

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 6月12日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22616008

 研究課題名(和文) 筋伸展はミオシン頭部をアクチンに向けて突出させ、
収縮性クロスブリッジ形成を促す

 研究課題名(英文) Stretch of muscle sarcomere induces protrusion of myosin
heads toward actin so as to facilitate formation of contractile cross-bridges.

研究代表者

竹森 重 (SHIGERU TAKEMORI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20179675

研究成果の概要(和文)：

筋が引き伸ばされるとより強く収縮するという性質が、横紋筋の規則構造のどこに組み込まれた性質かは未解明だった。本研究では心筋の二次元X線回折技術を開発しながら、筋伸展が、ミオシン分子の尾部を束ねた太いフィラメントからミオシンの頭部を、アクチン分子が作る細いフィラメントに向けて突出させ、ミオシン頭部とアクチン分子との収縮性相互作用を起こしやすくすることでより強い収縮を実現するものであることを示した。

研究成果の概要(英文)：

Stretch of sarcomeres of striated muscle induces higher contractile activity in striated muscle. Well organized fine structure of sarcomere is responsible to this stretch activation phenomenon, but its detailed mechanism has not been elucidated. Developing two-dimensional x-ray diffraction techniques, we found that stretch induces protrusion of myosin heads out of the thick filament backbone toward the neighboring actin molecules on thin filament so as to facilitate formation of contractile cross-bridges between myosin heads and actin molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：筋肉生理学

科研費の分科・細目：メカノバイオロジー

キーワード：横紋筋、エックス線回折、収縮

1. 研究開始当初の背景

力発生と短縮に特化した生体組織である骨格筋と心筋は、機能要素である収縮タンパク質のミオシンとアクチンがフィラメント状に高密度で規則配列された筋節の繰り返しからなる横紋構造を特徴とする。この構造構築は要素に還元し得ない多くの新たな特性を生み出す。その一つが筋節伸展による収縮の活性化（自原性収縮活性化機構・ストレッチアクティベーション）である。心筋においてはこの特性は心臓に還る血液量が多くなればなるほどに心臓が強く収縮して多くの血液を動脈に送り出し、心臓に血液が溜まることを防ぐ仕組みとして重要である。

この自原性活性化が構造構築の中にどのようにして組み込まれているのかについては、筋節伸展がミオシンが集積して形成する太いフィラメントと、アクチンが螺旋配列した細いフィラメントとの間隔を狭めることによるとする説が古くから根強く唱えられてきた。しかしこの説を支持する結果と否定的な結果が繰り返し提出され、未だ解明に至っていない。

2. 研究の目的

我々はこの見解の不一致を解消するものとして仮説「筋節伸展はミオシン頭部の突出状態を変えることで、ミオシン頭部とアクチンとが収縮性相互作用に入る確率を高める」を提唱し、これを検証するために、ミオシン頭部が筋節伸展で突出することを直接X線回折実験で調べることを本研究の目的とした。ここで、ミオシン頭部がアクチンからの影響を受けずに示す固有の突出状態を知るために、アクチンを除去した筋標本を用いるところに本研究の大きな特色がある。

3. 研究の方法

(1) X線回折実験

つくばの高エネルギー加速器研究機構の放射光施設にて共同利用研究課題としてX線回折実験を行った（課題番号 2011G602）。BL-6Aの小角散乱ステーションを利用し、イメージングプレートシステムを用いて二次元のX線回折像を筋標本から記録した。

(2) 標本調製

①ウサギ腸腰筋、ラット心室筋標本を、0.5%トリトン処理にて細胞膜除去し、細胞内液環境を細胞膜障壁なしに人工制御できるスキンド筋標本とした。溶液の拡散を早く確実にするために、直径250ミクロン以下の筋条片を用いた。標本は大学の研究室で調整し、保冷して放射光施設に移送し、細胞内液組成に似せた塩類溶液で標本を還流しながら回折像を取得した。

②アクチンフィラメントを除去するために

はゲルゾリン処理を行った。ゲルゾリンはウシ血清から精製した。アクチンを除去した筋標本はX線回折実験の後に大学の研究室に持ち帰り、電気泳動によってアクチンの除去率を確認した。

