

心筋・血管平滑筋における収縮制御の分子生理学

《研究の概要》

心循環器系の機能を支える心筋および血管平滑筋の収縮とその調節に関して、生きた細胞から個体に至るレベルにおける生理的、病態生理的諸現象を分子レベルできっちりと理解すること、また、それによって心循環器系疾患に対する新しい治療薬ないしは治療方法の開発に資することを目的として、5名の班員がそれぞれの持つ優れた研究基盤に立ち、その特徴ある技術を駆使して、それぞれの面から本研究を行った。

血管平滑筋に関して、**飯野**は収縮調節のみならず細胞増殖にも関係する Ca^{2+} 動態を解析し、平滑筋細胞において8秒に1回程度の自発的な Ca^{2+} 濃度上昇 (Ca^{2+} リプル)が生じていることを明らかにし、自然発症高血圧ラットにおいてそれが微妙に変化していることを見出した。 Ca^{2+} リプルの原因としてラットではレニン・アンジオテンシン系が関与していることが薬理学的実験から示唆されたが、マウスではレニン・アンジオテンシン系とは独立のメカニズムで Ca^{2+} リプルが形成されていることを示唆する結果を得た。

心筋、平滑筋、膵臓等に存在する ATP 感受性カリウムチャネル (K_{ATP}) は、細胞の代謝状態を電氣的興奮と連関させる働きを有している。これを活性化するカリウムチャネル開口薬は高血圧、狭心症、心筋梗塞などの治療薬として大きな可能性を持つが、その副作用のため一部を除いて臨床応用に至っていない。このチャネルは sulfonylurea 受容体 (SUR) と膜 2 回貫通型カリウムチャネル Kir6.0 の二つのサブユニットからなる異種重合体である。**倉智**は培養細胞を用いた電気生理学的アッセイ系と構造生物学的手法を組み合わせ、この K_{ATP} の臓器特性を含めたチャネル活性の基本的な性質とカリウムチャネル開口薬の作用機序について、チャネル構造に関連付けることのできる知見を得た。

哺乳動物心筋の興奮収縮連関機構の通説 calcium-induced calcium release (CICR) 説に一見矛盾するアデニンの薬理作用が永年の懸案であったが、**遠藤**はそれがアデニン作用の複雑さから来るもので、CICR 説と矛盾はないことを明らかにした。したがって CICR を促進する化合物は、新しい強心薬となる可能性があるので、多くの化合物を合成、スクリーニングし、それらのリアノジン受容体 (カルシウム放出チャネル) に対する作用について検討した。

杉浦は、心筋ミオシン軽鎖の機能的意義を分子レベルと細胞レベルの実験で検討した。その結果、軽鎖がユニークなメカニズムで心臓の収縮機能を調節していることを見出した。また、その過程で、単一心筋細胞の機能を測定する新しい実験系を開発した。

阪本は、重症な遺伝性心筋症ハムスターT0-2の原因遺伝子と発症機構の解明に取り組み、まず、心筋症を重症化する原因遺伝子を見出した。次いで、それが発症をもたらす分子機構を生化学的手法を中心に解析し、心筋細胞の同期的収縮に必須な T 管と筋原線維の Z 線との架橋タンパク分子構造を解明した。

研究の未完部分については、今後継続して鋭意解明を進める予定である。

飯野 正光	東京大学大学院医学系研究科 教授	血管平滑筋の細胞内カルシウムイオン動態
倉智 嘉久	大阪大学大学院医学系研究科 教授	心筋・血管平滑筋のカリウムチャンネルと収縮
杉浦 清了	東京大学医学部 助手	心筋収縮の分子生理
阪本 英二	国立循環器病センター研究所 室長	心筋の恒常的収縮破綻と遺伝子異常

研究報告

本研究班は、心筋または血管平滑筋の収縮制御の分子機構について5名の分担研究者がそれぞれのテーマを分担して研究を実施したので、研究報告もそれぞれのテーマに分けて別々に記載することにする。

1. 血管平滑筋の細胞内カルシウムイオン動態（飯野）

I. 研究目的

我々は、生体内の組織構築を維持した血管標本を用いて、外因性刺激を全く与えない状況において動脈平滑筋の細胞内で約 0.13Hz の自発的な Ca^{2+} オシレーションが生じていることを発見し、その Ca^{2+} 濃度上昇の大きさがノルアドレナリンにより生ずる Ca^{2+} オシレーションに比べて小さいことより、 Ca^{2+} リプルと名付けた。ラット尾動脈において Ca^{2+} リプルはアンジオテンシン拮抗薬により消失すること、アンジオテンシン II を適用すると頻度が増加すること、さらにアンジオテンシン変換酵素阻害薬によって抑制されることから、局所レニン・アンジオテンシン系が関与することが考えられた。

本研究では、 Ca^{2+} リプルの病態生理学的意義とその発生機構を明らかにすることを目的として、高血圧モデル動物の自然発症高血圧ラット (SHR) の尾動脈における Ca^{2+} リプルの性質を対照動物 (WKY) のものと比較した。また、レニン・アンジオテンシン系遺伝子欠損動物における Ca^{2+} リプルの存否について解析を進めた。

