

制御機構の解析. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.

- 17) 久保芽佳, 辰巳徳史, 鈴木英明, 岡部正隆. トランスクリプトーム解析による横隔膜の発生で発現する新たな遺伝子の探索. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 18) 姫岩翔子, 辰巳徳史, 長澤竜樹, 矢野十織, 岡部正隆. 条鰭類の鰓の起源の検討. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 19) 辰巳徳史, 岡部正隆. 発生期横隔膜の初代培養法の確立と部位別レチノイン酸応答能の比較解析. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.
- 20) 重谷安代, 立花利公, 岡部正隆. ポリプテルスの側線感丘後方移動時の基底膜の変化. 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会. 新潟, 3月.

IV. 著 書

- 1) 矢野十織, 阿部玄武, 岡部正隆, 田村宏治. 3. 動物の進化 脊椎動物の上陸-水面の下でつくり込まれた陸生装備. 日本動物学会編. 動物学の百科事典. 東京:丸善出版, 2018. p.162-3.
- 2) 重谷安代. I. 基礎編 6. 生物の進化. 早稲田大学先進理工学部生命医科学科編. 生命科学概論:環境・エネルギーから医療まで. 第2版. 東京:朝倉書店, 2019. p.53-61.

分子生理学講座

講座担当教授: 竹森 重 筋生理学, 体力医学
 准 教 授: 山口 眞紀 筋生理学, 体力医学
 准 教 授: 山澤徳志子 筋生理学, 薬理学,
 体力医学
 講 師: 大野 哲生 筋生理学, 体力医学

教育・研究概要

I. 示唆走査熱量測定 (DSC) 法による骨格筋細胞内水の相転移の観察

骨格筋細胞内には状態の異なる少なくとも5種類の水があることが核磁気共鳴 (NMR) 法, 核磁気共鳴画像 (MRI) 法を用いた研究で明らかになっている。この違いは水分子と周囲の相互作用で形成されることを解明したが, この水分子と周りの分子との相互作用の解釈には複数あり, 一義的にはわかっていない。

NMR も MRI もどちらも水分子プロトンのスピンをみる方法であるが, これらの方法とは異なる観点で水分子の状態をみるのがDSC法である。この方法は温度変化に伴う比熱変化, つまり氷が水に融けるような相転移の検出に優れており, その温度変化で形成/崩壊する水分子や周りの分子との分子間相互作用変化を熱エネルギーとして検出できる。

DSC法によるこれまでの研究により, ウシガエルの除膜筋線維 (スキンドファイバー) 内には-10℃以下に融解ピークを持つ水が少なくとも2種類あることを解明した。これらの融解ピークはDergersらの研究によりわかっているミオシンやアクチンの変性温度まで加熱すると, それぞれの融解ピークの大きさが特異的に変化することも明らかになった。さらにミオシンフィラメントやアクチンフィラメントを選択的に除去したスキンドファイバーでも融解ピークの大きさが変化することが分かった。

今年度は, これまで行っていたATPのない硬直状態のスキンドファイバーの計測結果がATPの有無に影響されるかを確かめるため, 収縮力を評価項目としてATPのある弛緩状態とATPのない硬直状態でのスキンドファイバーの熱安定性に大きな違いがあるかを検討した。硬直, 弛緩のそれぞれの状態で30℃, 60分間の熱負荷を与えた場合に熱負荷の前後での収縮力低下に違いがあるかを検討すると, どちらも熱負荷前の80%程度まで収縮力は低下したが, 硬直状態と弛緩状態での違いは認められなかった。これより, 今まで計測してきた硬直状態の

