに ADP を電気泳動的に投与しても，IP の pixel size（5×5nm）からみて，ミオシン頭部の有意な運動は起こらなかった（図 12）

5・4　得られた結果の考察

本実験系にはアクチンフィラメントは含まれていない．従って ATP 電極から放出された ATP は実験液中を拡散して複合フィラメント上のミオシン分子頭部に達しこれと反応する．ミオシン分子から分離したミオシン頭部（ヘビーメロミオシン HMM またはミオシンサブフラグメント 1）と ATP の水溶液中の反応は詳細に調べられており［17，18］，ミオシン頭部の ATP 結合部位を M で表すと，アクチンフィラメント非存在下では以下の反応が起こり，ATP は反応中間体 M・ADP・Pi を経由して ADP と無機リン酸 Pi に加水分解される．

M＋ATP→M・ATP　　(1)

M・ATP→M・ADP・Pi　　(2)

M・ADP・Pi→M・ADP＋Pi　(3)

M・ADP→M＋ADP　　(4)

反応（2）で生ずる反応中間体の平均 life time は 10 秒以上であり，このためアクチン非存在下でのミオシン頭部の ATPase activityは 0.1—0.2s^{-1} のオーダーに過ぎない．従って，本研究で記録された ATP 投与に対するミオシン頭部の運動は，上記の反応（2）に対応すると考えられる．反応中

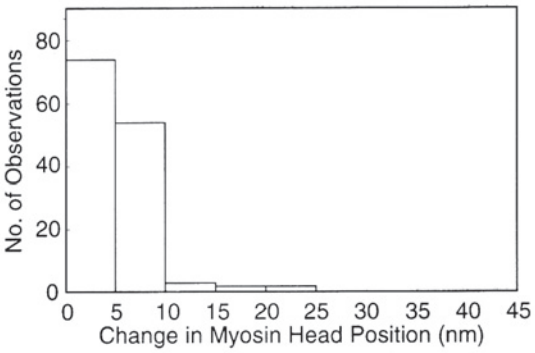

図 12. ADP 投与に対する複合フィラメント上のミオシン頭部の運動の振幅のヒストグラム［1］.

間体 M・ADP・Pi の平均 life timeは本実験の IP への露出時間（0.18s）に比して十分長い（>10s）ので，M・ADP・Pi 状態にあるミオシン頭部の位置は IP に明瞭に記録されると考えられる.

筋肉の収縮を起こすミオシン頭部の ATP 加水分解と共役した運動サイクルは，一般に以下のように考えられている.

(I) ミオシン頭部が M・ADP・Pi の状態でアクチンフィラメントと結合して，ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントを繋ぐクロスブリッジを形成する.

(II) このクロスブリッジが ATP の分解産物，ADP と Pi を放出しつつパワーストロークを行い，アクチンフィラメントをミオシンフィラメントの中央（bare region）に向かって手繰り寄せて両フィラメント間の滑り（つまり収縮）を起こす.

(III) パワーストロークを完了したミオシン頭部はアクチンと硬直（rigor）結合を形成した後，別な ATP 分子と結合して M・ATP 状態となりアクチンフィラメントから解離する.

(IV) このミオシン頭部は ATP を加水分解して反応中間体 M・ADP・Pi 状態となり，再びアクチンフィラメントに結合しクロスブリッジを形成する．この(III)の過程で，ミオシン頭部はパワーストロークを行う以前の状態にもどる．この(III)の過程のミオシン頭部の運動の振幅はパワーストロークと等しく，方向はパワーストロークと反対であり，リカバリーストロークと呼ばれる.

以上の考えに従えば，本実験でアクチンフィラメント非存在下に記録されたミオシン頭部の運動は，反応（1)→(3）にともなうミオシン頭部の構造変化，つまりミオシン頭部のリカバリーストロークを記録したものと考えられる．この解釈の正しさを証明するには，複合フィラメント中央の bare region でミオシン頭部の運動が bare region から遠ざかる方向に起こることを示さねばならない．しかしすでに述べた理由により，われわれはこの実験には成功せず，この問題の解決には本誌次号で述べるように約 10 年後に持ち越された.

5・5　筆者らの研究に対する国内外の反応

筆者らが生きた水溶液中で生理機能を保持したミオシン頭部の ATP 加水分解にともなう運動の記録に成功して間もなく，英国グラスゴーで国際生理科学連合（International Union of Physiological Science）の Congress が開催され，私は丁度同連合の筋肉分科会委員長に欧米の研究者によって選出されたのでこれに参加し，Hugh Huxley 氏主催のシンポジウムでわれわれの EC による実験結果の口頭発表を行った．彼は筆者の報告に対し“Congratulations”と祝意を述べ，さらに「将来あなたが，アクチンフィラメント存在下に ATP に対するミオシン頭部の運動記録に成功したら，わたしはその値をクロスブリッジのパワーストロークの振幅であると信ずる」と言ってくれた.

またこれより少し後に，筆者の友人であり，National Academy of Science の会員であった筋収縮研究の大家，William Harringtonhi 氏が急死し，彼を追悼するシンポジウムが米国バルチモアで開催され，私は 30 分にわたり詳しく EC の研究結果を説明する機会を得た．この際にも，筋収縮研究の大家John Gergelyらは，“Beginning of new era！”と過分な賞賛をしてくれた. 会場にいた聴衆にも，あとで『素晴らしい研究ですね，わたしもこんな研究ができたら』と話しかけてくる者が何人かあった.

