

## 温めた心筋細胞に備わった収縮リズムの周期安定化の仕組みについて

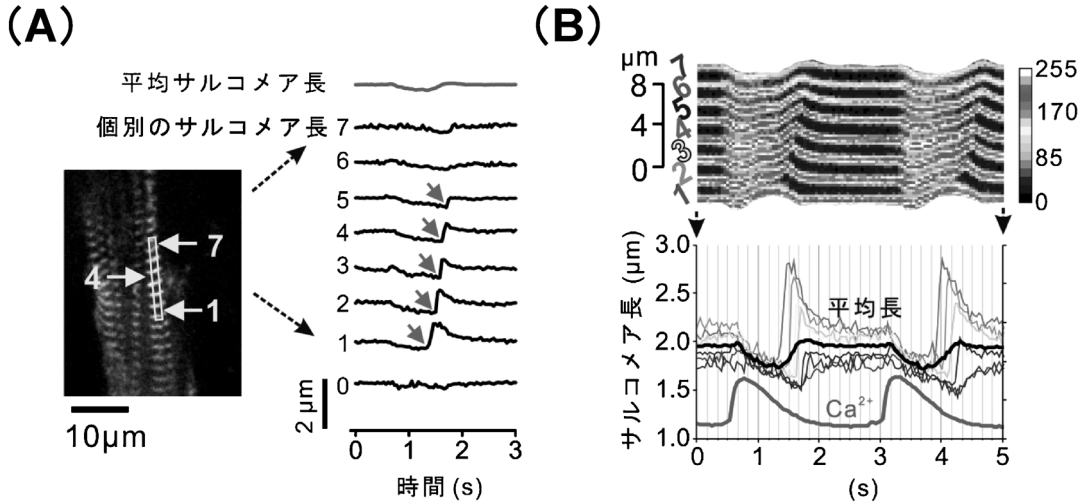
新 谷 正 嶺

本稿では、発表内容のうち、未論文化内容は割愛させていただき、既論文化データに基づき、筆者が発見した収縮リズム現象の紹介と、その計測を可能にした実験系の紹介を行う。

1 つの生体分子モーターの動きを計測する 1 分子生物学の発展により、個々の生体分子モータータンパク質は、確率的な挙動をすることが明らかとなった。そして、この生体分子モーターは、高濃度にするなどの方法で集合化させると、様々な動的秩序を生み出すことが見出されてきた。しかし、細胞の中で、分子モーターではないタンパク質分子を含む、多くのタンパク質分子の複合体として形成される細胞内小器官は、単に生体分子を混ぜただけでは決して生まれ得ない機能を生み出す。例えば、サルコメアという細胞内小器官は、心筋や骨格筋の収縮運動を生み出す収縮ユニットであるが、集まることで骨格筋の柔軟で強靱な運動機能や、心臓の一生涯の拍動運動を実現させる。サルコメアの収縮運動の源は、ミオシン分子のフィラメントと、アクチン分子のフィラメントとの相対的な滑り運動である。しかし、サルコメアの内部にはアクチンとミオシンだけではなく、その他にも多くのタンパク質分子が規則的に配置されており、サルコメアに機能を与えている。例えば、コネクチン/タイチンは、サルコメアに弾性的復元力を与え、トロポニンとトロポミオシンの複合体は、サルコメアに  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存したアクチンとミオシンの相互作用の制御特性を与えている。これらの多くの数、多くの種類のタンパク質分子の秩序ある集合体としてサルコメアは存在している。

以上のことから、サルコメアには単に生体分子を混ぜただけでは決して生まれ得ない機能が備わっていると考えられているが、それが具体的にどのようなものなのかは、明らかになっていない。その機能を調べるため、私は、生きた細胞内で正しく作られ、機能しているサルコメアの動きを高精度に計測できる実験系を構築した。具体的には、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) をラットの培養幼若心筋細胞の培養幼若心筋細胞の Z 線 ( $\alpha$ アクチニン) に強制発現させ、蛍光観察における Z 線の輝線の中心位置を輝線ピーク近傍の画素に対して、fitting 関数を用いることで推定すると、サルコメアの運動を高精度に計測できることを見出し、報告を行った[1]。GFP を Z 線に発現させることは、米国のグループが報告しているが、サルコメアの動的挙動を測定したのは世界で初めての試みである。我々は、低密度に撒いた初代培養幼若心筋細胞に対して、 $\alpha$ -actinin-AcGFP を発現させ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の計測が必要な時は  $\text{Ca}^{2+}$  感受性色素である Fluo-4 を導入し、蛍光観察を行った。

Fluo-4 などの  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬をあらかじめ心筋細胞内に導入しておくことで、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の計測と同時にサルコメア長の計測を行うことができる。これによって 7 個のサルコメア長の平均的な挙動を調べると、従来言われてきたとおり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇 (低下) すると平均値のサルコメア長が短縮 (伸長) する、というものであった。しかしながらサルコメア長ナノメートルによって個々のサルコメア長を計測すると、ゆっくりとした収縮の後に素早い伸長が生じること、しかも、それら個々のサルコメア

