1P077

心筋 SPOC の顕微解析 一心拍との相関と振動波形

○佐々木 大輔¹、藤田 英明²、福田 紀男³、栗原 敏³、石波 信一² (¹ 早大院・工研・生命理工、² 早大・理工・物理、³ 慈恵医大・生理学第二)

除膜心筋線維は、ATP・ADP・Pi 共存、低 Ca^{2+} 濃度という溶媒条件下において、筋節長及び発生張力の自励振動 (ADP-SPOC) を生じる。我々は、この心筋収縮系自体に備った振動特性と心拍機能との関連性を調べるため、様々な動物種における心筋 SPOC の筋節長振動を解析し、それぞれの動物における心拍数との相関について調べた。51%グリセリン中に保存した、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシの左室乳頭筋、及びラット右室内柱筋から、幅約 100 μm 、長さ 1~2mm の心筋線維試料を調製した。これらの試料を 1% の TritonX-100 を用いて除膜し、細いフィラメントを蛍光色素 Alexa488 phalloidin でラベルした。試料の両端をガラス底シャーレ上に両面テープを用いて固定し、共焦点蛍光顕微鏡下で SPOC を誘起し、観察した。得られた蛍光像から、筋節長振動波形、及び隣接する筋節間における振動の位相関係を詳細に解析した。その結果、SPOC 状態における各筋節は、ゆっくりとした収縮相とすばやい伸長相からなる鋸歯状の波形をもって周期的に振動し、伸長相は隣接する筋節へ等速に伝搬していくことが明らかになった。筋節長振動周期、及び伸長相伝播速度は、共に各動物の心拍と強い相関を示した。振動周期は安静時心拍周期のおよそ 25 倍となり、また心拍の速い動物の心筋ほど伸長相伝播速度も速いことが明らかになった。この結果は、各動物に固有の心拍に対して心筋収縮系が適応していることを示し、心筋収縮系に備った振動特性が、心拍の調節にあたって何らかの役割を担っていることを示唆する。心臓は、細胞膜を介した電気的な興奮・伝達系と、信号の受け手側である心筋収縮系とが協調的に機能することによって、多様な状況に適切に応じ得る心拍の柔軟な制御を実現しているものと考えられる。

D. Sasaki, H. Fujita, N. Fukuda, S. Kurihara, S. Ishiwata : Microscopic analysis of myocardial SPOC -correlation to heartbeat and oscillation waveform-

1P079

カエル骨格筋スキンド 筋線維内の水の浸透圧活性と水プロトン NMR 信号の横緩和経過

○山口 眞紀、竹森 重、木村 雅子 (慈恵医大・生理学第 1)

骨格筋の機能・状態変化に対する筋フィラメント間の水の寄与を探っている。カエル骨格筋生筋で、細胞内水の浸透圧活性と核磁気共鳴法で見た横緩和の速さの対応がついてきた。生筋と違って可溶性タンパクが失われているスキンド標本では、26 ミリ秒以下の速い緩和時間を持つ水が 4 分の 1 程に減り、逆に生筋では筋原線維間と細胞膜近傍に分布すると推定される比較的小い速い緩和成分 (緩和時間 160 ミリ秒程) が増えた。これらの水分分布を念頭に、弛緩から硬直、弛緩から収縮の機能状態変化に伴うスキンドファイバー内水性状の変化を、0~6 % デキストラン T-500 のもとで検討した。デキストラン T-500 はスキンドファイバーの筋フィラメント格子内に侵入できずに、ファイバーを浸透圧的に圧縮する効果を持つ。標本はウシガエルの縫工筋から単離して調製した機械的スキンドファイバーで、測定はバリアンの Gemini 2000, 300BB を改造し、 $\tau = 0.23$ ミリ秒の単一 CPMG パルス系列を使って行った。デキストラン非存在下では、弛緩から硬直への状態変化に伴って筋フィラメント格子内に分布すると考えられる緩和時間 40 ミリ秒ほどの成分が減少した。これは、フィラメント格子の圧縮によるものと考えられる。これと同時に、26 ミリ秒以下の速い緩和時間を持つ成分が増加した。一方、デキストランによる弛緩ファイバーの圧縮は、緩和時間 160 ミリ秒ほどの比較的小い速い緩和成分と、筋フィラメント格子内の緩和時間 40 ミリ秒ほどの成分を減少させた。このことから、硬直に伴う速い成分の増加は、フィラメント格子の圧縮によるものではなく、アクトミオシン結合の形成に伴うものと考えられる。同様にして、弛緩から収縮への状態変化に伴うファイバー内の水分分布の変化を調べている。

M. Yamaguchi, S. Takemori, M. Kimura : Correlation of osmotic activity and transverse relaxation of ^1H NMR signals from water in skinned skeletal muscle fibers.

