

分子生理学講座

教授：竹森 重 筋生理学・生物物理学・体力医学

講師：山口 眞紀 筋生理学・生物物理学・体力医学

教育・研究概要

I. 肥大型心筋症の原因となる変異トロポニン導入筋の構造解析

家族性肥大型心筋症を惹き起こすトロポニン変異体の張力増大メカニズムを知るために、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、トロポニン変異が収縮シグナル伝達経路の下流のタンパク相互作用に与える影響を調べた。

標本には、界面活性剤で化学的に膜を取り除いた除膜筋線維に変異/野生型トロポニン T 溶液を 5 時間作用させて変異/野生型トロポニン T を導入したものをを用いた。測定は大型放射光施設 SPring8 BL45A で行った。

トロポニン・トロポミオシンの構造を反映するアクチン第二層線外側部の強度は、野生型では弛緩状態に比べて収縮状態で増強し、トロポニン・トロポミオシンが弛緩から収縮への遷移にともなってアクチン上でシフトすることが確かめられた。これに対して E244D 変異体および K247R を導入した筋では、どちらも弛緩状態での強度が野生型に比べて強く、収縮状態ではさらに強くなった。

このことから、肥大型心筋症の原因となる E244D, K247R 変異体では、弛緩状態ですでにトロポニン・トロポミオシンの構造が収縮状態に近づいており、収縮時には更に大きな構造変化が起こることがわかった。これらの変異は弛緩状態でもトロポニン・トロポミオシンを動きやすくするような構造変化を起こすことにより、収縮時に野生型より大きなトロポニン・トロポミオシンのシフトを惹起し、アクチンとミオシンの相互作用を増強することが張力増大の原因であることが示唆された。

II. 悪性高熱症におけるリアノジン受容体機能的変異の同定

骨格筋のカルシウム放出チャネルであるリアノジン受容体遺伝子の突然変異は種々の筋疾患を引き起こす。このうち悪性高熱症 (malignant hyperthermia, MH) はリアノジン受容体のカルシウム誘発性カルシウム放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release,

CICR) 活性の異常亢進により引き起こされると考えられている。悪性高熱症や関連疾患患者のリアノジン受容体遺伝子解析から 200 あまりの変異が報告されているが、実際の悪性高熱症との相関は不明な点が多い。そこで、悪性高熱症患者から報告されているリアノジン受容体遺伝子変異を野生型 (WT) のリアノジン受容体に導入して CICR 活性を細胞レベルで調べることにより機能的変異を明らかにすることを目的として実験を行った。具体的には、野生型リアノジン受容体から 10 種類の変異遺伝子を作成してヒト胎児由来腎臓細胞にトランスフェクションして、安定発現細胞株を作成した。CICR 活性はカルシウムイメージングにより解析した。10 種類の MH 変異のうち 6 種類の変異は WT に比べて活性の亢進を引き起こしたが、それ以外は WT と有意な差がなかった。また、WT に比べて静止時の Ca^{2+} 濃度が上昇する変異もあった。これより、MH 変異には CICR 活性が亢進する機能的変異と CICR 活性には影響を与えない変異があることが明らかになった。静止時の Ca^{2+} 濃度が上昇したことより、MH 変異がリアノジン受容体のチャネル構造に影響を与え小胞体からカルシウムが漏れやすくなっている可能性が示唆された。

III. 細胞内分画水の相転移にともなう熱測定

これまでの核磁気共鳴 (NMR) 法、核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究により、骨格筋線維内には少なくとも 5 つの水成分分画が区別されることが明らかになっている。この水成分分画が、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まで突き止めたが、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手法であり、同じ振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は、固有のエネルギー状態を持つ各水分画が凍るときに放出する凝固熱の大きさから、各水分画内での分子間相互作用の強さを推定する方法が有用である。そこで示差走査熱量測定法 (DSC 法) を用いて骨格筋細胞内の各水分画の相転移にともなう熱発生を測定することを目指し、実験を開始した。DSC 法では一般に水を水に融かしていく加熱過程で相転移現象を観察する。これは水をゆっくりと冷却し凍結するときには過冷却現象が起

き、純粋試料を扱う際にはこの現象が夾雑物の影響を強く受けることを嫌うからである。しかし、今後観測を行なっていく生体組織は元来夾雑物を含むものである上に、凍結による組織破壊で組織の生理状態が損なわれることも危惧される。そのため過冷却を避けるのではなく、過冷却を利用したDSC法で組織破壊の影響を受けない各水分画の相転移現象を観察する方法を採用した。本年度は生体組織での実験に必要な基礎データを得るために、純水での過冷却現象を観察した。-5℃/分から-0.05℃/分の冷却速度の範囲では冷却速度によらず約-20℃で凝固が開始することが確認された。