II. 研究計画および方法

ラットおよびマウス尾動脈を摘出して蛍光 Ca^{2+} 指示薬 (Fluo-3) を細胞内に導入した。これを倒立顕微鏡のステージ上の実験装置に固定し、冷却 CCD カメラを用い細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った。得られた画像データから、画像解析ソフトウェア (IPLab) を用いて、個々の平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の時間変化を得た。

血圧は、ラット・マウス用無加温非観血式血圧計 (Mk-2000、室町機械) を用い、テールカフ法により測定した。

SHR/Izm と WKY/Izm は SHR 等疾患モデル共同研究会から入手した。アンジオテンシノゲンノックアウトマウスは米国ノースカロライナ大学 Smithies 教授らのグループから、AT1a/AT1b ダブルノックアウトマウスはデューク大学 Coffman 教授から供与を受け、PCR 法でジェノタイプの決定をしながら繁殖させ、実験に用いた。また、AT1a ノックアウトマウスは、筑波大学・深水教授から提供していただいた。

III. 研究成果

4週令のSHRと対象のWKYにおいても、収縮期血圧に明瞭に差が出た8~9週令のラットにおいても、尾動脈におけるCa²⁺リプルの発生率と振幅には有意な差がみられなかった。しかし、Ca²⁺リプルのCa²⁺ウエーブの伝播スピードは有意にSHRの方が速いことが明らかになった(約1.5倍)。また新たに、外因性刺激が全くない状態でも、Ca²⁺リプルよりピークサイズが数倍大きな「マクロリプル」が、まれにはあるが観察された。SHRではマクロリプルの発現頻度が増加している傾向が認められた。

Ca²⁺リプルは、局所レニン・アンジオテンシン系による反応であることが、薬理学的研究によって強く示唆されていたが、アンジオテンシノーゲン・ノックアウトマウスでもCa²⁺リプルが観測され、発生頻度はむしろ対照より増加していた。しかも、そのCa²⁺リプルは、アンジオテンシン受容体(AT1)拮抗薬で抑制された。そこで、AT1受容体がアゴニストの存在しない状況でも細胞内シグナルを送り続けているなどの可能性を考えてAT1受容体欠損マウスについて調べたところ、血管における主たるサブタイプであるAT1a受容体を欠損したマウスでもCa²⁺リプルは観測された。しかし、このノックアウトマウスでは、外因性のアンジオテンシンIIに対する反応も残存していたので、AT1aおよびAT1bのダブルノックアウトマウスの供給を受け、調べたところ、外因性のアンジオテンシンIIに対する反応は消失していたが、Ca²⁺リプルは依然として存在していた。

IV. 考察

SHRでは、週令の低い時期からアンジオテンシン拮抗薬を投与すると高血圧の発症が抑制されることが示されている。従って、高血圧が生じ始める前の4週令のSHRと対象のWKYにおいて、Ca²⁺リプルについて比較したが、Ca²⁺リプルの発生率と振幅に大きな差は見いだされなかった。レニン・アンジオテンシン系が特に強く発現している腎動脈での測定を進めることが必要かもしれない。しかし、Ca²⁺リプルのCa²⁺ウエーブの伝播スピードは有意にSHRの方が速く、またマクロリプルの出現頻度が高かった。この差が、何に起因するのか今後解析を進める必要がある。また、新たに発見したマクロリプルの成因についても、これがアンジオテンシンによるものか、あるいは他のアゴニストによるものなのか、さらに深く追及して行かなければならない。

ラットにおける薬理的な解析から、Ca²⁺リプルの成因に内因性レニン・アンジオテンシン系の関与が考えられたので、アンジオテンシノーゲンやAT1受容体のノックアウトマウスを用いたCa²⁺リプル解析を行ったが、ノックアウトマウスでも変わらずリプルが観測された。この結果は、マウスではCa²⁺リプルはアンジオテンシン受容体とは無関係であることを強く示唆し、ラットにおける薬理的な結果と見掛け上の齟齬が見られる。

今後、Ca²⁺リプルの生理的意義を確認していくためには、IP₃受容体レベルでCa²⁺シグナルを抑制するなどの研究が必要である。我々は、既にIP₃受容体の活性を抑制するミュータント受容体を発見しており、これを道具としてCa²⁺リプルの生理的あるいは病態生理学的意義を追求していく考えである。

