

分子生理学講座

講座担当教授：竹森 重	筋生理学, 体力医学, 生物物理学
准 教 授：山口 眞紀	筋生理学, 体力医学, 生物物理学
准 教 授：山澤徳志子	筋生理学, 薬理学, 体力医学, 生物物理学

教育・研究概要

I. 示差走査熱量測定 (DSC) 法による骨格筋細胞内の水性状解析

骨格筋細胞を核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いて測定すると少なくとも 5 種類の状態の異なる水があることがこれまでの研究で明らかになっている。この水分子と周りの分子の相互作用の解釈には複数あり, 一義的にはわかっていない。そこで他の異なる観点で水分子状態を測定する方法の一つとして, 我々は DSC 法を用いている。この方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/崩壊する水分子や周りの分子との分子間相互作用変化を熱エネルギーとして検出することが出来る。

DSC 法によるこれまでの研究により, ウシガエルの除膜筋線維 (スキンドファイバー) 内には -24°C や -21°C に融解ピークをもつ水が少なくとも 2 種類あり, ミオシンフィラメントやアクチンフィラメントを選択的に変性, 除去したスキンドファイバーでは融解ピークの大きさの変化が生じることから, これらはミオシンフィラメントやアクチンフィラメントに由来していると考えられた。

今年度はまず -80°C から $+20^{\circ}\text{C}$ まで温度上昇させる間の積算比熱に着目した解析を行った。積算比熱はミオシンの変性ではあまり変わらないのに対して, アクチンの変性には大きく依存して低下が認められた。特に溶液の要因を差し引き, タンパク重量当たりの積算比熱を見積もるとミオシン除去では 150% 程度に積算比熱が増加し, アクチンの除去では 25% 程度に低下した。このことからアクチンが大きな熱貯めとして働いており, 鈴木らが提唱しているようにアクチンの周りにバルクの水よりも動きやすいハイパーモバイル水が存在することが示唆された。

更に融解ピークの発現がサルコメア構造の存在を

必須とするかを調べるためにミオシンを精製しミオシンフィラメントの DSC 測定を行った。ミオシンの精製にはウシガエルの縫工筋を用い, 破碎処理後の遠心分離により筋原線維を精製した後, 高イオン強度で処理することでミオシンを抽出した。抽出したミオシンをフィラメント化して DSC 測定を行ったところ, -24°C や -21°C の融解ピークが観察されることを確認した。

II. 筋疾患に関与する変異リアノジン受容体 (RyR1) の解析

筋小胞体膜に存在し, Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR) の特性を担う RyR1 には, 300 種類以上の点突然変異が同定されており, 悪性高熱症 (malignant hyperthermia: MH) やセントラルコア病 (CCD) 等の筋疾患を引き起こすと考えられている。RyR1 の変異の大部分は, 3 箇所「ホットスポット」領域に見出されているが, たった一つのアミノ酸変異が, この巨大なイオンチャネル蛋白分子の働きを変調する制御機構は未だ不明である。RyR1 のホットスポット領域の 1 つである N 末端領域 (NTD) の構造的特徴についての知識を得るために, *in silico* で突然変異体の分子構造を構築することにより, これまでに機能解析をした MH 変異体および野生型 (WT) RyR1 について分子動力学 (MD) 計算を行った。NTD は 3 つのサブドメイン (A~C) から構成されるが, NTD の MD 計算の結果, サブドメインの境界に位置し CICR 活性を亢進する R402C 変異体は, BC サブドメインが旋回していることが明らかになった。そこで構造変化の原因を追究するため, NTD 内で形成される全てのアミノ酸残基間の相互作用 (塩橋/水素結合) を解析した。WT では, R402 を含んだ 4 種類の塩橋/水素結合ネットワークが形成されていたが, R402C 変異体では R402-D61 と R402-E40 の塩橋/水素結合が消失したことにより, サブドメイン間の安定性が悪くなり, 立体構造が変化したと考えられた。このように Ca^{2+} 応答の異常を構造的特徴と結びつけることにより点突然変異が機能的変異を起こす分子内機構が同定されていけば, 悪性高熱発症を予測する低侵襲な検査/治療の開発に繋がることが期待される。

