

アクチン-ミオシン相互作用時の ATP 依存性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 thin filament-remodeling of smooth muscle during actin-myosin interaction

渡辺 賢^{1,*}, 石田行知^{1,2}, 中原直哉³

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・保健医療技術学部 〒356-8533 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 港区西新橋 3-25-8

Masaru Watanabe^{1,*}, Yukisato Ishida², Naoya Nakahara³

¹ Tokyo Metropolitan Univ. Fac. Health Sci, Arakawa-ku, 116-8551, Japan

² Bunkyo Gakuin Univ. Fac. Health Sci. Tech, Fujimino, 356-8533, Japan

³ Jikei Univ. Sch. Med. Dept. Molecular Physiol., Minato-ku, 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、11 nm 付近、16 nm 付近、22 nm 付近にピークを持つ 3 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 11nm 付近にピークを持つ赤道反射も、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 nm 付近にピークを持つ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、標本作製して回折用チャンバーに取り付け、人工細胞外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状態で、X 線回折像を撮影した。

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 の実験条件でまず人工細胞外液を灌流した。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)。その後、細胞膜を 100 μ M β エスシン処理 60 分間で破壊した。c) 標本を静止状態のまま Ca^{2+} を含まない人工細胞内液で灌流し、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 の潤滑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 5 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、とし勘定系なかで検討した。Radiation damage を防ぐため、電動ステージで移動させた。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。

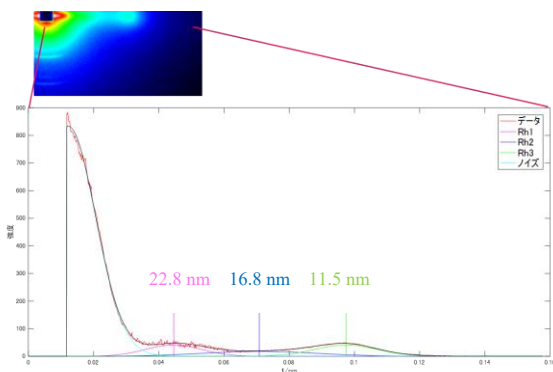


図 1. モルモット盲腸紐スキンド標本の赤道反射プロファイル β エスシンスキンド処理して細胞膜を破壊後後、5 分×3 箇所照射時の反射を重ねた。30°C。ATP 入り人工細胞内液で灌流

3. 結果

図 1 にスキンド平滑筋赤道反射プロファイルとその解析法を示す。赤道反射は、どの実験条件でも 22.8 nm, 16.8 nm, 11.5nm 付近にピークを持つ 3 個の正規分布の和と考えることができる。このうち特に 11.5 nm 付近にピークを持つ細いフィラメント由来格子構造由来反射については、実験条件によりピーク周期の変動が観察されたことから、スキンド標本と生筋標本で赤道反射と子午反射のそれぞれのピーク周期の変動がみられるかを同一標本を用いて確認した。

	赤道反射周期			子午反射周期		
	Rh1	Rh2	Rh3	ミオシン 14.4nm	コラーゲン 5 次	コラーゲン 3 次
生筋	22.48±0.40	15.97±0.60	10.40±0.10	14.48±0.03	12.96±0.01	21.53±0.01
スキンド後	22.78±0.38	16.86±0.28	11.54±0.43	14.35±0.17	12.97±0.02	21.56±0.02

表 1 スキンド処理が平滑筋赤道反射及び子午反射周期に及ぼす影響

すると、スキンド処理によって細胞膜を破壊すると、赤道反射のすべての周期が概ね 10% 程度拡大する事 (表 1)、一方、子午反射の周期には変化が見られないことが明らかになった。又、スキンド処理によりすべての反射の絶対強度が低下するが、相対強度は影響を受けないことが明らかになった。

4. 考察

今回の結果は、当初の研究計画が期待通りに進まない (赤道反射周期の多様性) ことの原因究明から得られたものである。

盲腸紐にスキンド処理を施しても、生筋同様に細胞内構造と配列が保持されると考えられる。ただ、スキンド処理後それぞれの筋フィラメント由来反射の強度が低下すること、筋フィラメント由来格子間隔が増加することから、スキンド処理によって盲腸紐フィラメント構造・配列が変化することが示唆された。今後、この間隔増大がどのような理由で増加するかを検討する必要がある。

* masaru@tmu.ac.jp