

心筋のトロポミオシン アイソフォームは筋原繊維 形成に不可欠である

豊田直二, 藤塚千秋, 石橋剛士

はじめに—トロポミオシンとは—

横紋筋の規則正しい横紋構造 (A帯, I帯, Z線など) の形成についてまだ十分に解明されたとはいえない。代表研究者は前回, 心筋のトロポミオシンを抑制させたところ異常な筋原線維を観察し, 筋原線維におけるトロポミオシンの重要性について報告した (豊田 *et al.*, 2007)。しかし心筋にはもう一つ別のトロポミオシンが存在することが報告されている (Wang *et al.*, 2008)。今回はこのトロポミオシンの発現を抑制させ, その働きを観察した。実験に入る前に, まず一般的なトロポミオシンの機能について説明し, 次に心筋でのトロポミオシン遺伝子はどのように発現するかを説明したい。

蛋白質レベル

トロポミオシン (以下TM) はBaileyにより横紋筋から単離された棒状蛋白質である (Bailey, 1948)。一般にTMは広く動植物界に存在し, アクチンに結合して細胞運動と筋収縮の制御に重要な働きをしている (Ohtsuki *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1999; Perry, 2001)。またTMは心筋, 骨格筋, 平滑筋, 脳等ほとんどの筋および非筋細胞にも存在する。

このように様々な種と組織に存在するTMは良く似たアミノ酸組成を持ながら, 分子量は異なっている。横紋筋では2種類のTMがあり, 小さい方を α -TM, 大きな方を β -TMと呼ぶ。 α -TM, β -TMのような分子を分子種 (ア

イソフォーム) という。

心筋は α -TMの1種類のみで β -TMはない。

α -TMと β -TMは互いの分子の頭部と尾部の先端で接触して長い分子となり、その状態でアクチン繊維 (F-actin) の二重鎖の長軸方向の溝に沿って絡む様に存在する。横紋筋ではトロポニン複合体とも結合し、 Ca^{2+} 存在下で筋の収縮の制御に重要な働きをする (Ebashi *et al.*, 1961; Ohtsuki *et al.*, 1986; Endoh, 2008)。Fig. 1 は TM, アクチンおよびトロポニン分子の位置関係を示している。上述したように心筋に存在するのは α -TMだけなので、これから調べる TM はすべて α -TMである (Perry, 2001)。以上蛋白質レベルの話である。

