

## 4. 遅筋型線維の筋型決定および筋型変換機構の解明

尾嶋 孝一

\*農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 畜産物研究領域

Key words : 骨格筋, 筋線維, 筋原線維, 筋型, ミオシン

### 緒言

生体のおよそ 40 - 50 % を占める骨格筋には二つの筋型が存在する。瞬間的に大きな力を発揮する速筋型、および持久力に富む遅筋型である。この筋型は個々の筋線維により異なり、その割合により骨格筋組織としての筋型が決定される。この筋型を決定するのがミオシン分子の構成成分であるミオシン重鎖である。一分子のミオシンは二つの重鎖と四つの軽鎖で構成され、およそ 300 のミオシン分子が重合して筋原線維内の太いフィラメントを形成する。一方、運動負荷等により、速筋⇔遅筋の筋型変換が起こることが近年報告されている。しかし、これらの研究で観察される変換は骨格筋組織をすり潰した RNA あるいはタンパク質レベルの解析に留まっているため、筋組織として筋型の変換が起きたことは明らかであるが、筋原線維レベルにおいて筋線維型変換の作用機序は不明である。そこで、本研究では遅筋型筋線維の決定および筋型変換機構のメカニズムを明らかにするために、筋原線維内の太いフィラメントを形成するミオシン分子の置換に着目し解析を行った。

### 方法、結果および考察

培養骨格筋細胞内でミオシン重鎖の動態を可視化するために、GFP 融合ミオシン重鎖 (GFP-Myh3) を発現するコンストラクトを作製し、培養骨格筋細胞に遺伝子導入後、分化誘導させ筋管を形成させた。なお、従来では Myh3 は胎仔型ミオシン重鎖として分類されていたが、近年遅筋型筋線維で優位に発現することが報告されている<sup>1)</sup>。発現した GFP-Myh3 の蛍光が筋原線維内に観察され、太いフィラメントに組み込まれているのが確認できた (図 1A)。太いフィラメント内でのミオシン重鎖の置換様相を明らかにするために、GFP-Myh3 を発現する筋管の一部にレーザー光を当てて蛍光を退色させ、GFP 蛍光の回復様相を共焦点レーザー顕微鏡で経時的に観察した (光退色後蛍光回復法: FRAP)。蛍光強度の最大回復値である Mobile fraction (Mf) ならびに Mf の 50 % に達するまでの時間である Half life ( $t_{1/2}$ ) を算出し、それぞれをミオシン分子の置換程度および置換速度の指標とした。その結果、 $t_{1/2} = 3.0 \pm 0.4$  (n=7)、つまり筋原線維内に存在するミオシン分子は約 3 時間でその半数が入れ替わっていることが判明した (図 1B)<sup>2)</sup>。

