

## 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・体力医学  
 講師：山澤徳志子 生理学・薬理学

### 教育・研究概要

#### I. 骨格筋線維内機能水の相転移にもなう熱測定

骨格筋線維内には少なくとも5つの状態が異なる水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法、核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究により明らかになっている。この水の違いは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はわかったが、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についてはいまだ明らかでない。これは NMR 法と MRI 法が、水集団アンサンブルの振る舞いをみる方法であり、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ことが、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、示差走査熱量測定 (DSC) 法を用いて水集団の分子間相互作用を評価した。この DSC 法は温度変化に伴う比熱変化、つまり水が水に融けるような相転移の検出に優れており、その温度変化で形成/崩壊する分子間相互作用を熱エネルギーとして検出することができる。

昨年度の研究により骨格筋細胞では昇温時に  $-10^{\circ}\text{C}$  以下で融ける氷の融解ピークが少なくとも2種類あることがわかったが、それらがどの水集団の構造に起因するものかは不明だった。そこで今年度は骨格筋細胞内の太いフィラメントの有無により  $-10^{\circ}\text{C}$  以下で融ける水成分のピークが変化するかを調べた。

カエル骨格筋のスキンドファイバー (細胞膜除去筋線維) で太いフィラメントを除去すると  $-10^{\circ}\text{C}$  以下の融解ピークの2つのピークのうち、高温側のピークでは変化があったのに対して低温側のピークでは変化がほぼみられなかった。これにより低温側のピークは細いフィラメントに起因して水状態が形成されていることが推測される。平均比熱の変化として  $-80^{\circ}\text{C}$  から  $20^{\circ}\text{C}$  まで昇温する際に必要だった熱エネルギーを見積もると太いフィラメントの有無では変化がなく、骨格筋細胞内の熱溜としての役割は細いフィラメントが関与していることが示唆された。

#### II. 骨格筋線維内機能水の粘弾性測定

これまでに、Initium 社と共同で QCM (水晶発振子マイクロバランス測定) 法を用いてミオシンタンパク質とその周囲の水との相互作用の性質を測定し、ミオシン周囲の粘性の高い水の量は硬直状態ではタンパク質自体の6倍近くにもものぼることを明らかにした。また、ミオシンによる ATP 加水分解反応の反応中間体の一つである  $\text{M} \cdot \text{ATP}$  状態を反映する  $\text{ATP}_{\gamma}\text{S}$  結合状態ではミオシンによる水の束縛量はほとんど変化しないが、他の中間体である  $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$  と  $\text{M} \cdot \text{ADP}$  では、その束縛量は半分に減少することも明らかになった。そこで本年度は、ミオシンフィラメント溶液の NMR 緩和経過測定を行い、QCM 法による結果との比較を試みた。多くのミオシンが中間体  $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$  の状態であると思われる弛緩液中では、硬直液中と比べ、ミオシンフィラメントによる水の束縛の程度は減少し、またその束縛量は QCM の測定と同程度であることがわかった。

#### III. 除アクチンフィラメント中のミオシン構造変化

骨格筋収縮反応の主役であるミオシン頭部 (M) は ATP 加水分解の自由エネルギーをいったん  $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$  の形で堰き止めた後、アクチン (A) 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中で ATP 加水分解反応中間体の X 線回折像の違いを BL6A にて取得し、ミオシンが ATP を加水分解する際の固有の構造変化を検出することを試みた。

ATP のミオシン頭部への結合によりミオシン構造の明らかな変化は見られなかったが、続く加水分解によりミオシン頭部の重心がロッドに近づき、ミオシンがコンパクトな構造になったことが示された。加水分解後のリン酸の放出により ( $\text{ADP}$  結合状態) ミオシン頭部の重心は再びロッドから遠ざかり、 $\text{ADP}$  放出によっても大きな変化は起こらなかった。核磁気共鳴法で調べた水プロトン横緩和経過から、ATP 結合・加水分解により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ていることとあわせて、ミオシンは ATP 加水分解による自由エネルギーを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た後に収縮反応に利用するものと考えられる。

#### IV. 心室細胞のカルシウム応答に対する細胞増殖因子ポリアミンの効果

ポリアミンは全ての生物に必須な細胞増殖因子で、核酸等に作用して細胞増殖を促す一方、膜電気現象に関与する生理的に重要なイオンチャンネルに対する修飾作用を併せもつ。運動負荷に誘発されたラット肥大心の心筋細胞でポリアミン濃度が上昇することが報告されているが、ポリアミン濃度の上昇が心筋細胞の興奮やカルシウム動態にどのように関与するかは解明されていない。そこで、ポリアミン濃度の上昇が心室細胞の興奮現象やカルシウム動態に与える影響をラット新生仔の心臓から調整した培養心室細胞および単離心室筋細胞で調べた。細胞内カルシウム濃度変化は心室細胞に蛍光カルシウム指示薬を導入し、顕微鏡で観察した。ポリアミンは培養心筋細胞の自発拍動に随伴するカルシウムトランジェントの頻度を濃度依存的に抑制した。また、スペルミンは非拍動性細胞のカルシウム振動を濃度依存性に誘発し、生体内でのポリアミン濃度の上昇が非拍動性細胞を活性化することにより心筋興奮に間接的に影響を与える可能性が示唆された。

