

# X線回折実験による心臓のナノオーダー分子モータ解析

奈良県立医科大学生理学第二講座

清水 壽一郎

## ANALYSIS OF NANO-ORDER MOLECULAR MOTOR IN THE BEATING HEART USING X-RAY DIFFRACTION TECHNIQUE

JUICHIRO SHIMIZU

*Department of Physiology II, Nara Medical University School of Medicine*

Received March 2, 2007

**Abstract:** アクチンとミオシンという収縮タンパクの相互作用による微小な力が無数に発生することにより、心臓はポンプ機能を発揮することができる。このアクチンとミオシンの相互作用は、分子生物学の発展により一分子レベルで解析されるようになってきている。しかし、一つの心臓を考えてみると、右心房、右心室、左心房、左心室と心臓のポンプ機能を発揮する上で、心臓の部位によって必要な力は異なっている。全身に血液を送る上でもっとも重要な左心室については、心外膜側、心内膜側で心筋線維の走行方向、冠循環の様式、様々なタンパクの発現量などが異なることが知られている。このような知見をふまえて心臓におけるアクチンとミオシンの相互作用を理解するには、心臓レベルでこれらの分子モータの挙動を観察することが必要となる。そこで、日本が誇る第三世代大型放射光施設である SPring-8 における X 線回折実験により、拍動している小動物の心臓でこれらアクチンとミオシンの相互作用をマスとして評価できるようになっており、その成果を紹介する。

**Key words:** X-ray diffraction, Heart, Actin-myosin interaction, cross-bridge, SPring-8

### はじめに

生理学は様々な生命現象の観察に始まり、そのメカニズムを明らかにする学問である。したがって、臓器レベルで観察される現象について、観察対象を組織レベル、細胞レベルさらには分子レベルへとシフトさせ、生命現象の根本的なメカニズムを研究が主流となっている。筋生理分野では大阪大学の柳田研究室、東京大学の杉浦研究室などで、筋収縮の単位分子モータとなるアクチン線維とミオシン単分子との相互作用を詳細に観察し、ATP加水分解によるエネルギーが、筋収縮にどのように利用されているか、ミオシンアイソフォームの違いによる単位収縮張力への影響などが解析されている<sup>1-4)</sup>。

しかし単離した生体分子を用いた研究は、人工的な環境下でなされているものであり、実際に生体内で起こっている現象を忠実に再現できているという保証はない。

一方で、生体内で実際に活動している臓器について、臓器機能を平均化、均質化して評価する研究や、臓器・組織機能を極小領域で可視化し、臓器内での部位による機能的な差違を解明する研究が行われている。心臓を対象とした臓器レベルの研究で代表的なものは、前者が左心室の圧容積関係と心筋のエネルギー代謝について解析したもの<sup>5-7)</sup>、後者が臓器レベルで観察した心筋細胞内カルシウムトランジェントの解析や、冠微小循環の解析などがあげられる。特に、後者の研究では共焦点レーザー顕微鏡を用いてより微小な領域の現象を高い分解能で捉える研究も行われている<sup>8,9)</sup>。

臓器機能の極小領域での可視化はいずれも光学顕微鏡レベルで観察可能な、マイクロメートル、サブマイクロメートル領域の現象を観察したものであるが、光学顕微鏡では数学的な後処理を加えても50~100ナノメートルの解像度が限界であり、アクチン、ミオシンといったナ

ノメートル領域の収縮蛋白相互作用を臓器レベルで観察することは不可能である。一般に、この領域の生体構造の観察には電子顕微鏡が用いられる。電子顕微鏡の理論的解像度は0.3ナノメートル位であり、アクチン、ミオシンの動きの観察には十分である。しかし、電子顕微鏡用の標本は一般に金属蒸着が必要であり、また小動物とはいえ臓器レベルでは電子線の透過、結像に難がありナノメートルオーダー分子機能の観察は不可能である。

生体透過性という点ではX線が思い浮かぶ。X線は波長が1ピコメートルから10ナノメートルの電磁波であり、生体透過性や分解能も十分期待できる。但し、X線を理想的に曲げることのできる理想的なレンズが無いため、X線顕微鏡は存在しない。しかし、特殊な状況ではレンズに相当する操作を人為的に加えることで、X線による顕微鏡と同じ効果が期待できる場合がある。そこで、X線を用いたナノメートルオーダーの心機能観察の事例を紹介する。

#### X線回折法

光学顕微鏡でも、電子顕微鏡でも、標本の拡大像を観

察するにはそれぞれ光線、電子線を試料に照射し散乱させる必要がある。さらに、散乱した光線、電子線を光学レンズ、あるいは電界により結像させることで、目で見てわかる像が得られる(図1A)。X線回折法も、試料にX線を照射し散乱させるところまでは同じである。しかし、前にも述べたように散乱したX線を結像させるための理想的なレンズが存在しないため、別の方法を用いて像を結ばせる必要がある。観察の第一段階の散乱が試料における光線、電子線、X線を散乱させる物質配置のフーリエ変換に相当することを19世紀のドイツの物理学者Abbeが解明している。また結像という過程も散乱した光線、電子線、X線の逆フーリエ変換に相当する。従って、試料にX線を照射し、その散乱X線を逆フーリエ変換処理することで、試料のより詳細な像が得られる(図1B)<sup>10)</sup>。

実際、タンパクの三次元構造解析はX線回折法無くしては成り立たないが、どのような試料でも良いというわけではない。タンパクの三次元構造解析であれば、まず目的タンパクの結晶を準備するところから始まる。また

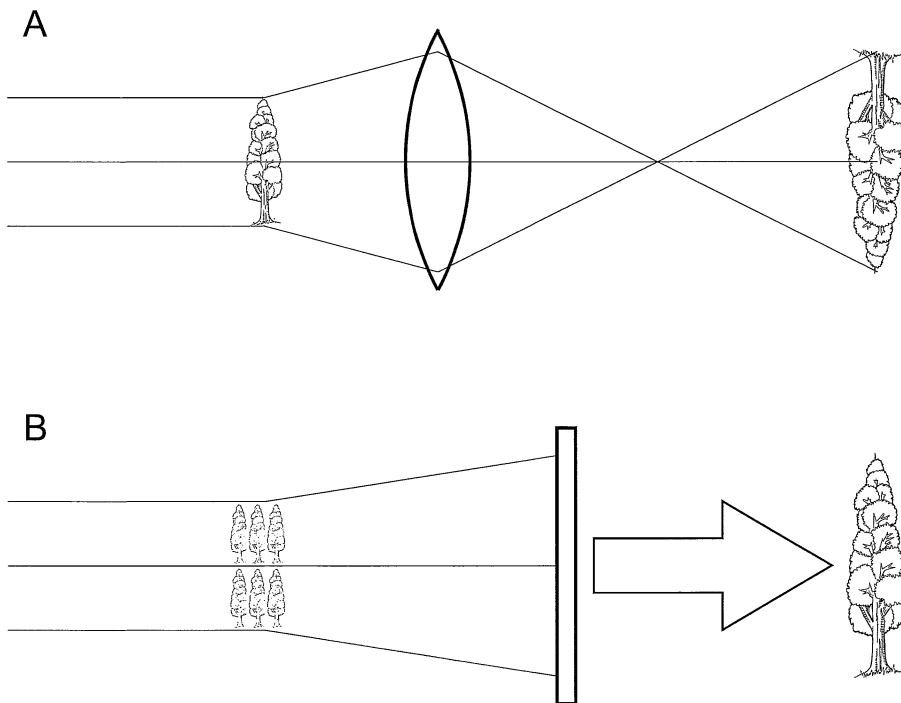


図1. 光学顕微鏡とX線回折による顕微法。A, 光学顕微鏡では、まず試料に光を当て散乱させる。次いで、レンズにより収束させて像を得る。B, X線顕微法では、試料は結晶を用いる。この結晶に単色、平行なX線を照射し、散乱したX線が回折像として観察される。この回折像を数学的に処理することで、結晶を構成している単分子の構造を解明する。

