

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：22604  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2011～2015  
課題番号：23500475  
研究課題名(和文) 平滑筋収縮フィラメント・リモデリングによるアクチンミオシン相互作用変調の仕組み

研究課題名(英文) Mechanisms of regulation of actin-myosin interaction induced by remodeling of contractile filaments in living smooth muscle

研究代表者  
渡辺 賢(WATANABE, MASARU)  
首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：60191798  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を破壊した平滑筋スキンド標本を用いて、フィラメント・リモデリングによる平滑筋収縮制御のメカニズムの検討を2つの方法を用いて検討した。(1) X線回折実験：モルモット盲腸紐またはラット肛門尾骨筋の弛緩時、収縮時のX線回折像を撮影し、赤道反射強度と力学応答の関係を経時的に記録した。ミオシンリモデリング条件下でミオシンのみならず、細い平滑筋収縮フィラメント配列についても攪乱が起こることを実証した。(2) X線回折実験と同様の条件で、生理学・生化学実験析を行った。フィラメント配列攪乱によりラッチブリッジ形成抑制が観察され、それはプロテインホスファターゼ2Aに依存した。

研究成果の概要(英文)：To explore the mechanisms of regulation of actin-myosin interaction induced by remodeling of contractile filaments in living smooth muscle, we examined X-ray diffraction studies and also force measurements in skinned (cell membrane permeabilized) smooth muscle. In skinned taenia cecum in the resting state, myosin-remodeling induced diffuse equatorial peak at 11.4 nm originated from lattice-like arrangement of the thin filaments, indicating that functional changes in smooth muscle myosin molecules regulate the organization of thick-filaments, resulting in the alteration of thin-filaments structure and/or organization even in the absence of cross-bridge formation. Under the same experimental conditions, we found that myosin remodeling changed chemo-mechanical coupling of skinned taenia cecum, because such a stimuli accelerated relaxation processes by interference of latch-bridge formation.

研究分野：生理学

キーワード：平滑筋 収縮フィラメント 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、収縮タンパク質フィラメントの細胞内分布の量的・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おり、現在、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。一方、リモデリングと平滑筋力学応答にどのような相関があるか、詳細は長らく不明であった。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いた。本研究代表者は、既に盲腸紐の X 線回折実験を行い、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(渡辺ら、日本薬理学雑誌 2009; 133: 130-133)。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。しかし、各々の赤道反射の由来、又、格子構造変化がアクチン・ミオシン相互作用に与える影響はいまだ詳らかではなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)平滑筋収縮タンパク質フィラメント格子配列由来の赤道反射の由来を、X 線回折実験、生理学実験・生化学実験により特定すること、(2)フィラメントリモデリングにより力学応答が変調するメカニズムを明らかにすること、の 2 点を具体的な研究目的とし、最終的には筋収縮タンパク質フィラメント・リモデリングが平滑筋収縮に果たす意義を細胞・組織レベルで解明することを目標とした。

## 3. 研究の方法

平滑筋標本：モルモット盲腸紐縦走筋及び気管束を摘出し、界面活性剤 -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(スキンド標本)し、細胞外から細胞内環境が直接制御できるようにした。

(1) 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。

具体的には、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。従ってこ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。

特に本研究では、フィラメントリモデリングを惹起することが知られている、ミオシン II 阻害薬、ヌクレオチド濃度減少、X 線連続照射について主に検討を行った。

(2) 力学実験：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。特に本研究では、比較的強固なサルコメア様構造を持つと考えられている盲腸紐と、ミオシンフィラメントリモデリングについての研究報告がある気道平滑筋に対する、ミオシン II 阻害薬の影響を比較検討し、ミオシンリモデリングのメカニズムについても検討した。

収縮張力の比較のみならず、ミオシン・アクチン相互作用のキネティクスを詳細に検討するため、収縮状態からの弛緩過程について経時変化を記録し、ラッチブリッジモデルを基に解析を行なった。

(3) 生化学実験他：力学実験で使用した標本を固定して、ミオシン活性化状態(軽鎖リン酸化)を測定すると共に、電子顕微鏡観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) X 線回折実験

