

分子生理学講座

教授：竹森 重 筋生理学・体力医学
 准教授：山口 眞紀 筋生理学・体力医学
 准教授：山澤徳志子 生理学・薬理学

教育・研究概要

I. 水の相転移からみた骨格筋線維内の水状態

骨格筋線維内には少なくとも状態が異なる5つの水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究で明らかになっている。この状態の違いは細胞内の水分子集団とそれを取り巻く構造タンパク質との分子間相互作用による束縛によって形成されることがわかっているが, ではこの分子間相互作用が具体的にどのようなものであるかについてはいまだ明らかでない。これは NMR 法と MRI 法が, 水集団アンサンブルの振る舞いをみる方法であり, 同じ振る舞いが様々な分子間相互作用の結果として表れ得ることが, 各水集団の特性を分子間相互作用レベルの知見と直接結びつけることを許さないことによる。この難点を補うために, 示差走査熱量測定 (DSC) 法を用いて骨格筋細胞内の各水分画の分子間相互作用の強さを推定した。DSC 法は温度変化に伴う比熱変化, つまり水が水に融けるような相転移の検出に優れているため, その温度変化で形成/崩壊する分子間相互作用を熱エネルギーとして検出することができる。

昨年度までの研究により, 骨格筋線維では -10°C 以下で融ける水の融解ピークが少なくとも2種類あることがわかっていた。さらに, 60°C もしくは 80°C まで加熱すると, 変性熱と思われる吸熱ピークが生じ, これらの吸熱ピークが観察された前後では融解ピークが大きく変化することがわかっている。今年度は 60°C や 80°C に加熱をした標本でみられていた融解ピークの変化は, 筋線維構造のどの部分とリンクしているかを電子顕微鏡像から検討した。

除細胞膜処理したカエル骨格筋 (スキンドファイバー) を, 硬直状態にしたのちに -80°C まで一度冷却した後室温まで戻したサンプル, $+60^{\circ}\text{C}$ まで加熱したサンプル, $+80^{\circ}\text{C}$ まで加熱したサンプル, 室温のまま冷却を一度もしないサンプルについて4種類の電子顕微鏡像を取得した。一度凍結したサンプルはサルコメア間の一部に隙間ができるなどの変化はあったが, サルコメアの内部構造には一度も凍結させていないサンプルと比較して大きな変化は認められなかった。一方, 60°C まで加熱したサンプルは

主に A 帯に大きな変化がみられた。 80°C まで加熱したサンプルでは A 帯だけでなくサルコメア全体にわたる変化が認められた。また, 60°C , 80°C は Dergez らが調べたミオシンやアクチンの変性温度とそれぞれ近い値であった。 -10°C 以下の融解ピークは 60°C や 80°C 加熱後に大きく変化することから, それぞれサルコメア内の特定の構造を反映している可能性が考えられた。

II. 核磁気共鳴法と水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法による水性状測定

NMR 法および QCM 法を用いて筋タンパク質周囲に存在する水構造の測定を試み, アクトミオシンによる ATP 加水分解反応の素過程でこの水構造がどのように変化するかを測定し, 筋収縮と水構造の変化との関わりについて焦点を当てて研究している。

Initium 社と共同で, QCM 装置を用いてミオシンタンパク質とその周囲の水との相互作用の性質を測定しその束縛量を計算した結果は, ミオシンフィラメント懸濁液の NMR 緩和経過から得られた測定結果と非常に良い相関がみられた。ミオシン頭部の ATP 分解素過程での反応中間体は, 硬直状態と M・ATP 状態では多くの水を束縛し, 他の中間体 M・ADP・Pi と M・ADP 状態では, その束縛量は半分に減少した。また, その束縛量は QCM 法での測定と同程度であった。これらの結果を踏まえて, 本年度は筋原線維懸濁液の NMR 緩和経過を測定した。それぞれの中間体での状態ごとに測定を行ったところ, QCM 法による測定やミオシンフィラメント懸濁液での NMR 測定で得られた結果と同様に, 硬直状態と M・ATP 状態では多くの水を束縛し, 他の中間体 M・ADP・Pi と M・ADP 状態では, その束縛量は半分に減少した。また, その束縛量は QCM 法による測定と同程度であった。

III. 骨格筋肥大に対するポリアミンの役割

筋力低下の原因には, 加齢に伴う筋減弱を特徴とする病態 (サルコペニア) や, 神経支配が消失することによる筋萎縮が知られている。しかしこれらの詳細なメカニズムは不明である。大豆食品等に含まれているポリアミンは微生物, 動物, 植物を問わず生体内において普遍的に存在する生理活性アミンで, 代表的なものにプトレシン, スペルミジン, スペルミンがある。これらは主として核酸, 特に RNA と相互作用することによりタンパク・核酸合成を促進し, 細胞増殖因子として機能する。生体内では, プ

