厚生省神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症解明のための遺伝子発現の基礎的研究

野々村班

昭和59年度研究報告書

昭和60年3月

緒　　言

班 長　野々村　禎　昭

総　論

本研究班は従来の江橋班をひき継ぐ形で本年より新らたに発足した。新らたに発足すくに当つて我々は明確に我々の目標を課題名にかゝげることにした。すなわち我々の班は筋ジストロフィー症解明の為に遺伝子発現のレベルで基礎的な研究を行うことを目指す。

筋ジストロフィー症の根本的治療とその根絶を目指す為には筋ジストロフィー症の病因の解明を行わねばならない。その為にこれ迄世界中で地道な研究がなされており，我国でも厚生省の委託研究を中心にして多くの成果が得られてきた。このような努力にも拘らず未だにジストロフィーの真の成因については不明のまゝにある。数年前までは欧米の研究と較べて我国の研究は遜色ないどころかむしろ進んだ研究が多かつた。しかし最近状勢は急速に変化してきた。遺伝子工学，細胞工学の進歩をふまえて，欧米での研究は積極的にこれら手法をとり入れて，急速に新らしい展開をとりはじめている。現在，筋ジストロフィー症を遺伝子レベルで正に捕えんとしており，その解明も間近かに迫っている感がある。残念ながら我国の研究は遺伝子レベルの研究では非常に遅れてしまつている。

我々は筋ジストロフィー症にとりくむ基礎班として，ここで欧米の現状に追いつき，追いこす為にも根本的に班の改組を考えた。先ず従来迄生理学，生化学が中心であつた班員構成を遺伝子工学，細胞工学的手法をもつて研究する班員を中心に組み変えた。また班員の年令構成も思い切って若がえらせ，同時に班員数をしぼってテーマを集中するようにした。このような構成のもとに我々の新らしいストラテジーで筋ジストロフィー症にせまることにした。

筋ジストロフィー症はX染色体上の遺伝子情報にもとづいて，生後，除々に進行する筋細胞への侵襲，破壊，委縮であり，この間に筋の生長，再生，が複雑にからみあつている。我々は一般的に遺伝子情報が発現する過程を検索し，特に筋細胞が発生，分化する過程で遺伝子発現が進行していく状況を生理，生化，形態レベルで追求していく。この過程で筋細胞が形成されていく状態を詳しく知ることが，実は形成の不全，欠損を知る手がかりとなり，また再生への誘因を知ることになると思う。このような理解の上で実験ジストロフィー動物と正常動物との比較を行い，ジストロフィー筋での発症原因の起点を求めていく。特にこゝで遺伝子レベル，染色体レベルの追求を加えて，遺伝子発現に到る調節機序を明らかにしていきたい。さらに細胞工学的手段を用いて，実験的ジストロフィーの発現を遺伝子導入で試みる。以下実際に班員によるグループ構成を示す。

第1のグループは生理学的な手法を用いて筋の分化の問題にせまる。

遠藤班員，長谷川班員，大塚班員がこゝに属して，主に筋細胞膜，神経要素の関与を中心にして問題の本質に近づこうとつとめる。こゝでは細胞表面膜のみでなく小胞体膜についても扱われ，表面膜上の神経伝達物質レセプターの問題も扱われる。

第2のグループは主として生化学的手法で筋構造蛋白質の分化の問題にせまる。

小林班員，大日方班員，松田班員，丸山班員，嶋田班員が当る。中心は従来より行われてきた収縮蛋白質の分化を追求するが，単に生化学的調製固定のみではなく免疫学的手法，超微形態的手法も用いられる。収縮蛋白のみでなく，コネクチンの様な細胞骨格蛋白も扱われる。またこゝで筋再生時での蛋白質変化，分化も扱われる。

第3グループは細胞生物学的手法を用いてせまるグループと蛋白質分解酵素とジストロフィーの関連を探るグループである。

石川班員，小沢班員，清水班員が細胞生物学的手法を用い，培養細胞を主に用いながら，超微形態，膜細胞内の分化による変化を明らかにしつつ，さらに染色体レベルでの変化をとらえようと試みる，勝沼班員，鈴木班員は蛋白質分解酵素の効果，機序を従来の生化学的手法に止まらず，細胞生物学的レベル，遺伝子工学的レベルで明らかにしようと試みる。

第4のグループはジストロフィーの遺伝子発現を種々の方法によつて明らかにしようとするグループである。

黒田班員，勝木班員，香川班員，真崎班員，班長の野々村が当る。このグループはジストロフィー動物を主として対象に選び，免疫学的手法，細胞工学的手法，分子生物学的手法を駆使して，直接ジストロフィーと正常の差を明らかにしていこうと試みるグループである。

第5グループは遺伝子レベルの解析を主として行うグループで，岡田班員，藤井班員，渡辺班員，奥田班員が当る。

ここでは研究対象は遺伝子そのものに向けられる。そこでは種々の手法の開発，染色体レベルと遺伝子をつなげる試みが行われ，一部ジストロフィーそのものの遺伝子にせまることも行われる。

この5つのグループは相互に密接に連絡をとりあいながら研究を推進する。さらに我々の班だけでなく，厚生省委託研究ジストロフィーの他班とも今後は相互に情報を交換しつつ新らしい観点での共同研究を進めていきたい。第1は臨床研究との共同作業である。これはジストロフィー第2，3，4班との共同作業になつていくと思われるが，ジストロフィー家系細胞バンクの作業である。これは一部欧米で行われつつあるが，遺伝子レベルでの研究を進めていく際に絶対必要なものであり，この為には患者家族との完全な了解のもとに高い倫理性につらぬかれて進めるべきことである。一方実験動物を供給される第5班とは特に最近導入されたX染色体に異常をもつたmdxマウスの利用は実験動物ジストロフィー研究にとつて飛躍的進歩をもたらすことが考えられる。とくに染色体レベルでの研究に向っていこうとする時，はじめて動物を用いてのジストロフィー研究が我々の最終目標たる人のジストロフィー症解明への足がかりとなる道を示したものといえる。

本年度の研究の概要

このようなストラテジーをもつてスタートした我々の班は実際には研究の端所についたばかりであるが，本報告書にみるとおり，すでにいくつかの成果があがつている。

第1グループでは遠藤班員による骨格と心筋小胞体のCaによるCa遊離機構の詳細な比較を行い，

長谷川班員による骨格筋膜上でのアセテールコリンレセプター分布への神経要素の影響を詳しく調べた。大塚班員は中枢神経抑制薬，興奮薬を用いて神経要素が筋発生，発達に及ぼす影響をみた。筋肉膜，表面レセプターの発達分化が発生過程でどのように変化するか，神経要素がどのように関係するかといつた点で第一歩となる研究が手がけられた。

第２グループは小林班員がジストロフィー鶏筋で３０Ｋの異常蛋白を発見し同定しつつある。大日方班員はミオシン関連のＣ蛋白質にアイソフォームがあることを免疫的手法で見出しこのひとつが除神経によつて発現誘発されることを明らかにした。松田班員は筋成長因子としてのトランスフェリンがジストロフィー鶏で細胞周辺に畜積することを見出した。丸山班員は同班員の発見，命名によるコネクチンの細胞内局在の詳細な研究を行つた。嶋田班員は胚，再生，除神経でトロポニン―Ｔアイソフォームがどう発現するかを調べた。このグループはとくに発生，再生時の筋蛋白の発現に焦点を合わせているが，ジストロフィー動物筋での発現との関連にも手をつけはじめている。

第３グループの石川班員は筋腱結合部の微細構造と膜の裏うち構造との関係を示した。小沢班員はトランスフェリン欠乏による筋変性との関係を培養細胞を用いて示した。この結果は第２グループの松田班員の結果と合わせてジストロフィーへの深い関係を示すかもしれない。清水班員は上皮増殖因子（ＥＧＦ）の細胞増殖作用に関して遺伝解析への可能性を示した。勝沼班員はリソゾームチオール蛋白質分解酵素とその内在性インヒビターの各種組織局在を抗体を用いて検索した。心筋，骨格筋は少ない方に属していた。鈴木班員はカルシュウム依存性プロテアーゼのｃDNAをとり，その全構造を決定した。この構造はＮ端側にチオール酵素，Ｃ端にCa 結合蛋白の配列をもち，中間にそれらをつなぐ配列が在存する独得な構造をしていた。ジストロフィーと蛋白分解酵素の関連をつける為の新らしいアプローチのはじまりと考えられる。

第４グループの黒田班員はジストロフィー鶏とそのコントロールの筋細胞膜試料のモノクローン抗体をつくり，抗原性の差を示すスクリーニングを行つて，かなりの差が得られた。しかし，この両鶏の遺伝子背景がかなり異っている為，ジストロフィー遺伝子に特異的なものと同定するのに問題があり，近交鶏ＧＣＮ―２/ａｍをもちいて実験が進められている。勝木班員は前述したｍｄｘマウスとBALB/c 間でキメラマウスを胚操作によつてつくることに成功した。また外来遺伝子ＤＮＡをマウス受精卵に注入し，操作卵の８％に組みこますことが出来た。このような胚操作は今後遺伝子工学的研究とカツプルして，大きな発展が期待出来る。香川班員は従来の筋ジストロフィーマウス（dy /dy）系骨格筋に高張食塩注入して筋再生を誘起させ，これを用いて細胞培養に成功した。これはサテライト由来細胞であり，クローン培養にも成功し，今後 mdx系についても細胞培養出来る道を開いた。真崎班員はポリADP リボース合成酵素活性を筋ジストロフィー鶏骨格筋で測りその活性の高いことから未分化状態にジストロフィー筋ではあることを予想した。我々は小浜を中心に野村班江崎班員及び野村班長の御好意のもとｍｄｘマウスの供給をうけ，その筋膜成分を分離し，特殊染色で高分子の糖蛋白のいくつかゞｍｄｘマウスに存在することを発見した。現在，この局在を確かめているが，この研究はジストロフィーにおける膜蛋白異常の最初の発見といえるであろう。このグループではｍｄｘマウスをもちいて積極的にジスト

ロフィーの異常遺伝子発現を明らかにすることに焦点が合わさつてきている。

第5グループの岡田班員はα及びδクリスタリン遺伝子のキメラを作製し，マウスの培養細胞に注入し発現させた。マウスにはδクリスタリンは存在しないので抗体で容易にその発現を知ることが出来る。遺伝子でキメラをつくり，遺伝子発現出来たこの方法は，ジストロフィー研究の進んだ段階で応用出来るであろう。藤井班員は膜結合蛋白として小胞体に存在し薬物の解毒反応に関係するp－450のcDNAと遺伝子DNAの解析を行つた。ジストロフィーの原発点は恐らく細胞膜にあると思われるので膜蛋白遺伝子解析の手法は今後重要と考えられる。渡辺班員はヒトのリンパ球細胞の染色体を分離し，X染色体の分離に成功した。さらにX染色体の遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーには80％以上のX染色体上遺伝子を含んでいることを確認した。このライブラリーは今後のジストロフィー研究にとつて大きな財産となることであろう。奥田班員は筋ジストロフィー鶏及びコントロール筋からpoly（A）$^{+}$ RNAを抽出し，それぞれのcDNAライブラリーを作製した。これらを用いて，dot hybridization法でジストロフィー特異的遺伝子の分離を手がけはじめた。前述のモノクロール抗体法と共に成功すれば，容易にジストロフィー特異性遺伝子がつかまるかもしれない。

我々の班は新らしい体制をととのえて，発足してから数か月あまりであるが，新らしい班員を中心にして遺伝子工学，細胞工学を駆使した展開がなされつつある。この様な研究は我国のジストロフィー研究としてははじめての試ろみなので，育てあげていかねばならない。今後の方向としては細胞膜とくに骨格筋の表面膜の研究と染色体を用いた研究を強化していくように我々班員の中でも研究の転換を行っていつてほしいと考えるし，新らたな公募班員で強化することも考えていきたい。

ジストロフィー解明の道は厳しく遠いいが我々の地道な努力のつみ重さねによつてのみ道は開かれていくであろう。

目　　次

緒　　言　　野々村　禎　昭

I　細胞生理とその分化

1. 筋小胞体の機能，とくにCaによるCa遊離機構の臓器差 …… 3
遠　藤　　実

2. 筋に対するtrophic効果 …… 10
長谷川　修　司

3. 筋発生異常における神経側の要因 …… 16
大　塚　正　徳

II　筋構造蛋白質とその分化

4. ジストロフィー鶏胸筋に存在する特異蛋白質（30K蛋白）について …… 23
小　林　良　二

5. ニワトリ骨格筋におけるミオシンとC蛋白質アイソフォーム発現に及ぼす除神経支配の影響 …… 32
大日方　　昂

6. ニワトリ正常遅筋とジストロフィー速筋にみられた筋細胞増殖因子 …… 39
松　田　良　一

7. 骨格筋の弾性タンパク質コネクチン …… 44
丸　山　工　作

8. 胚筋，再生筋および除神経筋におけるトロポニン — T …… 48
嶋　田　　裕

Ⅲ　細胞生物学・細胞工学的研究

9.　ジストロフィー筋病態と細胞骨格 …… 55
石　川　春　律

10.　筋変性モデルに関する一考察 …… 59
小　沢　鋏二郎

11.　リソゾームチオールプロテアーゼとその内在性インヒビターの組織分布 …… 63
勝　沼　信　彦

12.　カルシウム依存性プロテアーゼの構造，機能
ならびに活性に関する研究 …… 67
鈴　木　紘　一

13.　細胞の増殖と分化に関する細胞遺伝学的研究 …… 70
清　水　信　義

Ⅳ　遺伝子発現とその研究方法

14.　モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー鶏筋膜と
正常鶏筋膜の抗原性の差異の解析 …… 77
黒　田　洋一郎

15.　疾患モデル動物の研究における胚操作法の応用 …… 81
勝　木　元　也

16.　筋ジストロフィー症遺伝子発現の標識 …… 84
香　川　　務

17.　筋ジストロフィー症における筋分化のおくれと遺伝子調節機構 …… 87
真　崎　知　生

18. 幼若ジストロフィー（mdx）マウスの膜分画に
検出された異常蛋白質 …… 91
野々村 禎 昭

V 遺 伝 子 解 析

19. クリスタリン遺伝子の組織特異的発現機構の解析 …… 99
岡 田 節 人

20. 膜結合タンパク質のcDNA及び遺伝子DNAクローニング …… 103
藤 井 義 明

21. ヒト染色体の分離と染色体特異的遺伝子ライブラリーの作製 …… 107
渡 辺 武

22. 筋ジストロフィー症の筋組織における遺伝子発現の解析 …… 110
奥 田 拓 道

I　細胞生理とその分化

1.　筋小胞体の機能，とくにCaによるCa遊離機構の臓器差　3

2.　筋に対する神経のtrophic効果　10

3.　筋発生異常における神経側の要因　16

1　筋小胞体の機能，とくにCaによるCa遊離機構の臓器差

遠　藤　　實*
研究協力者　大　島　宜　子　　堀　内　桂　輔　　飯　野　正　光

骨格筋細胞は大きな速度で短縮することのできる速筋や，短縮速度は小さいが持続的な張力発生に適した遅筋などに分化していて，それぞれ目的に適した働きをしている。心筋も機能的構造的に基本的には骨格筋と同じ横紋筋であるが，骨格筋，とくに速筋が必要な時にだけ収縮し，また，その収縮力の調節は収縮を営む細胞数の増減によって行われているのに対し，心筋細胞ではすべての細胞が常時ほぼ一定のリズムで収縮・弛緩を繰り返し，かつその収縮力の増減は個々の細胞の収縮力の増減によって調節されているなど種々の点において差異が見られる。我々はこれらの機能の相違が収縮並びに制御蛋白系，あるいは筋小胞体のどのような差異によって生ずるかをできるだけ生理的な条件下においてskinned fiberを用いてまず明らかにし，次いで発生過程においてそれらの機能の分化がどのような経過で生ずるかを調べて，これらの機能に関係した遺伝子の発現様式を解明する手がかりを得ようと考えている。この線に沿って我々は従来，両生類骨格筋の速筋線維と遅筋線維の性質を詳しく比較し，その発生経過を追求しつつある[1~3]。本年度はこれと並行して骨格筋と心筋との比較を，主としてこれまで余り詳しく調べられていなかった筋小胞体のCaによるCa遊離（Ca－induced Ca release）の機構について比較を行った。

＊東京大学医学部・薬理学第二講座

実　験　方　法

材料は主としてモルモットの筋を用いたが比較のためにアフリカツメガエル骨格筋やヒト骨格筋生検標本なども用いた。モルモットの骨格筋は長趾伸筋から単一筋線維を，また心筋は心室乳頭筋を細くして直径約100μm束をいずれも弛緩液中で取り出し，50μg/mlのサポニンで約30分間処理し，skinned fiberとして用いた[4,5]。線維または線維束の両端は絹糸でしばり，2本の金属のフックにそれぞれ固定した。一方のフックはストレーン・ゲージ（エイカース AE80）に接続して，等尺性張力を測定し，ペン・レコーダー上に記録した。標本を浸した溶液は図1のように，免疫反応の検出などに用いるプラスチックの板にあいた穴の中に入れてあるが，液面が少し盛り上るようにしてあるので必要な時に板を水平に移動すると，速やかに液交換ができる。温度はプラスチックの板の直下を20℃の水で灌流し一定に保った。CaによるCa遊離の実験は既に報告した通り[6]図2のような手順で行った。あらかじめ標本中の小胞体から後述の方法でCaを全部放出させてから実験を始める。まず，標本を一定濃度のCa^{2+}を含む液中に一定時間浸し，（通常2×10^{-7} M Ca^{2+}，2分間）一定量のCaをCaポンプATPaseの作用により小胞体中に取り込ませる。次にその小胞体に種々の濃度のCa^{2+}を種々の時間適用してCaによるCa遊離を起こさせるのであるが，この時同時にCaポンプが働くとCa遊離と並行してCa取り込みも起こってしまうので，純粋にCa遊離だけを観察するために，まずMg

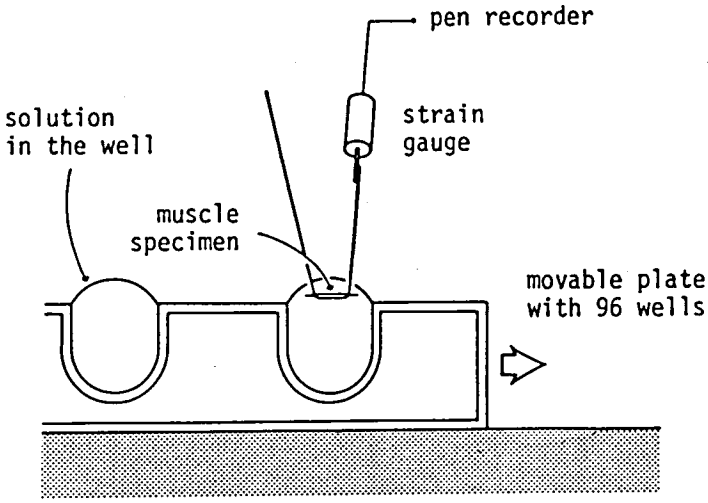


図 1.　実験装置概要の模式図。

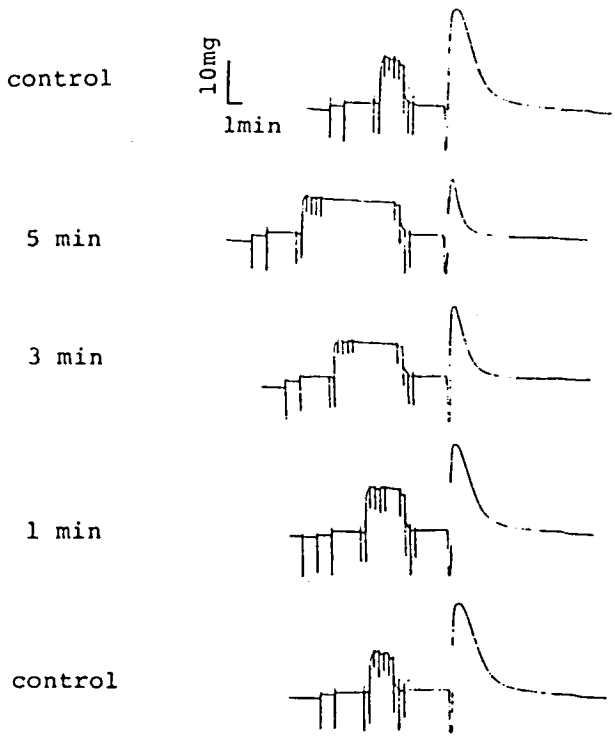


図 2.　CaによるCa遊離速度測定の実験手順。説明本文。

ATPを完全に除去してCaポンプを働かなくしてからCa^{2+}を適用する。MgATPが十分に減少すると，筋の収縮蛋白系はいわゆる硬直状態に陥るので，張力発生によってそれを知ることができる。この処理のあとCa^{2+}を十分洗い流してから，小胞体中に残っているCa量を測定する。この測定には30〜50mMの高濃度カフェインを適用すると小胞体中のCaがほとんど全量一気に放出される事

実を利用する。放出されたCaは結局は標本の外へ拡散して薄まってしまうが，その途中で標本の収縮蛋白系を刺激するので標本は一過性に張力を発生する。この一過性のカフェイン収縮の大きさ（張力曲線下の面積）から放出されたCa量，すなわち，カフェイン適用時に小胞体中に存在したCa量を推定した。最初に取り込ませるCa量を一定にしてあるので残っているCa量がすくなければ

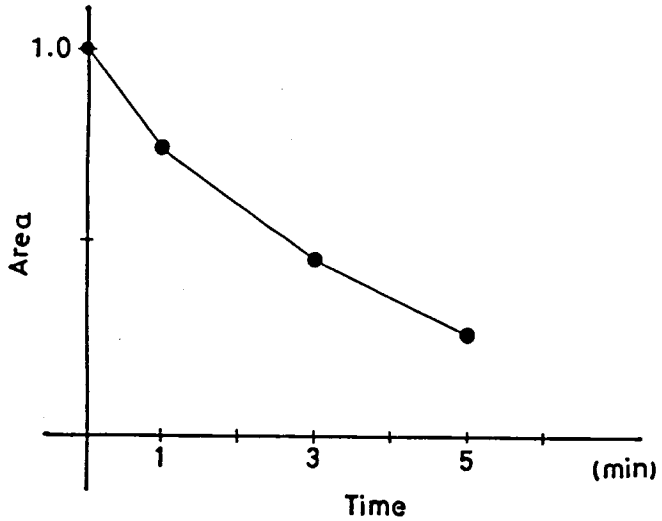


図3.　モルモット骨格筋小胞体のCaによるCa遊離の時間経過。説明本文。図2と同じ実験。

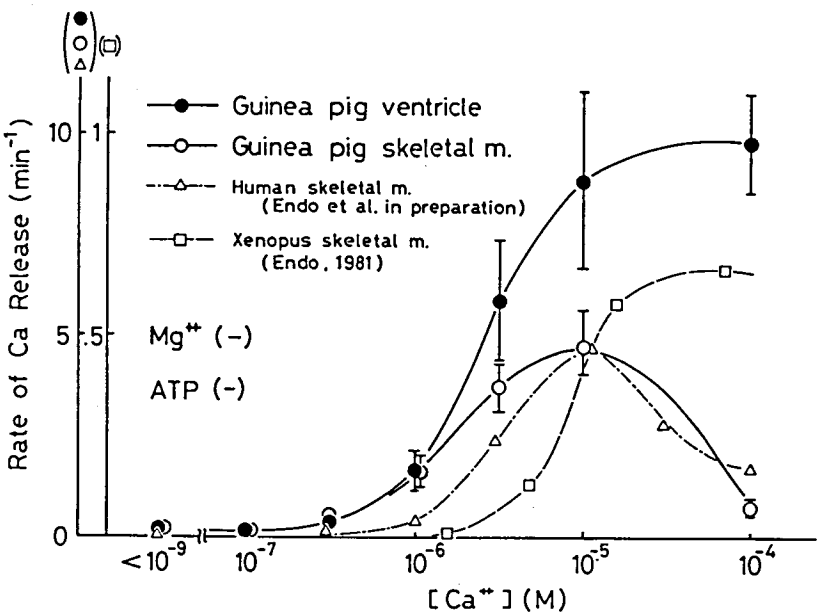


図4.　種々の筋肉から作ったskinned fiberの小胞体のCaによるCa遊離速度のCa^{2+}濃度依存性。

すくないほど多量のCaが遊離したのだということが分る。

標準弛緩液はPIPES 20mM, Mg^{2+} 1.5mM, Mg ATP 3.5mM, EGTA 2mM, を含み, pH 7.0でイオン強度0.20Mとなるようメンタンスルフォン酸およびK^{+}(KOH)を加えた。遊離Ca^{2+}濃度はHarafuji & Ogawa[7]によるCa－EGTAの見かけの結合定数を用いて計算した。

結　　果

図3は実験方法の項に述べたような図2の手順でまず小胞体に一定量のCaを取込ませ，10^{-6} MのCa^{2+}で1, 3, 5分間，CaによるCa遊離を起こさせた後に小胞体に残っているCa量を測定し，プロットしたものである。図に見られるように，残ったCa量はCa^{2+}を適用する時間が長くなるに従って次第に減少した。この減少の時間経過は多くの実験からほぼ指数関数的であることが分っている。このようなCa量減少の速度定数をCa遊離速度として測定した。

図4は種々のCa^{2+}濃度下のCaによるCa遊離速度をモルモット骨格筋と心筋のskinned fiber小胞体について測定した結果を示したものである。比較のために，ヒト骨格筋およびアフリカツメガエル骨格筋のデータも一緒に示してある。モルモット骨格筋，心筋は共に3×10^{-7} M近辺からCaによるCa遊離が起こり始め，Ca^{2+}濃度の増加と共にCa遊離速度が大きくなる。しかし，骨格筋でCa^{2+} 10^{-5} M以上になるとかえってCa遊離速度は減少するのに対し，心筋ではCa^{2+} 10^{-4} MまでCa遊離速度は著明な減少を示さなかった。至適Ca^{2+}濃度で得られる最大Ca遊離速度は心筋で骨格筋よりも大きい傾向を示した。

ヒト骨格筋はモルモット骨格筋よりもCa^{2+}濃度－Ca遊離速度曲線が右に寄っており，CaによるCa遊離のCa感受性が少し低かった。アフリカツメガエルはさらに低いCa感受性を示したが，これは実験が低温下（約2°C）で行われているので，温度による差が見かけの種差に関係している可能性を検討しなければならない。

図4のデータはMg^{2+}の不在下にCaによるCa遊離を行わせたものであるが，生理的に細胞内にはもちろんMg^{2+}が存在し，そのMg^{2+}はCaによるCa遊離を抑制することが分っている[8]。そこで，1.5mMおよび15mMのMg^{2+}存在下でCaによるCa遊離を行わせて見た。Mg^{2+}は図5に示すように，すでに報告されているとうり[8]　(1)Ca^{2+}濃度－Ca遊離速度曲線を右にずらせてCaによるCa遊離のCa感受性を下げると共に，(2)至適Ca^{2+}濃度下における最大Ca遊離速度を減少させる，という二つの作用を示した。このMg^{2+}の抑制作用，特に上記(2)の作用は骨格筋において（図5上），心筋（図5下）よりも強力であった。

実験方法の項に述べたように，以上の実験ではCa遊離中にCaポンプが働くことを避けるため，ATP不在下でCa遊離を起こさせている。しかし，生理的にはもちろんATPが存在し，そのATPはCaによるCa遊離を著るしく促進することが分っている[8]。そこで，できるだけ生理的に近い条件下でCaによるCa遊離を調べるために，ATPと同様なCaによるCa遊離促進作用を示すが，Caポンプを駆動させる力の全くないATPアナログ，AMPPCP，を用いて[9]，その存在下にCa遊離速度を測定した。まず予備実験としてCa遊離促進効果のAMPPCP濃度依存性を調べた所，10μM以上で促進効果が見られ，濃度の増加と共に効果は増大したが，約1mMでほぼ最大に近い効果が得られた。そこで1mMのAMPPCP存在下，Mg^{2+}濃度もほぼ生理的と考えられる1.5mM存在下にCaによるCa遊離の速度を調べたものが図6である。骨格筋に比して心筋の方が生理的条件下でCaによるCa遊離速度は大きいようである。

骨格筋小胞体で，CaによるCa遊離はカフェインで促進し，プロカインで抑制されることが分っている[8]。心筋小胞体でもその点が同様であるか否かを調べた。図7に示すように，カフェインは心筋小胞体におけるCa^{2+}存在下のCa遊離速度を濃度依存的に増大させた。Ca^{2+}不在下ではCa遊離

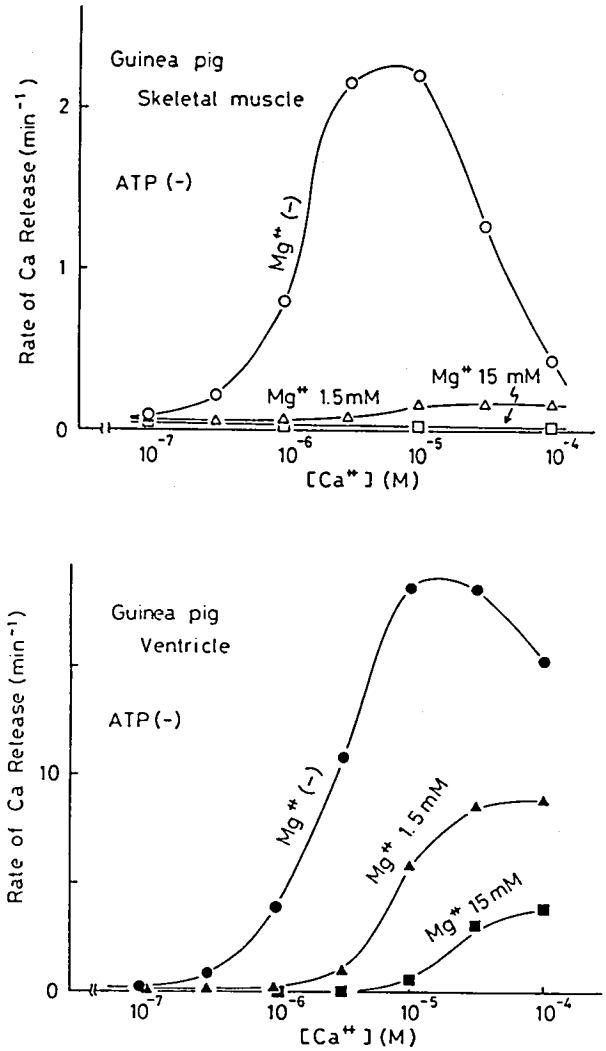


図5.　モルモット骨格筋および心筋小胞体のCaによるCa遊離に対するMg^{2+}の抑制作用。

速度の増大は起こさないので，カフェインのこの作用はやはりCaによるCa遊離の促進効果と言うことができよう。同様にプロカインは心筋小胞体においてもCaによるCa遊離を抑制した。

考　　察

skinned fiberを用いて筋小胞体のCaによるCa遊離機構を骨格筋（速筋）と心筋とで比較した。ヒト骨格筋においては速筋と遅筋でCaによるCa遊離機構の性質にほとんど差がないので[6]，もしモルモット骨格筋でもその点が同様であるとすれば，本実験は骨格筋一般と心筋との比較と考えてよいことになる。

心筋小胞体のCaによるCa遊離は，その大まかなCa感受性，Mg^{2+}およびプロカインによる抑制，ATPないしそのアナログ並びにカフェインによる促進など定性的には骨格筋小胞体のそれと全く同じであった。しかし，定量的には，要約すると次の二点に心筋と骨格筋とで差異が見られた。

(1)Caによる最大Ca遊離速度は心筋の方が骨格筋

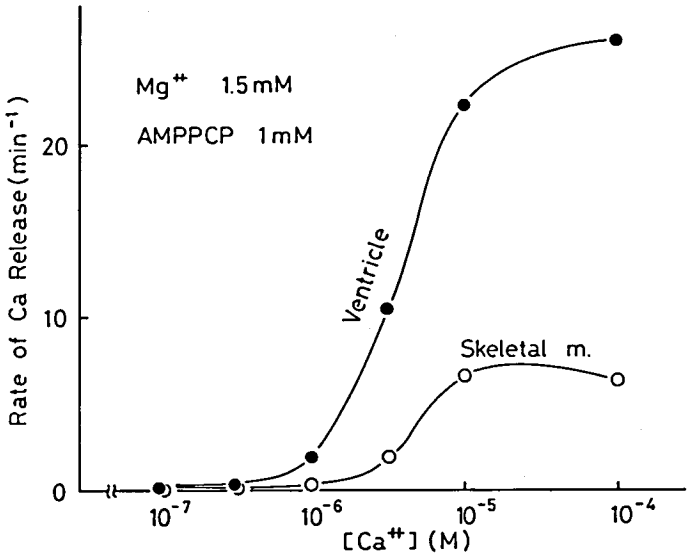


図 6.　モルモット骨格筋および心筋小胞体の生理的条件下（Mg^{2+}濃度，アデニンヌクレオチド濃度に関して）におけるCaによるCa遊離。

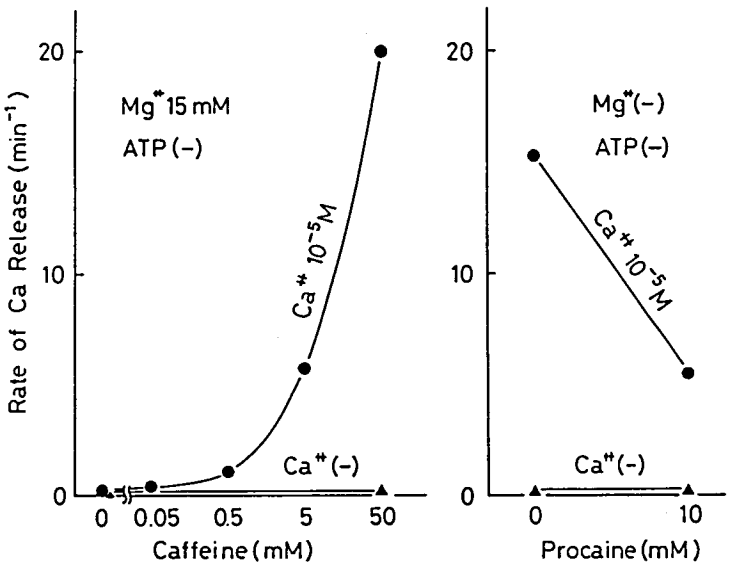


図 7.　モルモット心筋小胞体のCaによるCa遊離機構に対するカフェインの促進作用とプロカインの抑制作用。

より大きい。(2)Ca^{2+}濃度を十分に上げるとCa遊離速度がむしろ減少するが，その減少は骨格筋で強く心筋で弱い。また，Mg^{2+}による最大Ca遊離速度の減少も骨格筋で強く心筋では比較的弱い。これらの2価イオンの抑制作用の機序は，もちろんまだよく分っていないが，一つの考えとしてCaによるCa遊離はCa^{2+}によって小胞体膜に存在するCa^{2+}イオンチャンネルのゲートが開く結果であり，2価イオンはそのCa^{2+}イオンチャンネルを閉塞する，という可能性が考えられている。もし，

そのように考えるなら，上記の(1)，(2)の骨格筋と心筋の定量的差異は，いずれもCa^{2+}イオンチャンネルが心筋で大きいとすれば最大Ca遊離速度も大きく，また2価イオンで閉塞され難い，と説明することができる。しかし，もちろん他にも種々の説明があり得よう。いずれにしても上記の骨格筋と心筋間の定量的な差異は，CaによるCa遊離に関与する（恐らくは）小胞体膜蛋白質に差のあることを示している。CaによるCa遊離機構の生理的意義はまだ明らかでないが，この小胞体"膜蛋白質"の臓器差は蛋白レベルではどこにあるか，発生過程でその分化はどのように進むか，他のたとえば収縮蛋白質の分化とどのような位相的関連を有するか，それらの遺伝子発現機構はどのように制御されているか，などが今後の目指すべき方向である。

文　　献

1) 遠藤　實，堀内桂輔：両生類骨格筋の遅速両筋線維の比較，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，昭和56年度研究報告書 69－75，1982.
2) 遠藤　實，堀内桂輔：両生類骨格筋の遅筋と速筋：筋小胞体の性質の比較，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，昭和57年度研究報告書　80－87，1983.
3) 遠藤　實，堀内桂輔：幼年アフリカツメガエル腸骨腓骨筋の収縮系と筋小胞体，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，昭和58年度研究報告書　74－79，1984.
4) Ohtsuki, I., Manzi, R. M., Palade, G.E. & Jamieson, J. D. : Entry of macromolecular tracers into cells from chick breast muscle. *Biol. cellulaire* **31**, 119–126. 1980.
5) Endo, M. & Iino, M.: Specific perforation of muscle cell membrane with preserved SR functions by saponin treatment. *J. Muscle Res. Cell Motility*, **1**, 89–100, 1980.
6) Endo, M., Yagi, S., Ishizuka, T., Horiuti, K., Koga, Y. & Amaha, K. : Changes in the Ca-induced Ca release mechanism in the sarcoplasmic reticulum of the muscle from a patient with malignant Hyperthermia. *Biomed. Res.* **4**, 83–92, 1983.
7) Harafuji, H. & Ogawa, Y.: Re-examination of the apparent binding constant of ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid with calcium around neutral pH. *J. Biochem.* **87**, 1305–1312, 1980.
8) Endo, M. : Mechanism of calcium-induced calcium release in the SR membrane. In "The Mechanism of Gated Calcium Transport across Biological Membranes" (S.T. Ohnishi & M. Endo, eds.), pp. 257–264, 1981.
9) Kakuta, Y.: Effects of ATP and related compounds on the Ca-induced Ca release mechanism of the Xenopus SR. *Pflügers Arch.* **400**, 72–79, 1984.

