

機関番号：22604

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度 ～ 2010 年度

課題番号：19500356

研究課題名（和文）平滑筋フィラメントリモデリングによる力学応答変調を「はかる」

研究課題名（英文）Quantitative Evaluation of myofilaments remodeling during relaxation-contraction cycling in smooth muscle cells.

研究代表者 渡辺 賢 (WATANABE MASARU)

首都大学東京・大学院人間健康科学研究科・教授

研究者番号：60191798

研究成果の概要（和文）：平滑筋細胞における収縮フィラメント・リモデリングと細胞の力学応答の関係を定量的に検討する為に、力学特性を測定した標本の筋フィラメント構造の量的変化を電子顕微鏡観察、蛍光エネルギー移動法解析、電気泳動法等の手法を用いて測定した。更に X 線回折法を用いて力学応答とフィラメント動態変化の同時測定を行い、筋フィラメント格子配列に由来する反射が収縮・弛緩サイクルによって動的に変化することをとらえることに成功した。

研究成果の概要（英文）：To quantitatively evaluate the relation between myofilament remodeling and mechanical properties in vertebrate smooth muscle cells, by using electron microscopy, florescent resonance energy transfer (FRET) analysis and conventional electrophoresis techniques, we measured both the contractile force and changes in the myofilament structure of the same preparations of skinned (cell membrane permeabilized) taenia cecum. Also an X-ray diffraction study using skinned taenia cecum showed dynamic changes in the lattice structure originated from myofilament arrangement during contraction-relaxation cycles.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|----------|-------------|-----------|-------------|
| 平成 19 年度 | 900,000 円 | 270,000 円 | 1,170,000 円 |
| 平成 20 年度 | 800,000 円 | 240,000 円 | 1,040,000 円 |
| 平成 21 年度 | 800,000 円 | 240,000 円 | 1,040,000 円 |
| 平成 22 年度 | 800,000 円 | 240,000 円 | 1,040,000 円 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 円 | 990,000 円 | 4,290,000 円 |

研究分野：筋肉生理学

科研費の分科・細目：総合領域 脳神経科学 神経・筋肉生理学（B）

キーワード：平滑筋、筋収縮タンパク質、筋フィラメント、リモデリング

1. 研究開始当初の背景

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。このよう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いるが、リモデリング—平滑筋力学応答にどの様な相関があるか、詳細は未だ不明である。そこで、細胞・組織レベルで自在にリモデリング制御が可能で、更にリモデリング—力学応答の関係を定量的に評価できる実験系の構築が求められてきた。本研究代表者（渡辺）らは、フィラメント・リモデリングの細胞・組織レベルでの再現を目的として、スキンド（細胞膜破壊）平滑筋標本での細いフィラメント切断・再構成実験を行い、筋標本における人工的な細いフィラメントのリモデリング制御に成功した。更に、ミオシン II 阻害薬によりスキンド平滑筋標本の太いフィラメント構造を錯乱することを確認した。更に、平滑筋細胞の太いフィラメントと細いフィラメントの動態は各々独立しているのではなく、少なくとも特定の条件下では、相互に影響しあってリモデリングが調節されており、リモデリングと平滑筋力学応答の関係が単純ではないことを示唆する予備的な結果も得られた。

従って、平滑筋のフィラメント・リモデリングと力学特性の関係を定量的に評価するためには、太いフィラメントと細いフィラメント双方のリモデリング動態と力学応答を

同時に「はかる」必要性がある。

2. 研究の目的

以上の状況を受け、本研究では細胞膜を化学的に除去し、細胞内環境を自在に制御できるスキンド平滑筋標本を用いて、筋収縮タンパク質フィラメント構造と力学応答を同時に「はかり」、両者の関係を定量的に見積もることを目的とした。

太いフィラメントと細いフィラメントの構造および両者の相互作用の定量化には、従来用いられてきた手法を微小標本に適用するのみならず、新たに X 線回折法を用いて経時的に構造変化と張力変化を定量的に同時計測する実験手技の開発を目指した。

3. 研究の方法

平滑筋標本：モルモット盲腸縦走筋束を摘出し、界面活性剤 B-escin により細胞膜を、細胞骨格そのものには可能な限り影響を与えないように、破壊し、細胞外から細胞内環境が直接制御できるようにした。

