

ATP によって制御される平滑筋細いフィラメントリモデリングのメカニズム Mechanisms of ATP dependent remodeling of thin filaments organization in vertebrate smooth muscle

渡辺 賢^{1*}, 石田行知², 中原直哉³, 坂本麻衣¹, 平野和宏

1 首都大学東京・人間健康科学研究科、〒116-8551 荒川区東尾久 7-2-10

2 文京学院大学・保険医療技術学部 〒356-8533 埼玉県ふじみ野市亀久保 1196

3 東京慈恵会医科大学・分子生理学講座 〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8

Masaru Watanabe¹, Yukisato Ishida², Mai Sakamoto¹, Naoya Nakahara³ and Kazuhiro Hirano³

¹Tokyo Metropolitan University, Tokyo, 116-8551, Japan

²Bunkyo Gakuin University, Fujimino, 356-8533, Japan

³The Jikei University, Tokyo, 105-8461, Japan

1 はじめに

内臓器官の「うごき」を司る平滑筋細胞の収縮弛緩は、横紋筋サルコメア様構造（ミニサルコメア）における太いフィラメント（重合したミオシン）と、細いフィラメント（重合したアクチンに制御タンパク質が結合したもの）の滑り合いの程度によって調節されるのみならず、ミオシンやアクチンの重合・脱重合に伴うミニサルコメア構造の量的・空間的変化—リモデリング—によっても調節されている。この様なミニサルコメア構造のダイナミックな振る舞いは、特に血管攣縮・気管支喘息などの病的平滑筋収縮に関与することが指摘されており、平滑筋細胞内のミニサルコメア構造リモデリングの実態は不明とされてきた。その一つの理由として、平滑筋細胞ではミニサルコメア構造が散在しており、標本固定等の操作によりフィラメント構造そのものの変化が起こる可能性があるため、電子顕微鏡観察や生化学的手法による詳細な解析が困難であったことによる。

そこで、本研究代表者は、平滑筋のミニサルコメア構造変化そのものを探ることを目的として、シンクロトロン放射光の輝度の強い X 線の利用によりモルモット盲腸紐標本から経時的に X 線小角散乱像を得ることに成功した。また、盲腸紐標本に放射光を照射した際に得られる小角散乱像のうち幅広の赤道反射が、13.5 nm 付近、22 nm 付近にピークを持つ 2 種類のミニサルコメア由来と考えられるフィラメント格子配列の存在を発見し（平滑筋フィラメント格子構造定量解析の試み；2009G561）、BL-15A および BL-6A 小角散乱ステーションにおける盲腸紐平滑筋の弛緩・収縮・硬直サイクルに伴う赤道反射プロファイルの変化を明らかにしてきた。更に、細胞内 ATP 濃度変化により、赤道反射全体の強度が顕著に減弱し、ATP 再添加により一部回復するという、従来の生化学的研究から予測された結果とは全く異なるふるまいを示すことを見出した。この事実は、高エネルギーリン酸化合物による平滑筋細胞ミニサルコメア構造および配列の制御は、単離した筋収縮タンパク質フィラメントに対するそれとは異なったメカニズムによることを示唆する（ATP による平滑筋細胞内ミニサルコメアリモデリング;2011G569）。

この研究の過程で、本研究グループは、高エネルギーリン酸化合物によるリモデリングが生化学的にも観察される太いフィラメントのみならず、細いフィラメントの格子間隔由来と考えられる 11.4nm 赤道反射も、ATP 濃度依存性にダイナミックに変化を示すことを発見した。更にこの現象は、アクチン・ミオシン相互作用が起こりえない条件下でも観察されることから、何らかの ATP 依存性の制御機構が、太いフィラメントを介さずに、細いフィラメントに直接的に影響することによって、細いフィラメントのリモデリングが起こることを示唆する。

これを受けて本申請課題では、モルモット盲腸紐の細胞膜を化学的に破壊したスキンド標本を用いて、細胞内高エネルギーリン酸化合物濃度を人為的に変化させた際の 11.4 nm 赤道反射プロファイルの変化の詳細を定量的に解析し、細いフィラメント構造・配列変化の実態を解明することを具体的な研究目的とした。

2 実験

1) 筋標本作成 実験当日又は前日に代表者の所属機関（首都大学東京）でモルモットから盲腸紐を摘出し、放射光実験施設へ搬入した。搬入後直ちに β -escin 処理により筋の細胞膜を破壊してスキンド標本作製、その後、標本を回折用チャンバーに取り付け、人工細胞内液灌流下に標本の力学応答を測定し、平滑筋の活動状態を安定化した。尚、本研究にかかわる動物実験実施については、日本学術会議作成の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則り、首都大学東京より動物実験計画の承認を得て、動物実験の細則と関連諸法規を遵守して実施した。2) X 線回折実験 a) 標本をチャンバーに固定した。標本の劣化を防ぐため 30°C の実験条件で人工細胞内液を灌流した。灌流開始後、照射位置を決定した。b) イメージングプレートに X 線回折像を記録（露出 5 分×3 回、図 1 は弛緩液中のスキンド盲腸紐 X 線回折像。細いフィラメント格子構造由来 11.4 nm 赤道反射が観察される）。c) 標本を静止状態のまま灌流し、弛緩時の X 線回折像を経時的に記録（露出 5 分×3 回×3）d) 標本の細胞内 ATP 濃

