

IV. 著 書

- 1) 橋本尚詞, 石川 博. 抗がん剤感受性試験. 安田 允編著. よくわかる卵巣癌のすべて. 大阪: 永井書店, 2007. p. 344-54.

生 理 学 講 座 第 1

教 授: 馬 詰 良 樹 筋生理学・体力医学
講 師: 竹 森 重 筋生理学・体力医学

研 究 概 要

I. 横紋筋スキンドファイバーのフィラメント格子動態の再検討

骨格筋, 心筋の筋原線維筋節は主としてアクチンから構成される細いアクチンフィラメントとミオシンから構成される太いミオシンフィラメントからなるが, この両フィラメントは弾性コネクチンフィラメントによって筋原線維長方向に連結されながら, 太さ方向には美しい液晶様格子構造をとっている。この規則配列構造は, 収縮性相互作用の主体となるアクチンとミオシンの相互作用を, 相互の位置関係を均一にして変調することに合目的な意義があると考えられる。このためこの格子構造の安定性と動態を調べている。

ゲルゾリン処理はこの格子構造から細いアクチンフィラメントだけを選択的に除去するものであり, 筋細胞膜を除去した名取のスキンドファイバーから, さらに細いアクチンフィラメントを除去することを試みたところ, 太いミオシンフィラメントが作る格子構造をほぼ完全に維持したまま, 細いアクチンフィラメントのみを除去することができた。そこでこのゲルゾリン処理スキンドファイバーを用いて, 筋節を伸展したときの筋フィラメント格子間隔の動態を高輝度放射光施設 SPring8 の放射光を用いて固定処理なしに経時観測した。筋節の長さはレーザ光回折法によりモニタし, 弾性コネクチンフィラメントが発生する静止張力は張力トランスデューサで同時モニタした。

その結果, アクチンとミオシンの相互作用のない状態において, 骨格筋の白筋および赤筋, 心筋のいずれの標本においても, 先に研究室が提唱していた Y 字型弾性コネクチンフィラメントによる筋フィラメント圧搾では説明できない筋フィラメント格子間隔動態が筋節伸展に伴って観測された。このフィラメント格子間隔動態は, 静電反発力とファンデアワールス力による DLVO 説でも説明がつかない変化であり, これまでに提唱されていない新たなメカニズムを提唱するべく, NMR によるフィラメント格子内の水動態解析の結果と併せて検討を進めている。

なお, この研究は川崎医療大学医学部の奥山博司

博士、豊田弘子博士, SPring8 の八木直人博士との共同研究である。

II. 変異心筋トロポニン T の分子動力学解析

家族性肥大型心筋症をひきおこすトロポニン T のアミノ酸変異体のうち、244GLU → ASP および 247LYS → ARG の変異体はカルシウム感受性の増大をひき起こす。この機能変化の原因となる構造因子を分子動力学シミュレーションにより検索した。計算にはソフトウェア「アンバー」を用い、X 線結晶構造解析により解かれたトロポニン C I T 複合体(部分)の座標に変異を導入したモデル構造を、定温 (310 K) 条件下で野生型のもとと比較した。

変異型では主鎖の構造には大きな変化は認められなかったが、野生型でトロポニン I・T サブユニット間のコイルドコイル構造の形成に参与していた静電結合が変異型では失われることがわかった。また、両トロポニン I 末端に収縮状態でのサブユニット間相互作用を模倣する力を加えたところ、変異型と野生型であまり大きな違いがなかったのに対して、弛緩状態を模倣する力を加えたところ、変異型では野生型に比べてトロポニン T 両端に惹起されるゆがみがより小さかった。

このことから、変異型ではコイルドコイル構造が力学的に脆弱になった結果、弛緩時にトロポニン T にひきおこされる構造変化が小さく、抑制がうまく働かないことが収縮力増強の原因となる可能性が考えられる。

