

血流を保った“生きたまま”の *in vivo* 骨格筋の 2 次元 X 線回折法の確立 An x-ray diffraction study on *in vivo* skeletal muscle with maintained blood supply

中原直哉^{1,*}, 山内秀樹², 林友則¹, 平野和宏¹, 山口眞紀¹, 竹森重¹

¹東京慈恵会医科大学・分子生理学講座 〒105-8461 港区西新橋 3-25-8

²東京慈恵会医科大学・分子生理学講座・体力医学研究室 〒182-0022 調布市国領町 8-3-1

Naoya NAKAHARA^{1,*}, Hideki YAMAUCHI²,

Tomonori HAYASHI¹, Kazuhiro HIRANO¹, Maki YAMAGUCHI¹, Shigeru TAKEMORI¹

¹Jikei Univ. Sch. Med. Dept. Molecular Physiol., Minato-ku, 105-8461, Japan

²Jikei Univ. Sch. Med. Dept. Mol. Physiol. Physical Fitness Lab, Choufu-shi, 182-0022, Japan

1 はじめに

骨格筋は規則周期的な構造をとっているため、他の生体組織の構造研究では固定を必要とする光学顕微鏡や電子顕微鏡観察によるものが主になるのに対して、“生きたまま”の構造をとらえることができる X 線回折法が、タンパク構造と機能を関連付ける研究として発展してきた。しかしながら、従来の X 線回折法は固定を必要としないものの、取り出した骨格筋に対して行うものが多かった。このうち摘出した骨格筋をそのまま標本とする場合は、経時的な劣化や筋疲労などの要因が大きく影響した。また、膜透過処理を行った除膜筋線維を標本とする場合は、溶液環境をコントロールすることで ATP の枯渇などは防げる一方で、可溶性細胞内成分や繰り返しの収縮などの影響は評価ができないといった問題があった。

ここで、我々は血流を保った“生きたまま”の *in vivo* 骨格筋に X 線回折法を適応できないかと考えた。血流を保った *in vivo* 骨格筋の X 線回折法であれば、同一の標本での変化を観察することが可能となり、筋疲労などの実験系では代謝産物の影響を含めた経時変化が検出可能と考えられる。さらに今後、この系を応用すれば経神経刺激による収縮中の撮影といったナノレベルの構造と機能の同時測定が可能であり、応用の範囲は多岐にわたると考えられる。

本研究ではその第一歩としてマウスの速筋である長趾伸筋の“*in vivo*”骨格筋の X 線回折像を取得し、従来用いられてきた除膜筋線維(*skinned fiber*)の回折像との比較を試みた。

2 実験

6 か月齢の ICR 系雌性マウスの長趾伸筋を麻酔下で血流を保ったまま露出し、*in vivo* 骨格筋標本とした。長趾伸筋の遠位腱はモータに接続し、筋長を調節できるようにした。

除膜筋線維は 6 か月齢の ICR 系雌性マウスの長趾伸筋を摘出した後、0.5% Triton-X を含む人工細胞内液で 5 時間処理することにより作成した。測定に用いる除膜筋線維標本は 200 μ m 未満の数本の筋線維束として X 線回折実験に用いた。

