

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋特異的に発現するカルパイン(p94)の生理機能に関する研究

指導教官 脊山 洋右 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成7年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

田川 一彦

序論

p94 (カルパイン 3) は骨格筋特異的に発現し、カルパインスーパーファミリーに属する。カルパインスーパーファミリーにおいて代表的なのは哺乳類 μ -、m-カルパインである。この2つのアイソザイムは Ca^{2+} により制御される細胞内システインプロテアーゼであり、組織普遍的な分布を示す。それぞれの分子は分子量約 80kDa の活性サブユニットと両者に共通である約 30kDa の調節サブユニットから構成されるヘテロ二量体である。p94 は全長にわたって μ -、m-カルパインの活性サブユニットと高い相同性を持ち、一方で特異的な3つの挿入配列 (NS、IS1、IS2) を有する。IS1、IS2 領域は自己消化あるいは自身の寿命に関与し、また IS2 領域は巨大筋タンパク質コネクチンへの結合部位となっているが、NS 領域についての機能は明らかではない。また μ -、m-カルパインの活性サブユニットとは異なり調節サブユニットとヘテロ二量体は構成しない。p94 は自己消化活性が高く、タンパク質として検出と精製することが困難である。

1995年に、p94 が肢帯型筋ジストロフィー 2A 型(LGMD2A)の責任遺伝子産物であることが報告された。筋ジストロフィーは骨格筋の筋線維の壊死と再生を主な筋病的所見とし、進行性の筋萎縮と筋力低下がみられる遺伝性疾患である。このうち LGMD は四肢近位と腰部部の筋力低下と筋萎縮を特徴とする。LGMD は様々な責任遺伝子による不均一な疾病群であるが、現在までに遺伝子座の違いにより 14 種類に分類されている。その筋病理所見の特徴は筋線維の壊死・再生、大小不同、肥大線維、分葉線維、分割線維である。この疾患群の一つである LGMD2A は常染色体劣性遺伝形式をとる。筋ジストロフィーにおいて、なぜ筋線維が壊死に陥るかはいまだ明らかとはされていないが、ジストロフィンとその複合体や関連タンパク質の発見により筋細胞膜に一次的あるいは二次的な原因があると考えられている。

本論文では、p94 の生理機能と LGMD2A の病態分子機構との関係を解明するために、活性中心アミノ酸残基である Cys-129 を Ser に置換した p94 のプロテアーゼ不活性型変異体 (p94:C129S) を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの表現型より p94 のプロテアーゼ活性という生理機能が失われた状態を明らかとしたい。また、LGMD2A の発症分子機構を研究していくためのモデル動物となり得るかを検討する。

結果

骨格筋を含む多くの組織で p94:C129S を発現する独立した 3 系統のトランスジェニック

[別紙 1]

マウス S21、S44、S62 系統を確立した。骨格筋で発現している外来性 p94:C129S タンパク質が内在性の野生型 p94 タンパク質とは区別できないためそれぞれの量は比較できなかったが、p94:C129S mRNA の量は S62 >> S44 ≥ S21 であった。また骨格筋で発現している p94:C129S mRNA の量は内在性の野生型 p94 mRNA と比較して一番多い S62 系統マウスで約 10%、S44 と S21 系統マウスで 1% 以下であった。C57BL/6CrSlc(B6)マウスと比較して p94:C129S トランスジェニックマウスは外見上の明らかな違いが観察されず、12 週齢まで体重も同程度であった。しかしながら、20 週齢以降 S62 系統マウスは B6 マウスより体重が増加していた。実際、解剖したときに S62 系統マウスは B6 マウスと比較して多くの脂肪組織が観察された。次に運動機能として握力を測定すると、p94:C129S mRNA の発現量の増加と加齢に依存して握力が低下していた。S21 系統マウスにおいてはごくわずかな減少であったが、S44 と S62 系統マウスでは有意な減少を示した。S62 系統マウスの体重増加については、その筋力の低下により B6 マウスより活動的でなくなり、脂肪組織の多い肥満な状態になったのではないかと考えられた。次に 106 週齢 S62 系統マウスの連続凍結切片による組織化学的な解析により、tubular aggregate 様構造、中心核、分葉線維、分割線維といったミオパチー様の異常を明らかに示した。特に中心核と分割線維は LGMD に特徴的な所見であり、分葉線維においては LGMD2A に特徴的な所見であった。しかしながら筋ジストロフィーを特徴づける壊死再生線維そのものは観察されなかった。このような筋病理所見は、同週齢の B6 マウスには観察されないか明らかにその程度が低かった。対照的に、40 週齢の S62 系統と B6 マウスの筋線維には前述のミオパチー様の筋病理所見をはじめとして異常は認められなかった。最後にこの 106 週齢 S62 系統の骨格筋には p94:C129S タンパク質が蓄積していることが強く示唆された。

