

- 4) 平崎裕二, 南沢 享, 岡部正隆. (一般口演: 肉眼解剖学 2-1) 三次元心エコーを用いた軟骨魚類心臓の形態解析. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 郡山, 3月.
- 5) 岡部正隆. (教育講演 1) 脊椎動物の上陸と呼吸器の進化. 第 39 回日本嚥下医学会ならびに学術講演会. 大阪, 2月.
- 6) Shigetani Y, Yano T, Okabe M. Morphogenesis of the lateral line neuromast in the primitive fish *Polypterus*. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年會・第 88 回日本生化学会大会合同大会). 神戸, 12月.
- 7) 岡部正隆. (ワークショップ: デジタル画像の処理・解析・保存) 色覚の多様性に配慮したバリアフリーなプレゼンテーション. 第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 枚方, 10月.
- 8) 宇野好宣<sup>1)</sup>, 西田千鶴子 (北海道大), 豊田 敦<sup>2)</sup>, 藤山秋佐夫<sup>2)</sup> (国立遺伝学研究所), 岡部正隆, 松田洋一<sup>1)</sup> (名古屋大). (一般講演: 3D 染色体の構造と動態・ゲノム構造・機能解析・遺伝統計) 古代魚の比較染色体マッピングによる脊椎動物のマикро染色体の進化過程の解析. 日本遺伝学会第 87 回大会. 仙台, 9月.
- 9) 辰巳徳史, 岡部正隆. 横隔膜発生における Wt1 陽性細胞の分布解析. 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8月.
- 10) 平崎裕二, 南沢 享, 岡部正隆. 超音波画像診断法 (心エコー) を用いた軟骨魚類心臓の形態・運動特性解析. 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting. 東京, 8月.

## 分子生理学講座

教授: 竹森 重 筋生理学・体力医学  
 准教授: 山口 真紀 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. 水の相転移からみた骨格筋線維内の水状態

骨格筋線維内には少なくとも状態が異なる 5 つの水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究で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が分かったが, 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つけることを許さないことによる。この難点を補うために, 示差走査熱量測定法 (DSC 法) を用いて骨格筋細胞内の各水分画の分子間相互作用の強さを推定した。DSC 法は温度変化に伴う比熱変化, つまり氷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。

一昨年度, 昨年度の研究により, 骨格筋線維では昇温時に  $-10^{\circ}\text{C}$  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, および太いフィラメントの除去により融解熱が変わりうることまではわかってきた。さらに実験を進めて今年度はゲルゾリンタンパクによる細いフィラメントの除去でこれらが変化するかどうかを調べた。

カエル骨格筋をゲルゾリンタンパクにより処理することで細いフィラメントをなくした。SDS-PAGE によりそれぞれのタンパク質を定量したところ, アクチン/ミオシンの割合として未処理のものに比べて 3 割程度まで減少した。DSC でみた  $-10^{\circ}\text{C}$  以下の 2 つの融解ピークのうち, 高温側は細いフィラメントを除去することで減少したのに対して, 低温側は細いフィラメントを除去することで増加した。また, 平均比熱として  $-80^{\circ}\text{C}$  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かったが, 細いフィラメントを除去することで減少した。つまり,

骨格筋細胞内の熱溜めとして細いフィラメントが強く関与していると考えられる。

## II. 核磁気共鳴法と水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法による水性状測定

NMR 法, QCM 法などを用いているいろいろな角度から筋タンパク質周囲に存在する水構造の測定を試みるとともに, アクトミオシンによる ATP 加水分解反応の素過程でこの水構造がどのように変化するかを測定し, 筋収縮と水構造の変化との関わりについて研究の焦点を当てている。これまでに Initium 社と共同で, QCM 装置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 倍近い量であることが分かった。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  $M \cdot ATP$  状態を反映する  $ATP \gamma S$  の添加による測定では水の束縛量はほとんど変化しなかったが, 他の中間体である  $M \cdot ADP \cdot Pi$  状態と  $M \cdot ADP$  状態では, その束縛量は半分に減少した。この結果を踏まえて, 今年度はミオシンフィラメント懸濁液の NMR 緩和経過を測定した。それぞれの中間体での状態ごとに測定を行った。QCM 法で得られた結果と同様に, 硬直液中と  $M \cdot ATP$  状態では多くの水を束縛し, 他の中間体  $M \cdot ADP \cdot Pi$  状態と  $M \cdot ADP$  状態では, その束縛量は半分に減少した。また, その束縛量は QCM 法での測定と同程度であった。今後は, より生体に近い構造を保っている筋原線維標本を用いて硬直以外の中間体での束縛量の測定を行っていくことを考えている。

