

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24540430

研究課題名(和文) マウス骨格筋内分子ナノイメージングによる生命機能と階層性の関わりの解明

研究課題名(英文) Nano scale in vivo imaging of contractile proteins in mouse skeletal muscle

研究代表者

茅 元司 (Kaya, Motoshi)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00422098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉は、ミオシンがアクチンに相互作用し、アクチンを筋肉の中心方向に引っ張ることで収縮している。近年のタンパク質1分子計測から、ミオシン1分子の特性(力の大きさ、移動量)が解明されてきたが、こうした分子が集まった筋肉内構造サルコメアにおいて、ミオシンが集合したときにどのように機能しているのかは未だに不明である。1分子の機能の単純和であるのか、あるいは機能が飛躍するのかわかるために、マウス骨格筋サルコメア構造内のアクチン先端に局在するトロポモジュリンを遺伝子導入法により発現させて、その先端に蛍光量子ドットを標識できる実験系を構築し、アクチン1本の動態を調べる実験系の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In muscle, myosins are contractile protein that interacts with and pulls actin filaments toward the center of muscle. The recent single molecule studies have revealed various properties of muscle myosins, however it still remains unknown that how function of individual myosins is integrated into its molecular ensembles in sarcomere, which is a contractile unitary structure. In order to investigate whether they are simply a sum of their functional units or they enhance the functional output in their molecular ensembles, the experimental system was successfully developed to detect dynamics of single actin filaments in sarcomere structures by injecting DNA of the target protein, tropomodulin, into mouse skeletal muscles. Tropomodulin is located at the tip of actin filament and can be labeled by fluorescent particles (e.g., quantum dots) so that individual actin filaments can be visualized and are trackable.

研究分野：生物物理

キーワード：筋肉 サルコメア in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、1分子計測技術の発展が目覚ましく、様々なタンパク質1分子の機能が解明されてきている。特に骨格筋ミオシン1分子機能は、こうした1分子計測技術の台頭に伴って最も研究されてきた。その一方で、筋肉内で集合体としてどのように機能しているのかは不明である。その主たる原因は、サルコメア内での分子の動態を計測することが極めて困難であることに帰する。そこで、サルコメア内での分子の機能を可視化できる実験系を構築する必要性が迫られている。さらに、こうした実験から得られる知見は、単に筋収縮の分子機構だけに限られ問題だけではなく、様々な生体機能につながる分子～分子集合体～細胞への階層を超えた機能発現の理解としても極めて有用である。そこで本研究では、次のような目的で研究をすすめた。

2. 研究の目的

マウス骨格筋内のサルコメア構造におけるアクチン1本を蛍光標識する実験系を構築し、アクチン1本の動態観察から、ミオシン1分子の機能が集合体の機能において、どのように拡張されているかを検討する。

3. 研究の方法

3.1. 実験系の構築

マウス骨格筋内において、アクチン先端に局在するトロポモジュリンに着目し、GFPとビオチンタグを入れた融合タンパク質のプラスミドをエレクトロポレーションにより筋繊維内に導入した(図1)。1～3週間後の期間において、標的タンパク質が発現するので、発現した筋繊維はコラゲナーゼ処理により筋繊維1本ずつに単離し、界面活性剤により除膜してサルコメア構造を保ったままで、標的タンパク質を露わにする。ここで、ストレプトアビジン修飾された量子ドットを注入して、ビオチンタグの入ったトロポモジュリンと反応させて、アクチン先端部位を量子ドットで標識する。量子ドットをグリーンレーザーで蛍光励起して、アクチン先端の位置を可視化、定量化する。

分子の動態を見る場合、60倍以上の高倍率対物レンズが必要となるが、筋収縮のように高速(数mm/s)でかつ、長距離移動(数mm)する組織における最大の弊害は、標的観



図1 マウス前脛骨筋へのエレクトロポレーションの様子。

察物が筋収縮に伴い顕微鏡視野外に移動してしまうことである。そこで、標的をPC画面上で指定し、その標的位置をリアルタイムに追従するフィードバック制御ステージの開発を行った。観察対象とするサルコメア内の蛍光画像を共焦点ユニットを通して観察する一方、フィードバック制御用の標的としては、画像処理が簡単な蛍光ビーズを筋表面付近に散布し、その蛍光画像を高速カメラ(2000フレーム/秒)で撮影し、同時にその蛍光輝点の重心位置を2次元ガウス関数を用いて計算し、前のフレームに対する移動量を算出して、その移動量を電動ステージコントローラーにコマンド送信して、ステージを瞬時に反対方向に移動させた(図2)。