IV. 異なる脱水方法による筋線維の収縮張力変化

分子量から考えると筋フィラメント格子内に浸透可能なポリエチレングリコール (PEG) によりスキンドファイバー (除膜筋線維) が非浸透圧的に脱水されることが先行研究によりわかっている。このPEGによる脱水と筋フィラメント格子内に浸透できない高分子デキストラン (Mw500,000) による脱水が収縮張力変化に及ぼす影響を評価した。PEG (Mw900, 3350) 及びデキストランで脱水の程度を同一にしたスキンドファイバーを用意し、 Ca^{2+} - 張力関係を得た。その結果、25%までの脱水でデキストランは最大収縮力を増大させたのに対して、PEGは最大収縮力を低下させた。また、 Ca^{2+} 感受性に関してはデキストランではほぼ変化がなかったのに対して、PEGでは分子量に関わらず低下した。これらの結果からPEGとデキストランは収縮機能に関わる異なった水成分を除去することが示唆された。

V. 水晶発振子マイクロバランス法によるタンパク質束縛水の粘弾性測定

Initium社と共同で、水晶発振子マイクロバランス法 (QCM法) を用いてミオシンタンパク質とその周囲の水の粘弾性を測定した。タンパク質周囲には粘性が高い水の層が存在し、この層は硬直状態ではタンパク質自身の体積の6倍近い量に及ぶが、ATPの添加によりその量がタンパク質自身の体積の3倍程度に減少することがわかった。

これまでに行ったNMRによる筋原線維懸濁液の水プロトン緩和経過測定によると、硬直状態では筋原線維表面から500nmほどの距離に及ぶ範囲で存在する束縛水が、ATPの添加により大きく減少することが分かっており、QCM法により得られた結果と定性的に合致した。

VI. 膜電位感受性色素による骨格筋培養細胞の膜電位測定 (研究室配属テーマ)

プトレシンは筋肥大の際に増加する生体アミンであるポリアミンの一種で、核酸に対する増殖シグナル活性化効果の他に、内向き整流性カリウムチャネルを阻害することで、興奮性細胞の膜電位現象に影響を与え得ることが報告されている。しかし骨格筋細胞での実際の膜電位現象に対する効果はあまりよく調べられていない。そこで、培養骨格筋細胞C2C12に高カリウム刺激を与えた際の膜電位変化に対するプトレシンの効果を膜電位感受性色素Di-4-ANNEPSを用いて調べた。測定は共用実験施設に設置の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM FV900) を用いた。高カリウム刺激により、プトレシンを添加していない細胞では525nmの蛍光強度が増加したが1mMのプトレシン添加によりこの効果が抑えられた。これよりプトレシンは細胞増殖の際に骨格筋のカリウムチャネルを抑制して興奮収縮連関に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

「点検・評価」

1. 遺伝性筋疾患の分子病態解析

昨年度より引き続き、家族性肥大型心筋症の原因となる2種類の変異トロポニンを導入した筋線維の構造解析を行い、筋肥大をトリガするとされる心筋張力増大の直接原因が、トロポニンの変異によるトロポミオシンの過剰シフトである可能性を強く示唆するデータを得ることができた。また、悪性高熱症 (MH) については、疾患の原因として報告されている変異体10種類について細胞レベルで解析を行ったことにより、CICR活性が亢進している意味のある変異とそうでないものがあることを明らかにできた。そのメカニズムとしてリアノジン受容体のチャネル構造の変化が考えられるので、今後は分子動力学を用いた解析を加えるつもりである。また、静止時の Ca^{2+} 濃度が上昇したことより小胞体から Ca^{2+} が漏れやすくなっている可能性が考えられるので、小胞体内腔の Ca^{2+} 濃度を測定する実験系を確立し、この可能性を検証する。これらの方法によりCICR活性の異常亢進に関与しているリアノジン受容体の機能的変異を同定していくことで、悪性高熱発症を予測する低侵襲な検査の開発に繋げたい。

2. 細胞内機能水の特性と機能評価

NMR法で分画した組織水の性状を過冷却による凝固点の違いとして観察するための基礎実験として、本年度は示差走査熱量測定による純水の過冷却状態を評価し、ある範囲では冷却速度によらず凝固点