V. 研究成果の発表

1. Hashimoto, A., Hirose, K., Okada, H., Kurosaki, T. & Iino, M. Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca^{2+} mobilization by SH2 domain containing inositol 5'-phosphatase (SHIP). *J. Biol. Chem.* 274, 11203-11208, 1999.
2. Hirose, K., Takeshima, H. & Iino, M. Fluorescent indicators for inositol 1, 4, 5-triphosphate based on bioconjugates of pleckstrin homology domain and fluorescent dyes. *Anal. Commun.* 36, 175-177, 1999.
3. Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H. & Iino, M. Spatio-temporal dynamics of Inositol 1, 4, 5-trisphosphate that underlies complex Ca^{2+} mobilization patterns. *Science* 284, 1527-1530, 1999
4. Inoue, T., Kikuchi, K., Hirose, K. Iino, M. & Nagao, T. Synthesis and elevation of 1-position-modified inositol 1, 4, 5-trisphosphate analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 1697-1702, 1999.
5. Iino, M. Molecular aspects of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.* 49, 325-333, 1999.
6. Asada, Y, Yamazawa, T., Hirose, K., Takasaka, T. & Iino, M. Dynamic signaling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system. *J. Physiol.* 521, 497-505, 1999.
7. Iino, M. Molecular basis of spatio-temporal dynamics in inositol-1, 4, 5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} signalling. *Jpn. J. Pharmacol.* 82, 15-20, 2000.
8. Iino, M. Regulation of IP_3 receptor Ca^{2+} release channels. *In Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 147 Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors* Eds. Endo, M., Kurachi, Y. and Mishina, M. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 605-623. 2000.
9. Hashimoto, A., Hirose, K., Kurosaki, T. & Iino, M. Negative control of store-operated Ca^{2+} influx by B cell receptor crosslinking. *J. Immunol.* 166, 1003-1008, 2001.
10. Inoue, T., Kikuchi, K., Hirose, K., Iino, M. & Nagano, T. Small molecule-based laser inactivation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *Chem. Biol.* 8, 9-15, 2001.
11. Miyakawa, T., Mizushima, A., Hirose, K., Yamazawa, T., Bezprozvanny, I., Kurosaki, T. & Iino, M. Ca^{2+} -sensor region of IP_3 receptor controls intracellular Ca^{2+} signalling. *EMBO J.* 20, 1674-1680, 2001.
12. Fujiwara, A., Hirose, K., Yamazawa, T. & Iino, M. Reduced IP_3 sensitivity of IP_3 receptor in Purkinje neurons. *NeuroReport* 12, 2647-2651 2001.
13. Okubo, Y., Kakizawa, S., Hirose, K. & Iino, M. Visualiation of IP_3 dynamics reveals a novel AMPA receptor-triggered IP_3 production pathway mediated by voltage-dependent Ca^{2+} nflux in Purkinje cells. *Neuron* 32, 113-122, 2001.

14. Namikis, S., Hirose, K. & Iino, M. Mapping of heme-binding domains in soluble guanylyl cyclase-1 subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 798-804, 2001.
15. Yamazawa, T. & Iino, M. Simultaneous imaging of Ca^{2+} signals in interstitial cells of Cajal and longitudinal smooth muscle cells during rhythmic activity in mouse ileum. *J. Physiol.* 538, 823-835, 2002.
16. Oyamada, H., Oguchi, K., Saitoh, N., Yamazawa, T., Hirose, K., Kawana, Y., Wakatsuki, K., Oguchi, K., Tagami, M., Hanaoka, K., Endo, M. & Iino, M. Novel mutations in C-terminal channel region of the ryanodine receptor in malignant hyperthermia patients. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, 159-166, 2002.
17. Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M. & Kurosaki, T. Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 195, 673-681, 2002.

2. 心筋・血管平滑筋のカリウムチャンネルと収縮（倉智）

I. 研究目的

ATP感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルに対しての細胞内 ADP とカリウムチャンネル開口薬である MCC134 やジアゾキシドによる SUR サブタイプ特異的チャンネル活性化の分子機構を明らかにする。

II. 研究計画および方法

マウス由来の Kir6.2 と様々な SUR のクローンを HEK293T 細胞に transfection することにより、その細胞膜上に K_{ATP} チャンネルを再構築した。この K_{ATP} チャンネルによる電流をパッチクランプ法を用いて、ホールセルまたはインサイドアウトの条件下で測定し、細胞内 ADP やカリウムチャンネル開口薬の作用を調べた。また SUR のキメラ体、変異体を用いてそれらの作用部位・機序を検討した。

III. 研究成果

以下のような結果が明らかになり、論文として報告した。

①MCC-134 は SUR2B/Kir6.2 に対しては強く反応するが、SUR2A/Kir6.2 は少し活性化するのみであった。しかし SUR1/Kir6.2 に対しては逆に活性を抑制した。

②SUR1/Kir6.2 と SUR2B/Kir6.2 は低濃度の ADP で活性化されるが、SUR2A/Kir6.2 の活性化には約 100 倍の ADP 濃度が必要であった。

③ジアゾキシドは全ての SUR/Kir6.2 において ADP による活性化の efficacy を変化させずに potency を増加することによりチャンネル活性を増大した。また NBD2 に ADP の結合を阻害する変異を導入した SUR ではジアゾキシドによる作用は著しく阻害された。したがって、ジアゾキシドは NBD2 における ADP によるチャンネル活性化に特異的に作用すると示唆された。

