

機関番号：32651
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20500368
研究課題名（和文）心筋収縮構造の再構築によるスターリングの心臓法則の分子メカニズムの解明
研究課題名（英文） Elucidation of the Frank-Starling mechanism of the heart by thin filament reconstitution
研究代表者 福田 紀男（FUKUDA NORIO）
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号 30301534

研究成果の概要（和文）：スターリングの心臓法則は、心筋サルコメアの発生張力が伸展によって増大するという「筋長効果」に基づいている。本研究において申請者らは、筋長効果の程度が細いフィラメントの協同性と逆相関していることを見出した。また、実験的に得られた結果を、Ca²⁺依存性の細いフィラメントの ON-OFF スイッチ機構と格子間隔を組み入れたモデルによって、定量的にシミュレートすることに成功した。これらの結果は、Frank-Starling 機構が細いフィラメントの協同性によって制御されていることを示している。

研究成果の概要（英文）：Cardiac sarcomeres produce greater active force in response to stretch, forming the basis of the Frank-Starling mechanism of the heart. The purpose of this study was to provide the systematic understanding of length-dependent activation, by investigating experimentally and mathematically how the thin filament “on-off” switching mechanism is involved in the regulation. Our experimental analyses revealed that the magnitude of length-dependent activation was inversely correlated with thin filament cooperative activation. These results were quantitatively simulated by a model that incorporates the Ca²⁺-dependent “on-off” switching of the thin filament state and interfilament lattice spacing modulation. These findings demonstrate that the Frank-Starling relation is regulated by thin filament cooperative activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究代表者の研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 神経・筋肉生理学

キーワード：生理学、生物物理、細胞・組織、生物・生体工学、生体分子

1. 研究開始当初の背景

筋長効果は、心筋の収縮構造（サルコメア）に備わっている非常に重要な生理的調節機構であるが、その分子メカニズムは未だに解明されておらず、筋生理学における最も重要な研究テーマの一つとなっている。一方、心不全患者では、スターリング機構の減弱にともない運動耐容能が低下していることはよく知られており、筋長効果の分子メカニズムを解明することは、臨床的見地からも非常に重要である。これまでの研究において、申請者らは、シンクロトロン X 線による、高い時間・空間分解能での構造機能相関の解析を心筋において実現し、巨大弾性タンパク質タイチン（コネクチン）の伸展にともなう格子間隔の縮小が、筋長効果のトリガー因子として働いていることを突きとめた。しかしながら、この結果だけでは、筋長効果の分子メカニズムを十分に解明したとは言えない。なぜなら、クロスブリッジの結合・乖離は細いフィラメントの ON-OFF スイッチ制御の支配下にあり、筋長効果の全容を明らかにするためには、細いフィラメントの役割を系統的に明らかにする必要があるからである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋サルコメアの細いフィラメントの機能に焦点を当て、筋長効果の分子メカニズムをサルコメアレベルで系統的に解明することである。

3. 研究の方法

1) スキンド標本の作製

スキンド標本の作製、張力測定および電気泳動については、すべて我々の過去の報告に基づいて行った。すなわち、ブタ左心室乳頭筋から小筋束（直径：約 1 mm、長さ：約 1 cm）を切離し、1% (w/v) の Triton X-100 を含む弛緩溶液（pCa 9.0）中でスキンド処理を行った（約 3°C でオーバーナイト）。その後、Triton X-100 を弛緩溶液（5 mM MgATP、40 mM BES、1 mM Mg²⁺、10 mM EGTA、1 mM dithiothreitol、15 mM phosphocreatine、15 U/ml creatine phosphokinase、180 mM ionic strength (adjusted by K-propionate)、pH 7.0）で十分に洗浄し、50% のグリセロール (v/v) を含む弛緩溶液に保存した（-20°C で 3 週間まで）。タンパク質の分解を防ぐため、プロテアーゼ阻害剤（PMSF 0.5 mM、leupeptin 0.04 mM、E64 0.01 mM）を使用した。

2) トロポニン入れ替え

上記の筋束より細い筋線維（直径：約 0.1 mm）を切離し、ウサギ骨格筋速筋より抽出した高濃度のトロポニン（Tn）複合体（sTn：

2 mg/ml）を含む強直溶液に 1 時間ほど浸した。Tn を入れ替えた標本は、弛緩溶液（pCa 9.0）で 10 分ほど洗浄した。Tn の入れ替え率は、電気泳動（SDS-PAGE、15% gel）によって判定した。

3) 筋線維の張力測定

高感度トランスデューサー（AE-801）とフックに筋線維の両端を固定した。サルコメア長（sarcomere length : SL）はレーザー回折法によって測定し、弛緩条件（pCa 9.0）下で 1.9 μm に設定した。その後、標本を各 pCa (= -log [Ca²⁺]) の各活性溶液に浸し、Ca²⁺活性化張力を測定した（張力測定はすべて 15°C）。次いで SL を 2.3 μm に伸展し、静止張力が定常状態に達する 20 分後に各 pCa 溶液で張力測定を行った。静止張力には活性張力測定直前の値を用いた。測定終了後、標本の断面積を計算し、単位断面積あたりの静止張力および活性張力を求めた。各標本における pCa-張力関係をグラフ化し、Hill 式を用いてフィッティングした。最大張力の 50% の張力が発生する pCa の値を pCa₅₀ とした。それぞれの標本で SL を 1.9 から 2.3 μm に伸展させた際の pCa₅₀ の変化分を ΔpCa₅₀ とし、これを筋長効果の指標とした。

なお、本研究では、外因性にクロスブリッジ（アクチン-ミオシン）形成の協同性を変化させた際、筋長効果がどのような影響を受けるかも調べた。すなわち、クロスブリッジ形成は協同的プロセスであるため、周辺のコロスブリッジの形成によって大きな影響を受ける。我々は MgADP を加えると結合クロスブリッジの数が増加して活性張力が上昇すること、逆に、無機リン酸（Pi）を加えると結合クロスブリッジの数が減少して活性張力が低下することを見出している。本研究では、3 mM MgADP および 20 mM Pi が筋長効果に及ぼす影響を探った。

4) 動力学的特性の評価

クロスブリッジの動力学的特性は、 k_{tr} を測定することによって求めた。すなわち、心筋の活性張力が定常状態に達した直後に筋長を高速で短縮し、その後再び元の長さに戻した。筋長変化はいずれも高速で行った（~2 ms）。我々はこの過程を、指数関数で近似した。すなわち、 $F(t) = F_{ss} \times (1 - \exp(-k_{tr}t)) + F_{res}$ である（ここで、 k_{tr} が張力発生過程を示し、 $F(t)$ は筋長変化後の張力、 F_{res} は短縮/伸展直後の残存張力、 F_{ss} は短縮/伸展直前の等尺性張力を示す）。 k_{tr} は、クロスブリッジが一回転（結合+乖離）する速度を表す。本研究では、sTn 置換によって k_{tr} がどのように変化するかを調べた。

4. 研究成果

1) 筋長効果に及ぼす協同性の影響

-ADPおよびPiの影響-

筋長効果に対する ADP や Pi の影響について、pCa-張力関係にまとめた結果を図 1A,B に示す。上段の縦軸は、pCa 4.5 の最大張力値に対する各 pCa 溶液での相対値(%)を表す。また、下段には静止張力の値を示す。+MgADP 群 (協同性上昇) では、いずれの SL においても、コントロール群に比し Ca²⁺感受性は上昇していたが、その効果は SL 1.9 μm においてより大きかった。その結果、ΔpCa₅₀ が減弱した。逆に、+Pi 群 (協同性低下) では、いずれの SL においても Ca²⁺感受性は低下していたが、その効果は SL 1.9 μm においてより大きかった。その結果、ΔpCa₅₀ が増大した。また、図には示さないが、MgADP や Pi の効果は、sTn 再構築した標本においても認められた。これらの結果は、筋長効果が細いフィラメントの協同性の度合いと逆比例していることを示している。図 1C には、収縮性の指標として規定した pCa₅₀ (pCa 曲線の中点) と筋長効果との関係を示す。収縮性が高いほど、すなわち協同性が高いほど、筋長効果は減弱することが見出された。

