

# LECTURES

## 『心筋細胞フィジオーム理解のための電子教科書“e-Heart”』の 生理学教育教材および研究資材としての活用に向けて 第4回 ヒト心室筋細胞 (HuVEC) モデルの Ca<sup>2+</sup> 誘発 Ca<sup>2+</sup> 放出 (CICR)

立命館大学生命科学部生命情報学科, バイオシミュレーション研究センター

姫野友紀子, 天野 晃, 野間 昭典

### はじめに

心臓のポンプ機能を発揮するための心筋収縮力発生の要となるのは、心筋細胞の電氣的興奮を物理的な張力へと変換する興奮-収縮連関 (Excitation (E)-Contraction (C) coupling) である。E-C coupling のメカニズムを理解するには、その根幹である Ca<sup>2+</sup> 誘発 Ca<sup>2+</sup> 放出 (CICR; Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup>-release) の反応連鎖の把握が非常に重要である。CICR は、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]) の上昇によってリアノジン受容体チャネル (RyR) が活性化され、筋小胞体 (SR) に蓄えられていた Ca<sup>2+</sup> が RyR チャネルの開口によって、細胞質内へと放出されることを指している、極めて広範な定義である。心筋における EC-coupling を考えるには、dyadic junction の特殊な構造で誘導される CICR メカニズムを理解する必要があるが、Ca<sup>2+</sup> 動態が詳細にモデル化された HuVEC モデル [1] はこの問題に向かうための教材、研究資材として有用なツールであると言えよう。今回の解説では、特に HuVEC モデルで新規に開発された部分、つまり SR 膜上に存在する RyR あるいは RyR の集合体 (couplon, クプロン) の振る舞いがどのように数式化されているのか、という点に焦点を絞り、各数式の成り立ちを丁寧に辿っていきたい。一見ただ複雑に見える数式も、その意味がわかれば役割が見えてくるだろう。HuVEC モデルの中で CICR を再現する数式セットから、心筋細胞の中で

couplon が機能するイメージが湧いてくる、そんな解説を試みたい。

\*使用するプログラムに関しては、“e-Heart” プロジェクトのホームページにアクセスの上、ダウンロードページよりご入手いただきたい (<http://www.eheartsim.com/downloads/>)。

### 1. RyRのクラスターとしてのcouplonの振る舞い

心筋の dyad は、向かい合う T 管膜と SR 膜で構成されている。T 管膜上には複数個の L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネル (LCC) が、SR 膜上には 10~20 個の RyR の集団である couplon が存在する。僅か数十 nm の空間を挟んだ LCC と couplon の機能的連関を、Ca<sup>2+</sup> 放出ユニット (CaRU; Ca<sup>2+</sup> releasing unit) と呼んでいる。単一の CaRU におけるミクロな CICR は、時間的にはサブミリ秒、空間としては nm オーダーの、非常に微小な時空間での反応で Ca<sup>2+</sup> スパークと呼ばれ、この現象のスケールは顕微鏡や蛍光色素を用いて観察できる解像度の限界に近い。そこで、計測技術と相補的にシミュレーション技術を用いて理解を深めようと、世界中で相次いで Ca<sup>2+</sup> スパークを再現するモデルが開発された<sup>2)~5)</sup>。なかでも、現実的なモデルを提示したのは、Laver らによる dyad モデルである<sup>2)</sup> (図 1)。

彼らは、実際に二光子顕微鏡で得たラット心室筋細胞の立体構造を元に、T 管を取り巻く筋小胞

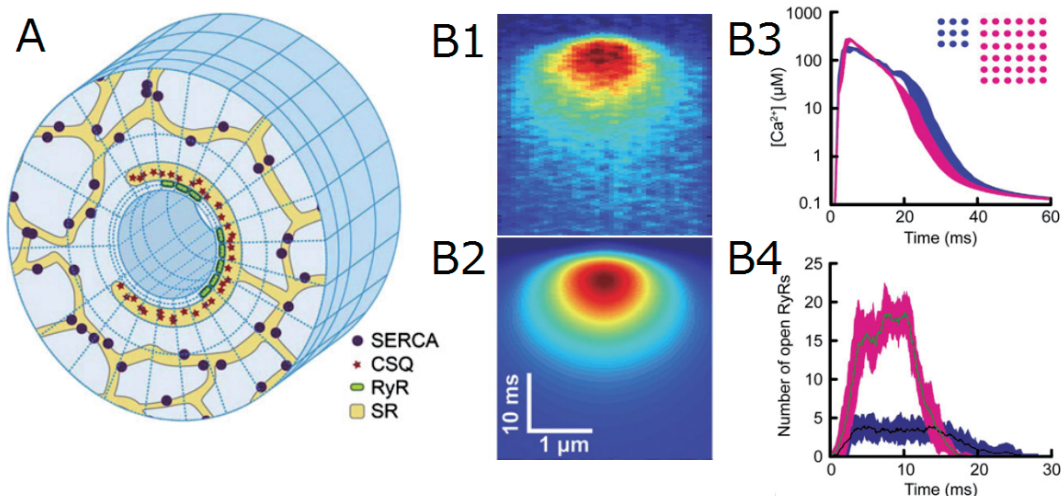


図1. Laver らによる dyad モデル (A) と再現された  $\text{Ca}^{2+}$  スパーク (B) [2]

B1: 実験で得られた  $\text{Ca}^{2+}$  スパークの蛍光シグナルデータ, B2: シミュレーション結果, B3: シミュレーションで得られた  $[\text{Ca}^{2+}]_{nd}$  の平均値, B4: RyR の開口数の時間変化. B3 右上の挿入図は, couplon を構成する RyR の数 (9 個もしくは 36 個) とその配置を表す. 右の上下のパネルでは, 時間軸が 2 倍異なるので注意する. SERCA: 筋小胞体カルシウム ATP アーゼ, CSQ: カルセクエストリン.

体 (SR) のネットワークを三次元の円筒状モデルに表した (図 1A). 網目状に見える network SR (nSR) には SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みポンプである SERCA (丸印) が配置されており, SR の一部が T 管の一部を覆って筋小胞体接合部 junctional SR (jSR) を形成し, その中には  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白である CSQ (図 1A の中の星マーク) が含まれている. 向かい合う T 管と jSR で囲まれた dyadic space あるいは nanodomain (nd) と呼ぶ局所  $[\text{Ca}^{2+}]$  計算のためのスペースは, 極めて微小であり図 1A では判別が困難である. T 管と jSR の間に挟まるような形で小さな楕円印の RyR が並んでいる構造が見てとれる. これが couplon である. couplon 内の RyR は 10~20 個程度のクラスターとして T 管膜に面して格子状に並んでいることが知られており, モデルでは図 1B3 挿入図のように  $3 \times 3$  あるいは  $6 \times 6$  の正方形であると仮定されている. 細胞質側の  $\text{Ca}^{2+}$  拡散の計算には, 空間を 3744 個のグリッドに分割し, それぞれの分画内における  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  バッファー (細胞質内のカルモジュリン, トロポニン, jSR 内の CSQ), 蛍光色素 (Fluo-4,

Fluo-5N), それに ATP の濃度をそれぞれの微分方程式によって計算している. 個々の RyR の開閉については, モンテカルロ法による完全確率論的シミュレーションで計算している.