III. 骨格筋筋萎縮や増殖を制御する因子の究明と臨床への応用

骨格筋線維の間に存在する幹細胞である「サテライト細胞」は *in vitro* で伸展刺激を加えると増殖能

が増すという報告がある。しかしこの機構の詳細は不明である。そこで、伸展位に固定した骨格筋には筋サテライト細胞刺激因子が含まれるのではないかと仮説を立て、片肢をギプス固定したマウスの骨格筋から作成した抽出液が、マウスの単離サテライト細胞の増殖にどのような影響を及ぼすか検討した。

ギプスにて伸展位に固定したマウス骨格筋からの抽出液の作成は、以下の方法で行った。まずマウスを麻酔下で後肢を伸展した状態でギプス固定、2日後にマウスを安楽死させ、ギプス固定側と無拘束側の骨格筋を摘出した。摘出した骨格筋はホモジェナイズの後に遠心分離をし、上清を採取し、280nmで吸光度を測定した後に筋抽出液として保存した。

マウス骨格筋サテライト細胞の採取と培養は以下の方法で行った。マウス両下肢の骨格筋を採取し、37℃ 60分の酵素処理によりサテライト細胞を採取し、増殖培地にて5日間培養した。この際に、ギプス固定有・無の条件で作成した4種類の抽出液（ギプス固定側前脛骨筋（TA）／長趾伸筋（EDL）、ギプス固定側腓腹筋（GAS）／足底筋PLA、無拘束側TA/EDL、無拘束側GAS/PLA）を0.34mg/mlまたは0.68mg/mlの濃度で加えた。期待に反して、同一筋群で比較すると伸展状態で固定をした筋から作成した抽出液により強い増殖促進効果は認められなかった。筋が受動的に伸展をうけることはサテライト細胞の増殖因子を刺激しないのではないかと考えられた。しかし同一筋群でギプス固定側と無拘束側の筋からそれぞれ作成した抽出液の効果を比べると、無拘束側のほうがギプス固定側よりも増殖効果が大きい傾向が認められた。そこで本実験の結果を「伸展固定側から採取した抽出液を加えた群」と「無拘束側から採取した抽出液を加えた群」に二別して平均値をとりなおしてみたところ、「伸展固定側から採取した抽出液を加えた群」より「無拘束側から採取した抽出液を加えた群」の方が細胞数が有意に多いことがわかった。つまり、*in vitro*の結果から予測した受動的な伸展刺激よりも、能動的な運動を繰り返した方がより多くの増殖因子が分泌されると考えられた。

IV. マウス骨格筋サテライト細胞から分化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン

サテライト細胞は、休止している筋芽細胞であり、骨格筋が損傷されると活性化され、既存の骨格筋線維に融合することなどにより筋修復ないしは筋再生を行う。

昨年度までに、サテライト細胞から分化させた筋

線維の主たるミオシンアイソフォームは大人のマウスに発現している型（I～IIa, IIx, IIb（速筋型）～EO（外眼筋型）とは異なる移動度を示し、その移動度は、embryonic myosin heavy chainを主とする新生仔マウス腓腹筋ホモジネートのものとほぼ同等であることを明らかにした。サテライト細胞は由来筋が異なっても一度共通のアイソフォームを経、その後細胞内外の機械的・化学的シグナルによってそれぞれの部位特異的なアイソフォームとなると考えられた。

本年度はこれに加えて、基盤研究室 岩本武夫先生に受託し、質量分析に基づくアイソフォーム発現解析を行った。サテライト細胞のミオシンの解析により、embryonic myosin heavy chainとともにMYH7B由来cardiac betaの発現が確認された。これは胎児期の心臓などでの発現が報告されているものである。本アイソフォームが検出されたことについての妥当性と意義については今後の検討課題と考える。

「点検・評価」

1. 研究

1) DSC法による骨格筋細胞内の水性状解析

今年度は精製したミオシンフィラメントのDSC測定を実施し、-24℃や-21℃の融解ピークを観察することができた。しかし除膜筋線維の実験条件と比べると、濃度の問題や試料中に含まれる水の割合の違いなど、検討すべき問題は残されている。次年度は精製フィラメントの濃度を高め除膜筋線維の条件に近づけることや、解析法の改善を行うとともに、精製アクチンフィラメントでの測定の準備を進めていく。

