

## ATP による平滑筋細胞内ミニサルコメアリモデリング

## ATP dependent remodeling of minisarcomere structure in vertebrate smooth muscle

渡辺 賢<sup>1\*</sup>, 石田行知<sup>2</sup>, 木村雅子<sup>3</sup>, 竹森 重<sup>3</sup>, 中原直哉<sup>3</sup>

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 Watanabe<sup>1</sup>, Yukisato Ishida<sup>2</sup>, Masako Kimura<sup>3</sup>, Shigeru Takemori<sup>3</sup> and Naoya Nakahara<sup>3</sup><sup>1</sup>Tokyo Metropolitan University, Tokyo, 116-8551, Japan<sup>2</sup>Bunkyo Gakuin University, Fujimino, 356-8533, Japan<sup>3</sup>The 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、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。

本研究代表者ら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。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、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が存在するという結果を得、BL-15A 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（平滑筋フィラメント格子構造定量解析の試み；2009G561）。そして細胞内 ATP 濃度減少により、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(2011

年日本生理学会大会—誌上開催—にて発表)。この事実、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。

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赤道反射プロファイルの変化の詳細を定量的に解析し、ミニサルコメア構造・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  $\beta$ -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）。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。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。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。

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

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。更に、同様の結果は、ミオシン ATP 結合・解離を特異的に阻害するプレビスタチン添加によっても得られた。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。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。

### 4 まとめ

ATP 濃度変化は、平滑筋細胞内ミニサルコメア構造のリモデリングに積極的に関与しており、平滑筋の収縮・弛緩制御メカニズムの一端を担っていることが明らかになった（本研究の一部は、2013 年 3 月に開催された物構研サイエンスフェスタでポスター発表した）。

\* masaru@hs.tmu.ac.jp