

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11368

研究課題名（和文）筋構造－収縮力相関における微小管の役割

研究課題名（英文）Role of Microtubules in the Muscle Structure-Contraction Relationship

研究代表者

小林 琢也（Kobayashi, Takuya）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：60468585

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）：本研究は骨格筋の収縮機能における微小管の役割を明らかにする目的で行われた。この目的のため、張力計測と筋イメージングを同時計測する装置の開発を行った。外力変形を行うステッピングモーターの組み込みと可動式顕微鏡の構築を行い、ノイズの少ない高精度な収縮力・変形応力計測を実現した。またイメージングにおける励起光波長と励起光照射方法の検討により、反復収縮や伸展変形時の光ダメージや背景光ノイズを大幅に低減し、筋繊維内部を可視化しながら張力計測を行う事に成功した。また本装置を用いて微小管が骨格筋の完全強縮の強度や変形応力緩和時間と関係する事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は張力計測とイメージングの同時計測法の確立および微小管の骨格筋粘弾性への寄与の解明という二つの点である。前者は異なる計測方法を同一時間軸で行うための技術開発である。近年の生命科学研究においては、生物システムの多要素的理解や分子・細胞・個体間の階層横断的理解が求められているが、生きた筋組織の多元的計測はその両者に貢献するものである。また、骨格筋粘弾性における微小管の寄与を示した事は骨格筋研究に新たな視点を提供することになった。これは筋の衝撃耐性や運動性能の理解に繋がるため、トレーニング法、マッサージ療法やスポーツウェア開発などの身体運動諸分野に波及するものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the role of microtubules in the contractile function of skeletal muscle. For this purpose, we developed a device for simultaneous measurement of tension and muscle imaging. A stepping motor for external force strain was incorporated and a movable microscope was constructed to realize highly accurate measurement of contraction force and deformation stress with low noise. By examining the excitation light wavelength and excitation light illumination method for imaging, optical damage and background light noise during repetitive contraction and extension deformation were greatly reduced, and tension force measurement was successfully performed while visualizing the inside of muscle fibers. Using this system, it was also clarified that microtubules are related to the strength of tetanus contraction and deformation stress relaxation time of skeletal muscle.

研究分野：生物物理学

キーワード：骨格筋 微小管 粘弾性 衝撃耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は身体運動を作り出すための収縮力を発生し、さらに体表の近傍にあって体外からの力を受け、これに抗して身体を防御している。しかし無理で急激な運動や抗しきれない外力による筋損傷の危険に常に晒されている。例えば、筋長軸方向、すなわち収縮軸方向から急激な力を受ければ肉離れに発展し、筋短軸方向からの強い負荷ならば筋挫傷が発生しうる。骨格筋自体の収縮力や外力に対する堅牢性はこれまでに、筋構造の60%を占める筋原線維と筋収縮の制御系である各イオンチャネルを中心に論じられてきた。微小管は骨格筋においては格子様配置を取り、筋原線維の周りを取り囲んでおり、細胞構造や制御系タンパク質配置および収縮装置と筋細胞膜との結合の維持に関与する。筋損傷時には細胞構造が破壊されるにも関わらず、微小管の外的負荷に対する堅牢性や筋収縮への寄与は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では筋収縮および筋構造の維持における微小管の役割を明らかにすることを目的とする。とりわけ、これらを定量的に示す事を企図している。「筋構造 収縮力相関」を定量的に取り扱うためには、同一試料を用いた実験が必要となる。そのため本研究はこれを実現するための計測装置の開発と方法の確立、および本装置を用いて微小管に注目した骨格筋の力学モデルを構築することである。

### 3. 研究の方法

本研究ではマウス長趾伸筋対象として実験を行った。長趾伸筋は腱から腱までの筋組織として取り出し、外科系を腱に結び小さな輪を作り、これを筋把持用プロープに取り付けて、収縮張力計測を行った。計測は還流チャンパーを用いて32℃に温度を維持して行った。筋収縮は電気刺激装置 SEN-3301 (日本光電) で誘導した。力計測はメカニカルトランスデューサー UL-100GR (MINEBEA) を、外力による伸展変形はステッピングモーター HPS60-20X-M5 (シグマ光機) を用いた。筋繊維内イメージングのための顕微鏡部の原型はコアユニット顕微鏡 (シグマ光機) を基にした。対物レンズは60倍長作動距離対物レンズ (LUCPLFLN60XPH) を、励起光源は LED470-900B (朝日分光)、LED505-900B (朝日分光)、LED625-900A (朝日分光) を用いた。カメラは DMK33GX287 (The imaging source) を用いた。