シミュレーションはまず任意の RyR を開口遷移させることから始まる. SR から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  によってそのチャネル周辺の  $[\text{Ca}^{2+}]$  が上昇するが, これによって次々と周辺の RyR が開口し,  $[\text{Ca}^{2+}]$  の上昇は空間的広がりを見せ, nd の  $[\text{Ca}^{2+}]$  が図 1B3 に示すように数 ms でピークに達する. 開口している RyR の数も, 図 1B4 に見るように数 ms のうちに上昇し, 約 10ms でピークに達する. その後, 急速に開口状態の RyR 数は減少しているが, これは計算された jSR 内の  $[\text{Ca}^{2+}]$  が CICR によって急速に減少する結果, nd の  $[\text{Ca}^{2+}]$  が大きく低下したためである. ここでは RyR に不活性化ゲートは想定されていない点に注意する必要がある.

このシミュレーションで確認された機能動態の重要な特徴は次の二点である.

- 1) couplon 内で一つでも RyR が開口遷移する

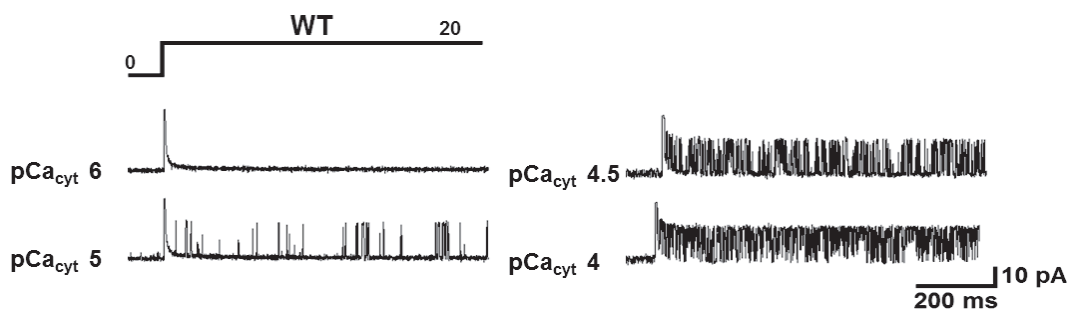


図2. 上原ら [8] によって報告されている単一 RyR チャンネル記録

とその周辺の  $nd$  の  $[Ca^{2+}]$  上昇によって次々に RyR の開口遷移が誘導される。(正帰還反応連鎖)

2) 続く couplon 中の RyR の閉口遷移は, jSR の  $[Ca^{2+}]$  が急速に減少した結果である。一旦, 開口状態にある RyR 数が減少し始めると,  $nd$  の  $[Ca^{2+}]$  の減少を介して couplon 活動が急速に終息する。(負帰還反応連鎖)

前節に示した Laver らのシミュレーション<sup>2)</sup>では, 彼ら自身による単一 RyR チャンネル電流の記録を使い,  $Ca^{2+}$  スパークの計測を行い, そのデータに基づいて  $[Ca^{2+}]$  変化を時間的, 空間的に計算している。実際の  $Ca^{2+}$  シグナル記録との相同性からも, モデルの信頼性は極めて高いと考えられる。ただ, 個々のチャンネル活動をモンテカルロ法によって計算し,  $Ca^{2+}$  フラックスによる数千の微小空間分画の  $[Ca^{2+}]$  変化を計算することは, 我々の目指す単一心筋細胞活動の包括的シミュレーションにとって, 計算コストがかかりすぎて現実的ではない。実用に供するには, couplon の活性化と不活性化を概算できる実験式が必要である。そこで我々は, 彼らのモデルで再現された  $Ca^{2+}$  スパークのシミュレーション結果を再現できる couplon モデルの構築を目指すことにした。

## 2. couplon のモデル化

### 2.1 実験に見る RyR の開口, 閉口速度とそのモデル化

図2に示すのは, 昨年上原らによって報告された論文の中の RyR の単一チャンネル記録である<sup>8)</sup>。HEK293 細胞に発現させた RyR2 タンパクを単離

して細胞人工脂質膜に埋め込み, 細胞質側と SR 内腔側を想定した膜の表裏の  $[Ca^{2+}]$  を自由に制御できる, 理想的な実験条件下で記録されたトレースである。20mV の電圧差で駆動された単一チャンネル電流が, 非常に高い精度で記録されている。生理的な細胞内  $[Ca^{2+}]$  範囲を  $0\sim 100\mu M$  ( $pCa_{cyt} > 4$ ) と考えると, その範囲内ではトレースに明らかな不活性化が見られていない。

couplon の開閉様式をモデル化するためには, このような単一チャンネル記録で得られた速度定数や時定数が利用できる。しかし, どの論文の実験データを参照するかによって, モデル化の過程で得られた開口速度 (図3A) と閉口速度 (図3B) のばらつきは大きい。

LC モデル<sup>2)</sup>, SJ モデル<sup>3)</sup>, SM モデル<sup>4)</sup>においては, 2 状態遷移モデルが使われている。Hinch モデル<sup>5)</sup>では不活性化を含む 3 状態遷移モデルが使われているが, このパネルでは活性化脱活性化の速度のみをプロットしてある。パネル A に示した開口速度は, いずれの実験式でも  $[Ca^{2+}]$  の上昇とともに指数関数的に上昇し, その勾配は比較的よく似ているが, 活性化の  $[Ca^{2+}]$  範囲は大きく異なる。閉口速度もばらつくけれども, 活性化速度と比較するとそのばらつきは軽度である。

ここで, HuVEC モデルの開口速度定数  $k_{co}$  は, SJ モデル<sup>7)</sup>や Hinch<sup>9)</sup>モデルと同じ形の式を用い, Guo ら<sup>10)</sup>や Qin ら<sup>9)</sup>によって参照されていた実験データを元に構築された SM モデル<sup>8)</sup>の値に近くなるようにフィッティングを行った。

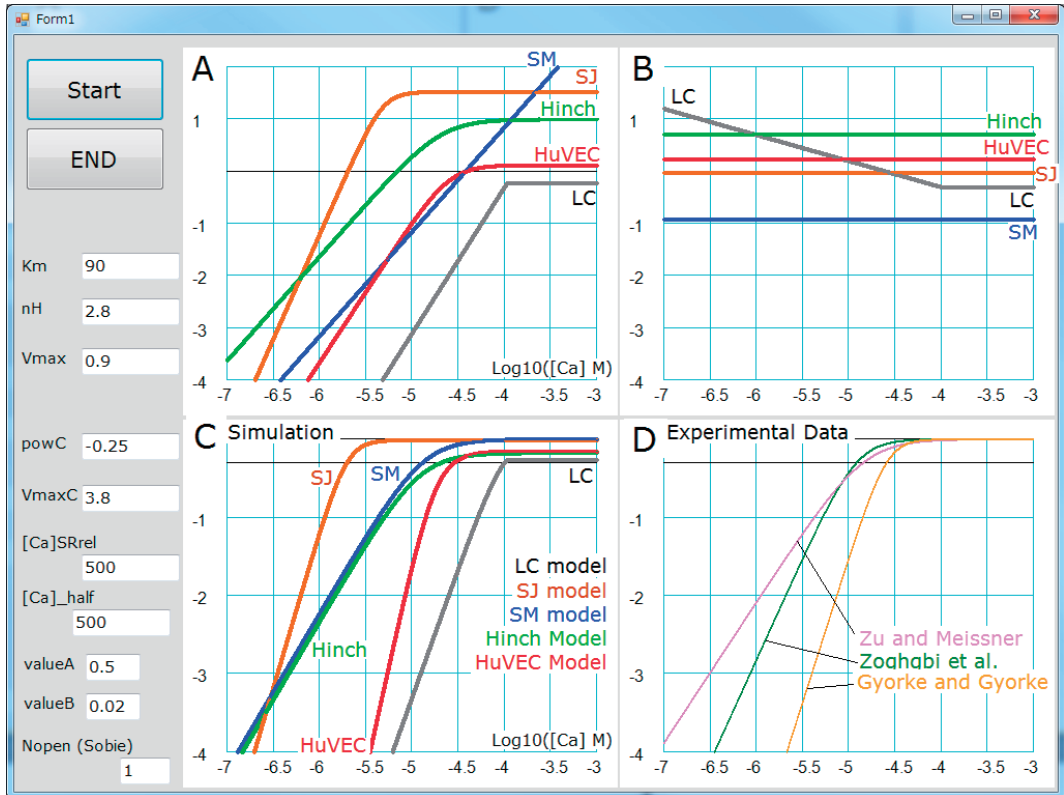


図3. 5つのモデルで用いられているRyRの開口速度  $k_{co}$  (A), 閉口速度  $k_{oc}$  (B), 開口確率  $pO$  (C) の細胞内  $[Ca^{2+}]$  依存性と実験データで得られた細胞内  $[Ca^{2+}]$  と開口確率との関係 (D) (プログラム [FitRyR05] の実行結果. Dの実験で求められたデータはSMモデル論文で参照されていたQinらのreview [9]を参考にプロット)

