

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15367

研究課題名（和文）ダイヤモンド量子センサーを用いた心筋収縮制御特性の温度生理学

研究課題名（英文）Thermal physiology of cardiac contractile regulation using diamond quantum sensors

研究代表者

石井 秀弥（Ishii, Shuya）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 量子機能創製研究センター・研究員

研究者番号：10880651

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋と心筋それぞれの筋収縮システムを精製タンパク質を用いて再構成し、それらの温度感受性を評価した。その結果、骨格筋と心筋の間で制御タンパク質が活性化する温度の違いがあること、そして心筋よりも骨格筋収縮システムの方が体温付近の温度上昇に敏感であることを示す結果が得られた。今回得られた知見から常に拍動している心臓とは異なり、骨格筋には必要な時に瞬時に力を出すために適した機能を持つことが示唆された。本研究結果は、国際学術誌に掲載され、共同研究機関とプレスリリースを行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨格筋の筋収縮における体温の役割を明らかにした。特に運動前のウォーミングアップによって、筋肉を予め活性化することでパフォーマンスを高めていると考えられる。筋肉収縮により産生された熱が環境へ散逸する過程では、体温が上昇するだけでなく、筋収縮システムそのものに影響し、その働きを補助したり、制御しているのではないかと仮説を立て、これを実験的に検証した。これまでCa<sup>2+</sup>シグナルに基づいた医療機器開発や筋トレーニング・リハビリテーションの技術開発が進んできたように、本成果は温度シグナルに基づいた新しい温熱療法、健康医療のための技術開発の扉を開くことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The muscle contraction systems of skeletal and cardiac muscles were reconstituted using purified proteins, and their heat response, or temperature sensitivity, was evaluated. The results showed that there is a difference in the temperature at which regulatory proteins are activated between skeletal and cardiac muscles, and that the skeletal muscle contraction system is more sensitive to temperature increases near body temperature than the cardiac muscle. Unlike the heart, which is constantly beating, it was suggested that skeletal muscles have a function that is suitable for instantly generating force when needed. The research results were submitted and published in an international academic journal, and a press release was also issued together with the collaborative research institute.

研究分野：生物物理学

キーワード：筋肉 体温 骨格筋 筋収縮 温度センサー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

図1に筋肉の階層構造と細いフィラメントの活性化を示す。一般に哺乳動物の筋肉の収縮や弛緩は、筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度によって制御されていると考えられている。弛緩状態では細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が低く保たれ、トロポミオシン-トロポニン複合体が分子モーターであるミオシンとアクチンフィラメント(F-アクチン)の相互作用を抑制しており、これを「OFF」状態と呼ぶ。すなわち、トロポニンCに結合する $\text{Ca}^{2+}$ が細いフィラメント状態の「ON-OFF」平衡を「ON」状態へとシフトさせ、アクチンミオシン相互作用を促進する。細いフィラメントの構造変化によりミオシンがアクチンと相互作用し、活発な力が発生する。申請者の研究グループは、哺乳動物の体温よりわずかに $\sim 2^\circ\text{C}$  高い間欠的な加熱レーザー照射が単離心筋細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性収縮を惹起するという驚くべき現象を発見し、その収縮の大きさが電気刺激によるものに匹敵することを報告した(Oyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012)。筋収縮の温度特性に関してはいくつかの報告(de Tombe and ter Keurs, *Circ. Res.*, 1990)があり、長年大きな関心を集めているが、大山らの研究成果は、筋収縮の制御に $\text{Ca}^{2+}$ を伴わないという点で従来の知見と一線を画すものである。申請者はその分子メカニズム解明に取り組み、加熱による $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性心筋の収縮が生じることを*in vitro*でタンパク質一分子の階層においても再現することに成功している(Ishii *et al.*, *J. Gen. Physiol.*, 2019)。図1にも示すように $\text{Ca}^{2+}$ イオンがなくても加熱が「熱シグナリング」として機能し、細いフィラメントを「ON」状態へシフトし得ることが示された。注目すべきは、この加熱依存性の収縮タンパク質間相互作用が哺乳動物の体温近くにおいて生じたということである。この発見は、*in vivo*心臓拍動における温度制御機構の関与を強く示唆する。生理的条件下、心筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は収縮期においても約 $6\ \mu\text{M}$ 程度に低く抑えられていることから(Bers, *Nature*, 2002) 拡張期において細いフィラメントが予め活性化していれば、収縮期に上昇する $\text{Ca}^{2+}$ によって速やかに心筋細胞を収縮することができ、かつ、 $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷がもたらす不整脈やタンパク質分解といったリスクを低減させることが可能になる。このような先行研究を踏まえたとき、**筋肉そのものが収縮に伴い自発的に産生する「熱」が収縮・弛緩を制御している可能性が強く示唆され、生体内において「温度」、つまりは体温をどのように上手く活用しているのか?という新たな疑問が生じる。**このような背景から、筋肉の収縮・弛緩の分子機構を明らかにするためには $\text{Ca}^{2+}$ による制御だけでなく、温度による制御を含めた観点から研究を進める必要がある。