## III. X 線回折法による外眼筋の微細構造解析

眼球運動を司る外眼筋は短縮速度が身体中の骨格筋の中で最速であり, また胎児型から外眼筋特有型までのありとあらゆるミオシンアイソフォームを発現していることが知られている。これらの特徴は眼球の素早い運動から対象物に視点をあわせる固視に至るまでの幅広い機能を担うために獲得した結果と考えられる。そこでこの外眼筋のユニークな機能の基盤となる構造的特徴を, X 線回折法を用いて探求した。外眼筋の X 線回折像は四肢筋 (腸腰筋) のものと比べて筋フィラメントのつくる格子の間隔やミオシン分子の周期性においてはほぼ一致していたが, ミオシン頭部とアクチンの相互作用の強さをあらかず赤道反射強度比に違いが見られた。外眼筋ミオシンとアクチンとの相互作用様式が異なることが特徴的な機能を実現する構造的基盤の一つであるこ

とが示唆された。

## 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, 膜興奮現象に関与する生理的に重要なイオンチャンネルを修飾する作用を併せもつ。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に与える影響をラット新生仔から調整した自発拍動性心室細胞および成熟ラットから調整した固有心室筋細胞で蛍光カルシウム指示薬を利用して調べた。

ポリアミンは自発拍動性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抑制した。また, 成熟ラットから単離した固有心室筋細胞では細胞内カルシウム濃度を増加させた。このとき一過性の電位変化は観察されたが細胞内カルシウム濃度に同期する膜電位変化は見られなかった。これらよりポリアミンは, 自動能を有する自発拍動性心筋細胞の興奮頻度に対しては抑制的に働き, 自動能を有さない固有心室筋細胞には細胞内カルシウム濃度を上げて張力増強の方向へ向ける作用を持つ可能性が示唆された。

## V. 大気圧電子顕微鏡による唾液分泌組織の観察

唾液腺の腺房細胞の萎縮等による分泌機能障害は口腔乾燥症 (ドライマウス) と呼ばれる病態を引き起こす。ドライマウスでは唾液の量が減少することで, 「口の渇き」だけでなく, 重症化すると, 嚥下や発声, 睡眠にも影響を与え, 直接的に生命予後には影響を与えないものの生活の質 (QOL) を著しく低下させる。ドライマウスを生じる代表的な疾患にはシェーグレン症候群があるが, この疾患に罹患する患者数が多いことも要因となり, ドライマウスに対する社会的な関心が近年高まっている。本研究では, ドライマウスモデル動物を用いて, 唾液腺組織の MRI を用いた組織形態の非侵襲的観察と障害部位の微細構造を光学・電子相関顕微鏡 (大気圧電子顕微鏡) により評価することで, 唾液腺組織の萎縮・損傷のパターンを形態学的側面から階層横断的に検出することを目的とした。高磁場 (9.4T) MRI 装置にクライオプローブを装着して約 2 倍相当の S/N 比にすることで, 100 $\mu$ m 以下の解像度で唾液

腺組織の損傷の程度を評価できる。この方法により野生型のマウスの顎下腺と舌下腺をMRI像で捉えることに成功した。続いて、唾液腺組織の形態を指標として評価するため、大気圧電子顕微鏡 (ASEM) の測定系の確立を試みた。これまでの電子顕微鏡は真空中で試料を観察するため、湿った試料や溶液中の試料を観察することはできなかった。これに対して大気圧電子顕微鏡は細胞・組織を乾燥させることなく大気圧下で直接観察できるという卓越した長所を持つ電子顕微鏡である。この利点により、同一視野の光学顕微鏡観察と、電子顕微鏡観察を交互に行うことができる。化学固定したマウス唾液腺組織をリンタンングステン酸で染色し、窒化シリコン (SiN) 薄膜越しに、水環境中での観察を実現した。シェーグレン症候群のモデルマウスの唾液腺組織中の分泌顆粒の微細形態は、野生型マウス唾液腺分泌顆粒の形態とは異なることが明らかになった。大気圧電子顕微鏡は、分泌顆粒の異常を検出する新たな方法になる可能性が示唆された。

