

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03100

研究課題名(和文)骨格筋肥大・萎縮の根幹である筋原線維構造の形成・維持・分解メカニズムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of myosin replacement in the thick filament of the skeletal muscle

研究代表者

西邑 隆徳(Nishimura, Takanori)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10237729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構を解明することを目的とした。太いフィラメントを構成するミオシン分子はフィラメントの両端部でより頻繁に置き換わっていること、一度解離したミオシン分子も再び太いフィラメントに組み込まれること、太いフィラメントからの解離と再利用を繰り返すうちに一部のミオシン分子はE3リガーゼによって選別され分解されることを明らかにした。さらに、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換頻度はミオシンアイソフォームによって異なっており、この要因としてミオシンのメチル化修飾が関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界人口の増加や発展途上国の経済発展を背景として食肉需要は拡大しているが、家畜生産による環境負荷等が問題となっている。環境調和・持続型の効率的な食肉生産確立するためには、食肉の主体である家畜骨格筋の筋肥大・維持機構を組織・細胞レベルで理解することが重要である。本研究の成果は、骨格筋の肥大・萎縮機構の分子基盤確立に寄与するとともに、食肉生産機構の最重要部分である家畜骨格筋肥大メカニズムの解明に繋がるため、食肉科学および畜産学分野に大きく貢献する。さらに、健康医学分野ではヒトの加齢に伴う骨格筋量の減少が身体機能を低下させるサルコペニアの発症機序解明および予防法開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the replacement mechanism of myosin molecules in thick filaments within myofibrils. We found that myosin is more frequently inserted in the tips than the rest of the thick filament when myosin is replaced in the thick filament. The combination of pulse-chase assay with FRAP directly demonstrated the presence of the recycled myosin, which is reinserted in the thick filament once released from the thick filament. Myh3 specific E3 ligase participates in myosin replacement by selecting myosin to be degraded. Ubiquitinated myosin accumulates in the cytosol rather than the myofibrils, indicating that ubiquitinated myosin is not incorporated into the thick filament and that myosin to be degraded is selected in the cytosol. LC-MS/MS analysis revealed that methylated Myh is different between ages, Myh isoforms, and fractions (myofibril/cytosol). As adding the methyl group changes the myosin hydrophobicity, methylation may influence myosin replacement.

研究分野：筋細胞生物学

キーワード：骨格筋 筋原線維 ミオシン アクチン 太いフィラメント 筋線維型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界人口の増加や発展途上国の経済発展を背景として世界的に食肉需要は拡大しているが、畜産による環境負荷や家畜生産に必要な投入エネルギーの大きさ等が問題となっている。環境調和・持続型の効率的な食肉生産確立するためには、家畜骨格筋の筋肥大・維持機構を組織・細胞レベルで理解することが重要である。

骨格筋は筋線維の集合体であり、筋線維は収縮機構を担う筋原線維で占められている。筋原線維は20種類以上のタンパク質が高次構造を組んだ収縮単位(サルコメア)から成る。サルコメア内ではミオシンを主体とする太いフィラメントとアクチンを主体とする細いフィラメントが規則正しく配列している。太いフィラメントはミオシン分子300~400が自己集合した1.6 μm の双極性フィラメントで、細いフィラメントを構成しているアクチン分子と相互作用することで骨格筋の収縮・弛緩を担っている。

生体機能を維持するためにはタンパク質の代謝回転が必要であるが、筋原線維を構築するタンパク質がサルコメア構造や収縮機能壊すことなく、どのように代謝しているのかは不明である。これまで私たちは、培養筋管を用いたライブイメージング観察により、筋原線維のミオシン分子は約10時間で50%程度置換していることを明らかにするとともに、ミオシン分子は筋原線維や太いフィラメント単位ではなくミオシン分子単位あるいはオリゴマー単位で置換している可能性を示した。また、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換調節にはHSP90が関与していることを示唆した。しかし、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子置換メカニズムの詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構を解明することを目的に、以下の4点について追究した。

太いフィラメントにおけるミオシン分子の挿入・解離パターン

新規合成ミオシン分子あるいは細胞質に存在するミオシン分子が太いフィラメントのどこに挿入され、また、どこから解離されるのかを蛍光標識ミオシン分子を用いたライブイメージングにより明らかにする。

