

論文審査の結果の要旨

論文題目：「骨格筋の機械的刺激応答機構に関する研究」

論文提出者氏名 桜井 隆史

この論文は、可塑性が高く、機械的刺激依存的に適応変化している骨格筋研究においては盲点となっているともいえる形態構築・張力伝達に必要な細胞骨格と、適応の鍵分子である“タンパク質の一生”を世話する分子シャペロン（ストレスタンパク質）の二大タンパク質基幹システムに焦点をあて、現代の細胞生物学から張力を発揮する機能をもち個体の移動（運動）を担い続ける骨格筋の“ダイナミックに適応変化する細胞”としての基本的特性を明らかにしたものである。“使用性肥大・廃用性萎縮”の機能と構造が見事に一致した骨格筋の時々刻々と変化適応するメカニズムの細胞生物学的基盤に取り組んだともいえる。骨格筋といえば、収縮して張力を発揮し動物の移動に欠くことができない器官である。しかしミオシンとアクチンだけでは両者の間にスライディングは起こるが、実はそれだけでは一定方向に力を取り出すことができない。これまでの骨格筋の研究では、張力の測定には必ず張力を取り出す測定者の手と張力発揮の支点が必須であるが、それを積極的に考慮した研究は見いだされない。両者とも実験システムの中に組み入れているもののそれらを評価することはなく、顕在化させていず、ミオシン-アクチンの相互作用のブラウン運動的側面のみが評価されたまま骨格筋特有の特異的な高度な構造化に対する研究が顕著に遅れたままになっている。人間の活動を生み出している高度に適応可能な身体が無視されたまま脳機能だけが一人歩きしているのと類似した感がある。そもそも骨格筋の主要な機能＝張力発揮は、筋原線維を束ね配向化しかつ力学的支点到に連結しなければ顕れない。それらはすべて細胞骨格とそれと連携する接着斑をつくるタンパク質システムが生み出したものである。

いまや細胞骨格系は細胞システムの基幹システムとしてあるだけでなく、遺伝子発現にいたるシグナル分子カスケードも細胞骨格依存的に機能していることが分かりつつある。“Stretching is good for a cell”と題した論文において“The shape is the thing”。“形そのものが意味がある”(Science, 1997)とレビューしたのは細胞外マトリクス研究の第一人者 Ruoslahti である。細胞は二次元・三次元構造により細胞システムを稼働させて生きている。基盤からの解離は細胞死を起こす。上述した力発揮の支点和び張力の伝達構造なくしては、つまり領域依存的にオーガナイズされている細胞という社会が大混乱に陥るわけである。機械的刺激や運動の有無は、細胞の基幹構造それ自体の生存基盤そのものに対する深刻な影響を与える問題であるともいえる。

細胞骨格の研究も分子シャペロンの研究も骨格筋の研究に比べると新しい。分子シャペロンはタンパク質の一生をお世話するタンパク質である。したがって分子シャペロンの発現の高い組織や細胞は、タンパク質のターンオーバーが早いと考えられる。これまでの骨格筋に関する適応の研究は、遅筋が活動の性質依存性に高い適応能をもつことが示されているが、その分子機序は不明であった。高い適応能とは、細胞や組織が安定化していることではなく、ダイナミックに活動している状態を維持し続けられるということであることが明らかになりつつある。つまり分子シャペロンがタンパク質のターンオーバーのケアをし続けることが、細胞が活性化していることであるともいえる。HSP70 や HSP90、本論文で研究対象としている α B-crystallin を含む低分子量ストレスタンパク質 (sHSPs) の仲間も骨格筋のうちでは抗重力筋 (遅筋) で多く発現している。HSP70 等は他の組織の細胞とどのように新生タンパク質のフォールディングに関与しているのかもしれない。しかし sHSPs は骨格筋、とくに遅筋では全てのアイソフォームが発現しているが、その意味はいまだに分かっていない。

本博士論文の科学的意義は以下の4点である。1) 細胞の基幹構造細胞骨格の一つである tubulin/microtubules システムが筋の活動状態によりタンパク質レベルで減少することを世界で初めて示した。2) その tubulin/microtubules の分子シャペロンであると考えられる α B-crystallin との骨格筋内相互作用の可能性を示した。3) 骨格筋の有効な *in vitro* 解析モデルを提示した。4) 3) のモデルを用いて筋の萎縮時にプロテアソーム活性が上昇する示唆的なデータを示した。順に注目すべき点をあげる。

1) はきわめて重要なデータである。この論文で用いている後肢懸垂法は重力解除で、後肢懸垂時との比較値 (対照群) は地球上で動いて活動している基底状態の代謝活動を反映している。適応の研究として行われているモデルは対照をどこにとるかがつねに問題となるが、その意味では重力場で進化してきた動物の移動に対してより本質的な現象をみているといえる。Tubulin はタンパク質量では変化が見られたが遺伝子発現レベルでは調節されていないことが示された。これは生物が「現場での活動」ベースでシステム制御を行っていることの実例であり、今後生体现象を解析する上でのきわめて重要な視点を提供しており、それが評価されて FASEB J に掲載された。アクチンや中間径フィラメントについても今後調べると、3つの細胞骨格のタンパク質及び mRNA レベルでの制御システムの差異を示すことができるだろう。

2) に関しては、免疫沈降も含めて生化学的方法で細胞骨格チューブリンと sHSPs 及びアクチンとの相互作用がある可能性を示した。これについてはまだ今後条件を検討すると詳細な分子シャペロン機構が明らかになる可能性がある。しかし tubulin タンパク質は骨格筋では全タンパク質量に比べて少なくまた抗体の感度が低く、心筋で微小管とフリーフォ

ームを分けてダイナミクスを解析していたが努力したものの骨格筋ではできなかったのは残念であった。

3) に関しては、心筋細胞や血管内皮細胞での培養細胞を用いた機械的刺激の研究が進む中で骨格筋は分化後融合し長い筋管を形成することで大きな張力を発揮し(自発興奮)基盤から解離して生存させておくことができない。それが災いして培養細胞を用いた成熟筋管での機械的刺激に対する研究が遅れている。本研究で用いた In vitro での組織培養は、個体での循環系や内分泌系などの筋細胞以外の要因をのぞいた研究モデルとして今後さらに方法を緻密化することで研究モデルとして有効利用できる可能性を示した。

4) 最後にこの in vitro モデルを用いた短縮筋で 20S プロテアソーム酵素活性が上昇したことの意味や背景はまだ今後検討してゆく必要があるが、心筋での活性と同様の傾向を示したことから、その生理学的意味付けを今後追求する価値を示した。今後の発展的研究が期待される

以上のように本研究は細胞の基幹システムである細胞骨格とダイナミクスの指標となる分子シャペロン・ α B-crystallin をマーカーにして機械刺激対応につくられている骨格筋の適応の基盤にとって重要な現象を明らかにし、今後の有効な研究モデルを提示した。したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。