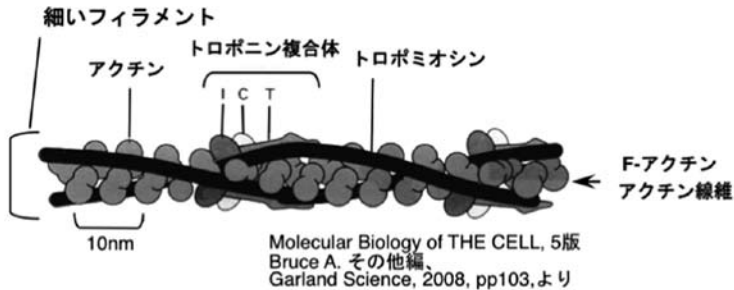


Fig. 1. 筋原線維の細いフィラメントの分子構成

F-actinの溝に沿ってトロポミオシンが存在する。心筋の場合は α -TMのみが存在し、 β -TMはない。

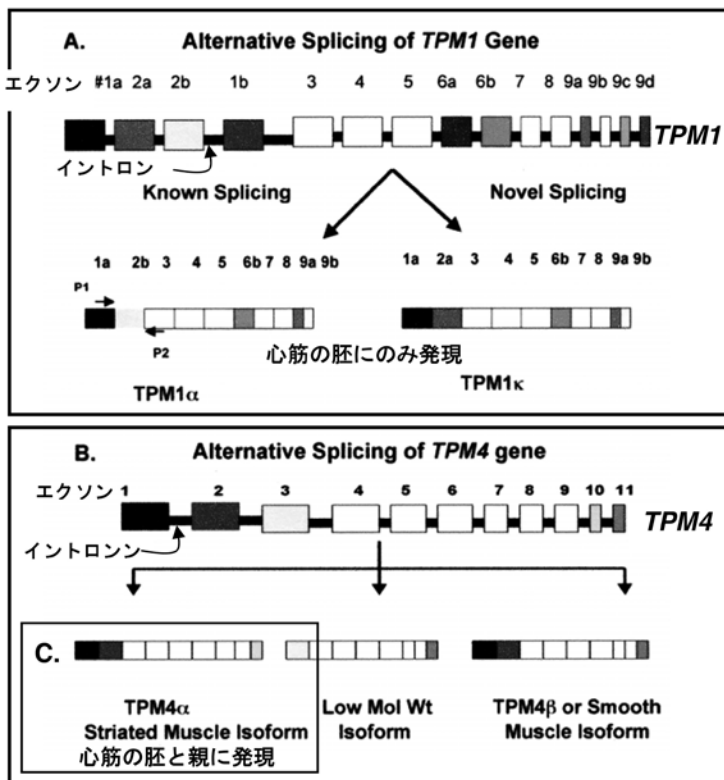
遺伝子レベル

心臓の α -TMはTPM1とTPM4遺伝子から3つのRNAアイソフォームができることが報告されている (Wang *et al.*, 2008)。TPM1からはTPM1 α とTPM1 κ が出来る (Fig. 2A)。これらのTPM1 α とTPM1 κ は心臓の胚期のみ現れ発達に伴って減少し、親には発現しない (Wang *et al.*, 2008)。

これとは別の遺伝子TPM4からはTPM4 α その他ができる (Fig. 2B)。

TPM4 α は心臓の胚期と親に継続的に発現する (Fig. 2C)。今回調べるのはこのTPM4 α である。

このように複数の遺伝子から多数の蛋白質アイソフォームが作られることをオルターネイティブ スプライシング (alternative splicing) という (Fig. 2)。すなわち TPM1も TPM4も 3, 6b など, 記号の付いた長方形が横線で連結されて



この図はWang *et al.*, 2008を改変したものである。

Fig. 2. 心臓のトロポミオシン遺伝子TPM1とTPM4

- A. TPM1からはTPM1 α とTPM1 κ ができる。これらは心臓の胚期にのみ発現する。
- B. TPM4からはTPM4 α その他ができる。
- C. TPM4 α は心臓の胚期と親に継続的に発現する。今回調べるものである。

いる。長方形部分はアミノ酸をコードしている部分 (エクソン) を示し、横線はアミノ酸をコードしていない部分 (イントロン) を示している。TPM4遺伝子 (B) の場合、TPM4 α はエクソンの1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10が集合し、3と11は省かれる。集合の過程でイントロンも取り除かれる。結果としてアミノ酸をコードした部分だけが組み継がれる。ほかの組み継がれ方をしたものは別のTMとなる。

研究の目的

以前の研究でTPM1 α とTPM1 κ (Fig. 2A) の両方を抑制させたところ心筋細胞の形、筋原線維の状態に大きな変化が現れ、両TMは心臓細胞に重要な働きをしていることが分かった (豊田 *et al.*, 2007)。今回調べるTPM4 α (Fig. 2B) は前回と遺伝子も全く別なTPM4 α である。心臓の胚期から親に継続的に発現するのでさらに重要な働きをしていることが予想される。当研究はニワトリの培養心筋細胞を使用し、RNAi法によりTPM4 α を抑制させた。抑制後の筋原線維を蛍光抗体法により調べ、TPM4 α はどのような役割をしているかを調べた。

RNAiについては毎回説明することにしてはいる。抑制させたい標的蛋白質と相同なmRNAの二重鎖RNA (siRNA) を培養細胞や微小動物 (線虫) などに導入したときに、そのmRNAの分解が起こり、標的蛋白質の発現が抑制される現象である (Fire *et al.*, 1998)。

RNAiの長所は標的蛋白質の抑制であり、決して完全な欠失ではない点である。少しは蛋白質が発現するので、心臓のように生命の維持に重大な影響を与える蛋白質の場合でも研究ができる。TMは完全に欠失させた場合には実験動物が致死で生まれるか、胎児が発達しないことが報告されていて、その後の研究に支障がでている (Blanchard *et al.*, 1997; Rethinasamy *et al.*, 1998)。短所は標的蛋白質に関してmRNAの塩基配列が公表されていないと研究ができない点である。

材料と方法

使用した抗体

Anti-CTnT；CTnTに反応するポリクロナール抗体（Toyota and Shimada, 1981 and 1983）。

Anti-CTM；ニワトリの心臓よりBailey（1948）の方法で精製したTMをウサギに免役し作成した抗体。A帯を染色する。モノクロナール抗体との二重染色に使用。

CH1；TMに対するモノクローナル抗体。Immunoblottingに使用。A帯染を色する。

HV11；心室のミオシン重鎖に反応するモノクロナール抗体，A帯を染色する。

EA-53；筋節の α -アクチニンに反応するモノクロナール抗体，Z線を染色する。

HV11, CH1と9D10はThe Developmental studies Hybridoma Bank at the University of Iowaから購入。EA-53はSigma Aldrich Japanより購入した。