収縮実験：筋束から、3~4 mm × 0.1~0.2 mm × 0.02~0.05 mm 程度の微小標本を作成し、張力計に接続した。還流液の組成を変えることによって細胞内環境を変え、その際の張力応答の変化を記録した。収縮実験終了時に標本を適切な方法で固定をし、筋収縮フィラメント構造測定に用いた。

フィラメント構造定量的測定：張力測定に用いた微小標本を用いて、透過型電子顕微鏡像、蛍光エネルギー移動法 (Fluorescent Resonance Energy Transfer ; FRET) 解析、タンパク質量の電気泳動を行い、太いフィラメントおよび細いフィラメントの構造変化を定量的に測定した。

X 線回折実験：(財) 高輝度光科学研究センタ

ー (SPring-8) および大学共同利用機関法人・高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 放射光実験施設 (PF) の小角散乱実験ステーション (BL-45XU SAX station ; SPring-8、BL-15A ; KEK-PF) において、非常に高い輝度の放射光を用いてスキンド平滑筋標本の X 線回折実験を行った。

X 線照射は照射部の損傷を引き起こすため、照射部位を変え、損傷をできるだけ起こさない必要がある。そのため標本は 30~40 mm × 3~5 mm × 0.1~0.2 mm の比較的長大なものを、回折実験専用の還流装置内に保持した。還流装置は電動式ステージに載せ、ステージを徐々に移動させ X 線照射部位を変え、一筋肉標本から 10 回程度の回折像を得ることを可能にした。

具体的は、スキンド標本の力学応答変化が定常状態に達したら 1 分 (SPring-8) または 5 分 (KEK-PF) X 線を照射し、得られた回折像を GE healthcare Imaging Plate® にて記録した。記録情報を SPring-8 および KEK-PF 内の専用ワークステーションで読み出し、研究代表者の所属研究室で解析をおこなった。

得られた回折像のうち、筋フィラメント由来の反射としては、ミオシンフィラメント由来 14.4 nm 子後反射、アクチンらせん構造由来 5.9 nm 子後反射、細いフィラメント格子状配列由来 11.4 nm 赤道反射が存在することが先行研究から明らかにされている。従ってそれらの反射の相対強度の変化を記録し、同時に計測した標本の力学応答と比較検討を行い、フィラメントリモデリングの経時変化と収縮の関係を定量的に検討した。

4. 研究成果

1) 細いフィラメントのリモデリング: アクチン切断タンパク質にリモデリングを自由に調節できる実験モデルの構築に成功した。そあ

して、アクチンのみの再構成のみの再構成では、収縮聴力の回復は十分にはなされないこと、アクチンに加え制御タンパク質トロポミオシン及びカルデスモンを導入して細いフィラメントを再構築した場合にのみ、平滑筋の収縮張力は対照群 (切断処理を行わなかった標本) と同等レベルまで回復することを明らかにした。また、切断および再構成実験時のこれらのタンパク質量の変化を定量的に測定することに成功した (雑誌論文2, 4)。

2) 太いフィラメントのリモデリング; ミオシン II 阻害薬ブレビスタチンおよびアラキドン酸により、筋標本の太いフィラメントリモデリングが起こり、太いフィラメントの配向が変化することを透過型電子顕微鏡像、FRET 解析により定量的にとらえることに成功した。そして配向変化に比例してミオシン ATPase 活性や収縮張力が変化することを明らかにした (雑誌論文1,3)。興味深いことに、ブレビスタチンによる太いフィラメント構造の攪乱に伴って、太いフィラメントと細いフィラメントの相互作用がないと考えられる弛緩時においても、細いフィラメントの配向の攪乱が起こることが示され、太いフィラメントと細いフィラメント間の連絡が単純ではないことが示唆された。

3) モデル平滑筋標本の X 線回折: 盲腸紐の X 線開設実験を行い、力学応答と X 線回折像プロファイルの同時・定量的な記録に成功した (雑誌論文5)。そして赤道反射プロファイルの解析から、この反射が従来言われてきた細いフィラメントの格子状配列のみならず、別の筋収縮フィラメントタンパク質の格子状配列に由来する 3~4 つの反射の合成であることを見出した (学会発表1,2,4)。

3. 現在までの達成度

実験モデル作成および、X線回折像プロファイルの定量的な記録に成功した。一方、プロファイル由来を同定することは本研究終了までにはかなわなかった。今後継続して研究を進めるとともに、電子顕微鏡やNMR測定等により、細胞内のフィラメント動態をあきらかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Watanabe M, Yumoto M, Tanaka H, Wang HH, Katayama T, Yoshiyama S, Black J, Thatcher SE, Kohama K. Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses contraction and disrupts contractile filaments organization of skinned taenia cecum from guinea pig Am J Physiol Cell Physiol 2010; 298:1118-1126.