標本は弛緩状態に比べて特別なものでなく、弛緩状態のDSC測定でも硬直状態の結果と同様の傾向が得られる可能性が示唆された。

II. 悪性高熱症関連疾患をもたらしている骨格筋型リアノジン受容体の解析

骨格筋のCa²⁺放出チャネルであるリアノジン受容体(RyR)の突然変異は種々の筋疾患を引き起こす。中でも悪性高熱症(malignant hyperthermia: MH)はRyRのCa²⁺誘発性Ca²⁺放出(Ca²⁺-induced Ca²⁺ release: CICR)活性の異常亢進により引き起こされると考えられており、MHや関連疾患患者の遺伝子解析から300以上のRyR点突然変異が報告されている。これらの変異多発領域は3箇所(領域1:35~614番, 領域2:2,163~2,458番, 領域3:3,916~4,943番)があるが、いずれの領域についても実際の病態との相関は不明な点が多い。そこで本講座では、RyRのN末端領域変異にまず焦点を絞り、その構造的特徴についての知識を得るために、in silicoで突然変異体の分子構造を構築し、これまでに機能解析をしたMH変異体および野生型(WT)の分子動力学(MD)シミュレーションを行った。50ナノ秒のシミュレーションにより、変異体のうちサブドメインの境界に位置している変異体(R402CとR402H)の細胞質側の中心部構造がWTに比べて変化することが明らかになった。この理由としてD61とR402の水素結合相互作用の消失により、サブドメインが旋回して、これがCICR活性を亢進する可能性が明らかになった。本手法により機能解析とMDシミュレーションを併用することで、点突然変異が機能的変異を起こす分子内機構が同定されていけば、悪性高熱発症を予測する低侵襲な検査/治療の開発に繋がることが期待される。

III. 外眼筋ミオシンに対する2,3-ブタンジオンモノオキシムの効果

外眼筋は四肢体幹筋に発現するあらゆるミオシン重鎖アイソフォームを有するとともに外眼筋特有のミオシンアイソフォームをもち、骨格筋の中で最高の短縮速度を実現している。この機能を裏打ちする構造的特徴を探るためにX線回折法による微細構造解析を行ったところ、外眼筋線維の筋フィラメントは四肢体幹筋の速筋ミオシンと同様の基本構造を有するがミオシン頭部の構造的ゆらぎが速筋に比べて大きい可能性がこれまでに示された。

外眼筋ミオシン頭部の構造的ゆらぎについて更な

る情報を得るために、ミオシン頭部のATP加水分解中間体の分布をより安定なものにシフトさせる2,3-ブタンジオンモノオキシム(BDM)を加えたときのX線回折像を取得した。BDMの添加により、外眼筋のミオシンでは構造ゆらぎは大きいままだった。高速運動を実現する外眼筋筋線維のミオシン頭部にみられる大きな構造ゆらぎは、ATP加水分解中間体の分布の違い以外の要因によることが示唆された。

IV. プトレシン経口摂取がラット心筋の機能と構造に与える影響

これまでに、運動負荷を与えた群と与えない群のそれぞれに二価のポリアミンであるプトレシンを経口投与し心肥大経過を比較したところ、プトレシンの経口投与は運動負荷なしでは心筋中のプトレシン濃度を大きく上昇させるが明らかな心肥大は起こさないこと、運動負荷とともにプトレシンを投与すると心筋中のプトレシン濃度の上昇が抑制され、心肥大経過や心興奮性には大きな影響を及ぼさないことを明らかにした。そこで運動負荷とともにプトレシンを投与した際に心筋中のポリアミン濃度上昇が抑えられるのは、ポリアミンが運動負荷でどこかの臓器に蓄積されたか排泄された可能性を考え、ラットに運動負荷を与えた群と与えない群のそれぞれにプトレシンを経口投与した際の、主要臓器中のポリアミン濃度および尿中ポリアミン代謝物をHPCL法により測定した。

骨格筋、肝臓、脾臓、腎臓、肺、脂肪でのポリアミン濃度は概ね心筋や血清と同様の振る舞いを示し、摂取したプトレシンは運動負荷により体内の他の臓器に蓄積されたのではなく体外に排泄されたか代謝された可能性が示唆された。そこで尿中ポリアミン濃度を調べたところ、臓器中および血清濃度とは異なり、安静群でも運動負荷群でもプトレシン摂取によりスペルミジンの尿中排泄量は増加している兆候が見られた。

摂取されたプトレシンは運動負荷により体外に排泄されてしまっただけではなく、しかるべき量がスペルミジンへ転換されているのではないかと考えられた。

V. マウス骨格筋サテライト細胞から分化誘導した骨格筋管細胞が発現するミオシン重鎖アイソフォーム

骨格筋肥大の鍵を握るのは、筋細胞間ニッシュに存在する骨格筋前駆細胞であるサテライト細胞であ

る。また収縮機能の主役をなす骨格筋ミオシンには多彩なアイソフォームがあり、精緻な身体運動を実現している。サテライト細胞が将来発現するミオシンのアイソフォームがいつ決定されるかは効率的なトレーニングを行う上で重要なポイントだが、未だわかっていない。

