

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580301

研究課題名（和文）骨格筋筋原線維形成過程における太いフィラメントの形成・制御機構に関する研究

研究課題名（英文）Studies on thick filament formation during myofibrillogenesis

研究代表者

服部 昭仁（HATTORI AKIHITO）

北海道大学・名誉教授

研究者番号：50125027

研究成果の概要（和文）：骨格筋筋原線維に存在する太いフィラメントは 300 以上のミオシン分子により形成されている。骨格筋細胞内部でミオシン分子が太いフィラメントを形成するためにはミオシン分子の Light Meromyosin ドメインが必須であること、さらに Subfragment2 と Light Meromyosin の両ドメインが存在すると効率よく太いフィラメントを形成することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Thick filaments are composed of more than 300 myosin molecules in myofibrils. In this study, we found that the light meromyosin (LMM), which is one of myosin heavy chain (Myh) domains, was essential to form thick filaments in cultured skeletal muscle cells. Furthermore, to form thick filaments of LMM was facilitated by the presence of the subfragment-2 (S2), although solely expressed S2 did not form thick filaments, suggesting that the S2 may regulate thick filament formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：骨格筋・ミオシン・太いフィラメント

1. 研究開始当初の背景

効率的な食肉の生産技術を確立するために、食肉の主体となる骨格筋の成長および肥大のメカニズムを解明することは極めて重要である。骨格筋肥大すなわち骨格筋量を増加させるには、骨格筋を構成する個々の筋線維のサイズを大きくする必要がある。筋線維

内に存在する筋原線維の数を増やすことができれば筋線維のサイズは大きくなり骨格筋量も増加する。筋原線維は筋収縮の最小単位であるサルコメアが規則正しく高度に配向したものである。筋原線維の数を増加するためには、新たに形成されたサルコメアが筋原線維を新たに構築、もしくは新たなサルコ

メアの既存筋原線維への付加が必要である。*in vivo* 骨格筋のサルコメアには双極性で直径 15nm、長さ 1.6 μ m の太いフィラメントが存在することは 1960 年代に明らかにされた。一方、*in vitro* でのサルコメア形成機構に関しても広く研究され、現在まで多くのデータが蓄積している。しかし精製したミオシンのみを用いた *in vitro* 実験から得られたフィラメント形成モデルを、ミオシン以外の筋原線維タンパク質が存在する *in vivo* 骨格筋細胞での太いフィラメントの形成モデルに適用することには無理があるため、*in vivo* 骨格筋細胞での太いフィラメント形成メカニズムについてはほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では骨格筋細胞における太いフィラメントの形成機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ミオシン分子に結合する分子の探索：ミオシンの各ドメインを GST 融合タンパク質として発現させ、培養骨格筋細胞を試料として GST-pull down assay を行った。その後、GST 融合タンパク質に結合してきた分子を質量分析計にて同定した。

培養骨格筋細胞への遺伝子導入：ミオシンの各ドメインを発現するコンストラクトを作成し、培養骨格筋細胞にトランスフェクションし遺伝子導入を行った。遺伝子導入 5 日目に細胞を固定し、免疫蛍光法により、発現させたミオシン変異体の局在を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

蛍光退色後回復測定：太いフィラメント内に存在するミオシン分子の置換効率を検討するために、Fluorescence Recovery After

Photobleaching (FRAP)を行った。具体的には GFP で標識したミオシン分子の発現コンストラクトを培養骨格筋細胞に発現させ共焦点レーザー顕微鏡にて測定した。

4. 研究成果

ミオシンの太いフィラメント形成機構を明らかにするために、①ミオシン分子に結合する分子による太いフィラメント形成制御、および②ミオシン分子自体の太いフィラメント形成制御の二つの観点からアプローチを行った。さらに、③太いフィラメントを形成するミオシン分子の置換様相も検討した。

①骨格筋細胞の筋原線維形成過程で太いフィラメントを構成するミオシン分子に結合する分子を探索した。ミオシン分子を各ドメイン Subfragment-1 (S1), Subfragment-2 (S2), および Light meromyosin (LMM)に分け、GST 融合タンパク質を精製した。各 GST-融合タンパク質に結合する分子の探索を Pull down assay にて行った。試料としてサルコメア形成過程の培養骨格筋細胞を試料として用いた。各ドメインに結合する分子を質量分析計にて同定した。その中の 1 つに eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (Eef1g)を見出した。しかし、他の生化学的な方法で Eef1g とミオシンの結合を解析した結果、Eef1g とミオシンの結合を積極的に支持する結果を得ることはできなかった。

②骨格筋細胞内部ではミオシン分子は太いフィラメントを形成する。ミオシン分子の各ドメインを培養骨格筋細胞に発現させ、どのドメインが太いフィラメント形成に必要であるのかを検討した。その結果、S2+LMM および LMM は太いフィラメントを形成できるが、太いフィラメント形成効率は S2+LMM

の方が高かった。しかし、S2のみでは太いフィラメントを形成できなかった。以上のことから、ミオシン分子が太いフィラメントを形成するには、少なくともLMMが必要であることが判明した。しかし、効率的に太いフィラメント形成にはS2も必要であることから、S2自体ではフィラメント形成できないものの、LMMとともに存在することで太いフィラメントの形成調節をしていることが示唆された。

③太いフィラメントはミオシン分子が300以上集合して形成されるタンパク質複合体である。一方、細胞内に存在するタンパク質は常に合成と分解を繰り返している。太いフィラメントを構成する個々のミオシン分子は新たに合成されたミオシン分子と入れ替わっていると考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、太いフィラメントを形成するミオシン分子がどのようにして置換しているのかを検討した。GFP標識したミオシン分子を培養骨格筋細胞に発現させFRAPを測定した。その結果、蛍光退色10時間後に、太いフィラメントの蛍光強度は元の強度の50-60%まで回復することを見出した。このことは放射性同位元素を用いてミオシン分子の半減期を測定した古典的な実験の報告でミオシン分子の半減期が2-3日であることを考慮すると、ミオシン分子は極めてダイナミックに置換していることを示している。

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0件)

[学会発表] (計4件)

①安川裕也, 尾嶋孝一, 若松純一, 服部昭仁, 西邑隆徳『筋原線維の太いフィラメント内でミオシン分子はダイナミックに置き換わっている』日本畜産学会第116回大会, 2013. 3/28 広島市安田女子大学

②尾嶋孝一, 中島郁世, 大江美香, 室谷進, 服部昭仁, 西邑隆徳『骨格筋細胞におけるミオシン分子の太いフィラメント形成能』日本畜産学会第116回大会, 2013. 3/30, 広島市安田女子大学

③Yasukawa, Y., Ojima, K., Wakamatsu, J.-i., Hattori, A., and Nishimura, T.『Myosin dynamics in cultured skeletal muscle cells.』2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012.12/17. The Moscone Center, San Francisco, USA.

④Ojima, K., Nakajima, I., Oe, M., Muroya, S., Nishimura, T., and Hattori, A.『The impact of each domain of myosin heavy chain molecule on forming thick filaments in muscle and non-muscle cells.』2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2012.12/17. The Moscone Center, San Francisco, USA.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

服部 昭仁 (HATTORI AKIHITO)

北海道大学・名誉教授

研究者番号: 50125027

(2)研究分担者

尾嶋 孝一 (OJIMA KOICHI)

独) 農研機構 ・ 畜産草地研究所 ・ 畜産物

研究領域 ・ 主任研究員

研究者番号 : 6 0 4 1 5 5 4 4

(3)連携研究者

なし