

横紋筋の遺伝子 論説

豊田直二、井上弘人、石橋剛士、藤塚千秋
(熊本学園大学 社会福祉学部 ライフウェルネス学科)

The gene structure of muscle proteins Naoji Toyota, Hiroto Inoue, Takeshi Ishibashi, Tiaki Hujituka

横紋筋がどのような構造をとり、どのような蛋白質によって出来ているかについては長い研究の歴史があります⁽¹⁾。横紋筋には骨格筋（速筋、遅筋）や心筋存在し、それらを構成する蛋白質（アクチン、ミオシン、トロポニン）も質的に異なることも知られています。ここでそれらの蛋白質の種類と遺伝子の構造について説明することを目的としています。

蛋白質はすべてアミノ酸が連なってでき上がっています。トロポニンは横紋筋にのみ存在する蛋白質なのでトロポニンについて説明します。トロポニンは3つの成分トロポニン Tn-T、Tn-I、Tn-C からなります。トロポニンはもともとウサギやニワトリの骨格筋を使用して研究されてきました。しかし研究が進むと骨格筋（速筋、遅筋）と心筋の Tn-T、Tn-I、Tn-C はアミノ酸配列や、免疫学的反応が異なることが分かってきました。まとめると TnT と TnI には速筋、遅筋と心筋が存在しますので^(2, 3, 4, 5)。とはいえトロポニン成分ですから大部分は同じアミノ酸配列です。所々アミノ酸配列が置き換わっている程度です。同じトロポニンでも性質が少し異なることになります。このような蛋白質を isoform（アイソフォーム、分子種あるいは類縁蛋白質）といいます。免疫学的にも調べられ、Tn-C は速筋と心筋の2種類の isoform があり、遅筋と心筋は同じ Tn-C を使っています^(4, 5)。

ミオシン重鎖も同様に速筋と遅筋のミオシン重鎖が知られています^(6, 7)。アクチンは2次元電気泳動で3種類（ α 、 β 、 γ ）の isoform があります⁽⁸⁾。このようにして様々な筋組織が調べられました。哺乳類の骨格筋は複雑で、1つの筋の中に速筋細胞と遅筋細胞が混合しています。蛋白質によっては心房と心室に異なった isoform が存在することも分かりました。鳥類はやや単純で、胸筋は速筋、広背筋は遅筋、心筋は心筋の筋蛋白質 isoform により構成されています。上でミオシンとアクチンという蛋白質がでましたが、これらの抗体を作るのは難しいと言われています。特にアクチンは細胞内に必ず存在し、様々な重要な役割をする物質なので、そのような物質では抗体はできにくいと言われています。またもし抗体ができると全身の細胞と筋組織内で反応してしまい生命維持に危険になります。ミオシンも同様な理由により、抗体が出来にくいと思われます。現在使われているミオシン、アクチン抗体はモノクローナル抗体という方法で作られたもので分子の一部を認識します。またアクチンを認識するファロイジンに蛍光色素を結合したものもよく使われます。

筋蛋白質の isoform は上で説明したように生化学と免疫学の分析から解明されてきました。免疫学的な例として抗体を使用した蛍光抗体法があります。蛍光抗体法は細胞生物学の中で最も使われる一般的な染色法の一つです⁽⁹⁾。蛍光抗体法の例として Tn-T について説明します。まず心筋の TnT に対する抗体 (anti-CTnT) と骨格筋 (速筋) の Tn-T に対する抗体を作成します (anti-FTnT)。作り方はモノクローナル抗体とポリクローナル抗体の2種類がありますが、ここではポリクローナル抗体を使用しました。心筋から作った anti-CTnT 抗体は心筋にのみ結合し (図 1a)、速筋には反応しません (図 1b)。速筋から作った anti-FTnT 抗体は心筋には反応せず (図 1c)、速筋のみに結合します (図 1d)。抗体が選択的に組織と抗原を区別します。抗体の選別性を特異性といいます。この抗体の持つ特異性は極めて正確に心筋と速筋を選別しますので筋組織の染色に利用することが出来ます (図 1)。