そこで骨格筋からサテライト細胞を単離し、in vitro で多核細胞（筋管）に分化させ、外的要因の影響をいまだ受けない分化直後のミオシンアイソフォームを解析することを目的とし、マウス外眼筋、横隔膜、下肢筋よりサテライト細胞を単離、培養して分化させ、電気泳動でミオシンアイソフォームを分離した。

単離サテライト細胞から分化したばかりの筋管細胞が発現する主たるミオシンの移動度は細胞の由来によらず新生仔マウス腓腹筋ホモジネートのものとほぼ同等であった。

これより、刺激を受けて活性化したサテライト細胞は、一度共通の幼若ミオシンアイソフォームを発現し、おそらくその後を受ける機械的・化学的シグナルに応じて個別のアイソフォームを発現していくものと考えられた。

「点検・評価」

1. 研究

悪性高熱症関連変異体のリアノジン受容体の解析においては、本年度は計算時間を50ナノ秒まで延長して解析し、分子動力学計算から得られた原子の配置を簡便に可視化できる解析手法を構築した。このようにしてCICR活性の異常亢進に関与しているRyR1の機能的変異が同定されていけば、MHを予測する低侵襲な検査の開発に繋がる可能性が期待される。これに加えて、個体レベルでの解析を行うため、ヒトMH変異をRyR1遺伝子に導入したノックインマウスを作成した（順天堂大学 村山 尚氏らとの共同研究）。RyR1遺伝子点変異ホモマウスは胎生死を引き起こし、ヘテロマウスはイソフルラン麻酔により体温が急上昇して死亡するMH様症状を示した。また、RyR1阻害薬であるダントロレンは、事前投与で体温上昇を阻害したとともに、イソフルラン麻酔により体温上昇中のマウスに投与することで体温低下を引き起こした。これより、RyR1遺伝子点変異ヘテロマウスは悪性高熱症モデル動物として有用であることが示された。

ポリアミン投与が心臓の構造・機能に与える影響に関する実験は本年度も分子生物学講座 大城戸真喜子氏と共同で推進した。運動負荷と同時にプトレ

シンを投与した際の尿中ポリアミン代謝物動態に関して興味深い知見が得られた。来年度はメタボローム解析も併用することによりポリアミンと運動負荷を結ぶ鍵となる生化学的過程を抽出したい。

2. 教育

教育面では、医学科2年コース基礎医科学Ⅰのユニット「自然と生命の理」およびコース基礎医科学Ⅱのユニット「感覚器系」を主に担当した。ユニット「自然と生命の理」講義では、続くコース基礎医科学Ⅱで学ぶ各論的な器官系の働きを理解する土台となるような生理学の総論的な部分を、物理化学の立場から理解することを目的に内容を編成した。講義では講義中に学生が自らの理解を確認する時間を設けるとともに、講義終了時にその日の要点を用紙にまとめ提出することで、後日教員からのフィードバックを受ける機会とするよう工夫した。演習では、講義内容の能動的な理解のために、達成度別小グループを編成し、講義内容を咀嚼するための演習課題を与え、それらをグループ内で教えあいながら解くという方式を引き続き採用した。この演習中には教員と学生との質疑応答も活発に行われるため、学生自身が受動的に講義を受けるだけでは気づかなかった問題点を抽出できるとともに、教員にとっても学生の理解の妨げとなっている箇所がどこであるかを知る助けにもなった。

実習では動物や人体を用いた生命現象にかかわる実験を、グループ構成員同士が方法を相談しながら進める選択実験を継続した。また、パソコンを用いて生命現象に関する時間変化をシミュレーションするパソコン実習も継続して行い、ばらばらになりがちな医学知識を頭の中で時々刻々の変化として再構築するためのトレーニングを行った。

コース基礎医科学Ⅱではユニット「感覚器系」を担当した。本年度は昨年度よりも更にユニット内での内容連携を強化し、スライドの共有や講義内容の相互引用を増やすことにより感覚器系全体、ならびにユニット「神経系」との関わりが理解できるような構成を工夫した。また講義中に動画やデモンストレーションを数多く盛り込むことで学生が関心を持ちやすくするような工夫も行った。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Sato C¹⁾, Yamazawa T, Ohtani A²⁾, Maruyama Y¹⁾, Memtily N (Xinjiang med Univ), Sato M¹⁾, Hatano Y¹⁾, Shiga T²⁾(² Univ Tsukuba), Ebihara T¹⁾ (¹ AIST). Primary cultured neuronal networks and

type 2 diabetes model mouse fatty liver tissues in aqueous liquid observed by atmospheric SEM (ASEM): staining preferences of metal solutions. *Micron* 2019; 118: 9-21.

