

厚生省  
神経疾患研究委託費

筋の発生と分化に関する  
基礎的研究

江橋 班

昭和57年度研究報告書

昭和58年3月

# 目 次

筋の発生と分化に関する基礎的研究班・総括報告 .....	3
江橋節郎	

## I 筋移植と成長

1. ジストロフィーハムスターと正常ハムスター の筋の交換移植についての研究 .....	9
寺尾寿夫	
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根伸筋の交換移植 ——組織学的変化—— .....	15
大塚正徳	
3. 筋ジストロフィー症マウスと小人症マウスの骨格筋の未熟度 .....	19
戸塚武	

## II 微細形態

4. 骨格筋の小窩について .....	31
岩崎祐三	
5. 細胞骨格の分化発達——中間径フィラメントの存在様式 .....	35
石川春律	

## III 細胞培養

6. サテライト細胞の培養 .....	41
香川務	
7. ニワトリ胚抽出物中の筋芽細胞増殖促進因子 .....	47
小沢鎧二郎	

8. 培養骨格筋における活動電位の発達に關与する神経性因子 ..... 52  
加 濃 正 明

#### IV 生 理 学

9. 骨格筋の発達過程の機能的, 形態的追跡  
— 鶏胸筋の正常とジストロフィー筋の比較 — ..... 59  
堀 田 健
10. 筋細胞膜における膜興奮機能の発生 ..... 65  
高 橋 国太郎
11. 除神経による活動電位の誘発 ..... 73  
栗 山 熙
12. ジストロフィーハムスターの心臓機能と骨格筋々小胞体  
のCaの取り込み能に関する研究 ..... 76  
酒 井 敏 夫
13. 両生類骨格筋の遅筋と速筋: 筋小胞体の性質と比較 ..... 80  
遠 藤 実

#### V 生 化 学

14. 培養筋細胞のアセチルコリンレセプターの代謝 ..... 91  
萩 原 彌四郎
15. アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体 ..... 94  
杉 山 博 之
16. 筋発生に伴うミオシン分子 isoform の変化 ..... 98  
江 橋 節 郎
17. 鶏ジストロフィー筋におけるC-蛋白質分子種の変化 ..... 102  
大日方 昂

18. 培養骨格筋および心筋細胞におけるトロポニンの分化 .....	109
嶋田 裕	
19. 筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の筋線維構成蛋白 —筋ジス遺伝子の白レグ鶏への導入— .....	114
野々村 禎 昭	
20. ジストロフィー鶏および正常鶏の発生過程におけるEF2 およびNAD含量の変化 .....	122
真崎 知 生	
21. 可溶性コネクチン .....	127
丸山 工 作	
22. 骨格筋細いフィラメント上のトロポニンの局在及びハイブリッド トロポニンの性質の検討 .....	131
大槻 磐 男	

## VI プロテアーゼ

23. 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割 .....	137
今堀 和 友	
24. サル心筋Ca依存性中性プロテアーゼの性状と阻害物質の影響 .....	141
高橋 健 治	
25. 筋ジストロフィー・ハムスターにおけるリソゾームプロテアーゼ 活性調節の異常 .....	145
勝 沼 信 彦	
26. 培養筋細胞における筋蛋白代謝 .....	149
杉田 秀 夫	
27. 筋ジストロフィー患者の血性酵素にみられる2種類の動態 .....	153
青柳 高 明	

28. 筋ジストロフィー症マウスに対する微生物プロテアーゼ・ ..... 157  
インヒビター投与の影響 松 下 宏

#### Ⅶ 関 連 領 域

29. 高分子物質の細胞内注入法の工夫 ..... 167  
岡 田 善 雄
30. 細胞接着分子と細胞収縮 ..... 168  
岡 田 節 人
31. 体幹部神経堤細胞からの間葉組織の分化 ..... 170  
仲 村 春 和



## 筋の発生と分化に関する基礎的研究班 総括報告

班長 江橋節郎

### 総論

本研究班では、筋ジストロフィー症という疾患名を表面的には班の名称としては唱っていない。しかし我々の目的は、筋ジストロフィー症の病因を現代の基礎医学、生物学の基盤において解明することを当面の目標としつつも、終局的には本疾患の根本的治療法確立と根絶を期するものである。

筋ジストロフィー症の研究の基礎として筋の発生と分化の問題が重要であることは、世界的に広く認められて既になかなか年月が経つが、その重要性は益々大きくなって来ている。この趨勢は、1982年秋に開かれた第5回筋神経疾患学会のシンポジウム、一般演題さらには教育講演などからも明瞭に読みとることができる。それでは何故に本疾患の研究のために筋の発生や分化の問題が重要なのであろうか。大きくいって三つの点があげられると思われる。

第一点は、本疾患では既に筋の発生期からはかなりの年月を経ているにも拘らず罹患筋に筋の発生期に見られるような種々の現象がみられることである。このことは想像の翼を伸ばすと筋の分化が充分でないことに病因を求め得るかもしれないという期待を持たせし、またそれを示唆する報告も行われても来た。しかしながら我々の班員は、全く新しい事実を過去において観察している。すなわちジストロフィー筋では分化の停滞があるというよりは、一度正常のように分化するにもかかわらず何らかの原因によって分化した状態を保ち得ず、再び幼若時代に類似した状態に戻るのであ

る。こゝに於いて我々は本疾患の研究に於いて如何にして分化が行われるかという発生生物学の基本問題として広くとり組まれている問題の他に、分化した状態が如何にして保たれているかという問題が重要なものとして認識することになる。

第二点は、分化した状態の崩壊に対する別の面からの見方である。上述の分化の「若返り現象」が遺伝子発現の質的な制御の乱れであるならば、この場合は割り切った言い方をすれば量的な乱れである。健康な筋細胞がその正常な姿を保ち機能を発揮するためには、一定量の蛋白質が常に合成されると共に分解されていくことが必要である。すなわち蛋白質の代謝が嚴重なバランスのもとに遂行されていることが要求される。これらの制御は究極に於いては遺伝子の発現の問題であろうが、筋ジストロフィー症罹患筋に於いては筋蛋白質代謝の乱れが存在する。すなわち罹患筋に於ては、蛋白質の合成が促進されているにも拘らず、分解がそれを上まわっているという事実が知られている。このことは常識的には蛋白分解酵素作用の亢進状態があつて、それが分化の安定性を乱す要因の一つとなっていることが考えられる。病的な機転をこのような立場からみる時、逆に正常な筋は如何にして量的にも分化した状態を保つかを探ることが、本疾患研究への一つのアプローチになるであろう。

第三点は筋の再生の問題である。本疾患の過程に於て再生がみられることは周知の事実である。いうまでもなく再生は筋の衛星細胞が活性化され

て増殖し、新に筋線維を形成するか、既存の筋線維にとり込まれて行く過程である。多くの考えでは、衛星細胞は、発生時期の筋芽細胞が活動を停止して筋線維に接触して存在するものである。これが再生の時に如何にして活性化されるかは、発生生物学の根本問題の一つである。もしこの活性化の本態が分かれば、不幸にして再生が停止あるいは相対的に低下する本疾患の進行期の問題を解明するのに大きな力を示すであろう。

第二点で述べた分化を保つために必要な要因、また第三点で述べた再生を促すための要因を物質の形で把握できるならば、それは終局の目的である治療法の確立に何等かの光を与えることになるであろう。

以上に述べたことは到達するには誠に困難な事柄であるが、我々は此の難病の解決のアプローチとして筋の発生と分化の問題を取り上げることの必要性についての一端を披瀝した。

実験のないところに科学は存在しない。本疾患の場合には通常の臨床実験のもつ困難さを遥かに超えた障碍が存在する。この困難さを回避するためには、できるだけ人間の筋ジストロフィー症に似た動物モデルを用いなければならない。本疾患とモデル動物の疾患が異った面を多く持っているであろうことは十分に認識しつつも、我々はモデル動物を重要な研究材料として、その病態の解明を上記述べた視点を踏まえて行って来た。

#### 本年度の研究の概要

本年度の研究も前年度に引き続いて上記の原則に基いて遂行された。

遺伝子発現の状況を調べるために最も単純な手段は一種のタンパク質に着目しその経時的な変化を詳細に記載することから始めることである。正常動物に於ける遺伝子発現の記載の比較が必要であるが、その際にまず正常動物の正確な記載が重要である。此の線上にあるものとして、ミオシン分子のアイソフォームの変化（江橋）トロポニン分子の分化（嶋田）がある。大日方は筋ジストロ

フィーニワトリの胸筋を用いてC蛋白の動態を検討した。C蛋白にも遅筋型と速筋型とがあり、幼若細胞は両型のC蛋白を持つが、成長と共に遅筋型は消失する。これに対して筋ジス細胞では一旦は消えた遅筋型が再び多く作られることを示した。これはかつて野々村らがトロポミオシンで示したのと同じ現象で、筋ジス細胞が幼若期に於ける遺伝子発現を再現している可能性を示唆するものである。

野々村は、野村班菊池によって開発された白レグ筋ジス鶏が劣性遺伝であることをふまえて、ヘテロに筋ジス遺伝子をもつニワトリでは、上記の遺伝子発現の幼若化が起りにくいことを示し、筋ジス発症と幼若化との間の因果関係を示唆した。

また丸山、杉山、大概らはこの様な線上の研究を発展させる足がかりを与える研究を行った。

この様にして出来上がった蛋白も分解され、新しい蛋白が合成されるのは、遺伝子発現の基礎であると共に、またそれ故に筋ジストロフィー症の病態の成立の理解に重要であり、更に蛋白の代謝過程のコントロールが可能になれば本症の治療に役立つことが考えられる。

杉田と萩原は、それぞれ筋蛋白とアセチルコリンレセプターの代謝について研究し、諸種の薬物の代謝過程に及ぼす影響について検討した。蛋白の分解過程には蛋白分解酵素が関与するが、それらの分子機構については、Ca依存性中性プロテアーゼについて今堀と高橋(健)がそれぞれの見地から研究を進め、カテプシンとその内源性インヒビター(TPI)について勝沼が研究を行った。勝沼は筋ジストロフィーハムスターを行い、骨格筋、心筋に於いてカテプシンとTPIがほぼ平行して増加していることを認めた。

また青柳は筋ジストロフィー症患者血清中の血清動態を調べ、松下は筋ジストロフィー症マウスにベスタチン投与によって症状が改善すると報告した。これ等の他に、正常及び筋ジス動物を用いて、諸種の機能の変化が堀田、高橋(国)、酒井、遠藤、岩崎、石川、香川、仲村らによって研究さ

れた。またそれらの研究のための基礎的手段について岡田(善)、岡田(節)から報告があった。

以上のような蛋白、酵素蛋白その他諸機能の変動がどのようにして調節されるかを知らうとする試みが行われて来ている。このことは疾患を理解しその解決法を求める上に重要であることはいふ迄もない。筋の分化に関しては古くから神経因子の関与が考えられており本研究班でも主として生理学的な立場から、除神経筋の分化状態の変動(栗山)や、筋の興奮性の発現に及ぼす神経由来の物質(加濃)の研究が行われた。特に加濃はこの物質が高分子であり、おそらく蛋白質であることを報告している。

筋ジストロフィー症においては、上述のようにある時期に筋の再生現象がみられる。その際には衛星細胞の著しい増殖がみられる。衛星細胞の増殖およびその後の変化を追うには色々な手法が考えられるが、大塚と寺尾はそれぞれニワトリ及びハムスターを用いて正常及びジストロフィー動物間での筋の交換移植を行い、筋の正常な発育には環境因子が重要であることを報告した。環境因子には当然神経及び他の因子の関与が考えられるがまだそれに関する知見は得られていない。小沢は筋芽細胞の増殖を促進する分画を、ニワトリ胚抽出物から得たが、まだ精製は充分には進んでいない。筋芽細胞と衛星細胞とどこまで等価かという問題はあるにしても、再生が行われるには十分な増殖が必要であることに留意したい。

筋ジストロフィー症モデル動物を用いて発症の原因についての研究が行われた。戸塚は骨と筋の

発達のアンバランスに注目し、真崎は細胞内NA Dレベルの変化が発症の原因として深くかかわっている可能性を指摘した。

## 結 語

個々の研究の進展の度合や、筋ジストロフィー症そのものとの直接のかゝり合いの度合などにはいろいろな違いがみられる。しかし研究班全体としては、世界の筋ジストロフィー症研究に比して勝るとも劣らないレベルを保ちながら、着実に前進しているといえる。そしてこれらの研究の間に、協同研究者として加わった若い研究者が、筋ジストロフィー症研究に深い関心を持つようになり、また既に出来上がった研究室間にもお互いの連帯の気運が盛り上って来たことは、喜ばしいことである。

また特に本年度の行事の一つとして、本研究班の業績を本格的な英文のモノグラフとして刊行した。過去において本班は毎年英文報告集として小冊子を刊行して来た。幸い内外の研究者から歓迎されて来たが、何分にも小冊子であって十分に意をつくすことはできず文献として後々迄残ることは期待できなかった。今回各班員に各自の問題を自分の業績を中心とした総説を書くことを依頼し、一書となして、本研究班の研究成果を世に問うこととした。

筋ジストロフィー症研究の道は峻しい。しかし我々は一步一步地道な努力を重ねてゆかなければならない。

## I 筋移植と成長

1. ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の  
交換移植についての研究 9
2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける  
長橈側手根伸筋の交換移植 15  
——組織学的変化——
3. 筋ジストロフィー症マウスと小人症マウスの骨格筋の未熟度 19

# 1 ジストロフィーハムスターと正常ハムスターの筋の交換移植についての研究

寺 尾 寿 夫<sup>\*</sup>  
研究協力者 増 野 和 子<sup>\*</sup>  
大 沢 伸 昭<sup>\*\*</sup>

## はじめに

ジストロフィー筋肉を正常の動物に移植した場合に、移植筋が如何なる再生をきたすかを明らかにすることはジストロフィーの成因を知る上に一つの手掛りを与えるものとして注目されている。そのために古くよりジストロフィー筋の正常動物への移植実験が行われてきた。<sup>1-4)</sup>

Homburger<sup>5)</sup>らが導入したジストロフィーハムスターがヒトのジストロフィー症のすぐれたModel動物であることはよく知られている。<sup>6)</sup>我々はこの動物と正常コントロール動物との間に筋の交換移植を行い、それぞれのgraftが新しいhost中で起す再生現象を比較したので報告する。

また、ジストロフィーハムスターの血中、尿中、骨格筋中のアミノ酸測定も併せ行なった。

## 方 法

### 1) アミノ酸測定

血漿中アミノ酸についてはハムスターを絶食させた後ヘパリン加採血し、血漿分離後ズルフォサリチル酸で除蛋白し、アミノ酸自動分析機にて各アミノ酸の濃度を測定した。

尿については、ラット用蓄尿ケージにて24時間蓄尿したものをを用いた。ハムスター尿は蛋白を含むため、ズルフォサリチル酸にて除蛋白し、その中の遊離アミノ酸を測定した。骨格筋は大腿四頭

筋、腓腹筋、ヒラメ筋などを脱血後採取し、homogenize後、過塩素酸にて除蛋白したものをを用いた。

### 2) 交換移植

これにはジストロフィーハムスターとコントロールハムスターの長指伸筋(EDL)を使用した。交換移植後、種々の時間を経てこれを取り出し、再生の状態を検討した。再生の指標には種々の方法が考えられるが、この研究では、再生筋線維の数と直径を目標にした。移植後2ヶ月目の再生筋を上中下の3部分にわけ、その各々につきクリオスタットにより薄切後、種々の染色標本を作り、その各部分ごとに2~3枚の標本(主としてH・E染色標本を使用)につき再生筋線維の数を数え、その平均値を求めてその筋の再生筋線維の数とした。また、各部分のcross section標本の中央部に含まれる筋線維の直径を上中下3部分より同数ずつ総計が1,000本になるまで測定し、その分布を調べた。染色にはH・Eの他Trichrome, ATPase, DP NHを行った。

## 結 果

### 1. ジストロフィーハムスターのアミノ酸代謝異常

#### a) 血中アミノ酸

ハムスターの血漿中にはグルタミン酸濃度がもっとも高く、次いでアラニン、グリシン、バリン、リジン、タウリン、プロリンなどが高濃度に含ま

\* 帝京大学医学部第1内科

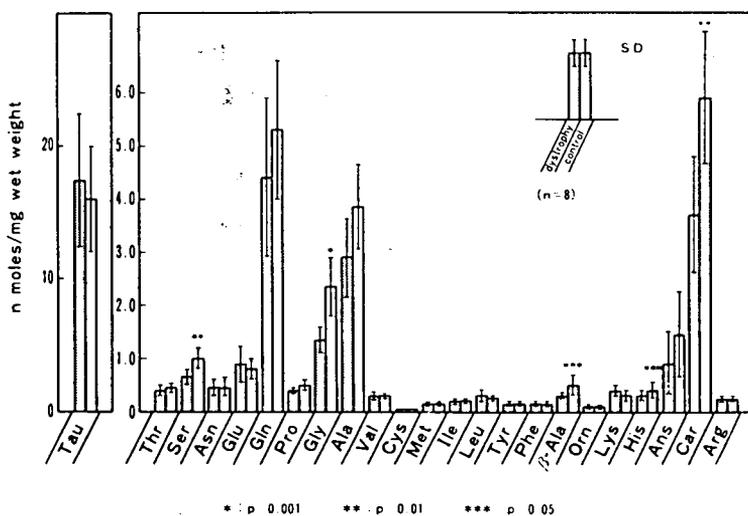
\*\* 東京大学医学部第3内科

れる。これら血漿中遊離アミノ酸をジストロフィーハムスターとコントロールにつき比較したものが第1図である (n = 8)。これに示す様に、ジストロフィーハムスターの血漿中にはコントロールに比し、濃度の低いアミノ酸が多いが、とくにシスチン、トリプトファンは有意に低値を示していた (P < 0.05)。これに反し、タウリンは有意に高かった (P < 0.01)。

b) 尿中遊離アミノ酸

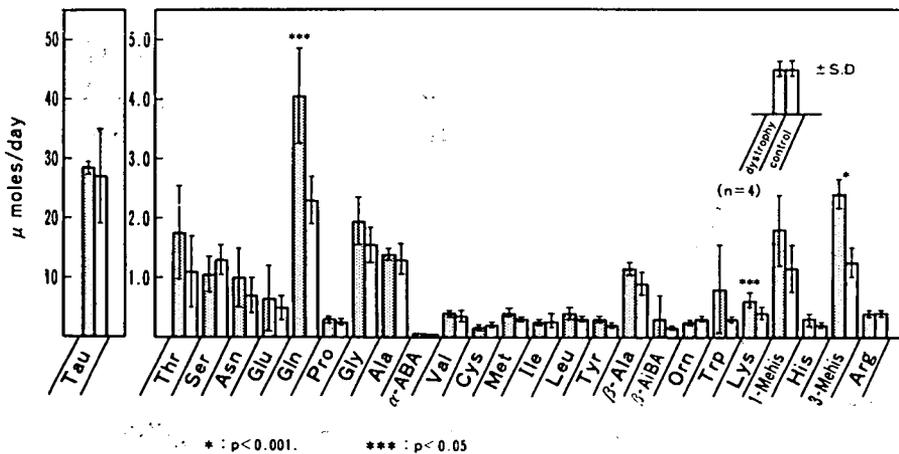
ハムスターの尿中に排泄される遊離アミノ酸はタウリンが著しく多く、次にグルタミン、グリシン、1-および3-メチルヒスチジン、スレオニン、アラニン、β-アラニンが多い。両者の比較を第2図 (n = 4) に示した。ジストロフィーハムスターではコントロールより排泄値の高いアミノ酸が多い。とくに3-メチルヒスチジン (P <

Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic hamster.



第1図

Urinary free amino acid levels of dystrophic hamster.



第2図

0.001), グルタミン, リシン ( $P < 0.05$ ) は有意に高かった。

c) 骨格筋の遊離アミノ酸

骨格筋の中の遊離アミノ酸はタウリンが極めて多く、次いでグルタミン, カルノシンが多い。またアラニン, アンセリンも比較的高濃度に含まれる。大腿四頭筋についてジストロフィーハムスターとコントロールの骨格筋の遊離アミノ酸を比較したのが第3図 ( $n = 8$ ) である。これに示す様にジストロフィーハムスターの大腿四頭筋中には遊離アミノ酸が低値を示すものが多い。とくにグリシン ( $P < 0.001$ ), セリン, カルノシン ( $P < 0.01$ ),  $\beta$ -アラニン, アンセリン ( $P < 0.05$ ) が有意に低値を示した。タウリンは逆に高い傾向を示した。また腓腹筋, ヒラメ筋でも同様な傾向がみられた。

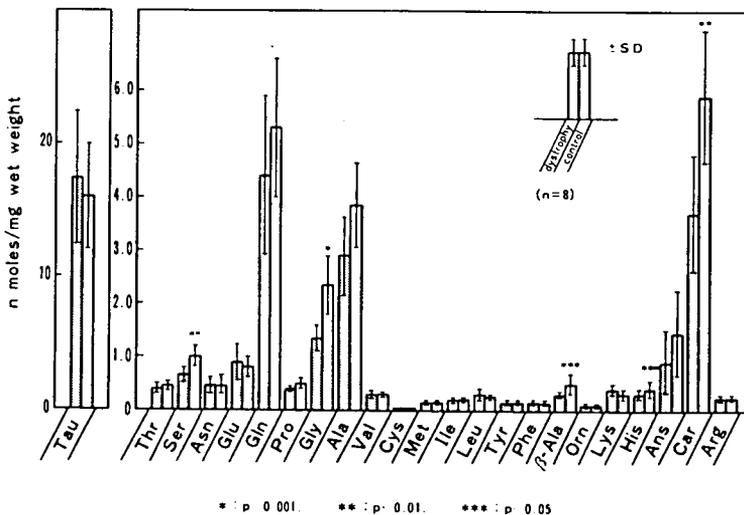
2. ジストロフィーハムスターとコントロールハムスター間のEDLの交換移植

ハムスターのEDLを交換移植した場合も, 昨年まで報告したマウスやラットの場合と同じく, graftの周辺から筋の再生が進む。

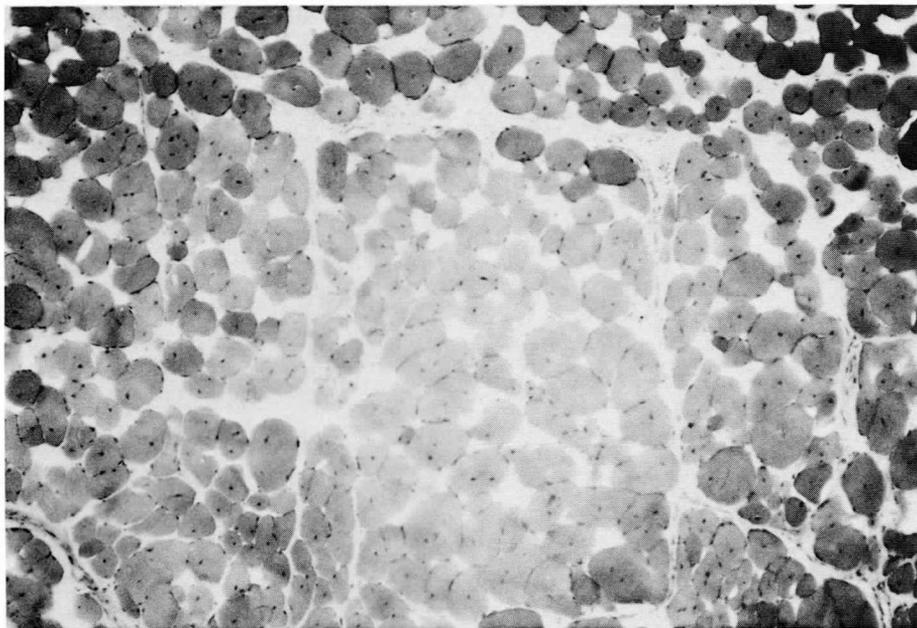
ジストロフィーハムスターのEDLをコントロールハムスターに移植し (以下dys  $\rightarrow$  cont と示す)

2ヶ月を経た再生筋の1例を第4図に, またこれと対をなし, コントロールハムスターのEDLをジストロフィーハムスターに移植した場合 (cont  $\rightarrow$  dys) の再生筋を同倍率で第5図に示した。これで見ると後者に細い筋線維が多い。このような交換移植筋を8組作り, 2ヶ月後それらの各々につき再生筋線維の数を示したものが第6図である。また, その直径の分布を第7図に示した。これに示す如くジストロフィーのEDLをコントロール動物に移植した場合は再生筋線維は20~40  $\mu$ mの直径のものがもっとも多いが, 逆の移植では20  $\mu$ mのものが圧倒的に多く, 明らかな差を示した。第7図はこれらをまとめたものである。上段は再生筋線維の数と直径を交換移植した再生筋の各群で比較したものである ( $n = 8$ )。再生筋線維の数はdys  $\rightarrow$  contの方がcont  $\rightarrow$  dysに比しやや多かったが, 有意の差はなかった。しかし直径では前者が有意 ( $P \leq 0.001$ ) に大きかった。図の下段は交換移植した8対につき, 各々のペアの再生筋線維の数と直径の比 (dys  $\rightarrow$  cont / cont  $\rightarrow$  dys) を求め, その平均とS. D. を示したものである。数の比は1.3, 直径の比は1.7である。

Free amino acid levels in Quadriceps of dystrophic hamster.

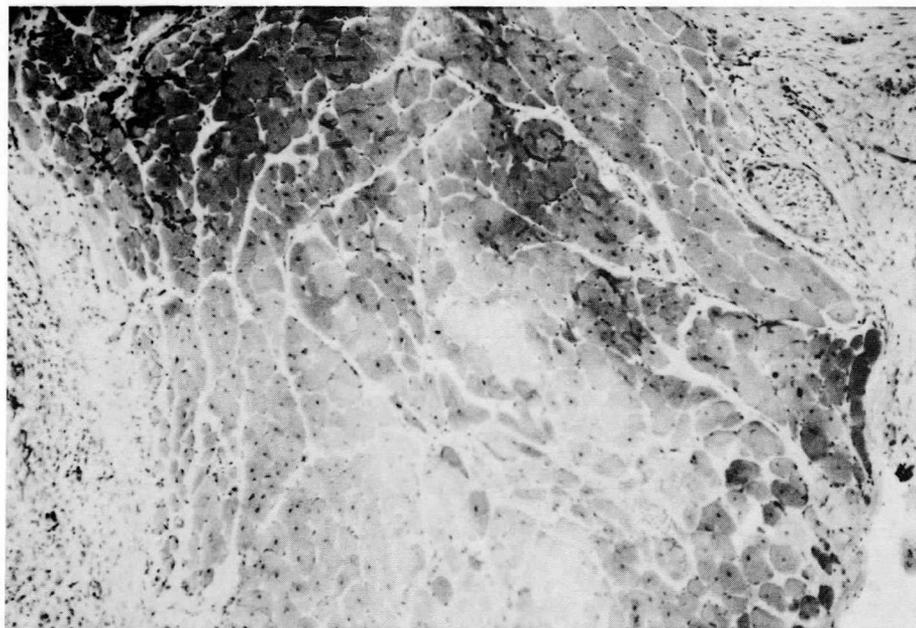


第3図



第 4 図

ジストロフィーハムスターの EDL をコントロールハムスターに移植後 2 ヶ月目の再生筋



第 5 図

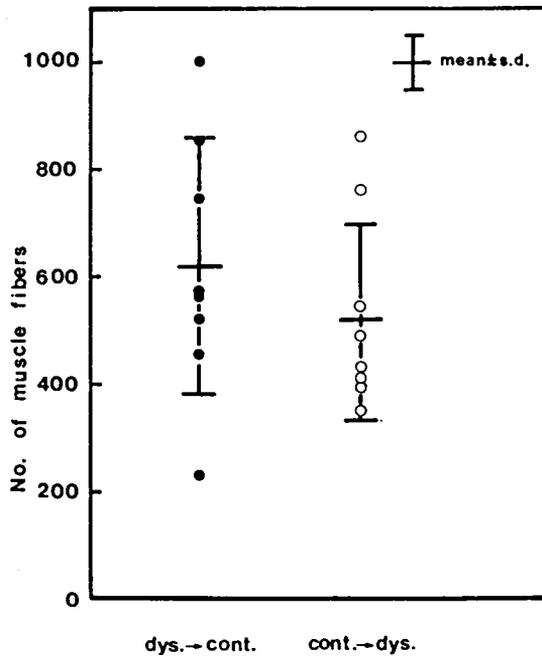
コントロールハムスターの EDL をジストロフィーハムスターに移植後 2 ヶ月目の再生筋 (第 4、第 5 図は交換移植したもので同倍率)

#### 考案及び結語

ハムスターに比し、血中、尿中、骨格筋中の遊離アミノ酸に変化がみられる。血中の遊離アミノ酸

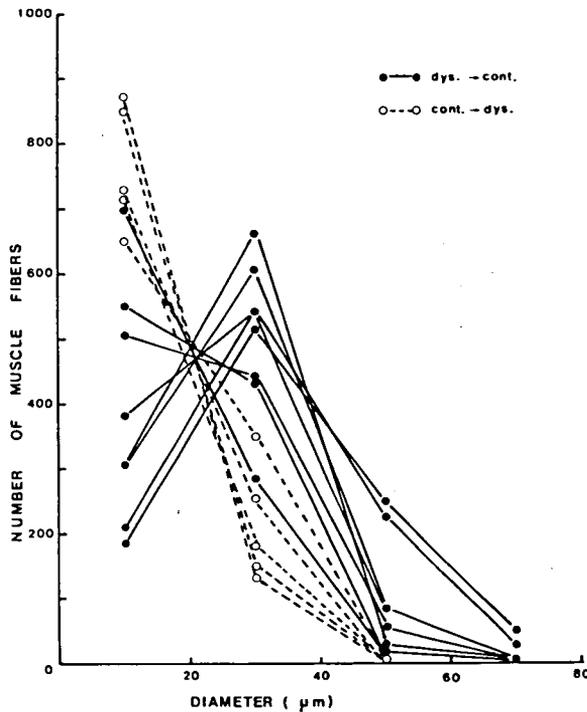
1) ジストロフィーハムスターではコントロール

Number of regenerated muscle fibers.



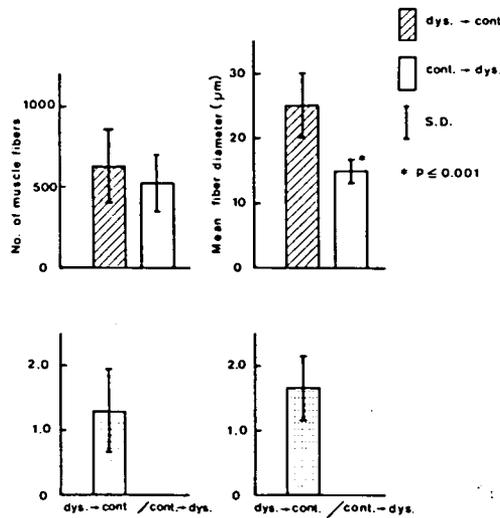
第 6 図

Distribution of diameter of regenerated muscle fibers



第 7 図

Comparison of number and diameter of regenerated muscle fibers.



第 8 図

はタウリンなどを除き、低値を示すものが多かった。また尿には部分的アミノ酸尿がみられた。これは血漿中の値より考えて overflow によるものでないことは明らかである。また骨格筋中の遊離アミノ酸も低値を示すものが多かった。これらは筋膜のアミノ酸の透過性の変化を疑わせる。

2) ジストロフィー・ハムスターとコントロールハムスターの EDL の交換移植を行った場合、移植後 2 ヶ月では再生筋線維の数には有意の差はないが、直径では dys → cont の方がその反対の場合より有意に太い。これがジストロフィーの host にみられた低アミノ酸血漿などの低栄養によるものか、あるいは神経性因子など他の原因によるものか明らかではなく、今後の研究が必要である。

## 文 献

- 1) Laird, J. L. and Timmer, R. F.: *Homotransplantation of dystrophic and normal muscle. Arch. Path., 80: 442, 1965.*
- 2) Hironaka, T. and Miyata, T.: *Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice. Exp. Neurol., 47: 1, 1975.*
- 3) Zalewski, A. A.: *Survival, reinnervation, and histochemical maturation of skeletal muscle xenografts in the nude mouse, Exp. Neurol., 58: 261, 1978.*
- 4) Wakayama, Y., Schotland, D. L., and Bonilla, E.: *Transplantation of human skeletal muscle to nude mice: A sequential morphologic study. Neurology, 30: 740, 1980.*
- 5) Homburger, F. et al., *Med. Exp., 6: 339, 1962.*
- 6) 野々村禎昭: ジストロフィー・ハムスターに関する知見, 筋の発生と分化に関する基礎的研究 (江橋班) 昭和56年度研究報告書, p. 1, 1981.

## 2 ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根伸筋の交換移植—組織学的変化

大 塚 正 徳<sup>\*</sup>  
 研究協力者 弘 中 哲 治<sup>\*\*</sup> 五十里 良 生<sup>\*\*</sup>  
 宮 田 雄 平<sup>\*</sup>

筋ジストロフィーの発症の原因を究明する有力な手段の一つとして筋の交換移植があり、我々はこれまでの研究において、交換移植の手法をジストロフィーチキンに適用した。この場合、定量的実験を容易とするため、また筋に対する神経の栄養的影響の観察を可能とする目的で、比較的分離した小型の筋、すなわち、長橈側手根伸筋 (ECRL) を選び、その神経の再支配に注目しながら交換移植の実験を行ってきた。移植筋の重量や収縮の性質については、すでに、55年度の報告にまとめてある。その中でチキンの筋ジストロフィー症の発症の原因として筋外性の要因が重要であることを示す結果を報告した。特に筋重量に関する実験の結果はミンスした胸筋を用いて行なわれた Cosmos らの交換移植の実験の結果とは異なるものであった。<sup>1) 2)</sup> Cosmos らは交換移植の実験の結果、チキンのジストロフィーは筋原性であると主張している。

一方、神経性の栄養的影響を強く受ける contraction time や half relaxation time はジストロフィーのチキンと正常のチキンの間で交換移植を行なった後にも、有意な値の変化を生じなかった。すなわち、宿主側の要因にしても、調べるパラメーターにより異常を示すものと示さないものがある。

ることが明らかとなった。このようなことから本実験では、さらに、交換移植を行なった筋についてその筋線維の数、大きさ、大きさのバラツキの程度について組織学的検索を行なった。

### 方 法

孵化後 2～3 日目の正常チキン (line 412) とジストロフィーのチキン (line 413) を用いて交換移植を行ない、移植後 60～65 日目に移植筋について生理学的実験を行なった後、摘出し、ホルマリンで固定した。筋の最大部の横断切片を作製し、HE 染色を行ない、適当な大きさに拡大した顕微鏡写真について細胞数を数えた後、一つ一つの細胞を切り取り、その重量から横断面積を換算した。筋移植の方法その他については 55 年度の報告に詳述してある<sup>1)</sup>。

### 結 果

移植 ECRL 筋：移植筋の筋線維細胞の数、大きさ、大きさのバラツキの程度 (変動係数) および小細胞による浸潤の度合について、測定の結果を表 1 にまとめた。筋細胞の数は宿主が正常である場合、移植筋が正常の方がジストロフィーである場合よりも多く、筋原性の異常を示した。しかし、正常の筋あるいはジストロフィーの筋同志の間で宿主の影響を比較すると、宿主が正常

\* 東京医科歯科大学・医学部・薬理学教室

\*\* 帝京大学・医学部・薬理学教室

である場合の方が大きな値を示した。殊に前者においては  $P < 0.02$  の統計的に有意の差を示した。細胞のサイズに関しては明らかに宿主側の影響を反映した結果であった。細胞のサイズの変動係数に関しては4種の移植筋 (Nn, Nd, Dn, Dd) の間に有意差はみられなかった。また小細胞による浸潤の程度にも差はみられなかったことから、免疫学的反応に関しても系統的な問題はなかったと思われる。

非移植 ECRL 筋との比較： 非移植 ECRL 筋の筋線維サイズの経時変化を図1に示した。ジストロフィーの筋線維はより大きな成長速度を示し、孵化後62日目では平均の線維断面積は  $34.3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$  であったのに対して、正常の筋の断面積は  $11.3 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$  であり両者は有意の差 ( $P < 0.01$ ) を示した。一方、移植筋の線維断面積も60~65日で、Nn, Nd, は  $11.8, 15.8 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ ; Dn, Dd は  $33.5, 32.4 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$  と、それぞれ、正常およびジストロフィーの非移植筋と同じ大きさに達し、正常とジストロフィーの間の成長速度の差異は宿主側の影響によることが明らかとなった(表1)。

図2は非移植筋について筋線維細胞の断面積の変動係数の経時変化を示している。孵化直後はかなり大きな変動を示したが、正常とジストロフィーの間には有意差がなかった。成長がすすむにつれ正常チキンでは次第にその係数が小さくなり、一方、ジストロフィーチキンでは一旦減少の傾向を示すが10日目あたりから以降は再び増加し、2ヶ月後には両者の間に大きな差が生じた。これに対して移植筋の変動係数はいずれのタイプにおいても大きな値を示し、お互い間に有意の差は存在しなかった(表1)。この結果から移植筋の再生・分化の何らかの過程が著しく妨げられていることが示唆された。

#### 考 察

表1の結果は測定したそれぞれのパラメータにより筋原性あるいは筋外性の因子の関与が異なることを示している。移植筋細胞数はこの実験系における筋の再生能を大きく反映しているものと思われ、移植筋群間の比較から、筋原性および筋外性の両方の要因が関係していることが示唆された。

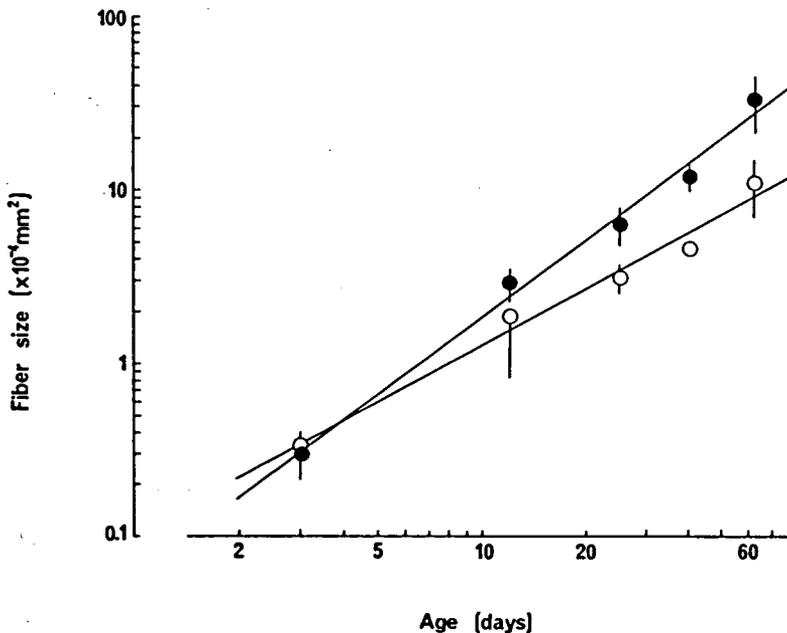


図1 非移植 ECRL 筋の筋線維サイズの経時変化

○, 正常チキン; ●, ジストロフィーチキン。縦棒は S. D., 斜めの直線は回帰線を示す。

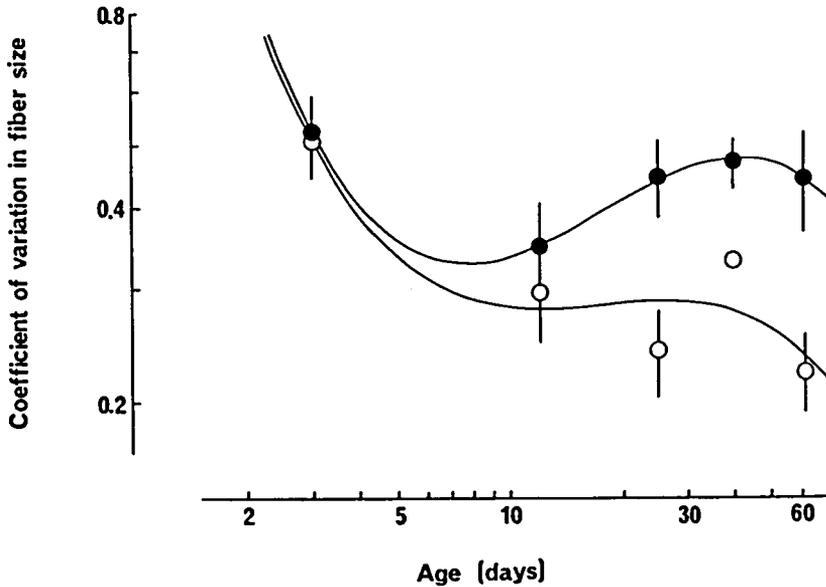


図2 非移植 ECRL 筋における筋線維サイズの変動係数の経時変化  
○, 正常チキン; ●, ジストロフィーチキン。縦棒はS. D., 曲線は3次のpolynomial regression を示す。

表1 移植 ECRL 筋の変化における組織学的測定の結果

	Nn	Nd	Dn	Dd	
	n=7	n=6	n=6	n=5	
Number of muscle fibers	11221 ±2237	5927 ±1791	3483 ±760	4132 ±493	
Fiber size (x10 <sup>-4</sup> mm <sup>2</sup> )	11.8 ±1.35	15.8 ±1.88	33.5 ±2.47	32.4 ±3.58	
SD/M	0.56 ±0.044	0.67 ±0.040	0.60 ±0.067	0.53 ±0.048	
% area occupied by small infiltrated cells	n=6 5.4 ±0.65	n=6 4.8 ±1.31	n=6 5.3 ±1.15	n=7 3.0 ±0.61	Mean ±S.E.M.

術後60~65日目。Nn, Nd, Dn, Dd: N, Dはそれぞれ正常およびジストロフィーのホストを, n, dは正常およびジストロフィーの筋を表わす。SD: standard deviation; M: mean. SD/Mは線維の断面積における変動係数を示している。

筋線維細胞のサイズに関するパラメータは筋の成長および維持の機構に関係していると思われるが、本実験ではホスト側に異常が存在することが示された。

我々は先にジストロフィーチキンの神経系に生

理的異常が存在することを示した<sup>3)</sup>。筋原性の要因が強いとされたチキンのジストロフィーにおいても、本実験でみられたように、早期に神経支配が成立した条件下でホストの影響が筋線維の断面積に明瞭に表われたことは興味深く<sup>1)</sup>(表1)、チキ

ンの筋ジストロフィー症の発症の原因に関して上記神経系の異常がどのように関与しているかが今後に残された興味ある問題の一つである。これに関連して、先に我々が筋ジストロフィーのマウスを用いて行なった交換移植の実験でも、ホスト側の要因がより重要であることを示す結果が得られている。<sup>6)7)</sup>

#### 文 献

- 1) 大塚正徳, 弘中哲治, 五十里良生, 宮田雄平: ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根伸筋の交換移植。厚生省神経疾患研究委託費, 筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班) 昭和55年度報告書, pp. 16-19.
- 2) Cosmos, E. and Butler, J. (1972). Differentiation of muscle transplanted between normal and dystrophic chickens. In *Research in Muscle Development and the Muscle Spindle* eds. B. Q. Banker, R. J. Przybylski, J. P. Van der Meulen, and M. Victor, PP. 149-162, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 3) Miyata, Y., Morimoto, S., Ikari, Y. and Hironaka, T. (1981). Origin of the spike discharges observed in muscles of dystrophic chickens. *Biomed. Res.* 2, 664-672.
- 4) Linkhart, T. A., Yee, G. W. and Wilson, B. W. (1975). Myogenic defect in acetylcholinesterase regulation in muscular dystrophy of the chicken. *Science* 14, 549-551.
- 5) Linkhart, T. A., Yee, G. W., Nieberg, P. S. and Wilson, B. W. (1976). Myogenic defect in muscular dystrophy of the chicken. *Developmental Biol.* 48, 447-457.
- 6) Hironaka, T. and Miyata, Y. (1973). Muscle transplantation in the aetiological elucidation of murine muscular dystrophy. *Nature* 244, 221-223.
- 7) Hironaka, T. and Miyata, Y. (1975). Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice. *Exp. Neurol.* 47, 1-15.

### 3 筋ジストロフィー症マウスと小人症 マウスの骨格筋の未熟度

研究協力者 戸塚 武\*  
渡辺 貴美\* 浦本 勲\*  
熊谷 俊幸\*\*

進行性筋ジストロフィー症は、病因、治療法はおろか対症療法開発の糸口さえも見出されていない、難病である。多数の研究者による長い研究の歴史を持ちながら、現在もこのような状態にあることは、この病気に対する根本的考え方、“骨格筋が進行性に変性萎縮する”，に間違いがあると思われる。病状の進行が加齢と密接に関連していることは、周知の事実である。そこで我々は、

“進行性=加齢”（筋の成長停止のため、加齢に伴い見掛け上筋萎縮が進行するように見える）という図式を設定し、筋ジストロフィー症（dy）マウスを用いて研究を進めてきた。その結果、図1に示すような結論に到達した<sup>1)</sup>。成長の止まった筋が、成長を続ける骨によって強制的に引き伸ばされることが、発症の直接的原因と考えられる。

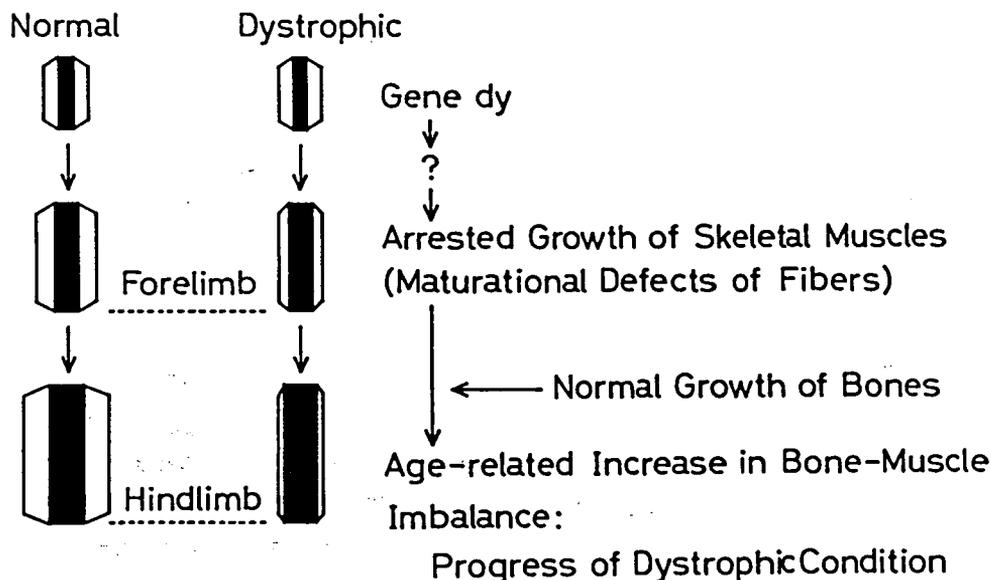


図1 マウスの筋ジストロフィー発症機構に関する“筋-骨不均衡”仮説

\* 愛知県心身障害者コロニー，発達障害研究所  
\*\* 同，中央病院

後肢の引きずり症状の初発時が後肢骨の急激な伸長成長期にあたること、重症の後肢に比べて著しく軽症（まったく正常だと言う人もいたが、我々は、前肢の耐久力が加齢に伴って著しく弱ることを明らかにした）の前肢の筋に後肢筋とはほぼ同程度の病変が認められること、前肢の軽症の原因は骨伸長成長が後肢に比べて低い（正常マウスでも同じ）ことによるらしいこと、小人症 (dw) 遺伝子を導入して dy マウスの成長を止めることで dy 症状を不顕化できること、などを本仮説の重要な証拠として発表した。ヒトでも、Duchenne 型筋ジス—小人症 (GH 欠乏による) 患児で筋ジス症状が著しく軽いことを Zatz<sup>3,4)</sup>らが報告した。また、dy ニワトリも、抗甲状腺剤投与により一種の小人症にされると、dy 症状が軽減されることを King<sup>5)</sup>らが報告している。

病因は、dy 筋で成長の停止がなぜ起るのかを突きとめることで、解明されると期待される。本研究の目的は、dy マウスの筋成長障害の病態を浮彫りにすることである。

### 材料と方法

#### 動物

dy マウス (C57BL/6J dy/dy), dw マウス (DW/J dw/dw), dy-dw マウス (前二者の雑種 BL-DW dy/dy dw/dw) とそれぞれに対応する正常マウスを用いた。ラットは 2 月齢の Wistar 系のものを用いた。

#### 電気生理学的検索

ウレタン麻酔した動物の坐骨神経 (Soleus の場合は後述) を電気刺激し、Gastrocnemius または Soleus からの誘発筋電位 (オシロスコープ) を写真記録した。5 Hz 連続刺激による筋電位の振幅の経時的変化を中心に解析した。詳しい方法は既に発表した。<sup>6-8)</sup>

#### 組織学的検索

ドライアイス—アセトン冷却下イソペンタン中で凍結させた筋の連続横断切片 (厚さ 20  $\mu\text{m}$ ) を HE, NADH-TR (Tetrazolium Reductase);

ATPase 染色した。ATPase 染色は、あまりきれいに行かなかったので、今回の報告では除外した。筋線維の直径 (短径) は、約 100 倍の顕微鏡写真により拡大鏡下で測定した (10  $\mu\text{m}$ —実測値 1 mm—以下の線維は結果から除外した)。

### 結果と考察

#### dy 筋の疲労抵抗性と未熟さ

dy マウスの筋が、非力ながら一種の疲労抵抗性を示すことが、Sandow と Brust (筋の電氣的直接的連続刺激による張力の経時的変化を調べた) により発見された。<sup>9)</sup> 一見矛盾するこの性質がどのような意味を持つのか、長く不明であった。我々は、dy 筋の疲労抵抗性 (坐骨神経連続刺激による誘発筋電位の振幅の経時的変化を測定) が未熟さからくるものであることを明らかにした。<sup>7)</sup> 不思議なことに、典型的な成長障害モデル動物 (現在では老化のモデル動物としても使われている) である小人症 (dw) マウスの筋は、誘発筋電位の特徴からみると、正常マウスとまったく同様に成熟することを見出した。<sup>10)</sup> 例えば、2~3 月齢の dw マウスと正常マウスでは、5 Hz の坐骨神経連続刺激により誘発される Gastrocnemius の筋電位の振幅は、同様の経時的減少 (数%) 変化を示した (図 2)。若い (例えば 20~30 日齢) 時は、dw マウスでも正常マウスでも、誘発筋電位の経時的減少傾向は小さかった (10% 程度)。dw マウスの筋には、形態的未熟 (筋線維が細い: 後述) と内的成熟が併存するわけである。

dy 筋の内的成熟障害が dw 筋の形態的成熟障害に先行しているらしいことが、dy-dw マウス (dy 症状はほとんどみられない) の筋が電気生理学的に dy 筋の特徴を示す (図 2, B) ことから、推察された。<sup>10)</sup> dy-dw マウスのこの性質は、別の観点からも重要なこと、" GH (成長ホルモン) の質的異常が dy 病変の発生誘因になっている可能性は少ない", を示唆している。なぜなら、dy-dw マウスは dw 遺伝子のため GH と T<sub>4</sub> (チロキシン) を欠いているはずである。

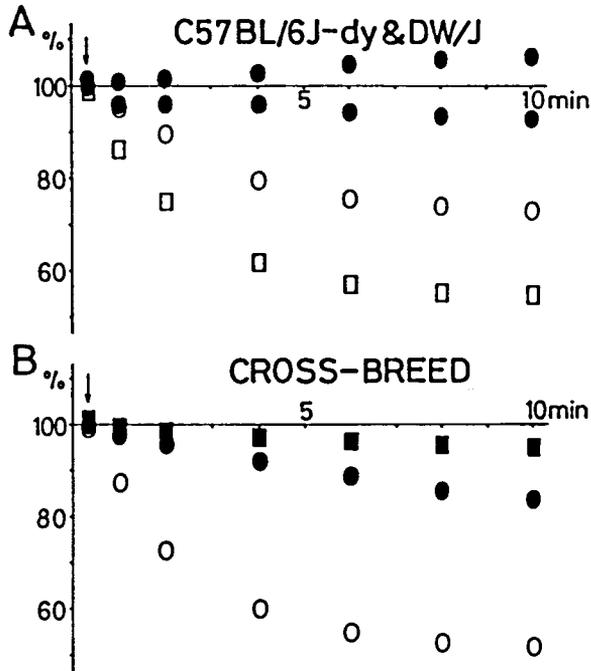


図2 dy, dw, dy-dw マウスの Gastrocnemius の誘発筋電位の特徴

坐骨神経を 5 Hz で連続刺激した時の誘発筋電位の振幅の経時変化を% (5 Hz 刺激の直前の値を 100%) で表してある。A) 2~3 月齢の, dy (●), dy の正常对照マウス (○), dw + dw の正常对照マウス (□: 両者はまったく同様であったのでまとめた)。正常マウスでも, strain により差がみられる (○と□)。B) 2~3 月の雑種 BL-DW (C57BL/6J × DW/J) の dy (■), dw + 正常マウス (○: 両者はまったく同様であった)。dy-dw マウス (●) は 1 匹 (98 日齢) の値 (現在は数匹で同様の結果を得ている) で, その他は数匹以上の平均値である。

#### dw 筋の組織学的特徴

dw マウスの筋は, その低体重に見合った程度に小さい。筋線維は, NADH-TR 染色により, ほぼ正常筋同様, 大まかに三種類 (染色の濃淡による) に分けられるが, 正常筋に比べると著しく細い (図 3 と 4)。このことから, 電気生理学的にみた dw 筋の内的成熟が, 筋線維の分化と関連している可能性が考えられる。典型的な "Slow" (赤, 遅) 筋である Soleus の筋線維が NADH-TR で濃, 中間のほぼ二種類からなる一方, Gastrocnemius の筋線維は濃, 中間, 淡の三種類からなり "Fast" (白, 速) 筋的 (濃, 中間線維が集中的にみられる Slow 筋的部域もある) である (図 5)。そこで, Soleus と Gastrocnemius の誘発筋電位を比較して

みた。マウスの Soleus は細いので, 今回は 2 月齢のラットを用いた。ラットの Gastrocnemius は, マウスのものとはほぼ同様に, 5 Hz の坐骨神経連続刺激で誘発筋電位の振幅に急激な減少がみられた (図 6)。Soleus の場合, Gastrocnemius から Soleus へ向う神経の筋枝を電気刺激することではじめてきれいな二相性 (Negative-Positive) の誘発筋電位パターンが得られた。5 Hz の連続刺激を行うと, Gastrocnemius とは対照的に, 筋電位の振幅は徐々に, しかし確実に増大した。これらのことから, 電気生理学的にみた筋の成熟変化が筋線維の分化と関連している可能性が高いことがうかがわれる。

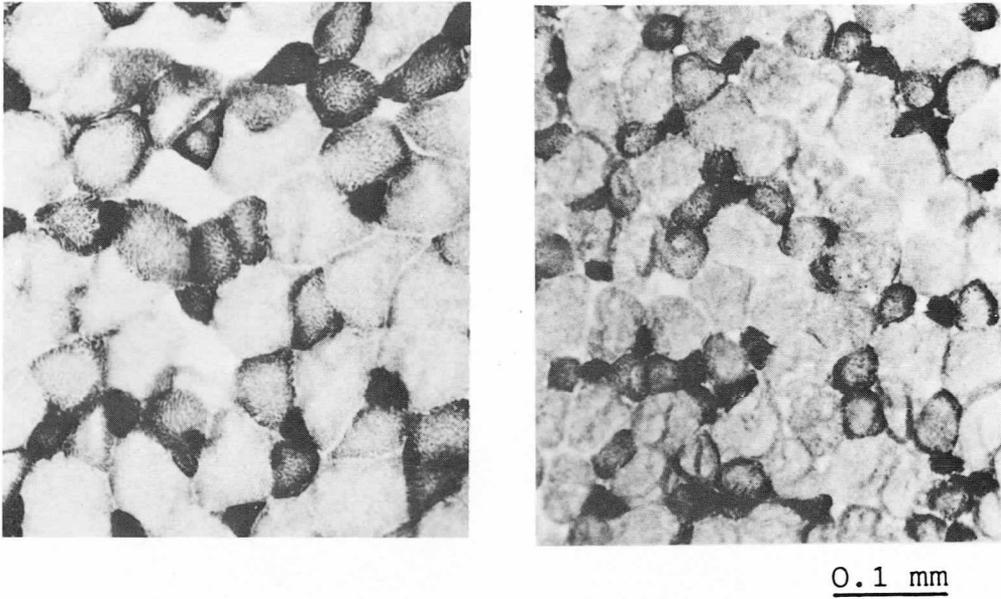


図3 dw (右; 150日齢) と正常DW/Jマウス (左; 70日齢) の前肢筋 (Triceps) の横断像(NADH-TR 染色)

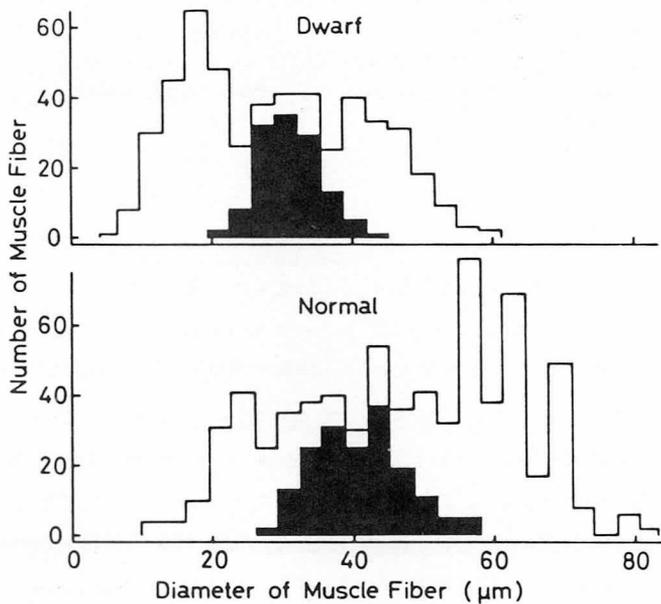
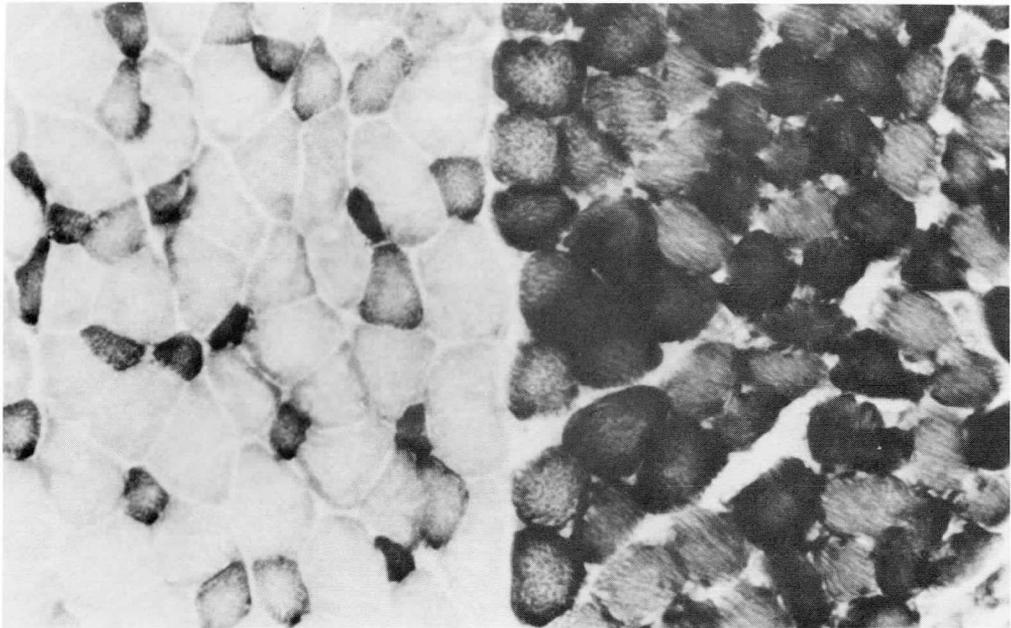


図4 dw と正常DW/J マウス (2月齢) の前肢筋 (Triceps) における筋線維の太さ分布  
 黒塗の部分、NADH-TR で中間的に染まった線維を示す。  
 濃、淡染の線維は、黒塗部分のそれぞれ左側 (細い方)、右側にきれいに分かれて分布した。

## Gastrocnemius

## Soleus



0.1 mm

図5 正常 DW/J マウス (2.5 月齢) の後肢筋の横断像 (NADH-TR 染色)

### dy 筋の組織学的特徴

dy マウスの筋は、体重に比べて著しく小さい。大腿直筋を横断面の直径 (凍結切片像の短径; 図7) でみても、20日齢 ( $1.9 \pm 0.2 \text{ mm}$ ,  $n = 4$ ), 30日齢 ( $1.9 \pm 0.1 \text{ mm}$ ,  $n = 5$ ), 100日齢 ( $2.1 \pm 0.1 \text{ mm}$ ,  $n = 4$ ) と細いままであり、加齢と共に肥大する正常筋 (20日齢で  $2.2 \pm 0.1 \text{ mm}$ ,  $n = 4$ ; 30日齢で  $2.5 \pm 0.3 \text{ mm}$ ,  $n = 4$ ; 70日齢では  $3 \text{ mm}$ 程になる) とは対照的であった。

dy 筋の筋線維の太さは異常に不揃いで、全体的には細い線維が多い反面、異常に肥大した線維も散見された。また、NADH-TR 染色で濃染 (ミトコンドリアに富む) する細い線維が、比較的一部領域に集中している (偏在) 傾向がみられた。それと関連して注目すべきことは、110日齢 (後肢は既に麻痺) でも、一部のそのような異常領域以外のところの線維は、比較的しっかりした様子

を保っていた。NADH-TR 染色で濃、中間、淡と三種類に線維を分類することは一応可能であったが、正常筋の場合ほどすっきりしなかった。今回の実験では、dy 筋の特徴がどのような線維の分化異常と関連するのか、特定することはできなかった。

dy 筋の特徴である中心核線維は一般に、変性線維に代わる再生線維と考えられてきた。もしそうであれば、大小不揃いの dy 筋線維の中で、中心核を持つ線維は NADH-TR 濃染の細いものに比較的限定されるはずである。しかし、実際は、あらゆる太さの (NADH-TR での濃淡とも関係なく) 線維に、中心核を持つものが認められた (図9)。この結果は、1枚の切片 (図8: 筋の全体像) によって中心核線維を同定したものであり、それでも 20~35% もみられたことから、もし連続切片で検討すればほとんど全部の筋線維が中心核を持

っているのではないかとと思われる。このことは、 からなることを示唆している。  
dy 筋が未熟な(または脱分化的に若返った)線維

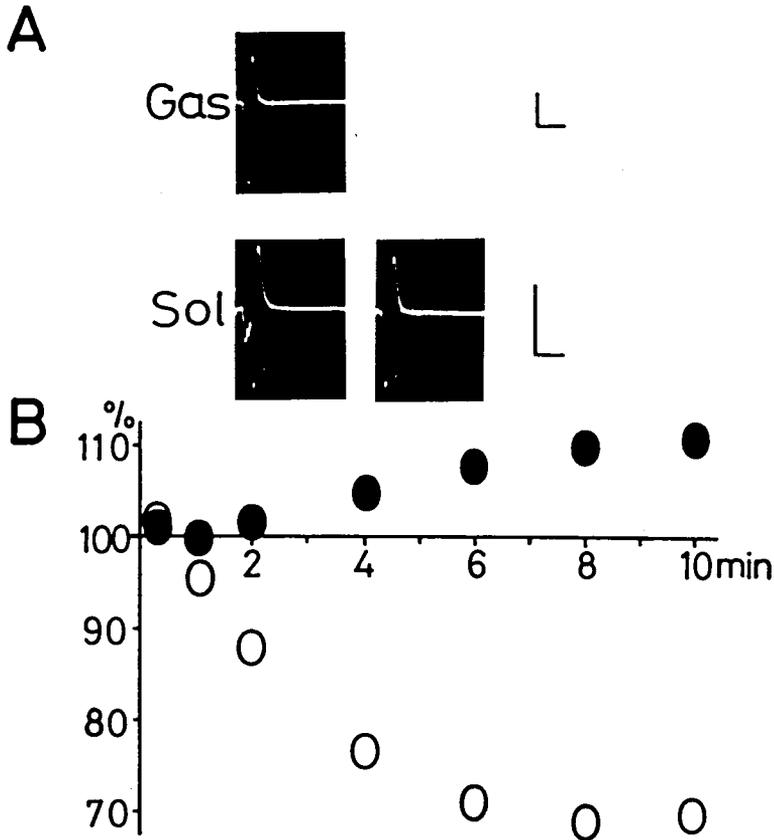


図6 ラット(2月齢)のGastrocnemiusとSoleusの誘発筋電位の比較

A) 坐骨神経(GasとSo(写真左)または、Soleusの近くの神経の筋枝(Sol 写真右)を刺激した時の誘発筋電位パターン(Calibration: 20 mV-4 msec)。B) 坐骨神経(Gastrocnemius, ○)または、Soleusの近くの神経の筋枝(Soleus, ●)を5 Hz連続刺激した時の、誘発筋電位の振幅の経時的变化(連続刺激開始直前の振幅値を100%とした)。

dy筋線維の大小不揃いの原因(dyの病因につながると思われる)は不明であるが、我々は先の報告の中で、コレステロール(代謝, 分布)異常<sup>11)</sup>を候補として、一つの可能と思われるmechanism<sup>12)</sup>を討論した。また、異常肥大線維の原因は、筋が骨により強制的に引き伸ばされることにあるかもしれない。Solaらは<sup>13)</sup>、正常筋でも、強制的持続的引き伸ばしにより異常肥大が誘発される(実験的

に)ことを報告している。本研究班の杉田と埜中<sup>14)</sup>は、dyニワトリ筋で実験的に変性させられた部域で再生してきた筋線維が大小不揃いであることを見出し、このような事実などから、筋線維の大小不同がdy筋の本質的異常によるだろうと結論している(私信)。

dy筋の成熟(分化)障害は、成獣レベルで正常筋と比較した場合、見掛け上dy Fast筋のSlow

化または dy Slow 筋の Fast 化現象として観察されるであろう (図 10)。実際, Parslow と Parry<sup>15)</sup>

は既にこのような現象を報告している (説明は異なる)。

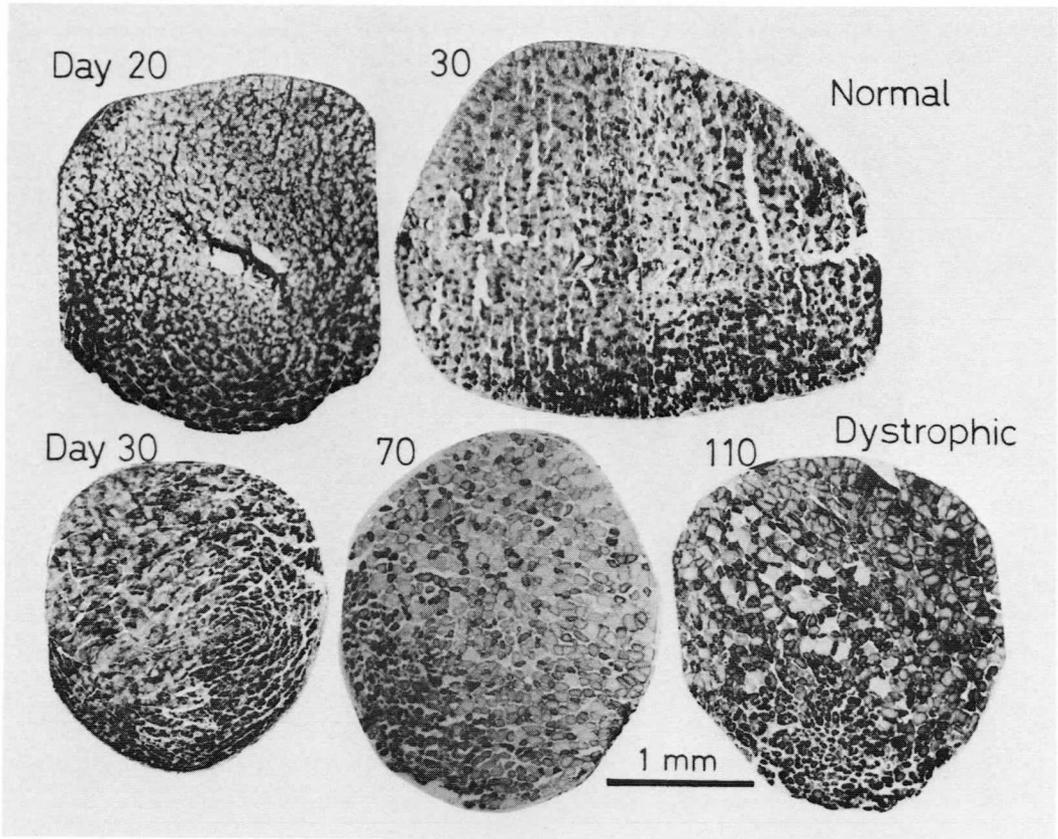


図 7 dy マウス大腿直筋の横断像 (NADH-TR 染色)

上段: 正常 C 57 BL/6J マウス, 下段: dy マウス

正常マウスの筋でも濃染線維の偏在がみられる。dy マウスの筋で濃染線維が集中している領域があり, このような部分に特に異常が目立つ。

### 結 論

1) 小人症マウスの骨格筋は, 電気生理学的にみると, ほぼ正常な成熟をする。その筋線維は, 細いままであるが, NADH-TR 染色でみるかぎりほぼ正常に分化している。

2) 筋ジス-小人症マウスの筋は, 電気生理学的にみて, 筋ジス筋の特徴をもっている。

3) 筋ジス筋の中心核筋線維は, 再生線維を意味するのではなく, 筋ジス筋線維の本質的特徴 (未

熟さ) によると考えられる (加齢に伴う筋-骨不均衡の増大からくる筋代謝の活性化による見掛けの脱分化または若返りによるという可能性は否定できない)。

4) 筋ジスマウスの筋が未熟であることは, 見掛け上 dy Fast 筋の Slow 化, dy Slow 筋の Fast 化現象としても観察されるだろうということを討論した。

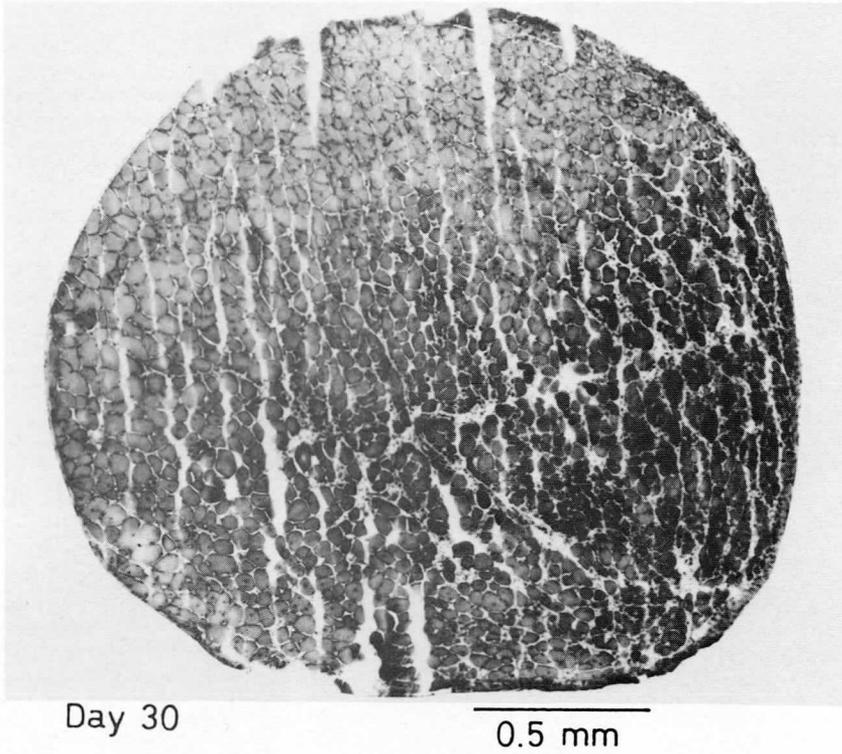


図8 dyマウス大腿直筋の横断像 (HE染色)

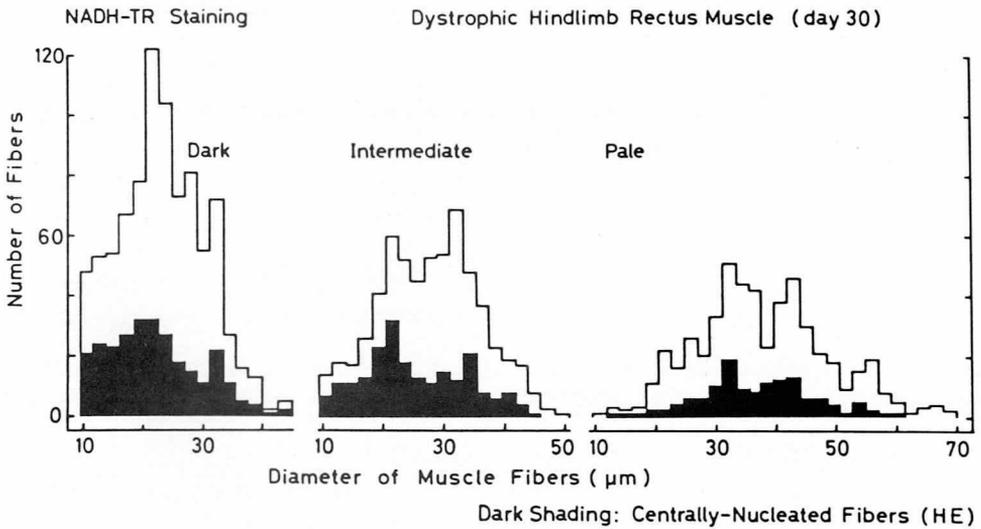


図9 dyマウス大腿直筋における筋線維の太さ分布  
 NADH-TR染色により濃(左), 中間, 淡(右)染線維に分け, HE染色により中心核のある(黒塗り部分)なしを調べた。

## Differentiation of Muscles

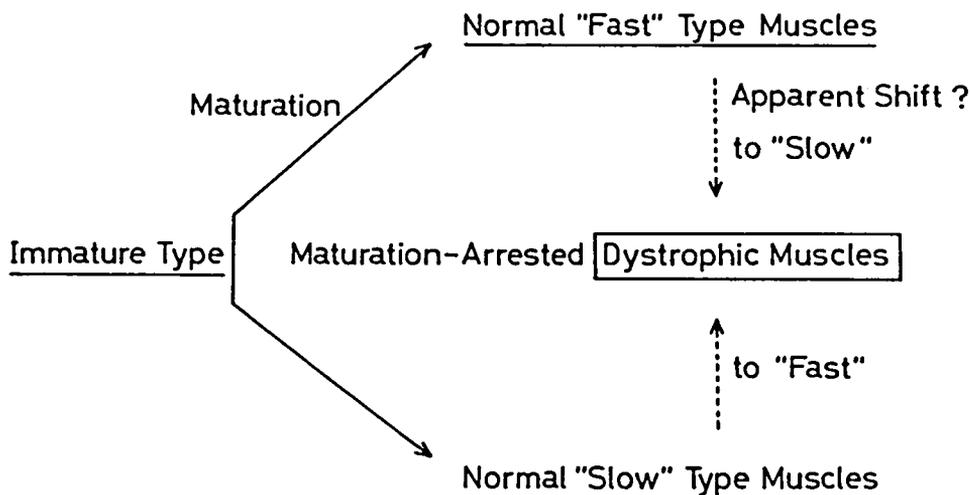


図10 dy筋が未熟であることから予想される dy Fast筋の見掛けのSlow化現象の模式図

## 文 献

- 1) Totsuka T., Watanabe K., Kiyono S. (1981) Masking of a dystrophic symptom in genotypically dystrophic-dwarf mice. *Proc. Japan Acad.*, 57B: 109-113.
- 2) Totsuka T., Watanabe K. (1981) Some evidence for concurrent involvement of the fore- and hind-limb muscles in murine muscular dystrophy. *Exp. Anim.*, 30: 465-470.
- 3) Zatz M., Betti R. T. B., Levy, J. A. (1981) Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency. *Am. J. Med. Genet.*, 10: 301-304.
- 4) Zatz M., Frota-Pessoa O. (1981) Suggestion for a possible mitigating treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.*, 10: 305-307.
- 5) King, D. B., King C. R., Jacaruso R. B. (1981) Avian muscular dystrophy: Thyroid influence on pectoralis muscle growth and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Life Sci.*, 28: 577-585.
- 6) Uramoto I. (1981) Ontogenetic differences in muscular potentials and their potentiation following tetanic stimulation in the rat. *Electromyogr. clin. Neurophysiol.*, 21: 433-445.
- 7) Watanabe K., Uramoto I., Totsuka T. (1982) Different time courses of reduction in muscular potentials in dystrophic and normal mice. *J. Physiol. Soc. Japan*, 44: 99-102.
- 8) Watanabe K., Uramoto I., Totsuka T. (1982) Characteristics of muscular potentials evoked by single shocks to sciatic nerves and their different changes due to repetitive stimulation at a moderate frequency in dystrophic and normal mice. *Electromyogr. clin. Neurophysiol.*, in press.
- 9) Sandow A., Brust M. (1962) Effects of activity on contractions of normal and dystrophic mouse muscles. *Am. J. Physiol.*, 202: 815-820.
- 10) Totsuka T., Watanabe K., Uramoto I. (1982) Dystrophy-specific alterations in muscular potentials under prolonged sciatic stimulation of 5 per sec in dystrophic, dwarf and their crossbred mice. *Cong. Anom.*, 22: 207-210.
- 11) Totsuka T., Watanabe K., Koyono S. (1981) Maturation defects of muscle fibers in the muscular dystrophic mouse. *Cong. Anom.*, 21: 253-259.
- 12) Totsuka T., Watanabe K. (1982) Elevated free cholesterol content in hindleg muscle of the dystrophic mouse during a postnatal period from 2.1 to 30 weeks. *Exp. Anim.*, 31: 139-142.
- 13) Sola O. M., Christensen D. L., Martin A. W. (1973) Hypertrophy and hyperplasia of adult chicken anterior latissimus dorsi muscles following stretch with and without denervation. *Exp. Neurol.*, 41: 76-100.
- 14) 杉田秀夫, 桒中征哉 (1982) ニワトリジストロフィー筋の再生 (野村班) 報告集,
- 15) Parslow H. G., Parry D. J. (1981) Slowing of fast-twitch muscle in the dystrophic mouse. *Exp. Neurol.*, 73: 686-699.

## Ⅱ 微 細 形 態

4. 骨格筋の小窩について 31
5. 細胞骨格の分化発達 —— 中間  
径フィラメントの存在様式 35

## 4 骨格筋の小窩について

岩 崎 祐 三

### 1 ハムスター骨格筋の小窩

実験動物中央研究所より供給された、5週令雄ジストロフィーハムスター (BIO 14.6) と対照ハムスター (BIO FIB) のひらめ筋 (Sol) と長指伸筋 (EDL) について、凍結切断法による観察を行った。

試料固定と凍結切断の条件は前報<sup>1)</sup>に準じた。正常ハムスターの骨格筋では筋細胞膜における小窩の配列に、正常ニワトリ骨格筋にみられたと同様な規則性がみられた。つまり、小窩の集団が一定の距離をへだてて配列している (Fig 1) 細胞膜上の小窩の密度は  $10\mu m^2$  あたりは  $\times 300$  で同週令の正常ニワトリのそれより高い傾向がみられた。個々の小窩の形態はニワトリのそれに極めて類似しており、その直径も  $30 \sim 100nm$  と、ニワトリ骨格筋の場合と同様かなりばらつきがある (Fig 2)

小窩の配列様式をもって、SolとEDLを識別することは困難であった。

ジストロフィーハムスターについてみると、ジストロフィー鶏にみられたような小窩の配列に規則性が失なわれている筋細胞膜が一部にみられたが、多くの筋膜では Figs. 3 および 4 にみられるように小窩が一定の方向性をもって配列していた。しかし、これらの線維では単位面積あたりの小窩の数が同週令の正常ハムスター (Fig 1) より明らかに減少していた。Fig 3, 4 のような所見は、2週令の幼弱正常ニワトリの筋細胞膜の構造に類似している。今回、凍結切断を行なったジストロフ

イーハムスター筋には細い再生線維が多数みられたので、Figs. 3 や 4 は恐らくこれらの再生線維である可能性が大きいと思われるが今後更に検討をつづける予定である。

### 2 ジストロフィー鶏の骨格筋の小窩について

ジストロフィー鶏では加齢にともない筋細胞膜の小窩の密度が増加、またその配列に規則性が失なわれていることを既に報告した<sup>1)</sup>。

そこで、この小窩の本態を明らかにする目的で小窩の直径の計測を行なった。まず培養筋管ではすべての小窩が  $50nm$  以下の径であった。次に正常鶏の骨格筋についてみると、鶏化時の浅胸筋を除くと  $50nm$  以下の小窩の占める割合は  $\times 30\%$  である (Table 1)。ここで、筋管や極めて未熟な鶏化時の浅胸筋では横管系が完成されていないことから、これらの未熟な細胞や線維にみられる  $50nm$  以下の小さな小窩は pinocytotic vesicle である可能性が大きい。また、成熟筋においては、pinocytosis は、ほとんどみられないと考えられているので、成熟筋にみられ大きな径をもつ小窩は恐らく横管系の細胞膜表面への開口部と考えるのが妥当であろう。

そこで、ジストロフィー鶏についてみると、罹患筋における小窩の増加は、直径  $50nm$  以下の小さな小窩の増加によることが明らかになった (Table 2)。更に興味深いのは、罹患筋では単に小さな小窩が増加しているのみならず、 $50nm$  以上の大型の小窩の密度が低下しているようである。つまり正常成熟鶏では  $10\mu m^2$  あたりの  $50nm$  以上の大型小窩の数の  $\times 100$  であるのに対し、ジストロフィ



Fig 1 5週令正常ハムスター長指伸筋の筋膜P面。小高のグルーピングがみられる。× 10,000

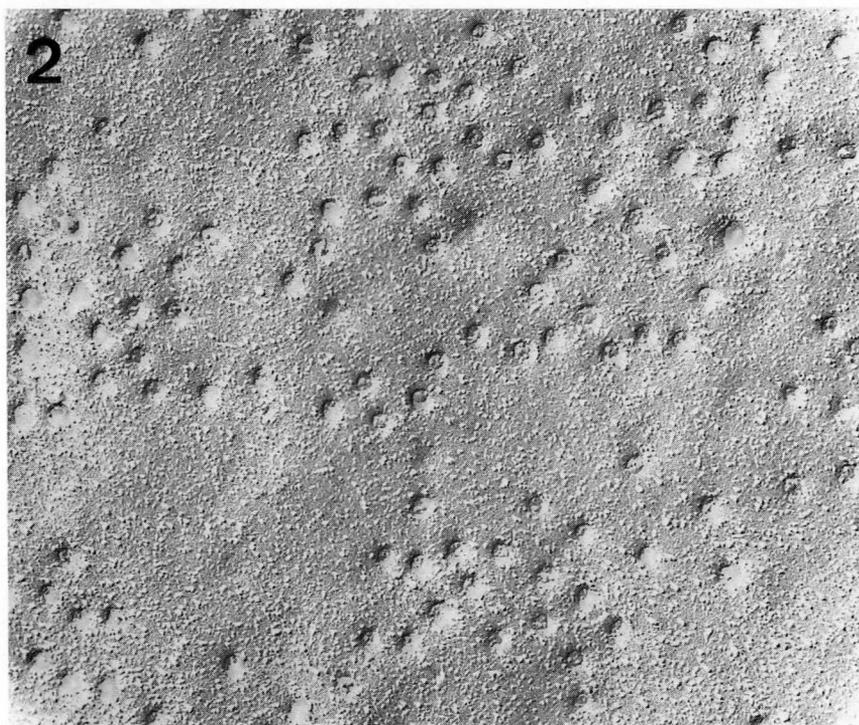


Fig 2 Fig 1の高倍像。 × 60,000

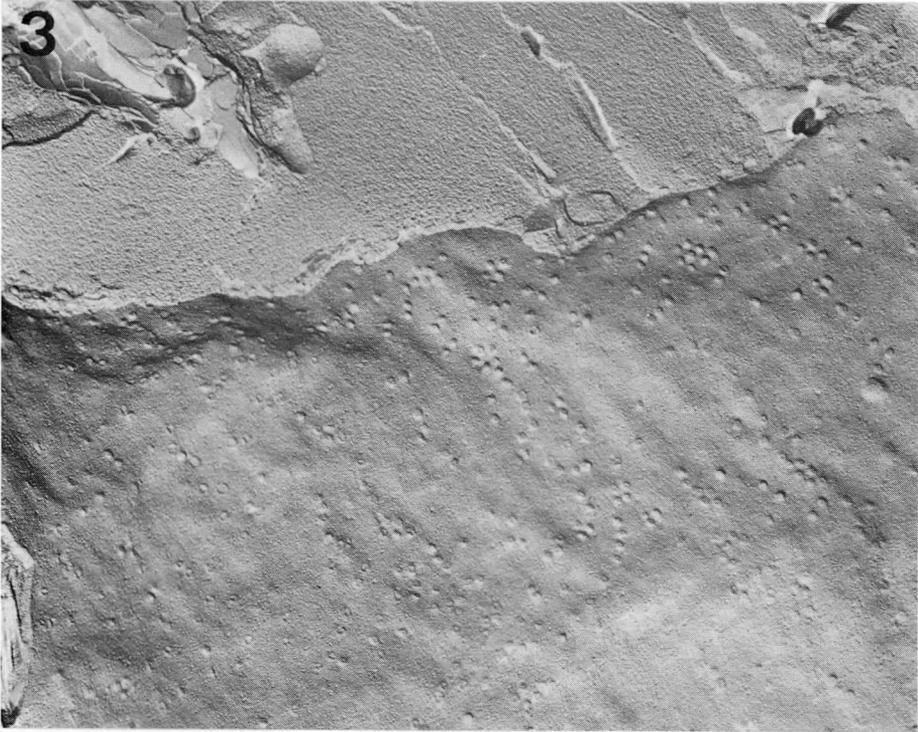


Fig 3 5週令ジストロフィーハムスター長指伸筋の凍結割断像 × 22,000

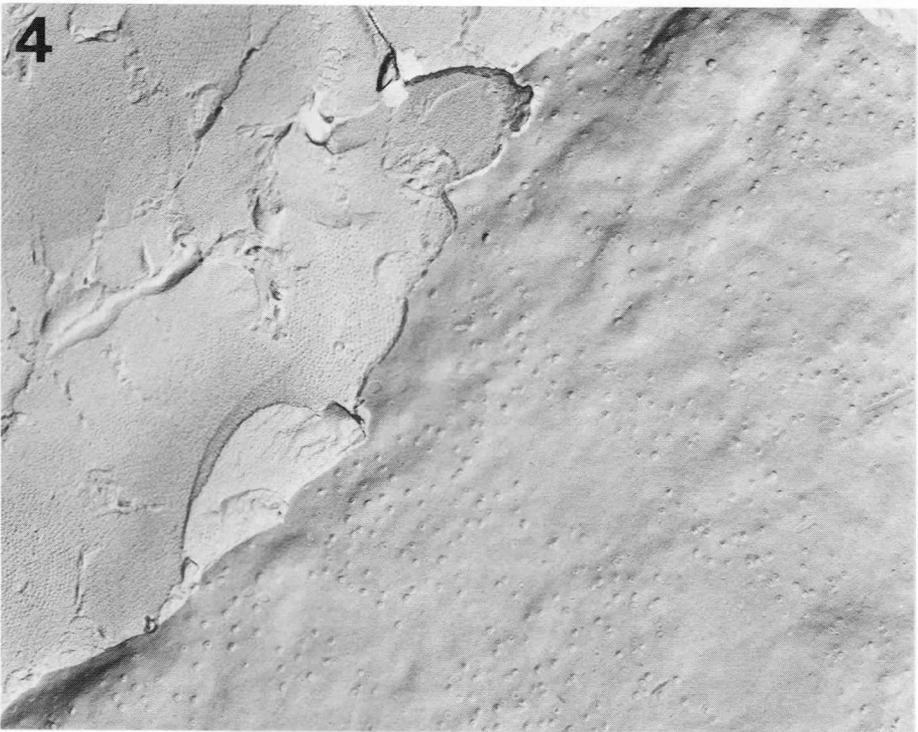


Fig 4 5週令ジストロフィーハムスター長指伸筋の凍結割断像 × 15,000

Table 1 Caveolar density and fiber diameter in control chickens

Muscles	Ages		
	day 0	2 weeks	5 weeks
Sup. pect.	108.6 ± 3.6* ( 98% )** 2.7 ± 0.2 ***	128.1 ± 14.8 ( 29% ) 10.2 ± 0.7	140.1 ± 4.0 ( 29% ) 26.8 ± 1.3
Lat. adduct.	106.4 ± 1.4 ( 14% ) 8.3 ± 0.2	140.0 ± 9.2 ( 28% ) 11.3 ± 0.4	139.7 ± 8.0 ( 31% ) 26.6 ± 1.5

\* the number of caveolae per 10  $\mu\text{m}^2$  of plasma membrane (mean ± SE)

\*\* the percentage of caveolae with a diameter of 50 nm or less

\*\*\* fiber diameter in  $\mu\text{m}$  (mean ± SE)

Table 2 Caveolar density and fiber diameter in dystrophic chickens

Muscles	Ages		
	day 0	2 weeks	5 weeks
Sup. pect.	111.5 ± 5.3* ( 97% )** 2.4 ± 0.2***	199.7 ± 17.3 ( 71% ) 8.8 ± 0.5	241.5 ± 5.2 ( 84% ) 31.3 ± 1.9
Lat. adduct.	105.3 ± 2.9 ( 14% ) 7.1 ± 0.4	131.1 ± 9.3 ( 26% ) 11.1 ± 0.6	261.8 ± 11.7 ( 59% ) 30.8 ± 2.2

\* the number of caveolae per 10  $\mu\text{m}$  of plasma membrane (mean ± SE)

\*\* the percentage of caveolae with a diameter of 50 nm or less

\*\*\* fiber diameter in  $\mu\text{m}$  (mean ± SE)

一鶏の浅胸筋のそれは、2週令で平均58、5週令で39に減少していた。Bankerらは未熟な筋で横管系が充分機能していない場合に Pinocytosis の亢進がみられることを報告しているが、Libeliusらのいうジストロフィー筋のT-tubule endocytosisなる状態が、必ずしも横管系の機能亢進にともなう横管の拡大ではなく、むしろ横管系の変性にともなう代償作用としての pinocytosis の亢進状態と考えることもできるように思う。

#### 文 献

- 1) Iwasaki, Y. (1982). A freeze-fracture electron microscopic study of dystrophic chicken. In *Muscular dystrophy* Ebashi, S. edit. University of Tokyo Press, Tokyo.
- 2) Banker, B. Q., Hirst, N. S., Chester, C. S. and Fok, R. Y. (1979). Histometric and electron cytochemical study of muscle in the dystrophic mouse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 317: 630-648.
- 3) Libelius, R., Jirmanova, I., Lundquist, I., Thesleff, S. and Barnard, E. A. (1979). T-tubule endocytosis in dystrophic chicken muscle and its relation to muscle fiber degeneration. *Acta Neuropath.*, 48: 31-38.

## 5 細胞骨格の分化発達—中間径フィラメントの存在様式

石川 春 律

研究協力者 月田 承一郎

月田 早智子

白 倉 治 郎

細胞骨格の主な構成要素の一つである中間径フィラメントはほとんどすべての真核細胞に存在するが、それを構成する蛋白質は細胞特異性が高い。筋細胞ではデスミン(desmin, スケレチンskeletin)と呼ばれる分子量約 53,000の蛋白質からなる中間径フィラメントが特異的に存在する<sup>1,2)</sup>。デスミンはしたがって分化した筋細胞のみが合成する蛋白質といえる。

骨格筋細胞において、中間径フィラメントは筋発達期に豊富に出現する<sup>3)</sup>。発達が進むにつれ、その数は減少し、成熟した筋細胞では極く少数見出されるのみである。一方、抗デスミン抗体を使った蛍光抗体法では、成熟筋細胞にも多量のデスミンが検出され、その上Z帯のレベルに一致して明瞭な横紋をなして分布することが示された<sup>4,5,6)</sup>。このことから、デスミンが筋原線維の横紋の位相を揃えるなどの重要な役割を果たすと唱えられるに至った<sup>7)</sup>。

蛍光抗体法で成熟骨格筋細胞に多量のデスミンが示されるにかかわらず、電子顕微鏡下に中間径フィラメントが極く少数しか見出されないことは興味深い。この蛋白質が中間径フィラメント以外の形で存在する可能性もあり、その存在様式が一つの重要な課題となってきた。

また、最近、この中間径フィラメントが増量する筋疾患が見出され、新しい型のdistal myopathy

として記載されている<sup>8)</sup>。

われわれは中間径フィラメントの存在様式を明らかにするために、まず、ヒト筋をはじめいろいろな動物の筋について電子顕微鏡的に検索を行なったので、その結果を報告する。

### 材 料 と 方 法

材料として、ヒト腓腹筋、サル横隔膜・外眼筋、マウス腓腹筋・横隔膜・外眼筋・耳筋、ニワトリ胸筋、広背筋を主な観察対象とした。型のごとくグルタルアルデヒド—四酸化オスミウム固定を施し、脱水・包埋ののち、超薄切片を作製し、電子顕微鏡により観察した。

### 結 果 と 考 察

検索された筋のうち、サル横隔膜を除くすべての筋では、中間径フィラメントは極く少数見出されるのみであった。これに対し、サル横隔膜の筋細胞には散在性ではあるが、よく発達した中間径フィラメントを観察することができた。

健常と考えられたサルの横隔膜筋細胞は筋原線維間に比較的少量の筋形質を有していた。特徴的な像は、筋細胞の縦断切片で、Z帯のレベルで筋原線維相互間を横に結ぶように中間径フィラメントが集合束をなして分布することであった(図1)。この束は切片が筋原線維表面を通る場合に明瞭に観察されたが、すべてのZ帯レベルに規則的に分布することはなく、散在性に見出されるのみであ

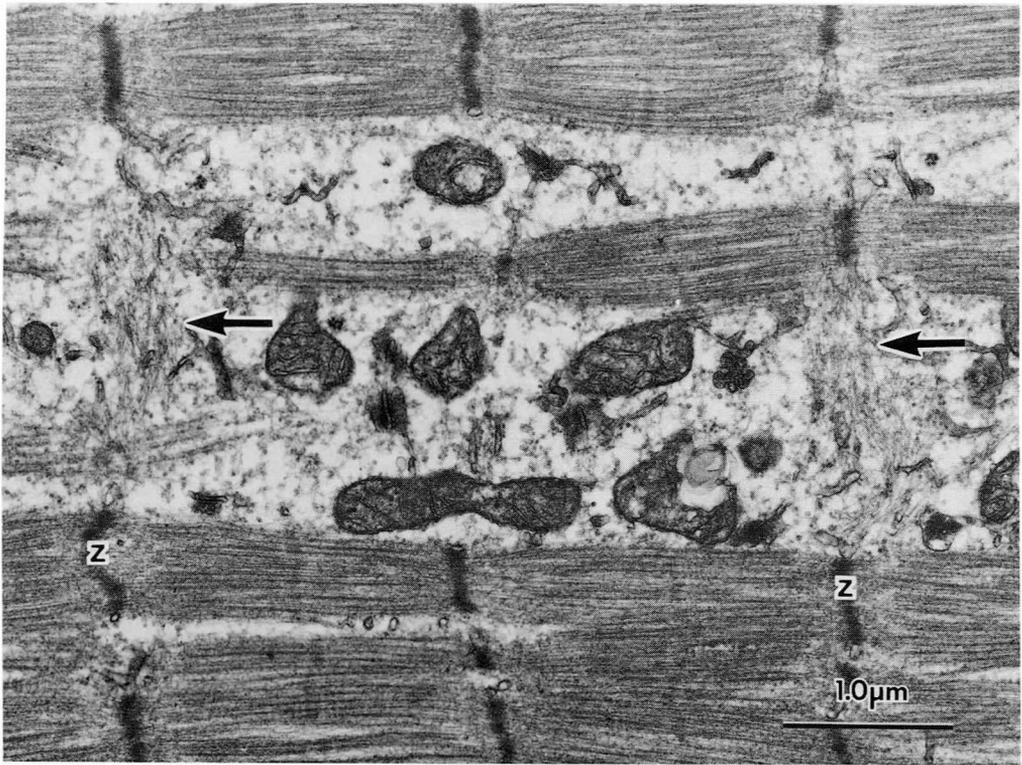


図1 サル横隔膜の筋細胞縦断像。筋原線維のZ帯(Z)のレベルを横走する中間径フィラメントの束が散在性に観察される(矢印)。

った。

この中間径フィラメントとZ帯との関係を見ると(図2), Z帯のレベルに限定して見出されたこと, 直接Z帯に付着する像も得られたことから両者の密接な相互関係が推論できる。しかし, 付着様式の詳細は明らかにできなかった。また, このフィラメント集合束に密接して筋小胞体も見出され, 膜系との相互関係も興味深い。筋細胞の横断切片でも中間径フィラメントはZ帯のレベルで筋原線維間に見出された。散在性に束をなして横走するのに加えて, Z帯のレベルの筋形質には線維性構造の網目も認められた。線維構造の直径を正確に測定することは困難であったが, その一部は約10 nmの直径を有していた。この部位では筋小胞体と考えられる膜構造がZ帯を直接的に囲んでおり,

線維性網目は通常その外側に位置していた。

以上の観察結果から, サル横隔膜では典型的な中間径フィラメントがZ帯のレベルを横走していることを示すことができた。このフィラメントは隣接筋原線維のZ帯間を結ぶように配列しており, 横紋の位相を揃えるのに役立っているように見える。しかし散在性に存在するのみであること, 他の多くの筋でこのような明確なフィラメント束が見出されないことは問題として残る。また, 蛍光抗体法で示されたデスミンの分布を十分説明できるものではない。これに関連して, Z帯レベルの筋形質内の線維性網目の存在は興味深い。デスミンの別の存在様式か, 固定時の人工産物か今後の詳細な検索が必要である。デスミンなどの中間径フィラメントは化学抽出に対して比較的安定であ

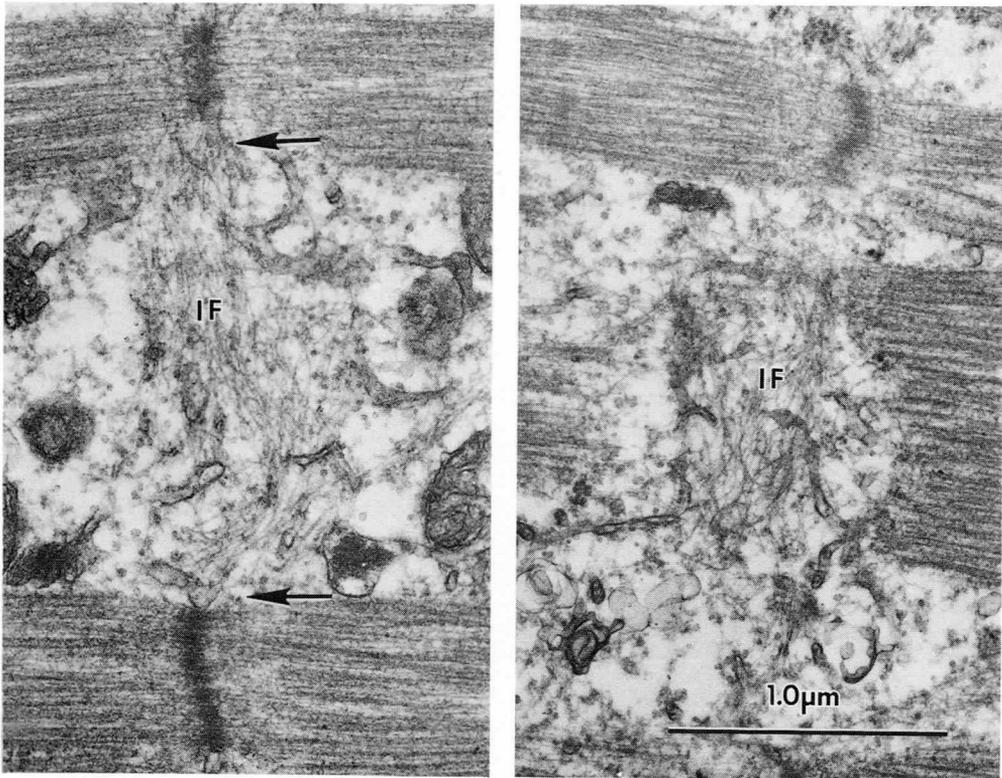


図2 サル横隔膜筋細胞。中間径フィラメント(IF)とZ帯との密接な位置関係に注目されたい(矢印)。

るが、蛋白分解酵素にて分解されやすいので化学固定時に注意する必要もある。

サル横隔膜に発達した中間径フィラメント束が見出されたが、これほど発達した束は骨格筋では記載がない。この筋に出現した理由は明らかでないが、Z帯や膜系との相互関係を詳細に分析する好材である。今後、超薄切片法のみならず、急速凍結エッチングレプリカ法により検索を進めたい。

なお、この研究と平行して、平滑筋における中間径フィラメントの分布様式を検索し、アクチンフィラメントとは部位特異性に dense body や dense plaque に付着することを明らかにした。この付着様式により細胞骨格系が筋の収縮機能に密接な関係をもつことが可能となる。

## 文 献

- 1) Lazarides, E. and Hubbard, B. M.: Immunological characterization of the subunit of the 100Å filaments from muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**: 4344 (1976).
- 2) Small, J. V., and Sobieszek, A.: Studies on the function and composition of the 10-nm (100Å) filaments of vertebrate smooth muscle. *J. Cell Sci.*, **23**: 243 (1977).
- 3) Ishikawa, H., Bischoff, R., and Holtzer, H.: Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **38**: 555 (1968).
- 4) Gard, D. L., Bell, P. B., and Lazarides, E.: Co-existence of desmin and the fibroblastic intermediate filament subunit in muscle and non-muscle cells: Identification and comparative peptide analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**: 3894 (1979).
- 5) Bennett, G. S., Fellini, S. A., Toyama, Y., and Holtzer, H.: Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and

- maturation in vitro. *J. Cell Biol.*, **82**: 577 (1979).
- 6) Thornell, L.-E., Edström, L., Eriksson, A., Henriksson, K.-G., and Ångqvist, K.-A.: The distribution of intermediate filament protein (skeletin) in normal and diseased human muscle. An immunohistochemical and electron microscopic study. *J. Neurol. Sci.*, **47**: 153 (1980).
  - 7) Lazarides, E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature*, **283**: 249 (1980).
  - 8) Tsukita, S., Tsukita, S., and Ishikawa, H.: The mode of association of actin and 10-nm filaments with the dense body in chicken gizzard smooth muscle cells. *Cell Tiss. Res.*, (In press).

### Ⅲ 細胞培養

6. サテライト細胞の培養 41
7. ニワトリ胚抽出物中の筋芽細胞増殖促進因子 47
8. 培養骨格筋における活動電位の発達に  
関与する神経性因子 52

## 6 サテライト細胞の培養

香川 務\*

研究協力者 智片 英治\* 北野 博司\*\*

巽 典之\*\* 橋本 孝二\*\*

我々は正常(+ / +)及び筋ジストロフィ(dy / dy) 発症マウス骨格筋に再生を誘起し、各再生筋から単核筋芽細胞を容易に得る方法を確立した。<sup>1,2)</sup>正常及び筋ジス筋芽細胞の多細胞培養下における筋線維分化の過程を比較し、両者の間で、少なくとも形態的な相異の認められない事を報告した。<sup>1,2)</sup>更に、両者の分化の過程を定量的に比較するため、マウス再生筋芽細胞のクロン培養技術を開発し<sup>3)</sup>、両者の一定培養期間における細胞分裂回数を比較し、筋ジス筋芽細胞の分裂回数は正常のそれに比し、有意に減少している事<sup>3)</sup>、分裂回数の減少は筋ジス筋芽細胞の世代時間の延長でなく、それは正常筋芽細胞よりも早期に分裂能を失う事による事を明らかにした。以上の結果に基づき、今年度は以下の各研究を行った。

- (1) 成熟マウス骨格筋単一筋線維の分離とその培養。
- (2) 筋コロニー単位の筋線維クレアチンキナーゼ(CK)のアイソザイム(Iz)解析法の開発。
- (3) In vivo における正常及び筋ジストロフィマウス骨格筋の再生能の比較。

(1)(3)についての実験結果は未だ発表の段階に至っていないため、今年度は(2)について報告する。

筋クロン培養は定量性の他、種々の特性を有し、筋の発生生物学上の重要な研究手段である。<sup>4)</sup>しかし、マウス再生筋芽細胞の形成する筋コロニーは

マウス胚筋芽細胞のそれに比べて、はるかに小さく、一般的な生化学的解析の材料としては必ずしも適しているとは言えない。我々はマウス再生筋芽細胞のクロン培養の利用範囲を拓げる為の一つの試みとして、筋コロニーのCK Iz解析の方法を開発した。なお、予備実験として行った正常及び筋ジスマウスの筋及び血清CK Izの解析結果についても報告する。

### 材料と方法

#### (1) 血清及び骨格筋酵素標品

正常(C57 B1 / 6 + / +, 121日令)及び筋ジス(C57 B1 / 6 J dy / dy, 101日令)の各マウスを瞬間的に断頭、採血し、その後、大腿部皮膚をはくりして、各大腿直筋を採取した。血液を5℃、2時間放置して後、3000 rpm、30分間遠心沈澱を行い、血清を分離した。筋を細切し、湿筋重量の20倍のMOPSOバッファ(3-(N-morpholino)-propane-sulphonic acid, 50 mM, pH7.8)を加え、2回の凍結融解を行い、5℃、10,000 rpm 30分間遠心沈澱をし、その上清を筋酵素標品(×20)とし、適宜稀釈して使用した。

#### (2) 単一筋コロニー酵素標品

正常マウス(C57 B1 / 6 + / +)再生筋由来筋芽細胞を我々の方法<sup>3)</sup>でクロン培養し、筋コロニーを得た。培地を棄て、多核筋線維だけからなるコロニーを選び、厚さ1 mm、内径4 mmのシリコンラバーのリングで囲い(図1の1)、Earle液で2回洗滌後、10 mM MOPSOバッファを10 μl 加

\* 国立療養所刀根山病院

\*\* 大阪市立大学医学部

+ 現住所 国立循環器病センター

え、針で筋線維をかき落とし、Ht(ヘマトクリット)管で吸引し(図1の2)、2回の凍結融解の後、Ht用遠心機で、10,000 rpm、5分間遠心沈澱を行った(図1の3)。Ht管の先端を切り、上清をシリコンラバー上に水玉状に置き、5℃の冷蔵庫内で全量が2  $\mu$ lに濃縮するまで放置(図1の4)(約1~2時間)して、電気泳動を行った。この濃縮の過程で酵素活性の濃縮を確認している。

### (3) 電気泳動

電気泳動はコーニング社のアガロース電気泳動システムを用いて行った。酵素反応はRosalki<sup>5)</sup>のコーニング変法によって行った。これはLohmanの逆反応で最終的に生成されるNADPHに紫外線を当て、その蛍光により、酵素活性を定量する。各アイソザイムの比率はコーニング社の蛍光測定機でスキャンする事により求めた。

## 結 果

### (1) 血清CK I<sub>z</sub>(クレアチンキナーゼアイソザイム)

正常及び筋ジス血清の電気泳動により、各々、次の各位置に蛍光を発するバンドを認めた。(a)標準人血清のMMより僅かに(+ )よりの位置、(b)同MBに相当する位置、(c)(b)の少し(+ )側で、明らかに(b)と異なる位置、(d)同BBに相当する位置。(a)、(b)、(d)の各位置のバンドは、各々、MM、MB、BBであると考えられる。(c)の成分は不明であるが、仮にX成分と呼ぶ(図2)。I<sub>z</sub>パターンのスキャンの結果、MB、BB、X成分の比率は筋ジス血清で高かった(表1)。

### (2) 筋抽出液のCK I<sub>z</sub>

正常、筋ジスいずれの筋酵素標品も、各々の血清同様、MM、MB、BBの三つのI<sub>z</sub>に分離した(図3)。各アイソザイムの電気泳動上の位置は血清と同じであった。X成分は認めなかったがMMの(-)側に一つのバンドが認められた。仮にこれをX'成分と呼ぶ(図3)。濃厚な筋酵素標品( $\times 20$ )を90℃、10分間加熱すると、MMの大部分、MB、BB、X'成分の活性は失われたが、元のMMバンド内の(+ )側のはしに、明らかに蛍光を発するバン

ドを認めた(図4B、C)。この成分を仮にX''成分と呼ぶ。X''成分は、その耐熱性から考えて、CKとは認め難い。筋ジス筋酵素標品のMB、BBの比率は正常筋のそれに比し、いずれも高い(表1)。

### (3) 単一筋コロニー筋CK I<sub>z</sub>

結果は図5に示した。Aは標準人血清CK I<sub>z</sub> B、C、Dは各々一個の筋コロニー筋線維のCK I<sub>z</sub>である。B、CはMBとBB、DはMB、BBの他に淡いMMのバンドを示している。MM、MB、BBは各々前記正常筋酵素標品のそれらと同じ位置を占めていた。

## 検 討

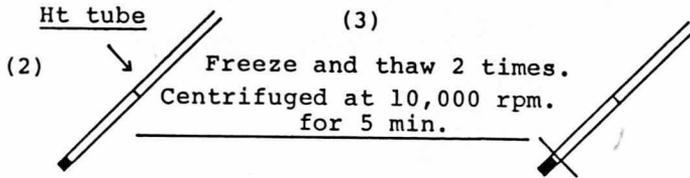
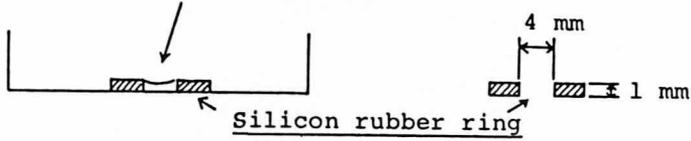
単一筋コロニー筋線維のCKアイソザイム解析が可能であることを示したのは本報が最初である。以上の結果はマウス再生筋芽細胞の作る小さな筋コロニーの筋線維からでも、以上述べた方法によって、十分に明瞭なアイソザイムバンドを作り得る活性を持った酵素標品を得る事が可能である事を示している。この方法によって、クローン培養下における筋分化の進行をCKアイソザイムのパターンの変化によって解析する事が可能である。又、筋コロニー筋線維を材料にする事により、線維芽細胞を含まない純すいの筋クレアチンキナーゼのアイソザイム解析が可能になる。単一コロニー筋線維アイソザイム解析が可能になる事により、筋発生生物学の研究手段としての筋クローン培養の利用範囲は更に広がるものと考えられる。

筋酵素標品の電気泳動で認められたX'成分は筋コロニー酵素標品の電気泳動では認められなかった。その理由として、(a)筋コロニー酵素標品の濃度が低い、(b)X'成分は筋組織中の筋線維以外の成分に由来する、の二つが考えられる。筋コロニー酵素標品のX'成分の存否は未だ調べていない。いずれにしても、アガロース電気泳動、Rosalkiのコーニング変法で筋CKアイソザイム解析を行う場合、X'、X''成分の存在を念頭におく必要がある。

最後に、本報で述べた酵素標品の濃縮法は微量

Preparation of Sample for Electrophoresis

(1) 10  $\mu$ l of MOPSO buffer



(4)

4°C for 120 min  
Silicon in a refrigerator  
rubber

MOPSO buffer: 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropane  
sulfonic acid. 10 mM, pH 7.8

図1

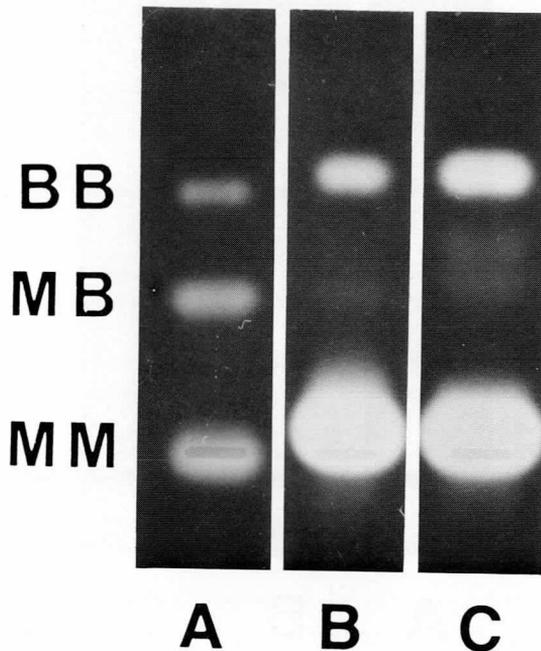


図2 マウス血清CKアイソザイム  
A: 標準人血清(1 $\mu$ l) ,, B: 正常マウス血清(2 $\mu$ l) , C: 筋ジスマウス血清(2 $\mu$ l)

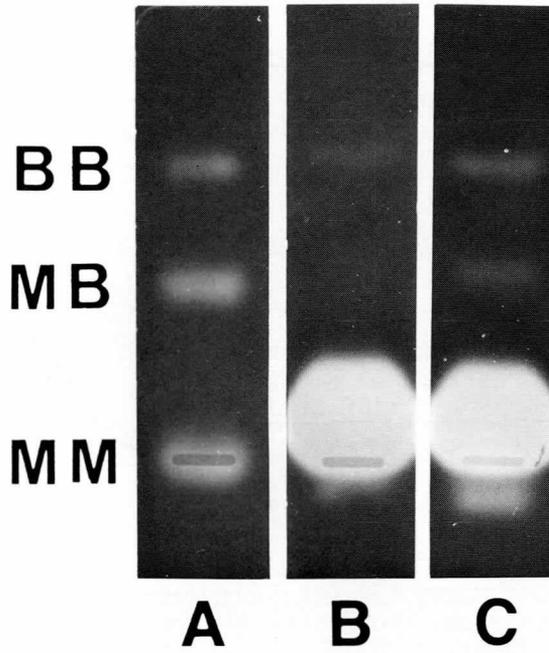


図3 マウス大腿直筋CKアイソザイム  
 A:標準人血清(1  $\mu\text{l}$ ), B:正常筋酵素標品( $\times 100$ ), C:筋ジス筋酵素標品( $\times 100$ )

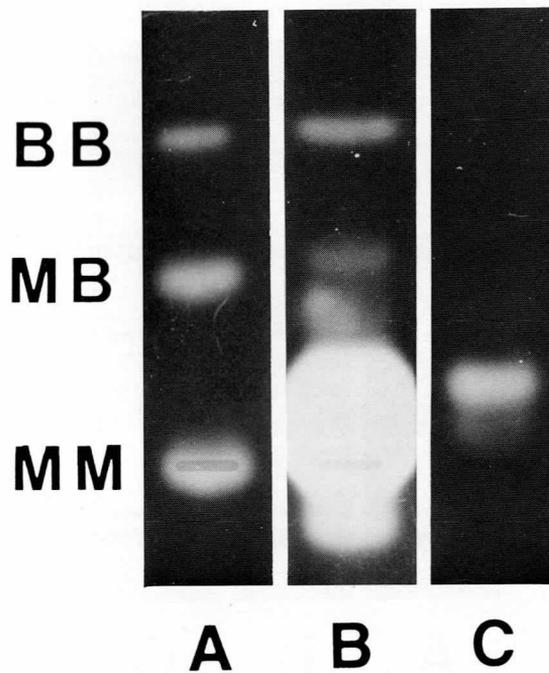


図4 正常マウス筋CKアイソザイムの熱処理  
 A:標準人血清(1  $\mu\text{l}$ ), B:正常筋酵素標品( $\times 20$ ), C:加熱(90  $^{\circ}\text{C}$ , 10分)処理した正常筋酵素標品( $\times 20$ )

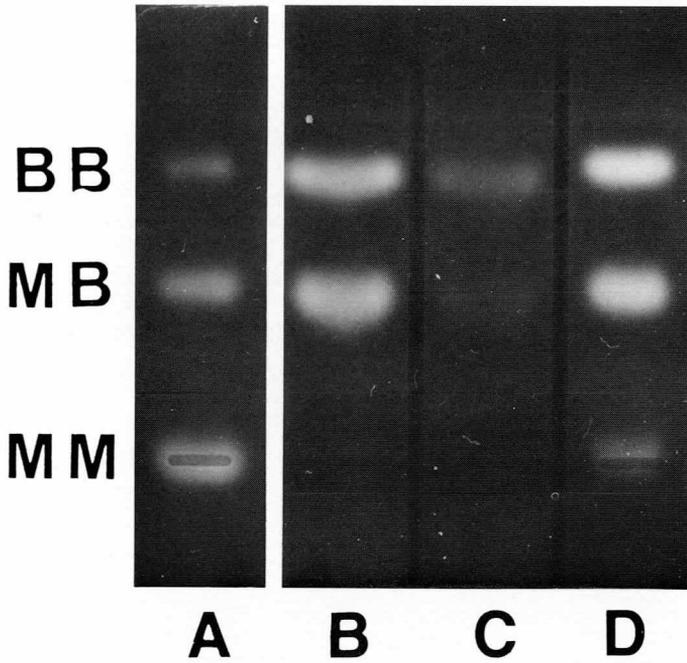


図5 単一筋コロニー筋線維CKアイソザイム  
A: 標準人血清(1 $\mu$ l), B~D: 単一コロニー筋酵素標品

Table 1

Creatine Kinase Isoenzyme Distributions  
in Serum and in Muscles either from  
Normal or Dystrophic Mice(%)

	Serum		Muscle	
	Normal	Dystrophy	Normal	Dystrophy
BB	11.2	18.6	1.2	4.1
X	1.4	2.1		
MB	2.3	2.5	2.8	3.7
MM	85.1	76.8	96.0	92.2

の不安定な物質の簡単且つ確実な濃縮法として利用する事が可能であろう。

戴きました。感謝致します。

### ま と め

単一筋コロニー筋線維のクレアチンキナーゼ解析の方法を開発した。

### 謝 辞

刀根山結核研究所 楠瀬正道教授 楠瀬恵美両氏にクレアチンアイソザイム解析について助言を

### 文 献

- 1) Kagawa, T., Chikata, E., and Tani, J. (1977). *Dev. Biol.*, **55**, 402.
- 2) Kagawa, T., Chikata, E., Tani, J., and Tsutamune, T. (1978). *Dev. Biol.*, **65**, 526.
- 3) Kagawa, T., Chikata, E., and Hamano, R. (In press). In *Biomedical Res. in Muscular Dystrophy* (Ebashi, S., and Ozawa, E. eds.). pp. 19-27.
- 4) 香川務 印刷中「筋の発生生物学」(小沢鎭二郎, 嶋田裕, 眞崎知生 編) pp. 57-63.
- 5) Rosalki, S. B. (1967). *J. Lab. clin. Med.*, **69**, 696.

