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58年度研究報告書

昭和59年3月

目　　次

総　括　報　告 …… 3
江　橋　節　郎

I　移植その他

1. 筋ジス－小人症(dy−dw)重複症疾患マウスとdy筋病変 …… 9
戸　塚　　武

2. ジストロフィーおよび正常チキンにおける
長橈側手根伸筋の神経支配 …… 17
大　塚　正　徳

3. ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植
についての研究(第2報)および再生筋の再移植について …… 20
寺　尾　寿　夫

II　細胞培養および細胞生物学

4. 外来性トランスフェリンの体内代謝について …… 29
小　沢　錠二郎

5. 筋芽細胞の成長を促進するラット脳由来酸性蛋白の性質 …… 35
畑　山　一　郎

6. サテライト細胞のin vivoおよびin vitroにおける再生能 …… 41
香　川　　務

7. アフリカツメガエル初期胚の単一割球由来細胞群の選択的分離法 …… 47
江　橋　節　郎

8. 鳥類胸腺筋様細胞の起源について …… 52
仲 村 春 和

9. 高分子注入法の新しい試み …… 57
岡 田 善 雄

10. 哺乳動物の初期胚形成に影響する単クローン抗体…… 59
岡 田 節 人

Ⅲ 生 理 学

11. 筋細胞における膜興奮機能の発生 …… 65
高 橋 国太郎

12. 培養骨格筋における膜興奮性の変化 …… 70
加 濃 正 明

13. 幼生アフリカツメガエル腸骨筋の収縮系と筋小胞体 …… 74
遠 藤 実

14. 筋収縮能の発現過程 ― 培養による正常と
ジストロフィーチキン胸筋の比較 …… 80
堀 田 健

15. 哺乳動物骨格筋の損傷後の Healing−over …… 85
栗 山 熙

Ⅳ アセチルコリンレセプター

16. 骨格筋アセチルコリン受容体の生合成と細胞内前駆体 …… 91
杉 山 博 之

17. アセチルコリンレセプター分布に対する神経の作用 …… 95
萩 原 彌四郎

V 微 細 形 態

18. 細胞骨格の分化発達－筋腱連結部の細胞骨格 …… 103
石 川 春 律

19. ラット骨格筋の凍結割断像 …… 107
岩 崎 祐 三

20. ジストロフィー鶏胸筋での異常蛋白質の発現について …… 110
野々村 禎 昭

VI 生 化 学

21. 筋ジスおよび正常鶏における筋細胞内 poly−ADP−ribose
含量とpoly−ADP−ribose 合成酵素活性の相異
（筋発達過程におけるその変化） …… 117
真 崎 知 生

22. コネクチンとミオシン，アクトミオシンとの相互作用 …… 122
丸 山 工 作

23. 筋発生・分化におけるアクチン結合蛋白の発現様式 …… 125
小 林 良 二

24. 除神経筋にみられる筋蛋白質分子種の変化 …… 133
大日方 昻

25. ニワトリ胸筋および足筋におけるトロポニンTの発生,
モノクローナル抗体を用いた研究 …… 138
嶋田　裕

26. ウサギ胎仔骨格筋収縮蛋白活性に対する抗トロポニン抗体の影響 …… 144
大槻磐男

27. 疾患筋筋小胞体膜の機能分類に関する一考察 …… 152
酒井敏夫

Ⅶ プロテアーゼ

28. サル骨格筋カテプシンBの精製と性質 …… 159
高橋健治

29. 内在性チオールプロテアーゼインヒビターの構造と
活性発現機構 …… 164
勝沼信彦

30. ブピバカイン（マーカイン）による急性筋崩壊の機序 …… 169
杉田秀夫

31. m−CANPと天然型μ−CANPとの比較研究 …… 173
今堀和友

32. 筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデル
における酵素網の比較 …… 177
青柳高明

33. 幾つかの筋神経系異常マウスに於ける
アルカリプロテアーゼ活性の変化…… 182
松下　宏

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かなりな年月が経つが，その重要性は益々大きくなって来ている。例えば 1983 年アメリカの Muscular Dystrophy Association (MDA) のコロキウムにも遺伝子発現と成長因子がとり上げられている。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，本疾患では発症時は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たし，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厳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。これらの制御も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って，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挙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充分に認識しつつも，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に述べた視点を踏まえて行ってきた。

本年度の研究の概要

上記総論に述べた基本的な理解の上に立った研究が本年も引き続き行われた。

総論の第一点に関与して，発生の各ステップがどのように行われるかを探ることを目的として研究が行われた。これは一つは遺伝子発現の問題であり，もう一つは細胞オーダーの発生生物学の立場からのアプローチである。第一の問題についての最も簡単な手段の一つは，遺伝子の発現の結果合成されるタンパク質について正しい記載をすることであり，まず正常動物のそれが行われた。これは前年度の進歩に引続いて行われたもので，嶋田はモノクロナル抗体を用いてニワトリ胸筋および足筋におけるトロポニンTの発生の過程を追った。小林はアクチン結合蛋白の発現について報告した。大日方の研究は病的過程に進み，蛋白の発現は大まかに胚型，新生児型から親型へと進むが，除神経やジストロフィーでは親型から新生児型へと逆戻りすることを示した。また杉山はアセチルコリンレセプターの生合成について報告した。同じ線上にある研究としては丸山及び大槻の研究がある。また酒井は筋ジストロフィー症様患者由来の筋小胞体のCa-uptakeについて報告した。

一方直接の遺伝子の表現の問題とのかゝわり合いはまだ不明だが真崎はpoly-ADP-riboseとその合成酵素活性が，筋ジスおよび正常鶏で大きく異ることを報告した。

このようにして発現された遺伝子を蛋白という形で合成する過程の形態学的裏づけを野々村が報告し，石川は筋腱連結部について，岩崎は凍結割断像について報告を行っている。同様にアセチルコリンレセプター形成の段階に於いて起る集合と分散について萩原が報告した。

この様にして形成される筋細胞がやがて膜興奮性を，また一方では収縮能を獲得するが，それらの基礎実験としてCaチャンネルについて高橋(国)と加濃が，また損傷後の healing over について栗山が，収縮系の分化について堀田と遠藤が報告を行った。また大塚は筋ジス筋では多神経支配という現象が正常よりも後々迄残ることを示した。

一方，畑山はラット脳に筋芽細胞の増殖を促す新しい物質の存在を示唆し，小沢はトランスフェリンのin vivo 実験を行うべく予備実験としてのその体内代謝の報告を行った。また胸腺の骨格筋が神経冠に由来するという証明を仲村が行った。

第二の点は筋の破壊効果及びおそらくそれに関与すると思われるプロテアーゼとそのインヒビターの問題である。マーカインは筋の急性破壊を惹起するが，このモデルを用いての研究が杉田によって報告された。勝沼は，リソゾーム・チオール・プロテアーゼの内在性インヒビターについて一次構造を報告し，それが普遍的に存在すること及び

肝型や皮膚型が存在すること等について述べた。今堀は，チオールプロテアーゼのmCANP及びμCANPについての高次構造や，自己溶解などについて報告を行った。この他青柳，高橋(健)，松下らもそれぞれプロテアーゼに関する報告を行った。

第三の点に関しては，寺尾は筋ジスハムスターと正常ハムスターの交換移植を行い，筋の再生が環境によって大きな影響を受けることを示した。さらに再移植，再々移植が可能であることをも報告した。香川は筋ジスマウスの衛星細胞を用いてin vivo及びin vitroでの再生を調べ，クローン培養における衛星細胞の分化をクレアチンキナーゼをマーカーとして研究した。

これらの研究以外にも戸塚は筋ジスマウスの小人症変異種の筋ジス病変の発現が，野生種筋ジスマウスよりも少いことに注目し，筋と骨との成長の程度の違いが本症の修飾にかゝわっているのであろうと推論した。また，江橋，岡田(節)，岡田(善)が本症研究の基礎的手技についての報告を行った。

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わ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。

本年度は，三年に亘って行って来た「筋の発生と分化に関する基礎的研究」の最後の年に当る。この間に筋蛋白の分化について，特にその基本的なことがかなり明瞭になり，これらの結果から，さらにこれらがどのような過程により分化が修飾されるか，更にそれらが病的過程がどのように現われるかを調べるための準備が，完全とはいえないにしても，できて来たと思われる。また病的過程における種々のプロテアーゼの持つ役割に対する或る程度の見方ができ上ったようである。しかしまだ再生過程という筋ジストロフィー症の病態生理学において非常に重要な過程に対する理解はまだ不充分であるといわなければならない。

さらにこの数年間世界的に急速に普及しかつ著しいレベルの向上をみた遺伝子工学およびモノクロナル抗体法については，後者については一応のレベルを持つに至っているが，少くとも筋発生分化はもちろん遺伝子疾患である筋ジストロフィー症研究のためには非常に強力な武器であるにもかかわらずまだ研究者の層が薄くこの面での研究者の養成が急ぎ望まれる。前述のMDAのコロキウムではこれらの手法を用いた研究が主流を占めている。

筋ジストロフィー症の研究の道は嶮しい。しかし我々は一歩一歩地道な努力を重ねてゆかなければならない。

I　移植その他

1.　筋ジス－小人症(dy－dw)重複症疾患マウスとdy筋病変　9

2.　ジストロフィーおよび正常チキンにおける
長橈側手根伸筋の神経支配　17

3.　ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の
交換移植についての研究（第2報）および再生筋
の再移植について　20

1　筋ジストロフィー症 ― 小人症（dy-dw）重複疾患マウスとdy筋病変

戸塚　武*
研究協力者　渡辺貴美*　浦本　勲*
大平敦彦*　伊藤　均**

マウスの筋ジストロフィー（dy）症は，筋の成熟成長障害（4,6,9,12,14）による疾患であり，成長の止った筋が成長し続ける骨により強制的に引き伸ばされることが発症の直接的原因であろう，と提唱してきた。その証拠として，筋は後肢筋同様異常（1,14）でありながら骨が低成長の前肢の症状が軽いこと(7)，骨を含む全身の成長も抑制されたdy-dw（dw:小人症）重複疾患マウスでdy症状が不顕化すること（*Proc. Japan Acad.*, **57B**: 109－113），を報告した。同じ年（1981），ヒトとニワトリでよく似た結果が発表された。ブラジルのZatzらはdy（Duchenne 型）-dw(GH欠乏による）重複疾患児を発見し，dy症状が著しく軽いこと（*Am. J. Med. Genet.*, **10**：301－304＆305－307）を，アメリカのKingらは，抗甲状腺剤投与により一種のdw症にしたdyニワトリのdy症状がやはり著しく軽いこと（*Life Sci.*, **28**: 577－585）を発表した。骨成長の抑制が一種の対症療法になるだろうと考えられる。

dy-dwマウスの筋にdy-specificな病変が見られるならば，それは前臨床期のdy病変と考えられる。残念なことに，dy-dwマウスは外見上dwマウスと区別できなかった。成長ホルモンとチロキシンを投与しdw症の治療を行うと，dy-dwマウスはdy症を発症する（後肢を引きずる）ようになることで初めて同定が可能であった。最近になって我々は，電気生理学的方法によりdy-dwマウスを同定することに成功した（8,10）。そこで本研究は，dy-dwマウスの前肢筋の組織学的分析を行った。また，dy筋の結合織成分のプロテオグリカンの糖鎖グリコサミノグリカンの量の分析と，dyマウスがEhrlich腹水ガン接種に対してどのような反応を示すか，検討した。

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。

dy-dwマウスの同定

ウレタン麻酔したマウスの坐骨神経を電気刺激し，Gastrocnemiusからの誘発筋電位（オシロスコープ上のパターン）を写真記録した。5 Hz連続刺激による誘発筋電位の振幅の経時的変化を解析したところ，dy-dwマウスはdyマウスの特徴（一種の疲労抵抗性：別の観点からは未熟性）（11, 13, 15）を持っていることがわかった（8, 10）。すなわち，正常マウスとdwマウスの誘発筋電位の振幅は5 Hz刺激開始後数分で，数十%も減少したが，dyマウスとdy-dwと思われるマウスの誘発筋電位の振幅は，せいぜい十数%の変化を示しただけであった。

＊愛知県心身障害者コロニー　発達障害研究所
＊＊三重大学医学部

筋線維の直径測定

前肢筋（triceps）のパラフィン包埋切片（厚さ7μ）を，通常の方法でHE染色し，光学顕微鏡写真を用いて筋線維の直径を測定した。

グリコサミノグリカンの定量

結合織成分プロテオグリカンの糖鎖グリコサミノグリカンの量としてウロン酸量を測定した。マウス後肢筋のアセトン乾燥粉末を水に浸した後，充分量のプロナーゼで蛋白質を分解（40－45℃，一晩）し，グリコサミノグリカンを抽出単離後，カルバゾール硫酸法に従いウロン酸として定量した。

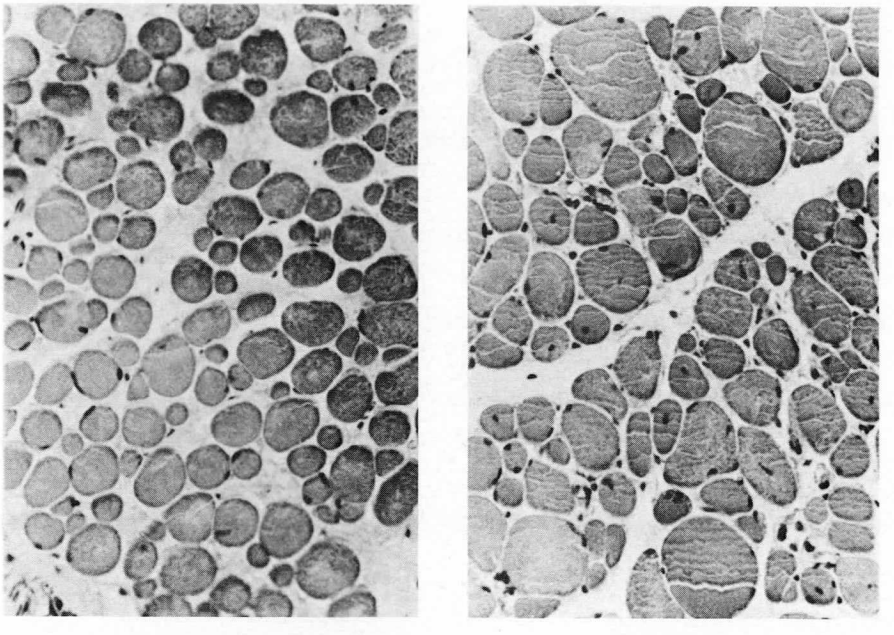
Ehrlich腹水ガン接種

マウス腹腔内にEhrlich腹水ガン細胞（2×10^6 cells/mouse）を接種し，ガン細胞の増殖に伴う宿主マウスの体重変動を調べた。また，実際のガン細胞増殖を知るため，腹水中のガン細胞（チュルク液で染色）の数を血球計算板で測定した。

結果と考察

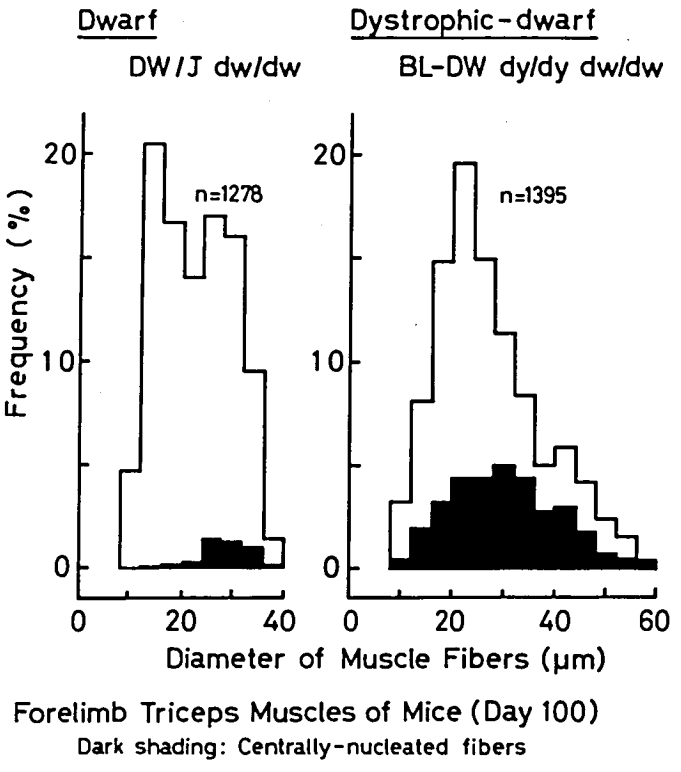
dy-dw 筋の特徴

dwマウスの前肢筋の筋線維は，正常マウスの筋線維と比べて著しく細いことを，昨年報告した。今回は，dwマウスとdy-dwマウスの筋線維を比べた。図1に，dw筋とdy-dw筋の光学顕微鏡写真（横断切片）を示す。dy-dw筋には，dw筋に見られない二つの特徴があることがわかった。筋線維の大小不同と，中心核である。dw筋に見られる中心核線維の数は，正常筋（全線維の1％前後かそれ以下）に比べれば多い（約5％）が，dy-dw筋では更に多くの中心核線維が観察された。このことは，図2で筋線維の直径の分布の様子を見れば明らかである。dw筋の線維の直径は，10－40μの



Forelimb Triceps Muscles of Mice (Day 100)

第1図　dwマウスとdy-dwマウスの前肢筋（横断）の光顕像。



第2図　dw マウスとdy-dw マウスの前肢筋の筋線維直径分布。

範囲にほぼ収まっていた。ただ，今回の実験では固定とパラフィン包埋のせいで，実際の直径より細めの答になっている。中心核線維の直径分布は図中に，黒塗りで示してある。dw筋と比べて，dy-dw筋の線維の直径は，10－60μに分布し，異常に肥大した線維の存在が確かめられた。しかも，dy-dw筋には，多数の中心核線維があり，その直径分布は全線維の直径分布とほぼ似ていた。dy-dw筋に見られたこれらの特徴は，前臨床期のdy-specific筋病変と考えられる。この二つの特徴は，dy筋線維が未熟な状態に留まっているとする我々の考えを，強く支持するものと思われる。dy筋に見られる線維の大小不同がdyの本質的特徴の一つであろうとする考えは，dyニワトリを用いた杉田，埜中らの報告（3）でも指摘されている。dy筋の成熟成長障害（我々は停止と考えているが，脱分化または変性に続く再生による可能性も否定できない）の機構の解明が待たれる。一つの可能性は，我々の電気生理学的研究（8,10,11,13,15）からも指摘されるように，生体膜（とくに筋線維の膜）の成熟変化が停止していることが考えられる。最近，Jaros & Jenkisonにより神経細胞の成熟障害も報告された（*Develop. Brain Res.*，6：231－242）。難病の研究には優れたモデル動物の開発が重要である。成長途上に発現する難病の研究には，dw症を合併させることで成長による二次的要素が除去されたdy-dwのようなモデル動物が，特に重要であろう。我々のdy-dwマウスに続いて，dy-dwニワトリの開発に成功したとの菊池らの報告（2）は，大変興味深い。

dy筋のグリコサミノグリカン含量異常

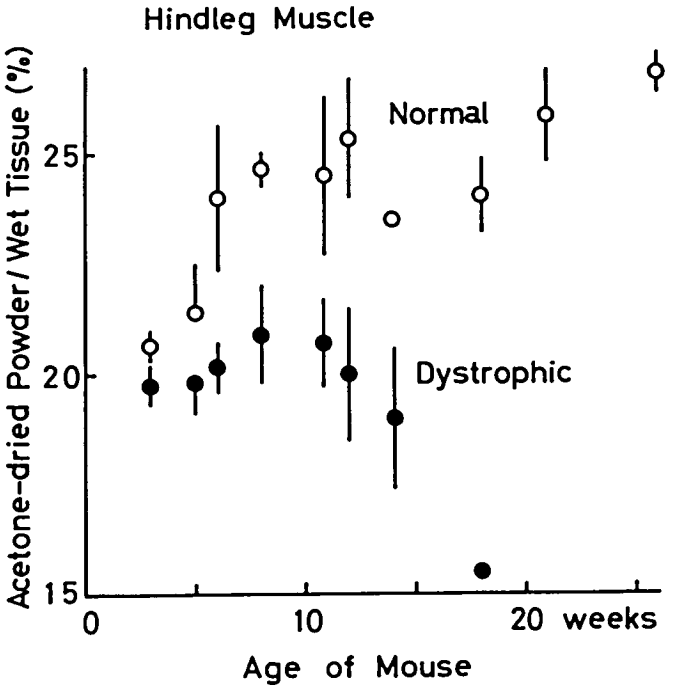
dy筋の特徴として，結合織の異常増殖が指摘されている。たしかに，筋湿重あたりでは結合織成分の一つであるコラゲン含量がdy筋中で異常に高い。しかし我々は，後肢あたりの全筋中コラゲン総量は，dy筋のほうがかえって少なめであること

を明らかにした。そこで今回，このことをさらに確かめるために，やはり結合織の成分であるプロテオグリカンの糖鎖グリコサミノグリカンの定量を行った。グリコサミノグリカンは，ウロン酸として定量した。後肢あたりの全筋湿重量は，正常マウスでは加令に伴って（10週令頃まで）著しく増加したけれど，dyマウスでは加令変化がほとんどなかった（10週令を過ぎると減少傾向が見られた)。このことは，以前に報告した結果と同じであるが，面白いことに，筋湿重あたりの筋乾燥重量についても同様な現象が観察され，正常筋の加令変化がdy筋では停止しているらしいことが，このことからも推察された（図3)。図4からわかるように，筋湿重あたりでみる限りdy筋でウロン酸含量の異常高進が認められた。しかし，コラゲンの場合と同様に，後肢あたりの全筋中ウロン酸総量は，dy筋と正常筋の間にほとんど差がなく，どちらかといえばdy筋のほうがかえって少なめであった（図5)。最近になって，dy筋中の結合織細胞に，成熟成長障害(5)や接着性異常があるとの報告があいついで発表されている。

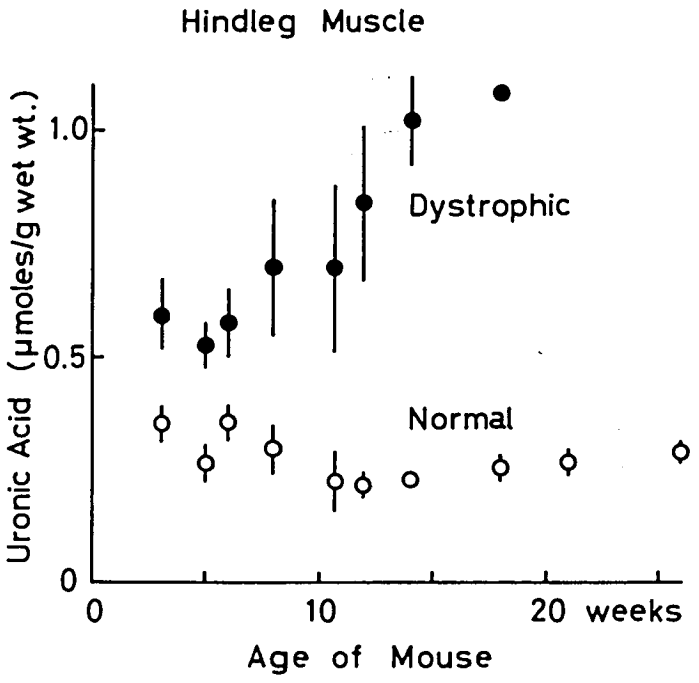
少なくともコラゲンとグリコサミノグリカンの量からみる限り，dy筋に結合織の異常増殖があるとは考え難い。dy筋では筋線維の成熟成長が停止しているにもかかわらず結合織の成長は準正常に進んでしまうため，見掛け上結合織が異常増殖するかのようにみえるだけであろう。この考え方を簡単に模式的に示したのが図6である。もしそうなら，筋中で筋線維と結合織細胞は別々の成長制御を受けていると考えられ，両者の成長に差があるdyマウスの筋は，筋線維と結合織細胞の成長機構を調べるための良い材料となるであろう。

dyマウスに対するEhrlich腹水ガンの影響

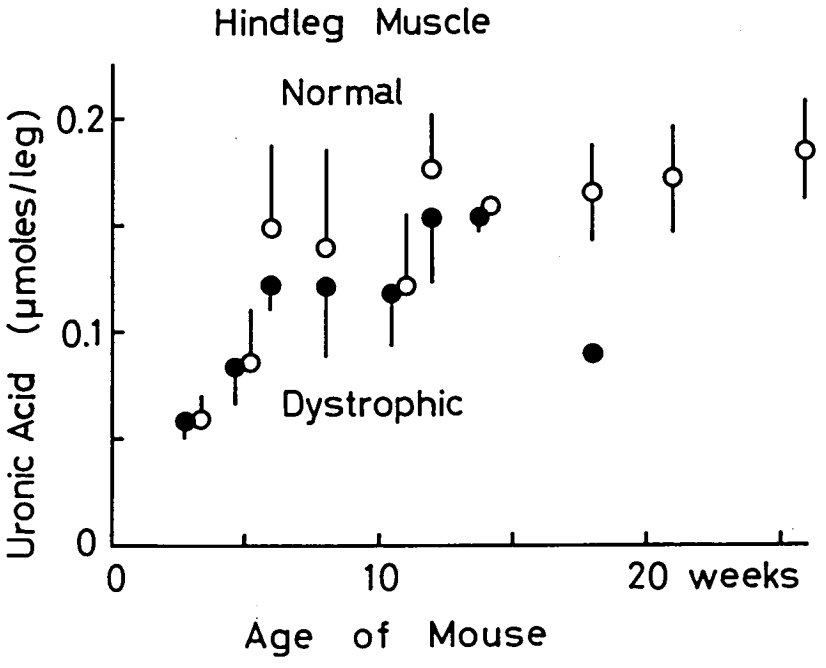
dyマウスは一種の成長障害を受けているので，発症機構における成長ホルモンやチロキシンの質的，量的異常の関与も考えられる。もしこのようなことがあるとすれば，成長ホルモンやチロキシンに依存性を示すガン細胞の増殖は，dyマウス体



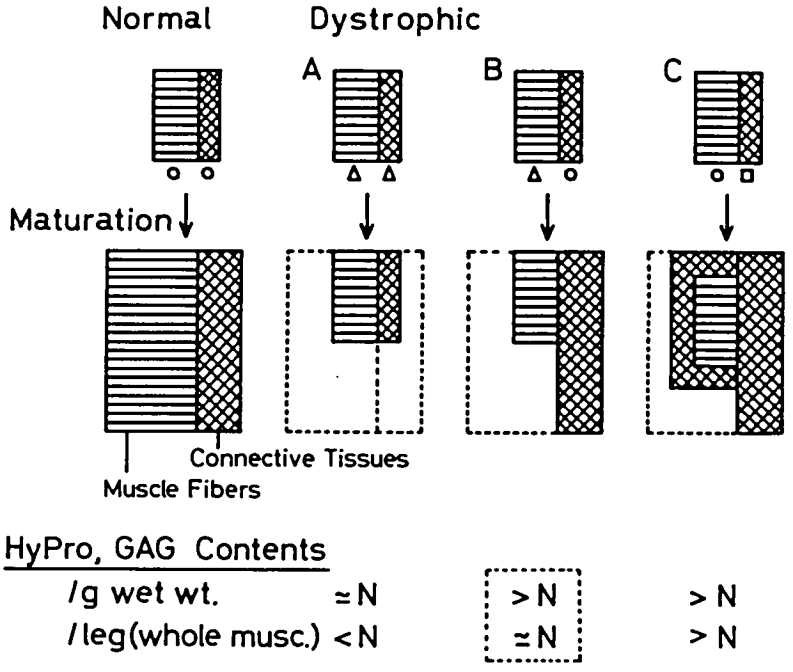
第3図　dyマウス後肢筋の湿重に対するアセトン乾燥重量の加令変化。



第4図　dy マウス後肢筋のウロン酸含量の加令変化。



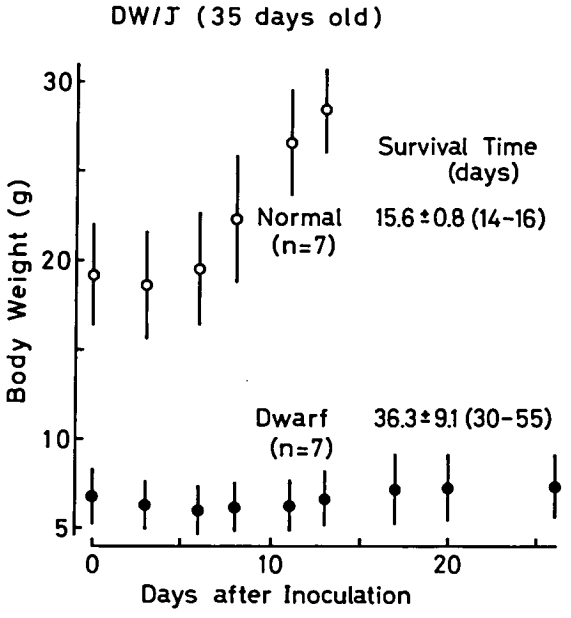
第5図　dy マウス後肢あたりの筋中ウロン酸総量の加令変化。



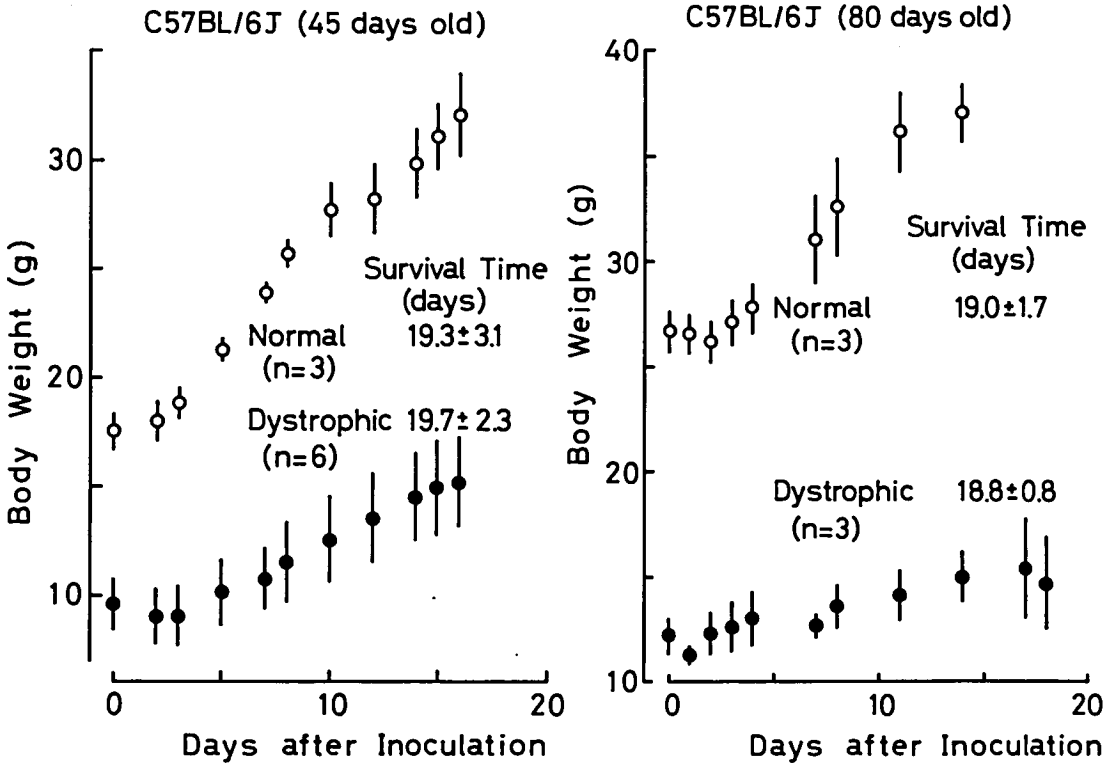
第6図　dy筋における筋線維と結合織の成長性に関する模式図
A：両者とも成長停止　B：筋線維のみ成長停止　C：結合織の異常増殖によって筋線維の成長が抑制されている。我々は，Bの可能性が高いと考えている（本文参照）。

内では抑制されるであろう。それを調べるために，Ehrlich腹水ガン細胞を用いた。Ehrlich腹水ガン細胞の増殖は，宿主マウスの体内ホルモン，とくに成長ホルモンとチロキシンの影響を強く受けることが知られている。実際，下垂体の萎縮により成長ホルモンとチロキシンをほとんど欠いているdwマウスの腹腔内では，ガン細胞の増殖が抑制されることがわかった。生存日数も正常マウスの二倍以上であった（図7）。dyマウスも，ガン細胞接種後の体重変動をみる限り，ガン細胞の増殖に抵抗性を持っているようにみえた。個体によってまた日令によって異なるものの，腹水ガンによる体重変動は，正常マウスに比べれば明らかに，dyマウスの方が少なかった（図8）。実際，外見的にも正常マウスと比べてdyマウスの腹部の膨脹はあまり目立たなかった。ただ，生存日数は，正常マウスとdyマウスで差はみられなかった。そこで，dyマウスで腹水ガン細胞の増殖が抑制されているのかどうかを知るため，腹水中のガン細胞数を測定した。その結果，dyマウスでもガン細胞は正常マウスなみに増殖すること，dyマウスでは腹水の貯留が著しく少ないことがわかった。ガン細胞接種後13日目の腹水量と腹水中のガン細胞数は，dyマウス（成獣3匹の平均±標準偏差）の0.63 ± 0.70 ml，（6.4 ± 7.6）×10^8 cellsに対して，正常マウス（成獣9匹）では7.3 ± 4.0 ml，（13.0 ± 9.2）×10^8 cellsであった。

Ehrlich腹水ガン細胞接種に伴う腹部の膨脹と腹水の貯留に，dyマウスが抵抗性を示したことの意味は不明である。しかし現時点で，二つの可能性が考えられる。一つは，腹部の筋も骨の伸長成長によって伸びるところまで引き伸ばされていて，それ以上の引き伸ばしに抵抗性が高まっていた。もう一つは，dyマウスでは浸透圧調節能に異常があるため，腹水の貯留ができないという可能性である。我々は今のところ前者を考えているけれど，



第7図　dw マウスに対する Ehrlich 腹水ガンの影響。



第8図　dy マウスに対する Ehrlich 腹水ガンの影響。

後者の可能性も充分考えられる。もし後者の考え方が正しいとすれば，それは即dy症の病因につながっているとも考えられる。最近Entrikinらは，症状軽減に有効な薬物が同時に体重減少をもたらすことに注目し，dyニワトリを数日間絶水させ，その後のようすを調べたところ，体重成長の抑制と同時にdy症状の軽減が見られたと報告している。同じく体重成長抑制が見られるものの，絶食ではdy症状の軽減が見られないことから，彼らは，dy症の重要な発生要因として浸透圧調節能異常の可能性を指摘している（*Exp. Neurol.*, 79：746－752)。

結　　語

1. dy症の不顕化したdy-dw重複疾患マウスの筋に，dy-specificな病変が認められた。電気生理学的に一種の疲労抵抗性（別の観点からは未熟性)，組織学的に筋線維の大小不同と中心核，が観察された。

2. dyマウスの後肢筋で，湿重あたりのグリコサミノグリカン含量は異常に多かったが，後肢あたりの全筋中グリコサミノグリカン総量に異常は認められなかった。

3. Ehrlich腹水ガン細胞の増殖はほぼ正常マウスなみであったが，dyマウスでは，ガン細胞の増殖に伴う腹水の貯留が著しく少なかった。下垂体萎縮により成長ホルモンとチロキシンを殆ど欠くdwマウスでは，ガン細胞の増殖は強く抑制された。

文　　献

1) 青柳高明 (1983) 筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデルにおける酵素網の比較。本報告集，
2) 菊池建機 (1983) 筋ジストロフィー鶏の発症過程の品種間差。(野村班) 報告集，
3) 杉田秀夫，埜中征哉，岡田理美 (1982) 筋ジストロフィー鶏骨格筋の再生能。(野村班) 報告集，23-43頁。
4) Skau K.A. (1983) The acetylcholinesterase abnormality in dystrophic mice is a reflection of a maturational defect. *Brain Res.*, 276: 192-194.
5) Sweeny P.R. (1983) Ultrastructure of the developing myotendinous junction of genetic dystrophic chickens. *Muscle & Nerve*, 6: 207-217.
6) Totsuka T., Watanabe K., Kiyono S. (1981) Maturational defects of muscle fibers in the muscular dystrophic mouse. *Cong. Anom.*, 21: 253-259.
7) Totsuka T., Watanabe K. (1981) Some evidence for concurrent involvement of the fore- and hindlimb muscles in murine muscular dystrophy. *Exp. Anim.*, 30: 465-470.
8) 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.
9) 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.
10) Totsuka T., Watanabe K., Uramoto I (1984) Differences among dystrophic, dwarf and their crossbred mice in the time course of changes in muscular potentials induced by 5 Hz-stimulation. *Exp. Neurol.*, in press.
11) Uramoto I., Watanabe K., Totsuka T. (1983) Contrast of time courses of changes in muscular potentials to prolonged stimulation at 5 Hz in rat medial gastrocnemius and soleus muscles. *Exp. Neurol.*, 80: 479-483.
12) Watanabe K., Totsuka T. (1976) Developmental defects of hindleg muscle cells in hereditary dystrophic mice. *Medicine and Biology*, 93: 203-206. (Japanese)
13) 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.
14) Watanabe K., Shimada K., Totsuka T., Uramoto I., Mizutani A., Kiyono S. (1982) Apparent elevation of α-bungarotoxin binding attendant upon maturational defect of forelimb muscle in muscular dystrophic mice. *Cong. Anom.*, 22: 199-206.
15) Watanabe K., Uramoto I., Totsuka T. (1983) 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. *Electrokyogr. clin. Neurophysiol.*, 23: 103-115.
myogr. clin. Neurophysiol., 23: 103-115.

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神経支配

大　塚　正　徳*
研究協力者　弘　中　哲　治**　五十里　良　生**

筋ジストロフィー症の発症の原因を究明する目的で，ジストロフィーチキン（line 412）および正常チキン（line 413）の長橈側手根伸（ECRL）筋を用いて，1）筋の交換移植[1]，2）生理学的および解剖学的性質の経時的変化[2]について実験を行なった。1）の実験から筋の発生・成長において筋外性の要因，とくに神経原性の要因が重要であることを示す結果が得られ，2）の実験から孵化後初期（～13日）における筋線維数の増加がジストロフィーチキンにおいて著しく抑制されているが，その後の時期には筋の種々のパラメターに与える神経性の影響には特に異常を認めないという結果を得た。しかも孵化直後にはECRL筋の諸種性質に正常およびジストロフィーチキンの間に差がないことから[2]，ジストロフィーチキンにおいて孵化後初期に一過性の神経性異常が存在することが示唆された。

この孵化直後の時期は，筋に対する神経支配がpolyinnevationからsingle innervationに変わるいわゆるeliminationの時期に相当し[3]，神経・筋の相互作用の観点からも大きな変化が起こりやすい時期であるものと思われる。この初期における神経性の変化を筋発生の異常との関係において追究することにより，筋の発生の基礎的機構を窺い知ることができ，延いては筋ジストロフィー症の発症の原因を知る手掛かりが得られるものと考え，以下の実験を行なった。今回は特に孵化後2週間にわたるECRL筋の筋線維数の経時的変化と，これに対応する同筋支配神経の数の経時的変化を調べた。

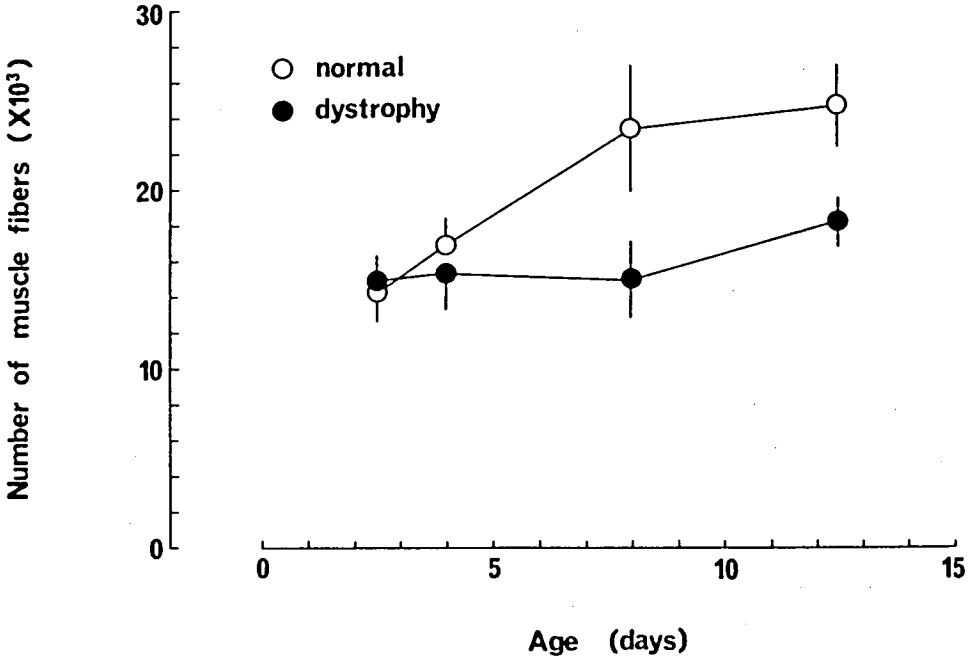
方　　法

孵化後1～14日目の正常チキン（line 412）とジストロフィーチキン（line 413）を用いた。エーテル麻酔下にチキンを腹位に固定し，実体顕微鏡下でECRL筋と橈骨神経を露出し神経・筋標本としてavian saline中に摘出した後，さらに結合組織を取り除きECRL筋への筋枝を見出した。標本をKarnovsky固定液[4]に移した後，その筋枝を正中神経からの分岐部とECRL筋へ入る直前で切断し，さらにオスミウムで固定した。この筋枝が分岐してECRL筋に入る手前で横断切片をつくり，ウランと鉛の二重染色を行なった後，電子顕微鏡写真を撮り（1000倍），ミエリン鞘を指標にして神経軸索の数を測定した。筋標本はホルマリンで固定した後，近位端から1/3の所で横断し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後，適当な大きさに拡大して写真に撮り筋線維数を計測した[2]。

結　　果

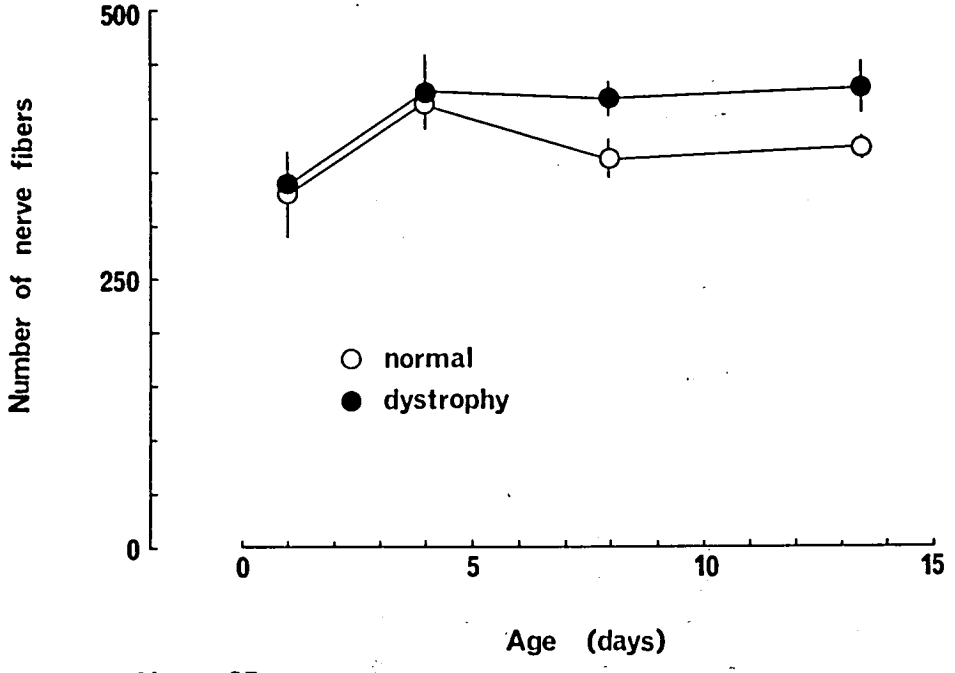
筋線維数の経時変化：　図1に測定した筋線維の数の経時変化を示した。孵化後2～3日目の正常チキンのECRL筋の線維数は平均14375（$n=4$），ジストロフィーチキンのそれは14912（$n=4$）で

*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



Mean ± SE

第1図　長橈側手根伸筋の線維数



Mean ± SE

第2図　長橈側手根伸筋を支配する神経の線維数

あり，両者の間に差はみられなかった。この線維数は正常では4日目，8日目と著しく増加し12～13日目にはほぼピークに達した。13日目における線維数は3日目の約1.8倍に相当していた。一方ジストロフィーチキンではこの孵化後の筋線維数の増加が強く抑制されていることが明らかとなり，8日目の筋線維数は正常のそれにくらべ有意の差を示した（P＜0.05）。

神経線維数の経時変化：　孵化後3日目までではECRL筋を支配する神経線維の数は筋線維数の増加に対応して増加を示し，正常チキンとジストロフィーチキンとの間に差が認められなかった（図2）。しかし4日目以降では正常チキンでは神経線維数が減少するのに対して，ジストロフィーチキンでは減少の傾向が弱く殆んど一定値を保った（図2）。

ジストロフィーチキンの神経線維数は8日目で明らかに正常チキンのそれより大であった（P＜0.05）。この事実はジストロフィーチキンの孵化後の筋重量の増加が正常チキンのそれに比較して勝るとも劣らない実験事実[2]をよく説明しているものと思われる。しかしながら孵化後の筋線維数の増加がジストロフィーチキンで著しく抑えられている事実（図1）とは明らかに食い違っている。

考　　察

正常チキンでは孵化後4日目までの筋線維数の増加に平行して神経線維数も増加することがわかった（図1,2）。しかし孵化後，筋線維数は3日目から13日目にかけて1.8倍に増加したのに対して，神経線維は1日目から4日目にかけて1.25倍に増加したが，13日目には1.13倍となったに過ぎなかった。神経線維数の増加は筋線維数の増加に先んじて，孵化以前の時期に起こっているのかも知れない。

正常チキンで4日目以降，神経線維の数が減少しているが（図2），この事実は中枢神経系において発生途上で細胞の自然死が起こること[5]に対応するものと思われる。この神経細胞の死が対応する筋の活動に密接に関係していること[6]から，本実験が見出されたジストロフィーチキンの神経線維が減少することなく残存していることは（図2）その神経細胞が筋細胞とシナプスを形成している可能性を示唆している。

本研究で明らかとなった孵化後初期におけるジストロフィー筋線維数の増加の抑制が神経側の要因に起因するか，筋側の要因によるかは今後さらに追究する必要がある。

文　　献

1) Hironaka, T., Ikari, Y., Miyata, Y., Morimoto, S., and Tsunoo, A. (1984). Transplantation of extensor carpi radialis longus muscle in normal and dystrophic chicks. *Exp. Neurol.* 83: 392-402.
2) Hironaka, T., Ikari, Y. and Miyata, Y. (1984). Development and growth of extensor carpi radialis longus muscle in normal and dystrophic chickens. *Exp. Neurol.* 83: 378-391.
3) Bennett, M.R. and Pettigrew, A.G. (1974). The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol.* 241: 515-545.
4) Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 270A.
5) Cowan, W.M. (1973). Neuronal death as a regulative mechanism in the control of cell number in the nervous system. In Development and Aging in the Nervous System, ed Rockstein, M. pp. 19-41, Academic Press, New York.
6) Pittman, R. and Oppenheim, R.W. (1979). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. *J. comp. Neurol.* 187: 425-446.

3　ジストロフィーハムスターと正常ハムスター間の筋の交換移植についての研究および再生筋の再移植に関する研究

寺　尾　寿　夫
研究協力者　増　野　和　子　　高　津　成　美

ジストロフィー筋が正常な動物に移植された時に如何なる再生を受け，また逆に正常筋がジストロフィー動物に移植された場合に如何なる変化を受けるかを知ることは，筋ジストロフィーの発症に関する筋内性または筋外性因子の存在を明らかにする上にきわめて重要である。[1)2)3)]

昨年我々は筋ジストロフィーハムスターBIO 14.6とコントロールハムスターF_1Bを用いて，骨格筋の交換移植を行ってその再生現象を研究したが，その後もこの研究は続けられ，新しい知見を得たのでこれを報告する。

また筋の再生はsatellite cellが活性化されて起るといわれているが，この様にして再生した筋にもsatellite cellは形成されていると考えられ，これを再び移植すれば再度再生現象が起ると思われる。本年はこの再生筋の再生能力がどの程度保たれているかについても検討を加えた。

1）筋ジストロフィーハムスターの骨格筋の交換移植について

方法および動物

使用した動物はジストロフィーハムスターBIO 14.6とコントロールハムスターBIO F_1Bであり，これらの動物のEDLを次の組合せで移植した。移植法は先回報告したものと同じである。

	Donor (EDL)	Host
1）	dystrophy	control
2）	control	dystrophy
3）	control	control
4）	dystrophy	dystrophy

これらのgraftは移植後種々の時間を経て取り出し，直ちにcryostattにより切片を作製し，組織学的および組織化学的に染色を行って再生状態を研究した。

筋の再生の指標としては，今回も再生筋線維の直径と再生筋線維の数を用いた。

再生筋線維の直径は，1本の再生筋を上中下の3部分に分けその各部より合計1,000本の直径を測定した。また再生筋線維の数は3部分の各々のcross-section標本につき，筋線維の数を数えそれらの平均をもってそのgraft中の再生筋線維の数とした。

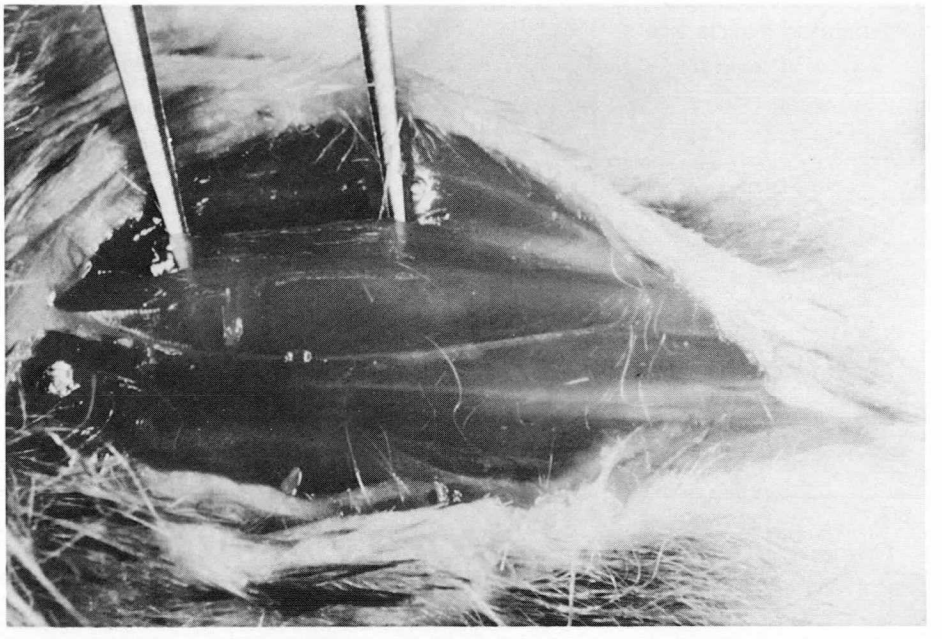
結果および考察

EDLの移植後，再生筋がどの位長期間保たれるかは興味のある問題である。ジストロフィーのEDLを正常のhostに移植し，1年目に観察してみると第1図に示す様な1ケの筋に発育している。またこれを取り出しcross-sectionの標本を作ってみると，第2図の如く新しい筋線維の束となっているのが見られる。

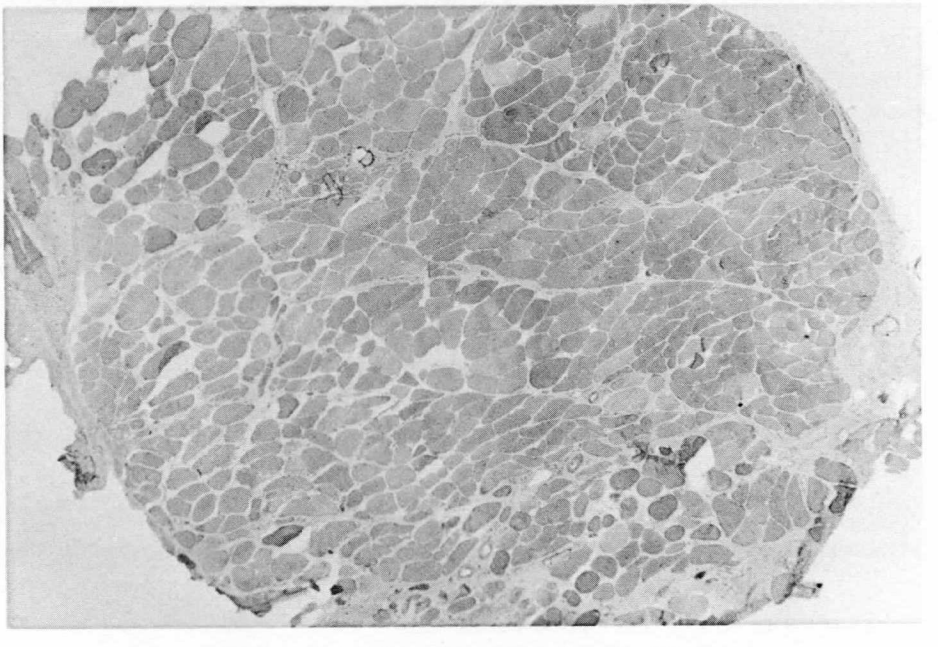
再生筋線維の直径：

さて，上述の4組の組合せについて移植後4ケ

＊帝京大学第1内科

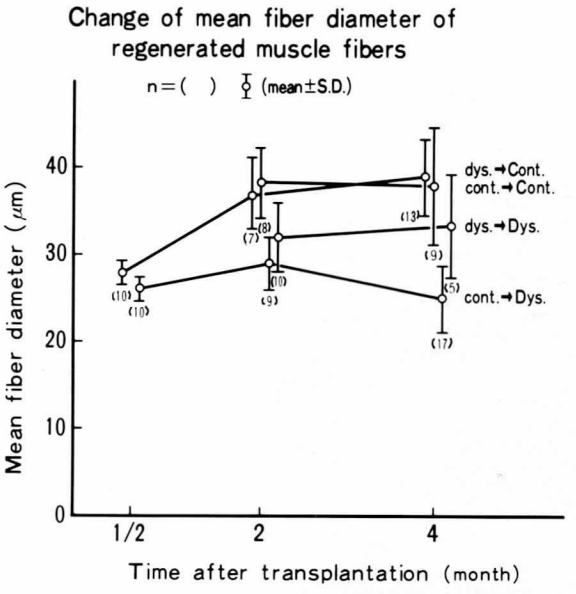


第1図　ジストロフィーハムスターのEDLを正常ハムスターに移植し，1年目の再生筋



第2図　第1図のcross-section 標本（H－E）

月まで経時的に再生筋線維の直径の平均を示したのが第3図である。これに示す様に再生筋線維の直径はジストロフィーのEDLでも，正常のEDLでも正常のhost に移植した場合は，ほとんど差はみられなかった。またいずれのEDLでも正常のhost に移植された場合の方が，ジストロフィーの



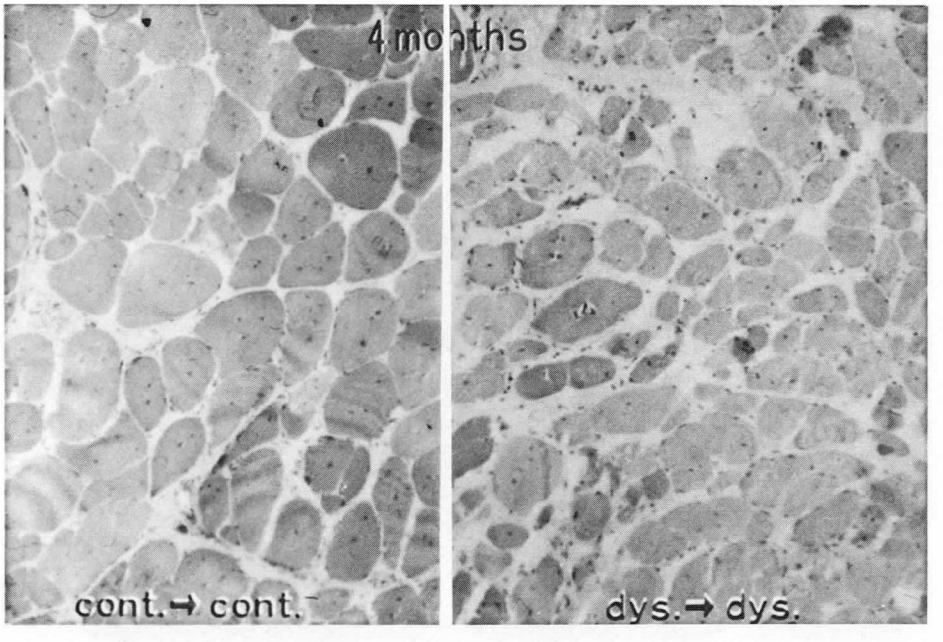
第3図　種々の組合せによるEDLの交換移植後4ケ月までの再生筋線維の直径の変化

host に移植された場合より再生筋の直径は大きかった。即ち再生筋の直径は或程度 host に依存することを示している。

これらの組合せの中，ジストロフィーのEDLをジストロフィーのhost に移植した場合は，再生筋の直径に大小不同が目立った。第4図は正常ハムスター同志（左側）とジストロフィーハムスター同志（右側）の交換移植4ケ月目の再生筋を比較したものである。この様にジストロフィー同志の交換移植の場合の方が再生筋線維は大小不同が明らかである。

再生筋線維の数：

一方，再生筋線維の数を数えてみると，移植後2ケ月位までは，いずれの組合せの交換移植でも大きな差はみられなかった。

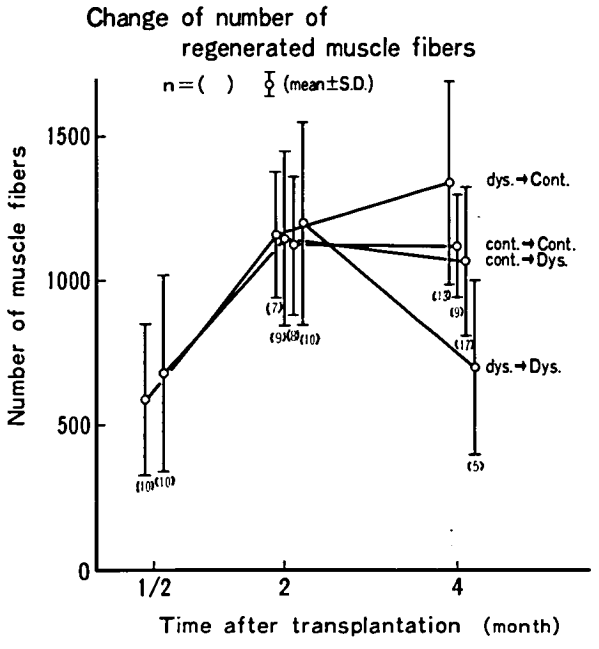


第4図　正常ハムスター間（左側）およびジストロフィーハムスター間のEDLの交換移植後4ケ月目の再生筋線維

しかし，それ以上時間が経つと変化が目立ってくる。第5図はそれを示したものである。

正常のEDLを移植した時にはhost は正常でもジストロフィーでも再生筋線維の数は大差なく，また移植後2ケ月と4ケ月の間にも大きな差はなかった。

しかしジストロフィーのEDLを移植した場合にはhost により非常に異る。host が正常の時は



第5図　種々の組合せによるEDLの交換移植後4ケ月までの再生筋線維の数の変化

再生筋線維の数はもっとも多く，4ケ月でもなお増加を示していた。他方hostがdystrophyの時は再生筋線維の数は非常に減少した。

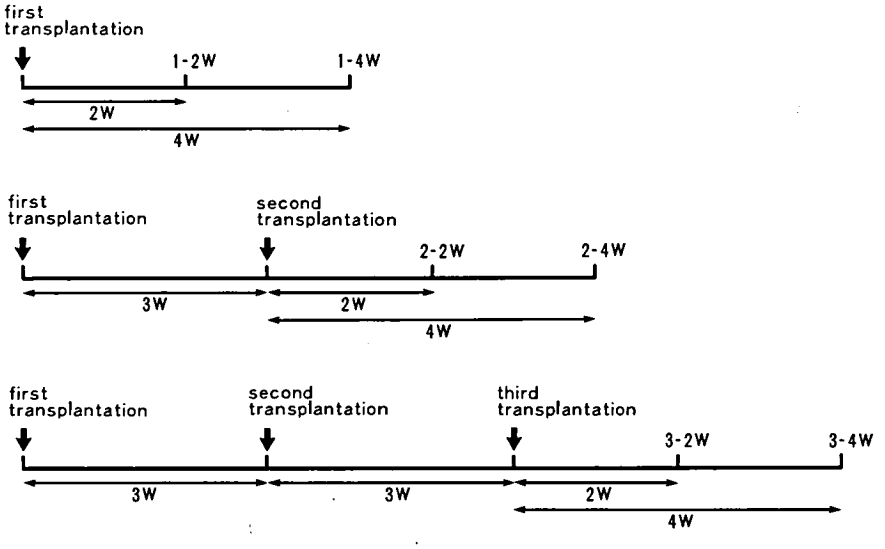
2）再生筋の再移植について

骨格筋の再生がsatellite cellによって始められることは現在通説になっている。この様にして出来た再生筋中にもまたsatellite cellが形成され含まれているわけで，これを移植すれば再び再生が起ると考えられる。この再生筋の再生能力を知るために我々は次の実験を行った。

動物および方法

この実験では動物はWister系のラットを使用した。移植に使用した筋肉はすべてEDLであり，方法はすべてautotransplantationを行った。

EDLを取り出し，これをまずもとの位置に移植する。3週間を経てからその再生筋を取り出し，他側のEDLを取り除いた場所に再び移植する。この再移植後，2週目と4週目にこれを取り出し，型の如く組織標本を作製して再生状態を検討した。また一部のラットは再移植筋をさらにもう一度取り出し，再び反対側すなわちスタートの位置に再々移植を行った。この場合も最終の移植後2週目と4週目に筋を取り出して観察した。これらの実験プランを第6図に示してある。



第6図　再移植（2回移植）および再々移植実験（ラットEDL）

結　　果

この実験の結果をまとめてみると次の如くなる。

(1) 再生筋も再移植を行うと再び再生過程をくり返す。再々移植の場合も同様である。

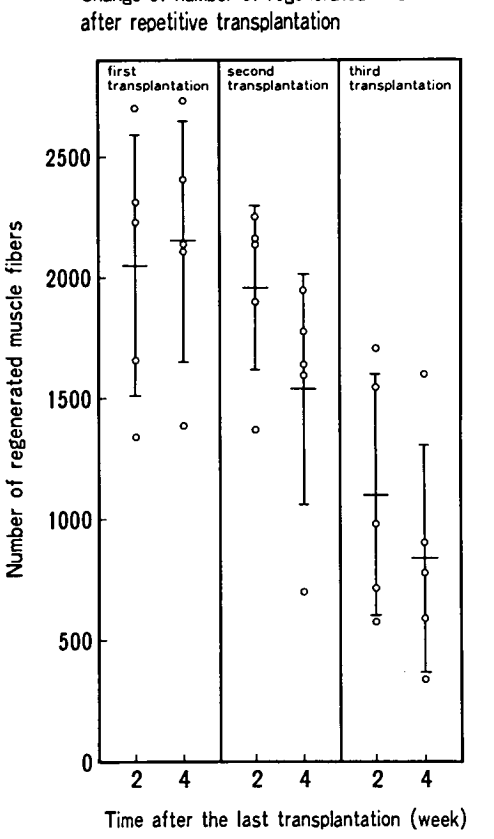
再生筋が再生する場合も，第1回移植の時の様に original の筋は一部を残して，変性消失し，再び新しい筋線維が形成されてくる。

(2) 再移植の場合は筋再生の過程が早い，ラットの EDL の場合，移植後の再生過程をみると，移植後4日目ではgraft 周辺にintermediate zone が形成され始めているが大部分はまだoriginal の筋線維で占められている。また移植後1週目でも中心部はまだdonor 本来の筋線維が残っているのが普通である。

しかし，再生筋の再移植の場合は筋線維は急速に変性し，4日目では既にほとんど見られず，graft 内は増殖した細胞の核で満たされている。そして移植後1週目には再生筋は中心部にも出現している。この様な再生過程の促進現象は再々移植の場合も同様である。

(3) 次に再生筋線維の数についてみると(第7図)初回移植と再移植の場合につき，最終移植後2週目と4週目の比較では，再移植筋の方が少い傾向がみられた。すなわち，初回移植の場合には移植後2週目と4週目の再生筋線維の数はそれぞれ2052±543，2157±499であったのに対し，再移植の場合はそれぞれ1967±355，1534±487であった。しかしこの差は統計学的に有意ではなかった。なお，3回移植すなわち再々移植の場合は再生筋線維の数は2週目，4週目ともに有意に減少していた。

(4) 再生筋線維の直径は再移植筋では明らかに細かった。第8図はこれを示したものである。初回移植の時の再生筋の平均直径は移植後2週目と4週目でそれぞれ20.7±0.35，24.1±5.8であったのに対し，再移植筋の場合はそれぞれ，15.6±3.1，14.7±4.5と有意に小さかった。3回移植を行うと再生筋の平均直径は最終移植後2週目で11.6±1.1，4週目で9.7±2.0とさらに細くなっていた。

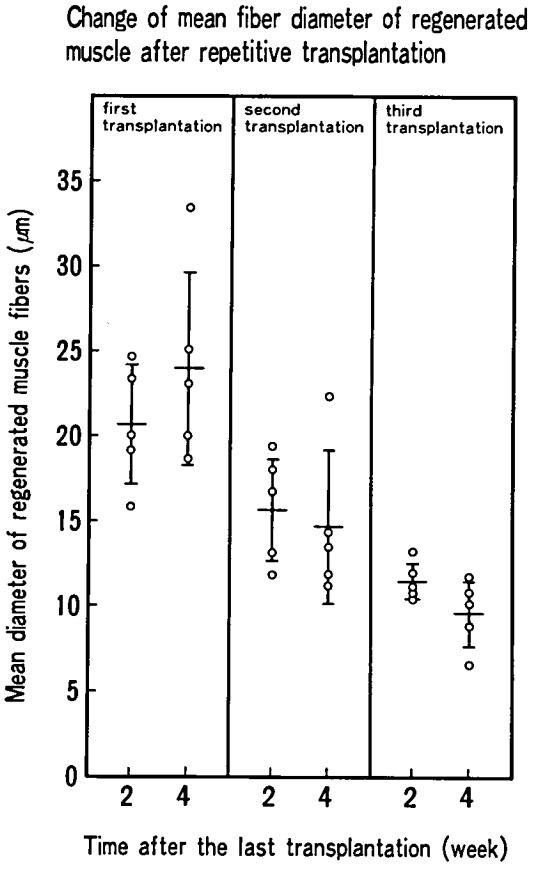


第7図　1回移植および反復移植後の再生筋線維の数の変化

考　　案

骨格筋を移植した場合，筋線維の再生と共にsatellite cell も新たに形成されて来ると考えられる。しかし，これらがどれだけ再生されるか，またその活性が反復移植により変化するかについては明らかになっていない。この研究で示される様に，再移植の場合には初回移植に比し，やゝ少い再生筋が形成されることから，satellite cell の活性が同じと仮定すればその数は original の EDL よりやゝ少なく形成されると想像される。

一方，再生筋の直径は再移植の場合は小さくなり，とくに3回移植ではさらに細くなり数も減少する。この現象は移植を反復することによりgraft



第8図　1回移植および反復移植後の再生筋線維の直径の変化

への神経の再支配，血液供給などの条件の悪化，結合組織の増加などの影響を受けることが大きいと考えられる。しかしsatellite cellの能力の低下も完全には否定できないだろう。この反復移植の影響がジストロフィー筋と正常筋で差があるか否かについて現在研究中である。

ま　と　め

1）ジストロフィーハムスターBIO 14.6とコントロールハムスターBIO F_1Bとの間およびそれぞれの動物間にEDLの交換移植を行い，再生筋の直径および数を比較し次の結果を得た。

a)再生筋線維の直径はEDLの由来に拘らず正常のhost内ではジストロフィーのhost内よりも大きくなる。

b)再生筋線維の数は，正常のEDLを移植した時はhostが正常でもジストロフィーでも移植後4ケ月までは大きな差がみられない。しかしジストロフィーのEDLを移植した場合は正常のhost内では数が増加するがジストロフィーのhost内では著しく減少する。

2）ラットのEDLの自家移植により，再生筋の再移植（2回移植）または再々移植（3回移植）を行い次の結果を得た。

a)再生筋も再移植により再び再生する。

b)再移植の場合は再生過程が初回移植より速い。

c)再生筋線維の数は初回移植に比し再移植の場合はやゝ少なく，再々移植では有意に減少した。

d)同様に再生筋線維の直径は再移植および再々移植で有意に小さかった。

文　　献

1) Jasmin, G. and Bokdawala, F.: Muscle transplantation in normal and dystrophic hamsters. *Rev. Can. Biol.*, 29: 197-201, 1970.
2) Neerunjun, J.S. and Dobowitz, V.: Muscle transplantation and regeneration in the dystrophic hamster. Part 1. Histological studies. *J. Neurol. Sci.*, 23: 505-519, 1974.
3) Neerunjun, J.S. and Dubowitz, V.: Muscle transplantation and regeneration in the dystrophic hamster. Part 2. Histochemical studies. *ibid*, 23: 521-536, 1974.