③標本は筋節の周期が作る横紋の間隔をレーザー光回折を参照して様々な長さに調整し、筋伸展の効果を評価した。

④取得した二次元X線回折像は、竹森が作成したパソコンプログラムで4象限を加算平均したのち、Matlabを用いて散乱ノイズをフィッティング除去し、ミオシン層線強度分布を抽出して解析した。

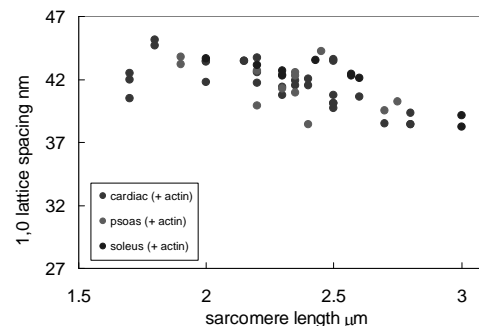
④筋活性化を変調する因子として知られる、2, 3-ブタンジオンモノオキシム (BDM)、硬直条件 (MgATP 非存在条件) についても標準的な弛緩状態と同様に実験を行った。

(3) 張力発生

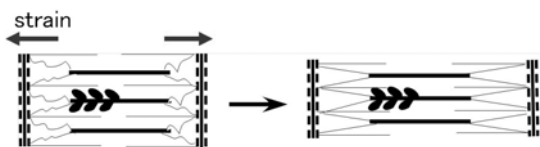
ミオシン頭部がアクチンに近づくことによって、確かにミオシンとアクチンとの間の相互作用がおこりやすくなるかどうかを、低いカルシウムイオン濃度のもとで、弱く活性化されたスキンドファイバーを、高分子量デキストランのT-500で浸透圧的に圧迫することによってより大きな活性化を張力レベルになるかどうかで確かめた。

4. 研究成果

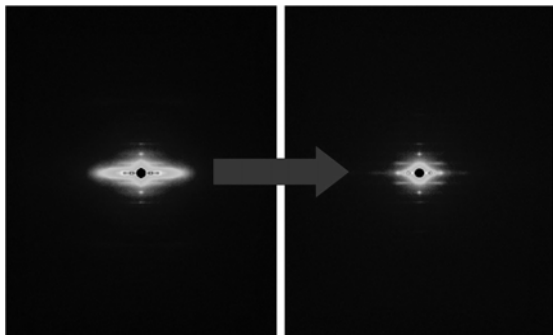
(1) 標準的な弛緩状態



筋節の伸展に従って、筋節を構成する太いフィラメント間隔は減少した。上の図で横軸は単位筋節の長さを表しており、縦軸は太いフィラメントの六方格子構造における1,0格子間隔である。この減少の仕方は骨格筋と心筋の区別なく筋標本の体積をほぼ一定に保つ減少の仕方であり、先行研究の結果と一致していた。この結果には、心筋の筋節において筋節を長さ方向につなぐ弾性フィラメントコネクチンが、骨格筋のものよりもコンプライアンスが低いことが反映されており、筋節伸展に伴う筋フィラメント間隔の減少が力学的な力バランスによって決まっているという通説（次頁図）強く否定するものである。



(2) ゲルゾリン処理筋

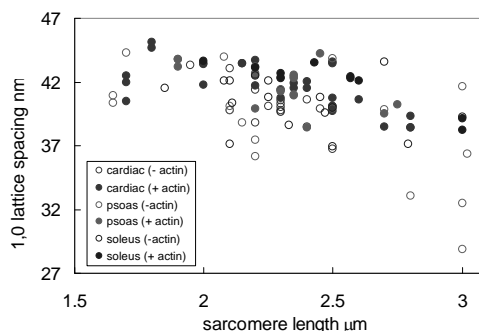


ゲルゾリン処理によってアクチンを主体とする細いフィラメント由来の層線が消えた。太いフィラメントが作る太さ方向の周期性を表す赤道反射においても、細いフィラメントの位置にある電子密度の寄与が大きい 1, 1 反射はアクチン除去によりほとんど観測されなくなり、筋節から実質的に細いフィラメントが除去されたことが示された。電気泳動でも少なくとも 4 割から 7 割以上のアクチンが除去されていることが確認された。

