

平滑筋異常収縮における筋フィラメントリモデリングの意義
**Role of myofilaments remodeling
 in abnormal contraction of smooth muscle**

渡辺 賢^a、石田行知^b、湯本正寿^c、八木直人^d、山口真紀^c、木村雅子^c、竹森 重^c
 M. Watanabe^a, Y. Ishida^b, M. Yumoto^c, N. Yagi^d, M. Yamaguchi^c, M. Kimura^c, S. Takemori^c

^a東京医科大学、^b文京学院大学、^c東京慈恵会医科大学、^dJASRI/SPring-8

^aTokyo Medical University, ^bBunkyo Gakuin University, ^cThe Jikei Univrsity, ^dJASRI/SPring-8

細胞内環境を自在にコントロールできるスキンド平滑筋標本を用いて、血管攣縮時に発生する低・無酸素状態が平滑筋ミオシンフィラメント構造に与える影響を X 線小角散乱実験により検討した。無酸素状態でおこる MgATP の枯渇により、平滑筋標本は硬直状態に至り張力発生がみられたが、生理的なミオシン軽鎖リン酸化依存性収縮とは異なり、ミオシンフィラメント由来 14.4 nm 子後反射強度の増強はみられず、むしろ減弱傾向を示した。この減弱は MgATP 再添加後にも不可逆的に持続し、MgATP 枯渇により不可逆的なミオシンフィラメント構造攪乱が起こることが示唆された。

To explore contribution of myosin filament remodeling in hypoxia-induced pathological changes in smooth muscle function during vasospasm, we studied the effects of MgATP depletion on the X-ray diffraction profile of “skinned” (cell membrane permeabilised) smooth muscles. MgATP depletion developed a “rigor” tension very slowly. Intensity of 14.4 nm meridional reflection originated from myosin filaments structure tended to decrease irreversibly. Since the 14.4 nm myosin reflection increased during “physiological” contraction induced by Ca²⁺, myosin filament organization during rigor might be quite different from that during Ca²⁺-induced contraction. Irreversible changes in myosin filaments by depletion of MgATP might contribute fatal deterioration of smooth muscle function during vasospasm.

目的および成果の概要：

平滑筋異常収縮が惹起する血管攣縮は、日本人死因の第 2・3 位を占める心・脳血管疾患の予後不良因子であり、発症の細胞内メカニズム解明とそれに基づく治療法の開発が求められてきた。横紋筋とは異なり、平滑筋の収縮は収縮タンパク質ミオシンの調節軽鎖 (MLC₂₀) リン酸化に依存し、リン酸化がミオシンの滑りを惹起する。

一方、ミオシンフィラメントは MLC₂₀ リン酸化レベル、細胞内 MgATP 濃度などの要因により、量的・空間的再配置 (リモデリング) を起こす。攣縮の一因として、異常なミオシ

ンフィラメントリモデリングが不可逆的に起こり、持続的な平滑筋異常収縮が惹起する可能性が挙げられる。しかし、平滑筋細胞レベルでのミオシンフィラメントリモデリングの定量的な解析は従来困難とされてきたため、この仮説は未だ実験的に立証されていない。

この様な事情を受け、本研究では攣縮時に起こる低酸素・無酸素状態による細胞内 MgATP 濃度減少が、ミオシンフィラメントリモデリングおよび力学応答に与える影響を定量的に見積もることを研究目的とし、人為的に細胞内 MgATP 濃度をコントロールした平滑筋細胞を用いた実験を行った。

方法：

BL45XU-小角散乱ステーション（理化学研究所）において、細胞膜を β -escin によって化学的に破壊したモルモット平滑筋標本に $200 \times 300 \mu\text{m}$ のサイズの X 線を 20 秒 \times 3 回照射した際に発生する小角散乱像を、Fuji イメージングプレートを用いて記録した（カメラ長 2.3 m）。張力トランスデューサを用いて標本の力学応答を同時に記録した。X 線照射による筋肉標本損傷を可能な限り避けるため、電動ステージを用いて 20 秒照射毎に照射位置を垂直および水平方向に移動した。

主な結果：平滑筋細胞の MgATP を人為的に除去するため、MgATP 存在下の弛緩状態から MgATP を含まない Rigor 液に標本を移し替えた。この際 Rigor 液に apyrase を加え、細胞内の様々なタンパク質に結合している MgATP を人為的に分解した。すると、硬直（Rigor）張力の緩徐な立ち上がりがみられ、長時間にわたり持続した。この際、MLC₂₀リン酸化に依存した収縮時に観察されるミオシンフィラメント配列由来 14.4 nm 子後反射強度の増加はみられず、寧ろ減弱傾向が観察された（Fig. 1A \rightarrow 1B）。更に、Rigor 状態の標本に再び MgATP を添加したときには、硬直張力の急激な低下がおり弛緩状態に戻ったが、14.4 nm 子後反射強度は更に減弱した（Fig. 1C）。

考察：

以上の結果から、無・低酸素によって起こる平滑筋硬直状態では、MLC₂₀ 依存性収縮時に観察されるミオシンフィラメント量増加・もしくはミオシンフィラメントの整列、のような現象は起こらず、逆にミオシンフィラメント構造の攪乱もしくはフィラメントの部分的

な解離が起こること、さらにこのようなミオシン構造の変化が非可逆的に持続することが示唆された。

従って、血管攣縮のような平滑筋の異常な持続的収縮時にはミオシンフィラメント構造の非可逆的な変化（損傷）があり、それが血管攣縮後の血管機能不全の一因になることが推察された。

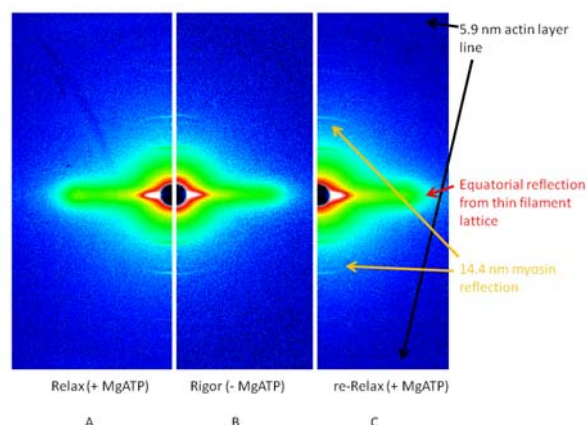


Fig. 1. Typical X-ray diffraction patterns of skinned smooth muscles in the presence and absence of MgATP. In rigor (- MgATP) conditions, 14.4 nm myosin reflection tends to decrease (B), and continue even after re-application of MgATP (C).

今後の課題：

ミオシンフィラメントのみならず、細いフィラメントも低酸素・無酸素状態で不可逆的な変化を起こす可能性が示唆された。今後、細いフィラメント由来の反射プロファイルの解析も行いたい。

発表状況：

本研究成果の一部は、2008 年 7 月の第 50 回日本平滑筋学会総会（弘前市）において発表された（X 線回折法による平滑筋収縮フィラメントのリモデリング観測の試み：渡辺 賢 他）

キーワード：

小角散乱、平滑筋、血管攣縮、硬直、ミオシンフィラメント