

厚生省精神・神経疾患研究委託費

筋ジストロフィーの発症に関する
細胞生物学的基礎研究

小 沢 班

平成 3 年度研究報告書

平成 4 年 3 月

班 長 総 括

班長 小 沢 鎧二郎

我々の班の最終的な目的は、筋ジストロフィーの成因を明らかにし、それに対する治療を求めることである。しかし当面の目的は班の名称のように筋ジストロフィーの発症の基礎的な研究を地道に行っていくことである。成因を明らかにするには筋が如何にして筋としての性質を獲得し、それを維持しているかということ明らかにすることと、Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の時に欠失するジストロフィンについて理解を深めることを二つの研究を柱とする。

1. ジストロフィン

現在基礎研究班として最も重要なことは、ジストロフィンが何をしているかを明らかにすることである。それによってジストロフィンの欠失の筋細胞の機能への影響を考えることが可能になり、それによる治療薬の開発に希望をつなぐことになるからである。

本班ではジストロフィタンパク質の精製とその性質の研究に取り組んでおり、既に精製に成功しその内部構造の研究や、超微構造の研究を行いまたそれに結合しているタンパク質の問題に取り組んでいる。そしてそこには大きな発展があった。しかし一方ではまだ精製に問題を残しており、この問題を解決すべく努力中である。精製したジストロフィン・タンパク質やその結合糖タンパク質を研究することによって、ジストロフィン・システムの作用を探ることが可能となるであろう。

ジストロフィンは細胞膜に存在しており膜細胞骨格であると考えられているが、その存在様式についてはまだ多くの問題がある。これについての研究にも大きな進展があった。存在様式を明らかにすることによって機能を明らかにするためには、他の細胞骨格との比較や膜タンパク質との比較が重要であり、その面からの研究も進んでいる。

2. 筋細胞の形成

筋肉の形成を行う遺伝子群 myo D1 や myogenin などが知られている。この遺伝子群が病状の形成にどのようにかかわっているかはまだ知られていない。しかし、myo D1タンパク質がジストロフィンの発現にかかわっていることが強く示唆されている。

本班の研究は特にジストロフィンの研究において、今年度は大きく進展し、多くの注目すべき研究が行われた。これらのいくつかは世界中のジストロフィン研究者が引用すべく記録に残るものとなると考えられる。

一方において国外の研究もすみやかに進んでおり、用いられる雑誌も多岐に渡るので班員には何等かの形で整理された多くの情報の供給が必要である。

目 次

班長総括

小 沢 鏝二郎

I ジストロフィン

1. ジストロフィンの分子形態 3
丸 山 工 作
2. デタージェント非存在下におけるブタ骨格筋ジストロフィン
の抽出とその不均一性 8
桑 山 秀 人
3. ラットジストロフィンの精製と性質 15
勝 沼 信 彦
4. ジストロフィン分子上の糖タンパク複合体結合部位について 21
小 沢 鏝二郎
5. ジストロフィンは骨格筋T管（直下）に存在する 28
山 下 茂
6. 筋形質膜裏打ち構造およびジストロフィン局在に関する超微
形態学的研究 32
石 川 春 律
7. ジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質を広く動物界に
検索する 38
小 浜 一 弘

II 細胞膜タンパク質と細胞骨格

8. 細胞膜関連構造に局在する α -アクチニンのクローニング 45
眞 崎 知 生

9. 骨格筋細胞の発達・萎縮とアクチン細胞骨格調節因子コフィ
リンの量的変動 49
大日方 昂
10. MAP 2C cDNA の強制導入と標識チューブリンの微量注入
による微小管の動態と解析 56
広川 信隆
11. 筋巨大蛋白質の発生とその局在 63
小宮山 政敏
12. AMPA 型グルタミン酸受容体チャンネルの Ca^{2+} 透過調節機構 68
三品 昌美

III Ca とタンパク分解

13. 骨格筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャンネルのカルパインによる分解
と機能変化 77
飯野 正光
14. カルシウム依存性プロテアーゼの活性化機構 83
鈴木 紘一
15. ライソゾーム系による筋の崩壊 88
熊本 俊秀

IV 発生と遺伝子発現

16. ニワトリ胚筋細胞のレチノイン酸への応答性 99
桃井 隆
17. ビタミンCのもつ筋細胞分化促進作用 104
松田 良一
18. 癌抑制遺伝子産物RBとcdc 2による骨格筋細胞分化と脱分
化の調節 112
遠藤 剛

19. 筋細胞分化制御因子の機能の解析 120
鍋島陽一

V 発生工学

20. トランスジェニックマウスを用いたジストロフィン遺伝子発
現の調節の試みとマウスジストロフィン様cDNAの構造解析 127
木村 稔
21. mdx マウス由来胚幹細胞株の樹立及びその利用 134
花岡和則

I ジストロフィン

1. ジストロフィンの分子形態 3
2. デタージェント非存在下におけるブタ骨格筋
ジストロフィンの抽出とその不均一性 8
3. ラットジストロフィンの精製と性質 15
4. ジストロフィン分子上の糖タンパク複合体結合部位について 21
5. ジストロフィンは骨格筋T管（直下）に存在する 28
6. 筋形質膜裏打ち構造およびジストロフィン局在に関する
超微形態学的研究 32
7. ジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質を広く動物
界に検索する 38

1 ジストロフィンの分子形態

丸山 工作*

研究協力者 佐藤 治*

要 約

ジストロフィンは、X染色体上のデュシャンヌ・筋ジストロフィー遺伝子の産物で、分子量約427,000の巨大なタンパク質である¹⁾。ジストロフィンは筋細胞膜の裏打ち構造を形づくっているものと考えられており、これがないと細胞膜の機能が維持できず、筋ジストロフィー症が発症するとみなされている²⁾。

ジストロフィンの分子構造については、アミノ酸配列から、 α アクチニンドメインにスペクトリン様シャフトがつづき、独自のC端部分があって約150nmのロッド状分子と推定されている¹⁾。現在までに、ロータリー・シャドウ法によりジストロフィンの分子形態について、2つの異なった報告がだされている。第1は、フランスのLégerらによるもので、長さ約175nmのフレキシブルロッドという主張である³⁾。それに対して、われわれは、長さ約120nmの鉄垂鈴モデルを提唱している⁴⁾。ジストロフィンを最初に単離したCampbellは、Légerモデルを改変して2本のジストロフィン分子がらせんを巻いて、糖タンパク質を介して細胞膜に結合しているモデルを提唱している²⁾。

われわれのモデルは、赤血球膜の裏打ち構造を形成するスペクトリンの形状に似ており生理的にみて十分ありうるものである。しかし、難点は、この鉄垂鈴構造の頻度がごくわずかしかないという事実である。だから、何かの混在物ではないかとの指摘ももっともである。

われわれは、本研究において、鉄垂鈴構造が混在物ではないことをゲル濾過法によって示し、頻度の少ないのは界面活性剤の使用による崩壊のためではないかとの可能性を示唆する結果を得た。

材 料 と 方 法

ウサギ骨格筋から筋原線維を調製し、混在する膜成分を出発物とした。筋原線維は、50 mM KCl, 1 mM NaHCO₃, 5 mM MEGTA 溶液で5回洗った。約400gの筋肉を用いた。

筋原線維からミオシンを抽出するため、ハッセルバッハ・シュナイダー溶液(0.6 MKCl, 0.1 M KPO₄, pH 6.5, 10 mM ピロリン酸ナトリウム, 1 mM MgCl₂)で5回(1時間)抽出した。10倍量の溶液を用いた。

残渣を肉の2.5倍量の溶液(1% Nonidet P-40, 10 mM MKPO₄, pH 7.0, 0.1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM MEGTA, 0.05 mM DFP)で1時間抽出し、8,500g 15分遠心して膜成分を可溶化した(図1)。

ポリエチレングリコール(6,000)を4%になるよう上清に加え、ジストロフィンなどを沈殿させた。12,000g 10分の遠心で集めた。

沈殿を0.3 M NaCl, 0.1 MKPO₄, pH 7.0, 0.1% Triton X-100, 0.01 mM DFP液に溶解し、同液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(3.3×13cm)にかけ、0.3 MKPO₄, pH 7.0を含む溶液で溶出した(図1のHy-ap)。高分子量成分としてリアノジン・レセプターが多量に含まれているが、そのすぐ下にジストロフィンが認められる。

*千葉大学・理学部・生物学科

この画分を0.15 M NaCl, 10 mM MKPO₄, pH 7.5, 0.1% TritonX-100, 0.05% NaN₃, 0.01 mM MDFP に対して透析してからWGA-アガロースカラム (0.9×20cm)⁵⁾ 2本にかけた。吸着した糖タンパク質は0.3 M N-アセチル-D-グルコサミンを含む溶液で溶出した(図1のWGA)。ジストロフィンが多くなっていることがわかる。

さらにDE 52カラムにかけてジストロフィンを純化した(1.5×4 cm)。0.1 M NaCl, 10 mM MKPO₄, pH 7.5, 0.1% TritonX-100, 0.01 mM MDFP 液で吸着させ, 0.2 M NaCl を含む溶液で溶出した。図1のDE 52のように, リアノジン・レ-

セプターは除かれ, ジストロフィンが主成分となっている。イムノブロットにより, N端部分のジストロフィン抗体(A1C)とC端部分の抗体(4-4C5)といずれも反応した(図1)。

電子顕微鏡による分子形態の観察には, 雲母板上に試料(50%グリセリン, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)をスプレーによって分散させ, プラチナとカーボンをも7.5°の角度で蒸着した(JFD-9000 蒸着装置)。JEM 100S 電子顕微鏡下で観察した。

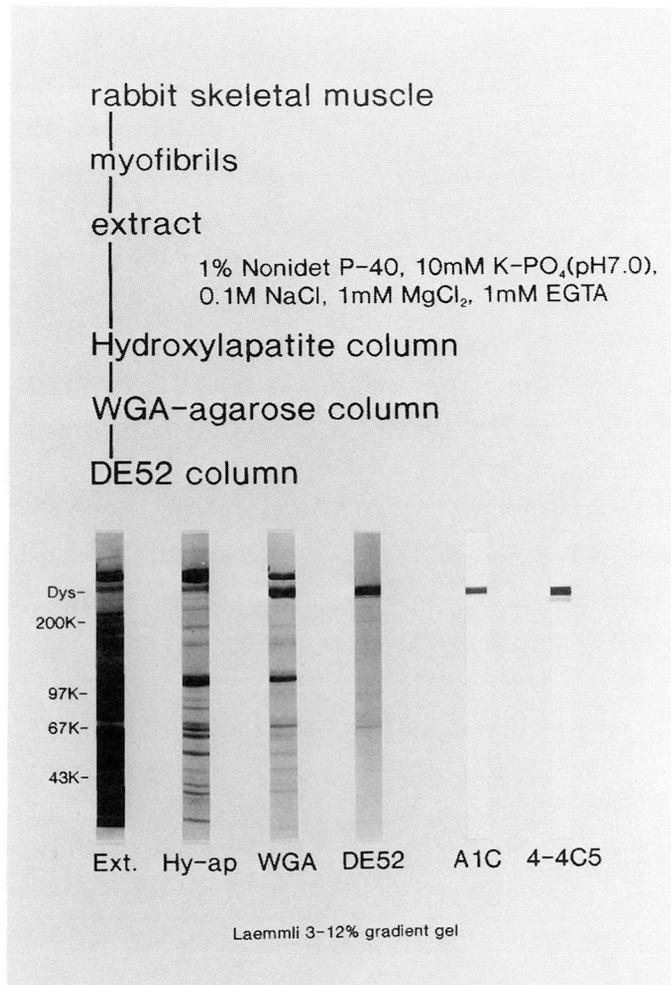


図1. ジストロフィンの精製

結 果

図1のDE52溶出液約20mlをアミコン社のCentriprep 30で、1,500 gの遠心によって約40倍に濃縮し、Asahipak GS-710のカラムにかけた。溶液は0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5% CHAPS, 10 μ g/ml ロイペプチン, 0.05 mM DFPである。Tosoh HPLC, 0.5 ml/minでゲル濾過した。

図2にみられるように、ポイド・ポリウムにつづいて溶出する高分子量画分(a)を濃縮してSDS電気泳動にかけると、ジストロフィンが主成分であるが、さらに高分子量のいくつかのバンドが認められた。それらの少なくとも3本は抗ジストロフィン抗体と反応したのでジストロフィンのオリゴマーとみなされる。メイン・ピーク(b)は、ジストロフィンが主成分であった。

メインピーク(b)のロータリー・シャドウ像(図3)は、フレキシブルロッドと球状物のからまりあったものである。これらの像は、DE52標品にみられるのと同じである。

高分子量画分(a)の電子顕微鏡像は、まさに鉄亜鈴が主であった。中にはフレキシブルロッドもあったが、70%は鉄亜鈴であった。

(a)には、さまざまな鉄亜鈴構造がみられた。それらを分類してみると、図4のようになる。まず長さ108 nm, 幅2 nmほどの両端に球をつけた鉄亜鈴がみられる(a)。球直径は、約13 nmである。われわれは、これをジストロフィンのモノマーと仮定した。このモノマーが2本少しずれて結合したダイマーがbである。長さ130 nm, 幅3 nmである。さらに、このダイマーが側面結合したテトラマー(c)が典型的な鉄亜鈴である。長さは130 nmとダイマーと変わらないが幅は5 nmと太くなっている。このテトラマーがいくつもつらなって複雑な構造がつくられる(d)。

テトラマーの鉄亜鈴は、1% Triton X-100抽出液ではほとんど見られないこと、0.2% CHAPS抽出液ではジストロフィンの抽出は少ないが鉄亜鈴がかなり存在することから、界面活性剤処理によってこわれるのではないかと考えられる。図3(b)に

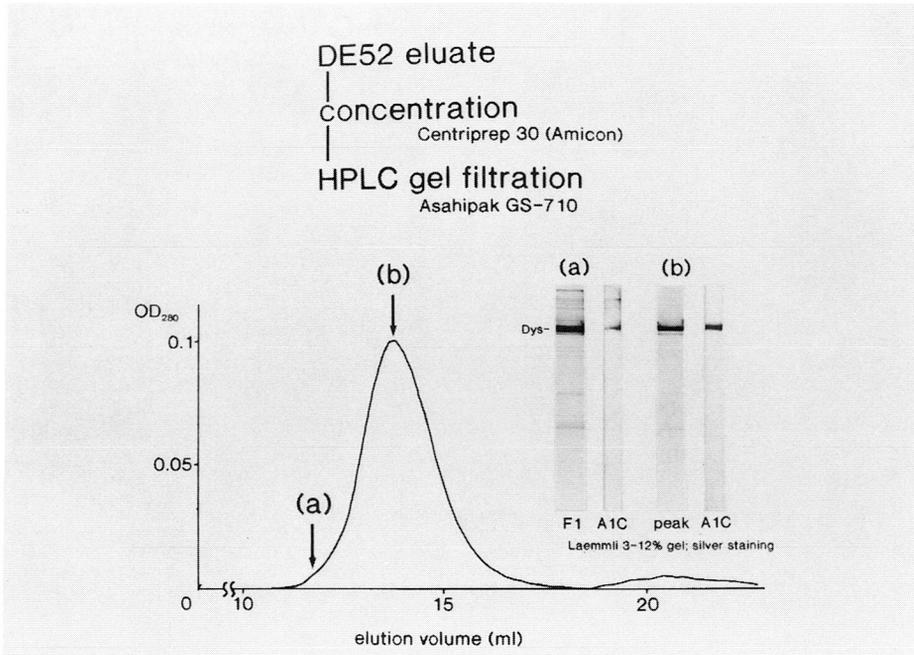


図2. ジストロフィンのゲル濾過

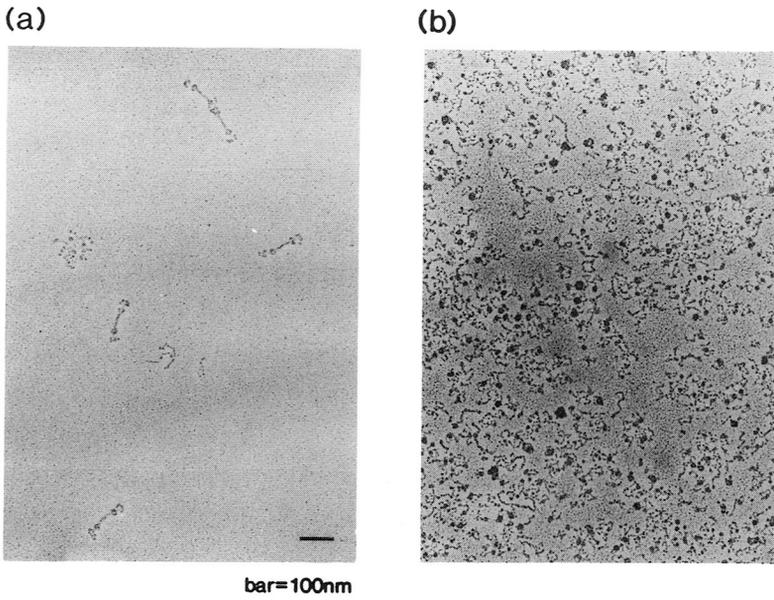


図3. ゲル透過したジストロフィンの電子顕微鏡像
図3の(a)と(b)画分

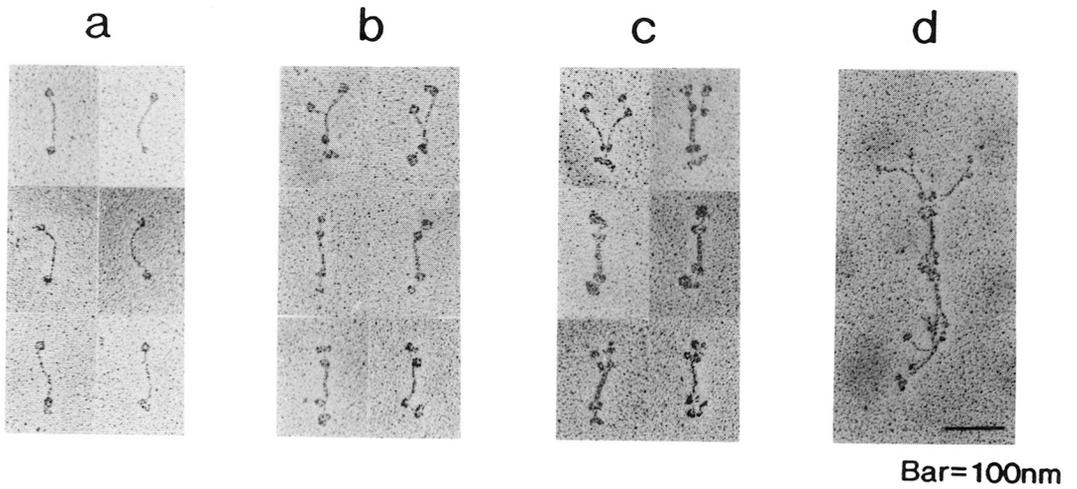


図4. ジストロフィン分子の形態
(a) モノマー (b) ダイマー
(c) テトラマー(鉄亜鈴) (d) テトラマーの会合体

みられるフレキシブルロッドと球形物は、崩壊したテトラマーが分散したように見える。大きな球形物はロッドのかたまりのようである。モノマーの大きさをもったロッドも存在するが、球は一端にしかついていないものが多い。

論 議

われわれのジストロフィン鉄垂鈴モデルは、ゲル濾過法によりポピュレーションの多いサンプルを得たこと、その主成分がジストロフィンであることからより確かになってきたといえよう。そして、界面活性剤によって崩壊しやすいと考えればその頻度の少ないことが説明できよう。界面活性剤を用いないでジストロフィンを可溶化できれば、その分子形態が保存されていると期待でき、この方面からの追究が望まれる。

Légerら³⁾の長さ175nmのフレキシブルロッドは、ウサギ骨格筋では確認されていない。彼らはニワトリ筋胃から得ているので直接比較できない(ニワトリ筋胃からは、ウサギ骨格筋の方法でジストロフィンを精製できない)。

ジストロフィン分子のN端側とC端側の構造が異なり、分子に方向性が存在する¹⁾。したがって、

ダイマーにモノマーの方向性の違いがあるのか、テトラマーではどうなっているのかは興味ある問題である。C端とN端に特異的なモノクローン抗体があるので、パラレルかアンチパラレルか明らかにしたいところである。現在、まだ実験に成功していない。

文 献

- 1) Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M. (1988) *Cell*, **53**, 219-228.
- 2) Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1991) *Cell*, **66**, 1121-1131.
- 3) Pons, E., Augier, N., Heilig, R., Léger, J., Mornet, D. and Léger, J. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7851-7855.
- 4) Murayama, T., Sato, O., Kimura, S., Shimizu, T., Sawada, H. and Maruyama, K. (1990) *Proc. Jpn. Acad.* **66B**, 96-99.
- 5) Campbell, K. P. and Kahl, S. D. (1989) *Nature*, **338**, 259-262.

2 デタージェント非存在下におけるブタ骨格筋 ジストロフィンの抽出とその不均一性

桑山 秀人*

研究協力者 杉浦全代** 杉田秀夫*** 江橋節郎**

要 約

デタージェントを使わない条件での調製を試みた。豚ひき肉を、ウェーバー・エドサル液(10倍容量, ATP存在下)で2度抽出した。残渣を冷水で良く洗浄して、沈殿をpH 8.6(室温)に合わせ、ジストロフィンを37°Cで1時間抽出した。懸濁液のイオン強度が1 mM以下であれば昨年度報告したTritonX-100による可溶化と同程度に抽出できた。

ジストロフィンの不均一性については、ヒト・ジストロフィン的一部分, アミノ酸一次配列440-489(N端側領域)または配列3495-6544(C端側領域)に相当する合成ペプチドを抗原にして作成したウサギ抗血清との反応を指標にして調べた。ブタ骨格筋の粗ジストロフィン分画をSodium dodecyl sulfate (SDS)存在下の調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)にかけて、免疫抗体と特異的に反応する成分として分子量400 kDaの2種の蛋白質を得た。

N端側領域の抗血清は豚より単離した両成分に対して同じ程度に反応するのに対して、C端側領域の抗血清は400 kDa成分と特異的な反応を示し、380 kDaとは弱く反応した。mdxからの抽出物には弱いながら400 kDa成分が認められたが、380 kDa成分は染まらなかった。

380 kDaは400 kDa成分とともにアイソフォー

ムとして組織内に存在している可能性が高い。

緒 言

Hoffmanら¹⁾ Koenigら^{1),2)}によりヒトDuchenne型筋ジストロフィー(DMD)において特異的に欠損している遺伝子が同定され、その遺伝子上にコードされている蛋白質はジストロフィンと命名された。DMDでは、患者の筋細胞膜³⁻⁶⁾にジストロフィンが存在しないため、膜の機能に何らかの重大な欠陥があって筋萎縮が起こると予想されている⁷⁾。現時点では、ジストロフィンは細胞膜を単純に安定化しているだけなのか、さらにそれ以外に特殊な役割を担っているのかについて、何らかの方法により探り当てるのが緊急課題の一つになった。この問題を研究するためにはもとの機能を保ったジストロフィンを調製することが重要である。最近、Loveら⁸⁾により常染色体におけるジストロフィン類似の遺伝子が発見され、さらにKhuranaら⁹⁾によりジストロフィンと同じ分子量の関連蛋白成分(DRP)が筋抽出試料中に見いだされた。このような状況から、組織より抽出されたジストロフィン試料の不均一性を明らかにすることも必要になってきた。

ここではデタージェント非存在下でのジストロフィンの抽出について述べ、以前、我々が豚骨格筋ジストロフィンとして報告した分子量のわずかに異なる二成分に関する新たな知見を報告する。

* 帯広畜産大学教養課程化学研究室

** 岡崎国立共同研究機構

*** 国立精神神経センター・神経研究所

材料と方法

粗ジストロフィンの調製は特に記述しない限り操作はすべて4°Cでおこなわれ、遠心分離は10,000xgで10分間行った。また以下で用いる溶液には1.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 mg/1 leupeptin, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride および 0.7 mM benzamidin-HCl を加えた。ブタ骨格筋は屠殺後、直ちに実験室に輸送し、氷冷して挽き肉を作り、0.5 kg ずつに分け-80°Cに保存したものを必要に応じて解凍して使用した。

挽き肉(500 g)に10容量のウェーバー・エドサル液(0.6 M NaCl, 5 mM Na₂CO₃, 20 mM NaCO₃, 1 mM ATP-Na₂, 0.1 mM EGTA)を加え、ヒスコロンホモジナイザーを用いて破碎した(pH 7.4)。2時間攪拌後、遠心して沈渣を集めた。沈渣に10容量のウェーバー・エドサル液を加え攪拌・遠心を繰り返した(pH 7.5)。得られた筋残渣に10容量の水を加えて均一にしたのち、遠心して沈渣を集めた。この操作を上清の電気伝導度が30 μmho 以下になるまで合計4回繰り返した。

筋残渣(約500 ml)を2容量の水に懸濁しNaOHをもちいて室温でpH 8.6に合わせ、ジストロフィンを37°Cで1時間抽出した(最終pH~8.4)。HClをもちいてpH 7.6にしたのち、氷冷し、遠心上清を粗抽出液とした(pH~8.3)。

SDS存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による分析・調製は昨年度の報告で述べた方法に従った¹⁰⁾。

タンパク質およびペプチド断片とジストロフィン抗血清の反応性はSDS-PAGE後のゲルをニトロセルロース膜を用いるイムノブロット法で分析した。2種の異なるウサギ抗ジストロフィン血清A1またはA2は、ヒト・ジストロフィン配列440-489(N端側領域)または3495-3544(C端側領域)の合成ペプチド断片をもちいて作成された。

我々はジストロフィンを抗体反応で同定しているが、A2抗体は豚DRPとジストロフィンを区別しているかどうかは問題となる。Loveら⁸⁾の発表

したジストロフィン類似遺伝子の一部分は我々がもちいている抗体A2の抗原である合成ペプチド(配列3495-3544)と重複する。昨年度の報告で豚ジストロフィン試料についてこの配列部分のシーケンスを探索すると、ヒト・ジストロフィン配列の3490-3499, 3504-3508, 3519-3525および3535-3544と完全に一致するシーケンスが得られ、抗原となったヒト配列3495-3544のうち27残基がブタ・ジストロフィンで同定された。このブタ・シーケンスはLoveら⁸⁾の報告した常染色体由来の遺伝子情報とは部分的にしか合致しなかった。従って、我々がここで用いる抗体反応はDRPではなくジストロフィンを識別していると考えられる。

結果と考察

ジストロフィンは膜の裏うち構造に深く関与していることが示唆されている。細胞膜骨格における関連蛋白質との相互作用の研究や、ジストロフィン分子の形態を研究するのに適した試料が必要である。ウサギ骨格筋ジストロフィンについては、穏和なデタージェントであるジギトニン¹¹⁻¹²⁾やTritonX-100¹³⁻¹⁴⁾などの存在下で抽出・精製が可能となっている。これらの試料から何らかの方法でデタージェントを除けば良いのであるが、一度加えたデタージェントはジストロフィンの性質を損なわずに除去することは困難である。我々はデタージェントを使わない調製法を再検討した。

勝沼¹⁵⁾あるいは石浦ら¹⁶⁾が指摘しているように、TritonX-100存在下においても、高イオン強度ではジストロフィンは抽出されなかった(表I)。抽出において重要な条件は低イオン強度と弱アルカリ性(約pH 8.5)である。Tritonを加えるとジストロフィンは抽出されやすくなるが、その理由は細胞膜が溶解するためではなく、細胞膜骨格における関連蛋白質との疎水性相互作用を弱めるためと思われる。温度は抽出性を変えるような大きな効果は無いが、得られる試料の純度は37°Cのほうが良かった。抽出に関して、ジストロフィンはス

表 I ブタ骨格筋ジストロフィンの抽出

イオン強度	Triton濃度	抽出pH*	温度	抽出時間	抽出**
mM	%		℃	hour	
300	1.5	8.8	4	2	none
30	1.5	8.5	4	1	+++
20	1	8.2	4	2	+++
3	0	7.9	4	2	+
~ 1	0	7.5	4	1	+
~ 1	0	8.7	4	1	+++
~ 1	0	8.7	37	1	+++
~ 1	0	8.4	37	2	+++

* 遠心上清の抽出液(4℃)のpH値

** ジストロフィン抽出の相対的程度を+で示した。

ペクトリンや α -アクチニンと類似点が多く、機能面での類似性が予想される。

抽出試料中のジストロフィンは50,000回転で2時間の超遠心により沈殿した。また抽出物をゲルろ過(トヨパールHW75)とすると、ジストロフィン溶出のみかけの分子量は約1,000万を示した(図1)。ジストロフィンは、自身あるいは混在する蛋白質と会合していると思われる。豚筋肉より得られた粗ジストロフィン分画の一部分はWGAカラムに結合したが、選択的濃縮には成功しなかった。抽出液に0.3 M NaClを加えてDMSO分画を行うと20-45%にジストロフィンは濃縮された¹⁷⁾。DMSO濃縮物は短時間に低イオン強度・弱アルカリ性の水溶液で希釈すると溶けたが、一晚以上放置すると、凝集して不溶化した。この凝集物はpH 9.5でも溶けないが6 M尿素を加える

と溶けた。精製法は確立していないが、骨格筋ジストロフィンをデタージェントおよび変性剤なしで筋組織から抽出できることは確認された。

図2は試料の蛋白染色およびイムノプロットの結果を示す。C端側領域に対する血清(A2)は400 kDa成分と特異的な反応を示し、380 kDaとは弱く反応した。一方、N端側領域に対する血清(A2)は両成分に対して同じ程度に反応し、さらに360 kDaおよび205 kDa成分とも反応した。この結果は以前の報告に一致している¹⁰⁾。4℃で一晚放置した豚肉から調製したジストロフィン試料でも図2と同様の結果が得られたので、A1抗体と反応する分子量400 kDa以下の成分のすべてを調製中の分解産物とは考えにくい。

A2抗体が蛋白量の多い400 kDa成分と蛋白量の少ない380 kDa成分に、同程度に反応するとい

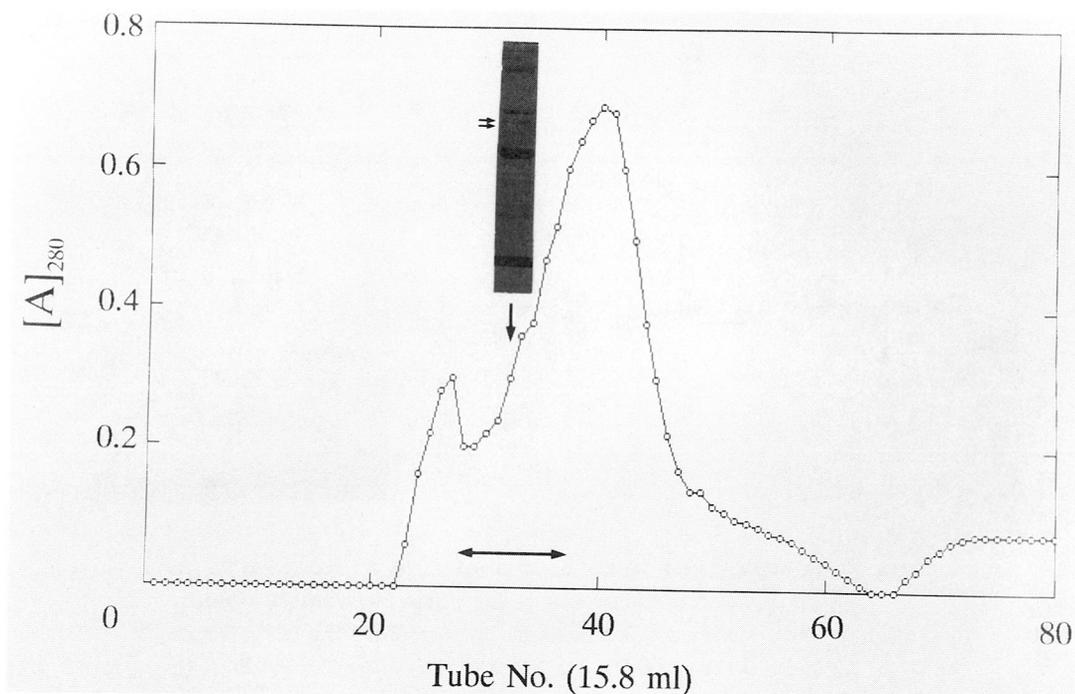


図1. ブタ骨格筋抽出物のトヨパールHW 75 カラム (ϕ 6 cm \times 40 cm, 0.15 M NaCl, 20 mM HEPES, 0.1 mM EGTA, pH 7.5) によるゲルろ過。分画 30 の SDS-PAGE (4%) の矢印は 400 kDa および 380 kDa のジストロフィンを示す。

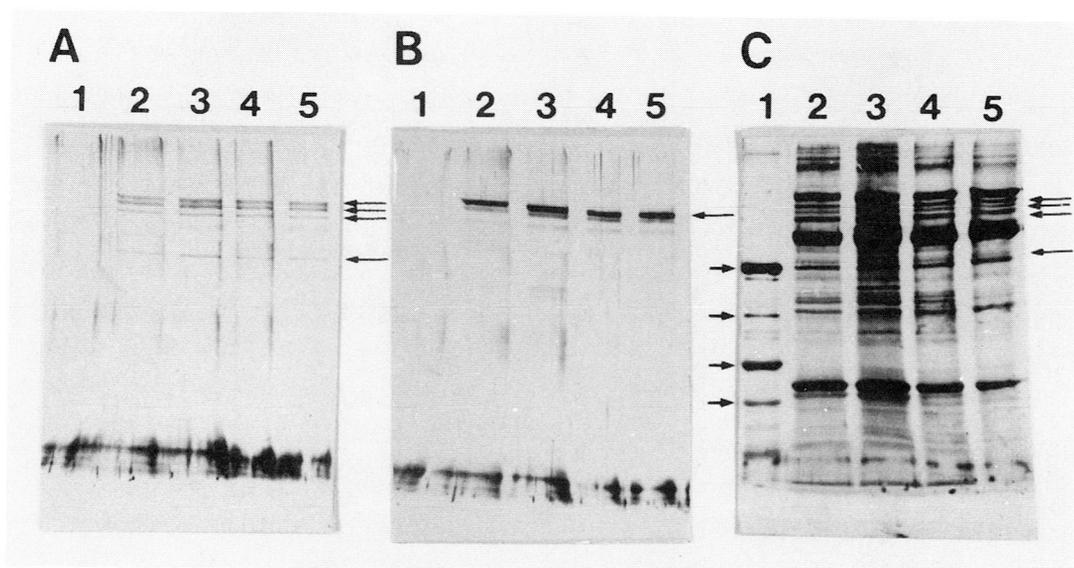


図2. SDS-PAGE (5%) 後のイムノプロットによるブタジストロフィン同定。
 A. 抗体 A1 (N 端側) によるイムノプロット染色。 B. 抗体 A2 (C 端側) によるイムノプロット染色。 C. 金コロイドによる蛋白染色。短い矢印で示す分子量マーカー (kDa) は上から 200, 116, 9.7 および 6.6 を示す。長い矢印の分子量 (kDa) は上から 400, 380, 360, 205 を示す。 1; 分子量マーカー, 2; 抽出物, 3; DMSO 濃縮物, 4; 6 M 尿素による可溶化物, 5; 陰イオンカラムの素通り分画。

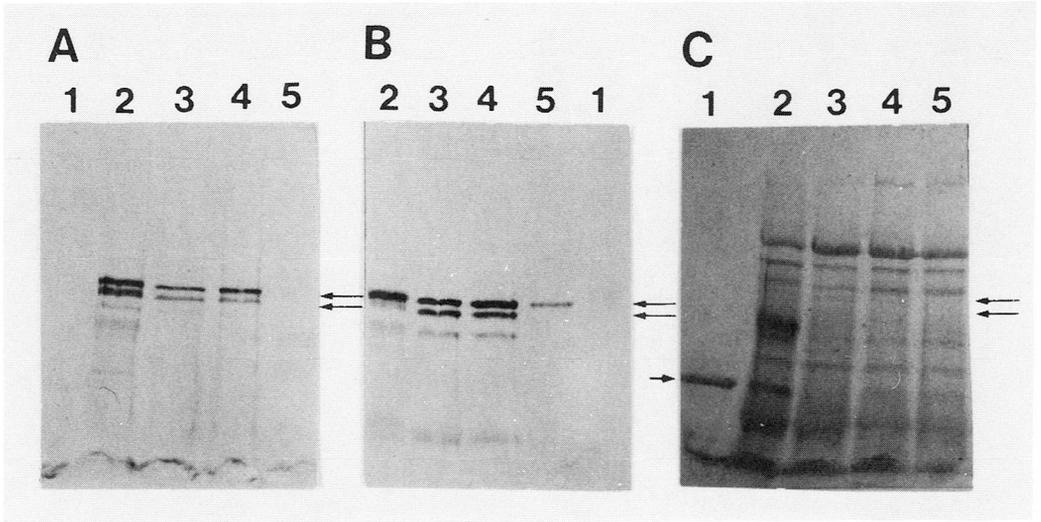


図3. SDS-PAGE (4%)後のイムノプロットによるマウスジストロフィン。
 A. 抗体 A1 (N端側)による染色。B. 抗体 A2 (C端側)による染色。
 C. アミドブラックによる蛋白染色。短い矢印で示す分子量マーカーは
 200kDaのミオシン重鎖。1; 分子量マーカー, 2; プタ抽出物, 3;
 マウス BALB/c, 4; マウス C57BL/10 ScSn, 5; マウス C57BL/
 10ScSn - md × BrCN。

う結果について、我々は豚骨格筋 400 kDa成分には少なくとも2種のジストロフィンが存在し、それら 400 kDa成分のうち、一方は A 2 と反応するが、他方は A 2 と反応しないと解釈している。380 kDa成分は豚筋組織に始めから存在すると考えたいが、あるいは A 2 と反応する 400 kDaの分解物である可能性もある。A 1 抗体の 400 kDaに対する強い反応性は、400 kDa成分の蛋白量が 380 kDa成分よりも量的に多く存在するためと解釈できる。

マウス試料における A 1 および A 2 抗体に対する反応性を調べた。A 2 抗体は豚 380 kDa とほとんど反応しないのに対し、正常マウスの 380 kDa とは A 1 抗体と同様に反応した (図 3 B)。一方 mdx では A 1 は反応せず A 2 が 400 kDa のみと反応した。これは mdx からの抽出物に対するジストロフィン抗体の反応に関する田中ら¹⁸⁾の報告と一致した。図 3 の結果を簡単に説明することはできないが、400 kDa と 380 kDa にはいくつかのアイソフォームが存在することを示唆している。

豚の 400 kDa 成分と 380 kDa 成分の相違点を調べた。図 4 は SDS ゲルから抽出精製した両成分にキモトリプシンを加え酵素加水分解し、生成した分解産物を SDS-PAGE で分析した結果である。分解ペプチドの金コロイド染色は明らかに異なるパターンを示したが、抗体染色では 380 kDa 成分の分解ペプチドにおいて C 末端側抗体と反応する分解物のうち 57 kDa 成分が特に弱い点を除くと、全体に類似の結果を得た。380 kDa は 400 kDa 成分とともにアイソフォームとして組織内に存在している可能性が高い。

文 献

- 1) Hoffman, E. P., Knudson, C. M., Campbell, K. P., and Kunkel, L. M. (1987) *Nature* **330**, 754-757
- 2) Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. (1988) *Cell* **53**, 219-228
- 3) Sugita, H., Arahata, K., Ishiguro, T.,

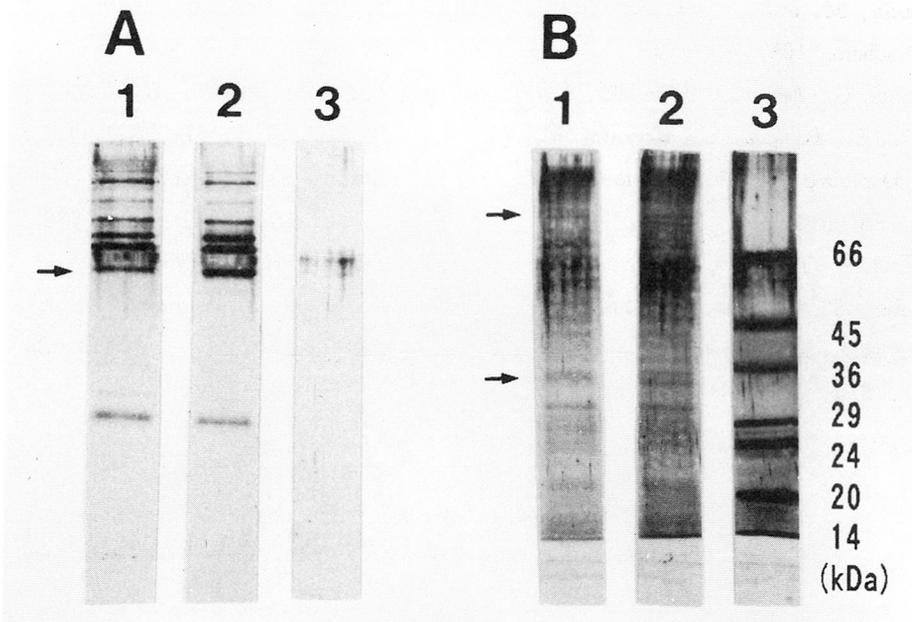


図4. SDS-PAGE (12%)による400 kDa成分と380 kDa成分との比較。
 SDSゲルから抽出精製した5 μ g/50 μ lのジストロフィンに0.5 μ gのキモトリプシンを加え、30 $^{\circ}$ Cで30分の加水分解し、生成した分解産物をSDS-PAGE (12% gel)で分析した。異なる部分を矢印で示した。A. 抗体A2 (C端側)によるイムノプロット染色。B. 金コロイドによるペプチド断片の染色。1; 380kDa, 2; 400kDa, 3; 分子量マーカー。右側の数字はマーカー分子量を示す。

- Suhara, Y., Tsukahara, T., Ishiura, S., Eguchi, C., Nonaka, I., and Ozawa, E. (1988) Proc. Japan Acad. **64B**, 37-39
- 4) Zubrzyeka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H. M., Befall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N., and Worton, R. G. (1988) Nature **333**, 466-469
- 5) Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., and Ozawa, E., and Sugita, H. (1988) Nature **333**, 861-863
- 6) Shimizu, T., Matsumura, K., Hashimoto, K., Mannen, T., Ishiguro, T., Eguchi, C., Nonaka, I., Yoshida, M., and Ozawa, E. (1988) Proc. Japan Acad. **64B**, 205-208
- 7) Hoffman, E. P. and Kunkel, L. M. (1989) Neuron **2**, 1019-1029
- 8) Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, R., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. (1989) Nature **339**, 55-58
- 9) Khurana, T. S., Hoffman, E. P., and Kunkel, L. M. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 16717-16720
- 10) Kuwayama, H., Sugiura, M., Sugita, H., and Ebashi, S. (1990) Proc. Japan Acad. **66B**, 145-150
- 11) Campbell, K. P. and Kahl, S. D. (1989) Nature **338**, 259-262

- 12) Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) *J. Biochem.* **108**, 748-752
- 13) Salviati, G., Betto, R., Ceoldo, S., Biasia, E., Bonilla, E., Miranda, A. F., and Dimauro, S. (1989) *Biochem. J.* **258**, 837-841
- 14) Murayama, T., Sato, O., Kimura, S., Shimizu, T., Sawada, H., and Maruyama, K. (1989) *Pro. Japan Acad.* **65B**, 207-210
- 15) 勝沼信彦(1991) 小沢班平成2年度研究報告書 3-7
- 16) 石浦章一, 荒畑喜一, 塚原俊文, 杉田秀夫 (1989) *生化学* **61**, 1371-1375
- 17) Ebashi, S. and Koga, R. (1988) *Proc. Japan Acad.* **64B**, 323-326
- 18) Tanaka, H., Shimizu, T., and Ozawa, E. (1989) *Proc. Japan Acad.* **65B**, 238-241

3 ラットジストロフィンの精製と性質

勝 沼 信 彦*

研究協力者 松 田 佳 子** 辻 明 彦**

本研究の目的とその意義

DMDの遺伝子産物であるジストロフィンはKunikelらにより、リバースゼネティクスの方法で、そのアミノ酸配列が推定されている¹⁾。タンパク質としてのジストロフィンの研究は合成ペプチド抗体を用いて行なわれ、ジストロフィンは筋細胞膜の内側に局在し、裏打ち構造として機能していると予想されている²⁾。ジストロフィンの精製は、その含量が高いウサギ骨格筋を材料として、Cawbellら³⁾、丸山ら⁴⁾、小沢ら⁵⁾により行なわれ、界面活性剤で可溶化されたジストロフィンは、小麦胚芽レクチン(WGA)に結合する糖タンパク質をはじめとする複数のタンパク質と複合体を作っていることが報告されている。Cawbellらは、ジストロフィン欠損により、ジストロフィン結合タンパク質の細胞内動態も変化することを見出している。然し、ウサギには良い筋ジストロフィーモデル実験動物はない。良いモデル実験動物のあるものにつきジストロフィンの研究をする必要がある。その上、ジストロフィンはウサギ・ブタ・マウスでかなり異なるものと思われ、ヒトの場合もかなり異なることが考えられる。また、ジストロフィンの存否と筋萎縮の関係にもバラティエーが存在するものようである。以上の理由から、我々は、ラット骨格筋を材料として用い、ラットジストロフィンの性質を調べ、ウサギジストロフィンとかなり基本的な性質が異なることを見出した。

DMDのモデル実験動物であるMdxマウスは、ジストロフィンは完全に欠損しているものの、その臨床像は、ヒトDMDとは明らかに異なり軽症である。このように欠損しても動物間でそのフェノタイプが異なる場合、ウサギのみでなく他の動物のジストロフィンの研究を行い、相互に比較することが必要となる。

方法と結果

① ジストロフィンに対する抗体の作製と、ジストロフィンの免疫学的検出法

ジストロフィンのcDNAから予想されるアミノ酸配列460-485に相当する合成ペプチドを作製し、ヘモシアニンと縮合後ウサギに免疫した、得られた抗血清は、合成ペプチド-セファロースカラムにて精製した。ジストロフィンの検出は次の様に行った。SDS-PAGE(4-15%グラジュントゲル)後、ゲル中のタンパク質をニトロセルロースフィルターに転写(100 mA, 15時間, メタノール抜き)の転写液使用し、3%BSAでブロッキング(30分間)、一次抗体(10 µg/ml)15時間、二次抗体(アルカリフォスファターゼコンジュゲート, 3,000倍希釈)、5時間反応後、発色させた。

② 界面活性剤可溶化ジストロフィンのポリエチレングリコール分画

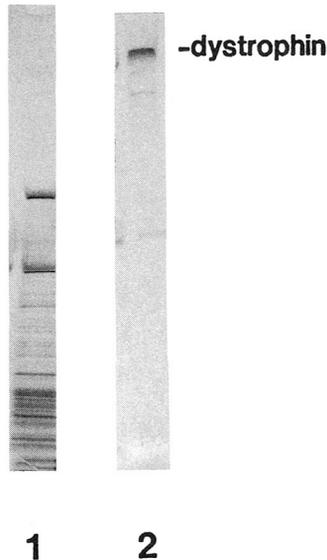
ハッセルバッハーシュナイダー溶液で遠心洗浄を行ったラット骨格筋ミクロゾーム画分より、1%トライトンX-100, 20 mMピロリン酸, 0.5 M塩化ナトリウム含量 50 mMトリス塩酸緩衝液 pH 8.5 にて、ジストロフィンを可溶化後、105000 × g

* 徳島大学・酵素科学研究センター

** 徳島大学・工学部・生物工学科

PEG FRACTIONATION OF RAT DYSTROPHIN

PEG 2-4% ppt



1, silver staining 2, immunostaining

図1. PEG FRACTIONATION OF RAT DYSTROPHIN

1. silver staining 2. immunostaining

1時間遠心した。得られた上清にポリエチレングリコール6000を順次加え、遠心後各沈殿に含まれるジストロフィンの検出を行った。図1に示すように、トライトンで可溶化されたラットジストロフィンは、ポリエチレングリコール2-4%の沈殿に濃縮された。次に、ポリエチレングリコール2-4%の沈殿を、トライトンX-100、CHA PS、ジキトニンを含む各50mMトリス塩酸バッファーpH7.5、0.5M塩化ナトリウム溶液にて、それぞれ抽出し、105000×g、1時間遠心後、上清、沈殿中のジストロフィン量を調べた。図2に示

すように、いずれの界面活性剤を用いてもラットジストロフィンは可溶化されず、ポリエチレングリコール6000で不可逆的に沈殿すると考えられ、可逆的に沈殿するウサギジストロフィンとは異なっていた。

③ 小麦胚芽レクチン(WGA)アガロースカラムに対する親和性

ウサギジストロフィンは、WGAに親和性を持つ糖タンパク質と複合体を作っているために、界面活性剤で可溶化後、WGA-ゲルマフィニティクロマトグラフィーにて、ジストロフィンの極め

