

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 眞紀 筋生理学，体力医学
准教授：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

これまでに骨格筋線維内には少なくとも状態が異なる5つの水があることを核磁気共鳴（NMR）法、核磁気共鳴画像（MRI）法を用いた研究で明らかにしている。この水状態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を解明したが、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する実験を推進している。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可能となる。

これまでの研究により、カエルの縫工筋をTriton-Xで除細胞膜処理した骨格筋線維（スキンドファイバー）では -10°C 以下で顕れる水の融解ピークが少なくとも2種類あることが分かった。また、 60°C もしくは 80°C まで加熱すると、タンパク変性熱と思われる吸熱ピークが生じ、これらの吸熱ピークが生じた後では水の融解ピークの性状が大きく変化することも分かった。電子顕微鏡観察では 60°C に加熱をした標本ではサルコメア内の主にA帯に変化が現れ、 80°C の加熱をした標本ではA帯だけでなくサルコメア全体にわたる変化が認められた。これらの結果とDergerzらによるミオシンやアクチンの変性温度についての報告を考えあわせると、 60°C や 80°C で観察される吸熱ピークはそれぞれミオシンとアクチンの変性熱であり、加熱条件の違いによって、変性前、ミオシン変性後、ミオシン・アクチン変性後の3段階の標本で水の融解ピークを比べていたことが明確になった。

そこで今年度はさらにこれらの2種類の水の融解ピークと骨格筋機能とをリンクさせた検討を行った。1つのスキンドファイバーを2つに切り分け硬直状態にした後、片方を一度も凍結していない標本、もう一方をDSCで冷却・加熱処理を加えた標本とした。冷却・加熱の条件は -80°C まで一度冷却した後室温まで戻すもの、 60°C まで加熱しミオシン変性を起こさせるもの、 80°C まで加熱しミオシンおよびアクチンの変性を起こすものの3条件とした。それぞれの条件で処理した標本の Ca^{2+} による最大収縮力を、何も凍結・加熱していない標本の収縮力を100%として評価したところ、ミオシン変性やアクチンの変性を起こさせた条件では全く張力が出ないのに対して、一度凍結した標本では5割程度の張力が確認された。つまり、ミオシン変性後は生理的機能が失われた標本であるのに対して、凍結のみを行った場合では生理機能を有する標本であったことが明らかになった。

II. 水晶発振子マイクロバランス（QCM）法とNMR法によるミオシンの化学的状態の変化による周囲の水の性質解析

Initium社と共同でQCM装置を用いてミオシン溶液中のミオシ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たところ、ミオシン頭部による周囲の水の束縛量は、ミオシンフィラメント溶液のNMR緩和経過での測定結果と非常に良く相関した。ATP分解素過程中的ミオシン頭部の各反応中間体による水の束縛量は、硬直状態と $\text{M} \cdot \text{ATP}$ の状態では多くの水を束縛し、他の中間体 $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ と $\text{M} \cdot \text{ADP}$ の状態では、その束縛量は半分に減少した。この結果を踏まえて、次に筋原線維標懸濁液のNMR緩和経過をそれぞれの中間体ごとで測定を行ったところ、ミオシンフィラメント懸濁液で得られた結果と同様に、硬直状態と $\text{M} \cdot \text{ATP}$ の状態では多くの水を束縛し、他の中間体 $\text{M} \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ と $\text{M} \cdot \text{ADP}$ 状態では、その束縛量は半分に減少した。しかしミオシン頭部あたりの束縛する水の絶対量に関しては、ミオシンフィラメント溶液での値は、ミオシン溶液での値の10倍程度、筋原線維標懸濁液での値はミオシンフィラメント溶液での値のさらに10倍程度であった。そこでこの束縛量の違いがミオシンフィラメントのより高次元の配列化によるのかを知るために、筋原線維から太いフィラメント（ミオシン）を取り除いた標本で測定を行ったところ、束縛する水の量は確かに減少することが明らかになった。

