

## 分子生理学講座

教授：	竹森 重	筋生理学・体力医学
講師：	山澤徳志子	筋生理学・薬理学
講師：	山口 眞紀	筋生理学・体力医学

### 教育・研究概要

#### I. X線回折法による ATP 加水分解にともなうミオシン頭部の構造変化の測定

骨格筋収縮反応の主役であるミオシン頭部 (M) は ATP 加水分解の自由エネルギーをいったん  $M \cdot ADP \cdot P_i$  の形で堰き止めた後、アクチン (A) と相互作用して収縮反応に利用されると考えられている。ところがミオシン頭部が ATP 加水分解の自由エネルギーを堰き止める詳細を調べようとする、アクチンとの相互作用がミオシン固有の変化をマスクしてしまう。そこでアクチンフィラメントをゲルゾリン処理で除いた除アクチン筋線維中で ATP 加水分解反応中間体の X 線回折像の違いを高エネルギー加速器研究機構内フォトンファクトリー-BL6A にて取得し、MATLAB (Mathworks Inc) により回折信号を解析することでミオシンが ATP を加水分解する際の固有の構造変化を検出することを試みた。

ATP のミオシン頭部への結合によりミオシン構造の明らかな変化は見られ

なかったが、続く加水分解によりミオシン頭部の重心がロッドに近づき、ミオシンがコンパクトな構造になったことが示された。加水分解後のリン酸の放出により（ADP 結合状態）ミオシン頭部の重心は再びロッドから遠ざかり、ADP 放出によっても大きな変化は起こらなかった。

## II. 骨格筋線維内の水分画の相転移にともなう熱測定

核磁気共鳴（NMR）法、核磁気共鳴画像（MRI）法を用いた研究により、骨格筋線維内には少なくとも 5 つの水成分分画が区別されることがこれまでに明らかになっている。この水成分分画は細胞内の水分子集団とそれを取り巻く構造タンパク質との分子間相互作用による束縛によって形成されることまでは突き止めたが、ではこの分子間相互作用が具体的にどのようなものであるかについてはいまだ明らかでない。これは NMR 法と MRI 法が、水集団アンサンブルの振る舞いをみる方法であり、同じ振る舞いが様々な分子間相互作用の結果として表れ得ることが、各水集団の特性を分子間相互作用レベルの知見と直接結び付けることを許さないことによる。この難点を補うために、示差走査熱量測定法（DSC 法）を用いて骨格筋細胞内の各水分画の相転移にともなう熱の出入りを計測し、各水分画内での分子間相互作用の強さを推定する試みを開始した。本年度は細胞内の ATP 加水分解による微小な熱放出が起こらない条件、つまりスキンドファイバー（細胞膜除去筋線維）に ATP を加えない硬直条件下での DSC 測定を行った。

スキンドファイバーを常温から冷却していくと凝固点の異なる複数の水成分が確認された。一方で、それらを昇温していくと氷の融解が $0^{\circ}\text{C}$ 付近以外でも生じ、またその際の融解熱は、高温によりタンパク変性が起こる前では変性後より試料 1g あたり約 0.8J 少ないことがわかった。またこの熱量は高温によるタンパクの変性熱と量的に釣り合うことが確認された。このことから変性前の水分子の一部は常温においても氷のような状態で維持されている可能性が示唆された。 $-80^{\circ}\text{C}\sim+20^{\circ}\text{C}$ での平均比熱は高温によるタンパク変性前は変性後より 1g あたり  $0.04\text{J}/^{\circ}\text{C}$ 大きかった。細胞内のタンパク質の構成割合が 10%程度であることを考えると、水分子が熱貯めとしての役割を担っていると考えられた。

### Ⅲ. ATP 加水分解に伴うミオシン～筋原線維周囲の水性状変化

Initium 社と共同で、QCM（水晶発振子マイクロバランス）装置を用いてミオシンタンパク質とその周囲の水との相互作用の性質を測定し、ミオシン周囲の粘性の高い水は硬直状態ではタンパク質自体の 6 倍近い量であることが分かった。ミオシンによる ATP 加水分解反応の反応中間体の一つである  $\text{M}\cdot\text{ATP}$  状態を実現する  $\text{ATP}\gamma\text{S}$  の添加では水の束縛量はほとんど変化しなかったが、他の中間体である  $\text{M}\cdot\text{ADP}\cdot\text{P}_i$  状態と  $\text{M}\cdot\text{ADP}$  状態では、その束縛量は半分に減少した。

