

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：34315

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2023

課題番号：20KK0358

研究課題名（和文）ミオシン側の新規筋収縮制御機構に着目した、反動動作におけるクロスブリッジ動態解明

研究課題名（英文）Examining the influence of the cross bridge behavior on the stretch-shortening cycle focused on the configuration of myosin heads

研究代表者

福谷 充輝（Fukutani, Atsuki）

立命館大学・スポーツ健康科学部・講師

研究者番号：80722644

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 9ヶ月

研究成果の概要（和文）：近年、ミオシンには、アクチンと相互作用可能なON状態と相互作用できないOFF状態が存在することが提唱された。このON状態とOFF状態の切り替えはミオシンフィラメントへのメカニカルストレスがトリガーとなっていることが示唆されている。そのため、伸張性収縮の後に短縮性収縮を行うと短縮性収縮時の筋力増大が起こるというstretch-shortening cycleは、ミオシンのON状態への移行が関与している可能性がある。そこでミオシン制御軽鎖に方位情報を含む蛍光標識を貼付し伸張性収縮時のミオシンヘッドの角度情報を計測したところ、伸張性収縮によってより多くのミオシンヘッドがON状態になることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、筋収縮はカルシウムイオンによりアクチン側の抑制が解かれることで生じると考えられていたが、近年、ミオシン側にも制御機構があり、物理的にアクチンと結合可能なON状態と結合できないOFF状態が存在することが提唱された。本研究はこの新規の筋収縮制御機構が、反動動作による筋力増強にも関与しているのではないかと考え、筋細胞を対象として反動動作を模した動作を行っている時に、ミオシン制御軽鎖に貼付した蛍光標識からミオシンヘッドの角度を計測した。その結果、反動動作（伸張性収縮）によってより多くのミオシンヘッドがONになるというデータが得られ、この機構も反動動作による筋力増強に貢献していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Recently, it has been suggested that myosin exists in two different forms: one is called the ON state, which can interact with actin filaments, and the other is called the OFF state, which cannot interact with actin filaments. This transition is believed to be induced by mechanical stress applied to the myosin filament. If so, force enhancement by stretch-shortening cycle might be related to this ON-OFF transition. Therefore, we examined this using a specially-designed fluorescent probe that indicates the direction of the probe. We found that when the muscle fiber was stretched, the direction of myosin heads changed. This result suggests that more myosin heads entered the ON state due to the stretch.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：ミオシン アクチン ミオシン制御軽鎖 蛍光標識

1. 研究開始当初の背景

従来、アクチンとミオシンの相互作用で説明される筋収縮は、アクチン側の制御と呼ばれてきた。これは、筋収縮は、筋小胞体から放出されたカルシウムイオンがアクチンフィラメント上に存在するトロポニン C と結合することで、アクチンとミオシンの相互作用を阻害しているトロポミオシンの位置がずれるため、アクチンとミオシンが結合可能となる、すなわち筋収縮が可能となると考えられているためである。しかしながら近年、アクチン側だけではなくミオシン側にも筋収縮制御機構があるという新知見が発表された (Linari et al. 2015)。これは、ミオシンフィラメントにメカニカルストレスが加わると、ミオシンヘッド部分がミオシンフィラメントから立ち上がるような形でアクチンに近づくという構造変化 (アクチンと結合できない OFF 状態から、結合可能な ON 状態への構造変化) が起こり、この構造変化したミオシンヘッドのみがアクチンと結合できるというものである。これまでは、筋収縮はアクチン側のみにその制御機構が存在すると考えられていたため、この新知見は非常に大きな注目を集めている、

