

分子生理学講座

教授：馬詰 良樹 骨格筋生理学・体力医学
 准教授：竹森 重 骨格筋生理学・体力医学
 講師：山口 真紀 骨格筋生理学

教育・研究概要

I. 細胞内水モデルの検索

骨格筋細胞の筋節周期構造内にあり、サルコメアタンパク分子との相互関係性がよく分かっている水をモデルとし、MR画像が描出する細胞内の水の状態を検討している。骨格筋細胞の核磁気共鳴測定では、診断用MR画像の素となる水プロトン信号の横緩和時定数 T_2 を観測することで、筋細胞内の各水成分を識別することができる。昨年度はそれぞれの水成分の気相-液相平衡をもとに、水分子が組織・細胞構造から受ける束縛力を求めた。本年度はこの束縛力の起源を、無生物素材の細胞内水モデルで検索した。

検索した無生物素材の一つは、ナノポーラスシリカという微細な小孔のあるハニカム構造物で、酵素活性を高く維持する働きがあることが知られている。骨格筋の筋節構造とほぼ同等のスケールの階層構造構築を持つこの素材がどのようにして酵素活性を高く維持するのはいまだ明らかにされていないが、生理的状态で酵素がその作用を発揮する細胞内の水環境をナノポーラスシリカが提供するのではないかという仮説が提唱されている。

核磁気共鳴測定の結果、ナノポーラスシリカの集積体を含む水は横緩和経過で見る限り、骨格筋組織が持つ水によく似ていることが分かった。骨格筋ではアクチンとミオシンが筋節内に共存することが水の状態に大きな影響を及ぼしていることが分かっているから、ナノポーラスシリカ内ではシリカ表面が内部の水に対してアクチン・ミオシン系と同様な作用を発揮したものと考えられた。

今一つの無生物系として逆ミセルを検討した。通常ミセルとは逆に、疎水性の有機溶媒の中に表面活性物質で安定化された水溶液のミセルが浮遊するもので、水と表面活性物質の比率によってミセル径を均一に任意調整できるものである。横緩和経過から評価した水の状態はミセル径が骨格筋筋節やナノポーラスシリカのサイズよりも一桁小さい10nm以下になったときに初めて急激に変化した。この結果から、水分子への束縛力は界面の性状に大きく依存することが示された。

II. 分子動力学・X線回折法による心筋症関連変異トロポニンの構造解析

家族性心筋症の原因となるトロポニンのアミノ酸変異に伴う病態を構造面から解明することを目指している。トロポニンコア部分にあり肥大型心筋症の原因となるトロポニンT変異体E244Dは、心筋細胞の収縮活性をカルシウム濃度によらず増大する(Nakaura et al., 1990, Matsumoto et al., 2009)。この収縮活性増大の分子機構を明らかにするために、野生型及びE244DトロポニンT変異体を導入した筋線維のX線回折像を取得し、収縮活性増大の原因となる構造変化を探った(分子免疫学講座・斎藤三郎准教授、秋山暢丈講師との共同研究)。

野生型及び変異型トロポニンはヒトmRNAからpET3DベクターとBL21を用いて作成・精製した。作成したトロポニンは除膜処理をしたラット心筋線維またはウサギ骨格筋線維にトロポニンT交換法を用いて導入した。トロポニンT導入率は電気泳動法により評価した。X線回折像は高エネルギー加速器研究機構のBL15Aにてイメージングプレートシステムにより取得し、自作解析プログラムにより反射の間隔と強度を測定した。

E244DトロポニンT導入筋では、トロポニンの細いフィラメント上での立体配置を示すトロポニン反射の間隔と強度は野生型と変わりはないが、アクチン相互作用の強さを表す赤道反射強度比は収縮状態で増強していた。これより、E244DトロポニンT導入筋では収縮時にクロスブリッジの生成が亢進していることが示された。これより、E244DトロポニンT変異心筋での収縮活性増大の一因として、トロポニンTからトロポミオシンへの信号伝達の異常が示唆された。

III. MRI画像の組織水分画解析による筋トレーニング効果の評価

内・外閉鎖筋、大腰筋を代表とする深部筋は姿勢の安定や歩行に重要な筋肉であり、その効率的トレーニング法の開発の為に両筋の活動状態評価が必要となる。そこで、核磁気共鳴NMR装置(varian, Gemini2000-300BB)により得られた抽出骨格筋組織水の特徴的指数成分と組織内分画データとの比較により、診断用MR画像の横緩和経過から深部筋トレーニングに伴う組織水分画変化を抽出し、より効果的な筋トレーニング法開発に役立つ画像評価法を確立することを目指して実験を行った。解剖的観察から内・外閉鎖筋、大腰筋に効果的と期待される運動(外旋運動、屈曲運動)を右側のみに4秒に1