Irreversible precipitation of rat dystrophin with PEG

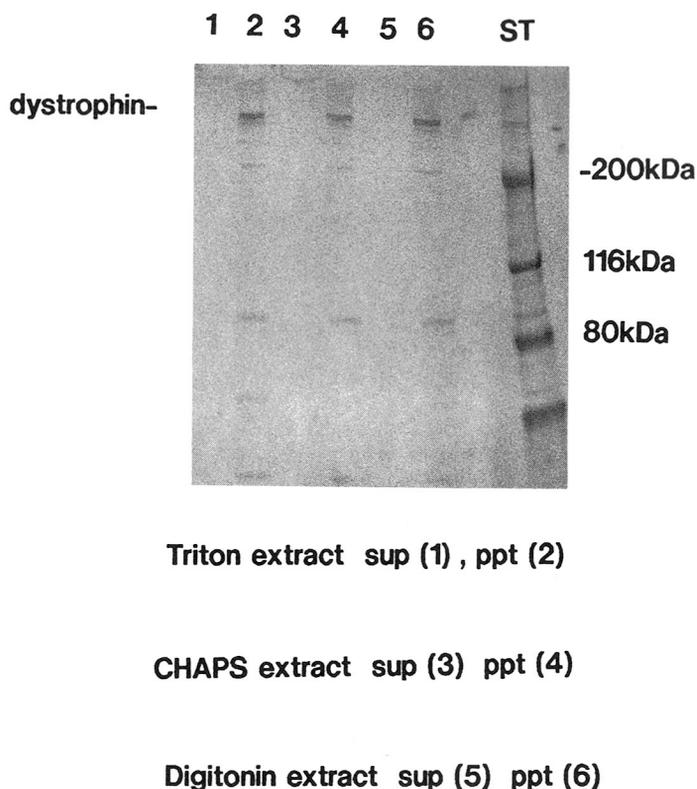


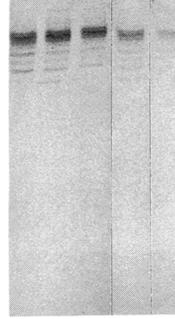
図2. Irreversible precipitation of rat dystrophin with PEG
Triton extract sup (1) , ppt (2)
CHAPS extract sup (3) ppt (4)
Digitonin extract sup (5) ppt (6)

で有効な精製濃縮が可能である。ラットジストロフィンも、WGAゲルカラムによる精製が可能かどうか調べた。ウサギ、ラットジストロフィンも、WGA-ゲルカラム (Vector社製) にかけて、洗浄後、0.5 M N-アセチルグリコサミンにてゲルに結合したものを溶出した。図3に示すように、ウサギジストロフィン、WGAゲルに結合し、N-アセチルグリコサミンにて特異的に溶出された。一方ラットジストロフィン、全んどWGA-ゲルに

結合しなかった。動物の種が異なると、糖タンパク質の糖鎖構造が変化することも考えられるので、WGA以外のレクチンカラム (Con A, RcA, UEA, DBAカラム……) で同様の実験を行ったが、ラットジストロフィンは、いずれのレクチンカラムにも親和性を示さず、素通り画分に存在した。以上の結果から、ラットジストロフィンは、ウサギジストロフィンと異なり、糖タンパク質との複合体として可溶化はしていないようである。

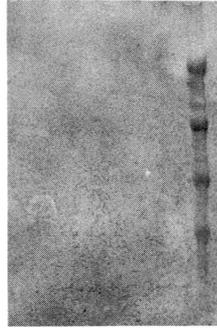
WGA-agarose affinity chromatography

rabbit dystrophin



-dystrophin

rat dystrophin



-dystrophin

pass through

eluate with NAGA

図3. WGA-agarose affinity chromatography

④ ヨウ化カリウムによるラットジストロフィンの可溶化

界面活性剤で可溶化されたラットジストロフィンには、WGA-アフィニティークロマトグラフィーができないため、未変性の状態で精製するのは非常に困難であると考えられた。そのため、界面活性剤を用いない可溶化方法について検討したところ、比較的低濃度のヨウ化カリウムにてラットジストロフィンが可溶化されることを見出した。ラット骨格筋マイクロゾーム画分を、0.2 Mから3 Mまでのヨウ化カリウム含有25 mM トリス塩酸

緩衝液 pH 7.5 で抽出し、105000 ×g、一時間遠心し、上清中の可溶化されたジストロフィンの含量を調べた。コントロールとして、ハッセルバッハーシュナイダー(HS)溶液にて抽出したものをを用いた。図4に示すように、ラットジストロフィンは、0.2 Mヨウ化カリウムでも可溶化された、それで0.2 Mまたは0.6 Mヨウ化カリウムで抽出されたラットジストロフィンを透析によりヨウ化カリウムを除去し、レクチンカラム、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイトカラムにかけ、その溶出位置を調べた。表1は、各種クロマトグ

Solubilization of rat dystrophin by KI treatment



1, 2 ; 0.2M KI , 3, 4 ; 0.6M KI, 5, 6 ; 1 M KI,

7, 8 ; 3 M KI, 9, HS

图 4. Solubilization of rat dystrophin by KI treatment
1,2 ; 0.2M KI, 3,4 ; 0.6M KI, 5,6 ; 1 M KI, 7,8 ; 3M KI, 9, HS

表 1. Comparison between Rat and Rabbit Dystrophin

	Rat		Rabbit
	Triton X-100	KI	Triton X-100
WGA-agarose	unbound	unbound	bound
Con A-Sepharose	unbound	unbound	bound
DEAE-cellulose	bound 0.15-0.2 M NaCl	bound 0.15-0.2M NaCl	bound 0.15-0.2M NaCl
Hydroxyapatite	bound 0.2M PO ₄	bound 0.3M PO ₄	bound 0.3M PO ₄
PEG fractionation	2-4% irreversible precipitation	ND	4% reversible precipitation

ラフィーにおける挙動を、トライトン可溶化ラットジストロフィン、ヨウ化カリウムで可溶化したラットジストロフィン、トライトン可溶化ウサギジストロフィンで比較したものである。ヨウ化カリウムで可溶化したラットジストロフィンも、トライトン可溶化ジストロフィンと同様、WGA, ConAカラムに親和性を示さなかった。しかし、DEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイトカラムでの挙動は、トライトン及びヨウ化カリウム可溶化ラットジストロフィン、トライトン可溶化ウサギジストロフィンの3者に全んど差は見られなかった。

考 察

ラットジストロフィンとウサギジストロフィン
の一番の性質の違いは、WGA, ConAカラムに対する親和性である。その原因としてはラットジストロフィンは、糖タンパク質と複合体を作っていない、または、複合体として存在しているとしても、可溶化の過程で糖タンパク質が解離する、糖タンパク質の糖鎖構造が全く異なっている等が考えられる。ラット、ウサギジストロフィンともに、骨格筋の免疫組織染色では、細胞膜に局在していることが判明しているが、両ジストロフィンの界面活性剤による可溶化条件は異なっている。ウサギジストロフィンは、中性で容易に可溶化されるのに対し、ラットジストロフィンは、低濃度のピロリン酸が共存し、弱アルカリ性であることが界面活性剤による可溶化のために必要である。これらを考えると、ラットとウサギのジストロフィンの膜上での存在様式が同じであるとは考えられない。しかも、此の差異の意義は生理機能上非常に

大切なものと考えられるジストロフィンが動物の種を問わず相同性が高いタンパクであることを考えると生理機能を発現するための膜上での存在様式も動物の種を問わず類似性は高いと考えられるべきである。ジストロフィンの膜上での存在様式を明らかにすることは、その生理機能の解明、ジストロフィン欠損と筋肉リソゾームカテプシン群の増加による筋タンパク崩壊亢進との関係の解明にとって最も重要である。今後ラットジストロフィンの膜上の存在様式、ヨウ化カリウムにて可溶化、精製したラットジストロフィンの諸性質について明らかにしていきたい。

文 献

- 1) Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M. *Cell*, **53**, 219-228 (1988)
- 2) Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, T., Ozawa, E. and Sugita, H. *Nature*, **333**, 861-863 (1988)
- 3) Cambell, K. P. and Kahl, S. D. *Nature*, **338**, 259-262 (1989)
- 4) Murayama, T., Sato, D., Kimura, S., Shimizu, T., Sawada, H., and Maruyama, K. *Proc. Jpn. Acad*, 668 (1990)
- 5) Yoshida, M. and Ozawa, E. J. *Biochem*, **108**, 748-752 (1990)

4 ジストロフィン分子上の糖タンパク複合体結合部位について

小 沢 鎧二郎

研究協力者 鈴木 厚 吉田 幹 晴

これまで多くの免疫組織化学的研究により、ジストロフィンが骨格筋や心筋の膜の細胞質側に局在していることが明かとされてきた^{1),2)}。一次構造の解析に基づいた分子構造予測³⁾とあわせて、この観察結果から、ジストロフィンはアクチンと結合しながら筋細胞膜裏打ち骨格を構成していると考えられるようになってきた。しかし、生化学的な研究の遅れから、まだジストロフィンの膜直下における存在状態、分子構築を具体的に実証するには至っていない。実際、ジストロフィンのアクチン結合に関しても直接的にはまだ確認されていないのが実状である。

近年、筋肉膜の界面活性剤可溶性画分においてジストロフィンがいくつかのタンパク質とともに大きな複合体を形成していることが示された^{4),5),6)}。昨年、当研究室の吉田らはこの複合体に含まれる6種のジストロフィン結合タンパク質をSDSゲル上で同定し、分子量の大きいものから順にA0 (94 kD), A1 (62 kD), A2 (52 kD), A3 (43 kD), A4 (36 kD) そしてA5 (24 kD) と名づけた⁵⁾。また、Campbellらはこの他に、単クローン抗体を用いて、CBB染色では同定しにくい分子量156 kDの糖タンパク質を発見した⁶⁾。これらのジストロフィン結合タンパク質のいくつか(A2, A3b及び156 kDプロテイン)は小麦胚芽レクチン(WGA)結合性の糖タンパク質であり、これらの糖タンパク質を介するジストロフィン-結合タンパク質複合体(DAPC)のWGAアフィニティーカラムへの結合を利用して

DAPCを精製することが可能である。さらに現在、このDAPCをアルカリ処理することによってジストロフィンも単離できるようになった。複合体中の糖タンパク質は膜タンパク質であると考えられるので、筋肉においてもジストロフィンはこれらの糖タンパク質を介して形質膜に結合していると推測し得る。このジストロフィンに結合するタンパク質群の一つ一つの構造と機能を明かとし、またDAPCの分子構築を調べることが、ジストロフィンの機能研究の次の生化学的課題である。

今回我々は、ジストロフィンと糖タンパク質複合体との結合部位=ジストロフィンの膜タンパク質結合部位を明かすことができたので報告する。これは、ジストロフィン分子の高次構造をカルパインによる限定分解を用いて研究する中で運良く発見しえたものである。これまでジストロフィンの膜結合部位は、一次構造の解析から、他のタンパク質(ジストロフィン関連タンパク質を除いて)との相同性のないそのC末端ドメインにあると予測されていた³⁾。結論から先に述べるならば、我々の結果はこの予測を裏切るものであり、ジストロフィンがむしろその手前に存在するシステイン頻出ドメインを中心とした領域を膜タンパク質に結合させていることが示された。これまでの臨床的研究⁷⁾から、ジストロフィンの機能にとってこのシステイン頻出ドメイン周辺領域の重要性がすでに指摘されてきている。今回の我々の結果は、この事実を分子レベルで合理的に説明するものであった。

材 料 と 方 法

〈DAPCの精製〉：ジストロフィン-結合タンパク質複合体 (DAPC) は既に吉田らの報告している方法に基づいてウサギ骨格筋から精製した⁵⁾。但し、本研究ではジチオスレイトール (DTT) を筋肉の膜画分調製時に 2 mM, 以後のカラムクロマトグラフィーにおいては 0.5 mM となるように添加した。

〈カルパインによる DAPC の消化, および消化物の WGA による分離〉：カルパインはシグマ社から購入した。消化反応は DAPC/カルパイン = 100 : 1 という重量比で 25°C 30 分間おこなった。使用した緩衝液は以下の通りである。(20 mM HEPES, 270 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 % digitonin, pH 7.5)。反応は 5 mM EGTA の添加によって停止させた。その後溶液を、レクチン結合用緩衝液 (20 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 10 μg/ml leupeptin, pH 7.5) によって平衡化した WGA-Sepharose カラムに通し、消化物を WGA 吸着画分と非吸着画分とに分離した。その際、WGA 吸着画分の溶出は N-アセチル-D-グルコサミン (NAG) を含む緩衝液 (20 mM HEPES, 0.3 M NAG, 0.5 mM DTT, 0.1 % digitonin, 10 μg/ml leupeptin, pH 7.5) を用いておこなった。

〈抗ジストロフィン抗体〉：抗体 P00a, P04d, P23a 及び P34c に関してはすでに報告している。それぞれヒトジストロフィンのアミノ酸配列 11-60, 440-489, 2360-2409 および 3495-3544 を認識するポリクローナル抗体である。Dy4/6D3 は Nicholson 博士の好意によって入手した単クローン抗体であり、ヒトジストロフィンの 1180-1388 番のアミノ酸配列を抗原としたものである。今回作製した二つのポリクローナル抗体 P30b 及び P31b は常法に従い以下のように作製した：それぞれ、ヒトジストロフィンの 3085-3097 及び 3186-3200 番のアミノ酸配列に対応する合成ポリペプチドを牛血清アルブミン (BSA) に結合さ

せ、それを抗原としてウサギを免疫した。できた抗血清は BSA-Sepharose カラムに通し、抗 BSA 抗体を血清中から除去した。

結 果 と 考 察

ジストロフィン-結合タンパク質複合体 (DAPC) をカルパインによって準定常状態にまで分解すると、図 1a lane 1, 2 に示すような結果を得る。ジストロフィンはカルパイン消化に対して非常に感受性が高く、速やかに 145 kD, 117 kD, 100 kD, 54 kD, 44 kD 及び 33 kD などの断片に分解する。一方、結合タンパク質は、A0 及び A3a を除いて、そのほとんどがカルパイン消化に対して抵抗性を示しているようにみえた。実際、DAPC の示す消化パターンは精製したジストロフィンの消化パターンとほとんど変わらず、結合タンパク質の存在による主要な新しいバンドがあまり見られないことが指摘されている (吉田未発表データ)。少なくとも、結合タンパク質に含まれる糖タンパク質のカルパイン消化抵抗性は、ビオチン化 WGA を用いた染色によって確認された：DAPC 中の糖タンパク質、A2, A3b 及び 156 kD プロテインの分子量はカルパイン処理によってほとんど変化せず、また WGA 結合能を完全に維持していた (図 1 b)。従って、もしカルパイン処理がジストロフィンと糖タンパク質との結合を損なっていないならば、消化物を WGA アフィニティークラムに通した場合、糖タンパク質との結合部位をその内部に有するジストロフィン断片のみが WGA に吸着すると考えられる。実際、図 1a lane 3, 4 に示すように、ジストロフィン断片のうち 145 kD 断片の一部 (145 b) 及び 100 kD 断片が WGA に対する結合性を維持しており、これらの断片に糖タンパク質結合部位が存在すると考えられた (図 2) (またこの実験において、結合タンパク質のうち A1 のみが、あまり分解を受けていないにもかかわらず他のものと異なる挙動を示し、WGA に吸着できなくなることも示された。従って、A1 のジストロフィン結合部位は他の結合タ

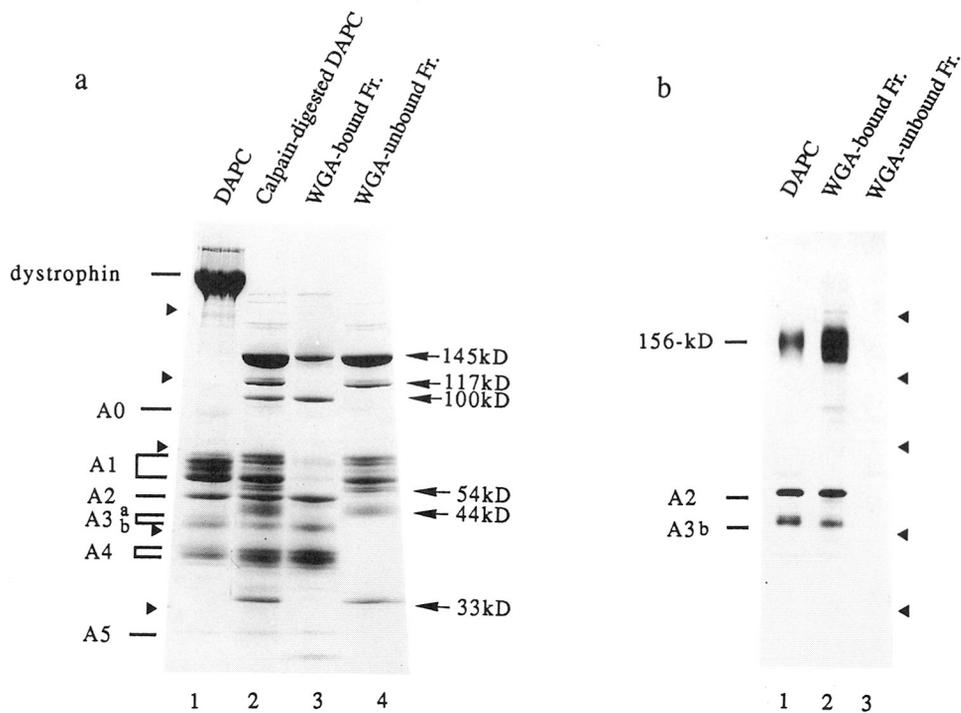


図1 ジストロフィン-結合タンパク質複体のカルパイン消化パターン，および消化物のWGAアフィニティーカラムによる分離。aはクーマジーブル染色，bはビオチン化WGAをもちいたプロットイング染色。

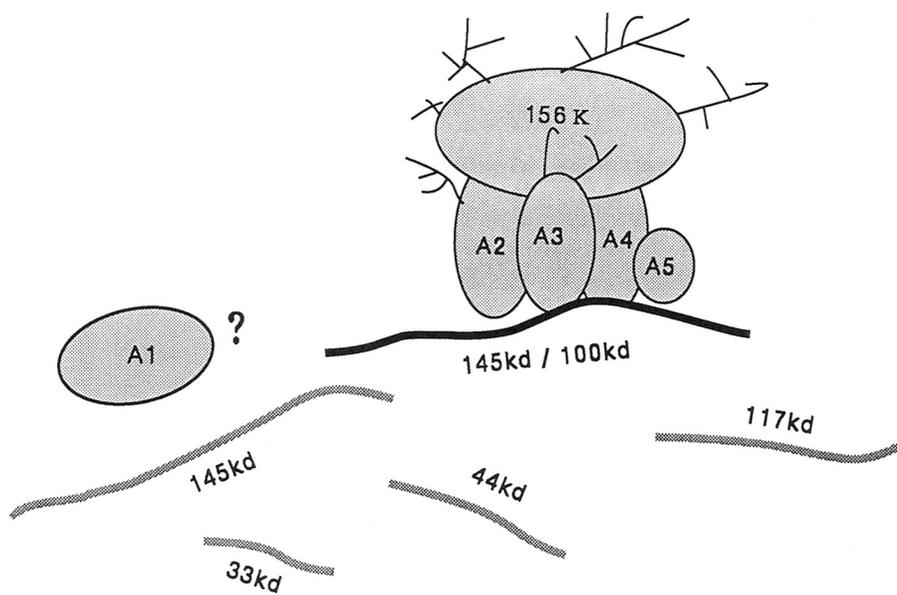


図2 図1の結果の模式図。

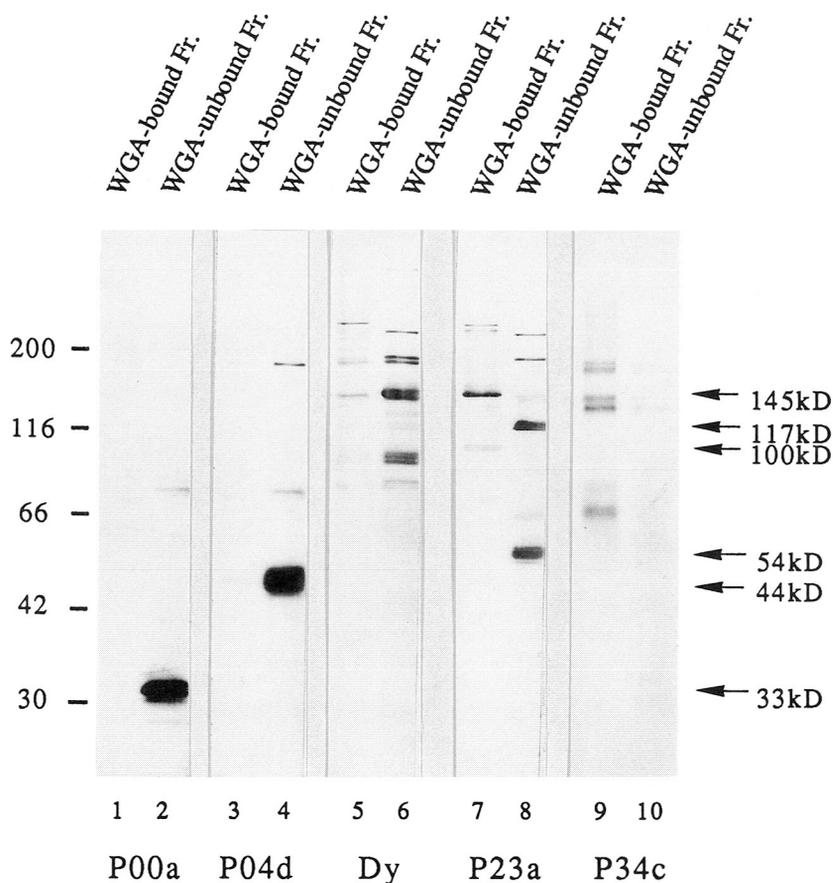


図3 WGA吸着, および非吸着画分の各種抗ジストロフィン抗体を用いたイムノブロット。各抗体のエピトープの位置は, 図5を参照のこと。

ンパク質の結合部位とは異なる可能性がある)。膜タンパク質結合部位をジストロフィン分子上で同定するため, ジストロフィン分子のさまざまな部分を認識する5種類の抗体を用いてWGA吸着画分, 非吸着画分のイムノブロットをおこなった(図3)。これから, 上記の145bはP23aで認識され, 100kD断片はどの抗体とも強い反応性を示さないことが明かとなった。また, ジストロフィン分子のC末端にエピトープをもつP34cは145b及び100kDのどちらの断片にも反応しなかった。これから, 膜タンパク質結合部位が, 予想されているC末端ドメインより内部に存在することが示唆される。さらに興味深いことに, P23aはWGAに

結合しない117kD断片も認識した。すでにこの117kD断片のN末端は145bのN末端と同一で, ヒトジストロフィンの1993番からのアミノ酸配列に相同であることが吉田らによって示されている(吉田未発表データ)。従って以上の結果から, ジストロフィンの膜タンパク質結合部位は, 145bと117kD断片の非重複部位に存在する事が示唆され, 分子量のおおまかな見積りから, それはジストロフィンのシステイン頻出ドメイン周辺に位置することが予想された。次に私たちは, この領域のアミノ酸配列を認識する2種のポリクローナル抗体P30b及びP31bを新たに作製し, それらを用いてイムノブロットをおこない, この予想を確

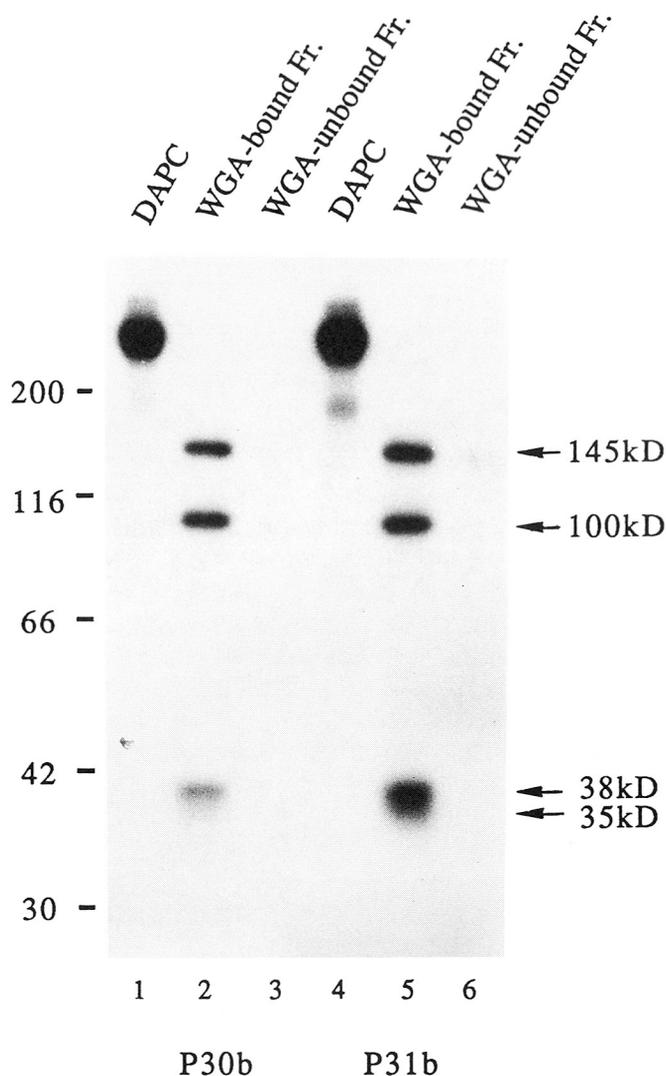


図4 新たに作製した抗ジストロフィン抗体、P30b及びP31bを用いた免疫ブロット。

認した(図4)。すなわち、これらの抗体は117kDを含むWGA非結合性の断片は全く認識せず、一方WGAに結合した145kD及び100kD断片を共に認識した。さらにこれらの抗体は、これまでに同定されていなかったWGA結合性の2つの小さなジストロフィン断片、38kD及び35kD断片を新たに認識した。これらは、145kD断片と117kD断片の非重複部分に対応すると考えられる。特に35kD断片はカルパイン消化によって生成するWGA

結合性の最小の断片と考えられるが、P30bのこの断片への反応性はP31bよりもかなり弱かった。従って、35kD断片のN末端はP30bのエピトープ周辺にあることが予想される。

以上の結果を総合すると、ジストロフィンの膜タンパク質結合部位は、P30bのエピトープ周辺からC末端側へ35kDの範囲、すなわちアミノ酸番号では約3090-3400の領域に限定し得ることが明かとなった(図5)。この領域は、ジストロフ

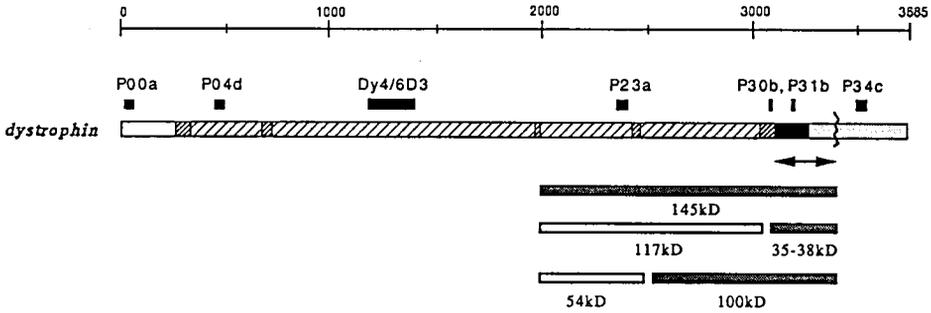


図5 ジストロフィンの各フラグメントの位置, および膜タンパク質への結合に必須な部分の同定。

中央のジストロフィン分子模式図内部には, 一次構造から予測されている四つのドメイン構造¹³⁾がわかるように示してある。: N末端ドメイン(白色部), スペクトリン様の棒状ドメイン(斜線部), システイン頻出ドメイン(黒色部), C末端ドメイン(点描部)。濃い斜線の部分は, Koenig らがプロテアーゼの消化を受け易い部分として予測した“ヒンジ”領域¹²⁾を示している。WGA 結合性のジストロフィン断片は影付きのバーで, 非結合性断片は白色バーで表している。矢印で示した領域は, ジストロフィン分子上で最もその一次構造が保存されている領域である。C末側のギザギザの実線は, 可変的スプライシングが主要に起こる位置を示す。

イン分子上のシステイン頻出ドメイン, 及びC末端ドメインの頭の部分を主としてカバーしており, ヒトジストロフィンのアミノ酸配列の中で最も(>99%)保存されている部分3123-3418⁸⁾に驚くほどよく一致していた。近年, 筋肉膜上に存在することが観察されてきている⁹⁾ジストロフィン関連タンパク質(DRP)のC末端も, この領域の3187-3400番のアミノ酸配列と高い相同性を示す¹⁰⁾。従って今回の結果は, DRPもまたジストロフィンと同様な膜タンパク質複合体を利用して膜にアンカーリングしている可能性をうかがわせる。また, ジストロフィンは組織によって異なる可変的スプライシングを受けて発現していることが指摘されている¹¹⁾が, その主要なスプライシング部位はアミノ酸残基でいえば約3408前後に存在している。従って, それ以降のジストロフィンのC末端は膜結合を中心的に担っているのではなく, むしろその結合を修飾し, ジストロフィンが

各組織特有の機能を果たせるようにしているのかもしれない。もちろん我々の今回の実験は, ジストロフィンのC末端と膜タンパク質複合体との相互作用を完全に排除するものではない。

Koenig らは, DMD/BMD患者の症状とそのジストロフィン遺伝子における欠損の位置との相関の解析をおこない, ジストロフィン分子上のどの部分が生理的機能にとって重要かを明かとする研究をおこなった⁷⁾。その結果, すでにこれまで, 重度な筋ジストロフィーの症状を示すに至るジストロフィン分子上の欠損は, 我々が膜タンパク質結合部位であると同定したシステイン頻出ドメインおよびC末端ドメインの頭の部分に集中していることが指摘されている。従って, 我々の今回の結果は, ジストロフィンと膜タンパク質との相互作用がジストロフィンの機能発現にとって決定的に重要であることを示唆している。

文 献

- 1) Arahata, K. et al. *Nature* **333**, 861 – 863 (1988).
- 2) Watkins, S.C., Hoffman, E.P., Slayter, H.S. & Kunkel, L.M. *Nature* **333**, 863 – 866 (1988).
- 3) Koenig, M., Monaco, A.P. & Kunkel, L.M. *Cell* **53**, 219–228 (1988).
- 4) Campbell, K.P. & Kahl, S.D. *Nature* **338**, 259–262 (1989).
- 5) Yoshida, M. & Ozawa, E. *J. Biochem.* **108**, 748–752 (1990).
- 6) Ervasti, J.M. et al. *Nature* **345**, 315 – 319 (1991).
- 7) Koenig, M. et al. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 498–506 (1989).
- 8) Lemaire, C., Heilig, R. & Mandel, J.L. *EMBO J.* **7**, 4157–4162 (1988).
- 9) Tanaka, H., Ishiguro, T., Eguchi, C., Saito, K. & Ozawa, E. *Histochemistry* **96**, 1–5 (1991).
- 10) Love, D.R. et al. *Nature* **339**, 55–58 (1989).
- 11) Feener, C.A., Koenig, M. & Kunkel, L.M. *Nature* **338**, 509–511 (1989).
- 12) Koenig, M. & Kunkel, L.M. *J. Biol. Chem.* **265**, 4560–4566 (1990).

5 ジストロフィン は骨格筋 T管 (直下) に存在する

山下 茂*

研究協力者 鳥居 俊** 佐々木 博之*** 野々村 禎昭*

Kunkel らによって蛋白質ジストロフィンが筋ジストロフィー病因遺伝子産物ということが明らかにされてから、骨格筋でのその局在、機能について多くの研究がなされている。局在については細胞膜 (下) の存在について杉田ら¹⁾ が示して以来、筋腱接合部、神経筋接合部に濃厚に存在するという結果の他はみるべきものがない。

細胞膜の陥凹である T管膜でのジストロフィンの局在については、その存在がそもそもトライアドからとられた²⁾ という歴史的背景から、先ずこの附近に存在すると考えられたにも拘らず、最近、Kunkel らはむしろ否定的な結果を示している³⁾。

我々はジストロフィン配列の最 C端 25 残基アミノ酸を合成し、システインを加えこれら 8 個をリジンでつないだフォーク型抗原から特異性が高く、抗体価の高いポリクローナル抗体を得たことを昨年報告した。この抗体を用いて、種々の方法を駆使して、T管膜附近に本当にジストロフィンが存在しないのかを明らかにすることにした。

方 法

ラットを 1%パラホルムアルデヒド灌流又は剔出後 30 分程固定 (リン酸バッファー下)、高張蔗糖で 24 時間以上置換後、凍結し、主として縦断切片

を作製した。スキムミルク、血清アルブミンでブロック後、同液に溶かしたフォーク抗体で 37°C で 3 時間反応させ、良く洗浄してから、ABC 液又は HRP 標識 2 次抗体又は FITC 標識 2 次抗体で同上ブロッキング液中に 37°C 1 時間以上反応させ、良く洗ってから HRP、ABC では強力染色法を行い検鏡、FITC は DABCO - 50% グリセロール処理後蛍光顕微鏡下で観察した。

電顕標本は同上 HRP での普通染色を確認 (後述する T管との反応) してから、スライドガラス上でオスミウム後固定、脱水、エポキシ樹脂に包埋、細切した後軽くウラン染色した。

結 果

FITC 染色は全ての標本で細胞膜が染っていた。時に縦方向に垂直に周期的に蛍光が認められることもあったが明らかではなかった。この頃迄、一次抗体反応は室温 2 ~ 3 時間又は低温室オーバナイトを行ってきたが 37°C 3 時間反応を行うことによって、この周期は認め易くなった。さらに油浸で 1,000 倍で観察するとフォーカスを変えると周期が明らかな面があることに気付いた。普通 400 倍程度では表面膜しか染っていないのに油浸で明らかにフォーカスの差によって周期が認められることがわかった。第 1 図にそのような例を示すが、a で表面膜のみが染っていたものがフォーカスを変えると、c、d、e の上部の細胞では明らかに周期がみえてくる。この時下部の細胞では膜が周期に一致してドット状に染っている。この周期間隔は標本をどの様な長さで固定するかで異ってい

* 東大医薬理

** 東大医整形

*** 慈恵医大医化研

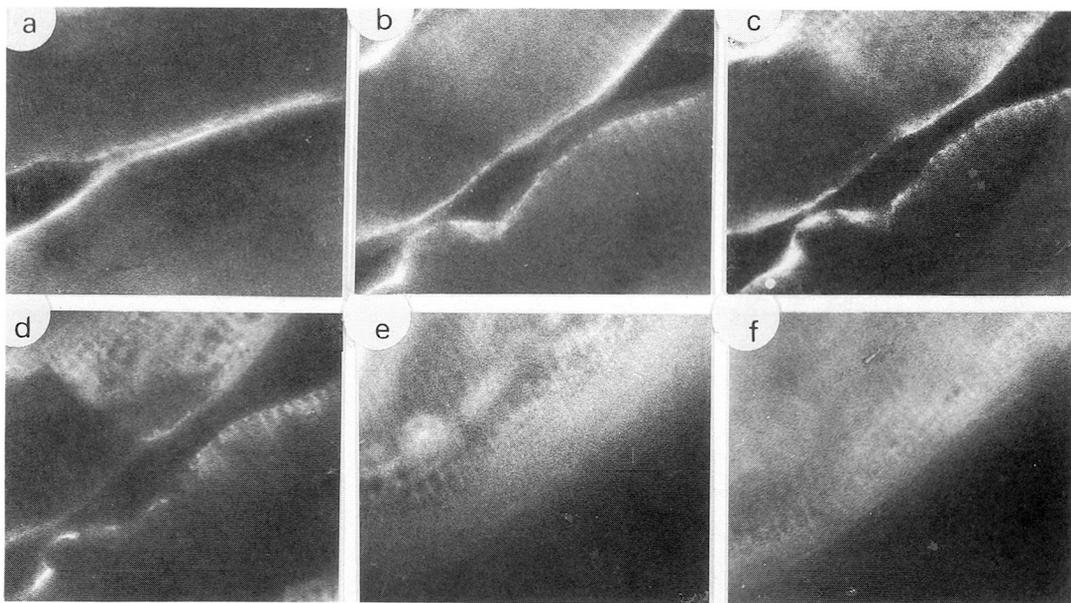


図1 油浸顕微鏡高倍率でフォーカスを変化させた際のジストロフィン抗体反応位置の変化

ラット凍結切片(骨格筋縦断像)の抗体反応をFITC-標識二次抗体でaからf迄フォーカスを変えた像変化を写した。a; 2つの細胞膜が染っている。b; 2つの細胞で縦断面に垂直に周期がみえてくる。下の細胞では周期に対応してドット状に染まる。cとd; 上の細胞の周期, 下の細胞のドットはさらに明らかになっていく。eとf; 下の細胞は視野から消え, 上の細胞は全体が光って(周期は一部残して)いる。恐らく膜表面にフォーカスがあっていると思われる。

るが、あまり解像出来ない為、こまかい議論は出来なかった。

そこでABC染色を行い、強力に染色してみたところ第2図aに示す様なきれいな周期を得ることが出来た。この時の濃い帯の中は約 $1.2\sim 1.5\mu\text{m}$ 薄い帯の中は $1.3\sim 1.6\mu\text{m}$ 、連続で同時につくった標本位相差像から筋原線維周期 $3.0\mu\text{m}$ なので、この染色はA-I接合部に一致し、T管膜の存在する場所と一致している。これ迄は骨格筋であったが、若しT管膜で反応がおきているとすれば心筋ではZ帯に相当する処にあり、一般に心筋は短縮状態で固定されるが第2図では、位相差で $2.2\mu\text{m}$ の筋原線維周期をもっていたが、同様に $2.2\mu\text{m}$ で等間隔でABC染色反応を示していた。これらの染色は強力に行っているの、コントロールをみてみたが、b, dに示すようにこの様な特異的周期はみられ

なかった。

免疫電顕法には色々な方法があるが、我々は光顕との対応も出来、もとの像がはっきりとらえられる「方法」に書いたpost-embedding法をとった。但し像の維持をよくする為、比較的状態の良い(この様な時、ABC染色は弱)が染色は特に強くはないが周期構造をもっているものについて標本作製を行った。第3図に示すようにT管と筋小胞体の僅かな間隙にHRP染色が認められた(矢尻頭で示す)。この例は一般ウラン後染色が強すぎた為、対比的にうまくは示せなかったが、広範囲にわたって、この限られた領域が染っていた。

考 察

これ迄、ジストロフィン抗体でT管附近を染めることが出来なかったのは、3図でみられるよう

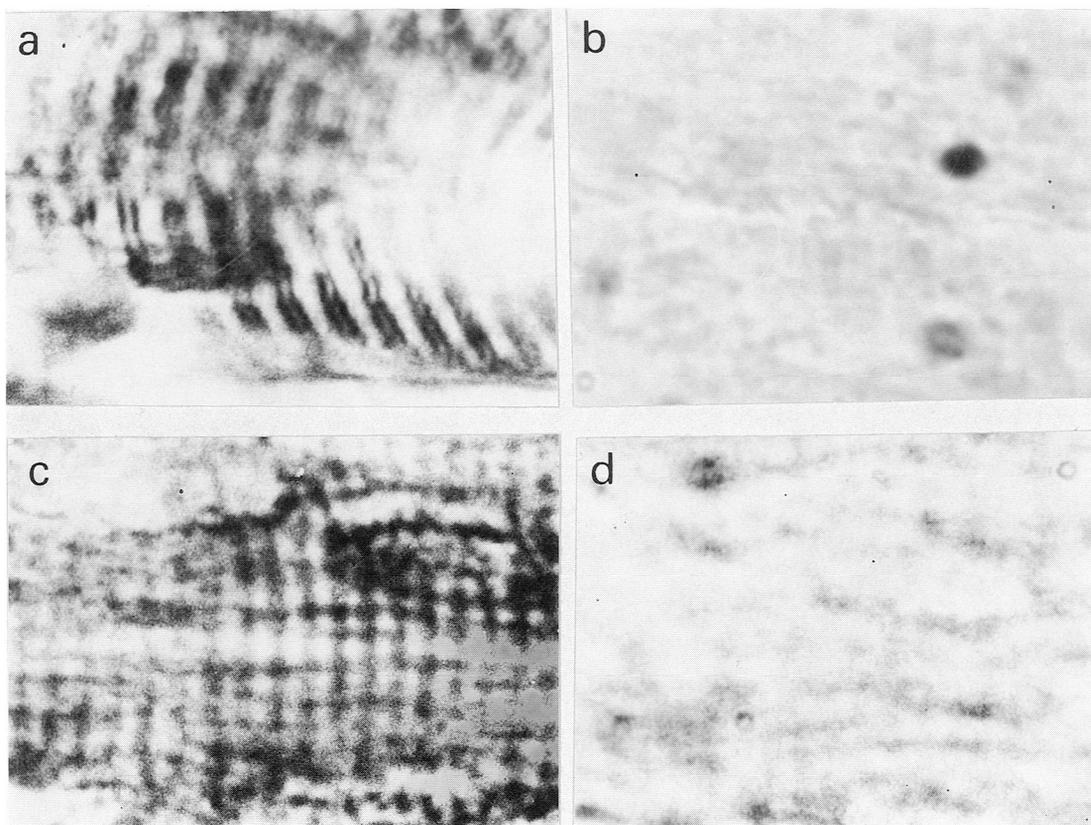


図2 骨格筋、心筋でのジストロフィン抗体反応のABC法での表示
 a, b; ラット骨格筋, c, d; ラット心室筋。a, cはジストロフィン抗体反応標本。b, dは2次抗体のみの発色のコントロール。aではA-I 接合部を, cではZ 帯部に相当する場所を染めている。

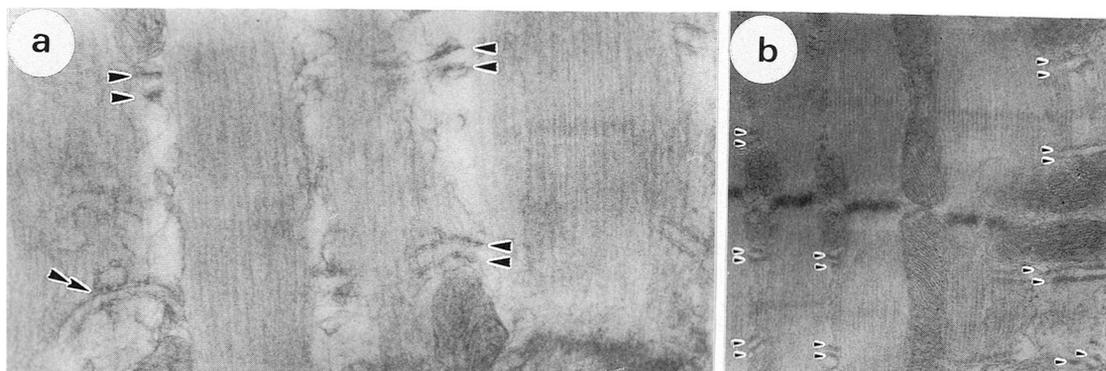


図3 第2図の様な処理を行った後の電顕標本(ラット骨格筋)
 ABC染色はa, b(低倍率) 共T管と筋小胞体間の間隙(リアノジン受容体のフットのある処)を選択的に染めている(矢尻頭で示す)。フットと区別出来ない場所もある(2重矢尻頭)。

に、非常に僅かな範囲領域でしか反応しないので、光顕レベルで可視化することは最初から困難であった。この為には37°Cで反応させることが必要であり、しかも1図でみるように油浸にして1,000倍という高倍率でフォーカスを変えながら観察する必要があった。この結果からT管(下)にジストロフィンが存在することは明らかになったが特に心筋と骨格筋では反応様式が異っているということは我々の結果が正しいことを示している。見えないからといって存在しないと結論することは危険である。我々は逆に認められたから存在するという立場であるので優位であったと言えるだろう。又、その存在は非常に微妙なものであって、これ迄認められなかったのも当然かもしれない。おかげで我々は抗原抗体反応を強く表示する方法を確立することが出来た。

一方、若しジストロフィンが細胞表面膜のみで

あったらその量は極端に少いことになるが、T管膜にあれば、或る程度の量は存在することになる。骨格筋は心筋の約2倍量(A-I接合部はZ帯に対して2倍)あることになるし、トリアッド分画にはかなり存在することになる。これらを含めて量的な問題、生化学的分画を骨格筋、心筋でやり、その量を比較検討することなどをやっていきたい。又、トリアッド分画で直接ジストロフィンの存在を証明することも検討していきたい。

文 献

- 1) Arahata, K. et al., (1988) Nature 333, 861
- 2) Hoffman, E.P. et al., (1987) Nature 330, 754
- 3) Bayers, T.J. et al., (1991) J. Cell Biol 115, 411

6 筋形質膜裏打ち構造およびジストロフィン局在に関する超微形態学的研究

石川 春 律

研究協力者 藤 卷 昇 増 田 俊 和 村 上 徹
尾 野 道 男 嶋 田 修 古 村 南 夫
アブ・サレム

はじめに

筋ジストロフィー症の筋線維に欠損する蛋白質としてジストロフィンが同定されて以来、この蛋白質の化学的性質、細胞内局在、分子形態などの研究が急速に進んでいる。この蛋白質は正常筋線維の形質膜に局在することが示され、おそらくは形質膜を裏打ちしていると考えられている^{1,2)}。しかしながら、この蛋白質がどのような高次構造を作り、膜とどのように連結しているかは推論の域を出ていない。

最近になって、ジストロフィンに特異的に結合する糖蛋白質の存在が明らかにされ、ジストロフィンとはそれらと複合体をなして筋形質膜に固定されていると考えられている³⁾。この糖蛋白質はWGA結合性を有し、一部が細胞外に突出しているという⁴⁾。しかし、このジストロフィン-糖蛋白質複合体の分子形態、局在、および膜との相互関係はいまだ明らかにされていない。

われわれは、これまで、各種電子顕微鏡技法を駆使し、ジストロフィンの分子形態および局在を明らかにすることを目的に研究を進めている。昨年度は、モルモットの正常骨格筋について、抗ジストロフィン抗体を用いた蛍光抗体法によって、ジストロフィンの分布様式を調べ、電子顕微鏡によって調べられた裏打ちの分布⁵⁾との相関を検

討した。とくに、共焦点レーザー顕微鏡を応用することによって、ジストロフィン免疫染色性が筋形質膜に沿って一様な分布ではなく、不連続で、しばしば内部の筋原線維の横紋と関係した格子模様の分布を示すことを明らかにした。また、筋腱連結部において、筋線維端に極めて強い免疫染色性が認められた。この部位では、形質膜のほとんどは典型的な裏打ち構造を有しており、この免疫染色性と裏打ちは場所的によく重なる。

筋形質膜と裏打ち構造ないしジストロフィンとの関係を超微形態学的に分析するためには、より単純化した系についても調べる必要がある。われわれは今回、筋形質膜標本を調製し、これについて、各種電子顕微鏡法を応用して分析したので報告する。

材料と方法

本研究に用いた筋形質膜標品はOhlndieckらの方法⁶⁾によって調製した。成熟家兔から背筋を切り出し、緩衝液中でホモジェナイズし、遠心し、その上清を再び超遠心した。その結果得られる上清を軽マイクロゾームとした。この軽マイクロゾームをさらに0.6MKC1で処理し、超遠心することを繰り返した。その沈渣を次に蔗糖密度勾配で超遠心し、0.303M/0.878M蔗糖界面の膜分画を粗筋形質膜分画として、主な分析試料とした。試料の一部として、この粗膜分画からWGA凝集法によ

ってさらに鈍化したものも用いた。

以上の各段階の膜標品から、ネガティブ染色法、超薄切片法、シャドウイング・レプリカ法により試料を作製し、電子顕微鏡にて観察した。超薄切片試料には、タンニン酸を含むアルデヒド固定液を用いた。抗ジストロフィン抗体にはモノクローナル抗体 4-4C5 (IgG) 腹水 (富士レビオ[®]および味の素[®]提供) を用いた⁷⁾。

結 果

(1) 軽ミクロゾーム

この標品をネガティブ染色で観察したところ、膜成分に加え、多量の線維構造の混在が認められた。線維構造は主としてアクチンおよびミオシンフィラメントからなっていた。膜はすべて小胞状を呈し、形態的には多様であった。次に、軽ミクロゾームを 0.6 M KCl 処理を施した膜標品では、線維構造はわずかで、散在性に認められるのみで

あり、ほとんどがアクチンフィラメントであった。

(2) 粗筋形質膜

次の段階として、蔗糖密度勾配超遠心で得られた膜標品はすべて膜のみからなり、線維構造は全く見いだされなかった。まず、ネガティブ染色で調べると、膜成分は円形、楕円形、管状、不定型など形態的に多様で、大きさも様々であった (図 1)。リボゾームが付着する小胞は認められなかった。これらの膜の中で、比較的大型で不定形の小胞をなすものはしばしば中に膜構造を容れ、また微細な線維構造が小胞内面に付着するのが観察された。このような形態は超薄切片の観察において明瞭に認められた (図 2)。大型、不定形の小胞は膜が比較的厚く、3 層構造が明瞭で、内部には微細線維構造の裏打ちや膜の封入が認められた。さらに、膜表面に粒状の突出が多数観察された。われわれは、これらの特徴を持つ小胞を筋形質膜由来とみなすことにした。これらの特徴に基ずくと、

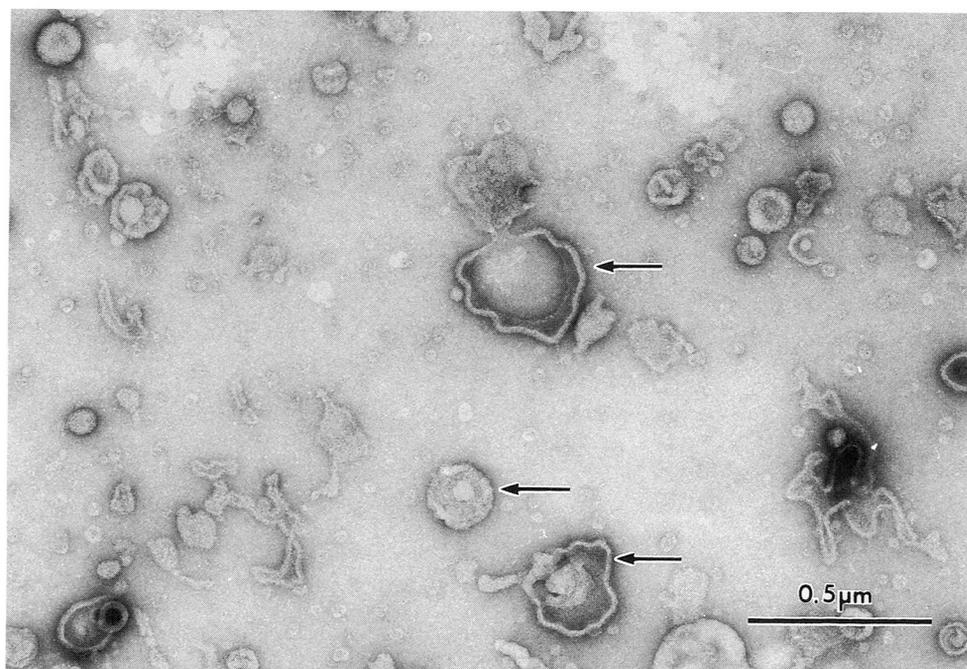


図 1 粗筋形質膜標品のネガティブ染色像。
大型不定形の小胞 (矢印) が散在性に見出される。内部に膜や線維構造を容れており、筋形質膜由来と考えられる。



図2 粗筋形質膜標品の超薄切片像。

表面平滑な球形や管状の小胞に混じって、大型不定形の、線維構造などを内容物にした筋形質膜小胞(矢印)が多数認められる。

粗筋形質膜標品の全小胞の $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{1}{4}$ が形質膜と概算される。実際、コロイド金標識のWGA(麦胚芽凝集素)を反応させたのち、ネガティブ染色して観察すると、これらの特徴を持った小胞のみが金標識を示した。