$$k_{co} = Q_{10} \cdot \frac{0.4}{1 + \left(\frac{0.025}{[Ca^{2+}]_{nd}}\right)^{2.7}} \quad (1)$$

$[Ca^{2+}]_{nd}$  は、単一チャネル記録における細胞質側の  $[Ca^{2+}]$  に相当し、実際の細胞ではCaRUが感受する局所  $[Ca^{2+}]$  となる。脱活性化速度定数  $k_{oc}$  は、SMモデルの式の形を採用したが、その値が他のモデルと比較して極端に小さかったため、4.8をかけて調整した。単一チャネル記録の実験は通常室温で行われているため、 $Q_{10}$  を使って体温を想定した温度補正を行った。

$$k_{oc} = Q_{10} \cdot 0.118 \cdot 4.8 \quad (2)$$

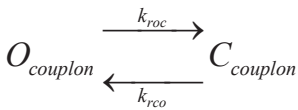
これらの速度定数を用いて計算するHuVECモデルのRyRモデルの  $[Ca^{2+}]$  依存性 (図3C) は、

様々なモデルや実験データで得られた値の中央付近にあり、実験データともある程度整合性があることがわかる。

次に、この開口・閉口速度定数で定義されるRyRが複数個寄り集まったクラスターとしてのcouplonの振る舞いを、どのようにモデル化するかを考える。couplon内のRyRは、互いに開口した際の  $Ca^{2+}$  フラックスを近傍のRyRと共有する形で加算的に局所  $[Ca^{2+}]$  を上昇させ、同じ局所  $[Ca^{2+}]$  を参照する関係にある。まずは2.2章でモデル化の方向性を明確にし、その後、3.3章で正帰還反応連鎖による再生的な活性化、3.4章で負帰還反応連鎖による脱活性化のモデル化についてそれぞれ解説する。

## 2.2 couplon 機能を表す 2 状態遷移モデル

第 1 章で紹介した Laver らのモデル<sup>2)</sup>では、単一 RyR チャンネル電流記録から求めた開口・閉口遷移速度を使って、couplon を構成する個々の RyR チャンネルの動きが計算されている。チャンネル周辺の数スケールの  $[Ca^{2+}]$  分布の時間経過が細かく分割された  $Ca^{2+}$  分画を想定することで正確に計算され、 $Ca^{2+}$  を介する RyR 相互の作用が計算されている。これに対して、我々が目指したのは、couplon を一つの  $Ca^{2+}$  放出単位として、その機能を簡略的に次の 2 状態遷移モデルで表すモデル式の開発である。



ここで、 $k_{rco}$  と  $k_{roc}$  が、couplon を機能単位としてみた場合の活性化・脱活性化速度となり、単一 RyR チャンネルの場合の  $k_{co}$ 、 $k_{oc}$  に対応する。新たに添えられた文字、r は regenerative の略で、活性化も脱活性化も帰還反応によって自己再生的に増幅する意味合いが込められている。

前回紹介したように、Hinch らの CaRU モデル<sup>5)6)</sup>には、*nd* における CICR の特殊性、即ち“*nd* の瞬時 Ca 濃度平衡”の概念が導入されていて、これによって個々の CaRU における couplon に与えられる  $[Ca^{2+}]_{nd}$  が概算できる。式 (3) の瞬時平衡式では、それぞれの数値積分計算の各時点における LCC の開閉、couplon の活性化・脱活性化によって、*nd* の  $[Ca^{2+}]$  である  $Ca_{nd}$  ( $Ca_{00}$ ,  $Ca_{L0}$ ,  $Ca_{0R}$ ,  $Ca_{L,R}$ ) の 4 種類の値を決定することができる。

$$Ca_{nd} = Ca_{xx} = \frac{Ca_{jnc} + f_r \cdot [Ca^{2+}]_{Srrt} + f_L \cdot \frac{\delta V \cdot e^{-\delta V}}{1 - e^{-\delta V}} \cdot [Ca^{2+}]_o}{1 + f_r + f_L \cdot \frac{\delta V}{1 - e^{-\delta V}}} \quad (3)$$

ここで  $\delta$  は、

$$\delta = \frac{R \cdot T}{2 \cdot F} \quad (4)$$

で表され、R、T、F はそれぞれガス定数 (= 8.3143C · mV/mmol/K)、絶対温度 (= 310k)、ファラデー定数 (= 96.4867C/mmol) で、V は膜電位 (mV) である。添え字の *xx* の左の *x* は LCC

が閉じていれば 0 で  $f_L = 0$ 、開いていれば L で  $f_L = 0.014$ 、右の *x* は couplon が閉じていれば 0 で  $f_r = 0$ 、開いていれば R で  $f_r = 0.31$  となる。この式を用いて時々刻々変化する膜電位 V で決定される LCC の開口遷移状態に応じた各 couplon の活性化を計算できる、という点が Hinch モデルの一つの大きな特徴である (CaRU の局所制御説<sup>6)</sup>)。式 (3) で求めた  $[Ca^{2+}]_{nd}$  を式 (1) に代入してやることで、CaRU 内の LCC と couplon の活性化状態に応じた  $[Ca^{2+}]_{nd}$  が開口速度 ( $k_{co}$ ) に反映されることになる。

さらに、HuVEC モデルで Hinch モデルに加えて詳細化されたメカニズムに、細胞内  $[Ca^{2+}]$  空間の分画化が挙げられる。これについても前回紹介してあるが簡単に説明すると、Hinch モデルでは 1 つしか存在しなかった細胞質空間を、CaRU に近いものから順に junction space (*jnc*)、intermediate zone (*iz*)、bulk space (*blk*) の 3 つに分割し、それぞれの分画の中の  $[Ca^{2+}]$  は時間積分によって計算する。従って、最も CaRU に近い *jnc* では、非常に高い  $[Ca^{2+}]$  が計算されることになり、この  $Ca_{jnc}$  は式 (1) より  $Ca_{nd}$  を底上げする形で非常に強力に couplon の活性化状態に効いてくることになる。*jnc* の体積については、 $Ca_{jnc}$  が単一 RyR チャンネル記録で得られる開口  $[Ca^{2+}]$  範囲にできる限り近いところで作動するよう調整した。また *iz* については、実験的に局所  $[Ca^{2+}]$  を  $Na^+/Ca^{2+}$  交換電流 ( $I_{NCX}$ ) の電流振幅を用いて推定する方法で得られた値が報告されている<sup>7)</sup>ので、その値が *iz* の  $[Ca^{2+}]$  に相当すると考え、調整を行った。

