

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08079

研究課題名(和文) 骨格筋細胞内における筋型変換のライブイメージングシステムの開発

研究課題名(英文) Myosin dynamics in cultured skeletal muscle cells and isolated fibers

研究代表者

尾嶋 孝一 (OJIMA, Koichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・上級研究員

研究者番号：60415544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋型決定に關与する筋原線維性タンパク質であるミオシンの動態を明らかにし、生きたマウスの筋線維/細胞内で異なるタイプの筋型をモニターする系を確立することを目的とした。その結果、筋原線維内ミオシンと入れ替わるミオシンの供給源として、新規に合成されたミオシン以外にも細胞質内にプールされているミオシンがあることを見出した。また、ミオシンのシャペロンである熱ショックタンパク質90(Hsp90)のシャペロン活性がミオシン置換効率に影響を与えることも明らかにした。さらに、内因性ミオシンの動態を解析するために赤色蛍光タンパク質融合したミオシンを発現する遺伝子改変マウスを作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来までは骨格筋型を判定するためには、生体から骨格筋組織を採取し、特異的抗体を用いて抗体染色を行うなど煩雑な作業が必要であった。本研究において作出した蛍光タンパク質を融合したミオシンを発現するマウスを用いることで、蛍光波長により筋型を視覚的に簡便に区別することが可能となった。さらに、内因性のミオシンの動態を顕微鏡下で追跡できることから、ミオシンを研究する上で非常にパワフルなツールになる。

研究成果の概要(英文)：In skeletal muscles, myosin is a major component of myofibrillar proteins. In myofibrils, approximately 300 myosin molecules form a single thick filament where continuous turnover of myosin is observed. However, we have not fully understood the mechanism by which myosin replacement is regulated in skeletal muscle cells. Here, we showed that one of the sources for myosin substitution in myofibrils was stored myosin in the cytoplasm of myotubes. Next, we searched for factors to affect myosin replacement rate in myofibrils. Our results demonstrated that chaperone activity of Hsp90 increased myosin replacement rate through upregulation of myosin amount in cultured myotubes. Finally, we generated genetically modified mouse in which red fluorescence protein fused myosin heavy chain was expressed in skeletal muscle cells to monitor the dynamics of endogenous myosin.

研究分野：骨格筋細胞生物学

キーワード：ミオシン 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋には筋収縮特性の異なる筋型が主に二つ存在する(速筋型、および遅筋型)。速筋型は筋肥大が起こりやすく、遅筋型ではキメが細かく脂肪交雑が入りやすいため、骨格筋型は家畜骨格筋の量および質を決定する重要な要因である。骨格筋は筋線維が数万本束ねられた組織であり、骨格筋組織としての筋型は速筋型筋線維と遅筋型筋線維の割合で決まる。筋収縮は筋線維内の筋原線維においてアクチンを主体とする細いフィラメント、およびミオシンを主体とする太いフィラメントが相互作用することで引き起こされ、その収縮特性は太いフィラメントを構成するミオシン重鎖の種類により決定される。そのため、筋線維に発現するミオシン重鎖が筋型のマーカーとなる。これまで研究代表者は筋型決定に重要なミオシン重鎖に着目し、太いフィラメントの形成および維持機構を追求した。その結果、太いフィラメントを構成するミオシン重鎖の半分は約3時間に入れ替わることを明らかにした(K. Ojima, et al. 2015. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 309, C669-79)。これらの結果は、太いフィラメント内のミオシン重鎖の置換は恒常的に起きること、太いフィラメントは極めて柔軟な構造体であることを示している。しかし、筋原線維を形成するミオシンの動態は不明な点が多く、ミオシン置換がどのような因子の影響を受けるのかは明らかになっていない。また、これまで得られた結果は外因性のミオシン重鎖を骨格筋細胞へ強制発現させて得られた結果であるため、骨格筋細胞が発現する内因性ミオシン重鎖の動態については不明である。さらに、骨格筋型の区別をするためには、骨格筋組織からイムノプロット、PCR、あるいは切片を作製して抗体染色を行う必要があり、レトロスペクティブに筋型を判断する方法しかなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では骨格筋内に存在する筋原線維形成機構を明らかにするために、太いフィラメントの主体であるミオシンに着目し、骨格筋細胞内でのミオシンの動態を解析する。さらに、生きた骨格筋線維/細胞において筋型を簡便かつ明確に識別するためのツール、および内因性ミオシンの動態を解析するためのツールとして、蛍光タンパク質を融合した速筋型ミオシン重鎖を発現する遺伝子改変マウスを作出し、ミオシンの動態を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨格筋細胞培養・遺伝子導入

ニワトリ胚から骨格筋細胞を調製した。緑色蛍光タンパク質融合 Myh3 (GFP-Myh3) および赤色蛍光タンパク質融合 Hsp90 (Cherry-Hsp90) をコードした発現ベクターを調製した培養骨格筋細胞に遺伝子導入した。骨格筋細胞膜の透過処理をするために Streptolysin- $\alpha$  (SLO) を用いた。

### (2) 蛍光退色後蛍光回復法 (FRAP 法)

蛍光タンパク質を融合した Myh を発現する筋管を試料とし、筋原線維の蛍光を一部退色させ、退色箇所の蛍光回復を測定した。

### (3) 遺伝子改変マウス作出

野生型 Myh1 の代わりに赤色蛍光タンパク質融合した Myh1 を発現する遺伝子改変マウスを作出した。

### (4) 単一筋線維の調製

マウスから速筋型骨格筋として長趾伸筋、遅筋型骨格筋としてヒラメ筋を採取し、コラゲナーゼ処理することにより、単一筋線維を調製し、FRAP 測定に供した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 筋原線維内ミオシンと置き換わるミオシンの供給源の解明

