

(様式4)

## 学位論文の内容の要旨

ASTRID FEINISA KHAIRANI



(学位論文のタイトル)

**Filamentous structures in skeletal muscle: anchors for the subsarcolemmal space**

(骨格筋細胞膜下における繫留構造としての線維構築)

(学位論文の要旨)

**【背景】**

細胞骨格はアクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメントの3種の主要要素からなり、これらが正しく細胞内に配置していることが骨格筋筋線維の細胞内諸構造の形成、さらには筋原線維と筋形質膜（細胞膜）の機械的統合および安定性の維持に重要である。

筋収縮をになう構造の筋原線維は筋節が構成単位となって形成され、アクチンフィラメント（細いフィラメント）とミオシンからなるフィラメント（太いフィラメント）が互いにかみ合うことでできている。この筋節は側面ではコストメアと呼ばれる部位で筋形質膜につながり止められている。コストメアは1980年代の研究の初期には近傍の筋原線維のZ線から引いた延長線上の形質膜に見られる肋骨（「コスタ」はラテン語の「肋骨」の意）状の構造と定義された。しかし現在では以下の3つの異なる領域からなる構造と認識されている。Z-ドメイン、M-ドメイン、L-ドメインである。前2者は形質膜下の筋原線維の長軸と直角の領域、L-ドメインは筋線維の長軸方向に走る領域である。コストメアの機能は筋形質膜下の筋原線維を筋形質膜へとつながり止める構造の維持にあると考えられている。このようなコストメアは筋線維にとって重要な役割を持つと考えられるが、その構成要素の超微構造レベルでの特徴は必ずしも十分には明らかにされていない。Z-ドメインについては電子顕微鏡を使った研究が詳しくおこなわれているが、M-およびL-ドメインについてはごく限られた報告しか存在しない。形質膜下を走る筋原線維のZ盤と形質膜下暗調斑（subsarcolemmal density）をつなぐ線維構造についてはいくつかの報告がある。形質膜下暗調斑とは筋系質膜の細胞質側に見られる、電子顕微鏡ではっきりと黒く見える細胞膜裏打ちの濃縮部位である[9,15]。形質膜下暗調斑はコストメアの一部とする報告もあるが、この点に関してはまだ結論は出ていないのが現状である。

**【目的】**

本研究は、筋形質膜下のスペースおよび筋原線維間に見られる線維状繫留構造物の超微構造レベルでの構築を明らかにすることを目的としておこなった。

**【材料と方法】**

野生型およびmdxマウス（デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウス）成獣の横隔膜を用い、筋線維の長軸と直角方向に張力をかけ、細胞膜直下と筋原線維間の

スペースを開離させた。また、試料は細胞内の可溶性タンパクを除き線維状構造を見やすくする為に、界面活性剤の1% Triton X-100、あるいはコレステロールとミセルを作り細胞膜に穴を開ける0.03%サポニンの処理をおこなったものも作製した。以上の処理をおこなった試料の透過型電子顕微鏡観察により、形質膜下スペースにおける筋形質膜と筋原線維をつなぐ線維状繫留構造の全体像をより良く理解することが可能となった。

### 【結果と考察】

形質膜下スペースにおける線維状繫留構造の存在形態は図7に示す模式図として示した。この図の記載にあたっては線維の直径を計測することで、従来から言われているようにアクチンフィラメントと中間径フィラメントをそれぞれの候補とすることができた。ジストロフィン、スペクトリンのような形質膜裏打ち（膜骨格）のタンパクは、その直径がアクチンフィラメントより細いことから、これらの線維状構造物の候補としては考えにくい。また、コスタメアのZ-ドメインではアクチンフィラメントと中間径フィラメントがともに筋原線維と筋形質膜間の連結に働いていた。アクチン線維はさらに長軸方向に走る繫留構造として、形質膜下スペースおよび筋原線維間にも観察することができた。形質膜下スペースではアクチン線維は細いフィラメントの延長として筋原線維から斜めに伸び出し、長軸方向に走って形質膜下暗調斑に終わっていた。この所見はアクチンフィラメントによる筋原線維間の連結を報告したBard & Franizini-Armstrongの論文にも記載がない。この形質膜下を斜めに走るアクチン線維の形質膜への付着部位はコスタメアのL-ドメインの反映である可能性が考えられる。コスタメアのM-ドメインに付着するフィラメントについては、今回の研究では中間径線維のみからなることが示唆されたが、この結果は従来の光学顕微鏡による報告とも一致する。

本研究における電子顕微鏡観察ではPierobon-BormioliやShearによる報告のある形質膜下暗調斑についても認めることができた。形質膜下暗調斑はビンキュリン、ジストロフィン、 $\beta$ -スペクトリンなどの膜裏打ちタンパクがその成分として考えられている。我々の研究結果ではこの形質膜下暗調斑がZ-、M-、L-の3つのコスタメアのすべてのドメインに認められ、ここに線維状繫留構造物が付着している像、特に筋原線維の細いフィラメントの延長が膜に終わる部位では明瞭な像が観察された。これらの結果からフィラメントと暗調斑の接着は、線維状構造を介する膜直下筋原線維の筋系質膜への繫留の反映であり、形質膜下暗調斑とそこに接着する繫留線維構造は超微構造的にみたコスタメアであると考えられる。

ジストロフィンとその結合タンパクはコスタメアのZ-ドメインに結合しながら筋形質膜に局在することが知られている。界面活性剤であるTriton X-100で脂質成分を可溶化した筋線維で免疫電子顕微鏡法によりジストロフィンの局在を調べると形質膜下暗調斑の細胞外側にラベルが認められる。今回の解析では筋線維の長軸と直角方向に張力をかけて固定した標本でも、形質膜下暗調斑は残っており、ジストロフィン、スペクトリン、その他の結合タンパクもこの暗調斑中に残存しているものと思われる。ところで、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィンをコードする遺伝子の変異により発症する。ジストロフィンタンパクが欠損するとコスタメアと筋系質膜の連結が阻害され、結果として筋形質膜に損傷が起きる。本研究では同じ処理を施した野生型マウスとmdxマウスの横隔膜で、線維状繫留構造に相違が認められ、mdxマウスでその数が減少していることを初めて明らかにした。特にmdxマウスではM-線と筋形質膜間の結合線維がほとんど認められなかった。この所見は従来から言われていたmdxマウスではコスタメアのM-ドメインがより傷害されやすいとの所見を支持するものである。ジストロフィ

ンの欠損と線維状繫留構造の不安定化はmdxマウスで認められるコスタメアの異常を引き起こす可能性が考えられる。

### 【結 論】

本研究では、形質膜下暗調斑と筋形質膜下のスペースを筋原線維の細いフィラメントの延長として走るものを含め、横走、縦走する繫留線維が超微形態学的にみたコスタメアの構成要素であることを示した。また、アクチンフィラメントと中間径フィラメントがこれらの繫留線維の本態であること、mdxマウスでは線維状繫留構造の一部に欠損があることなどを明らかにした。今後、mdxマウスでより詳細な解析をおこなうことが、骨格筋細胞骨格構築のさらなる解明と、これらの欠損が筋形質膜の脆弱化ひいては筋変性を引き起こす原因についてのより包括的な理解に役立つものと考えられる。