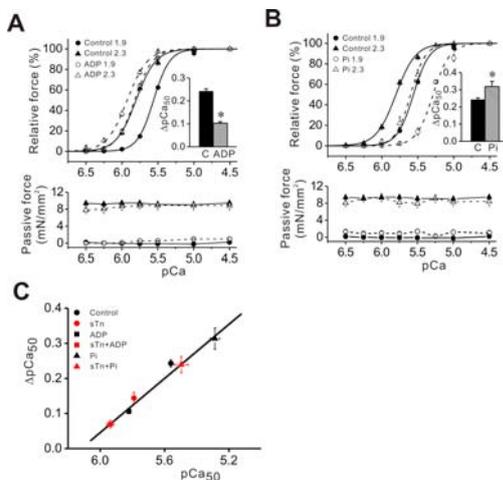


図 1: A) pCa-張力関係に及ぼす 3 mM MgADP の影響 (上)。曲線は pCa 4.5 にて規格化してある。下図は、静止張力の値を示す。*P<0.05。B) pCa-張力関係に及ぼす 20 mM Pi の影響 (上)。曲線は pCa 4.5 にて規格化してある。下図は、静止張力の値を示す。*P<0.05。C) pCa 曲線の中点 (pCa₅₀) と筋長効果 (ΔpCa₅₀) との関係。±ADP、Pi、sTn 再構成について、直線関係が得られた。なお、pCa₅₀ と収縮速度とは逆相関の関係にある (図には示さない)。すなわち、pCa₅₀ の値が大きければ大きいほど、素早い収縮を示す (下参照)。

2) クロスブリッジの動学的特性に及ぼす sTn 入れ替えの影響

sTn 入れ替えがクロスブリッジの動学的特性に及ぼす影響を図 2A に示す。コントロールの心筋において、k_{tr}は Ca²⁺濃度依存性に変化した。sTn 入れ替えによって、すべての Ca²⁺濃度において k_{tr}は上昇したが、この効果は中間活性条件、特に活性レベルが 30%ほどの際により顕著であった。図 2B は、活性張力と k_{tr}の関係を示す。張力レベルが似たような条件において、k_{tr}が上昇していること、すなわちクロスブリッジの形成が促進されていることが分かった。

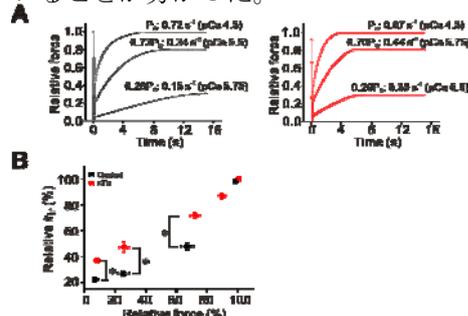


図 2: k_{tr} に及ぼす sTn 再構成の影響。A) 実トレース。左はコントロール、右は sTn 再構成を示す。B) k_{tr} と張力との関係。同じ張力レベルにおいて、k_{tr} は sTn 再構成によって上昇した。

筋生理学においては、協同性を正確に表現する力学パラメータは未だに確立されていないが、申請者らは協同性を「情報伝達の手数」と解釈し、収縮速度をその指標とした。その結果、筋長効果と収縮速度との間に負の相関があることを見出した (図 1, 2)。すなわち、細いフィラメントの協同性が上昇すると、潜在的に力を発揮し得るクロスブリッジ (recruitable cross-bridges) の数が減少し、筋長効果が減弱するものと解釈された。

