

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17180

研究課題名(和文)MR信号の理論的解釈に向けた骨格筋内の水分子間相互作用エネルギーの直接的定量測定

研究課題名(英文)Evaluation of interaction enthalpy between water and myoproteins in skeletal muscle for theoretical interpretation of MR signals

研究代表者

中原 直哉(Nakahara, Naoya)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10632193

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):MR画像でみる水分子の状態はその理論的な解釈がまだ不十分である。そこで細胞内の水分子間相互作用を直接融解潜熱エネルギーとして評価するのが本研究である。除細胞膜骨格筋細胞をDSCにより-80 から温度上昇をさせ、比熱・融解潜熱を測定すると0 だけでなく-24 や-21 で融ける水があることが明らかになった。アクチン・ミオシンの除去・変性を行うことで、-24 の水は主にアクチンの状態に由来し、-21 の水はサルコメア構造やアクチンに由来することが示唆された。更に積算比熱はアクチンがない条件ではある条件よりも低下した。これらの結果から細胞内の水状態とその局在をエネルギーとして評価できたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のMR信号での解析では水分子の集団としてのふるまいを検出することは可能であったが、水分子間相互作用をエネルギーとしての評価をすることは困難であった。本研究で行ったDSCによる評価は水分子間相互作用をエネルギーとして評価するだけでなく、その水分子の局在まで明らかにできた。これらの研究を進めていくことで、生体内の水分子の相互作用エネルギーとMR信号の対応付けを行うことで、MR画像を理論的な解釈が可能なものにしていく一助になると考えられる。

研究成果の概要(英文):Magnetic resonance images reflect not only water content but also water states in physiological tissue. Although water states in the tissue are not clarified yet in detail, interaction between water and macromolecules is generally considered to restrict motional freedom of the water molecules similarly to the freezing of water. As is the case with melting of ice, differential scanning calorimetry (DSC) can represent the restriction as extra heat absorption. DSC measurement with skinned fibers of the sartorius muscle from bull frogs at a rigor condition showed extra heat absorption at -24, -21, and 0 . The extra heat absorption at -24, -21 reflected the intracellular states of actin and myosin. Integrated heat capacity in the range from -80 to 20 was decreased by denaturation or removal of actin. These results suggest that actin and myosin independently and cooperatively restrict surrounding water and that extra integrated heat capacity mainly depends on actin filaments.

研究分野：骨格筋生理学

キーワード：DSC 水 骨格筋 MR信号

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MR 画像法は、生体組織内の水の状態を鋭敏に反映しているが、どのような水の状態を反映しているかはまだ不明であり、画像診断では経験の蓄積に大きく依存している。

色々な撮像方法が開発される一方で、MR 画像が組織の何を描き分けているのかの探求として、申請者の研究グループは、骨格筋細胞内の水状態を MR 信号から評価し、たんぱく質などの巨大分子表面から水分子間の相互作用を介した長距離束縛が従来の想定をはるかに超えた距離にわたって及んでいることを明らかにしている。さらに申請者は MR 信号だけでなく融解潜熱を計測することで、骨格筋の中に - 21 や - 24 に融解潜熱の水があることを明らかにしており、細胞内での水分子の分子間相互作用を測定する手法として期待される。

2. 研究の目的

MR 信号だけでは識別できていない分子を束縛する相互作用エネルギーの大きさを、相互作用エネルギーを反映する比熱・潜熱の指標を用いて明らかにすることを大きな目的とする。特に本研究では規則周期構造がある骨格筋線維を用いて、既に着目している骨格筋内にある - 21 と - 24 に融解潜熱をもつ二種類の水に着目してその局在を明らかにする。

3. 研究の方法

標本には骨格筋筋線維を用いて、アクチンフィラメントやミオシンフィラメントの状態を変化させた際に、- 21 や - 24 の融解潜熱がどう変化するかを観察した。

(1) 標本調製

ウシガエルの縫工筋細胞を 0.5% Triton X-100 を含む人工細胞内液で 1.5 時間処理し、除細胞膜筋線維を調製した。さらにこれらの除細胞膜筋線維は必要に応じてミオシンフィラメント・アクチンフィラメントを以下の方法により特異的に除去した標本を作製した。