筋線維型がミオシン分子の置換に及ぼす影響

筋線維は遅筋型と速筋型に分類されるが、筋線維型は主にミオシン重鎖アイソフォームによって決定される。本研究では、遅筋型ミオシン(GFP-Myh7)あるいは速筋型ミオシン(KusabiraOrange-Myh1)を発現するマウスの骨格筋線維を用いて、筋線維型によってミオシン分子の置換様相に差があるか否かを明らかにする。

ユビキチンプロテアソーム分解系によるミオシン分子の置換調節機構

細胞内タンパク質分解系に着目し、「ユビキチンリガーゼがユビキチン化によって筋線維中のミオシン分子量を調節することでミオシン分子の置換が制御されている」との作業仮説を立てて、ミオシン関連ユビキチンリガーゼの1つであるOzzを過剰発現させた筋管を用いて検証する。

翻訳後修飾によるミオシン分子の置換調節機構

ミオシン分子の置換メカニズムを制御している要因として翻訳後修飾に着目し、速筋/遅筋型ミオシンアイソフォームによって翻訳後修飾の種類や修飾率が変化するか否かを検討し、ミオシン分子の翻訳後修飾が太いフィラメントにおけるミオシン分子置換に及ぼす影響を追究する。

3. 研究の方法

太いフィラメントにおけるミオシン分子の挿入・解離パターン

筋原線維におけるミオシン分子の挿入・解離パターンを明らかにするために、KikGR標識ミオシンを遺伝子導入し発現させた筋管を用いてライブイメージングを行った。筋管の一部(ROI)をUV照射してKikGR標識ミオシンを緑蛍光から赤蛍光に変換し、ROIの赤蛍光強度の減衰を観察することで太いフィラメントからのミオシン分子の解離を、緑蛍光強度の増加を測定することでミオシン分子の挿入を調べた。また、新規合成ミオシン分子の挿入パターン、ならびに一度解離したミオシンの再挿入とその位置を調べるために、Halo標識ミオシン発現筋管を用いてライブイメージングを行った。得られた蛍光イメージを用いてサルコメアの長軸方向に沿ってラインスキャンし、蛍光強度の経時変化からミオシン分子の挿入・解離パターンを解析した。

筋線維型がミオシン分子の置換に及ぼす影響

GFP-Myh7ノックインマウスからはヒラメ筋、KusabiraOrange-Myh1ノックインマウスからは長趾伸筋を採取し、コラゲナーゼ処理を用いて筋線維を単離し、光退色後蛍光回復法(FRAP)によってミオシン分子の置換様相をライブイメージングした。蛍光強度の最大回復値である

Mobile fraction(Mf)および Mf の 50%に達するまでの時間である Half-life($t_{1/2}$)を算出し、それぞれをミオシン分子の置換程度および置換速度の指標とした。

ユビキチンプロテアソーム分解系によるミオシン分子の置換調節機構

胚型ミオシン重鎖を認識するユビキチンリガーゼとして Ozz が知られていることから、OZZ を過剰発現する筋管 (eGFP-Myh3 と mCherry-Ozz 共発現系) を作製し、ミオシン分子の置換様相を FRAP で調べた。また、Ozz の過剰発現が他のミオシンアイソフォームの置換にも影響するかを検討するために、速筋アイソフォームの Myh1 と遅筋アイソフォームの Myh7 の置換様相を mCherry-Ozz 共発現条件下で調べた。さらに、Ozz 過剰発現による Myh3 の置換抑制が Ub 化を介したものであるかを確認するために、mCherry-Ozz の発現の有無でミオシンのユビキチン化率を比較した。

翻訳後修飾によるミオシン分子の置換調節機構

タンパク質間の相互作用や局在変化を調節することで知られる翻訳後修飾に着目し、速筋・遅筋型アイソフォームによって受ける翻訳後修飾の種類や修飾率が変化するか否か検討した。速筋として前脛骨筋 (TA)、遅筋としてヒラメ筋 (SOL) をマウスから採取し、筋原線維画分と細胞質画分に画分してサンプルを調製した。このサンプルを電気泳動し、翻訳後修飾抗体を用いてイムノプロットングを行った。マウス生体内でミオシン分子が受けている翻訳後修飾の種類と修飾位置の同定するために質量分析を行った。