④SUR2A と SUR2B のキメラ体によって再構築される K_{ATP} チャネルの ADP によるチャネル活性を検討することにより、ADP による強い活性化作用には、上述した SUR2B の C 末端領域 42 個のアミノ酸 (C42) の中でも中央部の 7 残基がとくに重要であることを明らかにした。SUR は ATP binding cassette (ABC) protein super family に属する。この ABC protein の中で、すでに結晶化され立体構造の明らかにされているサルモネラ菌のヒスチジントランスポーターである HisP を鋳型とした SUR の 2 番目のヌクレオチド結合領域 (NBD2) の立体構造ホモロジーモデルによる検討で C42 の中央部が NBD2 の Walker A motif というヌクレオチドのリン酸と結合する領域と相互作用することも見出した。

IV. 考察

MCC-134 のように SUR のサブタイプにより活性化と抑制の両方を併せ持つ開口薬はこれまでに報告がない。このような性質の薬剤の作用機構を明らかにすることにより、臓器特異的で副作用のない新しい心血管系作用薬の開発が可能となると考えられる。すなわち膵 β 細胞でのインスリン分泌を減少させることなく心血管系に作用する薬剤の開発に繋がる可能性があり、これまでカリウムチャネル開口薬の使用が困難とされていた糖尿病合併の高血圧・狭心症などの心血管疾患例などに適用が広がると考えられる。

心筋細胞膜の K_{ATP} チャネルは生理的条件下では閉じているものの虚血時など細胞内 ADP の上昇に伴い開口し活動電位を短縮することにより心筋保護作用を示し、ジアゾキシドはこの ADP の開口作用をより低濃度で引き起こすようにしていると考えられた。

SUR2A と SUR2B は 1 つの遺伝子から生成されるスプライス変異体であり、C 末端 42 個のアミノ酸 (C42) のみが異なる。SUR1 は全く別の遺伝子産物であるが、C42 は SUR2B と約 70% のホモロジーを有している。したがって上述のような ADP に対する感受性の違いは C 末端によるもので、SUR2A の C42 が 2 番目のヌクレオチド結合ドメイン (NBD2) での ADP の作用を阻害する作用があるからと考えられた。その結果ジアゾキシドによる反応の差異も生じると考えられた。

V. 研究成果の発表

1. Shindo, T., Yamada, M., Isomoto, S., Horio, Y., Kurachi, Y. SUR2 subtype (A and B)-dependent differential activation of the cloned ATP-sensitive K^+ channels by pinacidil and nicorandil. *Br. J. Pharmacol.* 124, 985-991, 1998.
2. Matsuoka, T., Matsushita, K., Katayama, Y., Fujita, A., Inageda, K., Tanemoto, M., Inanobe, A., Yamashita, S., Matsuzawa, Y., Kurachi, Y. C-terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive K^+ channels. *Circ. Res.* 87, 873-880, 2000.
3. Matsushita, K., Kinoshita, K., Matsuoka, T., Fujita, A., Fujikado, T., Tano, Y., Nakamura, H., Kurachi, Y. Intramolecular interaction of SUR2 subtype for intracellular ADP-induced differential control of K_{ATP} channel. *Circ. Res.* 90, 554-561, 2002

3. 心筋の興奮収縮連関（遠藤）

I. 研究目的

哺乳動物心筋の興奮収縮連関は興奮時に細胞外から流入する Ca^{2+} の惹起する心筋細胞小胞体のカルシウム放出チャネル（リアノジン受容体）の calcium-induced calcium release (CICR) を介して起きると考えられている。一方、薬理的には生きた心筋における CICR の抑制薬であるアデニンが必ずしも心筋の興奮収縮連関を抑制しない事実が認められていたので、その矛盾の原因を追究した。また、CICR を促進する化合物は、新しい機序を持った強心薬となると考えられるので、多くの化合物をスクリーニングし、リアノジン受容体のカルシウム放出チャネルに対する作用について検討した。

II. 研究計画および方法

ラット乳頭筋の電気刺激による等尺性収縮張力を測定すると同時に、細胞内カルシウムイオン動態をエクオリン法により記録しながら、アデニンの作用を詳細に解析した。

岐阜大学工学部の鈴木教授の研究室にリアノジン受容体に作用するダントロレンの種々の誘導体を作成して頂き、その CICR に対する作用やその他のモードのカルシウム放出に対する作用を、マウス骨格筋のスキンド・ファイバーを用いて調べた。

III. 研究成果

予備実験でアデニンが生きた心筋細胞において CICR を抑制することを確認した上で、その収縮に対する作用を調べたが、アデニン適用によって心筋の生理的収縮は全く抑制されず、むしろゆっくりとした収縮増強のみが見られた。エクオリン法により細胞内カルシウムイオン濃度を張力と同時に測定したところ、興奮に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の一過性増加の程度は、アデニン適用直後に減少し、その後徐々に増加した。また、一過性増加の時間経過が延長した。カルシウム濃度の変化に対応して、アデニン適用直後には張力の立ち上がり速度は減少するが、時間経過が延長するので、到達時間は遅れるものの最大張力は変わらなかった。したがって、アデニンの作用は CICR 説と矛盾するものではなく、収縮反応が一見矛盾するようには見えたとしたのは、アデニンのその他の作用（小胞体のカルシウムポンプに対する抑制作用、収縮蛋白系に対するカルシウム感受性の増加）が同時に働いた結果であると結論された。