Ⅲ. 学会発表

- 1) Yamazawa T, Nakamura N(Kyoto Univ), Sato M¹⁾, Sato C¹⁾ (¹ AIST). (Poster) Observation of tissues in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). WCP2018 KYOTO (18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology). Kyoto, July.
- 2) 山澤徳志子, 山口眞紀, 小川治夫(東京大), 村山尚¹⁾, 小山田英人(昭和大), 呉林なごみ¹⁾, 鈴木純二(カリフォルニア大), 金丸和典²⁾, 桜井隆¹⁾(¹ 順天堂大), 飯野正光²⁾(² 日本大). (ポスター) 悪性高熱症関連変異を有する骨格筋型リアノジン受容体の構造と機能変化. 日本筋学会第4回学術集会. 倉敷, 8月.
- 3) 渡辺賢¹⁾, 中原直哉, 石田行知¹⁾²⁾(¹ 首都大学東京, ² 文京学院大). (ポスター) β エスシンスキンド処理は盲腸収縮フィラメント格子間隔を拡大する. 第60回平滑筋学会総会. 東京, 8月.
- 4) Morimoto S, Yamaguchi M, Ohno T, Takemori S. (Oral) Recovery process of potentiated mechanical signal of motor unit after prolonged contraction. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 340]
- 5) Yamazawa T, Yamaguchi M, Ogawa H(Univ Tokyo), Murayama T¹⁾, Oyamada H(Showa Univ), Kurebayashi N¹⁾ (¹ Juntendo Univ), Iino M (Nihon Univ). (Oral) Study of mutant ryanodine receptor channel using functional analysis and molecular dynamics. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 347]
- 6) Hirano K, Yamauchi H, Nakahara N, Hiratsuka R, Yamaguchi M, Takemori S. (Poster) Increased muscle stiffness after eccentric contraction. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 351]
- 7) Nakahara N, Yamauchi H, Yamaguchi M, Takemori S. (Poster) An x-ray diffraction study on in vivo skeletal muscle with maintained blood supply. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 353]
- 8) Yamaguchi M, Ohkido M, Yamauchi H, Yamazawa T, Ikeda M, Morimoto S, Takemori S. (Oral) Effect of exercise on accumulation of ingested polyamine in various tissues of rats. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 364]
- 9) Ikeda M, Ohno T, Nakahara N, Yamazawa T, Yamaguchi M, Morimoto S, Takemori S. (Oral) Seasonal variation in the growth rate of nail. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 438]
- 10) Tamagawa N, Nakahara N, Taguchi M, Takemori S. (Oral) Accelerometric evaluation of ordinary walking and posture walking. 第73回日本体力医学会大会. 福井, 9月. [J Phys Fit Sports Med 2018; 7(6): 473]
- 11) Yamazawa T, Yamaguchi M, Ogawa H¹⁾, Murayama T²⁾, Oyamada H (Showa Univ), Kurebayashi N²⁾, Suzuki J³⁾, Kanemaru K¹⁾³⁾, Sakurai T²⁾(² Juntendo Univ), Iino M¹⁾³⁾(¹ Univ Tokyo, ³ Nihon Univ). (Poster) Structure and function change of skeletal muscle-type ryanodine receptor. 日本生物物理学会第56回年会. 岡山, 9月. [生物物理 2018; 58(Suppl.1-2): S400]
- 12) 河原巧紘, 山口眞紀, 山澤徳志子, 秋山暢丈, 竹森重. (口頭) マウス骨格筋サテライト細胞から分化誘導した骨格筋のミオシン重鎖発現パターン. 第135回成医会総会. 東京, 10月.
- 13) 山澤徳志子, 小川治夫¹⁾, 山口眞紀, 村山尚²⁾, 小山田英人(昭和大), 鈴木純二(カリフォルニア大), 呉林なごみ²⁾, 金丸和典³⁾, 小口勝二¹⁾(¹ 東京大), 桜井隆²⁾(² 順天堂大), 飯野正光³⁾(³ 日本大). (口頭) リアノジン受容体N末端領域変異による構造と機能変化. 第248回生理学東京談話会. さいたま, 12月.
- 14) 中原直哉, 田口美香, 竹森重, 木村澄子. (口頭) カエル舌筋の粘弾性構築とコネクチン. 筋生理の集い. 東京, 12月.
- 15) Yamazawa T, Yamaguchi M, Ogawa H¹⁾, Murayama T²⁾, Oyamada H (Showa Univ), Kurebayashi N²⁾, Suzuki J³⁾, Kanemaru K¹⁾³⁾, Sakurai T²⁾(² Juntendo Univ), Iino M¹⁾³⁾(¹ Univ Tokyo, ³ Nihon Univ). (Poster) Investigation of mutant ryanodine receptor channel activity using functional analysis and molecular dynamics. BPS19 (63rd Annual Meeting of The Biophysical Society). Baltimore, Mar.
- 16) 山澤徳志子. (口頭) 骨格筋の恒常性維持に対する機能性食品素材の役割. 第92回日本薬理学会年会. 大阪, 3月.
- 17) Watanabe M (Tokyo Metropolitan Univ), Nakahara N, Ishida Y (Bunkyo Gakuin Univ). (Oral) Regulation of thick and thin filaments organization during smooth muscle contraction. FAOPS2019 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress). Kobe, Mar. [J Physiol Sci 2019; 69(Suppl.1): S33]

