

心臓研究に対する分子生物学的アプローチ

所属機関 東京慈恵会医科大学
研究者名 大野 典也

研究の概要

この研究組織の目的は分子レベルでの心筋の構造と機能に関する研究を推進する事により、心臓という特殊な器官の理解を一層深め、疾病の理解と治療法の開発に資するものである。

具体的には、心筋の収縮には、筋小胞体に局在するリアノジンレセプター (Ry-R) の他に IP₃レセプター (IP₃-R) が深く関わっていることが知られている。そこで、両レセプターの構造・機能相関により細胞内 Ca²⁺動態を制御して、心筋の機能発現に寄与しているかを明らかにする。

一方、機能面からの解析方法として、家族性肥大型心筋症について、最近この疾患はミオシンのβ重鎖の点突然変異が発症と深く関わっていることが明らかにされた。これまでに複数の変異が報告され表現型、および予後との関係が論じられているが個体レベルの変化と分子構造の関連は明らかでない。従って、本研究の目的はインビトロ運動再構成系と呼ばれる実験系および遺伝子工学の手法を使って家族性肥大型心筋症に見られる分子レベルの構造変化が心臓の収縮機能に与える影響を考察することである。

さらに、ミトコンドリア・心筋症と考えられる患者 14 例について変異の全解析を実施した。即ち、生検心筋など微量の標品中のミトコンドリア・DNA を PCR によって増幅し、個人別にミトコンドリア・DNA 全周塩基配列を決定した。更に、PCR 増幅したミトコンドリア・DNA では失われる体細胞変異の情報、特に活性酸素ラジカルによって生成し、複製に際して誤読され体細胞変異の原因となる 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) を、直接マイクロ HPLC/質量分析計を使って定量した。

心疾患治療法の究極の目標として、自己の心筋の再生の問題がある。心筋の再生が可能となれば、心臓移植の問題点の多くは解決できる。この心筋の再生に関する研究に端緒を付けべく、胎児期、新生児期および成長したラットにおける心筋細胞の増殖能について、Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みで確認した。その上で圧負荷心肥大における DNA 合成能について Goldblatt Ratt を作成し、経時的に BrdU の心筋への取り込みを観察した。3PCNA の発現について、Goldblatt Rat において DNA 合成が行われることは確認し、さらに PCNA の発現を検討している。増殖、分化と細胞周期関連遺伝子の動態についても検討している。また圧負荷肥大心において過剰発現している蛋白質の性状について、Nagano らが示した蛋白分画に対する Monoclonal antibody を作成した。現在、この抗体の性質を検討しているが、正常の成熟ラットには発現が見られていないが胎児心では発現しているようであり、さらに検討をしている。

その上で、分化した骨格筋を脱分化させ、筋原細胞から心筋へと再分化の誘導を試みる場合に、現時点では単一の筋細胞においては心筋細胞と骨格筋細胞との識別することは困難である。そこで、両者の相異点を分子生物学的に明らかにする目的で、IP₃レセプターの存在とその mRNA の発現パターンについて、マウス胎児期から新生児期を経て成熟個体に至

る心筋に付いての経時的検討を実施した。

研究者氏名及び所属機関

研究者氏名	所属機関及び地位	分担研究課題
大野 典也	東京慈恵会医科大学 微生物学講座第一教授	総括及び心筋への分化誘導の研究
御子柴克彦	東京大学医科学研究所 化学研究部教授	心臓における IP ₃ レセプターその機能と病態
山田 尚	東京慈恵会医科大学 青戸病院内科講師	心筋細胞の増殖と心肥大機構の解明
百村 伸一	東京大学医学部第二内科助手	心筋収縮機能の分子レベルにおける測定
小澤 高将	名古屋大学医学部 第二生化学講座教授	ミトコンドリア・心筋症における遺伝子異変

研 究 報 告

I 研究目的

医学に於ける分子生物学的手法の導入により医学研究は急速に進展しつつある。その結果、従来は不可能と考えられていた細胞内の微量分子や細胞膜上のレセプターの微細構造の解析が可能となってきた。これらの手法を心臓の機能と疾病の理解とその治療法の開発に向けようとするのが、本研究の目的である。

具体的には、1) 心筋の収縮には、筋小胞体に局在するリアノジンレセプター (Ry-R) の他に IP₃ レセプター (IP₃-R) が深く関わっていることが知られている。そこで、両レセプターの構造・機能相関の解析を手はじめに、両者の細胞内局在の解析、更に、両レセプターがいかなる機能的相関により細胞内 Ca²⁺ 動態を制御して、心筋の機能発現に寄与しているかを明らかにする。(御子柴)

2) 骨格筋から心筋へと分化誘導を試みる為に、心筋細胞と骨格筋細胞との相異点を分子生物学的に明らかにする目的で、幼若心筋細胞表面のマーカーの検索を試み、IP₃ レセプターの存在とその mRNA の発現パターンに付いて、マウス胎児期から新生児期を経て成熟個体に至る心筋に付いての経時的検討を実施した。IP₃ レセプターの加齢による発現の減少、その局在の証明に成功した。今後は細胞周期関連遺伝子と IP₃ レセプター機能との相互作用についても検討する。(大野)