## 7 ニワトリ胚抽出物中の筋芽細胞増殖促進因子

小 沢 鏡二郎\*

研究協力者 伊 井 一 夫\*

筋細胞の培養には、Eagle の minimum essential medium (MEM) と馬血清そしてニワトリ胚抽出物 (Chick embryo extract, EE) の混合液が広く用いられている。<sup>1,2)</sup> この混合液は、鳥類だけでなく哺乳類の筋細胞の培養にも用いられ、また高細胞密度での培養にもクローン培養にも用いられる。我々は、この混合物のうち EE の筋成長に関与する因子を明らかにすべく研究を進めて、まず第一に EE 中のトランスフェリン (Tf) が鳥類の筋成長に必須であることを明らかにしてきた。<sup>3,4)</sup> これは、Tf の作用には類特異性があり、馬血清中の Tf は鳥類の細胞には無効であるためである。<sup>5)</sup> しかし EE は哺乳類の筋細胞の培養にも用いられており、EE が哺乳類の筋細胞の増殖を促進し、EE の濃度を増すと筋芽細胞の融合を遅らせる効果があることも知られている。<sup>6,7)</sup> また EE のかわりにニワトリ Tf を用いた系では高細胞密度での鳥類の筋芽細胞の培養は可能であるが、クローン培養は困難である。これらのことは、EE 中に Tf 以外の筋成長促進因子が存在し、それは種特異性の高いものであることを示唆する。

今回、我々は EE 中の Tf 以外の筋芽細胞増殖促進活性を分析し、第二の因子としてプリン塩基類の関与さらに第三の因子としてタンパク様増殖因子の存在を明らかにした。この因子は、ニワトリやウズラだけではなくラットの筋芽細胞に対しても増殖促進効果を示す。以下このタンパク様増殖

因子の組成分布、部分精製とその性質について報告する。

### 材料と方法

培養細胞：9日目ウズラ、11日目ニワトリ胚胸筋から Konigsberg の方法で、<sup>2)</sup> また生後1日目ラット後肢筋から Yaffe の方法でそれぞれ単細胞を得、80% MEM 15% 馬血清 5% EE から成る培養液で初代培養を行なった。16—20時間後に低濃度でのトリプシン処理により筋芽細胞を選択的に集めた。<sup>2)</sup>

筋芽細胞増殖促進活性の測定：活性測定には、線維芽細胞の混入を最も少なくできるウズラの細胞を主に用いた。上記の方法で得たウズラ筋芽細胞を  $10 \mu\text{M}$  ヒポキサンチンを含む 84% MEM, 15% 馬血清, 1% ニワトリ血清, 0.1% EE の混合液に浮遊し、ゼラチンをぬった 35mm のプラスチックシャーレに  $0.5 \sim 2 \times 10^4$  cells/dish に播いた。1日後に培養液を 1.45 ml の  $10 \mu\text{M}$  ヒポキサンチン,  $10 \mu\text{g/ml}$  オヴオトランスフェリンを含む 85% MEM, 15% 馬血清 (BCMTH) に換えて、これに相当量の添加物を加えて 1.5 ml にして培養を行なった。培養後 48—72 時間後に細胞を集めて、DNA 量を測定した。DNA 定量は Hinegardner の方法<sup>8)</sup>で行ない、0.9% NaCl 水溶液を添加した上記液中で培養したコントロールの DNA 量との差を活性の指標とした。

筋芽細胞増殖促進因子の部分精製：EE をつくる

\* 国立武蔵療養所神経センター、機能研究部

原材料である12日目ニワトリ胚から増殖促進因子を精製した。ニワトリ胚に5倍容0.9% NaClを加え、ホモゲナイズし1N HClを加えてpH 3.5にし、1~2時間攪拌した。遠心上清のpHを1N NaOHで6.0に合わせ、0.9% NaCl, 0.1M Na phosphate (pH 6.0)に平衡化した。CM Sephadex C-50を加えて活性を吸着させ、0.2M NaClを含む0.1M Na phosphate (pH 6.0)で洗ったのち、0.5M NaClを含む緩衝液で活性を流出させた。Dia Flo (PM10膜)で濃縮、50倍容蒸留水に透析し不溶物を除き、塩濃度を0.15M NaCl 0.1M Na phosphate (pH 6.0)に合わせてCM Sephadex C-50カラムに添加し、0.2M-0.6M NaClの直線勾配で展開し、0.3-0.4M NaClの活性分画を濃縮した。この分画をSephadex G-75カラムに添加し、0.1M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 8.5)で展開した。活性はタンパクMarker  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (分子量25Kダルトン)より後、Cytochrome C (12.5Kダルトン)より前に流出した。活性の高い分画を濃縮し、Sephadex G-75で再分画し、1mM  $\text{NaHCO}_3$ を含む0.9% NaClに透析して部分精製標本とした。500gのニワトリ胚から3mgのタンパクが得られた。

### 結 果

筋芽細胞増殖促進活性の組織分布：12日目鶏胚及び成鶏(4ヶ月令, ♀)の各組織に5倍容0.9% NaClを加えたホモジェネートの遠心上清の活性を比較検討した。12日目鶏胚ではいろいろな組織抽出液で活性が認められたが、胸筋、足筋、砂のう、眼の活性が比較的高かった。成鶏では、胸筋や脳に高い活性が認められたが、肝臓や血清では低い活性しか認められなかった。

EE中の増殖促進活性の性質：飽和量のTfとヒポキサンチンを加えた培養系でのEEの筋芽細胞増殖促進活性は、透析や1%メルカプトエタノール処理ではほとんど失活しないが、70℃5分の熱処理や8M尿素処理で失活した。

部分精製因子による筋芽細胞増殖促進と融合遅

延：Sephadex G-75からの活性の流出パターンから因子の見かけの分子量は16Kから20Kダルトンであった。この因子によるウズラ及びラットの筋芽細胞に対する増殖促進効果をEEとタンパク濃度を基準にして比較したのが、第1図及び2図である。この因子はいずれの場合も0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で効果を発揮し、ウズラの場合は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ でラットの場合は1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で活性はプラトーに達した。EEのDose response曲線と比較すると、1/100~1/500の濃度で有効であるが、プラトーの活性レベルはずっと低かった。ラットの培養筋芽細胞は線維芽細胞の混入がかなりあったのでクレアチンキナーゼ(CK)活性も測定し、この因子が筋原細胞の成長を促進することを確認した。高い濃度の因子やEEを加えた場合かえってCK蓄積量の低下が見られたが、これはこの因子が融合を遅延させるためである。ウズラの培養細胞の写真を第3図に示す。24時間Platingの後、培養液を換えた直後は、単核のものしか見られないが、34時間後にはEEや因子を含まない培養液中のものは融合がかなり進んでいる。EEや因子を含んでいるものでは、筋芽細胞が増殖し、多核の細胞はほとんど見あたらない。この融合の遅延効果は、分化の生化学的指標としてよく用いられるCK活性/DNA値の経時変化を求めることによっても確かめた。即ち、因子の濃度を高めるほどCK活性/DNA値の立ちあがりは遅れた。

### 考 察

我々は前年度報告において、馬血清を含む培養液でEEが鳥類の筋細胞の成長に対して果たす最大の役割として、EE中のTfの役割一鉄の同類の細胞への供与一を明らかにした<sup>4)</sup>。今回はEE中にTf以外のタンパク様増殖因子が存在することを明らかにした。この因子は未だ部分精製の段階であるが、ウズラやニワトリだけではなくラットの筋芽細胞の増殖も促進する。即ちTfとは異なり細胞に対する特異性は高くない。

ここで活性測定に用いた基本培養液は、馬血清

Dose response for MPF and EE  
(quail myoblast,  $10^4$  cells/dish; 52hr incubation)

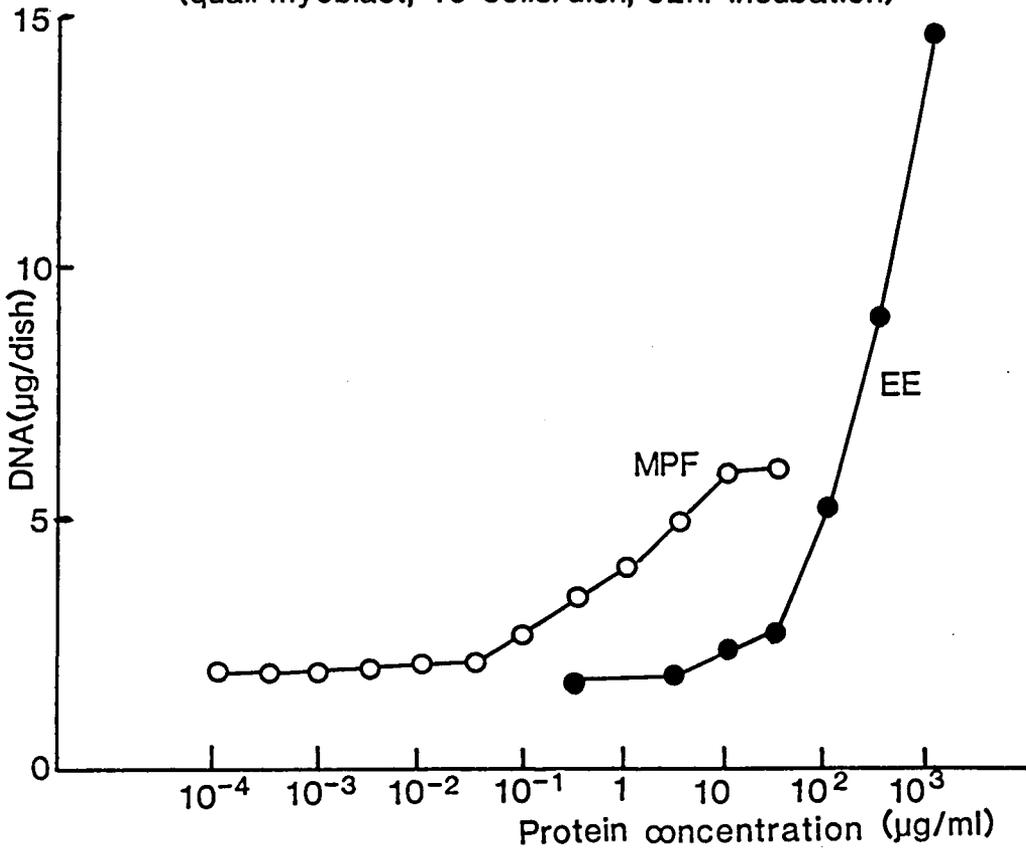


図1 筋芽細胞増殖促進因子(MPF)とEEのウズラ筋芽細胞に対する用量反応曲線

を含んでいる。従って馬血清中に充分量含まれているものの活性は除外される。ソマトメジン類やインシュリンの増殖促進活性は一般的に認められているが、我々の系では活性としては現われない。言い換えると、この assay 系で見出された増殖因子は馬血清中には低い濃度でしか存在しないと思われる。実際ニワトリ血清や胎児牛血清もEEと比較すると1/10以下の活性しか示さなかった。それに対して、筋や脳抽出物に高い活性が認められるので、神経-筋相互作用や筋の再生に重要な役割を果たす因子である可能性もあろう。

この因子とこれまで知られている成長因子との関連であるが、ソマトメジン類、EFGとは区別さ

れるが、牛の脳下垂体から精製されている FGF と作用上、性質上似ている点がある。しかし FGF の本性については、現在いくつかのグループから疑義が投げかけられており、<sup>9,10)</sup> 我々の因子との関連についても今後の研究を待たなければならない。

EEの筋芽細胞増殖促進活性は筋芽細胞融合の時期の決定との関連で注目されてきた。そして培養液中のある種の増殖促進因子が消費され、筋芽細胞のG1期が長びくにつれ融合への確率が高まると考えられている。<sup>11)</sup> 我々の因子は筋芽細胞の増殖を促進するとともに融合の時期を遅延させるので融合時期の決定に重要な役割を果たす因子である可能性もあろう。

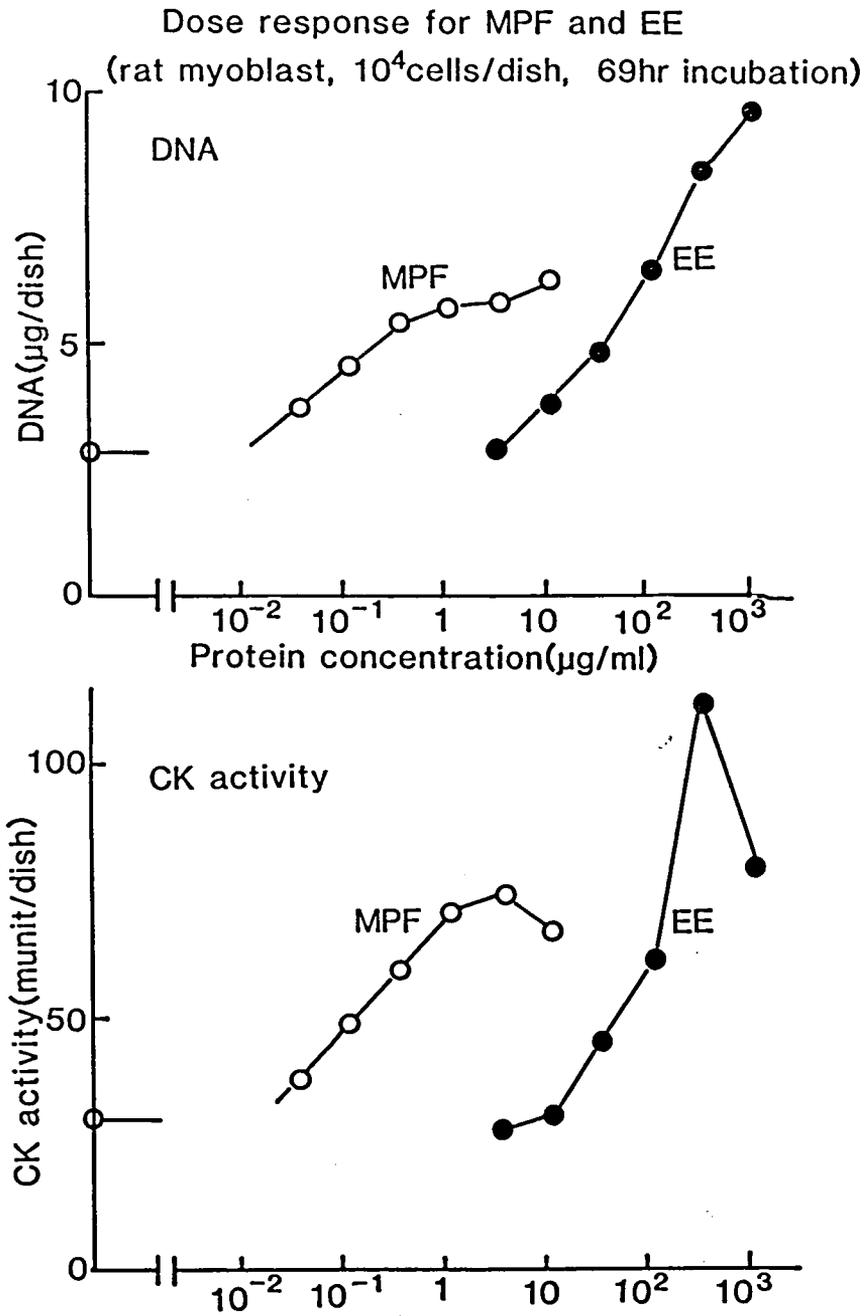


図2 筋芽細胞増殖促進因子(MPF)とEEのラット筋芽細胞に対する用量反応曲線

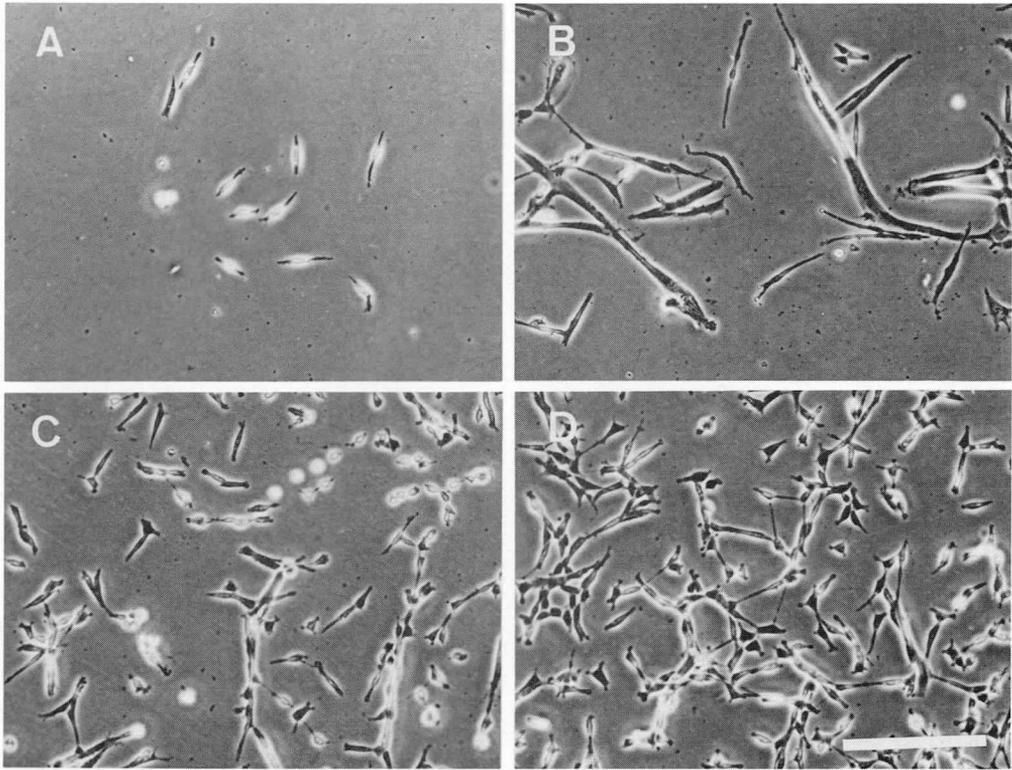


図3 筋芽細胞増殖促進因子とEEによる、ウズラ筋芽細胞の増殖促進と融合遅延。  
 A) 10個の細胞を35 mm dishに播き、24時間培養後培養液をBCMTHに換えた直後、B-D)はそれから34時間後 B) BCMTH C) 筋芽細胞増殖促進因子(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むもの D) EE(350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むもの  
 Bar: 200  $\mu\text{m}$ )

筋芽細胞の増殖促進に関与する因子を明らかにしていくことは筋の発生、分化そして再生の機構を解明するために重要なことである。そして我々は培養系に用いられるEEの増殖促進活性の本性のいくつかを明らかにしてきた。しかし部分精製因子を加えてもまだEEの活性には及ばず、さらに未知の増殖因子の関与が示唆される。

#### 文 献

- 1) Richler, C. and Yaffe, D.: *Dev. Biol.*, **23**, 1-22, 1970.
- 2) Konigsberg, I. R.: *Methods in Enzymology*, **58**, 511-527, 1979.
- 3) Kimura, I. et al.: *Dev. Growth Differ.*, **24**, 369-379, 1982.
- 4) Ii, I. et al.: *Dev. Biol.*, **94**, in press, 1982.
- 5) Ozawa, E. and Hagiwara, Y.: *Proc. Japan Acad.*, **57(B)**, 406, 1981.
- 6) Yaffe, D.: *Exp. Cell Res.*, **66**, 33-48, 1971.
- 7) Linkhart, T. A. et al.: *Dev. Biol.*, **86**, 19-30, 1981.
- 8) Hinegardner, R. T.: *Anal. Biochem.*, **39**, 197-201, 1971.
- 9) Thomas, K. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 5517-5520, 1980.
- 10) Kollet, J. G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 54-58, 1981.
- 11) Konigsberg, I. R.: *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies* (Excerpta Medica, Amsterdam), 779-798, 1976.

## 8 培養骨格筋における活動電位の発達 に關与する神経性因子

加 濃 正 明 \*

研究協力者 山 崎 捨 夫\* 佐 藤 諦 吉\*

骨格筋細胞の分化や、分化した性質の維持にはそれを支配する神経細胞が重要な役割を果たしており、神経の栄養的効果と呼ばれているが、この効果の少なくとも一部は、神経細胞で合成され、神経筋接合部を経て筋に移行しているところの栄養物質の作用によるものであるということを示す報告が最近多くみられるようになった。

脊椎動物成体の骨格筋細胞膜にはテトロドトキシン(TTX)感受性Naチャンネルが発達しており、その細胞の発生する活動電位はこのチャンネルの作用によるものである。またこのチャンネルは生後、神経支配の完成と共に発達して、筋細胞におけるその密度が増加し、逆に、成体筋で神経支配を断たれると、その密度が減少することがラット骨格筋でみられており、<sup>1,2)</sup>このチャンネルの発達および維持が、神経による栄養的影響のもとにあることを示している。

ニワトリ胚由来の細胞培養骨格筋では神経支配なしの状態でもTTX感受性Naチャンネルが発達するが、<sup>3)</sup>しかしこの際ニワトリの神経組織抽出液が培養液中に存在することが必要で、それが存在しないとTTX感受性Naチャンネルの発達が著しく低下することが確かめられた。<sup>4,5)</sup>神経組織抽出液中に、TTX感受性Naチャンネルの発達を促進する活性物質が含まれており、in vivoにおいてもこのような物質が栄養物質として働き、このチャンネルの発達、維持に關与していると考えられる。

本研究の目的は、骨格筋細胞膜の機能蛋白であるTTX感受性Naチャンネルの遺伝情報発現に關係すると思われる活性物質の化学的性質を明らかにし、栄養効果の本態を解明しようとするものである。

ニワトリ胚由来細胞培養骨格筋におけるTTX感受性Naチャンネルの発達を促進する活性物質は、昭和55年度研究報告書<sup>6)</sup>に述べたごとく、蛋白質であると考えられる。本年度はニワトリ胚の脳抽出液を出発材料として、硫酸塩析、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを行い、活性物質の分離精製を行った。

### 材料と方法

細胞培養の方法は昭和55年度研究報告書<sup>6)</sup>に述べた通りである。すなわち、孵卵11日目のニワトリ胚から胸筋を摘出し、これをトリプシン処理して筋原細胞の浮遊液を得る。これをコラーゲン塗布した培養皿に単層培養して筋細胞を形成させる。用いた基本培養液はイーグルの合成培養液にウマ血清(10%)、神経組織を除いたニワトリ胚の抽出液(2~5%)、L-グルタミン(1mM)および抗生物質を加えたものである。

ニワトリ胚(孵卵19日)の脳を2倍量のタイロイド液と共にホモジナイズした後、2000×g, 10分; 20K×g, 30分; 100K×g, 60分の3回の遠心を行って得られた上清を出発材料として、TTX感受性Naチャンネルの発達を促進する活性物質の分

\*北里大学医学部生理

離精製を行った。分離精製の段階での活性物質の分解、失活を防ぐ目的で、3種の蛋白分離酵素阻害剤の存在下で分離精製を行った。用いた阻害剤はロイペプチン(10  $\mu$ M)、アンチパイン(10  $\mu$ M) ペプスタチン-A (1  $\mu$ M) の3種類である。

蛋白分解酵素阻害剤の存在下での硫酸塩析、ゲルクロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによる分画は、Lowry法によってそれぞれの蛋白量を測定し、培養液1 ml当りの各分画の蛋白量が3.3  $\mu$ gになるように培養の全期間にわたって培養液に加えて、その活性を測定した。ある実験ではその1/10量を加えた場合もある。各分画中に存在する蛋白分解酵素阻害剤は、各分画を培養液に加える段階でさらに30~300倍に希釈されこの濃度では阻害剤それ自身による測定に対する影響のないことは、予備実験で確認した。

TTX感受性Naチャンネルの発達の指標として、TTX感受性Naスパイク電位の最大立上り速度を測定した。これが大きいということは細胞膜におけるTTX感受性Naチャンネルの発達がよく、その密度が高いということを示している。

2週目の培養を用い、倒立顕微鏡下で1本の筋細胞に2本のガラス管微小電極を刺入し、その一方より脱分極性のパルス電流を通電して刺激を行い、それに応じて発生するスパイク電位を他方の電極で導出し、これを電気回路で微分して、その立上り速度を測定した。ニワトリ培養骨格筋細胞の場合、スパイク電位はTTXにより殆んど完全に遮断され、その立上り速度の最大値はTTX感受性Naチャンネルの密度を反映している。TTX感受性Naチャンネルは、低い静止電位では不活性化されるので、最大のスパイク応答をうるために細胞膜に定電流通電を行い、予め-80 mVの常に一定の膜電位にした後、パルス電流による刺激を行ってスパイク電位を発生させた。

## 成 果

### 1) 硫酸塩析

脳抽出液の超遠心上清を硫酸塩析して得られる

沈澱分画を塩類溶液に再び溶解し、透析によって硫酸を除いた後、培養液に加えてTTX感受性Naチャンネルの発達を促進する活性を調べた成績を表1に示す。活性は主に50~67%飽和硫酸分画に回収されている。

### 2) ゲルクロマトグラフィー

上述の50~67%飽和硫酸分画をSephacryl S-300を用いてゲルクロマトグラフィーを行い、図1に示すごとく、全体を5つの分画に再び集めて、同様にして各分画の活性を調べた結果が表2である。分子量の低い分画IVに活性が回収されている。

### 3) イオン交換クロマトグラフィー

Sephacryl S-300による分画IVをDEAEセルロースイオン交換クロマトグラフィーによってさらに分離を進めた。図2に示したように最初NaCl濃度を0.15 Mにした時に吸着せずに素通りする分画I、0.25M-NaClで溶出される分画II、0.325 M-NaClで溶出される分画III、0.45 M-NaClで溶出される分画IVの4つの分画に分け、各分画の活性を調べたのが表3である。分画II、III、IVに活性が認められたが、特に分画III、IVに強い活性がみられている。

## 考 察

以上の成績から脳抽出液中に含まれる活性物質は、比較的分子量の低い蛋白質であることが解った。生体内での神経支配によるTTX感受性Naチャンネルの発達や維持に対する栄養効果の担い手として、このような蛋白質が栄養物質として働いているものと考えられる。脳抽出液中の活性物質によるTTX感受性Naチャンネルの促進作用は、培養液中に同時にmRNA合成阻害剤である $\alpha$ -アマニチンを加えておくことによって抑制されるのでこの活性物質の作用点はTTX感受性Naチャンネル蛋白の合成に関係した遺伝子の転写レベルではないかと考えている。

表1 培養骨格筋のTTX感受性スパイク電位の最大立上り速度(V/sec)に対する硫安分画の効果

Dilution	0 - 33 %	33 - 50 %	50 - 67 %
1	(48) 125.5 ± 3.5	(48) 126.8 ± 3.4 *	(50) 142.3 ± 3.2 **
10	(48) 121.9 ± 3.3	(48) 124.8 ± 3.5	(48) 136.3 ± 3.5 **

Mean ± SE. \* indicates significant increase from the control (118.0 ± 2.4, N=64) at  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

硫安分画は蛋白分解酵素阻害剤の存在下で行った。培養液 1 ml 当り 3.3  $\mu$ g の分画蛋白量を加えた場合が希釈 1 である。その 1/10 量の場合が希釈 10 である。

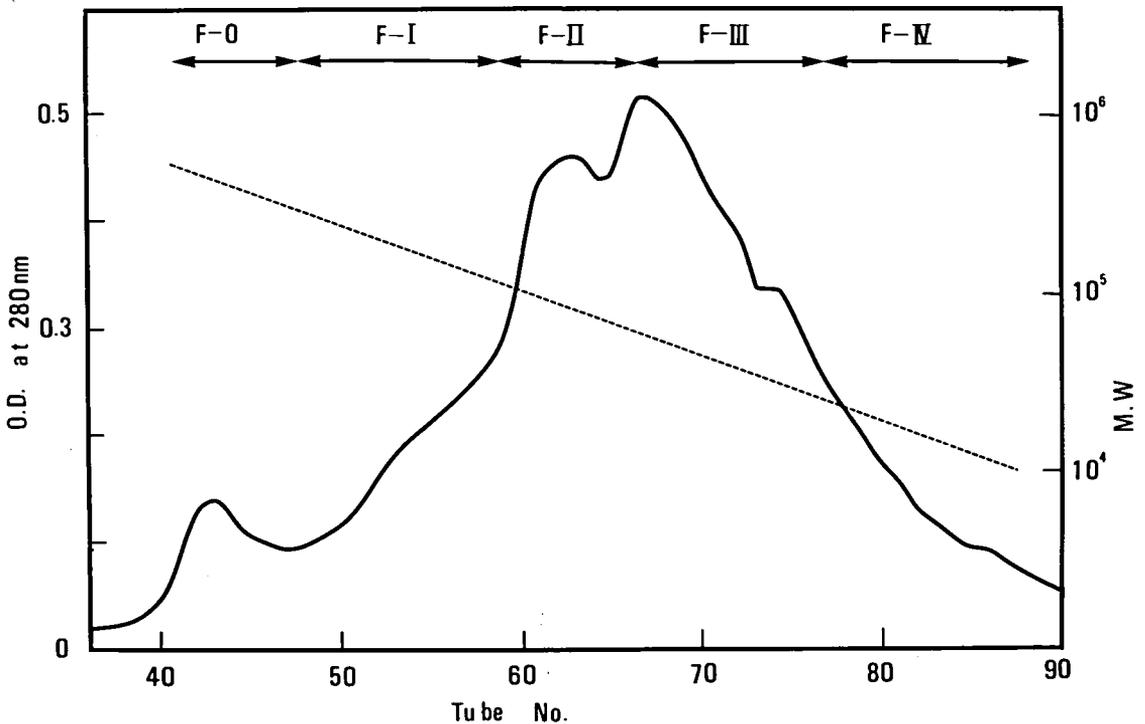


図1 50～67%飽和硫安分画の Sephacryl S-300 によるゲルクロマトグラフィー  
蛋白分解酵素阻害剤を含む緩衝液で濾過を行った。図に示したごとく全体を5つの分画  
に集めてそれぞれの活性を調べた。破線は分子量を表わしている。

表2 培養骨格筋のTTX感受性スパイク電位の最大立上り速度に対するゲルクロマトグラフィによる分画の効果

Fraction	N	Maximum rate of rise (v/sec)
Control	96	81.4 ± 1.7
F-0	48	77.6 ± 2.7
F-I	70	84.8 ± 2.4
F-II	72	86.6 ± 2.1
F-III	70	84.9 ± 2.1
F-IV	70	95.8 ± 2.3 *

Mean ± SE. \* indicates significant increase from the control at  $p < 0.001$ .

培養液 1 ml 当り 3.3  $\mu$ g の分画蛋白量を加えて活性を調べた。

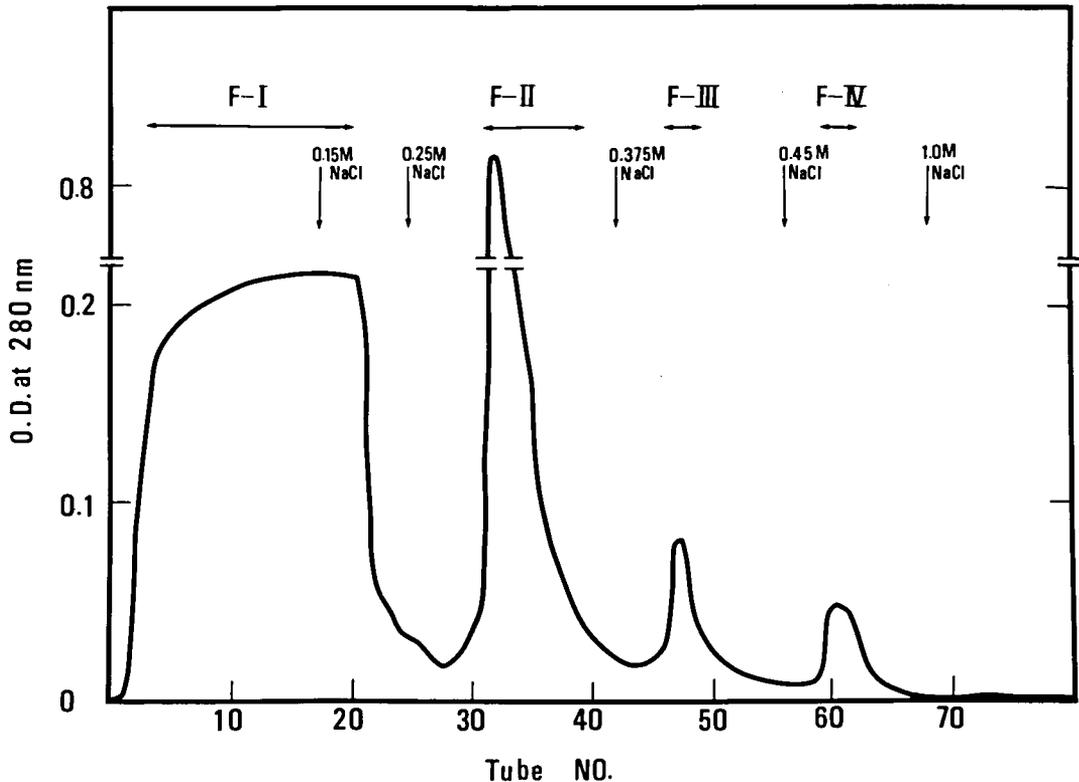


図2 Sephacryl S-300 による分画 IV の DEAE セルローズ (DE 52) イオン交換クロマトグラフィ

蛋白分解酵素阻害剤を含む緩衝液で行った。0.15M-NaCl を含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) でカラムを平衡化し、同じ液で試料を吸着させた後、0.25M, 0.325M, 0.45M の3段階の NaCl 濃度で溶出を行った。

表3 培養骨格筋のTTX感受性スパイク電位の最大立上り速度に対するイオン交換クロマトグラフィーによる分画の効果

Fraction	N	Maximum rate of rise (V/sec)
Control	64	66.2 ± 1.7
F-I	48	71.1 ± 2.6
F-II	48	74.3 ± 2.7 *
F-III	48	87.6 ± 2.3 **
F-IV	48	88.6 ± 3.0 **

Mean ± SE. \* indicates significant increase from the control at  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

分画IおよびIIは培養液1ml当り3.3 $\mu$ gの分画蛋白が加えられた。しかし分画IIIおよびIVは蛋白濃度が低く、それぞれ0.3 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/mlの蛋白濃度で加えられた。

#### 文 献

- 1) Harris, J. B. & Marshall, M. W. (1973). *Nature New Biol.*, 243: 191-192.
- 2) Redfern, P. & Thesleff, S. (1971). *Acta Physiol. Scand.*, 82: 70-78.
- 3) Kano, M. & Yamamoto, M. (1977). *J. Cell. Physiol.*, 90: 439-444.
- 4) Kano, M., Suzuki, N. & Ojima, H. (1979). *J. Cell. Physiol.*, 99: 327-332.
- 5) Yamazaki, S. & Kano, M. (1981). *Expl. Neurol.*, 74: 408-418.
- 6) 加濃正明, 山崎捨夫, 佐藤諦吉, 山本三恵, 筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和55年度研究報告書, 40-44.
- 7) Kano, M., Shimada, Y. & Ishikawa, K. (1972). *J. Cell. Physiol.*, 79: 363-366.
- 8) Kano, M. & Suzuki, N. (1982). *Develop. Brain Res.*, 3: 674-678.

## IV 生 理 学

9. 骨格筋の発達過程の機能的, 形態的追跡  
— 鶏胸筋の正常とジストロフィー筋の比較 — 59
10. 筋細胞膜における膜興奮機能の発生 65
11. 除神経による活動電位の誘発 73
12. ジストロフィーハムスターの心臓機能と骨格筋  
筋小胞体のCa 取り込み能に関する研究 76
13. 両生類骨格筋の遅筋と速筋: 筋小胞体の性質の比較 80

## 9 骨格筋の発達過程の機能的、形態的追跡 — 鶏胸筋の正常とジストロフィー筋の比較 —

堀 田 健

大 羽 利 治・山 本 まり子

私共は鶏胚胸部から得た筋細胞の培養標本についてその性状を電気生理学的、形態的に観察し、正常とジストロフィー筋の細胞膜機能のちがいを報告した<sup>1,2</sup>。今回は同じ標本を用い、培養初期から細胞膜電位、興奮に伴う膜電流を測定し、イオンチャンネルの形成発達過程及びそれに対する脊髄神経の影響等を追跡した。

### 材料及び方法

ジストロフィー (N.H 413) 及びコントロール (412) の受精卵37°Cで12日間孵化して得た鶏胚の胸部から筋原細胞をとり出し、コラーゲンを塗付した培養皿で95% air- 5% CO<sub>2</sub>, 37°Cの環境下で培養を開始、2日目から約2週間にわたってその成長を位相差顕微鏡及び電子顕微鏡で経時的に観察した。一方7~8日間孵化して得た正常胚の脊髄を破碎し、脊髄神経細胞を筋管形成が進行しつつある筋培養標本に加え、その筋細胞の成長に及ぼす効果をみた。

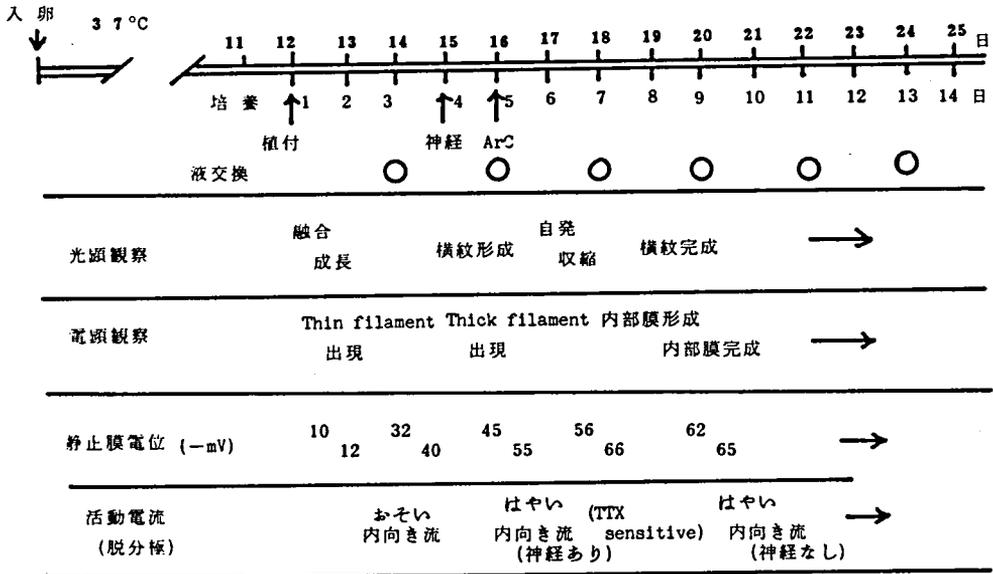
<sup>3)</sup> 電気生理的測定の装置は前に報告した成鶏筋線維のとき用いたものを改良したもので膜電位の測定と通電のために2連電極を用い、電極抵抗はおよそそれぞれ10MΩ, 5 MΩであった。又測定はO<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (95-5%) 飽和の正常クレブス液中で行った。第一図は実験の日程、形態ならびに機能的な成長過程の概要を示す。

### 結 果

培養細胞の初期発育過程：植付けた細胞は培地中で融合し、急速に筋管形成が進み、2日間経過したのちには第2図 a に示されるような myotubule に成長した。このとき細胞内には、細いフィラメントがあらわれ、Side-by-Side に配列した場所があることが電子顕微鏡で観察された (第2図 b)。Dystrophy の筋も同じような経過をたどって成長することが確かめられた。然しながら細胞内に細い線維の出現がみとめられるもの、全く出現していない細胞も多く、正常筋に比して成長が不揃いであった。

細胞内部構造の形成：培養開始後4~5日で光顕的に横紋があらわれ、7~8日で殆んどすべての線維が横紋をもつようになった。このとき細胞内に太いフィラメントが細いフィラメントに附着するようにあらわれはじめ、Z帯がみとめられるようになり明帯、暗帯の構造が完成する。つぎいて内部膜構造 (SR, T-system) がところどころに観察されるようになり、終末槽と triad が形成されたことを示す所見が得られる。第3図は筋細胞として完成した培養10日の標本で、a は光顕、b は電顕の写真を示す。Dystrophy 筋の場合、培養初期と同じく、正常とかわらない細胞と全く内部構造の形成のない細胞が混在していた。

膜電位と電流：筋管が形成された直後から微小電極が刺入出来るがその時点での静止膜電位は極めて浅く、通電によっても反応はあらわれない。



第 1 図

実験観察の経過、形態及び電気生理的性質の発達過程の概要

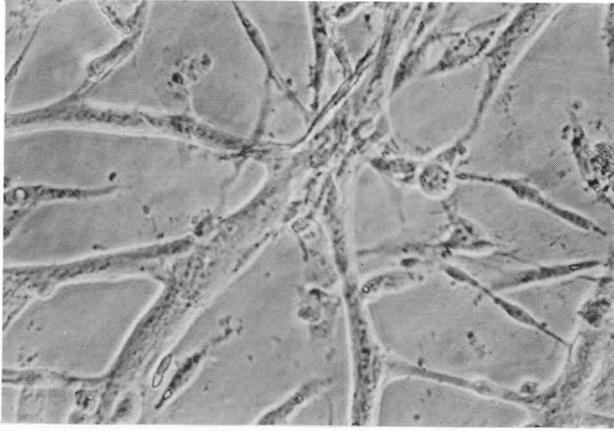
5日程度経過した Sample は膜電位が深くなり、脱分極電流によって顕微鏡下で収縮がみられるようになる。又とところどころ自発的な収縮があらわれる。

膜電位を静止電位に固定し、脱分極パルスを与えてそのときに膜を通して流れる電流は成長の初期の段階では第4図 a のような経過の長い内向き電流が記録される。このような電流は成鶏の場合観察されていない<sup>3)</sup>。成長が進むにつれ、脱分極パルスによって速い内向き電流があらわれる(第4図 b)。この電流は脊髄の共存によってその出現が著しくはやめられることが分った。第5図は植付け後6日(脊髄植付け後3日)の標品について種々の脱分極パルスによる内向き、外向き電流を示す。この電流は TTX によって消滅し、この電流は  $\text{Na}^+$  の influx によることが確かめられた。顕微鏡下では速い収縮がみられ、この時期ではすでに内部膜を介して E-C カップリングがあることを示唆している。電顕観察によるとこの時期に内部膜が形成されているので、この点からもはやい収縮のおこることが裏付けられる。

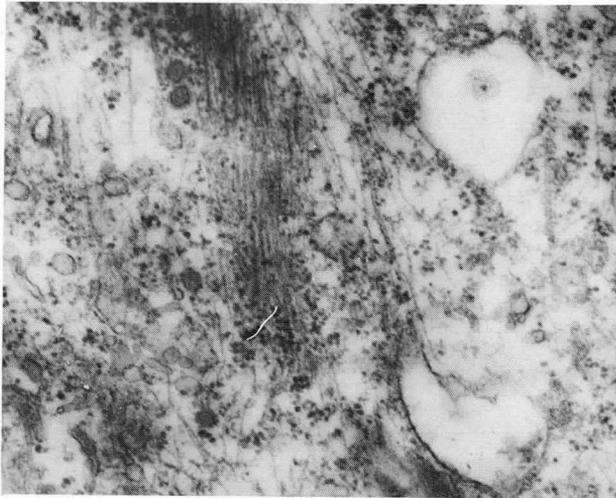
### 考 察

筋細胞が融合をはじめると直ちに筋管内には細いフィラメントがあらわれ、横にならぶ。これはアクチンの線状重合体と思われる。これにミオシンが附着し、会合を作って A バンドが形成され、収縮装置が完成されるが E-C カップリングに主役を果す SR, T-system はそのあとで配列が完了すると推測される。刺激よっての収縮は内部膜の形成以前にも認められる。これはこのとき、細胞膜にカルシウムチャンネルがあり、外液からの流入が恐らく収縮蛋白を活性化するためであろう。

細胞の静止膜電位は数日間で  $-50 \sim -60 \text{ mV}$  に達する。これは  $\text{K}^+$  チャンネルの形成過程を表現していると考えられる。膜電位を固定し脱分極パルスを与えると、第4図に示すように経過時間によって区別される2種の内向き電流が誘発される。最初あらわれるのはおそい経過の電流で、さらに培養をつづけるとはやい電流があらわれてくる。神経が入力すると後者の電流出現がはやめられるが、Dystrophy と Normal との間には目立った差異はなかった。速い経過の内向き電流は  $\text{Na}^+$  チ



a



b

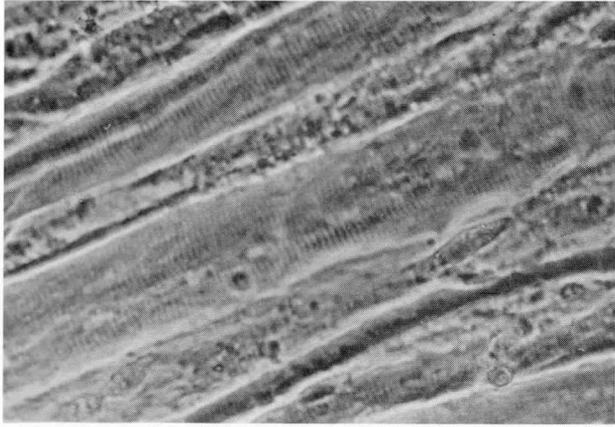
第 2 図

培養開始後 3 日間経過した標本, 正常筋

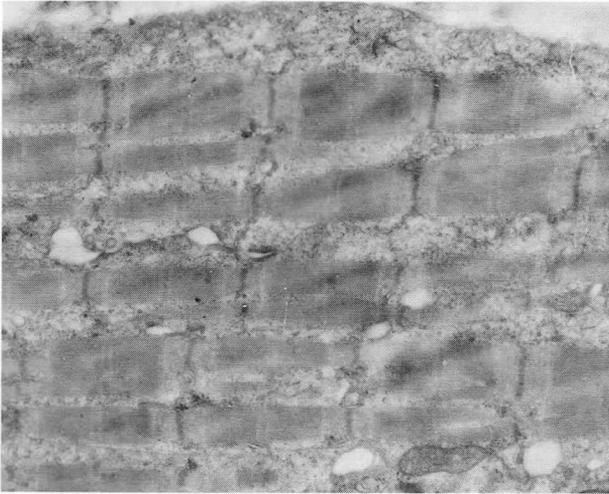
a. 位相差顕微鏡  $\times 200$

b. 電子顕微鏡  $\times 35,000$

多数の細い filament が出現している。



a

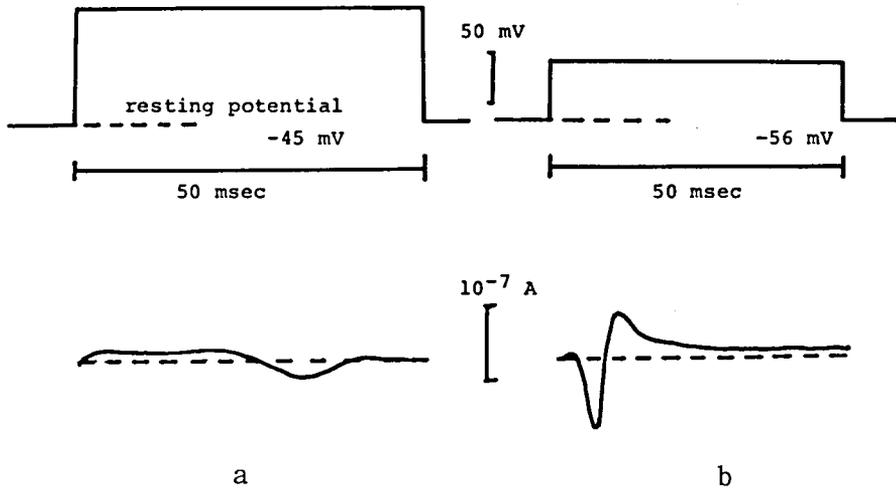


b

## 第 3 図

培養開始後 10 日目の標本, 正常筋

- a. 位相差顕微鏡  $\times 200$   
 すべての線維に横紋構造がみられ筋細胞として完成している。
- b. 電子顕微鏡  $\times 15,000$   
 A, I 帯が規則正しく配列して, Z 帯及びこれと共に T 管が走行している。



第 4 図

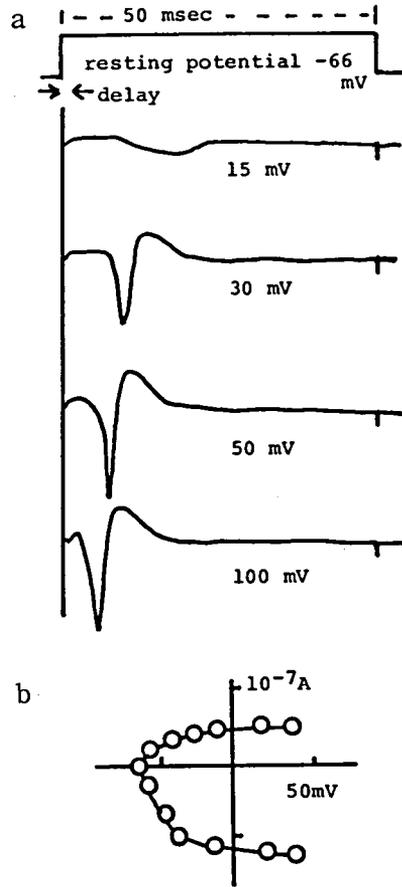
膜電位固定下で観察される膜電流, 正常筋  
 上段, 脱分極パルス  
 下段, 膜電流  
 a. 培養開始後3日, 経過のおそい内向き電流  
 b. 培養開始後5日, 経過のはやい内向き電流とそれにつづく外向き電流

チャンネルを通るので, 神経はその形成を促進する効果があるといえる。一方, おそい経過の電流はカルシウムの流入を反映している可能性が考えられるが直接の証明はない。

今後何らかの方法で培養標本について興奮と収縮の関連を定量的に測定し, dystrophy と Normal の筋について, 相違があるかどうかを検討してゆきたい。

文 献

- 1) 堀田健, 富田伸子, 杉山博之: 培養法による鶏ジストロフィー筋の電気生理的, 形態的及び代謝的特性について, 筋ジストロフィー症の基礎的研究, 昭和55年度報告書, 89-96 (1981)
- 2) 堀田健, 富田伸子: 発生初期におけるジストロフィー筋のアセチルコリンレセプターの代謝速度, 筋の発生と分化に関する基礎的研究, 昭和56年度報告書, 91-97 (1982)
- 3) 堀田健, 大羽利治, 越田信, 西原己栄子, 小鹿幸生: ジストロフィー筋の生理学的研究, 筋ジストロフィー症の基礎的研究, 昭和53年度報告書, 52-58 (1979)



第 5 図

種々の脱分極パルスによる膜電流

ジストロフィー筋に正常脊髄を植付けたもの。培養開始後6日，神経植付後3日

a. 膜電流，更正是bに同じ

b. 電流-電圧曲線，脱分極パルスは右方が正，内向き電流は下方

## 10 筋細胞膜における膜興奮機能の発生

高橋 国太郎

研究協力者 平野 丈夫

発生分化につれて同一機能を担うと考えられる蛋白分子種の交替がおこることは、筋収縮系などでよく知られている。イオンチャンネルが発生過程で交替する可能性は、ニワトリ骨格筋の筋管発生時に Ca 活動電位がまず出現し、のちに Na 活動電位があらわれ<sup>1)</sup>、また Na 活動電位のテイロドトキン感受性の増大<sup>2)</sup>がおこる等の事実から推測されている。この場合は Ca チャンネルから Na チャンネルへの交替が考えられる。

一方、同じ膜電位依存性の Ca 流入を惹起す Ca チャンネルも一種類ではなく、動物種により、発生時期により異なるものがある可能性が指摘されている<sup>3)</sup>。とくに最近報告されている各種の卵細胞に見られる Ca チャンネルは Sr イオンに対して透過性が高く、かつ不活性化過程も Na チャンネルに見られる様な膜電位依存性のものであると考えられている<sup>4)</sup>。このことは他の多くの興奮性細胞膜で見られる Ca チャンネルが Ba に対して透過性が高く、不活性化過程が Ca 電流依存性であることと対照的である。したがって、卵細胞型の Ca チャンネルは明らかに他の分化した興奮膜のものとは異っている。これが分化にともなう Ca チャンネルの変化であることを明らかにするためにホヤ分裂停止胚をもちいて行った解析を昨年度報告した。

ホヤ発生卵は卵割初期に細胞分裂を停止しても、大型の割球のまま、それぞれの細胞膜は予定領

域の運命にしたがって興奮性膜に分化する<sup>5)</sup>。とくに未分裂の 1 細胞胚をサイトカラシン B で処理し飼育した場合は細胞膜は表皮細胞型に分化し、Ca 活動電位を発生する。この膜の Ca チャンネルは分化した興奮膜の Ca チャンネルとよく似た性質を示すので、この 1 細胞胚の分化を解析することにより Ca チャンネルの分化にともなう性質の変化を解析できることを示した。本年度はこの発生系をもちいて、さらに Ca チャンネルの二型の性質の相違を明らかにし、またこの変化の発生時間に従った解析をおこなったので報告する。

### 研究方法

低温海水槽 (1.5 ~ 2.5 °C) に保存してある抱卵マボヤ個体を一昼夜高温海水 (11 ~ 12 °C) で飼うと放精放卵をおこなう。この卵と他の個体が放精した精子海水を混合して受精をおこなった。受精後は 8 °C の恒温槽に受精卵を入れたシャーレを入れて発生させた。受精卵の一部は対照としてそのまま正常発生させ、残りは第一卵割開始前にサイトカラシン B 2 μg/ml を含有する海水中で飼育した。また必要があれば 16 細胞胚で分裂を停止したものも飼育した。これらの分裂停止胚を対照の正常発生卵から幼生が孵化する時点まで飼育すると細胞膜が分化して興奮膜となる。このようにして得られた未分裂 1 細胞分化胚と対照として未受精卵のコリオン膜をプロネース 10mg/ml を含む海水に 30 分以上浸してから解剖針をもちいて除去した。これらの裸かにした卵および分化 1 細胞胚

\* 東京大学医学部脳研究施設神経生物学研究室

を10 mM KCl, 5 mM PIPES-Na (pH 7.0), 10 mg/ml BSA, 2  $\mu$ g/ml サイトカラシン B, 及び主要一価塩として 400 mM の NaCl あるいは TEACl, 主要二価塩として 100 mM の CaCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub> あるいは BaCl<sub>2</sub> を組成とする人工海水に入れ, 電圧固定法により膜電流の解析をおこなった。電圧固定は通常の二本の 3 M KCl ガラス微小電極を刺入しておこない, 必要に応じて 1 MEGTACs<sub>2</sub> をつめた微小電極を刺入した。EGTA を未受精卵に注入して卵賦活を防ぎ, 分化一細胞胚には Cs, および EGTA を注入して外向き電流とりわけ Ca 依存性に電流を抑制した。また外液も必要に応じて NaCl のかわりに TEACl を含むものもちい, 可及的に外向き電流を押えて, 純粋な Ca チャンネル電流を解析しようように努力した。また Ca チャンネルの Tail 電流を測定し, Ca チャンネル電流の少ない陽性膜電位範囲における Ca チャンネルコンダクタンスの時間経過を推定して, 不活性化過程の解析をおこなった。

### 研究結果

(1) 昨年度の研究結果から, 分化1細胞胚の Ca チャンネルは二価イオン選択特性として Ba > Sr > Ca の系列をなし, Ba あるいは Sr 溶液中では電流が持続し不活性化が少いが, Ca 溶液中では不活性化が明瞭となることがわかった。そして, この Ca チャンネルは分化した興奮膜の特長であることを示唆した。このことをさらに確かめるために, 筋細胞型に分化した分裂停止8細胞胚の B4<sup>+</sup> 割球をもちいて, その Ca チャンネルの電流を解析した (図1A)。筋細胞型に分化した場合の膜電流は Ca 内向き流のほかに Ca 依存性 K 電流と著明な遅延整流性電流がある。そこで, EGTA 及び Cs を注入すると図1Bのように持続の長い内向き流が著明となる。さらに外液の Na を TEA におきかえると図1Cに見られるように, 分化1細胞胚の Sr 電流と同様の長い持続を示す。この内向き電流は外液を Sr 溶液から Ca, Ba 溶液と交換する

と図1Cに見られるように Ca < Sr < Ba の順に増大する。また Ca 溶液中では不活性化が認められた。B<sub>4-1</sub> 割球は1細胞胚にくらべて小さいので, 時間を追って電流が減少する傾向があるが, 本質的には分化1細胞胚に見られた Ca チャンネルと相同のものが存在すると結論できた。

- (2) 分化型と卵細胞型の Ca チャンネルでは不活性化過程がことなることは昨年報告した。電流振巾が減少する陽性膜電位の範囲でも, 電流経過の各点で一定の負の膜電位のテストパルスを与えて Tail 電流を測定するとコンダクタンスの時間経過を推定することができる。図2の A と B に示すように, 分化型と卵細胞型では Ca 溶液中でのコンダクタンスの時間経過に明瞭な差があり, 卵細胞型は単に不活性化が早いだけでなく, 膜電位が高くなると時間経過はより早くなる。しかし, 分化型では膜電位の上昇につれて, 不活性化は少くなり時間経過は延長する。このことで分化型では Ca 電流の振巾に不活性化が依存するが, 卵細胞では膜電位に依存することがさらに確かめられた。
- (3) 図3A と B に示すように分化型と卵細胞型の Ca チャンネルの電流電圧曲線を比較すると, Ca, Sr, Ba の間の選択特性だけでなく安定化効果の差もあることがわかる。それぞれの二価イオン溶液中での最大電流時の膜電位, 閾膜電位が異っている。安定化効果は分化型・卵細胞型ともに Ba < Sr < Ca の順であるが, 調べてみると分化型の場合 Ca の結合が少ない。そのため Ca 溶液中でとくに閾値が下がっている。Ba のように結合力の殆んどないもの場合でも電流電圧曲線は分化型で負方向に10mVほど移動しているので, 本質的なチャンネル活性化の閾値のずれも考えられる。
- (4) 分化型と卵細胞型の Ca チャンネルは, 二価イオン選択特性, 不活性化過程, 安定化効果において異り, 明瞭な二型と考えられる。この二型は分化過程のある時点で交替するはずであり,