II　細胞培養および細胞生物学

4. 外来性トランスフェリンの体内代謝について　29

5. 筋芽細胞の成長を促進するラット脳由来酸性蛋白の性質　35

6. サテライト細胞の in vivo および in vitro における再生能　41

7. アフリカツメガエル初期胚の単一割球由来細胞群の選択的分離法　47

8. 鳥類胸腺筋様細胞の起源について　52

9. 高分子注入法の新しい試み　57

10. 哺乳動物の初期胚形成に影響する単クローン抗体　59

4　外来性トランスフェリンの体内代謝 — ニワトリ筋のヌードマウスへの移植のための基礎的研究

小　沢　鋏二郎
研究協力者　木　村　一　郎　　斎　藤　公　司

培養系における筋原細胞の増殖と分化には鉄またはその供与体としての鉄結合型トランスフェリン（Tf）が必須である[1~3]。このTfのもつ筋成長促進作用には綱特異性という一般則がほぼ成立し，哺乳類Tfは鳥類細胞には無効である[4,5]。

ニワトリ骨核筋をヌードマウスに移植したとき，長期にわたって活着させ，維持することは一般には困難である。これは培養系で確認されたTfの作用の一般則から考えて，ニワトリ筋原細胞に対してヌードマウスのTfが無効であることに起因するものと思われる。従って，外から適当な方法でニワトリTfを投与すれば，ニワトリ筋がヌードマウス体内でも維持され，さらには成長する可能性があるように思われる。この実験条件を確立することは，in vitro系とin vivo系をつなぐ中間的実験系としてのヌードマウス実験系の確立にとって極めて重要なことである。ここではその第一段階として，ニワトリTfをマウスに投与したとき，その血中濃度が経時的にどのように推移するかを調べた結果を報告する。血中糖タンパク質の血中からの消失の速度は，その糖鎖構造，特に末端シアール酸残基（NANA）の存在に大きく左右されることが知られているので[6]，糖鎖構造の異なるいくつかの精製ニワトリTf種について比較することを試みた。

＊国立武蔵療養所神経センター，機能研究部

方　　法

(1)　ニワトリTfの精製[2]　ニワトリ血清より精製したNANA2つのもの（Tf2），1つのもの（Tf1），Tf2をneuraminidase処理したものから分別精製したNANA1つのもの（Tf1′），NANAを欠くもの（Tf0′），および卵白より精製したNANAを欠くオボTf（oTf，Tf0′と異なって末端ガラクトースも欠いている）の5種を用いた。

(2)　Tfの筋成長促進活性の測定[2]　11日令のニワトリ胚胸筋細胞を85%イーグルMEM－15%馬血清から成る基本培養液に一定量の各種ニワトリTfを加えて培養し，筋成長の程度を細胞中に蓄積されたクレアチンキナーゼ活性を測定することにより調べた。

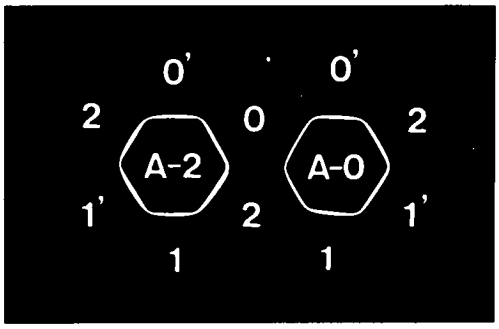
(3)　マウス血中のニワトリTfの濃度の測定[7]　0.15 M NaCl に溶かした各種ニワトリTfをマウス（BALB/cAJcl，5－6週令，雄）に尾静脈または背部皮下より投与し，経時的に尾部先端を切断することにより採血し，血清を得た。血清中のニワトリTfの濃度を抗Tf2ウサギ血清を用いたMancini の方法で測定した。

(4)　マウス血中のニワトリTfの等電点電気泳動による分析と〝無傷なTf〟の定量[8]　マウス血清を0.15 M NaCl，またはTfを鉄で飽和するために，0.15 M NaCl－0.1 mM $FeCl_3$－1 mM Na citrate－1 mM $NaHCO_3$（pH 8.6）で適当に稀釈したものを，平板ポリアクリルアミド等電点電気泳動したあと，ニワトリTfを抗Tf2ウサギ血清で選択的

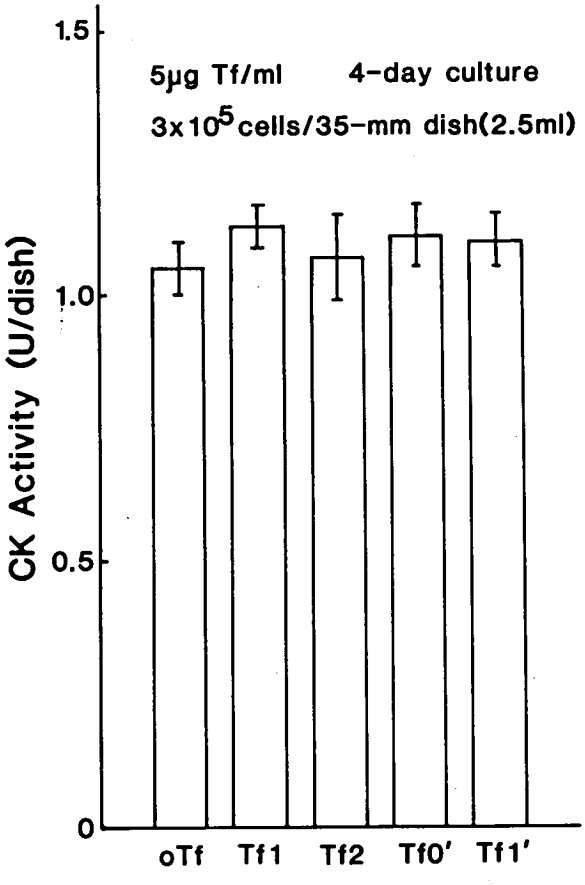
に直接免疫固定し，固定物をCoomassie Brilliant Blue R 250 で染色した。また染色された"無傷のTf"をそのバンドをデンシトメトリーすることにより定量した。

結果と考察

(1) 各種ニワトリTfの性状　糖の分析結果は，Tf1分子あたり，NANAはTf 2で2，Tf 1，Tf1′で1，Tf 0′，oTfで0，またヘキソースはTf 2，Tf 1，Tf 1′，Tf 0′で5，oTfで3にそれぞれ近い値を示し，これまでに報告されている値とよく一致した[9]。また，等電点は，Tf 2が5.7，Tf 1が5.9，oTfが6.1であるが[2]，Tf 1′はTf 1と，Tf 0′はoTfとそれぞれ区別できなかった。Ouchterlony法により，5種のTfの間には抗原性に差がないことも示された（図1）。また，in vitro系での筋成長促進活性について調べたところ，5種のTfの間には差がみられなかった（図2）。



第1図　各種Tfの Ouchterlony test.
(0)oTf; (1) Tf 1; (2) Tf 2; (0′) Tf 0′; (1′) Tf 1′;
(A-0) 抗oTf 血清; (A-2) 抗 Tf 2 血清



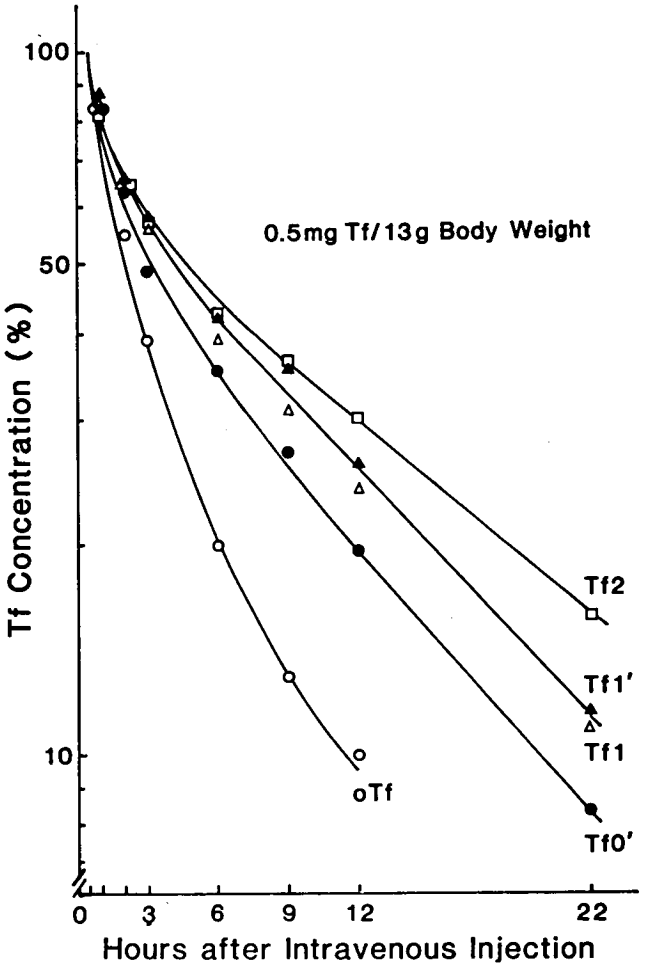
第2図　各種 Tf の筋成長促進活性

(2)　静脈注射したときの血中濃度の経時変化

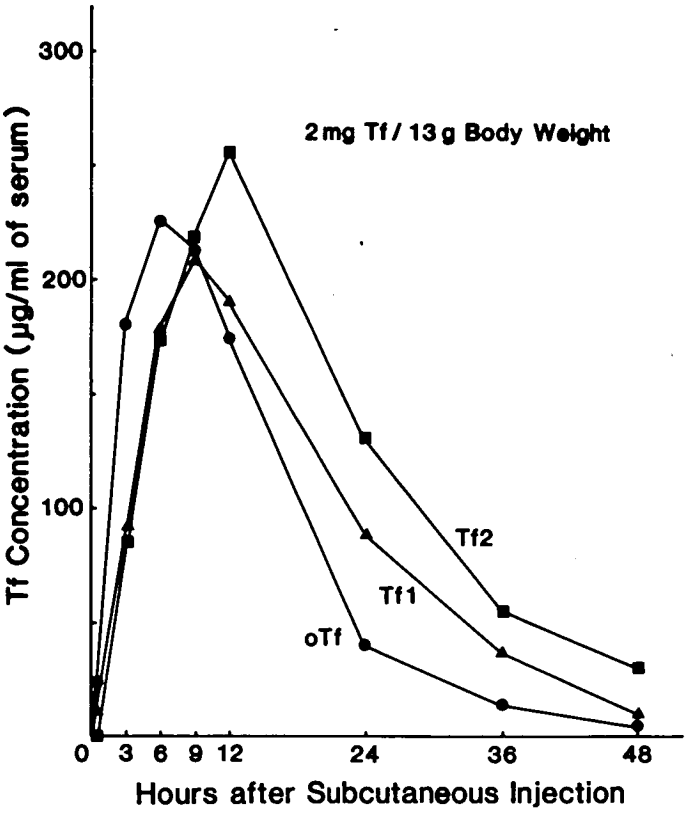
5種のTfについて調べたところ，それらの血中からの消失速度に大きな差があることがわかった（図3)。消失速度はTf 2 ＜ Tf 1 ≒ Tf 1′ ＜ Tf 0′ ＜ oTfの順であった。この結果は糖鎖の構造がTfの血中からの消失速度に大きく影響することを示している。末端NANAの数が少いほど，またNANAを欠く場合（Tf 0′とoTf）はその末端ガラクトースがなく，N―アセチルグリコサミンが露出している方（oTf）がそれぞれ速かに消失することを示している。

(3)　皮下注射したときの血中濃度の経時変化

Tf 2，Tf 1，oTfの3種について比較した。結果は図4に示されている。この場合も血中濃度の経時的推移は糖鎖構造に左右されることがわかった。皮下部から血中への移行は，NANAの数が少いものほど速い傾向がみられた。精製も容易であり，かつ大量に得ることができるため，将来のヌードマウスへの投与実験では有用なTf種となることが期待されるoTfは他のTf種に比べて皮下から速かに血中に入る反面，血中に入ったものは速やかに消失してゆく傾向を持つということがわかった。しかし，適当な量のTfを適当な時間間隔で皮下から投与してやれば，ある一定程度の血中濃度を維



第3図　静脈注射の場合の血中濃度の経時変化

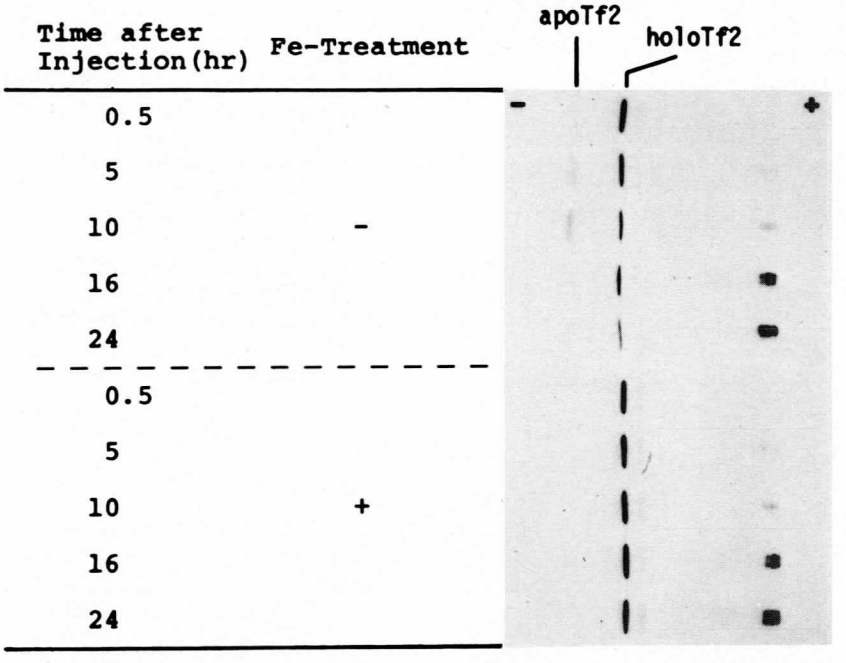


第4図　皮下注射の場合の血中濃度の経時変化

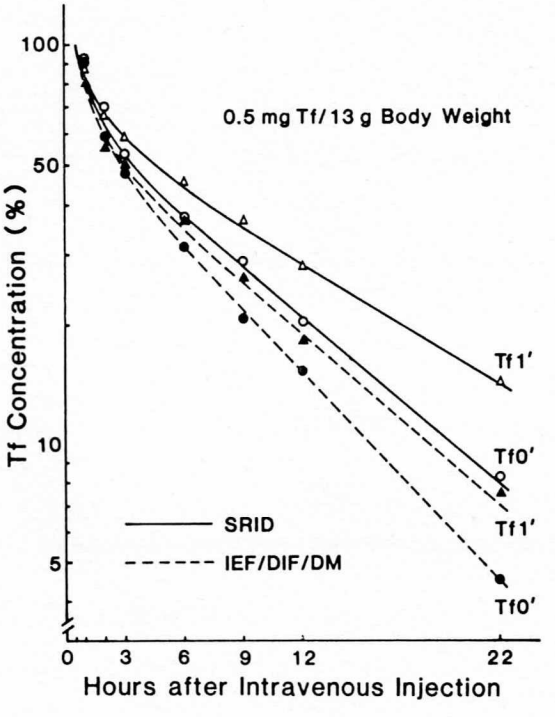
持しうることが予想された。事実，ヌードマウスに12時間毎に皮下よりoTf を投与したとき，ある一定濃度以上のoTfを血中に維持できるという結果を得ている。

(4)　循環血中のニワトリTfの性状と〝無傷なTf〟の消失速度　　マウス血中のニワトリTf分子の性状を等電点電気泳動によって経時的に調べてみると（図5），循環中にNANAの数が変化することはないこと，Tfの一部は鉄を失ってアポ型になることがわかった。さらに，時間とともにTfの分解物が血中に著明に蓄積することが示された。この分解物が抗原性を保持していることは明らかである。このことは抗原抗体反応に基づくManciniの方法で得られた上記(2)，(3)の測定結果は抗体との反応性をもった分解産物をも定量したものといえる。実際に，〝無傷なTf〟分子のみを定量してみると，予想通り〝無傷なTf〟は抗Tf抗体と反応するものよりもかなり速やかに血中から消失してゆくことがわかった（図6）。これまで報告されたタンパク質の血中消失速度に関する実験の多くが，^{125}I などで標識したタンパク質を投与して血漿または血清の放射能を測定し，その値をそのままタンパク濃度の指標としたり，Immunoassay によって定量したりすることにより行われているが，今回我々の得た結果はそれらの報告におけるタンパク質の血中消失速度は真の値を与えておらず，過小評価している可能性が強いことを示唆している。

ところで，移植筋に有効に作用するTfは血中のものではなく，組織液中のものである。今回の実験では組織液中のTf濃度と血中のそれとの関係は



第5図　血中Tf分子の性状の経時変化。Tf2について鉄飽和したものとしないものについて比較した。＋極側に存在するものが分解産物。



第6図　無傷なTf分子の血中からの消失。実線はManciniの方法で〝抗体と反応する〟Tfについて，破線は等電点電気泳動/直接免疫固定/デンシトメーターにより〝無傷な〟Tfについて測定したもの。

明らかではない。また，Tfの一部は循環過程で鉄を失って筋成長促進活性を持たないアポ型となる。投与されたTfが移植筋に対して有効な形で作用しうる条件を確立することはかなり困難な作業のように思われるが，我々はこれまでに得た基礎的データをもとに今後更に検討を加えてゆきたいと思っている。

文　献

1) Ozawa, E., *Proc. Japan Acad.*, 53(B): 130-132, 1977.
2) Kimura, I. et al., *Dev. Growth Differ.*, 24: 369-380, 1982.
3) Ii, I. et al. *Develop. Biol.*, 94: 366-377, 1982.
4) Ozawa, E. and Hagiwara, Y., *Proc. Japan Acad.*, 57(B): 406-409, 1981.
5) Hagiwara, Y. and Ozawa, E., *Dev. Growth Differ.*, 24: 115-123, 1982.
6) Ashwell, G. and Harford, J., *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 531-429, 1982.
7) Kimura, I. and Ozawa, E., *Dev. Growth Differ.*, 25: 523-529, 1983.
8) Kimura, I., *Dev. Growth Differ.*, 25: 531-535, 1983.
9) Williams, J., *Biochem. J.*, 108: 57-67, 1968.

5　筋芽細胞の成長を促進するラット脳由来酸性蛋白の性質

畑　山　一　郎*
研究協力者　佐　藤　清　美*

神経栄養因子の分子的性状および生物活性に関する特徴を明らかにすることは，正常筋の分化発達のみならず筋ジストロフィーの発症解明に重要な役割りを果すものと考えられる。神経栄養因子に関する研究は，種々の神経組織抽出液やその部分精製品の培養骨格筋細胞に対する添加効果を，細胞増殖や形態的，生化学的分化度を指標として行われてきた。これまで，性質の異なる多くの神経栄養因子が報告されてきたが，はじめて物質的に精製純化し，性状を明確にしたのはOhのグループ[1]で，この因子をSciatinと命名した。一方，小沢ら[2]がニワトリ血清に存在する筋成長因子をトランスフェリン(Tf)と同定し，神経組織においてもその存在を確認して以来，SciatinやPopielaのNTFも，Tfそのものあるいは Tf に非常に近い性質を有する蛋白質であることが判明した[3,4]。我々も，ラット脳にラット筋細胞の成長を促進する二種の活性物質が存在し，一つは分子量，等電点，免疫学的成績よりラット血清 Tf と区別されないことを確認した。[5]本研究では，もう一種の活性物質に関し，特に生物活性に関する特徴を中心として検索した。

材料と方法

筋細胞培養：出生直後または1日後のラット後肢筋をトリプシンにより細胞を分散させ，Yaffeの方法により単核の筋細胞を集めた。EagleのMEMに10%の仔牛血清を添加した培養液を用い[6]，ゼラチンで被膜を作った35mmプラスティックシャーレに 2×10^4 cells/dish になるように播種した。培養は，37℃，5%CO_2＋95%空気の条件で行った。脳抽出液または脳由来活性物質は，培養開始時に添加した。

脳由来活性物質の精製：Sprague－Dawleyラット脳を生理食塩水で洗篠後，使用時まで－20℃に保存しておいたものを用いた。Gospodarowiczの方法[7]に準じて，0.15M硫安溶液で破砕後，pH 8.5で4℃，2時間撹拌抽出した遠心上清を脳抽出液とした。硫安35－73%飽和で活性を沈澱部分に回収し，10mM Tris－HCl，pH 7.4 に透析した後，DE 52イオン交換クロマトグラフィーをNaClの段階溶液で行った。生物活性は 0－0.15 M NaClおよび0.25－0.50M NaClで溶出される二つの画分に認められた。前者は Tf と区別されなかった。後者の Sephadex G－200によるゲルろ過で，活性は void 付近に溶出された。そのカラム等電点電気泳動で活性は，pH 3.5に回収された。[5]

結　　果

Tf の混入のないラット脳由来筋成長因子をBrain－derived growth factor，以下 BDGF と称する。図1に BDGF の分子的性質を示した。ゲル内等電分画においてpH 3.5－4.0 に1本の蛋白帯が認められ，BDGFは脳の酸性蛋白の一つであることが判明した。PAGEで1本の蛋白帯が認

*弘前大学・医学部・第二生化学教室

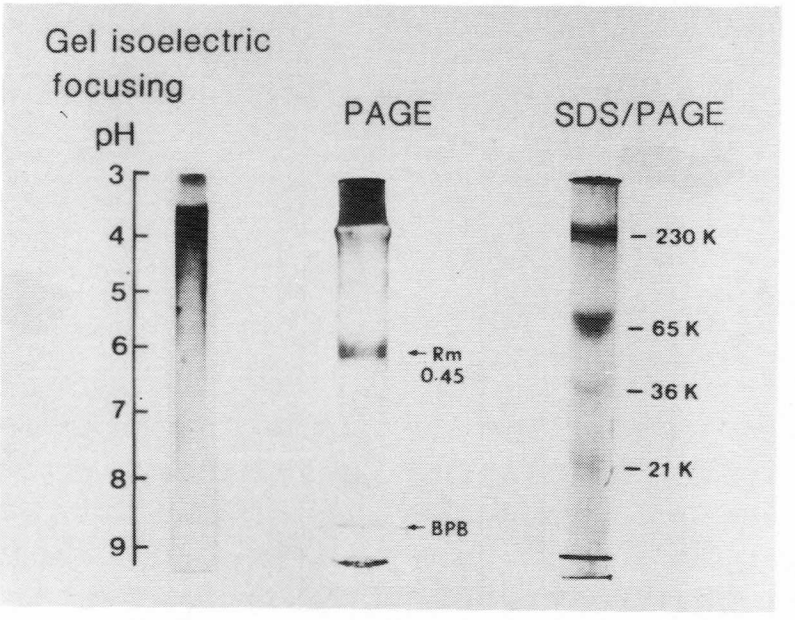


図1　ＢＤＧＦの分子的性質
左からゲル内等電分画，ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ），0.1％ＳＤＳを含むＰＡＧＥ

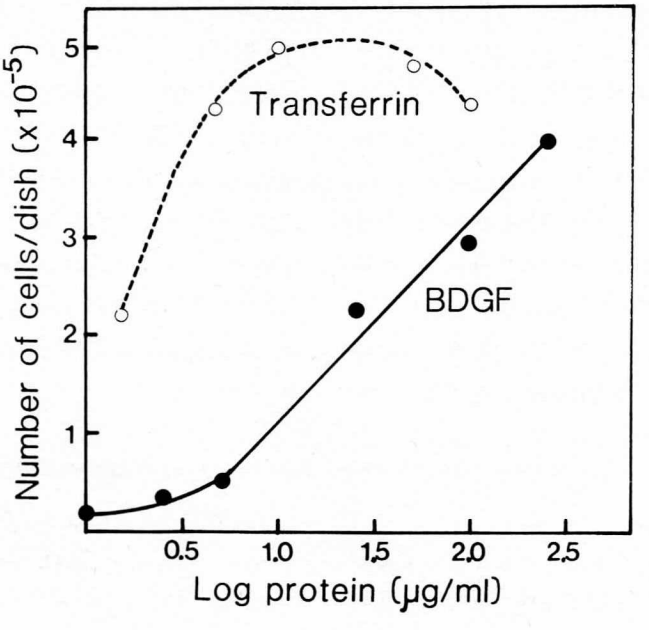


図2　筋細胞増殖に対するＢＤＧＦの用量反応曲線

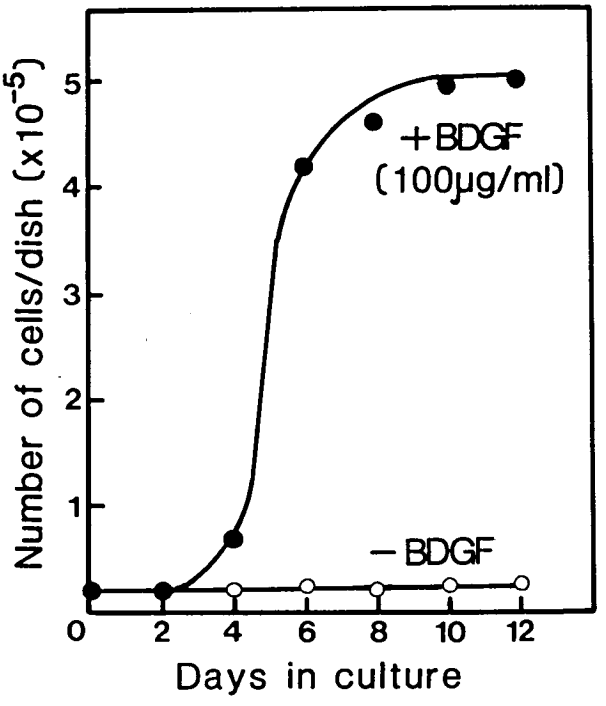


図3　ＢＤＧＦによる筋細胞数の経時変化

表1　ＢＤＧＦの精製

	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Activity (Units)	Yield (%)	Purity
Crude extract	3,822	10.0	38,220	100.0	1.0
DEAE-cellulose	45	100.0	4,500	16.8	10.0
Sephadex G-200	22	158.6	3,490	9.2	15.9

められるのに対し，SDS/PAGE では４本の蛋白帯が検出され，４種の蛋白成分が会合した高分子として生体中に存在するものと考えられる。

次に，BDGF のラット筋細胞の増殖に対する影響を調べた。図２は筋細胞増殖におけるBDGFの用量反応曲線を示す。終濃度10μg/mℓ で活性が発現し，以下 250 μg/mℓ まで直線的な上昇がみられた。一方，Tf は終濃度 10 μg/mℓ で最大活性が発現し，より高濃度では活性の低下傾向がみられた。図３は，BDGF 100 μg/mℓ 添加後の筋細胞増殖に関し，時間経過を追ったものであるが，培養４日目から６日目に対数的な増殖が認められ，

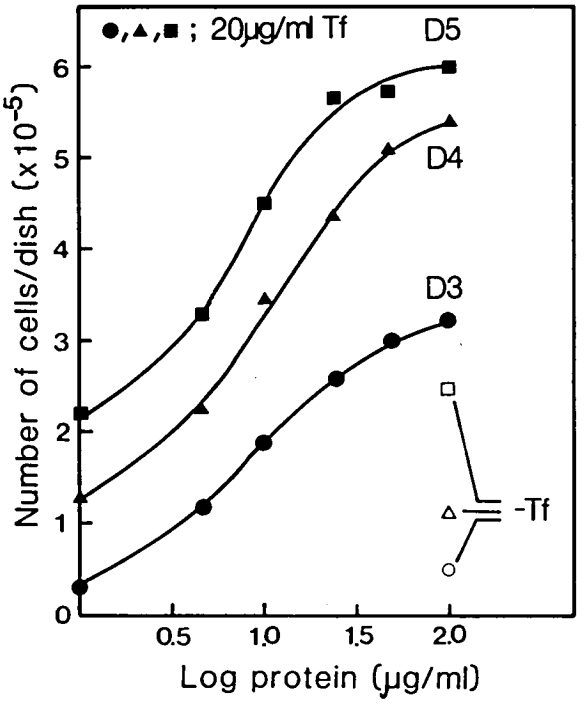


図4　BDGFおよびTfの筋細胞増殖に対する相乗効果

それ以降プラトーに達した。また，BDGF 未添加の対照では，細胞数の増減はみられなかった。以上の結果をもとに，BDGF の各精製段階のサンプルについて精製の程度を検討した。終濃度 100 μg/mℓ の蛋白が 2×10^4 cells/dish を培養5日目に 1×10^5 cells/dish，すなわち，培養時の5倍に細胞増殖を促す活性を1 Unit と規定した時の精製度を表1に示す。Sephadex G－200 の段階で，回収率 9.2%，純度 15.9倍であった。しかし，粗抽出液には，二種の活性物質，TfとBDGFが混在しており，両者が共存した場合に強い相乗効果が認められることから，粗抽出液中のBDGF単独の活性は表の数値よりかなり小さなものと考えられ，Sephadex G－200 での回収率，純度は低く算出しているものと考えられる。その Tf，BDGF の相乗効果発現の結果を図4に示す。Tf 20μg/mℓ またはBDGF 100μg/mℓ 各々単独添加で，培養3～5日目での細胞数は両者でほぼ同様の値を示した。Tf 濃度を一定にし，BDGF濃度を変えて添加した場合には，BDGF 単独では活性発現しないような低濃度で相乗効果が認められ，さらに，BDGF 100 μg/mℓ 同時添加により，いずれの計測時においても Tf，BDGF単独の和以上の効果が発現していた。図5は，この効果を写真で示したものである。培養4日目で，Tf，BDGF単独添加では未添加系に比較してmyoblastの数は多いが，一方，両者の共存した場合には，すでに myoblast の alignment，fusion が始まっている。6日目には単独添加系でmyotube形成が認められるが，共存系ではさらに大きなmyotubeが形成されていた。以上のことは，生理的にも二種の活性物質が筋あるいは他の細胞に対し協同的に作用している可能性を示唆する。

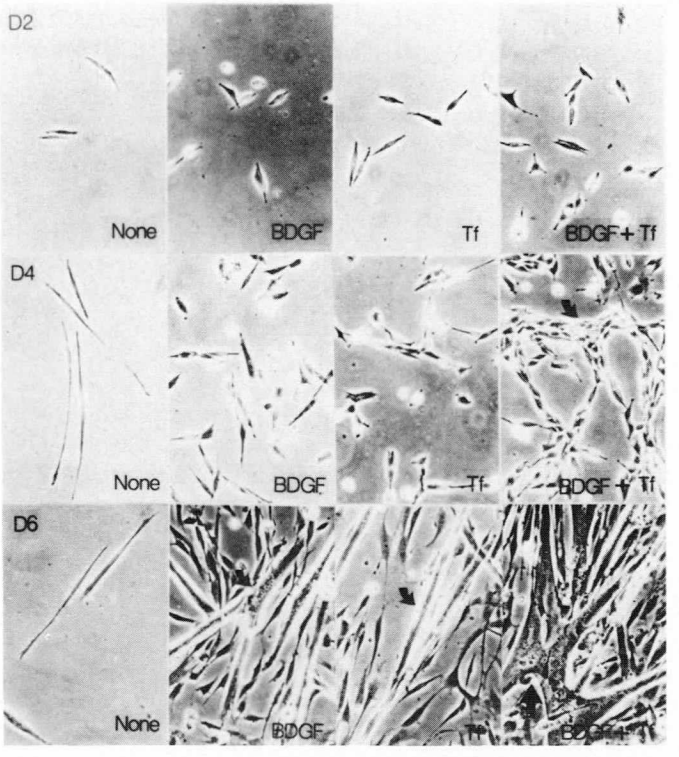


図5　ＢＤＧＦおよびＴｆの筋細胞成長に対する相乗効果
ＢＤＧＦは100μg/mℓ，Ｔｆは20μg/mℓ添加した。
培養４日目と６日目の矢印は myotube を指す。

考　　察

本研究において，ラット脳由来の，Ｔｆとは異なる筋成長因子，ＢＤＧＦの分子的性状および生物活性に関する特徴について検討した。このBDGFは，脳の酸性蛋白の一つであるが，既知の蛋白質に相当するものは認められない。1975年に，Oh[8]は，ニワトリ脳に分子量30万以上の蛋白性の筋成長因子が存在することを報告している。ＢＤＧＦは，この因子に相当するものと推測される。BDGFの活性サブユニットの検索に先立ち，１％ＳＤＳまたは６M尿素処理実験では，活性の完全な消失をもたらしたので（成績省略），ＳＤＳ/PAGE で認められた４種の成分は，疏水的に結合して活性を発現しているものと考えられる。

BDGFは，Ｔｆ共存下で，筋細胞の増殖分化に相乗的効果を発現した。Ｔｆは鉄原子の運搬蛋白として，Ｔｆ受容体を介して，種々の細胞の増殖や機能発現に関与していることが知られている。ラットＴｆなしにBDGFの作用が発現することから，BDGFはＴｆとは異なった機構で筋細胞に作用しているものと考えられるが，その詳しい機構については今後究明したい。

文　　献

1) Markelonis, G.J., Kemerer, V.F. & Oh, T.H. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**: 8967-8970.
2) Kimura, I., Hasegawa, T., Miura, T. & Ozawa, E. (1981) *Proc. Japan Acad.*, **57(B)**: 200-205.
3) Oh, T.H. & Markelonis, G.J. (1982) *J. Neurosci, Res.*, **8**: 535-545.

4) Beach, R.L., Popiela, H. & Festoff, B.W. (1983) *FEBS Lett.*, **156**; 151-156.
5) 松永宗雄，畑山一郎，佐藤清美，筋ジストロフィー症の疫学・臨床及び治療に関する研究（祖父江班）昭和57年度研究成果報告書 p.490-494.
6) 畑山一郎 (1982) 弘前医学，**34**, 666-676.
7) Gospodarowicz, D., Weseman, J. & Moran, J. (1975) *Nature*, **256**: 216-219.
8) Oh, T.H. (1975) *Exp. Neurol*, **46**: 432-438.

6　サテライト細胞の in vitro 及び in vivo に於ける再生能

香川　務*
研究協力者　槇永剛一*　橋本孝二**
巽　典之**　北野博司***

I　マウス再生筋芽細胞のクローン培養下での筋分化過程におけるその形態とCK(Creatine Kinase)アイソザイム

材料と方法

8週令以上の正常(C57BL/6+/+)及び筋ジストロフィ(C57BL/6J dy/dy)マウスを使用した。再生筋芽細胞の採取及び筋クロン培養の方法は既に報告した[1~3]。今回の培養では，FM(fresh medium)[1]で培養を開始し，24時間後，GM[1](growth m.)で培地を交換，培養9日以後はMM(maintenance m.：Eagle's MEM90%，馬血清10%)[3]で2～3日毎に培地を交換した。位相差顕微鏡で，各分化段階のコロニーの写真を撮って後，5μlのMOPSO緩衝液(pH7.8)で各コロニーを細い硝子管内に吸引採取して，2回の凍結融解の後，10,000rpm で5分間遠心を行い，上清の電気泳動を行った[4]。電気泳動，酵素反応はコーニング社のCardiotrak kit を用いて行い，CKアイソザイムの比率はコーニング社の蛍光スキャンニングメータで求めた。

結果と検討

個々の再生筋芽細胞はGMで増殖し，コロニーを形成した。9日目の培養では，球形又は紡錘形の筋芽細胞が相互に距離をおいて配列したコロニーから，紡錘形の細胞が既にパリセード形成を示すコロニーまで，いろいろな形態を示すコロニーが見られた(図1N1～2，D1～2)。此等，単核筋芽細胞からなるコロニーのCKの成分は100%BBであった(図2N1～2，D1～2)。この時期のコロニーには，既に，少数の短い筋管細胞が見られるものがあり(図1N3，D3)，このコロニーのCKはBBの他，少量のMB，MMを示した(図2N3，D3)。筋管細胞の数と大きさが増大するにつれ(図1N4～6，D4)。MB，つづいて，MMの比率が増加した(図2N4～6，D4)。以上の結果，筋管細胞に分化して，始めて，MB，MMの合成が可能となる事を示している。培養の経過と共に横紋の発現，筋線維の細小化，自発収縮が認められた(図1N7，D5)。これらのコロニーではMMの増加，BBの減少が見られた(図2N7，D5)。この培養条件では，培養17日以後，筋線維はその細小化や自発収縮の結果，培養皿より剥離，浮上し，これ以上培養を維持する事は困難であった。培養17日目の筋コロニー(図1N8，D6)CKのMMの比率は，正常，筋ジスのいづれにおいても，約70%であり，少量のMB，BBを示した(図2N8，D6)。生後8週の正常及び筋ジストロフィマウス骨格筋のCKはいづれも，MMがほとんど100%を占めていた(図2N9, D7)。この事は，この培養条件下で，最も分化した筋コロニーでも，生後8週マウス筋に比較し，少くとも，CKアイソザイムの分化に関する限り，未分化であると結論できる。なお，比較的未分化の筋

*国立療養所　刀根山病院
**大阪市立大学医学部
***国立循環器病センター

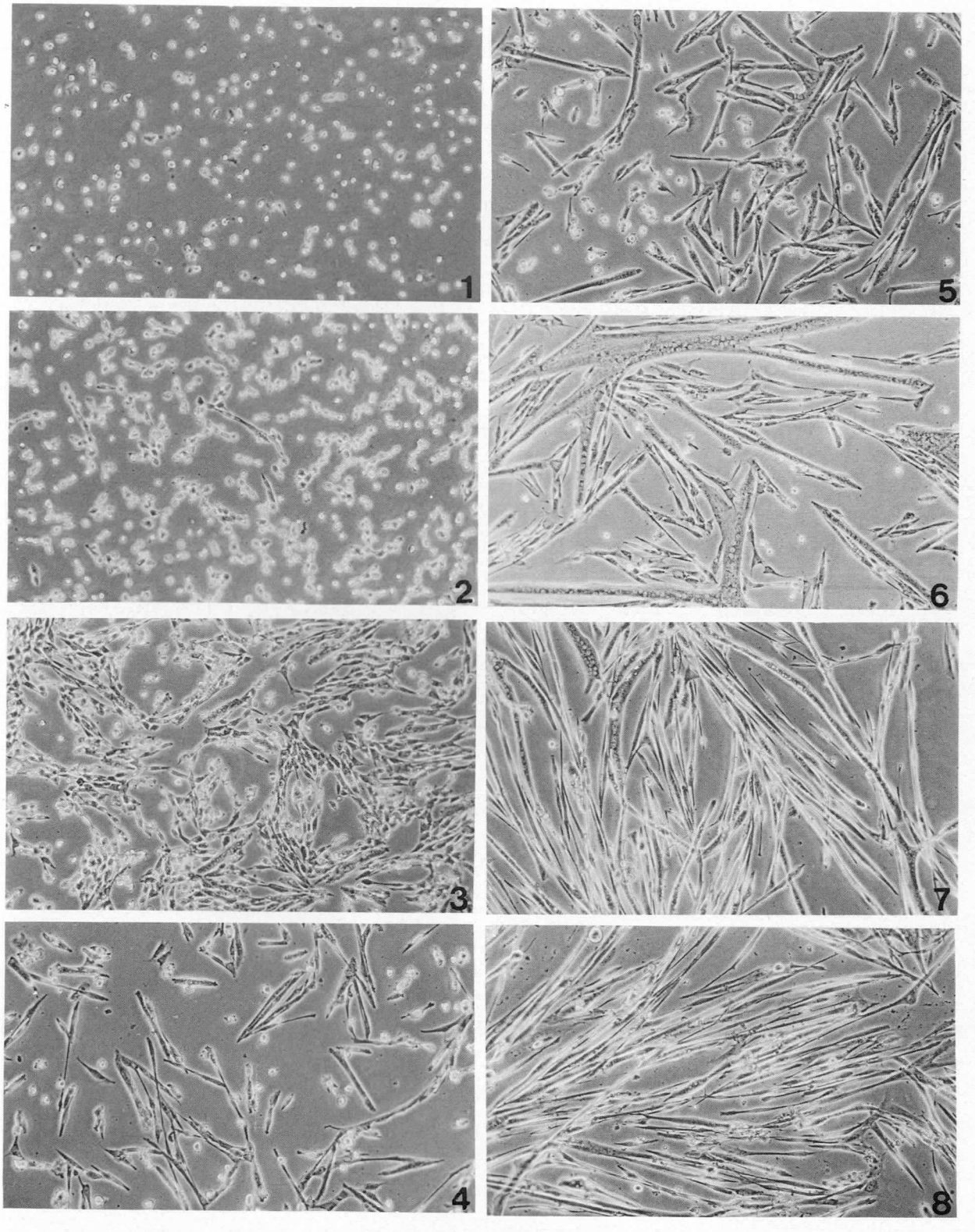


図1N　正常筋細胞コロニー

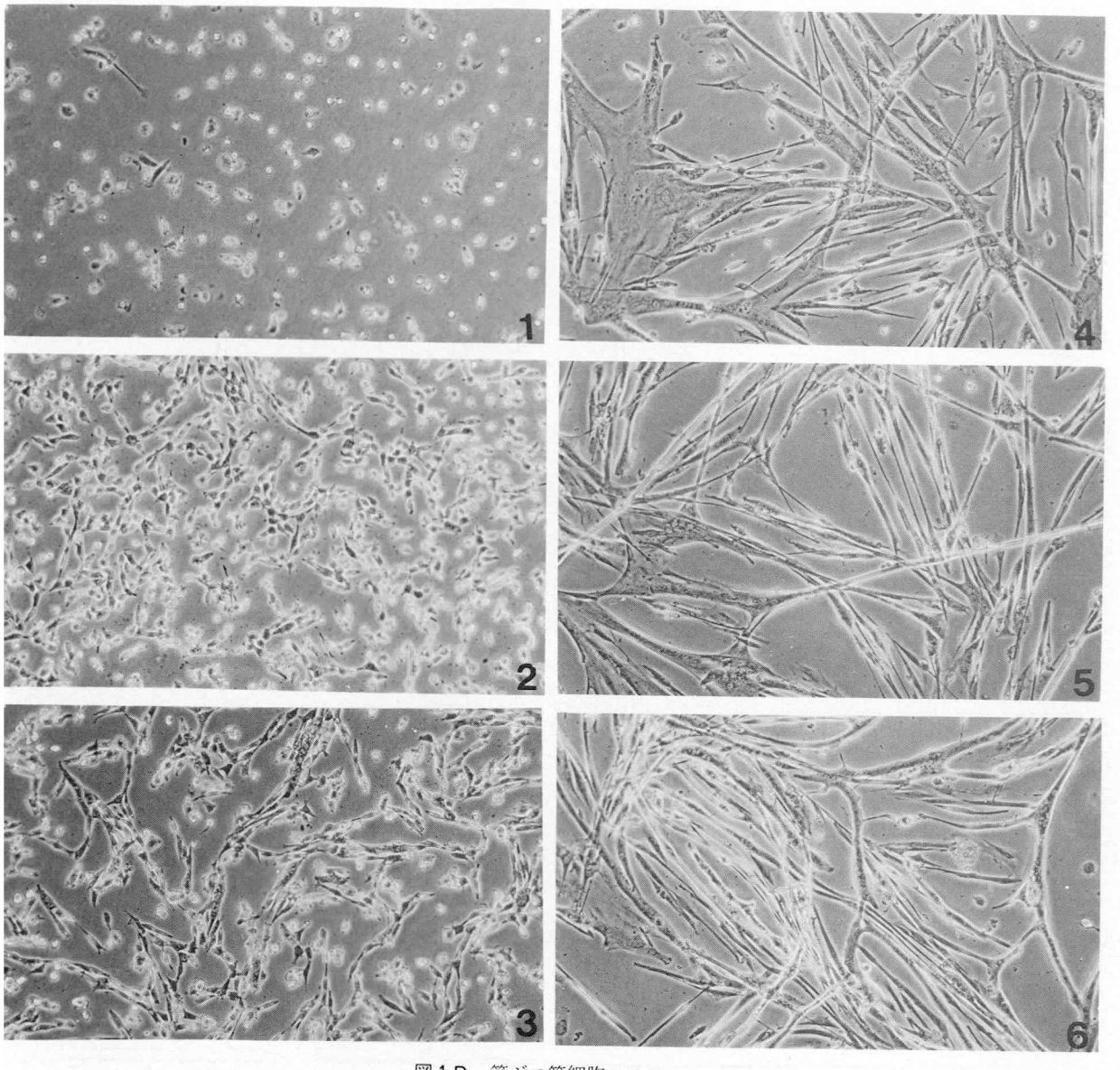


図1D　筋ジス筋細胞コロニー

コロニーのCK電気泳動で原点(Ⅰ)より陰極側に一つのピークが見られ，これは筋分化の進行と共に消失した（図2N1～4，D1～3）。この成分の筋分化における意義は現在不明である。

クロン培養下における正常及び筋ジストロフィ再生筋芽細胞の筋コロニー分化の過程を形態学的及びCKアイソザイム合成能から比較したが，両者の間で差を認めなかった。鶏胚筋芽細胞の多細胞培養下における筋分化過程のCKアイソザイム合成については既に報告されている[5]。クロン培養を用いる事によって純粋な筋細胞のCKアイソザイムパターンが得られること，各分化過程の筋細胞の形態とCKアイソザイムパターンとの関係を，より正確に知る事ができる等の利点がある。

Ⅱ　ラジオオートグラフィによる，正常及び筋ジストロフィマウス骨格筋の再生能の研究

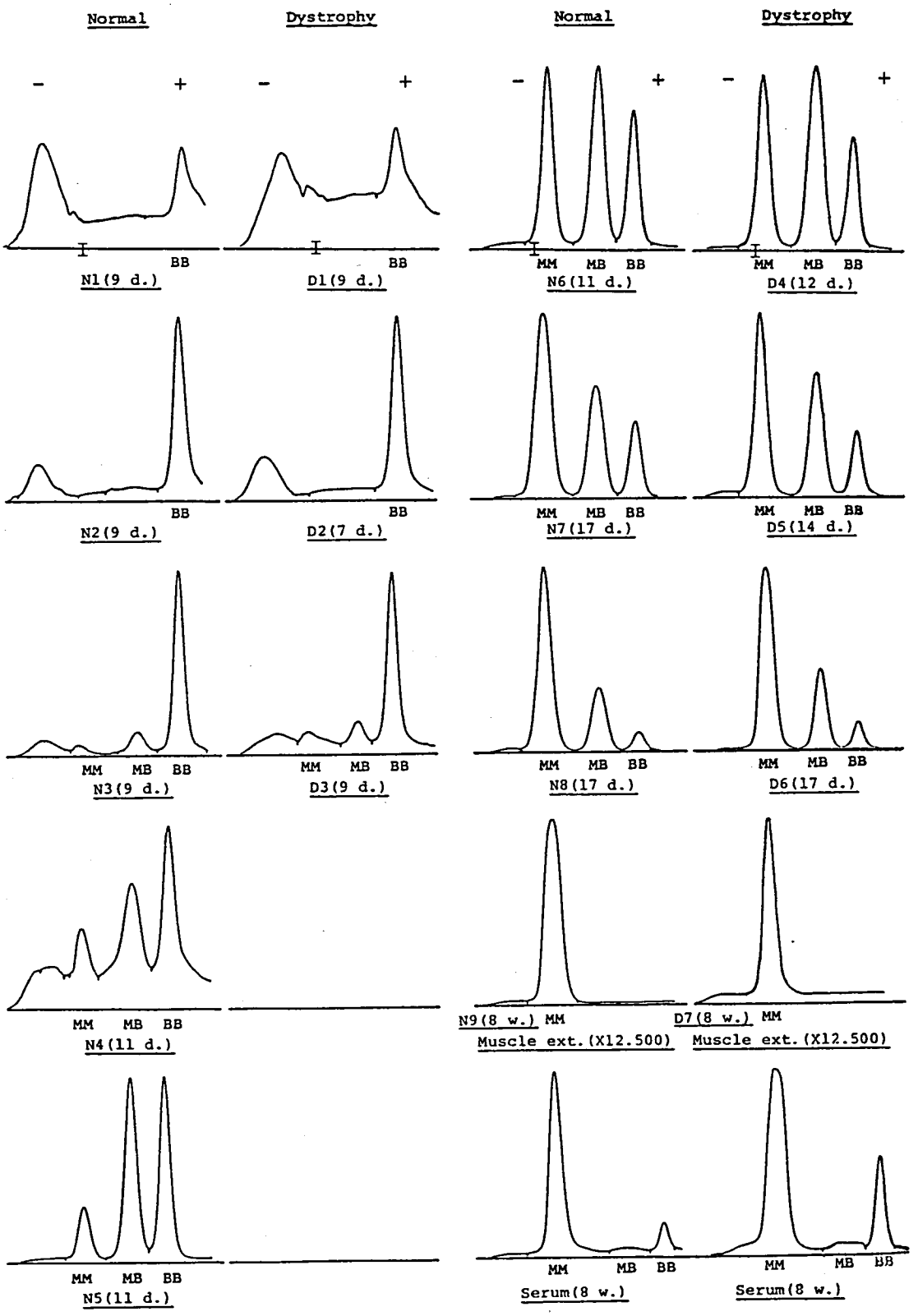


図2 各筋細胞コロニーの CK アイソザイム I：電気泳動の原点

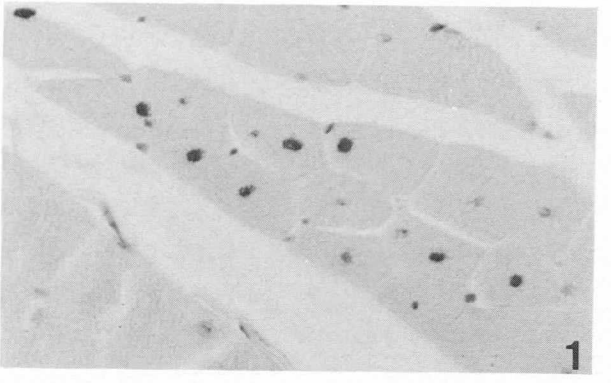


図3－1　正常筋再生3月

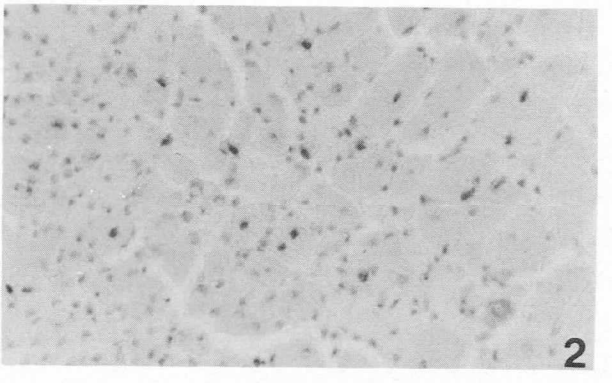


図3－2　筋ジス筋再生2月

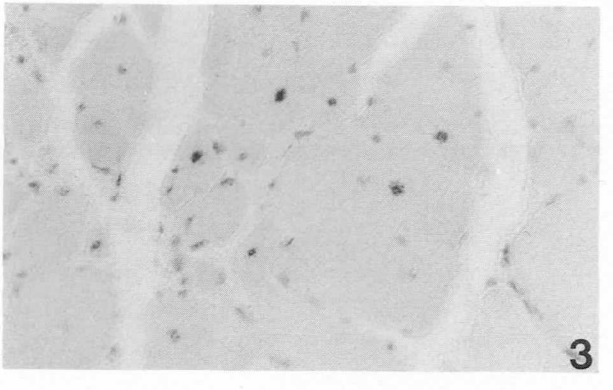


図3－3　筋ジス筋再生2月

材料と方法

6週令正常（C57BL/6 $^{+}/_{+}$）及び筋ジストロフィ（C57BL/6J dy/dy）マウスの大腿筋に 0.5％マーカイン[6]（正常：0.1 mℓ/肢，筋ジス：0.05 mℓ/肢）を注射し，約64時間後，同部位に^{3}H－チミジン（正常：100μc/肢，筋ジス：50μc/肢）を注射し，1/2，1，2，3月後に同部筋を採取，組織標本（各1/2～3月－標本と略称）を作製し，ディッピング法（サクラNR－M2）でラジオオートグラフィを行った。爆射時間は2週間である。

結果と検討

正常マウスでは1/2～3月の全標本（1/2 及び1月目各2肢，3月目3肢）で，核にグレインを示す筋線維群が認められた。3月－標本でもグレインを示す核の多くは，筋線維の中心部にあり（図3－1），この事は，正常マウス骨格筋の再生には3月以上を要する事を示している。筋ジス筋（1/2，1，2月目各2肢，3月目3肢）の場合，1/2～1月－標本では，核にグレインを示す筋線維は変性を示していなかった。2月－標本では，核にグレインを示す一群の筋線維が明らかに変性の開始を示しており（図3－2），同じ標本の近くには，殆んど変性を示さない筋線維群の核がグレインを示していた（図3－3）。3月－標本では，核にグレインを示す筋線維の数は極めて少数であった。しかし，その筋線維の中には，明らかな変性を示さないものも認められた。

以上をまとめると，1）再生開始3ケ月後では正常筋線維は未だ完全に分化していなかった。2）筋ジス筋では再生開始後，少くとも1ケ月以上を経過して後に，筋線維群毎に変性の開始が認められたが，その時期は一定でなかった，3）筋ジス筋線維が完全に再生するか否かについては，本実験では明らかにする事はできなかったが，再生開始後3ケ月以上変性を起さない筋線維の数は極めて少いと推定される。マウスdy－ジストロフィでは，完全に分化した筋線維が変性する事は知られているが，再生中の筋線維の大部分が，分化の途中で変性，消失する事を証明したのは本研究が始めてである。以上の各事実は，マウスdy－ジストロフィの成因を考える上で重要である。

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. (1983). *In "Muscular Dystrophy Biochemical Aspects"* (eds. by Ebashi, S., and Ozawa, E.) Japan Sci. Soc. Press. Tokyo and Springer-Verlag. Berlin, Heiderberg and New York.
4) 香川　務，北野博司，槇永剛一 (1983). 第16回日本発生生物学会 (A39).
5) Turner, D.C., Maier, V., and Eppenberger, H.M.: (1974). *Dev. Biol.* 37, 63.
6) Hall-Craggs, E.C.B. (1974). *Exp. Neurol.* 43: 349.