2　筋に対する神経のtrophic効果
－Acetylcholine receptorの分布－

長谷川　修　司*
研究協力者　黒　見　　担*

はじめに

運動神経は，骨格筋を少くとも二種類の信号伝達を通して支配していると考えられる。一つは，化学伝達物質（アセチルコリン）を筋に放出し，放出された伝達物質が筋の受容体（Acetylcholine receptor；AChRと略す）に結合すると筋に活動電位が発生し，筋収縮へといたる信号伝達である。この過程はmsec単位で終了する現象である。もう一つは，比較的長期間にわたる現象を支配していると考えられる，神経から骨格筋への信号伝達である。例えば，支配神経を切断すると，数日後には，筋は萎縮してくる。神経から筋維持の信号が絶えず送られていて，神経切断によってそれが絶たれたための筋萎縮だと解釈され，これを神経の筋へのtrophic効果と呼んでいる。これまで多くの研究が化学伝達物質を介する信号伝達についてなされ，この機構はかなりよく理解されるようになった。一方神経の骨格筋へのtrophic信号伝達機構については，現在ほとんどわかっていない。筋ジストロフィー症の成因と治療を考える場合，この長期的な作用を示す神経の筋へのtrophic影響を考慮に入れることが重要と考えられる。この点から，われわれは，骨格筋への運動神経のtrophic作用機構を理解するため，筋の活動電位発生のためのイオンチャンネルの性質をコントロールしているtrophic substanceの検索を進めている。[1, 2]

今回は，さらに神経の筋へのtrophic機構を理解するため，培養骨格筋細胞膜のアセチルコリン受容体（AChR）の発達過程での分布の変化とそれに対する神経の役割をしらべた。

培養骨格筋のAChRは，神経の支配を受ける前は，筋細胞膜表面全体にdiffuseに分布しているが，ところどころ密度の高い部分，つまりclusterの状態で分布しているところがある。神経が筋に接触すると，このAChRのclusterはこわれ，AChR分子はdiffuseに分布するようになる。その後，神経・筋接合部にAChRのclusterが形成される。[3] 生体においても，発生初期の骨格筋のAChRは筋線維表面全体に分布しているが，発達過程において，AChRは神経・筋接合部にのみ高密度で局在するようになる。おそらく神経がこのAChRの局在を制御しているであろうが，その作用機序はわかっていない。本実験において，AChRの分布を経時的に観察することによって，神経の筋のAChR分布に対するtrophic機構を調べた。[5, 6]

実験方法

アフリカツメガエル（Xenopus laevis）の胚から筋細胞および脊髄神経細胞をとり出し，すでに報告されている方法[4]で培養を行った。神経・筋細胞を一定時間培養後，筋細胞表面のAChRをRhodamine-α-Bungarotoxinで蛍光標識した。AChRの分布をimage intensifierを附けた蛍光顕微鏡で経時的に記録した。また，細胞表

＊千葉大学医学部脳機能研究施設　神経薬理研究部

面のAChRの膜内での動きを，Fluorescence photobleaching recorey（FPR）法で測定した。

結　　果

3－1　神経・筋接合部でのAChR clusterの形成

図－1に，神経・筋接合部でのAChRのclusterが形成される初期のAChRの分布の変化が経時的に示してある。この観察を始めた時（0：00）5つのきわめて小さいAChRのcluster（7，4，5，9の矢印）が神経の走行に沿ってみられ，2つのAChR cluster（10，11の矢印）が神経・筋接合部の外にみられた（図1のb）。8時間30分後，多くのAChR cluster が神経の走行に沿ってみられ，神経・筋接合部の外には，AChRのclusterはまったく見られなくなった（図1のe）。図1のAChR分布の経時的観察から，次の3つのことが結論される。(1)神経・筋接合部でAChR clusterは，diffuseに分布している部分に，最初小さいclusterとして現われる。接合外のAChR clusterが接合部に移動してくるのではない（例えば，図1dの1，12の矢印，図1eの2，3，13－15の矢印）。(2)小さいAChR clusterは神経・筋接合部でその大きさ（図1b－e，4の矢印図1b－c，5，6の矢印）および数が増加し，融合して大きなclusterが形成される（図1 2b-e，7の矢印）。なかには，大きさが減少し（図1d-e，8の矢印）または，消失する（図1b-c，9の矢印）AChR clusterも観察された。(3)神経・筋接合部の外のAChR clusterは，接合部でAChR clusterが形成される間に，小さいcluster に分解して消失したり（図1，b-d，10の矢印），そのまま消失したり（図1，b-c，11の矢印）した。

3－2　神経・筋接合部でのAChR cluster の形成速度

神経・筋接合部でのAChR cluster の形成される速さを決定するため，15個のAChR clusterを選び，その面積を経時的に測定した（例えば，図1 b-e，4の矢印，図1 b-c，5，6の矢印）。神経・筋接合部でのAChR cluster 形成の平均速度は個々のclusterで異なり，0.1 μm^2/hr以下から2.3 μm^2/hr であった（mean値は0.7 μm^2/hr；N＝21）（表－1）

3－3　FPR法によるAChRの膜内での拡散速度

培養骨格筋細胞のAChR分子の膜内での動きの速さを知るため，FPR法により，AChR 分子の拡散係数を測定した（表2）。その結果，(1) AChR分子でclusterを形成しているものは，実質上，動かない；拡散係数は10^{-12} cm^2/sec 22℃以下である。(2) diffuse に分布しているAChR 分子の大部分は膜内を自由に動き廻っている，(3) diffuse に分布しているAChR 分子の膜内での速さは，筋細胞だけの培養と神経支配を受けた培養とで，その拡散係数とBleach 後の回復程度に差はみとめられない。

3－4　除神経後のAChR分布の変化

神経・筋接合部でのAChR cluster 形成に対する神経の役割をさらに明らかにするため，除神経後のAChRの分布をしらべた。除神経はレーザー光線を神経細胞体に照射して行った。図2に示されている如く，除神経後，神経・筋接合部での大きなAChR cluster は小さい clusterに分解し（図2，B，C 3，4，5の矢印，図2C，D 6の矢印），消失した。また大きさが小さくなり消失した（図2B－E，7．8．9の矢印，図2B，C，1，2の矢印）。除神経後，神経・筋接合の外に，AChR の clusterが出現することもあった（図2，D，E 11の矢印，図2，D10の矢印）。

3－5　培養日数の異った神経・筋接合部でのAChR clusterの消失

神経細胞を加えて1日後に除神経を行うと，大部分のAChR clusterは，神経・筋接合部から消失した（図3の…○…，…●…）。一方神経細胞を加えてから3日後に除神経を行うと，半分近くのAChR cluster が神経・筋接合部に残った（図3 ——△——）。

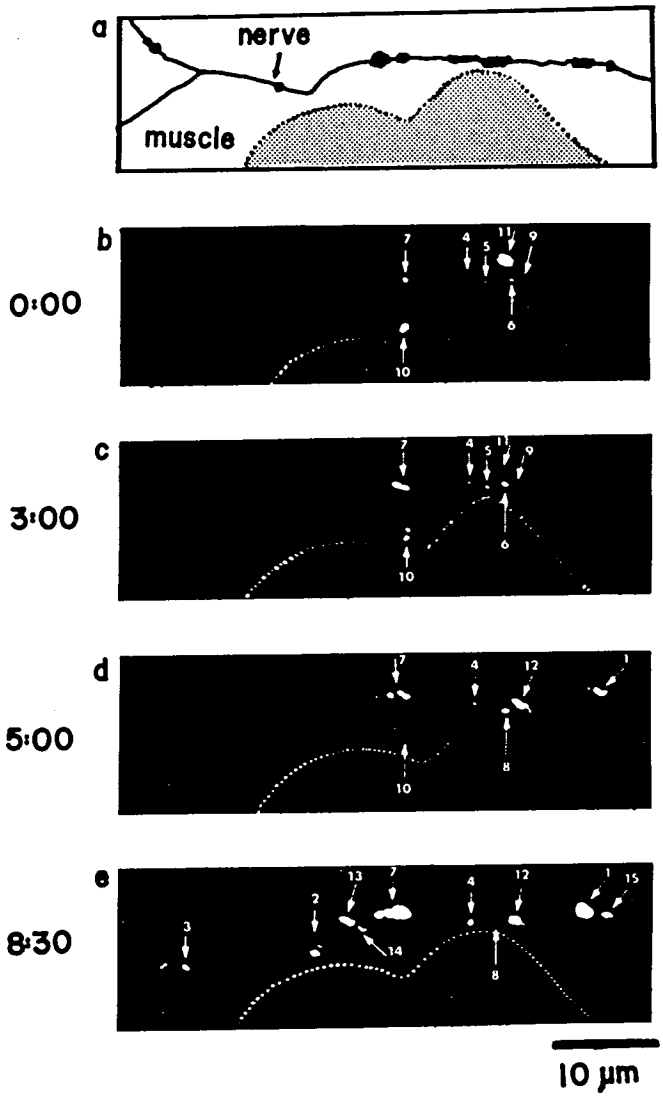


図１　神経・筋接合部でのAChR　cluster の出現，a；神経・筋細胞の図式（０：００時），b－e；蛍光顕微鏡写真（白いところがAChR　cluster，黒い部分はAChRがdiffuse に分布している)。カッコ内は比較的（時：分）。[6]

表1　神経・筋接合部でのAChR cluster の形成速度

AChR cluster番号	蓄積速度 (Sites/hr)	*理論値 (Sites/hr)
1	6.6×10^{2}	1.4×10^{4}
2	6.1	1.3
3	2.2	1.1
4	2.5	1.1
5	1.7	1.0
6	5.5	1.1
7	0.5	0.4
8	3.3	0.9
9	5.0	1.3
10	1.0	0.8
11	9.9	1.6
12	4.1	1.2
13	3.9	1.3
14	0	0.5
15	1.0	0.7

＊理論値は，$F=2\pi D\phi K\,(a/2c)$ によって計算した。[7]

表2　AChRの拡散

培養数		拡散定数 (10^{-10} cm²/sec)	回復値 (%)
筋細胞のみ	7	2.37±0.07	68.2±5.5
神経支配をうけた筋	6	2.50±0.35	61.1±6.4

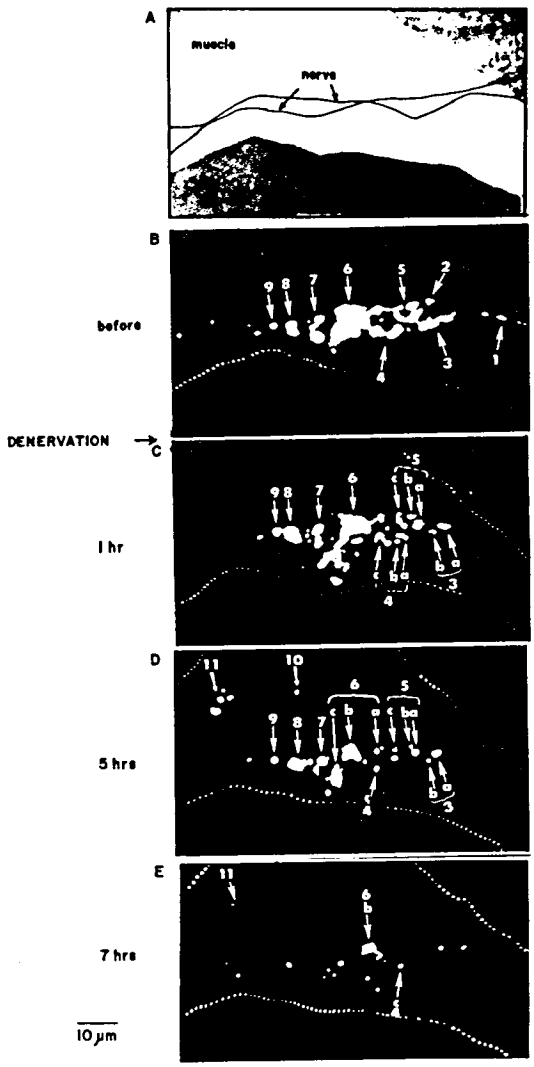


図2　除神経後のAChR clusterの変化[5]
A；この筋細胞は2本の神経に接触を受けていた。B－E；蛍光顕微鏡写真　除神経前(B)，除神経後1時間(C)，5時間(D)，7時間(E)

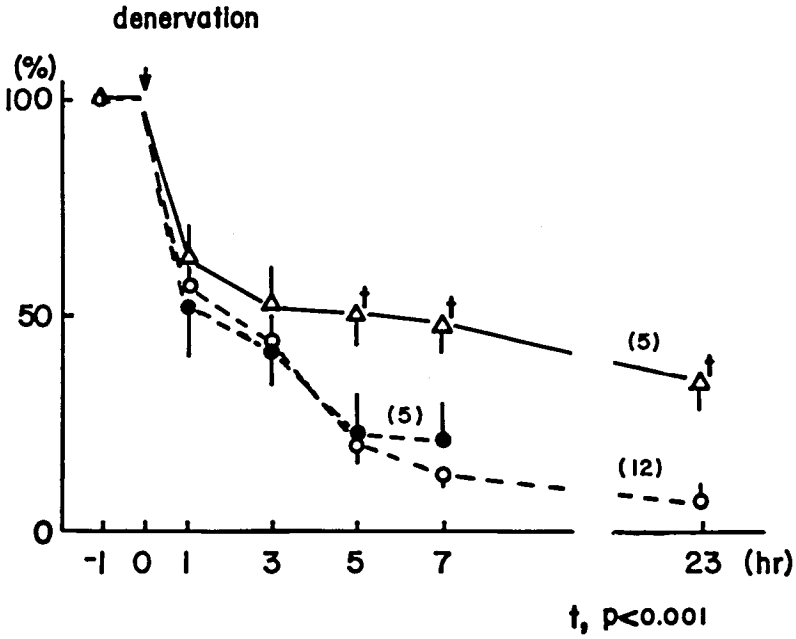


図3　除神経後のAChR cluster 消失の時間経過•縦軸；除神経前の神経•筋接合部でのAChR clusterの面積を100としてある。横軸；除神経後の時間。神経と3日共培養した4日培養筋（—△—）。神経と1日共培養した4日培養筋（----○----），2日培養筋（----●----）[5]。

考察と結論

神経・筋接合部にAChR分子が高密度（cluster）で分布する機構としては，一時期，神経が筋のAChR clusterを捜し，そこに接合部を形成するためであるとされていた。現在は，神経は筋の適当な場所に接合部を形成し，その後その接合部にAChR clusterが形成されるという説明が受け入れられている。今回の実験で示されたように，経時的にAChRの分布をしらべてみると，接合部でのAChRは，それまでまったくcluster がみられなかったところでも，cluster が出現してきた。このことは，神経・筋接合部でのAChR clusterは神経がもとあったAChR clusterに一致したためではなく，接合部形成後に形成されたのであるという上の説をはっきりと支持する。神経・筋接合部が形成された後，そこにAChR clusterが形成される機構として現在2つの説が提出されている。(1)接合外のAChR clusterが接合部に移動してくる。(2) diffuseに分布しているAChR分子は自由に拡散しているので，接合部に出会うとそこでtrapされる。(2)の説を排除する強い理由として，AChR 分子の拡散の速さが遅すぎて，実際にみられる接合部でのcluster形成の速さを説明できないというものであった。しかし，今回，AChR分子の拡散の速さをFluorescence Photobleaching Recovery 法で測定し，それによるAChR cluster の形成速度を計算した（表1の理論値）。一方，経時的に観察したAChR clusterの面積から，実際のAChR cluster の形成の速さを計算した（表1の蓄積速度）。その結果，これまで想像された結果と反対に，AChR clusterの形成速度は，AChR

分子の拡散によるもので充分説明されることが明らかになった。また経時的にAChR cluster 形成を観察した結果，接合部外のAChR cluster が移動して，接合部にAChR cluster が形成されるという知見は全く得られなかった。以上のことから，神経・筋接合部でのAChR cluster の形成は，自由に膜内に拡散しているdiffuse に分布しているAChR分子が，接合部に来るとそこで trap されたためであるという説で充分説明できると考えられる。

また，除神経の実験の結果から，神経・筋接合部でのAChR cluster は形成後安定化されていくことが培養下で示された。

文　　献

1) Kuromi, H. and Hasegawa, S. (1975). Neurotrophic effect of spinal cord extract on membrane potentials of organ cultured mouse skeletal muscle. *Brain Res.* **100**, 178-181.
2) Gonoi, T., Hasegawa, S., Kuromi, H. and Hagihara, Y. (1983). The neurotrophic substance regulating the membrane properties of skeletal muscles. "Muscle dystrophy; biomedical aspects" eds. Ebashi, S. and Ozawa, E. pp71-76, *Japanese Scientific Society Press.*
3) Kuromi, H. and Kidokoro, Y. (1984a). Nerve disperses preexisting acetylcholine receptor clusters prior to induction of receptor accumulation in Xenopus muscle cultures. *Develop. Biol.* **103**, 53-61.
4) Anderson, M.J., Cohen, M.W. and Zorychta, E. (1977). Effects of innervation on the distribution of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J. Physiol.* **268**, 731-756.
5) Kuromi, H. and Kidokoro, Y. (1984b). Denervation disperses acetylcholine receptor clusters at the neuromuscular junction in Xenopus cultures. *Develop. Biol.* **104**, 421-427.
6) Kuromi, H., Brass, B. and Kidokoro, Y. Formation of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junction in Xenopus cultures. *Develop. Biol.* (in press).
7) Edwards, C. and Frisch, H.L. (1976). A model for the localization of acetylcholine receptors at the muscle endplate. *J. Neurobiol.* **7**, 377-381.

3 筋発生異常における神経側の要因

大 塚 正 徳*
研究協力者　弘 中 哲 治** 五十里 良 生**

我々は筋ジストロフィー症の発症の原因を究明する目的で，正常チキン（line 412）およびジストロフィーチキン（line 413）の長橈側手根伸（ECRL）筋を用いて実験を行なってきた。ECRL筋の交換移植の実験から，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た。[1] 一方，ECRL筋の生理学的および解剖学的性質の経時変化を調べた実験から，孵化後初期（～13日）にみられる筋線維数の増加がジストロフィーチキンで著しく抑制されていることが分かった。[2]

これら二つの実験から，ジストロフィーチキンにみられる孵化後初期における筋発生の抑制が神経側の異常に基づくことは十分ありうることである。そこでまず，ECRL筋を支配する神経の発生異常の有無を調べるために同筋に進入する神経線維の数を測定した。[3] しかし，ジストロフィーチキンで神経線維の数が少ないと言う証拠はなく，むしろ多い位であった。[3] 支配すべき筋を持たない神経細胞は死滅して行くことが知られており，[4),5)] ジストロフィーチキンで見出された"余剰"の神経線維[3]はECRL筋を支配しているものと思われる。このように，これまでの実験結果からは孵化後初期における筋の発生でジストロフィーチキンに神経栄養的な意味で欠陥があることを示す積極的な証拠は得られていない。

我々はこれまでに，ジストロフィーチキンの中枢神経系に異常興奮を示すニューロンがあり，この孵化後初期（筋発生の時期）に，すでにECRL筋に対して異常刺激が加わっている事実を報告した。[6] 今回は，この支配神経による異常刺激が筋の発生において抑制的に働いている可能性について検討を行なった。もし，この異常刺激が筋の発生を阻害していれば，ジストロフィーチキンで中枢神経の異常興奮を抑えてやれば発生してくる筋線維数は増加し，正常チキンで中枢神経の異常興奮を起こしてやればそれは減少するはずである。中枢抑制薬としてphenobarbital　中枢興奮薬としてpentylenetetrazolを選び実験を行なった。

方　　法

孵化後1～13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。Phenobarbital（20，30mg/kg）およびpentylenetetrazol（20mg/kg）を毎日1回，前者は就寝前（夕方6時頃），後者は朝（10時頃）腹腔内に投与した。13日目にエーテル麻酔下にECRL筋を摘出し，ホルマリンで固定した後，近位端から⅓の所で横断切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジンで染色した。染色標本を適当な大きさに拡大して写真を撮り，サンプリング法により筋線維数を計測した。[1,2]

結　　果

薬物がヒヨコの動態に与える急性効果：Phenobarbital 20～30mg/kg 投与後ヒヨコの動きが少なくなり"眠い"様子を示したが，刺激に

*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（研究協力者）

対しては十分に応じ得る状態であった。朝方にはcontrol群と同じ動きを示した。Pentylenetetrazol 20mg/kgでは，逆に，動きが多くなり，鳴き声の調子が高くなり，時々飛び立ちそうな気配を示した。この薬用量ではけいれんは起らなかった。

薬物投与が成長に与える影響：図1にphenobarbital 20mg/kg 投与群における体重増加の様子を示した。Exponential function をあてはめて最小二乗法で算出したrate constant（k）はcontrol（○）で0.016/day，test（●）で0.014/dayであった。Phenobarbital 30mg/kgを投与した別の実験では，それぞれ，0.022/day，0.026/dayであった。また，pentylenetetrazol 20mg/kg投与では（図2），control 0.014/dayに対し0.013/dayであった。これらの実験から両薬物の成長におよぼす影響は無視し得る程度と思われる。

中枢抑制薬および興奮薬が筋の発生に与える影響：表1に薬物投与の影響を13日目に筋線維数の変化で調べた結果を示した。生理食塩水を投与したcontrol群の筋線維数は正常・ジストロフィーともに前に報告した[2]ものとほぼ等しい値を示した。従って，注射によるストレス等の影響はなかったものと思われる。このcontrolに対してphenobarbital 投与群では二つの実験でいずれも筋線維数が14,000から17,000，15,000から16,000と増加する傾向がみられたが統計的な有意差はなかった。これに対して，pentylenetetrazol 投与群では，25,000から16,000と筋線維数の著しい減少がみられ，ジストロフィーチキンのcontrolに近い値を示した。この減少は統計的にも有意であった（$P<0.05$）。Pentylenetetrazol 投与群の一部で孵化後13日目にflip-testを行なったところ，いずれも陽性であった。

考　　察

図1，2に示したように，正常チキンにおける体重増加に対するphenobarbitalとpentylenetetrazol の影響はそれ程大きなものではなく

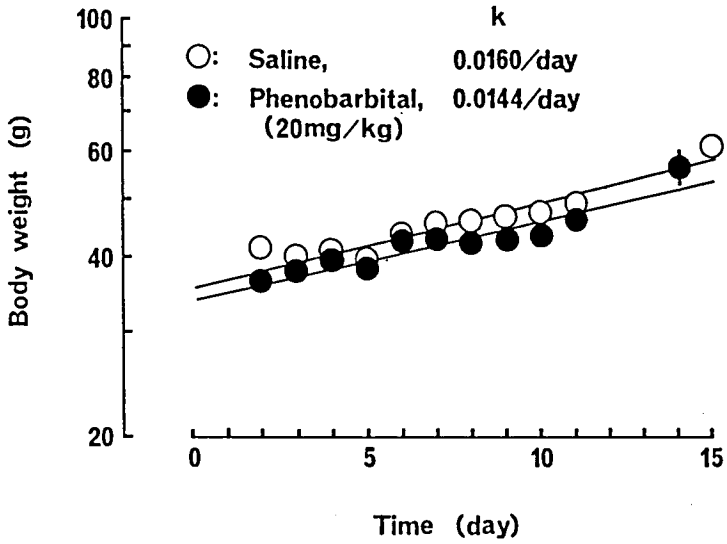


図1.　Phenobarbitalが体重増加に与える影響。薬物および生理食塩水は0.01 ml/g 体重となるように容量を調整し，腹腔内に投与した。○, control（n=3）; ●, test（n=4）。縦棒，SEM。k，最小二乗法により求めた直線の公配を表わす。正常チキン

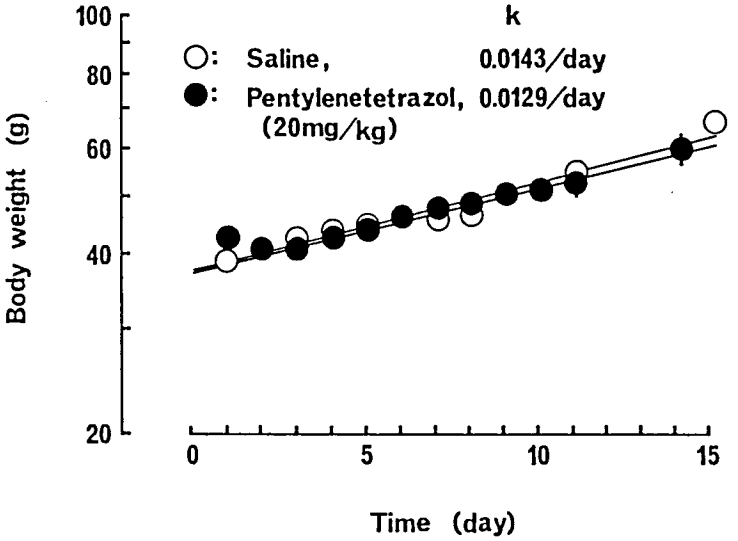


図 2.　Pentylenetetrazol が体重増加に与える影響。薬物および生理食塩水は 0.01 ml/g 体重となるように容量を調整し，腹腔内に投与した。○, control (n=5); ●, test (n=7)。縦棒, SEM。k, 最小二乗法により求めた直線の公配を表わす。正常チキン

表 1.　中枢抑制薬（phenobarbital）および興奮薬（pentylenetetrazol）の孵化後初期における筋発生に与える影響

	Chicken	Treatments	Number of muscle fibers (ECRL)
Exp. 1	Normal	Saline	25046 ± 2530 (5)
	Normal	Pentylenetetrazol (20 mg/kg, i.p.)	16189 ± 1687 (7) * flip test (+)
Exp. 2	Dystrophic	Saline	13913 ± 659 (4)
	Dystrophic	Phenobarbital (30 mg/kg, i.p.)	16749 ± 2294 (4)
Exp. 3	Dystrophic	Saline	14766 ± 2328 (3)
	Dystrophic	Phenobarbital (20 mg/kg, i.p.)	16254 ± 3203 (4)
			Mean ± SEM (n)

筋線維数は孵化後 13 日目に測定した。

バラツキの範囲に入るものであった。従って，これら二つの薬物の筋発生におよぼす影響も中毒作用の二次的結果とは考えにくいと思われる。薬物投与後のヒヨコの動態の観察においても，本実験で使用した薬用量では，軽い鎮静作用を示す程度であった。

表1に示した実験結果はいずれも，方向としては，我々の作業仮説，すなわち，"中枢神経系の異常興奮が孵化後初期における筋の発生を阻害している"[2] 可能性を支持するものであった。この作業仮説に対する結論をだすためにはさらに例数を重ねるとともに，薬物によりＥＣＲＬ筋を支配する神経の活動が実際にどの程度抑制あるいは促進されているかを直接的に調べる必要がある。仮にジストロフィーチキンでみられる支配神経の異常興奮が筋の発生を阻害しているとすると，先に考察したように，ジストロフィーチキンでも神経支配は正常に行なわれているようであることから[3]，例えば遺伝子発現に関わる何らかの因子が神経側から過剰に分泌されている可能性も考えておく必要がある。

Pentytenetetrazol で中枢神経系に異常興奮をひき起こすことにより筋発生の著しい抑制がもたらされたことに加えて，チキンのジストロフィーの発症の診断法の一つとして用いられている flip test が正常チキンで陽性になったことは興味深いことである。このことは我々が従来主張してきた"ジストロフィーチキンでみられるいろいろの病態像は中枢神経系の異常に由来する"ことをさらに支持する事実である。

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) 大塚正徳，弘中哲治，五十里良生（1984）。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。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
4) 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. 1941, Academic Press, New York.
5) 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 stabilizaiton of synapses. *J. comp. Neurol.* 187: 425-446.
6) Miyata, Y., Morimoto, S., Ikari, Y., and Hironaka, T. (1981). Origin of the spike discharges observed in muscles of dystrophic chickens. *Biomed. Res.* 2: 664-672.

II　筋構造蛋白質とその分化

4.　ジストロフィー鶏胸筋に存在する
特異蛋白質（30K蛋白）について　23

5.　ニワトリ骨格筋におけるミオシンとC蛋白質
アイソフォーム発現に及ぼす除神経支配の影響　32

6.　ニワトリ正常遅筋とジストロフィー速筋
にみられた筋細胞増殖因子　39

7.　骨格筋の弾性タンパク質コネクチン　44

8.　胚筋，再生筋および除神経筋におけるトロポニン—T　48

4　ジストロフィー鶏胸筋に存在する特異蛋白質（30K蛋白）について

小　林　良　二*

はじめに

筋ジストロフィーの病因や病態を解明する上で疾患モデル動物を用いた研究成果は，私達に重要な手がかりやヒントを与えてくれた。疾患モデルとヒトの筋ジストロフィーが全く同一というわけではなく，モデル動物における成果がそのままヒトに適用できるわけではないが，研究方法の開発，筋ジストロフィーの基礎的事項の解明などに極めて有力な武器である。筋ジストロフィー鶏についても既に多くの成果が積重ねられ，収縮蛋白の発現の異常，形態学的異常，膜異常などについて多様な検討が行われてきた。殊に収縮蛋白については，トロポニンT，トロポミオシン，C－蛋白，ミオシン重鎖及び軽鎖などの発現異常が見い出され，詳細でdefinitiveな成果が公表され，その概略と今後の発展方向についてもまとめられている（1～4）。

本研究では，筋ジストロフィー鶏をモデル動物として用い，もっとも典型的な形で発症する浅胸筋を材料として，ジストロフィー筋に特異的に発現する異常蛋白について追求した。その結果，分子量約30K dalton，等電点約8.4の特異蛋白を見い出したので，この蛋白を漸定的に「ジストロフィー特異蛋白」（Dystrophy-specific protein）と名づけ，主として生化学的検討を加えた。

＊秋田大学医学部生化学第2講座

研究材料及び方法

実験動物としては，主としてジストロフィー鶏（New Hampshire line 413）及びそのコントロール鶏（New Hampshire line 412）を用い，必要に応じて，白色レグホンなど他の鶏を用いた。SDS－ポリアクリルアミド電気泳動は，Laemliの系を用い二次元電気泳動はO'Farrellに従い，イムノブロットはTowbinの方法に準じた。またadenylate kinaseはNobaらの方法，[5]triose phosphate isomeraseはMcVittieらの方法[6]によって精製した。またトロポニン，トロポミオシン，ミオシンは，各々既に報告されている方法によって精製した[7]。ジストロフィー特異蛋白の抗体は，抗原を電気泳動後，バンドを切り出し抽出後，ウサギに免疫することによって得た。特異性及び抗体価は，オークタロニー法，イムノブロット，dot assay によって確認した。

実験結果

I．ジストロフィー特異蛋白の検出

ジストロフィー鶏浅胸筋における異常蛋白の出現（あるいは特定の蛋白の消失）を調べる目的で一次元及び二次元電気泳動法によるスクリーニングを行った。図1に示すように正常鶏胸筋とジストロフィー胸筋の電気泳動パターンの比較では，いくつかのバンドに差異を認めるが，約30K dalton のバンドの有無が最も明確な差異であった。二次元電気泳動の結果も，これを支持し，等電点は約8.4であった。この30K dalton，pI 8.4の異常蛋白は異った個体でも常に観察される

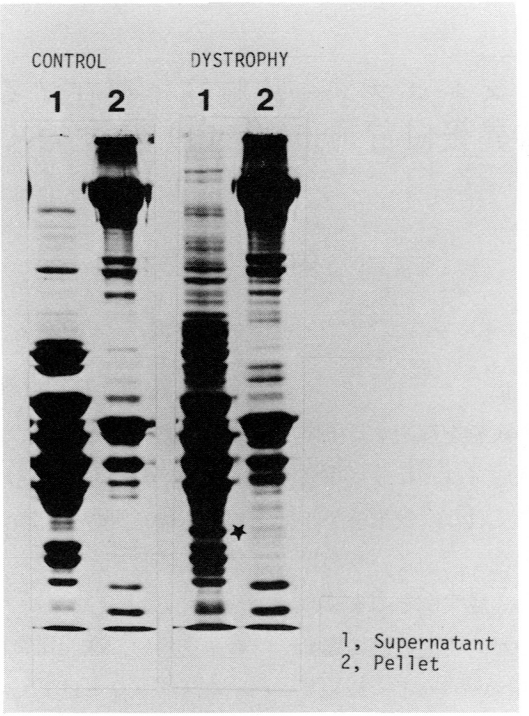


図 1.　SDS / PAGEによるジストロフィー鶏浅胸筋と正常鶏浅胸筋の比較。
0.15M NaCl, 10mM Tris - HCl, pH7.5のバッファーで筋をホモジナイズ後，遠心（18,000×g，20分）し上清と沈査をSDS/PAGEによって分析した。30K dalton のジストロフィー特異蛋白には星印を付してある。

表 1.　PURIFICATION OF DYSTROPHY-SPECIFIC PROTEIN

Step	Total protein (mg)	Dystrophy-specific Protein (mg)	Purification fold	Yield (%)
1. Tris-saline extract	960.0	32.6	1	100
2. Ammonium sulfate fractionation (50-80% saturation)	398.0	24.7	1.8	75
3. DEAE-cellulose chromatography	130.0	16.8	3.8	51
4. Hydroxylapatite chromatography	98.0	12.9	3.9	40
5. Elution from SDS-gels	8.0	8.0	29.5	25

ので，まずこの蛋白に注目し精製をすすめた。

Ⅱ．ジストロフィー特異蛋白の精製と抗体の作成

23gのジストロフィー鶏浅胸筋を出発材料として，ジストロフィー特異蛋白の精製をすすめた。5倍量の等張溶液（0.15 M NaCl, 10mM Tris−HCl，pH 7.5）で，ホモジナイズし，遠心（18,000×g，20分）後，その上清を，塩析（硫安，50〜80%飽和），DEAE-cellulose クロマトグラフィー，Hydroxylapatite クロマトグラフィー，電気泳動による分画によって精製した（表1）。ジストロフィー特異蛋白の生理活性は，現在のところ不明なので，SDS/PAGE とその後の densitometry によって精製度や回収率を計算した。Native な状態で完全精製するには至らず，最終ステップはSDS/PAGE 後バンドを切り出し，電気泳動的に溶出することによった。

抗体は通常の方法によりウサギに免疫することによって容易に得られ，特異性，抗体価についても十分なものであった。

Ⅲ．ジストロフィー特異蛋白の性状

SDS/PAGEによる推定では，この蛋白は30K daltonと考えられ，nativeな蛋白（Hydroxylapatite クロマトグラフィーステップの標品）のSephadex G-75によるゲルロ過でも同様の値が得られ，monomeric proteinと考えられた。二次元電気泳動からの等電点の推定ではpI 8.4という結果を得た。より詳細な，ジストロフィー特異タンパクの物理化学的性状については現在，検討中である。

Ⅳ．ジストロフィー特異蛋白の分布

ジストロフィー特異蛋白に対する抗体を用い，イムノブロット法によって，この蛋白の分布についても検討を行った。まず正常鶏（line 412）及びジストロフィー鶏（line 413）の各種骨格筋（浅胸筋，深胸筋，前広背筋，縫工筋，大腿筋膜張筋，大腿二頭筋，下腿三頭筋，長腓骨筋）についてジストロフィー特異蛋白の分布を調べた。既に述べた様に，ジストロフィー特異蛋白はイムノブロットによる検討でも，正常浅胸筋には存在せず，ジストロフィー浅胸筋には存在する。しかし，正常鶏においてもジストロフィー鶏においても，浅胸筋以外の筋，たとえば，深胸筋，前広背筋，縫工筋，大腿筋膜張筋などには存在する。大腿二頭筋，下腿三頭筋においては，全く検出出来ないか極く微量であった。更に注目すべきことは，ジストロフィー鶏のジストロフィー特異蛋白と正常鶏に存在する同様の蛋白はSDS/PAGE で泳動度が異り正常鶏のものは，分子量が小さいことであった。互いに isoproteinと考えられるが，この差異がジストロフィー遺伝子と何らかの関連を持つものか，line 412 と line 413の遺伝子背景の差[8]に起因するものかは，現在の段階では結論出来ない（図5）。

この蛋白が浅胸筋に存在することがジストロフィーの病態と関連があることを更に確認するために，遺伝子背景の全く異ると考えられる白色レグホン，チャボ，比内鶏などの浅胸筋についても同様の検討を行った。これら鶏の浅胸筋中にジストロフィー特異蛋白は存在しなかった（図6）。続いて，骨格筋以外の臓器についても検討した。心筋，平滑筋（砂胃），肝，脂肪細胞などにジストロフィー特異蛋白は検出できなかった（図7）。ジストロフィー筋では筋の変性に伴って脂肪細胞の浸潤が高度にみられるが，この蛋白が脂肪細胞に由来するものではないと考えられる。ジストロフィー鶏及び正常鶏の embryo（15日目及び21日目）についても検討を加えたが，ジストロフィー特異蛋白は，ジストロフィー成鶏にのみ見いだされ embryo の段階では検出できなかった（図8）。

更に，同種の蛋白が他種動物の骨格筋にも存在するかどうか，ヒト大腿四頭筋，ラット大胸筋について検討した。ヒト大腿四頭筋，ラット大胸筋抽出物をイムノブロット法によって検討すると，この抗体で認識される同様の蛋白が存在することがわかった（図9）。

Ⅴ．ジストロフィー特異蛋白は何か

ジストロフィー特異蛋白が既知の筋蛋白である可能性も高いので，いくつかの筋蛋白について異

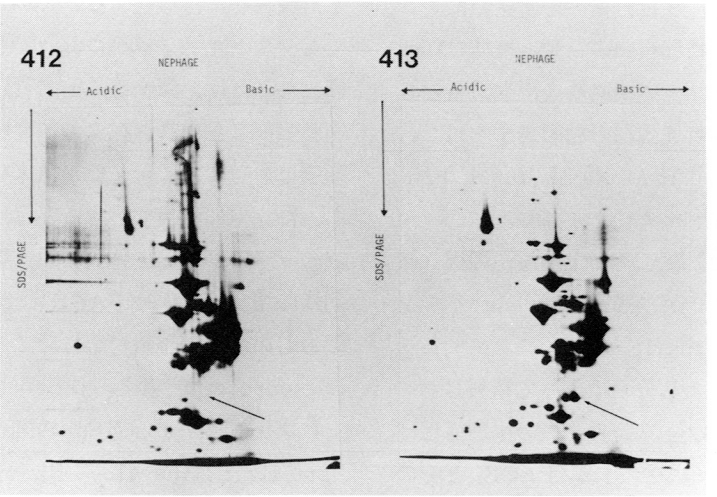


図 2.　二次元電気泳動によるジストロフィー特異蛋白の検出
筋肉可溶分画を一次元目をNEPHAGE，二次元目をSDS/PAGEによって分析した。ジストロフィー特異蛋白又はジストロフィー特異蛋白の出現する位置を矢印で示してある。

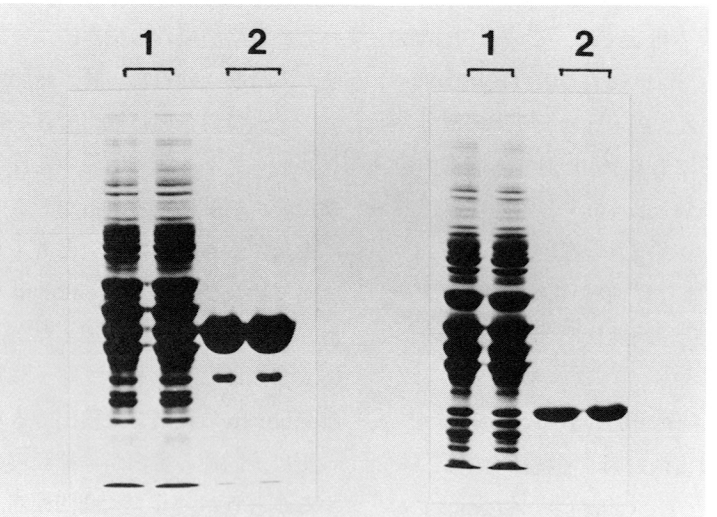


図 3.　部分精製又は完全精製されたジストロフィー特異蛋白のSDS/PAGE
左図はHydroxylapatite chromatography step (step 4)を，右図は最終標品 (step 5)を示す。各々　1は筋肉粗抽出物　2は精製標品を示す。

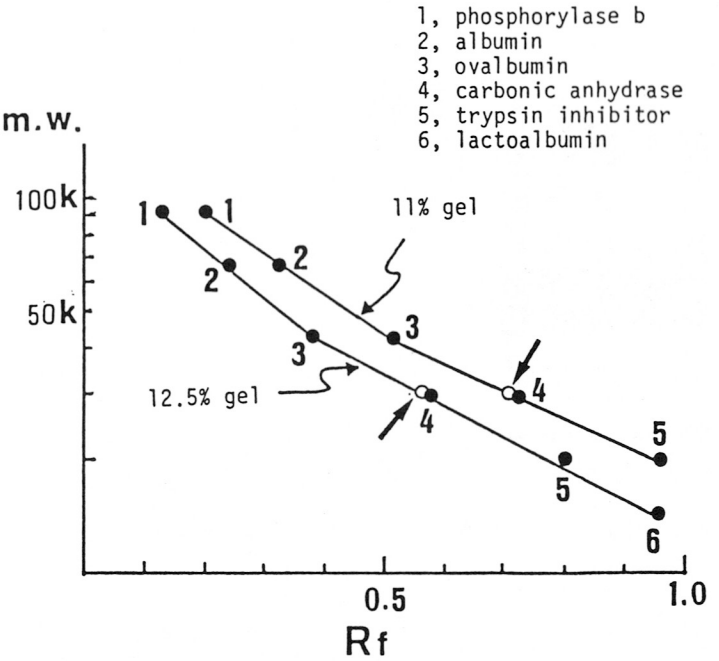


図4.　SDS/PAGEによるジストロフィー特異蛋白の分子量推定。ジストロフィー特異蛋白は白丸及び矢印で示してある。

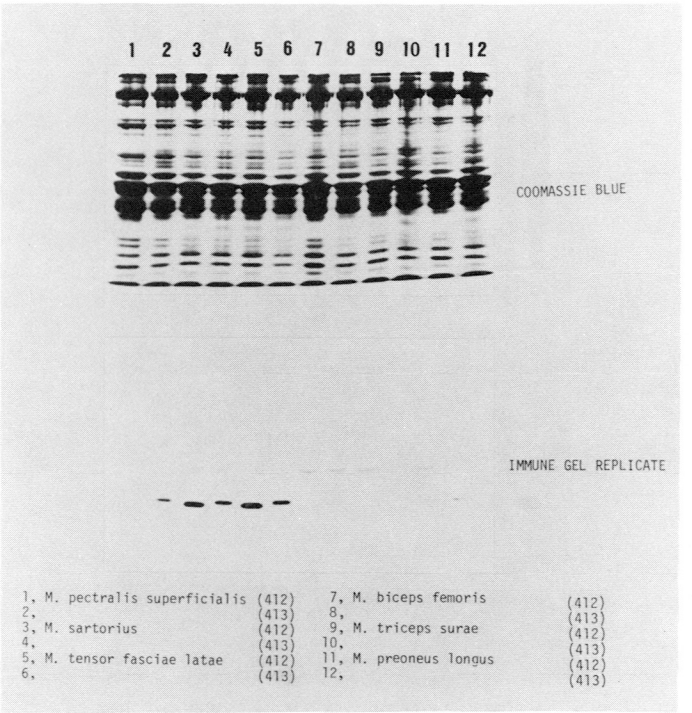


図5.　ジストロフィー鶏及び正常鶏浅胸筋のSDS/PAGEとイムノ・ブロットによる分析。説明は本文（尚，この図には前広背筋と深胸筋についての結果は示していない）。

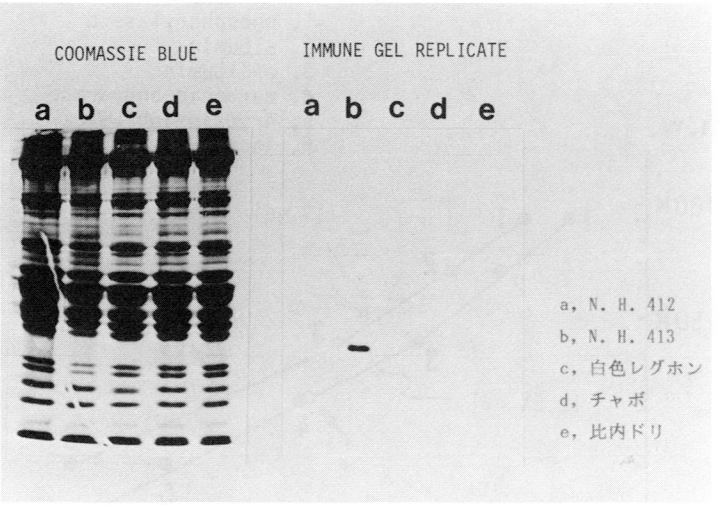


図 6.　各種ニワトリ浅胸筋におけるジストロフィー特異蛋白の出現。

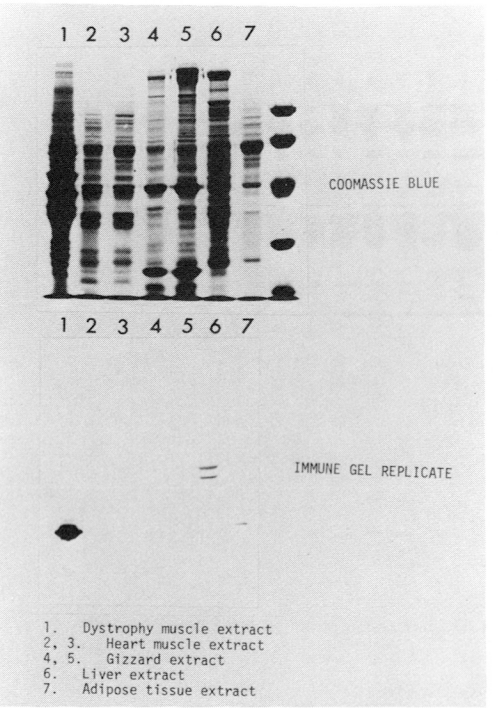


図 7.　各種臓器におけるジストロフィー特異蛋白の出現。

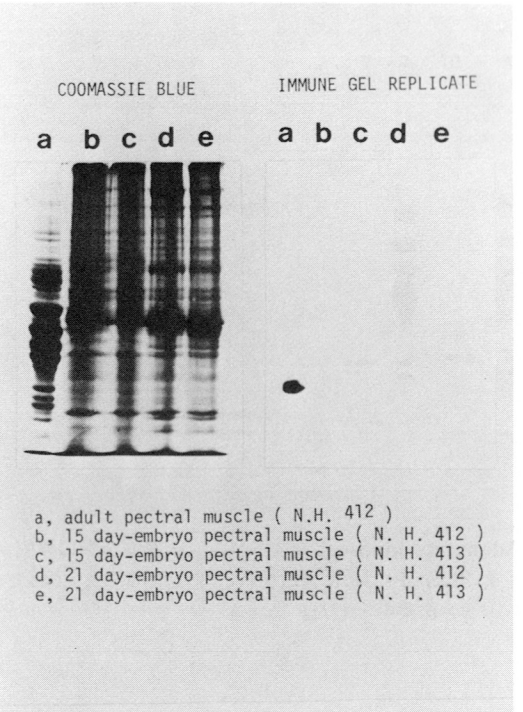


図8.　ジストロフィー鶏及び正常鶏embryoにおけるジストロフィー特異蛋白の出現。

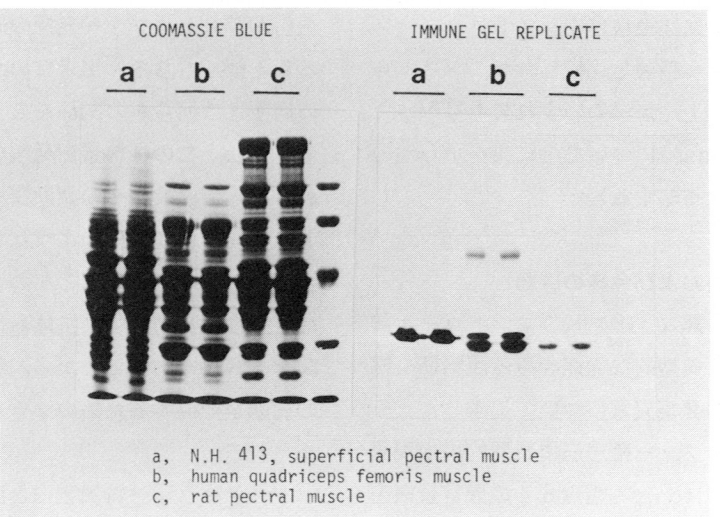


図9.　他種動物骨格筋におけるジストロフィー特異蛋白の出現。

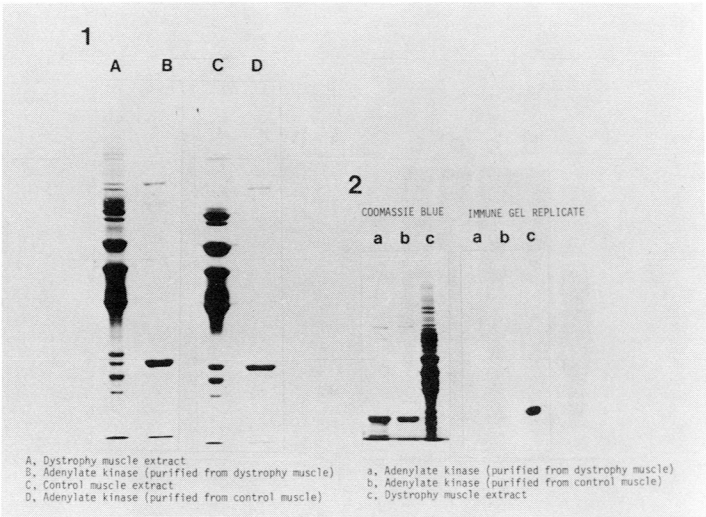


図 10. Adenylate kinaseとジストロフィー特異蛋白の異同。
1. はSDS/PAGEによる分析，2. はSDS/PAGEとイムノブロットの結果を示した。

