

using chicken embryos. American Society of Nephrology, Renal Week 2008. Philadelphia, Nov.

- 8) Shono T, Ogura Noda A, Okabe M. Acquisition of a novel organ involved in regulation of calcium concentration in the blood during vertebrate evolution. CDB Symposium "Cis Sequence Regulation And Its Evolution". Kobe, Sept.
- 9) 岡部正隆. 温故知新, 可以為師矣? 第6回先端医科学へのアプローチ研究会. 水上, 9月.
- 10) Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct cells using chicken embryos. KIDSTEM Conference 2008. Liverpool, Sept.

分子生理学講座

教授: 馬詰 良樹 骨格筋生理学, 体力科学
准教授: 竹森 重 骨格筋生理学, 心筋生理学,
体力科学
講師: 山口 真紀 骨格筋生理学, 心筋生理学

教育・研究概要

I. 細胞内の水の状態が持つ水活量測定

MR画像の素となる細胞内の水の状態の違いが何を反映しているのかという疑問を出発点に、筋節という小さな構造の単純な繰り返しと看做せる骨格筋の中の水に着目して調べている。MR画像法の原理となる核磁気共鳴法で観測される水プロトン信号の横緩和時定数 T_2 によって筋細胞内の水は明確に成分分けできる。この各成分に対する組織、細胞構造からの束縛エネルギーを、直接測定により明らかにした。具体的には、NMR試料管内の湿度を調節して、気相中の水の活量との平衡を保ちながらスキンドファイバー内の水の活量を徐々に下げ、外気の水の自由エネルギーをどれだけ下げれば、各成分の水が外気に奪い取られるかを調べた。最も強く束縛されている水成分は kT オーダーのエネルギーを蓄え得ることが分かった。より束縛エネルギーの小さい水成分でも、水分子の数の多さを考えると大きなエネルギーになる。筋タンパクの収縮性相互作用における ATP 加水分解の自由エネルギーを一時預かる「熱だめ」として、筋肉内の水が大きな役割を担うという我々の仮説が裏付けられた。

II. 横紋筋伸展に伴うミオシン頭部の振る舞い

骨格筋・心筋は細いアクチンフィラメントの格子と太いミオシンフィラメントの格子が周期的に交互嵌合する筋節構造を持ち、低カルシウム条件のような低い活性化レベルでは、筋節の受動伸展は活性化レベルを増強して能動張力を増大させる作用 (stretch activation) がある。この作用は心筋の短い筋節長で顕著であり、Starling 自己調節能の基礎をなすものとされる。stretch activation のメカニズムとして、筋節伸展に伴う細いフィラメントと太いフィラメントの間隔 (格子間隔) の狭まりが一義的という仮説が有力視されているが、我々の測定では、心筋において収縮活性が大きく修飾される短いサルコメア長範囲では太いフィラメントと細いフィラメント間距離がさほど変化しない結果となる。そこで長さ方向のひずみがミオシン頭部の突出度合い

を変化させ収縮活性の修飾を誘起するという仮説を立て、サルコメア長変化に伴う骨格筋・心筋の X 線回折像を取得し仮説を検証した。骨格筋にはウサギ腸腰筋のグリセリン処理筋を用い、心筋にはラット心室筋から筋束を剥離し 0.5% トリトン X100 で一時間以上処理した除膜標本を用いた。長さ方向のひずみに対するミオシン頭部の内因的振る舞いを検出するために、一部の標本ではゲルブリン処理で細いフィラメントを除去した。取得した X 線回折像を 4 象限加算平均化した後、Matlab software を用いてミオシン頭部の突出度合いを反映する第一層線の解析を行った。アクチン除去標本ではアクチン由来の反射が消失・減少しているにもかかわらず第一層線の解析が可能な美しい標本を作製することに成功した。解析の結果、アクチン除去骨格筋標本では 1.9~3.0 ミクロンの範囲のサルコメア長変化に対してミオシン頭部の突出度合いはほとんど変化しなかった。しかし骨格筋に比してコネクチン/チチンの長さがずっと短い心筋では、サルコメア伸展に伴い、アクチン除去していない標本ではサルコメアの伸展に伴いミオシン頭部の突出度合いはほとんど変化しなかったが、アクチン除去標本では 2~2.55 ミクロンの範囲のサルコメア伸展に伴いミオシン頭部が突出する傾向が得られた。この結果は我々の仮説を支持するものであり引き続き解析を継続する予定である。