心筋の培養

心筋の細胞は7－8日のニワトリ胚よりDeHaan（1970）の方法で，豊田（2004）のように培養した。すなわち心臓を，0.05%のトリプシン処理し，818B培養液で培養した。蛍光抗体および電子顕微鏡による観察には直径35mm培養皿に 1.5×10^5 の濃度で培養した。Immunoblotting用には90mmの培養皿に 1.5×10^6 の濃度で培養した。

siRNAの導入およびimmunoblottingによるTM発現抑制の検定

ニワトリ心筋のTPM4 α のcDNAから塩基配列をえらび次の2種類のsiRNAを合成した。

CTPM4-4；aagauucuuucugacaagcuc

CTPM4-5；aagcugaaguacaaagcaauc

(QIAGEN, Tokyo, Japan, 104-0054)

培養 1 日後に500pmolのCTPM4-4およびCTPM4-5を導入した。これらの siRNA は Oligofectamine (Invitrogen life Technologies Carisbad, CA 92008) と OptiMEM に混合し、以前と同様に導入した (豊田 *et al.*, 2004)。比較のため無処理の心筋細胞、Oligofectamine のみを加え siRNA を導入しない細胞についても発現を調べた。導入後 1 – 5 日後に SDS サンプル処理を行い、その 15 μ l を 10% ポリアクリルアミドゲルにのせ、電気泳動を行った。Immunoblot による観察は以前記述したとおりに行った (Toyota *et al.*, 1998)。すなわちゲルに展開された蛋白質をニトロセルロースへ転写後、TM 抗体 (CH1) による反応を行い、アビジンビオチン-HRP (VECTASTAIN) を使用して可視化した。

蛍光抗体法による TM 発現抑制の検定および筋原線維の観察

培養 1 日後、500pmol の CTPM4-4 および CTPM4-5 を心筋細胞に導入した。おもに siRNA 導入 3 – 4 日後の細胞を蛍光抗体法の二重染色を行った。二重染色は以前記述した方法で行った (Toyota *et al.*, 1998)。培養皿の細胞は 4°C のエタノールにより 20–40 秒固定し、1 回目の一次抗体と反応させた。

1 回目の 1 次抗体は CH1 ほか 3 種類のモノクローナル抗体 (HV11, EA-53, 9D10) を反応させ、二次抗体として赤色蛍光色素 (TMR) を結合させた抗マウス IgG 抗体を使用した。

さらに 2 回目の一次抗体はポリクローナル抗体 anti-CTnT 反応させ、2 次抗体として緑色蛍光色素 (FITC) を結合させた抗ウサギ IgG 抗体を使用した。

各抗体は約 45 分間反応させ、反応後は PBS で 3 回洗浄した。これらの標本は落射型蛍光顕微鏡、対物レンズ 100 倍を使用し観察した。

結果

Immunoblotting 法による発現抑制の検定

まずデザインした siRNA が TPM4 α を抑制するかについて調べた。CTPM4-4 および CTPM4-5 をニワトリの培養心筋細胞に導入した。Fig. 3 は CTPM4-4 を導

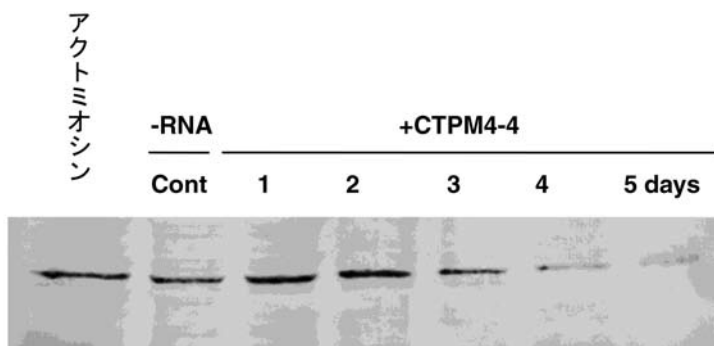


Fig. 3. immunoblotting法によるTPM4 α 発現抑制の検定。

培養心筋細胞にCTPM4-4を導入し、日ごとにサンプルを採取し、CH1 (TMに対するモノクローナル抗体) を反応させた。導入後、3 - 4日めでTPM4 α が抑制されている。

入したときの抑制状況について示している。導入後徐々に発現が抑制され、3 - 4日後が顕著に抑制されていることを示している。なおここには挙げていないがCTPM4-5も結果は同様であった。

蛍光抗体法による形態的観察

siRNA 導入後 2 - 4 日の細胞を蛍光抗体法により染色した。初めにCTPM4-4を導入後2日の心筋細胞をトロポミオシン抗体によりどの程度抑制されているかを観察した (Fig. 4a)。CTnT抗体による染色はCTnTの存在と、さらにF-アクチンの存在を示している。