3) 心筋病の病態は心室レベル及び心筋細胞レベルの機能変化に基づいて論じられて来たが近年心筋細胞を構成する蛋白の構造変化が原因として注目を集めるようになってきた。しかしこれらの知見には主に分子生物学及び生化学的手法を用いて得られたものであるためその機能 (特に収縮機能) との関連は必ずしも明らかではない。本研究の目的はインビトロ運動再構成系と総称されるいくつかの新しい実験手法を用いてこれまでに報告されている様々な心筋収縮蛋白構造変化と収縮機能との直接的な対応を分子レベルで明らかにすることである。特に心筋収縮において中心的な役割を果たすミオシンのアイソフォーム間

での機能的差異、家族性肥大型心筋症において見られる点突然変異の機能に及ぼす影響について着目し検討した。(百村)

4) 個人が生涯に獲得するミトコンドリア・DNA (mtDNA) の体細胞変異は遺伝された変異の蓄積よりも遙に速い速度で起き、これらの変異の蓄積が加齢変化及びミトコンドリア・心筋症などの退行性疾患を起こす重要な因子であろうとの作業仮説のもとに、以下の研究を計画した。即ち、mtDNA 変異に基づくと考えられるミトコンドリア・心筋症患者について、生殖腺細胞由来の点変異の集積と、体細胞変異を網羅的に検索し、その病因を明らかにしようとした。実際に、ミトコンドリア・心筋症と考えられる患者 14 例について個人別に、mtDNA の全周塩基配列を決定し、点変異の全解析を行う。さらに点変異によって誘起される遺伝子欠失を包括的変異同定法によって定量し、病態との相関を明確にしようとした。(小沢)

一般に、細胞は分化と共に増殖能を失う。成長心筋細胞は機能的にも最も分化した細胞であり細胞分裂能は既に失われていると考えられている。しかし、圧負荷や心筋症では心重量は確実に増大している。この心肥大が個々の心筋細胞の増大か、分裂を伴った増殖性の肥大かは結論が難しい。

細胞の分化増殖と細胞周期は密接な関係にあると想定される。近年、細胞周期の制御機構が明らかとなりつつある。G1 期は特に重要で細胞の増殖を基本的に制御している。そこで、胎生期を含め心筋細胞の成長の過程で心筋細胞の DNA 合成能がどの様に推移するか、この変化に対し細胞周期関連遺伝子のどの遺伝子が最も必要な役割を担っているか、病的な肥大状況では上記の変化がどの様に変動しているか、を明らかにすることを目的として実験を行った。(山田)

II 研究計画及び材料と方法

イノシトール三リン酸受容体 (IP₃R、2749 アミノ酸) のアミノ末端側 650 アミノ酸内には、リガンドであるイノシトール 1、4、5-三リン酸 (1、4、5-IP₃) を特異的に認識する領域が含まれていることが知られている。IP₃ 結合部位を決定するために、まず、IP₃R のリガンド結合領域を大腸菌で発現する系を確立し、リガンド結合活性を欠く部位特異的アミノ酸置換変異体を作製したり、部位特異的変異を導入してリガンド結合活性とイノシトールポリリン酸の結合選択性を解析した。イノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) は四量体として存在し、イノシトール三リン酸が結合することにより細胞内 Ca²⁺貯蔵部位から Ca²⁺を放出する細胞内レセプターチャンネルである。IP₃R には少なくとも 3 つのタイプ (タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3) が存在することが示されており、タイプ間にチャンネル機能の差異があることが示唆されている。我々はこの 3 つのタイプの C 末端部位を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成した。CHO-K1 細胞に存在する IP₃R が各々のタイプからなるホモ四量体のみなのか、異なるタイプで形成されるヘテロ四量体なのかを知るために、各々の抗体で免疫沈降を行った。(御子柴)

骨格筋から心筋へと分化誘導を試みる為に、心筋細胞と骨格筋細胞との相異点を分子生物学的に明らかにする目的で、IP₃ レセプターの存在とその mRNA の発現パターンに付いて、マウス胎児期から新生児期を経て成熟個体に至る心筋に付いての経時的検討を実施した。さらに、その上でヒトの心筋での発現状況を検討した。方法的には各目的に対応した組織

切片を作成して特異モノクローナル抗体での反応性と in situ ハイブリダイゼーション法により検討した。さらに RT-PCR 法により mRNA 検討を試みた。殊に in situ ハイブリダイゼーション法で、半定量的な検討を実施するために資料とする組織切片の固定条件が極めて重要である事を見だし、条件検討から開始した。また RT-PCR 法でのプライマーの選定等の基礎検討の上で、研究を遂行した。(大野)

様々な病態において発現することが報告されている構造の異なる心筋ミオシンを分離精製し滑り速度、力発生能力を含む多様な面から分子レベルでの力学的特性を検討した。

ミオシンの精製

ミオシンは動物モデル、及び遺伝子工学により作製したものの両者から得た。

1. 甲状腺機能低下症モデル

幼若ラットの心室心筋ミオシンは 100%V1 アイソフォーム (α 重鎖のホモダイマーであり ATPase 活性が高い) からなる。これに対し 12 週齢前後の成熟ラットに 12 週間抗甲状腺剤を投与すると、心室心筋ミオシンは 100%V3 アイソフォーム (β 重鎖のホモダイマーであり ATPase 活性が低い) に変換することが知られている。この動物モデルからそれぞれ V1、V3 アイソフォームを得た。

2. 遺伝子工学による変異ミオシンの作製

家族性肥大型心筋症の一部はミオシンの点突然変異が原因であることが同定され複数の変異型が報告されている。この一部を遺伝子工学の手法により細胞性粘菌と extrachromosomal vector を組み合わせた系を用いて作成した。点突然変異の作製は Kunkel 法を用いて行い electroporation にて細胞内に導入した。作製した変異は 403 番目の Arginine を Glutamine に変えたもの (403Arg-Glu)、453 番目の Arginine を Cysteine に変えたもの (453Arg-Cys)、584 番目の Glycine を Arginine に変えたもの (584Gli-Arg) である。