### 4. 研究成果

本研究の主要テーマである微小管動態と収縮力の関係の解明において、まずこれを実行するための計測装置の開発を行った(図1)。本装置に必要な要素は次の通りである。(1)収縮張力および変形応力の計測装置。(2)温度および溶液環境の管理のための還流装置。(3)定量的な伸展変形を行う牽引装置。(4)筋繊維内の構造を可視化するためのイメージング装置である。

それぞれの装置構築においてはいくつかの改良が必要であった。(1)および(2)の装置は、電気刺激装置による収縮刺激を筋固定用のプロープに接続したメカニカルトランスデューサーにより検出するという従来から広く用いられている方法を用いた。またその後の筋繊維内イメージングへの適用を考え、筋の長軸が水平になるようにメカニカルトランスデューサーを配置し、還流チャンパーの底面には顕微鏡観察用カバーガラスを用いた。還流溶液は還流チャンパーの直前で加温し、一定流速で還流を行うことで温度の安定性を維持した。

本研究では筋の力学的性質の定量と筋繊維内イメージングを計画の中心に据えていたため、とりわけ(3)および(4)の装置開発に力をいれた。(3)では高性能のステッピングモーターを用いた。本研究では筋の両端の腱をそれぞれ外科用糸により筋把持用プロープに固定している。このうち片方は先に述べた様にメカニカルトランスデューサーに接続されているので、筋変形用ステッピングモーターはもう一方の把持用プロープに接続した。通常、把持用プロープはトランスデューサー側も固定側も還流チャンパーと同一のステージ上に設置する。しかしながら、筋変形用ステッピングモーターの駆動時に大きな振動が発生した。これは変形時の収縮張力や変形応力計測に支障をきたすものであった。そこで、変形用ステッピングモーターをステージ外に設置するという工夫を行った。これにより変形時の計測ノイズを除去する事に成功した。しかしながら、これは筋繊維内イメージングにおいて大きな問題を生じた。装置設計・開発当初に

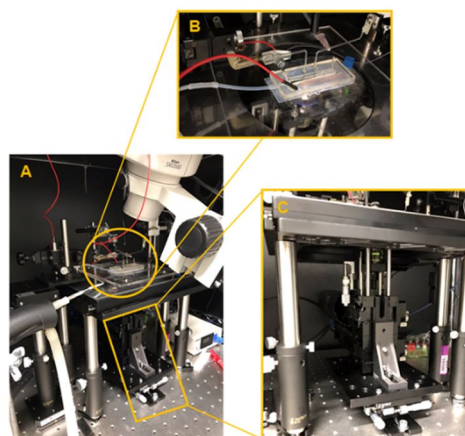


図1. 収縮力・イメージング同時計測装置  
A. 装置全景。B. 収縮力計測部。C. 顕微鏡部。

おいてはイメージング視野の移動のため、可動式ステージを採用していたが、変形用ステッピングモーターをステージ外に設置したことにより、把持用プローブとステージとの一体性が失われ、筋の状態を維持した視野移動が不可能となった。そこで、固定ステージを用いる事にした。また、イメージング視野の移動も実現する必要があったため、筋試料ではなく、顕微鏡そのものを可動式にするという大幅な設計の変更を行った。本研究ではその後の拡張性のため、既製品の顕微鏡筐体ではなく、開発当初から光学部品を組み合わせたコアユニット型の顕微鏡システムを採用していた。これは極めて軽量であったので、これをXYZステージ上に設置し直し、固定ステージの下部に設置し直した。これにより筋試料に影響することなく、視野移動およびピント調節をXYZステージで一括して行うことに成功した。さらに、この設計変更は、固定ステージである事と、ピント調節機構が対物レンズ近傍にない事から、観察時のノイズの大幅な低減の実現にも寄与した。