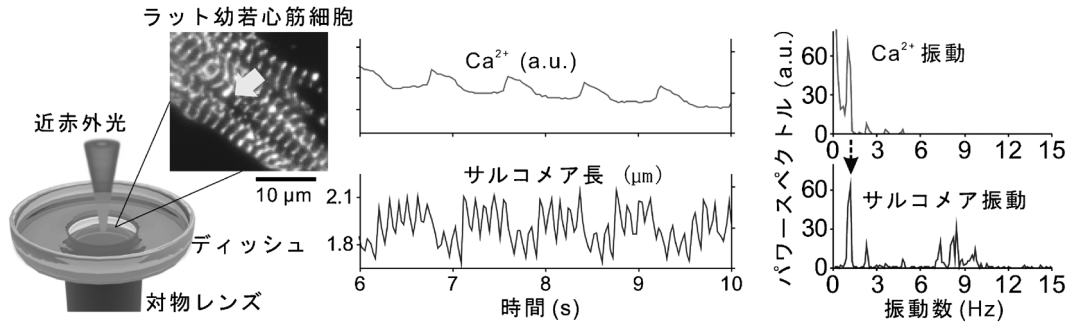


**Fig. 1** (A)左：自発拍動をする  $\alpha$ -actinin-GFP 発現幼若心筋細胞の蛍光像。右：左の黄線の枠の長軸方向の輝度分布から、連続する7つのサルコメア長を計測。番号は左図のラベル1~7に対応する。ラベル0はラベル1の隣接サルコメアである。右図上段の赤線は1~7のサルコメアの平均長を示す。右図の緑矢印はサルコメアが顕著に弛緩した部位を示す。(B)上：(A)のサルコメア長計測を行った際の黄枠領域の輝度値変化のカイモグラフ。縦方向が黄枠の長軸方向の空間分布に対応し、横方向が時間経過に対応している。色は、輝度値の大きさに対応している。Fluo4を導入しているため、輝度値の大きさの変化で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度も計測である。下：計測した  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化とサルコメア長変化。赤太線が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化に対応し、黒太線が連続する7つのサルコメアの平均長に対応する。細い線は7つのサルコメアそれぞれの長さ変化に対応する。細線の色と、上図のラベル番号の色は同じ色に対応している。文献[1]より改変。

の波形は同一ではなく、言わば“個性”が存在することが明らかとなった (Fig. 1. A, B)。そして、それらの波形には時間的なズレが生じ、そのために平滑化されてスムーズな収縮、伸展波形が得られた (Fig. 1. A, B)。

GFP の代わりに  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光タンパク質であるカメレオンを用いると、サルコメア長とそこにおける局所細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を同時に計測することができる。最近、上の幼若心筋細胞のZ線に  $\alpha$ -actinin-YC-Nano140を発現させることによって、これを実現することに成功した[2]。YC-Nano140は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存して、シアン (cyan) と黄色 (yellow) の蛍光を発する。我々は2光路系によって、それらの蛍光を同時に、かつ別々に計測した。Z線においてYC140が発する蛍光強度比を  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の指標とし、その間の間隔をサルコメア長としたのである。この系においても、個々のサルコメアの“個性”，そして、収縮・弛緩時における同調性が確認された。 $\alpha$ -Actinin-GFP と  $\alpha$ -actinin-YC-Nano140を使い分けることによって、今後、心筋細胞の動力学的特性が詳細に明らかにされてゆくものと期待される。

上述のサルコメアの個性も、サルコメアが獲得した機能である。しかし、我々は最近、幼若心筋細胞の系に赤外レーザーを適用し、瞬時に昇温させることにより、サルコメアが高速の (約10 Hz) 振動状態になることを発見した[3]。すなわち、速やかな昇温 (38°C以上) によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動の有無にかかわらず、高振動数のサルコメア自励振動が誘起されたのである (Fig. 2)。この現象を昇温誘起高速自励振動 (Hyperthermal Sarcomeric Oscillations; HSOs) と命名した。筋生理学は生理学の中でも長い歴史を有しているが、HSOsは新規の現象である。また、この現象は生体温度よりもわずかに約1°C高い条件において生じることは注目値する。筋小胞体の機能が正常に保たれている心筋細胞において、



**Fig. 2** 左：実験系の模式図。対物レンズに赤外光レーザーを入射させ、 $\mu\text{m}$  スケールの点熱源を形成する。中：加温中、HSOsが発生する。 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を上、サルコメア長変化を下に示す。右：高速フーリエ変換による振動数成分の解析結果。文献[3]より改変。

HSOsは $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の自発拍動と共存した (Fig. 2)。この時、両者の振動数を比較すると、HSOsは約10 Hzであり、自発拍動は約1 Hzであった。また、HSOsは、筋小胞体の機能を薬理的に阻害した条件下でも生じた。HSOsの振動パターンについてサルコメア長解析を行うと、その位相はcell-SPOCと類似していた。HSOsは、本質的にSPOCと等価の現象であること、昇温によって細いフィラメントの状態がonとoffの中間状態になり、それによってサルコメアの自励振動が生じたものと考えられる。HSOsの生理学的、あるいは病態生理学的意義は現時点では不明である。しかしながら、体温がわずかに約 $1^{\circ}\text{C}$ 上昇すると心筋サルコメアが自発的に高速振動するという事実は非常に重要であり、高熱時の心疾患などに関係している可能性もある。今後、*in vivo*心筋ナノイメージングによって、この点を明らかにしてゆく必要があるだろう。

#### 参 考 文 献

- [1] Sarcomere length nanometry in rat neonatal cardiomyocytes expressed with  $\alpha$ -actinin-AcGFP in Z discs. Shintani SA, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Ohki T, Ishiwata S, Fukuda N. *The Journal of general physiology* 143 (4) 513-524 2014年4月
- [2] Simultaneous imaging of local calcium and single sarcomere length in rat neonatal cardiomyocytes using yellow Cameleon-Nano140. Tsukamoto S, Fujii T, Oyama K, Shintani SA, Shimozawa T, Kobirumaki-Shimozawa F, Ishiwata S, Fukuda N. *The Journal of general physiology* 148(4) 341-355 2016年10月
- [3] High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat. Shintani SA, Oyama K, Fukuda N, Ishiwata S. *Biochemical and biophysical research communications* 457(2) 165-170 2015年2月