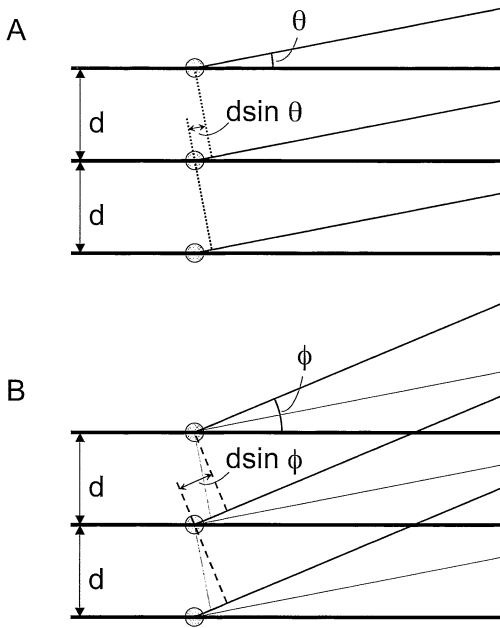


図2. X線回折の説明. A, 間隔  $d$  で原子が配列しているとき, 左から実線で示した様に波長  $\lambda$  の X 線を照射すると, X 線は各原子で散乱される. このとき,  $\theta$  が  $\lambda = d \sin \theta$  を満たすとき,  $\theta$  方向に回折像を結ぶ. 同じように  $-\theta$  方向にも回折像は現れる. B, A と同じく間隔  $d$  で配列した原子に, 波長  $\lambda$  の X 線を照射する.  $\phi$  が  $n \lambda = d \sin \phi$  ( $n$  は 2 以上の整数) を満たすとき,  $\phi$  方向に高次回折像を結ぶ.

照射する X 線もできるだけ平行光に近いことが要求される. このような条件を満たした上で, タンパクの結晶に X 線を照射すると, X 線は結晶中の各原子それぞれの電子雲により散乱され, 結晶に特有の繰り返し構造が回折格子として作用し, 繰り返しの間隔と X 線の波長により決定される方向に回折像を結ぶ. これは, 高校の物理でも出てきた光の回折と同じであると考えて差し支えない. 図2の様に, 格子間隔  $d$  の回折格子に対して平行かつ位相のそろった波長  $\lambda$  の光を照射すると, 隣接する格子点からの散乱光が,

$$\lambda = d \sin \theta \quad (1)$$

を満たす  $\theta$  方向に一次回折像を生じる(図2 A). さらに

$$n \lambda = d \sin \phi \quad (2)$$

を満たす  $\theta$  方向に  $n$  次回折像を生じる(図2 B). この格子点に相当するのが, タンパク質中の各原子の電子雲であるから, タンパクの結晶に X 線を照射したときの回折像はさながら満天の星空といったイメージである(図3).

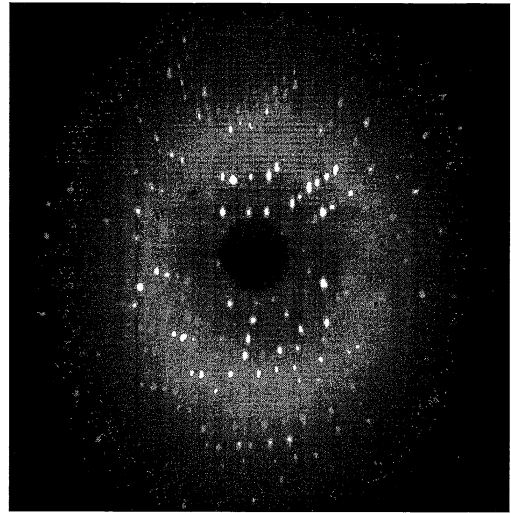


図3. 結晶解析の一例. インスリンの結晶から得られた X 線回折像.  
(<http://srs.dl.ac.uk/OTHER/OW/BDET/hipres2.html> より改変し引用)

このような回折像をタンパクの結晶を少しずつ回転させながら記録し, その回折像からタンパクの三次元構造が決定される<sup>10, 11)</sup>.

解析方法の詳細な説明は省くが, X 線回折法を用いて構造解析を行う場合, 回折波の振幅と位相を求める必要がある. 回折波の振幅は, 回折像の X 線強度が振幅の二乗であるためすぐに求めることができる. しかし, 位相に関する情報は回折像には全く含まれないため, ほかの方法を用いて位相を求める必要がある. 心筋などの筋肉の X 線回折実験では, この問題の解決にモデル法を用いる. これは, 大まかな構造がわかっているものとして, それに基づいた分子モデルを考案し, そのモデルが示す振幅, 位相と, 実際の振幅, 位相のずれを小さくしてゆくという作業を繰り返し, 最終的な分子像を得る方法である.

#### 心筋の微小構造と線回折像

心臓は全身の血管系に血液を送るポンプとして生命維持には必要不可欠な器官であり, 心筋細胞の協調的な収縮によりそのポンプ機能を発揮している. 心筋組織は, 一部枝分かれを持つ桿状の心筋細胞からなり, 心筋細胞はそれぞれの細胞の端部で他の心筋細胞と接している. また, 位相差顕微鏡による観察や組織標本では横紋構造が観察される. 心筋細胞を電子顕微鏡で観察すると, この横紋構造は骨格筋と類似しており, 細胞の両端に介在

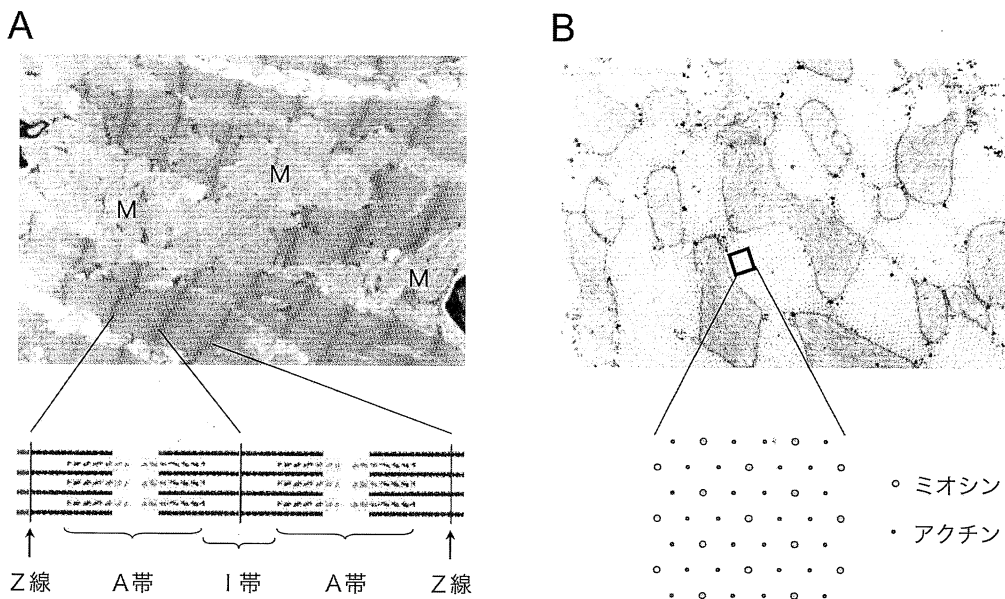


図4. 心筋筋線維の電子顕微鏡画像とそのイメージ図。ミトコンドリアが豊富に存在する。A, 筋織維の横紋と筋節の構造。B, アクチン線維とミオシン線維が重なった部分の横断面。規則正しい六角格子構造が確認できる。

板を持つ点が骨格筋とは異なることがわかる。この介在板に存在するギャップジャンクションを介して興奮が伝播し、各心筋細胞が全体として一つの細胞のように振る舞う機能適合胞体として心筋のポンプ機能を発揮している。

心筋細胞の細胞質の大部分はエネルギーを供給するミトコンドリアと、分子モーターであるミオシン、アクチンからなる筋線維が占めている(図4 A)。筋線維は、線維密度が高く暗いA帯と線維密度が低く明るいI帯からなり、その繰り返しが横紋構造として観察される。I帯の中心にはZ線が見られ、Z線から隣接するZ線までを筋節(sarcomere)と呼び、心臓の収縮を引き起こす筋線維の基本構造として認識されている。生理的な条件下では心筋の筋節長は約1.6 ~ 2.4 $\mu$ mの範囲にあり、筋節の伸展は発生張力の増大を引き起こす。心臓は拡張期容積の増大に伴い、より高い圧あるいはより多くの血液を駆出することが知られているが(Frank-Starlingの法則)、これは心臓の拡張期容積の増大により筋節が伸展され、心筋線維の発生張力が増すことに基づく。