## 2.3 couplon の活性化速度を表す実験式

couplon 内の RyR の開口遷移は、一つが開くと相互作用によって正帰還のメカニズムで隣り合うチャンネルを次々と開口遷移させることで couplon 全体の活性化が起こる。そこで、最初の一つ目の RyR が開くのをトリガーとして、couplon の活性化速度が上昇する triggered step は瞬時に平衡状態に達するとして、その確率  $f_i$  を次の平衡式で与えた。

$$f_i = \frac{k_{co}}{k_{co} + k_{oc}} \quad (5)$$

また、一つ目の RyR が開いて、近接する複数の RyR が加速的に開口する nearest neighbor 効果  $f_n$  を 7 とし、再生的な couplon の活性化の速度定数  $k_{rco}$  を求める。

$$k_{rco} = (f_n \cdot k_{co}) \cdot f_i \cdot (sloc_0 + Ca_{SRr}) \quad (6)$$

ここで、 $(sloc_0 + [Ca^{2+}]_{SRr})$  は jSR 内  $[Ca^{2+}]$  が低下すると活性化速度が底上げされることを表しており、 $sloc_0$  には 0.1mM という値が入る。これにより、jSR の  $[Ca^{2+}]$  ( $[Ca^{2+}]_{SRr}$ ) が 1mM から 0mM まで低下したときに、 $k_{rco}$  が 1.1 から 0.1 へと 1/11 になるという実験的な所見を再現することが可能となる。HuVEC モデルでは、以上 3 つの要素  $f_n$ ,  $f_i$ ,  $(sloc_0 + [Ca^{2+}]_{SRr})$  と単一 RyR の開口確率  $k_{co}$  の積として、couplon の活性化速度を求める。

#### 2.4 couplon の脱活性化速度を表す実験式

細胞レベルでの実験結果から、従来は RyR の不活性化によって CICR は終息するという説<sup>11)</sup>が主流であった。しかし、単一チャネルレベルでの実験で、生理的  $[Ca^{2+}]$  下では明らかな不活性化の存在は確認できなかったことから、RyR 不活性化説に代わって CICR の終息を理論的に説明できるメカニズムを想定しなければならないことになった。そこで Stern は、couplon には構成している RyR が確率的に一齐に閉じる可能性が常に存在し、いったんすべての RyR が閉じてしまうと couplon が活性を維持できる  $[Ca^{2+}]$  を下回ることによって CICR は終息する、という説（確率的漸減、stochastic attrition 説）を出した<sup>12)2)</sup>。しかし、couplon に含まれる RyR の数が大きく ( $N_{RyR} > 10$ ) になると、それを構成する RyR が一齐に閉じる確率が低くなりすぎて、脱活性化が一向に起こらないという根本的な問題点も同時に指摘されていた。その問題を回避する説として、局所的に SR から放出可能な  $Ca^{2+}$  が枯渇するというメカニズム (SR 枯渇, SR depletion 説) が提唱された<sup>13)2)</sup>。現在では、SR depletion が起こった後、stochastic attrition により CICR は終息する、つまり両方のメカニズムが必要であるという考え方が主流になって

いる。そこで我々は、Laver らによって再現された  $Ca^{2+}$  スパークの細胞内  $[Ca^{2+}]$  時空間動態を参考に、HuVECII<sup>1)</sup> の開発を行うこととなった。

まず  $N_{RyR}$  個の RyR から成る couplon を想定して確率論的シミュレーションを行い、10 個の RyR のうち 1 つでも開いたら couplon は開状態にあるとし、最後の 1 つが閉じるまでの時間を開口時間としてフィッティングを行ったところ、RyR の閉口確率  $pC$  を瞬時平衡式で求め、指数部分の補正乗数項  $l$  を用いることで式 (7) によってうまく表現できた。

$$k_{roc} = k_{co} \cdot pC^{(N_{RyR}-1)l} \quad (7)$$

$$pC = \frac{k_{oc}}{k_{co} + k_{oc}} \quad (8)$$

その結果、構築された couplon モデルは図 4 に示すように Laver らの時間経過と同様の速い開閉プロセスを再現することができた。また、図 4 のシミュレーションでは単一 couplon モデルを用いて 1 秒間の挿引を 20000 回独立に繰り返した。与えた  $[Ca^{2+}]_{nd}$  は、細胞が静止状態にあることを想定し、LCC と RyR の両方が閉じている  $Ca00$  が 0.2 $\mu$ M、RyR のみが開いている  $Ca0R$  が 0.15mM、 $[Ca^{2+}]_{SRr}$  が 0.6mM である。この実験条件を実際の細胞で観察される  $Ca^{2+}$  スパークと比較してみると、1 つの細胞に 20000 個の couplon が互いに独立に開閉すると仮定した場合に、細胞全体で発生するスパークの数に相当する。Cheng ら<sup>2)</sup> は、実験的に得られた毎秒当たりのスパークの発生確率から 1 秒間に観察される 1 細胞当たりのスパーク数は 100 程度であろうと試算している。今回のシミュレーションで観察された 167 回の活性化イベントは、実験結果とよく整合する結果であると言えるだろう。

なお、式 (7) を導出するための確率論的シミュレーションの詳細は、次の章で述べる。

### 3. couplon の脱活性化速度定数のフィッティング

HuVEC モデルの論文投稿に際して、査読者は単一 RyR チャネルの閉口速度定数をそのまま

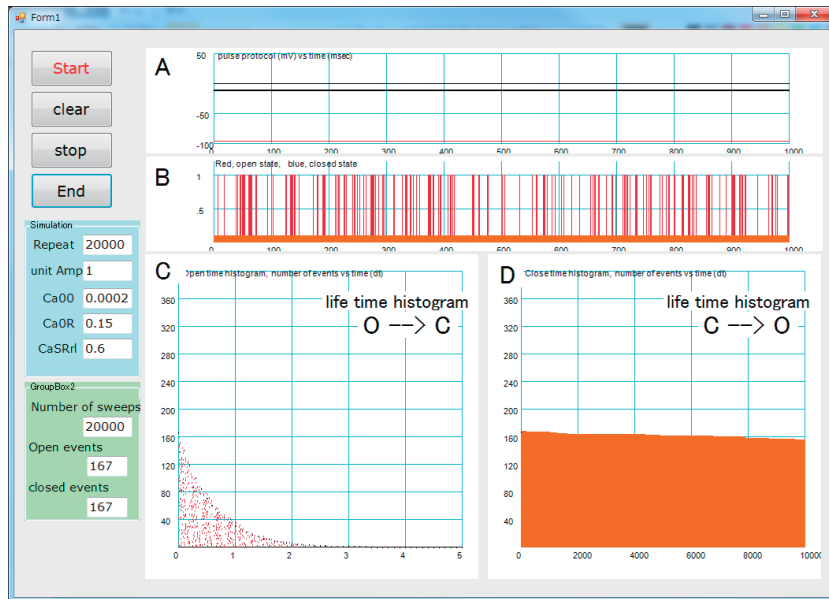


図4. 細胞を想定した couplon の振る舞い (プログラム [Singlecouplon] を使用) A:  $-10$  mV に保持した膜電位, B: 単一チャネルの活性化イベント, C: 活性化持続時間のヒストグラム, D: 脱活性化持続時間のヒストグラム

couplon の閉口速度定数として使用するのはいくつかと指摘した。その根拠として、一つの couplon の中で開口している RyR の数が多い場合、開口している RyR すべてが同時に閉口状態に遷移 (stochastic attrition) する確率は極めて低く、couplon の開口状態は単一 RyR に比べてより長く続くであろうと予測している。さらに査読者は、これを解決するためには couplon を構成する各 RyR チャネルの状態遷移を確率論的に計算し、Hinch 型モデルにおける couplon の閉口遷移速度との関係を解析する必要があると助言している。そこで、以下この助言に沿った検討を行った。先の 2.2 章で Hinch 型の couplon 2 状態遷移モデルにおける活性化速度を  $k_{co}$ 、脱活性化速度を  $k_{oc}$  と定義し、RyR の開閉速度定数 ( $k_{co}$  と  $k_{oc}$ ) から区別した。ここでの単一 couplon のシミュレーションでは、含まれる  $N_{RyR}$  個の RyR の閉口状態遷移に RyR 相互の協働性はなく、独立に動作するとし、それぞれの RyR が速度  $k_{co}$  と  $k_{oc}$  に従って開閉するとして、各 RyR の開閉の状態遷移を完全確率論