トレスイン⇄スベルミジン⇄スベルミンと相互変換することにより、ポリアミンとしての至適濃度が厳密に保たれている。また、アルツハイマー病にも関与している。そこで我々はポリアミンの骨格筋肥大に対する効果に期待して検証した。マウスの坐骨神経を片側除去し、その直後からポリアミン投与を開始し、除神経3週間後にCTによる画像撮影を行い、対照群とポリアミン投与群とで下肢の筋肉量を解析した。また、マウス骨格筋幹細胞(C2C12細胞)を用いて、筋芽細胞の増殖、及び多核になる分化過程に対するポリアミンの効果を検査した。

除神経実験においてポリアミン投与群では、対照群に比べて健足側の筋肉量が有意に増加した。骨格筋幹細胞の実験において、ポリアミン添加は多核になる細胞数、および一つの骨格筋細胞に含まれている核の数をもとに有意に増加させた。さらに、さらに、興奮収縮連関もポリアミン添加群で増強した。ポリアミンは骨格筋幹細胞の分化過程の促進及び収縮機能の促進により筋肥大を起こすことが示唆された。現在筋肥大を起こすシグナル経路について解析中である。

IV. 心筋の興奮性に対するポリアミンの効果

ポリアミンは多くの生理的に重要なチャネルに結合してイオン透過性を修飾する作用を持つ。特に心筋では、心筋細胞の活動電位シグナルの形成に必須な内向き整流性カリウムチャネルを膜電位依存的に抑制することが明らかにされている。運動負荷に誘発されたスポーツ性肥大心でも心筋細胞のポリアミン濃度が上昇することが動物実験により報告されているが、この際のポリアミン濃度の変動がスポーツ訓練中に不整脈などをひき起こす可能性が示唆される。そこでポリアミン濃度の上昇が心筋細胞の興奮活動に与える影響をラットの心筋細胞および個体を用いて調べた。経口投与の長期効果は、ラットを回転車輪により自発走を行わせて心肥大を誘発した群としない群のそれぞれで比較した。長期経口投与後の心形態変化は臓器重量と光学顕微鏡像から評価した。

心筋細胞の興奮活動は蛍光カルシウム指示薬および蛍光膜電位指示薬を導入することにより評価した。細胞外液にポリアミン(スベルミン、スベルミジン、プトレスイン)を添加すると新生仔ラットから調整した自発拍動性心筋細胞の興奮の頻度が抑制された。またスベルミンは若齢ラットから調整した非拍動性心筋細胞の細胞内カルシウム濃度を増加させたが、このときに膜電位変化は観察されなかった。一方で、

ラット個体にプトレスインを静脈注射すると、心拍数の抑制および心電図波形の変化が見られた。長期経口投与後の心形態と心電図上への明らかな影響は運動群と非運動群のどちらにおいても認められなかったが、ポリアミンの血中濃度は非運動群のほうが運動群よりも高い値を示した。

これらの結果より、経口摂取したポリアミンが運動とリンクした巧妙な代謝調節を受けている可能性が示唆された。

「点検・評価」

1. 骨格筋細胞内機能水に焦点を当てた研究では -10°C 以下で融ける2つの融解ピークが存在すること、その融解熱が 60°C および 80°C の加熱変性を加えると大きく変化することがわかっていた。今年度は 60°C および 80°C の加熱変性が特にどのような構造を変化させているか電子顕微鏡像を取得し、検討した。その結果、サルコメア内の構造を反映して -10°C 以下の融解ピークが変化している可能性は明らかになってきたが、これらの実験結果はカエル骨格筋のみで行っている。今後は心筋などの他の筋線維や、ラット・ウサギなどの哺乳類でも同様の融解ピークが確認されるかを検討することが課題である。

筋原線維懸濁液のNMR緩和経過から見積もった水の束縛量はQCMの測定と良い相関は示したものの、タンパク質あたりの絶対量は大きく異なった。筋原線維懸濁液では筋タンパク溶液に比べてより高次元の配列化が進むことに起因しているのかどうかを知るために、今後、細いフィラメントを取り除いた筋原線維標本を用いたNMR測定を行う予定である。