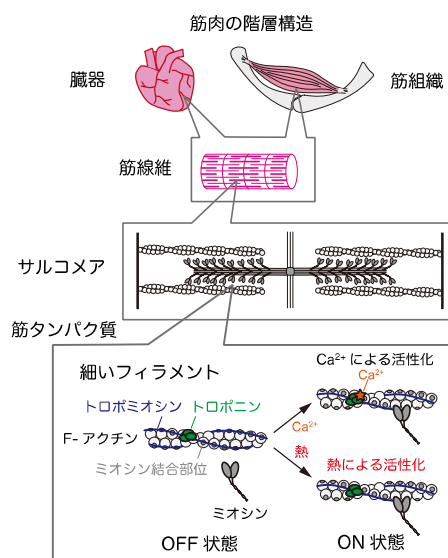


図1. 筋肉の階層構造と細いフィラメントの活性化

図1にも示すように $\text{Ca}^{2+}$ イオンがなくても加熱が「熱シグナリング」として機能し、細いフィラメントを「ON」状態へシフトし得ることが示された。注目すべきは、この加熱依存性の収縮タンパク質間相互作用が哺乳動物の体温近くにおいて生じたということである。この発見は、*in vivo*心臓拍動における温度制御機構の関与を強く示唆する。生理的条件下、心筋細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は収縮期においても約 $6\ \mu\text{M}$ 程度に低く抑えられていることから(Bers, *Nature*, 2002) 拡張期において細いフィラメントが予め活性化していれば、収縮期に上昇する $\text{Ca}^{2+}$ によって速やかに心筋細胞を収縮することができ、かつ、 $\text{Ca}^{2+}$ 過負荷がもたらす不整脈やタンパク質分解といったリスクを低減させることが可能になる。このような先行研究を踏まえたとき、**筋肉そのものが収縮に伴い自発的に産生する「熱」が収縮・弛緩を制御している可能性が強く示唆され、生体内において「温度」、つまりは体温をどのように上手く活用しているのか?という新たな疑問が生じる。**このような背景から、筋肉の収縮・弛緩の分子機構を明らかにするためには $\text{Ca}^{2+}$ による制御だけでなく、温度による制御を含めた観点から研究を進める必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、心筋や骨格筋における収縮中の体温ひいては温度の役割に着目し、「哺乳動物の筋収縮制御はどのように行われているか? そのとき体温はどのように利用されているか?」を解明することを目標とした。骨格筋と心筋の収縮に関連するタンパク質を精製し、一分子階層の筋収縮システムに対する温度の役割を明らかにする手法を通し、**新たな生命現象の計測技術基盤の構築**、さらに「筋熱生理学」の創成を目指した。

### 3. 研究の方法

*In vitro* motility assay と呼ばれる手法を基本として実験系を構築した(図2)。スライドガラス上に分子モーターのミオシン分子を吸着させ、その上に遺伝子工学的(ヒト由来)もしくは動物個体(ウサギ)から精製した筋制御タンパク質と蛍光標識したアクチンフィラメントから再構成した細いフィラメントを乗せることで一分子階層筋収縮再構成系を構築し、筋収縮の基となる