この新知見は、反動動作による筋力増強 (stretch-shortening cycle) という現象にも関わっている可能性がある (Fukutani et al. 2021)。なぜならば、反動動作 (伸張性収縮) を行うと大きな筋力発揮、すなわち大きなメカニカルストレスが発生し、このメカニカルストレスによって多くのミオシンヘッドがアクチンと結合できる ON 状態になり、伸張性収縮後の短縮性収縮時の筋力増強に繋がっているという仮説が成り立つからである。しかしながら、この仮説を実験的に検証するためには、nm スケールの変化を ms オーダーで記録しなければならないという時空間的な制限を克服する必要がある。そのような状況の中、上記の新規メカニズムを発見した Irving 研究室が、蛍光偏光を活用した、筋細胞の 3 次元構造が維持された生理的環境下における、ミオシンヘッドの方位を測定する手法に着目した。この手法は、ミオシンヘッド (ミオシン制御軽鎖) に方位情報 (電気ベクトル) を有した蛍光マーカーを貼付し (図 1 の黒、緑、赤、青の四つ)、その蛍光マーカーに偏光したレーザーを照射し、得られた励起強度から蛍光マーカー、すなわちミオシンヘッドの方位を計測するというものである。

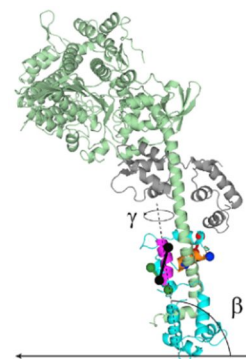


図 1. ミオシンに蛍光標識 (黒、緑、赤、青の四つ) を貼付したモデル (Fusi et al. 2015)

2. 研究の目的

そこで本研究では、ウサギの大腰筋から抽出した筋細胞を対象に、伸張性収縮を行ったときのミオシンヘッドの角度を計測することを目的とした。仮説として、伸張性収縮時の大きな筋力発揮が、より多くのミオシンヘッドを ON 状態にすると推察した。

3. 研究の方法

本研究では、ウサギの大腰筋から単一の筋細胞を対象とした。ウサギを安楽死させた後、大腰筋の一部を抽出し、グリセロールを 50% 含んだ水溶液に浸し、-20 度で 2 週間以上保存し、浸透圧により筋細胞膜に穴を開け、筋細胞内に水溶液を送り込める状態にした。この状態において、実験当日に実体顕微鏡下で単一の筋細胞を単離し、力学計測装置に固定した。この状態で、あらかじめ蛍光標識したミオシン制御軽鎖 (ミオシンヘッドの根本部分にあたる部分) と、本来のミオシン制御軽鎖と入れ替えるため、まずは筋細胞を、EDTA を含む水溶液内に浸すことでミオシン制御軽鎖を取り除き、次に、蛍光標識したミオシン制御軽鎖を含む水溶液内に浸すことで、蛍光標識されたミオシン制御軽鎖に交換した。この蛍光標識は、プラスとマイナスの電荷 (電気ベクトル) を有しており、プラスとマイナスの電荷によって生じる遷移モーメントが、偏光した励起光と平行であれば最大の励起が得られ、垂直であれば励起は得られない。この特徴を利用すると、蛍光標識の位置 (座標) は計測できないが、得られた励起強度から蛍光標識の方位 (角度) を計測することが可能である (図 2)。

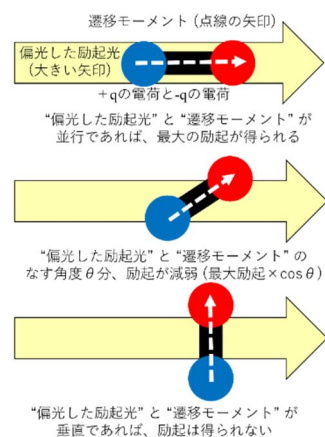


図 2. 励起強度から蛍光標識の角度を捉える原理

この状態において、等尺性収縮、および、伸張性収縮を行なわせた。筋収縮は、筋細胞内にカルシウムイオンを送り込むことで誘発した。このカルシウムイオンの拡散には数百ミリ秒程度の時間がかかり、この時間が長くなると筋細胞の表層部が収縮を始める一方で、筋細胞の深部は収縮が遅れるといった可能性がある。そこで本研究では、まずはカルシウムイオンを含んだ水溶液に浸すことでカルシウムイオンを筋細胞深部まで拡散させつつ、その時の水溶液の温度を 4 度と低温にすることで筋収縮による張力発生を抑制し、カルシウムイオンの拡散が担保される数