III. 咬筋ミオシンの化学状態の特定

昨年までの X 線回折実験の結果から、犬咬筋ではミオシンの化学状態が ATP 結合状態に偏っており、これが咬筋線維の大きな力の源ではないかということが示唆された。これを確かめるために、犬咬筋からミオシンを精製し、この精製ミオシンに ATP を混合したときの ATP 分解時間経過からミオシンの化学状態を推測した。ATP の分解活性はマラカイトグリーン法により見積もった。ATP 分解活性は混合初期は低値を示し、その後一定の傾きをもって変化した。この活性プロファイルを Y 軸方向に外挿して「初期リン酸放出量」を求めると通常の速筋型ミオシンでの 0.7 前後の値に比べて、0.1 前後の小さな値を示した。この値を 1 からひいたものが「ATP 結合状態のミオシンの比率」を反映するので、咬筋ミオシンでは通常の速筋ミオシンに比べて ATP 結合状態のミオシンの比率が高いことが示唆された。

IV. 筋原線維懸濁液の比重測定

筋節内にポリエチレングリコール (PEG) が浸透するかどうかを知るために、筋原線維懸濁液の比重測定を行った。

筋原線維内部に高比重のポリエチレングリコールが浸透しない場合は、浸透する場合より上澄みのポリエチレングリコール濃度が高くなるため、筋原線維懸濁液を遠心分離した際の上澄の比重が大きくなる。逆に沈殿の比重は、筋節内にポリエチレングリコールが浸透しない分、小さくなる。

20%PEG 溶液で測定を行った結果、筋原線維内部に PEG は浸透していない可能性のあることが示唆された。

V. トレハロースがカエル骨格筋スキンドファイバー活性張力に及ぼす効果

トレハロースは自然界の動植物に広く含まれている糖類の一種で、エネルギー源になる他に、過酷なストレス下 (高・低温, 乾燥, 脱水) でのタンパク質や細胞膜の保護作用を持つとされる。この保護作用機序には水との関わりが期待されていることから、「水」という場で行われるタンパク質相互作用としての筋収縮にも、トレハロースが効果を持つだろう。この仮説のもとに、トレハロースが筋収縮能に与える効果を調べた。

ウシガエル縫工筋の細胞膜をピンセットで剥いでスキンドファイバーを作成し、0.5% トリトン X100 で内部膜系を破壊した後、筋節長を 2.4 μm に調節して標本とした。収縮能はカルシウム濃度を累加的に高めた人工細胞内液での収縮張力で調べた。0.5 M トレハロースあるいはスクロース存在下での収縮能および、両二糖類をあらかじめ浸透させた後一晩乾燥させ、乾燥ストレスを与えた後の収縮能に対する効果を調べた。

両二糖類ともにカルシウム感受性を約 0.4 ユニット低下させたが最大張力はトレハロースのみが 10% 増大させた。二糖類の浸透なしで乾燥ストレスを与えると最大張力が 70% 減少したが、二糖類を浸透させた場合は最大張力・感受性ともに変化なく維持された。オストワルト粘度計で測定した両二糖類入り人工細胞内液の粘度に相違はなかった。

カルシウム感受性や乾燥ストレスに対する効果は両二糖類が同等の効果をもっていただことにより、粘度に反映されるようなマクロな水状態変化の結果であると考えられる。一方トレハロースに特異的だった最大張力増大効果はトレハロースの特徴的な化学構造に由来すると考えられ、トレハロースとタンパ

ク質の直接的相互作用や水分子ダイナミクス減少効果との関連が期待される。

VI. ミオシン化学状態に対するマグネシウムの効果

溶液のマグネシウム濃度が低いとミオシン頭部は太いフィラメントから浮き上がりアクチン側へ変位するといわれている。この効果がミオシンの化学状態間の平衡を変調することに起因するかどうかを、無機リン酸およびそのアナログ物質であるフッ化アルミニウムの取り込み・放出速度を見積もることで評価した。無機リン酸およびフッ化アルミニウムの取り込み・放出速度はマグネシウム濃度によって変化しなかった。これより、アクチン存在下でのミオシン・ADP・リン酸結合中間体の比率はマグネシウム濃度に影響されないことが示唆された。