3.2. シミュレーションモデルによるサルコメア内アクチン線維動態の予想

サルコメア構造内においては、3次元構造を考慮するとアクチン1本あたりにミオシン80分子程度が相互作用する。そこで、ミオシン80分子がアクチンと相互作用したときのアクチン先端の変位をシミュレーションモデルから推測した。アクチンとミオシンの相互作用サイクルは6つの状態に分けた状態遷移モデルで表記し、サルコメア構造体の仕切り部分に位置するZ帯とアクチンとの間のバネ弾性体の硬さ(k)を変えて、硬さの違いによるアクチン線維動態への影響を検討した。

4. 研究成果

エレクトロポレーションによる標的タンパク質の発現においては、電圧やパルス間隔、回数などのパラメータを変化させて、より高効率に標的タンパク質が発現する方法を検討した。その結果、マウス前脛骨筋においては、150V、1Hz(20msパルス幅)、20回という条件が有効であった。

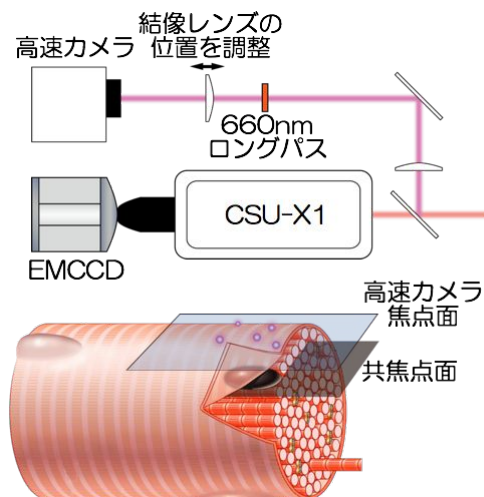


図2 上) 高速度カメラと共焦点ユニットの設置, 下) 筋線維膜表面に散布した蛍光ビーズ(ピンク)の位置を参照しながら、共焦点面上の標的を観測する。

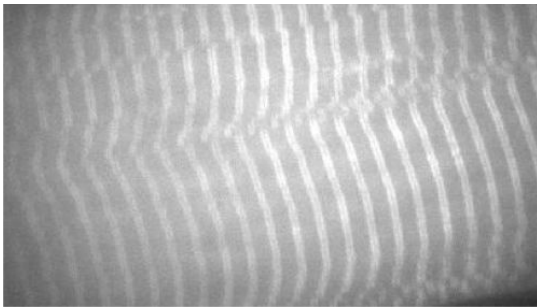


図3 マウス前脛骨筋に発現したトロポモジュリン GFP .

この方法によりトロポモジュリン GFP が綺麗に発現していることを確認した(図3). 筋線維の単離作業においては, ガラスピペットの口径サイズや形状, コラーゲナーゼ濃度などの実験条件の検討により, 安定してダメージの少ない筋繊維を単離する方法を確立した. このように単離した筋繊維から除膜する場合の方が, 単一筋から除膜する方法より遥かに低濃度の界面活性剤で内部構造を安定させたまま除膜できることが判明し, 実験系の安定化, 効率化につながる成果を出せた. 本研究期間では, 量子ドットでの標識による, アクチン1本の可視化や動態を獲得するまでにいたらず, その部分は今後継続していくが, 本研究で少なくとも, そのベースとなる実験系を確立することに成功した.

リアルタイムフィードバックステージにおいては, XY 平面方向には, 収縮中であっても1msの時間分解能で追従できるようになった. しかし収縮に伴い視野がZ(奥行き)方向にもずれることが判明し, 今後はZ方向への追従も可能なシステムに拡張していく必要性が判明し, 更なる開発に向けた検討事項が吟味できた.