3) 筋長効果のモデリング

本研究で用いた筋長効果のモデルを図 3 に示す。このモデルには二つの特徴がある。すなわち、1) サルコメアの伸展にともなって、格子間隔 (アクチン (細い) フィラメントとミオシン (太い) フィラメントの幅) が縮小する、2) Ca²⁺濃度の上昇にともなって、アクチンフィラメントが熱的に揺らぐ、ということである。

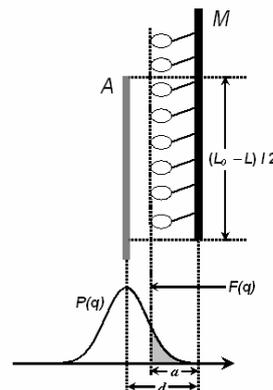


図 3: シミュレーションに使ったサルコメアモデル。A はアクチンフィラメント、M はミオシンフィラメントをそれぞれ示す。アクチンフィラメントは、 Ca^{2+} 濃度の上昇とともに、ガウス分布 ($P(q)$) にしたがって熱的に揺らぐと仮定。d は格子間隔。(L₀-L) / 2 はフィラメントの重なり幅。a の領域において、アクトミオシン相互作用が生じている。

本研究では、ブタ心筋のコントロール標本と sTn 入れ替え標本についてシミュレーションを行った。その結果、sTn によって、細いフィラメントの揺らぎの、 Ca^{2+} 濃度依存性の協同性が上昇すると仮定することによって、pCa-張力関係を定量的にシミュレートすることに成功した (図 4A) さらに、計算を拡張し、細いフィラメントの機能を、協同性と Ca^{2+} 感受性の二つに分割し、筋長効果は前者によって調節されていることを見出した。病態心筋では細いフィラメントの調節機構が著しく変化していることはよく知られており、これらの結果は、病態心臓の機能を理解する上でも重要であると考えられる。

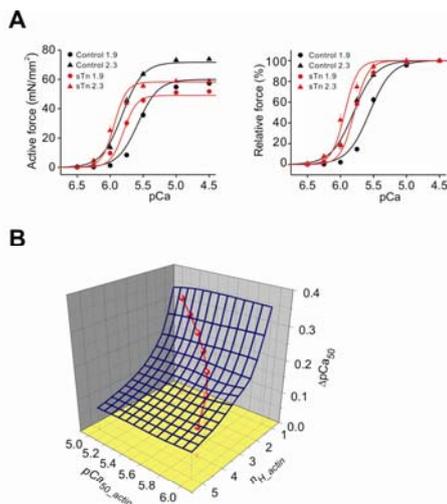


図 4: シミュレーションの結果 (実線: プロットは実験データを示す)。A: pCa-張力関係 (左: 絶対張力、右: 相対張力 (pCa 4.5 にて規格化))。B: 筋長効果 (Z 軸) に及ぼす細いフィラメントの Ca^{2+} 感受性 (pCa_{50_actin}) と協同性 (n_{H_actin}) の影響。筋長効果は協同性に大きく依存している。3D 図における青のメッシュ面が筋長効果の解を示す。

以上、本研究を遂行することによって、筋生理学において大きな問題とされてきた筋長効果の分子メカニズムを、サルコメアレベルで解明することに成功した。今後、臓器レベル、さらには動物個体レベルでの解析が必要になると考えられる。

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 6 件)

(1) S. Ishiwata, Y. Shimamoto (equal first author), N. Fukuda (equal first author). Contractile system of muscle as an auto-oscillator. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **105**, 187-198, (2011).

(2) N. Fukuda, T. Terui, S. Ishiwata, S. Kurihara. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **48**, 876-881, (2010).

