

厚生省  
神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症の  
基礎的研究

江橋 班

昭和55年度研究報告書

昭和56年3月

## 研究報告書の作成に当って

厚生省神経疾患研究委託費による「筋ジストロフィー症の基礎的研究」班の第3年目の研究報告集を発刊することになりました。

本年は現在の組織における研究班の最後の年でありまして、研究の一つの区切りであります。過去3年間、現代の基礎医学や生物学を基盤として筋ジストロフィーの病因を理解することをさし当てる目標とし、終局的には本疾患の根本的治療法の確立と根絶とを目ざして努力を続けて参りました。

もとより本疾患は難病中の難病であり、また原疾患を実験的に取扱うのは非常に困難であります。われわれは、原疾患との病像の差が存在することは十分に理解しておりますが、ひとまず筋ジストロフィー鶏を一つの重要な研究材料として、その病態の解明を当面の目標の一つとして参りました。そして各班員およびその協力者はこの面においても顕著な業績を挙げて参りました。しかし未解決の問題がまだ山積していることも事実であり、これらの解決には優れた研究者と研究費と時間が必要であります。

しかしながら過去における研究は報告書に現われた業績以外に、研究の過程を通じて筋ジストロフィー症の研究者としての優れた能力と自覚とを持った中堅研究者を育てて来ており、将来に大きな期待をいだかせるものであります。これらの厚みと質の高さを持った研究者に十分な研究環境が与えられることを希望して、本班のしめくくりとしての第3年目の報告集をお送り致します。

本年度も班会議後わずかの間に報告集をまとめることができました。多忙な中を執筆された班員の方々に感謝します。終りに本委託金の取扱いに色々とお骨折り下さった厚生省医務局療養所課、国立武蔵療養所、日本筋ジストロフィー協会の各位に御礼申し上げます。

昭和56年3月

班長 江橋 節郎

# 目 次

## I Whole Animal

1. 下垂体性小人症遺伝子 (dw) による  
筋ジストロフィー症遺伝子 (dy) の潜在化 (マウス) ..... 3  
戸 塚 武
2. ジストロフィー筋肉のヌードマウスへの  
異種移植に関する研究 ..... 10  
寺 尾 寿 夫
3. ジストロフィーおよび正常チキンにおける  
長桡側手根伸筋の交換移植 ..... 16  
大 塚 正 徳

## II 細胞培養

4. 筋細胞の異所的 Ectopic な発生 ..... 23  
岡 田 節 人
5. 遺伝子挿入細胞の選別に関する新しい試み ..... 26  
岡 田 善 雄
6. 組織培養法による筋ジストロフィー症の研究 ..... 29  
米 沢 猛
7. 正常及び筋ジストロフィーマウス再生筋細胞の分裂能の比較 ..... 34  
香 川 務
8. 培養骨格筋における活動電位の発達に關与する  
神経性因子について ..... 40  
加 濃 正 明

9. 培養筋細胞の成長に及ぼす各種血清の作用について ..... 45  
小 沢 鎧二郎

### Ⅲ 微 細 形 態

10. チキン骨格筋筋細胞膜の凍結切断像 ..... 53  
岩 崎 祐 三
11. ニワトリ筋の微細形態上の多様性 ..... 59  
石 川 春 律
12. 心筋および骨格筋における筋調節蛋白質の分化 ..... 65  
嶋 田 裕
13. 幼若筋ジストロフィーチキン胸筋の抗トロポニン染色 ..... 71  
大 槻 磐 男

### Ⅳ 生 理 学

14. 筋の生理学的性質の発生的研究 ..... 79  
高 橋 国太郎
15. 筋ジストロフィー鶏骨格筋 skinned fiber の短縮速度 ..... 84  
遠 藤 実
16. 培養法による鶏ジストロフィー筋の電気生理的,  
形態的及び代謝的特性について ..... 89  
堀 田 健
17. Myotonia ラットにおける筋細胞膜と  
神経筋伝達の性質について ..... 97  
栗 山 潤

## V 生 化 学

18. ジストロフィー鶏筋における蛋白合成能上昇の機構について ..... 103  
真 崎 知 生
19. 幼若筋及び筋ジストロフィー筋の筋蛋白質についての研究 ..... 108  
大日方 昂
20. ジストロフィー鶏筋の構造蛋白 ..... 114  
野々村 禎 昭
21. ラットミオシン分化に対する神経の影響 ..... 124  
杉 田 秀 夫
22. 筋肉の弾性蛋白質コネクチン ..... 131  
丸 山 工 作
23. ジストロフィー成鶏胸筋小胞体膜の  
Ca<sup>2+</sup> 取り込み能と, その膜構成について ..... 136  
酒 井 敏 夫
24. 筋ジス・マウスの中樞神経組織における  
ミエリン局在酵素 (CEHおよびCNP) 活性の日令変化 ..... 144  
松 下 宏

## VI 蛋白分解酵素

25. カテプシンBによる筋蛋白分解の  
蛋白化学的ならびに形態学的研究 ..... 153  
勝 沼 信 彦
26. 筋ジスニワトリおよびマウス筋肉内の  
各種酵素活性の対比 ..... 159  
青 柳 高 明

27. 筋組織の中性プロテアーゼに関する研究 .....	166
高橋健治	
28. カルシウム依存性中性プロテアーゼ (CAMP) に 対する $\text{Ca}^{2+}$ の役割 .....	172
今堀和友	
29. 筋蛋白質代謝回転に及ぼす蛋白質分解酵素阻害剤の影響 .....	177
江橋節郎	

## I Whole Animal

- 1 下垂体性小人症遺伝子 (dw) による  
筋ジストロフィー症遺伝子 (dy) の潜在化 (マウス) 3
- 2 ジストロフィー筋肉のヌードマウスへの異種移植に関する研究 10
- 3 ジストロフィーおよび正常チキンにおける長橈側手根伸筋の交換移植 16

# 1 下垂体性小人症遺伝子(dw)による筋ジストロフィー症遺伝子(dy)の潜在化(マウス)

戸塚 武\*

研究協力者 渡辺 貴美\* 清野 茂博\*

筋ジストロフィー症(dy)マウスで、重症の後肢と軽症の前肢を比較研究することは、dy症の発生機構の解明のための重要な手掛りを与えてくれるだろうと考え、一連の研究を行ってきた。外見上正常にみえる前肢も耐久力は弱っていること<sup>1)</sup>、前肢筋を生化学的に調べたところ後肢筋<sup>2,3)</sup>とほとんど同様に異常であること<sup>4,5)</sup>、後肢の骨は急成長するの

に前肢の骨の成長は緩やかで小さい<sup>6)</sup>(正常マウスでも)こと、などを明らかにした。また、前肢筋、後肢筋とも1月齢頃を境に成長が停止してしまい、後肢筋でみるかぎりそれは筋細胞の肥大伸長成長が停止するためであることが分かった。これらの結果から、マウスのdy症の発生機構に関して図1のような作業仮説を提唱した。

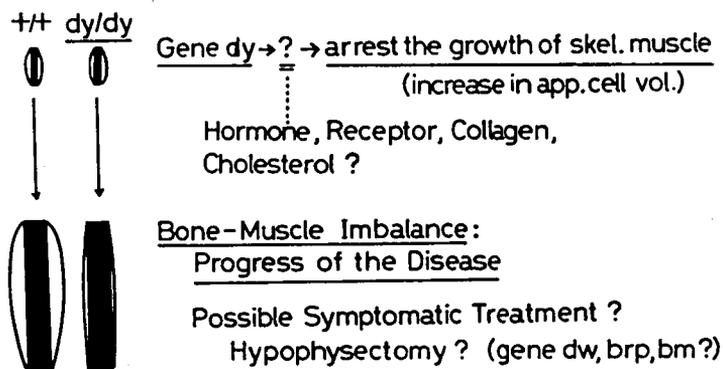


図1 筋ジストロフィー症マウスの発症機構に関する作業仮説。

本研究では、dyマウスの自発運動、前肢筋の組織像、下垂体機能(成長促進に関する)、がどうかであるか、また、下垂体性小人症遺伝子(dw)を導入してdyマウスの成長を停止させることでdy症状を緩和できるか、を調べた。

## 材料と方法

dyマウス(C57BL/6J-dyのdy/dy個体)、dwマウス(DW/Jのdw/dw個体)、両株の雑種第2代のマウスを用いた。自発運動は、Animex(type S)で行った(10分毎のカウント数を連続48時間記録)。組織検索は、摘出筋(前肢triceps、後肢biceps)のパラフィン連続切片(厚さ7 $\mu$ )を1枚おきにHE、Azan染色し、光学顕微鏡(直接倍率:×200)で行った。dyマウスの下垂体機能検査として、摘出した下垂体を生理食塩水中

\*愛知県心身障害者コロニー、発達障害研究所

でホモジナイズ(ガラス-テフロン)し、成長停止後のdwマウス(体重、尾長からみて10-15日齢の正常マウスに匹適)に投与(腹腔内、隔日)し、dwマウスに対する成長促進効果、成長したdwマウスの運動能力、を調べた。

## 結 果

### 自発運動

2-3月齢の雄dyマウス(後肢はほとんど麻痺)も正常対照マウスと同様に、明期(6-18時)に低く暗期(18-翌朝6時)に高い自発運動の日周パターンを示した(図2A)。各個体の明期と暗期の総

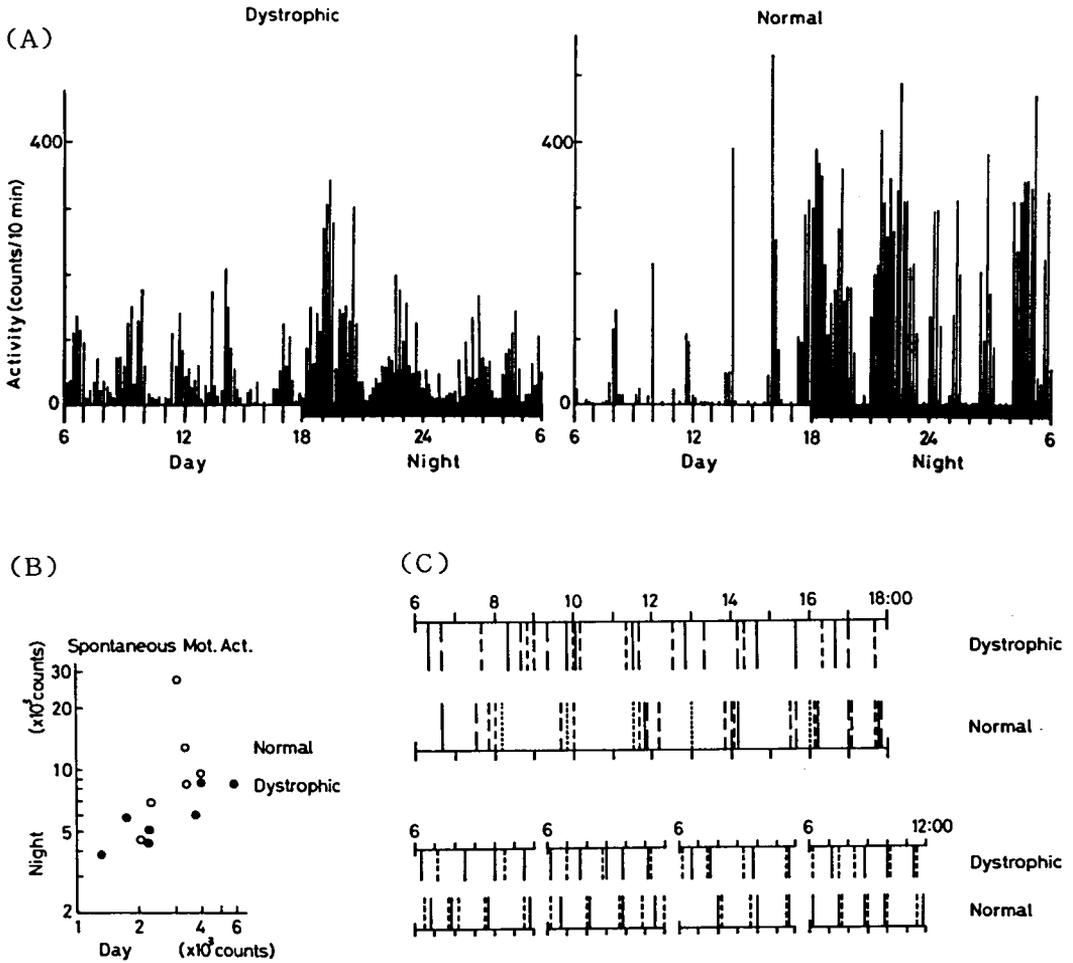


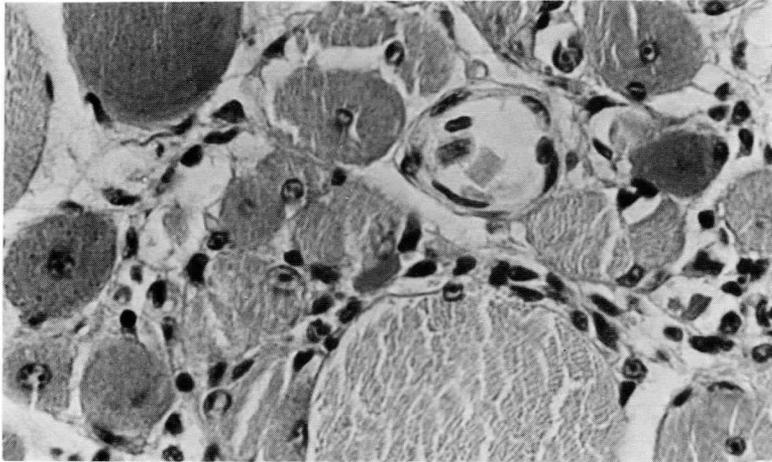
図2 2-3月齢の筋ジストロフィー症マウスの自発運動。  
A: 日周パターン(典型例)。B: 昼と夜の運動量の関係。  
C: 運動のピーク時の、個体(上)、日(下)による変動。

運動量の関係は図2 Bのようになった。これから分かるように、dyマウスの自発運動活性は、対照マウスに比べてそれほど際立った低下をしていなくて、症状のひどさを考えると予想外によく保持されていた。ただ図2 Aでも一部みられるように、dyマウスのパターンは、活動期と静止期の区別がはっきりしない傾向を示した。実際、明期における運動のピーク時を調べたところ、対照マウスではきれいな約2時間毎の周期性がみられたのに、dyマウスではそれがかなり乱れていた。このことは、個体によっても(図2 C, 上)、日によっても(図2 C, 下)、同様であった。dyマウスは集中的持続的運動をしないためであると考えられ、実際10分間の最高カウント数をもても、明期、暗期ともdyマウスの値は対照マ

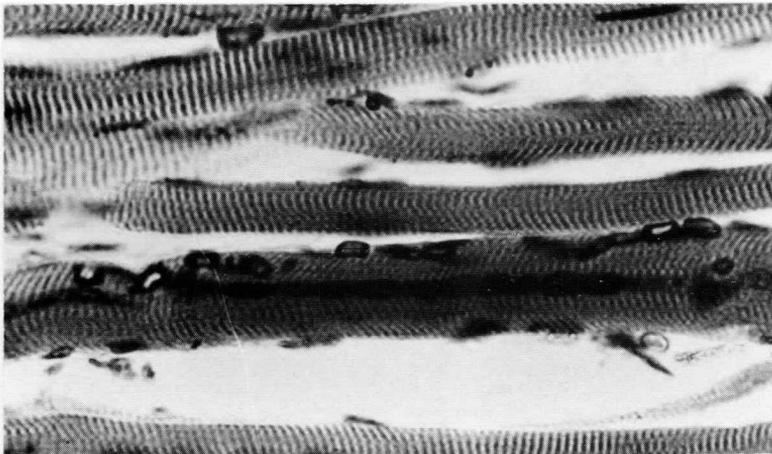
ウスの値の6割くらいに低下していた。

#### 前肢筋の組織所見

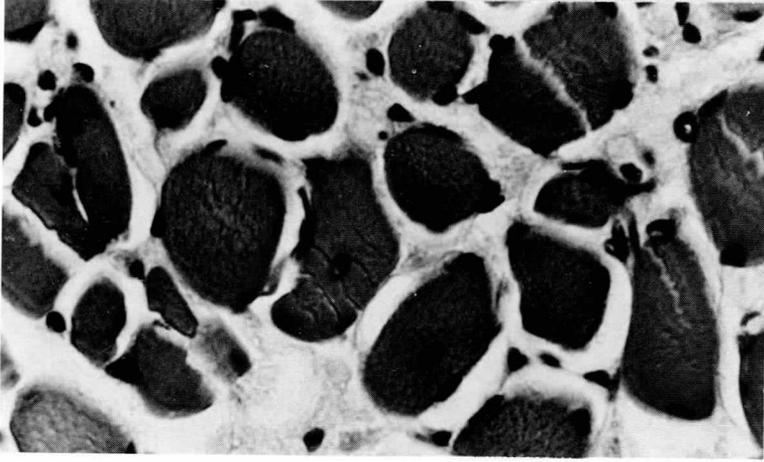
dyマウスの後肢筋の組織像において筋細胞の大小不同、中心核、変性細胞、結合織と脂肪織の浸潤、などが観察されることは、多くの研究報告により明らかにされてきた。そこでまず、あまり報告のない1月齢以前の発症初期(発症は2週齢頃)のdyマウスの後肢筋を調べてみたところ、3月齢くらいのものに比べると軽度ではあるけれど、同様な異常像が部分的に認められた。つぎにdyマウスの前肢筋の組織検索をしたところ、前肢筋の組織像は、時期的にみても、程度からみても、後肢筋でみられるのと同様に異常であった(図3)。Azan染色では、異常に多い線維組織の存在を認め、しかも、筋細胞の



A: 3月齢  
(横断)



B: 1月齢  
(縦断)



C : 0.5 月 齡  
(横 断)

図 3 筋ジストロフィー症マウスの前肢筋の光顕像。

周囲でも肥厚した線維像(前、後肢筋とも)を認めた。このような組織像は、0.5月齢のdyマウスでも軽度ながら認められた。

#### dyマウスの下垂体投与によるdwマウスの成長

下垂体投与開始後8日目頃から実験群(dyマウスの下垂体投与)、対照群とも成長が始まった。図4

は、両群(各2匹のdwマウス)の体重尾長間相対成長曲線である。実験群、対照群ともほぼ同様な成長性を示した。50日間程で成長が止まったため、注射を中止した。その後7月齢の時点で金網登りテスト<sup>8)</sup>によって運動能力を調べた(対照群2匹のうち1匹は6月齢で死亡した)ところ、実験群の運動能力も

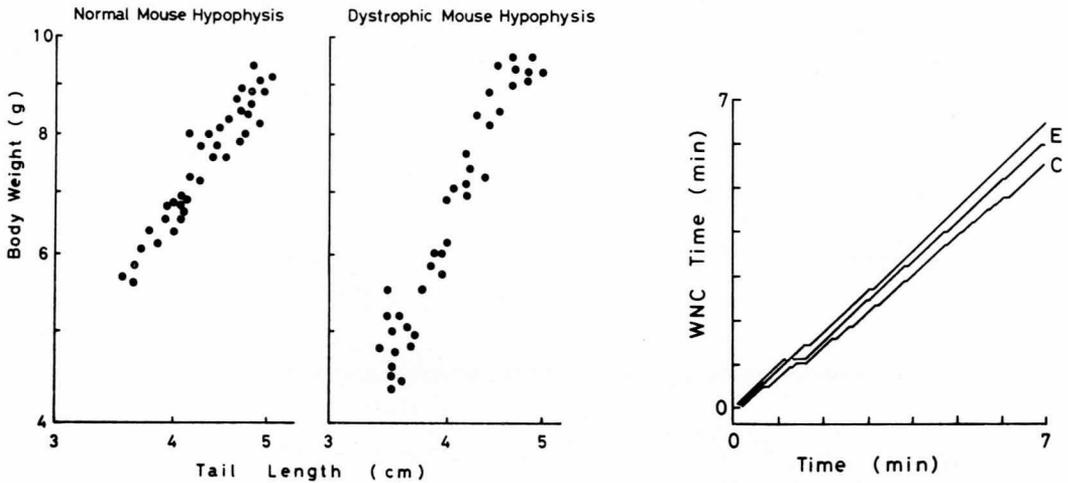
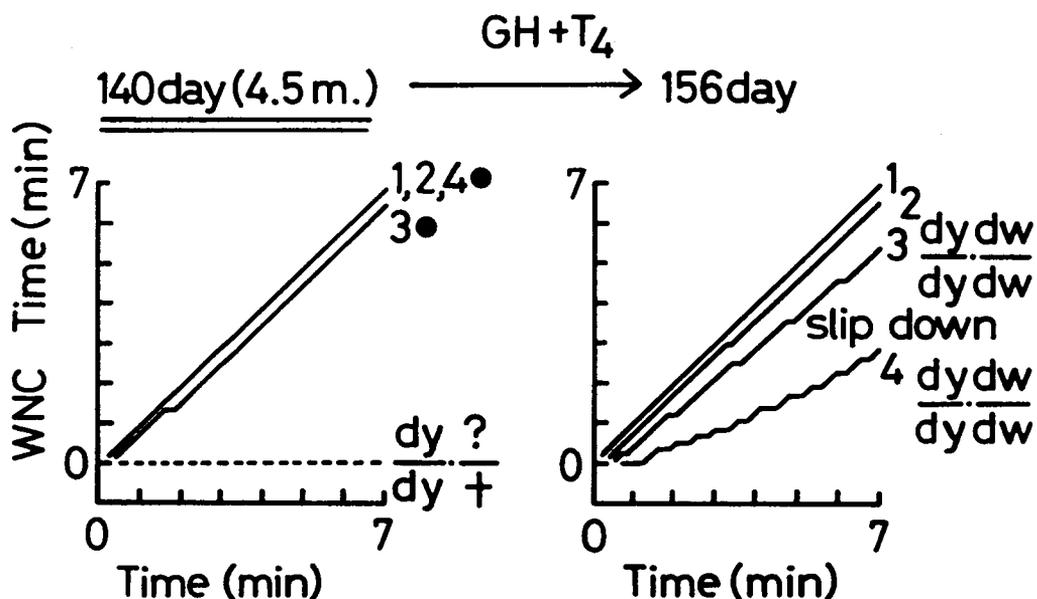


図 4 筋ジストロフィー症マウスの下垂体投与による下垂性小人症マウスの成長(左)と成長後の小人症マウスの金網登り能力(右: E, 実験群)。WNC Time: 金網登りの累積時間。

ほぼ正常であった(dyマウスでは1月齢を境に急激に金網登り能力を失う)。テスト後、脳湿重、後肢筋湿重、脛骨長を測定した。対照マウスの体重(10.5 g)、脳湿重(0.322 g)、筋湿重(1後肢あたり0.209 g)、脛骨長(1.30 cm)と比べて、実験群の体重(10.6と11.0 g)、脳湿重(0.312と0.329 g)、筋湿重(0.246と0.213 g)、脛骨長(1.30と1.27 cm)に特に異常は認められなかった。脛骨長の三乗に対する後肢筋湿重も、実験群で112と104 (mg/cm<sup>3</sup>)となり、ほぼ正常であった(重症のdyマウスでは40mg/cm<sup>3</sup>くらい)。

dy-dwマウスにおけるdy症状の潜在化

dyとdwの両遺伝子をヘテロに持つ個体(dy/+・dw/+)同志を交配したところ、表現型的に正常な個体、dy個体、dw個体が生まれた。dy-dw個体(dy/dy・dw/dw)も出現するはず(理論的には1/16の確率で)なのに、それらしい個体は1匹もみつからなかった(5匹の母獣、計10回出産の結果)。金網登りテストでも、測定した全個体(dy個体を除いて)がほぼ正常な運動能力をもっていた(図5)。ただ、dw個体の一部に、加齢とともに眼に異常(dyマウスの特徴の1つ)が現われてくるものがあり、



No.		B.Wt.		B.Wt.	Hindleg Muscle
1	f	7.6 g		11.5 g	0.26 g / leg
2	f	9.1		11.8	0.30
3	m	8.3	→	11.9	0.21
4	f	8.3	→	10.9	0.22

**Dystrophic**

図5 重複疾患マウス(筋ジストロフィー症,下垂体性小人症)の金網登り能力。4.5月齢でもほぼ正常であった(左図:黒丸印,3と4)が、GHとT4投与で成長するにつれて衰えた(右図)。f, m:雌,雄。

dy-dw 個体が潜在することが予想された。実際このことは、以下の実験によって証明された。<sup>11)</sup> ウンGH (約100 μg/回)とT<sub>4</sub> (約10 μg/回)をdw個体 (体重約8 g)の腹腔内に投与した (隔日, 20日間程)。注射開始後数日して成長が始まり、さらに数日して体重が10 gを越える頃になって、一部の個体で後肢のひきずり症状が出現し、金網登り能力も低下した (図5)。このことから、典型的なdy症状のない見掛け上dw個体と思われるものの中に、たしかにdy-dw個体がいることが明らかとなった。現在までに、5匹のdy-dw個体を観察した。

### 考 察

耐久力が弱っているとはいえ、外見上も、自発運動でも、一応の機能を果している前肢で、筋異常は重症の後肢とほとんど同様であることが、組織学的にも確かめられた。我々は、前肢の骨の伸長成長が後肢の骨の伸長成長に比べて際立って低い (正常マウスでも) ことが前肢の軽症の原因であり、骨の伸長成長を止めてやればdyマウス後肢の症状も前肢なりに軽くなるだろうと考えた。実際、骨を含めて体全体の成長をdw遺伝子で止めてやることにより、典型的なdy症状が後肢でも出現しないdy-dwマウスを作出することができた。dw遺伝子かわりに、下垂体切除を行うことも考えられる。しかし、症状が抑えられたとしても、いずれの場合もマウスの健康状態は比較的悪く短命である (dwマウスの寿命約6カ月) ことが予想されるので、GHやT<sub>4</sub>の一時的投与による健康維持の方法を今後考える必要がある。骨の伸長成長を特異的にしかも適度に抑制することがもっとも良いだろうと考え、現在dy-bmマウスとdy-brpマウス (bm, 短型症: brp, 短脚症) の作出を行っている (骨の成長を特異的に抑制する薬物は見あたらない: CB-154は試してみる必要がありそうである)。

若いdyマウスの前肢筋、後肢筋において線維組織が異常に多く、しかも筋細胞の周囲でも肥厚した線維組織像が認められた (図3C)。生化学的にも、後肢の発症時すでに前肢筋でもコラーゲンが異常に

高濃度に含まれることが分かっている。<sup>5)</sup> これらは、罹患後肢筋において観察された筋細胞の肥大伸長阻害が、結合織の異常増殖による可能性も考えられることを示唆している。

dyマウスで、動物の成長を司る下垂体の発育が悪く、<sup>12)</sup> しかも下垂体中のGH含量が相対的に低いけれども、GHとT<sub>4</sub>の大量投与でもdyマウスの症状を軽減することはできなかった。<sup>13)</sup> 本研究では、dyマウスの下垂体を投与することで、dwマウスをほぼ正常に成長させることができた。これらのことから、dyマウスの発症機構において、下垂体機能 (成長に関する) 異常の直接的関与はないだろうことが示唆された。ただ、筋側のGHレセプターなどに異常のある可能性は考えられる。

### 結 論

- 1) 2-3月齢の筋ジストロフィー症マウス (雄) で、自発運動活性は比較的よく保持されていたけれど、自発運動の周期性に一部乱れが認められた。
- 2) 筋ジストロフィー症マウスで、軽症の前肢の筋の組織所見は、重症の後肢の筋とほぼ同様に (時期的にも) 異常であった。
- 3) 筋ジストロフィー症マウスの下垂体は、正常マウスの下垂体とほぼ同様に、下垂体性小人症マウスを成長させる能力をもっていた。
- 4) 筋ジストロフィー症遺伝子と下垂体性小人症遺伝子をともにホモに持ったマウスを作出した。このようなマウスでは、筋ジストロフィー症は潜在化した。

### 文 献

- 1) 渡辺貴美, 戸塚 武: 筋ジストロフィーハツカネズミ前肢の耐久力の加齢に伴う減衰. 医学と生物学, 99: 171-173. (1979)
- 2) 戸塚 武, 渡辺貴美: 筋ジストロフィーハツカネズミの生後発達に伴う後肢筋中ヒドロキシプロリン含量の変化. 同94: 327-329. (1977)
- 3) 戸塚 武, 渡辺貴美: 筋ジストロフィーハツカネズミの後肢筋における中性プロテアーゼ活性の生後発達に伴う変動. 同97: 235-237. (1978)
- 4) 戸塚 武, 渡辺貴美: 筋ジストロフィーハツカネズミの前肢筋における中性プロテアーゼ活性の生後発達に伴う変動. 同98: 149-152. (1979)

- 5) 渡辺貴美, 戸塚 武:筋ジストロフィーハツカネズミの心臓と前肢筋のコラーゲン含量の生後発達に伴う変動. 同 98 : 257 - 260. (1979)
- 6) 戸塚 武, 渡辺貴美:筋ジストロフィーハツカネズミの病状進行の機構と対症療法の開発に関する一作業仮説. 同 99 : 1 - 5. (1979)
- 7) 渡辺貴美, 戸塚 武:筋ジストロフィーハツカネズミの罹患後肢筋組織細胞の発達障害. 同 93 : 203 - 206. (1976)
- 8) 渡辺貴美, 戸塚 武:筋ジストロフィーハツカネズミの後肢の運動能力を指標とした病状進行の病期分類. 同 95 : 237 - 239. (1977)
- 9) 戸塚 武, 渡辺貴美:遺伝的背景を変えることによる筋ジストロフィー症ハツカネズミの症状の軽減. 同 101 : 41 - 44. (1980)
- 10) 戸塚 武, 渡辺貴美, 吉田 豪:筋ジストロフィーマウスの病状進行の機構について. 昭和53年度本研究班報告書. p 88 - 92. (1979)
- 11) 戸塚 武, 渡辺貴美:筋ジストロフィー症ハツカネズミと下垂体性侏儒症ハツカネズミに対する成長ホルモンとチロキシンの影響. 医学と生物学. 99 : 335 - 337. (1979)
- 12) 戸塚 武, 渡辺貴美:筋ジストロフィー症ハツカネズミと下垂体性侏儒症ハツカネズミの発達障害にみられる類似性. 同 99 : 225 - 227. (1979)
- 13) 渡辺貴美, 戸塚 武:筋ジストロフィー症ハツカネズミ脳下垂体の塩可溶性分画のポリペプチド成分. 同 99 : 317 - 319. (1979)

## 2 ジストロフィー筋肉のヌードマウスへの異種移植に関する研究

<sup>3</sup>H-Thymidine を用いた Autoradiography による研究

寺 尾 寿 夫 \*

研究協力者 大 沢 伸 昭 \*\*

### 目 的

一連の本研究は、ジストロフィーなどの筋肉を、ヌードマウスに異種移植して、その再生を観察したものであるが、再生してきた筋についてみると、光顕を主とする現在までの研究では、ジストロフィー筋からのものと、正常コントロールからのものとは明瞭な差はみられない。しかし、これらの差異については、さらに詳細な観察が必要と思われる。

筋の再生が satellite cell に由来することはよく知られており、これに関しては、幼若な動物での in vivo における研究や、組織培養による in vitro<sup>1-4)</sup>での観察など、多くの研究がある。また、若山ら<sup>5)</sup>は Duchenne 型の筋ジストロフィーの筋で satellite cell の数を数えることにより、これが正常より多いことを報告している。

しかし、成熟したジストロフィー筋を他動物に移植して、再生筋の satellite cell の能力を研究した報告はすくない。

われわれは、ヒトなどのジストロフィー筋の satellite cell の再生能力を autoradiography 法等を用いて研究中であるが、本報告は、まず、正常マウスを用いて homotransplantation を行い、その再生筋の autoradiography を作製して観察したものである。

### 方 法

筋の移植は、広中らの方法<sup>6)</sup>により、ddy マウスの EDL (extensor digitorum longus) を取り去り、この部位に他の ddy マウスの EDL を移植した (homotransplantation)。移植後、2日目と7日目のマウスを用いて実験を行なった。

使用したアイソトープはメチルの位置に <sup>3</sup>H をラベルした thymidine で、これを体重 1 g 当り 5  $\mu$ C 腹腔内に注射した。

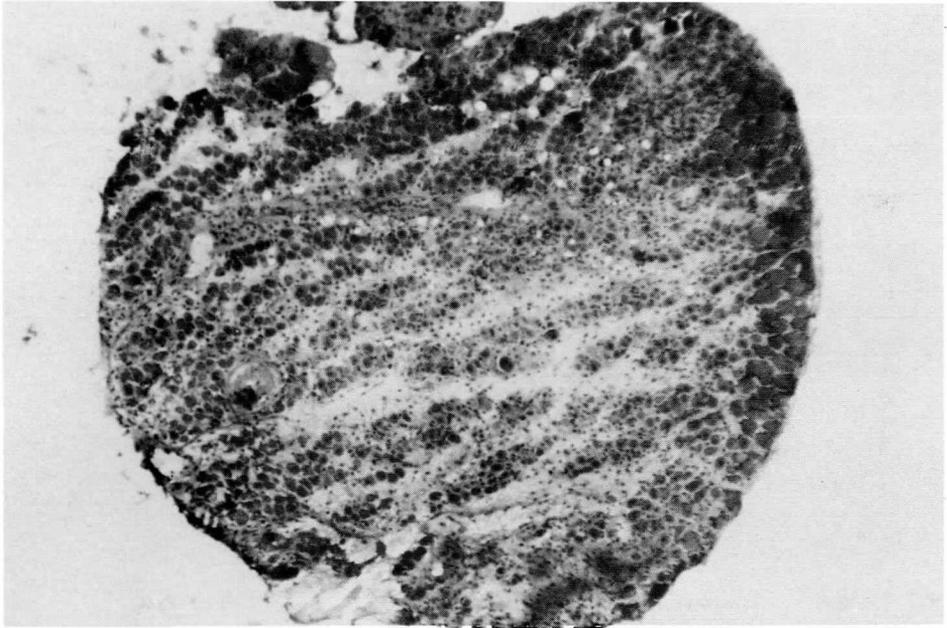
アイソトープ注射 6 時間後に、エーテル麻醉下マウスを sacrifice し、移植筋を取り出し、標本作製後、dipping 法で autoradiography を行なった。露出時間は、2 週間前後とした。また、後染色は H-E を主として行なった。

### 結 果

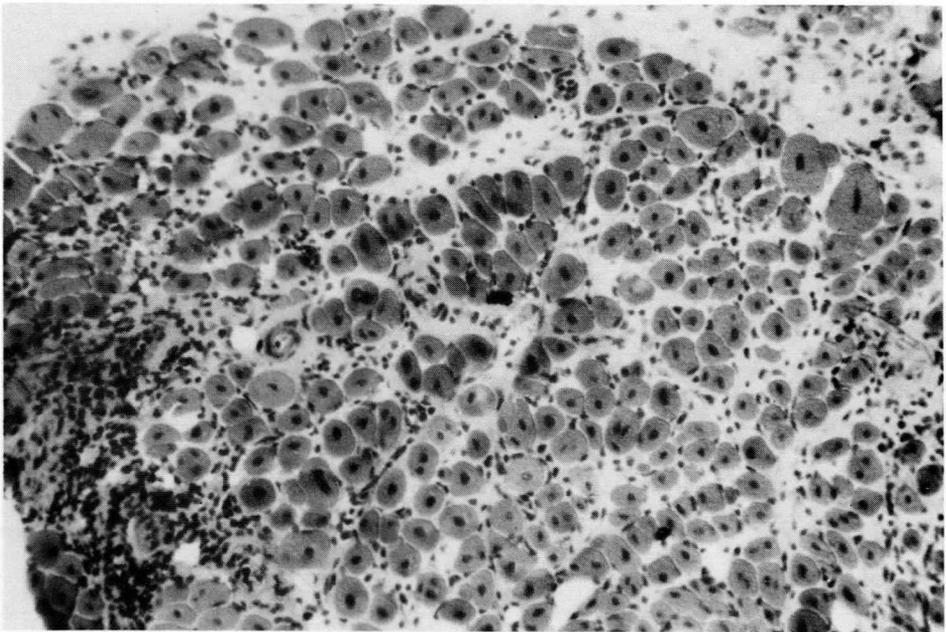
まず、ddy マウスの homotransplantation の場合の筋の再生についてみると、従来報告してきたニワトリの筋の異種移植や minced fragment 法による各種の筋の移植の場合にくらべて、再生はきわめて良好である。第 1 図は EDL 移植後 1 ケ月目のものを示すが、同一方向に揃った筋線維が再生し、結合組織の増殖はすくないのがわかる。また、graft の周辺程、再生が良好で、中心部は空洞または脂肪によって置きかえられている。これらの 1 ケ月目の再生筋線維は、ほとんどが中心核を有している (第 2 図)。

\* 帝京大学医学部第一内科学教室

\*\* 東京大学医学部第三内科学教室



第1図 ddy マウスの EDL の homotransplantation 後1ヶ月目の再生筋（低倍率）。



第2図 ddy マウスの EDL の homotransplantation 後1ヶ月目の再生筋。

しかし、移植後、日の浅い場合には、第3図の移植2日目のH-E染色でみられる様に、移植筋は変性を起し、横紋ははっきりせず、核の膨化がみられる。移植後1週を経ても、graftの中心部では、同様に変性した筋線維がみられるが、周辺部では盛んな筋の再生がみられる。



第3図 ddy マウスの EDL の homotransplantation 後2日目の筋 (H-E染色)。

#### Autoradiography

EDL移植後2日目の筋を取り出し、autoradiographyを作製したものが、第4図である。これにみられるように、横紋は消失し、無構造になった筋線維の周辺の核には $^3\text{H}$ -thymidineによるsilver grainはみられず、わずかにbackground程度のgrainが証明されるのみである。

しかし、移植後、7日を経たものではthymidineの取り込みは全く異なってくる。

Thymidineの取り込みからみると、7日目の移植筋は大体3層に分れている。

#### 1) 外層

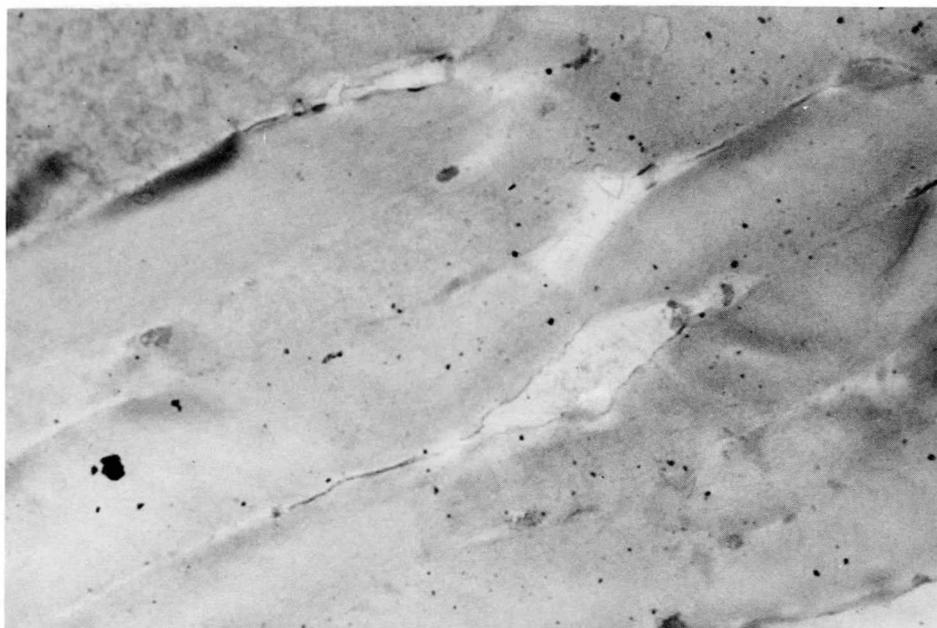
graftの一番外側には $^3\text{H}$ -thymidineを取

このように移植したEDLの中心部の血流を水素クリアランス法を用いて測定すると、移植する前の正常のEDLの血流は100g当り1分間平均86mlであったが、移植直後は0となり、これは徐々に回復し、移植後2日目には約40ml、7日目には約70mlとなる。

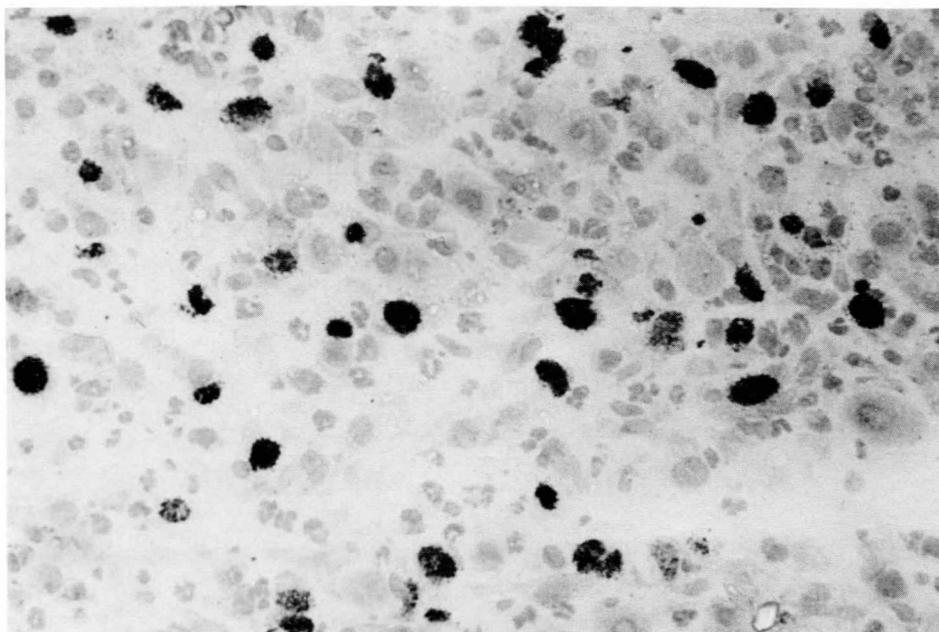
り込んだ多数の核より成る層がある。ここではmyotubeがすでに形成されている。第5図は、この層の多数の $^3\text{H}$ -thymidineを取り込んだ核を示している。この様な核は、macrophage, fibroblast, satellite cellなど種々のものがあると考えられるが、この染色方法ではそれらの区別は出来ない。また、第6図は、この層内の各所に形成されたmyotubeを示すが、この様に新たに形成された鎖状核は、 $^3\text{H}$ -thymidineを全く取り込まず、この時期には核の分裂は起らないことを示している。

#### 2) 中間層

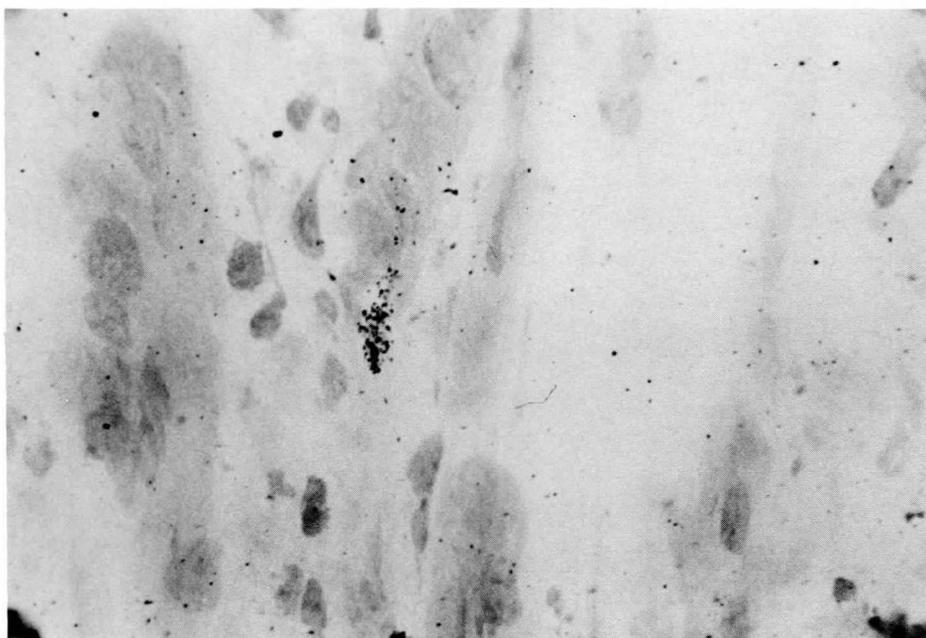
この外側の層の内側では、donorの筋が残ってお



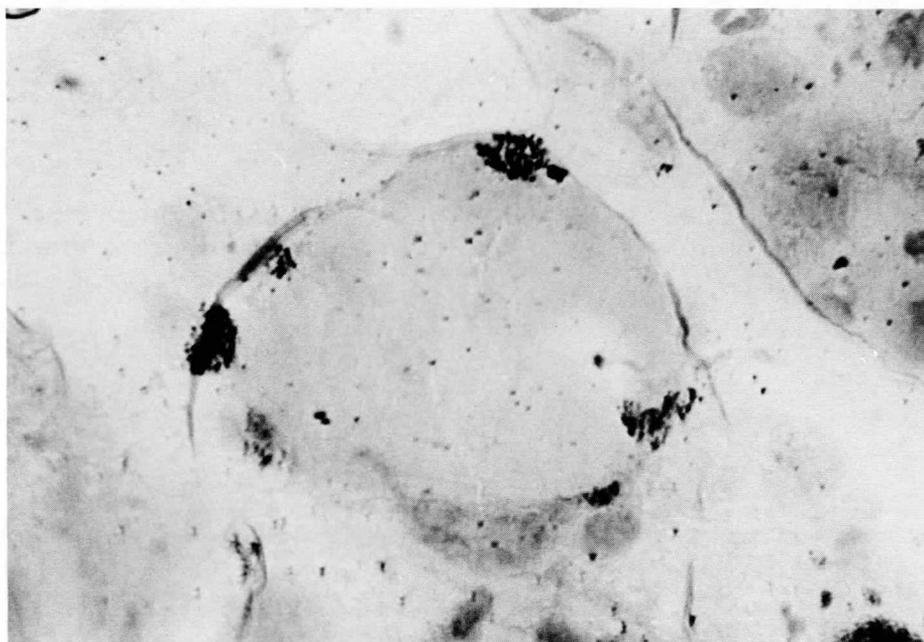
第4図 EDL 移植後2日目の筋の  $^3\text{H}$ -thymidine による autoradiography.



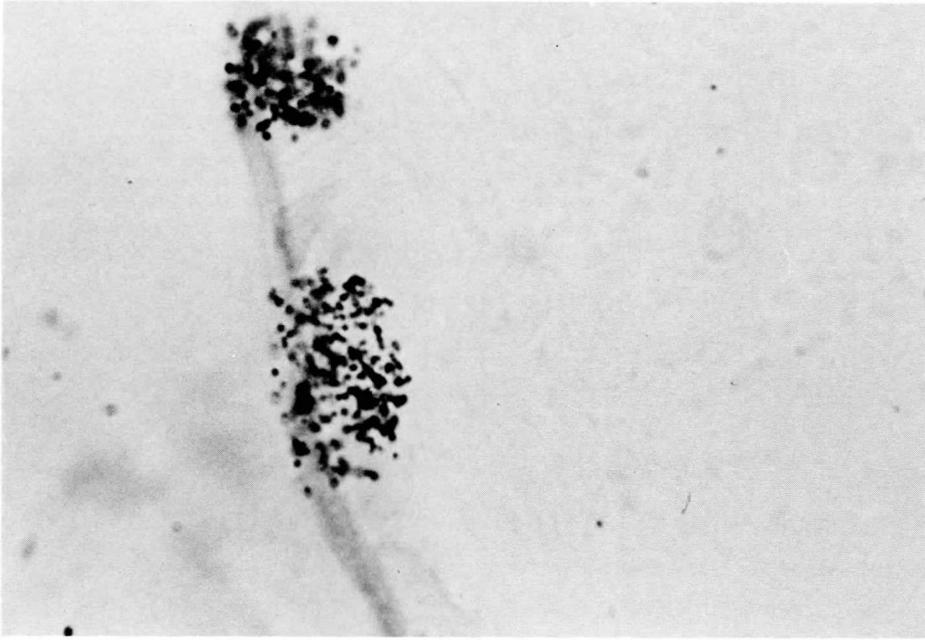
第5図 移植後7日目の筋の外層の autoradiography.  $^3\text{H}$  thymidineを取り込んだ多数の核がみられる。



第6図 移植後7日目の外層の autoradiography myotube の核は  $^3\text{H}$ -thymidine を取り込まない。



第7図 移植後7日目の筋の  $^3\text{H}$ -thymidine による autoradiography (中間層)



第8図 移植後7日目の筋の autoradiography の強拡大。

り、ここでは大部分の核は  $^3\text{H}$ -thymidine を取り込んでいない。しかし、筋線維のなかには、thymidine をいちじるしく取り込んだ核を有するものがある(第7, 第8図)。このうちのあるものは satellite cell と考えられるが、勿論その他のものもある。この区別は顕微鏡で可能という報告もあるが、電顕による観察を行なう方が確実である。

### 3) 内層

これは、graft の最内層、すなわち中心層であり、この中には donor 側の変性した筋線維が多数みられるが、 $^3\text{H}$ -thymidine による grain を有する核はほとんど認められなかった。

## 考 察

EDL の移植筋の再生初期における satellite cell の活性化が、 $\text{O}_2$  の不足によって起るのか、筋の分解物の刺激によるのか、遊走細胞の接触によるのかは明らかでないが、thymidine の uptake は再生の盛んな周辺部ほど強い。この場合、中心部では血流不足により thymidine の濃度の低いこ

とも考えられるが、水素のクリアランス法による血流の測定では、移植7日目では、血流は中心部でもかなり回復を示していた。

今後、これらの thymidine の uptake のいちじるしい核の中から、satellite cell を選んで追求するには電顕またはそれに代る確実な方法が必要と考えられる。

## 文 献

- 1) Snow, M. H.: Origin of regenerating myoblasts in mammalian skeletal muscle. In *Muscle regeneration* (edited by Mauro, A.) Raven Press, New York, 1978, p 91.
- 2) Bischoff, R.: Tissue culture studies on the origin of myogenic cells during muscle regeneration in the rat. *ibid.* p 13.
- 3) Hsu, L. and Trupin, G. L.: The role of satellite cells and myonuclei during myogenesis in vitro. *ibid.* p 115.
- 4) Konigsberg, I. R.: Regeneration of single muscle fibers in culture and in vivo. *ibid.* p 41.
- 5) Wakayama, Y. and Schotland, D. L.: Muscle satellite cell populations in Duchenne dystrophy in muscle regeneration. *ibid.* p 121.
- 6) Hironaka, T. and Miyata, Y.: Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice. *Exp. Neurol.*, 47: 1, 1975.

### 3 ジストロフィーおよび正常チキンにおける 長橈側手根伸筋の交換移植

大塚 正 徳 \*

研究協力者 弘 中 哲 治 \*\* 五十里 良 生 \*\*

宮 田 雄 平 \*

神経と筋の間には trophic な相互作用が存在することを示す多くの実験がある。<sup>1)2)</sup>従ってジストロフィー症に見られる筋および神経における異常所見からだけでは、その原因が筋の中に存在するのかわるいは神経側に存在するのかわるいを結論することはできない。筋ジストロフィーの発症の原因を究明する有力な手段の一つは筋あるいは神経の移植実験である。この移植実験から得られた結果は筋原性を示唆するものと神経原性を示唆するものがあり、ニワトリの筋ジストロフィーに限ってみても前者を思わせるもの<sup>3)-5)</sup>と後者を思わせるもの<sup>6)</sup>に分かれる。この一見矛盾した結果は genetic disorder が両方に存在することに起因しているように思われる。

そこで我々は人の筋ジストロフィー症のモデル実験の立場からその度合をより直接的にあらわすとされる筋の dynamic properties と重量の変化を主な指標にしてより定量的な移植実験を試みた。

先に我々はマウスの長趾伸筋を用いて、ミンスすることなく全筋を二つの個体間で交換移植することができ、再生した筋はドナーの筋の殆んど完全な replica であることを示した。<sup>7)</sup>この実験系をマウスの筋ジストロフィー症の原因の解明に適用し、マウスの筋ジストロフィー症では神経原性の要因がより重要であることを示唆する結果を報告した。<sup>8)9)</sup>この実験方法をニワトリの筋ジストロフィー症に用い、ニワトリの筋ジストロフィーにおける筋収縮の性質

の変化が筋原性であるかまたは神経原性(厳密な意味では筋外性)であるか、あるいはどちらの要因がより重要であるかを明確にする目的で以下の実験を行なった。

本実験で特に留意した点は以下の如くである。

1) 他の筋を傷つけることなく容易に分離できる筋を用いる。2) ホスト側の筋と移植した筋の混同をさけるためにまわりの筋となるべく分離した筋を使用する。3) 移植筋の収縮を in situ で測定するのを容易にするために神経および血管がなるべく近位端より侵入している筋を用いる。4) 移植筋への神経の再支配を図る。一定期間内に全筋への神経再支配を成立させるためになるべく小さな筋を使用する。5) より定量的に再生筋を得るために、また周囲組織との癒着を妨げる目的でミンスしないで筋を移植する (cf. Hironaka & Miyata, 1973a)。

これらの条件を満たすものとして生後2~3日目のヒヨコの長橈側手根伸筋 (ECRL) を移植筋として選んだ。

#### 方 法

孵化後2~3日目のヒヨコをアトロピンで前処置した後エーテルで麻酔し、背位で羽根を固定、実体顕微鏡下に ECRL 筋を露出した。ECRL 筋に侵入する神経をなるべく筋に近い所で切断した後全筋をとり出し、他のヒヨコのそれと交換して移植筋が一定の張力を保った状態で両端を固定した。手術は無菌的に行なった。

\* 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

移植後60~65日目に、アトロピン前処置(100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i. p.)後、酸素吸入下にエーテル麻酔を行ない等尺性筋収縮をオッシロスコープ上に観察し、X-Yレコーダーに記録した。麻酔の深度は眼球運動の停止と一定の呼吸運動を目安に調節した。背位に固定したニワトリの皮膚を切り開きこの皮膚を用いてパラフィンプールをつくり筋の温度を41~42°Cに保った。

筋および神経の刺激には白金電極を用い、twitch tension には持続0.5 msec で supramaximal の強度の矩形波刺激を与え、tetanus tension には上記パルスをも100 cps の頻度で200 msecの間与えた。

収縮を観察した後、筋重量を測定し、すみやかに凍結して組織化学的検策に供した後、ホルマリンで固定、HE染色を行ない筋の横断面積の測定に用い

た。神経支配の成立は神経刺激による収縮あるいはコリンエステラーゼ活性の組織化学的証明により確認した。

### 結 果

非移植ECRL筋の性質: 移植に用いたECRL筋の移植前の重量は正常のヒヨコで  $10.2 \pm 0.54\text{mg}$  (mean  $\pm$  SEM,  $n=15$ ), ジストロフィーのヒヨコでは  $10.3 \pm 0.48\text{mg}$  ( $n=17$ ) であった。これらの値の間には統計上の有意差は見られなかった。術後60~65日目の正常チキンの非移植ECRL筋の重量は  $1040 \pm 28.8\text{mg}$  ( $n=21$ ), ジストロフィーチキンのそれは  $1104 \pm 36.8\text{mg}$  ( $n=33$ ) であり、ジストロフィー筋はやや肥大の傾向を示したが、有意差はなかった。

術後60~65日目に相当する非移植ECRL筋の収

表1 正常およびジストロフィーチキン非移植ECRL筋の収縮の性質

	Twitch tension (kg/cm <sup>2</sup> )	Tetanic tension (kg/cm <sup>2</sup> )	$\frac{\text{Twitch}}{\text{Tetanus}}$	CT (msec)	1/2RT (msec)	P <sub>N</sub> /P <sub>M</sub>
Normal	1.14 $\pm 0.183$	3.14 $\pm 0.253$	0.38 $\pm 0.074$	29 $\pm 2.0$	20 $\pm 2.3$	0.96 $\pm 0.023$
n	8	8	7	8	8	8
Dystrophy	0.44 $\pm 0.051$	1.63 $\pm 0.140$	0.27 $\pm 0.018$	27 $\pm 1.2$	18 $\pm 1.5$	1.01 $\pm 0.032$
n	6	6	6	7	7	7

術後60日~65日目 P<sub>N</sub>は神経刺激による収縮, P<sub>M</sub>は筋直接刺激による収縮, nは例数を示す。CT: contraction time, 1/2 RT: half relaxation time.

縮の性質は表1にまとめてある。ジストロフィーチキンの twitch tension は正常の約40%であり、tetanus tension は約50%であった。Twitch-tetanus ratio はジストロフィーチキンがよ

り小さい値を示した。一方contraction time (CT)およびhalf relaxation time (1/2 RT)は両者で有意差を認めなかった。またP<sub>N</sub>/P<sub>M</sub>がジストロフィーチキンではほぼ1に近い値を示

し機能的には除神経が存在しないことが示唆された。この事実はマウスのジストロフィーではPn/Pmは<sup>9)</sup>著明な減少を示したことと対照的であった。

移植ECRL筋の性質：表2は移植筋の重量に関する結果をまとめたものである。ホストが正常の場合約60%において移植に成功したがジストロフィーの場合は約40%であった。移植に成功した例についての筋重量の平均値もホストが正常である場合は、よりよい成績を示し、ドナー筋が正常であるかジストロフィーであるかは結果にあまり差を与えなかった。

移植ECRL筋の収縮力は非移植ECRL筋のそれにくらべいずれの場合も小さい値を示したが(表1, 3), twitch tension, tetanus tension, twitch-tetanus ratioともにホストが正常であるかジストロフィーであるかにより大きな差を生じ、ドナーの筋の違いによってはあまり差を生じないという結果であった。一方CT, 1/2 RTでは非移植筋のそれにくらべ、平均的には、やや速くなる傾向を示したが、移植筋のタイプの違いによる系統的な差は見られなかった。

表2 筋重量に対する移植の影響

Type of transplanta-tion	Number of operation	Survival rate of muscle 60-65 days after operation (%)	Muscle weight for successful transplant (mg)
Nn	19	58	444 ± 99.8 n=11
Nd	25	60	344 ± 72.9 n=15
Dn	25	36	241 ± 81.0 n=9
Dd	19	37	235 ± 62.7 n=7
			mean ± S.E.

術後60~65日目 Nn, Nd, Dn, Dd: N, Dはそれぞれ正常, ジストロフィーのホストを示し, n, dはドナーを示す。

### 考 察

表2の移植筋重量に関する結果および表3の移植筋の収縮の性質に関する結果はニトリのジストロフィー症においても筋外性の要因が重要であることを示唆している。筋重量に関するデータは筋原性要因を示唆する他の移植実験<sup>3)</sup>と異なるものであるが、両実験には扱った筋(3)は胸筋)と移植の方法に違

いがある。ミンスして移植する方法では筋の再生能が強調された結果になるように思われる。人の筋ジストロフィー症のモデル実験としてはある程度出来上った筋が維持されていく過程を追求することがより重要であろう。

機能的な立場から表3に示された収縮力を減弱させる筋外性の要因がジストロフィーのホスト側に存

表3 移植 ECRL筋の収縮の性質

Type of muscle	Twitch tension (g/cm <sup>2</sup> )	Tetanic tension	$\frac{\text{Twitch}}{\text{Tetanus}}$	CT	1/2RT (msec)
n = 7					
Nn	45 ±19.4	150 ±49.1	0.35 ±0.003	24 ±1.7	18 ±0.7
Nd	83 ±34.3	247 ±82.8	0.34 ±0.020	26 ±1.2	16 ±1.1
Dn	15 ±5.3	62 ±19.9	0.23 ±0.046	24 ±2.8	19 ±1.6
Dd	17 ±6.6	55 ±23.0	0.25 ±0.051	26 ±2.3	20 ±3.6

術後60~65日目 Nn, Nd, Dn, Dd : N, Dはそれぞれ正常, ジストロフィーのホストを示し, n, dはドナーを示す。

在する事実は興味あることであろう。この筋外性の要因は、ジストロフィーチキンの非移植 ECRL筋で除神経はないが収縮力が低下している事実(表1)から、何らかの神経に由来する因子の欠損が示唆される。ジストロフィーの筋が正常のホストで正常の筋と殆んど同じ性質を獲得することから(表2, 3), ジストロフィーの筋が神経性の調節に適切に反応<sup>5)</sup>出来ないとする考えは本実験で扱ったパラメータに関するかぎりあてはまらないようである。

## 文 献

- 1) Gutmann, E. (1962). "The Denervated Muscle" Czech. Acad. Sci. Prague.
- 2) Guth L. (1968). Trophic influences of nerve on muscle. *Physiol. Rev.* 48: 645-687.
- 3) Cosmos, E. and Butler, J. (1972). Differentiation of muscle transplanted between normal and dystrophic chickens. in "Research in Muscle Development and the Muscle Spindle" eds. B. Q. Banker, R.J. Przybylski, J.P. Van der Meulen, and M. Victor, pp. 149-162, Excerpta Medica, Amsterdam.
- 4) Linkhart, T.A., Yee, G.W. and Wilson, B.W. (1975). Myogenic defect in acetylcholinesterase regulation in muscular dystrophy of the chicken. *Science* 14: 549-551.
- 5) Linkhart, T.A., Yee, G.W., Nieberg, P.S. and Wilson, B. W. (1976). Myogenic defect in muscular dystrophy of the chicken. *Developmental Biol.* 48: 447-457.
- 6) Rathbone, M.P., Stewart, P.A. and Vetrano, F. (1975). Dystrophic spinal cord transplants induce abnormal thymidine kinase activity in normal muscles. *Science* 189: 1106-1107.
- 7) Hironaka, T. and Miyata, Y. (1973a). Transplantation of an entire muscle in mice. *Experientia* 29: 1584-1568.
- 8) Hironaka, T. and Miyata, Y. (1973b). Muscle transplantation in the aetiological elucidation of murine muscular dystrophy. *Nature* 244: 221-223.
- 9) Hironaka, T. and Miyata, Y. (1975). Transplantation of skeletal muscle in normal and dystrophic mice. *Exp. Neurol.* 47: 1-15.
- 10) Karnovsky, M.J. and Roots, L. (1964). A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 219-221.