1P078

カエル骨格筋生筋の細胞内水の浸透圧活性と水プロトン NMR 信号の横緩和経過

○木村 雅子、竹森 重、山口 眞紀 (慈恵医大・生理学第 1)

骨格筋を浸漬するリンゲル液の NaCl 濃度を変えると、骨格筋は浸透圧効果によって膨潤・萎縮する。このとき、等張液中での細胞内容積にして、その約 3 分の 2 はファントホフの式に則る理想的な浸透圧計として振舞うが、残る約 3 分の 1 は浸透圧不活性である。骨格筋の乾燥重量は等張液中での湿重量の 10 パーセント以下だから、浸透圧不活性な容積にはかなりの水が含まれる。一方、骨格筋組織内の水は、核磁気共鳴法で見る横緩和の速さによって 3 つから 4 つ以上の分画に分けられる。これらの水分画の局在を機能的に定めることを意図して、各分画の浸透圧応答を調べた。標本は日本アカガエルの縫工筋を全筋で用いた。測定は改造したバリアンの Gemini 2000, 300BB で、 $\tau = 0.23$ ミリ秒の単一 CPMG パルス列を使って行った。一秒前後の緩和時間を持つ最も遅い成分 (成分 0) は、細胞外のリンゲル液量に伴って直線的に増減した。緩和時間 40 ミリ秒前後の比較的速い成分 (成分 2) が明らかな浸透圧活性を示した。より速く緩和する成分 (成分 3、4) は、浸透圧不活性だったが、細胞内の浸透圧不活性な水の全量には匹敵するには少ないようだった。また、筋フィラメント格子の膨潤限界を超える低張液中での筋細胞の膨潤では、成分 2 の増大は頭打ちとなり、比較的遅い 160 ミリ秒程度の緩和時間を示す成分 (成分 1) が増した。これらのことは、浸透圧活性な細胞内水は筋フィラメント格子内の成分 2 と、筋原線維間の成分 1 にまたがって存在することを示す。また、浸透圧不活性な水成分が必ずしも速く緩和する成分 3、4 だけではないとすると、成分 1 のような緩和の遅い成分にも浸透圧不活性な成分が含まれることになる。筋細胞内の水の状態をタンパクからの束縛の強さだけから単純には論じられないのかもしれない。

M. Kimura, S. Takemori and M. Yamaguchi : Correlation of osmotic activity and transverse relaxation of ^1H NMR signals from water in intact skeletal muscle fibers.

1P080

心室型ミオシンアルカリ軽鎖 (VLC-1) アクチン結合部位のペプチドミメティクス (P5 - 14) がラット心筋単一筋原線維の等尺性張力に与える影響

○大貫 芳樹¹、山田 武範²、三枝木 泰史¹、柳沢 慧二¹ (¹ 鶴見大・歯・生理、² 東京理科大・理・物理)

心室型ミオシンアルカリ軽鎖 (VLC-1) のアミノ末端領域には、アクチン (カルボキシ末端領域) との結合部位が存在することが知られている。この VLC-1 とアクチンの相互作用の機能的な重要性はまだ明らかになっていないが、VLC-1 の結合部位と同一のアミノ酸配列を持つ合成ペプチド P5 - 14 (KPEPKKDDAK) が human 心筋の生筋、スキンド標本の発生張力や短縮速度、また、ラット心筋の筋原線維 ATPase 活性を増大させることが報告されている。今回我々は、細い乳頭筋や肉柱に比べ、ペプチド拡散の制限が少なく、サルコメアのような収縮が観察できる単一筋原線維を標本として用い、このペプチドミメティクスがラット心筋の等尺性張力に与える影響を調べた。ラット (新生仔) 心筋のスキンド標本をブレンダーで粉砕し、筋原線維を調製した。顕微鏡下で適当な単一筋原線維 ($L = 20 \sim 30 \mu\text{m}$: 10~15 sarcomeres) の両端をかたさの異なる 2 本の微小ガラス針 (硬い針: $k = 8 \text{ N/m}$ 、軟らかい針: $k = 0.2 \sim 0.4 \text{ N/m}$) の先端に巻き付けた。やわらかい方のガラス針 (固定端) のたわみを 2 分割フォトダイオードにて検出し、ガラス針のコンプライアンスから筋原線維の発生張力を定量した。ラット心筋単一筋原線維を $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ のペプチドミメティクス (P5 - 14) で 30 分間処理 ($22 \sim 24^\circ\text{C}$) することにより、その等尺性張力 ($\text{pCa } 5.5$: submaximal Ca^{2+} level) は 7 % 増大した。この結果は、ラット心筋の等尺性張力も human 心筋と同様に P5 - 14 により増大することを示唆する。

Y.Ohnuki, T.Yamada, Y.Saeki and K.Yanagisawa : Effects of a synthetic peptide with the sequence of human VLC-1 (P5-14) on isometric contractile properties of rat cardiac myofibrils