- 18) Yamazawa T.(Oral) Analysis of disease mutants of type 1 ryanodine receptor using molecular dynamics and Ca^{2+} imaging. FAOPS2019 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress). Kobe, Mar. [J Physiol Sci 2019; 69(Suppl.1): S44]
- 19) Nakahara N, Ohno T, Kimura M (Kagawa Nutrition Univ), Kimura S, Takemori S. (Poster) Differential Scanning Calorimeter reveals interaction between water and myoproteins. FAOPS2019 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress). Kobe, Mar. [J Physiol Sci 2019; 69(Suppl.1): S191]
- 20) Ohno T. (Poster) Structure of bound water in myofibril suspension: a role of ATP. FAOPS2019 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress). Kobe, Mar. [J Physiol Sci 2019; 69(Suppl.1): S266]

細胞生理学講座

講座担当教授：南沢 享 循環生理・病態学
 准教授：福田 紀男 筋生理学
 准教授：草刈洋一郎 筋病態学
 講師：赤池 徹 発達循環器学

教育・研究概要

I. 教育概要

2018年度に本講座は以下の課目を担当した。

医学科：コース基礎医学Ⅱ(ユニット「循環器」(ユニット責任者：南沢), ユニット「泌尿器」(ユニット責任者：南沢), ユニット「呼吸器」, ユニット「機能系実習(生理学系)」(ユニット責任者：南沢)), コース臨床基礎医学(ユニット「症候学演習」(ユニット責任者：草刈), ユニット「感染・免疫テュートリアル」), コース研究室配属, 英語論文抄読演習, コース「臨床医学Ⅱ」(ユニット「症候から病態へ」)
 看護学科：解剖生理学Ⅲ(ユニット責任者：南沢)
 看護専門学校(慈恵看護専門学校)：解剖生理学講義(ユニット責任者：南沢)

II. 研究概要

1. 大血管の発生と機能獲得・維持の機序解明

1) 肺静脈系の特殊性と病態生理の解明

肺静脈は高濃度酸素血に曝されること、左心房と接合する肺静脈部位は心房細動を引き起こす異所性刺激発生部位になることなど、体静脈とは異なる特殊な低圧系血管であるが、その血管特性の理解は進んでいない。そこで肺静脈・左心房に特異的に発現するとされる転写因子 Pitx2 の両心房への過剰発現マウス及び欠損マウスを作成した。現在、その表現型を解析中である。また、手術的に左房狭窄を作成し、肺静脈血流うっ滞による肺高血圧症モデルラットを確立し、肺静脈系の構造異常と機能解析を行った。

2) 動脈管閉鎖機序の解明

動脈管は、肺動脈と大動脈を連結し、血液をバイパスする胎生期特有の大血管であり、生後に閉鎖する。我々は、動脈管が生後に閉鎖する分子機序を、ラット胎仔、ニワトリ胚、ヒト標本を用いて検討している。2018年度はプロスタグランジン E_1 刺激による動脈管平滑筋細胞から分泌されるタンパク質の解析を行い、論文化した。また、胎盤のないニワト