また、以前測定を行った NMR 法を用いた筋原線維懸濁液の水プロトンの緩

和経過は硬直液中で測定したものであったが、これを弛緩液中で測定した。この溶液中では多くのミオシンは、中間体  $M \cdot ADP \cdot Pi$  の状態であると思われる。硬直液中では筋原線維表面から 500nm ほどの距離に及ぶ範囲で水を束縛していたが、弛緩液中では筋原線維外の水の束縛はほとんどなくなることが分かった。

#### IV. 骨格筋幹細胞に及ぼすポリアミンの役割

大豆食品等に含まれているポリアミンは微生物、動物、植物を問わず生体内において普遍的に存在する生理活性アミンで、代表的なものにプトレシン、スペルミジン、スペルミンがある。主として核酸、特に RNA と相互作用することによりタンパク・核酸合成を促進し、細胞増殖因子として機能する。生体内では、プトレシン $\rightleftharpoons$ スペルミジン $\rightleftharpoons$ スペルミンと相互変換することにより、ポリアミンとしての至適濃度が厳密に保たれている。また、アルツハイマー病や筋肥大などに関与するという報告もある。本研究では骨格筋幹細胞を用いて骨格筋肥大効果を追及した。マウス骨格筋幹細胞 (C2C12 細胞) を牛胎児血清入り増殖培地で増殖させ、24 時間間隔で細胞数を測定してポリアミン添加群とコントロール群で比較した。骨格筋幹細胞を増殖させた後、低血清の分化誘導培地に交換して骨格筋幹細胞から多核の骨格筋細胞へと分化誘導し、4 日後に核、収縮タンパク質、横紋を染色して共焦点顕微鏡で観察し、ポリアミン添加群とコントロール群で比較した。ポリアミンを添加することにより、

骨格筋幹細胞の増殖速度に有意な差が生じなかった。一方多核の骨格筋細胞への分化に関しては、ポリアミンを加えることで多核になる細胞数、および1つの骨格筋細胞に含まれている核の数はどちらも有意に増加した。また、脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇もポリアミンを加えたことにより増強された。これより、骨格筋幹細胞におけるポリアミンの効果は、細胞増殖より細胞分化過程に作用していると示唆された。

## V. 速筋と遅筋での微細構造の違いと筋パフォーマンスの関係

速筋型と遅筋型の除膜筋線維標本の X 線回折像を取得し、筋タイプによる筋フィラメント構造の違いを解析した。実験は、高エネルギー加速器研究機構内フォトンファクトリー (BL6A) にて、主に速筋型ミオシンからなるウサギ腸腰筋と主に遅筋型ミオシンからなるウサギヒラメ筋から作成した除膜筋線維標本の二次元 X 線回折像を弛緩条件下で取得し、回折信号を解析した。

速筋型と遅筋型で、太いフィラメントと細いフィラメント間の距離を反映する 1,0 および 1,1 格子間隔に差は認められなかった。太いフィラメントと細いフィラメント間の距離は速筋と遅筋のパフォーマンスの違いの要因ではないと考えられた。

ミオシン頭部とアクチンの距離を反映する赤道反射強度比 (1,1 強度/1,0 強度) に関しても、速筋型と遅筋型で、差は認められなかった。ミオシン頭部とアクチン間の距離も速筋と遅筋のパフォーマンスの違いの要因ではない

と考えられた。

ミオシン頭部のミオシンロッドからの距離を反映するミオシン層線のピーク座標も、赤道反射強度の結果と対応して、速筋型と遅筋型で変わらなかった。しかしミオシン頭部のミオシンロッド軸を中心とした回転方向の配向度を示す  $0.05\text{nm}^{-1}$  のピークが遅筋では減弱していた。この特徴は、疲労状態モデルの一つと考えられる「調節軽鎖がリン酸化された速筋型ミオシン」と共通していた。これらより、遅筋型ミオシンの頭部はミオシンロッド軸を中心として回転方向に揺らいていることがわかった。この特徴は、疲労状態モデルの一つと考えられる「調節軽鎖がリン酸化された速筋型ミオシン」と共通しており、遅い ATP 分解速度で力を保持するために共通な機構である可能性が示された。