同を調べた。可溶分画に存在する分子量20～40K dalton の塩基性蛋白や，塩基性蛋白ではないが分子量が近似しているものを中心に検討した。Adenylate kinase, triose phosphate isomerase, 更に troponin I, troponin T（足型及び胸型），ミオシン軽鎖などをジストロフィー胸筋及び正常胸筋から精製し比較したが，ジストロフィー特異蛋白は上記蛋白のいずれでもなかった（Adenylate kinase についての結果を示し他のデータについては省略する）。

結論および今後の課題

ジストロフィー鶏（413）及びコントロール鶏（412）を用い，典型的な発症をみる浅胸筋を材料として，蛋白の発現異常について追求した。その結果，ジストロフィー罹患筋に特異的に出現する分子量30K dalton，等電点8.4の異常蛋白を見出した。本報告では，漸定的にジストロフィー特異蛋白と呼んだが，正常でもある種の骨格筋には存在する蛋白であった。従来報告されている収縮蛋白の発現異常についても事情は同様で，たとえば，トロポニンTやトロポミオシンについても，ジストロフィー鶏浅胸筋には本来正常では存在しない isoformが発現するが，これら“異常蛋白”は，広背筋や下肢筋群では正常でも存在する蛋白質である。

現在までの結果から，このジストロフィー特異蛋白がジストロフィー発症の原因であると結論することは，もちろん出来ないが，ジストロフィーの病態とは何らかの関係をもっていると考えられる。また，この様な蛋白発現の異常は従来報告された収縮蛋白及びその調節蛋白のみならず，ジストロフィー特異蛋白のような可溶分画に存在する蛋白にも及んでいることがわかった。比較的簡単な方法で精製可能で，抗体も得やすく，定量法の開発も容易であることから，筋ジストロフィー症の病態を把握するためのマーカーとなり得ると考えられる。

ジストロフィー特異蛋白と同様の蛋白が正常鶏骨格筋（浅胸筋には存在しないが）にも存在するが分子量が異なる。この差異もまた筋ジストロフィーの病態に関連している可能性もあるが，line 412 と line 413 の遺伝子背景が全く同一ではないということ[8]から，lineのちがいによる偶発的な

ものである可能性もある。今後 congenic strain を用いて検討を行う必要がある。またジストロフィー特異蛋白の浅胸筋における出現が，一次性であるか二次性であるかも今後の検討が必要である。ジストロフィー罹患筋においては，筋の崩解・変性に伴い筋の再生も進行する。ジストロフィー特異蛋白の出現が，再生筋細胞に起因するものかどうかなど形態学的観察を含め検討する必要がある。

さて，このジストロフィー特異蛋白は何かという問題であるが，現在までの研究からは明確な結論を得ていない。しかし特定の筋肉酵素のサブタイプであることを示唆する結果が得られ（未発表データ），現在ジストロフィー特異蛋白の酵素学的性状についても検討をすすめている。

文　献

1) Obinata, T. et al.: FEBS Lett. 120, 195- (1980).
2) Takeda, S. and Nonomura, Y.: *Biomed. Res.*, **1**, 176- (1980).
3) Rushbrook, J.I. and Stracher, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4331- (1977).
4) 野々村禎昭：厚生省「筋の発生と分化に関する基礎的研究」，江橋班，昭和58年度報告書 p 110-　，1984
5) Noda, L. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **51**, 229- (1975).
6) McVittie, J.D. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **29**, 67- (1972).
7) 生化学実験講座15「筋肉」日本生化学会編，東京化学同人，1975
8) 水谷誠：厚生省「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」，野村班，昭和55年度報告書 p 41-　，1981

5 ニワトリ骨格筋におけるミオシンとC蛋白質アイソフォーム発現に及ぼす除神経支配の影響

大日方　昂*
研究協力者　斉藤　修*　川島真帆*
新保和彦*　Donald A. Fischman**

ニワトリ骨格筋の発生・成長過程で筋収縮構造を構成する蛋白質の発現が著しく変化していくことが最近明らかにされてきた。この変化の内容はかなり複雑であるが，大別すれば，胚，新生児，成体で発現される筋蛋白質に違いがみられ，蛋白質分子種（アイソフォーム）が成長につれて順次おきかえられていくという特徴がある。このような蛋白質の発現の変化がどのように調節されているか未だ十分明らかではないが，少なくとも数種類の蛋白質アイソフォームの発現に神経支配が深く関わっていること，即ち，除神経されたニワトリ胸筋では新生児を特徴づけるβトロポミオシン，足型トロポニンT，遅筋型C蛋白質の発現が促されることを既に報告した。[1, 2] 一方，筋ジストロフィー鶏の骨格筋（特に胸筋）では，ジストロフィー症の発症に相応して，筋蛋白質の発現の特徴が新生児的となり，除神経筋の場合と類似していることが観察された。[3]

本研究では，ニワトリ胸筋の発生，成長過程で発現されるC蛋白質アイソフォームの特徴を明らかにし，更に，C蛋白質とミオシンH鎖アイソフォームの発現が，神経支配によりどう影響されるかについて比較検討した。

*千葉大学理学部生物学科
**コーネル大学医学部

実験方法

除神経筋の作製：ふ化1日目，1カ月後，2ケ月後の白色レグホンの片側の第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。切断された神経の末端を背部皮下に縫いつけ，神経支配の再生を抑制した。除神経されていない側の胸筋を対照として用いた。胸筋深部の赤色筋は筋線維のタイプが均一でないので，実験には，除神経及び対照胸筋いずれの場合も，中央，表層部領域の筋を用いた。

抗体：本実験では以下に示す抗体を用いた。モノクロナル抗体（McAb）であるMF1（速筋C蛋白質を認識），ALD66（遅筋C蛋白質を認識）MF20（胚，新生児及び親型ミオシンH鎖を認識），MF30（新生児及び親型ミオシンH鎖を認識），MF14（親型ミオシンH鎖のみを認識）は，Masaki，Fischmanらにより作成された。[4, 5] モノクロナル抗体，C315（心筋C蛋白質を認識）及び抗速筋C蛋白質抗体（ポリクロナル抗体）は当研究室で作成された。これらの抗体の特異性はイムノブロット法及び免疫組織化学法により，既に確かめられている。

ラジオイムノアッセイ（RIA）：Guba-Straub溶液により抽出されたC蛋白質を含む粗ミオシンをマイクロタイタープレートに乾燥固定した後，抗C蛋白質，抗ミオシンH鎖モノクロナル抗体及び ^{125}I－ヤギ抗マウスIgG抗体を作用させ，常法[5]により測定した。

免疫組織化学：筋小片を液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した後，8 μmの連続凍結切片を作成し，間接蛍光抗体法により調べた。

結　　果

(1)ニワトリ胸筋の発生・成長過程で発現されるC蛋白質アイソフォーム

本実験では，あらたに作成された抗心筋C蛋白質抗体（C－315）及び抗速筋及び抗遅筋C蛋白質抗体を用いて，発生のより早い時期の胚の胸筋で発現されるC蛋白質を主として免疫組織化学的手法で調べた。ふ卵10～12日目の胚の胸筋の細胞は，抗心筋C蛋白質抗体（C－315）と反応することがみられた。以後発生が進むとC－315の反応性は減少し，ふ化前に完全に消失する。一方，抗遅筋C蛋白質抗体（ALD66）は，12日胚でやや弱く反応するが，発生の進行につれ強く反応するようになり，ふ化直後の新生児胸筋ではすべての細胞が強く染色される。しかし，既に報告[6,7]したように，ふ化後10日程で胸筋の細胞との反応性は消失する。抗速筋C蛋白質抗体は若い胚の胸筋とは全く反応せず，18日胚胸筋で反応性が出現し以後親に至るまで胸筋細胞の多くと強い反応性を示す。3種の抗体によってそれぞれ特異的に認識されるわずかに分子量のことなる3種のポリペプチド（多分心筋型・遅筋型及び速筋型C蛋白質）が発生途上の筋で，生化学的手法で識別されている。従って，胸筋では胚子期に心筋C蛋白質，胚後期から新生児期まで主に遅筋C蛋白質，そして親で速筋C蛋白質が発現され，これらが順次おきかえられていくとみなされる。

(2)C蛋白質とミオシンH鎖アイソフォームの発現に及ぼす除神経支配の効果

ニワトリ胸筋の発生過程で発現されるミオシンH鎖も，胚，新生児，親で異なることがH鎖のペプチドマップによる解析やモノクロナル抗体を用いた解析により既に明らかにされてきた。[5]即ち，H鎖に対するMcAb の1つMF20は胚から親までのミオシンを認識するのに対し，別のMcAb，MF30は，新生児以降のミオシンを，更に別のMcAb，MF14は親のミオシンH鎖に特異的に反応する。[5] 発生過程でのミオシンとC蛋白質アイソフォームの発現の変化がどのように神経支配に依存しているかを知るために，新生児及び成長したニワトリ胸筋を除神経し，発現されるミオシンH鎖とC蛋白質のアイソフォームをミオシンH鎖とC蛋白質に対する各種抗体を用いて調べた。

ふ化直後に胸筋を除神経し，C蛋白質とミオシンH鎖をラジオイムノアッセイ法により調べた結果を図1・2に示す。C蛋白質に関しては，正常筋ではふ化後の成長過程でALD66 により認識される遅筋C蛋白質が減少し，MF1 により認識される速筋C蛋白質が増加するのに反し，除神経された場合，遅筋C蛋白質は減少することなく存在しつづけることが明瞭に認められた。2カ月令になっても，なお除神経筋には遅筋C蛋白質の存在が持続することが確認された。筋の凍結切片を作成し，個々の細胞レベルで存在するC蛋白質のタイプをみると，すべての細胞が両種の抗C蛋白質抗体と陽性に反応することがみられた（図3）。一方，ミオシンH鎖の発現は，除神経された場合でも，C蛋白質の場合ほど明瞭な影響がみられない。RIA法による測定結果では，ふ化直後にはMF14とMF30の反応性は，MF20に比してかなり低い。ふ化後の成長期に，MF14，MF30の反応性は除神経筋，対照筋いずれでも徐々に上昇し，両者にほとんど差はみられなかった。このことは，筋凍結切片の蛍光抗体法による観察でもほぼ同様であった。除神経後更に長期間経過を追えば，除神経の効果がみられる可能性は残されているものの，ミオシンH鎖の筋成長過程の変化は，C蛋白質の場合のように強く神経支配に依存していないことを示す。

筋蛋白質アイソフォームのタイプがほぼ親型となっている1カ月令のニワトリ胸筋を除神経した場合にも，C蛋白質の発現は大きく影響されるのに対し，ミオシンH鎖には顕著な変化は認められ

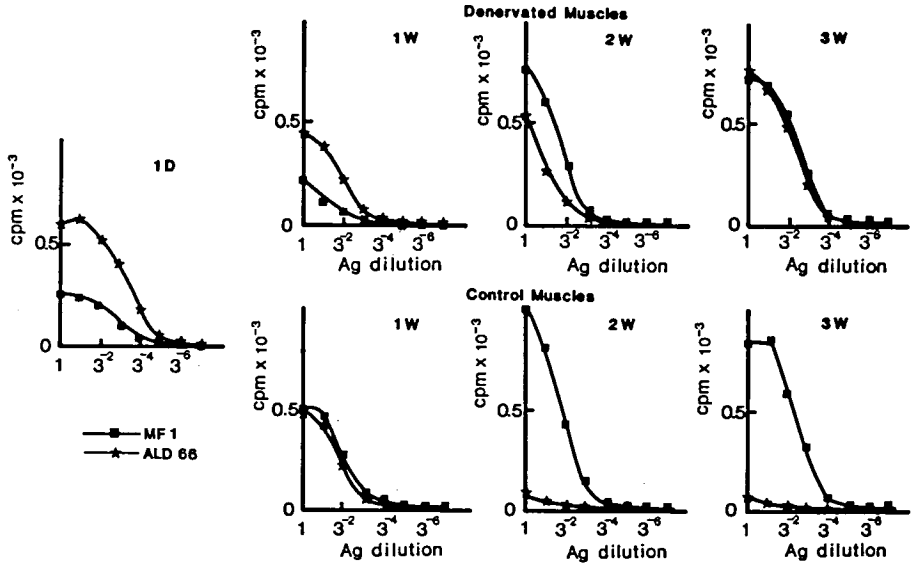


図 1.　新生児筋を除神経した場合にみられるC蛋白質の変化－ラジオイムノアッセイによる解析。
ふ化2日目ヒヨコ胸筋を除神経し，1週（1W），2週（2W），3週（3W）後に調べた。上段に除神経筋，下段に対照筋を示す。左端（1D）はふ化直後ヒヨコ筋の場合を示す。それぞれの図にMFIを用いた場合とALD66を用いた場合の結果を示す。横軸，抗原量10μg～10×$3^{-7}\mu$g の範囲で変えた。縦軸，抗体反応量。

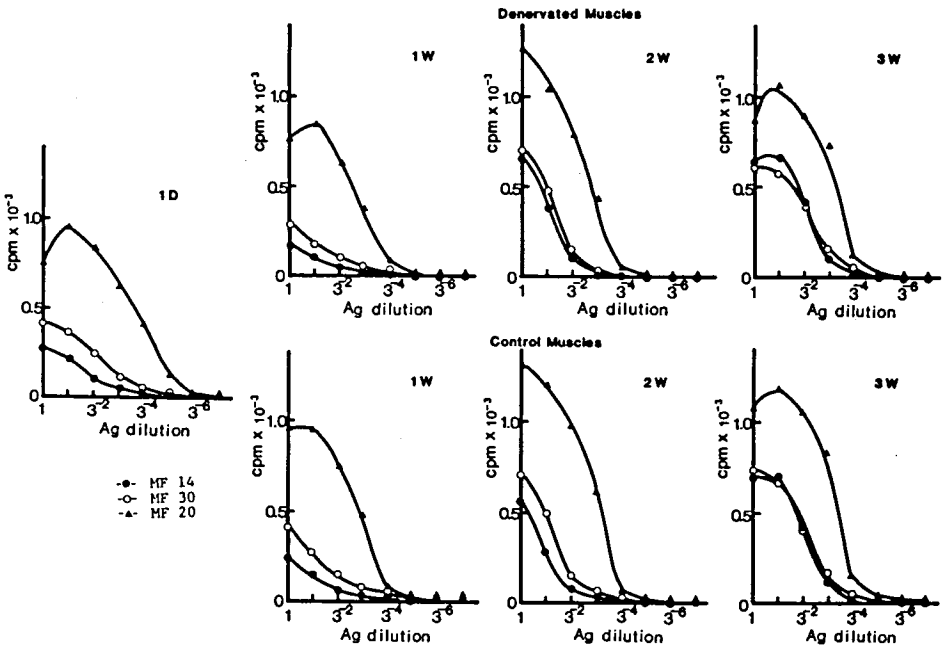


図 2.　新生児筋を除神経した場合にみられるミオシンH鎖の変化－ラジオノムノアッセイによる解析。図1の場合と同様の実験を3種の抗ミオシンH鎖抗体（MF14, MF30, MF20）を用いて測定した。

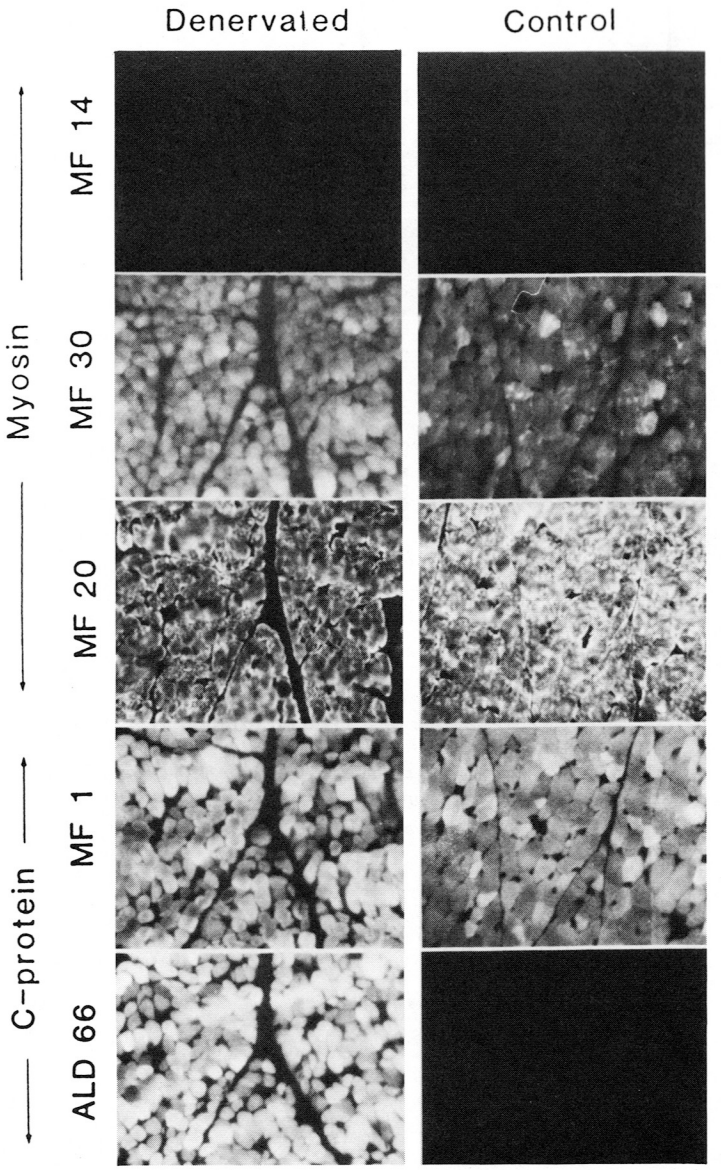


図 3.　ふ化 2 日目ヒヨコ胸筋を除神経した場合にみられるC蛋白質とミオシンH鎖の変化。除神経後 3 週の筋の連続凍結切片を間接蛍光抗体法で調べた。図中に用いた抗体を示す。

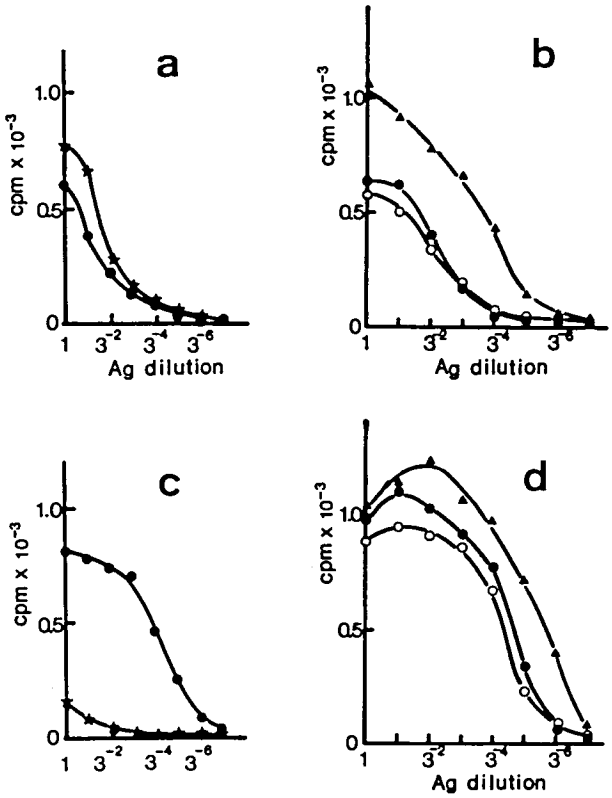


図4.　1カ月令ニワトリ胸筋を除神経した場合にみられるC蛋白質とミオシンH鎖の変化ーラジオイムノアッセイによる解析。
除神経後6週に測定。a, b: 除神経筋。c, d: 対照筋。a, c, c蛋白質の変化をMFI(—●—)とALD 66(—★)を用いて測定した; b, d, ミオシンH鎖の変化をMF14(—●—), MF30(—○—), MF20(—▲—)を用いて調べた。

なかった。除神経1週間後に既に遅筋C蛋白質の出現のきざしがみられ，2週以降ではALD66とMF1が同程度の反応性を示した(図4)。対照筋と比べると明瞭な違いである。それに対して，ミオシンH鎖では，除神経後6週で除神経筋と対照筋でわずかに差がみられた(図4)。即ち，除神経ではMF30とMF14の反応性がMF20の反応性より低くなっている。このことは，ミオシンアイソフォームの内容がやや新生児型に近づいたことを示唆する。しかし，その変化はC蛋白質でみられる変化に比べるとかなり小さい。RIAによって得られた結果は，免疫組織化学法により再確認された(図5)。除神経後6週の胸筋のすべての細胞がMF1とALD66で強く染色され，速筋及び遅筋C蛋白質の共存が証明されるのに対し，ミオシンH鎖については，除神経筋では親ミオシンH鎖に特異的なMF14の染色性が対照筋に対してやや低下しているのがみられた。2カ月令のニワトリ胸筋を除神経した場合にも，C蛋白質とミオシンH鎖の発現に関してほぼ同様の結果が得られた。

胚子期の胸筋を特徴づける心筋型C蛋白質が，除神経胸筋で発現されるようになるかどうかをC－315を用いてRIAと免疫組織化学的手法で調

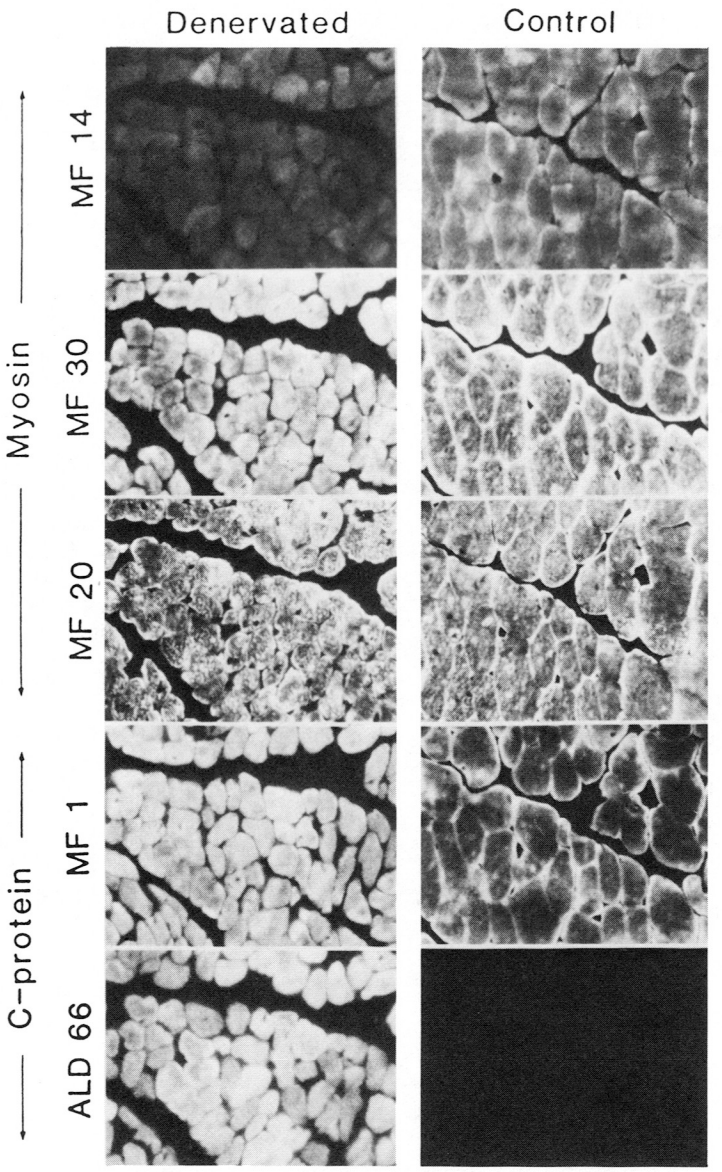


図 5.　1カ月令ニワトリ胸筋を除神経した場合にみられるC蛋白質とミオシンH鎖の変化。除神経後6週の筋の連続凍結切片を間接蛍光抗体法で調べた。

べた結果，ふ化直後に除神経した場合でも，1カ月令で除神経した場合でもほとんど心筋型C蛋白質の出現を認めることができなかった。このことはC蛋白質の発現でみる限り，除神経筋は新生児期に近い状態にあり，胚子期の状態へ移行することはないことを示している。それに対して，胸筋に凍結損傷を与え，人為的に筋の再生を誘起した時，再生過程にある多くの細胞が一時的に心筋型C蛋白質を含むようになり，やがて遅筋型及び速筋型C蛋白質におきかえられていくのが観察された。このように，除神経筋と再生筋とはC蛋白質の発現の面で異なる。なお，ニワトリ筋ジストロフ

ィー症の場合にも遅筋型C蛋白質の出現が，かなり多くの細胞に観察されるが，心筋型C蛋白質はごく少数の細胞に限られており，この点，除神経筋に類似していた。

まとめと考察

本研究で明らかになった第1の点は，除神経されたニワトリ胸筋でのC蛋白質の発現が新生児型となること，即ち，遅筋C蛋白質の発現が引きおこされること，しかし，胚子期にみられる心筋型C蛋白質の発現が引きおこされることはほとんどないことである。このように除神経筋でのC蛋白質発現の変化は，トロポニンTやトロポミオシンにみられる変化と期を一にするものである。又，胚の胸筋で発現されている遅筋型又は心筋型ミオシン軽鎖が除神経筋に出現しないという点とも一致している。除神経筋にみられる蛋白質の変化は，比較的短期間にほとんどすべての細胞に認められること，又，細胞間で不均一にモザイク状に起らないことから，恐らく新しい細胞によるおきかえではなく，既存細胞の幼若化と推定される。本研究での第2の点は，除神経でのミオシンH鎖の変化が顕著には起らないことである。この点は，ミオシンH鎖のペプチドマップによる解析の結果[8]とも一致している。筋原線維中の太いフイラメントを構成するミオシンとC蛋白質の除神経筋での変化が大きく異なることは興味深い。これら蛋白質の発現調節の違いを反映しているであろう。

文　　献

1) Obinata, T., Saitoh, O. & Takano-Ohmuro, H., *J. Biochem.* **95**, 585-588, 1984.
2) 大日方昂ほか：筋の発生と分化に関する基礎的研究（江橋班）　昭和58年度報告書　133-127, 1983
3) 大日方昂ほか：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　102-108, 1982
4) Masaki, T., Bader, D., Reinach, F.C., Shimizu, T., Obinata, T. Shafiq, S.A. & Fischman, D.A. In "Muscle Development: Molecular and Cellular Control" (M.L. Pearson and H.F. Epstein eds.) pp. 405-417. Cold Spring Harbor Laboratories, *Cold Spring Harbor, USA.* 1982.
5) Bader, D., Masaki, T. & Fischman, D.A. *J. Cell. Biol.*, **95**, 763-770. 1982.
6) Obinata, T., Reinach, F.C., Bader, D.M., Masaki, T., Kitani, S. & Fischman, D.A. *Develop. Biol.*, **101**, 116-124, 1984.
7) Obinata, T., Kitani, S., Masaki, T. & Fischman, D.A. *Develop. Biol.*, **105**, 253-256, 1984.
8) Matsuda, R., Spector, D. & Storohman, R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1122-1125, 1984.

6　ニワトリ正常遅筋とジストロフィー速筋にみられた筋細胞増殖因子

松　田　良　一 *,**
研究協力者　大日向　浩 *　東中川　徹 *
リチャード．C．ストローマン **

動物の体の大きさは成体時には各々の種ごとに大体一定の範囲にある。これは発生過程で各組織の構成細胞数を調節する機構が存在することを意味する。骨格筋組織は分裂能力をもつ筋芽細胞や結合織細胞及び分裂能力を持たない収縮性の多核筋管細胞から成っている。従って骨格筋組織の構成細胞数を規定する要因は筋芽細胞や結合織細胞の分裂頻度と筋芽細胞が分化し融合してできる多核筋管細胞の組織内での寿命にある。常に収縮を続ける遅筋は，その組織内に存在する筋芽細胞数が速筋に比べ単位体積当り多く[1],[2]，筋管細胞の寿命も速筋に比べ短いことが報告されている。[1] このことは遅筋が速筋より強い細胞増殖活性をもつことを示している。事実，ニワトリの遅筋である前広背筋には速筋の大胸筋に比べ高い濃度でトランスフエリン（Tf）が存在している。[3] このTfは培養細胞の増殖に必須であり，[4] ニワトリ胚抽出液から細胞増殖のための有効成分として分離され，特に培養骨格筋細胞の増殖と分化に重要な役割をもつことが示されている。[5] 又，線維芽細胞増殖因子（FGF）も培養条件下で筋細胞の増殖を促進し，[6] ニワトリ胚抽出液からもTf と共に筋細胞の増殖を促進する分子量の小さい蛋白質因子の存在が示されている。[7] 一方，ヒトやニワトリにおける筋ジストロフィー症（筋ジス）では，その初期に筋肥大が起こり，発症時には活発な筋再生を伴なうことが知られている。従って筋ジスが筋細胞の増殖調節機構と何らかの関係があることが予想される。このことは筋ジスニワトリの速筋には正常速筋より高い濃度でTfが存在していること[8] からも支持される。本研究の目的は骨格筋組織内に存在する細胞増殖因子を調べると共に，その因子が正常筋と筋ジス発症筋との間でどのような相違点があるかを明らかにすることにある。

材料と方法

①標本：ニワトリは白色レグホンの筋ジス（433系統）とその正常（03系統）及びニューハンプシャー系の筋ジス（413系統）と正常（412系統）を用いた。

②酵素抗体法：ニワトリ血清からTf を硫安塩析及びDEAE－セルロースカラムクロマトグラフィーにて精製しそれを抗原としてウサギを用いて抗血清を作成した。抗体は抗原結合アフィニティーカラムを用いて精製した。二次抗体には抗ウサギIgG－パーオキシダーゼ結合抗体（DAKO，アメリカ）を用いた。切片は正常ニワトリ前広背筋，大胸筋及び筋ジスニワトリ大胸筋より10 μmの厚さで凍結切片を作成して用いた。抗体反応後，ジアミノベンチジン法により発色させ光顕観察を行なった。

③筋組織抽出液の調製及び分画：413系と412系ニワトリを用いた。孵化後，両系統のヒヨコを同

＊東京都立大学理学部生物学教室
＊＊米国カルフォルニア大学バークレー校動物学教室

一条件下で飼育し，0，10，18，27及び37日目に放血死させ大胸筋を採取し，－80℃に保存した。解凍後4倍量のMEMを加えてホモジナイズし，10万×g，1時間遠心分離し，上清を組織抽出液とした。孵化後10日目の筋ジスニワトリの大胸筋抽出液（8mg／ml×4.5ml）を20mMトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に対して透析し，同緩衝液で平衡化したDEAE－セルロース（DE－52）カラムクロマトグラフィー（1×5cm）にかけ，4mlずつ分取した。分画番号6より0～0.4MNaCl の直線勾配をかけた。上記の抽出液調製及び分画は全て無菌的に行なった。蛋白質濃度はバイオ・ラッド社製プロティン・アッセイを用い，ウシ血清アルブミンを基準に測定した。

④細胞培養：13日ニワトリ胚大胸筋よりトリプシン処理によって単核筋細胞を分離し，ゼラチンコートした35mmプラスチック培養皿に1枚当り凡そ10^5個／2.5mlまいた。培養液は15％馬血清（GIBCO）を含むイーグルMEM（日水）を用いた。培養開始14時間後に培養液を新しいものと替え，鉄結合型Tfを15μg／ml 添加したものと加えないものの2群を設けた。このTfは10μg／mlの濃度で培養筋細胞の増殖と分化を十分に支持し，それ以上加えても細胞増殖はさらには促進されなかった。それぞれの培養液に組織抽出液又はその分画を加えた。培養皿は各サンプルにつきそれぞれ3枚ずつ用いた。カラムによって分画した蛋白質溶液は各々0.1mlずつTfを含む培養液に加えた。培養4日目に筋細胞のクレアチンキナーゼ（CPK）活性を培養皿毎に測定し分化した筋細胞総量の指標とした。

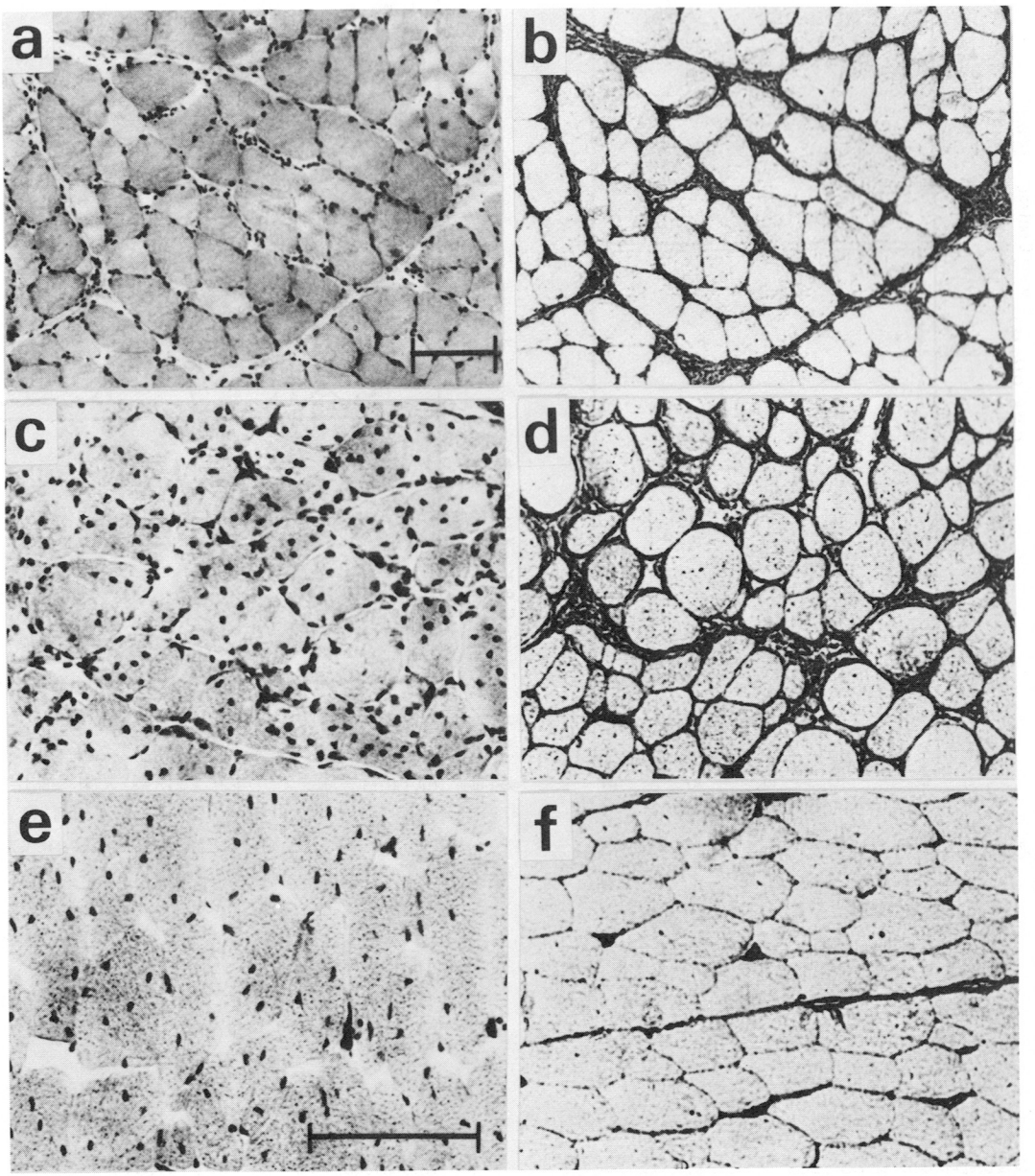
結　　果

①Tfの筋組織内における局在

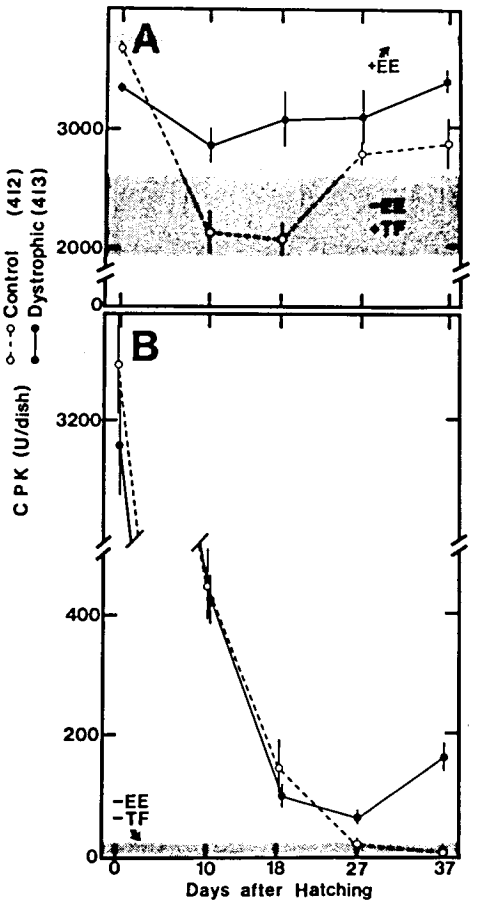
ニワトリの正常前広背筋と筋ジス大胸筋及び正常大胸筋組織内におけるTfの局在を酵素抗体法により調べた。その結果をそれぞれの組織のH・E染色像と共に図Ⅰに示す。Tfは筋管細胞内にはほとんど見られず，細胞外マトリクス又は結合組織内に存在した。前広背筋と筋ジス大胸筋は正常大胸筋にくらべ強く染色された。

②ヒヨコ大胸筋抽出液中の増殖促進活性の日令による変動。結果を図Ⅱに示す。AはTfを15μg／mlふくむ培養液に各筋組織抽出液を600μg 蛋白質加えて培養した場合の筋細胞のCPK活性を示す。従ってこの活性は抽出液中に含まれるTf以外の増殖因子の活性を表わすことになる。この活性も大胸筋抽出液中に存在し，しかも筋ジスでは正常に比べその活性が高い傾向にあった。BはTfを含まない培養液に各抽出液600μg 蛋白質加えて培養した場合の筋細胞のCPK活性を示す。培養筋細胞は鉄結合型Tfが存在しないと増殖分化できない[5]。従ってBにおける活性は基本的には抽出液中のTfまたはそれと類似した因子の活性とみなすことができる。孵化直後のヒヨコ大胸筋抽出液にはTf活性が高く，しかもそのCPK活性はTfのみの活性よりはるかに高かった。これは孵化直後には胸筋中にTfとTf 以外のすくなくとも2種類以上の活性因子が存在することを示している。しかし孵化後日令と共にTf活性は急激に低下するが，筋ジスの大胸筋では37日目に再び活性の上昇が認められた。

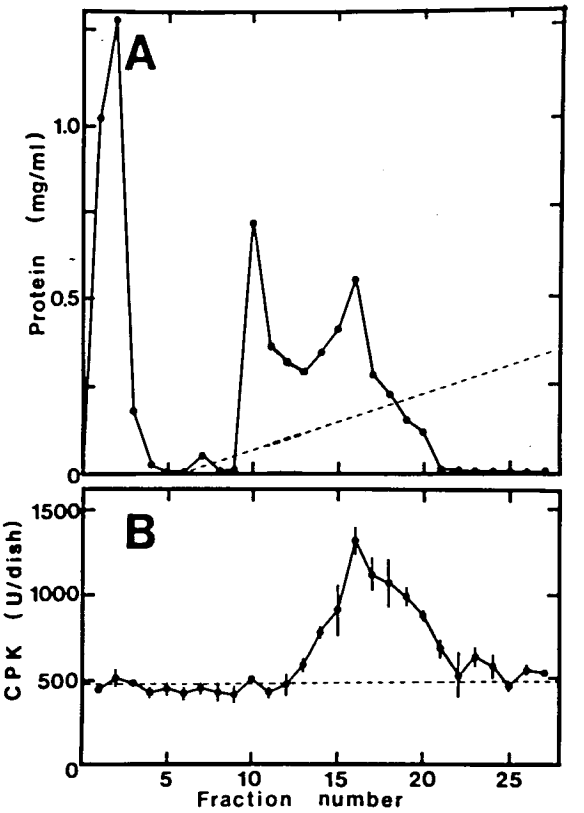
③筋ジスニワトリ大胸筋抽出液中に含まれるTf以外の増殖因子の分画。孵化後10日目の筋ジスニワトリ大胸筋の抽出液をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーにより分画し，各分画0.1mlずつをTfを含む培養液中に加え，その増殖因子活性の分布を調べた。結果を図Ⅲに示す。Aはカラムからの蛋白質の溶出パターンを表わし，Bは各分画を加えた培養液中で分化した筋細胞のCPK活性を示している。Tf以外の筋細胞の増殖促進活性は分画番号14～21にみられた。これはAの3番目のピークに対応していた。各分画に含まれる蛋白質のSDS－12.5％PAGE パターンを図Ⅳに示す。分画番号12に含まれる分子量80Kダルトンの蛋白質（図Ⅳ－№12，矢印）はペプチドマップの結果Tfと同定された。増殖促進活性を示す分画番号14～21にはまだ多くの蛋白質が存在し



図Ⅰ　正常ニワトリ（03系）前広背筋・筋ジス（433系）大胸筋・正常（03系）大胸筋の組織像とTfの局在。
(a)(b) 正常ニワトリ前広背筋，バーは0.1mm，(c)(d) 筋ジスニワトリ大胸筋（拡大率は (e)(f) と同じ），(e)(f) 正常ニワトリ大胸筋，バーは 0.1mm。(a)(c)(e) はH・E染色像。(b)(d)(f) は抗 Tf 酵素抗体法によるパーオキシダー染色像。



図Ⅱ　各日令の正常（412系）及び筋ジス（413系）大胸筋抽出液を加えて培養した4日目の筋細胞CPK値の変動。AはTfを15 μg/mℓ含む場合。Bは含まない場合の CPK 値を示す。AとBの灰色域は抽出液を加えずに培養した場合のCPK値の範囲（平均値±S・E）を示す。



図Ⅲ　(A) 10日令筋ジスニワトリ（413系）大胸筋抽出液のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィー。(B) 各分画を 0.1 mℓ ずつ Tf を含む培養液に加えて培養した筋細胞のCPK値。カラムの溶出条件は材料と方法を参照。（A）の灰色域はSDS−PAGEにより Tf の存在が認められる分画を示す。破線はNaCl の直線勾配を示す。
（B）の破線は分画を加えないで培養した場合のCPK値（495±15）の平均値を示す。

ていたが，分子量65Kダルトンの蛋白質（図Ⅳ，No.16星印）が比較的良く活性と対応していた。

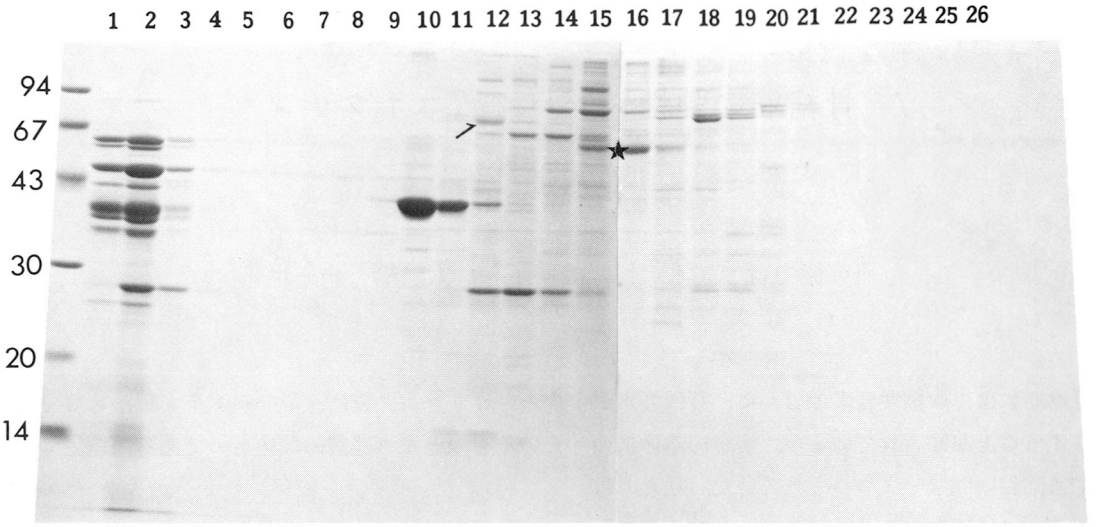
考　　察

①Tf の骨格筋組織内での局在

Tf が筋細胞の間げきに存在していることはサテライト細胞が筋管細胞の表面にあることと考えあわせると興味深い。結合組織を含む筋細胞間マトリクスがTf などの増殖因子を含むスポンジのような場を提供している可能性が考えられる。事実，筋細胞のターンオーバーが盛んな前広背筋では正常大胸筋に比べ多くの筋細胞間スペースが存在している。又，筋再生の盛んな筋ジス大胸筋においても同様なことが観察される。今後，増殖因子の貯蔵の場として細胞間マトリクスをとらえてみる必要があるように思われる。

②ヒヨコ大胸筋抽出液の増殖促進活性

筋ジス発症筋において多量のTf の蓄積がみられた。[8]　この蓄積が筋ジス症状の出現と時間的にどう対応するかを調べた結果（図Ⅱ）から判断し



図Ⅳ　10日令筋ジスニワトリ大胸筋抽出液のＤＥＡＥセルロースカラムクロマトグラフィーによって分画された蛋白質のＳＤＳ－12.5％ＰＡＧＥ像。
ゲル上端の数字は分画番号を示す。左端の数字は分子量マーカーを示す。分画番号12の矢印及び16の星印については本文参照。

て筋ジス発症（孵化後１ケ月前後）とほぼ同時期にＴｆの蓄積が始まると思われる。一方，Ｔｆ以外の増殖因子活性は筋ジスにおいて常に正常筋より高い活性を示した。従ってＴｆ活性が孵化後１ケ月前後で上昇してくるとバックグラウンドに存在するＴｆ以外の活性と協同的に筋細胞の増殖を促進する可能性が考えられる。これらのことが筋ジストロフィーの本態とどのように関わっているのかが，今後の課題である。このように組織内における細胞増殖促進因子の存在とその活性の変化は組織の成長を調節する一方，その活性変化が正常と異なるパターンをとる時，その組織の恒常性の維持に何らかの異常を来たす可能性が考えられる。

REFERENCES

1) Gibson, M.C. & Schultz, E. (1983), *Muscle & Nerve,* **6**, 574-580.
2) Matsuda, R., et al. (1983), *Develop. Biol.* **100**, 478-488.
3) Matsuda, R., et al. (1984), *Develop. Biol.* **103**, 267-275.
4) Neuman, R.E. & Tytell, A.A. (1961), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **107**, 876-880.
5) Ii, I. et al. (1982), *Develop. Biol.* **94**, 366-377.
6) Gospodarowicz, D. et al. (1976), *J. Cell Biol.* **70**, 395-405.
7) Ozawa, E. et al. (1984), In *"Gene Expression in Muscle."* Wolf, S. & Strohman, R.C. Plenum Press, N.Y. in press.
8) Matsuda, R. et al. (1984), *Develop. Biol.* **103**, 276-284.