III. 家族性心筋症の原因となる変異トロポニンの構造回折

家族性心筋症の原因として注目されているトロポニンのアミノ酸変異のうち、トロポニンコア部分にあり肥大型心筋症の原因となる二種のトロポニン変異体 (Glu244Asp・Lys247Arg) は、心筋細胞の張力発生をカルシウム濃度によらず増大するという特徴をもつ。そこでこれらの変異トロポニンによる張力増大メカニズムを知るために分子動力学解析を行った結果、両変異体について変異アミノ酸近傍の静電相互作用の異常が検出され、更に Lys247Arg では、トロポニン I からトロポニン T への力の伝達が抑制されていることがわかった。これより、Lys247Arg では、変異部位周辺の局所的な静電結合の異常の結果、トロポニン I からトロポニン T への信号伝達が阻害され、トロポミオシンの平衡位置に異常がおこることが、収縮増強の一因であると予測された。これを踏まえて、今年度は遺伝子工学的に作成した変異トロポニン T を導入した心筋細胞の X 線回折像を取得し、分子動力学から導かれ

た予測を検証した。実験は高エネルギー研究所の放射光実験施設 (BL15A) にて行った。変異型を導入した心筋では野生型を導入した心筋よりも、① トロポニンの周期と構造を示すトロポニン反射には大きな違いはなく、② ミオシンの周期性を示すミオシン層線の強度が変異型では増大していた。ミオシン層線の強度は間接的にトロポミオシンの位置を反映することから、変異型ではトロポミオシンの平衡位置が異なることが示唆され、分子動力学の結果を支持した。

IV. 心筋症を惹き起こすミオシン変異体の分子動力学解析

家族性心筋症を惹き起こす原因として報告されているミオシン変異体の分子動力学解析を行い、疾患発症の分子メカニズムを探った。初期構造の異なる 4 例の計算の結果、ATP 加水分解部位に変異があるアミノ酸変異体では、ここから数 10 残基離れてミオシン構造を大きく変える「スイッチ領域」とよばれる部位の静電結合の様子に異常をきたしていることが示された。これより、この変異体では加水分解のキネティクスの変調ならびに構造・化学相関の乖離が起きていることが示唆された。

V. 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。

筋原線維懸濁液を遠心分離した後に上澄の比重を測定すると、筋原線維内部に高比重の PEG が浸透しない場合は浸透する場合より上澄みの PEG 濃度が高くなり比重は大きくなる。逆に沈殿の比重は、筋節内に PEG が浸透しない分小さくなる。

10%PEG, 10%エチレングリコール (EG), 10%グリセリン, 10%トレハロース溶液での測定により、グリセリンとトレハロースは筋原線維内部にほぼ同じ濃度で浸透しているのに対して、PEG と EG は筋原線維内部では外部に比べて半分以下の濃度になっていることが示唆された。また、両親媒性の性質を持つ DMSO 存在下では PEG と EG も筋原線維内部に良く拡散していることが示された。これらの結果は筋原線維近傍の水のポテンシャルが、大量に存在する溶液中の水のポテンシャルと異なる可能性を示唆するものであった。

VI. 運動競技中の身体各部の加速度測定による動作解析

運動競技における簡易で影の生じない動作解析を、身体各部に装着した加速度センサで行う手法を開発し、この手法を剣道とバドミントンで実用した。剣道の理想的な動きを力に直結する加速度測定が、ビデオ測定を超えた利点を発揮することが確認された。バドミントンでのジャンプスマッシュのタイミングを調べたところ、上級者は四肢の相反神経支配や頸反射の神経回路系を利用しながら、インパクトの瞬間までラケットにブレーキをかけない動きを見ることが分かった。剣道の稽古やバドミントンの練習において競技者自身の力の入れ具合を直接反映する加速度測定結果をすぐに本人にフィードバックすることが可能となった。(本研究は成城大学の渡辺由陽、田中陽子、茨城大学の巽 申直の各教授との共同研究である。)