度を1時間位かけてほぼゼロまで低下させて硬直状態を惹起。ATPの涸渇を徹底して行うため、強力なATP分解構想である *apyrase* を還流液中に添加した。標本の力学応答が定常状態に達した状態でX線回折像を経時的に記録（露出5分×3回×3）。e) 細胞内にATPを再添加した状態で標本を弛緩させ、経時的にX線回折像を記録（露出5分×3回×3）。a)からe)（合計4時間）を繰り返し、回折像を蓄積した。更に、ミオシン阻害薬 *blebbistatin* の影響を、硬直条件下、とし勘定系ンかで検討した。Radiation damageを防ぐため、電動ステージ上に標本チャンバーを固定し、照射位置を移動させた。コントロール実験として弛緩状態で最後まで標本を灌流した際のX線回折像も記録し、両者を比較検討した。更に、X線照射によるradiation damageの影響を見積もるため、同一部位のみにおいて上記と同様の実験を行い、差を検討した。

全ての記録画像は施設内のBAS-2500またはPilatusで記録・読み取りを行ったのち、電子メディアに保存し、研究代表者または共同研究者の所属機関で解析し、赤道反射ピークの位置と大きさの経時変化を定量的に算出した。同時に測定した力学応答から、収縮及び硬直条件における、構造—力学応答関係を検討した。

3 結果および考察

細胞内ATPを*apyrase*添加によって完全に涸渇させることによって、細いフィラメント格子由来11.4nm赤道反射強度が顕著に減弱し（図2左）、ATP再添加により一部回復した（図2右）。

又、ミオシン阻害薬 *blebbistatin* も弛緩条件下では同様に、11.4 nm赤道反射強度を減弱させたが、硬直条件での相乗・相加効果は観察されなかった。

このように11.4 nm赤道反射強度が減弱している際には、回折像中心部のみバックグラウンドの増加がみられ、散乱が増加していることが考えられる。すなわち、フィラメント格子構造が攪乱していることが強く示唆された。

以上の結果から、高エネルギーリン酸化合物による平滑筋細胞ミニサルコメア構造および配列の制御は、ミオシンフィラメントのみならず、アクチンと制御タンパク質から構成される細いフィラメント格子構造を制御している、と考えられる。

いわゆるミオシン・アクチンがクロスブリッジを形成していない環境でもATP濃度に依存したミオシンの構造・酵素活性変化により細いフィラメント配列が制御されることは、クロスブリッジ以外のミオシン-アクチン相互作用、又は、ミオシンからアクチンへの細胞内情報伝達機構が存在することを示しており、この謎を今後は明らかにしていきたい。とが明らかになった（本研究の一部は、2015年8月に山口県宇部市で開催された第57回日本平滑筋学会総会の一般口演にて発表された；坂本麻衣・中原直哉・渡辺 賢）。

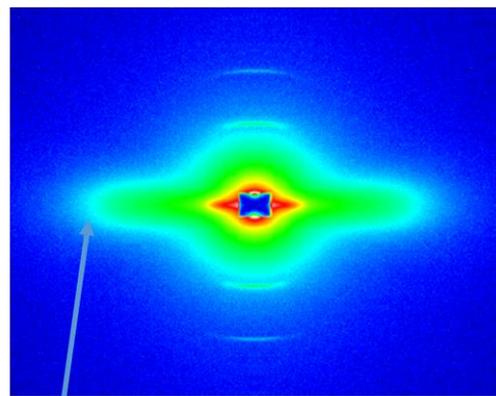


図1. 弛緩液中のスキンド盲腸紐X線回折像

11.4 nm赤道反射

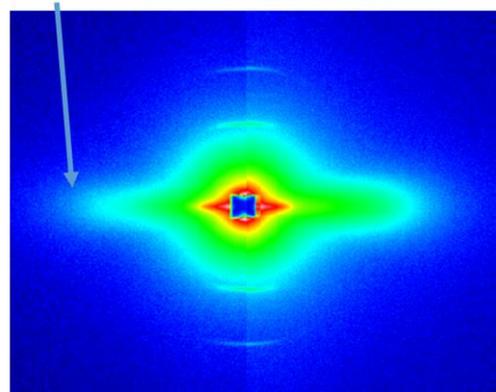


図2. ATP涸渇後（左半分）及び、その後のATP再添加時（右半分）スキンド盲腸紐X線回折像

* masaru@tmu.ac.jp