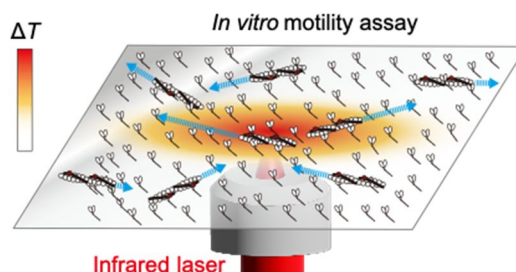


図2. 局所加熱レーザーを利用した一分子再構成系の実験模式図

滑り運動する様子を蛍光顕微鏡で観察する。筋線維はウサギ骨格筋から得たものを用いた。局所加熱顕微技術を用いてタンパク質や筋線維を局所的に加熱することにより、温度上昇が骨格筋と心筋の収縮力に与える影響を調べた。局所加熱顕微技術とは、赤外光レーザー(波長 1455 nm)を集光し、水に吸収させることで、瞬時(≤1 sec)に局所的な熱源を形成する技術のことである。

#### 4. 研究成果

本研究では、骨格筋が心筋よりも熱に敏感であり、加熱により筋収縮タンパク質が急速に活性化され、骨格筋のパフォーマンスが向上されることが明らかになった。

本研究では申請者が先行研究として行った、心筋収縮が温度変化によってどのように影響を受けるかを調べ、心臓が体温の範囲内で効率的に機能できることを示した(Ishii et al., J Gen Physiol, 2019)結果に基づき、申請者は本研究において骨格筋と心筋の収縮の温度感受性の違いに焦点を当てた。

光学顕微鏡下で再構成された骨格筋または心筋の細いフィラメントの骨格筋ミオシンまたは心筋ミオシン上での滑り速度の温度依存性を調べ以下の結果を得た。1) 骨格筋、心筋どちらの細いフィラメントも、心筋ミオシン上よりも骨格筋ミオシン上でより低い温度で滑り始め、2) 心筋の細いフィラメントは、どちらのミオシン上でも骨格筋の細いフィラメントよりも低い温度で滑り始めた。したがって、哺乳類の横紋筋は、体温範囲内でのミオシンとトロポミオシン・トロポニンの相補的調節を介して、効率的に収縮するように調整されている可能性が示唆された。

つまり筋収縮タンパク質自身が「温度センサー」として働き、骨格筋と心筋それぞれの筋収縮システムにおいて加熱の影響が異なることが明らかになった。Ca<sup>2+</sup>濃度の薄い弛緩条件(pCa 9)において骨格筋と心筋それぞれの細いフィラメントが熱による活性化を受けて動き出す温度(動いたフィラメント

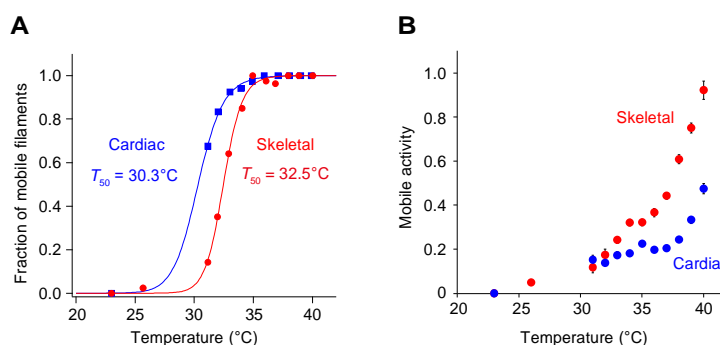


図3. (A)赤外レーザー加熱時の mobile フィラメントの割合(弛緩条件)。T<sub>50</sub> は、フィラメントの50% が動き始める閾値温度を意味する。(B)骨格筋および心臓収縮システムの弛緩条件と活性化条件における滑り速度比を比較したグラフ。

を mobile フィラメントとする)を評価したところ、図 3A に示すように心筋収縮系の T<sub>50</sub> は 30.3 で、骨格筋収縮系の 32.5 よりも低く、つまり骨格筋収縮システムにおける閾値は心筋収縮系よりも約 2 高いことが示された。同様に、Ca<sup>2+</sup>濃度の濃い活性化条件(pCa 5)で得られた滑り速度で弛緩条件で得られた結果を規格化(pCa 9/pCa 5)して滑り速度比から計算した温度依存性は、骨格筋収縮システムの方が心筋収縮システムよりも 1.6 倍高くなっていた(図 3B)。これらの実験結果は、骨格筋と心筋の筋収縮タンパク質が異なる温度依存性を持つことを示唆している(図 4)。骨格筋ミオシンは心筋ミオシン(中央)よりも温度依存性が低いが、骨格筋の細いフィラメントは心筋の細いフィラメントよりも温度依存性が高い(上)。まとめると、骨格筋の温度依存性が高いため、軽い動きや運動によるわずかなウォーミングアップでも温ま

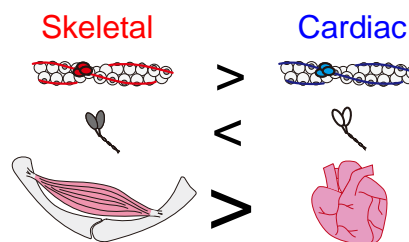


図4.温度感受性

ると比較的速やかに収縮出来る様になる可能性を示唆するものである。逆に必要のないときには筋肉はエネルギーを節約し、休むことができるのであろう。対照的に、心臓の温度感受性が低いことは、温度に関係なく恒常的な拍動を維持するのに有益である可能性がある。したがって、本研究により得られた知見は、運動前のウォーミングアップがタンパク質一分子階層でどのように筋肉のパフォーマンスを向上させるかについて、新たな指針を提供する。筋収縮タンパク質が温度センサーとして機能するという発見は、筋肉をウォーミングアップすることで骨格筋のパフォーマンスを向上させるという新たな温熱療法戦略につながる可能性がある。適切なウォーミングアップ習慣を個人、特に高齢者の日常生活に取り入れることで、筋肉と運動のパフォーマンスが向上し、それによって怪我のリスクが軽減され、自立した生活を送るのに役立つ可能性がある。

本研究の成果は科学誌に掲載され(Ishii et al., J Gen Physiol, 2023)、プレスリリースを通して日刊工業新聞の紙面への掲載、更には世界各国の媒体で取り扱われるなど世界的な評価を受けており、代表者は Society of General Physiologists からは生理学分野で最も荣誉ある若手賞である Cranefield postdoctoral fellow award を日本人で初めて授与された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Ishii Shuya, Oyama Kotaro, Kobirumaki-Shimozawa Fuyu, Nakanishi Tomohiro, Nakahara Naoya, Suzuki Madoka, Ishiwata Shin'ichi, Fukuda Norio	4. 巻 155
2. 論文標題 Myosin and tropomyosin/troponin complementarily regulate thermal activation of muscles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e202313414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202313414	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 大山 廣太郎、石井 秀弥、鈴木 団	4. 巻 100
2. 論文標題 光熱変換を利用した細胞機能の光操作	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 433 ~ 436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.34565/seibutsukogaku.100.8_433	査読の有無 無
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 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井 秀弥
2. 発表標題 体温における横紋筋の細いフィラメントの活性化
3. 学会等名 日本医学会特別大会 2023東京シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuya Ishii, Kotaro Oyama, Fuyu Kobirumaki-Shimozawa, Tomohiro Nakanishi, Naoya Nakahara, Madoka Suzuki, Shin'ichi Ishiwata, Norio Fukuda
2. 発表標題 Myosin and tropomyosin-troponin complementarily regulate thermal activation of skeletal and cardiac muscles
3. 学会等名 第101回日本生理学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 S. Ishii, N. Fukuda
2. 発表標題 Microscopic heat pulses induce activation of striated muscle thin filaments
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Ishii, K. Oyama, F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Nakanishi, S. Ishiwata, N. Fukuda
2. 発表標題 Microscopic heat pulses induce activation of cardiac and skeletal thin filaments in the absence of Ca <sup>2+</sup>
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023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