超薄切片を強拡大で観察すると、いくつかの興味ある所見が得られた。まず、形質膜と見なされる小胞には、膜を裏打ちするように微細な線維構造が網目をつくっていて、膜と密接に連結しているように見えた(図3)。裏打ちする線維構造の主体はアクチンフィラメントより小さく、また、線維構造は膜に沿って一様に分布することはほとんどなく、不連続な分布様式を示した。興味深いことに、裏打ちのある膜領域では、膜から外へ突出する粒子像が常に認められた(図4a, 6a)。この突出は長さがほぼ一定していて、膜面から約12~15nmであった。この突出は膜が斜めに切れた領域では平面的に分布した粒子像として観察できた

(図4b)。

膜から突出する粒子像はシャドウイング・レプリカ法による電子顕微鏡観察からさらに明瞭に観察された(図5)。多くの膜は外表面が比較的平滑であるのに対し、一部の膜に多くの粒子が集団をなして分布するが認められた。粒子像は大型・不定形の膜に多く、ネガティブ染色および超薄切片の観察とよく一致する。このように、粒状突出と内部の線維性裏打ちとが局在的によく一致することは興味深い。

(3) 免疫電顕観察

粗筋形質膜標品にはかなりのジストロフィンの濃縮が電気泳動的に認められる。したがって、筋形質膜と見なせる小胞にはジストロフィンが含まれているはずであり、ジストロフィンはおそらく裏打ちする微細線維網形成に関与すると考えられる。そこで、この膜標品を支持膜を張ったグリッドに載せ、免疫電子顕微鏡的に反応させた。抗体



図3 筋形質膜

筋形質膜 (SL) は概して大型不定形の小胞をなし、しばしば内部に膜を容れ、線維構造の裏打ち (矢印) や外表面に突出する粒状構造が特徴的である。大矢印は膜が切線方向に切れた部位を示す。

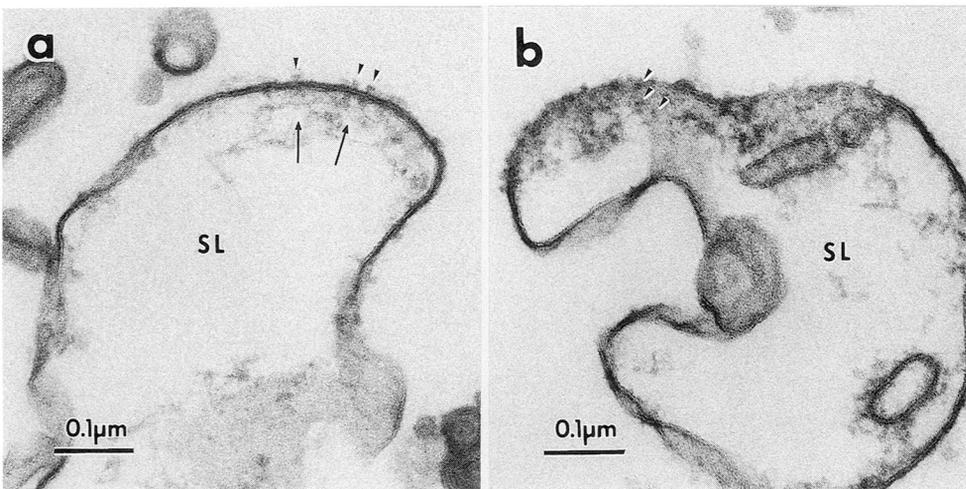


図4 筋形質膜

- 横切りされた筋形質膜 (SL) の直下に線維構造の裏打ち (矢印) が形成されており、その部位に一致して外表面に粒状構造 (矢じり) が認められる。
- 膜が切線方向に切れた部位では、膜表面に粒状構造 (矢じり) の平面的分布が観察される。

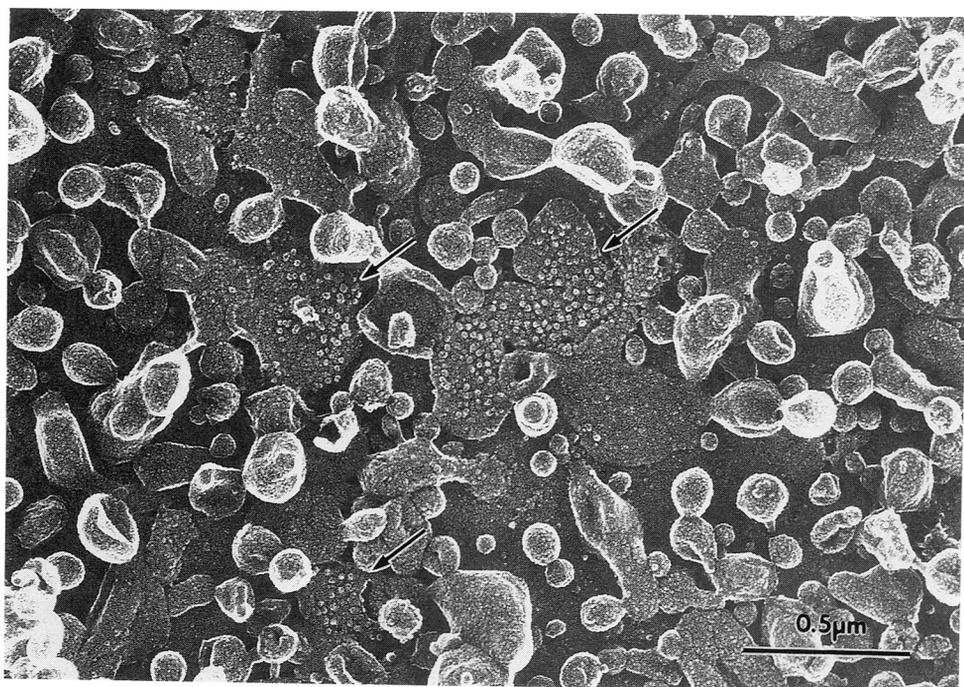


図5 粗筋形質膜標品のレプリカ像
 平滑な表面の小胞に混じって、表面に多数の粒状構造を有する大型不定形の小胞(矢印)が認められる。

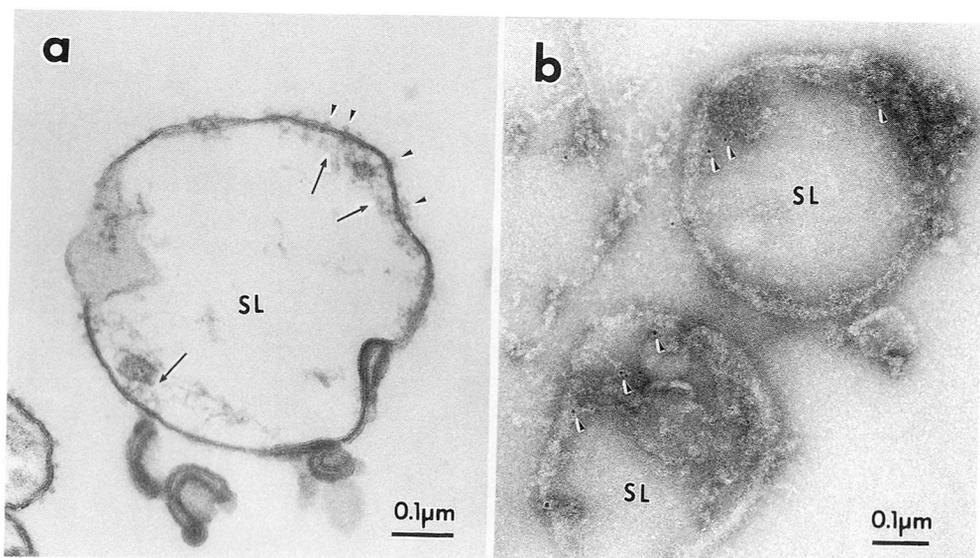


図6 筋形質膜

- a. 筋形質膜 (SL) の超薄切片像。膜直下の線維性裏打ち(矢印)と外表面の粒状構造(矢じり)との関係に注目されたい。
- b. 抗体染色した筋形質膜 (SL) のネガティブ染色像。0.1%トリトン前処理後、間接法にて抗ジストロフィン抗体染色を施してある。標識金粒子(矢じり)は膜直下の線維構造上に見出される。

にはモノクローナル4-4C5を用い、二次抗体にはコロイド金を標識したものをを用いた。無処理の膜では全く金染色は見られなかったが、0.1%トリトンX-100処理後では、小胞内の線維構造が選択的に染色された(図6b)。さらに、1%トリトンで前処理すると、膜はかなり破壊、抽出され、内部の線維構造が分散傾向を示したが、小胞に関係した線維構造には染色が認められた。このことは、膜を裏打ちする線維網がジストロフィンを含むことを示したことになる。

現在、さらに純化した筋形質膜標品についても同様の分析を進めている。

考 察

本研究では、単離した筋形質膜の超微構造を各種電子顕微鏡法を用い、分析した。粗形質膜分画の中で、膜を裏打ちする微細線維網の存在は特徴的で、この線維網がジストロフィンを含むことを免疫電顕的に示すことができた。このような線維網がどのような蛋白質構成を有するか、また、筋細胞におけるどのような構造に相当するかはさらに検索が必要である。さらに興味深いことは、この線維網の局在に一致して、膜上で外へ突出する大型の粒状構造が見出されたことである。この粒子が膜内蛋白質と関連の深いことは疑いなく、最近明らかにされたジストロフィン結合糖蛋白質の

一部である可能性が高い。結合蛋白質の一つは大きな分子で、細胞外に大きく突出しているらしい⁸⁾。今後、結合蛋白質に対する抗体を用いて、今回可視化された粒状構造とジストロフィンとの関連を調べていきたい。

文 献

- 1) Watkins SC, Hoffman EP et al (1988)
Nature 333 : 863 - 866
- 2) Arahata K, Ishiura, S et al (1988)
Nature 333 : 861 - 863
- 3) Campbell KP & Kahl SD (1989)
Nature 338 : 259 - 262
- 4) Ervasti JM, Ohlendieck, K, Kahl SD,
Gaver MG, & Campbell KP (1990)
Nature 345 : 315 - 319
- 5) Ishikawa H (1988) Arch. Histol. Cytol.
51 : 127 - 145
- 6) Ohlendieck K, Ervasti JM, Snook JB, &
Campbell KP (1991) J. Cell Biol. 112 :
135 - 148
- 7) Hagiwara Y, Yoshida M, Nonaka I
and Ozawa E (1989) Protoplasma
151 : 11 - 18
- 8) Ervasti JM & Campbell KP (1991)
Cell 66 : 1121 - 1131

7 ジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質を 広く動物界に検索する

小 浜 一 弘*

研究協力者 林 千 尋* 石 川 良 樹*

はじめに

近年になり、ジストロフィンに関し、筋細胞の膜蛋白質としての役割について興味ある知見が得られつつある。たとえば、アセチルコリン受容体とジストロフィンの局在が類似しているという報告(1)もそのうちのひとつであろう。この研究はジストロフィンがアセチルコリン受容体の密度の高いシビレエイの電気器管には異常なほど多重に存在するという研究を生んだ(2-4)。魚類であるにもかかわらずヒトのジストロフィンと同様な性質があった。ここに改めて、どの様な動物にジストロフィン又はその類似物質が存在するかという問題が生じるようになった。

本研究では図1に示される系統樹に従って、代表的な動物種につきそれらの筋組織にジストロフィンが存在するかどうかとウエスタンブロット法により検討したのでここに報告する。

実験方法

材料：ニッポンゴカイの体壁筋、イシダミガイの足筋、ベンケイガニの鋏部筋、ナマコの体壁縦走筋、マアジの肯筋、アフリカツメガエルの足筋、キンセンガメの足筋、mdx及びコントロールマウスの足筋、ニワトリ(白色レグホン)の胸筋。

試料調製：名大臨海試験場に於て新鮮な材料をドライアイス-エタノール中で急速に凍結し、ドライアイス存在下で群大に運搬した。ただちに液

体窒素に移し、液体窒素中に冷却したステンレス製のミルで機械的に破壊した。約0.3gの材料を10% SDS, 235 mM Tris-HCl(pH6.7) 3.35 mM EDTA, 10% 2-メルカプトエタノール及びブROMフェノールブルーより構成されるSDS サンプルバッファー0.6 ml中にすばやく移した。バッファー中の材料はさらにポッター型テフロンホモジェナイザーでさらにhomogenizeしたのち、沸騰した湯に3分間つけた。室温に一夜間放置し、このホモジェネートを14,000×gで10分間の遠心にかけて。遠心後の上清を試料として下記のウエスタンブロットに用いた。

ウエスタンブロット：調製した試料はSDS存在下の5%ポリアクリルアミド・スラブを用いた電気泳動にかけ(SDS-PAGEと略す)、ただちにPVDF-membrane(ミリポア社)に転写した。これはセミドライ転写装置(ニッポンエイドー社)を用い、0.175 M Tris-0.9 M グリシン及び20%のメタノールを含む転写バッファー中、20Vの電圧を約1時間にわたり氷冷下でかけて行なった。

一次抗体は国立精神神経センターよりいただいた抗ジストロフィン抗体:P34を用いた(5)。2次抗体はビオチン化した抗ラビットIgG抗体を用いた。発色反応はベクター社のVectastain ABCキットを用いて行なった。

電気泳動・転写は必ずダブルで行い、片方は上記の抗体染色、他方はアミドブラックの蛋白染色を行なった。電気泳動にかける試料の量はこの蛋白染色中のアクチンの量が各々の試料ではほぼ同じ

* 群馬大学医学部薬理学教室

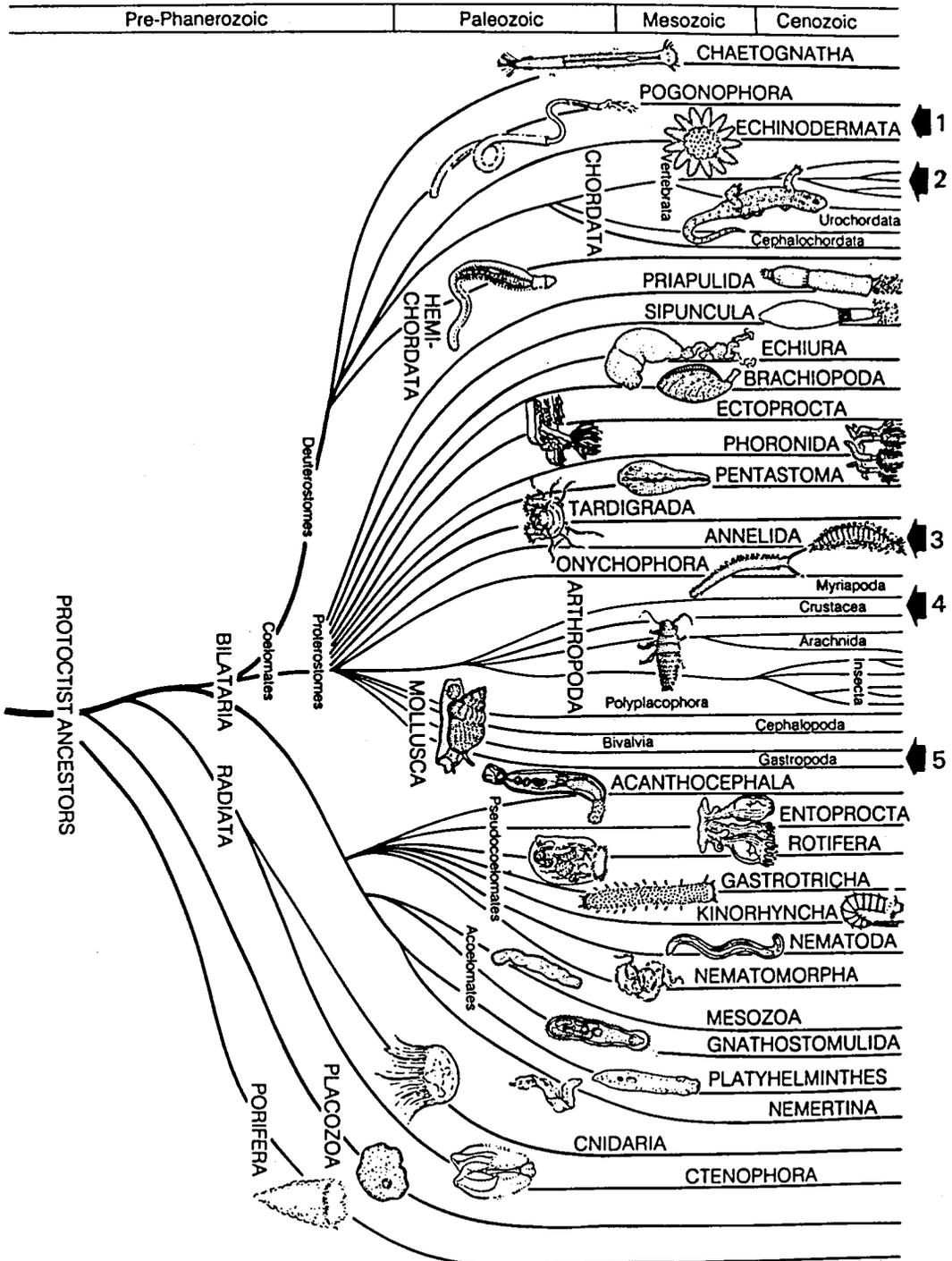


図 1. 用いた動物がどの程度の進化したものかを知る目的で柔軟樹に於てマークを入れた。矢印 1 はナマコ；矢印 2 はマウス，ニワトリ，カメ，カエル及びアジ；矢印 3 はゴカイ；矢印 4 はカニ；矢印 5 はカイが担当する。それぞれの動物の学名は実験方法の材料に示した。

になるように調節した。

本法によるジストロフィン検出はいくつかの研究室で行なわれているもので特に新しいものではないが、我々の研究室でも正常に作動しているかどうかにつき、mdx マウスとコントロールマウスより得られた試料をウエスタンブロットすることにより検討を加えた。図には示さないが確かに後者では 440 kDa に P 34 抗体と反応するバンドがみられたものの、前者には全く検出されなかった。

実験結果

図 2 は各種脊椎動物より得られた試料を同一の PVDF membrane に転写したのち抗ジストロフィン抗体と反応させたものである。ニワトリとカメの試料中にマウスのジストロフィンと同一の移動度を示すバンドが染色された。カエルでは反応が弱いながら同様のバンドがみとめられたものの、アジでは全く検出されなかった。

図 3 は脊椎動物以外のものについて検討を加えたものである。図 2 と同様にマウスを positive control として同一のウエスタンブロット上での抗体との反応性をしらべた。ゴカイ、カイ、カニ及びナマコすべてにおいて、マウスのジストロフィンと同一の移動度を示すバンドは検出されなかった。

以上より、マウス、ニワトリ、カメ及びカエルの骨格筋に於てはジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質が存在すると結論できた。アジ、ゴカイ、カイ、カニ及びナマコの筋組織に於てはジストロフィンが存在するというデータは得られなかったものの、ただちに存在しないと結論できなく、今後、検討の必要が生じている。

図には示さないが、シオシン重鎖又はそれよりも分子量の小さい側に、抗ジストロフィン抗体と反応するバンドがいくつかみられた。これらはジストロフィンの分解産物ないしはジストロフィンとエピトープを共有する蛋白質である。これらのバンドはジストロフィンの存在が証明される動物(マウス、ニワトリ、カメ及びカエル)よりの試料

のみならず、その存在の証明ができなかった動物(アジ、ゴカイ、カイ、カニ及びナマコ)の試料にも明瞭に存在した。特に後者の試料の結果についての解釈には今後検討が必要である。

考 察

本実験ではマウスのジストロフィンと同様のものがニワトリ、カメ及びカエルの骨格筋組織に存在することが証明された。マウスのジストロフィンを含め、SDS-PAGE の移動差に差異があるかどうかにつき今後検討の余地を残している。

魚類として、アジより試料を得たが図 2 に示すようにジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質は検出されなかった。同じ魚類でエイの電気器管にはそれが存在する(2-4)。エイの骨格筋に存在するかどうかという問題もあるが、P 34 抗体でみるかぎりでは魚類がジストロフィン又はジストロフィン様蛋白質の存在するかどうかの境界となるであろう。

魚類以下の(図 1 参照)動物よりの試料については、P 34 抗体でみるかぎりにはジストロフィン及びジストロフィン様蛋白質はなさそうである。しかし前述のように低分子側にいくつかの抗体と反応するバンドがあった。試料調製には蛋白質分解を防ぐよう最大の努力を払ったものの、ジストロフィン及びジストロフィン様蛋白質がすべて分解して低分子側に移行したという可能性が理論的には考えられる。しかし、この可能性は少ないと考えられ、今後ジストロフィン及びジストロフィン様蛋白質が存在しないということを明確にする必要があると考えている。このためには 1) 膜分画を得て、これにつき検討を加えること、及び 2) ジストロフィンの他の部位と反応する種々のジストロフィン抗体を用いて検討することが必要であろう。

用いた P 34 抗体はジストロフィンの N 末端近くを認識するものであるが(5)、この部位の異常がジストロフィー発症と関係が深いと考えられている。この考えに立てば魚類は問題点を残すが、

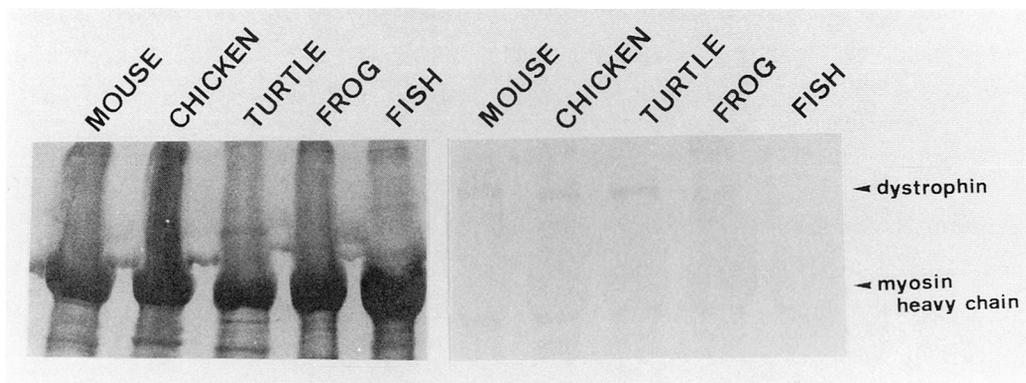


図 2. 各種脊椎動物の骨格筋よりの SDS 抽出試料をウエスタンブロット分析をしたもの。用いた抗体は P 34 抗体でジストロフィンの N 末近くを認識するものである。FISH (マアジ肯筋を用いた) には抗体と反応するバンドが positive Control の MOUSE (mdx マウスに対するコントロールマウス足筋を用いた) に担当する部位 (矢印で dystrophin と示す) 認められなかった。

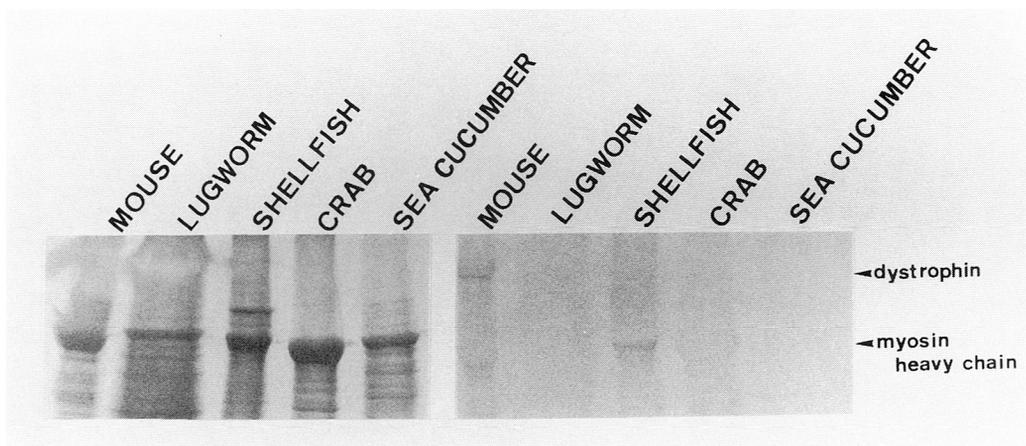


図 3. 下等動物の筋組織よりの SDS 抽出試料をウエスタンブロット分析したもの。positive Control の MOUSE に担当する部位 (矢印で dystrophin と示す) に抗体で染色されるバンドが認められなかった。

魚類より下等な動物の筋組織にはヒトのジストロフィー症と類似した病気は存在しないであろうと予想される。

文 献

1. Shimizu, T., Matsumura, K., Sunada, Y. and Mannen, T. (1989) Dense immunostaining on both neuromuscular and myotendon junctions with an antidystrophin monoclonal antibody. *Biomed. Res.* **10** : 405-409.
2. Chang, H. W., Bock, E. and Bonilla, E. (1989) Dystrophin in electric organ and vertebrate skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **109** : 1753-1764.
3. Sealock, R., Butler, M. H., Kramarcy, N. R., Kramarcy, N. R., Gao, K. -X., Murname, A. A., Douville, K., and Froehner, S. C. (1991) Localization of dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **113** : 1133-1144.
4. Jasmin, B., Cartaud, J. A., Ludosky, M. A., Changeux, J. -P. and Cartaud, J. (1990) Asymmetric distribution of dystrophin in leveloping and adult *Torpedo marmorata* electrocyte: evidence for its association with acetylcholine receptor-rich membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 3938-3941.
5. Hagiwara, Y., Yoshida, M. and Ozawa, E. (1989) *Protoplasma* **151** : 11-18.

II 細胞膜タンパク質と細胞骨格

8. 細胞膜関連構造に局在する α -アクチニンのクローニング 45
9. 骨格筋細胞の発達・萎縮とアクチン細胞骨格調節因子
コフィリンの量的変動 49
10. MAP 2C cDNA の強制導入と標識チューブリンの
微量注入による微小管の動態と解析 56
11. 筋巨大蛋白質の発生とその局在 63
12. AMPA型グルタミン酸受容体チャンネルの Ca^{2+} 透過調節機構 68

8 細胞膜関連構造に局在する α -アクチニンのクローニング

真崎知生*

研究協力者 今村道博** 桜井武** 小川昌克**

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症患者に特異的に欠損している遺伝子産物(ジストロフィン)は正常人では骨格筋細胞の形質膜直下に局在していることが示されている¹⁾。このジストロフィンのアミノ端領域の一次構造は α -アクチニンおよび β -スペクトリンのアミノ端領域の一次構造と高い類似性を有しており^{2,3)}、また、 α -アクチニン分子の構造解析により、この領域はアクチン結合構造を含むことが明らかにされているため⁴⁾ジストロフィンがアクチン系細胞骨格を含む膜の裏打ち構造の構築に深く関与していることが示唆されている。細胞内における蛋白質の局在はその蛋白分子の機能を解析する上で重要な情報を提供するが、ジストロフィンとスペクトリンの両者が細胞膜直下に局在するという事実は、この2種類の蛋白間の相同性が高い一次構造領域がそれらの局在に関与し、類似した機能を担っているということを暗示している。ただし α -アクチニンについて考えてみると α -アクチニンは骨格筋筋節のZ-線や、平滑筋細胞の濃密斑⁵⁾、また非筋細胞のストレスファイバーや接着斑⁶⁾というような、主に細胞膜領域を除くアクチン線維の統合部にその局在が認められ、ジストロフィンやスペクトリンの局在とは全く区別される。近年、我々は全く新しいタイプの α -アクチニン(115 k蛋白質)を発見し、この分子が未熟な骨格筋細胞

において細胞形質膜関連構造に局在するという結果を得た。このことは、115 k蛋白質の一次構造と、ジストロフィンやスペクトリンの構造を比較することによって分子構造と機能の関連について新たな情報が得られることを示していると言える。

そこで我々は、まず、この新しい α -アクチニン分子種の一次構造を明らかにする目的でcDNAクローニングを行なった。

材料と方法

cDNAライブラリーの作製：Li-Urea法で成鶏肺より調製したRNAをオリゴdTカラムにかけmRNAを得、cDNAを合成した。このcDNAを λ gt 10および λ gt 11にパッケージングし、ベクターの異なる2種類のcDNAライブラリーを作製した。

115 k蛋白質cDNAのスクリーニング：115 k蛋白質cDNAのスクリーニングは2種類のプローブを用いて行なった。一つは我々がすでに報告しているニワトリの線維芽細胞型 α -アクチニン分子種のcDNA⁸⁾を用いて λ gt 10より、もう一つは115 k蛋白質に特異的な抗血清(ウサギ血清)により λ gt 11のライブラリーより行なった。

cDNAの核酸配列の決定、またノーザンブロット解析は文献8に準じた。

結果と考察

我々の見出した新しい α -アクチニン分子種(115 k蛋白質)はニワトリの肺より精製すること

* 京都大学医学部第一薬理

** 筑波大学基礎医学系

に成功している。精製 115 k 蛋白質を尿素存在下で変性させた後、リシルエンドペプチターゼを作用させて得た 2 つの消化断片のアミノ酸配列を調べたところ、その断片のうち一つは、すでに発表されているニワトリの線維芽細胞型 α -アクチニンの配列と完全に一致していた。またもう一つの断片から得た配列はこれまでに発表されているどの α -アクチニンともことなるものであったが、線維芽細胞型 α -アクチニンの配列との相同性は 83% と高いものであった。そこで我々は 115 k 蛋白質の cDNA をスクリーニングするにあたって、プローブに線維芽細胞型 α -アクチニンの cDNA と 115 k 蛋白質に特異的に反応する抗体を用いた。

線維芽細胞型 α -アクチニン cDNA によるスクリーニング：ニワトリ線維芽細胞型 α -アクチニンの cDNA ($F\alpha 1^8$) の 5' 側 EcoRI フラグメント (約 2 kbp) をプローブとして用い (図 1, A 参照)

λ gt 10 ライブラリーより 90 万のクローンをスクリーニングした。最終的に得た陽性クローンより 6 つのクローンの制限酵素マップを作製すると同時に一部の核酸配列を決定したところ、これらの

うち 2 つは我々がすでに発表している線維芽細胞型 α -アクチニン (プローブとして用いたもの) と完全に一致していた (図 1, A)。また、残りの 4 つのクローンは Baron らがニワトリ線維芽細胞の cDNA ライブラリーよりクローニングした α -アクチニン⁹⁾ と一致していたが (図 1, B, C), そのうちの 2 つのクローンは線維芽細胞型 α -アクチニン cDNA ($F\alpha 1$) の 3' 側 EcoRI フラグメント (約 1 kbp) を用いたサザンブロットにおいて反応性が異なることが示され、これらは 3' 端の核酸配列に違いがあることが示唆された。これらの結果は 3 種類の異なる α -アクチニクローンが得られたことを示していたが同時に、115 k 蛋白質をコードする cDNA ではないことを示していた。

115 k 特異抗体によるスクリーニング：115 k 蛋白質に特異的な抗体を用い λ gt 11 ライブラリーから 90 万クローンを検索したところ、最終的に 6 つの cDNA クローンを得た。これらの制限酵素マップは全て一致していたが、上記の線維芽細胞型 α -アクチニンのマップとは異なったものであった (図 1, D)。このクローンをサブクローニングした後、

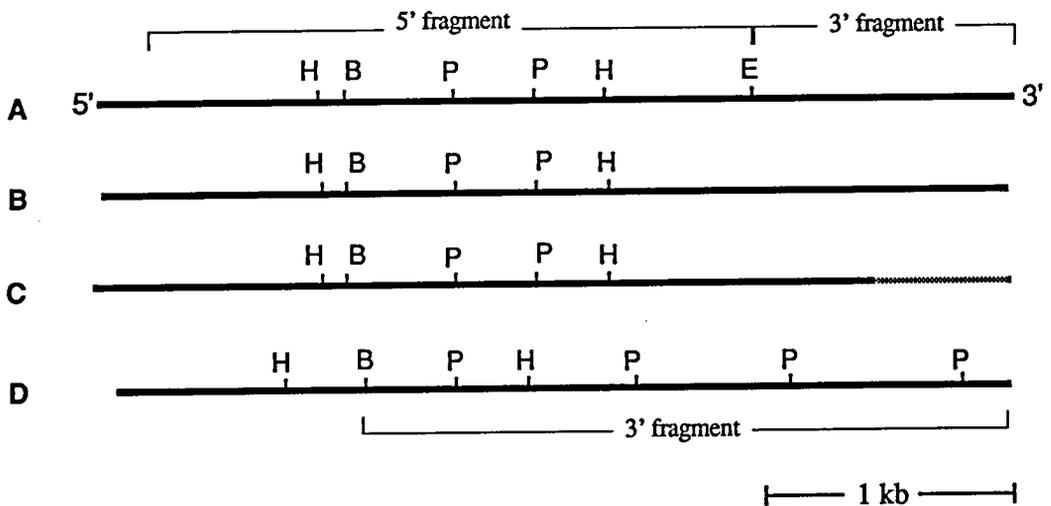


図 1. α -アクチニン cDNA クローンの制限酵素地図

図中の H, B, P, E はそれぞれ *HincII*, *BamHI*, *PstI*, *EcoRI* を示している。クローン B と C は 3' 端の non-coding 領域の構造が異なる。

一部の核酸配列を決定し、アミノ酸配列を推定したところ、115 k 蛋白質に特異的な配列が見いだされた。このことは、このクローンが115 k 蛋白質をコードしていることを示していた。

115 k 蛋白質mRNA の発現：骨格筋組織における115 k 蛋白質mRNAの発現を115 k 蛋白質 cDNA の3'側 BamHI フラグメント(図1, Dを参照)をプローブにしてノーザンブロット法により解析した(図2)。肺組織においては約4 kb のところに強いバンドが認められ、115 k 蛋白質mRNAの発現が認められた。また、成鶏胸筋ではこのmRNAの発現はほとんど認められなかったが、13日胚の胸筋には115 k 蛋白質mRNAの発現が認められた。この結果は115 k 蛋白質が未熟な骨格筋細胞で特

異的に発現しているという蛋白レベルでの解析結果と非常によく一致していた。

α -アクチニン分子種と115 k 蛋白質との類似性：現在までに、上記の115 k 蛋白質 cDNA の約8割の核酸配列を決定している。この配列から予測される蛋白質の一次構造をこれまでに報告されている α -アクチニン分子種と比較したところ、表1に示したように線維芽細胞型の α -アクチニン分子種(F α -An)とは84%、骨格筋型分子種(P α -An)とは76%の類似性が認められた。このことは115 k 蛋白質が進化的には骨格筋型分子種より線維芽細胞型により近いことを示していたが、骨格筋型と線維芽細胞型の類似性が81%であることを考えると、115 k 蛋白質は線維芽細胞型分子種とも進化的には距

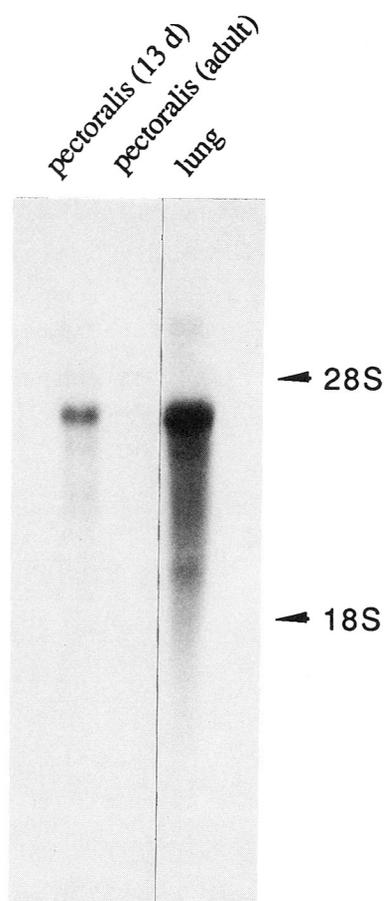


図2. 骨格筋組織における115 k 蛋白質 mRNA の発現

表 1. ニワトリ胚 115 k 蛋白質と骨格筋型および線維芽細胞型 α -アクチニンとの類似性

	P- α An	F- α An
115K	75.7	83.9
F- α An	80.5	—

離があることを示唆していた。

現在, 115 k 蛋白質の特異的な局在と分子構造の関連を解析する目的で 115 k 蛋白質の全一次構造の決定を行なっている。

参 考 文 献

- 1) Arahata, K., Ishirura, S., Ishiguro, T., Tsukara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E. and Sugita, H. *Nature*, **333** 861-863(1988)
- 2) Hammonds, R. G. Jr. *Cell*, **51** 1(1987)
- 3) Byers, T. J., Husain-Chishti, A., Dubreuil, R. R., Branton, D., and Goldstein, L. S. B., *J. Cell Biol.* **109** 1633-1641(1989)
- 4) Imamura, M., Endo, T., Kuroda, M., Tanaka, T., and Masaki, T. *J. Biol. Chem.*, **263** 7800-7805(1988).
- 5) Masaki, T., Endo, M. and Ebashi, S., *J. Biochem. (Tokyo)*, **62** 630-632(1967)
- 6) Fay, F. S., Fujiwara, K., Rees, D. D. and Fogarty, K. E., *J. Cell Biol.* **96** 783-795 (1983)
- 7) Lazarides, E., *J. Cell Biol.* **68** 202-219 (1976)
- 8) Arimura, C., Suzuki, T., Yanagisawa, M., Imamura, M., Hamada, Y., and Masaki, T., *Eur. J. Biochem.*, **177** 649-655(1988)
- 9) Baron, M. D., Davison, M. D., Fones, P., and Critchley, D. R., *J. Biol. Chem.*, **562** 1762-17629(1987)
- 10) Imamura, M., Wei, S., and Masaki, T., *In Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*, eds. Takao and Clark, Futura Publishing Co., Inc., New York pp 53-62 (1990)
- 11) Imamura, M. and Masaki, T., *In Frontiers in muscle research*, eds. Ozawa, E., Masaki, T. and Nabeshima, Y. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 249-257(1990)

9 骨格筋細胞の発達・萎縮とアクチン細胞 骨格調節因子コフィリンの量的変動

大日方 昂*

研究協力者 阿部 洋志** 品川 陽子** 南 成祐**
長岡 利栄** 斧 正一郎** 草野 賢一**

はじめに

骨格筋は筋ジストロフィー症のように病変したとき、あるいは神経支配に異常が生じて活動出来ない場合などに顕著に萎縮していく。また、伸長、張力発揮、収縮頻度などが筋の発達要因としてはたらくことが知られている。このような場合に、筋組織内の筋芽細胞の増殖とえ死のバランスの変化や蛋白質合成の量的な変化が起こることが考えられるが、さらに収縮装置を構成する蛋白質の質的な変化(アイソフォーム変換)が起こることが既に指摘されている¹⁾。さらに筋萎縮過程で筋原繊維が減少することから蛋白質の集合度にも変化が起こることが考えられる。最近の本研究者らの研究で、発生途上の幼若な筋細胞には性質の異なる数種のアクチン調節蛋白質が存在し、アクチンのフィラメントへの集合の制御やダイナミックなアクチンの再配置に深く関わる事が示された²⁾。これらアクチン集合制御蛋白質は、筋萎縮過程での筋原繊維のアクチン細胞骨格の崩壊、再編成にも関わっている可能性が考えられる。そこで、筋萎縮の顕著な除神経筋とジストロフィー筋をとりあげ筋萎縮時のアクチン制御因子(特にコフィリン)^{3,4)}の変動と細胞内での作用を検討した。本研究の最終目標は、ジストロフィーをもつ正常筋細胞と、これを欠くジストロフィー筋細胞の間で収縮構造の安定性にどのように差があるかを解明すること

であるが、そのことを理解していく上でアクチン細胞骨格の制御因子の研究は重要な一面と考えられる。

材料と方法

筋細胞の培養: マウス骨格筋C2細胞の培養はDMEM培地に10%ウシ胎児血清(FCS)を加えて増殖させたのち、5%馬血清を含む分化培地で維持した。心筋細胞は8日目ニワトリ胚心筋から解離、グルタミンを含まないMEM培地に5%FCSを加えて培養した。

電気泳動とイムノプロット: 筋組織からSDS溶液(4%SDS-4%メルカプトエタノールを含む)で抽出した蛋白質をSDS-アクリルアミドゲル電気泳動(13.5%ゲルを使用)で展開し、それをニトロセルロース膜に転写、抗体を用いて蛋白質のバンドを検出した。正常筋と萎縮筋を比較する場合、サンプル内の筋湿重量が同一となるよう配慮した。二次抗体としてHRP標識-抗マウスIgG抗体を用い、ジアミノベンチジン(DAB)を基質として検出した⁴⁾。

抗体: 抗コフィリン抗体(モノクローン抗体, MAB-22)⁴⁾、抗ミオシンアルカリ軽鎖抗体(EL-49)⁵⁾、抗ADF抗体(ポリクロナル)⁶⁾は既に作成、特異性を確認したものを用いた。

ノーザンプロット: 筋から抽出した全RNAの一定量を取り、既にクローニングしたコフィリンcDNA⁷⁾をプローブとして行った。

* 千葉大学理学部生物学科

cDNA トランスフェクション：1.1 kb のコフィリン cDNA をベクター (pcDL-SR α 296) に組み込みリン酸カルシウム法によりマウス C 2 筋細胞に導入，3～5 日培養した。コフィリンの発現は蛍光抗体法で確認した。

免疫細胞化学：細胞を 4% パラフォルムアルデヒドで 15 分間さらに 100% アセトンで 5 分間固定した後，MAB-22 を用いた間接蛍光抗体法でコフィリンを検出，さらにローダミン標識ファロイジン染色してアクチンの局在を観察した。

結 果

1) 除神経骨格筋におけるアクチン調節タンパク質コフィリンの発現上昇

正常な発生・成長過程で骨格筋細胞に存在するコフィリンの量は徐々に減少するものの，成熟筋にも明瞭に存在が認められた。ニワトリの親骨格筋についてみると，コフィリンは速筋繊維（例え

ば ALD 筋）に顕著に存在，それに比して速筋（胸筋）での存在量は少ない。ALD 筋の長軸方向の薄い切片を作成し，免疫組織化学的にコフィリンの局在を調べたところ，筋原繊維の I 帯部位に存在することが認められた。成熟骨格筋でも一定の役割を演じていることがうかがえる。

骨格筋を除神経すると，顕著な筋萎縮が起こることが知られるが，その際コフィリンの発現が顕著に高まることが明らかになった。図 1 に示すように，生後すぐのヒヨコ胸筋を除神経し，その後の成長過程で筋を採取し，SDS 溶液により抽出される蛋白質を SDS-PAGE に展開，抗コフィリン抗体 (MAB-22) を用いてイムノブロット法で解析した。除神経されない対照筋では成長につれコフィリンの量が減少するのに対して，除神経筋ではコフィリンの量がふ化直後のレベルに保たれるか，むしろ増加の傾向が見られた。このことは筋凍結切片を間接蛍光抗体法で調べた場合にも観察

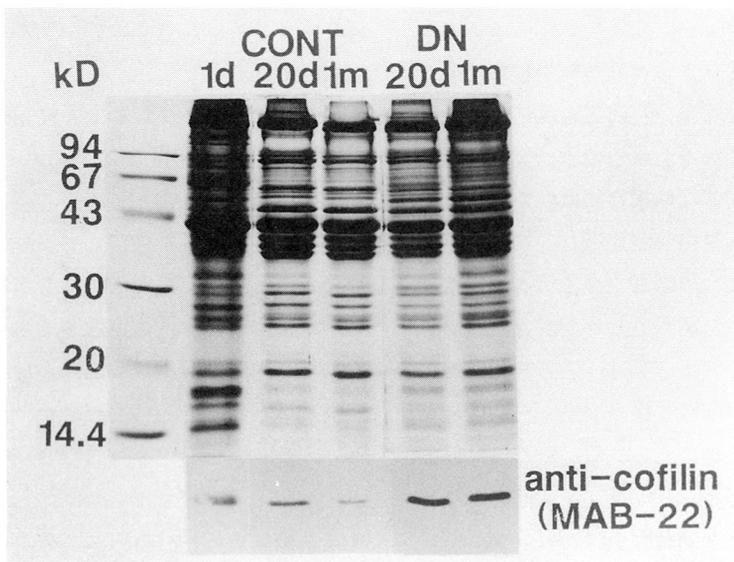


図 1. ニワトリ骨格筋 (胸筋) のふ化後の成長に伴うコフィリンの量的変化と除神経の影響
ふ化 1 日目に胸筋の一方を除神経し，無処理 (CONT) および除神経 (DN) 筋をふ化後 1 日 (1d)，20 日 (20d)，1 ヶ月 (1m) に採取，筋抽出物中に存在するコフィリンを SDS-PAGE と組み合わせたイムノブロット法により検出した。上段に SDS-PAGE のパターン，下段に抗コフィリン抗体によるイムノブロットを示す。

された。

成熟したニワトリ胸筋を除神経した場合にも、1～2ヶ月後にはコフィリンの量的な上昇が明瞭に認められた。コフィリンの発現変化を知るために、除神経2ヶ月目の筋および対照筋 RNA を抽出し、ニワトリ胚よりクローニングされたコフィリン cDNA をプローブとして、ノーザンブロット法で調べた。図2-Aに示すように、対照筋に比して除神経筋で著しいコフィリン mRNA の増加が認められた。従って、除神経筋ではコフィリン遺伝子発現が転写レベルで高められていることが明らかである。コフィリンの量的な増加は蛋白質レベルでも確認された。図2-Bに正常および除神経筋からの蛋白質抽出液を MAB-22 を用いて行ったイムノブロットにより解析した結果を示す。除神経筋内の細胞にはほぼ一樣にコフィリンの増加が免疫組織化学法により観察された。このことはコフィリンの発現上昇が再生途上の幼若細胞のみでなく、既存の筋繊維において起こっていること

を示す。生化学的な解析によりこのように量的に増加したコフィリンは細胞内の可溶性画分に存在、繊維構造に結合していないことが示された。

2) 筋ジストロフィー症 (dy) マウスでのコフィリンの発現上昇

筋萎縮の顕著なもう一つのケースとして、dy マウスの筋を解析した。SDS 溶液による筋抽出液を、SDS-PAGE と組み合わせたイムノブロット法 (MAB-22 を使用) で調べた。同一湿重量の筋組織を比較するようにサンプルを調製した。ニワトリの場合と同様にマウスでも、正常筋では速筋 (大腿直筋、前頸骨筋など) よりも遅筋 (ヒラメ筋) により多くのコフィリンが検出された。筋萎縮の著しい2ヶ月齢の dy マウスの大腿直筋と前頸骨筋では正常筋に比して、明らかに多量のコフィリンが検出された (図3)。このとき正常には速筋としての特性を示すこれらの筋に遅筋型ミオシン軽鎖の出現も見られた。萎縮過程での筋繊維の性質の変化あるいは幼若な筋細胞の出現を示唆している。

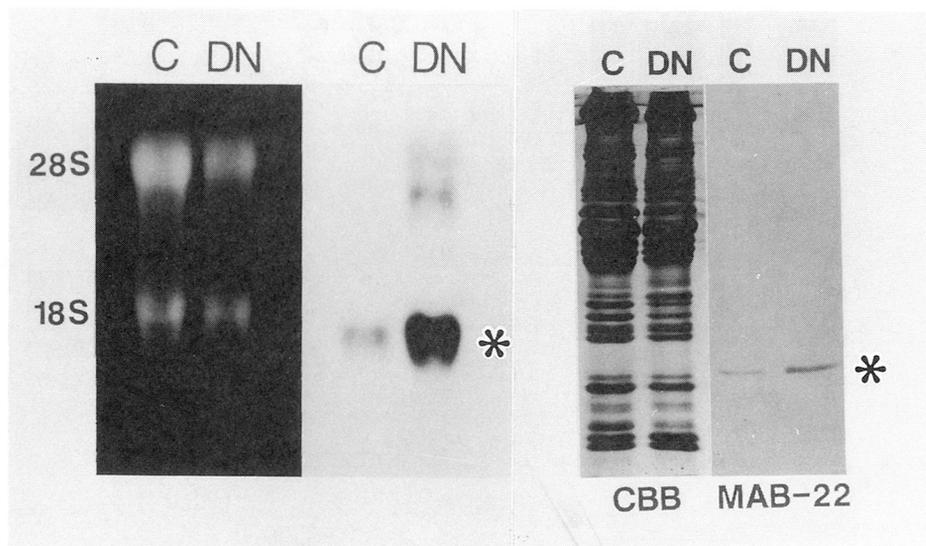


図2. 親ニワトリ胸筋を除神経したときのコフィリンの発現変化

コフィリン cDNA をプローブとしたノーザンブロット (左半分) と MAB-22 によるイムノブロット (右半分) の結果を示す。ノーザンブロットの左図は用いた RNA の電気泳動パターン。28S, 18S の rRNA のバンドが見られる。イムノブロットの左図は蛋白質電気泳動の CBB 染色パターン。いずれの場合も DN は除神経、C は対照筋、* はコフィリンのバンドを示す。

一方、発生初期の幼若筋で存在が知られるアクチンの脱重合因子(ADF)はこのジストロフィー(dy)筋では殆ど検出されなかった。従って、dy筋でのコフィリンの増加は筋再生に伴う幼若筋細胞の出現だけで説明できず、萎縮途中の筋で発現が高まりアクチン細胞骨格の変動に関与していることが推測される。