インビトロ運動再構成系

1. 遠心顕微鏡法

車軸藻と呼ばれる水草は長さ数センチにも及ぶ円筒状の節間細胞を持つがその内面には長軸に沿ってアクチンケーブルが整然と並んでいる。細胞の両端を開放して内部を灌流することによってこのアクチンケーブルを露出しそこにミオシンをコートしたマイクロスフィアを ATP を含む緩衝液に浮遊させて導入するとアクチンミオシン間の相互作用によりマイクロスフィアが滑り運動をするのが観察される。さらにこの細胞標本を回転ステージとストロボライトを組み合わせた遠心顕微鏡と呼ばれる装置のステージに固定して観察すると回転数に応じて決まる一定負荷の下での速度が測定でき、これによって張力速度関係を得ることができた。

2. 蛍光アクチンフィラメントの滑り運動観察系

カバーガラス上にニトロセルロースを介して固定したミオシンの上にファロイジンローダミンと呼ばれる蛍光色素でラベルしたアクチンフィラメントを ATP と共に導入するとフィラメントはランダムに配向したミオシンの上を蛇行して進むのが蛍光顕微鏡下で観察される。この時の滑り速度は無負荷最大滑り速度と考えられる。

3. レーザー光トラップ力測定系

顕微鏡の対物レンズを通してレーザー光を試料面に導入すると焦点位置に小物体を捕

捉することができる。この際捕捉力はある範囲内では捕捉中心からの距離に比例し、中心から遠ざかるにつれて力は強くなる。この原理を応用してアクチンミオシン間で発生する力を測定した。2. の系においてアクチンフィラメントの尾部にマイクロスフィアを付着させるとフィラメントはマイクロスフィアを引っ張って運動する。ここでマイクロスフィアを捕捉するとマイクロスフィアは中心から遠ざかりアクチンミオシン間で発生する力と捕捉力の釣り合う点で静止する。この点の位置から力を決定した。(百村)

本研究では、mt 心筋症と考えられる患者について、心筋組織 mtDNA の点変異の集積と、体細胞変異を同時に検索し、患者の遺伝子型とその表現型である病態との相関を明らかにしようとした。

1. 生殖腺細胞変異: 剖検、生検心筋など微量の標品中の mtDNA を PCR によって増幅し、我々の考案した蛍光色素ラベルによる、直接全周塩基配列決定法を用い mtDNA 全周塩基配列を決定する。

2. 体細胞変異: PCR 増幅した mtDNA では失われる体細胞変異の情報、特に活性酸素ラジカルによって生成し、複製に際して誤読され体細胞変異の原因となる 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) を、直接マイクロ HPLC/質量分析計を使って定量する。また、8-OH-dG の蓄積によって惹起される mtDNA の欠失を H鎖及び L鎖の複製開始点 (OrH、OrL) も含めてくまなく検出するため、180 対のプライマーを合成して網羅的に欠失検出法を開発する。(小沢)

G1 期を制御している遺伝子の分化、増殖制御における発現動態の変化を、分化、増殖抑制が既に明らかな血液細胞の系を用いて検討し、ラットにおける心筋細胞の増殖能について同様の比較検討を行った。

1. モデル実験としての血液細胞の分化と増殖抑制における細胞周期関連遺伝子の発現変動。

HL60 細胞を TPA で処理し単球系への分化誘導過程における変化、および roxithromycin を用いた多核化の機構。Daudi 細胞を用い Interferon で増殖抑制した場合の変化について

(1) 細胞周期の変化は propidium iodide (PI) 染色、および Bromodeoxyuridine (BrdU) の取り込みを併用して、Flowcytometry を行った。

(2) 細胞より total RNA を抽出し reverse transcription polymerase Chain reaction (RT-PCR) 法にて細胞周期関連遺伝子の発現変動を観察した。

2. 胎児期、新生児期および成長したラットにおける心筋細胞の増殖能について。

母体の腹腔内に BrdU を投与し、経時的に胎児を殺しその心筋細胞における BrdU の取り込みを検討した。同様にして、生後も経時的に BrdU の取り込みを観察した。

3. 圧負荷心肥大における DNA 合成能について。

6 週の Wistar rat を用いて Goldblatt Rat を作成し経時的に BrdU の心筋への取り込みを観察した。

4. PCNA の発現について。

DNA 合成酵素の一部である PCNA の発現を免疫組織化学的に検討した。(山田)

III 研究成果

イノシトール三リン酸受容体のリガンドである IP_3 の特異的結合部位を決定するために

各種の変異を加えた。1 アミノ酸の置換により 1、4、5-IP₃ に対する親和性は低下するが、2、4、5-IP₃ に対する親和性は変化せず、結果として 1、4、5-IP₃ と 2、4、5-IP₃ を同等の親和性で認識する変異体が得られた。また、1、4、5-IP₃ に対してより高い親和性を示す変異体も得られた。

タイプ 1、2、3 の各々に対する特異的抗体での CHO 細胞を用いて immunoblotting を行った。CHO-K1 細胞には 3 つの IP₃ が発現していることがわかった。特異的抗体を用いた沈降反応の結果、各 IP₃R タイプが会合していることが示され、IP₃R は CHO-K1 細胞内でヘテロ四量体を形成していることが証明された。また、cDNA から同時に発現させたタイプ 1 とタイプ 3 もヘテロ四量体をつくることが確認された。ヘテロ四量体は肝臓においても検出された。当研究により、IP₃R はホモ及びヘテロ四量体をつくることにより、チャンネル活性の多様性を増大していると考えられた。(御子柴)