Ⅲ. 変異リアノジン受容体における分子動力学計算とカルシウムシグナルの相関解析

骨格筋の小胞体にある Ca^{2+} 放出チャネルである 1 型リアノジン受容体 (RyR1) 遺伝子の突然変異は種々の筋疾患を引き起こす。悪性高熱症 (malignant hyperthermia: MH) は RyR1 の Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 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。MH や関連疾患患者の RyR1 遺伝子解析から 200 以上の変異が報告され、RyR1 チャネルには、3 ヲ所の変異多発領域 (領域 1 : 35~614 番, 領域 2 : 2,163~2,458 番, 領域 3 : 3,916~4,943 番) があるといわれているが、実際の MH 表現型との相関は不明な点が多い。そこで、MH 患者から報告されている RyR1 遺伝子変異を野生型 (WT) の RyR1 に導入して CICR 活性を細胞レベルで調べることににより機能的変異を明らかにすることを目的とした。領域 1 の変異 RyR1 遺伝子をヒト胎児由来腎臓 (HEK) 細胞に導入して安定発現細胞株を作成し、CICR 活性を Ca^{2+} イメージングにより解析した。これより、WT に比べて静止時の Ca^{2+} 濃度が上昇する変異、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。さらに、MH 変異による RyR1 のチャネル構造に与える影響を検証するため、蛋白質のダイナミックな構造変化を予測できる分子動力学計算法によるシミュレーションを行った。これより、領域 1 にある 3 つのサブドメインのうち、A-B ドメイン間の結合確率は CICR 活性と正に相関、その一方で A-C ドメイン間の結合確率は、静止時 Ca^{2+} 濃度と負に相関したことより、A-B ドメイン間の静電相互作用の増強は CICR 活性を高め、A-C ドメイン間の静電相互作用の減弱は小胞体から Ca^{2+} をリークし易くすることが示唆された。

Ⅳ. X 線回折法による外眼筋の構造解析

外眼筋では、収縮機能の主役を担うミオシンタンパクにありとあらゆるアイソフォーム (短縮速度は遅いが疲労しにくい遅筋タイプから外眼筋に特有に発現する超高速な短縮速度を持つタイプまで) が発現していることがわかっている。この多様なアイソフォーム発現の意義については動物実験での結果をもとに、「サッケードなどの素早い運動を担うために超高速なタイプが必要で、眼位を保持するために遅筋タイプが必要」と考えられている。そこでこの多様なアイソフォーム発現の意義を構造面から探るために、X 線回折法によりウサギ外眼筋のミオシン

頭部の構造を筑波市高エネルギー加速器研究機構内の放射光施設にて取得し、電気泳動によるミオシン重鎖アイソフォーム (タイプ I, IIa, IIb, IIx, II_{BO}) パターンと照合することで多様なアイソフォーム発現と構造的特徴との関係を探った。

X 線回折像から求められたミオシンフィラメントとアクチンフィラメントの格子間隔は、異なるミオシン重鎖発現パターンを有する部位間で差がなかったが、ミオシン頭部の構造を示すミオシン層線には異なる特徴が観察された。

「点検・評価」

1. DSC 法による骨格筋細胞内機能水の相転移についての研究では、今年度は -10°C 以下で出現する 2 つの氷の融解ピークの性質と生理機能の関係に焦点をあて、生理機能の残存したカエル骨格筋標本と生理機能の失われたミオシン変性後、アクチン変性後の標本とで氷の融解ピークの性状が大きく変化することを解明した。今後はさらに組織や生物種を超えて同様の現象が起こるかを明らかにする必要がある。具体的には心筋などの他の筋線維や、ラット・ウサギなどの哺乳類の筋線維でも同様の傾向が確認されるかを検討することが課題となる。

2. QCM 法と NMR 法によるミオシン頭部による周囲の水束縛量の解析では、筋原線維での水束縛量の増大にミオシンのより高次元の配列化が進むことが起因しているのかどうかを知るために、太いフィラメント (ミオシン) を取り除いた筋原線維での測定を行い、水束縛量が少ないことを明らかにした。今後は、細いフィラメントを取り除いた筋原線維標本を用いた NMR 測定を行っていく予定である。

3. 悪性高熱関連遺伝子変異の構造-機能相関の解析では、今回得られた結果は 2 ナノ秒間の計算時間によるトラジェクトリを解析に使用した。しかし近年の GPU (Graphics Processing Unit) の進化により分子動力学シミュレーションの計算時間が飛躍的に長くなっている。これを踏まえて、現在は計算時間を 50 ナノ秒まで延長した解析を行っている。加えて、分子動力学計算から得られた原子の配置を簡便に可視化できる解析手法を構築中である。本手法により CICR 活性の異常亢進に関与している RyR1 の機能的変異が同定されていけば、MH を予測する低侵襲な検査の開発に繋がる可能性が期待される。

4. 外眼筋の微細構造研究では、得られたデータを筋線維上での部位ではなく、電気泳動法で分離し

たアイソフォームの違いと結びつけることで外眼筋線維の特徴を解明する端緒を得ることができた。今後は、この研究を機能面とも結びつけるために、外眼筋線維から作成したスキンドファイバーの張力測定を行っていく予定である。本年度はその準備として、外眼筋スキンドファイバーの張力を規格化するための横断面積を光学的に測定するための装置の改良を、訪問研究員の奥山博司博士とともにに行った。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sato C¹⁾, Kinoshita T²⁾, Memtily N¹⁾, Sato M¹⁾ (¹ AIST), Nishihara S²⁾ (² Soka Univ), Yamazawa T, Sugimoto S. Correlative light-electron microscopy in liquid using an inverted SEM (ASEM). *Methods Cell Biol* 2017; 140: 187-213.
- 2) Ohno T, Abe T (Shibaura Inst Tech), Sugi H (Teikyo Univ). Effect of antibodies to myosin head on the development of rigor tension and stiffness in skinned muscle fibers. *Journal of Material Sciences & Engineering* 2018; 7(2): 435.