3) 培養筋細胞内のアクチン細胞骨格へのコフィリンの作用

細胞内でコフィリンの発現量が高まったとき、筋細胞内のアクチンフィラメントにどのような影響をもたらすかを探るために、細胞内のコフィリンの存在量を人為的に高める試みを行なった。

まず、培養筋細胞の細胞膜やジギトニンで壊し

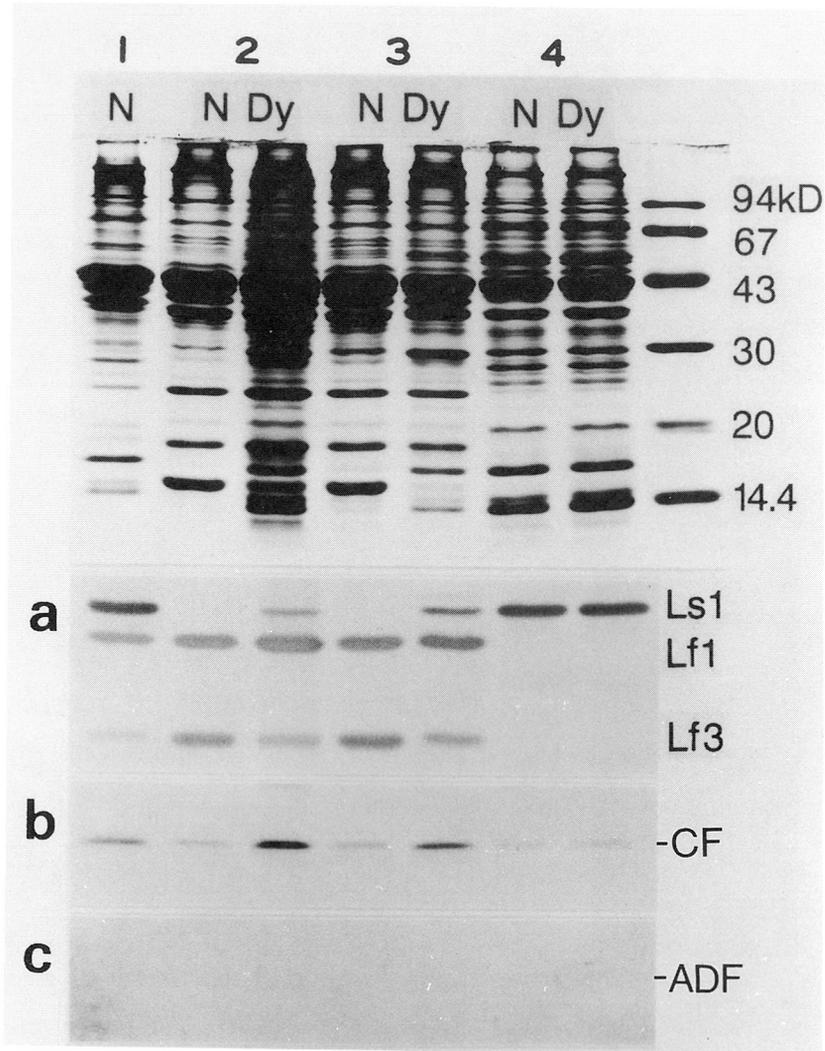


図3. 筋ジストロフィー症(dy)マウス骨格筋におけるコフィリンの発現変化
2.5ヶ月齢の正常(N)およびdyマウス(dy)のヒラメ筋(1), 大腿直筋(2), 前頸骨筋(3), 心筋(4)のSDS溶液による抽出蛋白質をSDS-PAGEに展開(上段)し, 抗ミオシナルカリ軽鎖抗体(a), 抗コフィリン抗体(b), 抗ADF抗体を用いてイムノプロットを行った。Ls1:遅筋(心筋)ミオシン軽鎖; Lf1, Lf3:速筋ミオシン軽鎖; CF:コフィリン

た後、コフィリンを外部から細胞内に浸透させてその効果をみた。この場合、多量のコフィリンを必要とするのでクローン化されたコフィリンcDNAをpETベクターに組み込み大腸菌で発現させたものを⁸⁾、カラムクロマトグラフィーにより精製して用いた。このようにして得たコフィリンは試験管内でアクチンに対して十分活性があることを確認してある。図4-a, bに心筋細胞をモデルとして行った結果を示す。高い濃度(2.5 mg/ml)のコフィリンを細胞内に入れても筋原繊維アクチンはあまり壊れないように見える。コフィリンや

ADFなどのアクチンへの作用がミオシンやトロポミオシンの存在で妨げられることが知られていることに一致する。骨格筋培養細胞を用いた場合にも同様の結果を得た。しかし、同条件で筋原繊維を構成していないアクチンフィラメント(ストレスファイバー)はコフィリンによって崩壊するのが観察された(図4-d, e)。

次にコフィリンcDNAのトランスフェクションによりマウスC2筋細胞内のコフィリンの発現量を高めた。コフィリンが高発現されていることが免疫細胞化学的に確認された細胞は、形態的には

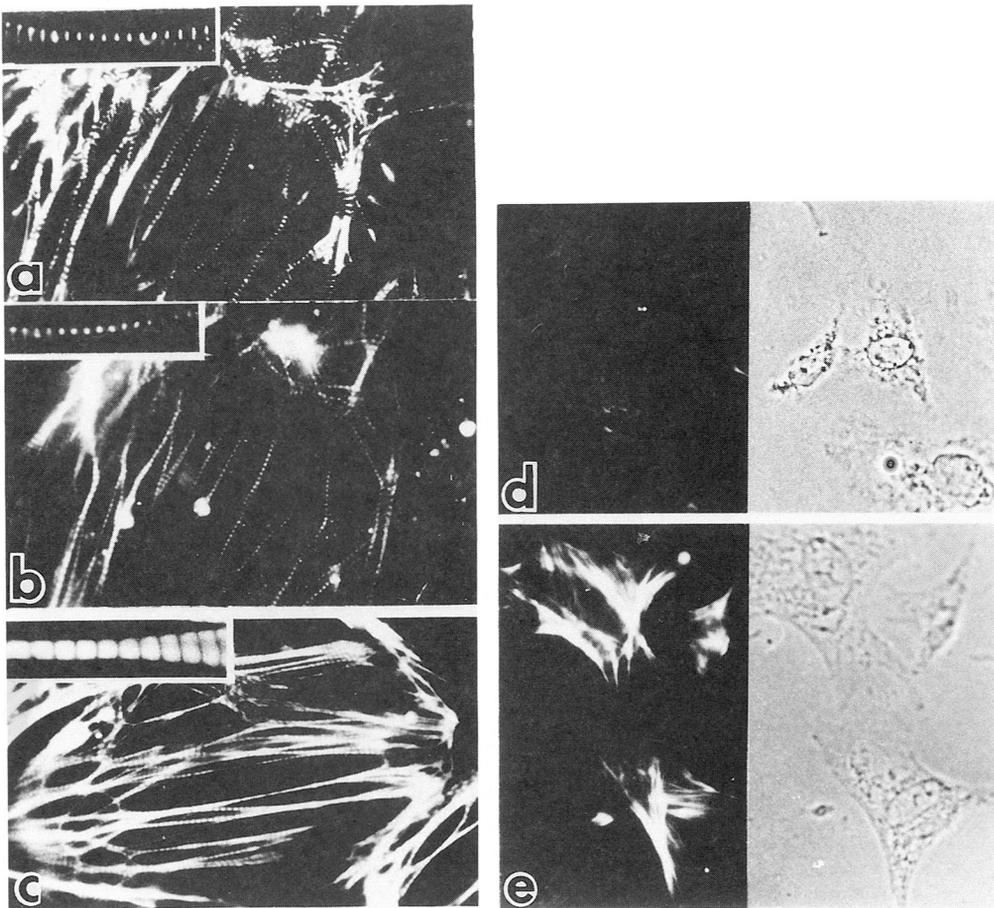


図4. 細胞内のアクチン細胞骨格に対するコフィリンの作用

40 μ M ジギトニンで処理した心筋細胞と繊維芽細胞を、コフィリン(2.5 mg/ml)を含む(a, b, d)または含まない(c, e)生理的塩溶液で1時間処理した後、ファロイジン(a, c, d, e)あるいは抗コフィリン抗体(MAB-22)で染色した。a, b, cの挿入図は拡大図。

やや偏平化，接触障害されない傾向にあり，ほとんど筋管細胞を形成しなかった。ストレスファイバー状のアクチンフィラメントはかなり残存した。このような細胞をジメチルスルフォキシド(DMSO)処理すると核内あるいは細胞質内に顕著なアクチン・コフィリンロッドを形成した。

考 察

本研究結果より，ジストロフィー筋や除神経筋のように萎縮が進行している筋ではアクチン集合制御因子の一つコフィリンの発現が顕著に高まることが明らかになった。しかし，幼若骨格筋ではたらく他のアクチン制御因子ADF，やプロフィリンの萎縮筋での発現上昇はみられなかった。コフィリンはG-アクチン，F-アクチンいずれにも結合，pH依存的にアクチンの集合制御，DMSOなどによるストレスを受けた細胞内での核内移行

など特徴的な性質が知られるが，萎縮過程でのアクチンフィラメント系の変化に関わるものとして興味深い。ジギトニン処理細胞へのコフィリンの導入実験から筋原繊維アクチンはコフィリンに抵抗性があるが，ストレスファイバー様のアクチンフィラメントはコフィリンの影響を強く受けることがわかった。生きた筋細胞内にcDNAトランスフェクションによりコフィリンの発現を高めた場合には，ストレスファイバーが存在し続けたことから，細胞内でのコフィリンのアクチンへの作用は単純ではないことを示している。イノシトールリン脂質(PIP₂など)によるコフィリンの機能の抑制なども関わるということが指摘されている。実際に筋萎縮過程でのアクチンフィラメントの脱集合や再編成にコフィリンがどのように関わっているかについてはさらに研究を進める必要がある。

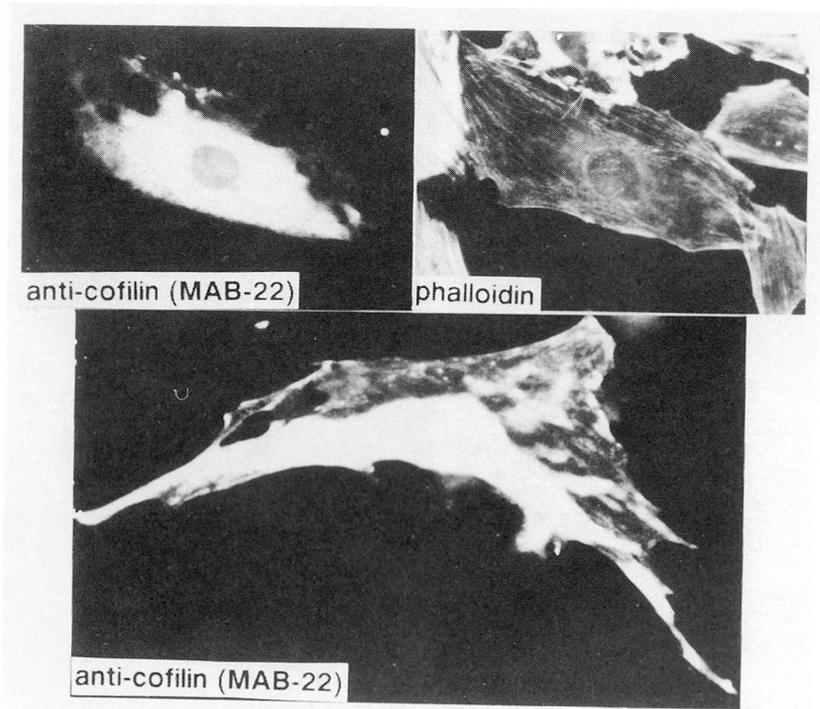


図5. cDNAトランスフェクション法によるコフィリンの高発現と筋細胞の形態変化
コフィリンを一時的に高発現しているC2筋細胞の抗コフィリン抗体(上段左，
下段)およびローダミン標識ファロイジン(上段右)による染色像

文 献

- 1) Obinata T. (1985) *Zool Sci*, **2** : 833-847.
- 2) Obinata, T. and Abe, H. (1991) In *Frontiers in Muscle Research* (Ozawa, E., Masaki, T. and Nabeshima, Y. eds) pp. 235-247. Elsevier Sci. Pub., Amsterdam.
- 3) Nishida, E., Maekawa, S. and Sakai, H. (1984) *Biochemistry* **23**, 5307-5313.
- 4) Abe, H., Ohshima, S., and Obinata, T. (1989) *J. Biochem.* **106**, 696-702.
- 5) Obinata, T., Ogasawara, Y., Takeuchi, K. and Takano-Ohmuro, H. (1990) In *Developmental Cardiology : morphogenesis and function* (Clark, E.B. and Takao, A. eds) pp. 41-51. Futura, New York.
- 6) Abe, H., and Obinata, T. (1989) *J. Biochem.* **106**, 172-180.
- 7) Abe, H., Endo, Yamamoto, K. and Obinata, T. (1990) *Biochemistry* **29**, 7420-7425.
- 8) Adams, M. E., Minamide, L. S., Duester, G. and Bamberg, J. R. (1990) *Biochemistry* **29**, 7414-7419.

10 MAP 2 C cDNAの強制導入と標識チューブリンの微量注入による微小管の動態の解析

廣川 信隆*

研究協力者 岡部 繁男* 梅山 剛成*

要 旨

神経細胞はその分化の過程で神経突起内に平行に配列する特徴的な微小管構造を形成するが、選択的安定化等の微小管 dynamics の変化がこの過程に関与すると考えられる。

今回、幼弱期神経細胞に多く発現される微小管関連蛋白 2 c (MAP 2C)の形態形成、微小管 dynamics に与える影響について検討した。

467アミノ酸よりなる mouse MAP 2C の全長を含むcDNA をクローニングし、MAP 2Cの発現が細胞骨格構造に与える影響を調べるため線維芽細胞 (COS cells) に transfection した。transfection された細胞では間期の微小管構造が変化し、微小管束を形成した。同時にビメンチン線維の再構築が見られ微小管束に平行に存在するビメンチン線維束が形成された。一方アクチン線維の構造は変化しなかった。

微小管束の形成過程を解析するため MAP 2C cDNA を強制導入したCOS細胞にビオチン標識チューブリン分子を microinjection した。外来性チューブリン分子は既存の微小管束の遠位端より組み込まれ境界明瞭な segments を形成した。

さらに caged-fluorescein 標識チューブリン分子を microinjection し、微小管束を photoactivation することにより、微小管束内の微小管の turn-over が非常に抑制されていることを示した。

微小管束を形成しチューブリン分子をその遠位端

から組み込み安定化することは神経細胞に特徴的であり、MAP 2Cの幼弱期神経細胞における重要な役割を示唆すると考えられた。

マウスMAP 2C cDNAのクローニング

高分子量MAP 2AとMAP 2Cはsingle gene よりの alternative splicing mechanism に由来すると報告されている。

そこで生後0日令のマウスcDNAライブラリーをMAP 2Aの部分シーケンスでスクリーニングすることにより1687 base pair (b.p.)よりなるcDNAクローンを単離した(図1, A)。1401 b.p.の完全な open reading frame を含み、467アミノ酸をコードした。既に報告されているMAP 2Aのアミノ末端(1-151)とカルボキシル末端(1513-1828)が保存されており中間部分の1361アミノ酸残基を欠いていた(図1, B)。Splicing 部位のアミノ末端側は酸性アミノ酸残基が豊富でA-Kinase への結合部位を含む。又、カルボキシル末端側は塩基性アミノ酸残基が豊富で微小管への結合部位とされる18アミノ酸残基よりなる3回の繰り返し配列と、そのアミノ末端側のプロリン残基の豊富な部分(16%)を含む。

形質導入による微小管束の形成

MAP 2Cの発現により細胞内の微小管構造の変化をcDNAを強制発現ベクター(p β act CAT 9のCAT gene と置換)に組み込み(p β act 2C), 線維芽細胞(COS cells)にリン酸カルシウム法を

*東京大学医学部第一解剖

用いて trangient に transfection することにより検討した。

Transfection された細胞の crude supernatant proteins の抗 MAP 2 抗体による Western blotting によりコントロールの細胞には存在しない 70 Kd のバンドが染色され報告されている MAP 2 C の SOS-PAGE 上の分子量と一致した (図 2)。

Transfection された細胞を 48 hr 後 0.2% Triton X-100 で膜を可溶化した後固定し、抗チュブリン、抗 MAP 2 抗体で二重染色した。

COS 細胞の間期の微小管は微小管形成中心 (MTOC) より放射状にひろがる微細な構造を形成するが (図 3, A), transfection された細胞では

太い微小管束が形成され細胞辺縁にのびだすのが観察された (図 3, B)。これらの微小管束の多くは MTOC を起始としない。又、細胞質の微小管束に取り込まれない線維状の微小管は著しく減少した。抗 MAP 2 抗体像は MAP 2 C の局在がこの微小管束に一致することを示した。

微小管安定化剤のタクソールにより COS 細胞を処理 (5 μM, 24 hr) すると微小管束を形成することは (図 3, D) MAP 2 C が微小管の重合を促進し安定化することが微小管束の形成に関与することを示唆する。

しかしタクソールにより安定化された細胞内の微小管束は MAP 2 C を transfection された細胞に

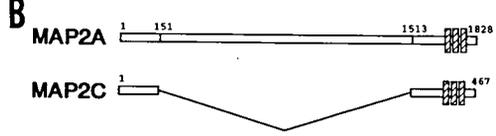
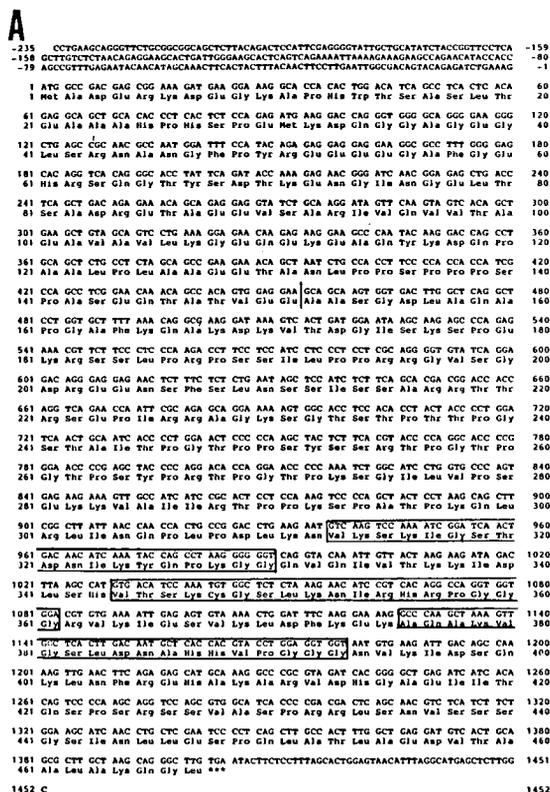


図 1 A : マウス MAP2C の核酸及びアミノ酸配列 box 部分は 3 回の緑り返し配列, 縦線はスプライシング部位を示す
B : MAP 2 A と MAP 2 C の一次構造の比較

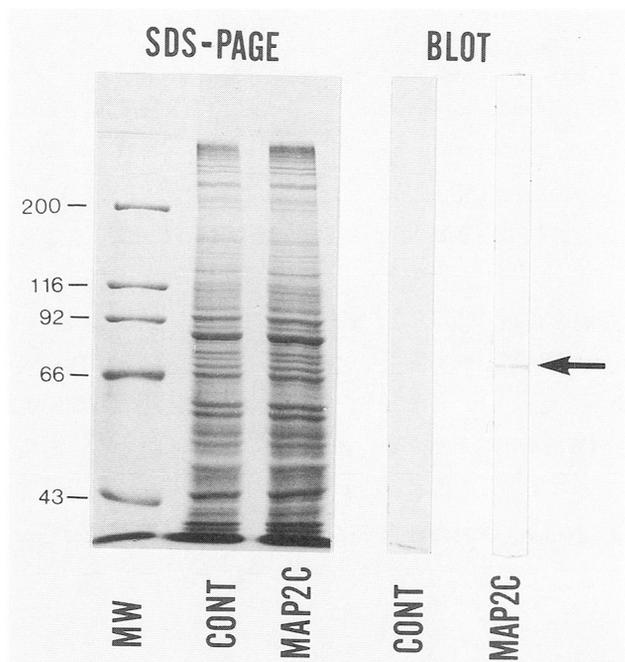


図2 MAP2C cDNAをtransfectionしたCOS細胞のSDS-PAGE及びWestern-blotting.
抗MAP2抗体で染色される70kdのband(矢印)を示す。

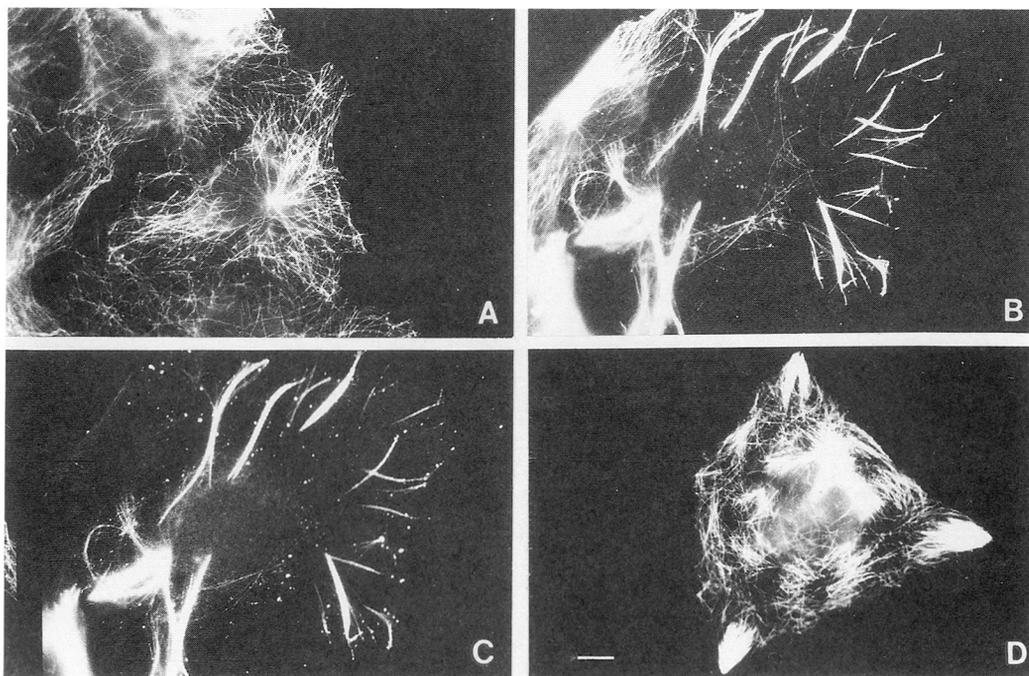


図3 A: COS細胞の抗チューブリン抗体染色像。
B, C: MAP2C cDNAをtransfectionしたCOS細胞。抗チューブリン(B), 抗MAP2(C)抗体による二重染色像。
D: タクソール処理したCOS細胞の抗チューブリン抗体染色像。

見られるように密に束状化することは稀で、又細胞質内の線維状の微小管がほとんど完全に消失することはなかった。従って微小管束形成にMAP 2Cは安定化以外に何らかの積極的な作用を有すると考えられた。即ちMAP 2C分子相互、又は他の蛋白を介在するcross-linkの存在、あるいはチューブリン分子の酸性カルボキシル末端とMAP 2Cの塩基性微小管結合部位との相互作用による静電的中による効果等の可能性が考えられるがさらに詳細な検討を要する。

MAP 2Cをtransfectionした細胞を固定後、抗チューブリン、抗ビメンチン抗体で二重染色することにより、ビメンチン線維の再構築が起こり微小管束と平行に存在するビメンチン線維束が形成されることを示した(図4, A, B)。神経突起内でMAP 2が微小管とニューロフィラメントを架橋することを考えると興味深い。

抗チューブリン抗体とファロイジンによる二重染色像よりアクチン線維の走行に対する影響は見られず、微小管束の形成された細胞にアクチン線維のストレスファイバーが観察された(図4, C, D)。

微小管束への外来性チューブリン分子の組み込み部位

外来性チューブリン分子の微小管束への組み込み部位を調べるためp β act 2Cと膜抗原cDNAをco-transfectionし、48hr後抗膜蛋白抗体で染色される細胞にビオチン標識チューブリンをmicroinjectionした。

5分、15分及び2時間後、膜を可溶化した後抗チューブリン、抗ビオチン抗体で二重染色した。

5分後固定した細胞では、抗ビオチン抗体像よりビオチンチューブリンは主に既存の微小管の遠位端に組み込まれた(図5, A, B, 矢印)。一方近

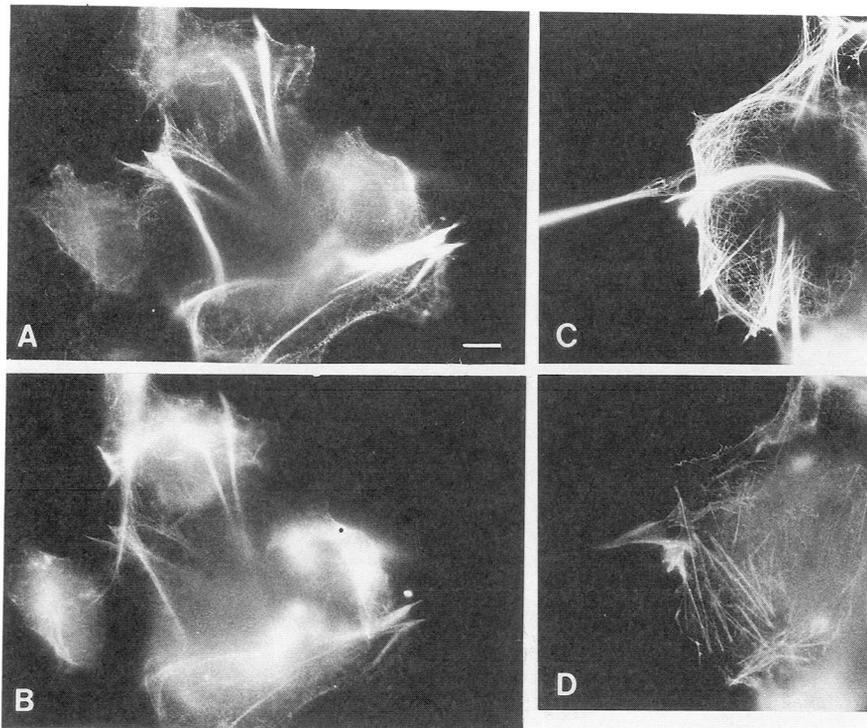


図4 MAP 2C cDNAをtransfectionしたCOS細胞。
A, B: 抗チューブリン(A), 抗ビメンチン(B)抗体による二重染色像。
C, D: 抗チューブリン抗体(C), ファロイジン(D)による二重染色像。

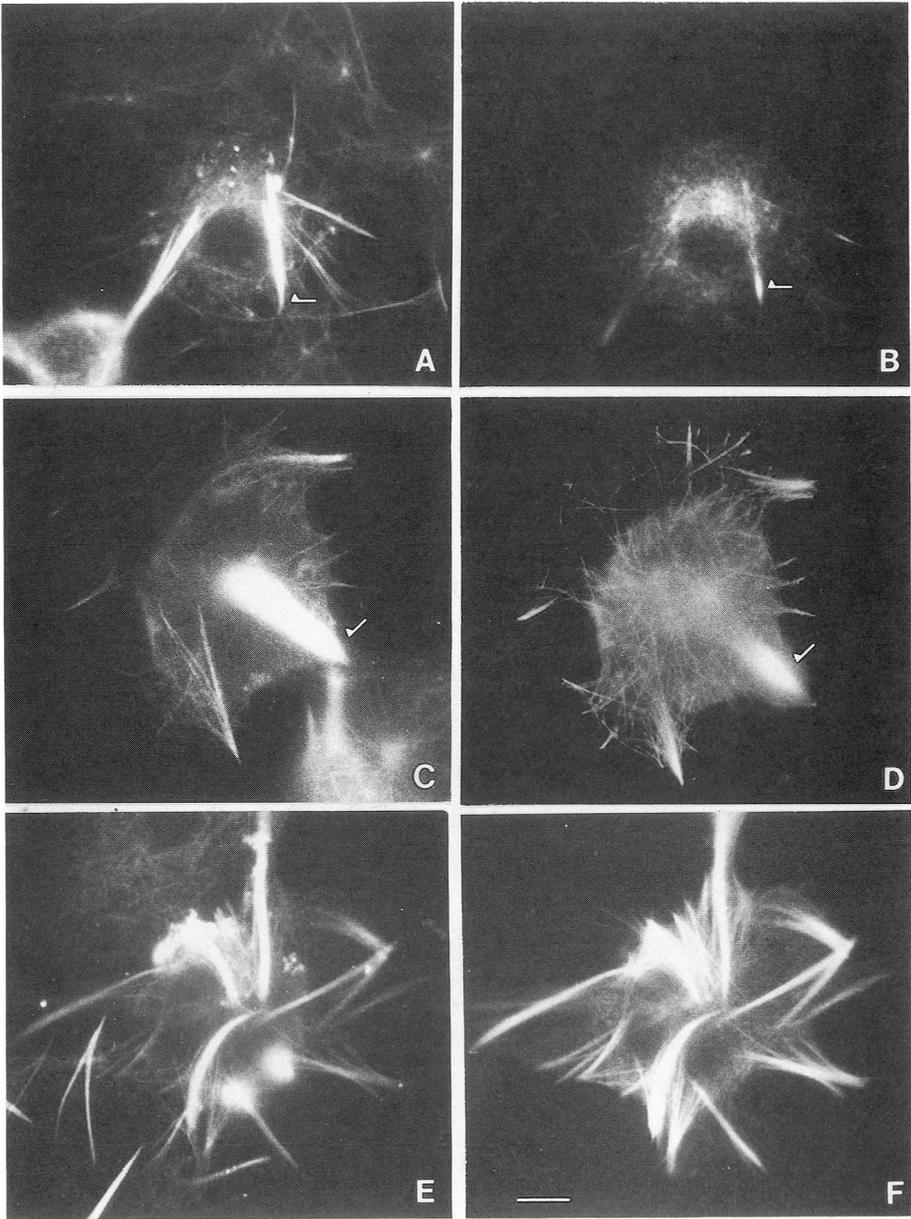


図5 MAP2Cと膜抗原cDNAをco-transfectionした細胞にビオチン標識チューブリンをmicroinjectionした後、5分(A, B), 15分(C, D), および2時間で固定。

抗チューブリン(A, C, E)及び抗ビオチン(B, D, F)抗体による二重染色像。

矢印は微小管束の遠位端からの外来性チューブリンの組み込みを示す。

位側の染色は弱い。この結果はチューブリン分子の組み込みに対する available な末端が主に遠位端に存在することを示している。微小管は主にそのプラス端で伸長するので、微小管束内の微小管は軸索内微小管と同様にプラス端が主に細胞辺縁側に存在する可能性が考えられた。しかし微小管のマイナス端も *in vitro* では遅いながら伸長を示すのでより正確な微小管の極性の決定が必要と考えられた。

又、細胞質内にビオチンチューブリンによる self-nucleation と考えられる多数の微小管が観察されたが、MAP2C の発現により微小管重合に対する critical concentration が細胞内で低下し、相対的にチューブリン分子が枯渇していることを反映していると考えられた。

15分後固定した細胞では、5分後固定した細胞と同様ビオチンチューブリンは境界明瞭な segments として微小管束の遠位端より組み込まれた (図5, C, D, 矢印)。

境界明瞭な segments の形成は、微小管束内の個々の微小管が近位側の境界を越えて短縮しないことを示しており、確率的な微小管の伸長と短縮、

即ち dynamic instability が抑制されていることを示唆し *in vitro* における報告と一致する。

2時間後、抗チューブリン、抗ビオチン抗体像は一致した (図5, E, F)。以下の photo-activation 法を用いた実験により、微小管束内の微小管の turn-over は非常に抑制されており、2時間で全体が turn-over されることは考えられない。又蛍光顕微鏡で微小管束内の個々の微小管を観察することはできない。従って染色像の一致は微小管束へのビオチンチューブリンの広範な組み込みの進行、あるいは微小管束の一部分の turn-over を表わしていると考えられた。

微小管束内の微小管の turn-over

p β act 2C と膜抗原 cDNA を co-transfection し、48hr 後、抗膜抗原抗体により染色される細胞に caged-fluorescein 標識チューブリンを micro-injection した。ラベルを微小管束に組み込ませるため 2hr インキュベートした後、スリット状の 365nm の microbeam を 0.25~0.5sec 微小管束に照射し bar 状の蛍光を励起した。photoactivation された部位の遊離チューブリン分子は数秒で拡

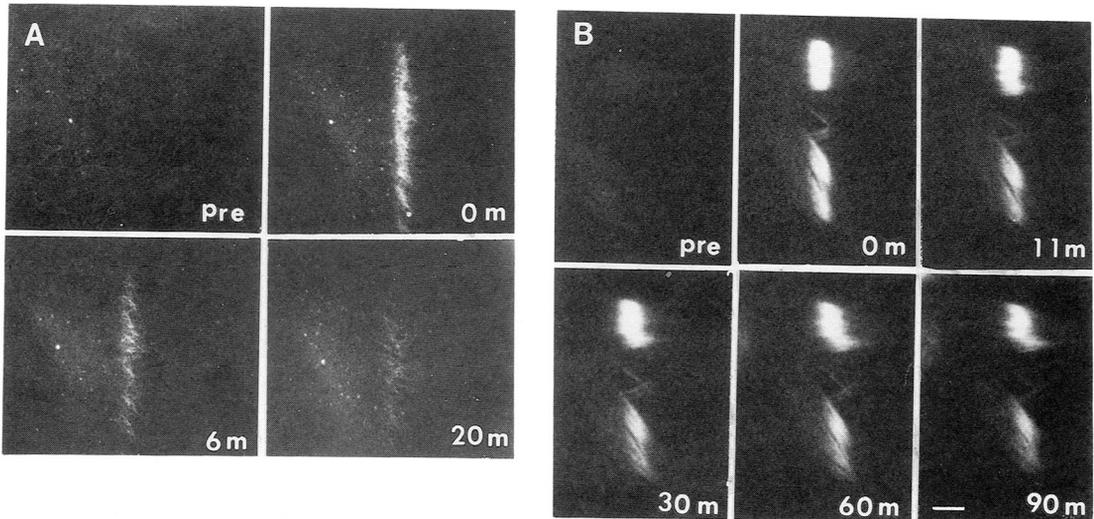


図6 コントロール(A), 及びMAP2C, 膜抗原cDNAを transection された細胞(B)を photoactivation する直前 (pre) 及び activation 後の蛍光の時間経過 (分)。

散するため蛍光の消退は微小管の turn-over を示している。

transfection されていない COS 細胞では蛍光は速やかに消退し 20 分後蛍光はほとんど見られず活発な turn-over を示した (図 6, A)。

MAP 2C を発現している細胞では photo-activation 後 90 分経過しても蛍光の消退はほとんど見られず非常に turn-over は抑制されていた (図 6, B)。 photoactivation の直後鮮明であった蛍光の bar の境界は次第にノコギリの歯状に変化したが、その全体の位置は基本的には不変であった。

この結果とビオチンチュブリンの microinjection による結果を併せると、微小管束内の微小管は dynamic instability の抑制のため短縮、脱重合し

チュブリン分子を交換することができず、turn-over の抑制が起きる可能性が考えられた。

神経特異的な MAPs を多く発現している PC 12 細胞あるいは後根神経節細胞では微小管の turn-over が低下しており、又 PC 12 細胞では微小管の遠位端より遊離チュブリン分子を組み込むことが報告されており、今回 MAP 2C を発現することにより形成された微小管束のダイナミクスはこれに類似すると考えられた。

従って幼弱な神経突起を伸長している神経細胞において MAP 2C は微小管の turn-over を抑制し微小管束を形成し、新たに組み込んだチュブリン分子を安定化することにより形態形成、機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

11 筋巨大蛋白質の発生とその局在

小宮山 政 敏*

研究協力者 丸 山 工 作** 嶋 田 裕*

はじめに

本研究は、筋特有の構造形成に対する筋巨大蛋白質の役割を解明することを目的とし、本年はコネクチン(分子量約3000kD)、ネブリン(分子量500kD~800kD)およびジストロフィン(分子量427kD)の発生と微細構造レベルでの局在について追求した結果を報告する。

材料と方法

コネクチンとネブリンの発生については、ニワトリ胚の心筋および胸筋の1次培養細胞を用いて、各種の抗体とローダミン標識フェロイジン(Molecular Probes, OR)のいろいろな組み合わせによる二重染を行い、蛍光顕微鏡で観察した。また免疫電顕法は、金コロイド標識抗体を用いて包埋前染色により行った。用いた抗体はポリクローナル抗コネクチン¹⁾、抗ネブリン²⁾、およびモノクローナル抗コネクチン(4C9³⁾、SM1⁴⁾、抗ミオシン(MF20)⁵⁾、抗 α -アクチニン(BioMakor, Rehovot)である。

ジストロフィンの局在については、成熟雌ラットの[足の]長指伸筋(EDL)およびニワトリ心筋の培養細胞を用い、凍結超薄切片による免疫電顕法および免疫染色後の急速凍結ディープエッチレプリカ法により、微細構造レベルで検索した。用いた抗ジストロフィン抗体はP04d⁶⁾と4-4C5(富士レビオ株式会社および味の素株式会社の提

供による)である。

抗体を提供して下さったCornell大学D.A. Fischman教授(MF20)、ならびに国立精神神経センター小沢鏑二郎部長(P04d)に感謝します。

結果と考察

1. コネクチンの発生

コネクチンの発生過程について培養心筋細胞を用いて蛍光抗体法で調べたところ、アクチンおよび α -アクチニンを含むI-Z-I様構造がまず形成され、後にコネクチンおよびミオシンがこれと関係をもつようになることが観察された(図1)。コネクチンは初めミオシンと一致した斑状に現れ、Aバンドの出現と同時に周期的な配列(ダブルット)をもつようになった(図1c, d)。このように、コネクチンの発生はミオシンの発生と密接にかかわり合っていることが予想された^{7, 8)}。

コネクチンとミオシンおよび α -アクチニンとの関係を、二重染色による免疫電顕法で調べたところ、大きなポリゾームが抗コネクチンおよび抗ミオシンによって同時に標識されるのが観察された(図2a; 矢尻)。これは蛍光抗体法でみられた斑状の構造^{7, 8)}に相当すると思われた。しかし、これらのポリゾームは α -アクチニン抗体では標識されなかった。このように、コネクチンとミオシンは合成されるとすぐに関係をもつようになると考えられた。

横紋をもたないI-Z-Iの部分を見ると、コネクチンの標識はミオシンフィラメントのあるところに限られていた(図2b; 矢尻)。dense bodyの周

* 千葉大学医学部解剖学第1講座

** 千葉大学理学部生物学科

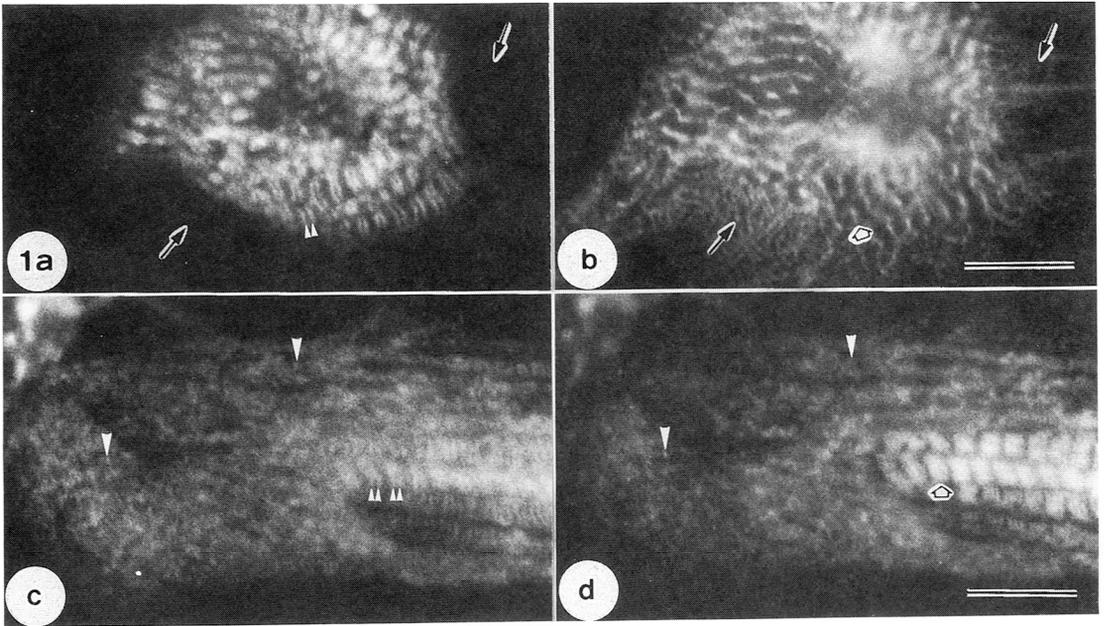


図1 培養1日(a, b)および2日(c, d)の心筋細胞。抗コネクチン(a, c)および α -アクチニン(b), または抗ミオシン(d)の二重染色。スケール=10 μ m。

辺には α -アクチニン抗体による標識がみられたので(図2b; 矢印), I-Z-Iへの抗体の浸透性には問題がないと思われた。したがって, 横紋をもたないI-Z-Iにおいても, コネクチンは α -アクチニンよりもミオシンと密接に関係していると考えられた。

以上から, コネクチンは発生の初期よりミオシンと密接に関係し, 先に形成されたI-Z-Iにミオシンと同時に組み込まれると考えられ, その時にコネクチンフィラメントはミオシンフィラメントをZ線に結び付けるように働くものと思われた。

2. ネブリンの発生

ネブリンの発生は骨格筋細胞で追求した。培養1~2日の筋芽細胞や若い筋管では, ファロイジンと α -アクチニンが陽性であってもネブリンは陰性の線維(図3a, b; 黒矢), またネブリンが陽性であってもミオシンとコネクチンは陰性という線維(図3c, d; 白矢)がみられた。また, ネブリンの蛍光は α -アクチニンの斑と同じ位置にみられた(図3a, b; 矢尻)。培養3日になると, ネ

ブリンと α -アクチニンに周期性が現れ, ネブリンのバンドはシングレットとしてZ線と同じ位置にみられた(図4a, b)。培養4日目には, アクチンの周期性が現れた。この段階ではネブリンのバンドは未だシングレットであったが, 培養6日目にはダブルットとなり, 親の筋におけるものと同様の像を呈するようになった(図4c, d)。

以上のことから, 筋蛋白質の集積の順序としては, まずアクチンと α -アクチニンを含む線維状のI-Z-Iが形成され, 次にネブリンがこれに組み込まれ, 最後にコネクチンとミオシンが組み込まれると考えられた。周期性については, 先ずZ線とネブリンのシングレットが現れ, やや遅れてコネクチンとミオシンのバンドが出現し, その後アクチンの縞が明瞭になり, 最後にネブリンバンドがダブルットになることが明らかになった。このように, ネブリンの発生は他の蛋白質に比べて遅いので, ネブリンは筋フィラメントの正しい配列の形成には直接に関係しないことが考えられた。

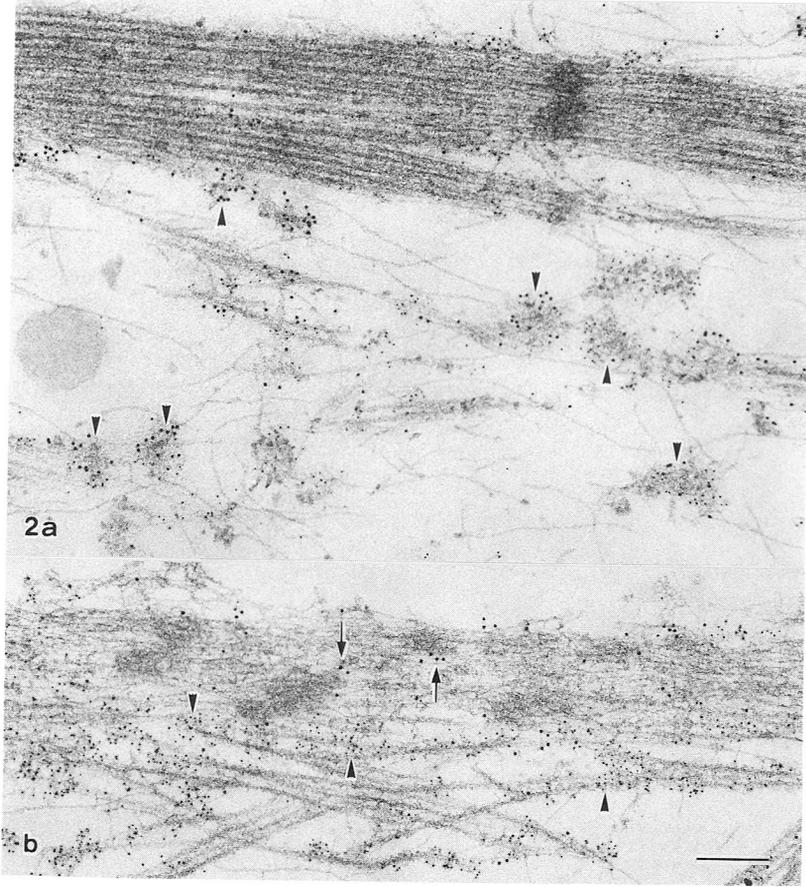


図2 培養1日(a)および3日(b)の心筋細胞。抗コネクチン(5nm gold)(a,b)および抗ミオシン(10nm gold)(a), または抗 α -アクチニン(10nm gold)(b)の二重染色。スケール=0.2 μ m。

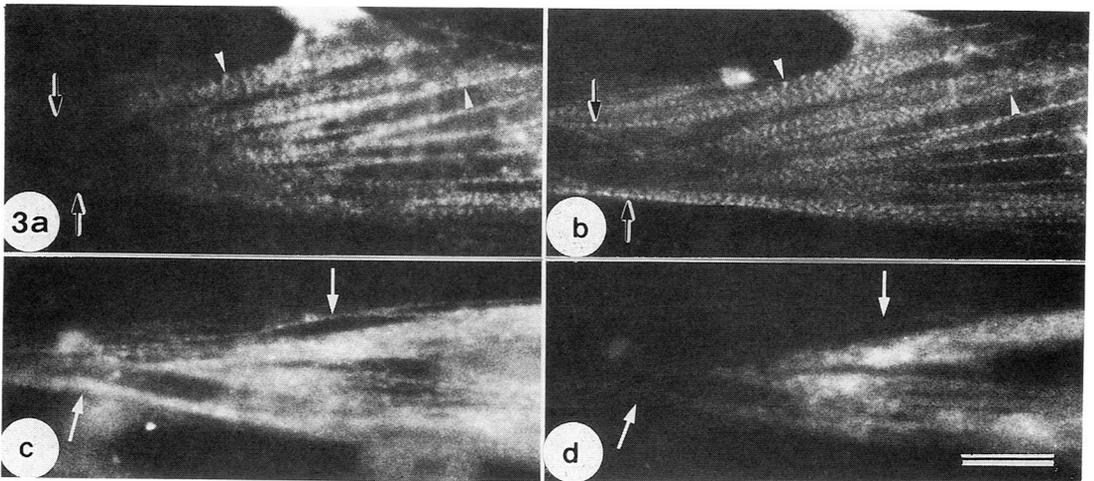


図3 培養2日の骨格筋細胞。抗ネブリン(a,c)と抗 α -アクチニン(b), または抗ミオシン(d)との二重染色。スケール=10 μ m。

3. ジストロフィンの局在

ジストロフィンの局在は2つの電顕的手法により観察した。

ラットのEDLを凍結超薄切片法にて観察すると、ジストロフィン抗体による標識は主として細胞膜の付近にみられた(図5; 矢尻)。また同筋のクリオスタット切片にジストロフィン抗体染色を施した後、凍結ディープエッチレプリカ法を用いると、ジストロフィンの標識はおもに細胞膜内面にみられた(図6; 矢尻)。さらにニワトリ胚心筋の培養細胞をフィジカルラプチャー法⁹⁾によって内部を露出し、ジストロフィン抗体で標識して凍結ディープエッチし、レプリカを作製すると、膜性小器官や細胞膜に標識がみられた(図7; 矢尻)。

今後これらについてさらに追求し、ジストロフィンの立体的な局在様式や細胞骨格との関連、発生に伴う局在の変化、筋収縮による極性の変化などについて明らかにしたい。

文 献

- 1) Maruyama K, Sawada H, Kimura S, et al (1984) *J. Cell Biol.* 99: 1391-1397.
- 2) Maruyama K, Matsuno A, Higuchi H, et al (1989) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 10: 350-359.
- 3) Matsuno A, Takano-Ohmuro H, Itoh Y, et al (1989) *Tissue Cell* 21: 495-505.
- 4) Itoh Y, Suzuki T, Kimura S, et al (1988) *J. Biochem. (Tokyo)* 104: 504-508.
- 5) Masaki T, Bader DM, Reinach FC, et al (1982) *In Muscle Development: Molecular and Cellular Control* (Pearson ML & Epstein HF eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 405-417.
- 6) Yoshida M & Ozawa E (1990) *J. Biochem.* 108: 748-752.
- 7) 嶋田 裕, 小宮山政敏, 豊田直二, 丸山工作 (1990) 厚生省神経疾患研究委託費野々村班平成元年度報告書. 59-64.
- 8) Komiyama M, Maruyama K, & Shimada Y (1990) *J. Muscle Res. Cell Motil.* 11: 419-428.
- 9) Isobe Y & Shimada Y (1986) *Cell Tissue Res.* 244: 47-56.

