

2の発現を制御していること<sup>49)</sup>, 2) 転写因子 C/EBP $\beta$  がマクロファージでの COX-2 の発現にかかわっているが, 線維芽細胞では働かないこと<sup>50)</sup>が報告された。これらの知見は, 我々の研究成果を支持する部分および異なっている部分の両方があり, さらに解析を続ける必要がある。

### 2-3. グルココルチコイドで抑制されない COX-2 の誘導

抗炎症性ステロイド剤デキサメタゾン (DEX) は, COX-2 の発現を強く抑制する。このような抑制は, 上記に示した U937 細胞等, 種々の細胞で報告されている。しかし, BAEC では LPS 処理による PGI<sub>2</sub> 産生増加は COX-2 選択的阻害剤 nimesulide によって抑制されるが, DEX ではほとんど抑制されない<sup>24)</sup>。また, 誘導される COX-2 mRNA の発現や COX-2 プロモーター活性も, DEX でほとんど抑制されない知見を得た。この知見に関連して, ある種のグルココルチコイドが尿中プロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) 代謝産物の産生を阻害しないことが報告され<sup>51)</sup>, 血液中の PGI<sub>2</sub> の産生は COX-1 が主に関与していると考えられてきた。しかし, COX-2 選択的阻害剤を服用すると尿中の PGI<sub>2</sub> 代謝産物が減少することから, COX-2 が生体内において PGI<sub>2</sub> 産生に関与していることが報告された<sup>52)</sup>。我々は最近, 血管内皮細胞において, 静脈血程度の弱い流れ刺激 (シェアストレス) で COX-2 が誘導され, PGI<sub>2</sub> 産生に関与することを明らかにした<sup>26)</sup>。これらの知見から, 生体の血管内皮細胞では流れ刺激によって COX-2 が構成的に発現し, PGI<sub>2</sub> 産生に関与していると考えられる。最近 COX-2 選択的阻害薬と心血管系疾患との関連が指摘され議論になっている<sup>53)</sup>が, 上記の COX-2 を介する PGI<sub>2</sub> 産生が関与している可能性が示唆される。

### 2-4. グルココルチコイド感受性の相違

血管内皮細胞における COX-2 発現の DEX 非感受性について, まずグルココルチコイド受容体 (GR) mRNA の発現レベルを検討した。その結果, BAEC では U937 細胞に比べると, GR の発現が非常に低いことが分かった。そこで, GR 発現ベクターを BAEC に導入したところ, DEX の濃度および導入する GR 発現ベクター量に依存して COX-2 プロモーター活性が抑制された<sup>24)</sup>。DEX によるプロモーター活性の抑制機構として, 限られた量の転写コアクチベーター CBP/P300 を転写因子が取り合うとする機構が報告されている<sup>54)</sup>が, CBP の発現ベクターを BAEC に共導入した場合, COX-2 プロモーター活性の抑制解除は認められなかった (未発

表)。また, MMTV (mouse mammary tumor virus) プロモーターは GR に最も感受性の高い DEX 誘導性プロモーターとして知られているが, BAEC に MMTV のレポーターベクターを導入すると, DEX で上昇するプロモーター活性が観察された。したがって, BAEC における GR の発現レベルは COX-2 の転写抑制には不十分であるが, MMTV プロモーターの活性化には充分であると解釈できる。しかし, その分子機構については明らかではない。また, DEX の作用機構としては転写レベル以外に, 転写後の段階でも調節されているが, COX-2 遺伝子の 3'非翻訳領域が GR を介して転写後調節に関与していることが示唆された (論文投稿中)。

一方ある特定の細胞では, COX-2 の発現が DEX やコレカルシフェロールによって誘導されることが報告されている<sup>55)56)</sup>。生殖生理が性ホルモンによって厳密にコントロールされることを考えると, COX-2 は核内受容体群の発現変化によってさまざまな発現バリエーションを示すのではないかと考えられた。以上のような知見が, 下記に示す COX-2 と PPAR の相互作用の研究に発展した<sup>25)</sup>。

## 3. マクロファージにおける PPAR $\gamma$ による COX-2 発現のフィードバック制御

### 3-1. PPAR と GR の生体内での役割の相違

我々は, DEX の場合と同様 PPAR $\gamma$  内因性リガンド候補である 15d-PGJ<sub>2</sub> によって COX-2 の発現が U937 細胞では抑制されるが, 血管内皮細胞では抑制されないことを見いだした。さらに, 血管内皮細胞では PPAR $\gamma$  の発現がほとんど認められないこと, 血管内皮細胞に PPAR $\gamma$  発現ベクターを導入すると, 15d-PGJ<sub>2</sub> による COX-2 プロモーター活性が抑制されることを見いだした。一方, U937 細胞では PPAR $\gamma$  mRNA の顕著な発現が観察されるが, LPS 刺激で迅速に下行制御された。この PPAR $\gamma$  の発現パターンとは対照的に, GR は LPS 刺激で上行制御されることを見いだした。U937 細胞において, 100 nM DEX では COX-2 の発現が 90% 以上抑制されるのに対し, 100  $\mu$ M 15d-PGJ<sub>2</sub> では 60% 程度の抑制しか観察されない。この DEX と 15d-PGJ<sub>2</sub> の COX-2 発現抑制効果の相違は, 核内受容体 GR と PPAR $\gamma$  の発現変動が関与していると考えられた。さらに, GR と PPAR $\gamma$  はマクロファージにおける COX-2 の発現, ひいては PG 産生に関して異なった役割を持つと考えられる。つまり LPS 刺激により COX-2 が誘導され, 多量の PG が産生された状態, これは活性化マクロファ-

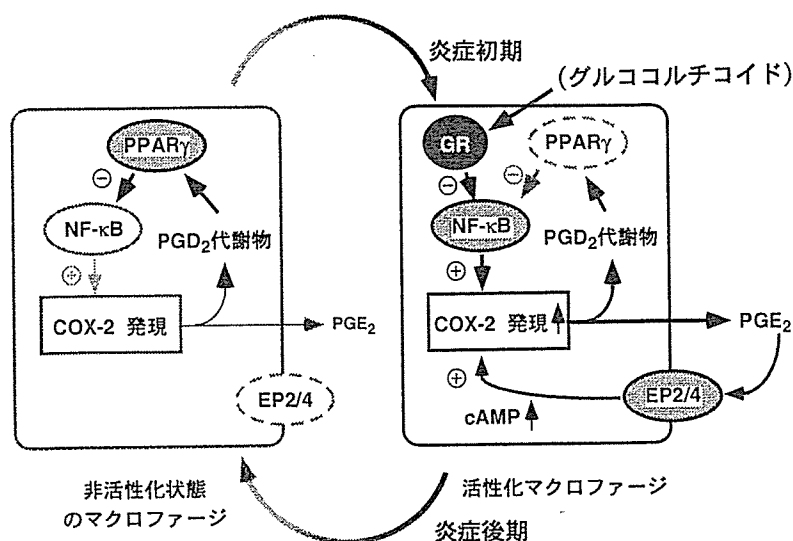


図3. PPAR $\gamma$ によるCOX-2の発現制御.

マクロファージ系細胞において、COX-2により産生されるPGのうちPGD<sub>2</sub>代謝物がPPAR $\gamma$ リガンドとして作用し、COX-2の発現にかかわるNF- $\kappa$ Bの転写因子の活性化を抑制する。この機構によって非活性化状態におけるCOX-2の発現は非常に低いレベルで維持される。炎症性メディエーターの刺激によってCOX-2の発現が活性化されると、同時にPPAR $\gamma$ の発現が下行制御され、この負のフィードバックから開放される。また、COX-2から産生されるPGE<sub>2</sub>はマクロファージ系細胞で発現している細胞膜型受容体に作用し、細胞内のcAMP濃度を上昇させ、それによってさらにCOX-2の発現が活性化する。なお、このような場合においても、グルココルチコイド受容体(GR)の発現は逆に増加し、グルココルチコイドによる抑制効果に対して感受性が高まる。

ジの状態と想定されるが、GRの発現上昇によってグルココルチコイドに対するCOX-2の発現抑制感受性が上がることが示唆される。それに対し、PPAR $\gamma$ はLPS刺激で下行制御されるため、15d-PGJ<sub>2</sub>に対する感受性は低下する。一方、活性化マクロファージになる前の非活性化状態、これは応答性マクロファージに相当すると考えられるが、COX-2の発現を15d-PGJ<sub>2</sub>が抑制していると考えられる。さらに、U937細胞では15d-PGJ<sub>2</sub>の前駆体となるPGD<sub>2</sub>がCOX-2に依存して産生されること、PGD<sub>2</sub>産生にかかわるPGD合成酵素が発現していることを見いだしたので、マクロファージにおいて、COX-2発現は自分自身で合成されたPGD<sub>2</sub>代謝産物がPPAR $\gamma$ のリガンドとして作用することによって、負のフィードバック制御を受けることが示唆された(図3)<sup>25)</sup>。最近、炎症反応後期においてはCOX-2が、通常とは逆に抗炎症性に働くことが報告された<sup>57)</sup>。図3で示すような制御機構を想定すると、活性化状態から非活性化状態に移行する際には、COX-2自身の発現が自分自身の発現を制御する過程が存在し、COX-2が「抗炎症性」に働くことも説明できると考えられる。一方、活性化状態になりPPAR $\gamma$ によるフィードバック制御から開放

されたCOX-2の発現はPGE<sub>2</sub>の産生を促し、それがマクロファージ系細胞で発現する細胞膜型受容体EP2あるいはEP4に働き、細胞内cAMP濃度を上昇させ、COX-2の発現を増強すると予想される。この予想に関連してCOX-2と同様、炎症性刺激で誘導され、DEXで抑制される性質を有し、COX-2の下流でPGE<sub>2</sub>産生にかかわる膜結合型PGE合成酵素(mPGES)が発見された<sup>58)</sup>。この酵素mPGESはU937細胞において、LPS刺激によって誘導されるCOX-2より、数時間以上遅れて誘導されることを見いだした(未発表)。以上、時間により異なる種類のPG産生が核内受容体と細胞膜型受容体へ異なる情報を伝達することで、マクロファージにおけるダイナミックなPG産生を可能にしていると考えられる。なお、血管内皮細胞ではPPAR $\gamma$ がほとんど発現しておらず、このような調節を受けていないことを見いだした。したがって、PPAR $\gamma$ を介するCOX-2の発現制御に関しても、マクロファージと血管内皮細胞では異なっていることが分かった。