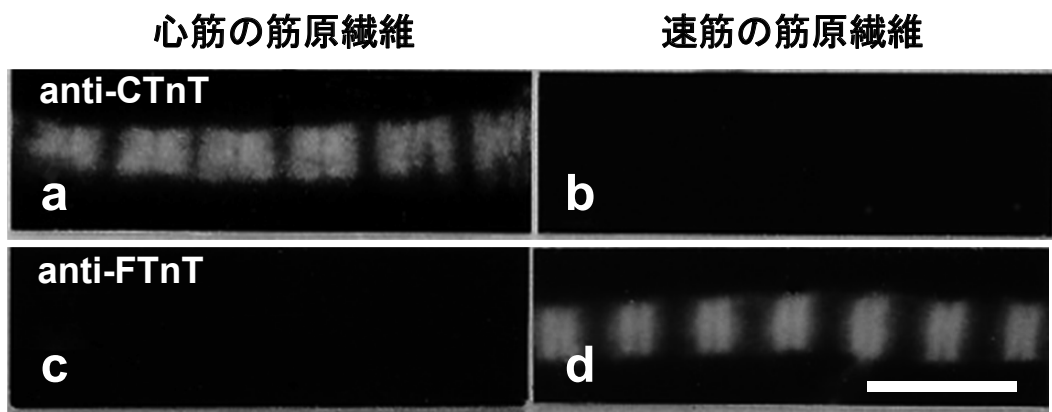


図1. 心筋と骨格筋の筋原繊維を anti-CTnT 抗体および anti-FTnT 抗体により染色した蛍光抗体像⁽⁵⁾

anti-CTnT 抗体は心筋の筋原繊維のみに反応し (a)、骨格筋には反応しない (b)。

anti-FTnT 抗体は骨格筋の心筋の筋原繊維には反応しないが (c)、骨格筋の筋原繊維には反応する (d)。anti-TnT 抗体の特異性を示している。2次抗体はウサギ抗体に対するヤギ抗体 FITC 結合を使用している。これは白黒ですが実際は美しい緑色に見えます。バーは 5 μ m。

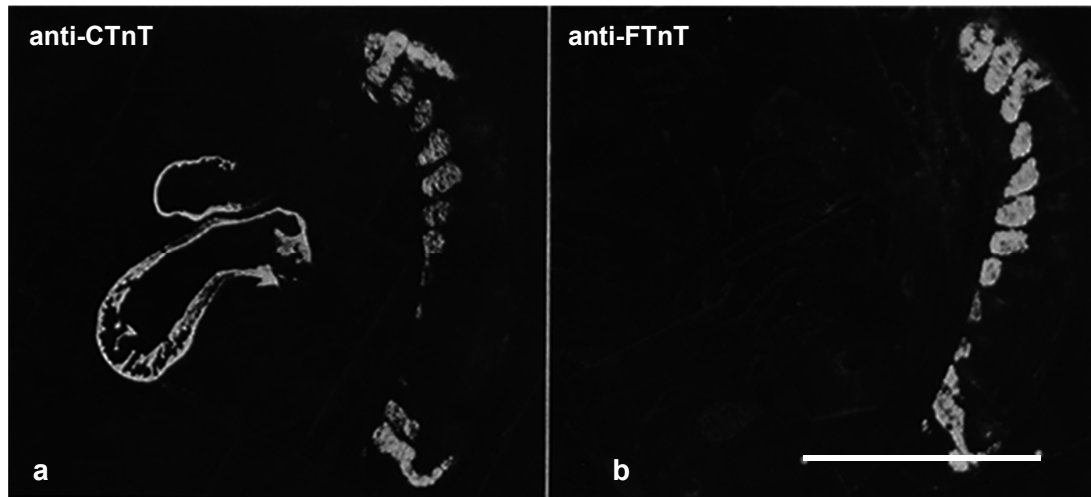


図2. 孵卵後、約60時間のニワトリ胚を anti-CTnT と anti-FTnT により染色した蛍光抗体像⁽⁵⁾

ニワトリ胚の切片を anti-CTnT により染色した (a)。心臓以外に骨格筋も染色されている。連続切片をさらに anti-FTnT により染色した (b)。骨格筋のみが染色され、心臓には反応しなかった。2次抗体はウサギ抗体に対する FITC—結合ヤギ抗体を使用し染色した。実際は美しい緑色似見えます (筆者撮影)。バーは 1mm。

