

分子生理学講座

教授：竹森 重 筋生理学・体力医学

講師：山口 眞紀 筋生理学・体力医学

教育・研究概要

I. 軟骨の生理・病理的状态とMRでみる組織水の状态の相関

水の浮力から離れた陸上動物は、重力に抗して姿勢を維持しながら運動するために筋・骨格系を発達させた。これらの運動器のうち骨格筋と軟骨とに着目したとき、いずれの組織も高度にバックされた構造タンパク中に強く電解質液を束縛した組織構築によって十分な強度と可動性という一見矛盾した要求に応えていることがわかる。水を重要な構成要素とするこの組織構築が、運動器の生理機能と病理状態にもたらす意義をMR画像法とその原理である核磁気共鳴測定を組み合わせて調べている。

今年度は診断用MRI装置(SIEMENS, 1.5T MAGNETOM SYMPHONY)による膝関節のMR画像の解析を進めた。MR画像で緩和が速いプロトンを持つ組織水は、組織に強く束縛されている活動度の低い水であることを骨格筋ですでに明らかにしているが、若年者では単に膝関節の関節軟骨が厚いだけでなく、骨に近い関節軟骨深部から関節腔に接する浅部に向けて組織からの束縛がだんだん弱くなるグラデーションがあることがわかった。このことは関節腔側では関節面に加えられた機械的圧迫で軟骨表面の水が束縛から解放されて軟骨間を潤滑し、骨の側では強く束縛された水が機械的な強度を維持することになり、理にかなっていると考えられる。これに対してすでに関節症様の症状を発現している高齢者では膝軟骨が薄くなっていることも加わり水状態のグラデーションは認めがたかった。このような関節での潤滑機能の回復には残された薄い軟骨組織の中に強いグラデーションを形成させる方策を検索することが有効であると考えられた。

II. 自重による筋組織圧迫がMR信号横緩和経過に及ぼす影響

自重による圧迫は組織の体液循環に影響し褥瘡を招来することもある。MR画像撮像時にも検査台で圧迫される体表面近くの筋では圧迫により組織水の状態が修飾されてMR画像による筋活動評価に影響する可能性がある。そこで実験用核磁気共鳴装置(varian, Gemini2000-300BB)を用いて得られた摘

出骨格筋組織水の特徴的指数成分と組織内分画を基に、自重による筋組織圧迫がMR信号の横緩和経過に及ぼす影響を検討した。撮像には診断用MRI装置(SIEMENS, 1.5T MAGNETOM SYMPHONY)を使用し、健康成人11人について深層筋および体表に近い筋の横緩和経過を90度励起パルス後120msまでの12枚のマルチエコーシーケンスから取得した。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、摘出骨格筋組織から得られた特徴的指数成分を前提にして指数分解した。すでに報告しているように筋組織内の水は横緩和時間が0.12秒以上の自由水と横緩和時間が0.07秒以下の中間水に分解されたが、自重による圧迫の影響のないと思われる体幹の深層筋(大腰筋・腸骨筋)と圧迫の影響のあると思われる表層筋(殿筋)とを比較したところ、期待に反して水成分比率に有意な違いは見られなかった。しかし、四肢筋であるヒラメ筋においては、自重による圧迫を受ける背臥位で時間とともに自由水の割合が増加した。この結果は静脈環流を阻害しても顕著な変化をしなかったことより、圧迫の効果は単純な細胞外液の増加とは考えにくく、細胞内水の成分変動や、細胞外のコラーゲンネットワークの構築の変形などが関与していると考えられた。

III. 筋原線維懸濁液の比重測定による水活性評価

筋原線維懸濁液にポリエチレングリコールなどの溶質を加えた後に遠心分離すると、筋原線維内部に高比重のポリエチレングリコールが浸透しない場合はする場合に比べて沈殿の比重が小さくなり、逆に上澄みの比重は、大きくなる。このことを利用して、筋原線維内へのポリエチレングリコールなどの溶質の浸透度合いを見積もり、筋フィラメント格子内の水活性を評価した。

