

学位論文題名

The studies on the development of skeletal muscle cells.

— The assembly of Z bands during myofibrillogenesis
in skeletal muscle cells —

学位論文内容の要旨

動物性タンパク質の主要な供給源である食肉を効率的に生産するためには、食肉の主体である骨格筋の発達を人為的に促進させることが一つの方法であり、そのためには骨格筋の形成及び成長のメカニズムの解明が必要である。骨格筋の主体は筋原線維であり、筋原線維は各種構成タンパク質により高度に組織化され筋収縮の基本単位であるサルコメアによって構築されている。そのため骨格筋形成機構を明らかにするにはサルコメア構造の形成機構を理解する必要がある。そこで本論文においては隣り合うサルコメアを連結することにより筋原線維の連続した構造を構築している Z 線に着目し、培養骨格筋細胞を用いた免疫蛍光抗体法および遺伝子工学的手法により、Z線を構成するタンパク質がサルコメア構造に組み込まれていく過程を追究することにより、筋原線維形成機構の解明のための知見を得ることを目的とした。得られた結果は以下の通りである。

(1) 培養筋細胞における Z 線およびサルコメアの形成

間接蛍光抗体法および電子顕微鏡観察によって鶏胸筋由来の初代筋細胞におけるサルコメアの形成過程を追究した。サルコメア形成過程においてミオシンを中心とした太いフィラメントおよび Z 線と細いフィラメントの前駆体である I-Z-I body はそれぞれ別々に形成され、その後両者が粗合わさることによりサルコメアが形成されることを確認した。また 5 つの主要な Z 線構成タンパク質がすべて筋形成初期の段階で複合体を形成していた。筋形成の初期段階では I-Z-I body の中心部分すなわち Z 線前駆体は形態学的に不均一な大きさ (0.2~0.8 μm) を示すが、筋形成の進行に伴い幅 ~0.1 μm の均一の成熟 Z 線となってサルコメア構造に組み込まれた。これらの事実は、筋形成の初期段階において複合体を形成した Z 線構成タンパク質は、サルコメアの形成過程において成熟した Z 線に再構築されることを示している。

(2) Z 線構成タンパク質変異体の培養骨格筋細胞における発現

アルファアクチニン、タイチンの N 端およびネプリンの C 端は Z 線の主要な構成タンパク質である。これらの Z 線構成タンパク質が Z 線に組み込まれるためにはそれぞれのタンパク質の特定領域が重要であると考えられる。そこで、各タンパク質のいずれの領域が重要なのかを明らかにするために上記 3 種類の構成タンパク質のいくつかの特定領域からなるミュータントタンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させるという方法を開発し、その局在様式と Z 線構造を観察することにより発現させたミュータントタンパク質すなわち各タンパク質の特定領域が筋原線維形成にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。

1) アルファアクチニン

アクチン結合領域(ABD)、二量体形成に必要な4個のスペクトリン様繰り返し構造(4Spr)、およびタイチン結合領域の3種の特定領域からなるアルファアクチニンはZ線を構成する主要なタンパク質である。アルファアクチニン分子の特定領域から構成される5種類のMYC標識ミュータントタンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させた。ミュータントタンパク質はアルファアクチニン分子が本来もつべき特定領域のいずれかが欠損しているために、これを発現した筋細胞ではサルコメアは異常な構造を示すこと、あるいはサルコメアが形成されないことが予想されたが、いずれのミュータントタンパク質を発現させた場合も形態学的には正常なZ線を形成することが分かった。1あるいは2つの特定領域が欠損した場合でも、欠損された以外の領域においてアルファアクチニン以外のZ線構成タンパク質と結合可能なためミュータントタンパク質がZ線で発現したものと考えられる。

2) タイチン

タイチン分子は1分子でZ線からM線まで延びる巨大タンパク質で、そのN端はZ線に局在する。タイチンは他のZ線構成タンパク質であるアルファアクチニンと試験管内で結合することから、両者はZ線中で相互作用があると考えられている。Z線に局在するタイチン分子のN端部分には、そのアミノ酸配列に基づいた特徴的な繰り返し構造を有する。この繰り返し構造に基づいた特定領域からなる5種類のミュータントタンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させた。5種類のミュータントタンパク質のうちZ線に発現したものは1種類のみで、その際に形成されたサルコメアは形態的に正常であった。Z線に発現したミュータントタンパク質に含まれる特定領域は試験管内でアルファアクチニンと結合することが報告されていることを考慮すると、ミュータントタンパク質中のこの領域がZ線内に存在するアルファアクチニンと結合することによってZ線で発現したものと考えられる。

3) ネブリン

骨格筋のサルコメアにおいてネブリン1分子はZ線から細いフィラメントに沿って細いフィラメントの先端まで存在している。またネブリンは約35のアミノ酸残基からなるモジュールを約200個有するタンパク質である。Z線内部に局在するネブリンC端は9個のモジュール、セリン残基を多く含む領域(Ser)およびSH3領域で構成されている。ネブリンは最大の分子量をもつアクチン結合タンパク質で試験管内における結合実験から1個のモジュールがアクチン1分子と結合することが報告されている。Z線付近の特定領域からなるMYC標識した8個のミュータントタンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させた。4個のミュータントタンパク質が選択的にZ線に組み込まれ、ネブリンがZ線に組み込まれるには特定領域が必要であることがわかった。また、ネブリンは代表的なアクチン結合タンパク質であるのにも関わらず、試験されたミュータントタンパク質で細いフィラメント上に発現をするものはなかった。