#### V. コーヒーポリフェノールによる神経毒性に対する細胞保護作用の検証

脳梗塞、脳出血、クモ膜下出血を合わせた脳卒中は罹患率、および死亡率が高い3大生活習慣病（悪性新生物、脳血管疾患、心疾患）の1つである。近年の疫学的研究により、習慣的コーヒー摂取には脳卒中のリスクを低下させる効果があることが明らかにされた。しかしコーヒーにはカフェインやポリフェノール等多くの含有成分があり、どの成分が効果を示すのかについては言及されていない。ポリフェノールには、抗炎症、抗癌、抗酸化など様々な効果が報告され注目されている。脳虚血を起こしたマウスに赤ワインポリフェノール（レスベラトロール）を投与すると梗塞領域が縮小し神経症状が改善されるという報告があることからコーヒー摂取による脳卒中のリスクの軽減はコーヒーに多く含まれているポリフェノールであるクロロゲン酸による効果ではないかと考え、この仮説を検証した。脳虚血では、(1)グルタミン酸放出→(2)グルタミン酸受容体を介したカルシウム流入→(3)一酸化窒素合成酵素(NOS)の活性化による一酸化窒素(NO)の産生→(4)NOシグナルの活性化、の経路で神経細胞死が誘発されることが知られている。そこでマウス胎児大脳皮質の初代培養神経細胞にグルタミン酸及びNOによる神経細胞死を誘発して、クロロゲン酸の

効果を調べた。クロロゲン酸はNOによる神経細胞死には効果がなかったが、グルタミン酸による神経細胞死を有意に抑制した。これより、クロロゲン酸は脳虚血による神経細胞死のNO産生より下流の過程ではなく、NOが産生されるまでの過程に作用することが示唆された。次に、グルタミン酸刺激による細胞内カルシウム濃度上昇にクロロゲン酸が作用するかを蛍光カルシウム指示薬を用いて測定した。神経細胞死を引き起こすグルタミン酸により細胞内カルシウム濃度上昇が認められ、クロロゲン酸処理により抑制された。これらの結果からクロロゲン酸の神経細胞死に対する保護作用はグルタミン酸受容体を介したカルシウム流入を抑制することにより引き起こされることが明らかとなった。

#### 「点検・評価」

まず昨年度から継続して、骨格筋収縮と骨格筋細胞内機能水の状態水との関わりについて焦点を当てた研究を推進した。今年度はミオシンを選択的に除去した骨格筋標本でのDSC法による相転移現象の観察により、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以下で融ける2つの氷の融解ピークの中で太いフィラメントの有無で変化するものと、変化しないものの2つがあることを明らかにできた。しかし、これらの実験で用いたサンプルを生物学研究室・平塚理恵准教授の技術協力のもとで電子顕微鏡で確認すると太いフィラメントがなくなっている様子が観察されたが、SDS-PAGEで確認するとまだミオシンタンパクとしては残っていることが分かった。ミオシンタンパクがほぼ残っていないような状態まで処理したサンプルでのDSC測定は今後の検討課題である。さらに細いフィラメントをなくしたサンプルでの測定も行い、それぞれの氷の状態がどこに起因するかを明らかにしていく。加えて上記以外の融解温度の異なる水の局在の解析に有効な方法についての検討も行っていく。

また、アクトミオシンによるATP加水分解反応の素過程と水構造の変化の関連についての研究では、以前測定を行ったNMR（核磁気共鳴法）を用いた水プロトンの緩和経過測定では筋原線維懸濁液を用いていたため束縛している水の量についてQCMによる結果との直接の比較は難しかったが、本年度はミオシンフィラメント溶液を用いた測定を行ったことによりNMRとQCMの結果がよく整合することが明らかになった。今後は更に、ミオシンの他の中間体での水束縛量の測定を継続していくとともに、X線回折法によるミオシン頭部の構造変化と水構造変化の関係も追及していく。

