

平滑筋フィラメント格子構造定量解析の試み

Quantitative analysis of lattice like structure of smooth muscles

渡辺 賢^{1*}, 石田行知², 木村雅子³, 竹森 重³, 湯本正寿³¹ 首都大学東京・人間健康科学研究科、〒116-8551 荒川区東尾久 7-2-10² 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 1196³ 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

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、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・脱重合に伴う細胞内分布の量的・空間的变化—リモデリング—によっても調節されている。この様な筋収縮タンパク質フィラメント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、主にリモデリングにかかわる細胞内情報伝達機構に関心が集まっている。しかし、リモデリングによる平滑筋細胞内の筋フィラメント構造変化の実態は未だ不明である。その一つの理由として、平滑筋細胞では収縮フィラメント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ることが挙げられる。一方 X 線回折法は、筋フィラメント構造を「生きたまま」経時的に観察できる手法ではあるが、脊椎動物の平滑筋から得られる X 線回折像は極めて微弱であり定量的な解析が困難であると考えられてきた。

本研究代表者は平滑筋収縮フィラメント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。そして、平滑筋細胞の筋収縮フィラメント構造動態観察を、主に子午反射強度変化を指標にして行ってきた。最近、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、従来いわれてきた 11-12 nm 周期の細いフィラメント格子様配列のみではなく、13.5 nm 付近、22 nm 付近にピークを持つ 2 種類の未知の反射も存在するという結果を得た。この事実は、平滑筋組織に細いフィラメントもしくは別のフィラメント由来の未知の格子構造が存在することを示唆する。しかし、その格子構造の実態は現在のところ全く不明であり、その解明には収縮・弛緩・硬直サイクルによる構造変化を詳細に検討する必要がある。

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、収縮・弛緩・硬直に伴う赤道反射の変化を定量的に解析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。

2) X 線回折実験 a) 標本をチャンバーに固定し、30°Cの実験条件で人工細胞内液を灌流した状態でイメージングプレートに X 線回折像を記録した。更に、溶液条件を ATP を除去した硬直条件、又、 Ca^{2+} を添加して収縮を起こす条件、に変え、X 線回折像の変化を見積もった。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。

全ての記録画像は施設内の BAS-2500 で読み取り、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

盲腸紐標本を Ca^{2+} で収縮させた際に、赤道反射強度の増強が観察された。一方、硬直条件では赤道反射強度の減弱が観察され、弛緩条件に戻すことにより、一部回復した。現在までの解析の結果、14nm と 20nm にピークを持つ赤道反射の強度比の低下が硬直条件によく対応しており、筋フィラメント格子様構造が、筋硬直条件では攪乱していることが示唆された。

謝辞

被災量子ビーム施設ユーザー支援課題 2011A1920 (受理番号: 18847) として、本研究の一部の実験を Spring-8BL-45 小角散乱ステーションにて、実施致しました。関係各位のご厚意に厚く御礼申し上げます。