回、3分間反復し、直後に120ミリ秒までの12枚のマルチエコーMRI撮像を行い運動前安静時と比較した。撮像には診断用MRI装置(SIEMENS, 1.5T MAGNET OM SYMPHONY)を使用した。目的とする筋に関心領域を設定しピクセルごとに横緩和経過を追跡し、著しく経過の異なるピクセルを除外・平均化した後に、抽出骨格筋組織から得られた特徴的指数成分を前提として指数分解した。比較対照として、非運動側の筋も同様に解析した。

MRIで得られた深部筋の横緩和経過は、抽出骨格筋組織から得られた特徴的指数4成分のうちの、細胞膜近傍水及び筋節内水を反映する中間的時定数を持つ2成分で良好なフィットが得られ、安静時には主に細胞膜近傍水を反映する約150ミリ秒の時定数成分が全体の7%、筋節内水を反映する約50ミリ秒の時定数成分が残り占めた。運動後は約150ミリ秒の時定数を持つ成分の比率が数%増加した。抽出骨格筋組織では繰り返す収縮が水分子への束縛を弱める方向に変化させるが、生体筋でも抽出筋組織同様、運動後に骨格筋組織の水の束縛が減弱することが示唆された。

IV. 比重測定による筋原線維内の水状態評価

筋原線維懸濁液にポリエチレングリコール(PEG)等の小～中分子量物質を加えて遠心分離した後に上澄みの比重を測定すると、筋原線維内部に高比重のPEG等が浸透しない場合は浸透する場合より上澄みの比重が大きくなる。逆に沈殿の比重は、筋節内にPEG等が浸透しない分小さくなる。このことを利用し、筋原線維懸濁液の比重測定を行うことにより筋節内へのポリエチレングリコール(PEG)等の小～中分子量物質の浸透度合いを調べることで、筋原線維内の水状態を評価した。

PEG, エチレングリコール(EG), グリセリン, トレハロースについて硬直条件で測定を行った結果、グリセリンとトレハロースは筋原線維内部に外液とほぼ同じ濃度で浸透しているのに対して、PEGとEGは筋原線維内部では外液に対して半分以下の濃度になっていることが示された。また、両親媒性の性質を持つDMSO存在下ではPEGとEGも筋原線維内部に良く浸透していることが示された。これらの結果から、筋原線維近傍の水のポテンシャルは、筋原線維周囲のバルク水のポテンシャルと異なる可能性が示唆された。

V. 電気光学効果による太いフィラメントの堅さ測定

筋線維の長軸方向に電場をかけると内部の筋フィラメントが双極子モーメントを持つため、電場に応答して配向する。このときの応答の大きさおよび速度を測定することで、筋線維内でのフィラメントの堅さを見積もることができ、筋収縮時の筋節内力バランスを知るための基礎データを得ることができる。除ミオシン筋線維による細いフィラメントの堅さ測定は既に終了している為、本年度はカエル筋線維をゲルゾリンで処理して細いフィラメントを除いた除アクチン筋線維の電場応答を調べることで、太いフィラメントの堅さを見積もった。ゲルゾリンはウシ血清から黒川らの方法により精製した。

除アクチン筋線維の電場応答は、過去に測定した除ミオシン筋線維の応答に比べて10倍以下の強度であり、結晶構造から予測した双極性モーメントの大きさを考慮しても、太いフィラメントは細いフィラメントの数10倍以上の堅さを持つことが示された。

【点検・評価】

1. 細胞内水の状態の検討

骨格筋筋節内の水の状態を水素結合強度のレベルで検討するためのラマン分光測定が立ち遅れている。レーザ光による筋の傷害が原因であることはわかっており、サンプルの照射部位をスキャンするシステムを組み上げる段階にあるのだが、その開発のための時間を確保することができず、来年度への持越しとなった。

2. 体力科学

高価で大掛かりな画像解析法に対して、加速度測定は画像解析法で陰になる部分の制約なしに身体運動の微妙なタイミングをよく捉えることから、その有用性を現実の剣道稽古やバドミントンの練習に応用する技術開発を進めている。本年度は、被験者を配線とデータレコーダーの荷重から解放することを目指して、加速度センサと発信機を被験者の目的とする部位に装着するのみで測定が可能となる装置を安価に開発する予定であった。安価な無線通信モジュールを見い出しはしたものの、その実用化試験に着手することはできなかった。モジュールをコントロールするためのプログラム作成手法を学ぶ取るための時間を十分にとらなかったことが最大の理由であり開発の為に時間を急ぎ作りたい。