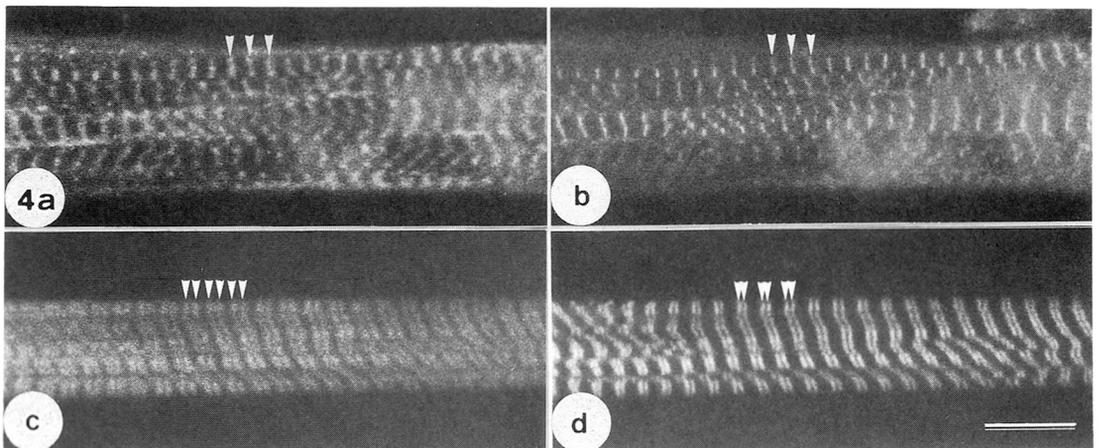


図4 培養3日(a, b)および6日(c, d)の骨格筋細胞。抗ネブリン(a, c)と抗 α -アクチニン(b), または抗コネクチン(SM1)(d)との二重染色。スケール=10 μ m。

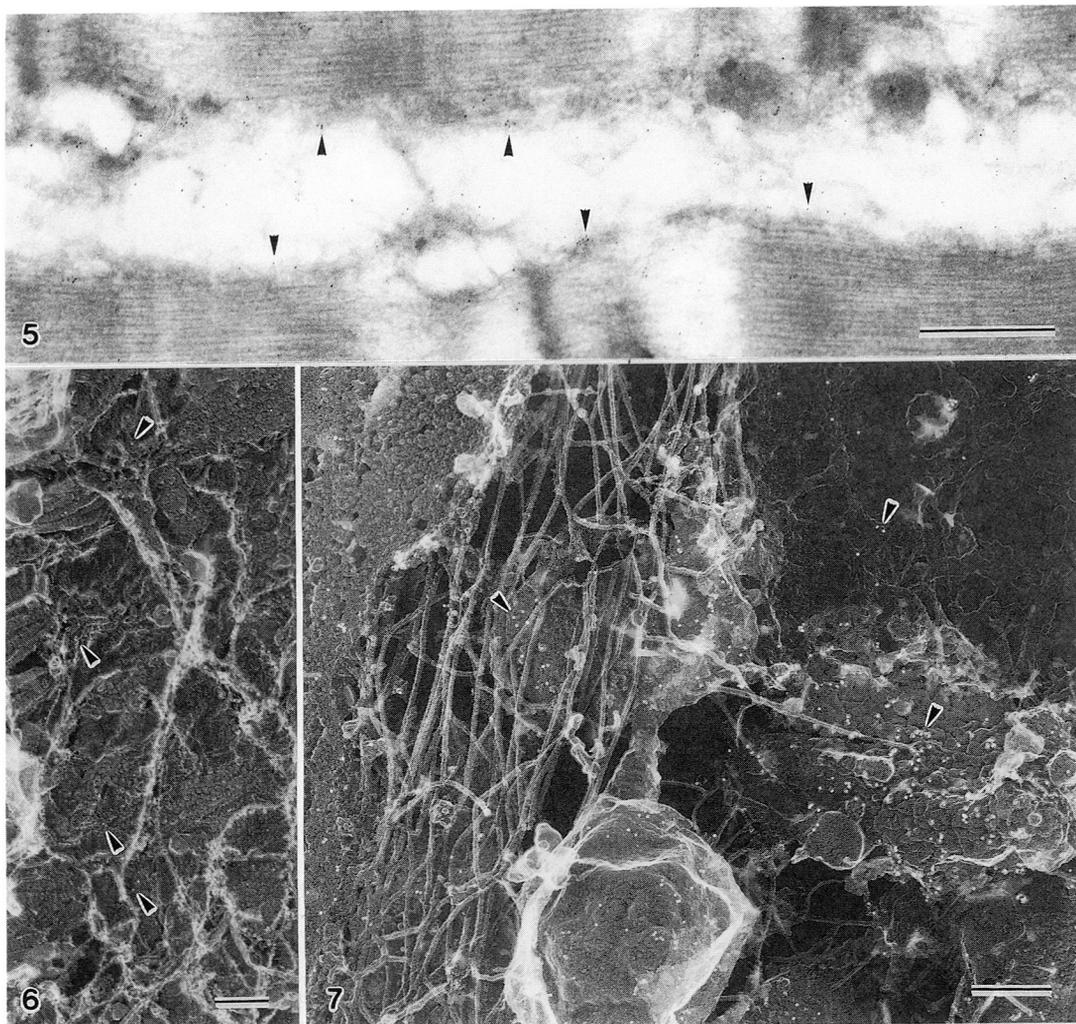


図5 ラットのEDLの凍結超薄切片免疫電顕像。抗ジストロフィン(P04d)染色(5 nm gold)。スケール=0.5 μm 。

図6 ラットEDLのクリオスタット切片の凍結ディープエッチレプリカ像。抗ジストロフィン(4-4C5)染色(10nm gold)。スケール=0.2 μm 。

図7 培養心筋細胞のフィジカルラプチャー凍結ディープエッチレプリカ像。抗ジストロフィン(4-4C5)染色(10nm gold)。スケール=0.2 μm 。

12 AMPA型グルタミン酸受容体チャンネルの Ca²⁺透過調節機構

三品 昌美*

はじめに

グルタミン酸受容体チャンネルは高等動物の中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質受容体であり、シナプスでの神経情報伝達に中心的役割を担っているとともに、記憶と学習の基礎となるシナプス可塑性の発現および脳虚血やてんかん重積状態などの病態で発生する神経細胞壊死などに深く関わっていることが示唆されている。薬理学的および生理学的研究からグルタミン酸受容体チャンネルに多様性のあることが指摘され、少なくともNMDA型、AMPA（古くはキスカル酸）型、カイニン酸型に分類して考えるのが一般的であった。AMPA型受容体はNa⁺、K⁺を透過し、通常の興奮性シナプス伝達を担っているのに対し、NMDA型受容体はCa²⁺に対して高い透過性を有し、シナプス可塑性や種々の病態時における神経細胞死に関与していると考えられている。

分子的多様性

サブユニットcDNAの単離と構造決定によってグルタミン酸受容体チャンネルには従来想定されていた以上に多くの分子種が存在することが明らかになってきた。これらのサブユニットは一次構造の類似性からいくつかのサブファミリー（ α , β , γ , δ , ϵ , ζ ）に分類することができる。同一サブファミリーに属するサブユニット（例えば $\alpha 1$, $\alpha 2$ など）はお互いに約70%のアミノ酸配列の相同性を有しているが、異なるサブファミリー間の

相同性は約40%である。

基本構造

一次構造の親水性/疎水性を解析することによって、グルタミン酸受容体チャンネルのサブユニットはアミノ末端にシグナルペプチドと推定される疎水性配列を、またカルボキシル末端側に4箇所疎水性領域（M1-M4）を有していることが見い出される（図1）。したがって、グルタミン酸受容体チャンネルはアミノ末端側が外側すなわちシナプス間隙に位置し、カルボキシル末端側の4箇所疎水性領域で膜を貫通しているものと考えられる。M2領域の近傍には負に荷電したアミノ酸残基が存在しており、アセチルコリン受容体のチャンネル部位とよく対応している。したがって、グルタミン酸受容体チャンネルは基本構造においてニコチン性アセチルコリン受容体、GABA_A受容体、グリシン受容体などの神経伝達物質依存性イオンチャンネルと類似していることが明らかとなった。

しかし、一次構造そのものについては有意な相同性は見い出されず、またグルタミン酸受容体は他の神経伝達物質依存性イオンチャンネルに比し約二倍の大きさを有している。その違いは大部分アミノ末端側すなわち膜の外側のシナプス間隙に位置すると想定している部分にある。M1領域のアミノ末端側にはニトリリやカエルのカイニン酸結合蛋白や大腸菌のグルタミン結合蛋白と相同性を有する部位が見い出され、グルタミン酸などのアゴニストの結合部位を形成していると推定され

*新潟大学脳研究所

	-1-	
α1	MPYVFAFFCTGFLGAVGVGNFPPMFIQISGLFNFQOSQENAKRFALSQLTEPP-KLPLQDILVNISSDFEMTYRFCS	58
α2	MQXIMHLVYLLSPVLKGLIFIGVS-SNLSIQISGLFRGAQDEISAFVGMQFSTSEFALTPHLDNLVANSFAVJTNAFCS	58
α1	QFSKGVYALFGFERRTVNMLITSECGALHYCFITPSFPIQISNOFVAVQALRFDALISLQHPKQDTFVVIYDAIDRGLS	138
α2	QFSRQVYALFGFVQKKSVMYITSECGTLHVSFLLTSPFVQWRDQKRALISLQEVYQDKFANLVYQSDRGLS	138
α1	VQRLVDTKAERKQVTAV---ILLTTEKRMLEFQLEKKYERVYVCESEERLHNLGQIVKLEKNGIGYHYJIAN	214
α2	PLGAVLDSKAERKQVTAIVGNINNDKQDEYRSLFQDLEKKYERVYVCESEERLHNLGQIVKLEKNGIGYHYJIAN	218
α1	LGFMDLQKFKESGANVYIGFQPMVYTPARIMQWRFSDARDHTAVDVKRPPYTSALTYGQKVMKFAFSQSLRQRRI	294
α2	LGFTDGLQKFGANVYIGFQPMVYTPARIMQWRFSDARDHTAVDVKRPPYTSALTYGQKVMKFAFSQSLRQRRI	298
α1	QISRRGNAGDCLANPAYPMGGQIQQRALQQRVEGLIGMVQFHEKQRINYLHVEMKHDRKXIGYHEDDQFVPA	374
α2	ELSRGNAGDCLANPAYPMGGQVEERALKQVQVEGLIGMVQFHEKQRINYLHVEMKHDRKXIGYHEDDQFVPA	378
α1	IDAQAQGGMSVQNRRTIVITVITILEQPYVMKKNANQFEGDRDREYEGYCVLAETAKRVGYSVRLLEIYSDGKYGARQDTR	454
α2	HELPQMDTSGLENKIVVVTITILESPYVMKKNANQFEGDRDREYEGYCVLAETAKRVGYSVRLLEIYSDGKYGARQDTR	458
α1	ANNGMVGELYGMAQVMAPLTILVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKPKQSKPGVFSFDPLAYEIVKCLVFAYIGVSV	534
α2	INNGMVGELYGKADIAAPLTIILVREEVIDFSKPFMSLGISIMIKKPKQSKPGVFSFDPLAYEIVKCLVFAYIGVSV	538
α1	VLFVSRFSPEYHISEEELGGQQTSDQSNTEGIFHSLVSLGAFMGGCDSIPRSLGRIVGGVWHFFLIISSYTA	614
α2	VLFVSRFSPEYHISEEELGGQQTSDQSNTEGIFHSLVSLGAFMGGCDSIPRSLGRIVGGVWHFFLIISSYTA	618
α1	NLAAFLTVRNVSPIESAEDLAKQTEIAYGTLKAGSTKEFFRRRSKIAYVREKHWIYMSAEPVSFVRTIEGHIRVRSKSG	694
α2	NLAAFLTVRNVSPIESAEDLSKQTEIAYGTLDSGSTKEFFRRRSKIAYVREKHWIYMSAEPVSFVRTIEGHIRVRSKSG	698
α1	KYAYLLESTNMEYIEQRKPCDTHKVGGLDQKGGYIATPKGSAIRGPNVLAVALKISCGVLEDLKSKMWWYKGGCGSKDS	774
α2	KYAYLLESTNMEYIEQRKPCDTHKVGGLDQKGGYIATPKGSAIRGPNVLAVALKISCGVLEDLKSKMWWYKGGCGSGGG	778
α1	QSRDKTSALSLSNVAGVFYILIGGLGLAMLVALLIEFCYKSRSESKRHKRFGFLIPQQSINEAIRSTLPRNSGAGASGGSG	854
α2	DSRDKTSALSLSNVAGVFYILVGGGLGLAMLVALLIEFCYKSRSESKRHKRFGFLIPQQSINEAIRSTLPRNSGAGASGGSG	858
α1	SGENGRVVSQDFPKSMQSIPTCHMSHSOGMPLGATGL	809
α2	SVKI	862

図1 グルタミン酸受容体チャネルα1およびα2サブユニットの一次構造の比較。同一のアミノ酸は囲っている。推定膜貫通領域(M1-M4)、糖鎖付加可能部位(*)および磷酸化可能部位(O)を示す。

る。細胞質側に位置すると想定されるM3とM4との間の領域には、 Ca^{2+} -カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIおよびプロテインキナーゼCによってリン酸化され得る部位が見い出される。長期増強の誘導と維持に蛋白質リン酸化酵素が関与していることが示唆されており、本受容体がリン酸化による調節を受けている可能性がある。

機能的性質

クローン化したサブユニットcDNAよりin vitroでmRNAを合成し、アフリカツメガエル卵母細胞で翻訳させることによりグルタミン酸受容体を発現させ、その機能を解析した。 $\alpha 1$ (GluR1)サブユニットは単独で機能的グルタミン酸依存性イオンチャンネルを形成する。 $\alpha 1$ サブユニットより成る受容体はグルタミン酸のみならずキスカル酸にもカイニン酸にも応答を示した。 $\alpha 2$ (GluR2)サブユニット単独ではカイニン酸に微弱な応答を示すのみであったが、 $\alpha 1$ サブユニットと組み合わせて発現させると $\alpha 1$ 単独の場合より大きな電流応答が観察された。

$\alpha 1$ サブユニットを単独あるいは $\alpha 2$ サブユニット

と組み合わせて発現させた場合に観察される電流応答は、カイニン酸に対して最も大きくグルタミン酸やキスカル酸に対しては小さい。しかしながら、濃度-応答曲線から、親和性はキスカル酸に対して最も高く次いでグルタミン酸である。カイニン酸に対する親和性は最も低い(図2)。したがって、 α サブファミリーはAMPA型受容体のサブユニットであると考えられる。

$\beta 2$ サブユニットも単独で機能的グルタミン酸受容体を形成し、グルタミン酸、カイニン酸、キスカル酸に応答を示した。 $\gamma 2$ サブユニット単独では応答が認められないが、 $\beta 2$ サブユニットと組み合わせて発現させると電流応答が数倍増加した。これらの受容体はカイニン酸に高い親和性を示したことから、 $\beta 2$ サブユニットと $\gamma 2$ サブユニットはカイニン酸型受容体を構成していると考えられる。

$\alpha 1$ サブユニット単独の濃度-応答曲線と $\alpha 2$ サブユニットと組み合わせて発現させた場合の曲線にはHill係数に大きな違いが見られる。 $\alpha 1$ サブユニットより成る受容体の種々のアゴニストに対するHill係数はほぼ1に近いのに対して二つの

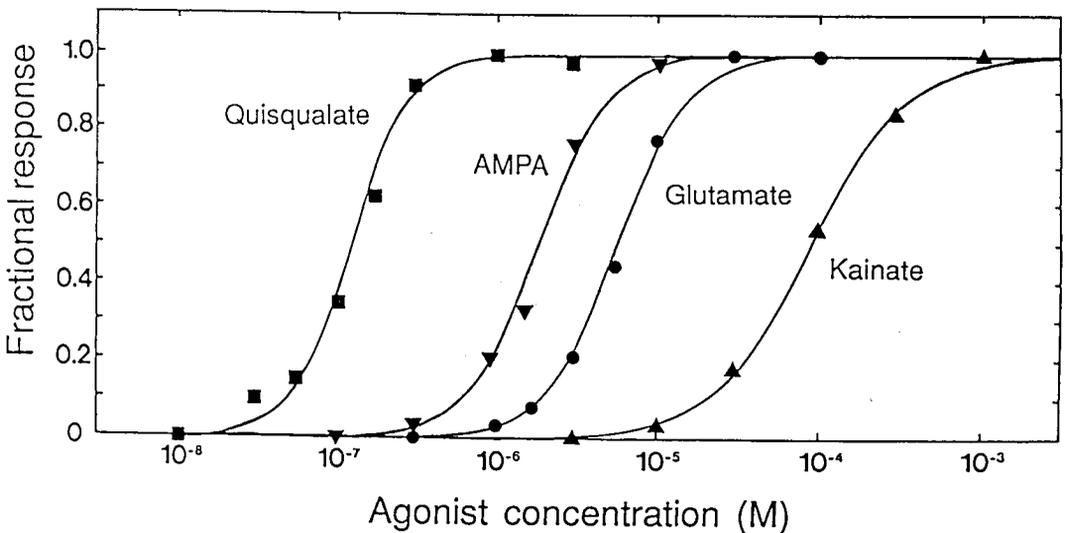


図2 アゴニストに対する $\alpha 1/\alpha 2$ グルタミン酸受容体チャンネルの濃度-応答曲線。

サブユニットを組み合わせた場合の係数は1.5 - 2.4である。この結果は、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ との間に正の協同性があることを明確に示している。複数のグルタミン酸受容体を組み合わせて発現させると電流応答の大きさが増すことも考え合わせると、グルタミン酸受容体チャンネルは他の神経伝達物質依存性イオンチャンネルと同様、複数の異なるサブユニットより構成されているものと思われる。

Ca²⁺透過性決定部位

$\alpha 1$ サブユニットにより形成されるグルタミン

酸受容体チャンネルはCa²⁺透過性を有し、その電流応答と膜電位との関係には強い整流作用が認められる。ところが、 $\alpha 1$ サブユニットと $\alpha 2$ サブユニットとの組み合わせによって形成される受容体チャンネルはCa²⁺に対してほとんど透過性を示さず、その電流応答と膜電位との関係はほぼ直線的であった(図3)。 $\alpha 1/\alpha 2$ 受容体の性質は実際に神経細胞に見いだされるAMPA型受容体の性質によく合致している。したがって、 $\alpha 2$ サブユニットはAMPA型受容体のチャンネルの性質を決定する上で非常に重要であることが明らかとなった。

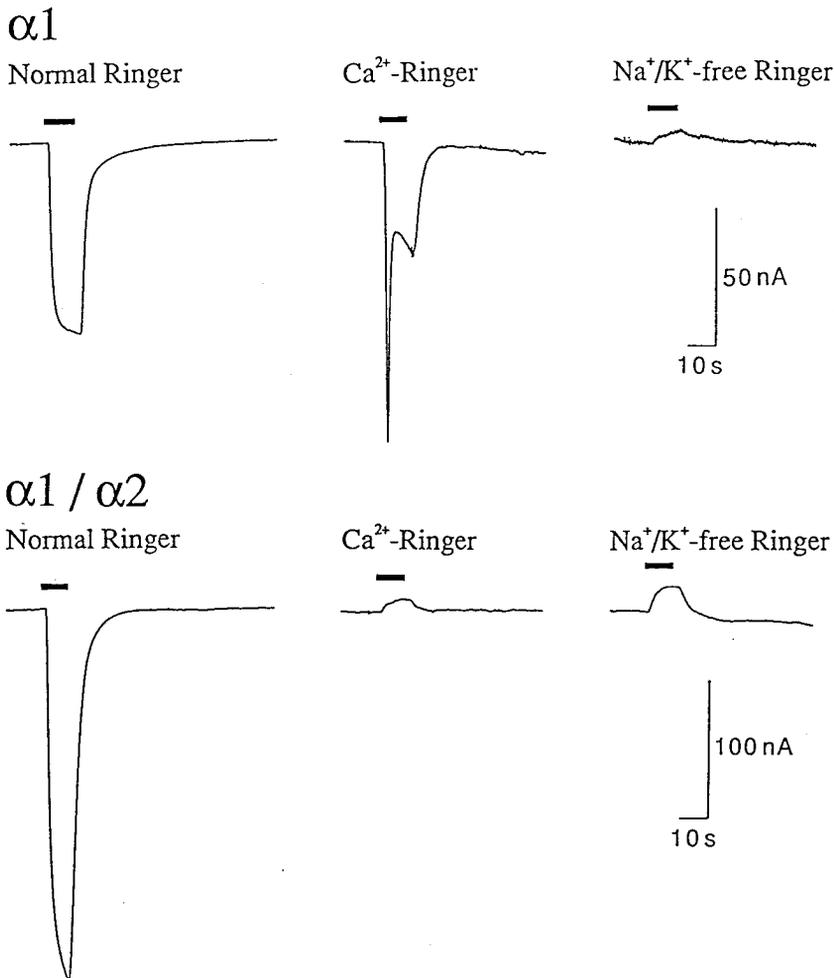


図3 $\alpha 1$ グルタミン酸受容体チャンネルおよび $\alpha 1 / \alpha 2$ グルタミン酸受容体チャンネルのカルシウムイオン透過性。

さらにグルタミン酸受容体サブユニットの一次構造を比較すると、 $\alpha 2$ サブユニットのM2領域には他のサブユニットと異なり正電荷を有するアルギニンが存在することを見出した。このアミノ酸残基をグルタミンに置換した $\alpha 2$ サブユニットで構成される受容体は Ca^{2+} に高い透過性を示した(図4)。したがって、このアルギニン残基がAMPA型グルタミン酸受容体チャンネルの Ca^{2+} 透過性および膜電位依存性を決定していることが明らかとなった。

文 献

K. Sakimura, H. Bujo, E. Kushiya, K. Araki, M. Yamazaki, M. Yamazaki, H. Meguro, A. Warashi-na, S. Numa, and M. Mishina (1990). Functional expression from cloned cDNAs of glutamate receptor species responsive to kainate and quisqualate. *FEBS Lett.* **272**, 73–80.

T. Konno, C. Busch, E. von Kitzing, K. Imoto, F. Wang, J. Nakai, M. Mishina, S. Numa, and B.

Sakmann (1991). Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. Lond. B* **244**, 69–79.

K. Imoto, T. Konno, J. Nakai, F. Wang, M. Mishina and S. Numa (1991). A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* **289**, 193–200.

M. Mishina, K. Sakimura, H. Mori, E. Kushiya, M. Harabayashi, S. Uchino and K. Nagahari (1991). A single amino acid residue determines the Ca^{2+} permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 813–821.

M. Mishina, K. Sakimura, E. Kushiya, K. Araki, M. Yamazaki, M. Yamazaki, and H. Meguro (1991). Structure and function of acetylcholine and glutamate receptors, in "Neurotransmitter regulation of Gene transcription" Fidia

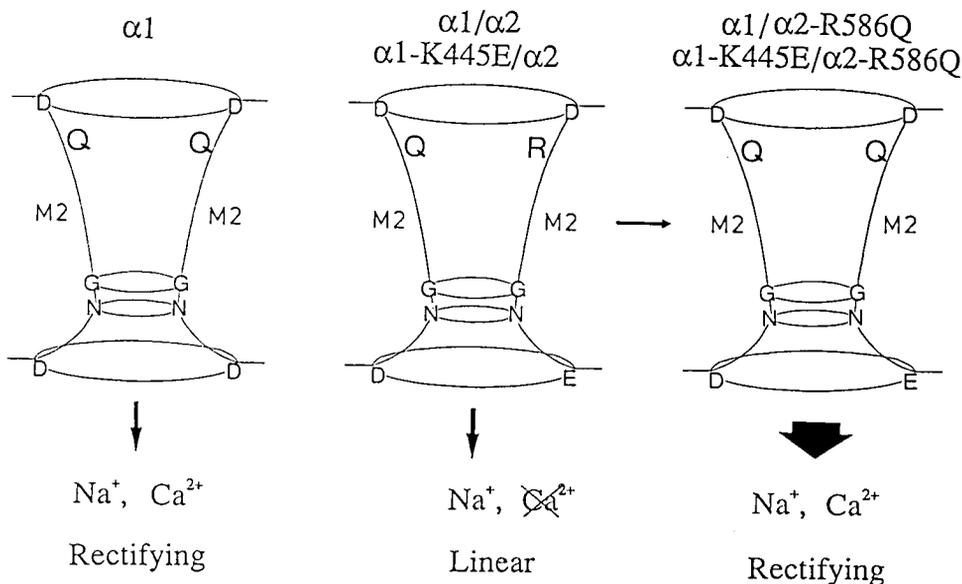


図4 $\alpha 2$ サブユニットのM2領域の正電荷を有するアルギニン残基をグルタミンに置換した $\alpha 2$ サブユニットで構成される受容体チャンネルのカルシウムイオン透過性。

Research Foundation Symposium 7, 133-142.

S. Kawamoto, H. Onishi, S. Hattori, Y. Miyagi, Y. Amaya, M. Mishina and K. Okuda (1991). Functional expression of the $\alpha 1$ subunit of the ANPA -selective glutamate receptor channel, using a Baculovirus system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 756-763.

M. Mishina, K. Sakimura, H. Mori, K. Araki, E. Kushiya, M. Yamazaki, M. Yamazaki, H. Meguro and T. Morita. Structure and fuction of the AMPA-selective glutamate receptor channel. Proceedings of the 1st Biennial International Conference on Amino Acid Research., in press.

Ⅲ Caとタンパク分解

13. 骨格筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャンネルのカルパインによる
分解と機能変化 77
14. カルシウム依存性プロテアーゼの活性化機構 83
15. ライソゾーム系による筋の崩壊 88

13 骨格筋小胞体Ca²⁺放出チャンネルのカルパインによる分解と機能変化

飯野正光*

研究協力者 大室弘美* 川名陽子*

ま と め

筋小胞体のCa²⁺放出チャンネルはカルパイン処理によって、NH₂末端側から分子量約14万の部分で分解されて、分子量約43万のCOOH末端側のフラグメントに分解された。このような分解によっても、CICR機構のCa²⁺依存性、アデニンヌクレオチドによる促進効果等は維持されたが、最大Ca²⁺放出速度が約2倍に増大した。この結果より、Ca²⁺放出チャンネル分子内の機能局在が明らかになった。このようなカルパインによるCa²⁺放出チャンネルの分解は、筋ジストロフィーにおけるCa²⁺動態異常に対して増悪効果を現わす可能性が考えられる。

緒 言

筋ジストロフィーの骨格筋細胞では細胞内Ca²⁺代謝異常が存在し、このため筋崩壊が引き起こされるとする説が提唱されており、この機構に関与する酵素として、Ca²⁺依存性の蛋白分解酵素であるカルパインが候補に上げられている。カルパインは骨格筋細胞内に存在し、磷脂質が存在するとμM程度のCa²⁺によって活性化されることが示されている⁽¹⁾。従って、筋ジストロフィーにおけるCa²⁺代謝異常で細胞内Ca²⁺濃度が上昇した場合、カルパインが作用して筋蛋白質の分解を引き起こし、筋崩壊につながる事が考えられるが、詳細については明らかでない。

骨格筋小胞体は細胞内Ca²⁺濃度の制御に最も重要な働きをしており、Ca²⁺を取り込むCaMg-ATPaseとCa²⁺放出チャンネルを備えている。このうちCa²⁺放出チャンネルはライアノジン受容体として単離精製され一次構造も明らかにされている⁽²⁾。またこれはCa²⁺によるCa²⁺放出(CICR)機構として機能すると共に、生理的な興奮収縮連関の際のCa²⁺放出を起こすチャンネルであると考えられている^(3,4)。ところで、筋小胞体の蛋白のうちCa²⁺放出チャンネルが特異的にカルパインによって分解され、チャンネル活性が増大すると報告されている⁽⁵⁾。このことは、結果として細胞内Ca²⁺濃度増加に傾き、カルパインの活性化をさらに促進すると予想され、筋ジストロフィーの病態を考える上で非常に重要であると考えられる。そこで本研究では、スキンドファイバーを用い生理的な構造を保ったままの筋小胞体でも、カルパインによってCa²⁺放出チャンネルが分解されるかどうか、また分解されるなら機能にどのような変化が生じるかについて解析した。

方 法

スキンドファイバー ウサギ腸腰筋から幅約10 mm長さ約50 mmの筋束を切り出し、短縮するのを防ぎながら弛緩液に移した。これから幅約2 mmの細い筋束を取り出し、50 μg/mlのサポニンを含む弛緩液中で処理してスキンドファイバーとした。

カルパイン処理 サポニン処理した筋束をさら

* 東京大学医学部薬理学第2講座

に細く分離して、2本の筋線維からなる長さ2mmの線維束を取り出し、ステンレス線に両端を絹糸で縛って固定した。これを一旦(Ca²⁺ATP)除去液(10mM EGTA, 100mM KMs, 20mM PIPES, pH7.0)に移し標本内のATPを洗い去った。その後100μg/mlのm-カルパイン(Sigma)を含む高Ca²⁺液(2mM Ca, 100mM KMs, 20mM PIPES, pH 7.0)に移して、攪拌しながら酵素処理を行った。この後(Ca²⁺ATP)除去液に戻してカルパインを洗い去った後、筋小胞体機能の測定を行った。

これと平行して5本から10本の筋線維を含む長さ約20mmの筋束を5本用意し、全く同様の酵素処理を行った後、後述するゲル電気泳動解析を行った。予備実験の結果、カルパインを30分以上処理するとはっきりした分解が起こることが分かったので、以後の実験では室温で60分以上の処理条件を用いた。

ゲル電気泳動及びイムノプロット スキンドファイバーから2% CHAPS溶液中でCICRチャンネル(ライアノジン受容体)を抽出し、2-15%のアクリルアミドグラディエントゲルを用いたSDS電気泳動(Laemmli)を行った。泳動終了後、常法に従ってゲル上の蛋白質をニトロセルロース膜に転写し、CICRチャンネルのCOOH末端に対する抗体と反応させた。抗原抗体反応産物はペルオキ

シダーゼ標識二次抗体を用いて検出した。

Ca²⁺放出機構の解析 カルパイン処理後あるいは未処理の標本をステンレス線に結び付けたまま内径400μmのガラスキューベットに挿入固定した。これをポンプにつないで溶液交換が行えるようにした。キューベットは落射蛍光顕微鏡のステージ上に固定し、345nmと365nmの紫外光で交互に励起し、蛍光強度を光電子倍增管で測定しCa²⁺濃度を測定した⁽⁶⁾。

実験のプロトコルを図1に模式的に示す。

- 1) Ca²⁺取り込み。カルパイン処理後は収縮制御蛋白系が分解されて、MgATP中で不可逆的収縮が起きるので、ATP非存在下にCICRチャンネルを介して受動的なCa²⁺を取り込みを行った。このためCa²⁺濃度を1mMに上げ、CICR機構を活性化するためAMPを10mM加えた溶液中に1分おいた。この後AMPとCa²⁺を除去(ウォッシュ)した。
- 2) テスト処理。CICR機構を活性化するため10mM EGTAで緩衝したCa²⁺溶液を一定時間処理し、その後ただちにCICR機構を停止させるため、10mM Mg²⁺と10mMプロカインを含む液でCa²⁺を洗い去った。
- 3) アッセイ。EGTA濃度を下げ、40μMのfura-2を含む液に移してから50mMカフェインを投与して筋小胞体内のCa²⁺を完全に放出させ、その時のCa²⁺放出量をfura-2の蛍光強度変化として測定した。

テスト処理の時間とともに筋小胞体に残存してアッセイ時に測定されるCa²⁺量が減少し、その時間経過は単一指数関数で近似できるので、Ca²⁺放出速度は指数関数の速度定数を用いて表した。

結 果

図2にカルパイン処理によって分解された骨格筋スキンドファイバーのイムノプロットの結果を示す。見かけの分子量約45万のバンドがカルパイン処理後に約35万に分解されている。用いた抗体はCOOH末端を認識するものであることから、この結果はカルパイン処理によってNH₂末端から見

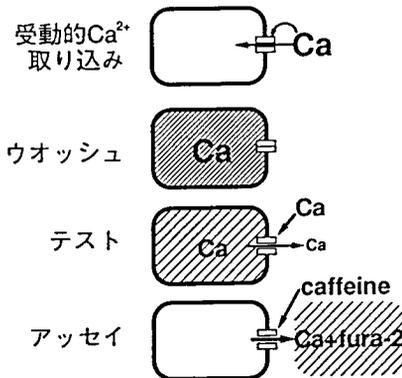


図1 CICR機構解析法の模式図

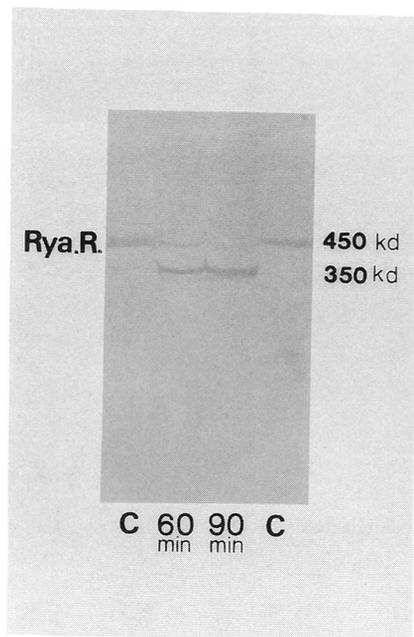


図 2 カルパイン処理によるライアノジン受容体分解産物のイムノブロット法による解析。両端のレーン是对照のライアノジン受容体 (Rya.R.) で、真ん中の2つのレーンはカルパイン処理をそれぞれ60分あるいは90分行った分解産物。

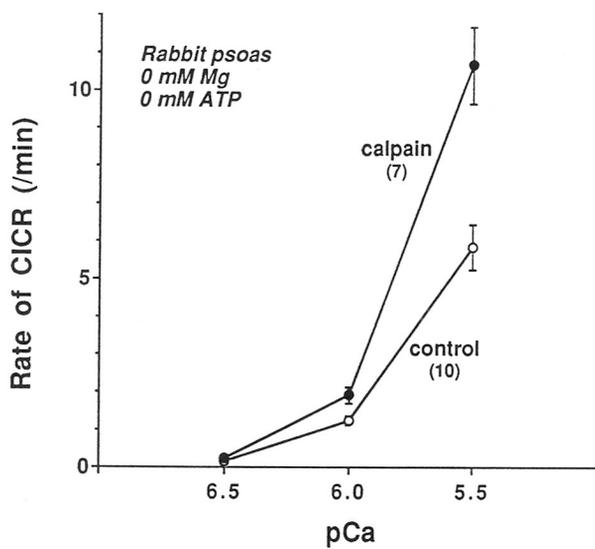


図 3 カルパイン処理前後のCICR速度。 Mg^{2+} およびアデニンヌクレオチド非存在化。

かけの分子量にして約10万の部分が切断されたことを示す。また分解産物の移動度はジストロフィンとほとんど同じであった。

酵素処理時間を60分以上に延長したり、酵素濃度を3倍にしたり、処理温度を37°Cにするなどの方法を用いてもこれより小さいフラグメントに分解することができなかった。

カルパイン未処理及び処理後のスキンドファイバーを用いてCICR速度を測定した結果を図3に示した。低Ca²⁺濃度ではCICR速度は著明な影響を受けていない。しかしpCa 5.5では、Ca²⁺放出速度が2倍近く増加している。

このようなCICR機構の促進作用はアデニンヌクレオチドで見られるものと全く同じである。そこで、アデニンヌクレオチド存在下のCICR機構がカルパイン処理によってどのような影響を受けるかを調べた。図4に示すように、ATPアナログのAMPPCP存在下でも、低Ca²⁺(pCa 6)でのCICRにはカルパイン処理は影響を与えず、pCa 5.5のCICR速度を約2倍程増大させた。

考 察

イムノプロットの結果から、ライアノジン受容体はカルパイン処理によりジストロフィンと同様な分子量のCOOH末端を含むペプチドに分解されることが明らかになった。cDNAクローニングから示された分子量はライアノジン受容体57万⁽²⁾、ジストロフィン43万⁽⁷⁾であるので、分子量にして約14万のペプチドがNH₂末端から切り落とされたことになる。この切断部分よりNH₂末端側をN-フラグメント、COOH末端側をC-フラグメントと呼ぶことにする(図5)。

このような切断が起っても、CICR機構のCa²⁺感受性は失われなかったが、最大Ca²⁺放出速度が約2倍に亢進した。これはアデニンヌクレオチドに見られるCICR促進効果と非常に良く似ている。しかし、カルパイン処理後もAMPPCPの促進効果が見られたので、アデニンヌクレオチド結合部位がN-フラグメントに存在するとは考えにくい。

このような結果から、C-フラグメントにCa²⁺チャンネル、Ca²⁺結合部位及びアデニンヌクレオチド結合部位が存在すると考えられる。これに対して、N-フラグメントはCa²⁺チャンネルのCa²⁺

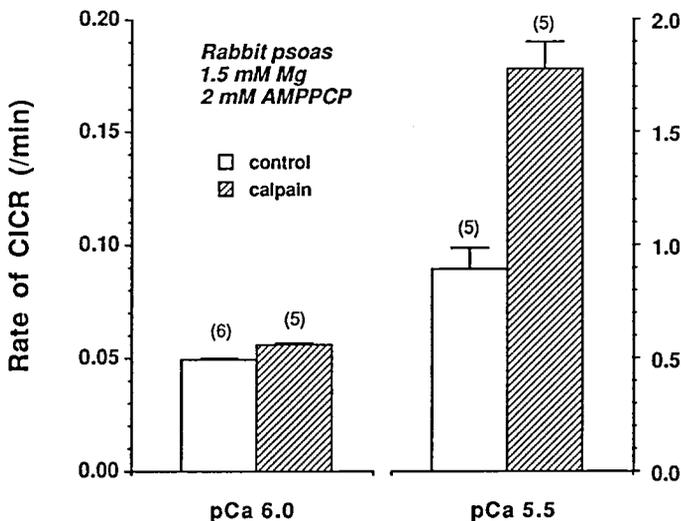
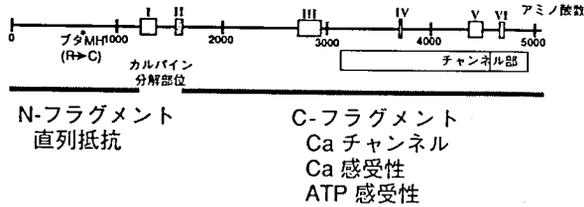


図4 カルパイン処理前後のCICR速度。1.5 mM Mg²⁺、2 mM AMPPCP 存在下。



N-フラグメント
直列抵抗

C-フラグメント
Caチャンネル
Ca感受性
ATP感受性

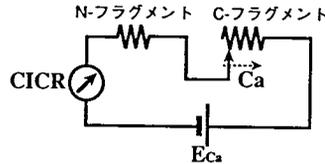


図5 上：ライアノジン受容体とカルパインによる分解産物を示す模式図。
下： Ca^{2+} 放出チャンネルの機能を示す等価回路。 Ca^{2+} 放出を電流で表すと、C-フラグメントは Ca^{2+} およびアデニンヌクレオチド依存性の可変抵抗で、N-フラグメントはそれに対する直列抵抗と見なすことができる。

透過性を抑制するように作用すると考えられる。等価回路で示すと図5のようになる。

ブタの悪性高熱症では、CICR機構がちょうどカルパイン処理によるものと同様に促進しており⁽⁸⁾、615番目のアミノ酸であるアレルギニンがシステインに変異していることがその原因であると考えられている⁽⁹⁾。この変異部位がN-フラグメントの中央部にあることは興味深い。

Jonesらのグループは、分離筋小胞体標本をカルパイン処理して、我々が得たと同様の見かけの分子量35万のペプチドを得ている⁽⁵⁾。但しそれが NH_2 末端側か、 COOH 末端側かは明らかにされていないが、我々の研究によって COOH 末端側であることが明らかになった。Jonesらはさらに酵素処理を進めるとライアノジン受容体はもっと小さなペプチドにまで分解されると報告している⁽⁵⁾。しかし我々の今回の実験では、酵素処理を強くしてもこれ以上のフラグメントに分解することができなかった。さらに条件を工夫して、もっと小さなC-フラグメントにできるならどのような機能変化が起こるかも興味のあるところである。ただ

し、構造をもった状態では、これ以上に分解されない可能性もある。

このように Ca^{2+} 放出チャンネルは収縮系の制御蛋白などに比べて、カルパインによる分解にはかなり耐性のある蛋白であるようである。しかし、カルパインが活性化を受けるのは膜磷脂質が存在する細胞膜直下であり、まさにCICRチャンネルが存在する部位なので、酵素による分解を受けないとは断定できない。もし筋ジストロフィーの病態で Ca^{2+} 放出チャンネルがカルパインによる切断を受けると、 Ca^{2+} 放出が起こりやすくなり、さらにカルパインの活性が高まって自己崩壊機序が進展することが予想される。

文 献

- 1) 鈴木紘一 厚生省神経疾患研究依託費(小沢班) 平成2年度研究報告書 pp. 83-88.
- 2) Takeshima, H. et al. (1989) *Nature* **339**, 439-445.
- 3) Endo, M. (1985) *Curr. Top. Membr. Transp.* **25**, 181-230.

- 4) Ebashi, S. (1991) *Ann. Rev. Physiol.* **53**, 1-16.
- 5) Rardon, D. P. et al. (1990) *Circ. Res.* **67**, 84-96.
- 6) Iino, M. (1989) *J. Gen. Physiol.* **94**, 363-383.
- 7) Koenig, M. et al. (1988) *Cell* **53**, 219-228.
- 8) Ohta, T. et al. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, C 358-C 367.
- 9) Fujii, J. et al. (1991) *Science* **253**, 448-451.

14 カルシウム依存性プロテアーゼの活性化機構

鈴木 紘一*, ***

研究協力者 西道隆臣* 川崎博之* 長尾俊介*
鈴木英紀** 田上憲次郎**

はじめに

カルシウム依存性プロテアーゼ（カルパイン）は、カルシウムの存在下で基質を切断するので活性のある酵素と考えていた。その後、基質を切るときに必要なカルシウム濃度が生体内のカルシウムよりずっと高い原因を追求した結果、これまで活性を持つと考えていたカルパインは、実は、活性のない酵素前駆体で、この前駆体がカルシウムの存在下に自己触媒的に活性型に変化し、活性型が基質を切断することが判明した。昨年度、いくつかの実験事実をもとにカルパインの活性化モデルを提唱した¹⁻³⁾。

カルパインは不活性な酵素前駆体として細胞質に存在する。細胞が種々の刺激を受けて細胞質のカルシウム濃度が上昇すると、カルパインはカルシウムを結合して生体膜に移行する。生体膜上でリン脂質とカルシウムの存在下にカルパインの活性化がおこり、活性型のカルパインが生体膜またはその近傍にある基質タンパク質を切断する。カルパインの自己消化による活性化は生体膜上、すなわちリン脂質が存在すると生理的カルシウム濃度でおこるが、生体膜がないと mM に近いカルシウム濃度が必要になる。これまで *in vitro* で測定したカルパインのカルシウム感受性は、この自己消化に必要なカルシウム濃度に相当し、活性型カ

ルパインが基質を切断するのに必要なカルシウム濃度は μM 程度であることが示された⁴⁾。

カルパインが自己消化に要するカルシウム濃度はリン脂質の存在で著しく低下する。本年度は、このリン脂質によるカルパインの活性化への効果が、生体内でも実際に見られるのか否かを検討した。

実験材料および方法

カルパインはウサギ筋肉から単離した μ -および m-カルパインを使用した。カルシウム濃度は E-GTA 緩衝液を使って調節した。フォドリンはウシ腎臓から既法の方法で抽出精製し、これを抗原にしてウサギで特異抗体を作成した。

結果と討論

1. 前駆体および活性型に特異的な抗体

ヒトの μ -カルパインは自己消化の際に図 1 に示す構造変化がおこる。すなわち、カルパイン大サブユニットの N 末端から 26 個のアミノ酸がとれ、27 番目のアミノ酸が活性型カルパインの N 末端になる。前駆体型および活性型に特異的な抗体を調製するため、それぞれ No 1~20 および No 27~31 番に相当するペプチドを合成し、これを抗原として用いた。ポリクローナル抗体ではあるが、各々特異的な抗体がえられた。

2. 血小板の刺激に伴うカルパインの活性化⁵⁾

血小板には μ -カルパインだけが含まれる。上記 1 でえられた前駆体および活性型 μ -カルパインに対する特異抗体を使って、血小板を刺激したとき

* 東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

** 同循環器病研究部

*** 現東京大学応用微生物研究所

におこるカルパインの活性化を調べた。図2に示したのは血小板をカルシウムイオノフォアで刺激したときの結果である。図2右側に示すように、血小板にカルシウムイオノフォアを作用させると数分のうちに血小板の凝集が観察される。左側は前駆体型と活性型カルパインに対する抗体を用いたウエスタンブロットである。刺激前には前駆

体型しか存在しない。この前駆体型は刺激後1分以内に完全に消失する。一方活性化型は刺激前の血小板には全く存在しないが、刺激後1分で最大量に達し、その後急速に減少して10分後には消失する。血小板では刺激に伴ってすべてのカルパイン前駆体が急速に活性化され、活性型のカルパインは不安定でごく短時間のうちに分解される。

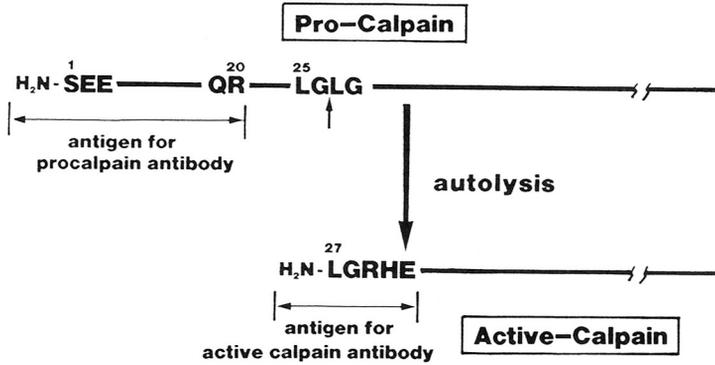


図1 カルパイン前駆体が活性型になるときの大サブユニットの構造変化と抗体を作るために使用した抗原部位。

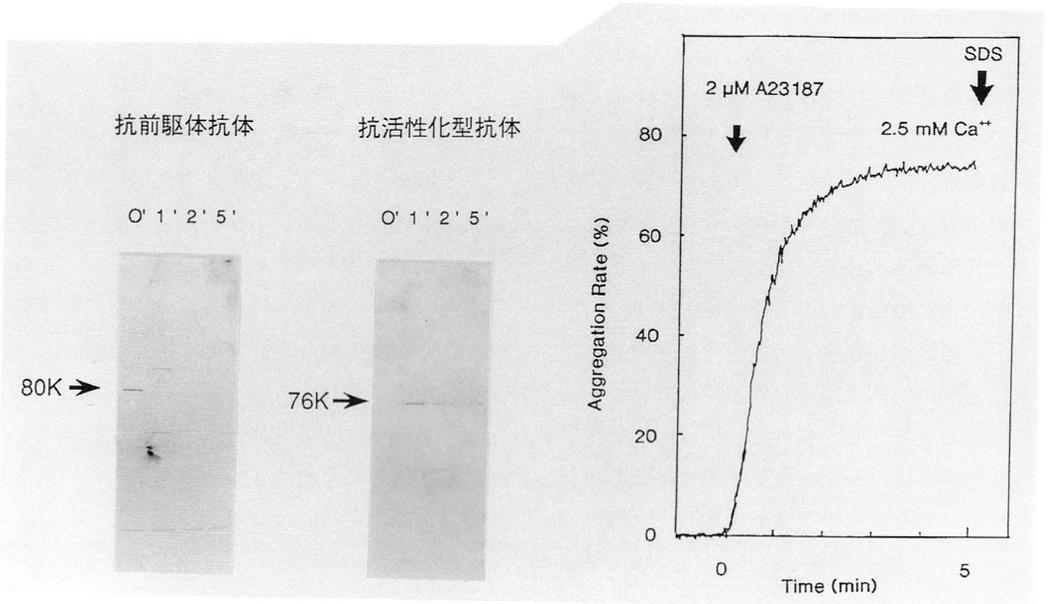


図2 ヒト血小板の凝集（右側）とその際のカルパイン大サブユニットの変化（左側）。

刺激に伴って活性化されるカルパイン前駆体の量や、活性化に要する時間などは細胞や刺激の種類によってさまざまであった。しかし、いずれの場合にも活性型カルパインは不安定で急速に消失した。

活性型カルパインは前駆体型カルパインから *in vitro* では容易に作る事ができる。しかし、これまで生物材料から活性型カルパインが単離されたことはないで、活性型カルパインが本当に細胞内でもできるのかについて若干の疑問があった。今回の血小板や他の剖養細胞を使って行った実験で、活性型カルパインが刺激に伴って細胞内で実際に生成することが明らかになった。また、これまで活性型カルパインが生物材料から単離できなかった主な理由は、活性型カルパインが不安定であるためと予想された。

3. カルパインの活性化と基質の分解に対するネオマイシンの効果

ネオマイシンは *Streptomyces fradiae* が生産する抗菌性物質で、イノシトールリン脂質と相互作用をし、ホスホリパーゼCの活性を阻害することに起因すると考えられている。カルパインの活性化にイノシトールリン脂質 (PIP₂, PIP, PI など) が重要な役割をはたすなら、ネオマイシンはカルパ

インの活性化を阻害するはずである。この考えにもとずき、カルパインのプロテアーゼ活性に対するネオマイシンの効果をまず調べた。カルパインのフォドリン分解を10⁻⁶ Mカルシウムの存在下で検討した。ネオマイシン (100 μM) はフォドリンの加水分解に対し何らかの影響も与えなかった。一方、カルパインがフォドリンを加水分解する反応はPIP₂を加えると用量依存的に著しく加速される。この系にネオマイシンを加えると、PIP₂に依存した加水分解の促進だけが阻止される。すなわち、ネオマイシンは予想通りにPIP₂と相互作用し、PIP₂がカルパインを活性化するのを阻害することが判明した (図3)。

次に、リンバ球系の Molt 4 細胞をカルシウムイオノフォアで刺激したときにおこる内在性のフォドリン様タンパク質の加水分解に対するネオマイシンの効果を調べた (図4)。細胞にカルシウムイオノフォアを添加すると、フォドリン (230 K) が分解し、150 K の断片が生じる。これにネオマイシンを添加すると、フォドリンの分解が阻害される。また、カルパインの活性を阻害する膜通過性の低分子阻害剤 E 64 d を添加してもフォドリンの加水分解は阻害される。図4中のフォドリンの

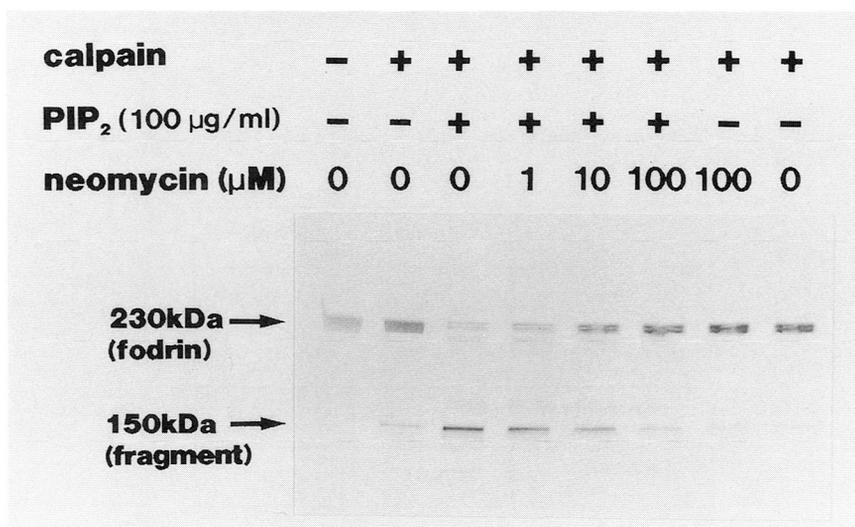


図3 カルパインによるフォドリンの加水分解に対するネオマイシンの効果

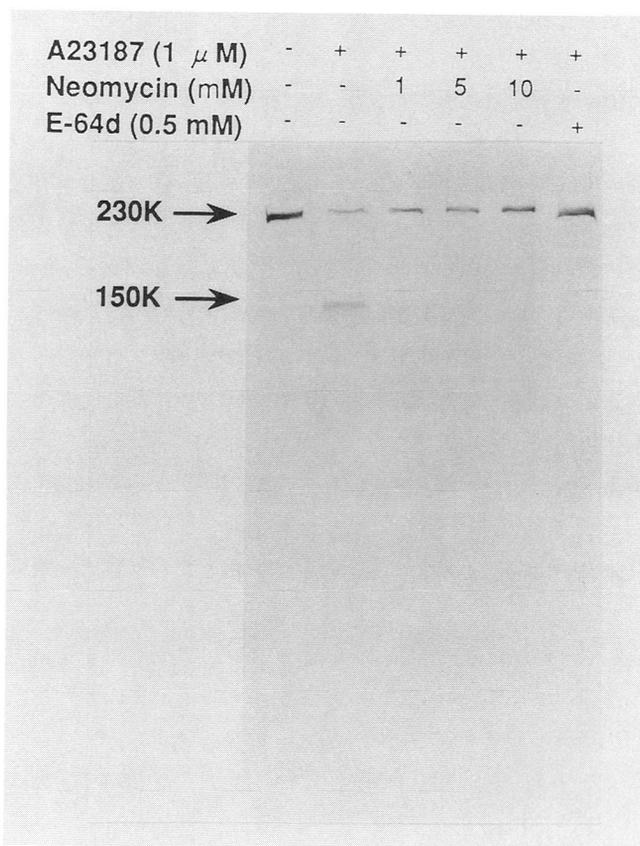


図4 Molt 4 細胞をカルシウムイオノフォアで刺激した際におこるフォドリンの加水分解に及ぼすネオマイシンと E 64d の効果

表 フォドリンの加水分解に対するネオマイシンと E 64d の効果。図4の結果を定量したもの。

	Proteolysis* (%)	Inhibition (%)
none	0	0
A23187 (2 μ M)	23.7	0
+ neomycin (5mM)	7.3	69
+ E64d (0.5mM)	5.6	76

* (150K)/(230K + 150K)

バンドをトレースして定量し、その結果をまとめたのが表1である。カルシウムイオノフォアを加えると、内在性のフォドリンの分解がおきる。上述のように、この系にネオマイシンまたはE 64dを加えると、フォドリンの分解のほとんど(70~80%)が阻害される。フォドリンの分解がE 64dで阻害されることは、フォドリンの分解の大部分はカルパインによるものであり、ネオマイシンが分解を阻止したことは、この際に働くカルパインの活性化が主にPIP₂などのイノシトールリン脂質を通じた経路でおこなうことを示す。また、ウエスタンブロットにより活性型カルパインの量を定量すると、用いたMolt 4細胞では1mMネオマイシンでカルパインの活性化がほとんど完全に止っていた。

以上の結果から、カルパインの活性化の大半は、PIP₂などのイノシトールリン脂質を介す系によることが明らかになった。イノシトールリン脂質は各種の生体膜に含まれ、生体膜に含まれる濃度のイノシトールリン脂質でカルパインは十分活性化される。従って、カルパインは細胞膜をはじめとする種々の生体膜上でイノシトールリン脂質とカルシウムの存在下で活性化されるものと予想される。事実、血小板の活性に伴うカルパインの挙動を免疫電顕で追跡すると、前駆体型のカルパインは細胞質に存在するが、活性型カルパインは生体膜上に存在することが明らかになった。これは前駆体型カルパインがカルシウムを結合すると生体膜に移行し、生体膜上でリン脂質の存在下に活性化されるとした我々の活性化モデルとよく一致す

る。

今後は、細胞がいかなる刺激を受けたときに、カルパインがどの生体膜でどの位活性化されるかを明らかにし、カルパインの生理機能を明らかにしたい。また、カルパインの活性化モデルは μ -カルパインの活性化を説明するには好都合であるが、 m -カルパインの活性化はこのモデルでは十分説明できない。 m -カルパインの活性化に必要なカルシウム濃度は確かにPIP₂の存在下で低下するが、生理的なカルシウム濃度に比べるとまだかなり高い。 m -カルパインの場合にはそのカルシウム感受性を高める何らかの機構が必要である。幾つかの研究室から報告があるカルパインの活性化タンパク質がこの機構と関係している可能性があり、その他の活性化因子の関与も考えられる。これらの点については引続き検討を加えている。

文 献

- 1) Suzuki, K. & Ohno, S. : Cell Structure and Function, 15 : 1-6 (1990)
- 2) 鈴木紘一 : Annual Review 細胞生物学 1991 (矢原一郎, 御子柴克彦, 月田胤一郎編), 中学医学社, pp. 294-306 (1991).
- 3) 鈴木紘一 : 細胞工学, 10 : 878~885 (1991).
- 4) Saido, T. C., Mizuno, K. & Suzuki, K. : Bio-med. Biochim. Acta, 50 : 4-6 (1991).
- 5) 西道隆臣, 鈴木紘一 : 血小板活性化の生化学 (日高弘義, 山崎博男, 大熊稔, 青木延雄, 蔵本淳編), 金芳堂, pp. 135-154 (1991).

