

22) 筋ジストロフィー症の筋構造蛋白の変性と Ca⁺⁺ プロテアーゼ

杉 田 秀 夫*

研究協力者 清 水 輝 夫* 石 浦 章 一**
片 本 哲 郎** 鈴 木 宏 一**

はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症(DMD) と言う疾患は筋萎縮即ち筋構造蛋白が進行性に減少する疾患である。DMD罹患筋の筋構造蛋白の特徴として、ミオシンのheavy chain の異常と共に早期の変化としてトロポニン(TN) 亜分画のうちTN-I, TN-Cが著しく減少し、TN-Tが相対的に残存する事が注目されている。かかるDMDにおける筋構造蛋白の変化に対しては何らかのプロテアーゼが関与している事が想像され、正常サルグリセリン筋にトリプシンを作用させた後筋構造蛋白を抽出するとかなりDMD筋の場合に類似した変化を作成出来る事が明らかとなった¹⁾。この事はDMDにおける筋構造蛋白の変性に何らかの蛋白分解酵素が関与している事を示唆している。現在DMDにおける筋構造蛋白の変性に重要な役割をはたしていると考えられる蛋白分解酵素は2つあり、1つはserine protease (勝沼)²⁾であり、他の1つはCa依存性中性プロテアーゼ(CANP)である。

本研究の目的はCANPの骨格筋に対する蛋白分解作用、CANP抗体によるCANPの種特異性、並びに筋細胞内局在について検索

し、更に生検筋材料を用いてCANPの微量定量法を開発する事にある。

1) CANPの筋構造蛋白分解作用

実験にはニワトリから抽出したCANPを用いた³⁾。

このCANPは分子量80,000のモノマーでありSDSゲル電気泳動上単一である。サルグリセリン筋をホモゲナイズし可溶性蛋白を除去した後、3mM Ca⁺⁺存在下で20γ/mgの割合にCANPを加え30℃、30分間反応させた後遠沈し上清、沈澱に分け、沈澱を用いてTNをnative tropomyosinの形で抽出し、SDSゲル電気泳動で調べてみると図1に示される様にTN-I, TN-Cは著明に減少したがTN-Tは相対的に良く残存していた。

このパターンはトリプシンの場合と本質的に同じであり同時にDMDの場合と同じである。

次に上清をslab gelで調べてみるとZ帯に存在するα-アクチニン、及び10S-アクチニンと同じ易動度の蛋白が同定された。更に此等の蛋白をOuchterlony法で同定してみると図2に示される様にα-アクチニン、10S-アクチニン、及びトロポミオシンが存在する事が明らかになった。