## Ⅱ 細胞培養

- 4 筋細胞の異所的 Ectopic な発生 23
- 5 遺伝子挿入細胞の選別に関する新しい試み 26
- 6 組織培養法による筋ジストロフィー症の研究 29
- 7 正常及び筋ジストロフィーマウス再生筋細胞の分裂能の比較 34
- 8 培養骨格筋における活動電位の発達に関与する神経性因子について 40
- 9 培養筋細胞の成長に及ぼす各種血清の作用について 45

## 4 筋細胞の異所的 Ectopic な発生

### 培養ラット松果体からの筋分化

岡田 節人\*

研究協力者 渡辺 憲二\*\* 青山 裕彦\*\*

ある組織・器官の中に、全く別の機能をもった細胞が予想外に発生してくる場合がときおり報告されるが、このような場合をいうのに、ある細胞が「異所的 ectopic」に発生した、と表現する。例えば、ヒトの肺癌などに内分泌機能をもった細胞が出現するという、思いがけない事例があり、これらは「異所性ホルモン産生」と呼ばれて病理学上の注目を惹いている。筋肉細胞が、全く予想外の場所に分化する例として、こゝでは松果体という内分泌器官の細胞培養で分化してくる例を報告し、その意味を考察する。<sup>1)</sup>

#### 材料と方法

材料はラット新生児である。松果体を注意深く摘出し、それらをコラゲナーゼで処理してから、実体けんび鏡下で、松果体茎、被膜をきれいに除去する。残った純粋な松果体は、組織観察によると殆んどが単一タイプの細胞の均一な集団からなっている。これらを、コラゲナーゼとトリプシンの混合液で約30分間処理してから、ピペティングによって細胞けんだく液とちる。

培養は、ファルコン・プラスチック・ペトリ皿を用い、培地は6%牛胎児血清を含むイーグルMEMである。37℃、5%CO<sub>2</sub>-95%空気の下で約20日間培養を行ない、その間で起こる変化を日々観察を続ける。その途次に、ある特別なタイプの集団が出現しているような場所があれば、ペトリ

皿のうら側からマーカー・ペンによってマークし、これらのマークされた部域内で起こるその後の変化を記録していった。

20日間以上経過した培養は、ブアン液で固定して光学けんび鏡の観察に供する。またある培養は、電子けんび鏡観察用に固定・包埋し、培養底面と平行の方向に超薄切片を製作して電子けんび鏡によって観察した。

#### 結 果

ペトリ皿にまいた細胞のうち、約50%が、24時間以内に培養基質に接着する。以後の観察はこれらの細胞についてのみ行なわれることとなる。接着した細胞は直ちに扁平となり、上皮細胞様の形状を呈する。

2-3日後には、明らかに区別できる2つのタイプの細胞が認められる。第一のタイプは著しく扁平であって、培養基質に直接に接着しているものである。かなり大形の細胞であって、お互いがかなり密に接触している個所もある。しかし、隣りの細胞とへだたった、細胞の free な細胞縁からは、このタイプの細胞に特徴的な毛様の突起を出している。これら毛様突起の形状、それらが突出してくる細胞表面での位置は刻々と変化している。

第2のタイプの細胞は、第1のタイプのものよりはずっと小形である。形状は球形であって、直接培養基質に接着することなく、第一のタイプの扁平細胞の上ののっかっている。これらの球形細胞の中には小油滴を含むものがある。

\* 京都大学理学部

\*\* 福井医科大学解剖学教室

培養後2週間を経ると、あらたに2つのタイプの顕著な細胞の分化がある。その一つは横紋筋繊維であって、これは第一のタイプである扁平細胞から由来するらしい。図1A, Bに示すようにこれらは典型的な筋繊維の構造を備えている。筋繊維は培養皿の中で、島を作って出現し、そこでは束状・格子状に分布していて、刺戟によって不規則な収縮を繰返した。

もう一つの分化した細胞タイプは、双極性の神経細胞である。これは、培養初期に出現する2つの細胞タイプのうちの第2のもの、つまり球形の小形細胞から由来するらしいことが、連続観察によって判っている。これらの神経様の細胞は集合して、細胞体がロゼット様の構造を作っていることが多い。そして各細胞間は、ノイロンと思われる長い突起で互いに連絡している。

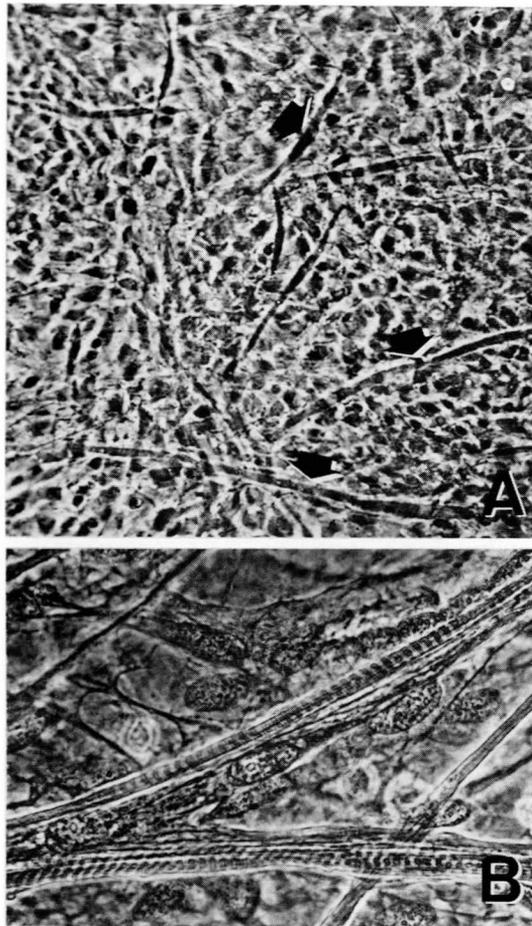


図1 A. 松果体細胞を14日間培養したもの。培養中の生細胞の位相差顕微鏡写真。×160。発達した筋繊維が見られる。(矢印でその一例を示す。)  
B. 松果体細胞を30日間培養した後、ブアン液で固定した標本の位相差顕微鏡写真。×500。横紋筋繊維に独特の横紋がよく観察される。

## 考 察

ラットの培養松果体細胞からの筋繊維の分化は、けって量的に数多く起こるものではないが、今まで行なってきた培養では常にみられる。そもそも松果体は系統発生の過程において、光受容器から内分泌器官へと変化してきたものと考えられている。哺乳類では、胎生期、幼若期には光受容の機能を示喚する構造が一時的に観察されるとはいえ、純粋な内分泌器官である。いずれにせよ、このような器官の細胞培養で筋分化の起こることは、予想外といわねばなるまい。

では、培養で分化してくる筋細胞の起原はどこであるのだろうか？ たまたま、松果体摘出時に筋原細胞がまぎれてこみ、そのまま培養されたのではないか、という可能性は否定されねばならない。なぜなら、どの培養例であっても、筋分化は常に起こるからである。

すると、筋繊維は松果体そのものの含む細胞から分化してきたはずだ、ということになる。では次の問題は、松果体内には正常発生においても筋繊維に分化するような「松果体筋原細胞」ともいうべきものが存在しているのか、それとも、本来は内分泌機能を行なうべく分化している細胞が、分化転換をして筋繊維を形成したのか、ということになる。第一の可能性を示喚する事実が歴史的にいくらかある。それは、過去の文献の中に正常の生体の松果体内に少数ではあるが、筋繊維の存在を見出したという報告が、いくらかの材料についてあるのである。もちろん、これらは一例報告的な記載にしか過ぎず、また系統的な研究の対象ともされていない。

予想外の、異所的に分化した筋繊維の例としては、ラットやマウスの胸腺を培養して筋分化が高率に起こることが報告されている。<sup>2)</sup>この予想外の実験結果

は、正常の発生において胸腺中に筋分化が起こっているのではないか、という可能性より、胸腺にはリンパ球にも筋繊維にも分化できる多筋性をもった幹細胞が存在しているのであらう、と解釈された。

胸腺の筋分化については、最近鳥類胚を用いて詳細な研究が行なわれた。それによると胸腺は、正常の発生において明らかに筋原細胞をもっており、しかも興味深いことにこの胸腺筋原細胞は、胸腺のリンパ細胞はもちろん、一般の筋原細胞とも発生的起源を全く異にしている、神経冠（提）から由来するというのである。<sup>3)</sup>

松果体についても、おそらく松果体の筋繊維ともいべきものが、正常の発生においても分化してくるのではないか、と想像される。胸腺の場合と同じく、こうした異所的な筋肉の発生的起源が、神経冠である可能性はある。

松果体にせよ、胸腺にせよ、このような異所的に発生した筋は数も少ないことであらう。だが、これらは一体どのような機能をもっているのであらうか？ たとえ少数であっても、それらの異所的筋繊維の異常が重大な疾病の要因をなす可能性は充分にある。筋ジストロフィーと関係しても、今後研究されるべき新しい問題であらう。

## 文 献

- 1) K. Watanabe, R. Nojyo, H. Aoyama, T. Matsuura and T. S. Okada *Develop Growth and Differ.*, 23: (in press)
- 2) H. Wekerle, B. Paterson, U. -P. Ketelsen and M. Feldman *Nature*, 256: 493-394. (1975)
- 3) H. Nakamura, C. Livre and N. LeDouarin. Personal communication.

## 5 遺伝子挿入細胞の選別に関する新しい試み

岡田善雄<sup>\*\*\*</sup>  
研究協力者 内田 驍<sup>\*\*\*</sup> 目加田 英 輔<sup>\*</sup>  
須川 秀 夫<sup>\*</sup> 杉 田 一 之<sup>\*</sup>  
原 嘉 宏<sup>\*</sup> 石 浦 正 寛<sup>\*\*</sup>  
河 野 憲 二<sup>\*\*</sup>

### 目 的

ヒトを含む哺乳類細胞に遺伝子を人為的に挿入して機能発現を観察する新しい分野がこの数年急速に展開してきている。この方法はヒト遺伝病解析にも新しい有力な手段を提供してくれる。即ち機能欠損を示す遺伝病細胞に正常細胞由来の遺伝子を挿入して欠損修復を観察する方向から欠損遺伝子のクローニングを含む基礎的な解析にまで研究が進められる道になりそうに思われる。

然し残念ながら現状では1つの壁があって遺伝病細胞研究に直接利用することは困難である。それは挿入遺伝子の発現頻度が低く大体 $10^{-6}$ 程度であるために如何に細胞選別が行えるかという難問題が要求されるからである。即ち遺伝子発現のない $10^6$ ヶの細胞を選択的に除去できてはじめて実験が成立するのである。

この隘路を除去する工夫が現在1つ報告されている。それは授容細胞として $TK^{-}$  L株細胞を用い、大量の目的の遺伝子に少量のTK遺伝子を含めた混合遺伝子を挿入したのち $TK^{+}$ の表現型に変化した細胞だけをHAT培地で選別してくると、この選別クローン群では面白いことに同時挿入した目的の遺伝子も発現している頻度が異常に高いという現象である。この現象をCO-transformationと呼ぶが、非常

に実用的で具体的成果がすでに色々報告されている。然し残念ながらこの選別方法は遺伝病細胞に直接利用はできない。なんとなれば、この方法は授容細胞として $TK^{-}$ 変異株を利用せねばならないが、ヒト初代培養細胞から $TK^{-}$ 変異株を採取することが非常にむづかしいからである。

私達は以上の考慮のもとでTK指標の代りに使えてしかも野生型の培養細胞に利用できる指標遺伝子を選択したいと考えた。選んだ遺伝子はジフテリア毒素でADPリボシル化を受けないような構造変化を示すEF2を生産する遺伝子がある。もしこのような遺伝子が存在し挿入された細胞内で発現があれば、この遺伝子産物はジフテリア毒素耐性という指標に関して優性因子であるから、ジフテリア毒素による選別を行えば生残ってくれる可能性が考えられる。もし可能ならこの遺伝子を指標遺伝子としてTK遺伝子の代りに用いることでヒト遺伝病細胞解析に新しい道が拓けることになる。

本研究は以上の思考に立って可能性の有無を検討したものである。

### 材 料 と 方 法

ジフテリア毒素耐性細胞はヒト羊膜由来の株化FL細胞から採取された。単層培養FL細胞に紫外線照射 ( $15 J/m^2$ ) で変異率を上昇さす処理をしたのち0.1Lfのジフテリア毒素存在下で生き残るクローンを採取した。

\* 大阪大学微生物病研究所

\*\* 国立基礎生物学研究所

デフテリヤ毒素による細胞の蛋白合成阻害は90分間の3H-ロイシンの酸不溶性分画へのとり込み量として測定された。

デフテリヤ毒素によるEF2のADPリボシル化の定量は細胞をDTT存在下でオクチールアルコールで可溶化し遠心上澄にPMSFを加えたのちバッファーA(10mM・トリスHCl, 50mMKCl, 1.5mM-DTT, 2.5mMEDTA, 5%グリセリン, pH7.5)で透析したのち $^{14}\text{C}$ -NAD及びデフテリヤ毒素フラグメントAを加え37°15分反応後の酸不溶性分画中のカウントとして計測された。

染色体の採取は分裂期細胞をTCS液(0.001M・トリスHCl, 3mMCaCl<sub>2</sub>, 0.1%サポニン)で37°20分処理したのちダウンスホモジェナイザーで細胞をこわし, 1M蔗糖液に重層して900 r.p.m 10分遠心上澄を採取したのち, 3,000 r.p.m 20分遠心で染色体を集めた。最終的にはHBS液(NaCl 8.0g/l, KCl 0.37g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1g/l, Dextrose 1g/l, Hepes 5g/l, pH 7.1)に浮遊させた。

染色体の細胞内への挿入にはCa法を用いた。HBSに浮遊させた染色体試料にCaCl<sub>2</sub>を最終濃度

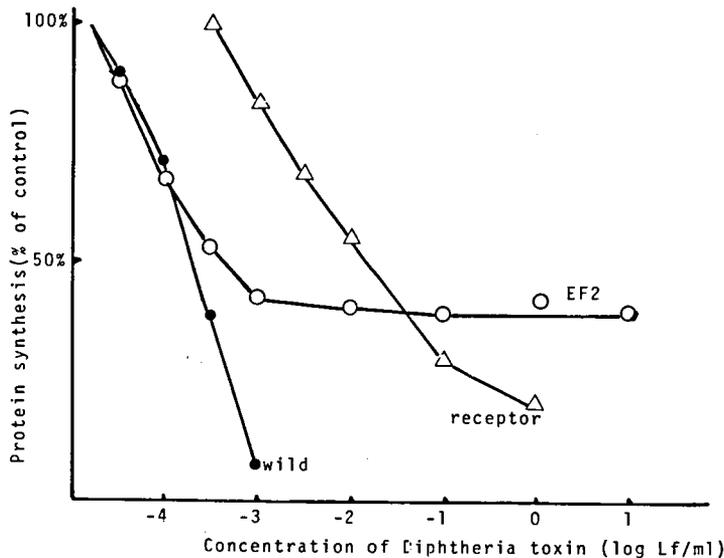
125mMになるように加えたのち出現するリン酸カルシウムゲルを単層培養細胞に添加し37°C17時間置いた。その後DMSO処理(最終濃度10%)或は不活化HVJ処理(2,000HAU)を行ったのち3日間培養し, トリプシン処理で細胞を再分散させると同時に0.001Lf/mlのデフテリヤ毒素を培地に加えて選別を行った。

### 結果と考察

デフテリヤ毒素はよく知られているように2つのサブユニットから成立っている。フラグメントBは細胞表面の毒素レセプターと反応する部域であり, フラグメントAは細胞質内でEF2をADPリボシル化してその活性をうばい蛋白合成を阻害し細胞を殺す。

したがってデフテリヤ毒素耐性細胞がとれるとすれば常識的に2種類の変異が考え得る。1つは毒素レセプターに変化を示すもので他はEF2がフラグメントAによってADPリボシル化を受けないように変化するものである。

我々はデフテリヤ毒素耐性FL細胞を28株採取した。之等変異株の毒素に対する蛋白合成阻害度を野生株と比較してみると第1図のように2種類の型



第一図 デフテリヤ毒素耐性FL細胞の毒素による蛋白合成阻害度

に分類されてしまった。28株の半数ずつがほぼ等分に両型に分類された。1つの型は毒素の低濃度では蛋白合成阻害に耐性であるが $10^{-3}$  Lf/mlあたりから阻害が急速に現われるもので毒素レセプターに変化を示すものらしかった。他の型は毒素低濃度域では野性型細胞と同じような感受性を示すが、約50%阻害のレベルからは毒素濃度を高くしても低下しない性格を示した。後者がEF2構造に変異をもつ可能性が強いと判断され、その確認が行われた。無細胞系で後者の変異細胞のEF2がフラグメンAでADPリボシル化をおこす量を測定してみると約50%のEF2しかリボシル化をうけない事が示された。さらにこの細胞の表面レセプター量を測定してみると野生株と等しかった。以上の考察から後者の型では2セット存在するEF2遺伝子の1つに変異がおこっているものと結論された。

次にこの変異細胞の遺伝子を野性型FL細胞に挿入した場合にデフテリヤ毒素に抵抗性を獲得し得るかどうかを検討された。変異細胞由来の染色体をリン酸カルシウムゲルに封じて野性型細胞に挿入したのちデフテリヤ毒素で生き残るコロニー数が測定された。第一表はその結果である。 $10^6$ 細胞あたり

200ヶほどの耐性コロニーが出現したが、この頻度はTK<sup>-</sup>L細胞に野生型染色体を挿入してHAT選別で生き残る率よりも大きい値であった。

以上の結果はこのEF2遺伝子を用いてCO-transformationを期待してヒト遺伝病細胞の遺伝子解析が可能である事を示している。今後の作業として染色体の代りにDNAを用いて研究を進め最終的には変異EF2遺伝子のクローニングを行う事になる。こゝまで進めばよいよ遺伝病細胞の解析に進むことができる。

**第一表** EF2変異を示すデフテリヤ毒素耐性FL細胞由来の染色体導入による野性型FL細胞の毒素耐性発現。

試料	耐性コロニー数
染色体なしの対照	3.3コロニー/ $10^6$ 細胞
染色体導入 (HVJ処理)	181.7コロニー/ $10^6$ 細胞
染色体導入 (DMSO処理)	231.0コロニー/ $10^6$ 細胞

## 6 組織培養法による筋ジストロフィー症の研究

### ヒトのジストロフィー筋の培養

米 沢 猛

研究協力者 岡 部 英 俊

我々は、ヒト生検筋を材料として、Duchenne型ジストロフィー (DMD) 及びその保因者筋の筋芽細胞増殖から筋管形成、神経支配に至るまでの経過を器官培養を用いて検討し、この過程のなかでジストロフィー所見の有無を検索することを試みた。また、筋芽細胞の増殖から筋管形成にいたるまでの初期の過程を細胞培養を用いて定量的に解析する試みを開始したので、その過程を併せて報告する。

#### 1) 器官培養

##### 実験材料および方法

1～10才までの正常者DMD患者並びに保因者生検筋を0.5mm角に細切し、コラーゲン塗布カバーグラス上に一部はそのまま培養し、また一部は1～4日後にWistlar系ラットまたはICR系マウス胎仔(胎齡13～15日)の脊髄横断薄切片を筋組織近傍に添加して培養した。用いた手技はMaximow 2重カバーグラス法で、培養液組成および液交換は既に報告した方法<sup>1)</sup>に準じておこなった。

#### 結 果

1) 対照筋：筋移植片近傍に脊髄を添加すると、1～2日のうちに脊髄より軸索が急速に伸長し筋組織に到達する。これにともなって、それまで極めて良好に保たれていた移植片の筋線維は横紋を失ない急速に融解する。そして移植片周囲に筋の衛星細胞由来と思われる紡錘形の筋芽細胞が遊出し、その後

活発な増殖を示した後、互いに融合を開始し、12日目頃までには合胞性の多核の筋管細胞(図1)が多数形成されてくる。また、この頃までに、運動神経軸索と新たに形成されてきた筋管との間に接触が見られる(図1)。この接触部位では軸索先端は丸く腫大し、時にはその腫大部が分葉を示すことがある。3週末頃には筋芽細胞の分裂増殖は減少し、筋管細胞は緩徐に肥大延長をつづけ、その胞体の長軸方向に多数の筋原線維を認めるようになる。4週を終るところには、少数ながら横紋を有する筋線維の出現をみる(図2)、数ヶ月余を経て未だ同期収縮等の完全な成熟の徴候はみられていない。

これに対し、脊髄片を加えることなく、筋組織片のみを単独で培養した場合には、約1週後に、組織片周囲に少数の線維芽細胞が遊出と増殖を示すが、移植片そのものはほぼ全体にわたり横紋を失なくことなく数週の間保たれていた。しかし、移植片作成にあたって筋線維を切断した部位には局所的に変性が生じ、2週目半ば頃には、その部より筋芽細胞の遊出と増殖が生じ、3週末までには筋管形成がみられ、一部は移植片筋線維と融合するに至る。しかしその再生現象は、脊髄を加えた場合に比し、はるかに貧弱である。

2) DMD筋：DMDについては6例について検索を行ったが、脊髄を加えた場合、筋芽細胞の遊出から筋管形成、運動神経軸索との接触に至るまでの時間的経過は、健康筋の場合とはほぼ同様であるが、形成されてくる筋管は対照のそれに比して少数かつ貧弱であった。また、4週を終える頃より少数の筋



图 1

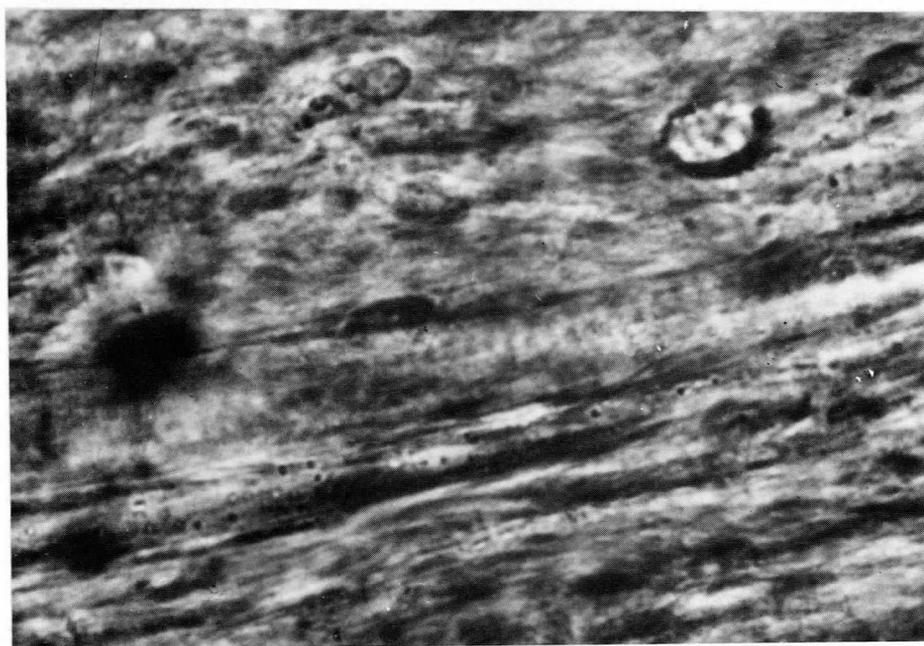


图 2

管細胞に横紋が認められた。このような所見に加えて、DMD筋では培養開始後1年半を経る頃より、神経支配の有無にかかわらず、筋管表面に大小の孔や、部分的な変性像を認め(図3)、その所見は既報の筋ジストロフィー鶏のものと同ー変化と思われる。また非特異的ではあるがDMD筋管は対照のそれに比して早く変性消失する傾向がみられた。

筋単独培養の場合の再生過程の時間的経過とその程度には対照との間に著しい差はみられなかった。

また移植片筋線維も対照同様数週にわたり良好に保存されていた。

3) 保因者筋: 現在まで1例のみの経験ではあるが、その所見は全般的に対照とほぼ等しい。しかし、脊髄添加の場合、2ヶ月を越す頃より、少数ではあるが筋管表面膜にDMD筋同様の細孔の出現とその部の筋漿の顆粒状変性を認めることがある。

## II) 細胞培養

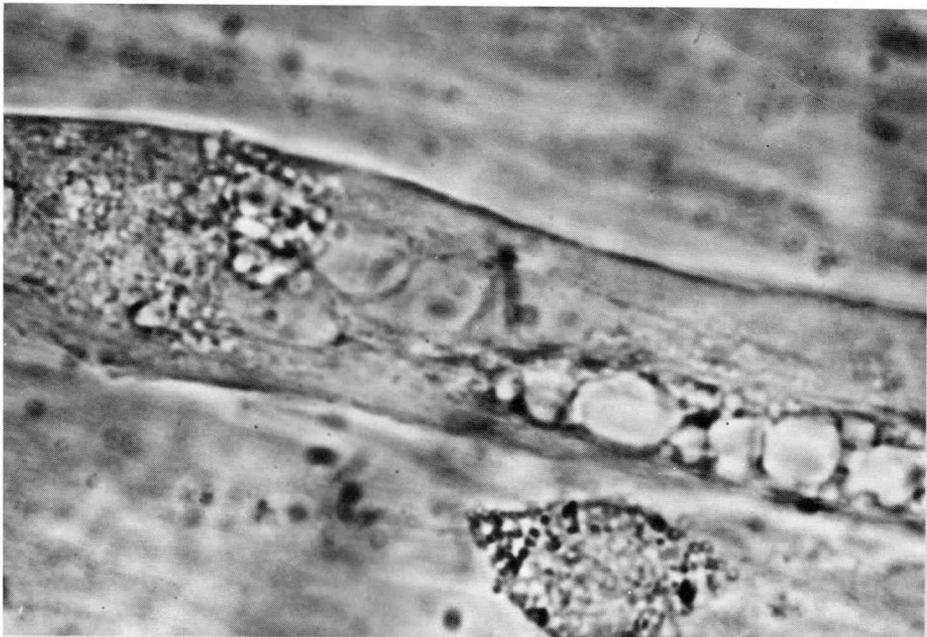


図3

### 実験材料および方法

兄妹のDMD患者および保因者の各1例より同時に生検した筋を0.5mm角に細切の後、各20コづつプラスチック培養ビンおよびペトリ皿に入れて炭酸ガス培養器(CO<sub>2</sub>5%, Air95%)内で培養した。培養液は、L15(85%) + 胎仔牛血清(15%)を標準として用い、一部の系列はこれに鶏胚抽出液10%を加えて使用した。液交換は3日毎におこな

った。2代目以降は以下に示す方法<sup>2)</sup>で、保因者およびDMD患者の両培養から同時に筋芽細胞を分離し各代 $5 \times 10^5$  viable cell/dish(5cc) 植込み観察した。

Trypsinization(0.125%, for 10min. at 37°C)

↓

Wash & Centrifuge (1.000g, 2 min. ×3)

↓

Filter through lens paper for elimination of myotube

↓

Incubation in feeding medium (40min, at 37°C)

(= absorption of fibroblasts)

↓

Collection of floating cells

↓

Cultivation in CO<sub>2</sub> incubator

継代は2代目が20日, 3代目は14日目, 4代目は24日目におこない, 現在4代目観察中である。

### 結 果

1) 初代: 保因者およびDMD何れもほぼ同様の時間経過をとって発育を示した。即ち, 4日目に移植片よりの筋芽細胞遊出を認め, 10日目~17日目にかけて筋管形成が進行した。

2) 2代目: 保因者筋芽細胞は継代後2日目頃より活発な増殖を示し, 4日目には10核以上の筋管細胞を多数形成したのに対し, DMD筋は, 分裂像を示す筋芽細胞は少なく, 10核以上の筋管は6日目まで認められず, その出現頻度も保因者筋に比して少なかった。3代目へ移行時の細胞核の増加は保因者の方がDMDより約2.4倍多かった。

3) 3代目: 2代目と同様の傾向がさらに顕著となり, 保因者では4日目に10核以上の筋管が多数形成されたのに対し, DMDでは細胞の増殖はほとんどみられず, 融合の遅延も顕著で, 24日を経たなお最高で8核の小筋管を少数認めるのみである。4代目継代時の細核の増加は, 保因者の方がDMDの約4倍多かった。

### 考 按

Maximow法による器官培養で筋を単独に培養した場合には, 移植片の変性崩壊がごくわずかに留るために再生現象はあまり活発に生じないが, 脊髄を加えた場合には軸索との接触により成熟筋組織が破

壊されて再生過程が惹起される。又, Maximow法以外では, 筋単独培養でもかなりの再生現象がみられるが, この場合も植付けた筋線維そのものは比較的早く変性する。このように, 筋組織の再生には母体となる筋線維の破壊という過程が必須の条件であると思われる。In vitro では脊髄運動神経は移植片中の筋線維との接触は, in vivo の場合のように re-innervation がそのまま生じることはなく, むしろ筋の破壊再生を促すという事実は, どのような機構にもとづく現象であるのか今後の検討課題である。

また, 現在までヒトの生検筋の in vitroでの再生にもとづく完全な成熟は未だ報告されていない<sup>3)</sup>が, この再生過程が組織発生の繰返しであること, かつまたヒトの組織発生がかなり長時間を要するものであることを考え併せると, 培養そのものを相当長期にわたって維持することにより筋の成熟が見られるものと思われる。従って, 今後更に技術的な検討を加えて長期培養を行う必要がある。

しかしながら現在までの段階で, DMD筋には, 対照筋, 保因者筋に比して, 筋管形成が貧弱で横紋構造の出現は極めて少ないなどの点で差があり, in vitroでは再生そのものがより不完全であることが示された。また, 細胞培養による予備的実験の結果もこの所見を支持しているが, この再生に関する異常は, 成熟筋の Dystrophy<sup>4)</sup>病変と同様のDMDの遺伝的欠陥による膜の異常<sup>5)</sup>の一次的な表現であるのか, あるいは単に in vivoでの筋破壊と再生による筋芽細胞の疲弊の結果によるものなのかは更に慎重な検討を要するものと思われる。

さらに, DMD筋管において高頻度に見られた空胞形成と細胞質の部分的変成は, DMDの筋変性が筋管レベルの成熟に達すれば惹起し得る可能性を示唆するものと考えられる。今後, 筋管の成熟の度合と病変出現との関連性を追求することにより, DMD解明の新しい手がかりが得られるものと思われる。

### ま と め

以上, ヒトの生検筋を用いて in vitroで筋の再

生過程の解析をおこない、あわせてDMD筋の再生ならびに病変形成と筋組織の成熟度の関係につき検索した。今後さらに技術的検討を加えて、in vitroでヒト骨格筋の発生乃至再生過程を神経支配による完全な成熟にまで至らせ、この過程との関連において、DMDに特異的な病変の成立を解明するとともに、細胞培養を併用してDMD筋芽細胞のふるまいを明らかにする予定である。

## 文 献

- 1) 米沢 猛, 有蘭直樹, 長谷川通規, 西明真理: 培養法による筋ジストロフィー症の研究。厚生省神経疾患研究委託費, 筋ジストロフィー症の基礎的研究 (江橋班) 昭和53年度報告書, P102.
- 2) Yaffe, D.: Retention of differentiation potential during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Sci. Acad.*, 61: 477, 1968.
- 3) Witkowski, J.A.: Diseased muscle cells in culture. *Biol. Rev.*, 52: 431, 1970.
- 4) Morki, B. & Engel, A.G.: Duchenne dystrophy; Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurol. (Mineap.)*, 25: 111, 1975.
- 5) Rowland, L.P.: Biochemistry of muscle membranes in duchenne muscular dystrophy, *Muscle & Nerve*, 3: 3, 1980.
- 6) Witkowski, J.A., Durbidge, M. & Dubowitz, V.: Growth of human muscle in tissue culture. An improved Technique. *In Vitro*, 12: 98, 1976.

## 7 「正常成熟(+/+ )及び筋ジストロフィ発症(dy/dy) マウス再生筋由来細胞の *in vitro* における分裂能の比較」

香川 務\*

研究協力者 智片 英治 浜野 理一郎

各種動物で見られる筋ジストロフィ罹患動物の筋、その他、諸組織の形態的、機能的異常は多彩且つ複雑である。我々は、最も顕著な変化を示す筋組織に研究対象を絞り、より単純な条件下で解析を行う為に、正常成熟(+ /+)及び筋ジストロフィ発症(dy /dy)マウスから、単核筋細胞を分離し、それらの *in vitro* に於ける筋線維分化の実験系を開発した。<sup>1,2)</sup> この実験系を用い、筋細胞の増殖、筋線維の分化、筋線維の維持の各段階に於て、*in vitro* における正常筋と筋ジストロフィ筋の比較を行い、両者の相違点を明らかにし、ジストロフィ遺伝子発現による、筋における一次的欠損を知る目的の下に、研究を進めている。我々は既に、(1)正常成熟(+ /+)及び筋ジストロフィ発症(dy /dy)マウス由来の各単核筋細胞は、いずれも、*in vitro* に於て、収縮性を持つ横紋筋線維分化能を示す事、<sup>1,2)</sup> (2) dy 遺伝子発現の結果とされて来た、筋ジストロフィ筋(dy /dy)の *in vitro* における Pseudostrap 形成<sup>3)</sup> は、dy 遺伝子を持たない正常筋(+ /+)の培養に於ても、培養条件によっては見られる事、について報告し<sup>4)</sup> た。昭和54年度には、我々は実験系を更に単純化し、正常及び筋ジストロフィ筋細胞の諸性質を定量的に比較する目的で、正常及び筋ジストロフィ再生筋由来単核細胞のクローン培養及び同筋細胞の純培養の技術を開発し報告した。<sup>5)</sup> 今回はこの前者の方法を用い、正常(+ /+)及び筋ジストロフィ(dy /dy)

再生筋由来各単核細胞の、*in vitro* における細胞分裂能を定量的に比較したので報告する。

### 材料と方法

再生筋、8~12週令の正常(C57B1/6 + /+)及び筋ジストロフィ発症(C57B1/6J dy /dy)マウス大腿直筋に20%食塩水を注射(正常マウスでは各0.1ml/肢、<sup>1)</sup>筋ジスマウスでは各0.05ml/肢<sup>2)</sup>)し、3日後に同筋を採り、再生筋として、以下の各実験に用いた。なお、各実験内で用いた、正常、筋ジスマウスの日令の違いは14日以内である。

単核細胞の分離 各再生筋を細切し、10mlの Fresh medium<sup>1)</sup>を入れた硝子遠心管に加え、ピペット攪拌法<sup>6)</sup>で、単核細胞を遊離し、白金網(150-mesh)でろ過、各再生筋由来単核細胞浮遊液を得た。Fresh medium を適宜加え、細胞数100個/mlの各細胞浮遊液を調製し、以下の各培養に用いた。

培養方法 0.2%ゼラチン処理<sup>7)</sup>60mm-Falcon培養皿を用い細胞培養を行った。培養開始24時間後、各5mlのGrowth medium<sup>1)</sup>で培地交換を行い、更に5日間培養し、固定した。培養条件は37℃、湿度100%、CO<sub>2</sub>5%、空気95%である。

培地の組成

- |                                 |             |     |
|---------------------------------|-------------|-----|
| (1) Fresh medium <sup>1)</sup>  | Eagle's MEM | 85% |
|                                 | 馬血清         | 10% |
|                                 | 鶏胚抽出液       | 5%  |
| (2) Growth medium <sup>1)</sup> | *条件培地       | 90% |

牛胎児血清 10%

※条件培地 Fresh mediumを正常マウス再生筋由来細胞培養に加え、24時間培養した後、培地を回収し、3000 rpm 20分間遠心沈殿を行い、上清を条件培地として使用した。なおこの実験で用いたEagle's MEM (阪大微研)、馬血清 (阪大微研)、牛胎児血清 (M.B.A.) は、各々、同じロット番号のものを使用した。

細胞分裂回数の算定 前記期間培養した各細胞培養の培地を棄て、室温で約30分間風乾した後、100%エタノールで5分間固定し、ヘマトキシリンで核染色を行い、筋細胞、線維芽細胞の各コロニー毎に核数を算定した。核数の正確な算定の困難なコロニーは除外した。次の式で定義される×を細胞分裂回数とした。

$$\times = \frac{\log N}{\log 2} \quad N: \text{コロニー当りの核数}$$

## 結 果

実験1 正常再生筋由来細胞培養 (正常培養と略す)。各培養皿当り、500個の細胞を播き、合計11枚の培養を行い、その結果、392個の筋細胞コロニーと160個の線維芽細胞コロニーが形成され、Plating efficiency (P. E.) は10.0%であった。(Table 1)。

筋ジストロフィー再生筋由来細胞培養 (筋ジス培養と略す)。各培養皿当り、500個の細胞を播き、合計10枚の培養を行い、139個の筋細胞コロニーと115個の線維芽細胞コロニーを得た。P. E. は5.1%であった。(Table 1)。

細胞分裂回数 上記正常及び筋ジス各培養に於ける筋及び線維芽細胞の分裂回数を、各々、各コロニー毎に求め、ヒストグラムに表示し、細胞分裂回数の分布を求めた (Figs. 1, 2)。正常、筋ジス各培養での筋細胞、線維芽細胞の各細胞分裂回数は、いずれも、正規分布に近い分布を示したので、各々の平均値と標準偏差を求め、平均値の差の検定を行った (t-検定)。

細胞分裂回数は、正常再生筋由来筋細胞 (正常筋細胞と略す) では  $6.93 \pm 1.21$ 、筋ジス再生筋由来筋

細胞 (筋ジス筋細胞と略す) では  $5.38 \pm 1.13$ 、その差は1.55であり、有意であった ( $P < 0.001$ ) (Table 2)。正常再生筋由来線維芽細胞 (正常線維芽細胞と略す) の分裂回数は  $4.50 \pm 0.90$ 、筋ジス再生筋由来線維芽細胞 (筋ジス線維芽細胞と略す) の分裂回数は  $4.23 \pm 0.84$ 、その差は0.27であり、この差は筋細胞の分裂回数の差に比較し、小さいが、これも有意であった ( $P < 0.02$ ) (Table 3)。

実験2 この実験は実験1と同じである。正常、筋ジス培養共、各培養皿当り、500個の細胞を播き、各11枚づつ培養した。正常培養では、145個の筋細胞コロニーと、127個の線維芽細胞コロニーが得られ、P. E. は4.9%であった (Table 1)。筋ジス培養では、52個の筋細胞コロニーと、158個の線維芽細胞コロニーが形成され、P. E. は3.8%であった (Table 1)。

正常筋細胞の分裂回数は  $6.14 \pm 1.39$ 、筋ジス筋細胞のそれは  $5.16 \pm 1.15$ 、その差は0.98で、有意であった ( $P < 0.001$ ) (Table 2)。線維芽細胞の分裂回数は、正常培養では  $4.44 \pm 1.12$ 、筋ジス培養では  $4.22 \pm 1.05$  であり、その差は0.22で、有意ではなかった (Table 3)。

実験3 実験1、実験2では、培養皿当り形成されたコロニーの数は、いずれも、正常培養でより多く (Table 1)、この事が正常培養中の筋細胞の細胞分裂を増加せしめた可能性がある。この可能性を検討する為に、実験3を計画した。

正常培養 培養皿当り、500、250、125の各細胞密度で、各々、10枚づつの培養を行った。各細胞密度の培養で得られたコロニーの培養皿当り平均数は、各々、18.0、12.1、6.7であった (Table 1)。各細胞密度における筋細胞の分裂回数は、各々、 $6.99 \pm 1.29$ 、 $6.89 \pm 1.21$ 、 $7.00 \pm 1.53$  (Table 2)、線維芽細胞の分裂回数は、各々、4.41 ± 1.07、 $4.32 \pm 1.12$ 、 $4.00 \pm 1.33$  (Table 3)であった。筋細胞、線維芽細胞のいずれにおいても、各々の細胞密度における各細胞分裂回数相互間で、有意差を認めなかった。

筋ジス培養 正常培養と同様、培養皿当り、500、

Table 1

Plating efficiency and number of colonies formed per dish in each series of experiment.

Series of explt.	Explt. 1		Explt. 2		Explt. 3					
	Norm.	Dystr.	Norm.	Dystr.	Norm.			Dystr.		
Inoculum size	500	500	500	500	500	250	125	500	250	125
No. of cultures	11	10	11	11	10	10	10	12	10	8
Pl. efficiency(%)	10.0	5.1	4.9	3.8	3.6	4.8	5.3	6.8	6.4	8.0
No. of col./pl.	50.2	25.4	24.7	19.1	18.0	12.1	6.7	33.8	16.1	10.0
<u>Myoblast</u>	35.6	13.9	13.2	4.7	12.9	9.1	4.1	12.3	6.3	3.5
<u>Fibroblast</u>	14.6	11.5	11.5	14.4	5.1	3.0	2.6	21.5	9.8	6.5

Figure 1.

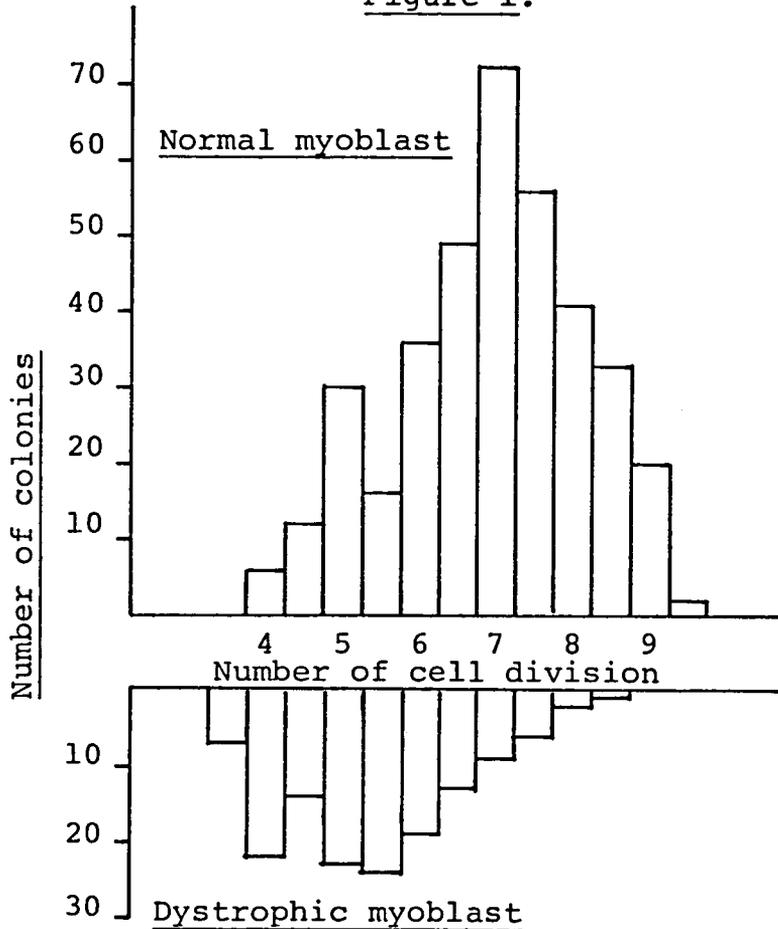


Figure 2.

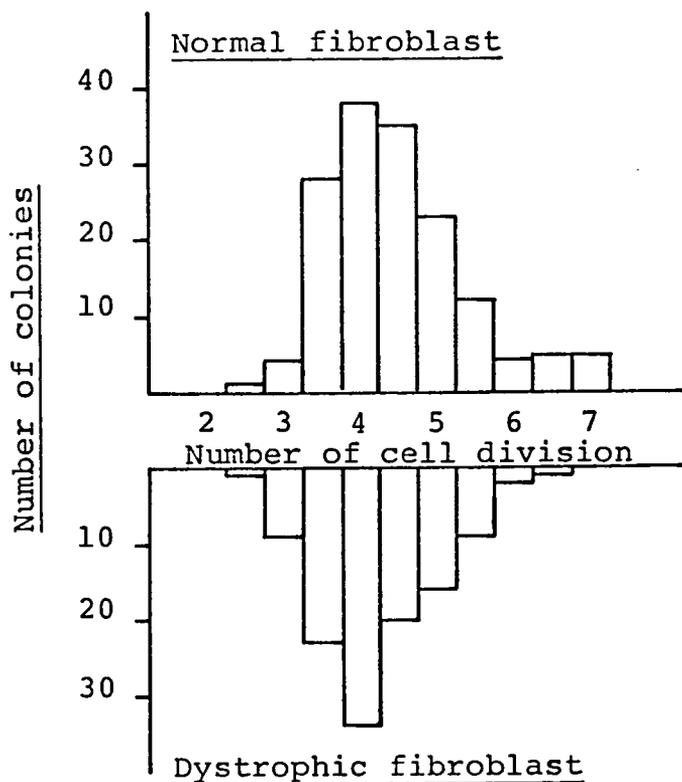


Table 2

Number of Cell Division of Myoblasts

Series of explt.	Inoculum size	Normal ( $\bar{X}_n$ )	Dystr. ( $\bar{X}_d$ )	$\bar{X}_n - \bar{X}_d$	d.f	t-stat.
Explt. 1	500	6.93±1.21 (373)	5.38±1.13 (139)	1.55	510	p<0.001
Explt. 2	500	6.14±1.39 (124)	5.16±1.15 (51)	0.98	173	p<0.001
Explt. 3	500	6.99±1.29 (116)	4.98±1.20 (140)	2.01	254	p<0.001
	250	6.89±1.21 (83)	5.22±1.34 (58)	1.67	139	p<0.001
	125	7.00±1.53 (27)	4.89±1.19 (26)	2.11	51	p<0.001

n: normal. d: dystrophy.

$\bar{X}$ : Average number of cell division.

t-stat.: t-statistics. d.f: degree of free.

( ): Number of colonies used for the count of number of cell division.

Table 3  
Number of Cell Division of Fibroblasts

Series of explt.	Inoculum size	Normal ( $\bar{X}_n$ )	Dystr. ( $\bar{X}_d$ )	$\bar{X}_n - \bar{X}_d$	d. f	t-stat.
Explt. 1	500	4.50±0.90 (155)	4.23±0.84 (115)	0.27	268	p<0.02
Explt. 2	500	4.44±1.12 (121)	4.22±1.05 (156)	0.22	275	N.S.
Explt. 3	500	4.41±1.07 ( 50)	4.11±1.18 ( 53)	0.30	301	N.S.
	250	4.32±1.12 ( 28)	4.15±1.10 ( 97)	0.17	123	N.S.
	125	4.00±1.33 ( 22)	4.32±1.24 ( 51)	-0.32	71	N.S.

n: normal. d: dystrophy.

$\bar{X}$ : Average number of cell division.

t-stat.: t-statistics. d.f: degree of free.

( ): Number of colonies used for the count of number of cell division.

N.S.: not significant.

250, 125の各細胞密度で、各々、12枚、10枚、8枚づつ培養を行った。各細胞密度の培養において、得られたコロニーの培養皿当り平均数は、各々、33.8, 16.1, 10.0 (Table 1), 各細胞密度における細胞分裂回数は、筋細胞では、各々、4.98±1.20, 5.22±1.34, 4.89±1.19 (Table 2), 線維芽細胞では、各々、4.11±1.18, 4.15±1.10, 4.32±1.24 (Table 3)であり、筋細胞、線維芽細胞のいずれにおいても、各細胞密度における細胞分裂回数相互間に有意の差を認めなかった。以上の結果から、正常、筋ジスのいずれの培養においても、筋細胞、線維芽細胞の分裂回数は、少なくとも、此の実験で形成されたコロニーの数の範囲では、コロニー密度と関係はないと結論出来る。更に、いずれの細胞密度においても、筋ジス筋細胞の分裂回数は正常筋細胞の分裂回数より有意に小さく (Table 2), 線維芽細胞の分裂回数は、正常培養、筋ジス培養の間で、有意差を認めなかった (Table 3)。

#### 検 討

以上の各実験結果から、この培養条件では、筋ジストロフィ発症マウス (dy/dy)由来筋細胞の分裂

回数は、正常成熟マウス (+/+)由来筋細胞の分裂回数に比較し、有意に少く、一方、線維芽細胞の分裂回数は、正常、筋ジス両者の間で、殆んど、差を認めなかった。dyジストロフィマウス筋のin vitroにおける形態的標識とされて来たPseudo-strap形成<sup>3)</sup>が、培養条件によっては、dy遺伝子を持たない正常マウス筋によっても、見られる事が証明されて<sup>4)</sup>以来、未だ、in vitroにおける標識が見出されていないdyジストロフィ筋にとって、筋細胞分裂回数の減少は極めて注目すべき現象である。しかし、これが今後の筋ジストロフィ症研究の一つの手がかりになるか否かについては、次の三つの問題について、明らかにしてからでないと、結論を下す事は出来ない。

(1)同一培養期間中に於ける筋ジス筋細胞の分裂回数が正常筋細胞のそれより少いのは、筋ジス筋細胞の世代時間が、正常筋細胞のそれに比較し、長い事によるのか、又は、筋ジス筋細胞の細胞分裂が、正常筋細胞のそれより、早く終了する事によるのか。

(2)筋ジス筋細胞の分裂回数の減少 (上記いずれの原因によるものであっても)はdy遺伝子発現の直接の結果であるか。

(3)筋ジス筋細胞の分裂回数の減少は筋ジス筋 (dy

/dy) に見られる各種異常 (筋線維の大小不同, 筋線維の断裂, 変性等) の直接の原因であるか。

以上の各問題について, 今後解析を進め, 筋細胞分裂回数減少の, 筋ジストロフィー症 (dy/dy) 発症に於ける, 意義を明らかにして行く予定である。

### ま と め

正常成熟 (+/+ )及び筋ジストロフィー発症 (dy/dy) マウス再生筋由来単核細胞の *in vitro* に於ける各細胞分裂能を比較した。筋ジストロフィー発症マウス由来筋細胞の分裂回数は, 正常マウス由来筋細胞の分裂回数よりも, 有意に減少していた。一方, 線維芽細胞の分裂回数は, 正常と筋ジスの間で, 殆んど, 差を認めなかった。

### 文 献

- 1) Kagawa, T., Chikata, E., and Tani, J. *Develop. Biol.* 55: 402, 1977.
- 2) Kagawa, T., Chikata, E., Tani, J., and Tsutamune, T. *Develop. Biol.* 65: 526, 1978.
- 3) Parsons, R. *Nature* 251: 621, 1974.
- 4) 香川 務: 第12回日本発生生物学会講演要旨集, 118. (1979)
- 5) 香川 務: 第13回日本発生生物学会講演要旨集, 20 A 4. (1980)
- 6) 香川 務, 智片英治, 谷 淳吉, 蔦宗俊明: 第30回日本細胞生物学会予稿集, A-28. (1977)
- 7) Richler, C., and Yaffe, D. *Develop. Biol.* 23: 1, 1970.

## 8 培養骨格筋における活動電位の発達に 関与する神経性因子について

加 濃 正 明\*

研究協力者 山 崎 捨 夫\* 佐 藤 諦 吉\*

山 本 三 恵\*

成熟脊椎動物の骨格筋が発生する活動電位はテトロドトキシン (TTX) により完全に遮断され, TTX感受性Naチャンネルの作用によるものである。しかし骨格筋が神経支配を断たれると, その発生する活動電位はTTX感受性を失う。<sup>1)</sup> また生れた直後では, 骨格筋の活動電位はTTX感受性がなく, 生後次第に, 神経支配に関連してTTX感受性が増してくる。<sup>2)</sup> すなわち, 骨格筋細胞膜におけるTTX感受性Naチャンネルの発達や維持は支配神経による栄養的影響下にあると考えられる。

ニワトリ胚由来細胞培養骨格筋を用いてのこれまでの実験から,<sup>3-5)</sup> TTX感受性Naチャンネルは, 筋細胞の分化成熟につれて, 神経支配なしの状態においても, 筋細胞膜におけるその密度が増加し, 骨格筋細胞の興奮性細胞としての分化を遂げること, およびこのような神経支配なしでのTTX感受性Naチャンネルの分化発達には, 神経組織からの抽出液が神経支配に代って重要な役割を果していることなどが確かめられている。神経組織抽出液の中に, 神経支配を代行するいわゆる栄養物質が含まれていると考えられる。今回はこの神経組織抽出液中の栄養物質の化学的性質を明らかにすべく実験を行った。

### 実験方法

細胞培養の方法は昭和53年度研究報告書<sup>3)</sup>に述

べられているものと殆んど同じである。すなわち, 孵卵11日目のニワトリ胚の胸筋をトリブシン処理することによってえられる筋原細胞を, コラーゲン塗布したプラスチック培養皿に単層培養する。用いた基本培養液はイーグルの合成培養液にウマ血清(10%), ニワトリ胚抽出液(2~5%), L-グルタミン(1mM)および抗生物質を加えたものである。今回用いたニワトリ胚抽出液は, 普通に用いられているニワトリ胚全体からの抽出液ではなく, 神経組織を除いた胚からの抽出液である。すなわち, 孵卵10日目のニワトリから頭部, および脊髄を含んだままの脊柱を取り除き, 残りの部分を2倍量のタイロイド液と共にホモジナイズし, これを2,000×g, 10分間遠心してえられた上清である。

神経組織抽出液は, 孵卵19日目のニワトリ胚の脳を2倍量のタイロイド液と共にホモジナイズしたのち, 2,000×g, 10分間遠心してえた。この脳抽出液をさらに, 高速遠心あるいは超遠心した上清を, 硫酸塩析, 透析, 各種酵素処理, 酸処理した後, 筋培養に加えて培養筋細胞膜におけるTTX感受性Naチャンネルの発達に対する栄養的効果を検定した。

単層培養された筋原細胞は分裂して増殖した後, 融合をくりかえして多核の筋管とよばれる細胞になる。培養1週目頃より筋管内に形成された筋原線維による横紋がみられるようになり, 筋細胞にまで分化成熟したことがわかる。培養2週目の筋細胞について, TTX感受性活動電位の発達を調べた。

\*北里大学医学部生理学教室

培養液を塩類溶液に置換した後、倒立顕微鏡下で、1本の培養筋細胞に2本のガラス管微小電極を刺入し、その一方を通じて脱分極性のパルス電流を通电して刺激し、それに応じて発生するTTX感受性の活動電位を他方の電極で導出し、これを電気回路で微分して、その活動電位の立上り速度を測定し、そ

の最大値をTTX感受性Naチャンネルの、その筋細胞膜における密度の指標として用いた。

TTX感受性Naチャンネルの静止電位での不活性化を除き、最大の活動電位応答をうるために、細胞膜に定電流通電を行ない、予め-80mVの基準の膜電位にまで過分極した状態で刺激を行った。

表1 培養骨格筋のTTX感受性活動電位の最大立上がり速度に対する栄養効果

Fraction added	Protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Maximum rate of rise (V/sec)
Control	—	(59/4) $73.8 \pm 3.2$
2000xG sup.	300	(56/4) $84.3 \pm 3.0^*$
20KxG ppt.	40	(31/2) $59.8 \pm 2.5$
20KxG sup.	260	(62/4) $96.8 \pm 3.4^*$
Saltrated (Amm. sulf.)		
0 - 40%	100	(63/4) $96.4 \pm 3.1^*$
40 - 60%	50	(61/4) $87.5 \pm 3.2^*$
Dialyzed		
Inner sol.	240	(35/2) $91.1 \pm 4.2^*$
Outer sol.	10	(61/4) $65.3 \pm 3.0$

Mean  $\pm$  SE. \* indicates a statistically significant increase from the control.

培養液に加えた量は培養皿1枚(3mlの培養液を含む)に対して脳湿重量約50mgに相当する量であり、Lowry法で測定したタンパク量を培養液1ml当りの $\mu\text{g}$ 量で示してある。括弧内の数は計測した筋細胞数と培養皿数である。

### 成 果

表1に示す如く、基本培養液で培養した筋細胞(control)におけるTTX感受性活動電位の最大立上り速度の値に比し、脳抽出液(2,000xG, sup)を加えて培養した筋細胞における値は有意に高い値であった。TTX感受性Naチャンネルの発達を促がす栄養物質が脳抽出液の中に存在するものと考え

られる。培養液に加えておくことによってTTX感受性Naチャンネルの発達を促がす活性は、脳抽出液を高速遠心(20KxG, 60分)した上清に、またこの高速遠心上清を硫酸塩析してえられる沈殿画分に回収された。表1には、0~40%および40~60%飽和硫酸分画の効果を示してあるが、両者の間に活性の差はみられなかった。しかしこれは脳湿

重量約 50 mg に相当する量を培養皿 1 枚当り (3 ml の培養液を含む) に加えた場合であり, 加えた分画のタンパク濃度は培養液 1 ml 当りそれぞれ 100  $\mu$ g および 50  $\mu$ g であった。

0 ~ 33%, 33 ~ 50% および 50 ~ 67% 飽和硫安分画についてタンパク量当りの活性をみると表 2 に示すごとく, 50 ~ 67% 飽和硫安分画において活性が強かった。

表 2 培養骨格筋の TTX 感受性活動電位の最大立上がり速度に対する硫安分画のタンパク量当りの栄養効果

Dilution	0 - 33 %	33 - 50 %	50 - 67 %
1	(27) 103.4 $\pm$ 4.3	(28) 100.8 $\pm$ 3.8	(28) 114.0 $\pm$ 3.6 *
10	(27) 108.7 $\pm$ 4.5	(28) 102.8 $\pm$ 3.4	(28) 113.8 $\pm$ 4.8 *

Mean  $\pm$  SE (V/sec). \* Significantly increased in comparison with the value for control cultures (95.6  $\pm$  4.7, N=28) at  $p < 0.01$ .

Lowry 法で測定したタンパク量に基づき, 培養液 1 ml 当り 3.3  $\mu$ g になるように加えた場合を稀釈 1 として示してある。その 1/10 量の場合が稀釈 10 である。括弧内の数は計測した筋細胞数である。

高速遠心上清を透析して透析内液と外液の活性を調べると, 活性は内液のみに認められ外液には認められなかった (表 1)。

脳抽出液中の活性は超遠心 (100K $\times$ g, 60 分) した場合もやはり上清に回収される (表 3, 100K $\times$ g, sup)。この超遠心上清を各種の固定化酵素を用いて, 37 $^{\circ}$ C で 60 分間処理したところ, Trypsin および Protease 処理では失活し, RNase および DNase 処理では活性は保たれた (表 3)。

また超遠心上清を酢酸処理 (pH = 4.3) してえられる上清と沈殿を, 凍結乾燥して酢酸を除き, 再び塩類溶液に溶解した後, 培養に加えて活性を調べたが, 上清分画にも沈殿分画にも活性は認められず, 酸で失活することがわかった (表 4)。

## 考 察

脳抽出液中に含まれる活性物質は, 超遠心上清に

回収され, 可溶性成分であると考えられる。これは透析膜を通過せず, 硫安で塩析され, 酸処理, タンパク分解酵素処理で失活する。以上の成績からこの活性物質はタンパク質であろうと推定される。この物質の分離精製は現在進行中である。生体内での神経支配による TTX 感受性 Na チャネルの発達や維持に対する栄養効果の担い手としてこのようなタンパク質が働いているものと考えられる。

筋ジストロフィーのニワトリの骨格筋では TTX 感受性活動電位の立上り速度が遅く,<sup>6)</sup> TTX 感受性 Na チャネルの筋細胞膜における密度の低いことが予想される。TTX 感受性 Na チャネルの発達や維持を担う栄養物質が神経組織中で欠損しているのではないかと考え, 筋ジストロフィー系統 (413 系統) と正常系統 (412 系統) を用いて同様の筋培養を行ない, TTX 感受性活動電位の最大立上り速度を比較した。その成績は昨年度報告したが,<sup>7)</sup> 412

表3 TTX 感受性活動電位の最大立上がり速度に対する栄養効果および酵素処理によるその活性の変化

Treatment	Maximum rate of rise ( V/sec )
Control	(8) 70.9 ± 5.0
100KxG Sup.	
Non-incubated	(16) 113.8 ± 3.5 *
Incubated	(16) 99.8 ± 3.7 *
DNase Treated	(16) 93.9 ± 5.4 *
RNase Treated	(12) 88.7 ± 2.9 *
Trypsin Treated	(16) 68.6 ± 4.3
Protease Treated	(14) 67.3 ± 4.6

Mean ± SE. \* indicates a statistically significant increase from the control.

培養液に加えた量は培養皿1枚に対して脳湿重量約50mgに相当する量である。酵素処理は固定化酵素を用い、37°Cで60分間行なった。遠心によって固定化酵素を除いた後培養液に加えた。酵素を加えずに同様の対照処理を行ったもの（Incubated）についても活性を調べた。括弧内の数は計測した筋細胞数である。

表4 脳抽出液の TTX 感受性活動電位の最大立上がり速度に対する栄養効果の酢酸処理による変化

Dilution	Supernatant	Precipitate
1	(53) 87.4 ± 2.7	(49) 81.6 ± 3.3
10	(53) 83.7 ± 3.9	(52) 86.7 ± 4.3
100	(52) 85.0 ± 4.0	(54) 83.5 ± 3.3

Mean ± SE (V/sec). Control: 82.1 ± 3.9, N=55.

脳抽出液の超遠心上清（100 K × g, 60分）を酢酸で処理（PH = 4.3）した後遠心（20 K × g, 30分）して上清と沈殿に分画し、これらを凍結乾燥して酢酸を除き、塩類溶液に再び溶解してそれらの活性を調べた。Lowry 法で測定したタンパク量に基づき、培養液 1 ml 当り 3.3 μg になるように加えた場合を稀釈 1 として示してある。また括弧内の数は計測した筋細胞数である。

系統および 413 系統からの脳抽出液で、TTX 感受性活動電位の最大立上り速度に対する栄養効果の活性に関して差は全く認められなかった。また筋ジストロフィー系統からの培養筋を長期培養すると（3 週）活動電位の最大立上り速度は減少した。今回培養 4 週についても調べてみたが同様の成績であった。これは昨年度報告書<sup>7)</sup>に述べた如く、神経の栄養効果の欠損によるものでなく、筋原性の膜異常によるものと推定される。

## 文 献

- 1) Redfern, P. & Thesleff, S. *Acta Physiol. Scand.*, **82**: 70-78, 1971.
- 2) Harris, J. B. & Marshall, M. W. *Nature New Biol.*, **234**: 191-192, 1973.
- 3) 加濃正明, 鈴木信之, 山崎捨夫, 小島久幸, 山本三恵: 筋ジストロフィー症の基礎的研究 (江橋班) 昭和53年度研究報告書, 118 - 122.
- 4) Kano, M. & Yamamoto, M. *J. Cell. Physiol.*, **90**: 439-444, 1977.
- 5) Kano, M., Suzuki, N. & Ojima, H. *J. Cell. Physiol.*, **99**: 327-332.
- 6) Albuquerque, E. X. & Warnick, J. E. *Science*, **172**: 1260-1263, 1971.
- 7) 加濃正明, 山崎捨夫, 佐藤諦吉, 山本三恵: 筋ジストロフィー症の基礎的研究 (江橋班) 昭和54年度研究報告書, 85 - 89.

## 9 培養筋細胞の成長に及ぼす各種血清の作用について

小 沢 鎧二郎\*

研究協力者 木 村 一 郎\* 萩 原 康 子\*

ニワトリ骨格筋の培養には、多くの場合塩類や栄養物を含むいわゆる合成培地、例えばEagleのminimum essential medium (MEM)やHamのF12などと、ウマ血清とニワトリ胚抽出物(EE)とを混合した培地が用いられる。このような培養液中で培養されると筋芽細胞は増殖した後、融合して筋管細胞を作り大きなネットワークを作る。また筋細胞に比較的特異的に大量に含まれている酵素にクレアチンキナーゼ (CK)がある。CKは筋芽細胞には殆んど含まれないが、筋管細胞には多く含まれている。<sup>1)</sup>従ってCKの活性は筋管細胞の発達の程度を示す指標となり得るから、培養液の効果を判定する指標と考えてもかまわない。

上に述べた培養液からEEを除いた液すなわちMEMとウマ血清でできている培養液中でニワトリの筋芽細胞を培養しても、筋管細胞の発達はみられない。これに少量のEEを加えると筋管細胞の発達が見られるが、このEEの作用は少量のニワトリ血清で代用し得る。<sup>2)</sup>このようなMEMとウマ血清の液に何等かの物質を加えることによって筋管細胞の成長の程度、いいかえればCK活性をマーカーとして、その物質のmyogenesisに及ぼす効果を判定することが可能である。

我々はこの方法を指標としてニワトリ血清の中に存在し、ニワトリ筋細胞のin vitroでの成長に必要な物質(筋成長因子, MTF)の精製を行った。MTFは筋芽細胞の分裂や筋管細胞の成長を促し、従ってCK活性の蓄積を促すという意味においては、

EEに代り得るものである。

MTFはニワトリ血清の一成分であり、しかもEEに代って、MEMとウマ血清を成分とする液にニワトリ筋細胞の成長を促す効果を与えるということ を考慮すると、ウマ血清とニワトリ血清とは何か質的に異なる物質を含んでいるということが考えられる。このことは、ニワトリ筋細胞はMEMとニワトリ血清とでできている培養液中では大きく成長し得ることからもうかがわれる。

血清の筋細胞へ及ぼす影響を色々な動物の種に渡って広く観察することはまだ行われていない。これらのことはMTFのヒトにおける研究の基礎データとして非常に重要であるので、我々は各種鳥類及び哺乳類の血清について研究を行った。そしてある程度の例外はあるものの、類特異性が存在することを認めたので報告する。

### 材 料 と 方 法

ウシ胎児、仔ウシ、ウシ、ウサギ、ブタ、ウマ、サル、ニワトリの血清はFlou Laboratoryより購入した。コシヤモ、チャボ、ウズラ、キンケイ、キジ、シチメンチョウ、ホロホロチョウ、アヒル、ガチョウ、セグロカモメ、ドバト、トビの血清は北大獣医学部大賀、喜田、名大農学部近藤、佐藤教授、都試験場田中分場長からの贈与を受けた。ラット、ドハト、イヌ、ヒト血清は動物から採取した。

MTFの精製法は既に報告した方法に従った。<sup>3)</sup>

ニワトリ筋芽細胞は、孵卵11~12日胚の胸筋をコラゲナーゼ処理し単細胞を得た後、differential adhesion法によって精製して用いた。

\* 国立武蔵療養所神経センター機能研究部

ラット筋芽細胞は、新生児後肢を細切後、トリプシン処理して単細胞を得て用いた。

培養液：ニワトリ細胞は、85%MEM, 15%ウマ血清でできている培養液 2.5ml に他の血清を 0.1ml 加えた液で培養した。これと異なる場合には別に記した。

ラット細胞は、80%MEM 20%ニワトリ血清あるいは90%MEM 10%ニワトリ血清 2.5ml に他の血清 0.1ml を加えた液で培養した。

培養期間はニワトリ細胞では4日、ラット細胞では5日であった。

細胞の集め方やCK測定法は、既に報告した方法

に従った。<sup>4)5)</sup>

## 結 果

ニワトリ筋細胞に対する効果：15%ウマ血清存在下で各種動物の血清濃度を色々にかえてCK活性蓄積に及ぼす効果について調べた。血清濃度の変化分はMEM濃度の変化でおぎなった。ニワトリ血清は0.1%あれば有効で、濃度が増すにつれてCKは上昇した。アヒル血清の有効濃度はニワトリよりも高いが、似たような曲線を描いた。ドバト血清は最低有効濃度は3%と高いが、曲線は急速に上昇した。

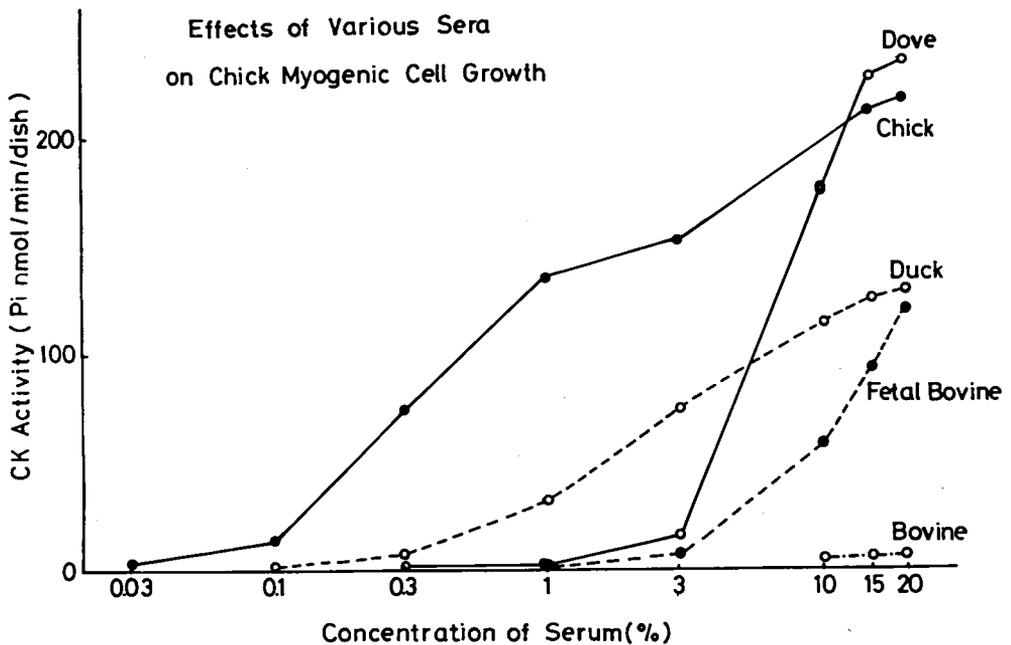


図 1

また胎児ウシは10%以上ではかなり有効であった。これに反してウシ血清は殆んど有効でなかった。20%ではCKを測り得る大きさに迄は成長しなかったものの、顕微鏡下で中程度の筋管細胞の成長が観察され、ある程度は有効であると思われた。しかし有効濃度差が非常に大きいということは、やはり質的に違っていると思われる。また有効であった四

種の血清の濃度-作用曲線が平行でないことは、これらの曲線を用いて平行線検定法等の通常の検定法の適用が容易でないことを示している。従って以下の実験では定量的な比較を行わず、半定量的な表示を行った。

種々の血清を適当な濃度でMEM-ウマ血清培養液に加えて培養後、生えた細胞中に含まれるCK活

性を測定した。ニワトリやアヒル血清ではCK活性は図1からすると大まかには血清の対数濃度には直線的に増加することから、すべての血清が3.8%

存在する場合のCK値を換算した。3.8%ニワトリ血清の値を1,000として800以上を(卅), 200から400を(卍), 30から100を(+)で表わしたところ表1

表1 Effects of Various Sera on Chick Myogenic Cell Growth in vitro

Birds		Mammals	
Chick	(+++)	Fetal Bovine	(+)
Cochin-China Fowl	(+++)	Calf	(-)
Bantam	(+++)	Bovine	(-)
Japanese Quail	(+++)		
Golden Pheasant	(+)	Dog	(-)
Korean Pheasant	(+)	Rat	(-)
Turkey	(+)	Rabbit	(-)
Guinea Fowl	(+)	Swine	(-)
Duck	(++)	Monkey	(-)
Goose	(++)	Human	(-)
Herring Gull	(+)		
Dove	(+)		
Kite	(+)		

の結果が得られた。

哺乳類の血清は3.8%ではニワトリの成長には有効でなかった。ただし胎児ウシ血清はわずかに有効であった。一方鳥類の血清は多かれ少なかれ有効であった。同じキジ目でも鶏類は非常に有効なのに

対してホロロチョウ、キジ、シチメンチョウ、キンケイの血清はあまり効果はなかった。それに反してガンカモ目のアヒル、ガチョウ血清はかなり有効であった。

Age Effects of Bovine Serum on Chick Myogenic Cell Growth

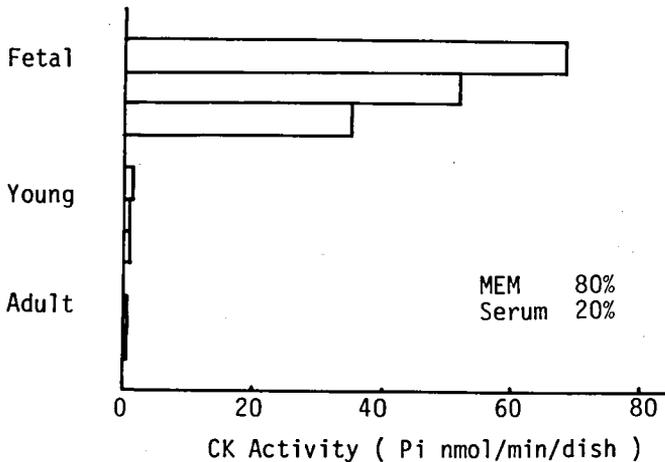


図2

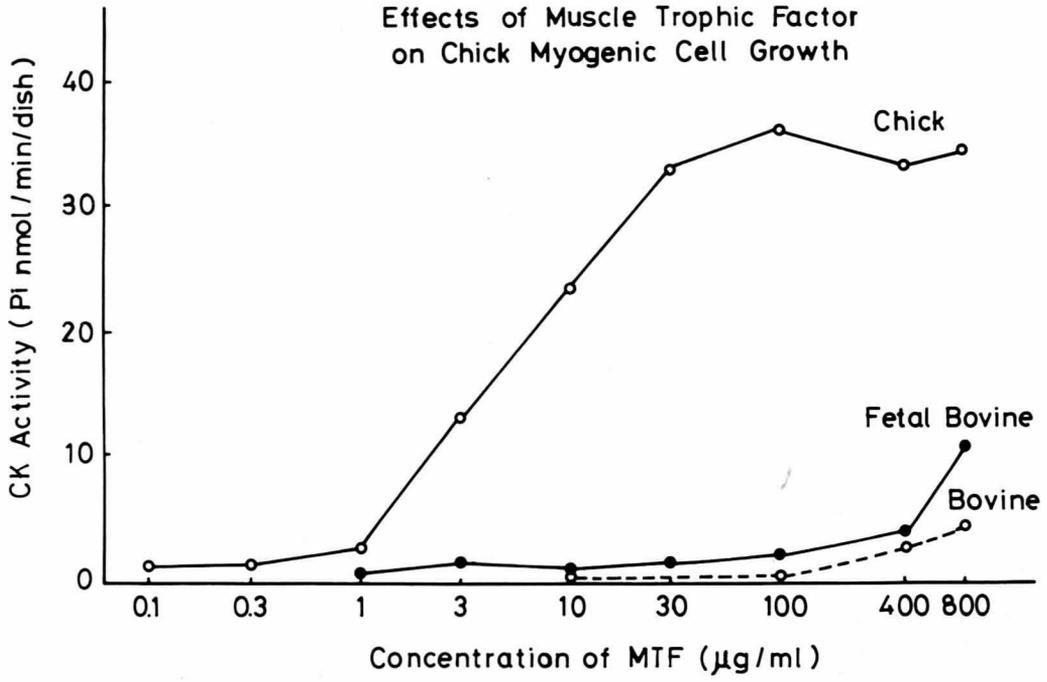
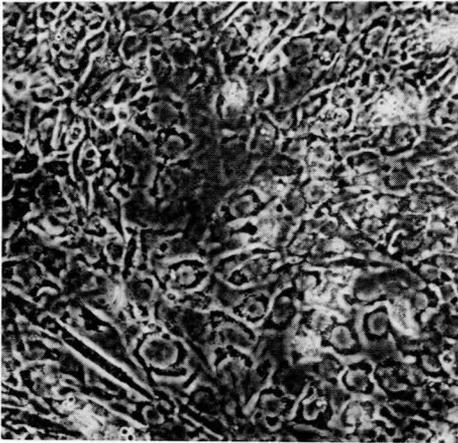
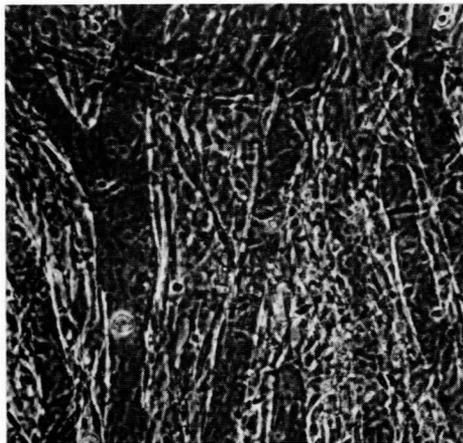


图 3

Effects of Rat Serum on Rat Myogenic Cell Growth  
5 Days of Incubation



MEM 90%  
Chick Serum 10%



MEM 90%  
Chick Serum 10%  
Rat Serum 0.06%

图 4

以上から上記の条件下でニワトリ筋の成長には鳥類の血清は有効であるが、哺乳類の血清は有効でないといえることができる。我々は既にウマ血清の濃度をいくら高めてもニワトリ筋の成長に有効でないことを認めている。しかしウシ血清は特例かもしれないと考え、胎児ウシ、仔ウシ、あるいはウシ血清20%とMEM80%の培養液の効果を調べたところ、図2に示すように胎児ウシ血清のみが有効であった。しかし、MTFをニワトリ、胎児ウシあるいはウシ血清から精製して比較したところ、胎児ウシとウシのMTFの有効濃度はほぼ同じであり、しかもニワトリのMTFの有効濃度の400倍以上であった。一方図1から分るように、血清で比較する場合

にはニワトリは胎児ウシの約30倍である。これらことは胎児ウシ血清が有効なのはMTF以外の成分がニワトリ筋の成長に関与していることを示唆している。

ラット筋細胞に対する効果：図4に示すように、ラット筋芽細胞は90%MEM10%ニワトリ血清から成る培養液中では殆んど成長しなかった。これは80%MEM20%ニワトリ血清中でも同じであった。しかしこれに微量のラット血清を加えると筋管細胞が発達する。これらの事実は、ニワトリ筋細胞の場合と同様の実験系を組むことができるが、この際ウマ血清の代りにニワトリ血清を用いるとよいことが分る。

表2 Effects of Various Sera on Rat Myogenic Cell Growth in vitro

Mammals		Birds	
Rat	(++)	Chick Embryo Extract	(+)
Fetal Bovine	(++)	Chick	(±)
Bovine	(++)	Japanese Quail	(±)
Rabbit	(++)	Golden Pheasant	(-)
Dog	(++)	Korean Pheasant	(-)
Swine	(++)	Turkey	(-)
Horse	(++)	Guinea Fowl	(-)
Monkey	(++)	Duck	(-)
Human	(++)	Goose	(-)
		Dove	(±)

各種の動物の血清の比較をニワトリの場合と同様に行った。表2にみられるように哺乳類の血清はラット筋細胞の成長に有効であり、鳥類の血清は殆んど有効ではなかった。たゞ鳥類のうちでEEやドバトがやゝ有効かもしれないがなかった。哺乳類の血清がすべて同じ程度に有効なわけではないがすべて(++)で示してある。これは、測定を3.8%の血清存在下で行ったのであまり差が大きく開かなかったためである。しかしブタ、ウマ、ラットの血清は特に有効であった。しかしこれらの効果も、血清のロットによって

異なるようである。

哺乳類の場合もこの効果はMTFによるものか否かを検討するためにニワトリ、ウサギのMTFを精製して同様の実験を行った(図5)。ウサギのMTFは $8\mu\text{g}/\text{ml}$ で有効であるのに、ニワトリのMTFは $250\mu\text{g}/\text{ml}$ でも有効でなかった。

#### 考 察

以上の事実から、原則としてニワトリの筋を成長させるためには鳥類の血清が、ラットの筋を成長さ

Effects of Muscle Trophic Factor  
on Rat Myogenic Cell Growth

5 Day Incubation

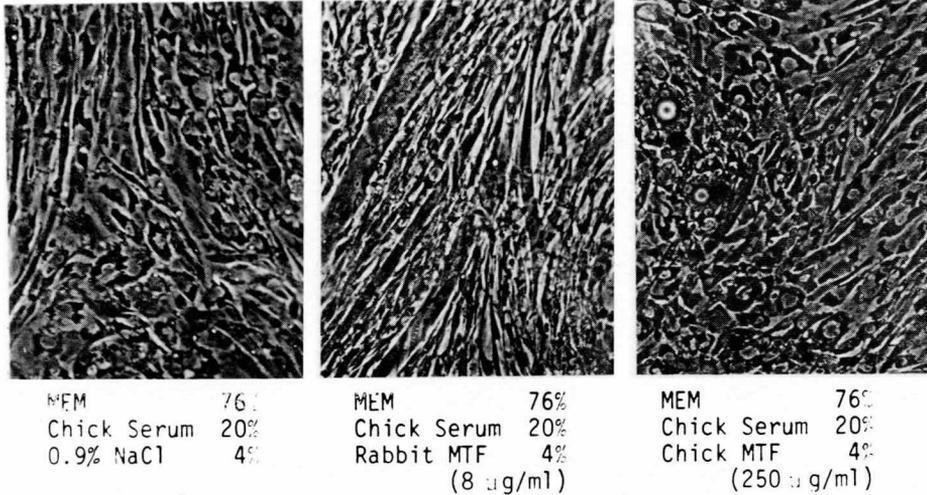


図 5

せるためには哺乳類の血清が必要であり、その最も重要な部分はそれぞれの類のMTFであることが分る。一方胎児牛血清やEEが類の特異性を越えて有効であるように見えるが、胎児牛の場合について示したようにMTFでは類を超えて作用する能力が血清に比してずっと低いことを考えると、胎児牛血清の中にはMTF以外の何物かがあることが推測される。

我々は既に報告したように、<sup>3)</sup>一度成長したニワトリ筋管細胞は、培養液からニワトリMTFを除くことによって変性し再び培養液にニワトリMTFを加えることによって再成長することをみている。この際MTFを除いた培養液はMEMとウマ血清からできているので血清は存在する。それにもかゝわ

らず筋管細胞に変性起ることは、MTFの類特異性のためにウマ血清中に当然含まれるウマMTFはニワトリ筋に対しては無効であるためと考えられる。

文 献

- 1) Ohtsuki, I. & Ozawa, E.: *Cell Structure and Function* 2: 367-370, 1977.
- 2) Ozawa, E. & Kohama, K.: *Proc. Japan Acad.* 49: 852-856, 1973.
- 3) 小沢鏞二郎: 本研究班昭和53年度報告書, PP.25 - 31. (1979)
- 4) Ozawa, E.: *Develop., Growth & Differ.* 20: 179-189, 1978.
- 5) Ozawa, E., Hagiwara, Y. & Kimura, I. *ibid.* in press.

### Ⅲ 微 細 形 態

- 10 チキン骨格筋筋細胞膜の凍結切断像 53
- 11 ニワトリ筋の微細形態上の多様性 59
- 12 心筋および骨格筋における筋調節蛋白質の分化 65
- 13 幼若筋ジストロフィーチキン胸筋の抗トロポニン染色 71

## 10 チキン骨格筋筋細胞膜の凍結切断像

岩 崎 祐 三\*

研究協力者 石 井 弘 子\*

ジストロフィーチキン骨格筋の筋細胞膜の凍結切断像を報告する。孵化直後、孵化後2および5週目のジストロフィー鶏（413株）とその対照健康鶏（412株）の浅胸筋と後肢外転筋について検索を行ない、各筋群について、筋細胞膜のcaveolaeの密度とその分布様式について検討した。

### 材 料 と 方 法

班長より供与されたジストロフィー鶏および対照鶏の受精卵を回転孵卵器で孵化後、当神経センターで飼育した幼鶏を検索の対象とした。筋組織はネンブータル麻酔下に採取、リン酸緩衝液(pH7.4, 285 mOsm)で稀釈した2.5% グルタルアルデヒドで固定した。グルタルアルデヒド固定筋試料を二分し、一部は凍結切断法による細胞膜構築の検索に用い、一部はオスミウム酸により後固定ののち、エポキシ樹脂に包埋し、光顕のおよび電顕の観察用切片の作製に用いた。凍結切断のためには細切したグルタルアルデヒド固定筋を2.5%グリセリンで処理したのち、銅製試料台にのせ、液体窒素で冷却したフロン12中で急速に凍結した。凍結試料はエイコー社製凍結試料作製装置を用いて、試料台温度 $-115^{\circ}\text{C}$ 、真空度 $1\sim 2\times 10^{-7}$  Torrで切断し、切断面に直ちに白金パラジウムの電子線蒸着とカーボンの蒸着を行なった。切断面のレプリカはハイターで処理後、蒸留水で洗い、300メッシュにのせ、加速電圧100KVで写真撮影を行なった。caveolaの密度の測定には直接倍率1.500~3.000倍、膜内

粒子密度の測定には40.000倍で撮影した写真を3倍に引き伸ばしたものをを用いた。電顕写真のcaveolaおよび膜内粒子の密度の測定、光顕写真の筋線維の直径の測定には、コントロール社製画像解析装置を用いた。

### 結 果

今回、検索に用いた筋の筋線維の直径を計測した結果を表1に示す。5週令でジストロフィー鶏の筋線維の径が対照鶏のそれに比らべ大きい傾向が見られるが、筋線維の直径のばらつきは対照鶏のそれと大差ない。またトルイジンブルー染色標本についての組織学的検索でも、ジストロフィー鶏における筋線維の変性は比較的軽く、少数の脂肪顆粒はみられたが、筋線維の空胞化や、明白な筋細胞の再生像はみられず、今回検索の対象とした組織は変性の初期にある筋組織であると考えられた。

図1は、鶏化直後の浅胸筋である。表1からも明らかのごとく、鶏化時の浅胸筋は、他の筋にくらべ線維の径が小さく、またその横断面をみても、円形または楕円形のものが多く、成熟した筋線維の多角形の断面とは明らかに異なる。このような未熟な筋線維の細胞膜の特徴は、caveolaeの配列に規則性が見られないことである。また、5ないし8個のcaveolaeの集簇の存在もこのような未熟な筋線維膜の特徴のように思われた。一方、後肢筋についてみると、孵化時、筋線維の横断面は多角形で成熟筋線維の形態を示しており、浅胸筋の形態とは異なる。更に、その細胞膜の凍結切断像をみると、caveolaeの単位面積当りの密度は孵化時の浅胸筋のそれに近

\* 国立武蔵療養所神経センター

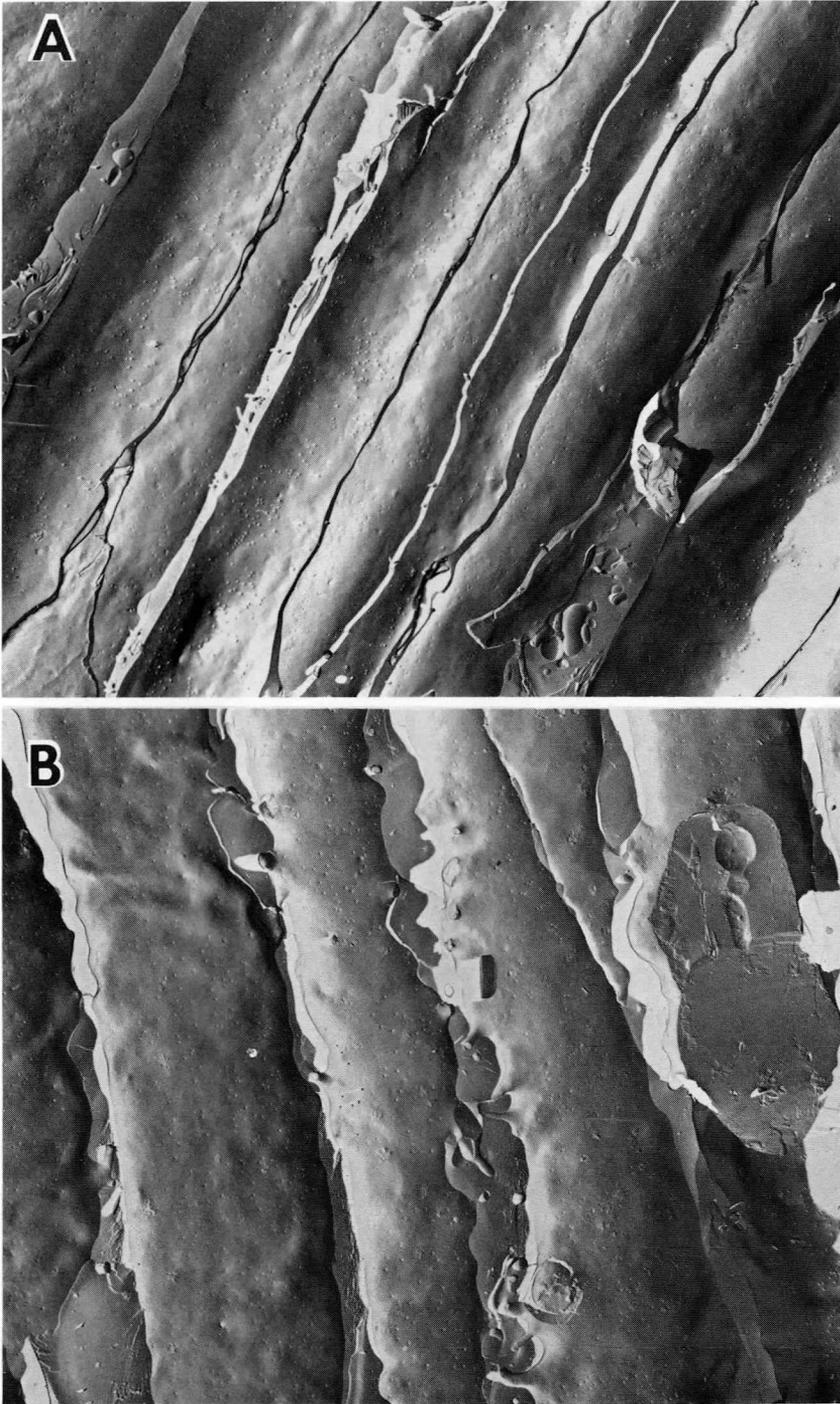


図1 孵化直後の浅胸筋の凍結割断像  
A：対照鶏 B：ジストロフィー鶏 倍率 × 6,000

表1 Diameters of muscle fibers

<u>Breast muscle</u>	day 0	2 wks.	5 wks.
Control	2.7 ± 0.2*	10.2 ± 0.7	26.8 ± 1.3**
Dystrophic	2.4 ± 0.2	8.8 ± 0.5	31.3 ± 1.9
			** p < 0.1
<u>Leg muscle</u>			
Control	8.3 ± 0.2	11.3 ± 0.4	26.6 ± 1.5**
Dystrophic	7.1 ± 0.4	11.1 ± 0.6	30.8 ± 2.2
	*mean ± S.E. N = 30		*** p < 0.05

表2 Densities of caveoles  
( per 10 μm<sup>2</sup> )

<u>Breast muscle</u>	day 0	2 weeks	5 weeks
Control	108.6 ± 3.6	128.1 ± 14.8	140.1 ± 4.0
Dystrophic	111.5 ± 5.3	199.7 ± 17.3	241.5 ± 5.2
	p < 0.5	p < 0.01	p < 0.001
<u>Leg muscle</u>			
Control	106.4 ± 1.4	140.0 ± 9.2	139.7 ± 8.0
Dystrophic	105.3 ± 2.9	131.1 ± 9.3	261.8 ± 11.7
	p < 0.5	p < 0.5	p < 0.001

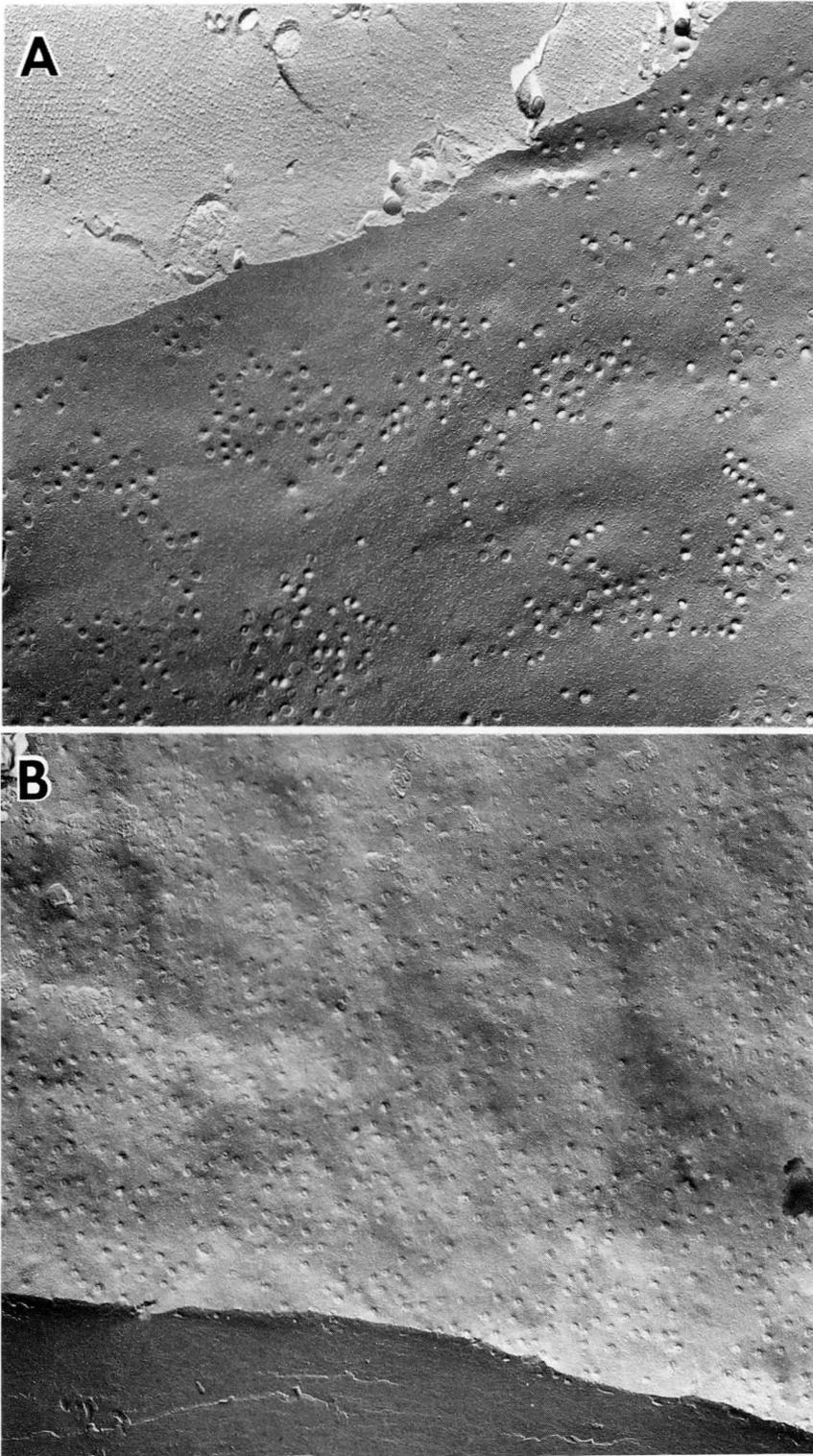


図2 孵化後5週目の後肢外転筋

A: 対照筋 B: ジストロフィー鶏

倍率 × 15,000

いが、その配列様式は、後述する対照成熟鶏の配列に類似した規則性を示すものが多い。このような所見はジストロフィー鶏と対照鶏に共通の所見である。

孵化後2週間目の幼鶏の筋細胞膜の caveolae の密度と配列を後肢筋についてみると、対照鶏とジストロフィー鶏との間に差異を認めず、いずれにおいても、対照成鶏に類似した規則性を示している。ところが浅胸筋では両者の間に明白な差がみられる。つまり、対照鶏では caveolae の配列が規則的であ

るのに対しジストロフィー鶏では caveolae は膜面に一様に分布しており、単位面積当りの caveolae の密度もジストロフィー鶏のそれは、同週令の対照鶏に比らば有意に増加している（表2）。

図2は5週令のジストロフィー鶏と対照鶏の筋細胞膜であるが、5週令では浅胸筋、後肢筋ともジストロフィー鶏と対照鶏の間に明白な差異がみられる。対照鶏にみられる caveolae の規則的な配列はジストロフィー鶏では全く失なわれており、ジストロフ

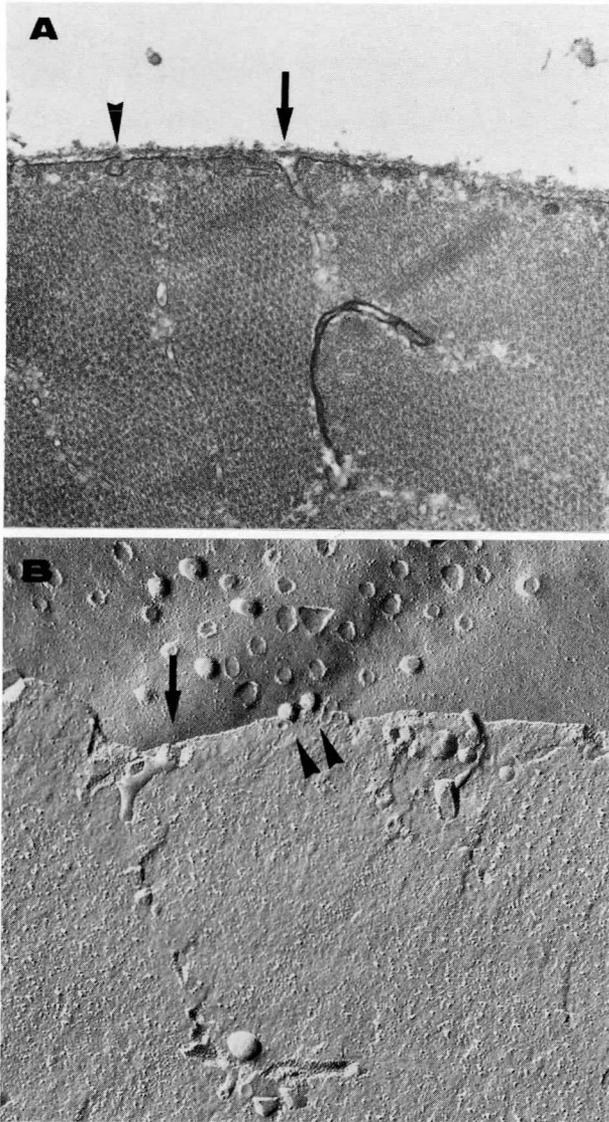


図3 5週令対照鶏の後肢外転筋 倍率  $\times 30,000$   
T-system の開口部を矢印, pinocytotic vesicle  
を三角で示す。

イー鶏では caveolae はほぼ一様に配列しており、単位面積当りの caveolae の密度も対照鶏のそれに比べ、著しく増加している (表 2)。

図 3 に、筋線維の透過電顕像と凍結切断像の対比を示すが、ここでみられるごとく、凍結切断像で caveolae としてみとめられる構造は、透過電顕像でみられる、T-system の開口部と pinocytotic vesicle に相当するものと思われるが、両者が形態学的に同一のものか否か、更に検討を要するものと思われる。

### 考 案

筋ジストロフィー症における筋細胞膜の異常が示唆されて久しいが、凍結切断法による筋細胞膜の構築に関する報告は少ない。Duchenne 型ジストロフィー症については、Schotland らが膜内粒子の密度に注目して報告を行ってきたが、膜内粒子密度の計測には幾多の技術的困難性があることは、Schotland 自身の data をみても、初期に発表された data<sup>1)</sup> と最近の報告<sup>2)</sup> との間に大きな違いがあることから明白である。しかも、そのような差異を生じた原因について十分な説明がなされていない。したがって、膜構築の異常を膜内粒子の密度を指標として論ずるのは慎重であらねばならぬと思われる。一方、今回、われわれが指標とした caveolae の密度については、凍結切断の技術的影響を受けにくく、膜構築の変化をみる指標としては、膜内粒子の密度に比べ、より信頼性の高いものと考えられる。しかしながら、caveolae に重点をおいた、筋細胞膜の凍結切断法による研究報告は少なく、<sup>3,4)</sup> 特にニワトリの骨格筋についての報告は、われわれの知る限り皆無である。したがって、今回われわれの観察結果についても慎重に論じなければいけないが、cav

eolae の単位面積当りの密度がジストロフィー筋では電顕で観察される筋胞体の変化に先行して、変化していることは確かなことのように思われる。次に、このような caveolae の密度の増加が再生筋についてみられるのか、あるいは変性筋にみられる現象であるのかの点についても、再生筋が、ほとんどないと考えられる 2 週令の浅胸筋においてみられることから、変性の初期変化と考えてよいように思われる。更に再生筋の変化をとらえるために、高い週令の動物についての検索をすすめている。

### 結 論

凍結切断法により明らかにされる、ニワトリ骨格筋、筋膜の caveolae の密度と分布は、孵化時にはジストロフィー鶏と対照鶏の間に有意の差が認められないが、ジストロフィー鶏の浅胸筋では孵化後 2 週目、後肢筋では孵化後 5 週目に採取した試料において、対照鶏のそれに比べ、有意な密度の増加と配列の乱れがみられ、ジストロフィー鶏の骨格筋では、筋胞体の変性に先行して、筋細胞膜の変化がおきていることが推測された。

### 文 献

- 1) Schotland, D.L., Bonilla, E. and van Meter, M.: Duchenne Dystrophy: Alteration in muscle plasma membrane structure. *Science*, 196: 1005-1007, 1977.
- 2) Schotland, D.L., Bonilla, E. and Wakayama, Y.: Application of the freeze fracture technique to the study of human neuromuscular disease. *Muscle and Nerve*, 3: 21-27, 1980.
- 3) Dulhunty, A.F. and Franzini-Armstrong, C.: The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibers at different sarcomere lengths. *J. Physiology*, 250: 513-539, 1975.
- 4) Shafiq S.A., Leung, B. and Schutta, H.S.: A freeze-fracture study of fiber types in normal human muscle. *J. Neurol. Sci.* 42: 129-138, 1979.

## 11 ニワトリ筋の微細形態上の多様性

石川 春 律\*

研究協力者 月 田 承一郎\* 月 田 早智子\*

筋ジストロフィーにおいて、罹患性は筋の種類によって異なるが、その要因についてはまだ明らかにされていない。他方、筋線維の形態は筋の種類により多様である。この形態の多様性を詳細に分析することは罹患筋選択性の局所的要因の解明につながると思われる。われわれはこの観点に立って、さきにマウス同一個体内の多数の筋について電子顕微鏡的に検索した。

今回、ニワトリの各種骨格筋について、筋線維内膜系を中心に微細形態の多様性を検索したので、その結果を報告する。

### 材料および方法

材料として、成熟白色レグホン（1.0～1.8 kg 体重、雄）および、成熟キンカチョウ（雄）を用いた。ネンブタール腹腔内麻酔で、全身各部から筋組織を切り出し、伸展位で、2.5% グルタルアルデヒド・2%ホルムアルデヒド混合液（カコジル酸ナトリウム緩衝液、pH7.3）で前固定を行なった。1%四酸化オスミウムで後固定ののち、エタノール脱水、エポン812樹脂に包埋した。筋線維は縦断切片像および横断切片像として透過電子顕微鏡で観察した。

### 結果および考察

#### 1. 横細管系

ニワトリ筋では、大胸筋（外層部）、前広背筋、後広背筋、下腿筋（前脛骨筋・総趾伸筋）、大腿筋（縫工筋・恥坐大腿骨筋）、眼筋（内側直筋・毛様

体筋）について検索した。横細管系の全体的な発達程度、走行の規則性や横走レベルは筋の種類によって多様であった。

筋は横細管の走行レベルから、2種に大別できる。Z板レベルを横走する筋（Z横細管系）と、A-I境界レベルを横走する筋（A-I横細管系）とがある。ニワトリでは、検索された限り、大胸筋（外層部のみ検索）のみがZ横細管系に属し（図1）、他のすべての筋はA-I横細管系に分類できた（図2、3、4）。同一動物の骨格筋において、このように横細管のレベルを異にする2種の筋が存在することはすでにニワトリのみでなく、<sup>1~4)</sup>ハトでも記載されている。<sup>5)</sup>われわれが今回検索したキンカチョウでも同じ結果で、鳥類に共通した特性と考えられる。このような所見は機能的のみならず進化上の観点からも興味深いことで、さらに、ジストロフィーチキンで大胸筋が主な罹患筋である事実との関連で注目される。

横細管の発達程度や走行の規則性も筋の種類によって大いに異なる。同一筋内で線維型による差もあるが、筋の種類による差が大きい。ニワトリでは、大胸筋、下肢筋、後広背筋が規則的走行をとるのに対し（図1、2、3）、外眼筋、毛様体筋は中等度（図4）、前広背筋は最も規則性が悪い。キンカチョウでは、下肢筋が比較的規則正しい走行を示し、量的にも発達が良好なのに対し、大胸筋や後広背筋では規則性や発達程度は中等度であった。前広背筋は不規則な走行を示した。

横細管の走行や発達程度は超薄切片のみの観察で不十分な場合がある。遅筋として知られる前広背筋

\*東京大学医学部解剖学教室

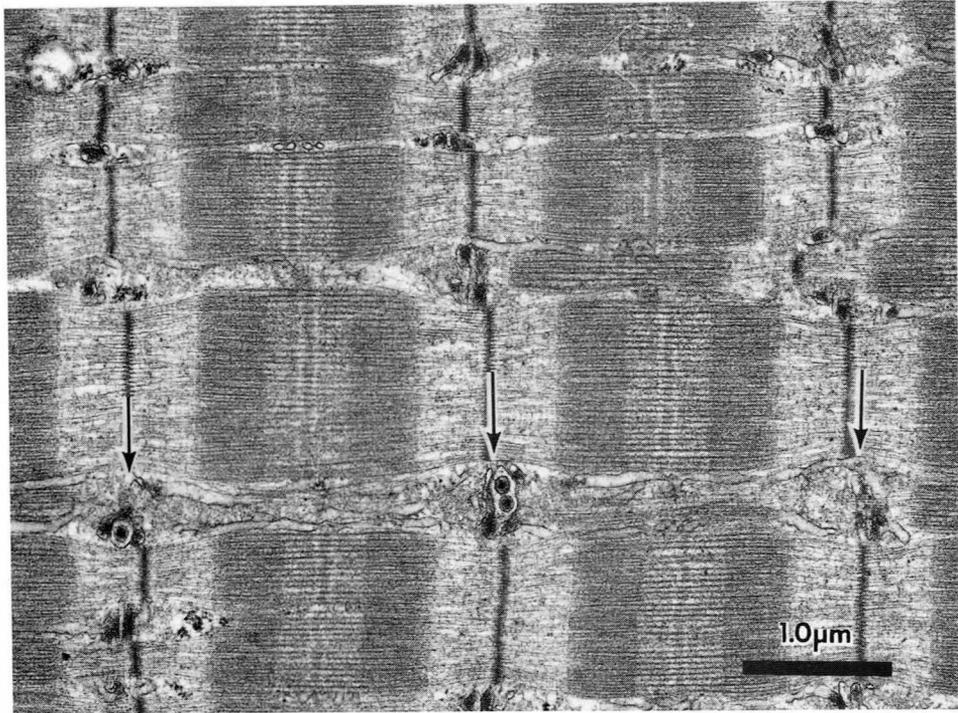


図1 縦断切片で見るニワトリ大胸筋線維  
横細管(矢印)はZ板のレベルに位置している。

では超薄切片にて走行が非常に不規則で、基本的横走レベルを決定するのは困難である。三つ組のレベルが多くA-1境界レベルに位置することから推論できるのみである。しかし、硝酸ランタンなどを横細管トレーサーとして、厚さ1 $\mu$ mの切片を超高圧電子顕微鏡で観察すると横走レベルが判定できる。不規則な走行で縦走する横細管部分が多い中に、短かい巨離ではあるがA-1帯を横走する部分が散在的に観察できる。Z板やA帯中央域を横走する所見がほとんどないことから、この筋も本質的にはA-1横細管系であると判定した。

## 2. 筋小胞体と三つ組

筋小胞体の全体的な発達程度や筋筋レベルの形態分化は筋の種類により多様であった。筋小胞体は筋原線維間にあり、そのおのおのを取り巻くように網目をなしている。筋小胞体の発達程度は横細管系の発達と相まって、筋線維の収縮活動、とくに収縮速

度と密接に関係していると信じられている。

筋小胞体の網目の正面像は筋原線維表面を通る縦断切片にて示されるのみである(図2, 3)。同じ縦断切片での筋原線維間に見られる筋小胞体プロフィールを合わせて、立体的構成を推論することができる。しかし、この方法では数多くの筋線維についての量的分析は困難である。われわれは筋線維横断切片で分析することを目標に、上記縦断切片像との対比を行なった。

筋小胞体網のパターンは基本的には横細管レベルに対応して2型に分類される。ニワトリの大胸筋ではZ板のレベルに三つ組が形成され、拡張した筋小胞体終末槽から連続して、A帯に向う比較的一定した直径の管状小胞体が認められる。この管状小胞体はA帯中央で合して、扁平な有窓部をなす(図2a)。三つ組を除き、横紋のレベルによる発達の大きな差はない。この筋小胞体網は横断切片像での膜プロイ

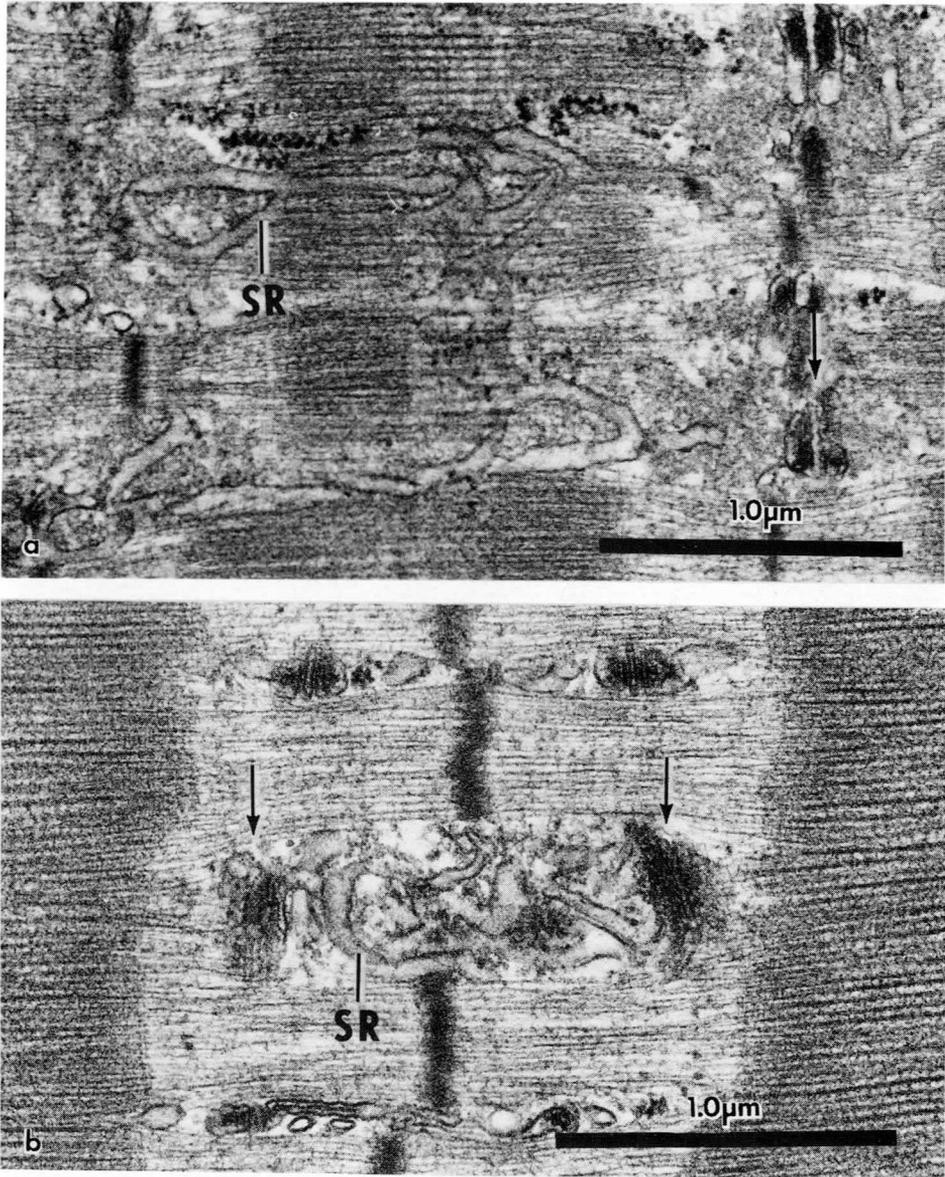


図2 ニワトリ筋の筋小胞体正面像

a. 大胸筋      b. 総趾伸筋

筋原線維表面を通る縦断切片で、筋小胞体 (SR) の網目が正面像として観察できる。横細管 (矢印) は大胸筋ではZ板のレベル、総趾伸筋ではA-I境界のレベルを横走する。

ルとよく対応する。筋原線維の横断レベルとの関連で、I帯やA帯(周辺部と中央部)に一致した膜形態がA帯中央部の有窓性小胞体を含めて明瞭に観察できる。

ニワトリ下肢筋では、三つ組はA-I境界に位置

し、筋小胞体がI帯(Z板を含む)のレベルで著しく良く発達しているのが特徴的である(図2b, 3a)。横断切片像で、I帯では筋原線維間に2層の筋小胞体網が形成されていることが多い(図3b, 5)。しかし、A帯では筋小胞体の発達は悪く、H帯でわずか

に増加するのみで、筋原線維間の境界は不明瞭である(図5)。しばしば、隣接筋原線維相互が連続する像が認められる。後広背筋では三つ組の両側、すなわち、I帯およびA帯ともよく発達した筋小胞体網を示す。前広背筋では3つ組の大多数がA-I境

界のレベルに縦向きに位置しており、それに対応した筋小胞体網を示す。三つ組の位置・方向も横断切片像で判定できる。キンカチョウでも同様の判定ができる。

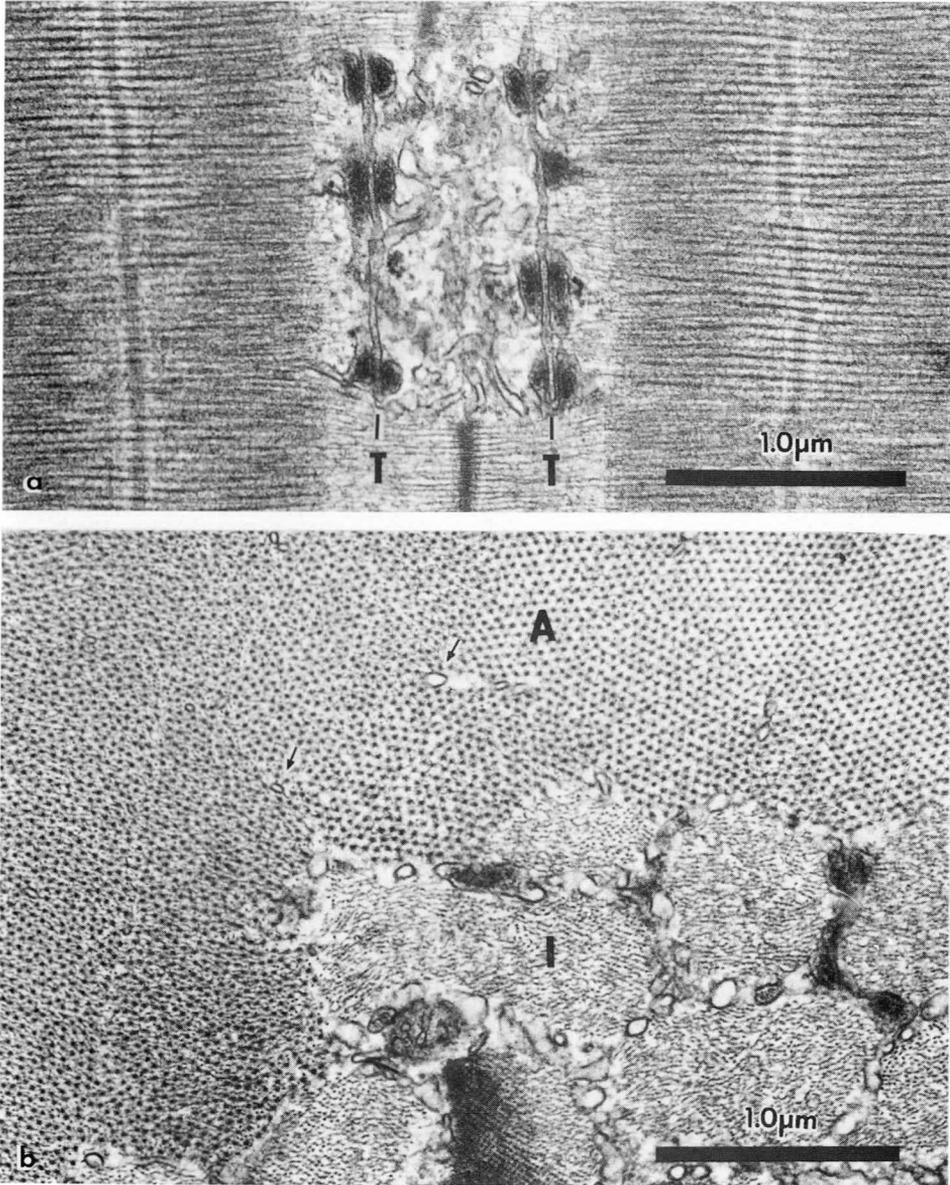


図3 ニワトリ縫工筋線維

a. 縦断切片像      b. 横断切片像

縦断切片で見ると、横細管(T)はA-I境界のレベルを走り、筋小胞体はI帯(I)のみに発達している。この所見は横断切片像で明瞭に確認できる。A帯(A)では筋小胞体プロフィール(矢印)が少なく、筋原線維相互の境界も不明確である。

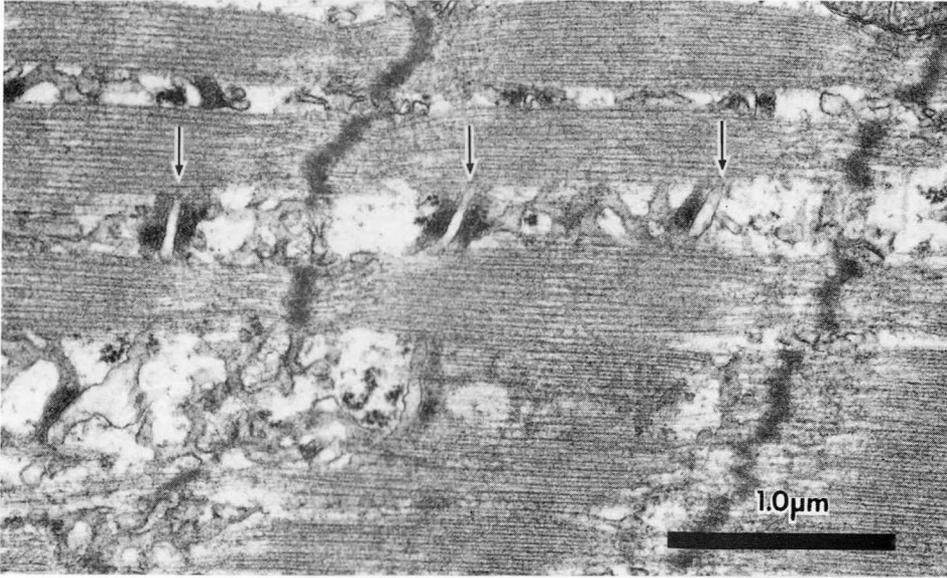


図4 縦断切片で見る外眼筋線維  
横細管(矢印)はA-I境界のレベルを横走しているが、筋小胞体はA帯、I帯ともほぼ一様に分布している。内側直筋。

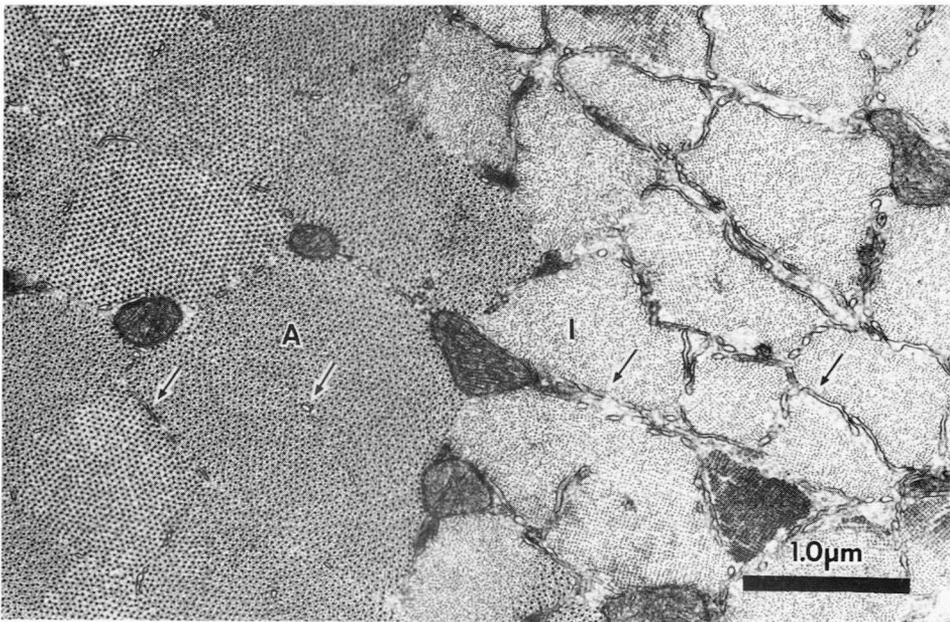


図5 横断切片で見るニワトリ総趾伸筋線維  
横断切片像で、筋小胞体(矢印)がI帯(I)で極めて良く発達し、しばしば2層に配列しているのに対し、A帯(A)では発達が比較的悪い。

## 結 論

ニワトリ骨格筋について、横細管系および筋小胞体を中心に、微細形態上の多様性を検索した。横細管系の走行レベルの差により、筋は2系、すなわち、Z横細管系とA-I横細管系に大別される。検索された限り、大胸筋のみがZ横細管系に属した。この性質は鳥類に共通のものと考えられるが、さらに多種の筋について検索していきたい。

筋小胞体の発達程度や横紋レベルの形態分化は筋の種類により多様であった。筋線維縦断切片像で見る筋小胞体網は、横断切片像における膜プロフィールによく反映されていることが確認された。このように、横断切片像から筋小胞体網の発達程度や分布パターンが判定できることから、今後、筋小胞体を定量的に観察していきたい。

## 文 献

- 1) Mendell, T.R.: Unusual features of the T-system of the pectoralis muscle of the chicken. *J. Ultrastruct. Res.*, 37: 383-387, 1971.
- 2) MacNaughton, A.F.: An ultrastructural and histochemical study of the fibre types in pectoralis thoracica and iliofibularis muscles of the fowl (*Gallus domesticus*). *J. Anat.*, 118: 171-181, 1974.
- 3) 徳臣晴比古, 上野 洋, 植川和利, 安藤正幸, 出田透: 筋の発生過程における変化 — 特に筋ジストロフィーチキンにおける横細管系について — 「筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究: 昭和53年度研究成果報告書」, 336-343, 1979.
- 4) Crowe, L.M. and Baskin, R.J.: Freeze-fracture of infact sarcotubular membranes. *J. Ultrastruct. Res.*, 62: 147-154, 1978.
- 5) Ashhust, D. E.: The fine structure of pigeon breast muscle. *Tissue & Cell*, 1: 485-496, 1969.

## 12 心筋および骨格筋における筋調節蛋白質の分化

嶋 田 裕\*  
研究協力者 豊 田 直 二\*

筋原線維を構成する筋蛋白質は、骨格筋、心筋および平滑筋では、それぞれ抗原性、電気泳動度等の性質が異なる型を呈していることが知られている。<sup>1)</sup> また骨格筋のなかでも速筋と遅筋<sup>2)</sup>、さらに胸筋と足筋<sup>3)</sup>においては、蛋白質が相違していて、異なった型をもっていることが明らかにされている。心筋の場合においても、心房筋、心室筋および Purkinje 線維では myosin isozyme の型が異なっていることが知られている。<sup>4)</sup>

一方、胚の骨格筋の蛋白質は成体のものと異なり、発生が進むにつれてその型を変化させ、最終的に成体と同じ性質を持った筋蛋白質に分化していくことが明らかにされつつある。<sup>5,7)</sup> しかし心筋の筋蛋白質の分化については、myosin<sup>6)</sup> について調べられているのみで、他の蛋白質については未だ詳細には解明されていない。

本研究では、筋の収縮弛緩に関与する調節蛋白質 troponin (TN) の各成分 (TN-T, I および C) を指標として、発生期における心筋と骨格筋において、それらは個体発生の中のどのような時期に出現し、どのような性質をもち、さらには発生につれて性質に変換がみられるか等の問題について、免疫組織学的方法を用いて追求した結果について報告する。

### 材 料 と 方 法

成体ニワトリの心筋 (心室筋) および骨格筋 (胸筋) から、TN の各成分 (TN-T, I および C) を分離精製し、これらの TN 各成分を抗原として、

心筋はウサギにより、骨格筋はモルモットにより抗血清を作製した。抗血清の特異性を高める目的で抗心筋 TN-T, I および C 血清は 2 回骨格筋の筋原線維で吸収し、さらに IgG に分離してから骨格筋の TN-T, I および C 成分をそれぞれ結合させたシアノゲンブロマイド (CNBr) 活性化 Sepharose 4 B カラムにより 2~3 回吸収した。骨格筋の TN 各成分の抗体についても、心筋筋原線維と心筋 TN 成分を用いて、同様な吸収操作を行った。

ニワトリ胚子の stage 9~38 までは胚子全体をグリセリン処置し、アセトン固定ののち、パラフィン包埋し、全身縦断連続切片を作製した。stage 39 以上の胚子については、グリセリン処置ののち 10 μm の凍結横断連続切片を作製し、アセトン固定をした。これらの切片は心筋および骨格筋の各 TN 成分より作製した抗体を用いて、FITC を用いた間接蛍光抗体法によって観察した。

### 結 果

このような抗体を用いて、ニワトリ胚子の切片を蛍光顕微鏡で観察した結果を表 1 に示す。stage 10 より抗心筋の TN 抗体によって心臓領域が染色され始めた (図 1)。同一胚子の連続切片は、抗心筋 TN-T, I および C の 3 つの抗体で同時に染色された。また胚子の心筋は、骨格筋の抗 TN-I 抗体とも反応した。この時期には、骨格筋は未だ形成されていないので、いずれの抗体によっても染色されなかった。

stage 14 から骨格筋は抗骨格筋 TN-T, I および C 抗体によって同時に染色された (図 2)。ま

\* 千葉大学医学部解剖学教室

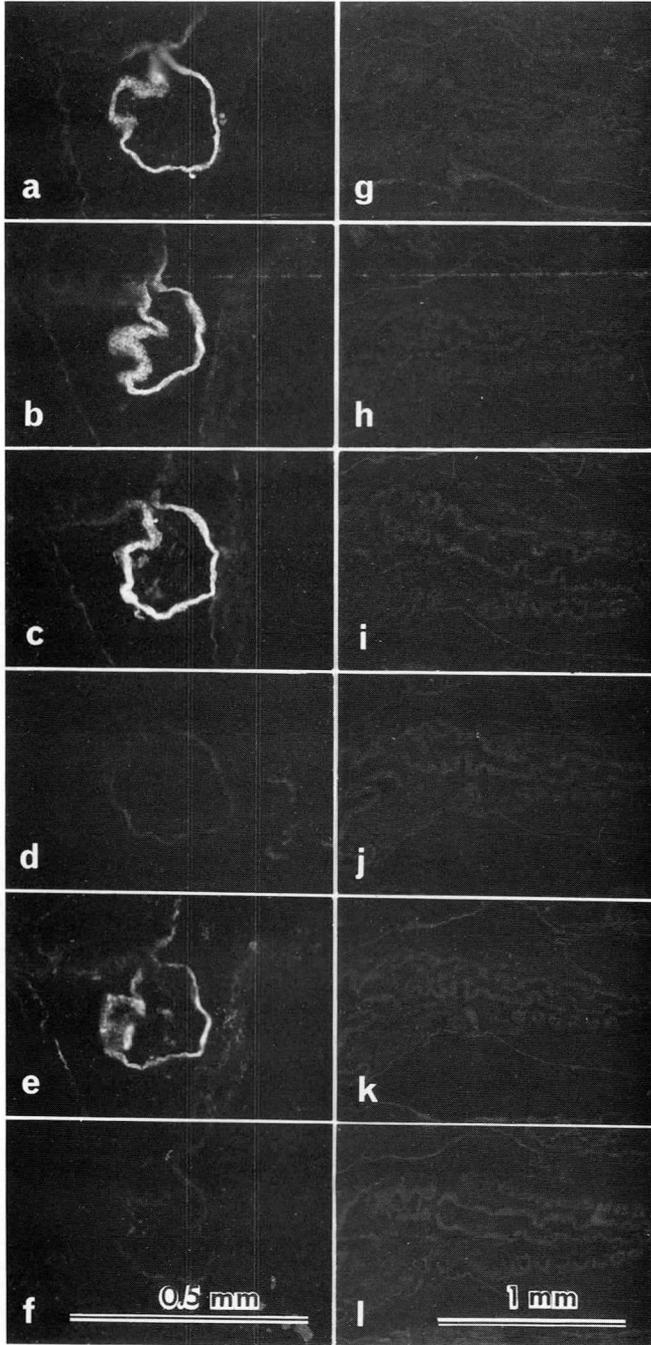


図1 Stage10 (Hamburger - Hamilton) のニワトリ胚における心筋と骨格筋。心筋は抗心筋 TN-T 抗体 (a), I 抗体 (b) および C 抗体 (c), さらに骨格筋の TN-I に対する抗体 (e) によって染色された。骨格筋はいずれの抗体とも反応しなかった。(g-l)。

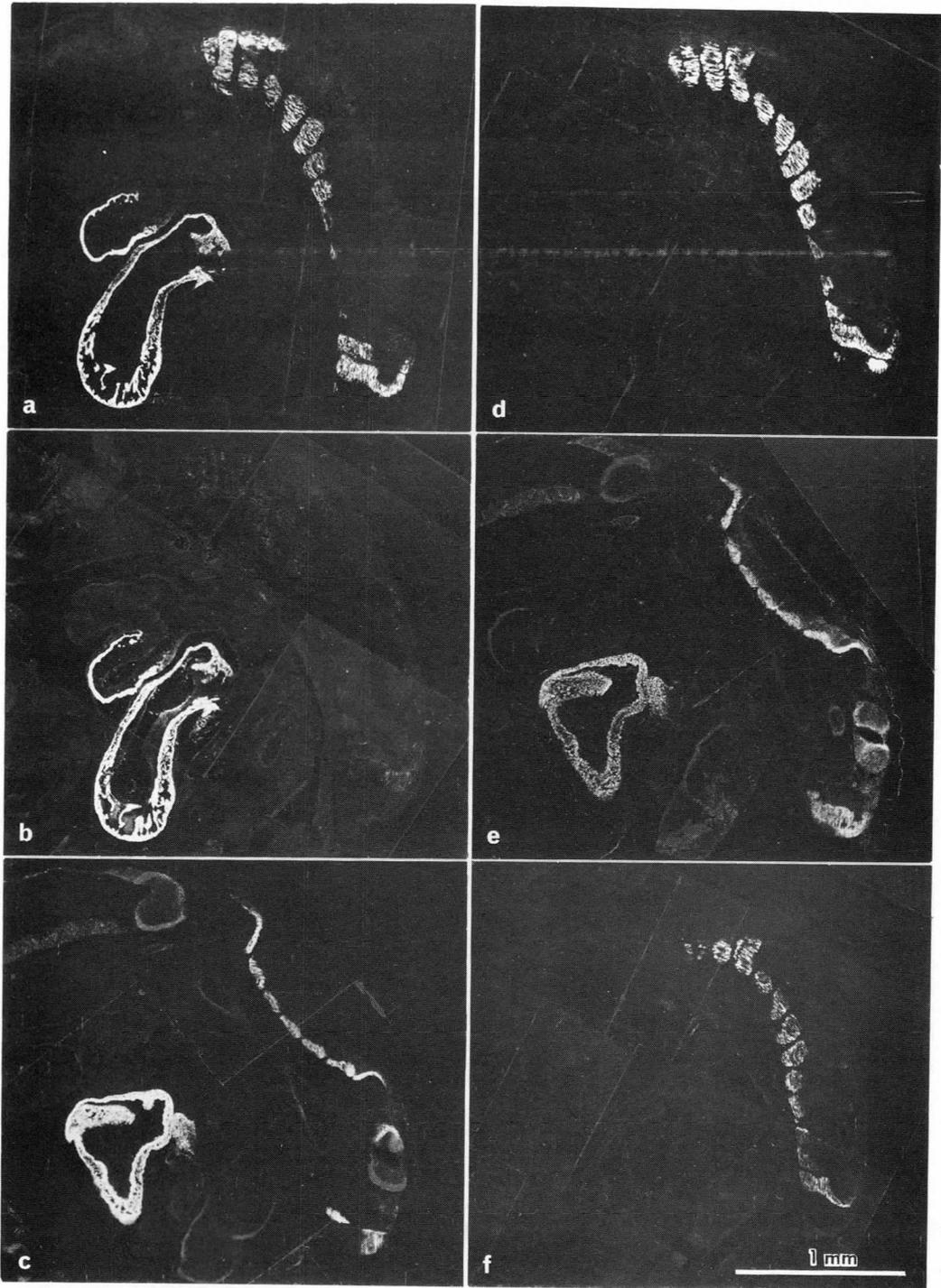


図2 Stage20 のニワトリ胚の矢状断。心筋は抗心筋 TN-T 抗体 (a), I 抗体 (b) および C 抗体 (c), さらに抗骨格筋 TN-I 抗体 (e) によって染色された。骨格筋は抗骨格筋 TN-T 抗体 (d), I 抗体 (e) および C 抗体 (f), さらに抗心筋 TN-T 抗体 (a) および C 抗体 (c) によって染色された。

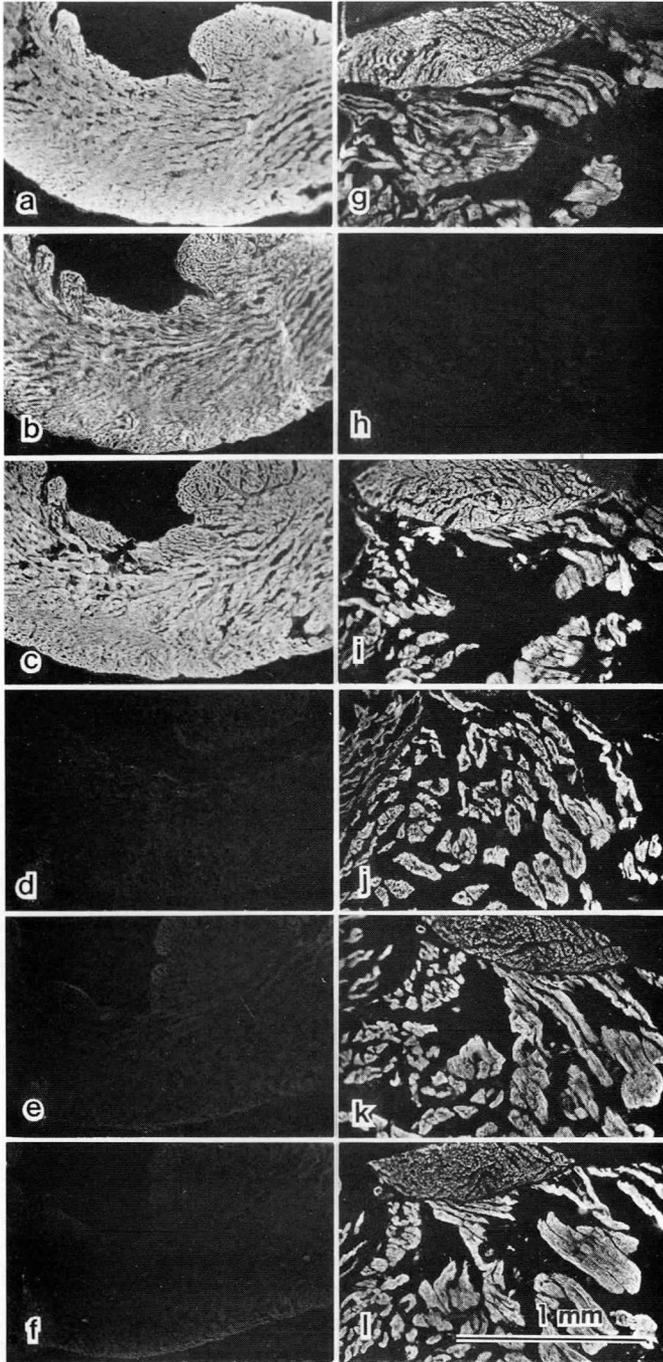


図3 Stage45 のニワトリ胚における心筋と骨格筋。心筋は抗心筋 TN 抗体 (a, 抗 TN-T 染色; b, 抗 TN-I 染色; c, 抗 TN-C 染色) のみと反応した。骨格筋は抗骨格筋 TN 抗体 (j, 抗 TN-T 染色; k, 抗 TN-I 染色; l, 抗 TN-C 染色) および心筋の TN-T と C に対する抗体 (g, i) によって染色された。

た胚子の骨格筋は抗心筋TN-TおよびC抗体によっても染色された。

心筋の抗骨格筋TN-I抗体に対する反応性は孵化前のstage38には消失した(図3)。骨格筋の抗心筋TN-TおよびCの2抗体に対する反応性はstage45以後も残っていたが、孵化後4日までに完全に消失した。しかし心筋の抗骨格筋TN-I

抗体に対する反応性、および骨格筋の抗心筋TN-TとC抗体に対する反応性の消失期は胚子によって異なっていた。また骨格筋の抗心筋TNの2つの抗体に対する反応性は、ある胚子ではC抗体の消失がT抗体の消失より先であり、また別の胚子ではその逆であり、さらに別の胚子ではほぼ同時期に消失するというように個体差が大きかった。

表1 ニワトリ胚子の心筋と骨格筋におけるTNの分化。心筋は抗心筋のTN抗体によって stage10から染色され始めた。また胚子の心筋は、stage10から孵化前まで骨格筋のTN-I抗体によっても染色された。骨格筋は抗骨格筋TN抗体によって stage14から染色され始めた。さらに胚子の骨格筋は抗心筋TN-TおよびC抗体とも反応した。孵化後、心筋と骨格筋はそれぞれ心筋と骨格筋のTN抗体とのみ反応した。

Tissue	Antibody against	Stages (Hamburger-Hamilton) of Chicken Embryos				
		10 (33-38 hr)	14 (50-53 hr)	20 (70-72 hr)	45 (19-20 days)	Adult
Cardiac muscle	Cardiac TN-T	+	+	+	+	+
	Cardiac TN-I	+	+	+	+	+
	Cardiac TN-C	+	+	+	+	+
	Skeletal TN-T	-	-	-	-	-
	Skeletal TN-I	+	+	+	-	-
	Skeletal TN-C	-	-	-	-	-
Skeletal muscle	Cardiac TN-T	-	+	+	±	-
	Cardiac TN-I	-	-	-	-	-
	Cardiac TN-C	-	+	+	±	-
	Skeletal TN-T	-	+	+	+	+
	Skeletal TN-I	-	+	+	+	+
	Skeletal TN-C	-	+	+	+	+

## 考 察

心筋のTN出現は stage 10 から観察されたが、この時期より心臓拍動の開始することが知られており<sup>8)</sup> また筋原線維の形成も観察されている。<sup>9)</sup> このことから心臓における調節蛋白質の出現と収縮構造の形成、さらには拍動の開始時期とはよく一致していることが明らかとなった。心筋においてTNの出現が骨格筋より早いのは、心臓の機能開始時期が骨格筋より早いためであると考えられる。

同一胚子の心筋あるいは骨格筋は、TNの3成分の抗体により同時に染色が開始された。このことはTNの各成分の合成の開始は、同一タイプの組織内では同調していることを示している。また胚子期には一方のタイプの筋のTNのある成分は、他方のタイプの筋のTNの同一成分に対する抗体にも反応性を示していた（すなわち、心筋は心筋と骨格筋のTN-Iの抗体と、また骨格筋は心筋と骨格筋のTN-TとCに対する抗体と反応した）が、このように異なったタイプの筋の抗体に対する反応性は孵化期頃には消失した。骨格筋において心筋TNの2成分の抗体に対する反応性の消失が必ずしも同調していないのは、合成開始の遺伝情報の発現は各TN成分とも同時であるが、代謝回転速度は各TN成分間に多少の相違があることによるのではないかと考えられる。

本研究によって胚子の心筋TN-Iは骨格筋のTN-Iと抗原性を共有し、また骨格筋のTN-TおよびCは心筋のものと同抗原性を共有していることが明らかとなった。しかし胚子期において、1つのTN成分が2つの抗体（すなわち、心筋と骨格筋にそれぞれ特異的なTN成分の抗体）と反応しているのか、あるいは1つの組織に心筋の抗体と骨格筋の抗体に反応するTN成分が2種あるのかについては明らかではない。このように、胚子の心筋TN-Iおよび骨格筋TN-TとCは、親に存在するものと免

疫学的に異なった性質をもっており、発生が進むにつれてそれぞれのタイプの筋特有の調節蛋白質に分化してゆくことが明らかとなった。

以上の結果から、細胞内における遺伝子の発現機構は、心筋および骨格筋の発生において変化していることが想像される。すなわち、細胞は初期には免疫学的に心筋と骨格筋とを識別することが不可能な一部の蛋白質成分を合成しているが、次第にそれぞれの組織に特有な蛋白質成分のみを合成するようになる。しかしなぜ心筋のTN-Iおよび骨格筋のTN-TとCは発生段階でその型を変化させるが、他のTN成分は変化させないのかについては明らかではない。おそらく高度に複雑な機構が遺伝子の発現を制御しているのではないかと考えられる。

## 文 献

- 1) Weeds, A. G. and Frank, G.: Structural studies on the light chains of myosin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: pp 9-14, 1972.
- 2) Gauthier, G. F. and Lowey, S.: Distribution of myosin isoenzymes among skeletal fiber types. *J. Cell Biol.* 81: 10-25, 1979.
- 3) Wilkinson, J. M.: Components of troponin from chicken fast skeletal muscle. *Biochem. J.* 169: 229-238, 1978.
- 4) Whalen, R., Thornell, L. E. and Eriksson, A.: Heart Purkinje fibers contain both atrial-embryonic and ventricular type myosin light chains. *Europ. J. Cell Biol.* 22: 319, 1980. (Abstract).
- 5) Dhoot, G. K. and Perry, S. V.: The components of the troponin complex and development in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 127: 75-87, 1980.
- 6) Masaki, T. and Yoshizaki, C.: Differentiation of myosin in chick embryos. *J. Biochem. (Tokyo)* 76: 123-131, 1974.
- 7) Roy, R. K., Sreter, A. F. and Sarkar, S.: Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Develop. Biol.* 69: 15-30, 1978.
- 8) DeHaan, R. L.: Morphogenesis of the Vertebrate Heart. *Organogenesis*. DeHaan, R. L. and Ursprung, H., eds., pp. 377-419, Holt, Reinhart & Winston, New York, 1965.
- 9) Manasek, F. J.: Histogenesis of the embryonic myocardium. *Am. J. Cardiol.* 25: 149-168, 1970.