蛍光抗体法が進んでくると、各筋蛋白質の抗体を作成して様々な筋を観察するようになりました。動物の発生段階の筋の研究が盛んに行われるようになりました。すると胚の筋は親と異なり多くの isoform を含んでいることが分かってきました。図2は anti-CTnT と anti-FTnT を使用してニワトリ胚を調べたものです。

ニワトリ胚の anti-CTnT 抗体と anti-FTnT 抗体の反応は親と異なっていました (図1、2)。ニワトリ胚では CTnT が心筋のほかに骨格筋にも存在することが分かりました (図2a)。FTnT は骨格筋のみに存在し、心筋には見られなかった (図2b)。胚の骨格筋は骨格筋のトロポニン-Tと心臓のトロポニン-Tを合成することが分かった。このような発生過程における蛋白質の出現は遺伝子に組み込まれていることが考えられる。その理由はわからないが発生の段階は進化の過程を繰り返しているのかもしれない⁽⁵⁾。

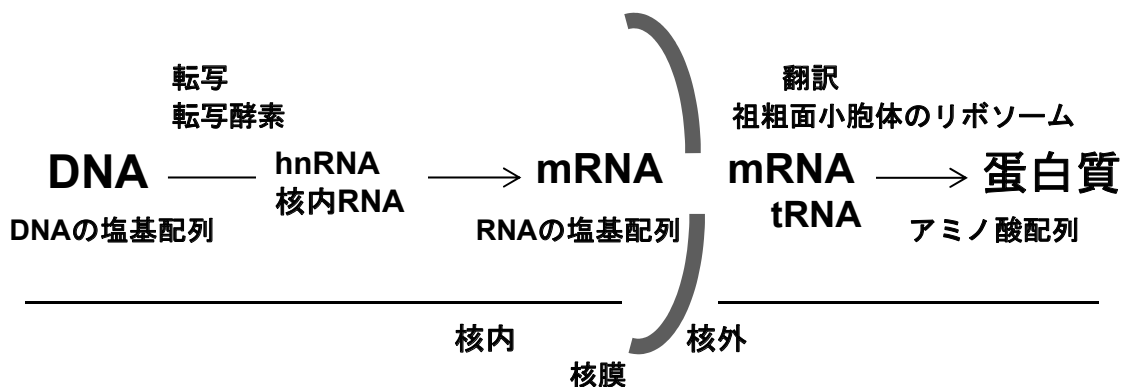


図3. 細胞内でDNAから蛋白質が合成されるまでの略図

図3、核は核膜で仕切られている。核の内部にDNAが保存され、必要な遺伝情報は転写酵素によりhnRNAおよびmRNAに写し取られる(転写)。mRNAは核外の粗面小胞体の内部に出て、リボソームとtRNAによって暗号化された遺伝情報を蛋白質に合成する(翻訳)。生物学では転写と翻訳は特別な意味を持ち、他には使用しない。

蛍光抗体法により調べられる一方で、分子生物学的にも調べられてきました。一般にゲノム遺伝子—mRNAの塩基配列—アミノ酸配列—蛋白質という順序で蛋白質が作られます(図3)。細胞の核内部と外部では大きな違いがあります。

核内のDNAは生物の設計図のようなもので遺伝情報が書かれています。DNAは遺伝情報のマスターテープとして大事に保管されています。DNAに書かれた遺伝情報はアミノ酸に対応した暗号で書かれています。蛋白質を作る時、暗号はDNAからmRNAに転写され、mRNAは粗面小胞体に運ばれます。粗面小胞体のリボソームとtRNAの働きでmRNAの暗号がアミノ酸に解読され(翻訳)、蛋白質が合成されます。DNA—mRNA—蛋白質という一連の流れをセントラルドグマと言うことがあります。

RNAのことを書きましたが、RNAの取り扱いは難しいものがあります。RNA分解酵素がガラス器具にも付着し、またヒトの手からも出るなど分解しやすいのです。RNAを取り扱う時は必ず使い捨ての手袋をします。ガラス器具は180℃で熱処理するなど準備が必要です。



図4. mRNAからDNAを合成する逆転写酵素が発見された

RNAは分解され易いのですが、もしRNAの塩基配列をDNAに置き換えれば安定に取り扱うことができます。今ではDNAに変換出来る逆転写酵素が発見され、良く使われています(図4)。図3と4に示すように、遺伝情報はDNAからmRNAへ転写されます。しかし逆転写酵素はmRNAからDNAへ塩基配列が写し取られ、自然とは逆に転写が起きるという意味です。写し取ったDNAは元のmRNAに相補的(complementary)に対応しているという意味でcDNAといいます。mRNAの情報はcDNAに写しとられますので現在cDNAがよく利用されます。筋蛋白質のアミノ酸配列はほとんどcDNAを使用して解明されるようになりました。ミオシンなど分子量が大きい蛋白質は特にcDNAを作成してアミノ酸配列が調べられるようになりました。このようにして筋蛋白質mRNAの塩基配列とアミノ酸配列が続々と発表されるようになりました。しかし蛋白質レベルのアミノ酸配列の研究も重要です。アミノ酸配列が明らかになっていないとcDNAが何の蛋白質に相当するのか分からないからです。

遺伝子はDNA(デオキシリボヌクレイックアシド)という糸状の物質で、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の4種類の物質(塩基)がいくつも配列しています(図5A)。ヒトのDNAは31億のATGC塩基が並んでいます。4種類の塩基で20個のアミノ酸に対応します。AGGやTAGのように3塩基で1アミノ酸に対応しています。3塩基の順序がどのようなアミノ酸に対応するかは暗号表があり、それを使って翻訳します。またアミノ酸の配列で蛋白質が特定されます。遺伝子は蛋白質の暗号を含んだ領域です。