7　アフリカツメガエル初期胚の単一割球由来細胞群の選択的分離法

江　橋　節　郎*
研究協力者　三　川　　隆*　古　関　千寿子**

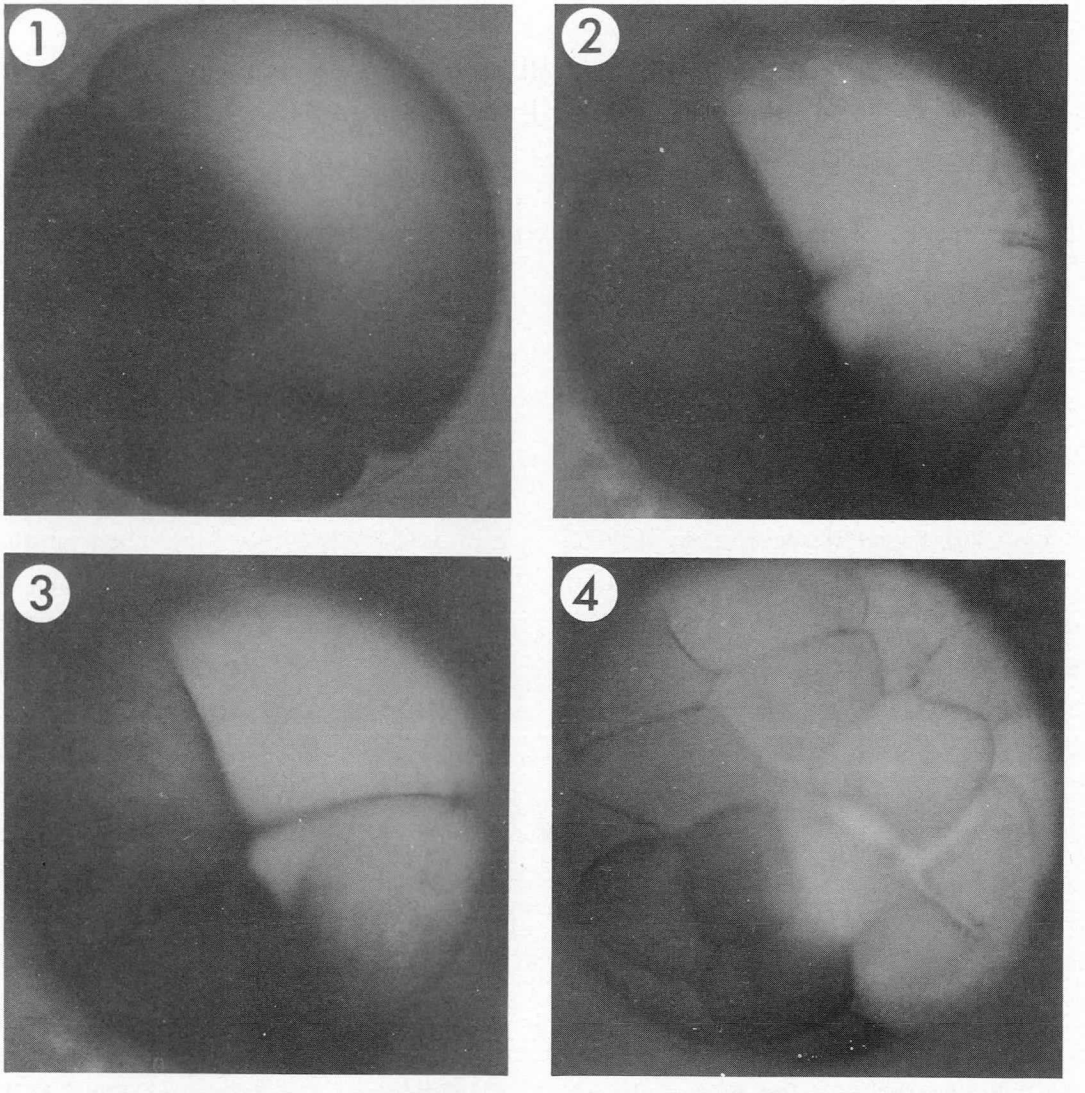
単一割球である受精卵は分裂をくりかえし，多細胞化する。発生初期の多細胞化の特色は増殖ではなく自らの細分にある。受精卵を細分することによって卵球体上に割球が配列される。細胞系謀の研究から球面上の割球の位置とそれから由来する細胞群が個体のどの部位を形成するかという対応関係は，明らかにされつつある（1－3）。しかし特定の割球あるいはその割球を起源とする子孫細胞群にどの様に個性が獲得され，いつ個性発現のスイッチが入るのか――発生の最初におこる細胞間の分子的変化に関する解析は，エアポケットの状態で手がつけられないでいる。特定割球から発生する子孫の細胞群は，胚の中で複雑な空間配置をとり，これを初期発生の任意の時期に選択的に集めてこなければならない。今回単一割球を標識することにより，特定割球から由来する子孫細胞群のみを選択的に分離することが可能となったので報告する。

特定割球の標識

特定割球あるいはそれを起源とする子孫細胞群を他から区別する為に標識が必要である。細胞の標識には特定の細胞に遺伝的突然変異を起こすことが最も確実な方法であるが，特別な場合を除き一般的には利用できない。キメラの利用も有用であるが，解像力に限界のある点や突然変異利用の場合と同様標識として使える形質が自由に選択できない。我々は最も直接的な方法としてマーカーの特定割球への注入をおこなった。マーカー物質としては①細胞毒性のないこと，②gap janction等を通過して隣接する細胞へ移動しないこと，③注入した細胞には全体に拡散すること等が必要である。またマーカーが細胞分裂に伴い希釈されない事も重要な条件であるが，本研究の目的は，発生の非常に早い時期におこる最初の細胞間の分子的変化のスイッチの解析である。幼生の体積がほとんど変化しない幼若幼生期までの解析が重要であり，注入するマーカーの希釈は考えなくてもよい。

マーカー物質としてはHRP（horseradish peroxidase）が有名である。しかし検出の為には固定，包埋し切片を作り染色するという作業が必要で，細胞を生かしたままマーカーを検出できないという欠点がある。我々は注入するマーカー物質として蛍光標識物質を考えた。これは後で述べる検出の容易さと分離とためである。マーカー物質の細胞内の安定性の為D型アミノ酸からなるペプチド(4)やD型の糖鎖に蛍光標識するのが最良と思われるが，簡単に入手できないし，蛍光量に限界がある。今回用いたマーカー物質は市販されているFITC－BSA（fluorescein isothiocyanate 標識ウシ血清 albumin）である。FITC－BSAを20 mg/ml程度の濃度で溶かしたものを，卵割のパターンが規則的なアフリカツメがエルの初期胚の特定割球に注入した。注入量は割球体積の5％以

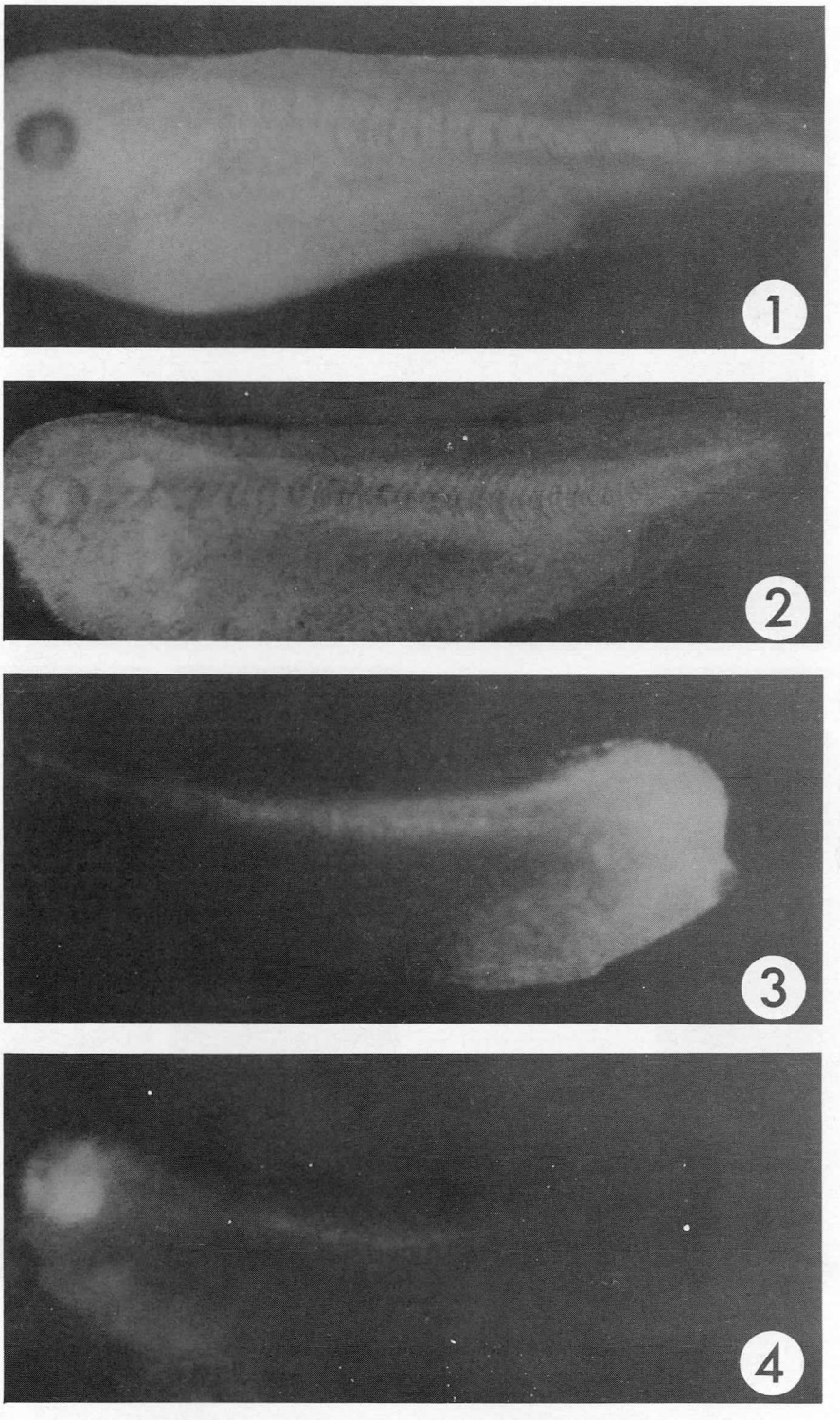
*岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・分子生理研究系・神経化学部門
**国立循環器病センター研究所・薬理部・分子薬理研究室



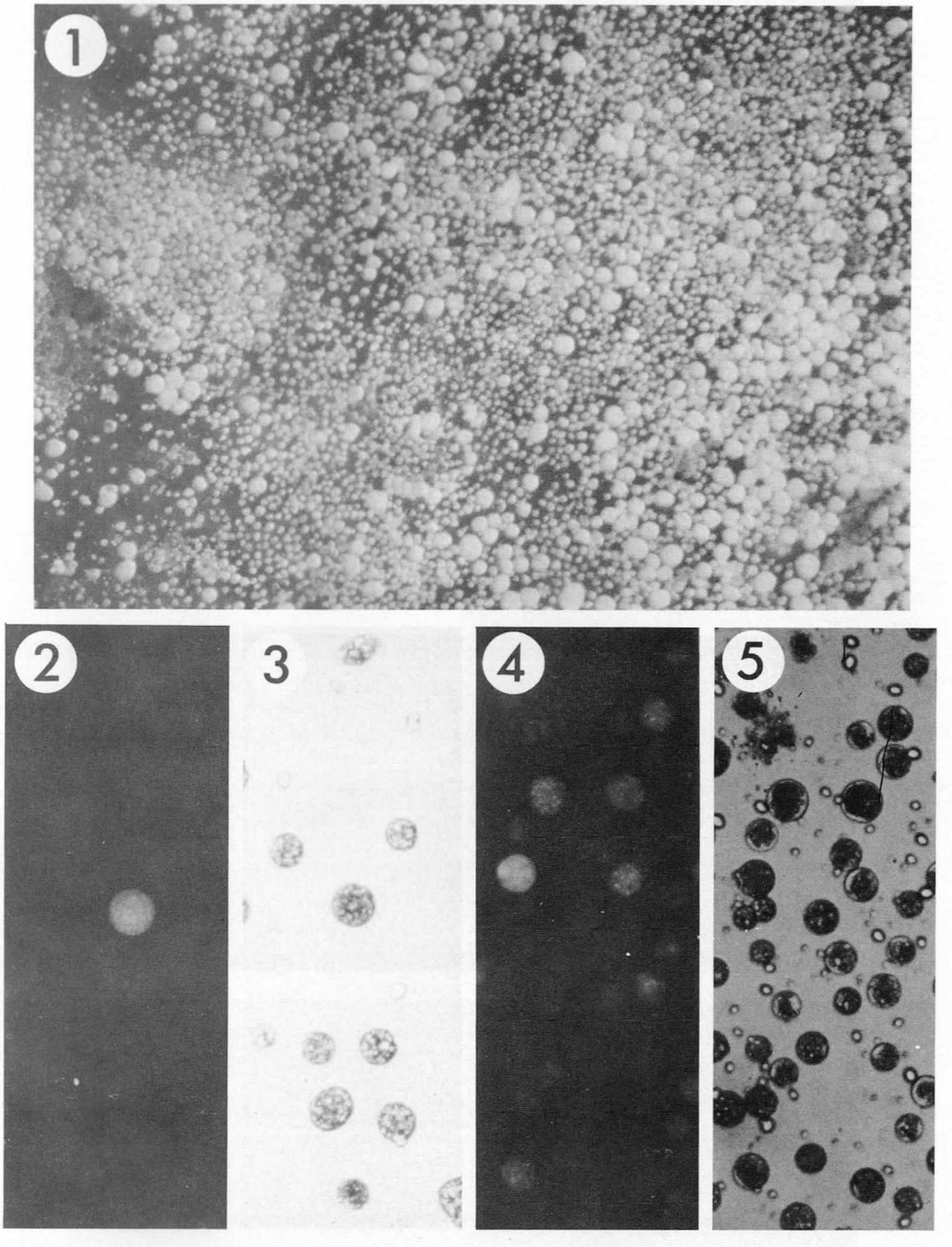
第1図　2細胞期の1割球への FITC－BSA の注入
①2細胞期に注入を受けた胚の蛍光写真
②第2分裂中
③4細胞期
④32細胞期

下である。図1には2細胞期の片方の割球に FITC－BSA を注入した結果を示した。注入されたマーカーが数分間の内に割球全体に拡散してゆく。隣の割球には移っていくことはなく，細胞分裂も異常なく進行した。

図2には，受精卵から8細胞期の初期胚の1つの細胞に FITC－BSA を注入し,30～40時間発生を続けた幼生の蛍光写真を示した。単一細胞の時に注入を受けたものは，個体全体に蛍光が分布していた（図2－1）。分裂過程で特定の細胞にマーカーが分配されないという事や，特定の細胞群がマーカーを除去するという事は無い様に思われる。幼若幼生期まででは，FITC－BSA はそれ程代謝をうけないのであろう。4細胞期の背側の1割球に注入をうけた場合には頭部・胸および神経管と思われる部位に蛍光が限局して検出された（図2



第2図 幼若幼生期の蛍光写真
①1細胞期に FITC－BSA の注入をうけた胚
②2細胞期の1割球に注入をうけた胚
③4細胞期の背側の一割球に注入をうけた胚
④8細胞期の上部背側の一割球に注入をうけた胚



第3図

①遊離した胚細胞の実体顕微鏡写真
②8細胞期の背側上部の一割球に注入をうけた胚の遊離細胞の蛍光写真
③②の透過光写真
④セルソーターで分離後の細胞群の蛍光写真
⑤④の透過光写真

－3)。8細胞期の背側上部の一割球に注入を受けた場合にはマーカーの存在部位はさらに限局された（図2－4)。

以上の結果からFITC－BSAは発生毒性は大きくないと言える。実際に発生は進行し大きなオタマジャクシになってゆく。しかしながら注入後100時間以上では体積の増大に伴い蛍光強度は急速に減少した。また特定の細胞だけに蛍光が検出されるので，代謝も急速にうけはじめるらしい。しかし少なくとも幼若幼生期までに関しては，注入を受けた割球に起源を発する子孫細胞群にマーカー物質は限局して存在する。

子孫細胞の選択的分離

特定割球に起源を発する細胞群だけを発生の任意の時期に分離するには，上述の様にFITC－BSAでマークされた細胞だけを集めてくることが出来ればよい。

細胞の持つ〝蛍光量〟と〝大きさ〟の2情報で細胞を分離し集める装置としてセルソーターが現在利用できる。我々は胚全細胞を一旦遊離細胞とし，マーカー物質を保持している細胞だけをセルソーターで集めることを試みた。

幼生の培養液から2価イオンを除くだけで自然に細胞が遊離してきた。内胚葉性および中胚葉性の細胞の遊離は筋肉反応期や心臓鼓動期でも容易に起こるが外胚葉性の細胞の遊離には，緩かなピペッティングが必要であった。図3－1に示す様に胚の細胞を遊離させる事ができた。これらの細胞の中からマーカーを保持する細胞だけをセルソーターで分離することができた（図3－2～図3－5)。

以上の方法で特定の細胞を標識しその細胞から生じる子孫細胞の個体形成の過程を胚が生きたまま観察でき，さらに発生の任意の時期に子孫細胞群だけを分離し集めることが可能となった。

文　　献

1) Hirose, G. & Jacobson. M.: *Develop. Biol.*, **71**: 191-201, 1979.
2) Jacobson, M. & Hirose, G.: *Science*, **202**: 637-639, 1978.
3) Jacobson, M. & Hirose, G.: *J. Neurosci*, **1** 271-284: 1981.
4) Weisblat, D.A., Zackson, S.L., Blair, S.S. & Young, J.D.: *Science*, **209**: 1538-1541, 1980

8　鳥類胸腺筋様細胞の起源について

仲　村　春　和*

胸腺内に横紋筋様細胞が存在することはかなり以前から知られているが，近年この筋様細胞がコリンレセプターに対する自己免疫疾患である重症筋無力症の発現に関与しているのではないかといわれており興味を集めている[1,2,7,8]。胸腺内の筋様細胞の機能に関しては未だに不明であり，その起源に関しては内胚葉性の胸腺上皮から分化してくるとする説[6]，胸腺内の結合組織に由来するとする説[8]がある。胸腺の上皮は第3，第4鰓嚢からおちこんできた内胚葉性の細胞であることはよく知られている。一方胸腺内の結合組織については最近の研究により外胚葉性の神経堤由来であることが明らかにされている[4]。

本研究は胸腺の筋様細胞が神経堤由来かどうかを明らかにする目的で行なわれた。ウズラの細胞はニワトリの細胞と形態的に識別できるので，発生初期にウズラの神経堤をニワトリ胚に移植して，形態的に胸腺筋様細胞の由来を追求した。

材料と方法

孵卵2日目で7－10体節期のニワトリ胚から菱脳部の神経管の片側を切りとる。ここに同じ発生段階のウズラ胚の菱脳の片側を挿入する（図1）。孵卵19～20日（孵化直前）に移植を受けた側の胸腺を切りとって2.5％グルタールアルデヒドで固定する。1％オスミウム酸で後固定の後，脱水，エポン包埋後，超薄切片を作製し，酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し，電子顕微鏡で観察する。

移植を受けた胚の一部は孵卵16日目に移植を受けた側の胸腺を小さく切り，コラーゲンコートを施したファルコン培養皿に入れ培養する。培養には鶏血清を5％と，馬血清を15％の割合で含むEagle's MEMを用いた。培養2～3週間後に2.5％グルタールアルデヒドで固定し，脱水，包埋の後，超薄切片を作製し，電子顕微鏡で観察した。

図2と図3にウズラの筋様細胞とニワトリの筋様細胞を示してある。ウズラの細胞ではヘテロクロマチンが凝集しており，これが核小体のRNA部分と接している。一方ニワトリの細胞ではヘテロクロマチンと核小体のRNA部分が混在しているために，注意深く観察すると両者を形態的に識別することが可能である[3]。

結果と考察

胸腺の筋様細胞は孵化直前にミオフィラメントが見られるようになる[5]が，その数は少なく，胸腺の水平断面上に2～3の細胞が見られるのみである。筋様細胞は髄質の方に多くみられ，多核の細胞も少数ながら存在する。

ウズラの神経管を移植されたキメラ胚の胸腺では確かに結合組織は神経堤より移動してきた細胞でできている（図4，5）。筋様細胞に関してはその数が少ないことと，光顕で同定できないことからウズラの細胞かニワトリの細胞かを同定することは困難である。

図6にキメラ胚孵卵20日の胸腺に見られた筋様細胞を示してある。この細胞では細胞質にミオフィラメントが見られ，ヘテロクロマチンは凝集しているように思われるが，ウズラ細胞と断定するまでにはいたらない。

*広島大学医学部第1解剖学教室

キメラ胚の胸腺を細切して培養すると，上皮細胞と線維芽細胞がほとんどの部分を占めるが，5～6日たつと多核のミオチューブが見られるようになる。培養2週間後くらいになると自発的な収縮も見られるようになったが，位相差顕微鏡では横紋を確認することはできなかった。

ミオチューブのコロニーのあるところを電顕で観察すると細胞質内にミオフィラメントをもった細胞が多数存在することがわかった。ヘテロクロマチンがいくつかに分かれているが，どれもRNA部分と混じることなく凝集しているので，これはウズラの細胞と思われる。

本報告書に示した筋様細胞の写真のみではこれらがウズラの細胞だと断定することはできないがウズラ様の細胞が見つかったとはいえる。すなわちキメラ胚胸腺の筋様細胞は，移植されたニワトリ神経堤から移動，分化してきた可能性が高いといえる。

文　　献

1) Drachman, D.B. The biology of myasthenia gravis. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4: 195-225, 1981.
2) Kao, I. and Drachman, D.B. Thymic muscle cells bear acetylcholine receptors: Possible relation to myasthenia gravis. *Science*, 195: 74-75, 1977.
3) Le Douarin, N. Caracteristiques ultrastructurales du noyau interphasique chez la Caille et chez le Poulet et utilisation de cellules de Caille comme 'marqueures biologiques' en embryologie expérimentale. *Annls. Embryol. Morphol.*, 4: 125-135, 1971.
4) Le Lievre, C.S. and Le Douarin, N.M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: Analysis of chimeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34: 125-154, 1975.
5) Nakamura, H., Le Lievre, C.S. and Le Douarin, N.M. Electron microscopic observation of the myoid cells in birds. *Acta Anat. Nippon*, 56: 316-317, 1981. (Abstract)
6) Raviola, E. and Raviola, G. Striated muscle cells in the thymus of reptiles and birds: An electron microscopic study. *Am. J. Anat.*, 121: 623-646, 1967.
7) Rimmer, J.J. Myoid cells and myasthenia gravis: A phylogenetic overview. *Develop. Comp. Immunol.*, 4: 385-394, 1980.
8) Van de Velde, R.L. and Friedman, N.B. Thymic myoid cells and myasthenia gravis. *Am J. Pathol.*, 59: 347-368, 1970.

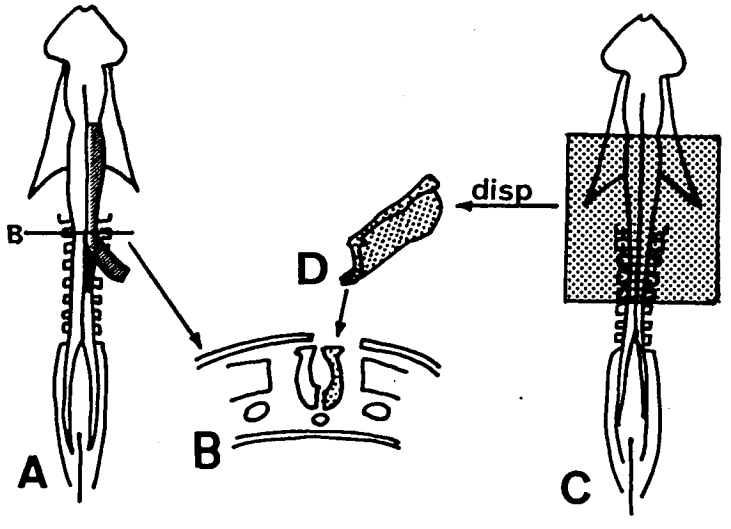
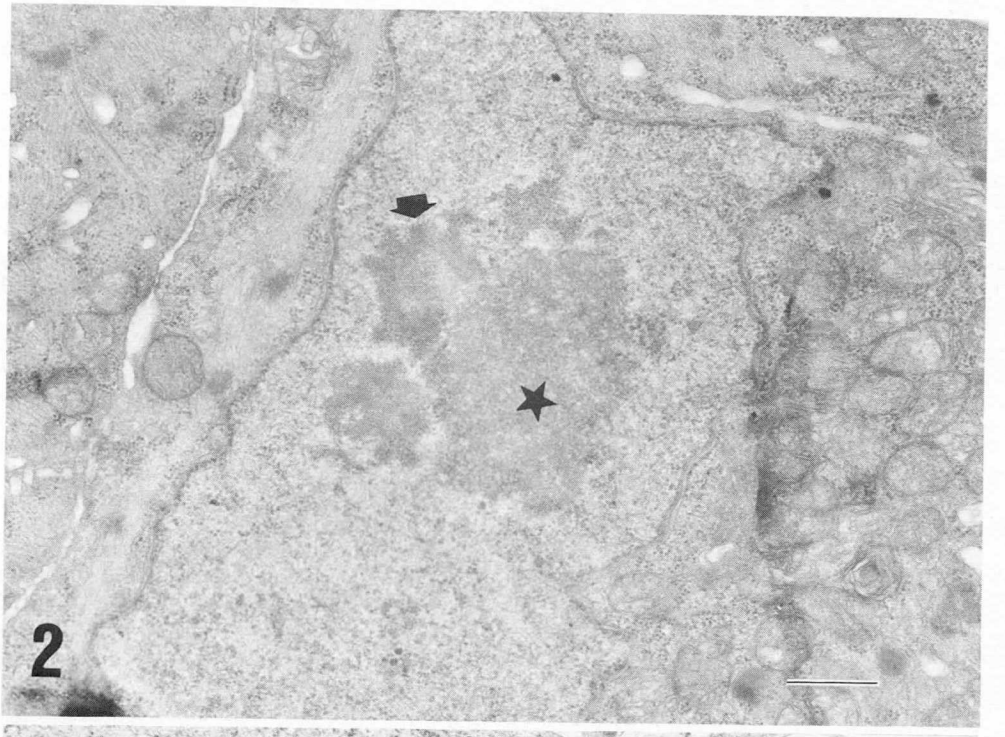


図1　移植の模式図。まず孵卵2日目のニワトリ胚（7－10体節期）より菱脳部神経管の片側を切りとる（A）。Bは横断図。次に同時期のウズラ胚（C）の菱脳部をディスパーゼ処理（disp）し，神経管の片側（D）を移植する。



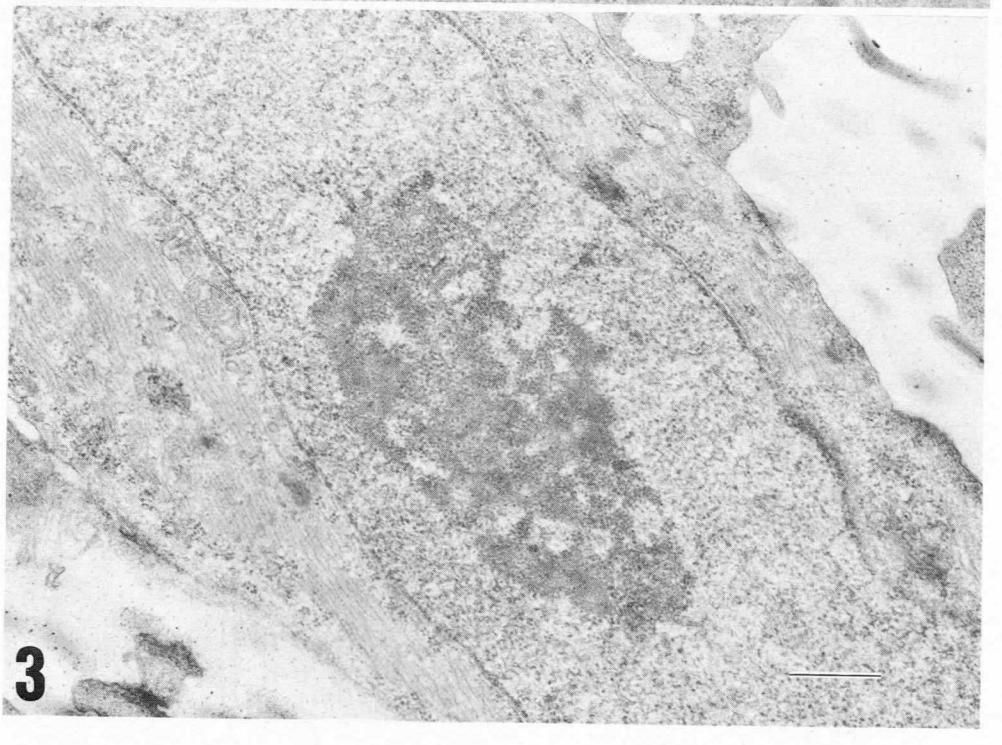


図2　ウズラ胸腺の筋様細胞。ウズラの細胞ではヘテロクロマチンが凝集し（星印）それが核小体RNA（矢印）と接している。バーは0.5 μm。

図3　ニワトリ胸腺の筋様細胞。ニワトリの細胞ではヘテロクロマチンと核小体RNAが混在している。バーは0.5 μm。

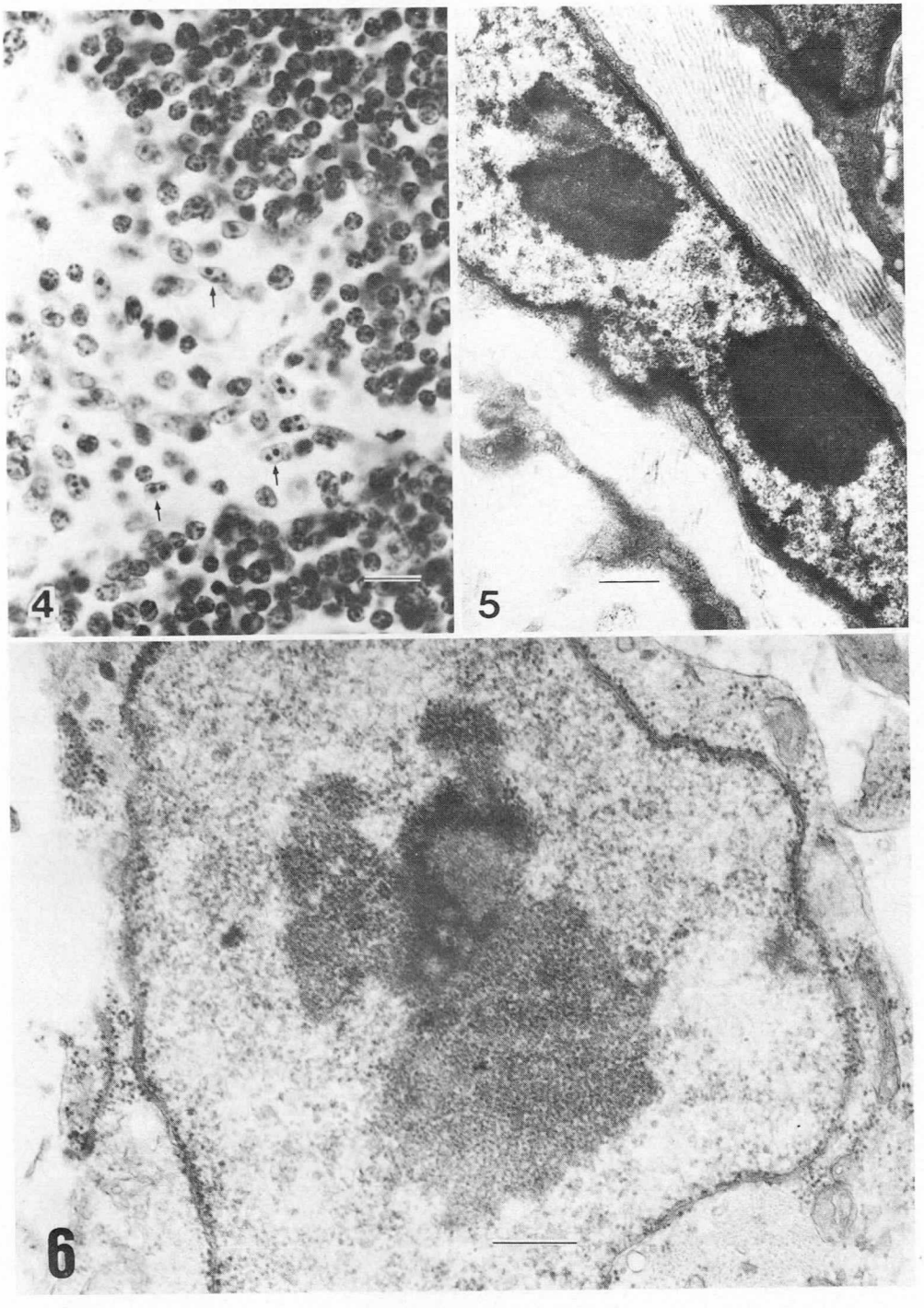


図 4 移植を受けた胚の胸腺。結合組織の細胞はウズラの細胞よりできている（矢印）。バーは10μm。

図 5 移植を受けた胚の胸腺中の結合組織細胞。この細胞は神経堤由来であるのでウズラの細胞である。バーは 0.5 μm。

図 6 移植を受けた胚の胸腺筋様細胞。これはウズラと思われる核をもった細胞である。バーは 0.5 μm。

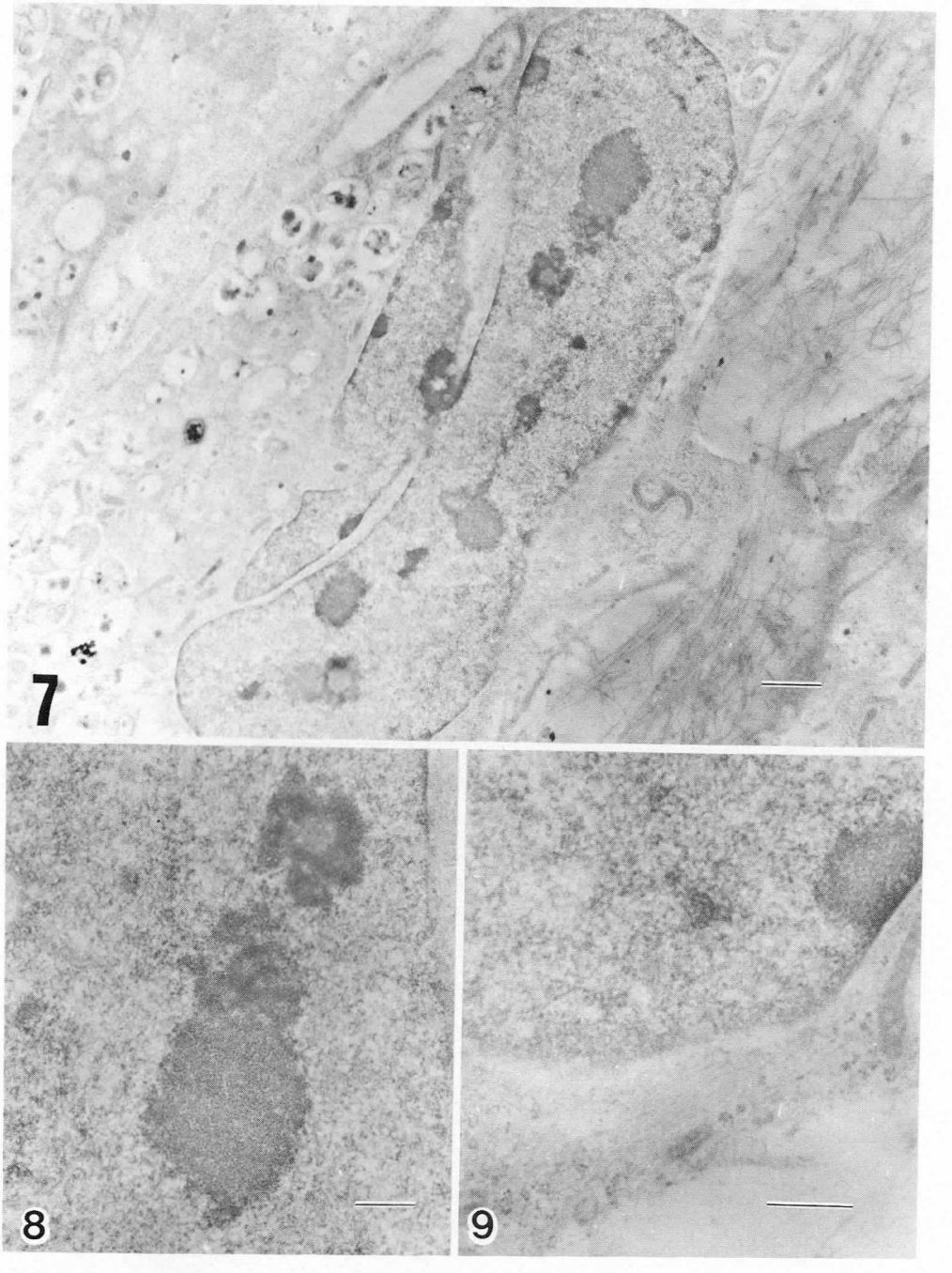


図7～9　移植を受けた胸腺を培養したときに見られた筋様細胞。この細胞はウズラと思われる核（図8）とミオフィラメントをもっている（図9）。バーは0.5 μm。

9　高分子注入法の新しい試み

岡　田　善　雄*
研究協力者　中　西　真　人*　内　田　　驍*

細胞融合現象を利用して生体高分子物質を生きている細胞内に注入することが可能である。すでに我々の研究室で3種類の方法が開発され，細胞遺伝生理学的研究に利用されている。

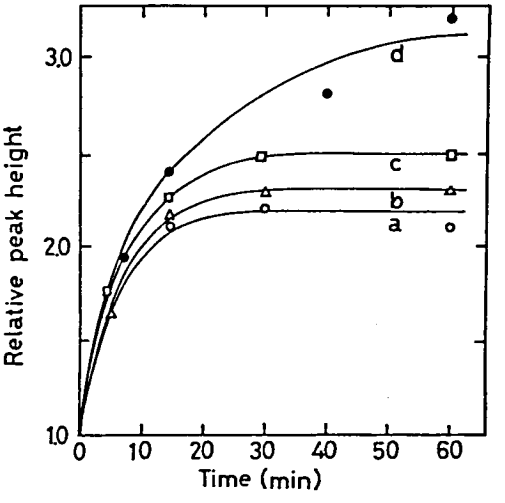
細胞融合現象を物質注入に利用することを意識し始めた頃，我々は4種類の方法が可能であると判断していたが，その最後の方法を具体的に示すのに時間がかかってしまった。本研究はこの最後の方法に関するものである。

1.　細胞融合現象の1側面

かって我々はHVJのリン脂質をスピン標識してヒト赤血球を反応させ，そのESRスペクトルの変化を観察したことがある（文献1）。
その目的は，HVJ外膜と赤血球膜との融合でスピン標識リン脂質の赤血球膜脂質による稀釈が急速に起こる筈で，その量をESRスペクトルで定量しようとしたのである。

第1図にその結果が示してある。横軸は反応時間で縦軸はHVJ外膜にぎっしりつまったスピン標識リン脂質（フォスファチジールコリン）分子の稀釈量と考えて頂きたい。37℃で両者を反応させると直ちにウイルスリン脂質と赤血球膜リン脂質の混合がおこり大体60分以内に平衡に達することがわかる。

この実験の途中で面白い現象が観察された（第2図)。インフルエンザウィルスはHVJと異って，中性或はアルカリ側では細胞融合反応を起こさない。

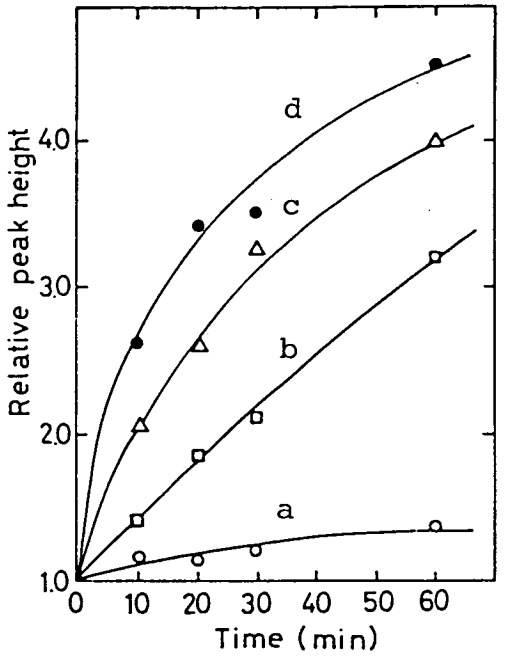


第1図　HVJ*のヒト赤血球への融合反応（37℃）でのESRスペクトルの経時的変化。
PC*のHVJ*内濃度は，
〔PC*〕／総ウイルスリン脂質＝(a) 0.6,(b) 1.5,
(c) 3,　(d) 6
である。

したがって，このような条件下で，ウイルス外膜リン脂質をスピン標識したインフルエンザウイルスとヒト赤血球を反応させても，ウイルスの赤血球表面への吸着は勿論効率良くおこるが，外膜と赤血球膜の融合はおこらずスピン標識リン脂質の稀釈もおこらない。ところがこの系に無標識のHVJを加えてやるとインフルエンザウイルス外膜と赤血球膜との反応が誘発され標識リン脂質の稀釈が現われるのである。しかもその稀釈量は加えたHVJの濃度に依存している。

他のいろいろな観察からHVJにより細胞膜面

*大阪大学・細胞工学センター



第2図　インフルエンザウイルス*外膜に組込まれたPC*の赤血球膜への移行のHVJによる誘発。
a) HVJなと
b) HVJ 200 HA単位添加
c) HVJ 800 HA単位添加
d) HVJ1500 HA単位添加

全体に大きな変化が現われ，それが細胞と細胞の融合を引きおこすと理解されていたが，第2図に示した現象もその1つの変型として理解することのできるものである。インフルエンザウイルスもHVJも細胞表面レセプターはシアル酸を末端にもつ糖鎖であるので，赤血球表面でインフルエンザウイルスとHVJはある距離を置いて吸着していた筈である。37℃で反応を開始すると，先ずHVJ外膜と赤血球膜との反応が局部的におこり，その変化が赤血球膜全体に波及すると共にインフルエンザウイルス外膜と赤血球膜との融合が誘発されるのである。

2. 高分子物質注入への利用

我々はすでに人工リポゾームを利用した物質注入法を開発しているが，この場合単純なリポゾームは細胞表面によく吸着するが細胞膜との融合は凡んどおこらないことをすでに示してある。リポゾーム表面にHVJの2種類の糖タンパク質，HNとFを分子比1：2で組込んだ場合にのみ，リポゾームと細胞膜との融合が進み，リポゾーム内に封印してあった物質が細胞質内に注入されるのである。

然し上記の現象を考え合わせてみると単純リポゾームと細胞膜との融合をHVJの添加によって誘発さすことも可能であろうという考えが浮んでくる。これを実施したのが本研究なのである。

3. 結　　果

未発表の部分が多いので詳細な報告の出来る段階ではないが，極めて有望な結果を得つつある。

フオスフアチヂールコリンとコレステロールよりなるリポゾームを人工的に作り内部にジフテリア毒素のフラグメントAを封印しておく。このリポゾームは細胞表面によく吸着するがそれ以上のことは起こらない。ここにHVJを加えると細胞のタンパク合成が急激に抑えられる。勿論HVJのみではタンパク合成の阻害はない。この阻害はフラグメントAの細胞内注入によるEF2のリボシル化に原因するものであった。

さらにこの人工リポゾームにレクチンを結合させたものもHVJによって有効に反応を誘発させれることが判明してきた。このことは人工リポゾーム表面に特定の細胞表面だけに親和性のある物質，例えば，或る細胞表面だけを認識する単一クローン抗体をセンサーとして連結させておけば，HVJを加えることで，その特定の細胞だけに物質を注入することができることを示している。今後大きく実用面をもつ方法と考えている。

文　　献

1) A spin-label study on fusion of red blood cells induced by Hemagglutinating Virus of Japan by Maeda, T., Asano, A., Ohki, K., Okada, Y. and Ohnishi, S. *Biochemistry (1975)*, 14: 3736-3741.

10　哺乳動物の初期胚形成に影響する単クローン抗体

岡　田　節　人

哺乳動物の胚発生において，広い意味で収縮と呼んでよいような現象は，マウスでいうと8細胞期で起こるコンパクションと呼ばれるものである。こゝで，それまで，はなればなれにあった割球間同志の接着面積が急激に増加し，そのため胚全体が固くしまるようになり，いわば多細胞の系としての胚はこのときにでき上る。細胞間の接着に機能する細胞表面分子として，いくらかのものが指摘されているが，哺乳動物胚において最も重要なものは，元来はマウスの奇形がん腫細胞についてTakeichiらによって同定され，その機能にCaを要求する分子量124.000の蛋白分子である。[1)2)3)] この分子はTakeichiらによってカドヘリンと命名されたが，これに対する単クローン抗体を準備することができた。この抗体（以下ECCD-1というコード名で記する）で処理されたマウス胚ではコンパクションの現象では可逆的に阻止され，カドヘリン分子が初期胚の形態形成に重要な機能をもつことが示唆された。[4)]

それで，今回報告する実験では，マウス初期胚をさらに長期にわたってECCD-1で培養し，その胚発生に与える効果をみたのである。[5)]

結　　果

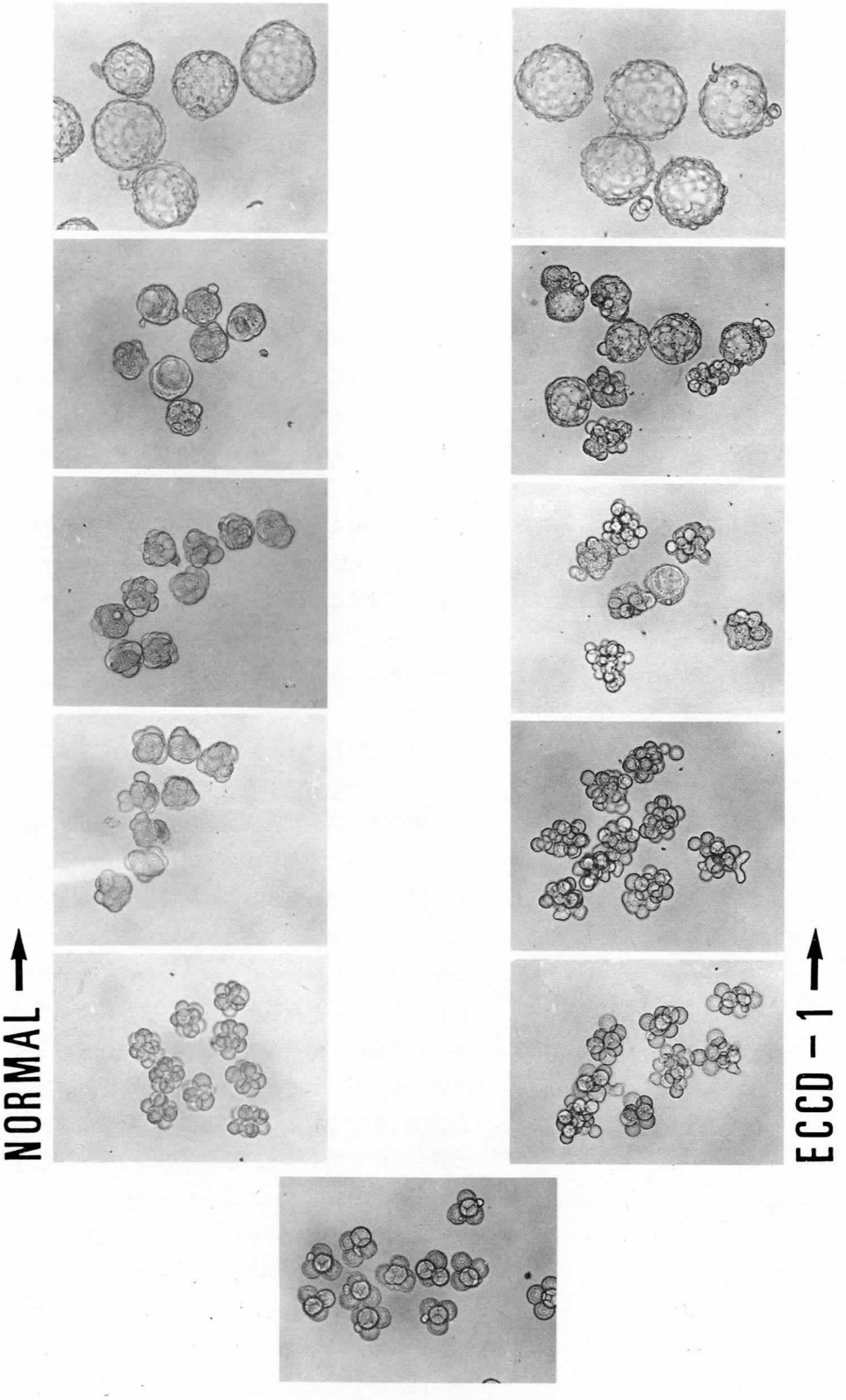
4細胞期の胚を妊娠マウスからとり，試験管内の培養に移す。標準培地はDulbecco's modified MEMに10％の牛胎児血清を加えたものである。標準培地で培養された胚はやがて分裂して8細胞期胚となり，こゝでコンパクションを起こす。ECCD-1を加えた培地でも細胞分裂は正常に進行するが，8細胞期でコンパクションは起こらない。コンパクションはじつは起こるのではあるが，それは対照胚よりおくれ，16細胞期で初めて起こるようになる。しかし，その後発生は進行して一見正常胚と同様な胚盤胞が形成されてくる（第1図）。

しかし，ECCD-1中で発生を進行してきた胚盤胞は正常胚とは際立った違いがある。というのは処理胚には内部細胞塊が全く出現せず，外側の栄養芽層のみからなる中空の胚が形成されてくるからである。

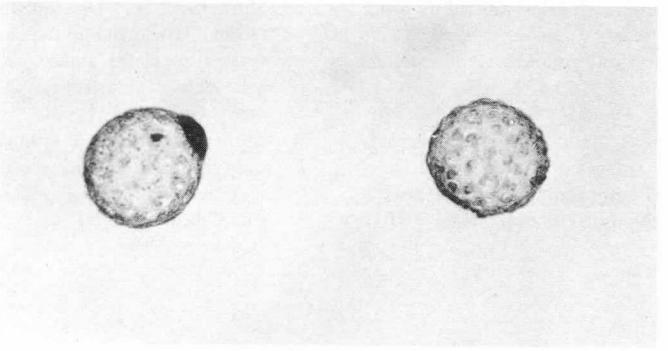
このことはECCD-1胚にアルカリ性フォスファターゼの組織化学的染色を行なうとよく判る。この酵素は，胚盤胞では内部細胞塊の細胞にのみ局在しているのであるが，処理胚を染色すると，この組織化学で染色される細胞の全く存在していないことがよく判るのである。（第2図）また，胚盤胞を培養基質に接着させるような条件で，静置培養を行うと違いが明らかとなる。正常胚では単層の上皮性細胞が培養基質の上に広がり，その上に球状の細胞のクラスターがのっかった状態となる。ECCD-1で処理された細胞では，単層の細胞層が広がるのみであって，球状の細胞（内部細胞塊の細胞と見做してよい）は全く出現してこない。

このような著しい胚形成の異常は，胚盤胞期に至るまでのどの発生期を，ECCD-1で処理したときに起こるのであろうか？ それを知るために発生の異なった時期のみ短時間だけECCD-1で処理した。胚を16細胞期までECCD-1で処理して

＊京都大学理学部　生物物理学教室



第1図　4細胞期以後をECCD-1.を含む培地で培養を続けたマウス胚の発生（ECCD-1.）を，正常培地における発生（NORMAL）と比較して示したもの。



第2図 右側はECCD-1処理によって得られた内部細胞塊を欠く胚盤胞。左は正常のもので，アルカリ性フォスファターゼ染色でよく染まる内部細胞塊の存在がみられる。

から（つまり，コンパクションは未だ起こっていない），正常培地に移して培養を続けると，正常に内部細胞塊をもった胚盤胞が発生してくる。ところがもう少し処理時間を長くして，16細胞期と32細胞期の中間期までにすると，内部細胞塊を欠いた異常胚が発生するのである。

一方，16細胞期までを正常培地において，以後をECCD-1で発生させると異常胚が得られる。しかし，16細胞期と32細胞期の中間までを正常培地で，以後をECCD-1で発生させると，得られるのは正常胚である。従って，16細胞期と32細胞期の間に，ECCD-1によって異常胚の作られてくるための，クリティカルな時期のあることが明らかである。

考　　察

これらの実験の結果から，カドヘリンと名ずけた細胞表面蛋白がマウスの初期発生における形態変化に極めて重要な機能をもつことが明らかである。形態変化といえども，要は細胞のもつ分子の機能によって規定されるものであることはいうまでもない。こゝで述べた実験の結果は，初期発生における形態変化に機能する特定の蛋白分子として同定された最初のものである。従って，カドヘリン分子の性状と，その機能についてのより詳細な研究は，形態変化の分子的背景を理解する重要な手がかりになると考えられる。

カドヘリンに対する単クローン抗体であるECCD-1が内部細胞塊のない胚の発生をもたらす機構はどのようなものが考えられるだろうか？ JohnsonとZiomek（1981）は，マウス胚の初期の卵割期にある割球では，コンカナバリンAに対するレセプターが細胞の一方に局在し，このことがその後の内部細胞塊と栄養芽層との分化の原因となることを示唆した。[6] ところがECCD-1で処理すると，このレセプターの局在が起こらず，細胞表面の全部に均一に分布することが観察された。このことからすると，カドヘリン分子とそれ以外の細胞表面分子（コンカナバリンのレセプターを含む）との分子間相互作用が，マウスの発生で最初に起こる細胞分化にも重要な役割を果たしていることが推察されるのである。

文　　献

1) Takeichi, M., Asumi, T., Yoshida, Ch., Uno, K., and Okada, T.S. (1981). Selective adhesion of embryonal carcinoma cell and differentiated cell by Ca-dependent site. *Develop. Biol.*, 87: 340-350.
2) Yoshida-Noro, Ch., and Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, 28: 217-224.
3) Takeichi, M. Yoshida-Noro, Ch., Ogou, S.-I. Shirayoshi, Y., Okada, T.S., and Wartiovaara, J. (1983). A cell-cell adhesion molecule involved in

embryonic cellular interactions as studied by using teratocarcinoma cells. In "Teratocarcinoma Cells", Cold Spring Harbor Conf. on Cell Proliferation, vol. 10 (Ed. F. Jacob), pp. 163-171.

4) Yoshida-Noro, Ch., Suzuki, N., and Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Develop. Biol.*, **101**: (in press).

5) Shirayoshi, Y., Okada, T.S., and Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell*, **35**: 631-638.

6) Johnson, M.H., and Ziomek C.A. (1981). Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry and stability. *J. Cell Biol.*, **91**: 303-308.

Ⅲ 生　理　学

11. 筋細胞における膜興奮機能の発生　65

12. 培養骨格筋における膜興奮性の変化　70

13. 幼生アフリカツメガエル腸骨筋の収縮系と筋小胞体　74

14. 筋収縮能の発現過程 — 培養による正常と
ジストロフィーチキン胸筋の比較　80

15. 哺乳動物骨格筋の損傷後の Healing – over　85

11　筋細胞膜における膜興奮機能の発生

高　橋　國太郎*
研究協力者　平　野　丈　夫*　三　谷　昌　平*

脱分極によってCaイオン透過性が増加して細胞内にCaイオン流入をひき起こす機構すなわちCaチャンネルは興奮性膜の重要な成分であり，個体発生的にみても，系統発生的にみても広い分布を示している。たとえば脊椎動物成体の骨格筋は従来典型的なNaスパイクを発生し，殆んどCaチャンネルはないと考えられていたが，最近の研究によるとTTXおよびTEA存在下で電圧固定をおこない電流を解析すると明らかにNa電流とはことなった時間経過を示すCaイオン依存性の電流が見られている。もちろん，心筋・平滑筋におけるCaチャンネルの存在はすでに多くの報告がある。骨格筋についても発生初期の筋管細胞膜においてはNaスパイクとともに長い持続をもつCaプラトーからなる複合電位がみられている。したがって興奮性膜として骨格筋細胞が分化する際に，Caチャンネルの質的・量的な変化がともなっていることは充分予想できる。

これまで我々の研究によりホヤ卵細胞に見られるCaチャンネルと初期の1細胞胚でサイトカラシンBで分裂を停止した場合に見られるCaチャンネルとはことなり，後者は他の筋細胞膜などの興奮性膜にみられる分化型Caチャンネルであることを報告した[1,2]。この発生直後に分裂を停止した未分裂ホヤ発生卵における膜の分化過程を観察して，卵細胞型から分化型のCaチャンネルへの発生にともなう変化をさらに解析する[3]ことを目的とした。

*東京大学医学部脳研究施設神経生物学部門

研　究　方　法

低温海水槽に保存してある抱卵個体を10℃に加温すると放卵する。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℃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。受精卵のうち一部は対照としてそのまま発生させ，残りは第一分裂開始前にサイトカラシンB 2μg/mℓを含有する海水に入れて飼育した。この未分裂発生胚を対照の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。

未受精卵および未分裂発生胚のコリオン膜は，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。この裸になった卵あるいは胚細胞を100mM $SrCl_2$，400mM NaCl，10mM KCl，5mM PIPES－Na (pH7.0)，10mg/mℓ BSA，2μg/mℓサイトカラシンBからなる基準人工海水中に入れ，電圧固定法をもちいて膜電流の解析をおこなった。電圧固定は通常の二本の3M KClガラス微小電極を刺入しておこない，その装置については他にすでに発表してある。

研究成果およびその考察

(1)　分化型Caチャンネルと卵細胞由来のCaチャンネル

Caチャンネルはホヤ分裂停止胚において興奮性細胞型に分化したすべての割球にみられることがわかっているが，とくに分裂停止1細胞胚をもちいて，表皮細胞型分化に伴って出現するCaチ

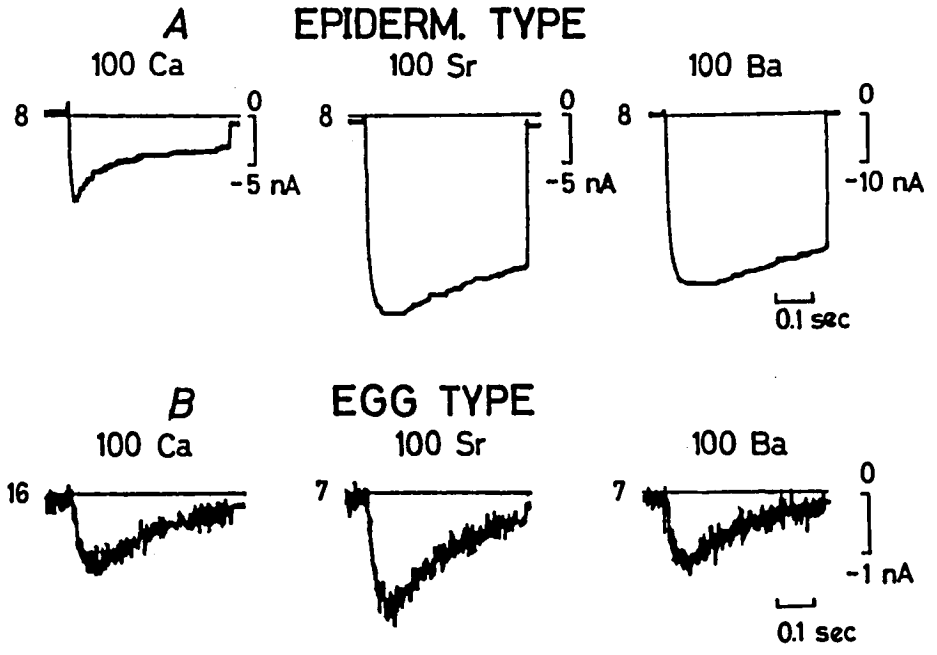


図1　表皮細胞型に分化した1細胞胚の Ca チャンネルの電流(A)と卵細胞にみられる Ca チャンネルの電流(B)の比較。膜電位は記録の左側の数字(mV)で表してある。外液は 100 mM の Ca あるいは Sr あるいは Ba を含む人工海水である。

ャンネルにつき詳細な解析をおこなった。

表皮細胞型の割球にみられる Ca チャンネルは二価陽イオン選択特性として $Ba^{2+}>Sr^{2+}>Ca^{2+}$ を示したが，これに対して卵細胞の Ca チャンネルは $Sr^{2+}>Ca^{2+}\fallingdotseq Ba^{2+}$ となっている。また表皮型の Ca チャンネルでは電流の不活性化が少く，Sr あるいは Ba 溶液ではとくに電流の持続が長かった。これは図1のAに示してある。しかし，Ca 溶液中では早い不活性化がみられた。これは細胞内に流入する Ca イオンによる Ca チャンネルの不活性化といわれるもので，他の興奮性細胞，軟体動物の神経節細胞，ゾウリムシなどの Ca チャンネルでよく知られているものである。一方，卵細胞の Ca チャンネルは外液によらずに一様な不活性化を示し，Na チャンネルなどで知られている膜電位依存性の不活性化であることがわかった。また表皮細胞型に分化した割球の Ca チャンネルは筋細胞型，あるいは神経細胞型に分化した割球のものと共通した性質があり，一方では卵細胞膜に見られるものとは明瞭に区別できた。そこでホヤ胚に関する限り，この表皮型の Ca チャンネルを分化型と呼ぶことにした。

(2)　発生に伴うイオンチャンネルの型の変化

発生に伴って卵細胞の膜および表層にあった特異的な分子が各割球でどのように集積，あるいは消失するかを知ることは必要である。イオンチャンネルは膜に存在する特異的な機能をもつ蛋白分子であると考えられ，かつ未受精卵の表面膜にもすでに存在することがわかっているので，イオンチャンネルの発生に伴う膜での変動を解析した。ホヤ卵細胞に存在した Na チャンネル・Ca チャンネルは受精後嚢胚期にいたる初期発生時に一度減少するが，正常胚で Na－Ca依存性の活動変位が出現する時期に対応して分裂停止16細胞胚にお

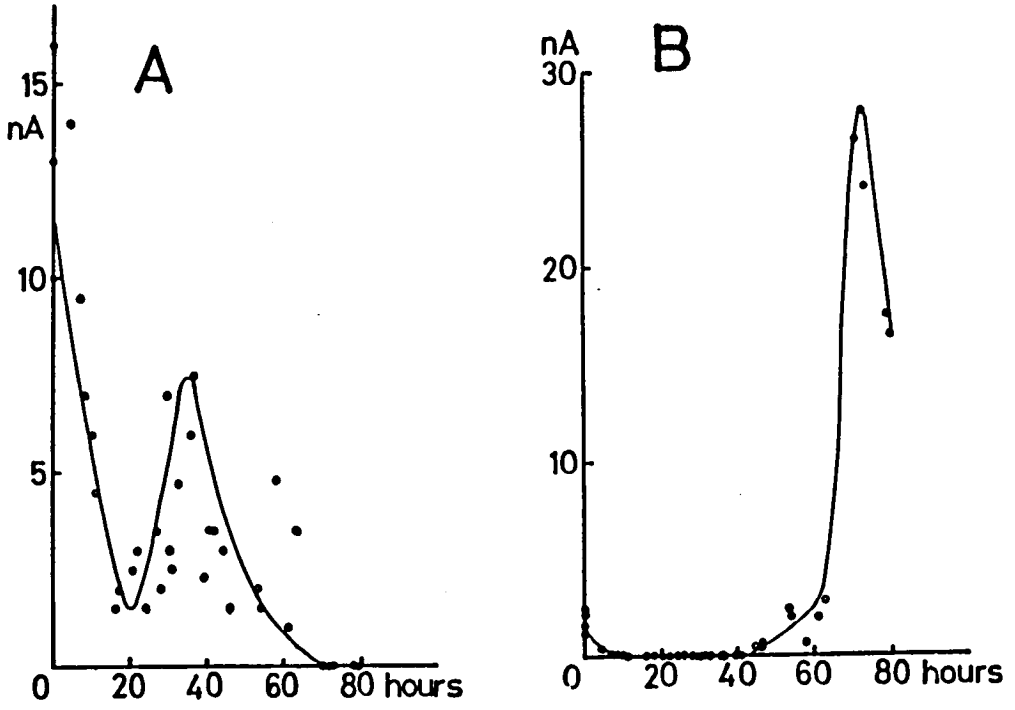


図2　分裂停止1細胞胚におけるNaチャンネル(A)およびCaチャンネル(B)のNa－Sr人工海水中における最大電流値の変化。横軸は8℃における受精時からの発生時間。

いてもNaチャンネル・Caチャンネルの増加がおこることはすでに報告してある。本研究においては特に分裂を抑制した1細胞胚をもちい，受精直後から発生後期に表皮細胞型への分化が完成するまでの期間におけるチャンネルの膜への集積，膜からの消失を定量的に解析した。

1細胞胚においては，卵細胞由来のNaチャンネルは嚢胚期に相当する時点までに一度減少するが（図2のA，20時間），神経胚の初期に相当する時点より再び増加しはじめ，尾芽期からオタマジャクシ幼生の初期に相当する時点で極大に達したのち（図2のA，40時間），急激に減少した。またこの時点でCaチャンネルを調べてみると分化型のチャンネルへの交替が始っていた（図3のB，40時間）。Naチャンネルはその後消失していくが，分化型のCaチャンネルは孵化直前に相当する時点（図2のB，70時間）で急激に量的に増加した。異常整流性Kチャンネルは発生中期にNaチャンネルとともに増加し，後期にはCaチャンネルの急激な量的増大と一致した増大も観察された。後期に増加するCaチャンネルと異常整流性Kチャンネルは表皮細胞型分化の特徴となることがわかった。ここで，Actinomycin Dを加えた海水中で飼育すると分化型Caチャンネルの出現およびそれに伴う異常整流性Kチャンネルの増加は完全に抑制されたが，Naチャンネルとそれに伴う異常整流性Kチャンネルの一過性の増加は不変であったので，これら発生中期に変動するチャンネルは卵細胞由来のものではないかと考えた。事実，増加するNaチャンネルの活性

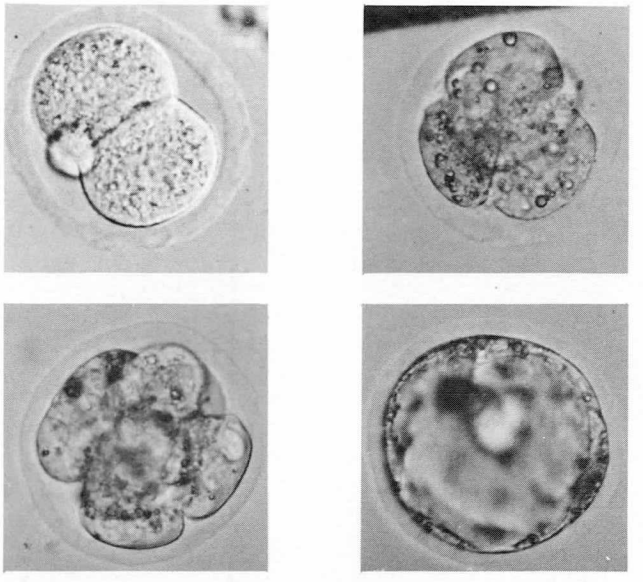


図3　マウス2細胞胚をCO_2培養装置内で培養したときの，2細胞期（左上），4細胞期（右上），8細胞期（左下），胞胚期（右下）におけるノマルスキー型倒立顕微鏡像。

化の閾値は卵細胞の Na チャンネルのものと等しく，神経細胞型に分化した割球の Na チャンネルのものとは異っていた。またアカボヤをもちいた場合は神経胚初期に相当する時点より Ca チャンネルのわずかな増加が見られたが，これは卵細胞型の Ca チャンネルであることがわかった。このように膜の分化の完成に先立って，神経胚初期より，卵細胞由来のチャンネルの表面膜への再集積が示唆されたが，この集積が表皮細胞型への分化の決定と関連するものであるかは今後の問題である。

(3)　マウス卵における卵細胞由来のイオンチャンネルの初期発生に伴う変化

典型的なモザイク卵として知られているホヤ卵と異なり，調節卵である哺乳動物マウス卵をもちい，初期発生時の卵細胞由来のイオンチャンネルの変化を調べ，ホヤ卵の場合と比較した。マウス未受精卵は過排卵により卵管に集積したものを切り出してもちい，発生卵については試験管内で受精後，CO_2培養装置内で2細胞胚になるまで飼育した。また2細胞胚以上に発生した卵が必要なときは，過排卵した雌マウスを交尾させ，受精発生した卵を2細胞期にとりだし，その時点からCO_2培養装置内で飼育した。実験は発生の各時点で実験槽内に胚をおき，電圧固定法により解析した。図3は2細胞胚でとりだしたマウス胚をCO_2培養装置で飼育し，4,8細胞および胞胚となったものを示してある。

マウス未受精卵には我々の研究から Ca チャンネル，および50mV 以上の陽性膜電位で活性化される外向き整流性チャンネルが存在する。また，Ca チャンネルは二価イオン選択特性として Sr ＞Ca≒Ba を示し，不活性化は膜電位依存性である。この性質はマウスの内分泌細胞などでみられるような不活性化が少く，Ba＞Sr＞Caの選択特性をもつ Ca チャンネルとは異っていることを示している。したがって，マウス卵の Ca チャンネルも卵細胞型と考えられる。

この卵細胞由来のCaチャンネルと外向き整流特性チャンネルは受精直後，卵核が第2減数分裂の中期より後期にいたる過程で，表面膜上に集積し，1.5倍ほどに密度が増加することがわかった。その後は8細胞胚にいたるまでの過程で減少しつづけることがわかった。これはホヤ胚において，Naチャンネルが受精直後に増加して，ただちにCaチャンネルとともに嚢胚期の初期にいたるまで減少する過程と対応するものと考えられた。また，ホヤ卵における分化にともなうCaチャンネル型の変化に相当するものがマウス卵で見られるかどうかを確かめるために，マウス発生卵を2細胞期あるいは，8細胞期でとりだし，サイトカラシンDを含む培養液で飼育した。しかし，現在のところ，分化型のCaチャンネルを出現させることに成功していない。

文　　献

1) Hirano, T. and Takahashi, K.: Determination of excitability types in blastomeres of the cleavage-arrested but differentiated embryo of an ascidians. *J. Physiol.* (Lond.) in press.
2) Hirano, T. and Takahashi, K.: Comparison of properties of Ca channels between the differentiated 1-cell embryo and the egg cell of ascidians. *J. Physiol.* (Lond.) in press.
3) Hirano, T. and Takahashi, K.: Development of calcium channels in the membrane of the cleavage-arrested embryo of ascidians. *"The Physiology of Excitable Cells."* Edit. A. Grinnel & W. Moody. Alan R. Liss, Inc., N.Y., 279-289 (1983).