2) Watanabe M, Ishiwata S, Liou Y-M. A potential role of actin filament polymerization/depolymerization in smooth muscle contraction. Adaptive Medicine 2010; 2: 23-28

3) Katayama T, Watanabe M, Tanaka H, Hino M, Miyakawa T, Ohki T, Ye LH, Xie C, Yoshiyama S, Nakamura A, Ishikawa R, Tanokura M, Oiwa K, Kohama K. Stimulatory effects of arachidonic acid on myosin ATPase activity and contraction of smooth muscle via myosin motor domain. Am J Physiol Am J Physiol Heart Circ

Physiol.; 298: H505-H514.

4) Liou YM, Watanabe M, Yumoto M, Ishiwata S. Regulatory mechanism of smooth muscle contraction studied with gelsolin-treated strips of Taenia Caeci in Guinea Pig. Am J Physiol Cell Physiol 2009; 296: 1024-1033.

5) 渡辺 賢, 小比類巻 生, 湯本 正寿. 血管異常収縮の新しい治療戦略: 平滑筋収縮タンパク質フィラメント構造と機能からのアプローチ. 日本薬理学雑誌 2009; 133: 130-133.

[学会発表] (計 7 件)

1) Watanabe M, Kimura M, Taguchi M, Takemori S, Ishida Y, Yumoto M, Yagi N. ATP depletion induces disturbance of myofilament lattice structure in smooth muscle cells. 第88回日本生理学会大会. 誌上開催 (震災のため). 2010年3月. 抄録集 p250.

2) 渡辺 賢, 石田行知, 木村雅子, 田口美香, 竹森 重, 湯本正寿, 山口真紀, 八木直人: X線小角散乱による平滑筋・筋フィラメント格子動態解析の試み (第2報). 第52回日本平滑筋学会総会. 宮城県仙台市. 2010年7月. 日本平滑筋学会雑誌 14; J-31, 2010

3) Watanabe M, Kimura M, Taguchi M, Takemori S, Ishida Y, Yumoto M, Yagi N. Analysis of lattice like arrangement in skinned taenia cecum by using X-ray diffraction technique. 第87回日本生理学会大会. 岩手県盛岡市. 2010年5月. J Physiol Sci 60; S87, 2010

4). Watanabe M, Kimura M, Taguchi M, Ishida Y, Yumoto M, Yagi N, Takemori S: An X-ray diffraction study on skinned smooth muscles of taenia cecum from guinea pig. The 36th Congress of the International Union of Physiological Science. 京都市 2009年7月30日.

5) ●Watanabe M, Kimura M, Taguchi M, Ishida Y, Yumoto M, Yagi N, Takemori S: Analysis of lattice like arrangement in skinned smooth muscles by using X-ray diffraction technique. Satellite symposium of the IUPS 2009 "Post-Genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle. 愛知県名古屋市. 2009年7月23日. Abstracts p59

6) ●Watanabe M, Kobirumaki F, Yumoto M: Role in myofilaments dynamics in smooth muscle excitation-contraction coupling. 第85回日本生理学会大会. 東京都新宿区. 2008年3月26日. J Physiol Sci 58; s31, 2008.

7) ●渡辺 賢、小比類巻 生、湯本 正寿: 血管異常収縮の新しい治療戦略: 平滑筋収縮タンパク質フィラメント構造と機能からのアプローチ. 第81回日本薬理学会大会. 神奈川県横浜市. 2008年3月18日. J Pharmacol Sci 106; 34p, 2008

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 賢 (WATANABE MASARU)

首都大学東京・健康福祉学部／人間健康科学研究科・教授

研究者番号：60191798

(3)連携研究者

木村 雅子 (KIMURA MASAKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30328314

石田 行知 (ISHIDA YUKISATO)

文京学院大学・保健医療技術学部・教授

研究者番号：50092135