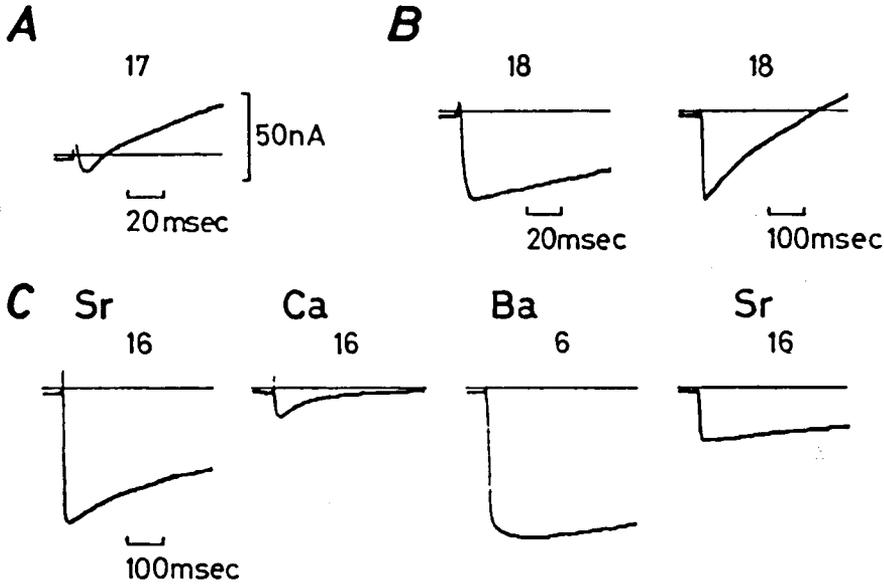


図1 分裂停止8細胞胚の分化したB<sub>4-1</sub>割球の膜電流記録。A Sr溶液中での記録。B EGTAおよびCsを細胞内に注入後の記録。C外液のNaをTEAにかえて、さらに外向き電流を抑制したあと、筋細胞型に分化した場合のCaチャンネルの二価イオン選択特性を調べたもの。各電流記録上の数字は膜電位。

これを実際に調べたのが図4である。8℃における発生時間のそれぞれの点で、Caチャンネルの量をSr電流の最大値で示してある。未受精卵すなわち発生時間零で存在していたCaチャンネル(黒丸)は10時間以内に一旦消失し、20時間ほどで再び出現する。Caチャンネルはまだ卵細胞型であるが、40時間を境にして分化型にかわる。附図に示すように37時間ではBa溶液中の電流はSr電流より少なく、40時間では逆にBa溶液中で大きい。すなわち選択特性の逆転がみられる。この40時間という発生時間は正常発生の場合Ca活動電位が出現し、筋細胞上にACh感受性があらわれる時点に一致する。また15℃で発生させた場合は形態変化の観点から、17時間に相当する。図5のAは分裂停止16細胞胚を15℃で飼育した場合にCa溶液

中で測定したCaチャンネルの安定化効果を電流が最大値の半値になる膜電位で表し、その変化を調べたものである。安定化効果が17時間の時点で明瞭に変化することがわかる。

(5) 発生過程におけるチャンネル型の変化はCaチャンネルの場合だけでなく、Naチャンネルについても観察される。図6は分裂停止16細胞胚でのNaチャンネル電流電圧曲線の発生に伴う変化を示している。すべて曲線はCa溶液中でもとめたもので6時点の発生時間で計測した。これからわかるように19時間以後のものは電流電圧曲線が陽性方向に5mV程度移動している。すなわち安定化効果の増加がある。このことを発生時間に対する最大電流値の半値となる膜電位の変化で示したのが図5のBである。やはり、15℃17時間でNaチャンネルの活性化の閾値変

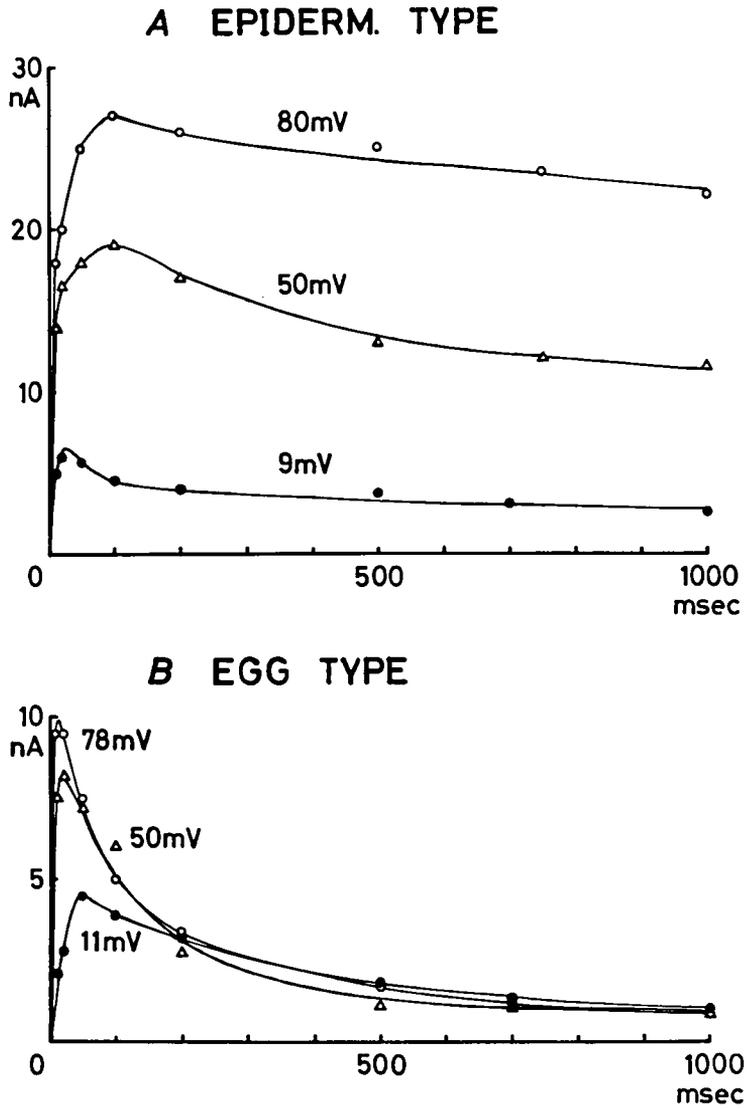


図2 分化型(A)と卵細胞型(B)のCaチャンネルのCa溶液中におけるコンダクタンスの時間経過をtail電流の測定により推定したもの。

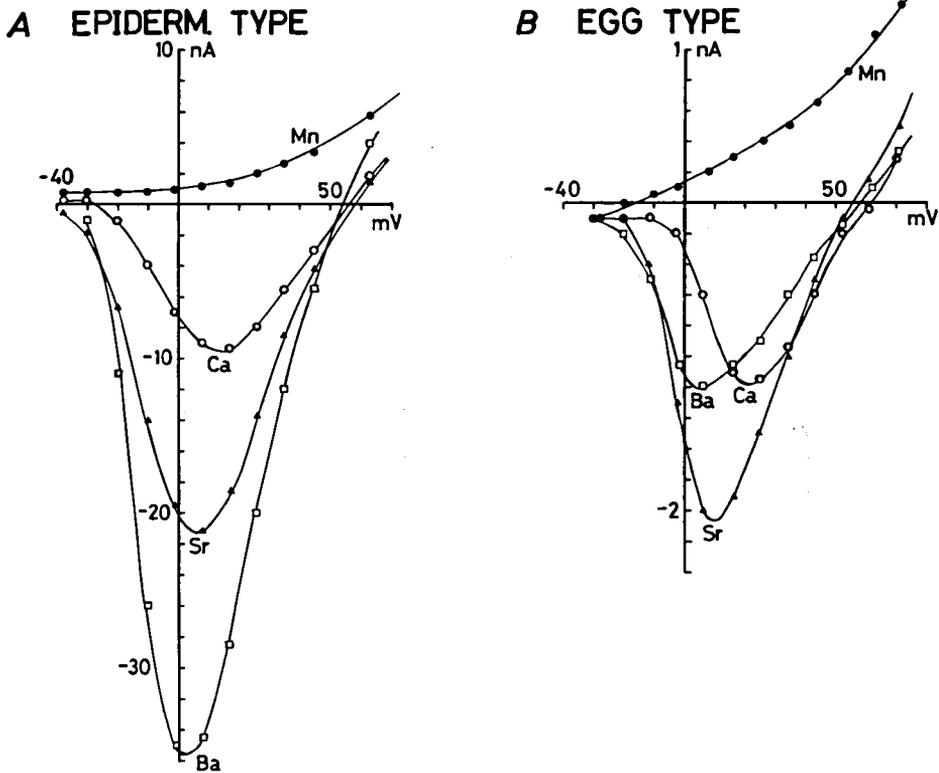


図3 分化型(A)と卵細胞型(B)のCaチャンネルの電流電圧曲線の比較、とくに二価イオンの安定化効果の差を比較するため、溶液は100 mM Ca, Sr, Ba および5 mM Mnと95 mM Mgの溶液をそれぞれもちいて測定した。

化があることがわかる。Naチャンネルではこの他に性質の大きな変化はみられないが、卵細胞型から分化型への変化ということではCaチャンネルと共通するところがあると思われる。

#### 研究の考察

Caチャンネルの二型は二価イオン選択特性、

二価イオンのCaチャンネルに対する安定化効果、不活性化過程の膜電位との関係など多面的な変化とも考えられるが、選択特性におけるCa選択性の相対的低下、Caの安定化効果の相対的低下などの面を総合して考えると、不活性化過程については別として、チャンネルへのCa結合能の低下という点で統一的に考えられるかも知れない。ま

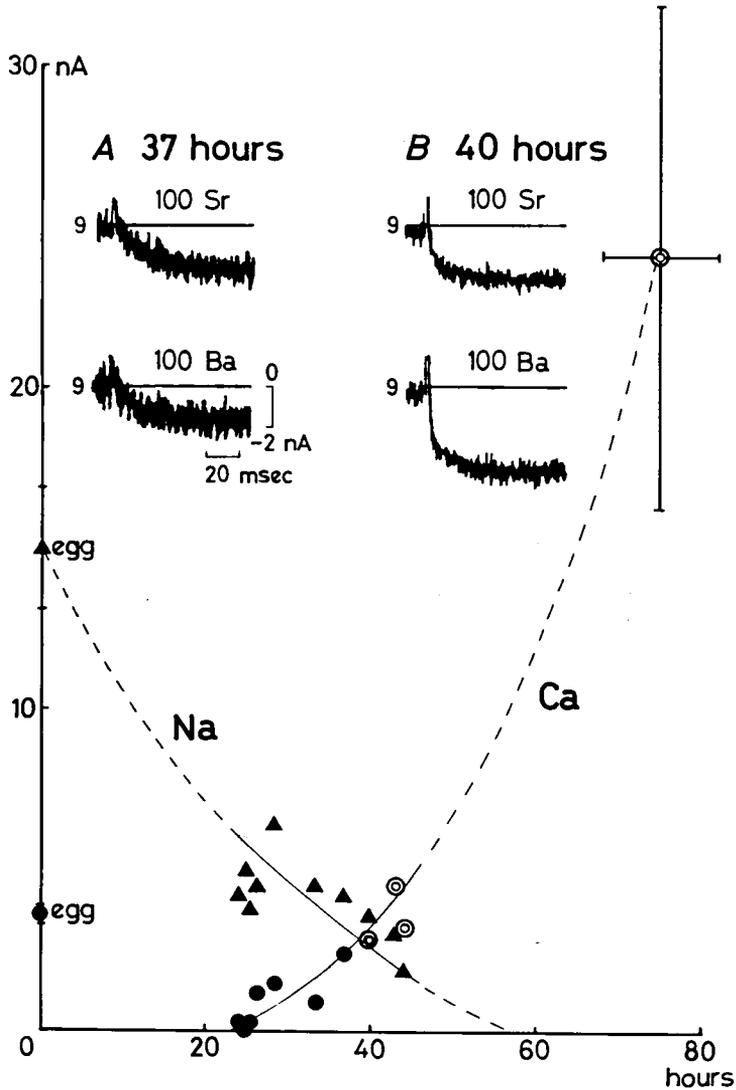


図4 分裂停止1細胞胚におけるCaチャンネルの発達を受精後の8℃における発生時間を横軸にとって表示したもの。測定はすべてSr Na溶液中でおこない、黒丸は発生各時点での卵細胞型のSr電流の最大値である。二重丸は同様にSr電流の最大値であるが分化型のCaチャンネルによると考えられるもの。黒三角は比較のために卵細胞型のNa電流の最大値の変化をましている。分化にともなって卵細胞型Naチャンネルは消失する。附図AとBは各発生時点でのCaチャンネルの選択特性の変化を示すために、Sr電流を比較したものである。

た、分化によって新しく出てくるCaチャンネルは卵細胞型のものとはまったく異った分子種であるのか、糖鎖などで修飾されただけであるのか

は重要な点である。これらの点についてはRNA合成阻害剤、蛋白合成阻害剤、糖鎖合成阻害剤などをもちいてさらに検討する必要がある。

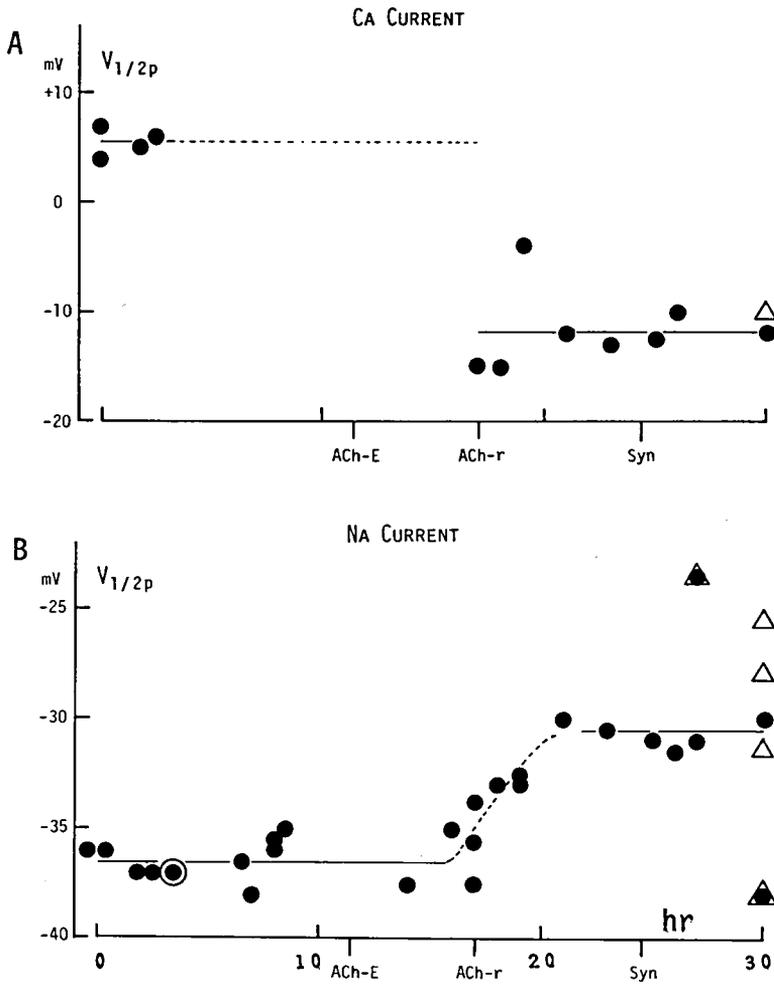


図5 Caチャンネル(A)とNaチャンネル(B)の安定化効果の発生ともなう変化。30 mM Ca, 50 mM Mgを含むNa Ca溶液中で分裂停止16細胞胚をもちいて測定し, 安定化効果の指標としてCa電流およびNa電流について, それぞれの最大電流値の半値となる膜電位をもちいた。発生時間は15°Cのもので, 8°C 40時間は15°C 17時間にあたる。△は電圧固定下でなく, 通常の定電流刺激による活動電位出現の閾値から換算した。

文 献

1) Kano, M. (1975). Development of excitability in embryonic chick skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, 86: 503-510.  
 2) Kano, M., Suzuki, N. & Ojima, H. (1979). Neuro-

trophic effect of nerve extract on development of tetrodotoxin-sensitive spike potential in skeletal muscle cells in culture. *J. Cell. Physiol.*, 99: 327-331.  
 3) Hagiwara, S. & Byerly, L. (1981). Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4: 69-125.

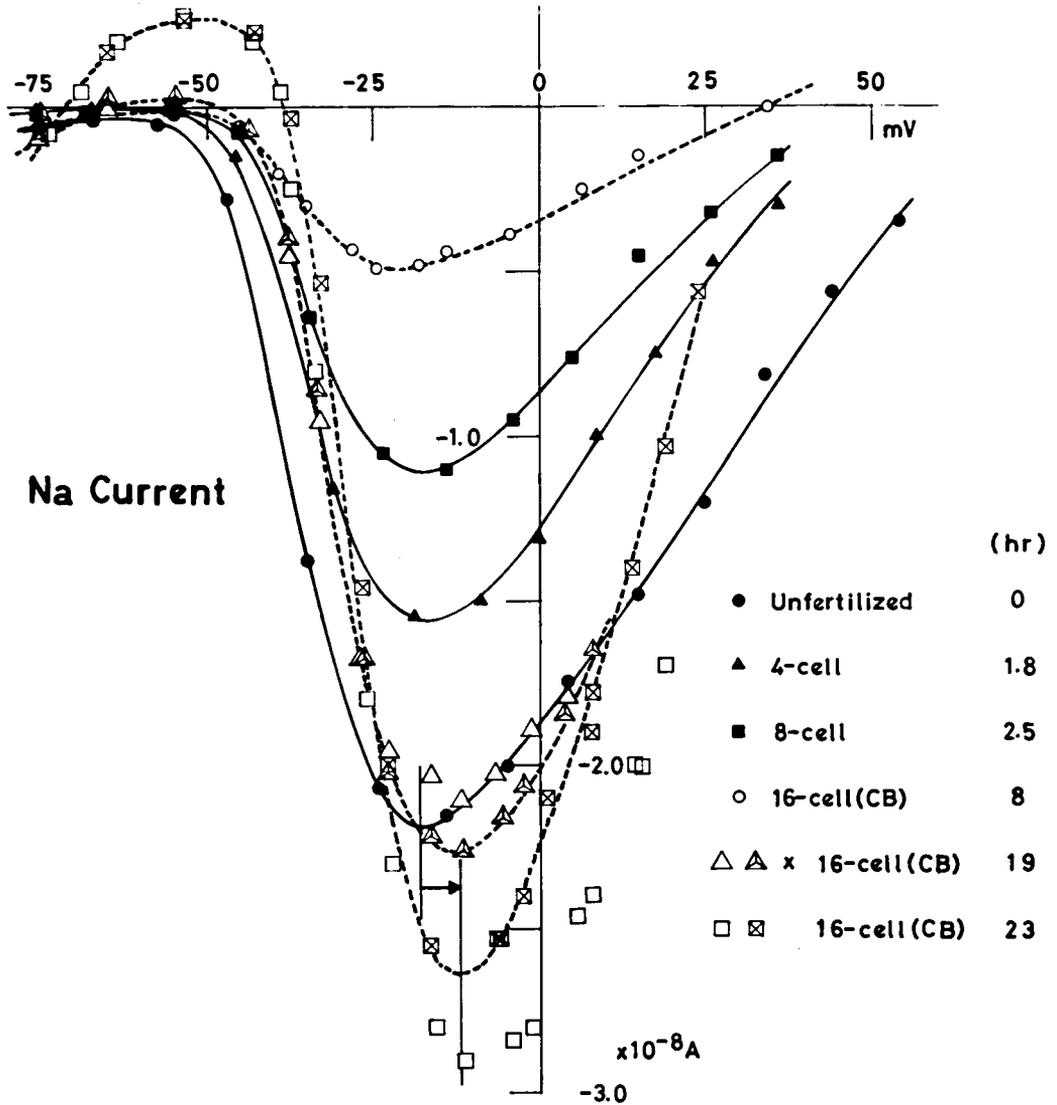


図6 分裂停止16細胞胚(点線)のNa電流の電流電圧曲線の発生時間による変化。実線は分裂を停止していない胚で16細胞期にいたるまでの初期変化をしらべたもの。測定した溶液はすべて、30 mM  $\text{CaCl}_2$ 、430 mM  $\text{NaCl}$ 、50 mM  $\text{MgCl}_2$ 、10 mM  $\text{KCl}$ 、5 mM  $\text{PIPES-Na}$  (pH 7.4)。

4) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yamashita, N. (1977). Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 267: 465-495.

5) Takahashi, K. (1981). Development of Ca channels in the cleavage-arrested embryo of a certain ascidian. The mechanism of gated calcium transport across biological membranes. Edit. Ohnishi and Endo. Academic Press, pp. 9-16.

## 11 除神経による活動電位の誘発

栗山 熙

研究協力者 伊東 祐之 是永 進

高勝 強

### 目 的

運動神経は脊髄から骨格筋へ興奮を伝導するだけでなく、支配筋組織の生理学的、生化学的性質を規定し維持する役割をも有している。従って運動神経の軸索の一部を外科的又は化学的に切除すると軸索や髄鞘が変性するばかりでなく、神経細胞体と筋組織に於て著るしい生理学的、生化学的変化が引き起こされる。

筋細胞の電気的膜性質のうち活動電位を例にとると、カエルの遅筋は正常神経支配下では活動電位を発生しないことが知られているが(1)除神経により活動電位を発生する能力を獲得すると報告されている(2)しかし現在まで活動電位の除神経による誘発現象はカエル遅筋に於てしか知られていない。

一方フナ胸ビレ筋細胞は運動神経による多重神経支配を受けており、正常条件下では筋直接刺激あるいは運動神経刺激により活動電位を発生しない(3)

そこで除神経による活動電位誘発現象がカエル遅筋に特有な現象であるか否か、さらにフナ胸ビレ筋に於て運動神経がその興奮性を制御する因子であるか否かを検討する目的で、除神経のフナ胸ビレ筋に及ぼす効果を検討した。

### 方 法

日本産フナ (*Carassius Auratus Linne*) 胸ビレ

九州大学医学部薬理学教室

筋 (*M. levator pinnae pectoralis*) を用い、その支配神経 (Th 1 及び Th 2) を胸ビレへの進入部位で外科的に切除した。外科処置は右側で行い反対側の胸ビレ筋を対照とした。術後 1 ~ 5 週間後に両側の胸ビレ筋を摘出し、人工灌流液中で微小電極による実験に供した。記録用及び通電用微小電極はそれぞれ 3 M KCl 及び 2 M K-acetate を充てんし、微小電極用増巾器と接続し、通電した電流及び筋細胞膜の電気現象を記録した。用いたリンゲル液の組成は NaCl, 129.6 mM, KCl, 2.7 mM, CaCl<sub>2</sub>, 1.8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2.5 mM であった。

### 結 果

外科処置の後、神経-筋伝導が停止する時期を検索する目的でまず微小終板電位 (m.e.p.p.) を記録した。対照側の同定した筋細胞で m.e.p.p. の頻度を経時的に観察すると、胸ビレ筋摘出後 30 ~ 50 時間では 80 - 120/min と安定した値を示した。一方、除神経側で同様の実験をくり返すと術後 44 時間後 m.e.p.p. の頻度の減少が観察され、45 ~ 50 時間後にその発生は完全に停止した。15 個の同定した筋細胞に於てその平均値を求めると  $47.6 \pm 0.8$  時間 ( $\pm$  S.D.) であった。このときフィールド刺激 (期間 50  $\mu$ sec) を与えると、対照側では終板電位 (e.j.p.) とそれに引き続くれん縮が発生するが、検側では e.j.p. の発生は全く観察されなかった。すなわち本実験では術後約 47 時間後に運動神経の変性が完了し、神経-筋伝達は完全に遮断されたと考

えられる。

カエル骨格筋では除神経によりm.e.p.p.が完全に消失した後、低頻度のm.e.p.p.の再出現が報告されているが(シュワン細胞m.e.p.p.; 4) 本実験ではm.e.p.p.の再出現は観察されなかった。

運動神経の変性に伴い、両生類や哺乳類の骨格筋では電氣的膜性質が変化することが知られている。そこで運動神経変性後のフナ胸ビレ筋の電氣的膜性質を検討した。

フナ胸ビレ筋の静止膜電位は正常時には、 $-87.5 \pm 2.1 \text{ mV}$  ( $\pm \text{S.D.}$ ,  $n=50$ )で、除神経30日後に $-88.3 \pm 3.0 \text{ mV}$  ( $\pm \text{S.D.}$ ,  $n=30$ )と除神経により正常時に比しわずかに増加する傾向を示したが、統計的有意差は見られなかった。

さらに除神経後7日目までは膜実効抵抗( $R_{in}$ )、空間定数( $\lambda$ )、膜時定数( $\tau_m$ )及び筋細胞の直径( $\rho$ )とこれらの値から計算した単位面積当りの膜抵抗( $R_m$ ;  $\text{K} \Omega \text{ cm}^2$ )、細胞内抵抗( $R_i$ ;  $\Omega \text{ cm}$ )及び膜容量( $C_m$ ;  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ )に変化は認められなかった。除神経後10日目より $R_{in}$ の増加傾向が認められ、約30日目に最大値を示し(対照の約1.3倍)その後この値は一定値を示した。一方、 $\lambda$ 及び $\tau_m$ はわずかな増加を示したが(対照の約1.1~1.2倍)、 $R_i$ に変化は認められなかった。しかし、除神経後20日目まで筋細胞の直径に殆んど変化は認められなかったので、除神経による筋萎縮が $R_{in}$ 、 $\tau_m$ 増大の直接原因ではないと推定できる。

対照側胸ビレ筋では筋直接刺激あるいは運動神経刺激により活動電位の発生は見られないが、検側では除神経後3~4日目に筋直接刺激により局所応答が観察され、その大きさと立ち上り速度は経時的に増加し、約3週後にはほぼ最大値を示し、all or none型の活動電位となった。ちなみに除神経後7, 10, 20, 30日目に観察された活動電位の平均立ち上り速度は $27.1 \pm 16.0$ ,  $55.8 \pm 23.9$ ,  $84.4 \pm 14.3$ 及び $89.2 \pm 11.5 \text{ V/sec}$ であった。さらに静止膜電位は前述のように除神経により影響を受けないが、活動電位発生の閾値は除神経後7, 10, 20そして30日後にそれぞれ $-35.0 \pm 4.0$ ,  $-42.1 \pm 6.5$ ,

$-51.4 \pm 2.1$ 及び $-55.3 \pm 3.5 \text{ mV}$ と徐々に低下し、除神経30日以降では一定値を示した。

除神経後に観察される活動電位はテトロドトキシン( $10^{-6} \text{ g/ml}$ )によって、また外液中の $\text{Na}^+$ を正常時の $132.1 \text{ mM}$ から $2.5 \text{ mM}$ に減少することによって完全に消失したので $\text{Na}^+$ の内向き電流によって発生すると考えられる。

カエル遅筋における除神経による活動電位の誘発現象や、カエル速筋で除神経後に見られるシュワン細胞由来のm.e.p.p.発生現象はアクチノマイシンの投与により消失することが知られている(5, 6)。

そこで除神経によるフナ胸ビレ筋での活動電位誘発現象の機構を検討する目的で除神経後5日目及び6日目にアクチノマイシンD ( $5 \times 10^{-5} \text{ g/ml}$ )をリンゲル液に溶解しその $0.5 \text{ ml}$ をフナ腹腔内に注入し、その活動電位発生に及ぼす効果を観察した。一方、対照としてリンゲル液のみを腹腔内に注入した胸ビレ筋を用いた。対照とした筋組織では除神経後経時的に活動電位を発生する筋細胞数が増加した。すなわち除神経10日目に、検索した40例の筋細胞のうち活動電位を発生した筋細胞は25、発生しない細胞は15例であった。除神経後20日目には24個の筋細胞のうち21個の細胞で活動電位発生が観察され、30日目には検索したすべての細胞(22個)が活動電位を発生した。

一方、アクチノマイシンDを除神経後5日目及び10日目に2回注入した筋組織では、除神経20日後に検索したすべての筋細胞(13例)で活動電位の発生が見られず、さらに25日目に検索した4例の筋細胞も全く活動電位を発生しなかった。しかし除神経後20日目及び25日目にアクチノマイシンDを注入したフナ胸ビレ筋では検索した7例の筋細胞(除神経後30日目)のうち4例の筋細胞が活動電位を発生した。

この実験結果はフナ胸ビレ筋に於ては、除神経後早い時期に注入したアクチノマイシンDにより活動電位の誘発現象が抑制されることを示している。

## 考 察

フナ胸ビレ筋は正常神経支配条件下では、神経刺激あるいは筋直接刺激により活動電位を発生しない。しかしこの筋細胞は多重神経支配を受けており神経刺激により発生するe.p.p.の大きさが機械的閾値より大きく、e.p.p.により収縮が発生する。

しかし本実験によりフナ胸ビレ筋はカエル遅筋と同様、除神経により活動電位発生機構を獲得することが明らかとなった。

この変化がどのような除神経効果により発生するのか種々の可能性、例えば①神経の興奮伝導の阻害、②筋収縮の抑制、③軸索輸送の阻害による「栄養因子」の消失などが考えられる。

カエル遅筋ではこれらの可能性を検討した種々の実験がある。カエル速筋及び遅筋はそれぞれ伝導速度の速い運動神経と遅い運動神経によって支配されているが、遅筋が速筋を支配する速い運動神経により支配される実験条件下でも活動電位の発生が観察されていること(7)や、さらにカエル遅筋を組織培養した条件下でも活動電位が発生すること(8)が報告されている。しかしボツリヌス毒素で神経-筋伝達を完全に遮断した条件下では、遅筋は活動電位を発生しない(9)。またこの実験では遅筋を支配する運動神経の興奮伝導と神経-筋接合部の形態は正常に保たれている。これらの実験結果は除神経効果のうち③の効果、すなわち支配神経から放出される栄養因子の放出の停止により活動電位が誘発される可能性を示しており、フナ胸ビレ筋でもおそらく同様のメカニズムで活動電位を発生させると考えられる。さらに除神経の後、RNA合成阻害薬であるアクチノマイシンDを投与することにより活動電位誘発現象が抑制さ

れることは、フナ胸ビレ筋に於ても、活動電位発生機構の獲得にはRNA合成が必要条件であることを示している。

これらの実験事実から、フナ胸ビレ筋やカエル遅筋を支配する運動神経末端から末知の栄養因子が放出され、この因子はNa-チャンネルの合成に不可決である蛋白合成系を阻害し活動電位の発生を抑制している可能性が推定出来る。

## 文 献

- 1) Kuffler, S. W. & Vaughan Williams, E. M. (1953). Properties of the 'slow' skeletal muscle of the frog. *J. Physiol.*, **121**: 318-340.
- 2) Miledi, R. & Orkand, P. (1966). Effect of a 'fast' nerve on 'slow' muscle fibres in the frog. *Nature*, **209**: 717-718.
- 3) Hidaka, T. & Toida, N. (1969). Biophysical and mechanical properties of red and white muscle fibres in fish. *J. Physiol.*, **201**: 49-59.
- 4) Birks, R. I., Katz, B. & Miledi, R. (1960). Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration. *J. Physiol.*, **150**: 145-168.
- 5) Schmidt, H. & Tong, E. Y. (1973). Inhibition by actinomycin D of the denervation-induced action potential in frog slow muscle fibres. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **184**: 91-95.
- 6) Bevan, S., Miledi, R. & Grampp, W. (1973). Induced transmitter release from Schwann cells and its suppression by actinomycin D., *Nature, New Biology*, **241**: 85-86.
- 7) Miledi, R., Stefani, E. & Steinbach, A. B. (1971). Induction of the action potential mechanism in slow muscle fibres of the frog. *J. Physiol.*, **217**: 737-754.
- 8) Cull-Candy, S. G., Miledi, R. & Uchitel, O. D. (1980). Induction of action potentials in cultured slow muscle fibres of the frog. *J. Physiol.*, **299**: 197-202.
- 9) Miledi, R. & Spitzer, N. C. (1974). Absence of action potentials in frog slow muscle fibres paralysed by botulinum toxin. *J. Physiol.*, **241**: 183-199.

## 12 ジストロフィーハムスターの心臓機能と骨格筋々小胞体のCa取り込み能に関する研究

酒井敏夫

研究協力者 栗原敏 西島博明

小西真人 小林啓三

### 1 緒言

ジストロフィーハムスター(BIO 14.6)は、人間の筋ジストロフィーの疾患モデルとして注目され、幼若期から心筋に病変が現われることが知られている。我々は、ジストロフィーハムスターの心臓機能と心筋の興奮-収縮連関機構に注目し、正常ハムスターとの機能性差異について、また、下肢骨格筋から得られた分離筋小胞体のCa uptake能を検討した。

### 2 方法

実験に用いたハムスターは、正常群は、BIO F1B、ジストロフィー群はBIO 14.6で、第I群は正常、ジストロフィー群とも36週齢のものを、第II群としては28週齢のものをを用いた。心臓機能としては、軽度エーテル麻酔下で心電図(第IIまたは第I誘導)を記録し(室温25°C)Signal ProcessorでR-R間隔のinterval histogramを観察し、変動係数を算出して比較した。心電図記録後、心臓を摘出し、湿重量を計測した後に、心筋内カテコールアミンを高性能液体クロマトグラフィーにより分離した後、electrochemical detectionによって測定した。また、右室から比較的無傷の肉柱を得て(直径0.2~0.4mm、長さ1.2~2.0mm)、両端をナイロン糸で結紮し、張力を測定

した。張力測定と同時に、微小電極法により膜電位、活動電位を測定した。用いた溶液はKrebs氏液で、97%O<sub>2</sub>と3%CO<sub>2</sub>により、PHを7.2に調節した。温度は36°Cに保った。薬物としては、*l*-アドレナリン、カフェインをKrebs氏液に溶解して用いた。

分離筋小胞体膜の分離及びCa-uptake能の測定はNishijima et al(1978)<sup>2)</sup>によって行なった。

### 3 結果

#### A 心臓機能に関する実験

##### a) 体重と心重量

第I群の正常群の平均体重は124.0gで、ジストロフィー群のそれは116.8gであった。第II群の正常群の平均体重は127.0gで、ジストロフィー群は、112.7gであり、正常群、ジストロフィー群との間に差異が認められた。

摘出心臓の重要は、ジストロフィー群の方が、正常よりも重く有意差が認められた。(正常群-平均0.49g、ジストロフィー群-平均0.67g)。体重に対する心重量の割合も、ジストロフィー群で大きかった。

##### b) 心電図の測定とR-R間隔の変動

軽度エーテル麻酔下では、安定した心電図記録が得られた。R-R間隔は正常群で146.9±16.3 msec、ジストロフィー群では136.9±13.27 msecであり両者の間には有意差はなかった。

しかし、R-R間隔を正常群、ジストロフィー群について、それぞれ200心拍について計測し、 $CV(\%) = SD/M \times 150$  (SD: 標準偏差, M: 平均値)の式により変動係数を算出すると、正常群では $5.34 \pm 3.94\%$ で、ジストロフィー群では $0.79 \pm 0.26\%$ で両者の間には有意差があった。このことは、正常群の方がジストロフィー群よりも、R-R間隔の変動が大きいことを示唆している。

#### c) 心筋カテコールアミン含有量の測定

ハムスターをクロロホルム麻酔後、断頭脱血し、 $0^{\circ}\text{C}$ のクレブス氏液に摘出した心臓を浸漬した。心室内の血液を可能な限り除去してから、湿重量を測定した後カテコールアミンの測定を行った。正常ハムスターのドーパミン(Dm)、アドレナリン(Ad)、ノルアドレナリン(Norad)、はそれぞれ、45, 37, 1221 (ng/g組織)(n=5)であった。これに対し、ジストロフィー群のDm, Ad, Noradは、24, 16, 695 (n=5)であり、カテコールアミンはいずれも、正常ハムスターよりも低値を示し、有意差が認められた。

#### d) 摘出肉柱における活動電位と収縮の特性

白金電極を介して矩形波刺激を与え、単収縮と活動電位を観察した。正常ハムスターの膜電位は $-72.7 \pm 6.1\text{mV}$ (n=27)( $m \pm S.D.$ )で、ジストロフィーハムスターの膜電位は $-72.8 \pm 3.8\text{mV}$ (n=28)であった。活動電位のオーバーシュートは数mVであり、初期のスパイク相と、それに続くプラトー相が明瞭に分かれ、スパイク相の振幅の約50%のところから、プラトー相に移行した。ジストロフィーハムスターでは、初期のスパイク相が約30%程、再分極したところから、ゆるやかなプラトー相へ移行した。再分極完了時点での活動電位持続時間は、ジストロフィーハムスターが、正常ハムスターよりも延長していた。

通常、 $1/5\text{s}$ の頻度で刺激したが、その時の発生張力は、正常ハムスターで $15.7 \pm 4.3\text{g}/\text{cm}^2$ (n=3)、ジストロフィーハムスターで $55.4 \pm 22.4\text{g}/\text{cm}^2$ (n=5)であり、ジストロフィーハムスターの方が発生張力は大きかった。発生張力は刺激頻度に依

り、刺激頻度 $1/1\text{s}$ ,  $1/0.5\text{s}$ ,  $1/0.3\text{s}$ と増すに従い、張力は減少しnegative staircaseを示した。刺激頻度が増加するに伴い、活動電位の振幅は増加し、持続時間は逆に短縮しプラトー相の減少がみられた。この様な張力と活動電位の刺激頻度依存性は、正常ハムスター、ジストロフィーハムスターの両者に見られ、定性的には差異を認められなかった。

#### e) アドレナリンの作用

$10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ のアドレナリンをそれぞれ3分間隔で次々の作用させた。 $10^{-8}\text{M}$ アドレナリン作用直後から、張力の減少がみられ $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ と次第に、張力は回復傾向にあるものの、アドレナリン作用前よりも張力は低くかった。アドレナリン投与は、活動電位の持続時間の延長と、プラトー相の増加をもたらした。 $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-6}\text{M}$ , アドレナリンでは弛緩速度はやや速くなった。アドレナリンのこれらの効果は、正常ハムスター、ジストロフィーハムスターの両者で定性的に同じ様に見られた。

### B 下肢骨格筋内部膜に関する実験

#### a) 下肢骨格筋の重量変化

正常時の体重100g当りのEDLの平均重量は87.5gであった、しかし、ジストロフィー群では68.9gであり正常群の78%であった。また、M. soleusでは正常群では57.5g、ジストロフィー群では47.5gであり正常群の82.6%であった。これはジストロフィー群の骨格筋重量の方が正常群よりも軽く、この傾向は赤筋よりも白筋の方に顕著に差が現われている事を示している。

#### b) 分離筋小胞体膜の収量とCa-uptake能

分離筋小胞体膜収量は筋1g(wet weight)当り正常群とジストロフィー群とでは各筋(EDL, M. soleus, M. gracilis)共に有意差はなかった。またジストロフィー鶏で見られた様なlight fraction( $36000 \times \text{g}$ 以上で得られる分画)の増大は認められなかった。

ジストロフィーハムスター下肢筋の分離筋小胞体膜のCa-uptake能は正常筋と顕著な相異はなかった。ジストロフィーEDL筋の分離筋小胞体膜

Ca-uptake能は正常筋に比べて17%程度の抑制が観察されたが、M. soleus筋では、6~7%程度であった(Fig 1)。しかし、比較的障害の強いと

思われたM. gracillisではinitial rateの強い抑制と、最大Ca-uptake量の減少が見られた(Fig 2)。

		15sec		30 sec		60sec	
		C	D	C	D	C	D
EDL	A	160.3	133.6	178.6	156.3	182.7	149.9
	B	0.83		0.83		0.82	
M. Soleus	A	130.4	125.0	150.4	142.3	167.5	156.1
	B	0.96		0.95		0.93	

A :  $\times 10^{-9}$  moles/mg protein  
B : D/C

Fig 1 ジストロフィーハムスター下肢骨格筋筋小胞体膜のCa-uptake能

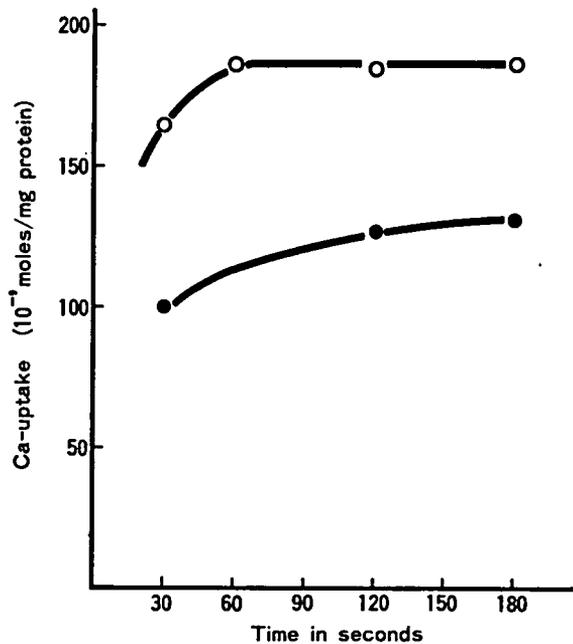


Fig 2 M. gracillisからの分離筋小胞体膜のCa-uptake能 H fractionによるCa-uptake能, -○-は正常ハムスター, -●-はジストロフィーハムスター。

#### 4 考 察

筋ジストロフィーハムスターの特徴は、①体重増加が遅くかつ、体重が正常ハムスターに比べて約30%程低い。②心臓重量が大きく、体重あたりの心重量は、正常ハムスターの約1.5倍である。このような心重量の変化は心筋そのものに原因があると同時に、血管病変があり、二次的に心肥大をきたしていることが考えられる。これらの心筋の異常と共に、心電図のR-R間隔変動が、筋ジストロフィー群で少ないことは、自律神経系の機能障害がジストロフィー群にあり、呼吸性のR-R間隔変動が少ないと考えられる。自律神経系の機能的障害を示唆するものとして、心筋内カテコールアミン含有量は、ジストロフィー群で明らかに低値を示した。これは、交感神経末端におけるカテコールアミンの合成が障害されているか、カテコールアミンの分解が亢進しているかのいずれかであることが考えられる。これらの結果は、ジストロフィーハムスターでは、心筋の障害と共に、自律神経の障害が生じている可能性を強く示している。

しかし、摘出心筋の実験では、発生張力はジストロフィー群でむしろ大きく、我々が用いた心筋条片には十分ジストロフィーが進行しておらず、代償性に収縮系が正常より大きな張力発生を行い得たものと考えられる。ジストロフィー群と、正

常群の間に見られた、活動電位波形の差異は、交感神経末端から、分泌されるカテコールアミン量がジストロフィー群で低いため、膜のイオンチャンネルが二次的に修飾されている可能性があり、今後の電流解析が待たれる。

正常、ジストロフィー両群で、アドレナリン作用後、活動電位のわずかな延長と、プラトー相の増加が見られたが、収縮は、むしろ抑制された。これは、ハムスターの心筋収縮系のCa<sup>++</sup>感受性が、アドレナリンにより低下しているものと考えられ、この点、他の心筋と異なる性質をもっている。

下肢骨格筋の内部膜系機能については、ジストロフィー鶏で得られた様な収量の増大がみられなかったため、筋の被破壊性も正常筋と同様であった。またCa-uptake能も、ジストロフィー鶏で示された様なuptake能の抑制が見られず、むしろ除神経筋で得られ結果と類似していた。

#### 文 献

- 1) K. Iriyama, M. Yoshiura & T. Iwamoto. Determination of catecholamines in rat tissues by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (Analysis of catecholamines in rat tissues). *Jikeikai Med. J.*, 30 (1): in press.
- 2) N. Nishijima, R. Shiba and Y. Ogino. The method for the preparation of fragmented sarcoplasmic reticulum from small pieces of leg skeletal muscles of rats. *Jikeikai Med. J.*, 25: 287-290, 1978.

## 13 両生類骨格筋の遅筋と速筋：筋小胞体の性質の比較

遠藤 實

研究協力者 堀内桂輔

普通によく知られている骨格筋細胞すなわち骨格筋線維は、短い単発の電気刺激で細胞膜に活動電位を発生し、それに伴って素早い収縮すなわち攣縮を起こす。これを速筋線維という。しかし、脊椎動物の骨格筋には、この速筋線維とは著しく異なる性質を持つよう分化をとげた筋線維、遅筋線維がある。この遅筋線維は活動電位を発生せず、連続的に長く刺激を繰返したときのみ収縮し、しかもその収縮は緊張性で緩徐である。

従来われわれは、この筋細胞の2種類の分化型の性質を、スキンドファイバ標本を用いて生理学的に比較検討してきており、収縮系については、その結果を既に報告した<sup>1)</sup>。本報ではそれに続けて、筋小胞体について比較検討した結果を報告する。

### 実験方法

スキンドファイバ標本は、成長したアフリカツメガエルの腸骨腓骨筋から遅筋線維あるいは速筋線維を一本切出し、ピンセットで引裂いて細胞膜を除去するという方法で作った。遅筋線維と速筋線維の弁別は、両者の収縮系のストロンチウム感受性にはっきりとした差のある<sup>2)</sup>ことを利用して行った。

作製した標本は弛緩液のはいった実験槽に移し、発生する張力の測定のためにストレンゲージに接続した。弛緩液は  $Mg^{2+}$  1mM・Mg ATP 4 mM・EGTA 2mM・PIPES 20mM (pH 7.0)・イオン強

度 0.17M (Kメタンスルホン酸で調整)の組成のものを 4°C で用いた。なお、実験には、遊離カルシウムイオンの濃度を種々の値に固定した液も用いたが、それには 10mM の EGTA を用いてカルシウムを緩衝した。

筋小胞体内のカルシウムの定量には、ごくわずかのカルシウムで筋肉が収縮することを利用した一種のバイオアッセーの方法を用いた。

十分に濃くカフェインを溶かした弛緩液を標本に適用すると、小胞体に蓄積していたカルシウムが一気にほとんどすべて小胞体外に遊離してしまう。すると、標本のなかに小胞体と共に存在する収縮系が、この遊離してきたカルシウムで活性化されて張力を発生する。(図1)ただし、このスキンドファイバ標本は表面細胞膜を除去して弛緩液の中に浸してあるので、液の中のカルシウムキレート剤 EGTA とカルシウムは次々に結合して標本の外に拡散してしまうから、このカフェインによる拘縮は一過性に終わる。この拘縮の大きさは、従って、弛緩液の中の EGTA の濃度に依存して変化しうるものであるが、いつも一定の条件の下でカフェイン拘縮を起こすことにすれば、その拘縮の大きさから、遊離してきたカルシウムの量すなわち小胞体に蓄積していたカルシウムの量が、大まかに推定できることになる。そこで我われは、この、カフェイン拘縮の大きさから小胞体内カルシウムを半定量的に推定する方法を用いた。

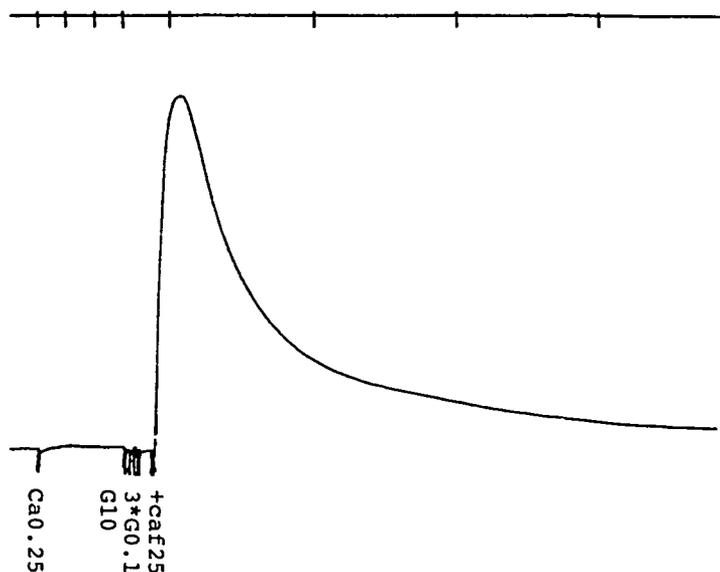


図1 遅筋線維のスキンドファイバにおけるカフェイン拘縮の記録例。標本を、 $0.25\mu\text{M}$ のカルシウムの液に3分間ひたしたあと、 $10\text{mM}$ のEGTAの液で洗い、次にEGTAを $0.1\text{mM}$ に下げ、最後にカフェインを $25\text{mM}$ 適用した。横軸1目盛は1分、拘縮の頂上での張力は約 $33\text{mg}$ 重。

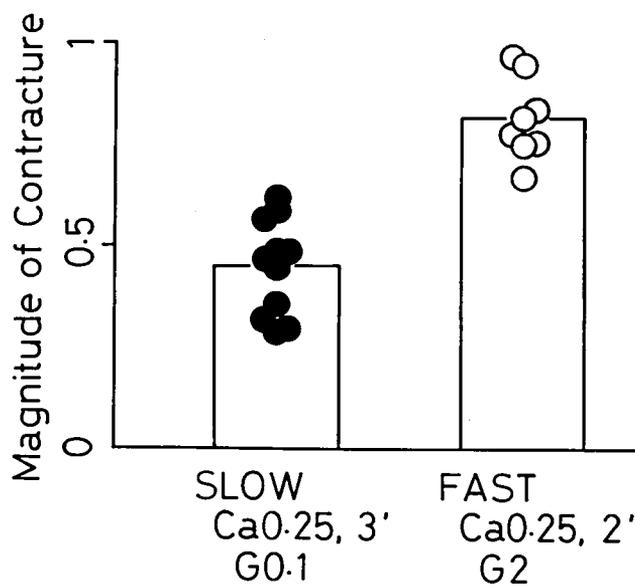


図2 カフェイン拘縮によって発生する張力の大きさ。左：遅筋線維に $0.25\mu\text{M}$ のカルシウムを3分間とりこませたあとにEGTA  $0.1\text{mM}$ のなかで拘縮を起こした場合。右：速筋線維に2分間とりこませたあとに $2\text{mM}$ のEGTAのなかで拘縮を起こした場合。縦軸は、濃いカルシウムの液で標本を収縮させたときに発生する最大の張力を1としたときの相対値。

## 結 果

## 1 筋小胞体のカルシウム蓄積の能力

遅筋線維のスキンドファイバを $0.25\mu\text{M}$ のカルシウムを含む液に3分間ひたし、その小胞体にカルシウムを取込ませた後に、蓄積したカルシウムをカフェインで遊離させるとき、カルシウムキレート剤のEGTAを $0.1\text{mM}$ に下げおけばはっきりとした拘縮を観察できた(図1)。この拘縮曲線の頂上での張力の大きさは、濃いカルシウムで標本を活性化したときに発生する最大の張力の約 $\frac{1}{2}$ であった(図2左)。一方、同じような実験を速筋線維で行うと、 $2\text{mM}$ のEGTAの中でも、むしろもっと大きな拘縮が観察できた(図2右)。

収縮系のカルシウム感受性の点では、遅筋線維と速筋線維とにあまり差がないことが判っている(前報<sup>1)</sup>)。したがって、上の結果を解釈すると、遅筋線維と速筋線維の、小胞体に蓄積されたカルシウムの量の比は、ごく大まかにおよそ0.1対2、即ち、遅筋線維の筋小胞体は速筋線維でよりも1桁

カルシウム蓄積の能力が低いと考えられる。

## 2 遅筋線維の筋小胞体のカルシウム取込みの時間経過

カフェインによって予め空にした遅筋線維の小胞体に、3分間だけ、種々の濃度のカルシウムを取込ませた(図3)。取込ませるカルシウムの濃度が $1\mu\text{M}$ より稀薄である場合には、カルシウムが濃いほど、小胞体に溜るカルシウムの量が多くなり、これは当然のことと考えられる。ところが、カルシウムが $1\mu\text{M}$ より濃い場合には、カルシウムが濃いほどかえって、溜る量が減少してしまった。例えば、 $10\mu\text{M}$ では $1\mu\text{M}$ での量の約半分しか溜らない。

取込ませるカルシウムの濃度を固定して、取込ませる時間を種々変化させて、小胞体のカルシウム取込みの時間経過を調べてみた(図4下)。カルシウム濃度を、 $0.25 \cdot 1.6 \cdot 10\mu\text{M}$ と次第に高めてゆくと、初期の取込み速度は速くなってゆくが、一定値に達したときの最終的な小胞体内カルシウ

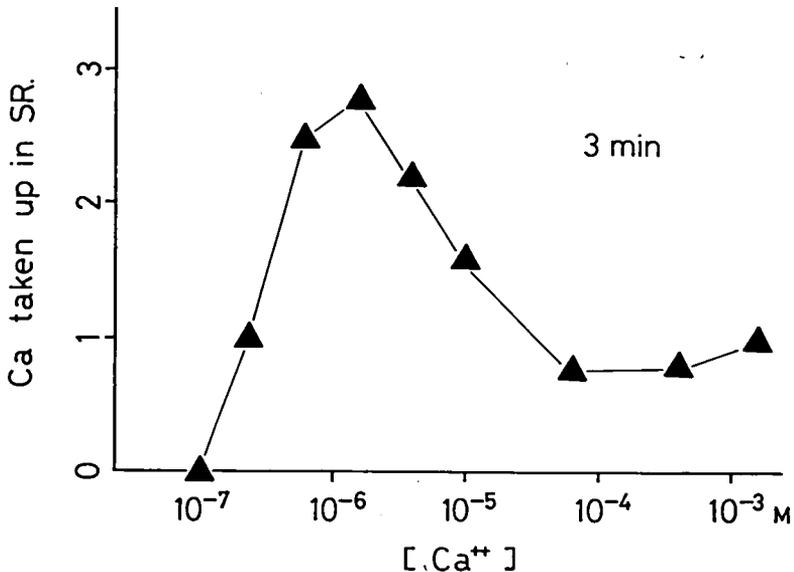


図3 遅筋線維の筋小胞体に3分の間いろいろな濃度のカルシウムを取込ませたときに小胞体に蓄積するカルシウムの量。横軸は取り込みに用いた液のカルシウム濃度、縦軸は蓄積したカルシウムの量。後者は、 $0.25\mu\text{M}$ での量を1としたときの相対値。

ム量は、 $10\mu\text{M}$ にすると、 $1.6\mu\text{M}$ のときのわずかに半分になった。すなわち、初期のはやい取込み速度と、一定値に達したときの最終的な取込み量との間に乖離が起こった。

速筋線維のカルシウム取込みの経過には、似たような乖離の現象のあることが既に判っているが、これも確認できた(図4上)。

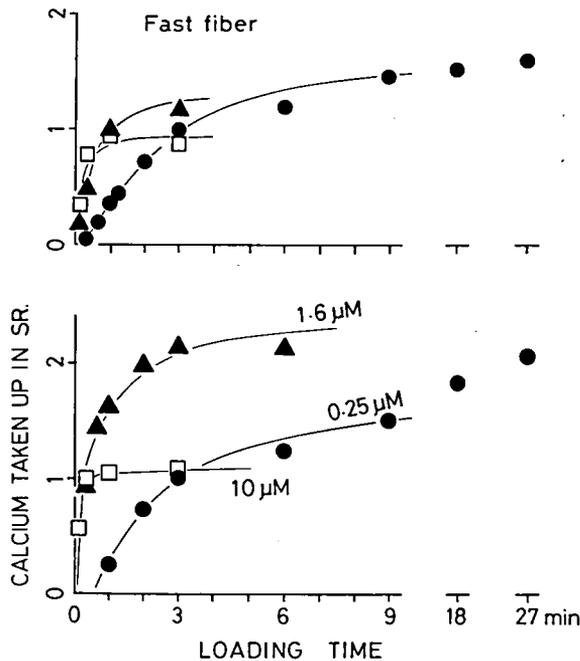


図4 筋小胞体のカルシウム取込みの時間経過。下は遅筋線維での例、シンボルを結んだ線に付してあるのは取込みに用いた液のカルシウム濃度、縦軸は3図に同じ。上は速筋線維で同じ実験をしたときの結果、シンボルも遅筋線維でと同じ。

### 3 筋小胞体のカルシウム取込みの速度

小胞体のカルシウムの取込みの初期速度は、少なくとも $10\mu\text{M}$ くらいまで、カルシウムの濃度とともにどんどん速くなる(図4)。そこで、この初期のはやい取込み速度は、カルシウムポンプの真の取込みの活性を反映しているものと仮定して、これとカルシウム濃度との関係を調べた。比較のために、実験は速筋線維でも遅筋線維でも行ったが、双方の結果にほとんど差が認められなかった。したがって実験結果は、繁雑を避けるために、ひとつのデータとしてまとめて図5に示す。

カルシウム $0.25\mu\text{M}$ での初期取込み速度を1とすると、 $0.04\mu\text{M}$ での速度は約0.05で、この程度に稀薄なカルシウム濃度の範囲では、速度が濃度の約1.6乗に比例していた。またカルシウム $10\mu\text{M}$ 付近で最も速い取込みが見られたが、その $\frac{1}{2}$ の速度は約 $1\sim 2\mu\text{M}$ で達成された。

ストロンチウムをカルシウムのかわりに小胞体に取り込ませて同様の実験をした(図5, 黒四角)。ここではカルシウムのときは別に、ストロンチウム $10\mu\text{M}$ での初期取込み速度を1としたので、カルシウムのときの速度とストロンチウムのとき

の速度を比較するのは無意味である。しかし、最大速度の $\frac{1}{2}$ を与える濃度をカルシウムのとときとストロンチウムのとときとで比較することによって、カルシウムポンプのストロンチウム感受性を推定できる。実際、ストロンチウムの場合には、最大の $\frac{1}{2}$ の速度を与える濃度が約 $40\mu\text{M}$ で、これはカルシウムの場合よりも数十倍たかい値であった。

なお、別の実験で、カルシウム取込みの最大速

度とストロンチウム取込みの最大速度とを大まかに推定してみたところ、両者の間に大きな差は無く、概ね、速筋線維で $1 \times 10\text{mM}/\text{min}$ ・遅筋線維で $3 \times 10^{-1}\text{mM}/\text{min}$ の程度であるらしかった。(ここではカルシウムやストロンチウムの量を、筋線維体積あたりの濃度として言及したので、その取込み速度の単位が $\text{mM}/\text{min}$ となった。)

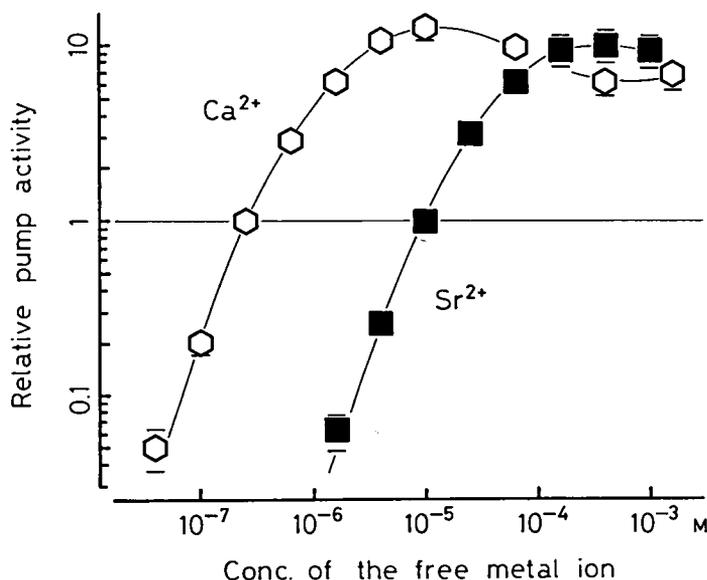


図5 カルシウムポンプの、 $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Sr}^{2+}$ による活性化。縦軸は、CaあるいはSrを小胞体が取込むときの初期の早い取込みの速度の相対値で、 $\text{Ca}^{2+}$ では $0.25\mu\text{M}$ ・ $\text{Sr}^{2+}$ では $10\mu\text{M}$ の値を基準としてある。横軸は取込みに用いた $\text{Ca}^{2+}$ または $\text{Sr}^{2+}$ の濃度。遅筋線維での結果と速筋線維での結果はほとんど同じだったのでひとつのデータとしてまとめた。

#### 4 カルシウムによる、小胞体からのカルシウムの遊離

小胞体に予め一定量のカルシウムを取込ませたあと、ATPを含まない液に標本を浸して種々の濃度のカルシウムを適用し、このときの小胞体内のカルシウムの減少する速さを測定した。すなわち、カルシウム取込みの機能の働かない条件の下で、カルシウムによるカルシウムの遊離の現象を調べた。ここに示す結果(図6)は、小胞体にカルシウムのかわりにストロンチウムを詰めて、「Caによ

るSrの遊離」を調べたものであるが、本質的には「CaによるCaの遊離」と同じと考えられる。実際、その点については速筋線維における二・三の実験で多少の確認をしている。

いずれにせよ、結果は次のようになった。速筋線維(図6上)でも遅筋線維(図6下)でも、カルシウムによる遊離は、ATPが無いと(図6R)きわめて起こりにくく、両筋線維型の間に差があるのか否か不明だった。そこで、従来カルシウムによる遊離を起こり易くするとされてきたAMPやカフェ

3) インを、遊離に用いるATP無しのカルシウム液に加えてみた。AMP存在下では(図6 AMP), たしかにカルシウムによる遊離が著しくなり, しかもその程度の上からは速筋線維と遅筋線維とに大差がなかった。これに対してカフェインの効果は(図6 Caf), 速筋線維においては著しかったのに, 遅

筋線維においては僅かであり, 両者に対するカフェインの効果に差があると考えられた。実際, AMP存在下でカフェインの効果をも(図6, AMPとAMP+Cafとを比較), 遅筋線維に対するカフェインの効果は速筋線維でよりも僅かであった。

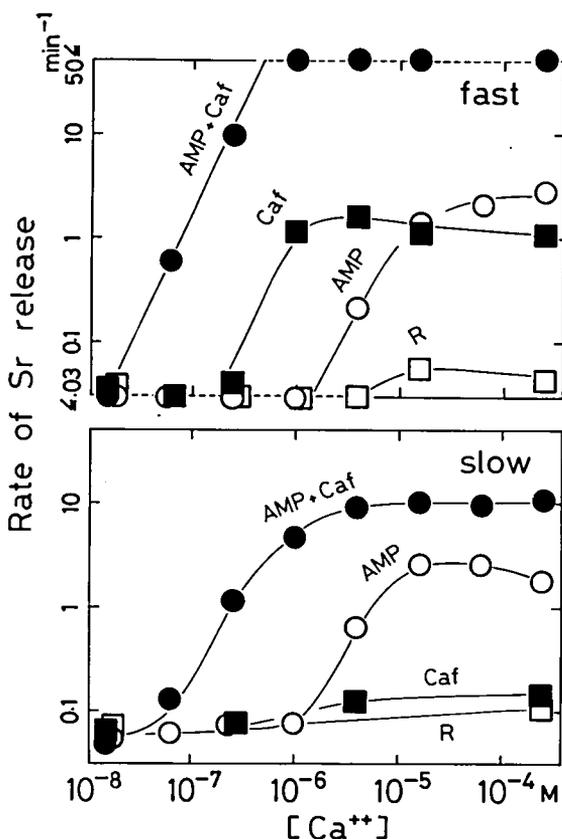


図6 ATPの存在しない環境における「CaによるSrの遊離」。上は速筋線維, 下は遅筋線維での結果。横軸は, ストロンチウムを遊離させるのに用いたカルシウムの濃度で, 縦軸は, 小胞体内ストロンチウムの減少する速さを, 時間あたりの率として測定したもの。「R」が対照, 「AMP」はAMP 11mM存在下, 「Caf」はカフェイン25mM存在下, 「AMP + Caf」は両者が同時に存在したときの結果。いずれの試薬も, 遊離させるのに用いたカルシウム液に混じた。

#### 考 察

1 遅筋線維の筋小胞体のカルシウム蓄積能  
遅筋線維の小胞体にも, その収縮系を活性化するのに十分な量のカルシウムが蓄積されうる(図

1)が, 速筋線維と比べると, その量は1桁く  
ないらしい(図2)ことが判った。このような違い  
が両線維の間に存在するかもしれないことは,  
Costantin等<sup>9)</sup>によっても間接的な証拠から推測さ

れていたが、今回のように比較的定量的に示した実験はこれまでになかった。実際、図2・図4の結果と、カフェイン存在下での収縮系のカルシウム感受性についての前報<sup>1)</sup>の結果(前報の図5・図6)とから、小胞体に蓄積されうる最大のカルシウム量を、筋線維体積あたりの濃度として推定すると、概ね、遅筋線維では高だか0.2mM程度、速筋線維では少なくとも2mM程度であろうと考えられる。

ここでの議論は、図1に示したような一過性に発生する張力を基としている点で、定量性に少し疑問がある。そこで、カフェインの適用の直後に標本の周囲の溶液を全部ぬき取って空気に置換することで、カフェインにより遊離するカルシウムが標本外に拡散しないようにし、この時に発生する定常性の張力を測定してみるという実験を行ってみた。しかし、この実験から得られた結論も、上述のものとはほとんどかわらなかった。

## 2 筋小胞体のカルシウム取込みの経過からみた「CaによるCaの遊離」

遅筋線維の筋小胞体にカルシウムを取込ませる時の、その初期のはやい取込みの速度と、一定値に達したときの最終的な取込みの量とを分けて考えると、適当なカルシウム濃度の範囲において両者の間に乖離の起こることが判った(図4下)。

この乖離は、カルシウムに2つの作用、例えば、カルシウム取込みを促進する作用とカルシウム遊離を促進する作用との2つを仮定すれば説明が可能になる。実際4項に述べるように、ATPが無くカルシウム取込みの起こらない条件のもとでは、カルシウムが小胞体からのカルシウムの遊離を促進することが確かめられた。それで、上述のカルシウム取込みにおける乖離の現象は、ATP存在下でのカルシウムによるカルシウム遊離を反映しているものと考えられる。

また、速筋線維でも(図4上)遅筋線維と同じようにこの乖離の現象が起こり、しかも3項に述べるようにカルシウム取込みの方にも両線維型の差

があまりなかったから、このATP存在下での「CaによるCaの遊離」に関しても、速筋線維と遅筋線維の間に大差がないのだろうと考えられる。

## 3 カルシウムポンプのCa<sup>2+</sup>感受性とSr<sup>2+</sup>感受性

小胞体のカルシウムポンプのCa<sup>2+</sup>とSr<sup>2+</sup>に対する感受性を、これらのイオンを小胞体が取込む速度を指標として測ると、両者の間には数十倍の差がある(図5)が、この点に関して、遅筋線維と速筋線維とに大差がなかった。

一方、収縮系のCa<sup>2+</sup>とSr<sup>2+</sup>に対する感受性を、発生する張力を指標として測ると、速筋線維では両者の間に約30倍のひらきがあるのに、遅筋線維にはあまり差がない(前報<sup>1)</sup>)。すなわち、Ca<sup>2+</sup>とSr<sup>2+</sup>に対する収縮系の感受性に関して、遅筋線維と速筋線維との間に大きな差がある。

この収縮系での事情と、先のカルシウムポンプでの事情の違いを考え合わせると、カルシウムに対して同じように高い感受性を示す系ではあっても、収縮系のカルシウム感受部位とカルシウムポンプのカルシウム感受部位とはかなり異なる由来のものであろうと考えられる。

## 4 「CaによるCaの遊離」に対するカフェインの効果とAMPの効果

CaによるCaの遊離に対する、ATPアナログとしてのAMPの効果は遅筋線維と速筋線維とで大差がないのに、カフェインの効果には大きな差があることが判った(図6)。

従来、いくつかの理由から<sup>3)</sup>、AMPとカフェインの「CaによるCaの遊離」に対する作用の仕組みは異るとされてきた。今回の結果は、AMPとカフェインの効果の程度の比率が遅筋線維と遅筋線維とで著しく異なることを示しているので、このことも、2つの薬物の作用の仕組みが異なると考える根拠のひとつと言えよう。

また、ATPアナログとしてのAMPの効果に、遅筋線維と速筋線維とで大した差がなかったので、

2項で考えたことと合わせて、生理的環境における「CaによるCaの遊離」は、遅筋線維と速筋線維とで同じ程度に働きうると考えても、現在のところはよいだろう。この点を目下、実験的に検討している。

## 文 献

- 1) 遠藤實ほか：筋の発生と分化に関する基礎的研究，昭和56年度報告書，69-75, 1982.
- 2) Costantin, L. L., Podolsky, R. J. & Tice, L. W. *J. Physiol.*, **188**: 261-271, 1967.
- 3) Endo, M. in *The Mechanism of Gated Calcium Transport across Biological Membrances*, pp. 257-264. Academic Press, New York, 1981.
- 4) Endo, M. *Proc. Jap. Acad.*, **51**: 467-472, 1975.

## V 生 化 学

14. 培養筋細胞のアセチルコリンレセプターの代謝 91
15. アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体 94
16. 筋発生に伴うミオシン分子 isoform の変化 98
17. 鶏ジストロフィー筋におけるC-蛋白質分子種の変化 102
18. 培養骨格筋および心筋細胞におけるトロポニンの分化 109
19. 筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の筋線維構成蛋白  
—筋ジス遺伝子の白レグ鶏への導入— 114
20. ジストロフィー鶏および正常鶏の発生過程  
におけるEF2およびNAD含量の変化 122
21. 可溶性コネクチン 127
22. 骨格筋細いフィラメント上のトロポニンの局在  
及びハイブリッドトロポニンの性質の検討 131

## 14 培養筋細胞のアセチルコリンレセプターの代謝

萩原 彌四郎

研究協力者 長谷川 修 司

骨格筋のアセチルコリンレセプター(AChR)の筋線維上での分布とその代謝安定性は筋の発生、分化の段階で変化することが知られている(1)。幼若な筋では半減時間のみじかい AChR が筋膜全体にひろがって存在するが、成熟するにつれ AChR の半減時間がながくなり神経筋接合部に局限して存在するようになる。このような AChR の分解を遅くする因子が培養神経細胞の条件培養液(NCM)中に存在することと、NCM は AChR が細胞表面から細胞内部へ移行するステップを遅延することを報告した(2)。今回は AChR の分解の機序と NCM が AChR の細胞内移行のステップを遅延するメカニズムをさぐるために AChR の分解にたいするいくつかの薬剤の効果を検討した。

### 実験方法

筋培養……ラット胎仔骨格筋の培養は Christianらの方法(3)にしたがっておこなった。20-21日胎仔の後肢筋の筋芽細胞を80% Dulbecco-Vogt modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)-10%馬血清-10%牛胎児血清中に浮遊し  $1.5 \times 10^5$  の細胞を16mmプラスチックマルチウエルに播き培養した。培養第4日に50  $\mu$ Mフルオロデオキシウリジンを24時間作用させ、そののち90% DMEM-10%馬血清-0.5  $\mu$ g/mlテロドトキシン中で培養した。培養筋を実験に供する1日まえに馬血清を2mg/mlの牛血清アルブミン

で置換した。

AChR の半減時間の測定……7-10日の筋培養を10nMの $^{125}$ I- $\alpha$ -ブングロトキシン(ABT)と45-60分保温し結合させる。過剰のトキシンを洗いながしたのち一定時間毎にメディウム中に放出される $^{125}$ I-ABT-AChR複合体の分解産物を測定し AChR の半減時間をもとめた。

### 実験結果

- (1) 培養筋細胞に代謝速度の異なる AChR の集団が混在するのかどうか検討するために AChR の一部を D-ツボクラリンでブロックしたのちに残りの AChR の分解速度を測定した。1-100  $\mu$ M の D-ツボクラリンとプレインキュベーションすることにより  $^{125}$ I-ABT の結合量はコントロールの80-36%に減少したが  $^{125}$ I-ABT-AChR 複合体の半減時間はコントロールと差がなかった(表1)。この実験からは代謝速度の異なる AChR が培養筋に混在するという積極的な証拠は得られなかった。
- (2) レクチン等の効果：コンカナバリン A は50  $\mu$ g/mlで半減時間を180%延長したが一価の誘導体であるサクシニルコンカナバリン A は同濃度でわずかに114%延長したにすぎない(表2)。架橋試薬である1,5-ジフルオロ-2,7-ジニトロベンゼン, N,N'-フェニレンジマレイミド, N-メチルマレイミドもそれぞれ半減時間を延長した(表2)。またメチラミン, エチラミン, プロピラミンはいずれも5mMで半減時

表1 D-ツボクラリンとブレインキューベーションした培養筋細胞  
<sup>125</sup>I-ABT-AChR 複合体の半減時間

EXP. NO	PREINCUBATION WITH	125-I-ABT BOUND		T 1/2 RELATIVE TO CONTROL (%)
		(CPM)	(%)	
1	NONE	45,747	100	100
	d-TUBOCURARINE 0.001mM	36,441	80.0	101.9
	0.01 mM	23,908	52.3	101.6
2	NONE	62,313	100	100
	d-TUBOCURARINE 0.01 mM	40,087	64.3	96.4
	0.1 mM	22,710	36.4	99.6

表2 AChR の分解におよぼす架橋試薬の効果

CROSSLINKING AGENT	CONCENTRATION mM	T 1/2 RELATIVE TO CONTROL %
1,5-DIFLUORO-2,7-DINITROBENZENE	0.001	99
	0.02	137
N,N'-P-PHENYLENE-DIMALEIMIDE	0.1	677
	0.01	92
N-METHYLMALEIMIDE	0.1	636
		181
CONCAVALIN A (50 µg/ml)		114
SUCCINYL CONCAVALIN A(50 µg/ml)		

間を延長する効果を示した(表3)。

#### 考 察

NCM による AChR の細胞内部への移行の遅延のメカニズムを考えると、代謝速度にかんして AChR は均一なのか不均一なのかはまず問題とな

る。*in vivo* の筋では接合部のレセプターと接合部外のレセプターでは代謝速度が異なり、D-ツボクラリンにたいする感受性も異なる。しかし表1に示した実験結果からは不均一性はあきらかではない。

NCM は AChR の異化を遅らすほかに AChR

表3 AChR の分解におよぼす諸種薬物の効果

COMPOUND	CONCENTRATION mM	T 1/2 RELATIVE TO CONTROL %
METHYLAMINE	1	103.0 ± 1.3
	5	143.8 ± 3.2
ETHYLAMINE	1	105.2 ± 4.6
	5	132.2 ± 4.9
PROPYLAMINE	1	107.4 ± 10.0
	5	161.9 ± 28.5
EGTA	3	238.4 ± 5.2
SODIUM AZIDE	1	130.9 ± 4.0
CHLOROQUINE	0.01	882.1 ± 99.6

の凝集を促進する効果をもつ(3)。もしレセプター分子が形質膜を移動するのを実験的に妨げるならば NCM と同じ効果が生じるであろうか。膜タンパク質を架橋する物質はいずれも半減時間を延長した。しかし AChR にたいする抗体を作用させた場合には逆に短縮する(4)。またコンカナバリン A はクラスター形成に影響をおよぼさない(4)。このようにレクチンと抗体の効果は必ずしも NCM の効果と一致しないので NCM 中にレクチン様の分子を想定し、その作用で AChR にたいする NCM の効果を説明するのは困難である。

最近、リガンドが結合したレセプターが細胞内へととりこまれる機構にトランスグルタミナーゼが関与していることが線維芽細胞などのホルモンレセプターで報告されている(5)。培養筋細胞の ACh

R の分解もトランスグルタミナーゼの阻害剤であるアルキルアミンと EGTA で抑制された。これらの成績は筋細胞において AChR が細胞表面から内部へ移行する機構にトランスグルタミナーゼが関与している可能性を思わせるが用いた阻害剤の特異性の程度がそれほど高くないので別の証拠が必要であろう。

#### 文 献

- 1) Fambrough, D. M. *Physiol. Rev.*, **59**: 165-227 (1979).
- 2) 萩原弥四郎, 長谷川修司: 筋の発生と分化に関する基礎的研究班昭和56年度報告書, 82-85 (1981).
- 3) Christian, C. N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 4011-4015 (1978).
- 4) Prives, J. et al., *Life Sci.*, **24**: 1713-1718 (1979).
- 5) Davies, P. J. A. et al., *Nature*, **283**: 162-167 (1980).

## 15 アセチルコリン受容体に対する モノクローナル抗体

杉山博之\*

研究協力者 山下幸子\*

我々はこれまでに、骨格筋のアセチルコリン受容体 (AChR) の発生・分化の問題を検討してきた<sup>1-3)</sup>。このような目的のためには、AChR に対する特異抗体、特にモノクローナル抗体が極めて有力な手段を提供すると考え、その作製を試みた。ただ筋組織における AChR 含量は極めて低いため、十分量をを得ることは容易でないので、本研究においてはシビレエイ発電器官よりの AChR を出発材料とし、骨格筋 AChR と交叉反応をするモノクローナル抗体が得られるか否かを試みることを第一の目的とした。

一方、この目的とは別に、モノクローナル抗体が幾つか得られたならば、それによってシビレエイ AChR の構造・膜内存在様式等を検討することができる<sup>4)</sup>と期待される。この点を第二の目的として本研究を行った。

### 材料と方法

シビレエイ (*Narke japonica*) 発電器官より Triton X-100 (2%) で抽出した AChR 粗抽出物を、海ヘビ  $\alpha$ -ニューロトキシン Ls III を用いたアフィニティ・クロマトで精製<sup>4)</sup>したものを抗原とした。純度は約46% (重量比) 程度であった。免疫動物は BALB/C マウスを用い、その脾細胞とマウス・ミエローマ NS-1 細胞とをポリエチレングリコール #1500 によって融合させ、HAT

培地によりハイブリドーマを選択した。

特異抗体活性は固相プロテインA法によって行った。すなわち、あらかじめ<sup>3</sup>H標識した $\alpha$ -ブングロトキシンと結合させておいた AChR をハイブリドーマ培養上清と反応させた後、熱処理固定した *Staphylococcus aureus* 菌体 (プロテインA) を加えて遠心し、上清よりの<sup>3</sup>H減少の程度を特異抗体活性の指標とした。

クローニングは限定希釈法を最低2回は繰り返すことによって行った。

### 結果と考察

これまで7種類のハイブリドーマ・クローンを確立した (NAR-1~NAR-7)。それらのモノクローナル抗体について、幾つか特徴を検討した。結果を表1にまとめる。

- (1) 骨格筋 AChR 等との交叉反応性：ラットおよびニワトリ骨格筋培養細胞 AChR との反応性を調べたが、7種のモノクローナル抗体はいずれもこれらと有効に反応しなかった。NAR-4 と NAR-6 が電気ウナギの AChR と交叉反応を示した。
- (2) 膜結合型 AChR との反応性：7種のモノクローナル抗体は、界面活性剤で可溶化した AChR を抗原として得られたものであるが、これらはいずれも、シビレエイ発電器官の膜断片と結合した。すなわち、それらの抗体の識別する抗原決定基はいずれも、膜外空間に露出してい

\* 生理学研究所 細胞器官研究系

表1 *Narke japonica* AChR に対するモノクローナル抗体の諸性質。

Monoclonal antibody	Reactivity with AChR in membrane	Max. binding (mols IgG/mol AChR)	Subunit specificity	Cross-reactivity with AChR from:		
				rat	chick	Electrophorus
NAR-1	+	1		-	-	-
NAR-2	+	1		-	-	-
NAR-3	+	2	$\alpha$	-	-	-
NAR-4	+	1		-	-	+
NAR-5	+	2	$\alpha$	-		-
NAR-6	+	1		-		+
NAR-7	+	1		-		-

NAR	1	2	3	4	5	6	7
1		2	2	2	2	2	2
2	2		2	1	2	1	1
3	2	2		2	2	2	2
4	2	1	2		2	1	1
5	2	2	2	2		2	2
6	2	1	2	1	2		1
7	2	1	2	1	2	1	

表2 シビレエイ AChR に対するモノクローナル抗体間の競合的結合。

タテ軸およびヨコ軸に示されるモノクローナル抗体を同時に反応させたとき、表中その交点に示された数だけの IgG 分子が最大1分子当りの AChR に結合することを表わす。

ると考えられる。

- (3) 最大結合数とサブユニット特異性：可溶化したシビレエイ AChR に大過剰の抗体を反応させ、反応生成物の沈降係数をショ糖密度勾配遠心法で測定することによって、各抗体の最大結合数を見積った。典型的な結果を図1に示す。図1の場合、AChR モノマー1分子当り NAR-2は1分子、NAR-3は2分子の IgG が結合し得ることが示されている。このような方法で調べた結果、NAR-3と NAR-5は2分子、

それ以外のモノクローナル抗体は1分子の IgG が結合し得ることが分った(表1)。AChR は  $\alpha_2\beta\gamma\delta$  というサブユニット構成をもつことから、NAR-3と NAR-5は  $\alpha$  サブユニットに対する抗体であると考えられる。

- (4) 抗体間の競合：2種(以上)の抗体を同時に反応させたとき、最大何分子の IgG が結合し得るかを、上と同様ショ糖密度勾配遠心法で調べた。このような抗体間の競合的結合を調べることによって、各抗体の認識する抗原決定部位

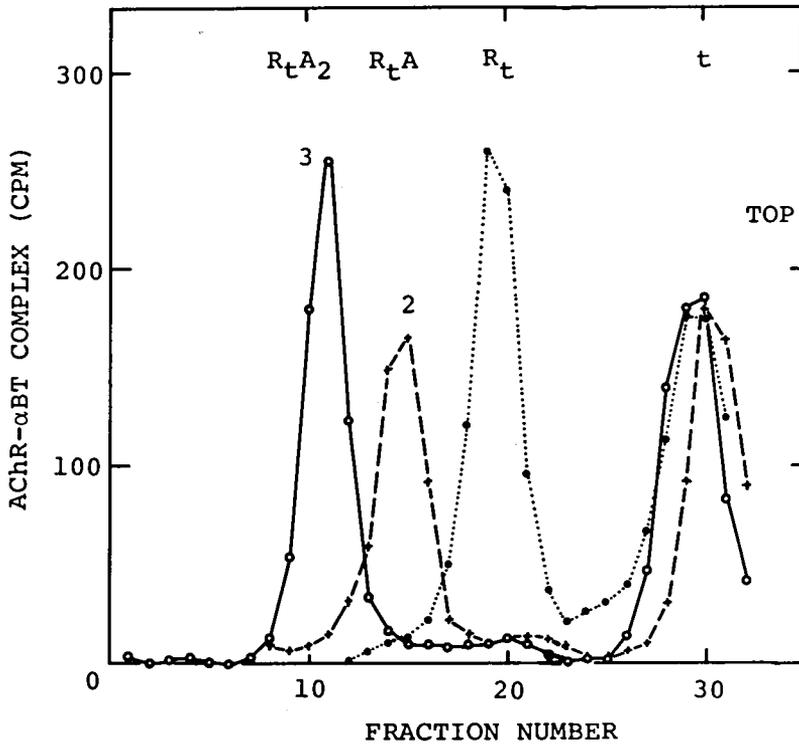


図1 抗原抗体複合体のショ糖密度勾配遠心分析。各ピークは右より遊離 $\alpha$ -ブングアロトキシン(t), トキシン-AChR複合体( $R_t$ ), および $R_t$ に抗体が1分子( $R_t A$ )または2分子( $R_t A_2$ )結合したもの。図中の数字はモノクローナル抗体の番号。

の相互位置関係を知ることができる。結果を表2にまとめた。これらの結果から、7種のモノクローナル抗体は次の3つのグループに分類できることが分った。

グループA: NAR-3および-5。 $\alpha$ -サブユニットに結合。両抗体の決定部位は相互に近接しており、同一の決定部位領域内にある。両者が同時に、両方とも結合することはできない。このような決定部位領域が $\alpha$ -サブユニット上に1箇所、従ってAChR 1分子上に2箇所ある。

グループB: NAR-1。 $\alpha$ -サブユニット以外と結合。その抗原決定部位はグループAの2つの決定部位領域の一方とのみ近接している。

グループC: NAR-2, -4, -6および-7。

$\alpha$ -サブユニット以外と結合。4つの抗体の決定部位は相互に近接しており、かつ、グループAの2つの決定部位領域のうち、グループBと近接していない方の領域と近接している。グループBとCの間では決定部位領域が離れており、拮抗は起きない。

今後更に、各モノクローナル抗体のサブユニット特異性を明らかにし、これらの知見とあわせて、AChR分子のサブユニット配位や抗原決定基の分布等に関して検討を加えて行きたいと考えている。

#### 文 献

- 1) H. Sugiyama (1980). Isoelectric focusing analysis of acetylcholine receptors in mouse and chick muscle cells in culture. *Biomed. Res.*, 1, 91-95.
- 2) H. Sugiyama, S. Yamagishi, & Y. Yamashita

- (1982). Characterization of acetylcholine receptor precursors and related components in cultured rat muscle cells. *Proc. Japan Acad.*, 58B, 40-43.
- 3) H. Sugiyama, Y. Yamashita, & F. Murakami (1982). Multiple molecular forms of acetylcholine receptors in cultured muscle cells: subcellular localization and characterization. *J. Neurochem.*, 39, 1038-1046.
- 4) Y. Ishikawa, H. Yoshida, & N. Tamiya (1980). Purification and properties of the acetylcholine receptor protein from *Narke japonica*. *J. Biochem.*, 87, 313-321.

## 16 筋発生に伴なうミオシン分子 isoform の変化

江 橋 節 郎\*

研究協力者 三 川 隆\* 大 室 弘 美\*\*  
大 日 方 昂\*\*\* 真 崎 知 生\*\*\*\*

筋肉をはじめ細胞一般の“動き”が分子レベルでは、アクチンとミオシンという2種類の蛋白が主に担っていることは最早言うまでもない。しかし生体を構成する組織・細胞の種類は多く、筋肉に限っても骨格筋には速筋と遅筋があり、骨格筋以外にも心筋・平滑筋とその種類は多く、収縮特性はまちまちである。この特性は神経支配、細胞膜の性質の差異等の他に、収縮蛋白系の特異性がその分子的背景となっている。

細胞運動におけるエネルギー転換と深くかかわる ATP 分解能を有するミオシン分子については近年特に詳細な研究が進み、酵素系にアイソザイムが存在すると同様、多くのアイソフォーム(isoform)が存在することが明らかとなっている。細胞機能の特異性に応じ、異なったアイソフォームが利用されている。ミオシン分子は分子量約20万のheavy chain(HC)2分子と、分子量2~3万の最低2種類のlight chain(LC)が2分子ずつ会合し構成される6サブユニットからなる複合蛋白である。ニワトリにおいては8種類以上のアイソフォームが知られている。細胞の分化過程でこれらのアイソフォーム群の中から細胞特異型を選択してゆくパターンを、速筋、遅筋、心筋、平滑筋について比較した。

### 実験方法

1) 材料: 胚および孵化後各 stage のニワトリより速筋(浅胸筋), 遅筋(ALD筋) 心筋(心室筋) および平滑筋(筋胃)を实体顕微鏡下で採取, トリミングし試料とした。50%グリセリン pH 7.0,  $-20^{\circ}$  の条件で保存した。

2) ミオシン・アイソフォームの分析

各 stage の組織から, ハッセルバッハ・シュナイダー液を使用して, ミオシンを粗抽出し, これを50mM ピロリン酸ナトリウム, 1 mM DTT, 2.5 mM EGTA, 50%グリセリン, pH 8.8 に希釈した。これらの各試量を, 20mMピロリン酸ナトリウム(pH 8.8) および10%グリセリンを含む3.8%のアクリルアミドゲルを用いて, 約16時間の電気泳動をおこなった。このピロリン酸ゲル電気泳動(PPi-PAGE)の条件下では, ミオシンはHC およびLCを含むホロ蛋白として挙動し, HC およびLC組成の差異により, その移動度が異なることが知られている(文献1)。

各アイソフォームのサブユニットの分析は, PPi-PAGEをおこなったゲルをクーマシーブリアントブルーで染色し, 各アイソフォームのバンドを切り出し, 2次元目の電気泳動としてSDS電気泳動(SDS-PAGE)によりおこなった。HCは約20万ダルトンのペプチドであり, SDS-PAGEだけでは詳細な分析が困難なため, Clevelandらの方法(文献2)によるペプチド

\* (東大・医)

\*\* (東京都臨床医学総合研究所)

\*\*\* (千葉大・理)

\*\*\*\* (筑波大・基礎医)

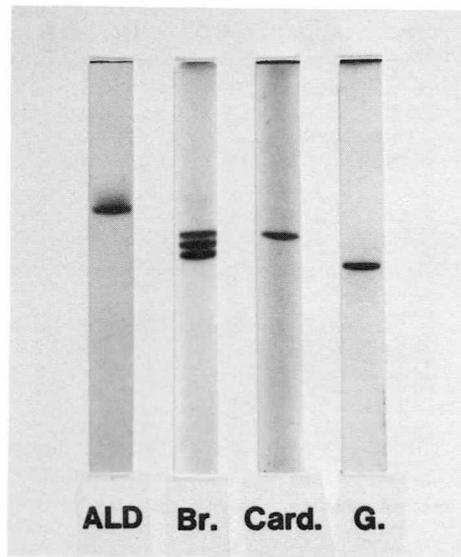
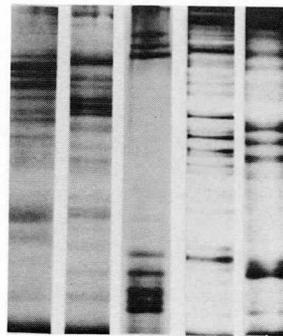


図1 成鶏各筋組織のミオシンの PPI-PAGE パターン：ALD (遅筋), Br (速筋), Card (心筋), G (平滑筋)



ALD Br. Card. G. F.

図2 各組織のミオシン H.C. のペプチドマップ PPI-PAGE 後, バンドを切り出し, 一キモトリブシンと共に SDS-PAGE しペプチドマップを得た (文献2)。F 培養ファイibroプラストのミオシンを示す。他は図1と同じ。

マップによる比較をおこなった。

#### 結果と考察

成鶏の速筋・遅筋・心筋・平滑筋より得たミオシンを PPI PAGE にかける移動度とバンドパ

ターンを比べると (図1), 速筋が3本のバンドを示す以外, 他の筋のミオシンは1本のバンドしか示さない。また平滑筋が最も早い移動度を示し, 遅筋のミオシンの移動度が最も小さい。各々の筋に含まれるミオシンは全て異なる移動度を示す。

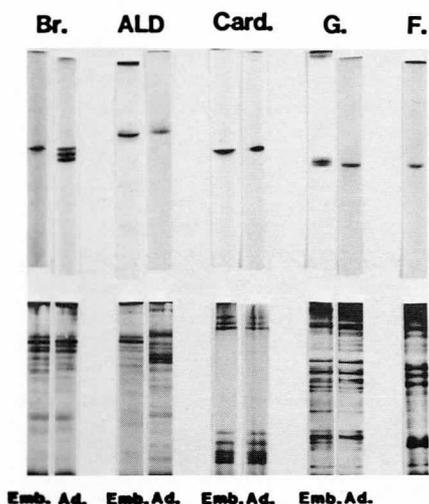


図3 胚および成体各筋由来ミオシンの PPI-PAGE パターン (上段) とミオシン H.C. のペプチドマップ (下段) 速筋 (Br), 遅筋 (ALD), 心筋 (Card), 平滑筋 (G) の左のゲルパターンが胚由来, 右が成体由来。

速筋が3本のバンドを示すのは, LC 組成の違いによることが既に明らかとなっている (文献1)。LC の組成が遅筋と心筋では同一である以外 (文献3), 各筋のミオシンは異なっている。LC 組成が一致するにもかかわらず, 遅筋と心筋のミオシンが PPI-PAGE で異なる移動度を示すのは HC の差異と考えられる。実際図2に示す様に遅筋と心筋の HC の一次元ペプチドマップは全く異なっている。また速筋, 平滑筋のミオシン HC も異なるパターンを示し, 組織特異的な HC が発現されていることが示された。また各組織にはファイブプロブラストが混在し, その関与が考えられるが, そのペプチドマップを見ると筋由来ミオシン HC とは別種のペプチドであることがわかった (図2)。

さて胚における各筋組織のミオシンについて上述と同様の分析をおこなった。図3に示したように, 速筋・遅筋・平滑筋の場合, 胚におけるミオシンの主構成アイソフォームの PPI-PAGE における移動度は, 成体のそれとは異なっていた。心筋の主構成成分は, 成体のものと一致したが少

量の移動度の速い成分も認められる。HC のペプチドマップを見ると胚心筋では, 成体型と区別できないパターンが得られた。9 体節期の頃に心拍動が観察されるが, この時期のミオシンの PPI-PAGE および HC ペプチドマップのパターンも成体とほとんど差がなく, 心筋のミオシン・アイソフォームの分化は既にこの時期に終りつつあると考えられる。さて胚速筋および胚遅筋に存在するミオシン HC のペプチドマップは非常に良く一致し, 胚の骨格筋に特有の胚型 HC が発現されていることが考えられる。細胞分化に伴い, 共通の胚型 HC が速筋型あるいは遅筋型へと置換されてゆく様である。平滑筋の胚ミオシンの PPI-PAGE パターンは成体のそれと一致するバンドの他に移動度の小さい2本のバンドが存在する。しかしどのアイソフォームの HC ペプチドマップも成体のマップと差異がなく (文献4), 胚特有の LC が存在していることを予想させた。

胚ミオシンの LC 組成を見ると (図4), 平滑筋の場合成体には20Kダルトンと17Kダルトンの

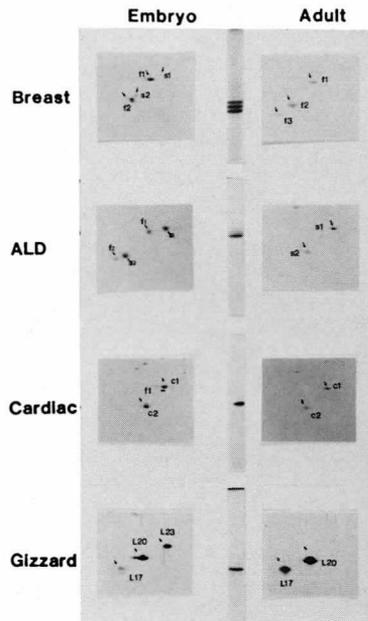


図4 胚および成体の各筋組織のミオシン L.C. 組成。シリンダーゲルは PPI-PAGE 平盤ゲルは 2 次元電気泳動の酸性低分子である。f: 速筋型, S: 遅筋型, C: 心筋型, L: 平滑筋 L.C. を示し数字はキロダルトンを示す。

2種の LC しかないが、胚には23Kダルトンのものが存在する (文献5)。①23K+20K ②23K+20K 17K, ③20K+17K という3種の LC の組合せを持ったミオシンが PPI-PAGE の3本のバンドに対応することがわかった (文献4)。心筋の場合成体型以外に胚では少量速筋型の LC が検出され (図4), PPI-PAGE の成体型の下に認められる少量のバンドがこの LC を持つアイソフォームに由来する可能性も考えられる。骨格筋の場合、速筋、遅筋を問わず胚の時期では共に両方の型の LC を発現させており、分化過程で一方の型が抑制されてゆくことが考えられる。

以上の様に心筋の場合を除き他の筋組織では発生初期には多量の胚特有の HC あるいは LC を発

現させており、分化過程で親型への置換、あるいは胚型の抑制という調節をおこない、細胞特異ミオシンアイソフォームの選択をおこなっている。現在のところ、胚における特有のアイソフォームの機能とその意義については不明で、今後の研究が待たれる。

#### 文 献

- 1) Hoh, J. F. Y., *FEBS Lett.*, **98**, 267-270, (1979).
- 2) Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. & Laemmli, U.K. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102-1106.
- 3) Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T. (1981). *J. Biochem.*, **89**, 1951-1962.
- 4) Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Mikawa, T. & Masaki, T. (1981). *J. Biochem.*, in press.
- 5) Katoh, N. & Kubo, S. *Biochem. Biophys. Acta*, **535**, 401-411 (1978).

## 17 鶏ジストロフィー筋における C-蛋白質分子種の変化

大日方 昂\*, \*\*

筋ジストロフィーの発症に際して、筋原線維の構造蛋白質のレベルで、どのような変化が起るかを知る目的で、ジストロフィー鶏を用いて、既にいくつかの実験を行ってきた。その結果、(1)ジストロフィー筋では、筋原線維蛋白質の分子種が、幼若な筋のタイプに近づくこと、即ち、発症に伴い、トロポニンTでは、足型分子種の出現、ミオシンでは、3種のアイソザイムの量比の幼若筋型への移行と、ミオシンL鎖の1つ (FL<sub>3</sub>) の減少などを確認した<sup>1)</sup>。トロポミオシン分子種の変化も、Takeda & Nonomura (1980) により報告された<sup>2)</sup>。又、(2)線維構造へのアクチンの集合度、即ち、筋組織内でのFアクチン(ポリマー)量と、Gアクチン(モノマー)量との相対比がジストロフィー筋において顕著に減少することを観察した<sup>3)</sup>。

このような筋ジストロフィーに伴う蛋白質の変化が、他の構造蛋白質においても普遍的かつ、協調的に起るのか、又、蛋白質の変化が個々の細胞レベルでどのように起るかなどが検討される必要がある。本研究では、このような観点から、主にC-蛋白質を指標として研究を行なった。C蛋白質は、筋原線維内では、ミオシンフェラメントに結合して存在し、このフィラメントの維持に関与しているともいわれる。最近、速筋型、遅筋型分子種が存在することが明らかになり、鶏胸筋では、ふ化数日までは、速筋型、遅筋型両種が共存し、

10日後には速筋型のみになることを既に報告した<sup>4)</sup>。

### 実験方法

標本：ジストロフィー鶏(413系)および正常鶏(412系)について、ふ化後の種々の時期の浅胸筋のほぼ中央部、かつ、やや表層近傍の部分を中心に解析に用いた。

間接蛍光抗体法：筋の横断連続凍結切片を3.5%ホルマリンで固定し、これを1%血清アルブミン溶液で処理した後、抗C蛋白質抗体(一次抗体)および、FITC-標識・抗マウス、又は、抗ウサギIgG抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

イムノブロット法：筋の小片から、蛋白質を2% SDS、2%メルカプトエタノールを含む溶液で抽出し、これをSDS-アクリルアミドゲル電気泳動(7.5%アクリルアミドゲルを使用)にかけて、蛋白質を分離した後、ニトロセルロース膜に転写し、これに抗C蛋白質モノクローン抗体および<sup>125</sup>I-標識抗マウスIgG抗体を反応させ、オートラジオグラフィー法を行なった。

抗体：速筋型C蛋白質を特異的に認識するモノクローン抗体(MF1)<sup>5)</sup>、及びポリクローン抗体、遅筋型C蛋白質のみを特異的に認識するモノクローン抗体(ALD66)<sup>5)</sup>を用いた。これらの抗体の特異性は、既に別に確かめられている<sup>5)</sup>。又、本研究で用いているモノクローン抗体は、コーネル大学Fischman 筑波大学真崎両教授の御厚意により供与されたものである。ミオシンL鎖に対する抗体は、鶏胸筋ミオシンL鎖(FL<sub>1</sub>) (速筋型)と心筋

\* 千葉大学理学部生物学科

\*\* 東京都臨床医学総合研究所

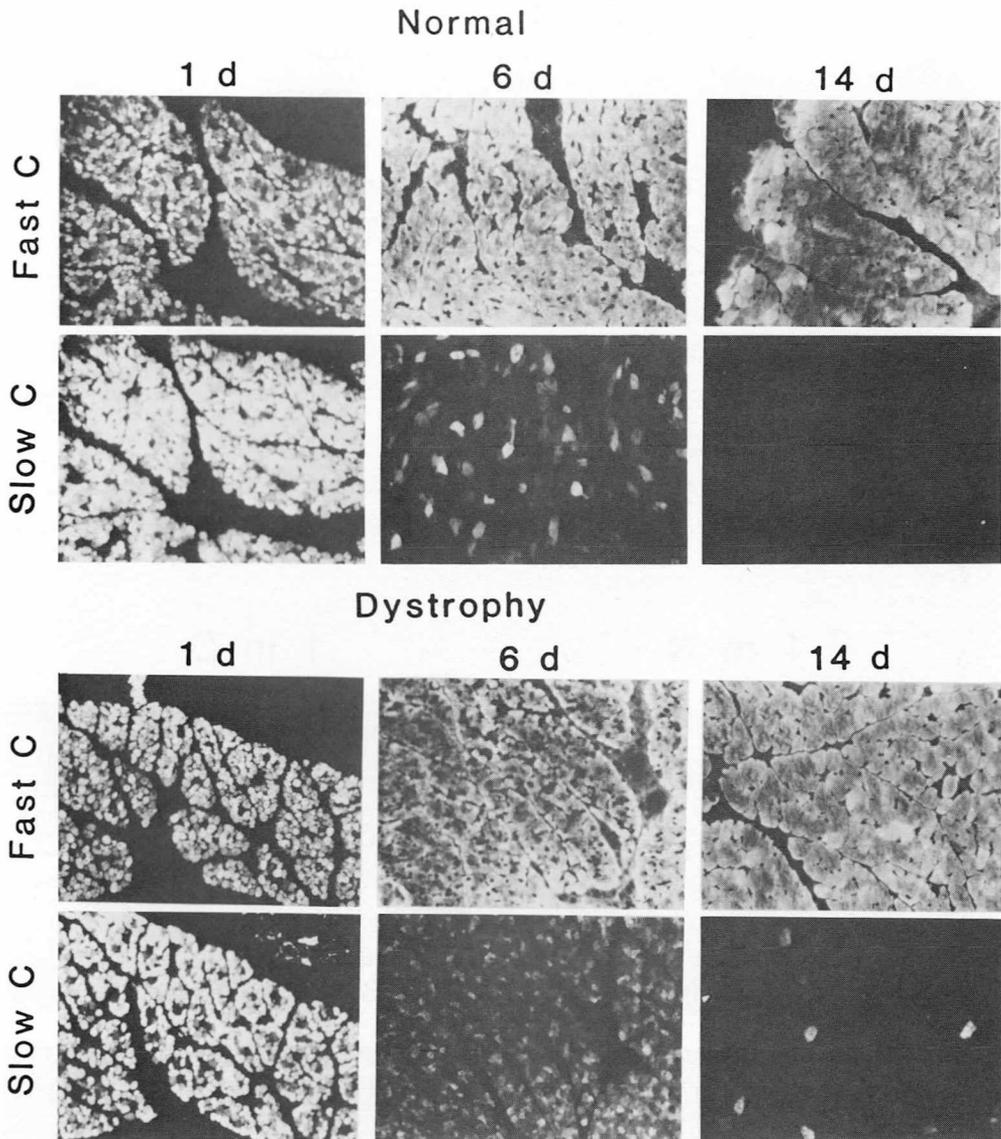


図1 ふ化後1日(1d), 6日(6d), 14日(14d)目の正常(412系)と筋ジストロフィー(413系)胸筋の凍結横断切片の抗速筋型C蛋白質(Fast C), 及び抗遅筋型C蛋白質抗体(Slow C)との反応性。間接蛍光抗体法による。×140

ミオシンL鎖 (CL<sub>1</sub>) (心筋型) をウサギに注射して得、IgG を分画後、抗速筋L鎖は、心筋筋原線維で、抗心筋L鎖抗体は、胸筋筋原線維で吸収した後、それぞれの免疫原のアフィニティーカラムで精製した。抗 CL<sub>1</sub> 抗体は、遅筋ミオシンL鎖をも認識する。<sup>6)</sup>

### 結 果

既に、前年度にも一部報告したように、鶏胸筋では、胚の時期から、ふ化後数日まで、速筋型および遅筋型C蛋白質が共存している<sup>4)</sup>。このことは、胸筋の凍結横断切片を用いた間接蛍光抗体法により、個々の細胞レベルで、更に明確となった。ほとんどの細胞は、両種のC-蛋白質と共有していた。ところが、ふ化後6日目には、抗遅筋型C蛋白質抗体と強く反応する細胞は少数で、多くの細胞は弱く反応するのみで、遅筋型C蛋白質の減少

が知られた。2週令になると、正常鶏胸筋では、速筋型C蛋白質のみを含む細胞だけになった。以後の成長過程を通じて、正常鶏の胸筋に遅筋型C蛋白質は検出されなかった。それに対して、筋ジス鶏の場合、ふ化直後には正常鶏と同様、ほとんどすべての細胞が2種のC蛋白質を含み、1週間で遅筋型C蛋白質をもつ細胞は減少していく。ところが、2週令になると、正常鶏と筋ジス鶏の間で若干の違いが現われはじめた。即ち、2週令の筋ジス鶏胸筋の多くの細胞は、速筋型C蛋白質のみをもつが、少数ながら、明瞭に遅筋型C蛋白質をも併せもつ細胞が認められた。このような2種のC蛋白質を共有する細胞の数は、筋ジス鶏の成長とともに増加した。図2に1カ月令、図3に4カ月令の場合を示す。1カ月令の筋ジス鶏では、胸筋のほぼ全域にわたって、遅筋型C蛋白質を含む細胞が存在するのがより顕著になった。興味あ

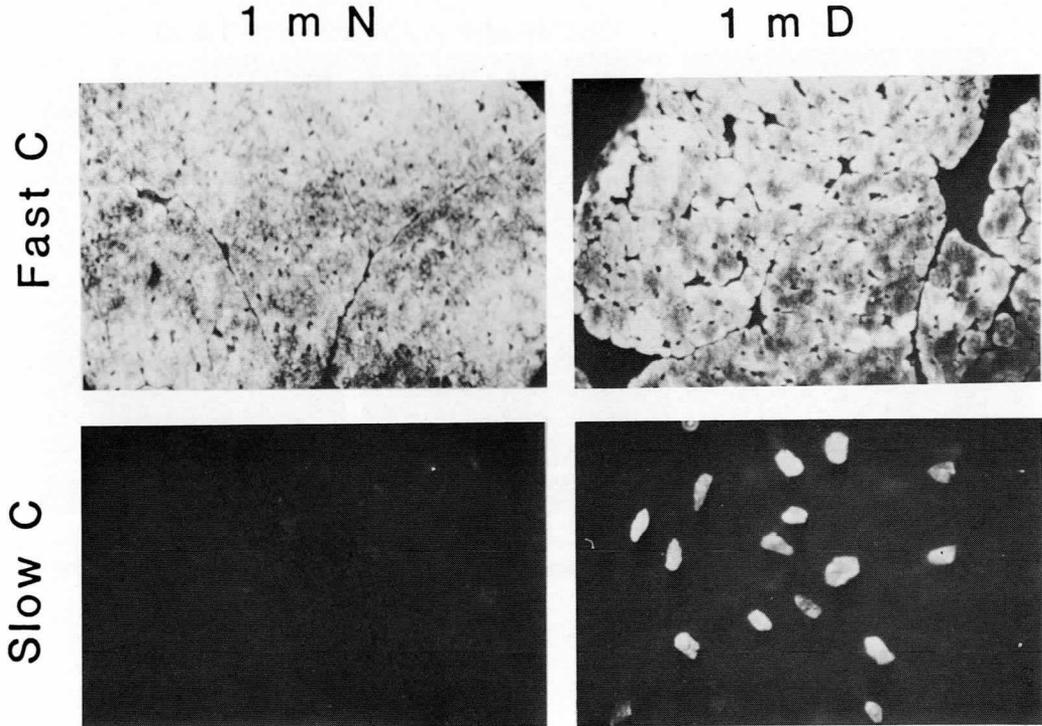


図2 ふ化後1カ月令の正常 (1 mN) と筋ジス鶏 (1 mD) 胸筋細胞に存在するC蛋白質のタイプ。手法は図1と同じ。×180

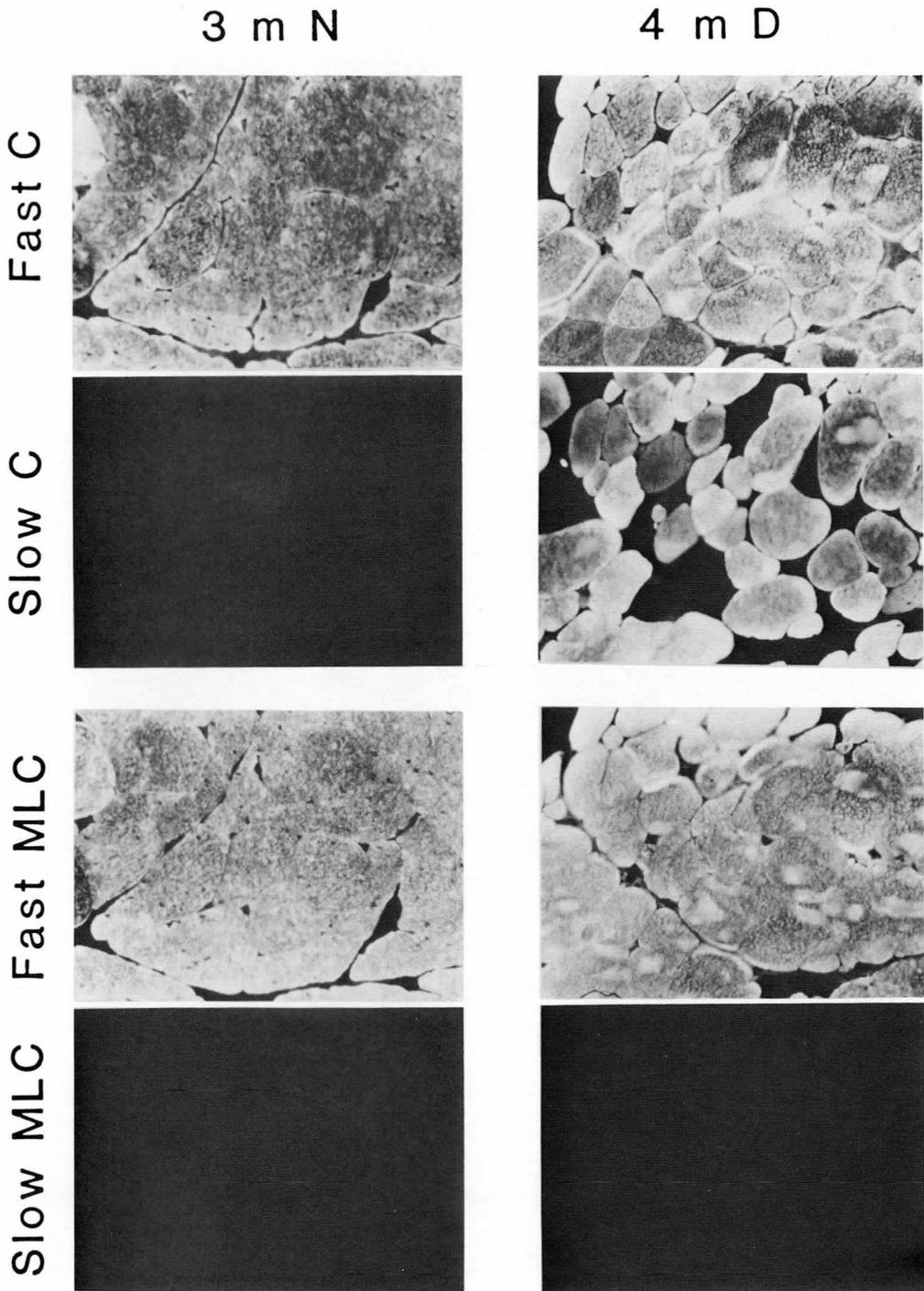


図3 ふ化後3カ月令の正常鶏（3mN）と4カ月令の筋ジストロフィー鶏（4mD）の胸筋に存在するC蛋白質とミオシンL鎖（MLC）のタイプ。手法は図1の場合と同様。×200

ることに、この場合抗遅筋型C蛋白質抗体(ALD 66)との反応性は、反応するか、反応しないかに明らかに2分され、弱く反応する例はほとんどなかった。筋ジストロフィー症がかなり発症した4カ月令の胸筋では、細胞の径はかなり不揃いであるが、これらの大部分は、遅筋型C蛋白質を含むに至る(図3)。しかし、4カ月令でも、少数ながら遅筋型C蛋白質を含まない細胞もみられた。又、速筋型C蛋白質は、これらの成長期を通じて、すべての細胞に含まれていた。ジストロフィー筋に遅筋型C蛋白質が存在することは、イムノブロット法でも確認された(図4)。即ち、1年令の正常鶏、筋ジス鶏の胸筋から抽出した蛋白質を検定したところ、前者では抗速筋抗体(MF1)と陽性反応を示し、単一のバンドを与えたが、抗遅筋

抗体(ALD 66)とは全く反応しなかった。ところが、筋ジス鶏胸筋からの抽出物は、MF1, ALD 66 いずれとも反応し、それぞれ1本のバンドを与えた。検出感度の問題から、2週令や1カ月令の筋ジス鶏胸筋に、遅筋型C蛋白質を検出することは、イムノブロット法ではできなかった。

以上のべてきたC蛋白質の場合と比較する目的で、ミオシンL鎖の速筋型・遅筋型分子種が、筋ジスおよび正常鶏胸筋細胞に、どう分布するかを蛍光抗体法で調べたところ、若い胚の胸筋では、遅筋及び速筋ミオシンL鎖が共存するが、ふ化以降には、筋ジス・正常鶏を問わず、胸筋には速筋型分子種のみしか検出されず、筋ジストロフィー症に併い、ミオシンL鎖の遅筋型分子種の出現は否定された。この点C蛋白質の場合と明らかに異なる。

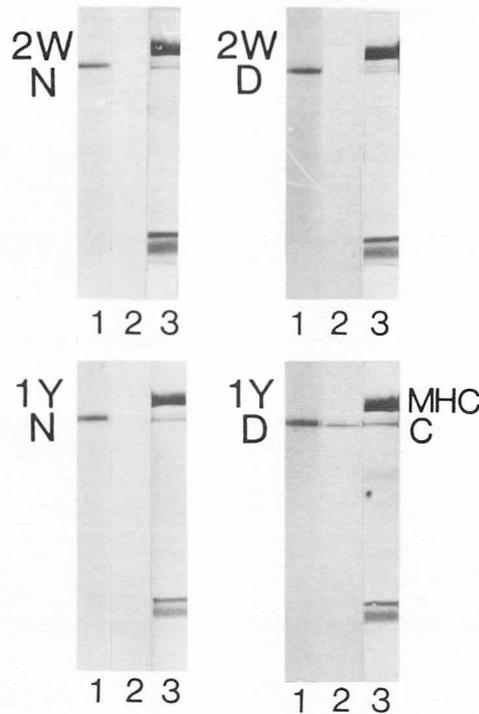
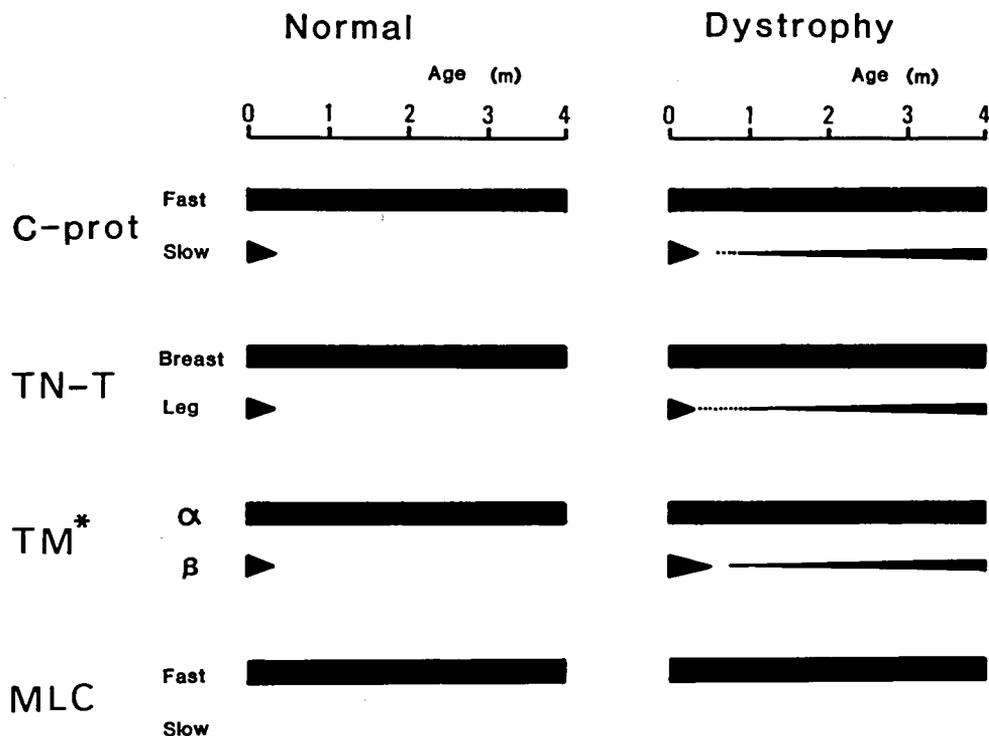


図4 2週令(2W)と1年令(1Y)の筋ジスと正常胸筋に存在するC蛋白質のイムノブロット法による解析。1, 抗速筋C蛋白質抗体(MF1)で処理; 2, 抗遅筋C蛋白質抗体(ALD 66)で処理; 3, クマージ染色した電氣流動のパターン、ミオシンH鎖(MHC)との蛋白質(C)の泳動位置を示した。



\* ACCORDING TO TAKEDA AND NONOMURA (1989)

図5 筋ジスおよび正常鶏の胸筋成長にともなうC蛋白質(C-prot)分子種の変化とトロポニンT(TN-T)・トロポミオシン(TM)とミオシンL鎖(MLC)の分子種の変化の時間経過の比較。

### 考 察

特異性の高い抗体を使用することにより、筋ジストロフィー症に伴う胸筋におけるC蛋白質分子種の変化を明瞭にとらえることが出来た。特に、凍結連続切片を用いることにより、単一細胞について、存在する分子種を吟味することが出来た。筋ジストロフィーにおける筋構造蛋白質の変化は、トロポニンT<sup>1)</sup>、ミオシンアイソザイム<sup>1)</sup>、トロポミオシン<sup>2)</sup>などで明らかにされたが、これらの場合、蛋白質分子種を特異的に識別するための抗体が得られていないので、細胞レベルでの解析が容易でない。C蛋白質の場合、免疫組織化学的に分子種を判別できるので、筋ジストロフィーにおける変化を、遅筋型C蛋白質の出現として、細胞レベルでとらえることができる利点がある。

筋ジストロフィーの細胞が遅筋型C蛋白質をも

つことは、基本的には、幼若期の細胞の特性に一致する。初期には、ごく少数の細胞に変化がみられ、徐々にその数が増していくとみなされる。又、胸筋の前・中・後部について調べたところ、若干の差はあれ、いずれの部位でも細胞の変化はみられ、筋ジストロフィーに伴う遅筋C蛋白質の出現は、胸筋全域にわたる現象とみなされる。このような変化が、筋の再生現象を反映していることなのか、既存の細胞自身が幼若化するのか、本研究だけでは解答は得られない。ただ、4カ月令の筋ジス胸筋には、遅筋型C蛋白質を含むかなり多数の細胞があり、これらすべての細胞が、再生細胞とすると、細胞レベルの turnover がかなり速いことになる。

筋ジストロフィー症に伴うC蛋白質の変化を、既に筋ジストロフィーに伴う変化が知られている

トロポニン T, トロポミオシンの場合と比較すると, 変化の経過に若干の違いはあっても, 全体的にはよく似かよっているといえる (図 5 参照)。これら 3 種の蛋白質はいずれも, 鶏胸筋では, 正常にはふ化後 10 日程の間に幼若型蛋白質組成から親型蛋白質組成へ移行するものである。<sup>7)</sup>ところが, ふ化前に蛋白質組成が幼若型 (速筋型 + 遅筋型) から親型 (速筋型のみ) への移行を終えるミオシン L 鎖のような場合には, 筋ジストロフィーの発症に際して, ほとんど変化が起らない。アクチンの場合も同様である。<sup>3)</sup>これらを考えると, 筋の発生, 成長の比較的後期に親型に移行する C 蛋白質, トロポニン T, トロポミオシンなどの場合の方が, より分子種の変異が起りやすい。いいかえれば, 可塑性があるのではなからうか。

#### 謝 辞

モノクローン抗体をご恵与下さった筑波大真崎教授, コーネル大学 Fischman 教授に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. and Matsuda, R. (1980). Changes in troponin-T and myosin isozymes during development of normal and dystrophic chicken muscles. *FEBS Lett.*, **120**: 195-198.
- 2) Takeda, S. and Nonomura, Y. (1980). Presence of the tropomyosin  $\beta$ -chain in dystrophic chicken breast muscle. *Biomed. Res.*, **1**: 176-179.
- 3) Obinata, T., Shimizu, N. and Okamoto, K. (1983). Quantitative changes in monomer and polymer actins during development of normal and dystrophic chicken skeletal muscle. *Biomedical Research of Muscular Dystrophy*, Ebashi, S. and Ozawa, E., eds. Japan Sci. Soc. Press. In press.
- 4) 大日方昂, 大室弘美, 真崎知生: 骨格筋の発生・成長に伴うミオシンアインザイム及び C-蛋白質の分子種変異, 筋ジストロフィー症の基礎研究 (江橋班) 56 年度報告書, 135-140.
- 5) Reinach, F. C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T. and Fischman, D. A. (1982). Isoforms of C-protein in adult chicken skeletal muscle: Detection with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, **95**: 78-84.
- 6) Obinata, T., Masaki, T. and Takano, H. (1980). Types of myosin light chains present during development of fast skeletal muscle in chick embryo. *J. Biochem.*, **87**: 91-88.
- 7) Matsuda, R., Obinata, T. and Shimada, Y. (1981). Types of troponin components during development of chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.*, **82**: 11-19.

## 18 培養骨格筋および心筋細胞における トロポニンの分化

嶋田 裕\*

研究協力者 豊田 直二\*\*

### はじめに

われわれはすでにニワトリ胚子の骨格筋と心筋を材料として、筋調節蛋白質であるトロポニン(TN)成分の性質は各筋の発生にともないどのように交換して行くかについて、免疫反応を利用した蛍光抗体法を用いて調べた。<sup>1)</sup>すなわち、親の骨格筋および心筋の TN-T, I, C 成分とそれぞれ特異的に結合する抗体を用いて調べたところ、胚の骨格筋と心筋はそれぞれの親の骨格筋と心筋の TN-T, I, C 抗体と反応するが、その他に骨格筋は心筋の TN-T, C と、心筋は骨格筋の TN-I 抗体とも強く反応した。すなわち胚の筋細胞内で合成される TN 成分は、骨格筋とも心筋とも免疫学的に見分けのつかない性質を持っていることを示している。したがって胚の時期には骨格筋と心筋とでは TN はかなり似かよった性質を持っており、発生が進むにつれてそれぞれの筋特有の TN が合成されるようになると考えられる。

これらの蛋白質の胚子型から親型への変換は、どのような機構によるのであろうか。成体筋の性質はその支配神経に依存していることが多くの実験により知られている<sup>2)</sup>ので、われわれは骨格筋と心筋の発生に対する神経の影響について調べた。胚子における骨格筋と心筋の支配神経を操作することは不可能に近いので、この実験には培養系を

用いることにした。

### 材料と方法

骨格筋細胞の培養には11日目ニワトリ胚の胸筋を、心筋細胞の培養には7日胚の心室筋を用い、それぞれトリプシン処理により単一細胞に解離し、35mmシャーレに $8 \times 10^5$ 個の細胞を培養した。

神経を含む筋培養はつぎのように行なった。①3~12時間培養の骨格筋細胞と心筋細胞に、脊髓(コリン作動性神経)あるいは上頸神経節(アドレナリン作動性神経)を加えた。脊髓は60~66時間胚の脊髓断片を $10 \mu\text{M}$  1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl cytosine を含む培養液に24時間巡回培養し、 $\alpha$ 運動神経細胞を多く含むようにしたものである。<sup>3)</sup>上頸神経節は11~13日胚のものを用いた。培養液には頭部と脊髓を除去した7~11日胚より作製した胚抽出液を加えた。②骨格筋と心筋細胞の培養のうちのあるものには、神経組織および胚抽出液のかわりに、7~11日胚の脳と脊髓より作製した神経抽出液を加えた。胚抽出液および神経抽出液ともに、蛋白質濃度は7mg/mlに調節し、いずれも培養液には5%の割合で加えた。③心筋細胞を神経のconditioned medium(NCM)中で培養することも行なった。NCMは4日胚から摘出した脊髓をトリプシン処理して、35mmの培養皿に $10^7$ 個の割合で培養し、3日ごとに採取した培養液上清である。④骨格筋と心筋細胞に非神経性の組織片(11日胚の肝臓、腎臓および肺)を加える培

\* 千葉大学医学部解剖学第1講座

\*\* 東京都精神医学総合研究所神経化学部門

TABLE 1  
TN in Skeletal and Cardiac Muscle Cells Cultured with and without Nerves

Cultures tested	Antibody against	Addition to standard cultures							
		None	Spinal cord	Symp. ggl.	Nerve ext.	Nerve cond. med.	Liver	Kidney	Lung
Skeletal muscle cells	Skeletal TN-T	+	+	+	+		+	+	+
	TN-I	+	+	+	+		+	+	+
	TN-C	+	+	+	+		+	+	+
	Cardiac TN-T	+	-	-	-		+	+	+
	TN-I	-	-	-	-		-	-	-
	TN-C	+	-	-	-		+	+	+
Cardiac muscle cells	Skeletal TN-T	-	-	-	-	-	-	-	-
	TN-I	+	-	-	-	-	-	+	+
	TN-C	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cardiac TN-T	+	+	+	+	+	+	+	+
	TN-I	+	+	+	+	+	+	+	+
	TN-C	+	+	+	+	+	+	+	+

養も行なった。

### 結 果

このような方法で培養した細胞を光学顕微鏡により観察すると、筋細胞培養に加えた脊髄および上頸神経節はそれぞれ突起を伸ばし、骨格筋や心筋細胞と接触しているのが見られた。しかしすべての筋細胞が神経と接触してはいなかったが、接触した筋細胞としない細胞との間に分化の程度に相違は認められなかった。また神経の影響下（神経組織、神経抽出液、NCM）に培養した筋細胞と、その存在しない条件下に培養した筋細胞との間にも著明な差異はみられなかった。

神経の非存在下に培養した骨格筋細胞を親の骨格筋および心筋に特異的な TN 成分の抗体を用いて間接蛍光抗体法により観察した。骨格筋細胞は培養の 2 日目から抗体に対する反応が現われ始めた。骨格筋細胞は骨格筋の TN-T, I, C 抗体に

より染色されるだけでなく、心筋の TN-T, C 抗体とも反応した。このような反応性は長期間（3 週間）培養しても変化がみられなかった（図 1）。

しかし、脊髄、上頸神経節または神経抽出液と共に骨格筋細胞を培養した場合には、1 週間後には TN 抗体に対する反応性に変化が現われた。すなわち、心筋の TN-T と C 抗体に対する反応性が消失し、骨格筋の TN 抗体とのみしか反応しなくなった（図 2）。これらの変化は神経がある一定量（運動神経細胞数が  $1.8 \times 10^4$  個、上頸神経節細胞数が  $2 \times 10^5$  個、神経抽出液濃度が  $3.5 \text{ mg/ml}$ ）以上の時に起こった。それ以下の時には TN 抗体に対する反応性に変化は現われなかった。

つぎに、心筋細胞を神経細胞あるいは神経抽出液の影響のない状態下で培養した場合の TN 抗体との反応性を調べた。心筋細胞は培養後 3 時間目から心筋の TN-T, I, C 抗体と反応すると同時に、骨格筋の TN-I 抗体によっても染色された。

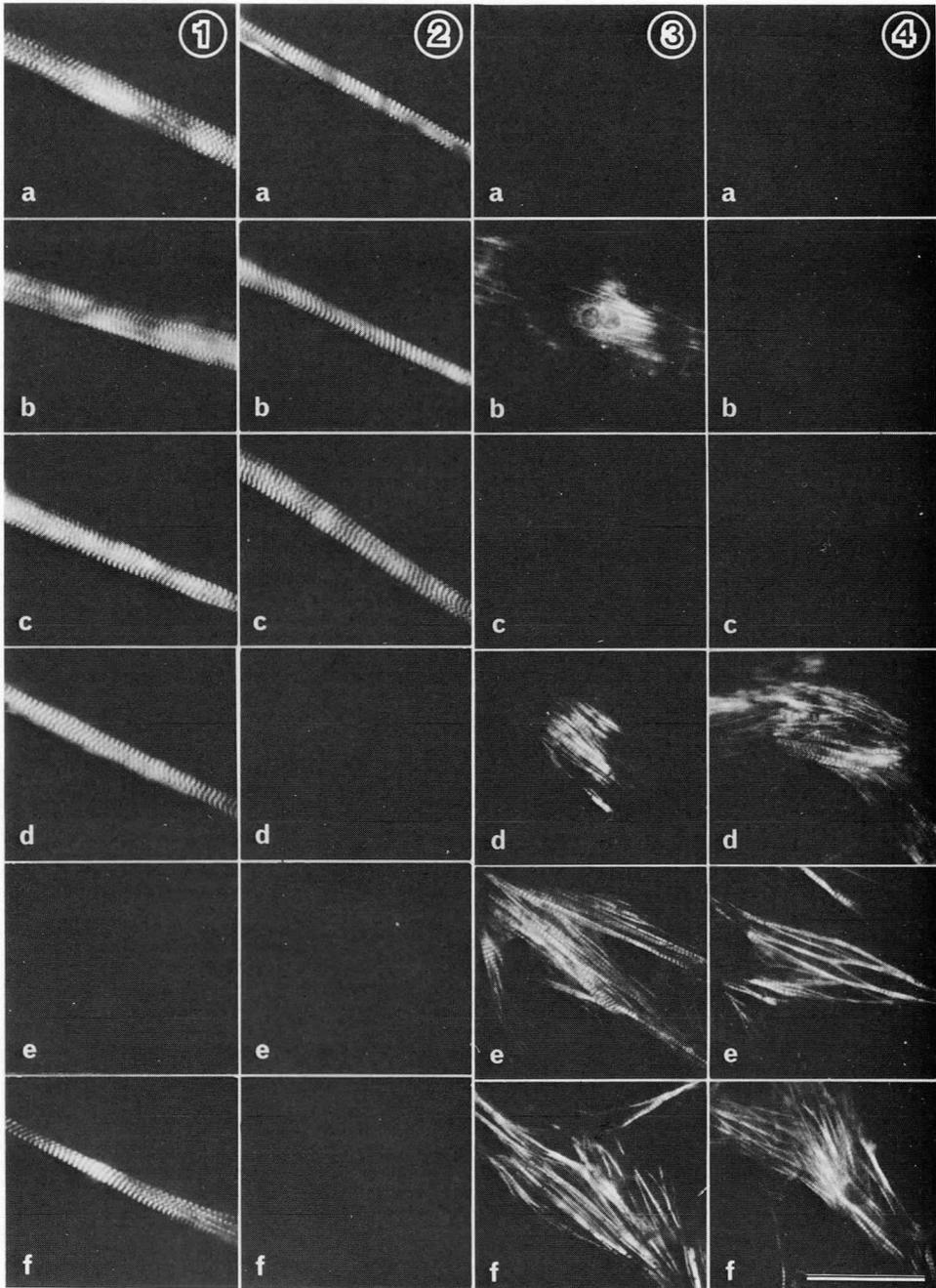


図1

間接蛍光抗体法による培養胚骨格筋(1, 2)および心筋(3, 4)細胞の観察。神経の影響の非存在下の培養(1, 3)と脊髄の存在下の培養(2, 4)。骨格筋のTN-T(a), TN-I(b), TN-C(c)および心筋のTN-T(d), TN-I(e), TN-C(f)抗体により染色。培養14日目。スケール=50 $\mu$ m。

この反応性は培養期間を長くしても変化しなかった(図3)。

しかし、脊髄、交感神経節または神経抽出液を加えて培養した心筋細胞は、培養1週間後には心筋のTN抗体とのみ反応し、骨格筋のTN-I抗体とは反応しなくなった(図4)。この反応性の変化は神経がある一定量(運動神経細胞、上頸神経細胞、神経抽出液がそれぞれ $3 \times 10^4$ 個、 $4.5 \times 10^4$ 個、 $0.7 \text{ mg/ml}$ )以上の時に起こり、それ以下の細胞数または蛋白質濃度では起こらなかった。さらに心筋細胞にNCMを加えて培養した場合にも抗体に対する反応性は同様に変化した。 $10^7$ 個の運動神経細胞で培養したNCMを心筋培養細胞に加えると、骨格筋のTN-I抗体に対する反応性は消えたが、 $10^6$ 個の運動神経細胞で作製したNCMではそのような効果は現われなかった。

非神経性の組織(肝臓、腎臓、肺)を加えた場合には、各培養筋細胞の抗体に対する反応性はコントロールの培養と同じであった。ただし、心筋の培養に肝臓を加えた場合には、神経性の要素を加えた時と同様の結果が出た。

これらの結果を表1に示した。

### 考 察

以上の結果をまとめるとつぎのようになる。神経細胞および神経抽出液の存在しない状態で培養した骨格筋細胞は、親の骨格筋に特異的なTN抗体のほかに、心筋のTN-T、C抗体とも反応し、また心筋は心筋のTN抗体以外に骨格筋のTN-I抗体とも反応した。すなわち培養骨格筋細胞のTN-T、Cおよび培養心筋細胞のTN-Iは、免疫学的に親の骨格筋と心筋の両方の性質を持っていることを示している。すなわち、培養系で合成されるTN成分はニワトリの胚子期に存在するものと同じ性質をもつものであることを表わしている。

本実験ではさらに運動神経細胞、交感神経節細胞、神経抽出液、あるいはNCMと共に培養した骨格筋と心筋細胞は、それぞれ親の骨格筋と心筋に特異的な抗体と反応するようになった。すなわ

ち神経要素の存在下で培養した筋細胞のTN成分は、それぞれ親の各筋のものと同じ反応性を示す<sup>1)</sup>ようになった。このような混合培養系での胚子型から親型へのTN成分の変化は、神経突起と筋細胞の接触の有無にかかわらず、また生きた神経細胞のない状態下(神経抽出液あるいはNCM)でも起こるので、機能的なシナプスの形成や、神経と筋の物理的な接触が必要であるとは考えられない。また腎臓や肺などの非神経性の組織を加えても、このような変換は起らなかった。したがって、このような蛋白質の抗原性の変換は、神経液性の因子に依存しているのではないかと想像される。このような物質の解明は、これからの問題であるが、神経以外の組織である肝臓も心筋のTNを親型に変換させたので、肝臓には心筋を分化させる因子が存在していることが予想される。

ミオシンの抗体を用いた免疫組織学的実験では、生後間もないラットの腓腹筋(速筋)を除神経しても、正常な発生をするという報告がある<sup>4)</sup>。これは筋の分化に神経の関係がみられなかったことを示しているが、この点に関しては、鳥類や哺乳類の筋発生の仕組の相違や、in vivo と in vitro の実験系の違い、さらには観察している蛋白質の分化様式が異なることも考えられる。この報告では、神経の影響の非存在下でも培養の期間を長くすることによって、各筋の反応性を親型に変換させることができるか否かについては、解明することができなかった。しかし、少なくとも神経の影響下ではTN分子の変換を早期に引き起こさせることは明らかで、神経性因子は骨格筋および心筋細胞の遺伝子発現に影響を与えていることが想像される。

### 文 献

- 1) Toyota, N. and Shimada, Y.: Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy. *J. Cell Biol.*, **91**, 497-504, 1981.
- 2) Buller, A. J., Eccles, J. C. and Eccles, R. M.: Interactions between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speeds of their responses. *J. Physiol. (London)*, **150**, 399-416,

- 1960.
- 3) Masuko, S., Kuromi, H. and Shimada, Y.: Isolation and culture of motoneurons from embryonic chicken spinal cords. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 3537-3541, 1979.
  - 4) Butler-Browne, G. S., Bugaisky, L. B., Cuénoud, S., Schwarts, K. and Whalen R. G.: Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. *Nature (London)*, 299, 830-833, 1982.

## 19 筋ジストロフィー症鶏浅胸筋の筋線維構成蛋白 —筋ジス遺伝子の白レグ鶏への導入—

野々村 禎 昭

研究協力者 武田 伸一 菊池 建機\*

### はじめに

筋ジストロフィー症鶏(以下、筋ジス鶏)の顕著な罹患筋である胸筋については、幾つかの筋原線維を構成する蛋白に異常が見い出され、殊に発生<sup>1-4)</sup>・成長過程での分子種の変換の上から注目されてきた。

我々は、筋ジス鶏胸筋のトロポミオシンについて、孵化後早期の $\beta$ -トロポミオシンの減少～消失過程の遅延と、その後の再出現があり、筋ジス成鶏胸筋の単一筋線維の分析では、個々の筋線維<sup>1-2)</sup>上に $\beta$ -トロポミオシンが存在した事を報告してきた<sup>2)4)</sup>。

一方、筋ジス鶏の発症を解明する一つの方向として、ヘテロタイプ鶏(ヘテロ鶏)の解析が重要であるが、白色レグホン種鶏(白レグ鶏)と筋ジス鶏(line 413)とのヘテロ鶏は、組織化学的及び血清酵素学的にキャリアー鶏であるとの位置付けがなされてきた<sup>5-7)</sup>。

今回我々は、筋原線維を構成する蛋白の上から、筋ジス鶏の形質がどのように白レグ鶏に導入されるのかを、殊にヘテロ鶏に注目しながら分析した。

### 材料と方法

実験鶏は、筋ジス鶏(ニューハンプシャー種 line 413)と白レグ鶏との交配により東北大学農学部

で作出された鶏群(図1)のうち、白レグ対照鶏(+/+), 白レグ筋ジス鶏(am/am)及び雑種第1代鶏(ヘテロ鶏, am/+)の3種である。生後1年半以上経過した白レグ対照鶏1羽, 白レグ筋ジス鶏, ヘテロ鶏各2羽について、後頸部打撲、放血後、浅胸筋、縫工筋等を採取し、筋組織を液体窒素、イソペンタン下で急速凍結し、ドライアイス完全密封下に東京へ輸送し-20℃で凍結保存した。一方、同部から採取した筋組織をドライアイス・アセトンにて急速凍結、10 $\mu$ クリオスタート切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (H-E)染色を行ない検討した。

筋線維構成蛋白の分析は、全筋線維抽出蛋白と粗活性トロポミオシンを材料とした。全筋線維抽出蛋白は、Mikawa<sup>4)</sup>の方法に依ったが、粗活性トロポミオシンは、Ebashi<sup>8)</sup>の方法を一部改変して抽出した。即ち、凍結保存した筋組織の1ブロックは、3-4gと少量で肉ひきが困難のため、20倍量の0.1MKCl, 5mMK-Pi (pH7.0)下で細かく裂いた筋組織をWaring blenderで短時間ホモジナイズし、15,000回転20分遠沈後得た筋残渣を出発点とした。

筋構成蛋白の分析は、通常のSDS-PAGE(Laemmli<sup>9)</sup>)の他、3種類の二次元電気泳動を用いた。それらは、①SDS-UREA-PAGE $\rightarrow$ SDS-PAGE<sup>1)</sup>、②IEF $\rightarrow$ SDS-UREA-PAGE<sup>10-11)</sup>、③NEPHGE $\rightarrow$ SDS-PAGE<sup>4)</sup>であり、②③の場合、AmpholineはpH4~6を80%、pH3.5~10を20%とし、③のNE-

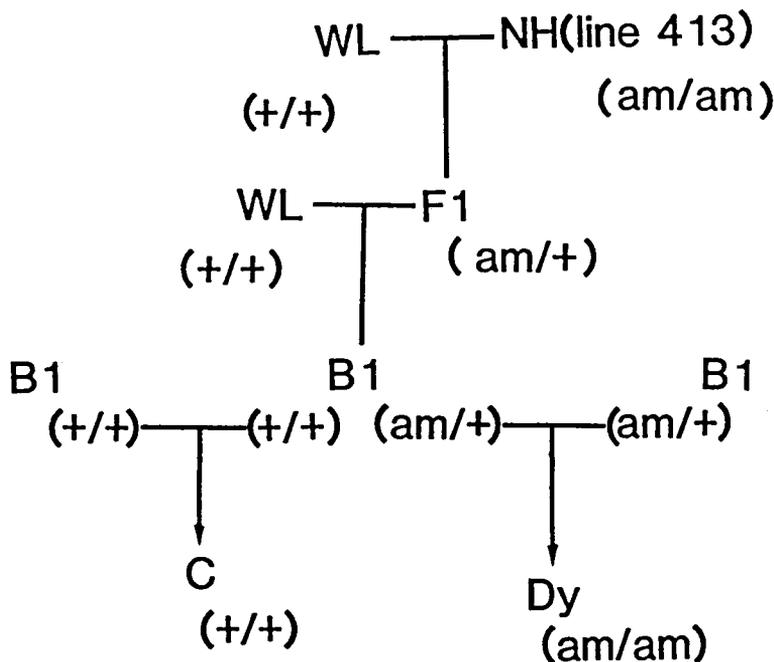


図1 筋ジス鶏遺伝子 (am) の白レグ鶏 (+/+) への導入

ニューハンプシャー種 (NH) 筋ジス鶏 (line 413) と白レグ鶏 (WL) の交配により、雑種第1代ヘテロタイプ鶏 (am/+) (F<sub>1</sub>) を得た。F<sub>1</sub> と WL の戻し交配により得た B<sub>1</sub> 鶏同士を交配する事により、白レグ対照鶏 (+/+) (C) 及び白レグ筋ジス鶏 (am/am) (Dy) を得た。

PHGE は 250 Vh とした。②の場合、Acrylamide 12.5% に対し、Urea を 3.5 M 加え二次元目とした。

## 結 果

### 1. 組織学的研究

図2に白レグ対照鶏、筋ジス鶏、ヘテロ鶏浅胸筋の組織学的所見を示した。

白レグ対照鶏浅胸筋では、筋の基本構築は良く保たれ、結合織や脂肪織の増加は無い。個々の筋線維をみると、比較的直径も均一で、筋線維の大小不同、壊死、中心核の増加も認められない。

白レグ筋ジス鶏浅胸筋では、壊死線維及び貪食細胞による清掃現象が目立ち、結合織や脂肪織も高度に増加し、筋の基本構築に乱れを生じている。筋線維の大小不同はあるが、肥大線維は筋ジ

ス鶏 (line 413) 程目立たず、むしろ小径の萎縮線維が大半を占める。中心核の増加はあるが高度ではない。

前2者に対しヘテロ鶏浅胸筋では、筋線維の大小不同が顕著で、多数の肥大線維及び小径で角ばった angular fiber を混ざる。結合織や脂肪織の増加もあるが、壊死線維はあるものの非常に稀で、中心核の増加も顕著では無い。所見をまとめると、ヘテロ鶏浅胸筋は、壊死線維が少ないという特徴はあるが、筋線維の大小不同、肥大線維、結合織、脂肪織の増加等の点については、筋ジス鶏の形質を受け継いでいる事が判る。

### 2. 全筋線維抽出蛋白の検索

白レグ対照鶏、筋ジス鶏、ヘテロ鶏浅胸筋の IEF→SDS-UREA-PAGEの結果を図3に示した。この系では、酸性側のミオシン軽鎖、アクチン、

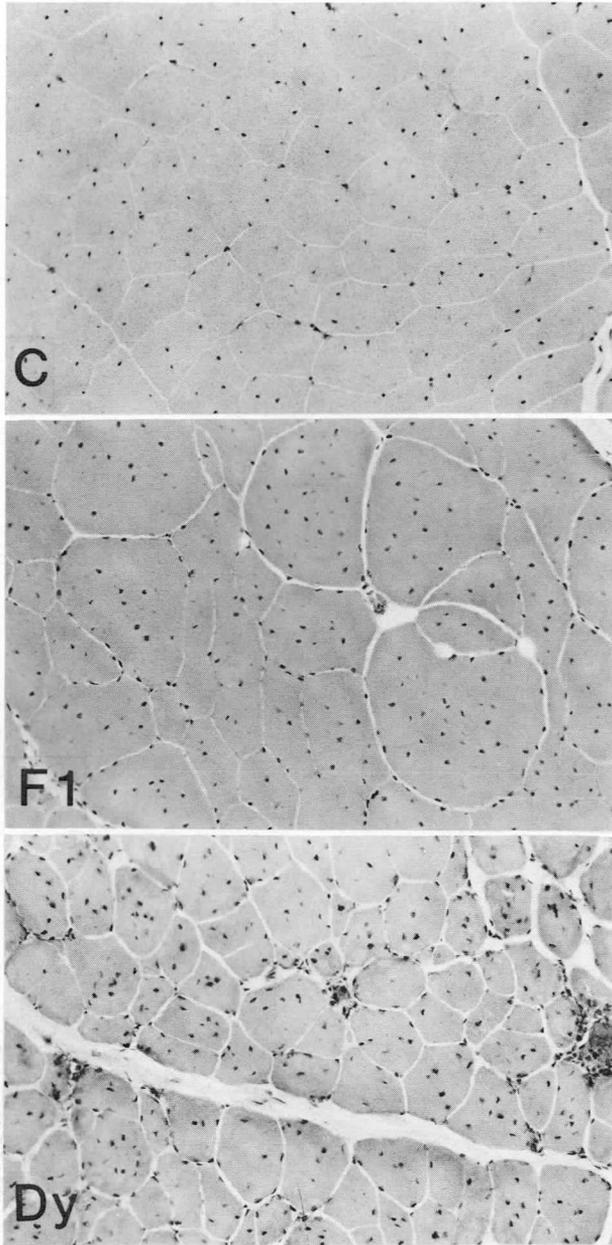


図2 白レグ対照鶏 (C), ヘテロ鶏 (F<sub>1</sub>), 白レグ筋ジス鶏 (Dy) 浅胸筋の組織学的所見  
筋ジス鶏での壊死線維と貪食, 小径の萎縮線維, ヘテロ鶏での大径の肥大線維が目立つ。  
Hematoxylin-Eosin 染色, ×211。

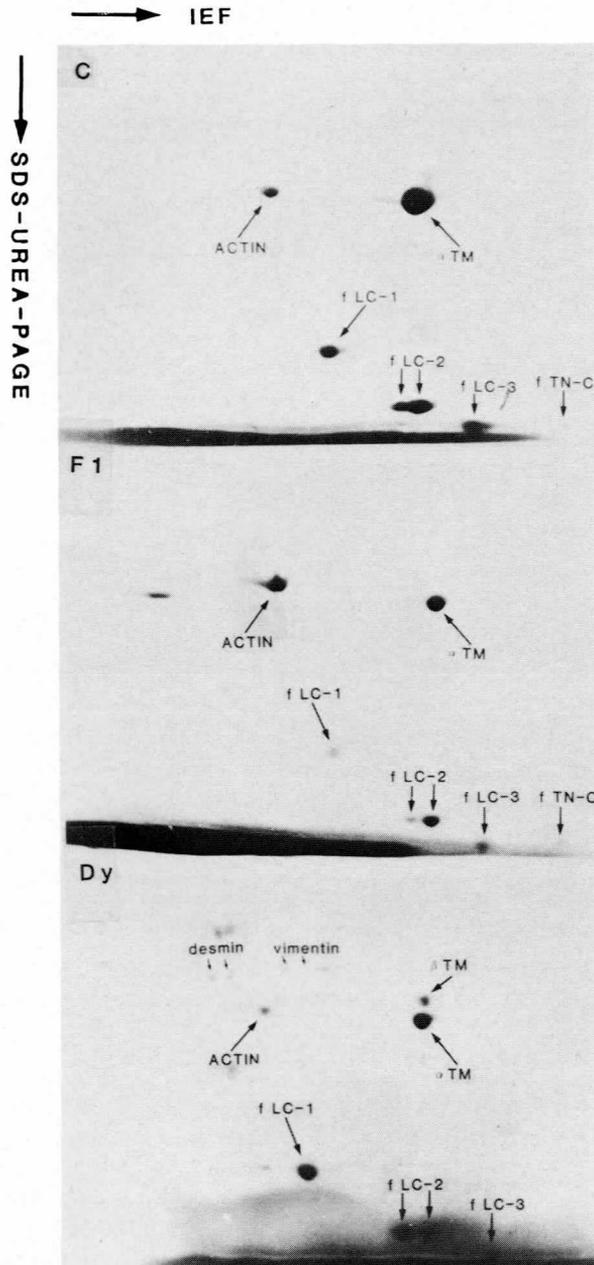


図3 白レグ対照鶏 (C), ヘテロ鶏 (F<sub>1</sub>), 白レグ筋ジス鶏 (Dy) 浅胸筋の全筋線維抽出蛋白の比較

等電点電気泳動 (IEF) から Urea 存在下の SDS 電気泳動 (SDS-UREA-PAGE) への二次元電気泳動で示す。fLC-1, 2, 3 : ミオシン軽鎖の速筋タイプ。TM : トロポミオシン。  
fTN-C : トロポニン C の速筋タイプ。

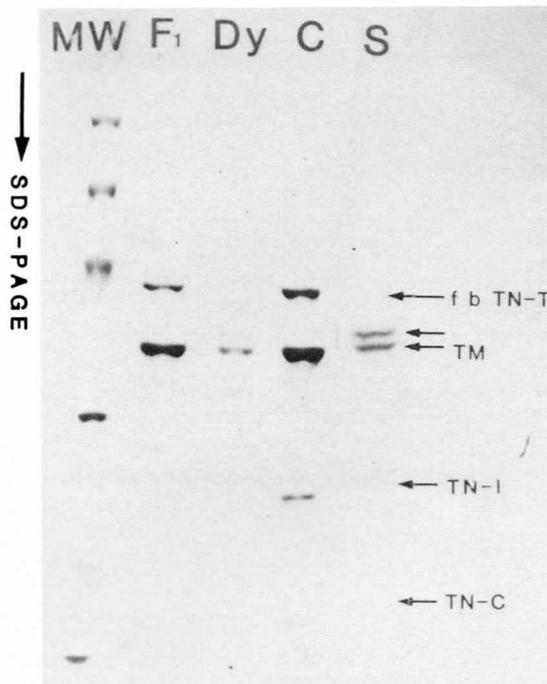


図4 白レグ対照鶏(C), ヘテロ鶏(F<sub>1</sub>), 白レグ筋ジス鶏(Dy) 浅胸筋から抽出した粗活性トロポミオシンの比較

SDS-PAGE で比較した。S: 白レグ対照鶏縫工筋, fbTN-T: トロポニンT 速筋タイプの胸型, TN-I, C: トロポニンI, C. molecular weight marker(MW) は分子量 94,000, 67,000, 43,000, 30,000, 20,100, 14,400 に相当する band を示している。

トロポミオシン, トロポニンC 及び骨格蛋白であるデスミン, ビメンチンの比較が可能である。ミオシンの軽鎖, トロポニンCについては, 何れも速筋由来の分子種より構成され, アクチンも同一である。トロポミオシンについては, 白レグ筋ジス鶏浅胸筋のみで $\beta$ -トロポミオシンの出現があり, 白レグ対照鶏やヘテロ鶏とは区別できる。更に同鶏では筋ジス鶏の単一筋線維で Mikawa<sup>4)</sup>らの指摘したようにデスミンやビメンチンも増加していた。但し, この全筋線維抽出蛋白は, ごく少量の筋組織を材料としているため, 各ブロックから複数の Sample を作製し比較したが, 白レグ対照鶏, ヘテロ鶏では $\beta$ -トロポミオシンは無いが, 存在してもごくわずかであり, 相当量存在する白レグ筋ジス鶏とは明瞭に区別された。

### 3. 粗活性トロポミオシンの検索

前項のトロポミオシンの結果及びトロポニンT

について検討するために, 3種の鶏の浅胸筋から粗活性トロポミオシンを抽出して比較した。

図4に SDS-PAGE による比較を示した。蛋白量が均一ではないが, 白レグ筋ジス鶏では抽出性が悪い事を反映している。白レグ筋ジス鶏では, 対照鶏縫工筋に明らかな $\beta$ -トロポミオシンに一致するバンドが見い出される。しかし近傍に足型トロポニンTの混在が予想されるので, 次の2種類の二次元電気泳動により分析した。

図5に Urea 存在下の SDS-PAGE から, Urea なしの SDS-PAGE への二次元電気泳動の結果を示した。この二次元電気泳動ではトロポミオシンを容易に同定することができる。<sup>1)</sup> 縫工筋を対照とすると, 白レグ筋ジス鶏にのみ,  $\beta$ -トロポミオシンが存在する事が明らかである。トロポニンTについてみると, 対照鶏浅胸筋にはその胸型が, 縫工筋には足型が存在するが, 白レグ筋ジス鶏で

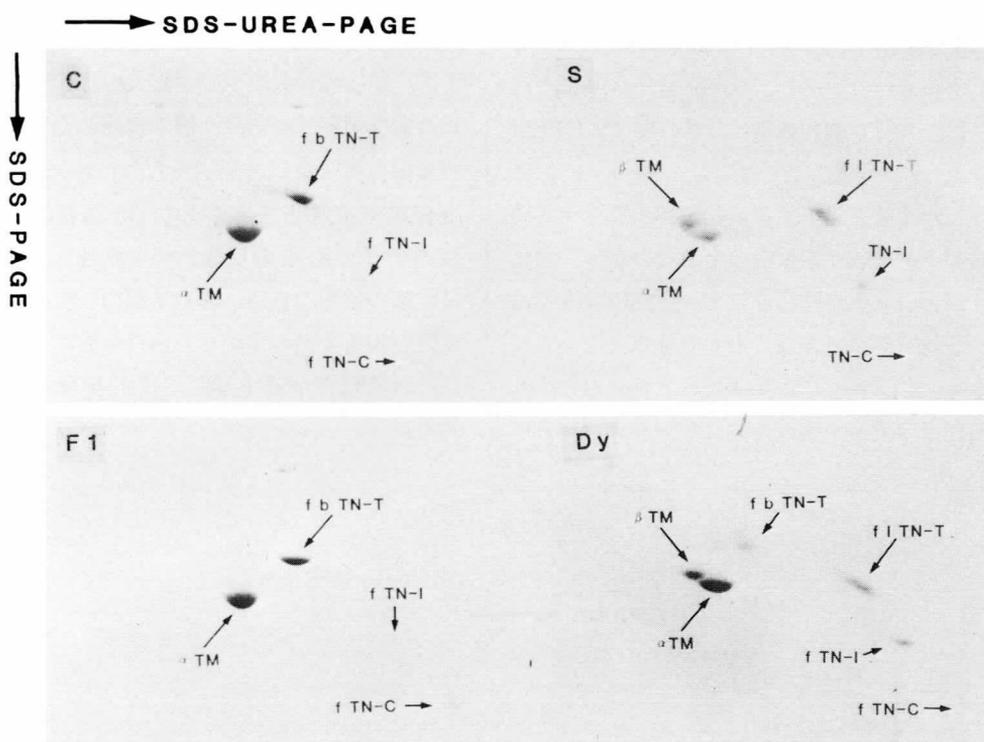


図5 浅胸筋粗活性トロポミオシンの二次元電気泳動による比較

Urea 存在下の SDS-PAGE から Urea なしの SDS-PAGE への二次元電気泳動で示す。筋ジス鶏 (Dy) 浅胸筋では、対照鶏 (C) やヘテロ鶏 (F<sub>1</sub>) には無い  $\beta$ -トロポミオシン ( $\beta$ -TM) が存在し、胸型トロポニン T (fbTN-T) の減少と、足型トロポニン T (fTN-T) も認められる。

は、胸型の減少と足型の出現があり、Obinata の<sup>3)</sup>報告と一致している。ヘテロ鶏は、トロポニン T に関する対照鶏と一致したパターンである。

こうした結果を図6では NEPHGE  $\rightarrow$  SDS-PAGE の二次元電気泳動で確認した。この系では短時間で広い pH の範囲の蛋白について検索が可能である。結果は、前の二次元電気泳動に一致し、白レグ筋ジス鶏のトロポミオシン、トロポニン T に関する異常は、ヘテロ鶏では検出されなかった。但し、この電気泳動では、幾つか興味深い点を指摘できた。1つはトロポニン T に関する事項で、対照とした縫工筋で胸型のトロポニン T に一致するスポットが存在した事と、ヘテロ鶏の場合に最も明らかであったが、胸型のスポットより、わずかに酸性側低分子側に随伴するスポットを認めた

事である。他の1項はトロポミオシンに関して白レグ筋ジス鶏の両サブユニットの酸性側にリン酸化型と考えられるスポットが観察された事である。<sup>10-11)</sup>

## 考 察

筋ジス鶏の筋線維を構成する蛋白については、その幾つかについて異常が知られ<sup>1-4)</sup>、殊に孵化後その分子種の間で変換を生ずる蛋白が注目されてきた。しかし、病因につながる生化学的な一次欠損はいまだ不明である。

ヘテロ鶏を分析する事は、単に遺伝形式を検討するばかりでなく、一次欠損を推測する上でも重要である。幾つかの試みの中で、筋ジス鶏の白レグ鶏への導入については、ヘテロ鶏の解析が進んでいる。雑種第一世代及び交配を繰り返して作出さ

れた第二世代以下のヘテロ鶏に共通する特徴として、菊池らは、組織学的な筋線維の大小不同や肥大線維及び血清学的な pyruvate kinase (PK) の増加を認めている。但し、フリップテストによる発症は検出されず壊死線維は非常に稀で、CPKも正常群と分離できない。

こうした組織所見の上で変化を認めるヘテロ鶏が、筋線維を構成する蛋白の上でどのような変化を示すかという事が注目された。今回の検索では、白レグ筋ジス鶏には少なくともトロポミオシン、トロポニンT、デスミン及びピメンチンという3つの蛋白上の異常が導入されたが、ヘテロ鶏では

これらの特徴は見い出されなかった。

ここで、ヘテロ鶏の臨床所見、組織学的、血清学的所見と今回の筋線維構成蛋白の結果をまとめると、筋線維の大小不同や肥大線維、PKの値は優性遺伝の形式をとり、筋の壊死、CPK値、筋構成蛋白の異常及びフリップテスト上の発症は劣性遺伝の形式をとる事がわかる。蛋白の異常が劣性遺伝子の直接の反映との可能性も生まれて来るが筋の壊死こそは、筋ジス鶏の一次的欠損とごく近い現象であろうから、蛋白の異常が、壊死及びそれに随伴する事項の二次的現象との見方も残る。

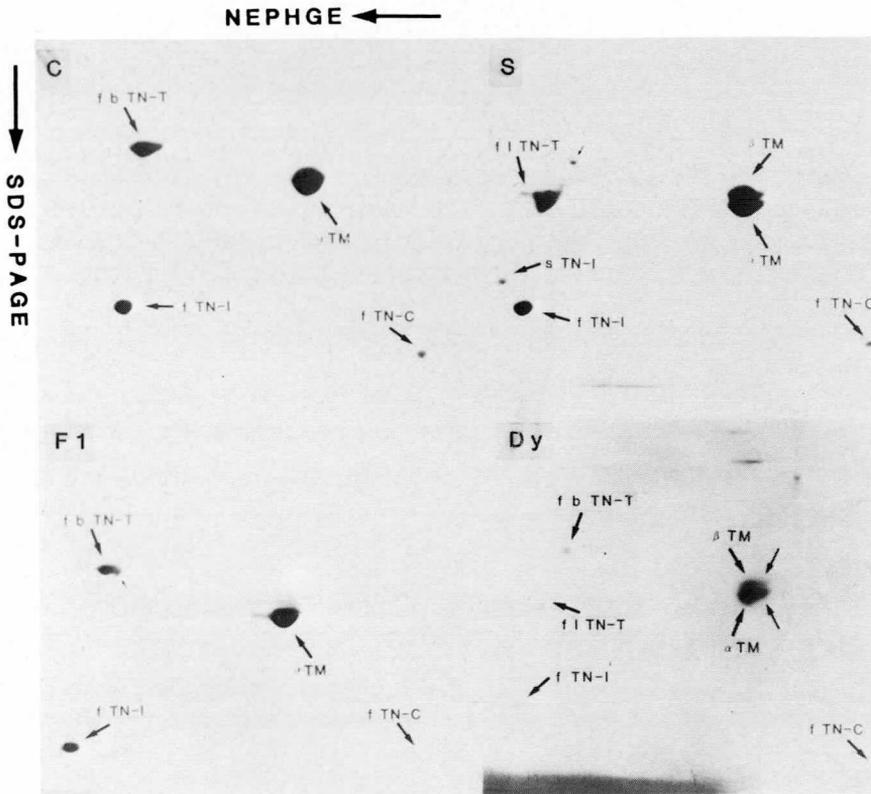


図6 浅胸筋の粗活性トロポミオシンの二次元電気泳動による比較

非平衡 pH 勾配ゲル (NEPHGE) から SDS-PAGE への二次元電気泳動で示す。対照鶏縫工筋 (S) では胸型トロポニンT (小矢印) に一致するスポットが存在し、ヘテロ鶏 (F<sub>1</sub>) では、胸型トロポニンT のやや酸性側低分子側に混在する小成分 (小矢印) がある。筋ジス鶏 (Dy) トロポミオシンの酸性側には、リン酸化型と思われるスポット (大矢印) を認める。

特に、筋線維の壊死は貧食細胞による清掃と同時に、一部では言わゆる再生を伴うであろうから、蛋白の異常がこの筋線維の崩壊～再生に伴う現象か否かが重要な課題となる。

但し、ヘテロ鶏の検索の結果、蛋白の異常が、筋の肥大現象によるとの可能性は低くなった。肥大の多いヘテロ鶏で蛋白異常はなく、既に大半が萎縮に陥っていた筋ジス鶏でも蛋白の異常は明瞭であったからである。

こうしたヘテロ鶏の結果とは別に、今回の分析では興味深い点が見い出された。それは、白レグ筋ジス鶏のトロポミオシンに少量のリン酸化型が認められた事である。最近、鶏胚の骨格筋及び成長期ラット心筋において、幼若期程、トロポミオシンのリン酸化型の占める割合が高いとの報告があり、白レグ筋ジス鶏のみで、リン酸化型が検出された事が注目される。

### 結 論

筋ジス鶏 (line 413) の形質が、どのように白レグ鶏に導入されるのかを、浅胸筋の筋線維を構成する蛋白の上から検討した。

1. 筋ジス鶏 (line 413) 浅胸筋の筋線維を構成する蛋白の異常の内、トロポミオシン、トロポニンT、デスミン及びビメンチンに関しては、白レグ筋ジス鶏に完全に導入された。
2. 白レグ鶏と筋ジス鶏との間に作出されたヘテロ鶏には、上記の蛋白の異常は見い出されなかった。
3. こうした筋蛋白の異常は、ジストロフィーの劣性遺伝子により直接あるいは間接に支配されていると考えられた。

### 文 献

- 1) Takeda, S. & Nonomura, Y.: Presence of the tropomyosin  $\beta$ -chain in dystrophic chicken breast muscle. *Biomed. Res.*, 1: 176-179, 1980.
- 2) Nonomura, Y. & Takeda, S.: Structural proteins of dystrophic chicken muscles, in *Muscular Dystrophy* (ed. Ebashi, S.) University of Tokyo Press, Tokyo, 1982.
- 3) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. & Matsuda, R.: Changes in troponin-T and myosin isozymes during development of normal and dystrophic chicken muscle. *FEBS Lett.*, 120: 195-198, 1980.
- 4) Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T.: Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken - micro two dimensional gel electrophoretic analysis. *J. Biochem.*, 89: 1951-1962, 1981.
- 5) 菊池建機: 筋ジストロフィー鶏新株の開発 — 白色レグホン種とのF<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>鶏について、筋ジストロフィーの基礎的研究 (江橋班) 53年度研究報告書, p. 82-87, 1979.
- 6) Kikuchi, T., Ishiura, S., Nonaka, I. & Ebashi, S.: Genetic heterozygous carriers in hereditary muscular dystrophy of chickens. *Tohoku J. Agr. Res.*, 32: 14-26, 1981.
- 7) Chung, C. S., Morton, N. E. & Peter, H. A.: Serum enzymes and genetic carriers in muscular dystrophy. *Am. J. Human Genet.*, 12: 52-66, 1960.
- 8) Ebashi, S., Kodama, A. & Ebashi, F.: Troponin, I. preparation and physiological function. *J. Biochem.*, 64: 465-477, 1968.
- 9) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- 10) Montarras, D., Fizman, M. Y. & Gros, F.: Characterization of the tropomyosin present in various chick embryo muscle types and in muscle cells differentiated in vitro. *J. Biol. Chem.*, 256: 4081-4086, 1981.
- 11) Montarras, D., Fizman, M. Y. & Gros, F.: Changes in tropomyosin during development of chick embryonic skeletal muscles in vivo and during differentiation of chick muscle cells in vitro. *J. Biol. Chem.*, 257: 545-548, 1982.
- 12) Heeley, D. A., Moir, A. J. G. & Perry, S. V.: Phosphorylation of tropomyosin during development in mammalian striated muscle. *FEBS Lett.*, 146: 115-118, 1982.

## 20 ジストロフィー鶏および正常鶏の発生過程におけるEF2およびNAD含量の変化

真 崎 知 生<sup>\*,\*\*</sup>

研究協力者 吉 川 昭<sup>\*\*</sup>

筋ジストロフィー鶏の特徴である初期の hypertrophy, 後期の atrophy の現象について我々は蛋白代謝, 特に蛋白合成能の面から検討してきた。その結果筋ジストロフィー鶏の蛋白合成能は正常鶏と比較し, 胚の時期より高いこと, この原因として蛋白合成延長因子(EF1およびEF2)の活性が亢進していることを既に報告してきた<sup>1)</sup>。本報告では先づEF2の活性亢進が量的なものか質的なものかを明らかにし, 次にジストロフィー筋の蛋白合成能亢進の意味について, NAD含量の変化との関連において考察する。

### 材 料 と 方 法

ジストロフィー鶏(413系統)および正常鶏(412系統)の15日胚から生後6ヶ月の胸筋を用いた。胸筋より上清およびポリゾームを調製し<sup>1)</sup>、上清中の free のEF2およびポリゾームに結合したEF2含量を測定した。EF2含量の定量は, [<sup>14</sup>C]NADおよびジフテリアトキシン存在下にEF2を[<sup>14</sup>C]ADPリボシル化し, その生成量を測定することにより行った<sup>1)</sup>。筋肉中のNAD含量はKlingenberg<sup>2)</sup>の方法により測定した。ポリADPリボース合成酵素活性は, 反応液0.1ml中に, 10 $\mu$ mol Tris-HCl(pH8.0), 2.5 $\mu$ molMgCl<sub>2</sub>, 0.08 $\mu$ molDTT, 0.2 $\mu$ Ci(<sup>3</sup>H)NADおよびChauveau<sup>3)</sup>

の方法により分画した核を含む溶液を, 25 $^{\circ}$ C, 15minインキュベーションし, [<sup>3</sup>H]ADPリボース量を測定することにより行った。DNA含量はジフエニルアミン法<sup>4)</sup>により測定した。

### 結 果 と 考 察

1) ジストロフィー筋と正常筋EF2の質的・量的比較

ジフテリアトキシンにより, 1分子のNADおよび1分子のEF2から1分子のADPリボシルEF2が生成されるのでEF2の定量が可能である。図1(A)は部分的に精製した親の筋肉上清, 20日胚の筋肉上清およびポリゾームのEF2を[<sup>14</sup>C]ADPリボシル化した試料を, 10%SDSポリアクリルアミド電気泳動したパターンで, 図1(B)は(A)のオートラジオグラムである。いずれの試料も約10万分子量の位置に[<sup>14</sup>C]ADPリボシルEF2のバンドが認められた。上清中のEF2もポリゾームに結合したEF2も差が認められなかった。ジストロフィー筋と正常筋のEF2分子に差があるかどうかを確かめるため, Clevelandら<sup>5)</sup>の方法により図1に示したEF2のバンドを切り取り蛋白分解酵素による限定分解を行った。トリプシン処理では差はなく, V8プロテアーゼ処理で僅かな差が認められた(図2)。しかし本質的な差ではなく, ブタ肝, 正常およびジストロフィー筋のEF2分子の間には差はないと思われる。図3に20日胚の上清中の free のEF2含量とポリゾーム

\* 筑波大・薬理

\*\* 都・臨床研

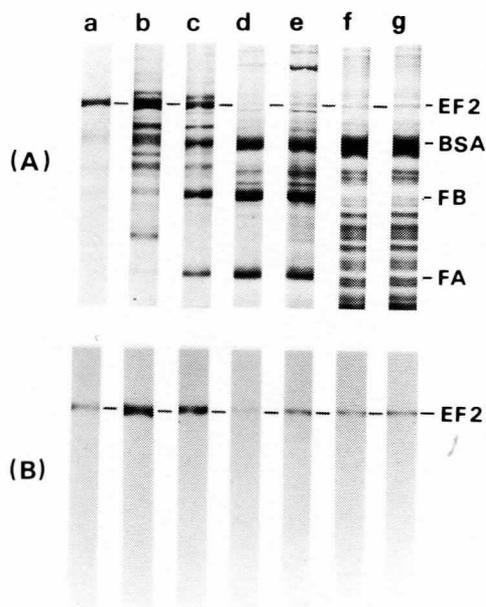


図1  $^{14}\text{C}$  ADPリボシルEF2の10% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン(A)およびオートラジオグラム(B)。 (A), (a): ブタ肝EF2, (b, c): 部分的に精製した正常(b)および筋ジス(c)親鶏胸筋上清EF2, (d, e): 正常(d)および筋ジス(e)20日胚筋肉上清(f, g): 正常(f)および筋ジス(g)20日胚筋肉ポリゾーム。BSA: ウシ血清アルブミン。FA(FB): ジフテリアトキシンラグメントA(B)。 (B): (A)のオートラジオグラム。

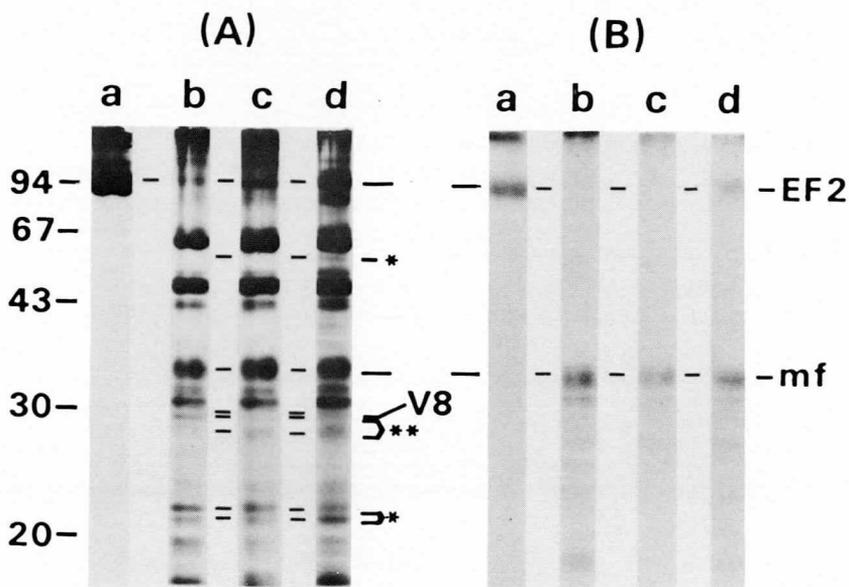


図2  $^{14}\text{C}$  ADPリボシルEF2部分を切り取り、V8プロテアーゼで限定分解した15% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動したパターン。(A), (a): V8プロテアーゼ未処理の正常筋EF2, (b): ブタ肝EF2, (c): 正常筋上清EF2, (d): ジストロフィー筋EF2。\*: ジストロフィー筋にのみ特徴的なバンド, \*\*: ブタ肝EF2と鶏筋上清EF2で異なるバンド。(B): (A)のオートラジオグラム, mf:  $^{14}\text{C}$  ADPリボシルEF2の主な限定分解フラクソン。

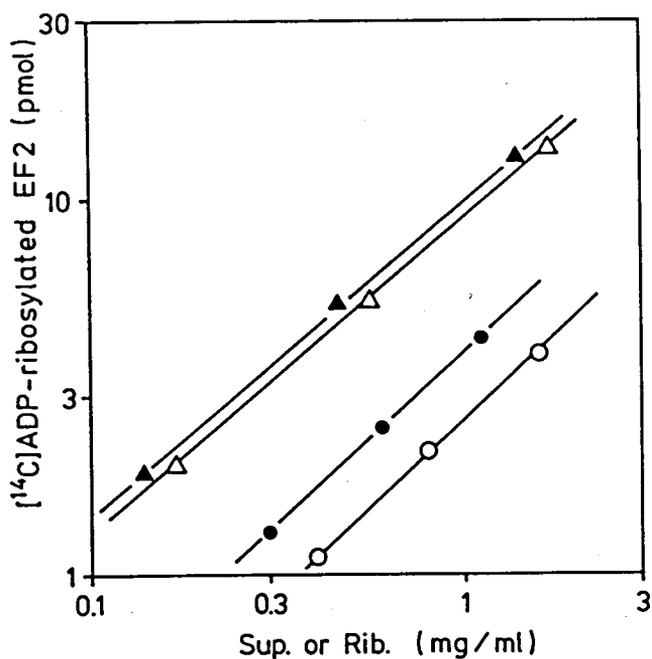


図3 20日胚胸筋上清EF2およびポリゾーム結合EF2含量  
 上清(Sup)は、上清蛋白(mg)/反応溶液(ml)を、ポリゾーム(Rib)は、ポリゾーム(20 A<sub>260</sub> = 1 mg)(mg/反応溶液(ml))を示す。  
 ○: 正常筋上清EF2, ●: ジストロフィー筋上清EF2, △: 正常ポリゾーム結合EF2,  
 ▲: ジストロフィー筋ポリゾーム結合EF2。

表1 発生過程における正常筋およびジストロフィー筋上清中のEF2含量の比  
 値は、ジストロフィー筋上清EF2含量/正常筋上清EF2含量の平均値±標準誤差を示す。

Embryo		After hstch		
15.th day	20 th day	2 week	4 week	adult
1.04 ± 0.15 (n=7)	1.52 ± 0.10 (n=7)	1.72 ± 0.48 (n=6)	1.78 ± 0.17 (n=5)	2.53 ± 0.69 (n=4)

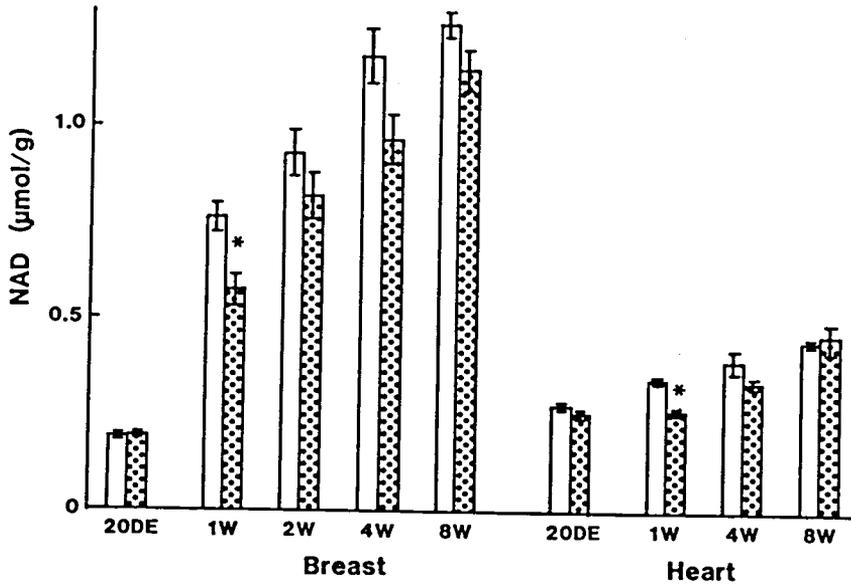


図4 発生過程における筋肉細胞内NAD含量の変化

NAD含量は湿重量当りの値を示す。

白：正常筋，黒点：ジストロフィー筋

※：5%の危険率で正常筋とジストロフィー筋の間に有意差あり。バーは標準誤差の値を示す。

に結合したEF2含量を示した。上清中の蛋白当りのEF2含量はジストロフィー筋で高いが、ポリゾームに結合したEF2含量はRNA当りで両者に差は認められなかった。このことからEF2のリボゾームへの結合能には差はないと思われる。なお20日胚では上清中のEF2含量とポリゾーム結合EF2含量の比は、正常筋で約2：1であった。20日胚の心筋では上清中およびポリゾームに結合したEF2含量とも差は認められなかった。表1に発生過程の正常筋に対するジストロフィー筋EF2含量の比を示した。15日胚では差は認められなかったが20日胚以降8週令までジストロフィー筋上清中のEF2含量は有意に増加していた。しかし8週令ではジストロフィー筋上清中の蛋白濃度は正常筋の約1/2であるので、ジストロフィー筋上清中の蛋白当りのEF2含量が正常筋の2倍であっても、wet weight当りで

はジストロフィー筋上清中のEF2含量は低いか等しいことになる。これはwet weight当りのDNA含量およびRNA含量の動能と一致しており、発症前の4週令までは蛋白合成能が亢進してhypertrophyになり、8週令以降徐々にatrophyになる原因と考えられる。

## 2) 細胞内NADレベルと発生分化

筋ジストロフィー鶏胸筋では、蛋白合成能が亢進しているが、これは先に述べてきたように蛋白合成に関与する因子が質的に異なるのではなく量的に増加しているのに過ぎない。この原因の一つとして、ジストロフィー筋の幼若性が考えられる。即ち幼若性のため蛋白合成能が高いまま持続していると考えられる。ジストロフィー筋の幼若性に関しては、乳酸脱水素酵素(LDH)アイソザイムパターンに関して詳しく報告されている。ジストロフィー筋では親型であるLDH4、LDH5が現われず、

LDH1, LDH2, LDH3のみのままである<sup>6,7)</sup>。細胞レベルでは埜中ら<sup>8)</sup>による幼若型線維から親型線維への分化障害が報告されている。最近では大日方ら<sup>9)</sup>、武田ら<sup>10)</sup>によるトロポミオシン、トロポニン等のアイソフォームの研究からジストロフィー筋には幼若型アイソフォームが存在していることが報告されている。現象的にはジストロフィー筋の分化障害が明らかになりつつあるが、この原因は現在のところ不明である。我々は分化に関与する可能性がある筋肉内NAD含量の変化を測定した。Caplanら<sup>11)</sup>は間充織細胞が筋肉に分化する際、細胞内NAD含量が増加することを報告している。図4に示すように、鶏胸筋細胞中のNAD含量は、生後1週令の時点で正常筋に比較し有意に減少していた。この有意な減少は、1週令の時のみ認められたことから細胞膜変性による細胞からのNADの漏出によるものとは考えにくい。大日方ら<sup>9)</sup>の構造蛋白アイソフォームの研究によれば、正常筋の場合1週令付近で幼若型と親型が混在し、これ以降幼若型が消え親型にのみ限定されてくるとのことである。1週令でジストロフィー筋の細胞内NAD含量が有意に低いことは、分化と何らかの関係を持っているとも考えられる。一方心筋細胞内NAD含量の成長による変化は少いものの、やはり1週令で有意な差が認められた。骨格筋に比較し心筋の分化は早期に終わり骨格筋ほどの影響を受けないとも考えられる。

NAD含量と分化との関係に関しては、NADを基質とするポリADPリボース合成酵素の関与が推察される。ポリADPリボースはヒストンに結合しており、DNAの修復や遺伝子発現の調節を行っていることが示唆されている<sup>12,13)</sup>。筋肉の分化に関しては、間充組織細胞から筋肉に分化する際ポリADPリボース含量が減少する結果、基質であるNAD含量の増加が示唆されている<sup>11)</sup>。逆に分化が抑制されていればポリADPリボース含量の増加とそれに伴うNAD含量の減少が考えられる。ジストロフィー筋の核中ポリADPリボース

合成酵素活性は増加しており、先に述べた仮説と符合する。但しポリADPリボース合成酵素活性とポリADPリボース含量との関係等更に検討する必要がある。

ジストロフィー筋では、幼若型から親型への分化に必要な遺伝子の発現が障害されている可能性があるが、今後更に遺伝子レベルでの解析、および幼若性と筋ジストロフィー発症との関係の検討が必要であろう。一方発症前後の蛋白合成能亢進は幼若性で説明出来ても、20日胚ですでにEF2含量が高いことは幼若性だけでは説明出来ず別の面からの検討も更に続ける必要があると思われる。

#### 謝 辞

ジフテリアトキシンを頂いた大阪大学 内田先生、ブタ肝EF2を頂いた東京大学 水本清久先生に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Yoshikawa, A. & Masaki, T. (1981). *J. Biochem.*, **90**, 1775.
- 2) Klingenberg, M. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U. ed.) Vol. IV, pp. 2045-2072, Academic Press, New York.
- 3) Chauveau, J., Moulé, Y. & Rouiller, C. (1965). *Exptl. Cell. Res.*, **11**, 317.
- 4) Schneider, W. C. (1945). *J. Biol. Chem.*, **161**, 293.
- 5) Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., & Laemmli, U. K. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102-1106.
- 6) Kaplan, N. O. & Cahn, R. D. (1962). *Biochemistry*, **48**, 2123.
- 7) Dawson, D. M., Goodfriend, T. L., & Kaplan, N. O. (1964). *Science*, **143**, 929.
- 8) 埜中征哉, 春原経彦, 杉田秀夫, 石浦章: (1979) 神経内科, **11**, 259.
- 9) Obinata, T., Ohmuro, T. H., & Matsuda, R. (1980). *FEBS Lett.*, **120**, 195.
- 10) Takeda, S. & Nonomura, Y. (1980). *Biomed. Res.*, **1**, 176.
- 11) Caplan, A. I. and Rosenberg, M. J. (1975). *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1852.
- 12) Nishizuka, Y., Ueda, K., Honjo, T. & Hayaishi, O. (1968). *J. Biol. Chem.*, **243**, 3765.
- 13) Terada, M., Fujiki, H., Marks, P. A. & Sugimura, T. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **76**, 6411.