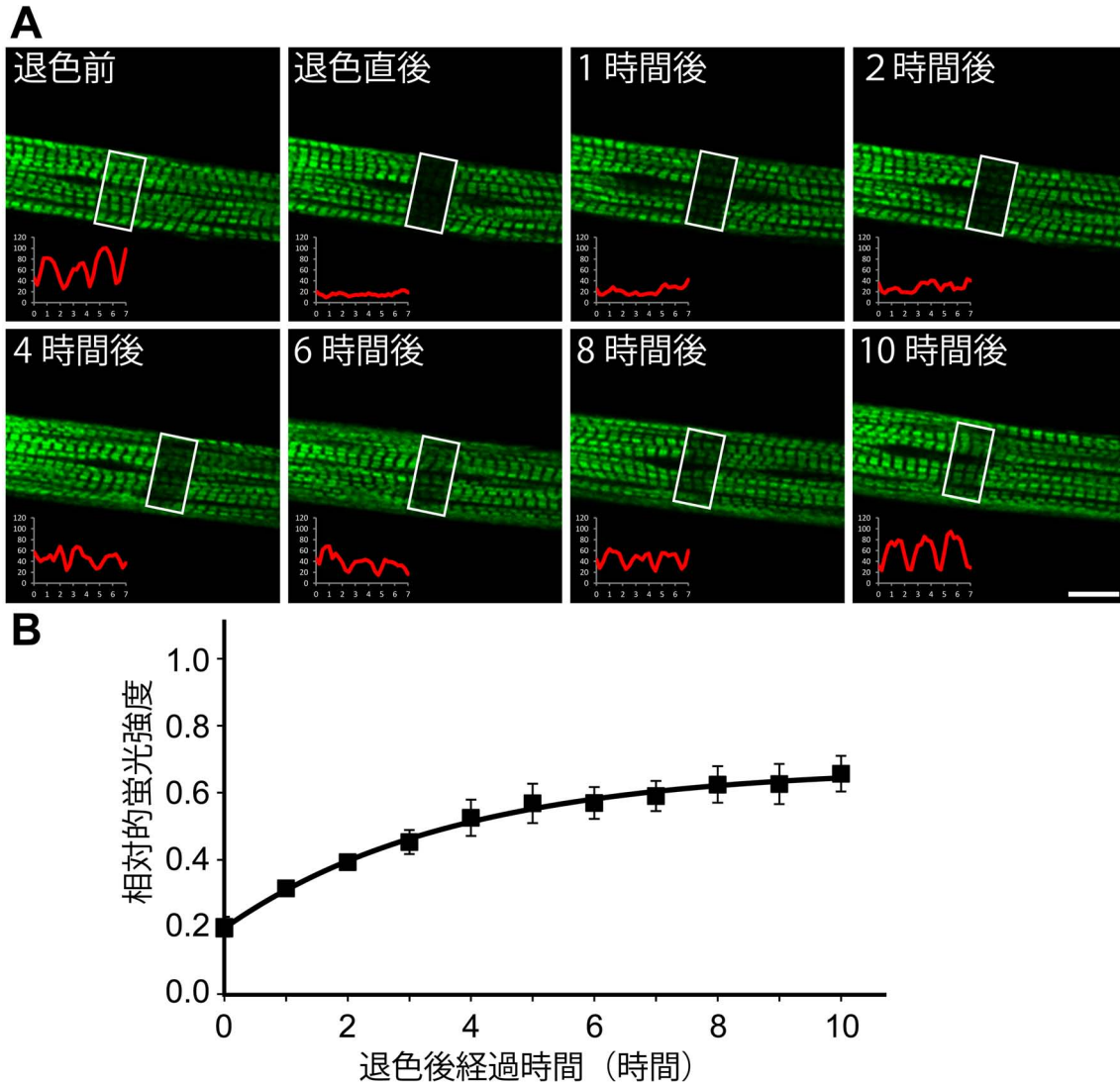


図1. GFP 融合したミオシン重鎖の蛍光退色後の蛍光回復

A) GFP-Myl3 を発現させた培養筋管細胞において FRAP を測定した。各時間は蛍光退色後の時間を示す。グラフは四角で囲まれた部分の蛍光強度を line scan mode で求めて作成した。x 軸は位置、y 軸は蛍光強度を示す。bar は  $10\mu\text{m}$  である。

B) 蛍光退色後、経時的に蛍光強度を測定し蛍光変化曲線を作成した。

筋原線維内のミオシン分子は太いフィラメントを形成し、その太いフィラメントはC-プロテインにより束ねられている。赤色蛍光タンパク質を融合したC-プロテインと GFP-Myl3 を培養筋細胞に共発現させると、C-プロテインは GFP 陽性の太いフィラメント上に局在した (図 2A-C)。共発現させた培養筋管細胞において両蛍光の FRAP を同時に測定し、蛍光変化曲線を作成した結果 (図 2D)、ミオシン重鎖およびC-プロテインの Mf (%) はそれぞれ、 $48.3 \pm 9.6$  ( $n = 4$ ) および  $80.5 \pm 4.8$  ( $n = 4$ ) であった ( $p < 0.05$ )。また、 $t_{1/2}$  はそれぞれ、 $3.8 \pm 1.4$  ( $n = 4$ ) および  $1.3 \pm 0.5$  ( $n = 4$ ) であった。このため、筋原線維内のミオシンおよびC-プロテインの分子置換は独立して行われること、すなわち、筋原線維を構成するミオシン分子の置換は太いフィラメントを単位として起きるのではなく個々のミオシン分子を単位として置換することが示唆された。