3. X線回折実験

分子動力学で一端をとらえた変異トロポニンによる心筋症発症機構についての研究を拡張し、変異トロポニン導入心筋のX線構造解析に本格的に取り組んだ。変異トロポニンの発現・精製法に改良を加えながら構造解析に最適な標本の条件を模索しつつ、データを蓄積した。結果は昨年度までに行った分子動力学による予測と概ね合致するものであった。来年度は測定条件を整理して絞り込むことによってデータの質を向上し、変異体特有の微細な構造変化を捕らえることを目標とした。

4. 核磁気共鳴法による筋活動状態評価

骨格筋の活動評価法には超音波や針/表面筋電図の手法があるが、深部筋の活動状態評価には骨格筋組織水の核磁気共鳴信号の横緩和経過が良く利用される。しかし横緩和経過が水のどのような状態を反映しているのかについては一致した見解が得られていない。そこで我々が今まで蓄積したNMR測定による骨格筋組織水についての知見を基に、限られた測定時間範囲の診断用装置によるマルチエコー画像列から筋組織水の変化をより確実に推測できる手法の開発を試みた。ただし摘出骨格筋とは異なり生体では運動に伴う血流変化の影響を無視できないため、今後は血流変化の影響を解析に加える必要がある。

5. 比重測定による筋原線維水環境の評価

過去に行った筋原線維の熱測定で硬直から弛緩する際に観察された、水分子を起源とすると思われる吸熱反応の実態に迫るため、比重測定による筋原線維近傍の水構造の解析を推進した。来年度はこれらの測定を弛緩条件(ATP存在下)で行い、硬直状態と弛緩状態での筋原線維近傍の水構造の相違を検索していく予定である。また、本年度に得られた比重測定の結果と、過去に測定した筋原線維懸濁液中の硬直条件での水プロトンのNMR横緩和経過との比較検討、および弛緩条件での筋原線維懸濁液の水プロトンNMR横緩和経過についても測定を実施する予定である。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yamaguchi M, Takemori S, Kimura M, Tanishima Y, Nakayoshi T, Kimura S (Chiba Univ), Ohno T, Yagi N (SPring-8/JASRI), Hoh J (Sydney Univ), Umazume Y. Protruding masticatory (superfast) myosin heads from staggered thick filaments of dog jaw muscle revealed by X-ray diffraction. *J Biochem* 2010; 147(1): 53-61.

- 2) 渡邊由陽¹⁾, 田中陽子¹⁾(¹成城大学), 竹森 重. 呼吸・心拍機能とは別の生体情報源としての長距離走・ジョギング中体温測定の有用性. *成城大学経済研* 2010; 188: 77-94.

III. 学会発表

- 1) 木村雅子, 木下一雄, 平野和宏, 竹森 重. MR画像による深部筋トレーニング時の筋活動性評価. 第17回日本運動生理学会大会. 東京, 7月. [*Adv Exer Sport Physiol* 2009; 15(2): 58]
- 2) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Otsuka Y (Teine Keijinkai Hospital), Akiyama N, Yagi N (SPring8/JASRI). The molecular mechanism of cardiomyopathy caused by mutant troponin: A molecular dynamics study tested by an X-ray diffraction experiment. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [*J Physiol Sci* 2009; 59 (Suppl. 1): S60]
- 3) Takemori S, Kimura M, Torigoe K (Tokyo Univ), Yamaguchi M, Abe M (Tokyo Univ). Understanding water states in organized structure of skeletal muscle with reference to non-bio materials and MD simulation. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [*J Physiol Sci* 2009; 59 (Suppl. 1): 311]
- 4) Watanabe M (Tokyo Med Univ), Ishida Y (Bunkyo Gakuin Univ), Yumoto M, Yagi N (SPring8/JASRI), Kimura M, Yamaguchi M, Takemori S. An X-ray diffraction study during contraction-relaxation cycles of the skinned smooth muscle of the guinea pig taenia cecum. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [*J Physiol Sci* 2009; 59 (Suppl. 1): 311]
- 5) Kawabe M, Takemori S. Energy Stored in the states of water molecules in skinned skeletal muscle. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [*J Physiol Sci* 2009; 59 (Suppl. 1): 311]
- 6) Kimura M, Takemori S, Yamaguchi M, Ohno T, Yagi N (SPring8/JASRI). Protrusion of myosin heads with the increase of longitudinal strain in the sarcomere of striated muscle. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto, July. [*J Physiol Sci* 2009; 59 (Suppl. 1): 312]
- 7) Yoshida S, Kimura M, Takemori S. The dehydrating effects of small organic molecules on the structural integrity of biological tissues; Skeletal muscle and nerve. The 36th Congress of the International

- Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 441]
- 8) Ohno T. The effects of polyethylene glycol to the myofibril lattice structure. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 312]
- 9) Watanabe Y (Seijo Univ), Tatsumi N (Ibaraki Univ), Takemori S. Accelerometric analysis of the limb movements of kendo players who win or lose the games. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 404]
- 10) Tanaka Y¹⁾, Watanabe Y¹⁾ (¹Seijo Univ), Takemori S. Accelerometric analysis of the movements of badminton players of varied skill acquirements. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009). Kyoto, July. [J Physiol Sci 2009; 59 (Suppl. 1) : 404]
- 11) 渡邊由陽 (成城大学), 巽 申直 (茨城大学), 竹森 重. 剣道打撃中における身体各部位の時系列解析: 習熟者と未習熟者の比較. 日本武道学会第42回大会. 大阪, 8月. [武道学研究 2009; 42 (別冊): 40]
- 12) 木村雅子, 木下一雄, 平野和宏, 竹森 重. 内・外閉鎖筋の活動のMRIによる評価. 第64回日本体力医学会大会. 新潟, 9月. [体力科学 2009; 58(6): 638]
- 13) 竹森 重, 木村雅子. 骨格筋組織の活動状態に必要なMR画像列. 第64回日本体力医学会大会. 新潟, 9月. [体力科学 2009; 58(6): 638]
- 14) 田中陽子¹⁾, 渡邊由陽¹⁾ (¹成城大学), 竹森 重. バドミントン動作の加速度計を用いた評価. 第64回日本体力医学会大会. 新潟, 9月. [体力科学 2009; 58(6): 937]
- 15) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Akiyama N, Watanabe M¹⁾, Yumoto M¹⁾ (¹Tokyo Med Univ), Otsuka Y (Teine Kenjinkai Hospital), Takamura T, Yagi N (SPRING8/JASRI). Molecular mechanism of hypertrophic cardiomyopathy caused by troponin mutation: molecular dynamics and X-ray diffraction study. 日本生物物理学会第47回年会. 徳島, 10月. [生物物理 2009; 49 (Suppl.): S27]
- 16) Kimura M, Takemori S, Yamaguchi M, Ohno T, Yagi N (SPRING8/JASRI). Protrusion of myosin heads from their backbone in actin removed striated muscle with sarcomere elongation. 日本生物物理学会第47回年会. 徳島, 10月. [生物物理 2009; 49 (Suppl.): S27]
- 17) Takemori S, Kimura M, Ohno T, Yamaguchi M. Water states in myofilament lattice of skeletal muscle: observation of molecular vibration with Raman spectroscopy. 日本生物物理学会第47回年会. 徳島, 10月. [生物物理 2009; 49 (Suppl.): S27]
- 18) Ohno T. Whether ethylene glycol diffuse into the sarcomere lattice or not. 日本生物物理学会第47回年会. 徳島, 10月. [生物物理 2009; 49 (Suppl.): S170]
- 19) 木村雅子, 木下一雄, 平野和宏, 竹森 重, 大木一剛¹⁾, 三井田和夫¹⁾, 辰野 聡¹⁾, 青柳 裕¹⁾ (¹東京歯科大). 核磁気共鳴法で得られた骨格筋組織水分画を前提としたMR画像列の再検討. 第436回日本医学放射線学会関東地方会. 東京, 12月.
- 20) 大木一剛¹⁾, 辰野 聡¹⁾, 木村雅子, 三井田和夫¹⁾, 青柳 裕¹⁾, 松本真由子¹⁾, 石川博通¹⁾, 丸茂 健¹⁾ (¹東京歯科大). 生前診断が困難であった膀胱腺癌の1例. 第436回日本医学放射線学会関東地方会. 東京, 12月.
- 21) 山口真紀, 木村雅子, 竹森 重, 大野哲生, 渡辺賢¹⁾, 湯本正寿¹⁾ (¹東京医大), 八木直人 (勸高輝度光科学研究センター). 肥大型心筋症の原因となる変異トロポニン導入筋のX線回折. 第27回PFシンポジウム. つくば, 3月.
- 22) 渡辺 賢¹⁾, 湯本正寿¹⁾ (¹東京医大), 石田行知 (文京学院大), 木村雅子, 田口美香, 竹森 重, 山口真紀, 八木直人 (SPRING8/JASRI). 小角散乱による平滑筋・筋フィラメント格子動態解析の試み. 第27回PFシンポジウム. つくば, 3月.
- 23) 竹森 重. 運動を創発する分子相互作用と名取の階段. 自発性発現の物質プロセス研究会主催シンポジウム. 東京, 10月.
- 24) 竹森 重. 神経・筋の運動生理とトレーニング効果. 第36回スポーツ医学研修会. 東京, 8月.