的に計算する。

### 3.1 RyR の重複開口による couplon の脱活性化遷移速度への影響

ここでは LC model で用いられている RyR モデルを例として取り上げ、couplon の脱活性化速度の解析を行う。仮に  $N_{RyR} = 10$  (個) の RyR で構成される couplon について、いろいろな  $[Ca^{2+}]$  でそれぞれの RyR の開閉状態遷移を確率論的な計算によって求め、coincidence による couplon の脱活性化を再現した。ここでは解析を容易にするため、couplon の脱活性化 (閉口) イベントをすべての RyR が閉じている時間 ( $t_c$ ) で定義し、逆に一つ以上の RyR が開いている時間を活性化 (開口) イベントの持続時間 ( $t_o$ ) とする。図 5A は RyR の開口確率の時間経過を 50ms のサンプル記録で示している。この図では、すべての RyR が閉じている時間 ( $t_c$ ) を下の帯で示している。連続する二つの閉口イベント  $t_c$  の間隔が couplon の閉口時間、 $t_o$  である。

このようにして測定した 8950 個の開口イベン

ト  $t_o$  の持続時間のヒストグラム (図 5B) (横軸がイベントの持続時間で、縦軸は各持続時間を示したイベント数の対数) から、それぞれの分布密度を求めた。この  $t_o$  のヒストグラムでは、イベントの持続時間に対して分布密度  $f(t_o)$  は概ね指数関数的に減少した。指数関数的な減衰は、時定数を  $\tau$  とすると、その分布密度は式 (9) で表すことができる。

$$f(t) = N_e \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

ここで、 $N_e$  はイベントの数、 $1/\tau$  は減少速度で、 $t$  はイベントの持続時間である。今回の couplon の閉口時間経過を確認するために、比較対象として単一 RyR チャンネルの  $k_{oc}$  と、couplon の開状態の持続時間  $t_o$  を式 (9) に代入した式 (10) を、図 5B のヒストグラムの上に重ね合わせて描画してみた。

$$f(t_o) = N_e \cdot e^{-\frac{t_o}{\tau}} = e^{-k_{oc} \cdot t_o} \quad (10)$$

すると、ヒストグラムの分布密度は、短い  $t_o$  では  $k_{oc}$  で比較的良く説明できるが、長い  $t_o$  の分布は明らかにこの理論直線から逸れていることがわかった。これは挿入図の  $t_m$  に見られる開口イベントのように、複数の RyR の開口遷移 (重複開口イベント、multiple open events) が一つの RyR 開口状態 (単一開口イベント、single open events) と混在していることによると考えられた。これを確かめるために、各重複イベントの持続時間の合計 ( $\sum t_{mi}$ ) を測定された開口イベント時間  $t_o$  から差し引いて、単一 RyR のみが開いているクプロンの開口状態持続時間 ( $t_o'$ ) を求めた。

$$t_o' = t_o - \sum t_{m,i} \quad (11)$$

そして、計算で求めた  $t_o'$  の分布密度 ( $f(t_o')$ ) を図 5C に示した。そして  $t_o$  の場合と同様に式 (12) をヒストグラムに重ね描きすると、この  $t_o'$  の分布密度はほぼ完全に単一指数関数で表現でき、時定数は  $k_{oc}$  の逆数で表すことができた。

$$f(t_o') = N_e \cdot e^{-k_{oc} \cdot t_o'} \quad (12)$$

言い換えると、一つの RyR が開いている時間にはのみ  $k_{oc}$  による couplon の閉口遷移が引き起こされることを意味している。すなわち、パネル B の

$t_o$  ヒストグラムで単一指数関数から逸れた原因は重複イベントによるものである、ということを確認することができた。以上の結果より、couplon の  $k_{roc}$ 、 $k_{rc}$  を用いた 2 状態遷移モデルで、単一 RyR の  $k_{oc}$  をそのまま用いた場合に生じうる誤差の大きさと、そのメカニズムが確認されたことになる。

### 3.2 couplon の閉口遷移速度の決定

couplon 閉口時間  $t_o'$  では、couplon の中で開いている一つの RyR チャンネルを除いた残り ( $N-1$ ) 個のチャンネルはすべて閉じている。すなわち、 $t_o$  にこの ( $N_{RyR}-1$ ) 個のチャンネルが閉じている確率を乗じて  $t_o'$  を計算で求めることができれば、couplon の  $k_{roc}$  を  $t_o$  から決定することができる。ここでは、この閉じている確率を  $pC^{(N_{RyR}-1)l}$  で近似する。ここで  $pC$  は単一 RyR の定常状態における閉口状態確率で、 $l$  は補正項である。

$$pC = \frac{k_{oc}}{k_{co} + k_{oc}} \quad (13)$$

式 (12) と (13) より、開口イベント持続時間の分布密度  $f(t_o')$  は、

$$f(t_o') \approx N_e \cdot e^{-k_{oc} \cdot t_o'} \cdot pC^{(N_{RyR}-1)l} = N_e \cdot e^{-k_{roc} \cdot t_o'} \quad (14)$$

すなわち、couplon の閉口遷移速度  $k_{roc}$  は RyR の  $k_{oc}$  を用いて次の式で求めることができる。

$$k_{roc} = k_{oc} \cdot pC^{(N_{RyR}-1)l} \quad (15)$$

そして、シミュレーション結果から補正項  $l$  の値を実験的に求める。まず、stochastic simulation で求めた couplon の  $t_o$  の開始時点点を 0ms として、5000 個の  $t_o$  の合計 (アンサンブル平均) を求めた。図 6A 外側の線に示すように、正規化した  $t_o$  イベントのアンサンブル平均の減衰は単一指数関数 (式 (14)) に従っている。このアンサンブル平均をいろいろな  $[Ca^{2+}]$  で求め、それぞれの  $[Ca^{2+}]$  を横軸に、得られた閉口速度  $k_{roc}$  を縦軸にとってプロットしたものが図 6B の LC モデルの点である。連続曲線は式 (15) の  $l$  を調整して求めたもので、 $l$  の値が  $\sim 0.74$  の時に stochastic simulation データ (●印) とよく一致した。

細胞内  $[Ca^{2+}]$  は  $50\mu M$  とした。外側の線は確率密度関数  $P(t) = e^{-\frac{t}{\tau}}$  を最小二乗法でフィットしたものである。この  $\tau$  の逆数として  $k_{roc}$  を推定す