### 3-2. 問題点

以上のようなPPAR $\gamma$ によるCOX-2発現の制御機構を想定した場合、いくつかの問題点に直面する。我々は、

血管内皮細胞に PPAR $\gamma$ 発現ベクターを導入すると、15d-PGJ<sub>2</sub>による COX-2 の発現抑制を見いだしたことから、少なくともこの現象が PPAR $\gamma$ に依存していると解釈した。しかし、糖尿病治療薬として用いられている最も PPAR $\gamma$  に選択性の高い合成リガンド rosiglitazone (Avandia<sup>TM</sup>)は U937 細胞においては、COX-2 の発現に対し15d-PGJ<sub>2</sub>のような効果が認められなかった。15d-PGJ<sub>2</sub>は、PPAR $\gamma$ を介さずに転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化を阻害するなど、PPAR $\gamma$ を介さない作用が報告されている<sup>59)</sup>。また一方で、単一アミノ酸置換(R288H)の変異を持つ PPAR $\gamma$ が rosiglitazone に対しては正常な応答を示すが、15d-PGJ<sub>2</sub>に対して応答しなくなる<sup>60)</sup>、ある種のマクロファージ系細胞では15d-PGJ<sub>2</sub>によって COX-2 が誘導されることも報告されている<sup>61)62)</sup>。したがって、PPAR $\gamma$ は細胞の種類、リガンドの種類によって異なった応答を示すことや、リガンドによっては PPAR $\gamma$ を介さず他の経路を介して作用を発揮すること等も考慮して、さらに検討していく必要がある。

#### 4. 今後の展望

前節では、マクロファージ系細胞における COX-2 と PPAR $\gamma$  の関係について述べたが、このような関係は PPAR $\gamma$ 以外の核内受容体群の間にも想定される。ゲノム解析の結果から、核内受容体の総数は48であると考えられているが、COX-2 経路で産生される PG 類を内因性リガンドとする受容体も他に存在する可能性があり、COX-2 と PPAR $\gamma$ のような関係が種々の系で成立していると想定される。実際、COX-2 ノックアウトマウスの雌の初期発生に種々の段階で障害が起きることが報告されている<sup>17)</sup>。また一方、エストロゲンが核内受容体ではなく、細胞膜に由来するステロイドシグナル伝達系によって COX-2 の発現を血管内皮細胞で迅速に誘導することが報告された<sup>63)</sup>。これらの知見は、時間軸に沿って厳密にコントロールされる COX-2 の発現の重要性を示しているが、同時に COX-2 の発現制御にかかわる複数の核内受容体群、細胞膜型受容体群の相互作用の結果とも解釈できる。

これまでの遺伝子研究では、「遺伝子さえつかまえば、生命現象は解明されるに違いない」と考えられてきたが、遺伝子やゲノムの構造が解明されただけでは、生命現象を説明することができない。DNA チップを用いた研究のように、遺伝子全体の発現パターンを解析し、そのパターンを分類することは重要であるが、同時にその基礎となる遺伝子間の相互関係が大切な課題

であると考えられる。この視点において、遺伝子制御ネットワークという概念がある。例えば、COX-2 の発現調節に関与している転写因子群として GR, C/EBP, PPAR などが挙げられるが、これらの転写因子群は脂肪細胞の分化に関与する転写制御ネットワークの重要な構成員である。生体の様々な場における COX-2 の発現は異なった作用を発揮するが、転写因子群が異なったネットワークを形成していると予想され、そのネットワークを明らかにすることが重要ではないかと思われる。一方で、PPAR は血中脂肪酸のセンサーとして働くこと、PPAR リガンドとして食物に含まれるいくつかの物質が同定されていること、COX の阻害剤として見いだされているアスピリンはもともと柳の皮の成分であるサリチル酸に由来すること、最近共同研究により見いだされた赤ワインに含まれるポリフェノールは COX-2 の発現および活性を阻害することなどが分かってきた。多因子疾患における PG 産生と PPAR の相互作用、アルツハイマー病、がん、初期発生や環境ホルモンとの関連など、今後解決されるべき多くの問題が残っている。その中で、COX-2 と核内受容体の相互作用の問題は、ビタミンを含む生理活性物質の作用や PG や核内受容体を標的とする薬剤との相互作用の視点から、重要な研究課題であると考えられる。

#### 謝 辞

本研究は、京都大学ウイルス研究所 故梅園和彦教授との共同研究による成果であり、深謝するとともにご冥福を祈ります。本学会奨励賞の推薦をいただきました鹿児島大学農学部 岡 達三教授に感謝いたします。COX-2に関する研究は、1994年より国立循環器病センター研究所薬理部 田辺 忠部長のもと横山 知永子博士、原 俊太郎博士、波多 江利久博士、七山 豊通博士、刀棚 佳典博士、西森 健雄博士、桑本 伸介さんと開始した研究成果が礎となっており、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究は文部科学省科学研究費基盤研究(C)(No. 11838021, 13670110)、厚生労働科研究萌芽の先端医療技術推進研究事業ナノ001による助成を受けたもので、ここに感謝いたします。

(平成15.4.21受付)

#### 文 献

- 1) 室田誠逸, 山本尚三編 (2001) 現代化学増刊 38 プロスタグランジン研究の新展開, 東京化学同人, 東京
- 2) Smith WL, Langenbach R (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107, 1491-1495
- 3) Herschman HR (1999) Function and regulation of prostaglan-

- din synthase 2. *Adv Exp Med Biol* **469**, 3-8
- 4) Vane JR, Bakkel YS, Botting RM (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 97-120
  - 5) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky, PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* **12**, 1063-1073
  - 6) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839
  - 7) Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* **56**, 239-263
  - 8) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM (1995) 15-Deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* **83**, 803-812
  - 9) Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819
  - 10) Lin Q, Ruuska SE, Shaw NS, Dong D, Noy N (1999) Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* **38**, 185-190
  - 11) McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, Hilaire AS, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA). *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 131-136
  - 12) Jiang C, Ting AT, Seed B (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **391**, 82-86
  - 13) Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM (1996) Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2. *Cell* **87**, 803-809
  - 14) Girnun GD, Smith WM, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg DW, Bronson RT, Edelmann W, Kucherlapati R, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002) APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13771-13776
  - 15) Saez E, Tontonoz P, Nelson MC, Alvarez JG, Ming UT, Baird SM, Thomazy VA, Evans RM (1998) Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation. *Nat Med* **4**, 1058-1061
  - 16) Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med* **4**, 1053-1057
  - 17) Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**, 197-208
  - 18) Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM, Dey SK (1999) Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* **13**, 1561-1574
  - 19) Tran PO, Gleason CE, Poitout V, Robertson RP (1999) Prostaglandin E2 mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1beta. *J Biol Chem* **274**, 31245-31248
  - 20) Inoue H, Nanayama T, Hara S, Yokoyama C, Tanabe T (1994) The Cyclic AMP Response Element Plays an Essential Role in the Expression of the Human Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 Gene in Differentiated U937 Monocytic Cells. *FEBS Lett* **350**, 51-54
  - 21) Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 24965-24971
  - 22) Kuwamoto S, Inoue H, Tone Y, Izumi Y, Tanabe T (1997) Inverse Gene Expression of Prostacyclin and Thromboxane Synthases in Resident and Activated Peritoneal Macrophages. *FEBS Lett* **409**, 242-246
  - 23) Inoue H, Tanabe T (1998) Transcriptional role of the nuclear factor kB site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 143-148
  - 24) Inoue H, Umesono K, Nishimori T, Hirata Y, Tanabe T (1999) Glucocorticoid-mediated suppression of the promoter activity of the cyclooxygenase-2 gene is modulated by expression of its receptor in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 292-298
  - 25) Inoue H, Tanabe T, Umesono K (2000) Feedback control of COX-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* **275**, 28028-28032
  - 26) Inoue H, Taba Y, Miwa Y, Yokota C, Miyagi M, Sasaguri T (2002) Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by Fluid Shear Stress in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1415-1420
  - 27) Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Dannenberg AJ (1997) Retinoids suppress phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2. *Cancer Res* **57**, 1081-1085
  - 28) Kelley DJ, Mesre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Ramonetti JT, Dannenberg AJ (1997) Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* **18**, 795-799
  - 29) Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Dannenberg AJ (1997) Retinoids suppress epidermal growth factor-induced transcription of cyclooxygenase-2 in human oral squamous carcinoma cells. *Cancer Res* **57**, 2890-2895
  - 30) Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273**, 21875-21882
  - 31) Takahashi S, Shigeta J, Inoue H, Tanabe T, Okabe S (1998)

- Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. *Am J Phys* **275**, G1137-1145
- 32) Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arata J, Jetten AM (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 by Interferon Gamma and Transforming Growth Factor alpha in Normal Human Epidermal Keratinocytes and Squamous Carcinoma Cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **274**, 29138-29148
- 33) Shao J, Sheng H, Inoue H, Morrow JD, DuBois RN (2000) Regulation of Constitutive Cyclooxygenase-2 Expression in Colon Carcinoma Cells. *J Biol Chem* **275**, 33951-33956
- 34) Moriuchi M, Inoue H, Moriuchi H (2001) Reciprocal Interactions between Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Prostaglandins: Implications for Viral Transmission. *J Virol* **75**, 192-198
- 35) Murono S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS (2001) Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6905-6910
- 36) Tang Q, Gonzales M, Inoue H, Bowden GT (2001) Roles of Akt and Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  in the Ultraviolet B Induction of Cyclooxygenase-2 Transcription in Human Keratinocytes. *Cancer Res* **61**, 4329-4332
- 37) Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, Bang YJ (2001) Transcriptional Silencing of Cyclooxygenase-2 by Hyper-methylation of the 5' CpG Island in Human Gastric Carcinoma Cells. *Cancer Res* **61**, 4628-4635
- 38) Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Inoue H, Bowden GT (2001) Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes. *Oncogene* **20**, 5164-5172
- 39) Mori N, Inoue H, Yoshida T, Tanabe T, Yamamoto N (2001) Constitutive Expression of the Cyclooxygenase-2 Gene in T-cell Lines Infected with Human T Cell Leukemia Virus Type I. *Int J Cancer* **94**, 813-819
- 40) Glinghammar B, Inoue H, Rafter JJ (2002) Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *Carcinogenesis* **23**, 839-845
- 41) Nanayama T, Hara S, Inoue H, Yokoyama C, Tanabe T (1995) Regulation of Two Isozymes of Prostaglandin Endoperoxide Synthase and Thromboxane Synthase in Human Monoblastoid Cell Line U937. *Prostaglandins* **49**, 371-382
- 42) Kim Y, Fischer SM (1998) Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem* **273**, 27686-27694
- 43) Sirois J, Simmons DL, Richards JS (1992) Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding a novel isoform of prostaglandin endoperoxide H synthase in rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* **267**, 11586-11592
- 44) Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF (1997) An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* **11**, 2153-2162
- 45) Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M (1996) DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* **271**, 3891-3896
- 46) Xie W, Herschman HR (1995) v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* **270**, 27622-27628
- 47) Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S (1995) Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **270**, 31315-31320
- 48) Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* **275**, 23627-23635
- 49) Caivano M, Gorgoni B, Cohen P, Poli V (2001) The induction of cyclooxygenase-2 mRNA in macrophages is biphasic and requires both CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem* **276**, 48693-48701
- 50) Gorgoni B, Caivano M, Arizmendi C, Poli V (2001) The transcription factor C/EBP is essential for inducible expression of the cox-2 gene in macrophages but not in fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 40769-40777
- 51) Sebaldt RJ, Sheller JR, Oates JA, Roberts II LJ, FitzGerald GA (1990) Inhibition of eicosanoid biosynthesis by glucocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 6974-6978
- 52) McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX-2): the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 272-277
- 53) Ray WA, Stein CM, Daugherty JR, Hall K, Arbogast PG, Griffin MR (2002) COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. *Lancet* **360**, 1071-1073
- 54) Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414
- 55) Zakar T, Hirst JJ, Mijovic JE, Olson DM (1995) Glucocorticoids stimulate the expression of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in amnion cells. *Endocrinology* **136**, 1610-1619
- 56) Kanekura T, Lauderkind SJ, Kirtikara K, Goorha S, Ballou LR (1998) Cholecalciferol induces prostaglandin E2 biosynthesis and transglutaminase activity in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **111**, 634-639
- 57) Gilroy DW, Colville-Nash PR, Chivers WJ, Paul-Clark MJ, Willoughby DA (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Med* **5**, 698-701

- 58) Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7220-7225
- 59) Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG (2000) Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. *Nature* **403**, 103-108
- 60) Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM (1999) Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* **3**, 799-804
- 61) Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* **274**, 8328-8334
- 62) Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM (2002) Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* **277**, 13029-13036
- 63) Ali Pedram, Mahnaz Razandi, Mark Aitkenhead, Christopher C. W. Hughes, and Ellis R. Levin (2002) Integration of the Non-genomic and Genomic Actions of Estrogen. *J Biol Chem* **277**, 50768-50775

## ミニレビュー



## 微小血管撮影装置開発と 再生血管の可視化†

河合敏昭, 鈴木克彦, 高瀬欣治, 川上博己,

望月 亮\*, 山口孝一\*, 田中越郎\*\*,

笠原啓史\*\*, 福山直人\*\*, 篠崎芳郎\*\*,

盛 英三\*\*\*, 東 将浩\*\*\*, 西上和宏\*\*\*,

田中良一\*\*\*, 内藤博昭\*\*\*

(浜松ホトニクス(株),

\* (財)NHK エンジニアリングサービス,

\*\* 東海大学医学部,

\*\*\* 国立循環器病センター)

Key Words : microangiography, synchrotron radiation, gene therapy, super high sensitivity TV camera, phosphor

### 1. はじめに

近年シンクロトロン放射光施設から単色 X 線を利用した循環器障害の診断・治療に関する手法が報告されている。このうちの代表例が微小血管造影法である<sup>1)-6)</sup>。再生医療・遺伝子治療・レーザー治療等における新生血管の挙動を解明し評価することはこれまでの血管造影法では困難でありこの放射光を利用した微小血管造影法が初めて達成したものである<sup>7)-9)</sup>。

ここでは巨大な X 線発生装置であるシンクロトロン放射光施設を使用せず, 病院に設置可能な微小血管造影装置の開発について述べる。

†Under Development on Microangiographic System: Visualization of Angiogenic Vessels. Toshiaki KAWAI, Katsuhiko SUZUKI, Kinji Takase, Hiroki KAWAKAMI, Ryo MOCHIDUKI\*, Koichi YAMAGUCHI\*, Etsuro TANAKA\*\*, Keishi KASAHARA\*\*, Naoto FUKUYAMA\*\*, Yoshiro SHINOZAKI\*\*, Hidezo MORI\*\*\*, Masahiro AZUMA\*\*\*, Kazuhiro NISHIGAMI\*\*\*, Ryoichi TANAKA\*\*\* and Hiroaki NAITO\*\*\*: Hamamatsu Photonics K. K., \*NHK Engineering Service, \*\*Tokai University School of Medicine, \*\*\* National Cardiovascular Center.

放射光の代替として改変した大容量 X 線源を用い, これに超高感度・高精細 X 線検出器系を組合わせて, 微小血管障害の精密診断を実現しようというものである。本システムの装置開発の紹介と医療ニーズの一つとして新生・再生血管の可視化の重要性についても報告する。

### 2. 開発装置の概要

#### 2.1 装置構成

図 1 は開発中の診断・治療装置の構成図である。X 線源は X 線 CT 用で代表される冷却性能の優れた大容量大出力 X 線管を改変したもので, 連続 20 秒照射・8 分間休止で駆動される。シンクロトロン放射光施設では Si 単結晶の 2 回ブラッグ反射法により単色化した放射光を線源として使用している。本装置ではガラス製フィルタによる造影剤の吸収 X 線エネルギーに整合した疑似単色 X 線化とマイクロキャピラリーによる平行化により微小血管造影のコントラストおよび空間解像度向上を意図している。被検体を透過した X 線の検出は, 次の要素技術によってなされる。蛍光体は解像度・高光出力を最適に満たす CsI:Tl あるいは Gd<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S:Tb を材料としてグリーン光を発する。レンズはこの蛍光波長に合致した高透過率・高解像・低歪でリモート操作による大中小 3 視野可変となる。カメラは 1 インチ径撮像管を蔵して高精細・超高感度を実現する。撮像管が利用する非晶質 Se の光導電膜はアバランシェ効果による信号増倍を定常状態の 600 倍まで可変でき, かつ増倍に伴う雑音が付加されない特徴を有している。このカメラの感度は放送用ハイビジョン CCD カメラの感度の 60 倍から 100 倍にもなる。蛍光体・レンズ・カメラで構成される検出器系は透視モードの X 線イメージインテンシファイアの感度にはやや劣るものの解像度でこれを凌駕する特性をもつ。カメラからの良質画像はデジタル処理装置によりユーザーにフレンドリーな表示形態となる。

上述の諸要素技術を総合してマイクロアンギ

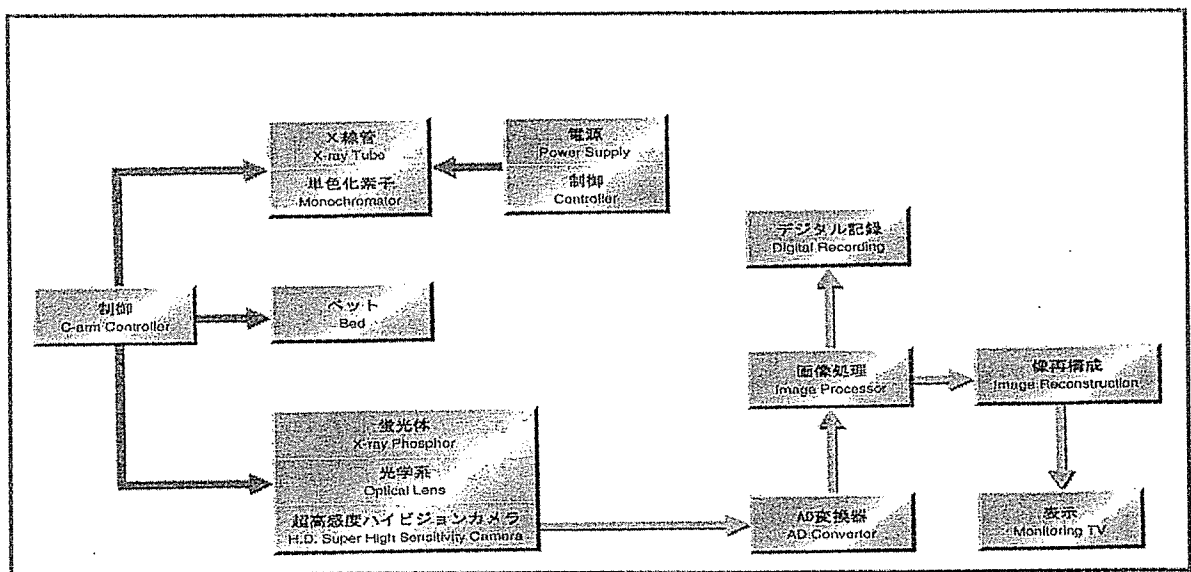
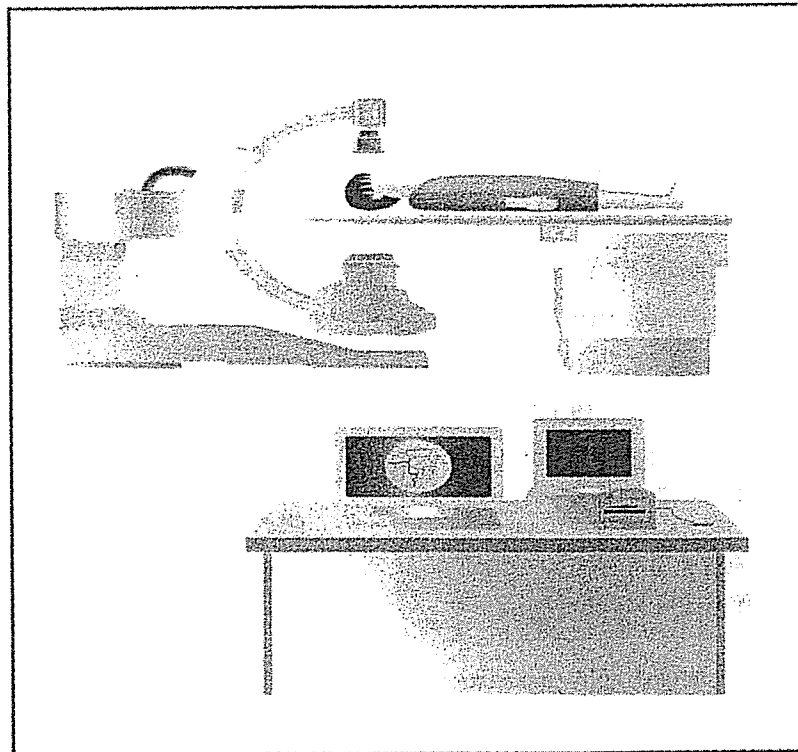