ポリエチレングリコール、エチレングリコール、グリセリン、トレハロースについて測定を行ったところ、グリセリンとトレハロースは筋原線維内部にほぼ同じ濃度で浸透したが、ポリエチレングリコールとエチレングリコールは筋原線維内部では外部に比べて半分以下の濃度であったことが示された。また、両親媒性のDMSO存在下ではポリエチレングリコールとエチレングリコールも筋原線維内部に良く浸透することが示された。DMSOはタンパク質周囲の水構造や溶液中の水構造を変化させて水活性を変化させると考えられるため、筋フィラメント格子内の水はタンパク質により大きな活性の変調を受

ける結果、バルクの水活性とは大きく異なっている可能性が示唆された。

IV. 家族性心筋症を惹き起こすトロポニン変異体の構造解析

家族性心筋症を惹き起こすトロポニン変異体の張力増大メカニズムを知るために、変異トロポニンTを導入した心筋細胞のX線回折像を取得し、トロポニン変異がトロポニンより下流のタンパク相互作用に与える影響を探った。

標本には、界面活性剤にて化学的に膜を取り除いた除膜筋線維に変異/野生型トロポニンT溶液を1時間作用させて変異/野生型トロポニンTを導入したものをを用いた。測定は高エネルギー加速器研究機構内フォトンファクトリー-BL15Aにて行った。

得られた回折像を比較したところ、トロポニン反射の周期と強度に違いは認められず、トロポニンのアクチンフィラメント上での配置には違いがないことがわかった。しかし、ミオシン頭部の動きを反映する赤道反射強度変化は、変異型のほうが野生型より大きく、変異型トロポニンTを組み込んだ筋線維ではより多くのミオシンがアクチンとの相互作用に動員されていることがわかった。これらのことから、変異型トロポニンTを組み込んだ筋線維ではトロポニンTの変異の結果、大きな構造変化がトロポミオシンに惹き起され、より多くのミオシンがアクチンと相互作用していることが示された。

V. ATP加水分解にともなうミオシン頭部の構造変化

弛緩骨格筋のX線回折像は主にミオシンフィラメントのつくるらせん構造を反映するミオシン層線からなる。この層線は、収縮相互作用の主体となるミオシン頭部の構造情報を含むため、ATP加水分解に伴うこの層線の強度やピーク位置の変化を調べることは、ミオシンがATPの化学エネルギーをどのように力学エネルギーに変換するか（化学力学変換）を知る手がかりとなる。しかし生筋あるいは細胞膜を除いた除膜筋線維（スキンドファイバー）でこれらを調べようと思うと、ATP加水分解と同時にアクチンとの収縮性相互作用が起こってしまうためにミオシン層線はアクチン構造に攪乱されて弱くなる。したがって、ATP加水分解にともなうミオシンによる化学力学変換の素過程をみるためには、細いフィラメントをゲルズリンなどの酵素で除去した「ミオシンフィラメントのみからなる除膜筋線維」が適している。

細いフィラメントをゲルズリンで除いた除膜筋線維のX線回折像を高エネルギー研究所フォトンファクトリー-BL15Aにて取得したところ、ATPのミオシンへの結合・加水分解によりミオシン層線強度は増強し、ミオシン頭部のゆらぎが小さくなるとともにミオシンロッドと一定の角度をもつ構造に変化した。

また、ATPを結合したミオシンにATP加水分解抑制剤（ブタンジオンモノオキシム：BDM）を加えると、ミオシン層線は更に増強し、ミオシンのゆらぎがより顕著に抑えられた。このことから、収縮反応のエネルギー源となる化学力学変換過程では、ミオシンのもつ熱ゆらぎによるブラウン運動をATPのエネルギーによってミオシンの特定構造に変換することで、アクチンとのすべりの動力源とすること、ATP加水分解抑制剤（BDM）は、ミオシンをこの特定構造にロックしてエネルギーを取り出せないようにする作用があることが示唆された。

「点検・評価」

1. 物理化学的測定に基づいた組織内水性状の評価
直接電気活動を観測することが困難な深部筋の骨格筋の活動評価法には一般にMR画像がよく用いられる。しかし、限られた画像からの解析を行う制約から、得られる情報は一般に乏しく、結果の解釈についても一致した見解が得られていない。そこでこれまでに実験用核磁気共鳴装置を用いて我々が蓄積した骨格筋の精細な組織水プロトン緩和過程を前提にすることで、限られた画像から骨格筋の状態についてのより詳しい情報を引き出す手法の開発を推進した。現段階で、活動していない状態の骨格筋からも、自重による圧迫だけで十分に検出可能な変化が組織水に惹き起こされたことが確認できた。静脈環流障害の程度をコントロールし、より定量的な評価をすることが来年度の課題である。