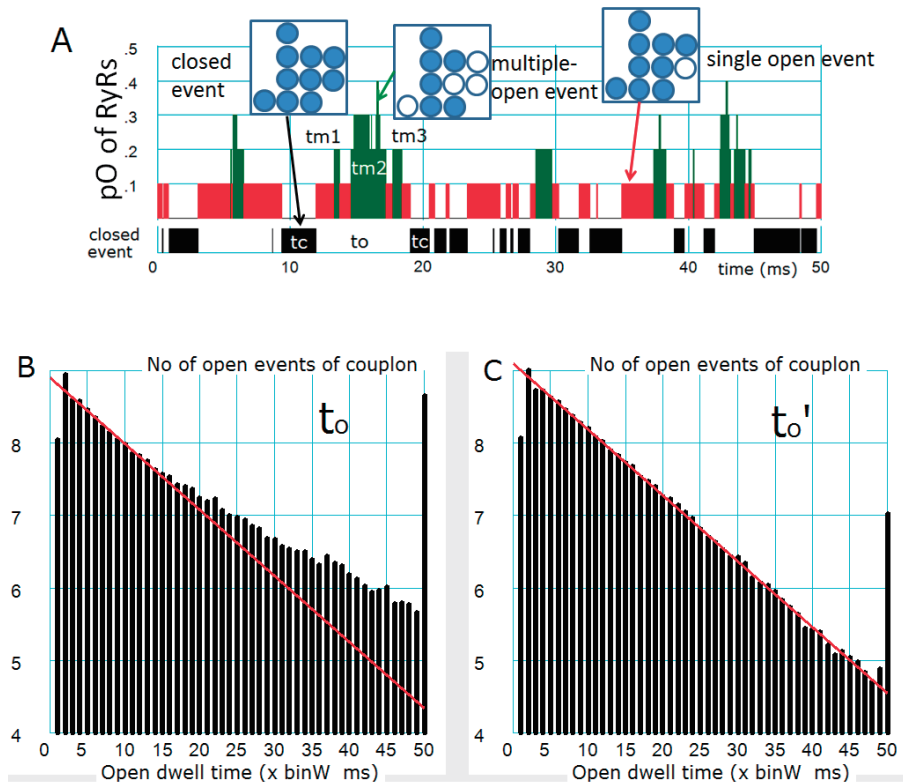


図5.  $k_{oc}$  と  $\beta$  の関係 (プログラム [coincidenceRyR150501] の実行結果)

A: LC model の RyR の開閉速度定数を用いて1つの couplon に含まれる 10 個の RyR それぞれの開閉遷移を確率的に計算したときの、50 ms のサンプル記録。縦軸は RyR の開口確率で横軸は記録時間である。  $t_c$ : 閉口イベントの持続時間,  $t_m$ : 重複開口イベントの持続時間,  $t_o$ : 開口イベントの持続時間を図中に示す。  $[Ca^{2+}]$  は  $50 \mu M$ 。 B, C: A に示すシミュレーションを 20 万回行った結果として得られた開口時間  $t_o$  のヒストグラム (B) と補正した開口時間  $t_o'$  のヒストグラム (C)。

ることができる。内側の線は、対照として同じ確率密度関数に  $\tau=1/k_{oc}$  を代入して重ね描きしたものである。 B は、LC モデルと HuVEC モデルで用いられている RyR モデルから A のアンサンブル平均を用いる手法で求めた  $k_{roc}$  を様々な  $[Ca^{2+}]$  で求め、●で示した。この●印にうまくフィットする曲線を探索することで、補正項  $l$  の値を求めた。

式 (14) の汎用性を確認するために、 $N_{RyR}$  の値を 1~20 の範囲で変えて同様の解析を行ったが、測定された  $f(t_o)$  の  $[Ca^{2+}]$  依存性は、LC モデルと HuVEC モデルのいずれの RyR モデルを用いても、良くフィッティングできた。また、HuVEC

モデルの RyR モデルを使って、図 6B に示す  $f(t_o)$  の  $[Ca^{2+}]$  依存性を確認しても、式 (15) を用いて重ね描きした理論曲線は simulation データ (●印) とよく一致した。ちなみに LC モデルで見られる低  $[Ca^{2+}]$  領域での  $\beta$  の上昇は、 $k_{oc}$  自身の  $[Ca^{2+}]$  依存性による。以上のように、RyR の閉口状態遷移速度  $k_{oc}$  から couplon モデルの脱活性化遷移速度  $k_{roc}$  を決定する実験式 (式 (15)) を得ることができたので、HuVEC モデルの couplon の脱活性化状態遷移は式 (15) を使って計算する。

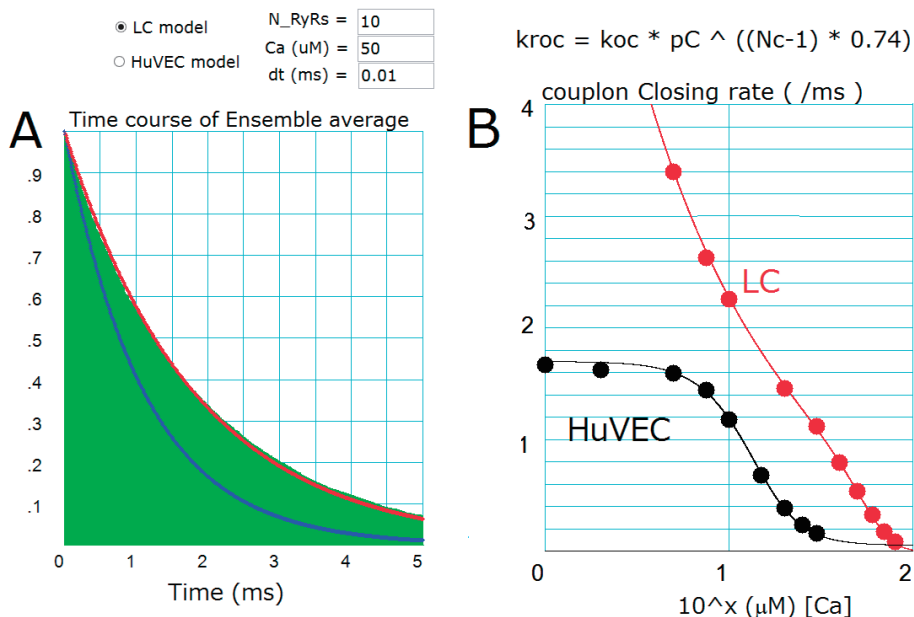


図6. couplonの脱活性化速度  $k_{roc}$  の決定に用いたプログラム [coincidenceRyR150508] の実行結果  
 AはLCモデルのRyRで構成したcouplon ( $N_{RyR}=10$ )の $t_0$ のアンサンブル平均を示す.

#### 4. HuVECモデルにおける couplonの振る舞い

最後に、上記のような過程を経て構築された couplon モデルが、細胞モデル (HuVEC モデル) の中に配置されるとどのような振る舞いを見せるのかを確認する。図7に示すのは、これまでの第1~3回の解説で見てきた HuVEC モデルで、couplonの活性化・脱活性化に関わる部分を抜き出してプロットさせる Form の実行画面である。

パネル A を見ると、左上に書かれた on と off の間の時間 ( $t=50\sim 53\text{ms}$ ) に  $-12\text{pA/pF}$  の刺激電流が与えられ、活動電位が発生していることがわかる。刺激からほんの  $20\text{ms}$  の間の時間経過を大きく拡大して表示してある理由は、Eのパネルに示すように couplonの活性化 ( $pO_{\text{couplon}}$ ) の時間経過が非常に速いからである。持続時間で言うと、ほんの  $10\text{ms}$  程度の非常に速い現象であることがわかる。この速い時間経過を生み出すのは、パネル D に示す couplonの活性化・脱活性化速度の時間変化である。パネル C に、そのタイミングでの  $[\text{Ca}^{2+}]_{nd}$  が示されている。LCC と couplon の