### 「点検・評価」

まず昨年に引き続き筋収縮と水構造の変化との関わりについて研究の焦点を当て、筋タンパク質周囲に存在する水構造がタンパク質の機能状態の変動に連携してどのように変化するかに着目し、DSC、NMR、QCM による実験を行った。

今年度は DSC 法により高温によるタンパク変性前後で融解熱が異なることがわかった。それだけでなく変性前の比熱が変性後より  $0.04\text{J}/\text{C}/\text{g}$  大きいことも確認できた。これらの変性による違いが筋線維内のどの部分に起因する

のか、 $-25^{\circ}\text{C}$ での 2 つの融解ピークの大きさと温度に変動を与える溶液条件を探ることなどにより今後追及していく。また、硬直条件以外での測定も行うとともに、凝固点の異なる水成分分画の局在の解析に有効な方法についての検討も行っていく。

筋タンパクが束縛している水の量についての NMR と QCM の結果の対応については双方で用いた標本が異なるため直接の比較が難しく今後の課題となるが、QCM 装置では測定に用いることのできる標本のサイズに限界があり筋原線維標本での測定は不可能であることから、NMR 測定をタンパク溶液で行うことを考えている。また、除アクチン筋線維での X 線回折の結果から得られた ATP 加水分解にともなうミオシン構造変化の結果と NMR と QCM の測定結果を照合するために、ミオシン-水系の分子動力学シミュレーションを来年度に行う予定である。

今年度から本格的に開始した骨格筋幹細胞を用いた研究では、骨格筋幹細胞が細胞に分化する過程においてポリアミンが多核の筋細胞を増加することで分化を促進するという結果を得ることができた。骨格筋には可塑性（筋線維タイプの変化）や筋損傷から再生する能力がある。その能力の大半は骨格筋幹細胞によって担われている。今後はこの筋再生過程にポリアミン摂取が関与しているかを検証する。具体的にはマウスの足の筋肉にコブラ由来の毒を注入することにより、当該筋の筋線維を損傷させ、ポリアミン摂取群と対照群に分けて筋損傷からの回復過程を核磁気共鳴画像法（MRI）で観察するこ

とにより回復過程を経時的に解析する。本研究でポリアミン摂取が筋損傷の回復に寄与することが明らかできれば、ポリアミン含有食品を食べることの有効性が期待でき、高齢者の加齢や怪我などによる筋力低下を予防して健康寿命を延伸するための方策にも繋がる。

## 研究業績

### Ⅱ. 総説

- 1) Yamauchi H, Takeda Y, Takeda Y, Tsuruoka S, Takemori S. Effects of aging on unloading-induced skeletal muscle atrophy and subsequent recovery in rats. *J Phys Fit Sports Med* 2013; 2(4): 418-22.

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 竹森 重. (ワークショップ6) 体力科学の特徴～生命の階層性が創る安定性・不確定性と全機性. 第68回日本体力医学会大会. 東京, 9月. [体力科学 2014; 63(1): 100]
- 2) 山内秀樹, 竹森 重. 持久的運動による骨格筋代謝能力の改善に対する運動頻度の影響. 第68回日本体力医学会大会. 東京, 9月. [体力科学 2013; 62(6): 482.]

- 3) 山口眞紀, 木村雅子(女子栄養大), 中原直哉, 大野哲生, 山澤徳志子, 竹森 重. (ワークショップ 10)速筋と遅筋の筋フィラメント構造の特徴と筋パフォーマンスとの関係. 第 68 回日本体力医学会大会. 東京, 9 月. [体力科学 2014; 63(1): 122]
  
- 4) 池田道明, 中原直哉, 竹森 重. 29 年間の爪重量測定から. 第 68 回日本体力医学会大会. 東京, 9 月. [体力科学 2013; 62(6): 516]
  
- 5) 山澤徳志子, 大野哲生, 山本裕大, 山口眞紀, 竹森 重. 骨格筋幹細胞の増殖・分化におけるポリアミンの作用. 第 68 回日本体力医学会大会. 東京, 9 月. [体力科学 2013; 62(6): 522]
  
- 6) Yamazawa T, Oyamada H1), Murayama T2), Kurebayashi N2), Oguchi K1) (1 Showa Univ), Sakurai T2) (2 Juntendo Univ), Iino M(Univ Tokyo), Takemori S. Exploration of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. IUPS(International Congress of Physiological Sciences) 2013. Birmingham, July.
  