ミオシン II 阻害薬 Blebbistatin 処理、人工細胞内液ヌクレオチド濃度減少、又、X 線連続照射のいずれも、盲腸紐のフィラメント

格子構造由来赤道反射の強度を減弱させた（図1：処理前と処理中の赤道反射強度の差、オレンジ色が処理前に比べて減弱、青色が処理前に比べて増大）。

前二者については、処理終了後に強度の一部回復が観察された。

その一方で、バックグラウンド（図1、青色部分）が増大したことから、ミオシンフィラメント構造の攪乱と共に、ミオシンやアクチンなどのモノマー量が増加したことが示唆される（坂本ら、2015）。

ミオシン II 阻害薬処理でも、細いフィラメント（アクチン+制御タンパク質）格子に由来する11.4 nm 赤道反射でも見られたことから、細いフィラメントのリモデリングにミオシンフィラメントが何らかのかかわりを持っていることが示唆された（Watanabe et al., 2015）。

フィラメント攪乱による赤道反射強度変化

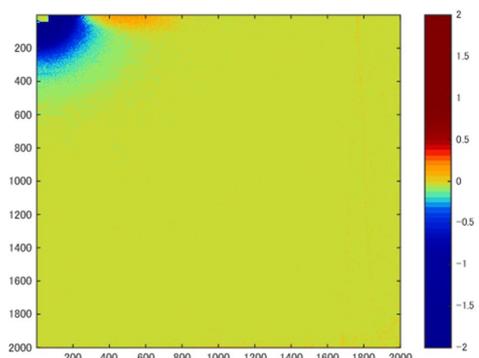


図 1

## (2) 力学実験

気管平滑筋収縮に対するミオシン II 阻害薬の効果：ミオシン II 阻害薬 blebbistatin のモルモット気管平滑筋スキンド（細胞膜破壊）標本収縮に対する効果を、ミオシン軽鎖リン酸化依存性、非依存性収縮の何れについても検討し、ミオシン軽鎖リン酸化レベルに全く影響を与えずに、blebbistatin が収縮を抑制すること、そしてその抑制効果は（ミオシンリモデリングが少ないとされる）モルモット盲腸紐標本よりも大きいことを明らかにした（Yumoto, Watanabe 2013）。

弛緩経過におけるミオシン II 阻害薬 blebbistatin 及び N-benzyl-nitrosotoluensulfonamide の影響：モルモット盲腸紐スキンド標本の収縮→弛緩への移行過程の力学応答変化を詳細に検討し、これらの阻害薬が弛緩経過を促進すること、又、その効果は、主に速いクロスブリッジサイクルからゆっくりとした張力保持過程（ラッチブリッジ）への移行の抑制によるものであることを明らかにした（図2）。

この結果から、ミオシンフィラメントリモデリングにより、速いアクチンミオシン相互作用からラッチブリッジへ移行する、という

化学・力学変換過程の変調が起こることが明らかになった（Watanabe et al. 2013, Watanabe et al. 2013b, Watanabe et al. 2015 など）。

ミオシン II 阻害薬はスキンド平滑筋標本の弛緩をラッチブリッジ形成阻害することで促進する

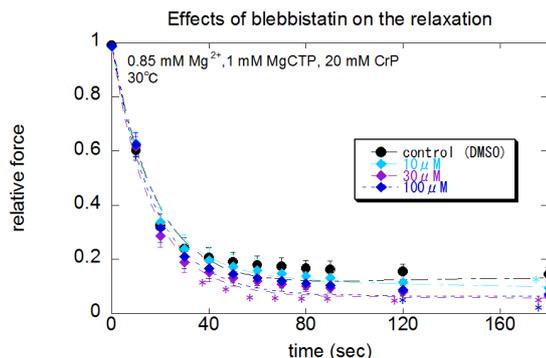


図 2

数 μM 程度の PP2A 阻害薬 Rubratoxin A はラッチ形成率 a を低下させることでスキンド平滑筋弛緩を促進する

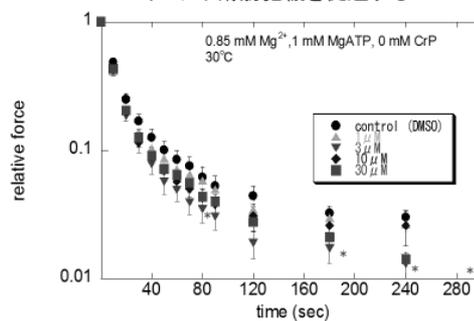


図 3

更に、本研究の実施の過程で、プロテインホスファターゼ 2A もミオシン II 阻害薬と同様の弛緩過程促進効果を持つことを見出した（図3）。

これは、平滑筋収縮フィラメントリモデリングにプロテインホスファターゼ 2A が関与することを強く示唆する（渡辺 2015）。現在、その作用点を明らかにすべく、検討を開始している。

