

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