2. 骨格筋には可塑性(筋線維タイプの変化)や筋損傷から再生する能力がある。その能力の大半は骨格筋幹細胞によって担われている。まず、骨格筋幹細胞を用いてポリアミンの作用を検証することにより細胞分化過程において多核の筋細胞が増加し分化を促進するという結果を得ることができた。加えて生体において、筋肥大過程にポリアミン摂取が関与しているかを検証する実験系を確立できた。今後は再生過程におけるポリアミンの関与を更に検証する。具体的にはマウスの足の筋肉にコブラ由来の毒を注入することにより、当該筋の筋線維を損傷させ、ポリアミン摂取群と対照群に分けて筋損傷からの回復過程をMRI法で観察することにより回復過程の経時変化を解析する予定である。本研究でポリアミン摂取が筋損傷の回復に寄与することが明らかであれば、ポリアミン含有食品を食べることの有効性が

期待でき、健康寿命の延伸のための指針作成にも繋がる。一方、ポリアミンの心機能に対する効果についての実験は、細胞レベルでの研究を踏まえて本格的に個体での経口投与実験を開始することができたが、細胞や静脈注射で観られていた効果と個体での結果を照合するには、ポリアミンの代謝制御について詳細に調べることが重要であることを改めて認識した。来年度は今年度に採取した組織でのポリアミン濃度や酵素活性解析を行うことでポリアミンの個体での効果を系統的に評価し、細胞での実験結果と突き合わせることでポリアミン経口投与の心機能への効果を詳らかにしていきたい。なお、ポリアミンに関する実験は分子生物学講座の大城戸真喜子氏と協同行った。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sugi H (Teikyo Univ), Yamaguchi M, Ohno T, Kobayashi T (Shibaura Inst Tech), Chaen S (Nihon Univ), Okuyama H. Tension recovery following ramp-shaped release in high-Ca and low-Ca rigor muscle fibers: evidence for the dynamic state of AMADP myosin heads in the absence of ATP. *PLoS One* 2016; 11(9) : e0162003.
- 2) Ohno T, Arao T (Nihon Univ), Sugi H (Teikyo Univ). Effect of inorganic phosphate and low pH on the force-velocity relation of single skinned skeletal muscle fibers studied by applying parabolic fiber length changes. *J Nanomed Nanotechnol* 2017; 8(1) : 428.
- 3) Mikami Y¹⁾²⁾ (²Toho Univ), Kanemaru K¹⁾, Okubo Y¹⁾, Nakaune T¹⁾, Suzuki J¹⁾, Shibata K¹⁾, Sugi-yama H¹⁾, Koyama R¹⁾, Murayama T³⁾, Ito A¹⁾⁴⁾ (⁴Teikyo Univ), Yamazawa T, Ikegaya Y¹⁾, Sakurai T³⁾ (³Juntendo Univ), Saito N¹⁾, Kakizawa S (Kyoto Univ), Iino M¹⁾⁵⁾ (¹Univ Tokyo, ⁵Nihon Univ). Nitric oxide-induced activation of the type 1 ryanodine receptor is critical for epileptic seizure-induced neuronal cell death. *EBioMedicine* 2016; 11 : 253-61.
- 4) Murayama T¹⁾, Kurebayashi N¹⁾, Ogawa H²⁾, Yamazawa T, Oyamada H (Showa Univ), Suzuki J²⁾, Kanemaru K²⁾, Oguchi K²⁾, Iino M²⁾ (²Univ Tokyo), Sakurai T¹⁾ (¹Juntendo Univ). Genotype-phenotype correlations of malignant hyperthermia and central core disease mutations in the central region of the RYR1 channel. *Hum Mutat* 2016; 37(11) : 1231-41.
- 5) Yamazawa T, Nakamura N (Kyoto Univ), Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹AIST). Secretory glands and microvascular systems imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). *Microsc Res Tech* 2016; 79(12) : 1179-87.

II. 総説

- 1) 柿澤 昌 (京都大), 山澤徳志子. 【脳における細胞内Ca²⁺ストアの制御機構と脳疾患の新たな治療戦略】脳における新規細胞内カルシウム放出機構 一酸化窒素依存的カルシウム放出 制御機構と神経機能への関与. *日薬理誌* 2016; 147(4) : 194-9.
- 2) 山澤徳志子, 柿澤 昌 (京都大). 【脳における細胞内Ca²⁺ストアの制御機構と脳疾患の新たな治療戦略】脳における新規細胞内カルシウム放出機構 一酸化窒素依存的カルシウム放出 神経細胞死への関与. *日薬理誌* 2016; 147(4) : 200-5.
- 3) Mikami Y (Toho Univ), Kakizawa S (Kyoto Univ), Yamazawa T. Essential roles of natural products and gaseous mediators on neuronal cell death or survival. *Int J Mol Sci* 2016; 17(10) : E1652.