15 ライソゾーム系による筋の崩壊

熊本 俊秀*

研究協力者 上山 秀嗣* 渡辺 進* 荒木 淑郎*

要 約

筋原線維構成蛋白が autophagy を介したライソゾーム系によって分解されるか、若しされるなら如何なる機序で分解されるかを明らかにするため、脱神経処理したラットに chloroquine (CQ) を投与した骨格筋を実験モデルとして検討した。脱神経することにより、単独に CQ のみを投与した筋に比較し、筋原線維の崩壊と共に、autophagic vacuoles (AVs) または二次ライソゾームが過剰に形成され、また、cathepsin B などのライソゾーム・プロテアーゼ活性が亢進した。AVs 内には、電顕的に membranous structure, mitochondria remnants, glycogen 顆粒を認めるものの筋原線維の成分はなく、各種筋原線維蛋白の抗体を用いた免疫組織学的検討でも AVs 内に陽性反応はみられなかった。一方、cathepsin B, H, L は、一次または二次ライソゾーム内に限局するほか、calpain と共に、対照筋に比し細胞質にもより活性がみられた。すなわち筋原線維蛋白は細胞膜, mitochondria, glycogen などとは異なり、AVs に取り込まれることなく、ライソゾーム外へ逸脱した cathepsin あるいは calpain などのライソゾームまたは非ライソゾーム・プロテアーゼにより分解される。

はじめに

筋ジストロフィー (筋ジス) において、ジストロフィン蛋白が欠損していることが判明したが、しかし、その筋線維の崩壊機序は未だ不明である。

従来より、筋ジスの筋線維内の Ca 濃度が高いことより、Ca 依存性プロテアーゼ (calpain) が本症の筋変性に重要な役割を演じていることが推測されている¹⁾。しかし、我々の immuno-gold を用いた calpain の免疫電顕の検討では、本プロテアーゼは変性の初期に増加するが、筋崩壊の進行と共に減少し²⁾、かつ脱神経筋などの他の病的筋でも増加し得ることがわかり³⁾、筋線維の崩壊には、もう一つの細胞蛋白代謝を担うライソゾーム系の関与を明らかにする必要がある。従って、筋の崩壊課程において筋原線維蛋白が autophagy を介したライソゾーム系によって分解 (崩壊) されるか、若しされるなら如何なる機序で分解されるかを、*in vitro* でなく *in vivo* の系を用いて明らかにすることを目的として研究を行なった。

材料と方法

エーエル麻酔下で、Wistar 系雄ラット 12 匹の右坐骨神経を坐骨結節直下で結紮した。そのうち 6 匹に連日 50mg/kg/日の chloroquine chloride (CQ) 溶液を腹腔内注射し、残りの 6 匹には同量の生食水を同様に注射した。結紮後、4, 8, 16 日目に両群の左右ヒラメ筋を摘出し、一部はアルコール脱水後、型の如く、エポニーアラルダイト樹脂に包埋し、0.2% トルイジンブルー染色横断標本を作成し、観察すると共に、電顕的観察を行なった。Dense bodies または autophagic vacuoles (AVs) を有する筋線維の出現頻度は、上記標本を基に、200 個の筋線維を数え、算定した。免疫電顕用には LR white レジンに包埋し、post-

* 熊本大学医学部第一内科

embedding法で、一次抗体にポリクロナールの抗 α -actinin, myosin, actin抗体を、二次抗体に10 nm-gold 結合抗ウサギIgG抗体を用い、各々室温で1時間および30分間反応させた。また、組織の一部は、凍結標本を作成後、Gomoriの方法でacid phosphatase (ACPase) 染色を行なうと共に、一次抗体にポリクロナールの抗calpain, cathepsin B, H, Lおよび α -actinin, myosin, actin抗体を用い免疫組織学的検討を行なった。二次抗体には抗ウサギIgG抗体を用い、各々室温で2時間および30分間反応させ、免疫染色はABC法を行なった。免疫組織学的検討は、ヒトのrimmed vacuolesを有する遠位型ミオパチー患者の生検筋についても同様の方法で行なった。

また、各実験筋をポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、可溶性分画を調整し、SDS-PAGE後、ポリクロナールの抗calpain抗体を用い、イムノブロットを行なった。

結 果

形態学的所見：エポソーンアララルダイト包埋トルイジンブルー染色横断標本での検討では、CQ投与のないラットの非神経結紮筋（対照筋）では16日目でも、特に形態学的に変化を認めない。対側の神経結紮筋（脱神経筋）では、筋線維は4日目ではほぼ正常だが、8、16日目にかけて筋線維の萎縮、横紋の消失、変性がみられた。しかし、対照筋および脱神経筋ともに非CQ投与ラットの骨格筋では明らかなdense bodiesあるいはAVsはみられなかった。

一方、CQ投与ラットの非神経結紮筋（CQ投与筋）では、8日目でもその形態に大きな変化を認めないが、16日目では、筋線維内にdense bodiesあるいはAVsを持つ筋線維がごくわずかながら散見された。しかし、筋線維の変性、壊死はない。

対側のCQ投与ラットの神経結紮筋（CQ投与-脱神経筋）では、筋の萎縮、横紋の消失、変性、

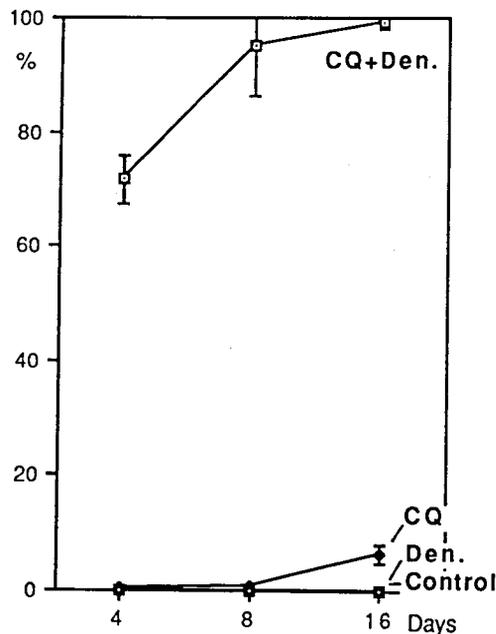


図1 対照筋、脱神経筋、CQ投与筋およびCQ投与-脱神経筋におけるdense bodiesまたはautophagic vacuolesを有する筋線維の出現頻度

時に壊死がみられたが、種々の大きさ、形をした dense bodies および AVs が、CQ 投与筋に比し過剰に形成し、認められた。また、電顕では glycogen の増加、mitochondria の変性・崩壊、また筋原線維の粗しょう化あるいは崩壊がみられた。図 1 に対照筋、脱神経筋、CQ 投与筋および CQ 投与-脱神経筋について、エボン-アラルダイト包埋トルイジンブルー染色横断標本でこれら dense bodies あるいは AVs を有する筋線維の出現頻度を示した。非 CQ 投与ラットでは神経支配および脱神経筋共に、これら構造物は全く認められなかった。一方、CQ 投与ラット、すなわち CQ 投与筋および CQ 投与-脱神経筋では、4 日目では各々 $0.5\% \pm 0$ および $71.7\% \pm 4.2$ 、8 日目では $1.0\% \pm$

0 、16 日目では、 $6.5\% \pm 1.5$ および $99.0\% \pm 0.9$ と、明らかに CQ 投与-脱神経筋で著明に AVs の過剰形成がみられた。

また、CQ 投与筋および脱神経筋でみられる AVs の超微形態の比較検討では、前者でみられる AVs は殆ど dense bodies, membranous structure, mitochondrial remnants などの heterogenous materials より成るが、後者でみられる AVs では、上記 materials に加え、多数の glycogen 顆粒、すなわち glycogenosome がみられ、これは所謂、ヒトの遠位型ミオパチーや眼・咽頭型筋ジストロフィーでしばしばみられる rimmed vacuoles に酷似した^{4,5)} (図 2 a, b)。

免疫組織学的検討：16 日目における CQ 投与-

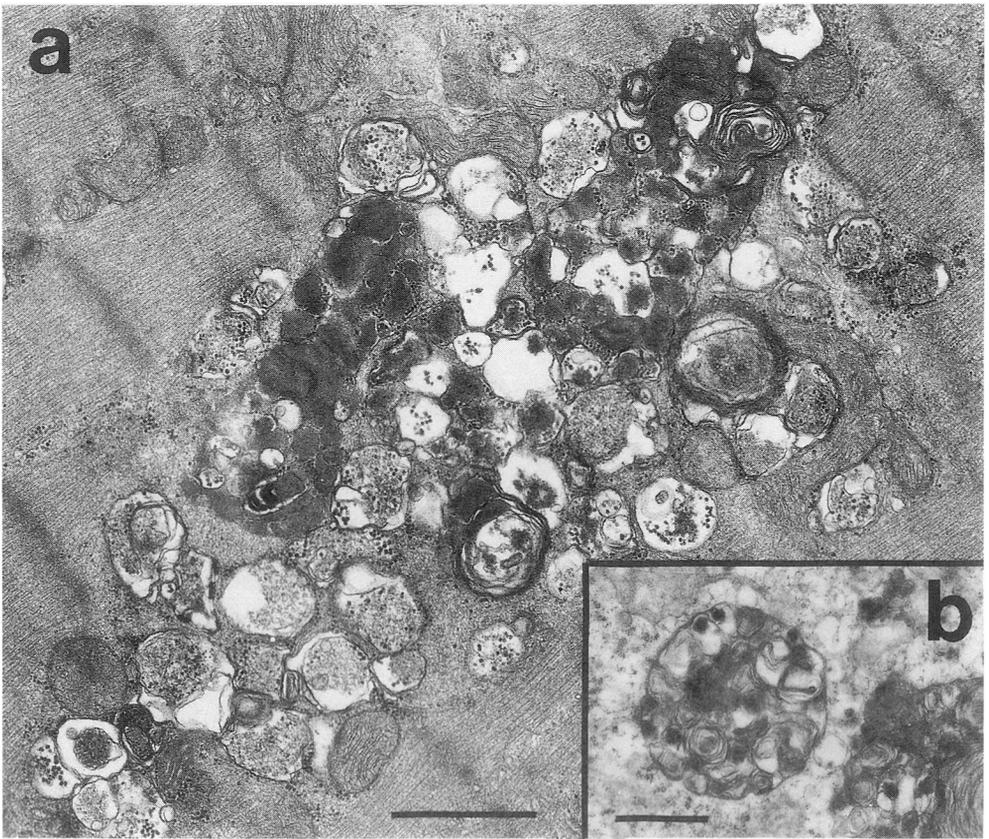


図 2 CQ 投与-脱神経筋 (a) および CQ 投与筋 (b) にみられる autophagic vacuoles の電顕像。Bar = 1 μ m。脱神経処理により空胞内には、多数の glycogen 顆粒 (glycogenosomes) がみられる。

脱神経筋の免疫組織学的検討では、 α -actinin, myosin, actin などの筋原線維蛋白は筋線維内に認められるが、AVsあるいは二次ライソゾームと思われる空胞内には認められない。免疫電顕レベルでの検討でも同様であった。一方、cathepsin B, H, L は、対照筋では殆ど染色されないが、CQ投与-脱神経筋では、顆粒状濃染し、AVsや二次

ライソゾーム内に限局するものの、増加していることが示された。また、cathepsin 陽性顆粒を有する線維はしばしば、細胞質も濃染した。ラットのCQ投与-脱神経筋では空胞が小さく、判定しにくいので、同じAVあるいは二次ライソゾームであるヒトのrimmed vacuolesについても検討した。ヒトのrimmed vacuolesのうち、空胞内にACP-

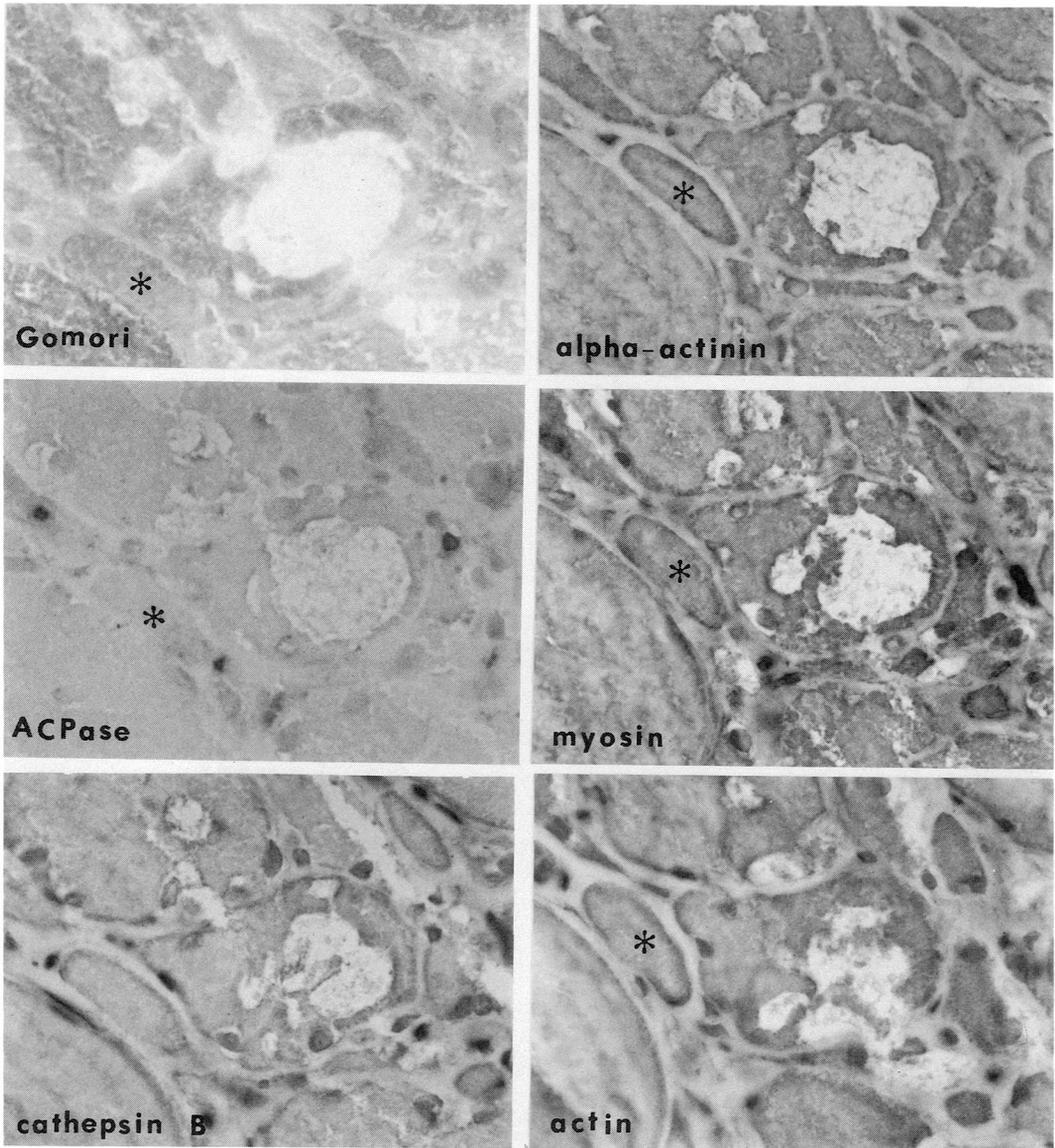


図3 ヒト rimmed vacuoles の連続標本。ACPase および cathepsin B 活性のない空胞は AVs であるが、免疫染色で内部に筋原線維蛋白の陽性反応を認めない。

ase あるいは cathepsin B 活性がみられないのは AVs であるが、ラット筋のそれと同じように空胞内には α -actinin, myosin, actin などの筋原線維蛋白は認められなかった (図3)。また, rimmed vacuoles のうち, 二次ライソゾーム内には cathepsin B, H, L 活性が認められた。基本的にこれらプロテアーゼはライソゾーム内に限局するが,

しばしば、細胞質内にも陽性反応を示した (図4)。

また, calpain は対照筋ではややモザイク様に淡く染色されるが, CQ 投与-脱神経筋では, しばしば強陽性を示す線維が散見され, 活性が増加していることが示唆された。

イムノブロット法: Calpain の immunoblot では, 16日目のラットの対照筋では明らかではない

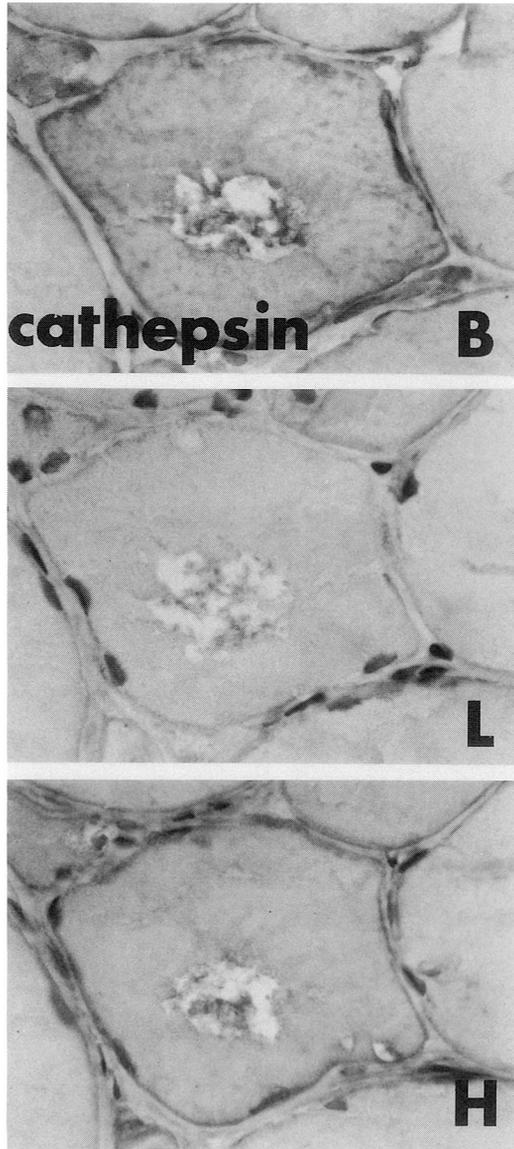


図4 ヒト rimmed vacuoles の連続標本の免疫組織。Cathepsin B, H, L は空胞内に存在するが (二次ライソゾーム), しばしば細胞質にも陽性反応がみられ, プロテアーゼが逸脱していることが示唆される。

が、脱神経筋、CQ投与筋では薄く、さらにCQ投与-脱神経筋では、より明瞭な calpain のバンドがみられた。すなわち、免疫組織の結果と合わせ、CQ投与-脱神経筋では calpain はその活性が増加していることが示された (図5)。

Cathepsin 活性の測定：筋ホモジネートの cathepsin B, B plus L および D 活性は、16日目でCQ投与筋は、対照筋に比し、明らかに活性増加を示したが、脱神経筋、CQ投与-脱神経筋はそれ以上に高活性を示した。しかし、両脱神経筋の間の酵素活性に有意な差異はなかった (図6)。

考 察

CQの長期投与により骨格筋の筋線維内に多数の rimmed vacuoles 類似の AVs を過剰に形成され、その筋崩壊にライソゾーム系が深く関与している

ことが知られている⁶⁾。従って、筋原線維蛋白が autophagy を介したライソゾーム系によって分解 (崩壊) されるか否かを明らかにする目的で、CQ投与筋をモデルに本実験を行なった。

まず、AVsの過剰形成における脱神経の影響を明らかにするために、一側坐骨神経を結紮し、CQを投与したが、対照筋および脱神経筋では光顕上AVsは全くみられず、CQ投与筋では16日でもわずかに認める程度であった。しかし、CQ投与-脱神経筋では、早期から過剰のAVsがみられ、16日目ではほぼ全ての筋線維にみられた。すなわち、CQ投与ラット骨格筋においては脱神経によりAVsが過剰に形成されることが明らかになった。

また、CQ投与-脱神経筋では、電顕的にもAVsに加え、筋原線維の粗しょう化、断列、崩壊がみられ、一方、生化学的に筋内の cathepsin B, B

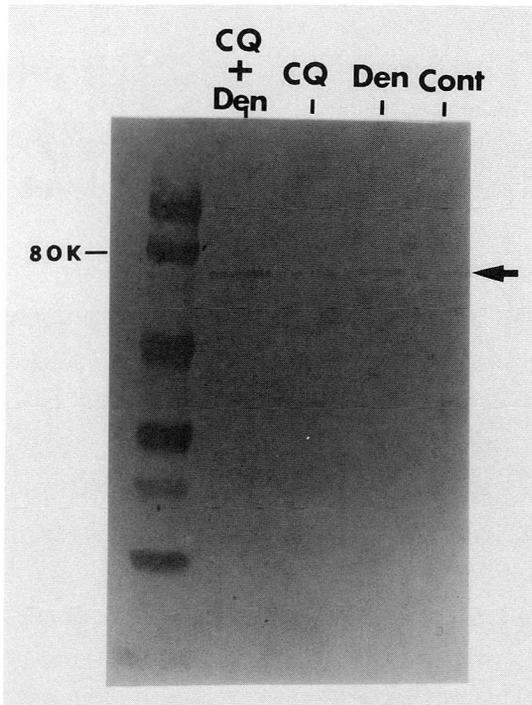


図5 16日目の対照筋、脱神経筋、CQ投与筋およびCQ投与-脱神経筋の可溶性成分のイムノブロット。Calpainは対照筋ではみられないが、CQ投与-脱神経筋では明瞭な band として認められ、活性が亢進していることが示唆される。

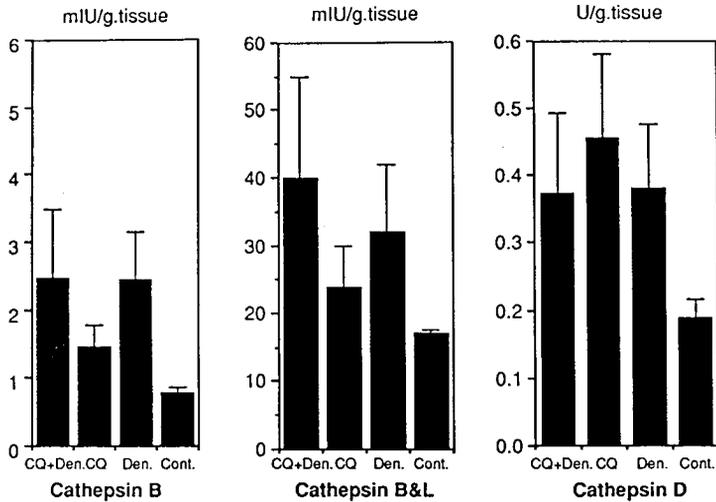


図6 16日目の対照筋, 脱神経筋, CQ投与筋およびCQ投与-脱神経筋の cathepsin B, B plus LおよびD活性。

plus LおよびD活性の増加がみられた。すなわち本病的筋の筋崩壊にライソゾーム系の関与が深くあることが示唆された。CQ投与-脱神経筋にみられるAVsの電顕的検討では, 空胞内には細胞膜由来と思われる membranous structure, mitochondria remnants, glycogen顆粒が認められるが, 筋原線維は明らかに見出せなかった。すなわち筋原線維蛋白がAVs内に存在しない事実を確認すべく, 各種筋原線維蛋白の抗体を用い, 空胞内にこれらの成分が存在するか否かを検討したが, α -actinin, myosin, actinなどの陽性反応は全く見出せなかった。

一方, cathepsin B, L, Hは, 一次または二次ライソゾームに局限する他, しばしば筋の細胞質にも陽性反応がみられた。このことはある種の病的状態では, これらプロテアーゼが一次または二次ライソゾームから細胞質に逸脱する可能性を示唆している。また, 細胞質内に存在する非ライソゾーム・プロテアーゼである calpainは正常対照に比し, CQ投与-脱神経筋でより強い活性を示した。

以上より, 細胞膜, mitochondria, glycogenはAVsに取り込まれ, 一次ライソゾームとの癒合→二次ライソゾームのプロセスで分解されるが,

筋原線維蛋白はAVsに取り込まれることなく, ライソゾーム外へ逸脱した cathepsinなどのライソゾーム・プロテアーゼおよび calpainなどの非ライソゾーム・プロテアーゼにより分解(崩壊)される可能性が示唆された。

Cathepsinの各抗体を分与下さった順天堂大学医学部生化学木南英紀教授に深謝致します。

文 献

- 1) Kar NC, Pearson CM: A calcium activated protease in normal and dystrophic human muscles. *Clin Chem Acta* 73: 293-297, 1976
- 2) 荒木淑郎, 熊本俊秀, Goll DE, Stern LZ: ヒト正常および筋ジストロフィー骨格筋によるCa依存性プロテアーゼおよびそのインヒビターの局在および動態について。"厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィー症及び関連疾患の病態とその病因に関する研究”(杉田班)平成元年度 研究報告書, 1990, pp 62-66.
- 3) Kumamoto T, Kleese WC, Cong J, Goll DE, Pierce PR, Allen RE: Localization of

- the Ca^{2+} -de-pendent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and de-nervated rat skeletal muscle. *The Anatomical Record* **232** : 60-77, 1992
- 4) Kumamoto T, Fukuhara N, Nagashima M, Kanda T, Wakabayashi M : Distal myopathy : Histochemical and ultrastructural studies. *Arch Neurol* **39** : 367-371, 1982
- 5) Fukuhara N, Kumamoto T, Tsubaki T : Rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol (Berl)* **51** : 229-235, 1980
- 6) Kumamoto T, Araki S, Watanabe S, Ikebe N, Fukuhara N : Experimental chloroquine myopathy : Morphological and biochemical studies. *Eur Neurol* **29** : 202-207, 1989

IV 発生と遺伝子発現

- | | |
|---|-----|
| 16. ニワトリ胚筋細胞のレチノイン酸への応答性 | 99 |
| 17. ビタミンCのもつ筋細胞分化促進作用 | 104 |
| 18. 癌抑制遺伝子産物RBとcdc 2による骨格筋細胞分化と
脱分化の調節 | 112 |
| 19. 筋細胞分化制御因子の機能の解析 | 120 |

16 ニワトリ胚筋細胞のレチノイン酸への応答性

桃井 隆

研究協力者 富田 幸子* 林 謙介** 中村 清二***

1. 序

ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸は発育過程での形態形成、とくに肢芽形成、や神経系の形成での生理作用が注目されている(1)。レチノイン酸に結合するタンパクとして、細胞内レチノイン酸結合タンパク (CRABP)と核内レチノイン酸レセプター (RAR)の存在が明らかにされており、CRABPにはI、IIのサブタイプが(2, 3)、RARには α 、 β 、 γ の三種類のサブタイプが存在する(4)。CRABP-Iが神経系に発現するのに対し、CRABP-IIはニワトリ胚の筋、骨に特異的に発現し、肢芽形成において部域特異的発現を示す(1)。ステージ23の肢芽の筋細胞予定域には体節より移動してきた筋細胞の前駆体が存在するが、それらの細胞は一部CRABP-IIが弱陽性として存在しているが、筋細胞の分化にともなって、CRABP-II強陽性をしめすようになる(1, 5, 6)。一方、RARは α 、 β 、 γ が組織特異的発現を示すものの、肢芽において部域特異性の発現を示さず、筋細胞前駆体、骨芽細胞前駆体などでRAR α は均一な発現分布を示す(6, 7)。骨格筋細胞におけるレチノイン酸の生理作用は現在までのところ知られていないが、このようにレチノイン酸の情報伝達に関与する結合タンパクや受容体の筋細胞における発現は、筋細胞の分化や機能にレチノイン酸が関与していることを示唆してい

る。今回、レチノイン酸の筋細胞への生理作用を調べるひとつの方法として、レチノイン酸に応答するRAR β およびMyoDのmRNAの発現を指標にニワトリ胚筋細胞分化の各段階におけるレチノイン酸に対する応答性について検討した。

2. 方 法

2-1 培養

筋芽細胞前駆体はステージ23の肢芽筋細胞予定域を機械的に単離した。筋芽細胞は11日胚ニワトリ胸筋より常法に従って、分離した。筋芽細胞前駆体、および筋芽細胞をトランスフェリン、15%馬血清を含むMEM培地中にて、レチノイン酸存在下で培養をおこなった。筋管細胞は筋芽細胞を3日間培養し、融合したものを筋管細胞としてレチノイン酸とともに培養した。

2-2 RAR β およびMyoDの検出

培養細胞よりグアナジニチオシアネート法を用いて、RNAを分離し、ホルマリンアガロース電気泳動後、ニトロセルロースフィルターにプロットした。プローブとして、ニワトリRAR β 、ニワトリMyoDのcDNAをマルチプライマーラベルキットを用いて、³²P標識し、RAR β 、MyoDのmRNAの検出をおこなった。

2-3 イムノプロット

筋芽細胞、筋管細胞の粗核画分は0, 5M NaClを含む50mM Tris-HCl (pH7, 4)バッファーにて抽出し、遠心後、上清のタンパク(100ug)をSDSアクリルアミドゲル(12%)電気泳動に供した。泳動後、ニトロセルロースフィルター

* 東京女子医大、心血研

** 神経研究所機能研究部

*** 東京大学医学部薬理学教室

にブロットし、RAR α の合成ペプチドに対する特異抗体を用いてイムノブロット法にてRAR α 蛋白の検出を行った。

3. 結 果

3-1 RAR α 蛋白の発現

筋芽細胞、筋管細胞におけるRAR α の発現をイムノブロットで調べた(図1)。

筋芽細胞でRAR α 蛋白の発現が観察されたが、培養3日後にはRAR α 蛋白の発現が減少し、5日後には、RAR α の蛋白は観察されなくなった。一方、筋細胞特異的蛋白であるミオシンは培養とともに存在量の増加が観察され、筋芽細胞から筋管細胞へと分化していた。

3-2 レチノイン酸にたいする応答性

ステージ23の筋細胞予定域から得られた筋芽細胞前駆体はレチノイン酸(1 μ M)に反応してRAR β のmRNAを3時間以内に発現することが判明した(図2)。一方、11日胚の胸筋より得られた筋芽細胞はRAR β を発現していないが、1 nMのレチノイン酸に反応し、RAR β を発現し、濃度依存的に増加がみられた。しかし、筋管細胞では、0.1 - 1 μ Mのレチノイン酸にたいして微かに反応が検出するだけであった(図3)。

一方、筋細胞特異蛋白の発現に關与するMyoD遺伝子の発現は、筋芽細胞ですでに発現がみられるが、PPAにより抑制された。

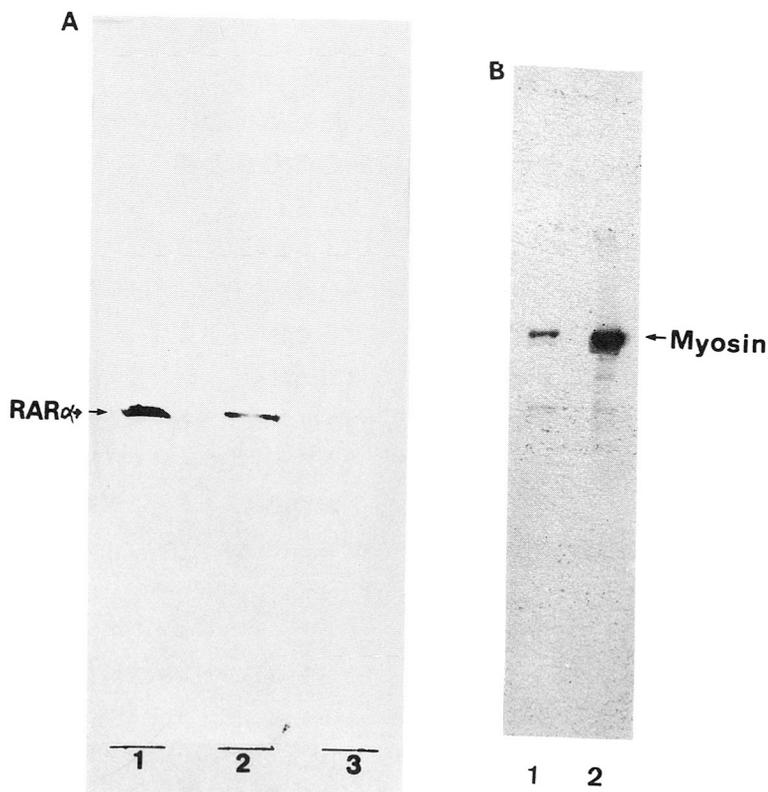


図1 イムノブロットによるRAR α 蛋白の発現の解析。

- A) 筋芽細胞、筋管細胞におけるRAR α 蛋白発現。
1 ; 培養1日目, 2 ; 培養3日目, 3 ; 培養5日目
- B) Myosin 蛋白の発現
1 ; 培養1日目, 2 ; 培養3日目

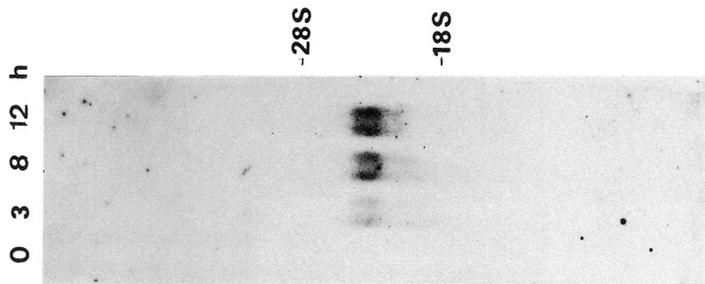


図2 ニワトリ胚(ステージ23) 肢芽の筋芽細胞前駆体を含む細胞におけるレチノイン酸に対する応答性。
0.1 μ M レチノイン酸存在下で3, 8, 12時間培養した細胞における, RAR β の mRNA の発現を調べた。

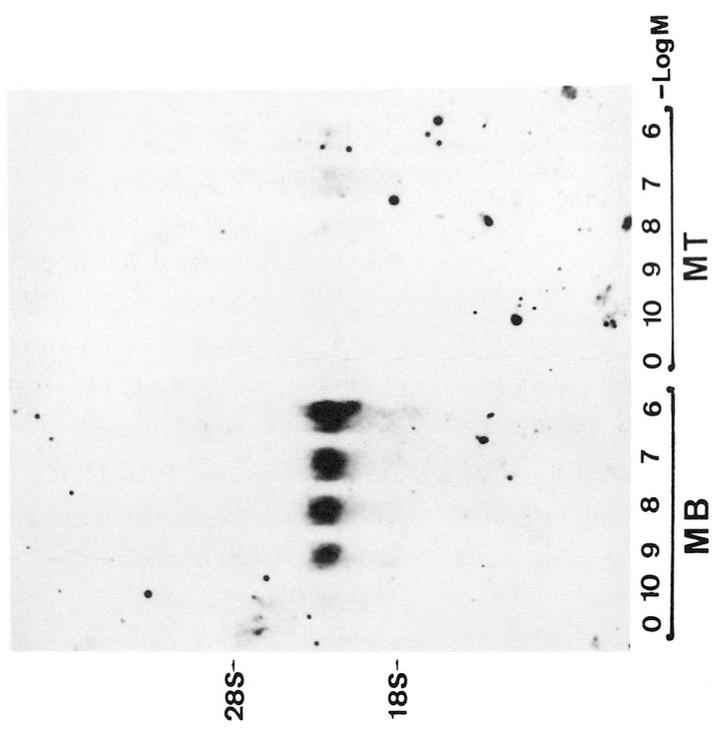


図3 筋芽細胞 (MB), 筋管 (MT) 細胞におけるレチノイン酸による RAR β の発現誘導。
筋芽細胞, 筋管細胞を様々な濃度 (0.1 nM - 1 μ M) のレチノイン酸と24時間培養し, RAR β の mRNA の発現を調べた。

しかし、1 nMのレチノイン酸処理により約2倍に増加し、10 nMのレチノイン酸で最高値をしめし、レチノイン酸無処理の約5倍量のMyoD mRNAが発現していた。しかし、それ以上のレチノイン酸の濃度はMyoDの発現を抑制した(図4)。

4. 考 察

培養系では多くの癌細胞がレチノイン酸で分化が促進する事が知られているが、正常細胞では、表皮細胞、軟骨細胞など分化誘導する細胞の例は少ない。われわれは、ニワトリ胚の筋組織にレチノイン酸にたいする結合蛋白(CRABP II)を見いだしたことから、筋細胞におけるレチノイン酸の生理作用に注目した。その結果、筋芽細胞、及びその前駆体細胞では、RAR α が発現しており、レチノイン酸(1 nM)に应答して、RAR β の mRNAの発現が促されることが明らかになった。

しかし、筋管細胞では、レチノイン酸に対する应答性が消失し、RAR β の発現は1 μ Mレチノイン酸によっても微かにしか見られなかった。このようにレチノイン酸は筋細胞分化の初期に应答性を示すこと、また、生体では、レチノイン酸は数十～数十 nM存在することから、発生過程において筋細胞はレチノイン酸の生理作用の影響下に分化することが推測された。一方、筋細胞の分化過程において筋特異的蛋白の発現を調節するMyoD遺伝子の発現はレチノイン酸(1–10 nM)により約2–5倍増加した。このことはレチノイン酸がRAR α や誘導されたRAR β を介して直接あるいは間接にMyoD等の筋分化に必須な遺伝子の発現調節することにより、筋細胞の分化を調節している可能性を示唆している。

また、イムノブロットでRAR α 蛋白が筋管細胞に検出されなくなることが、筋管細胞のレチノ

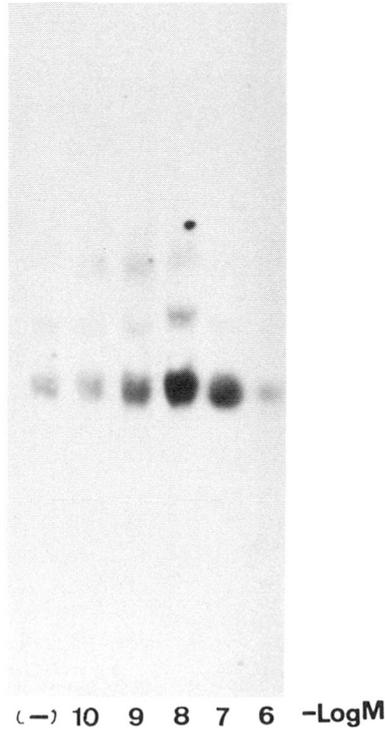


図4 TPA処理LE筋芽細胞におけるレチノイン酸によるMyoD mRNAの発現誘導。筋芽細胞を様々な濃度(0.1 nM–1 μ M)のレチノイン酸と24時間培養し、MyoDのmRNAの発現を調べた。

イン酸にたいする応答性の減少の原因として考えられるが、筋管細胞の核は筋芽細胞の核同様陽性をしめすことから(未発表)、イムノブロットで検出されなくなるのは、ミオシンやアクチンなどの筋特異的蛋白の大量の発現の結果、RAR α 蛋白の量が相対的に減少したためとも考えられる。むしろ、CRAP II蛋白が筋管細胞に分化するにつれ増加してくることが、freeのレチノイン酸がRAR α との結合することを抑制し、レチノイン酸の応答を減少させている可能性も否定できない。

分化の初期で筋細胞がレチノイン酸に応答することが判明したが、筋細胞分化の決定にレチノイン酸が関与しているか否かはあきらかでない。しかしながら、未分化精巢腫瘍細胞であるP19EC細胞はレチノイン酸の濃度依存的(10nM)に骨格筋細胞へと分化することから、レチノイン酸が筋分化の初期の決定機構に関与している可能性も考えられ、今後中胚葉未分化細胞である10T/2細胞、ニワトリ胚ステージ21肢芽細胞をもちいて検索していく予定である。また、ジストロフィンおよびその関連蛋白など、筋特異的蛋白の発現に関して検討していく必要があるものとおもわれる。

文 献

1) 桃井 隆：発生分化と形態形成におけるレチ

ノイン酸と生理作用。蛋白質核酸酵素 36：2506, 1991

- 2) Kitamoto, T. Momoi, T. et al.
The presence of a novel cellular retinoic acid-binding protein in the chick embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 1302, 1988.
- 3) Kitamoto, T. Momoi, M. et al.
Expression of cellular retinoic acid binding protein II (Chick-CRABP II) in the chick embryo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:49, 1989
- 4) Zelent, A., Krust, A., et al. Cloning of murine α and β retinoic acid receptors and a novel receptor γ predominantly expressed in skin. *Nature* 339:714, 1989.
- 5) Momoi, T., Kumagai, H. et al.
Retinoic acid receptor in the chick limb buds in the early developmental stages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:544, 1990.
- 6) 桃井 隆：厚生省神経委託研究平成3年度報告書(小沢班)
- 7) Tomita, S. Momoi, T et al. (投稿中)

17 ビタミンCのもつ筋細胞分化促進作用

松田良一*

はじめに

ビタミンCは生体内でコラーゲン合成の際のコファクターとしての作用、抗酸化作用、鉄イオンの吸収、アミノ酸代謝における作用などの機能をもつ¹⁾。このビタミンC(アスコルビン酸)の多彩な生理活性は個体の生存に必須であるにもかかわらず、その細胞レベルでの作用に関する知見は多くない。そのおもな原因としてアスコルビン酸のもつ不安定性が考えられる。即ちアスコルビン酸は水溶液中では不安定で、とくに37°Cの中性溶液中(通常の細胞培養条件)では24時間以内に、ほぼ完全に酸化分解される。Hataら(1989)は、このような細胞培養条件下にも分解されず安定な活性持続型ビタミンCとしてアスコルビン酸2-リン酸(Asc 2-P)を報告した²⁾。この発見によりビタミンCの及ぼす培養細胞の増殖や分化に対する影響が容易に検討できるようになった。

我々は筋細胞の分化能に欠陥があると考えられている(筋芽細胞同志が細胞融合せず、いわゆる最終分化をおこさない)マウス筋細胞株BC3H1³⁾を用いて、その細胞分化に対するビタミンCの影響について検討した。その結果、Asc 2-PはBC3H1細胞の筋分化に促進的作用をもつことがわかった。

材料と方法

細胞培養: BC3H1細胞株はATCCより分与されたものを用いた。グラチンコートしたプラスチック培養皿に増殖培地(20%胎児牛血清, 80%ダ

ルベッコ改変イーグルMEM(高グルコース型), 60 μg/mlカナマイシン)に浮遊したBC3H1細胞をまき, 2日毎に培地交換しながらコンフルエントになるまで細胞した。その後, 培地を増殖培地から分化培地(10%馬血清, 90%イーグルMEM, 60 μg/mlカナマイシン)に交換して分化培養0日目とした。培地交換は2日毎に行ない, その際, 実験群には最終濃度100 μMになるようにAsc 2-Pを加えた。このAsc 2-Pは和光純薬より入手し, 分子量を400として100mMになるようにPBSに溶解後, ろ過滅菌し分注, 凍結保存したものを用いた。