MR画像や核磁気共鳴装置で観測する水プロトンの振る舞いはメソスコピックな水状態を反映するが、そのミクロスコピックな基盤は水素結合を介した水分子間のネットワークである。その観測のためのラマン分光測定を以前から進めているが、骨格筋を標本とした場合、測定対象を小さくすればするほど観測に伴う組織損傷が大きくなる点が障害になっていた。その点、軟骨組織は骨格筋と同様に束縛水を利用して機械的強度と可動性を実現している一方で、細胞外成分の占める割合が大きく代謝活性が低く安定であることから、骨格筋よりも扱いやすいという利点がある。これをふまえ、次年度は軟骨を対象と

した変形関節症のような病態や、深部筋活動の評価法の開発という実用を目指した研究とともに、ミクロスコピックな水状態の解明のためのラマン分光測定も推進し、応用的な研究と基礎的な研究とのバランスを意識しながら研究を進展させていく必要がある。

また、組織内水活性測定の別方面からのアプローチとして、Initium社と共同で、ミオシタンパク質とその周囲の水の相互作用を含めた粘弾性を評価する新規実験系を立ち上げた。本格的な測定は次年度からとなるが、現在までに、ミオシタンパク質周囲に高粘度の水層ができてきている可能性が示唆された。

2. X線回折法による筋機能タンパクの構造解析
昨年度から継続して行った変異トロポニン導入筋線維の構造解析については、データの取得がほぼ終わり、筋肥大をトリガするとされる心筋張力増大の直接の原因が、アクチンと相互作用するミオシン数の増大であることが明らかになった。しかしトロポニンの変異がアクチンとミオシンの相互作用を増大する際には、トロポニンが直接結合しているトロポミオシンの構造変化も増強されているはずだと考えられるが、そのことの実験的証拠はまだ得られていない。したがって次年度は、トロポミオシンの構造変化を捕らえる実験に着手したい。また、肥大型心筋症を惹き起こす別のトロポニン変異体K247Rについても同様の実験を開始する予定である。

また、除アクチン処理により、アクチンによる攪乱なしにミオシン自体の構造変化を調べるための実験系が確立でき、ATP加水分解による化学力学変換機構の一端をタンパク分子の構造とそのゆらぎ変化により捕らえることができた。次年度はこの系を核磁気共鳴測定にも用いて、同一条件下で水性状の変化を測定することを計画している。両者の結果を照合することで、水性状とタンパク構造変化の相互関係についてこれまでに提案してきた仮説を実証したい。

研究業績

Ⅲ. 学会発表

- 1) Ohno T. Whether ethylene glycol molecules diffuse into the sarcomere lattice or not. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S190]
- 2) Ohno T. Whether ethylene glycol diffuse into the sarcomere lattice or not. 第87回日本生理学会大会.

- 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1): S144]
- 3) Watanabe M (Tokyo Metropolitan Univ), Kimura M, Taguchi M, Takemori S, Ishida Y (Bunkyo-Gakuin Univ), Yumoto M, Yagi N (JASRI/SPRING8). ATP depletion induces disturbance of myofibrillar lattice structure in smooth muscle cells. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S190]
- 4) Takemori S, Kimura M, Nakahara N. Microscopic evaluation of water states in skeletal muscle. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S190]
- 5) Kimura M, Kawabe M, Takemori S. Evaluation of water state in skeletal muscle with reference to cartilage. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S190]
- 6) Yamaguchi M, Takemori S, Kimura M, Ohno T, Nakahara N, Yagi N (JASRI/SPRING8). Structural change of thick filaments in the thin-filament-extracted skinned fibers upon removal of ATP and actin binding. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S190]
- 7) Nakahara N, Kimura M, Takemori S. Effects of glycogen on sarcomeric water states in skinned skeletal muscle. 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会. 横浜(誌上開催), 3月. [J Physiol Sci 2011; 61 (Suppl. 1): S103]
- 8) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Akiyama N, Watanabe M (Tokyo Med Univ), Yumoto M, Yagi N (JASRI/SPRING8). Molecular mechanism of cardiomyopathy caused by troponin mutation: an X-ray diffraction study based on the predictions of molecular dynamics. 第87回日本生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1): S144]
- 9) Watanabe M (Tokyo Med Univ), Kimura M, Taguchi M, Takemori S, Ishida Y (Bunkyo Gakuin Univ), Yumoto M, Yagi N (JASRI/SPRING8). Analysis of lattice like arrangement in skinned teania cecum by using X-ray diffraction technique. 第87回日本生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1): S87]
- 10) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M. Sarcomere-spacing dependent force development and water states in sarcomere in striated muscle. 第87回日本