骨格筋から心筋へと分化誘導を試みる為に、心筋細胞と骨格筋細胞との相異点を分子生物学的に明らかにする目的で、IP₃ レセプターの存在とその mRNA の発現パターンに付いて、マウス胎児期から新生児期を経て成熟個体に至る心筋に付いての *in situ* ハイブリダイゼーション法により経時的な検討を実施した。実験条件の検討の第一段階として、*in situ* ハイブリダイゼーション法の為の組織の固定方法から検討した。その結果、4%パラフォルムアルデヒドを固定液として使用し、温度は 4°C で固定時間は 24~48 時間が最良であることを見出した。*in situ* ハイブリダイゼーション法で IP₃ レセプターの mRNA の存在をマウス小脳のプルキンエ細胞で確認の上でマウス心筋で確認した。さらに、その上でヒトの心筋での発現状況を検討した。方法的には *in situ* ハイブリダイゼーション法、さらに RT-PCR 法により IP₃ レセプターの mRNA 検討を試みた。その結果、マウス小脳のみでなく心筋細胞中にも type 1 の IP₃ レセプターの mRNA の転写を検討した。胎児マウスの心臓形成の初期には多量の IP₃ レセプターの mRNA の発現が観察された。興味深いことに、胎児小脳では逆に胎児期には発現が少なく、新生児期に増殖してくる事を見出した。(大野)

1. ミオシンアイソフォームによる張力-速度関係の変化

甲状腺機能低下症モデルより得た V1、V3、2 つの心筋ミオシンアイソフォームについて遠心顕微鏡で張力-速度関係を記録した。この結果無負荷滑り速度は V1 で有意に高かったもの、最大力については両者に差を認めなかった。ただし、張力-速度関係曲線の形状は大きく異なり、V1 では筋肉の実験で見られる効率の悪いタイプの形に類似していた。

2. ミオシンアイソフォームによる力発生能力の変化

ラット心筋より抽出した 2 種類の心筋ミオシンアイソフォーム (V1、V3) についてレーザー光トラップを用いて比較を行った。発生する力はアクチンフィラメントの長さに比例していたが、単位長さで比較した場合、心筋ミオシンは骨格筋に比べ力発生能力は小さいものの 2 種の心筋ミオシンアイソフォーム間には力発生能力に差はないことを認めた。これは遠心顕微鏡で得た結果と一致し、また一部の心室乳頭筋を用いた実験から予測された結果を実証したものである。

3. 点突然変異による滑り速度の変化

403 番目の Arginine を Glutamine に変えたもの (403Arg-Glu)、453 番目の Arginine を Cysteine に変えたもの (453Arg-Cys)、584 番目の Glycine を Arginine に変えたもの (584Gly-Arg) では野性株に比べアクチンフィラメントとの間の滑り速度が有意に低下し

ており（野性株 $2.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、403Arg-Glu $1.0 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、453Arg-Cys $0.7 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、584Gly-Arg $0.8 \mu\text{m}/\text{sec}$ ）、機能低下が示唆された。（百村）

1. 日本人及びイギリス系オーストラリア人にみられるミトコンドリア・心筋症患者の mtDNA 全周塩基配列にみられた塩基置換の集積には顕著なクラスターが認められ、変異がミトコンドリア・イブから順次系統的に分岐したことを示しており、患者には世界的な広がりを持った一つの遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。

患者 mtDNA の生殖腺細胞変異の遺伝子型は、mit-変異のみ存在する (mit-) 型と、syn-変異のみを有する (syn-) 型、mit-変異と syn-変異が共存する (mit+syn-) 型に大別できることが判った。死亡患者についてその死亡年齢にもとづいて Kaplan-Meier 法によって累積生存率を計算した。メデアン生存時間は、(mit-)型患者が 75 歳であるのに対して (mit+syn-) 型患者は 21 歳と著明な差のあることが判明した。このことは、こうした遺伝子診断によって、患者の平均余命を知り、その治療、心臓移植、遺伝子治療への適応などを知る上に極めて有用であると考えられる。

2. PCR 増幅した mtDNA では失われる体細胞変異の情報、特に活性酸素ラジカルによる遺伝子酸素障害の結果である 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG) は、65 歳以上の高齢者では加齢によって 8-OH-dG 量が急増し、これとよい相関を示して mtDNA の欠失が増大した。mtDNA が同一鎖内で欠失を起こすためには、その部分が一本鎖の状態であることが必須である。mtDNA 二本鎖中に 8-OH-dG が所々に生成すると、その部分は相補鎖とミスマッチを起こし、結果的に二重鎖の一定範囲が解けた持続的な一本鎖になった状態での疑似組み換え、ないし再配列が欠失を起こす機構として考えられる。

3. 包括的欠失同定法によって検索した結果は、重篤な点変異を有し 19 歳でミトコンドリア心筋症のために死亡した患者心筋 mtDNA は驚くべき事に実に 235 種類の欠失が検出され、こうした欠失によって全 mtDNA の 85% が断片化し崩壊していた。また、同様に重篤な点変異を有し拡張型心筋症のためユタ大学で心臓移植を受けた 7 歳児の心筋 mtDNA は 212 種類の欠失が証明された。対象とした 3 歳児の心筋 mtDNA では欠失は 5 種類にとどまっていた。こうした心筋 mtDNA の顕著な断片化、崩壊は、心筋エネルギー産生の著しい低下、細胞死をもたらすものと考えられた。（小沢）