(3) T. Terui, Y. Shimamoto, M. Yamane, F. Kobirumaki, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara, N. Fukuda. Regulatory mechanism of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle: role of thin filament cooperative activation in the Frank-Starling relation. *Journal of General Physiology* **136**, 469-482, (2010).

(4) D. Matsuba, T. Terui, J. O-Uchi, H. Tanaka, T. Ojima, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara, N. Fukuda. Protein kinase A-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in cardiac and fast skeletal muscles after reconstitution with cardiac troponin. *Journal of General Physiology* **133**, 571-581, (2009). (Featured in *Journal of Cell Biology*).

(5) N. Fukuda, T. Terui, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara. Titin and troponin: central players in the Frank-Starling mechanism of the heart. *Current Cardiology Reviews* **5**, 119-124, (2009).

(6) N. Fukuda, H.L. Granzier, S. Ishiwata, S. Kurihara. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *Journal of Physiological Sciences* **58**, 151-159, (2008).

[学会発表] (計 10 件)

(1) S. Shintani, M. Yamane, K. Oyama, S. Kurihara, S. Ishiwata, N. Fukuda. "Microscopic analyses of sarcomeric oscillations in rat neonatal cardiomyocytes. 第 55 回米国生物物理学会 2011.3

(2) 福田紀男、照井貴子、小比類巻生、芹澤隆博、下澤東吾、石渡信一、栗原 敏 「筋収

縮自励振動現象 (SPOC) の生理的意義」 第 48 回日本生物物理学会 仙台 2010.9

(3) 新谷正嶺、山根光智、大山廣太郎、栗原敏、石渡信一、福田紀男 「幼弱心筋細胞における筋収縮自励振動現象 (SPOC) の顕微解析」 第 48 回日本生物物理学会 仙台 2010.9

(4) 福田紀男 「心筋収縮系における自励振動現象 (SPOC) の生理的意義」 第 8 回ナノ学会 2010.5

(5) 新谷正嶺、大山廣太郎、山根光智、栗原敏、石渡信一、福田紀男 「筋収縮自励振動現象 (SPOC) の生理的意義：幼若心筋細胞を使った解析」 第 8 回ナノ学会 2010.5

(6) N. Fukuda, T. Serizawa, S. Shintani, T. Terui, S. Ishiwata, S. Kurihara. Single sarcomere imaging in cardiomyocytes with quantum dots (Qdots): physiological significance of SPOC in cardiac beat. 第 54 回米国生物物理学会 2010.2

(7) T. Terui, S. Shingani, S. Ishiwata, S. Kurihara, N. Fukuda. Single sarcomere imaging by quantum dots (Qdots) in the heart. 第 54 回米国生物物理学会 2010.2

(8) T. Terui, Y. Shimamoto, M. Sodnomsereen, M. Yamane, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara, N. Fukuda. "Role of thin filament cooperative activation in length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle". 第 53 回米国生物物理学会 2009.2

(9) N. Fukuda, D. Matsuba, T. Terui, J. O-Uchi, H. Tanaka, T. Ojima, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara. "Protein kinase A-based modulation of Ca^{2+} sensitivity in skinned skeletal muscle fibers reconstituted with cardiac troponin". 第 53 回米国生物物理学会 2009.2

(10) 福田紀男: Nonlinear properties of cardiac sarcomeres: novel insights into the physiology of the heart. 第 36 回国際生理学会、京都国際会議場 (京都) 2009.7

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

福田紀男. 心筋収縮系の運動特性：自励振動現象 (SPOC) と心拍. 日本生物物理学会 ホームページ.

<http://www.biophys.jp/wiki/wiki007.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 紀男 (FUKUDA NORIO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30301534

(2) 研究分担者

栗原 敏 (KURIHARA SATOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90057026

(3) 研究分担者

大槻 磐男 (OHTSUKI IWAO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70009992

(4) 連携研究者

石渡 信一 (ISHIWATA SHIN'ICHI)

研究者番号：10130866