骨格筋の興奮収縮連関の実験と数値解析*

仲 町 英 治^{*1}, 塚 本 純^{*2}

Experiment and Numerical Simulation of Excitation-Contraction Coupling of Skeletal Muscle

Eiji NAKAMACHI and Jun TSUKAMOTO

The in vitro experiment of excitation-contraction coupling of semitendinosus muscle of *Rana Castesbeiana* has been done. We measured the time history of tension force in case of isotonic contraction. The characteristics of the force history changed according to the condition of electric pulse stimulation, e. g., from twitch to tetanus for single and sequential stimulation, respectively. Two numerical models to analyze the complete E-C coupling dynamics are proposed. One is the modified self-induced translation model, the other is the biochemical reaction model, which is newly proposed. The latter modelled the relationship between Ca^{2+} density and ATPase activity. The process is modelled as follows: first, electric stimulation (excitation), followed by the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum, (also taken in by Ca^{2+} pump), the binding of Ca^{2+} at binding sites of troponin, and finally, activation of ATPase between the myosin head and actin filament. The comparison between the experiment and numerical simulation shows difference in the magnitude of force and the characteristics of the time history of force. The former is caused by the difference of size, i. e., whole muscle in the experiment and the half-sarcomere in the numerical simulation. The latter is due to the incomplete model's of the biochemical reaction process, e. g., Ca^{2+} density-ATPase relationship.

Key Words: Excitation-Contraction Coupling, Muscle Contraction, Semitendinosus Muscle, *Rana Castesbeiana*, Acto-Myosin, ATPase, Self-Induced Potential, ATPase, Isotonic Contraction, Ca^{2+} , Sarcoplasmic Reticulum

1. 緒 言

興奮収縮連関(E-C Coupling)は1952年にSandow⁽¹⁾によって命名されて以来, 生理学, 生物物理学および生体力学の分野で活発に研究が展開されてきた⁽²⁾⁽³⁾. 興奮収縮連関は, 神経終板への刺激による筋形質膜の電氣的興奮から, 筋原線維内の生化学反応, そしてアクトミオシン系の収縮運動に至る連鎖過程であり, 現在ではこのメカノケミカルな現象を分子および細胞レベルで解明する研究が盛んである⁽⁴⁾⁻⁽⁸⁾. 著者らは, アクトミオシン系の収縮運動の解析のために分子レベルの現象論的ポテンシャル理論に基づく力学モデルを提案し, 基本的な収縮運動の数値解析を行い実験との比較を行ってきた⁽⁴⁾⁽¹⁰⁾. ここでは, 新たに実験観察結果を基にした生化学反応プロセスの現象論的なモデルを提案し, これまで提案した力学モデルとの結合によって興奮収縮連関を記述する新たな数値モデルを構築する. まず, カエルの半腱筋を用いた等尺性興奮収縮連関の実験を行い, 各種の電気刺激のパターンに対する

筋張力を計測する⁽¹¹⁾⁽¹²⁾. 次に, 筋小胞体から放出されるカルシウムイオンの濃度の時間変化から ATP 加水分解発生までを段階に応じて関数関係式によって表す. この生化学反応プロセスの数値モデルは先に提案した著者らの力学モデル⁽¹⁰⁾との結合が容易となるように特殊化したものである. そのために, これまでの膨大な生化学反応プロセスの研究⁽⁷⁾⁽¹³⁾⁻⁽¹⁶⁾の成果と整合性がとれない結果を示す要素も含んでいる. 特に分子レベルでの生化学反応プロセスおよび力学現象の解明は現在もっとも先端的な研究テーマである. そのため, 本論文では不確実さを持つ仮定⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾の導入が必要となったことを明記する. 以上の収縮連関モデルを用いて解析したサルコメア単位の等尺性収縮力解析結果と半腱筋の実験結果とを比較することで本数値解析モデルの有効性を検討する.

2. カエル半腱筋の等尺性収縮実験

ウシガエル(*Rana Catesbeiana*)の半腱筋(semi-tendinosus muscle)を用いた興奮収縮連関の実験装置概要を図1に示す. 実験は田村陽次郎博士(鈴鹿高専)の指導のもとで実現したものである⁽¹¹⁾⁽¹²⁾. ウシガエルの半腱筋を両脚から摘出し, リンゲル液内に浸し, 張力計(Shinkoh, UT-1 K type)に絹糸で固定する. 実験

* 平成5年7月23日 第4回バイオエンジニアリング部門学術講演会において講演, 原稿受付 平成6年2月28日.

*¹ 正員, 大阪大学工学部 (〒565 吹田市山田丘2-1).

*² 正員, (株)東芝 (〒183 府中市片町3-22).