X 線回折像の取得はいずれの標本においても BL-6A にて行った。カメラ長は 2.5m として、Pilatus 1M で回折像を取得した。

3 結果および考察

血流を保った *in vivo* 骨格筋においても、除膜筋線維と同様に高次の反射が認められる良好な X 線回折像を取得できた(図 1, 2)。

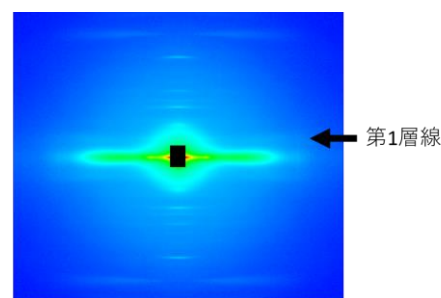


図1 血流を保った *in vivo* 骨格筋の X 線回折像

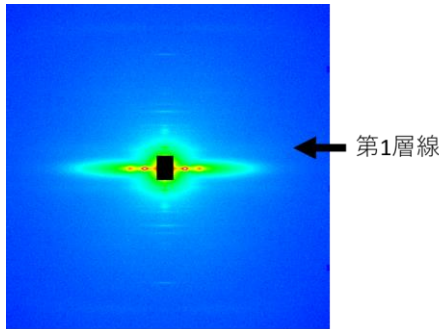


図2 除膜筋線維のX線回折像

1) 赤道反射

報告されている摘出筋と除膜筋線維の違いと同様に[1]、除膜筋線維に対して *in vivo* 骨格筋では太いフィラメントの間隔を反映する 1,0 格子間隔が狭い傾向が確認された(図 3)。

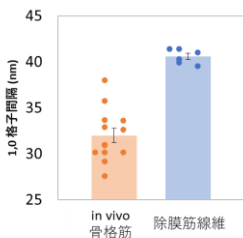


図3 1,0格子間隔の比較

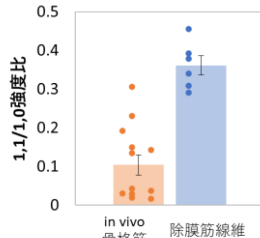


図4 1,1/1,0強度比

赤道反射の 1,1/1,0 強度比は、除膜筋線維に対して *in vivo* 骨格筋では小さく、*in vivo* 骨格筋は除膜筋線維に比べてミオシン頭部がアクチン側へあまり近づいていない状態と考えられた。

2) 子午反射

第一層線はアクチンを主体とする細いフィラメントらせん成分とミオシンを主体とする太いフィラメントらせん成分に分離されるが、これらの成分比は、*in vivo* 骨格筋と除膜筋線維とで変わらなかった。アクチンとミオシンのクロスブリッジが形成されるとミオシン頭部の質量により細いフィラメントらせん成分が増加することが報告されていることから、除膜筋線維と *in vivo* 骨格筋とを比較するとクロスブリッジ形成の割合は同等であると考えられた。

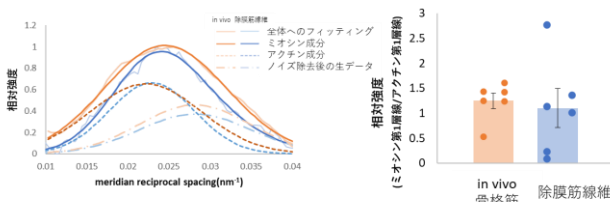


図5 第1層線のミオシン/アクチン強度比

以上より、*in vivo* 骨格筋では除膜筋線維に比べてミオシン頭部がアクチンから遠ざかっているが、クロスブリッジ形成は除膜筋線維と同等であるということが示唆された。この結果をどのように解釈すべきかについては、今後、1,1/1,0 強度比の上昇が期待される収縮中や硬直時の X 線回折像を取得して検討していく。

4 まとめ

血流を保った *in vivo* 骨格筋の X 線回折像を試みて、マウスの長趾伸筋から高次の反射も解析可能な良好な X 線回折像を取得することができた。この手法を発展させ、収縮中の X 線回折像の取得することで、繰り返し収縮時の筋疲労の過程などの解明をしていく。

謝辞

回折像の取得および本実験手法の可否についてご相談に乗っていただきました清水先生をはじめとした PF スタッフの方々に深く感謝申し上げます。

参考文献

[1] G. F. Elliott and I. Matsubara, J. Physiol., 226, 88-89(1972).

成果

1. 中原直哉, 山内秀樹, 山口眞紀, 平野和宏, 竹森重. 血流を保った骨格の *in vivo* X 線回折画像取得. 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会/第 98 回日本生理学会大会合同大会. 2021 年 3 月 Web 開催

* nkhr@jikei.ac.jp