

氏名(本籍)	えん 遠	どう 藤	たけし 剛	(千葉県)
学位の種類	医学博士			
学位記番号	博甲第240号			
学位授与年月日	昭和59年3月24日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	医学研究科 生化系専攻			
学位論文題目	Molecular Properties and Functions in Vitro of Chicken Smooth-Muscle α-Actinin in Comparison with Those of Striated-Muscle α-Actinins (ニワトリ平滑筋 α -アクチニンのin vitroでの分子特性と機能, 横紋筋 α -アクチニンと比較して)			
主査	筑波大学教授	医学博士	田村	昇
副査	筑波大学教授	医学博士	河野	邦雄
副査	筑波大学教授	医学博士	大菅	俊明
副査	筑波大学教授	医学博士	杉田	良樹
副査	筑波大学教授	医学博士	浜口	秀夫

論文の要旨

α -アクチニンは骨格筋の構造タンパク質として発見され、筋原線維のZ帯を構造する主要なタンパク質であることが知られている。このタンパク質は心筋ではZ帯とintercalated discsに、平滑筋では細胞質内の濃密体と細胞膜に結合した濃密斑に存在している。さらにいくつかの非筋細胞や組織からも単離されている。 α -アクチニンの生体内での機能についてはまだ確立されていないが、上記の局在部位から、Z帯、intercalated discs、濃密体、あるいは濃密斑の微細構造の構成に関与しているのではないかと考えられている。

著者は、Z帯やintercalated discsなどの構造の違いが、そこに存在する α -アクチニン分子の性質の違いによるのではないかと考え、ニワトリ骨格筋、心筋、平滑筋からそれぞれの α -アクチニンを精製して、in vitroでのそれらの分子の性質と機能を調べ比較した。

骨格筋速筋(胸筋)、遅筋(前広背筋)、心筋(心室筋)、平滑筋(砂囊筋)より精製した α -アクチニンはいずれもSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)では分子量100,000のポリペプチド鎖から成っており、dimethyl suberimidateで処理してからSDS-PAGEにかけるといずれも分子量200,000となった。従っていずれの α -アクチニンも二重体(分子量100,000 \times 2)として存

在しているものと推定できる。また、等電点電気泳動 (IEF) あるいは二次元電気泳動 (IEF/SDS-PACF) による分析でも、平滑筋 α -アクチンは他の横紋筋 α -アクチンのそれと類似した等電点変異種を示し、両者の α -アクチンの間に明らかな差を見出すことはできなかった。しかしながら、Staphylococcus aureus V8プロテアーゼによる限定分解ペプチドマップでは、平滑筋の α -アクチンは横紋筋(速筋, 遅筋, 心筋) α -アクチンと大いに異なっていた。横紋筋の α -アクチン同士には違いはみられなかった。すなわち平滑筋 α -アクチンと横紋筋 α -アクチンとは一次構造において大きく異なっていると思われる。

次に α -アクチンに対する抗体を作製し、それらを用いて平滑筋 α -アクチンと横紋筋 α -アクチンの抗原性を比較した。Ouchterlony法では、平滑筋 α -アクチンに対する抗体は横紋筋(胸筋) α -アクチンに対する抗体は平滑筋 α -アクチンに対して、ほとんど交差反応を示さなかった。しかし、より感度の高い免疫蛍光抗体法では免疫学的交差反応が認められ、平滑筋 α -アクチンに対する抗体は横紋筋のZ帯を染め、骨格筋 α -アクチンに対する抗体は平滑筋細胞を染めた。従ってこれらの分子には共通の抗原決定基も存在していると思われる。

以上のことから、平滑筋 α -アクチンと横紋筋 α -アクチンとは、その分子量や分子形態(約 4×40 nmの棒状分子)は極めて類似しているにもかかわらず、その一次構造や抗原性は大いに異なっていると言える。

横紋筋 α -アクチンはアクトミオシンの Mg^{2+} -ATPaseを活性化することが知られているが、平滑筋 α -アクチンにも同様の作用がみられ、この作用はトロポミオシンによって打ち消された。平滑筋 α -アクチンはさらに平滑筋アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性も促進した。平滑筋 α -アクチンとトロポミオシンとの競合は、電子顕微鏡による観察でも見出された。すなわち、主にアクチンとトロポミオシンから成る平滑筋thin filamentsに、平滑筋 α -アクチンを加えると、 $0^{\circ}C$ では α -アクチンはthin filaments上からトロポミオシンを追い出しアクチンフィラメントを架橋して束を作るのに対し、 $25^{\circ}C$ ではトロポミオシンが α -アクチンをアクチンフィラメント上から追い出し束は形成されなかった。これらの性質は横紋筋 α -アクチンとトロポミオシンにみられるものと同様である。

平滑筋 α -アクチンは、横紋筋 α -アクチンと同様に、アクチンフィラメントを側面結合させて束にしてしまうが、形成された束の構造は異なっていた。すなわち、 $2 \sim 5$ mMのATP存在下で横紋筋 α -アクチンにより形成されたアクチンフィラメントの束には、 α -アクチンによる隣接アクチンフィラメント間の架橋構造の形成が電子顕微鏡下で観察されたが、平滑筋 α -アクチンにより形成されたアクチンフィラメントの束にはこのような架橋構造はみられなかった。また、 0.1 MMgCl 2 存在下でも横紋筋 α -アクチンは同様の架橋構造を形成するが、平滑筋 α -アクチンでは架橋構造は観察されず、アクチンのパラクリスタル状構造が形成されたのみであった。これは横紋筋 α -アクチンはその分子の両端にアクチン結合部位をもち、そこでアクチンフィラメントを架橋するのに対し、平滑筋 α -アクチン分子には中心付近に結合部位があるために、架橋している分子が観察されないのであろうと推測される。Z帯の横断面の電子顕微鏡像にはaxial filamentsとconnecting

filamentsより成る格子構造が観察される。このaxial filamentsはアクチンフィラメントから成ると考えられるので、connecting filamentsはアクチンフィラメントに架橋した α -アクチニン分子と考えるのが妥当であろう。平滑筋に α -アクチニンがあるにもかかわらずZ帯が存在しないのは、上記のような横紋筋と平滑筋 α -アクチニンの架橋形態の違いによるものであり、推測できる。

審 査 の 要 旨

本論文は、平滑筋の α -アクチニンが横紋筋の α -アクチニンと異なるものであるか否か、異なるとすればその違いが平滑筋と横紋筋の構造の違いを反映し得るものであるか否かを明らかにしようとした研究報告である。本論文の第一成果は、平滑筋 α -アクチニンは、横紋筋 α -アクチニンとその分子量や分子形態が極めて類似しているにもかかわらず、その一次構造が大いに異なっていることを明らかにしたこと、第二はこの二種類の α -アクチニンの抗原性が、一部に共通する抗原決定基を有するものの、著しく異なっていることを見出した点である。それぞれの α -アクチニンに特有な抗原決定基が存在することは、筋細胞の分化発達にともなうこれら α -アクチニンの出現とその局在部位とを明らかにする上で、有力な手段を与えるものであり、第三は、 α -アクチニンによって形成されるアクチンフィラメントの束の構造が、平滑筋 α -アクチニンと横紋筋 α -アクチニンとは異なることを見出し、その違いがZ帯の有無を反映している可能性を推論できたことである。これらの成果は、著者の綿密な実験計画と高度な実験技術によるものであり、筋収縮研究の発展に大いに寄与するものと、高く評価される。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとする。