

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12665

研究課題名(和文)多核細胞である骨格筋が筋線維タイプ変化を生じる機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of fiber type maintenance and change in skeletal muscle fibers as multinucleated cells

研究代表者

狩野 豊 (KANO, Yutaka)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授

研究者番号：90293133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、多核細胞である骨格筋の細胞内物質や情報の共有化のメカニズムについて調べた。その結果、グルコースの細胞内レベルを一定に保つための能動的な輸送システムの存在、ならびに、特異的なタンパク質の発現を細胞内で均一化する機構の存在を示すデータを得ることに成功した。今後、多核細胞の骨格筋が均一の形質を保持する機構において、筋線維全体の形質発現の調節を司るようなシステムの解明が求められる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of intracellular substances and nuclear information sharing of skeletal muscle fibers (multinuclear cells). This study clarified the existence of an active transport system to keep the intracellular level of glucose constant, and the existence of a mechanism to homogenize specific protein expression in the cell. As future research, it is necessary to elucidate the system that controls the mechanism by which skeletal muscle fibers retain uniform traits.

研究分野：運動生理学

キーワード：多核細胞 細胞内輸送 グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋線維（骨格筋細胞）は多核細胞であり、一定の間隔で核が存在する。特定の核が支配する領域を筋核ドメインと呼んでいる。骨格筋線維は、ミオシン重鎖(MHC)のアイソフォームによって大きく速筋や遅筋に分類されている。そして、筋線維タイプごとに収縮特性（収縮速度）、代謝特性（エネルギー産生能力）が異なっている。しかしながら、細胞全体が同一の形質を保持するメカニズムは不明である。本研究は、多核細胞である骨格筋細胞が、1本の筋線維において均一な形質発現を支える機構についての手がかりを探ることを目標とした。当初、この研究課題に対して、逆説的に、遅筋と速筋を同時に発現する骨格筋の作成を試みる実験計画を立案した。ハイブリッド線維（同一の筋線維で速筋と遅筋が混在する）が可能であれば、多核細胞の骨格筋が均一の形質を保持する機構において、筋線維全体の形質発現の調節を司るようなシステムは否定されることになる。骨格筋線維が多核細胞であることは、他の細胞と異なる最も特徴的な点であるが、これに関して「筋核間の情報共有機構があるのか？」あるいは、「筋核ドメインによって独立しているのか？」については明らかになっていない。本研究は、*in vivo* 環境下で、人為的に細胞内環境を変化させ、ハイブリッド筋線維を作成すること最終目標として立案された。この研究モデルは、骨格筋の多核細胞という特徴と運動による適応との関係性を、従来の研究手法にはない新しい視点から追求するものである。

## 2. 研究の目的

骨格筋は環境的な要因によって形態や機能に変化する可塑性に富んだ組織である。他の細胞と異なり複数の細胞核が配置している「多核細胞」である。この特徴は、骨格筋適応のメカニズムを解明する上での重要なポイントである。本研究は、同一の筋線維内のそれぞれの領域において、細胞質内環境の変化に対する情報の共有化メカニズムの有無について明らかにすることを目的とした。はじめに、骨格筋細胞において、細胞全体が同一の形質

や機能を保持するためには、細胞内環境を均一化するための物質輸送機構の存在が必要であると考えた。そこで、エネルギー基質として重要なグルコースに着目して、骨格筋細胞内の拡散・輸送システムについて検証した。次に、細胞内のグルコース感受性タンパク質を筋線維に発現させる遺伝子導入によって、発現パターンを観察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光グルコースによる細胞内物質輸送機構の評価

本研究では、マイクロインジェクション法を用いて蛍光標識グルコース2-NBDG (0.5 mM) をWistar系雄性ラットの脊柱僧帽筋単一線維に導入し、先行研究に基づき*in vivo*バイオイメージング技法 (Sonobe et al., Am J Physiol 2008) によって拡散動態を観察した。生理活性の異なる蛍光誘導体を用いて筋細胞内における拡散動態を比較・検証した。2-NBDG (D-グルコース誘導体)、2-NBDLG (L-グルコース誘導体)、FITC (非エネルギー基質) および Rhodamine B dextran (高分子量かつ非エネルギー基質) を単一筋線維にマイクロインジェクションし、拡散動態を注入20分後まで断続的に観察した。それぞれの溶液注入を行う際には、5  $\mu$ m以下に加工したキャピラリーを用いて、35 psi (24,000 Pa) の圧力で0.5 mM 溶液 (溶媒: 145 mM KCl buffer) を注入した。評価にあたっては、筋線維内における溶液の相対濃度分布を取得し、その分散値の時間変化率 (拡散係数) を算出した上で比較した。

### (2) グルコース感受性タンパク質発現パターンの評価

グルコース感受性蛍光タンパク質 (FLII12 Pglu-700  $\mu$   $\delta$  6, Takanage ら, 2008) を pcDNA3.1 FLII12Pglu-700  $\mu$   $\delta$  6 に組み込み、cDNA を作成し、観察筋線維周辺の皮下へ注射した。その直後に、電圧クランプを施すことで骨格筋筋へ導入した。その後、筋線維毎の発現パターンを *in vivo* バイオイメージングによって評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 蛍光グルコースによる細胞内物質輸送機構の評価

図 1 (中段) はマイクロインジェクション後の経時的な蛍光値変化の代表例を示しており、横軸は時間  $t$ 、縦軸は蛍光値  $I_t$  を表す。近位部 ( $|x| \sim 200 \mu\text{m}$ ) ではマイクロインジェクション直後の立ち上がりおよび減衰動態が確認できる。遠位部 ( $|x| = 250 \mu\text{m}$ ) では一定値までの上昇および収束動態が観測された。

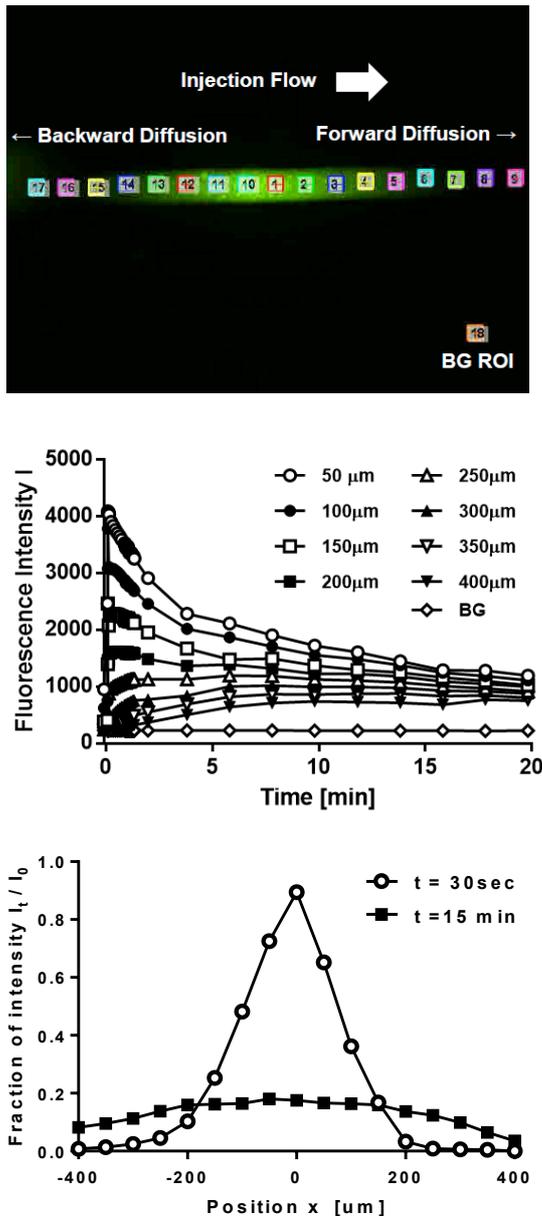


図1 マイクロインジェクション後の *in vivo* イメージング画像 (上段), 経時的な蛍光値変化の代表例 (中段), 筋線維内に注入した溶液の相対濃度分布および経時変化 (下段)

図 1 に示された結果より、分散値  $\sigma^2$  を算出し、筋線維内の溶液濃度の分布が広がりをついていく様子を評価した。分散値は濃度分布のピーク  $C_0$  値に影響を受けないため、蛍光試薬の経時的な消光に影響されずに分布変化を評価することができた。

図 2 はマイクロインジェクション後の、2-NBDG 群, 2-NBDLG 群, FITC 群および RhoB 群の経時的な分散値変化を示しており、縦軸は分散値  $\sigma^2$ 、横軸は時間  $t$  を表している。分散値の経時変化は少なくとも 2 min 時点以降は直線的であり、細胞内の拡散障害が約 20 分の間に変化していないことを意味している。2-NBDG 群, 2-NBDLG 群, FITC 群, RhoB 群の分散値は 18 分時点までにおいて、 $8.64 \pm 0.03 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ,  $6.88 \pm 0.20 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ,  $4.81 \pm 0.03 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ ,  $0.816 \pm 0.045 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  まで増加した。2-NBDLG, FITC, RhoB それぞれに対して、2-NBDG の分散値の時間変化は統計的に有意に早かった ( $P < 0.05$ )。

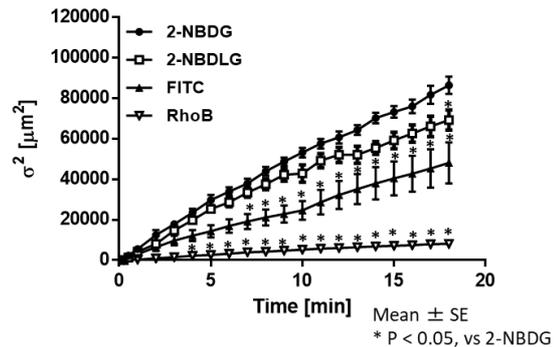


図 2 マイクロインジェクション後の、2-NBDG 群, 2-NBDLG 群, FITC 群および RhoB 群の経時的な分散値変化

図 3 は分散値の時間変化率を拡散係数として換算した結果を示しており、縦軸は拡散係数  $D$  [ $\text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ ], 横軸は分子量を示している。拡散係数は 2-NBDG で  $4.17 \pm 0.15 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ , 2-NBDLG で  $3.36 \pm 0.08 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ , FITC で  $1.89 \pm 0.27 \times 10^{-11} \text{m}^2 \text{sec}^{-1}$ , RhoB で  $4.39 \pm 0.28 \times 10^{-12} \text{m}^2 \text{sec}^{-1}$  であり、分子量と拡散係数は負の関係性にあることが確認された。また、統計解析では分散値の時間変化と同様に 2-NBDG の拡散係数は統計的に有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。

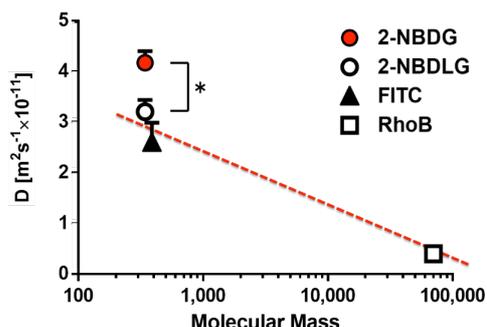


図3 2-NBDG 群, 2-NBDLG 群, FITC 群および RhoB 群の分散値と分子量の関係性

2-NBDG および 2-NBDLG (分子量 342.3), FITC (M=389.4) は分子量が近いにも関わらず拡散性が大きく異なっており (図3), 細胞内の物理構造だけでは説明できない。また,  $\text{Ca}^{2+}$  や  $\text{O}_2$  などの小分子で報告された拡散の異方性 (半径方向より長軸方向に拡散しやすい性質) は, 2-NBDG (分子量 342.3), 2-NBDLG (分子量 342.3), FITC (分子量 389.4) でも同様であると考えられる。そのため, 以上の3物質の中で, 異方性に起因する拡散制限が異なるということは考えにくい。ここで特筆すべき点は, 2-NBDG と 2-NBDLG は鏡像異性構造であり, 物理的特性が全く同じであるにも関わらず拡散係数が異なることである。このことから, D-グルコース構造および L-グルコース構造によって結合性が異なるタンパク質が拡散に影響を及ぼしている可能性がある。例えば, 解糖系の第一段階の酵素反応に関わるヘキソキナーゼ (HK) I または II は 2-NBDG と 2-NBDLG で結合性が異なる。筋細胞では HK II が主として働いており,  $K_m$  値が低いため細胞に取り込まれた D-グルコースと迅速に結合する。しかしながら, HK と 2-NBDG の結合性が高いことは拡散の制限となりえる。そのため, 2-NBDG の拡散性を高めることは考えにくい。したがって, 1) D-グルコースより L-グルコースと強く結合するタンパク質の影響, または 2) 細胞内における能動的な D-グルコース輸送機構などの未知の機構が関与している可能性も考えられる。

(2) グルコース感受性タンパク質発現パターンの評価



図4 グルコース感受性タンパク質発現の *in vivo* バイオイメージングによる評価

図4はラット脊柱僧帽筋に pcDNA3.1 FLII12 Pglu-700  $\mu$   $\delta$  6 を 50  $\mu$ l 注入し, エレクトロポレーションによるタンパク発現を *in vivo* 環境下で観察した画像である。特徴的な点として, 1) タンパク質発現が認められる線維と認められない線維とのどちらか一方であること, 2) タンパク質発現は, 単一筋線維のすべての領域で確認されたことが挙げられる。このことは, 多核細胞の筋核間の情報共有機構を示唆する結果であり, 骨格筋細胞において, 細胞全体が同一の形質や機能を保持する機構の存在を示唆するものである。

本研究は, 研究の立案段階での人為的に細胞内環境を変化させ, ハイブリッド筋線維 (形質の異なる特徴が混在する筋線維) を作成することに対して, 1) グルコースの細胞内レベルを一定に保つための能動的な輸送システムの存在, 2) 特異的なタンパク質の発現を細胞内で均一化する機構の存在を示すデータを得ることに成功した。

今後, 多核細胞の骨格筋が均一の形質を保持する機構において, 筋線維全体の形質発現の調節を司るようなシステムの解明が求められる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Eshima Hiroaki, Miura Shinji, Senoo Nanami, Hatakeyama Koji, Poole David C. and Kano Yutaka. Improved skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$

regulation in vivo following contractions in mice overexpressing PGC-1 $\alpha$ . American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology: 2017, 1017-1028. 査読有  
DOI 10.1152/ajpregu.00032.2017

〔学会発表〕(計1件) 小泉 柁夫, 狩野 豊. 骨格筋細胞内におけるグルコース特異的な拡散動態. 第72回日本体力医学会 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ecc.es.uec.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

狩野 豊 (KANO, Yutaka) 電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授  
研究者番号: 90293133