A帯はミオシンの重合体である太い線維により構成されている。このA帯の断面を電子顕微鏡で観察すると、ミオシンの太い線維の周囲を、アクチンの細い線維が六角形に配列しながら囲んでいる、規則正しい繰り返し構

造を示す(図4 B)。この心筋線維の軸に対して垂直なX線を照射すると、図5 Aの様なX線回折像が得られる。これは筋線維の軸に対して垂直な方向に観察される回折像で赤道反射(equatorial reflection)と呼ばれる。これに対し、アクチン線維やミオシン線維の軸方向にも回折像が現れ、こちらは子午反射(meridional reflex)という(後述)<sup>10)</sup>。

心筋からのX線回折像の由来とその意味

心筋の収縮に関連したX線回折像の解析では、この赤道反射の輝度情報とその位置が重要になるため、まず赤道反射の由来について説明する。心筋線維のA帯に相当する部分では、図5 Bに示すようにアクチン線維とミオシン線維が六角格子構造を持っている。ここでミオシン線維だけを通る斜交座標系を考えると、その単位格子は菱形になる。このとき原点(0, 0)と点(1, 0)を通る直線を設定すると、それに平行な直線は何通りも設定することができる。アクチン線維とミオシン線維は共にこのページ面に垂直な線維であるから、この原点(0, 0)と点(1, 0)を通る直線は実際には平面であり、その平面にはアクチン線維は含まれない。また、筋線維の六角格子構造のため、この平面群は120度ずつ回転させた三方向に存在し、これを総称して(1, 0)格子面とよぶ(図5 C)。一方、点(1, 0)と点(0, 1)を通る直線を考えると、点

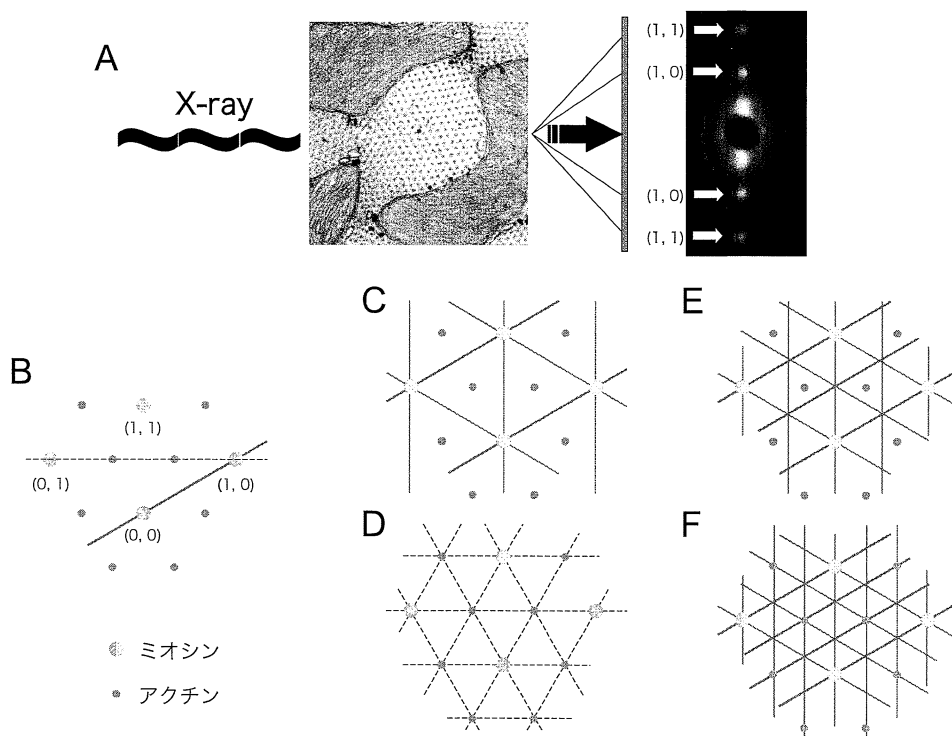


図5. 筋線維のX線回折像と筋線維の格子構造. A, 筋線維にX線を照射すると、筋線維とX線双方に垂直に、X線回折像が得られる。図は、ラット右室乳頭筋のX線回折像を示す。内側のペアが(1, 0)赤道反射、外側のペアが(1, 1)赤道反射と呼ばれる。B, 筋線維の単位格子。4本のミオシン線維を頂点に持つ菱形が単位格子となり、一番下のミオシンを原点として、図のように座標を持つ。C-F, 筋線維の格子構造。C, ミオシン線維のみからなる(1, 0)格子。単位格子からみて、(1, 0)格子がもっとも格子間隔が大きい。D, ミオシンとアクチンからなる(1, 1)格子。(1, 0)格子に次ぐ格子間隔を持つ。E, (1, 0)格子の間隔が $1/2$ になった(2, 0)格子。格子間隔が狭い分、回折像は外側へ現れるようになり、また輝度も小さくなる。図には回折像は示していない。F, (1, 0)格子の間隔が $1/3$ になった(3, 0)格子。格子間隔がさらに狭い分、回折像はより外側へ現れ、輝度もより小さくなる。

(1, 0)と点(0, 1)の間には、点( $1/3, 2/3$ )と点( $2/3, 1/3$ )にアクチン線維が存在し、設定した直線はこれらのアクチン線維も通ることがわかる(図5 B)。この直線も同じく多数の平行線(面)が設定でき、この平面群を(1, 1)格子面とよぶ(図5 D)。他にも(1, 0)格子面に平行で、格子面間隔が半分の(2, 0)格子面、 $1/3$ の(3, 0)格子面や、点( $1/2, 0$ )と点(0, 1)を通るような、(2, 1)格子面などが設定できる(図5 E, F)。

筋線維における格子面の間隔と回折像の中心から赤道反射のスポットまでの距離は相反的な関係があり、X線の波長と試料から撮像素子までの距離により決定される(式1)。従って、格子面間隔が大きいほどその回折像は

内側に、格子面間隔が小さいほどその回折像は外側に現れる。従って、図5 A にみられる回折像は、内側と外側に各一對の赤道反射が観察されており、内側の回折像が格子間隔の広い(1, 0)格子面からの(1, 0)赤道反射であり、外側の回折像が格子間隔の狭い(1, 1)格子面からの(1, 1)赤道反射となる。また、回折像とはミオシン線維やアクチン線維で散乱されたX線の重ね合わせにより輝度が高まった部分であるが(干渉)、散乱角が大きくなるほど散乱光の強度は低下するから、(2, 0)格子面や(3, 0)格子面からの赤道反射の輝度は非常に小さく、心筋のX線回折実験では解析に用いることは少ない。

**心筋の収縮と赤道反射の変化**

心筋組織が収縮するときにはアクチンとミオシンの相互作用により、クロスブリッジが形成される。その過程をかいつままで説明すると、細胞膜の脱分極とそれに引き続いてL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルからのCa<sup>2+</sup>イオンの流入が起こり、そのCa<sup>2+</sup>イオンが筋小胞体のリアノジン受容体へ作用すると、リアノジン受容体が開口し筋小胞体から大量のCa<sup>2+</sup>イオンが放出される。このCa<sup>2+</sup>イオンはアクチン線維上のトロポニンに結合し、その構造を変化させることでアクチン線維に付随しているトロポミオシンの位置をずらし、アクチンのミオシン結合部位を露出させる。するとミオシン頭部がミオシン線維近傍からアクチン線維近傍へシフトし、アクチンとの相互作用によりクロスブリッジが形成され、張力が発生する。

ここで、先ほどの赤道反射の成因について考える。収縮時にミオシン頭部がミオシン線維近傍からアクチン線維近傍へシフトすると、(1, 0)格子面はミオシン線維だけを通る平面の集合体であるから、シフトしたミオシン頭部の持つ電子雲の分だけ、X線を散乱させる働きが小さくなる。すなわち、(1, 0)赤道反射の輝度が低下することを意味する。また、どんなに厳密に試料をセットしても、心筋の収縮運動に伴うX線が通過する心筋組織量が増えるため、それに伴う(1, 0)赤道反射の輝度変化も考慮する必要がある。(1, 1)格子面はアクチン線維と