4. 研究成果

太いフィラメントにおけるミオシン分子の挿入/解離パターン

鶏胚由来骨格筋細胞に KikGR 標識ミオシン重鎖 (Myh) あるいは Halo-Myh を遺伝子導入し形成させた筋管を用いてミオシン分子の挙動をライブイメージングにより観察した。KikGR-Myh 発現筋管に UV 照射をすると蛍光が緑から赤に変換するため、照射部分の赤蛍光と緑蛍光の変化を観察することで筋原線維におけるミオシン分子の解離と挿入を観察することができる。緑蛍光の増加と赤蛍光の減少は同調していたことから、筋原線維におけるミオシン分子の挿入と解離は同時に起こっていることが示唆された。次に、Halo-Myh3 発現筋管を用いて新規合成ミオシンの蛍光パルスチェイスを行った結果、挿入されたミオシン分子の局在を示す赤蛍光ピークはパルスチェイス 7 分後には太いフィラメントが存在する A 帯端に認められ、30 分後にはそのピーク位置が中央に接近した。また、新規合成ミオシン分子の非標識条件下においても蛍光回復が観察されたことから、太いフィラメントから一度解離したミオシン分子も再度筋原線維に組み込まれることが示された。この際、一度解離したミオシン分子の再組み込みも新規合成ミオシンと同様に A 帯端から起こる傾向が見られた。これらの結果から、筋原線維の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換は A 帯端を起点としていることが示唆された (図 1)。

筋線維型がミオシン分子の置換に及ぼす影響

遅筋型および速筋型筋線維におけるミオシン分子置換様相を比較したところ、遅筋型は速筋型に比べて Mf が有意に大きかった ($p < 0.05$)。遅筋型の方が速筋型に比べて短時間で置換が行われており、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換は筋線維型によって異なることが示唆された。そこで、両筋線維型におけるミオシン分子置換様相が異なる要因を検討するため、タンパク質の合成・分解が筋原線維におけるミオシン分子の置換に及ぼす影響を検討した。タンパク質の翻訳を阻害する Cycloheximide および分子シャペロンである Hsp90 を阻害する Geldanamycin を添加した結果、両筋線維型で Mf が対照区と比較して有意に小さくなった ($p < 0.05$)。また、その抑制割合は遅筋型筋線維の方が大きかった。さらに、骨格筋の主要な分解系であるユビキチン-プロテアソーム系とカルパイン系が太いフィラメントのミオシン分子の置換に及ぼす影響を検討した。プロテアソームを阻害する MG132 を添加し蛍光強度変化を測定した結果、遅筋型筋線維において Mf が対照区と比較して有意に小さかった ($p < 0.05$)。また、カルパインを阻害する Calpeptin を添加した結果、両筋線維型で蛍光強度変化は対照区と同程度であった。さらに、加齢がミオシン分子の置換に及ぼす影響を検討した。1 年齢および 2 年齢のノックインマウスから筋線維を単離し FRAP した結果、遅筋型筋線維では 2-3 か月齢から単離した遅筋型筋線維に比べて Mf が小さい傾向が見られた。一方、速筋型筋線維では 2-3 か月齢と比較して同程度の蛍光回復だった。以上の結果より、筋線維型によるミオシン分子の置換様相の違いは合成および分解能の違いによる可能性が示された (図 2)。

ユビキチンプロテアソーム分解系によるミオシン分子の置換調節機構

上述した で、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換にユビキチン-プロテアソーム系が関与している可能性が示されたので、ミオシン関連ユビキチンリガーゼの 1 つである Ozz に着目し、その過剰発現が太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換様相に及ぼす影響を検討した。速筋型 (GFP-Myh1)、遅筋型 (GFP-Myh7) あるいは胚型 (GFP-Myh3) のミオシン分子と mCherry-Ozz を共発現する筋管を用いて GFP の光退色蛍光回復法で調べた結果、Ozz 過剰発現下における GFP-Myh1 および GFP-Myh7 の蛍光回復は、Ozz を過剰発現していない対照区と同程度で