7　骨格筋の弾性タンパク質コネクチン

丸　山　工　作*
研究協力者　木　村　澄　子*　大　橋　一　世*

骨格筋には，収縮性要素のほかに，弾性要素が存在することが知られているが，後者の本体については，長い間なぞにつつまれていた。私たちは，塩不溶性の残渣に弾性タンパク質が存在することを見いだし，コネクチン（connectin）と名づけた。[1)2)]数年あとに，アメリカのWangは，筋原線維のＳＤＳ抽出物の電気泳動によってダブレットの高分子量タンパク質を見いだし，タイチン（titin)と命名した。[3)] コネクチンとタイチンは同じタンパク質であることが判明した（綜説[4)]参照)。

1983年から1984年にかけて，コネクチンが未変性のまま単離されるにおよんで，研究がいちじるしく進展するにいたった。[5)6)7)] コネクチンには，αとβの２種類が存在し，おのおのの分子量は，2.8×10^6，2.1×10^6と測定された。[8)] 単離されたのは，β－コネクチンであって，じつは，α－コネクチンの分解産物である。[8)]生筋のＳＤＳ抽出液中には，αとβの比は４：１であるが，死后硬直をへてほとんどβになる。α－コネクチンは塩に溶けにくいが，βは塩可溶性なので単離できたわけである。

β－コネクチンは，巾４～５nm，長さ0.4μmほどの細長いフイラメント分子である。[6)7)8)] ただし，長さはフレキシブルで１μm にもなりうるランダムコイルとみなされる。このように巨大なフイラメントのタンパク質は，いままで知られていない特異的なものである。分子量が200万以上というタンパク質は，単一ペプチド鎖からなっているものとすれば例のないものである（綜説４）参照)。

本研究では，このようなきわめて長いフレキシブルなフイラメントのコネクチンがカエル骨格筋の微細構造において，どのように局在しているかが追究された。

材料と方法

材料は，ウシガエルのsemidendinous 筋から作成したskinned fiberである。

skinned fiberをrelaxing solution（60 mMKCl，2.9mMATP，3.4mMMgCl_2，10mM EGTA，0.1mMPMSF，5.7mMPIPES，pH 7.0）中でかるくホモジナイズして筋原線維束を取りだした。スライドグラス上でカバーグラスを動かして伸長した筋原線維を４％ホルマリンで固定し，ニワトリ胸筋のβ－コネクチンに対する抗血清で処理し，ついで蛍光色素（FITC）ラベルの抗ウサギIgG抗体で２次処理をおこなった。そして，日本光学の蛍光顕微鏡下で観察した。

skinned fiberを伸長させ，6.7mMPIPES，pH 7.0 の低イオン強度溶液で洗って筋原線維をぼうじゅんさせたのち，抗体処理をおこなった。これは，抗体の浸透をよくさせるためである。それから固定，包理，染色后，切片を作成して電子顕微鏡下で観察した。また，抗体処理をせずに，伸長したskinned fiber を直接タンニン酸で固定し，電子顕微鏡下でしらべた。

＊千葉大学理学部

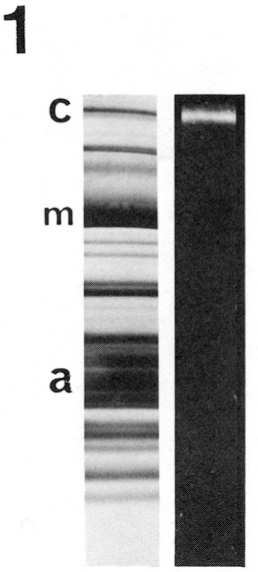


図 1.　ニワトリ胸筋のコネクチンの抗体による検出。
左：Coomassie Blue 染色による電気泳動パターン。C，コネクチン。m，ミオシン。a，アクチン。 右：ニトロセルロース紙に転写後，蛍光ラベル抗体で反応させたパターン。

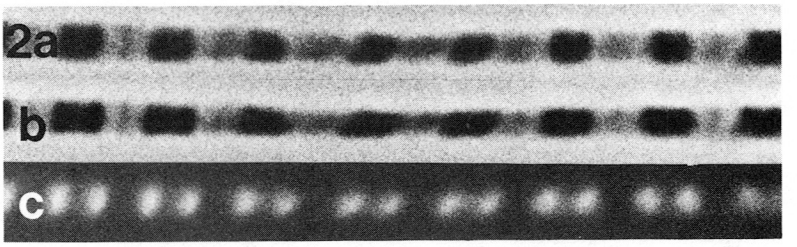


図 2.　蛍光抗体法によるコネクチンのカエル骨格筋筋原線維における局在。a，対照。b，抗体処理後（位相差顕微鏡像）。 C，同（蛍光顕微鏡像）。

結　　果

私たちが用いた抗血清は，β－コネクチンに対するものであるが，immunoblot 法による分析によれば，α－コネクチンに対しても反応した（図１）。[9] 図１でニワトリ胸筋のＳＤＳ抽出液の電気泳動パターンの一番上のダブレットバンドがコネクチンである。抗血清はこれとのみ反応した。

この抗血清で処理したカエル筋原線維は，位相差顕微鏡下でみると，明らかにＡ帯の巾が大きくなった（図２ａとｂ）。1.6 μmから 2.5 μm にもなった。蛍光顕微鏡下で観察すると，Ａ帯の両端からＡ－Ｉ接合部にかけて，強い蛍光が認められた。すなわち，コネクチンは，Ａ帯の両端からＩ帯へかけて局在することが示唆された。

図３は，抗体処理をしていない伸長したカエル筋原線維の電子顕微鏡像である。2.5 μm のサルコメア長（休息時）から６ μm までつよく引き伸ばされているので，Ａ帯のミオシンフイラメント

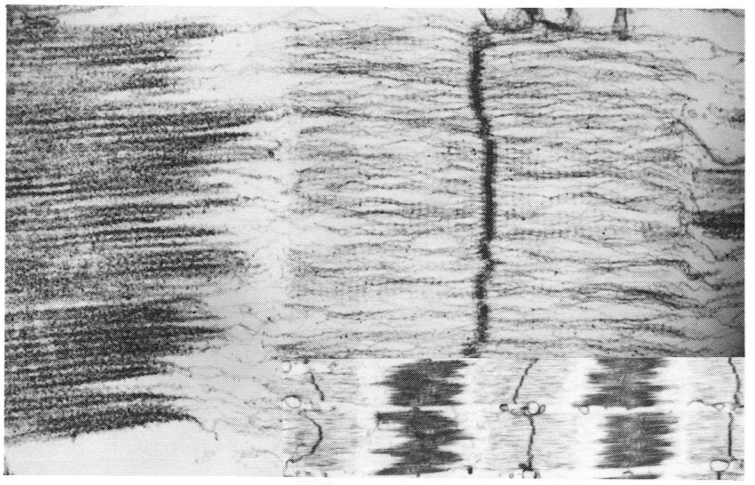


図 3.　伸長したカエル骨格筋筋原線維の電子顕微鏡像（タンニン酸固定）。
I 帯の鎬はトロポニンによる。

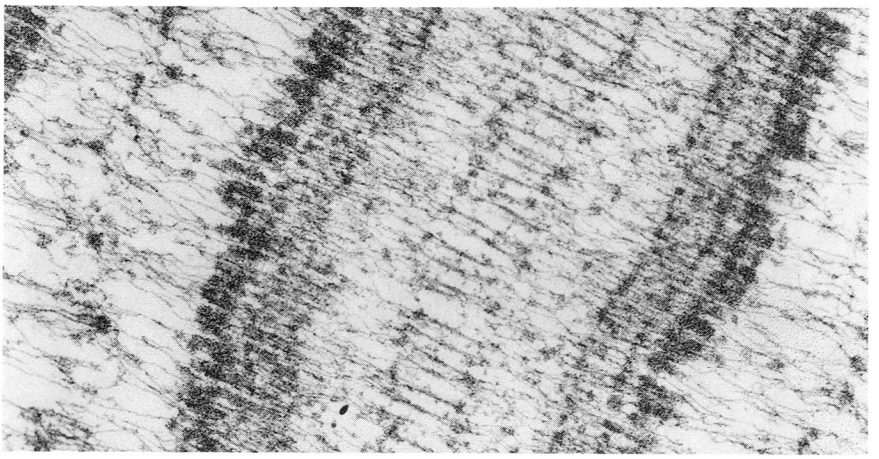


図 4.　抗コネクチンで処理したカエル骨格筋筋原線維の電子顕微鏡像。低イオン強度溶液で洗った後抗体処理した。

は左右へランダムに引きよせられている（図3挿入図）。ミオシンフイラメントの先端からアクチンフイラメント側に細いフイラメントが走っているのがよくわかる。ミオシンとアクチンは接していないので，この細いフイラメントが，図2の蛍光抗体法の結果からみて，コネクチンフイラメントであることが強く示唆される。このフイラメントの形状が単離されたコネクチンと同様だからである。1962年にSjöstrandがgap filamentとよんだものと同じである。[10] このギャップ・フイラメントは，H.E.Huxleyの批判にあって無視されたが，1976年以来，R.H.Lockerがそのリバイバルを主張していた。[11]

問題は，ミオシンフイラメントのどこからコネ

図5.　コネクチンフィラメント構造のサルコメア・モデル。

クチンフイラメントがでて，どこまでつながっているかということである。免疫電顕像は，あるていどの示唆をあたえた。ただし，筋原線維束の内部への抗体の浸みこみが意外にわるいため，そのままではごく表層しか結合がみられない。ところが，低イオン強度下でふくれあがった筋原線維束では，抗体がよういに内部の筋原線維に到達し反応がおこった（図4）。抗コネクチン処理筋原線維のサルコメアでは，A帯中央に対して対称的にいくつかの鎬がみられた。中央の central bare zone（0.3 μm）の両端を起点に，A帯上に5本，A－I接合部に強い2本の鎬が存在した。I帯には，はっきりしないがいくつかの点がみられた。そして，Z線上にもみられた。引き伸ばした筋原線維（抽出していない intact 標品）でも，I帯に不規則な electron dense spot が認められ，Z線でも抗原抗体反応がおこっていた。これらのことから，コネクチンフイラメントは，ミオシンフイラメント上からZ線まで走っているものとみなされる。

考　　察

本研究成果は，抗コネクチン抗体（ポリクローン）を用いた電子顕微鏡下での観察から，コネクチンフイラメントは，ミオシンフイラメントからZ線まで走っていることを明らかにした。これは，Wang [12]がコネクチン（タイチン）はミオシンからネブリン（nebulin）につながり，Z線にいたると主張しているのを訂正するものである。ネブリンは，未変性のまま単離されておらず，その性質も不明である。また，Locker [11]は，コネクチンはミオシンフイラメントの芯の中を貫通していると述べているが，ミオシンフイラメントの表面（中央の0.3 μmを除き）に結合しているものと思われる（図7）。

コネクチンフイラメントはフレキシブルな弾性フイラメントとしてミオシンフイラメントを両側のZ線につないでいるものと結論される。ジストロフィー筋で，この弾性フィラメントがどのようになっているか，また発生の途上でつくりあげられている過程が今后の問題点である。

文　　献

1) Maruyama, K., Natori, R. and Nonomura, Y. (1976). *Nature*, **262**: 58-60.
2) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S. and Ohashi, K. (1977). *J. Biochem.*, **82**: 317-337.
3) Wang, K., McClure, J. and Tu, A. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3698-3702.
4) 丸山工作 (1984) 科学, **54**: 747-753.
5) Kimura, S. and Maruyama, K. (1983). *J. Biochem.*, **94**: 2083-2085.
6) Wang, K., Ramirez-Mitchell, R. and Palter, D. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**: 3685-3689.
7) Trinick, J., Knight, P. and Whiting, A. (1984). *J. Mol. Biol.*, 180: 331－356.
8) Maruyama, K., Kimura, S., Yoshidomi, H., Sawada, H. and Kikuchi, M. (1984). *J. Biochem.*, **95**: 1423-1433.
9) Maruyama, K., Sawada, H., Kimura, S., Ohashi, K., Higuchi, H. and Umazume, Y. (1984). *J. Cell Biol.*, **99**: 1391-1397.
10) Sjöstrand, F.S. (1962). *J. Ultrastruc. Res.*, **7**: 225-246.
11) Locker, R.H. (1984). *Food Microstruct.*, **3**: 17-32.
12) Wang, K. (1984). Contractile Mechanisms in Muscle (Pollack, G.H. and Sugi, H. eds.) pp. 285-305, *Plenum Press*, New York.

8 胚筋，再生筋および除神経筋における トロポニン－T

嶋田　裕*
研究協力者　清水法子*

はじめに

筋蛋白質は各筋で特有のアイソフォームをもつこと，またこれらは発生過程で変化することが知られている。トロポニン－T（TN-T）においても同様で，ニワトリ胸筋および足筋にはそれぞれ分子量の異なる特有のTN-T（胸型TN-T および足型TN-T）が存在することが知られている。[1)2)] また発生過程においてTN-Tが変換することは，胸筋および足筋を識別できるモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による結果を，われわれはすでに報告している。[3)] すなわち正常発生において，12日胚ではいずれの速筋（胸筋，足筋，後広背筋）も足型（胚子型）のTN-Tを合成しているが，次第に胸型TN-Tを含む線維が現われてくる（新生児型）。その後，各筋は孵化後1週までにそれぞれの筋に特有なTN-Tの分布様式を示す方向へと分化する（親型）。しかしこの様なアイソフォームの変換を支配する要因についてはまだ不明な点が多い。

本研究では，神経支配がTN-T のアイソフォームの変換にどのような影響を与えているかについて，除神経筋および除神経再生筋を用いて検討した結果について報告する。

材料と方法

除神経筋および除神経再生筋：2か月齢あるいは親ニワトリの片側の腕神経叢を切断することにより，胸筋および後広背筋（PLD）を除神経した。神経の再生を防ぐため，神経の断端を短いシリコンチューブに通し，さらにその背部の皮膚に縫いつけた。一部のニワトリにおいては，除神経後ただちに液体窒素温度にまで冷却した5×15㎜の黄銅片を両側のＰＬＤの表面に3秒間密着させて，損傷を加えた。術後5日～2か月に胸筋およびＰＬＤを標本として摘出した。

蛍光顕微鏡的観察：胸筋およびＰＬＤの凍結横断連続切片を作製し，4％パラホルムアルデヒドで5分間固定した。切片はモノクローナル抗体（F5D3：胸型および足型TN-T と反応する。D5：胸型TN-Tとのみ反応する）と反応させた後，0.4M $MgCl_2$，10mM 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

除神経筋：正常なニワトリの胸筋においては，ほとんどすべての線維がF5D3およびD5と反応した（図1a，c）。PLDは，F5D3とD5 の両方に反応する線維と，F5D3とのみ反応する線維がモザイク状に配置していた（図1b，d）。一方，支配神経を切除した胸筋およびＰＬＤでは，筋線維は萎縮し，抗体の染色性は正常筋線維とは異なっていた。すなわち，大多数の線維はF5D3と反応したが，術後4週にはD5と反応する線維の減少が観察され，8週までにほとんどの線維はD5と

＊千葉大学医学部解剖学第一講座

反応しなくなった。しかし，ＰＬＤにおいては，正常筋で観察されない少数の小さな線維がＤ５と強く反応していた（図１ｃ，ｅ，ｆ，ｈ）。

再生筋：ＰＬＤに凍傷を与えると，損傷部付近に正常な親の筋線維より細く，中央に核をもち，さらに染色性が正常筋線維と異なる細胞が出現した。このような細胞は，筋衛星細胞由来の幼若な筋管細胞であると考えられる。損傷後５日に，すべての再生している筋管細胞はＦ5Ｄ3と強く反応したが，Ｄ５とは反応しなかった（図２ａ，ｄ）。Ｆ5Ｄ3との強い反応性は，その後の再生期間を通じて変化しなかった。２週間後には半数以上の再生線維はＤ５とも様々な強度で染まるようになった（図２ｂ，ｅ）。このような染色性を示す線維は徐々に数を増し（図２ｃ，ｆ），８週までには再生線維は正常な筋線維とほとんど区別できなくなった。

除神経再生筋：神経支配のないＰＬＤにおいて再生している線維の染色性の変化は，損傷後２週までは神経支配を受けたＰＬＤにおける再生線維と同じであった。すなわち，すべての再生線維は再生期間を通じてＦ5Ｄ3と強く反応した。一方，これらの線維は最初はＤ５と反応しないが，次第にＤ５とも反応する線維が増加してきた（図３ａ，ｂ，ｄ，ｅ）。しかし，損傷後４週では神経支配を受けた筋と受けない筋において，大きな相違が観察された。すなわち，一度Ｄ５と反応するようになった多くの除神経筋の再生線維は，再びＤ５との反応性を徐々に失っていった。しかし，なお少数の小さな線維だけはＤ５とも強く反応していた（図３ｃ，ｆ）。これらの染色性は８週後でも変わらなかった。このように除神経再生筋も最終的には除神経筋と同様の染色性を示すようになった。

考　　察

胸筋およびＰＬＤを除神経すると，８週までに両筋とも胸型TN-Ｔから足型TN-Ｔへの変換がおこった。すなわち，両除神経筋は大多数の線維が足型TN-Ｔを持つようになった。このように除神経筋は発生初期にみられるような染色パターンを示すことから，親型（特に胸型）のTN-Ｔの発現を維持するには神経が必要であると考えられる。また除神経ＰＬＤの中には，胸型TN-Ｔを持つ径の小さな線維がしばしば観察された。除神経筋において筋衛星細胞が増加することが報告されている[4]ので，これらの線維は除神経により刺激された衛星細胞由来で，新生児型まで分化した線維ではないかと考えられる。

除神経胸筋において足型TN-Ｔが再び現われることは，大日方ら[5]および松田ら[6]によってイムノブロット法により報告されている。しかし，ＴＮ－Ｔの胸型から足型への変換の程度において今回の結果と異なっている。彼らの報告によると，術後１か月および７か月でさえ，足型より胸型のＴＮ－Ｔの方が量的に多く存在していた。今回の結果では，術後の経過と共に足型ＴＮ－Ｔが増加し，２か月までにほとんど足型ＴＮ－Ｔに変換していた。これらの結果の相違が何に起因するかは今後明らかにされなければならない。

凍傷後，神経支配のあるＰＬＤの再生線維に見られる抗体反応性の変換は，同筋の発生過程に見られるものと同様であった。損傷後５日の再生線維の反応性はＰＬＤの発生初期（胚型）に，２～４週後の再生線維の反応性は孵化前後（新生児型）に見られるものと類似していた。これらの線維は，８週までに正常筋とほぼ同じ大きさと染色性に回復した。したがって，再生過程においては，発生過程におけるＴＮ－Ｔの変換と同じ過程をくり返していることが考えられる。この結果は，ミオシン，トロポミオシン，ＴＮに関する他の報告と一致している。[7)8)9)]

除神経筋の再生線維にみられる抗体染色性の変換は，最初の２週までは神経支配のある再生線維のものと類似していた。すなわち，神経支配の有無に関係なく，胸型TN-Ｔを合成する線維が現われた。このように，胚型から新生児型への変換は神経支配の有無に関係なく起こることから，ＴＮ－Ｔの初期の分化は神経に依存していないことが考えられる。したがって，このような初期発生

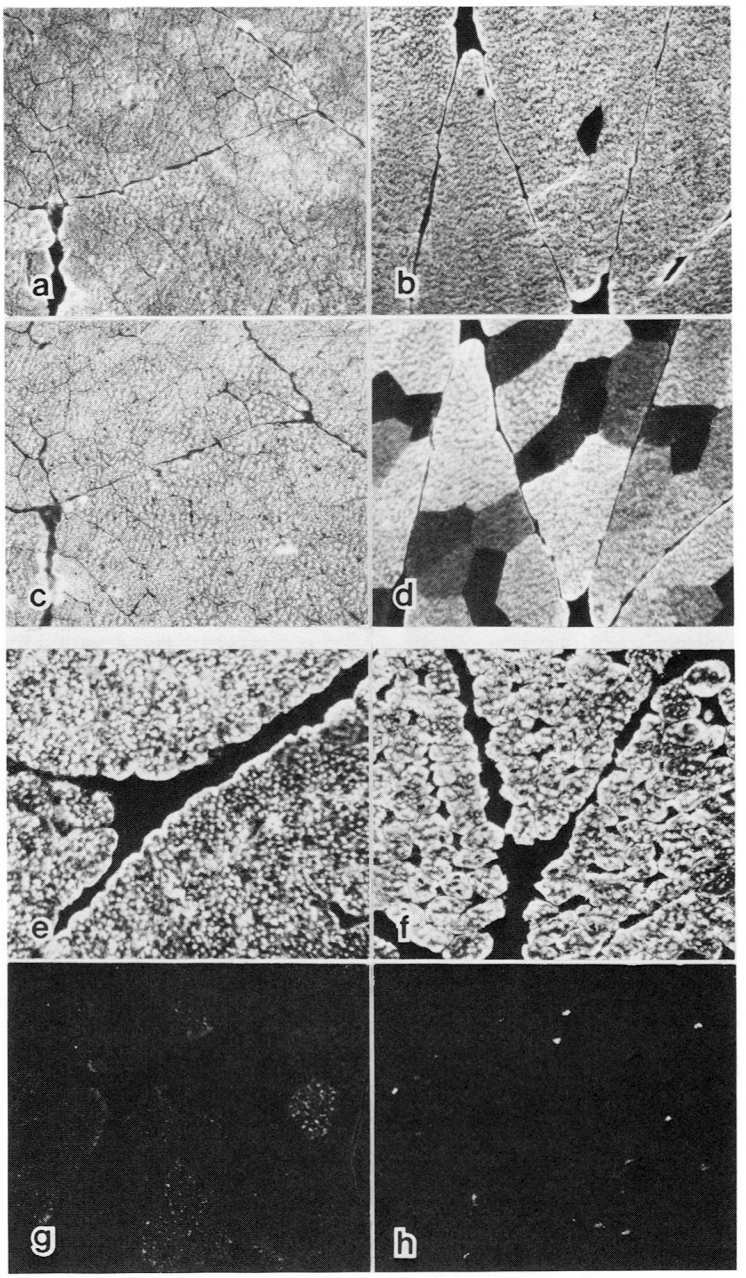
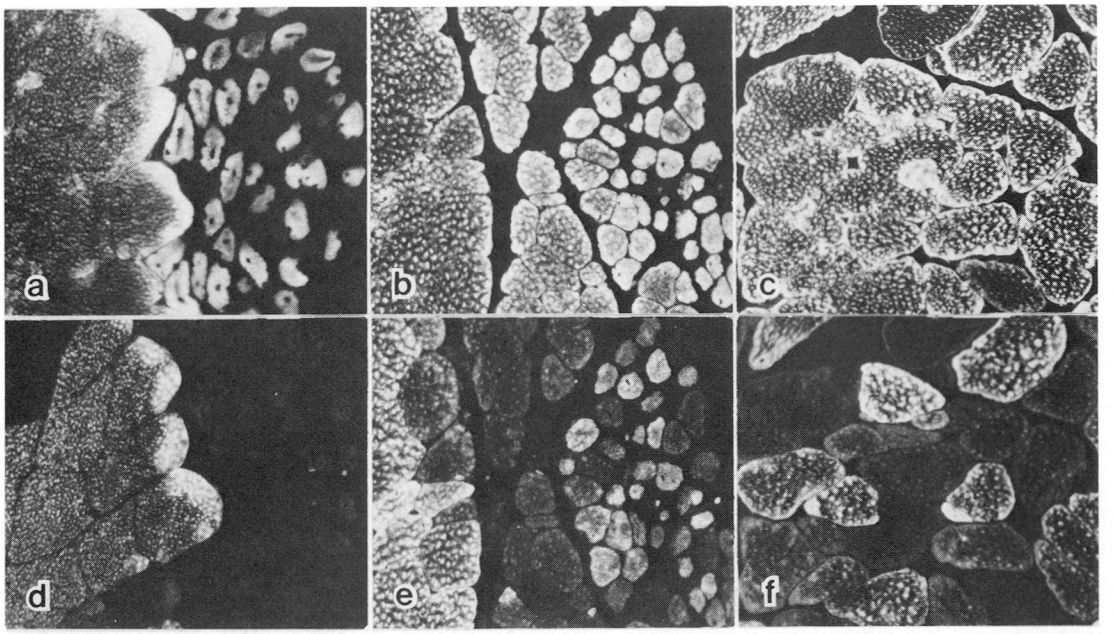


図 1.　間接蛍光抗体法による正常筋（a－d）および除神経後８週の筋（e－h）の観察。ニワトリ胸筋（a, c, e, g）および PLD（b, d, f, h）を F5D3（a, b, e, f）および D5（c, d, g, h）により染色した。　a－d　×120;　e－h　×160



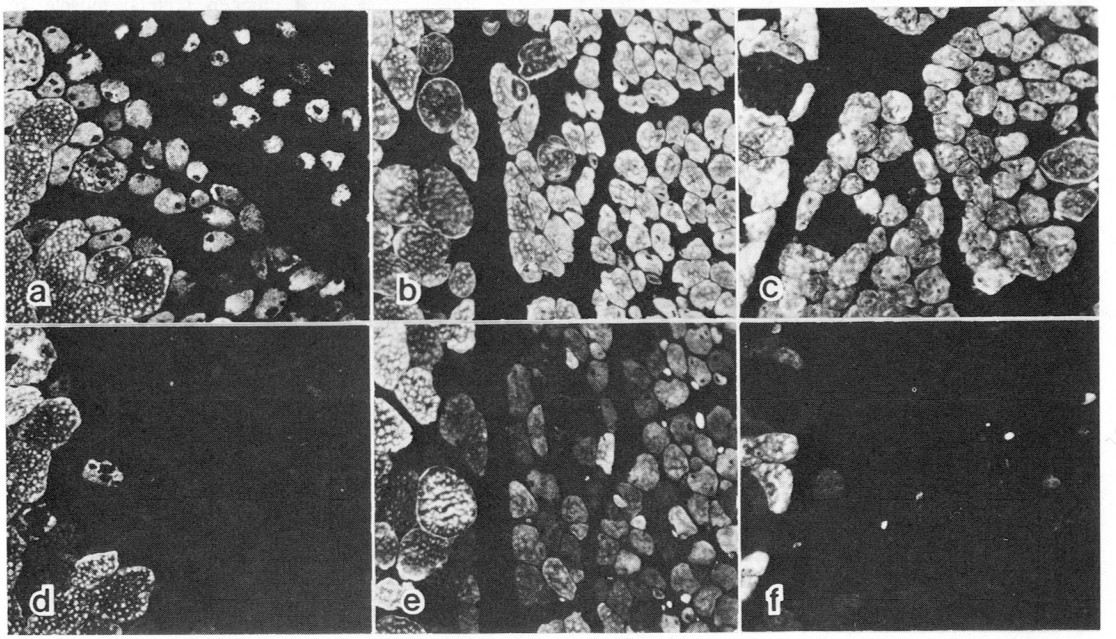


図 2, 3. 間接蛍光抗体法による再生筋および除神経再生筋の観察。神経支配のあるPLD（図２）および無いPLD（図３）に凍傷を与え，術後５日（a, d），２週（b, e）および４週（c, f）に再生部位をF5D3（a－c）およびD5（d－f）により染色した。上図，図２；下図，図3. ×120

は線維内に内在的にプログラムされている可能性がある。あるいは他の因子（ホルモンなど）に依存している可能性も否定できない。実際に，サイロキシンが骨格筋[10]や心筋[11]に存在するミオシンのアイソフォームの変換を誘引するという報告がある。その他，除神経前にすでに神経が正常な成熟筋に存在する衛星細胞に何らかの影響を与えていた可能性も除外できない。

損傷後4週で，神経支配のあるＰＬＤの再生線維は親型の染色性へと回復しつつあったが，除神経筋においては再度胚型の染色性を示すようになった。これは，発生後期のＴＮ－Ｔの発現は，神経依存性であることを示唆している。このように神経支配は筋の親型への成熟に必須であることが考えられる。これらの神経の影響が液性因子によるものか，あるいは機械的刺激によるものか，または神経以外の因子も同時に関与しているかなどについては今後明らかにされなければならない課題である。

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) Wilkinson, J.M., Moir, A.J.G., and Waterfield, M.D.: The expression of multiple forms of troponin-T in chicken fast skeletal muscle may result from differential splicing of a single gene. *Eur. J. Biochem.* **143**, 47-56, 1984.
3) 嶋田裕，清水法子：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。筋ジストロフィー症の基礎的研究（江橋班）。昭和58年度研究報告書 138－143, 1984.
4) Ontell, M.: Muscle satellite cells: A validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. *Anat. Rec.* **178**, 211-228, 1974.
5) Obinata, T., Saitoh, O., and Takano-Ohmuro, H.: Effect of denervation on the isoform transitions of tropomyosin, troponin T and myosin isozyme in chicken breast muscle. *J. Biochem. (Tokyo)* **95**, 585-588, 1984.
6) Matsuda, R., Spector, D., and Strohman, R.C.: Denervated skeletal muscle displays discoordinate regulation for the synthesis of several myofibrillar proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1122-1125, 1984.
7) Carraro, U., Linbera, L.D., and Catani, C.: Myosin light chains in muscle regenerating in absence of the nerve: Transient appearance of the embryonic light chain. *Exp. Neurol.* **79**, 106-117, 1984.
8) Matsuda, R., Spector, D.H., and Strohman, R.C.: Regenerating adult chicken skeletal muscle and satellite cell cultures express embryonic patterns of myosin and tropomyosin isoforms. *Dev. Biol.* **100**, 478-488, 1983.
9) Toyota, N., and Shimada, Y.: Isoforms of troponin during regeneration of chicken skeletal muscle fibers after cold injury. *Cell Tissue Res.* **236**, 549-554, 1984.
10) Ianuzzo, D., Patel, P., Chen, V., O'Brien, P., and Williams, C.: Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature (London)* **270**, 74-76, 1977.
11) Hoh, J.F.Y., McGrath, P.A., and Hale, P.T.: Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: Effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **10**, 1053-1076, 1978.

Ⅲ　細胞生物学・細胞工学的研究

9.　ジストロフィー筋病態と細胞骨格　55

10.　筋変性モデルに関する一考察　59

11.　リソゾームチオールプロテアーゼと
その内在性インヒビターの組織分布　63

12.　カルシウム依存性プロテアーゼの構造，機能，
ならびに活性に関する研究　67

13.　細胞の増殖と分化に関する細胞遺伝学的研究　70

9 ジストロフィー筋病態と細胞骨格
― 筋腱連結部の超微形態 ―

石 川 春 律
研究協力者 藤 巻 昇 神宮司 洋 一
狩 野 由美子

細胞骨格は細胞を構造的に支持するもので，主として細胞質線維要素から構成され，細胞の外形を維持するのみならず，内部でも各種構造体の分布・配列や移動をコントロールしている。さらに，細胞骨格は細胞表面の形質膜との相互作用を通じて，形質膜の機能的領域化を支持している。後者は形質膜の裏打ち構造に負うところが大きい。筋細胞についても，これらの細胞骨格の役割は同様で，筋の収縮活動に密接な関連を有していると考えられる。ジストロフィー罹患筋の初期変化として，オルガネラや筋原線維に障害が起こることが知られているが，これらの病態と細胞骨格の変化との関係が明らかになれば，病因究明の糸口の一つになると信ずる。

骨格筋細胞において，形質膜上の機能的領域（ドメイン）は細胞骨格－膜相互作用の観点からも把えることができる。機能的ドメインとして，筋腱連結部における力学的ドメインと，神経筋接合部における化学的ドメインはよく知られているが，それ以外の細胞表面にも各種のマイクロドメインが存在すると考えられる。これらのドメインを細胞骨格，とくに形質膜裏打ちとの相関で分析して行きたい。

本年度は，筋腱連結部について，電子顕微鏡的に検索を進めたので，その結果を報告する。

＊群馬大学医学部解剖学教室

材料と方法

材料として，ラット横隔膜を用いた。通常の微細構造研究のための試料作製のほかに，各種の化学処理を施したのち固定した試料も用いた。筋腱連結部を組織片に細切し，1％ Triton X－100抽出し，また，さらにH－メロミオシン（HMM）処理したのち，固定，脱水，包埋し，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. 筋原線維の形質膜への付着様式

筋腱連結部をつくる筋線維端は大・小さまざまな突起や弯入を形成し，基底膜を介して腱の膠原線維とかみ合うように連結されている。筋細胞内部では，筋原線維がZ板レベルで筋形質膜に付いて終る。筋原線維の形質膜への付着様式については多くの研究者の関心を惹いているが，詳細は明らかにされていない[1,2,3]。

筋原線維の最終筋節のI帯フィラメントは，形質膜にほぼ垂直に付く部位では，Z板のレベルで膜について終ることになり，フィラメントの配列は比較的分析されやすい。形質膜直下に層構成をとる暗物質が裏打ちしていて，最終のI帯フィラメントはこの裏打ち構造に連結されている。I帯フィラメントは裏打ち構造を介して形質膜に付くように見え，裏打ち構造を貫いて直接形質膜に付くことはない。裏打ち構造の微細構造は明らかでないが，膜の直下にやゝ明調の層とその下の暗質

の層からなる。明調層には垂直に向く微細柱状の構造が認められる。I 帯のフィラメントの長さはほぼ 1μm であるが，幾分長い部位もある。

多くの筋原線維は形質膜に対して斜めに付いて終る。同一の筋原線維の一部がこの様式で膜に付着し，残りの部分はさらに次の筋節を形成することも多い。最終筋節からのI帯のフィラメントはZ板のレベルより遠位では密な集合束をなし，形質膜直下を膜に平行に走り，次第に先細りになっていく様式を示す。集合束の部分は暗調を呈し，Z板との連続が認められる。この集合束はI帯の細いフィラメントと連続しているようにみえるが，束内ではフィラメントは相互に密に配列している。形質膜直下には裏打ち構造が存在し，集合束はこの裏打ち構造に側面的に付着している。束内のフィラメントは順次，裏打ち構造に付着して終り，束の大きさも次第に細くなると考えられる。

2.　Triton処理の筋腱連結部

Triton処理によって，細胞膜の溶解と細胞質の抽出が起こる。筋腱連結部のTriton処理でも同様で，処理時間とともに膜溶解が進行し，細胞質基質が抽出され，線維性構造がコントラスト良く明瞭に観察されるようになる。筋原線維の膜付着部では，裏打ち構造の広がりに一致して，形質膜の三層構造が比較的よく保存されている（図1）。この部位の膜構築上の特異性を示唆している。加えて，裏打ち構造も明瞭で，膜に平行な暗質層，この層と膜とを結ぶ垂直要素がとくに明瞭に観察される。最終の I 帯フィラメントがこの裏打ち構造を貫通しないことも確認される。

細いフィラメントがつくる集合束はTriton処理によって，かなり明調になるが，集合束の緊密さはTriton長時間処理でもよく保たれている。束内には不規則な横縞ないし斑点模様が明瞭に観察される。束を維持する架橋物質によるものと考えらる。

3.　H−メロミオシン修飾による分析

Triton抽出組織片をH−メロミオシン(HMM)で処理すると，筋原線維の細いフィラメントは特異的な矢じり構造を呈する。最終筋節の I 帯フィラメントが形質膜に直角に付く部位では，フィラメントの極性は矢じりが膜から遠ざかる方向である（図2）。 Z板との連結と同じ極性を示す。最終筋節ではI帯フィラメントの全長に矢じり構造が形成されることは困難で，20時間のＨＭＭ処理でも，膜裏打ちとの連結帯は矢じり形成がみられないくらいであった。

集合束として形質膜に斜めに付いて終る部分では，HMMによる修飾はさらに困難である（図3）。集合束は緊密のままで，斑点状ないし横縞様の模様が残存している（図3）。 束に隣接するI帯フィラメントが矢じりを形成していることから，反応を妨害する構造が束内に組み込まれていると考えられる。実際，HMM処理時間を延長し（40時間），高濃度で処理すると，束の表面や近位部分のフィラメントが反応し，矢じりを呈する。観察された限り，束のフィラメントはすべて，一方向性に配列していて，矢じりを膜から遠ざける方向を示す（図3）。 このことは最終筋節のI帯フィラメントは連続して集合束をつくり，膜に近いフィラメントから順次，裏打ちを介して膜に付くことを強く示唆する。したがって，最終I帯フィラメントは1μmよりも長く，最高3μmぐらいまで伸長していると推論される。この推論はさらに明確な証明を必要とするが，フィラメントが膜に付く様式として合理的である。集合束をなして，膜に平行に走りながら膜に付くことは膜の広い領域に亘って力を伝えることができる。さらに，密な束内で，2方向性の配列をとる困難性がなく，一方向性の結晶様の束をつくり，かつ，矢じりを膜から遠ざける方向という細胞一般の原則を守る。この集合束の近位端にI帯が連続することになる。筋線維端の特徴的外形に対応した付着様式といえよう。

今後，裏打ち構造の分子構築，および最終 I 帯フィラメントの集合束化に関与する蛋白質を検索するとともに，筋病態における筋腱連結部の変化を追求したい。

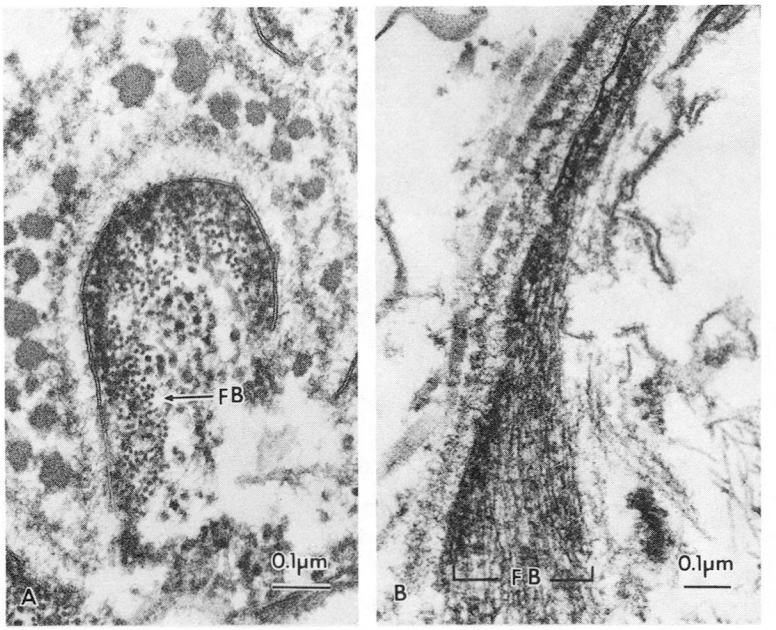


図 1.　Triton 処理の筋線維端一部。 A. 横断像。 B. 縦断像。
最終筋節の I 帯フィラメントは延長して密な集合束をなし（FB），形質膜直下を走り，順次，膜に付いて終る。この集合束はHMM と反応し難い。また，裏打ちの存在部位の形質膜は三層構造をよく残している。

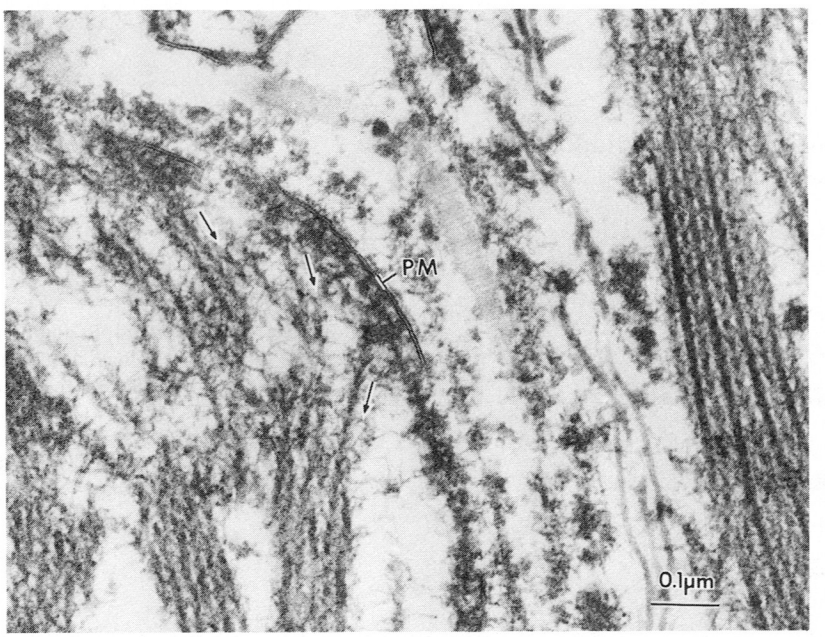


図 2.　Triton- HMM 処理の筋線維端。細いアクチンフィラメントは形質膜（PM）に付いて終るが，その極性はHMMの矢じりが膜から遠ざかる方向（矢印）である。

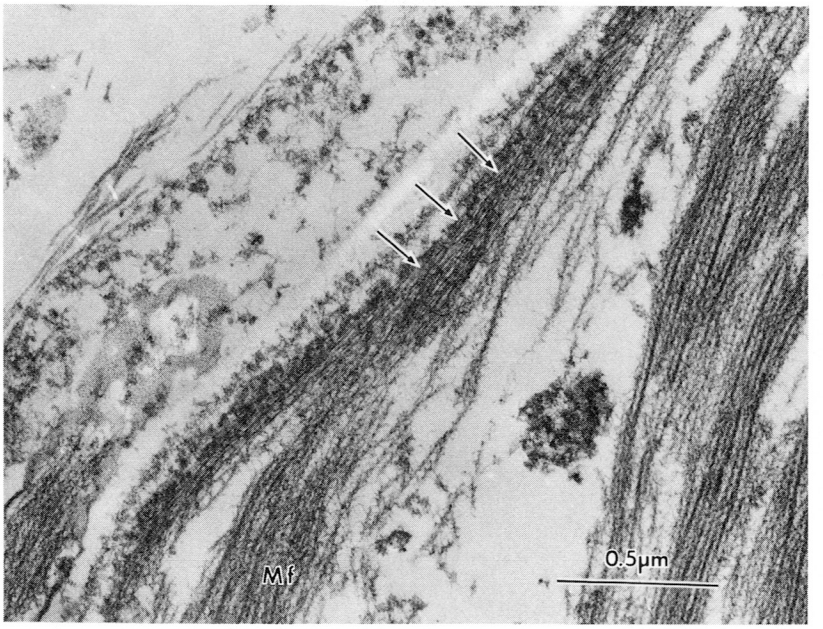


図 3.　Triton-HMM 処理の筋線維端縦断像。
筋原線維の最終筋節（Mf）のＩ帯から連続して，細いフィラメントの集合束が形成されている（矢印）。集合束内には暗物質の斑点ないし横縞模様が見られ，この部分はHMMで修飾され難い。しかし，表層のフィラメントの一部は反応し，矢じりはすべて膜から遠ざかり，筋節へ向う方向を示す。

結　　語

ラット横隔膜の筋腱連結部の超微形態，とくに筋原線維と形質膜との連結様式について電子顕微鏡的に分析した。最終筋節のＩ帯フィラメントはＺ板のレベルで，裏打ち構造を介して形質膜に付いて終っていた。Ｉ帯フィラメントが1μm を越えるいろいろな長さに延長している部位が多く，延長部分は密な集合束をなし，膜に平行に走り付着していた。そのフィラメントはＨＭＭによる矢じりを常に膜から遠ざける方向で配列していた。フィラメントと膜とを仲介する裏打ち構造は膜直下に２層構成をなし，フィラメントがこの層を貫くことはなかった。

文　　献

1) Ishikawa, H.: Fine structure of skeletal muscle. *"Cell and Muscle Motility"*, Vol. **4** (ed. by M. Dowben and J.W. Shay), 1-84, Plenum Publ. Corp., New York, 1983.
2) Trotter, J.A., Eberhard, S. and Somora, A.: Structural domains of the muscle-tendon junction. 1. The internal lamina and the connecting domain. *Anat. Rec.*, **207**, 573-591 (1983).
3) 石川春律：細胞骨格の分化発達 ― 筋腱連結部の細胞骨格。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，103-106 (1984).