III. 学会発表

- 1) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Yamaguchi M, Oyama H (Showa Univ), Suzuki J²⁾, Kurebayashi N¹⁾, Kanemaru K²⁾, Sakurai T¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Iino M²⁾³⁾ (² Univ Tokyo, ³ Nihon Univ). (Oral) Correlation of molecular dynamics analysis and Ca²⁺ homeostasis in mutant type 1 ryanodine receptors. Gordon Research Conference. Les Diablerets, June.
- 2) 山澤徳志子, 村山 尚¹⁾, 大城戸真喜子, 山口眞紀, 山内秀樹, 竹森 重, 櫻井 隆¹⁾ (¹ 順天堂大), 大野哲生. (口頭) ポリアミンによる骨格筋肥大誘発メカニズム. 日本筋学会第3回学術集会. 小平, 8月.
- 3) 渡辺 賢 (首都大学東京), 中原直哉, 石田行知 (文京学院大). (ポスター) 盲腸紐 X 線回折像に対するβエスシンスキンド処理の影響. 第59回日本平滑筋学会総会. 福岡, 8月.
- 4) 山澤徳志子. (口頭) N末端1型リアノジン受容体の構造・機能解析. 生理学研究所研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」. 岡崎, 9月.
- 5) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Ohkido M, Yamaguchi M, Yamauchi H, Takemori S, Sakurai T¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Ohno T. (Oral) Role of polyamines in skeletal muscle hypertrophy. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 428]
- 6) Morimoto S, Nakano M (Yokohama Univ Pharmacy), Ikeda M, Nakahara N, Ohno T, Yamazawa T, Yamaguchi M, Takemori S. (Oral) Timing of signal amplitude and hysteresis of motor unit activity during prolonged contraction. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 411]
- 7) Ikeda M, Ohno T, Nakahara N, Yamazawa T, Yamaguchi M, Morimoto S, Takemori S. (Oral) Growth rate of nails at the bottom and the tip. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 534]
- 8) Hirano K, Yamauchi K, Nakahara N, Hiratsuka R, Yamaguchi M, Takemori S. (Poster) The effect of eccentric contraction on sarcomere structure and muscle anabolic signals. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 417]
- 9) Nakahara N, Nakahara M, Itaki H, Yamauchi H, Takemori S. (Poster) T2-relaxation change precedes denervation-induced muscle atrophy. 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 421]
- 10) Yamaguchi M, Yamazawa T, Ohkido M, Yamauchi H, Ikeda M, Morimoto S, Takemori S. (Oral) Does polyamine administration affect cardiac structure and function of athletes' heart? 第72回日本体力医学会大会. 松山, 9月. [*J Phys Fit Sports Med* 2017; 6(6): 445]
- 11) 中原直哉, 田口美香, 竹森 重, 木村澄子. カエル舌筋の粘弾性構築とコネクチン. (ポスター) 日本動物学会第88回富山大会. 富山, 9月.
- 12) Ohno T. (Poster) Spin-spin relaxation of ¹H NMR signals from myofibril suspension during cross-bridge cycling. 第55回日本生物物理学会年会. 熊本, 9月. [*生物物理* 2017; 57(Suppl.1-2): S246]
- 13) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Yamaguchi M, Oyama H (Showa Univ), Kurebayashi N¹⁾, Suzuki J²⁾, Kanemaru K²⁾, Sakurai T¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Iino M²⁾³⁾ (² Univ Tokyo, ³ Nihon Univ). (Poster) Correlation of molecular dynamics analysis and calcium dynamics in mutant type 1 ryanodine receptor. 第55回日本生物物理学会年会. 熊本, 9月. [*生物物理* 2017; 57(Suppl.1-2): S257]
- 14) 山澤徳志子, 村山 尚¹⁾, 大城戸真喜子, 山口眞紀, 山内秀樹, 竹森 重, 櫻井 隆¹⁾ (¹ 順天堂大), 大野哲生. (口頭) 骨格筋肥大に対するポリアミンの作用. 第247回生理学東京談話会. 東京, 10月.
- 15) Yamazawa T, Murayama T¹⁾, Yamaguchi M, Oyama H (Showa Univ), Suzuki J²⁾, Kurebayashi N¹⁾, Kanemaru K²⁾, Sakurai T¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Iino

M²⁾³⁾ (² Univ Tokyo, ³ Nihon Univ). (Oral) Correlation of molecular dynamics analysis and Ca²⁺ homeostasis in mutant type 1 ryanodine receptors. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (CaBP20). Awaji, Oct.