筋原センイにCa⁺⁺存在下でCANPを加えるとZ帯が消化される事はすでにBusch⁴⁾、

* 東京大学医学部脳研究所神経内科

** 東京大学医学部第二生化学

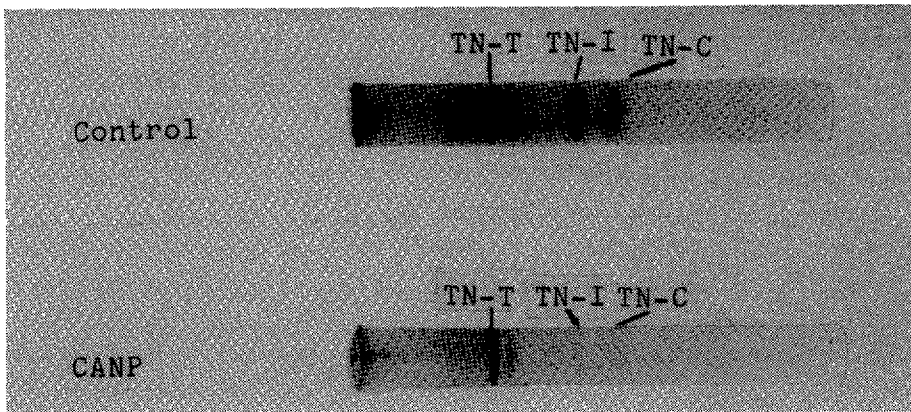


図1 SDS gel electrophoretic pattern of Troponin pretreated with CANP

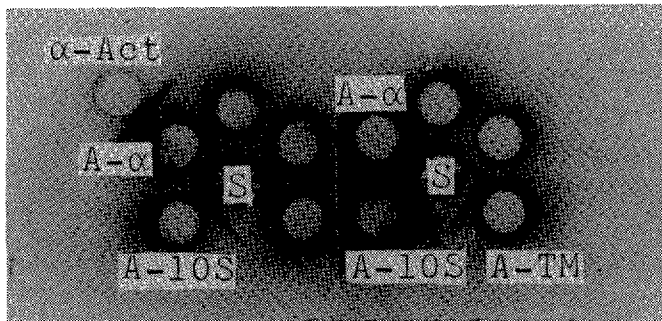


図2 Control CANP

Dayton⁵⁾らによって報告されており我々もこの事実を確認している。

抽出された各筋構造蛋白のCANPに対する感受性に関してはミオシンはCANPに対して抵抗性があり、この点が勝沼らのserine proteaseと著しく異なる点である。TNは感受性が強いが抽出されたTNに作用させるとTN-T, TN-Iが消化され易く、TN-Cはresistantである。この点は筋肉にCANPを作用させた後TNを抽出した場合と著しく異なる点でありこの理由はTN-Tは本来感受性が強いがin vivoではトロポミオシンと結合している為に相対的にCANPにresistantになった為と考えられる。

従ってin vivoではまずTN-Tがdigestされ、その為にTN-IとTN-Cとの結合がはずれ、TN-Cは遊離し、その結果としてDM Dにみられる様なパターンが出現するものと想定出来る。

2) CANPの免疫学的検索

a) CANPの種特異性

Daytonらがブタから純化したCANPは分子量110,000でありSDSゲル電気泳動で80,000と30,000のモノマーからなるダイマー酵素である。今堀らがニワトリから抽出したCANPは分子量80,000のモノマー酵素であり(又、サルから抽出されたものは80,000と60,

000のモノマーからなり) 種による差が認められる。

そこでこの問題を免疫学的に検索した。

まずニワトリから抽出したCANPをFreundの complete adjuvant と共に 2 週間間隔で 2 回家兎に反復注射し、抗ニワトリ CANP 抗体を作成した。

同様の操作でサルより抽出した CANP を用いて抗サル CANP 抗体を作成した。

免疫電気泳動では抗ニワトリ CANP 抗体はニワトリ CANP 及びサル CANP に対して沈降線を示した。一方サル CANP 抗体を用いた場合にはニワトリ CANP とは沈降線を示さなかった (図 3)。