横紋のある筋原線維 (以下筋原線維) と横紋のない発達途上の筋原線維 (以下発達途上の筋原線維) が見えた。CTnT抗体で調べると両線維は強く染色され、(Fig. 4b) さらに発達途上の筋原線維から分岐し、CTnT抗体で強く染まる構造が見えた (Fig. 4a-c, 白い矢印)。トロポミオシン抗体は抑制される傾向にあり、CTnT抗体のほうが微細構造を詳しく観察できたので、以下の観察ではCTnT抗体を使用した。

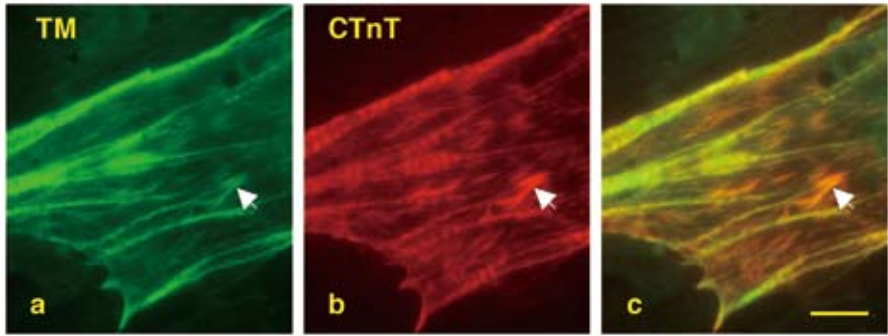


Fig. 4. CTPM4-4導入2日後の心筋細胞

トロポミオシン抗体 (a, CH1) およびトロポニン抗体 (b) による蛍光抗体染色。a と b の統合画像 (c)。やじりは異常な分岐構造を示す。バーは10 μ m

以下の観察では α -アクチニン抗体, ミオシン抗体とCTnT抗体による二重染色を行った。

2日には細胞上部には筋原線維が形成され, 細胞下部には発達途上の筋原線維もみられた (Fig. 5a-c)。 α -アクチニンは両筋原線維に見られた (Fig. 5a)。CTnTは筋原線維よりさらに広い部分にも見え, 発達途上の線維に挟まれた部分にも存在していた (Fig. 5b, c, ミドリ線で囲まれた部分)。

ミオシンも筋原線維と発達途上の筋原線維の両線維に存在していた (Fig. 5d)。CTnTも両筋原線維に見えた (Fig. 5e)。さらにCTnTは筋原線維に挟まれた領域 (Fig. 5f, シロ線で取り囲まれた部分) および発達途上の筋原線維で挟まれた部分に存在した (Fig. 5f, ミドリで取り囲まれた部分)。

CTnTは発達途上の筋原線維で挟まれた部分のみにある場合と (Fig. 5c, f, ミドリで取り囲まれた部分), 筋原線維に挟まれた部分 (Fig. 5f, シロ線で囲まれた部分) 場合があった。

Fig. 6aでは2-4個の横紋構造および全く横紋の無い線維が連続的に見えている。これらは発達途上の筋原線維であり, α -アクチニン (緑) とCTnT (赤)

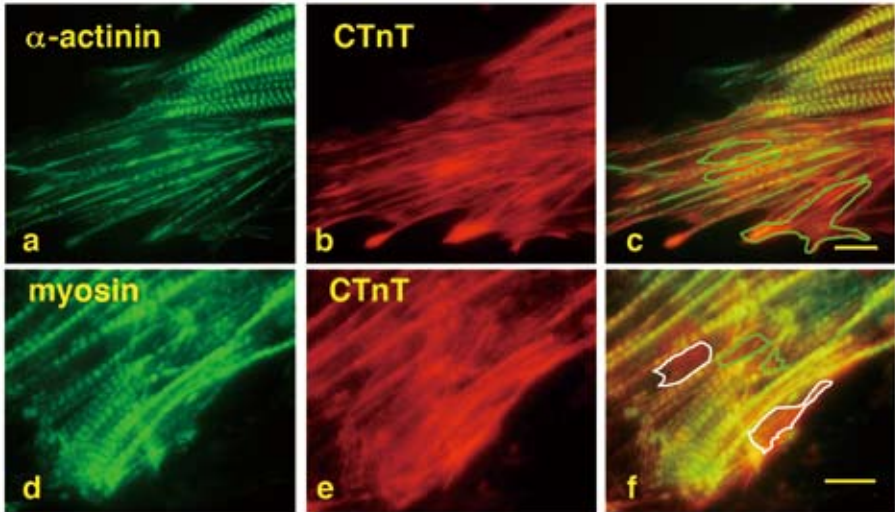


Fig. 5. CTPM4-4導入2日後の心筋細胞

α -アクチニン抗体 (EA-53) では横紋のある筋原線維横とまだ横紋になっていない発達途上の両繊維が染まっている (a)。Anti-CTnT抗体による染色 (b)。aとbを重ねた画像 (c)。ミオシン抗体も筋原線維と発達途上の繊維が染まっている (d)。Anti-CTnT抗体による染色 (e)。dとeを重ねた画像 (f)。ミドリ線で囲まれた部分は発達途上の筋原線維に挟まれた領域を示している。シロ線でかこまれた部分は筋原線維に挟まれた領域を示している。バーは $10\mu\text{m}$