リアノジン受容体は、骨格筋においては生理的な刺激により CICR とは異なるモードで開口することが分かっている。2 つの開口モードをある程度区別して認識するダントロレンから出発して、鈴木研究室と協同していくつかの興味あるダントロレン誘導体を得た。これらの化合物の中に、CICR を全く抑制しないで骨格筋の生理的開口モードのみを抑制するものを複数見出したが、また逆に、CICR を促進するものも見出した。CICR を促進する化合物は強心作用を示した。その作用様式を現在追及中である。

IV. 考察

永年の懸案であったアデニンの CICR 抑制作用と心筋収縮増強作用との矛盾が、CICR はアデニンで抑制されるものの、アデニンのその他の作用によってその抑制が覆い隠され逆に収縮増強のみが見えたものであることが明らかになり、哺乳動物心筋興奮収縮連関の

CICR 説のアデニン作用に関する難点は消失した。

リアノジン受容体カルシウム抄出チャネルは、骨格筋において異なる複数のモードで開口することが分かっているが、それらを区別して認識する化合物が得られた。それらの中には、CICR を促進するものが存在しており、その強心薬としての可能性を検討している。

V. 研究成果の発表

1. Li, Y., Sawata, H., Norota, I., Endoh, M., Endo, M. Effects of adenine on rat excitation-contraction coupling. Jpn. J. Pharmacol. 82 (Suppl. I), 148P, 2000.
2. Endo, M., Ikemoto, T. Regulation of ryanodine receptor calcium release channels. In Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 147: Pharmacology of Ionic Channel Function: Activators and Inhibitors. Eds. Endo, M., Kurachi, Y., Mishina, M. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp.583-603, 2000.
3. Ikemoto, T., Endo, M. Properties of Ca^{2+} release induced by clofibric acid from sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Brit. J. Pharmacol. 134, 719-728, 2001
4. Ikemoto, T., Hosoya, T., Aoyama, T., Kihara, Y., Suzuki, M., Endo, M. Effects of dantrolene and its derivatives on Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle fibres. Brit. J. Pharmacol. 134, 729-736, 2001

4. 心筋収縮の分子生理 (杉浦)

I. 研究目的

心筋ミオシン軽鎖については主にリン酸化の影響が研究されてきたが、近年、突然変異が家族性肥大型心筋症の原因となること、および心疾患においてアイソフォーム変換が起こることが報告されたためにその機能的意義が再認識されつつある。本研究の目的は心筋ミオシン軽鎖と心筋収縮機能との関係を分子レベルおよび単一細胞レベルで検討することにより心筋収縮のメカニズムについての情報を得ると同時に治療への応用の可能性を探ることにある。

II. 研究計画および方法

(1) *in vitro* motility assay: 軽鎖の構造と機能の関係を検討するため、重鎖は α 重鎖で一致しているが、軽鎖が心房型 (ALC)、心室型 (VLC) と異なるラット心房筋と心室筋からミオシンを抽出精製し、アクチン活性化 ATPase 活性測定、*in vitro* におけるアクチンフィラメントの滑り速度測定、同じく *in vitro* におけるアクチンフィラメントとミオシンの間で発生する張力の光トラップ法による測定を行った。

(2) 単一心筋細胞張力測定系の開発および細胞レベルにおける軽鎖機能の検討: 軽鎖の収縮機能に与える影響を調べるために、単一心筋細胞の発生張力について、細胞をカーボンファイバーで固定し、収縮に伴うファイバーの変異をフォトダイオードセンサーで実時間検出し力の推定を行う方法を開発した。さらにミオシン軽鎖がアクチンフィラメントとの間で抑制的な相互作用を行っているとの仮定に基づき、相互作用を行っていると思われる部

位の 10 個のアミノ酸からなるペプチドを合成して単離心筋細胞培養液に加え、このペプチドが軽鎖とアクチンの相互作用を競合的に阻害し得るかを検討した。

IV. 研究成果

(1) ラットの心房筋と心室筋のミオシンを比較したところ、心房由来のミオシン (α 重鎖 + ALC) が心室由来 (α 重鎖 + VLC) に比べアクチン活性化 ATPase 活性は変わらないが *in vitro* におけるアクチンフィラメントの滑り速度が速いという結果を得た。さらに *in vitro* でアクチンフィラメントがミオシンとの間に発生する平均の力を比較したところ、逆に心室由来のミオシンがより大きな力を発生していた。1 分子の力発生を検討したところ、単位力の大きさは変わらないものの、力を発生している時間が心室型軽鎖で長いとの結果を得た。これによって ATPase 活性には差がないものの滑り速度および平均の力に差があることを統一的に説明できるものと考えている。