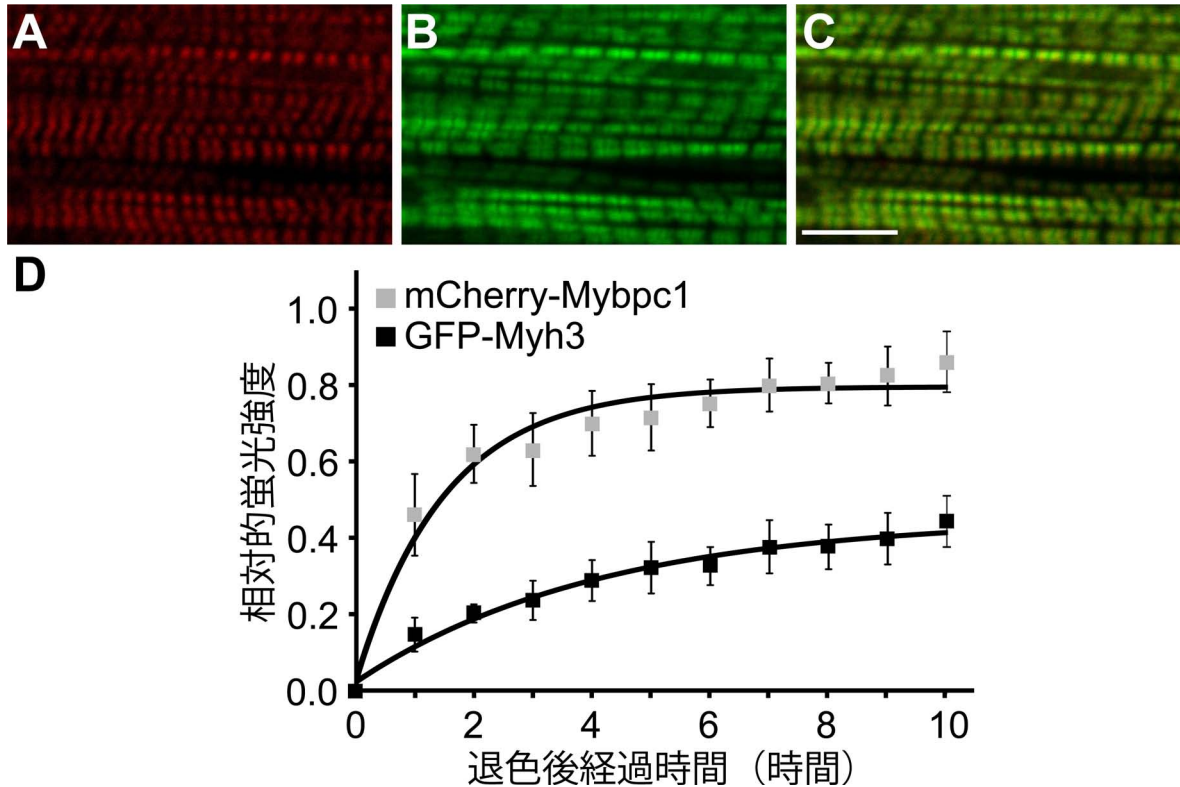


図2. C-プロテインとミオシン重鎖の蛍光退色後の蛍光回復

A-C) ミオシン結合タンパク質である C-プロテインに赤色蛍光である mCherry を融合した mCherry-Mybpc1 と GFP-Myh3 を培養筋管細胞に共発現させた。C-プロテイン (A 赤色) は GFP 陽性 (B 緑色) の太いフィラメント上に局在した (C は A と B の重ね合わせた像である)。bar は  $5\mu\text{m}$  を示す。

D) 共発現させた培養筋管細胞において C-プロテインとミオシン重鎖の両蛍光の FRAP を同時に測定し蛍光変化曲線を作成した。

タンパク質翻訳阻害剤を添加してミオシン分子の生合成を阻害し FRAP を行った結果、非添加である対照区の MF は 39.8 % ( $n = 9$ ) であるのに対し、タンパク質翻訳阻害剤添加区では 18.9 % ( $n = 8$ ) と、蛍光強度の回復程度は添加区で対照区に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ )。ミオシン分子の生合成を阻害すると太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換程度は低下するものの完全には阻害されないことから、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換には新規合成ミオシン分子が主に利用されているが、筋原線維に組み込まれていない細胞質に存在しているミオシン分子も置換に利用されていると考えられた。一方、従来までの研究によりミオシン分子は生理的イオン強度下では凝集するため溶媒に分散することは出来ないことが知られている<sup>3)</sup>。そのため、低イオン強度下である骨格筋細胞質内において筋原線維に組み込まれていないミオシン分子が存在するとは考えられていなかった。しかし、本研究結果により筋原線維に組み込まれずに細胞質に存在するミオシン分子があることを明らかにした。今後は、筋細胞質内に存在するミオシン分子が低イオン強度下で凝集せずに存在するメカニズムを解明する必要がある。

