

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500358

研究課題名（和文）

骨格筋収縮における細胞内カルシウム濃度とトロポニン構造変化の同時測定

研究課題名（英文）

Simultaneous measurement of intracellular Ca concentration and the structural change of troponin in skeletal muscle.

研究代表者

八木 直人（YAGI NAOTO）

財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・副部門長

研究者番号：80133940

研究成果の概要：

同一のカエル骨格筋標本において、蛍光色素を使った細胞内カルシウム濃度測定と、カルシウム結合収縮制御タンパク質トロポニンのX線回折測定を行う技術を開発した。この結果、電気刺激後のトロポニン反射の強度変化は、細胞内カルシウム濃度から計算したトロポニン分子のカルシウム結合量に遅れて生じることが観察された。このようにトロポニン分子の構造変化は計算から推測されるトロポニンへのカルシウム結合とは必ずしも一致していないことが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：筋収縮、カルシウムイオン、シンクロトロン放射光、X線回折法、生物物理学

1. 研究開始当初の背景

筋肉の収縮がカルシウムイオンによって制御されていることは、よく知られている。これは骨格筋・心筋・平滑筋に共通であり、筋収縮機構の研究において筋細胞内のカルシウムイオン濃度の変化をリアルタイムで測定する方法が開発されてきた。現在では、カルシウム蛍光指示薬の進歩によって、細胞

内自由カルシウム濃度を詳細に測定できるようになった。細胞内自由カルシウム濃度から、トロポニンのカルシウム結合定数を用いてトロポニンのカルシウム結合量を計算することが可能である。しかしその一方で、細胞内自由カルシウム濃度は、収縮制御を行っているトロポニンのカルシウム結合と必ずしも比例しないことも指摘されてきた。例え

ば骨格筋や心筋の単収縮では、細胞内カルシウム濃度は刺激後 10 ミリ秒以内に最大に達して、後は減少するばかりであるが、収縮はその後も継続し、最大張力は数 10 ミリ秒後に発生する。このように実際に収縮を制御しているのは細胞内カルシウム濃度ではなく、トロポニンである。トロポニンはカルシウムイオンを結合してアクチンとミオシンの相互作用を制御するだけでなく、ミオシン（クロスブリッジ）の状態を感受する機能を持っていると考えられている。すなわち、クロスブリッジがアクチンと結合していると、トロポニンへのカルシウム結合が強まり、細胞内カルシウム濃度が低くてもカルシウムを結合した状態を保っている。もしくは、カルシウムが結合していなくても、アクチンのミオシンへの結合を妨げない。従って、例えば収縮中に筋肉を解放し、張力を下げてクロスブリッジのアクチンからの解離を促すと、カルシウムイオンがトロポニンから解離することが知られている (S.Kurihara, *Jpn. J. Physiol.* **44**, 591, 1994)。このように、トロポニンのカルシウム結合は細胞内カルシウム濃度とクロスブリッジの二重の制御を受けており、筋収縮制御機構の研究には、細胞内カルシウム濃度だけでなく、細胞内でのトロポニンへのカルシウム結合を測定することが重要である。

現在実用化されている測定法の中で、トロポニンのカルシウム結合による構造変化を、生きた細胞内でリアルタイムで測定できる方法は X 線回折法だけである。この方法では、細いフィラメント上に 38.5nm の間隔で結合しているトロポニンからの X 線回折を、シンクロトロン放射光を用いて記録する。カルシウムイオンがトロポニンに結合することによって、トロポニンに構造変化が生じ、この反射の強度は増大する。0.5 ミリ秒の時間分解能が可能で、数回の収縮のデータを加算することによって十分な S/N で解析が可能となる。また、X 線回折法では、トロポニンの構造変化以外にも、張力発生に直接関与しているクロスブリッジの構造変化も同時に測定可能である。