## 21 可溶性コネクチン

丸山 工 作\*

研究協力者 木村 澄 子\* 沢田 元\*\*

ずっと昔から、骨格筋には収縮性要素のほかに弾性要素が存在すると生理学者が主張してきたが、その実体は不明のままであった。筋線維をおおっているコラーゲン線維のシートによるのではないかともいわれた。1954年に名取礼二はスキンド・ファイバーを用いて、たしかに弾性のあることを示し、弾性内部膜の存在を仮定した<sup>1)</sup>。というのは、ミオシンとアクチンフィラメントの重なりがなく、なるほど引っぱってもはなせば、ゆっくりともとの長さにもどっていくからである。

1975年来、私たちは脊椎動物骨格筋には、塩で溶出されない細いフィラメントの網目構造が存在することを主張し、その本体を弾性タンパク質コネクチンと名づけた<sup>2)</sup>。コネクチンは、分子量100万におよぶ高分子量成分と43,000ダルトン成分からなると報告したが<sup>2,3)</sup>、最近、後者は変性アクチンにはかならないことが明らかにされた<sup>4)</sup>。したがって、コネクチンは高分子量成分からなっている。

コネクチンは、SDSなどタンパク質変性剤の存在下で単離されてきた<sup>2,3)</sup>。そのため、nativeな標品が得られなかった。したがってミオシンやアクチンなどの相互作用が研究できなかった。私たちは、1981年からコネクチンの一部を塩溶液で可溶することに成功し、その単離法を確立することに努力してきた。今回、純粋に得られた可溶性コネクチンとアクチンとの相互作用を報告する。

### 材 料 と 方 法

実験材料としては、ニワトリ胸筋、ウサギ骨格筋、コイ骨格筋を用いた。いずれも同様な結果が得られたが、どちらかという、コイの筋肉の標品が混在物が少なかった。

筋肉を50mM KCl-1mM NaHCO<sub>3</sub> 溶液でホモジナイズし、5,000rpm 5分の遠心で沈殿をみつめた。これをふたたびホモジナイズし、遠心をくりかえし、8回つづけた。そのうち、0.5% Triton X-100 溶液で0℃ 30分処理して、膜成分を可溶化した。黄色い上清が無色になるまで洗いをくりかえした。しかるのち、10mM NaHCO<sub>3</sub> で5回、5mM NaHCO<sub>3</sub> で洗って、水溶性タンパク質を徹底的に除去する。最後にガラス蒸留水で数回洗う。このさいは、10,000rpm 20分遠心した。ぼうじゅんした筋原線維に3M NaClを1/10量加え、1時間0℃でかくはんする。そして、ワットマンNo 2のろ紙でろ過する。ろ過に4~5時間かかる。このろ液が粗コネクチン溶液で、70-90%は、100万ダルトン成分が占める。

コネクチンの精製は、ロータリー・エバポレーターで濃縮した粗コネクチン溶液(~1mg/ml)をゲルろ過することによってなされた。Toyo pearl HW-65のカラム(1.8×90cm)に6mlのサンプルをのせ、0.1M Na phosphate (pH 7.0) で溶出し、素通りの画分につづくピークをみつめた。

アミノ酸は、110℃、24時間、6N HCl中で加水分解したのち、日立835分析計で定量した。流動複屈折はRao社装置、粘度はLow Shear-100

\*千葉大学理学部生物学科

\*\*東京大学医学部解剖学教室

粘度計を用いて測定した。電子顕微鏡は、日本電子100Sを使用した。

## 結 果

### 可溶性コネクチンの性質

可溶性コネクチンは、3%ポリアクリルアミド SDS ゲル電気泳動で、ほんの少し移動する高分子量成分から成っている。280nm にピークを示し、核酸などは含まれていない。また、糖もほとんど含んでいなかった。表1に示すように、これまで得られていた不溶性コネクチンとアミノ酸組成がほとんど同じであった。可溶性コネクチンは、ふつうのオストワルト型粘度計で測ると、粘度はごく小さいが、低速度勾配 ( $0.01\text{s}^{-1}$  以下) では高い粘度を示した。このことは、細長いフィラメントがからまりあい、外力でようやくこわれること

を示唆する。ただし、 $1\text{mg/ml}$  でも、流動複屈折はみられなかった。

可溶性コネクチンが細いフィラメントからできていることは、酢酸ウランによる逆染色法では電子顕微鏡から明確には観察されなかった。しかし、ロータリー・エバポレーターで濃縮してゆくと、ついに、ファイバー状のものが折出し、これを引っぱって、急速凍結エッチングレプリカ法<sup>5)</sup>によって電子顕微鏡下で観察すると、細いフィラメントが配向しているのが見られた(図1)。フィラメントの太さは明らかでないが、アクチンフィラメントより細いようである。これらは、筋残査中にみられるフィラメント網目構造と同様である。したがって、可溶性コネクチンは細いフィラメントが本体であるといえよう。

表1 可溶性コネクチンのアミノ酸組成

	可溶性コネクチン		塩不溶性コネクチン (SDS可溶性)
	粗標品	精製標品	
Asp	110	102	93
Thr	73	77	66
Ser	63	62	67
Glu	113	112	118
Pro	67	66	67
Gly	78	79	76
Ala	68	68	75
Cys/2	3	3	6
Val	83	86	78
Met	14	12	16
Ile	61	63	56
Leu	64	65	76
Tyr	30	30	30
Phe	27	27	29
Lys	81	83	79
His	14	13	18
Arg	51	52	50

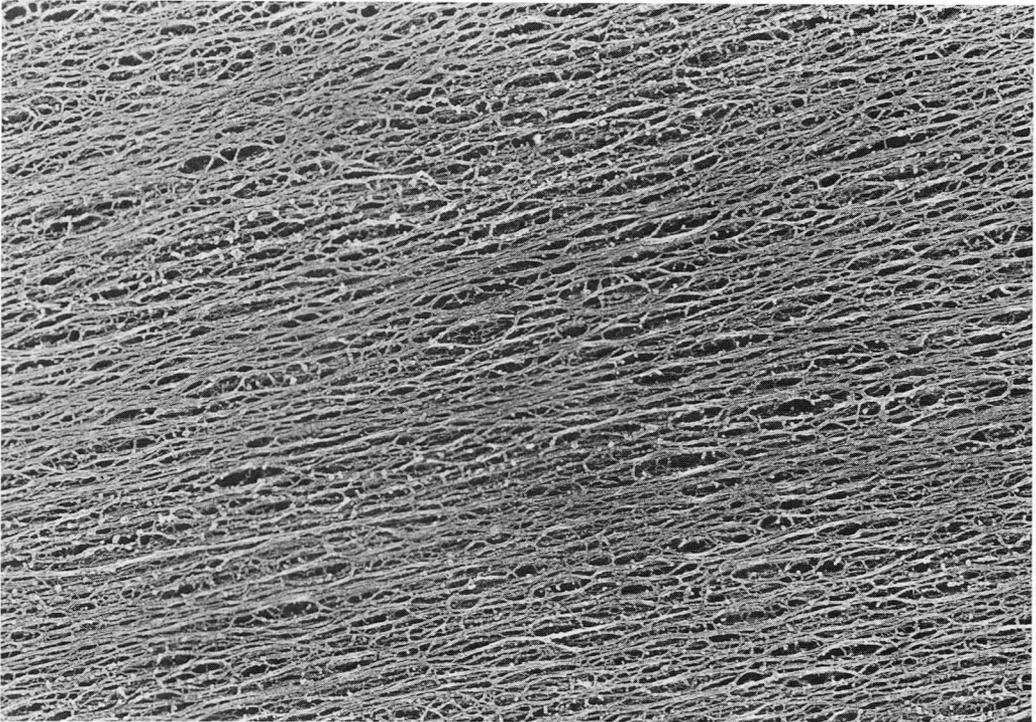


図1 可溶性コネクチンのファイバーの凍結レプリカ像

#### アクチンとの相互作用

F-アクチンにコネクチンを重量比で5-10%加えると、アクチンフィラメントをよりあつめる効果がみられた。0.1M KCl 存在下では、アクチンフィラメントの構造粘性を増加させた。しかし、 $\alpha$ -アクチニンやフィラミンのようなゲル化効果ではなかった。流動複屈折を測定したところ、速度勾配が $10\text{ s}^{-1}$ 以下で、アクチンフィラメントの流れによる配向を促進した。したがって、消光角が減少し、複屈折度が増加した。 $1000\text{ s}^{-1}$ では差がみられなかった。電子顕微鏡下でみると、フィラメントのからまりあいが強くなっていた。

20mM KClという低イオン強度になると、コネクチン自体会合するが、同時にアクチンフィラメントもよりあつまり、無定形の束が形成された。

これらの結果は、コネクチンフィラメントがアクチンフィラメントと弱い相互作用をもっている

ことを示唆している。

#### 考 察

本研究は、不溶性とみなされていたコネクチンが可溶化され、native stateで単離されることを示した。おそらく、筋原線維にあって、ミオシンフィラメントの両端部(A-Iジャンクション)に密集しているコネクチンフィラメントの一部が機械的に取りだされたものと思われる。これらはミオシン抽出のさいにも可溶化するが、あとの単離がこれまでできなかったものである。しかし、濃縮すればコネクチンフィラメントは会合して塩不溶性のファイバーを形成する。

コネクチンフィラメントは、溶液内でアクチンフィラメントと弱い親和性をもつ。これは、細長いフィラメント間の機械的なからまりあいではないかと思われるが、塩濃度依存性からみて妥当で

ある。すなわち 0.2 M KCl 以上では相互作用はみられず、0.1 M KCl では弱いからまりあい、0.02 M KCl では束形成がおこるからである。この弱い親和性は生体内の機能からも想像されることである。アクチンフィラメントはコネクチン・ネット間をスライドするからである。

コネクチンとミオシンとの相互作用は、次の研究テーマである。

#### 文 献

- 1) Natori, R. (1954). The property and contraction process of isolated myofibrils. *Jikeikai Med. J.*, **1**, 119-126.
- 2) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Handa, S. & Eguchi, G. (1977). Connection, an elastic protein of muscle, Characterization and function. *J. Biochem.*, **82**, 317-337.
- 3) Maruyama, K., Kimura, S., Kuwano, Y. & Ohashi, K. (1981). Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of titin with connectin. *J. Biochem.*, **89**, 701-709.
- 4) Maruyama, K., Yamada, N., Ikeya, H. & Kimura, S. (1983). Connectin, one million dalton elastic protein, of chicken breast muscle with a reference to dystrophic muscle. In *Biomedical Research of Muscular Dystrophy* (Ebashi, S. & Ozawa, E. eds.), pp. 201-208, Japan Sci. Soc., Press, Tokyo.
- 5) Ishikawa, H., Usukura, J. & Yamada, E. (1981). Application of cryomicrotomy to the freeze-etch replica method for unfixed tissues. *J. Electron Microscopy*, **30**, 215.

## 22 骨格筋細いフィラメント上のトロポニンの局在及びハイブリッドトロポニンの性質の検討

大槻 磐 男

研究協力者 小野山 佳 道 山 本 和 彦

トロポニン-トロポミオシン-アクチンのフィラメント状複合体である横紋筋の細いフィラメントの分子配置については以下の通りであることが明らかにされている。すなわちアクチン分子が形成する二重らせん構造の二つの溝に沿って長さ400 Åのせんい状分子であるトロポミオシンが端々状に配列し、トロポニンはトロポミオシン分子の一定部分に結合している。実際、免疫電子顕微鏡的にトロポニンが細いフィラメント全長にわたって、380 Å間隔に分布することが見出されている。細いフィラメント上での抗トロポニン結合部位は、ニワトリ骨格筋の場合についてみると常に24個所であり、これは細いフィラメントが約1ミクロンの一定の長さに揃っていることを示すものである。形成途上にある細いフィラメントについては、筋原線維がきわめてこわれやすいこともあって観察が難しかったが、サポニン法によってこれが可能であることが示され、ニワトリ胚胸筋ではトロポニン局在部位が25~31と完成した細いフィラメントより多いこと、つまり長い細いフィラメントが形成されていることが判明した。孵化後3週間程度で一定の長さに揃うこともわかった。また筋ジストロフィーチキンを用いて検討したところ、孵化後5週を経てもなお、長いフィラメントが観察され短縮化の過程が正常の場合に比べて著しく遅れることも見出されている。またウ

サギ骨格筋でも誕生の前後でフィラメント長の変化がおこることが見出されている。<sup>1)</sup>

ここでは、前年度にひきつづいて孵化直後の正常及びジストロフィーチキン胸筋及び脚筋についてフィラメント長の分布を追跡した。また、分子機構についての手掛りを得ることを目的として、骨格筋と心筋から調製したハイブリッドトロポニンの性質についても検討を行った。

### 方 法

筋ジストロフィーチキン(413)とコントロールチキン(412)の孵化後1週から5週までの胸筋と脚筋を使用した。抗トロポニン染色はサポニン法と解離フィラメント法によって行った。筋束を解離溶液(0.1M KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM K-phosphate(pH7.0), 3mM ATP, 0.4mM EGTA)に浸し、サポニン $10^{-4}$  g/ml で10分間処理したのち、やはり解離溶液に溶解した抗トロポニン抗体で処理し固定包埋した。包埋標本から超薄切片を作製し二重染色を施すか、解離フィラメントの場合にはネガティブ染色を施して電子顕微鏡で観察した。

ハイブリッドトロポニンを用いた実験は次の通りの方法で行った。ウサギ骨格筋、ブタ心筋からトロポニンを江橋の方法にしたがって調製したのち吸着カラムで三成分に分離した。これらの三成分から8種のハイブリッドトロポニン複合体を作製し、各々についてブタ心筋脱感作アクトミオシンとウサギ骨格筋トロポミオシンを含む系でCa

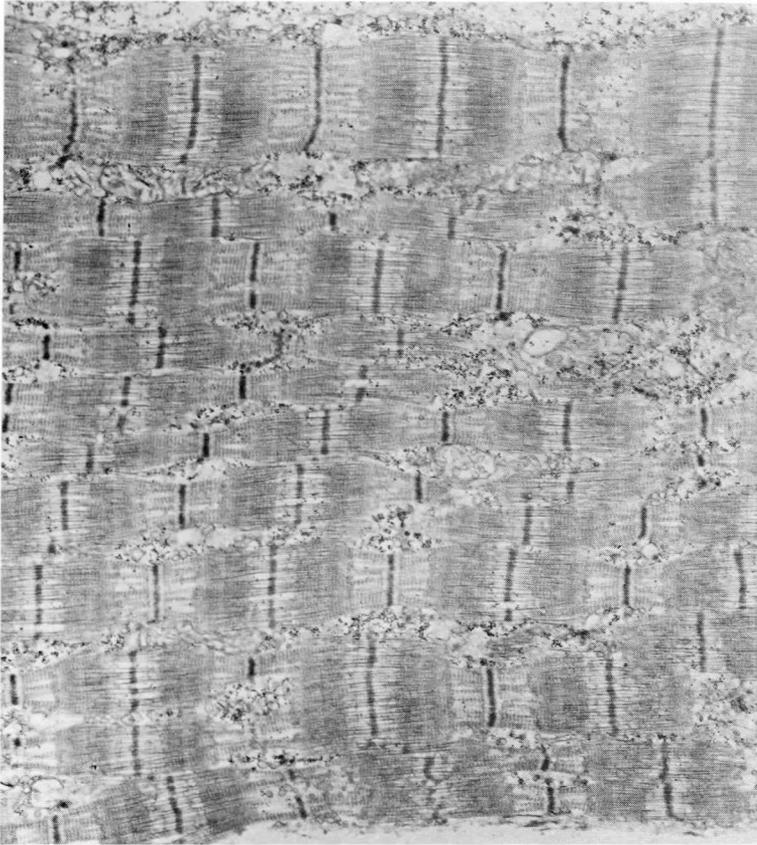
とSr感受性アクトミオシンATPase活性を測定した。

### 結果と考察

細いフィラメント抗トロポニン染色については今回はZ帯から両側にのびるフィラメントの縞の数の相互関係に主力をおいて検討した。その結果、片側が未成熟型つまりトロポニン横縞の数が25またはそれ以上の場合には他側も殆んど横縞の数は25以上であることがわかった。横縞の数は週を経るにつれて減る傾向がみられた。

第3週のジストロフィーチキン胸筋で、まだ一

例だけではあるが中央のZ帯から一侧に伸びるフィラメント上には抗トロポニン横縞が24個形成されているのに対して、他側では25本の横縞を形成する<sup>1)</sup>場合が観察された。これはフィラメントの短縮化が細胞単位あるいは筋原線維を単位としておこる過程ではなく、むしろ単一の細いフィラメント束ないしは単一のサルコメア単位の過程であることを示唆している。この点に関しては現在観察を続行中である。脚筋では正常ジストロフィーとともに第一週でも既に殆んど細いフィラメントの抗トロポニン横縞が24本であることが見出された(第1図)。



×13,000

第1図

この細いフィラメントの短縮の機構については現在の所なお明らかでないが、二つの説明が考えられる。一つは実際に長いフィラメントが形成され先端部が何らかの過程で切断されて一定に揃うことである。もう一つは、解化後に形成されるフィラメントの長さが一定であるというものである。現在の所両者とも可能である。ただ、ある種のカニの筋肉では同一細胞内でも種々の長さの太いフィラメントが存在しているが、細いフィラメント長はこの場合太いフィラメント長と相関していることが見出されている。また、アクトミオシン糸を何回も収縮反応をくり返させるとアクチンの長さが一樣になることが見出されている。これらの所見は、細いフィラメントの構造形成が収縮反応と密接に関連していることを示しており、万一の可能性を予想させるものである。

骨格筋と心筋のトロポニン三成分は色々な点で差異のあることが知られている。今後、両筋の細いフィラメントの構造形成を分子的にさぐる基礎

的な研究として、両筋のトロポニン三成分を組み合わせたハイブリッドトロポニンを作製し収縮反応に対する作用の差異について検討した(第1表, 第2表)。先ずCa感受性についてみると、低Ca濃度ではいずれの場合もATPase活性は抑制されていた。高Ca濃度における活性化はすべての組み合わせについてみる事ができたものの、その程度は組み合わせによってかなり変動した。元の組み合わせであるI<sub>C</sub>C<sub>C</sub>T<sub>C</sub>とI<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>S</sub>に比べるとハイブリッドの活性化は総じて低かったが、I<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>C</sub>の場合だけは50%も高値を示した。これは超沈殿法により得られた従来の知見に一致していた。また、Ca親和性の指標である50%活性化Ca濃度はトロポニンIの種類に従って二つのグループに分れる傾向を示した。

Sr感受性に対する影響については、Ca感受性の場合とかなり異なる点のあることがわかった。Caの場合に高値を示したI<sub>S</sub>C<sub>S</sub>T<sub>C</sub>の組み合わせは元のトロポニンより低値を示した。また、I<sub>C</sub>C<sub>S</sub>T<sub>C</sub>,

第1表 ハイブリッドトロポニンのアクトミオシンATPase Ca感受性に対する影響

Troponin component	ATPase activity (n mole Pi/min/mg)		Ca <sup>2+</sup> concentration at half maximum activation (×10 <sup>-6</sup> M Ca <sup>2+</sup> )
	1.0×10 <sup>-5</sup> M Ca <sup>2+</sup> (maximum)	1.1×10 <sup>-7</sup> M Ca <sup>2+</sup> (minimum)	
I C T			
S S S	(2) 6 1. 0	1 2. 6	1. 4
S C C	(3) 5 6. 2	1 8. 8	1. 4
S S C	(2) 9 3. 2	1 7. 2	1. 1
S C S	(3) 5 2. 8	1 5. 6	1. 6
C C C	(3) 9 9. 4	1 7. 1	2. 2
C C S	(2) 5 9. 6	1 0. 5	2. 4
C S C	(2) 5 5. 8	1 4. 5	2. 8
C S S	(2) 4 4. 4	1 5. 2	2. 5

第2表 ハイブリッドトロポニンのアクトミオシンATPase Sr感受性に対する影響

Troponin component	ATPase activity (n mole Pi/min/mg)		Sr <sup>2+</sup> concentration at half maximum activation ( $\times 10^{-5}$ M Sr <sup>2+</sup> )	
	I C T	$3.6 \times 10^{-4}$ M Sr <sup>2+</sup> (maximum)		$8.5 \times 10^{-7}$ M Sr <sup>2+</sup> (minimum)
S S S	(2)	5 3. 5	1 0. 6	3. 8
S C C	(2)	5 2. 1	1 5. 4	1. 4
S S C	(2)	6 9. 7	1 1. 6	3. 8
S C S	(3)	4 3. 9	1 2. 7	1. 6
C C C	(2)	7 6. 7	1 9. 9	1. 6
C C S	(2)	5 3. 6	1 1. 9	1. 7
C S C	(3)	3 7. 1	1 1. 6	5. 3
C S S	(3)	3 7. 9	1 0. 6	6. 0

I<sub>C</sub>C<sub>S</sub>T<sub>C</sub>は元のトロポニンに比べてわずか50%の活性化を示すのみであり、Srによってうまく賦活されないことを示している。また、50%活性化Sr濃度はトロポニンCの由来によって二つに分けることができた。心筋トロポニンCを含むハイブリッドの方がSr感受性が高いことがわかった。

今後、トロポニンの構造と機能を中心として細かいフィラメント形成の機構を分子的に追究してい

く予定である。

#### 文 献

- 1) I. Ohtsuki and Y. Onoyama. *Biomedical Research of Muscular Dystrophy* (Ebashi, S. and Ozawa, E. eds), pp. 193-200 (1983).
- 2) K. Yamamoto. *J. Biochem.*, **93**, (4) in press (1983).

## VI プロテアーゼ

23. 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割 137
24. サル心筋 Ca 依存性中性プロテアーゼの性状と  
阻害物質の影響 141
25. 筋ジストロフィー・ハムスターにおける  
リソゾームプロテアーゼ活性調節の異常 145
26. 培養筋細胞における筋蛋白代謝 149
27. 筋ジストロフィー患者の血性酵素にみられる 2 種類の動態 153
28. 筋ジストロフィー症マウスに対する微生物  
プロテアーゼ・インヒビター投与の影響 157

## 23 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割

今堀和友\*

研究協力者 鈴木絃一\*\* 川島誠一\*

### はじめに

筋蛋白の代謝回転は筋の変性、再生といった発生分化において重要な役割を果たしていると考えられる。代謝回転のうち分解に関しては、カルシウムで活性化される中性プロテアーゼ (CANP) の役割が注目されるようになってきた。例えば、Salpeterらはアセチルコリンのアゴニストを筋細胞に投与した際みられる筋蛋白の分解がCANPによることを示している<sup>1)</sup>。その際CANPを活性化するのはアゴニストによる $\text{Ca}^{2+}$ の流入である。

他方CANPには、mM程度の $\text{Ca}^{2+}$ で活性化されるm-CANPと、 $\mu\text{M}$ 程度の $\text{Ca}^{2+}$ で活性化される $\mu$ -CANPとがあるが、前記 $\text{Ca}^{2+}$ の流入によっても細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がmMに達するとは思われないので、主役を演ずるのは $\mu$ -CANPであろうと思われる。

昨年度の報告において、m-CANPが自己消化により $\mu$ -CANPに変換することを示した。今年度は筋組織より直接 $\mu$ -CANPを抽出し精製することに成功したので、これにつき報告する。区別を明らかにするため、m-CANPの自己消化により得られたものを誘導型 $\mu$ -CANP、筋組織より直接精製したものを天然型 $\mu$ -CANPと呼ぶことにする。以下には、誘導型および天然型 $\mu$ -CANPの異同ならびにこれらとm-CANPとの関係についても論ずることとする。

### 材料および方法

$\mu$ -CANPの精製の材料としてはウサギ骨格筋を用いた。精製の方法と結果とは表1に示す通りである<sup>2)</sup>。この方法の特徴は、m-CANP、 $\mu$ -CANPおよび内在性インヒビターを分取精製できる点である。すなわちDEAEセルロース(DE52)のカラムクロマトグラフィーで、 $\mu$ -CANPとインヒビターとは低イオン強度で、m-CANPは高イオン強度で溶出される。ついでフェニルセファロースカラムを用いると、インヒビターは素通り画分に来るが、 $\mu$ -CANPは0.3M NaClで始めて溶出される。さらにDEAEセルロース(DE53)により共雑蛋白の大部分を除き、最後にフェニルセファロースカラムから二重勾配[NaCl(0.3M→0.0M)、エチレングリコール(0→50%)]で溶出することにより、 $\mu$ -CANPを単一に精製することに成功した。

### 実験結果

#### 1) 天然型 $\mu$ -CANPの性質

このようにして得られたウサギ骨格筋のm-CANPおよび $\mu$ -CANP活性の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を図1に示す。最大活性の半分を示すに必要な $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $K_a$ )は $\mu$ -CANPでは約40 $\mu\text{M}$ であり、m-CANPの $K_a$ (700 $\mu\text{M}$ )の1/17.5である。この値は、誘導型 $\mu$ -CANP<sup>3)</sup>およびブタ骨格筋の天然型 $\mu$ -CANP<sup>4)</sup>の $K_a$ 値にほぼ一致する。

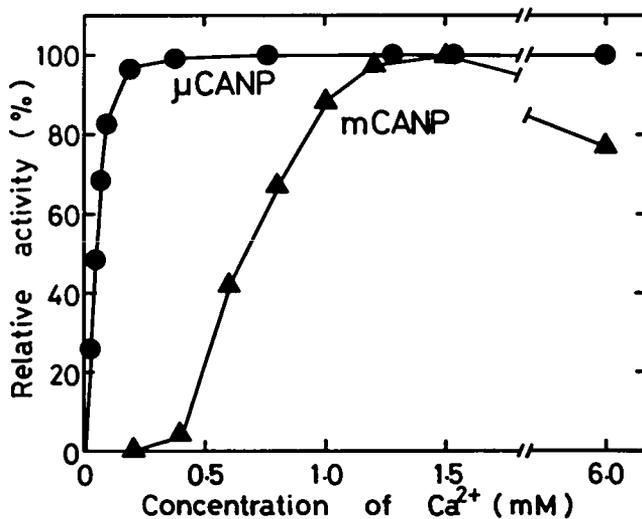
次にSDS存在下および非存在下でのポリアクリルアミド電気泳動の結果を図2に示す。まずS

\* 東京都老人総合研究所

\*\* 東京大学医学部第二生化学教室

表1  $\mu$ -CANPの精製(5 Kg)

段	階	総蛋白量 (mg)	総活性 (単位)	比活性 (単位/mg)
粗抽出液		267,500	—	—
DEAE セルロース(DE-52)		4,820	—	—
フェニルセファロース		193	1,377	7.1
DEAE セルロース(DE-53)		28.5	1,916	67.2
フェニルセファロース		2.7	436	161.5

Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the Activity of  $\mu$ CANP and mCANP図1  $\mu$ -CANP (●) および m-CANP (▲) 活性の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性

DS 非存在下での電気泳動では、天然型  $\mu$ -CANP は m-CANP より移動度が小さいので、前者は後者より塩基性が強いことが示される。このことは DEAE セルロースからの溶出の結果と一致する。誘導型  $\mu$ -CANP も、m-CANP より塩基性が強く、これまでの結果は天然型および誘導型  $\mu$ -CANP の性質が類似していることを示している。

しかしながら SDS 存在下でのゲル電気泳動の結果は、天然型  $\mu$ -CANP は m-CANP と同様、

80 K, 30 K のサブユニットからなるが、80 K サブユニットは  $\mu$ -CANP の方が m-CANP のものより大きいことを示している。2種の CANP 共泳動させた結果はこのことを明らかに証明している。さらにこの事実は、天然型  $\mu$ -CANP は誘導型のものとは異なり、m-CANP の自己消化によるものでないことを示した点で重要である。

2)  $\text{Mn}^{2+}$  による m-CANP の活性化

このように天然型  $\mu$ -CANP の存在が明らかに

Electrophoretic Banding Patterns of  $\mu$ CANP and mCANP in the Presence or Absence of SDS

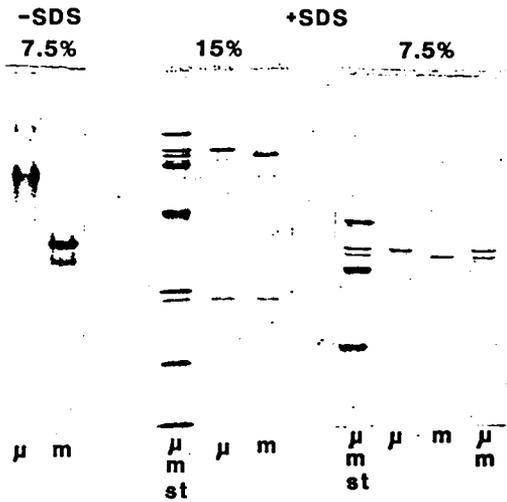


図2 m-CANP,  $\mu$ -CANP のポリアクリルアミド電気泳動  
 左より第1, 第2列は-SDS, 第3列, 第6列はマーカー,  
 3~5列は15%, 6~9列は7.5%ゲル, 9列は $\mu$ と $m$ との共泳動

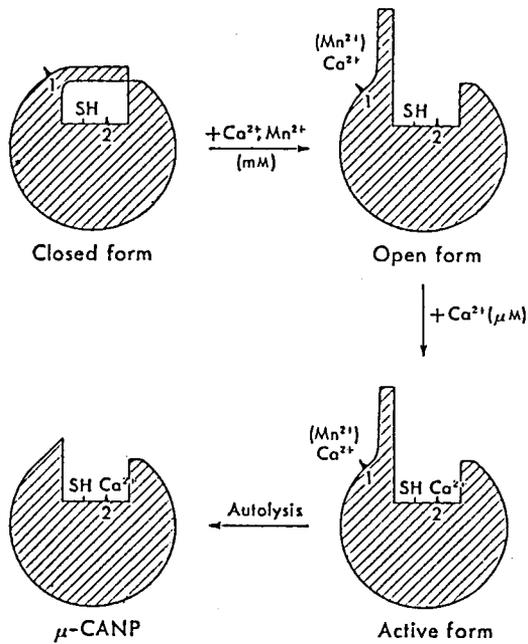


図3 m-CANP 活性化機構の模式図

なると、m-CANPの生理学的意義はますます疑問視されるようになる。しかしながら注目すべきことは、m-CANPの $Mn^{2+}$ による活性化である。 $Mn^{2+}$ はそれ自体ではm-CANPも $\mu$ -CANPも活性化する作用はもたず、その濃度を20 mM程度まで上げて活性はみられない。ところが、2 mM  $Mn^{2+}$ の存在下で、m-CANP活性の $Ca^{2+}$ 依存性をしらべてみると、図1の $\mu$ -CANPのものとはほぼ同一の曲線を与えるのである。勿論2 mM  $Mn^{2+}$ というのは非生理学的濃度ではあるが、 $Mn^{2+}$ と同様にm-CANPの $Ca^{2+}$ 感受性を上げる因子が細胞内に存在する可能性はあるであろう。そのような因子の同定もCANPの生理作用を明らかにする上で重要なことである。

#### 考 察

図1に示したm-CANP活性の $Ca^{2+}$ 依存性がS字型を示すことは、m-CANPの活性発現には複数個の $Ca^{2+}$ が協同的に作用することを示唆している。これを模式的に示したのが図3である。m-CANPには $Ca^{2+}$ 結合部位が2個あり、部位1(外側)と部位2(内側)のKaがmM,  $\mu$ Mであったとする。しかし、図から明らかなように、部位1に $Ca^{2+}$ が結合してコンホメーション変化が起きない限り、部位2には $Ca^{2+}$ の結合が起らない。逆にいえば、部位1に $Ca^{2+}$ が結合するや否や、部位2への結合も起こる。これが協同現象である。一方、部位1に結合する $Ca^{2+}$ の作用は $Mn^{2+}$ で代用できるが、部位2には $Mn^{2+}$ は結合しないと考えれば、 $Mn^{2+}$ の添加でm-CANPの

$Ca^{2+}$ 感受性が上昇することもよく理解される。さらには自己消化により、活性部位を掩う部分が除去されたとすれば、当然 $\mu$ M程度の $Ca^{2+}$ で活性化されるようになる。これが誘導型 $\mu$ -CANPである。

最後に天然型 $\mu$ -CANPであるが、次のように想像することもできる。すなわち部位1に何等かの化学修飾が起り、この修飾が部位1に対する $Ca^{2+}$ または $Mn^{2+}$ の結合と同じ効果をもたらせば、やはり $\mu$ M程度の $Ca^{2+}$ で活性化されることになる。これは天然型 $\mu$ -CANPがm-CANPより分子量が大きいという事実とも一致する。しかしながらこれはあくまで想像の域を脱せず、今後の研究にまつ他ない。

CANPの研究はごく最近世界中で多くの研究者が手をつけるようになった。m-CANPと $\mu$ -CANPとの関係や、CANPの生理学的活性化機構等が解明される日もそう遠くはないように思われる。筋の発生分化との関連はその後で明らかにされるものであろう。

#### 文 献

- 1) Salpeter, M. M., Leonard J. P. and Kasprzak, H., *Neuroscience Commentaries*, 1, 73-83 (1982).
- 2) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K., and Kawashima, S. *J. Biochem.*, 93, 291-293 (1983).
- 3) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y., and Imahori, K. *J. Biochem.*, 90, 275-278 (1981).
- 4) Dayton, W. R., Schollmeyer, J. V., Lepley, R. A. and Cortes, L. R. *Biochim. Biophys. Acta*, 659, 48-61 (1981).
- 5) Suzuki, K. and Tsuji, S., *FEBS Letter*, 140, 16-18 (1982).

## 24 サル心筋Ca依存性中性プロテアーゼの 性状と阻害物質の影響

高橋 健 治\*

研究協力者 原

薫\* 市原 慶 和\*

最近、筋組織に依存するCa依存性中性プロテアーゼ(以下CANPと省略)<sup>1)</sup>に関する研究が進み、筋組織の病態との関連が推定されて来ている。CANPの生理的役割や病態との関係を追究する上で、CANP自身の精製ならびに諸性質の検索が基本的に重要である。骨格筋CANPについてはすでに、種々の動物からの精製と性質の解明が進められ、活性発現にmMオーダーのCaイオン濃度を必要とするものと、 $\mu$ MオーダーのCaイオン濃度で活性を示すものとの2種が存在することが知られてきている。しかし、骨格筋にくらべて、心筋に関するこの種の研究はまだ大変遅れている。本研究では、サル心筋よりCANPを精製し、その諸性質を究明するとともに、種々の低分子量阻害剤の影響を比較検索した。<sup>2,3)</sup>

### 実験材料および方法

CANPの精製 — ニホンザル心筋500gを4倍容量の20mM Tris-HCl(pH 7.5) - 1mM EDTA中でホモジナイズし、上清をpH 4.7に調整し、1夜放置する。沈澱を集め、20mM Tris-HCl(pH 7.5) - 0.1M NaCl - 1mM EDTA - 5mM 2-メルカプトエタノールに溶かし、DE-32セルロースカラム(3×36cm)にかけて分別する。0.25M NaClで溶出される分画を集め、セファロースCL-6Bカラム(1.6×104cm)を通し、活性分画をさらにDEAE-セファセルカラム(1.3×30cm)

に通す。0.22M NaCl附近で溶出する活性分画を集め、さらに、*l*-アミノフェニルメルクリ酢酸をブロムシアン活性化セファロース4Bに結合させたアフィニティーカラム(1.0×5.6cm)に吸着させる。20~40mM 2-メルカプトエタノールで溶出される分画を集め、さらにセファデックスG-150カラム(1.3×90cm)を通し、活性分画を集める。

酵素活性の測定 — Toyo-okaとMasakiの方法<sup>4)</sup>を若干改変して用いた。すなわち、アルカリ変性カゼイン(0.5%溶液, pH 7.5)を基質として、10mM 2-メルカプトエタノール, 5mM CaCl<sub>2</sub>存在下で、25°C, 60分間酵素と反応させ、過塩素酸可溶性上清の280nmにおける吸光度の増加を測定した。他の蛋白基質に対する活性もこれに準じた方法で測定した。

### 実験結果

表1にCANPの精製の結果を示した。この方法によりpH処理のステップから、見かけ上約1800倍に精製された標品が得られた。精製標品はセファデックスG-150カラムを用いる方法で、分子量が約110,000と算出された。ポリアクリルアミド電気泳動では近接する2本のバンドに分離し、いずれも活性を示した。SDS存在下では、さらに一方は分子量74,000と28,000のバンドに、また他方は分子量74,000と26,000のバンドに分かれた。この結果は、両者とも2個のサブユニットから構

\* 京都大学霊長類研究所生化学研究部門

表1 サル心筋 CANP の精製

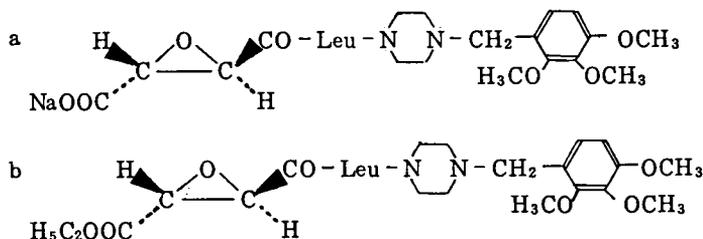
ステップ	容量 (mℓ)	全蛋白量 (mg)	全活性 (単位)	比活性 (単位/mg)
粗抽出液	2,290	26,500	—	—
pH 処理	70	976	56	0.058
DE-32	180	91.0	514	5.64
セファロースCL-6B	18	13.7	280	20.4
DEAE-セファセル	40	6.7	248	37.0
有機水銀セファロース4B	12	1.6	164	102.6

出発試料：500g

表2 CANP 活性に対する種々の阻害剤の影響

酵素と阻害剤は活性測定前に 25℃ で15分間インキュベートした。

阻害剤	濃度 (mM)	阻害度 (%)
EDTA	1	100
DFP	1	0.7
p-クロロメルクリフェニル スルホン酸	1	31.8
TLCK	1	55.6
TPCK	1	61.6
ヨード酢酸	1	90.7
キモスタチン	0.16	98.0
アンチパイン	0.16	100
ロイペプチン	0.21	100
E-64	0.28	100
NP-176(R, R) <sup>a</sup>	0.19	95.4
NCO-700 <sup>b</sup>	0.18	64.9
大豆トリプシン インヒビター	0.005	0



成されることを示している。両CANP共比活性は同じであり、以後の実験には両者を分離せずに用いた。カゼイン基質に対する最適pHは約8.0であり、活性発現には還元剤が必要である。10 mM 2-メルカプトエタノール存在下での活性を100とした場合、天然の還元剤である還元型グルタチオンでは1 mMで34%、10 mMで111%、またシステインでは1 mMで77%、10 mMで152%の活性を示した。表2には、種々の阻害剤の効果を示してある。活性はEDTA、ヨード酢酸、キモスタチン、アンチパイン、ロイペプチン、またエポキシコハク酸誘導体であるE-64やNP-176 (R, R)等によって強く阻害された。表3には、エポキシコハク酸の各種誘導体の阻害効果を示してある。この結果は、エポキシコハク酸がトランス型であることと、その2個のカルボキシル基の一方が遊離カルボキシル基であること ( $R_1=OH$ ) が必須であることを示している。また、他方のカルボキシル基側にL型の疎水性アミノ酸が存在することが阻害活性の増強に重要である。これらの誘導体によるCANPの阻害効果は、同じSHプロテアーゼであるパピインのそれにくらべて20~1500倍弱く、阻害の濃度依存性等にも若干差異があり、阻害様式が両者で多少異なることが示唆された。CANPのCaイオン要求性は極めて高く、それ以外の金属イオンではSr, Mn, Niの存在下で若干の活性が認められたのみである。一方、0.4 mM  $Ca^{2+}$  存在下(この濃度では活性はない)に、2 mMのSrまたはMnイオンを加えると5 mM  $Ca^{2+}$  存在下での活性の約50%程度の活性があらわれた。これは両金属イオンが協同的に作用していることを示唆している。

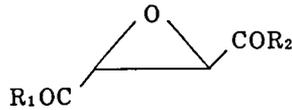
種々の蛋白質に対する作用を調べたところ、カゼインはよく分解するが、血清アルブミン、オвалブミン、フィブリノーゲン、ヘモグロビンにはほとんど作用せず、また筋肉蛋白質では、トロポミオシン、トロポニン、ミオシンH鎖に作用するがミオシンL鎖には作用しないことが知られた。サル心筋ミオフィブリルに作用させると、分子量

30,000, 89,000 および 110,000 の分解産物の生成が認められ、また分子量 54,000, 41,000 および 28,000 の筋蛋白成分の分解がみられた。これらの分解はEDTAやNP-176 (R, R)等により阻害された。なおCANPを4 mM  $Ca^{2+}$  存在下にインキュベートすると、0.2 mM  $Ca^{2+}$  で活性を示す分子種の出現が認められた。

### 考 察

以上の結果から明らかなように、本研究で精製されたCANPはm Mオーダーの  $Ca^{2+}$  を必要とするいわゆるm-CANPである。μMオーダーの  $Ca^{2+}$  で活性化されるμ-CANPは、自己消化でも生ずることが示されたが、天然のμ-CANPの存在は検知できなかった。これは、おそらく天然のμ-CANPが存在量が少ない上に、内在性の阻害剤と結合して存在するためであろうと思われる。m-CANPは、精製の初段階に活性が検知できなかったり、あるいは低いことから、天然の阻害剤と結合して存在することは明らかである。実際、この阻害剤はDEAE-セルロースカラムからCANPの溶出位置(0.25 M NaCl)より前、1.2 M NaCl濃度で溶出された。本研究で得られた2種のm-CANPについては両者とも本来から存在するものなのか、あるいは一方は他方の自己消化産物であるのか、いずれの可能性もあり、今後の問題として残されている。分子量約7万と3万のサブユニットからなるという結果は、哺乳動物の骨格筋CANPの場合と類似している。また、活性のpH依存性、阻害剤の効果、金属イオンの影響と協同効果、自己消化によるμ-CANP活性の出現なども、微妙な差異はあるが、大まかにみて骨格筋CANPの場合と非常に似ているといえよう。したがってまた、サルに最も近いヒトの心筋CANPもサル心筋CANPと非常に類似した性質を有するものと予想される。サル心筋CANPについては当面μ-CANPの精製と同定、またこれらCANPの天然の阻害剤の検索、同定などの問題が残っており、また心筋CANP全体から見ると、今後

表3 CANP 活性に対する種々のエポキシコハク酸誘導体の阻害度



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	I D <sub>50</sub> (μM)
OK	Leu-Leu-OEt	1.8
"	Leu-NH <sub>2</sub>	3.9
"	Leu-OEt	8.4
"	Leu-Leu-Leu-OEt	8.8
"	Val-N-Et	15
"	Tyr-OEt	17
"	Leu-OK	34
"	D-Leu-OEt	39
"	OEt	200
"	β-Ala-OEt	410
OEt	Leu-OK	130
LeuOK	Leu-OEt	420
LeuOK	Leu-OK	>1100
NH <sub>2</sub>	OEt	2600
OH	OH	>3800
OK	Leu-OEt ( <i>cis</i> )	>1600

その生理的意義の究明, また筋ジストロフィー症や心筋硬塞などの疾患との関連の解明が特に重要である。

#### 文 献

- 1) 今堀和友: Ca 依存性プロテアーゼと生体制御, 蛋白質核酸酵素, 25, 483-489, 1980.
- 2) Hara, K., Ichihara, Y., and Takahashi, K.: Purification and Characterization of a Calcium-Activated Neutral Protease from Monkey Cardiac Muscle, *J. Biochem.*, 93, 1983, in press.
- 3) Hara, K., and Takahashi, K.: Inhibition of calcium-activated neutral protease of monkey cardiac muscle by epoxysuccinic acid derivatives, *Biomed. Res.*, 4, 121-124, 1983.
- 4) Toyooka, T., and Masaki, T.: Calcium-activated Neutral Protease from Bovine Ventricular Muscle: Isolation and Some of Its Properties, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11, 769-786, 1979.

## 25 筋ジストロフィー・ハムスターにおける リゾゾームプロテアーゼ活性調節の異常

勝 沼 信 彦\*

研究協力者 木 南 英 紀\*

### はじめに

骨格筋の平均的なタンパク分解の速度は肝、腎などの臓器と比べると極めて遅く、その一因は細胞内タンパク質分解系としてのリゾゾームが少なく、従ってリゾゾーム・カテプシン類の活性が極めて低いことにあると思われる。昨年度はこのリゾゾームのチオール性カテプシンに群特異的に作用する内在性インヒビター(TPI)の諸性質について報告すると共に、ジストロフィー・ハムスター骨格筋におけるチオール性カテプシンの活性増加とインヒビターの増加について報告した。今回はジストロフィー・ハムスターでのカテプシンとTPI活性の変動の詳細を述べ、筋ジストロフィー・ハムスターにおけるリゾゾームプロテアーゼの活性調節の異常を考察する。

### 材料と方法

ジストロフィー・ハムスター(BIO14.6系)及び対照動物としてのF<sub>1</sub>Bは18週令のものを使用した。骨格筋、心筋、平滑筋はPolytronを用いて、5倍量の0.1 mM EDTA, 20 mM KCl, 10 mM Hepes pH 7.5を含む0.25 M sucroseでホモゲナイズし、12000 × g, 20分遠心し、上清をTPIの測定に、沈澱は元と同量のバッファーにけん濁後、もう一度ホモゲナイズし、リゾゾーム水解酵素の測定に供した。肝及び脳はPotter-Elvehjem型ホモゲナイザーでホモゲナイズ後、ミトコンドリアーリゾゾーム分画及び上清分画を調製し、それぞれカ

テプシン及びTPI活性測定のために用いた。筋細胞分画は以下のように行った。ジストロフィー・ハムスターのひらめ筋を5倍量の上記バッファー中でPolytronホモゲナイザーを用い、Max speedの80%、5秒ホモゲナイズし、800 × g, 5分の遠心を行った。沈澱分画を同バッファーで洗滌遠心をくり返し、沈澱分画をMyotibrillar分画とし、併せた上清は15,000 × g, 20分遠心し、沈澱分画をミトコンドリアーリゾゾーム分画、上清をリゾゾーム後上清分画とした。カテプシンB & LはSuc-Tyr-Met-βNAを用いて、カテプシンCはGly-Arg-βNAを用いて、Barrettの方法<sup>1)</sup>で測定した。β-glucuronidaseはp-nitrophenyl-β-glucuronideを用いてKoldovskyらの方法<sup>2)</sup>で測定した。酸フォスファターゼはIgorashiらの方法<sup>3)</sup>で測定した。TPIはラット肝より精製したカテプシンHに対する阻害で測定した。<sup>4)</sup>

### 結 果

ジストロフィー症におけるTPIの測定に先立ち、筋粗抽出液を用いての測定法の検討を行った。骨格筋、心筋などの臓器ではリゾゾームを破壊せずに上清分画を調製することは極めて困難であり、ホモゲナイズ中に上清に存在するTPIとリゾゾーム中のカテプシンが結合する可能性が高い。そこでTPIが熱処理に耐性であり、pH 3.0以下ではTPIとカテプシン複合物が解離しやすい性質を利用して、筋ホモジネート上清分画をpH 2.5、各種温度で1分熱処理してTPIの活性を測定した。

\* 徳島大学医学部酵素研・酵素化学

図1に示す如く、pH 2.5での熱処理にはTPIは安定であり、以下の実験では80°, 1分の熱処理を行った。熱処理なし、あるいは50°以下の熱処理では、カテプシン活性が残存しており、TPIを定量的に測定することは難しい。そこで、筋ジストロフィー・ハムスター18週令のひらめ筋(赤筋)、長指伸筋(白筋)、横隔膜、心筋、食道平滑筋、空腸平滑筋、肝及び脳におけるカテプシンB&LとTPIの活性を測定した。(表1)昨年度の報告のように骨格筋ではどの筋においても、カテプシン活性の上昇が認められる。赤筋の方が白筋より上昇率が高いようにみられるが、他の筋についても検討する必要があると思われる。TPIの測定法の確立により、TPIもカテプシン活性と平行して増えていることが確認された。食道平滑筋と空腸平滑筋ではカテプシン活性で著しい差がみられ、空腸の方が圧倒的に高い。空腸では真にSvc-Tyr-Met- $\beta$ NAがカテプシンBとLだけを測定しているかどうか検討してみる必要がある。食道平滑筋がなぜTPIが高いのか現在のところ意味は不明である。平滑筋では食道のカテプシンがジストロフィーでやや上昇しているが、空腸では変化がなく、TPIはどちらの組織でも上昇していない。心筋はジストロフィー・ハムスターでは骨格筋と並んで障害を受ける組織であり、事実、カテプシン、TPIとも有意の活性上昇が認められるが、骨格筋ほど著明ではない。脳ではカテプシン、TPI両活性とも正常とジストロフィー症に全く差はない。肝臓では約2倍のカテプシン活性の上昇がある。単一細胞でカテプシン活性の上昇がみられるかどうかを調べるため、フィコールバックを用いてリンパ球を集め、カテプシン活性を測定したが、正常、ジストロフィー症間には差が認められなかった。

ジストロフィー症骨格筋におけるカテプシン活性の上昇がリソゾームの数の増加に基づくものか、それともカテプシン活性の上昇のみを上昇かを調べるため、各種のリソゾーム酵素活性を測定した。表2に示す如く、ジストロフィー症で活性の上昇するものとほとんど上昇しない酵素に分けられるが、

カテプシンB&Lの特異的な上昇とはいえない。そこで、骨格筋の細胞分画を行い、実際にリソゾーム分画の活性が増えているかを検討した。骨格筋の細胞分画は極めて難しく、確立した方法はなすが、敢えて方法の項に記載した如く分画を行った。(表3)リソゾームの標識酵素 $\beta$ -グルクロニダーゼは今回の分画法では全ての分画に活性の分布が認められるが、比活性で見るとミトコンドリア・リソゾーム(ML)分画が圧倒的に高い。ジストロフィー症でみられる $\beta$ -グルクロニダーゼの活性上昇は活性分布のパターンに変化なく、ML分画ではその活性上昇に相応して比活性の上昇が認められる。この結果はジストロフィー症ではリソゾームの数あるいは量が増えていることを示唆している。しかし、骨格筋中のリソゾームの数が増えるとすれば、骨格筋中の各種リソゾームの酵素活性が平行して増えねばならないが、そうではない。(表2)従って、外来性のリソゾームが増えたと考えられる。

## 考 察

我々の教室ではカテプシンB及びHの構造に関する研究を進め、その全一次構造を千谷、滝尾らの共同研究で決定している<sup>5)</sup>。又、その内在性インヒビターの詳しい性格づけも行なったが<sup>6)</sup>、最近このTPIは酸化型と還元型があり、前者は不活性、後者が活性型であることが明らかになってきた。ジストロフィー骨格筋にみられるTPIの上昇の機作及びTPIのin vivoの役割りはまだわからないが、ジストロフィー筋内のGSH, GSSG, バランスの変化もTPIの活性型の量を知る上で重要となってきた。ジストロフィー症におけるカテプシン活性の上昇は骨格筋で最も強く、もう一つの障害部である心筋では著明でない。TPIの変動もほぼカテプシン活性と平行している。骨格筋のカテプシン活性の上昇は筋内のリソゾームの増加というよりも、外来性のたとえば、強いカテプシン活性をもつマクロファージのリソゾームに由来することが示唆された。(表2, 3)従って、ジストロフィ

The centrifuged supernatant at 12,000 xg, 20 min of the homogenate of soleus muscle from dystrophic hamster was heated at the indicated temperature for 1 min. After the centrifugation and adjusting pH 7, TPI was determined.

Fig. 1. Heat Stability of TPI.

Table 1. Activities of Cathepsin B & L and Thiol Proteinase Inhibitor in Various Tissues of Normal (F<sub>1</sub>B) and Dystrophic Hamster

Tissue	Cathepsin B & L		TPI	
	mU/g tissue		mU/g tissue	
Soleus M.	40.9±6	108±40	132±14	341±72
Ext.Dig.Long.M.	58.8	101	123	205
Diaphrag.M.	34.5	81.1	130	467
Esophagus M.	16.3	30.6	754	826
Jejunum M.	416±41	438±35	279±20	269±13
Heart	233±17	289±101	182±6	236±8
Lung	548±90	1072±202	426±19	414±13
Brain	252±18	253±23	234±14	238±10

N=5

Table 2. Activities of Lysosomal Hydrolases and TPI in Biceps Femoris Muscle and Myocardium of Dystrophic Hamsters

Enzymes	Biceps Femoris		Myocardium	
	Normal	Dystrophy	Normal	Dystrophy
	mU/g tissue			
Cathepsin B & L	340±6.8	97.6±30.2	233±17	289±101
Cathepsin C	274±34	304±37	976±91	1620±380
β-Glucuronidase	9.1±4.2	49±9.9	—	—
Acid phosphatase	758±68	743±60	1510±110	1490±120
TPI	144±39	539±57	182±6	236±8

N=10

Table 3. Subcellular Distribution of β-Glucuronidase in Soleus Muscle of Normal and Dystrophic Hamsters

Fraction	Normal		Dystrophy		
	Total activity	Specific activity	Total activity	Specific activity	
	mU	%	mU	%	mU/mg
Homogenate	51.0(100)	0.11	152(100)	0.31	
Myofibrillar	24.5(48)	0.087	78(51)	0.26	
ML*	3.64(14)	0.70	20(13)	2.11	
PS**	19.4(38)	0.14	54(35)	0.37	

\* Mitochondrial-lysosomal fraction

\*\* Postmitochondrial-lysosomal supernatant

一症における筋タンパクの崩壊がリソゾームのチオール性カテプシンの活性増加と密接な関係があるとしても、発症の初期過程への関与はなく、症状の進展過程への関与と考えるべきだろう。

## 文 献

- 1) Barrett, A. J.: *Anal. Biochem.*, 47: 280, 1971.
- 2) Koldovsky, O. & Palmieri, M.: *Biochem. J.*, 125: 697, 1971.
- 3) Igarashi, H. & Hollander, V. P.: *J. Biol. Chem.*, 243: 6084, 1968.
- 4) Kominami, E., Wakamatsu, N. & Katunuma, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 99: 568, 1981.
- 5) Takio, K., Towatari, T., Kominami, E., Wakamatsu, N., Katunuma, N. & Titani, K.: In *Proteinase Inhibitors—Medical and Biological Aspects* (edited by Umezawa, H., Holzer, H. & Katunuma, N.), Springer-Verlag, Heiderberg, in press, 1983.
- 6) Kominami, E., Wakamatsu, N., & Katunuma, N.: *J. Biol. Chem.*, 14648, 1982.

