

cestor model of tetrapods (ポリステルス・セネガルの Hox 遺伝子の解析 - 四肢動物の生きた祖先モデル). 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.

- 17) Tatsumi N, Okabe M. Comparative anatomy of the diaphragmatic muscle precursor cells in mouse and chick. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.
- 18) Kidokoro H, Tamura K, Okabe M, Gary C. Cellular aspects of heart formation and LR asymmetric morphogenesis. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Ginowan, May.
- 19) Shigetani Y, Okabe M. Development of a new culture method for a precursor to the neural crest and pre-placodal ectoderm. 第34回日本神経科学大会. 横浜, 9月. [Neurosci Res 2011; 71(Suppl.): e124]

## 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

### 教育・研究概要

#### I. 骨格筋線維内水分画の相転移測定

これまでの核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究により, 骨格筋線維内には少なくとも5つの水成分分画が区別されること明らかになってきた。この水成分分画が, 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までは突き止められているが, 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はいまだ解明されていない。これは NMR 法と MRI 法が, 水集団アンサンブルの振る舞いを見る手法であり, 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事が, 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付けることを許さないことによる。この難点を補うために, 筋組織内の水の相転移を示差走査熱量測定法 (DSC 法) を利用して調べた。一度凍らせたスキンドファイバー (細胞膜除去筋線維) が融ける過程を観察したところ, いくつかの温度で相転移によると考えられる熱放出を認めた。このことは筋組織内に複数種類の水分画が存在することに符合しており, 各相転移の温度の違いには各分画における分子間相互作用のプロフィールが反映されていることを示している。

#### II. 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定法によるミオシン周囲束縛水の定量

筋線維で観察された水分子集団と構造タンパク質との分子間相互作用をより直接的に評価する今一つの方法として, QCM 装置によるミオシンタンパク溶液の粘弾性測定を昨年より継続して行った。QCM は本来, 水晶に物質が吸着して重量が増加するとその共鳴周波数が低下することを利用してナノグラムレベルの質量変化を量ることを目的として開発された装置であるが, 水溶液中で生体高分子同士の結合を経時的に測定するアルゴリズムが開発されたことにより, その利用範囲が大きく広がった。講座ではこの装置で, 高分子吸着後の共鳴周波数のピーク値だけでなくそのピーク幅を解析することで吸着した分子の粘弾性を知り得ることに着目した。計測された質量とその粘弾性には, 吸着した高分子

だけでなく、その高分子と相互作用している周囲の溶液の情報も含まれるため、吸着した高分子の質量や粘弾性と比較することで、水溶液中で高分子と相互作用している水分子の量や性質を知ることが可能となるからである。

本年度はまずミオシン分子の水晶への吸着過程を観察した。低密度で吸着している時は、リゾチームやアルブミンなど球状ないしは長楕円体のタンパク質と同様に、溶液中での質量はタンパク質自体の質量の2～3倍程度であった。この量はタンパク質表面の凹凸によって動きにくくなっている水分子の質量で説明可能な範囲であった。しかし、生体内でのミオシン濃度に匹敵する程度の高密度吸着時には、溶液中での質量は5倍程度にまで上昇した。また、この質量はATP存在下では2～3倍程度に減少した。このことから、高密度で存在するミオシンは硬直条件ではかなり広い範囲の水分子を束縛していること、また、ATPがミオシンに結合すると、束縛していた水を解放することが示唆された。この結果は、以前筋原線維標本を用いて測定した、硬直から弛緩する際の水が溶けるような吸熱反応の存在と符合する。

### Ⅲ. 除アクチン筋線維内でのATP結合によるミオシン頭部とその周囲の水構造変化

筋節周期構造内の組織された水環境において、骨格筋収縮反応の主役であるミオシン頭部はATP加水分解の自由エネルギーをいったんADPと無機リン酸の形で堰き止めた後、アクチンと相互作用して収縮反応に利用すると考えられている。ところがミオシン頭部がATP加水分解の自由エネルギーを堰き止める詳細を調べようとすると、アクチンとの相互作用がミオシン固有の変化をマスクしてしまう。