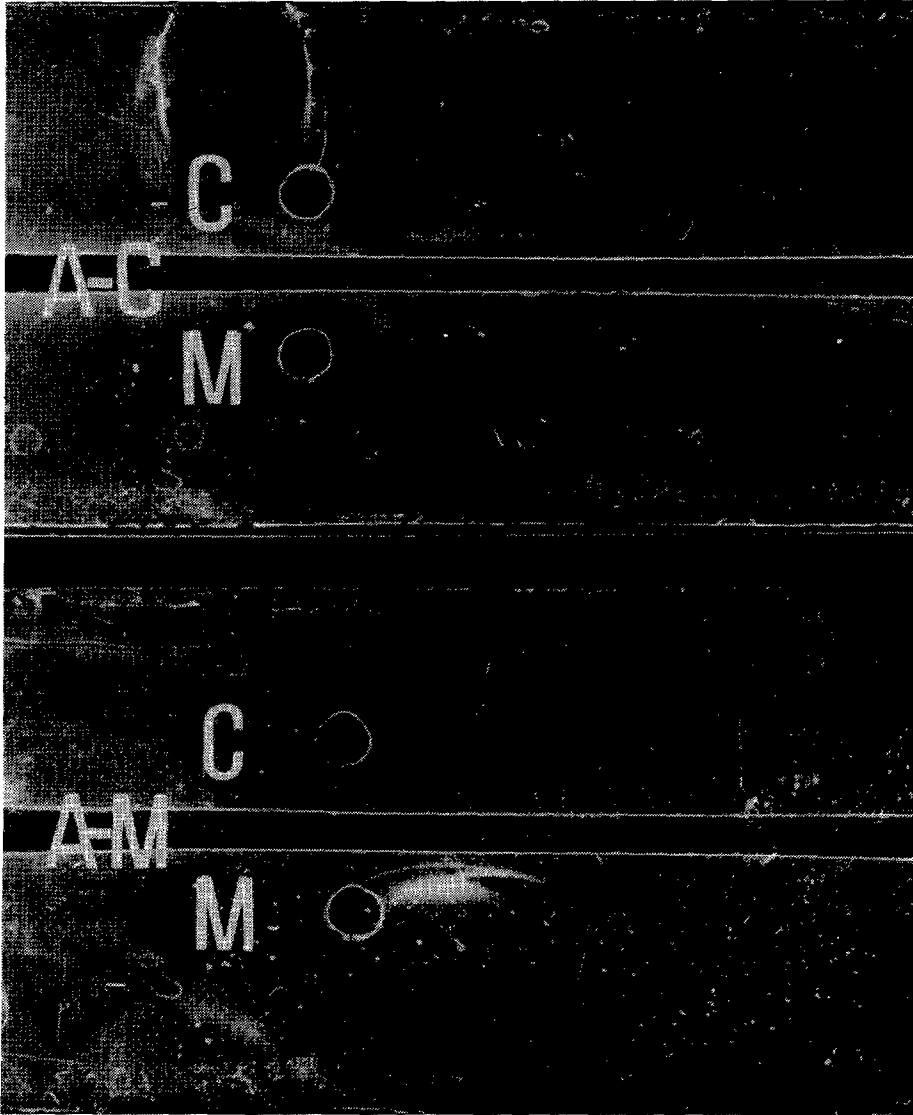


図 3 A-C: 抗ニワトリ CANP 抗体
A-M: 抗サル CANP 抗体
C: ニワトリ CANP
M: サル CANP

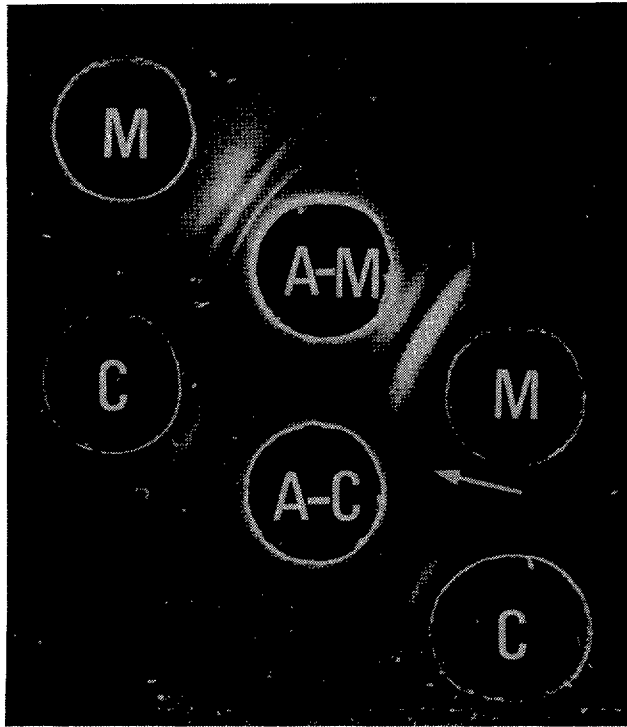


図4 略号は図3と同じ
矢印はサル及びチキン CANP に対する共通沈降線

Ouchterlony 法で調べてみるとサル及びニワトリ CANP は共に各々の抗体と 3本の沈降線を示した。そして図4に示されるようにその内の1本は共通の沈降線である事がわかった。

サルの CANP は分子量80,000と60,000のダイマーでありニワトリの場合80,000のモノマーであるからこの共通沈降線は80,000に対する沈降線と考えると理解し易い。今後この点を更に明らかにする必要がある。

b) CANP の筋細胞内局在

次に抗ニワトリ CANP 血清より γ -グロブリンを抽出し FITC をラベルし骨格筋クリオスタット切片を用いて筋細胞内局在について検索した。

ニワトリ骨格筋のクリオスタット切片に F

ITC をラベルした抗 CANP 抗体を作用させてみたが全く染色されなかった。この事は CANP が極めて微量の為に同定されないのか、又は CANP は筋細胞内のオルガネラと結合していない為に洗滌時 wash out される可能性がある。Dayton らは生化学的に CANP の筋細胞内の局在としてサルコプラスムである事を報告しており我々の結果もこの事と矛盾しない。