## 13 幼若筋ジストロフィーチキン胸筋の抗トロポニン染色

大 槻 磐 男\*

トロポニンは骨格筋の細いフィラメント全長にわたって38 mm間隔で分布することがわかっている。成鶏胸筋においては、細いフィラメントは約1  $\mu$ の一定の長さに揃っており、抗トロポニン処理によって常に24本の横縞が形成されることも見出されている。

一方細いフィラメントがこのように一定の長さに揃う過程については、従来適当な手法がないまま、不明のまま残されていたが、最近細胞免疫化学的な手法として、サポニン法が案出され、形成途上の細いフィラメントのトロポニン局在を細胞内で観察することができるようになった。その結果ニワトリ胚胸筋では、細いフィラメント上のトロポニン局在部位が成鶏に比べて多いこと、すなわち細いフィラメントが長いことがこれまでに明らかにされている。そして孵化後数週を経て何らかの過程によってはじめて一定の長さに揃った細いフィラメントが完成するものと、現在のところ考えられている。

ここでは筋ジストロフィーチキン及びコントロールチキンの幼若胸筋を用いて、抗トロポニン局在部位を電子顕微鏡的に検索することにより、細いフィラメント長の構造形成の過程を追跡し、それらの特徴を検討した。

### 方 法

1. 材料 筋ジストロフィーチキン(413)及び、コントロールチキン(412)の孵化後1週から5週までの胸筋を使用した。またこれらから、グリセリン筋も作製した。

2. 抗トロポニン染色 サポニン法と解離フィラメント法の二つを併用した。a)サポニン法 胸筋の細束を解離溶液(0.1M KCl, 10mM K-phosphate (pH 7.0), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM ATP, 0.4mM GEDTA)中で、サポニン処理(10<sup>-4</sup> g/ml)して、細胞膜に小孔をあけたのち、やはり解離溶液に溶かした抗トロポニン抗体で3-5時間処理した。処理後によく洗滌し、固定包埋した。b)解離フィラメント法 グリセリン処理筋の細束を解離溶液中でホモジナイズすることによって解離フィラメント標本作製する。これに抗トロポニン処理を施して、カーボン蒸着を施したマイクログリッド上に採った。

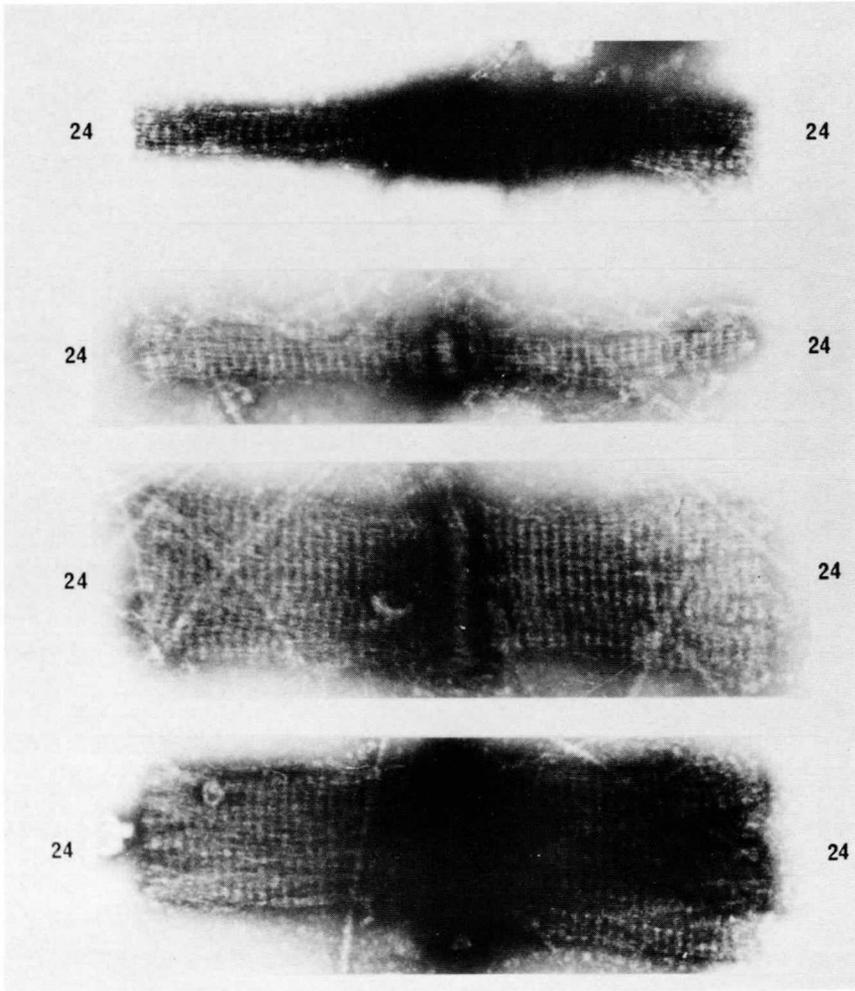
3. 電子顕微鏡観察 包埋標本はミクロトームで超薄切片として、酢酸ウランと鉛で二重染色を施して観察した。解離フィラメント標本は酢酸ウランでネガティブ染色を施した。

### 結 果 ・ 考 察

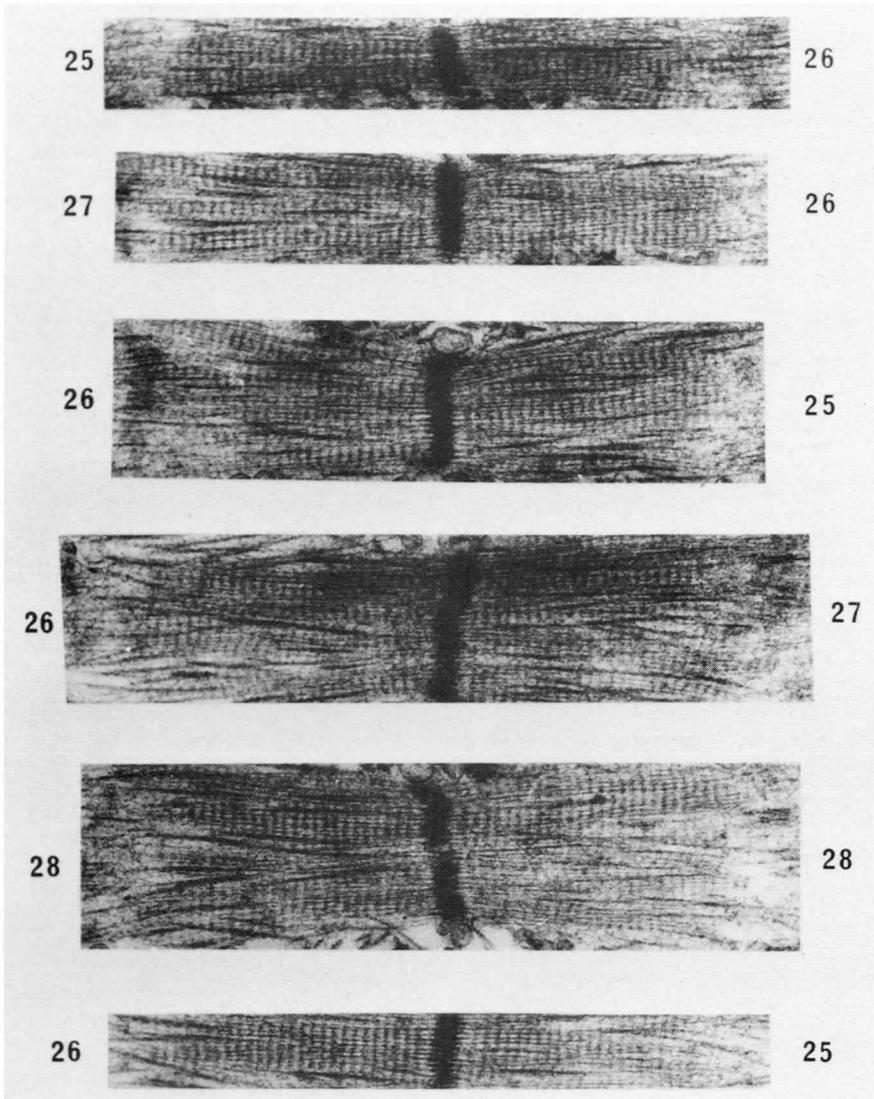
まずコントロールチキンにつき観察した。その結果、第1週の胸筋の抗トロポニン染色では、明らかにトロポニンの局在部位は一本の細いフィラメント上で24個より多く、最大33個の横縞まで観察することができた。24個の縞をもつものは認められなかった。けれども3週を経たニワトリ胸筋では、サポニン法、解離フィラメント法両方で調べたところ、共に全例が一本の細いフィラメントに24個の抗トロポニン縞を形成していることが見出された。この結果は孵化後、3週以内に細いフィラメントの短縮化が完成するという従来の観察に一致するものであった。

一方、ジストロフィーチキンでは、1週めの標本

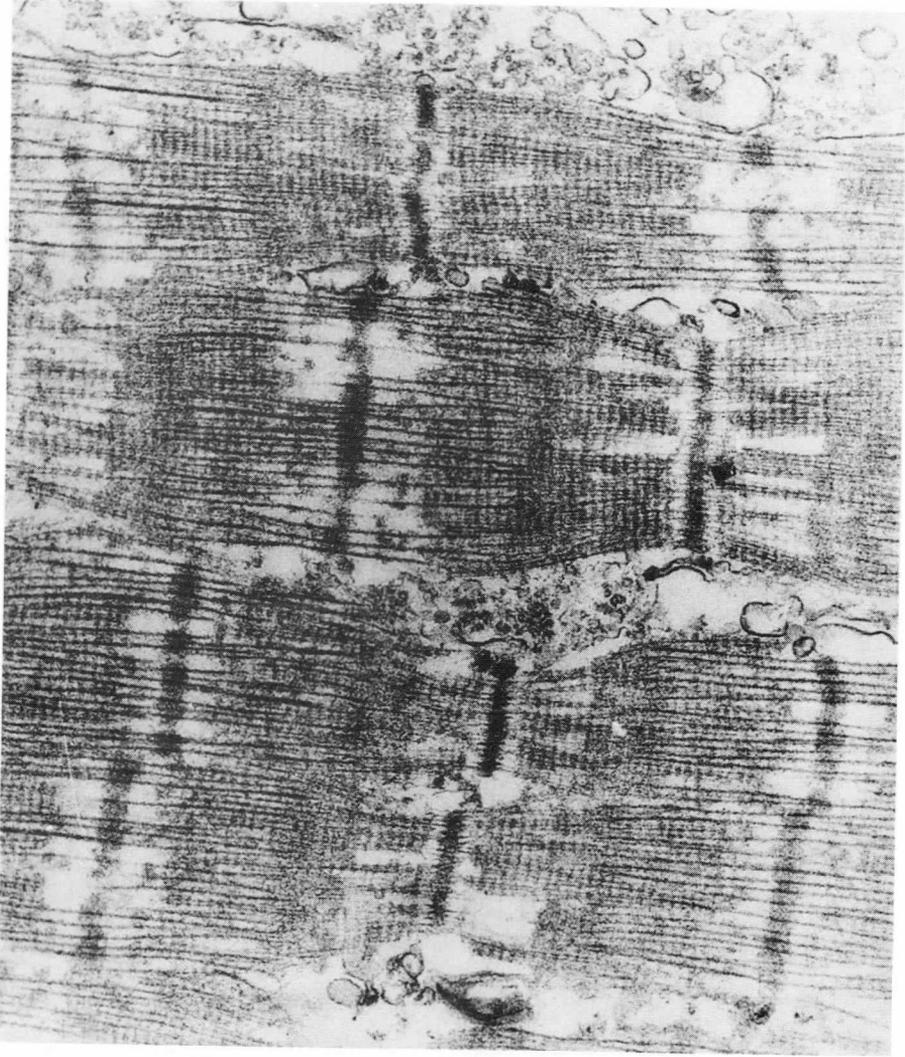
\*九州大学医学部臨床薬理学教室



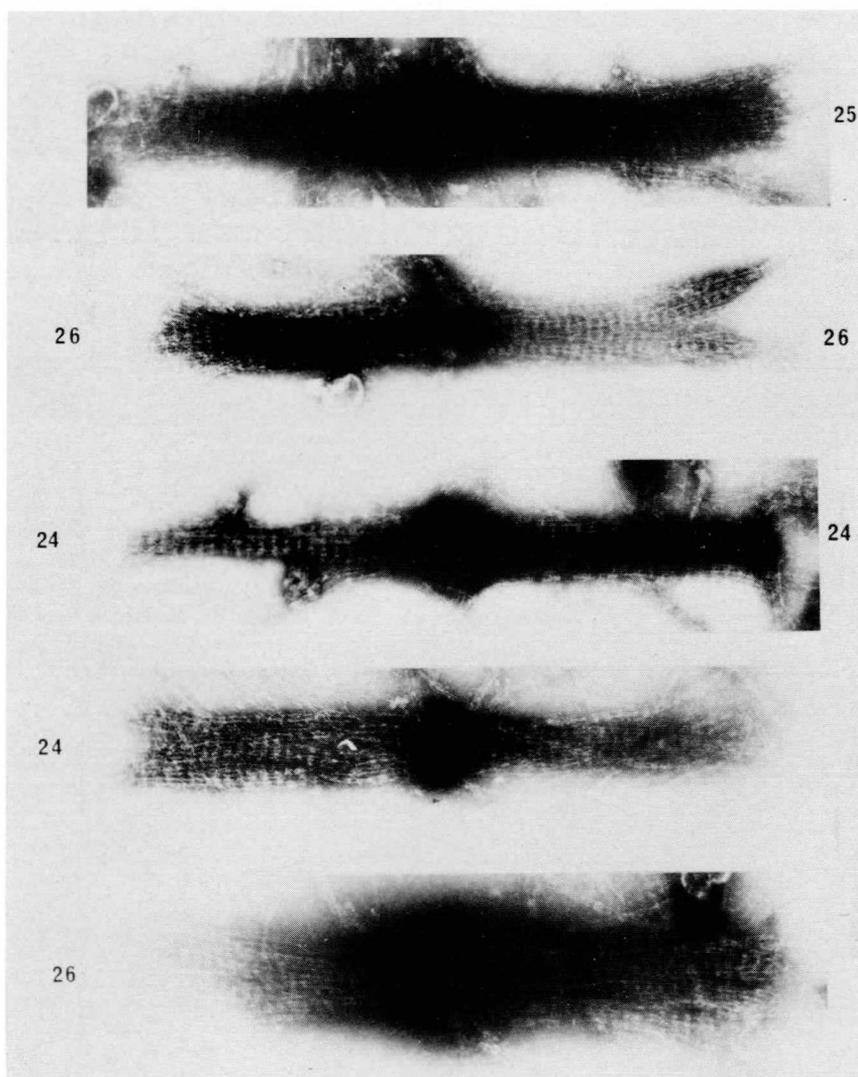
第1図 孵化後3週コントロールチキン胸筋の抗トロポニン染色（解離フィラメント法）40,000倍  
抗トロポニンは、中央のZ帯から左右にのびる細いフィラメント上に24本の横縞を形成する。（図の左右の数字は横縞の数を示す）



第2図 孵化後1週ジストロフィーチキン胸筋の抗トロポニン染色（サポニン法）40,000倍  
細いフィラメント束上に抗トロポニンによって形成される25~28本の横縞が見られる。



第3図 孵化後4週ジストロフィーチキン胸筋の抗トロポニン染色（サポニン法）40,000倍  
抗トロポニンが、細いフィラメント束に24本の横縞を形成している。



第4図 孵化後5週ジストロフィーチキンの抗トロポニン染色（解離フィラメント法）45,000倍  
抗トロポニンは24～26本の縞を細いフィラメント上に形成する。

においては、細いフィラメント束に形成される抗トロポニンの縞の数は、25ないし30であって、やはり24より大であることが見出された。一つの束の中で長さが必ずしも揃っているのではなく、部分的には揃っているが、全体として種々の長さが共存することが観察された。ただ横縞の数が24またはそれ以下のものは観察することができなかった。コントロールチキンの例でも同様であった。そして、2週、3週と週を経ても大略同じ傾向が観察されたが、4週の標本になると、細いフィラメントの長さが比較的良く揃ってきて、抗トロポニンの縞数が24個のものが明瞭に認められるようになった。24より数の多い場合も共存した。5週になっても、抗トロポニン縞数が24より多いものが存在することが認められた。なお、約3ヶ月を経たジストロフィーチキン胸筋でも、24本縞の細いフィラメントが大多数を占めるも

の、少数の24より数の多いフィラメントの存在を認めることができた。

以上の結果は、筋ジストロフィーチキン胸筋においては、細いフィラメントの短縮化の過程が、コントロールチキンに比べて明らかに遅延していることを示すものである。この差異と発症との間の関係を明らかにするためには、今後筋ジストロフィーチキンのフィラメント形成の過程を、さらに詳細に、また異った部位の数種の筋肉について追跡する必要があるものと考えられる。

#### 文 献

- 1) I. Ohtsuki, T. Masaki, Y. Nonomura and S. Ebashi *J. Biochem.* 61: 817-819, 1967.
- 2) I. Ohtsuki *J. Biochem.* 75: 755-765, 1974
- 3) I. Ohtsuki, R. M. Manzi, G. E. Palade and J. D. Jamieson *Biol. Cell.*, 31: 119-126, 1978.
- 4) I. Ohtsuki *J. Biochem.* 85: 1377-1378, 1979.

## Ⅳ 生 理 学

- 14 筋の生理学的性質の発生的研究 79
- 15 筋ジストロフィー鶏骨格筋 skinned fiber の短縮速度 84
- 16 培養法による鶏ジストロフィー筋の  
電気生理的, 形態的及び代謝的特性について 89
- 17 Myotonia ラットにおける筋細胞膜と神経筋伝達の性質について 97

## 14 筋の生理学的性質の發生的研究

高橋 国太郎\*

Ca 活動電位は最初甲殻類の横紋筋細胞膜において発見され、その後心筋細胞膜、平滑筋細胞膜、内分泌細胞、神経終末部とくに伝達物質放出箇所附近など多くの興奮性細胞膜に見出だされている。<sup>1)</sup>一方、細胞分化の起始点である卵細胞膜においても、ホヤ卵・ヒトデ卵・マウス卵・ハムスター卵など多くの場合についてCa 活動電位が見出だされている。<sup>2)</sup>

ところで細胞内Ca<sup>2+</sup>は筋収縮・伝達物質の放出発生時における受精変化・細胞分裂など各種の細胞内運動系の制御に役立つと考えられており、とくに細胞膜に作用してCa<sup>2+</sup>透過性を高めるCaイオノフォアにより細胞内運動系の変化がおこることが種々報告されている。したがって天然のCaイオノフォアであるCaチャンネルが特異的な細胞内運動系としての筋細胞にとって重要な膜特性であることは想像にかたくない。とりわけホヤ幼生の横紋筋細胞では筋細線維が細胞表層にのみ存在し、表面からのCa<sup>2+</sup>流入によって収縮の抑制がかなりの程度おこなわれている様に思われる。したがって筋細胞膜の分化性質としてCaチャンネルに注目し、Ca電流を解析することにより筋細胞の胚細胞からの分化過程を調べることを目的とした。

### 研究方法

4℃の低温海水槽に抱卵したマホヤを保存し、必要に応じて1個づつ12℃の小型海水槽にうつして、翌日放卵・放精させた。この卵精子海水から卵と精子をナイロン網で分離し、異個体からの卵と精子の

間で受精をおこなった。この時点を生時時間零とした。受精卵を10±0.5℃の恒温槽中に入れたシャーレ中で飼育した。この発生卵を8・16細胞期のそれぞれの時期で1μg/mlのサイトカラシンBを含む海水に入れ、さらに対照の卵からオタマジャクシ幼生が孵化するまでの期間飼育した。その後、この分裂停止胚のコリオン膜をプロネース10mg/mlを含む海水に入れて除去した。ただちに牛血清アルブミン10mg/mlを含む10℃人工海水に入れて実験をおこなった。実験は定電流刺激により活動電位を観察する方法、および膜電位固定法により膜電流を解析する方法によりおこなった。実験にもちいた標準の人工海水の成分は100mM SrCl<sub>2</sub>、400mM NaCl、10mM KCl、5mM PIPES-Na(pH 7.0)で必要に応じSrをCaに置換し、Naをコリンに置換した。また標準の人工海水としてSr海水をもちいたのはCaチャンネルの電流を増加して観察するためである。

### 研究成果

1) ホヤ分裂停止16細胞胚におけるCa電流の発達。初期胚で分裂を停止したホヤ発生卵においても興奮性膜は分化し、NaおよびCa活動電位が出現することはすでに報告した。<sup>5)</sup>とくに16細胞胚で分裂を停止した場合には個々の割球も大きく、膜の分化過程のどの時点でも膜電位固定法によりCa電流を解析することができる。また分裂停止胚においても正常の対照胚・幼生と同じく発生のある段階までは(オタマジャクシ幼生の初期、9℃海水中で受精後50時間)、細胞間の電氣的連結が強く、胚は電氣的に一つの細胞のように振舞う。したがって膜電位固定下

\* 東京大学医学部脳研究所神経生物学研究室

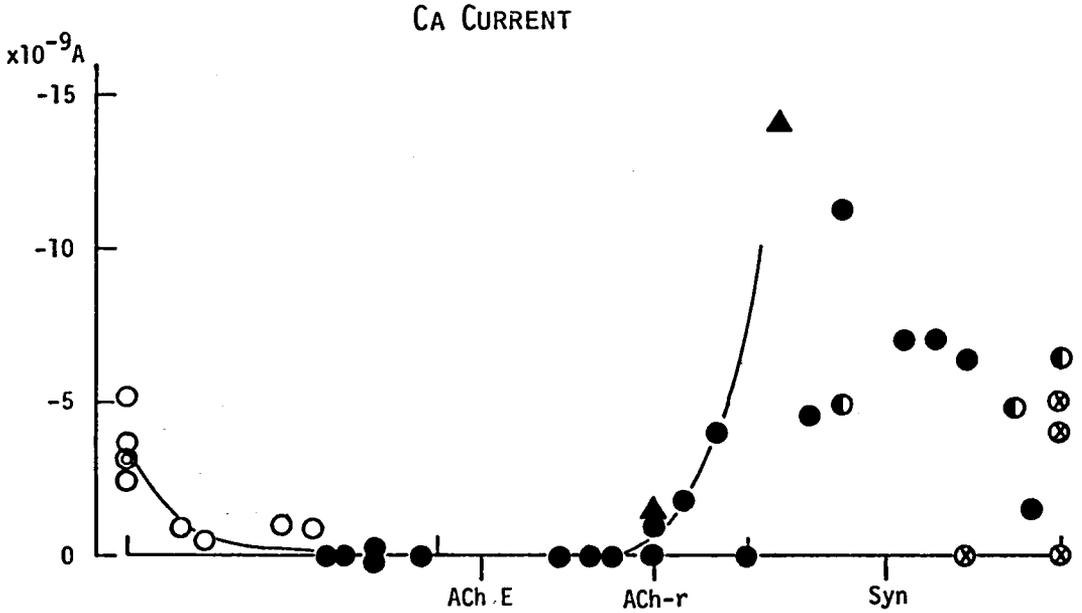


図1 ホヤ分裂停止16細胞胚におけるCa電流の発達。胚を30 mM $\text{Ca}^{2+}$ を含む人工海水中におき、膜電位固定法により、最大のCa電流振幅をもとめた(縦軸)。15°Cにおける受精後の発生時間である。

で測定されるNa電流およびCa電流は全胚表面での総和となる。この分裂停止16細胞胚におけるCa電流の最大値を縦軸に発生時間(15°Cにおける)を横軸にとって示したのが図1である。白丸は卵細胞膜にあったCa電流が発生初期に一端減少することを示し、興奮性膜の分化につれて再びCa電流が増加してくる様子が黒丸で示されている。

先にのべた様な分裂停止した16細胞胚にあった細胞間連結は発生50時間後になると一部割球間では切り離されて、割球個々の興奮膜特性を調べることができる。古典的に初期胚の各割球には名前がつけられており、その発生予定運命もわかっている。この分裂停止16細胞胚についてCa電流の出現する割球を調べてみると次のことがわかった。植物半球側において予定筋細胞域を含む $B_{5-1}$ 割球は100%の頻度で遅延整流性K電流を伴うCa電流を示し(図2, Muscle type 参照), 定電流刺激に対しては正常のオタマジャクシ幼生にみられるものと同一のCaスパイクを発生した。しかし同様に予定筋細胞域を

含む割球でも $B_{5-2}$ は殆んどCa電流をしめさず, $A_{5-1}$ ,  $A_{5-2}$ (いずれも植物半球側)割球も膜電位依存性の電流を示さなかった(図2のnon-Ex type 参照)。動物半球側の $b_{5-3}$ ,  $b_{5-4}$ 等を含む小割球群は互に電気的に連結して遅延整流性K電流を殆んど伴わない純粹のCa電流を示した。この割球群は古典的に表皮細胞になることが知られているものである。この予定表皮細胞割球群にみられる活動電位はK電流が殆んどないので極めて持続長く2~3秒もあるのが特徴である。なお, $a_{5-3}$ ,  $a_{5-4}$ の割球はある頻度(60%ぐらいの胚で)で表皮細胞型小割球群と電気的に離れ遅延整流性K電流を伴うNa電流を示した。これらの割球は古典的にオタマジャクシ幼生の脳胞になるものでNa電流は神経細胞型の活動電位に対応することがわかった。また表皮細胞型の割球群にもNa電流がわずかに見られたが、このNa電流は神経細胞型のものとは異り、活性化の閾値が10mV以上も低く、卵細胞膜にみられるNa電流と同一のものである。したがって動物半球側には卵細

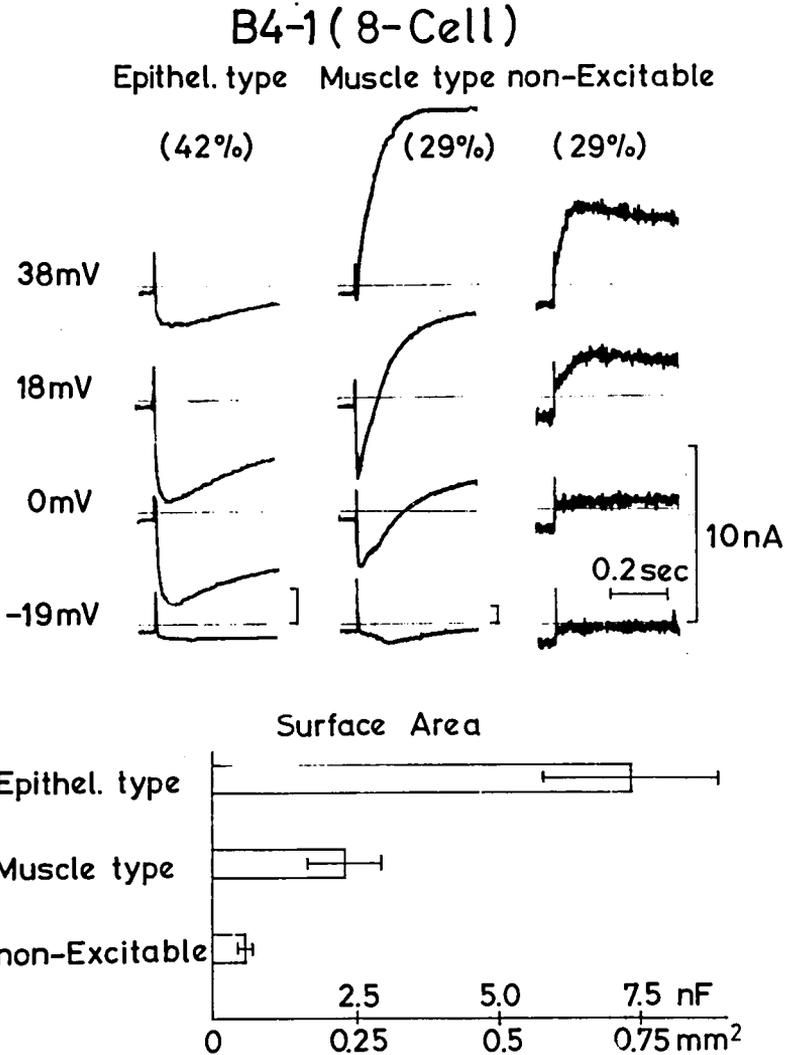


図2 上図はホヤ分裂停止8細胞胚における膜電流の三型を示したものである。記録した割球は植物半球側のB<sub>4-1</sub>。%は記録した胚の総数における出現頻度。下図は膜電流の三型に対応するB<sub>4-1</sub>。割球の全膜容量。

胞由来のNaチャンネルが残っているものと思われた。  
 2) ホヤ分裂停止8細胞胚におけるCa電流の発達。  
 細胞分裂を8細胞期のときに停止した場合でも植物半球にある大割球のうち尾側にあるもの、すなわちB<sub>4-1</sub>は約30%頻度で遅延整流性K電流を伴うCa電流(図2, Muscle type)を示し、定電流刺激

では筋細胞に見られるものと同一のCaスパイクを発生した。またB<sub>4-1</sub>は約40%の頻度で動物半球側の小割球群a<sub>4-2</sub>(×2), b<sub>4-2</sub>(×2)と電氣的に連結し、全体としてK電流を伴わない表皮細胞型のCa活動電位を発生した(図2, Epithel type)。ときにB<sub>4-1</sub>は電氣的には単離していても興奮性を示さず非

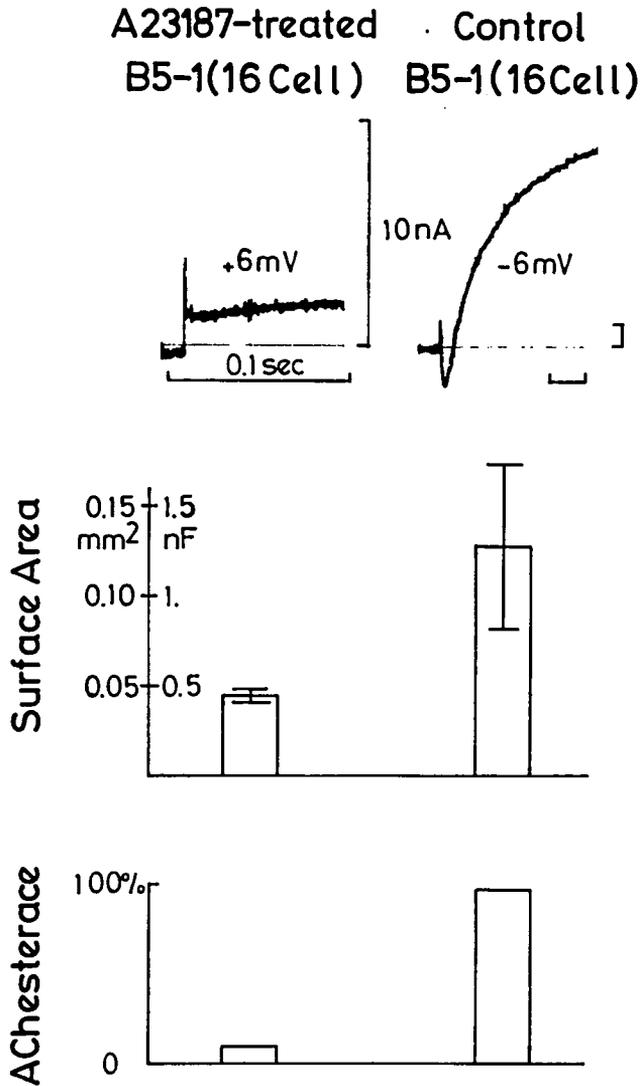


図3 上図はホヤ分裂停止16細胞胚B5-1割球の筋細胞型への分化阻害を示したもの(本文参照)。中図はその時の割球の全膜容量。下図はアセチルユリソエステラーゼ活性の出現の頻度である。

興奮型になった場合もあった。なお小割球群のうち  $a_{4-1}$  はときに電氣的に単離して神経細胞型の Na 電流を示すことがあった。B<sub>4-1</sub> 割球は上にのべたように筋細胞型・表皮型・非興奮型と三つの分化形式をとることがあったが、筋細胞型になった場合はアセチルコリンエステラーゼ活性がみられ膜容量からみると細胞表面積が非興奮型にくらべて5倍近くもふ

えていた。これはB<sub>4-1</sub>の筋細胞型の分化に伴い表面膜の陥入等の変化がおこっていることを示唆した。表皮型に分化したB<sub>4-1</sub>割球も容量が増大したが、これは動物半球側の小割球と電氣的に連結し、見掛け上の表面積が増加しているためであることがわかった。3) 筋細胞型への分化と細胞内Ca<sup>2+</sup>の影響。分裂停止した16細胞胚のB<sub>5-1</sub>割球はつねに筋細胞型に

分化することを確めたので、この割球をもちいて  $Ca^{2+}$  が筋細胞の分化に影響を及ぼすかどうかについて実験をおこなった。まず発生卵を16細胞期でサイトカラシンBを含む海水中に入れ分裂を停止する。さらに対照の正常胚が神経胚となった時点で、このサイトカラシンBを含む海水中に  $20 \mu M$  の濃度でA23187を加える。そして対照の正常のオタマジャクシ幼生が孵化した時点でA23187を加えたものと加えないものの胚の  $B_{5-1}$  割球を比較した。図3に示すように、A23187を加えた場合は  $B_{5-1}$  の筋細胞型への分化は全然みられず非興奮性細胞型となった。一方A23187を入れなかった場合は著明なCa内向き電流と遅延整流性K電流を示した。この様な筋細胞型への分化の阻害に伴って膜表面積の増加をしめす容量の増加も見られず、筋細胞型への分化の特徴の一つでありアセチルコリンエステラーゼ活性も殆んど出現しなかった。

#### 研究の考察

分裂停止した16細胞胚の  $B_{5-1}$  割球あるいは8細胞胚の  $B_{4-1}$  割球では筋細胞型への分化にともない電氣的興奮性からみるとCaスパイクが発生し、またコリン感受性細胞膜の特徴であるアセチルコリンエステラーゼの活性が見られた。また予備的な電子顕微鏡による観察からも割球全体にホヤ筋細胞の特徴である細胞膜直下への筋細線維の集積とミトコンドリアの包埋がみとめられた。つまり割球全体として筋

細胞胚となっており、一つの割球がモザイク的に分化することがないように思われた。一方16細胞胚の  $B_{5-1}$  割球は正常胚では予定筋細胞領域のほかにかのりの部分の内胚葉性の領域を含んでいる。したがってこの  $B_{5-1}$  割球が100%筋細胞型になるということは割球内に2つ以上の分化因子を含んでいても結果としては一種類の分化形式しか示さないことを意味した。さらに8細胞胚で分裂を停止した場合は、 $B_{4-1}$  割球は40%の頻度で小割球群と連結して表皮型に分化する場合もあるが一端、 $B_{4-1}$  が筋細胞型に分化する場合は16細胞胚の  $B_{5-1}$  とまったく同一のCaスパイクを発生し、アセチルユリンエステラーゼ活性は割球全体で陽性となった。したがって、ある割球の筋細胞型の分化は割球を一つの単位として表現され、分化の発現はある意味で all or none におこなわれているものと考えられた。

#### 文 献

- 1) Reuter, H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. mol. Biol.*, 25: 3-43, 1973.
- 2) Okamoto, H., Takahashi, K. and Yamashita, N. Ionic currents through the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 267: 465-495, 1977.
- 3) Ebashi, S. and Endo, M. Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. mol. Biol.*, 18: 123-183, 1968.
- 4) Epel, D. Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. *Cur. Top. Dev. Biol.*, 12: 185-249, 1978.
- 5) Takahashi, K and Yoshii, M. Development of Sodium, Calcium and Potassium channels in the cleavage-arrested embryo of an ascidia. *J. Physiol.*, in press.

## 15 筋ジストロフィー鶏骨格筋 Skinned fiber の短縮速度

遠藤 実\*  
研究協力者 八木 忍\* 角田 康典\*  
石塚 徹\* 堀内 桂輔\*

江橋, 大槻はジストロフィーチキン胸筋の細いフィラメントにおいては抗トロポニン抗体結合の結果の横縞の数が正常よりも多い(すなわちジストロフィー筋の細いフィラメントは正常筋よりも長い)ことが多く, この点で胚の筋肉に類似していることを報告した。<sup>1)</sup> 一方, 我々が先に見出したことであるが,<sup>2)</sup> 骨格筋の長さ-張力関係はCa濃度によって非常に異なり, ことに筋節長が約 $2\mu\text{m}$ 以下でフィラメント同士の重なりが過剰になる領域においては, 高Ca濃度による発生張力は筋節長が短くなってもそれほど小さくならないのに対し, 比較的低いCa濃度による発生張力は筋節長が短くなると著しく小さくなること分っている。この張力の結果に対応して, 筋の最大短縮速度( $V_{\text{max}}$ )も, 比較的低いCa濃度により収縮させたときの $V_{\text{max}}$ は筋節長約 $2\mu\text{m}$ 以下の領域で非常に小さくなる。<sup>2)</sup> これらの事実から我々は, 過剰なフィラメント同士の重なりが, ジストロフィー筋においてはより長い筋節長から始まるとすれば, 比較的低いCa濃度下における $V_{\text{max}}$ もより長い筋節長から小さくなり始めるのではないかと考えて以下の実験を行った。

### 実験方法

筋ジストロフィー成鶏(ニューハンプシャー, 413)およびコントロール(同412)から後広背筋を分離し, 直ちにサポニン $100\mu\text{g/ml}$ を加えた弛

緩液に浸す。このとき一過性収縮を起こすが, 筋が短縮しないよう長さは一定に保った。実体顕微鏡下に, 上記のサポニン添加弛緩液中で単一筋線維を分離し, その筋節長が一様な約 $3\text{mm}$ の部分を選んで用いた。実験はサポニンを含まない液で行ったが, 筋線維はすべて30分以上サポニン含有液中に浸っているのので, いずれも十分chemically skinned fiberの状態になっていると考えてよい。<sup>3)</sup>

線維の両端は絹糸でしばり, その糸をそれぞれ2片の両面スコッチテープ間にはさんで固定する。一方のスコッチテープはストレーンゲージ(Uゲージ, 100 $\mu$ 用, 新興通信)に接続して線維の発生する張力を記録し, 他方はマイクロアンメーターの指針の先に接続し,<sup>4)</sup> 以下の方法で $V_{\text{max}}$ を測定した。

上記のマイクロアンメーターに, 線維を引き伸ばす向きに指針がふれるような方向の電流を十分に流し, かつ実際の指針はストッパーで動かぬよう止めておくと, 等尺性の条件が得られる。こうしておいて液中のCa濃度を上げて線維を収縮させ, 等尺性張力の大きさが定常状態に達したら, マイクロアンメーターに流す電流の向きを逆転させて, 指針を第2のストッパーの位置まで急激に動かすことによって, 線維を一定の長さだけ急激に縮める。この縮める速度は $V_{\text{max}}$ より大きいので線維は一たんとたわみ, 張力はゼロに落ちる。その直後, 線維は無負荷状態にあるので $V_{\text{max}}$ の速度で短縮し, 上記の急激に縮められた短縮距離を短縮し終えた時点から, ふたたび張力を発生し始める。この張力再発生が始まるま

\*東北大学医学部薬理学第一教室

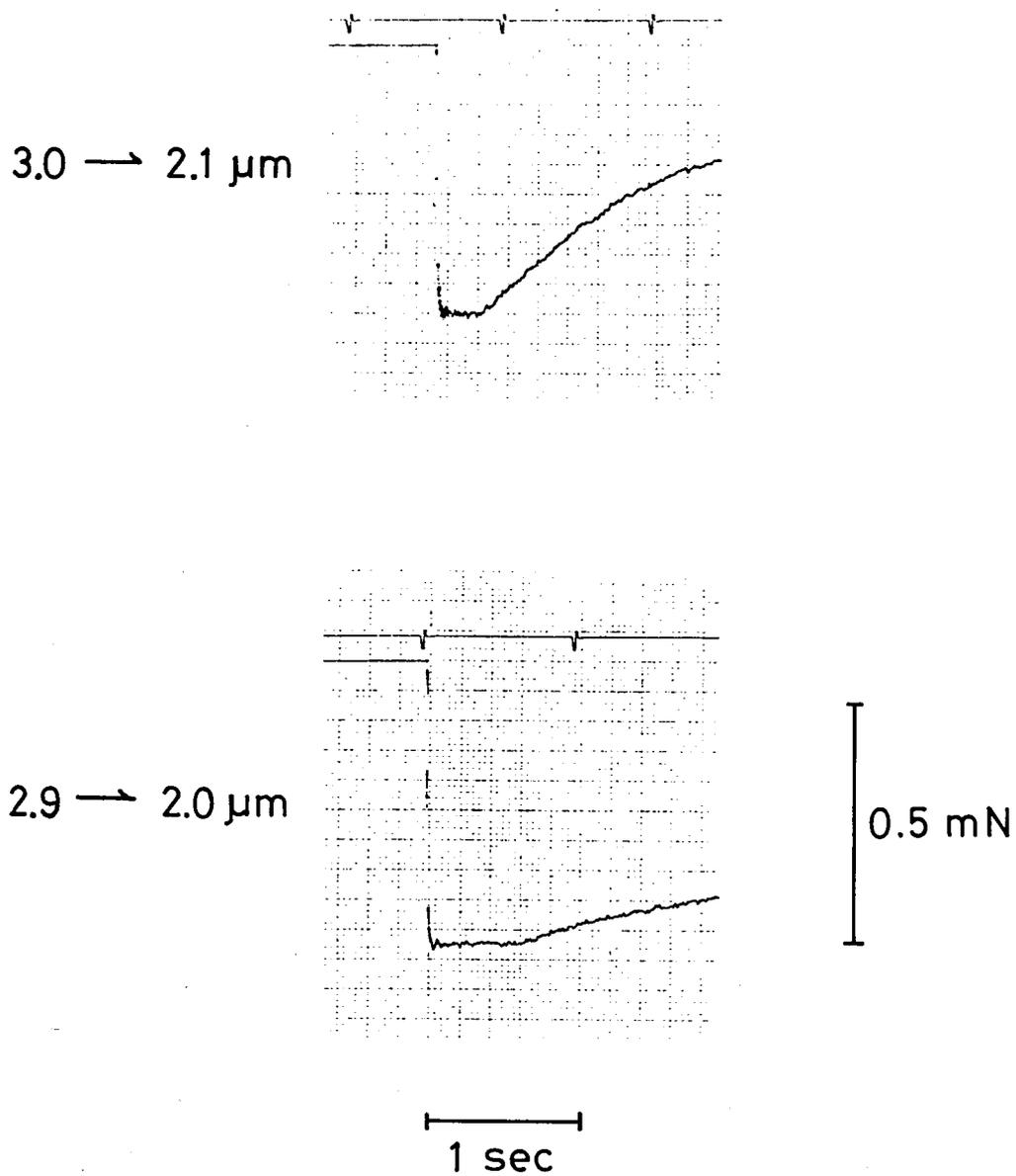


図1 急速短縮後の張力の時間経過。サルコメア長を図に記した通り急激に変えた。張力再発生の時点は比較的明瞭である。ジストロフィー筋。

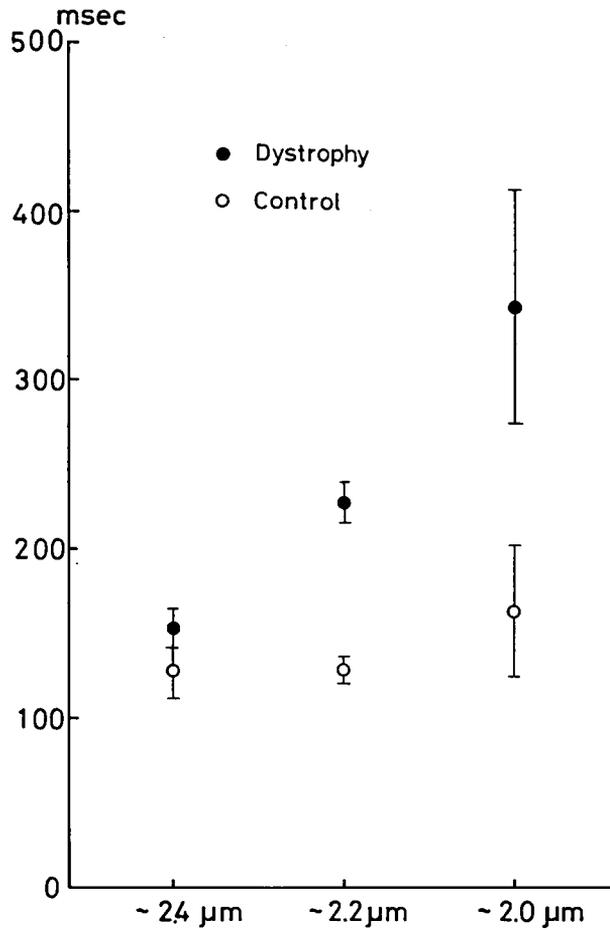


図2 サルコメア当り 0.9 msec 急速短縮後張力再発生までの時間とサルコメア長。短縮終了点でのサルコメア長を下に記してある。平均±S. E.

での時間と短縮距離とから  $V_{max}$  を測定した。厳密に言えば短縮距離を上記の時間で割った値は正確な  $V_{max}$  ではない可能性が強い。というのは、たるませた距離を丁度短縮し終えてから張力再発生開始が検出されるまでには一定の時間を要すると思われるからである。しかし、本実験においては、正確な  $V_{max}$  の値ではなく、それが条件を変えたときに変動するか否かのみを問題にしているので、この点を注意して議論すれば差しつかえないと考えられる。

筋節長は光学顕微鏡下に測定し、それが線維の全長と比例して変ることを確かめた。実験は一定温度

(20℃)の水で実験槽直下を流し、この温度下で行った。室温も約20℃であった。

弛緩液の組成は87mMメタンサルフォン酸カリウム、4mM ATP、4mMメタンサルフォン酸マグネシウム、10mM EGTA (エチレンジグリコールビス(β-アミノエチルエーテル)-NN'-四酢酸)、20mM トリス-20mM マレイン酸で、pHは苛性カリにより6.80に合わせた。ただし、筋を取り出してから単一筋線維を分離するまでのサポニン含有弛緩液には20mM ATP、16.6mMメタンサルフォン酸マグネシウム、10~20mM EGTA、20mM トリス-20

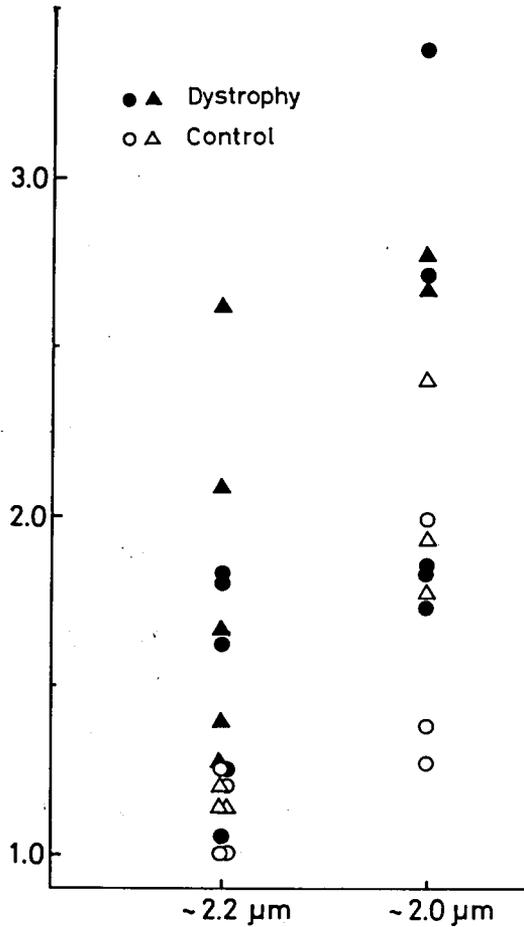


図3 3.1 → 2.1  $\mu\text{m}$ および2.9 → 2.0  $\mu\text{m}$ の短縮時間と3.3 → 2.4  $\mu\text{m}$ の短縮時間との比。

○, ●: 1本の線維の第1実験の結果, △, ▲: 同第2実験の結果。  
その他の説明は本文参照。

mMマレイン酸(pH 6.80)を用いた。Caを含む収縮系活性化溶液は、初めに挙げた弛緩液(ただし、メタンサルフォン酸カリウムは69mM)に6mMメタンサルフォン酸カルシウムを加えたもの(pH 6.80)を用いた。この液の遊離Ca濃度は、Ca EGTAのpH 6.8における見かけの結合定数を $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と仮定すると、 $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ と計算される。

### 結 果

$V_{\text{max}}$ で短縮させる距離をすべての線維についてサルコメア当り0.9  $\mu\text{m}$ に固定し、サルコメア長を

変えて実験を行った。したがって、短縮し始めとし終りのサルコメア長が種々に異なるわけである。図1に実際のジストロフィー鶏からの線維の張力記録の例を示す。この例は同時に、サルコメア長が僅かに異なっただけで、 $V_{\text{max}}$ が非常に異なり得ることを示している。すなわち、上のトレースではサルコメア長を3.0  $\mu\text{m}$ から2.1  $\mu\text{m}$ に急激に縮め、張力が再発生するまでに約320ミリ秒を要しているが、下のトレースに見られるように同じ線維を2.9  $\mu\text{m}$ から2.0  $\mu\text{m}$ まで縮めたときには、同じ距離の短縮であるにもかかわらず、張力再発生までに約620ミリ

秒を要している。

図1のような実験を  $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$ ,  $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$ ,  $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  の3つの領域において行い、急激な短縮から張力再発生までの時間をプロットしたのが図2である。線維は収縮-弛緩をくり返すと次第に劣悪化するので、図2の結果は各線維について最初の収縮のデータのみを集めたものである。図2から、正常筋では  $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$  と  $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$  での短縮時間はあまり変わらないが、 $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  での短縮時間はやや長くなる傾向が見られる。ジストロフィー筋では、 $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$  の短縮時間がそもそも正常筋よりやや長めではあるが大きくは正常筋と変わらないのに反し、 $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$ , および  $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  での短縮時間は著明に長くなっていることが分る。

線維間のバラツキが比較的大きいので、上記の結果を確かめるために、同一線維で異なったサルコメア長において実験をくり返し、 $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$  および  $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  の短縮時間と  $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$  の短縮時間との比をプロットしたものが図3である。この場合、くり返しによる劣悪化をできるだけ補正するために、 $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$  または  $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  の実験の前後にはすべて  $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$  の実験を行って、その平均値に対して比をとった。図3に見られるように、やはり  $3.1 \rightarrow 2.2 \mu\text{m}$  および  $2.9 \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  の短縮時間は  $3.3 \rightarrow 2.4 \mu\text{m}$  のそれに比べて、ジストロフィー筋で正常筋よりも著明に長いと言えそうである。

## 考 察

我々は先に、筋ジストロフィーマウス骨格筋 skinned fiber の  $V_{\text{max}}$  をサルコメア  $2.5 \sim 3.1 \mu\text{m} \rightarrow 2.0 \mu\text{m}$  の範囲で測定し、正常マウスのそれとほとんど差がないことを報告した。しかし、これは高 Ca 濃度下での実験でもあり、もちろん本報告とは矛盾しない。マウスにおける低 Ca 濃度、チキン<sup>6)</sup>における高 Ca 濃度での実験は現在進行中である。

本実験結果は、当初我々が予想したのと同じ方向に出た。すなわち、本実験の結果は  $\text{Ca } 3 \times 10^{-6} \text{ M}$  下における  $V_{\text{max}}$  が正常筋ではサルコメア長  $2.0 \mu\text{m}$  あたりから落ち始めるのに対し、ジストロフィー筋

では  $2.2 \mu\text{m}$  近辺から落ち始めることを示唆している。しかし、これを確実に結論するためには、“実験方法”の項に述べた問題があるので、本実験とは逆に短縮終了点のサルコメアを固定し、短縮距離を変化させる実験結果を待つべきで、これも現在進行中である。ところで  $V_{\text{max}}$  が上記のように変わったとしても、それが我々の当初考えた、ジストロフィー筋では過剰なフィラメントの重なりが長いサルコメアから始まるからだ、という可能性は小さいと考えられる。というのは、我々は生後約2年の成鶏を実験に用いたのであるが、大槻(私信)によれば、その時期には少なくとも胸筋においては、正常よりも長いフィラメントは非常に稀にしか見出せなくなっているということだからである。

一つの可能性として、本実験の結果は、ジストロフィー筋収縮系の Ca 感受性が  $\text{Ca } 3 \times 10^{-6} \text{ M}$  近辺で正常筋よりも僅かに低いということと説明できるかも知れない。高木<sup>7)</sup>はジストロフィー鶏 skinned fiber の Ca 感受性が正常筋とほとんど変わらない、と報告しているが、張力測定よりも本実験の方がはるかに差を検出し易いことを考えると、この可能性は否定できない。今後の検討が必要である。

しかし、そもそも、比較的低 Ca 濃度で何故に  $V_{\text{max}}$  がサルコメア長  $2.0 \mu\text{m}$  前後から急激に落ちるかは明らかではない。筋収縮制御機構を解明する上で今後追究されるべき重要な問題の1つである。

## 文 献

- 1) 江橋節郎, 大槻磐男(1979)厚生省神経疾患研究委託費 筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和53年度研究報告書, 152-154.
- 2) 遠藤 実:生物物理, 15, 247-259. (1975)
- 3) Endo, M. & Iino, M. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1: 89-100, 1980.
- 4) 遠藤 実:生化学実験講座, 15, 筋肉, 江橋・丸山編, 東京化学同人, 東京, PP. 295-312. (1975)
- 5) Ogawa, Y. *J. Biochem.* 64: 255-257, 1968.
- 6) 遠藤 実:厚生省神経疾患研究委託費, 筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和53年度研究報告書, 47-52. (1979)

## 16 培養法による鶏ジストロフィー筋の電気生理的、形態的及び代謝的特性について

堀 田 健\*

研究協力者 富 田 伸 子\* 杉 山 博 之\*\*

われわれは従来からジストロフィー筋の形態的・生理的特性を鶏から得た筋線維及び組織培養標本を用い、正常筋との比較において追求してきた。今迄にジストロフィー筋の膜電位はやや低く、かつ興奮から張力発生までの時間が長くかかること、又膜電位のちがいは筋細胞が形成されてから間もなくあらわれることなどを報告した<sup>1,2)</sup>。今回は膜電位の測定をmyotubule形成直後から15日ごろまでの組織培養標本について行い、かつ電顕による形態観察も加えた。また筋細胞膜の代謝過程に相違があるかどうかを細胞培養した試料を用い、アセチルコリンレセプターの代謝速度を指標として確かめることを試みた。

### 材料及び方法

組織培養：Dystrophy (NH413) 及びControl (412) Chickの受精卵を37.5℃に6日間孵化したのち胚をとり出し、その脊髄の細片をコラーゲンを塗布したカバーガラス上でMaximowの二重カバーガラス法に従い培養を開始した。2, 4, 6, 8, 10, 15日経過したところでとり出し、膜電位測定を行い、かつ電顕のための試料固定を行った。培養液及び電位測定のための溶液の組成は前報<sup>2)</sup>に述べた。

膜電位測定：培養標本をカバーガラスのまま測定セルに入れ、37℃で20~30MΩの電極を刺入し、出力を増巾器(日本光電MEZ8201)を通してメモリー(岩通DM-305)に導き、よみとった。電極抵

抗は常時抵抗計によってcheckした。膜電位が電極抵抗の変化による人工産物でないことを確かめる基準として(1)電極が入ったと思われるとき、急に電位が変化し、一定時間以上保持しつづけること。(2)電極抵抗が刺入前後に変化していないこと。(3)一週間以上培養し、ある程度生長したときには20~30μAの通電によって興奮があり、活動電位が観察され、かつ収縮があること。等を満足することとして、それらを満たさない測定値はDataから除外した。