一方、興奮性細胞に対する生理活性物質の効果を評価する研究では、神経細胞でクロロゲン酸がグルタミン酸によるカルシウム流入を抑制していることを明らかにできた。この効果は、近年承認されたアルツハイマー治療薬（商品名メマリー）と作用点が同じである可能性があるため、アルツハイマー型痴呆や脳血管性痴呆の治療薬への利用の可能性が期待できる。また、クロロゲン酸の抗酸化による神経保護作用も報告されている。脳梗塞では脳虚血が起こるとその中心部分の細胞死を起こす壊死巣部と、その辺縁部の機能不全であるが壊死に至っていない虚血部位（ペナンブラ）ができる。虚血が持続するとペナンブラは壊死巣へと移行する。ペナンブラの修復が脳梗塞治療のターゲットとして重要になるが、いまだペナンブラの病態は詳細に解明されていない。今後は、血栓塞栓モデルマウスを用いて、脳梗塞直後から梗塞壊死に移行するまでをMRIを用いて解析する。マウスにコーヒーポリフェノールであるクロロゲン酸を投与することにより、ペナンブラから壊死巣への移行を抑制できるかを動物個体レベルで検討したい。

分子細胞生物学講座との共同研究で行った細胞増殖必須因子ポリアミンの心筋細胞に対する効果の測定では、ポリアミンが心室細胞の性質に複数の影響を及ぼすことを明らかにできた。今後はポリアミンがこれらの現象を引き起こす機序と実際に個体レベルで心肥大を起こしたときに興奮収縮連関の異常が引き起こされる可能性について検討していきたい。

## 研究業績

### Ⅲ. 学会発表

- 1) 竹森 重. 上書きを繰り返す中枢神経系の構築. 2014年度人工知能学会全国大会（第28回）. 松山, 5月.
- 2) Takemori S. The world and the charm of skinned fibers. 第22回日本運動生理学会大会. 倉敷, 7月. [Adv Exerc Sports Physiol 2014; 20(4): 76]
- 3) 中原直哉, 竹森 重. グリコーゲンが筋収縮に及ぼす影響. 第161回日本体力医学会関東地方会. 坂戸, 7月. [体力科学 2014; 63(6): 741]
- 4) Yamazawa T, Murayama T<sup>1)</sup>, Oyamada H<sup>2)</sup>, Suzuki J<sup>3)</sup>, Kanemaru K<sup>3)</sup>, Kurebayashi N<sup>1)</sup>, Oguchi K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Showa Univ), Sakurai T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ), Takemori S, Iino M<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Univ of Tokyo). Functional analysis of ryanodine receptor carrying malignant hyperthermia associated mutations. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014). Cape Town, July.
- 5) 大野哲生, 我妻美千留<sup>1)</sup>, 市橋素子<sup>1)</sup>, 伊藤 敦<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>アルバック). 金電極へのミオシン吸着過程の粘弾性解析. 第8回 QCM 研究会: QCM による分子間相互作用の測定. 東京, 8月.
- 6) 竹森 重. 体育授業に用いられるアナログンの加速度計を用いた動作解析. 日本武道学会第47回大会. 福山, 9月. [武道学研究 2014; 47(別冊): 92]
- 7) 中原直哉, 竹森 重. グリコーゲンは骨格筋収縮に有利か不利か. 第69回日本体力医学会大会. 長崎, 9月. [体力科学 2014; 63(6): 571]
- 8) 玉川奈津子(ノイエス), 竹森 重. 姿勢が悪いと茶道のパフォーマンスが低下するのは何故か. 第69回日本体力医学会大会. 長崎, 9月. [体力科学 2014; 63(6): 695]
- 9) 渡邊由陽<sup>1)</sup>, 田中陽子<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>成城大), 竹森 重, 中原直哉, 巽 申直<sup>2)</sup>, 上田純也<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>茨城大). 剣道の加速度計を用いた打撃インパクト後の動作解析. 第69回日本体力医学会大会. 長崎, 9月. [体力科学 2014; 63(6): 695]
- 10) 山口真紀, 山澤徳志子, 高木邦彰, 池田道明, 大城戸真喜子, 竹森 重. ポリアミン蓄積はスポーツ心臓の不整脈の誘因か? -培養細胞での検討. 第69回日本体力医学会大会. 長崎, 9月. [体力科学 2014; 63(6): 584]
- 11) Yamazawa T, Murayama T<sup>1)</sup>, Oyamada H (Showa Univ), Suzuki J<sup>2)</sup>, Kurebayashi N<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ), Kanemura K<sup>2)</sup>, Yamaguchi M, Takemori S, Iino M<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Univ of Tokyo). Functional mutations in N-terminal region of type 1 ryanodine receptor in malignant hyperthermia. 第52回日本生物物理学会年会 (BSJ2014). 札幌, 9月. [生物物理 2014; 54(Suppl.1-2): S245]
- 12) Ohno T, Yamaguchi M. Spin-spin relaxation of <sup>1</sup>H NMR signals from myosin filaments suspension with or without ATP. 第52回日本生物物理学会年会 (BSJ2014). 札幌, 9月. [生物物理 2014; 54(Suppl.1-2): S164]
- 13) 栗原 貴, 中原直哉, 山口真紀, 竹森 重. 固視微動をする外眼筋の超分子構造と収縮特性. 第131回成恵医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2014; 129(6): 200-1]
- 14) 山口真紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 山内秀樹, 高木邦彰, 吉岡 悠, 松藤千弥, 竹森 重. ポリアミン蓄積はスポーツ心臓の不整脈の誘因か? 培養細胞とアンチザイムノックアウトマウスでの検討. 第163回日本体力医学会関東地方会. 東京, 2月. [体力科学 2015; 64(3): 373-4]
- 15) Nakahara N, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ),