図1 診断・治療装置の構成図

オグラフィとして装置開発される。

### 3. 微小血管造影法による新生・再生血管の可視化

血管再生療法の効果を判定する上で新生血管の反応性の有無を確認することの重要性が上述の要素技術と放射光を用いた微小血管造影法に

より明らかになった。既存の X 線管撮影装置による画像と本法との比較画像を図 2 に示す。家兎に下肢虚血モデルを作製した。線維芽細胞成長因子遺伝子 (FGF 4) および対照としてマーカー遺伝子 (lacZ) を用い、ゼラチン (GHG) とともに投与した。すなわち FGF 4-ゼラチン治療群 (FGF 4-GHG), FGF 4 単独治療群



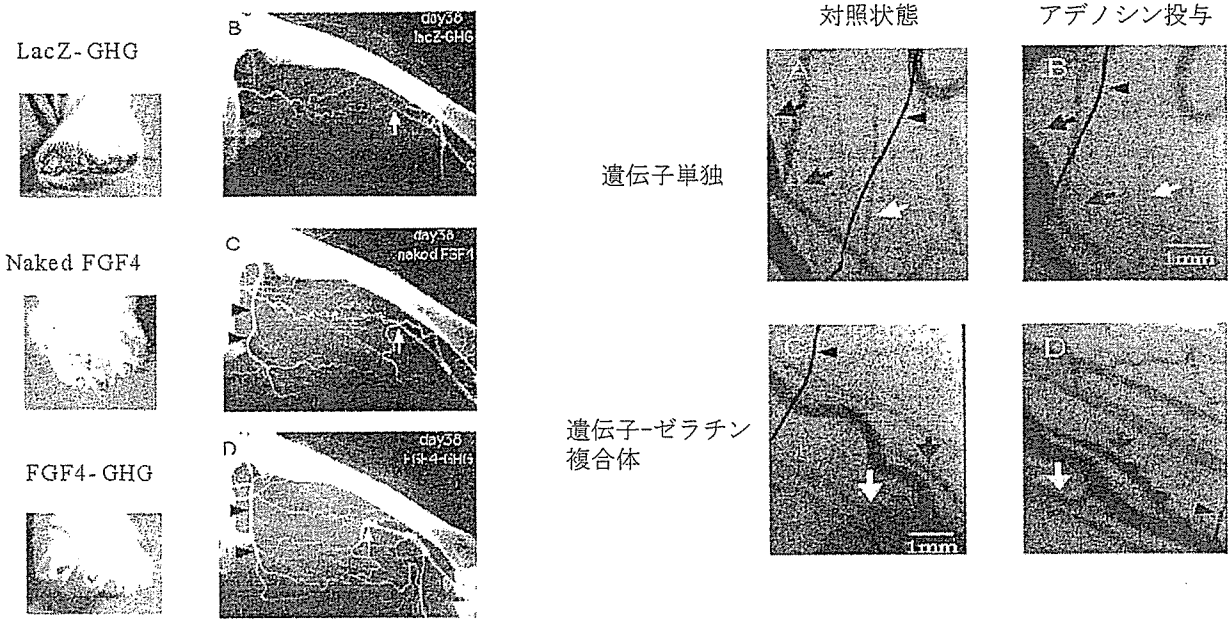


図2 X線管撮影と本法との比較画像

(Naked FGF 4), lacZ-ゼラチン治療群 (LacZ-GHG) の3群である。遺伝子投与後4週間の時点で治療効果の評価を目的としてアデノシンを投与して血管拡張刺激に対する反応性を検討した。これら3群間の治療効果の差異が微小血管造影法により有意差をもって評価された。すなわち既存の血管造影法では FGF 4-ゼラチン治療群と FGF 4 単独治療群との間に血管造影所見で有意な違いを示せなかった。一方、放射光微小血管造影法では明らかな差が認められた。FGF 4-ゼラチン複合体治療群では血管拡張刺激に対する局所血管陰影の増加 (血管反応性の確認) を認めたが、FGF 4 単独治療群ではむしろ血管陰影が減少した。このような血管再生療法における臨床効果の差が血管反応性の差として現れることが予想されるので、一般の病院レベルで広く微小血管の可視化ができるようになれば、遺伝子治療等の血管再生療法を行う上できわめて有効な手段となろう。

#### 4. 謝 辞

本研究開発は新エネルギー・産業技術総合開発機構の「健康寿命延伸のための医療福祉機器

高度化プログラム」によって実施された成果です。ここに深く感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Mori, H., Hyodo, K., Tanaka, E., Mohammed, M. U., Yamakawa, A., Shinozaki, Y., Nakazawa, H., Tanaka, Y., Sekka, T., Iwata, Y., Handa, S., Umetani, K., Ueki, H., Yokoyama, T., Tanioka, K., Kubota, M., Hosaka, H., Ishikawa, N. and Ando, M.: Small vessel radiography in situ using monochromatic synchrotron radiation, *Radiology*, **201** (3) 173-177 (1996)
- 2) Mori, H., Tanaka, E., Hyodo, K., Uddin Mohammed, M., Sekka, T., Ito, K., Shinozaki, Y., Tanaka, A., Nakazawa, H., Abe, S., Handa, S., Kubota, M., Tanioka, K., Umetani, K. and Ando, M.: Synchrotron microangiography reveals configurational changes and to-and-fro flow in intramyocardial vessels, *Am. J. Physiol.*, **276** (2), H 429-H 437 (1999)
- 3) Tanaka, A., Mori, H., Tanaka, E., Mohammed, M. U., Tanaka, Y., Sekka, T., Ito, K., Shinozaki, Y., Hyodo, K., Ando, M., Umetani, K., Tanioka, K., Kubota, M., Abe, S., Handa, S. and Nakazawa, H.: Branching patterns of intramural coronary

- vessels determined by microangiography using synchrotron radiation, *Am. J. Physiol.*, **276**(6), H 2262-H 2267(1999)
- 4) Tanaka, E., Tanaka, A., Sekka, T., Shinozaki, Y., Hyodo, K., Umetani, K. and Mori, H.: Digitized cerebral synchrotron radiation angiography: quantitative evaluation of the canine circle of Willis and its large and small branches, *Am. J. Neuroradiol.*, **20**(5), 801-806(1999)
  - 5) 盛 英三, 笠原啓史, 田中越郎, 佐藤江利子, 石過孝文, 篠崎芳郎, 谷岡健吉, 河合敏昭, 兵藤一行, 安藤正海, 放射光微小血管造影法による新生血管の評価, *Med. Imag. Tech.*, **18**(4), 445-446(2000)
  - 6) Kuwabara, E., Furuyama, F., Ito, K., Tanaka, E., Hattan, N., Fujikura, H., Kimura, K., Goto, T., Hayashi, T., Taira, H., Shinozaki Y., Umetani, K., Hyodo, K., Tanioka, K., Mochizuki, R., Kawai, T., Koide, S. and Mori, H.: Inhomogeneous vasodilatory response of rat tail arteries to heat stress: Evaluation by synchrotron radiation microangiography, *Jpn. J. Physiol.*, in press(2002)
  - 7) Takeshita, S., Isshiki, T., Mori, H., Tanaka, E., Ito, K., Miyazawa, Y., Tanaka, A., Shinozaki, Y., Hyodo, K., Ando, M., Kubota, M., Tanioka, K., Umetani, K., Ochiai, M., Sato, T. and Miyashita, H.: Use of synchrotron radiation microangiography to assess development of small collateral arteries in a rat model of hindlimb ischemia, *Circulation*, **95**(4), 805-808(1997)
  - 8) Takeshita, S., Isshiki, T., Mori, H., Tanaka, E., Tanaka, A., Umetani, K., Eto, K., Miyazawa, Y., Ochiai, M. and Sato, T.: Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats, *Cardiovasc. Res.*, **35**(3), 547-552(1997)
  - 9) Takeshita, S., Isshiki, T., Ochiai, M., Eto, K., Mori, H., Tanaka, E., Umetani, K. and Sato, T.: Endothelium-dependent relaxation of collateral microvessels after intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rat model of hindlimb ischemia, *Circulation*, **98**(13), 1261-1263(1998)

# ■ 総 説 ■

## 虚血部心臓交感神経終末における ノルエピネフリン動態\*

秋山 剛<sup>1</sup> 山崎 登自 盛 英三

### はじめに

ノルエピネフリン(NE)は神経伝達物質として交感神経終末から放出され、心臓においては心拍数、心収縮の調節に極めて重要な役割を果たしている。生理的条件下では心臓交感神経終末からのNEの放出は循環中枢からの情報によって制御されているが、心虚血時においてその放出は生理的な制御を逸脱し、むしろ致死性不整脈、心筋壊死巣の拡大、血液凝固能の亢進など虚血に伴う障害助長因子となることが示唆されている<sup>1,2)</sup>。したがって、急性心筋梗塞時の複雑な病態の解明とその治療には、まず虚血部の心臓交感神経終末におけるNE動態を把握することが重要である。

拍動する心臓の交感神経活動を評価する方法として、放射性同位元素でラベルしたNEの測定や電気的交感神経活動の測定などが従来から行われているが、こうした方法で虚血領域に特定した心臓交感神経のNE動態を知ることは極めて困難である。われわれは、マイクロダイアリシスを心臓に用いて、左室領域に特定した心臓交感神経終末のNE動態をモニターする方法を確立し<sup>3,4)</sup>、様々な実験を重ねてきた。その結果、心臓マイクロダイアリシス法が *in vivo* において虚血部心臓交感神経終末からのNE放出をモニターするのに有用であることを明らかにした<sup>5,6)</sup>。

さらに、ダイアリシスプローブを介して各種阻害剤を虚血部の特定領域にのみ投与したり、交感神経終末におけるNEの代謝物質であるジハイドロキシフェニルグリコール(DHPG)をモニターすることにより、神経終末内のNE動態やそれに伴うイオン動態の関与を把握することができるようになり、生理的条件下と心虚血時の心臓交感神経終末におけるNE動態の差異を報告してきた<sup>7-9)</sup>。