ミオシン線維の両方を通る平面の集合体であるが、心筋の収縮に伴うミオシン頭部の移動は(1, 1)格子面上で起こるため、(1, 1)格子面内の電子量は変化せず、(1, 1)赤道反射の輝度は変化しない。逆に、収縮に伴うX線照射部位がずれた場合には、X線が通過した心筋組織量の変化が(1, 1)赤道反射の輝度変化として把握できる。上記のことから、収縮に伴うミオシン頭部の移動量は、(1, 0)赤道反射の輝度を(1, 1)赤道反射の輝度で規格化した(1, 0)/(1, 1)輝度比により表すことができる<sup>12)</sup>。また、この(1, 0)/(1, 1)輝度比は収縮期にはミオシン頭部がアクチン線維側へ移動するため減少し、弛緩期にはアクチンから解離したミオシン頭部がミオシン線維側へ戻るため増加する傾向を示す(図6)<sup>13)</sup>。

また、撮像素子上で、(1, 0)赤道反射の中心からの位置をD、試料から撮像素子までの距離をL、X線の波長をλとすると、(1, 0)格子面の間隔dは

$$d = \lambda L / D \tag{3}$$

として、求めることができる。ここで、dは(1, 0)格子面の間隔であり、隣接するミオシン線維間の距離ではない。

X線源と回折像記録

回折の原理のところで記したように、試料に照射するX線は、単色(単波長)で平行であることが要求される。

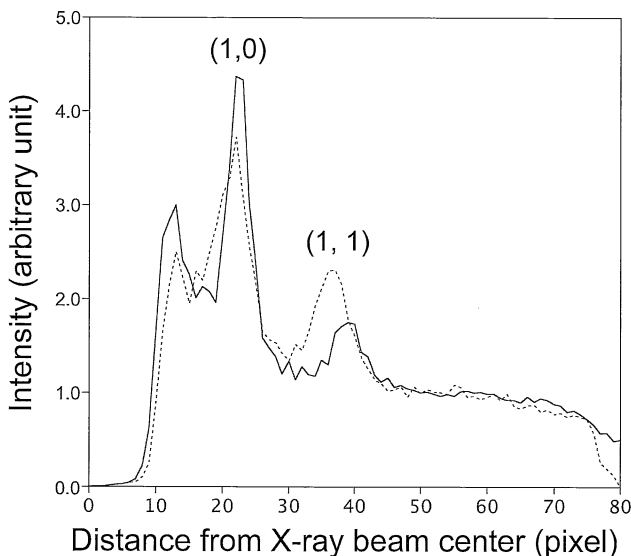


図6. 心筋線維のX線回折像の輝度分布。収縮前(実線)に比べ、収縮時(点線)では(1, 0)赤道反射の輝度が低下し、やや左方へシフトしていることが解る。逆に(1, 1)赤道反射の輝度は増加し、左方へのシフトも見られる。X線の中心から10ピクセルまでは撮像素子(CCD)を保護するため、試料と撮像素子の間に鉛ブロックを置いているため、撮像素子への入力がない。

また、生体組織の大部分を占める水による吸収を考えると、光量(光子量)もできるだけ多い方がよい。心筋組織を用いてのX線回折実験は30年前から行われているが、その当時はX線源として使用できるのは管球のみであり、理想的な実験条件ではなかった。図7は、その当時のX線回折像から得られた心筋線維の横断面のイメージである。ここで表示したイメージは、拍動性の収縮をしていない心筋組織のX線回折像から逆フーリエ変換により再構築したものである。図7A, B, Cは(1, 0)および(1, 1)赤道反射から再構築しているが、図7D, Eは(9, 0)赤道反射までの情報から再構築しているため、ミオシン線

維、アクチン線維がより鮮明に描写されている<sup>10)</sup>。

静止状態にある心筋からのX線回折像の記録は、露光時間の延長によりシグナル/ノイズ比を高めることができるが、拍動している心筋では露光時間の延長はできない。そこで心電図に同期させたシャッターにより拡張期、収縮期のX線回折像をそれぞれ記録する必要があるが、1心拍あたりの露光時間は静止筋標本と比べると極めて短く、シグナル/ノイズ比を改善するために、一つのイメージを得るために一万数千拍の加算回折像が必要であった。この拍動心筋のX線回折実験は、長時間実験の可能なイヌ摘出心血液交叉灌流標本を用い、右心室から引

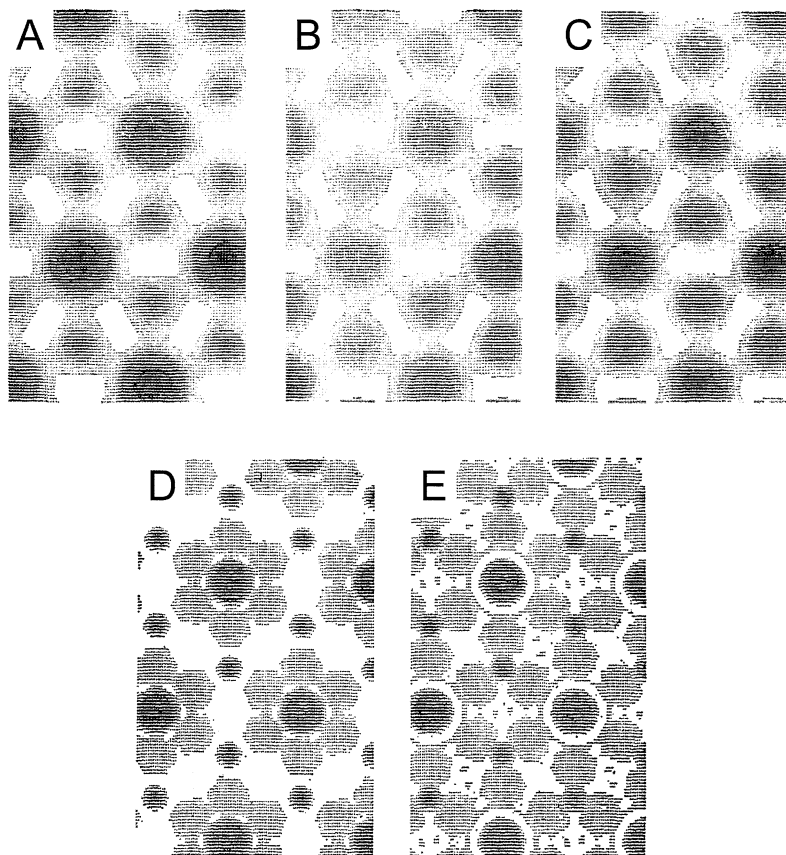


図7. 筋線維のX線回折像をもとに、逆フーリエ変換により再構築した筋線維断面図。A-C, (1, 0)赤道反射, (1, 1)赤道反射から再構築したイメージ。A, 静止状態。B, 強縮状態。静止状態より太い線維が細くなり、逆に細い線維は太くなっていることが解る。C, 硬直状態。すべてのミオシン頭部がアクチンと結合していると考えられる。強縮状態と比べ、太い線維はさらに細く、細い線維はさらに太くなっている。D-E, (9, 0)赤道反射までの回折像から再構築したイメージ。骨格筋では、心筋よりはるかに明瞭に高次回折像が記録できる。また情報量が多いため、より詳細なイメージが得られる。D, 静止状態。E, 硬直状態。ミオシン頭部が放射状に細いアクチン線維側へシフトしていることがよく分かる。(文献10より引用)

き出した右室乳頭筋を1 Hzで刺激しながらX線記録用のシャッターを制御し、一つのイメージを4時間かけて記録したということである<sup>12,14)</sup>。

その後、筑波にある高エネルギー研究機構に放射光施設が完成し、ラット右心室乳頭筋摘出標本を用い Krebs液、Tyrode液等で表面灌流しながらX線回折像を記録することが可能となった。そして、1997年からは、第三世代放射光施設であるSPring-8が稼働し、ラット心筋・心臓標本、マウス非開胸標本を用いて、1心拍のみで心筋X線回折実験が可能となった。