「点検・評価」

11月20日に永眠された名取禮二名誉学長が開発した骨格筋スキンドファイバーは、全機的に統合された生体機能の解明のために、安易な分解・分析に走ることなく細胞構造に瑕疵を与えることに対する畏れをもって臨んだ結果生まれたものだった。ゲルゾリン処理筋はこの考え方を発展させて、もう一段階分析に向かうことを意図したものである。筋節という構造に構築されて初めて発現する性質の起源をあきらかにするために、各筋組織の静止張力測定・X線回折による格子間隔測定・弾性コネクチン分子の一次構造解析らの手法によって千葉大学の木村澄子博士との共同研究を進めているが、さらに収縮張力測定との相関を調べる実験を急がねばならない。

咬筋ミオシンの化学状態に関する実験は、X線回折実験により示唆された結果の裏づけを得る意味での急務であった。これまでのところX線回折の結果と合致する結果が得られている。来年度は温度による平衡状態の違いについての実験を追加することで、より確実な結論を得たい。

分子動力学では心筋筋関連トロポニン変異体に関する結果が蓄積されてきた。今後は解析をさらに進め、拡張型・肥大型という病型の違いが分子の動的構造のどの部分に起因するかを明らかにしたい。

細胞内機能水動態に関しては、水素結合ネットワークを攪乱するとされ注目を集めているトレハロースおよびポリエチレングリコールに焦点をあて、筋収縮タンパク機能との関わりを前年度より継続して調べた。

溶液粘度の上昇そのものは筋収縮能を低下させる

という報告があるにも関わらず、トレハロースは筋線維の最大張力を増大させることが見出された。トレハロースが他の二糖類とは異なる水相互作用を持つことを念頭に、筋収縮変調作用の原因を探索していくつもりである。

水ネットワークに関する分子動力学計算はあまり進捗がなかった。計算化学系の専門家との共同研究も視野にいれて、来年度は力を入れたい。

研究業績

III. 学会発表

- 1) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M. Crowding problem in skinned muscle: muscle compression with organic solutes of small molecular weight. 第83回日本生理学会大会. 前橋, 3月. [J Physiol Sci 2006; 56(Suppl): S78]
- 2) Kimura M, Kimura S (千葉大), Takemori S. Passive tension of cardiac and skeletal muscle with a reference to the domain structure of connectin. 第83回日本生理学会大会. 前橋, 3月. [J Physiol Sci 2006; 56(Suppl): S146]
- 3) Yamaguchi M, Otsuka Y. Molecular dynamics study on mutant troponin related to cardiomyopathy. 第83回日本生理学会大会. 前橋, 3月. [J Physiol Sci 2006; 56(Suppl): S147]
- 4) 山口真紀, 木村雅子, 大野哲生, 竹森 重, 馬詰良樹, Hoh J (シドニー大), 八木直人 (SPring-8). Superfast myosin の構造解析. 第48回歯科基礎医学学会. 横浜, 9月. [J Oral Biosci 2006; 48(Suppl): S55-2]
- 5) 渡邊由陽(成城大), 竹森 重, 巽 申直(茨城大). 剣道競技中の動作解析: 安価・軽量なモニタ装置を用いて. 日本武道学会第39回大会. 東京, 9月.
- 6) Kimura M, Kimura S (千葉大), Takemori S. Passive and active tension generation of striated muscles with reference to the domain structure of their connectin/titin. 日本生物物理学会第44回年会. 沖縄, 11月. [生物物理 2006; 46(Suppl): S203]
- 7) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T, Okuyama H¹⁾, Toyoda H¹⁾ (1)川崎大), Yagi N (SPring-8), Tanishima Y, Yamada T, Saitou K. Arrangement of myosin heads in intact and actin-extracted skinned myofibril bundles of striated muscle. 日本生物物理学会第44回年会. 沖縄, 11月. [生物物理 2006; 46(Suppl): S204]
- 8) Ohno T, Kimura M, Yamaguchi M, Takemori S. Spin-spin relaxation of ¹H-NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle. 日本生物物理学会第44回年会. 沖縄, 11月. [生物物理