- 7) 鈴木隆之, 山口眞紀, 竹森 重. ヒト心筋ミオシンの分子動力学解析: ATP 結合状態から ADP 結合/硬直状態への構造変化. 第 130 回成医会総会.

東京, 10 月.

- 8) Yamazawa T, Murayama T1), Oyamada H2), Suzuki J3), Kanemaru K3), Kurebayashi N1), Oguch K2) (2 Showa Univ), Sakurai T1) (1 Juntendo Univ), Takemori S, Iino M3) (3 Univ Tokyo). Functional analysis of ryanodine receptor carrying malignant hyperthermia associated mutations. Biophysical Society 58th Annual Meeting. San Francisco, Feb.
- 9) Takemori S. Recent advancements in controversial topics of skeletal muscle research viewed with a special interest in fatigue. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suupl. 1): S95]
- 10) Watanabe M(Tokyo Metropolitan Univ), Ishida Y(Bunkyo Gakuin Univ), Nakahara N, Taguchi M, Kimura M(Kagawa Nutrition Univ), Takemori S. Regulation of thick and thin filaments organization by smooth muscle myosin. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suupl. 1): S38.]

- 11) Nakahara N, Kimura M(Kagawa Nutrition Univ), Takemori S. Interaction between water and proteins in skeletal muscle. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suppl.1): S164]
  
- 12) Murayama T1), Kurebayashi N1), Yamazawa T, Oyamada H2), Suzuki J3), Kanemaru K3), Takemori S, Oguchi K2) (2 Showa Univ), Iino M3) (3 Univ Tokyo), Sakurai T1) (1 Juntendo Univ). Effects of amino-terminal disease-associated mutations on the RyR1 channel. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suppl.1): S178]
  
- 13) Ohno T, Kimura M(Kagawa Nutrition Univ), Yamaguchi M, Takemori S. Spin-spin relaxation of <sup>1</sup>H NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle with or without ADP. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suppl.1): S229]
  
- 14) Yamauchi H, Takemori S. Ubiquitin ligase Nedd4 expression and atrophy in unloaded rat plantaris muscle. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suppl.1): S266]
  
- 15) Yamazawa T, Ohno T, Ohkido M, Yamamoto H, Yamaguchi M, Takemori S.

Mechanisms of regulation of skeletal muscle proliferation and differentiation. 第 91 回日本生理学会大会. 鹿児島, 3 月. [J Physiol Sci 2014; 64(Suppl.1): S275]

16) Yamazawa T, Murayama T1), Oyamada H2), Suzuki J3), Kanemaru K3), Kurebayashi N1), Oguch K2) (2 Showa Univ), Sakurai T1) (1 Juntendo Univ), Takemori S, Iino M3) (3 Univ Tokyo). Functional analysis of type 1 ryanodine receptor carrying N-terminal malignant hyperthermia associated mutations. 第 87 回日本薬理学会年会. 仙台, 3 月. [J Pharmacol Sci 2014; 124(Suppl.1): 137]

17) 山口眞紀, 竹森 重, 木村雅子(女子栄養大), 大野哲生, 中原直哉. (ポスターセッション)除アクチン筋線維内でミオシン頭部の構造変化. 第 2 回物講研サイエンスフェスタ 2013(第 5 回 MLF シンポジウム, 第 31 回 PF シンポジウム). つくば, 3 月.

18) Ohno T, Wagatsuma M1), Ichihashi M1), Itoh A1) (1 ULVAC). Viscoelastic analysis of myosin adsorbed to gold. IUPS 2013. Birmingham, July.

19) 竹森 重. (オーガナイズドセッション「OS-12 知の身体性-2」) ヒト中枢

の構成経済と投射の拡張—知能の形成基盤. 2013 年度人工知能学会全国大会(第 27 回). 富山, 6 月. [2013 年度人工知能学会全国大会(第 27 回) 論文集; 2013]

20) 竹森 重. 神経・筋の運動生理とトレーニング. 日本整形外科学会第 40 回スポーツ医学研修会. 東京, 8 月.