(2) 新しい製法のカーボンファイバーを利用することにより容易で確実な細胞の固定が可能となった。ファイバーの撓みをダイオードセンサーで検出し、さらにこの信号をファイバーを固定したピエゾ素子にフィードバックすることにより細胞の収縮を無負荷から等尺性までの広い条件下で測定できるようにした。Indo-1 の蛍光により細胞内カルシウムの同時測定にも成功した。計測の結果、細胞の短縮によりカルシウムトランジェントはピークが上昇するが下降が速くなることを見出した。

ミオシン軽鎖のペプチドをラット心筋の単離細胞に加え機能測定した実験においては、ペプチドによ心筋細胞の短縮率の増大および発生張力の増加が観察された。

V. 考察

心房由来のミオシン (α 重鎖 + ALC) が心室由来 (α 重鎖 + VLC) のものに比べアクチン活性化 ATPase 活性は変わらないが滑り速度、平均の力には差が見られ、それが個々の分子が力を出している時間の差に基づくとの結果を得た。これはミオシンの酵素活性を規定するのは重鎖の構造であり、軽鎖は kinetics を調整していることを示唆する新しい知見である。これまで報告された様々なミオシンアイソフォーム間の機能の比較データより類推すれば、長い相互作用時間 (attachment time) は economy の点でも有利であり、軽鎖の機能面での重要性が確認された。メカニズムについては、外から加えた軽鎖の N 末端のペプチドがミオシン軽鎖とアクチンとの結合を競合的に阻害したと考えれば、軽鎖による kinetics 調整のメカニズムにこの軽鎖・アクチン相互作用が深く関わっていると考えられる。この点をさらに検討するため、1) 変異を持った軽鎖とミオシン重鎖をバキュロウイルスの発現系で作成し *in vitro* motility assay で機能測定する。2) アデノウイルスベクターを用いて単離心筋細胞に N 末端のペプチドまたは変異軽鎖を発現させて機能測定を行う、という 2 つの実験を準備中である。もし機能の亢進が認められれば、これはアクチン・ミオシン相互作用を標的にした新たなる強心効果の可能性を開くものであり、さらに研究を進める予定である。

一方新たに開発した単一心筋細胞の力測定系においては、indo-1 の蛍光を用いた発生張力とカルシウムトランジェントの同時測定を実現した。単一心筋細胞レベルでの測定はこれまでに報告がなく、観察されたカルシウムトランジェントの負荷依存性も新しい知見で

あった。遺伝子導入の手法と組み合わせれば、心機能研究にとって有力な実験法となると考えている。

VI. 研究成果の発表

1. Miyata, H., Chaen, S., Sugiura, S., Sugi, H. Evanescent excitation microscopy. Its application to the study of single molecular process kinetics of actomyosin motor. In Sugi, H., Pollack, G.H. eds. Mechanics of work production and work absorption in muscle. Plenum Press, New York, pp.29-36, 1999.
2. Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Momomura, S., Chaen, S., Sugi, H. Distinct kinetic properties of cardiac myosin isoforms revealed by in vitro studies. In Sugi, H., Pollack, G.H. eds. Mechanics of work production and work absorption in muscle. Plenum Press, New York, pp.125-130, 1999.
3. Sugiura, S. Actin myosin interaction. Cardiovasc. Res. 44, 266-273, 1999.
4. Eto, Y., Yonekura, K., Sonoda, M., Arai, N., Sata, M., Sugiura, S., Takenaka, K., Guarbelto, A., Hixon, M.L., Wagner, M.W., Aoyagi, T. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. Circulation 101, 2134-2137, 2000.
5. Yonekura, K., Eto, Y., Yokoyama, I., Mtsmoto, A., Sugiura, S., Momomura, S., Kirimoto, T., Hayashi, Y., Omata, M., Aoyagi, T., Inhibition of carnitine synthesis modulates protein contents of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and hexokinase type 1 in rat hearts with myocardial infarction. Bas. Res. Cardiol. 95, 343-348, 2000.
6. Yasuda, S., Sugiura, S., Kobayakawa, N., Fujita, H., Yamashita, H., Katoh, K., Saeki, Y., Kaneko, H., Suda, Y., Nagai, R., Sugi, H. A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers coupled with a feedback system. Am. J. Physiol. 281, H1442-1446, 2001.
7. Saeki, Y., Takigiku, K., Iwamoto, H., Yasuda, S., Yamashita, H., Sugiura, S., Sugi, H. Protein kinase A increases the rate of relaxation but not the rate of tension development in skinned rat cardiac muscle. Jpn. J. Physiol. 51, 427-433, 2001.