放射光とは、運動している荷電粒子の軌道が強い磁場などにより曲げられた時に、軌道の接線方向にでる電磁波をさす<sup>15)</sup>。例えば真空中をある速度で運動している電子を考える。電子の進行方向(電流と逆向き)に垂直な磁界を加えると、フレミングの左手の法則に従って電子の進行方向および磁界に対して垂直な方向にローレンツ力(向心力)が働き、電子は円運動をするようになる。電子のエネルギー(速度)が十分に小さい場合はニュートン力学の範疇にあり、電子はこの円運動の接線方向に広がりを持った電磁波を出し、この電磁波はサイクロトロン放射と呼ばれ、また、そのスペクトルも連続スペクトルで幅広いものである(可視光で言えば白色)。

電子のエネルギーが高くなり、光速に近い状態で運動しているときには、相対性理論の範疇に入り、電子の質量はその速度により増大する。この高いエネルギーを持った電子の進行方向に垂直な磁場をかけると、やはり円運動を行いその接線方向に電磁波を放出するが、この場合はシンクロトロン放射と呼ばれ、電子のエネルギーが高いほど高い指向性を示し、より狭い範囲に電磁波を放出する。たとえばSPring-8のヘリカルアンジュレータで得られるシンクロトロン放射光は、スリットにより指向性の低い高調波を除去し、単色、平行光、同位相というレーザー光に匹敵するような特徴が得られる。これにより、ミラーを用いた単色化が不要となり光子量の損失を抑えることができる。我々が実験を行っているBL40XUビームラインも、ヘリカルアンジュレータを用いており、X線のエネルギーが12.4KeVの時のフォトン数は1秒あたり $10^{15}$ 個になる。このX線のエネルギーと光子量は、ヒトの掌であればすぐに穿孔させることができるほどであり、アルミニウムのフィルターにより光子量を下げ、スリットを通してより細いX線にするなど、試料に応じたセットアップが可能である。この放射光の特徴により、心筋収縮のX線回折実験では単収縮、実時間で解析が可能となった。

### ラット右心室乳頭筋でのX線回折実験

我々は最初にラット右心室乳頭筋を用いた実験をSPring-8で行った。ラット乳頭筋を用いる利点は、心筋細胞がほぼ一方に配向しておりX線回折像の処理が行いやすいこと、厚さが数百マイクロメートルほどでありSPring-8で得られるような指向性の高いX線であれば、X線の光子量もさほど必要としないことが挙げられる。また、赤色レーザー光も透過できるため、筋節の繰り返し構造に基づく赤色光回折像実験を同時に行うことにより、筋節の長さ情報が得られる点も利点として挙げられる。逆に欠点としては、約2~3ミリメートル×数百マイクロメートルの微小な組織であり実験手技の習熟に時間がかかる点、表面灌流標本であるため酸素および代謝基質の供給は乳頭筋表面からの拡散に頼らざるを得ず、ラットの生理的な心拍数(300~400拍/分)と比べ遙かに低い刺激頻度(1拍/5秒)での実験しか行えない点が挙げられる。

ラット右心室乳頭筋を用いた実験はSPring-8のBL45XUビームラインを用いて行われており、乳頭筋の長さ-張力関係と、それに対応するアクチン、ミオシン相互作用と格子面間隔の関係についての研究がなされている。我々の研究グループは、ラット右心室乳頭筋が等尺性収縮時に最大張力( $F_{max}$ )を発生するように筋長を設定し、最大張力を発生する等尺性収縮時の張力とX線回折像を経時的に記録した。次いで、等張性収縮時の張力が、 $F_{max}$ の80%、50%、30%となるように収縮中の乳頭筋を短縮させ、同じく張力とX線回折像を記録した。その結果、 $F_{max}$ の80%および50%の等張性収縮では、(1, 0)/(1, 1)輝度比が等尺性収縮時と同じ程度まで低下し、等張性収縮では等尺性収縮より早く(1, 0)/(1, 1)輝度比が拡張期末レベルに戻ることを明らかにした。また、 $F_{max}$ の30%での等張性収縮では、(1, 0)/(1, 1)輝度比の低下の程度も等尺性収縮より明らかに小さく、ミオシン頭部の移動量自体が減少している可能性が示された。また、 $F_{max}$ の80%、50%、30%の等尺性収縮では、この順に筋の短縮速度は高まり、筋の短縮に伴う(1, 0)格子面間隔も増大した<sup>16)</sup>。

筋節長と(1, 0)格子面間隔の計測では、生理的な筋節長の変動(約1.7~2.4マイクロメートル)の変化により、(1, 0)格子面間隔は約36~40ナノメートルの範囲で変動することを明らかにした。すなわち筋節の伸長にともない(1, 0)格子面間隔は小さくなる傾向を示した。また、筋節長と(1, 0)格子面間隔から求められる格子容積は、筋節が長くなるにつれ格子容積も増大する傾向を示した。細胞膜を除去したスキンド標本では(1, 0)格子



面間隔が43ナノメートルにもなるデータが示されているが、我々のデータでは最大で40ナノメートルまでであり、正常な心筋細胞には筋線維格子の膨化を抑えるような因子があるものと推察された<sup>17)</sup>。

Frank-Starlingの法則は、筋節長の増大に伴う筋線維格子間隔の狭小化により、アクチン、ミオシン相互作用の発生確率の増加などが関与しているとされており、ラット右心室乳頭筋を用いて解析した我々の研究は、そのメカニズム解明の一助となると考えられる。しかし、右心室乳頭筋は右室の収縮時に三尖弁が右房側へ逸脱するのを防ぐ働きを持つ組織であり、乳頭筋のデータに基づいて全身に血液を送る左室機能についてすべてを説明することはできないため、次に摘出心標本を用い、左心室壁を構成する心室筋の挙動を解析する手

法を開発した。

#### 心室壁のX線回折像は二重の環状を呈する

心室壁へX線を照射すると、乳頭筋とは異なるパターンの回折像が得られる<sup>18)</sup>。これから述べる実験は、SPring-8のBL40XUというビームラインで、準単色放射光(波長0.08nm, ビーム直径 $100 \times 250 \mu\text{m}$ )をラット摘出心標本の左心室自由壁に照射して行った。8~10週齢のWistarラットの心臓を摘出後、20mMの2,3-butanedione monoximeを加えたタイロイド液で灌流した。実験ハッチ内では心基部が上、心尖部を下にして、左心室前壁がX線源側を、左心室後壁がX線撮像装置(イメージンテンシファイアとCCDカメラ)側を向くように配置した。この時、左心室自由壁の心外膜面は

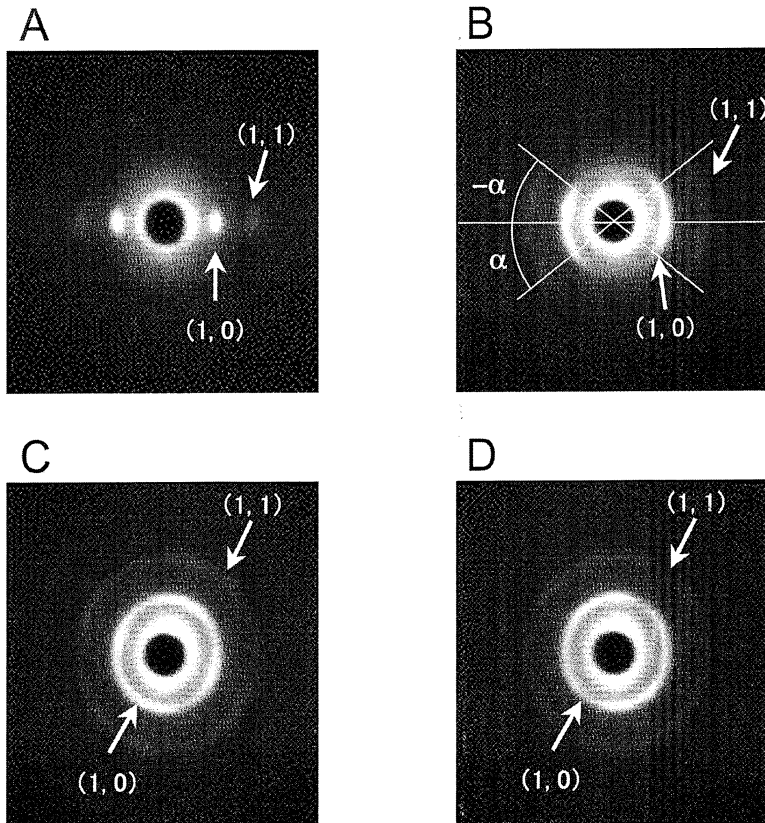


図8. ラット左心室自由壁からのX線回折像。A, X線が心外膜直下を通るときの回折像。B, X線が心外膜直下よりやや深い部位を通るときの回折像。前壁側、後壁側の心外膜下の筋線維が鉛直方向に対して $\pm\alpha$ の傾きを持つため、回折像は水平に対して $\pm\alpha$ の範囲にある円弧状の回折像を示す。C, X線が心室壁中層付近を通るときの回折像。ほぼ環状を呈するが、心外膜下の筋線維の回折像が、 $\pm 45^\circ$ の方向に輝度の高いスポットを作る。D, X線が心内膜下付近を通るときの回折像。左心室自由壁の前壁側、後壁側すべての回折像の重ね合わせと考えられ、同じく環状を呈する。