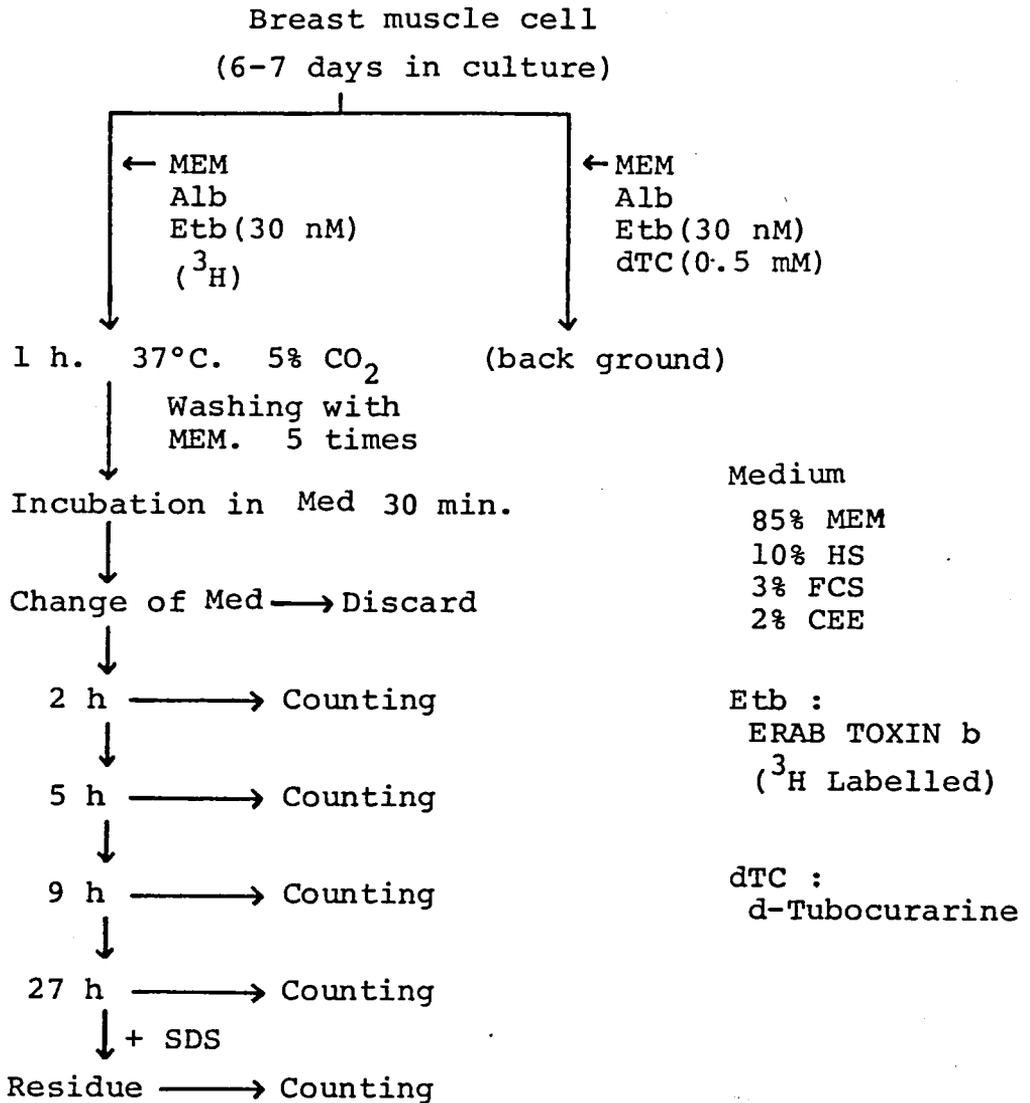
電子顕微鏡観察：組織培養によって得た標本を生長過程毎にグルタルアルデヒド固定ののち、小口ら<sup>3)</sup>の方法に従って硝酸ランタンを含む緩衝液で約1時間浸し、T-システムを特異的に染色する処理を行った。オスミック酸で後固定後エポン包埋し、厚さ0.5μmの切片を作った。これを高圧電子顕微鏡(日本電子, 200KV)で観察、細胞内部構造の発達を追跡した。

アセチルコリンレセプターの代謝速度：この測定には37℃で10日間孵化した卵の胸部筋をとり出して細胞培養した標本を用いた。液(第1図)は3日目毎に交換し、実験には6日間培養したものを使用した。代謝速度の測定には先ず標本に<sup>3</sup>Hでラベルしたエラプトキシンb (Etb)を作用させ、レセプターに結合させる。過剰のトキシンを洗滌後新しい培養液を加え、一定時間毎に液を交換する。そのとき交換液中にあらわれる<sup>3</sup>Hの量から試料のなかに残留しているエラプトキシンを計算し、代謝速度をうる。実際の実験手続きは第1図に示す。

\* 名古屋市立大学医学部 第一生理学教室

\*\* 生物科学総合研究機構 生理学研究所生体膜部門

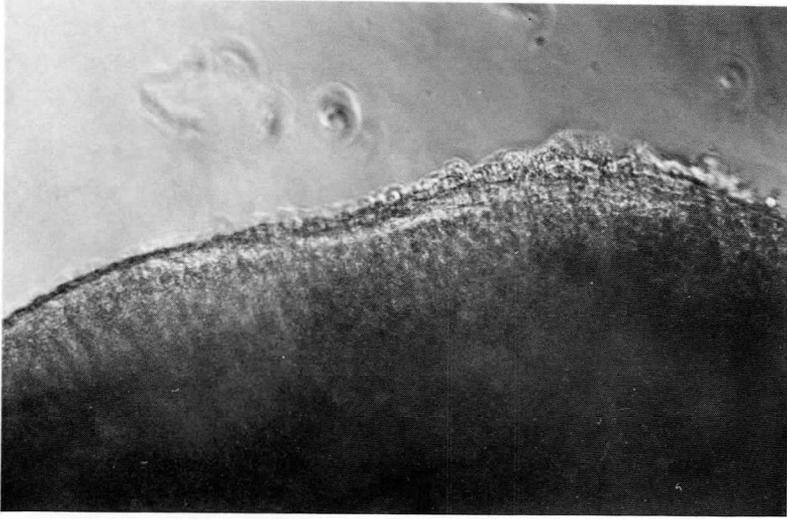
## EXPERIMENTAL PROCEDURE



第1図 細胞培養液の組成とアセチルコリンレセプターの代謝測定手順

MEM : Engle MEM    HS : 馬血清    FCS : 仔牛血清

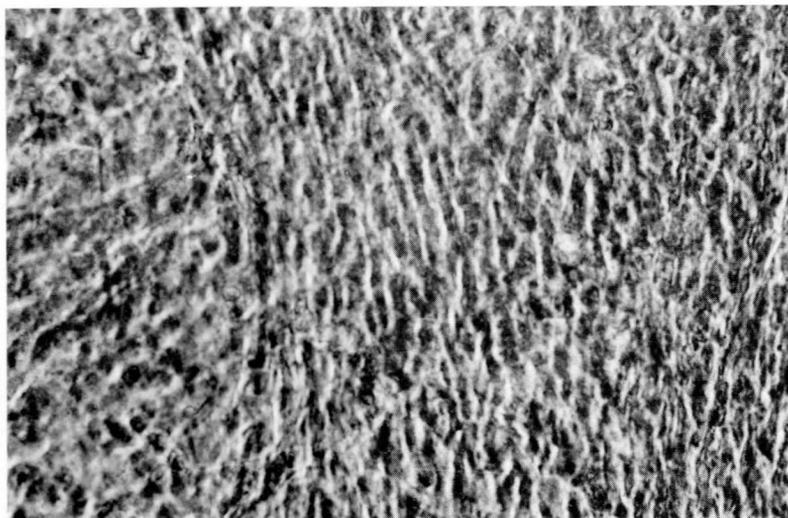
CEE : 鶏胚抽出液    Alb : アルブミン



a



b



C

第2図 組織培養標本の位相差顕微鏡写真  
 入卵後6日目の胚より得た myotome (N. H. 412)  
 a. 植付直後 (×200)  
 b. 植付後1日経過したもの (×200)  
 c. 培養開始後1週間経過したもの (×200)

## 結 果

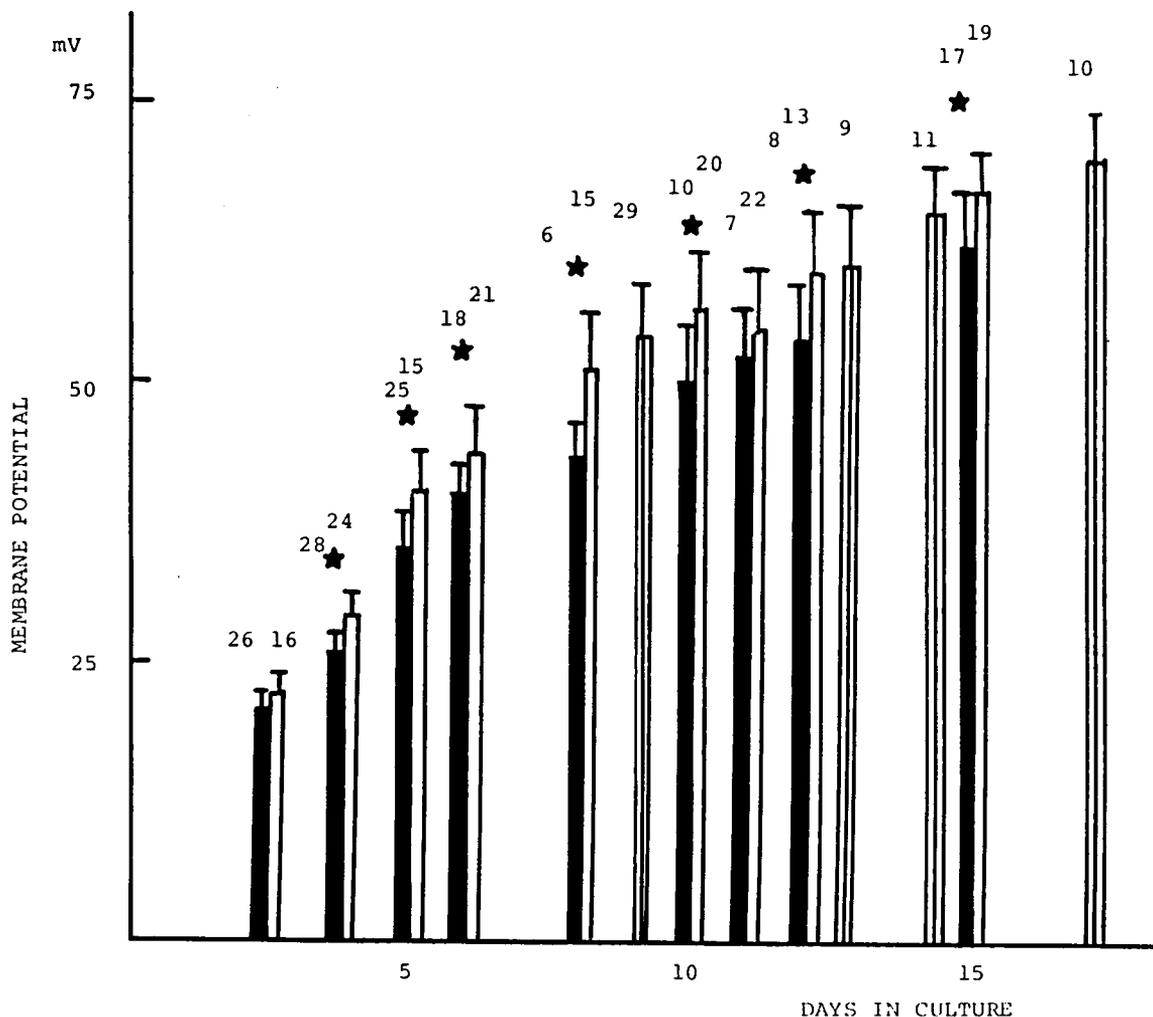
組織培養細胞の発達過程：第2図aにみられるように植付けた脊髄には外側に多くのmyoblastが附着している。このmyoblastはお互いに癒着(fuse)してmyotubuleを形成し、急速に外に向かって成長する(outgrowth)。第2図bは植付け後約1日を経過したもので、この間著しいmyotubuleの形成がみられる。7日目ごろには横紋が現われはじめ、自発性の収縮が顕微鏡下でみとめられるようになる(第2図c)。以後前報<sup>2)</sup>のべたような経過をたどって15~16日目ごろには成長が完了し、それからは変性がはじまり、かえって横紋が全体的にぼやけてくる。発達の過程及び完成された筋線維について、位相差顕微鏡でみる限り、DystrophyとNormalの筋の間に目立った差異はみとめられなかった。

電極の刺入が可能になるのはmyotubuleが形成される植付け後2日目あたりで、この時期には-15~20mVの膜電位が観察される。第3図に示すように日数の経過とともに膜電位は上昇し、5~6日後の

自発収縮があらわれ、横紋が出来るころには50mV前後になる。通電による興奮もみられ、Na<sup>+</sup>チャンネルが形成されていると思われる。14~15日目には70mVとなり、成鶏のそれに近づくがそれ以後あまり増加せず、かえって減少する場合が多かった。

Dystrophyの胚からの標品は測定の最初の時期から膜電位がやや低く、4日目の試料において同じ期間培養したNormalとの間で有意の差があった。有意差の検定はペアで行い、母集団の分散が同じ場合はt検定を、異なる場合にはWelchの検定を行い、棄却限界が5%以下である場合を有意とした。これによれば6日以降はすべて有意の差があり、2週後の値は正常67.2±3.1mVに対してDystrophy 60.7±5.7mVであった。なお同じ期間培養して得たBroiler標品の膜電位差も測定したが、N.H.412との間に有意差はなかった。

アセチルコリンレセプターの代謝速度：10日間孵化、6日間培養した胸筋を材料として<sup>3</sup>HラベルのEt bを作用させ、過剰のEt bを洗い流すと、一般にDystrophy筋に結合しているEt bがNormalに



第3図 組織培養標本の膜電位発達過程

N. H. 412  
(control)

N. H. 413  
(Dystrophy)

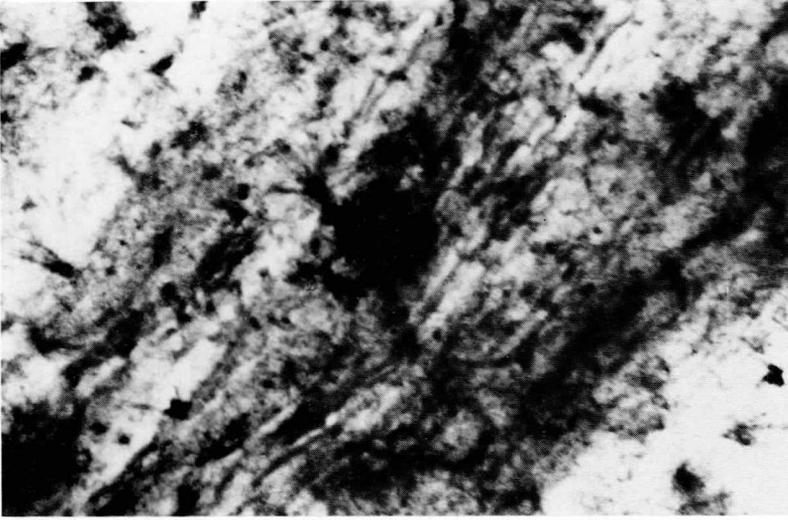
Broiler  
(control)

数字は測定数を示す。★P < 0.05 (有意差あり)

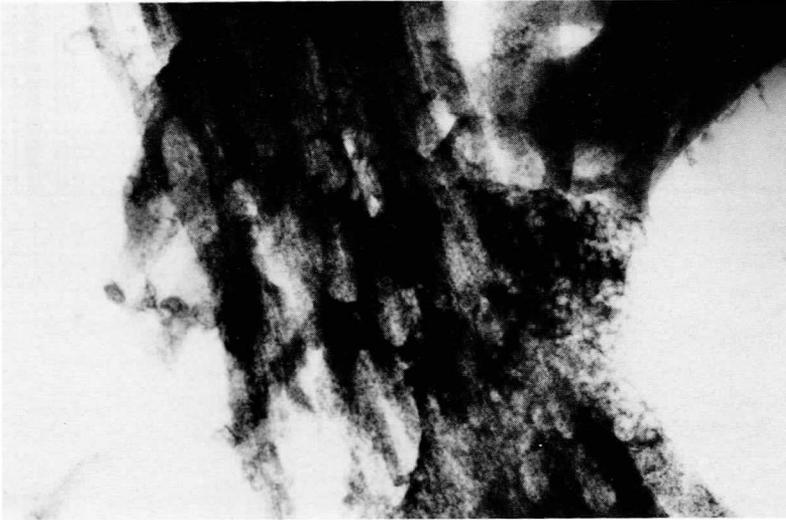
比して少なかった。これは膜に局在するアセチルコリンレセプターの数が少ないことを意味する。また<sup>3</sup>Hの放射能より計算される結合Et bの減少率はNormalの方が少なく、従ってレセプター代謝の半減期も長いことが知られた。然しながらこの結果は例数が少なく、preliminaryであるので定量的な論議は今後にまたねばならない。

培養細胞の電顕所見: myotubule が形成される

とその内部に細い線維状の構造物があらわれる。第4図aは第2図bに対応するものである。線維は培養経過に従い太くなりmyofibrilに成長する。ここで用いた標品は組織培養で層があつく、又走行方向も一定でない上に厚切りなのでこれによってmyofibrilの走行についての明らかな所見は得られなかった。第4図bは10日間培養の正常筋であるがA帯、I帯の区別はよく分らず、又Tシステム状の構



a



b



C

第4図 組織培養標本及び成鶏広背筋の電子顕微鏡写真(厚さ0.5 $\mu$ m)

- |             |                     |
|-------------|---------------------|
| a. 培養開始後3日目 | ( $\times 44,000$ ) |
| b. 培養開始後7日目 | ( $\times 15,000$ ) |
| c. 成鶏       | ( $\times 15,000$ ) |

造もところどころにみられるが、成鶏の広背筋を固定したもの(第4図c)に比し、構造が軟弱で細胞内構造物(Tシステム、SR等)の詳細をDystrophy筋と正常筋の比較においてとらえることは出来なかつた。技術の改良が今後の課題である。

#### 考 察

ここに示された結果は昨年発表した preliminary の結果 — Dystrophy筋の膜電位は発生の極めて初期より正常筋に比して低い — をより早い時期から、より多くの試料について確めたものである。第3図に示すように培養筋の膜電位は急速に深くなるがThomsonとDrydenは10日間孵化の胚から得た筋の膜電位を培養開始後から追跡すると、3日目では20mVであったものが5日目では70mVに達することを報告している。われわれの場合こんなに急激に発達することはなかったが、孵化条件及び培養法のちがいを考慮すると実質的に同じであるということが出来、われわれの方法で培養された筋は順調な発達をしていると考えられる。然しながら培養

筋の細胞内部構造は成鶏の筋に比して不規則で電顕的に filament の配列やT-system, 小胞体などの微細構造を見極めることは困難で、DystrophyとNormalの差異を見出すことはむずかしいと思われる。これは培養法の技術的な問題であるのか、それとも組織培養標本を用いる際の本質的なものであるのかは今後検討しなければならない。

preliminary ではあるがアセチルコリンレセプターの代謝される速さはDystrophy筋の方が速いという知見が得られた。これが膜の代謝速度を反映しているとすればDystrophy筋では、細胞内蛋白分解酵素の活性や蛋白合成能が亢進しているという事実と同じ方向である。今後培養期間をかえ、又異なる部位からの筋について実験をかさね、その意義をDystrophy発症との関連においてとらえたい。

#### 文 献

- 1) 堀田 健, 大羽利治, 越田 信, 西原己栄子, 小鹿幸生: ジストロフィー筋の生理学的研究, 筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和53年度報告書, 53-58. (1979)

- 2) 堀田 健, 小鹿幸生, 村瀬幹雄: 発生初期におけるジストロフィー筋の電気生理学的性質, 筋ジストロフィー症の基礎的研究 (江橋班) 昭和54年度報告書 90 - 94. (1980)
- 3) 小口喜三尺, 塚越 広: Duchenne 型進行性筋ジストロフィー症における横細管系の高圧電子顕微鏡による研究, 神経内科, 11, 280 - 282. (1979)
- 4) C.M. Thomson and W.F. Dryden: Development of membrane conductance of chick muscle in culture, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 600-605, 1980.

## 17 Myotonia ラットにおける筋細胞膜 と神経筋伝達の性質について

栗山 熙\*  
研究協力者 是永 進\* 小田 健一郎\*  
伊東 祐之\*

### 方 法

#### はじめに

Myotonia は筋細胞膜が間接刺激や膜の脱分極の後反復性に放電し、筋拘縮を引き起こす症状である。このような症状は人間 (Lipicky, Bryant & Salmon 1971) やある種のやぎ (Bryant 1969, 1973) に疾病として存在するが, 20, 25-diazacholesterol, 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) や Anthracene-9-carboxylic acid などの急性又は慢性投下により同様の症状が作り出されることが知られている。このような症状の原因は主に筋細胞膜の  $C\ell$  コンダクタンスの著しい低下によるものと考えられている。しかし myotonia 発症の原因について神経原性か筋肉原性か今なお明確でない。たとえば Caccia 等 (1975) は除神経した筋肉ではこれらの薬剤によって myotonia を作る事ができないと報告し、一方 Eyzaguirre (1948) たちは 10 日間の除神経にもかかわらず 2, 4-D 処理によって myotonia が発症すると主張している。最近になり Eberstein (1979) らは myotonia の重症度は除神経期間の長さによって変ると報告している。我々は Anthracene 投与によりラットで観察される myotonia 発症時の神経筋接合部および筋細胞膜の電気的性質を微小電極法および筋電図を用いて検討し、さらに myotonia 発症に及ぼす除神経の効果を観察した。

Anthracene-9-carboxylic acid (Anthracene) をラット (Wister king, 250-300 g) 腹腔内に 2~3 日間 250mg/day/kg 投与し myotonia を発症させ、直径 100  $\mu$  の筋電図用電極を大腿二頭筋に刺入し、プレアンプ (日本光電 MZ 3B) を通して筋電図波形をオシロスコープ上で観察した。増強および減衰を伴ういわゆる急降下爆撃型 (dive-bomber pattern) 筋電図が myotonia の重要な特徴であり発症の基準とした。in vivo 又は in vitro で微小電極法を用い静止膜電位、活動電位および神経筋接合部の微小終板電位 (m. e. p. p.) を細胞内記録した。一方灌流実験では Anthracene  $10^{-2}$ ~ $10^{-6}$  g/ml を用いて、Anthracene の筋細胞膜、神経-筋伝達に及ぼす効果を観察した。この実験には横隔膜および長指伸筋 (EDL) を in vitro で用いた。膜定数は Hodgkin & Rushton (1946) による方法で求めた。電極は 3MKCl で満たした微小ガラス管で 30~50 M $\Omega$  の電極抵抗のものを細胞内及び通電電極として用いた。

### 結 果

Anthracene を 1 日 250 mg/kg, 3 日間ラットの腹腔内に投与すると、15 匹すべてのラットに於てヒト myotonia と同様の臨床症状、たとえば機械的刺激に対して断続的な筋肉の拘縮を示すなどが観察された。筋電図を myotonia rat の大腿二頭筋

\*九州大学医学部薬理学教室

より記録するとヒトの myotonia と同様の所見すなわち自発的筋活動が見られた。多くの例で筋電図は増強および減衰を伴う一連の放電現象をくり返し示し、これはヒトの myotonia に典型的といわれる急降下爆撃型 (dive-bomber pattern) に酷似していた。そこで微小電極を用いて myotonia ラットの大腿二頭筋より *in vivo* で細胞内記録を行うと、心筋のペースメーカー細胞におけるようなゆっくりとした prepotential を伴って活動電位の連発が始まり、それとともに活動電位の閾値が上昇し、大きさは不活性化により次第に減少し、その後膜は徐々に再分極し、約 1~2 秒後に静止レベルに到達した。筋電図における一連の放電現象の間、個々の筋細胞においてこのような電気現象が発生していると考えられる。又、myotonia ラットは自発的な筋の活動だけでなく神経刺激によっても特徴的な反応を示した。すなわち正常ラットでは一回の坐骨神経刺激に対し、数 msec の二層性の筋電図が大腿二頭筋から記録されたが、myotonia ラットでは一発の刺激に対し数秒間続く burst 状の放電現象がみられた。そこで myotonia 症状に対する支配神経の関与を調べるため坐骨神経切断と d-tc を用いてその効果を大腿二頭筋の筋電図を指標として観察した。坐骨神経切断では myotonia ラットの自発筋電図は全く影響を受けなかった。d-tc 投与では周期的に発生する一連の放電現象は影響を受けない。しかしこの群発放電の間に散発的に発生する単発性の電気現象は完全に消失した。次に灌流実験において Anthracene の正常ラットの横隔膜の筋細胞膜および神経-筋伝達に及ぼす効果を細胞内記録法により観察した。Anthracene  $10^{-4}$  g/ml の灌流投与によっても筋細胞膜の自発活動が発生し、その自発活動電位は 2 種に分類出来た。1 つはゆっくりした prepotential を伴う連発する自発活動であり、もう 1 つは立ち上りに hump がみられる単発性の活動電位であった。ただし後者は終板近くの筋膜のみにおいて記録された。同じく灌流実験で微小電極法による通電実験を行い活動電位発生閾値を調べると、Anthracene  $10^{-4}$  g/ml 灌流後、横隔膜で

46.9 mV から 54.8 mV に (10 例の平均値)、長指伸筋で 48.2 mV から 54.8 mV にそれぞれ減少した。閾値以上の通電により正常筋細胞では一発の活動電位しか発生しないのに対し、Anthracene 灌流後多発する傾向がみられた。Anthracene  $10^{-4}$  g/ml の灌流による筋細胞膜の電気的定数の変化を横隔膜と長指伸筋で観察した。横隔膜では Anthracene 灌流後、入力抵抗 ( $R_{in}$ ) が約 1.5 倍に、長さ定数 ( $\lambda$ ) が約 2 倍に、個有膜抵抗 ( $R_m$ ) が約 4 倍に、そして膜時定数 ( $\tau$ ) が約 3 倍にそれぞれ増加したが、内部抵抗 ( $R_i$ ) および個有膜容量 ( $C_m$ ) はほとんど変化しなかった。長指伸筋ではこの傾向がより著明であった。同じく横隔膜と長指伸筋を用いて神経筋接合部の微小終板電位 (m.e.p.p.) に及ぼす Anthracene 灌流の効果を一連の記録で観察した。 $10^{-4}$  g/ml の Anthracene を灌流後、m.e.p.p. の大きさは約 1.5 倍に、そして時間経過は正常の 1.5 倍に増加した。Anthracene  $10^{-4}$  g/ml と Vagostigmine  $10^{-6}$  g/ml を同時に投与すると m.e.p.p. の大きさおよび時間経過がさらに大幅に増加した。さらに Anthracene  $10^{-4}$  g/ml と d-tc  $10^{-6}$  g/ml を同時に灌流すると m.e.p.p. は完全に消失した。すなわち Anthracene は少くとも抗コリンエステラーゼ作用やシナプス後膜の受容器の感受性を介して m.e.p.p. の大きさや時間経過を変化させているのではなく、この現象は入力抵抗 ( $R_{in}$ ) や時定数 ( $\tau$ ) などの膜定数の変化のためと考えられた。m.e.p.p. の大きさの Histogram は正常 Krebs 液中ではいわゆるベル型を示し、Anthracene 灌流後これが右方に平行移動するのが観察され、その右端においては 9~10 mV 以上の m.e.p.p. (いわゆる Giant m.e.p.p.) がときどき出現するのが観察された。Anthracene  $10^{-4}$  g/ml を灌流中、活動電位発生の閾値が 6~7 mV 減少することから、m.e.p.p. によって活動電位が発生することは可能であり、終板近くの筋膜で記録された hump をもった単発性の活動電位や筋電図においてみられた d-tc 投与によって消失する単発性の電気現象は Anthracene 投与によって発生する巨大な m.e.p.

p.によって発生した活動電位であると推定出来た。一本の筋細胞において、終板部、終板部より1mm, および2mm離れた筋細胞膜に微小電極を刺入しm.e.p.p.を記録した。Anthracene  $10^{-4}$  g/ml の灌流以前では、終板より1mm離れたところではm.e.p.p.は全く記録出来ない。しかしAnthracene 灌流後では終板より2mm離れた筋細胞膜においても0.2~0.4 mVの大きさのm.e.p.p.が記録できた。これは長さ定数( $\lambda$ )や入力抵抗( $R_{in}$ )の増加によるものである。myotonia 発症に及ぼす神経要因の効果をしらべる目的で除神経の myotonia の発症に対する効果をラット大腿二頭筋からの筋電図記録によって検討してみた。すなわち除神経期間を種々変化させ(3日~40日), その後Anthracene を3日間250 mg/kgで腹腔内に投与して myotonia 発症に対する除神経期間の効果を観察した。一週間の除神経ののちAnthracene を投与したものは臨床症状、筋電図所見とも除神経を行わない myotonia ラットと差異なかったが、30日以上除神経したものでは臨床症状は myotonia 症状を示すにもかかわらず、筋電図では典型的な急降下爆撃型は全く観察されず diffuse な burst 状の電気現象のみ記録できた。ただし30日以上除神経を行っただけで Anthracene の処置をしていないラットの大腿二頭筋において低頻度ではあるが散発性の電気現象が筋電図にみられた。これは除神経効果による筋肉の攣縮によるものではないかと思われた。

## 考 察

Monocarboxylic acidの一つである Anthracene を用いて正常及び除神経された骨格筋に myotonia 症状を発症出来ることがこの実験によって確認できた。この症状の発症に主に関与しているのは筋膜性質の変化、すなわち Adrian や Bryant らが報告している  $C\ell$  conductance の著明な低下と  $K^+$  conductance の上昇が関与してい

るものと思われる。又彼らは一連の連発する活動電位の原因について、表面筋膜における  $C\ell$  conductance の著しい低下によって、膜の活動時における transverse tubular system への  $K^+$  の蓄積が膜電位に大きく関与するようになるためと説明している。本実験に於ても、個有膜抵抗と時定数の著しい増大が観察され、myotonia の発症の原因は主に膜性質の変化にあり筋原性のものであると考えられる。しかし神経要素を完全に無視することはできない。なぜなら少数ではあるが神経筋接合部の m.e.p.p.によって活動電位が十分に発生し得ることや、30日以上除神経したラットでは、臨床症状では明らかに myotonia の症状を示したにもかかわらず、その筋電図では典型的な dive-bomber pattern が記録できなかったことを考えあわせると、神経要因が一次的ではないにせよ、二次的に myotonia の発症に関与している可能性があると考えられる。

## 文 献

- 1) Lipicky, R.J., Bryant, S.H. & Salmon, J.H. Cable parameters, sodium potassium and chloride and water content and potassium efflux in isolated external intercostal muscle of normal volunteers and patients with myotonia congenita. *J. Clin. Invest.* 50: 2091-2103, 1971.
- 2) Bryant, S.H. (1969). Cable properties of external intercostal muscle fibres from myotonic and normal goats. *J. Physiol.* 204: 539-550.
- 3) Bryant, S.H. (1973). The electrophysiology of myotonia with a review of congenital myotonia of goats. In *New Developments in Electromyotrophy and Clinical Neurophysiology*, ed. Desmedt. 1: 420-450, Basel: Karger, 1973.
- 4) Caccia, M.R., Boiardi, A., Andreussie, L. & Cornelio, F. Nerve supply and experimental myotonia in rats. *J. Neurol. Sci.* 24: 145-150, 1975.
- 5) Eyzaguirre, C., Folk, B.P., Zierler, K.L. & Lilienthal, Jr., L.L. Experimental myotonia and repetitive phenomena. *Am. J. Physiol.* 155: 69-77, 1948.
- 6) Eberstein, A., Goodgold, J. & Johnston, R. Myotonia induced in denervated muscles. *Exp. Neurol.* 51: 266-270, 1976.
- 7) Hodgkin, A.L.Z. & Rushton, W.A.H. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc. Roy. Soc. B.* 133: 444-448, 1946.

## V 生 化 学

- 18 ジストロフィー鶏筋における蛋白合成能上昇の機構について 103
- 19 幼若筋及び筋ジストロフィー筋の筋蛋白質についての研究 108
- 20 ジストロフィー鶏筋の構造蛋白 114
- 21 ラットミオシン分化に対する神経の影響 124
- 22 筋肉の弾性蛋白質コネクチン 131
- 23 ジストロフィー成鶏胸筋小胞体膜の  
Ca-取り込み能と, その膜構成について 136
- 24 筋ジス・マウスの中樞神経組織における  
ミエリン局酵素 (CEHおよびCNP) 活性の日令変化 144

## 18 ジストロフィー鶏筋における蛋白合成能上昇の機構について

真 崎 知 生\*

研究協力者 吉 川 昭\*\*

筋ジストロフィー症において最も著名な変化は疾病の進行に伴ない骨格筋細胞の崩壊と消失がおこることである。最近のこの分野における研究があきらかにしているような細胞の膜系における異常がこの筋の変性とどのような関係にあるかはまだ明らかではないが、いづれにしてもこの筋組織の崩壊がこの疾病の直接的な症状発現の原因となっていることはまちがいない。さてこの筋細胞の消失はこれを構成している筋蛋白の消失が重要な役割を果しており、またこれは筋細胞における蛋白の合成と分解の平衡の上になりたっている蛋白の代謝回転の総決算の結果おこる現象である。したがってジストロフィー筋を正常筋とくらべた場合、蛋白合成が低下しているのか、あるいは蛋白分解が増加しているのかということが当然問題になる。最近の結果によればジストロフィー筋ではある種の蛋白分解酵素の活性が増加しているという報告がいくつかある。

しかしジストロフィー筋における蛋白合成に関する報告の結果は必ずしも一致していない。我々はこの点に関してこの数年来研究を進め、少なくともジストロフィー鶏の筋に関しては蛋白合成能が上昇しているという結果を出している。我々のこの結果は最近外国の文献で出されたジストロフィーハムスターを用いての実験結果と一致している。今回の報告では、前年度までに報告したジストロフィー鶏におけるデータを整理して得られた結論と同時に、この蛋

白合成能上昇のひとつの原因が、いわゆる300,000 xg 上清中の蛋白合成に必要な蛋白因子の量的な変化に帰せられる可能性を示唆するデータが得られたので報告する。

### 材 料 と 方 法

ジストロフィー鶏と正常鶏は前回通り New Hampshire line 413 および 412 をそれぞれ用いた。この受精卵を 38℃ の孵卵器中におき、孵卵 13 日目の胸筋あるいは心筋より通常の方法によりポリゾームを得た。つまり胚の胸筋を 2 倍量の溶液 A (0.25 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM β-メルカプトエタノール) 中でダウンスホモジェナイザーを用い 5 回ホモジェナイズする。このホモジェネートを 10,000 xg で 15 分間遠心し、その上清を溶液 A 中の 8 ml の 2 M および 5 ml の 0.5 M の不連続密度勾配上にのせ、約 300,000 xg で 4 時間遠心する。沈澱として得られたポリゾームはもう一度同様の不連続密度勾配にかけて精製する。この密度勾配遠心後その上清の 2/5 ほどをとり溶液 B (0.1 M KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 6 mM β-メルカプトエタノール) に十分透析する。その後さらに 300,000 xg で 90 分程遠心し、その上清を 300,000 xg 上清として実験に用いた。

<sup>14</sup>C-標識アミノ酸、<sup>14</sup>C-標識アミノアシル tRNA、ピュロマイシン処理リボゾームの調製法およびこれら各因子存在下での種々の条件下におけ

\* 筑波大学基礎医学系

\*\* 東京都臨床医学総合研究所

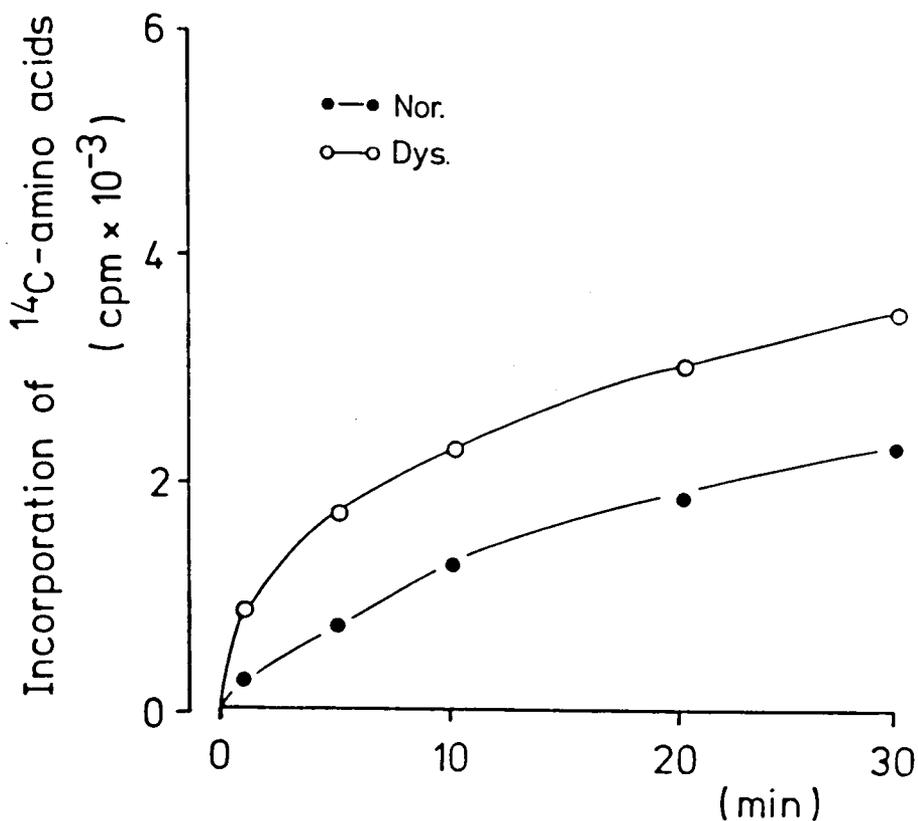


図1 アミノアシル tRNA 合成酵素活性  
<sup>14</sup>C-標識アミノ酸から<sup>14</sup>C-アミノアシル tRNA へのとり込みの反応開始後の時間変化

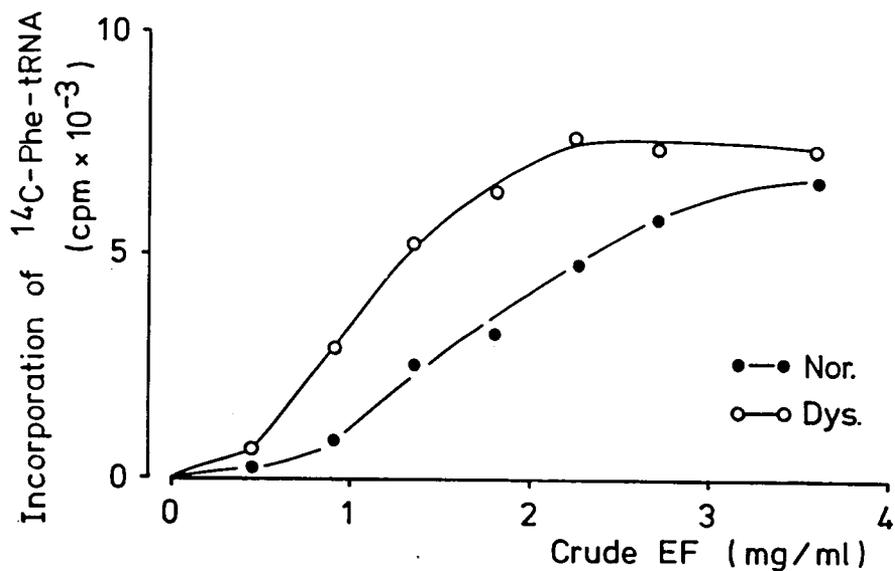


図2 粗延長因子活性の濃度依存性  
<sup>14</sup>C-標識フェニルアラニル tRNA からポリフェニルアラニンへの取り込みを種々の濃度の粗延長因子の存在下で測定したもの。

る  $^{14}\text{C}$ -アミノ酸のポリペプチドへの取り込みの測定法については、前年度までの報告書および他の論文に詳しく記載した通りに行った。

### 結 果

孵卵13日目の正常およびジストロフィー鶏の胸筋

よりポリゾームを調製し、同時に得られる300,000 xg 上清を用いて  $^{14}\text{C}$ -標識アミノ酸からポリペプチドへの取り込み実験を行った。ジストロフィー筋、正常筋それぞれのポリゾームによる取り込みの値の比をとってみると多かれ少なかれジストロフィー筋によるものの方が高くなっている。表 I には過去に

表 I ポリゾームと 300,000 xg 上清による  $^{14}\text{C}$  標識アミノ酸の取り込み

孵卵13日目、胸筋 (Breast) および心筋 (Cardiac) ポリゾームとそれぞれの 300,000 xg 上清による  $^{14}\text{C}$ -標識アミノ酸のとり込み。ジストロフィー筋由来のポリゾーム、300,000 xg 上清による値を正常筋由来のそれで除した値。

### Dystrophy/Normal

Breast	1.35±0.10	(S.E. n=10)
Cardiac	0.96±0.03	(S.E. n=10)

行った実験の中から信頼出来るもの10回の結果を示してある。同時に行った心筋ポリゾームによる結果の値がほぼ1であることとくらべると胸筋ポリゾームによる1.35は有意の差である。なお昨年度報告したように、正常筋の可溶性蛋白分画には蛋白合成を抑制する因子が含まれているため、この影響を十分に除くように300,000 xg の上清を用いた。

しかしながら、この胸筋のポリゾームによる蛋白合成の活性化の程度には標本毎の差がかなりある。また一方、ジストロフィー筋の筋萎縮が進行するにしたがって筋細胞が他の細胞におきかえられる。そこでその筋以外の細胞が蛋白合成に必要な因子を筋細胞と同程度含んでおり、しかもその細胞質に含まれる可溶性蛋白がかなり少ないと仮定すると、ジストロフィー筋の300,000 xg 上清中には蛋白合成に必要な因子が相対的に多く含まれていると考えられる。つまりみかけ上蛋白合成促進効果があることが期待される。

そこで筋に2倍量の溶液Aを加え、これから300,000 xg の上清を調製、その蛋白濃度を測定する。ジストロフィー筋の上清について得られた値を正常筋のそれで除した値が表 II に示してある。これからわかるように孵化後約5週で発症し、筋萎縮が進行するに従いジストロフィー筋では300,000 xg 上清中の蛋白濃度が減少してゆくことがわかる。ジストロフィー筋と正常筋の300,000 xg 上清中の蛋白濃度がほぼ等しい時期は孵化の前後であって、胚の時代にはジストロフィー筋の300,000 xg 上清中の蛋白濃度はむしろ増加している。したがってこの結果からは筋萎縮の進行した際の300,000 xg 上清による蛋白合成促進効果が前述のようなみかけ上の効果によるものでないとは言いきれないが、胚の時代から筋萎縮の出現するまでの蛋白合成促進効果についてはこれがみかけ上の効果でないということを示唆するデータである。

しかしながら、表 II からはより興味深い事実がう

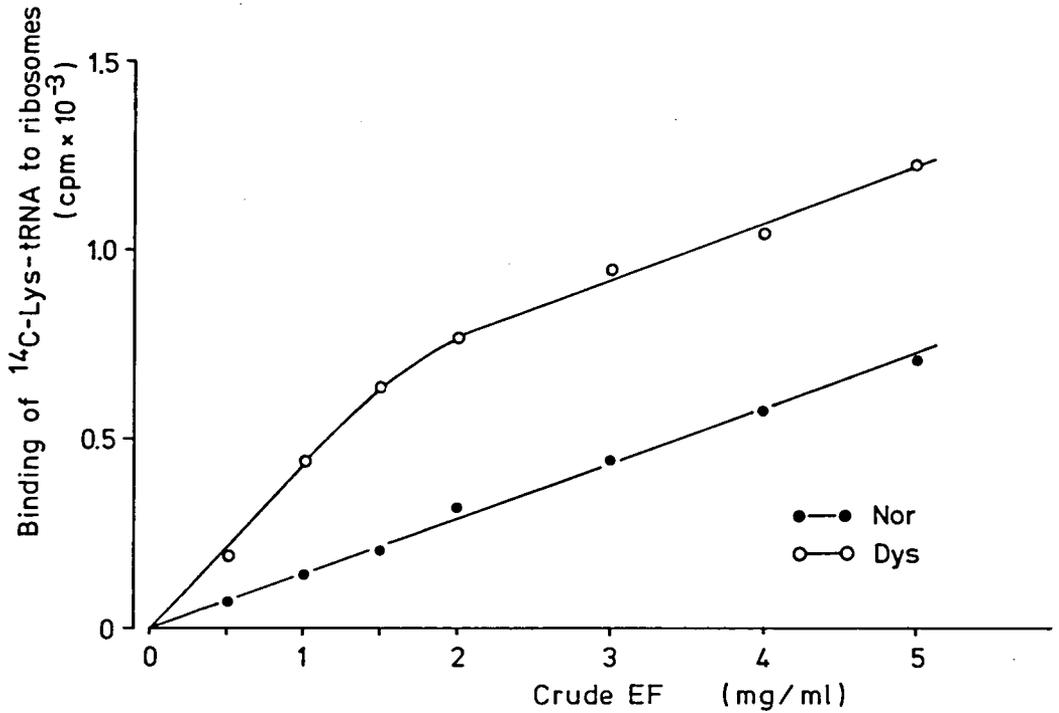


図3 種々の濃度の粗延長因子存在下におけるGMP-PCP存在下の<sup>14</sup>C-リジルtRNAのピュロマイシン処理リボソームへの結合

embryo		after hatch				
13th day	19th day	2-3 day	1 week	3-4 week	7-8 week	adult
1.48±0.39	1.29±0.09	0.95±0.11	0.76±0.08	0.82±0.07	0.68±0.04	0.54±0.06
(n=4)	(n=3)	(n=2)	(n=2)	(n=6)	(n=5)	(n=5)

表II 孵化前後の各発達段階における筋の300,000×g上清の蛋白濃度の正常筋の値に対するジストロフィー筋の値の比 (Dystrophic / Normel)

かがえる。ジストロフィー筋における上清の蛋白濃度が正常筋のそれよりも高く、次第に減少して行くという事実である。このことはジストロフィー筋が筋萎縮のあらわれる以前にすでに正常筋と異なる蛋白の代謝回転の機構を持っていることを示唆している。

ジストロフィー筋におけるこの蛋白合成能上昇の

原因がこのポリゾーム側の因子によるものなのか、上清側の因子によるものなのかという問題は、まだ完全に解決してはいない。しかし昨年度までの報告書に示したようにこの原因のかなりの部分は上清側にあることは確実である。

また昨年度までの報告書の中に示したように

300,000 xg 上清中の蛋白合成促進因子の原因として現在までにアミノアシル tRNA 合成酵素の活性化および延長因子の活性化の2つがわかっている。図1に示したようにジストロフィー筋および正常筋の300,000 xg 上清中のアミノアシル tRNA 合成酵素の活性の時間変化を追ってみると、その初速度はジストロフィー筋の方が高い。このことはこの酵素量が正常筋よりジストロフィー筋の上清中に多いことを示唆している。

300,000 xg 上清の50~70% 飽和硫酸の分画を集め、溶液D (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M KCl, 1mM EDTA, 6mM  $\beta$ -メルカプトエタノールおよび0.25M 蔗糖) に透析後300,000 xg で90分間超遠心する。その後これをハイドロキシアパタイトに吸着させ、0.05M-0.3Mのカリウムリン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出して来る部分を集め粗延長因子とする。ピューロマイシン処理リボゾーム、poly U を用い<sup>14</sup>C 標識フェニルアラニル tRNA よりポリフェニルアラニンへの<sup>14</sup>C 標識アミノ酸の取り込みをみたのが図2である。前年度の報告書で述べたように、この図をみると正常筋とジストロフィー筋で延長因子の量に差があるように思えるが必ずしも確実ではない。そこで<sup>14</sup>C-標識リジン tRNA のピューロマイシン処理リボゾームへの結合をこの粗延長因子およびグアニル ( $\beta$ ,  $\gamma$ -メチレン) ジフォスフォネイト (GMP-PCP) 存在のもとで測定した。このGMP-PCPの存在下では、1モルの<sup>14</sup>C 標識 tRNA が1モルのリボゾームに結合した段階で蛋白合成反応は停止する。<sup>14</sup>C 標識リジンのリボゾームへの結合は延長因子の増加と共に増加する。図3にみられるようにジストロフィー筋と正常筋の上清による値は平行線をなす。この結果から計算するとジストロフィー筋の粗延長因子分画中のEF1の量は正常筋中のそれにくらべて約3倍量にあることがわかる。同様な結果はジフテリア毒素を用いた結果からもわかった。

上清にみられる蛋白合成促進効果は少なくともアミノアシル tRNA 合成酵素および延長因子の活性化によるものであり、この活性化とはEF1がジストロフィー筋で量的に増加していることが少なくともその一因である。この事実を含めて蛋白合成に必要な蛋白因子がジストロフィー筋で増加していることが強く示唆される。しかし発症後の萎縮筋では300,000 xg 上清中の蛋白濃度が減少しているため、みかけ上の蛋白因子の量的増加がおこっているようにも見える。しかしジストロフィー筋の組織学的な所見、あるいは非筋細胞の細胞質中の蛋白濃度等を考え合わせると、これは単なるみかけ上の蛋白因子の増加でなく萎縮筋において蛋白合成に必要な蛋白因子が増加していることが推察される。しかも表2からあきらかなようにこの蛋白合成に必須な蛋白因子の増加はジストロフィー筋に固有な性質で発症のかなり以前から筋細胞にそなわっている性質と考えられる。

## 文 献

- 1) 真崎知生：ジストロフィーチキンの発生過程における蛋白合成能の変化、筋ジストロフィー症の病因に関する研究、昭和52年度報告書、P 39. (1978)
- 2) 真崎知生：ジストロフィーチキン骨格筋の蛋白合成能、筋ジストロフィー症の基礎的研究、昭和53年度研究報告書、P 7. (1979)
- 3) T. Masaki, A. Yoshikawa, N. Harada and H. Shinozaki: *Current Research in Muscular Dyst. JAPAN.* 22: 1978.
- 4) T. Masaki and A. Yoshikawa: *Current Research in Muscular Dyst. JAPAN.* 32: 1979.
- 5) 真崎知生：ジストロフィーチキンの蛋白合成因子の変化、筋ジストロフィー症の基礎的研究、昭和54年度研究報告書、P 111. (1979)
- 6) T. Masaki and A. Yoshikawa: Increase of Protein Synthetic Activity in chicken Muscular Dystrophy (in preparation).
- 7) T. Masaki and A. Yoshikawa: Muscle Protein Synthesis in Dystrophic Chicken *Proceeding of the symposium on Muscular Dystrophy* in press.

## 考 察

以上の結果からジストロフィー筋の300,000 xg

## 19 幼若筋及び筋ジストロフィー筋の筋蛋白質 についての研究

大日方 昂\*

研究協力者 大室 弘美\*\* 清水 法子\*

筋蛋白質分化をめぐる問題として、タンパク質の合成から筋原線維の規則的構造への諸蛋白質の集合まで様々の問題がある。これらの中で2つの問題、幼若筋から成熟筋に至る間の蛋白質の変異と蛋白質モノマーから構造への集合について、正常筋と筋ジストロフィー（以下筋ジスと略）筋の場合について検討してきた。最近までの多くの研究は、筋の発生・成長過程で筋蛋白質のタイプが著しく変化していくことを示してきた。又、筋蛋白質のタイプは正常筋と筋ジストロフィー筋の間で違いのあることがトロポミオシン<sup>1)</sup>、ミオシンL鎖<sup>2)3)</sup>について指摘された。我々も、前年度までにトロポニン及びミオシンアイソザイムが正常筋、筋ジス筋とで差異のあることを見出し<sup>4)5)</sup>てきた。一方、発生途上の筋細胞内での筋蛋白質の集合についての研究はあまりなされていない。

本年度の研究においては、筋ジス筋と正常筋の成長過程でのトロポニンT（以下TN-Tと略）のタイプの変化における違いを更に詳しく検討し、又ミオシンアイソザイムのパターンの変化と関連させてミオシンL鎖の変化、更に筋成長にともなう筋細胞内でのアクチンの重合度の変化についても調べた。

### 実験方法

トロポニン及びミオシンの解析：ふ化後の種々の時期の正常（412）及び筋ジス（413）鶏の浅胸筋より定法によりトロポニン及びミオシンを抽出・精製

の操作を行ない、トリス-グリシン緩衝液系を用いてSDS-アクリルアミドゲル電気泳動法により（詳しくは文献5）参照）、TN-Tのタイプ及びミオシンL鎖を調べた。一方、トロポニンについては、筋小片から加熱SDS溶液で直接蛋白質抽出を行ない、これをSDS-ゲル電気泳動により分離した後、抗TN-T抗体及び抗トロポミオシン抗体を用いた免疫拡散を行なうことによる解析も実施した。<sup>5)</sup>

アクチンの濃度及び重合度の測定：筋を3倍量の生理的塩溶液（0.1MKCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mMイミダゾールpH 7.0, 0.5% Triton X-100, 1mM 2-メルカプトエタノール, 0.5mM ATP, 0.05mM PMSF）でホモジェナイズし、一部は、10<sup>5</sup>xg, 1hr 遠心し、上清をモノマーアクチン（G-アクチン）濃度の測定に用い、又遠心前のホモジェネートの一部には0.6M KI（又は、0.5Mグアニジン塩酸）を加えてポリマーアクチン（F-アクチン）を脱重合させ、アクチン総量の測定に用いた。アクチン濃度測定は、G-アクチンがDNase Iの活性を特異的に抑制することを利用して行なった。<sup>6)</sup>

### 結果と考察

1. 筋構造蛋白質のタイプの変化  
i) トロポニンTの変化について

図1に種々の成長段階の正常及び筋ジス筋のトロポニンの電気泳動パターンを示す。ふ化後の比較的若い時期（ふ化後2週令）から十分成長した1年令のものまで、筋ジス鶏の胸筋には足型TN-Tが存在

\*千葉大学理学部生物学科

\*\*東京都臨床医学総合研究所

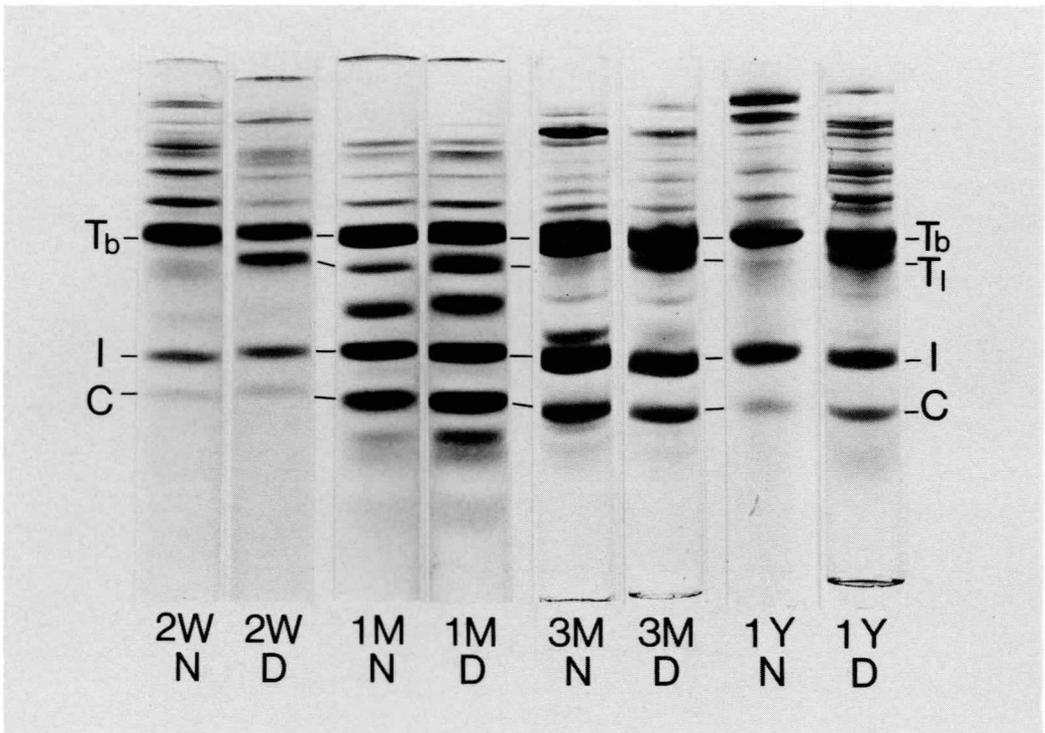


図1 正常鶏・筋ジス鶏胸筋のトロポニン成分のSDSアクリルアミドゲル電気泳動パターン。孵化2週(2W), 1カ月(1M), 3カ月(3M)及び1年(1Y)令の正常(N)と筋ジス鶏(D)よりトロポニンを抽出した。Tb, 胸型TN-T; T<sub>1</sub>, 足型TN-T; I, トロポニンC; C, トロポニンC。

することが認められた。それに反し、正常鶏では、ふ化後2週、1カ月、1年令などの胸筋には胸型TN-Tのみが検出され、足型TN-Tはみられなかった。正常鶏の胸筋の抽出物にも、時により足型TN-Tにはほぼ一致するバンドがみられる場合がある(図1, 1MN)が、これは足型TN-Tとはほぼ同分子量をもつトロポミオシンの混入によるバンドであると考えられる。筋組織中に存在するTN-Tのタイプを厳密に同定するために、SDS-アクリルアミドゲル電気泳動と組合わせた免疫拡散法は有効な方法であるが、種々の時期のニワトリ胸筋の小片から、95℃に加熱したSDS溶液でタンパク質を抽出し、まずSDS-アクリルアミドゲル電気泳動を行ない、抗TN-T抗体及び比較のために抗トロポミオシン抗体を用いて免疫拡散を行なって調べてみると、筋ジス筋からの抽出物は抗トロポニン抗体に対して2本の沈降線を生じた(図2A, B)。このうちの1本は、筋抽

出物に対して抗トロポミオシン抗体を作用させた時生ずる沈降線の位置にほぼ一致し、他方は抗トロポミオシン抗体により生じた沈降線より高分子量側に生じた。このような、生じた沈降線の位置的關係から、筋ジス筋にはトロポミオシンとはほぼ同分子量の足型TN-Tと、それより分子量のやや大きい胸型TN-Tとが筋の成長期を通じて共存することが結論づけられる。又、この方法を用いて調べてみると、抽出・精製操作の過程で生じたと思われるTN-Tの分解産物がトロポニン分画に共存していることがわかった(図2, C)。特に、筋ジス筋からのトロポニンの場合に目立つ様である。このような点からすれば、筋からの加熱SDS溶液を用いた粗抽出物を直接、電気泳動法で解析する方法は、TN-Tのタイプの同定には好都合の面がある。

#### ii) ミオシンL鎖の変化

ふ化の種々の時期の正常及び筋ジス胸筋から得た

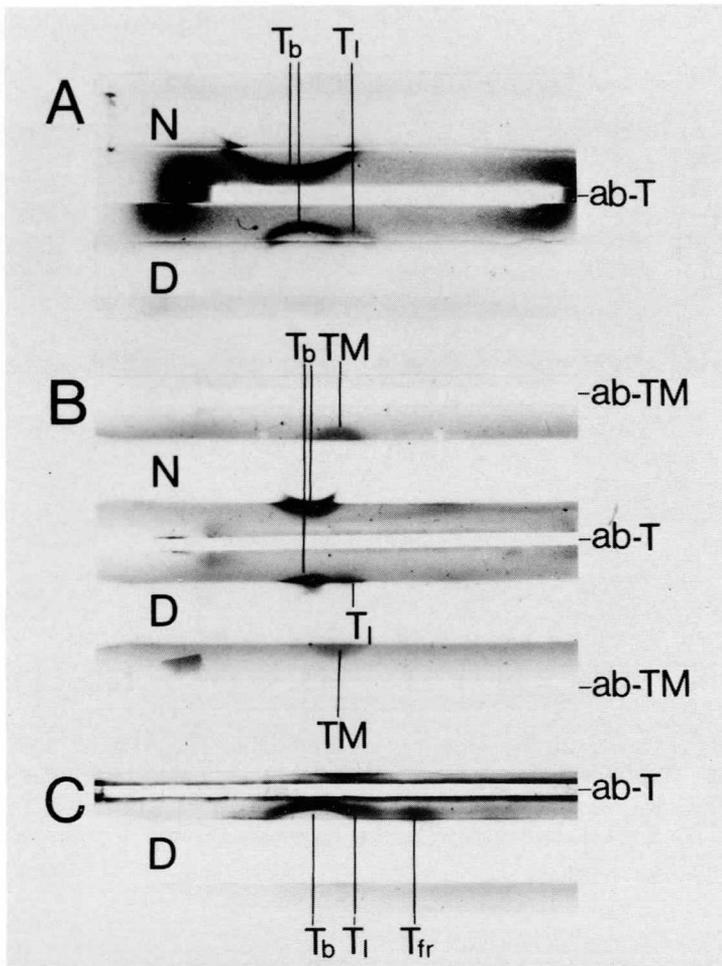


図2 SDS-ゲル電気泳動と組合わせた免疫拡散法によるトロポニンTのタイプの解析。4週 (A) 及び1年令 (B) の胸筋からのSDS抽出物、及び3カ月令の胸筋からのトロポニン分画を電気泳動した後、抗TN-T抗体 (ab-T) 又は抗トロポミオシン抗体 (ab-TM) を拡散させ調べた。N, 正常鶏; D, 筋ジス鶏; TM, トロポミオシン; Tfr, TN-Tの分解産物。他のシンボルは図1と同じ。

ミオシンのL鎖のパターンを図3に示す。比較的若い時期には筋ジス筋・正常筋間で、ミオシンL鎖のパターンの違いは、はっきりしない。しかし、成長の進んだふ化後7週、1年令では正常・筋ジス筋の間でのL鎖パターンの違いが顕在化している。特徴的なことは、筋ジス筋ではFL<sub>3</sub>の量が相対的に減少していることである。L鎖パターンの変化は、先に報告した<sup>4)5)</sup>ミオシンアイソザイムのパターンの変化と相応している。

iii) 筋ジス筋と正常筋の筋蛋白質の比較のまとめ。

表1に現在まで我々が調べた結果の要点を示す。全般的に、成長の進んだ筋ジス鶏の筋蛋白質のパタ

ーンは、幼若期の正常及び筋ジス鶏のパターンに類似している。ただし、アクチンについては、筋ジス筋でのアクチン種の変化は検出されていない。又、蛋白質のタイプの変化の時間的経過は蛋白質の種類によりややことなっているように思われる。<sup>5)6)</sup>

## 2. アクチンモノマー・ポリマーの量的変化

ニワトリの発生過程での胸筋に存在するアクチン総量 (筋湿重量当り) 及び非重合モノマーアクチンの量的変化を図3に示す。アクチン総量は、10日胚からふ化2カ月のニワトリまで、成長につれて急速に増す。ところが、モノマーアクチンの濃度は逆に若い筋程高い。ふ化後2カ月目ではふ卵10日目胚の

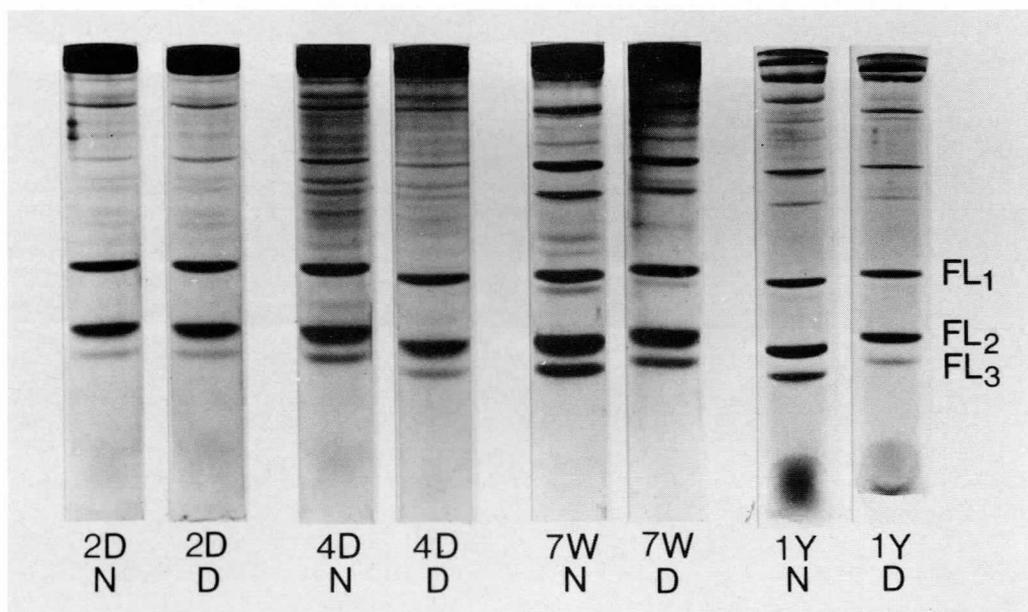


図3 正常鶏と筋ジストロフィー鶏胸筋のミオシンL鎖の比較。孵化後2日(2D), 4日(4D), 7週(7W), 1年(1Y)の正常(N)と筋ジスト(D)鶏からのミオシンを調べた。

表1 正常鶏, 筋ジストロフィー鶏の発生, 成長にともなう筋構造蛋白質の変化。

		EMBRYO	YOUNG	MATURE
MYOSIN ISOZYMES	N	$FM_1 \ll FM_3$	$FM_1 < FM_3$	$FM_1 > FM_3$
	D		$FM_1 < FM_3$	$FM_1 < FM_3$
MYOSIN FL-3 LIGHT CHAINS	N	±	+	++
	D		+	+
TROPONIN-T	N	LEG-TYPE + (BREAST-TYPE)	LEG-TYPE + BREAST-TYPE	BREAST-TYPE
	D		LEG-TYPE + BREAST-TYPE	LEG-TYPE + BREAST-TYPE
ACTIN	N	$\alpha, \beta, \gamma$	$\alpha$	$\alpha$
	D		$\alpha$	$\alpha$

表2 2カ月令の正常及び筋ジス鶏の胸筋におけるアクチン全量及びモノマーアクチン量の比較。比較のために20日胚(20D)のアクチン量も示した。

	20 D EMBRYO	2 M NORMAL	2 M DYSTROPHY
TOTAL PROTEIN (mg/mg wet weight)	81.3	222	172
G-ACTIN (mg/mg wet weight)	0.36	0.14	0.43
TOTAL ACTIN (mg/mg wet weight)	10.4	34.8	24.8
G-ACTIN/TOTAL ACTIN (%)	4.3	0.4	1.73
ACTIN-TYPE	$\alpha$ ( $\beta, \gamma$ )	$\alpha$	$\alpha$

約1/8に下がっている(10日胚の数値は示していない)。この違いは、総アクチン量に対するモノマーアクチンの割合でみると更に顕著で、10日胚では全アクチンの約40%がモノマー、ふ化後2カ月のニワトリでは1%以下がモノマーとしてあるにすぎない。精製されたアクチンは生理的塩濃度の存在下では速かに重合してフィラメントとなり、共存するアクチンモノマーの濃度は著しく低い(0.05mg/ml程度)ことがよく知られている。所が、若い胚の筋細胞質からの抽出物には、生理的濃度の塩(0.1M KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>)が存在してもなお高濃度のアクチンモノマーが存在する。しかし、胚の筋から得た非重合モノマーアクチンをDEAEセルロース、硫酸分画を併用して精製を進めると次第に重合するようになる。又、胚の筋アセトンパウダーから抽出・精製されたアクチンは正常な重合性をもつ。これらの事実は、幼若な筋には、アクチンの重合を調節・

抑制する因子の存在することを示唆している。

一方、正常筋と筋ジス筋とを比較した所、両者でアクチンの重合度にやや差のあることが認められた。即ち、ふ化後2カ月の正常及び筋ジス鶏の胸筋におけるモノマーアクチンの濃度及び総アクチン量に対するモノマーアクチンの量比を調べた所、表2に示すように両者間で差があった。筋ジス筋ではモノマーアクチンの濃度がかなり高まっている。言い換えれば、筋ジス筋では、アクチンのモノマーからポリマーへの重合を抑制するか、あるいはアクチンフィラメントをモノマーへ脱重合させる要因が高められているのではないかと推測される。

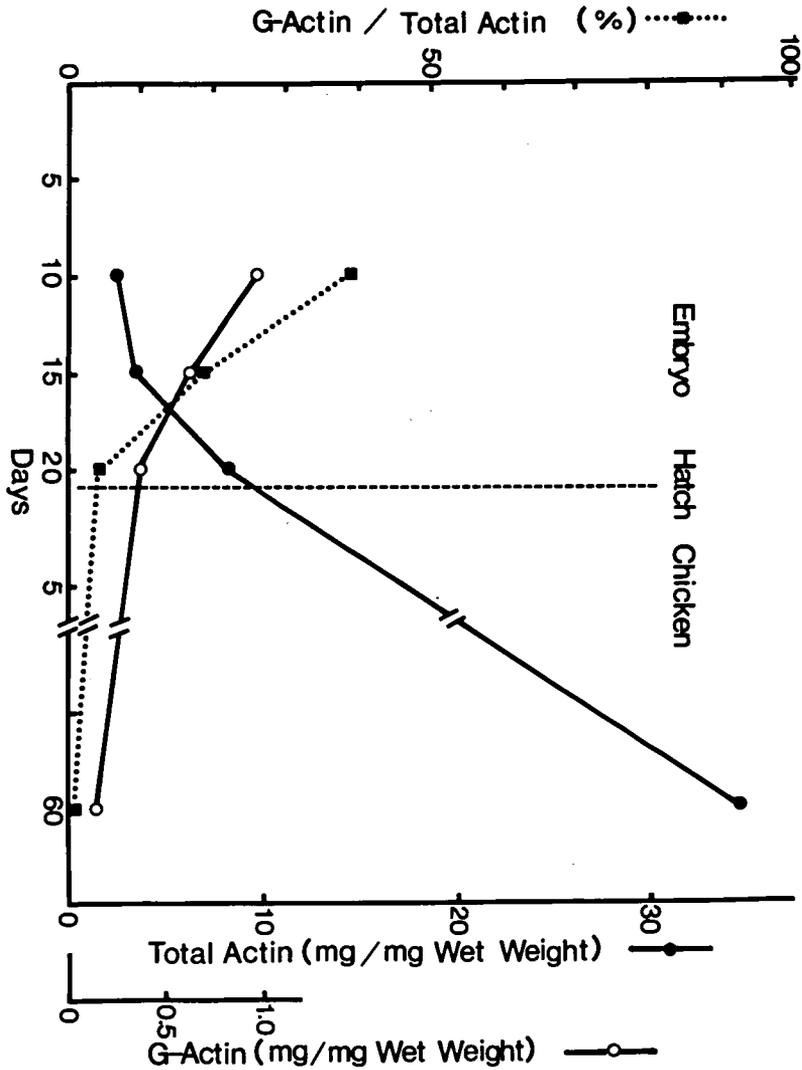


図4 ニワトリ胸筋中のアクチン全量及びモノマーアクチン量の発生にともなう変化。

文 献

- 1) Takeda, S. and Nonomura, Y. *Biomed. Res.* 1: 176-179, 1980.
- 2) John, H. A. *FEBS Lett.* 64: 116-124, 1976.
- 3) McGowan, E. B., Siemankowski, L., Shafiq, S. A. and Stracher, A. in *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies* (Rowland, L. P. ed) Elsevier /Excerpta Medica, Amsterdam, New York. 1976.
- 4) 大日方 昴：筋ジストロフィー症の基礎的研究（江橋 班）昭和54年度研究報告書，114 - 120。（1980）
- 5) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. and Matsuda, R. *FEBS Lett.* 120: 195-198, 1980.
- 6) Blikstad, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T. and Lindberg, U. *Cell*, 15: 935-943, 1978.
- 7) Matsuda, R., Obinata, T. and Shimada, Y. *Develop. Biol.* 81: 1981, in press.

## 20 ジストロフィー鶏筋の構造蛋白

### IEF・SDS 二次元電気泳動による分析

野々村 禎 昭\*

研究協力者 武 田 伸 一\*

Dystrophy 鶏 (Dy 鶏) の顕著な発症筋である胸筋については、筋構造蛋白の level で異常を認めたとする報告が幾つかある。<sup>1)-6)</sup>

我々は、Dy 幼鶏の胸筋では、tropomyosin の  $\beta$ -subunit の減少～消失に遅延があり、<sup>1)-2)</sup> Dy 成鶏胸筋には、対照成鶏には無い  $\beta$ -subunit が再び存在する事を示した。<sup>2-3)</sup>

今回は、等電点電気泳動 (IEF) 及び非平衡 pH 勾配ゲル電気泳動 (NE pHGE) から、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDSPAGE) への二次元電気泳動を用いる事により、whole myofibrillar protein の中で Dy 鶏筋の特性を検討した。更に Dy 鶏の胸筋から single fiber を作製し、1 つの cell の中で筋構造蛋白の異常がどのように表現されているのかを知る事を目的とした。

#### 方 法

対照鶏 (line 412), Dy 鶏 (line 413) の孵化後 1, 5, 10, 15, 25, 28, 35, 46, 60, 70, 120 日目鶏及び成鶏の各々数羽を使用。頭部を叩打、脱血後、直ちに浅胸筋、前広背筋 (ALD)、後広背筋 (PLD) 梨状筋の Pars caudofemoralis (大腿内側の深層にある白筋) を摘出した。

別に、対照及び Dy 成鶏胸筋からグリセリン筋を作製し、<sup>7)</sup> Mikawa らの方法にならって、筋の bundle を、実体顕微鏡下、0.1M KCl, 4mM EGTA, 3

mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM HEPES pH 7.0 の組成の solution 中で tease し、single fiber を得た。この fiber については、顕微鏡で観察し、一部の fiber については、標本の半分をグルタルアルデヒド、オスミウム二重固定後、エポキシレジンに包埋し、顕微鏡下で観察し、single fiber であることを確認してから、以下の検索を行なった。

上記2系統の sample は、9.5M Urea, 2% Nonidet (P-40), 2% Ampholine (1.6% pH 5-7, 0.4% pH 3.5-10), 5%  $\beta$ -mercaptoethanol の組成の sample buffer 下で、micro dissecting homogenizer を用いて、充分 homogenize し、以下の電気泳動的検索を行なった。

IEF 及び NEpHGE からの SDS 二次元電気泳動 (acrylamide 14.5%) は、基本的に O'Farrell <sup>8)-9)</sup> の原法に従ったが、装置は全て小型化したものを用いた。<sup>7)</sup>

一部の sample については、Urea 系 (7M) から SDS 系への二次元電気泳動も行なった。

蛋白の検出には、通常の Coomassie brilliant blue による蛋白染色の他に、single fiber の場合には、Switzer らにより始められ、<sup>10)</sup> Oakley らにより簡略化された銀染色を用いた。<sup>11)</sup>

#### 結 果

1) IEF 及び NEpHGE から SDS 系への二次元電気泳動の pattern :

図 1 に、対照成鶏浅胸筋の IEF → SDS, NEpHGE → SDS への二次元電気泳動の pattern を示した。

\* 東京大学医学部薬理学教室

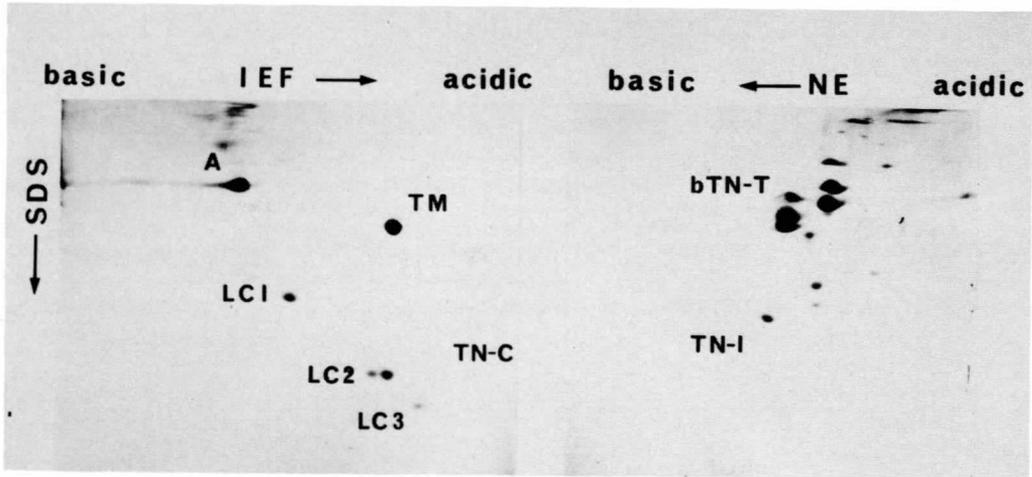


図1 対照成鶏浅胸筋の IEF → SDS, NEpHGE → SDSへの二次元電気泳動の patternを示す。左側の等電点電気泳動 (IEF) から、SDS系への二次元電気泳動では、Myosinの light chain 1, 2, 3 (LC1, LC2, LC3), Actin (A), Tropomyosin(TM), Troponin-C (TN-C) を区別する事ができる。Tropomyosin に関しては、ほとんどが  $\alpha$ -subunit から成る。一方、右側の非平衡 pH 勾配ゲル電気泳動 (NE) から SDS 系への二次元電気泳動では、胸型の Troponin-T (bTN-T) 及び Troponin-I (TN-I) を識別することができる。

蛋白の同定については、IEF→SDSでは、既知の主要構造蛋白の等電点と、SDSPAGE上の移動度を根拠とし、Myosinの light chain (LC), Actin, Tropomyosin, Troponin-Cを同定する事ができた。一方、NEpHGE→SDSへの二次元電気泳動では、一次元の電気泳動において、basicな方向に向かって移動していく蛋白の流れを、任意の時間で停めてその pattern を観察するという電気泳動の性質上、蛋白の持つ等電点を、その同定に利用する事ができない。今回は、既知の蛋白を抽出、純化し、co-migrationを行なう事により、Troponin-T, Iを同定した。

## 2) 対照成鶏主要筋の二次元電気泳動上の pattern:

Dy筋の異常について検討するためには、対照鶏の筋について、その拡がりを知る事が必要である。鶏の骨格筋は、大きく fast muscle (速筋) と slow muscle (遅筋) に分けることができる。図2には、fast muscleの代表として PLDを挙げ、slow muscleの代表として、PLDと解剖学的に近接している ALDを挙げて、両者の比較を示し

た。MyosinのLCについて比較すると、PLDにはLC3が存在し、LC1, LC2についても、fastとslowでは存在型が異なる事が判る。Actinは両者に共通するが、Troponin-T, I, Cについては、それぞれ fast type と slow type を判別できた。この比較では、TropomyosinとTroponin Tについては問題が残る。従来、Tropomyosinに関しては、 $\alpha$ -subunitは主として fast muscleに、 $\beta$ -subunitは主として slow muscleに存在するのではないかとされてきた<sup>12)</sup>。今回の検索では、PLD, ALD共に、それぞれ fast, slow muscleの純粋な型である事が、Tropomyosin以外の蛋白の存在型から予想されるのにも拘らず、Tropomyosinについては、両筋共に、 $\alpha$ ,  $\beta$  subunitが存在している。Troponin-Tに関しては、fast muscleにおける存在型に、胸型と脚型のある事が<sup>13)</sup>問題となる。

Dy鶏では fast muscleの選択的な罹患性が問題とされているが、fast muscle相互の違いを明らかにするために、図3に対照鶏の浅胸筋、PLD、

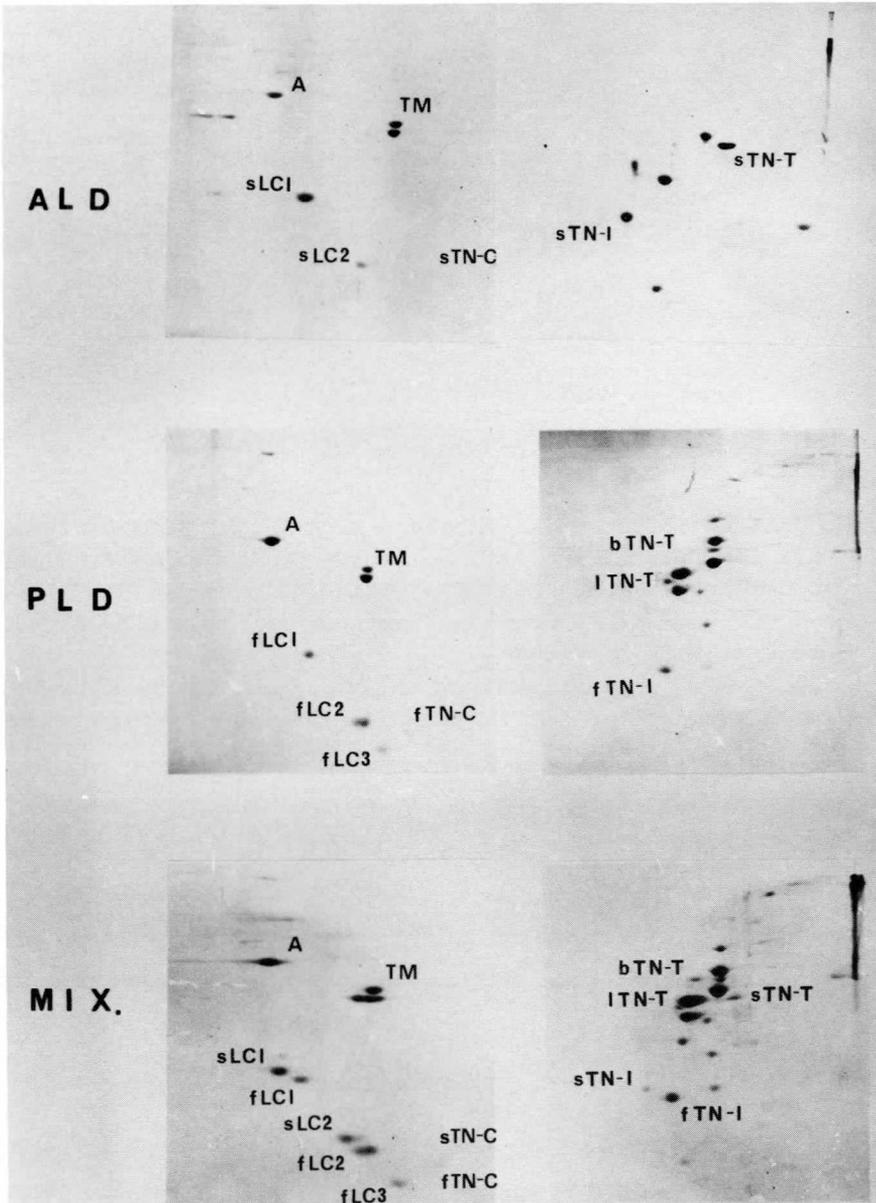


図2 対照成鶏のfast muscleとslow muscleの二次元電気泳動を示す。slow muscleの代表としてALDを、fast muscleの代表としてPLDを挙げ、最下段に両者のmixture (MIX)を示した。各spotが、fast muscle (f) 由来のものか、slow muscle (s) 由来のものを示した。PLDには、胸型のTroponin-T (bTN-T)の他に脚型のTroponin-T (ITN-T)が存在する。(以下の図について、電気泳動の方向及びspotの名称は図1に同じ)

梨状筋の Pars caudofemoralis の比較を示した。MyosinのLCを見ると、どの筋肉でもLC3が存在し、LC1, 2共にfast typeであり、何れもかなり純粋なfast muscleであると言える。同じ

事は、Troponin-I、及びCについても言える。ところがTropomyosinとTroponin-Tは、それぞれの筋肉で異なっている。Tropomyosinについて検討すると、浅胸筋の場合、 $\alpha$ -subunitの

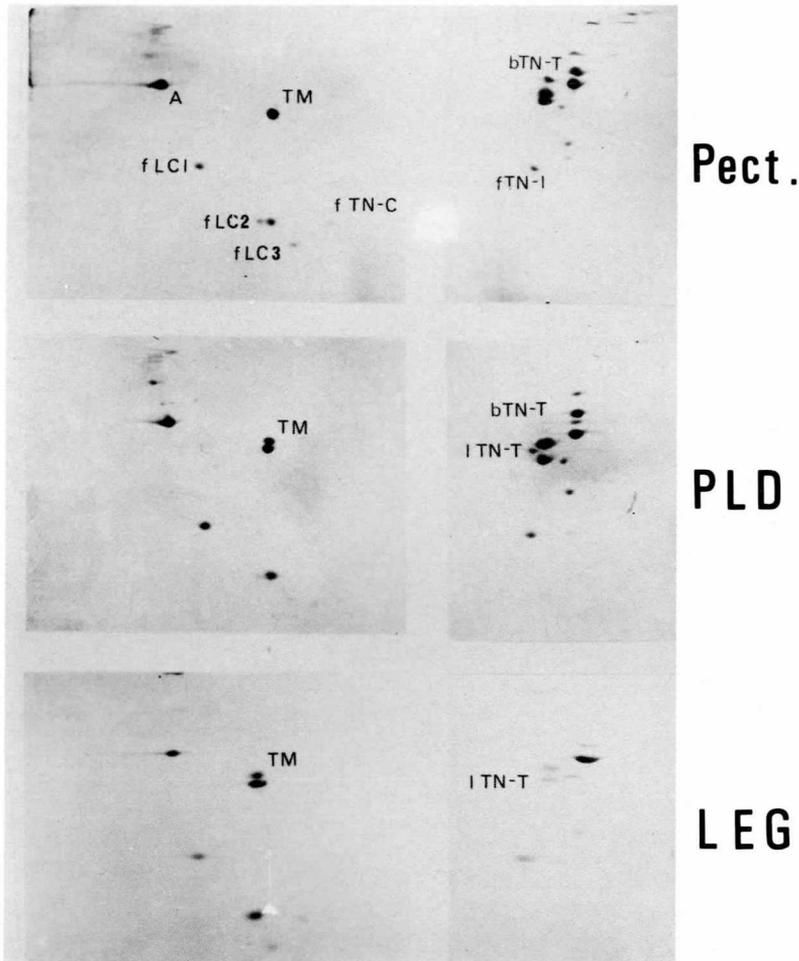


図3 対照成鶏の代表的な fast muscle である浅胸筋, (Pect.) PLD, 梨状筋の Pars caudofemoralis (LEG) の二次元電気泳動の Pattern を示す。Myosin の LC, Actin, Troponin - I, C が各筋に共通して fast type であるのに対し, Tropomyosin の subunit と Troponin - T が各筋ごとに異なる事を示す。

みから成るのに対し, PLD及び梨状筋では,  $\alpha$ -subunit と共に  $\beta$ -subunit が存在している。Troponin - T については, 浅胸筋が胸型の Troponin - T だけから成るのに対し, 梨状筋は脚型の Troponin - T だけから成る。一方, PLD には, 胸型と脚型の Troponin - T が, 両方存在することが明らかとなった。

### 3) 対照, Dy 成鶏胸筋の比較:

図4に対照成鶏と Dy 成鶏の浅胸筋の二次元電気泳動による比較を示した。両者が基本的に fast muscle である事は, Myosin の LC, Troponin - I, C から明らかである。両者が異なる点は, 少な

くとも二つ認められる。1つは, Tropomyosin であって, 対照鶏は  $\alpha$  - subunit のみからなるのに対して, Dy 鶏では,  $\alpha$  と共に  $\beta$  - subunit が存在している。これは我々が報告してきた結果と一致している。2つ目は Troponin - T で Dy 鶏では, 胸型と共に脚型が存在している。Tropomyosin と Troponin - T は, 前項のように, 同じ fast muscle の中でも, 各筋肉ごとにその存在型が異なっていた事が想起される。しかも, この2つの蛋白の Dy 鶏での存在型は, 対照成鶏の PLD で認められた pattern である事も注目される。

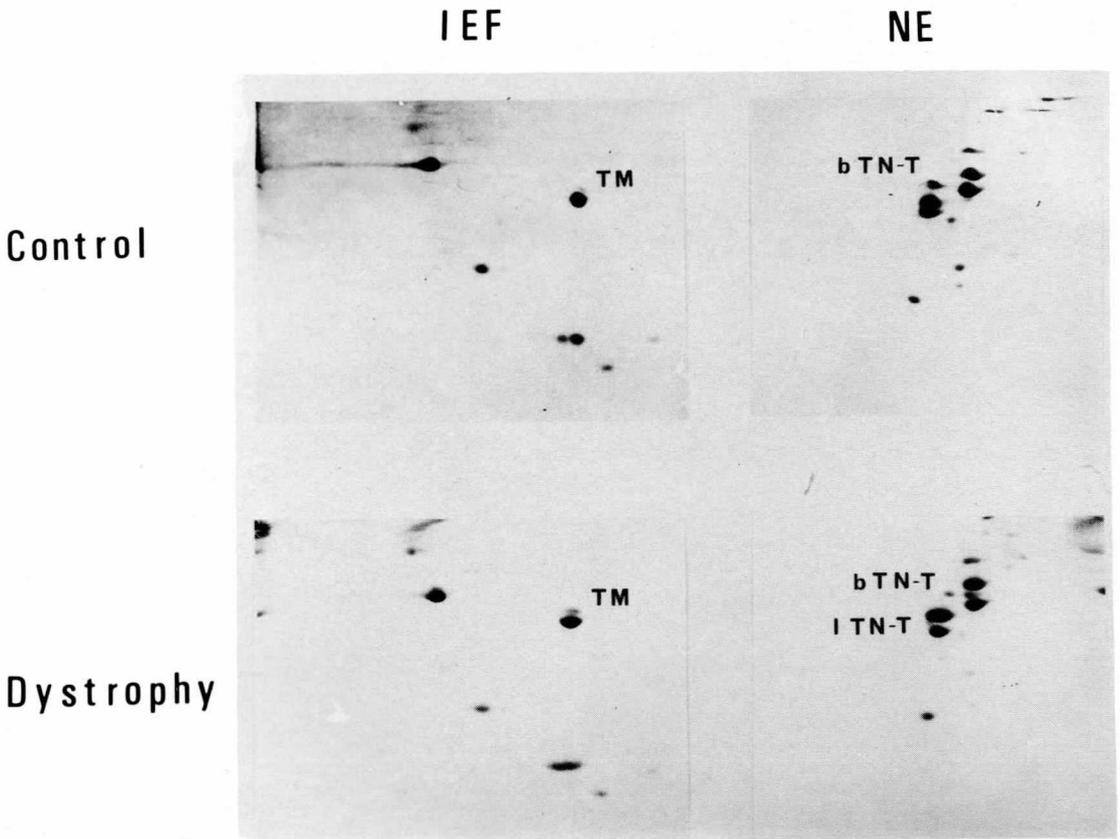


図4 対照, Dy成鶏の浅胸筋の二次元電気泳動による比較を示す。対照鶏 (Control) の Tropomyosin (TM) が $\alpha$ -subunitのみから成るのに対して, Dy鶏 (Dystrophy) は,  $\beta$ -subunitが存在する。Troponin-Tに関しては, 対照鶏が胸型 Troponin-T (bTN-T) から成るのに対し, Dy鶏では胸型のTroponin-Tが減少し, 脚型の Troponin-T (ITN-T)が存在する。

対照鶏とDy鶏との差異については,他にも幾つかの候補があるが,何れも定量的な扱いが必要である。

#### 4) 胸筋Tropomyosin subunitの時間的経過:

前項で認められたTropomyosinの異常の時間的経過を明らかにするために,経時的に採取した浅胸筋について二次元電気泳動を行なった。図5-Aに,IEF $\rightarrow$ SDSの二次元電気泳動のTropomyosinの部分だけを示した。この結果は,基本的に我々の行なってきた報告に一致するもので,以下の3つの点が明らかになった。1つは,対照鶏浅胸筋では孵化後早期に $\beta$ -subunitが減少 $\sim$ 消失する。<sup>1)-2)</sup>

<sup>14)</sup>次に,対照鶏でみられた減少 $\sim$ 消失の過程がDy鶏では遅延する。<sup>1)-2)</sup>更にDy鶏では, $\beta$ -subunitは一度減少し,孵化後25-30日で極小比をとるが,

以降再び増加に転じ,こうした再増加が,Dy成鶏浅胸筋における $\beta$ -subunitの存在と連絡する事が明らかとなった。

図5-Bには,これまでの検索とは独立に,一次元にUrea gelを行ない,Tropomyosinを含む部分だけを切り出し,二次元のSDSPAGEに展開した結果を示した。この方法を用いても,上の3つの結果が確認された。

#### 5) single teased fiberの検索

前項までで明らかとなったDy鶏胸筋におけるTropomyosinの異常が,1つのcellのlevelではどのように表現されているのかを明らかにするために,single fiberを作製し,IEF $\rightarrow$ SDSへの二次元電気泳動を行ない,銀染色法によりspotの

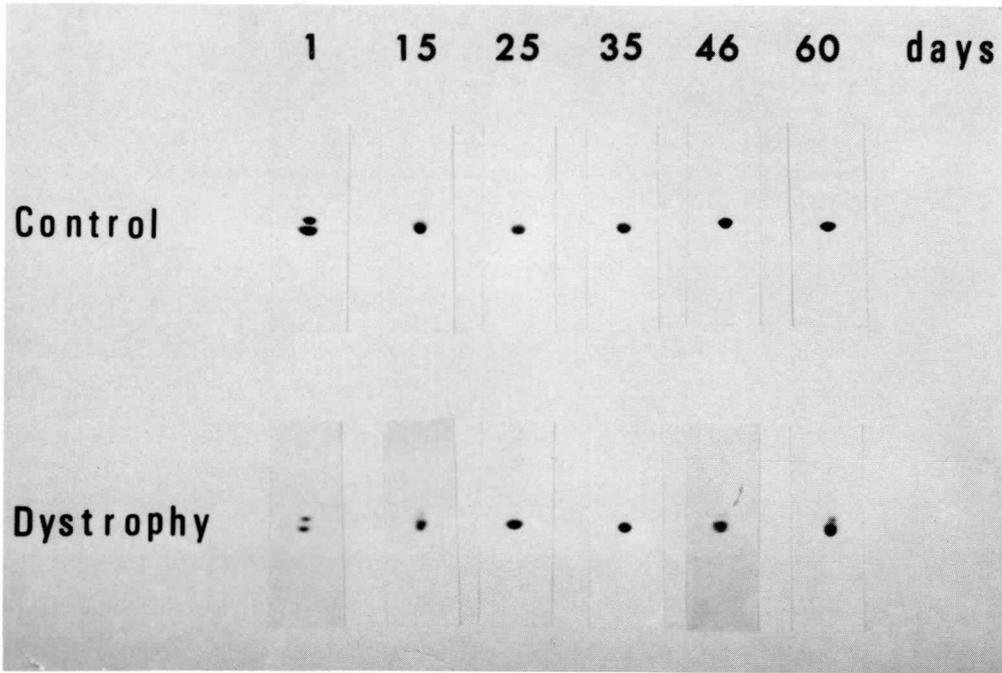


図5-A 対照, Dy 鶏浅胸筋の Tropomyosin subunit の経時的变化を示す。対照(Control), Dy (Dystrophy) 鶏の孵化後, 1, 15, 25, 35, 46, 60 日目の浅胸筋の IEF-SDS への二次元電気泳動の Tropomyosin の部分だけを示す。対照鶏では, 15 日目で  $\beta$ -subunit が消失するが, Dy 鶏では残り, 25~35 日目極小比を取った後, 再び増加している。

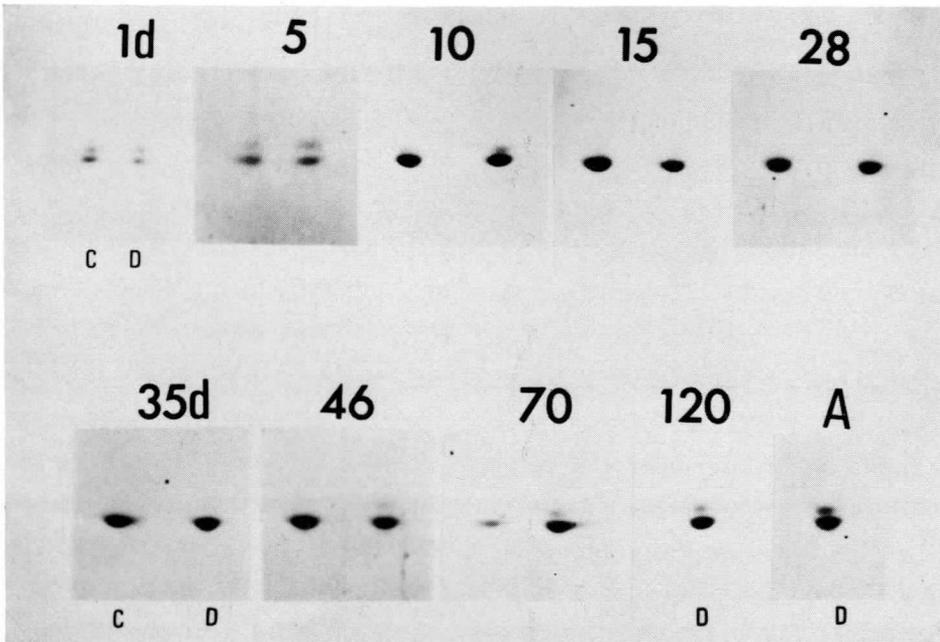


図5-B 対照, Dy 鶏浅胸筋の Tropomyosin subunit の経時的变化を, Urea系から SDS 系への二次元電気泳動の結果として示す。孵化後, 1, 5, 10, 15, 28, 35, 46, 70, 120 日目及び成鶏 (A) の対照鶏 (C) 及び Dy 鶏 (D) の Pair で示す。図5-A に基本的に一一致する結果である。

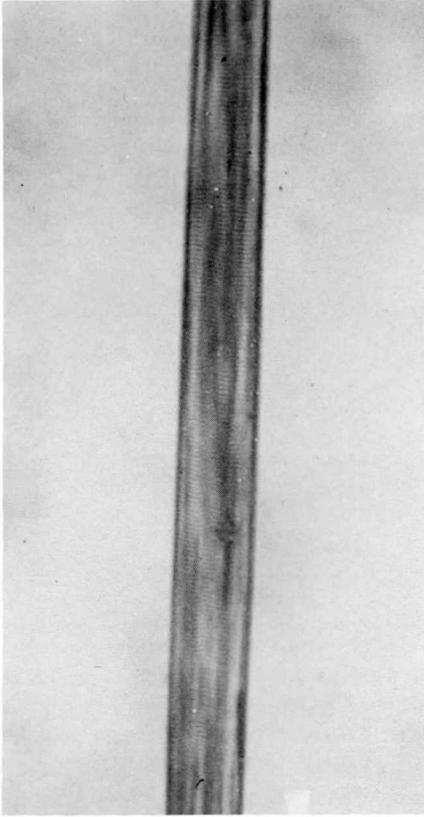


図6-A Single teased fiber の光顕像 (×100)

検出を行なった。

teaseしたsingle fiberについては、形態学的に、一つのcellである事を確認してから、電気泳動的検索を行なった。図6-A, Bに、teaseされたfiberの光顕像と電顕像の例を示した。何れも、そのfiberが一つのcellから成る事を示している。対照鶏胸筋については、Tropomyosinの $\alpha$ -subunitのみから成るfiberが殆んどである事が既に明らかにされているので、Dy鶏のfiberを中心に示す。図7に、Dy鶏胸筋から得られたsingle fiberの直径についてのdistributionを示した。このグラフは、検索されたfiberが直径 $100\mu\text{m}$ を中心に、大きな片よりなく分布する事を示している。

図8に、こうしたfiberのIEF→SDSへの二次元電気泳動の銀染色によるpatternを示した。このfiberには、Tropomyosinに関しては、 $\alpha$ と共に $\beta$ -subunitが存在している。今後の問題とし

ては、直径 $30\mu\text{m}$ 以下のより細いfiberが同じ蛋白組成を持つのかどうか<sup>1</sup>が1つの問題である。更に、Tropomyosinの $\alpha$ -subunitに対する $\beta$ -subunitの比率が、fiberごとに、どのように隔たるかという点も一つの興味である。

### 考 察

Dy鶏筋の構造蛋白については、Tropomyosin<sup>1)-3)</sup>、Troponin-T<sup>4)-5)</sup>、MyosinのLC等<sup>6)</sup>について異常があるのではないかとされて来た。こうした異常のもつ意味については、幼若性の残存あるいは、Dy鶏が発症するのに伴う幼若性の獲得などが考えられる。我々が検索を進めて来たTropomyosinを例に挙げて考えてみると、孵化後早期の対照鶏胸筋における $\beta$ -subunitの減少～消失が、Dy鶏で遅延し、その後再び存在比の上で増加する事から、幼若性の残存だけでは説明できず次の2つの可能性がある。1つは、胸筋を構成するfast fiberが、従来 $\beta$ -subunitが主として存在するとされてきたslow fiberに変換を遂げる事であり、2つ目は、いわゆる再生現象による幼若要素の再出現である。これらの可能性に対して、今回、我々の得た結果は幾つかの示唆を与える。まず、slow fiberへの変換については、前提となるTropomyosinの存在様式自体が問題となる。従来の、 $\alpha$ -subunitがfast muscleに、 $\beta$ -subunitがslow muscleにと<sup>12)</sup>いう図式は、今回示した組織のレベル(fast muscleであるPLDにも脚筋にも $\beta$ -subunitは存在する)でも、細胞のレベル<sup>7)</sup>でも成立しない事が明らかになりつつある。従って、 $\beta$ -subunitがあるからと言ってslow fiberを考えるという前提が危いと言える。Dy鶏胸筋ではTropomyosin以外の蛋白についても、slow muscleのcomponentが、少なくともmajorなspotとしては存在しない事が今回の検索で明らかとなっている。

では、幼若性の再出現、更には再生現象との関連はどうだろうか。今回のsingle fiberの分析では、検索した限りのfiberから、Tropomyosinに関しては、 $\alpha$ -subunitと共に $\beta$ -subunitが

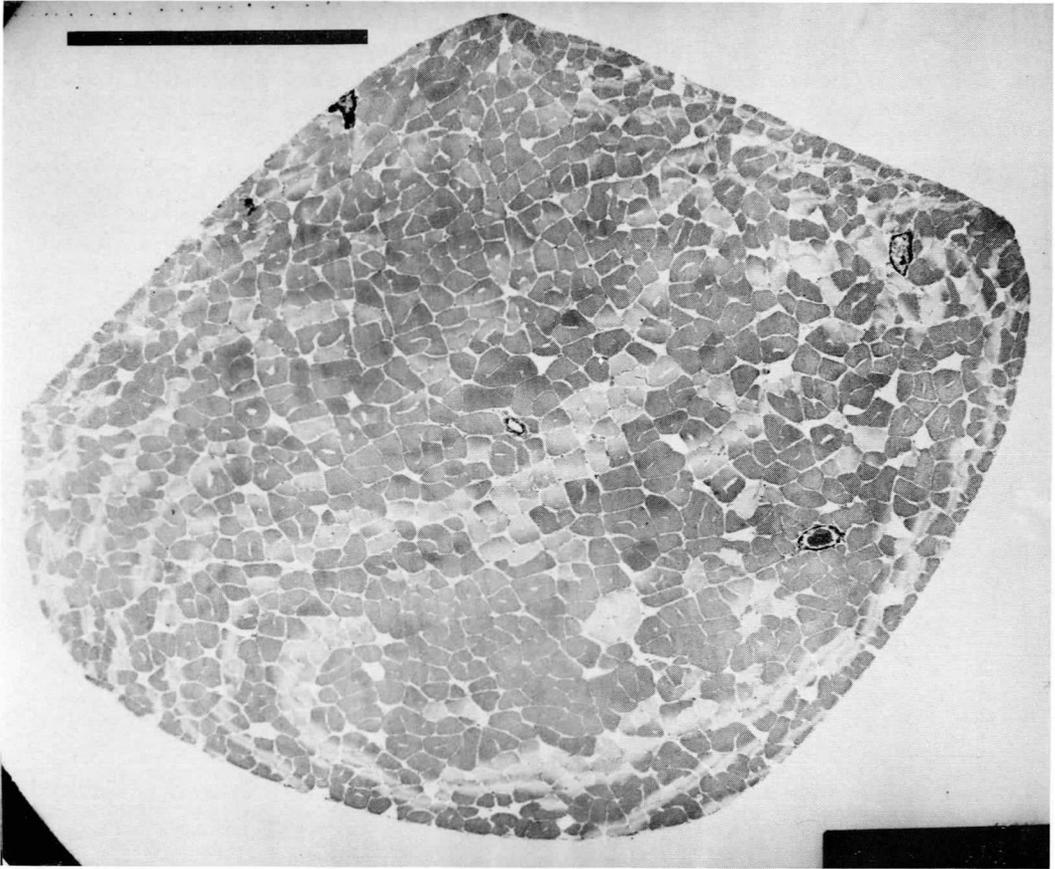


図6-B Single teased fiberの横断像(×3,000)  
 光顕, 電顕像共に tease された fiber が1つの cell から成る事を示している。  
 (左上の bar は10 $\mu$ mを示す)

検出された。こうした $\beta$ -subunitの分布は、組織化学的に散在性と言われている再生線維<sup>15)</sup>の分布とは異なっている。少なくとも、組織化学的にみた再生線維だけが $\beta$ -subunitを持つという確率は低いのではないかと考えられる。むしろ、Dy鶏胸筋のfiberの1本1本が、対照鶏の胸筋には無いsubunitを持ち、恐らくは合成されていると考えられるのである。ここで注目される事が2つある。1つは、孵化後早期の胸筋には $\beta$ -subunitが存在するが、何らかの機構に従って減少~消失してしまう事である。もう1点は、同じfast muscleでも、PLDや脚筋には成鶏でも $\beta$ -subunitが存在する事である。この2つの点は、Tropomyosinの合成が、他の蛋白合成に比べてflexibleな要素を持

つ事を示すと共に、胸筋という特殊な筋肉だけに特有なTropomyosinの変換機構が存在する事を示唆するものである。このTropomyosinの変換機構の追究は、細胞生物学的な段階を経て、geneのlevelで解明されるであろう。遺伝子疾患としてのDy鶏の異常の1つが、この変換機構にあるとすれば、異常の原因もまたgeneのlevelに求められる事になる。こうした予想は、我々が進めてきた筋構造蛋白の解析が、Dy鶏のgeneのlevelの解析の1つのいとぐちである事を示している。

一方、他の筋構造蛋白、殊にTroponin-Tについては、Tropomyosinと同じく、孵化後早期に変換を生じ、fast muscleの分析でもflexibleな要素を持つだけに、今後の研究が重要である。

## 結 語

鶏の骨格筋の構造蛋白を、IEF→SDS, NEpHGE→SDSへの二次元電気泳動を用いて分析し、次のような結果を得た。

1. fast muscleの代表として、浅胸筋, PLD,

梨状筋を比較すると、MyosinのLC, Troponin-I, Cが、それぞれの fast type で uniformに対応するのに対し、Tropomyosin, Troponin-Tは、筋肉ごとにその存在型が異なっていた。

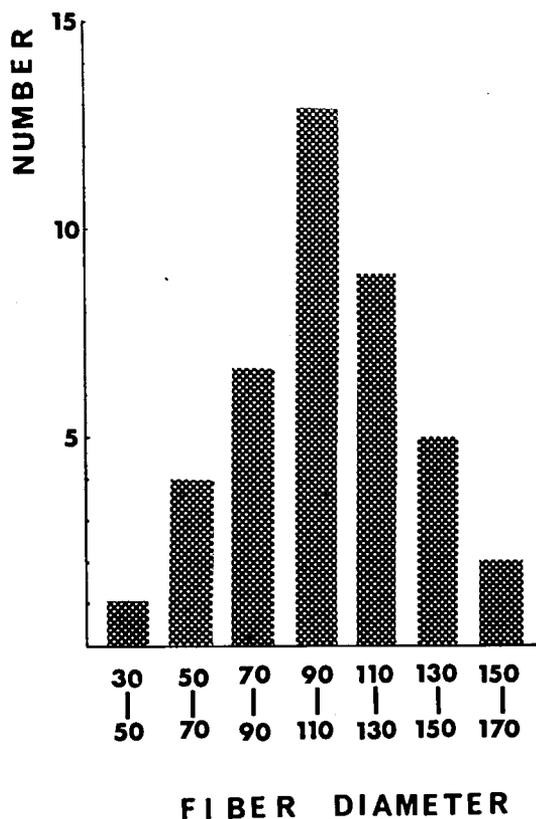


図7 Dy鶏胸筋の検索されたsingle muscle fiberの、直径に対する分布を示す。90-110 $\mu$ mを中心に、特に片寄りなく分布している事を示す。

2. 対照鶏の孵化後早期の胸筋では、Tropomyosinの $\beta$ -subunitの減少～消失があるが、Dy鶏では減少に遅延があり、孵化後25-35日に極小比を取った後、再び増加していた。

3. Dy鶏胸筋のsingle fiberを作製したが、Tropomyosinに関しては検索した限りの全てのfiberから、 $\alpha$ と共に $\beta$ -subunitが検出された。

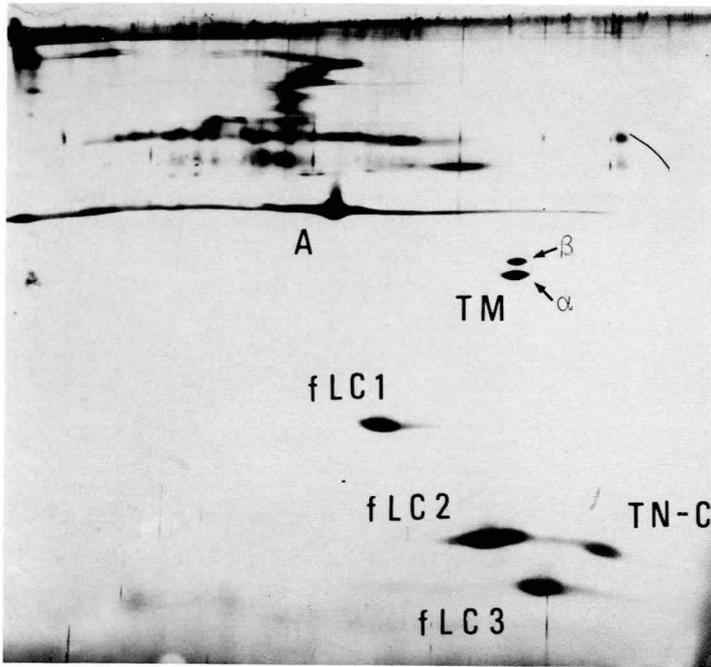


図8 Dy鶏胸筋の single fiber の IEF → SDS 系への二次元電気泳動の銀染色による例を示す。Tropomyosin に関しては、 $\alpha$  と共に  $\beta$  - subunit が存在している。

## 文 献

- 1) 野々村禎昭, 武田伸一: 筋ジストロフィー動物の微細形態学—ジストロフィー鶏胸筋の孵化後比較的早期の経時的変化—。筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和53年度研究報告書。
- 2) 野々村禎昭, 武田伸一: 筋ジストロフィー動物の微細形態学—ジストロフィー鶏胸筋におけるトロポミオンサブユニットの存在様式—。筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和54年度研究報告書。
- 3) Takeda, S. & Nonomura, Y.: Presence of the tropomyosin  $\beta$ -chain in dystrophic chicken breast muscle. *Biomed. Res.*, 1: 176-179, 1980.
- 4) 大日方昴, 高野弘美: 幼若筋の筋蛋白質についての研究—トロポニンT及びミオシンアイソザイムの発生にともなう変化—。筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班)昭和54年度研究報告書。
- 5) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H. & Matsuda, R.: Changes in troponin-T and myosin isozymes during development of normal and dystrophic chicken muscle. *FEBS lett.*, 120: 195-198, 1980.
- 6) Stracher, A., McGowan, E. B., Siemankowski, L., Molak, V. & Shafiq, S. A.: Relationship between myosin structure and muscle degeneration. *Ann. NY Acad. Sci.*, 317: 349-369, 1979.
- 7) Mikawa, T., Tadedo, S. & Shimizu, T.: Manuscript in preparation.
- 8) O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250: 4007-4021, 1975.
- 9) O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M. & O'Farrell, P. H.: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12: 1133-1142, 1977.
- 10) Switzer, R. C., Merrill, C. R. & Shifrin, S.: A high sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 98: 231-237, 1979.
- 11) Oakley, B. R., Kirsch, D. R. & Morris, N. R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 105: 361-363, 1980.
- 12) Dhoot, G. K. & Perry, S. V.: Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature*, 278: 714-718, 1979.
- 13) Perry, S. V. & Cole, H. A.: Phosphorylation of troponin and the effects of interactions between the components of the complex. *Biochem. J.*, 141: 733-743, 1974.
- 14) Roy, R. K., Sreter, F. A. & Sarkar, S.: Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Develop. Biol.*, 69: 15-30, 1979.
- 15) 埜中征哉, 春原経彦, 杉田秀夫, 石浦章一: 筋ジストロフィー鶏骨格筋の組織学的, 組織化学的研究。神経内科, 11: 259 - 269. (1979)

## 21 ラットミオシン分化に対する神経の影響

杉 田 秀 夫\*\*

研究協力者 石 浦 章 一\* 埜 中 征 哉\*

三 川 隆\*\*

### 結 果

#### はじめに

種々の動物の骨格筋の中でラットは特に未分化の段階で誕生することが知られている。生後, slow muscleである soleus筋は組織学的にタイプ I の形質を獲得する。Fast muscleである extensor digitorum longus (EDL) muscle は同様にタイプ 2 となる。我々は, 筋の分化に対する神経の影響を調べるため, 生後 1 日目のラットの坐骨神経を切断し, 分化に及ぼす影響について観察した。<sup>1)</sup> 分化の程度はミオシンの L 鎖, 並びにミオシン ATPase 染色を指標として検討した。

#### 方 法

11 匹のラット (生後 1 日) の左坐骨神経を 5 mm の長さまでわたって切除した。30 日後, soleus と EDL を腿と共に摘出し, 湿重量を測定した。

とり出した骨格筋はグリセリン溶液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 M KCl, 5 mM EGTA, 50% glycerol, 0.2 mM leupeptin, pepstatin, E-64, bestatin) に入れ -20°C に 2 週間以上保存した。

単一筋線維電気泳動並びに銀染色は三川の方法<sup>2)</sup>を改変して使用した。

表 1 に, soleus 筋と EDL 筋の 湿重量変化を示した。双方共, 約 70% の減少を見ることから脱神経の効果は明らかであった。脱神経筋ではほとんどすべての筋線維の萎縮が見られ, grouped hypertrophy が見られないことから, re-innervation はないと考えられた。

まず脱神経の効果を見る前に, 正常のラット骨格筋の筋タンパク組成を単一筋線維二次元電気泳動法で調べた。図 1 は, 正常の成熟ラット (150 日) の slow fiber (A) 並びに fast fiber (B) の電気泳動像である。正常の骨格筋では明らかに 1 本の筋線維に 1 種類のタイプのミオシンしかないことが明らかである。ラットではトロポミオシンの  $\alpha$ ,  $\beta$  各成分にはタイプ特異性がない。図 2 に slow, fast 各 1 本ずつの混合泳動パターンを示した。L1 と L2 には明らかに分子量及び pI のタイプ差がわかる。図に X で示したのは slow muscle に特異的に存在するもので L1s' と言われているタンパクであるが, これが slow myosin の L 鎖であるかどうかは, まだ不明である。

次に筋全体のタンパク質のパターンを 1 次元電気泳動 (図 3) と 2 次元電気泳動 (図 4) を使用して検討した。出生直後の soleus には L1s, L1f, L2s, L2f, L3 すべてが存在し, slow と fast 両方のミオシンがほぼ等量ずつあることがわかる。一方, ミオシン ATPase 染色ではすべての筋線維が一樣に染色されることより誕生時では, slow fi-

\* 東京大学医学部神経内科

\*\* 国立武蔵療養所神経センター-疾病 1 部

Muscle wet weight ( after 30 days )

Control Soleus (red)	20.2 ± 3.8 mg
Denervated Soleus	5.4 ± 1.8 mg (27%)
Control EDL (white)	21.5 ± 3.8 mg
Denervated EDL	6.3 ± 1.1 mg (29%)

表1 脱神経による筋湿重量の変化

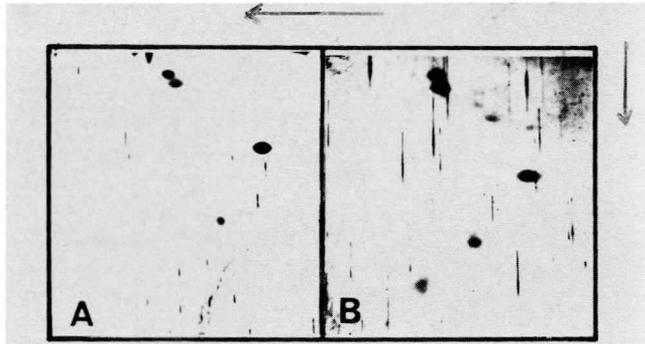


図1 成熟ラット(150日)の単一筋線維二次元電気泳動図。Aはslow fiber, Bはfast fiber. 銀染色。

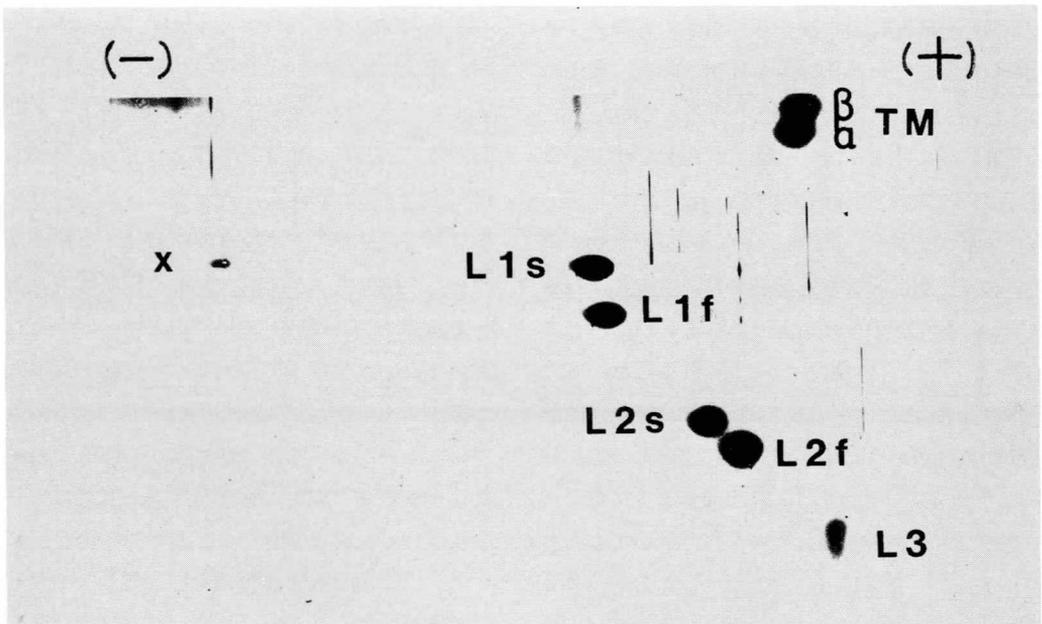


図2 図1の2本の単一筋線維をまぜて泳動したもの。銀染色。

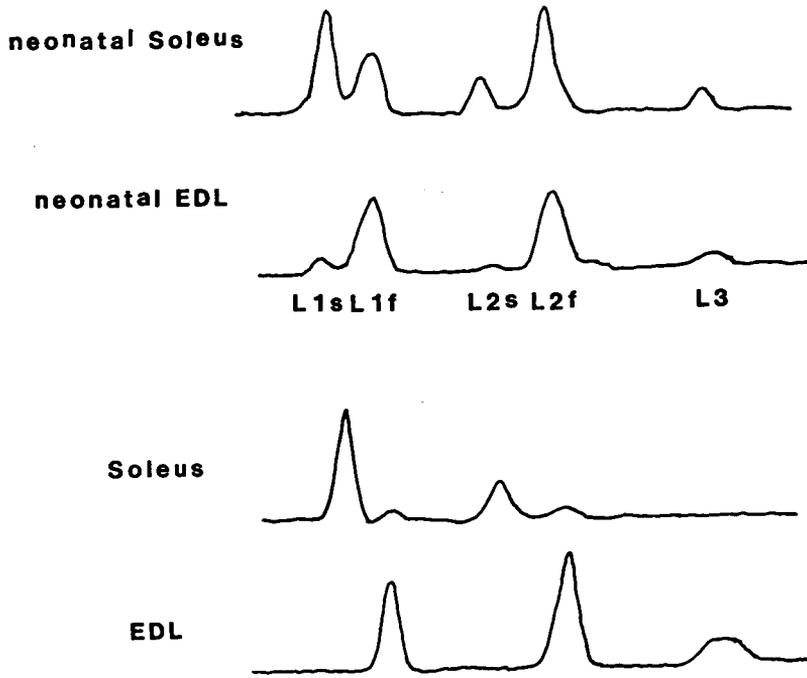


図3 生後1日目の Soleus、EDL 筋及び生後30日目のものを一次元電気泳動したもの。CBB染色後、600nm でトレースした。

berとfast fiber が等しい数だけ存在するのではなく、1本のfiberの中に両タイプのミオシンが混在すると考えた方が妥当である。このことは、泳動に使用した筋線維の本数を変化させても両タイプの比率が変化しないことから証明される。成長に従ってL1s、L2sの量が多くなり逆にL1f、L2f、L3の量が減少する(図4B)。しかしながら生後30日目のsoleusでは約20-30%のミオシンがfastタイプである。30日目になるとATPase染色で両タイプがはっきりと分別され、1本の筋線維には1つのタイプのミオシンしか存在しなくなると言える。

EDLでは同様に出生直後ではATPase染色で筋線維間に差は認められないが、生後30日たつと、はっきりとslow、fastの区別がつくようになる。図3より、ミオシンL鎖は生後1日においてかなりfast typeに分化しているように見えるが、少量のL1s、L2sも確認できる。生後30日ではほとんどfastタイプのみしか検出できない。

図4で明らかのように、embryonic light chain (矢印)らしきものも見えるが、未同定である。

図5に脱神経30日後のsoleus及びEDLの筋組織、並びに健側の同じ筋肉の組織像を示す。表2にミオシンATPase染色で見た筋線維のタイプ別本数を同時に示した。まずsoleusを見ると健側では61%がType 1、39%がType 2になっているが、脱神経筋ではすべてがType 2に分化していることがわかる(図6の5)。同時に筋萎縮が顕著である。一方、EDLでは健側の96%がType 2に、残り4%がType 1になっているが、脱神経側ではType 2線維がその割合は変わらないものすべて萎縮していることがわかる。しかしながら本来Type 1になるべき数%の線維が完全なType 1ではなく中間型になって(図5D星印)、しかも萎縮せずに存在する。この筋線維1本の電気泳動像が図6の6である。これで明らかのように、L1鎖が2種存在し、各々がL1sとL1fに相当する。つまり1本の筋線維

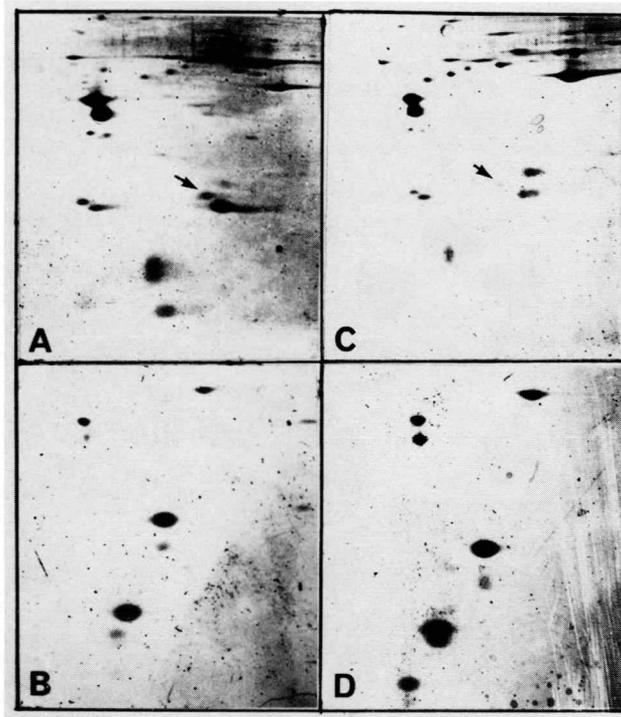


図4 図3と同じサンプルを二次元に泳動したもの。Aは1日目 Soleus, Bは30日目 Soleus, Cは1日目EDL, Dは30日目EDL。矢印は embryonic light chainと思われるもの。

表 2

PERCENTAGE DISTRIBUTION OF EACH FIBER TYPE

		Type 1	Intermediate	Type 2
Soleus	C.	61	0	39
	D.	0	0	100
EDL	C.	4	0	96
	D.	0	5	95

(After neonatal denervation)

の中に2つのタイプのミオシンが存在することになる。

以上の事実より、骨格筋が未分化の段階で神経の影響を断ち切ると、骨格筋はそれが以後 fast に分

化するように運命づけられていようが slow に分化するように運命づけられていようが、必ず fast タイプに分化することが判明した。

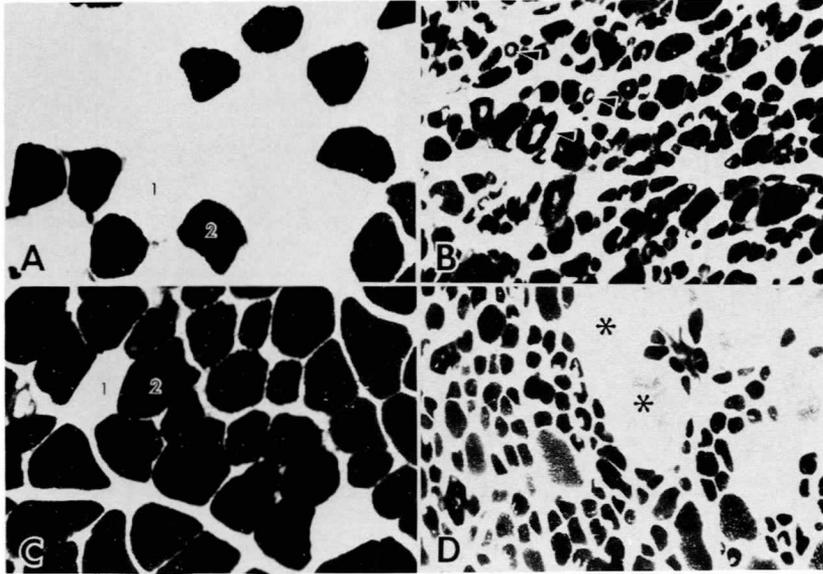


図5 脱神経筋のミオシンATPase染色 (pH 9.4)。Aは健側の soleus Bは脱神経筋の soleus Cは健側の EDL, Dは脱神経筋の EDL。1はタイプ1線維。2はタイプ2線維。

### 考 察

ミオシン分子のタイプによる相異を利用してタイプの変化を検討する試みが広く行われている。通常は発生段階を追ってそのタイプの変化と分化の程度が比例することから、非常に優れた指標の1つであると考えられる。

一方、哺乳類の筋の分化は神経支配によることが大であるが、鳥類のように胎生期からの観察が容易でないことから筋の分化と神経との関連は十分追求されていないのが現状である。成長した動物では筋は十分に分化しており、脱神経の効果はすぐには現れない。ラットの出生直後の骨格筋は他の動物と違ってかなり未分化であると考えられる証拠がいくつかある。そこで我々は、未分化な段階で脱神経を行うと、神経を除去した効果が即座に表われることを期待し本実験を行った。

まず第1に、未分化な筋線維は slow と fast 両タイプのミオシンを持っていることは非常に興味ある事実である。Soleusではほぼ等量だけ slow と fast が混在するのに対し、EDLでは fast 優位であるが、どちらもそのミオシンが酸、アルカリに比較的耐性で組織学的に均一なタイプ2 Cである。

第2に神経支配が除かれると、骨格筋は脱分化を起こして胎生型に戻るのではなく、完全に fast タイプに成熟することである。これは、脱神経筋の電気泳動図でミオシンL3が明らかに判別できることで証明される。

第3にこの実験により、筋のファイバータイプの変化は1本の筋線維が萎縮してなくなり新しく他のタイプの筋線維ができるのではなく、1本の筋線維の中でタイプ変化が起こることが示された。

図7にミオシンL鎖の変化をまとめた。

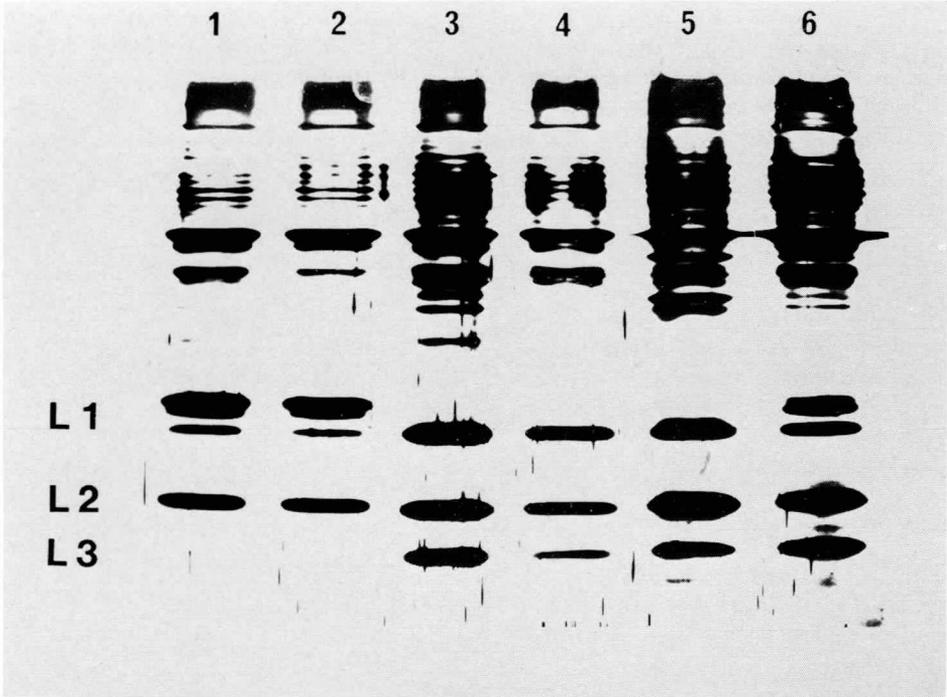


図6 脱神経筋の電気泳動図。1,2は健足の soleus 筋線維束, 6は脱神経足 EDL の肥大中間型単一筋線維。

DIFFERENTIATION OF MYOSIN LIGHT CHAINS

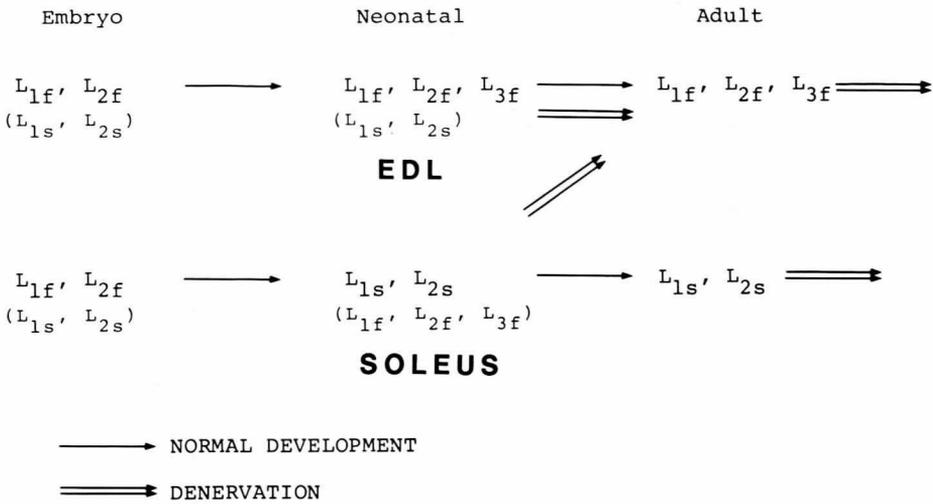


図7 脱神経によるミオシンの分化スキーム。

## 文 献

- 1) S. Ishiura, I. Nonaka, H. Sugita, T. Mikawa: Effect of the denervation of neonatal sciatic nerve on the differentiation of myosin in a single muscle fiber.
- 2) T. Mikawa, T. Shimizu, S. Takeda: Differentiation of chick myofibrillar proteins J. Biochem in preparation.  
*Exp. Neurol.* 1981 in press.