申請者らは、この回折の測定によって、16°C のカエル骨格筋においては、刺激後数ミリ秒たって初めてトロポニンに構造変化が生じ、それに引き続いてミオシンのアクチンへの結合が生じ、収縮張力が発生することを示した (N.Yagi, *Biophys. J.* **84**, 1093, 2003)。これは、カルシウム指示薬で測定された細胞内カルシウム濃度の上昇に比べて遅く、サルコメア中でのカルシウムイオンの拡散が収縮開始の律速になっている可能性を示唆した。さらに、潜時弛緩の時間経過とトロポニン反射、ミオシン反射の強度変化との時間経過の比較から、骨格筋の収縮前に生じる潜時

弛緩が、弛緩状態でアクチンと結合しているミオシン頭部の解離によるという結論を得た (N.Yagi, *Biophys. J.* **92**, 162, 2007)。このように高い時間分解能でトロポニン分子の構造変化が追えるようになったことで、細胞内カルシウム濃度変化との時間経過の比較が可能になってきた。

2. 研究の目的

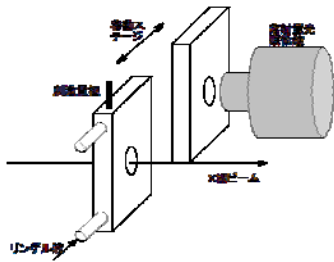
本研究では、トロポニンへのカルシウムイオンの結合と、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を対応づけ、ここにクロスブリッジがどのように影響するかを解明することを目的とする。そのために、X 線回折測定装置に蛍光測定装置を組み込み、同一の標本で細胞内カルシウム濃度とトロポニンへのカルシウム結合を測定する装置を製作する。

本研究では、筋収縮におけるカルシウム遊離から張力発生までの全過程を分子レベルで観察することにより、クロスブリッジによるトロポニンのカルシウム結合への影響を解明し、収縮時間を決めている要因を明らかにする。これは、筋収縮の分子機構を理解する上で重要なだけでなく、心筋における弛緩不全のメカニズムなどを理解する上で重要な知見を与える。

3. 研究の方法

X 線回折実験には、大型放射光施設 SPring-8 の高フラックスビームライン BL40XU を用いた。X 線エネルギーは 10.5keV、カメラ長は 2.8m とした。このビームラインは、毎秒 10^{15} フォトンという、従来の放射光ビームラインより三桁高いフラックスを有するが、試料への放射線損傷を避けるために、アブソーバーで毎秒 10^{14} フォトン程度に減弱して使用した。

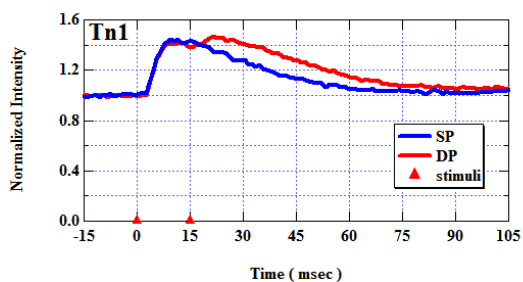
食用蛙骨格筋（太いフィラメントと細いフィラメントの間の重なりを無くすために、サルコメア長 3.6 ミクロン以上に引き伸ばした半腱様筋全筋）を、X 線と蛍光測定に共用可能な窓の付いた試料セルに固定した。筋肉の一端は張力トランスデューサと接続した。試料セルにはリンゲル液を灌流し、温度を一定に保った。多くの実験は、これまで細胞内カルシウム測定が行われている 16°C で行った。X 線回折の測定には、高速三板式 CCD カメラを用いる (N.Yagi et al., *J. Synchrotron Rad.* **11**, 456, 2004) か、最近開発されたフォトン社の超高速 CMOS カメラを使用した。X 線による放射線損傷を防ぐため、試料を毎秒 5~10cm の速度で降下させながら電気刺激を行い、同時に X 線回折像を 1 ミリ秒の時間分解能で記録した (N.Yagi, *Biophys. J.* **84**, 1093, 2003)。