ほぼ鉛直となり、X線は左心室自由壁を前壁側から後壁側へ通過する。ここで、心臓を水平面内でX線に垂直な方向に動かすことで、X線が通過する部位、すなわちX線を左心室自由壁外膜面からどれだけ深い部位を通過させるか、自由に設定できる。このようにして左心室自由壁にX線を照射しその回折像のパターンとX線が通過した心外膜面からの深さの関係をみてみると、X線が通過する部位が心外膜直下から心内膜面に向かうにつれて、X線回折像は図8のように変化した。まずX線が心外膜直下を通過するときは、乳頭筋のX線回折像に類似したスポット状の回折像が得られる(図8A)。心外膜から0.6ミリメートルまでの深さでは、これらのスポット状の回折像が上下方向に広がり、円弧を呈するようになる(図8B)。さらに心室壁の中層(心外膜から約1ミリメートル)では円弧はほぼつながらり、環状の回折像を示す(図8C)。このとき、約±45度の方向に輝度の高い部分が観察できる。さらに深い部分では、より均質な環状の回折像が観察されるようになる(図8D)<sup>10</sup>。

このようなX線通過部位と回折像の変化との関係は、左心室自由壁での筋線維の方向の違いと、それらの筋線維に由来する回折像の重ね合わせにより説明することができる。筋線維からのX線回折像は、X線と筋線維の軸が平行であるとき以外は、X線と筋線維の軸の双方に対し垂直な方向に現れる。左心室自由壁の筋線維は、心外膜下では左ねじ方向、中層では水平方向、心内膜下では右ねじ方向に配向していることが知られており<sup>19,20</sup>、この筋線維の配向とX線の通過部位から、回折像のパターンを理解することができる。まず、心外膜直下では筋線維は左ねじ方向に配向しているが、筋線維の投影像は鉛直方向にあるため、図8Aのような水平方向の回折像が得られる。もう少し深い部分をX線が通過する場合、心外膜下層では筋線維はやはり左ねじ方向に配向しているがX線が入射する前壁側では、筋線維の投影像は鉛直に対して $\alpha$ という角度を持って左上から右下方向に傾いている。X線の出口にあたる後壁側では、逆に鉛直に対し $\alpha$ という角度を持って右上から左下方向に傾いている。X線が通過する部分の筋線維の投影像は、前壁側の投影像と後壁側の投影像の間に連続して回転するように現れるため、観察される回折像は水平方向に対し± $\alpha$ の角度を持った二重円弧となる(図8B)。

X線が中層付近を通過するとき、心室壁中層の筋線維の配向は水平方向であり、一部はX線と同軸となる。このような場合には環状の回折像が得られる。ただし、前壁側、後壁側にある中層の筋線維は鉛直方向の回折像を、心外膜下層の筋線維は水平を挟んだ円弧状の回折像を示

し、これらの重ね合わせにより図8Cのような回折像が得られる。さらにX線が深い部分を通過するときには、前壁側、後壁側の心外膜下心筋、中層心筋、心内膜下心筋からの回折像が重ね合わせられ、より均質な環状回折像を呈すると理解できる(図8D)。

#### 左心室拡張期末圧の増大に伴いミオシン線維格子間隔は小さくなり、アクチン・ミオシン相互作用は強くなる

ここで左室容積の増大に伴う、筋線維格子およびアクチン、ミオシンの相互作用について考えてみる。上で述べた実験と同じSPring-8のBL40XUを使用し、8~10週齢のWistarラットから摘出した心臓を、タイロド液で灌流しつつ実験ハッチ内に配置した。10%ホルマリンの少量局所注入により完全房室ブロックを作成し、心室を2 Hzで電気刺激した。左心室腔内に、水を満たした薄いラテックスのバルーンを挿入し、硬性チューブを介して圧トランスデューサに接続し、等容性収縮時の左心室圧を記録した。拡張末期圧が0 mm Hgもしくは20 mmHgとなるようバルーン内の水量を調整し、それぞれの拡張末期圧での(1, 0)格子面間隔および(1, 0)/(1, 1)輝度比について解析した。

等容性に拍動している左心室における拡張末期および収縮末期のX線回折像を図9に示す。収縮期には(1, 0)赤道反射の輝度が著しく低下していることが解る。拡張末期圧を0 mm Hgから20 mm Hgへ増加させると、ミオシン線維格子間隔は約37 nmから36 nmへと有意に小さくなったが、(1, 0)/(1, 1)輝度比はほとんど変化していない。収縮に伴う左心室発生圧は約110 mm Hgから約150 mm Hgへ増加し、収縮期の(1, 0)/(1, 1)輝度比は1.0から0.7へ低下した(図10)。筋節の伸展に伴う格子間隔の減少は、アクチンとミオシンの結合確率を増加させると考えられている。従って、拡張末期圧の増加に伴う左心室発生圧の増大は、ミオシン線維格子間隔の有意な減少と、それに伴う(1, 0)/(1, 1)輝度比の低下、すなわちクロスブリッジ形成の増加によると考えられる。

#### 生体位心臓のX線回折実験

摘出心標本以外にも、SPring-8を利用した心筋のアクチン・ミオシン相互作用に関する実験が行われている。まず、開胸ラット心標本を用いた実験が行われている。その方法を概説すると、麻醉下および人工呼吸下にラットを開胸し、左心室心尖部より1.4 Frの左室圧計測用のカテーテルと1.5 Frの左室容積測定用のコンダクタンスカテーテルを左室内に留置する。これらのカテーテルから得られた左心室圧および左室容積データから駆出性収縮時の圧容積ループが得られる。この標本の左心室後壁

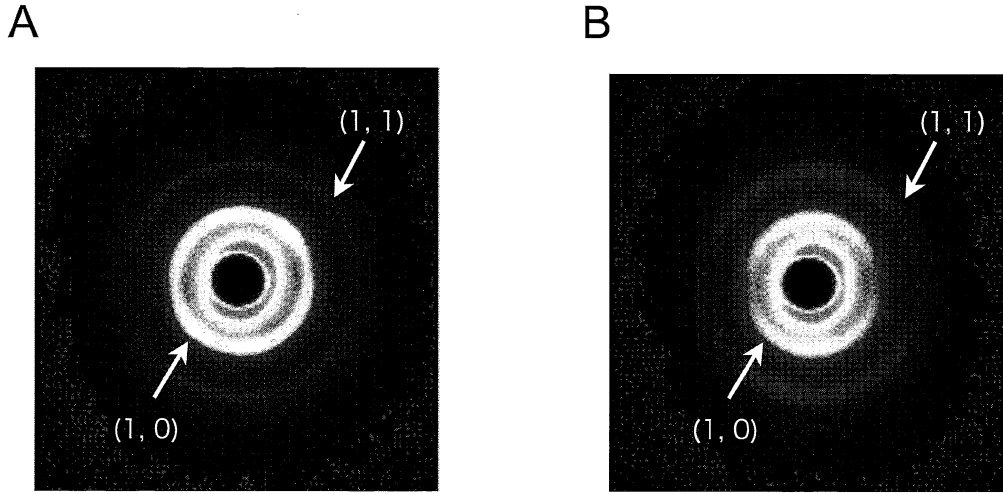


図9. ラット摘出心標本において等容性収縮時の回折像変化. A, 拡張期末, B, 収縮期末のイメージ. 収縮により(1, 0)赤道反射の輝度が低下していることが解る.