筋型の異なる成獣型のミオシン重鎖の変換機構の一端を明らかにするために、GFP 融合した遅筋型ミオシン重鎖 (Myh7)、および速筋型ミオシン重鎖 (Myh1) を培養筋細胞に発現させ FRAP を測定した。その結果、GFP-Myh7 および GFP-Myh1 の  $t_{1/2}$  はそれぞれ  $9.8 \pm 2.7$  ( $n = 3$ ) および  $5.3 \pm 1.4$  ( $n = 3$ ) であった ( $p < 0.05$ )。速筋型 (Myh1) の方が遅筋型 (Myh7) と比べて短時間にミオシン分子が入れ替わることが明らかとなり、ミオシン重鎖の筋型により筋原線維内のミオシン分子の置換速度に差があることが判明した (図3)。

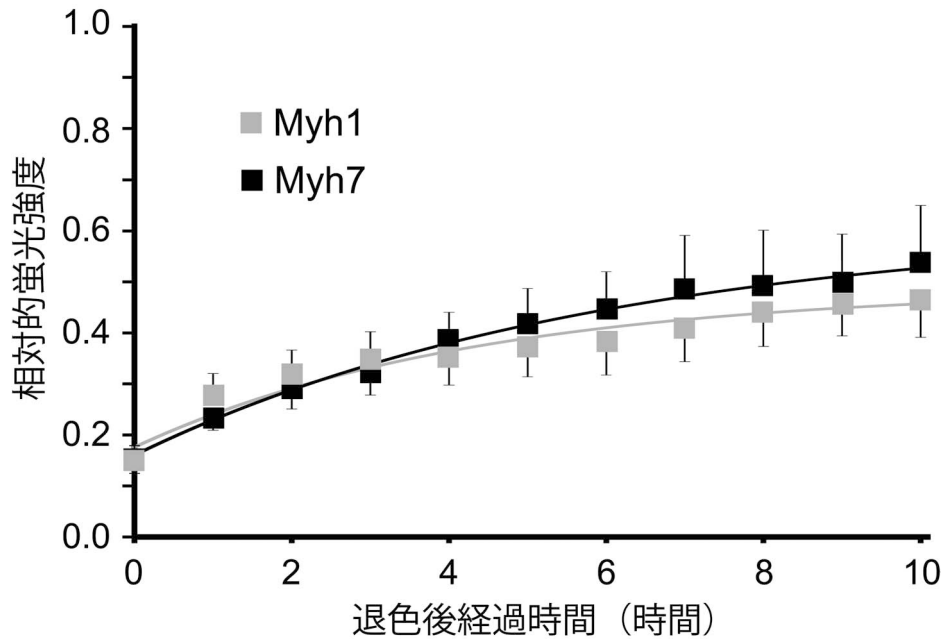


図3. 速筋型ミオシン重鎖と遅筋型ミオシン重鎖の蛍光強度変化

GFP-Myh1 (速筋型) および GFP-Myh7 (遅筋型) を発現させた培養筋細胞において、蛍光退色後、経時的に蛍光強度を測定し蛍光変化曲線を作成した。

成獣マウス骨格筋における遅筋型ミオシン重鎖の筋型変換を視覚的に評価するために、GFPを融合した遅筋型ミオシン重鎖 (Myh7) を発現する遺伝子改変マウスの作出を行った。現在、作出したマウス由来骨格筋を用いて筋型決定および筋型変換機構の検討を行っている。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は北海道大学大学院農学研究院の西邑隆徳である。本稿を終えるにあたり、本研究のご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) Chemello F1, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, Lanfranchi G. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. PLoS One. 2011; 6(2): e16807. doi: 10.1371/journal.pone.0016807. PMID: 21364935.
- 2) Ojima K, Ichimura E, Yasukawa Y, Wakamatsu J, Nishimura T. Dynamics of myosin replacement in skeletal muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2015; 309 (10): C669-79. doi: 10.1152/ajpcell.00170.2015. PMID: 26377314.
- 3) Perry, S.V. Myosin adenosinetriphosphatase. Methods in Enzymol. 1955;2:582-588.