10　筋変性モデルに関する一考察
—トランスフエリン欠乏による筋変性

小　沢　鏃二郎*

筋ジストロフィー症（以下筋ジス）の研究に当っての大きな障害の一つは，実験的な変性の生物学がないに等しいことである。ガンや炎症の生物学については，それがまた完成したものでないにしても多くの研究者によってかなりのレベルの生物学が作り上げられている。

われわれの目的は，変性の生物学を作り，筋ジスの本態の解明や治療に役立てようとするものであり，さらには多くの変性病変を主体とする難病研究の基礎を作りあげようとするものである。

このためには，実験系を単純化することがまず重要であり，従って現在の細胞生物学的方法，特に培養細胞を用いた各種の方法を用いることが必要となる。

筋ジスの本体を解明するために用いられる細胞生物学的な研究は大きくいって二つの立場に分けることができる。一つは筋そのものの中に疾病の原因が存在するという仮定に立って，罹患筋を in vitro で培養することによって何等かの病的な変化があることを期待するものである。この線にそって，ヒトの筋ジスの筋を生検し，その衛星細胞を培養したり，いわゆる筋ジスモデル動物の筋芽細胞や衛星細胞を培養したりすることが行われて来ている。しかしながら現在迄確実に病的な過程を in vitro で再現していると思われる像は得られていない。Blau ら[1]は，Duchenne 型筋ジス筋の衛星細胞の培養によって得られた筋管細胞の萎縮について報告しているが，多くの人を納得させるに至っていない。このように病的筋の培養によって病的過程が再現されないのは，もともとこれらの筋には病的な過程を発現することがないのか，培養という人工的な条件下では，病的な状態を発現する迄分化しないのかあるいは下に述べることと関連するが，現在用いられている培養液の供給する何物かが発症を抑えているのか，更に生体内で与えられるかもしれない毒素がこの条件では与えられないためなのか，色々な可能性が考えられるであろう。しかし現在迄の結果が negative だからといって培養法の改善によって将来において病的発現の可能性がないと断言することはできない。

もう一つの立場は病気の本質が筋細胞の外にあって，筋細胞の病変はそれを取巻く環境の変化によって起こると考える立場からの実験である。この立場はさらに考え方によって二つに分れる。一つは神経系に病因があると考えるもの，他は体液性の影響に原因を求めるものである。神経因性と考える場合の実験法としては，筋の移植や培養皿の上で神経筋接合部を作ったりする方法，更に培養液に神経由来の物質を加える方法などが考えられる。体液性因子を考える場合には，神経以外の生体成分の筋細胞への作用を調べることになる。この場合は，培養細胞を用いるのが普通であって，その培養液中に生体因子を添加することによって起る培養細胞の変化を観察することになる。

われわれは，生体因子を十数年に渡って研究している。[2] 筋細胞の材料としては主としてニワトリ胚胸筋を用い，基本培養液としては Eagle's

*国立武蔵療養所　神経センター　機能研究部

MEM85％ウマ血清15％を用いている。ニワトリ筋芽細胞は基本培養液中で培養しても成長しない。しかしこれに少量のニワトリ胚抽出物を添加することによって非常によい成長が起ることに着目した。このことはニワトリ胚抽出物中に筋細胞の成長を促進する物質を含んでいることを示していた。この研究を始めた1971年には，大塚，弘中ら[3]によって筋ジスマウスの交又移植が行われ，細胞外因子の重要性が認識されていた。彼らの解釈ではむしろ神経因子が重要視されたが，上述のような液性因子が関与している可能性も否定できなかった。現在では当時用いられていた筋ジスマウスのヒト筋ジスのモデルとしての有用性は低くなってしまったけれども，この実験は私の発想の引き金としては有用であった。すなわち，extracellular の因子で in vitro の assay system を用いて筋の成長に関与する物質を調べてそれらを列挙することは可能であろうし，それらは必ずしも筋ジスの病因と関連しているとは限らないにしても，数多い原因不明の筋疾患の中にはそれらの欠乏によるものもあるかもしれないというものであった。しかもそういう疾患の場合には，原因となる欠乏物質を「物」として握むことができるのであるから，治療に用いることができると考えられる。これは上述の原因論のうち，もし可能ならば得られる物質がそのまま古典的な意味での薬物療法と直結し得る数少い例であろう。

まずニワトリ胚抽出物に含まれる有効成分を抽出することとしたが，この際の方法は活性のある分画を種々の方法で精製してゆくことになるが，その際重要なのは生理活性を定量とすることである。このためには初めは核の数を算えることを行ったが，[4] 後にはより簡単のために，筋管細胞内に蓄積されるクレアチンキナーゼ（CK）の活性を測定することによって，筋の成長の定量を行った。[5]

胚抽出物は複雑な混合物なので，有効成分がどの臓器に由来しているかを検索した結果血清（成鶏のものでも）が最も強い活性を含むことを見出した。[6] 従って成鶏の血液を材料とし，活性の強い分画を集めるという方法で種々の方法を併用して精製を行った。得られた分画は，紅褐色をした蛋白で分子量80Kであった。酸性で無色となり蛋白分画は活性を持たないが，その時の液性成分と混じて中性に戻すと紅褐色の色調を回復すると共に，活性も回復した。

分子量や色調などが，トランスフエリン（Tf）によく似ているので，既知の方法で血清および卵白から精製したTf（sTfとoTf）と，われわれの標品を比較した。その結果，異った材料から異った方法で得た標品の蛋白当りの筋成長促進効果が同じであること，上記の酸処理の効果が定量的に同じであることなどから，われわれの標品の有効成分はTfであることがわかった。[7)8)9)] さらにFeを結合しないapo Tfは無効であることが明らかとなり，一方FeイオンはTfタンパクと結合しなくとも，高濃度では筋の成長を促進したし，さらにTfにFeの代りに他の遷移元素を結合させたものには，筋の成長を促進する作用がないことが分った。[10)11)] このことは細胞に必要なものはFeであって，Tfタンパクは必要でないかもしれないことを示唆した。しかしTfと結合したFeは，遊離Feイオンの200倍も有効であるので，TfはFeのキャリアーであることが考えられた。これに関係しては後にKarinとMinz[12] によって奇形腫幹細胞を用いて，Fe-Tf はリセプターに結合して細胞内にとり込まれ，Feを放出した後apoTfはリセプターに結合したまま細胞表面へ戻りapoTf はやがて細胞から離れるという過程が明らかにされた。

上に述べたように，Feのみでも適当な条件下ではCK活性をマーカーとして筋の成長を調べる限り，Fe-Tfと同じような成長促進作用を示した。しかし筋細胞の機能的な分化がFe添加培養液中でも，Fe-Tf添加培養液中の場合と同様に行われているか否かを調べることが必要であった。この問題について種々の方面から検索を行った。[13] まず筋収縮の要素である筋原線維を形づくってい

る種々のプロテインの二次元電気泳動法による検出，ミオシンB　ATP　ase活性の検出，電顕による筋原線維および筋小胞体の検索，グリコーゲンホスホリラーゼキナーゼ活性の検出，CKアイソザイムの分化様式の検索等においてFe イオン添加によって育った筋管細胞も，Fe-Tf添加によって育った筋管細胞もほぼ同様な成績を示した。さらにこれらの成績は培養細胞の場合も，本質的に成筋における収縮と同様な機構によって収縮が行われている可能性を示している。そしてこの段階までの分化にはTf タンパクは事実上要求されない。さらに，細胞膜の興奮性の分化や，われわれのグループの斉藤[14]が創始した培養筋細胞の収縮を測定する方法によって検討した。細胞全体として観察すると，興奮収縮連関は，段階的に成筋のものに近づいているが，この分化の過程も上記の二種の筋管細胞でほぼ同じようであった。

これまでニワトリ筋に対するニワトリのFeTfについて述べて来た。しかしわれわれの基本培養液にはウマ血清が入っているので，血清中にはウマTf が非常に高濃度に入っていた筈である。この際ニワトリ筋の成長がみられなかったのは，例外を除いて哺乳類のFe-Tfは鳥類のTf リセプターと結合できないために，ニワトリ筋細胞はウマTfを利用できなかったためである。[5]なお，われわれはニワトリ胚抽出液中からFe-Tfを精製し同定している。[15]

さて主題を始めに戻して筋の変性とTf との関連[16][17]について述べる。筋原細胞にFe の供給が行われると，筋芽細胞の増殖がみられるし，筋管細胞の成長，分化がみられる。それでは一度成長した筋管細胞は，Fe の供給が失われた場合は成長は当然とまるだろうが，細胞はそのままの状態を保つであろうか。

基本培養液にニワトリTf を添加した培養液中で成長したニワトリ筋管細胞を，Tf を含まない基本培養液中で培養を続けると，細胞は変性し遂に死に至る。急速に細胞が死に至る場合には，数日後には大きな筋管細胞の核が凝縮して米粒のようになり，細胞膜の透過性が増加して細胞質が泡状のいわゆるbleb を作って漏出するようになる。Blebは数μmから数十μm程度の大きさで，一ケの筋管細胞に多数出現する。Bleb が漏出すると細胞は急速に痩せて培養皿から剥離する。

徐々に起る変性としてはまず無数の脂肪滴が現われ，あるものは空胞化し，あるものは痩せ細り，あるものは細胞の厚さが薄くなる。薄くなった細胞の中にはかなり形の変ったものが見られる。これらの細胞も多くは十数日後にはボロボロになって死滅する。一方筋芽細胞や未分化の細い筋管細胞，あるいは痩せて細くなった筋管細胞は比較的丈夫であり，かなり生き残り，FeTf　の添加により再び分裂や融合が起り，遂には横紋がみられる迄発達する。

これらの事実は，筋細胞の変性と治癒が，細胞にFeを与えるか，与えないかで起るというモデルを提供することになる。このプロセスは，これ迄あまり注目を引かなかったFeと筋の病変とを関係づけたものである。われわれはこのプロセスを諸種の方法で分析することによって，変性病変の攻め方を確立したいと考えている。

色々な物質の欠乏症では，多くの場合その物質は分解されて足りなくなる様な性質のものである。このモデルではFe という分解不可能な物質も常時与えておかなければ，細胞は破壊されるということが示された。このような場合に，Fe は細胞が必要としているにもかかわらず細胞から細胞外へと放出されるのであろうか，それとも利用不可能な状態になって蓄積されてしまうのであろうか。そしてFe そのものは生命の過程のどこに組込まれているのであろうか。そして形態的にみられる変性とは，生命の過程のどこがどのように修飾された時に起るのであろうか。このような問題が解決されてゆく過程に於いて，筋ジスの本態解明の手がかりが得られてゆくのではなかろうか。

文　　献

1) Blau, H.M., Webster, C. & Pavlath, G.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 4856-4860, 1983.
2) Ozawa, E., Kimura, I., Hasegawa, T., Ii, I., Saito, K., Hagiwara, Y. & Shimo-Oka, T.: *Muscular Dystrophy: Biomedical Aspects*, (Ebashi, S. & Ozawa, E. eds) pp. 53-60, 1983.
3) 大塚正徳：筋肉病学。里吉営二郎，豊倉康夫編，南江堂，1973.
4) Ozawa, E. & Kohama, K.: *Muscle & Nerve*, **1**, 230-235, 1978.
5) Shimo-Oka, T., Hagiwara, Y. & Ozawa, E.: in preparation.
6) Ozawa, E. & Kohama, K.: *Proc. Japan Acad.* **49**, 852-856, 1973.
7) Kohama, K. & Ozawa, E.: *Proc. Japan Acad.* **49**, 857-860, 1973.
8) Kimura, I., Hasegawa, T., Miura, T. & Ozawa, E.: *Proc. Japan Acad.*, **57(B)**, 200-205, 1981.
9) Kimura, I., Hasegawa, T. & Ozawa, E.: *Development, Growth & Differ.*, **24**, 369-380, 1982.
10) Hasegawa, T., Koji, S., Kimura, I. & Ozawa, E.: *Proc. Japan Acad.*, **57(B)**, 206-210, 1981.
11) Saito, K., Hagiwara, Y., Hasegawa, T. & Ozawa, E.: Development, *Growth & Differ.*, **24**, 571-580, 1982.
12) Karin, M. & Mintz, B.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 3245-3252, 1981.
13) In preparation.
14) Saito, K. & Ozawa, E.: Proc. *Japan Acad.*, **59(B)**, 367-370, 1983.
15) Ii, I., Kimura, I. & Ozawa, E.: *Developmental Biol.*, **94**, 366-377, 1982.
16) Ozawa, E.: Proc. *Japan Acad.*, **53(B)**, 130-132, 1977.
17) Ozawa, E. & Hagiwara, Y.: *Biomedical Research* **3**, 16-23, 1982.

11 リソゾームチオールプロテアーゼとその内在性インヒビターの組織分布

勝沼信彦*
研究協力者　木南英紀*　板東祥晃*
塚原俊文*

はじめに

筋ジストロフィー症における壊死性崩壊の機序と強い筋タンパクの分解能をもつリソゾームのチオール性カテプシン群との関連を追求している。カテプシンLを除き，カテプシンB及びHに関しては精製，諸性質，アミノ酸配列も決定され，プロテアーゼ自体の性質は明らかになってきた。しかし，機能面の研究はまだ不十分であり，骨格筋をはじめ諸組織におけるプロテアーゼの濃度についても全く報告がない。今回，カテプシンB，H及びその制御因子としてのチオールプロテアーゼインヒビター（TPI-αとTPI-β）に対する特異抗体を得，それぞれの酵素免疫測定法を確立し，各種組織における濃度を測定した。

材料と方法

ラット肝よりカテプシンB[1]，カテプシンH[2]TPI-β[3]をラット皮膚上皮よりTPI-α[4]を精製し，それぞれに対する抗体を作製した。ペルオキシダーゼ標識抗体の調製は石川らの方法[5]に従った。即ち，F(ab)$_2$を調製し，ヒンジ部のSH基を露出させる一方，ペルオキシダーゼにマレイミド誘導体を導入し，両者を反応させ，ペルオキターゼ標識抗体を作製するものである。この標識抗体を用いてサンドウィッチ法で抗原の定量を行った。

定着マクロファージは，腔腔を洗滌して集めた。多核白血球及び浸出マクロファージは6％のカゼイネイト15mℓを腔腔内投与後6時間後及び4日後に採取した。白血球及びマクロファージはパコールを用いた密度勾配遠心により，顕微鏡的に95％以上各々の細胞を含む標品を得た。リンパ球はラット血液からフィコールパックを用いて分離した。

結果と考察

1. リソゾームのチオールプロテアーゼとその内在性インヒビター

リソゾームの代表的なチオールプロテアーゼであるカテプシンB及びHの諸性質，アミノ酸配列，糖鎖構造に関する知見が増えてきているのに対し，もう一つの最も強力なエンドペプチド作用をもつカテプシンLの構造に関する研究は遅れている。その大きな理由はカテプシンB，Hに比べ著しく含有量が低いことと不安定なため精製が非常に困難なことによる。我々は最も含有量の高いラット腎より迅速な精製法を確立し，以前の報告より分子量の大きい型のものを精製することができた。しかし，電気泳動のパターンを感度の高い銀染色を行ってみると精製途上の分解産物とみられるminorバンドが認められる。現時点では，natineなカテプシンLの精製は極めて難しいと思われるので，一次構造の決定はDNAの配列を決める方向からのアプローチも検討しなければならないと考えている。

チオールプロテアーゼ群の制御因子として内在

*徳島大学医学部酵素研究施設酵素化学

性インヒビターは，ここ数年の研究によって概要がほぼ明らかになってきた。血中に存在する大きな分子量のＴＰＩ（実は低分子キニノーゲンと同じ物）とは別に分子量11,000～13,000のＴＰＩが存在するが，現在までに４種固定されている。[6)～9)] ＴＰＩ－αとＴＰＩ－βが非分泌性であるのに対し，ＴＰＩ－γ（別名γ－trace，シスタチン－Ｃ）及びシスタチンＳは分泌性であり，ＴＰＩ－γは血液，脳脊髄液，精液等へ，シスタチンＢは唾液に分泌される。ラットのＴＰＩ－α[6)]とＴＰＩ－β，[7)] ヒトのＴＰＩ－γ[8)]，シスタチンＳ[9)]はすでに一次構造が決定されている。

2　骨格筋と全身臓器におけるカテプシンＢ，カテプシンＨとチオールプロテアーゼインヒビターの分布

カテプシンＨ及びＬには選択的な基質が開発されておらず，組織の阻抽出液を用いて，それらを特異的に測定することは極めて難しい。又，ＴＰＩも阻害活性だけでは４種のＴＰＩを区別できない。最も優れた方法は，抗体を用いてそれぞれを定量することである。我々はラットのカテプシンＢ，Ｈ．ＴＰＩ－α及びＴＰＩ－βに特異的な抗体４種を得て，これらの酵素免疫測定法を確立した。いずれも高感度で，それぞれの抗原のみを定量でき，しかもプロテアーゼはインヒビターの存在によって影響を受けることなく又，インヒビターはプロテアーゼの存在によって影響を受けることなく測定が可能であった。ラット各種組織におけるプロテアーゼとインヒビターの分布を図１に示す。上段はカテプシンＢ及びＨの量の多い組織であり，腎が単位タンパク当り最も含有量は高い。腎，脾，肝，肺などではカテプシンＢ＋Ｈの量がＴＰＩ－α＋βの量を上廻っている。ＴＰＩ－αは皮膚上皮，及び重層偏平上皮に多量に存在し，中段に示されている臓器など限定した組織しか存在しない。これらの組織ではＴＰＩ－αが多いため一見ＴＰＩの方がプロテアーゼ量を上廻っているが，必ずしも同じ細胞にプロテアーゼをインヒビターが局在するとは限らない。脳と副腎ではカテプシンＨに比べカテプシンＢのレベルが圧倒的に高く，カテプシンＢ＋Ｈの量はほぼＴＰＩと拮抗している。目標である骨格筋及び心筋はプロテアーゼ，インヒビター共に少ない組織であることが明白である。ペルオキシダーゼ標識抗体を用いて免疫組織学的にそれらの局在を調べると正常な骨格筋ではカテプシンＢ，Ｈ及びＴＰＩ－β いずれも筋細胞内はbackgroundレベルの染色で濃染される部分はみられなかった。むしろ間質のマクロファージ及び血管内皮細胞(?)がいずれも陽性であった。

3　末梢血細胞におけるカテプシンとインヒビタの分布

筋ジストロフィーハムスターの罹患筋及び急性筋壊死のモデルとしてのプラスモシドミオパチーでは，リソゾームのカテプシンＢ＋Ｌ活性及びＴＰＩの著明な活性増加がみられる。この増加は主として間質及び筋細胞内へ浸潤してきた細胞群とくにマクロファージ由来であることを免疫組織学的及び生化学的に証明した。[10)] 今回は，壊死筋に遊走してきたマクロファージではなく，腹腔内マクロファージ及びその他の末梢血細胞のチオールプロテアーゼとインヒビターの量を測定した。マクロファージ及び好中球はラット腹腔より採取し，さらにパコールの密度勾配遠心で分離精製した。リンパ球は血液よりフィコールパックを用いて分離した。表１に示すように，カテプシンＢ及びＨのレベルはマクロファージが圧倒的に高い。カテプシンＢはリンパ球及び好中球の50～30倍，カテプシンＨは約10倍であった。ＴＰＩ－β の量はマクロファージ好中球，リンパ球間でそれほど大きな差はみられない。ＴＰＩ－α は好中球にのみ認められた。マクロファージではＴＰＩ量に比し，カテプシンＢ，及びＨの量が圧倒的に高いことは注目に価する。カゼイネイト（表１），チオグリコレート，グリコーゲン（表に示されていない）等で，誘起されたマクロファージではカテプシンＢの量が著しく増えている。ＴＰＩ及び同じリソゾームのプロテアーゼであるカテプシンＨの量はそれほど増えない。おそらく炎症性マクロファー

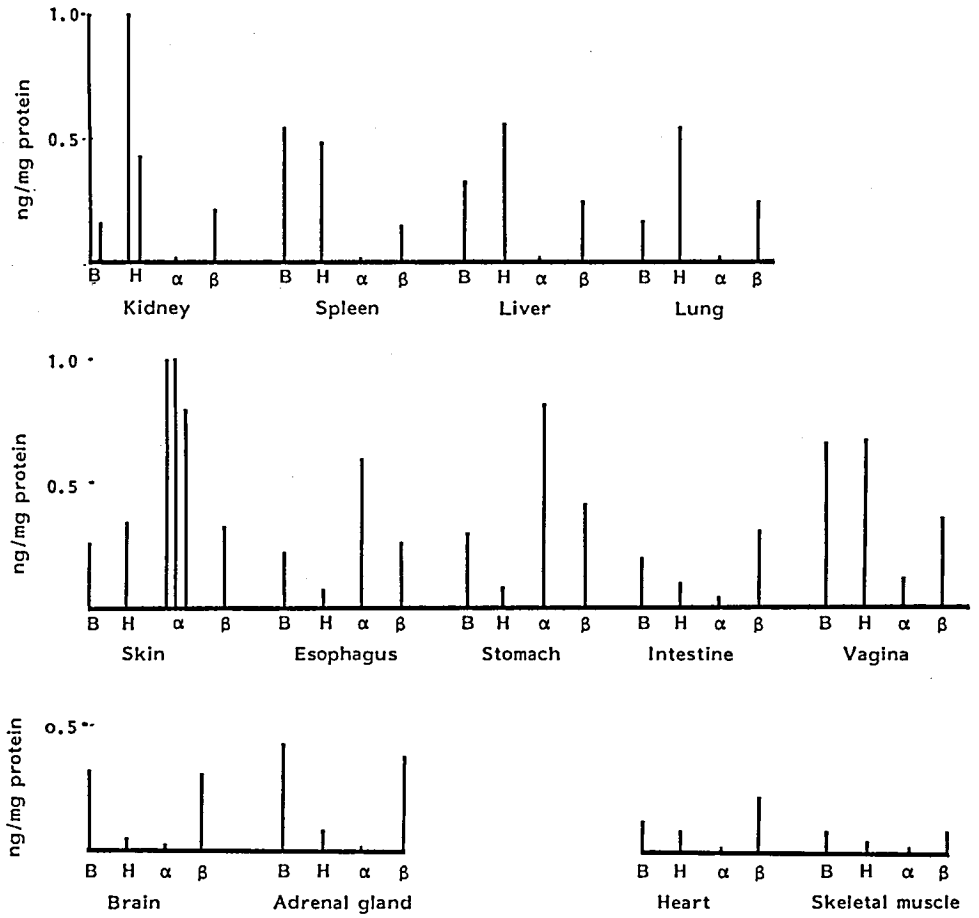


図1.　ラット各種組織におけるカテプシンB，カテプシンH，TPI－α及びTPI－βのレベル。

表1.　Levels of Cathepsin B, Cathepsin H, TPI-α and TPI-β in Rat Peripheral Blood Cells

Cells	Cathepsin B	Cathepsin H	TPI-α	TPI-β
		ng/10^6 cells		
Lymphocytes	4.1 ± 1.2	16 ± 3.2	0.006 ± 0.002	7.67 ± 1.25
Neutrophiles	6.2 ± 1.8	16 ± 4.4	0.55 ± 0.08	9.53 ± 1.30
Macrophages				
resident	194 ± 28	158 ± 36	0.027± 0.004	28.7 ± 3.9
elicited	1259 ± 350	298 ± 44	0.039± 0.008	56.2 ± 7.8
Erythrocytes	0.5	0.5	0.001	0.56 ± 1.1

ジの食作用と関係ある変化と思われる。実際に，ジストロフィー筋に浸潤してきたマクロファージも炎症性マクロファージとしての性質を示すのかどうか，しかも，それらが筋タンパクを取り込み分解しているかどうかも今後の重要な課題である。再に，マクロファージを遊走させる骨格筋の変化は何かも重要な問題である。

REFERENCES

1) Towatari, T., Kawabata, Y., and Katsunuma, N., *Eur. J. Biochem.* **102**: 279, 1979.
2) Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., and Hanson, H., *Acta Biol. Med. Germ.* **36**: 185, 1977.
3) Kominami, E., Wakamatsu, N., and Katsunuma, N., *J. Biol. Chem.* **257**: 14648, 1982.
4) Kominami, E., Bando, Y., Wakamatsu, N., and Katsunuma, N., *J. Biochem.* **96**: 1437, 1984.
5) Ishikawa, E., Imagawa, M., Hashida, S., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., and Ueno, T., *J. Immunoassay* **4**: 209, 1983.
6) Takio, T., Kominami, E., Wakamatsu, N., and Katsunuma, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**: 149, 1984.
7) Takio, K., Kominami, E., Wakamatsu, N., and Katsunuma, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 902, 1984.
8) Grubb, A., and Löfberg, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3024, 1982.
9) Isemura, S., Saitoh, E., Sanda, K., *J. Biochem.* **96**: 489, 1984.
10) Kominami, E., Bando, Y., Ii, K., Hizawa, K., and Katsunuma, N., *J. Biochem.* **96**: 1841, 1984.

12 カルシウム依存性プロテアーゼの構造，機能，ならびに活性に関する研究

鈴木紘一*
研究協力者 大野茂男 榎森康文
今城忍 川崎博史
杉原英光

カルシウム依存性の中性プロテアーゼ(CANP)は高等動物細胞の細胞膜に大量に存在するプロテアーゼで，活性発現にCaを必要とする。CANPは単に種々のタンパク質をアミノ酸やペプチドに分解するいわゆる消化酵素として作用する以外に，タンパク質のプロセシングを通じて多くの細胞機能と密接に関係していると考えられる。CANPは細胞質に存在し，常に基質と接しうる状態にある。このため，CANPは普通の状態では活性を持たず，必要な時だけ活性を持つように活性が厳密に制御されているはずである。この活性制御系が不調になると，CANP活性の異常が生で種々の疾患に通じる。筋ジストロフィー症ではCANP活性の顕著な上昇がみられ，このために筋タンパク質の崩壊がおこる。このCANP活性の上昇は活性制御系の不調にもとづくものであり，CANPの活性制御系とその異常を明らかにし，筋ジストロフィー症の原因を探索する目的で研究を行っている。

方法および結果

ニワトリCANPの構造決定

哺乳類ではCa感受性を異にする2種のアイソザイムmおよびμが存在する。しかし，ニワトリにはmとμの中間の性質を示すものがただ一種類存在する。また，CANPは80Kと30Kのサブユニット各1個からなるダイマーであるが，現在知られているCANPの性質はすべて80Kサブユニットだけで説明できる。これらの事実から，ニワトリ80Kサブユニットのクローニングを行い，その構造を解析した。

ニワトリ骨格筋よりグアニジンチオシアネート法でmRNAを精製し，これからcDNAバンクを作製した。既に明らかにしたニワトリCANPのアミノ酸配列の一部に相当する3種類のオリゴヌクレオチドを合成し，これをプローブとしてスクリーニングを行った。その結果えられた2個のクローンを使って約3.5 kbのCANP cDNAの全構造を明らかにした。この結果と，タンパク質レベルでの構造解析の結果から，CANPは705個のアミノ酸からなるprimary translation productのN末端メチオニン残基がとれたものであることが判明した（図1）[1]。

ニワトリCANPのドメイン構造

決定したCANPの構造をDayhoffのProtein Sequence Data Bankを使って解析した。その結果，CANPは図1に示すように明らかなドメイン構造を持つことが解った。

CANPはチオールプロテアーゼで，活性中心Cys近傍のアミノ酸配列はパパインやカテプシンBなど他の代表的なチオールプロテアーゼと似ていることが知られている[2]。ここで全構造を比べて詳細

*東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部

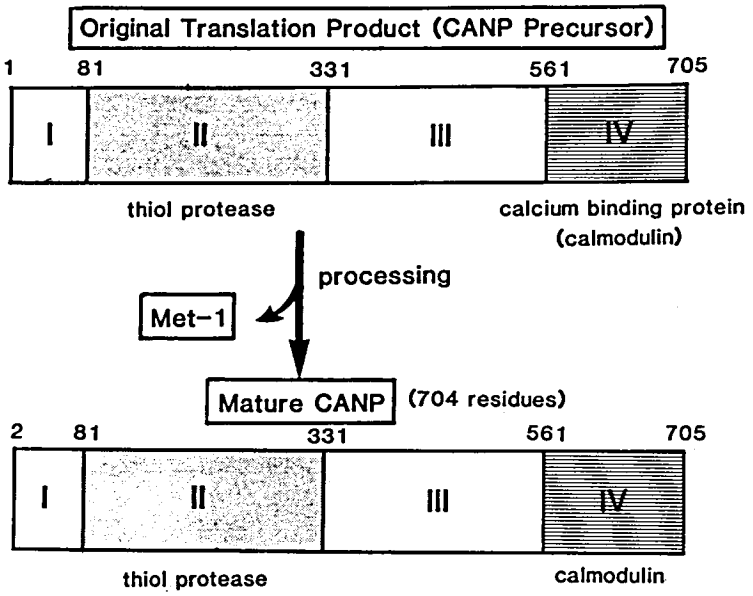


図 1.　CANPのドメイン構造。図中の番号は残基番号を示す。

な比較検討をした結果，活性中心CysやHis近傍を中心により広い範囲でCANPと他のチオールプロテアーゼとの間にアミノ酸配列の相同性が見出された。この結果，CANPの№81−330の部分はチオールプロテアーゼドメインであると結論した。

カルシウムを結合する構造としてカルモデュリンなどに見られるEFハンド構造がCANP中に見られるか否かを次に検討した。図2に示すようにCANPのC末端に近い部分に4ケ所のEFハンド構造をとる部分が見出された。これらの部位はいずれもC末端に近い部分に存在し，ペプチド鎖上の分布はカルモデュリンの場合と非常に良く似ていた。以上の結果，この部分（№561−705）をCANPにおけるカルシウム結合部位であると判定した。

CANPはチオールプロテアーゼとカルシウム結合部位を持ち，図2に示すように4つの部分からなる明確なドメイン構造を持つことが明らかになった。

CANPの活性制御機構

CANPのチオールプロテアーゼ部分は，構造の相同性から考えると，この部分だけを切り離せばCaがなくても活性を持つと思われる。しかし，CANP分子の中に組込まれると不活性な状態で存在している。CANPのCa結合部位にCaが結合すると，Ca結合部位に構造変化がおこり，これがプロテアーゼ部位の構造変化を誘起し，CANPがプロテアーゼとしての活性を持つと考えられる。

今までカルモデュリンの存在状態としては遊離の状態のものと，標的酵素のサブユニットになっているものの2種が知られている。CANPでは，カルモデュリンが標的酵素であるCANPと共有結合で結ばれた形で存在している。このようなカルモデュリンの存在形式は今まで全く知られていない。共有結合でカルモデュリンと標的酵素が結合していれば，その制御は最も簡単かつ確実である。CANPがペプチド結合の水解という不可逆反応を行うこと，CANPが細胞質に存在し，CANPの活性異常は細胞にとって極めて有害であることなどを考えると，この活性制御機構は非常に合理的な制御機構である。

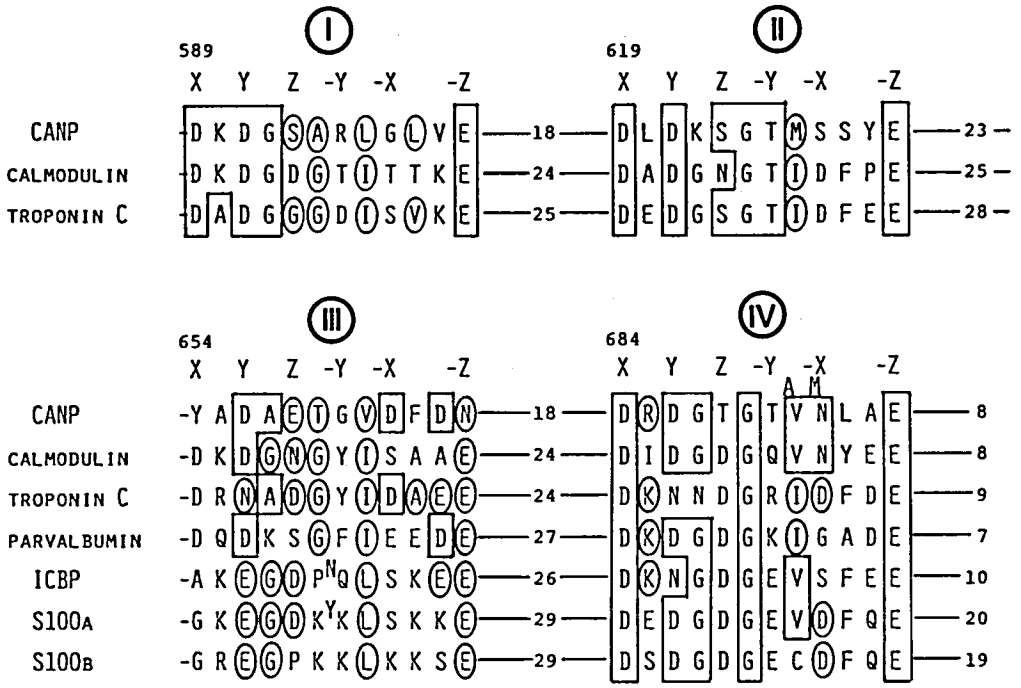


図2.　CANP中のカルモデュリン様構造
Ⅰ～ⅣはN末端側から順につけたCANP中のカルシウム結合部位。X，Y，Z，−Y，−X，−Z：カルシウムの配位する位置。Xの上側の数字はCANPにおけるアミノ酸の残基番号。−ZとXの間，または−Zの後にある数字は，そこに存在するアミノ酸の残基数を示す。

考　　察

現在ニワトリCANPの構造解析に続きヒト，ウサギのmおよびμCANPの構造決定を行っている。こうして得られる結果を比較検討すれば，mおよびμCANPの構造と活性の相関，Ca感受性の差異などが分子レベルで明らかになるものと考えている。また，CANPの活性制御機構は簡単かつ確実ではあるものの，この機構では酵素活性がCaの存在のみによって左右される。Caの存在下でも活性を制御したり，Caの感受性を変化させるためにタンパク質性のインヒビター，アクチベーター，エフェクターなどが存在するのであろう[3)4)]。従って，CANPの活性はこれらの因子が相互作用をする複雑な制御系で制御されている。そのため，CANP活性の異常の原因を明らかにするには，この複雑な制御系の全体像を明らかにする必要があり，それにはかなりの時間が必要である。しかし，その制御系の中心をなすCANPの構造と機能の概要は近い将来に明らかになるであろう。

文　　献

1) Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. & Suzuki, K.: *Nature*, **312**, in press (1984).
2) Suzuki, K., Hayashi, H., Hayashi, T. & Iwai, K.: *FEBS Letters*, **152**, 67-70 (1983).
3) Suzuki, K.: J. Biochem., **93**, 1305-1312 (1983).
4) Suzuki, K. & Ishiura, S.: *J. Biochem.*, **93**, 1463-1471 (1983).