そこでアクチンフィラメントをゲルゾリン処理で除いた除アクチン筋線維のX線回折像を大型放射光施設(SPring8/BL45 XUおよび高エネルギー加速器研究機構/BL15A)にて取得したところ、ATPのミオシン頭部への結合・加水分解によりミオシン層線のピークがシフトし、ミオシン頭部の重心がミオシンフィラメント軸に近づく変化を起こすことがわかった。このときNMR法で水プロトン横緩和経過を調べると、ミオシン頭部の周りの強い束縛水が解放されることが示唆された。これは前述したQCM測定の結果および過去の筋原線維の熱測定の結果と合致し、ATP加水分解の自由エネルギーがいったん頭部の大きな配置変化と水構造変化の中に堰き止められた後に収縮反応に利用されることを強

く示唆した。

### Ⅳ. 骨格筋筋節の液晶用構造の安定性復元

骨格筋の細胞膜を除去してスキンドファイバー(細胞膜除去筋線維)を調整する時、同時に筋節内の液晶用規則構造の安定性が失われることが知られている。このことはミオシン頭部が太いフィラメントの周りに作るらせん配置の乱れに最も鋭敏に反映される。NMR法を用いた測定により、この構造安定性の低下が細胞内からの巨大溶質分子の流出によることが明らかになったことから、外因性の巨大溶質分子の添加により構造安定性を復元できるのではないかと考えて研究を進めてきた。太いフィラメント周囲のミオシン頭部のらせん配置の規則性は二次元X線回折像において特徴的なミオシン層線を与える。さまざまな不活性巨大溶質分子のうち、ポリエチレングリコール(PEG)が筋節の液晶用規則構造の安定性を復元するのに極めて有用なことがわかった。しかも分子量3350のPEGは3%で筋フィラメント格子におけるフィラメントの間隔を細胞膜を除去する前の生理的な間隔に戻した。静止時の筋タンパクの状態を安定化することがわかっている2,3-ブタンジオンモノオキシムを併用することによって、生理的状态と同等の構造安定性を復元することがわかった。この知見は、各種の条件が筋節の構造に与える影響をスキンドファイバー(細胞膜除去筋線維)を用いて明らかにすることを可能にするものである。

### Ⅴ. 膝関節軟骨のMR画像の横緩和経過による水分画解析

摘出豚関節軟骨の水分画成分と人工的な生体水モデルを前提として、ヒト膝関節軟骨のMR(magnetic resonance)画像を再評価した。

非可逆的な骨軟骨の破壊が生じる変形性膝関節症は、高齢者の半数以上が罹患する国民的疾患である。膝関節の痛みが高齢者の生活の質の低下を招くため、高齢化社会が目前と迫った現代において、マクロな形態変化が生じる以前の早期発見と予防は急務である。そこで、膝関節にマクロな形態変化が生じる以前の軟骨内分子レベルの変化をMR画像解析からとらえることを目標として、摘出豚関節軟骨標本および逆ミセル内水のNMR測定をベースとしてヒト膝MR画像の解析を行った。

健常成人の膝関節軟骨の横緩和経過は臨床用MR画像装置で32マルチエコー撮像法を用いて取得した。骨表面と垂直な方向に膝関節軟骨を3層に分解

して関心領域を設定した後にピクセルごとの横緩和経過を追跡し、豚の摘出軟骨組織のNMR測定で得られた特徴的指数成分を前提に指数分解した。また生体内の水状態を模倣するモデルとして、人工的に大きさを制御できる逆ミセルを調整し、逆ミセル内水のNMR測定も行った。

摘出関節軟骨の横緩和経過は $T_2$ （横緩和時定数）より3～4成分に分解された。MR画像で解析した膝軟骨は摘出標本と同様に骨表面に近いほど水の自由度が低下する層構造が認められ、大部分を占める水成分は数オングストロームの直径を持つ逆ミセル内水に相当した。

以上より、限られた時間で撮像するMR画像からでも、摘出組織と水モデルのNMR測定を前提に解析することで軟骨内の三次元構築を類推することができた。この方法により、形態変化が明らかになる以前の軟骨状態変化を捉えることが可能になると考える。

## VI. 心臓の部位特異的張力特性について

圧負荷に伴う心筋肥大では、家族性心筋症による肥大に比べ、心室中隔より自由壁の肥大が強く、このことが同じ心肥大でも臨床症状の違いを生む。この原因解明を目指した基礎実験として、心筋の部位によるカルシウムに対する張力応答の違いを調べた。心室中隔では、心室自由壁に比べて張力応答のカルシウム感受性が低かった。このことは、心臓が効率的に血液を駆出するために合理的であると思われる。この部位特異的張力特性の違いが圧負荷への適応の際に合目的に働き、圧負荷の際に自由壁に優位に肥大を起こす可能性が示唆された。

