HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The mechanism of myosin replacement in the thick filament of the skeletal muscle [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	上仲（市村），恵美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14814号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85453
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Uenaka_Emi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博　士（農学）　　氏 名：上仲 恵美（ウエナカ エミ）

The mechanism of myosin replacement in the thick filament of the skeletal muscle
（骨格筋筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構）

食肉の主体は家畜の骨格筋である。世界人口の増加や発展途上国の経済発展を背景として世界的に食肉需要は拡大しているが、畜産業による環境負荷や家畜生産に必要な投入エネルギーの大きさ等が問題となっている。環境調和・持続型の効率的な食肉生産確立するためには、家畜骨格筋の筋肥大・維持機構を組織・細胞レベルで理解することが重要である。

骨格筋は筋線維の集合体であり、筋線維は収縮機構を担う筋原線維で占められている。筋原線維は 20 種類以上のタンパク質が高次構造を組んだ収縮単位（サルコメア）から成る。サルコメア内ではミオシンを主体とする太いフィラメントとアクチンを主体とする細いフィラメントが規則正しく配列し、両者が滑り込むことで筋収縮が起こるとされている。生体機能を維持するためにはタンパク質の代謝回転が必要であるが、筋原線維を構築するタンパク質がサルコメア構造や収縮機能壊すことなく、どのように代謝しているのかは不明である。本研究では、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構を解明することを目的とした。

１．太いフィラメントにおけるミオシン分子の挙動を明らかにするために、蛍光標識ミオシン分子を用いたライブイメージングにより、太いフィラメントにおけるミオシン分子の挿入・解離パターンを検討した。鶏胚由来骨格筋細胞に KikGR 標識ミオシン重鎖（Myh）あるいは Halo-Myh を遺伝子導入し形成させた筋管を用いてミオシン分子の挙動を観察した。KikGR-Myh 発現筋管へ UV 照射すると蛍光が緑から赤に変換するため、照射部分の赤蛍光と緑蛍光の変化を観察することで筋原線維におけるミオシン分子の解離と挿入を観察することができる。緑蛍光の増加と赤蛍光の減少は同調していたことから、筋原線維におけるミオシン分子の挿入と解離は同時に起こっていることが示唆された。次に、Halo-Myh3 発現筋管を用いて新規合成ミオシンの蛍光パルスチェイスを行った結果、挿入されたミオシン分子の局在を示す赤蛍光ピークはパルスチェイス 7 分後には太いフィラメントが存在する A 帯端に認められ、30 分後にはそのピーク位置が中央に接近した。また、新規合成ミオシン分子の非標識条件下においても蛍光回復が観察されたことから、太いフィラメントから一度解離したミオシン分子も再度筋原線維に組み込まれることが示された。この際、一度解離したミオシン分子の再組み込みも新規合成ミオシンと同様に A 帯端から起こる傾向が見られた。これらの結果から、筋原線維の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換は A 帯端を起点としていることが示唆された。

２．筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構を明らかにするために、細胞内タンパク質分解系に着目し、ミオシン関連ユビキチンリガーゼの 1 つである Ozz を過剰発現させた筋管を用いて検討した。速筋型（GFP-Myh1）、遅筋型（GFP-Myh7）あるいは胚型（GFP-Myh3）のミオシン分子と mCherry-Ozz を共発現する筋管を用いて GFP の光退色蛍光回復法で調べた結果、Ozz 過剰発現下における GFP-Myh1 および GFP-Myh7 の蛍光回復は、Ozz を過剰発現していない対照区と同程度であった。しかし、GFP-Myh3 の蛍光回復は対照区よりも

有意に抑制された。また、mCherry-Ozz は細胞質画分には存在せず、筋原線維画分にのみ存在した。Ozz の過剰発現が GFP-Myh3 の置換を特異的に抑制したことから、筋原線維における胚型ミオシンの置換にユビキチンリガーゼが関与することが示唆された。

３．細胞内環境が筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換に影響するか否かを検討するために、骨格筋細胞に速筋型と遅筋型の 2 種類の蛍光標識ミオシンアイソフォームを同時に発現させて置換様相を観察した。両ミオシンアイソフォームは同一のサルコメアに組み込まれているにも関わらず、速筋型の方が遅筋型よりもより速く置換することが示されたことから、ミオシン分子自身に置換率を変化させる要因があることが示唆された。そこで、タンパク質間の相互作用や局在変化を調節することで知られる翻訳後修飾に着目し、速筋・遅筋型アイソフォームによって受ける翻訳後修飾の種類や修飾率が変化するのか否か検討した。速筋として前脛骨筋（TA)、遅筋としてヒラメ筋（SOL）をマウスから採取し、筋原線維画分と細胞質画分に分画してサンプルを調製した。各サンプルをイムノブロットに供したところ、TA において 1 ヵ月齢のマウスでメチル化ミオシンの割合が高く、SOL では 1–24 ヵ月齢のマウスでミオシンのメチル化率が高かった。そこで、Myh1 と Myh7 でメチル化修飾を受けるアミノ酸位置の違いを質量分析で調べた。Myh1 と Myh7 の両方で、ミオシンの重合において重要な役割を担う尾部でメチル化修飾が多く検出された。ミオシン分子尾部におけるメチル化修飾位置は、アイソフォーム、筋原線維/細胞質画分、マウスの月齢によって影響を受けることが示された。以上の結果から、アイソフォームによって筋原線維内太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換速度は異なること、その要因として、ミオシン分子の翻訳後修飾の一種であるメチル化が関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、筋原線維内の太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換機構は以下のように考察される。太いフィラメントを構成するミオシン分子はフィラメントの両端部でより頻繁に置き換わっており、一度解離したミオシン分子も再び太いフィラメントに組み込まれる。太いフィラメントからの解離と再利用を繰り返すうちに一部のミオシン分子は E3 リガーゼによって選別され分解される。また、太いフィラメントにおけるミオシン分子の置換頻度はミオシンアイソフォームによって異なっており、この要因としてミオシンのメチル化修飾の関与が考えられる。