5. 心筋の恒常的収縮破綻と遺伝子異常 (阪本)

I. 研究目的

心筋は骨格と同じく横紋筋であるが、骨格筋とは異なり袋状であり、筋原線維に垂直の方向にも力学的ストレスが加わる。そのため心筋細胞には、張力を効率よく伝達し、また力学的ストレスから自己を保護する様々な分子機構が存在するものと予測される。

心筋が一次のかつ進行性に変性し、重症の不整脈や心不全に至る難治性疾患は心筋症と総称される。遺伝性心筋症のモデル動物として心筋症ハムスターがあり、そのプロトタイプである BI014.6 から、より重症な T0-2 ハムスターが分離されている。本分担研究者は先に、全ての心筋症ハムスターにおいて dystrophin-associated proteins (DAPs) の一つで

ある δ -sarcoglycan 遺伝子が欠失していることを見出した。本研究では、T0-2 の重症化に関わる遺伝子異常とその発症機構の解明を通じ、心筋に内在する未知の収縮制御・力学的ストレス対応機構を明らかにすることを目的とした。

II. 研究計画および方法

(1) T0-2 ハムスターの病因：正常 Golden ハムスターと心筋症の BI014.6、T0-2 ハムスターの左心室における代償性心肥大関連遺伝子発現量を半定量的 RT-PCR 法で検討した。

また、Formaldehyde で固定した左心室からパラフィン切片を作成し、H&E と Azan 染色法ならびに TUNEL 法で観察し、また、左心室から抽出したゲノム DNA のゲル電気泳動により DNA の laddering の存否を検討し、ネクローシス、アポトーシスを判定した。さらに、透過型電子顕微鏡による観察も行った。

(2) T0-2 ハムスターの第二原因遺伝子の同定：Z 線タンパク質の α -actinin と desmin の量を、生後 6、12、26 週のハムスター左心室全体と、左心室を 1% Triton-X100 で可溶化して得た筋原線維から 0.3M KCl と 0.2mM の ascorbic acid 水溶液で myosin と actin を除去して調整した Z 線タンパク質濃縮画分とにおいて、immunoblot により検討した。

Golden と T0-2 ハムスターの desmin cDNA を左心室から RT-PCR で単離し、その塩基配列を決定した。Desmin の翻訳領域の 574 番目に相当する塩基が G あるいは A である DNA を特異的に増幅するプライマーセットを作成し、各種ハムスターを解析した。

(3) T0-2 ハムスターの発症機構の解析：単離心筋細胞と心筋凍結切片で dystrophin 結合タンパク質の存否を immunoblot ならびに免疫蛍光染色で検討した。

Desmin に結合する候補タンパク質をまず yeast の two-hybrid 法を用いてスクリーニングした。Desmin の N 末端-head、coil-1、coil-2 ならびに C 末端-tail の各ドメインの融合タンパク質を大腸菌で発現し、セファロースビーズ上に精製、固相化した。Desmin の 4 つの各ドメイン、あるいは desmin の N 末端側半分と C 末端側半분을 S^{35} の標識タンパク質として rabbit reticulocyte lysate で調整した。これら融合タンパク質と標識タンパク質とをインキュベートした後、遠心、洗浄したサンプルを SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーを取って固相化した融合タンパク質との結合の有無を検出した。

ハムスターの心室壁の動きを超音波で検討した。

IV. 研究成果

(1) T0-2 ハムスターの病因：T0-2 ハムスターでは、心肥大誘導因子ならびに心筋構成成分の遺伝子発現は、共に BI014.6 以上に亢進していた。心肥大関連遺伝子の強い活性化にもかかわらず肉眼的肥大を認めないことは、T0-2 では心筋変性が BI014.6 より激しく起っているためと考えられた。

T0-2 では、BI014.6 に比べネクローシスに特徴的な炎症細胞浸潤が強いがアポトーシスの指標 (TUNEL 法および DNA laddering) には有意差がなく、ネクローシスを主とする心筋変性が亢進していることを示唆した。また、電子顕微鏡で T0-2 では Z 線が全体に細く、部分的に断裂あるいは間隔の不整があり、T 管が隣接して存在しない部分を認めたことから、T0-2 では Z 線に存在するタンパク質の遺伝的異常の可能性が示唆された。

(2) T0-2 ハムスターの第二原因遺伝子の同定：生後 6 週の T0-2 では心筋変性は少なく、既

知の Z 線タンパク質 α -actinin と desmin は筋原線維画分に正常に存在していたが、myosin と actin の除去操作により、筋原線維から有意に脱落した。また加齢した T0-2 では desmin の減少が認められたが α -actinin には有意な変化はなかった。T0-2 では恐らく収縮という物理的ストレスに関連した何らかの原因で desmin が不安定となり、そのために Z 線が脆くなるものと考えられた。

Golden ハムスターの desmin cDNA は、open reading frame (ORF) が 1407 塩基で、469 残基からなる分子量 53,445 のポリペプチドをコードすると推定された。T0-2 では、ORF の 574 番目の塩基が guanine から adenine に変異していて、正常で alanine である 191 番目のアミノ酸を threonine に置換させる missense mutation である。BI014.6 ではこの変異はなく、T0-2 に特異的であった。