## 22 筋肉の弾性蛋白質コネクチン

丸 山 工 作

コネクチンは、骨格筋の弾性構造を形成する骨格蛋白質で、筋原線維の機械的性質にあづかっている<sup>1)2)3)</sup>。最初、ミオシンやアクチンなどを抽出した残渣から得られていたが、筋原線維を直接 SDS に溶かしてからゲルろ過法で見かけの分子量 100 万という高分子量成分として純化できるようになった。

ジストロフィー筋では、コネクチン含量が低下することから、弱化した筋機能の原因のひとつである可能性がある。ジストロフィー筋では、カルシウム依存性プロテアーゼの活性増加が示されており、この酵素のコネクチン構造に及ぼす作用は、生理的にみて興味がある。本研究では、コネクチン構造についての基礎的な検討とともに、種々のプロテアーゼの効果がいしらべられた。

### 実 験 方 法

#### コネクチンの単離

ニワトリ胸筋を 50 mM  $KCl$ , 5 mM EGTA, 1 mM  $NaHCO_3$  溶液でホモジナイズし、よく洗う。筋原線維を等量の SDS 溶液 (10% SDS, 40 mM DDT, 20 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA) に溶かし、不溶成分を遠心によって除き、上清を Biogel 50 Am にかき、高分子量成分を分離する。3% SDS ゲル電気泳動でチェックした。

#### コネクチンの抗体

単離したコネクチンをウサギに注射して、抗血清を得た。1 回に 0.3 mg あて、4 回注射した。免疫グロブリンは、抗血清をアクリルアミドに分散させた

コネクチンのカラムを通したのち、1 M  $MgCl_2$  で溶出して得られた。このグロブリン溶液でニワトリ筋原線維を処理したのち、FITC ラベルの抗ウサギグロブリン・ヤギグロブリンで蛍光染色して蛍光顕微鏡下で観察した。

#### プロテアーゼの作用

ニワトリ筋原線維を直接プロテアーゼ処理し、SDS ゲル電気泳動法によってコネクチンバンドの変化を追跡した。カルシウム活性プロテアーゼ (東大医鈴木紘一助教授の提供) は、20 mM Tris, pH 8.0, 5 mM  $CaCl_2$ , 5 mM 2-メルカプトエタノール存在下で処理した。セリン・プロテアーゼ (徳島大勝沼信彦教授の提供) は、0.25 M リン酸, pH 8.0 存在下でしらべられた。

### 実 験 結 果

#### コネクチンの電気泳動パターン

図 1 に示すように、筋原線維に含まれる蛋白質中では、コネクチンのダブルット・バンドが、もっとも泳動移動度がおそい。このダブルット・バンドは、筋原線維調製時に 5 mM EGTA を用いないと、しばしば明らかにみられない (これはカルシウム活性プロテアーゼなどのためであろう)。また、1% SDS 中で不安定であり、37°C、2 日間で完全に消失する。そのさい、ぼんやりした低分子量 (ミオシンより大きい) 成分があらわれてくる。ただし、0°C では分解されない。1% SDS 存在下で超音波処理を 30 秒かけると、同様に分解する。これらのことは、比較的不安定な架橋結合によってポリペプチド鎖が多数架橋されて巨大なコネクチンが形成されていることを

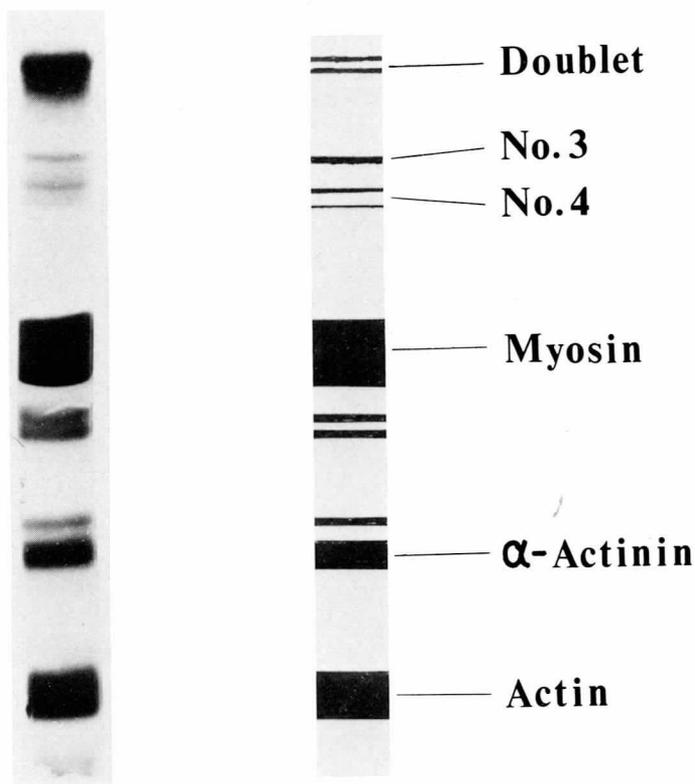


図1 ニワトリ胸筋の筋原線維全部の SDS ゲル電気泳動パターン (ダブルレットがコネクチン)

示唆する。

筋原線維におけるコネクチンの局在

抗コネクチンで筋原線維を染色すると、A-I 接合部がつよく蛍光を発する(図2 a)。1サルコメア内のその間隔は  $1.7 \mu\text{m}$  で、A帯の  $1.5 \mu\text{m}$  より幅がひろい。他のA帯、I帯はごく弱く染色される。Hasselbach-Schneider 溶液でミオシンを抽出すると、Z線をはさむI帯の両端部がやや濃く見え、その部分がつよく染色される(図2 b)。さらに、 $0.6 \text{MKI}$  で処理してアクチンを抽出すると、Z線の両側に蛋白質があつまり、その部分がつよく蛍光を発する(図2 c)。ここでは、サルコメア内に蛍光をだすフィラメントが走っている。ただし、Z線そのものは染色されていない。これらのことは、引きのばした筋原線維ではっきりと見える(図2 d)。

プロテアーゼによるコネクチン分解

コネクチンは、トリプシンによって容易に分解さ

れる。<sup>5)</sup>今回は、カルシウム活性プロテアーゼ(CANP)とセリンプロテアーゼの作用を研究した。

CANPは筋原線維と重量比で100:1で、コネクチンのダブルレットの上のバンドをすみやかに分解し、下のバンドはなかなか分解しない(図3 a)。20分処理後では、もとと同じようなダブルレットがみえるようになる。このことは1, 2, 5, 10, 20分と処理時間を変えたパターンを比較すると了解される。これに対して図1のバンド3(N<sub>2</sub>線蛋白質<sup>6)</sup>)はCANPによってすみやかに消失する。

セリン・プロテアーゼは、CANPとちがって、コネクチンを速く分解するが、バンド3には作用しない(図3 b)。

#### 考 察

コネクチンは、直径2nmのごく細いフィラメント<sup>3)</sup>のからまりあった網目構造を形成する。しかし、分

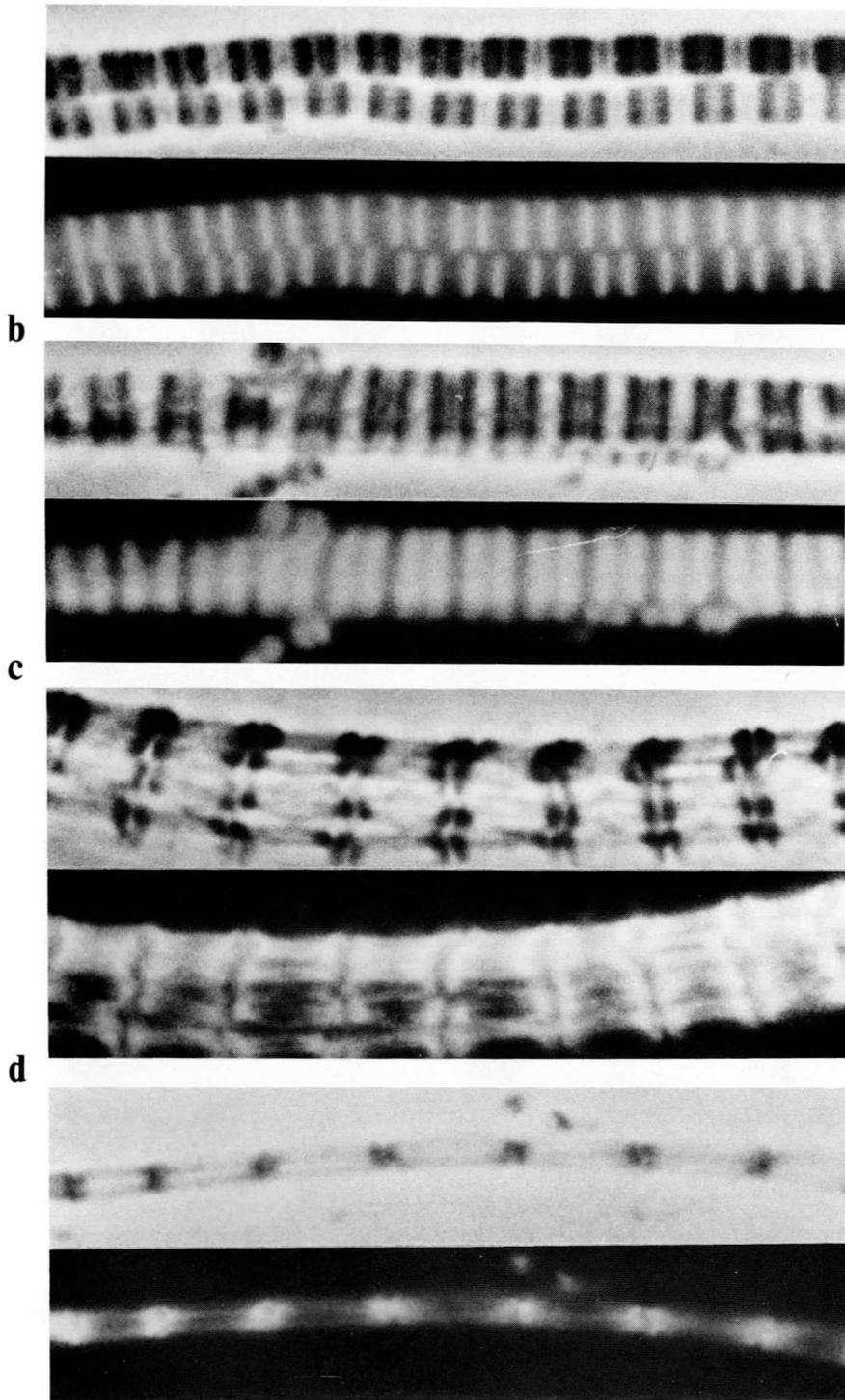


図2 抗コネクチンで処理した筋原線維

- a. 対照    b. Hasselbach - Schneider 溶液で抽出后  
 c. 0.6MKIで処理后    d. cと同じ。上は位相差顕微鏡像で、下は  
 蛍光顕微鏡像 ——は10 $\mu$ m

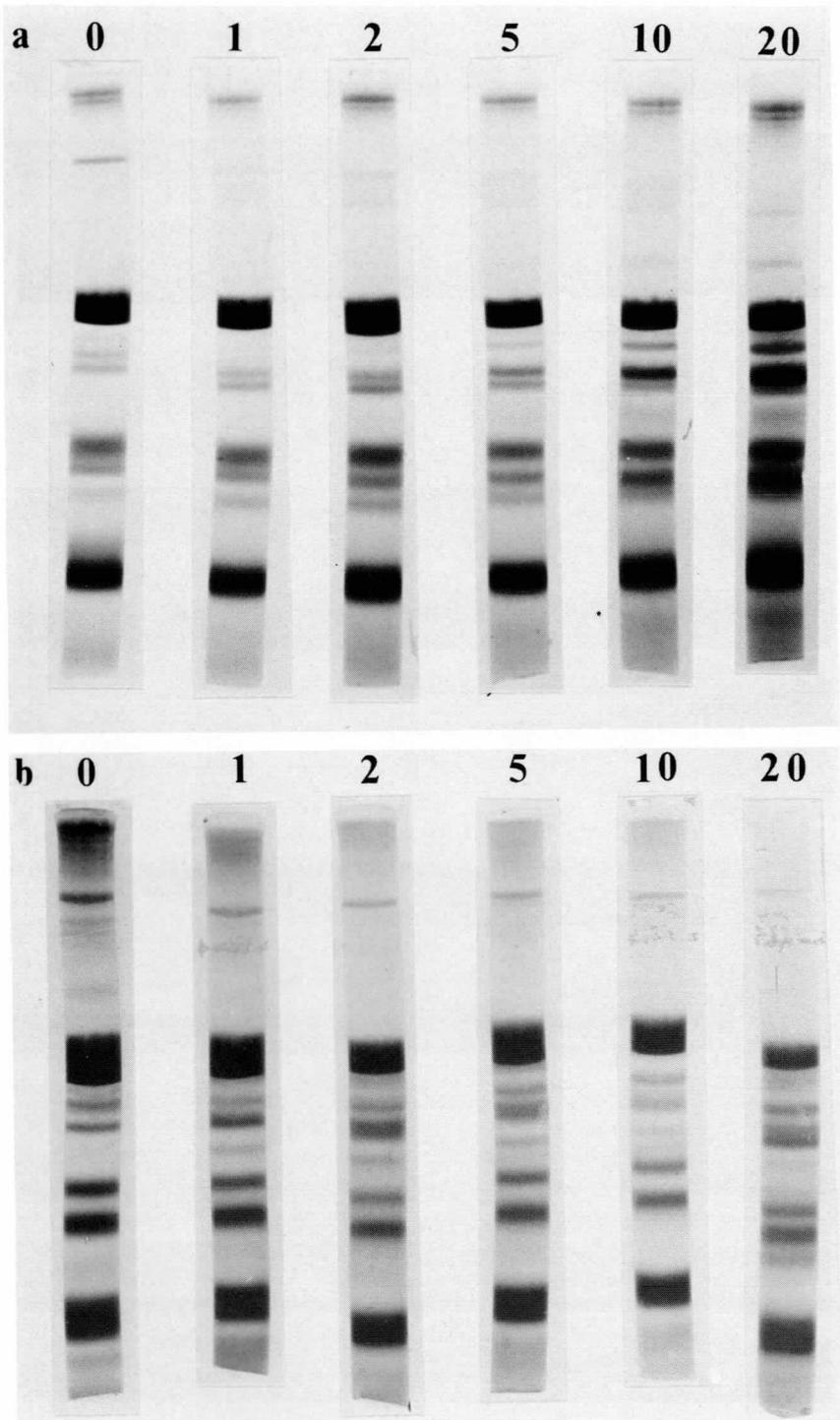


図3 プロテアーゼ処理筋原線維のSDSゲル電気泳動パターン  
 a. カルシウム依存性プロテアーゼ (1 : 100)  
 b. セリン・プロテアーゼ (1 : 100)  
 数字は処理時間 (分) を示す。

子量100万のバンドがどのようなモノマーからできているか、また架橋結合からできているかはわかっていない。<sup>2)7)</sup>

蛍光抗体法で明らかになったことは、コネクチンは、ミオシンフィラメントの両端部にとくに多く存在していることである。ミオシンを抽出したのちも、なお、アクチンフィラメントの自由端近くに存在する。0.6MKIでアクチンフィラメントを抽出すると、Z線のまわりに集る傾向がある。これらの観察は、コネクチン網がミオシンフィラメントをサルコメア中央部に位置させるのにあづかっていることを示唆する。このことは、Lockerの“gap filament”<sup>8)</sup>説と一致する。事実、我々は、Hasselbach-Schneider 抽出液から少量ではあるが、コネクチンを回収することができた。なお、KI 残渣の線維状のコネクチンは、よりあつまつたものと思われる。コネクチンはZ線内には存在せず、サルコメア内でZ線間をつないでいるものとみなされる。

プロテアーゼの作用では、CANP の効果が興味ぶ

かい。多少限定分解するが、トリプシンやセリン・プロテアーゼのように全部分解しない。CANP処理筋原線維とジストロフィー筋原線維との注意ぶかい比較検討を、これから行う予定である。

## 文 献

- 1) Maruyama, K., Natori, R., and Nonomura, Y. *Nature* 262: 58-60, 1976.
- 2) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Murakami, F., Ohashi, K., Handa, S., and Eguchi, G., *J. Biochem.* 82: 317-337, 1977.
- 3) Toyoda, N. and Maruyama, K. *J. Biochem.* 84: 239-241, 1978.
- 4) Wang, K., McCure, J., and Tu, A., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 3698-3702, 1979.
- 5) Maruyama, K. and Yamamoto, K. “Cross Bridge Mechanism in *Muscle Contraction*” ed. H. Sugi and G.H. Pollock pp 319-328, 1979, Univ. Tokyo Press.
- 6) Wang, K. and Williamson, C. L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3254-3258, 1980.
- 7) Maruyama, K., Kimura, S., Ohashi, K. and Kuwano, Y. *J. Biochem.* 1981, in press.
- 8) Locker, R.H. and Daines, C.J. “Fibrous Proteins” ed D.A.D. Parry and L.K. Creamer pp43-55, 1980, Academic Press.

## 23 ジストロフィー成鶏胸筋小胞体膜のCa-取り込み能と、その膜構成について

酒井敏夫\*

研究協力者 西島博明\* 今井孝行\*

渡辺雅之\* 岩垣丞恒\*\*

ジストロフィー筋の筋収縮能は著しく減弱している事が知られている。ところが、神経・筋接合部における性質である電気生理学的現象には大きな変化が見い出されていない<sup>1)</sup>。われわれは、筋収縮・弛緩機構の過程で、筋構成内部膜である筋小胞体の機能に着目し、膜構成脂質、蛋白質、およびCa取り込み能について検討してきた。われわれは、従来筋小胞体膜構成脂質の著明な変化、特に cholesterol の増大、または膜 phospholipid (特に lecitin) の減少などを報告してきた。しかし、われわれの方法で分離したジストロフィー成鶏胸筋小胞体のCa-uptake 能は、正常成鶏胸筋から分離した筋小胞体(C-FSR)と大差なく、uptake rate の遅延が示されたにすぎなかった。これは、ジストロフィー筋には機能の異常な筋線維と正常なものとの混在している事実から考えると、正常な筋小胞体のみを分離していた可能性がある。

今回、従来の分離法を若干変更し、筋小胞体膜を分離し、このCa-uptake 能と、構成膜脂質および膜蛋白を分離したので報告する。

### 材料及び方法

1. ジストロフィー成鶏(413)及びコントロール(412)の浅胸筋を使用した。

2. 分離筋小胞体の調整

筋筋を15℃前後の20mM Tris-HCl buffer

(pH 6.8)で洗浄し、細切した後、筋1g当り2.0 mlの割合量の20mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)中でホモジネイトする。ワーリングブレンダー回転数は250~300 rpmとし、20秒毎にpH 6.8~7.0となる様に5mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)を滴下し、筋肉泥となる様にホモジナイズする。このホモジネイトを粗穴テフロン網でろ過し、ロ液を遠心し、筋小胞体膜を得る。分離したSRの fraction は従来我々が用いている8650~36600×Gの fraction をH-FSR fraction とし、これ以上65000×Gまでの fraction をL-FSR fraction とした。得られた各FSRを20mM Tris-maleate buffer (pH 6.8)で2回洗浄した。

3. Ca-uptake 能の測定

Ca-取り込み能は従来我々が用いている方法(Nishijima et al)によった。反応溶液条件は0.1M KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-maleate pH 6.8, 0.1mM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>, 1.0mM ATP, Temp. 20℃で行った。尚、反応はミリポア法によって停止し、FSRに取り込まれた<sup>45</sup>Ca量を液体シンチレーション法によって測定した。

4. 組織標本の作製

胸筋小片をドライアイス・イソペンタンで直ちに凍結し、クリオスタットで均10μの厚さの切片とし、HE, Trichrome 染色を行った。

5. 筋および筋小胞体膜構成脂質の測定

各構成脂質の抽出はFolch等の方法を用いた。尚、中性脂質、ステロールの展開溶媒はヘプタン：石油

\* 東京慈恵会医科大学第二生理学教室

\*\* 東海大学体育学部体育生理

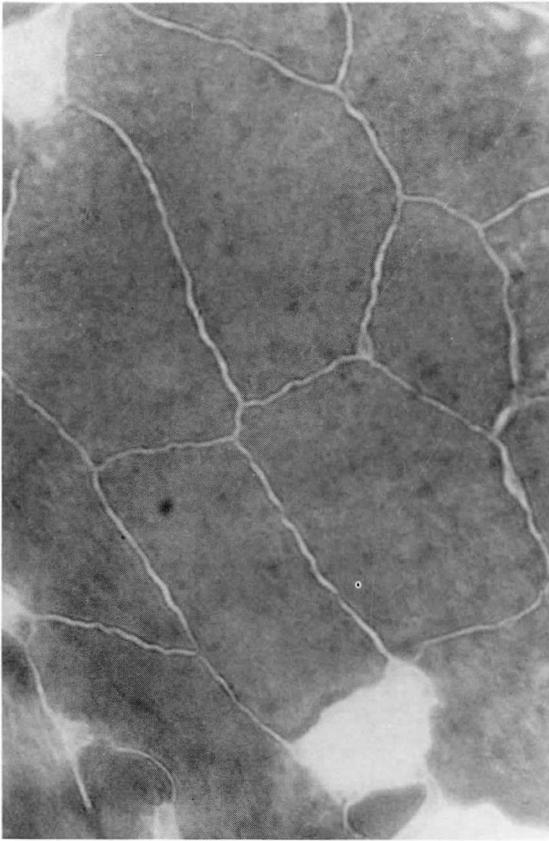


図1 正常成鶏胸筋の組織像

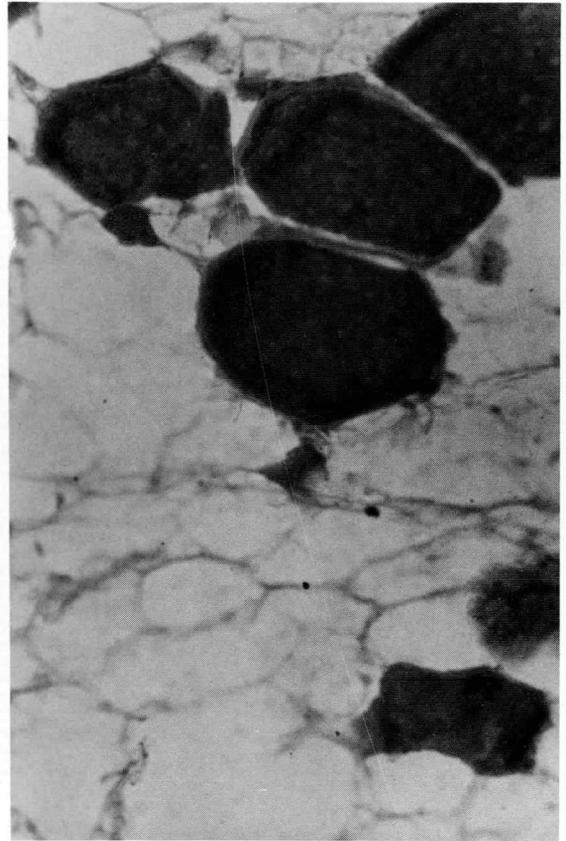


図2 ジストロフィー成鶏胸筋の組織像

エーテル：エーテル：酢酸 = 60：20：20：1 ( $V_V/V_V$ ), また磷脂質はクロロホルム：メタノール：アンモニア = 14：6：1 ( $V_V/V_V$ )を用いた。これらの抽出液を薄層クロマトグラフィーによって分離し、各脂質をW. Morison and L.M Smithの方法によってmethylationし、ガスクロマトグラフィー (FLD 163) で分析した。

### 結果と考察

#### 1. 筋小胞体の分離

ジストロフィー成鶏 (413) の胸筋からの筋小胞体の分離は筋組織内脂肪量の増大と思われる状態を呈し、正常成鶏胸筋の場合と同様な分離法では収量の著しい減少<sup>4)</sup>が示された。これはジストロフィー胸筋組織内脂肪が多く正常筋細胞の減少は明らかである

事から (図1, 2) ホモジナイズ時に著明な液性的変動が有る為と思われる。我々はこの点に留意し、適切な液性の補正を行なうと、正常成鶏胸筋からの小胞体膜の分離収量より明らかに増大していた (Table 1)。これはジストロフィー胸筋は前回報告した様に筋組織内膜様構造物の破壊の進行が有る事から、通常ホモジナイズ条件では正常筋のそれよりも破壊されやすく、結果的に膜様構造物の抽出量が増大したものと考えられる。

#### 2. Ca<sup>+</sup>-uptake 能と膜構成成分について

正常成鶏胸筋から分離したH-fraction (C-H-FSR) のCa<sup>+</sup>-uptake 能は他の温血動物の下肢筋から分離したFSRのCa<sup>+</sup>-uptake 能と同様なuptake 能を示し、反応開始後均60秒で最大量を示していた。しかしジストロフィー成鶏胸筋から分離し

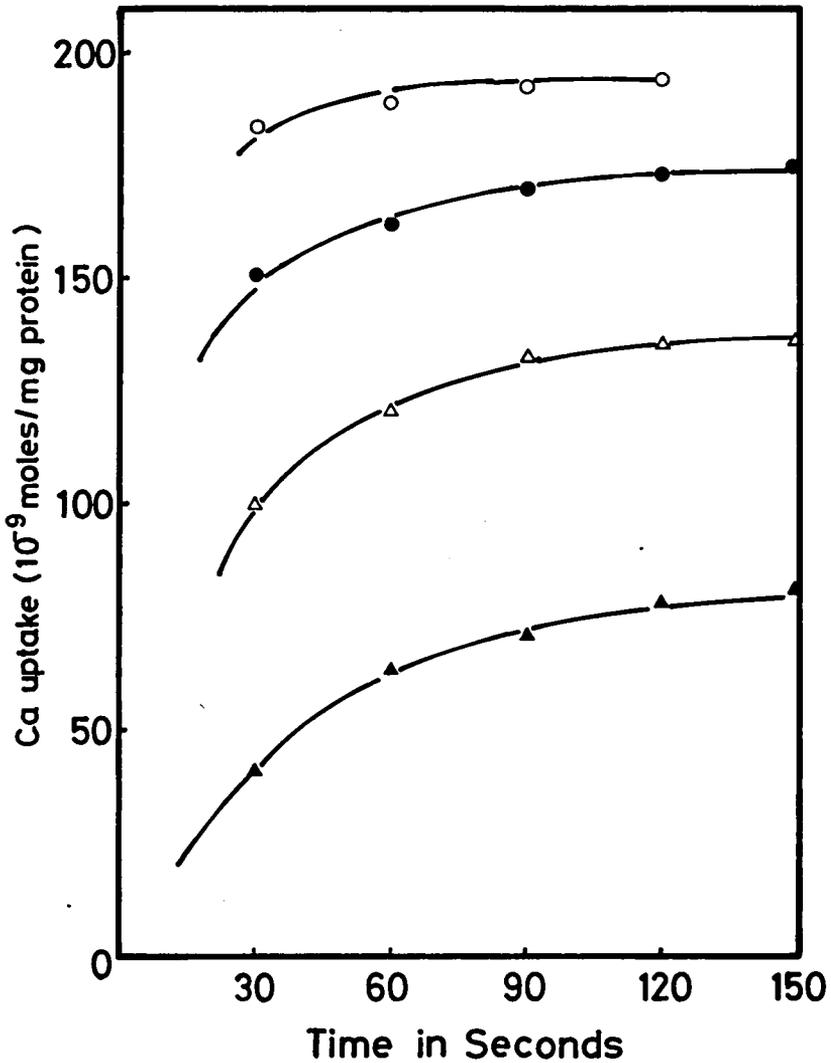


図3 分離筋小胞体膜の Ca-uptake 能  
 —○— : control H-fraction  
 —●— : Dys-H-fraction  
 —△— : control L-fraction  
 —▲— : Dys-L-fraction

たH-fraction (dys-H-FSR) では前回報告した様に uptake 能はC-H-FSRの15%程度の減少を示しているにすぎない。これはジストロフィー筋の小胞体機能が正常か、又は若干の機能低下があるのみであろうと考えられる。しかし、我々の採取したdys-H-FSRは正常か又はそれに近いFSRのみを分離している可能性を有している。事実我々はH-fractionより軽いL-fractionのCa-uptake能を測定すると、control L-FSRのそれ

よりも明らかにCa-uptake能の低下が示され、その最大量を示すのは反応開始後150秒以降と考えられる。しかし、D. scales等(1977)<sup>5)</sup>はジストロフィー成鶏(5~6w)のbreast muscleのFSRではCa-uptake量は正常FSRより極かに少ないのみでuptake能の低下は示さないと言う。また、total (Ca-Mg) ATPase activity等のCa-pump機能は正常FSRと同様であると報告している。また、A. Gideon et al (1979)<sup>6)</sup>はoxala-

表1 胸筋からの筋小胞体膜の収量

	H-fraction	L-fraction
Control	0.46	0.23
Dystrophy	0.98	0.41

(mg protein / mg muscle)

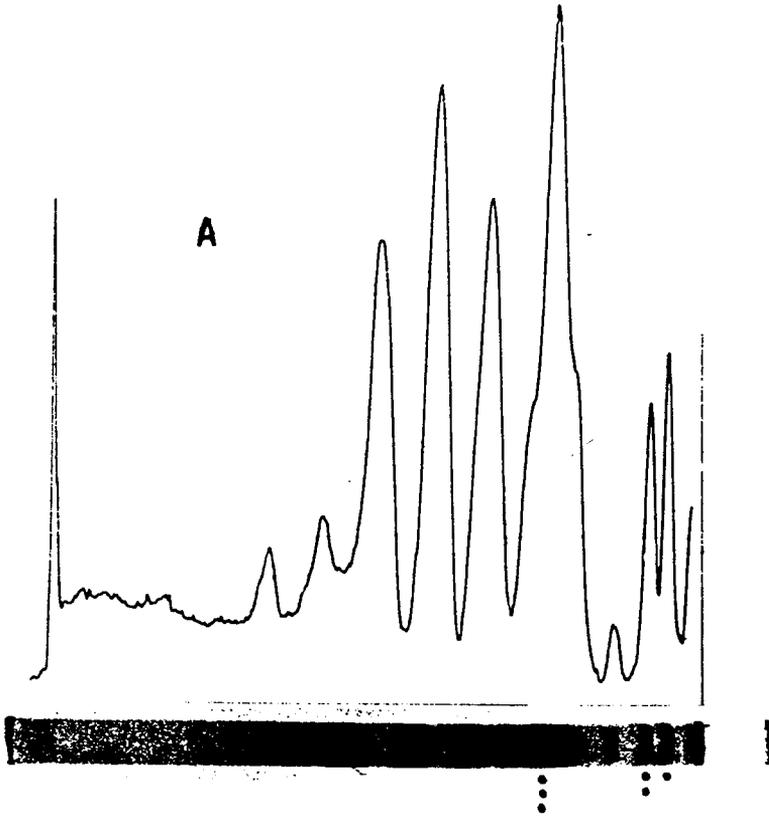
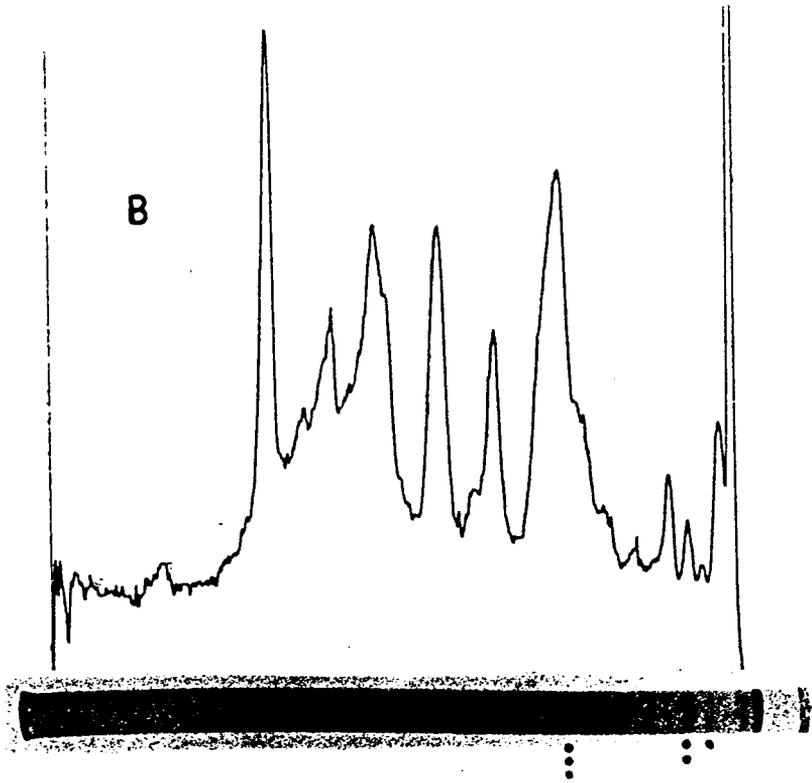


図4 分離筋小胞膜構成蛋白の polyacrylamide gel による分離  
分離法は Laemmli (1970) によった。

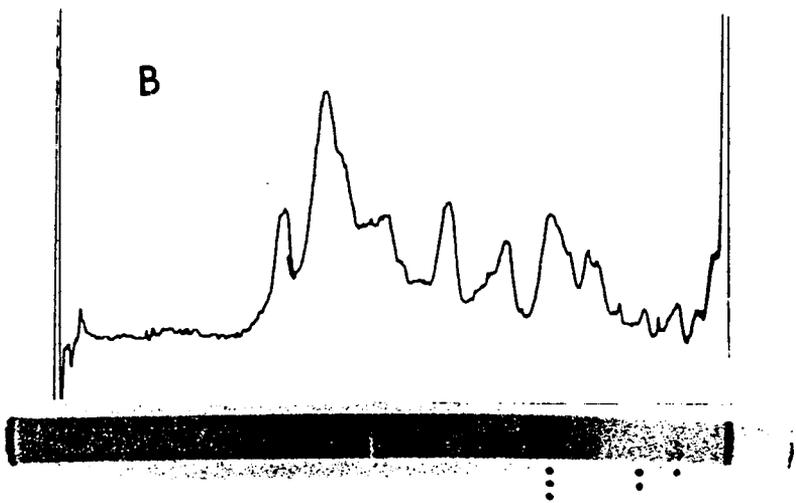
A: control H-fraction

te(+ )によるCa-uptake能は正常FSRの3倍に上昇している。特にMg-Ca ATPase活性はジストロフィー筋FSRで上昇すると報告している。そこで我々はFig 3に示したdys-FSRのCa-uptake能の低下を説明する事が出来ないで、FSRを構成する蛋白質の分離を試みた。その結果、G. Meissner (1975)<sup>7)</sup>によるCa-pump proteinに相当する100,000~110,000 dal.の蛋白質はdys-H-FSRにおいてcontrol-H-FSRと同様であった

がdys-L-FSRでは著しく減少していた。この蛋白質bandはR. E. Mark and R. J. Baskin (1978)<sup>8)</sup>によるとFSRの主bandであり、(Ca-Mg) ATPaseであるとしている。S. D. Hanna and R. J. Baskin (1978)<sup>9)</sup>はジストロフィー成鶏胸筋のFSRの(Ca+Mg) ATPaseは正常FSRと同じであるがCa-ATPase活性は減少していると報告している。これは図3に示したようにdys FSRのCa-uptake能の減少を説明出来るものと思われる。

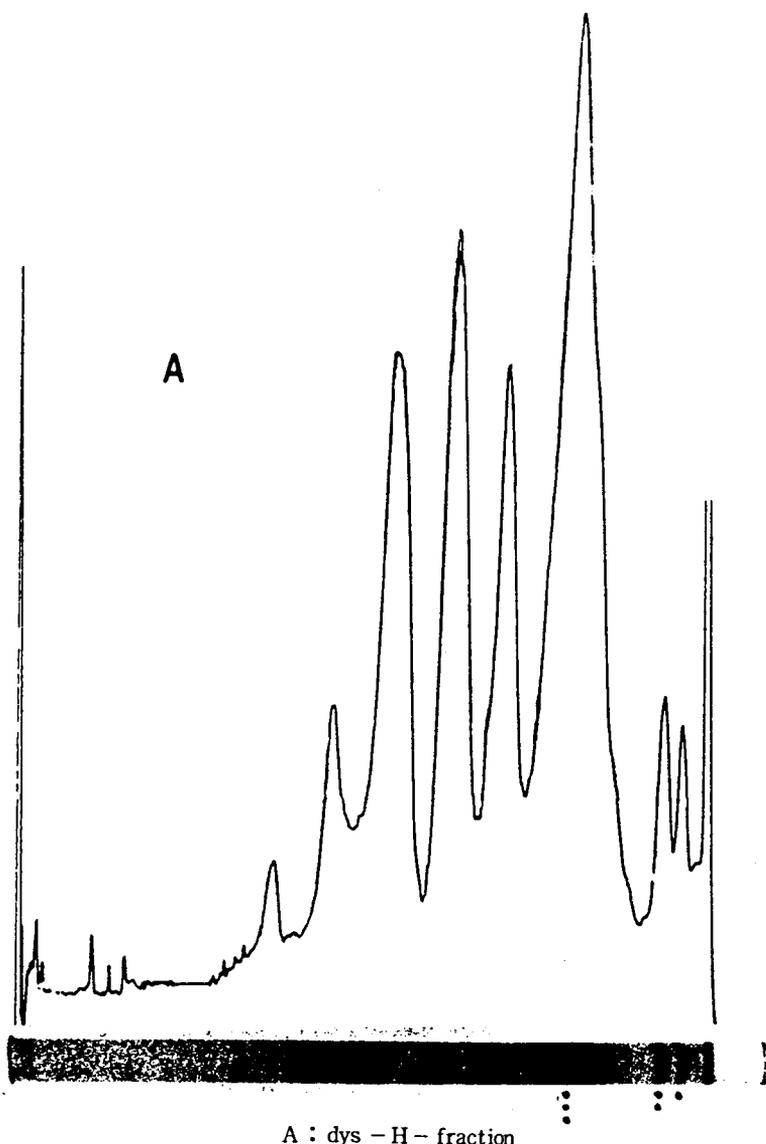


B : control L - fraction



B : dys - L - fraction

図5 ジストロフィー筋分離筋小胞体膜構成蛋白の polyacrylamide gel による分離



また、図5では65,000 daltonの蛋白質はdys-FSRで減少し、特にdys-L-FSRでは著明に減少している。これはG. Meissner (1975)<sup>7)</sup>によるCa-binding proteinに相当している。上述の事から、我々はジストロフィー筋の筋小胞体Ca-uptake能は通常の分離法によるH-fractionでは正常筋小胞体と同様な機能を持ち、Ca-binding proteinの若干の減少に伴ってuptake能の低下を示す。さらに、L-fractionでは(Ca+Mg)ATPaseの減少、binding proteinの減少に伴って、その機能の低下は著明となっている事を示し

ているものと推定される。

次に、この様な筋小胞体膜の機能を論ずる場合、その機能低下の一因として、D. Kunze (1973)<sup>10)</sup>、B. P. Hughes (1973)<sup>11)</sup>等によって報告されている様に、膜構成脂質の変動が推定される。我々は前回dys-FSRではtotal-phosphalipidの減少、特にsphingomyelinの増大とphosphatidylcholinの減少が特徴的である事を報告した。これ等の変動はdys-L-FSRに著明で、Ca-uptake能の低下と比例的関係を有していた。我々はこの膜構成脂質の代謝系を追求しているが、今回、筋組織

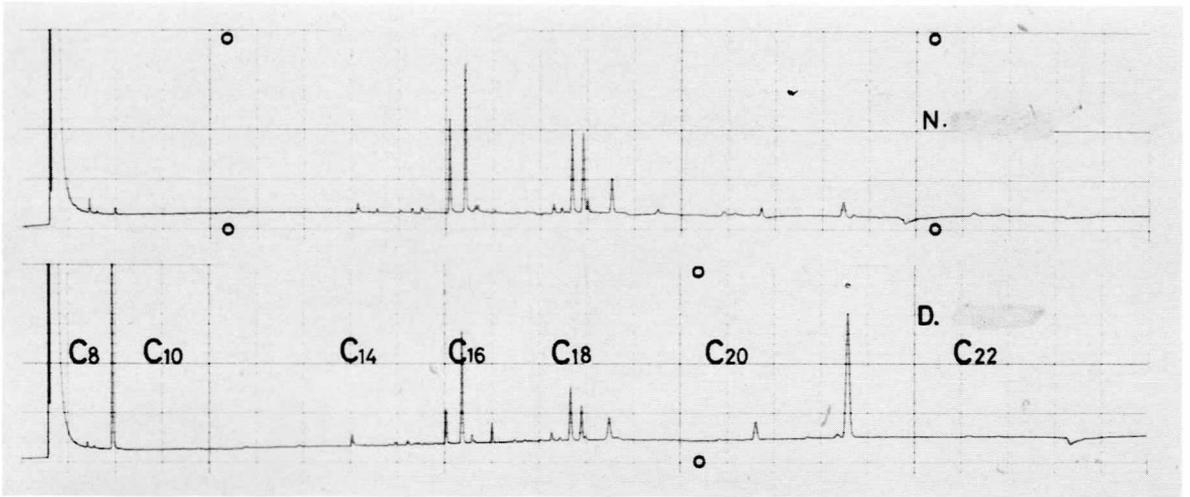


図 6 成鶏胸筋の全脂質脂肪酸構成  
N：正常成鶏胸筋      D：ジストロフィー成鶏胸筋

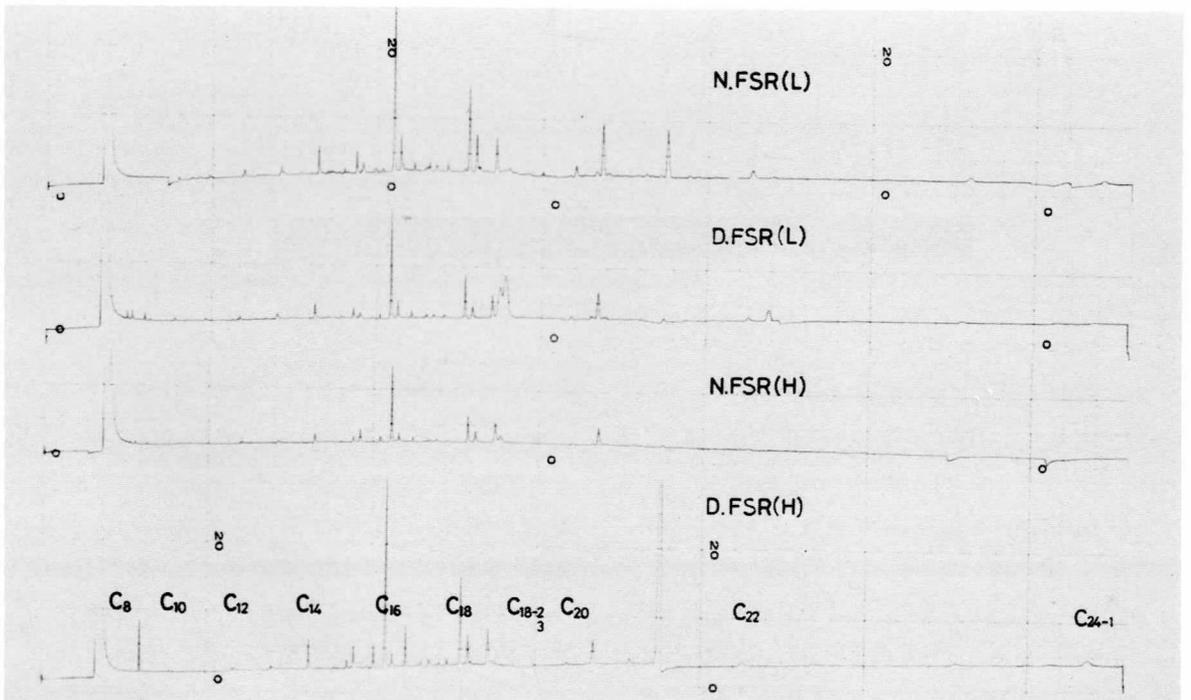


図 7 分離筋小胞体膜構成脂肪酸

自体から、 $C_8 \sim C_9$ に相当する脂酸の増大、 $C_{20} \sim C_{22}$ に相当する脂酸の増大が、dys-FSRに特徴的に認められた(図6)。この脂酸の増大は前回報告した結果と合わせて考察すると、 $C_8 \sim C_9$ の鎖の短い脂酸の増大はdys-H FSRに観られ、 $C_{20} \sim C_{22}$ の長い鎖の脂酸はdys-L-FSRに観られる事が判った(図7)。現在我々はこの筋小胞体膜を構成している各脂質の脂酸構成から、ジストロフィー筋小胞体膜の脂質代謝系を追求中である。

### 文 献

- 1) Kuriyama, et al.: ジストロフィーチキン骨格筋の神経筋持合部と筋性質の研究 - 筋ジストロフィーの基礎的研究班53年度報告書, 114 - 117. (1978)
- 2) Nishijima et al - On the ability of Ca-uptake in the fragmented Sarcoplasmic reticulum extracted from the guinea pig sartorial muscle *proc. Jpn Acad.* 49: 367-371, 1973.
- 3) Foeh, J. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. *J Biol Chem.* 226: 497-509, 1957.
- 4) Sakai, et al.: ジストロフィー成鶏胸筋小胞体膜のCa-uptake 能と膜構成脂質について。筋ジストロフィー症の基礎的研究(江橋班) 昭和55年報告書, 125 - 132. (1980)
- 5) D. Scales, et al. The involvement of sarcotubular membranes in genetic muscular dystrophy *Biochem. Biophys Acta.* 465: 535-549, 1977.
- 6) Gideon, A. et al. Adenylate cyclase in muscular dystrophy. *Ann. New York Acad. Sci.* vol. 670-691.
- 7) G. Meissner: Isolation and characterization of two types of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 389: 51-68, 1975.
- 8) R. E. Mraz and R. J. Baskin. Calcium Transport and phosphoenzyme formation in dystrophic mouse sarcoplasmic reticulum. *Biochemical Medicine.* 19: 47-70, 1978.
- 9) S.D. Hanna and R. J. Baskin: comparison of the (CaMg) ATPase protein from normal and dystrophic chicken sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys. Acta.* 540: 144-150, 1978.
- 10) D. Kunze: Lipid composition and phospholipid metabolism of muscle in progressive muscular dystrophy. In *Basic Research in Myology*, pt. Ed. by Kakulas. Amsterdam, Excerpta, Medica 161-176, 1973.
- 11) B. P. Hughes: Lipid Changes in muscle disorders and their relation to maturation. In *Basic Research in Myology*, pt Ed. by Kakulas. Amsterdam, Excerpta, Medica 155-160, 1973.

## 24 筋ジストロフィー・マウスの中樞神経組織における ミエリン局在酵素(CNP, CEH)活性の日令変化

松 下 宏\*  
研究協力者 辻 繁 勝\*

生后1~2ヶ月で軽症の筋ジストロフィー・マウスでは脊髄神経組織中のミエリン含量が正常対照マウスと比較して著しく減少していること、並びにセレブロンド或いはコレステロールなどのミエリン構成脂質にも量的変化が認められること、などに就いては既に確かめられている。<sup>1)</sup>更に昨年度はミエリン分画に局在する2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP)及びcholesterol-ester hydrolase(CEH)の2酵素の活性が1~2ヶ月令の筋ジストロフィー・マウスの脊髄神経組織中のミエリン分画においていずれも著しく低下していることを報告した。<sup>2)</sup>本年度はこれ等の事実を更に詳細に追求する目的で、筋ジストロフィー・マウス中樞神経組織中のミエリン局在CNP及びCEH両酵素の活性を発病初期から日令順に追跡し、活性変化と発病との関連に就いて検討を行なった。

### 材料及び方法

実験に使用した動物は当教室で自家繁殖を行っているC57BL/6J-by系の筋ジストロフィー症マウス及びその同腹正常対照マウスである。

動物を断頭瀉血した後速やかに嗅脳を除いた脳及び脊髄神経組織を採出し、それぞれ20倍容の氷冷の0.32M蔗糖液を加えてテフロンホモジナイザーでホモジナイズする。以下Norton等の方法<sup>3)</sup>に従ってpurified myelin分画を得た。即ちホモジネートを900g, 10分間遠心沈殿し、その上澄及び

3回繰返し洗滌した上澄を集め、0.32M, 0.85Mの蔗糖非連続濃度勾配によって75,000g, 30分間遠心沈殿し、crude myelinを分離する。これを更に蒸留水中に浮遊させ(g/10ml), 1時間低張液処理を行なった後、75,000g, 15分間遠心沈殿する。沈殿物を蒸留水中でホモジナイズした後、12,000g, 10分間の遠心沈殿操作を3回繰返して洗滌した沈殿物を再び0.32M蔗糖液に浮遊させる。最后再び0.32M, 0.8Mの蔗糖非連続濃度勾配によって75,000g, 30分間遠心分離してpurified myelinを得る。

purified myelin分画は更に0.3mg/mlのTriton X-100液に入れ、1時間放置して膜の破壊を行い浮遊液を軽くホモジナイズした後CNP活性測定用の酵素標品として使用した。又CEH活性測定用の酵素標品にはpurified myelinを2μmoles/mlのタウロコール酸を含むリン酸緩衝液に浮遊させ、1時間放置後軽くホモジナイズしたものを使用した。

CNP酵素の活性測定はOlafson法<sup>4)</sup>に準じた2', 3'-cyclic AMPを基質とする方法に加えてSogin法<sup>5)</sup>による2, 3-cyclic NADPを基質とする方法を併用した。即ち1mlMES緩衝液(pH6.0)中に5mM glucose-6-phosphate, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6units G6PDH, 1mM Sodium cyclic NADPを含んだ反応液に10μlの酵素標品を加え25℃で、NADPの遊離による340mμの吸光度変化を測定し、酵素活性を算定した。CEH酵素の活性測定にはコレステロール・オ

\*和歌山県立医科大学第二生理学教室

レイン酸エステルを基質として酵素を反応させ、遊離したオレイン酸をクロロフォルムで抽出し, Itaya-Ui による NEFA 測定法<sup>6)</sup>に従って比色定量する方法が用いられた。酵素標品中の蛋白定量は Lowry 法に従って行った。

## 結 果

CNP 活性に就いて、出来るだけ発症の初期に逆のぼって、筋ジストロフィー・マウスの脊髄及び脳中のミエリン局在 CNP 活性を測定し、ミエリン総蛋白量当りの活性値を日令順に並べ、正常対照マウスのそれと比較した。図 1 は脊髄に於ける変化を示

表 1 Myelin 2', 3'- cyclic nucleotide 3'- phosphohydrolase in brain and spinal cord of dystrophic mice

	Dystrophic	Normal	D/N x 100	Pr.
<b>Brain</b>				
Total activity	11.52 ± 0.90	17.28 ± 1.63	66.7	P < 0.01
Specific activity	4.43 ± 1.10	4.77 ± 1.56	92.9	N.S.
<b>Spinal cord</b>				
Total activity	10.36 ± 1.44	15.21 ± 2.30	68.1	P < 0.01
Specific activity	4.14 ± 0.83	4.20 ± 1.11	98.6	N.S.

Unit:  $\mu$ moles NADP/total protein or mg protein/min.  
Averaged age of the mice are 51.3 (41-60) days.

したものであるが、発症直後の 2 週令で既に正常個体よりもかなり低い活性を示し、最大活性値に達する 30 日令頃には、正常対照の約  $\frac{2}{3}$  程度の活性になっていることが判った。図 2 は同様に脳中のミエリン分画に於ける CNP 活性の変化を示したものであるが、この場合は発症初期には正常対照マウスと全く同じ活性上昇を示し、ほぼ最大活性値に達する 4 週令頃から急激に活性が低下していることが認められ、40 日令に至ると、正常対照の約  $\frac{2}{3}$  に活性が低下している。これらの結果は筋ジストロフィー・マウスの脊髄ではミエリン形成期の始めに既に CNP 活性の顕著な低下が見られるのに対して脳では一旦最大活性値に至るまで CNP 活性が上昇した後、急激に活性低下が起ることを示している。一方、CNP 活性を単位蛋白量当りで換算した値で表示すると、図 3 及び図 4 の如くになり、筋ジストロフィー・マウスの脊髄及び脳ではいずれも、2 ヶ月令に至ると正常対照との間に活性差は見られなくなり、又

最大活性値が正常対照よりもやや低くなっていることが判った。更に最大活性値に達する時期が脊髄では正常対照と同じく 18 日令前後であるのに対して、脳では筋ジストロフィー・マウスが正常対照より 1 週間程遅れ、25 日令頃に最大活性値に達していることが認められた。

以上の如く筋ジストロフィー・マウスに見られたミエリン CNP 活性の変化を再確認する目的で、cyclic NADP を基質とする別の方法によって測定を行った。表 1 は 2 ヶ月令の筋ジストロフィー・マウス及び正常対照マウス各 8 頭に就いて測定した活性値の平均値を示したものであるが、脳、脊髄共にミエリン総蛋白量当りの活性値では筋ジストロフィー・マウスが有意に活性低下を示しているのに対して、単位蛋白量当りの活性値では有意な差が見られなくなっていることが確かめられた。

次にミエリン局在のもう一つの酵素である CEH に就いても同様に日令を追って活性測定を行った。

表2 Myelin cholesterol-ester hydrolase in brain and spinal cord of dystrophic mice

	Dystrophic	Normal	D/N x 100	Pr.
Brain				
Total activity	14.32 ± 0.69	25.71 ± 3.43	55.7	P < 0.01
Specific activity	5.65 ± 2.52	10.81 ± 2.73	52.3	P < 0.01
Spinal cord				
Total activity	21.57 ± 4.26	46.98 ± 11.25	45.9	P < 0.01
Specific activity	5.47 ± 1.94	9.88 ± 1.81	55.4	P < 0.01

Unit;  $\mu\text{M}$  oleate/ total protein or mg protein/ min.  
Averaged age of the mice are 57.8 (41-75) days.

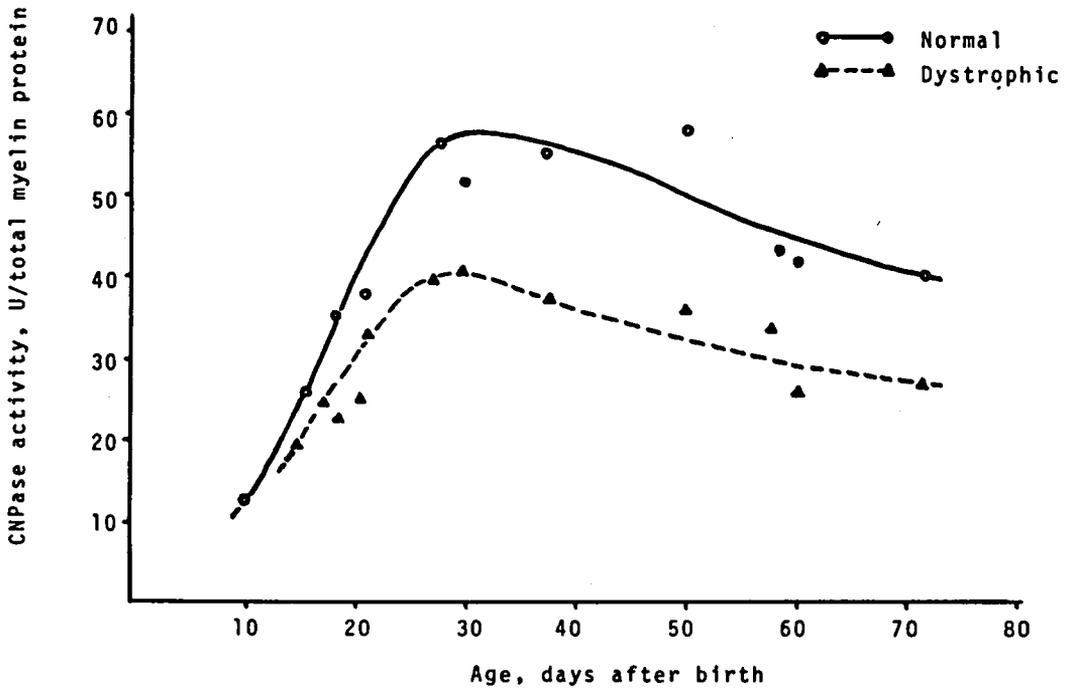


图1 Myelin CNPase activity in the developing and maturing spinal cords of dystrophic and normal mice

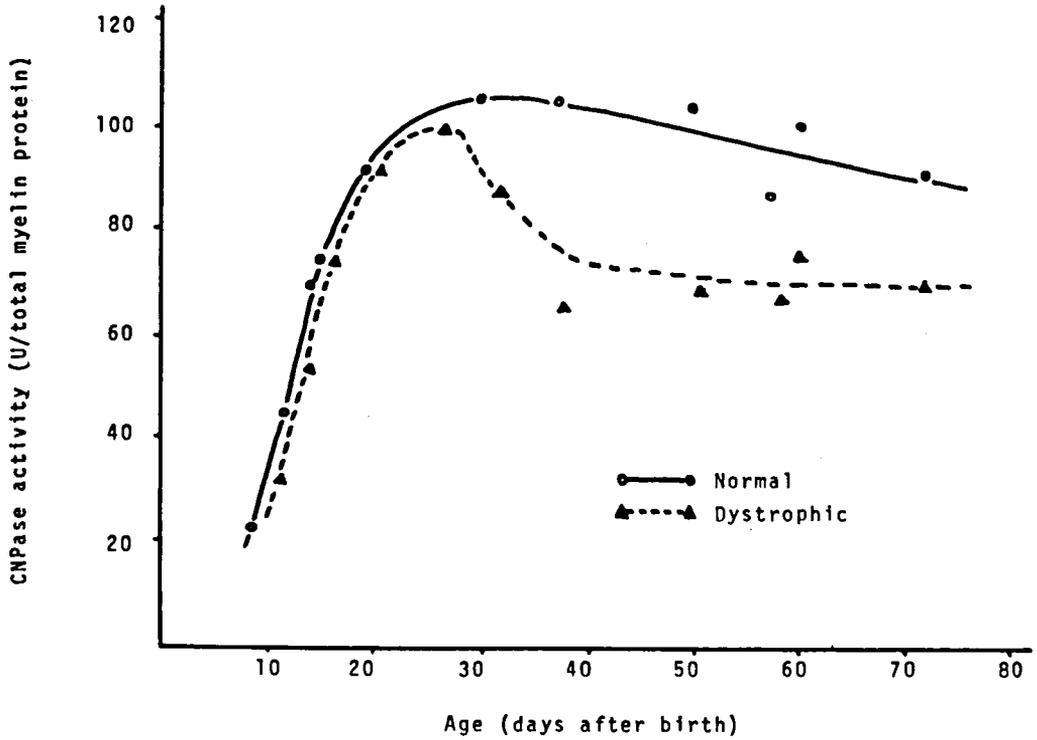


図2 Myelin CNPase activity in the developing and maturing brains of dystrophic and normal mice

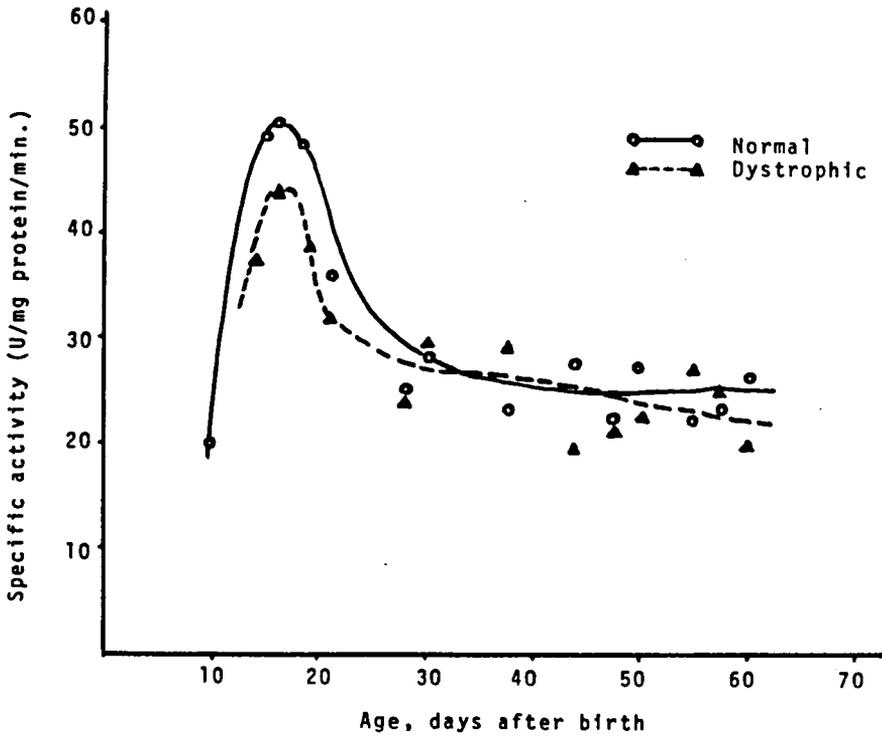
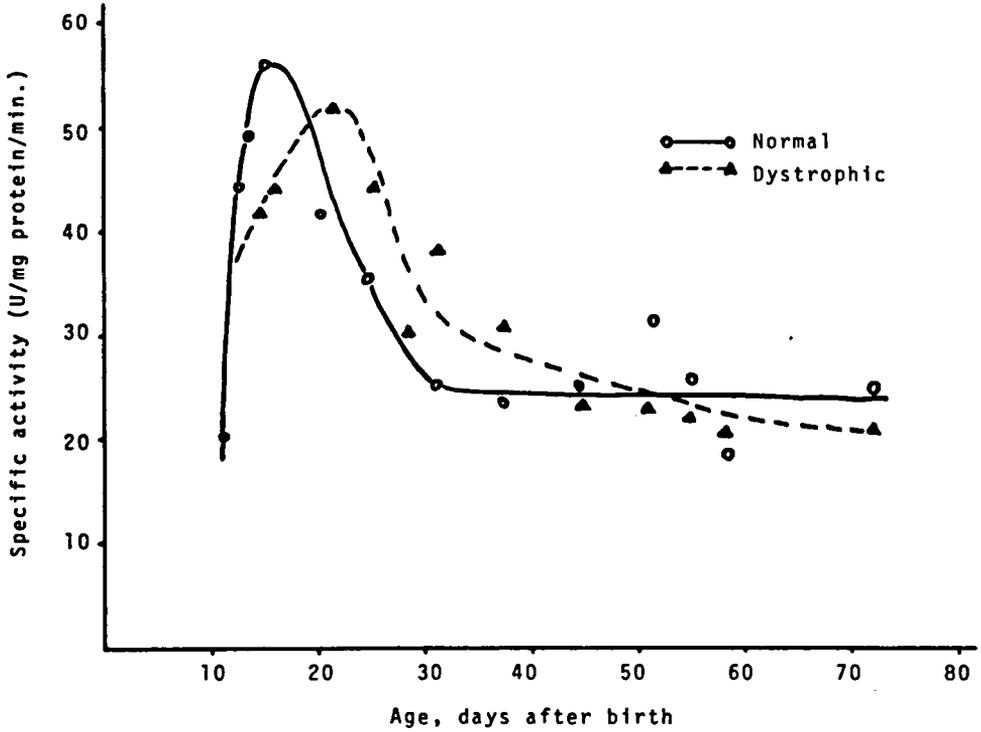
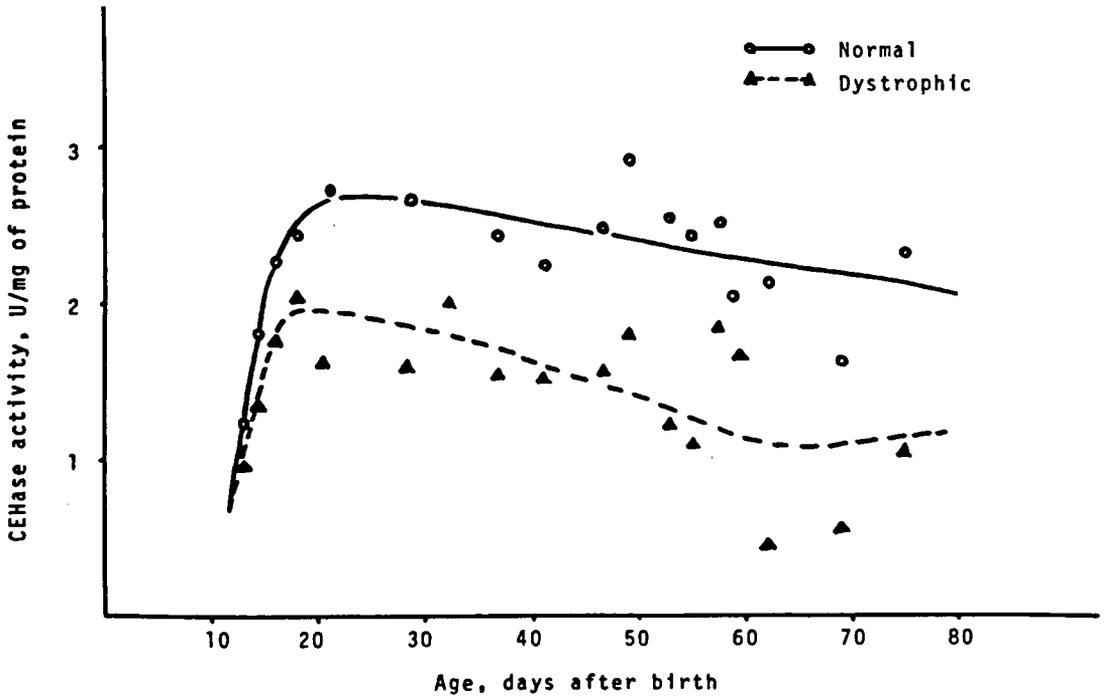