- 16) 山澤徳志子, 中村直俊 (京都大), 佐藤主税 (産業技術総合研究所). (口頭) 大気圧走査電子顕微鏡で唾液腺組織を観る. 2018 年生体運動研究合同班会議. 東京, 1 月.
- 17) Yamazawa T. (Planned Symposium 17: Joint Symposium with the Biophysical Society of Japan: Cutting-Edge Interdisciplinary Physiology for Heat Production and Sensing) Analysis of disease mutants of type 1 ryanodine receptor by molecular dynamics simulation and calcium imaging. 第 95 回日本生理学会大会. 高松, 3 月. [J Physiol Sci 2018; 68(Suppl.1) : S24]
- 18) Ohno T. (Poster) Spin-spin relaxation of ¹H NMR signals from highly ordered myosin filaments suspension. 第 95 回日本生理学会大会. 高松, 3 月. [J Physiol Sci 2018; 68(Suppl.1) : S147]
- 19) Watanabe M (Tokyo Metropolitan Univ), Nakahara N, Ishida Y (Bunkyo Gakuin Univ). (Poster) Effects of beta escin skinning on X-ray diffraction pattern of taenia cecum smooth muscle from guinea pig. 第 95 回日本生理学会大会. 高松, 3 月. [J Physiol Sci 2018; 68(Suppl.1) : S147]
- 20) Nakahara N, Ohno T, Kimura M, Kimura S, Takemori S. (Poster) Interaction between water and myoproteins evaluated with scanning calorimetry. 第 95 回日本生理学会大会. 高松, 3 月. [J Physiol Sci 2018; 68(Suppl.1) : S179]

IV. 著 書

- 1) 山口眞紀, 橋本 透訳. 3 章: 筋骨格系 V. 骨格筋. 栗原 敏監修, 大橋十也, 岡野ジェイムス洋尚, 本郷賢一, 横尾 隆監訳. イラストレイテッド統合臨床基礎医学: リッピンコットシリーズ. 東京: 丸善出版, 2018. p.132-48.

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
准教授: 草刈洋一郎 筋病態学
講師: 赤池 徹 発達循環器学

教育・研究概要

I. 教育概要

2017 年度に本講座は以下の課目を担当した。

医学科: コース基礎医学Ⅱ (ユニット「循環器」(ユニット責任者: 南沢), ユニット「泌尿器」(ユニット責任者: 南沢), ユニット「呼吸器」, ユニット「機能系実習 (生理学系)」(ユニット責任者: 南沢)), コース臨床基礎医学 (ユニット「症候学演習 (ユニット責任者: 草刈), ユニット「感染・免疫テュートリアル」), コース研究室配属, 英語論文抄読演習, コース臨床医学Ⅱ (ユニット「症候から病態へ」)

看護学科: 解剖生理学Ⅲ (ユニット責任者: 南沢)

看護専門学校 (慈恵看護専門学校): 解剖生理学講義 (ユニット責任者: 南沢)

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) 肺静脈系の特殊性と病態生理の解明

肺静脈は高濃度酸素血に曝されること, 左心房と接合する肺静脈部位は心房細動を引き起こす異所性刺激発生部位になることなど, 体静脈とは異なる特殊な低圧系血管であるが, その血管特性の理解は進んでいない。そこで肺静脈の構造的・機能的特徴が構築される分子機序を解明することを目的として, 肺静脈の網羅的遺伝子発現解析を行った。

また, 手術的に左房狭窄を作成し, 世界でも報告例がなかった左心系心障害による肺高血圧症モデルラットを確立し, 組織学的検討や遺伝子発現変化を観察した。

2) 動脈管閉鎖機序の解明

動脈管は, 肺動脈と大動脈を連結し, 血液をバイパスする胎生期特有の大血管であり, 生後に閉鎖する。我々は, 動脈管が生後に閉鎖する分子機序を, ラット胎仔, ニワトリ胚, ヒト標本を用いて検討している。2017 年度は兵庫県立こども病院心臓血管外科との共同研究でヒト動脈管標本を使って, 長期プロスタグランジン E₁ 使用による動脈管の組織学