(3) T0-2 ハムスターの発症機構の解析: 以上のことから、T0-2 の desmin は変異のために不安定になり、加齢と共に Z 線から脱落したと考えられる。一方、BI014.6 と T0-2 では δ -sarcoglycan の遺伝子異常のために他の DAPs も二次的に脱落すること、その脱落は T0-2 でより早期に desmin の脱落に呼応して起こり、DAPs の中でも α -dystrobrevin で最も顕著であること、DAPs は筋形質膜だけでなく T 管にも存在し、T0-2 では T 管における DAPs の脱落が著しいことなどが分かっている。したがって、正常では desmin と DAPs との間に結合が存在し、T0-2 では desmin 変異のためにそのタンパク複合体を介した T 管の Z 線への架橋構造が破綻するのではないかと考えて、desmin に結合するタンパク質を検索した。Yeast の two-hybrid 法により α -dystrobrevin の結合タンパク質として最近同定された desmulin が候補に上った。Desmulin は desmin と同様の 4 ドメインから構成される中間系フィラメントである。in vitro の結合実験から、desmin は coil-1 を介して homopolymer を形成すること、desmulin は N 末端から coil-2 にまたがる領域で desmin の N 末端ドメインと結合することが分かった。T0-2 で認められた desmin の変異は coil-1 内にある。したがって、T0-2 では変異 desmin が恒常的収縮による力学的ストレスで徐々に脱落し、その結果、desmulin が Z 線に結合できず、T 管の Z 線への架橋構造も徐々に破綻するものと考えた。

心臓の超音波検査で T0-2 の心室壁は薄いだけでなく動きが空間的に不均一であることが判明した。細胞内の同期的興奮収縮を支える T 管の構造異常がその一因と考えた。

V. 考察

従来は個別に捉えられていた心筋の筋原線維と筋形質膜とを統合させた点が本研究の最重要の成果である。T0-2 ハムスターで T 管が崩壊すれば、心筋細胞ひいては心臓全体の同期的収縮が障害され、心機能の低下から心不全に至ることは容易に理解される。また、今回明らかにされた T 管と Z 線との支持機構は筋原線維と垂直方向の力の伝搬にも重要な役割を果たし、その崩壊は心筋のネクロシスに至ることが予想される。

T 管と Z 線を架橋する分子基盤として DAPs と desmin を含んだタンパク複合体の存在とその意義を明らかにできたのは、偶然にも T0-2 ハムスターで DAPs の一つ δ -sarcoglycan と desmin の双方に遺伝子異常が存在したためである。マウスにおいて遺伝子の過剰発現や破壊によるエレガントな発生工学に比べ、自然発症疾患モデル動物の解析は地味ではあるが、得られる果実も大きいものだと実感している。

Desmin の変異点は、protein kinase A や CaM kinase によるリン酸化部位と考えられ、その病態生理的意義を明らかにして、この 3 年間の研究成果を論文にまとめる予定である。

VI. 研究成果の発表

1. Li, J., Dressman, D., Tsao, Y.P., Sakamoto, A., Hoffman, E.P., Xiao, X. rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther.* 6: 74-82, 1999.
2. Kawada, T., Nakatsuru, Y., Sakamoto, A., Koizumi, T., Shin, W.S., Okai-Matsuo, Y., Suzuki, J., Uehara, Y., Nakazawa, M., Sato, H., Ishikawa, T., Toyo-oka, T. Strain- and age-dependent loss of sarcoglycan complex in cardiomyopathic hamster hearts and its re-expression by N-sarcoglycan gene transfer in vivo. *FEBS Lett.* 458: 405-408, 1999.
3. Sakamoto, A., Abe, M., Masaki, T. Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster. *FEBS Lett.* 447: 124-128, 1999.
4. Kawada T, Nakatsuru Y, Sakamoto A, Koizumi T, Shin WS, Nakazawa M, Suzuki J, Nakajima T, Uehara Y, Takato T, Sato H, Ishikawa T, Toyo-oka, T. In Vivo Gene Supplementation for the Therapy of Cardiomyopathy. *Heart Failure -Frontiers in Cardiology-* pp.199-208, 2000.
5. Kawada, T., Sakamoto, A., Nakazawa, M., Urabe, M., Masuda, F., Hemmi, C., Wang, Y., SooShin, W., Nakatsuru, Y., Sato, H., Ozawa, K, Toyo-oka, T. Morphological and physiological restorations of hereditary form of dilated cardiomyopathy by somatic gene therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 431-435, 2001.
6. Ono K, Masumiya H, Sakamoto A, Christie G, Shijuku T, Tanaka H, Shigenobu K, Ozaki Y. Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit SA node cells. *Physiol.* 537 (Pt. 2), 467-488, 2001.
7. 阪本英二、心筋症ハムスターの分子生物学的解析 心筋の構造と代謝 1998, pp.105-110, 心筋研究会編、六法出版社、1999.
8. 豊岡照彦、申偉秀、溪航、河田登美枝、阪本英二. 神経・筋疾患に伴う心筋疾患. 目で見える循環器病シリーズ 14 心筋症 pp.198-205、2000.
9. 阪本英二、心筋症に対する新しい治療法の探索、心筋の構造と代謝 1999, pp.1-4, 心筋研究会編、六法出版社、2000.
10. 豊岡照彦、溪航、河田登美枝、申偉秀、阪本英二. 心筋症の筋蛋白異常による心不全. *Annual Review 神経* pp.30-35、2001.