### 〔点検・評価〕

組織内水性状についての研究を、溶液系や動物から摘出した標本を対象とした基礎科学的解析から、人のMR画像を対象とした臨床応用を目指した解析にまで拡張し、多角的にアプローチした。

まず、昨年度より導入した示差走査熱量測定計により、バルク水、人工細胞内液水、筋線維内水の三種類の標本について融解熱および凝固熱を再現性よく測定できる条件を決定した。更に、筋線維の中の異なる温度での複数の相転移ピークをとらえることができた。このピークとNMR法により区別されている5種類の水分画との対応を調べることが次年度のテーマとなる。

同じく昨年度より開始したQCM装置による水タンパク系の粘弾性測定についても安定した結果を

蓄積することができ、筋原線維標本を用いてこれまでに得られた熱測定の結果と符合する結果を得ることができた。今後、熱測定結果とのより定量的な照合を行うために、QCM装置で筋原線維標本が硬直から弛緩する際の水分子の束縛状態の観察を試みていく予定である。加えて、精製したアクチンを添加することでミオシンに結合させ、硬直性クロスブリッジ形成に伴う周囲の水の束縛状態変化の測定も行う予定である。また、水タンパク系での水の束縛の程度を今後より定量的に解析していくにはミオシンがどのように水晶表面に吸着されているかを電子顕微鏡により決定する必要があるが、水晶表面とミオシンの間に介在する金電極が邪魔をして通常の方法では難しい。次年度はこの困難を乗り越える工夫を施して観察を試みる予定である。

NMR装置による水緩和経過測定では、X線回折法によるタンパク構造変化の解析と組み合わせることによって、水性状変化の由来をタンパク構造変化との関連から予測することができた。筋収縮タンパクのドメインドメイン間のダイナミックな構造変化とそれに伴う結合水の解放が、ミオシンによるATP加水分解反応のエントロピックな駆動力の実体である可能性が示された。次年度は、加水分解過程の反応物質濃度を変えることで加水分解反応から得られる自由エネルギーを増減した系において同様の測定を行い、この可能性を検証する。

実験室で得られた知見を臨床応用に広げることを目指す試みとしては、健康人で撮影されたMR画像に基礎実験で得られた複数の水分画の緩和時間をあてはめ、国民的疾患である変形性膝関節症の早期発見につながる基礎研究を推進した。基礎実験で得られた緩和時間を前提とすることで、時間的・空間的分解能に限界のある臨床用MR装置からでも、軟骨内の微細な変化を検出できる可能性が示された。しかし、まだデータ数が少なく、また健康ボランティアに限ったデータ収集であるため疾患の進行段階との関連はつかめていない。今後は、有症状のボランティアや無症状でも高齢ボランティアの解析を加えることや、摘出標本の詳細な解析を加えるつもりである。

今一つのテーマとして継続している心筋症の解析に関しては、本年度は家族性心筋症と圧負荷による心室肥大の病理学的所見の違いに着目し、基礎データとして心臓の部位による収縮特性の違いを解析した（選択実習で配属された三田光慶氏との共同研究）。

## 研究業績

## I. 原著論文

- 1) 渡邊由陽 (成城大), 巽 申直 (茨城大), 竹森 重. 夏季剣道稽古における暑熱障害の危険を生命兆候から簡便に推測できないか? 武道学研究 2011; 44(1): 1-12.
- 2) 竹森 重. 美しく奥ゆかしい筋肉にとり憑かれたひとびとは. 成城大学経済研究 2012; 195: 9-31.
- 3) 巽 申直 (茨城大), 岩瀬 学 (流通経済大), 渡邊由陽 (成城大), 竹森 重, 岡嶋 悟 (北海道教育大), 柴田一浩 (流通経済大). 3軸加速度センサを用いた剣道技の技能評価の検討. 成城大学経済研究 2012; 195: 33-46.
- 4) 田中陽子 (成城大), 渡邊由陽 (成城大), 竹森 重. 上級を目指すバドミントン競技技能の加速度計を用いた動作解析. 成城大学経済研究 2012; 195: 47-74.