13 細胞の増殖と分化に関する細胞遺伝学的研究

清 水 信 義

研 究 目 的

EGF（上皮増殖因子）やインスリンなどのポリペプチドは，膜の特異的レセプターに結合することによってシグナルを誘導し細胞の代謝・増殖や分裂を調節している。本研究はEGFやインスリンの細胞増殖促進作用の分子機構や遺伝制御を細胞遺伝学的アプローチを用いて追究し，筋細胞の増殖や分化の解明の基礎とすることを目的とする。この目的のためにEGFやインスリンに応答しない変異株や異常な仕方で応答する変異株を分離する必要がある。これらの変異株には膜レセプター機能欠陥に関与する種々の蛋白因子・酵素の欠損やポリペプチドホルモンあるいはそのレセプターの細胞内プロセッシングに関する細胞骨格やオルガネラ機能の欠陥などが含まれる。得られた変異株に関して，その変異の分子レベルでの性状を調べると共に，雑種細胞形成法やDNAトランスファー法などを組み合わせて，それらの遺伝子の発現の調節や遺伝子マッピング，遺伝子のクローニングなどを行なう。

現在までの研究状況

EGFやインスリンの作用の分子機構に関して，レセプターの集合機構やリン酸化反応が最近注目されているが，核のDNA複製に連なるプロセスは全く判っていない。最近我々はEGFを運搬する新しい細胞顆粒，Mitosomeを発見し，それが従来のリソソームを経由する分解系と異なって，細胞のDNA複製の促進に関与する新しい系であると考え，EGF作用の分子機構に関してDual pathwayモデルを提唱している[1~4]（図－1）。

このような生化学的・分子生物学的研究をおぎなうアプローチとして，我々は細胞遺伝学の立場からの研究も数年前に開始した[5]。遺伝子クローニングなどの技術の導入によって，遺伝子DNAの構造解析は急速に進んでいるが，細胞側の変異とそれに伴なう増殖や分化の調節機構に関する研究は，これからの加速度的な進展が期待される段階であるといえる。殊に，ポリペプチドホルモン作用の遺伝解析は，それに応答する種々の細胞株が確立されてきたことと相挨って，今後の細胞生物学・細胞遺伝学における最も重要な課題の一つである。

我々はこれまでにEGFの細胞増殖作用に関して次のようなことを明らかにした。EGFレセプターを欠損するマウス細胞とヒト正常細胞との間で雑種細胞を形成し，それらの遺伝解析から，レセプター機能の発現にはヒトの第7染色体が関与していること，さらに，EGFレセプターの遺伝子は第7染色体のp13－p22領域にマップされることを明らかにした[6,7]（図－2）。ヒトのEGFレセプターに特異的なモノクロナール抗体を用いて，雑種細胞で発現されたレセプターがヒト由来の遺伝子産物であることも証明した[8]。雑種細胞におけるEGFのプロセッシングとDNA合成促進の関連も解析した。このような一連の成果によって，ポリペプチドホルモン様増殖因子とレセプター系の機能に関して遺伝解析が可能であることを初めて示した。遺伝解析をさらに遂行するためには適切な変異株の分離が必須である。我々はジフテリ

＊慶応義塾大学医学部

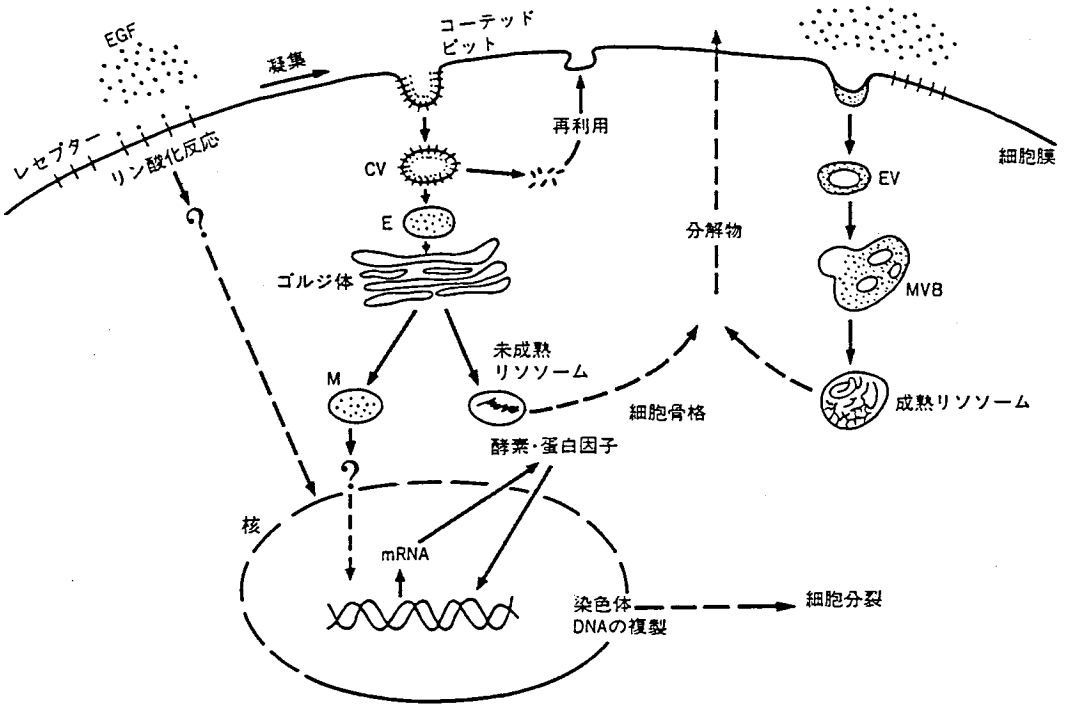


図 1　EGF 作用の模式図

CV : coated vesicle, EV : endocytic vesicle, E : endosome, MVB : multiple vesicular body, mRNA : メッセンジャー RNA, M : mitosome（マイトソーム）

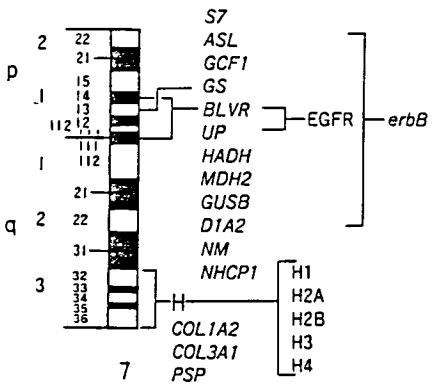


図 2　ヒトの第 7 染色体上にマップされた EGF レセプター（EGFR）などの遺伝子　S7 : 細胞表面抗原, *ASL* : 間充組織不全, *GCF1* : 増殖速度調節因子 1, *GS* : Greig 症候群, *BLVR* : ビリルビン還元酵素, *UP* : ウリジンホスホリラーゼ, *HADH* : ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素, *MDH2* : リンゴ酸脱水素酵素ミトコンドリア型, *GUSB* : β-グルクロニダーゼ, *DIA2* : ジアホラーゼ 2, *NM* : 血友病転移, *NHCP1* : 非ヒストン性クロマチン蛋白質 1, *H* : ヒストン, *COL1A2* : コラーゲン I α 2 鎖, *COL3A1* : コラーゲン III α 1 鎖, *PSP* : ホスホセリンホスファターゼ, *erbB* : トリ赤芽症ウイルス由来の腫瘍遺伝子に相補なオンコジーン

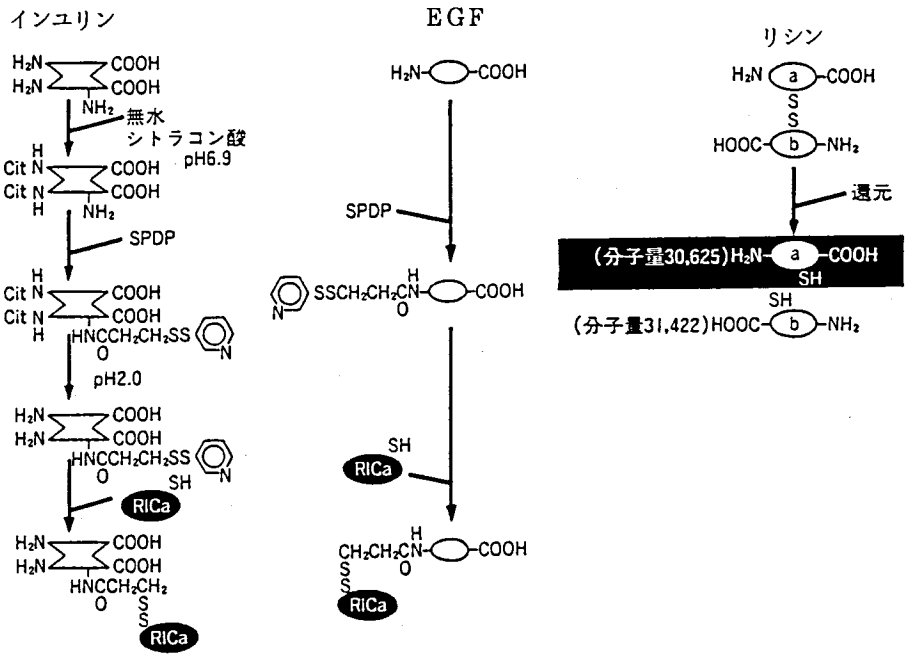


図3　インスリンやEGFのアミノ基にリシンのAサブユニット（RICa）を接合する方法
EGFレセプターに対するモノクローナル抗体にもRICaを接合できる

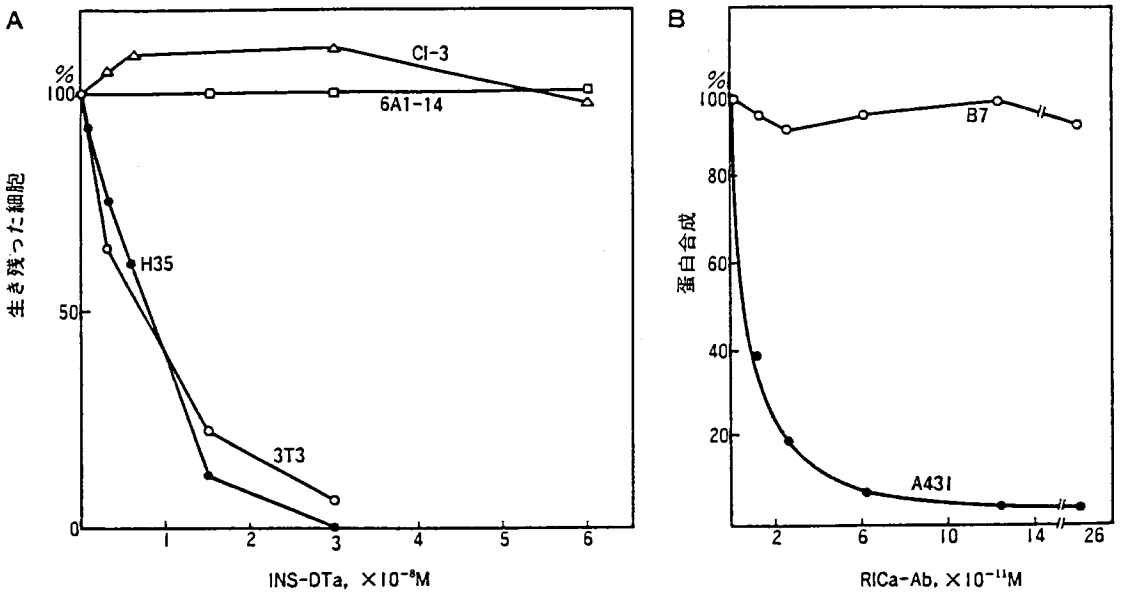


図4　インスリン-DTa接合体やリシンA-モノクローナル抗体接合体に抵抗性の変異株
CI-3はマウス線維芽細胞Swiss/3T3株から得た．6A1-14はラットヘパトーマH35株から分離した．B7はヒトA431株から得た．

ア毒素のAフラグメントやリシンのAサブユニットに，EGFやインスリンを連結させた毒性ホルモンを合成し[9,10]（図－3），それらを用いてレセプター欠損株，エンドサイトーシス欠陥株，シグナル応答不能株など数種の変異株をすでに分離している[11~13]（図－4）。今後，これらの変異の性状を生化学的・分子生物学的に解析することによって，詳しいメカニズムと遺伝制御の解明を進めていく。

文　献

1) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: *J. Cell Physiol.*, **112**: 327-338 (1982).
2) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: *J. Cell Biochem.*, **20**: 41-50 (1982).
3) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: *J. Cell Physiol.*, **118**: 305-316 (1984).
4) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: *in Peptides; Structure and Function,* (ed) Hruby, V.J. pp. 681-684, Pierce Chem. Co. (1983).
5) Shimizu, N.: *in Receptors and Recognition,* (ed) Goodfellow, P. N., B-16, pp. 109-142, Chapman and Hall (1984).
6) Shimizu, N., Behzadian, M.A. and Shimizu, Y.: Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3600-3604 (1980).
7) Kondo, I. and Shimizu, N.: Cytogenet. Cell Genet., **35**: 9-14 (1983).
8) Behzadian, M.A., Shimizu, Y., Kondo, I. and Shimizu, N.: *Somat. Cell Genet.*, **8**: 347-362 (1982).
9) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: Biochem. *Biophys. Res. Commun.*, **91**: 143-151 (1979).
10) Shimizu, N., Miskimins, W.K. and Shimizu, Y.: *FEBS Lett.*, **118**: 274-278 (1980).
11) Miskimins, W.K. and Shimizu, N.: Proc. Natl. *Acad. Sci. USA*, **78**: 445-449 (1981).
12) Shimizu, N., Miskimins, W.K., Gamou, S. and Shimizu, Y.: *Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, Growth of Cells in Hormonally Defined Media*, **9**: 397-402 (1982).
13) Shimizu, N., Shimizu, Y. and Miskimins, W.K.: *Cell Str. Funct.*, **9**: 203-212 (1984).

Ⅳ　遺伝子発現とその研究方法

14.　モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー鶏筋膜と正常鶏筋膜の抗原性の差異の解析　77

15.　疾患モデル動物の研究における胚操作法の応用　81

16.　筋ジストロフィー症遺伝子発現の標識　84

17.　筋ジストロフィー症における筋分化のおくれと遺伝子調節機構　87

18.　幼若ジストロフィー（mdx）マウスの膜分画に検出された異常蛋白質　91

14　モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー鶏筋膜と正常鶏筋膜の抗原性の差異の解析

黒　田　洋一郎

はじめに

KöhlerとMilstein（1984年ノーベル医学生理学賞受賞）によって開発されたモノクローナル抗体[1]は，ガンの治療への応用をはじめ，医学・生物学の分野で盛んに利用されている。モノクローナル抗体の利点として，特異性の単一な抗体がとれることの他に，良いスクリーニング法があれば，抗原を精製せずに，すなわち目的の抗原が未知であっても，その抗原に対する特異抗体が得られる可能性があることが指摘できる[2),3)]。ここで述べる研究は，モノクローナル抗体のこの利点を利用して，ジストロフィー遺伝子と対立正常遺伝子の遺伝子産物の差をモノクローナル抗体を用いて検出し，その遺伝子産物の本体を明らかにする目的で開始された。まず予備実験として，Duchenne 型筋ジストロフィー症モデル動物としての研究が良く行なわれており，充分な数の個体が入手できた筋ジス鶏（Line 413），正常鶏（Line 412）を用いた。

Strategy

Duchenne 型筋ジストロフィー症は遺伝性疾患であるので，筋ジストロフィー症（筋ジス）遺伝子と対照正常遺伝子産物の差が発症の有無を決定していると考えられる。そこでさまざまな遺伝子産物に対するモノクローナル抗体の中から，筋ジストロフィー症に相関した抗原性の差を示すものを選択すれば，筋ジスに相関した遺伝子産物が抗原性をもつ限り，その中に筋ジス特異モノクローナル抗体が含まれるはずである。

図1のように，モデル動物でも，筋ジストロフィー鶏（Line 413）は単一の不完全優性筋ジス遺伝子をもち，対照正常鶏（Line 412）は対立正常遺伝子を持っている。これらの遺伝子は発生分化の過程で発現し，筋ジス遺伝子由来の遺伝子産物は欠損の場合を含め，おそらく他の遺伝子産物と2次的，3次的な影響を引き起こしながら筋ジス発症させ，一方，対立正常遺伝子は，正常な筋肉を作っていく，と思われる。

筋ジストロフィー症の発症の部位と分子機序は不明であるが，筋細胞膜の何らかの異常によるとの推定が多い。宇尾野らがすでに報告したように[5)]，筋ジス鶏培養細胞からのCPKの遊離が，細胞の破壊による非特異的なものでないと考えられたことも筋ジス細胞膜の異常を示唆している。

筋ジス遺伝子由来と考えられる筋膜異常を探るstrategyとして，筋ジス鶏と対照正常鶏のそれぞれの筋膜の間で抗原性の差を示すモノクローナル抗体をスクリーニングすることが考えられる。しかしながら，Line 413，412の鶏の間では，筋ジス関連遺伝子以外の遺伝子もいくつか異なっていることが知られている[6)]ため，予備実験をかねてまず筋ジス鶏（Line 413），対照正常鶏（Line 412）の筋膜画分の間に，どのくらい抗原性の差があるかをモノクローナル抗体を使って調べてみた。

方　　法

1. 免疫法とハイブリドーマの選択

筋ジス鶏（Line 413），対照正常鶏（Line 412）の

＊東京都神経科学総合研究所神経生化学研究室

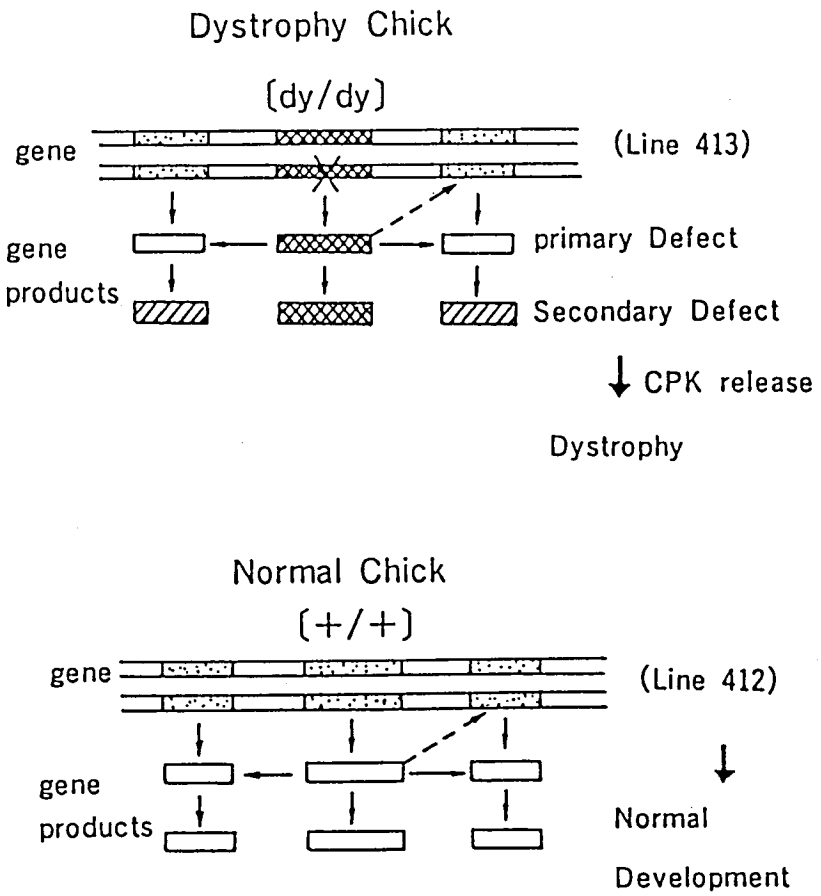


図 1. 筋ジストロフィー鶏筋ジス遺伝子の遺伝子産物と発症機序の模式図

表 1. 筋ジス鶏，対照正常鶏の筋膜抗原に対するモノクローナル抗体
Dys-M ELISA：筋ジス鶏筋膜を用いたELISAによるOD値
Nor-M ELISA：正常鶏筋膜を用いたELISAによるOD値

Spleen cell immunized with	1st Test No. of positive well	2nd Test No. of positive well
Dystrophy membrane	Dys-M ELISA (+++, ++) 42/192	$\frac{\text{Dys-M ELISA}}{\text{Nor-M ELISA}} > 3$ 2/42
Normal membrane	Nor-M ELISA (+++, ++) 51/192	$\frac{\text{Nor-M ELISA}}{\text{Dys-M ELISA}} > 3$ 1/51

孵化直後の胸筋からBarchiらの方法[7]に従って筋膜画分を調製した。この筋膜画分をそれぞれ蛋白量で200μgずつ，BALB/cマウスに2週間隔で3回免疫した。最終免疫の4日後にマウスから脾臓細胞をとり，ポリエチレングリコールの存在下でミエローマ細胞（NS－1）と隔合させ，ハイブリドーマをHAT法で選択した。

2. ELISA（Enjyme-Linked Immunosorbent Assay）

96穴プレートのwellの底に5μg蛋白の筋ジス鶏，および対照正常鶏の筋膜画分を結合させたELISAプレートを用い，各ハイブリドーマの培養上清液をアッセイした。第1段では，筋ジス筋膜画分で免疫したマウス由来のハイブリドーマは筋ジス筋膜画分ELISAプレートを用いる，というようにホモの系で，免疫した抗原に対する抗体を産生しているハイブリドーマを選択した。第2段では，第1段でそれぞれの筋膜画分に対する抗体産生が確認されたハイブリドーマの培養上清液を筋ジス筋膜画分，対照正常筋画分のそれぞれのELISAプレートを用いてアッセイし，両者の反応性の差を，一定条件下のフェニレンジアミン発色のOD値の差で測定した。

3. クローニングと抗体の大量調製

筋ジスと対照正常筋画分で抗原性の差を示すハイブリドーマのクローニングを試みた。限界希釈法を用い，クローニングは2回以上行なった。クローン化されたハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して数週間増殖させ，蓄積したモノクロナール抗体を大量に含む腹水を得た。

結　　果

1. ハイブリドーマのスクリーニング

免疫マウスから採血し，血清中の抗体価が一番高いマウスの脾臓細胞を用いたハイブリドーマのスクリーニングの結果を表1に示す。第1段のテストで，それぞれ陽性度の高いハイブリドーマは，筋ジス筋膜画分に対する抗体を産生するもの192well中42well，対照正常筋膜画分に対する抗体を産生するもの192well中51wellとかなり高率に見つかり，免疫が良好なことを示していた。

これらの陽性ハイブリドーマの上清を，第2段テストとして，筋ジス，対照正常の筋膜画分を結合させたELISAプレートでアッセイし，両者のOD値の比が3以上のものを抗原性の差が有意であるものとした。筋ジス筋膜画分に対して抗原性が高いwellは42well中2well，対照正常筋膜画分に対して抗原性の高いwellは51well中1well存在した。

2. モノクローナル抗体の作製

OD値の比が2以上のものを含めてホモELISA系のみを使って試みにクローニングを行なったところ，最終的に7個のクローンがとれた。これらを腹水中で増殖させ，抗体を大量に得た。これらを希釈し2種のELISAプレートを使って抗原性の差を見た。ELISA陽性となる最大希釈度をELISA titreとすると，筋ジス筋膜画分と対照正常筋膜画分ELISA titre値の差は最も大きなもので4倍であった。

考　　察

実験結果はLine 413とLine 412の筋膜の抗原性が筋ジス遺伝子産物の有無以外にも大きく異っていることを示している。すなわち，Line 413とLine 412の筋膜画分の間で抗原性の差を示すモノクロナール抗体産生ハイブリドーマの出現率は，どちらの筋膜で免疫した場合も約2～5％とかなり高率であった。この原因としては，①筋ジス関連遺伝子の発現が孵化以前にかなり早く起こっており，2次3次的影響がすでに筋膜に及んでいる，②Line 413とLine 412の間の遺伝子背景はかなり異なっており，筋ジス関連遺伝子以外の遺伝子が，筋膜画分にも発現して差を生じている，ことなどが考えられる。今回の予備実験の結果では，そのどちらかは断言できないが，もともとLine 413，Line 412は近交系をbaseにしたものではなく，遺伝子背景についての考慮はなしに継代されてきたものなので，②の可能性はかなり高いと考えられる。

最近，Line 413，Line 412 のこの欠点を補うため，近交系鶏GSN－2にLine 413の筋ジス遺伝子をcross-inter cross法で導入したGSN－2/amが開発されつつある。これらの鶏を使って②の可能性を少なくすることにより，さらに筋ジス特異モノクローナル抗体の検索を検討しようとしたが，現在までのところ，この方法によるモノクローナル抗体のスクリーニングに充分な実験系が得られていない。良い実験動物系がこの種の疾患研究のキーポイントであり継続的な開発が切望される。

今回は孵化直後の筋膜画分を抗原として用いたが，抗原の種類，抗原をとり出す発生段階については原理的には制限がない。ただ，抗原が粗であればあるほど，発生段階が筋ジス遺伝子発現後遅くなればなるほど，筋ジス遺伝子産物に対するモノクローナル抗体がとれる確率は相対的に低くなることは自明である。また試験的に行なったクローン化の実験結果は当然のことながら，抗原性の差を目安にクローン化を行なう必要性を示している。

本研究は，国立静岡病院院長　宇尾野公義先生，都立神経病院神経内科　高元喜代美先生との共同研究として開始されたものであり，ことに御指導，御援助下さった宇尾野先生に感謝いたします。

文　　献

1) Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells screening antibodies of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497, 1975.
2) 小林和夫，黒田洋一郎：細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体(1)-ＥＬＩＳＡを用いた一次スクリーニング，神経化学，21：378-380，1982.
3) 黒田洋一郎：神経系機能分子のモノクローナル抗体一新しい strategy とその可能性。「生理情報発現の分子機構」公開シンポジウム要録，文部省総合研究「生理情報変換システムの研究の展開」，1-18, 1983.
4) Wilson, B.W., Randall, W.R., Patterson, G.T. & Entrikin, R.K.: Major physiologic and histochemical characterics of inherited dystrophy of the chicken. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **317**: 224-246, 1979.
5) 宇尾野公義，黒田洋一郎，高元喜代美：ジストロフィー鶏・培養筋細胞からのＣＰＫの遊離。厚生省「筋ジストロフィー症の発症機序に関する臨床的研究」。三好班，昭和57年度研究報告書：75-77, 1983.
6) 水谷誠：筋ジストロフィー鶏 413 とコントロール鶏 412 の遺伝的背景の差異とcongenic strain の必要性。厚生省「筋ジストロフィー症動物の生産・開発に関する研究」。野村班，昭和55年度研究報告書：1981.
7) Barchi, R.L., Bonilla, E. & Wong M.: Isolation and characterization of muscle membranes using surface-specific labels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 34-38, 1977.

15　疾患モデル動物の研究における胚操作法の応用

勝　木　元　也

研　究　目　的

ヒト筋ジストロフィー症の治療法を研究するには，疾患の機構がヒトと共通性をもつモデル動物を作ることが動物実験にとって必要なことである。従来，ニワトリ，ハムスター，マウスなど，症状がきわめてヒト疾患と類似している実験動物を用いた筋ジストロフィー症の研究がなされて来たが，必ずしも症状の類似性によるモデル動物の選択が有用であったとはいえない。自然界又は飼育コロニー中に出現する筋ジストロフィー症様のモデル動物を，これからも探索することは必要且つ有意義であるが，一方近年の胚操作技術を用いてヒト疾患と機構論的に要因を同じくするモデル動物を作る方法が検討されてもよいと考えられる。

組換えDNA技術，細胞工学技術，胚操作技術は，それぞれ独自の方法論と原理にもとづく進歩ばかりでなく，相互の技術を総合的に使いこなせるまでに発達した。これらの技術を，疾患モデル動物の開発に適用する目的で，本年度は技術開発と，ヒト筋ジストロフィー症のモデル動物作成の可能性についての検討を行なった。

研　究　方　法

①ヒト筋ジストロフィー症の実験動物の開発と供給に関する班では，マウスの筋ジストロフィー症として知られるdyおよびmdx系統が，健常な近交系マウスとキメラを作ることによって，筋ジストロフィー症の症状を示す原因となる組織（例えば神経，筋，消化管など）が何であるかを診断できることを示して来た。筋原性として知られるヒト疾患のモデルとしては，やはり筋原性のモデル動物が必要であると考えられ，まず診断をする必要があるからである。キメラ法は，実験動物班の作成したものを解析することによって本研究に重要な役割を果すものと考えられる。

②胚操作法によるモデル動物開発法として有望なものの一つは，外来遺伝子DNAをもつマウス（transgenic mouse）を作ることである。とくにヒト筋ジストロフィー症と遺伝的背景が原理的に同一のマウスを作ることができれば理想的であるといえる。そこで，transgenic mouse 作成のための技術の確立を，すでに我々がクロン化したミエリン塩基性タンパク質遺伝子DNAを用いて検討した。

研　究　成　果

①新しく見出されたマウスの筋ジストロフィー症様系統であるmdxは，X染色体に生じた突然変異である。ヒト筋ジストロフィー症のモデルとなり得るかどうかの一つの指標は筋原性であるか否かであろう。そこで，mdxとBALB/cとの間でキメラマウスを作り，筋原性であるか神経に由来するものであるかの決定を試みた。C57BL/10 mdx ↔ BALB/cは，それぞれの系統のGPI のパターンがb typeおよびa type，被毛の色が黒および白であることから，生まれた個体キメラ性は，酵素および被毛の色によって確認できる。今回の実験では，14個の集合胚を移殖し，5匹のキメラマウス（♂2匹，♀3匹）を得た。被毛の色から判断する限り，mdx由来の細胞の方がキメラ個体に占める割合が多く，

＊東海大学医学部
＊（兼）（財）実験動物中央研究所

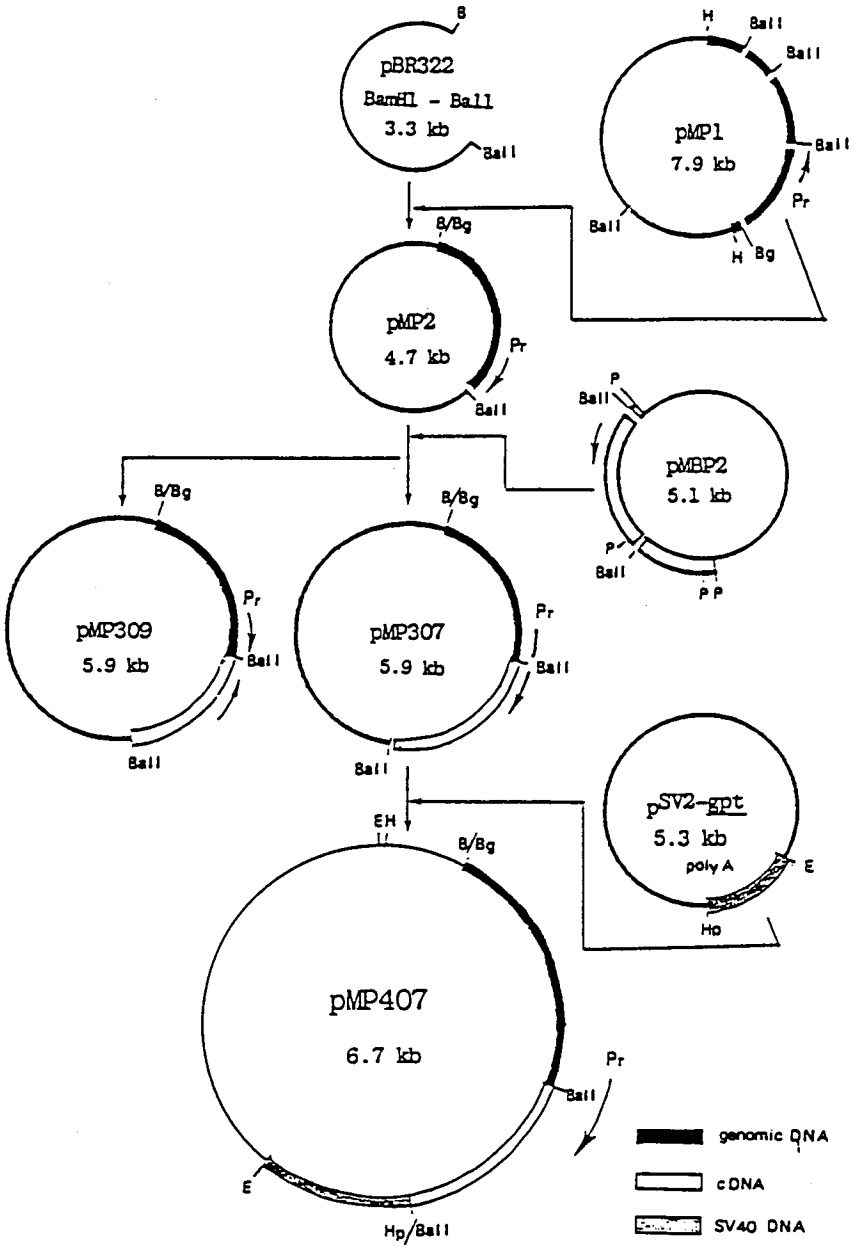


図1.　BP遺伝子導入用プラスミド

キメラのパターンに偏よりが見られた。今後は，個体数を増やし，組織化学的に，症状の原因となる組織を調べる予定である。

②外来遺伝子DNAのマウス受精卵への注入法の検討を，マウスミエリン塩基性タンパク質遺伝子DNAを用いて行なった。PBR 322 をベクターとし，当該遺伝子のプロモーター部分に，cDNAを連結し，受精卵へ注入した。（図1）

注入法は常法による[1]。その結果，操作卵の約20%，64匹が仔動物として得られ，合計5匹にDNA が組み込まれていることがわかった（表1）。

ミエリン塩基性タンパク質遺伝子に大きな欠失

表1.　BP遺伝子導入マウスの作成

strain	injection	transferred	born	transgenic
BALB/c - +/+	223	138 (61.9%)	14 (10.1)	2 - 3 (14.2 - 21.4)
BALB/c - +/shi	37	16 (43.2)	2 (12.5)	1 - 2 (50 - 100)
BALB/c - shi/shi	259	159 (61.4)	13 (8.2)	0 (0)

があることが証明されたシバラー[2]では，行動異常が認められるが，この突然変異系統にも同様にDNAを注入し，行動異常の回復が起るか否かを検討した。その結果shi/shiのようにホモ型の遺伝子をもつ仔動物への外来遺伝子の導入には未だ成功していないが，shi/+のようにヘテロ型のものは少なくとも1匹生まれた（表1）。現在，それらの仔動物からF1を作り(約20匹誕生)，shi/shiに外来のミエリン塩基性タンパク質遺伝子が組み込まれた場合の行動について検討中である。

討論と今後の課題

胚操作による疾患モデル動物の開発法は，筋ジストロフィー症研究の場合にも重要な方法の一つであると考えられる。その方法および技術は，ほぼ確立したといえる。そこで実際に筋ジストロフィー症動物を胚操作によって作るには，ヒトの変異した部分を含むDNAを分離する必要がある。他の班員によってなされることを期待し，単離できれば，すぐにマウス胚への導入は可能である。

今後は，ヒト型のモデル動物を作ることを第Iの目標として研究を進めたい。また，キメラ法は診断法として有力であることを付け加える。

最後に，ヒト型でないと解かった動物は，疾患動物ではあっても，疾患モデル動物ではない。したがって，筋ジストロフィーに苦しむ人々の事を考えればヒト型の実験動物を見極めることが重要であると考える。

文　献

1) マウス初期胚の培養と顕微操作
勝木元也　生体の科学 35, 90-95 (1984).
2) Molecular Genetic Analysis of Myelin Deficient Mice: *shiver* mutant mice show deletion in gene(s) coding for myelin basic protein. Kimura, M. et al.: *J. Neurochem.* in press.

16 筋ジストロフィ症遺伝子発現の標識 我々の研究の現況と今後の方向

香川　務*
研究協力者　槇永剛一*　北野博司**
巽　典之***

I 筋ジストロフィ遺伝子発現とその病像

筋ジストロフィ（筋ジスと略す）症は骨格筋の進行性の破壊と再生を主徴とする遺伝性疾患である。本症では骨格筋の他，神経細胞，線維芽細胞，赤血球等の諸細胞にも，形態学的，あるいは，生理学的な異常の存する事が報告されている。本症の骨格筋の病像は，(1)筋ジス遺伝子の発現から，筋線維の変性に至る過程，(2)それにつづく筋線維の再生とその再生筋線維の変性の過程，の二つに分ける事が出来る。筋ジス筋の再生については，近年多くの報告がある。我々は，ラジオオートグラフィの方法を用いて，In vivo における正常及び筋ジス筋の再生の研究を行い報告した。[1] その結果は下記の通りである。(1)再生筋線維は再生の早い時期から，その平均の直径が異常に大きく，直径の大小不同がみられた。(2)殆んど全ての再生筋線維の直径は，次第に細小化し，再生開始3ケ月以内に変性，消滅した。(3)再生3ケ月後においても，極めて少数であるが，殆んど変性を示さない再生筋線維が認められた。以上の結果から，元の筋線維の変性と再生筋線維の変性の過程が非常に類似しており，この事は，両者の変性の機作が同一である事を示唆している。筋ジス筋の再生過程については，以上の如く，次第に明らかにされつつあるが，一方，筋ジス遺伝子の発現から筋線維の変性に至る過程については，未だ全く解明されていない。この過程が明らかにされれば，遺伝子の異常を直す事が出来ないとしても，本疾患の発症を予防する事が可能になるかもしれない。

筋ジス骨格筋内では，以上述べた様に，筋線維の変性と再生が，同時に平行して進行しており，その病的過程は極めて複雑である。従って，筋ジス動物骨格筋は，そのままでは，遺伝子発現から筋変性に至る過程の解析のための研究材料として，必らずしも適当であるとは言えない。

II 筋ジストロフィ症研究におけるin vivoでの筋線維分化の実験系の意味

我々は正常，筋ジス発症マウス骨格筋に高張食塩水を注射して，筋の再生を人工的に誘起し，その過程で出現する各筋由来筋芽細胞を分離し，多細胞培養，及び，クロン培養下で筋線維に分化する実験系を開発した。[2, 3, 4] 両培養条件下で，正常（C57BL/6 $^{+}/_{+}$），筋ジス（C57BL/6J dy/dy）動物由来の筋芽細胞は，いずれも，横紋を有し，自発収縮を示す筋線維に分化した。しかし，いづれの筋線維も多細胞培養下で，1ケ月以内，クロン培養下で，20日以内に細小化し変性した。正常，筋ジス間で，明らかな差を認めなかった。この培養条件下における筋線維の変性の過程は，筋ジス動物内における変性とは形態学的に明らかに異っていた。この筋線維は，いづれも，サテライト細胞に由来しており，従ってこの筋線維分化の過程は，in vivo における筋の再生過程に

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

相当すると考えられる。前記した如く，in vivo における元の筋線維の変性と再生筋線維の変性の機作が同じものであれば，この実験系も，筋ジス遺伝子発現のモデルとして，使用出来ると考えている。この系では二次的な筋線維の再生も見られず，特にクロン培養では，線維芽細胞の介在がなく，同一コロニー内での筋線維の分化は，比較的同期的に進行する等，in vivo における筋ジス筋組織に比し，はるかに単純な実験系である。我々は，今後も，この実験系を用いて，以下の細胞生物学的，生化学的，免疫学的な研究を進めたいと考えている。

Ⅲ　今後の研究の方向

a）細胞生物学的研究

上記の様に，我々の実験系での筋線維の分化の過程や，分化した筋線維の形態は，正常と筋ジスとの間で差を認めなかった。しかし，両者は相互に異った遺伝子を有している事は明らかな事実である。この培養条件下では，(1)筋ジス遺伝子が未だ発現していない。(2)すでに発現し，筋ジス筋線維に蛋白の異常があってもこの培養条件下では，筋線維の変性が起こらない，の二つの可能性が考えられる，今後筋ジス筋線維のみが，変性を起こす培養条件を検討する事を考えている。筋ジス遺伝子発現の形態的標識としては，筋線維経の増大や，大小不同をとるべきであると考えている。

b）生化学的研究

我々は，微量の筋線維のＣＫアイソザイム解析の方法を開発した。[5]その結果，クロン培養下で分化した筋線維のＣＫアイソザイムをコロニー単位で解析する事が可能となり，筋線維の分化の程度と，ＣＫアイソザイムのパターンとの相関を，より明確に，とらえる事が可能になった。正常，筋ジスマウス血清のＣＫアイソザイムは，いづれも，MM，MB，ＢＢの三つの成分からなる。しかし，後者ではＢＢの比率が明らかに高い。正常，筋ジスマウス間のＣＫアイソザイムパターンの違いが，筋ジス遺伝子発現の直接の表現か否かを判定する為に，次の実験を行った。[6] 両マウス再生筋由来の筋芽細胞のクロン培養を行ない，各分化段階の筋線維のＣＫアイソザイムパターンを両者の間で比較した。その結果，両者の間で遺伝子の相異があるにも拘らず，各分化段階にある筋線維のＣＫアイソザイムパターンは，正常，筋ジス間で完全に一致した。この事は，ＣＫアイソザイムに関する遺伝子は筋ジス遺伝子座にある遺伝子とは関係ない事を示している。正常，筋ジスマウスの血清や筋組織のＣＫアイソザイムパターンの相異は，筋ジス遺伝子発現の直接の表現ではなく，恐らく，筋ジス動物内での筋線維変性に伴って，二次的に再生された未分化筋線維の存在によるものと推定される。Duchenne 型筋ジス患者の血清や筋組織のＣＫは，正常人のそれに比し，ＭＢ成分の多い事が報告されている。我々の結果から，これら，筋ジス患者のＣＫアイソザイムの異常も，Duchenne 型筋ジス遺伝子発現の直接の表現ではなく，再生した未分化筋線維の存在によるものと考えられる。In vitro で分化した，変性も再生も伴わない状態での正常，筋ジス筋線維の各細胞成分の生化学的な比較は，筋ジス遺伝子発現の研究の一つの重要な方向であると考える。しかし，筋細胞で dy- 遺伝子が発現しない場合，この研究は無意味である。

c）免疫学的研究

筋ジストロフィ症の様に，遺伝子の働きも又その発現の標識も知られていない場合，この遺伝子あるいは，その発現の標識を特定する方法として，(1)遺伝子工学により，正常動物と筋ジス動物の遺伝子を直接比較する，(2)免疫学的方法によって，この遺伝子の突然変異に対応した蛋白の変化を検出する，の二つの方法が考えられる。

dy-locus の遺伝子だけが異り，そのバックグラウンドの遺伝子がすべて同じである一組の動物があれば，その間で，相互に免疫する事は，dy-locus 上の遺伝子の突然変異に対応した蛋白を純粋に取り出して，免疫するのと，理論的には同じである。我々はこの考えをもとにして，免疫学的な実験を始めているが，その問題点につき，次

に述べる。

(i) 実験動物

C57BL/6J系，129ReJ系マウスとそれぞれの突然変異（dy/dy又は dy^{2J}/dy^{2J}）：バックグラウンドの遺伝子が，出来るだけ同じである為に，同胞中の正常（$^{+}/_{+}$）個体と筋ジス動物が必要である。上記突然変異は，いづれも，常染色体性劣性遺伝であるため，正常（$^{+}/_{+}$）個体を得ることは一般に困難である。最近C57BL/10系マウスで伴性劣性遺伝を示す筋ジスの突然変異(mdx)が発見された。この系♂とキアリアとのF_1の正常♂と発症♂の組み合わせは，この研究のため，現在考えられる最も理想的な組み合わせであろう。

(ii) 近交系動物間での免疫成立の可能性

極めて少数の遺伝子だけが互いに異なる近交系動物間で免疫が成立するかの疑問がある。皮膚移植に関してEichwaldらは，ある純系マウス間で，♂の皮膚を♀に移植した場合，移植片は拒絶されたと報告している。これは，皮膚移植という特別な例であるが，この事実は，純系動物間においても，遺伝子が異なれば免疫が成立する可能性を示している。

(iii) 抗原の条件

筋ジス遺伝子の発現は筋組織で起るとの証拠は現在なく，筋以外の組織を抗原として用いる事も必要である。なお，筋ジス筋を抗原として用いる場合，筋線維の変性の結果，変性した蛋白が筋ジス遺伝子の発現と関係のない抗原になる可能性があり，注意を要する。この場合，in vitroで分化した，変性筋線維を含まない筋ジス筋線維を抗原として，使用すべきである。正常動物組織を抗原とする場合，この種の問題はない。

我々は，以上の考えに基づき，近交系の正常，筋ジスマウス間で相互に免疫し，筋ジス遺伝子発現の結果，産生される異常な蛋白，あるいは，その結果，産生されなくなる正常蛋白に対するモノクロナール抗体を作る事を当面の目標にして，研究を進めている。

文　　献

1) 橋本孝二，北野博司，山崎君江，巽典之，香川務（1984）　第17回日本発生生物学会
2) Kagawa, T., Chikata, E., and Tani, J. (1977). *(Develop. Biol.* **55**, 402.
3) Kagawa, T., Chikata, E., Tani, J., and Tsutamune, T. (1978). *Develop. Biol.* **65**, 526.
4) 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.
5) 香川務，北野博司，槇永剛一（1983）　第16回日本発生生物学会
6) 槇永剛一，北野博司，香川務（1984）　第17回日本発生生物学会

17 筋ジストロフィー症における筋分化のおくれと遺伝子調節機構

真崎知生*
研究協力者 吉川 昭**

筋ジストロフィー症は遺伝性の疾患であり，その筋は若い時期には正常であるにもかかわらず成長に伴ない進行性の筋萎縮をおこす。最終的に，筋細胞は萎縮，崩壊をおこし消失して行くが形態学的に異常が認められる以前の状態では筋細胞そのものの異常は認めにくいのが特徴である。したがって形態学的異常の見出されない発症前における研究もある一時期の状態を比較するかぎり発生に伴なう変化あるいは疾患による二次変化を混同する可能性があり，これまでの研究報告の中にも研究者間の不一致が生ずる原因となったと考えられる。すなわち筋細胞の構成要素は質的にも量的にもその発生分化の過程で，あるいは，疾患，外部環境の変化等でかなりの程度変化しうることがわかっているので，このことを考慮した病因解明のための研究がなされなければならない。しかし，このような研究は疾患筋の各発育段階の筋の試料をある程度の量必要とすることから今までは研究がなかなか発展しなかった。ところが過去十年間におけるヒトの筋ジストロフィー症類似の症状を示す筋ジストロフィー鶏（筋ジス鶏），筋ジストロフィーマウス（筋ジスマウス），同ハムスターなどのモデル動物の開発によってこの問題はほぼ除かれて，この観点にたった研究が数多く報告されるようになった。これらの研究成果の中で特に注目すべきことは，筋の発生分化に伴ない正常筋においても認められる筋蛋白分子種の胚あるいは胎児型から新生児型へ，さらには親型への変換が，ジストロフィー筋では遅延するという現象である。この現象はＬＤＨアイソザイム，ミオシン，トロポミオシン，Ｃ－蛋白などの蛋白に於いて観察される。[1,2] 同様に筋細胞がジストロフィー筋に於いて幼若型にとどまる，あるいは筋分化が遅延するという事実は以下に述べるように筋蛋白合成速度，ＤＮＡ量の問題，筋細胞核のポリＡＤＰリボース合成酵素活性に於いて認められる。本報告ではこれらの成果をまとめて報告し，さらに今後これをどのように発展させて筋ジストロフィー症の病因解明のための研究を展開させるかについて述べる。

筋ジストロフィー症の罹患筋に於いて蛋白分解酵素すなわちカルシュウム依存性，中性プロテアーゼ，セリンプロテアーゼなどの活性が高まっていることは知られている。[3,4,5]

しかし，発症以前のかなりはやい時期の筋ジス鶏胸筋では蛋白分解酵素活性はそれほど高くない（表１）。これに対してジストロフィー鶏胸筋における筋蛋白合成能は，胚の頃にすでに高い値を示していることが示された。[7] さらにこの蛋白合成能の増加の原因として，少くともアミノアシルｔＲＮＡ合成酵素活性の上昇，蛋白合成延長因子１および２（ＥＦ１，ＥＦ２）の細胞質中での活性が高いことがわかった。[7] またさらに細胞質中のＥＦ２の定量によりこの細胞質中のＥＦ２の活性の高まりは，その量的増加に帰せられることが示さ

*筑波大学基礎医学系
**埼玉赤十字血液センター研究部

表 1.　筋全体の蛋白分解活性
筋スライスを37°C 2時間反応させることによって反応液中に遊離された全チロシン量を測定した。[6] nmole tyrosine/mg protein/ hr
平均値±標準誤差　筋ジス鶏胸筋（Dys）正常鶏胸筋（Nor）

	19-day-embryo	4-week-old
Nor (6)	4.83 ± 0.40	2.67 ± 0.19
Dys (6)	4.29 ± 0.17	2.83 ± 0.19