本稿では、その成果を中心に紹介しつつ、生理的条件下と心虚血時の心臓交感神経終末におけるNE放出の差異について神経終末内外のイオンの動きと終末内NE動態の観点から概説する。

### 生理的条件下での 心臓交感神経終末におけるNE動態(図1)

#### 1. NEの放出

神経終末においてNEは主としてシナプス小胞に貯蔵されており、NEの放出はこの小胞のシナプス前膜への融合・開口で起きる。この開口放出と呼ばれる過程には、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルからのCa<sup>2+</sup>の細胞内流入とATPの分解によるエネルギーが必要とされる<sup>10,11)</sup>。われわれの麻酔下猫における実験でも、星状神経節の電気刺激あるいは圧反射によって引き起こされる心臓交感神経終末からのNE放出は、電位依存性N-

\* Norepinephrine Kinetics in Cardiac Sympathetic Nerve Endings of the Ischemic Region (2002年6月17日受付)

<sup>1</sup> 国立循環器病センター研究所心臓生理部(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1) Tsuyoshi Akiyama, Toji Yamazaki, Hidezo Mori: Department of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center Research Institute

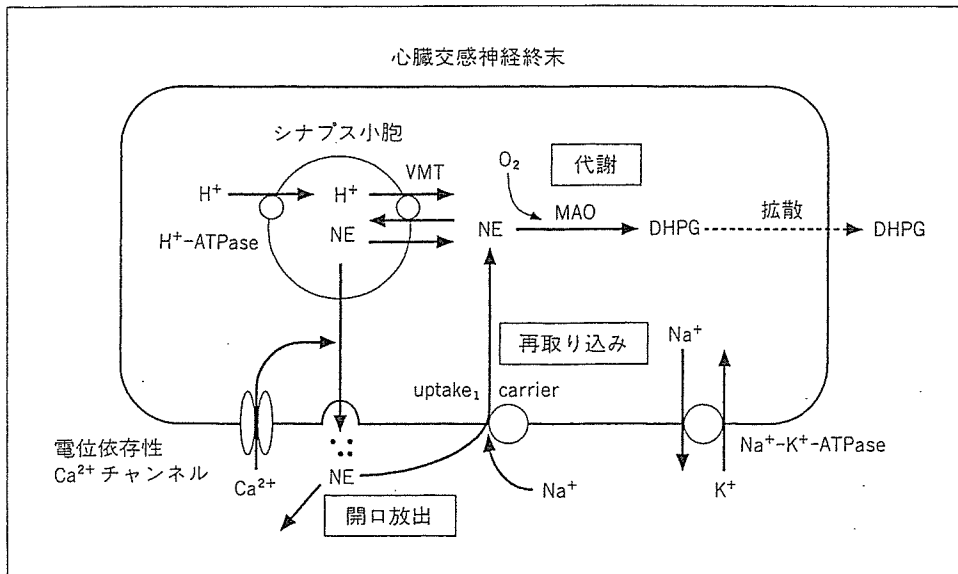


図1 生理的条件下での心臓交感神経終末におけるNE動態  
(NE:ノルエピネフリン, DHPG:ジハイドロキシフェニルグリコール, MAO:モノアミンオキシダーゼ, VMT:シナプス小胞のトランスポーター)

type Ca<sup>2+</sup> チャンネルの選択的阻害剤である $\omega$ -conotoxin GVIA によって強く抑制される<sup>12,13</sup>。したがって、生理的条件下では中枢からの信号によって心臓交感神経終末が脱分極し、電位依存性の主としてN-type Ca<sup>2+</sup> チャンネルからCa<sup>2+</sup> が細胞質に流入することによりシナプス小胞のNEが開口放出されるので、虚血によって引き起こされるNE放出が生理的な開口放出か否かの鑑別は、 $\omega$ -conotoxin GVIAによるNE放出抑制の有無で判定できる。

## 2. NEの再取り込み、およびNEの代謝

放出されたNEの多くは、細胞膜のuptake<sub>1</sub> carrierにより心臓交感神経終末の細胞質内に再び取り込まれ再利用される。細胞膜のuptake<sub>1</sub> carrierは、細胞膜内外のNa<sup>+</sup>濃度勾配によってNa<sup>+</sup>を共役輸送させることによりNEを取り込んでいる<sup>14,15</sup>。さらに細胞質内に取り込まれたNEは、シナプス小胞のトランスポーターによって再び小胞内に貯蔵される。この輸送は小胞内外のH<sup>+</sup>の電気勾配によって駆動される<sup>16-18</sup>。これらの原動力になっているNa<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>の濃度勾配は、前者が細胞膜のNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPaseにより、また後者がシナプス小胞にあるH<sup>+</sup>-ATPaseによって主に維持されており、虚血に伴うATP枯渇はそれぞれの濃度勾配に影響を与えられ。シナプス小胞に貯蔵されたNEの一部は細胞質に漏出し、モノアミンオキシダーゼ

(MAO)によりDHPGに代謝される<sup>19,20</sup>。細胞質内で産生されたDHPGは脂肪親和性であり、拡散によって容易に細胞外に流出されることから、MAO活性が変化しないかぎり、心臓ダイアリシス法で測定された心筋間質DHPGは心臓交感神経終末の細胞質内NE濃度の指標となる<sup>21,22</sup>。われわれの麻酔下猫における実験では、星状神経節の電気刺激あるいは圧反射による心筋間質NE濃度応答は心筋間質DHPG濃度の上昇を伴うが、uptake<sub>1</sub> carrierの阻害剤であるdesipramineによってシナプスからのNE再取り込みを抑えると、心筋間質NE濃度応答は約5~8倍に増強され、一方心筋間質DHPG濃度の上昇は減弱する<sup>12,21,23</sup>。このように、NEの開口放出の場合心筋間質DHPG濃度はNE再取り込みの指標となる。

## 虚血部の心臓交感神経終末におけるNE動態

虚血部の心臓交感神経終末からのNE放出の大きな特徴は、中枢からの制御とは無関係に、生理的条件下の開口放出と異なる放出機構により、大量のNEの放出が起こることである。まずはじめに、このNE非開口放出について述べる。

### NEの非開口放出(図2):

uptake<sub>1</sub> carrierは、生理的条件下ではNa<sup>+</sup>を共役輸送させることにより、NEをシナプスから細胞質内に取り込んでいるが、このcarrierは、

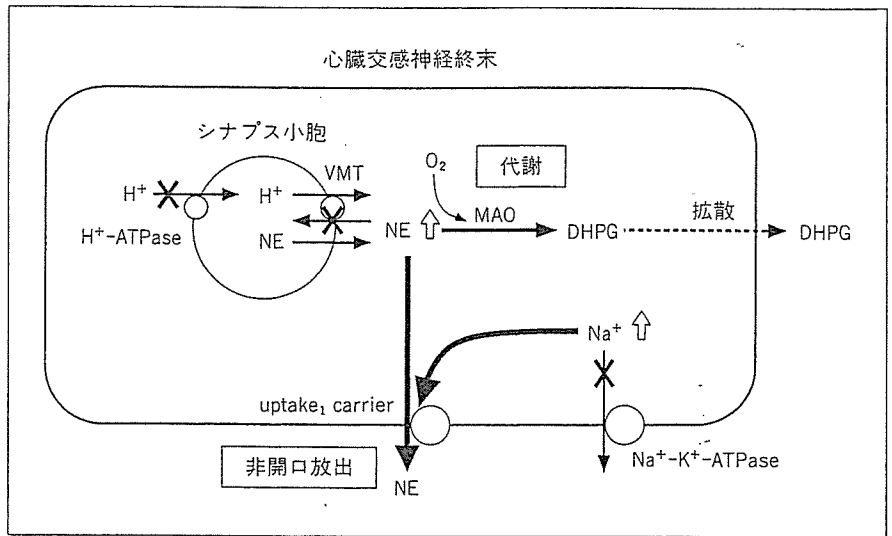


図2 虚血部心臓交感神経終末における非開口放出時 NE 動態  
(NE:ノルエピネフリン, DHPG:ジハイドロキシフェニルグリコール, MAO:モノアミンオキシダーゼ, VMT:シナプス小胞のトランスポーター)

細胞内外の Na<sup>+</sup> 濃度勾配の変化によって NE を逆に細胞外に放出することがある<sup>24-26</sup>。虚血により ATP が枯渇すると、ATP を必要とする細胞膜の Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase が阻害され、細胞質内 Na<sup>+</sup> 濃度が上昇する。この細胞質内 Na<sup>+</sup> 濃度の上昇により、細胞内外の Na<sup>+</sup> 濃度勾配が逆転すると、uptake<sub>1</sub> carrier は逆に細胞質内 Na<sup>+</sup> を細胞外に流出させようと働き、輸送の方向が流入から流出に逆転し、uptake<sub>1</sub> carrier を介して細胞質内 NE が細胞外に流出する。この現象が uptake<sub>1</sub> carrier の逆回転である。この場合、シナプス小胞ではなく細胞質に存在する NE が放出される。同時に、ATP の枯渇によりシナプス小胞の H<sup>+</sup>-ATPase も阻害され、小胞内外の H<sup>+</sup> 濃度勾配は低下し、細胞質からシナプス小胞への NE の輸送が阻害され、細胞質内 NE 濃度が上昇する。細胞内外の Na<sup>+</sup> 濃度勾配の逆転と細胞質内 NE 濃度の上昇によって、細胞質に蓄積した大量の NE が uptake<sub>1</sub> carrier を介して細胞外に流出することになる。この NE 放出機構は、中枢からの電気信号とは無関係であり、外液からの Ca<sup>2+</sup> の細胞内への流入や ATP の分解によるエネルギーを必要とせずシナプス小胞の開口を伴わないため、非開口放出と呼ばれる。われわれの実験では、薬理的に Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase の阻害剤である ouabain を投与して細胞質内 Na<sup>+</sup> 濃度を上昇させたり、また cyanide によって化学的無酸素を引き起こしても非開口 NE 放出を観察

できる<sup>27,28</sup>。これらの NE 放出応答は uptake<sub>1</sub> carrier の両方向性の動きを阻害する desipramine によって抑制されることを特徴としており、虚血によって引き起こされる NE 放出が非開口放出か否かの鑑別は desipramine による NE 放出抑制の有無で判定できる。