筋イメージングの装置開発においては3点の重要なポイントがあった。まず一つ目は対物レンズの選定である。本研究では収縮や変形中の筋繊維内の変化を観察することを目的としたため、対象となる筋試料は還流チャンバーの底面に配置したガラスに直接触れないように浮かせた状態となっている。この場合、100倍の油浸レンズの作動距離では観察が不可能であった。そこで、長作動距離観察用対物レンズを採用し、ガラス面との摩擦を筋試料に与えることなく、張力計測とイメージングを同時に実行する事に成功した。このレンズは100倍の油浸レンズよりも分解能が下がるものの、カメラと組み合わせるとピクセルサイズ0.1 $\mu\text{m}/\text{pix}$ の解像度で画像取得を実現することができた。

本研究のイメージングは蛍光観察法を用いている。この観察では将来的な筋における蛍光タンパク質の遺伝子発現技術利用への拡張も視野に入れていたため、開発当初はライブイメージングで広く用いられている蛍光タンパク質であるGFPの利用が可能となるように、この励起・蛍光波長帯に合わせて設計を行った。しかしながら実際に観察を行ったところ、2点の問題があることが分かった。第一はバックグラウンド蛍光によるノイズが極めて大きい事であった。本研究では長趾伸筋やヒラメ筋といった筋組織を対象としたため、腱、筋周膜および脂肪組織を含んでいる。これらはGFP観察用波長帯である473nmの青色励起光を強く散乱するものや強い自家蛍光を発するものが多く含まれている。筋試料作製時にこれらの要素を極力除去したが、バックグラウンドノイズを低減させるのは困難であった。

また、第二は波長帯の励起光は筋に対して大きなダメージを与える事である。静止状態の筋においてはある程度の時間の観察において問題は無かったが、この励起光を照射した状態で反復電気刺激による収縮や外力による伸展変形を行ったところ、収縮張力および変形応力の著しい低下が見られた。さらに励起光照射を続けると収縮能は失われ、静止張力も低下した。このことから、青色励起光は筋繊維に致命的障害を与えると考えられる。そこで、励起光波長および筋繊維内観察用蛍光試薬の再選定が必要となった。蛍光試薬との関係から、緑色(495nm)および橙色(633nm)の励起光について同様の検証を行ったところ、緑色励起光でも同様の問題が発生した。一方で、橙色励起光では長時間照射や反復刺激、外力による変形においても収縮能に影響しない事が分かった。これにより橙色励起光を採用し、またこれに合わせてミトコンドリアおよび微小管の観察用途にMitotracker-DeepRed (invitrogen)およびTubulin-DeepRed (invitrogen)をそれぞれ採用することにした。さらに橙色励起光では青色励起光で見られた高いバックグラウンドノイズを大幅に低減することに成功した。

青色励起光において生じた問題点の解決のために、先に述べた励起光波長の再選定と並行して筋試料への励起光照射方法の検討も行った。開発当初において、ムラの無い励起光照射の方法として蛍光観察で広く一般に用いられているケラー照明法を採用した。この照明方法は視野内の縦横方向および深さ方向に対して均一な照射が行えるという利点があるが、本研究で用いた筋試料では筋繊維周囲の脂肪成分が励起される事と、深さ方向に重層した複数の筋繊維が同時に励起されるという点において不利に働いた。前者においては励起光の再選定により大幅に低減されたが、後者においては長作動距離観察用60倍レンズを採用しているために、観察している筋繊維と異なる層の筋繊維が発する蛍光によるノイズが生じた。そこで、本装置においては観察焦点面を重点的に励起できるクリティカル照明法を採用した。これによりバックグラウンドノイズをさらに低減することに成功した(図2)。