表 2.　正常および筋ジス鶏胸筋の筋湿重量とミオシン含量

		Body Weight (g)	Breast muscle wet weight (g)	Breast muscle/ Body weight (%)	myosin/breast muscle (mg)/(g)
19-day-embryo	Nor (3)	25.4 ± 2.5	0.33 ± 0.03	1.34 ± 0.22	34.3 ± 0.67
	Dys (4)	24.3 ± 1.1	0.39 ± 0.03	1.60 ± 0.12	33.0 ± 0.80
4-week-old	Nor (5)	214 ±14	14.5 ± 0.92	6.78 ± 0.06	26.2 ± 0.87
	Dys (5)	181 ± 8	17.4 ± 0.58	9.46 ± 0.57 *	26.2 ± 1.41
8-week-old	Nor (3)	792 ±32	67.7 ± 7.2	8.50 ± 0.68	20.3 ± 2.80
	Dys (4)	606 ±27	63.7 ± 2.6	10.57 ± 0.84	18.4 ± 0.71

* Statistically significant ($P < 0.05$)

れた。[8] このような結果から考えると発症以前の筋細胞では正常筋に比して，蛋白の蓄積が大きくなければならない。事実，筋ジス鶏においては19日胚，13日胚と若い程細胞質蛋白質量が多く，孵化後日を追って次第に下り発症後は，正常よりも細胞質蛋白質の密度は低くなってゆく。[7] しかし，構造蛋白であるミオシン量に関しては筋ジス鶏胸筋湿重量あたりの値は正常鶏のものと変わりがない（表２）。さらに表３に示されるように筋ジス鶏胸筋では筋の湿重量あたりのＤＮＡ量が多いことが示されている。しかし20日胚の胸筋では，筋ジス，正常鶏共にほぼ同じ値を示している。このような事実は，いずれも筋ジス鶏胸筋が正常筋にくらべて幼若型であることを示していると思われる。しかしこのことは同時にこの筋ジス鶏胸筋が萎縮発症後に認められる筋細胞の崩壊に伴なう筋細胞の再生現象と同一のものか否かという問題を提起する。しかし再生現象に先行する筋細胞崩壊像が形態学的にも，この段階ではきわめて少ないことなどからジストロフィー筋に於けるこのような筋の幼若化現象は，ジストロフィー筋特有なものと考えたい。この事実はさらにジストロフィー筋細胞核におけるポリＡＤＰリボース合成酵素活性と，その産物ポリＡＤＰリボースが正常に比して高いという事実からもわかる[11, 12]（図１）。この酵素の機能と筋分化に直接の関連があるか否かは明確ではないが，細胞核のこの活性が高いと筋細胞は未分化な状態にあり，筋分化に伴ってこの活性が低下することが知られている。[13] ジストロフィー筋では筋成長に伴なうこの酵素活性低下はか

表3. 正常および筋ジス鶏胸筋におけるRNAとDNAの濃度。
RNAはFlek[9]らの，DNAはBurton[10]の方法で測定した。平均値±標準誤差，用いた試料数は（ ）の中に示してある。

			RNA/w.w. (μg-P/g)	DNA/w.w. (mg/g)	RNA/DNA (μg-P/mg)
Breast muscle					
20-day-embryo	Nor	(5)	185 ± 9	3.34 ± 0.09	55.4
	Dys	(5)	215 ± 11	3.27 ± 0.06	65.7
2-week-old	Nor	(5)	198 ± 6	1.05 ± 0.18	189
	Dys	(5)	242 ± 13*	1.52 ± 0.14*	159
5-week-old	Nor	(4)	233 ± 11	1.01 ± 0.06	231
	Dys	(4)	279 ± 25	1.42 ± 0.04*	196
1-year-old	Nor	(4)	183 ± 16	0.99 ± 0.07	185
	Dys	(4)	124 ± 15*	0.43 ± 0.04*	288
Cardiac muscle					
2-week-old	Nor	(5)	161 ± 3	2.23 ± 0.14	72.2
	Dys	(5)	165 ± 8	2.03 ± 0.06	81.3

* Statistically significant ($P < 0.05$)

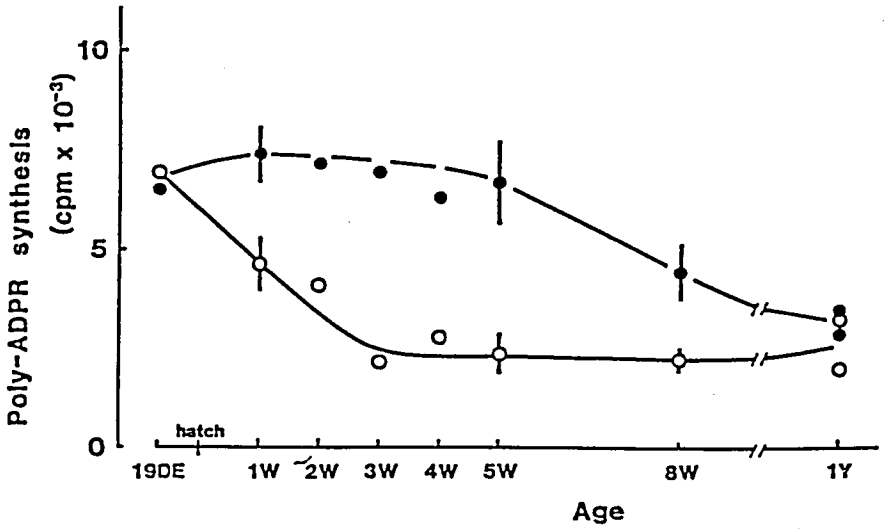


図1. 筋ジス鶏(•)と正常鶏(○)胸筋における細胞核のポリADPリボース合成酵素活性の筋分化，成長に伴なう変化。

なり遅延する。前述の正常の筋分化に伴なうアイソザイムの変化や蛋白合成速度の促進は正常細胞核におけるポリＡＤＰリボース合成酵素活性の低下がおこるかなり以前から認められる現象であるが，これに引続いておこるこの酵素活性低下の現象においてもジストロフィー筋は正常筋にかなり遅れている。しかも筋病変がはじまり筋萎縮がはじまると，筋再生が盛んになるにもかかわらずかえってこの酵素活性が低下することは再生核によるポリＡＤＰリボース合成酵素活性の上昇が発症前の筋核のそれに対してそれほど大きく寄与していないことを示していると考えられる。このように正常筋におけるアイソザイムの変化や蛋白合成能の変化は筋分化と密接に関連しており，筋ジス鶏胸筋においてはこれが遅延していることがかなり明確に示された。[14] そこでこのような筋構成蛋白質の合成と分解による量的バランスを欠く状態に長くとどまっているということが成長過程における環境変化への形態的，生化学的不適応を生じ，筋萎縮，筋崩壊をもたらすことがまず考えられる。しかし，最も基本的な問題は筋ジス鶏筋が何故このような幼若形にとどまるかという問題である。この幼若化のために筋細胞がそれ自身であるいはそれに伴なう外的要因によって萎縮して行くと考えられる。この真の原因はやはり遺伝子とその発現の機構に求められなければならない。蛋白代謝あるいはpoly ADPリボース合成，あるいは蛋白分子種の変遷における筋ジスと正常鶏の前述のような差はこれから先の遺伝子レベルにおける研究においてよい指標となり得ることが考えられる。そこでひとつの方法は今までよく研究されてきたミオシン分子種に注目し，その遺伝子の発現がどのようにして調節されているかという問題を研究することであるように思われる。筋分化の過程におけるミオシン分子種の変化の問題は蛋白レベルで大変よく研究されており，また最近は遺伝子レベルの研究も進んでいる。したがってまずこの問題を追究することによって方法論的な確立を行うことが良策であるように考えられる。しかしヒト筋ジストロフィー症の異常はＸ染色体上にあることが指摘されていることから，いずれはその最もよい指標を選択してそれによって研究を進展させねばならないと考えている。

文　　献

1) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. and Matsuda, R. (1980). *FEBS Lett.*, **120**, 195-198.
2) Takeda, S. and Nonomura, Y. (1980). *Biomed, Res.*, **1**, 176-179.
3) Iodice, A.A. (1966). *Enzymol Biol. Clin.*, **6**, 269-278.
4) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katsunuma, N. (1978). *J. Biochem.*, **83**, 27-33.
5) Suzuki, K., Ishiura, S., Tsuji, S., Katamoto, T., Sugita, H. and Imahovi, K. (1979). *FEBS Lett.*, **104**, 355-358.
6) Waalkes, T.P., Uden friend, S. and Bethesda, (1957). *J. Lab. & Clin. Med.*, **50**, 733-736.
7) Yoshikawa, A. and Masaki, T. (1981). *J. Biochem.*, **90**, 1775-1786.
8) Yoshikawa, A., Takano-Ohmuro, H. and Masaki, T. (1983). *Muscle and Nerve*, **7**, 733-740.
9) Fleck, A. and Munso, H.N. (1962). *Biochim. Biophys. Acta.*, **55**, 571-583.
10) Burton, K. (1968) in "Method in Enzymol" (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds) Vol. 12, pp. 163-166, Academic Press, N.Y.
11) Yoshikawa, A. and Masaki, T. (1983). *Proc. Japan Acad.*, **59**, 198-202.
12) Yoshikawa, A. and Masaki, T., (1984). *FEBS Lett.*, in press.
13) Caplan, A.I., Niedergang, C., Okazaki, H. and Mandel, P. (1979). *Dev. Biol.*, **72**, 102-109.
14) Masaki, T. and Yoshikawa, A. (1983). Muscular Dystrophy. *Biomedical Aspect*, 99-107.

18 幼若ジストロフィー(mdx)マウスの膜分画に検出された異常蛋白質

野々村 禎 昭*
研究協力者 小 浜 一 弘* 江 崎 孝三郎** 野 村 達 次**

新しく利用が可能となったmdxマウスは，筋ジストロフィー症のモデル動物として種々の利点を持つ[1]。そのひとつに生まれた子孫は，100%発症する事が保証されている事があげられる。我々は非常に幼若な時期において，まず最初に出現する徴候を発見する目的で若い週齢のmdxマウスの筋細胞膜及び小胞体の分画を試み，同じ週齢のコントロールマウスと比較した。

筋成長及び微細形態上異常の検出されない若い時期に，膜分画を構成するいくつかの異常糖蛋白質がすでにあることを報告する。

実 験 方 法

1. 膜分画・その他の調製（図1）

3.5週齢と6週齢のジストロフィーmdxマウス(♂)と，コントロールC57BLマウス(♂)の両後肢を股関節より切断し，筋をすべて遊離した。重量を測定後，3倍量のTKM液(20mM Tris−HCl 60mM KCl，5mM $MgCl_2$，pH 7.5，生化学的取扱い時に蛋白質分解酵素の阻害及び蛋白質の腐敗を予防する目的でDFPとAF 2を加えている）中でポリトロンを用いて筋を破壊した。このhomogenateを7,000×gで10分遠心した。得られた上清をさらに100,000×gで30分遠心し沈殿を得た。この沈殿をTKMにsuspendしたものをmembrane fractionと呼ぶ。この分画は主として筋小胞体膜で細胞膜も含んでいると考えられる。

7,000×gの沈殿は4倍量の0.2mM ATPを含むGuba−Straub液にsuspendし，1.5時間の間0℃に保ち，収縮性蛋白質を抽出した。15,000×g，15分遠心により未抽出物を除去した上清に10倍量の冷水を加えた。生成した沈殿を遠心により集め，2mM $NaHCO_3$を含む0.5M NaClに溶解した。これをMyosin Bと呼ぶ。

membrane fractionは特に酢酸ウランによる負染色後，電子顕微鏡により膜分画であることを確認した。（図2）

2. SDS存在下のポリアクリルアミド電気泳動（SDS PAGE）。

Laemmliの開発したSDS PAGE[2]をmini−slabを用いて行った。上段を8%，下段を16%とするアクリルアミドゲルを用い，同時に高分子量と低分子量の蛋白質を分離できる様にした。

染色はCoomassie brilliant blue，又は，Stains−allを用いた。

3. 電子顕微鏡観察のための標本作成。

後肢筋遊離時に縫工筋の一部（約1cm×0.5cm）を別にして，型通りグルタール・アルデヒド固定を行った。オスミウム酸処理後，酢酸ウランブロック染色，エタノール，アセトン脱水後，エポキシ樹脂に包埋し，ミクロトームを用い超薄切片を作成し鉛染色を行った。これをJEOL 100B型電子顕微鏡にて観察した。

* 東京大学医学部薬理学教室
** 実験動物中央研究所

表 1.　コントロール・マウス(C) ジストロフィー・マウス(D) の筋重量(weight)と全蛋白質量(total protein) の比較。

	3.5 週齢		8 週齢	
	C	D	C	D
weight (mg)	300	300	1360	1970
total protein (mg)	48	48	228	339

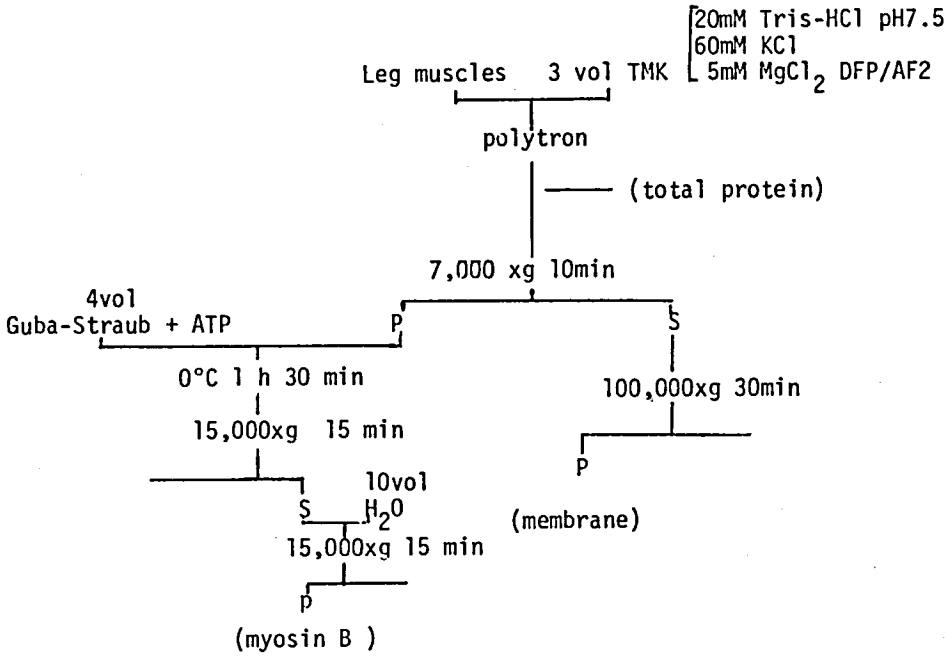


図 1.　ジストロフィー及びコントロール筋の各分画の調製法。

実　験　結　果

1.　ジストロフィーマウスにみられた筋肥大(表 1)。

ジストロフィー・マウスを同一の誕生日のコントロール・マウスと同一条件で飼育し筋の成長を比較した。

3.5 週齢のジストロフィー・マウスの筋重量(湿重量)は 300mg で，コントロール・マウスと同一であった。8 週齢になるとジストロフィー・マウスの筋重量は 1970mg となりコントロール・マウス(1360mg)の 1.4 倍となっていた。

筋蛋白質量を total protein (図 1) を測定することにより比較しても，3.5週齢ではジストロフィーはコントロールと同一であるが，8 週齢ではジストロフィーはコントロールの 1.5 倍であった。

この様なジストロフィーの筋肥大はすでに 6 週

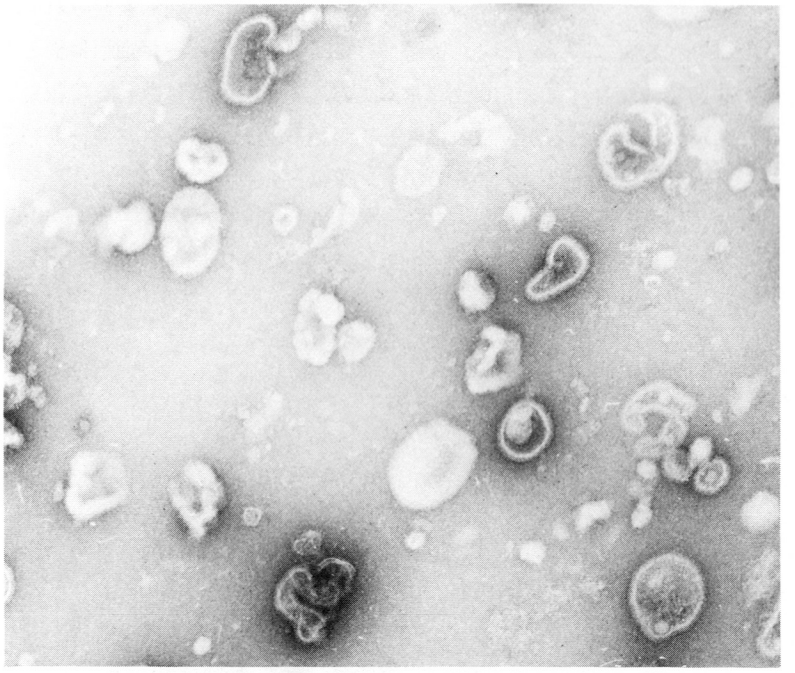


図 2.　membrane fractionの負染色後の電子顕微鏡像。全てマイクロゾームから成っている。

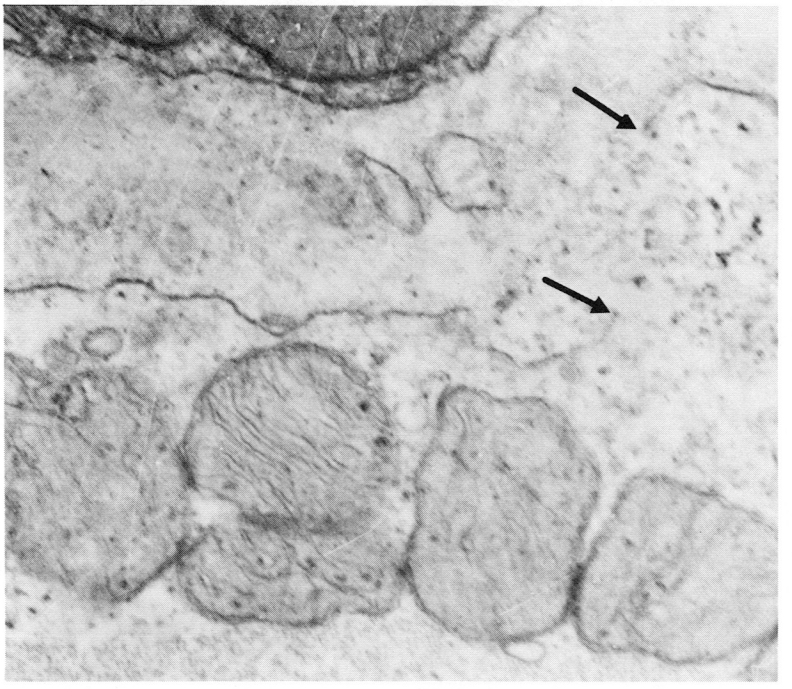


図 3.　6 週齢ジストロフィー筋にみられた典型的な病変像。矢印のところで膜破壊がおこっている。

齢でも検出することができた。

2.　電子顕微鏡にみられる病変

1.に述べた様に6週齢になったジストロフィー・マウスに僅かに筋肥大がみられるが，これに対応して6週齢のジストロフィー・マウスの筋の超薄切片を電子顕微鏡で観察すると膜の断裂と筋原線維の変性が一部に観察された（図3）。　他に中心核をもった細胞も観察された。しかしこれら病変又は異常をもった細胞は極く僅かであった。一方，3.5週齢では数多くの視野を観察したにもかかわらず，ジストロフィー筋特有の病変又は異常像はみられなかった。

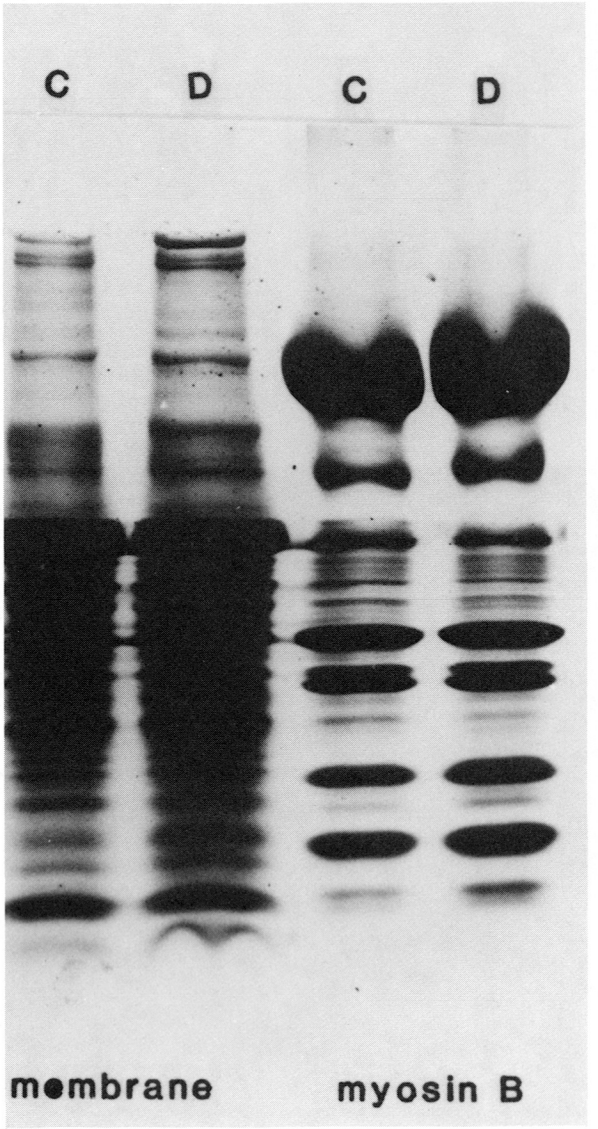


図4.　6週齢のジストロフィー(D)とコントロール(C)筋のmembrane fraction及びmyosin BのSDS PAGEのCBB全蛋白質染色。

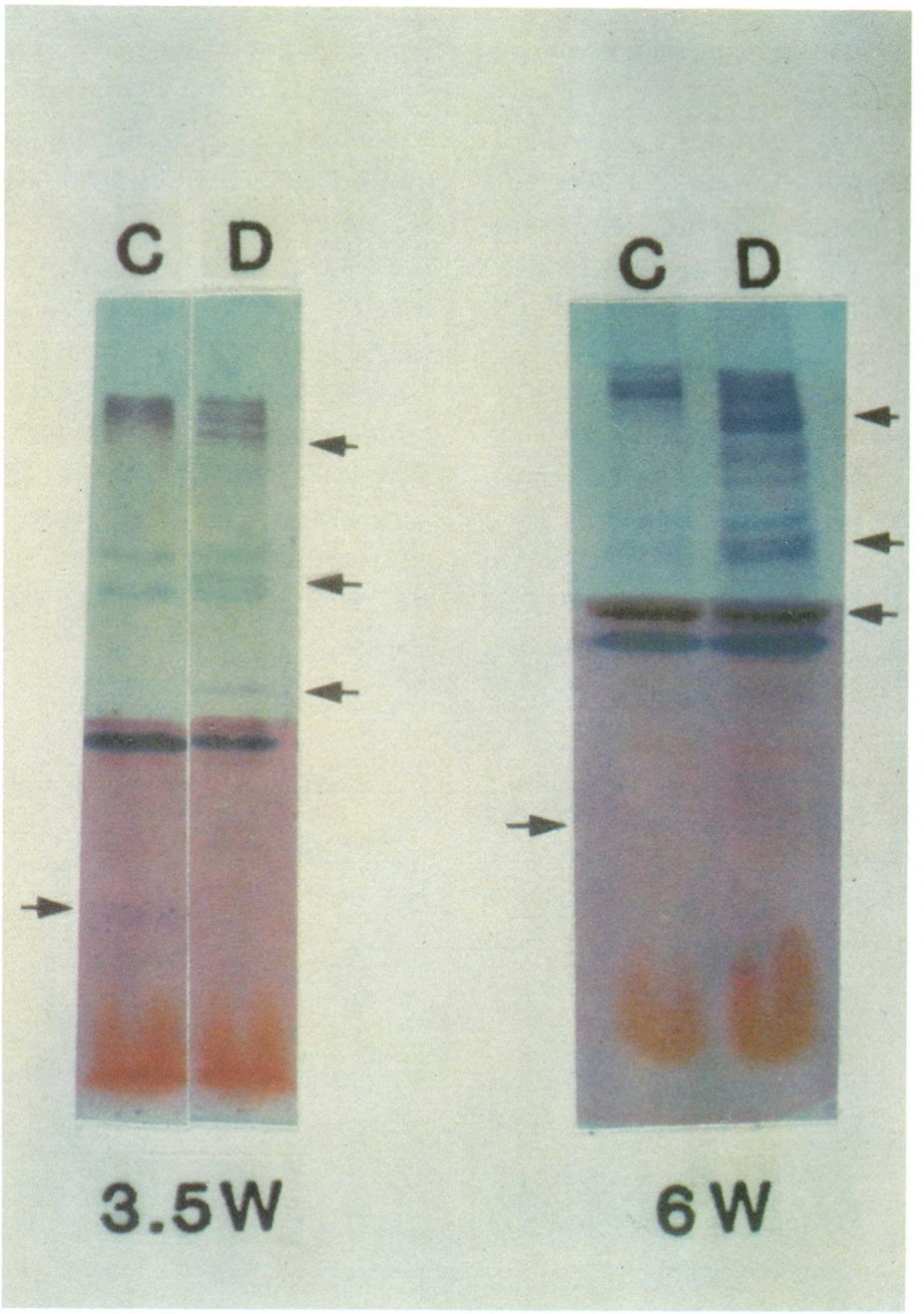


図 5.　3.5 週及び 6 週のジストロフィー(D) とコントロール(C) 筋の membrane fraction の SDS PAGE 後，Stains-all による特殊染色。矢印で示される bands がジストロフィーとコントロール間で異なっている。6 週目の上から 3 番目のブルーバンドは少し流しすぎた為15% ゲル内に入ってしまった為，みにくくなっている。

3. SDS PAGEによる異常蛋白質の検出。

A. CBB染色による全蛋白質染色（図4）。

6週齢筋より抽出した収縮性蛋白質（Myosin B）は，2.に示した様に電子顕微鏡観察により筋原線維上の病変がみつかるにもかかわらずコントロールとジストロフィーで差はなかった。

同時期のmembrane fractionではSDS PAGE上，高分子領域にコントロールとジストロフィーで異なっているbandsがある印象が得られたもののminor bandsであるための確実性を欠いていた（下記3B参照）。

B. stains－allによる特殊染色（図5）。

membrane fractionのSDS PAGEをstains－allにより染色すると高分子領域で青色に染色されるbandsのうち図4の矢印で示される少くとも3つのものが，ジストロフィー筋に特異的に含まれていた。

青色に染色されるbandsのうち低分子領域のもので矢印で示されるものはジストロフィーに欠損していた。

この変化は6週齢ばかりでなく1,2で検出されたジストロフィー病変又は異常の出ていない3.5週齢でも明瞭に検出された（図5）。

Stains－allにより青色に染色されるタンパク質は，糖タンパク質，りんタンパク質及びCa^{2+}結合性蛋白質であると考えられている[3]。

異常バンドがmembrane fractionにある事，及び分子量の大きい事を考えると，膜構成糖タンパク質上に異常があると考えられる。またすべての生化学的取扱い時に蛋白質分解酵素阻害剤が十分用いられているので上述の異常バンドはmembrane fraction調製時に蛋白質分解酵素が作用してできた人工産物ではないと考えられる。さらに膜蛋白質で糖鎖がついている為にSDS PAGE上で高い分子量をもつようにみられ，その量比も少いことを考え合わせると，この異常bandsがおそらくは細胞表面膜に由来するものと考えられる。

今後は糖蛋白質の，とくに糖類の性質の解析，抗体をつくってその局在の決定から，遺伝子レベルでの追求も行っていきたい。若し表面膜にある異常とすれば，従来から考えられていたジストロフィー筋の初期異常発生の原因として興味ある結果である。

文　　献

1) Bulfield, G. et al., (1984) *Pro. Nat. Acad. Sü, USA* **81**, 1189–1192.
2) Laemmli, U.K. (1970) Nature, **277**, 680–685
3) Campbell, K.P. et al., (1983) *J. Biol, Chsm.* **258**, 11267–11273

V 遺 伝 子 解 析

19. クリスタリン遺伝子の組織特異的発現機構の解析 99

20. 膜結合タンパク質のcDNA及び
遺伝子DNAのクローニング 103

21. ヒト染色体の分離と染色体特異的遺伝子
ライブラリーの作製 107

22. 筋ジストロフィー症の筋組織における遺伝子発現の解析 110

19 クリスタリン遺伝子の組織特異的発現機構の解析

安田国雄*
研究協力者　岡田節人*

一個の受精卵が細胞分裂をくり返し，各細胞は時間的・空間的に規定されて多様に分化し，複雑な組織を形成して多細胞生物体はつくられる。このような複雑多彩な細胞の個性は，発現されている遺伝子によって決定されているといえる。高等動物では免疫系の細胞を除けば発生過程を通じて，遺伝子の構成は変化しないと考えられている。従って細胞の分化とは特定の遺伝子(群)が特定の細胞群でのみ発現し，他の細胞群では発現しないという遺伝子の発現制御の問題と考えられる。

筋ジストロフィー症を含めて一群の病気は，これら遺伝子の異常またはその発現調節の異常に起因すると考えられる。このような一群の病気の治療方法を確立するうえで，遺伝子の構造や発現調節を調べる基礎的研究は欠かせないといえる。従って，以下に述べる筋ジストロフィー症とは一見無関係と思われる眼の水晶体のクリスタリン遺伝子の組織特異的発現機構の解析から明らかになったことが，筋ジストロフィー症の病因解明とその治療方法の確立に役立つ事を期待している。

(1) クリスタリン

クリスタリンは脊椎動物の眼の水晶体に特異的に存在する水溶性構造蛋白質の総称であり，生化学的性質と抗原性のちがいにより，α，β，γ，δ の4つのクラスに分類される。これらのクラスのうち，α，β-クリスタリンは種間を通して共通にあり，δ-クリスタリンは鳥類と爬虫類に，γ-クリスタリンは鳥類と爬虫類を除く脊椎動物に存在する。これらの蛋白質は，抗原の共通性から，また一部はアミノ酸配列の結果から，保守的であり種間でよく保存されていることが明らかとなっている。

眼の水晶体の分化は，胚発生の初期にみられる際立った現象の一つであり，特にニワトリ胚を用いて詳細に研究されてきた。例えば，δ-クリスタリンはレンズプラコードと呼ばれる眼の形成以前の時期にすでに合成が開始されていること，また水晶体は上皮と繊維部の両方から形成されているが，クリスタリンの合成は両者でちがう形で調節されていることなど。

このようなクリスタリン遺伝子の発現制御を研究するために，遺伝子のクローニングを開始した。先に述べたように，クリスタリンは水晶体に多量に含まれるため，そのmRNA の分離精製も比較的容易であり，我々の所で，ほぼ全長に近いδ-c DNA及びα-c DNAを作製した。これらをニックトランスレーションで ^{32}Pで標識して，ニワトリ遺伝子ライブラリーから各々の遺伝子を分離した。δ-クリスタリン遺伝子の組織特異的発現の解析結果は他で述べているので，ここではα-クリスタリン遺伝子について述べる。

(2) α-δ-クリスタリン・キメラ遺伝子の作製

δ-クリスタリン遺伝子の場合は，マウスの種々の組織の初代培養の核内に注入し，その発現を調べた。これは，先に述べたように，δ-クリスタリン遺伝子はマウスにはないため，導入された

*京都大学理学部生物物理

遺伝子の発現をδ－クリスタリン抗体を用いて感度よく検定できたという利点があったためである。ところが，α－クリスタリン遺伝子は共にあるためα－クリスタリン抗体を用いる方法は使えない。従って，α－クリスタリン遺伝子の発現調節の解析には，次の点に留意した。δ－クリスタリンを含め多くの遺伝子の転写活性制御領域が，5′上流にあり遺伝子の内部にはないことと，マウス細胞で発現させるために蛋白部分をδ－クリスタリンに置換すること。

これらの目的のために，図1に示すような5′上流はα－クリスタリン遺伝子から，ペプチドをコードする大部分のエクソンをδ－クリスタリン遺伝子から成るキメラ遺伝子を作製した。このα－δキメラ遺伝子は，α－遺伝子の1番目のエクソンとδ－遺伝子の3番から17番までエクソンを含む。この遺伝子から転写翻訳されるペプチドは，δ－クリスタリンのN末端の4個のアミノ酸が，αクリスタリンのN末端の63個のアミノ酸で置換された全長504個のアミノ酸から成っている。このようなペプチドが合成されるためには，キメラ遺伝子が転写されスプライシングがうまく行なわれる必要がある。

(3) α－δ－キメラ遺伝子の発現

α－δキメラ遺伝子をプラスミドにクローン化，約100コピーのキメラ遺伝子をマウス水晶体の初代培養細胞の核中に顕微注入した。転写活性の一番高い遺伝子導入後48時間に固定し，δ－クリスタリン抗体を用いて免疫組織化学法（PAP法）で染色した。図2Aがその写真で，矢印で示してある濃く着色した細胞は，遺伝子の注入を受けδ－クリスタリン抗体と反応する蛋白質を合成していることを示している。その分子量を同定するために，遺伝子導入を受けた約100個の細胞を，SDSで可溶化しポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。これをWestern blot法で検定した結果が，図2Bレーン2に示してある。δ－クリスタリンの分子量48Kより約6K大きい54Kのバンドの位置にキメラ遺伝子からの翻訳産物が認められる。これは，キメラ遺伝子の翻訳産物がδ－クリスタリンよりも59個余分なアミノ酸を含んでいるからである。これらのことから，α－δ－キメラ遺伝子は，マウス水晶体細胞でδ－クリスタリン遺伝子と同様に，効率よく発現され，正しくスプライシングされ蛋白質を合成することが明らかになった。

同様の方法を用いて，マウスの種々の組織細胞や株細胞で，キメラ遺伝子の発現を解析したが，発現はほとんどみられなかった。従って，このα－δ－キメラ遺伝子はマウス水晶体細胞でのみ効率よく発現しているといえる。

(4) 組織特異的発現に必要な遺伝子領域

遺伝子の転写活性を制御する領域は，5′上流にあることが多くの研究から明らかになっている。では前述した組織特異的発現を規定する遺伝子領域はどこにあるのであろうか？ α－クリスタリン遺伝子の5′上流を欠失した変異遺伝子を作製して，遺伝子導入をしてその活性を検討した。その結果，転写開始点から上流－162 bp の位置まで欠失すると水晶体細胞での発現はなくなり，上流－376 bpの位置までを含むと効率よく発現する。従ってこの領域（図3MboⅡ-BglⅡDNA断片）が，水晶体細胞での特異的発現に必要といえる。では，この領域は，ウイルスのLTRや免疫グロブリン遺伝子のエンハンサー配列と同等の効果をもつであろうか？ エンハンサー配列は，その方向や遺伝子上での位置（数K6以内）によらず，その遺伝子の転写活性を高める効果をもつ。

これらのことを検討するために，前述したMboⅡ－BglⅡ DNA断片を，元の位置で方向を逆転したり，この断片をキメラ遺伝子の2番目のイントロンの中に，同方向，逆方向に挿入した変異遺伝子を作製し，その転写翻訳活性を測定した。その結果を，図3に，簡略化して示した。このDNA断片を本来の位置で方向を変えても発現に変化はなかった。しかし，位置を変える（本来の位置から約2Kb下流）と発現は低下したが，喪失はしなかった。このような点から，クリスタリン遺

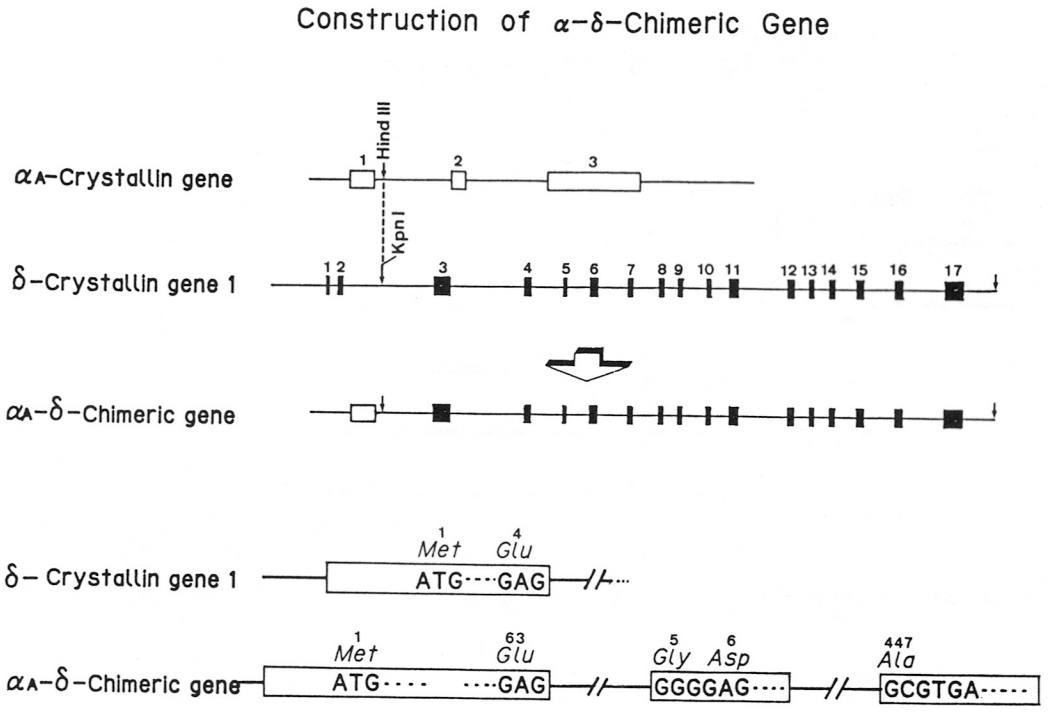


図1　α－δ－クリスタリン・キメラ遺伝子の作製法

キメラ遺伝子はα－クリスタリン遺伝子の1番号のイントロン中にあるHind Ⅲの部位に，δ－クリスタリン遺伝子の3番目以下のエクソンを完全に含むKpn Ⅰ断片を結合して作製された。従って，このキメラ遺伝子からは下図に示すように，δ－クリスタリンの最初（N末端）の4個のアミノ酸が，α－クリスタリンのN末端の63個のアミノ酸に置換されたペプチドを合成される。その分子量はδ－クリスタリンの分子量48,000より約6,000大きい54,000となる。

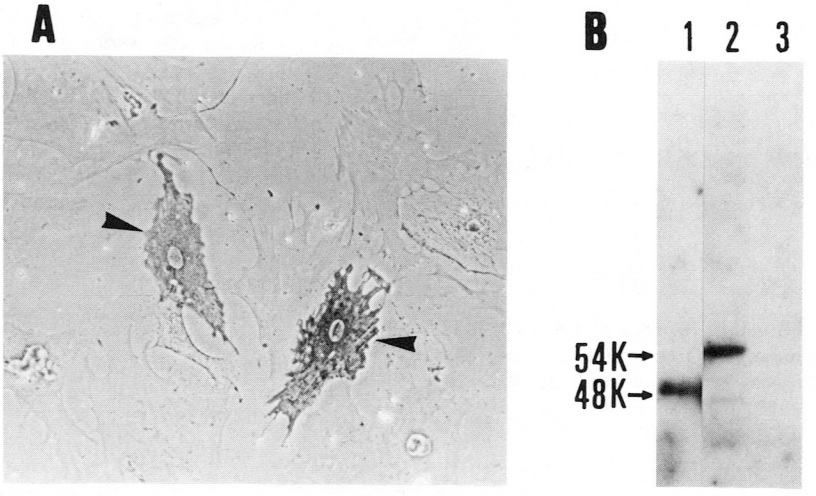


図2　マウス水晶体細胞の核内に注入されたキメラ遺伝子の発現

A．マウス水晶体の初体培養細胞にキメラ遺伝子を核内注入したのち，48時間後に固定し，PAP法により遺伝子産物を検出した。矢印の着色した細胞が外来遺伝子を発現している。

B．約100個の遺伝子が核内注入された細胞をSDSで可溶化し，SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのちWestern blot 法により翻訳産物を同定した。(1)　δ－クリスタリン　(2)　α－δ－キメラ遺伝子を注入された細胞　(3)　遺伝子の注入を受けない細胞。キメラ遺伝子の産物はδ－クリスタリンの分子量48kより約6k大きい54kのバンドとなって検出されている。

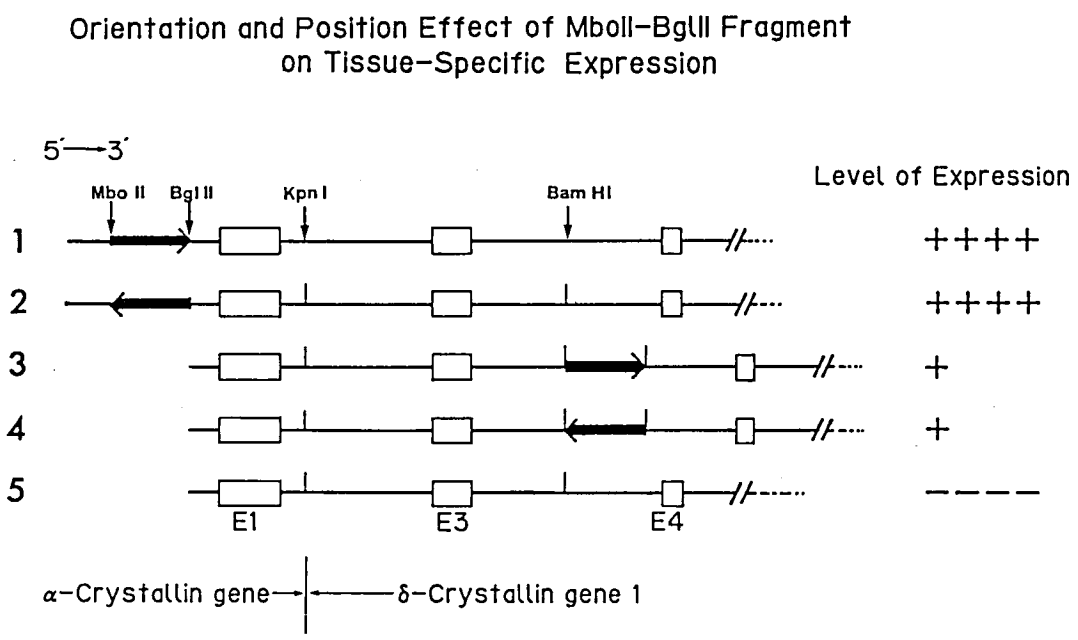


図3 組織特異的発現に必要な領域とその方向及び位置効果

α－クリスタリン遺伝子の水晶体細胞における組織特異的発現には，5′上流のMbo II－Bgl II DNA断片が必要である。(1) 元の遺伝子 (2) 同位置で方向を変えたもの，(3)(4)キメラ遺伝子の2番目のイントロン中にMbo II－Bgl II DNA断片を方向を変えていたもの，(5) Mbo II－Bgl II DNA断片を欠失したもの。

伝子の組織特異的発現に必要なＤＮＡ領域は，エンハンサー配列とは異なった効果をもっている。このことはエンハンサー機能に必要といわれているコアー配列が，上に述べたクリスタリン遺伝子のMbo II－Bgl II DNA 断片中に見い出されないことからも示唆される。

文　　献

1) Yasuda, K., Kondoh, H., Okada, T.S., Nakajima, N., and Shimura, Y. Organization of δ-crystallin genes in the chicken. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2879-2891 (1982).

2) Kondoh, H., Yasuda, K., and Okada, T.S. Tissue-specific expression of a cloned chick δ-crystallin gene in mouse cells. *Nature* **301**. 440-442 (1983).