(3) 生化学実験他：ミオシン軽鎖リン酸化測定を平滑筋の小標本で定量的に解析することに成功した。H-NMR については、緩和時間の測定には成功したが、実験条件によりばらつきが大きく、定量的な解析を行うための条件設定を再度行っている。

## 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 1 件)

1. Yumoto M, Watanabe M. Blebbistatin, a myosin II inhibitor,

suppresses Ca<sup>2+</sup>-induced and "sensitized"-contraction of skinned tracheal muscles from guinea pig. J Smooth Musc Res 2013; 49: 89-98. (査読有)

〔学会発表〕(計 12件)

1. 渡辺 賢 平滑筋収縮におけるプロテインホスファターゼ 2A の役割. 第 57 回日本平滑筋学会総会. 2015 年 8 月 25-27 日. 山口大学医学部 (山口県、宇部市)

2. 坂本 麻衣, 渡辺 賢, 中原 直哉. X 線連続照射による平滑筋収縮フィラメント構造の攪乱. 第 57 回日本平滑筋学会総会. 2015 年 8 月 25-27 日. 山口大学医学部 (山口県、宇部市)

3. Watanabe M. Nucleotide dependence on the accelerating effects of myosin II inhibitors on the smooth muscle. 第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21 - 23 日. 神戸国際会議場 (兵庫県、神戸市)

4. 渡辺 賢 ミオシン ATPase 阻害薬による平滑筋収縮抑制のメカニズム. 第 24 回日本病態生理学会大会. 2014 年 8 月 9-11 日. 北九州国際会議場 (福岡県、北九州市)

5. 渡辺 賢 ミオシン II 阻害薬による平滑筋弛緩促進のメカニズム. 第 56 回日本平滑筋学会総会. 2014 年 8 月 6 - 8 日. 新横浜プリンスホテル(神奈川県、横浜市)

6. Watanabe M, Ishida Y, Nakahara N, Taguchi M, Kimura M, Takemori S. Regulation of thick and thin filaments organization by smooth muscle myosin. 第 91 回日本生理学会大会. 2014 年 3 月 16-18 日. 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県、鹿児島市)

7. Watanabe M, Yamamura S. Myosin II inhibitors accelerate relaxation of skinned taenia cecum. Regulatory Circuits in Cell Motility. 2013 年 10 月 11-12 日. Thomas Jefferson University (米国、ペンシルバニア州、フィラデルフィア)

8. 渡辺 賢, 山村 聡. ミオシン II 阻害薬によるスキンド平滑筋弛緩促進のメカニズム. 第 55 回日本平滑筋学会. 2013 年 8 月 6-8 日. 旭川クリスタルホール (北海道、旭川市)

9. Watanabe M, Yamamura S. Mechanisms of blebbistatin induced smooth muscle relaxation. 第 90 回日本生理学会大会. 2013 年 3 月 27-29 日. タワ

ーホール船堀 (東京都、江戸川区)

10. 渡辺 賢, 石田行知, 他 7 名 ミオシン阻害薬による平滑筋フィラメント配列の攪乱. 第 1 回物構研サイエンスフェスタ. 2013 年 3 月 14-15 日. つくば国際会議場エポカル (茨城県、つくば市)

11. 渡辺 賢, 山村 聡, 湯本正寿, 中野 真. ミオシン II 阻害薬によるスキンド平滑筋弛緩過程. 第 54 回日本平滑筋学会総会. 2012 年 8 月 2-3 日東京慈恵会医科大学 (東京都、港区)

12. Watanabe M. Accelerating effects of myosin II inhibitors on the relaxation process of skinned taenia cecum from guinea pig. 第 89 回日本生理学会大会. 2012 年 3 月 29-31 日. 信州大学松本キャンパス他 (長野県、松本市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
渡辺 賢 (WATANABE MASARU)  
首都大学東京・人間健康科学研究科・教授  
研究者番号 : 60191798

(2) 連携研究者  
石田 行知 (ISHIDA YUKISATO)  
文京学院大学・保健医療学部・教授  
研究者番号 : 50092135