が見えている (Fig. 6a)。

α -アクチニンの無い部分から分岐したCTnT構造物がある (Fig. 6a, 白矢印)。Fig. 6bは拡大を上げた筋原線維である。TM (緑) の先端が少しくびれ、そこからCTnT構造物が分岐していることが分かる (Fig. 6b)。これらの分岐構造物のサイズは $3-20\mu\text{m}$ もあり巨大であることも分かる。導入2日では68%の細胞にこのような異常が現れた。

CTPM4-4導入後3日では規則的な横紋構造のある筋原線維はほとんど見られなかった。さらに α -アクチニン (Fig. 7a), とCTnT (Fig. 7b) の分布は全く異なっていた。広い領域がCTnT抗体で染まった (Fig. 7b)。 α -アクチニン

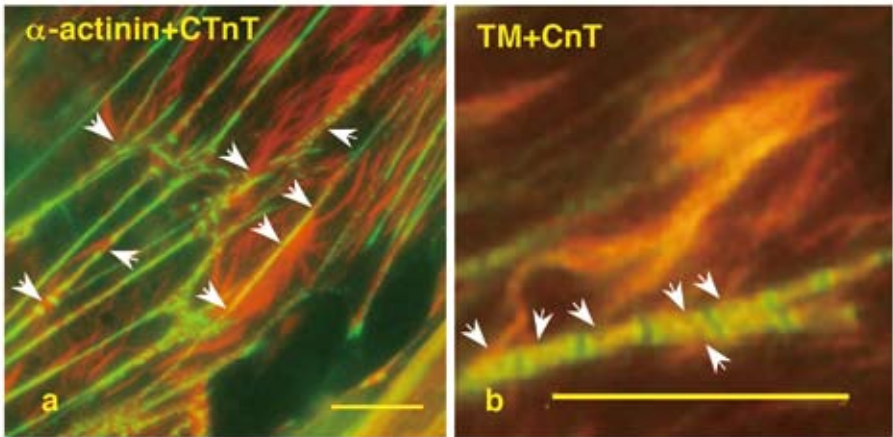


Fig. 6. 培養2日の発達途上の筋原線維および筋原線維から分岐した構造物

発達途上の筋原線維を α -アクチニン抗体 (EA-53, 緑) とAnti-CTnT抗体 (赤) により観察し、それらの像を統合した蛍光像 (a)。筋原線維をTM抗体 (CH1, 緑) とAnti-CTnT抗体 (赤) により観察し、それらの像を統合した蛍光像。矢印は構造物の分岐した点を示す。バーは10 μ m

がある領域はCTnTは見えなかった (Fig. 7c)。しかし逆にCTnTの存在する領域は α -アクチニンは見られなかった (Fig. 7c, ソラ色の線で囲まれた部分)。2日後では発達途上の線維に挟まれた部分にCTnTが存在していた (Fig. 6)、しかし3日ではあまりにも変化が大きく確認できなかった。おそらくソラ色の線に囲まれた部分はそのようなところではないかと思われる。さらに α -アクチニンはZ線の主成分なので通常F-アクチン上に存在するものであるが、正確には確認できなかった。しかしソラ色の線に囲まれた部分にCTnTと α -アクチニンが共存している線維があると思われる。

Fig. 7dの右下にやや規則性のくずれた横紋構造が見え、そこにミオシンもみえる (Fig. 7d)。ミオシンのある領域ではCTnTは見えなかった (Fig. 7d, f, キ色線で囲まれた部分)。ミオシンもCTnTも見えない領域もあった (Fig. 7d, f,