2006; 46(Suppl) : S205]

- 9) Kimura S (千葉大), Kimura M, Takemori S. Primary structure of connectin and passive tension generation in striated muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S34]
- 10) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T, Okuyama H¹⁾, Toyoda H¹⁾ (川崎大), Tanishima Y, Yagi N (SPring-8). Transient of lattice shrinkage of thick filament lattice induced by sarcomere elongation of striated muscle. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S66]
- 11) Kimura M, Tanaka H (柴又駅前クリニック), Takemori S. Reconsideration of MRI images based on tissue water states resolved by ¹H-NMR. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S93]
- 12) Yamaguchi M, Otsuka Y. Structural change of mutant troponin related to hypertrophic cardiomyopathy. 第84回日本生理学会大会. 大阪, 3月. [J Physiol Sci 2007; 57(Suppl) : S93]

生理学講座第2

教授: 栗原 敏	心筋の興奮収縮連関 体力医学
客員教授: 大槻 磐男	トロポニンによる心筋の収縮制御
客員教授: 小西 真人	Mg ²⁺ の輸送
講師: 須田 憲男	骨格筋・心筋の興奮収縮連関, 副甲状腺細胞の生理
講師: 草刈洋一郎	心筋の興奮収縮連関

研究概要

I. 心筋の興奮収縮連関に関する研究

1) α_1 アドレナリン受容体のサブタイプによる L 型 Ca²⁺ 電流の調節に関する研究

我々は、 α_1 アドレナリン受容体刺激により L 型 Ca²⁺ 電流が二相性変化(初期の一過性の低下に続く増加)を示すことを報告した。本年度は、 α_1 アドレナリン受容体サブタイプ(α_{1A} , α_{1B})の詳細な細胞膜上の局在と、サブタイプ選択的的刺激による L 型 Ca²⁺ 電流変化を誘起する細胞内情報伝達機序を調べた。 α_1 アドレナリン受容体刺激によって惹起される細胞内情報伝達系は、受容体サブタイプと受容体に結合している G タンパク質のレベルで2経路に分かれ、 α_{1A} と α_{1B} 受容体はそれぞれ異なる G タンパク質、G_{q/11} と G_o に結合していることを明らかにした。 α_{1A} 受容体刺激は、G_{q/11} を介してその下流の PKC, CaMKII を活性化し、Ca²⁺ 電流を増加させ、 α_{1B} 受容体刺激は G_o を介して直接 L 型 Ca²⁺ チャネルを抑制する。

2) マウス心室筋における筋小胞体 (SR) Ca²⁺ ハンドリングに関する研究

筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum; SR) は心筋細胞内 Ca²⁺ 濃度調節の中心的役割を担っている。心不全などの病態時には SR の Ca²⁺ 制御タンパクや微細構造に異常がみられることが報告されている。これまで SR 機能評価に用いてきたサポニン処理スキンド標本の、SR の Ca²⁺ 制御タンパク量と細胞構造をウェスタン免疫染色法と電子顕微鏡を用いて調べた。サポニン処理は細胞膜にのみ細孔を開けるが SR は無傷に保持されることを確認した。

SR の Ca²⁺ 放出, Ca²⁺ 取り込みに加えて, SR からの Ca²⁺ リークが病態と関係していることが指摘されている。我々は SR の Ca²⁺ ポンプ機能の変化が, Ca²⁺ 取り込みと SR からの Ca²⁺ リークに与える影響を検討した。Ca²⁺ ポンプ機能を変化させるた