2) 筋疾患に関する変異リアノジン受容体の解析

今年度は計算時間を250ナノ秒まで延長して解析し、また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した。次年度は、点変異により主にカテコラミン誘発性多形性心室頻拍（CPVT）を引き起こすと示唆されている心臓に発現するRyR2についてRyR1と同じ手法でMD計算を行う。RyR2についても、N末端領域はX線結晶構造が解かれているので、この構造を用いてMD計算を行うことができる。RyR2にもRyR1で見出された塩橋／水素結合ネットワーク形成に関与するアミノ酸残基が保存されていることが一次構造により確かめられているので、これらに人工的変異（アラニン置換）を導入してMD計算を実施する予定

である。

3) 骨格筋筋萎縮や増殖を制御する因子の究明と臨床への応用

In vitro の報告から予測された受動的な伸展刺激よりも、能動的な運動を繰り返した方がより増殖因子の分泌に効果的であることが示唆された。同様な傾向はウサギ外眼筋にて上直筋を手術した際の拮抗筋においても観察されたことから、次年度はこの効果の発現機構をより追及し、臨床応用へとつなげることも目指していく。

2. 教育

教育面では、医学科2年コース基礎医科学Ⅰのユニット「自然と生命の理」およびコース基礎医科学Ⅱのユニット「感覚器系」を主に担当した。

コース基礎医科学Ⅰのユニット「自然と生命の理」講義では、続くコース基礎医科学Ⅱで学ぶ各論的な器官系の働きを理解する土台となるような生理学の総論的な部分を物理化学の立場から理解することを目的に内容を編成しているが、本年度は更にコース基礎医科学Ⅱとの連携を深めることを意識し、酸塩基平衡と腎臓での物質輸送の概要を物理化学的観点から捉える講義を新設した。講義では講義中に学生が自らの理解を確認する時間を設けるとともに、講義終了時にその日の要点を用紙にまとめ提出することで、後日教員からのフィードバックを受ける機会とする方式を、演習では、講義内容の能動的な理解のために、達成度別小グループを編成し、講義内容を咀嚼するための演習課題を与え、それらをグループ内で教えあいながら解くという方式を引き続き採用した。実習では動物や人体を用いた生命現象にかかわる実験を、グループ構成員同士が方法を相談しながら進める選択実験を継続した。昨年まで行っていた「PCを用いた生命現象に関する時間変化のシミュレーション実習」は、方法に改善の余地が認められたため一度とりやめとし、コース基礎医科学Ⅱのユニット「感覚器系」に繋がる「弁別閾値の測定」を新規テーマとして導入した。

コース基礎医科学Ⅱではユニット「感覚器系」を担当した。本年度は昨年度よりも更にユニット内での内容連携を強化し、スライドの共有や講義内容の相互引用を増やすことにより感覚器系全体、ならびにユニット「神経系」との関わりが理解できるような構成を工夫した。また試験では、ユニット全体での統合がなされているかを意識した問題となるように工夫した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using Ca^{2+} imaging and molecular dynamics. *J Gen Physiol* 2020; 152(1): e201812235
- 2) Sugi H, Yamaguchi M, Ohno T, Okuyama H, Yagi N. X-ray diffraction studies on the structural origin of dynamic tension recovery following ramp-shaped releases in high-Ca rigor muscle fibers. *Int J Mol Sci* 2020; 21(4): 1244.

II. 総説

- 1) Ogawa H, Kurebayashi N, Yamazawa T, Murayama T. Regulatory mechanisms of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel revealed by recent advancements in structural studies. *J Muscle Res Cell Motil* 2020 Feb 10. [Epub ahead of print]