1. 分化誘導および増殖抑制時における細胞周期の変化と細胞周期関連遺伝子の変化分化誘導に伴い細胞は G1 期に停止し、この変化は G1 期関連遺伝子の内でも特に Cyclin E、A の抑制による事が示唆された。Interferon による増殖抑制で Cyclin A、E に加えて G1 期を抑制する遺伝子を含め、ほとんど全ての G1 期関連遺伝子が増殖の停止に向かう方向で変動した。

2. 胎児期、新生児期および成長したラットにおける心筋細胞の増殖能について。胎生期のラット心筋は BrdU を取り込んだが母体のそれでは取り込みが認められなかった。また、生後 4~7 日までは BrdU の取り込みが観察されたがそれ以降は認められなかった。

3. 圧負荷心肥大における DNA 合成能について

BrdU の取り込みは術後 6 週より認められ一定の範囲内では心重量の変化と一致する傾向にあった。また、一部の心筋においては多核化が観察された。

4. PCNA の発現について

免疫組織化学的に圧負荷心肥大においては control に比較して発現の亢進が認められた。

(山田)

IV 考察

IP₃Rのリガンド結合部位の特定のアミノ酸配列に依存することが明らかとなった三つのIP₃Rのアイソフォームは、ヘテロ四量体をつくることが確認された。この結果は、IP₃Rの機能の多様性を考える上で、大変重要な結果である。(御子柴)

心肥大などで観察される心臓の変化は形態病理、生理学的検討のみが行われていた時代には質的なものとして捉えられていた。続いて心臓研究にも生化学、分子生物学の手法が取り入れられ形態及び機能の変化には心筋を構成する蛋白の構造変化がともなうことが次々と明らかにされてきた。しかしこれらの研究は心筋細胞を破壊した後蛋白、核酸を抽出して行わなければならないため、筋収縮といった物理的現象を検討するには不適であった。このギャップを埋めるものとして考案されたものがインビトロ運動再構成実験系である。本研究においては様々な機械的負荷、神経性、液性刺激によって変化することが報告されている心筋ミオシンのアイソフォームがそれぞれどのような収縮特性を持つのかを検討した。V1、V3アイソフォームは無負荷滑り速度で大きく異なるものの最大発生張力は変わらなかった。しかし張力-速度関係曲線の形状は大きく異なり負荷に対する特性の差が示唆された。心筋レベルの検討でも同じ傾向の結果が報告されているがこうした細胞の構造を保った実験系ではミオシンと共に変化する他の要因の影響を除外することはできない。今回得られた結果により心臓全体でみられる機能変化の内ミオシンの変化に由来する部分を同定することができたと考える。

続いて家族性肥大型心筋症の直接病因を確定できたものとして注目されている点突然変異を持つミオシンの機能を同様にインビトロ運動再構成系を用いて検討した。この検討は現在進行中であるが変異ミオシンはコントロールに比べ明らかに滑り速度が低下しておりこの機能低下が肥大型心筋症の病態を形成する原因と考えられた。これらの検討を通じ心筋ミオシン分子の構造と機能の関係がある程度明らかになってきたが今後さらに詳細な構造機能連関を究明する予定である。(百村)

欠失については、今までのミトコンドリア病では表現型である症状との間に不一致が奇異な点として指摘されていたが、その原因は、mtDNAはH鎖、L鎖にある複製開始点、それぞれ0rH、0rL、がその複製の為に必須であると言われていたために、研究者が0rHおよび0rL領域を避けた部分についてのみの検索を行っていたためである。我々が網羅的欠失検出様によって、mt心筋症患者を検索したところ、200種を越す欠失が見い出された。0rHおよび0rLを持つ欠失は全欠失の20%に過ぎず、残りの欠失は、0rHないし0rLを欠くか、0rHおよび0rLを共に欠いていた。即ち、従来の検索は、全欠失の約1/5に制限されていたことになり、表現型との乖離は当然であったと言える。今後は網羅的に全欠失を検索することによって、遺伝子型と表現型との奇異な不一致は解消されるものと考えられる。またこうした多種類の欠失は、mtDNAの断裂、断片化をもたらし、アポトーシスとの関係において注目される。

研究の結果得られた事実を総合すると、毒物などの外部要因、世代に対して垂直および水平な変異集積の内部要因によりエネルギー産生系の構築が障害され、活性酵素ラジカルの産生を促しmtDNA中の8-OH-dGが増大し、mtDNAが数千塩基対にわたって持続した一本

鎖状態となることにより大小の欠失が体細胞変異として獲得され、欠失はさらに活性酸素ラジカルの産生を促進し体細胞変異の新生を促進するという悪循環が体細胞変異の指数級数的な増大として実測されたものといえる。こうした欠失と点変異の蓄積とが複合した変異 mtDNA 量の増大によって遺伝子の断片化、崩壊が進行した結果、心筋細胞のエネルギー産生が需要の閾値をまわると、機能障害として顕在化し心不全症状として発現するものと考えられる。(小沢)