これまでアクチンとの相互作用を受けないミオシン頭部の状態を調べるには、アクチンを主体とする細いフィラメントと、ミオシンを主体とする太いフィラメントとの重なり合い（オーバーラップ）がなくなるほどに過伸展した筋標本が使われてきた。しかし前項に示すように、過伸展した筋標本では太い筋フィラメントの間隔が強く狭められており、コネクチンフィラメントを介した歪も太いフィラメントにかかっていることから、太いフィラメント上のミオシン頭部の状態の評価には多くの制限があった。今回作成に成功したゲルゾリン処理筋では、筋節の微細構造を十分に保ちながら細いフィラメントだけが選択的に除去されているから、太いフィラメント上でのミオシン頭部の固有状態をより自然な状態で示すものと考えられる。今後幅広い応用研究の可能性が拓かれた。

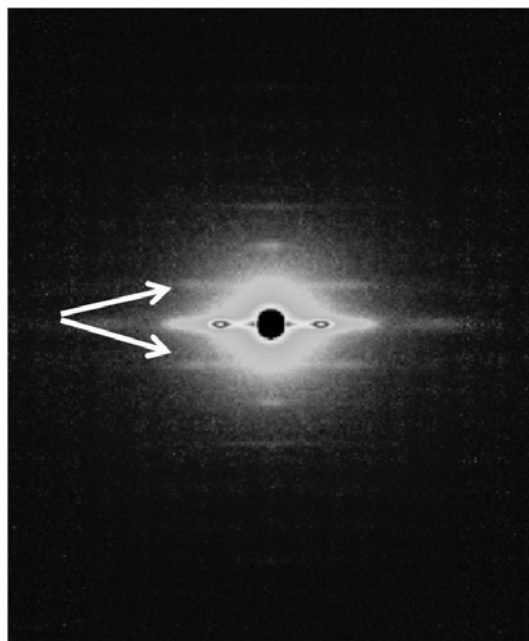
(3) ゲルゾリン処理筋の筋フィラメント間隔

ゲルゾリン処理によってアクチンフィラメントを除去したスキンド筋標本において、筋伸展が太いフィラメントの間隔に与える効果を検討した。短い筋節長においては太いフィラメントの筋フィラメント間隔は細いフィラメントの有無にほとんど影響されないことがわかった。



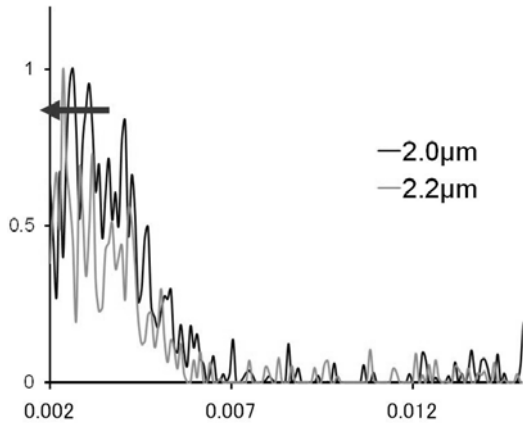
しかし、筋節を伸展していくと、細いフィラメントの有無による太いフィラメントの間隔の違いが明らかになった。このことは、短い筋節長においては太いフィラメントの間隔が機械的な上現値に頭打ち制約されていることを示唆した。このことは筋節伸展による自原性活性化効果は骨格筋においても心筋においても短い筋節長で強く表れる事がわかっているから、それを筋伸展によるフィラメント間隔の減少で解釈しようとして生じた見解の不一致を説明するものと考えられる。

(4) ミオシン頭部の突出状態

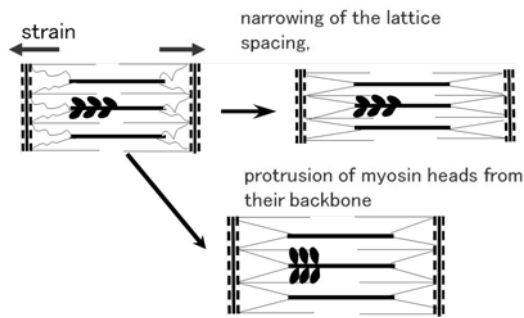


ミオシン頭部の突出状態は上図の矢印が示す層線の強度分布から見積もった。アクチンを除去した筋標本ではこの層線に対するアクチン第一層線の寄与はほとんどなく、ミオシン頭部が太いフィラメントの周りに作るらせん配置を表すミオシン第一層線と考えられた。この層線の赤道方向に沿った強度分布は筋節を引き伸ばすと、子午線寄りに近づいた（次頁図）。逆格子の関係にある回折像と現実のミオシン頭部の分布の関係から、