#### 〔点検・評価〕

1. 骨格筋細胞内機能水に焦点を当てた研究では、まず昨年度行った骨格筋内の太いフィラメントを除去した標本での測定に続いて、細いフィラメントを除去した標本でのDSC測定を行った。それぞれの結果から各フィラメントの有無によりDSCで観察される $-10^{\circ}\text{C}$ 以下の氷の融解ピークが変わることが明らかとなった。しかしながら今回の実験で用いた処理条件はウサギではゲルゾリンによる細いフィラメントを1割程度まで除去できるのに対して、カエルでは3割程度とフィラメントの除去が不十分であった。骨格筋内の選択的フィラメント除去をさらに高効率に行うとともに、除去の程度を段階的に変えることで融解ピークの変化がフィラメント量依存的に変化するかを検討することは今後の課題である。

2. ドライマウスの原因究明を目的とした唾液腺組織研究においては、今年度は野生型マウスの顎下腺と舌下腺をMRI像で捉えることに成功したので、次年度はこの方法を更に改良し、シェーグレン症候群モデルマウスでは、唾液腺のうち、どこに障害が発生しやすいかを明らかにする。唾液分泌には、腺房細胞内カルシウム濃度上昇が引金になることが報告されている。マウスの口腔開口部から逆行して蛍光カルシウム指示薬を導入し、カルシウム動態を解析、及びアミラーゼ分泌を定量することで分泌機能を評価する。これまで、口腔乾燥症病態研究におい

て、細胞内小器官から個体レベルまでを、時空間画像情報により階層横断的に解析する研究はほとんど行われていない。超高齢化社会の時代に突入した我が国においては、ドライマウスのしくみを解明することは、生きる悦びの大きな部分を占める食事の質を高め、QOLを向上するために重要である。本研究のアプローチは、近年大きく技術発展を遂げた先端的な形態観察技術を利用することで、ドライマウス病態研究の新たな進展に資するものとする。

## 研究業績

### I. 原著論文

- 1) Mikami T (Univ Tokyo), Yamazawa T. Chlorogenic acid, polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci* 2015; 139(1): 69-74.
- 2) Murayama T<sup>1)</sup>, Kurebayashi N<sup>1)</sup>, Yamazawa T, Oyamada H<sup>2)</sup>, Suzuki J<sup>3)</sup>, Kanemaru K<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Univ Tokyo), Oguchi K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Showa Univ), Iino M<sup>3)</sup>, Sakurai T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ). Divergent activity profiles of type1 ryanodine receptor channels carrying malignant hyperthermia and central core disease mutations in the amino-terminal region. *PLoS One* 2015; 10(6): e0130606.
- 3) Yamaguchi M, Kimura M, Li ZB (Johns Hopkins Univ), Ohno T, Takemori S, Hoh JFY (Univ Sydney), Yagi N (JASRI). X-ray diffraction analysis of the effects of myosin regulatory light chain phosphorylation and butanedione monoxime on skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310(1): C692-C700. Epub 2016 Feb 24.

### II. 総説

- 1) Yamaguchi M, Takemori S, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ), Nakahara N, Ohno T, Yamazawa T, Yokomizo S (Tokai Univ), Akiyama N, Yagi N (JASRI). Approaches to physical fitness and sports medicine through X-ray diffraction analysis of striated muscle. *J Phys Fitness Sports Med* 2016; 5(1): 47-55.

### III. 学会発表

- 1) 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), Kanemaru K<sup>2)</sup>, Yamaguchi M, Takemori S, Iino M<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Univ Tokyo). Functional analysis of type1 ryanodine receptor carrying disease associated mutations. Gordon Research Conference. Sunday Riv-