「点検・評価」

細胞内機能水測定

MR 画像法や NMR 測定は空間分解能が低いのでそれだけで生体内の水状態の実体を特定するのは困難である。この困難の克服のために空間分解能の高い顕微ラマン分光法の筋標本への応用を進めている。原理的には筋節レベル以下の小さな領域からの測定が可能であるが、レーザ光によるアーティファクトが強く出るために、標本をスキャンしながらデータを筋節周期に同期させて取得する必要があることがわかった。このためのラマン分光装置の改良を、ラマン光のロスを減らすための光学系の改良とともに進めなければならない。また、細胞内の水の状態を再現する非生物モデル物質を検索することも、生体内の水状態の実体解明を推進するはずである。

筋伸展に伴うミオシン頭部の構造解析

心臓が血液充填によって拡張された度合いに応じた拍出力を発生する Starling 自己調節能として知られる stretch activation のメカニズムとして、筋節伸展に伴う細いフィラメントと太いフィラメントの間隔(格子間隔)の狭まりが一義的という仮説が有力視されている。我々は、心筋において stretch activation が顕著な短い筋節長範囲では格子間隔の狭まりがさほど変化しないという結果を基に、筋節伸展がミオシン頭部の突出度合いを変化させて収縮活性を修飾するという仮説をたて、X 線解析にて検証し、仮説を支持する結果が得られた。この成果は、改良を重ねた末、子午反射の解析が可能な美し

い心筋標本(アクチン除去標本を含め)を得られたことによる。stretch activation のメカニズムの解明は正常・異常心機能の基礎的理解を深めるという生理・医学的意義を持つ。この技術と解析方法の改良をもとに今後は心筋を含めた筋収縮メカニズムの解明に努める。

(全ての X 線回折実験は高輝度光科学研究センターの八木直人主任研究員との共同研究である。)

変異筋タンパクの構造解析

心筋症の原因となる変異筋タンパクが次々と報告されている。昨年度まではトロポニンの変異体に焦点を絞り分子動力学による解析をすすめてきたが、今年度は分子動力学の結果を実験的に検証するため、実際に変異タンパクを作成して(分子免疫学講座との共同研究) X 線回折実験を実行した。現段階では分子動力学の結果を間接的に支持する結果が得られている。来年度はより例数を増やし、分子動力学から予測された「トロポミオシンの平衡位置の異常」を直接検出することを目標とする。また、ミオシンの変異体についても分子動力学解析を開始し(研究室配属・中西智博君との共同研究)、興味深い結果が得られた。

筋原線維の比重測定

過去に報告した「筋原線維の硬直から弛緩に伴う水構造を起源とする吸熱反応」の実態に迫るため、筋原線維近傍の水構造の解明を行っている。今後は DMSO の濃度を変化させ、筋節内部への EG 分布の DMSO 濃度依存性を明確にすることに加え、この測定を弛緩液中で行うことにより硬直状態と弛緩状態での筋原線維近傍の水構造の相違を検索し、筋原線維近傍の水構造を模索していく予定である。加えて、過去に測定した筋原線維懸濁液中の水プロトン緩和経過と比重測定結果の比較検討もあわせ行う。

体力科学

加速度測定が、身体運動の微妙なタイミングをよく捉えることが確認され、その有用性が強く期待される。開発した加速度測定を現実の剣道稽古やバドミントンの練習に応用する予定であったが、本年度は実現しなかった。有用性を急ぎ確認したい。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kimura M, Takemori S. CH₂-units on (poly-)ethylene glycol radially dehydrate cytoplasm of resting skinned skeletal muscle. J Biochem 2008; 143(6): 841-7.

- 2) 渡邊由陽(成城大学), 竹森 重, 巽 甲直(茨城大学). 剣道動作に影響しない携帯型体温モニタ装置の開発: 体温測定の効果. 武道学研究 2008; 41(1): 17-23.