12　培養骨格筋における膜興奮性の変化

加　濃　正　明*

細胞が分化するということは，細胞の特異性の獲得であり，他の形質は発現されなくなることである。これは具体的にはその特異性に対応する蛋白を選択的に合成し，その他の蛋白の合成を停止することである。細胞の分化につれて，このような蛋白の分子種に変化が起るということは，同じような機能を担うと考えられる蛋白においてもみられ，たとえば収縮蛋白などでよく調べられている。

筋細胞の特異性の一つとして細胞膜の電気興奮性が挙げられるが，この興奮性は筋細胞で合成され，筋細胞膜に組み込まれたイオンチャンネル蛋白の作用によるものであり，この蛋白も筋細胞の分化の過程で変化していることが考えられる。

無機イオンを選択的に透過させるイオンチャンネルは．伝導する活動電位を起すことによって情報伝播の役割を果しているが，その他に，種々の細胞機能に重要な役割を果していることが示唆されている[1]。特に Ca チャンネルは，それを通って細胞内に流入した Ca イオンによって，種々の細胞機能の調節に役立っていることが知られており，たとえば神経細胞における伝達物質の放出，筋細胞における収縮の発現などを挙げることができる[1]。

発生過程にある筋細胞でも種々のイオンチャンネルの存在が報告されており[2]，当然その時期の筋細胞の機能に役立っていることが考えられ，さらに筋細胞の分化の制御にも重要な役割を果しているものと考えられる[3]。この意味で筋発生に伴うイオンチャンネルの変化を探ることは筋細胞の分化を理解する上に重要なことであると考えられる。

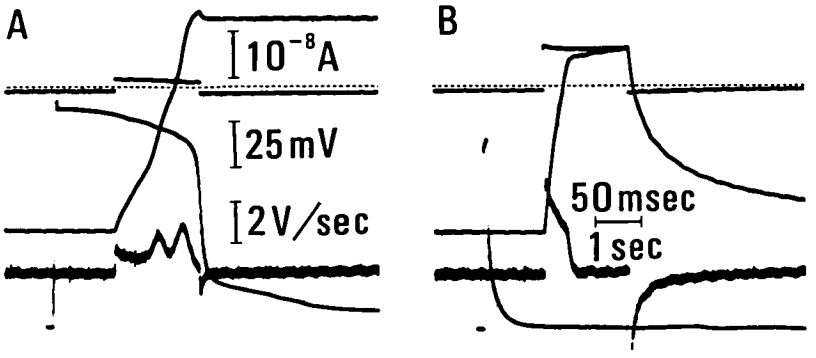
ニワトリ骨格筋の場合，その成熟過程において，先づ Ca チャンネルが発達してその密度が増加し，遅れて Na チャンネルが発達してその密度が増加する。その後の筋細胞成熟につれて，Na チャンネルの増加は進む一方，Ca チャンネルは次第に減少してゆく[4]。細胞成熟に伴う同じようなイオンチャンネルの変化はその他の種々の細胞でみられている[2]。

ニワトリ胚由来細胞培養骨格筋の成熟過程において，Na チャンネルが発達して次第にその密度が増加してゆくこと，この発達に対して促進的効果を有する物質がニワトリ神経組織抽出液中に存在すること．この物質は蛋白であり，神経細胞の筋細胞に対する栄養効果を担う栄養物質であると考えられること，など Na チャンネルの発達については昨年度までの報告書において示してきた。本年度は特に筋細胞成熟に伴う Ca チャンネルの変化を同じ培養筋について調べ，それに対する神経組織由来物質の効果を解析したので報告する。

材料と方法

細胞培養の方法は昭和53年度研究報告書に述べた通りである。すなわち，孵卵11日目のニワトリ胚の胸筋から筋芽細胞を分離し，これをコラーゲン塗布したプラスチック培養皿に単層培養して筋細胞を形成させる。用いた培養液は，イーグルの合成培養液にウマ血清（10%），ニワトリ胚抽出液（5%）を加えたものである。ニワトリ胚抽出液は孵卵10日目のニワトリ胚を用い，2倍量のタイ

*北里大学医学部生理



第1図　ニワトリ胚由来の細胞培養骨格筋の活動電位に対する Co^{2+} の効果

神経組織由来物質を含まない培養液を用いての培養4日目の筋管。Ba塩類溶液中での記録。通流電極より定電流を通流して膜電位を予め−80mVに移動させてイオンチャンネルの不活性化を除いた状態にした後，同じ通流電極により脱分極性のパルス電流を通流して刺激した。AとBは同じ細胞からのもので，Aは Co^{2+}（20mM）を加える前，Bは加えた後のもので活動電位の遮断が起こっている。活動電位は速い掃引速度（第2トレース）と遅い掃引速度（第4トレース）で示してある。第1トレースは速い掃引速度による通流電流記録であり，第3トレースはやはり速い掃引速度による膜電位変化の微分波形で，活動電位の立上り速度を示す。点線は第2トレースに対する0電位を示す。

ロイド液と共にホモジナイズした後遠沈して得られる上清であるが，ニワトリ胚全体からの抽出液と脳および背髄を除いた胚からの抽出液の2種類を調製し，前者は神経組織由来物質を含む培養液に，後者はそれを含まない培養液に用いられた。

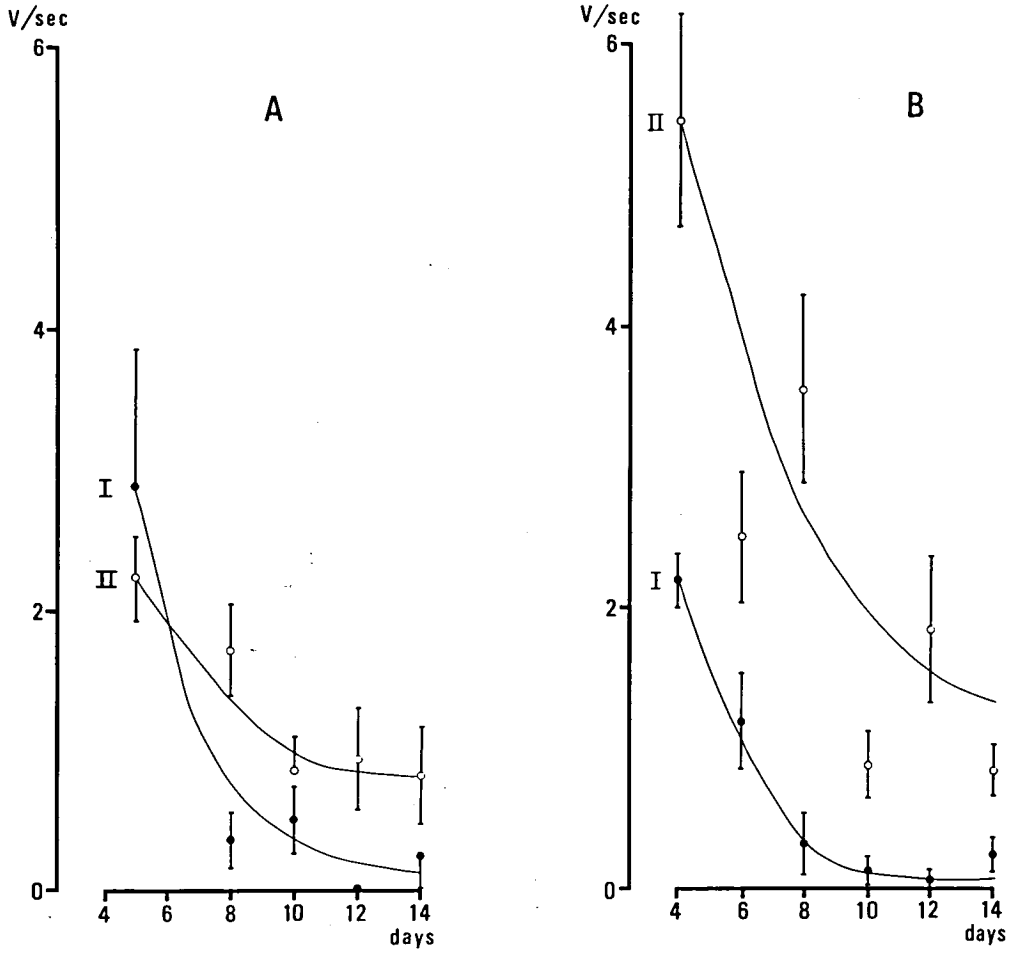
神経組織由来物質を含まない培養液での培養の場合は，筋細胞の形態発生が多少遅れるが，いづれにしても培養2～4日の間に細胞融合が盛んに行なわれて筋管が形成され，培養5日目から7日目になると，明瞭な横紋を呈する形態的に成熟した骨格筋細胞が出現してくる。

4日から14日の培養を用いその中から直径20μm以上の筋管または筋細胞を選んで，Caチャンネルの作用による活動電位を調べた。

培養液を塩類溶液に置換したのち，倒立顕微鏡下で1本の細胞に2本のガラス管微小電極をお互いに近づけて挿入し，一方で通流を行い，他方で膜電位の導出を行った。通流に用いた電極は酢酸カリウムを充したものである。

この実験で用いた塩類溶液はBa塩類溶液でその組成は次の通りである。酢酸バリウム，50.0mM；酢酸カリウム，2.7mM；酢酸マグネシウム10.0mM；蔗糖，111.6mM；トリス緩衝液（マレイン酸でpH＝7.4に調節），10.0mM。すなわち通常の塩類溶液中の Na^{+}，Ca^{2+} を Ba^{2+} で置換し，Cl^{-} を CH_3COO^{-} で置換したものである。Ba^{2+} はCaチャンネルを通って活動電位を発生することができる他に，Kチャンネルを遮断するという作用がある。この塩類溶液を用いることによって，Naチャンネルの作用による活動電位を除き，またKチャンネル，Clチャンネルを通る電流による再分極作用を抑制でき，Caチャンネルの作用による活動電位を選択的に顕著に発生させることができる。

Caチャンネルの発達程度の指標としてCaチャンネルの作用による活動電位の最大立上り速度を測定した。これは活動電位発生に際してCaチャンネルを通るイオンによる電流を示しており，細胞膜におけるCaチャンネルの密度すなわち発達の程度を反映している。



第2図　ニワトリ胚由来の細胞培養骨格筋におけるCaチャンネル活動電位の最大立上り速度の変化。
　Aは神経組織由来物質を含む培養液を用いての培養の場合，Bはそれを含まない培養液での培養の場合である。
●印は成分Ⅰの最大立上り速度，○印は成分Ⅱのそれである。

結　　果

図1，Aは培養4日目の筋管から得られた活動電位の一例である。この時期の筋管の活動電位はこの例でみられるように二段階に上昇してオーバーシュートし，また持続時間の非常に長いプラトー型のものである。閾膜電位の異なる2つの成分からなることがわかる。この中低い閾膜電位(−45 mV位）で発生する第Ⅰ成分は−50mV位の條件脱分極によって速やかに，完全に不活性化されて消失するが，閾膜電位の高い（−10mV位）方の第Ⅱ成分は條件脱分極による不活性化がゆっくりで数秒の経過を要し，また完全に不活性化するには0 mV近くまで脱分極する必要がある。この両成分ともに，Caチャンネルの遮断剤であるCo^{2+}やD 600で遮断され（図1，B），Caチャンネルの作用による活動電位であることが確かめられた。

このようなCaチャンネルの作用による活動電位は，培養日数が進み，細胞が成熟するにつれて

次第に起こりにくくなる傾向がみられ，特に成分Ⅰが速やかに消失してゆき，全体としてCaチャンネルの密度が減少していると考えられる。

筋細胞成熟に伴う2つの型のCaチャンネルの密度の変化をみるために，活動電位のそれぞれの成分の最大立上り速度（図1，第3トレース）を培養日数を追って測定した（図2）。

図2，Aは神経組織由来物質を含む培養液を用いた培養についてのものである。成分Ⅰの最大立上り速度は培養4日以後速やかに減少し，培養2週目では殆ど0V/secにまでなってしまう。成分Ⅱのそれも0V/secまでにはならないがやはり減少してゆくことがわかる。

神経組織由来物質を含まない培養液で培養した場合は（図2，B），成分Ⅰの最大立上り速度の値と，その減少の経過は神経組織由来物質を含む培養の場合と大差はないが，成分Ⅱの最大立上り速度は，培養日数と共に減少することは確かであるが，培養の全経過にわたって，神経組織由来物質を含む培養の場合に比して大きな値を示している。

考　　察

幼若なニワトリ骨格筋細胞膜にはCaチャンネルが発達しており，これは成熟するにつれて次第に減少してゆくことが確かめられた。このCaチャンネルにも，閾膜電位，不活性化の膜電位などの異なる二型がみとめられた。成熟過程にあるニワトリ骨格筋において正常タイロイド液中で記録される持続の長いプラトー電位[4,5]の発生にこれらのCaチャンネルが関与しているものと考えられる。

これらCaチャンネルの減少と期を同じくしてNaチャンネルは増加してゆく[6]ことがみられており，CaチャンネルからNaチャンネルへの交替が起こって興奮性膜が分化してゆくと考えられる。

筋細胞膜におけるイオンチャンネルの分化に対して神経支配が重要な役割を果していることが考えられる。Naチャンネルの発達に対して促進的に作用する蛋白が神経組織抽出液中に存在するという昨年度までの成績から，支配神経は栄養物質を介してイオンチャンネルの分化に影響していることが示唆されているが，Caチャンネルに対しては特に成分Ⅱの減少に対して影響していると考えられる。

成熟過程におけるCaおよびNaチャンネルの変化は分化しつつあるホヤ卵において詳細に解析されており[7]，特にCaチャンネルは分化そのものに重要な影響をもっていることが示されている[3]。

文　　献

1) Hagiwara, S. & Byerly, L.: (1981) Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.*, 4: 69-125.
2) Spitzer, N.C.: (1979) Ion channels in development. *Ann. Rev. Neurosci.*, 2: 363-397.
3) Takahashi, K. & Yoshii, M.: (1978) Effects of internal free calcium upon the sodium and calcium channels in the tunicate egg analysed by the internal perfusion technique. *J. Physiol.*, 279: 519-549.
4) Kano, M.: (1975) Development of excitability in embryonic chick skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, 86: 503-510.
5) Kano, M. & Shimada, Y.: (1973) Tetrodotoxin-resistant electric activity in chick skeletal muscle cells differentiated in vitro. *J. Cell. Physiol.*, 81: 85-90.
6) Kano, M. & Yamamoto, M.: (1977) Development of spike potentials in skeletal muscle cells differentiated in vitro from chick embryo. *J. Cell. Physiol.*, 90: 439-444.
7) Takahashi, K. & Yoshii, M.: (1981) Development of sodium, calcium and potassium channels in the cleavage-arrested embryo of an ascidian. *J. Physiol.*, 315: 515-529.

13　幼生アフリカツメガエル腸骨腓骨筋の収縮系と筋小胞体

遠藤　實*
研究協力者　堀内桂輔*

成長した両生類の骨格筋には遅筋線維と速筋線維の2種類が存在する。筋線維のこのふたつの分化型の性質の違いを，アフリカツメガエルの腸骨腓骨筋から得た単一筋線維のスキンドファイバー標本を用いてこれまで研究してきた[1,2]。今回はその研究結果を基礎として，変態期の幼若アフリカツメガエルの腸骨腓骨筋の性質について調べた。その結果，この筋肉を構成する筋線維の大部分は，成体における速筋線維とよく似たものであることが判った。

実験方法

既に成体アフリカツメガエルの実験で用いたのと基本的には同じ方法を用いた[1,2]。ただし，今回の実験の材料として用いた変態期のアフリカツメガエル（すなわちアフリカツメガエルのオタマジャクシ）の後肢はきわめて小さく，その腸骨腓骨筋は太さ数百ミクロン，長さ数ミリメートルであった。小さいために，そこから単一筋線維標本を得ることはきわめて困難であったが，その反面筋肉全体を用いても，界面活性剤による処理で細胞膜を破壊すればそのままスキンドファイバー標本として実験に用いることが可能であった。

結果と考察

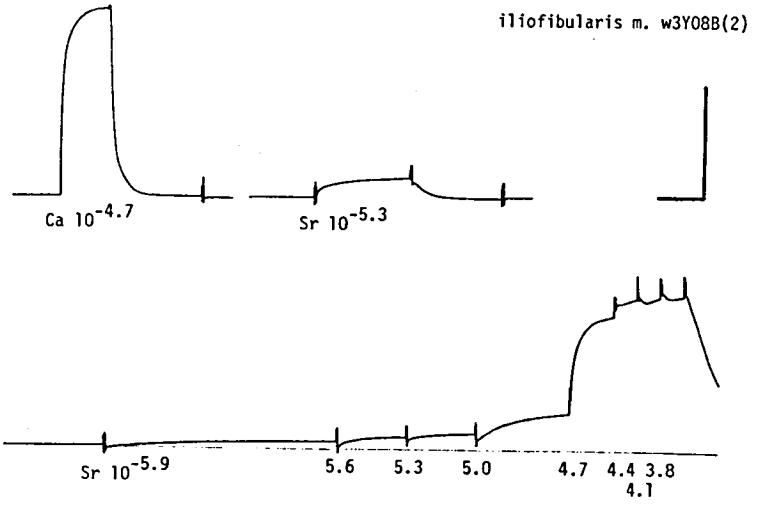
1. 幼若アフリカツメガエルの腸骨腓骨筋のSr感受性

筋肉はCa^{++}イオンだけでなくSr^{++}イオンによっても収縮するが，成体アフリカツメガエルの遅筋線維と速筋線維とではそのSr感受性が著しく異なり，遅筋線維のSr感受性は速筋線維よりも約30倍高い。[1]したがって，このSr感受性を用いて速筋線維と遅筋線維とを区別することが可能である。

図1は，前肢の無い後肢のみの出現した，変態期のなかでも比較的はやい時期のオタマジャクシから得た腸骨腓骨筋を全筋で実験したときの張力記録の一部である。筋の太さは約0.2㎜，長さは約2㎜で，サポニン300μg／mℓ・30分の処理によってスキンドファイバー標本とした。下段は，Sr^{++}イオン濃度を$10^{-5.9}$Mから$10^{-3.8}$Mまで低濃度側から順に，間で一旦Sr^{++}イオン濃度を下げることなく累積的に適用したときに発生する張力を記録したものである。$10^{-5.9}$Mでもはっきりとした張力発生がみとめられるが，それは$10^{-5.3}$Mあたりまでで一旦飽和し，$10^{-5.0}$Mから再び張力が大きくなりはじめ，$10^{-4.4}$Mでそれが完全に飽和するという，2相性の張力発生が観察された。同じ実験を2匹のオタマジャクシの4つの筋肉で繰返したときの結果を図2にまとめた。

図2は，●印でオタマジャクシの腸骨腓骨筋全筋のSr^{++}イオン濃度－張力関係を表わしているが，×印と＋印は成体における遅筋線維と速筋線維の単一筋線維スキンドファイバーでの濃度－張力関係を示している。オタマジャクシの全筋でのデータは確かに2相性で，10^{-5}M以上の高濃度領域では成体速筋線維のデータときわめてよく一致し，

＊東京大学・医学部・薬理学第二講座



pH7.0, 0°C, 0.200M, Mg^{++}1, MgATP 7, EGTA 20, PIPES 20.

図1　サポニン処理した，幼若アフリカツメガエル腸骨腓骨筋全筋を各種濃度のSr^{++}イオンで活性化したときの張力の記録，較正：横軸1分，縦軸25mg重。

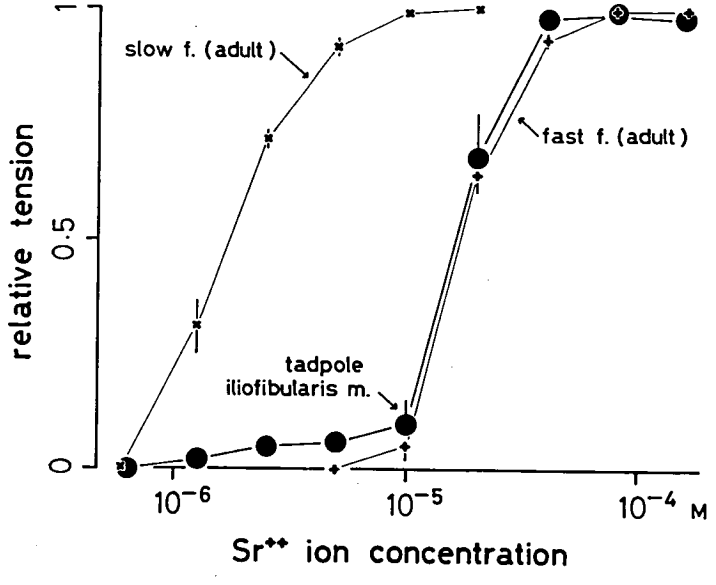


図2　サポニン処理した，幼若アフリカツメガエル腸骨腓骨筋全筋におけるSr^{++}イオン濃度－張力関係（●）。＋と×は，それぞれ成体の遅筋線維と速筋線維とでの濃度－張力関係で，いずれも単一筋線維標本のスキンドファイバー（各2本）で得られたもの。張力は，充分に高い濃度のSr^{++}で発生する最大の張力で基準化して相対値として表わした。シンボルとそれに付けた誤差線は何回かの測定の平均とその標準誤差（S.E.M.）である。

一方10^{-5}M以下の低濃度領域では成体遅筋線維のデータを張力軸方向に縮小した形によく似ている。すなわち，このオタマジャクシ全筋でのデータは，この筋肉が少しの遅筋線維と多くの速筋線維とで構成されていると考えるとよく説明できるものである。

成体速筋線維は全く収縮しないが遅筋線維はほぼ完全に収縮する濃度である$10^{-5.3}$MのSr^{++}イオンをオタマジャクシの全筋に適用したときに発生する張力がCa^{++}イオン($10^{-4.7}$M)による最大張力の何パーセントに当るかを図1上段のようにして調べた。3匹のオタマジャクシの5つの腸骨腓骨筋でしらべたところSr^{++}$10^{-5.3}$M による張力は，Ca^{++} $10^{-4.7}$Mによる最大張力の3～9％であった。成体速筋線維と遅筋線維は単位断面積当りほぼ同程度の最大張力を発生し，かつその最大張力はCa^{++}イオンとSr^{++}イオンとでほぼ同じである。したがって前述の仮説がもし正しいとすると，少ないと述べた遅筋線維のその量は，断面積にしてもその程度，すなわち数パーセントであろうと思われる。

この数パーセントという量は，組織化学的に切片標本を用いて測定した成体腸骨腓骨筋での遅筋線維の量（藤田，堀内，未発表）とオーダーは一致する。しかし，尾のなくなり始めた，あるいは

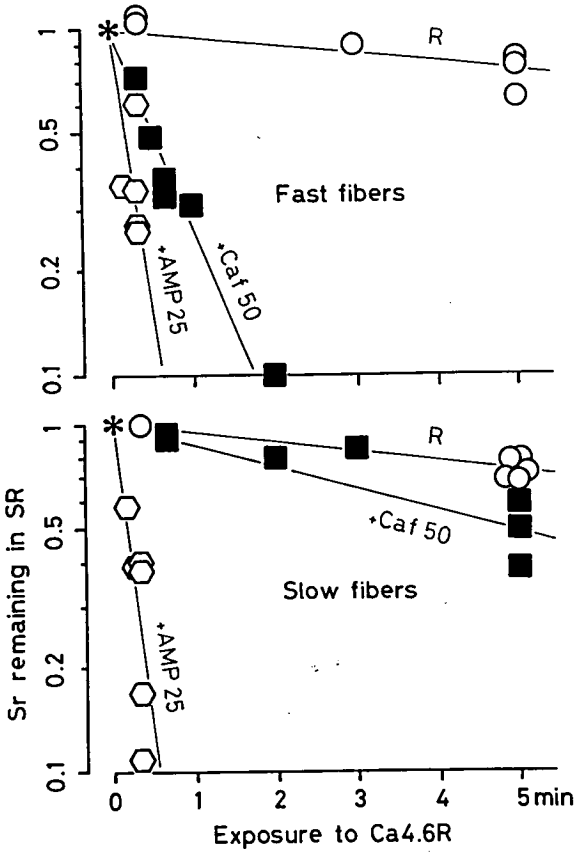


図3　成体アフリカツメガエルの筋線維の筋小胞体に対するカフェインとAMPの作用。上段：速筋線維，下段：遅筋線維。「R」は対照「＋Caf 50」は50mMのカフェインの存在下，「＋AMP 25」は25mMのAMPの存在下での結果。詳細は本文を参照。

ほとんど無くなったオタマジャクシ，すなわち変態期のなかでも比較的おそい時期のオタマジャクシ3匹から得た6つの腸骨腓骨筋で実験を行なったところ，$Sr^{++}10^{-5.3}$Mで発生する張力はCa^{++}による最大張力の1.1±0.6（mean±S. D., n=6）%で，前述の変態期早期で得た値6.0±3.3（n=5）%よりも少し小さい値を示した。したがって，成長とともに，全筋に占める遅筋線維の相対量はしだいに減少するという可能性がある。しかし，筋肉の大きさが異ると種々の物質の拡散速度が異るなど，実験方法の上でかなりの問題もあるので結論を下すには今後もっと詳細な研究が必要である。

いずれにせよ，変態期のアフリカツメガエルの腸骨腓骨筋は，そのほとんどが，Sr感受性の低い，成体の速筋線維によく似た筋線維で構成されていることが判ったので，次にその筋小胞体の性質について調べた。

2. 幼若アフリカツメガエルの筋小胞体の性質

筋小胞体からのCa遊離のメカニズムのひとつである「CaによるCa遊離」は，成体の速筋線維と遅筋線維とで少し性質を異にすることがこれまでに判明している[2)]。図3に示したのは「CaによるSr遊離」に関するデータであるが，これは「CaによるCa遊離」とほとんど同じ性質を示している[2)]。すなわち，小胞体に$10^{-5.0}$MのSr^{++}液で1～2分間Srを取込ませたあと，ATPを含まない$10^{-4.6}$MのCa^{++}液に浸漬し，小胞体内Sr量の経時変化を調べたものであるが，ATPが存在しない環境では，Ca^{++}イオンが充分にあっても，小胞体からのSrの遊離はきわめて起りにくく，小胞体中のSrの減少の時間経過は遅い。しかし，AMPやカフェインの存在下ではこの$10^{-4.6}$MのCa^{++}液によるSr遊離作用が起こり易くなり，Sr減少の時間経過が速くなる。このカフェインの効果が速筋線維と遅筋線維とで異り，ATPやAMP等のアデニンヌクレオチドの存在しない環境では，遅筋線維においてカフェイン効果はきわめて発現しにくい。（ただしアデニンヌクレオチド存在下ではカフェイン効果は遅筋線維においても強く発現する。）

そこで，今回は幼若アフリカツメガエルの腸骨

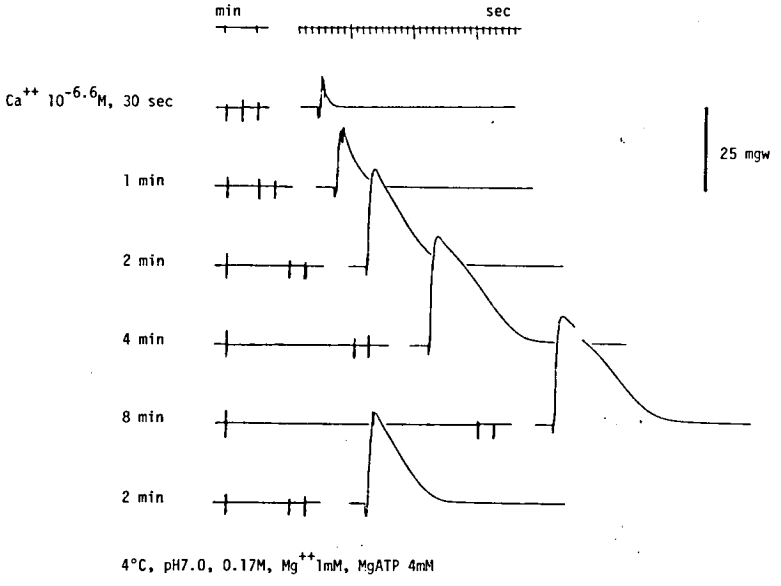


図4 幼若アフリカツメガエル腸骨腓骨筋から得た細い筋束における，Ca取込み機能の検出。標本は15μg/mlのサポニンで20分間処理してある。これを$10^{-6.6}$MのCa^{++}液に1～8分浸漬してよく洗浄したのち，EGTA 2mM中で25mMのカフェインをこれに適用した。Ca^{++}液への浸漬時間とともに拘縮が大きくなるのが観察される。

腓骨筋の筋線維の小胞体の「CaによるCa遊離」に対するカフェインの効果を調べてみた。実験は，後肢のみでなく前肢も出現しているが，尾はまだほとんど短くなっていないオタマジャクシの腸骨腓骨筋から得た細い筋線維の束を用いて2回行なった。結果はいずれも同様であった。

図4は，太さ90 μm 長さ約1 mm の筋束で得た記録の一部である。図には示さないが，$Sr^{++}10^{-5.3}$ M ではほとんど張力を発生しなかったので，この筋束を構成する筋線維はほとんどすべて Sr 感受性の低い筋線維であると判別される。サポニン15 μg／mℓ で20分間処理するという方法によって細胞膜のみを破壊し小胞体は保存しようと試みたところ，この図に示すように，小胞体の Ca 取込みの機能を検出できた。

すなわち，ATPと$10^{-6.6}$MのCa^{++}イオンとを含む液に標本を適当時間浸すと，そのあとで，小胞体から Ca を放出させるとして知られているカフェインを適用したときに拘縮が生じ，その大きさはCa^{++}液に浸す時間の長さとともに増大した。Ca^{++}液に充分浸した後のカフェイン拘縮の大きさは，EGTA 2mM 存在下にカフェインを適用した場合でも，この標本の発生し得る最大張力にほぼ達するものであったので，このオタマジャクシの筋線維にもかなりの Ca 取込み能力があると結論できる。

このような標本を用いて「CaによるCa遊離」の実験を行った実験の結果を図5に示す。結論を先にすると，この筋線維束はその小胞体の性質においても成体の速筋線維に似て，ATP の存在しない環境においてもカフェインが強く「CaによるCa遊離」を促進した。

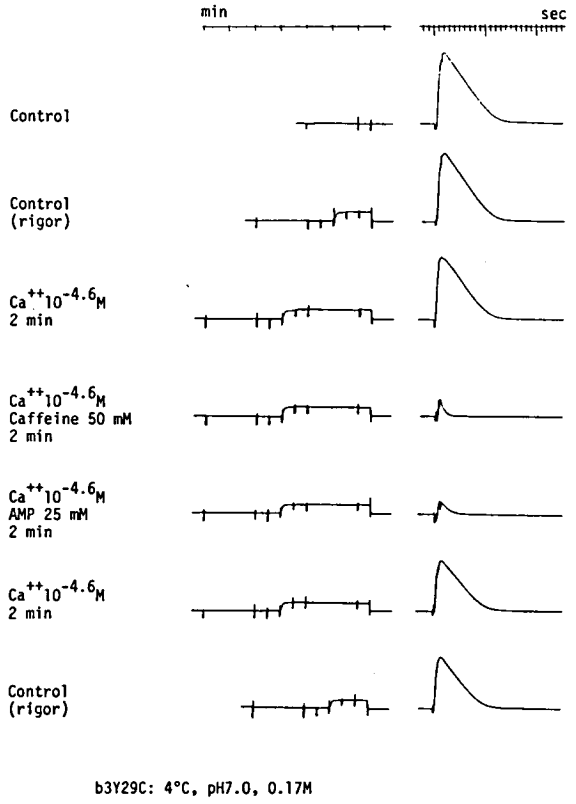


図5　幼若アフリカツメガエル腸骨腓骨筋から得た細い筋束における「Ca によるCa遊離」のメカニズムの性質。カフェインも AMPと同様に「Ca によるCa遊離」を起こり易くした。詳細は本文を参照。

この図の上のふたつの記録は対照で，小胞体にCaを取込ませたあと何もしないでそのままカフェインで小胞体内のCaを放出させて拘縮を起こしたものである。3段目は，Caを取込ませた後カフェインを適用する前に，無ATP環境下で高濃度のCa^{++}（$10^{-4.6}$M）の液を2分間適用したものであるが，そのあとに起こしたATP存在下でのカフェイン拘縮の大きさにほとんど変化がないので，小胞体内のCa量にほとんど変化がなかった，つまり「CaによるCa遊離」はほとんど起こらなかったと考えられる。（実際の拘縮の大きさはすこし小さくなっているが，これは一番あとの対照の記録から明らかなように，大部分は標本の劣化のためである。）それに対して，4段目と5段目は，ATP無しでもカフェイン（50mM）やAMP（25mM）の存在する環境で同様にCaを2分間適用したときの記録であるが，後でおこしたATP存在下でのカフェイン拘縮がかなり小さくなっているので，小胞体内に残存するCaが少なくなった，すなわちCa遊離が起こったことが判る。（註：ここには示していないが，Ca^{++}イオンがほとんど存在しない条件下で同様にカフェインやAMPを適用しても，Ca遊離はほとんど起こらない（前報[1]）のでカフェインやAMPは「CaによるCa遊離」を起こり易くしたと考えられる。）

したがって，幼若アフリカツメガエルの腸骨腓骨筋の大部分を構成しているSr感受性の低い，成体の速筋線維によく似た筋線維においては，筋小胞体の「CaによるCa遊離」のメカニズムの薬理学的性質も，成体の速筋線維のそれとよく似ているようである。

文　　献

1) 遠藤実ほか：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) 同，昭和57年度報告書，80~87, 1983.

14　筋収縮能の発現過程－培養による正常とジストロフィーチキン胸筋の比較

堀田　健*
研究協力者　大羽利治*　高木由美子*

私共は鶏胚胸部からとり出した筋芽細胞を培養した標本についてその成長過程を電気生理的・形態的に追跡して構造と機能の発達ならびに正常とジストロィー筋のちがいを研究してきた。今回は前回の報告[1]と同じ材料を用いて Skinned fiber とし，その収縮能力の発現と発達をとらえ，電気的，形態的な観察との関連を考察した。

材料及び方法

ジストロフィー（NH 413）及びコントロール（412）鶏の受精卵を37℃で11～12日間孵化して得た鶏胚の胸部からとり出した筋芽細胞を 95％ air －5％ CO_2，37℃で培養を開始し，2日から14日間にわたって形態，膜電位，電流，収縮性および Skinned fiber の収縮，カルシウム感受性などを観察した。

膜電流の測定は前に報告した[2]ものを改良し，3本の微小電極を用い膜電位を－70mv に固定して脱分極パルスを与えて行った。同時に収縮を観察した。測定はカルシウム 5 mM を含む Ginsborg 液中37℃で行った。

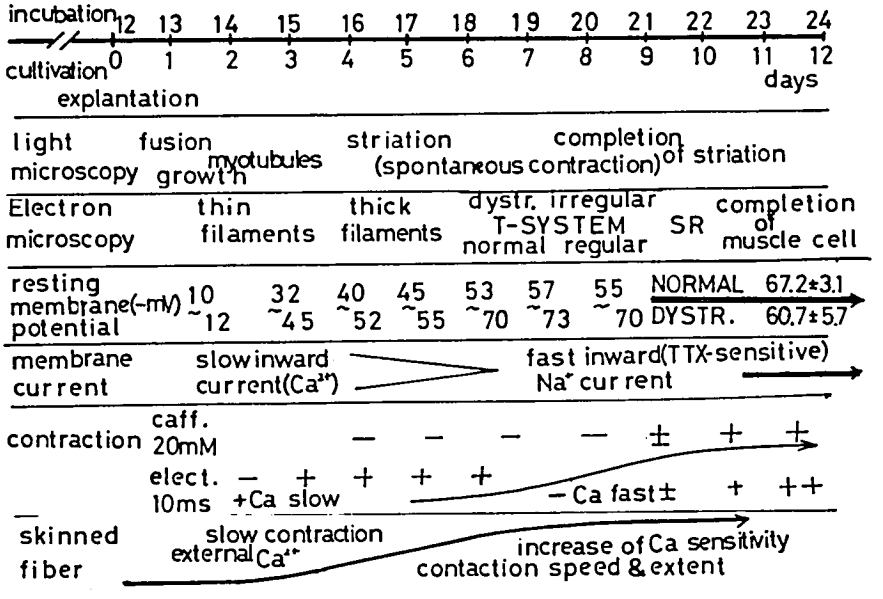
筋細胞の Skinning は relax solution（K－propionate，150 mM；ATP，5 mM；$MgCl_2$，1mM；EGTA，4 mM；$CaCl_2$，0.3mM；pH，7.0）中で 0.25％ Brij 15分間処理によった。収縮は一定濃度のカルシウムを含んだ液（activating solution）と交換し，反応を連続写真にとって閾値，収縮高，スピードなどを計測した。連続写真は毎秒3枚で，閾値は収縮の認められる最小カルシウム濃度（Sensitivity），収縮高は培養10日目の試料の pCa 5.5 のときを1としての比較値．スピードは収縮が最大の90％に達するまでの秒の逆数であらわした。これらはいずれも大略の値であり，こゝに用いた方法では再現性のある定量的な値は得られなかった。電気刺激による収縮及びカフェイン拘縮については写真で追跡出来なかったので，顕微鏡下で収縮のみられた場合を＋，みられなかった場合を－としてあらわした。

結　　果

培養細胞の発育過程：植付けられた筋芽細胞は培地中で急速に筋管形成をはじめ，細胞内では myofilament の形成がすすみ，電顕観察によれば thin filaments が side－by－side に配列しはじめていることが2日間培養の試料でみとめられた。ジストロフィーでも大体同様の経過をたどったが正常に比して若干 filament の構造が不揃いで出現がおくれている細胞が多くあった。横紋構造は培養開始後4～5日であらわれはじめ，8日目ごろにはすべての線維にみられるようになった。このときの微細構造は thick と thin filament が規則正しくならび，Z帯がはっきりと認められ，ほぼ完成した細胞となるが小胞体や triad の形成は10日目ごろまでははっきりしない。SR は恐らく細胞構造のなかで一番おそく出現するのではないかと思われる。ジストロフィー筋の場合，正常と

＊名古屋市立大学医学部第1生理学教室

第１表　培養過程の各ステージにおける形態的・電気生理的及び力学機能の獲得の概要。

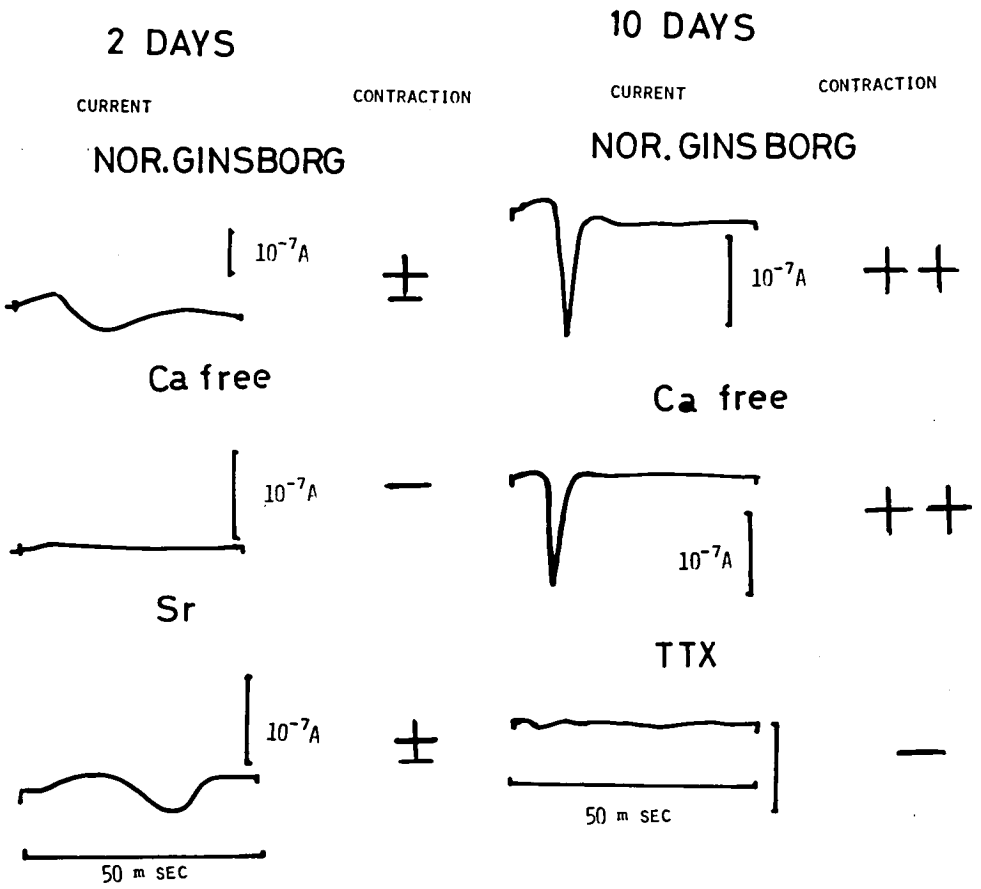


かわらない内部構造の細胞が大部分であったがなかには全く微細構造のないものや，不規則な配列などのものもあった。

膜電流と収縮：筋管が形成されるとすぐに微小電極の刺入が可能になるが，その時点での膜電位はひくい（表１）。通電によってゆっくりした収縮があらわれ，長い経過の膜電流が記録される（図１）。これは medium からカルシウムを除くと消え，収縮も消失するのでカルシウム電流であると考えられる。ストロンチウムの存在下でも同じような電流と収縮反応がみとめられる。この時期（発生初期）には膜にカルシウムチャネルが出現していると思われる。培養日数がたつにつれてこのカルシウム電流は小さくなり消失してしまう。かわりに速い経過の内向き電流があらわれはじめる。図１に示すようにこれは TTX でブロックされ，収縮もないので Na^+ 電流であり，Na^+ チャネルが発達したことを示すものである。このときの収縮ははやくなり，カルシウムを含まない液中でも収縮するので，この時期では内部ストアからのカルシウムの利用が可能になると思われる。カフェイン20mM を含む液に試料を浸すと拘縮がみとめられるようになるのは10日目以降のものに限られていた。SR のカルシウムとりこみ機能が発現するのはこのころであろうと思われる。

Skinned fiber による実験：筋管が形成され，細胞内部にフィラメント様の構造物があらわれはじめる２日間培養標本でも skinning が可能である。この標品にカルシウムを与えれば僅かながら収縮する。成長につれて収縮高，スピードも上昇する。図２は３日，５日，10日間培養した筋についての他緩及び収縮状態の位相差顕微鏡写真である。これらの計測から得られた結果をまとめて模式的に示すと図３のようになる。

(a)カルシウム感受性，種々のカルシウム濃度の activating solution（pCa 7.0，6.7，6.5，6.2，6.0，5.5）を与えたとき，収縮の認められる最低のカルシウム濃度と培養日数をプロットしたものが図３(A)で経時的にカルシウム感受性の増大が認められる。(b)収縮高，同濃度のカルシウムに対す

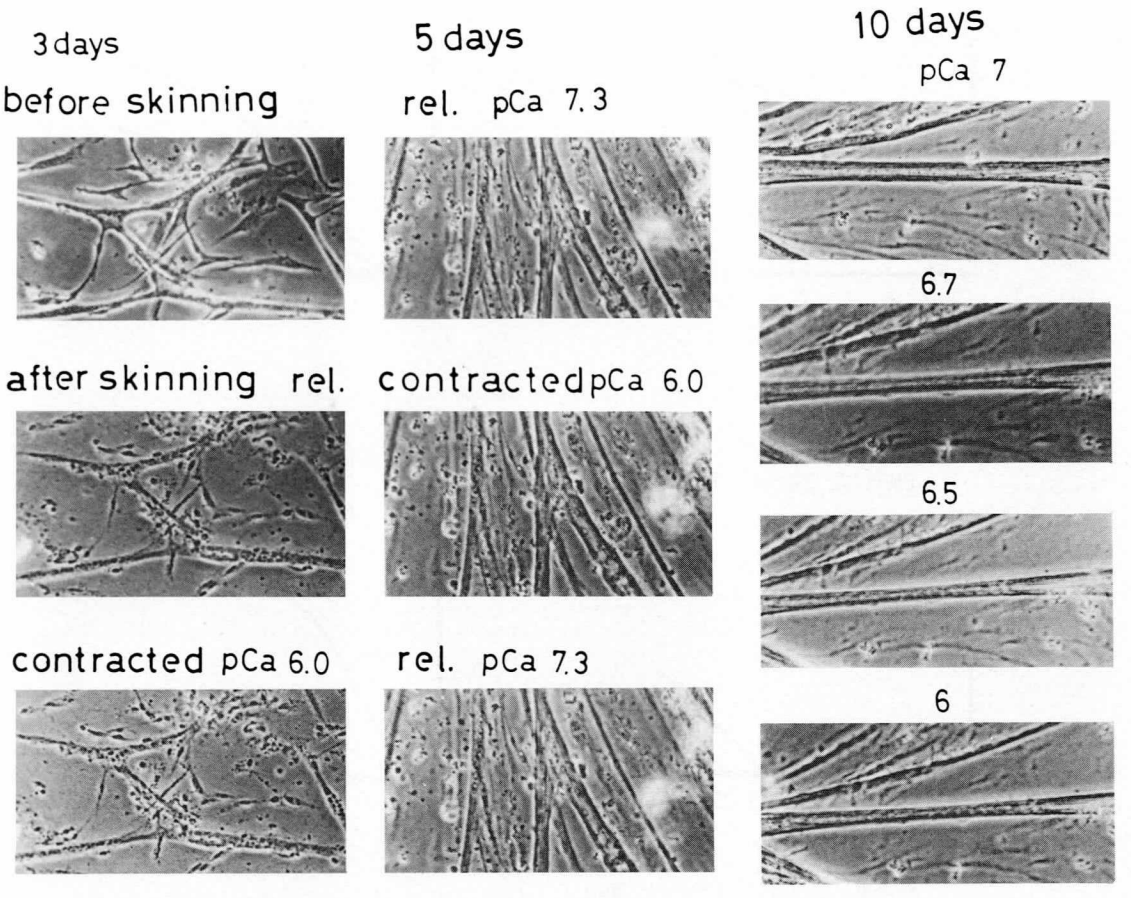


第1図 培養開始後2日及び10日後のサンプルについての膜電流及び収縮。
固定電位 −70 mV. Ginsborg solution はカルシウム5 mMを含む。
Sr; 10 mM, TTX: 1 μM

るレスポンスは培養日数の多いものほど大きいが2日間のものでも収縮する。(c)収縮速度，溶液のpCa を7.3から5.5にかえた場合の各ステージの収縮の速さを時間の逆数であらわすと(C)のようになる。(d)カフェイン拘縮，カフェインによる収縮は intact fiber と異り skinned にした場合殆んどみられず，10日以降の標品にわずかにみとめられたに過ぎない。これは Brij 処理が SR の膜を破壊したためであろう。

考 察

鶏胚からとり出した筋芽細胞は2日間の培養で筋管が形成され，同時に内部には収縮蛋白のフィラメントが観察されるようになる。このとき電気刺激を与えると液中にカルシウムが含まれていれば顕微鏡下でゆっくりながら収縮がみられる。このことは膜に電位依存性のカルシウムチャネルが作られており，又収縮蛋白も能力をもちはじめていることを示すものである。細胞膜にはその後 Na^+ チャネルの形成がはじまり，内部膜の発達にともなって外液カルシウムに依存しない収縮が可能となる。そのころには収縮蛋白もその能力をまし，カルシウム感受性を獲得して速い収縮に適したものとなる。Na^+ チャネルの発達，内部膜系の

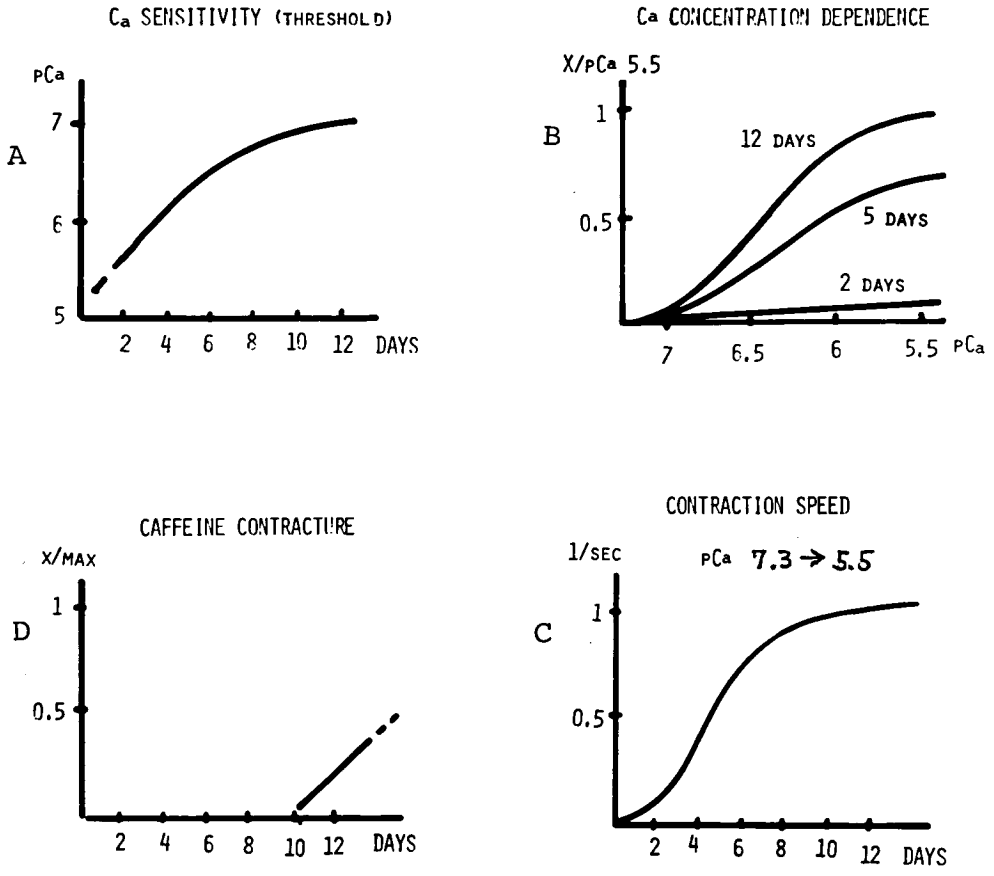


第2図　Skinned fiber の収縮。
培養開始後3日，5日，10日の試料についての測定。Medium をかえてから収縮，弛緩が完了したのちの撮影。通常1分～2分後。

形成と収縮速度の増大は平行しておこっていると考えられる。然しながらカフェイン拘縮が10日間培養以後にのみ認められるということは，SR のカルシウムストアとしての機能の発現が他の能力よりも一番おそいのではないかと思われる。植付けから発達の概要を表1に掲げた。正常とジストロフィー筋の間には，定量的に論議出来るような際立った差異はなかったが，表1にあるようにジストロフィー筋では T－system の配列がみだれていたこと，静止電位が低いことなどがあげられる。

文　　献

1) 堀田健，大羽利治，山本まり子：骨格筋の発達過程の機能的，形態的追跡，筋の発生と分化に関する基礎的研究　昭和57年度報告書 59-63 (1983)
2) 堀田健，大羽利治，越田信，西原己栄子，小鹿幸正：ジストロフィー筋の生理学的研究，筋ジストロフィーの基礎的研究　昭和53年度報告書 52-58 (1979)



第3図 Skinned fiber の収縮。
A：カルシウム感受性 B：カルシウム濃度依存性 C：収縮速度
D：カフェイン拘縮の発現

15　哺乳動物骨格筋の損傷後のHealing-over

栗　山　　熙
研究協力者　古　川　研一郎

緒　　言

心筋では機械的損傷により生じた損傷電位は数分以内に消失する。この現象はhealing-overとしてよく知られており，この発生機序は境界膜特にネクサスの抵抗の増大によると考えられている。[2・3・5・11・12] 一方骨格筋ではこの損傷電位は長く持続し，healing-over 現象は発現しないと考えられてきた。[11] しかし，近年になり一部骨格筋（カエルの縫工筋，モルモットの挙睾筋）で損傷電位が消失するという報告や，[4・9] 哺乳動物のcut muscleの性質はintact muscle変わらないという報告など，[7] 骨格筋にもhealing-overの存在を示唆する報告が散見される。そこで今回私達は哺乳動物の骨格筋にhealing-over 現象が存在するか否か電気生理学的手法を用いて研究した。そして筋の切断端における電気的性状をケーブル理論で解析し，さらにhealing-overが挙睾筋に特異的なものか否かを他の骨格筋と比較検討した。

実験と方法

体重300～400gの雄のモルモットを断頭致死後挙睾筋を摘出した。挙睾筋と比較するために長趾伸筋（EDL）および横隔膜を使用した。標本はKrebs液で灌流し，温度は31～32℃，pHは7.2－7.4に維持した。筋線維は顕微鏡下に小刀で切断した。

膜の電気的受動的性質は2本の微小電極を用いたsquare pulse analysisにより求めた。細胞内液の比抵抗（Ri）は131Ωcmとした。[1] 無限ケーブルによると電気緊張電位（V）の拡がりは，

$$V = \frac{1}{2} I_0 \sqrt{r_m \cdot r_i} \exp(-x/\lambda) \quad \cdots\cdots\cdots Eq\ (1)$$

となる。（I_0；全電流，r_m；膜抵抗，r_i；内部抵抗，x；電極間の距離，λ；空間定数）。筋が切断された時は一方端が有限の半無限長ケーブルの理論を用いた。すなわち切断端が電気的に短絡されている場合は切断端では（従ってxは負），

$$V = \sqrt{r_m \cdot r_i}\ I_0 \exp(-L/\lambda) \sinh((L+x)/\lambda) \quad \cdots\cdots\cdots Eq\ (2)$$

となる（L；刺激電極から断端までの距離）。
切断端が膜で閉じている（seal）場合は，

$$V = \sqrt{r_m \cdot r_i}\ I_0 \exp(-L/\lambda) \cosh((L+x)/\lambda) \quad \cdots\cdots\cdots Eq\ (3)$$

となる。筋線維が切断された時，いずれのモデルとよく一致するかを検討した。

結　　果

挙睾筋の静止膜電位は－73.6±2.0mV（n=42），半径24.6±3.8μm（n=28），入力抵抗462±147KΩ，λ 1.21±0.19mm，時定数2.8±0.7msec，膜の比抵抗（Rm）1660±523Ωcm²，そして膜の比容量（Cm）1.7±0.4μF/cm² であった。

挙睾筋を切断すると切断端より1mmのところでは膜は約5分後に最大の脱分極となり，その後徐々に回復し60分後には元のレベルまで回復した。この脱分極の程度と膜電位の回復の速度は距離により多少の差がみられた。そこで切断端より1mmのところで最大の脱分極より½まで回復するのに

＊九州大学医学部薬理学教室

要した時間をT½とし，回復の速度のパラメーターとした。32℃のT½は22.4±5.1分（n=7），であった。

灌流液の温度を22°Cに下げると静止膜電位は−65.3±2.6mV（n=10）と浅くなり，損傷後の膜電位の回復は遅くなった。温度と膜電位の回復の速度（T½の逆数）の関係をArrhenius プロットより求めると，回復の速度の温度係数Q_{10}は2.1であった。

次に膜電位の回復に及ぼすCaの効果を観察した。灌流液中のCaを正常の1/10（0.25mM）に減らすと（Mg置換），膜電位の回復は観察されなかった。しかし正常の1/3（0.75mM）では回復する傾向がみられたが，元のレベルまでは回復しなかった。これに対して正常の5倍のCa（12.5mM）ではコントロールと差がみられなかった。すなわち膜電位の回復には少なくとも0.8mM以上のCaが必要なことが判明した。

RNA合成阻害剤であるactinomycin D（Sigma）0.5mg/weight kgを腹腔内に投与し，第1，2，3日目に摘出した挙睾筋を用いて同様の実験を行った。投与群のT½は25.3±4.3分（n=6）でコントロール群と差がなかった。この結果とQ_{10}値より，膜電位の回復には代謝の関与が少ないと示唆された。

膜電位が回復した時点において電気緊張電位の拡がりを調べた。intact muscleではEq(1)により求めた理論値と実測値はよく一致した。cut muscleでは切断端と反対側では，すなわち無限ケーブル側では，緊張電位は切断端の性状にかかわらず指数関数的に減少する。切断端側では，緊張電位は切断端が電気的に短絡されていればEq(2)により求めた理論値を示し，電気的にsealされていればEq(3)により求めた理論値を示すことになる。実測値は，後者の理論値とよく一致し切断端が電気的にsealされていることを示している。cut muscleではこの時点において，intact muscleと同様に外向き通電により活動電位が観察され，電気的活動性も回復していることがわかった。

膜電位の回復が挙睾筋に特異的なものか否かを検討する目的で他の骨格筋を用いて実験した。EDLでは挙睾筋と同様に膜電位の回復が観察されたが，横隔膜では脱分極後ある程度回復するが，正常のレベルにはならなかった。

考　　察

本実験によりモルモットの挙睾筋は切断後60分経過すると膜電位は元のレベルまで回復し，電気的活動性も回復する事が判った。さらに切断端はケーブル理論により解析すると電気的にsealされていることが判った。すなわちこの筋線維はhealing-over 現象を有していると結論した。モルモットの挙睾筋はアドレナリンなどで収縮する平滑筋でおおわれているという特異な構造を持っており，そのために他の骨格筋とは全く違った収縮を引きおこす。[8,10] しかしこの骨格筋線維のケーブル定数は他の哺乳動物の骨格筋とほぼ同じで，[1] 電気的膜定数に差がみられなかった。EDLと横隔膜の実験から挙睾筋以外にもhealing-over 現象が存在し，healing-over 現象が挙睾筋自体の特異性によるものでないことが判明した。

Healing-over 現象の発現機構としては，心筋ではネクサスの抵抗の増大が考えられている。[11,12] 骨格筋にはこのような細胞間構造はなく，healing-over の速度も心筋の数分に比べて遅いので他の機構が考えられる。筋線維の切断端ではmembrane sealing や plug の形成がみられることはよく知られている。[4,6] またNinomiya et al.[9] は挙睾筋の切断端よりの色素の浸透は切断後50分で止まると報告している。これは膜電位の回復の時期とほぼ同じで切断端においてdiffusion barrierによるmembrane sealingの存在が，healing-overと密接な関係にあることを示唆している。またCaがhealing-over に重要な役割を果たしていることも判った。これらのことは，今後healing-over 現象の発現機構の解明の助けとなるだろう。

以上をまとめると，healing-over 現象が心筋に特有な現象ではなく哺乳動物の特定の骨格筋に

も存在することが明らかになった。このような筋線維では，cut muscle の標本を用いてその電気的膜性質を調べることが出来ると考えられる。

文　　献

1) Boyd I.A. and Martin A.R. (1959). Membrane constants of mammalian muscle fibres. *J. Physiol*, 147: 450-457.
2) Délèze J. (1970). The recovery of resting potential and input resistance in sheep heart injured by knife or laser. *J. Physiol*, 208: 547-562.
3) De Mello W.C. (1972). The healing-over process in cardiac and other muscle fibres: in Electrical Phenomena in the Heart. ed. De Mello W.C. Academic Press, New York, pp. 323-351.
4) De Mello W.C. (1973). Membrane sealing in frog skeletal-muscle fibers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(4): 982-984.
5) Engelmann T.W. (1877). Vergleichende Untersuchungen zur Lehre von der Muskelund Nervenelektricität. *Pflügers. Arch. ges. Physiol*, 15: 116-148.
6) Heilbrunn L.V. (1956). The Dynamics of Living Protoplasm. Academic Press, New York, pp. 62-84.
7) Léoty C. and Léauté M. (1982). Membrane potential and contractures in segment cut from rat fast and slow twitch muscle. *Pflügers. Arch.* 395: 42-48.
8) Ninomiya J.G. (1975). Some pharmacological properties of the cremaster muscle of the guinea-pig. *Br. J. Pharmac*, 55: 487-495.
9) Ninomiya J.G. and Mascher D. (1982). Recovery of the membrane potential of the sectioned striated muscle fibers of the guinea-pig cremaster. *Jpn. J. Physiol*, 32: 529-539.
10) Ninomiya J.G., Merchant H. and Alonso-de Florida F. (1976). Ultrastructural arrangement and distribution of smooth muscle and striated muscle fibers in the cremaster of the guinea-pig. *Anat. Rec*, 186: 127-132.
11) Rothschuh K.E. (1951). Über den funktionellen Aufbau des Herzens aus elektrophysiologischen Elementen und über den Mechanismus der Erregungsleitung im Herzen. *Pflügers. Arch. ges. Physiol*, 253: 238-251.
12) Weidmann S. (1952) The electrical constants of purkinje fibres. *J. Physiol*, 118: 348-360.

Ⅳ　アセチルコリンレセプター

16.　骨格筋アセチルコリン受容体の生合成と
細胞内前駆体　91

17.　アセチルコリンレセプター分布に対する神経の作用　95

16　骨格筋アセチルコリン受容体の生合成と細胞内前駆体

杉　山　博　之*
研究協力者　山　下　幸　子*　八木沢　　仁*

ニコチン性アセチルコリン受容体は，複数個のポリペプチドサブユニットが集合してできた膜内在性糖タンパク質であり，それぞれのサブユニットは別々の遺伝子に基づいて合成されることが知られている。ところが，cell－free のタンパク合成系でこの受容体を合成すると，生成されるサブユニットは正しく集合体を形成せず，また特異的リガンドであるα－ブンガロトキシンと結合することもできない。このことから，サブユニットの集合とα－ブンガロトキシン結合能の獲得とは密接に関係した現象であり，サブユニットが集合することによって正しいコンフォメーションができ上り，α－ブンガロトキシンとの結合能などの生理活性が生じてくるのであろうと想像されている。しかし，このサブユニットの集合がどのような過程を経て行われるのか，またどのステップでα－ブンガロトキシンとの結合能が生じてくるのか，という問題については余り分っていない。

我々は培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化の問題を検討してきたが，これまでに(1)培養細胞表面膜上の受容体には等電点を異にする２つのタイプのものが存在すること，(2)両タイプの受容体は，共通の前駆体から分化する形で生じて来ると考えられること，を報告した[1]。今回は，細胞内のアセチルコリン受容体前駆体成分について更に詳細に検討し，その生合成過程においてサブユニットが次第に集合して行くステップに相当すると考えられる未完成前駆体様の成分を見い出したので報告する[2]。

＊生理学研究所・細胞器官研究系

材料と方法

培養細胞としては，ウイスター系新生ラットの下肢筋より得た筋細胞を用いた。培養法の詳細，細胞膜分画や細胞内成分の調製法等については既に報告した方法[1]に従った。

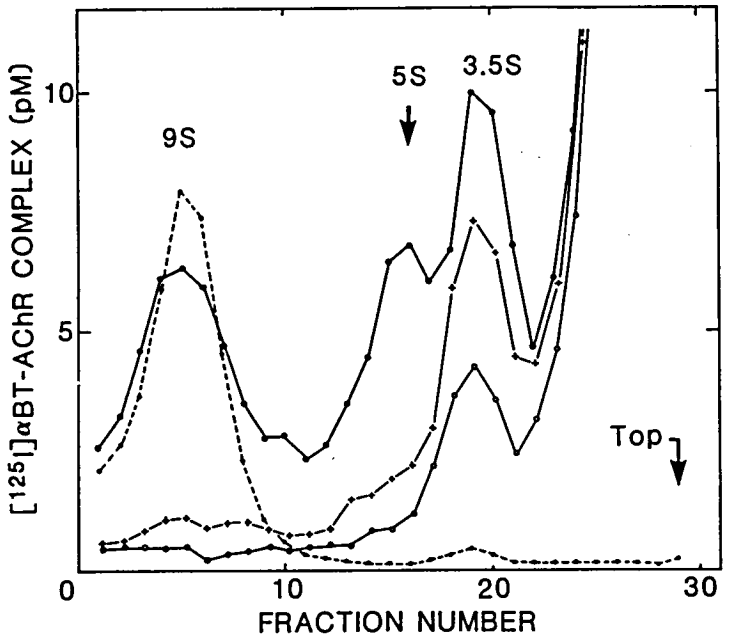
アセチルコリン受容体またはその前駆体成分は全て，放射能標識したα－ブンガロトキシンとの複合体として検出・解析した。従って，α－ブンガロトキシンとの結合能を持たない成分についてはここでは触れない。また細胞内成分についてはあらかじめ細胞表面膜上の受容体を非標識α－ブンガロトキシンでマスクした後，標識α－ブンガロトキシンを用いて検出した。

結果と考察

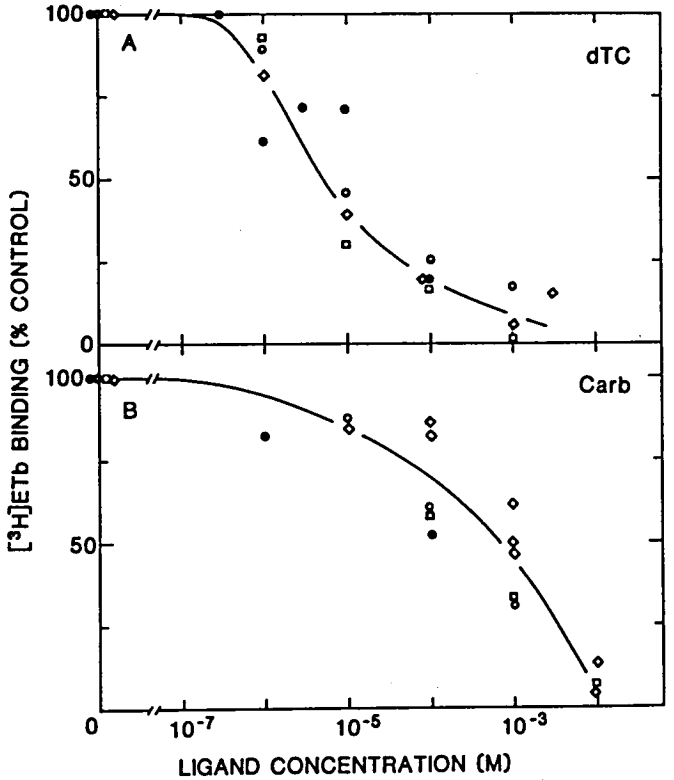
培養骨格筋細胞の細胞内α－ブンガロトキシン結合成分を，分子量，薬理学的性質，免疫化学的性質，代謝制御に関する特徴，等の種々の側面から検討した結果，次にまとめるような知見を得た[2]。

(1)　細胞内成分は，ゲル濾過やショ糖密度勾配遠心によって分離される少なくとも三種類の異なった分子サイズを持つ成分を含む（図１）。それらの沈降係数は９Ｓ，５Ｓ，および3.5Ｓと見積られる。

(2)　これらの三成分はいずれも細胞表面受容体と同様，α－ブンガロトキシンの他にカルバコー



第1図　培養筋細胞の細胞表面アセチルコリン受容体（-----）および細胞内α－ブンガロトキシン結合成分（—●—）のショ糖密度勾配遠心による分析。放射標識α－ブンガロトキシンの結合はカルバミルコリン（○）またはクラーレ（＋）によって阻害される。



第2図　クラーレ（dTC）またはカルバミルコリン（Carb）による放射標識α－トキシン（[^{3}H] ETb）結合の阻害。●，細胞表面アセチルコリン受容体。□，細胞内9S成分。○および◇，細胞内の低分子量成分（5S成分と3.5S成分の混合物）。

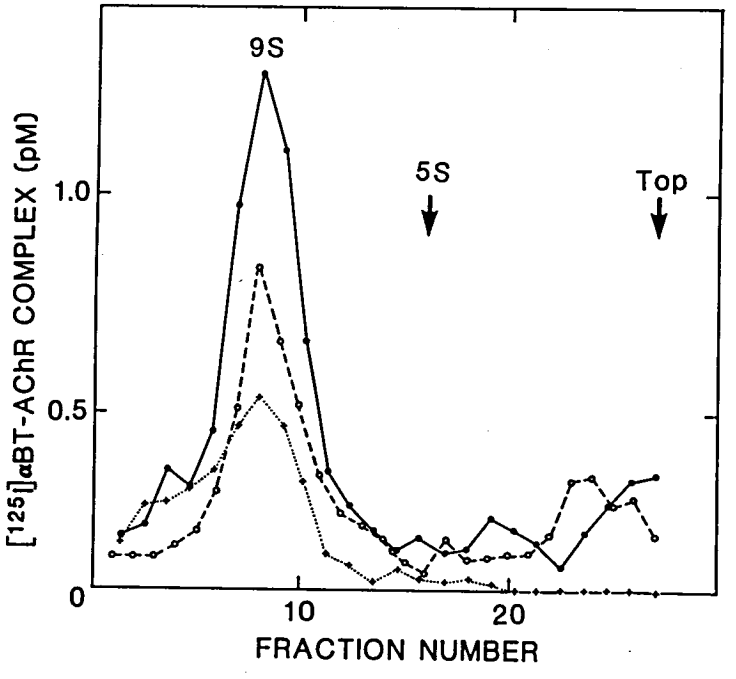
ルやクラーレ等のコリン性薬と結合し，かつこれらコリン性薬とα－トキシンとの結合は拮抗し合う（図1,2）。

(3)　これらの3成分はいずれも細胞表面受容体と同じように，シビレエイ（*Torpedo marmorata* または *Narke japonica*）アセチルコリン受容体に対する抗体と交差反応をする（表1）。

(4)　これら3成分のうち，分子量の小さい5Sおよび3.5Sの成分は，9S成分が部分的に分解して生じたものである可能性が考えられるので，この点を検討した。すなわち，9S成分を，いろいろな条件下で保温し，その結果分子量の低下が起こるかどうか調べたところ，図3に示されるように，そのような変化は見られなかった。

(5)　筋細胞を種々の糖タンパク合成阻害剤の存在下で培養し，その結果細胞内成分がどのような影響を受けるか検討した。阻害剤としては，ポリペプチドの合成を阻害するcycloheximide，ポリペプチド鎖への糖鎖の添加を阻害するtunicamycin，およびGolgi装置での合成後のプロセシングを阻害するmonensinを用い，糖タンパク合成経路上の異なったステップで生合成反応を阻害した。その結果，表2に示すように，細胞内の3成分は異なったやり方で影響を受けることが分った。特にmonensinの場合，低分子量成分（5Sおよび3.5S成分）は減少するのに対して，9S成分は増大することが分った。このことからも，5Sおよび3.5S成分は9S成分から部分分解によって生じた人為的産物ではないことが支持される。

以上の結果から，現在のところ我々は，細胞内α－ブンガロトキシン結合成分について次のように考えている。すなわち，これらの成分はいずれもアセチルコリン受容体と密接に関連した成分である。このうち，9S成分はサブユニット集合が完了し，サイズ的に完成した直接の前駆体であろう。より小さい成分は，9S成分より由来した部



第3図　細胞内の9S成分のショ糖密度勾配遠心。●，処理なし。○，4℃8日間保温後更に37℃30分保温したもの。＋，新しい培養筋細胞と共に再ホモジェナイズし20℃19時間保温したもの。いずれの処理でも分子量の低下は見られない。

表1　シビレエイ（*Torpedo marmorata* および *Narke japonica*）アセチルコリン受容体に対する抗血清と培養筋細胞α－ブンガロトキシン結合成分との反応性。十分量の抗血清によって沈澱する割合で表わす。

抗血清	免疫沈降反応量（%）			
	細胞表面受容体	細胞内成分		
		9 S	5 S	3.5 S
抗 *N. japonica*	87±1	40±1	45±23	36±12
抗 *T. marmorata*	69±4	40±2	46±23	7±11

表2　糖タンパク合成阻害剤による細胞内α－ブンガロトキシン結合成分の増減。コントロールの培養筋細胞に対する相対量（%）で表わす。

阻害剤	細胞内成分の量（%）		
	9S	5S	3.5S
cycloheximide	39±14	36±10	49±15
tunicamycin	43±19	23± 9	29±14
monensin	126±15	57±20	66± 7

分分解産物ではなく，サブユニット集合の完了していない未完成の前駆体であろう。今後更に，これらの点を確かめて行きたいと考えている。

文　　献

1) Sugiyama, H., Yamashita, Y., & Murakami, F.: (1982) Multiple molecular forms of acetylcholine receptors in cultured muscle cells: *J. Neurochem.* **93:** 1038-1046.