- er, May.
- 2) 竹森 重. 神経・筋の運動器生理とトレーニング効果. 日整会第42回スポーツ医学研修会. 東京, 7月.
  - 3) 山澤徳志子, 大野哲生, 村山 尚<sup>1)</sup>, 大城戸真喜子, 櫻井 隆<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>順天堂大), 山口真紀. 骨格筋の増殖・分化に及ぼすポリアミンの作用. 第1回日本筋学会学術集会. 小平, 8月.
  - 4) 村山 尚<sup>1)</sup>, 呉林なごみ<sup>1)</sup>, 山澤徳志子, 小山田英人<sup>2)</sup>, 鈴木純二<sup>3)</sup>, 金丸和典<sup>3)</sup>, 小口勝司<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>昭和大), 飯野正光<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>東京大), 櫻井 隆 (<sup>1</sup>順天堂大). 1型リアノジン受容体における悪性高熱変異の遺伝型-表現型相関解析. 第1回日本筋学会学術集会. 小平, 8月.
  - 5) 坂本麻衣<sup>1)</sup>, 渡辺 賢<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>首都大学東京), 中原直哉. X線連続照射による平滑筋収縮フィラメント構造の攪乱. 第57回日本平滑筋学会総会. 山口, 8月.
  - 6) 村山 尚<sup>1)</sup>, 呉林なごみ<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>順天堂大), 山澤徳志子, 渡辺 賢 (首都大学東京). 組換えバキュロウイルスを用いた遺伝子導入法の筋組織への適用. 第57回日本平滑筋学会総会. 山口, 8月.
  - 7) Ohno T, Yamazawa T. Spin-spin relaxation of <sup>1</sup>H NMR signals from myosin filaments suspension with or without ADP. 第53回日本生物物理学会年会. 金沢, 9月. [生物物理 2015; 55(Suppl.1-2): S278]
  - 8) Yamazawa T, Murayama T<sup>1)</sup>, Oyamada H<sup>2)</sup>, Suzuki J<sup>3)</sup>, Kurebayashi N<sup>1)</sup>, Kanemaru K<sup>3)</sup>, Yamaguchi M, Takemori S, Oguchi K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Showa Univ), Sakurai T<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>Juntendo Univ), Iino M<sup>3)</sup> (<sup>3</sup>Univ Tokyo). Correlation of molecular dynamics analysis and calcium signaling in mutant ryanodine receptors. 第53回日本生物物理学会年会. 金沢, 9月. [生物物理 2015; 55(Suppl.1-2): S323]
  - 9) 山口真紀, 山澤徳志子, 大城戸真喜子, 池田道明, 山内秀樹, 竹森 重. 心筋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. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山, 9月. [体力科学 2015; 64(6): 582]
  - 10) 中原直哉, 福田倫子, 山内秀樹, 竹森 重. 神経性筋萎縮にともなう骨強度の変化. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山, 9月. [体力科学 2015; 64(6): 571]
  - 11) 平野和宏, 中原直哉, 平塚理恵, 山内秀樹, 竹森 重. 遠心性収縮による微細筋損傷モデルの作製. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山, 9月. [体力科学 2015; 64(6): 558]
  - 12) 玉川奈津子 (インテリム), 中原直哉, 竹森 重. 靴のヒールの高さや路面条件を変えた時の動作分析. 第70回日本体力医学会大会. 和歌山, 9月. [体力科学 2015; 64(6): 715]
  - 13) 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), Kanemaru K<sup>2)</sup> (<sup>2</sup>Univ Tokyo), Yamaguchi M, Takemori S, Sato C (AIST). Correlation of molecular dynamics analysis and calcium signaling in mutant ryanodine receptors. 60th Annual Meeting Biophysical Society. Los Angeles, Feb.
  - 14) 山澤徳志子, 中村直俊 (理化学研究所), 佐藤真理<sup>1)</sup>, 佐藤主税<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>産業技術総合研究所). 大気圧電子顕微鏡による唾液腺組織の水中観察. 第89回日本薬理学会年会. 横浜, 3月.
  - 15) 中原直哉, 平野和宏, 山内秀樹, 平塚理恵, 竹森 重. 骨格筋を強くする遠心性収縮負荷の筋節内検知センサー. 2015年度量子ビームサイエンスフェスタ・第7回 MLF シンポジウム・第33回 PF シンポジウム. つくば, 3月.
  - 16) 栗原 貫, 中原直哉, 大野哲生, 山澤徳志子, 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. 2015年度量子ビームサイエンスフェスタ・第7回 MLF シンポジウム・第33回 PF シンポジウム. つくば, 3月.
  - 17) Nakahara N, Ohno T, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ), Takemori S. Interaction between water and myoproteins revealed by calorimetry. 第93回日本生理学会大会. 札幌, 3月. [J Physiol Sci 2016; 66(Suppl.1): S112]
  - 18) Ohno T, Yamazawa T, Suzuki T. Spin-spin relaxation of <sup>1</sup>H NMR signals from myosin filaments suspension with or without ADP. 第93回日本生理学会大会. 札幌, 3月. [J Physiol Sci 2016; 66(Suppl.1): S113]
  - 19) Yamazawa T, Nakamura N (RIKEN), Sato M<sup>1)</sup>, Sato C<sup>1)</sup> (<sup>1</sup>AIST). Observation of exocrine organs in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy. 第93回日本生理学会大会. 札幌, 3月. [J Physiol Sci 2016; 66(Suppl.1): S146]