III. 学会発表

- 1) 渡邊由陽(成城大学), 巽 申直(茨城大学), 竹森 重. 加速度計を用いた剣道の対人的技能の動作解析. 日本武道学会第41回大会. 横浜, 8月. [武道学研究 2008; 41(別冊)]
- 2) 田中陽子(成城大学), 渡邊由陽(成城大学), 竹森 重. バドミントンシャトルコックの軌道予測に基づく身体運動能力: 加速度モニタを用いた軌道と速度別運動動作解析. 第63回日本体力医学会大会. 別府, 9月. [体力科学 2008; 57(6): 902]
- 3) 竹森 重, 川邊万佑子, 吉田志帆, 木村雅子. 脱水に伴う骨格筋と神経束組織内の水状態変化. 第125回成医会総会. 東京, 10月.
- 4) 竹森 重. MRIが拓いた医療と医学の世界. 2008 バリアンテクノロジーズジャパンリミテッド NMR ユーザーズミーティング. 東京, 10月.
- 5) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T. Contribution of water molecules in sarcomere structure of muscle. 日本生物物理学会第46回年会. 福岡, 12月. [生物物理 2008; 48(Suppl. 1): S17]
- 6) Kimura M, Takemori S, Yamaguchi M, Ohno T. Mechanism that links longitudinal strain in sarcomere of striated muscle to the submaximal activation level of actin-myosin interaction. 日本生物物理学会第46回年会. 福岡, 12月. [生物物理 2008; 48(Suppl. 1): S97]
- 7) Yamaguchi M, Otsuka Y, Ohto Y. Structural change of mutant troponin related to cardiomyopathy. 日本生物物理学会第46回年会. 福岡, 12月. [生物物理 2008; 48(Suppl. 1): S97]
- 8) 山口真紀, 木村雅子, 竹森 重, 大野哲生, 渡辺賢¹⁾, 湯本正寿¹⁾(東京医大), 八木直人(SPring-8/JASRI). トロポニン変異による家族性心筋症発症機序のシンクロトロン放射光回折による解明. 第26回PFシンポジウム. つくば, 3月.

V. その他

- 1) 馬詰良樹. 名取のスキンドファイバーと名取先生の思い出. 慈恵医大誌 2008; 123(5): 249-56.
- 2) 竹森 重. 名取禮二の挑戦: 名取がスキンドファイバー創製で乗り越えたもの. 慈恵医大誌 2008; 123(5): 271-88.

細胞生理学講座

教授:	栗原 敏	心筋の興奮収縮連関・体力医学
客員教授:	大槻 馨男	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
講師:	草刈洋一郎 <small>(米国, ハーバード大学に留学中)</small>	心筋の興奮収縮連関
講師:	福田 紀男	心筋・骨格筋の収縮制御の分子メカニズム

教育・研究概要

I. 心筋の興奮収縮連関に関する研究

1. β アドレナリン受容体刺激下で α_1 アドレナリン受容体を刺激した時の心筋L型Ca²⁺電流の細胞内調節機構に関する研究

α_1 アドレナリン受容体は, β アドレナリン受容体と共に, 生理的条件下および病態時にノルエピネフリンによって同時に刺激され, 心筋細胞機能を調節している。我々は, α_{1A} アドレナリン受容体刺激によって活性化されるPKCやCaMKIIがL型Ca²⁺チャネルを活性化し, Ca²⁺流入量(Ca²⁺電流)を上昇させるメカニズムを報告してきた。しかし, 心筋細胞における β 受容体刺激時のシグナルと α_1 受容体刺激時のシグナルのクロストークに関しては明らかにされていない。今年度は, β 受容体が刺激されている時に α_1 受容体を刺激した時のL型Ca²⁺電流の変化を誘起する細胞内調節機構の研究を行った。 β 受容体刺激下で, α_{1A} 受容体を刺激すると, Ca²⁺電流が抑制され, α_{1A} 受容体単独刺激効果とは正反対であることが分かった。また, α_{1A} 受容体刺激によって直接活性化されるチロシキナーゼが, β 受容体シグナルを受容体(あるいはG蛋白質)レベルで抑制し, Ca²⁺電流を減少することも明らかになった。

2. エンドセリン刺激による心筋L型Ca²⁺電流の細胞内調節機構に関する研究

エンドセリンは, 21のアミノ酸から構成される強力な血管収縮作用を有する生理活性物質(ペプチド)である。近年, このペプチドは心筋細胞に対する直接効果を有することも明らかにされた。エンドセリンは細胞内一過性Ca²⁺濃度の上昇を介した陽性変力作用を示すことが報告されているが, その効