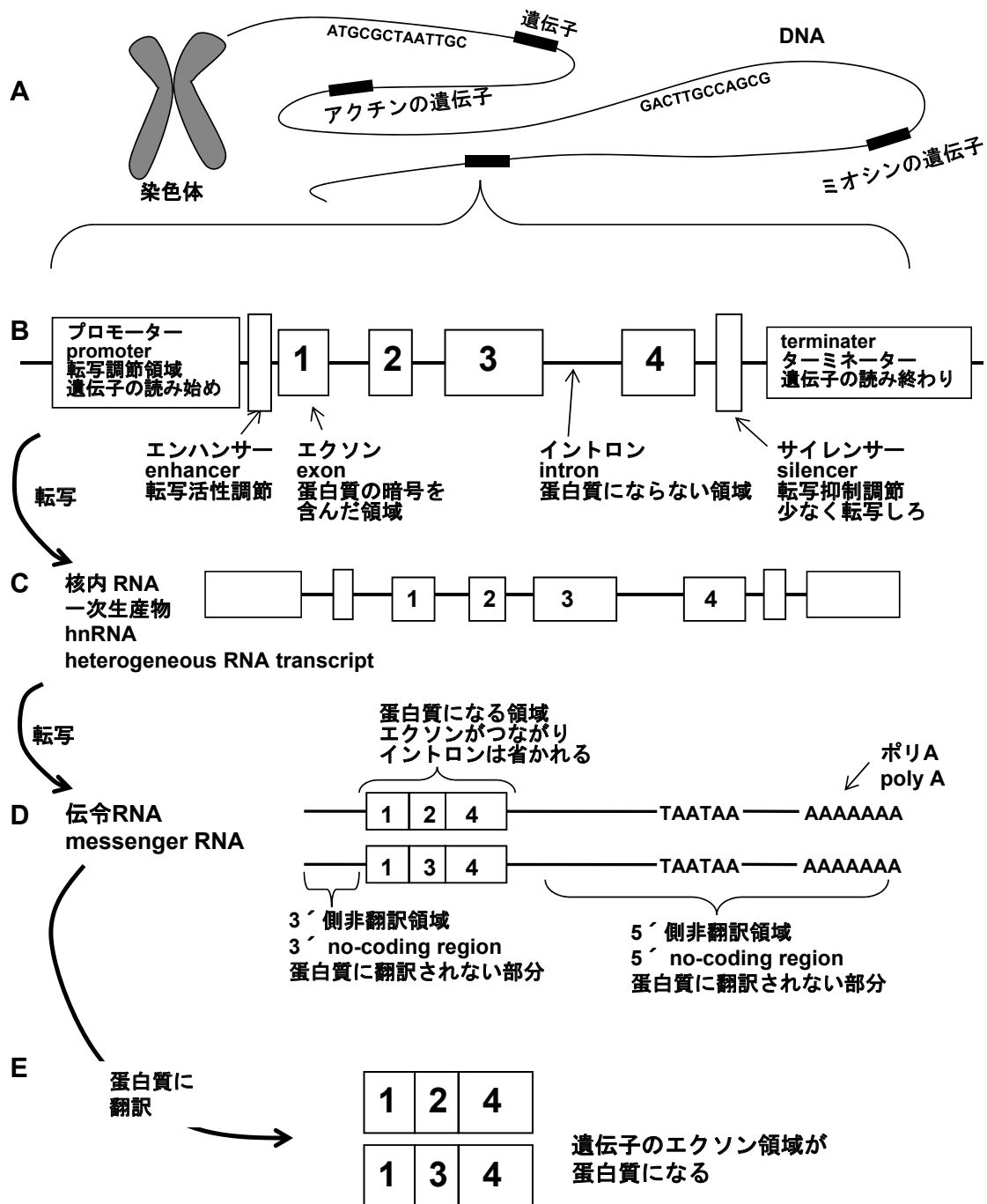


図 5. 一般な遺伝子がどのような構造をしているかを示しています。

長い DNA の中に遺伝子が存在している (A)。一般的遺伝子抗の構造 (B)。DNA から必要な遺伝子が hnRNA に転写される (C)。必要なエクソンのみがスプライシングにより組み次がれ mRNA ができる (D)。イントロンは省かれる (D)。1 遺伝子から 2 種類の蛋白質ができる (E)。

上に書いたように DNA は AGCT という塩基が配列している長い糸状の物質で、その一部に遺伝子暗号が書かれています (図 5A)。遺伝子の構造はプロモーター、イントロン、エンハンサー、サイレンサー、これらの暗号部分はイントロンで繋がっています。最後にターミネーターがあります (図 5B)。詳しくみると

- 1) プロモーターはここからが遺伝子、RNA を転写しなさいという暗号。ターミネーターはここで遺伝子が終わり、転写を止めなさいという暗号領域です。
- 2) エンハンサーは RNA を多くし、蛋白質も多く作れ、：サイレンサーは逆に少なく作れという暗号です。
- 3) エクソンは長方形で囲まれた 1、2、3、4 の部分で、アミノ酸の暗号が書かれた領域です。
- 4) イントロンはエクソンをつなげている部分。この図ではエクソンとエクソンの間の線になります。この線の領域は蛋白質にならない領域です。ここにも ATGC 配列があります。イントロンと呼ばれています。まだ詳しく分かっていませんがイントロンを切り取ると蛋白質を生産しなくなるので重要な役割をしているようです。遺伝子の構造はこのようになっています (図 5B)。

遺伝子は随時、細胞の必要な部分だけが RNA に写し取られます。DNA はすぐ核中に保管されます。最初は核内で転写されるので RNA は核内 RNA、または一次生産物 (hnRNA) と呼ばれます (図 5C)。この時点では遺伝子のプロモーターからターミネーターまで転写されます。しかしこのまま mRNA にはなりません。エクソンの組み次ぎが起こります。図 5D ではエクソンの 1、2、4 のみが蛋白質となり 3 は省かれています。また同じ細胞内でもエクソンは 1、3、4 が蛋白質になることもあります。エクソンをつないでいたイントロンはここで切り取られエクソンだけが組み次がれます (図 5D)。

