

平滑筋細胞膜破壊が収縮フィラメントリモデリングに与える影響

Effects of cell membrane permeabilization on contractile filaments-remodeling in smooth muscle from guinea pig taenia cecum

渡辺 賢^{1,*}, 石田行知¹, 中原 直哉²

¹東京都立大学・人間健康科学研究科 〒116-8551 荒川区東尾久 7-2-10

²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 Ishida¹, Naoya Nakahara²

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

²Jikei 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とともに、その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にも起こることを明らかにした（ATP による平滑筋細胞内ミニサルコメアリモデリング;2011G569、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 2015G599）。

この研究の過程で、本研究グループは細胞膜を化学的に破壊するスキンド処理を行う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と、11.5 nm 付近にピークを持つ、細いフィラメント（アクチン及び制御タンパク質で構成）由来格子間隔が増加することを見出した。

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 β エスシン処理により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化合物濃度を人為的に変化させた際の、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（東京都立大学・荒川キャンパス）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、標本を作製して回折用チャンパーに取り付け、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、東京都立大学より動物実験計画の承認(A30-20, A31-1)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) 標本をチャンパーに固定した。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 3 分×3 回×IP2 枚分）。その後、細胞膜を 50 μ M β エスシン処理を行った。c) β エスシン処理開

始後 60 分で、X 線回折像を記録（露出 3 分×3 回×IP2 枚分）。d) β エスシン処理後 90 分後に、 Ca^{2+} を含まない人工細胞内液で灌流。灌流開始後 60 分後に筋弛緩時の X 線回折像を経時的に記録（露出 3 分×3 回×IP2 枚分）。細胞内 ATP 濃度変動が実験結果に与える影響を見積もるため、c) β エスシン処理中、d) 処理後において細胞内に ATP を含まない所謂硬直条件でも同様の実験を実施した。

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 β エスシン処理のみを実施しない条件で、同様の実験を行った際の X 線回折像も記録し、両者を比較検討した。

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。

3. 結果

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、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同一標本を用いて確認した。予備実験結果(Photon Factory Activity Report 2018 #36)と同様に、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、一方、子午反射の周期には変化が見られないことが定量的に明らかになった。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定量的に明らかになった。さらに、この様な赤道反射周期の拡大は、細胞内に ATP が存在しない硬直条件でも同様の結果が得られた。

4. 考察

盲腸紐に β エスシンによりスキンド処理を施し部分的に細胞膜を破壊しても、生筋同様に細胞内構造と配列が保持されるが、収縮フィラメント周期的配列に基づく赤道反射周期は拡大した。この赤道反射周期の拡大は、スキンド処理がもたらす細胞内 ATP 濃度の変動がもたらす収縮タンパク質構造・配列の変化によるものではないことから、細胞膜・細胞骨格による収縮タンパク質配置制御がスキンド処理により一部変化することが推察される。一方、 β エスシン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は、筋フィラメントタンパク質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。