細胞内カルシウム濃度の測定を行うには、筋肉を試料セルに固定したまま、ステージを横に移動して、セルを蛍光測定装置にセットした。筋肉は実験前に細胞膜透過性のカルシウム蛍光指示薬 (fluo3-AM) に浸しておき、蛍光指示薬が細胞内に浸透した時点で測定を行った。X線実験と同じように電気刺激を行って、蛍光測定を行った。この蛍光測定装置は、ライカ社製の落射蛍光実体顕微鏡に手を加えて、X線測定用の試料セル内で蛍光測定を行える装置とした。X線回折実験用の試料セルは大がかりなものであるが、実体顕微鏡の光学系であれば、被写界深度が十分に深いために、セルから離れた位置でも十分な蛍光量を集めることができた。蛍光顕微鏡を横立させることで、X線測定と同様に蛍光強度を測定可能となった。X線回折のデータ測定と蛍光測定を、収縮ごとに交互に測定を行うことによって、二つの測定方法で対応の取れたデータを収集した。試料はX線照射後に水平に位置を変えて、同一の部分が二回以上照射されないようにすることで試料の放射線損傷を防いだ。

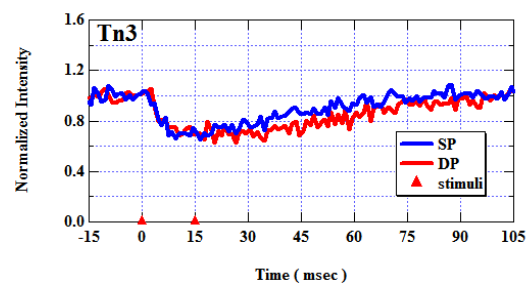
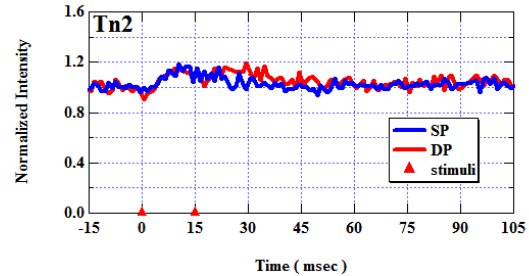
4. 研究成果

トロポニン分子由来のX線回折ピークは、子午線上 $1/38.5\text{nm}^{-1}$ の位置に観察される。このピークの強度は、下図青線のように刺激後4ミリ秒から増加を始め、10ミリ秒で約40%増加し、半値時間約25ミリ秒で弛緩時の強度に戻った。最初の刺激から15ミリ秒の時点で再び刺激を行うと、強度は一度目の刺激とほぼ同じレベルまで回復した。

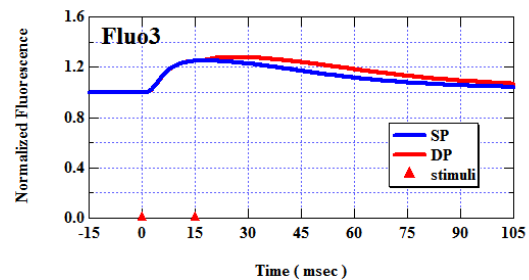


トロポニン分子由来の子午線反射は、他に

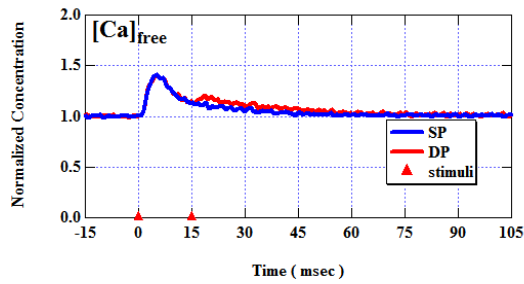
も 38.5nm の高次に相当する $1/19.2\text{nm}^{-1}$ と $1/12.8\text{nm}^{-1}$ に観察される。これらのピーク強度も測定した。 19.2nm ピークは、 38.5nm ピークと同様の時間経過で強度が増加した。逆に 12.8nm ピークは、同様の時間経過で強度が減少した。