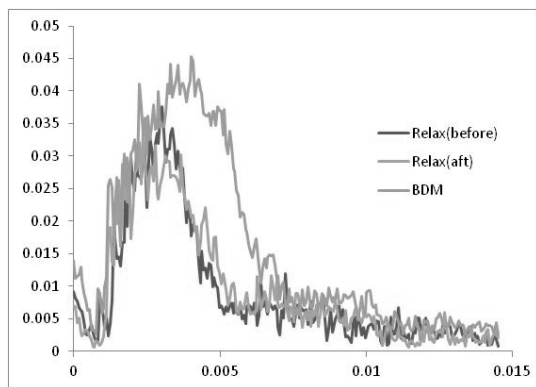
このことはわずか数ミクロンの筋節伸展がミオシン頭部を大きく突出させる効果があることを示唆した。グラフの縦軸は層線の強度、横軸が子午線からの距離である。



このことは我々の当初の作業仮説を支持する（下図）。



(5) 他の活性化修飾因子

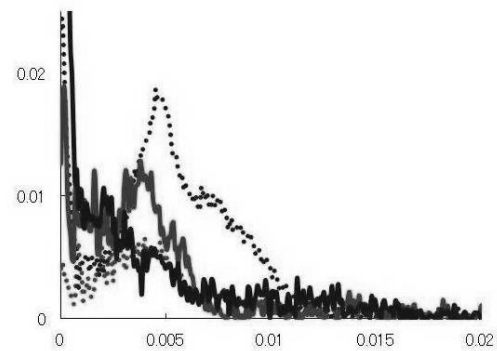


筋伸展による収縮活性修飾との比較として BDM の効果を検討した。BDM は筋収縮の可逆的抑制剤であり、高イオン強度、低温でより強い収縮抑制効果を示す。その抑制効果は、筋伸展の効果とは逆に、弱い収縮性相互作用状態 (weakly binding cross-bridges) が強い収縮性相互作用状態 (strong binding cross-bridges) に遷移することを抑制することにあるとされている。このことは、筋伸展効果を打ち消す作用を BDM が発揮すること

を期待させる。そこで伸展した筋標本において BDM を作用させたときの効果を骨格筋スキンド標本を用いて調べてみた。BDM は第一層線の強度分布を子午線から遠ざける方向に強く作用した。このことは、逆格子関係にある現実のミオシン頭部の分布についていえば、BDM がミオシン頭部を太いフィラメントのバックボーンに近づけたことを意味する。

BDM についてのこの結果は筋節伸展の効果と合わせて、ミオシン頭部の突出状態がミオシンとアクチンとが収縮性相互作用に入る過程に大きく影響するとおいて我々の仮説を強く支持する。

(6) MgATP が与える効果

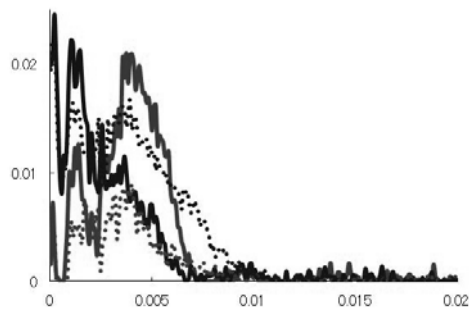


アクチンフィラメントの存在下で MgATP の除去は、ミオシンとアクチンとの強い結合を形成させる。上に示すのは骨格筋における MgATP 除去が第一層線に与える効果である。MgATP 存在下では、ミオシンがアクチンから解離してミオシン頭部固有のらせん配置をとることから、第一層線にはミオシン第一層線の寄与が大きい。MgATP を除去するとミオシン頭部がアクチン分子のらせんに沿った配置をとることから、アクチン第一層線の寄与がほとんどになることが示されている。このようなデータはこれまで骨格筋については得られてきたが、心筋については得られていなかった。これは、心筋では代謝を支えるミトコンドリア等の構造が筋節間に多く、これらの非規則構造物が与える X 線の散乱が、微細な筋節の周期構造に由来する X 線の反射や層線をマスクしてしまうことによる。

