

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650212

研究課題名(和文) 弛緩溶液に分散した筋原線維懸濁液の水プロトンNMR横緩和経過

研究課題名(英文) Spin-spin relaxation of  $^1\text{H}$ -NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：以前測定した硬直条件では、筋原線維表面から500nmほどの距離まで動きの束縛された水が分布することが示唆されていたが、当該研究によりATP存在下では水の束縛量は半分程度に減少することが分かった。ミオシン頭部でATPを加水分解しながらアクチンとミオシンのクロスブリッジの結合乖離が起こることで筋肉は張力を発生しているが、今回測定された硬直と弛緩状態での束縛された水の量の大きな変化は、収縮のキネティクスに何らかの寄与をしている可能性がある。さらに、収縮中のほかの中間体としてミオシンADP複合体があるが、ADP存在下でも同様の測定を行い、ADP結合状態でも水の束縛量が減少していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In the absence of MgATP, myofibril affects water molecules within 500 nm from its surface differently from water molecules in the bulk solution, and releases many water molecules in the presence of MgATP or MgADP.

This may suggest that the potential of the water molecules that surround myofibril proteins are dynamically changed during cross-bridge cycling.

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：筋原線維 水 疎水性相互作用 筋タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

筋タンパク質のアクチンフィラメントに高濃度にミオシンが結合する時には熱力学パラメータが変化することが示唆されている (Smith SJ, White HD, Woledge RC, J Biol Chem, 259, 10303-8, 1984) が、生体内濃度に近い条件で観察されたこの現象は収縮のエンジェティクスの議論には必須であるにもかかわらず、未解決のままである。申請者は以前筋原線維の収縮に伴う熱産生を測定したが、この際、硬直から弛緩時に上記の現象と類似の現象が観察された。タンパク質だけにその原因を求めるには非常に大きな変化で、周りの水分子の寄与が示唆された。そこで筋原線維懸濁液の水プロトン NMR 横緩和経過を測定し、現在までに、筋原線維では 500-600 nm の距離の水分子まで何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

本研究による新しい知見は、筋蛋白質が生体内で機能している時に、周りの水を含めたキネティクスを考える必要があることを示すだけでなく、代謝マップなどで知られている生体内の多くの蛋白質のキネティクスも、同様に周りの水を含めたキネティクスを考えることで、生体内化学反応の解析におけるブレークスルーとなる。

## 2. 研究の目的

筋タンパク質の収縮時の熱力学パラメータは生体内に近い濃度では異なる可能性が示唆されているにも拘わらず、未解決のまま放置されている。以前の研究から、このパラメータの変化にはタンパク質周囲の水が寄与するのではないかと考え、生体内とほぼ同じ構造を持つ筋原線維標本を用い、この懸濁液の水プロトン NMR の横緩和経過を測定しタンパク質周囲の水の状態がバルクの水とどのように異なるかを解明することを手掛けている。現在までのところ、タンパク質表面から 500-600nm 離れた水分子まで何らかの

影響を受けていることがわかっている。また、収縮中に加速するミオシン ATP 加水分解反応の素過程で存在するミオシン ADP, Pi 複合体とミオシン ADP 複合体の状態での水の束縛の状態を測定は、収縮時の熱力学パラメータへの周囲の水の影響を解明する一助となる。そこで本研究では、この長距離に及ぶ影響が、筋節内のどの構造に起因しているか、静電的な相互作用によるものか疎水性相互作用によるものか、ATP または ADP のミオシン頭部への結合による水分子への影響がどのように変化するか、以上 3 点を明確にすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

硬直液中での筋原線維の測定結果はほぼ集まっているので、本研究ではミオシンを主成分とした太いフィラメントを溶出した筋原線維 (Myosin Ghost Myofibril:MGmf) と、アクチンを主成分とした細いフィラメントを切断した筋原線維 (Actin Ghost Myofibril:AGmf) を作成し、それぞれの筋原線維懸濁液の NMR 測定を行い、筋蛋白質周囲の水の状態を考察し、長距離に及ぶ水分子の束縛力がどちらのフィラメントに依存するものかを考察する。平成 24 年度はミオシンを溶出した筋原線維標本 (MGmf) と細いフィラメントを切断した筋原線維標本 (AGmf) を作成し、それぞれの NMR 測定を行う。平成 25 年度は ATP または ADP 存在下で、その NMR 測定を行う。またこれらの測定それぞれ 7、20、34 で行う。

## 4. 研究成果

以前測定した硬直条件では、筋原線維表面から 500nm ほどの距離まで動きの束縛された水が分布することが示唆されていたが、今回 AGmf MGmf とともに筋原線維周囲の動きの束縛された水は観察されなかったことから、長距離に及ぶ水の束縛には両フィラメントがコ

ンパクトに整列していることが必須であることが示された。また、7、34での測定結果より、温度上昇に伴って束縛の距離が長くなることが分かった。またこの時、時定数の変化は見られなかったことから、温度依存的に束縛の仕方は変化せず、その範囲だけが広がることが分かった。この温度依存性から、長距離に及ぶ水分子の束縛の力は疎水性相互作用に類似したものであることが示唆された。

次に弛緩条件の筋原線維懸濁液のNMR測定を20で行い、弛緩条件ではこの動きの束縛された水の層が筋原線維外には殆ど見られなくなることがわかった。

また7、34で同様の測定を行った。弛緩状態では筋節内部にしか存在しないと考えられる動きの束縛された水は、その温度依存性から硬直状態と同様に、疎水相互作用に類似した束縛を受けていることが分かった。

これらのことから筋タンパク周囲の水分子は、温度によらずまたATP,ADPのあるなしによらず疎水性相互作用に類似した束縛を受けており、硬直から弛緩になるときにその量が大きく減少することが示唆された。

ミオシン頭部でATPを加水分解しながらアクチンとミオシンのクロスブリッジの結合乖離が起こることで筋肉は張力を発生しているが、このクロスブリッジの結合乖離のサイクル中に硬直性のクロスブリッジが形成されることは知られている。

今回測定された硬直と弛緩状態での、束縛された水の量の大きな変化は、収縮のキネティクスに何らかの寄与をしている可能性もある。

## 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 件)

[学会発表](計 2件)

大野哲生、ウサギ骨格筋筋原線維懸濁液の水プロトン緩和経過、日本生理学会、2013 3月、東京

大野哲生、筋原線維懸濁液のADP存在下でのプロトンNMR緩和経過、日本生理学会、2014 3月、鹿児島

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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

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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：