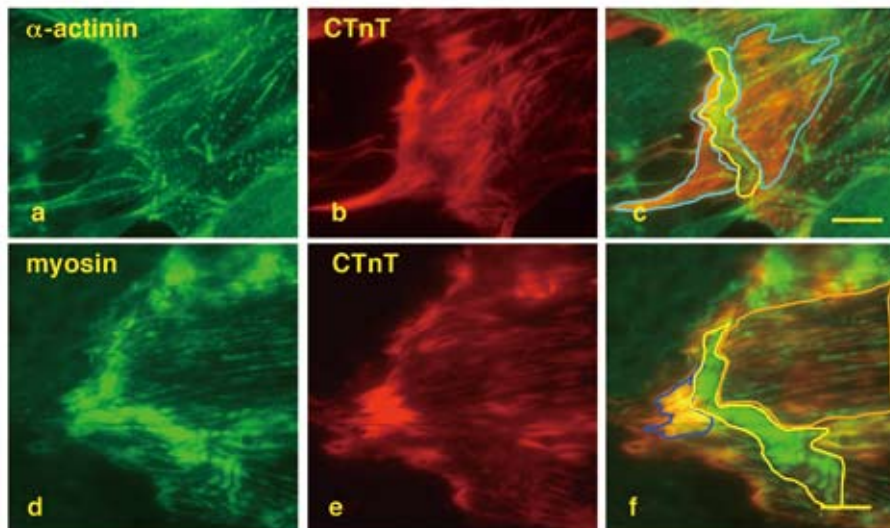


Fig. 7. CTPM4-4導入3日後の心筋細胞

発達途上の筋原線維の変化が大きかった。どの細胞にも発達した筋原線維はほとんど見られなかった。 α -アクチニン抗体 (a) およびAnti-CTnT抗体 (b) を使用した蛍光抗体染色像。a と b を結合させた画像 (c)。ミオシン抗体 (d) およびAnti-CTnT抗体 (e) の染色。d と e を結合させた画像 (f)。キ色線で囲まれた領域は α -アクチニン抗体およびミオシン抗体で染まりCTnT抗体で染まらなかった領域。ソラ色の線で囲まれた領域はCTnT抗体で良好に染まり、 α -アクチニン抗体では染まらない領域。しかし発達途上の筋原線維が α -アクチニン抗体で染まっている。ダイダイ色の線で囲まれた領域はミオシン抗体およびAnti-CTnT抗体で染まりの悪い領域。コン色の線で囲まれた領域はミオシン抗体とAnti-CTnT抗体の両方で染まった領域。バーは10 μ m

ダイダイ色の線で囲まれた部分)。さらに両抗体で良く染色された部分があった (Fig. 7d-f, コン色線で囲まれた部分)。TPM4 α は細いフィラメントの成分であるが、抑制すると太いフィラメントにも異常が現れた。導入3日では約77%の細胞にこのような異常が現れた。

Fig. 8はCTPM4-4を導入してから4日の心筋細胞である。全体に横紋構造は全く見られなかった。発達途上の筋原繊維には α -アクチニンとCTnTの共存する繊維があった (Fig. 8a-c, 白いヤジリ)。導入4日では筋原線維が様々に変化

していた。これらの細胞では細胞の外形も変化していた (Fig. 8d-f)。

ミオシンとCTnTは細胞の内部構造が壊れていて、繊維も詳しく特定できなかった (Fig. 8g-i)。他の細胞も筋原線維構造は崩れているように見えた (Fig. 8j-l)。

培養4日では約83%の細胞にこのような異常が現れた。導入後5日からは細胞が培養皿からはがれて、蛍光抗体染色はできなかった。

考察

Immunoblotting法による検定では培養心筋細胞のTPM4 α はCTPM4-4の導入により効率よく抑制された。導入後2-4日にかけて68-83%の細胞に正常細胞に無い独特の構造が現れた。心筋は培養後、数回分裂し、その度に筋原繊維の分解と再形成を繰り返している (Ahuja *et al.*, 2004)。TPM4 α の抑制は筋原繊維の形成と維持に大きな影響を与えたことが考えられる。

導入した細胞に出現したこの独特の構造はTMとCkTnTの両方を含んでいるので細いフィラメント性の性質を持っているが、長さ3-20 μ mもあり巨大である。普通心筋の細いフィラメントは0.94-1.10 μ mである (Burgoyne *et al.*, 2008)。なんと3-20倍の大きさの構造物である。

この独特の異常構造は初めは発展途上の筋原線維の α -アクチニンの無い部分から分岐して現れ、徐々に巨大化し、やがてその筋原線維に挟まれた領域へ蓄積されるように見える。導入2日では、ごく希に横紋のある筋原線維にも出現し、I帯の一部、 α -アクチニンの少ない部分から分岐が始まり、巨大化している。さらにTPM4 α は細いフィラメントの成分であるにもかかわらず、抑制すると太いフィラメントも横紋構造から離れ、筋原線維は出来なくなった。

上に述べたように異常構造ができた細胞には規則的横紋構造が無い。もしある場合は極めて稀な場合である。TPM4 α を減少させるとどうして横紋が形成されないのかという点については次のように推測される。 α -アクチニンと細いフィラメントはZ線の主要要素である。TPM4 α を抑制すると細いフィラメントから