あった。しかし、GFP-Myh3 の蛍光回復は対照区よりも有意に抑制された。また、mCherry-0zz は細胞質画分には存在せず、筋原線維画分にのみ存在した。0zz の過剰発現が GFP-Myh3 の置換を特異的に抑制したことから、筋原線維における胚型ミオシンの置換にユビキチンリガーゼが関与することが示唆された (図 3)。

翻訳後修飾によるミオシン分子の置換調節機構

速筋/遅筋型アイソフォームによって受ける翻訳後修飾の種類や修飾率が変化するか否かを検討した。速筋として前脛骨筋 (TA)、遅筋としてヒラメ筋 (SOL) をマウスから採取し、筋原線維画分と細胞質画分に分画してサンプルを調製した。各サンプルをイムノプロットに供したところ、TA において 1 ヶ月齢のマウスでメチル化ミオシンの割合が高く、SOL では 1-24 ヶ月齢のマウスでミオシンのメチル化率が高かった。そこで、Myh1 と Myh7 でメチル化修飾を受けるアミノ酸位置の違いを質量分析で調べた。Myh1 と Myh7 の両方で、ミオシンの重合において重要な役割を担う尾部でメチル化修飾が多く検出された。ミオシン分子尾部におけるメチル化修飾位置は、アイソフォーム、筋原線維/細胞質画分、マウスの月齢によって影響を受けることが示され、その要因として、ミオシン分子の翻訳後修飾の一種であるメチル化が関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構は以下のように考察された。太いフィラメントを構成するミオシン分子はフィラメントの両端部でより頻繁に置き換わっており、一度解離したミオシン分子も再び太いフィラメントに組み込まれる。太いフィラメントからの解離と再利用を繰り返すうちに一部のミオシン分子は E3 リガーゼによって選別され分解される。また、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換頻度はミオシンアイソフォームによって異なっており、この要因としてミオシンのメチル化修飾の関与が考えられた。

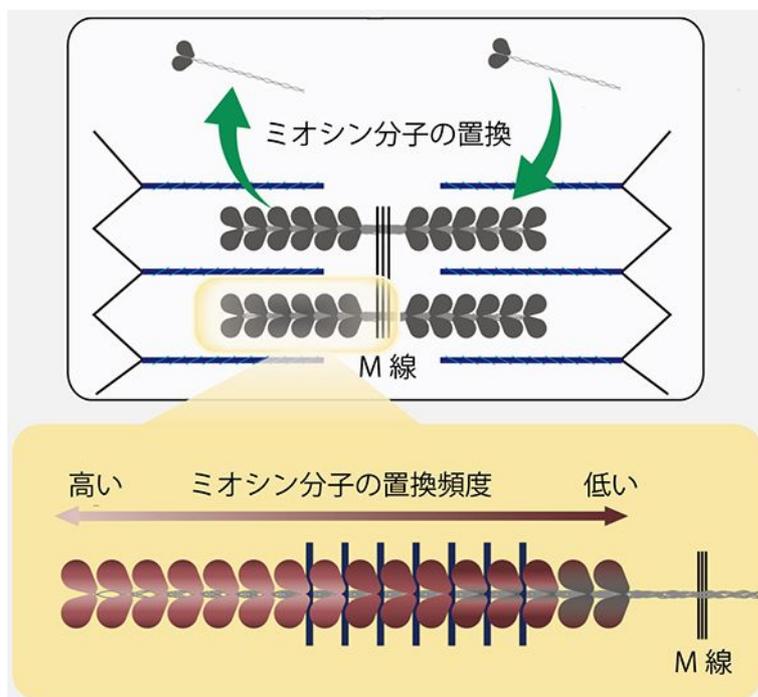


図 1 太いフィラメントにおけるミオシン分子の挿入/解離パターンのモデル図

太いフィラメントの部位によりミオシン分子の置換速度が異なり、太いフィラメントの両端が中央部 (M 線付近) と比較すると速く入れ替わる傾向にある。

(FEBS Open Bio 2020, 12, 852-863 より改変)