筋型決定の主要要因であるミオシンにより形成される太いフィラメントに着目し、太いフィラメント内のミオシン置換メカニズムについて追究した。これまでの当研究グループの研究から、新規に合成されたミオシンが優先的に太いフィラメント内のミオシンと置換されることは明らかになってきたが、新規に合成されたミオシン以外に置換されるミオシンの供給源は不明であった。一方、ミオシンの性質として生理的イオン強度下では凝集・会合することが知られている。従って、骨格筋細胞質内ではミオシンが単分子として存在するとは困難なため、細胞質内にミオシンのプールがあるとは考えられていなかった。そこで、GFP-Myh3 を遺伝子導入した培養骨格筋細胞を試料として用い、SLO 処理することで細胞膜の透過処理を行った。その後、太いフィラメントに組み込まれていないミオシンを細胞外に漏出させた状態で FRAP を測定した。その結果、GFP-Myh3 の蛍光回復が対照群と比較すると有意に低下した。この結果はミオシンのプールが骨格筋細胞質内に存在し、このミオシンが太いフィラメントを構成するミオシンと置換する供給源となることを明らかにした (K. Ojima, et al., 2017 Animal Sci. J.)

##### (2) Hsp90 のミオシン置換におよぼす影響の解明

ミオシンのシャペロンである熱ショックタンパク質 90 (Hsp90) に着目し、太いフィラメント内のミオシン置換が Hsp90 により受ける影響を FRAP 法にて評価した。GFP-Myh3 および Cherry-Hsp90 を共発現する培養骨格筋細胞では太いフィラメント内のミオシン置換速度が対照群と比較して速くなることが明らかとなった。さらに、Hsp90 の活性阻害剤を加えた条件では GFP-Myh3 の置換速度が顕著に低下することが判明した。ミオシン置換には Hsp90 の活性が関与することを強く示唆する結果を得た。このメカニズムを探求した結果、骨格筋細胞に Hsp90 を過剰発現させるとミオシンの発現が転写レベルにおいて上昇すること、および骨格筋細胞質内にプールされたミオシン総量が増えることが明らかとなった。さらに、Hsp90 阻害剤存在下では骨格筋細胞内にプールされたミオシンの総量が減少することで、ミオシン置換速度が低下することが明らかになった (K. Ojima, et al., 2018 Am. J. Physiol. Cell Physiol.)

##### (3) 遺伝子改変マウスの作出

内因性に発現する速筋型ミオシンの動態を解析するために、野生型 Myh1 の代わりに赤色蛍光タンパク質融合した Myh1 を発現する遺伝子改変マウスを作出した。また、遅筋型ミオシンの動態を解析するために、野生型 Myh7 の代わりに GFP-Myh7 を発現する遺伝子改変マウスを使用した。これらのマウスから EDL 筋およびヒラメ筋を採取した。骨格筋から調製した単一筋線維では蛍光シグナルにより発現しているミオシンを区別できたため、筋線維ごとに筋型を決定することができた。筋原線維内におけるミオシンの置換速度を FRAP 法にて測定した結果、筋線維を構成するミオシンのタイプにより、ミオシン置換速度が異なること、また、蛍光強度の最大回復値は Myh1 と比較して Myh7 の方が有意に高いことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 尾嶋孝一	4. 巻 759
2. 論文標題 骨格筋量を制御する細胞分子メカニズムに関する研究 -基礎的な観点から骨格筋形成を研究する-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 畜産技術	6. 最初と最後の頁 2-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ojima Koichi, Ichimura Emi, Suzuki Takahiro, Oe Mika, Muroya Susumu, Nishimura Takanori	4. 巻 315
2. 論文標題 HSP90 modulates the myosin replacement rate in myofibrils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C104-C114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00245.2017	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 Koichi OJIMA, Emi ICHIMURA, Yuya YASUKAWA, Mika OE, Susumu MUROYA, Takahiro SUZUKI, Jun-ichi WAKAMATSU, and Takanori NISHIMURA	4. 巻 88
2. 論文標題 The myosin substitution rate is affected by the amount of cytosolic myosin in cultured muscle cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1788-1793
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.12826	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 -

1. 著者名 Ojima Koichi	4. 巻 90
2. 論文標題 Myosin: Formation and maintenance of thick filaments.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 801-807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13226	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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 尾嶋孝一
2. 発表標題 骨格筋細胞におけるミオシン分子のダイナミクス
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会 獣医解剖分科会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大江美香, 尾嶋孝一, 室谷進
2. 発表標題 速筋型および遅筋型筋線維のゲノムDNAのメチル化解析
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾嶋孝一, 市村恵美, 大江美香, 室谷進, 鈴木貴弘, 西邑隆徳
2. 発表標題 骨格筋筋原線維内ミオシン分子の置換はHsp90により促進される
3. 学会等名 日本畜産学会第123回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K. Ojima, E. Ichimura, S. Muroya, M. Oe, T. Suzuki, T. Nishimura
2. 発表標題 Myosin replacement in myofibrils is induced by Hsp90 activity
3. 学会等名 2017 ASCB EMBO meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾嶋孝一
2. 発表標題 骨格筋の量と質を制御する細胞分子メカニズムに関する研究
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾嶋孝一、市村恵美、安川裕也、室谷進、鈴木貴弘、西邑隆徳
2. 発表標題 筋原線維に組み込まれていないミオシン分子の量が太いフィラメントのミオシン分子置換に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第122回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Kigaki, K. Ojima, T. Suzuki, K. Kobayashi, T. Nishimura
2. 発表標題 The replacement of myosin molecules in thick filaments is different between slow- and fast-twitch myofibers.
3. 学会等名 2019 ASCB EMBO meeting (国際学会)
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