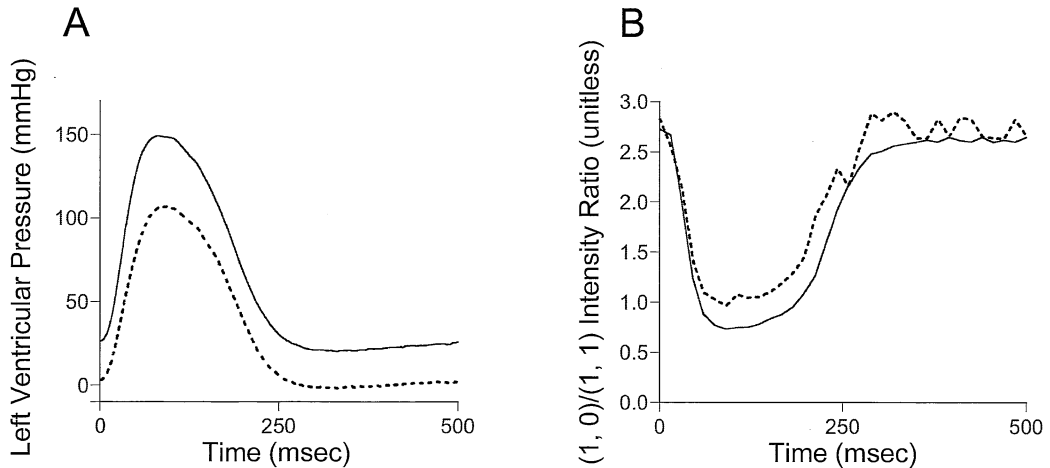


図10. 摘出心標本において拡張期末圧が0および20mmHgの時の左心室圧と(1, 0)/(1, 1)輝度比の時間経過. A, 拡張期末圧の増加により, 左心室発生圧も増加していることが解る. B, 拡張期末圧の増加により, 収縮時の(1, 0)/(1, 1)輝度比が低下している, すなわちより多くのミオシン頭部が移動し, (1, 0)赤道反射の輝度が低下していることが解る.

~自由壁の背側付近に, BL 40 X UビームラインのX線を照射し, そのX線回折像を解析した. 心臓の収縮に伴い(1, 0)/(1, 1)輝度比は摘出心での等容性収縮の時と同じように低下することが確認されたが, (1, 0)格子面間隔は摘出心での等容性収縮の時と比べ, 収縮に伴い明らかに増大することが確認された. ラット生体位心では

一心周期は200~300ミリ秒ほどであるから, この短い間に心筋細胞の容積が変わらないと仮定すると, 駆出性収縮に伴う(1, 0)格子面間隔の増大は, 心筋細胞の長軸方向の短縮により単軸方向の細胞径が増大しているためと考えられる. 摘出心標本での等容性収縮時にも左心室のデフォーメーションにより心筋細胞が多少短縮し(1, 0)

格子面間隔もやや変化するが、生体位心の駆出性収縮では心室壁の心筋細胞はより明確な短縮に伴う大きな(1, 0)格子面間隔の変化を見せる。これは実際にポンプ活動を行っている心臓におけるアクチン、ミオシンというナノメートルオーダーの分子モータ挙動を観察していることになる。ピアソンらはこの標本を用いて、心筋梗塞時の分子モータの機能不全を解析している<sup>20)</sup>。

また、杜らはマウス左心室心筋のX線回折像の記録とその解析に成功している。これは、麻酔下および人工呼吸下のマウスを用い、体毛によるX線の散乱を避けるために胸背部の皮膚を除去しただけの開胸を伴わない標本である。心臓は胸郭や肺などに囲まれた状態にあるため、左室心筋からのX線回折像を記録するには、前胸部肋間からX線を照射し、左室壁を通した後、背部肋間から撮像素子に到達するようセットアップする。右内頸動脈より左室内に心室圧測定用のカテーテルを挿入留置し、左心室圧とX線回折像を同時に記録する。従って、この標

本から得られるX線回折像は、左室自由壁心筋の回折像と、骨格筋である前胸部および背部肋間筋の回折像の重ね合わせとして記録される。しかしながら、心臓の動作環境における(1, 0)格子面間隔および(1, 1)格子面間隔は、肋間筋の動作環境におけるそれぞれの格子面間隔と異なることから、心筋に由来するX線回折像を分離することが可能である。これにより、胸郭内で拍動している心臓のアクチン・ミオシン相互作用の解析が可能となり、ドブタミン負荷により収縮期末の(1, 0)/(1, 1)輝度比がコントロールより有意に低下し、アクチン・ミオシン相互作用の増加、すなわちクロスブリッジの形成量が増加したことが確認された<sup>20)</sup>。

**赤道反射以外の回折像**

ここまで、心筋の赤道反射についてその解析方法と意味合いについて、概説してきた。しかし、筋線維の繰り返し構造は線維に平行な方向だけでなく、筋線維の軸方向にも存在する(図11 A)。アクチン線維はほぼ球状のア

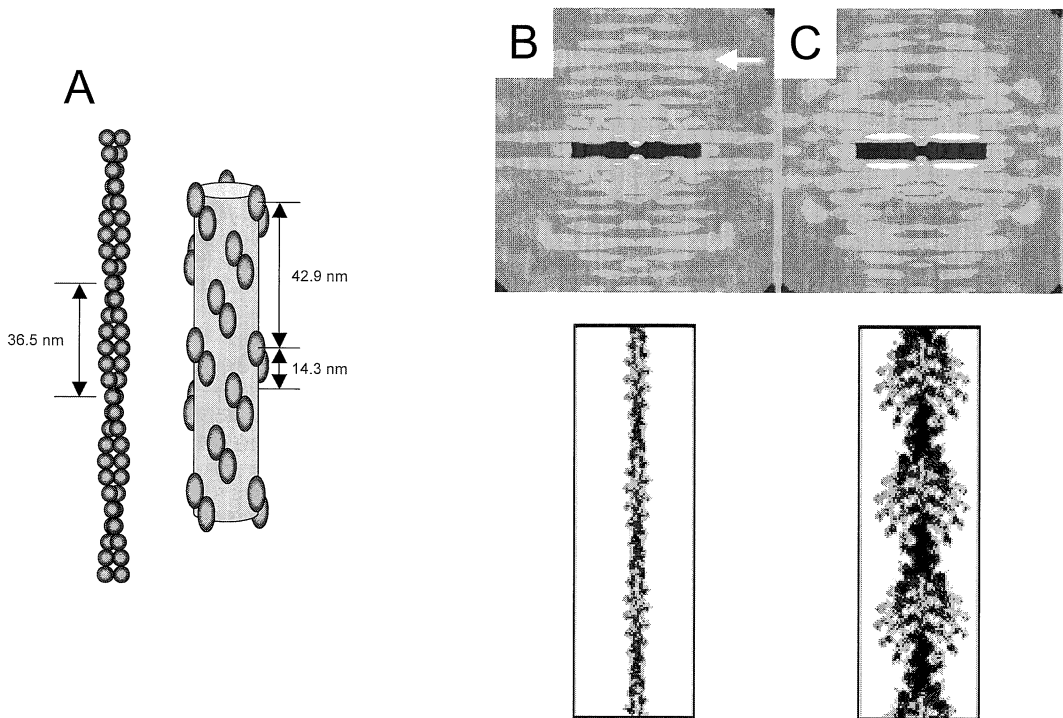


図 11. A, アクチン線維とミオシン線維。共に軸方向に繰り返しのあるらせん構造を持つ。B, アクチン線維の子午方向のX線回折像。不連続らせんによるたたみ込みにより層線(白矢印)が現れている。C, Bのアクチン線維に、ATPを供給せずにミオシン頭部だけを作用させたときの子午方向のX線回折像。硬直状態と同じくすべてのアクチンにミオシンが結合していると考えられる。したがって、アクチン線維の電子密度が上がり、X線の散乱量も増大し、結果的に各子午反射、層線の輝度が増大していることが解る。