- 生理学会大会. 盛岡, 5月. [J Physiol Sci 2010; 60 (Suppl. 1): S87]
- 11) 渡辺 賢 (首都大, 東京医大), 石田行知 (文京学院大), 木村雅子, 田口美香, 竹森 重, 湯本正寿, 山口真紀, 八木直人 (JASRI/SPring8). X線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2報). 第52回日本平滑筋学会総会. 仙台, 7月. [日平滑筋会誌 2010; 14(1): J-31]
- 12) 岩瀬 学¹⁾, 巽 申直¹⁾(¹茨城大), 渡邊由陽 (成城大), 竹森 重. 加速度計を用いた剣道技の動作解析. 日本武道学会第43回大会. 東京, 9月. [武道学研究 2010; 43 (別冊): 47]
- 13) 渡邊由陽 (成城大), 竹森 重, 巽 申直 (茨城大), 作道正夫 (大阪体育大), 岡嶋 恒 (北海道教育大). 剣道高段者の打撃中における身体各部位の時系列解析. 日本武道学会第43回大会. 東京, 9月. [武道学研究 2010; 43 (別冊): 45]
- 14) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Akiyama N, Watanabe M (Tokyo Metropolitan Univ), Yumoto M, Yagi N (JASRI/SPring8). Molecular mechanism of hypertrophic cardiomyopathy caused by troponin mutation revealed by Molecular dynamics and X-ray diffraction study. 日本生物物理学会第48回年会. 仙台, 9月. [生物物理 2010; 50 (Suppl. 2): S169]
- 15) Takemori S, Ohno T, Kimura M, Kawabe M, Yamaguchi M. Motility emergent from biomolecular interaction. 日本生物物理学会第48回年会. 仙台, 9月. [生物物理 2010; 50 (Suppl. 2): S5]
- 16) 田中陽子¹⁾, 渡邊由陽¹⁾(¹成城大), 竹森 重. バドミントン技能別のバックハンドレシーブ動作の加速度解析. 第65回日本体力医学会大会. 市川, 9月. [体力科学 2010; 59(6): 917]
- 17) 竹森 重, 吉田志帆, 木村雅子. 摘出骨格筋からの核磁気共鳴信号を前提とした生体内骨格筋のMR画像による評価. 第65回日本体力医学会大会. 市川, 9月. [体力科学 2010; 59(6): 608]
- 18) 木村雅子, 川邊万佑子, 竹森 重. 膝関節軟骨の状態をMR画像から評価する: 摘出関節軟骨と逆ミセル内の水の核磁気共鳴測定を参照した解析. 第65回日本体力医学会大会. 市川, 9月. [体力科学 2010; 59(6): 607]
- 19) 竹森 重. (第2部: サイエンスカフェ「身体を知る・身体から学ぶ」)自らの身体が広大な自然への窓口. 第16回いのちの科学フォーラム/日本学術会議公開シンポジウム「心と身体から教育を考える」. 京都, 5月.
- 20) 木村雅子, 竹森 重. MR画像による膝関節軟骨の評価. 第18回日本運動生理学会大会. 鹿児島, 7月. [Adv Exer Sport Physiol 2010; 16(2): 59]

V. その他

- 1) 竹森 重. 特集筋収縮の謎: 名取のスキンドファイバー, 滑り説, 57年モデル, そして現在. Sportsmed 2010; 22(1): 3-17.