に用いた半腱筋は2個であり、試料1および2と記す。それらの自然長は、ともに約55 mm、実験装置に取付けた場合は、約60 mmであり、その平均直径は約4 mmであった。そのデータを表1に示す。半腱筋を収縮させるための電気刺激は、2本の白金電極を筋肉に直接接触させ、パルス発振器[日本光電(株)]によって約370 mV、幅10 ms程度のパルスを与える。単一の刺激による収縮(単収縮:twitch)の測定を行った後に、2種類の電気刺激を与えることで張力発生メカニズムについての基礎的知見を得た。

(A) 試料1を用い、2回のパルスを与え、パルス発生時間隔 Δt_s を変化させる。

(B) 試料2を用い、周期性連続パルスを与え、パルスの発信周期(周波数)を変化させる。

図2(a), (b)には条件(A), (B)のそれぞれの場合に筋に発生した張力の計測結果を示す。図2(a)の結果から、パルス発生の時間間隔が短くなると張力の積算が行われることがわかる。また、図2(b)の結果から周期50 Hzの連続時間刺激では強縮(tetanus)状態となっていることがわかる。単収縮の場合は Ca^{2+} 濃度減少が早く、 Ca^{2+} はすべてのトロポニンに供給されないが、連続的なパルス発生の場合は、より多くのトロポニンが Ca^{2+} と結合して構造変化を起こすので、単収縮時のピークの2-3倍ぐらいの張力が発生することが観察された。さらに、図2(a)にあるように、2回

めのパルス発生までの時間間隔が短い場合も同様に単収縮に比べて、より多くのトロポニンが Ca^{2+} と結合するために、より大きな張力が発生することがわかった。実験では2匹のウシガエルの筋を用いたが、実験条件および個体差による誤差が考えられたために、赤沢堅造博士(神戸大学)らによる骨格筋に関する同様な実験によって得た結果も図2(a), (b)の右列に参考のために併せて示した⁽⁵⁾。筋のサイズおよび刺激周期が少々異なる場合もあるために正確な比較はできないが、ほぼ同様な傾向を示すことがわかる。この比較から著者らの実験結果は妥当なものであると考えた。

3. 興奮収縮連関の数値モデル

興奮収縮連関の連鎖過程を、(I)生化学反応プロセス(刺激パルス→ATP加水分解)、および(II)力学プロセス(ATP加水分解→張力発生)の二段階に分けて数値モデル化する。(II)力学プロセスについては、すでに著者らによってアクトミオシン系の収縮運動モデルが提案されており、ここでもそれを採用する。モデルの詳細は文献(10)を参照されたい。以下では、(I)生化学反応プロセスの数値モデルについて示す。

(I) 生化学プロセス 生化学反応プロセスは、刺激パルスによって筋膜に電氣的興奮が起こり、筋小胞体(SR)の終末槽部分からカルシウムイオン Ca^{2+} が筋の原形質内に放出される時点を起点とし、ATP加

表1 カエル半腱筋の寸法と重量(試料no.1およびno.2)

	muscle no.1	muscle no.2
natural length	55mm	55mm
length at experiment	60mm	60mm
diameter at experiment	4.0mm	4.1mm
weight	0.0078 N	0.0082 N

(a) カエル半腱筋

(b) 興奮収縮連関実験装置概略図

図1 カエル半腱筋の興奮収縮連関実験概要

(a) 単収縮および2回刺激の場合

(b) 一定周波数による連続刺激の場合

図2 興奮収縮連関の実験結果

水分解が誘起される時点を終点としてモデル化される。図3に筋線維の構成とプロセスの概略図を示す。

(I-1) カルシウムイオン放出・取り込み 刺激による筋小胞体からの Ca^{2+} イオン放出速度の時間的な変化を、神経線維におけるナトリウムイオンチャネル (Na^+ channel) の膜透過性-コンダクタンス g_{Na} の時間的な変化と類似と仮定する⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁸⁾。筋小胞体からの Ca^{2+} 放出速度 v_{Ca} を次のように定義する。

$$v_{\text{Ca}} = v_{\text{Ca,max}} \cdot g_v = v_{\text{Ca,max}} \cdot (m^3 h) \dots\dots\dots (1)$$

ここで、 m および h は活性化および不活性化ゲーディング粒子がナトリウムイオンチャネルゲートを開けている確率を表す⁽¹⁴⁾。 $v_{\text{Ca,max}}$ は最大 Ca^{2+} 放出速度であり、 $3.0 \times 10^{-3} [\text{M/s}]$ とした⁽³⁾。図4(a)に、時刻 $t = 0 \text{ s}$ に刺激が生じた後の Ca^{2+} 放出速度の時間変化を示す。次に、in vitro 実験結果⁽³⁾ を参考にして、 Ca^{2+} 取り込み速度 v_p を原形質内の Ca^{2+} 濃度から求める関係式を定義する。

$$v_p = v_{p,\text{max}} \cdot \frac{[\text{Ca}^{2+}]^{1.4}}{2.8 \times 10^{-9} + [\text{Ca}^{2+}]^{1.4}} \dots\dots\dots (2)$$