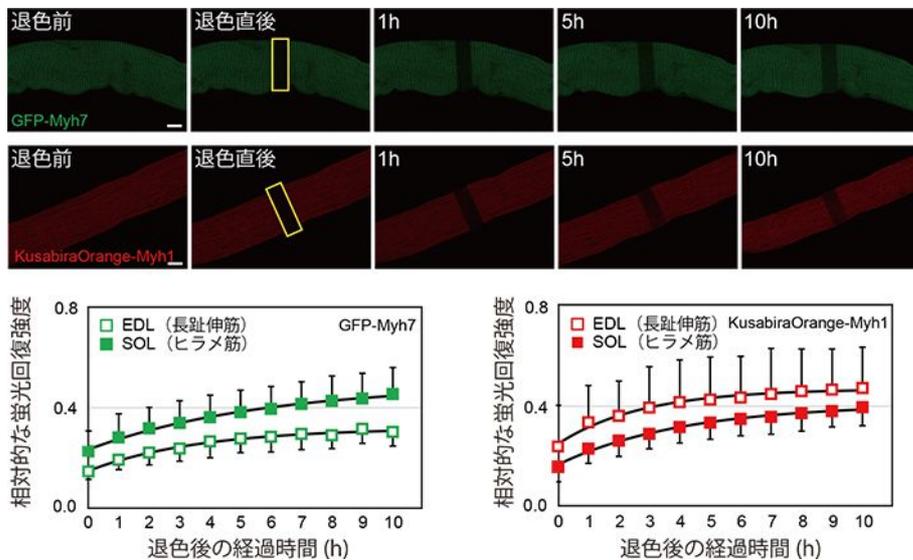


図2 単一筋線維内における GFP-Myh7 および KusabiraOrange-Myh1 の動態
 蛍光退色後回復法による GFP-Myh7 および KusabiraOrange-Myh1 の動態を筋線維レベルで解析した。GFP-Myh7 の Mobile fraction は EDL で $22.7 \pm 6.6\%$ 、SOL で $29.3 \pm 11.7\%$ であり、KuO-Myh1 の Mf は EDL で $23.9 \pm 11.2\%$ 、SOL で $26.0 \pm 6.6\%$ であった。means \pm SD. GFP-Myh7: n=8 (EDL), n=12 (SOL). KuO-Myh1: n=13 (EDL), n=8 (SOL). スケールバーは $10\mu\text{m}$ を示す。
 (*Am J Physiol Cell Physiol* 2022, 323, C520-C535 より改変)

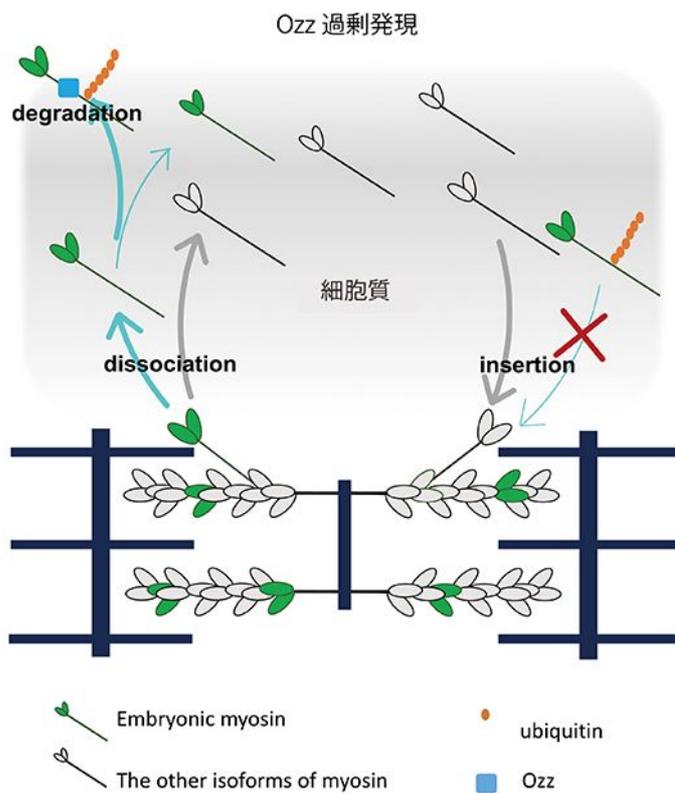


図3 OZZ 過剰発現下におけるミオシン分子の置換モデル
 胚型ミオシン重鎖 (Myh3) 特異的なユビキチンリガーゼである OZZ が細胞質内において Myh3 をユビキチン化し分解する。ユビキチン化された Myh3 は太いフィラメント内のミオシン分子とは置換されない。また、Myh3 以外のミオシン分子は OZZ の影響を受けない。
 (*Physiol Rep* 2021, 9, e15003 より改変)