両方が閉じている  $\text{Ca}_{a0}$ 、これは瞬時平衡で  $[\text{Ca}^{2+}]_{jnc}$  と一致する値であるが、この値が、CaSR から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  が蓄積することで徐々に増加しているのがわかる。この  $[\text{Ca}^{2+}]_{jnc}$  の上昇は、式 (1) で示したようにすべての  $[\text{Ca}^{2+}]_{nd}$  を底上げする形で効いてきて、couplonの活性化を正帰還反応連鎖で促進するため、この  $[\text{Ca}^{2+}]_{jnc}$  の上昇と同期するようにパネル D の活性化速度が上昇し、同時に脱活性化速度が低下することで  $pO_{\text{couplon}}$  の速やかな活性化が実現している。一方の couplon の非常に速い脱活性化のプロセスは、Bのパネルに示す、SR内の  $\text{Ca}^{2+}$  を放出可能なスペース ( $j\text{SR}$ , モデル内ではSR放出サイト,  $\text{SR}_i$ ) 内の  $[\text{Ca}^{2+}]$  で説明される。つまり、パネル B の  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}_i}$  を見ると、パネル E に示す couplonの活性化と同時に低下しはじめ、 $k_{roc}$  がピークに達する  $61\text{ms}$  の辺りで一気に低下し、数  $\text{ms}$  のうちに  $0.1\text{mM}$  以下の非常に低い濃度まで低下、つまり枯渇していることがわかる。このパネル B の  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}_i}$  の低下に伴い、couplonが開いているときの  $\text{Ca}_{\text{LR}}$  と  $\text{Ca}_{\text{OR}}$  の

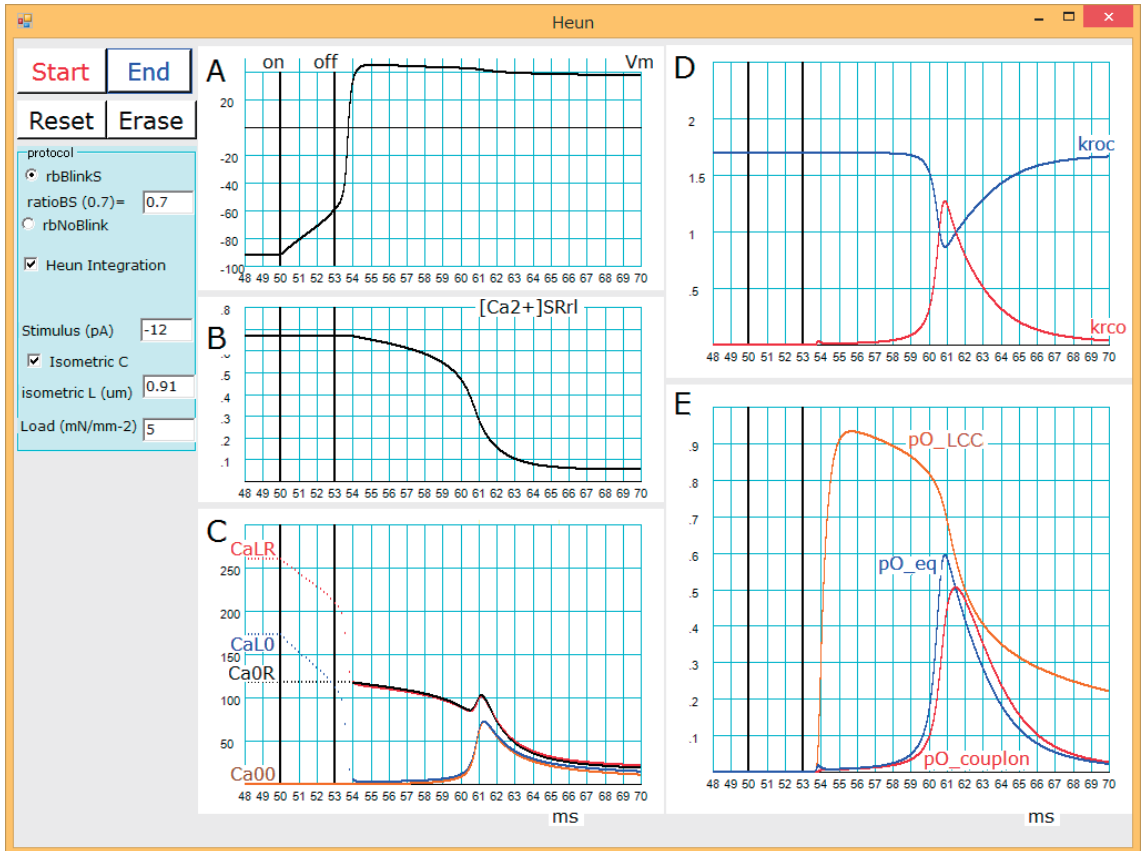


図7. HuVECモデルのcouplonの振る舞い（プログラム [HuVECmodelIII\_180208] の [Form\_RyRtransient.vb] の実行結果）A：膜電位，B： $[Ca^{2+}]_{SRrI}$ ，C： $[Ca^{2+}]_{nd}$ ，D：活性化速度 ( $k_{rcO}$ ) と脱活性化速度 ( $k_{roc}$ )，E：LCCの開口確率 ( $pO_{LCC}$ ) と couplonの開口確率 ( $pO_{couplon}$ ) とその瞬時平衡点 ( $pO_{eq}$ )

値が徐々に低下し、活性化のときとは逆向きの  $[Ca^{2+}]_{nc}$  を介した負帰還反応連鎖により、速やかに couplon の脱活性化が進行する。

以上に述べたように、HuVECモデルにおける CICR のモデル化は、couplon の速度決定の際に stochastic attrition 説に基づく脱活性化時間経過にフィッティングした実験式を取り入れ、またその couplon が細胞モデル内に組み込まれたときに SR depletion 説を満足するよう調整された。結果として、両方のメカニズムに基づく CICR の終息を実現するモデルが遂に完成した。しかし、RyR の不活性化による CICR の終息メカニズムの可能性は、完全に否定できるものではない。実際に上原らは、単一 RyR レベルでも細胞内  $[Ca^{2+}]$  が高

濃度 (100mM,  $pCa_6$  以上) になると明らかな不活性化所見が見られたと報告している<sup>8)</sup>。また、RyR2 チャンネル分子のポドメイン付近に存在し、ゲーティングへの関与が示唆される K4750Q の点変異により、その不活性化が消失したという実験データも示されている (図 8A)。

我々の HuVEC モデルを用いて行った今回のシミュレーションでは、最も高濃度の細胞内  $[Ca^{2+}]$  は、活動電位発生直後の CaOR あるいは CaLR の値で、 $120\mu M$  程度である (図 7C)。従って、上原らが実験的に示した不活性化のプロセスが現在 HuVEC モデルに用いられている couplon の状態遷移状態にそのまま組み込まれた (図 8C) としても、CICR の終息過程にはほとんど寄与し得ない