収縮力 - 筋イメージング同時計測装置開発の要点は以下の通りである。

**伸展変形用ステッピングモーターの設置に伴う可動式顕微鏡の作製**

**長作動距離対物レンズの採用**

**橙色LED光源およびクリティカル照明法の採用による励起光照射系の改良**

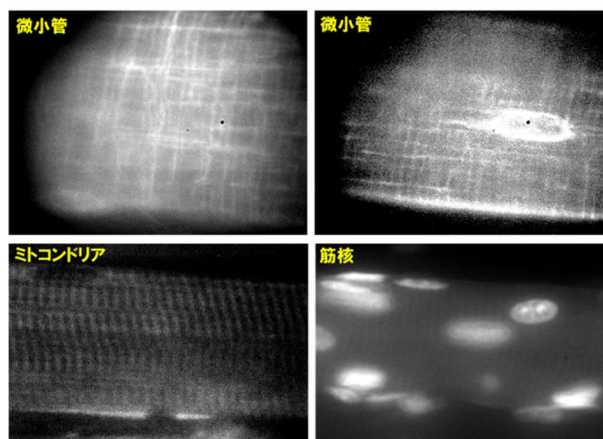


図2. 骨格筋繊維内イメージング

「収縮力 - 筋構造相関における微小管の役割の解明」を目的とする本研究の遂行過程において、これらの装置開発・改良を成功させることができた。

収縮力 - 筋イメージング同時計測装置を用いた研究では大きく次の3つの成果を得た。伸展変形に伴うサルコメア長変化と収縮力との関係。コルヒチン添加による収縮力の変化。伸展変形による筋弾性の計測と筋粘弾性の数理モデルの構築である。

ステッピングモーターを用いて伸展変形を与え、長さごとの変形応力を計測した。Mitotracker-DeepRedを用いてミトコンドリアを染色した。ミトコンドリアはA-Iジャンクションに存在し、1ユニットのサルコメアに2本の線として見られた。この2本の間隔はおよそ0.8 $\mu\text{m}$ であった。またサルコメア間でのミトコンドリアの間隔は伸展変形により2.2~3.0 $\mu\text{m}$ の変化が見られた(図3)。伸展に伴う変形応力はサルコメア間隔が3.0 $\mu\text{m}$ までは緩やかに上昇し、それ以降は急激に増大した。このことから変形応力は二相性を示している事が分かった。すなわち少なくとも2つの弾性要素が存在している事が示唆された。

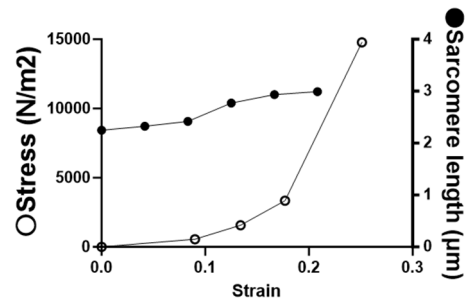


図3. サルコメア間隔と変形応力

微小管の役割を調べるため、本研究では微小管脱重合剤を用いた微小管脱重合の誘導を行った。研究開始当初はノコダゾールを用いていたが、還流溶液への溶解性が低く実験の再現性に問題があったためコルヒチンを選定した。微小管脱重合条件ではコルヒチンは還流溶液に添加し、常にコルヒチン存在下で計測を行った。コルヒチン添加により、完全強縮時において収縮張力の低下が見られた。このことから微小管が収縮機能に関与している事が示唆された。ただし、この際に単収縮張力には変化が無かった。すなわち、微小管脱重合が収縮能そのものに影響するのではなく、単収縮の連結による完全強縮の構成に関与していると考えられる。

筋の受動的な変形への応答における微小管の関与を調べるため、コルヒチン存在下で変形応力の計測を行ったところ、微小管脱重合条件において応力緩和時間の短縮が見られた。これは筋の変形が起きやすくなっている事を示している。すなわち、通常時において微小管は筋の変形を制限する要素となっていると考えられる。