免疫組織学: 培養液中に最終濃度10%になるようホルマリン液を加え, 室温で3分間固定した。洗浄後メタノールにより10分間処理し, 10%馬血清を含むPBS(0.1%アジ化ナトリウム含有)を加え4°Cに保存, 4日以内に使用した。1次抗体としては, 抗筋肉型ミオシン重鎖抗体にはMF20⁴⁾, 抗myogenin抗体としてIF507⁵⁾, 抗マウスコラーゲンタイプI抗体(バイオデザイン), 抗ラミニン抗体(シグマ)を用いた。抗体の希釈, 反応はそれぞれの指示によった。2次抗体には抗マウスIg-テキサスレッド標識抗体又は抗ウサギIg-FITC標識抗体をそれぞれ100倍に10%馬血清を含むPBSにて希釈して用いた。

RNAの分離及びノーザンブロット解析: トータルRNAはRNAzol(シナバイオテックス)を用いて分離した。凡そ15 μg/レーンの割合でSaitohらの報告(1990)⁶⁾と同じ条件で泳動後, ノーザンブロット解析を行なった。プローブとしてはMyoD1 cDNA(Lassar)⁷⁾, myogenin cDNA

*東京大学教養学部生物学教室

(Olson)⁸⁾, L32cDNA (Bowman)⁹⁾, GAPDH cDNA (Dugaiczek)¹⁰⁾を用いた。

結果と考察

図1にビタミンCをふくまない(A)又は含む分化培地(B)中で10日間培養したBC3H1細胞の位相差顕微鏡像を示す。Aは特記すべき形態変化は認められないのに対し、ビタミンCの影響によりBでは多核筋管細胞が出現している。図2にビタミンCを含まない(A, B)又は含む分化培地(C,

D)中でそれぞれ4日間(A, C)又は8日間(B, D)培養した細胞の抗ミオシン重鎖抗体による免疫蛍光抗体染色パターンを示す。対照群では少数の単核細胞が陽性に染色されるのに対し、実験群では多くの細胞、とくに培養日数がふえるにつれて増加する多核筋管細胞がMF20によって陽性に染色されている。従ってビタミンCはBC3H1細胞の筋細胞としての分化を促進する作用があることがわかった。これは今まで筋分化能に欠陥があると報告されてきたBC3H1細胞が自発的に筋分

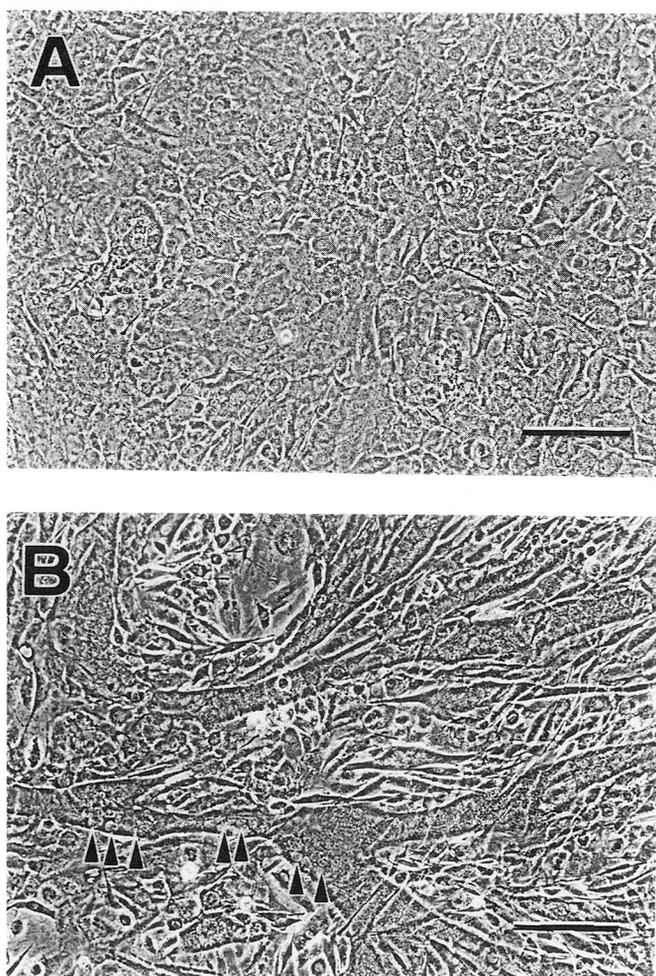


図1 ビタミンCによるBC3H1細胞の多核筋管細胞形成。

分化培地中で10日間培養した細胞の位相差顕微鏡像、スケールは200 μm 。Aは対照、BはビタミンC処理(100 μM Asc 2-P)群。矢じり印は筋管細胞中の核を示す。

化できることを示した例として注目される。ではビタミンCにより筋分化が促進されているBC3H1細胞における筋分化制御遺伝子産物myogeninの発現はどうか？ 抗myogenin抗体による染色パターンを図3に示す。シンボルは図2と同じである。興味深いことにビタミンC非存在下に分化した細胞は4日目には多くの細胞がmyogeninを発現するものの8日目にはその陽性細胞数が激減するのに対し、ビタミンC存在下に分化した細胞は4日目、8日目共、多くの細胞が抗myogenin抗体により染色されている。全細胞核数あたりのmyogenin抗体染色陽性細胞核数、同じくミオシン重鎖(MHC)抗体染色陽性細胞核数の比及び細胞融合指数(Fusion Index)をグラフに示したのが図4である。各ポイントは100~300個の全細胞核数あたりの陽性細胞核数の百分率を示

している。この結果から次の様なことが明らかである。即ち1) BC3H1細胞はビタミンC非存在下でも筋分化制御遺伝子myogeninの発現を行なう。2) しかしビタミンC存在下の細胞はさらに多核化を起こすため自己活性化された細胞核はさらに多くなりmyogeninの発現率は上昇を続ける。3) 多核筋管細胞は分化形質である筋型ミオシン重鎖の発現をさらに活性化する。この様にビタミンCにより筋芽細胞同志の融合が促進されることがmyogenin発現率の上昇につながっていると考えられる。ではMyoD1の発現はビタミンCにより変化するであろうか。図5AはMyoD1をプローブとしてビタミンCを含まない分化cDNA培地中で10日間培養したBC3H1細胞由来のRNA(レーン1)、ビタミンCを含む場合(レーン2)、陽性対照として分化48時間目のマウス筋細胞株C2C12由

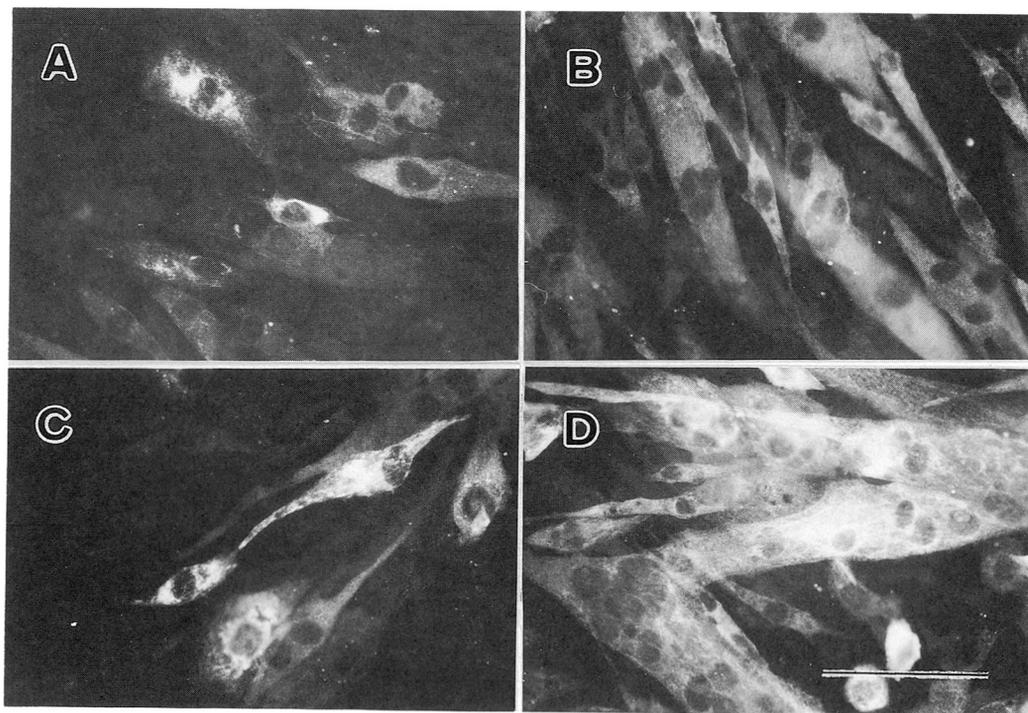


図2 ビタミンCによるBC3H1細胞の筋型ミオシン重鎖発現の活性化。
A, Cは対照。B, DはビタミンC処理群。A, Bは分化培地中で4日間培養。C, Dは同じく8日間培養したものをMF20にて蛍光抗体染色した。スケールは100 μ m。

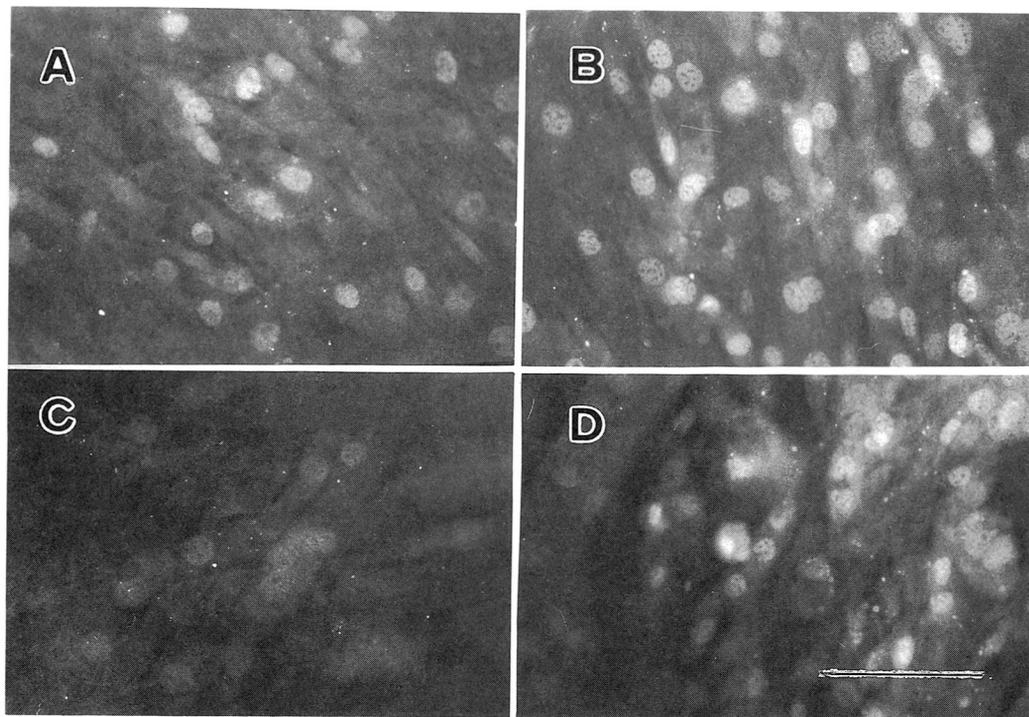


図3 ビタミンCによるBC3H1細胞のmyogenin発現の活性化。
記号は図2と同じ。スケールは100 μ m。抗myogenin抗体IF507にて蛍光抗体染色した。

来のRNA (レーン3) に対するノーザンブロットのパターンである。この結果からビタミンCはMyoD1の転写活性を上昇させないことが明らかである。これに対してmyogenin cDNAをプローブとした場合が図5Bである。このブロットでは内部対照としてリボゾーム蛋白質サブユニットの1つであるL32のcDNA及び図5Cではグリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素 (GAPDH) のcDNAを同時に用いた。RNA標品は増殖培地中のBC3H1細胞由来のもの (レーン1)、ビタミンCを含まない分化培地で10日間培養したBC3H1細胞由来のもの (レーン2)、ビタミンCを含む分化培地中で10日間培養したものの由来のRNA (レーン3) である。この結果から明らかにビタミンC処理によりmyogeninの転写物の増加がみられることがわかった。それに対してL32やGAPDHの転写産物の量はほとんど変化が認められない。

したがってビタミンC処理は筋分化制御遺伝子myogeninに対して比較的特異的活性化を起こすと思われる。

ではビタミンC (この場合はAsc2-P) は一体どのステップで効いているのだろうか？まずコラーゲンの合成分泌過程で必須なプロリン及びリジン水酸化酵素のコファクターとしてのビタミンCがこのBC3H1細胞の筋分化促進に効いている可能性がまず考えられる。そこでこのプロコラーゲンのプロリンの水酸化を阻害する目的で2つの異なった阻害剤を用いてその影響を調べた。1) Cis-OHプロリンによる阻害：あらかじめ培地中にCis-OHプロリンを50 μ g/ml及至100 μ g/ml加えておくとビタミンC存在下にも正常なプロリン水酸化 (transの形に水酸基を導入する) はおこらずコラーゲンの3重らせん構造が形成されないことが示されている¹¹⁾。そこでBC3H1

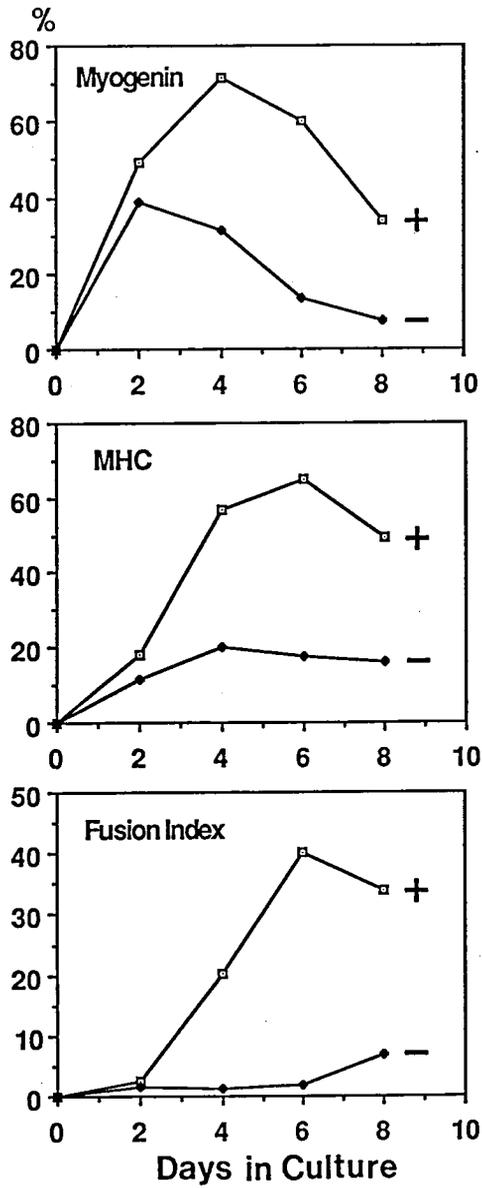


図4 ビタミンC処理をしたBC3H1細胞の筋型ミオシン重鎖(MHC), myogeninの発現と融合指数(Fusion Index)の経日的変化。縦軸は全細胞核数あたりの陽性細胞核数を示す。+はビタミンC処理群, -は対照群を示す。

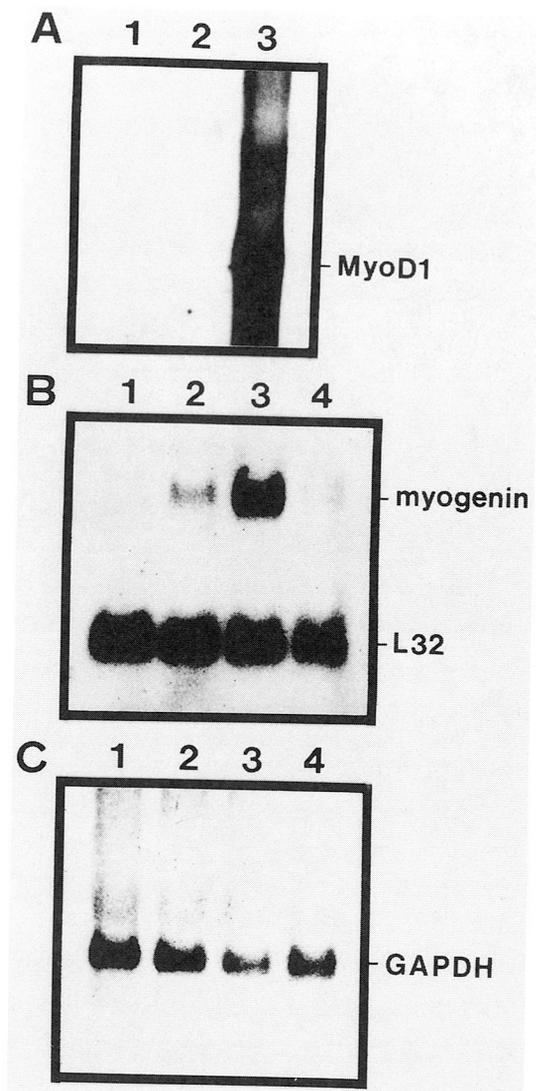


図5 BC3H1細胞の発現するMyoD1 (A), myogenin + L32 (B)及びGAPDH (C) mRNA に対するノーザンブロットによる解析。
説明は本文参照。

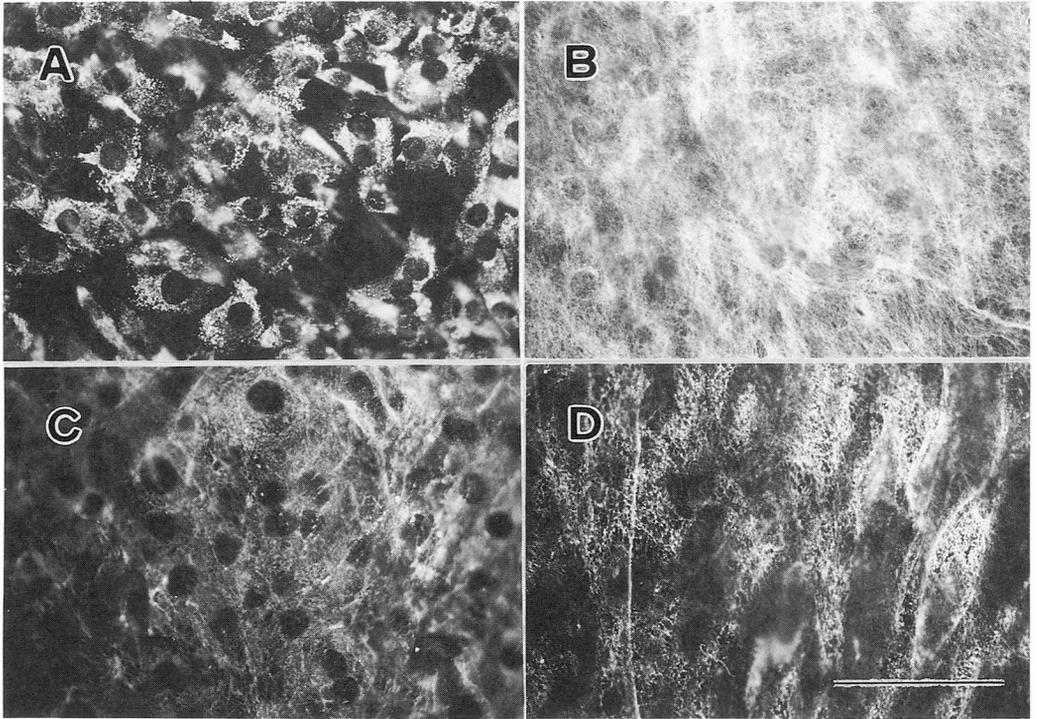


図6 ビタミンCによるBC3H1細胞の作る細胞外基質の構築。

A, Bは抗マウスコラーゲンタイプI抗体, C, Dは抗ラミニン抗体による蛍光抗体染色。細胞はA, Bは分化培養2日目, C, Dは8日目のものを示す。A, Cは対照群, B, DはビタミンC処理群を示す。

細胞をAsc 2-Pと50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及至100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCis-OHプロリンを含む分化培地で10日間培養を試みた。その結果、ビタミンC存在下に形成されるはずの多核筋管細胞は出現せずMF20陽性細胞もCis-OHプロリンの濃度に依存して減少していった(データはここでは示さない)。この分化を抑制されたBC3H1細胞由来のRNAに対してのノーザンブロットのパターンが図5B, Cのレーン4である。L32とGAPDHは対照と同レベル検出されるのに対し、myogenin転写産物の量はほとんど検出レベル以下である。従ってビタミンCのもつBC3H1細胞に対する筋分化促進効果の作用点はコラーゲン合成と分泌に密接な関係があると考えられる。

コラーゲンは細胞外基質の主要成分の一つで、他の成分のあるラミニン、ファイブロネクチン、

テネシン、プロテオグリカン等と相互作用しながら複雑なマトリクスを構築すると考えられている。ではビタミンC処理によりBC3H1細胞の作るコラーゲンやラミニンの分子局在はどのように変わるだろうか?コラーゲンタイプIとラミニンに対する抗体を用いた免疫蛍光抗体法による染色パターンを図6に示す。A, BはコラーゲンタイプI, C, Dはラミニンを示し、A, CはビタミンC非存在下で培養したもの、B, DはビタミンC存在下で培養したものである。Aに示された如くビタミンC非存在下ではプロコラーゲンの水酸化がおこらず分泌顆粒中にコラーゲン前駆体が蓄積した状態になっているのに対し、ビタミンC存在下ではほとんどのコラーゲンタイプIが正常に修飾をうけ、細胞外にあみ目状構造をつかって分布していることがわかる。又、ラミニンは

ビタミンC存在下では細胞間にあみ目状又は細胞膜あるいは表層上に点状に分布している(D)が、ビタミンC非存在下ではラミニンは不定形の分布を示している(C)。このことからビタミンCがBC3H1の作る細胞外基質の形成に大きな役割を果たしていることが証明された。今後はこの細胞外基質のどの成分が筋芽細胞の融合を促進する効果をもつのかを検討したい。

筋ジストロフィー症と本研究の関連

筋ジストロフィー症で欠損している遺伝子産物ジストロフィン筋細胞の細胞膜直下に存在する裏打ち蛋白質であることが最近の研究から示されている。又、このジストロフィンはそれと特異的に結合する膜上の糖蛋白質と複合体を作っていると考えられている。この糖蛋白質がどのような生物学的機能を持っているかは未だ不明である。本研究により筋細胞が自前で作るコラーゲンを中心とした細胞外基質が筋芽細胞の融合や分化形質の維持に重要な役割を演じている可能性が示唆された。細胞外基質の何がどのようにしてこのような筋分化の促進に関係しているのかは今のところ不明であるが、細胞外基質はその受容体などの膜上の糖蛋白質を介して細胞自体に大きな影響を及ぼしていることから考えて、ジストロフィンに結合する糖蛋白質がこの細胞-細胞外基質間の相互作用に関係している可能性が考えられる。今後はこの観点から筋分化に影響を及ぼす細胞外基質成分と筋細胞膜との相互作用について調べていきたい。

文 献

- 1) 稲垣, 荒川, 香川, 池田, 吉田, 村田, 鈴江 (1985) ビタミン学II (日本ビタミン学会編) pp. 567-599, 東京化学同人
- 2) Hata, R., & Senoo, H. (1989) *J. Cell Physiol.* **138**, 8-16
- 3) Taubman, M.B., Smith, C.W.J., Izumo, S., Grant, J.W., Endo, T., Andreadis, A., & Nadal-Ginard, B. (1989) *J. Cell Biol.* **108**, 1799-1806
- 4) Bader, D., Masaki, T., & Fischman, D.A. (1982) *J. Cell Biol.* **96**, 763-770
- 5) Wright, W.E., Sassoon, D.A., & Lin, V.K. (1989) *Cell* **56**, 607-617
- 6) Saitoh, O., Olson, E.N., & Periasamy, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19381-19384
- 7) Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.-F., Weintraub, H., & Lassar, A. (1989) *Science* **242**, 405-411
- 8) Edmondson, D.G., & Olson, E.N. (1989) *Genes & Dev.* **3**, 628-640
- 9) Agrawal, M.G., & Bowman, L.H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4868-4875
- 10) Dugaiczak, A., Haron, J.A., Stone, E.M., Dennison, O.E., Rothblum, K.N., & Schwartz, R.J. (1983) *Biochem.* **22**, 1605-1613
- 11) Saitoh, O., periasamy, M., Kan, M., & Matsuda, R. (1992) *Exp. Cell Res.* **199**, in press.

18 癌抑制遺伝子産物RBとcdc 2による骨格筋細胞分化と脱分化の調節

遠藤 剛*

研究協力者 後藤 進* 大久保 悌* 岸本 健雄**

要 約

誘導性プロモーターにつないだSV40 *large T* をマウス骨格筋細胞株C2にトランスフェクトして得たC2SVTtsII細胞では、最終分化をした筋管細胞に *large T* を誘導すると、増殖を停止していた細胞が再び細胞周期にはいり細胞分裂がもたらされる。この現象は脱分化とみなすことができる。この骨格筋細胞の分化にともなう増殖の停止、および脱分化による分裂の再開を誘導する機構を解明するために、癌抑制遺伝子RBとM期誘導因子(MPF)の活性サブユニットcdc 2に着目し、それらの発現と活性を調べた。最終分化の過程では、RB mRNAとタンパク質の量は著しく増加し、逆にcdc 2の発現量は減少した。しかし脱分化の過程では、RBの発現量は減少し、一方cdc 2の発現量はM期付近で増大した。またcdc 2のSer/Thrキナーゼ活性はその発現量と正の相関関係を示した。これらのことは、分化にともなう増殖の停止と脱分化にともなう分裂の再開には、それぞれRBとcdc 2が主要な役割をしていることを意味している。またlarge Tそのものあるいはlarge Tによって誘導されるある因子によって、RBとcdc 2の発現および活性がそれぞれ負と正に調節されていることを示唆している。

はじめに

骨格筋細胞の最終分化には、増殖の不可逆的停止、一群の筋特異的遺伝子の発現、および細胞融合の3つの現象が不可欠であり、いずれか1つでも欠けると最終分化には至らない。したがって最終分化の機構を解明するには、これらの個々の現象を誘導する細胞内因子を同定するとともに、それらの因子(タンパク質)の発現機構を明らかにする必要がある。この最終分化の機構を解明する目的で私たちは、Zn²⁺などの重金属により活性化されるメタロチオネイン遺伝子プロモーターにつないだSV40T抗原遺伝子(温度感受性large Tおよび野性型small tをコードしている)をマウス骨格筋細胞株C2にトランスフェクトして形質転換細胞株C2SVTtsII(以下C2SVTと略す)を得ている(1)。この未分化の筋芽細胞をZn²⁺存在下でlarge Tにとって許容温度の33°Cで培養すると、誘導されたlarge Tにより分化が阻害される。またZn²⁺不在下であらかじめ最終分化を起こし形成させた筋管細胞を、Zn²⁺存在下に移しlarge Tを誘導すると、不可逆的に増殖を停止していると考えられていた細胞が再び細胞周期にはいり、18時間後にはDNA合成を、34時間後には細胞分裂を行なう(1, 2)。この現象は脱分化とみなすことができる。

癌抑制遺伝子である網膜芽細胞腫遺伝子RBの産物(RB)は、細胞周期のG0/G1期においては脱リン酸化されており、SからM期にかけてはリン酸化されている。また特に脱リン酸化されたRB

* 千葉大学理学部生物学教室

** 東京工業大学生命理工学部生体機構学科

は、癌遺伝子産物のSV40 large TやアデノウィルスE1Aなどと複合体を形成しうる。さらに、脱リン酸化されたRBは、増殖にかかわるいくつかの遺伝子の転写因子であるE2Fやc-Mycとも結合することが示されている。これらのことから、脱リン酸化されたRBはE2Fやc-Mycと結合することにより、それらの転写活性を抑制して、その結果、増殖を抑制すると考えられる。一方、リン酸化されたRB、あるいはいくつかの癌遺伝子産物と複合体を形成したRBは、E2Fやc-Mycと結合することができなくなる。そのために遊離したE2Fやc-Mycにより増殖にかかわる遺伝子の転写が起これば増殖がもたらされると推測されている(3)。このようにRBの活性はリン酸化や他のタンパク質との相互作用で調節されていると考えられており、その発現量と活性との間には有意な関係が見いだされていない。

MPFはタンパク質Ser/Thr キナーゼ活性を持つ活性サブユニットのcdc 2と調節サブユニットのcyclin Bとからなり、G2からM期にかけて活性化される。MPFによってリン酸化される基質として、ラミン、ヒストンH1、MAP2などがある。これらのリン酸化により、M期の際に起こる核膜の崩壊、染色体の凝縮、微小管の再構成がもたらされると考えられている(4, 5)。またRBとSV40 large Tも*in vitro*でcdc 2によりリン酸化されることが示されている。

したがってRBとlarge Tおよびcdc 2は相互作用して細胞の増殖を調節しているものと思われる。この研究ではC2SVT細胞を用いて、その分化にともなう増殖の停止、および脱分化による増殖の再開を誘導する機構を解明するため、RBとcdc 2に着目し、それらの発現と活性を調べた。

材料と方法

ノーザンブロッティングは文献(6)に、イムノブロッティングと免疫蛍光顕微鏡法は文献(7)に準じて行なった。

cdc 2のヒストンH1キナーゼ活性は次のよう

にして検定した。細胞を0.1% Triton X-100を含む50 mM Tris-HCl (pH8.0)で抽出し、この抽出物に最終濃度1 mg/mlのヒストンH1および[γ - 32 P] ATPを加え、30°Cで60分間インキュベートした。ヒストンH1のリン酸化の程度を 32 Pの取り込みによるオートラジオグラフィーにより調べた。

結 果

1. 分化の過程におけるRBとcdc 2の発現

増殖培地(10%ウシ胎児血清を含むDME培地)中で培養していたC2SVT筋芽細胞を分化培地(5%ウマ血清を含むDME培地)に移すと48時間ほどで筋管細胞の形成がみられるようになる。96時間経過すると、80%以上の細胞が筋管細胞を形成する。この最終分化の過程で12時間おきに細胞からRNAを調製して、ノーザンブロッティングによりいくつかの筋特異的遺伝子(ミオシン重鎖、 α -アクチン、トロポニンT、ミオシン軽鎖2)とRBおよびcdc 2のmRNA量を調べた(図1)。筋特異的遺伝子のmRNAsは増殖している筋芽細胞には検出されなかったが、細胞が分化するにつれて出現し、量が増していった。RB mRNAは増殖中の筋芽細胞にも少量存在していたが、36時間後あたりから急激に量が増大した。72時間後に発現量はほぼ最大値に達し、それ以降はそのレベルを維持していった(8, 9)。一方cdc 2 mRNAは、筋芽細胞では多量に存在していたが、分化の過程でしだいに減少し、84時間後以降はごくわずしか検出されなかった。

次にタンパク質量の変動を、RBに対するモノクローナル抗体PMG3-245およびcdc 2に特異的なPSTAIRモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡法により調べた。RBは筋芽細胞にはほとんど検出されなかったが、筋管細胞の核には多量に存在していた(図2 A-F)(8, 9)。cdc 2は筋芽細胞でも筋管細胞でも細胞全体に分散した状態でみられたが、特に筋芽細胞に多量に存在していた。この分化の過程におけるタンパク質量の減

少は、イムノブロッティングによっても明らかにされた(図3A)。

2. 脱分化の過程における*RB*と*cdc 2*の発現

あらかじめ形成させたC2SVT筋管細胞を100 μM Zn^{2+} を含む33°Cの増殖培地に移すと、メタロチオネイン遺伝子プロモーターを介して*large T*が誘導される。この様子をノーザンブロッティングでみると、2時間後あたりから*large T* mRNAが誘導されはじめ、約8時間後にその量は最大に達した。その後しばらく発現量は減少したが、細胞分裂のみられる34時間後付近では再び最大値にまで回復した(図4)。この発現と非常に協調的に*c-jun* mRNAが誘導された(10)。筋特異的遺伝子mRNAsはこの脱分化の過程でしだいに

減少していった。*RB* mRNAも同様にしだいに減少してゆき、34時間後には筋芽細胞中のレベルにまで低下した(8)。一方*cdc 2* mRNAは最終分化をした筋管細胞ではほとんど存在していないが、脱分化により細胞がG2からM期にはいる24時間後以降に著しく増加した。

脱分化によりM期にはいった筋管細胞では、RBタンパク質もmRNAと同様にほとんど存在していなかった(図2G-I)。逆に*cdc 2*は、脱分化により増加することが免疫蛍光顕微鏡法で示された。またこの増加は、mRNAの場合と同様に24時間後以降すなわちG2からM期にかけてであることが、イムノブロッティングにより明らかにされた(図5A)。

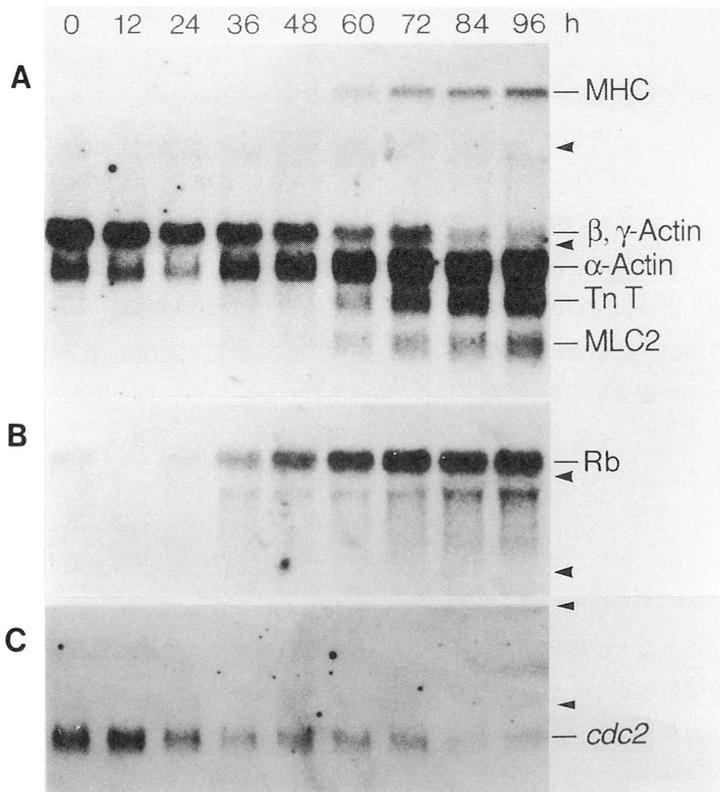


図1 C2SVT細胞の最終分化の過程における*RB*と*cdc 2*の発現。最終分化の過程で12時間おきに細胞からRNAを調製して、ノーザンブロッティングにかけた。(A)いくつかの筋特異的遺伝子(ミオシン重鎖、 α -アクチン、トロポニンT、ミオシン軽鎖2)mRNAsおよび β -と γ -アクチンmRNAs。(B)*RB* mRNA。(C)*cdc 2* mRNA。

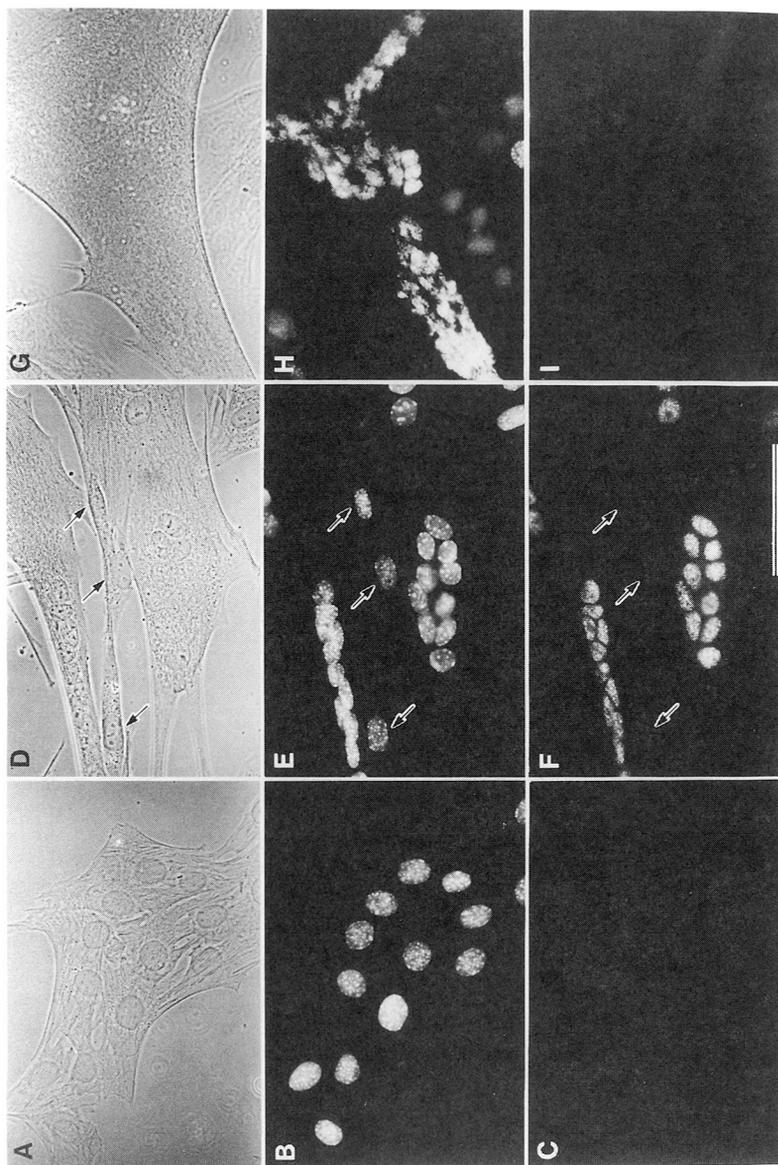


図2 C2SVT細胞の最終分化と脱分化にともなうRBタンパク質量の変動。
 筋芽細胞(A-C), 最終分化をした筋管細胞(D-F), および脱分化をして
 M期の前期ないし前中期に進行した筋管細胞(G-I)を, DNAに結合す
 る蛍光色素の bisbenzimidazole H33258 とRBに対するモノクローナル抗
 体PMG3-245で二重染色し, 蛍光顕微鏡で観察した。矢印で示してあ
 る細胞は筋管細胞の培養に混在している未分化の筋芽細胞。スケールバ
 ーは100 μm 。

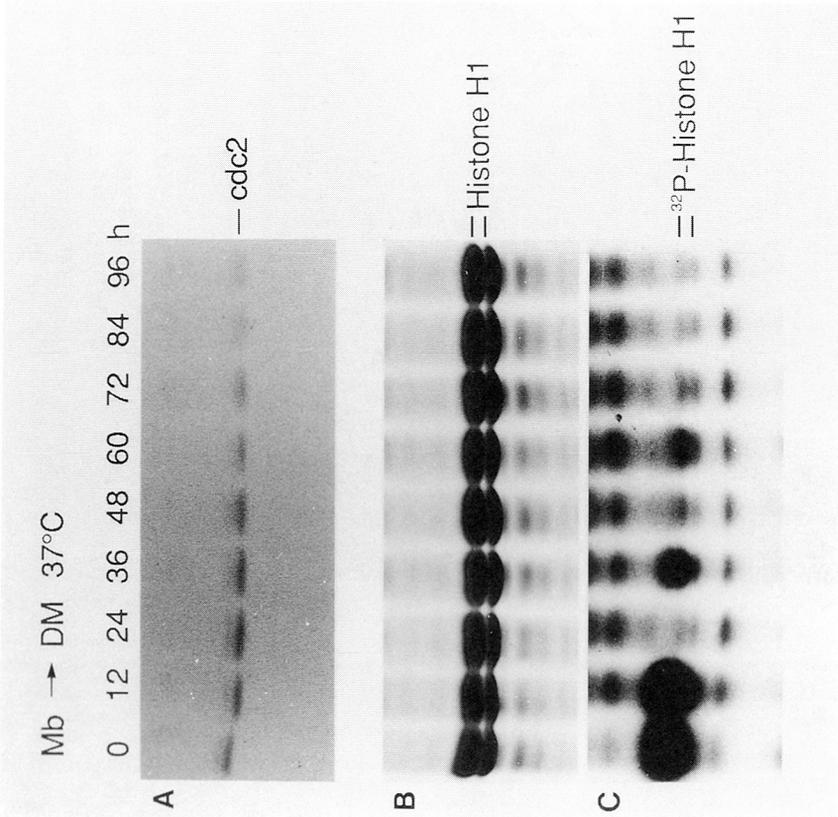


図3 C2SVT細胞の最終分化の過程におけるcdc2タンパク質の変動およびcdc2のヒストンH1キナーゼ活性。(A)PSTAIR抗体を用いたイムノブロッティング。最終分化の過程で12時間おきに細胞をSDS-PAGEサンプリングして抽出し、SDS-PAGEにかけた後に、イムノブロッティングを行った。(B、C)ヒストンH1キナーゼ活性。細胞の抽出物に最終濃度1mg/mlヒストンH1と[γ - 32 P]ATPを加えリン酸化反応を行った。SDS-PAGEのCBB染色(B)と 32 Pの取り込みをみたオートラジオグラフィ(C)。

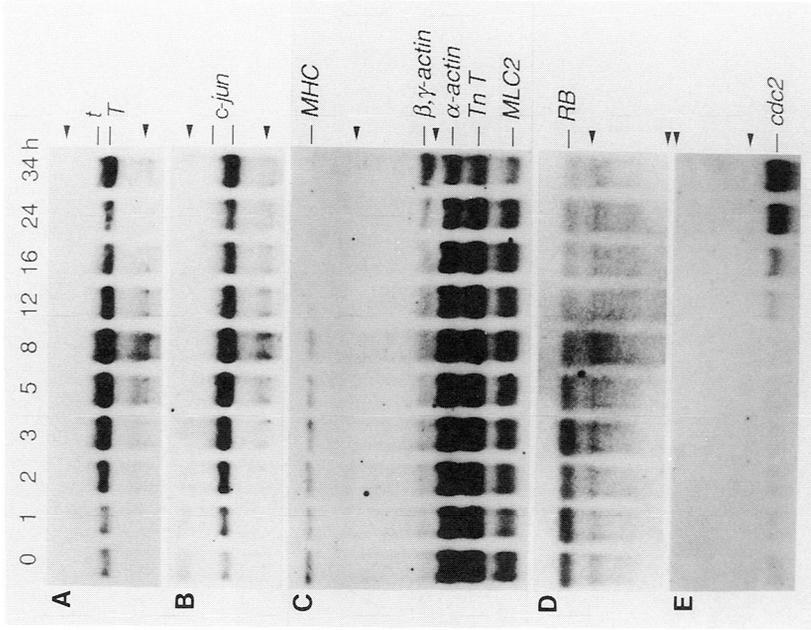


図4 C2SVT細胞の脱分化の過程におけるc-jun、RBおよびcdc2の発現。脱分化の過程で図に示した時間ごとに細胞からRNAを抽出して、ノーザンブロッティングにかけた。(A)SV40 large Tとsmall t mRNAs。large T mRNAのみが誘導された。(B)c-jun mRNA。(C)特異的遺伝子mRNAsおよび β -と γ -actin mRNAs。(D)RB mRNA。(E)cdc2 mRNA。

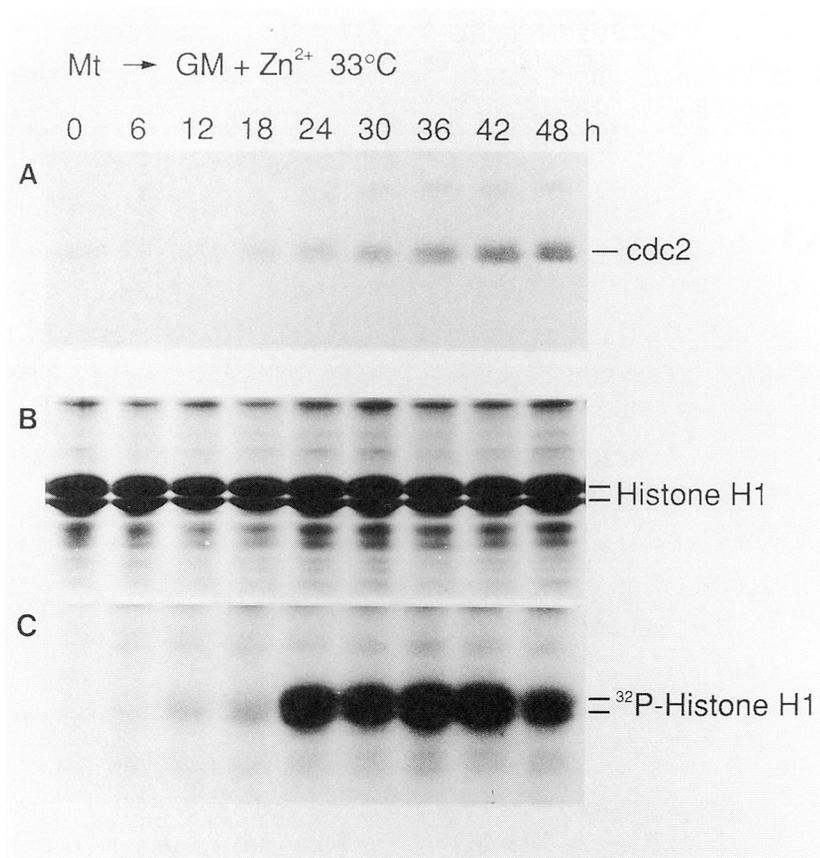


図5 C2SVT細胞の脱分化の過程におけるcdc 2 タンパク質量の変動およびcdc 2のヒストンH1 キナーゼ活性。(A)PSTAIR 抗体を用いたイムノブロットング。(B, C)ヒストンH1 キナーゼ活性。SDS-PAGEのCBB 染色(B)と³²Pの取り込みをみたオートラジオグラフィー(C)。

3. 分化と脱分化の過程におけるcdc 2 キナーゼ活性の変動

cdc 2のもつSer/Thrキナーゼ活性が分化と脱分化の過程でどのように変動するかを、cdc 2のよい基質であるヒストンH1のリン酸化を指標にして調べた。筋芽細胞では非常に高いキナーゼ活性が認められたが、最終分化の過程でこの活性は著しく低下した(図3C)。また脱分化の過程では、G 2期に相当する24時間後あたりからこのキナーゼ活性が顕著に高まった(図5C)。したがってcdc 2の発現量とその産物のキナーゼ活性との間には明瞭な相関関係が認められる。

考 察

この研究により、骨格筋細胞の最終分化の過程ではRB mRNAとタンパク質の量が著しく増大し、逆にcdc 2の発現とそのキナーゼ活性は低下することが示された。またSV40 large Tによってもたらされる脱分化の過程では、RBの発現量は減少し、一方cdc 2の発現とそのキナーゼ活性はG 2からM期にかけて増大することが明らかにされた。

今までに他の細胞種を用いて調べられている限りでは、RBの増殖抑制活性はリン酸化により調節されており、細胞周期におけるその活性とRB

の発現量との間には明瞭な関係が見いだされていない。したがって少なくともC2SVT細胞およびその親株のC2細胞の分化による増殖停止には、リン酸化されていないRBタンパク質が蓄積する必要があると考えられる。またSV40 large Tは特にリン酸化されていないRBと結合し、その増殖抑制活性を阻害すると考えられている。したがって脱分化にともなって細胞周期を回る際は、RBはリン酸化されている必要はないということになる。同様の理由から、筋管細胞内でのRB量の減少は細胞周期を再開するのに不可欠というわけではないかもしれない。このRB量の減少はlarge Tを誘導した結果として起こったわけであるから、large T自身、あるいはlarge Tによって誘導されたある遺伝子産物によってRBの転写が抑制されたか、またはRB mRNAが不安定になった結果ということが考えられる。large Tの発現によって、プロトオンコジーンのc-junが誘導された(図4)(10, 11)ことは、この考えを支持しているかも知れない。なぜならばc-Junは転写因子AP-1としての活性を持ち、いくつかの遺伝子の転写活性化または転写の抑制を行なうからである。

この研究の結果から、骨格筋細胞の最終分化にともなう増殖の停止と脱分化にともなう細胞分裂の再開も、増殖中の細胞の細胞周期と同様に、cdc 2のキナーゼ活性の変動によって調節されていることが推測される。増殖中のHeLa細胞の場合、cdc 2のmRNA量とタンパク質合成量はG2からM期にかけて増加するが、そのタンパク質総量は細胞周期を通じてほとんど変化しない¹²。しかしC2SVT細胞の最終分化と脱分化の過程では、cdc 2のmRNA量のみならずタンパク質量も変動した。これは増殖中の細胞の場合には細胞周期の各期が短いために、ある程度の長さの寿命を持つと思われるcdc 2タンパク質の総量は変動しないが、最終分化の場合にはcdc 2の合成が低下するG0/G1期が長いために、そのタンパク質量が減少したと思われる。

cdc 2は*in vitro*でRBをリン酸化することが示されているが、cdc 2が活性化されるのはG2/M期であるのに対し、細胞内でのRBのリン酸化はSからG2期にかけて起こる。最近、cdc 2に類似したSer/ThrキナーゼとしてCDK2が同定された。この活性はS期の誘導にかかわっているようである¹³。したがって*in vivo*のRBのリン酸化はcdc 2ではなくCDK2によるものかも知れない。今後、分化と脱分化の過程におけるCDK2の発現と活性についても調べる必要がある。cdc 2やCDK2の転写調節機構についてはまだ報告がなされていない。C2SVT細胞は細胞分化と脱分化を増殖という面からみた場合、それを調節しているRBおよびcdc 2, CDK2の発現機構を研究するうえでも有用である。

文 献

- 1) Endo, T. & Nadal-Ginard, B. (1989) *Cellular and Molecular Biology of Muscle Development* (F. Stockdale & L. Keddes, eds.). Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 95-104.
- 2) 遠藤剛(1989)厚生省神経疾患研究委託費“筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究(野々村班)”昭和63年度研究報告書, pp. 103-109.
- 3) Weinberg, R.A. (1991) *Science* 254: 1138-1146.
- 4) Moreno, S. & Nurse, P. (1990) *Cell* 61: 549-551.
- 5) Lewin, B. (1990) *Cell* 61: 743-752.
- 6) Endo, T. & Nadal-Ginard, B. (1987) *Cell* 49: 515-526.
- 7) Tokuue, Y., Goto, S., Imamura, M., Obinata, T., Masaki, T., & Endo, T. (1991) *Exp Cell Res.* 197: 158-167.
- 8) Endo, T. & Goto, S. (1992) submitted for publication.
- 9) 遠藤剛(1990)厚生省神経疾患研究委託費

- “筋ジストロフィー症の発症に関する遺伝子工学的基礎研究(野々村班)”平成元年度研究報告書, pp. 30 - 37.
- 10) Endo, T. (1992) submitted for publication.
- 11) 遠藤剛 (1991) 厚生省神経疾患研究委託費 “筋ジストロフィー症の発症に関する細胞生物学的基礎研究(小沢班)”平成2年度研究報告書, pp. 94 - 100.
- 12) McGowan, C.H., Russell, P., & Reed, S.I. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10 : 3847 - 3851
- 13) Hunter, T. & Pines, J. (1991) *Cell* 66 : 1071 - 1074.