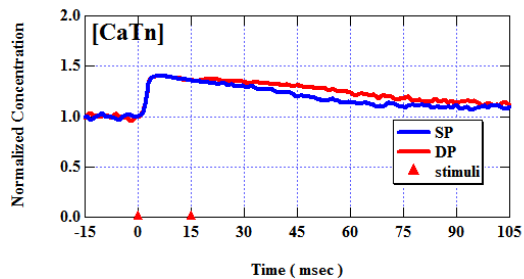
これらX線回折強度変化に対して、fluo-3からの蛍光強度は下図のように変化した。すなわち刺激後2ミリ秒で増加を始め、15ミリ秒で最大に達し、半値時間40ミリ秒程度で低下した。15ミリ秒で二度目の刺激を加えると、最大レベルは余り変わらず、強度上昇の時間が延長が観察された。



fluo-3の蛍光強度変化は、細胞内のイオン環境を仮定することで(Harkins et al., *Biophys. J.* **65**, 865, 1993)、細胞内自由カルシウムイオン濃度に換算することが可能である。その結果得られた濃度変化は、下図のように刺激後1-2ミリ秒から上昇し、5ミリ秒にはピークに達し、半値時間6ミリ秒程度で減少する。二度目の刺激は、僅かな濃度上昇を生じるに過ぎない。



さらに細胞内自由カルシウム濃度から、トロポニン分子のカルシウム結合定数を用いて、トロポニン分子へのカルシウム結合を計算したのが下図である。トロポニンへのカルシウム結合は、刺激後1-2ミリ秒で増加を始め、5ミリ秒でピークに達し、半値時間40ミリ秒程度で低下した。二度目の刺激はトロポニンへのカルシウム結合量をほとんど増やさず、濃度低下の時間経過が延長するのみであった。



本研究における実験結果は、トロポニン分子へのカルシウム結合が直ちに同分子の構造変化を引き起こすものではないことを示している。一般にカルモデュリンなどのカルシウム結合タンパク質の構造変化はカルシウム結合後1ミリ秒以下で生じるので、この結果はトロポニン分子(特にカルシウム結合サイトを持つトロポニンC)の構造変化が他のタンパク質との結合によって遅くなっていることを示している。また、カルシウムがトロポニン分子から解離する過程においては、構造変化がカルシウム解離よりもむしろ先行して生じていることが示唆される。しかし、トロポニン由来の回折ピークの強度は構造変化を生じたトロポニン分子の数に比例するとは限らず、二乗に比例している可能性もあるため、この解釈は慎重を要する。

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 3件)

1. Tamura, T., J. Wakayama, K. Inoue, N. Yagi and H. Iwamoto. Dynamics of Thin-Filament Activation in Rabbit Skeletal Muscle Fibers Examined by Time-Resolved X-ray Diffraction. *Biophys. J.* 96, 1045-1055 (2009). 査読有り
2. Matsuo, T. and Yagi, N. Structural Changes in the Muscle Thin Filament during Contractions Caused by Single and Double Electrical Pulses. *J. Mol. Biol.* 383, 1019-1036 (2008). 査読有り
3. Iwamoto, H., K. Oiwa, M. Kovács, J. R. Sellers, T. Suzuki, J. Wakayama, T. Tamura, N. Yagi and T. Fujisawa. Diversity of Structural Behavior in Vertebrate Conventional Myosins Complexed with Actin. *J. Mol. Biol.*, 369, 249-264 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 2件)

1. T. Matsuo and N. Yagi. Measurements of structural changes of troponin molecules caused by crossbridge formation in live frog muscle during contraction. 日本生物物理学会、2008年12月4日、福岡
2. N. Yagi. Measurement of Ca-induced structural changes of the thin filament in intact frog skeletal muscle. 日本生理学会、2008年3月25日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木 直人 (YAGI NAOTO)
財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・副部門長
研究者番号：80133940

(2) 研究分担者

2007年度のみ
岩本 裕之 (IWAMOTO HIROYUKI)
財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・バイオ実験支援チーム・主幹研究員
研究者番号：60176568

(3) 連携研究者

2008年度のみ
岩本 裕之 (IWAMOTO HIROYUKI)
財団法人高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・バイオ実験支援チーム・主幹研究員
研究者番号：60176568