実際の冠動脈閉塞により虚血部の心臓交感神経終末における NE 動態がどう変化するか、われわれの麻酔下猫における実験結果から考察する。図3に左前下行枝を120分閉塞した際の虚血部心筋間質 NE および DHPG 濃度の推移を示した。また、図4では ω-conotoxin GVIA (N-type Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤)、desipramine (uptake<sub>1</sub> carrier 阻害剤)、または desipramine + TMB-8 (8-(N,N-diethylamino)-octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride, 細胞内 Ca<sup>2+</sup> バッファからの Ca<sup>2+</sup> の流出阻害剤) をダイアリシスプローブより局所投与した状態で、左前下行枝を120分閉塞した際の虚血部心筋間質 NE 濃度の推移を示す。冠閉塞後の NE 放出機構は、虚血の進度、すなわち冠閉塞後からの経過時間によって異なると考えられ、冠閉塞期間を3期に分けて虚血部の心臓交感神経終末における NE 動態をみると、それぞれの NE 放出機構の差異が明らかになる。

1. 虚血 I 期(冠閉塞 0~20 分)

心筋間質 NE 濃度の緩やかな上昇がみられる(図3)。この NE 濃度上昇は ω-conotoxin GVIA

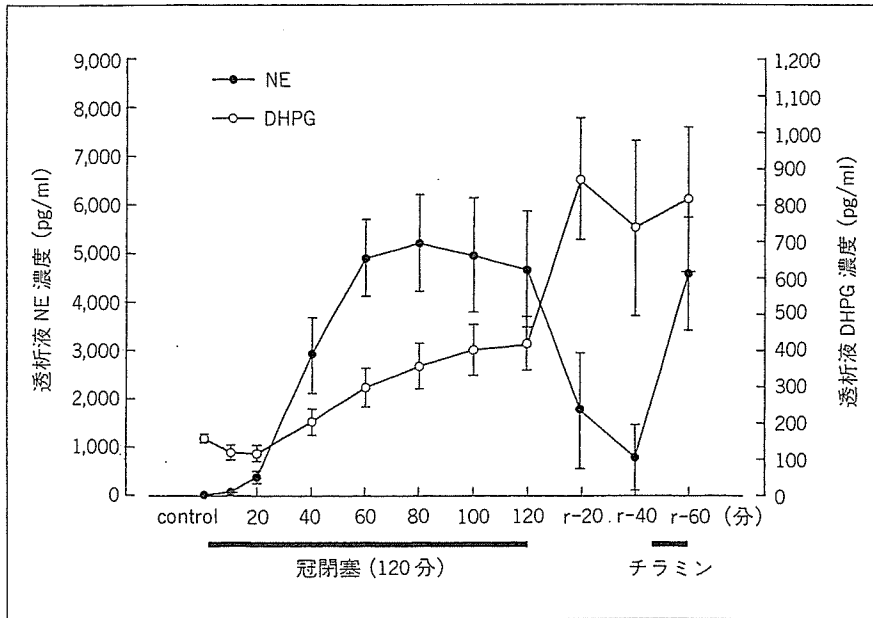


図3 虚血部心筋間質 NE および DHPG 濃度の推移

(NE: ノルエピネフリン, DHPG: ジハイドロキシフェニルグリコール, r: 再灌流)

により抑制され, desipramine により増強される (図4)。このことから, この段階ではまだ ATP の分解によるエネルギー利用が可能で, NE 放出は開口放出によって起こり, uptake<sub>1</sub> carrier は放出された NE をシナプスから細胞内に取り込んでいると考えられる。一方, 心筋間質 DHPG 濃度は低下する (図3)。NE 放出, 再取り込みにより, 細胞質内 NE 濃度は上昇しているにもかかわらず, DHPG 産生は低下しており, 細胞質内 NE 濃度と心筋間質 DHPG 濃度変化の解離は, 酸素濃度低下による MAO 活性の低下を反映したものと考えられる<sup>29)</sup>。

## 2. 虚血II期(冠閉塞 20~60 分)

心筋間質 NE 濃度は著明に上昇する (図3)。冠閉塞 60 分後の心筋間質 NE 濃度は, 星状神経節を最大電気刺激した際の NE 濃度の約 20 倍にも達する。この心筋間質 NE 濃度の著明な上昇は,  $\omega$ -conotoxin GVIA ではまったく抑制されず, uptake<sub>1</sub> carrier の阻害剤である desipramine によってのみ抑制される (図4)。したがって, NE 放出機構が虚血初期にみられた NE 開口放出から, 冠閉塞 20~60 分では uptake<sub>1</sub> carrier を介した非開口放出に移行したものと考えられる。虚血 20 分以後, ATP が枯渇して細胞質内 Na<sup>+</sup> 濃度および細胞質内 NE 濃度の上昇が著しくなり, uptake<sub>1</sub> carrier の逆回転が起き, 細胞質から

NE の大量流出が起きていると考えられる。一方, 心筋間質 DHPG 濃度は, 冠閉塞 20~120 分まで緩やかに上昇する (図3)。このことは, 低酸素状態にもかかわらず MAO 活性が消失していないことを示しているが, 細胞質内 NE 濃度が MAO 活性の低下を埋め合わせする以上に上昇し, DHPG 産生が亢進しているものと考えられる<sup>30)</sup>。

## 3. 虚血III期(冠閉塞 60~120 分)

心筋間質 NE 濃度はもはや上昇しないが, 依然高い値を維持する (図3)。 $\omega$ -conotoxin GVIA は心筋間質 NE 濃度に何ら影響を及ぼさない (図4)。冠閉塞 20~60 分の著明な心筋間質 NE 濃度上昇は desipramine により抑制されるが, その後も心筋間質 NE 濃度は緩やかに上昇し, 冠閉塞 100 分後には desipramine を投与していない群と同じレベルまで上昇する (図4)。もはや両薬剤で抑制されない NE 放出機序, たとえば, 虚血により交感神経終末の細胞膜が破壊されて細胞質 NE の流出が起きるのかもしれない<sup>24)</sup>。しかし, 後述するように冠閉塞 60 分以後も交感神経終末の膜構造は機能的に破壊されておらず,  $\omega$ -conotoxin GVIA や desipramine で抑制されない別の NE 放出機構が関与していると考えられる。

*in vitro* の実験から, 電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルとは異なった機構によって細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度

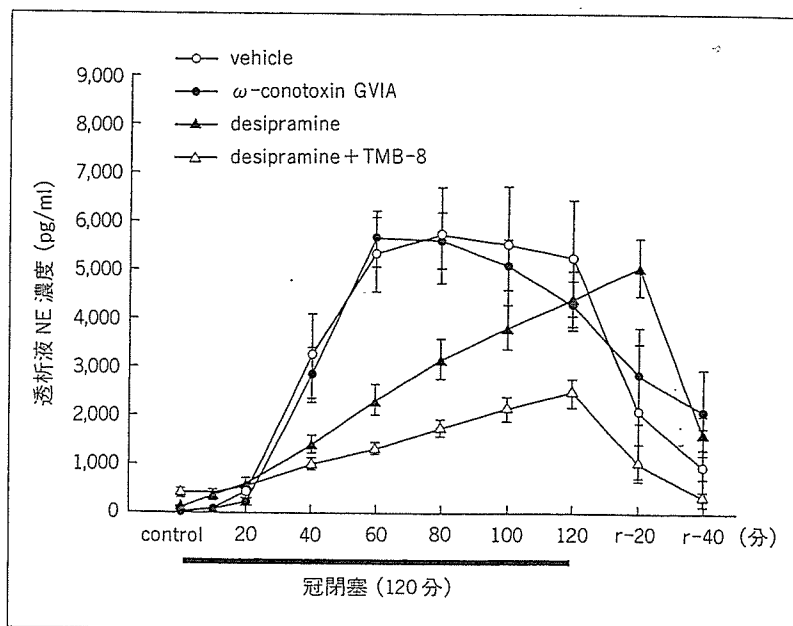


図4 ω-conotoxin GVIA, desipramine, desipramine+TMB-8存在下での虚血部心筋間質 NE 濃度の推移 (r:再灌流)

が上昇し、NEの開口放出が引き起こされること示唆されている<sup>31)</sup>。われわれの麻酔下猫の実験でも、desipramine存在下に細胞内Ca<sup>2+</sup>バッファからのCa<sup>2+</sup>の流出をTMB-8で阻害すると、冠閉塞80分以降のNE放出はさらに抑制された(図4)<sup>7)</sup>。したがって、細胞内Ca<sup>2+</sup>バッファからCa<sup>2+</sup>が流出して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、NEの開口放出が起きるのかもしれない。あるいは、細胞質内Na<sup>+</sup>濃度の上昇により、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>exchangeが逆回転して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、NEの開口放出が引き起こされるのかもしれない<sup>32)</sup>。今後、さらに詳しい放出機構の解明が必要であろう。

#### 再灌流後の心臓交感神経終末におけるNE動態

再灌流液中のNEから虚血時のNE動態を推測する摘出灌流心の実験と比べ、心臓ダイアリス法の特長は、再灌流時の心臓交感神経終末におけるNE動態を観察できることである。120分の冠閉塞後、再灌流により心筋間質NE濃度は速やかに低下する(図3)。再灌流によってNE放出が停止し、心筋間質からNEがwashoutされて低下するのかもしれない。しかし、再灌流後に心筋間質DHPG濃度は著明に上昇し(図3)、desipramine投与下では、再灌流後に心筋間質NE濃度はさらに一過性に上昇する(図4)。このこと

から、再灌流後にuptake<sub>1</sub> carrierは正常の方向に働き、大量のNEを細胞内に取り込み細胞質内NE濃度を上昇させ、再灌流によって回復したMAO活性も手伝い、DHPGの産生亢進につながっていると考えられる。したがって、再灌流後に心臓交感神経終末のuptake<sub>1</sub> carrierは、心筋間質NE濃度の減少に大きく貢献していると考えられる。さらに再灌流60分後において、チラミンに対する心筋間質NEおよびDHPG応答は非虚血時と同様である(図3)。チラミンはuptake<sub>1</sub> carrierおよびシナプス小胞のトランスポーターを介して、細胞質内およびシナプス小胞のNEと取って代わってNEを放出させる<sup>33)</sup>。これらの結果から、大量のNE放出にもかかわらず、120分の冠閉塞では心臓交感神経終末内のNEは枯渇せず、再灌流後にuptake<sub>1</sub> carrierおよびシナプス小胞のトランスポーターの機能は正常化し、非可逆的な膜構造の破壊による細胞内からのNE流出は起きないと推察される。

#### おわりに

虚血部の心臓交感神経終末におけるNE動態を、再灌流後も含めて冠閉塞からの時間経過によって概説した。冠閉塞20~60分に虚血部の心臓交感神経終末から非開口放出によって大量のNEが放出され、その時の心筋間質NE濃度はそ