今回の研究で我々は、第一層線の解析を心筋の標本でも行うために標本調製法に改良を重ねた。その結果、心筋から得た標本においても骨格筋並みに詳細な微細規則構造を評価することができるようになった。次頁に示すのは MgATP 除去前後の第一層線強度分布を心室筋から得た筋標本で記録した結果である。

今回の研究でこのように良好な二次元 X 線回折像を心筋標本からも得られるようになったことは、心筋標本における X 線回折実験

の可能性を大きく広げるものである。今後この標本の利点を生かした研究を展開していきたい。



(7) 収縮張力

今回検証した仮説の前提には、ミオシン頭部がアクチン分子に近づきやすいことが、ミオシン分子とアクチン分子とが収縮性相互作用に入ることを促進するという期待がある。この期待を確認するために、ミオシンとアクチン分子を接近させた時の活性化張力を調べた。Dextran T-500 を添加した溶液中では、スキンド筋標本は特に低いカルシウム濃度において顕著に増大した収縮張力を発生した。Dextran T-500 分子はその分子量の大きさから筋節内の空間から排除され、浸透圧的に筋フィラメント間隔を圧縮する作用を持っており、3%濃度におけるスキンド筋標本の太いフィラメントの間隔はちょうどインタクトな筋肉のフィラメント間隔に相当した（1, 0格子間隔にして36.5nm）。

筋伸展により筋節がその体積を一定に保つように筋フィラメント間隔が変化したこと（研究成果の1参照）と合わせると、筋フィラメント間隔はインタクトな筋線維で至適に保たれていることが想像される。ただし、今回の実験から示されたように、このフィラメント間隔が至適であるのは生理的なミオシン頭部の突出状態においてであり、BDM作用下のようにミオシン頭部の突出状態に変調が加えられれば、筋の収縮活性は大きく損なわれることになる。

(8) 今後の展望

今回用いたBDMはミオシン頭部の（軽鎖の）リン酸化状態を修飾することによってミオシン頭部の突出状態に影響する可能性が示されている。事実、インタクトな筋肉においては細胞内のリン酸化、脱リン酸化システムがミオシン頭部（軽鎖）をリン酸化することによって収縮活性を変調している可能性が提唱されている。ミオシン軽鎖を人為的にリン酸化、脱リン酸化することによってスキンド筋標本の収縮活性を制御できることが示されれば、平滑筋における収縮調節機構であ

るリン酸化につながる収縮制御機構を骨格筋・心筋も持っていることになるわけで、力発生と短縮に特化した組織として横紋筋を生み出した生命の進化のプロセスを明らかにする上で重要な知見がえられるものと期待される。

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1件）

1. Takemori S, Kimura M. Structure and function of skeletal muscle and locomotive systems: Involvement of water-state transitions. *J. Physical Fitness Sport Med.* 1:95-101(2012) 査読有。

〔学会発表〕（計3件）

1. Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T, Nakahara N, Yokomizo S. 日本生物物理学会, 2012年9月23日, 名古屋

2. Takemori S. Multidimensional approaches to the secrets of life. 日本生物物理学会, 2012年9月22日, 名古屋

3. 山口真紀, 竹森重, 木村雅子, 大野哲生, 中原直哉, 八木直人. 細いフィラメント除去筋線維内でのミオシン頭部の振る舞い, 日本生理学会大会・日本解剖学会総会合同大会 2011年3月紙上開催

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹森 重 (TAKEMORI SHIGERU)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：20179675

(2) 研究分担者

山口 真紀 (YAMAGUCHI MAKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30271315

木村 雅子 (KIMURA MASAKO)

女子栄養大学・栄養学部・准教授

研究者番号：0328314

(3) 連携研究者

大野 哲生 (OHNO TETSUO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30233224

(4) 研究協力者

中原 直哉 (NAKAHARA NAOYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10632193