図3 骨格筋線維の構造概略図および興奮収縮連関プロセスの概略

ここで、 $u_{p,\text{max}}$ はカルシウムポンプの最大 Ca^{2+} 取り込み速度活性定数であり、 $0.2 \times 10^{-3} [\text{M/s}]$ とした⁽³⁾。この関係式を図4(b)に示す。原形質内の Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]$ の時間変化は放出・取り込み速度 v_{Ca} の差を時間積分することで得られ、図4(c)の実線のようになる。取り込みポンプが作動しない場合の結果を破線で示す。

(I-2) カルシウムイオン濃度と ATPase 活性的関係 ATP 加水分解(筋収縮エネルギー)を誘起する酵素 ATPase の活性化は Ca^{2+} 濃度に依存すること

が知られている⁽²⁾⁽³⁾。このATPase活性化率 w_{ATPase} をPotterらの“トロポニンに結合する Ca^{2+} 量”と原形質内の Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}][\text{M}]$ との関係式⁽¹³⁾と類似であると仮定して次のように表す。

$$w_{\text{ATPase}} = \frac{K[\text{Ca}^{2+}]}{(1 + K[\text{Ca}^{2+}])} \dots\dots\dots (3)$$

ここで、 K は Ca^{2+} 結合に対する親和性定数(affinity constant)で $4.03 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ とした。図4(d)にその関係を示す。式(1), (2), (3)および同時に示したパラ

図4 興奮収縮連関における生化学反応プロセス⁽³⁾⁽¹⁷⁾

図5 1回および2回刺激による興奮収縮連関の数値解析結果

メータを導入して単収縮の場合のカルシウムイオン濃度およびATPase 活性化率の時間変化のシミュレーション結果を図5(a)の上中段に示す。この結果では両者ともに電気刺激から数ミリ秒(約2 ms)でピークに達し、数十ミリ秒(30-60 ms)でほぼ零になることがわかる。このATPase 活性化率に応じて半サルコメアに設定した20個のミオシン頭部S1にATPaseが発生する、つまり、発生個数の時間変化をATPase 活性化率によって決定した。ATP加水分解の開始が設定された後は力学モデルのATPase 誘起ポテンシャルが作動し、結果として図5(a)下段のATPase 活性化に対して時間遅れ(ピーク時は15 ms程度、弛緩時80 ms程度)を生じる結果を得た。これらの結果をTaylorらのカエル骨格筋の実験結果⁽¹⁹⁾と比べると、時間的な変化に関して定量的な一致を示しているとは言えないが、傾向としてはほぼ妥当な結果と言えることがわかる。

4. 数値解析結果

3章で示した生化学反応プロセスの数値解析モデルと力学プロセスモデル⁽¹⁰⁾を組合せることでサルコメア単位の興奮収縮連関の数値解析を行った。まず、図

2(a), (b)に示した興奮収縮連関の実験条件に対応させて刺激(時刻 $t=0$ s)を入力し、その刺激に応じて生じる生化学および力学反応のプロセスの数値解析結果を示す。図5(a)には単収縮の場合の解析結果を示しており、上段から Ca^{2+} の濃度、ATP加水分解活性化率、およびサルコメアに発生する等尺性収縮力(張力)のそれぞれの時間変化を示す。図5(b)に示す二度の刺激に対する応答、あるいは図6(a)の周波数20 Hzの連続刺激の場合には、ATP 活性化率の減少が急激なために、発生張力は急激な減少状態を示すことがわかる。図6(b)に示す周波数50 Hzの場合には、ほぼ一樣な張力を生じており、強縮状態の応答を示している。

図7(a), (b)には、興奮収縮連関の一連の実験によって得た発生張力応答に関して数値解析結果と比較して示す。図中の●印は与えた刺激を表し、興奮収縮連関張力応答の数値解析結果は実線、実験結果は破線で示す。数値解析ではサルコメア細胞単位の興奮収縮連関を考えたことになる。一方、実験においては筋全体の興奮収縮連関であり、筋膜、コネクチンなどのサルコメア以外の細胞組織の応答への影響がある。さらに、数値モデルではATPase 活性化率をそのままミ