考察

p94 の機能における以前の知見とこの研究における結果より、LGMD2A の病態分子機構に関して以下のように考察した。

(1)p94:C129S の発現がミオパチー様表現型を引き起こすことは、他の因子あるいは遺伝子が LGMD2A に関連している可能性はあるが、p94 タンパク質自身、特にそのプロテアーゼ活性の欠失あるいは低下が LGMD2A における症状の原因である。

(2)加齢した p94:C129S トランスジェニックマウスマウスの骨格筋において p94:C129S が蓄積していた理由については次のように考察する。p94:C129S タンパク質のターンオーバーは野生型 p94 より遅い。結果としてコネクチンに結合している p94:C129S タンパク質は時間とともにゆっくりと増加し、ついには野生型 p94 に対して優勢となると考えられる。一方でコネクチンと結合している p94 だけが骨格筋中で安定に存在できる状態を保っていると考えられるため、コネクチンから解離している野生型 p94 と p94:C129S は急激に自己消化されるか野生型 p94 および他のプロテアーゼのいずれかあるいは両方によりプロテオリシスされると考えられる。つまり p94:C129S タンパク質の優勢化と p94 タンパク質の全体量の恒常性により p94:C129S が蓄積したと考えられる。また、p94 の急激な自己消化活性は、この p94 タンパク質の量（分子数）を限定する機構の重要な部分であると考えられる。

(3) LGMD2A が常染色体劣性遺伝形式であるにもかかわらず、野生型 p94 を発現している

[別紙 1]

p94:C129S-トランスジェニックマウスが機能獲得的な表現型を示したということは見かけ上矛盾している。この点については以下のように説明する。

三次構造を変化させることなくプロテアーゼ活性のみを完全に不活性化していると考えられる p94:C129S の変異は LGM2A においていまだ見いだされてはいない。高次構造が保たれている p94:C129S は一見“正常な”タンパク質として振る舞い、このため細胞の分解系から逃れたと考えられる。その結果として、p94:C129S タンパク質が蓄積し、時間経過に従い野生型 p94 タンパク質と比較して p94:C129S の優勢さがおき、p94 のプロテオリシス活性という観点からみたときにドミナントネガティブな状態へ移行していると考えられる。このように p94:C129S は他の LGMD2A の変異と比較して異なる性質もっている可能性がある。

p94:C129S の発現はプロモータが異なるため空間時間的に発現形式が内在性の p94 遺伝子とは異なると考えられる。そのため発生あるいは発育の初期段階の野生型 p94 遺伝子の発現は非常に低いのでその時点での p94:C129S の発現が優勢であるかもしれない。このように、発生初期段階の p94:C129S タンパク質の優勢さが骨格筋のその後の分化と成長に影響を及ぼすかもしれない。また、成体の筋線維ではそのタイプに依存して野生型の p94 の発現が変化している。この場合骨格筋全体において p94:C129S mRNA の総量は野生型より少ないが、野生型 p94 を非常に少量発現している筋線維では p94:C129S mRNA が優勢に発現しているかもしれない。異常はこれらの筋線維にのみ現れて、その結果骨格筋全体では穏やかな機能不全となるかもしれない。

(4)プロテアーゼの不活性化がタンパク質分解を含む筋肉の壊死を引き起こすことは珍しい事象と考えられる。DMD や他の筋ジストロフィーにおいては、ジストロフィン、サルコグリカン群あるいは他の骨格筋の構造タンパク質が欠損し、筋細胞膜の構造が不安定化する。そして引き起こされた Ca^{2+} 濃度の上昇により μ -、m-カルパインが活性化し、壊死に至る。しかしながら、LGMD2A においては p94 の活性の欠失あるいは低下が最終的に LGMD2A を引き起こす。これは既存の筋ジストロフィー発症過程を説明する場合における μ -、m-カルパインの作用とは逆の考え方である。カルパインの活性が低下すると標的となるタンパク質が不安定化するという同様の事象が *Saccharomyces cerevisiae* のカルパイン様システインプロテアーゼをコードする *CPL1* にみいだされる。ひとつの仮説は、p94 が筋線維の壊死に関連したプロテアーゼあるいはプロテアーゼの活性化因子を不活性化しているということである。このように、p94 と *Cpl1p* は細胞内のプロテオリシスを制御している新しいタイプのプロテアーゼであると考えられる。

p94 (カルパイン 3) の分子レベルにおける生理機能に関する情報はまだまだ少なく、LGMD2A の病態分子機構についても未解決である。今回の p94:C129S-トランスジェニックマウスの研究によって、p94 プロテアーゼ活性と LGMD2A 様表現型の関係は証明された。今後は p94 がいつ、どこで、どのようなシグナルを受け、何を基質としているかという点を解決していく必要がある。まず最初は p94 の生理的な基質に関して研究を進めて行くべきであると考えている。また、この p94 の機能としてはタンパク質代謝的なプロテオリシスというよりシグナル伝達の系として考えるべきであろう。基質の解析とともに p94 を解離させるシグナルについての研究も大変興味あるところである。