一方，筆者が国内の学会で同様な発表を度々行っても，（座長を含む）聴衆はいつも沈黙し，何の発言もない．筆者は長年の経験から，この沈黙を予期していたので全く気にしなかったが，この

図 13. 2000 年筆者の自宅にて．中央　Andrew Huxley 夫妻，右端と左端はそれぞれ筆者と共同研究者　秋元君．

図 14. 箱根で 2002 年に開催された藤原セミナー

聴衆の態度は，我が国で芽生えかけている若い（大研究室の後ろ盾のない）研究者の独創を圧殺するだろうと心配している．

英国の Andrew Huxley 氏は周知のように 1963 年神経の活動電位のイオン機構でノーベル生理学・医学賞を受賞後，筋収縮機構の研究に転じた．彼は生理学者として，筋の構成要素を分解する生化学的研究や，構成要素を人工的に再構成する生物物理学的研究を好まず，筋線維の構造を出来る限り保持した実験系から得られる結果を最も重視する立場を貫いている．彼は 1997 年来日の際，筆者の研究室に 3 日間滞在し，われわれが蓄積した実験データを，それらの解析法を含めて詳細に検討し，米国科学アカデミー紀要（PNAS）掲載の労をとられた［1］．

筆者は複合フィラメントの研究はこれで打ち切り，長年の念願であった脊椎動物（ウサギ）骨格筋のミオシンフィラメント上のミオシン頭部の ATP に対する運動の記録，さらにはアクチンフィラメント共存下で筋フィラメント間の滑りを起こすクロスブリッジのパワーストロークの記録に進むことを考え，予備実験を開始した．しかし残念

なことに，種々の学内事情により，1999年より突然筆者のEC実験の継続のための研究者および研究費用の確保が不可能となり，筆者の定年退職する2004年までの5年間はEC実験を中断することになった．

この間2000年の暮れにAndrew Huxley氏が私の研究室を訪問され，「あなたがECにより筋収縮の研究を再開し，結果がでるのを心から期待している」と励ましてくださった（図13）．また，2002年には藤原科学財団のご好意により，筋収縮機構に関する国際シンポジウム（藤原セミナー）を我が国で開催させていただき，Hugh Huxley氏ら多数の国外参加者と筋収縮のクロスブリッジ機構について論議し，記録を出版することができた（Sugi, H. Ed, Molecular and Cellular Mechanism of Muscle Contraction, AEMB Vol. **538**, Kluwer/Plenum, New York, 2003）[19]（図14）．これは当時逆境にあった筆者を大いに勇気づける出来事であった．藤原財団にたいし改めて感謝いたします．このシンポジウムでもHuxley氏は筆者らの研究の発展への期待を表明してくれた．

幸運にも筆者の定年退職直後，これまで筆者らのECによる研究に物心両面の援助を惜しまれなかった日本電子株式会社のご好意により，同社に研究拠点を移してECによる研究を再開することができた．この研究の成果は非常に実り豊かなものであり，また筆者が定職を持たない一介の退職教授であることを考えると奇跡的ですらある．これらについては，本誌次号に詳しく説明したい．

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, 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
3. Minoda H, et al: Electron microscopic evidence for the myosin head lever arm mechanism in hydrated myosin filaments using the gas environmental chamber. Biochemical and Biophysical Research Communications in Press, 2011
4. Butler EP & Hale KF, Eds: Dynamic Experiments in the Electron Microscope, North-Holland, Amsterdam, pp 457, 1981
5. Huxley HE & Hanson J: Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. Nature **173**: 973–976, 1954
6. Huxley HE: The mechanism of muscle contraction. Science **164**: 58–65, 1969
7. Fukami A & Adachi K: A new method of preparation of a self-perforated microplastic grid and its applications. J Electron Microsc **14**: 112, 1965
8. Fukushima K: Ph.D thesis, Nihon University, 1988 (in Japanese)
9. Fukushima K, et al: In situ observation of biochemical reaction processes using film-sealed environmental cell. Proc Xith Int Congr Electron Microsc (Kyoto) 229–230, 1982
10. Fukami A & Murakami S: Progress of electron microscopy of wet specimens using film-sealed environmental cell. J Electron Microsc **28**: S41, 1991
11. Oiwa K, et al: Measurement of work done by ATP-induced sliding between rabbit muscle myosin and algal cell actin cables in vitro. J Physiol **437**: 751–763, 1991
12. Suda H, et al: Evaluation of the critical electron dose on the contractile activity of hydrated muscle fibers in the film-sealed environmental cell. J Electron Microsc **41**: 223–229, 1992
13. Sutoh K, et al: Electron microscopic mappings of myosin head with site-directed antibodies. J Mol Biol **206**: 357–363, 1989
14. Huxley AF: Muscle structure and theories of contraction. Prog Biophys Biophys Chem **7**: 255–318, 1957
15. Squire JM: The Structural Basis of Muscle Contraction, Plenum, New York, pp 698, 1981
16. Harrington WF, et al: Helix-coil melting in rigor and activated cross-bridges of skeletal muscle. In: Molecular Mechanism of Muscle Contraction, Sugi H & Pollack GH, Eds. Plenum, New York, pp 307–318, 1988
17. Lymn RW & Taylor EW: Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. Biochemistry **10**: 4617–4624,
18. Bagshaw CR: Muscle Contraction, Chapman & Hall, London, pp 155, 1993
19. Sugi H, Ed: Molecular and cellular Aspects of Muscle contraction. In: Advances in Experimental Medicine and Biology, Kluwer/Plenum, New York, Vol 538 pp 701, 2003