(1)- ミオシン除去をした筋線維

除細胞膜筋線維をさらに高イオン強度(450mM KCl)の人工細胞内液で処理し、ミオシンフィラメントを除去した。

(1)- アクチン除去をした筋線維

ウシの血液から精製したゲルゾリンタンパクを含む人工細胞内液で処理し、アクチンフィラメントを除去した。

(2) 融解潜熱測定

融解潜熱の測定には温度変化を加えた際の比熱・潜熱を測定可能な示差走査熱量測定(DSC; Differential Scanning Calorimetry)法を用いた。測定時には一度 1 /分の速度で - 80 まで標本温度を下げたのちに、1 /分の速度で昇温した際の比熱および融解潜熱を測定した。測定時には代謝の熱が入らないように ATP のない人工細胞内液(Rigor 条件)で行った。

測定中には+60 まで一度温度変化を加えてミオシンの変性を起こしたものと、+80 まで温度変化を加えてミオシンおよびアクチンの変性を起こしたものの 3 段階を比較した。

4. 研究成果

(1) ミオシン/アクチンフィラメントの処理

ミオシンフィラメントもしくはアクチンフィラメントを各々特異的に除去した標本の処理率を 8% SDS-PAGE にて確認した(図 1)。ミオシン除去ではミオシン/アクチンの比が 40%まで低下し、アクチン除去ではアクチン/ミオシンの比が 35%まで低下した。

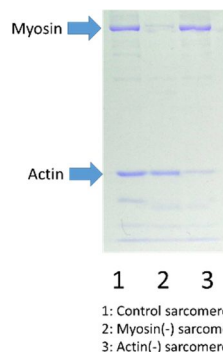


図1: アクチン・ミオシン処理標本

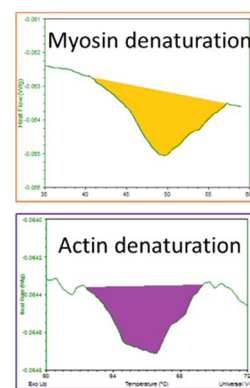


図2 ミオシン/アクチンの変性熱

(2) ミオシン/アクチンの変性

+60 まで昇温したサンプルは 1 回目の昇温時のみ+46 付近にミオシンの変性熱と思われる吸熱ピークを示した。その状態の標本の電子顕微鏡画像を取得すると、主に A 帯が変化していた。一方で、+80 まで昇温したサンプルでも同じようにミオシンの変性に加えて、+68 付近にアクチンの変性熱を示し、こちらの電子顕微鏡画像では全体を通して A 帯・I 帯ともに壊れていた。

(3) DSC 測定でみた骨格筋細胞内の水

DSC 測定時にみられた吸熱は、0 の融解潜熱(図3 緑枠)、1度目の温度変化時のみ観察される変性ピーク(図3 橙・紫枠)に加えて、-24 および-21 のピーク(図3 青枠)があった。