今までの研究結果より、心臓の個体発生や肥大心形成の機構に細胞周期の制御機構が直接的な役割を担っていることが明らかになった。とりわけ cyclinE、A が重要な働きを担っているものと推察される。D-type cyclins の役割については不明な点が多いが血液細胞の結果や老化、分化に関する結果を総合すると心筋細胞に関しても重要な働きが想定され興味深い点である。また、cyclin dependent kinase inhibitors (CDKIs) の動態も今後の課題である。すなわち通常的心筋細胞における G1 停止状況は G1 を促進する力が低下していることに起因するのか、もしくは G1 を抑制する力の増大によるものか、を示してくれるからである。このことは病的状況における心筋細胞での不均衡状況の原因を提示してくれる可能性がある。

今回の研究により成長した心筋細胞においてもある程度 DNA 合成能が保たれていることが示唆された。このことは、何らかの方法に依れば脱落した一部の心筋細胞の再生が可能なことも示している。今後、正常心臓の発生過程や圧負荷による肥大心の過程について、細胞周期関連遺伝子の変化をさらに明らかにし、成長した心筋における G0 期の Restriction point は如何に制御されているかを明らかにしたいと考えている。また、心肥大の逆の現象として、心筋細胞の死を細胞周期の観点から検討したい。とりわけ細胞周期の抑制遺伝子の役割を明らかにしたい。(山田)

本プロジェクトの最終目標たる心筋細胞の再構築は、すでに分化した骨格筋を脱分化させ、筋原細胞とし、分裂再生能を付与し、さらにこの細胞から心筋へと再分化の誘導を試みようとしている。この場合に、現時点では単一の筋細胞においては心筋細胞と骨格筋細胞との識別することは困難である。そこで、両者の相異点を分子生物学的に明らかにする目的で、最初に IP3 レセプターの存在に着目し、心筋での局在を明らかにした。その上で mtDNA の発現パターンに付いて、マウス胎児期から新生児期を経て成熟個体に至る心筋に付いての経時的検討を実施した。その結果、胎生期の心筋で強く発現していることを見いだした。分化誘導を図るうえでの有力な指標としての応用の可能性が示唆された。(大野)

V 研究成果の発表

1. Suburo AM, Rodorigo J, Rossi ML, Martinez-Murillo R, Terenghi G, Maeda N, Mikoshiba K, Polak J. Immunohistochemical Localization of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in the human nervous system. *Brain Research*, 601, 193-202, 1993
2. White A. M., Varney M. Maeda N, Mikoshiba K, Comparison of Ins (1, 4, 5) P3 receptors from rat cerebellum and bovine adrenal cortex. *Biochem. Biophys. Acta*, 1175, 307-311, 1993
3. Nakajima K, Ikenaka K, Kagawa T, Aruga J, Nakao J, Nakahira K, Shiota C, Kim S.

- U, Midoshiba K. Novel isoforms of mouse myelin basic protein predominantly expressed in embryonic stage. *J. Neurochem* 60. 1544-1563, 1993
4. Yoshikawa S, Miyamoto I, Aruga J, Furuichi T, Okano T, Mikoshiba K. Isolation of a drosophila Gene Encoding a Head-Specific Guanylyl Cyclase. *J. Neurochem*, 60, 1570-1573, 1993
 5. Furuichi T, Simon-Chazottes D, Fujino I, Yamada N, Hsegawa M, Miyawaki A, Yoshikawa S, Guenet JI, Mikoshiba K. Widespread ezpresion of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 1 gene (insp 3 rl) in the mouse central nervous system. *Receptors and Channels*, 1, 11-24, 1993
 6. Fujita Y, Mynlieff M, Dirksen TR, Kim M, Niidome T, Nakai J, Friedrich T, Iwada N, Miyata T, Furuichi T, Furutama D, Mikoshiba K. Mori Y, Beam GK. Primary Structure and Functional Expression of the-Conotoxin-Sensitive N-Type Calcium Channel from Rabbit Brain. *Neuron*, 10, 585-598, 1993
 7. Kume S, Muto A, Aruga J, Nakagawa T, Michikawa T, furuichi T, Nakade S, Okano H, Mikoshiba K. The Xenopus IP3 Receptor: structure function and localization in oocytes and eggs. *Cell*. 73, 555-570, 1993
 8. Hamada E, Nakajima T, Ota S, Terano A, Omata M, Nakade S, Kurachi Y, Mikoshiba K. Activation of Ca²⁺-Dependent K⁺ Current by Acetylcholine and Histamine in a Human Gastric Epithelial Cell Line. *Journal of General Physiology*, 102, 667-692, 1993
 9. Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, Ohtsuki T, Handa N, Niinobe M, Mikoshiba K, Sasake S, Nishimura T, Yanagihara T, Kamada T. Differential Vulnerability in the Hindbrain Neurons and Local Cerebral Blood Flow During Bilateral Vertebral Occlusion in Gerbils. *Neuroscience*, 56, 423-439, 1993
 10. Shimizu H, Ochiai K, Ikenaka K, Mikoshiba K, Hase S. Structures of N-Linked Sugar Chains Expressed Mainly in Mouse Brain. *J. Biochem*, 114, 334-338, 1993
 11. Rodrigo J, Suburo AM, Bentura ML, Fermadez T, Nakade S, Mikoshiba K, Martinez-Murillo R, Polak JM. Distribution of the Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor, P400, in Adult Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 336, 1-25, 1993
 12. Wojcikiewicz R, Furuichi T, Nakade S, Mikoshiba K, Nahorski S. Muscarinic receptor activation down-regulates the type I inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor by accelerating its degraation, *J. Biol. Chem.* 269, 7963-7969, 1994
 13. Yamamoto-Hino M, Sugiyama T, Hikichi K, Matteri GM, Hasegawa K, Sekine S, Sakurada K, Miyawaki A, Furuichi T, Hasegawa M, Mikoshiba K. Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors, *Receptors and Channels*, 2, 9-22, 1994
 14. Nakade S, Rhee SK, Hamanaka H, Mikoshiba K. Cyclic AMP-dependent phosphlylation of an immunoaffinity purified type I homotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate resptor increases Ca²⁺ flux in reconstituted lipid vesicles, *J. Biol. Chem*, 296,