微小管脱重合による完全強縮の低下および応力緩和時間の短縮の共通点は変形のしやすさの上昇である。前者では弛緩のしやすさが上昇したために、単収縮の連結よりも弛緩が優位になった結果であり、後者は変形に対する抵抗が減少したためであると考えられる。“変形のしやすさ”と微小管が関係するという事から、微小管は骨格筋における重要な粘弾性要素であると結論できる。こうした本研究の伸展から、骨格筋の粘弾性の面から微小管の力学的役割を説明する事が必要と考え数理モデルの構築を行った(図4)。ステッピングモーターを用いた伸展および短縮変形による応力計測から求めた弾性係数を用い、粘性係数を変数として立式した運動方程式について、変形時の実測の応力グラフにフィッティングする数値計算を行ったところ、実測グラフとよく一致した。さらにこのフィッティングにより求められた粘性係数は実験によって求めた粘性係数とほぼ同一の値であった。

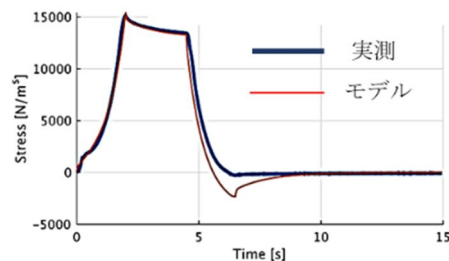


図4. 筋変形の数理モデル

以上の結果から、本研究で開発した装置を用いて、筋粘弾性の高精度な計測を実現することができた。またこれにより微小管が筋の粘弾性要素として、骨格筋の生理的な役割と直結する完全強縮の構成や筋の変形に対する安定性という筋機能における重要な役割を担っているという事を明らかにすることができた。これらの成果は The 5th Rocky Mountain Muscle Symposium、第60回日本生物物理学会年会および第61回日本生物物理学会年会において発表を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gao J, Makiyama T, Yamamoto Y, Kobayashi T, Aoki H, Maurissen TL, Wuriyanghai Y, Kashiwa A, Imamura T, Aizawa T, Huang H, Kohjitani H, Nishikawa M, Chonabayashi K, Fukuyama M, Manabe H, Nakau K, Wada T, Kato K, Toyoda F, Yoshida Y, Makita N, Woltjen K, Ohno S, Kurebayashi N, Murayama T, Sakurai T, Horie M, Kimura T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel Calmodulin Variant p.E46K Associated With Severe Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Produces Robust Arrhythmogenicity in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCEP.122.011387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue Takayoshi, Inoue Y U., Nishino I, Mori S, Iinuma H, Manaka N, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez J R., Liu X, Diggie C, Allen P D., Kakizawa S, Ikeda K, Lin B, Ikemi Yui, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, Murayama T	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4293-4306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24644-1	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 該当する
1. 著者名 Kobayashi Takuya, Kurebayashi Nagomi, Murayama Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 The Ryanodine Receptor as a Sensor for Intracellular Environments in Muscles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10795 ~ 10795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910795	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 Yamazawa Toshiko, Kobayashi Takuya, Kurebayashi Nagomi, Murayama Takashi	4. 巻 157
2. 論文標題 Therapeutic effects of novel type1 ryanodine receptor inhibitor on skeletal muscle diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 15 ~ 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1254/fpj.21068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T Kobayashi, N Kurebayashi, Murayama, T Sakurai, M Kaya
2. 発表標題 The effects of microtubule depolymerization on muscular viscoelastic properties.
3. 学会等名 The 5th Rocky Mountain Muscle Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 琢也, 茅 元司, 呉林 なごみ, 村山 尚, 櫻井 隆
2. 発表標題 骨格筋の粘弾性における微小管の役割
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 琢也
2. 発表標題 骨格筋のしなやかさ～粘弾性に寄与する微小管～
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 琢也, 村山 尚, 呉林 なごみ
2. 発表標題 微小管脱重合薬により骨格筋の粘弾性は変化する
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林琢也
2. 発表標題 発熱する骨格筋、イオンチャネルの暴走
3. 学会等名 第11回分子モーター討論会
4. 発表年 2022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
研究分担者	茅 元司 (Kaya Motoshi)  (00422098)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教  (12601)	
研究分担者	渡邊 大輝 (Watanabe Daiki)  (30823281)	大阪体育大学・大学院スポーツ科学研究科・助手  (15401)	
研究分担者	呉林 なごみ (Kurebayashi Nagomi)  (50133335)	順天堂大学・医学部・客員准教授  (32620)	

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
---------	---------