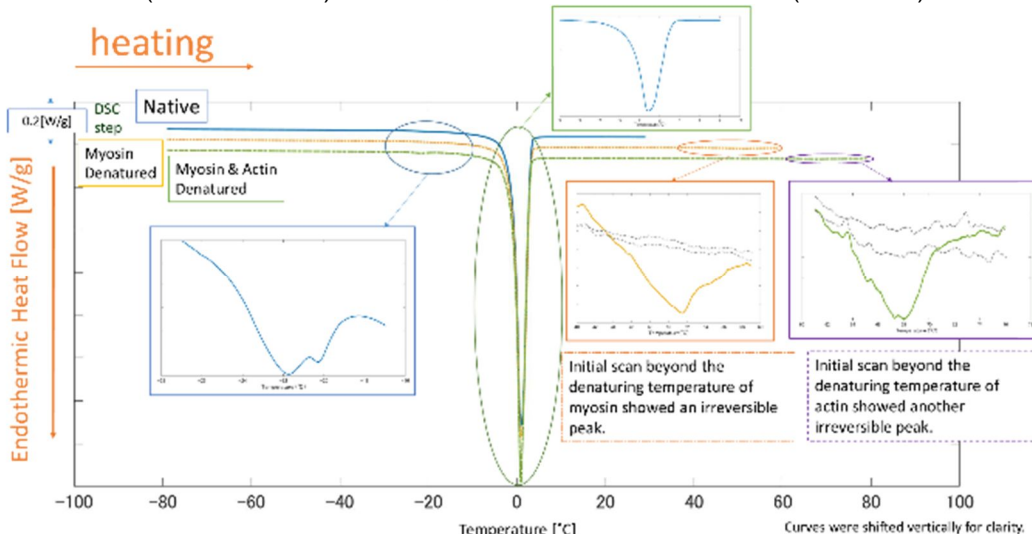


図3 DSC 測定時の吸熱ピーク

(3)- -24 ・ -21 の融解ピークの変化

特に-24 および-21 のピークに着目して、標本中のミオシン・アクチンの変性状態、ミオシン・アクチンの除去の影響を解析した(図4)。-24 の融解ピーク(図4 peak1)はミオシンの除去では大きく変化しないのに対して、アクチンの除去では溶液条件に近づいた。つまり、-24 のピークは主にアクチンの状態に影響を受けていると考えられる。

一方で、-21 の融解ピークはミオシン除去時のアクチン変性後のピークの大きさ、アクチン除去時のミオシン変性時で大きさが変化し、ここからアクチンとミオシンがともに安定に存在する状態のサルコメア構造が保たれていることが-21 のピークに関係していることが示唆された。さらにアクチン除去時の残っているアクチン変性時のピークも変化することから、-21 のピークはサルコメア構造のみならず、アクチンにも関連するピークであると考えられた。

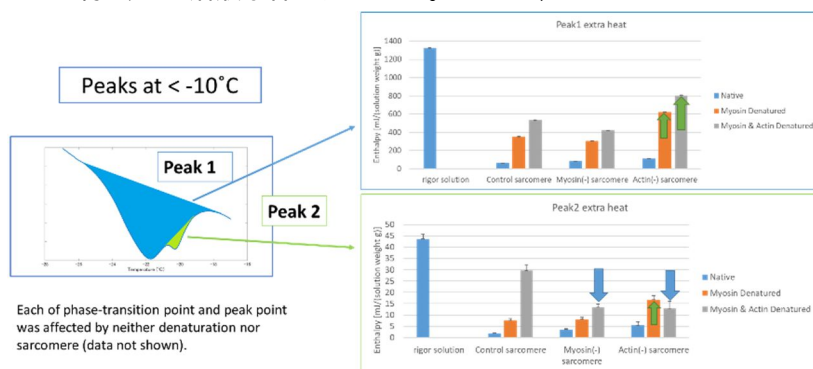


図4 ミオシン/アクチンの状態による-24 /-21 の融解ピーク変化

(3)- 積算比熱の変化

また、今回融解ピークのみでなく、-80 から+20 までの昇温時の間の積算比熱を解析した(図5)。積算比熱はアクチンの変性で低下し、低下後は溶液条件と同程度となった。一方で、アクチンの除去では変性前から積算比熱が低下していた。この積算比熱がどの温度帯によるかを確認するために、10 刻みで積算比熱を取り直すと(図5 黄色枠)、いずれの温度帯であってもアクチンの変性後での積算比熱の低下が認められた。この結果からアクチンは熱だまりとして働いており、アクチンもしくはアクチン周囲の水にエネルギーとして蓄えられていると考えられた。アクチン周囲に動きやすい水(ハイパーモバイル水)があるという先行研究と一致する結果であった(Kabir et al., 2003)。