Takemori S. Interaction between supramolecular organization of sarcomeric proteins and myowater revealed with heat denaturation. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会／第92回日本生理学会大会合同大会. 神戸, 3月. [J Physiol Sci 2015; 65(Suppl.1) : S189]

- 16) Yamaguchi M, Nakahara N, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ), Ohno T, Yamauchi H, Suzuki T, Kurihara T, Takemori S. Structural change of myosin head in skeletal muscle fiber without thin filament. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会／第92回日本生理学会大会合同大会. 神戸, 3月. [J Physiol Sci 2015; 65(Suppl.1) : S133]
- 17) Yamazawa T. Nitric oxide-induced calcium release in central neurons. 第88回日本薬理学会年会. 名古屋, 3月. [J Pharmacol Sci 2015; 128(3 Suppl.): S58]
- 18) Ohno T, Yamazawa T. Spin-spin relaxation of <sup>1</sup>H NMR signals from myosin filaments suspension with or without ATP. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会／第92回日本生理学会大会合同大会. 神戸, 3月. [J Physiol Sci 2015; 65(Suppl.1) : S192]
- 19) Yamazawa T, Mikami Y (Univ of Tokyo). Coffee polyphenol chlorogenic acid protects neurons against glutamate neurotoxicity. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会／第92回日本生理学会大会合同大会. 神戸, 3月. [J Physiol Sci 2015; 65(Suppl.1) : S286]
- 20) Yamaguchi M, Nakahara N, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ), Ohno T, Yamauchi H, Suzuki T, Kurihara T, Takemori S. Structural change of myosin head in skeletal muscle fiber without thin filament. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会／第92回日本生理学会大会合同大会. 神戸, 3月. [J Physiol Sci 2015; 65(Suppl.1) : S133]

## 細胞生理学講座

教授：南沢 享 循環生理・病態学  
 准教授：福田 紀男 筋生理学  
 講師：草刈洋一郎 筋病態学

### 教育・研究概要

#### I. 教育概要

2014年度に本講座は以下の課目を担当した。

医学科：基礎医学Ⅱ（循環器ユニット・泌尿器ユニット）、機能系実習（生理学実習）、症候学演習、感染・免疫チュートリアル、研究室配属、英語論文抄読演習、選択実習

看護学科：解剖生理学Ⅲ

看護専門学校（慈恵看護専門学校）：解剖生理学講義

#### II. 研究概要

##### 1. 大血管の発生と機能獲得・維持の機序解明

###### 1) 動脈管閉鎖機序の解明

動脈管は肺動脈から大動脈へ血液をバイパスする胎生期特有の大血管である。我々は動脈管が生後に閉鎖する機序、特に血管の構造変化をきたす分子機序について、ラット胎仔、ニワトリ胚、ヒト標本を用いて検討した。プロスタグランジンEの特異的受容体のひとつEP4を介するシグナルが動脈管弾性線維低形成を起し、動脈管が弾性血管から筋性血管へと構造変化をすることを明らかにした。そのシグナル経路は従来知られていたPKAを介するものではなく、PLCを介して lysyl oxidase (LOX) の蛋白分解を促進することを見出した。また、血管収縮因子 thromboxane A2は動脈管をより選択的に収縮させ、かつ血管リモデリングを促進することを明らかにした。さらに先天的に動脈管閉存症を生じる Brown-Norway ラットの新生児から動脈管組織を抽出し、対照ラット動脈管との網羅的遺伝子解析を行った。その結果、Brown-Norway ラット動脈管に特徴的な70以上の遺伝子を見出すことが出来た。

###### 2) 大動脈弾性線維形成・維持の機序解明

大動脈は弾性を有することで、末梢組織まで一定量の血液を送ることが可能であり、弾性線維の劣化は動脈硬化や大動脈瘤などの疾病を生じる。我々は細胞積層化技術を使って、平滑筋細胞層を積層化し、3次元下で弾性線維形成を検討する実験系を確立し