III. 学会発表

- 1) 竹森 重. (オーガナイズドセッション: 知の身体性 2) 盲点補完則にみる中枢の創造性~自覚的空間座標系の身体外への拡張投射~. 2016年度人工知能学会全国大会. 北九州, 6月.
- 2) Hirano K, Nakahara N, Hiratsuka R, Yamauchi H, Takemori S. (Oral) Evaluation by X-ray diffraction of minute structural change due to the eccentric contraction. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2016; 5(6) : 427]
- 3) Ohno T, Yamazawa T, Yamaguchi M, Ohkido M. (Poster) The effects of polyamine to skeletal muscle. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2016; 5(6) : 439]
- 4) Yamaguchi M, Yamazawa T, Ohkido M, Ikeda M, Yamauchi H, Takemori S. (Oral) Effect of polyamine on cardiac cells. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2016; 5(6) : 448]
- 5) Yamazawa T, Nakamura N (Kyoto Univ), Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹AIST). (Oral) Observation of secretory glands in aqueous solution by ASEM. 第71回日本体力医学会大会. 盛岡, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2016; 5(6) : 474]
- 6) 平野和宏, 中原直哉, 山内秀樹, 平塚理恵, 山口眞紀, 竹森 重. (ポスター) 骨格筋を強くする遠心性収縮負荷の筋節内検知センサ. 第133回成医会総会. 東京, 10月.
- 7) Yamazawa T. (Invited Lecture) Observation of

- salivary organs in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). 21st World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine. Athens, Oct.
- 8) 山澤徳志子. (招待講演) 大気圧電子顕微鏡によるドライマウス分泌腺の観察. 日本顕微鏡学会第59回シンポジウム. 東京, 11月.
- 9) Ohno T, Sano H. (Poster) Spin-spin relaxation of ^1H NMR signals from myofibril suspension during cross-bridge cycling. 第54回日本生物物理学会年会. つくば, 11月. [生物物理 2016; 56(Suppl.1-2): S301]
- 10) Nakahara N, Ohno T, Kimura M, Kimura S, Takemori S. (Poster) Interaction between water and myoproteins revealed by melting points. 第54回日本生物物理学会年会. つくば, 11月. [生物物理 2016; 56(Suppl.1-2): S301]
- 11) Yamazawa T, Nakamura N (Kyoto Univ), Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹AIST). (Poster) Secretory glands imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). 第54回日本生物物理学会年会. つくば, 11月. [生物物理 2016; 56(Suppl.1-2): S328]
- 12) 山口真紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 栗原 貫, 山内秀樹, 竹森 重. (口頭) 心興奮現象に対するポリアミンの効果. 日本ポリアミン学会第8回年会. 習志野, 1月.
- 13) Yamazawa T, Nakamura N (Kyoto Univ), Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹AIST). (Poster) Secretory glands imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy. 61st Biophysical Society Annual Meeting. New Orleans, Feb.
- 14) 平野和宏, 中原直哉, 山内秀樹, 平塚理恵, 山口真紀, 竹森 重. (ポスター) 低強度の速心性収縮は回復してもサルコメア構造に分子レベルでほとんど影響を与えない. 第8回MLFシンポジウム/第34回PFシンポジウム. つくば, 3月.
- 15) 山澤徳志子, 村山 尚¹⁾, 大城戸真喜子, 山口真紀, 山内秀樹, 竹森 重, 桜井 隆¹⁾, 大野哲生 (¹順天堂大). (口頭) 骨格筋の増殖と分化におけるポリアミンの調節機構. 第90回日本薬理学会大会. 長崎, 3月.
- 16) Nakahara N, Ohno T, Kimura M, Kimura S, Takemori S. (Poster) Interaction between water and myoproteins in skinned skeletal muscle detected by DSC. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月. [J Physiol Sci 2017; 67(Suppl.1): S167]
- 17) Ohno T. (Poster) Spin-spin relaxation of ^1H NMR signals from myofibril suspension with or without ATP-analogue. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月. [J Physiol Sci 2017; 67(Suppl.1): S167]
- 18) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Ohkido M, Yamaguchi M, Yamauchi H, Takemori S, Sakurai T¹⁾ (¹Junendo Univ), Ohno T. (Poster) Effects of polyamines on skeletal muscle. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月. [J Physiol Sci 2017; 67(Suppl.1): S168]
- 19) Kurihara T, Nakahara N, Ohno T, Yamazawa T, Yamaguchi M, Takemori S. (Poster) The structure and function of extraocular muscle fibers. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月. [J Physiol Sci 2017; 67(Suppl.1): S169]
- 20) Hirano K, Yamauchi H, Nakahara N, Hiratsuka R, Yamaguchi M, Takemori S. (Poster) Evaluation by X-ray diffraction of minute structural change in the sarcomere due to the mild-intensity eccentric contraction. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月. [J Physiol Sci 2017; 67(Suppl.1): S169]