2) Sugiyama, H., Yamagishi, S., & Yamashita, Y.: (1983) Multiple forms of intracellular α-bungarotoxin binding components with different molecular sizes in cultured skeletal muscle cells. *Biomed. Res.* **4:** 425-432.

17　アセチルコリンレセプター分布に対する神経の作用

萩　原　彌四郎＊
研究協力者　黒　見　　坦＊

骨格筋のアセチルコリンレセプター（AchR）は，発生初期の筋では筋細胞表面全体に分布しているが，成熟動物では神経との接合部だけに高密度で存在する（AchR cluster の形成)。神経を除くと AchR は再び筋細胞全体に分布するようになる。これらのことから神経は筋の AchR の局在をおこしていると考えられる。今回はその作用機序を明らかにするため，AchR が神経筋接合部に蓄積していく過程を培養細胞でしらべた。

実　験　方　法

細胞培養；アフリカツメガエルの胚から筋および神経管を取り出し，すでに述べられている方法で細胞培養を行った。[1] 筋細胞を3～4日室温中で培養した後，神経細胞を加えた。

AchR の蛍光標識；培養筋細胞を蛍光色素ローダミンをつけたα－バンガロトキシン（2μM）中に1時間浸して，細胞表面の AchR を染めた。

蛍光顕微鏡；従来の蛍光顕微鏡では褪色のため，同一標本の写真を何回もとることは不可能であった。しかし今回は，image intensifier をつけた Video システムを利用することによって，同一標本から，生きたまま少くとも10数回の蛍光写真をとることが可能であった。[2)3)]

実　験　結　果

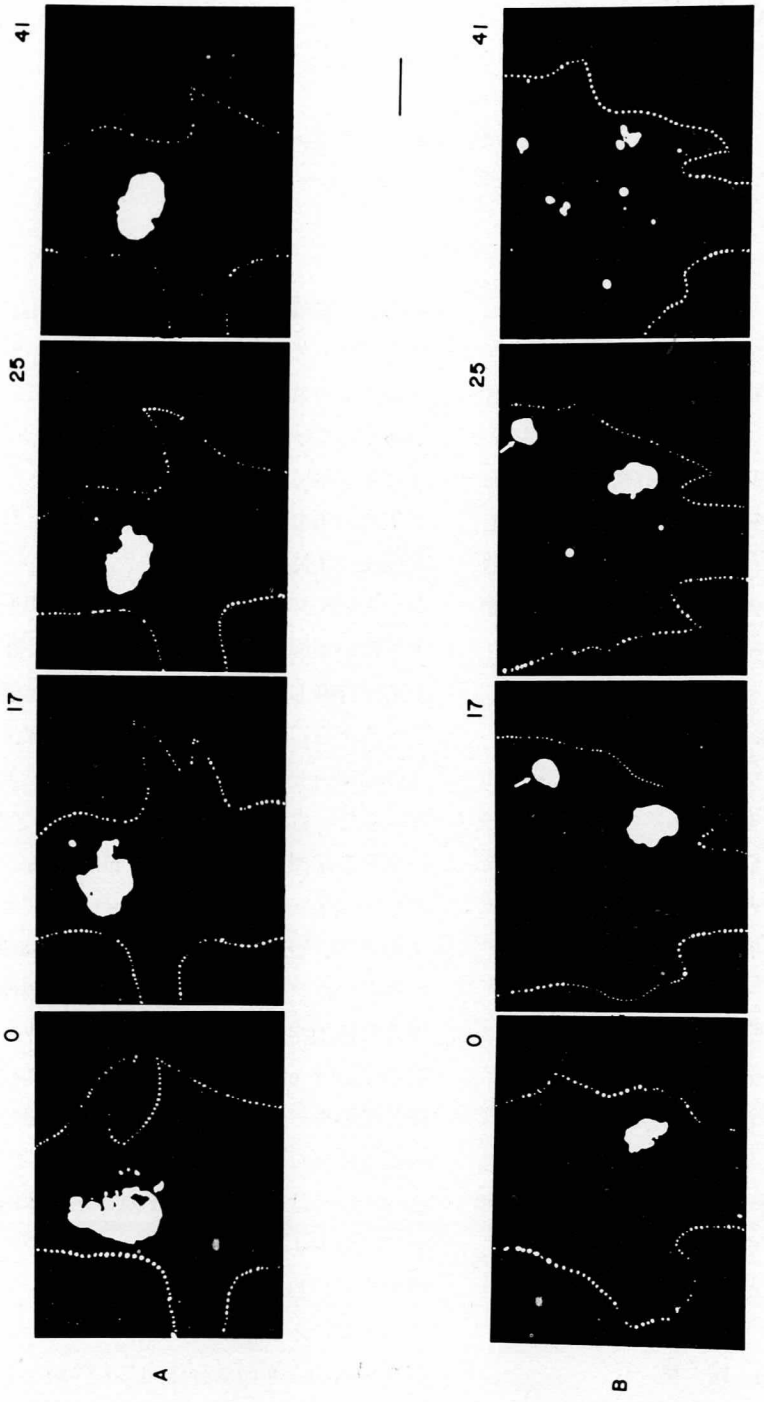
1. 神経支配を受けない筋細胞の AchR は2つの分布，高密度分布（AchR cluster，図1の白くみえる部分）と低密度分布（diffuse receptor，図1ののこりの部分，AchR の密度が低いため蛍光はみれない）に分けられる。AchR cluster は図1に示す如く，筋細胞の形が変っても，比較的同じ位置にあり，消失するものもあったが，多くの cluster は長く存在した。

2. AchR の分布に対する神経の効果を時間的に示したのが図2である。神経が筋に接触すると，すでに存在していた AchR cluster は消失し（図2のAとB)，その後，神経との接触部分に多くの AchR の cluster が出現した（図2C)。

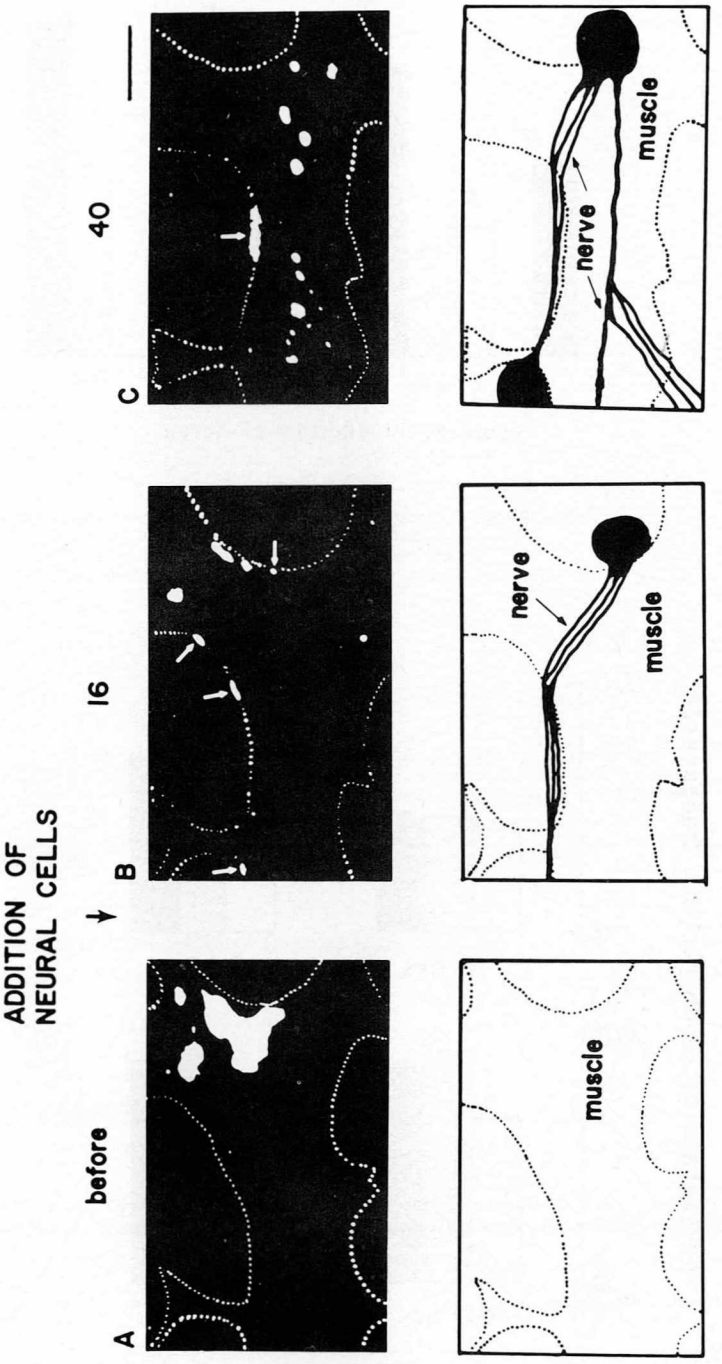
3. すでに存在する AchR cluster に対する神経の作用を定量的に示したのが図3である。筋細胞だけの培養でも AchR cluster は時間とともに消失したが，48時間後でも約半分の AchR cluster は存在した（図3白カラム)。ところが神経細胞を加えた筋細胞培養のうち，神経の接触をうけない筋の AchR cluster は生存率が有意に増加し，神経の接触をうけた筋は逆に AchR cluster の生存が減少させられ，神経添加後16時間で半分の AchR cluster は消失した。このことは，神経接触は，すでに存在する AchR cluster を破壊する効果を示すことがわかる。

4. すでにある AchR cluster をこわす神経の作用が局所的なものか全体的なものかを示したのが図4である。AchR cluster の消失率は，神経からの距離に依存してなく，従って，神経のこの作用は，接触した筋細胞全体におよぶことがわかっ

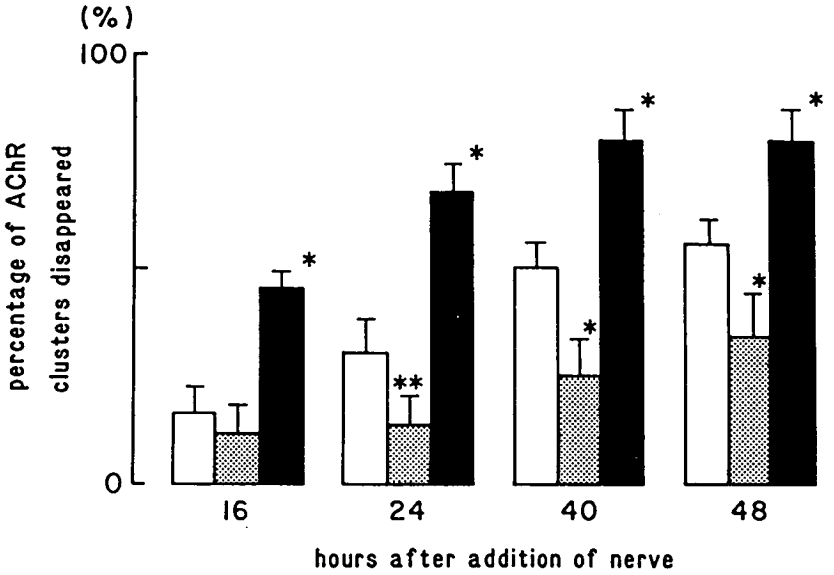
＊千葉大学医学部脳機能研究施設神経薬理研究部



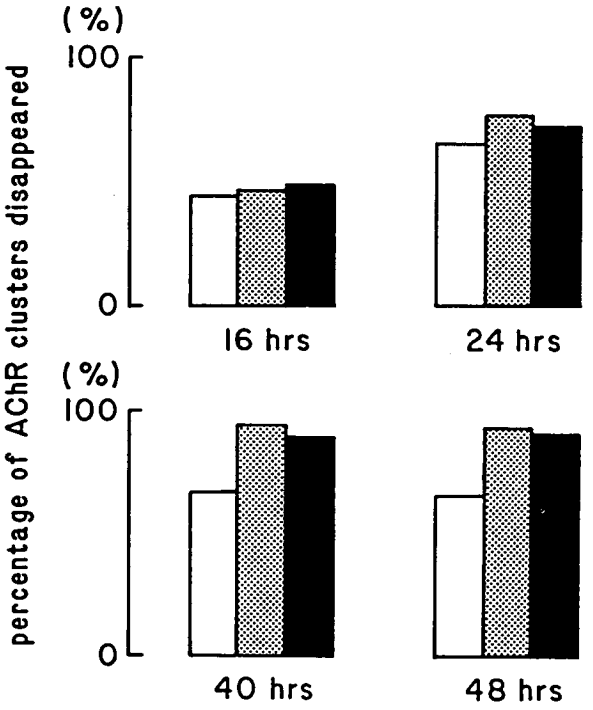
第1図　神経支配のない筋細胞の AchR cluster の生存・消失・出現。
各写真の数字は AchR を染めてからの時間・スケール 10 μm



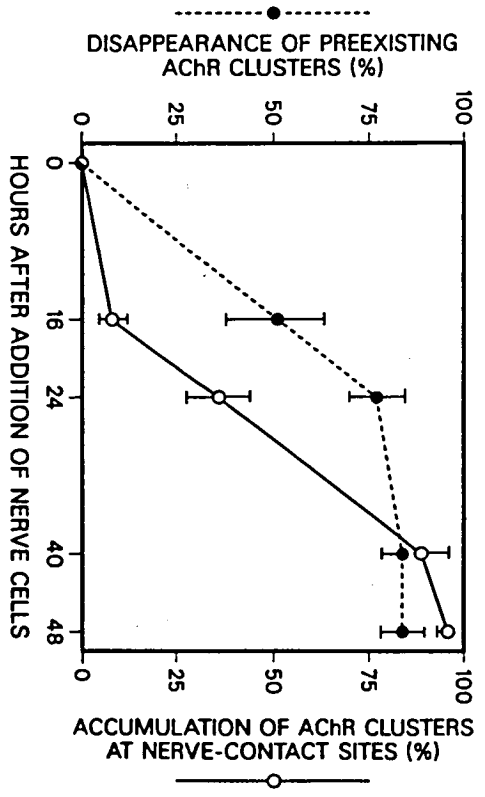
第2図　神経支配前（A）と後（BとC）での AchR cluster 分布の変化。
上が蛍光写真，下は図式化した筋・神経細胞。数字は，神経細胞を加えてからの時間（時）。矢印は端の AchR cluster を示す。



第3図 すでに存在していた AchR cluster に対する神経の作用。
縦軸は消失した AchR cluster の%，横の時間は神経を加えてからの時間(時)。
＊p＜0.001，xx＜0.005 対照接合（白カラム）との比較。



第4図 すでに存在していた AchR cluster の消失と，神経からの距離。
縦軸は消失した AchR cluster の%，時間は神経を加えてからの時間。
白カラム（神経に接触された AchR cluster）
点カラム（2.4 μm＜ ＜16 μm）
黒カラム（＞16 μm の AchR cluster）



第5図 すでに存在した AchR cluster の消失（点線），と神経筋接合部での AchR cluster の形成（実線）。
横軸：神経細胞を加えてからの時間。

た。

5. すでにある AchR cluster の消失と神経筋接合部での AchR cluster の出現の時間経過。

神経筋接合部に AchR cluster が形成されることはよく知られているので，すでに存在する AchR cluster の消失は，AchR が神経筋接合部に蓄積した，その結果という可能性も考えられる。しかし，図5に示す如く，すでに存在していた AchR が消失してから，後に AchR cluster が接合部に出現してきた。このことは，上の可能性を否定するものである。

考察と結論

以上の結果より，神経は，その筋との接合部に AchR cluster を形成する作用の他に，すでに存在する AchR cluster を破壊する作用を有することが見つけられた。この AchR cluster 破壊作用は，接触した筋細胞全体におよんでおり，cluster 形成作用か，その接触部位のみに限定しているのとは対照的である。

AchR cluster が神経筋接合部に形成される機序として，capping 現象から考えられた。まず小さい AchR patch ができ，それが移動して大きい cluster が形成されるとの説が出されているが，今回はこれを支持する結果は得られなかった。つまり(1)小さい AchR patch も cluster も膜上を動くという証拠はなかった。(2) AchR cluster が神経筋接合部に形成される前に，すでにあった AchR cluster は消失した。

むしろ，trap theory（膜内を自由に動く Ach

R が神経筋接合部で trap される）の方が可能性があると考えられ，それについての実験を続行中である。

文　　献

1) Anderson, M.J., M.W. Cohen and Zorychta E.: (1977), Effects innervation on the distribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J. Physiol.* **268**: 731-756.
2) Kuromi, H. and Kidokoro Y.: (1982) Development of acetylcholine receptor clusters at nerve muscle contacts in Xenopus cultures. *Soc. Neurosci Abstr.* **8**: 863.
3) Kuromi, H. and Kidokoro, Y.: (1983) Formation and dispersal of acetylcholine receptor clusters at nerve-muscle junction in Xenepus culture. *Soc. Neurosci Abstr.* **9**: 1179.

V 微 細 形 態

18. 細胞骨格の分化発達－筋腱連結部の細胞骨格 103

19. ラット骨格筋の凍結割断像 107

20. ジストロフィー鶏胸筋での異常蛋白質の発現について 110

18　細胞骨格の分化発達－筋腱連結部の細胞骨格

石　川　春　律*
研究協力者　月　田　承一郎**　月　田　早智子**　臼　倉　治　郎**
塩　村　洋　子**　藤　巻　　昇*　神宮司　洋　一*

骨格筋の正常な収縮活動は筋細胞内の筋原線維や膜オルガネラの規則的な分布・配列を基盤にして行われている。このような形態を形成し，維持する役割を担っているのが細胞骨格である。[1)]

細胞骨格の主な構成要素は，(1)微小管（microtubule），(2)中間径フィラメント（intermediatefilament），および(3)マイクロフィラメント（microfilament）である。筋細胞では微小管と中間径フィラメントが細胞骨格要素として問題になる。われわれはまず，中間径フィラメントの存在様式を微細形態学的に分析した。ヒト筋をはじめ，いろいろな動物の筋について観察した結果，サル横隔膜の筋線維にとくに中間径フィラメントがよく発達し，隣接筋原線維のZ板相互を結ぶような配列をとることを見出し，前報で報告した。[2)]

今回，筋腱連結部における細胞骨格要素についてその分布・配列を電子顕微鏡的に観察したので報告する。この部位は筋線維端であり，筋原線維の収縮力が筋形質膜を介して腱に伝えられる特殊な部分である。[3)]

材料と方法

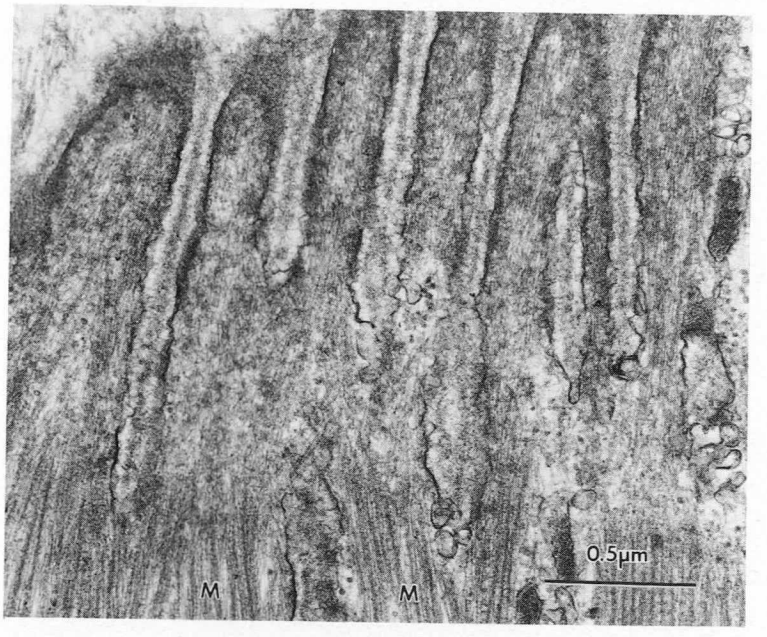
材料として，マウス横隔膜およびサル横隔膜を用いた。型のごとく，グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムの二重固定を施し，脱水・包埋ののち，超薄切片を作製し，電子顕微鏡による観察を行なった。

結果と考察

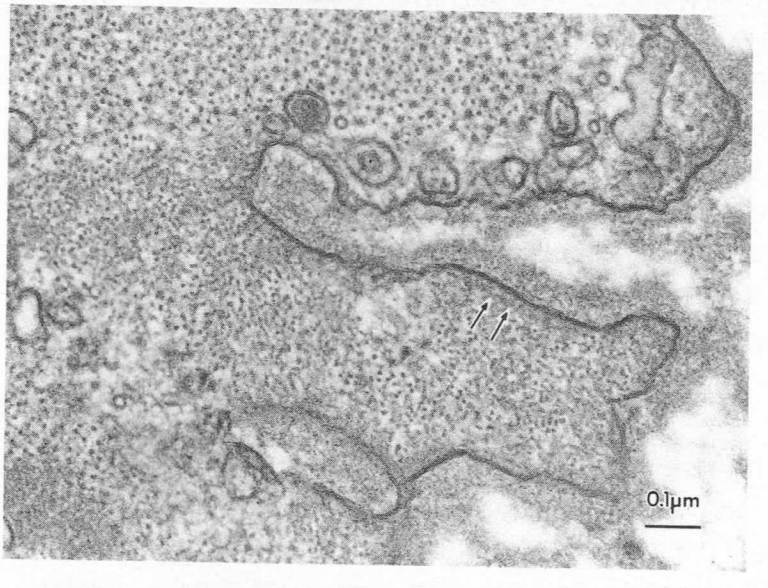
1.　筋原線維と形質膜の連結

筋腱連結部をなす筋線維端は複雑な外形を示し長軸方向に大・小の突起や弯入を形成し，腱からの膠原線維束とかみ合うように連結されている（図1）。筋線維端のこの凹凸構造は筋節長にして3～4個以内に限定されている。筋線維内部では，筋原線維がZ板のレベで筋形質膜に付いて終る様式をとる。しかし，詳細に観察すると，最終の筋筋のI帯の細いフィラメントは通常の筋節内の1μm長を超えて，したがってZ板のレベルを超えて，さらに伸び，形質膜内面に付いているように見える（図1）。おそらく，最終I帯の細いフィラメントの全長は多くが1μmより長いと考えられる。その上，この伸長部分のフィラメント束は通常のI帯に比してかなり密な集合束をなしている。フィラメント束にはその末端の膜付着部のみならず，束内にも散在して暗物質の小斑が認められた。この暗物質の性質は不明であるが，Z板構成成分と共通の蛋白質である可能性が強い。実際，暗物質はZ板と連続しているのが観察でき，また電子密度もほぼ同等である。この部位の細いフィラメントがどのくらい長いのか，また，形質膜に付く途中でフィラメント極性を変えるかどうかについて現在分析中である。

*群馬大学医学部解剖学教室
**東京大学医学部解剖学教室

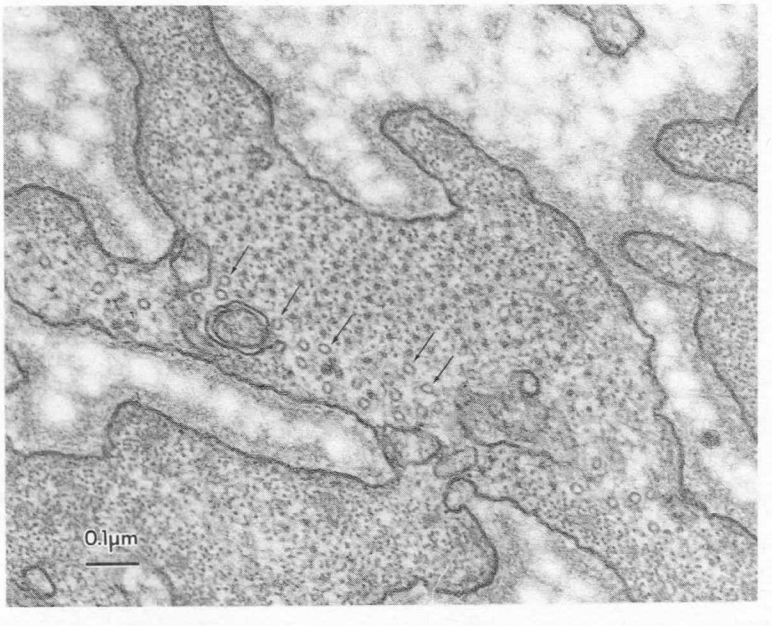


第1図　筋線維端の縦断像
筋線維端には多数の突起や弯入が形成されている。筋原線維の最終筋節のI帯の細いフィラメントは長く伸びて，突起や弯入の形質膜に付いて終る。サル横隔膜。



第2図　筋線維端の横断像
筋原線維の細いフィラメント束は裏打ち（矢印）構造を介して形質膜に付く。裏打ちの部位に一致して基底膜も厚く発達している。
マウス横隔膜。

第3図　筋線維端の横断像
線維端の突起（1, 2, 3）内に多数の微小管が見出される。また，糸粒体（Mit）の集積がみられる突起もある（1, 2）。マウス横隔膜。



第4図　筋線維端の横断像
筋線維端には多数の横断微小管（矢印）が見出され，すべて縦方向に配列している。
マウス横隔膜。

上記のように，最終筋節の細いフィラメント束は暗物質を介して形質膜内面に付く。暗物質は形質膜内面上に層をなしているが，両者の間には約15nm の明調層が介在しており，ここに橋渡し構造が認められる（図2)。この暗物質層は一種の裏打ち構造（形質膜裏打ちplasmalemmal under-coat）とみなすことができる。その上，この層構成は他のいろいろな細胞の形質膜裏打ちにも共通している。細いフィラメントはこの裏打ちに付いて終るように見え，決してこれを貫通して膜自体に直接付く像は得られなかった。今後，フィラメントの形質膜への付着の分子機構を分析していきたい。

興味深いことに，裏打ち構造としての暗物質層はフィラメント束の付着部位以外の部位にも斑状に存在し，その多くは付着部位と連続していると考えられる。付着部位以外の裏打ち構造がどのような機能を果すかも今後の問題として残る。

2. 筋線維端の細胞骨格要素

まず微小管について検索した。筋線維端では，他部に比して微小管の数が多く，かつ，長軸方向に配列しているのが観察される（図3)。形質膜直下や筋原線維間の筋形質内に見出され，しばしば束をなして走っている（図4)。微小管は糸粒体などの膜オルガネラと密接な位置関係を示し，また，微小管に富む筋細胞突起内には糸粒体の集積が認められる（図3)。筋線維端以外の部位では，微小管が横走する傾向を示し，横細管と平行して走る像がしばしば認められる。部位によるこのような微小管配列の差は何を意味するのか明らかでないが，筋線維における微小管の役割を考える上で重要な所見である。一般に微小管は細胞に機械的な支持を与えるのみでなく，物質輸送や膜オルガネラの移動にも関与している。筋細胞端における微小管の数の増加と長軸配列はこの部位の機能的特異性を反映しているにちがいない。

中間径フィラメントは筋線維端で，横方向および縦方向の走行を示し，数も増加している。このフィラメントは筋原線維相互間をZ板のレベルで連結するのみでなく，筋細胞突起の中央を縦走し筋線維端の形態を維持するのにも働いているようにみえる。

以上，筋腱連結部における筋線維端の細胞骨格に関する観察結果を記述した。とくに，筋原線維付着部をなす形質膜裏打ち構造，筋原線維間の微小管および中間径フィラメントについて興味ある所見を得た。今後，この観察を分子構築の観点から進めるとともに，病筋における筋腱連結部の形態変化を検索したい。

われわれは，この研究に平行して，現在(1)急速凍結デープエッチングレプリカ法による筋収縮機構[4]，および(2)急速凍結置換法による筋原線維および筋小胞体の微細構造[5]について研究を進めている。

文　献

1) 石川春律：細胞骨格の微細構造。蛋白質核酸酵素，28, 624-635 (1983).
2) 石川春律・月田承一郎・月田早智子・臼倉治郎：細胞骨格の分化発達 ― 中間径フィラメントの存在様式。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年度報告書, 35 – 38 (1983).
3) Ishikawa, H.: Fine structure of skeletal muscle. In *Cell and Muscle Motility*, 4: pp.1-84, (Dowben, R.M. and Shay, J.W., eds.), Plenum Publishing Co., New York, 1983.
4) 月田承一郎・矢野雅文・月田早智子・田仲広明・石川春律・清水博：急速凍結法を用いた筋収縮過程の観察，II. 第36回日本細胞生物学会大会講演要旨集, p.74, 1983.
5) 塩村洋子・臼倉治郎・石川春律：急速凍結置換法によるカエル骨格筋線維の微細形態，第36回日本細胞生物学大会講演要旨集，p.75, 1983.

19　ラット骨格筋の凍結割断像について

岩　崎　祐　三

成熟した骨格筋においては，細胞内への物質の移動は主として横管系を介して行なわれており，pinoeytosis による物質の取込みはほとんどないものと考えられている。一般に細胞膜に観察される小窩は pinocytotic vesiele と考えられているが，筋細胞膜にみられるそれは上述のような理由から，その大部分は横管系の開口部に対応するものでpinocytotic vesiele ではないであろうと思われている。事実，一般の細胞の凍結割断像でみられる小窩はその径が50μm 以下であるのに対し，成熟骨格筋にみられる小窩の多くは70～100μm の径をもつ。しかし病的状態では，骨格筋に50μm 以下の径の小窩が多くみられる。Bonilla らはヒトの筋ジストロフィー筋について小さな径の小窩が増加していることを報告したが，われわれはジストロフィー鶏について同様な観察結果を得ている。

今回は1)骨格筋の成熟にともなう筋膜構造の変化，2)速筋と遅筋における膜構造の差異の有無を明らかにする目的で以下の実験を行なった。

材料および方法

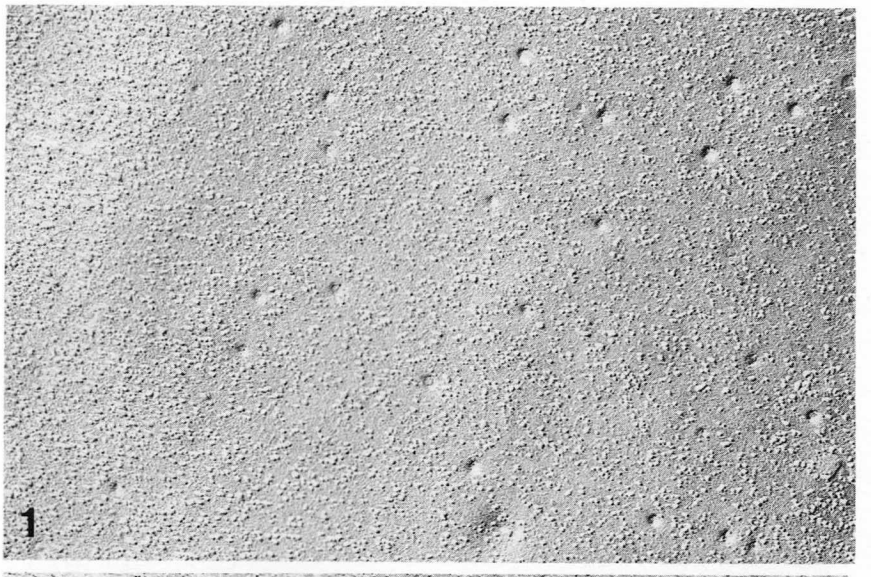
ウイスター系ラットのひらめ筋と後肢長伸筋について検索した。エーテル過麻酔によりと殺した生後7日，14日，6週目のラットを30分室温で放置したのち，筋組織を2％グルタールアルデヒドで固定後細切し，30％グリセリンで処理したのち，液体窒素で凍結した。エイコー社製凍結試料作製装置を用い試料台温度－110℃，2×10^{-7} Torr の真空度のもとで割断し，白金レプリカを作製した。レプリカは日立H－6000 電子顕微鏡を用い加速電圧100Kv で写真撮影を行なった。小窩の密度の算定には筋線維の横断面との連続性が確認でき，それが筋膜であることが明らかに膜の割断面をえらび，最終倍率3万の写真を用いた。実測した面積は各サンプルについて104～229μm^2 である。

結果と考察

Figs 1, 2 に幼弱ラットのFig 3 に成熟ラットの骨格筋膜の代表的像を示す。Fig 3 にみられるごとく成熟ラットの骨格筋膜では小窩は群をなしてみられる。一方，幼弱動物の骨格筋膜の小窩は Figs 1, 2 に示すごとく散在性にみられる。Fig 4 は単位面積（10μm^2）あたりの小窩の数を示しているが，成長にともない数が増える傾向があるが，その程度はトリの骨格筋の場合ほど顕著でない。今回の実験では，筋が完全にちかんした状態で固定し標本を作製するよう留意したが，このような状態では2週令の動物と6週令の動物の間に小窩の密度に有意な差はないものと思われる。この点については更に検体をふやし検討をつづける予定である。

次に小窩の大きさであるが，幼弱では50μm 以下の小さなものが多い。特に今回，検索した7日令のラットひらめ筋では Fig 1 に示すように大多数が50μm 以下のもので，これらは筋以外の細胞の膜にみられる pinocytotic vesicle と全く同じ形態を示している。同じ7日令のラットでも EDL では大型の小窩がかなりみられ，14日令では soleus，EDL とも大型小窩の方が多く，6週令では，その大多数は大型の小窩であった。

＊東北大・医・脳研



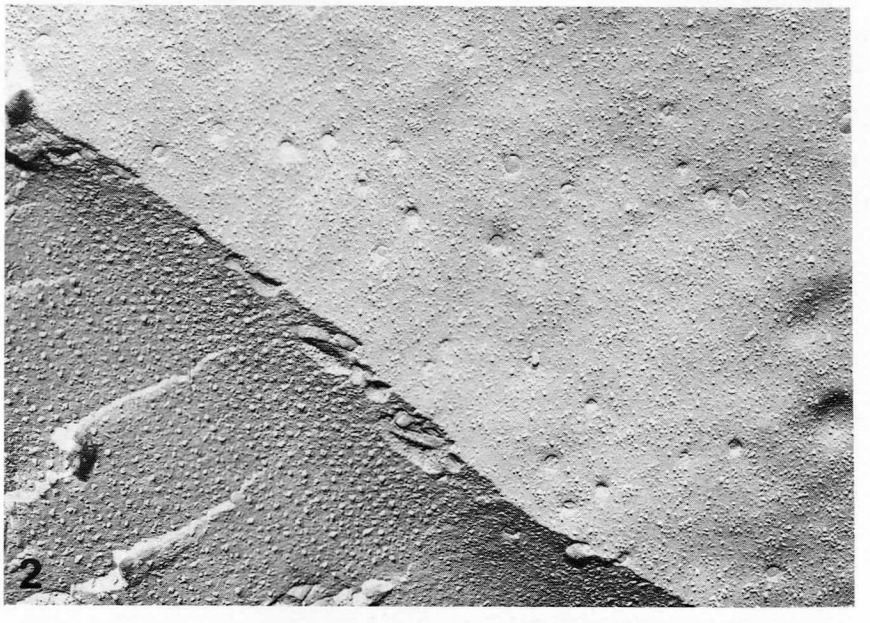


Fig 1 正常7日令ラットsoleusの凍結割断像 ×45,000

Fig 2 正常14日令ラットのEDL ×45,000

このような加令にともなう小窩の質的な変化については今のところ明白な説明はできない。しかしながら，横管系の楷築が著しく乱れていると言われるジストロフィー筋や横管系の発達が充分行なわれていない幼弱な筋で小型でpinocytotic vesicleと区別しがたい小窩が多くみられる事実は，筋細胞においても病的状態や未熟な筋ではpinocytosisが活発に行なわれており，横管系が正常に機能している成熟正常筋ではpinocytosisはほとんど行なわれておらず，横管系の直接開口部と考えられる大型の小窩が大多数を占めていると考えられないであろうか。また今回の検索ではFig 4に示すようにsoleusとEDLの小窩の密度に有意の差を認めなかった。

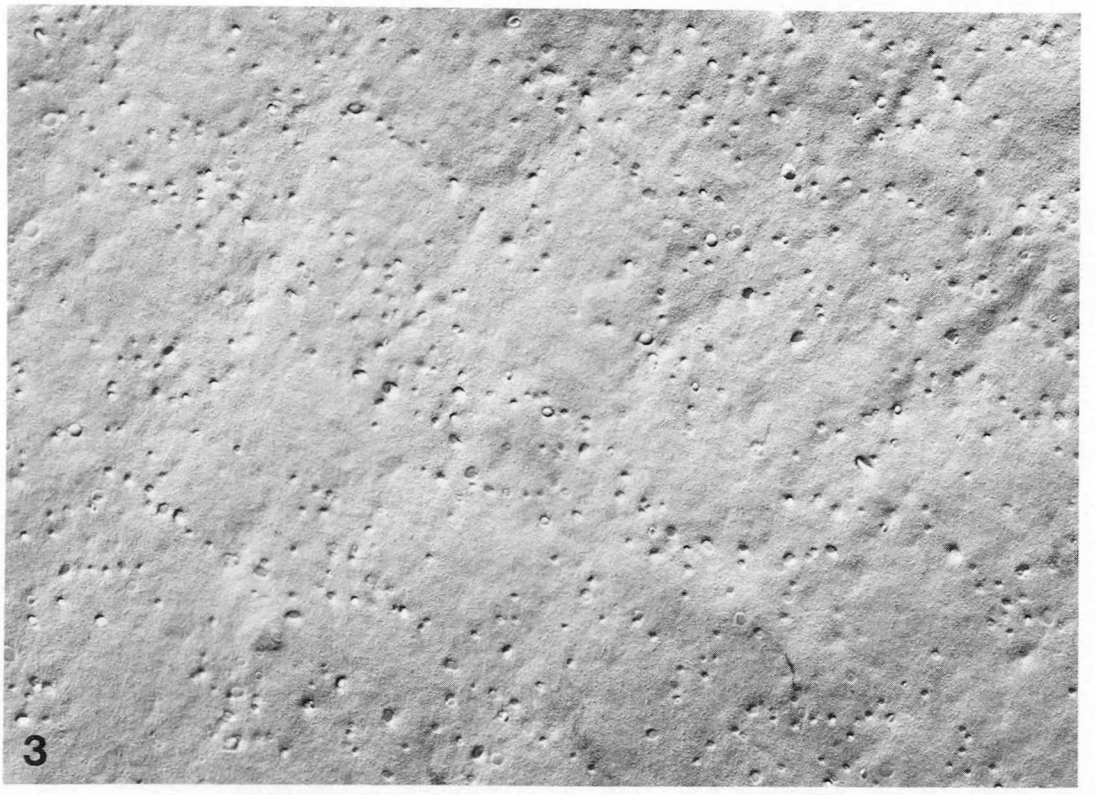


Fig 3　正常6週令ラットのEDL

	7 DAYS	14 DAYS	6 WEEKS
SOLEUS	96* (80 - 108)	132 (124 - 137)	114 (108 - 133)
EDL	96 (71 - 117)	130 (104 - 144)	113 (100 - 133)

* per 10 μm^2 , 104 - 229 μm^2

Fig 4

20　ジストロフィー鶏胸筋での異常蛋白質の発現について

野々村　禎　昭*

はじめに

筋ジストロフィー症を攻めていく為に我々は実験動物と鶏ジストロフィーを主として用いてきた。鶏ジストロフィーと人ジストロフィー，特にDuchenne型ジストロフィーの類似を議論していくことは重要ではあるが，仮に類似点が認められないとしても遺伝子疾患の本質をついている問題であれば，今後人ジストロフィーを攻めていく為の参考にはなる。その様な意味で本研究班によって発見された鶏ジストロフィー症に発見された収縮蛋白質における3つの異常は，人ジストロフィーにはそのような収縮蛋白質の異常は見出されていないにせよ今後の追求方法への多くの示唆を与えるであろう。本年度で本研究班が一応しめくくられるに当って，本研究班で発見された収縮蛋白質異常について概観し，今後の研究方向についても論じておきたい。

1. 鶏ジストロフィーにおける収縮蛋白質異常—トロポミオシンβ鎖，トロポニンT，C蛋白質

ジストロフィー鶏413において，もっとも典型的な発症をみる胸筋について本研究班では大日方によって[1]，先ずトロポニンTの異常が報告された。すなわち胸筋には分子量39KのトロポニンTが存在するが，ジストロフィー鶏には分子量35KのトロポニンTが共存する。35KのトロポニンTは胸筋には普通に存在するものであり，一方胸筋でも胚ではかなり存在し，むしろ39Kの方が少い。孵化後，脚型は減少し，10日位で消失し，39Kの胸型だけになる[2]。ジストロフィー鶏の胸筋ではこの脚型が再出現してくるわけである。

一方トロポミオシンは胸筋にはβ鎖だけしかなく，胚ではα鎖とβ鎖がほぼ同量あり，これが孵化後15日目位でβ鎖は減少，消失する[3]。我々はジストロフィー鶏胸筋ではβ鎖が存在することを見出し[4]，さらにこの出現は実は孵化後15日目でもジストロフィー鶏ではβ鎖が僅かに残り，20〜25日目では一旦消失したかにみえるが45日目には再出現してくることを発見した[5]。しかもこれは細胞差によるのではなく単一線維をわけてもジストロフィー胸筋ではβ鎖が存在していた[6]。

最近，大日方らはC蛋白質が後期胚では抗体型では胸筋型（遠筋型）とは異った遅筋型が存在し孵化後直ちに消失していくことをみた。ジストロフィー鶏胸筋では抗体によって遅筋型が出現していることを認めた（私信）。

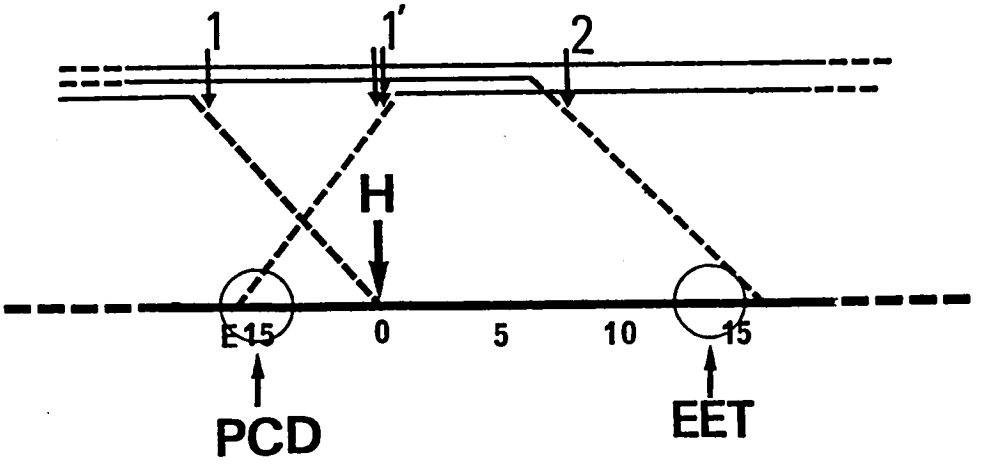
少くともニューハンプシャ413系では収縮蛋白質に胸筋でコントロールの412系と較べて以上の3つの異常が見出されている。他の収縮蛋白質の異常報告としては，Bardmanがコントロール03系とジストロフィー433系のPLD筋を比較して非変性ゲル電気泳動の結果からコントロールでは成鶏ではFM_1，FM_2，FM_3の三本の帯があるのにジストロフィーではFM_2とFM_3の二本の帯しか認められない。これは孵化後ほんの暫くは二本帯であるが，10日目頃から三本帯になるのに較べてジストロフィーではいわゆる新生児型のまつ成鶏

*東大・医・薬理

になっているとしている[6]。しかしこのような結果は少くとも412，413系の胸筋ではみられておらず不確かとも思われる。

2. 鶏骨格筋収縮蛋白質の分化を示す模式図

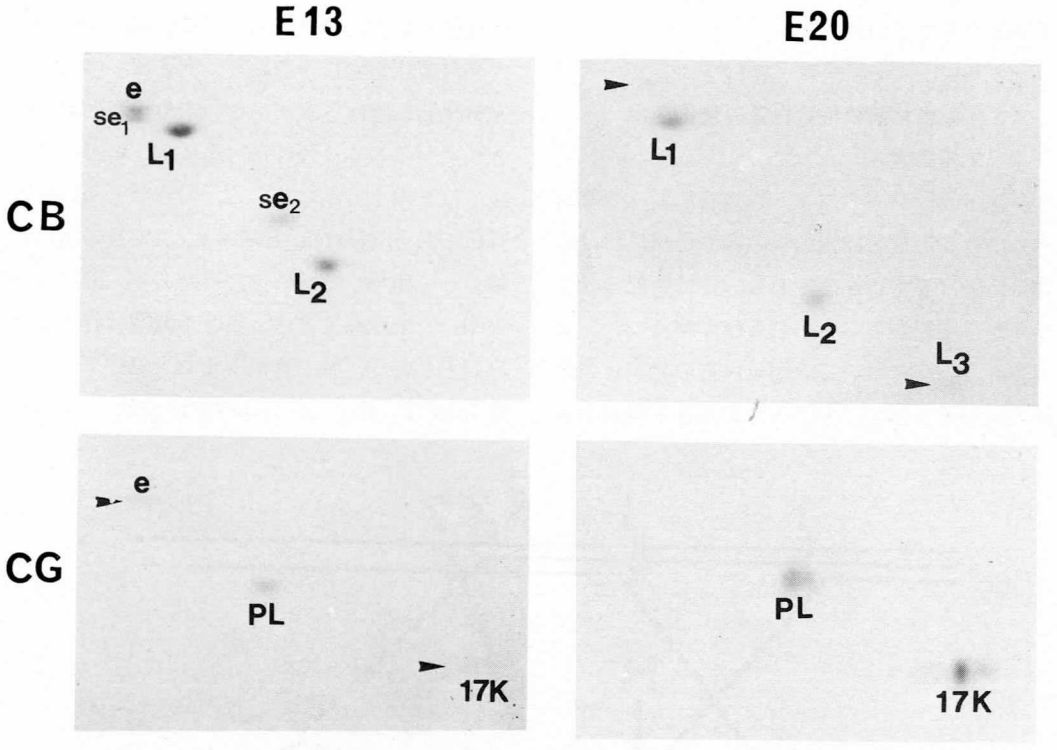
今，413系ジストロフィー鶏胸筋に限って議論を進めよう。最近収縮蛋白質の発生過程における分化の問題は非常に進んでおり，特に材料の入手し易さから胸筋がもちいられる確率が高いので都合が良い。胸筋について収縮蛋白質の発現と消滅の模式図を第1図に示す。3つの大きな時点を示すことが出来る。第1の時期は胚15日目頃で生理的細胞死（Physiological Cell Death, PCD）と名付けても良い時期である。この頃筋細胞内では大きな変化がおこっており，例えば，中心になる未分化筋細胞はさらに小さい未分化筋細胞へのおきかえがはじまり胚17日目迄にほとんど完了する。図では矢印1で示してある。もうひとつの転期は孵化であり（Hatch, Hで示す。PCDを境にして新らしく出現する収縮蛋白質があり，図では2重矢印，1′で示してある。第3の転期は孵化後15日目のところで，胚トロポミオシンの終了という意味でEET（End of embryonic tropomyosin）



第1図　鶏骨格筋収縮蛋白質の分化を示す模式図
PCD；生理的細胞死，H；孵化，EET；胚型トロポミオシンの終了

としてある。ここでいくつかの収縮蛋白質が消滅する。矢印2で示してある。

1に相当する収縮蛋白質を考えてみよう。典型的な例がミオシン軽鎖（LC）で第2図CBに示すように胚13日目ではL_3がなく，L_1近傍に胚遅筋型L_1（se_1）とL_2近傍に胚遅筋型L_2（se_2）が存在する。胚20日目頃からL_3が出現しse_1, se_2は消失し成鶏型L_1，L_2，L_3が完成する。矢印で示した痕跡はse_1の残存かもしれない。同じ時期の平滑筋（砂嚢，CG）では胚13日目はリン酸化軽鎖（PL）と17K軽鎖の他に約23K胚型(e)が存在する[7]。これは胚20日で消失する。最近大日方は骨格筋にもこの胚型(e)が存在することを示した（私信，本研究班班会議）。E13，CBに示されたeは恐らくこの平滑筋共通胚型を示しているのであろう。この胚型23KLCは平滑筋では胚17日頃に消失する。胸筋においても同じ頃消失するらしい。これでeLCは1型で，LC_3は1′型であることがわかる。また遅筋形LCはLse_1，Lse_2共1型である。このようにしてみるとアクチンのβ，γはいずれも1型であり，平滑筋では上述したeLCが1型で別にトロポミオシンのf鎖に胚型（ETMf）



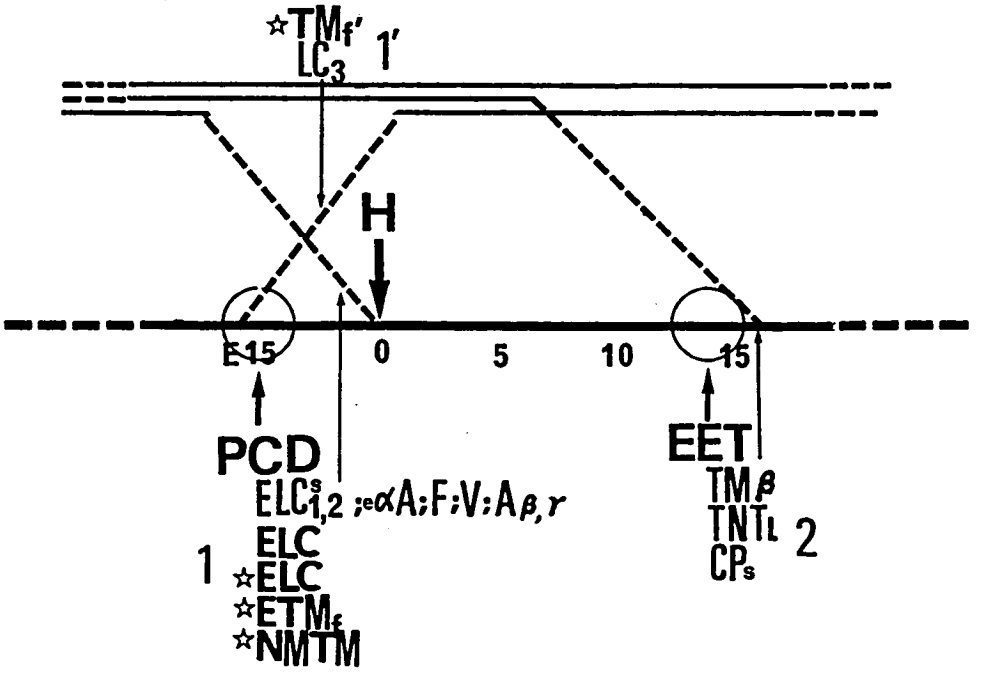
第2図　ミオシン軽鎖を示す二次元電気泳動像
CB：鶏胸筋，CG：鶏砂嚢，E13胚13日目，E20胚20日目
（東大医学部学生櫻井隆君の協力による）

があり1型を示しf鎖にETMfの消失に対応してふえていくものがありTMf'で1′型であるが，これは成鶏型TMfと区別はつかない。一方非筋型TMがあって（NMTM），これは胚に存在して17日目頃で消失する1型である。ミオシン重鎖には，最近，胚型，新生児型，成鶏型に分ける仕事がでている[8]。が，あく迄も非変性ゲル電気泳動パターンからいくものであって，あえていうなら胚型は1型に，新生児型は2に対応すると言える。我々の班会議で小林は抗体を用いて骨格筋胚にα-アクチニン，ビンキュリン，フィラミンが存在すること。それらは脛化前に消失することを示した。いずれも1型ということになる。

これらの結果をまとめると第3図のようになる。1型，1′型，2型をそれぞれ示した。胚の時に存在し，そのまま成鶏につづいていくものは示していないが，アクチンα，トロポミオシンI，C，ミオシン軽鎖1，2がある。平滑筋でここに示したものは星印をつけた。

3. 何がジストロフィー鶏で異常をひきおこすか

上述の模式図で明瞭なことは2型が全てジストロフィー鶏413系で異常をひきおこすということである。トロポミオシンβ，トロポニンT脚型，C蛋白質緩筋型であるが，これらの特徴は胚に存在し，脛化後15日目頃迄に消失する型のものであり，いずれも脚筋には（例えば遅筋としても）成鶏でも存在するものばかりである。ジストロフィー筋では少くともトロポミオシンβでは正常に較べ



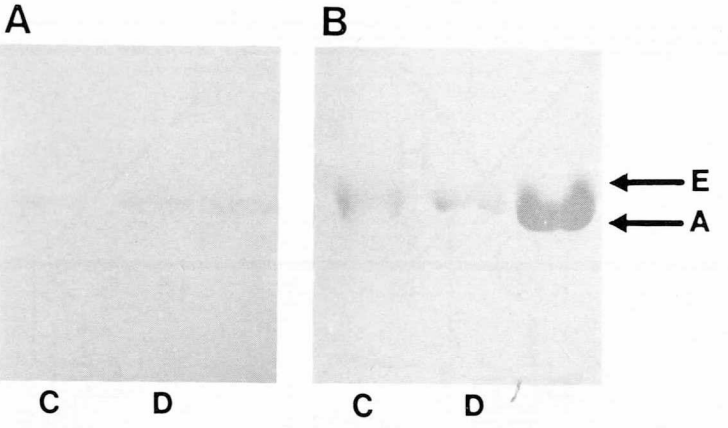
第3図 第1図に具体的に収縮蛋白質を示した模式図
F；フィラミン，V；ビンキコリン，$ELC_{1,2}$；胚型軽鎖遅筋型1,2，A；アクチン，eαA，胚型α-アクチニン，ELC胚型軽鎖，TNTl；トロポニンT脚型，CPs；C蛋白質遅筋型。他は文中に示した。

て多少遅くはなるが一旦消失する。そして再び出現する。これらを全て合わせて考えると遺伝子発現機構がジストロフィーでは2型を示すものについて突然ONの状態に30日目頃からなったことを意味する。

2型以外の収縮蛋白質に異常はおこり得ないであろうか。この点について1型で$LC_{1,2}$の胚遅筋型，アクチンβ，γについてはこれ迄の二次元電気泳動の結果から先ずおこりえないことはわかっている。そこで小林の報告した胚型α-アクチニンである。小林によれば，α-アクチニン抗体の免疫転写法の結果は胚15日頃はSDS電気泳動でα-アクチニンより少し遅い位置に反応が出ており，小林はこれを胚型α-アクチニンと呼んだ。そこで，小林博士，武田博士と共に成鶏のα-アクチニンを抽出し，小林のα-アクチニンで免疫転写法を行った（第4図）。この結果はAでニトロセルロース膜の蛋白染色を行ったもの，Bは免疫反応を行ったものである。412系も413系も成鶏α-アクチニン位置（A矢印）に反応は出ているが胚α-アクチニン（E矢印）には全く反応が出ていない。やはり1型ではジストロフィーによる異常遺伝子発現はないと考えられる。

おわりに

ジストロフィー鶏にみられた収縮蛋白質異常について概観した。胚型収縮蛋白質のうち2型のもののみに異常が現われるのは興味深い。遺伝子発現がその消失も含めてセットになっているということは例えば染色体上位置についてこれらの遺伝子位置が関係深いところにあるのかもしれない。また蛋白質としてはトロポミオシンは胚型βも脚型βもジストロフィーβも区別出来ないが，実は遺伝子クローニングを行い，遺伝子上のDNA配



第4図 α-アクチニンの免疫転写
A：SDSゲル電気泳動をニトロセルロース膜の転写後蛋白染色，Bはα-アクチニン抗体による免疫反応後ペルオキシターゼ発応発色，C：コントロール，D：ジストロフィー，Eは胚型α-アクチニン位置，Aは正常α-アクチニン位置。
（小林博士，武田博士との共同実験による，未発表）

列は異なるものかもしれない。いずれにしても我我は次の段階としては蛋白質レベルからひとつ上ったDNAレベルで収縮蛋白質異常を追求すべきところにきていると思う。人ジストロフィーでは収縮蛋白質の異常は見出されていない。恐らくもっとも重要な場所は細胞表面膜であろうし，膜蛋白質の異常がその重要なポイントであろう。しかし，このような蛋白質レベルの異常の発見は直ちにに遺伝子レベルでその発現を求めねばならない。この2，3年国際的に収縮蛋白質の遺伝子クローニングの仕事は非常にさかんなのに我国では非常に遅れている。遺伝子疾患としてのジストロフィーを攻めるのに先ず我々もこのように異常発現がわかっている遺伝子の解析に手がけるべきであろう。そしてその手段を用いて次の膜への接近をはかるべきであろう。

文　献

1) Obinata, T. et al.: FEBS Lett. 120, 195 (1980).
2) Matsuda, R. et al.: Devel. Biol. 82, 11 (1981).
3) Roy, R.K. et al.: Devel. Biol. 69, 15 (1979).
4) Takeda, S. & Nonomura, Y.: Biomed. Res. 1, 176 (1980).
5) Nonomura, Y. & Takeda, S.: In "Muscular Dystrophy" ed. Ebashi, S. p117, Univ. Tokyo Press, Tokyo (1982).
6) Bandmun, E.: Muscle & Nerve, in press.
7) Obinata, T. et al.: Devel. Biol., in press.
8) Buder, D. et al.: J. Cell Biol. 95, 763 (1982).