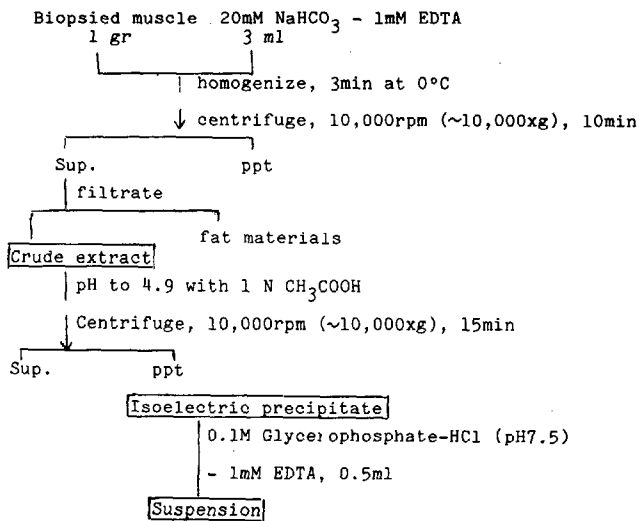
3) 生検筋を用いた CANP の微量定量法

CANP が DMD における筋構造蛋白の変性に関与しているか否かを調べる為には生検材料を用いて CANP の微量定量法を確立する必要がある。骨格筋には protein inhibitor が内在しているので骨格筋ホモジェネートを用いた場合活性は殆ど測定出来ない。従って prote-

in inhibitor をはずした後測定する必要がある。もう一つの問題点は基質である。我々はアルカリカゼインを使用しているが感度を良

くするには合成基質が望ましいが現在迄適当なものはない。そこで我々は図5が示す様に骨格筋ホモジェネートの遠沈上

I. Preparation of the material



II. Assay method

0.1M Glycerophosphate-HCl, pH 7.5	406μl
1M CaCl ₂	3μl
β-mercaptoethanol	1μl
30mg/ml Alkali-denatured casein	40μl
+	
Suspension	50μl
incubation at 30°C, 30min	
0.5ml, 10% TCA, 4°C, 1hr.	
centrifuge at 3,000rpm, 5min	
Sup. ΔOD280	

CANP activity of control muscle

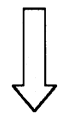
	ΔOD280	protein mg/ml
A	0.033	49.0
B	0.022	32.0
C	0.024	24.0
D	0.005	29.9

図5 Method of the determination of CANP activity

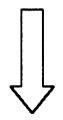
清を pH4.9 とし, protein inhibitor を上清に, CANP を沈澱させ, この沈澱を 0.1M Glycerophosphate-HCl (pH7.5), 1mM EDTA に溶解し, 粗 CANP を抽出する. この suspension を用い 6 mM Ca^{++} 存在下で CANP 活性を測定出来る事がわかった. 正常筋 4 検体の平均値は ΔOD_{280} で 0.021 であり, 今後 DMD 筋について活性を測定する予定である.

文 献

- 1) H. Sugita and Y. Toyokura :
Alteration of troponin subunits in progressive muscular dystrophy (DMP) I . II . Proc. Japan Acad. 52 : 256-263, 1976.
- 2) 勝沼信彦, 真田幸弘: 筋ジストロフィーとセリン性蛋白分解酵素. 日本臨床, 35 : 20-27, 1977.
- 3) 石浦章一, 今堀和友: 筋カルシウム依存性蛋白分解酵素とその抑制物質について. 日本臨床, 35 : 28-32, 1977.
- 4) W. A. Busch, M. H. Stromer, D. E. Goll and A. Suzuki : Ca^{2+} -specific removal of Z-lines from rabbit skeletal muscle. J. Cell Biol. 52 : 367-381, 1972.
- 5) W. R. Dayton, D. E. Goll, M. G. Zuce, R. M. Robson and W. J. Reville : A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. Biochemistry. 15 : 2150-2158, 1976.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症(DMD)と言う疾患は筋萎縮即ち筋構造蛋白が進行性に減少する疾患である.DMD 罹患筋の筋構造蛋白の特徴として,ミオシンの heavy chain の異常と共に早期の変化としてトロポニン(TN)亜分画のうち TN-I, TN-C が著しく減少し, TN-T が相対的に残存する事が注目されている.かかる DMD における筋構造蛋白の変化に対しては何らかのプロテアーゼが関与している事が想像され,正常サルグリセリン筋にトリプシンを作用させた後筋構造蛋白を抽出するとかなり DMD 筋の場合に類似した変化を作成出来る事が明らかとなった 1).この事は DMD における筋構造蛋白の変性に何らかの蛋白分解酵素が関与している事を示唆している.現在 DMD における筋構造蛋白の変性に重要な役割をはたしていると考えられる蛋白分解酵素は2つあり,1つはserine protease(勝沼)2)であり,他の1つはCa依存性中性プロテアーゼ(CANP)である.