秒後に、水溶液の温度が 27 度のチャンバーに筋細胞を移動させることで張力の抑制を解除し、通常の筋収縮に移行した。本研究における筋収縮は全てのこの方法で誘発し、純粋な等尺性収縮のみを行う試行と、等尺性収縮中に筋細胞を引き伸ばし伸張性収縮に移行した試行の 2 つを行った。

4. 研究成果

まず、本研究手法によってミオシンヘッドの角度が計測できているかどうかを確認するため、安静状態において、水溶液の温度を 5 度から 35 度の範囲で変化させ、その時のミオシンヘッドの角度を計測した。先行研究において、低温ではミオシンヘッドが ON 状態となり、高温になるほどミオシンヘッドが OFF 状態になることが報告されている (Fusi et al. 2015)。この結果と本研究結果を照らし合わせた所、先行研究と同様に温度増大に伴いミオシンヘッドの角度が小さくなる (OFF 状態に近づく) 傾向がみられたため (図 3)、本測定の妥当性を確認することが出来た。

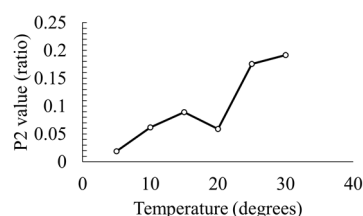


図 3. 温度と P2 強度の関係 (P2 強度が高いほどミオシンヘッドは OFF 状態となる)

次に、純粋な等尺性収縮のみを行う試行と、等尺性収縮中に筋細胞を引き伸ばし伸張性収縮に移行した試行の結果を紹介する。先行研究において、ミオシンヘッドの角度は、最大収縮強度の 50% 程度で上限に達する (全てのミオシンヘッドが ON 状態となる) と考えられているため (Fusi et al. 2016)、最大強度の等尺性収縮から、それ以上のメカニカルストレスが生じる伸張性収縮を加えても変化はないと考えられる。そこで本研究では、カルシウムイオン濃度を下げることで低強度の収縮を対象とした。本研究では、pCa6.07 と pCa6.60 の 2 強度を実施した。本研究試行の波形を図 4 に示す。まず、等尺性収縮中に筋細胞をストレッチして伸張性収縮を行うことで、伸張性収縮後の等尺性収縮と純粋な等尺性収縮間で筋の長さは同一 (力-長さ関係は同一) にも関わらず、発揮筋力が大きくなるという現象 (residual force enhancement) がみられ (Fukutani and Herzog 2019)、伸張性収縮による筋力増強効果が確認された。また、この伸張性収縮による筋力増大に伴い、P2 値が低下、すなわち、ミオシンヘッドの角度が大きくなった (ON 状態に近づいた)。

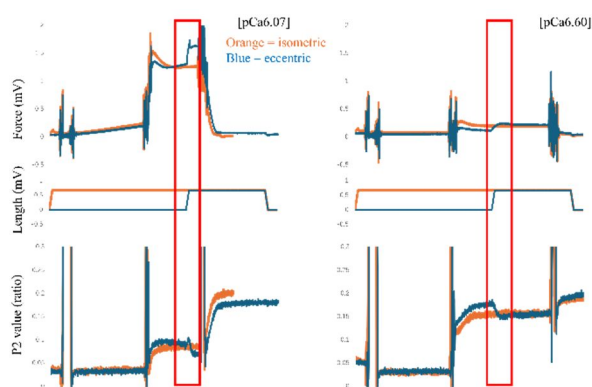


図 4. 筋力、筋の長さ変化、P2 (ミオシンヘッドの角度を反映) の値

現在、伸張性収縮による筋力増大はタイチンの弾性力の増大によって説明されていることが多い (Herzog 2018)。加えて、この伸張性収縮による筋力増大は、低強度の収縮において顕著になることが報告されている (Fukutani and Herzog 2018)。これは、高強度での収縮時には、既に全てのミオシンヘッドが ON 状態のため、伸張性収縮によってメカニカルストレスを増大させてもこれ以上 ON 状態にミオシンヘッドが増えることはないが、低強度であれば、伸張性収縮によってより多くのミオシンヘッドが ON 状態になる可能性が残っており、タイチンの弾性力に加えて、ミオシンヘッドの ON・OFF 状態の切り替えも伸張性収縮による筋力増強効果に貢献しうる可能性があり、Fukutani and Herzog (2018) でみられたような、低強度収縮においてより顕著な伸張性収縮による筋力増大に繋がった可能性がある。