Ⅵ 生　化　学

21. 筋ジスおよび正常鶏における筋細胞内 poly−ADP−ribose
含量と poly−ADP−ribose 合成酵素活性の相異
（筋発達過程におけるその変化）　117

22. コネクチンとミオシン，アクトミオシンとその相互作用　122

23. 筋発生・分化におけるアクチン結合蛋白の発現様式　125

24. 除神経筋にみられる筋蛋白質分子種の変化　133

25. ニワトリ胸筋および足筋におけるトロポニンTの発生，
モノクローナル抗体を用いた研究　138

26. ウサギ胎孔骨格筋収縮蛋白活性に対する
抗トロポニン抗体の影響　144

27. 疾患筋筋小胞体膜の機能分類に関する一考察　152

21 筋ジストロフィーおよび正常鶏における筋細胞内NADおよびpoly−ADP−ribose 含量と poly−ADP−ribose 合成酵素活性（筋発達過程におけるその変化）

真 崎 知 生*
研究協力者 吉 川 昭**

遺伝的に筋ジストロフィー症状を呈するニワトリ（筋ジス鶏）の筋は孵化後5週を過ぎると，光学顕微鏡によってもはっきりとその異常を認めることができる。しかし発症前の筋では通常形態学的な異常は著名ではない。しかしながら最近生化学的方法を用いた検索により，この発症前のジストロフィー筋にも異常があることが報告されている。[1〜7] たとえば細胞質内酵素である乳酸脱水素酵素，[1〜4] 構造蛋白であるミオシン，トロポニン，トロポミオシンC−蛋白についても，その分子種が正常のものとは異なっていることが報告されている。[5〜7] しかし，これらはいづれも成長するに従って正常のものとの間に差がなくなることが示されている。したがって，正常筋とジストロフィー筋の間の大きな差は，その筋細胞分化の過程に異常があるのではないかと考えられる。

このような筋分化のプログラムは実は筋細胞内の遺伝子上に組み込まれていることはあきらかであり，筋ジストロフィー症の筋ではこの調節機構に異常があることが当然推測される。しかしこの核内の遺伝子発現調節機構に関してはほとんど何もわかっていないというのが現状である。

このような状況の下で，最近核内のポリADPリボース合成酵素活性が，細胞分化ときわめて深い関連性があるのではないかと考えられている。[8] ポリADPリボース合成酵素はNADをポリADPリボースに変換すると同時に核内の蛋白をポリADPリボシル化することによってその機能をあらわすと考えられている。[8] 一方，細胞内のNADレベルが筋細胞分化に関連深いことも報告されているため，[9] 本研究計画では，細胞内NADレベル，核のポリADPリボース合成酵素活性，核内のポリADPリボース量の間の関係が，正常筋とジストロフィー筋でどのように異なっているかという点を検討することを目的とした。

方 法

New Hampshire line 413の筋ジス鶏および正常鶏 New Hampshire line 412 の各発育段階における胸筋から Chauveau の方法[10] で核を調製した。ポリADPリボース合成酵素活性は三輪の方法[11] で測定した。

核中のポリADPリボース量は次のような方法で測定した。まず核を20%トリクロール酢酸（TCA）でよく洗った後遠心し，その沈渣を0.3N KOHに浮遊させ，37℃で16時間反応させる。反応後20%TCAを加えて遠沈し，その沈渣を0.25M酢酸ナトリウム緩衝液（pH8.8），6M塩酸グアニジン溶液に溶かす。これをあらかじめ同溶液で平衡させておいたジヒドロキシボロン酸セファロースのアフィニティーカラムに通す。DNAはこれに結合しないので，通過した溶液をDNAの定量

*筑波大学基礎医学系
**東京都臨床医学総合研究所

に用いる。ポリ ADP リボースは0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.1）で溶出される。これを蒸溜水に透析した後，凍結乾燥，酢酸緩衝液に溶かし，蛇毒ホスホジエステラーゼで分解する（37℃，3時間）。反応後そのまま凍結乾燥，これをトリエチルアミン緩衝液（pH 8.0）に溶解させ，アビセルSF の薄層クロマトグラフィーで展開，ホスホリボシル AMP と 5′－AMP のスポットをそれぞれ集める。それぞれを10mM HCl 溶出させた後，蛍光分光光度計，あるいは ^{14}C 標識 NAD より合成させた場合には液体シンチレーションカウンターを用いてそれぞれ定量を行なう。これによって核内ポリ ADP リボース量が測定出来る。

DNA 量は Fleck [12] の方法を用いて測定した。

細胞よりの NAD の抽出，およびその量の測定は Klingenberg [13] の方法を用いた。

結果と考察

筋の湿重量あたりの NAD 量は筋の発達と共に増加する。特に孵化後最初の一週間の増加が著るしい（表1）。ジストロフィー筋の NAD 量は正常にくらべると多少低いことが認められる。しかし孵化前の20日目胚胸筋においては正常との間にほとんど差がない。そこで核あたりの NAD 量を正常筋とジストロフィー筋で比較したところジストロフィー筋における値の方がかなり小さくなることがわかった。その理由はジストロフィー筋の方が正常筋より湿重量あたりの DNA 量が多いためである（表2）。このように NAD レベルはジストロフィー筋の方が正常筋より低いと考えてよいように思われる。またジストロフィー筋では湿重量あたりの核数が正常筋に比して多いという事実を，ジストロフィー筋では発症前ですでに蛋白合成能が高いという以前に報告した結果と考えあわせると興味が深い。ジストロフィー筋における筋細胞の幼若性を示唆しているのかも知れない。

さてそれでは核内のポリ ADP リボース合成酵素活性とその量はどうであろうか。図1に示すよ

第1表　正常およびジストロフィー筋における NAD 濃度

Table I.　NAD concentration in normal and dystrophic muscle

	20-day-old embryo (8)	1-week-old (8)	2-week-old (5)	5-week-old (4)	8-week-old (4)
Nor	0.193±0.008	0.765±0.036	0.932±0.060	1.183±0.073	1.268±0.030
Dys	0.197±0.009	0.578±0.042*	0.828±0.065	0.968±0.057	1.148±0.055

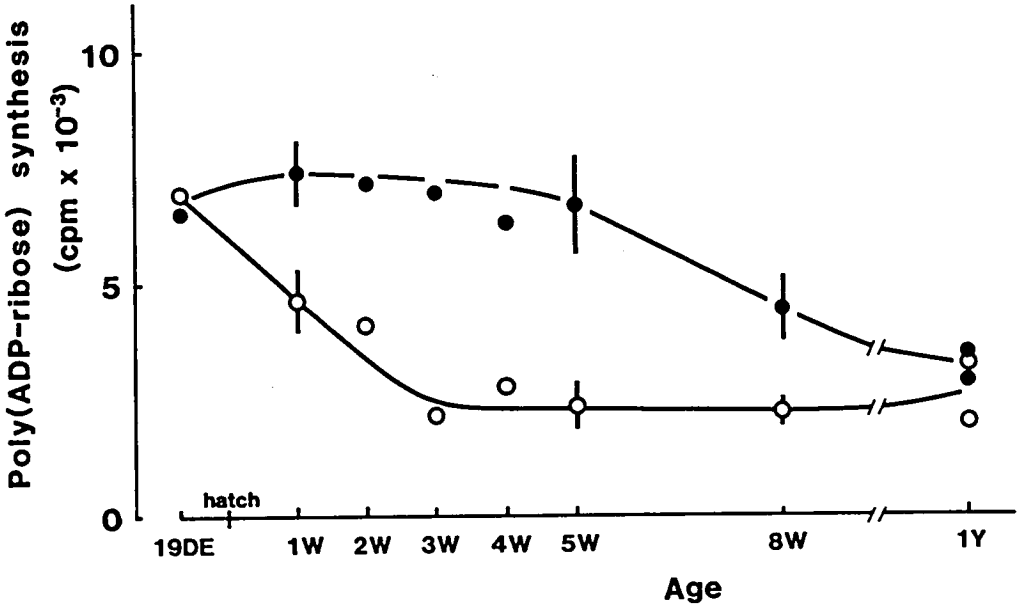
湿重量（g）あたりの DNA（mg）量。
平均値±標準誤差，試料数を括弧内に示す。＊統計学的有意（P＜0.05）

第2表　正常およびジストロフィー筋における DNA 濃度

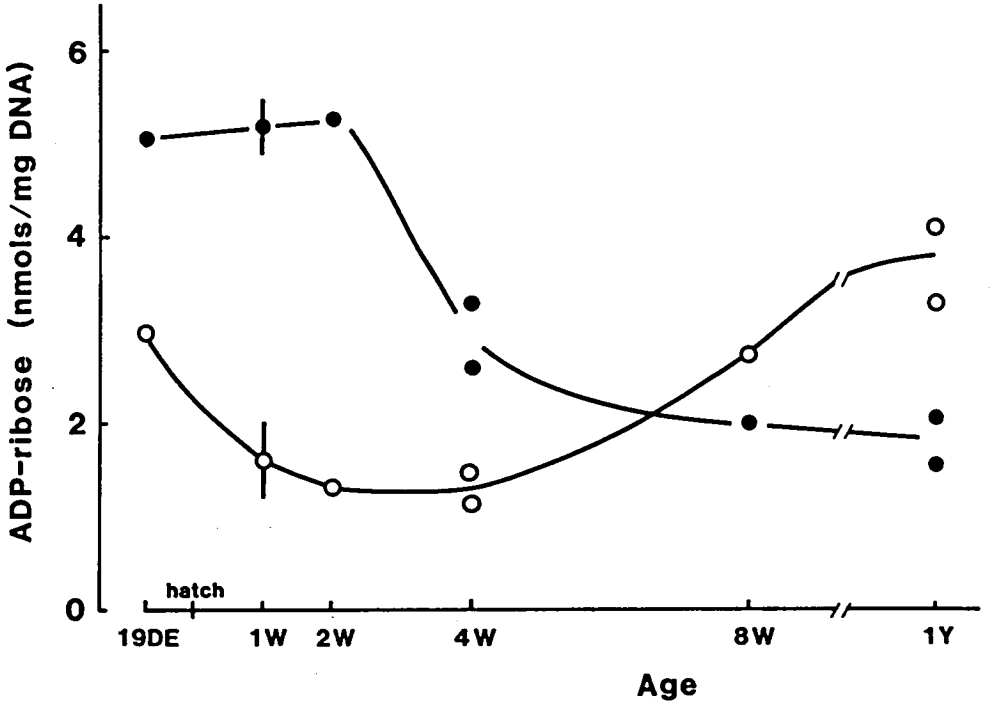
Table II.　DNA concentration in normal and dystrophic muscle

	20-day-old embryo (5)	1-week-old (6)	2-week-old (5)	5-week-old (4)	8-week-old (4)	1-year-old (4)
Nor	3.34±0.09	1.63±0.08	1.05±0.09	1.01±0.06	0.94±0.16	0.99±0.07
Dys	3.27±0.06	1.93±0.08*	1.52±0.14*	1.42±0.04*	1.33±0.13	0.43±0.04*

湿重量（g）あたりの NAD（μg）量。
平均値±標準誤差，試料数を括弧内に示す。＊統計学的有意（P＜0.05）


Poly(ADP-ribose) synthesis
(cpm x 10⁻³)
10
5
0
hatch
19DE
1W
2W
3W
4W
5W
8W
1Y
Age

第1図


ADP-ribose (nmols/mg DNA)
6
4
2
0
hatch
19DE
1W
2W
4W
8W
1Y
Age

第2図

うに正常筋とジストロフィー筋の間のポリ ADP リボース合成酵素活性の差は胚筋では認められない。しかし孵化後正常筋では低下するのに対し，ジストロフィー筋では低下せず5週をすぎてやっとその低下がみられる。この間筋の成長発達はきわめて著るしく，筋重量は増加する。

正常筋とジストロフィー筋の核内のポリ ADP リボース量も筋発達成長に伴ない同様の変化をする（図2）。孵化後1～2週目の核では正常筋にくらべてジストロフィー筋の方がポリ ADP リボース量はあきらかに高い。しかし図2の場合には，ポリ ADP リボース合成酵素活性がまだ高い4週前後のジストロフィー筋で，すでにジストロフィー筋核内のポリ ADP リボース量は減少している。まだ実験例が少ないのでポリ ADP リボース量とその合成酵素活性の間の関係についてはあまり多くのことが言えない。また図2中に示してあるように，孵化後1年の親正常筋でポリ ADP リボース量がジストロフィー筋より多くなっているが，この理由についても不明である。

真核細胞において核内蛋白が翻訳された後ポリ ADP リボシル化される。[14] この現象は DNA 合成，細胞分化，ヒストンの機能の修飾，あるいは DNA 修複等に何らかの関係があるのではないかと考えられている。[15～20] ジストロフィー筋が正常筋にくらべてこのようにポリ ADP リボース含量が多く，またその合成活性が多いということは，筋発達に伴なうジストロフィー筋の分化が正常筋の場合とくらべて遅れているのではないかと考えられる。フレンドの赤芽白血球細胞においても細胞分化の際，ポリ ADP リボース合成酵素活性が低下する事実はよく知られている。[21] ジストロフィー筋の筋蛋白分子種のパターンが孵化後しばらくの間幼若型をとること，[1～7] 蛋白合成能が正常筋より高いことなどもこれと一致する。[22～25]

筋の分化発達の最終段階である筋発達成長の段階で，もし筋重量増加前に，筋発達に伴なうポリ ADP リボース量の低下が必要であるとすると，ジストロフィー筋では筋が成長発達する条件下にはないことになる。つまり筋が幼若型でありながら，骨などの他の器官の発達のために筋が成長しなければいけない状況下におかれることが筋ジストロフィー症の発症につながるかも知れない。このことはジストロフィー症と小人症が合併した場合には筋ジストロフィーの症状の発現が抑制されるという報告[26] とある点で一致している。

以上ジストロフィー筋におけるポリ ADP リボース合成酵素活性およびポリ ADP リボース含量について報告した。この結果の一部はすでに報告されている。[27]

文　　献

1) Kaplan, N.O. and Cahn, R.D.: (1962) *Biochemistry* **48**: 2123-2130.
2) Emery, A.F.H.: (1964). *Nature* **201**: 1044-1045
3) Pearson, C.M. et al.: (1965) *Amer. J. Med.* **39**: 91-97.
4) Tsvetanova, E. and Ognianov. M.: (1967). *Clin. Chim Acta* **18**: 87-88.
5) Obinata, T., Ohmuro, T.H. and Matsuda, R.: (1980) *FEBS Lett*, **120**: 195-198.
6) Takeda, S. and Nonomura, Y.: (1980) *Biomed. Res.* **1**: 176-179.
7) 大日方，他，(1983) 筋の発生と分化に関する基礎的研究，昭和57年度報告書.
8) Hayaishi, O. and Ueda, K.: (1977) *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 95-116.
9) Caplan, A.I. and Rosemberg, M.J.: (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **2**: 1852-1957.
10) Chauveau, J. Maulé, Y. and Rouiller, C.: (1956) *Exptl. Cell Res.* **11**: 317-321.
11) 三輪正直・杉村　隆：生化学実験講座8巻，528-543.
12) Fleck, A. and Munro, H. N.: (1962) Biochem. Biophys. Acta **55**: 571-583.
13) Klingemberg, M.: (1974), Methods of Enzymatic Analysis (ed. Bergmeyer H.V.) **4**: Academic Press N.Y. 2045-2072.
14) Nishizuka, Y. et al.: (1967) *J. Bill. Chem.* **242**: 3164-3171.
15) Caplan, A.I. et al.: (1979) *Dev. Biol.* **72**: 102-109.
16) Burzio, L. and Koide, S.S.: (1971) *Biochem Biophys. Res. Comm.* **42**: 1185-1190.
17) Robberts, J.H., Startk, R. and Smulson, M.: (1973), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **52**: 43-50.
18) Miller, E.G. (1975) *Biochem. Biophys. Acta.*, **395**: 191-200.
19) Durkacz, B.W. et al.: (1980) *Nature* **283**: 593-596.
20) Juarz-Salinas, H., Sims., J.L. and Jacobson M.K. (1980) *Nature* **282**: 740-741.
21) Terada, M. et al. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **76**: 6411-6414.
22) Yoshikawa, A. and Masaki, T.: (1981) *J. Biochem.*

90: 1775-1786.
23) Masaki, T. and Yoshikawa, A.: (1982) *Muscular Dystrophy* (ed. by Ebashi, S.) 169-181.
24) Masaki, T. and Yoshikawa, A. (1983) *Muscular Dystrophy; Biomedical Aspect.* 99-107.
25) Yoshikawa, A., Takano-Ohmuro, H. and Masaki, T.: (投稿中).
26) 戸塚，他 (1983) 筋の発生と分化に関する基礎的研究，昭和58年度報告書.
27) Yoshikawa, A. and Masaki, T. (1983) *Proc. Jap. Acad.* 59B 198-202.

22 コネクチンとミオシン，アクトミオシンとの相互作用

丸 山 工 作*
研究協力者 木 村 澄 子*

はじめに

背椎動物骨格筋の筋原線維内弾性要素として見いだされたコネクチンは，塩不溶性のため，変性したあとでなければ単離できなかった。[1)2)3)] したがって，蛍光抗体法による筋原線維内の局在をしらべるほかは，生理的な研究はできなかった。また，その分子量が巨大（～10^6）なため，タンパク化学の研究も進まなかった。

私たちは，コネクチンを未変性のままニワトリ筋原線維から単離することに成功し，その方法を昨年当研究班会議で報告した。ここでは，ミオシンとアクトミオシンとコネクチンとの相互作用の研究成果について述べるとともに，コネクチンの筋肉構造における生理的意義についてもふれたい。

材料と方法

ニワトリ胸筋から筋原線維を調製し，コネクチンを私たちの方法によって単離した。[4)] よく洗った筋原線維を0.1 M phosphate buffer（pH5.6）で処理して変性アクチンなどを除去したあと，0.1 M phosphate buffer（pH6.6）で抽出すると，コネクチンが得られる。

ミオシンとの相互作用は，320 nm での吸光度測定，流動複屈折法，電子顕微鏡法などで研究した。アクトミオシン－ATP 系は，660nm での吸光度測定と ATPase 活性測定でしらべられた。

コネクチン分子について

ニワトリ筋原線維を直接 SDS で抽出して SDS 電気泳動にかけると，移動度のおそい2本のコネクチン・バンド（α, β）がみられる。[2)3)] 分子量があまりに大きいため，未変性のまま単離したコネクチンがいずれに相当するかを決定することは容易ではなかった。アルブミン，ヘモシアニンなどの架橋ポリマーをマーカーにしておよその分子量を見積ったところ，α－コネクチンは2800K（3×10^6），β－コネクチンは 2100 K（$2.\times10^6$）と判明した。抽出したコネクチンの分子量は 2100 K で，β－コネクチンと判明した。

β－コネクチン分子は，300～400nm の長さで，巾は約40nmの flexible rod である。沈降定数（$S^0_{20,w}$）は約 16 S である。ごく低い速度勾配下で大きな構造粘性を示すがこれは分子（フィラメント）が溶液内でからまりあうためのようである。濃縮すると，側面結合してひも状になり，弾性を示す。コネクチンを弾性タンパク質とよぶのはふさわしいといえよう。これら native connectin 分子の形と大きさについてはまもなく発表する予定である。[5)]

ミオシンとコネクチン

pH 7.0，20℃で，ミオシンはコネクチンと結合して巨大な会合体を形成する。30mM KCl から 150 mM KCl までの間で，濁度が上昇し，20％（重量比）以上のコネクチンが存在すると，放置中に沈殿する。この沈殿は，KCl 濃度を 0.15M以上に

＊千葉大学理学部

あげると溶解し，75 mM に下げるとふたたび生ずる。

80 mM KCl 存在下で流動複屈折法を用いてミオシン・フィラメントの長さを測定すると，0.8～1.3 μm に分布していたが，5，10，20％コネクチン存在下では，0.9－1.6，1.1－2.0，1.2－2.8 μm と長くなった。これは，ミオシン・フィラメントが会合したためである。酢酸ウランで逆染色して電子顕微鏡下で観察したところ，ミオシン・フィラメントがからまりあっているのがみられた。コネクチン分子は酢酸ウラン法でははっきりみることができない（グリセリン存在下でマイカに吹きつけ，低角度回転シャドーウィング法で見えるようになる）。

ミオシン・フィラメントとコネクチンの結合はイオン強度に依存するだけなので，アクチン・フィラメントとの結合も同様に静電的なイオン結合によるものであろう。[6]

アクトミオシンとコネクチン

アクトミオシンの ATP による超沈殿がコネクチンによって促進されることが濁度法でたしかめられた。ただし，α－アクチニンに比べると，その効果はずっと小さい。

アクトミオシンの ATPase 作用におよぼすコネクチンの影響をみると，0.1 M KCl 以下の低イオン強度，pH 7～8.5 でかなり増加させることがわかった。しかし，この場合もα－アクチニンより効果が小さかった。

80 mM KCl 存在下で，pH 8.0 でコネクチンの量を増加させたところ，50％で最大値に達し，対照のほぼ 3.5 倍に上昇した。5 mM $CaCl_2$ 存在下のミオシン（アクトミオシンとしてではなく）特有の ATP アーゼ活性はコネクチンの影響をまったく受けなかった。1 M KCl，10 mM EDTA 存在下の K－活性 ATP アーゼ作用もコネクチンによって変化しなかった。また，トロポニン－トロポミオシン系を加えてカルシウム感受性を与えると，カルシウム（10^{-4} M）存在下においてのみ，ATP アーゼ活性がコネクチンによって促進された。これらの事実は，コネクチンがアクトミオシンの超沈殿を促進して，その Mg－ATP アーゼ活性を増加させることを示している。

コネクチンのアクトミオシン系への効果はα－アクチニンの場合と同様に，アクチンを束にすることによっておこる in vitro における artifact であろう。

コネクチンの生理的意義

本研究によって，コネクチンは，分子量が～10^6 という線維状タンパク質であることがわかった。単離されたのは分子量のやや小さいβ－コネクチンであるが，おそらくα－コネクチンが一部切断されたものと思われる。抗体抗原反応やアミノ酸組成からみてたしかなものと思われる。コネクチンはミオシンやアクチンのフィラメントと結合することが示された。いったい，この巨大なフィラメントタンパク質は，筋原線維内にあって，どういう役割を荷なっているのであろうか？

まず，コネクチンの筋原線維内の局在についてみてみよう。蛍光抗体法によれば，コネクチンは，A 帯の両端－A－I 接合部－にもっとも多量に存在し，A 帯の中央部にむかって少ない。I 帯にはごく少し存在し，Z 線にはほとんどない。[1)2)3)] カエル骨格筋のスキンド・ファイバーを引き伸ばしてアクチン・フィラメントとミオシン・フィラメントを引き離すと，その部分に抗コネクチンと反応する部域があり，ミオシンに結合した細いフィラメントが多数みられ，コネクチンとみなされる。他端はアクチン・フィラメントか，Z 線につながっているものと思われる。ミオシンを部分的に抽出するにつれ，引き伸ばしたスキンド・ファイバーの受動的張力の発生が減少することから，[7] コネクチンがミオシン・フィラメントを引っぱっているものと思われる。

コネクチンは，ミオシン・フィラメントに結合して，A－I 接合部に多数存在し，他端は結局 Z 線につながり，A 帯をサルコメアの中央部に位置さ

せている弾性構造といえよう。その意味で，20年以上前に Sjostrand が主張したギャップ・フィラメント[8] のリバイバルということができる。

最近，Wang らは，筋原線維のたて方向の連結構造として筋原線維の表面をZ 線間に走る数本の中間経フィラメントの重要性を強調した。[9] たしかに Tokuyasu によって免疫電顕法によってデスミン・フィラメントが筋原線維間のスペースにたて方向に走り，Z 線につながっていることが示された。[10] しかし，デスミン・フィラメントは中性塩に不溶性であるから，樋口・馬詰の実験からみて弾性に大きく寄与しているとは思えない。それに，弛緩状態でも大きくたるんでなければならない。

Wang の示した KI 残渣の電顕像にみられるたて方向のフィラメントは，デスミンも存在していようが，コネクチンやアクチンがからまりあったものであろう。いずれにしても，Tokuyasu の方法を用いて，コネクチンフィラメントの存在を電顕下でたしかめる必要がある。

文 献

1) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, Y., Nonomura, Y., Kimura, K., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., 4 Eguchi, G. (1977) Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem.* **82**: 317-337.

2) Wang, K., McClure, J., & Tu, A.: (1979) Titin: major myofibrillar component of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3698-3702.

3) Maruyama, K., Kimura, S., Ohashi, K., & Kuwano, Y.: (1981) Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J. Biochem.* **89**: 701-709.

4) Kimura, S. & Maruyama, K.: (1983) Preparation of native connectin from chicken breast muscle. *J. Biochem.* **94**: 2083-2085.

5) Maruyama, K., Kimura, S., Sawada, H., Kikuchi, M., & Yoshidomi, H.: (1984) Molecular size and shape of β-connectin, an elastic protein of striated muscle *J. Biochem.* in press. .

6) Kimura, S. & Maruyama, K.: (1983) Interaction of native connectin with myosin and actin. *Biomed. Res.* **4**: 607-610.

7) 樋口秀男・馬桔良樹 (1983) スキンドファイバーの弾性要素の局在 生物物理，**23**, S79.

8) Sjöstrand, F.S. (1962) The connections between A- and I-band filaments in striated frog muscle. *J. Ultrastruct. Res.* **7**: 225-246.

9) Wang, K., & Ramirez-Mitchell (1983) A network of transverse and longitudinal intermediate filament is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle *J. Cell Biol.* **96**: 562-570.

10) Tokuyasu, K.T. (1983) Visualization of longitudinally-oriented intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac muscle by a new staining method. *J. Cell Biol.* **97**: 562-565.

23　筋発生・分化におけるアクチン結合蛋白の発現様式

小　林　良　二

はじめに

筋の発生・分化にともなう筋蛋白の発現形式については，既に多くの成果が公表されている[1]。殊に，myosin, actin, tropomyosin, troponin といった主要構成蛋白については，ほぼ解明され，発現の異常についても明らかになりつつある。しかし，微量であったり精製が困難であったりする蛋白については，その生理的意義の重要性は指摘されながらも，筋発生・分化における役割は，いまだ明らかではない。

そこで，本研究においては，actin 結合蛋白（actin 調節蛋白）の筋発生・分化における発現の形式を追求した。最近，非筋肉細胞から，数多くの actin 調節蛋白が発見されいずれも興味深い機能を有しているが，本研究では，これらの中から，まず α−actinin, filamin, vinculin, gelsolin の4種の蛋白について，ニワトリ embryo を材料として in ovo での発現様式に検討を加えた。

実験方法および実験材料

a．抗体の調製

α−Actinin は Pint'er らの方法[2] を用いて，成鶏胸筋より精製し，filamin, vinculin は，Feramisco and Burridge[3]の方法により成鶏gizzard（筋胃）から精製した。各蛋白は，98%以上の純度であったが，抗原用としては，この純度でも必しも十分でないため，更にsodium dodecyl sulfate−polyacrylamide 電気泳動（SDS／PAGE）を行い，短時間の染色後，バンドを切りだし，ホモゲナイズ後，抗原として用いた。免疫は，抗原液と complete adjvant をよく混和した後，ウサギ背部数個所に筋注又は皮下注することによって行った。2週間の間かくで更に2回追加免疫した後，10日後に採血を行い抗血清を得た。抗体の純度は，オークタローニー法および後に述べる immuno−blot 法によって確認した。尚，gelsolin 抗体は，九州大学農学部六車三治男博士の御好意により供与を受けた。

b．電気泳動

一次元の SDS／PAGE は Laemmli の方法[4] に準じ2次元電気泳動は，O'Farrell の方法[5]によった。

c．Immuno−blot 法

Towbin らの方法に従って，immuno−blot を行ったが，泳動バッファーのメタノールは5%に下げた。尚，immuno−blot に用いたニトロセルロース膜は東洋口紙より入手し，第2抗体はペルオキダーゼ標識抗ウサギIgG（カッペル）を用い，ジアミノベンチジン（和光）を基質として発色させた。

d．ペプチド・マッピング

一次元ペプチド・マッピングは V_8 プロテアーゼを用い Cleveland らの方法[7] によって行った。二次元ペプチド・マッピングは，SDS／PAGE 後，必要な蛋白バンドを切り出し，^{125}I でラベルした後，trypsin で16時間処理後，薄層上で一次元を電気泳動，二次元をクロマトグラフィーで展

＊秋田大学医学部生化学第2講座

開し，オートラジオグラフィーによりペプチドを検出した。詳細は田部によって報告されている。[8]

e．その他

Immuno－precipitation は，Kessler の方法に準じ，protein A bearing Staph. aurens を用いて行い，enzyme immuno－assay は，ニトロセルロース膜を固定化担体として用い，いわゆる dot assay によった。

実験結果

a．α－Actinin の発現

ニワトリ骨格筋，ウサギ骨格筋等のα－actinin に多様性のあることは既に報告したが[10]，これら isoforms が embryogenesis のどの段階で，どの様に発現するかを知る目的で実験を行った。ニワトリ embryo の各段階（ふ卵 8 日，10日，12日，15日，21日）で骨格筋を，とりだし，二次元電気泳動後，immuno－blot法により，α－actininを検出した。使用したα－actinin抗体は，ニワトリ赤筋，心筋，平滑筋，マウス骨格筋，ヒト骨格筋，ヒト血小板，ブタ腎から精製された α－actinin（又は α－actinin 様蛋白）とも交叉した。結果

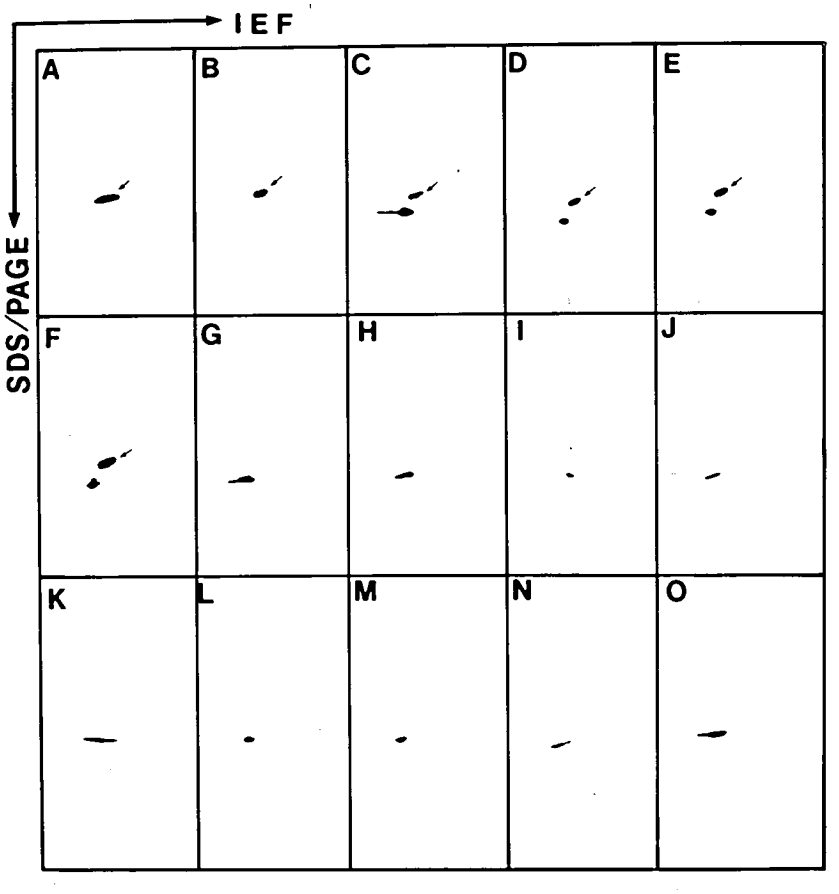


図1　α－Actinin の immuno－blot による検出
骨格筋と 2 次元電気泳動後 immuno－blot を行った。矢印は embryonic form を示す。
A，8 日目骨格筋 ： B，10日目胸筋 ： C，15日目上肢筋 ： D，15日目背筋 ：
E，15日目胸筋 ： F，15日目下肢筋 ： G，21日目上肢筋 ： H，21日目背筋 ：
I，21日目胸筋 ： J，21日目下肢筋 ： K，Adult 胸筋 ： L，Adult 広背筋 ：
M，Adult，soleus ： N，Adult sartorius ： O，Adult gizzard

は，図1に示されているが，8日目及び10日目embryo の骨格筋では，分子量 112 K dalton，pI 5.80 の蛋白（以後，仮に embryonic form と呼ぶ）が検出されたが，15日目 embryo骨格筋では，embryonic formに加えて，分子量100K dalton, pI 5.85の spot adult form も同時に検出された。以後21日 embryo, adult においてはembryonic form は消失しadult form のみが検出された。以上の結果から，少くとも免疫学的方法による検索では，成鶏にみられる α−actinin 以外に，embryo の早い stage では，やや分子量が大きくacidic な isoform が存在し，ふ卵15日〜21日の

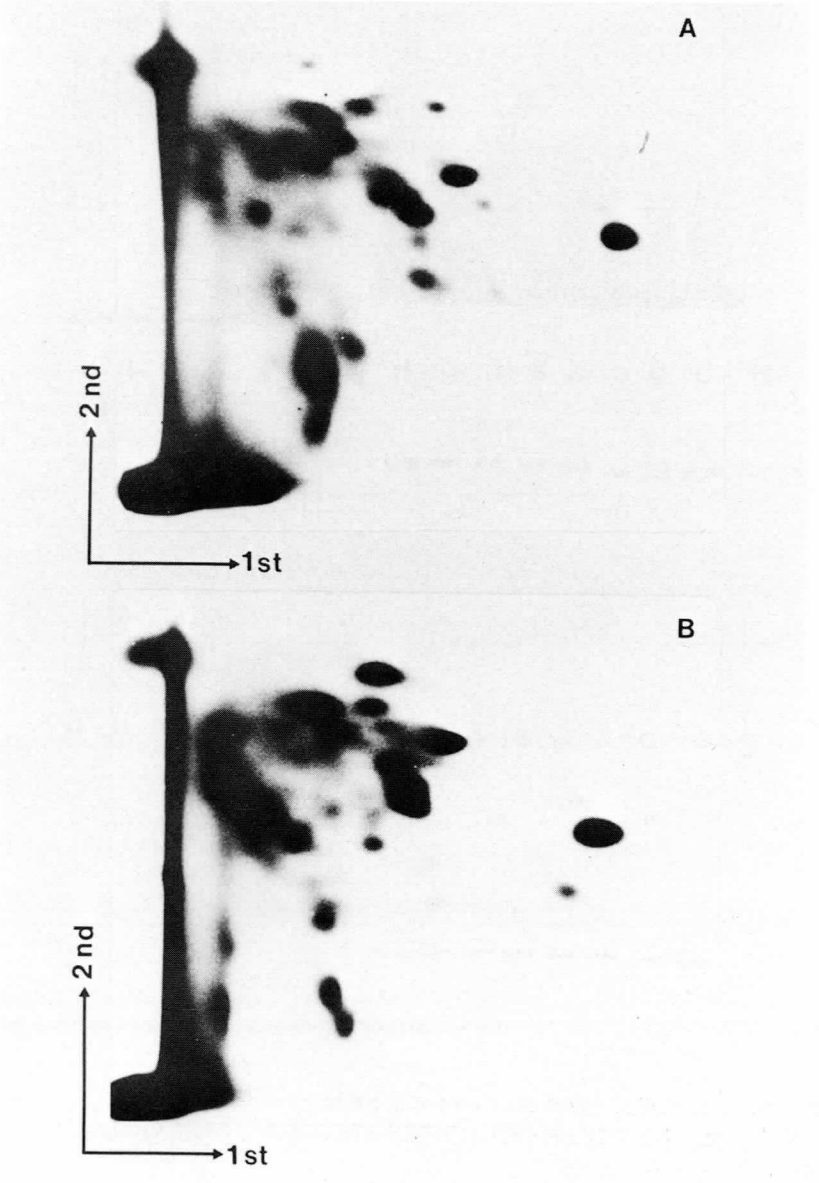


図2　^{125}I ラベル法による α− actinin のペプチドマップ
A，15日目 embryo 胸筋の embryonic form
B，15日目 embryo 胸筋の adult form

間にこの embryonic form は消失することがわかった。免疫学的同定法に加え，このembryonic form が蛋白化学的にも α－actinin-related protein かどうかを検討した。embryonic form が少量しか存在せず通常の精製法が用いられないことから，骨格筋（15日目 embryo）の低イオン強度抽出物を DEAE－cellulose chromatography で部分精製の後，α－actinin 抗体を用いてimmuno－precipitation を行い，その後SDS/PAGE によってembryonic form とadult form を分離

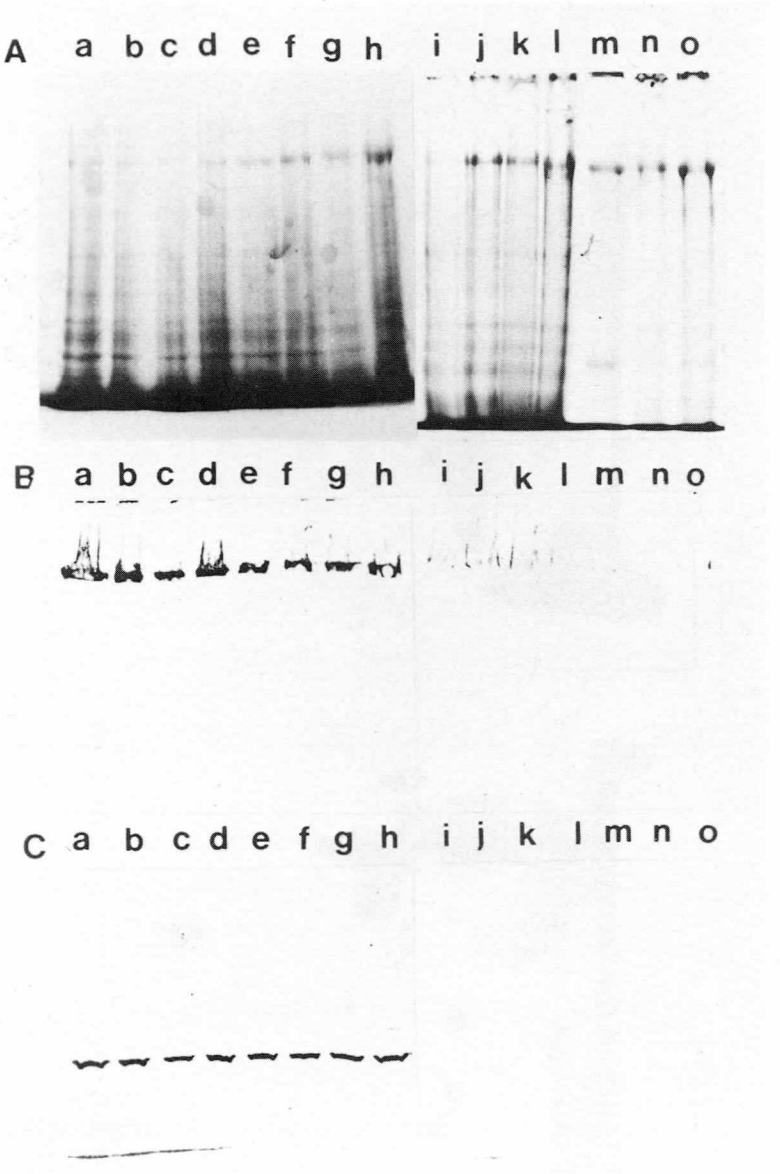


図3　Filamin，vinculin の immuno－blot による検出
Aは蛋白染色，Bは抗 filamin 抗体による immuno－blot，Cは抗 vinculin 抗体による immuno－blot を示す。
a，8日目骨格筋　：　b，10日目上肢筋　：　c，10日目胸背筋　：　d，10日目下肢筋　：
e，15日目上肢筋　：　f，15日目背筋　：　g，15日目胸筋　：　h，15日目下肢筋　：
i，21日目上肢筋　：　j，21日目背筋　：　k，21日目胸筋　：　l，21日目下肢筋　：
m，adult 胸筋　：　n，adult 広背筋　：　o，adult，soleus　：

し，^{125}I ラベル法で，ペプチド・マップを作成した。図2にその結果を示すが，adult form と embryonic formは互いに良く似たパターンを示すことが明らかになった。同時に異った spot もみられ，蛋白の一次構造上，多くの類似があるとともに異った蛋白であることが明らかとなった。更に，control として成鶏胸筋，gizzard のα－actinin についても同様のペプチド・マップを作成したが，gizzard のものは embryonic form とも adult form とも異り，胸筋α–actinin は15日目 embryo胸筋のもの（adult form)と完全に一致した。

b. Filamin および vinculin の発現

Filamin や vinculin は元来平滑筋において発見された actin 結合蛋白であるが，成熟動物の骨格筋や非筋肉細胞にも微量ながら存在することが明らかになっている。

α－Actinin 同様，immuno－blot 法を用いて検索した。SDS／PAGE，immuno－blotの結果を図3に示すが filamin，vinculin ともに8日～15日目 embryo骨格筋には，大量に存在することがわかる。21日目 embryo 又成熟動物骨格筋では極く微量に存在するか又は検出不能であった。尚，vinculin については，平滑筋組織では，meta－vinculin とも呼ばれる約 150 K dalton の vin－culin-related protein の存在が報告されているが，15日目及び21日目 embryo で，この meta－vinculin が，わずかながら検出された。しかし，極く微量であるため，細部にわたる解析は不可能であった。

Immuno－blot法による定性的解析に加えて，filamin，vinculin の消長を定量的に調べた。筋組織の 8M urea 抽出液をニトロセルロース膜に固定したのち，いわゆる dot assay により定量し

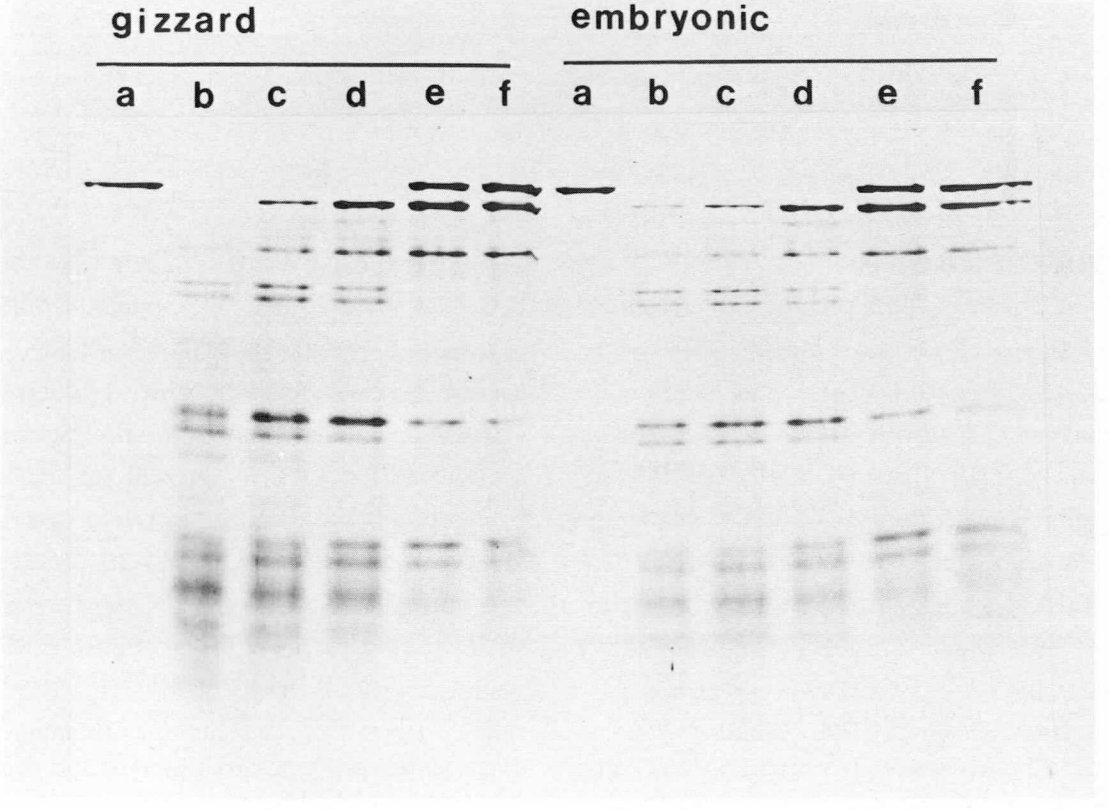


図4　Filamin の1次元ペプチドマップ
a は original，b は1 μg の V_8 protease，c は 0.5 μg，d は 0.2 μg，e は 0.1 μg，f は 0.05 μg の protease を使用した。

表1 ニワトリ embryo 骨格筋の Vinwlin, Filamin の量的変化

Muscle Source		Vinculin (ng/mg protein)	Filamin (ng/mg protein)
8 d. embryo,	whole muscle	1083	6278
10 d. embryo,	upper limb	1139	5972
	back & breast	1125	5569
	lower limb	1056	5944
15 d. embryo,	upper limb	1181	4680
	back	1139	4528
	breast	1042	4181
	lower limb	1125	4819
21 d. embryo,	upper limb	181	694
	back	139	597
	breast	56	500
	lower limb	111	486
Adult,	pectoral	N.D.*	278
	anterior latissimus dorsi	N.D.	153
	soleus	N.D.	181

* not detected

た。結果は，表1に示されているが，filamin, vinculin とも15日目 embryo まではほぼ一定量存在するが，21日目では激減し，adult では更に低濃度しか存在しない。

初期 embryo 骨格筋に比較的大量に含まれている filamin や vinculin が筋細胞に由来するのか，又は他の細胞に由来するかという問題が残るが，in ovo の実験からは直接的解答は得られない。embryo の脳，肝臓について骨格筋と同様にimmuno－blot 法で検出を行ったが，trace amount しか検出出来なかった。従って，間接的な証明法ではあるものの，骨格筋に見いだされたvinculin や filamin が，血管平滑筋や非筋細胞の混在に由来するとは考えにくい。

更に，embryo 骨格筋の vinculin や filamin が，gizzard 由来の蛋白と異なるかどうかを知る目的で，一次元ペプチド，マッピングを行った。図4，5に示す様に embryo 骨格筋の filamin や vinculin は gizzard 由来のものと差異がなかった。

c．Gelsolin の発現

Gelsolin は Stossel らによってマクロファージから発見されたアクチン調節蛋白で，actin の核形成を促進するとともに，F－actin の切断因子である。その後同様の蛋白が血小板，甲状腺，gizzard 等々からも発見されている。小腸粘膜から見出されたvillinや粘菌から発見されたfragminも同様の機能を持っている。gizzard gelsolinに対する抗体を用いて immuno－blot 法によりgelsolin 出現の経過を調べた。10日，12日，15日，17日，21日目の embryo 骨格筋（ジストロフィー鶏及びコントロール鶏）を用いた。gelsolin は embryo の成長に伴い除々に増量するという結果を得た。したがって，α－actinin，filamin，vinculin の様に15日目～21日目の間に embryonic form から adult form への変換又は消失するといった劇的な変化は，gelsolin では起こらないと考えられた。

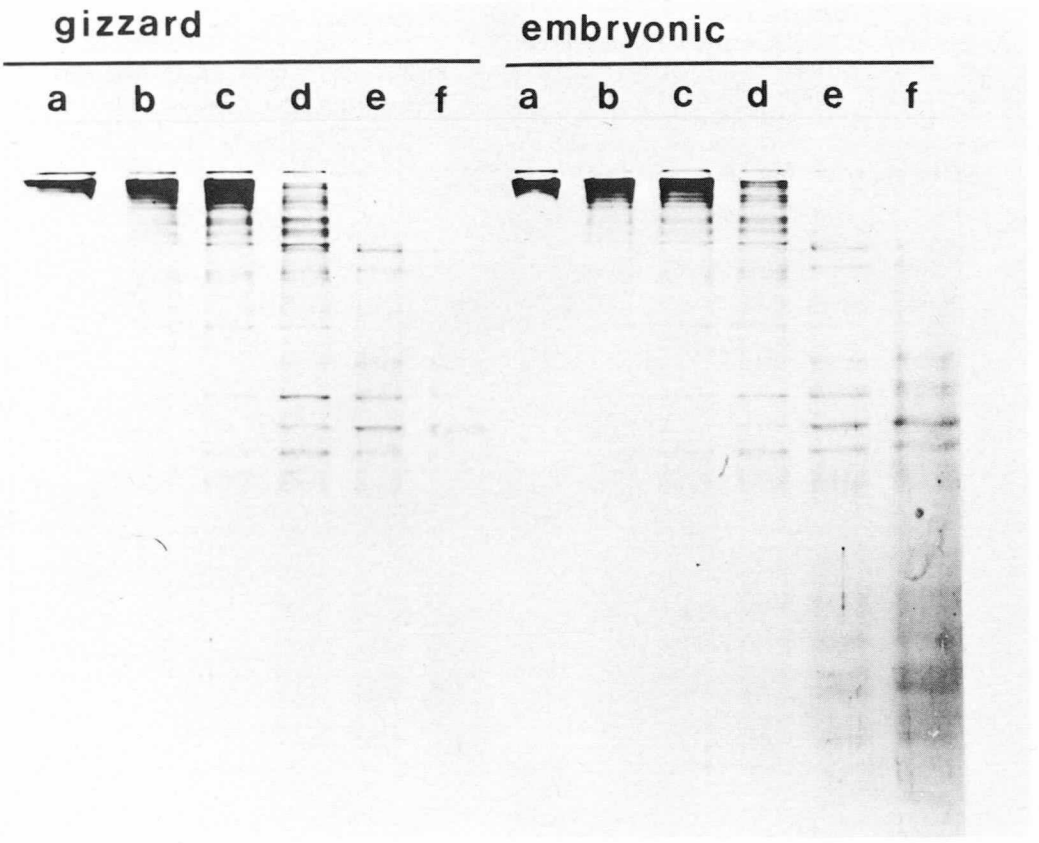


図5　Vinculin の1次元ペプチドマップ a～f までは図4と同様に処理した。

ま と め

Actin 結合蛋白（α－actinin, filamin, vinculin, gelsolin）について，骨格筋発生・分化にともなう形式を in ovo で検討したが，実験結果から以下の様な結論が引き出せる。

①α－actinin には，従来明らかにされなかった embryo 特有の isoform（embryonic form）が存在し，"後期 embryo"（15～21日）では消失し adult formに置き換わる。②平滑筋に特有で成熟動物骨格筋には微量しか含まれていないと考えられる filamin やvinculin は，15日目までの embryo には大量に存在するが，以後急激に消失する。③他の多くの筋蛋白や actin結合蛋白についても検討した上でなければ，明確なスキームは提出できないが，少くとも上記3種の蛋白を含む，いくつかの筋蛋白においては，"後期 embryo"の時期に分子種の変換又は消失といった大きな変化が起こると考えられる。④しかし gelsolinの様に embryo 初期から後期まで徐々に増加しつづけ明確な変換点を持たないものも存在する。この様な結論の上に今後の問題を考えてみると，まず，より多くの筋蛋白を検討した上で，上記の結論が普遍的であるかどうか検証すべきであるが，それに加えて，筋蛋白の発現型式を，蛋白レベルのみならず mRNA 又 DNA レベルで明らかにすべきであろう。また個々の蛋白の発現の解析とともに，いかにこれらの蛋白が統合され収縮装置を形成するかを解明する必要があろう。

文　　献

1) 大日方　昂：筋発生の細胞生物学（小沢鋏二郎他編）pp.153-181，学会出版センター (1983).

2) Pinter, K., et al.: Acta Biochem. *Biophys. Acad. Sci. Hung.* **15.**: 217-222, 1980.
3) Feramisco, J.R., and Burridge, K.: *J. Biol. Chem.* **255**: 1194-1199, 1980.
4) Laemmli, U.K.: *Nature* **227**: 680-685, 1970.
5) O'Farrell, P.H.: *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021, 1975.
6) Towbin, H., *et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354, 1979.
7) Cleveland, D.W., et. al.: *J. Biol. Chem.* **252**: 1102-1106, 1977.
8) 田部一史：生化学 **53**: 337-340, 1981.
9) Kessler, S.W.: *J. Immunol.* **117**: 1482-1489, 1976
10) Kobayashi, R., et. al.: *Eur. J. Biochem.* **113**: 607-611, 1983.

24　除神経筋にみられる筋蛋白質分子種の変化

大日方　昂*
研究協力者　斉藤　修*　大室弘美**

筋原繊維を構成する蛋白質には数種の異なるアイソフォームが存在すること，及び胚(又は胎児)の発生過程や，生後の成長過程に発現される筋蛋白質のタイプが著しく変化することが最近の多数の研究により明らかにされてきた。ニワトリ胸筋では，このような蛋白質の変化が特に顕著にみられる。発生に伴う蛋白質の変化を大別すると，その変化は胚型→新生児型→親型に整理される。[1] 種々の筋蛋白質について，発生過程での変化がみられる時期は，すべてが協調しているわけではない。ミオシンL鎖についてみると，胚の初期には速筋型，遅筋型が共存するが，胚の成長過程で変化し，ふ化前に胸筋では速筋型のみとなる。それに対してトロポミオシン，トロポニンT，C蛋白質，ミオシンアイソザイムなどの組成は，胸筋のふ化後の成長期にほぼ協調して，顕著に変化することを既に報告した[1-4]。本研究では，ニワトリ胸筋の成長に伴う蛋白質アイソフォーム変化を支配する要因を採ると同時に，筋ジストロフィー鶏でみられるような蛋白質の変化を引き起す条件を探る意図で，神経支配が筋蛋白質アイソフォームにどのような効果をもつのかを検討した。

実験方法

筋の除神経：実験にはすべて白色レグホンを用い，ふ化2日目のヒヨコ，又は2～4カ月令のニワトリの片側の第14，15，16頸椎神経を切断することにより，片側の胸筋のみを除神経した。神経の再生を妨げるために切断された神経の末端を背部の皮膚に縫いつけた。この処理により，手術された側の翼の運動は全く不能となり，胸筋は約1週間以上経過すると白みを帯びた。ヒヨコの場合は，胸筋の湿重量の増加が著しく阻害された。ほとんどすべての実験において，除神経された筋と除神経手術を施されなかった側の胸筋（対照筋）について，胸筋のほぼ中央の表層部から小片を採取し，蛋白質のタイプを比較検討した。胸部の深部の赤色領域を除けば，他の領域の胸筋でも基本的には同様の結果を得ている。

筋蛋白質のタイプの解析：検討した蛋白質は，トロポミオシン，トロポニンT，C蛋白質，ミオシンアイソザイム，ミオシンL鎖である。トロポミオシンとミオシンL鎖はO'Farrell の二次元電気泳動法により，ミオシンアイソザイムはピロリン酸ゲル電気泳動法により調べた。トロポニンTのタイプは，筋からのSDS溶液による粗蛋白抽出液をSDS－PAGEにより展開した後，ニトロセルロース膜に転写し，抗トロポニンTと抗トロポミオシン抗体とを用いたイムノブロット法により解析した。[7] 胸筋トロポニンTと足型トロポニンTは抗原性がほとんど区別されないが，分子量が異なり，低分子量の後者の移動度がトロポミオシンの場合とほぼ一致することから容易に識別可能であった。C蛋白質のタイプは，筋の凍結切片に，抗速筋C蛋白質（ポリクローナル）と抗遅筋C蛋白質（モノクローナル）[5]を作用させ，間接蛍光抗体法で調べた。

*千葉大学理学部生物学科
**東京都臨床医学総合研究所

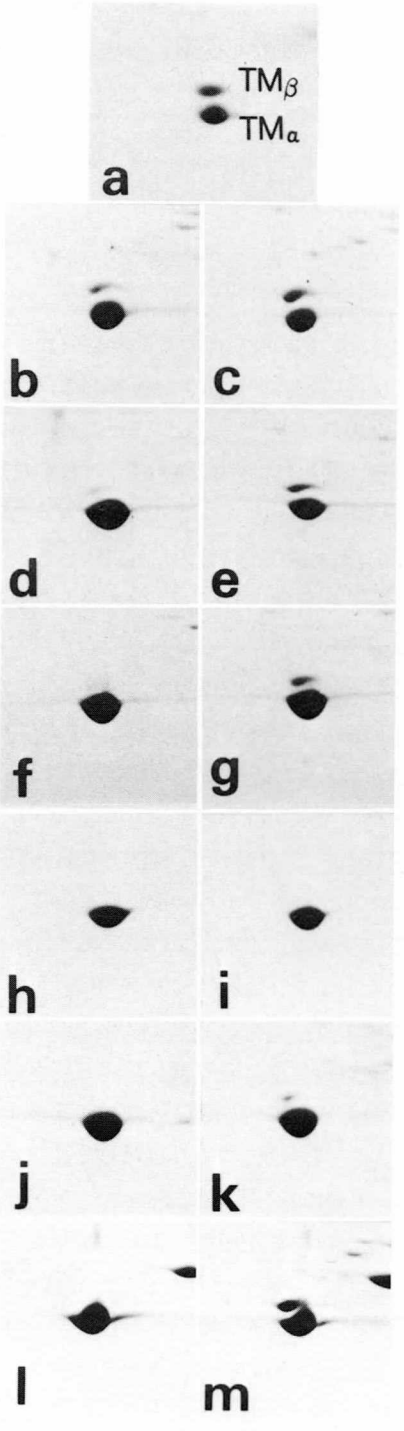


図1　正常筋と除神経筋のトロポミオシンの二次元電気泳動パターン：ニワトリ胸筋をふ化2日後（b－g）又は3か月後（h－m）に除神経し，手術後，1週間後（b，c，h，i），2週間後（d，e，j，k）又は，3週間後（f，g，l，m）に調べた。図の左半分は対照筋を，右半分は除神経筋を示す。aはふ化2日目の胸筋におけるトロポミオシンのパターン。

結　　果

トロポミオシン，トロポニンT，ミオシンアイソザイム，C蛋白質のいずれについてみても，ふ化直後のヒヨコに除神経手術を施した場合，蛋白質のタイプが新生児型から親型への移行が著しく阻害された。又，成鶏の胸筋を除神経した場合には，これらの蛋白質のタイプが親型から再び新新生児型へ逆行することがみられた。以下，個々の蛋白質の場合についてのべる。

トロポミオシン：既に報告されているように，[2,6] ふ化直後のヒヨコ胸筋にはα，β両種のトロポミオシンが共存する（図1a）。正常な筋の成長につれ，βトロポミオシンは除々に消失し，ふ化1カ月後には胸型の主要部分にはほとんど全くみられなくなる。このことは，本実験で用いた対照筋，即ち，一方の胸筋が除神経されているようなケースでも，無傷の側の筋では全く同様にみられた（図1.b，d，f）。ところが，ふ化直後に除神経された胸筋では，ヒヨコが1カ月令まで成長してもなおβトロポミオシンは，ふ化直後のヒヨコ同様に存在しつづけることが認められた。一方，βトロポミオシンをほとんど全く含まなくなっている2～4カ月令のニワトリ胸筋（図1.h，j，l）を除神経したところ，2週間後にはβトロポミオシンが微量ながら出現し（図1.k），1カ月後には非常に明瞭にβトロポミオシンの存在が認められた[7]（図1.m）。この時のα，βトロポミオシンの量比は，ふ化直後のヒヨコの場合とほぼ同様であった。

トロポニンT：ふ化直後のヒヨコの胸筋は胸型トロポニンT（MW 38K）の他に，足型トロポニンT（MW 35K）が共存し，成長を続けると2週間後位までに足型トロポニンTが顕著に減少していく（図2e）[2]。ふ化直後に除神経し，成長させ

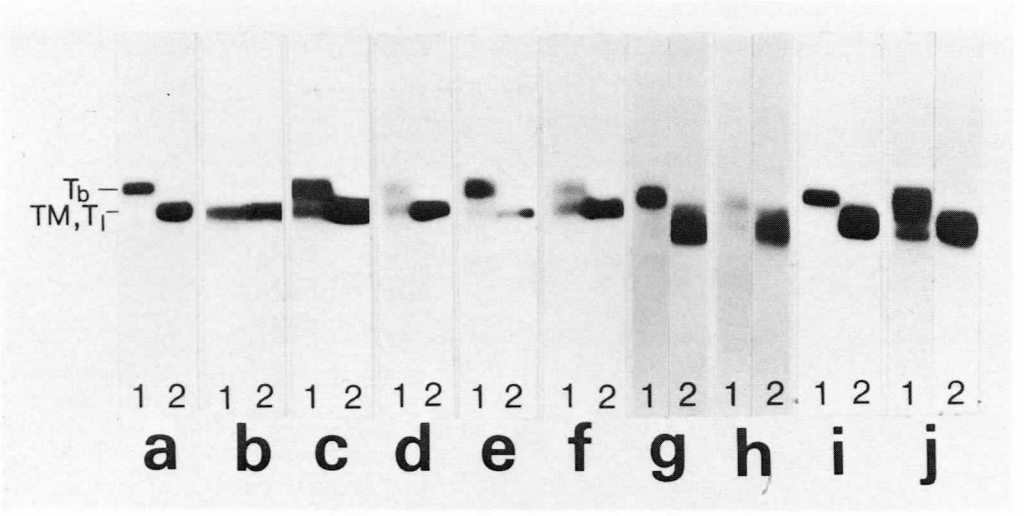


図2　除神経筋（d，f，h，j）と対照筋（c，e，g，i）におけるトロポニンTのタイプ：ふ化2日後（c－f）又は2か月後（g－j）に除神経し，1週（c，d），2週（e，f，g，h）及び1か月（i，j）後に，筋蛋白質抽出物を得，SDS－PAGEを行ない，イムノブロット法で調べた。それぞれの場合について(1)は抗トロポニン抗体で処理したもの，(2)は分子量マーカーとしてトロポミオシンの泳動位置をみるために，抗トロポミオシン抗体で処理したもの。

た胸筋から抽出された蛋白質について，抗トロポニンT抗体を用いて，イムノブロットを行なったところ，対照筋では，胸型トロポニンTに相当するほぼ単一のバンドのみが得られたのに反し，除神経された筋の場合には，1カ月令になっても分子量のことなる2本のバンドがみられた(図2.f)。これらのバンドを抗トロポミオシン抗体により得られたバンドと比較した結果，抗トロポニンT抗体により生じた低分子量のバンドは，分子量から判断して，足型トロポニンTであると判定された。即ち，除神経筋では成長しても足型トロポニンTをもちつづけるとみなされる。成鶏胸筋を除神経した場合には，約2週間後に再び足型トロポニンTの出現を認めることができた(図2.h)。1カ月後には足型トロポニンTは更に顕著となった（図2.j）。

ミオシンアイソザイム：ニワトリ胸筋には，速筋型の3種のミオシンアイソザイム（移動度の順にFM_1，FM_2，FM_3）が存在することがピロリン酸ゲル電気泳動法により検出される。正常筋の発生過程では，ふ化直後には，$FM_1 < FM_2 < FM_3$であるのが成長すると$FM_1 > FM_2 > FM_3$に変化することが既に知られている[4,8]。ふ化2日目に除神経した場合，ニワトリの成長が進んでも，ミオシンアイソザイムの量的関係は変化せず，新生児期と同様のパターンを示した（図3.c，e）。3カ月令の成鶏胸筋を除神経したところ，FM_1の顕著な減少がみられ，ミオシンアイソザイムのパターンは，ふ化直後のヒヨコ同様，$FM_1 < FM_2 < FM_3$となった[7]。FM_1の相対量の減少は，ミオシンL鎖のうち速筋型L鎖（Lf_3）の減少と対応していることが認められた。しかし，除神経に遅筋型ミオシンL鎖が出現することは，特にみられなかった。

C蛋白質：ふ化直後の胸筋のほとんどの細胞は，速筋型C蛋白質と遅筋型C蛋白質を共にもっているが，2週令までに後者がほぼ完全に消失する[3]。しかし，ふ化直後に除神経された場合，1カ月令となってもほとんどの細胞が，両方のタイプのC蛋白質を含むことが胸筋の連続凍結切片に抗速筋型，及び抗遅筋型C蛋白質抗体を作用させ，間接蛍光抗体法により調べた結果明らかになった。又，

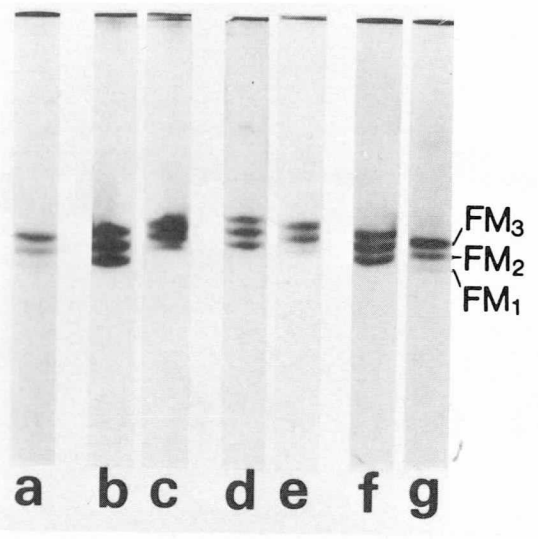


図3　除神経筋（c，e，g）と対照筋から得られるミオシンアイソザイム（FM_1，FM_2，FM_3）のピロリン酸ゲル電気泳動パターン。ふ化2日（b，c，d，e）又は3か月（f，g）に除神経し，2週（b，c）又は1か月後（d，e，f，g）に調べた。aは無処理のふ化2日目のヒヨコのパターン。

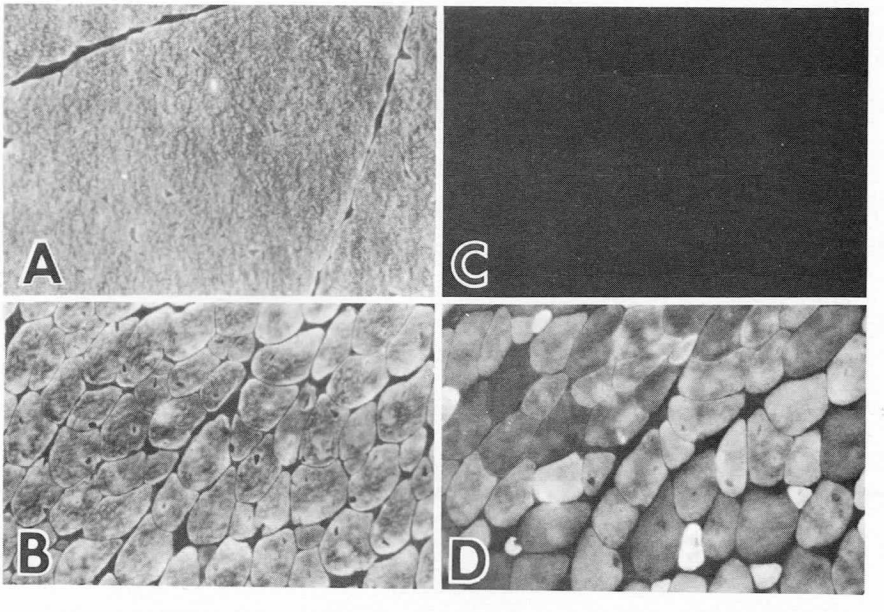


図4　除神経によって引きおこされたC蛋白質アイソフォームの変化。2か月令のニワトリ胸筋を除神経し，1週間後に凍結切片を作成し，抗速筋C蛋白質抗体（A，B）又は，抗遅筋C蛋白質抗体（C，D）を作用させて間接蛍光抗体法で調べた。上段（A，C）は対照筋，下段（B，D）は除神経筋を示す。スケール，100 μm。

2カ月令の胸筋を除神経したところ，約1週間には，多くの細胞が再び遅筋型C蛋白質を含むようになり（図4.D），時間を経るにつれ，更に明瞭になった。このように除神経された胸筋に遅筋型C蛋白質が出現してくる場合，再生細胞と思われる小型の細胞に特異的に出現してくるというのではなく，大きさからみて既存細胞と思われるものにかなり一様に出現してくるようである。このことはC蛋白質でみる限り，成熟分化した細胞が除神経されることにより幼若化するという印象が強い。

考　　察

本研究での観察結果から判断すると，トロポミオシン，トロポニンT，ミオシンアイソザイム，C蛋白質などで顕著にみられるふ化直後の新生児型の筋タンパク質組成から親型の筋タンパク質組成への移行はかなり可塑性があり，また，この変化および親型の筋タンパク質組成の維持には神経支配が深く関わっていると思われる。しかし，胚から新生児期への過程でタンパク質アイソフォームの変化がおこるミオシンL鎖の場合は，神経切断の影響をほとんど受けない。このことは，神経切断によってタンパク質組成が胚型までは戻らないことを示す。いいかえれば，胚型→新生児型と，新生児型→親型のタンパク質アイソフォーム変異に関わる要因は同一ではない可能性を示している。

最近，筋ジストロフィー症の発症に相応して，一群の筋構造タンパク質のタイプが顕著に変化し，幼若筋の特徴を示すようになることが明らかになった[9,10]。本研究でみられた除神経筋におけるタンパク質アイソフォームの変化は，筋ジストロフィー症のニワトリ胸筋でのタンパク質の変化とよく一致している。筋ジストロフィー筋との類似性は，単なる現象的一致にすぎないかもしれないが，今後，ニワトリにおける筋ジストロフィー症筋における筋蛋白質遺伝子発現の問題を考えていく上での示唆となるであろう。

文　　献

1) 大日方　昂 (1983) 筋肉の分化 — 筋蛋白質の多型性と可変性　科学 **53**: 689-696.
2) Matsuda, R., Obinata, T. & Shimada, Y. (1981) Types of troponin components during development of chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.*, **82**: 11-19.
3) Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D.M., Masaki, T., Kitani, S. & Fischman, D.A. (1984) Immunochemical analysis of C-protein isoform transitions during the development of chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.* **101**: in press.
4) Takano-Ohmuro, H. Obinata, T. Masaki, T. & Mikawa, T. (1983) Changes in myosin isozymes during development of chicken breast muscle. *J. Biochem.* **91**: 1305-1311.
5) Reinach, F.C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T. & Fischman, D.A. (1982) Isoforms of C-protein in adult chicken skeletal muscle: Detection with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* **95**: 78-84.
6) Roy, R.K., Streter, F.A. & Sarkar, S. (1979) Changes in tropomyoslin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Dev. Biol.* **69**: 15-30.
7) Obinata, T., Saitoh, O. & Takano-Ohmuro, H. (1984) Effect of denervation on the isoform transitions of tropomyosin, troponin and myosin isozyme in chicken breast muscle. *J. Biochem.* **95**: 585-588.
8) Hoh, J.F.Y.: Developmental changes in chicken skeletal myosin isozymes. *FEBS Lett.* **98**: 267-270.
9) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. & Matsuda, R. (1980) Changes in troponin-T and myosin isozymes during development of normal and dystrophic chicken muscles. *FEBS Lett.*, **120**: 195-198.
10) Takeda, S. & Nonomura, Y. (1980) Presence of the tropomyosin β-chain in dystrophic chicken breast muscle. *Biomed. Res.*, **1**: 176-179.