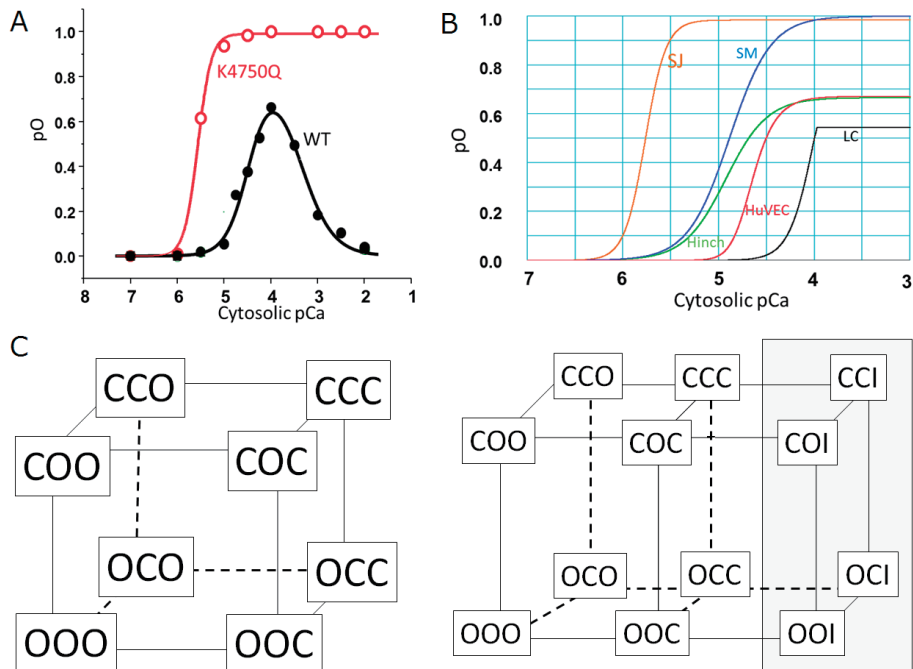


図8. RyRの開口確率の細胞内  $[Ca^{2+}]$  依存性と不活性化

上原ら [8] による実験 (A) と、5 種類の RyR モデルで計算 (B) して求められた RyR の開口確率の細胞内  $[Ca^{2+}]$  依存性. C は今回シリーズで紹介している HuVEC モデル (HuVECIII モデル) で用いられている CaRU モデル (左) と、Hinch モデル [5, 6] や HuVECI モデル [14] の couplon の不活性化 (塗りつぶした四角の部分) を組み込んだ場合の CaRU モデル (右) を比較してある.  $[XXX]$  中の文字 X は左から右へ順に LCC の  $V_m$  依存性ゲート, LCC の  $Ca^{2+}$  依存性ゲート, couplon ゲートの開閉状態を O か C で, couplon ゲートの不活性化状態を I で表している.

ということがわかる. また, 不活性化を組み込んだモデルを用いて著しく速い CICR の時間経過を再現するためには, couplon の不活性化速度を非常に速い値に設定しなければならないことが, すでに Hinch モデル<sup>5)6)</sup>や Hinch モデルをほぼそのまま組み込んだ初代 HuVEC モデル (HuVECI)<sup>14)</sup>で示されている. しかし, 未知の要素が多数含まれる実際の細胞の生理的な状態で, 局所的な  $[Ca^{2+}]$  がこれ以上に高くなる可能性や, 生体内で couplon の活性が温度や周囲の環境に影響を受けて変化する可能性を否定することはできない. 単一 RyR チャンネルレベルの信頼できる基礎データを, 細胞モデルの中にしっかりと位置づけられることができれば, モデル精度は一段と向上する. 今後

も引き続き CICR モデルの更なる精緻化に取り組んでいきたい.

#### おわりに

今回のテーマ CICR のモデル化は, シミュレーション結果にフィッティングすることで理論式を構築するという新しい手法を用いた. これまで生体機能モデルを構築する場合に, 参照するのはいつも wet な生理学実験によって得られた計測データであった. しかし, 今回は wet 実験データの代わりに, 原理的なモデルを用いて確率的シミュレーションを行った結果を用いた. 具体的には, Laver らによるシミュレーション実験の結果に couplon の開閉の時間経過が合致するかどうか,

また我々の複数のRyRを想定したcouplonモデルの確率論的シミュレーション実験結果にうまくフィッティングできる理論式はどのようなものか、という視点からモデル式が構築された。今回のモデル化は、プログラムの中で、すべて手動でパラメータを動かし、その都度パソコンのモニター画面で実行結果を確認しながら試行錯誤を繰り返して値を決定したが、現在このプロセスの自動化が世の中で急速に進みつつある。特にこの研究領域は機械学習や人工知能との親和性も高く、将来的には限られた実験データを網羅的に補間するようなシステムが遅かれ早かれ構築されると予想される。しかし、その場合でもベースとなるのはあくまで信頼できるwetの生理学実験による計測データであり、実体とは結びつかないデータ（情報）が独り歩きするようなことは決してあってはならない。殊に、医学と情報学、ヒトと情報を媒介する数値を提供する学問とも言える生理学において、つぶさに生体あるいは単離された機能単位の振る舞いを観察し、直観的な理解を深めるwetの実験プロセスを軽視してはならない。これは、シミュレーションを行う立場からの痛切な実感である。次回e-Heart解説シリーズ第5回は最終回となり、細胞の刺激頻度依存性のメカニズムについてHuVECモデルを用いてわかりやすく解説する予定である。ぜひ最後まで、お付き合いいただけることを期待したい。

## 文 献

- Himeno Y, Asakura K, Cha CY, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A: A human ventricular myocyte model with a refined representation of excitation-contraction coupling. *Biophys J* **109**: 415-427, 2015
- Laver DR, Kong CH, Imtiaz MS, Cannell MB: Termination of calcium induced calcium release by induction decay: an emergent property of stochastic channel gating and molecular scale architecture. *J Mol Cell Cardiol* **54**: 98-100, 2013
- Sobie EA, Dilly KW, dos Santos Cruz J, Lederer WJ, Jafri MS: Termination of 35 cardiac Ca (2+) sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release. *Biophys J* **83**: 59-78, 2002
- Stern MD, Ríos E, Maltsev VA: Life and death of a cardiac calcium spark. *J Gen Physiol* **142**: 257-274, 2013
- Hinch R: A mathematical analysis of the generation and termination of calcium sparks. *Biophys J* **86**: 1293-1307, 2004
- Hinch R, Greenstein JL, Tanskanen AJ, Xu L, Winslow RL: A simplified local control model of calcium-induced calcium release in cardiac ventricular myocytes. *Biophys J* **87**: 3723-3736, 2004
- Acsai K, Antoons G, Livshitz L, Rudy Y, Sipido KR: Microdomain [Ca<sup>2+</sup>] near ryanodine receptors as reported by L-type Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange currents. *J Physiol* **589** (Pt 10): 2569-2583, 2011
- Uehara A, Murayama T, Yasukochi M, Fill M, Horie M, Okamoto T, Matsuura Y, Uehara K, Fujimoto T, Sakurai T, Kurebayashi N: Extensive Ca<sup>2+</sup> leak through K4750Q cardiac ryanodine receptors caused by cytosolic and luminal Ca<sup>2+</sup> hypersensitivity. *J Gen Physiol* **149**: 199-218, 2017
- Qin J, Valle G, Nani A, Chen H, Ramos-Franco J, Nori A, Volpe P, Fill M: Ryanodine receptor luminal Ca<sup>2+</sup> regulation: swapping calsequestrin and channel isoforms. *Biophys J* **97**: 1961-1970, 2009
- Guo T, Gillespie D, Fill M: Ryanodine receptor current amplitude controls Ca<sup>2+</sup> sparks in cardiac muscle. *Circ Res* **111**: 28-36, 2012
- Fabiato A: Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* **85**: 247-289, 1985
- Stern MD: Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* **63**: 497-517, 1992
- Sato D, Bers DM: How does stochastic ryanodine receptor-mediated Ca leak fail to initiate a Ca spark? *Biophys J* **101**: 2370-2379, 2011
- Asakura K, Cha CY, Yamaoka H, Horikawa Y, Memida H, Powell T, Amano A, Noma A: EAD and DAD mechanisms analyzed by developing a new human ventricular cell model. *Prog Biophys Mol Biol* **116**: 11-24, 2014