mRNA にも構造があります (図 5D)。蛋白質の暗号の書かれたエクソン 124 と 134 の前後に、蛋白質にならない塩基が連なっています。後ろには TA の多い領域と A が 200-300 連なったポリ A があります (図 5D)。ポリ A は mRNA の特徴で蛋白質になる RNA を意味しています。この後 mRNA はリボソームで蛋白質に合成されます。蛋白質は 1、2、4 と 1、3、4 の 2 種類が合成されます (図 4E)。2 種類の内どちらか一方だけが作られることもあります。RNA には mRNA のほかにトランスファー RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA) があります。これらの蛋白質の合成に重要な役割を果たしますが、ここでは省きます。このように 1 つの遺伝子からエクソンの組み次ぎによって複数の蛋白質 isoform が合成されます。これをオルタネイティブスプライシングといいます。トロポミオシンはこの方法で約 20 種類の isoform を合成することが分かっています⁽¹⁰⁾。

アクチン遺伝子もエクソンとイントロンは有りますが、大きく異なります。アクチンは基本的に 1 遺伝子が 1 アクチンしか作りません。

蛋白質の相同性高い		遺伝子の相同性低い	
骨格筋	速筋のアクチン	遺伝子	} アクチンの マルチジーン ファミリー
	遅筋のアクチン	遺伝子	
心筋のアクチン		遺伝子	
平滑筋のアクチン		遺伝子	
非筋細胞のアクチン		遺伝子	
非筋細胞のアクチン		遺伝子	

図 6. アクチン遺伝子、マルチジーンファミリー

アクチンのアミノ酸配列は非常に良く似ていて高い相同性を示します。蛋白質が似ていれば mRNA も相同性が高いと想像されますが 6 種類の mRNA 塩基配列は似ていません (図 6)。全く別物です。遺伝子の塩基配列も似ていません。アクチンは重要な働きをするので進化の過程で様々な異なった起源の遺伝子からよく似た蛋白質を作るようになったとされています。このようによく似た蛋白質を生産し、遺伝情報の異なる遺伝子群をマルチジーンファミリーといいます⁽¹¹⁾。ちなみにヒトのアクチンは 9 種類の isoform が知られています⁽¹¹⁾。

ミオシンは筋、神経、植物にも存在し 37 種類ものスーパーファミリーを形成している。ミオシン II が筋に存在することが分かっています⁽¹²⁾。

参考文献

1. 豊田直二、石橋剛士、藤塚千秋、2011. 横紋筋の研究の歴史. 「総合科学」熊本学園大学論文集. 35 : 1-24.
2. Wilkinson JM, Grand RJ. 1978a. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature*. 5:271 (5640) : 31-35.
3. Wilkinson JM, Grand RJ. 1978b. The amino-acid sequence of chicken fast-skeletal-muscle troponin I. *Eur J Biochem*. 16:82 (2) : 493-501.
4. Dhoot GK, Frearson N, Perry SV. 1979. Polymorphic forms of troponin T and troponin C and their localization in striated muscle cell types. *Exp Cell Res*. 122 (2) : 339-350.
5. Toyota N, Shimada Y. 1981. Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 91 (2 Pt 1) : 497-504.
6. Bormioli SP, Sartore S, Vitadello M, Schiaffino S. 1980. "Slow" myosins in vertebrate skeletal muscle. An immunofluorescence study. *J Cell Biol*. 85 (3) : 672-681.
7. Gauthier GF, Lowey S. 1979. Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J Cell Biol*. 81 (1) : 10-25.
8. Whalen RG, Butler-Browne GS, Gros F. 1976. Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73 (6) : 2018-22.
9. 豊田直二、井上弘人、藤塚千秋、石橋剛士、2013. 心筋細胞の 3 重蛍光抗体法による観察. 「総合科学」熊本学園大学論文集. 39 : 69-77.
10. Perry SV. 2001. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil*. 22 (1) : 5-49.
11. Engel J, Gunning P, Kedes L. 1982. Human cytoplasmic actin proteins are encoded by a multigene family. *Mol Cell Biol*. 2 (6) : 674-684.
12. Richards TA1, Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature*. Aug 25;436 (7054) : 1113-8.