- 6735-6742, 1994
15. Mikoshiba K, Furuichi T, Miyawaki A. Structure and function of IP3 receptor, *Seminars in Cell Biology*, 5, 273-281, 1994
 16. Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K. Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, *J. Biol. Chem.*, 296, 12, 9184-9189, 1994
 17. Rodrigo J, Uttenthal O, Bentura ML, Maeda N, Mikoshiba K, Martinez-Murillo K, Polak JM. Subcellular localization of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor P 400, in the vesicular complex and dorsal cochlear nucleus of the rat, *Brain Research*, 643, 191-202, 1994
 18. Yamada N, Makino Y, Clark RA, Pearson DW, Mattei MG, Guenet JL, Ohame E, Fujino I, Miyawaki A, Furuichi T, Mikoshiba K. Human inositol 1, 4, 5-trisphosphate type 1 receptor, *Ins P3R1: Structure, Function, regulation of expression and chromosomal localization*, *Biochem J.*, 302, 781-790, 1994
 19. Fujimoto T, Miyawaki A, Mikoshiba K. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments, *J. Cell Science*, 108, 7-15, 1995
 20. Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Kawano H, Sugiyama T, Furuichi T, Hasegawa M, Mikoshiba K. Immunohistochemical study of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 in rat central nervous system, *Neuro Report*, 6, 273-276, 1995
 21. Fujino I, Yamada N, Miyawaki A, Hasegawa M, Furuichi T, Mikoshiba K. Differential expression of type 2 and type 3 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor mRNAs in various mouse tissues: in situ hybridization study, *Cell & Tissue Research*, 280, 201-210, 1995
 22. Poulsen JCJ, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell REA, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K, Treiman M. Thapsigargin-sensitive Ca^{2+} -ATPases account for Ca^{2+} uptake to inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in adrenal chromaffin cells, *Biochem. J.*, 1995, in press
 23. Futatsugi A, Kuwajima G, Mikoshiba K. Tissue-specific and developmentally regulated alternative splicing in mouse skeletal muscle ryanodine receptor mRNA, *Biochem. J.*, 305, 373-378, 1995
 24. Monkawa T, Miyawaki A, Sugiyama T, Yoneyama H, Yamamoto-Hino M, Furuichi T, Saruta T, Hasegawa M, Mikoshiba K. Heterotrimeric complex formation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subunits, *J. Biol. Chem.*, 270, 14700-14704, 1995
 25. Hirota J, Michikawa T, Miyawaki A, Furuichi T, Okura I, Mikoshiba K. Kinetics of calcium release by immunoaffinity-purified inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in reconstituted lipid vesicles, *J. Biol. Chem.*, 270, 32, 19046-19051, 1995
 26. Shiraishi K, Okada A, Shirakawa H, Nakanishi S, Mikoshiba K, Miyazaki S. Developmental changes in the distribution of the endoplasmic reticulum and

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the spatial pattern of Ca^{2+} release during maturation of hamster oocytes, *Developmental Biology*, 170, 594-606, 1995
27. Honda Z, Takano T, Hirose N, Suzuki T, Muto A, Kume S, Mikoshiba K, Itoh K, Shimizu T. Gq pathway desensitizes chemotactic receptor-induced calcium signaling via inositol trisphosphate receptor down-regulation, *J. Biol. Chem.*, 270, 9, 4840-4844, 1995
 28. Yamashita H, Sugiura S, Sata M, Serizawa T, Iizuka M, Shimmen T, Momomura S. Depressed sliding velocity of isolated cardiac myosin from cardiomyopathic hamsters: Evidence for an alteration in mechanical interaction of actomyosin, *Mol. Cell. Biochem.*, 119, 79-88, 1993
 29. Sata M, Sugiyama S, Yamashita H, Momomura S, Serizawa T. Dynamic interaction between cardiac myosin isoforms modifies velocity of actomyosin sliding in vitro, *Circ. Res.*, 73, 696-704, 1993
 30. Yamashita H, Sata M, Sugiura S, Momomura S, Serizawa T, Iizuka M. ADP inhibits the sliding velocity of fluorescent actin filaments on cardiac and skeletal myosins, *Circ. Res.*, 74, 1027-1033, 1994
 31. Sugiura S, Yamashita H, Momomura S, Serizawa T. Sliding velocity of Cardiomyopathic hamster cardiac myosin on Nitellopsis actin cables: A study using an in vitro motility assay. *The cardiomyopathic heart*. In Nagano M, Takeda N, Dahlla NS eds, Raven Press, New York, 41-48, 1994
 32. Sata M, Sugiura S, Yamashita H, Fujita H, Momomura S, Serizawa T. MCl-154 increases Ca^{2+} sensitivity of reconstituted thin filament A study using a novel in vitro motility assay technique, *Circ. Res.*, 76, 626-633, 1995
 33. Sata M, Sugiura S, Yamashita H, Aoyagi T, Momomura S, Serizawa T. Pimobendan directly sensitizes reconstituted thin filament to slide on cardiac myosin, *Eur. J. Pharmacol.*, 290, 55-59, 1995
 34. Sata M, Yamashita H, Sugiura S, Fujita H, Momomura S, Serizawa T. A new in vitro motility assay technique to evaluate calcium sensitivity of the cardiac contractile proteins, *Pflugers Arch*, 42, 443-445, 1995
 35. Sugiura S, Yamashita H, Sata M, Momomura S, Serizawa T, Oiwa K, Chaen S, Shimmen T, Sugi H. Force-velocity relation of rat cardiac myosin isozymes sliding on algal cell actin cables in vitro, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1231, 69-75, 1995
 36. Sata M, Sugiura S, Yamashita H, Fujita H, Momomura S, Serizawa T. Phosphocreatine shuttle provides optimal condition for mechanical interaction of cardiac actomyosin, *Circulation*, 1995, in press
 37. Sugiura S, Yamashita H, Sata M, Fujita H, Momomura S, Seriazawa T, Sugi H. Kinetic property of cardiac myosin in vitro. *Cardiac Energetics: From Emax to Pressure-Volume Area*. Le Winter M, Suga H, Watkins MW eds. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1995 in press
 38. Grivell LA. Mitochondrial DNA: Small, beautiful and essential. *Nature*, 341,

- 569-571, 1989
39. Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T, Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 979-985, 1992
 40. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts, *Mol. Cell. Biochem.* 119, 95-103, 1993
 41. Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Sugiyama S, Ozawa T. Fragmentation of human heart mitochondrial DNA associated with premature aging, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202, 102-110, 1994
 42. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases, *Lancet*, 642-645, 1989
 43. Ozawa T, Mitochondrial cardiomyopathy. *Herz*, 19, 105-118, 1994
 44. Ozawa T, Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1271, 177-189, 1995
 45. Ozawa T, Katsmata K, Hayakawa M, Sugiyama S, Tanaka T, Itoyama S, Nunoda S, Sekiguchi M. Genotype and phenotype of a severe mitochondrial cardiomyopathy: a recipient of heart transplantation and the genetic control, *Biochem, Biophys. Res, Commun.*, 207, 613-620, 1995
 46. Ozawa T, Katsymata K, Hayakawa M, Yoneda M, Tanaka M, Sugiyama S. Mitochondrial DNA mutations and survival rate, *Lancet*, 355, 189, 1995
 47. Tanaka M, Ozawa T. Analysis of Mitochondrial DNA Mutations, In protocols in *Molecular Neurobiology*, 13 (ed, A. Longstaff and P. Revest), 25-53, The Humana Press, Totawa, 1992
 48. Wallace DC, Diseases of the mitochondrial DNA, *Annu. Rev, Biochem.*, 61, 1175-1212, 1992
 49. Horiguchi-Yamada J, Yamada H, Nakada S, Ochi K, Nemoto T. Changes of G1 cyclins, cdk 2, and syclin A during the differentiation of HL 60 cells induced by TPA, *Mol. Cell. Biochem.*, 132, 31-37, 1994
 50. Yamada H, Ochi K, Nakada S, Nemoto T, Horiguchi-Yamada J. Changes of cell cycle-regilating genes in interferon-treated Daudi cells, *Mol. Cell. Biochem.*, 136, 117-123, 1994
 51. 有野亨、武田信彬、山田 尚、土屋昌史、永井 誠、望月正武、永野 允、庄負荷肥大心における DNA 合成、心筋の構造と代謝—1993—、16、399-404、1994
 52. Nakada S, Horiguchi-Yamada J, Yamada H. Early changes of G1 -controlling genes in human erythroleukemia HEL cells after TPA stimulation, *Jikeikai Med J.*, 42, 33-43, 1995
 53. Nagai M, Yamada H, Nakada S, Ochi K, Nemoto T, Takahara S, Hoshina S, Horiguchi-Yamada J. A macrolide antibioti, roxithromycin, inhibits the growth of human myeroid leukemia HL 60 cells by producing multinucreate cells, *Mol. Cel. Biochem.*, 144, 191-195, 1995

54. Yamada H et al. Interferon modulates the messenger RNA of G 1-controlling genes to suppress the G1-to-S transition in Daudi cells, *Mol. Cell. Biochem.*, in press
55. Nakamura M, Asakura M, Kamada M, Kawashima K, Ikeda M, Ohno T. An enzyme-linked immunosorbent assay for screening monoclonal antibodies against cellular receptor molecules, *Jikeikai Med. J.*, 51, 174-179, 1993
56. Matsuhisa A, Saito Y, Ueyama H, Aikawa Y, Ohno T. Detection of staphylococci in mouse phagocytic cells by in situ hybridization using biotinylated DNA probes, *Biotechnic & Histochemistry*, 69, 31-37, 1994
57. Matsuhisa A, Saito Y, Sakamoto Y, Keshi H, Ueyama H, Aikawa Y, Kishi Y, Ohno T. Detection of Bacteria in phagocyte-smears from septicemia- suspected blood by in situ hybridization using biotinylated probes, *Microbiol. Immunol.*, 38, 511-517, 1994
58. Ryuichi Nagahori, Tsuneya Ohno. Establishment of an in situ hybridization method using digoxigenin-labeled cRNA probe for IP₃ receptor gene expression in mouse and human heart muscle tissues, *Jikeikai Med. J.*, 42, 13-24, 1995
59. Sasaki H, Nakamura M, Ohno T, Matsuda Y, Yuda Y, Nanomura Y. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 2026-2030, 1995