1)、2)および3)の結果から、Z線は構成タンパク質が平面的に密接に結合した堅牢な集合体であるという従来の考えとは異なり、各Z線構成タンパク質と他の構成タンパク質との結合部位は互いに飽和されておらず、外因性のタンパク質が結合しうるゆとりを持った構造であることが示唆された。

以上の結果から、筋原線維形成過程において、サルコメアを構成する太いフィラメント、および細いフィラメントとZ線から構成されるI-Z-Iバンドはそれぞれ独立に形成された後、サルコメアとして組み込まれること、Z線構成タンパク質は筋原線維形成の初期段階に複合体を形成した後その成熟過程で再構築されることが明らかになった。また、Z線構成タンパク質はそれぞれ特徴的な構造をもつ特定領域を有するが、いずれのタンパク質の場合も限定された特定領域がZ線の形成に排他的に重要であるという結果は得られなかった。これらの知見は、筋原線維の形成機構を解明する上で多くの情報を提供するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	服部	昭仁
副査	教授	近藤	敬治
副査	教授	島崎	敬一
副査	助教授	西邑	隆徳
副査	助教授	松田	良一

(東京大学大学院総合文化研究科)

学位論文題名

The studies on the development of skeletal muscle cells.

— The assembly of Z bands during myofibrillogenesis
in skeletal muscle cells —

本論文は、図 33、表 1、引用文献 121 を含み、7 章からなる総頁数 119 の英文論文であり、別に 4 編の参考論文が添えられている。

本論文は、動物性タンパク質の主要な供給源である食肉の主体である骨格筋の筋原線維形成機構の解明を目的として、筋原線維の連続した構造を構築している Z 線に着目し、培養骨格筋細胞を用いた免疫蛍光抗体法および遺伝子工学的手法により、Z 線を構成するタンパク質が筋原線維の基本単位であるサルコメア構造に組み込まれていく過程を追究した研究成果をとりまとめたものである。

得られた結果の概要は以下の通りである。

(1) 培養筋細胞における Z 線およびサルコメアの形成

鶏胸筋由来の初代筋細胞におけるサルコメアの形成過程を追究し、1) サルコメア形成過程においてミオシンを中心とした太いフィラメントおよび Z 線と細いフィラメントの前駆体である I-Z-I 構造はそれぞれ別々に形成され、その後両者が組合わさることによりサルコメアが形成されること、2) 5 つの主要な Z 線構成タンパク質がすべて筋形成初期の段階で複合体を形成し、筋形成の進行に伴い成熟 Z 線となってサルコメア構造に組み込まれることを示した。

(2) Z 線構成タンパク質変異体の培養骨格筋細胞における発現

- 1) Z線の主要な構成タンパク質であるアルファアクチニン分子の特定領域から構成される5種類の変異体タンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させた。いずれの変異体タンパク質を発現させた場合も形態学的には正常なZ線を形成した。
- 2) 1分子でZ線からM線まで延びる巨大タンパク質であるタイチンは、N端がZ線に局在する。タイチン分子のN端部分に存在する特徴的な繰り返し構造に基づいた特定領域からなる5種類の変異体タンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させたが、Z線に発現したものは1種類のみで、その際に形成されたサルコメアは形態的に正常であった。
- 3) Z線から細いフィラメントに沿って細いフィラメントの先端まで存在しているネブリンのC端はZ線を構成している。Z線付近の特定領域からなる8個の変異体タンパク質を鶏胸筋由来の初代筋細胞に発現させた。4個の変異体タンパク質が選択的にZ線に組み込まれ、ネブリンがZ線に組み込まれるには特定領域が必要であることがわかった。また、ネブリンは代表的なアクチン結合タンパク質であるのにも関わらず、試験された変異体タンパク質で細いフィラメント上に発現をするものはなかった。

1)、2) および3)の結果は、Z線は構成タンパク質が間隙なく密接に結合した堅牢な集合体であるという従来の考えとは異なり、各Z線構成タンパク質と他の構成タンパク質との結合部位は互いに飽和されておらず、外因性のタンパク質が結合しうるゆとりを持った構造であることを示している。

以上のように、本研究は、筋原線維形成過程における太いフィラメントとZ線と細いフィラメントの前駆体であるI-Z-I構造との関係を明らかにし、これまでいくつかのモデルが提案され未解決の課題であるサルコメア形成過程における構成タンパク質の集合機構の解明に大きな糸口を提供した。さらに、Z線の構造に関しても新たな実験事実に基づき従来の概念を否定する新たな構造を提案している。これらの知見は、骨格筋筋原線維の形成機構を解明する上で多くの情報を提供するものであり、学術上高く評価される。

よって、審査員一同は、尾嶋孝一が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。