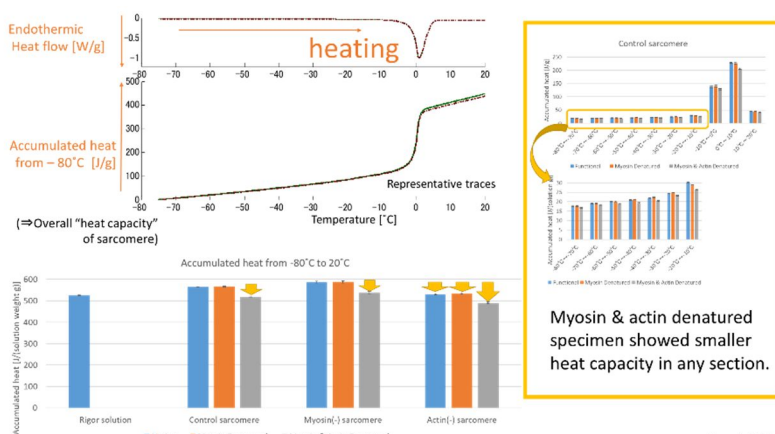


図5 ミオシン/アクチンの状態による積算比熱の変化

上記の結果をまとめると図6のように-24の融解潜熱は主にアクチンに由来し、-21の融解潜熱は主にサルコメア構造およびアクチンに由来、積算比熱はアクチンに由来すると考えられた。

これらの結果からDSCでみた融解潜熱ピークは細胞内の状態を反映し、タンパク周囲の水の分子間相互作用を直接的にエネルギーとして評価でき、MR信号の理解の助けになると期待された。

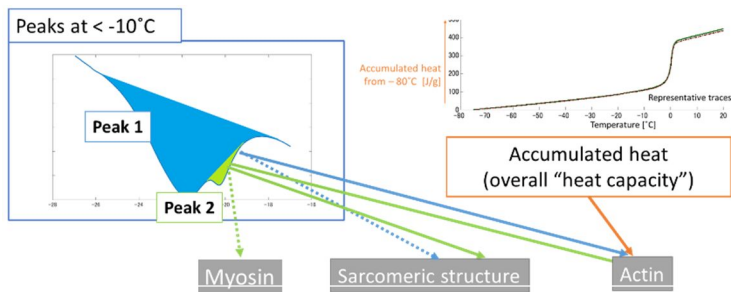


図6 -24と-21の融解潜熱および積算比熱の局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi Maki, Kimura Masako, Ohno Tetsuo, Nakahara Naoya, Akiyama Nobutake, Takemori Shigeru, Yagi Naoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Crossbridge Recruitment Capacity of Wild-Type and Hypertrophic Cardiomyopathy-Related Mutant Troponin-T Evaluated by X-ray Diffraction and Mechanical Study of Cardiac Skinned Fibers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3520 ~ 3520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21103520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Kazuhiro, Yamauchi Hideki, Nakahara Naoya, Kinoshita Kazuo, Yamaguchi Maki, Takemori Shigeru	4. 巻 22
2. 論文標題 X-ray Diffraction Analysis to Explore Molecular Traces of Eccentric Contraction on Rat Skeletal Muscle Parallely Evaluated with Signal Protein Phosphorylation Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12644 ~ 12644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312644	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中原直哉、山内秀樹、山口真紀、平野和宏、竹森重
2. 発表標題 Development of x-ray diffraction methods for in vivo skeletal muscle with maintained blood supply
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原直哉、山内秀樹、山口真紀、平野和宏、竹森重
2. 発表標題 X線回折法による血流を保った骨格筋の除神経後の変化
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原直哉
2. 発表標題 Actin filaments render considerable heat capacity to skeletal muscle sarcomere
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中原直哉、大野哲生、木村雅子、木村澄子、竹森重
2. 発表標題 熱測定で評価した骨格筋内の水と筋タンパクの相互作用
3. 学会等名 成医会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------