一定になることを確認した。これを溶液での測定や筋線維での測定に生かしていくことが次年度のテーマである。

異なる脱水方法により除膜筋線維の収縮張力特性に違いが見られたことは、除膜筋線維の収縮張力特性が水状態の違いによる生理機能変化の評価として有用である可能性を示した。水状態に対して摂動を与えた時の収縮張力特性と、DSC法やNMR法により測定した水状態変化を対応させることにより、細胞内の水分画がそれぞれどのような生理的意義を持っているかについての推測が可能となるかもしれない。今後はさらに複数の溶液で収縮特性変化を確認するとともに、DSC法やNMR法での同条件の測定も行っていく。

NMR法とQCM法によるタンパク周囲の束縛水測定結果の定量的な対応については次年度への持ち越しとなったが、現行の測定方法では双方で用いる標本が異なるため直接の比較は難しい。QCM装置では装置の特性上の理由から筋原線維標本での測定は不可能であることから、NMR測定をタンパク溶液で行うことを考えている。

3. 骨格筋培養細胞の膜電位測定

研究室配属のテーマとして行った骨格筋培養細胞の膜電位感受性色素を利用した膜電位測定では、筋肥大の際に増加するプトレシンによりカリウムチャネルの機能が抑制される様子をとらえることができた。この結果は筋肥大の際に興奮収縮連関が修飾される可能性を示しており、次年度以降も継続して測定を行うつもりである。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kakizawa S (Kyoto Univ), Yamazawa T, Iino M (Univ Tokyo). Nitric oxide-induced calcium release: Activation of type 1 ryanodine receptor by endogenous nitric oxide. *Channels (Austin)* 2013; 7(1): 1-5.
- 2) Yano F¹⁾, Saito T¹⁾, Ogata N¹⁾, Yamazawa T, Iino M¹⁾, Chung UI¹⁾, Kawaguchi H¹⁾ (Univ Tokyo). β -catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor. *Arthritis Rheum* 2013; 65(2): 429-35.
- 3) Takemori S, Kimura M. Structure and function of skeletal muscle and locomotive systems: Involvement of water-state transitions. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 2012; 1(1): 95-101.

- 4) 竹森 重. 【リンの栄養学】細胞内のリン リン酸と細胞機能. *腎と骨代謝* 2013; 26(1): 7-13.

III. 学会発表

- 1) 木村雅子, 竹森 重. The aspect of muscle training that is evaluated by magnetic resonance (MR) (MRによる筋トレーニング評価が見ているもの). 第20回日本運動生理学会大会. つくば, 7月. [*Adv Exer Sport Physiol* 2013; 18(4): 82]
- 2) 渡邊由陽 (成城大), 巽 申直 (茨城大), 岩瀬 学 (流通経済大), 竹森 重. 剣道における基本打ちと実践的な打ちの手の内の作用の比較. 日本武道学会創立45周年記念大会. 小金井, 9月. [*武道学研究* 2012; 45(別冊): 44]
- 3) 玉川奈津子 (ノイエス), 竹森 重. 茶道における動作の加速度測定を利用した動作修練補助法の検討. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜, 9月. [*体力科学* 2012; 61(6): 713]
- 4) 横溝駿矢 (東海大), 山内秀樹, 山口真紀, 木村雅子, 中原直哉, 大野哲生, 竹森 重. 骨格筋除神経後極早期に現れる骨格筋規則周期構造の乱れ. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜, 9月. [*体力科学* 2012; 61(6): 587]
- 5) 田中陽子¹⁾, 渡邊由陽¹⁾ (成城大), 竹森 重, 玉川奈津子 (ノイエス). バドミントン競技における加速度測定データを基にした技術指導の試み. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜, 9月. [*体力科学* 2012; 61(6): 718]
- 6) 木村雅子, 竹森 重, 横溝駿矢 (東海大), 木下一雄. MR横緩和と拡散強調を用いた深部筋トレーニング評価法の開発の試み. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜, 9月. [*体力科学* 2012; 61(6): 586.]
- 7) 渡辺 賢, 田口美香, 木村雅子, 竹森 重. 運動時における消化管運動抑制機構解明の試み. 第67回日本体力医学会大会. 岐阜, 9月. [*体力科学* 2012; 61(6): 585]
- 8) Takemori S. Multidimensional approaches to the secrets of life. 日本生物物理学会第50回年会. 名古屋, 9月. [*生物物理* 2012; 52(1): S29]
- 9) Takemori S, Kimura M, Yamaguchi M, Ohno T, Nakahara N, Yokomizo S (Tokai Univ). Stability of myofilament lattice in striated muscle sarcomere. 日本生物物理学会第50回年会. 名古屋, 9月. [*生物物理* 2012; 52(1): S53]
- 10) 竹森 重, 横溝駿矢 (東海大), 山内秀樹, 山口真紀, 中原直哉, 木村雅子, 渡辺 賢, 大野哲生, 石田行知 (文京学院大). 横紋筋節構造の安定性と廃用性萎縮. 第1回物構研サイエンスフェスタ. つくば, 3月.
- 11) 渡辺 賢, 石田行知 (文京学院大), 田口美香,

竹森 重, 中原直哉, 山口眞紀, 横溝駿矢 (東海大), 木村雅子. ミオシン阻害薬による平滑筋フィラメント配列の攪乱. 第1回物構研サイエンスフェスタ. つくば, 3月.