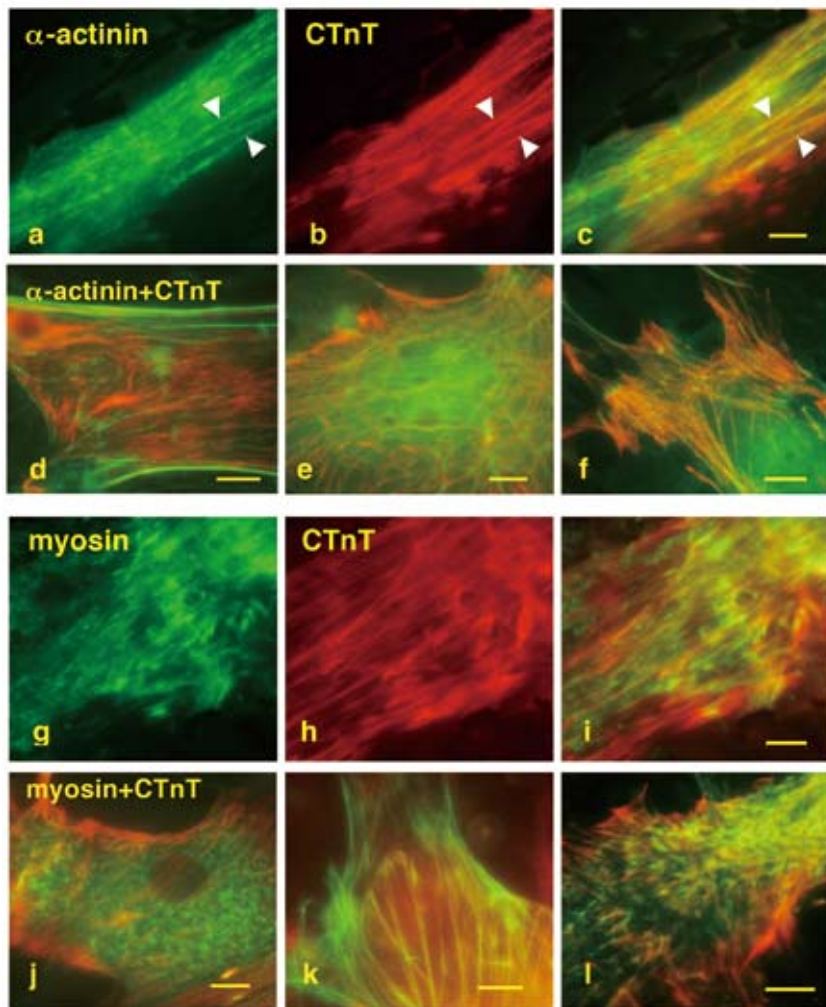


Fig. 8. CTPM4-4を導入後4日の培養心筋細胞

α -アクチニン抗体 (a) およびAnti-CTnT抗体 (b) を使用した蛍光抗体染色像。a と b を統合した画像 (c)。他の細胞について α -アクチニン抗体とAnti-CTnT抗体で染色し、さらに画像統合したもの (d - f)。ミオシン抗体 (g) およびAnti-CTnT抗体 (h) の蛍光抗体染色。g と h の統合画像 (i)。同様に同じ抗体による染色の統合画像 (j - l)。バーは10 μ m

TMが減少し、細いフィラメントが維持できなくなり固く閉じられているZ線も弛み始める。

Z線には横紋構造と筋節の維持に重要なネブリン、ネプレット、コネクチンが結合している (Hoshijima, 2006; Pyle and Solaro, 2004)。どちらも巨大な蛋白質でネブリン、ネプレットは細いフィラメントの長さに重要である (Witt *et al.*, 2006; Littlefield and Fowler, 2008; Ono, 2010; Pappas *et al.*, 2010)。コネクチンは太いフィラメントを筋節の中央に維持するのに重要な働きをしている (Hoshijima, 2006)。TPM4 α が減少すると、解離し始めたZ線からこれらの蛋白質はなれはじめ、結果として細いフィラメントも太いフィラメントも筋原繊維から離れるようになり、独特の構造物ができると思われる。これらの遊離した細いフィラメントと太いフィラメントは元の筋原繊維には戻ることができず細胞内に蓄積される。

遊離した細いフィラメントはどのようにして巨大化するのだろうか。離れた細いフィラメントどうしが層状に重なり、大きくなったのか、あるいは未知の因子が細いフィラメントを束ねている可能性もある。太いフィラメントは細いフィラメントのよう巨大化せず小さな塊で細胞内に分散している様に見えた。太いフィラメントと細いフィラメントに付属する因子が異なり、集合の大きさが異なると思われる。