クチン分子が重合し、36.5 ナノメートルというピッチを持った二重らせん構造をしている。また、ミオシン線維は、正三角形の拡張点にミオシン頭部が二つずつ配置され、それが14.3 ナノメートル毎に40度ずつ回転した構造のため、結果として $14.3 \times 3$ 、すなわち42.9 ナノメートルピッチの三重らせん構造を持っている。このような軸方向の繰り返し構造に由来する回折像を、子午反射という。筋線維の軸方向の繰り返し構造が、らせん構造を持たない単純な軸方向の繰り返しであれば、子午反射は単純に筋線維の軸方向に現れ、赤道反射、子午反射による十字方向の回折像が得られるはずである。らせん構造からのX線回折像は、X字状に並んだスポットとして観察される。しかし、実際に観察される子午反射は単純なX字状ではない。これは、アクチン線維もミオシン線維も、モノマーの重合体あるいは規則的な集合体であり、電子密度分布が不均一な(連続ではない)構造になっている。このような不連続らせん構造のX線回折像は、上記のX字状の回折像が、さらに不連続らせん構造の出現周期(ミオシン線維ならば14.3ナノメートル)に由来する間隔毎にX字状の回折像が重ね合わされて現れる、たたみ込みという状況が起きる<sup>10)</sup>。

図11 Bは心筋線維ではなくアクチン線維のみからのX線回折像の子午反射である。アクチン線維は上記のように不連続らせん構造であるため、単純なX字状ではなく、それらのたたみ込みによりいくつかの回折像が幅を持って観察され、層線と呼ばれている(図中白矢印)。このアクチン線維に単離したミオシン頭部をATPの供給なしに作用させると、死後硬直と同じようにすべてのアクチン分子にミオシン頭部が結合した状態となる(図11 C)。このときのX線回折像はすべての層線の輝度が増加しており、子午反射によるアクチン・ミオシン相互作用解析の可能性も考えられる。しかし、図11 B, Cに示すように、子午反射は赤道反射と比べてその輝度が低いことに加え、心筋の場合はミトコンドリアなどの影響によりほとんど見えないことが多いことから、子午反射によるアクチン・ミオシン相互作用の解析は新たなブレイクスルーがない限り難しいと思われる。

心筋のX線回折実験は、心臓を動かす分子モータのマス挙動を見るためには最適な手法であり、また、心筋局所毎にことなる振る舞いを示す可能性もある。我々の研究グループでは、心不全の病態生理を心臓という臓器レベルで力学的な評価や、エネルギー代謝、興奮収縮連関など様々な角度から解析しており、X線回折実験により収縮機能へのアプローチもできるようになった。現在、分子生物学的手法と臓器レベルでの研究手法のキャブリ

ングが大きく注目されるようになってきており、今後も活発な研究を展開していきたいと考えている。

## 謝 辞

SPring-8での実験に際し、八木直人先生、菅弘之先生、梶谷文彦先生、高木都先生から頂いた、ご助言、ご協力に心より感謝申し上げます。また、実験に協力していただいた岡山大学、川崎医科大学、奈良県立医科大学の諸先生方へ感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Sako, Y., Minoghchi, S. and Yanagida, T.: Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* **2** : 168-172, 2000.
- 2) Sako, Y. and Yanagida, T.: Single-molecule visualization in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. Suppl.*: SS1-5, 2003.
- 3) Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Momomura, S., Chaen, S., Omata, M. and Sugi, H.: Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation. *Circ. Res.* **82** : 1029-1034, 1998.
- 4) Sugiura, S., Yamashita, H., Sata, M., Momomura, S., Serizawa, T., Oiwa, K., Chaen, S., Shimmen, T. and Sugi, H.: Force-velocity relations of rat cardiac myosin isozymes sliding on algal cell actin cables in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* **1231** : 69-75, 1995.
- 5) Suga H. Ventricular energetics. *Physiol. Rev.* **70** : 247-277, 1990.
- 6) Shimizu, J., Araki, J., Iribe, G., Imaoka, T., Mohri, S., Kohno, K., Matsubara, H., Ohe, T., Takaki, M. and Suga, H.: Postextrasystolic contractile decay always contains exponential and alternans components in canine heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **279** : H225-H233, 2000.
- 7) Shimizu, J., Todaka, K. and Burkhoff D.: Load dependence of ventricular performance explained by model of calcium-myofilament interactions. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **282** : H1081-H1091, 2002.

- 8) Kaneko, T., Tanaka, H., Oyamada, M., Kawata, S. and Takamatsu, T.: Three distinct types of Ca(2+) waves in Langendorff-perfused rat heart revealed by real-time confocal microscopy. *Circ. Res.* **86** : 1093-1099, 2000.
- 9) Toyota, E., Fujimoto, K., Ogasawara, Y., Kajita, T., Shigeto, F., Matsumoto, T., Goto, M. and Kajiya, F.: Dynamic changes in three-dimensional architecture and vascular volume of transmural coronary microvasculature between diastolic- and systolic-arrested rat hearts. *Circulation* **105** : 621-626, 2002.
- 10) 心臓・血管研究方法の開発, 江橋節郎編, 学会出版センター, 1983.
- 11) X線結晶解析の手引き, 桜井敏雄, 裳華房, 1983.
- 12) Matsubara, I., Suga, H. and Yagi, N.: An X-ray diffraction study of the cross-circulated canine heart. *J. Physiol.* **270** : 311-320, 1977.
- 13) Yagi, N., Ito, M.H., Nakajima, H., Izumi, T. and Matsubara, I.: Return of myosin heads to thick filaments after muscle contraction. *Science* **197** : 685-687, 1977.
- 14) Matsubara, I., Yagi, N. and Endoh, M.: Movement of myosin heads during a heart beat. *Nature* **278** : 474-476, 1979.
- 15) 放射光について, SPring-8ホームページ URL:<http://www.spring8.or.jp/ja/users/new-user/sr/>
- 16) Okuyama, H., Yagi, N., Toyota, H., Araki, J., Shimizu, J., Iribe, G., Nakamura, K., Mohri, S., Kakishita, M., Hashimoto, K., Morimoto, T., Tsujioka, K., Kajiya, F. and Suga, H.: An X-ray diffraction study on contraction of rat papillary muscle with different afterloads. *Adv Exp. Med. Biol.* **538** : 533-539; discussion 539, 2003.
- 17) Yagi, N., Okuyama, H., Toyota, H., Araki, J., Shimizu, J., Iribe, G., Nakamura, K., Mohri, S., Tsujioka, K., Suga, H. and Kajiya, F.: Sarcomere-length dependence of lattice volume and radial mass transfer of myosin cross-bridges in rat papillary muscle. *Pflugers Arch.* **448** : 153-160, 2004.
- 18) Yagi, N., Shimizu, J., Mohri, S., Araki, J., Nakamura, K., Okuyama, H., Toyota, H., Morimoto, T., Morizane, Y., Kurusu, M., Miura, T., Hashimoto, K., Tsujioka, K., Suga, H. and Kajiya, F.: X-ray diffraction from a left ventricular wall of rat heart. *Biophys. J.* **86** : 2286-2294, 2004.
- 19) Streeter, D. D., Jr., and W. T. Hanna. : Engineering mechanics for successive states in canine left ventricular myocardium. II. Fiber angle and sarcomere length. *Circ. Res.* **33** : 656-664, 1973.
- 20) Streeter, D. D., Jr., H. M. Spotnitz, D. P. Patel, J. Ross, and E. H. Sonnenblick. Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. *Circ. Res.* **24** : 339-347, 1969.
- 21) Pearson, J.T., Shirai, M., Ito, H., Tokunaga, N., Tsuchimochi, H., Nishiura, N., Schwenke, D.O., Ishibashi-Ueda, H., Akiyama, R., Mori, H., Kangawa, K., Suga, H. and Yagi, N.: In situ measurements of crossbridge dynamics and lattice spacing in rat hearts by x-ray diffraction: sensitivity to regional ischemia. *Circulation* **109** : 2976-2979, 2004.
- 22) Toh, R., Shinohara, M., Takaya, T., Yamashita, T., Masuda, S., Kawashima, S., Yokoyama, M. and Yagi, N.: An X-Ray diffraction study on mouse cardiac cross-bridge function in vivo: effects of adrenergic {beta}-stimulation. *Biophys. J.* **90** : 1723-1728, 2006.