れだけで心筋細胞を傷害するに十分な濃度と考えられる<sup>1,2)</sup>。今後、虚血時に放出される大量のNEが急性心筋梗塞の病態をどのように修飾しているかを解明することが重要と思われる。

### 文 献

- 1) Penny WJ: The deleterious effects of myocardial catecholamines on cellular electrophysiology and arrhythmias during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J* 5: 960-973, 1984
- 2) Waldenström AP, Hjalmarson AC, Thornell L: A possible role of noradrenaline in the development of myocardial infarction. *Am Heart J* 95: 43-51, 1978
- 3) Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I: In vivo monitoring of myocardial interstitial norepinephrine by dialysis technique. *Am J Physiol* 261: H1643-1647, 1991
- 4) Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, et al: A new, concise dialysis approach to assessment of cardiac sympathetic nerve terminal abnormalities. *Am J Physiol* 272: H1182-1187, 1997
- 5) Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I: Differential regional responses of myocardial interstitial noradrenaline levels to coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 27: 817-822, 1993
- 6) Shindo T, Akiyama T, Yamazaki T, et al: Increase in myocardial interstitial norepinephrine during a short period of coronary occlusion. *J Auton Nerv Syst* 48: 91-96, 1994
- 7) Akiyama T, Yamazaki T: Norepinephrine release from cardiac sympathetic nerve endings in the in vivo ischemic region. *J Cardiovasc Pharmacol* 34 (suppl 4): S11-14, 1999
- 8) Akiyama T, Yamazaki T: Myocardial interstitial norepinephrine and dihydroxyphenylglycol levels during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 49: 78-85, 2001
- 9) Shindo T, Akiyama T, Yamazaki T, et al: Regional myocardial interstitial norepinephrine kinetics during coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 270: H245-251, 1996
- 10) Baker PF, Knight DE: Calcium - dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 276: 620-622, 1978
- 11) Knight DE, von Grafenstein H, Maconochie DJ: Intracellular requirements for exocytotic noradrenaline release, in Brachmann J, Schömig A (eds): *Adrenergic System and Ventricular Arrhythmias in Myocardial Infarction*. New York/Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, pp3-20, 1989
- 12) Kitagawa H, Akiyama T, Yamazaki T: Myocardial interstitial noradrenaline monitoring during occlusion of inferior vena cava in cats. *Acta Physiol Scand* 163: 173-179, 1998
- 13) Yahagi N, Akiyama T, Yamazaki T: Effects of  $\omega$ -conotoxin GVIA on cardiac sympathetic nerve function. *J Auton Nerv Syst* 68: 43-48, 1998
- 14) Iversen LL: Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. *Br J Pharmacol* 41: 571-591, 1971
- 15) Sammet S, Graefe KH: Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and Na<sup>+</sup> in neuronal uptake: Kinetic evidence for co-transport. *Arch Pharmacol* 309: 99-107, 1979
- 16) Beers MF, Carty SE, Johnson RG, et al: H<sup>+</sup>-ATPase and catecholamine transport in chromaffin granules. *Ann NY Acad Sci* 402: 116-133, 1982
- 17) Phillips JH: Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience* 7: 1595-1609, 1982
- 18) Winkler H, Apps DK, Fischer-Colbrie R: The molecular function of adrenal chromaffin granules: Established facts and unresolved topics. *Neuroscience* 18: 261-290, 1986
- 19) Trendelenburg U: The metabolizing systems involved in the inactivation of catecholamines. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 332: 201-207, 1986
- 20) Starke K, Hedler L, Steppeler A: Metabolism of endogenous and exogenous noradrenaline in guinea-pig atria. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 317: 193-198, 1981
- 21) Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, et al: Dialysate dihydroxyphenylglycol as a window for in situ axoplasmic norepinephrine disposition. *Neurochem Int* 38: 287-292, 2001
- 22) Eisenhofer G, Smolich JJ, Cox HS, et al: Neuronal reuptake of norepinephrine and production of dihydroxyphenylglycol by cardiac sympathetic nerves in the anesthetized dog. *Circulation* 84: 1354-1363, 1991
- 23) Yamazaki T, Akiyama T: Effects of locally administered desipramine on myocardial interstitial norepinephrine levels. *J Auton Nerv Syst* 61: 264-268, 1996
- 24) Schömig A, Dart AM, Dietz R, et al: Release of endogenous catecholamine in the ischemic myocardium of the rat. Part A: locally mediated release. *Circ Res* 55: 689-701, 1984
- 25) Schömig A, Fischer S, Kurz T, et al: Nonexocytotic release of endogenous noradrenaline in the ischemic and anoxic rat heart: Mechanism and metabolic requirements. *Circ Res* 60: 194-205, 1987
- 26) Schömig A, Kurz T, Richardt G, et al: Neuronal sodium homeostasis and axoplasmic amine concentration determine calcium-independent noradrenaline release in normoxic and ischemic rat heart. *Circ Res* 63: 214-226, 1988
- 27) Yamazaki T, Akiyama T, Kitagawa H, et al:



- Elevation of either axoplasmic norepinephrine or sodium level induced release of norepinephrine from cardiac sympathetic nerve terminals. *Brain Res* 737: 343-346, 1996
- 28) Yamazaki T, Akiyama T, Kawada T: Effects of ouabain on in situ cardiac sympathetic nerve endings. *Neurochem Int* 35: 439-445, 1999
- 29) Fowler CJ, Orelund L: The nature of the substrate-selective interaction between rat liver mitochondrial monoamine oxidase and oxygen. *Biochem Pharmacol* 29: 2225-2233, 1980
- 30) Stefano FJE, Trendelenburg U: Saturation of monoamine oxidase by intraneuronal noradrenaline accumulation. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 328: 135-141, 1984
- 31) Dry KL, Phillips JH, Dart AM: Catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells during anoxia or metabolic inhibition. *Circ Res* 69: 466-474, 1991
- 32) Du X-J, Bobik A, Little PJ, et al: Role of  $Ca^{2+}$  in metabolic inhibition-induced norepinephrine release in rat brain synaptosomes. *Circ Res* 80: 179-188, 1997
- 33) Takauchi Y, Yamazaki T, Akiyama T: Tyramine-induced endogenous noradrenaline efflux from *in situ* cardiac sympathetic nerve ending in cats. *Acta Physiol Scand* 168: 287-293, 2000

# トロポニンの結晶構造とカルシウム調節のメカニズム

前田雄一郎・武田壮一・森本幸生・大槻馨男

骨格筋と心筋の収縮は細胞内カルシウムイオン濃度変化によって調節されている(カルシウム調節)。筆者らは、最近カルシウム受容蛋白質であるトロポニンの結晶構造を解明した。また遺伝性心疾患をひき起こすトロポニン変異の機能解析を進め、カルシウム調節のメカニズムについて新しい知見を得た。これらの研究によって、カルシウム調節のメカニズムを全面的に解明するための材料と条件が揃ったと思われる。本稿では、これら最近の筆者らの結果をまとめて紹介し、今後の研究方向についての筆者らの考えを示す。

**Keywords** 筋収縮 カルシウム調節 トロポニン X線結晶解析 遺伝性心疾患 アクチンフィラメント

## はじめに

筋収縮(心筋と骨格筋)は細胞内カルシウムイオン濃度( $[Ca^{2+}]$ )の上昇によって開始する。 $Ca^{2+}$ はアクチンフィラメント上に存在する蛋白質分子トロポニン(Tn)に結合し、その信号はトロポミオシン(Tm)を経てアクチンフィラメントに伝搬し、ミオシンとの滑り運動が始まって張力が発生する(図1)。ここまでは江橋節郎らによって1960年代に発見された。

江橋らは、試験管中にアクチン、ミオシン、ATPを共存させると収縮は再現できるが、弛緩は再現できないことに注目して、弛緩因子を発見した。それは筋小胞体由来の膜画分であった。この膜画分はATP加水分解に駆動された $Ca^{2+}$ 取込み活性( $Ca^{2+}$ -ATPase)をもつ(「興奮・収縮連関」の発見)。他方、筋から調製したアクトミオシン試料には、ATP加水分解活性に $[Ca^{2+}]$ 依存性があるが、それを低塩濃度溶液で抽出するとカルシウム感受性が失われることから、カルシウム感受性を付加する因子としてTnとTmを発見した(「筋収縮のカルシウム調節」の発見)。こうして、 $Ca^{2+}$ が筋小胞体から放出され、それがTn/Tmに受容され、アクトミオシンの

相互作用を開始させる、とのカルシウム説の全体が成立することになる(図2)。これは細胞内での $Ca^{2+}$ が介在する信号伝達のメカニズムの最初の発見であって、その生物学における一般的な意義はきわめて大きい。それま

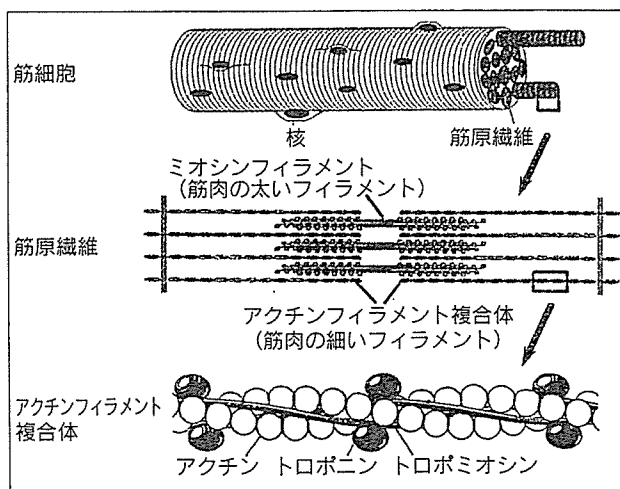


図1 アクチンフィラメント複合体  
アクチン重合体(白球はアクチン単量体)の上に周期的にトロポニン(Tn, 黒球)とトロポミオシン(Tm, 棒状)が結合する。

Yuichiro Maéda, 理化学研究所播磨研究所 E-mail: ymaeda@spring8.or.jp

Soichi Takeda, 国立循環器病センター研究所心臓生理部

Sachio Morimoto, 九州大学大学院医学研究院臨床薬理学分野

Iwao Ohtsuki, 東京慈恵会医科大学生理学教室

The crystal structure of troponin and the mechanism of calcium regulation

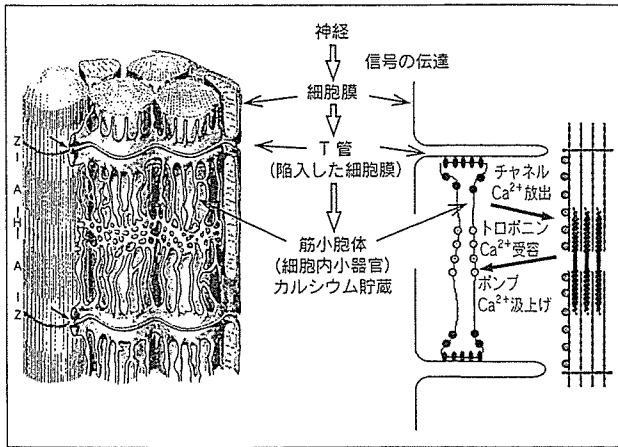


図2 骨格筋の興奮収縮連関と筋収縮のカルシウム調節

では  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内での役割はまったく理解されていなかった(カルシウム説の成立については文献1を参照)。