< 引用文献 >

- Linari M, Brunello E, Reconditi M, Fusi L, Caremani M, Narayanan T, Piazzesi G, Lombardi V, Irving M. Force generation by skeletal muscle is controlled by mechanosensing in myosin filaments. *Nature*. 528(7581):276-9. 2015.
- Fukutani A, Isaka T, Herzog W. Evidence for Muscle Cell-Based Mechanisms of Enhanced Performance in Stretch-Shortening Cycle in Skeletal Muscle. *Front Physiol*. 11:609553. 2021.
- Fusi L, Huang Z, Irving M. The Conformation of Myosin Heads in Relaxed Skeletal Muscle: Implications for Myosin-Based Regulation. *Biophys J*. 109(4):783-92. 2015.
- Fusi L, Brunello E, Yan Z, Irving M. Thick filament mechano-sensing is a calcium-independent regulatory mechanism in skeletal muscle. *Nat Commun*. 7:13281. 2016.
- Fukutani A, Herzog W. Current Understanding of Residual Force Enhancement: Cross-

Bridge Component and Non-Cross-Bridge Component. *Int J Mol Sci.* 20(21):5479. 2019.

Herzog W. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production. *Biophys Rev.* 10(4):1187-1199. 2018.

Fukutani A, Herzog W. Residual Force Enhancement Is Preserved for Conditions of Reduced Contractile Force. *Med Sci Sports Exerc.* 50(6):1186-1191. 2018.

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukutani Atsuki, Hashizume Satoru, Isaka Tadao	4. 巻 13
2. 論文標題 Measurements of tendon length changes during stretch-shortening cycles in rat soleus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-32370-5	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 Fukutani Atsuki, Kunimatsu Shiho, Isaka Tadao	4. 巻 225
2. 論文標題 Force loss induced by inhibiting cross-bridge cycling is mitigated in eccentric contraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.244962	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 Fukutani Atsuki, Kunimatsu Shiho, Isaka Tadao	4. 巻 12
2. 論文標題 Influence of caffeine on the maximal isometric and concentric force produced by skinned fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12222-4	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 Atsuki Fukutani, Walter Herzog	4. 巻 136
2. 論文標題 Residual force enhancement is attenuated for quick stretch conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanics	6. 最初と最後の頁 111076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiomech.2022.111076	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kalakoutis M, Wang Y, Smith E, Arcidiacono A, Fukutani A, Hill C, Brunello E, Fusi L, Irving M.
2. 発表標題 Calcium binding to troponin-C is required for the orientation change in cardiac myosin RLC associated with contraction
3. 学会等名 50th European Muscle Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukutani A, Hashizume S, Isaka T
2. 発表標題 Direct measurements of tendon length changes during stretch-shortening cycles in rat
3. 学会等名 29th Congress of the International Society of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hashizume S, Fukutani A, Isaka T, Mochimaru M
2. 発表標題 Extreme elongation of triceps surae muscle-tendon unit was attributable to the elongation of the muscle rather than that of the tendon in rat
3. 学会等名 29th Congress of the International Society of Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福谷充輝, 國松汐帆, 伊坂忠夫
2. 発表標題 筋力低下の影響は等尺性収縮と伸張性収縮で異なる
3. 学会等名 第36回日本トレーニング科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國松汐帆, 福谷充輝, 伊坂忠夫
2. 発表標題 乳酸は筋力低下筋疲労を引き起こすか? -pHをコントロールすることによる、乳酸イオンが筋力に与える影響の検証-
3. 学会等名 第36回日本トレーニング科学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fukutani Atsuki, Kunimatsu Shiho, Isaka Tadao
2. 発表標題 Sarcomere length variations in the pure isometric and the enhanced isometric conditions in the skinned single fiber preparations
3. 学会等名 9th World Congress on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2022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		
英国	King's College London		