25　ニワトリ胸筋および足筋におけるトロポニンTの発生
―モノクローン抗体を用いた研究―

嶋田　裕*
研究協力者　清水法子*

はじめに

ニワトリの胸筋および足筋には，それぞれ特有のトロポニンT（TN−T）が存在する。すなわち，胸筋のTN−T（胸型TN−T）の分子量は38,000であり，足筋のTN−T（足型TN−T）の分子量は34,000である[1]。しかし各々の一次構造は非常に類似している[1]ため，従来のポリクローン抗体では両者を区別することができなかった[2]。

筋の発生過程で筋蛋白質の型（isoform）は変化することが知られてきている。TN−Tにおいても同様のことが明らかにされている。すなわち，胚の骨格筋は胸筋TN−Tに対する抗体だけでなく，心筋TN−Tに対する抗体とも反応するが，発生が進むと抗心筋TN−T抗体に対する反応性は消失する[3]。また胚の時期には胸筋も足筋も足型の分子量をもつTN−Tを合成しているが，孵化後には胸筋は胸型TN−Tに変換し，足筋は足型TN−Tのままである[2]。さらに免疫電子顕微鏡的にも筋原線維上にできる縞の幅の相違により，前者の変換が確認されている[2]。しかし組織内での分布様式や細胞レベルでの変換などは知られていない。

本研究では胸型TN−Tと足型TN−Tを区別できるモノクローン抗体を作製し，これを用いて胸筋，足筋および後広背筋（PLD）における胸型および足型TN−Tの分布を免疫組織学的に発生段階を追って調べた。

*千葉大学医学部解剖学第1講座

材料と方法

抗体の調製：孵化後5日のヒヨコ胸筋からTN−Tを分離精製し，これを抗原としてBALB/cマウスに注射した。その脾細胞とミエローマ細胞をポリエチレングリコールにより融合させ，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，固相ラジオイムノアッセイ（RIA）法により行った。クローニングは限定希釈法を2～3回行った。活性を持つハイブリドーマをマウス腹腔内に注射し，その腹水から抗体を精製して使用した。

イムノブロット法：SDS−アクリルアミド電気泳動（13%ゲル使用）で蛋白を分離した後，ニトロセルロース膜に転写し，これに抗TN−Tモノクローン抗体およびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を反応させ，発色させた。

蛍光顕微鏡的観察：成体および幼若（孵卵12日，17日）ニワトリ胸筋，足筋（m. iliotibialis posterior）および後広背筋（PLD）の横断連続凍結切片を作製し，2%パラホルムアルデヒドで5分間固定した。切片はモノクローン抗体と反応させた後，0.4 M $MgCl_2$，10 mM tris − HCl（pH 7.6）で，さらにPBSで洗い，FITC標識抗マウスIgG抗体を反応させ，間接蛍光抗体法により観察した。

結果

得られたモノクローン抗体の反応性をイムノブ

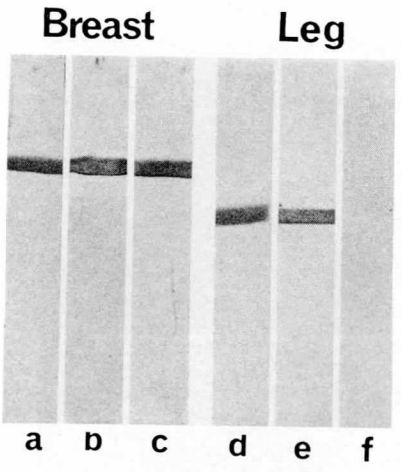


図1　イムノブロット法によるモノクローン抗体の反応性。成体胸筋TN－T（a，b，c）および成体足筋TN－T（d，e，f）電気泳動をニトロセルロース膜に転写し，アミドブラック（a，d），F5D3（b，e），D5（c，f）で処理した。

ロット法（図1）および間接蛍光抗体法により調べた結果，反応性の異なるつぎの3種類の抗体が得られた（表1）。①胸筋および足筋のTN－Tと反応する抗体（F5D3）②胸筋TN－Tとのみ反応する抗体（D5）③すべての骨格筋（胸筋，足筋，前広背筋ALD）および心筋と反応する抗体（G5G4）。D5はイムノブロット法では胸型TN－Tとだけ反応し，足型TN－Tとは反応しない（図1）が，間接蛍光抗体法やRIA法では弱く反応した。この弱い反応性はモノクローン抗体を低濃度（2～5μg/mℓ）で使用し，反応後0.4M $MgCl_2$，Tris－HCl（pH 7.6）で洗うことにより除去することができた。F5D3およびG5G4は，この条件下でも反応性に相違はみられなかった。これらの抗体のうち，F5D3とD5を用いて，成体および幼若ニワトリの胸筋，足筋およびPLDを間接蛍光抗体法により観察した。

表1　モノクローン抗体の反応性

Monoclonal Antibody	Reactivity with			
	Breast	Leg	ALD	Cardiac
F5D3	+	+	-	-
D5	+	-	-	-
G5G4	+	+	+	+

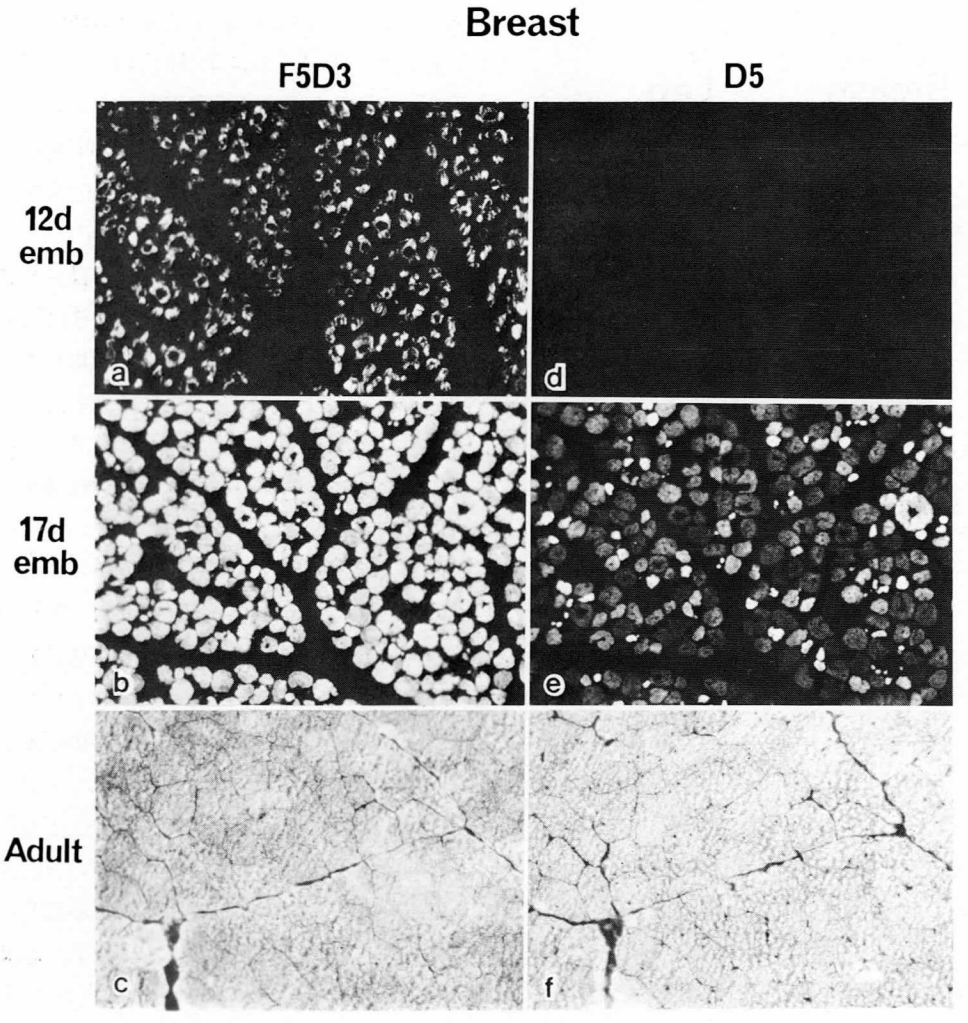
12日胚における胸筋，足筋，PLDはいずれもF5D3とのみ反応した。15日胚頃からF5D3とともに，D5とも反応する線維が現われ始めた。その後は各筋でそれぞれ異なる変化を示した。

胸筋では孵卵15日頃よりF5D3とともにD5とも反応する線維が増加し，成体の筋線維はすべて両抗体と反応するようになった（図2）。足筋では孵卵17日頃にF5D3で染まると同時に，一時的にD5とも反応する線維が増加したが，孵化後にはこのような線維は著しく減少した。成体では足筋の線維はF5D3とのみ反応した（図3）。PLDでは胸筋と同様に，F5D3とD5の両者に反応する線維は15日頃より増加した。成体においてはF5D3およびD5と反応する線維と，F5D3とのみ反応する線維とがあり，この2型の線維の分布はモザイク状であった（図4）。胸筋および足筋においては，D5に反応する線維は，径の小さな線維から染まり始める傾向があったが，PLDではそのような所見は観察されなかった。

考　　察

用いた抗原は孵化後5日の胸筋で，胸型・足型の両型のTN－Tを含んでいる[2]。合計4回の融合を行ったが，胸型TN－Tのみを認識する抗体は得られたが，足型TN－Tを認識する抗体は得られなかった。これは胸型TN－Tは一次構造のN末端で足型TN－Tよりやや長いだけで，残りは大部分同じである[1]ためであると考えられる。また胚のTN－Tのみを認識するような胚型TN－T抗体も得られなかった。

胸型TN－Tと強く反応する抗体（D5）はイムノブロット法では足型TN－Tとは全く反応しなかったが，間接蛍光抗体法やRIA法では弱く反



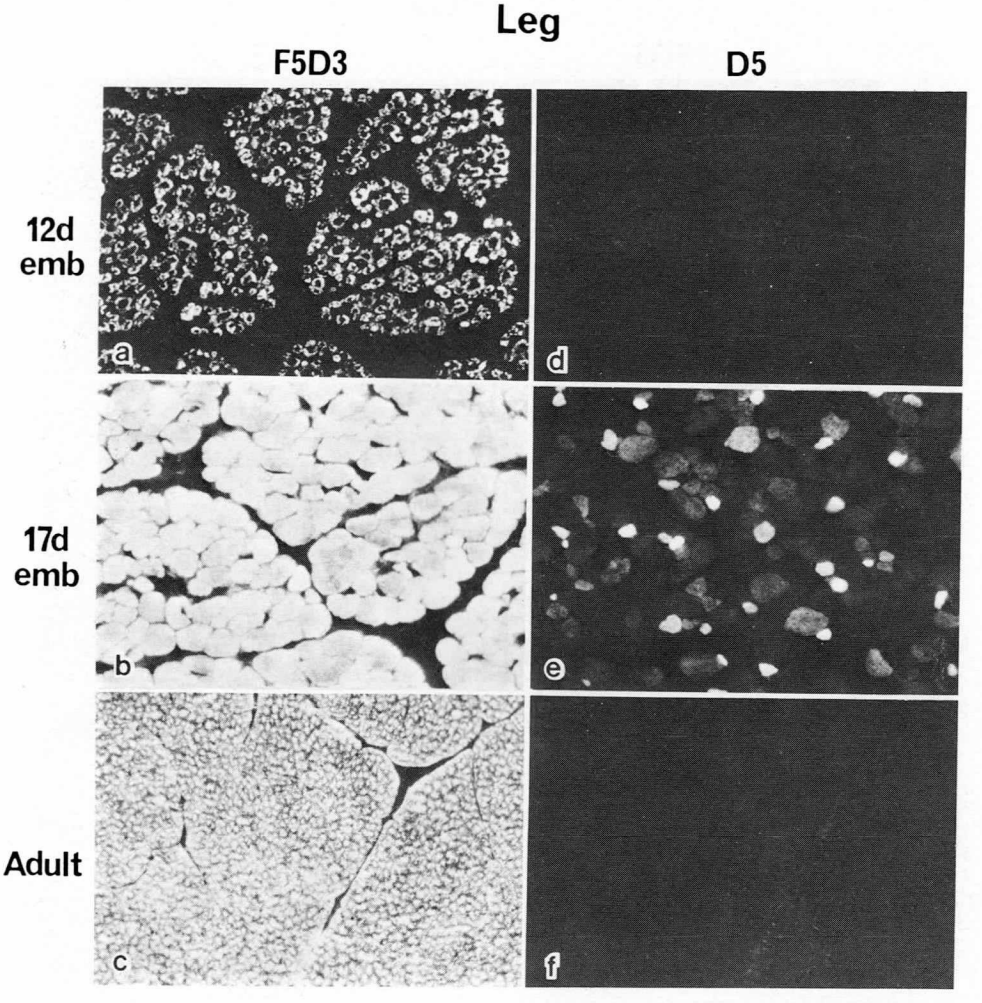
（図2）

図２－４　間接蛍光抗体法による筋発生段階の観察。12日胚（a，d），17日胚（b，e）および成体（c，f）の胸筋（図２），足筋（図３）およびＰＬＤ（図４）を，Ｆ５Ｄ３（a，b，c）およびＤ５（d，e，f）により染色した。

応した。この反応を防ぐためには，モノクローン抗体反応後，通常より塩濃度を上げた溶液で洗うことが効果的であった。これは胸型・足型両TN－Ｔは高次構造が類似しているので，その構造が保たれるような方法（間接蛍光抗体法，RIA法）ではＤ５が足型 TN－Ｔとも弱く反応するためであると考えられる。

間接蛍光抗体法において，胸型 TN－Ｔだけを認識する抗体（D5）とは反応せず，胸型・足型両TN－Ｔを認識する抗体（Ｆ５Ｄ３）と反応した場合，切片に存在する TN－Ｔの種類には①足型の TN－Ｔおよび②新しい型の TN－Ｔの存在の２つの可能性が考えられる。成体の足筋の場合は前者であるといえる。幼若胚の場合，電気泳動の結果では足型 TN－Ｔと同分子量を持つ[2]が，抗心筋 TN－Ｔ抗体とも反応する[3]ことから後者の可能性も残る。

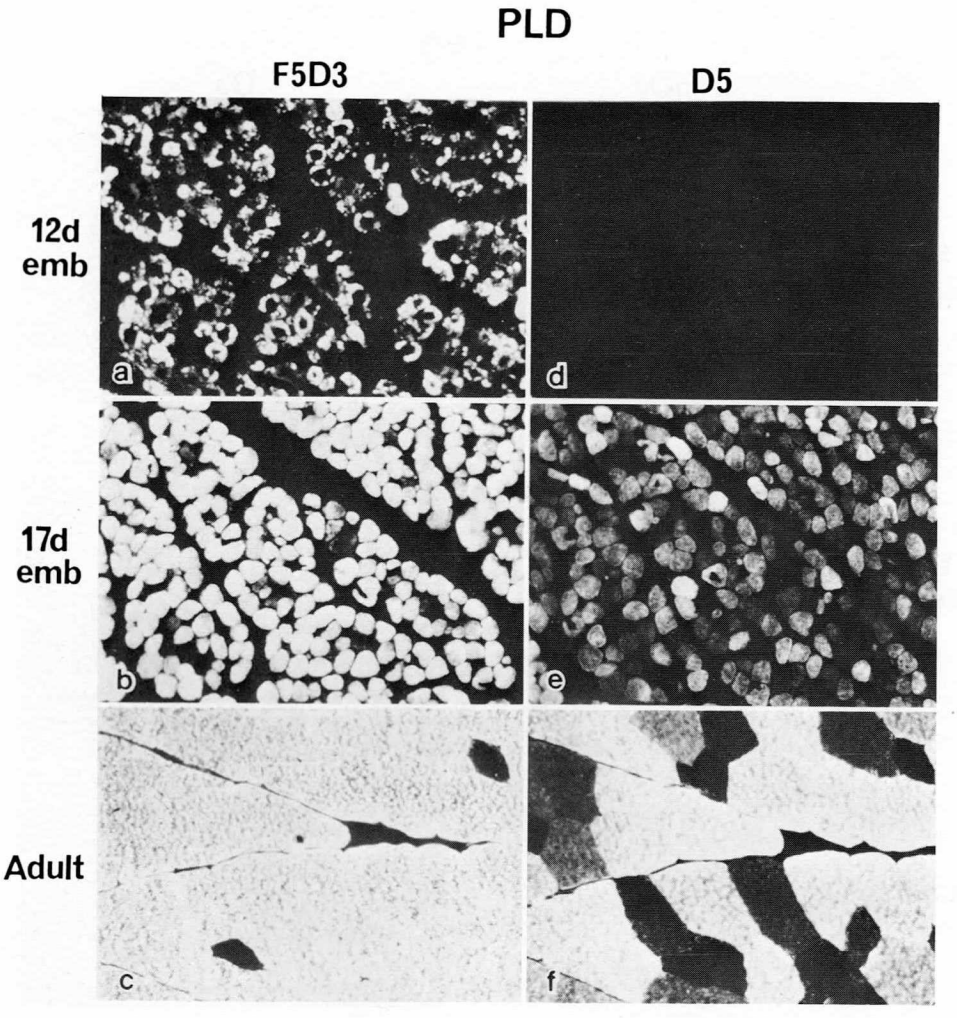
胸筋，足筋，ＰＬＤのいずれにおいても，発生の初期には足型 TN－Ｔの線維のみがみられた。そして孵卵15日前後には胸型 TN－Ｔを持つ線維



（図３）

が現われ始めた。特に胸筋，足筋においては，この時期に新生された小径の細胞が胸型 TN－T を合成し始めると考えられた。胸筋では足型 TN－T に対する反応性は胸型に変換して行った。この所見は松田ら[2]により報告された電気泳動による結果と一致する。一方，足筋では再び胸型 TN－T は減少した。この所見は発生過程の胸筋におけるミオシンH鎖にみられる胚型→新生児型→親型という３段階の変化[4]に類似している。すなわち，足筋の発生は胚期（胸型 TN－T を持たず，抗心筋 TN－T 抗体と反応する）→新生児期（胸型TN－T を持つ線維が出現する）→成熟期（足型 TN－T が存在する）の３段階に分けることができる。胸筋 TN－T においても同様の変換の行われている可能性はあるが，本研究では区別できなかった。

成体の PLD は，ATPaseおよびミオシンに関しては速筋型を示し，C－蛋白質に関してはすべての線維が同時に遅筋型と速筋型（胸筋型）を呈している[5,6]。また二次元電気泳動法では PLD は胸型と足型の TN－T を含むことが示されている[7]。本研究では PLD の TN－T は胸型と足型の２型を有すること，またそれらは同一線維に存在するのではなく，各線維はモザイク状に配置されていることを示した。



（図4）

筋の特性は神経に依存しているのであろうという報告は数多くみられる。この考えに従えば，ATPase，ミオシン，C－蛋白質の表現型から判断すると，PLDのすべての線維は同一の性質を有する神経の支配をうけているようにみえる。ところがTN－Tについてみると矛盾が生ずる。さらに胸筋のミオシンH鎖と足筋のTN－Tは3段階の変換を示すが，胸筋のTN－Tは2段階であるというように，遺伝子の発現は非常に複雑である。これらを調節している因子には神経性のものの存在を除外することはできないが[8]，さらに別の因子の関与による表現型の直接的あるいは間接的な修飾の可能性も考えられ，これらは今後に残された課題である。

文　　献

1) Wilkinson, J.M.: The components of troponin from chicken fast skeletal muscle. A comparison of troponin T and troponin I from breast and leg muscle. *Biochem. J.*, **169**: 229-238, 1978.
2) Matsuda, R., Obinata, T. and Shimada, Y.: Types of troponin components during development in chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.*, **81**: 11-19, 1981.
3) 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.

4) Bader, D., Masaki, T. and Fischman, D.A.: Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **95**: 763-770, 1982.
5) Reinach, F.C., Masaki, T., Shafiq, S., Obinata, T. and Fischman, D.A.: Isoforms of C-protein in adult chicken skeletal muscle: detection with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, **95**: 78-84, 1982.
6) Reinach, F.C., Masaki, T. and Fischman D.A.: Characterization of the C-protein from posterior latissimus dorsi muscle of the adult chicken: heterogeneity within a single sarcomere. *J. Cell Biol.*, **96**: 297-300, 1983.
7) 野々村禎昭・武田伸一：ジストロフィー鶏筋の構造蛋白 IEF・SDS二次元電気泳動による分析。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，114–123, 1981.
8) Toyota, N. and Shimada, Y.: Isoform of troponin in skeletal and cardiac muscle cells cultured with and without nerves. *Cell*, **33**: 297-304, 1983.

26　ウサギ胎仔骨格筋構造蛋白に対する抗トロポニンの影響

大　槻　磐　男*
研究協力者　小野山　佳　道*

骨格筋の細いフィラメントは，アクチン・トロポミオシン・トロポニンの三種の蛋白の規則的な重合体で，筋肉内では約1ミクロンの一定の長さに揃って配列している。この細いフィラメントの構造形成についてこれまで次の様な所見を得てきた。抗トロポニンのサポニン法によるニワトリ胸筋内における局在部位から，胚筋ではフィラメント長が長くまちまちであること，そして孵化後3週間以内に一定のフィラメント長に揃うことを見出した。ニワトリ骨格筋より約0.1 μ長いウサギ骨格筋細いフィラメントにおいても誕生前後に同様の変化のおこることを観察した。このように一旦長いフィラメントが形成されたのちに短縮する機序については，筋肉線維の収縮反応が重要な役割を果しているのではないかと考えられるが，未だ確証が得られる段階に達していない。

今回，我々は，細いフィラメントを形成するトロポニン三成分のうちトロポニンIとトロポニンCについて特異的な抗体を作製し，そのトロポニンに対する作用を，ATP ase Ca 感受性を指標にして，胎後期と成熟ウサギ骨格筋について比較し，細いフィラメント構造形成に伴うトロポニン三成分の分子配置の変化を議論した。

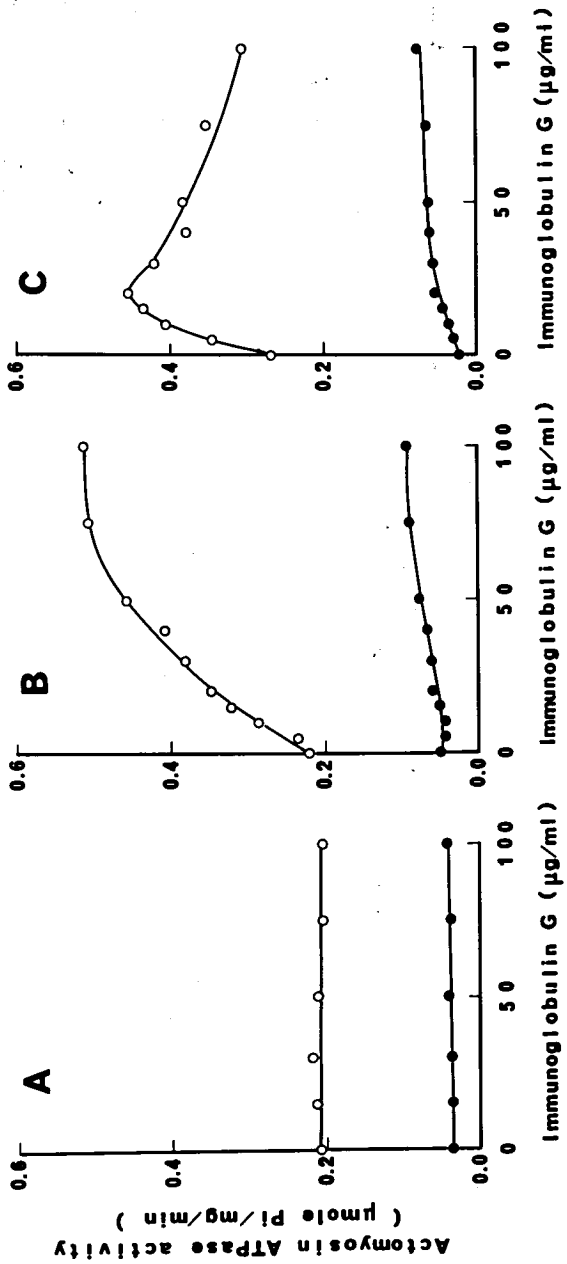
方　　法

ウサギ骨格筋から調製したトロポニンIとトロポニンCをヤギに対して免疫し，抗血清を得た。特異抗体はトロポニンC又はIのアフィニティクロマトグラフィーによって作製した。成熟ウサギ・ミオシンBは江橋の方法に従って調製した。24日及び28日目の胎仔骨格筋のミオシンBはHitchcock の方法に従って調製した。アクトミオシン ATP ase 活性の測定条件は，0.1 mg／ml ミオシンB，50mMKCl，2 mM $MgCl_2$，20mM Tris－maleate（pH 6.8）及び 4.6×10^{-5}M（又は 2.4×10^{-8}M）Ca^{2+}（1 mM Ca・EGTA buffer）中で行なった。加える抗体量は0～100 μg／ml であった。抗体を加えて25℃15分間置いたのちに2 mM ATP を加えてATP ase 反応を開始し，TCAで6分後に停止させた。そしてATP から分解放出されたリンをBaginski とZakの方法で測定した。

結 果 と 考 察

先ず，成熟ウサギ骨格筋アクトミオシン ATP ase 活性に対する抗体の作用を，高カルシウムおよび低カルシウム濃度下で測定した（図1）。コントロールIgG では，ミオシンBと同濃度の100 μg／ml まで加えても，いずれのカルシウム濃度においても，活性に影響を及ぼさなかった（図1－A）。抗トロポニンCを加えると，低カルシウム濃度での活性が1.9倍，高カルシウム濃度では2.3倍にそれぞれ上昇した（図1－B）。　いずれの場合も75 μg／ml で最大効果がみられた。抗トロポニンI抗体を加えた場合は，低カルシウム濃度では抗トロポニンC抗体の場合と同じく，濃度依存性に

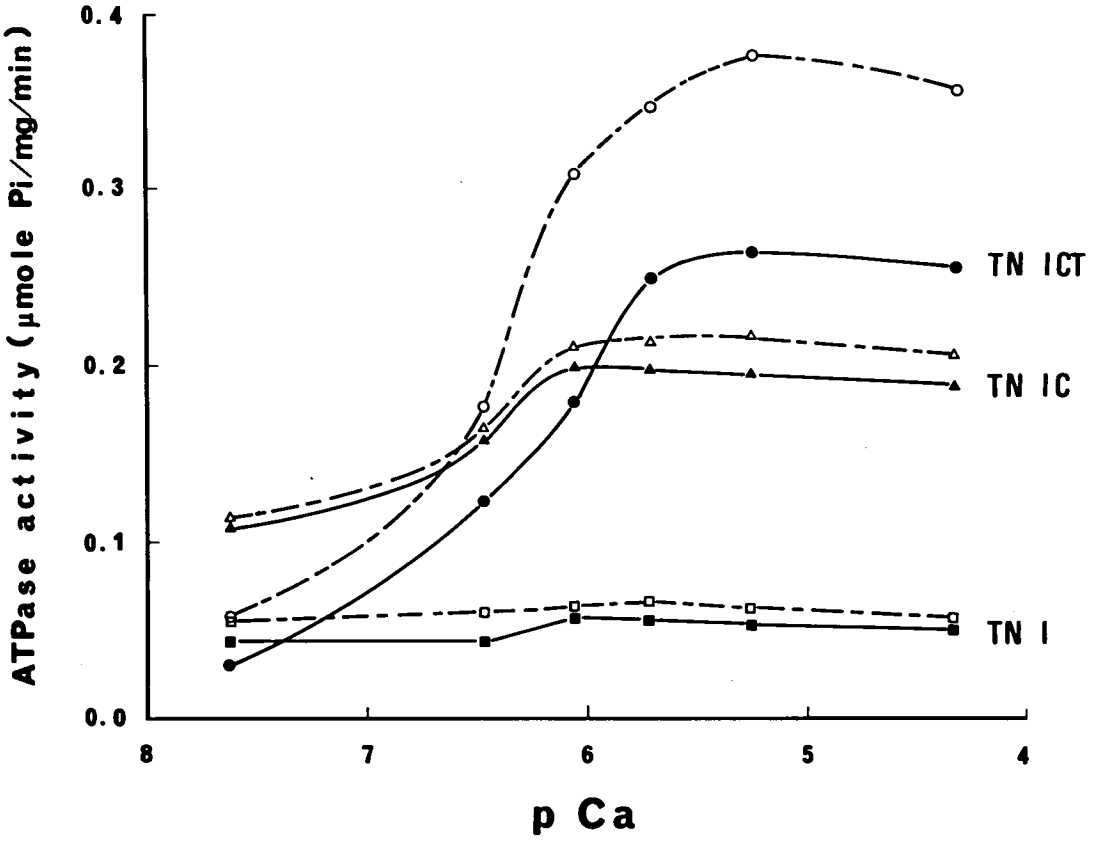
＊九州大学医学部臨床薬理学教室



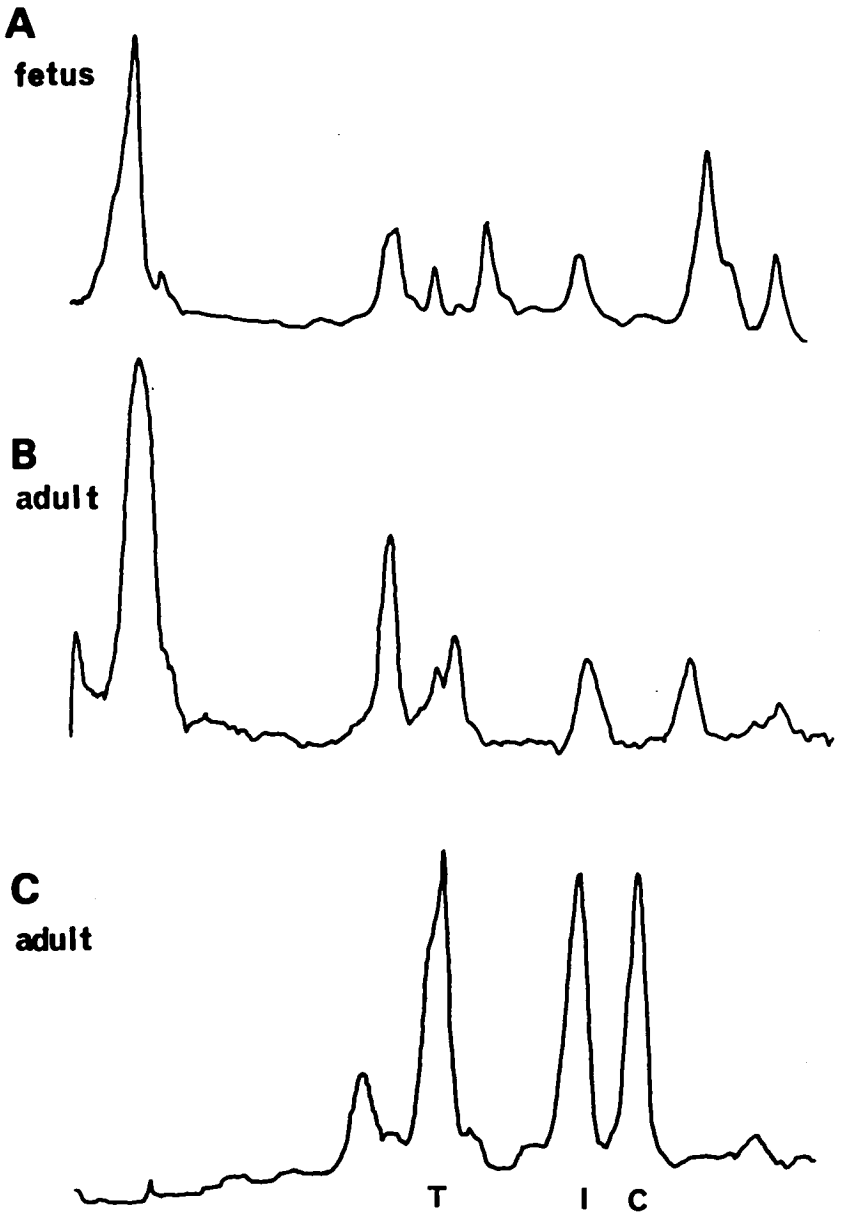
第1図　抗トロポニン抗体の成熟ウサギ骨格筋アクトミオシン ATP ase 活性に対する作用
A. コントロールIgG; B. 抗トロポニンC抗体; C. 抗トロポニンI 抗体;
○　4.6×10^{-5} M Ca^{2+}; ●. 2.4×10^{-8} M Ca^{2+}

活性の上昇を認めた（図１－Ｃ）。しかし高カルシウム濃度では二相性の反応を示した。即ち，抗体量が低濃度の場合に活性高著明に促進し，20 μg／ml で最大活性（1.7 倍）となった。更に抗体濃度を増加させると活性は却って抑制したが，100 μg／ml でも抗体非存在下より高い値を示した。但長期間保存した抗体では，高濃度下での抑制作用が弱まり，結果的には抗体量20 μg／ml 以上では一定値を示した。又，ミオシンＢに対する抗体の総合量を電気泳動にて検討したが，抗体の濃度に依存して総合量は増加しており，二相性の変化は認められなかった。

次に抗体の作用がトロポニンの一成分に対する作用のみによるのか，あるいは他成分との相互関係にも依存しているのかをみるため，トロポニンの再構成系について検討した。図２は，抗トロポニンＩ抗体を20 μg／ml 作用させた例であるが，脱感作アクトミオシン－トロポミオシンに，トロポニンＩもしくはトロポニンＩ・Ｃのみを加えた系では，カルシウム濃度にかかわらず抗体による



第２図　抗トロポニンＩ抗体のトロポニン再構成系成熟ウサギ骨格筋アクトミオシンATPase活性に対する作用
条件；0.1mg／ml 脱感作アクトミオシン，0.01mg／ml トロポミオシン，0.05mg／ml トロポニンＩ（□，■），0.05mg／ml トロポニンＩ＋0.043 mg／ml トロポニンＣ（△，▲），0.05mg／ml トロポニンＩ＋0.043mg／ml トロポニンＣ＋0.0073mg／ml トロポニンＴ（○，●）。0.02mg／ml コントロールIgG（■，▲，●），又は0.02mg／ml 抗トロポニンＩ抗体（□，△，○）存在下。

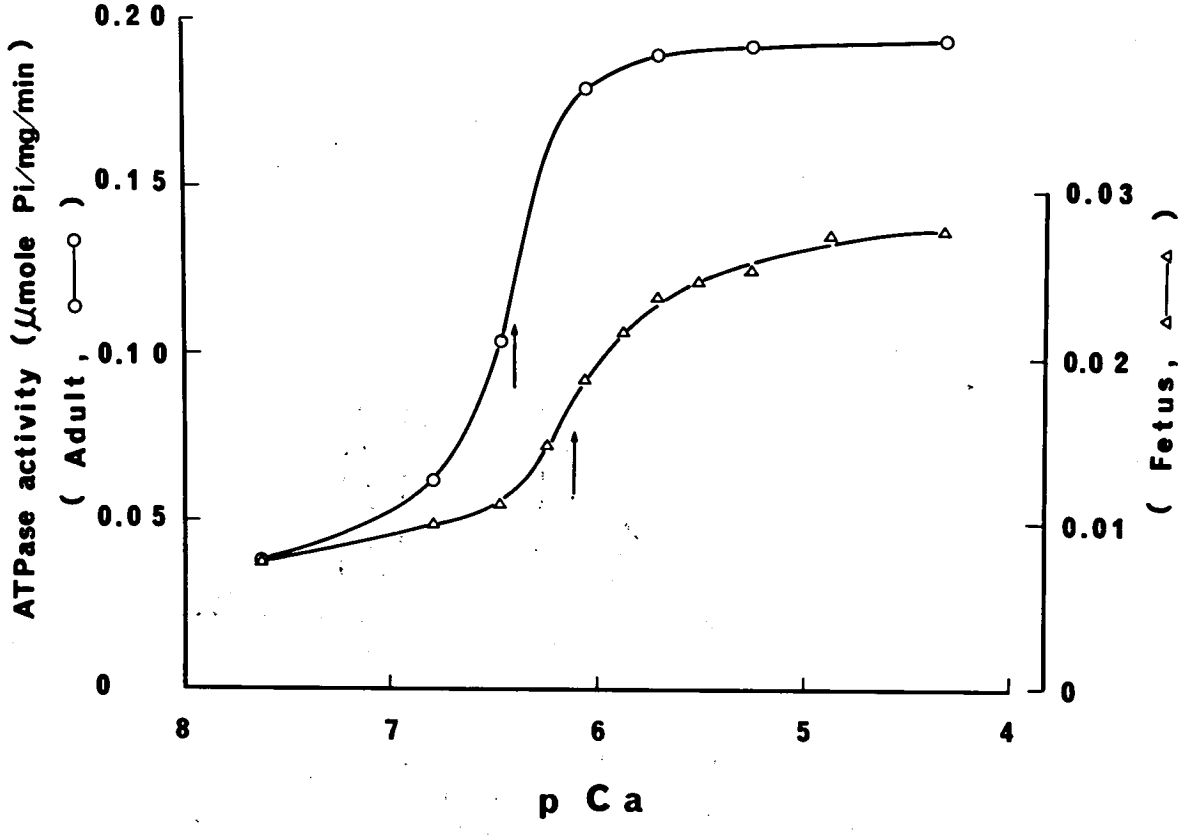


第3図　胎仔および成熟ウサギ骨格筋ミオシンBの電気泳動パタン
A，胎令28日胎仔ウサギ骨格筋ミオシンB；B，成熟ウサギ骨格筋ミオシンB；C，成熟ウサギ骨格筋トロポニン。0.1％SDS－10％ポリアクリルアミドゲル，Tris－Glycine（pH 8.8）でPorzio & Pearson の方法による。

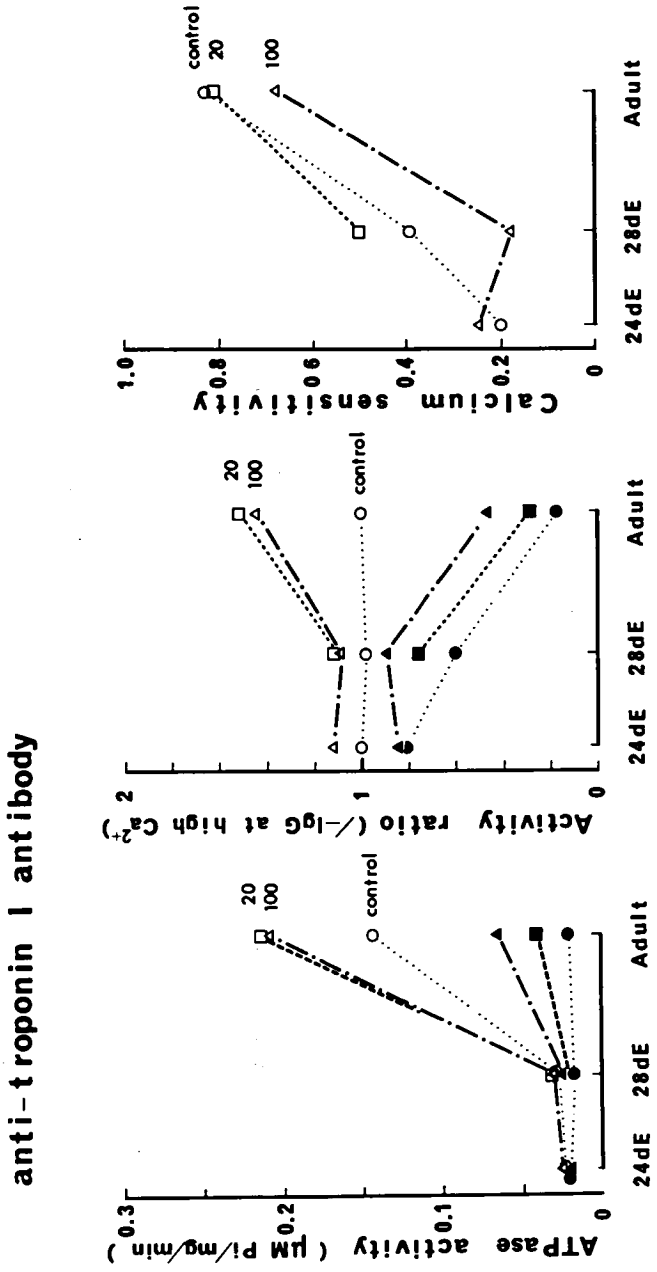
活性促進作用はわずかしか認められなかった。トロポニンⅠ・Tの系についても同様であった。そしてトロポニンⅠ・C・Tの三成分が揃った場合にだけ充分な抗体の作用が発現した。これは抗体の作用が発現するためには，Ⅰ・C・Tの三成分が一定の配置をとることが必要なことを示している。

抗トロポニンC抗体では最大効果のみられる75から100 μg／ml において，カルシウム感受性は抗体非存在下では0.78に対し，抗体存在下で0.82で殆んど変化しなかった。抗トロポニンⅠ抗体でも，抗体非存在下で0.92に対し，抗体20 μg／ml 存在下では0.89で同じく殆んど変化せず，100 μg／ml では0.75でやや低下した。

以上述べたように，高カルシウム濃度下でも抗体が存在すると活性が更に上昇すること，つまりアクトミオシンATP ase の最大活性を増強する現象は，この他にも知られている。心筋の脱感作アクトミオシンおよびトロポミオシンに，心筋のトロポニンTと骨格筋のトロポニンⅠ・Cを加えると，ATP ase 活性は高カルシウム濃度で生理的なレベルより更に促進がみられる。また骨格筋脱感作アクトミオシンに，ホヤのトロポミオシンとトロポニンを加えると，活性はトロポニン非存在下のときよりも上昇することが報告されている。これらの間には何らかの相関があると思われるが



第4図　胎仔および成熟ウサギ骨格筋アクトミオシンATP ase 活性のカルシウム依存性
△，胎令28日胎仔；○，成熟ウサギ，
矢印は50%活性時のカルシウム濃度を示す。



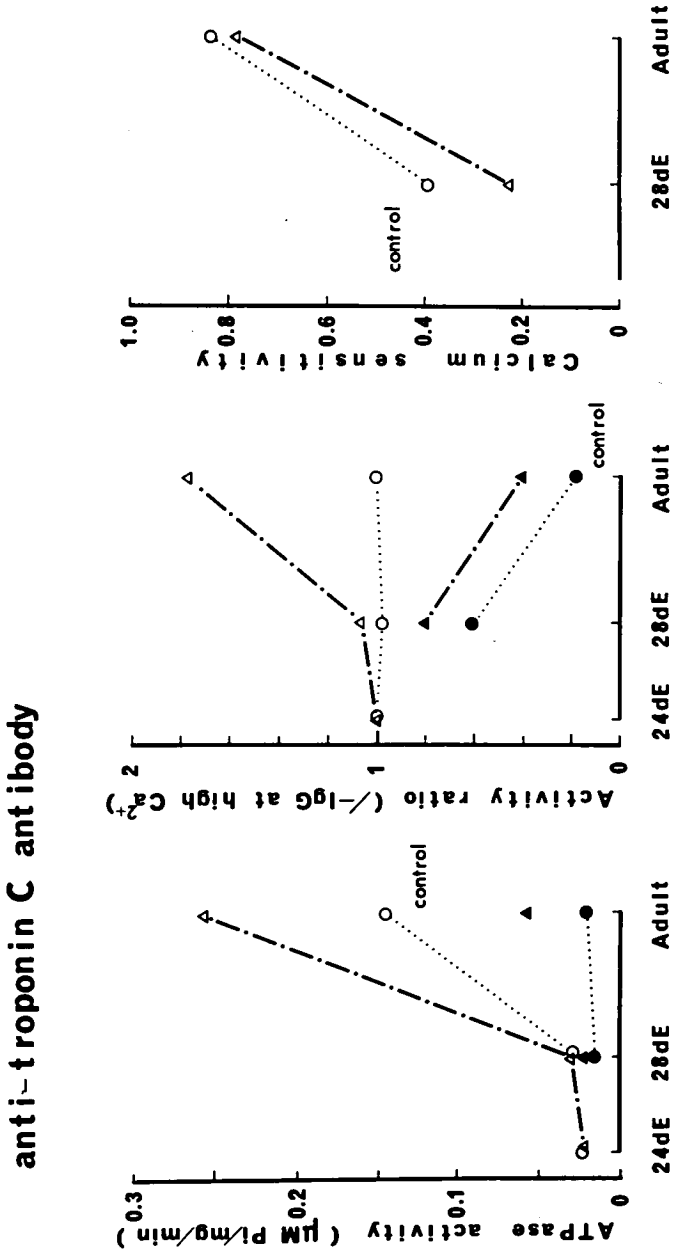
第5図　抗トロポニンI抗体のアクトミオシンATPase活性およびカルシウム感受性に対する作用

24dE，胎令24日胎仔；28dE，胎令28日胎仔；Adult，成熟ウサギ。

○，□，△，4.6×10^{-5} M Ca^{2+}；●，■，▲，2.4×10^{-8} M Ca^{2+}；Control（○，●），100（△，△），各々20 μg/ml 及び 100 μg/ml 抗トロポニンI抗体存在下。

活性比は冬時期において 4.6×10^{-5} M Ca^{2+} でIgG非存在下での値に対する比。

カルシウム感受性＝1－（2.4×10^{-8} M Ca^{2+} でのATPase活性／4.6×10^{-5} M Ca^{2+} でのATPase活性）



第6図 抗トロポニンC抗体のアクトミオシンATPase活性およびカルシウム感受性に対する作用

シンボルは図5に同じ。但し control (○, ●), 75 μg/ml コントロール IgG; 75 μg/ml 抗トロポニンC抗体

詳細は将来の問題として残されている。

抗トロポニンⅠ抗体が，高カルシウム濃度で二相性の変化を示すことは，トロポニンⅠに二種類以上の抗原性決定部位が存在し，最初に結合する抗体で活性は促進され，次に他の抗体が抑制の方向に作用することを示唆する。

次に胎仔ウサギ骨格筋に対するこれらの抗体の作用を，アクトミオシンATP ase 活性を用いて検討した。ミオシンBの抽出時間は成熟筋の場合は2時間であるが，胎令24日，及び28日の場合は約20時間とした。図3に胎令28日及び成熟ウサギ骨格筋ミオシンBの電気泳動パターンを示す。ミオシン重鎖／アクチン比は，胎仔筋で3.4，成熟筋で2.8であった。トロポニンTは成熟筋と同じ位置に認め，アクチンに対する量比も両者で同様であった。トロポミオシンは，胎仔筋ではかなり少なく，そのやや低分子側に別のピークを認めた。

胎仔筋（胎令28日）および成熟筋のアクトミオシンATP ase 活性のカルシウム依存性を図4に示す。胎仔筋ATP ase 活性は成熟筋の15から20％程度であり，50％活性を示すカルシウム濃度は成熟筋が4×10^{-7} Mに対し，胎仔筋では8×10^{-7} Mとやや高濃度を要した。

胎仔筋のアクトミオシンATP ase 活性に対する抗トロポニンⅠ抗体の作用を，成熟筋の場合と比較してみると，活性の絶対値は低カルシウム濃度では時期によってもそれ程大きくは変化しない（図5左）。一方高カルシウム濃度でのATP ase 活性は成長と伴に著明に上昇することを示している。又抗体を加えても，胎仔の場合は効果が著明でない。高カルシウム濃度でIgGを加えないときの活性値を基準にして，それにコントロールIgG，または抗体を作用させたときの活性比をみると（図5中央），コントロールIgG では影響は殆んどみられないが，抗体存在下では，低カルシウム濃度では成熟筋と同じく促進作用があり，しかも抗体量が多い程強い。しかし高カルシウム濃度での促進作用は成熟筋の場合の約$1/5$で，作用は明らかに弱い。ATP ase カルシウム感受性は，胎令24日及び28日では，成熟筋に比較すると低感受性を示した。(図5右)。抗体を加えると胎仔筋，成熟筋共にCa感受性は減弱傾向を示した。

抗トロポニンCの作用を示す（図6）。活性の促進効果はいずれのカルシウム濃度においても認められたが，その作用発現程度は成熟筋に比べると明らかに弱い。胎令24日では作用が認められなかった。カルシウム感受性は成熟筋では殆んど変化しなかったが胎仔筋では低下が抗体によって認められる。

以上のことから，抗トロポニンⅠ及び抗トロポニンC抗体の胎仔筋に対する作用は，成熟筋に比べると明らかに弱くしか発現しないと結論できる。現段階では，胎仔筋においてはトロポニンの構成成分の分子種が成熟筋のものとは異なるか，もしくは多種類のアイソフォームが混在している可能性と，トロポニン三成分の分子配置が成熟筋の場合とは異なっている可能性が考えられる。

文　　献

1) Ohtsuki, I.J. *Biochem.*, 85: 1377-1378, 1979.
2) Ohtsuki, I. *Current Research Muscular Dystrophy, Japan*, 2: 23-24, 1981.
3) Ohtsuki, I. and Onoyama, Y. Muscular Dystrophy: Biomedical Aspects (Ebashi, S. and Ozawa, E. eds.), pp. 193-200, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, 1983.
4) Toyota, N. and Shimada, Y. J. *Cell Biol.*, 91: 497-504, 1981.

27　疾患筋筋小胞体膜の機能分類に関する一考察

酒　井　敏　夫*
研究協力者　西　島　博　明*

筋構成内部膜としての筋小胞体膜は筋収縮・弛緩機構の過程でその引金となるCa^{2+}の遊離・取り込み能を持つ重要な部位である。我々はこれまで，この筋小胞体膜のCa^{2+}調節機能を各種骨格筋。疾患筋から分離し比較検討してきた。一般に筋ジストロフィー症筋ではこの筋小胞体膜のCa^{2+}調節能が低下しているといわれている。しかし，この原因については筋自身に生因が有るのか，神経又は筋接合部における神経筋伝達系機能の低下に在るかの判定は明確になされていない。

そこで，我々は温血動物（ラット，鶏）や各種ヒト筋疾患筋からの筋小胞体膜を分離し，そのCa－uptake 能を比較検討し，各々の成因による筋疾患時の筋小胞体膜の機能がどの様な変化を示すかを検討した。

材料及び方法

1.　実験動物

a）ラット下腿筋（EDL)を使用した実験

i）ラットの成長にともなう骨格筋を各週別に試料とした。[1]

ii）成熟ラット（250g）を用い座骨神経切断によって，その支配筋を各周齢別に試料とした。[2]

b）ジストロフィーチキン（New Hampshire 412. 413）の幼鶏（3～5週)及び成鶏のPLDを試料とした。

c）ヒト各種疾患筋は下腿四頭筋又は上腕二頭筋を試料とした。

2.　分離筋小胞体膜の調整

各種温血動物の骨格筋は摘出後，直ちに，15℃前後の20mM－Tris－HCl buffer (pH 6.8)で十分洗浄し，細切りした後，筋1g当り20mℓの割合量の20mM－Tris－Hcl　buffer（pH 7.2）中でテフロンホモジナイザーにて低回転でホモジネイトを行なう。10秒毎にpH 6.8～6.9 となる様にホモジネイトを行なう。このホモジネイトを粗穴テフロン綱で濾過し，濾液を遠心し，筋小胞体膜を得る。分離した筋小胞体膜（FSR）の fraction は8500～48000×Gまでの試料で有り，従来我々が用いてきたH－fruction の他に2～3割のL－fruction の混入が有る[3,4]。

3.　Ca－uptake能の測定

Ca－uptake 能は従来我々が用いている方法によった。[5] 反応溶液条件は0.1M Kcl, 3mM $Mgcl_2$, 20mM Tris－maleat　buffer　pH6.8, 1mM ATP, 90～120μmoles $CaCl_2$ とした。実験は millipore filter 法[6] によった。また，FSR内 ^{45}Ca－Ca量は液体シンチレーションにて，FSR内及び反応液中のCa量は原子吸光法によって測定した。

結果と考察

温血動物のFSRの調整は冷血動物とは異なり分離操作中の液性変化が著しく，特に数百ミリグラムの筋から得られた試料では，L－fruction の混入が有る事，そのCa－uptake能はH－fruction

＊東京慈恵会医科大学第二生理学教室

のみの場合より遅延する傾向を示した。従って，本実験では ATP 添加後60秒以内に最大Ca−uptake 量を示し，その 1/2の時間で最大量の80%程度の Ca量を取り込むこと，最大 Ca量は2分前後は一定値を保つこと，最大値を示した後，1 mM caffeine で最大量の 7〜8%程度のCa^{2+}量を遊離すること，以上の四点を満足するCa−uptake 能を示す FSR を正常 FSR とした。

温血動物骨格筋の筋機能は加齢にともなって変動する事は良く知られている。従って，FSR の Ca−uptake 能も加齢によって変動する事が考慮されねばならない。そこで，加齢にともなうFSR の Ca−uptake 能の変動をラットを用いて実験した[1]。その結果，幼若ラット骨格筋の FSR では，成熟ラット骨格筋FSRの Ca−uptake 能に比較して，初期の Ca−uptake 能及び最大 Ca量もともに，平衡的に低値を示していた。また，caffeine による FSR内Ca^{2+}の遊離は成熟ラットFSR と同程度か，または，わずかに低い程度であった。

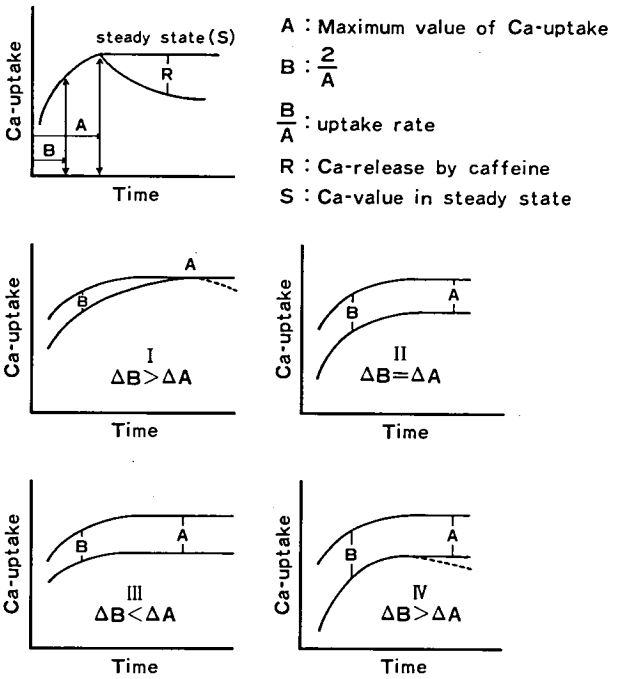
一方，筋ジストロフィーチキンの PLD筋からの FSRのCa−uptake能を測定した結果，幼若鶏からの FSR の Ca−uptake 能は，その初期において著明な抑制を示すが最大量は正常鶏 FSR と同程度の Ca 量にまで達した。またジストロフィーの進行した成鶏の FSR では Ca−uptake 能初期での抑制と，最大 Ca量の抑制が示されていた。ジストロフィーチキンでは幼若鶏，幼熟鶏からの FSRのいずれもが caffeine による Ca−release は正常鶏 FSR に比し著明であった。

ラットの除神経による支配筋の萎縮はその期間の延長によって進行し，支配筋からのFSRの Ca−uptake 能は抑制される事が知られている[2]。この除神経筋の FSRのCa−uptake能は除神経の初期過程では Ca−uptake 初期における抑制と最大 Ca 量の平衡的な低下が示された。しかし，除神経の進行と共に Ca−uptake 初期における抑制よ

		Ca-uptake	Ca-release	
			S	R
		型		
1. 幼若筋(Rat)		II	±	±
2. 筋ジスチキン	幼鶏	I	±	+
	成鶏	IV	+	++
3. 除神経筋	1 W	II	±	±
	4 W	II	±	−
	8 W	III	±	−−
4. 筋無力症	A	II	±	±
	B	III	±	−−
5. 甲状腺機能亢進症		II	±	±
6. 周期性四肢麻痺		I	±	+
7. DMP	A	IV	+	+
	B	IV	+	++

(図1)

図1 • Ca−uptakeの型は図2中のI〜IV型の分類から判別した。
• Ca−releaseはS; caffeine なしで steady state における Ca−releaseを示した。
R; caffeine (1mM) 添加による Ca−release を示した。



（図２）

りも，最大Ca量の低下が著しくなり，また，caffeineによるCa－release は抑制される。すなわち，除神経筋FSR は幼若筋FSR と同傾向のCa－uptake 能を示すが，caffeine に対するCa－release 能が著しく異なる事から，除神経によるFSR 膜内構成成分の変化が予測される。

ヒトの各種疾患筋からの FSR の調整に際し，我々はラットの加齢にともなうFSRのCa－uptake 能が変動する事実[1]を参考にして，対照疾患患者と，同年令，同体重の筋疾患のないヒト骨格筋FSR を用い，正常対照 FSR とした。

神経原性の筋疾患とされる筋無力症と診断された46才の男性（図1-4A）の大腿四頭筋からのFSRでは初期Ca－uptake 能と最大 Ca 量が平衡的に抑制される，幼若鶏と同様なCa－uptake 能を示したが，caffeine によるCa－release量は極めて低値であった。また全身型筋無力症と診断された29才の男性の大腿四頭筋からの FSR では，図１中の除神経筋８週ラット下腿筋の FSR と同様なCa－uptake 能を示していた。また，caffeineによるCa－release は示されなかった。

一方，甲状腺機能亢進症と診断され，下腿筋の萎縮が示された46才の女性では筋無力症と診断された筋の FSR と同様なCa－uptake 能を示していた。また，低K^+血漿性の周期性四肢麻痺と診断された24才の男性の下腿四頭筋からの FSR では正常 FSR と比較してCa－uptake 初期に抑制されるが最大 Ca 量は正常であった。

筋原性疾患とされている Duchenne 型筋ジストロフィーと診断された７才男児（図1-7A）及び６才男児（双生児 図1-7B）の上腕二頭筋から分離した FSR ではジストロフィー成鶏筋から得られた FSR と同様なCa－uptake 能を示し，Ca－uptake 能初期の強い抑制と最大量の低下が示され，また caffeine によるCa－release の亢進を認めた。

以上の実験結果から，我々は各種疾患筋FSRのCa－uptake 能を基本的な四つのパターンに分類してみた。この四つの基本的パターンに改めて本実験結果を適用すると図２に示した様になった。この

結果から我々は神経原性に由来するとされる萎縮からのFSRのCa−uptake能はⅡ型又はⅢ型に分類された。すなわち，疾患初期又は筋萎縮初期ではCa−uptake初期，及び最大Ca量の抑制が示され，萎縮の進行した筋では最大Ca−uptake量の著明な低下が示される。またcaffeineによるCa−releaseは萎縮の進行と共に低下した。一方，筋原性疾患とされ筋からのFSR Ca−uptake能は図1中のⅠ型又はⅣ型に分類された。すなわち，初期Ca−uptakeの抑制のみが示される型(Ⅰ型)と，最大Ca−uptake量の抑制も示される型(Ⅳ型)であり，最大Ca量を示した後に，Ca−releaseと想定されるFSR内Ca量の減少が示される。また，caffeineによるCa−releaseが亢進している事から，我々はCa−induced Ca−releaseが正常FSRよりも引き起こされやすい条件が具っているものと考えた。

文　献

1) Ogino, U. Takahashi, A. and Nishijima H. Developmental changes in the function of fragmental sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle of rat. *Jikeikai Med. J.* **30**: 335-345, 1983.
2) Nishijima H. Nagano. T. and Imai T. The changes of ca-uptake on fragmented sarcoplasmic reticulum from the denervated and innervated muscle or rat. In preparation.
3) Sakai. T. and Nishijima, H.: Changes in the amount of ca-uptake and protein and lipid composition on sarcoplasmic reticulum from denervated rat and dystrophic chicken muscles muscular dystrophy (Biochemical aspects) Ed. Ebashi. S. and Ozawa E. *Japan Sci. Soc. Press Tokyo/Springer-Verlag, Berlin* 177-183, 1983.
4) Nishijima, H., Shiba, R., and Ogino, U.: The method for the preparation of fragmented sarcoplasmic reticulum from small pieces of leg skeletal muscles of rat. *Jikei Med. J.* **25**: 287-290, 1978.
5) Nishijima, H., Ito, U., and Kuriyama, H.: On the ability of ca-uptake in the fragmented sarcoplasmic reticulum extracted from the guinea pig masticatory muscles. *Proc. Jpan. Acad.* **49**: 367-371, 1973.
6) Nishijima, H.: The passive ca-bound to the millipore filter membrane and fragmented sarcoplasmic reticulum. *Jikeikai Med. J.* **22**: 267-275, 1975.

Ⅶ プロテアーゼ

28. サル骨格筋カテプシンBの精製と性質 159

29. 内在性チオールプロテアーゼインヒビターの構造と活性発現機構 164

30. ブピバカイン(マーカイン)による急性筋崩壊の機序 169

31. m－CANPと天然型μ－CANPとの比較研究 173

32. 筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデルにおける酵素網の比較 177

33. 幾つかの筋神経系異常マウスに於けるアルカリプロテアーゼ活性の変化 182

28　サル骨格筋カテプシンBの精製と性質

高　橋　健　治*
研究協力者　平　尾　哲　二*　原　　薫*

筋組織中に存在するプロテアーゼの精製と性状の検索は，筋ジストロフィー症等の筋組織病態の成因を追究する上で基礎的に重要である。筋組織の蛋白質の分解には，非リソゾーム系プロテアーゼであるCa^{2+}依存性中性プロテアーゼ(CANP)等とともに，リソゾーム系のプロテアーゼ，とくにカテプシンB，L等が重要な役割を果たしていると考えられる。カテプシンBに関しては，従来主にラット肝臓起源の酵素等について詳しい研究がなされている[1]が，筋組織のカテプシンBの精製と性質に関する研究は意外に少なく，ラット骨格筋酵素の精製と性状の一部の報告[2,3]がある程度である。そこで，ヒトに近いサルの筋組織のカテプシンBを精製し，その諸性状をくわしく比較検索しておくことは基本的に重要であると考え，本研究[4]では，ニホンザル骨格筋を用いて実験を行なった。

実験材料および方法

カテプシンBの精製―― ニホンザル骨格筋(1.3 kg)を3ℓの0.1M酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）－1mM EDTA－1mM 2－メルカプトエタノール中でホモジナイズした後，10,000×g，15分間の遠心で粗抽出液を得る。硫安分画（pH 5.5，40～70%飽和）で生じる沈殿を集め，0.02M酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0)－1mM EDTAに透析した後，CM－32セルロースカラム（3×35cm）によるクロマトグラフィーを行なう。1.5M NaCl附近で溶出する活性分画を集め，再クロマトグラフィーを行なった後，セファデックスG－75カラム（1.5×125cm）で2回ゲルろ過する。最後に活性分画を有機水銀セファロースカラム（1×8cm）によるアフィニティークロマトグラフィーにかけ，50mM 2－メルカプトエタノールで溶出される分画を集める。

酵素活性の測定―― Barrett の方法[5]を一部改変して用いた。すなわち，Z－phe－Arg－MCAを基質に用い，8mM L－システインおよび4mM EDTA存在下，pH6.0で37℃，10分間反応を行ない，遊離されるアミノメチルクマリンを蛍光分光光度計により測定する（励起波長，380nm；測定波長，460nm）。

蛋白質およびペプチドへの作用―― 0.1M酢酸ナトリウム緩衝液－1mM EDTA－2mM ジチオトレイトール中，種々のpH（3，4，5および6）で37℃，6時間反応させ，蛋白基質の場合はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で，またペプチド基質の場合はTSK－ゲルLS－410Kカラム（4×250mm）を用いる逆相系高速液体クロマトグラフィーにより反応混合物を分析した。

実　験　結　果

表1にカテプシンBの精製の結果を示した。この方法により粗抽出液から約11,000倍精製された標品が得られた（収率，13.1%）。精製標品はSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一バンドを与え，セファデックスG－75カラムでのゲルろ過法で分子量24,000を与えた。Z－Phe－Arg

*京都大学霊長類研究所生化学研究部門

第1表 サル骨格筋カテプシンBの精製

ステップ	容量 (ml)	全蛋白量 (mg)	全活性 (m単位)	比活性 (m単位/mg)	活性収率 (%)	精製度 (倍)
粗抽出液	2,750	68,750	4,675	0.068	100	1
硫安分画	450	35,100	3,690	0.105	78.9	1.54
CM－32 (1st)	1,180	1,326	1,758	1.33	37.6	19.6
CM－32 (2nd)	494	375.4	1,151	6.92	24.6	102
セファデックスG－75 (1st)	30	6.30	875	122	18.7	1,790
セファデックスG－75 (2nd)	40	3.20	928	290	19.8	4,260
有機水銀セファロース4B	30	0.81	611	754	13.1	11,100

出発試料：1.3 kg

第2表 カテプシンB活性に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の影響。
酵素と阻害剤は活性測定前に20℃で60分間インキュベートした。

阻害剤	最終濃度 (mM)	阻害度 (%)
E－64	1	100.0
ヨード酢酸	1	99.7
TLCK	1	95.2
TPCK	1	95.6
pCMB	1	71.2
p－クロルメルクリフェニルスルホン酸	1	58.7
N－エチルマレイミド	1	18.1
ロイペプチン	0.1	100.0
アンチパイン	0.1	97.8
キモスタチン	0.1	97.0
ペプスタチン	0.1	0.0
DFP	1	7.2
大豆トリプシンインヒビター	0.001	2.1

－MCAに対する最適pHは6.5であり，活性発現に還元剤の存在を必要とした。還元剤の効果は，ジチオトレイトール＞システイン＞2－メルカプトエタノール＞還元型グルタチオンの順序であり，2mMシステイン存在下での活性を100％とすると，還元型グルタチオンでは2mMで10.2％，0.2mMで3.3％であった。表1には種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を示してある。活性はヨード酢

Leu-enkephalin

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu

S (55%)

I (15%)　III (23%)

II
(t)

β-Neoendorphin

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro

III (33%)　II (89%)

IV (22%)　I (21%)

α-Neoendorphin

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys

S (73%)

III (10%)

II (9%)　I (17%)

Dynorphin(1-13)

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys

II (82%)　I (100%)

Substance P

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2

I (15%)　V (35%)　IV (42%)　III (65%)

II (57%)　VI (47%)

第1図　種々の神経ペプチドに対するカテプシンBの作用。
各ペプチドの下に生成したペプチド断片とその収率が示してある。

酸，TLCK，TPCK，アンチパイン，キモスタチン，ロイペプチン等のチオールプロテアーゼ阻害剤で強く阻害された。また，pCMB，P－クロルメルクリフェニルスルホン酸は中程度の阻害作用を示したが，N－エチルマレイミドの阻害作用は弱かった。また，エポキシコハク酸誘導体により強く阻害され，50%阻害濃度はE－64，NP－176（R，R），NCO－700でそれぞれ1.2×10^{-8} M，1.2×10^{-6} M，3.5×10^{-5} Mであった。

種々の蛋白質に対する作用を調べたところ，カゼイン，アゾカゼイン，ヘモグロビン，ウシ血清アルブミンにはほとんど作用しなかった。ウサギ骨格筋ミオシンには作用し，H鎖が分解されて分子量のやや低い分解産物を生じたほか，L_2鎖が分解を受けた。ミオシン分解の最適pHは4－5であった。一方，ニホンザル骨格筋ミオフィブリルに作用させたところ，ミオシンH鎖とアクチンの分解が認められ，分解はpH 4－6でも起こったが最適pHは3付近であった。α－アクチニンは分解されなかった。

また種々の神経ペプチドを基質に用いてそれらの分解活性を調べたところ，図1に示したような結果が得られた。すなわち，多くの場合，カテプシンBはジペプチジルカルボキシペプチダーゼ活性によりC末端からジペプチドを順次遊離するように作用したが，一部エンドペプチダーゼ活性をも示すようであった。なお，本カテプシンBはArg－MCAには作用しなかった。

考　　察

以上サル骨格筋カテプシンBについて得られた結果を他動物あるいは他組織由来のカテプシンBと比較すると，それらの性状には微妙な相違はあるが基本的には非常に類似しているということができる。これは，リソゾーム酵素であり，比較的限定された生理的機能を持つ酵素であることを考えれば当然ともいえる。本実験では，骨格筋カテプシンBがプロテアーゼ基質として通常用いられるカゼインやヘモグロビン等にはほとんど作用しないにもかかわらず，同じ骨格筋由来のミオシン等の筋蛋白には作用することが示されており，この結果は，骨格筋カテプシンBが筋組織中で筋蛋白の分解に実際に関与しうることを示していよう。ミオシンやミオフィブリルへの作用の最適pHが酸性側にずれているのは，酸性pHで筋蛋白のコンホメーション変化が起こり，酵素作用を受けやすくなるためと解釈される。

カテプシンB活性の発現には還元剤の存在が必要であり，その効果は，サル心筋m－CANPの場合[6]と類似している。組織中の還元型グルタチオン濃度が平均数mMのオーダーであり，一方この濃度ではカテプシンB（m－CANPも同様）は完全に活性化されないことを考えると，組織内の還元型グルタチオン濃度がこれらのチオールプロテアーゼの活性調節に関与している可能性も考えられる。また，各種プロテアーゼ阻害剤の効果は心筋m－CANPの場合[6,7]と定性的にみてかなり類似している。一方，基質特異性の面からみるとm－CANPはミオシンも分解するが，カゼイン分解活性もあり[6]，また各種の神経ペプチドに対してエンドペプチダーゼとして作用する[8]。したがって，カテプシンBの活性部位チオール基の反応性はm－CANPとかなり類似しているが，特異性決定に関与する基質結合部位の性状は両者でかなり異なっているものと推定される。なお，E－64に対する感受性はカテプシンBはm－CANPよりも高く，パパインと同程度であった。

本精製酵素はアゾカゼインやArg－MCAに作用しないことから，同じリソゾーム系チオールプロテアーゼであるカテプシンLおよびHの混入はないと考えられる。今後，筋組織におけるカテプシンL，H等他のリソゾームプロテアーゼの精製と性状の比較解析が必要である。また，これらの酵素に対する内在性インヒビターの性状の比較検索も重要な課題となろう。

文　　献

1) 勝沼信彦：リソゾームチオールプロテアーゼの構造・機能・活性調節，生化学，55: 77-89, 1983.
2) Schwartz, W.N. & Bird, J.W.C.: Degradation of Myofibrillar Proteins by Cathepsins B and D, *Biochem. J.*, 167: 811-820, 1977.
3) Hardy, M.F. & Pennington, R.J.T.: Separation of Cathepsin B1 and Related Enzymes from Rat Skeletal Muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, 577: 253-266, 1979.
4) Hirao, T. & Takahashi, K.: Purification and Chracterization of Cathespin B from Monkey Skeletal Muscle, *J. Biochem.*, 95: 1984, in press.
5) Barrett, A.J.: Fluorometric Assays for Cathepsin B and Cathepsin H with Methylcoumarylamide Substrates, *Biochem. J.* 187: 909-912, 1980.
6) Hara, K., Ichihara, Y., & Takahashi, K.: Purification and Characterization of a Calcium-Activated Neutral Protease from Monkey Cardiac Muscle. *J. Biochem.*, 93: 1435-1445, 1983.
7) Hara, K. & Takahashi, K.: Inhibition of calcium-activated neutral protease of monkey cardiac muscle by epoxysuccinic acid derivatives. *Biomed. Res.*, 4: 121-124, 1983.
8) Hirao, T., Hara, K., & Takahashi, K.: Degradation of Neuro-peptides by Calcium-Activated Neutral Protease. *J. Biochem.*, 94: 2071-2074, 1983.