3) Yasuda, K., Nakajima, N., Isobe, T., Okada, T.S., and Shimura, Y. The nucleotide sequence of a complete chick δ-crystallin cDNA. *The EMBO J.* **3**, 1397-1402 (1984).

4) Kondoh, H., Takahashi, Y. and Okada, T.S. Differentiation-dependent expression of the chicken δ-crystallin gene introduced into mouse teratocarcinoma stem cells. *The EMBO J.* **3**, 2009-2014 (1984).

5) Ohno, M., Sakamoto, H., Yasuda, K., Okada, T.S. and Shimura, Y. Nucleotide sequence of a chicken δ-crystallin gene. *Nucleic Acids Res.* (in press).

20 膜結合タンパク質のcDNA及び遺伝子DNAクローニング

藤井義明*

肝細胞において薬物の酸化的解毒反応に関与するチトクロームP−450はER膜に結合した膜結合タンパク質である。外来の莫大な種類の化合物がこのヘム蛋白質によって水酸化，脱メチル化，脱ハロゲン化，脱ニトロ化などの反応をうけて解毒代謝されるわけであるが，この反応は一分子種のP−450によって触媒されるのではなくて，一群のP−450の分担的作用によって行われることが判って来た。一つの分子種のP−450の基質特異性はかなり広いが一定の限られた範囲の基質に対して反応しまた他の分子量のP−450は異なった基質スペクトルの特異性を持って，ある場合にはオーバーラップした基質特異性を示しながら網羅的に外来の低分子物質に対する生体防御系を作っている。またこのような薬物代謝に関与しているP−450は多くの場合誘導酸素である，ある薬物を投与すると特定の分子種のP−450が特異的に誘導合成される。このようなP−450の分子多様性，薬物による誘導機構，膜えの組み込み機構などを研究するために我々はこの数年間遺伝子クローニングの方法を用いて，いくつかの種類のP−450のcDNAクローンと遺伝子DNAクローンの解析を行って来た。本年度はメチルコラントレンによって誘導される2種類のP−450のcDNAクローン及び遺伝子DNAクローンの解析を行ったので報告したい。この2種類のP−450（P−450c及びP−450d）はメチルコラントレン，ベンツピレン，ポリ塩化ビニルなどの化合物によって同じように誘導されるがイソサフロールはP−450dの合成のみを選択的に誘導する。また基質特異性もP−450cは芳香族多環炭化水素化合物の水酸化反応に強い活性を示すのに対し，P−450dはGluP−2などの複素環化合物のN水酸化反応に活性を示すことが知られている。

メチルコラントレンで誘導されるチトクロームP−450d cDNAクローンの分離と構造解析

ラット肝ホモゲネートのポストミトコンドリア分画より105,000 g 90分の遠心によりミクロソーム分画を得て，これよりSDS−フエノール・クロロホルム法によってRNAを抽出した。RNAをオリゴdTセルロースカラムによってrRNAやtRNAからポリ(A)RNA（mRNA）を分離した。さらにポリ(A)RNAを5−25%のショ糖密度勾配遠心によって分画し，各フラクションのmRNA活性を無細胞タンパク質合成系を用いて測定した。その結果P−450を合成する活性は18S付近にピークを持って局在することを認めた。この18S RNAからAMV逆転写酵素によりcDNAを合成して，PBR322をベクターとしてGC−tail法によってそのPstI切断部位に挿入してCa^{2+}法によって処理した大腸菌よりP−450のcDNAの挿入された組換え体プララミドを持ったクローンの同定はhybridization-selected translationにより行った。Maxam-Gillbertの塩基配列決定法によりcDNAの塩基配列を決定したところ精製P−450dで報告されているN末端の30個のアミノ酸

*癌研・生化学部

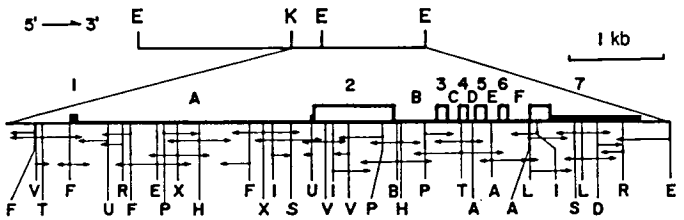
```
                                                                                                    -AC CCT TCA GTC GTA CAG

                                                  10                                                  20
Met Ala Phe Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Ala Pro Glu Leu Leu Leu Ala Thr Ala Ile Phe Cys Leu Val Phe Trp
ATG GCG TTC TCC CAG TAT ATC TCC TTA GCC CCA GAG CTG CTA CTG GCC ACT GCC ATC TTC TGT TTA GTG TTC TGG

                    30                                                  40                                                  50
Val Leu Arg Gly Thr Arg Thr Gln Val Pro Lys Gly Leu Lys Ser Pro Pro Gly Pro Trp Gly Leu Pro Phe Ile
GTG TTG AGA GGC ACA AGG ACC CAG GTT CCC AAA GGT CTG AAG AGT CCT CCC GGA CCC TGG GGC TTG CCC TTC ATT

                                                  60                                                  70
Gly His Met Leu Thr Leu Gly Lys Asn Pro His Leu Ser Leu Thr Lys Leu Ser Gln Gln Tyr Gly Asp Val Leu
GGG CAC ATG CTG ACC CTG GGG AAG AAC CCA CAC CTA TCT CTG ACA AAG CTG AGT CAG CAG TAT GGG GAC GTG CTG

                    80                                                  90                                                 100
Gln Ile Arg Ile Gly Ser Thr Pro Val Val Val Leu Ser Gly Leu Asn Thr Ile Lys Gln Ala Leu Val Lys Gln
CAG ATC CGC ATT GGC TCC ACA CCC GTG GTG GTG CTG AGC GGC CTG AAC ACC ATC AAG CAG GCC CTA GTG AAG CAG

                                                 110                                                 120
Gly Asp Asp Phe Lys Gly Arg Pro Asp Leu Tyr Ser Phe Thr Leu Ile Thr Asn Gly Lys Ser Met Thr Phe Asn
GGG GAT GAC TTC AAA GGC CGG CCA GAC CTC TAC AGC TTC ACA CTT ATC ACT AAT GGC AAG AGC ATG ACT TTC AAC

                   130                                                 140                                                 150
Pro Asp Ser Gly Pro Val Trp Ala Ala Arg Arg Arg Leu Ala Gln Asp Ala Leu Lys Ser Phe Ser Ile Ala Ser
CCA GAC TCT GGA CCG GTC TGG GCT GCC CGC CGG CGC CTG GCC CAG GAT GCC CTG AAG AGT TTC TCC ATA GCC TCA

                                                 160                                                 170
Asp Pro Thr Ser Val Ser Ser Cys Tyr Leu Glu Glu His Val Ser Lys Glu Ala Asn His Leu Ile Ser Lys Phe
GAC CCC ACA TCA GTA TCC TCT TGC TAC TTG GAG GAG CAC GTG AGC AAA GAG GCT AAC CAT CTA ATC AGC AAG TTC

                   180                                                 190                                                 200
Gln Lys Leu Met Ala Glu Val Gly His Phe Glu Pro Val Asn Gln Val Val Glu Ser Val Ala Asn Val Ile Gly
CAG AAG CTG ATG GCA GAG GTT GGC CAC TTC GAA CCA GTC AAC CAG GTG GTG GAA TCG GTG GCT AAT GTC ATC GGA

                                                 210                                                 220
Ala Met Cys Phe Gly Lys Asn Phe Pro Arg Lys Ser Glu Glu Met Leu Asn Leu Val Lys Ser Ser Lys Asp Phe
GCC ATG TGT TTT GGG AAG AAC TTC CCC AGG AAG AGC GAG GAG ATG CTC AAC CTC GTG AAG AGC AGC AAG GAC TTT

                   230                                                 240                                                 250
Val Glu Asn Val Thr Ser Gly Asn Ala Val Asp Phe Phe Pro Val Leu Arg Tyr Leu Pro Asn Pro Ala Leu Lys
GTG GAG AAT GTC ACC TCA GGG AAT GCT GTG GAC TTC TTT CCG GTC CTG CGC TAC CTG CCC AAC CCA GCC CTC AAG

                                                 260                                                 270
Arg Phe Lys Asn Phe Asn Asp Asn Phe Val Leu Ser Leu Gln Lys Thr Val Gln Glu His Tyr Gln Asp Phe Asn
AGG TTT AAG AAC TTC AAT GAT AAC TTT GTG CTG TCT CTG CAG AAA ACA GTC CAG GAA CAC TAT CAA GAC TTC AAC

                   280                                                 290                                                 300
Lys Asn Ser Ile Gln Asp Ile Thr Gly Ala Leu Phe Lys His Ser Glu Asn Tyr Lys Asp Asn Gly Gly Leu Ile
AAG AAC AGT ATC CAG GAC ATC ACA GGC GCC CTG TTC AAG CAC AGT GAG AAC TAC AAA GAC AAC GGT GGT CTC ATC

                                                 310                                                 320
Pro Gln Glu Lys Ile Val Asn Ile Val Asn Asp Ile Phe Gly Ala Gly Phe Glu Thr Val Thr Thr Ala Ile Phe
CCT CAG GAG AAG ATT GTC AAC ATT GTC AAT GAC ATC TTT GGA GCT GGA TTT GAA ACA GTC ACA ACA GCC ATC TTC

                   330                                                 340                                                 350
Trp Ser Ile Leu Leu Val Thr Glu Pro Lys Val Gln Arg Lys Ile His Glu Glu Leu Asp Thr Val Ile Gly
TGG AGC ATT TTG CTA CTT GTG ACA GAG CCC AAG GTG CAG AGG AAG ATT CAT GAG GAG CTG GAC ACG GTG ATT GGC

                                                 360                                                 370
Arg Asp Arg Gln Pro Arg Leu Ser Asp Arg Pro Gln Leu Pro Tyr Leu Glu Ala Phe Ile Leu Glu Ile Tyr Arg
AGA GAT CGG CAG CCA CGG CTT TCT GAC AGA CCC CAG CTG CCA TAT CTG GAG GCC TTC ATC CTG GAG ATC TAC CGA

                   380                                                 390                                                 400
Tyr Thr Ser Phe Val Pro Phe Thr Ile Pro His Ser Thr Thr Arg Asp Thr Ser Leu Asn Gly Phe His Ile Pro
TAC ACA TCC TTT GTC CCC TTC ACC ATC CCC CAC AGC ACA ACG AGG GAC ACC TCA CTG AAT GGC TTC CAC ATT CCC

                                                 410                                                 420
Lys Glu Cys Cys Ile Phe Ile Asn Gln Trp Gln Val Asn His Asp Glu Lys Gln Trp Lys Asp Pro Phe Val Phe
AAG GAG TGC TGC ATC TTC ATA AAC CAG TGG CAG GTC AAC CAT GAT GAG AAG CAG TGG AAA GAC CCC TTT GTG TTC

                   430                                                 440                                                 450
Arg Pro Glu Arg Phe Leu Thr Asn Asp Asn Thr Ala Ile Asp Lys Thr Leu Ser Glu Lys Val Met Leu Phe Gly
CGC CCA GAG CGG TTT CTT ACC AAT GAC AAC ACG GCC ATC GAC AAG ACC CTG AGT GAG AAG GTG ATG CTC TTC GGC

                                                 460                                                 470
Leu Gly Lys Arg Arg Cys Ile Gly Glu Ile Pro Ala Lys Trp Glu Val Phe Leu Phe Leu Ala Ile Leu Leu His
TTG GGA AAG CGC CGG TGC ATT GGG GAG ATC CCG GCC AAG TGG GAA GTC TTC CTC TTC TTA GCC ATC CTC CTG CAT

                   480                                                 490                                                 500
Gln Leu Glu Phe Thr Val Pro Pro Gly Val Lys Val Asp Leu Thr Pro Ser Tyr Gly Leu Thr Met Lys Pro Arg
CAG CTG GAG TTC ACT GTG CCA CCG GGC GTG AAG GTG GAC CTG ACA CCC AGC TAT GGG CTG ACC ATG AAG CCC AGA

                                                 510
Thr Cys Glu His Val Gln Ala Trp Pro Arg Phe Ser Lys
ACC TGT GAA CAC GTC CAG GCC TGG CCA CGC TTC TCC AAG TGA AGA TGG CCG AGA CAT CGG CCG CCA CCC TTG TTC

CTT TTC CTT TCT TTT TAA ATA ACA GCT TTT TCA AGA TAC AAT TCC TCC ACC ATT TAA TTC AGC TCC AAT CAA TTT

TCA ATA TTG TCT ACA CTG TTC CCT GCA AAC CCA TAC CCA TTA AGA TTT ATG ACT ATT CCT CCT ACC CTG TTT CGC

TTG CTG TGC CAC GTG CTA ATC TAG TTT TTG ACT CAA TAG ATT TGC CAA CTC TGG CTG ---
```

図－1. チトクロムP-450d cDNAの塩基配列とアミノ酸配列，アンダーラインされた部分は各種P-450分子間で保存された部分を示す。

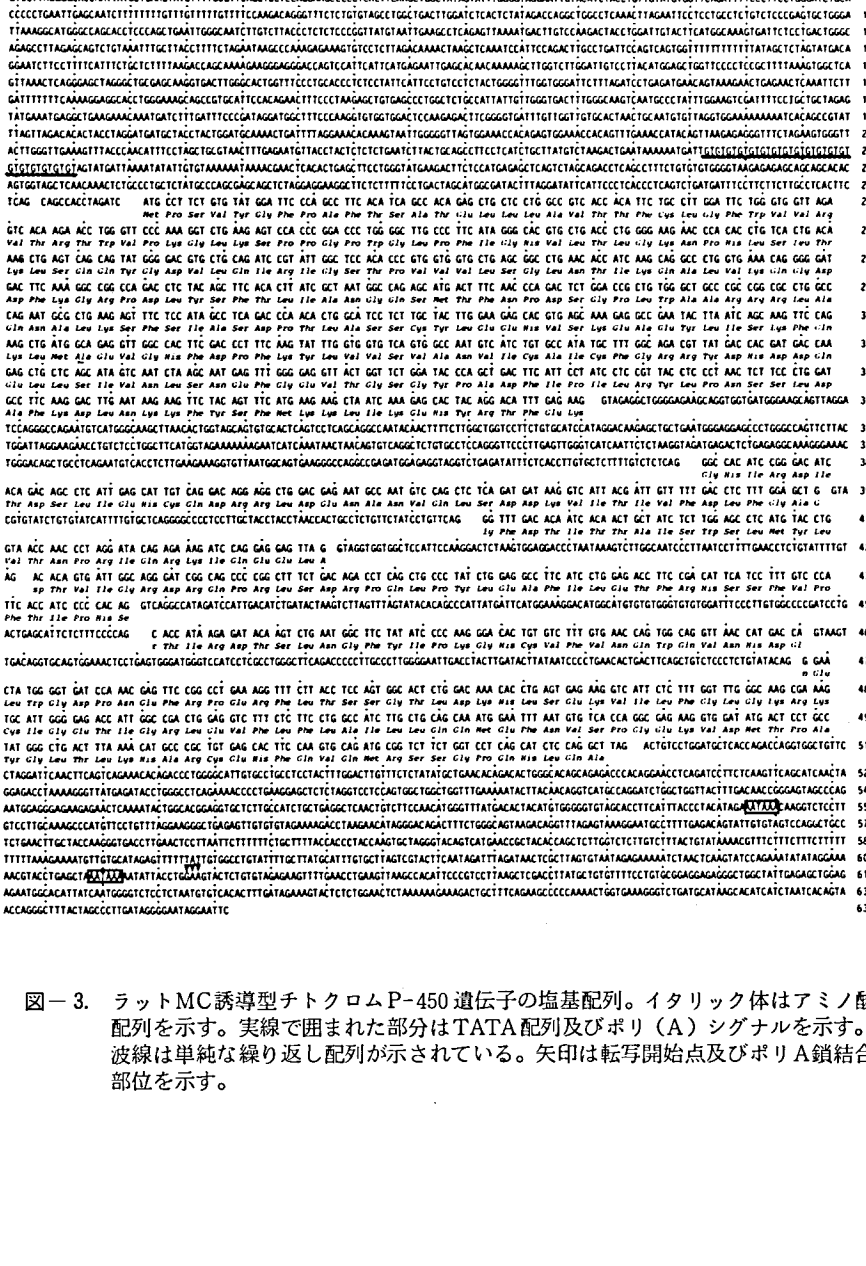
配列をコードする塩基配列を含むことが判った。cDNAの構造解析より図－1に示すように513個のアミノ酸よりなるP－450d の全一次構造を決定することができた。このP－450dには我々が先にフェノバルビタール誘導型P－450bとPseudomonas Putida P－450 camの構造の比較から推定した保存されたシステイン残基を含むアミノ酸配列を含んでいた。この部分のシステイン残基（456）がヘムの第5配位子となっていると考えられる。

メチルコラントレンで誘導される二つのP 450（P−450cとP−450d）の遺伝子クローンの分離と構造解析

ラットのDNAのHae Ⅲ部分水解物よりcharon 4 Aをベクターとして作られた遺伝子ライブラリーの約10^6個のプラークを上記cDNAをプローブにしてスクリーニングを行い制限酵素マップからみて2種類の遺伝子クローンを単離した。構造解析の結果一つはプローブとして用いたチトクロームP−450dの遺伝子であり，他はチトクロームP−450cの遺伝子であることが判った。遺伝子の全長は各々P−450dの場合は6,7 Kb，P−450cの場合は6.0 Kbであった。図−2にチトクロームP−450cの遺伝子の概略と塩基配列決定の方法を示すが両遺伝子共にその概略はよく似ていて，遺伝子は6個のイントロンにより7個のエクソンに分れた分断構造をしている。図−3にP−450cの遺伝子の全構造を示すが，両遺伝子間で塩基配列の比較をしてみるとエクソン部分，特に第2エクソンの部分が両遺伝子でホモロジーが高いことが判った。この部分のホモロジーのためにP−450 d cDNAをプローブにして，遺伝子ライブラリーより両遺伝子が選別されたことが理解された。遺伝子の5′又は3′隣接塩基配列あるいはイントロン部分には広い領域にわたる塩基配列でホモロジーのある部分は認められなかったが5′隣接部位のプロモーター領域に，10〜15スクレオチドからなる塩基配列で両遺伝子間で共通の構造が見出された。また第1イントロンには両遺伝子共にZ DNA構造をとることが知られているGTGT……の繰り返し構造も認められた。今後この共通構造が薬物による誘導にどのような役割を果すか in vitro geneticsの方法を用いて検討する予定である。



図−2. MC誘導型チトクロームP-450遺伝子の概略と塩基配列決定法。矢印を塩基配列決定の方向，及びその長さは決定された塩基配列の長さを示す。実線で囲まれた部分はエクソン部分を示し，黒くぬられている部分はリーダー及びトレイラー部分を示す。A, *Acc*I; B, *Bam*HI; D, *Dde*I; E, *Eco*RI; F, *Fok*I; H, *Hind*Ⅲ; I, *Pst* I; K, *Kpn*I; L, *Hpa*Ⅱ; P, *Pvu* Ⅱ; R, *Dra* I; S, *Sst* I; T, *Bst* EⅡ; U, *Sau*3AI; V, *Ava* Ⅱ; X, *Xba* I の制限酵素切断部位を示す。



図－3. ラットMC誘導型チトクロムP-450遺伝子の塩基配列。イタリック体はアミノ酸配列を示す。実線で囲まれた部分はTATA配列及びポリ（A）シグナルを示す。波線は単純な繰り返し配列が示されている。矢印は転写開始点及びポリA鎖結合部位を示す。

21 ヒト染色体の分離と染色体特異的遺伝子ライブラリーの作製

渡 邊 武*

目 的

ヒトリンパ球，線維芽細胞をはじめとする種々のヒト細胞から染色体を分離し，Flow cytometry法により分析すると共に，そのSorting 機能を用いて，各染色体を分離精製する。さらに分離された染色体よりＤＮＡを抽出し，染色体特異的遺伝子ライブラリーを確立する。Duchenne型筋ジストロフィーのごとく，伴性劣性型の遺伝形式をとるジストロフィーを遺伝子レベルにて解析するために，特にヒトＸ染色体遺伝子ライブラリーを確立する。確立したライブラリーよりユニーク配列を有するクローンを選択抽出し，それらのクローン中から，Duchenne型筋ジストロフィー（ＤＭＤ）の遺伝子座と強く連鎖したクローンを見い出す。

成 果

(1) ヒト末梢血リンパ球，Epstein-Barrウィルスによりトランスホームとしたｂ細胞株，線維芽細胞を用いて染色体分離を行った。すなわち，コルセミド処理によりＭ期の細胞を濃縮し，ポリアミンージギトニン法により染色体を調製した。得られた染色体をエチジウムブロミドにより染色した。セルソーターはコールター社ＥＰＩＣＳ－Ｖ型を使用し，アルゴンレーザー管を用いた。レーザー波長は515 nm と488nmの合成波で，レーザー出力は，1.5 W，540 nm emission filter を用いた。正常ヒト末梢血リンパ球のFlow karyotype（Flow cytometry法による各染色体の蛍光強度分布）を調べてみると，我々の用いた条件では，15～16個のピークが得られた。すなわち，第1，2，3，4，5，6，7，X，8，13，21，22番の染色体は1個の独立したピークとして認識され，9～12番は一つのピークにグループとして出現し，(14, 15, 16)，(17, 18)，(19, 20) 番は個々の独立したピークとして得られることもあれば，一つのグループとして得られることもあった。Ｙ染色体のピークは，通常は22番染色体のピークの左側に現われるが，必ずしも位置は一定していない。

我々は，20名の正常の女性のFlow karyotypeを調べ，つねにほぼ一定のパターンが得られることを確認した。

48ＸＸＸＸの染色体異常を有する患者の末梢血リンパ球を，ＥＢウイルスにてトランスフォームし，Ｂ細胞株として樹立した。この株化細胞より染色体を調製し，Flow karyotypeを調べてみると，Ｘ染色体の位置に大きなピークが得られる。このピークをソーティングすることにより，Ｘ染色体のみを純度高く得ることが出来た。得られたＸ染色体をもう一度，セルソーターにより解析を行ったところ，周辺の染色体（７番と８番）の混入は非常に少く，90%以上の純度でＸ染色体が得られていると考えられた。

このほか21トリソミー患者の染色体解析においても，良好な分析分離の結果が得られた。このように我々は，ヒト染色体（全てではないが）を，個々に分離精製する技術を確立した。染色体分離に関して大切なことは，(1)細胞から出来るだけ

＊佐賀医科大学免疫血清学
（昭和60年４月より，九州大学生体防御医学研究所）

intactな形で染色体を取り出すこと，(2)セルソーターの調製を厳密に行なうことである。Flow cytometry 法による染色体パターンの解析は，染色体をいかにうまく細胞から取り出すかに大きく左右される。

分離の際に核・染色体の断片化，凝集を出来るだけ防ぎ，長時間染色体の構造，生化学的特性を維持することが肝要である。また，セルソーターのコンディショニングは入念に行うべきであり，フィルターのスリット巾，CV値，レーザー出力等によってその精度は大きく左右される。

(2) 精製されたヒトX染色体1×10^7個を用いて，セトX染色体特異的遺伝子ライブラリーの作製を行った。約1×10^7個のX染色体を，プロテイナーゼK処理，SDS処理，フェノールクロロホルム処理，エタノール沈澱により高分子DNA約150 ngを得た。このDNAを制限酵素EcoRIにて完全分解し，λgt WESベクターアームにligationし，Hohnの方法に従ってin vitro packagingをおこなった。E. coli K12 LE392菌を指示菌として，約1×10^5個の種々の大きさのプラークを得た。プラークの大きさが種々であることから，インサートの大きさが様々（2～15kb）であることが示唆された。こうして得られたクローンのうち，ヒトDNAを含むクローンの割合を算定するために，反復配列Kpn I familyのDNAをプローブとして，プラークハイブリダイゼーションを行なった。その結果，インサートの平均の長さを8kbと考えると，X染色体遺伝子の少くとも80%が我々のライブラリーに含まれていることがわかった。

X染色体由来のユニーク遺伝子のDNAを含むクローンを同定するために，まずKpn I およびAlu family のような反復配列DNAを用いてpre-hybridizationを行った後に，48XXXXの全DNA，46XYの全DNAをプローブとして，プラークハイブリダイゼーションを行った。それぞれのプローブでX染色体の比活性の差を大きくし，同時にX染色体以外の比活性は等しくなるように，一枚のフィルターはラベルした46XY-DNAとラベルしていない48XXXX-DNAを，同じプレートからレプリケートしたもう一枚のフィルターはラベルした48XXXX-DNA とラベルしていない46XY-DNAを混合してプローブとして用いた。両者のフィルターを比較することによりX染色体特異的クローンを多数同定し得た。このうち強いシグナルを示すクローンは，反復配列を含んでいると考えられ，ユニーク遺伝子のみから成るクローンは，非常に弱いシグナルを示すと考えられるので，弱いシグナルを示すクローンを一つ一つ丹念に拾いあげ，X染色体由来のユニーク配列DNAのみを含むクローンのストックを作製した。このようにして得たクローンからのDNAをプローブとして，ヒト46XY-DNAおよび48XXXX-DNAのSouthern blot analysisを行った。ヒトゲノムDNAを制限酵素で切断し，ハイブリダイゼーションを行うと，48XXXX-DNA によって得られるバンドは，46XY-DNAによって得られるバンドよりも数倍濃いバンドとして検出される。

この方法によって，用いたクローンのDNAが，X染色体特異的ユニーク配列を含むことが確認された。また，用いたプローブがRFLP（ristriction enzyme fragment length polymorphism）を認識し得るかどうかも，種々のヒトX-DNAとのSouthern hybridization によって検出されるであろう。この点については次年度において検討を加える予定である。

まとめ

ヒト末梢血リンパ球をEBウイルスを用いて細胞株化し，その細胞よりX染色体をセルソーターにより分離精製した。90%以上の純度によって得たX染色体よりDNAを抽出し，制限酵素EcoRIにより完全分解した後，λファージのアームに組み込み，X染色体特異的遺伝子ライブラリーを作製した。得られたライブラリーは，X染色体上の遺伝子の少くとも80%以上を含んでいること

がわかった。ライブラリー中からユニーク配列遺伝子を含むクローンの単離と，それを用いた遺伝子の制限酵素断片の多様性について検討中である。

次年度は，これらのクローンを用いて，伴性劣性型遺伝を示すと思われる筋ジストロフィーの遺伝子解析を行いたいと考えている。

文　献

1) Harita, S., Sugimura, K. and Watanabe, T.: Macrophage-chemotactic factor-producing T cell hybridoma reactive to phosphorylcholine in I-E restricted manner. *Eur. J. Immunol.*, **14**, 692-697 (1984).
2) Ishihara, T., Kudo, A. and Watanabe, T.: Induction of immunoglobulin gene expression in mouse fibroblasts by cycloheximide treatment. *J. Exp. Med.*, **160** (12), 1937, (1984).
3) Kudo, A., Ishihara, T., Nishimura, Y. and Watanabe, T.: A cloned human immunoglobulin heavy chain gene with a novel direct repeat sequence in 5′flanking region. *Gene* (1984) (印刷中).
4) Saito, H., Ishihara, T., Suzuki, H. and Watanabe, T.: Production and characterization of a murine monoclonal antibody against a heavy chain of Hageman factor (factor XII). *Blood* (印刷中).
5) Watanabe, T., Maeda, H., Kudo, A., Ishihara, T., Ohara, J., Eda, Y. and Kitamura, D.: Microinjection of cytoplasmic and nuclear factors into cells of the immune system. *"Lymphokines"* Ed. E. Pick (Academic Press), Vol. **11** (印刷中).
6) 渡辺　武：Flow cytometry 法による染色体の分離，医学のあゆみ　128(9)，T-65，(1984)

22 筋ジストロフィー症の筋組織における遺伝子発現の解析

奥田拓道* 澄田道博*
塩坂孝彦**
濱田　稔***

私達は，数年前より，細胞の遺伝子の異常は，何らかの形でその転写に影響を及ぼすものと考え，白血病細胞を中心にその転写を研究してきた。このような考えに基づく研究は，以前より，とくに癌研究を中心に行われているが，最近の遺伝子操作法の開発されるまでは，個々の転写ＲＮＡの識別が難しく，特定のＲＮＡを除き，別個に各々のＲＮＡの転写を調べることは困難であった。私達は種々の白血病細胞の転写ＲＮＡレベルでの性格づけを行い，白血病の病因を検討するとともに，それらを利用して，それぞれの白血病細胞の制癌剤に対する反応等の検討を行っている。白血病細胞の種々の遺伝子に対する転写ＲＮＡ量の比較のため，その性質が比較的正常リンパ球に類似している慢性リンパ性白血病細胞よりpoly $(A)^+$ ＲＮＡを分離して，そのＲＮＡよりcDNA libraryを作製し，白血病細胞の個々の遺伝子の転写量を胎盤組織を対照に比較した。その結果，白血病細胞に比較的特徴的に転写される数種の遺伝子を単離した。それらの単離した遺伝子を用い，白血病細胞の転写パターンを比較し，各々の白血病の性格づけを行っている。[1)]

筋ジストロフィー症（以下，筋ジス）が遺伝子の何らかの異常によって引き起こされる遺伝子病であることはよく知られている。そこで，今回は先程の白血病細胞での研究方法を筋ジスの病態解明に応用する。

すでに多くの研究者によって，筋ジスにおける遺伝子の表現型としての蛋白質の解析は十分なされている。たとえば，共同研究者の濱田らはアデニレート・キナーゼの研究を行い，その筋ジスに特異的なアイソザイムが存在する可能性を見い出し報告している。[2)] が，しかし，これらの研究でも，まだ筋ジスの病因を決定していない。

私達は，転写ＲＮＡレベルの研究の利点として，① cDNA library を用いることにより，比較的簡単に筋ジスの poly $(A)^+$ RNA の異常の有無を検討できる，②翻訳段階の異常は少ないため，遺伝子の異常は転写ＲＮＡレベルで捕えることができる，③ cDNA library の利用なので，すぐＤＮＡの構造解析が行える，と考えている。

材料は筋ジス・チキンの胸筋を選らび，その poly $(A)^+$ RNAを正常の poly $(A)^+$ RNA と比較した。これらの比較にあたり，筋ジスに見られる遺伝子の異常は，種々のことが考えられるが，大きく分けて，二通りの可能性が考えられる。一つは，筋ジス・チキンにのみ特徴的に転写されるＲＮＡが存在する場合，他は，筋ジス・チキンに正常チキンに見られる転写RNAの一部が欠除している場合である。そこで，これらのいずれかの異常の有無を明らかにするため，二通りの，cDNA library の作製が必要となる。すなわち，筋ジス・チキンにのみ発現される遺伝子があるとすれば筋ジス・

＊愛媛大学医学部生化学第２
＊＊愛媛大学医学部第１内科
＊＊＊宮崎医科大学衛生学

チキンからのpoly(A)$^+$ RNAよりcDNA libraryを作らなければならない。他方，正常には発現され筋ジスにおいて特異的に発現されない遺伝子の存在は，正常チキンのpoly(A)$^+$ RNAでCDNA library を作製しなければならない。これらのことを考え，実験計画を図1に示す。

次に作られた二通りのcDNA library を利用して，正常および筋ジス・チキンの個々の遺伝子に対するpoly(A)$^+$ RNA量の比較を行い，正常および筋ジスの間で，明らかなpoly(A)$^+$ RNA 量の差が見られる遺伝子の分離・精製を行う。さらに，そのRNAへの転写量の差が確実なものかどうか，Dot hybridization 法を用い定量的に確認する。そこで，問題となる遺伝子が分離できれば，その遺伝子の染色体での位置をin situ hybridization法で解析する。最終的にその遺伝子のDNA配列を決定し，その遺伝子の性格および細胞内での役割りを明らかにする。

方　　法

混在する転写RNAの情報を個々の単一情報に分離するためのcDNA library作製を行った。筋ジスまたは正常チキンの胸筋をフエノール・プロテネースKを用いてRNAを調整し，オリゴ（dT）セルロースによるアフィニテイ・カラムでpoly(A)$^+$ RNAを調整した。このpoly(A)$^+$RNAより逆転写酵素を用い，二重鎖・相補的DNA（cDNA）を合成し，一般的な方法であるG－C homopolymer tailing法にてプラスミドpBR 322のpst 1切断端にクローニングした。

筋ジスに特徴的に読まれる転写RNAのクリーニングには簡便なcolony hybridization法を使用した。この方法は，シャーレの寒天培地の上に滅菌ニトロセルロース膜を置き，その上に組換えプラスミドを含む大腸菌をスタンプし，培養した。同様のニトロセルロース膜を複数枚作り，アルカリ・高塩濃度緩衝液にて洗浄後，80℃　2時間のbakingし，プラスミドをニトロセルロース膜に固定し，各々の膜は筋ジスまたは正常チキンのpoly(A)$^+$ RNAより合成した^{32}P標識cDNAとハイブリダイゼーションした。洗浄後，オートラジオグラフィーにて転写RNA量を比較した。その結果の確認および定量的比較のため，Dot hybridizationを行った。方法は分離・精製した組換えプラスミドの一定量をアルカリ又は熱処理後ニトロセルロース膜に塗布し，筋ジスまたは正常チキンのpoly(A)$^+$ RNAの断端を^{32}Pで標識し，ハイブリダイゼーションした。又これより先の分離した遺伝子の解析は，現在使用されている一般的方法で行った。

結果および考察

現在まで，筋ジス・チキンまたは正常チキンの胸筋よりpoly(A)$^+$ RNAを抽出して，そのcDNA libraryを作製した。その結果はあまり満足するものではなく，筋ジス・チキンのpoly(A)$^+$ RNAよりは約1300個のクローンが得られたのみだった。この程度のcDNA libraryでは両者の差を導き出すには不十分であるためcDNA libraryの作製が再度必要となり，現在その実験を繰り返している。一方このcDNA libraryで，何か正常および筋ジスの転写RNA量に差が見られるかも知れないと考え，筋ジスのこの1300クローンのlibraryを用い，Colony hybridizationを行った。比較するRNAは，細胞の分化度の差による変化も追究したく筋ジスのチキンの成鶏と孵化後14日目および正常チキンの成鶏と孵化後14日目の胸筋4種類のpol(A)$^+$ RNAで行った。その結果は，図2，3に主な所を示した。今回のcDNA libraryに意味のないフラグメントが多く組み込まれたためかハイブリダイゼーションの効率は悪かった。筋ジス・チキン（成鶏および孵化後14日目）に現われ，正常チキン（成鶏および孵化後14日目）に現われない写真のスポットは2個存在した。これらのスポットをさらにDot hybridization法にて定量的に確認を行っている。

なお，今回は準備段階でまだ実験に入っていないが共同研究者の濱田らの筋ジスに特異的なアイ

Selection and Analysis of Clones Containing Specific Sequences Concerned with Muscular Dystrophy

Preparation of cDNA Library from Total Poly(A)$^{+}$RNA of
(1) Dystrophic Chicken Skeletal Muscle (1300 clones)
(2) Normal Human Skeletal Muscle (1500 clones)

↓

Screening of library with [^{32}P]-cDNA from Normal and Dystrophic Muscle

↓

Dot Hybridization of the Selected Clones with [^{32}P]-mRNA from Normal and Dystrophic Muscle

↓

Localization of Selected Clone on G-Band Human Chromosomes by in situ Hybridization

↓

Analysis of DNA Sequnces with Use of Selected Clones

図1.

Screening with [^{32}P]-cDNA Transcription Prepared from Skeletal Muscle Poly(A)$^{+}$RNA of Normal and Dystrophic Chicken

(1300 cDNA Clones from Muscular Dystrophy were Used in This Experiment)

Normal Chicken Muscle　　Dystrophic Chicken Muscle

Adult　　14 days　　Adult　　14 days

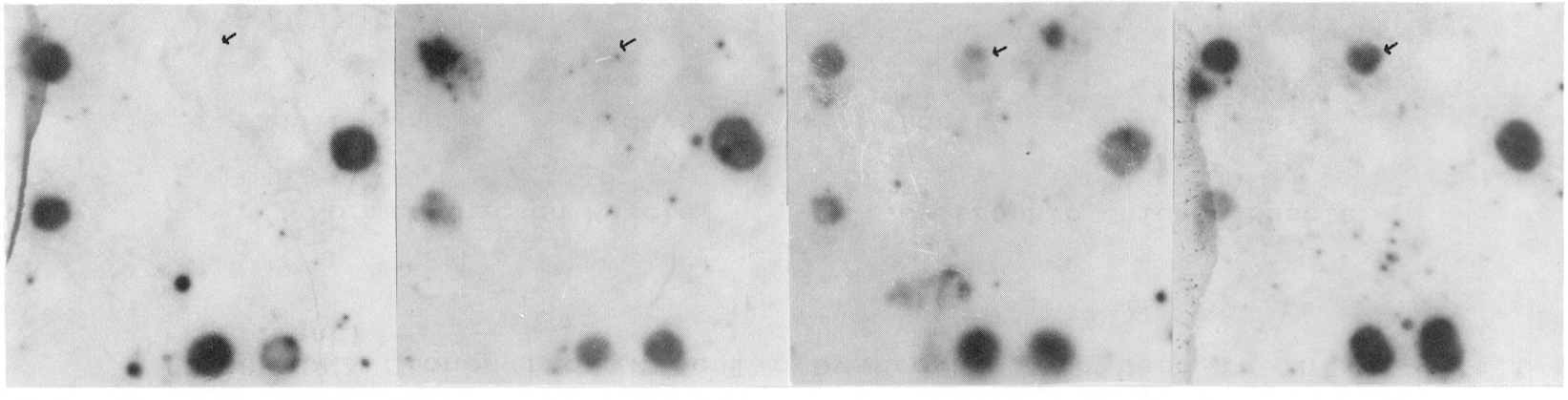


図 2.

Screening with [^{32}P]-cDNA Transcription Prepared from Skeletal Muscle Poly(A)$^{+}$RNA of Normal and Dystrophic Chicken

(1300 cDNA Clones from Muscular Dystrophy were Used in This Experiment)

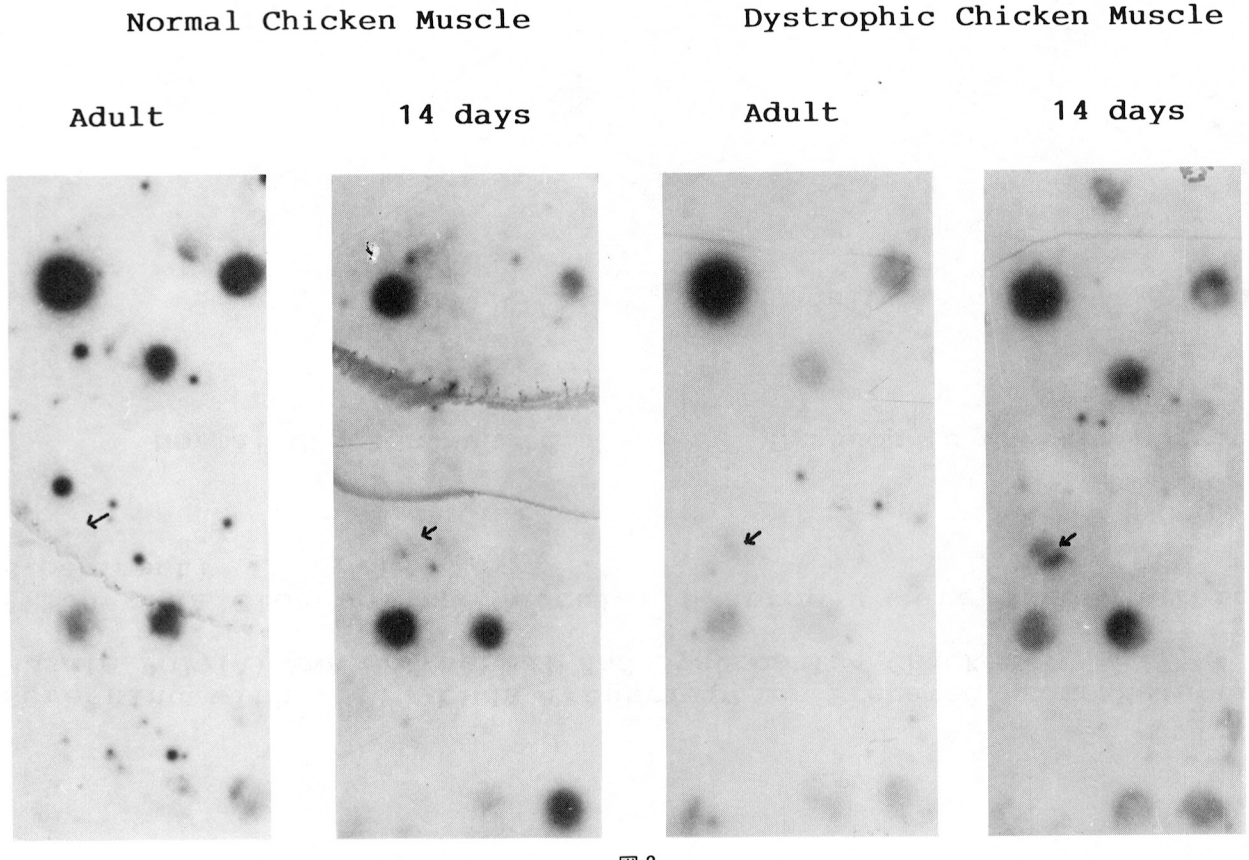


図 3.

ソザイムが存在する可能性のあるアデニレート・キナーゼに関し，一部その酵素のアミノ酸配列も明らかになっているため，このアデニレート・キナーゼの特定ＤＮＡ配列を化学合成し，これをプローブとしてこの酵素の遺伝子の構造解析も合わせて行い，筋ジスとの係わりについても検討する予定である。

文　　献

1) Shiosaka T. and Saunders G.F., *Pros. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4668-4671, (1982).
2) Hamada M. et al. *J. Biol. Chem.*, **257**, 13120-13128, (1982).

「筋ジストロフィー症解明のための遺伝子発現の基礎的研究」班分担研究者一覧

	氏名	所属	住所	
班長	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
幹事	大塚　正徳	東京医科歯科大学医学部薬理学教室	113	東京都文京区湯島 1−5−45 03(813)6111
	大日方　昂	千葉大学理学部生物学教室	260	千葉市弥生町 1−33 0472(51)1111
運営幹事	小沢鉄二郎	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 4−1−1 0423(41)2711
監事	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
班員	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
	遠藤　実	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
	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
	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
	勝木　元也	東海大学医学部細胞生物学教室	259-11	神奈川県伊勢原市望星台 0463(93)1121
	黒田洋一郎	東京都神経科学総合研究所生化学	183	府中市武蔵台 2−6 0423(25)3881
	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
	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
	清水　信義	慶応大学医学部分子生物学教室	160	新宿区信濃町 35 03(353)1211
	鈴木　紘一	東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部	113	文京区本駒込 3−18−22 03(823)2101
	長谷川修司	千葉大学脳機能研究施設神経薬理研究部	280	千葉市亥鼻 1−8−1 0472(22)7171
	藤井　義明	がん研究会生化学部	170	豊島区上池袋 1−37−1 03(918)0111
	真崎　知生	筑波大学基礎医学系	305	茨城県新治郡桜村 0298(53)3277
	丸山　工作	千葉大学理学部生物学教室	260	千葉市弥生町 1−33 0472(51)1111
	松田　良一	都立大学理学部発生	158	世田谷区深沢 2−1−1 03(717)0111

氏　名		所　属	住　所
班員	渡辺　武	佐賀医大免疫血清	840-01 佐賀市鍋島町大字鍋島 0952(31)6511
公募班員	奥田　拓道	愛媛大学医学部生化学二	791-02 愛媛県温泉郡重信町 0899(64)5111
顧問	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
	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