III. 学会発表

- 1) Yamazawa T, Ogawa H, Yamaguchi M, Murayama T, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. (Poster) Molecular dynamics and Ca^{2+} imaging of mutant type 1 ryanodine receptors. Gordon Research Conference, Lucca, June.
- 2) 渡辺 賢, 石田行知, 中原直哉, 山村 聡. (口頭) 消化管虚血による消化管平滑筋収縮機能と構造の変調. 第29回日本病態生理学学会大会. 東大阪, 8月.
- 3) 渡辺 賢, 石田行知, 中原直哉, 劉 英明. (シンポジウム) 細いフィラメント制御とスキンド盲腸収縮・弛緩. 第61回日本平滑筋学会総会. 名古屋, 8月.
- 4) 山澤徳志子. (口頭) 分子動力学計算とカルシウムイメージングによるリアノジン受容体制御機構の解析. 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) 山澤徳志子, 小林琢也, 呉林なごみ, 野口 悟, 井上高良, 井上由紀子, 西野一三, 櫻井 隆, 村山 尚. (口頭) リアノジン受容体変異マウスを用いた悪性高熱症病態解析. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 6) 山口真紀, 栗原 貫, 中原直哉, 大野哲生, 山内秀樹, 平野和宏, 山澤徳志子, 竹森 重. (ポスター) 外眼筋の構造的特徴の探求. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 7) 河原巧絃, 山口真紀, 山澤徳志子, 秋山暢丈, 竹森 重. (ポスター) マウス骨格筋サテライト細胞から分

- 化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 8) 池田道明, 大野哲生, 中原直哉, 山口真紀, 山澤徳志子, 森本 茂, 竹森 重. (口頭) 爪の伸びの季節変動解釈のための爪重量密度測定から-爪の中の水の状態. 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 9) 森本 茂, 山口真紀, 竹森 重. (口頭) 筋力保持中に見られる運動単位筋振動信号の振幅増強は活動後の振幅増強に繋がるか? 第74回日本体力医学会大会. つくば, 9月.
- 10) 山澤徳志子, 小川治夫, 山口真紀, 村山 尚, 小山田英人, 呉林なごみ, 鈴木純二, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. (ポスター) 変異リアノジン受容体の分子動力学シミュレーション. 日本生物物理学会第57回年会. 宮崎, 9月.
- 11) 中原直哉, 大野哲生, 木村雅子, 木村澄子, 竹森 重. (ポスター) 熱測定で評価した骨格筋内の水と筋タンパクの相互作用. 第136回成医会総会. 東京, 10月.
- 12) 山澤徳志子, 小川治夫, 村山 尚, 山口真紀, 小山田英人, 鈴木純二, 呉林なごみ, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. 分子動力学計算による変異リアノジン受容体チャネル変調機構. 第249回生理学東京談話会. 千葉, 11月.
- 13) 山口真紀, 中原直哉, 大野哲生, 山内秀樹, 平野和宏, 山澤徳志子, 竹森 重. (口頭) 外眼筋線維の構造的特徴. 筋生理の集い. 東京, 12月.
- 14) Yamazawa T, Ogawa H, Murayama T, Yamaguchi M, Oyamada H, Suzuki J, Kurebayashi N, Kanemaru K, Oguchi K, Sakurai T, Iino M. (Poster) Molecular dynamics and Ca^{2+} imaging of mutant type 1 ryanodine receptor. 64th Annual Meeting of the Biophysical Society. San Diego, Feb.
- 15) 山澤徳志子. (シンポジウム14: Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) 研究の最前線: CICR 発見から50年を記念して) 分子動力学シミュレーションと悪性高熱症モデルマウスによるCICR制御機構の解析. 第93回日本薬理学会年会. 横浜, 3月. (紙上開催)
- 16) 山澤徳志子, 小川治夫, 村山 尚, 山口真紀, 小山田英人, 鈴木純二, 呉林なごみ, 金丸和典, 小口勝司, 櫻井 隆, 飯野正光. (ポスター) 変異リアノジン受容体の分子動力学解析. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)
- 17) 山口真紀, 河原巧絃, 飯田貴絵, 山澤徳志子, 秋山暢丈, 竹森 重. (ポスター) 骨格筋サテライト細胞の増殖・分化過程に対する骨格筋抽出液の効果. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)
- 18) 中原直哉. (ポスター) Actin filaments render considerable heat capacity to skeletal muscle sarcomere. 第97回日本生理学会大会. 別府, 3月. (誌上開催)

V. その他

- 1) 山口真紀, 木村雅子, 大野哲生, 秋山暢丈, 中原直哉, 竹森 重, 八木直人. 収縮性クロスブリッジにより惹起される心筋トロポニンTの構造変化. SPring-8/SACLA 利用研究成果集 2019; 7(2): 120-4.