さて、江橋らのカルシウム説が比較的短期間のうちに世界中の研究者の間に受け入れられたのは、筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の移動を、筋小胞体から Tn に至るまで全面的に解明したこと、Ca-ATPase や Tn などの  $\text{Ca}^{2+}$  の移動を支配する主要な蛋白質装置を発見したことをあげることができる。とくに、Tn/Tm/アクチンからなる「アクチンフィラメント複合体の分子模型」の提案とその確立は、きわめて大きな意義をもった(図1下)。この分子模型は、①分子配置の美しい周期性は、Tn/Tm/アクチン = 1:1:7 という分子の存在比から見事に説明されること、また、②カルシウム調節を担う構造は Tn のみではなく3者の複合体であること、③アクチンフィラメントは収縮力を発生するモーターの一部であると同時にスイッチでもあることを示した。ある英国の研究者は「江橋らの研究が短期間にこの分子模型に到達したことは驚嘆に値する。この分子模型はカルシウム説の成功を決定的にした」と筆者に語ったことがある。このアクチンフィラメントの分子模型こそ、本稿で述べる研究の出発点である(アクチンフィラメント分子模型の成立については文献2を参照)。

現時点における「筋収縮のカルシウム調節」の研究の目的は、カルシウム調節機能のメカニズムを、アクチンフィラメント複合体中での蛋白質相互作用の言葉で理解することである。蛋白質分子間の相互作用の豊かな可能性を汲みつくすことは、疑いもなく現代生物学の中心問題のひとつである。

「筋収縮やその調節の研究はまだ続いているのです

か?」という質問を受けることがある。また好意的にせよ、「結晶構造が解明されて Tn の研究もめでたく完成しましたね」との意見も耳にする。しかし、筆者らはこれらの見解に同意することはできない。われわれの生物認識の作業には複数の段階があり、それぞれの研究がどの段階にあるかを区別する必要がある。江橋らは新しい現象(生体機能)を発見し、その機能を担う蛋白質装置を同定しその分子模型を確立した。現在の研究の課題は、第1に分子模型から原子模型へ進むこと、すなわち個々の分子の形と分子相互の位置関係を大雑把に理解していた分子模型からそれらを原子座標として解明することであり、第2に、原子模型からメカニズムの理解に進むことである。結晶構造が解明されてから、メカニズムの解明に向けた研究の新しい時代が始まる。

なお、筋小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  汲上げポンプ(Ca-ATPase)の結晶構造は  $\text{Ca}^{2+}$  結合型<sup>3)</sup>、非結合型<sup>4)</sup>の双方について豊島らによってすでに解明されている。また、筋小胞体から放出される  $\text{Ca}^{2+}$  が通るイオンチャンネルであるリアノジン受容体(ryanodine receptor)の構造については、複数のグループが電子顕微鏡写真の単粒子解析法を用いて解析している。今後、これら主要な分子装置の原子構造が揃ってくれば、「興奮・収縮連関」と「筋収縮のカルシウム調節」の双方について、そのメカニズムの研究が大いに進展するであろう。

## I. トロポニンの結晶構造

筆者らはカルシウム調節の機能メカニズムを理解するには、蛋白質の原子構造を知ることがどうしても必要と考え、まずトロポニン(Tn)の結晶構造解明に取り組み、最近それに成功した<sup>5)</sup>。Tn になじみのない読者にとっては、結晶構造は無味乾燥に見えよう。結晶構造をおもしろく見るには、その構造を見る「眼」が必要である。最良の「眼」は生理学の知識であろう。筆者ら自身、その「眼」をもつ作業と、その「眼」で結晶の意味するところを読みとる作業を並行して進めていく必要を痛感している。この節では、筆者たちが得られた構造から何を読みとろうとしているか、を中心に解説したい。詳しい説明は原著論文<sup>5)</sup>を参照されたい。

### 1. 結晶構造を解明した分子

Tn は、TnC、TnI、TnT の3つのポリペプチド鎖か

ら成り立っており、Tm およびアクチンとの相互作用部位をもつ。Tm との結合部位が含まれているとそれどうしが結合するためか沈殿物を生じて結晶をつくらない。また、この部分を削除しても、アクチンフィラメント複合体としてのカルシウム調節機能が大きく損なわれることはない(詳しくは後述)。それゆえ、今回構造を解明した分子は、心筋 Tn から Tm との結合部分を除いた機能部分という意味で「コアダメイン」とよぶことにする。また、分子量の相異なる2種類の「コアダメイン」、Tn 46k と Tn52k, から2種類の結晶を得てそれぞれの結晶構造を得た。さらに双方とも Ca<sup>2+</sup> 結合型である。Ca<sup>2+</sup> 非結合型では結晶が得られていない。心筋と骨格筋の Tn の間のおもな違いは、心筋 TnI の N 末端に心筋特有の 32 残基が付加されていることである。今回の結晶ではいずれもこの部分を除いているので、今回の構造は心筋および骨格筋 Tn に共通であると考えられる(残基番号は心筋のそれによった)。なお、これまで知られていた Tn の構造は、TnC 単独の構造<sup>6)</sup>と、TnC に TnI の一部が結合している構造<sup>7)</sup>だけであった。今回の構造で初めて3つのポリペプチド鎖の位置関係が明らかになった(Tn 結晶中の2次構造と領域について説明した一覧表は以下の URL に掲載したので参照されたい。<http://www.riken.go.jp/lab-www/biochemi/PNE-table.html>)。

## 2. 3つのポリペプチド鎖は複雑に絡みあっている

結晶構造から、Tn の「コアダメイン」はさらに2つのサブドメイン、「調節頭部」と「IT アーム」に分かれることがわかる(図3)。興味深いことに、サブドメインの境界とポリペプチド鎖の境界はまったく一致しない。たとえば「IT アーム」では3つのポリペプチド鎖が複雑に絡みあっており、TnT と TnI は単独でサブドメインを形成しないことが初めて明らかになった。大きな複数のポリペプチド鎖からなる複合体蛋白質はそれぞれのポリペプチド鎖ごとにまとまった構造をとることが一般的であるが、Tn ではそのようになっていない。この構造を見ると、蛋白質変性剤(6M 尿素など)を作用させてはじめて3つのポリペプチドが解離するとの実験事実をよく理解することができる。以上のような理由から、筆者らは Tn を構成する3つのポリペプチド鎖を「サブユニット」とよぶよりは「成分」とよぶのが適当と考える。

## 3. サブドメイン間の連結は柔軟で動きやすい

今回、2種類の結晶中にそれぞれ「姿勢」の異なる2つの分子(A および B)の構造を得ることができた。つまり、「コアダメイン」の構造を4回解いたことに相当する。得られた合計4分子の構造を比較すると「調節頭部」と「IT アーム間」のそれぞれはほとんど同一の形をしているが、それらの間の角度が分子ごとに大きく異なる(図4)。すなわち Tn 分子は、複数の“固い”サブドメ

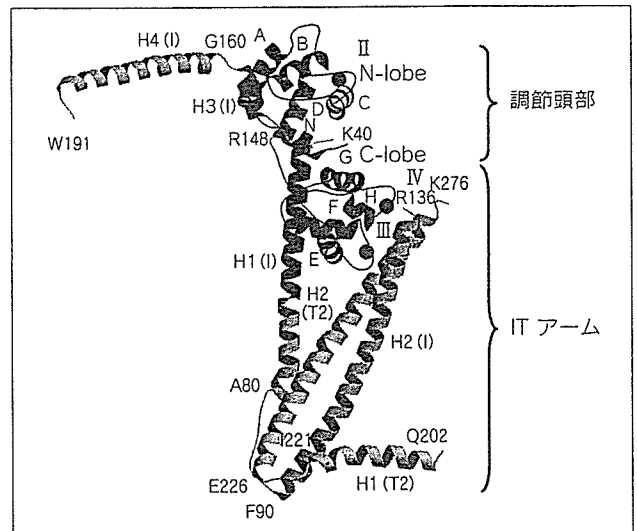


図3 心筋トロポニン・コアダメイン(Tn52kB)の結晶構造リボンモデル。赤：TnC, 空色(一部 TnC 結合領域を青色)：TnI, 黄：TnT, 3つの黒球：結合している Ca<sup>2+</sup>。(文献5より許可を得て転載)

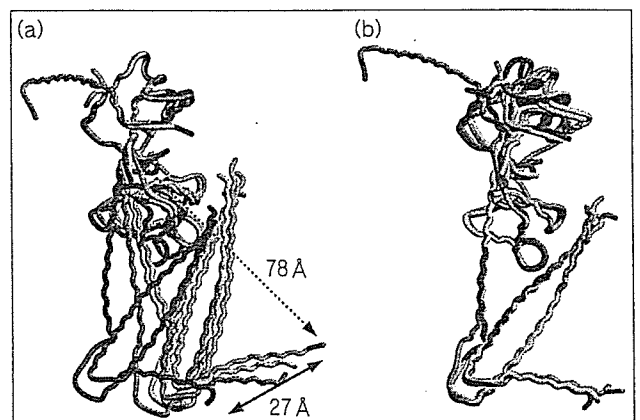


図4 4つのトロポニン分子の構造の重ね合わせ。2種類の結晶(Tn52k および Tn46k)より得た計4分子(異なる色で表示)を対応するサブドメイン(aは調節頭部, bはITアーム)ごとに重ね合わせた。2つのサブドメインの間の角度が大きく異なる。(文献5より許可を得て転載)