19 筋細胞分化制御因子の機能の解析

鍋 島 陽 一*

要 旨

筋分化制御因子群の機能を筋細胞で特異的に発現する遺伝子の転写誘導能を指標に検討し、次の結果を得た。1) 骨格筋ミオシン軽鎖遺伝子のエンハンサー領域には5個のEboxが並んでおり、MyoD, myogeninは異なる配列を認識してエンハンサーを活性化している。2) プロモーターにはMLCboxとEboxが並んでいるが筋分化制御因子はMLCboxに直接結合しないがMLCboxを活性化して転写を誘導する。Eboxを介しての転写誘導は極めて弱いがEboxがMLCboxと並んでいることにより、全体の活性が3倍に増大することから、MLCboxとの相互作用による転写の増大にEboxが機能している。3) 2つの全く性質を異にする因子であるEboxとMLCboxの活性化に筋分化制御因子が関与しており、筋特異遺伝子の発現は筋分化制御因子群によって一元的に制御されている可能性が高い。

はじめに

筋細胞は中胚葉多能性細胞より筋芽細胞への決定、引き続き筋管細胞への分化、筋管細胞における収縮構造の形成に代表される生化学的分化のプロセスを経て形成される。この過程の制御に最も重要な役割を負う因子としてMyoD遺伝子が分離されて以来、筋細胞分化の分子機構の研究は急速に発展し、現在では4種のMyoD類似の筋分化制御遺伝子が分離され、その機能の詳細な解析が進

められている。4種の筋分化制御因子は何れもHelix-Loop-Helix構造を分子の中央に持ち、そのN末端側に塩基性配列を持つDNA結合蛋白であり、中胚葉多能性細胞を筋芽細胞へと誘導する活性を有しているがその機能分担、階層性、因子間の相互作用など詳細な機能については不明な点も多く残されている。筋分化制御因子はDNAに直接結合し、ヒエラルヒーの下位に位置する遺伝子の転写を制御することによって様々な現象に関与していると考えられるが、筋収縮蛋白遺伝子はそのターゲットの一部であることが明かとなり、転写誘導機構の解明が進められている。我々は以前よりミオシン軽鎖遺伝子群の転写誘導機構を解析してきたが、これらの遺伝子群のシスの制御因子に対して筋分化制御因子群がどの様に作用するかを検討することによって筋分化制御因子群の機能の一端を明かにしたので報告する。

実験方法

1) 筋分化制御因子を強制的に発現するプラスミド、発現制御機構をテストするプラスミドの構築

ニワトリ骨格筋のcDNAライブラリーよりマウスのMyoD, myogeninをプローブとしてクロスハイブリにより、3種の筋分化制御遺伝子(CMD1, myogenin, MRF4)をクローン化した。次いで各種の細胞で普遍的にかつ強く発現するアクチン遺伝子のプロモーターの下流にcDNAを連結し、強制発現プラスミドを構築した。テストプラスミドは①骨格筋型ミオシンアルカリ軽鎖LC1f遺伝子の5'上流領域3.3kbと大腸菌CAT遺伝子を

*国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子工学研究部

連結したもの、及び②5'上流配列より2kb上流に存在するエンハンサー配列を除いたもの、③エンハンサー配列をLC1f遺伝子のプロモーター上流に連結したもの、④LC1f遺伝子のプロモーターを-299までしか持たないものを構築し、エンハンサーにたいする筋分化制御因子の作用の検討に使用した。第2のテストプラスミドは胚型ミオシン軽鎖L23遺伝子のプロモーター配列にCAT遺伝子を連結したもの、プロモーターに存在するMLCbox, Eboxの一方を欠いたもの、両者を欠いたものを構築し、MLCboxに対する筋分化制御因子の作用の検討に使用した。

2) 転写誘導活性の測定

テストプラスミドと筋分化制御因子強制発現プラスミドをリン酸カルシウム法で10T1/2細胞あるいはニワトリ繊維芽細胞に導入し、発現したCAT活性を測定し、転写誘導活性とした。

実験結果

1) エンハンサーに対する筋分化制御因子の作用

MyoD, myogenin, MRF4 発現プラスミドとLC1f 遺伝子の上流3.3kdをもつテストプラスミ

ドを繊維芽細胞に導入し、転写誘導活性を測定したところ、MyoD, myogeninは転写を誘導するがMRF4は転写を誘導できなかった(図1)。この活性はエンハンサーを取り除くことによって失われることから、MyoD, myogeninがエンハンサーに作用した結果と判断し、次にLC1f 遺伝子の上流299bpまで含むプロモーターにエンハンサーを連結したテストプラスミドに対するMyoD, myogeninの作用を検討したところ、MyoDは転写を誘導するがmyogeninは転写を誘導できなかった。この結果から、MyoDは上流2kbに存在するエンハンサー配列を活性化し、LC1f 遺伝子の転写を誘導するがmyogeninはエンハンサー配列に加えて第2のシス因子を必要としていることが示唆された。myogeninに反応するシス因子の検索を行なったところ、MyoDに反応するエンハンサー(ELC1Dと名付けた)の3'端側に並んで存在することが明らかとなった(図2)。ELC1Dは2個のEboxより構成されているが、myogeninに反応するエンハンサー領域(ELC1G)にも3個のEboxが存在し、結果として5個のEboxが並ん

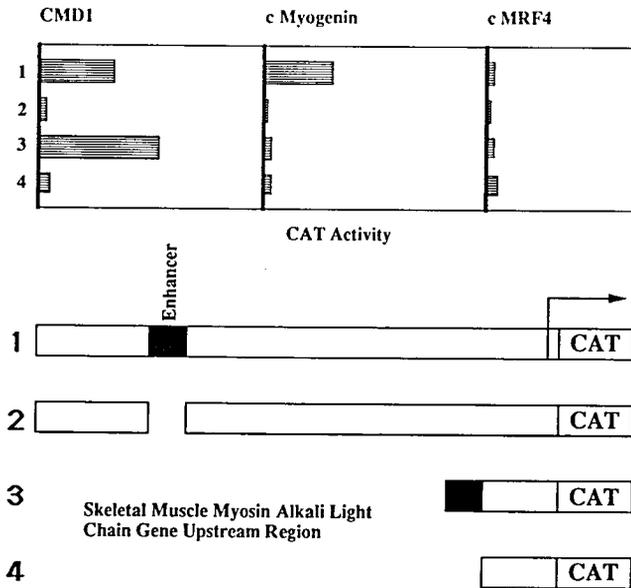


図1 筋分化制御因子による転写誘導

でおり, MyoD, myogeninは異なるEbox を認識してLC1f 遺伝子の転写を誘導していると考えられる。図2にその配列を示すがエンハンサーとしてよく解析されているMCK遺伝子のエンハンサーと高い相同性を持つことを併せて図示した。MRF4もEboxを認識して転写を誘導すると推察されるがMRF4に応答するシス因子は未だ明かにされていない。

2) MLC box に対する筋分化制御因子の作用

胚型軽鎖L23遺伝子のプロモーターは筋細胞で強く遺伝子を発現するが、この領域にはMLCbox とEboxが並んでおり、その役割を検討した。図3に示すように何れの筋分化制御因子もL23プロモーターを活性化する機能を有している。MLCboxを欠くとたとえEboxがあってもその活性は著しく減少するがEboxを欠いても十分活性が保持される。さらにMLCboxのコア配列に変異を導入すると筋分化制御因子に応答する活性を失うことも明らかとなった。なお、Eboxが並んでいるとMLCbox単独に比して約3倍の活性が認められる。これは両因子が単独で機能する活性を足したものよりはるかに高いことから、両因子に結合する蛋白が相互作用し、より機能的に高度な複合体が形成されることを示唆している。筋分化制御因

子とMLCboxの直接の結合は確認されないことから、筋分化制御因子がMLCboxに結合する転写因子の発現を誘導し、二次的にMLCboxを活性化している可能性が高い。

考 察

エンハンサーに対する作用が3種の筋分化制御因子で異なっていることを明かにしたが、特にMyoD, myogeninが認識するEbox が区別されたことに意義を認めたい。この違いがMyoD, myogenin分子のどのドメインに依存しているかを明らかにすることが次ぎの課題である。MRF4による転写誘導は確認されなかったが、MRF4により内在性のLC1/LC3遺伝子の発現は誘導される。この結果は本実験で使用した領域にはMRF4に応答する領域が含まれていない可能性を示唆している。筋細胞で発現する遺伝子の発現制御領域にはEbox とCArGあるいはMLCboxが存在し、この両者が筋分化制御因子の制御下であり、筋細胞における特異的発現、筋管細胞への分化に伴う発現誘導の基本要素となっている。これらのことを図4にまとめた。

```

Mouse MCK  5'-TTAACCCAGACATGTGGCTGCTCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTGAGCCTCAC-3'
Chick ELC1 D 5'-AGGAGCTGCAGATGCCAGCAATATCTCACATCTCAGCTGCTGCTTTCCCTT-3'
Chick ELC1 G  GGGCAAATCCCAGCAAGTGTGAGGCTGGGGTTTCGCTCAAGTGCTTGTGCTCACA
              GGAAGAGGCTGCTAACAGCAGCAGAGGAGCCATCCTGCTGCGGCAGCTGCAGAGC
              ACAGGGACACATCTCCACGCTTTGCTCCCAGGGGACAGGCAGGCACAGCCACACA
              CTCCCAGGGATGCTCTGGACACATCC
    
```

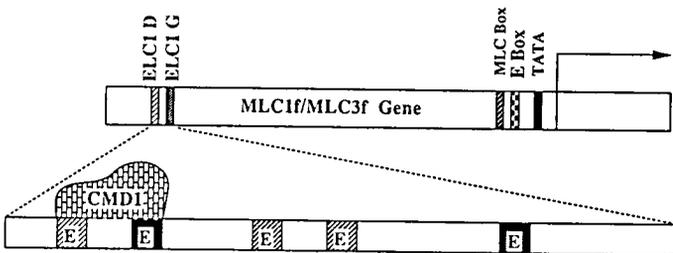


図2 LC1 遺伝子 Enhancer のCore 配列

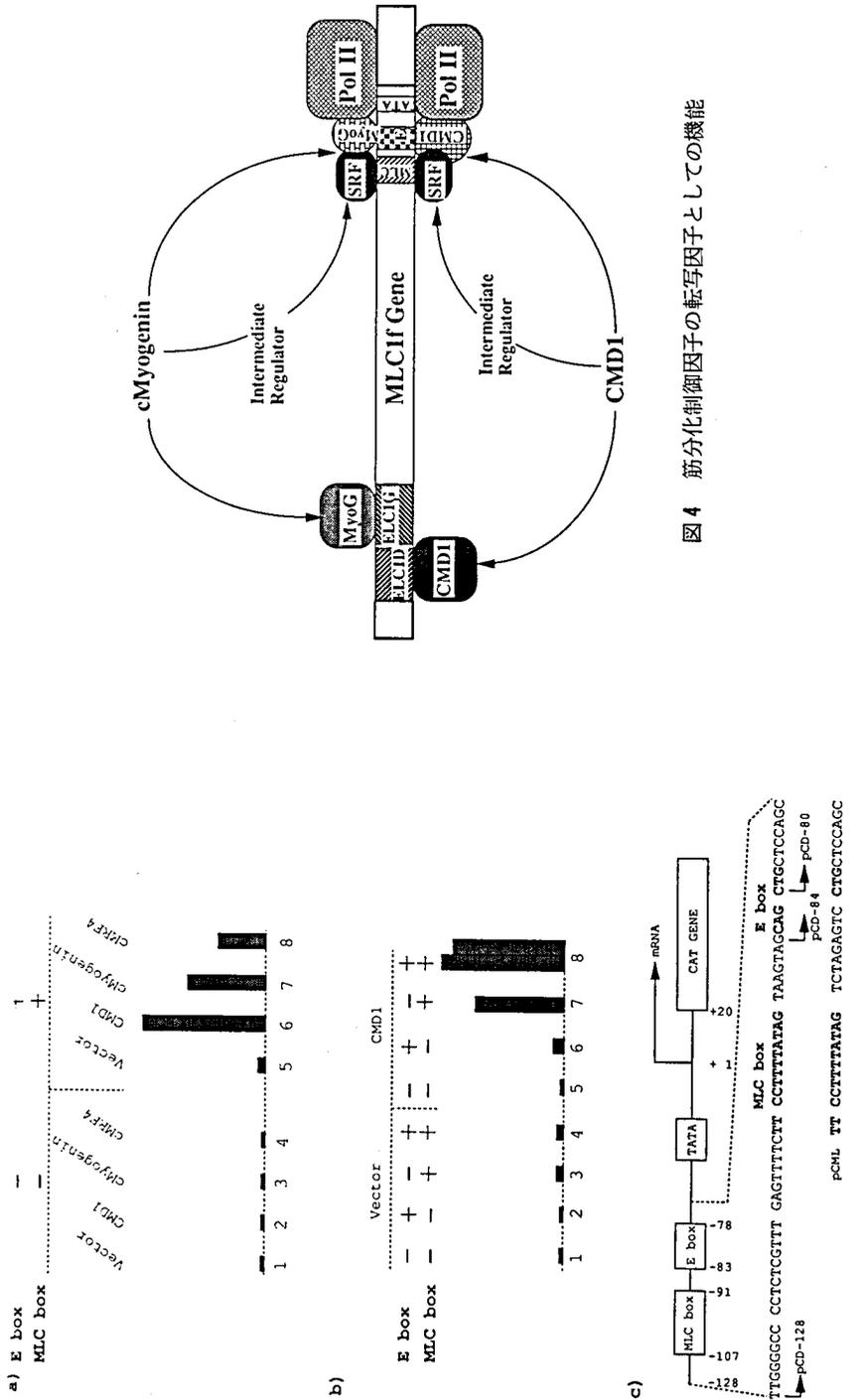


図3 筋分化制御因子のL23遺伝子Promoterに対する作用

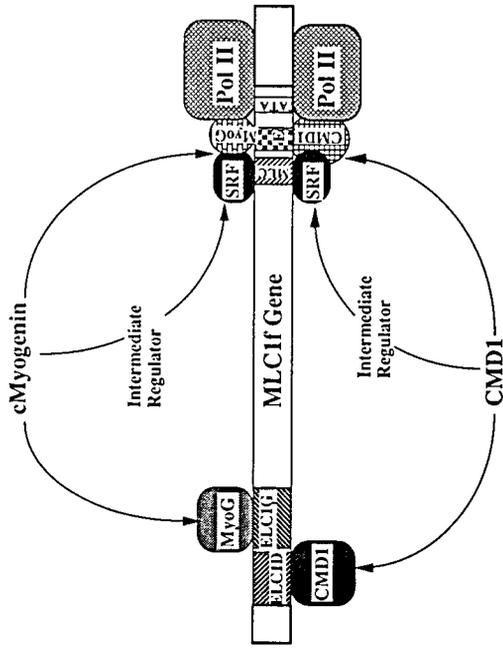


図4 筋分化制御因子の転写因子としての機能

文 献

- 1) Fujisawa-Sehara A., Nabeshima Y., Komiya T., Uetsuki T, and Nabeshima Y. Differential trans-activation of muscle-specific regulatory elements by chicken MyoD, Myogenin, and MRF4. *J. Biol. Chem.* in Press
- 2) Fujisawa-Sehara A., Nabeshima Y., Hosoda Y. and Nabeshima Y. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**, 15219 – 15227
- 3) Uetsuki T., Fujisawa-Sehara A., Nabeshima Y., and Nabeshima Y. Regulation of the chicken embryonic myosin light-chain (L23) gene. *Mol. Cell. Biol.* (1989) **10**, 2562 – 2569
- 4) Shirakata M., Nabeshima Y., Konisi T., and Fujii-Kuriyama Y. Upstream regulatory region for inducible expression of the chicken skeletal myosin alkali light-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* (1988) **8**, 2581 – 2588

V 発 生 工 学

- 20. トランスジェニックマウスを用いたジストロフィン遺伝子発現の調節の試みとマウスジストロフィン様cDNAの構造解析 127
- 21. mdx マウス由来胚幹細胞株の樹立及びその利用 134

20 トランスジェニックマウスを用いたジストロフィン遺伝子発現の調節の試みとマウスジストロフィン様 cDNA の構造解析

木村 稔*

研究協力者 勝木元也*,**鍋島陽一***梶原景正****
 浜之上誠***長谷川孝徳**横山峯介**
 竹光正和***埜中征哉***

はじめに

我々は導入遺伝子の構造を工夫することによって、遺伝子導入マウス(トランスジェニックマウス)個体内でジストロフィン遺伝子発現を抑制することを目的として研究を進めている。近年、デュシェンヌ型(DMD)およびベッカー型(BMD)筋ジストロフィー症の原因はジストロフィン遺伝子の変異にあることが強く示唆されてきたが、実験動物としてよく用いられるマウスにおいてはわずかに *mdx* の点突然変異が知られるのみであり、この遺伝子の機能的な発現の調節機構や発現異常と発症との関係を個体レベルで検討する系は未だ確立されていないのが現状である。本年度は、昨年度作製したトランスジェニックマウスについて、その系統化に取り組むと共に一部の解析を行った。

また、一方でジストロフィン遺伝子に類似した遺伝子の存在や、筋肉以外の組織におけるジストロフィンの発現が報告されているが¹⁾⁻⁶⁾、特に脳におけるジストロフィン様タンパク質の発現は、DMD等々で時として観察される精神遅滞との関連を想起させるものであることから、初代神経培養細胞の

cDNAライブラリーより、ジストロフィン様cDNAの単離を試み、昨年度は一つのcDNAクローンを単離することができた。本年度はcDNAクローンの塩基配列の全決定を行ったのでここに報告する。

材料と方法

トランスジェニックマウス作成にはC57BL/6系統の受精卵を用い、Gordonらの方法によってDNAを導入している⁷⁾。継代にあたっては、通常、初代マウスの性成熟を待って交配したが、一部は体外受精も行った。また早期に死亡した雌の初代マウスについては、卵巣移植によって可能な限り、子孫取得に努めた。

一部のトランスジェニックマウスについては採材を行い、導入遺伝子の発現をまずRNAブロット解析により検討した。また同時にジストロフィン抗体を用いた組織化学的解析も行った。

MD911クローンの塩基配列決定にあたっては、まず λ gt10にクローン化されたcDNAをBluescript SK(+)に再クローン化したのち、Exonuclease IIIおよびMung Bean Nucleaseを用いて数々の欠失変異体を作成した。これらのクローンを鋳型とし、Sanger法によりcDNA両鎖の塩基配列を決定した。

* 東海大学医学部

** (財)実験動物中央研究所

*** 国立精神・神経センター

**** 神奈川歯科大学

結 果

1. トランスジェニックマウスの系統化

マウス個体内でジストロフィン遺伝子の機能的発現を抑制するために、昨年度我々は2つの導入遺伝子を構築し、トランスジェニックマウスを作製した。まず第1は、ジストロフィン遺伝子の mRNA に相補的な RNA を産生するアンチセンス導入遺伝子を用い、筋肉細胞中でジストロフィンタンパク質の発現を抑制しようというものであり、また第2は、ジストロフィンの膜直下での局在とその機能的な発現の相関が強く示唆されることから、機能的には欠陥を持ちながら本来の局在場所では、正常なジストロフィンと競合するようなポ

リペプチドを筋肉細胞内に発現させ、ジストロフィンの機能的な発現を阻害しようとするものである(図1)。両遺伝子とも、すでに我々が他のトランスジェニックマウス作製で有効性を確認した cDNA 発現ベクターの骨格を持ち、またジストロフィン遺伝子のプロモーターはよく解析されていないことから、筋肉細胞に発現するプロモーター・エンハンサーとして、マウスミオシン軽鎖遺伝子3型のプロモーター(MLC3)およびエンハンサーを配置している^{8,9)}。

昨年度報告したように、MAD から3匹、MSD から7匹のトランスジェニックマウスが得られたが、それぞれ一匹ずつ早期に死亡し、また MSD

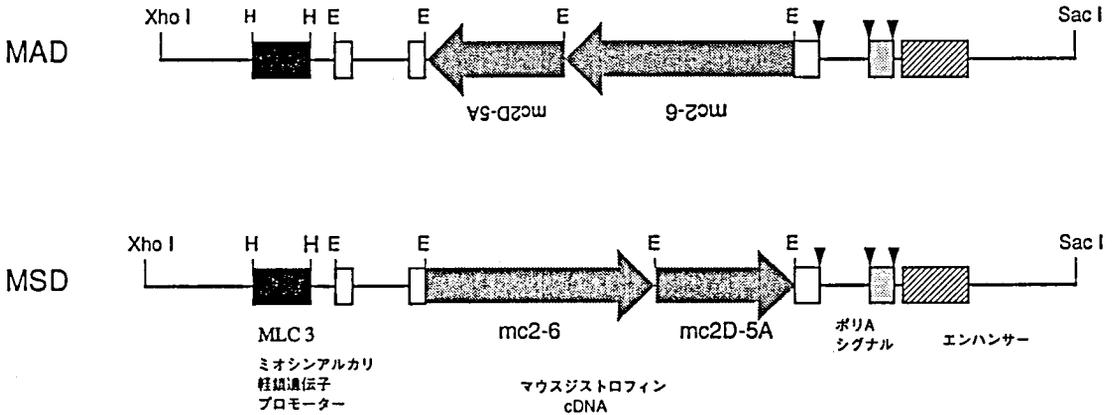


図1 導入遺伝子の構造

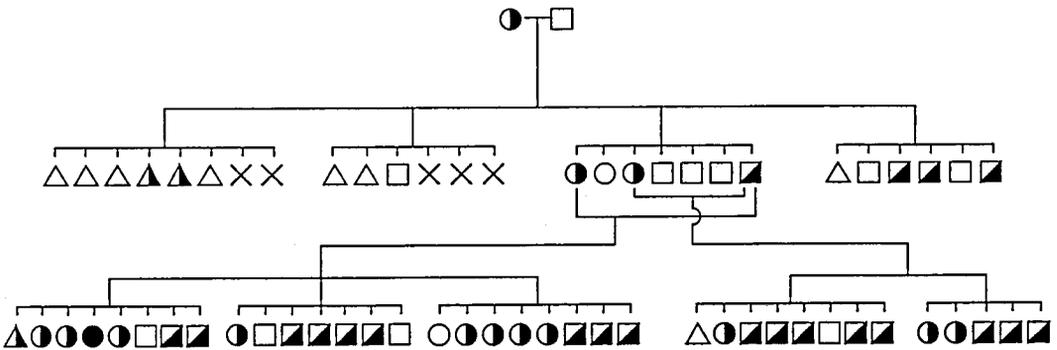


図2 MAD II2-4^m系統図(○●は雌, □■は雄, △▲は早期死亡個体, ×は食殺を示す。●■▲はヘミ型接合体であることを示す。)

の別の一匹は生後一日目に卵巣移植を行った。MADの出生数に対するトランスジェニックマウスの取得率(8.3%)はMSDのそれ(25.0%)に比べかなり低かった。

今年度は初代マウスのうち、MAD 2匹(MAD II 2-4^m, MAD II 2-11^m)およびMSD 6匹(MSD II 1-2^m, MSD II 1-13^p, MSD II 1-14^p, MSD II 2-9, MSD II 2-12^p, MSD II 2-13^p)について継代を試みた(右肩の^m・^pはそれぞれ雌, 雄をあらわす)。継代の結果, 図2~図8の系統図に示すような子孫が得られた。このうちMAD II 2-11^mについては, 卵巣移植まで試みたが子孫は得られず, また図7に示すMSD II 2-12^pの場合もトランスジェニックマウスの継代は不成功であった。そのほかのマウスについてはほぼメンデルの法則にしたがった導入遺伝子の伝達を示した。

初代マウスおよびその子孫について症状の有無

について観察したが, MSD II 1-2^mにおいて初代マウスが生後1日目に死亡し, わずかに継代された一匹の子孫が生後22日目に突然死亡したほかは正常マウスと全く変らなかった。

現在, 導入遺伝子の発現およびジストロフィンの発現について, それぞれRNAプロット解析および免疫組織抗体法について検討しているが, 前者については5系統6匹中発現を確認されたものではなく, また後者についても6系統15匹の検体中にジストロフィンの発現が顕著に低下したと思われる検体は見い出されていない。

2. ジストロフィン様mRNAに対するcDNAの全塩基配列決定

このcDNA(MD911)は, 胎生17日目のマウス脳の初代培養cDNAライブラリー約 8×10^4 クローンからヒトジストロフィンmRNAの3'末端側(7875-13973)に相当するcDNAをプローブと

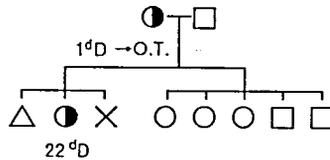


図3 MSD II 1-2^m 系統図

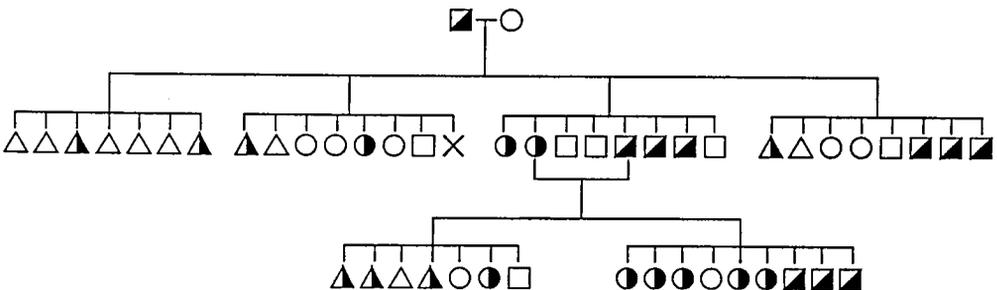


図4 MSD II 1-13^p 系統図

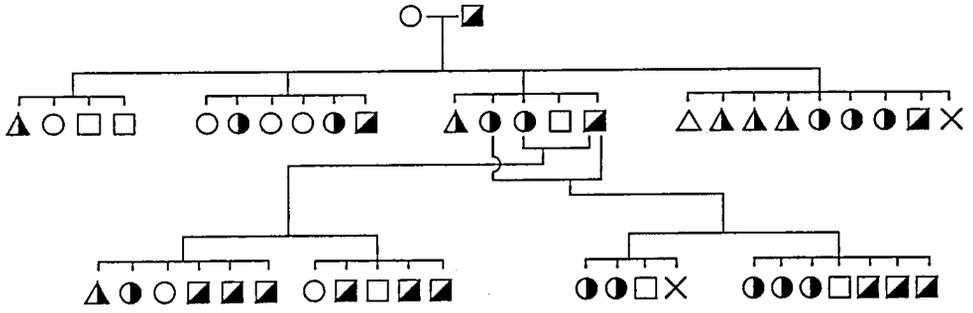


图5 MSDII1-14^P系统图

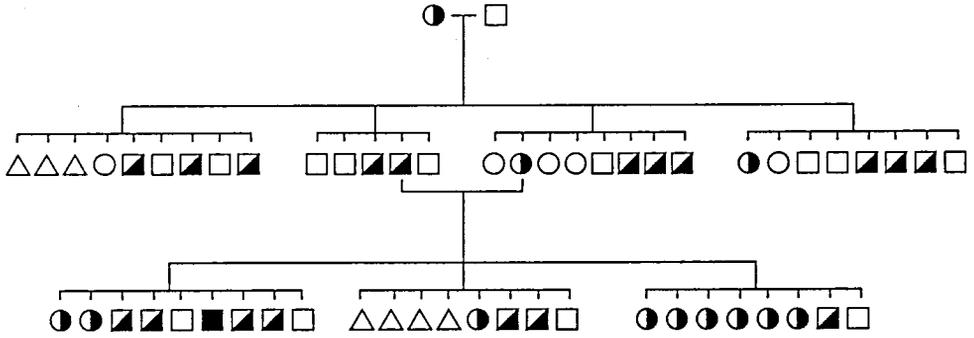


图6 MSDII2-9^m系统图

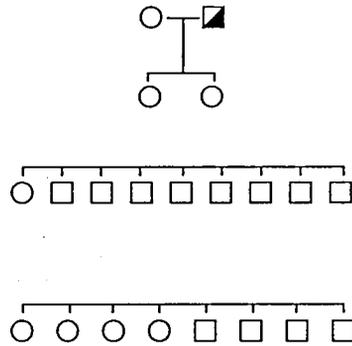


图7 MSDII2-12^P系统图

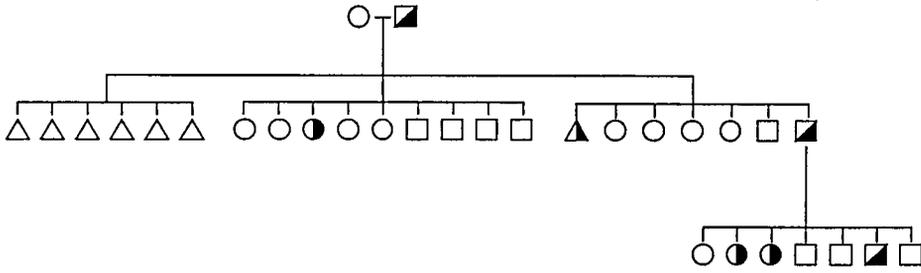


図8 MSDII2-13^P系統図

して、スクリーニング、単離されてきたものである。MD911の塩基配列の決定は、cDNA部分をBluescript SK(+)ベクターに再クローン化した後、欠失クローンを系統的に作成しジデオキシ法によって行った。単離したcDNAは776bpで、一部に連続した欠失がみられるものの、ヒトジストロフィンcDNA 3'末端(非コーディング領域)と83%のホモロジーを示した(図9)。ヒト-マウス間の非コーディング領域の相同性としては非常に高いと思われ、また、いくつかのエネルギー的に安定なステムアンドループ構造をとり得ることが判明した。

考 察

現在ジストロフィン遺伝子に変異を持つマウスで解析が進んでいるものは点突然変異の*mdx*のみである。ジストロフィン遺伝子の発現はDMD/BMDの発症に深く関わっており、個体レベルでこの遺伝子発現を抑制したマウスが作成できれば、ジストロフィン遺伝子発現の調節機構のみならず、本疾患の発症機構の解明や、治療法の検索に役立つマウスができるものとして本計画はスタートした。

しかしながら、現在のところ導入遺伝子の発現は確認されず、またジストロフィンの発現低下や症状の出現もほとんど皆無である。MLC1/3共に骨格筋で発現するものの、今回やむを得ず使用し

たMLC3は、心筋では発現しないこと、またマウスMLCプロモーターにラットのMLCエンハンサーがうまく作用するかどうかなどの問題点が存在する。またMSDから産生されるタンパク質が内在性ジストロフィンと競合する保証はない。今後同様の目的でのトランスジェニックマウスの作製においては培養細胞系での発現確認なども必要となろう。ただMADトランスジェニックマウスの取得率が低く、継代例は1例であること、あるいはMSDII1-2^mにおける2例の死亡例などはなんらかの導入遺伝子の効果を示すものかも知れない。

一方、昨年、マウス胎児大脳初代培養細胞cDNAライブラリーからジストロフィン様mRNAに対するcDNAが単離し、一部の塩基配列を決定していたが、今年度はその全塩基配列を確定することができた。マウスのジストロフィンmRNAの3'側の塩基配列が明らかにされていないため、これがジストロフィン本来のmRNAに由来するかどうかは現在のところあきらかでないが、図9に示すようにヒトジストロフィンmRNAに対するcDNAとの相同性は非常に高く、マウスのジストロフィンmRNAの3'側の配列を反映している可能性は十分にある。

今回mRNAの3'非翻訳領域における種間を越えた高い相同性が見出されたことは興味深い。mRNAの安定性などに関わっている配列なのか

も知れない。

また昨年度報告したように、これをプローブとしてRNAブロット解析を行うと、新生マウス脳、心臓・肺共に5kbのmRNAが検出されると共に、脳で特に8kbのmRNAが強く反応する(ジストロフィンmRNAと思われる14kbのRNAは心臓・肺のみに検出される)。Bar等は成体ラット脳において同様なRNA(6.5kb)の存在を認めており¹⁰⁾、もしこれらが同一のジストロフィン遺伝子に由来するものならば、少なくとも齧歯類の脳においては従来の報告に比べ、はるかに長さの短い異型ジストロフィンmRNAが存在することになり、今後DMDにおける精神遅滞との関連を考えていく上で注目すべき事実であると考えられる。

文 献

- 1) Hoffman EP, Kunkel LM *et al.*: Dystrophin Abnormalities in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. *Neuron* 2; 1019-1029, 1989.
- 2) Love DR, Hill DF *et al.*: An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58, 1989.
- 3) Hoffman EP, Hudecki MS *et al.*: Cell and Fiber-type Distribution of Dystrophin. *Neuron* 1, 411-420, 1988.
- 4) Chelly J, Kaplan JC *et al.*: Transcriptin of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature* 333, 858-860, 1988.
- 5) Feener CA, Koenig M *et al.*: Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338, 509-511, 1989.
- 6) Hoffman EP, Monaco AP *et al.*: Conservation of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene in Mice and Humans. *Science* 238, 347-350, 1987.
- 7) Gordon JW, Scangos GA *et al.*: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7380-7384, 1980.
- 8) Rosenthal N, Kornhauser JM *et al.*: Myosin light chain enhancer activates muscle-specific, developmentally regulated gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7780-7784, 1989.
- 9) Donoghue M, Ernst H *et al.*: A muscle-specific enhancer is located at the 3' end of the myosin light-chain 1/3 gene locus. *Genes and Develop.* 2, 1779-1790, 1988.
- 10) Bar S, Barnea E *et al.*: A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem. J.* 272, 557-560, 1990.

21 mdx マウス由来胚幹細胞株の樹立及びその利用

花岡 和 則*

はじめに

胚幹細胞(ES)株は、発生過程のマウス胚の中で活発に増殖・分化を行っている全能性未分化幹細胞である。ES細胞は、生殖巣の腫瘍である奇形腫の未分化幹細胞(胚性癌腫細胞, EC細胞)と性質が類似しており, 1) 培養下で無限増殖能を有すること, 2) 正常なマウスの初期胚(胚盤胞)に注入すると体内のあらゆる細胞(生殖細胞を含む)に分化しキメラマウスを形成できることがこれらの細胞の著しい特徴である。この性質を利用すると, 培養下で遺伝子操作を施した胚幹細胞を用いてキメラマウスを作成し生殖細胞へ分化させその子孫を得ることにより胚幹細胞を担体(vehicle)としたマウス個体の遺伝子操作が可能となる(図1)。この手法は, 直接マウス受精卵に遺伝子を導入する方法に比べいくつかの利点がある。特に, 相同組み換え反応(homologous recombination)を利用することにより任意の遺伝子の機能が破壊された幹細胞株を単離することができるという報告は, この手法(Gene Targeting)の応用範囲を飛躍的に広げるものであり, 広範な注目を集めている。

胚幹細胞は, 奇形腫幹細胞に酷似した細胞であるが, 腫瘍の過程を経過していないことから初期胚細胞により近い性質を保持していることが期待でき, 事実胚操作の担体としては有利な点が多い。反面, 胚幹細胞株の樹立は奇形腫より困難であり, 一般的な技術として確立されたものとはいえないのが現状である。我々は, キメラ法を利用した疾

患モデル動物の開発のための基礎的研究の一つとしてES細胞株を効率的に樹立するための培養条件について検討を加えてきた。本年度は, ジストロフィン遺伝子が欠損し筋ジストロフィーのモデルマウスと考えられているmdxマウス胚に由来する胚幹細胞の樹立について報告し, その応用について考察する。また, これらの胚幹細胞を用いてgene targetingを行うための予備的な研究についてもその概略を報告する。

胚幹細胞の樹立

[方法] 1) 初代培養 マウス胚盤胞期胚(受精後3日)を培養条件下(15% FCSを含むDMEM)に移す。胚は通常3-5日目には, 培養ディッシュ上に発達した卵円筒様構造を形成した。実体顕微鏡下でこれらの胚の胚体外胚葉(原始外胚葉)の部分単離し, トリプシン/EDTA処理によりこれらの細胞塊を軽く解離した後, フィーダー細胞上に移した。フィーダー細胞としては, マウス(12-15日胚)由来初代培養繊維芽細胞及びSIMマウス由来株細胞であるSTO細胞株にマイトマイシン処理を施したものをを用いた(10 μ l/ml, 3hr)。

2) 培地 様々な培地を検討した結果, DMEM培地に, メルカプトエタノール(10^{-7} M), 非必須アミノ酸(シグマ, 200倍希釈で使用), アデノシン, グアノシン, シチジン, ウリジン(各3mM), チミジン(1mM), LIF(Leukemia inhibitory factor, 10^2 U/100ml)を加えたものを使用した。血清は40以上のロットのうち最もES細胞の増殖のよいものを選び使用した(血清濃度, 20%)

[mdx マウス由来胚幹細胞の樹立]

*国立精神神経センター神経研究所

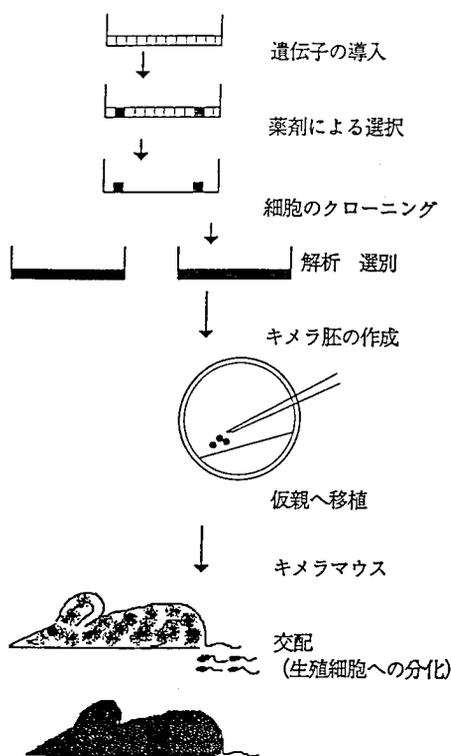


図1. 胚幹細胞を利用したマウス胚の遺伝子操作

B6C3HF₁マウス胚を用いて、胚幹細胞の樹立の条件を検討した。培養下に移された胚細胞は多くの場合極めて不安定であり、数週間後には様々な細胞に分化しその増殖性を失った。3000個以上の胚を用いて、培地の組成、継代方法、フィーダー細胞などについて様々な検討を加えた。最初にマウス胎児の初代培養繊維芽細胞をフィーダー細胞として用い、細胞の増殖が安定した後にSTO細胞株をフィーダーとして用いることにより効率的に幹細胞を未分化状態で分離できることを見だし、3株のES細胞株を樹立した。この方法により、197個のmdxマウス初期胚から17株の胚幹細胞株を単離することに成功した(図2)。これらの細胞株はいずれも体外で長期間安定に維持できること、培養下で高い分化能を有することが確認されており、現在生殖細胞への分化能について検討を急いでいる。

[mdxマウス由来胚幹細胞の標識化]

今回樹立されたmdxマウス由来胚幹細胞は、ジストロフィンの欠損した発生的多能性未分化幹細胞であり、正常なマウス胚に注入するとキメラマウスを形成し、ジストロフィン遺伝子の機能や発現の解析に威力を発揮することが期待される。キメラマウスを解析するためには、キメラを構成する二種類の細胞群(mdxマウス由来胚幹細胞及び宿主胚細胞)を組織レベルで判別できることが必須である。そこで、mdx胚幹細胞に外来遺伝子を導入し標識化することを試みた。導入遺伝子としては、昨年度の研究で普遍的に発現することが確認されているヒトペプチド進展因子(EF1 α)プロモーターに核移行シグナル及び標識遺伝子として大腸菌の β -ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を連結したプラスミドpEFNLacZを作成した。この遺伝子をリン酸カルシウム法によりmdx胚幹細胞

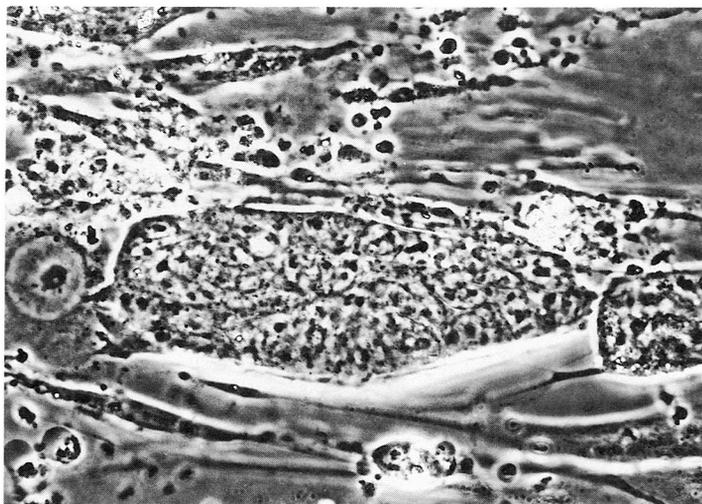


図2. mdx マウス由来胚幹細胞株

胞に導入し、核が標識化された細胞株を単離した(図3)。核だけを標識することにより、いくつかの組織の細胞質で発現している内在性 β -ガラクトシダーゼとの区別が可能となり、組織レベルでのmdx細胞の追跡に有効な実験系を構築することが可能となった。

胚幹細胞を用いたGene targeting技術の確立

マウスの細胞に導入された外来遺伝子は、多くの場合宿主細胞のゲノムの不特定の位置にランダムに組み込まれる。しかし、導入遺伝子と宿主ゲノムに相同性がある場合、低い確率ではあるが相同な遺伝子間で交換反応が生じることが知られている(相同組み換え, homologous recombination)。マウス胚幹細胞で相同組み換え反応を利用することにより、染色体上の特定の遺伝子を選択的に破壊した動物個体を得ることが可能であり、Gene targetingと呼ばれている。この手法は、遺伝子の機能解析や劣性遺伝性疾患のモデル動物の作成に有力な手法として注目されている。我々は、この手法を筋ジストロフィーの解明や筋発生過程の解析に利用するための第一歩として、名古屋大学グループとの共同研究によりマウスのN-myc遺伝子を破壊したマウス個体を作成することを試み

た。

[方法] N-myc 遺伝子のプロモーターを除き、さらにそのエクソンの一部をネオマイシン耐性遺伝子と置き換えた遺伝子断片を作成し(図4)、電気穿孔法により胚幹細胞株に導入した。これらの細胞をネオマイシン存在下で培養することにより、相同組み換えにより宿主染色体上のN-myc 遺伝子が導入遺伝子と交換した細胞(ネオマイシン耐性遺伝子を発現する)だけを選択的に単離することができる。この方法により65の胚幹細胞株を単離した。相同組み換えが生じていることの確認にはサザンハイブリゼーション法を用いた。これらの細胞を、マウス胚に注入しキメラマウスを作成した。誕生したキメラマウスをB6C3HF₁ マウスと交配した。誕生したマウス(F₁) 同士を交配し、N-myc 遺伝子を欠損した動物個体を作成した。

[相同組み換えによりN-myc 遺伝子の欠損下マウス個体の作成]

1. ネオマイシン存在下で選択された65の胚幹細胞株のうち約半数の32株のクローンで相同組み換えが生じていることが確認された。
2. これらの細胞クローンを用いてキメラマウスを作成した。誕生したキメラマウスを野生型マウス(B6C3HF₁)と交配し、3匹のキメラマウス

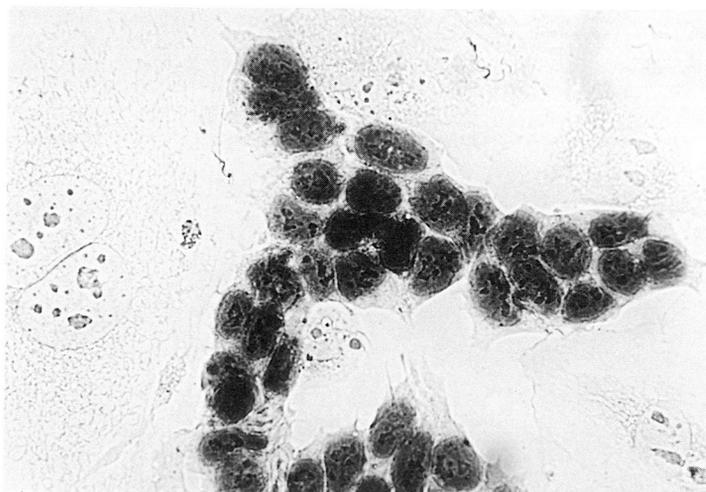


図3. 標識された胚幹細胞株

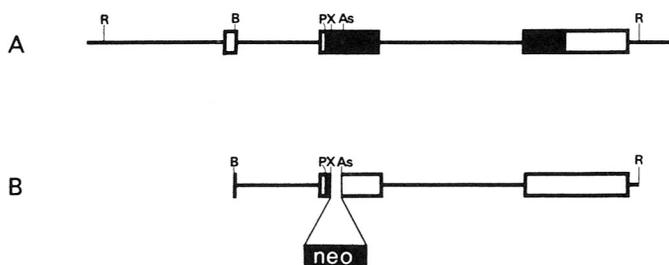


図4. マウス N-myc 遺伝子の Gene targeting

A) マウス N-myc 遺伝子の模式図

B) N-myc 遺伝子破壊のためのターゲティングベクター

において生殖細胞キメラであることが確認された。これらのキメラマウスの子孫(F₁)同士を交配し、N-myc 遺伝子が欠損したマウスを作成した。

3. この結果から Gene targeting 技術を確立することができたと考えられる。

考 察

本研究により樹立された mdx マウス由来胚幹細胞株は、ジストロフィン遺伝子を欠損した発生的多能性細胞株である。この細胞株の核が LacZ 活性により特異的に染色されるようにデザインされた標識遺伝子を導入した細胞株を得た。これらの標識化された mdx 胚幹細胞株を用いてキメラマウ

スを作成することによりジストロフィン遺伝子の機能や発現を今後解析する予定である。また、胚幹細胞を用いた実験系のうち最も有力な手法の一つである Gene targeting 技術を確立することにも成功した。現在、この手法を用いて筋形成に参与する遺伝子の機能解析のための共同実験が進行中である。Gene targeting 技術は、ヒトの遺伝性難治疾患の多くを占める劣性遺伝疾患のモデル動物を人為的に作成することが可能な現在唯一の実験系と思われる。本年度の研究をもとに、筋ジストロフィーのような劣性遺伝性疾患のモデル動物作成のための実験系の確立に向けて今後研究を進める予定である。

2 指 - 1 筋ジストロフィーの発症に関する細胞生物学的基礎研究

氏 名	所 属	住 所
主任 小沢鉄二郎	国立精神・神経センター神経研究所	187 小平市小川東町4-1-1 0423(46)1720
運営 幹事 真崎 知生	京都大学医学部	606 京都市左京区吉田近衛町 075(753)4391
幹事 鍋島 陽一	国立精神・神経センター神経研究所	187 小平市小川東町4-1-1 0423(41)2711
監事 勝沼 信彦	徳島大学酵素科学研究センター	770 徳島市蔵本町3 0886(31)3111
分担 飯野 正光	東京大学医学部	113 文京区本郷7-3-1 03(3812)2111
" 石川 春律	群馬大学医学部	371 前橋市昭和町3-39-22 0272(31)7221
" 遠藤 剛	千葉大学理学部	260 千葉市弥生町1-33 0472(51)1111
" 大日方 昂	千葉大学理学部	260 千葉市弥生町1-33 0472(51)1111
" 木村 穰	東海大学医学部	259 伊勢原市望星台 -11 0463(93)1121
" 熊本 俊秀	熊本大学医学部	860 熊本市本荘1-1-1 096(344)2111
" 桑山 秀人	帯広畜産大学	080 帯広市稲田町 0155(48)5111
" 小浜 一弘	群馬大学医学部	370 前橋市昭和町3-39-22 0272(31)7221
" 小宮山政敏	千葉大学医学部	280 千葉市亥鼻1-8-1 0472(22)7171
" 鈴木 紘一	東京都臨床医学総合研究所	113 文京区本駒込3-18-22 03(3823)2101
" 花岡 和則	国立精神・神経センター神経研究所	187 小平市小川東町4-1-1 0423(41)2711
" 広川 信隆	東京大学医学部	113 文京区本郷7-3-1 03(3812)2111
" 松田 良一	東京大学教養学部	153 目黒区駒場3-8-1 03(3467)1171

氏 名	所 属	住 所
分担 丸山 工作	千葉大学理学部	260 千葉市弥生町1-33 0472(51)1111
" 三品 昌美	新潟大学脳研究所	951 新潟市旭町通1-757 025(223)6161
" 桃井 隆	国立精神・神経センター神経研究所	187 小平市小川東町4-1-1 0423(41)2711
" 山下 茂	東京大学医学部	113 文京区本郷7-3-1 03(3812)2111
顧問 江橋 節郎	岡崎国立共同研究機構長	444 岡崎市明大寺町字西郷中 0564(53)7345
山田 圭津	国立精神・神経センター神経研究所 ・機能研究部	187 小平市小川東町4-1-1 0423(41)2711