シミュレーションモデルの結果から, 等尺性収縮においてサルコメア内のアクチン1本が振動している可能性が示唆された(図4). シミュレーションモデルにおける各分子動態の解析結果から, この振動現象はミオ

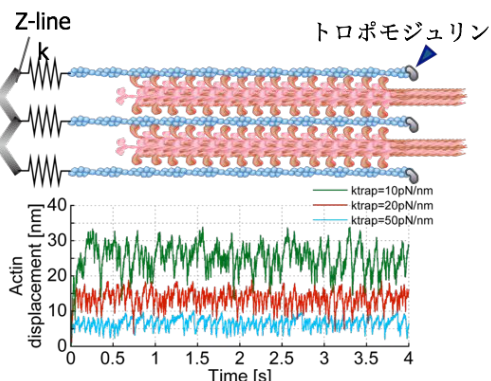


図4 シミュレーションモデルから予想される等尺性収縮時におけるアクチン先端の変位波形(緑, 赤, 青の順にZ板とアクチン間の弾性体の硬さが硬くなっている). 何れの弾性率(k)であっても, アクチンが振動していることが予想される.

シン分子間の協調的な力発生の結果からおきる現象と考えられる. 高負荷においては, ミオシンがアクチンへ結合している時間が長くなり, その結果, そのあとの構造変化に伴う力発生が確率的に同調し, 一斉に大きな力ができる. その後, こうした分子がほぼ同時にアクチンから解離するため, 力が一気に下がる. こうしたミオシン分子間の同調的な力発生と解離が繰り返し起こるため, アクチンは振動現象のような振る舞いで変位することがわかった. またアクチンとZ帯間の硬さを変えた結果, 硬さが硬いとそれに伴い力も大きく出すが, 一方で振動現象に伴う力の振れ幅(分散)がより大きくなることが予想された. このことから, アクチンとZ帯間の硬さがどの程なのか検討することは, サルコメア内の分子動態(変位, 力, これらの振れ幅)を知るうえで極めて重要であることがわかった. 今後は, シミュレーションから予想された振る舞いが実際におきるのか, 構築した実験系を用いて検討していく.

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)

Kaya M. and Higuchi H. Stiffness, working stroke, and force of single-myosin molecules in skeletal muscle: elucidation of these mechanical properties via nonlinear elasticity evaluation. Cellular and Molecular Life Sciences, 査読あり, 70, 2013, 4275-4295.

DOI: 10.1007/s00018-013-1353-x.

[学会発表](計 7 件)

- 1) Motoshi Kaya and Hideo Higuchi, Intermolecular cooperativity of skeletal myosins enhances force output in myofilament. 58th annual meeting of Biophysical Society, Feb 24-28, 2015, Baltimore, USA.
- 2) 茅 元司 1分子顕微鏡を用いて見えてきた筋肉の効率的な収縮メカニズム. 日本光学会年次学術講演会シンポジウム「バイオフォトリクス展望」, 2014年11月5-7日, 筑波大学東京キャンパス文京校舎.
- 3) 茅 元司 1分子計測技術を用いて効率的な筋収縮の仕組みを紐解く. 第87回日本生化学会大会シンポジウム「次世代型筋研究の夜明け」, 2014年10月15-18日, 国立京都国際会館.
- 4) Motoshi Kaya, Yoshiaki Tani, Takuya Kobayashi and Hideo Higuchi, Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日, 札幌.

- 5) Motoshi Kaya and Hideo Higuchi, Intermolecular cooperativity of skeletal myosins in myofilaments. The 2014 Gordon Research Conference Muscle and Molecular Motors, July6-11, 2014, Mount Snow VT, USA.
- 6) 茅元司 骨格筋ミオシン分子複合体の力発生に特化したミオシン1分子の特性とダイナミクス.第51回日本生物物理学会年会シンポジウム「少数個分子の協同が生み出す生命機能のメカニズム」,2013年10月28-30日,国立京都国際会館.
- 7) 茅元司 Molecular mechanism of muscle contraction - Elucidation from single molecule approaches - .マルチスケール骨格筋収縮動態に関する国際シンポジウム,2013年3月22日,神奈川大学.

〔図書〕(計 1 件)

茅元司 2章 筋肉ミオシン「1分子生物学」原田慶恵・石渡信一編 化学同人,2014年.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茅元司(KAYA, Motoshi)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号:00422098

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

小林 琢也(KOBAYASHI, Takuya)

東京大学・大学院総合文化研究科・研究員

研究者番号: 60468585