## 26 培養筋細胞における筋蛋白代謝

杉田 秀夫\*

研究協力者 石浦 章一\*

### 目 的

骨格筋の蛋白代謝の詳細な機構を知る目的で、ニワトリ胚より単離した筋細胞の蛋白合成、並びに分解を測定した。また、種々のプロテアーゼ阻害剤の効果もあわせて測定した。

### 材料および方法

#### (1) 培養方法

ニワトリ12日胚から胸筋をとり出し、江橋、小浜の方法で6日間培養した<sup>1)</sup>。条件は、80% Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), 馬血清10%, ニワトリ胚抽出物10%で培養を始め、2日目からMEM 80%, 馬血清15%, 胚抽出物5%に切りかえた。このような培養条件(37℃, 5%CO<sub>2</sub>-95% air)では、筋芽細胞は3日目頃からfuseしはじめ、6日目には太い筋管細胞で皿がおおわれるまでになった。

#### (2) 蛋白代謝の測定

培養7日目に1μCi/mlの<sup>3</sup>H-Leuを加え、24時間培養を続けることによって蛋白質を標識した。この時点でのPCA不溶性カウントを合成量と仮定した。次いで、培養液を除き、10mlのMEMで3回洗滌して過剰の<sup>3</sup>H-Leuを除いた(<0.1%)後、1晩培養を続け、標識された(遊離)アミノ酸の外液への遊離(A), 並びに蛋白にとりこまれた標識アミノ酸の減少(B)の2つを指標に蛋白質の分解量を計算した。

A法はより感度の高い方法で、<sup>3</sup>H-Leuを除

いた後、一定時間培養を続け、外液0.8mlに25% PCA 0.2mlを加えて4℃1時間放置した後、3000rpm 5分間遠心し上清のpHを中性にあわせた後、カウントを測定した。実験終了後、PCAにて全蛋白を沈澱させ残存放射活性を測定した後、次式にて分解量を計算し%表示した。

$$\text{分解量(\%)} = \frac{\text{外液に流出した総カウント}}{\text{残存カウント} + \text{外液に流出した総カウント}} \times 100$$

B法は、感度の点ではA法に劣るが、特定の蛋白質の挙動が測定できるため、一便法だと考えられる。実験終了後、Guba-Straub溶液、10mM ATP, 10mM Mg溶液を細胞に加え、4℃2時間抽出することによって粗アクトミオシン分画を得た。塩濃度を下げ、蛋白を沈澱させた後、SDS電気泳動を行い、ミオシンH鎖とアクチンの部分を切りとり、25%ピリジン抽出でCBB-タンパク量を定量し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>にて溶解させ放射活性を測定した。誤差を最小限にする目的で、同一サンプルの量を変化させて泳動し少なくとも5回の平均をとって1点とした。また、個々のゲルの蛋白量は、同一ゲル内の標準蛋白量から逆算した。

### 結果と考察

(1) A法による、システィンプロテアーゼインヒビター、E-64-cの蛋白代謝に及ぼす効果の判定

E-64-cは細胞内の代表的なエンドプロテアーゼであるカテプシンB, L及びCa依存性プロ

\* 国立武蔵療養所神経センター 疾病研究第一部

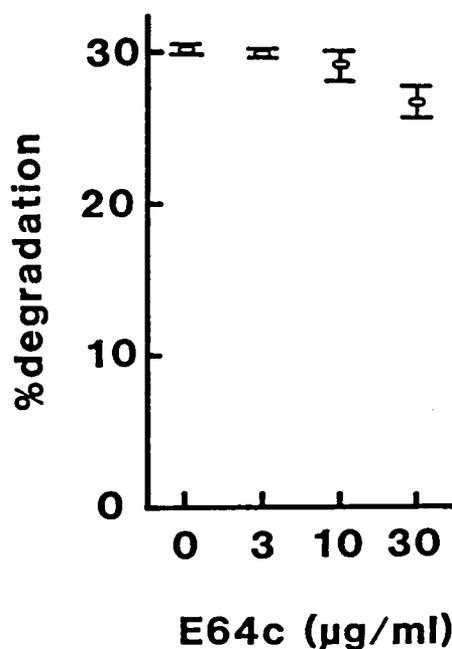


図1 E-64-Cの蛋白分解に及ぼす影響  
縦軸は前処理(24時間,  $1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$   $^3\text{H}\text{-Leu}$ )にて合成された蛋白質の, 次の24時間における分解量(%)を表す。

テアーゼを不可逆的に阻害することが知られている。我々は、培養外液にE-64-cを添加し、24時間の培養における蛋白分解の阻害の程度を調べた。図1はE-64-cの濃度依存性を見たものである。縦軸は24時間の間に標識された蛋白質(PCA不溶性のもの)に対する次の24時間での分解量(%表示)を示したもので、E-64-cの濃度を上げると明らかに分解量が低下していくのがわかる。外液に遊離する放射活性はその大部分がPCA可溶性分画に回収され、薄層クロマトグラフィーで遊離ロイシンであることから、ロイシンの生体内での代謝はあまり行われていないようであった。

また、 $^3\text{H}\text{-E-64-c}$ を使った実験により、24時間の培養では外液の40%が細胞内にとり込まれることが明らかになった<sup>2)</sup>。これらの結果はE-64-cがプロテアーゼのKi( $\sim 2 \mu\text{M}$ )<sup>3)</sup>より十分に細胞内にとり込まれていることを示している(特に  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  以上の添加の場合)。にもかかわら

ず、阻害の程度が低いことから次のことが考えられる。(1)E-64-cは細胞内のどこかに濃縮されプロテアーゼを阻害していない。(2)システインプロテアーゼは細胞内蛋白質の代謝に関与していない。(3)A法で見ているのは、24時間の間に標識されたいわばshort-lived proteinであるから、これらの分解についてはシステインプロテアーゼは関与しない。などが考えられる。

(2) B法によるE-64-cの蛋白代謝に及ぼす効果の判定

B法(図2)は、蛋白にとり込まれた放射活性がいつまで残存しているかを判定する方法で、縦軸は比活性(arbitrary unit)である。横軸はSDSゲルを2mmの等間隔に切ったもので、slice No 1がミオシンH鎖(分子量20万), slice No 9がアクチン(分子量4.3万)である。実線は阻害剤を添加しない場合の実験で、一見分解量と分子量の間には既報のごとくの関係は見られない。分子量が極端に大きいと分

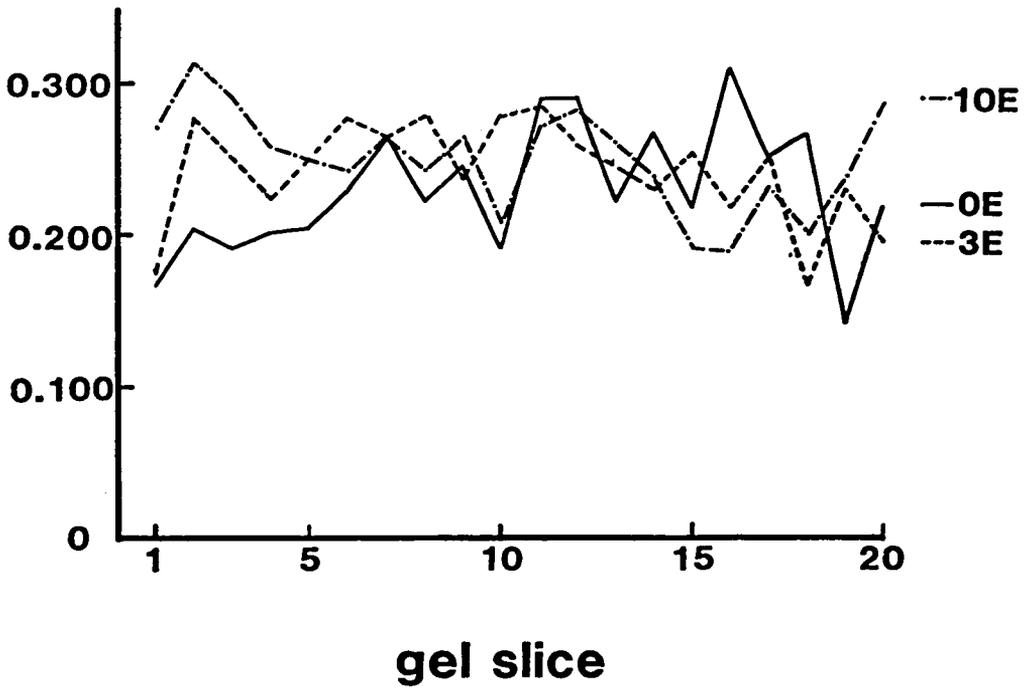


図2 E-64-cの粗アクトミオシン分解に及ぼす影響  
E-64-c(E)の濃度は  $\mu\text{g/ml}$ 。

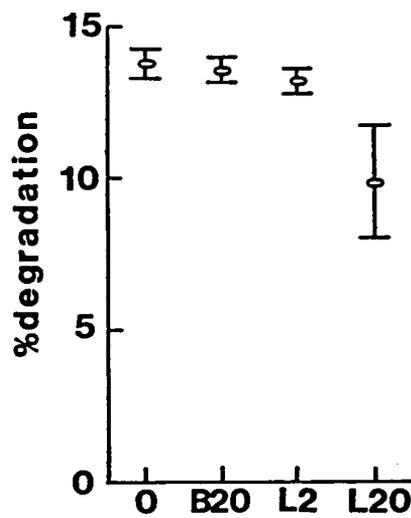


図3 ベスタチン(B), ロイペプチン(L)の蛋白分解に及ぼす影響  
縦軸は図1と同じ, 濃度は  $\mu\text{g/ml}$ 。

解が速い傾向はあるようである。E-64-c  $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 外液に添加したときの図もあわせて示した。分子量が20万付近の蛋白質の分解を阻害剤が抑制しているように見えるが、有意差はなかった。その理由として考えられるのは前述した感度の問題で、B法の分母が、A法のような標識された総蛋白量ではなく、未標識のものも含む全蛋白量であるため、差が出にくいものと思われる。

### (3) その他のプロテアーゼインヒビターの効果の判定

次にアミノペプチダーゼB様酵素の阻害物質であるベスタチンと、セリン・システインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンの効果をA法で検索した<sup>4)</sup>。

まずベスタチン(図3参照)であるが、本法では $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では有意な分解抑制は見られなかった。方法として、PCA可溶性分画を見ているため、短いペプチドはPCA上清に来ることから、

アミノペプチダーゼ抑制の効果はこの方法では見られない可能性もあり、今後検討の余地がある。

一方、ロイペプチンは明らかに $20\mu\text{g}/\text{mL}$ で蛋白分解を抑制した。しかし抑制量は培養肝細胞で報告されているものよりも低く<sup>5)</sup>、筋膜の薬剤透過性、ロイペプチンの細胞内濃縮機構の差など、筋と肝臓ではかなり性質に違いがあるためであろうと考えられた。

### 文 献

- 1) 江橋節郎, 小浜一弘, 白尾智明, 三谷昌平: 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(E-64)の開発研究報告書, 昭和55年度, pp. 82-92, 1981.
- 2) 石浦章一, 山下茂, 小浜一弘, 杉田秀夫, 江橋節郎: 同上, 昭和56年度報告書, pp. 91-95, 1982.
- 3) Ishiura, S., Hanada, K., Tamai, M., Kashiwagi, K. and Sugita, H.: *J. Biochem.*, **90**, 1557-1560, 1981.
- 4) 梅沢浜夫 編: 微生物の二次代謝産物に由来する難病治療薬(ロイペプチン)の開発研究, 昭和56年度報告書.
- 5) Seglen, P. O., Grinde, B. and Solheim, A. E.: *Eur. J. Biochem.*, **95**, 215-225, 1974.

## 27 筋ジストロフィー患者の血性酵素にみられる 2種類の動態

青柳高明\*

研究協力者 和田孝雄\* 三吉野産治\*\*

### 緒言

筋ジストロフィーマウスおよびニワトリの筋肉を含む各臓器内の酵素活性の変動を調べ、従来注目されていたエンドペプチダーゼの異常のみでなく、アミノペプチダーゼ、グリコシダーゼ、フォスファターゼ、エステラーゼなどの異常も関与していることを明らかにした。<sup>1-3)</sup>一方、筋ジストロフィー患者血清中の酵素活性についてはCK, GOT, GPT, LDH, Aldolase などについては調べられているが、その他の酵素群については未だ報告がない。

本報告は細胞膜酵素<sup>4,5)</sup>および臓器内で異常な変動が認められた酵素群を指標にして Duchenne muscular dystrophy (DMD)患者血清中の酵素活性を経時的に調べ、同時に臨床的指標として用いられている酵素群との関連性について報告する。<sup>6)</sup>

### 実験材料および方法

DMD患者24名、気管支喘息患者14名および正常者9名より採取した静脈血清について、11種類のアミノペプチダーゼ(AP), エンドペプチダーゼ、アンジオテンシン転換酵素(Conv-Enz), スルファターゼ、フォスファターゼ、エステラーゼ、リボヌクレアーゼ(RNase)などの活性を測定した。CK, GOT, GPT, LDH, Aldolase は臨床検査法(東芝キット)により測定した。基質ならび

に測定法は既に報告した通りである。<sup>b,2,6)</sup>

患者は病状の進行に応じて3群に分けた。すなわち、第1度は歩行可能な9名、第2度は車椅子を利用している10名、第3度はベッド臥床の5名である。

### 結果および考察

酵素活性の測定にあたって、予め酵素濃度および経時変化と活性との間に直線関係のあることを確認した。<sup>1)</sup>重症度に関して分類した3群の患者と正常被検者との酵素活性の比較を行ない、以下の結果を得た。

第1度の患者群ではAP-A, Gly-AP, Ser-AP, Leu-AP, Phe-AP, Trp-AP, Gly-Pro-AP などほとんどのアミノペプチダーゼが有意な活性上昇を示した。しかし、第2度、第3度と病状の進行にともない、これらの酵素群の活性は低下する傾向にあることが認められた。一方、トリプシン様酵素、カテプシンC、エステラーゼ、RNaseなどは第1度の患者群では有意な低下が認められた。しかし、病状の進行にともない、これらの活性は上昇する傾向を示した。

次に、病状の進行にともなう酵素変化の推移を別の角度から検討するために、回帰分析を行なった。<sup>7)</sup>この分析に際しては、重症度に関係なく全ての患者を一群にまとめ、病状の持続期間の指標として年齢を用いた。年齢の増加にともなう血清酵素活性の推移を検討した結果、酵素活性の変動は

\* 微生物化学研究所

\*\* 国立療養所 西別府病院

Table I  
Relationship between Serum Enzyme Activity and Age of Patients  
with Duchenne Muscular Dystrophy

Enzyme	Regression lines	r	Significance	n
AP-A	$\log Y = -0.934 \log X + 1.810$	-0.732	***	24
AP-B	$\log Y = -0.047 \log X + 1.190$	-0.143	NS	24
Gly-AP	$\log Y = -0.425 \log X + 1.373$	-0.519	**	24
Ala-AP	$\log Y = -0.101 \log X + 1.930$	-0.217	NS	24
Ser-AP	$\log Y = -0.277 \log X + 0.814$	-0.473	*	24
Leu-AP	$\log Y = -0.189 \log X + 1.648$	-0.355	(*)	24
Met-AP	$\log Y = -0.001 \log X + 1.626$	-0.004	NS	24
Phe-AP	$\log Y = -0.113 \log X + 1.736$	-0.299	NS	24
Trp-AP	$\log Y = -0.197 \log X + 1.384$	-0.418	*	24
Gly-Pro-AP	$\log Y = -0.742 \log X + 1.979$	-0.603	**	24
Gly-Pro-Leu-AP	$\log Y = 0.132 \log X + 0.537$	0.183	NS	24
Trypsin-like	$\log Y = 0.231 \log X + 2.702$	0.643	***	24
Cathepsin C	$\log Y = 1.063 \log X - 0.643$	0.773	***	24
Converting Enzyme	$\log Y = -0.419 \log X + 1.282$	-0.493	*	24
Sulfatase	$\log Y = -1.062 \log X + 0.536$	-0.437	*	24
Phosphatase	$\log Y = -0.466 \log X + 0.877$	-0.578	**	24
Ac-Cholinesterase	$\log Y = -0.059 \log X + 0.793$	-0.025	NS	24
Esterase	$\log Y = 0.225 \log X + 2.943$	0.281	NS	24
RNase	$\log Y = 0.402 \log X + 1.215$	0.469	*	24
CK	$\log Y = -1.676 \log X + 4.274$	-0.884	***	24
GOT	$\log Y = -1.065 \log X + 3.042$	-0.841	***	24
GPT	$\log Y = -1.093 \log X + 3.112$	-0.755	***	24
LDH	$\log Y = -0.734 \log X + 3.769$	-0.792	***	23
Aldolase	$\log Y = -0.777 \log X + 2.169$	-0.722	***	23

(\*):  $P < 0.1$ , \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$

Relationship between Serum Enzyme Activity and  
Age of Patients with Asthma

Enzyme	Regression lines	r	Significance	n
AP-A	$\log Y = -0.100 \log X + 0.712$	-0.517	(*)	14
AP-B	$\log Y = 0.079 \log X + 1.107$	0.293	NS	14
Gly-AP	$\log Y = 0.098 \log X + 0.705$	0.333	NS	14
Ala-AP	$\log Y = 0.052 \log X + 1.733$	0.178	NS	14
Ser-AP	$\log Y = -0.077 \log X + 0.355$	-0.243	NS	14
Leu-AP	$\log Y = 0.073 \log X + 1.313$	0.250	NS	14
Met-AP	$\log Y = 0.038 \log X + 1.631$	0.117	NS	14
Phe-AP	$\log Y = 0.168 \log X + 1.436$	0.623	*	14
Trp-AP	$\log Y = 0.069 \log X + 1.036$	0.229	NS	14
Gly-Pro-AP	$\log Y = 0.018 \log X + 1.111$	0.044	NS	14
Gly-Pro-Leu-AP	$\log Y = 0.052 \log X + 0.955$	0.087	NS	14
Trypsin-like	$\log Y = -0.063 \log X + 3.038$	-0.076	NS	14
Cathepsin C	$\log Y = 0.602 \log X + 0.465$	0.320	NS	14
Converting Enzyme	$\log Y = -0.105 \log X + 0.935$	-0.294	NS	14
Sulfatase	$\log Y = -0.385 \log X + 0.201$	-0.357	NS	14
Phosphatase	$\log Y = -0.140 \log X + 0.828$	-0.231	NS	14
Ac-Cholinesterase	$\log Y = -0.168 \log X + 1.300$	-0.522	(*)	14
Esterase	$\log Y = 0.065 \log X + 3.203$	0.194	NS	14
RNase	$\log Y = 0.124 \log X + 1.663$	0.363	NS	14
GOT	$\log Y = -0.427 \log X + 1.727$	-0.644	*	12
GPT	$\log Y = -0.143 \log X + 1.288$	-0.265	NS	12
LDH	$\log Y = -0.198 \log X + 2.832$	-0.402	NS	11

(\*):  $P < 0.1$ , \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$

直線的ではなく双曲線的であることが推察された。そこで、年齢および酵素活性を対数に換算して回帰分析を行なった結果、多数の酵素に関して有意な相関がみられた(表1)。大部分の酵素は負相関

の関係にあることが認められたが、トリプシン様酵素、カテプシンC、RNaseなどは正相関を示した。つまり大多数の酵素は年齢の増加につれ活性低下の傾向を示したが、ごく少数の酵素はそれと

逆の変動を示すことが明らかになった。

上述した結果から、次の点が指摘される。すなわち、第1には負の相関を示す酵素群には大多数の酵素が属し、しかも臨床的指標として用いられているCK, GOT, GPT, LDH, Aldolaseも同様な傾向を示した。第2に、この年齢との相関は、病気の持続期間との相関と同じ意味を有していることを明らかにした。第3に、エキソペプチダーゼの動きとエンドペプチダーゼの動きは逆の推移であるように思われる。

さらに、これらの酵素レベルの経時的推移がDMD患者に特有なものであるか否かが問題となる。そこで、対照患者として気管支喘息患者の血清酵素について同様の検討を行なった。表2に示したように、Phe-APおよびGOTにおいて有意な時間に対する回帰がみられたが、DMD患者にみられたような変化は認められなかった。

### 結 論

DMD患者血清内酵素は、この病気の重症度および持続期間の両面から検討した結果、2つの型に分類されることを明らかにした。アミノペプチダーゼ、ジペプチジルカルボキシペプチターゼ、

スルファターゼ、フォスファターゼを含む大多数の酵素が臨床的指標として用いられているCK, GOT, GPT, LDH, Aldolaseなどと平行した動きを示した。しかし、エンドペプチダーゼ、RNaseなどの少数の酵素は逆の動きを示すことを明らかにした。この知見を基にして、筋肉内酵素活性の変動および筋肉細胞膜の透過性の変化などを検討し、難病解決の緒口としたい。

### 文 献

- 1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H (1981). *J. Clin. Invest.*, **67**, 51-59.
- 2) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H. (1981). *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 184-190.
- 3) Aoyagi, T., Wada, T. and Umezawa, H. (1982). Catabolic enzymes in dystrophic muscle. In: Ebashi, S. ed., *Muscular Dystrophy*. Univ. of Tokyo Press, Tokyo. pp. 239-252.
- 4) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 131-143.
- 5) Aoyagi, T., Nagai, M., Iwabuchi, M., Liaw, W. S., Andoh, T. and Umezawa, H. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 3505-3508.
- 6) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H. (1983). *Clin. Chim. Acta*, in press.
- 7) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1960). *Principles and Procedures of Statistics*. New York/McGraw-Hill Book Company, Inc., pp. 332-345.

## 28 筋ジストロフィー症マウスに対する微生物 プロテアーゼ・インヒビター投与の影響

松 下 宏\*

研究協力者 辻 繁 勝\*

進行性筋ジストロフィー症では一般に骨格筋中の分解系酵素の活性が増加しており、中でもリソゾーム・プロテアーゼ活性の著しい上昇が見られることから、これら酵素の活性増加が症状進行の原因の一つになっているという考え方がある。

一方、放線菌などから分離抽出されたプロテアーゼ・インヒビターがカテプシンB、CANPなどの活性を抑制することが知られているので、これらのインヒビターを投与することによって筋ジストロフィー症の症状進行を抑制しようとする試みが各種の動物モデルを用いて行われている<sup>1),2)</sup>。我々は今回、筋ジストロフィー症マウスを用いて、発症初期からロイペプチン又はベスタチンを連続投与した場合の血清中および骨格筋中の疾病の進行に強い相関を示す幾つかの酵素活性の変化に対する影響、並びに具体的な症状の改善或いは延命効果の有無等について検討を行った。

### 材 料 と 方 法

実験には自家繁殖を行っているC57BL/6J-dy系マウスの疾病個体(dy/dy)および同腹正常個体(+/-)が用いられた。インヒビター投与による血清中並びに骨格筋中のマーカー酵素群の活性変動を検討する実験には4週令又は6週令の疾病マウス各20頭を一実験区とし、10頭づつを1ケージに入れ、それぞれインヒビター投与群と食塩水投与対照群とした。インヒビターとして使用した

ロイペプチンおよびベスタチンは厚生省新薬開発梅沢班より供与されたものである。両インヒビターは生理食塩水にそれぞれ1mg/ml濃度に溶解して使用した。投与量は1回0.2mlづつ1日2回、背部皮下又は筋肉内に注射した。対照群にはそれぞれ0.2mlづつの生理食塩水を同様に注射した。

被検マウスは8週令に至ると酵素活性測定のため断頭採血し、分離した血清および後肢筋を標品として使用した。後肢筋の0.32M蔗糖液ホモジネートは通常のSchneider法に従って細胞質分画とミトコンドリア分画に分離し、それぞれの酵素活性測定に用いられた。

酵素活性の測定は以下の方法によって行われた。即ちCANPはDaytonらの方法<sup>3)</sup>に準じて行い、CPKはHessらのUV法<sup>4)</sup>、GOTおよびGPTはKarmen法<sup>5)</sup>、LAPはTappy法<sup>6)</sup>、PKはTanakaらの方法にそれぞれ準じて行った。

ベスタチン長期投与に依る病状抑制実験には、dy/+ 個体同志の交配によって生まれた仔マウスを10日令より連日、尾を持ってつり下げるテストを行い、後肢を内側に縮めるなど完全に発症が認められた個体について直ちに投与を開始した。平均発病日は14～20日令である。

### 結 果

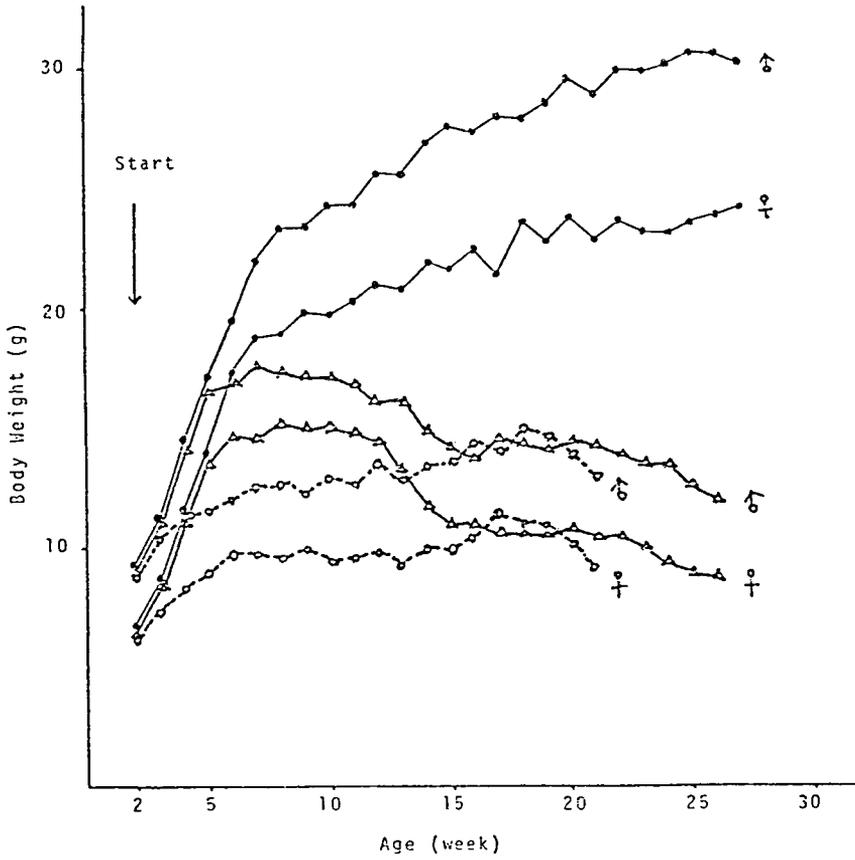
表1は4週令および6週令の比較的未だ軽症の疾病マウスにプロテアーゼ・インヒビターをそれ

\*和歌山県立医科大学第二生理学

ぞれ4週間および2週間連続投与した後、血清遊出酵素の幾つかに就いて活性変化を対照マウスのそれと比較した結果を示したものであるが、いずれの酵素の場合も、食塩水投与と疾病個体よりも活性低下していることが認められる。又2週間投与よりも4週間投与の方が変化が大きく、特にベスタチンの4週間投与によってCPK, PK, LAPなどが大巾に活性低下していることが注目される。表2は表1の条件下に於ける骨格筋中の酵素活性変化を測定したものであるが、CANP活性が両インヒビターの投与によっていずれも著しく活性低下していることおよび投与期間が長い方が変化の程度が大きいことが認められる。又、CANP以外の酵素の活性はベスタチン4週間投与群でのLAP活性を除いていずれも活性上昇の傾向を示していた。以上の結果は、比較的軽症の筋ジストロフィーマウスに両インヒビターを連続投与することによって、症状の改善及至は進行の抑制に効果があることを示唆しているものと考えられたので、次に出来るだけ発病の初期から投与を開始した場合の変化に就いてベスタチンを用いて検討した。表3は発症直後からベスタチン投与を開始した疾病マウスの1ヶ月令および2ヶ月令に於ける体重変化を示したものであるが、1ヶ月令で既に同令の無処置疾病マウスと比較して著しく体重が増加していることが認められる。又、投与マウス群は個体によって体重に大きなバラ付きが認められ、大まかに、正常マウスと同様な体重変化を示すグループと、無処置疾病マウスと正常マウスの中間的体重増加を示すグループに別けられることが判る。この傾向は2ヶ月令に至ると更に顕著になり、体重増加の著しいグループは臨床症状が全く消失し、正常マウスと外見的に区別出来なくなるのに対して、体重増加の少ないグループは、無処置の疾病マウスよりはやや症状進行が遅いが、次第に病状が悪化する傾向が認められた。図1は各グループ中の典型的な個体に就いてそれぞれの体重変化を週令順にプロットしたものであるが、症状を消失したマウスは殆んど正常マウスと同じ体重変

化を示し、症状の消えないマウスでは5週令迄はほぼ正常マウスに近い体重増加を示すがその後、体重増加が停止し、12週令以降は急激に減少し、17週令に至ると無処置の疾病マウスと全く変わらない状態になることが認められる。然し、症状の消えないマウスも連続してベスタチンの投与を行っているとならば無処置の疾病マウスと比較して有意な程度の寿命の延長があることがわかった。即ち表4の如く、筋ジストロフィー症マウスの平均寿命は約5ヶ月であるのに対して、ベスタチン投与群では平均8ヶ月令迄生き延びること、個体によっては1年以上の寿命を示すものも認められた。

一方、症状消失マウスは、外見的には確かに正常マウスと区別できなくなるが、はたして実際に骨格筋の筋力が正常並みになっているか否かを知るために運動強制負荷による耐久力テストを行った。60℃のホットプレート上に天蓋付きの円筒状金網を置き、その中に被検マウスを入れてやると足が熱いため金網によじ登る。この状態を7分間継続して、ホットプレートから四肢を離していた時間の総和を筋の耐久力として示したものが表5である。無処置の筋ジストロフィー症マウスでは半分以上の時間プレート上に落ちていたのに対してベスタチン投与群では殆んど正常マウスに近い耐久力を示していた。以上の如く、ベスタチン投与によって体重、筋力などの面で2つの違った変化を示すグループが得られたことから、症状消失マウスがはたして遺伝的にもdyホモ個体であったか否かを確かめるために、交配テストを実施した。表6はその結果を示したものであるが、ベスタチン投与マウスとdyヘテロマウスとの交配によって得られた75頭の仔マウスのうち、発病個体が33頭で、ベスタチン投与マウスがdyホモ個体と仮定した場合の期待値によく一致する結果になっていた。又、ベスタチン投与マウス同志の交配によって得られた仔マウスはわずか5頭であるが、全て発病したことから、ベスタチン投与によって症状の消失したマウスは遺伝的にも発病すべきdyホモ個体であったことが確かめられた。



Growth curve of bestatin treated dystrophic mice.

- : Bestatin treated and symptomatically improved mice.
- ▲—▲ : Bestatin treated and non-improved mice.
- : Non-treated mice.

図 1

表1

Effects of protease inhibitors on the enzyme activities  
in serum of dystrophic mice

	Bestatin		Leupeptin	
	2 weeks*	4 weeks	2 weeks	4 weeks
CPK	—	21.9	—	75.4
GOT	95.2	80.5	97.4	84.6
GPT	98.7	84.3	95.0	92.2
LAP	93.3	59.3	93.4	84.5
PK	83.8	76.1	73.9	81.0

Units: Treated/Non-treated x 100  
All mice were sacrificed at 8 weeks of age  
and prepared for enzyme assay.  
\*: Treatment period

表2

Effects of protease inhibitors on the enzyme activities  
in skeletal muscle of dystrophic mice

	Bestatin		Leupeptin	
	2 weeks*	4 weeks	2 weeks	4 weeks
CANP	77.4	35.5	43.4	36.9
CPK	—	156.3	—	102.6
GOT	113.7	109.2	107.7	117.2
GPT	115.4	104.6	112.6	107.9
LAP	111.0	78.5	104.9	161.5
PK	136.8	139.4	108.4	118.7

Units: Treated/Non-treated x 100  
All mice were sacrificed at 8 weeks of age  
and prepared for enzyme assay.  
\*: Treatment period

表3

Effect of bestatin administration on weight gain of dystrophic mice

Treatment	1 month	2 month
Non-treated	7.7* [6.0 - 10.0] (20)	10.4 [6.5 - 13.5] (25)
Treated	11.3 [7.0 - 18.0] (34)	15.2 [8.5 - 27.5] (38)
	9.8 [7.0 - 11.0] (20)	12.3 [8.5 - 14.0] (20)
	13.5 [11.5 - 18.0] (14)	18.4 [14.5 - 27.5] (18)

\*: Average body weight (g)  
 Parentheses show the numbers of mice tested.  
 Brackets show the range of each data.

表4

Effect of Bestatin administration on life span of dystrophic mice

	No treated	Treated	Pr.
Male	129.8 ± 23.4 (20) [ 73-152 ]	187.6 ± 69.7 (21) [ 102-373 ]	P < 0.01
Female	130.3 ± 31.4 (22) [ 68-161 ]	244.6 ± 64.1 (14) [ 140-362 ]	P < 0.01

Brackets show the range of each data.  
 Parentheses show the numbers of mice used.  
 Unit: existent days

表5

Durability test on bestatin treated dystrophic mice

Dyagnosis	Treatment	Total holding time (second)	Pr.
Normal	Saline	407.2 ± 4.3 (5)	N.S. P < 0.01
Dystrophic	Bestatin	374.0 ± 22.5 (5)	
Dystrophic	Saline	151.6 ± 18.6 (5)	

Testing period: 420 second  
 Parentheses show the numbers of mice tested.

表6

Incidence of muscular dystrophy in the offspring of test matings  
with bestatin treated dystrophic mice

Phenotype	No. of Litt.	No. of progeny							
		Normal				Dystrophy			
		Total	Expect.	Total	Expect.				
dy/+ x Bestatin	8	9	12	21	(20)	9	10	19	(20)
Bestatin x dy/+	6	11	10	21	(17.5)	9	5	14	(17.5)
<u>Total</u>	14	20	22	42	(37.5)	18	15	33	(37.5)
Bestatin x Bestatin	3	0	0	0		2	3	5	

Expect.: dy/dy x dy/+ → dy : N = 1 : 1

### 考 察

比較的軽症の筋ジストロフィー症マウスに微生物プロテアーゼ・インヒビターであるロイペプチン、或いはベスタチンを2週間又は4週間連続投与することによって、症状進行に強い相関を示す幾つかの酵素の血清中並びに骨格筋中の活性が症状改善を示す方向に変化することが認められた。又、細胞質プロテアーゼであるCANP および膜局在ペプチターゼであるLAPの活性がそれぞれロイペプチンおよびベスタチンの投与によって強く抑制されることが認められた。これらの結果は、両インヒビターの *in vivo* に於ける症状改善効果を示すと同時に直接、蛋白分解酵素の活性を抑制することに依る改善効果と共に、筋細胞の生理状態、特に膜機能を正常化させることによって間接的に症状進行を抑制させる効果があることを示唆しているものと考えられる。更に、ベスタチンを発症直後の約2週令から連続投与すると、症状が全く消失し、正常と外見的に区別出来なくなるマウスが得られること、並びにベスタチン投与を続けることによって症状の進行が遅れ、著しい延命効果が認められることなどから、筋ジストロフィー症マウスでは一般的な膜機能の異常が発症前から既に存在し、これが発症並びに症状進行に重要

な役割を果たしていること、ベスタチンが膜構造に附着することによってこの状態が改善されることなどが推測される。従って発症以前にさかのぼって、この膜機能異常を抑えることが出来れば、マウスの筋ジストロフィー症の発症および進行を完全に抑止出来る可能性があるものと思われる。

### 要 約

- 1) 微生物プロテアーゼ・インヒビターであるロイペプチン並びにベスタチンを軽症期の筋ジストロフィー症マウスに連続投与することによって疾病の進行と相関性の強い幾つかの酵素の血清中への遊出を減少させ、骨格筋中での活性低下を抑制させることが認められた。
- 2) 発症直後の約2週令からベスタチンを長期間連続投与することによって、体重の増加、症状の消失を示す個体が得られた。これらのマウスは遺伝的に発病すべき dy ホモ個体であることが確かめられた。又、ベスタチン投与によって症状の消失は見られなかった個体も、投与を続けることによって無処置の筋ジストロフィー症マウスに比較して明らかな寿命の延長が認められた。

## 文 献

- 1) Stracher, S., McGowan, E. B. and Shafiq, S. A. Muscular dystrophy; Inhibition of degeneration in view with protease inhibitors. *Science*, **200**: 50-51 (1978).
- 2) Sher, J. H., Stracher, A., Shafiq, S. A. and Hardy-Stashin, J. Successful treatment of murine muscular dystrophy with the proteinase inhibitor leupeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **78**: 7742-7744 (1981).
- 3) Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. and Stromer, M. H. A  $\text{Ca}^{++}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry*, **15**: 2159-2167 (1976).
- 4) Hess, J. W., Murdock, K. J. and Natho, G. J. W. Creatine phosphokinase, A spectrophotometric method with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.*, **50**: 89 (1968).
- 5) Karmen, A., Wroblewski, F., and LaDue, T. S. Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.*, **34**: 126 (1955).
- 6) Tappy, H., Wiesbaner, U., Wintersberger, E. Amino acid-p-nitroanilide as a substrate for amino peptidases and other proteolytic enzymes. *Hoppe Seyler Z., Physiol. Chem.*, **329**: 278-288 (1962).
- 7) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F., and Morimura, H. Crystallization, Characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochim.*, **62**: 71-91 (1967).

## VII 関 連 領 域

- 29. 高分子物質の細胞内注入法の工夫 167
- 30. 細胞接着分子と細胞収縮 168
- 31. 体幹部神経堤細胞からの間葉組織の分化 170

## 29 高分子物質の細胞内注入法の工夫

岡田 善雄\*

研究協力者 内田 驍\*

現在迄我々の研究室で開発されてきた高分子物質注入法は以下の3種類である。

- ① 細胞融合初期におこる細胞膜構造の乱れを利用する方法。
- ② 人工リポゾーム内に高分子物質を封印し、リポゾーム膜にウィルススパイクを植込んで、細胞膜とリポゾーム膜との融合を介して物質を注入する方法。
- ③ 内部に高分子物質を封印した赤血球ゴーストと細胞とをウィルスで融合させる方法。

これ等を用いて、非ヒストンタンパク質、紫外線特異的エンドヌクレアーゼ、IgG、毒素などの細胞内注入による細胞解析を進めてきた。今回の努力はDNAをこのような形で細胞内に注入したいという事である。

遺伝病細胞を用いて遺伝子解析を進めてゆく場合の1つの大きな壁が、細胞内への遺伝子注入にある。現在一般に用いられているDNA注入法は、DNAをリン酸カルシウムゲル内に組込んだドロドロの液を培養細胞に、ふりかけるものである。この方法は確かに有効でL細胞や3T3細胞では $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$ の頻度でトランスフォーマントを観察できるが、残念なことに、細胞によりこの頻度は大きく変動する。上記の細胞以外では凡どの細胞の頻度は $10^{-7}$ 以下となり実用性がない。その理

由は不明であるが、リン酸カルシウムが強い細胞毒性をもつこと、細胞内への取込みが受動的で細胞まかせであることなど、この方法の欠点を指摘することができる。

我々はリン酸カルシウムゲルを用いずに、もっと積極的に細胞内にDNAを注入したいのである。上記の3種類の手法から③赤血球ゴースト法をこの目的に使うこととした。赤血球ゴースト内に高分子物質を封印する方法として、従来は赤血球の低稠処理による封印を行っていたが、この方法では凡どDNAは封印できない。如何にして封印さすかというのが一番の問題である。色々の試行錯誤の末、最近になってやっと可能性が考えられるようになった。

赤血球を表面活性剤で部分的に溶かし、磷脂質を加え表面活性剤を抜いて赤血球ゴーストを再構成する時にDNAを加えておくとDNAがうまく封印できそうである。この方法では、DNAの他、分子量900,000のIgMも容易に封印できるし、λファージ粒子そのものも封印さすことができる。この方法で作った $t\kappa$  geneを含むDNAを封印した赤血球ゴーストと細胞とを融合させることで $t\kappa^{-}$ のL細胞から $t\kappa^{+}$ のトランスフォーマントを高頻度で出現させることができた。これからもう少し具体的な解析データを集め正式に発表したいと考えている。

\*大阪大学細胞工学センター

## 30 細胞接着分子と細胞収縮

岡田 節人\*

研究協力者 竹市 雅俊\*

筋肉以外の細胞が収縮系をもつことは今や常識であるが、その収縮の調節機構は筋肉の場合ほどにはわかっていない。細胞を培養すると、基質上に伸展し、一見弛緩したかのような形態をとる。このような細胞に、ある種の薬剤（たとえばEGTA）を与えると、細胞は球状となり“収縮”する。このような現象が、筋肉の収縮と対応するものであるかどうかは別にして、細胞の収縮系と何らかの関わりがあることには間違いない。

私たちは、細胞表面上に存在する“ $Ca^{++}$ 依存細胞間接着因子（CDS）”の分子的本体の研究するための一環として、CDSの機能を阻害する単クローン抗体を得た。この単クローン抗体は、細胞間の接着を阻害するが、それだけでなく、細胞の収縮をも引き起こすことが明らかとなった。そこで、この抗体の標的分子の性状について述べ、それが細胞収縮系の調節因子であるという可能性を考察してみたい。

### 単クローン抗体の調製

実験の材料は、マウスのテラトカルシノーマ細胞（EC細胞と略す）である。EC細胞を、ラットに注射して免疫し、この動物のリンパ球とミエローマX63細胞を融合して、多数のハイブリドーマを得た。それぞれのハイブリドーマの培養液を、EC細胞の培養に加え、EC細胞の形態に何らかの変化を引き起こすような抗体を産生するハイブリドーマクローンを探した。その中から、図1に

示すような活性を示す単クローン抗体（ECCD-1）を産生するクローンを分離した。

ECCD-1は、EC細胞相互の結合を破壊するが、同時に、個々の細胞を球状にする。この現象は、細胞間結合破壊の二次的結果であると見なすこともできるが、しかし、それだけでは細胞の極端な球状化を説明しにくい。抗体が、積極的に細胞の収縮を引き起こしている可能性が大である。

### ECCD-1の細胞への結合の特性

放射性ラベルしたECCD-1を、さまざまな条件下でEC細胞に与え、ECCD-1の結合の特性を調べると、 $Ca^{++}$ が存在する時のみ細胞に結合することがわかった。ECCD-1の結合は可逆的で、抗体が結合している細胞を、抗体を含まない液の中で培養すると、短時間のうちにすべての抗体が細胞から遊離してしまう。この時、 $Ca^{++}$ のキレート剤であるEGTAで細胞を洗うと、抗体の遊離は著しく促進される。すなわち、抗体の細胞への結合は $Ca^{++}$ 依存である。

### ECCD-1の標的分子

ECCD-1の標的分子を、Western blotting法により同定することを試みた。EC細胞の表面抗原を集め、これを電気泳動にかけてタンパク質を分離する。次に、タンパク質をニトロセルロース紙に写しとり、ECCD-1に浸す。次いで、二次抗体として、放射性ヨードでラベルした抗ラットIgで処理し、ECCD-1が結合したバンドを検出した。その結果、分子量約

\*京都大学理学部

124,000 のタンパク質 (p 124) が, ECCD-1 と特異的に反応することがわかった。

興味深いことに, ECCD-1 と p 124 との反応は  $\text{Ca}^{++}$  依存であることがわかった。ニトロセルロース紙に写しとった抗原試料を ECCD-1 と反応させる時,  $\text{Ca}^{++}$  が存在しないと p 124 との結合が起きない。また, p 124 に結合した ECCD-1 は, EGTA で洗うことにより遊離してしまう。前述したように, ECCD-1 の細胞に対する結合は  $\text{Ca}^{++}$  依存であった。これは, 抗体と抗原分子そのものの反応が  $\text{Ca}^{++}$  依存であることの反映であったわけである。

以上の実験結果から, 次のような結論が導き出される。p 124 は,  $\text{Ca}^{++}$  の依存下において初めて ECCD-1 により認識される。このことは,

p 124 が,  $\text{Ca}^{++}$  と反応し, “形” を変えるということの意味する。この分子の構造上の変化こそ p 124 の生理活性と密接な関連があると考えられる。

#### p 124 と細胞収縮

筋収縮が  $\text{Ca}^{++}$  によって統御されていることは周知の事実であるが, 非筋細胞の収縮系にも  $\text{Ca}^{++}$  が関与していて不思議はない。その観点から, p 124 が  $\text{Ca}^{++}$  受容タンパク質であるという事実は大変興味深い。p 124 と  $\text{Ca}^{++}$  の反応が, どのように細胞接着と細胞収縮に関わっているかは, まだ不明であるが, 今回得られた結果は, 細胞表面の  $\text{Ca}^{++}$  受容タンパクが細胞内収縮系の調節因子であるという可能性を示唆する初めての実験結果であるといえよう。

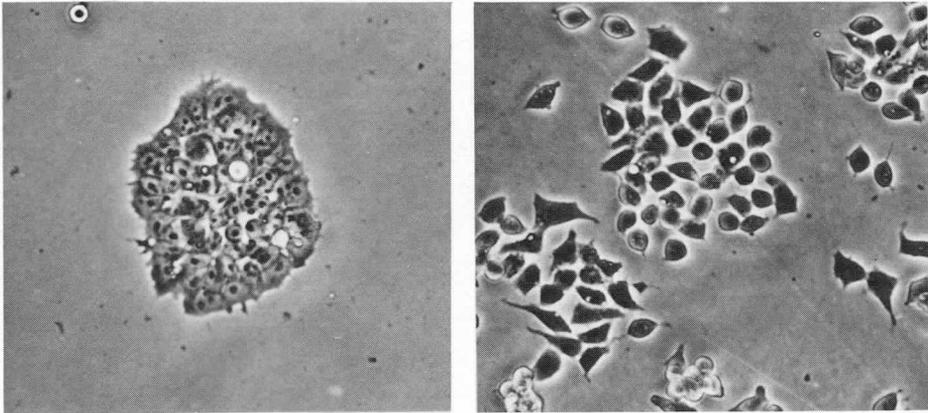


図1 EC細胞のECCD-1に対する反応。  
 (左) 正常なEC細胞(AT 805株)のコロニー。  
 (右) ECCD-1の中で4時間培養したEC細胞。

## 31 体幹部神経堤細胞からの間葉組織の分化

仲 村 春 和\*

### 1. はじめに

神経堤は神経管が閉じるときにその背側に見られるが、神経堤細胞はそこから移動していき、色素細胞、末梢神経細胞、間葉細胞、内分泌細胞等へ分化していく。この神経堤細胞の移動、分化の解析にはウズラの細胞を生物学的マーカーとしてニワトリ-ウズラのキメラ法による研究がたいへん有効である (Le Douarin, 1969)。このキメラ法により神経堤細胞の分化は頭尾方向での出発点の位置によって決まることが明らかにされている。またある位置の神経管を頭尾軸上のちがうレベルに移植することにより、神経堤細胞の分化にはその移動中、あるいは最終位置に到達してからの環境要因の影響が強く働くことが示されている (Le Douarin, 1980)。

間葉組織に分化するのは頭部の神経堤細胞で、これは他の細胞のラインから早期に分れる。すなわち頭部の神経管を体幹部に移植すると、移植された神経堤細胞は間葉組織に分化し、椎骨等の中にも神経堤由来の細胞が見られる。また逆に体幹部の神経管を頭部に移植すると間葉組織が不足するためにあたかも神経堤を切りとったときのような顎骨等の異常をおこす (Le Douarin, et al. 1977)。

ところが体幹部の神経管を片側的に菱脳域に移植すると移植された体幹部神経堤から間葉組織の分化が見られ、両側的に移植した場合には移植された頭方あるいは尾方の端の神経堤のみが間葉組織に分化できる。いずれの場合にも移植された体

幹部神経堤由来の間葉細胞は宿主の細胞と混合している (Nakamura and Ayer-Le Lievre, 1982)。このことから、神経堤細胞が間葉組織に分化するためには頭部神経堤あるいは頭部神経管が必要だと思われる。すなわち体幹部神経堤細胞は頭部神経堤細胞と一緒に移動することにより間葉組織に分化できるのではないかと考えられる。

### 2. 材料と方法

ふ卵約50時間のニワトリ胚(約20体節期)の尾方の5体節分の神経管の片側を切りとり、そこにおよそ10体節期のニワトリ胚の同側の菱脳部神経管を0.5%ディスパーゼで処理してまわりの間葉細胞をとり除いた後に移植した。さらにその外側におよそ20体節期のウズラ胚体幹部神経管の片側を移植した(図1)。移植5日後にZenker液で固定し、パラフィン包埋後8 $\mu$ mの連続切片を製作して、Feulgen染色を施した。

### 3. 結果と考察

移植を受けた胚ではLe Douarin (1977) らが頭部神経管を体幹部に移植したときのような間葉系細胞が過剰になるための椎骨等の奇形が見られる(図2)。注意深く観察を行うと少量ではあるが、椎骨原基の中にニワトリの細胞に混じってウズラの細胞が存在することがわかる(図3)。すなわち移植されたウズラ体幹部神経堤から間葉組織が分化してきたわけである。

正常の発生過程では体幹部神経堤は間葉組織に分化しない。ところが頭部に移植されたときは頭部神経堤細胞と一緒に移動する細胞のみが間葉細

\* 広島大学医学部 第一解剖学教室

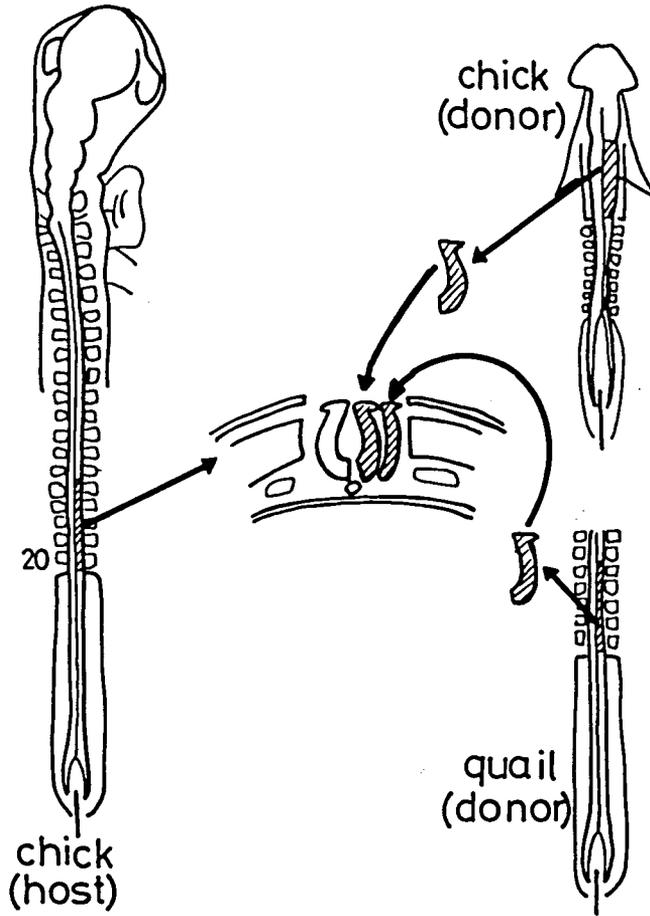


図1 実験方法の模式図

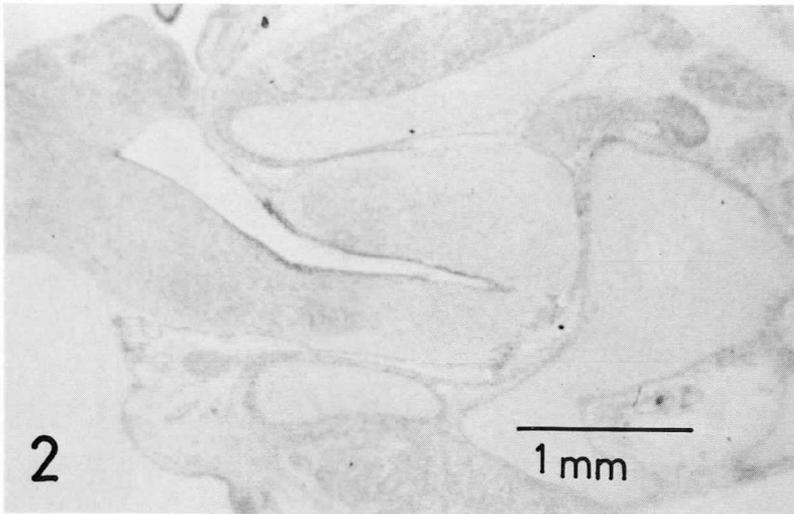


図2 図1に示したような移植を受けた胚をふ卵7日に固定したものの横断像。

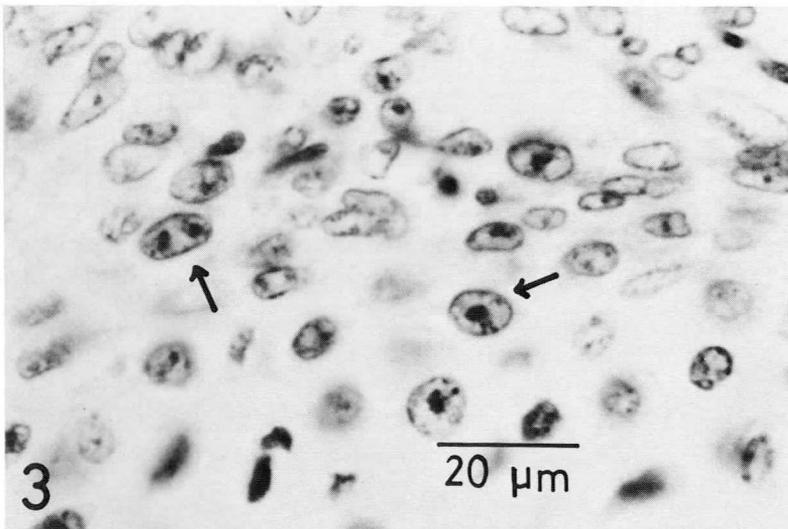


図3 図2の椎骨の一部の高倍像。  
椎骨原基の中にニワトリ細胞に混じってウズラの細胞が存在する(矢印)。これは移植されたウズラ体幹部神経堤由来の細胞である。ウズラの細胞はヘテロクロマチンが凝集している。

胞になることができる。また本実験で示したように体幹部神経堤細胞は、体幹部においてさえも頭部神経堤細胞と一緒に移動すれば間葉組織に分化できるということは神経堤からの間葉組織の分化に頭部神経堤の影響が大きいことを示している。

以上のことをまとめると、神経堤細胞の運命は正常の発生では頭尾軸のどの位置から出発するかによって決まるが、その分化の方向性は出発前にすでに決定されているのではなく、移動中あるいは最終位置に到達してからの環境要因との相互作用によって決まるといえることができる。すなわち移動前の神経堤細胞は多分化能を持っているといえることができる。

一方頭部の神経管は体幹部に移植されても間葉組織に分化する(Le Douarin, 1977)ということは頭部の神経堤細胞の一部は移動前にすでに間葉組織としての決定を受けているように思われる。これらの細胞の分化の決定がいつおこなわれるかは今後に残された問題である。いずれにしても神経堤細胞のラインのうちで、間葉組織に分化するラインがいちばん早く分化の決定がおこるように思われる。

#### 4. 神経管移植法のジストロフィー研究への応用

ジストロフィーの発症には筋肉にその原因があるとする筋原説と神経に原因があるとする神経原説とがある。そこで現在筋ジストロフィーニワトリと正常ウズラあるいはニワトリとの間で腕神経叢領域の神経管の交換移植と、肢芽の交換移植を行い解析を進めている。

### 文 献

- 1) Le Douarin, N. (1969) Particularités du noyau interphasique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*). Utilisation de ces particularités comme 'marquage biologique' dans les recherches sur les interactions tissulaires et les migrations cellulaires au cours de l'ontogenèse. *Bull Biol. Fr. Belg.*, 103, 435-452.
- 2) Le Douarin, N. (1980) Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr. Topics Develop. Biol.*, 16, 31-85.
- 3) Le Douarin, N., Teillet, M.-A. and Le Lièvre, C. (1977) Influence of the tissue environment on the differentiation of neural crest cells. In: *Cell and Tissue Interaction* (ed. J. W. Lash and M. M. Burger), pp. 11-27 Raven Press, New York.
- 4) Nakamura, H. and Ayer-Le Lievre, C. S. (1982) Mesectodermal capabilities of the trunk neural crest of birds. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 70, 1-18.

## 「筋の発生と分化に関する基礎的研究」班分担研究者一覧

氏名	所属	住所
班長 江橋 節郎	東京大学医学部第一薬理学教室	113 東京都文京区本郷 7-3-1 03(812)2111
監事 今堀 和友	東京都老人総合研究所	173 東京都板橋区栄町 35-2 03(964)1131
幹事 勝沼 信彦	徳島大学医学部酵素研究施設	770 徳島市蔵本町 3-18-15 0886(31)3111
野々村 禎昭	東京大学医学部第二薬理学教室	113 東京都文京区本郷 7-3-1 03(812)2111
運営 幹事 小沢 鏡二郎	国立武蔵療養所神経センター 機能研究部	187 東京都小平市小川東町 2620 0423(41)2711
班員 青柳 高明	微生物化学研究所	141 東京都品川区上大崎 3-14-23 03(441)4173
石川 春律	東京大学医学部解剖学教室	113 東京都文京区本郷 7-3-1 03(812)2111
岩崎 祐三	国立武蔵療養所神経センター 微細構造研究所	187 東京都小平市小川東町 2620 0423(41)2711
遠藤 実	東北大学医学部薬理学教室	980 仙台市星陵町 2-1 0222(74)1111
大塚 正徳	東京医科歯科大学医学部薬理学教室	113 東京都文京区湯島 1-5-45 03(813)6111
大日方 昂	千葉大学理学部生物学教室	260 千葉市弥生町 1-33 0472(51)1111
岡田 節人	京都大学理学部生物物理学教室	606 京都市左京区北白川追分町 075(751)2111
岡田 善雄	大阪大学微生物病研究所	565 大阪府吹田市山田丘 3-1 06(877)5121
香川 務	国立療養所刀根山病院	560 豊中市刀根山 5-1-1 06(853)2001
加濃 正明	北里大学医学部生理学教室	228 相模原市北里 1-15-1 0427(78)8111
栗山 熙	九州大学医学部薬理学教室	812 福岡市東区馬出 3-1-1 092(641)1151
酒井 敏夫	東京慈恵会医科大学生理学教室	105 東京都港区西新橋 3-25-8 03(433)1111
嶋田 裕	千葉大学医学部解剖学教室	280 千葉市亥鼻 1-8-1 0472(22)7171
杉田 秀夫	国立武蔵療養所神経センター 疾病研究第一部	187 東京都小平市小川東町 2620 0423(41)2711
杉山 博之	岡崎国立共同研究機構生理学研究所 細胞器官研究系	444 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38 0564(52)9770

氏名	所属	住所
班員 高橋 健治	京都大学霊長類研究所	484 愛知県犬山市官林 0568(61)2891
高橋國太郎	東京大学医学部脳研神経生物学教室	113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
寺尾 寿夫	帝京大学医学部第一内科学教室	173 東京都板橋区加賀2-11-1 03(964)1211
戸塚 武	愛知県心身障害者コロニー 発達障害研	480-03 愛知県春日井市神屋町713-8 0568(88)0811
萩原彌四郎	千葉大学医学部脳機能研究施設	280 千葉市亥鼻1-8-1 0472(22)7171
堀田 健	名古屋市立大医学部生理学教室	467 愛知県名古屋市瑞穂区川澄町1 052(851)5511
真崎 知生	筑波大学基礎医学系	300-31 茨城県新治郡桜村 0298(53)3061
松下 宏	和歌山県立医大生理学教室	640 和歌山市九番丁9 0734(31)2151
丸山 工作	千葉大学理学部生物学教室	260 千葉市弥生町1-33 0472(51)1111
公募 班員 大槻 磐男	九州大学医学部臨床薬理学教室	812 福岡県東区馬出3-1-1 092(641)1151
仲村 春和	広島大学医学部第一解剖学教室	734 広島市南区霞1-2-3