## III. 学会発表

- 1) 山口真紀, 木村雅子, 竹森 重, 大野哲生, 渡辺賢 (首都大), 湯本正寿, 八木直人 ((財)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構造解析. 第28回PFシンポジウム. つくば, 7月.
- 2) 竹森 重, 木村雅子. 運動器における水の利用とその障害. 第19回日本運動生理学会大会. 徳島, 8月. [Adv Exer Sport Physiol 2011; 17(2): 70]
- 3) 平野和宏, 木下一雄, 木村雅子, 竹森 重. 日常臨床リハビリテーションレベルの運動負荷における深層筋活動評価. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 611]
- 4) 玉川奈津子 (フェーズオン), 竹森 重. 同等強度の異なる身体活動が呼吸・心拍変動に与える効果. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 643]
- 5) 田中陽子<sup>1)</sup>, 渡邊由陽<sup>1)</sup>(成城大), 竹森 重. バドミントン競技のプッシュ・ショット動作の加速度解析. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 830]
- 6) Ohno T, Wagatsuma M<sup>1)</sup>, Ichihashi M<sup>1)</sup>, Itoh A<sup>1)</sup> (<sup>1) Ulvac</sup>). Viscoelastic analysis of myosin adsorbed to gold. 第89回日本生理学会大会. 松本, 3月. [J Physiol Sci 2012; 62(1): S158]
- 7) Kimura M, Takemori S, Yamaguchi M, Ohno T, Yokomizo S (Tokai Univ.), Nakahara N, Yagi N (SPring-8). A method to analyze two-dimensional X-ray diffraction patterns obtained from stripes of cardiac muscle. 第89回日本生理学会大会. 松本, 3月. [J Physiol Sci 2012; 62(1): S162]
- 8) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T,

Nakahara N, Yokomizo S (Tokai Univ.), Yagi N (SPring-8). Stabilizing effects of macromolecular organic solutes on the myofilament lattice of striated muscle. 第89回日本生理学会大会. 松本, 3月. [J Physiol Sci 2012; 62(1): S158]

- 9) Yamaguchi M, Takemori S, Kimura M, Ohno T, Nakahara N, Yagi N (SPring-8). Structural change of myosin heads and water in the thin-filament-extracted skinned fibers upon ATP binding. 第89回日本生理学会大会. 松本, 3月. [J Physiol Sci 2012; 62(1): S157]
- 10) 中原直哉, 大野哲生, 山口真紀, 竹森 重. 融点からみた骨格筋の組織水の状態分析. 第128回成医会総会. 東京, 10月.
- 11) 渡邊由陽 (成城大), 竹森 重, 巽 申直 (茨城大). 加速度計を用いた剣道打撃の手の内作用の動作解析. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 829]
- 12) 木下一雄, 平野和宏, 木村雅子, 横溝駿矢 (東海大), 竹森 重. 圧迫された筋のMR画像による評価. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 615]
- 13) 木村雅子, 竹森 重. 摘出豚関節軟骨と生体水モデルを前提とした膝関節軟骨のMRI評価. 第66回日本体力医学会大会. 下関, 9月. [体力科学 2011; 60(6): 640]
- 14) 竹森 重. 神経・筋の運動生理とトレーニング効果. 第38回スポーツ医学研修会. 東京, 8月.
- 15) 渡辺 賢 (首都大), 石田行知 (文京学院大), 八木直人 (SPring-8), 木村雅子, 田口美香, 竹森 重, 湯本正寿, 山口真紀. Radiation Damageによる脊椎動物平滑筋赤道反射プロファイルの変化. 第28回PFシンポジウム. つくば, 7月.
- 16) 渡辺 賢 (首都大), 木村雅子, 田口美香, 竹森 重, 湯本正寿, 石田行知 (文京学院大), 八木直人 (SPring-8). 細胞内ATP濃度低下は平滑筋収縮タンパク質フィラメント格子状配列を攪乱する. 第53回日本平滑筋学会総会. 東京, 8月. [日本平滑筋会誌 2011; 15(1): J-33]

## V. その他

- 1) 竹森 重. 自らの身体が広大な自然への窓口. 環境と健康 2011; 24(3): 338-42.