心筋は常に拍動しているので筋原繊維の維持は非常に重要であり、構造的にも強く構築されているように思える。しかしTPM4 α を抑制すると筋原繊維形成に大きな影響を与えた。TPM4 α の量的バランスが重要であると思われる。このように心筋の筋原繊維の形成と維持には、きわどい量的バランスの上に成り立っていて、その量的バランスが精密に調節されていることを示している。それらにはノンコーディングRNAやマイクロRNAが重要な働きをしていると思われる。

我々は以前にトロポニンTを抑制したことがある。トロポニンTを抑制すると筋節が広がった筋原繊維がみられた。しかし今回の様な筋原繊維が大きく崩れるような現象は無かった。TPM4 α のように筋原繊維の形成と維持に大きく影響する

蛋白質とCTnTのように影響の少ない蛋白質があることが分かった。

今後はTPM4 α を抑制させた細胞のコネクチンとミオシンの関係についても調べる予定である。

参考文献

Ahuja P, Perriard E, Perriard JC, and Ehler E (2004) Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* **117**: 3295-3306.

Arimura C, Suzuki T, Yanagisawa M, Imamura M, Hamada Y, and Masaki T (1988) Primary structure of chicken skeletal muscle and fibroblast alpha-actinins deduced from cDNA sequences. *Eur. J. Biochem.* **177**:649-655.

Bailey K (1948) Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. *Biochem. J.* **43**: 271-279.

Ebashi S (1961) Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* **50**: 236-244.

Blanchard EM, Iizuka K, Christe M, Conner DA, Geisterfer-Lowrance A, Schoen FJ, Maughan DW, Seidman CE, and Seidman JG (1997) Targeted ablation of the murine alpha-tropomyosin gene. *Circ. Res.* **81**: 1005-1010.

Burgoyne T, Muhamad F, and Luther PK (2008) Visualization of cardiac muscle thin filaments and measurement of their length by electron tomography. *Cardiovasc. Res.* **77**: 707-712.

DeHaan RL (1970) The potassium-sensitivity of isolated embryonic heart cells increases with development. *Dev. Biol.* **23**: 226-240.

Endoh M (2008) Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circ. J.* **72**: 1915-1925.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Hoshijima M (2006) Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **290**: 1313-1325.

Littlefield RS, and Fowler VM (2008) Thin Filament Length Regulation in Striated Muscle Sarcomeres: Pointed-end dynamics go beyond a nebulin ruler. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**: 511-519.

丸山工作. (1976) 筋収縮の制御—筋蛋白質の役割. 現代科学選書岩波書店. pp.5-7.

Ohtsuki I, Maruyama K, and Ebashi S (1986) Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv. Protein Chem.* **38**: 1-67.

Ono S (2010) Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton* **67**: 677-692.

豊田直二, 吉信久美子, 荒木正健, (2004) RNA干渉は鶏心筋の一次培養細胞の筋蛋白質トロポニンTの発現を抑制した. 熊本学園大学論集『総合科学』11: 63-74. (査読有り)

豊田直二, 鈴木—豊田二美枝, 大室弘美, (2007) 心筋の筋蛋白質トロポミオシンの発現抑制による筋原線維形成異常. 熊本学園大学論文集『総合科学』14, 11-26. (査読有り)

Pappas CT, Krieg PA, and Gregorio CC (2010) Nebulin regulates actin filament lengths by a stabilization mechanism. *J. Cell Biol.* **189**: 859-870.

Perry SV (2001) Vertebrate tropomyosin: distribution, genetics, proteins and function. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **22**: 5-49.

Pyle WG, and Solaro RJ. (2004) At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ. Res.* **94**: 296-305.

Rethinasamy P, Muthuchamy M, Hewett T, Boivin G, Wolska BM, Evans C, Solaro RJ, and Wiczorek DF (1998) Molecular and physiological effects of alpha-tropomyosin ablation in the mouse. *Circ. Res.* **82**: 116-123.

Toyota N, Uzawa H, and Shimada Y (1998) Assembly of force-expressed troponin I

isoforms in myofibrils of cultured cardiac and fast skeletal muscle cells as studied by epitope tagging. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**: 937-947.

Toyota N, and Shimada Y (1981) Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence. *J. Cell Biol.* **91**: 497-504.

Toyota N, and Shimada Y (1983) Isoform variants of troponin in skeletal and cardiac muscle cells cultured with and without nerves. *Cell* **33**: 297-304.

Wang J, Thurston H, Essandoh E, Otoo M, Han M, Rajan A, Dube S, Zajdel RW, Sanger JM, Linask KK, Dube DK, and Sanger JW (2008) Tropomyosin expression and dynamics in developing avian embryonic muscle. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**: 379-392.

Witt CC, Burkart C, Labeit D, McNabb M, Wu Y, Granzier H, and Labeit S (2006) Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *EMBJ* **25**: 3843-3855.