29 内在性チオールプロテアーゼインヒビターの構造と活性発現機構

勝 沼 信 彦*
研究協力者 木 南 英 紀* 若 松 延 昭*

はじめに

筋ジストロフィー症における筋タンパクの崩壊とリソゾームのチオール性プロテアーゼ群との関連を追求している。ジストロフィーハムスターの大腿四頭筋においてカテプシンB＆Lの活性が著明に増加すると共に，内在性インヒビターも平行して増加していることを見い出し，昨年度報告した[1]。その後，内在性インヒビターの酵素化学的な検索により，インヒビターは2つのシスティン残基の中，分子表面の1つのSH残基が複合ジスルフィドを形成したり，S－S結合を介して2量体を形成すると不活性となり，システィン残基が遊離であると活性であることがわかった。さらに，このチオールプロテアーゼインヒビター（ここでは肝型インヒビターと呼ぶ）とは別に，もう一種類のチオール性プロテアーゼインヒビターが存在することを明確にした。肝型インヒビターの活性調節機構と2種類のインヒビターの諸性質について報告する。

実験材料と方法

肝型TPIの精製は木南らの方法[2]により，ラット肝より，皮膚型TPIは武田らの方法[3]でラットの皮膚上皮細胞より，それぞれ精製した。インヒビターの活性はパパインに対する阻害で測定し，活性の表現は木南らの方法[2]に従った。

＊徳島大学医学部酵素研・酵素化学

結　　果

1. 肝型インヒビターの構造

ラット肝より精製したチオールプロテアーゼインヒビターの一次構造を決定したところ，98残基からなり，アミノ末端の配列はAc－Met－Met－cysと非常に特有なものであった[4]。2個のシスティン残基はcys－3とcys－64に存在した。

2. 肝型TPIの多様性

肝臓のホモジネートの10万×g遠心上清をカルボキシメチル化したパパインをリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィーを行った後，セファデックスG－75のカラムクロマトグラフィーを行うと，2つの阻害ピークが得られた。先に溶出してくるピークは分子量24,000で，SDS存在下，非存在下のPAGEで共に1本のバンドを示す。しかし，SDS－PAGEで還元剤があると12,000，ないと24,000であり，S－S結合を介した二量体と考えられた。後に溶出してくるピークは分子量12,000で，SDS－PAGEでは1本のバンドを示し，分子量は12,000であったがNormal PAGEでは2本の蛋白バンドを示した。これをDEAE－セルロースで分離し，溶出順に従い，TPI－1及びTPI－2と名づけた。

3. 肝型TPIの3型の諸性質

TPI－1はシスティン，ジチオスレイトールなどの還元剤を加えてもNormal－PAGE上の移動度の変化はなく，還元剤の存在，非存在にかかわらず，カテプシンHと複合体を形成する（図－1－A）。TPI－2は還元剤の添加でTPI－1に変

表1 肝型インヒビターと皮膚型インヒビターの諸性質の比較

Properties	TPI-L	TPI-S
Mr. W	11,000	11,000
pI	5.1 (4.9, 4.7)	5.1
Cysteine content	2	0
Inhibition spectra	ID_{50}(μg)	
Papain (3.7 mU)	0.11	0.07
Ficin (4.7 mU)	0.35	0.28
Cathepsin L (3.8 mU)	0.43	0.19
Cathepsin B (4.4 mU)	0.63	10.0
Cathepsin H (4.7 mU)	0.25	1.73
Cathepsin C (3.6 mU)	0.97	10.4
Immunological properties	no cross reaction	
Distribution	ubiquitous	skin, G-1 tract

換し，複合体の形成能を回復する。還元剤なしでは複合体を形成しない（図－1－B)。二量体のインヒビター（TPI－D）も還元剤なしでは複合体の形成能がなく，還元剤の添加によって，はじめて活性をもつ（図－1－C)。

TPI－2は分子表面のシスティン残基（cys－3）が負の電荷をもつチオール化合物と複合ジスルフィドを形成していることが，次のような実験事実より明らかになった。

1) 還元後，グアニジン非存在下でカルボキシメチル(CM)化すると1個／モルのS－CM－システィンが，グアニジン存在下では2個／モルが検出された。

2) 還元剤存在下で過剰のジスルフィドであるシスタミン（塩基性），ホモシスチン(中性)，GSSG（酸性）を加えると，複合ジスルフィドを形成し，それぞれ等電点の異なった電気泳動的移動度を示す。

3) TPI－2を還元後〔^{3}H〕－GSSGと反応させると，インヒビター分子に放射活性は取り込まれ，還元剤とのインキュベートで，放射活性は追い出される。

4) 肝型インヒビターは98のアミノ酸残基からなり[4]，2個のシスティン残基（cys－3，cys－64)を含むが，複合体形成に関与するのはcys－3であることを明らかにした。変性剤存在下及び非存在下でCM化（アイソトープを用いて）後，CNBr 消化し，消化物をセファデックスG－25で分けて，放射活性を測定することにより証明した。メチオニンがN末端より1，2及び10番目に含まれるこ

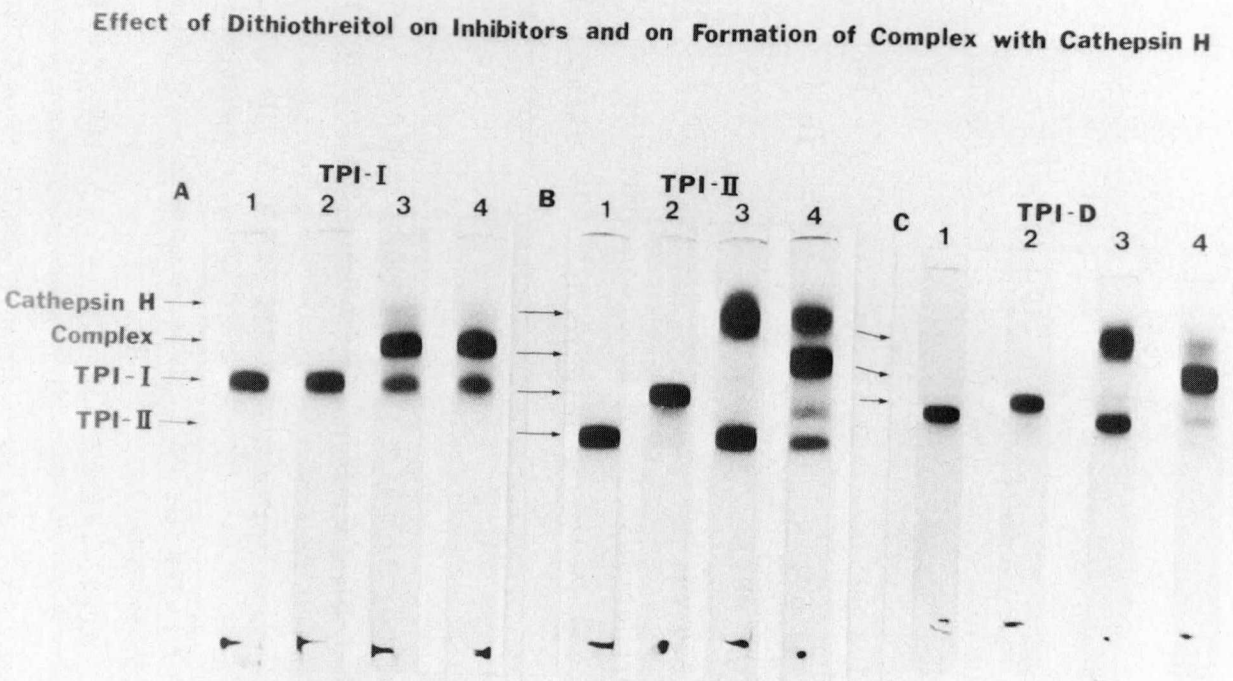


図1　チオールプロテアーゼインヒビター３型に対するジチオスレイトール（ＤＴＴ）の添加効果。 lane－１はインヒビターのみ， lane－２はインヒビター＋ＤＴＴ， lane－３はインヒビター＋カテプシンＨ， lane－４はインヒビター＋ＤＴＴ＋カテプシンＨ

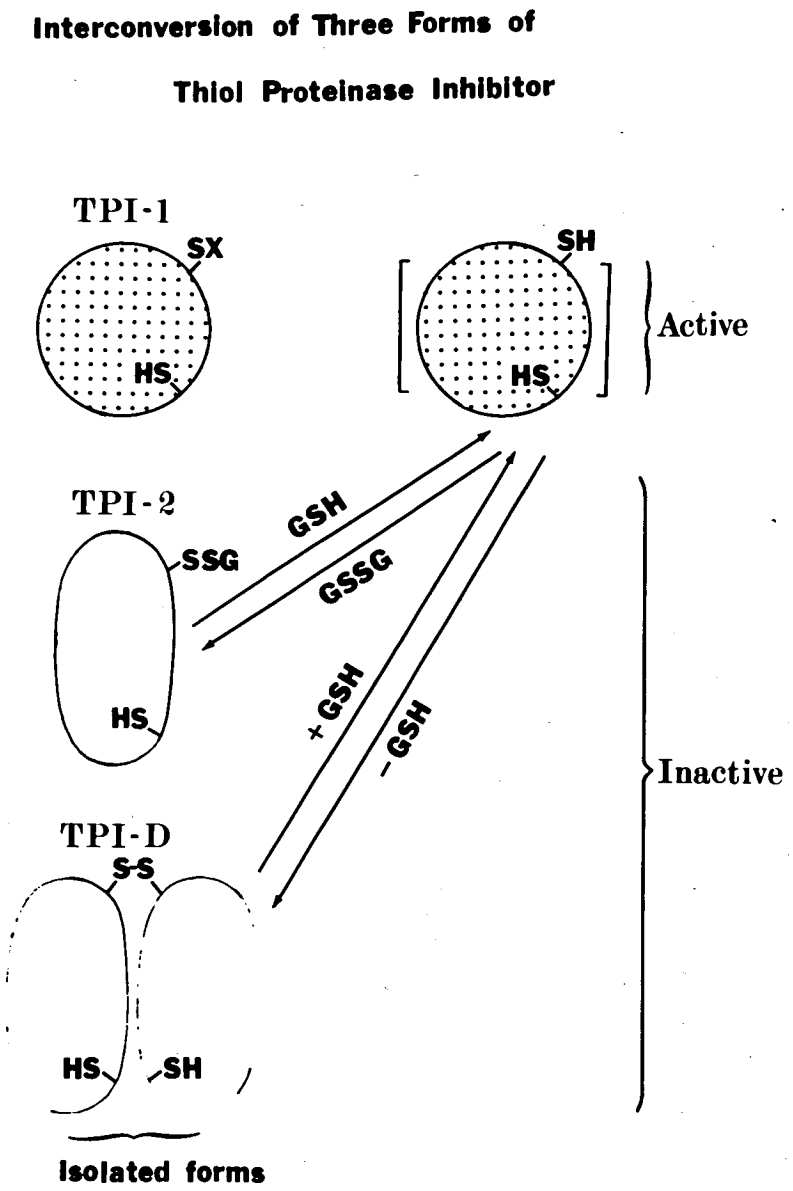


図2 チオールプロテアーゼインヒビター3型のシステイン残基の酸化・還元状態の修飾による相互変換と活性調節

とを利用した。

TPI－1のcys－3は還元剤とインキュベートしても遊離のSH基は露出さず，CM化もされない。従って複合ジスルフィドを形成してないことは確かであり，cys－3を含むアミノ末端が切除されている可能性もアミノ酸分析より否定されている。今までに得られた情報を元に，3つの型のTPIの相互変換と活性調節を図2に模式的に示す。合成されたインヒビターはcys－3が遊離の活性型と考えられるが，組織内のチオール剤（とくにGSH）が除かれる段階で，3つの型が生じたと思われる。従って，細胞内GSH／GSSG比がインヒビターの活性調節に重要な役割を荷っていると想像される。

3. 肝型インヒビターと皮膚型インヒビターの比較

チオールプロテアーゼのインヒビターは，いろいろの組織より精製されてきたが，その異同は，はっきりしなかった。我々はラットの皮膚上皮よりインヒビターを精製し，その性質を肝のものと比較した。分子量はともに11,000で，等電点は5.2で肝のTPI－1と一諸であった。アミノ酸分析でとくに注目すべきことは，肝TPIが2残基のシスティンを含むのに対し，皮膚TPIは全くシスティンを含まないことである。従って，上記の肝TPIにみられるシスティン残基の修飾を介する活性調節は皮膚TPIにはなく，常に活性である。阻害のスペクトルに対しても大きな差があり，エクソペプチダーゼ性の強いカテプシンB，Hを肝TPIがよく阻害するのに対し，皮膚TPIは殆んど阻害しない。エンドペプチダーゼ作用の強い，カテプシンL，パパインなどは両者ともよく阻害する。又，両者は免疫学的に全く異なり，組織の分布も大いに異なっている。

考　　察

肝TPIは肝臓の細胞分画的手法によって細胞質に存在することが確かめられている。しかし，形態学的手法による確認は行なわれていない。又，肝TPIは広く組織に分布するが，肝以外での組織での細胞内局在は不明である。カテプシンと局在を異にするとすれば，どのようにしてTPIが阻害因子として働くか現在のところ明らかでない。もし両者が作用する時には，GSHなどのチオール剤が必要であることを示した。TPI－2からTPI－1への完全な変換には2mMのGSHが必要だが，肝では，GSHはmMオーダーレベルであるのでインヒビターは常に活性型であろう。骨格筋でのGSHレベルは1オーダー低いという結果を得ており，プロテアーゼとインヒビターの反応には1つの調節因子となるかもしれない。

ラット骨格筋のホモジネートのカテプシンB，肝TPI，皮膚TPIの量を酵素抗体法により測定すると，それぞれ2.1，3.0，0.01 μg/g tissueという値が得られた。カテプシンBと肝TPI量はほぼ匹適するが，皮膚TPIは極めて少ない。この骨格筋のカテプシンBの量は肝の1/70であり，骨格筋はリソゾームが少なく，リソゾームのプロテアーゼも少ないことを示している。

文　　献

1) 勝沼信彦：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：筋の発生と分化に関する基礎的研究（江橋班）57年度研究報告書，pp. 145-148. 1982.
2) Kominami, E., Wakamatsu, N., & Katunuma, N.: *J. Biol. Chem.* 257: 14648, 1982.
3) Takeda, A., Kobayashi, S., /& Samejima, T.: *J. Biochem.* 94: 811, 1983.
4) Takio, K., Kominami, E., Wakamatsu, N., Katsunuma, N., & Titani, K.: *Biochem. Biophys. Res. Commum.* 115: 902, 1983.

30 ブピバカイン（マーカイン）による急性筋崩壊の機序

杉田秀夫*
研究協力者 石浦章一* 藤田武久*
埜中征哉* 高木明夫*

はじめに

筋タンパク質の分解活性亢進が特徴である筋ジストロフィー症に代表される壊死性筋崩壊の機構を明らかにする目的で，新しい実験モデルを開発した。

実験

ラットヒラメ筋に，局所麻酔薬である塩酸ブピバカイン（マーカイン，0.5％溶液）を筋注することによって急性筋崩壊を惹起させた。[1)2)3)] この方法により，筋崩壊は2日目には最大となり，以後徐々に再生し，1ケ月後には完全にブピバカイン投与前と同じ像を呈した。

シクロヘキシイミドは，ブピバカイン投与と同時に腹腔内に1ml（2mM/生食）注入した。

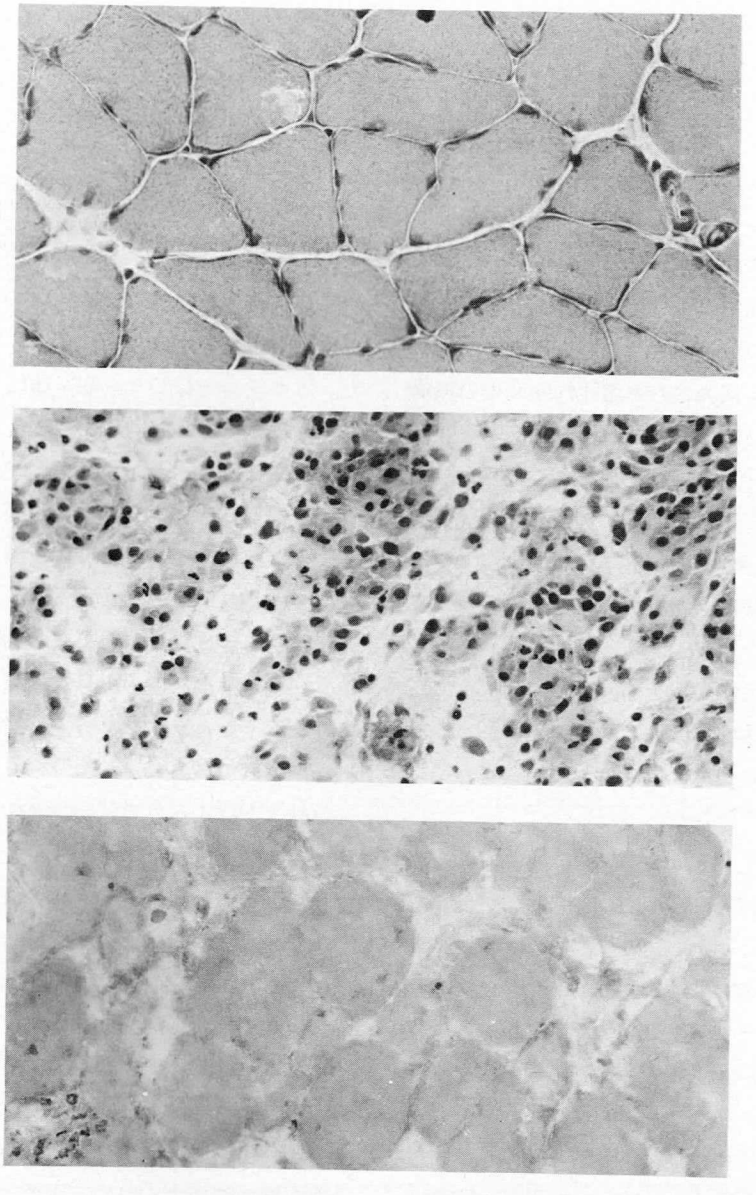
結果と考察

図1は，ブピバカイン投与後48時間目におけるヒラメ筋のH&E染色像である。生理的食塩水筋注により，ヒラメ筋には一時的な膨張が見られるが，2,3時間後には再び正常状態に戻り，48時間後には何の変化も認められないのに対し，ブピバカイン筋注ヒラメ筋では多くの浸潤細胞が見られ，筋の崩壊が顕著である。マクロファージの浸潤はDuchenne型筋ジストロフィー症，多発筋炎など特に後者に於て著明であるが筋細胞の一部分に限局し筋線維単位で進行するため，筋ホモジネートではその寄与を明確に同定することは困難であった。本モデルではヒラメ筋全体に一様な壊死が起こりマクロファージも均一に浸潤するため，解析が容易になったことがポイントである。

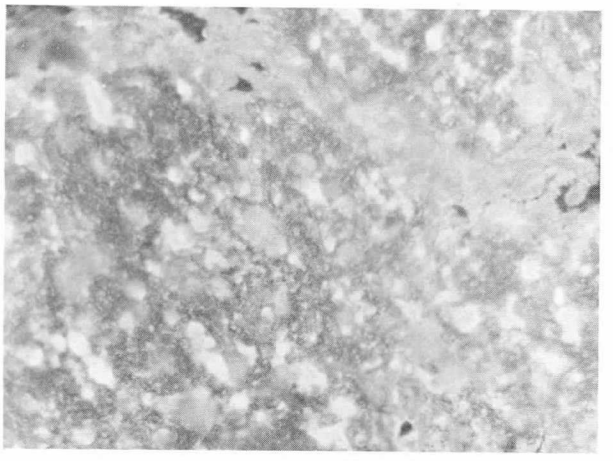
図2は，カテプシンBの筋内局在を示す。図1によりブピバカインによって誘導される急性筋壊死は，細胞外からのマクロファージの浸入を伴うことが明らかになったが，筋ホモジネート内のライソゾーム酵素活性の上昇が浸潤細胞数に比例していることからライソゾーム酵素が浸潤マクロファージ由来であることが推測された。そこで，最も急激に上昇するカテプシンBの局在を坑体（徳島大学，勝沼信彦，木南英紀両先生にいただいたもの）を用いて検討した。図2より明らかなように，カテプシンBは筋細胞内に一様には染色されず，特定の大きさを持った粒子状に存在していることが判明した。連続切片を用いて局在を調べると，マクロファージ内が濃染しており，変性筋細胞内や末梢神経内の存在はごくわずかであった。

急性筋崩壊に非筋由来の細胞が関与している可能性を更に確認する目的で次に，マクロファージの増生を抑制することを試みた。方法は，ブピバカイン筋注と同時に腹腔内にタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシイミドを投与し，ブピバカイン筋注によって急激に誘導される血中マクロファージの増加を阻止しようというものである。図1の下段にその結果を示す。ブピバカインの筋毒性

*国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部



第1図 ラットヒラメ筋組織像。上より生食注入対照筋，ブピバカイン筋注48時間後，及びブピバカイン＋シクロヘキシイミド投与48時間後。



第2図　ブピバカイン筋注48時間後の筋，抗カテプシンB抗体蛍光染色像。

作用により，筋細胞の一部は脱落してはいるが，全体として形は保っているのがわかる。ブピバカイン単独投与に比べての明らかな相違は，シクロヘキシイミドによって筋内へのマクロファージ浸潤が完全に阻止されていることである。表1に種々のライソゾーム酵素への影響，並びに筋構造タンパク質の減少に対する効果をまとめた。ブピバカイン投与により48時間後の筋ホモジネート中のライソゾーム酵素活性は対照の0.9～13倍に上昇した。ここで上昇の割合が酵素によって異なるのは次の理由による。(1)カテプシンB&L，カテプシンD，α－ガラクトシダーゼはマクロファージに大量に含まれており，筋ホモジネート中の酵素活性パターンはマクロファージの混入を示唆する。(2)酸性ホスファターゼとα－グルコシダーゼは筋ライソゾーム内に比較的多く存在し，[4] ブピバカイ

表1.　ライソゾーム酵素活性に対するシクロヘキシイミド投与の効果　（n＝10）

投与48時間後

酵　素	筋ホモジネート中の比活性　（U／mg）		
	ブピバカイン投与群(B)	対　照　群　(C)	B＋シクロヘキシイシド投与群
カテプシン B&L	314±16＊	24±3	72±14＊
カテプシン　D	0.499±0.042＊	0.163±0.013	0.215±0.018＊
α－グルコシダーゼ pH 4	1.85±0.19＊	2.20±0.12	0.64±0.05＊
α－ガラクトシダーゼ	3.89±0.36＊	1.03±0.08	1.37±0.10＊
酸性ホスファターゼ	0.175±0.011＊	0.174±0.008	0.122±0.009＊
アルカリ可溶性筋タンパク量（mg／soleus）	4.03±0.29＊	9.08±0.74	6.87±0.26＊

＊ P＜0.01

ン投与によってこれらの活性が減少又は不変なのは筋ライソゾーム由来の酵素が少ないことを意味する。これらの酵素活性の変化と共に，筋構造タンパク量は対照の44%に低下していることからも，マクロファージ由来のライソゾーム酵素によって筋構造タンパク質が消化されているものと思われる。

ところが，シクロヘキシイミドの投与により，ホモジネート中のライソゾーム酵素活性の減少と共に，筋構造タンパク質の減少が76%と，かなり抑制された（表1）。これらを完全に阻止できない理由としては，シクロヘキシイミドの効果が持続的ではないこと，ブピバカインの筋毒性によって必然的に20%位の筋細胞が破壊されてしまい，それらが分解してしまうこと，などが考えられる。

しかしながら，結果として，マクロファージの増生を防ぐことにより筋タンパク質の分解が抑制されたことになる。これは，マクロファージ及びその中に含まれるタンパク分解酵素が急性筋崩壊に深く関与していることを示唆するものである。

おわりに

塩酸ブピバカインによる急性筋壊死の実験モデルを用いライソゾーム酵素特に筋外のマクロファージ由来ライソゾーム酵素が重要な役割をはたしているものと想定した。この結果は進行性筋ジストロフィー症に於ける筋壊死機構の解明に重要な示唆を興へるものと考える。

文献

1) Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H., & Sugita, H.: Acta Neuropathol. **60**: 167-174, 1983.
2) Ishiura, S., Nonaka, I., Nakase, H., Tsuchiya, K., Okada, S. & Sugita, H.: *J. Biochem.* **94**: 311-314, 1983.
3) Ishiura, S., Nonaka, I., Fujita, T. & Sugita, H.: *J. Biochem.* **94**: 1631-1636, 1983.
4) Miyazawa, H., Ishiura, S., Yonemoto, K., Takagi, A. & Sugita, H.: *Biomed. Res.*, 1983 in press.

31　m－CANPとμ－CANPとの比較研究

今　堀　和　友*
研究協力者　川　島　誠　一*

1. はじめに

筋の発生分化に伴ない筋タンパク質のタイプが変ることが知られているが，このためにはその代謝パターンの変更が必要である。一方，ジストロフィーのような病変は筋蛋白質の合成分解のバランスの崩壊によると考えられる。いづれの場合においても，筋細胞中のプロテアーゼが重要な役割を果していることが考えられる。この考えから，われわれは細胞質中に存在し，Ca^{2+}イオンで活性化される中性プロテアーゼ（以下CANPと略す）が鍵をにぎるプロテアーゼであろうという想定の下で研究を進めてきた。まずCANPにはmM程度のCa^{2+}で活性化されるm－CANPと，μM程度のCa^{2+}で活性化されるμ－CANPとがあることが明らかになった。細胞内のCa^{2+}濃度から判断して，後者が生理的な意味をもち，前者は病理的意味をもつと考えられる。

しかしながら正常の筋細胞中には必ずm－，μ－CANPが共に存在することから，m－CANPもまた何か生理的役割を有することが考えられる。その1つは，m－CANPはμ－CANPの前駆体であるという考え方である。前駆体は生理的条件下ではμ－CANPに変換されない限り活性をもたないが，異常条件下，高Ca^{2+}の場合には活性を発現するため，ジストロフィーの様な病変を起こすと考えれば妥当な解釈ができる。事実一昨年の本報告書でものべた様に，m－CANPを自己消化させるとμ－CANPになるのである。[1]

しかし，昨年の報告書では，われわれが筋細胞より直接μ－CANPを精製してみた所，その分子量はm－CANPのものより大きいことを発見した。[2] 筋細胞中に存在するμ－CANPを，天然型μ－CANPとよぶことにすれば，天然型μ－CANPはm－CANPの自己消化によって生じたものではないことになる。m－CANPの自己消化によって生じたものは，誘導型μ－CANPとよぶことにする。

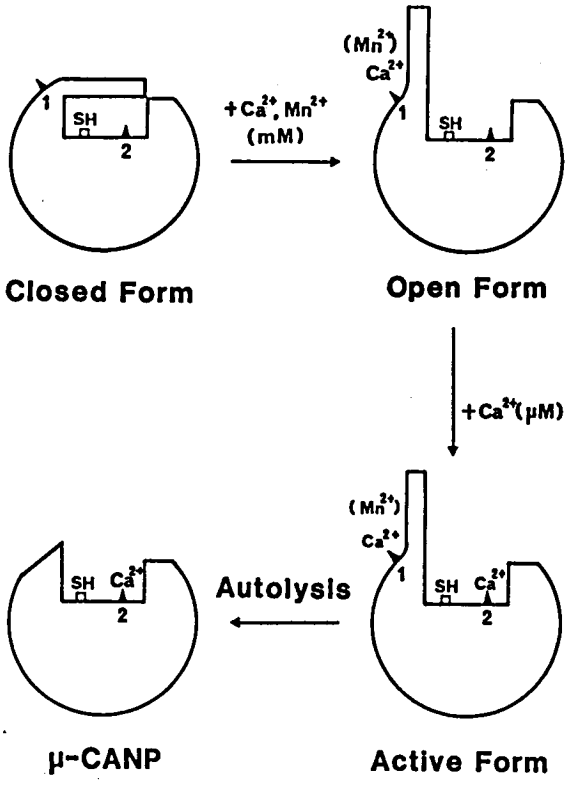
本年度は天然型μ－CANPの諸性質を精しくしらべ，これをm－CANPのものと比較したので，以下にその結果をのべる。

2. 結　　果

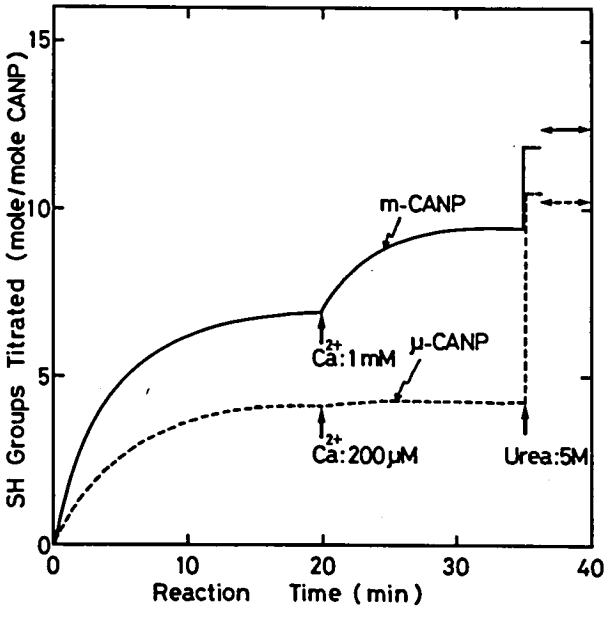
m－CANPのCa^{2+}依存性を説明するためのモデルが図1である。この場合CANPにおけるCa^{2+}結合部位は1,2と2つあり，そのKdはそれぞれ，10^{-3}，5×10^{-5}であると考える。しかし，部位2は活性部位内にあり，しかもこの部位は，部位1にCa^{2+}が結合しない限り露出しないと考えればよい。すなわち部位1に結合するCa^{2+}はコンホーメーション変化の役割を，部位2に結合するCa^{2+}は触媒に関与していると考えられる。一方，μ－CANPは図の活性型に固定されたものと考えられるから，部位2のKd，5×10^{-5}M程度のCa^{2+}で活性化されるのである。

このモデルの証明のために行った実験が図2に示されている。図1のモデルが正しければ，m－CANPの場合，活性部位に含まれるSH基もCa^{2+}を加えない限り露出せず，したがって滴定さ

*東京都老人総合研究所



第1図　m－CANP とμ－CANP のモデル



第2図　m－CANP およびμ－CANP の SH の滴定

ことはないはずである。事実，m－CANPのSH基をDTNBで滴定してみると，最初から外部に露出しているもの，Ca^{2+}を加えることにより露出するもの，尿素で変性して始めて露出するものの3種類に分けられるのが，図2より分る。これに反し，μ－CANPの場合には，Ca^{2+}の添加で露出するSH基が存在しないことが明らかである。すなわち活性部位は最初から露出しており，これは図1の活性型に対応するわけである。

このように，m－CANPとμ－CANPとの差は，活性部位がふさがっているか，空いているのかのちがいだけということになると，Ca^{2+}感受性を除く酵素学的性質は，両CANPでよく類似していることが予想される。

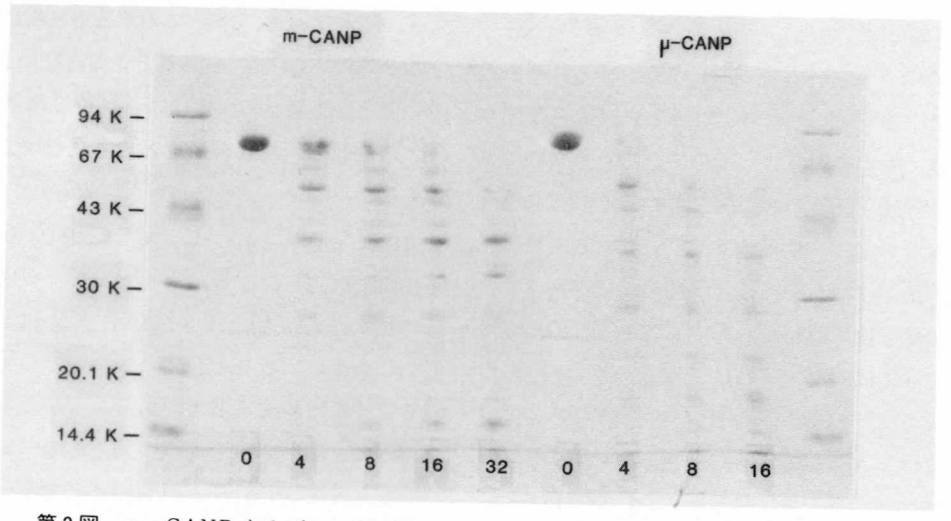
まず第一に両CANPとも活性部位にSH基を含む，いわゆるチオールプロテアーゼであるから，ともにモノヨード酢酸やE－64を1モルとり込んだ所で失活する。ただし，これらのとり込みにはそれぞれのCANPの活性発現に必要な量のCa^{2+}の存在を必要とする。このことは図1における部位1へ結合するCa^{2+}の役割についての上述のモデルを支持するとともに，部位2に結合するCa^{2+}が，触媒作用に関与することをも示唆するものである。例えばμ－CANPに対するE－64のとり込みに，50μMのCa^{2+}を必要とするということは，E－64とSH基との反応には，部位2に結合したCa^{2+}の触媒作用を必要とすると考えればよく説明できる。

次に表1に示すように，両CANPの基質特異性を比較検討した。表から明らかなように，各基質に対する*Km*値はm－CANPとμ－CANPとでかなりよい一致を示している。このことは図1のモデルを支持するものである。すなわち図に示すように，活性部位の構造が両CANPで本質的に同一であるのなら，*Km*値も同じであるべきだからである。一方，*Vmax*に関しては両CANPの間に差があり，大体においてμ－CANPのものの方が大きい値を示している。カッコ中の*Vmax*の値はカゼインを基質にした場合を，両CANPとも100に揃えてあるから，カゼイン基質の場合との相対値を示している。μ－CANPの*Vmax*がm－CANPのそれより大きい理由は不明である。

以上のように，μ－CANPとm－CANPとは，Ca^{2+}感受性を除けば，蛋白化学的ならびに酵素学的性質がすこぶる類似していることから，両者は共通の前駆体から生じるものであるか，さもなく

表1.　種々の基質に対する両CANPの動力学的パラメーター

基質	*Km*（μM）		*Vmax*（N mol／min／unit）	
	μ－CANP	m－CANP	μ－CANP	m－CANP
アルカリ変性カゼイン	22.0	34.4	354.6（77.7）	377.3（102.1）
スクシニル化カゼイン	8.1	10.0	588.6（98.4）	136.0（43.9）
スクシニル化ウシ牛血清アルブミン	2.0	2.2	376.9（63.6）	110.8（35.8）
スクンニル化インシュリンB鎖	283.5	453.7	1020.6（223.6）	292.8（79.2）
スクシニル化プロタミン	63.0	101.3	90.6（20.0）	40.6（11.0）



第3図 m－CANP およびμ－CANP の80K サブユニットのペプチドマップ。各サブユニットを S. aureus V 8プロテアーゼとともに，下段に示した時間（分）加温した後，文献（3）の方法で SDS－PAGE した

ば一方が他方の前駆体になっている可能性が強いと考えられる。事実，m－CANP とμ－CANPとは免疫学的に交さするし，両者のアミノ酸組成もきわめて類似している。

そこで決定的な実験として，両 CANP のペプチドマップを比較した，両 CANP とも80K と30Kの2つのサブユニットからなるので，それぞれのサブユニット同志の比較を行った。このうち80Kサブユニットについての比較を図3に示す。図は分離したサブユニットをV8のプロテアーゼで消化し，消化物のゲル電気泳動を消化時間を変えながら測定したものである。[3] 明らかに，m－CANPとμ- CANPとではパターンを異にするから，その一次構造はかなり異っていることが示唆される。これに反し，30Kについてのペプチドマップは，両CANPについてよい一致を示しており，従って両者の一次構造もほぼ同一であると結論できる。

3. 考　　察

本年度の研究によって，m－CANP とμ－CANP とは，図1に示したような関係にあることが明らかにされた。酵素的にいえば両者のちがいは Ca^{2+}感受性だけであり，反応機構そのものは同一であると考えられる。また蛋白化学的にも，免疫的に交さするなど近縁の関係にあることも明らかである。これらのことは，両 CANP が同一の前駆体から作られるか，一方が他方の前駆体になっているかなど，いづれにせよ細胞内では必要に応じてどちらかの CANP のみを主成分とできるように設計されていることを示唆するものであった。

それにもかかわらず，両 CANP の80Kサブユニットのペプチドマップがかなりの相違を示すことは，蛋白質レベルでの両者の相互変換の可能性を否定するものであり，それぞれの CANP の活性は転写もしくは翻訳のレベルで制御されていると考えられる。今後 CANP 遺伝子がクローニングされれば，この問題はさらに明らかになるであろう。一方，30Kのサブユニットが，m－CANP，μ－CANP について共通らしいという事実は，このサブユニットの起源と，その役割の解明に一つの手がかりを与えるものと思われる。

文　　献

1) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. and Imahori, K. *J. Biochem.* **90** 275-278, 1981.
2) Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Imahori, K. and Kawashima, S.: *J. Biochem.* **93**: 291-293, 1983.
3) Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. and Laemmli, U.K.: *J. Biol. Chem.* **252**: 1102-1106, 1977.

32 筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデルにおける酵素網の比較

青柳高明*
研究協力者 和田孝雄*

緒言

筋ジストロフィーのマウスとハムスターは典型的な筋ジストロフィー症のモデル動物である。これらのモデル動物はヒトの筋ジストロフィー症に可成り類似した筋肉変化を示すものとして基礎的研究に汎用されている。しかし，ヒトの代用として用いられるためには，少くとも代謝面での共通性がなくてはならない。すでに，筆者らは筋ジスマウスの筋肉内において，各種のアミノペプチダーゼ，グリコシダーゼ，エステラーゼ，R Nase などの活性が上昇するのに比べ，筋崩壊の主役と考えられているエンドペプチダーゼ活性の変動が少ないことを見出した。[1-3] さらに，Duchenne muscular dystrophy（DMS）患者血清中の酵素活性を調べた結果，上記の酵素の異常が疾病の進行と密接な関係を有していることを報告した。[4]

本報告は筋ジスマウスおよびハムスターモデルの筋肉を含む諸臓器の酵素活性の変化を調べ，酵素網の変動という面から両者の類似性を検討したので，その結果について述べる。

実験材料および方法

動物：筋ジスマウス（C57BL/6 J, dy/dy, 7週令，雄）と対照マウス（C57BL/6J, dy/+と+/+, 7週令，雄）は実験動物中央研究所より購入した。筋ジスハムスター（BIO 14.6, 7週令，雄）と対照ハムスター（BIO F1 B hybrid, 7週令，雄）は BIO－Research Consultants Inc, Boston, U. S. A より購入した。筋肉および臓器は10倍量の PBS（pH 7.2）を加え，Ultra－turraxで1分間ホモジナイズしたのち，3,000xg, 20分間の遠心上清を酵素活性の測定に用いた。

基質：L－Glutamic acid β－naphthylamido hydrochloride (Glu・NA), Arg・NA, Pro・NA, Leu・NA, fMet・NA, Phe・NA, Gly－Pro－Leu・NA, Ser－Tyr・NA を基質として用い，アミノペプチダーゼ活性を測定した。エンドペプチダーゼの基質としては BAEE（N^{α}－benzoyl－L－arginine ethyl ester・HCl), ATEE（N^{α}－acetyl－L－tyrosine ethyl ester), Ac (Ala)$_3$・ME (acetyl－L－alanyl－L－alanyl－L－alanine methyl ester), ヘモグロビンを用いた。グリコシダーゼの基質としては NP－Glc（p－nitrophenyl－α－D－glucopyranoside), NP－Man（p－nitrophenyl－α－D－mannopyranoside), NP－Glc NAc（p－nitrophenyl－N－acetyl－β－D－glucosaminide）を用いた。さらに，クレアチンキナーゼ（CK）の測定には 1－^{14}C－クレアチンを，ホスファターゼの測定にはNPP（p－nitrophenyl phosphate）を，そしてエステラーゼの測定にはNPA（p－nitrophenyl acetate）をそれぞれの基質として用いた。

測定：組織ホモジネートの遠心上清をPBS，基質を含む反応試験管に分注し，37℃，1時間の測定を行なった。[1] また各酵素活性の変化を対照を基

＊微生物化学研究所

Table 1
Enzymatic Changes in Forelimb Muscle of Dystrophic Mice and Hamsters

Enzyme	Specific activity ±SD (nmol/min/mg protein)			
	Mouse (N=6)		Hamster (N=5)	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
AP-A	0.71 ± 0.24	1.88 ± 1.11*	0.20 ± 0.03	0.69 ± 0.14***
AP-B	4.41 ± 1.22	6.01 ± 1.50(*)	4.81 ± 1.22	2.97 ± 0.77*
Leu-AP	3.61 ± 0.49	7.33 ± 0.29***	3.08 ± 0.53	4.46 ± 0.46**
Phe-AP	4.41 ± 0.82	11.11 ± 0.77***	5.28 ± 1.07	7.69 ± 1.15**
Trypsin-like	14.27 ± 4.04	19.94 ± 12.67	17.84 ± 2.90	30.00 ± 5.28**
Chy-try-like	13.59 ± 3.20	15.44 ± 4.11	21.81 ± 3.60	31.37 ± 4.33**
Elastase-like	8.99 ± 4.65	17.20 ± 9.76(*)	14.36 ± 1.40	21.83 ± 2.23***
Cathepsin C	0.36 ± 0.07	1.62 ± 0.53***	0.54 ± 0.23	1.06 ± 0.56(*)
Glucosidase	0.18 ± 0.11	0.40 ± 0.04**	0.14 ± 0.01	0.25 ± 0.03***
Mannosidase	0.07 ± 0.07	0.14 ± 0.09	0.18 ± 0.01	0.24 ± 0.02***
GlcNAcase	0.23 ± 0.14	0.79 ± 0.28**	0.16 ± 0.02	0.45 ± 0.07***
Phosphatase	1.28 ± 0.37	1.62 ± 0.45	1.22 ± 0.32	1.78 ± 0.43*
Esterase	40.29 ± 26.09	114.49 ± 50.31**	37.45 ± 7.30	32.00 ± 4.47

(*): P < 0.1, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001
NS: Pro-AP, fMet-AP, Gly-Pro-Leu-AP, Cathepsin D, CK

準として Student の t 値で表わし，そのプラス値の大きいものから，マイナス値の大きいものへと順位づけし，その順位についての相関を Spearman の順位相関係数（rs）として表わした。[5]

結果および考察

筋ジスモデル動物の前肢筋における酵素活性の変化を表1に示す。筋ジスマウスにおいては AP－A, Leu－AP, Phe－AP, cathepsin C, glucosidase, Glc NAc－ase, esterase などの活性が有意に上昇している。筋ジスハムスターにおいては AP－A, Leu－AP, Phe－AP, trypsin－like, Chy－try－like, esterase－like, glucosidase, mannosidase, Glc NAc－ase, phosphatase などが有意に上昇しているが，AP－Bの活性のみ低下する。筋ジスハムスターは筋ジスマウスに比べ，はるかに多くの酵素活性が変動することが認められた。

脾臓における酵素活性の変化は表2に示す。筋ジスマウスでは trypsin－like, Chy－try－like の活性上昇がみられた。一方，筋ジスハムスターでは AP－A のみ上昇するが，AP－B, Pro－AP Leu－AP, Phe－AP, Gly－Pro－Leu－AP, trypsin－like, Chy－try－like, elastase－like, cathepsin C, mannosidase など，多くの酵素の活性が有意に低下した。脾臓を含む他の臓器においても，筋ジスハムスターの方が筋ジスマウスより広範囲な酵素活性の変化することが認められた。

上述したように，各臓器内の酵素活性の変化は非常に巾広く，単一な酵素変化のみに注目するよりも，むしろ酵素網の変化をパターンとして捉えることが必要と思われた。この目的のために，対照群と疾患群の間の差を検定するために用いた Student の t 値を用い，順位相関係数を求め，両

Table 2
Enzymatic Changes in Spleen of Dystrophic Mice and Hamsters

Enzyme	Specific activity ±SD (nmol/min/mg protein)			
	Mouse (N=6)		Hamster (N=5)	
	Control	Dystrophy	Control	Dystrophy
AP-A	0.78 ± 0.25	2.57 ± 4.64	2.55 ± 0.72	5.64 ± 0.42***
AP-B	12.72 ± 2.38	13.73 ± 2.59	8.93 ± 1.19	0.98 ± 0.29***
Pro-AP	1.51 ± 0.25	1.70 ± 0.31	1.17 ± 0.13	0.20 ± 0.03***
Leu-AP	7.85 ± 0.76	7.97 ± 3.02	4.56 ± 0.44	3.33 ± 0.23***
Phe-AP	7.01 ± 1.40	8.84 ± 7.59	7.50 ± 1.07	5.06 ± 0.37**
Gly-Pro-Leu-AP	1.57 ± 0.33	1.71 ± 0.82	1.21 ± 0.08	0.64 ± 0.08***
Trypsin-like	35.55 ± 12.88	81.50 ± 42.46*	160.70 ± 15.57	77.07 ± 15.38***
Chy-try-like	31.58 ± 11.66	45.79 ± 5.43*	167.51 ± 25.58	89.93 ± 26.12**
Elastase-like	36.23 ± 15.13	38.89 ± 12.51	106.18 ± 23.79	50.90 ± 9.25**
Cathepsin C	2.83 ± 1.37	3.73 ± 1.72	1.30 ± 0.21	0.78 ± 0.26**
Mannosidase	0.42 ± 0.34	0.10 ± 0.18(*)	0.37 ± 0.08	0.19 ± 0.14*
Phosphatase	2.68 ± 1.47	2.76 ± 1.75	1.43 ± 0.44	2.75 ± 1.44(*)

(*): P < 0.1, *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001
NS: fMet-AP, Cathepsin D, Glucosidase, GlcNAc-ase, CK, Esterase

Table 3
Correlation among enzymatic changes in various organs of dystrophic mice

Organs	Muscle		Bone		Heart	Spleen	Liver	Kidney
	Forelimb	Hindlimb	Forelimb	Hindlimb				
Muscle								
Forelimb	—	0.92***	0.65**	0.65**	-0.19	-0.22	-0.07	-0.38
Hindlimb	0.92***	—	0.76***	0.77***	-0.07	-0.13	-0.14	-0.39
Bone								
Forelimb	0.65**	0.76***	—	0.86***	-0.32	0.25	-0.18	-0.37
Hindlimb	0.65**	0.77***	0.86***	—	-0.15	-0.01	-0.12	-0.31
Heart	-0.19	-0.07	-0.32	-0.15	—	-0.06	0.11	0.19
Spleen	-0.22	-0.13	0.25	-0.01	-0.06	—	-0.30	-0.08
Liver	-0.07	-0.14	-0.18	-0.12	0.11	-0.30	—	0.37
Kidney	-0.38	-0.39	-0.31	-0.31	0.19	-0.08	0.37	—

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

Table 4
Correlation among enzymatic changes in various organs of dystrophic hamsters

Organs	Muscle		Bone		Heart	Spleen	Liver	Kidney
	Forelimb	Hindlimb	Forelimb	Hindlimb				
Muscle								
Forelimb	—	0.93***	0.26	0.15	0.63**	0.36	0.20	0.11
Hindlimb	0.93***	—	0.31	0.19	0.62**	0.47*	0.24	0.24
Bone								
Forelimb	0.26	0.31	—	0.73***	0.63**	0.54*	-0.02	0.36
Hindlimb	0.15	0,19	0.73***	—	0.41	0.65**	0.23	0.42(*)
Heart	0.63**	0.62**	0.63**	0.41	—	0.50*	0.16	0.43(*)
Spleen	0.36	0.47*	0.54*	0.65**	0.50*	—	0.07	0.18
Liver	0.20	0.24	-0.02	0.23	0.16	0.07	—	0.25
Kidney	0.11	0.24	0.36	0.42(*)	0.43(*)	0.18	0.25	—

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

者間における各臓器の比較を行った。

表3には筋ジスマウスの各臓器間における相関係数を Spearman の順位相関係数として表わした。筋ジスマウスの酵素変化のパターンは前肢および後肢の筋肉，骨の間で非常に高い相関がみられ，相互に可成り類似していると考えられる。しかも，これらの変化は心筋，脾，肝，腎などとは明らかに異なるパターンであることが認められた。

表4は筋ジスハムスターにおける各臓器間の関係を示したものである。このモデルは筋ジスマウスに比べ，前肢，後肢の筋肉と骨との相互関係がうすれ，その代りに心筋，脾などにも関連性が広がる傾向を示した。すなわち，筋ジスハムスターにおける酵素変化は必ずしも筋肉，骨などに特有なものではなく，より全身の臓器に及んでいると考えられる。この結果，ハムスターモデルは筋肉に原発した筋ジストロフィーのモデルというよりは，より全身病のモデルとして再評価すべきではないかと考える。ことに脾の変化が筋肉，骨などの変化と類似性をもつことから，自己免疫疾患の可能性も否定できない。[6)]

結　　論

筋ジストロフィーのマウスおよびハムスターモデルの前肢，後肢の筋肉と骨および心，脾，肝，腎の酵素網の変動を比較検討した。筋ジスマウスの酵素変化は筋肉と骨で観察された。一方，筋ジスハムスターでは筋肉のみでなく骨，心，脾，肝，腎などで明かな変化が認められた。この結果，筋ジスマウスは筋骨格症により特異的なモデル動物と思われる。また筋ジスハムスターは免疫をともなった全身的疾患と思われる酵素変化が観察された。

文　　献

1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: *J. Clin. Invest.*, 67: 51-59, 1981.
2) Aoyagi, T., Wada, T. and Umezawa, H. Catabolic enzymes in dystrophic muscle.In: Ebashi, S. ed., *Muscular Dystrophy*. Univ. of Tokyo Press, Tokyo. 239-252, 1982.
3) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Kojima, F.,

Nagai, M. and Umezawa, H.: *Biochem. Int.*, **5**: 97-103, 1982.
4) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Miyoshino, S. and Umezawa, H.: Clin. Chim. Acta, **129**: 165-173, 1983.
5) Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. *New York/McGraw-Hill Book Company Inc., 332-345,* 1960.
6) Aoyagi, T., Wada, T., Yamamoto, K., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H.: *J. Pharm. Dyn.* in press, 1984.

33　幾つかの筋神経系異常マウスに於けるアルカリプロテアーゼ活性の変化

松　下　　宏*
研究協力者　辻　　繁　勝*　楠　本　茂　夫*

マウスに見出されている幾つかの筋神経系異常突然変異体は臨床症状疾病進行の経過或いは遺伝的背景などの面で互いに相違している。我々はこれらの変異体マウスを用いて血清，骨格筋，中枢神経系などの臓器に於ける疾病進行の指標酵素群の活性変動を測定し，正常対照マウスと比較検討することによって筋の分化に対する神経系異常の影響に就いて研究を進めている。今回はアルカリ側に至適 pH の在るプロテアーゼ活性の症状進行に伴う変化とその原因に就いて若干の考察を行った結果を報告する。

骨格筋ホモジネート中にアルカリプロテアーゼが存在することは既に多数の研究者によって報告されているが，一方この酵素が mast cell 中に存在する酵素と同一であること[1]がラットの骨格筋から精製された酵素蛋白によって確かめられた。[2]更に dy マウス萎縮筋中でも，この酵素活性が上昇していることが報告され[3)4)]以前から知られている dy マウス萎縮筋中での mast cell の増加[5]という現象と結び付いて骨格筋中のアルカリ・プロテアーゼ活性の変化は，dy マウスの疾病進行と強い関連があり，更にこの変化は mast cell 増加に依存している可能性が考えられている。

材料と方法

dy マウスは C 57BL/ 6J－dy 系を，myd マウスは MYD/ J－myd 系をそれぞれ Jackson 研究所より輸入し，当教室で自家繁殖したものを，又 SM/J 系に見出された mutant は金沢大学医学部動物実験施設より提供して載いたものを実験に使用した。使用時のマウスの週令は 6 ～ 12 週である。各臓器はマウスを断頭採血後速やかに採出し 20 倍容の 0.32 M蔗糖液に加えホモジナイズする。以下ホモジネートは通常の Schneider 法に従って cytasol 分画を分離し，酵素標品として使用した。アルカリ・プロテアーゼ活性の測定は Edmunds & Pennington の方法[6]に従ってカゼインを基質として glycine－NaOH buffer（pH 10）中でインキュベートし，TCA 処理上清の吸光度を 224nm 波長で比色定量した。筋の Autolytic activity は Mayer 等の方法[7]に従って，myofibrillar fraction をインキュベートすることによって測定した。

mast cell の量的変化は，組織中のヒスタミン含量の変化を測定することによって間接的に計量した。ヒスタミン定量は Shore らのO－フタールアルデヒド法を基にした Anton らの変法[8]に従って測定した。酵素標品中の蛋白含量は Lowry 法によって測定した。

mast cell の脱顆粒による細胞数減少とアルカリ・プロテアーゼ活性の変化との相関を見る実験には Sigma 社より購入した Compound 48/ 80（a polymer of N－methyl homoanisylamine and formaldehyde）を食塩水に溶かし，4 ケ月令の C 57BL/6J－系正常マウスの腹腔中に毎日 1 回直線的に増量しながら 5 日間投与し（1 － 5 μg /g 体重），6 日目に投与マウスを殺し，骨格筋中

＊和歌山県立医科大学・第 2 生理学教室

第 1 表

Alkaline protease activities in skeletal muscle of several strains of mice with genetic muscular dystrophy

	Normal	Affected	A/N	Pr.
C57BL/6J-dy	21.4 ± 9.5(7)	58.4 ± 13.6(7)	2.73	P < 0.001
SM/J-mut	22.1 ± 5.9(6)	51.9 ± 13.5(5)	2.35	P < 0.001
MYD/J-myd	33.6 ± 12.2(6)	69.4 ± 28.3(6)	2.07	P < 0.001

Unit: O.D./mg protein
Parenthesis show numbers of mice used.

第 2 表

Alkaline protease activities in heart muscle of several strains of mice with genetic muscular dystrophy

	Normal	Affected	A/N	Pr.
C57BL/6J-dy	5.0 ± 3.6(4)	6.7 ± 4.6(4)	1.34	N.S.
SM/J-mut	9.4 ± 2.1(4)	8.6 ± 2.3(4)	0.91	N.S.
MYD/J-myd	6.2 ± 1.1(6)	7.4 ± 2.1(6)	1.19	N.S.

Unit: O.D./mg protein
Parenthesis show numbers of mice used.

第 3 表

Alkaline protease activities in liver of several strains of mice with genetic muscular dystrophy

	Normal	Affected	A/N	Pr.
C57BL/6J-dy	3.6 ± 1.6(4)	4.9 ± 3.7(4)	1.36	N.S.
SM/J-mut	6.5 ± 2.2(5)	5.1 ± 3.1(5)	0.78	N.S.
MYD/J-myd	7.0 ± 2.4(5)	7.1 ± 1.3(6)	1.01	N.S.

Unit: O.D./mg protein
Parenthesis show numbers of mice used.

第 4 表

Histamine concentrations in muscle, heart and liver of several neuromuscular mutations

		Normal	Affected	A/N
C57BL/6J-dy	Muscle	3.52*	12.35	3.51
	Heart	1.52	2.00	1.32
	Liver	0.42	0.35	0.83
SM/J-mut	Muscle	4.52	16.89	3.74
	Heart	1.30	1.32	1.02
	Liver	0.42	0.81	1.93
MYD/J-myd	Muscle	3.35	6.56	1.96
	Heart	0.98	1.15	1.17
	Liver	0.44	0.43	0.98

Unit: γ/g wet tissue weight
*; Average value of three trials

のアルカリ・プロテアーゼ活性および Autolytic activity の測定を行った。

結果と考察

dy マウス，myd マウス並びに mutant マウスの後肢，骨格筋に就いてアルカリ・プロテアーゼ活性を測定した処表 1 の如き結果を得た。3 つの筋疾患突然変異体マウスの骨格筋中でいずれも 2 倍以上の活性増加が起っていることが認められたが，活性増加の程度は dy マウスが最も高く，myd マウスが最も低かった。これは症状進行の速度に比例した変化とも考えられる。一方心筋に関しても mast cell タイプのアルカリ・プロテアーゼ活性が存在することが認められているので，筋萎縮症発病による変化が存るか否かを知るために 3 系統の疾病マウスに就いて活性の測定を行った。結果は表 2 の如く，いずれの疾患マウスに就いても有意な活性変化は認められなかった。

更に，肝臓中にも mast cell がかなりの量存在することが知られているので，肝臓に於けるアルカリ・プロテアーゼ活性に就いても測定したが結果は表 3 の如く，やはり 3 系統マウス共に疾患による有意な変化は認められなかった。以上の結果から，アルカリ・プロテアーゼ活性は，測定に用いた筋疾患マウスのいずれに於ても骨格筋で特異的に活性増加を示していることが判明したので，次にこの活性変化が mast cell の量的変化と直接関連しているか否かを，検討するために各臓器中のヒスタミン含量を測定する実験を行った。

mast cell がヒスタミンを特異的に産生する事は衆知の事であるが，脳を除く各臓器中のヒスタミン含量の少なくとも 2/3 以上は mast cell 由来であるという報告[9] から，組織中のヒスタミン含量の変化を mast cell の数の変化ととらえることは可能と考えられる。測定結果は表 4 に示される如く，3 系統の疾病マウスいずれに於ても骨格筋中

第 5 表

Effect of Compound 48/80 treatment on proteolytic and autolytic activities in mouse muscle and heart

	Proteolytic activity			Autolytic activity		
	Control	Treated	T/C	Control	Treated	T/C
Muscle	29.7 ± 12.3(10)	17.9 ± 4.2(5)	60.3	88.1 ± 21.7(8)	27.6 ± 11.5(6)	31.3
Heart	7.8 ± 1.6(10)	4.9 ± 1.1(5)	62.8	———	———	

Units: Proteolysis; A224/mg protein
Autolysis; μg tyrosine equivalent/g protein
Parenthesis show numbers of mice used

で著しくヒスタミン含量が増加していることが認められた。一方肝臓と心臓でのヒスタミン含量に就いてはいずれの系統マウスでもあまり大きな変化を示していなかった。更に，dy マウスと，SM/J－mutant マウスの骨格筋中では 4 倍近い増加を示すのに対して myd マウスの骨格筋では約 2 倍の増加にとどまっているなど変化の程度に遺伝的背景による差異が存ることが示唆された。

そこで，骨格筋中のアルカリ・プロテアーゼ活性の変化が mast cell 数の変化と確実に関連しているか否かを実証するために，mast cell に作用して脱顆粒をひきおこすことが知られている Compound 48/80を腹腔内に注射した後，アルカリ・プロテアーゼ活性の変化を見る実験を行った。結果は表 5 の如く，この物質を投与して，mast cell の数を強制的に減少させる事により，骨格筋並びに心筋中のアルカリ・プロテアーゼ活性が無処置対照マウスの約 60 %に減少していること，又骨格筋の myofibrillar fraction をインキュベートすることによって測定される autolytic activity が無処置対照の約 30 %に迄低下していることが認められた。

要　　約

マウスにそれぞれ独立に見出された筋ジストロフィー症を発現する突然変異体の幾つかに就いて，症状進行に関連して活性変化を示すことが知られているアルカリ・プロテアーゼの活性変動と，同じくアルカリ・プロテアーゼ活性の存在が知られている mast cell の量的変化との関係を検討した。その結果，dy マウス，SM/J－mutant マウス，並びに myd マウスの 3 突然変異体に就いてはいずれもアルカリ・プロテアーゼ活性が骨格中で特異的に増加している事実が確かめられた。又同時に主として mast cell によって産生される臓器中のヒスタミン含量がやはり骨格筋で著しく増加していることが判明した。更に，この 2 つの事象の間の関連性を確かめるために，Compound 48/80 を連続投与して，mast cell 数を抑制する実験を行った所，mast cell 数の減少と連動してアルカリ・プロテアーゼ活性並びにアルカリ側に至適 pH の存る Autolytic activity が大幅に低下する結果が得られた。即ち，マウスの筋ジストロフィー症では一般に骨格筋中のアルカリ・プロテアーゼ活性が上昇しているが，これは mast cell の増加に依存した変化であるという事が確かめられた。

文　　献

1) Woodbury, R.G. Everitt, M. Sanada, Y., Katunuma, N., Lagunoff, D. and Neurath, H.: A major serine protease in rat skeletal muscle. Evidence for its mast cell origin. *Proc. Nal. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 5311-5313, 1978.
2) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N.: Crystallization and amino acid composition of a serine protease from rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 82: 108-113, 1978.
3) Pennington, R.J.: Biochemistry of dystrophic muscle: 2. Some enzyme changes in dystrophic mouse muscle. *Biochem. J.*, 88: 64-88, 1963.
4) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N.: Serine protease in mice with hereditary muscular dystrophy. *J. Biochem. (Tokyo)*, 83: 27-33, 1978.
5) Bois, P.: Mast cells and histamine concentration in muscle and liver of dystrophic mice. *Am. J. Physiol.*, 206: 338-340, 1964.
6) Edmund, T. and Pennington, R.J.T.: Mast cell origin of myofibrillar protease of rat skeletal and heart muscle. *Biochem. Biophys. Acta*, **661**: 28-31, 1981.
7) Mayer, M., Amin, R. and Shafrir, E.: Rat myofibrillar protease: Enzyme properties and adaptive changes in conditions of muscle protein degradation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**: 20-25, 1974.
8) Anton, A.H., Sayre, D.F.: A modified fluorometric procedure for tissue histamine and its distribution in various animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **166**: 285-292, 1969.
9) Yamatodani, A., Maeyama, K., Watanabe, T., Wada, H. and Kitamura, Y.: Tissue distribution of histamine in mutant mouse deficient in mast cells: Clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 305-309, 1982.

「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	岡崎国立共同研究機構生理学研究所	444	岡崎市明大寺町字西郷中 38 0564(53)7345
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	東京大学医学部薬理学教室第一講座	113	東京都文京区本郷 7−3−1 03(812)2111
運営幹事	小沢鋏二郎	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	微生物化学研究所酵素研究部	141	東京都品川区上大崎3−14−23 03(441)4173
	石川　春律	群馬大学医学部解剖学教室	371	前橋市昭和町 3−39−22 0272(31)7221
	岩崎　祐三	東北大学医学部脳研脳微細構造部門	980	仙台市星陵町 2−1 0222(74)1111
	遠藤　實	東京大学医学部薬理学教室第二講座	113	東京都文京区本郷 7−3−1 03(812)2111
	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	280	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	大阪大学細胞工学センター	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 0424(78)9158
	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(54)1111
	高橋　健治	京都大学霊長類研究所	484	愛知県犬山市官林 0568(68)1387

氏名		所属	住所	
班員	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)3277
	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	千葉大学医学部生物学教室	280	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	福岡市東区馬出 3−1−1 092(641)1151
	小林　良二	秋田大学医学部生化学第二講座	010	秋田市本道 1−1−1 0188(33)1166
	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 1−2−3 082(251)1111
	畑山　一郎	弘前大学医学部生化学第二講座	036	弘前市在府町 5 0172(33)5111