- 12) Yamaguchi M, Kimura M, Takemori S, Ohno T, Nakahara N, Yokomizo S (Tokai Univ), Yagi N (SPring-8). Mechanical and structural characteristics of cardiac muscle fibers with troponin-T mutant causing hypertrophic cardiomyopathy. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S123]
- 13) 大野哲生. ミオシンの金電極表面への吸着過程の粘弾性解析. 第6回 QCM 研究会. 東京, 8月.
- 14) Ohno T, Kimura M, Yamaguchi M, Takemori S. Spin-spin relaxation of ¹H NMR signals from myofibril suspension of rabbit skeletal muscle with or without ATP. 第90回日本生理学会大会. 東京, 3月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S274]
- 15) Yamazawa T, Oyamada H¹⁾, Maruyama T¹⁾, Nakano K¹⁾, Oguchi K¹⁾, Sakurai T¹⁾(¹Showa Univ), Iino M (Univ Tokyo), Takemori S. Exploration of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. 第86回日本薬理学会年会. 福岡, 3月. [J Pharmacol Sci 2013; 121(1): 152]
- 16) Yamazawa T, Oyamada H (Showa Univ), Maruyama T (Juntendo Univ), Iino M (Univ Tokyo), Takemori S. Identification of functional mutations of ryanodine receptor in malignant hyperthermia. 第90回日本生理学会大会. 東京, 2月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S200]
- 17) 山澤徳志子, 村山 尚 (順天堂大), 小山田英人 (昭和大), 飯野正光 (東京大), 竹森 重. 悪性高熱症におけるリアノジン受容体機能的変異の同定. 第129回成医会総会. 東京, 10月.
- 18) Nakahara N, Kimura M, Takemori S. Effects of polyethylene glycol on contactin in skinned skeletal muscle. 第90回日本生理学会大会. 東京, 2月. [J Physiol Sci 2013; 63(1): S275]
- 19) 山内秀樹, 竹森 重. ミオスタチンによる骨格筋代謝調節: 発育-運動モデルからの検証. 第129回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2012; 127(6): 252-3]
- 20) 山内秀樹, 竹田夕希, 鶴岡志乃, 湊久美子, 竹森 重. 運動負荷の骨密度増加作用に対する食事制限の影響. 第67回日本体力医学会. 岐阜, 9月. [体力科学 2012; 61(6): 59]

細胞生理学講座

教授: 南沢 享 循環生理・病態学

客員教授: 小西 真人 Mg²⁺の輸送

准教授: 福田 紀男 心筋・骨格筋の収縮制御の分子メカニズム

講師: 草刈洋一郎 心筋の興奮収縮連関

教育・研究概要

I. 教育概要

2012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, 研究室配属, 英語論文抄読演習

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. サルコメア収縮機構の解明

1) 拡張型心筋症マウス左室筋のスターリング効果

これまで当教室では, Frank-Starling の心臓法則の分子メカニズムの解明に努めてきた。本年度は, これまでの研究成果を更に発展させ, トロポニン T に変異 ($\Delta K210$) を持つノックイン (KI) モデルマウスの心筋を用い, 筋長効果におけるトロポニン T の関与を明らかにすることを試みた。KI マウス, ワイルドタイプ, それぞれのマウスの左心室から直径約 100 μ m の筋標本を切り出し, スキンド処理を行った試料を対象として, トロポニン複合体入れ替え実験や細いフィラメントの協同性に影響を及ぼす試薬を使った実験を行った。その結果, KI 標本では細いフィラメントの協同性が低下しているために伸展時にクロスブリッジ結合が抑制され, スターリング効果が減弱していることを明らかにした。

2) 小動物心臓における単一サルコメアのリアルタイムイメージング

心筋の収縮・弛緩の機序解明研究において, *in vivo* における心筋サルコメアの動的挙動の分子メカニズムは未だに明らかにされていない。我々は, *in vivo* 心臓において心筋局所のサルコメアの収縮動態を高い時間・空間分解能でリアルタイムイメージングできる技術を開発し, 生体内の心筋収縮・弛緩の分子メカニズムを解明することを試みた。先ず,