(a) 周波数 20 Hz の連続刺激の場合

(b) 周波数 50 Hz の連続刺激の場合

図 6 周期刺激による興奮収縮連関の数値解析結果

オシン頭部 S1 の ATPase 発生数(100%の場合 20 個とした)としており、これには時間遅れの要素は考慮されていない。これらが原因で図 7(a)に示すような張力のピークに関する 1 けた近い時間の相違を示したと考える。さらには図 7(a) 2, 3, 4, 5 段の実験結果にあるような張力の重畳効果の影響を考慮した定式化を行っていないために相違が生じていることがわかる。今後は実験結果を基に式(3)に時間効果を導入すること、および重畳効果を表すためにミオシン頭部 S1 の ATPase 活性発生数およびその時間変化を表す関係式の提案が必要と考える。強縮張力の絶対値の比較は容易でないが、文献(2)によると、ウサギ腰筋の場合

サルコメアは単位面積当たり 2.5×10^{14} 本程度とされている。カエルも同程度と考えると、直径 4 mm の半腱筋には約 3×10^8 本のサルコメアがあり、1 本のサルコメアに生じる強縮時の張力は約 6×10^{-10} N である。数値解析結果では約 1.3×10^{-9} N となっており、2 倍程度の相違を示している。この絶対量の相違は著者が提案したアクトミオシン系の現象論的分子ポテンシャル理論に基づく数値モデルにおいて採用したパラメータの不確定に起因するものと考えられる。しかし、数ナノメータ(nm)の分子レベルの実験観察から構築したモデルであることを考えると本数値モデルは評価に値するものと考えられる。

(a) 単収縮および2回刺激の場合

(b) 一定周波数による連続刺激の場合

図 7 興奮収縮連関における発生張力に関する実験および数値解析結果の比較

5. 結 言

数値解析結果と実験との比較では張力の絶対値および応答の時間遅れに関して相違が見られた。これらは、実験で用いた半腱筋とのサイズの相違、力学および生化学過程モデルの不完全さに起因すると考えられる。著者らはタンパク質工学における分子動力学法などの実体論的解析手法を用いるのではなく、あくまでも実験観察を基にアクトミオシン系での生化学反応プロセスおよび分子ポテンシャル場を定義する現象論的解析手法を採用している。今後、ミクロレベルでの実験計測技術が進歩することで、これらの数値モデルはより正確になり、マクロな運動との相違が改善され则认为る。本研究では、アクトミオシン系の滑り運動を素過程とする生体材料の能動的な収縮運動力学系のモデルとして、有意な数値解析結果を得たものとする。

研究を進めるにあたり有益な助言と助力をいただいた鈴鹿工業高等専門学校・田村陽次郎博士、伊藤裕朗氏および実験データを提供いただいた神戸大学・赤沢堅造博士に感謝する。さらに、本研究の一部は平成5年度文部省科学研究費補助金〔重点領域研究(2)：No. 05221223〕の支援を受けたものであり、ここに感謝の意を表する。

文 献

- (1) Sandow, A., *Yale J. Biol. Med.*, **25**(1952), 176.
- (2) 酒井・遠藤・杉田編, 筋の構造と機能, (1977), 164-248, 医学書院.
- (3) 富田・杉編, 新生理科学大系 4 筋肉の生理学, (1988), 250-416, 医学書院.
- (4) Huxley, A. F., Muscle structure and theories of contraction, *Prog. Biophys. Biophys. Chem.*, **7**(1957), 255.
- (5) Akazawa, K., ほか 3 名, *Japan J. Physiol.*, **26**(1976), 9-28.
- (6) Ashley, C. C., Mulligan, I. and Lea, T., *Quarterly Rev. of Biophysics*, **24**-1(1991), 1.
- (7) Ebashi, S., *Annu. Rev. Physiol.*, **53**(1991), 1.
- (8) 鈴木, 機誌, **97**-902(1994), 48.
- (9) Mitsui, T. and Oshima, H., *J. Musc. Res. Cell Motility*, **9**(1988), 52.
- (10) 仲町・廣川・田村, 機論, **58**-551, A(1992), 91.
- (11) Tamura, Y., ほか 4 名, *Nature*, **299**(1982), 631.
- (12) Hatta, I., Sugi, H. and Tamura, Y., *J. Physiol.*, **403**(1988), 193.
- (13) Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, M., *Nature*, **228**(1970), 34.
- (14) Endo, M., *Physiol. Rev.* **57**(1977), 77.
- (15) Ebashi, S., Maruyama, K. and Endo, M., *Muscle Contraction*, (1980), 33-187, Japan Scientific Societies Press.
- (16) Kohama, K., *Calcium Inhibition*, (1992), 167-200, Japan Scientific Societies Press.
- (17) Potter, J. D. and Gerbely, J., *J. Biol. Chem.*, **250**(1975), 4628.
- (18) Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., *J. Physiol.*, **117**(1952), 500.
- (19) Taylor, S. R., Rudel, R. and Blinks, J. R., *Federation Proc.*, **34**(1975), 1379-1381.