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 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ojima, K., Kigaki, M., Ichimura, E., Suzuki, T., Kobayashi, K., Muroya, S., and Nishimura, T.	4. 巻 323
2. 論文標題 Endogenous slow and fast myosin dynamics in myofibers isolated from mice expressing GFP-Myh7 and Kusabira Orange-Myh1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C520-C535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00415.2021	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 Ichimura, E., Ojima, K., Muroya, S., Kobayashi, K., and Nishimura, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Thick filament-associated myosin undergoes frequent replacement at the tip of the thick filament.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 852-863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13379	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 Oe, M., Ojima, K., and Muroya, S.	4. 巻 53
2. 論文標題 Difference in potential DNA methylation impact on gene expression between fast- and slow-type myofibers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Genomics	6. 最初と最後の頁 69-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/physiolgenomics.00099.2020	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 Ichimura, E., Ojima, K., Muroya, S., Suzuki, T., Kobayashi, K., and Nishimura, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The ubiquitin ligase Ozz decreases the replacement rate of embryonic myosin in myofibrils.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiol Rep	6. 最初と最後の頁 e15003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15003	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 E. Ichimura, K. Ojima, S. Muroya, T. Suzuki, K. Kobayashi, T. Nishimura
2. 発表標題 Embryonic Myosin replacement in myofibrils is controlled through degradation and ubiquitination by a ubiquitin ligase, Ozz
3. 学会等名 CELL BIO virtual 2020, An Online American Society of Cell Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村恵美、尾嶋孝一、鈴木貴弘、小林謙、西邑隆徳
2. 発表標題 筋原線維内太いフィラメントにおけるミオシン分子置換に及ぼすユビキチンリガーゼの影響
3. 学会等名 127回日本畜産学会
4. 発表年 2020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 American Society for Cell Biology (ASCB) 58th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾嶋孝一、大江美香、室谷進、西邑隆徳
2. 発表標題 骨格筋線維型をタイピングせずに識別できるマウス
3. 学会等名 SATテクノロジーショーケース
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Iseki, S., Ojima, K., Arihara, K., and Komiya, Y.
2. 発表標題 The effects of oleic acid on matured muscle fibers isolated from mice: fiber type-specific analysis.
3. 学会等名 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 有松里央, 尾嶋孝一, 中村真子, 辰巳隆一, 小林謙, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋幹細胞におけるmyogeninの生理機能を骨格筋種で比較する
3. 学会等名 日本畜産学会第128 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 森愛華, 久枝皓雅, 西百合子, 有松里央, 小林謙, 辰巳隆一, 尾嶋孝一, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋幹細胞が合成するNetrin-1は速筋型筋線維の形成誘導に関する
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木貴弘, 森愛華, 久枝皓雅, 西百合子, 有松里央, 小林謙, 辰巳隆一, 尾嶋孝一, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋幹細胞の合成・分泌因子 Netrin-1 による速筋型筋線維の形成誘導
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 大江美香, 尾嶋孝一, 室谷進
2. 発表標題 筋線維型間でDNAメチル化率の異なる遺伝子群の遺伝子オントロジー解析
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城垣誠大, 尾嶋孝一, 鈴木貴弘, 小林謙, 西邑隆徳
2. 発表標題 筋原線維内のミオシン分子置換様相は筋線維型によって異なる
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 Suzuki, T., Mori, A., Ichimura, E., Nishi, Y., Arimatsu, R., Maeno, T., Kobayashi, K., Ojima, K., Tatsumi, R., and Nishimura, T.
2. 発表標題 Netrin-1 synthesized in satellite cells isolated from fast-twitch muscles may promote fast myofiber-type commitment.
3. 学会等名 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
研究 分担者	尾嶋 孝一 (Ojima Koichi) (60415544)	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 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 貴弘 (Suzuki Takahiro) (80750877)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	2020年に九州大学大学院農学研究院・准教授に異動。

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