図3 Specific activity of myelin CNPase in the developing and maturing spinal cords of dystrophic and normal mice



⊗ 4 Specific activity of myelin CNPase in the developing and maturing brains of dystrophic and normal mice



⊗ 5 Myelin cholesterol-ester hydrolase activity in the developing and maturing spinal cords of dystrophic and normal mice

図5は脊髄組織中のミエリンCEH活性を日令順にプロットしたものであるがCNP活性と同様に発病直後で、且つミエリン形成の最も盛んに行なわれている2週令の時期に既に筋ジストロフィー・マウスでの活性値が正常対照の $\frac{2}{3}$ 程度に低くなっていることが認められた。又最大活性値に達する時期が正常対照と同じく20日令頃であり、CNP活性の場合30日令以後に最大活性値に達したのと比較してかなり早期であることが注目される。又、脳中のミエリンCEH活性の日令変化は図6の如く3週令迄は筋ジストロフィー・マウスも正常対照と全く同じ経過をたどって活性上昇を示しているが、22日令頃から急速に活性低下が起り、40日令に至ると、正常対照の活性値の約 $\frac{1}{2}$ になっていることが判った。

表Ⅱは2ヶ月令の筋ジストロフィー・マウス8頭に就いて中枢神経組織中のミエリンCEH活性を測定しその平均値を正常同腹対照マウスの活性値と比較したものであるが、脳、脊髄両組織で共にミエリン総蛋白量当りでも単位蛋白量当りでも筋ジストロフィー・マウスの活性値の方が有意に低い値を示していることが認められた。

### 考 察

軽症の時期の筋ジストロフィー・マウスでは脊髄神経組織において著しいミエリン欠乏状態が存在することが並にミエリン構成脂質に量的変化が見られること、更にミエリン分画に局在し、ミエリン存在のマーカーク酵素として知られているCNP及びCEHの活性が著しく低下していることに就いては既に報告した。<sup>7,8)</sup>今回は上記2酵素の筋ジストロフィー・マウス中枢神経系での活性変化と発病との関連に就いて更に詳細に検討する目的で日令別に活性の測定を行った。その結果筋ジストロフィー・マウスの脊髄では両酵素共に発病直後の2週令で既に正常対照に比較して著しい低活性を示しており、最大活性時には正常値の約 $\frac{2}{3}$ になっているのに対して脳では両酵素共に最大活性値に至るまでは正常対照とほぼ同じ経過をたどり、その後急速に活性低下が起ることが認められた。この事実は脊髄と脳とでは両酵素

の活性変化の現れる時期、及びその発現機序が異なっていることを示しているものと考えられる。又2ヶ月令の筋ジストロフィー・マウスの中脳神経組織では総ミエリン蛋白量当りでは両酵素共に正常対照に比較して有意な活性低下を示しているが、単位蛋白量当りではCNP活性値に有意差が無くなること並びにCEH活性に就いては依然として有意な低下が認められることなどの結果から、CNP活性の低下は特異的な変化ではなく、むしろミエリン全体の量的変化に伴って現われる二次的な現象と考えられる。一方CEH活性の変化はマウス神経組織に於けるこの酵素の活性がミエリン形成期の始めに既に最大活性値に達していることと併せて考えると、筋ジストロフィー・マウスに於けるCEH酵素の活性変化或いはコレステロール代謝の異常が、これら臓器において極めて早い時期に起っているものと推測され、この異常がミエリン形成不全の原因の一つになっている可能性が示唆される。

筋ジストロフィー・マウスにおけるコレステロール代謝の異常に関してはKadara<sup>9)</sup>或いはRadinowitg<sup>10)</sup>等が報告している。彼等はアイソトープを用いた取込み実験によって、筋ジストロフィー・マウス骨格筋及び脳に著しいコレステロール代謝の異常が存在すること、就中、脳ではコレステロール含量が増加しており、特に遊離型が著しく増加しているのに、エステル型は逆に減少していること、又コレステロール全体の合成速度は正常対照マウスに比較して促進が見られるのにも均らず、エステル化の速度は正常よりむしろ遅くなっていること、などを報告している。今回の我々の結果は、これ等の報告とよく一致しており、筋ジストロフィー・マウス中枢神経組織においてはコレステロール代謝に著しい異常があり、これがミエリン形成不全、更には一般的な膜機能異常の原因の一つになっている可能性を示唆しているものと思はれる。

### 要 約

(1)2ヶ月令の筋ジストロフィー・マウス中枢神経組織ではミエリン分画中のCNP酵素並びにCEH

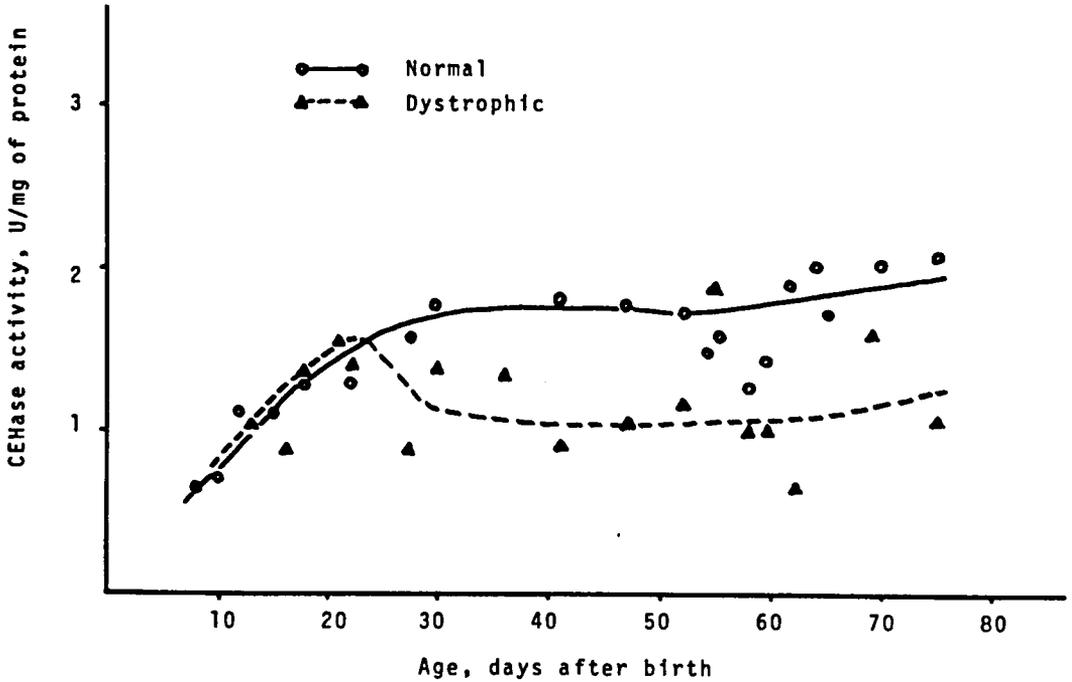


図6 Myelin cholesterol-ester hydrolase activity in the developing and maturing brains of dystrophic and normal mice

酵素の総活性が正常対照マウスに比較して有意に低下していた。然し単位蛋白量当りで換算するとCNP活性には有意差が見られなくなった。

(2)日令順に活性変化を追跡すると筋ジストロフィー・マウス脊髄組織ではCNP及びCEH両酵素共に発症初期の2週令で既に正常同腹マウスのそれよりも低い活性値を示し、最高値では正常の約 $\frac{2}{3}$ に低下しているのに対して、脳組織では筋ジストロフィー・マウスの場合も最高値に至る迄は正常対照マウスとほぼ同じ経過をたどり、その後急激に活性低下が起ることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) Tsuji, S. and Matsushita, H.: Alteration of lipid composition in brain and spinal cord of mouse with muscular dystrophy. In *Current Research in Muscular Dystrophy, Japan*, p 60-61, 1977.
- 2) Tsuji, S. and Matshita, H.: 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase and cholesterol ester hydrolase in brain and spinal cord of dystrophic mice. In *Current Reserach in Muscular Dystrophy, Japan*, p 47-48, 1979.
- 3) Norton, W.T. and Poduslo, S.E.: Myelination is rat brain: Method of myelin isolation. *J. Neurochem.* 21: 749-757, 1973.
- 4) Olafson, R.W., Drummond, G.I. and Lee, J.F. Studies on 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase from brain. *Canad. J. Biochem.*, 47: 961-966, 1969.
- 5) Sogin, D. C.: 2',3'-cyclic NADP as a substrate for 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase. *J. Neurochem.* 27: 1333-1337, 1976.
- 6) Itaya, K. and Ui, M.: Colorimetric determination of fatty acids in biological fluids. *J.Lipid Res.* 6: 16-20, 1965.
- 7) 辻 繁勝, 松下 宏: 筋萎縮症マウス神経組織に見られるミエリン形成不全について。第14回日本実験動物学会口演抄録集, 28, (1979)
- 8) 辻 繁勝, 松下 宏: 筋萎縮症マウス神経組織中のミエリン局在酵素 (CNP及びCEH) の活性変化, 日本生理学雑誌, 42, 282. (1980)
- 9) Kabara, J.J.: Brain cholesterol VII. The effect of hereditary dystrophia muscularis on [2- $^{14}$ C] meralonic and [2- $^3$ H] acetate incorporation. *Texas Rep. Biol. Med.* 22: 143-151, 1964.
- 10) Rabinowitz, J.L.: Enzymic studies on dystrophic mice and their littermates (lipogenesis and cholesterolgenesis). *Biochim, Biophys, Acta.* 43: 337-338, 1960.

## VI 蛋白分解酵素

- 25 カテプシンBによる筋蛋白分解の蛋白化学的ならびに形態学的研究 153
- 26 筋ジス・ニワトリおよびマウス筋肉内の各種酵素活性の対比 159
- 27 筋組織の中性プロテアーゼに関する研究 166
- 28 カルシウム依存性プロテアーゼ (CAMP) に対するCa<sup>2+</sup>の役割 172
- 29 筋蛋白質代謝回転に及ぼす蛋白質分解酵素阻害剤の影響 177

## 25 カテプシンBによる筋蛋白分解の 蛋白化学的ならびに形態学的研究

勝 沼 信 彦\*

研究協力者 野 田 隆\* 磯 貝 和 秀\*

### はじめに

筋ジストロフィー症進行過程に見られる萎縮という現象について考える際、蛋白分解酵素の異常による筋蛋白崩壊を抜きにしては考えられない。また筋蛋白崩壊の過程には、分解される側の問題(易水解性,修飾等)分解する側の問題(活性化,トランスロケーション等)ならびに形態変化(hypercontraction, membrane disorder)等に関する構造上の問題が含まれている。我々はまず蛋白分解酵素の側から、この筋蛋白崩壊現象を追求してみた。既に我々は、筋組織中のマストセル・セリンプロテアーゼによる筋蛋白に対する分解様式を報告してきた。<sup>1)</sup>今回は本症患者ならびにジストロフィーマウス、<sup>2)</sup>ジフトロフィーチキン<sup>3)</sup>の萎縮筋中で活性が上昇するカテプシンBによる筋蛋白分解の様式を蛋白化学的ならびに形態学的方法で研究した。

### 実験材料及び方法

#### カテプシンB精製法

ラット肝より、唐渡らの方法<sup>4)</sup>で精製し、比活性が結晶酵素と同じものを用いた。

#### 筋原線維構成蛋白質の調整

家兎骨格筋を用い、ミオシンはPerryらの方法で抽出し、Richardsらの方法で精製したのものを用いた。アクチンはMommaertの方法で精製した。トロポニン<sup>5)</sup>は江橋ら、トロポミオシンはMueller,  $\alpha$

−アクチニンは真崎・高市の方法で精製した。

#### 易水解性の測定

各筋原線維構成蛋白は $10^{-5}$  M, カテプシンBは $10^{-7}$  Mとなるように調整し、pH6.0の酢酸緩衝液5 mMメルカプトエタノール, 1 mM EDTA存在下で37°Cにおいて反応させ、上清に遊離するアミノ酸・ペプチドの量を測定した。

#### 分解様式の検討

SDS−ゲル電気泳動上で分解像を解析した。蛋白量は20 $\mu$ gとした。反応液組成は上記と同様で、反応の停止はE−64を用いた。

#### 形態学的観察

グリセリン筋は、家兎腸腰筋から調整したものを、東大・江橋研より供与されたものを用い、電顕、位相差顕微鏡による実験は、神経センターの埜中・石浦両博士の御協力を得て行なった。反応はスライドガラス上で、室温で行なったものを、位相差顕微鏡で観察し、試験管内で反応を進行させたものは、E−64で反応を停止したのち、遠心し、上清に遊離してきた蛋白はSDS−ゲル電気泳動で分別し、沈殿は電顕用の試料とした。

### 結果及び考察

#### 筋原線維構成蛋白のカテプシンBに対する易水解性

表1に示すように、ミオシン $\gg$ トロポニン $\gg$ トロポミオシン $\gg$ アクチンの順にカテプシンBによって水解されるが、 $\alpha$ −アクチニンは分解されない。ミオシンの水解速度ははやく、かつ30分までは直線

\*徳島大学酵素化学教室

表1 Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B<sup>a</sup>

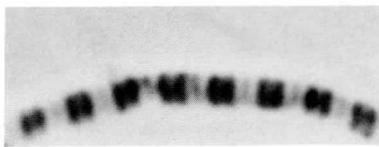
Substrate	Incubation time (min)					
	0	15	30	60	90	120
Myosin	0	54.4	72.1	88.1		
Troponin	0	14.5	23.3	43.3	46.6	48.3
Tropomyosin	0	17.1	21.5	23.9		
Actin	0	3.3	10.8	12.8		
$\alpha$ -Actinin	0	0	0	0		

<sup>a</sup>The molar ratio of cathepsin B to substrate in the reaction mixture was 1:100

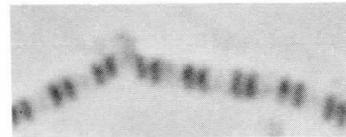
的に進行するが、それ以後は反応速度は徐々に遅くなる。トロポニン<sup>1</sup>は60分まで大体直線的に反応は進むがその後は徐々に遅くなる。またトロポミオシンはミオシンとよく似た反応速度の変化を示す。ア

クチンはごくわずかの量しかアミノ酸・ペプチドを遊離しない。次に示す分解像と合わせて考えると、ミオシン、トロポニン、トロポミオシンはカテプシンBによって限定的に分解されると考えられる。

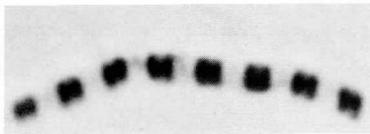
### Cathepsin B Effect on Isolated Myofibrils



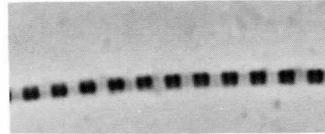
Cathepsin B treatment  
0'



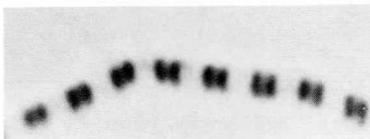
Cathepsin B treatment  
60'



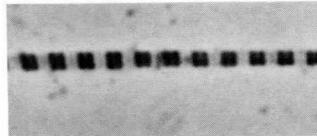
Cathepsin B treatment  
15'



Control  
0'



Cathepsin B treatment  
30'



Control  
60'

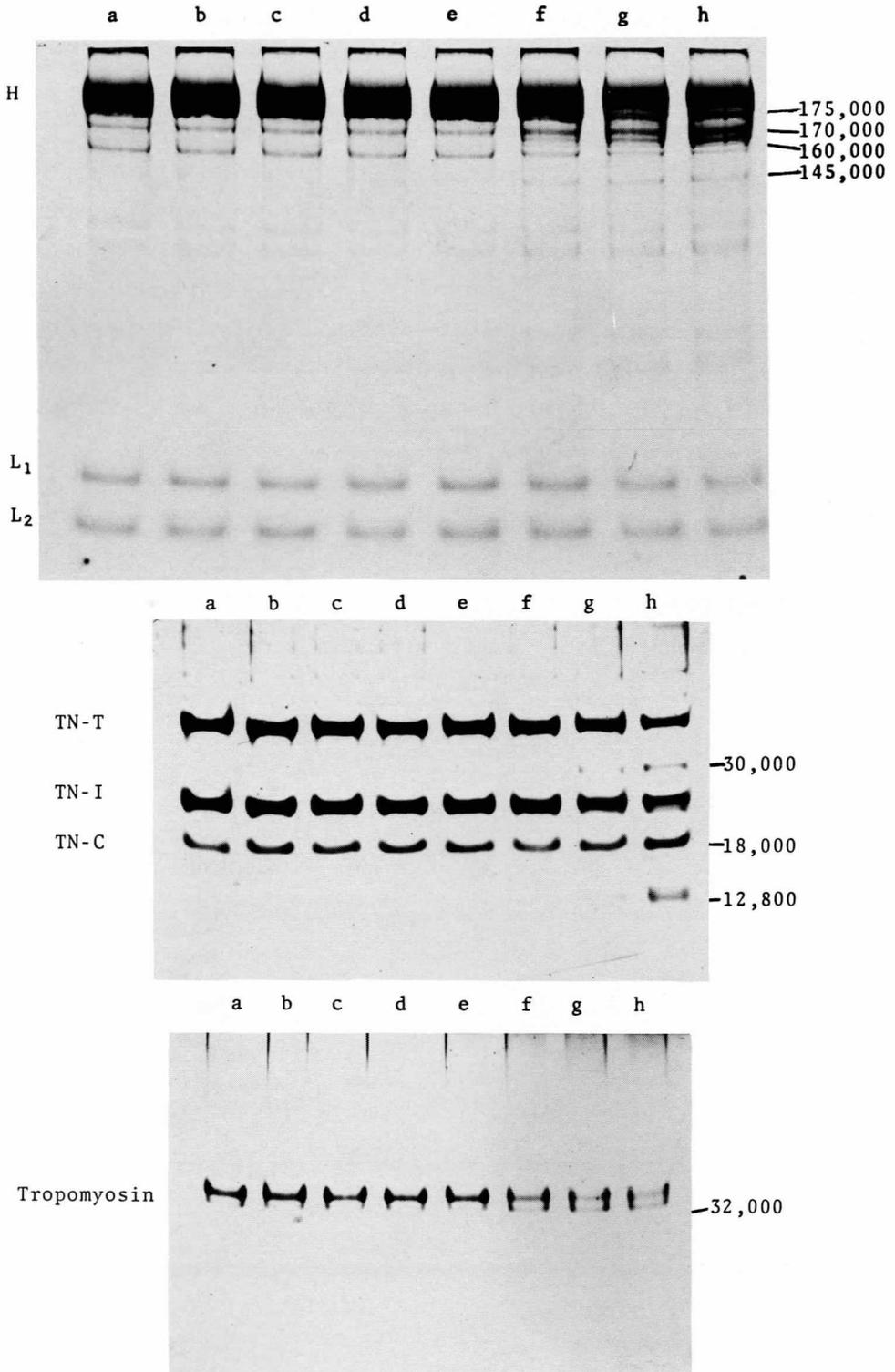


図1 SDS gel electrophoretic patterns of myosin, troponin and tropomyosin after incubation with and without cathepsin B  
 a: 0, b: 15, c: 30 and d: 60 (min) without cathepsin B  
 e: 0, f: 15, g: 30 and h: 60 (min) with cathepsin B

カテプシンBによる筋原線維構成蛋白分解様式

図1に、ミオシン、トロポニン、トロポミオシンのカテプシンBによる分解像を、経時的に示した。ミオシンは、分子量175,000, 170,000, 160,000, 145,000の分解産物を形成するが、分子量より考えて、おそらくミオシン重鎖の限定分解産物であろう。しかし、マストセル・セリンプロテアーゼと同様に、軽鎖は殆んど分解しない。トロポニンはTN-TとTN-Iのみ分解され、出現経過と分子量から考えて、分子量30,000と12,800の分解産物はトロポニン-Tより生じたと思われる。トロポニン-Iの分解産物はトロポニン-Cとほぼ同様の分子量を持つため、トロポニン-Cのバンドと重なり、経時的にトロポニン-Cに相当するバンドの濃度が増加すると思われる。トロポミオシンは、分子量約32,000の分解産物を生ずる。ここでは示していないが、表1の結果より想像されるように、SDS-ゲル電気泳動上で、アクチンのバンドの減少は見られなかった。

カテプシンBによる筋原線維の形態変化

図2に示すように、カテプシンB処理により、筋原線維はまず軽度の膨潤を示し、まずZ線の密度が減少する。同時にA帯の密度が低下し、あたかもH帯が開大したかの如く見られる。60分も反応させると、一部では崩壊像が見られ全体の長さも伸長するが、全体の構造は大体よく保たれている。比較的thin filamentの損傷は少ない事をうかがわせる。

電顕によるカテプシンB処理後の筋原線維の形態変化

図3に示す通り、カテプシンB処理後30分には、Z線が消失し、A帯が膨潤し、A帯・H帯・M帯の密度の差が不明瞭になってくる。60分後には、Z線は完全に消失し、M線も消失する。そして、A帯は断裂を起こす。しかし、A帯とI帯の境界はかなり明瞭に残っているので、ミオシン・アクチン間の接触は破壊されないであろう。

筋原線維より遊離する蛋白の解析

図4に示す如く、筋原線維からは、カテプシンB

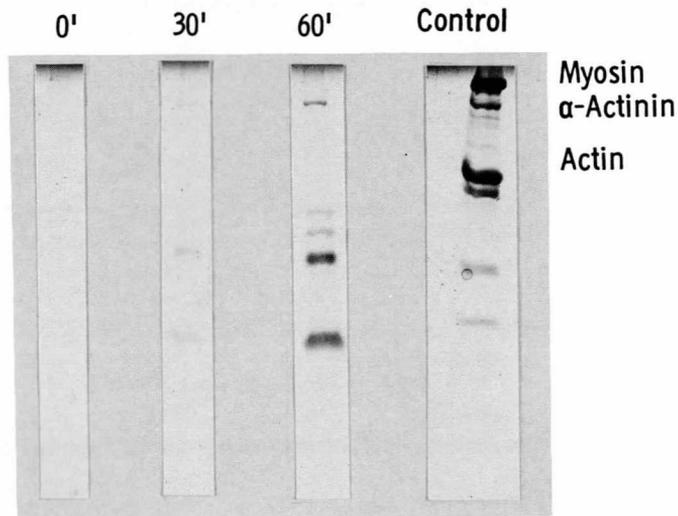


図4 SDS gel electrophoresis of liberated products from isolated myofibrils during incubation with cathepsin B

## Cathepsin B Effect on Isolated Myofibrils

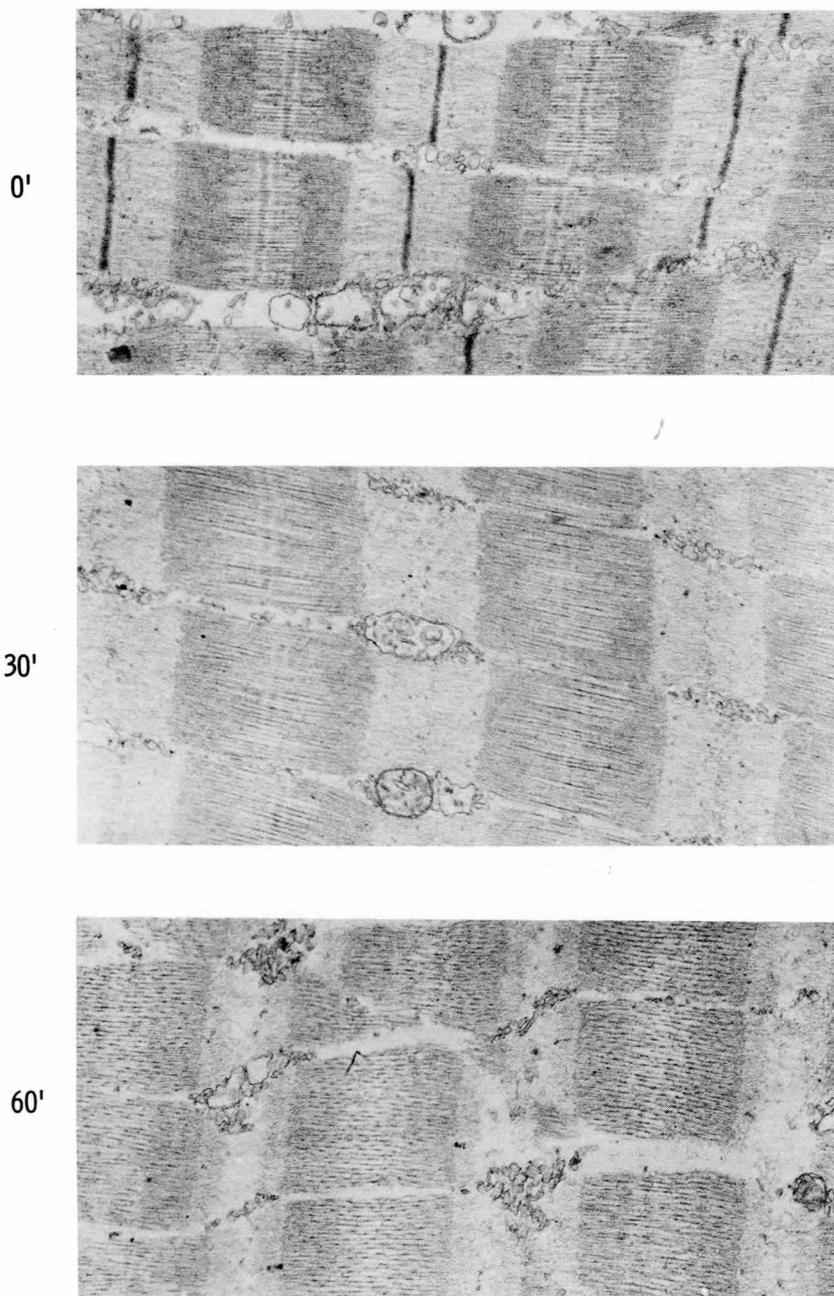


図 3

処理後5分には、分子量96,000の $\alpha$ -アクチニンと思われる蛋白が遊出してくる。しかも、その蛋白は $\alpha$ -アクチニンの抗体と反応することから、表1で示した様に、カテプシンBによって殆んど切断を受けていない $\alpha$ -アクチニンと思われる。その他の

バンドは、コントロールの筋原線維構成蛋白と比較してみると、易動度の違いから、他の蛋白の分解産物と考えられる。またバンドの数が、60分後でも増加しない事から、前にも述べた様に限定分解産物であることが推察される。

## 結 語

従来多くの蛋白分解酵素が、筋ジストロフィー症患者及びジストロフィー動物筋中にその活性を増加し、かつ筋原線維構成蛋白質の分解に関与するとされ、その分解酵素側の特異性を明らかにしてきたが、正常の立体構造を保持している場合には分解されやすい蛋白というのは、カルシウム依存性中性プロテアーゼでも今回のカテプシンBでも類似性が高く、それらの分解酵素の基質特異性はかなり重複していると考えられる。そこで今後は endopeptidase のみではなく、従来 exopeptidase と考えられている酵素も含めて基質側の修飾にどう関与しているか、また蛋白分解酵素相互の協調作用についても検討していきたい。

## 謝 辞

本研究の形態学的観察の実験について、御助言・御指導を賜りました神経センターの杉田先生・石浦先生・埜中先生に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Yasogawa, N., Sanada, Y. and Katunuma, N., *J. Biochem.* 83: 1355-1360, 1978.
- 2) Sanada, Y., Yasogawa, N. and Katunuma, N., *J. Biochem.* 83: 27-33, 1978.
- 3) Simon, E., Groos, C.S. and Lessell, I.M., *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 41-46, 1962.
- 4) Towatari, T. and Katunuma, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 513-520, 1978.

## 26 筋ジスニワトリおよびマウス筋肉内の 各種酵素活性の対比

青 柳 高 明\*

研究協力者 和 田 孝 雄\*

### 目 的

この数年間、筋ジストロフィー症におけるプロテアーゼの役割が注目されて来た。またそれと同時に本疾患の病態解明および治療という面から、ロイペプチン、E-64などプロテアーゼインヒビターの有用性ということが検討されはじめている。このことは、たしかにこの分野における新しい研究の方向を示すものであり、各種の期待が持たれるところでもある。しかしまた、他方において、本疾患における catabolic enzymes の役割を論ずる場合に、あるいくつかの限定されたプロテアーゼ及びそれに対するインヒビターという面にのみ目がうばわれてしまうことは、必ずしも得策ではない。こういう観点に立ち、我々はより広い範囲の酵素群に目をむけて研究を行って来た。またそれと同時に、筋肉内の代謝異常のみならず、全身諸臓器内における代謝に対しても追究を行って来た。今回はこれらの報告に基づき、筋ジスマウスならびに筋ジスニワトリの筋肉内酵素活性変化を対比させ、これらの疾患モデルとしての意義についての考察を行った。

### 方 法

実験動物としては、正常ならびに筋ジストロフィーマウス (C57BL/6N) および正常ならびに筋ジストロフィーチキン (Line 412, 413) を用いた。各種筋肉を摘出し、10倍量のPBS (pho-

sphate buffer saline, PH 7.2) の中で Ultraturrax で1分間ホモジナイズした。試験液としては5000rpm, 20分の遠心上清を用いた。

Glu-NA (Glutamic acid  $\beta$ -naphthylamide), Arg-NA, Gly-NA, Ala-NA, Ser-NA, Pro-NA, Leu-NA, Met-NA, f-Met-NA, Phe-NA, Trp-NA, Gly-Pro-NA, Gly-Pro-Leu-NA, Gly-His-Lys-NA を基質として用い、アミノペプチターゼ活性 (arylamidase 活性) を測定した。Glycosidase の基質としては p-nitrophenyl-2-D-glucopyranoside (NP-2-D-Glc), NP- $\beta$ -D-Gal, NP-2-D-Glc), NP- $\beta$ -D-Gal, NP-2-D-Man と NP-N-Ac- $\beta$ -D-GlcNH<sub>2</sub> を用いた。また各種 endopeptidase 活性の測定には、N-2-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE), acetyl-L-alanyl-L-alanine methyl ester (Ac-(Ala)<sub>3</sub>ME), L-seryl-L-tyrosine- $\beta$ -NA (Ser-Tyr-NA) と hemoglobin を基質として用いた。さらに esterase 活性の測定には NP-acetate, phosphatase の活性測定には NP-phosphate, RNase の活性測定には酵母RNAをそれぞれ基質として用いた。<sup>1), 4)</sup>

### 結 果

正常および筋ジスマウスにおけるアミノペプチダ

\* 微生物化学研究所

表 1 Comparisons, between controls and dystrophic mice, of aminopeptidases in muscle

Enzyme	Activities $\pm$ SD (N=4)		t-Value	Significance of difference
	Control	Dystrophy		
AP-A	0.73 $\pm$ 0.08	1.68 $\pm$ 0.32	5.76	P < 0.01
AP-B	5.02 $\pm$ 1.11	5.38 $\pm$ 1.14	0.45	NS
Gly-AP	0.65 $\pm$ 0.17	2.10 $\pm$ 0.27	9.07	P < 0.001
Ala-AP	5.77 $\pm$ 0.96	14.13 $\pm$ 0.50	15.42	P < 0.001
Ser-AP	0.51 $\pm$ 0.18	0.85 $\pm$ 0.17	2.72	P < 0.05
Pro-AP	1.10 $\pm$ 0.50	1.08 $\pm$ 0.43	-0.06	NS
Leu-AP	3.59 $\pm$ 0.31	7.70 $\pm$ 0.20	22.26	P < 0.001
Met-AP	4.64 $\pm$ 0.51	11.80 $\pm$ 0.60	18.26	P < 0.001
fMet-AP	5.32 $\pm$ 1.31	4.58 $\pm$ 0.34	-1.10	NS
Phe-AP	4.97 $\pm$ 0.70	12.40 $\pm$ 0.80	13.59	P < 0.001
Trp-AP	0.96 $\pm$ 0.15	3.18 $\pm$ 0.05	27.42	P < 0.001
Gly-Pro-AP	0.52 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.13	4.94	P < 0.01
Gly-Pro-Leu-AP	0.50 $\pm$ 0.14	0.80 $\pm$ 0.14	3.04	P < 0.05
Gly-His-Lys-AP	0.09 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.00	14.48	P < 0.001

Enzyme activities are expressed as n mol/min/mg protein.

表 2 Comparisons, between controls and dystrophic chickens, of aminopeptidases in muscle

Enzymes	Activities* $\pm$ S.D. (N=6)		t-Value	Significance of difference
	Control	Dystrophy		
AP-A	0.65 $\pm$ 0.19	1.73 $\pm$ 0.59	4.30	P < 0.01
AP-B	9.17 $\pm$ 3.66	18.17 $\pm$ 5.66	3.27	P < 0.01
Gly-AP	2.02 $\pm$ 0.97	6.38 $\pm$ 2.70	3.73	P < 0.01
Ala-AP	11.70 $\pm$ 4.67	24.60 $\pm$ 8.45	4.67	P < 0.01
Ser-AP	1.70 $\pm$ 0.75	4.30 $\pm$ 1.73	3.38	P < 0.01
Pro-AP	4.67 $\pm$ 2.18	13.00 $\pm$ 5.20	3.60	P < 0.01
Leu-AP	4.58 $\pm$ 1.38	10.30 $\pm$ 2.40	5.10	P < 0.01
Met-AP	7.62 $\pm$ 2.48	16.80 $\pm$ 4.30	4.51	P < 0.01
f-Met-AP	0.45 $\pm$ 0.21	0.52 $\pm$ 0.16	0.63	NS
Phe-AP	8.75 $\pm$ 3.51	18.30 $\pm$ 7.00	2.98	P < 0.05
Trp-AP	1.82 $\pm$ 7.28	3.77 $\pm$ 1.04	3.96	P < 0.01
Gly-Pro-AP	0.35 $\pm$ 0.15	0.45 $\pm$ 0.16	1.09	NS
Gly-Pro-Leu-AP	0.58 $\pm$ 0.16	0.72 $\pm$ 0.12	1.66	NS
Gly-His-Lys-AP	0.20 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.09	1.94	P < 0.1

\* Enzyme activities are expressed as n mol/min/mg protein.

ーゼ活性を表1に示す。14種類のアミノペプチダーゼ活性のうち、AP-B, Pro-AP, f-Met-APを除いたものは全て、ジストロフィー群において有意に活性上昇を示した。この時のt-value (student's t-test)を見ると、ほとんどがプラスの値を取っており、この大きさはジストロフィー群と正常群の差を示すindicatorとして用いられることがわかる。

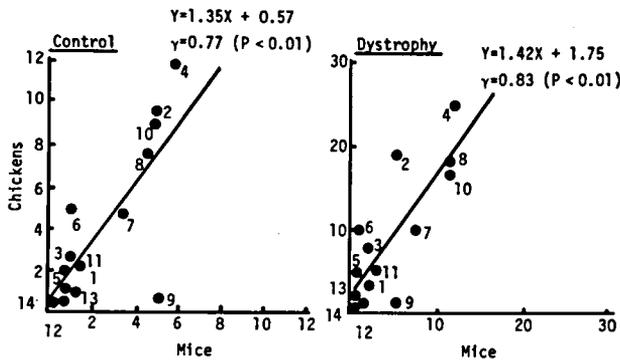
表2には筋ジスニワトリのアミノペプチダーゼ活性を示す。この時にもマウスと同様にほとんどの酵素活性においてジストロフィー群で有意の上昇が見られた。しかしPhe-AP, Gly-Pro-AP, Gly-Pro-Leu-APでは有意差はなく、Gly-His-Lys-APでは10%以下の危険率でのみ有意であった。こういう点で筋ジスマウスの動きとは多少異なるという印象を与えるが、この点をより定量的に表わすことを考えねばならない。そこでt-valueを見ると、筋ジスマウスの場合と同様にほとんどプラスの値を取って居り、これも筋ジスニワトリとコントロールの差を表わすindicatorとし

てよいと思われる。

さて、これらのニワトリとマウスのアミノペプチダーゼ活性を比較してみたい。図1にはニワトリとマウスのコントロール同士(左図)とジストロフィー同士(右図)にて、酵素活性を比較してある。左右の図を比較すると一見して、回帰曲線がほぼ同じ傾きを示している。この場合の酵素活性は蛋白量で補正した比活性(n mol/min/mg protein)として表わしてあるが、この単位で比較してみるかぎり、両者のジストロフィー群においても、コントロール群同士の相関関係が保たれていることがわかる。

しかし一方、図2に示すように、酵素活性を臓器重量単位あたり(n mol/min/g wet weight)に補正すると、この関係がくづれて来る。図2の左、右のグラフにおける回帰曲線が可成り異なっていることから見ると、臓器重量単位あたりの蛋白量は、コントロール同士における場合と、ジストロフィー同士における関係とでかなり異なっているのではないかと考えられる。このことはジストロフィー症における蛋白合成系の異常と結びつけて考えると、興味深

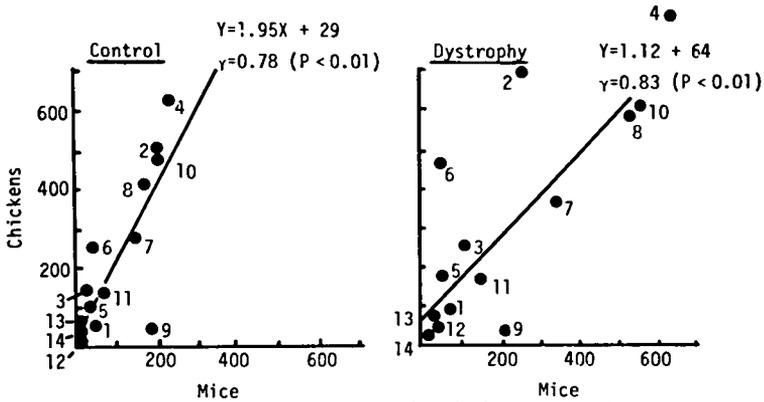
図1 Comparison, between Chickens and Mice, of Intramuscular Activities per mg Protein.



Results are expressed as n mol/min/mgprotein.

- 1) AP-A 2) AP-B 3) Gly-AP 4) Ala-AP 5) Ser-AP
- 6) Pro-AP 7) Leu-AP 8) Met-AP 9) f-Met-AP
- 10) Phe-AP 11) Trp-AP 12) Gly-Pro-AP 13) Gly-Pro-Leu-AP
- 14) Gly-His-Lys-AP

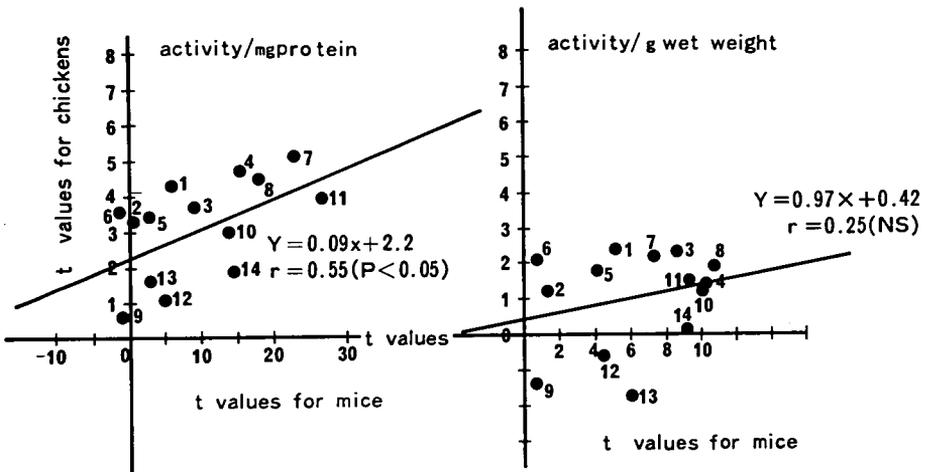
☒ 2 Comparison, between Chickens and Mice, of Intramuscular Aminopeptidase Activities per g Tissue.



Results are expressed as n mol/min/g (wet weight).

- 1) AP-A 2) AP-B 3) Gly-AP 4) Ala-AP 5) Ser-AP
- 6) Pro-AP 7) Leu-AP 8) Met-AP 9) f-Met-AP
- 10) Phe-AP 11) Trp-AP 12) Gly-Pro-AP 13) Gly-Pro-Leu-AP
- 14) Gly-His-Lys-AP

☒ 3 Aminopeptidase Activity Changes in Dystrophic Chickens as Compared to Those in Dystrophic Mice



い問題をふくんでいる。しかし、それにしても、蛋白量によって補正を行うことによって図1に示すごとく、正常同士の関係に立ち戻るといふは、この二種類のモデルの間における類似性を示すものである。

さて、次にもう一つの異ったアプローチにより、ジストロフィー群とコントロール群の差をマウスとニワトリのモデルで比較してみたい。<sup>3,4)</sup> そのためには、すでに表1、表2について論じたごとく、*t*-valueをジストロフィー群とコントロール群の差のindicatorとして用い得よう。この*t*-valueは平均値の差の程度を標準誤差によって補正したものである。したがって“standardized degree of difference”とも呼ぶべきもので、差の有意性を示すindicatorとなり得る。図3はX軸上にマウスの差を、Y軸にはニワトリの差を*t*-valueとしてとり、14種類のアミノペプチダーゼに相当する点をプロットしてみたものである。興味あることに、activity/mg proteinとして酵素活性を表わした時には、マウスとニワトリの間に有意な相関がみ

られた( $r = 0.55$ ,  $P < 0.05$ )。しかしactivity/g wet weightとして表わした場合には有意な相関は見られなかった。このことはアミノペプチダーゼ活性という面から見ると、両モデルの間に類似した酵素活性の変動が見られるということを示唆する。

そこで次に、アミノペプチダーゼ以外の酵素活性についても同様な検討を行った。表3はマウスの筋肉内の各種酵素活性のコントロール群とジストロフィー群における比較である。この場合にも一見してわかるように、ほとんどの場合において、*t*-valueがプラスの値を取り、その大部分は推計学的に有意性を示している。このことはジストロフィーマウスにおける各種酵素活性の上昇を意味する。これに対して表4に示したニワトリ筋肉内の各種酵素活性を見ると、可成り異った動きを示している。最も顕著なものは各種の糖に関する酵素活性であり、*t*-valueはマイナスの値を取り、しかも推計学的に有意である。このことは、これらの酵素活性につい

表3 Comparisons, between control and dystrophic mice, of various enzymes in muscle

Enzyme	Activities* $\pm$ SD (N=4)		t-Value	Significance of difference
	Control	Dystrophy		
Trypsin like	17.00 $\pm$ 10.70	8.40 $\pm$ 3.74	-1.51	NS
Chy-try like	12.20 $\pm$ 4.80	18.60 $\pm$ 2.40	2.39	P < 0.1
Elastase like	8.12 $\pm$ 8.95	15.60 $\pm$ 6.90	1.33	NS
Cathepsin C	0.41 $\pm$ 0.09	1.53 $\pm$ 0.36	6.02	P < 0.01
Cathepsin D**	0.00 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	3.27	P < 0.05
$\alpha$ -D-Glucosidase	0.20 $\pm$ 0.10	0.43 $\pm$ 0.05	5.20	P < 0.01
$\beta$ -D-Galactosidase	0.04 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.08	3.28	P < 0.05
$\alpha$ -D-Mannosidase	0.08 $\pm$ 0.09	0.20 $\pm$ 0.00	2.87	P < 0.05
N-Ac- $\beta$ -D-glucosaminidase	0.17 $\pm$ 0.05	0.98 $\pm$ 0.10	14.72	P < 0.001
Phosphatase	1.25 $\pm$ 0.30	1.78 $\pm$ 0.53	1.72	NS
Esterase	14.10 $\pm$ 16.00	80.10 $\pm$ 45.40	2.74	P < 0.05
RNase (free)***	1.08 $\pm$ 0.17	5.53 $\pm$ 0.70	12.30	P < 0.001

\* Enzyme activities are expressed as n mol/min/mg protein.

\*\* Cathepsin D activity is expressed as absorbance (at 280 nm)/min/mg protein.

\*\*\* RNase activities are expressed as unit/mg protein. 1 unit is equivalent to the activity of 1 ng standard RNase from bovine pancreas.

表 4 Comparisons, between controls and dystrophic chickens, of various enzymes in muscle

Enzymes	Activities* $\pm$ S.D. (N=6)		t-Value	Significance of difference
	Control	Dystrophy		
Trypsin like	5.38 $\pm$ 0.79	7.60 $\pm$ 4.06	1.31	NS
Chymotrypsin like	5.37 $\pm$ 2.21	11.77 $\pm$ 4.90	2.92	P < 0.05
Elastase like	5.80 $\pm$ 3.83	12.58 $\pm$ 5.92	2.36	P < 0.05
Cathepsin C	1.17 $\pm$ 0.67	1.75 $\pm$ 0.46	1.74	NS
Cathepsin D**	0.002 $\pm$ 0.0005	0.006 $\pm$ 0.001	6.17	P < 0.01
$\alpha$ -D-Glucosidase	0.37 $\pm$ 0.10	0.10 $\pm$ 0.09	-4.75	P < 0.01
$\beta$ -D-Galactosidase	0.04 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	-8.16	P < 0.01
$\alpha$ -D-Mannosidase	0.03 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00	-5.21	P < 0.01
N-Ac- $\beta$ -D-glucosaminidase	0.25 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.19	2.00	P < 0.1
Phosphatase	2.08 $\pm$ 0.50	4.18 $\pm$ 2.04	2.45	P < 0.05
Esterase	12.98 $\pm$ 2.55	24.70 $\pm$ 6.20	4.31	P < 0.01
RNase (free)***	0.08 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.13	2.03	P < 0.1

\* Enzyme activities are expressed as n mol/min/mg protein.

\*\* Cathepsin D activity is expressed as absorbance (at 280 nm)/min/mg protein.

\*\*\* RNase activities are expressed as unit/mg protein. 1 unit is equivalent to the activity of 1 ng standard RNase from bovine pancreas.

ていえば、マウスとニワトリのモデルでは全く逆の動きをしているという事を意味する。このことを反映して、表3、表4に示したt-valueの相関性を図3におけると同様に推計してみると、推計学的に有意な相関性は見られなかった。

### 考 察

筋ジストロフィー症のモデル動物として、最も一般的なものは、現在のところマウスとニワトリのモデルである。これらはヒトの筋ジストロフィーに可成り類似した筋肉変化を示すものとして、基礎的研究に広汎に利用されて来た。しかし、これらモデルがヒトの代用として用いられるためには、少なくとも両者の有する代謝異常に共通性がなくてはならない。今回、我々は広範囲な酵素活性変化の面から両者の類似性を検討した。我々の取ったアプローチはpurifyした酵素について一つ一つ検討するのは異なり、substrate specificityなどの面から見ると、多少の問題点がないとはいえない。しかし多少の特異性に関する疑問はあったとしても、こういうスクリーニング的な簡易法を採用することにより、多面

的な酵素活性異常へのアプローチが可能になる。

それによって、代謝異常と酵素活性異常との関連を総合的に追求することが出来るという捨てがたい長所を持っている。事実、我々がこれらの酵素活性を多変量解析という手法を用いて研究する過程において、各種酵素活性間の相互のつながりを示唆する知見が得られつつある。これは純粋に化学的なアプローチのみでは解明し得なかった諸現象を解くための手がかりを与える可能性を示すものである。また本研究では推計学的手法により、二種のモデル動物間の類似性及び相違性を、ある程度定量的に示すことが出来た。このことは、これらモデル動物の有用性と共にその限界をも示すものである。ことにモデル動物に関して得られた知見を、ヒトの疾患にあてはめ、さらに治療面に応用するということになる。モデル動物とヒトにおける疾患との差が当然問題になる。しかし、それ以前に少なくともモデル動物間における代謝の相関性を十分に検討しておくことは、非常に有用である。そこで今後、コンピュータを用いて、この二種のモデルの対比を多変量的に行うことを計画している。

## 結 論

筋ジストロフィー症の動物モデルであるジストロフィーマウスとニワトリについて, catabolic enzymes と代謝との関連性という面から比較を行った。両者間にはアミノペプチダーゼという面からは類似性が見られたが, 他の酵素面では2~3の明らかな相違点も見られた。これらの所見の意味するところは, 今後, 各種のアプローチによって明らかにしていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Aoyagi, T., Suda, H., Nagai, M., Ogawa, K., Suzuki, J., Takeuchi, T. and Umezawa, H. Aminopeptidase activities on the surface of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 452: 131-143, 1976.
- 2) Aoyagi, T. and Umezawa, H., Hydrolytic enzymes on the cellular surface and their inhibitors found in microorganisms. In *Industrial and Clinical Enzymology*. VOL61. (ed. L. J. Vitale and V. Simeon), p. 89. Federation of European Biochemical Societies, 1979.
- 3) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H., Various enzyme activities in muscle and other organs of dystrophic mice. *J. Clin. Invest.* 67: 51-59, 1981.
- 4) Wada, T., Kojima, F., Harada, S., Aoyagi, T. and Umezawa, H., Intramuscular enzyme abnormalities of dystrophic chickens compared to those of dystrophic mice. *J. Pharm. Dyn.* 4: 184-190, 1981.

## 27 筋組織の中性プロテアーゼに関する研究

高橋 健治\*

研究協力者 市原 慶和\* 十川 和博\*

最近、筋組織をはじめ種々の動物組織のマイクロゾーム分画に膜と強く結合し、界面活性剤の存在下でないと可液化されない中性プロテアーゼの存在が知られて来ている。<sup>1-3)</sup>筋組織のマイクロゾーム分画の膜結合中性プロテアーゼについては、その可溶化と部分精製をラット骨格筋を用いて行ない、若干の性質をすでに明らかにしている。<sup>4)</sup>この部分精製標品はカゼイン等の蛋白質に対するエンドペプチダーゼ活性とアミノペプチダーゼ活性を含んでおり、数種のプロテアーゼの混合物であると推定される。本年度は、第一にこのラット骨格筋マイクロゾームの膜結合プロテアーゼについて、各種阻害剤の活性に対する影響をさらによくわしく調べるとともに、基質特異性を比較検索した。また第二に、正常および筋ジストロフィー症ニワトリ胸筋について、マイクロゾーム膜結合プロテアーゼおよび可溶性プロテアーゼ、特にアミノペプチダーゼの活性および基質特異性を比較検索した。

### 実験材料および方法

ラット骨格筋マイクロゾーム分画は、肝臓の細胞分画法に準じ、前回記載した方法<sup>4)</sup>で調製した。また、ニワトリ(正常および筋ジストロフィー症成鶏)胸筋マイクロゾーム分画もこれに準じて調製した。またこの場合、100,000×g、90分間遠心してマイクロゾーム分画を沈殿させた後の上清を上清分画とした。中性プロテアーゼ活性は熱変性カゼインを基質として、pH 8.0、25°Cで反応させ、トリクロル酢酸可

溶部分の $\alpha$ -アミノ基をフルオレッサミンにより蛍光測定する方法<sup>1)</sup>によった。アミノペプチダーゼ活性はL-ロイシン *p*-ニトロアニリドを主に用いてpH 7.0、37°Cで測定した。<sup>2)</sup>他の合成基質に対する感受性も同様な条件下で測定した。

### 実験結果

1. ラット骨格筋マイクロゾーム分画の膜結合中性プロテアーゼの各種プロテアーゼ阻害剤に対する感受性と基質特異性

ラット骨格筋マイクロゾーム分画をIMKC1で洗った標品より1%コール酸ナトリウムで可液化し、セファロースCL-6Bカラムに通して得た主分画(前報<sup>4)</sup>参照)について、カゼイン分解活性およびアミノペプチダーゼ活性に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の影響を比較検索し、表1に示した結果を得た。カゼイン分解活性は、前回の結果に加えて、フェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF) TLCK、TPCKがかなり顕著な阻害作用を示す点が注目され、活性発現にセリン残基およびSH基が関与することが支持される。エラストチナールはロイペプチンと同程度に若干の阻害作用を示したが、ジチオトレイトール(DTT)、小豆プロテアーゼインヒビターI、ヘパリン等は阻害効果を示さなかった。一方、アミノペプチダーゼ活性に対する阻害効果をみると、ジイソプロピルフルオロリン酸(DFP)、フェニルメタンスルホニルフルオリド、TLCK、TPCK等の阻害効果がカゼイン分解活性に対するよりも顕著に小さい点、*o*-フェナントリンにより強く阻害される点等が特徴的であり、カ

\* 京都大学霊長類研究所生化学研究部門

表1 ラット骨格筋ミクロゾームの膜結合中性プロテアーゼに対する各種プロテアーゼ阻害剤の影響

試 薬			残 存 活 性 (%)	
			カゼイン分解 活 性	アミノペプチ ダーゼ活性
DFP	10	mM	43	92
	1	mM	63	96
PMSF	10	mM	48	73
	1	mM	85	97
DTT	1	mM	102	78
TLCK	1	mM	65	105
TPCK	1	mM	42	96
pCMPS	1	mM	55	75
Chymostatin	200	μg/ml	48	*
	20	μg/ml	69	80
Pepstatin	200	μg/ml	102	103
Soybean trypsin inhibitor	200	μg/ml	100	103
Adzuki bean proteinase inhibitor I	20	μg/ml	92	100
Leupeptin	200	μg/ml	76	90
Elastatinal	200	μg/ml	74	101
Antipain	20	μg/ml	69	72
Bestatin	20	μg/ml	96	65
Heparin	200	μg/ml	101	107
EDTA	10	mM	61	68
	1	mM	65	54
EGTA	10	mM	53	53
	1	mM	60	61
CaCl <sub>2</sub>	5	mM	90	*
MgCl <sub>2</sub>	5	mM	94	101
o-Phenanthroline	1	mM	25	14
	0.1	mM	90	47

\*未測定

表2 ラット骨格筋マイクロゾームの膜結合中性プロテアーゼの尿素変性蛋白基質に対する作用

基 質	相 対 活 性
Histone	793
Protamine sulfate	181
Hemoglobin	175
Casein	100
Myosin B	37
Fibrinogen	25
$\gamma$ -Globulin	21
Bovine serum albumin	19
Ovalbumin	16
Myosin A	3

ゼイン分解活性でみた中性エンド型プロテアーゼとアミノペプチダーゼが異なった酵素であることが明らかである。

次に、若干の尿素変性蛋白基質に対する作用特異性を検索した結果を表2に示してある。ヒストンに最も強く作用し、次いでプロタミン、ヘモグロビン、カゼインの順序で作用しており、ミオシンBにはある程度作用するが、ミオシンAにはほとんど作用していない。これらの結果からみて、本中性プロテアーゼは主にトリプシン様の特異性を有するものと思われる。一方、合成基質に対するアミノペプチダーゼ活性を測定した結果を表3に示してある。Gly-Pro-メチルルクマリナムドに対する活性が非常に高いが、これはマイクロゾーム膜結合性のジペプチジルアミノペプチダーゼIVに主によるものであろう。他のいくつかのモノアミノ酸の2-ナフチルアミドにも作用することから、複数のアミノペプチダーゼが混在している可能性が大きい。

## 2. 正常および筋ジストロフィー症ニワトリ胸筋の中性プロテアーゼ活性の比較

ラット骨格筋マイクロゾームの場合と同様にして調製したマイクロゾーム分画をIMKClで洗った不溶性残渣（IMKCl処理マイクロゾーム）の量はラットの場合に比較してかなり少なかった。この試料につきカゼイン分解活性を測定すると、筋ジストロフィーの方が正常にくらべてタンパク質当り、および組織重量当りとも若干高い活性を示したが、その差は2倍以下であった。同様にして数種の合成基質に対するアミノペプチダーゼ活性を測定した結果を表4に示した。この結果から、まず正常筋についてラットマイクロゾームの場合と、各基質に対する相対活性が非常に異なっていることが分かる。これは種属差によるところが大きいと思われる。次に正常と筋ジストロフィーのニワトリ間では、タンパク重量当り、組織重量当りとも、筋ジストロフィーの方が活性が顕著に高くなっていること、また特にArg-2NAに

表3 ラット骨格筋ミクロゾームの膜結合中性プロテアーゼ標品中のアミノペプチダーゼ活性

基 質	比 活 性 (units/mg 蛋白質)
Gly-Pro-MCA	616
Ala-2NA	169
Leu-2NA	108
Arg-2NA	57
Gly-Phe-2NA	41
Cystine-di-2NA	13
Pro-2NA	12

MCA：メチルクマリンアミド  
2NA：2-ナフチルアミド

対する活性の上昇が顕著であることなどが分かる。比較のために、上清分画について同様な測定を行なった結果を表5に示した。この場合も正常ニワトリで、ミクロゾームと上清では各アミノペプチダーゼの相対活性が異なっているが、いずれの活性も筋ジストロフィーでは上昇している。なお、このほかカルシウム依存性プロテアーゼおよびカテプシンDについても筋ジストロフィーの場合に活性の上昇が認められた。

上清分画をセファロースCL-6Bカラム(1.7×150cm)に通して、Gly-Phe-2NA, Arg-2NA, およびLeu-p-ニトロアニリドに対するアミノペプチダーゼ活性およびカテプシンD活性を測定したところ、正常および筋ジストロフィーの場合とも、アミノペプチダーゼ活性は分子量約63,000の位置に、またカテプシンDは分子量約30,000~35,000の位置に単一のほぼ重なるピークとして溶出することが知られた。したがって、分子量が異なる分子種が筋ジストロフィー症の場合生じているよ

うなことは無いように思われる。一方、カルシウム依存性プロテアーゼ活性を測定したところ、正常では分子量約47,000の位置にピークがあらわれたが、筋ジストロフィーの場合には分子量約100,000の位置に主ピークがあり、分子量約47,000の位置に肩がみられ、みかけ上明らかな相違が溶出曲線にみられた。

#### 考 察

ラット骨格筋ミクロゾーム分画の中性プロテアーゼの性状と機能をさらに明らかにするためには、今後共存するプロテアーゼ類を相互に分離・精製し、均一なプロテアーゼ標品についてさらにくわしい性状の検索を行なわねばならない。また、筋組織を構成する各種蛋白質に対する作用特異性や、特に限定分解作用の有無等を注意深く測定する必要がある。また、さらにそれらの存在部位についても今後の検索が必要である。筋ジストロフィー症との関連では、

表4 正常および筋ジストロフィー症ニワトリ胸筋の1M KCl  
ーム分画のアミノペプチダーゼ活性

基 質	比活性 (nモル/hr/mg蛋白質)		
	正 常 (N)	筋ジストロフィー (D)	D/N <sup>*</sup>
Arg-2NA	67	527	7.9 (11.5)
Gly-Pro-MCA	16	66	4.1 (6.0)
Leu-2NA	153	490	3.2 (4.7)
Ala-2NA	125	391	3.1 (4.6)
Pro-2NA	21	43	2.0 (3.0)
Gly-Phe-2NA	83	116	1.4 (2.0)
Cystine-di-2NA	25	30	1.2 (1.7)

\* ( ) 内の値は組織重量当りの比活性のD/N値。

表5 正常および筋ジストロフィー症ニワトリ胸筋の上清分画のアミノペ  
プチダーゼ活性

基 質	比活性 (nモル/hr/mg蛋白質)		
	正 常 (N)	筋ジストロフィー (D)	D/N <sup>*</sup>
Gly-Pro-MCA	2	13	6.5 (2.5)
Pro-2NA	186	873	4.7 (1.8)
Gly-Phe-2NA	93	397	4.3 (1.7)
Ala-2NA	1220	4510	3.7 (1.4)
Arg-2NA	766	2730	3.6 (1.4)
Leu-2NA	560	2020	3.6 (1.4)
Cystine-di-2NA	30	77	2.6 (1.0)

\* ( ) 内の値は組織重量当りの比活性のD/N値。

今回は正常および筋ジストロフィー症ニワトリについて比較検索を試みたが、ミクロゾーム膜結合プロテアーゼについては、IMKCl 処理ミクロゾームの収量がラット骨格筋にくらべて相当に低いので、細胞分画そのものについてもニワトリで基礎的検討をある程度しておく必要があるように思われる。ラットとニワトリでは種属差がかなり大きいので、筋ジストロフィーマウス等についても同様な検索を行なうことが望ましいであろう。なお、今回のニワトリを用いた実験で、種々のプロテアーゼ活性が筋ジストロフィー症で上昇するという結果が得られたが、これは従来、マウス、ヒトなどで報告されている結果とも矛盾しない。筋ジストロフィー症では一般に各種プロテアーゼ活性の上昇により、筋蛋白質の分解が促進されると考えられるが、最初のひきがねになるような作用をどのプロテアーゼが演じているかについてはまだ不明の点が多く、膜構造の変化等の問題を考えると、膜結合性プロテアーゼについてもさらにくわしく検索を進める必要がある。なお、筋ジストロフィー症ニワトリのカルシウム依存性プロテアーゼのセファロースカラムでの溶出パターンが正常の場合と一見異なるという結果を得た。一方、ニワトリから精製されたカルシウム依存性プロテア

ーゼの分子量は約 80,000 と報告されており、<sup>5)</sup> 今回得られたゲルろ過の溶出パターンとみかけ上若干矛盾する点もあるが、これはおそらくカルシウム依存性プロテアーゼのインヒビターの共存の影響による可能性がある。正常と筋ジストロフィー症のニワトリ間で、この天然のインヒビター含量に相違があるか否かという点も含めて、今後慎重に検討する必要がある。

## 文 献

- 1) K. Sogawa, K. Takahashi: Evidence for the Presence of a Serine Proteinase(s) Associated with the Microsomal Membranes of Rat Liver, *J. Biochem.* 84: 763-770, 1978.
- 2) K. Sogawa, K. Takahashi: A New Neutral Proteinase of Monkey Liver Microsomes, Solubilization, Partial Purification, and Properties, *J. Biochem.* 86: 1313-1322, 1979.
- 3) 市原慶和, 十川和博, 高橋健治: ラット骨格筋ミクロゾーム分画の膜結合性中性プロテアーゼの性状, *生化学* 51, 649. (1979)
- 4) 高橋健治, 市原慶和, 十川和博: 筋中性蛋白分解酵素の生化学的研究, 筋ジストロフィー症の基礎的研究, (江橋班) 昭和54年度報告書, pp 154 - 158. (1979)
- 5) S. Ishiura, H. Murofushi, K. Suzuki, K. Imahori: Studies of a Calcium Activated Neutral Protease from chicken Muscle. I. Purification and Characterization, *J. Biochem.* 84: 225-230, 1978.

## 28 カルシウム依存性中性プロテアーゼ に対する $\text{Ca}^{2+}$ の役割

今 堀 和 友

$\text{Ca}^{2+}$  依存性中性プロテアーゼ (CANP) は、  
a) 筋肉のZバンドを特異的に消失させること、<sup>1)</sup>  
b) リソゾーム中ではなく、可溶性画分やZバンド  
等に存在すること<sup>2)</sup>などから筋タンパク質の崩壊の  
引き金を引く酵素ではないかと考えられている。我  
々は、筋ジストロフィー症に本酵素が何らかの関与  
をしているものと考えて以前より研究を行なってきた。<sup>3)</sup>

昨年度までの研究で、ニワトリならびに種々の哺乳類の骨格筋のCANPを精製し、その酵素学的な性質や分子量、サブユニット組成などを調べてきた。<sup>4)</sup> その結果、本酵素はチオールプロテアーゼでありながら活性発現に  $\text{Ca}^{2+}$  (もしくは  $\text{Sr}^{2+}$ ) を特異的に要求すること、しかも、それに必要な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は生理的な条件から大きくはなれて mM 程度の濃度が必要であることが明らかになってきた。現在、この点に関して多方面から多くの関心を集めているのが現状である。<sup>6)</sup> CANPの細胞内での機能・役割を考える上で、 $\text{Ca}^{2+}$  の役割を明らかにすることは重要であると考え、本年度我々はこの点についてさまざまな検討を行なった。

### 材料および方法

ウサギ骨格筋のCANPはヒト<sup>4)</sup>の酵素の精製法に準じた方法で精製した。プロテアーゼのタンパク量は吸光係数 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} (280\text{nm}) = 14.2$ ) を用いて求めた。酵素活性測定法は、アルカリ変性カゼインを基質とし、ニワトリ骨格筋のCANPのそれに

準じた。<sup>4)</sup>

CANPのヨード酢酸 (以下IAAと記す) によるカルボキシメチル化の概略を次に示す。0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のCANP溶液 (20 mM トリシュー塩酸緩衝液, 0.1 M 塩化ナトリウム, 5 mM メルカプトエタノール, 1 mM EDTA) に終濃度 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のIAA-Na (pH 7.0) を2時間おきに加え、30°C 5時間反応させた。その後、未反応のIAAを透析により除き、そのCANPが失活をしていることを確認した上で、それをCM-CANPとしてそれぞれの実験に供した。

セルロースアセテート膜 (6 × 6 cm) を用いた電気泳動は酢酸ナトリウム緩衝液を用い 80V/cm で20分間行なった。染色剤はボンソーSを用いた。

CDの測定は1 mm ~ 1.0 cmのセルを用い、日本分光のJ-40Aで測定した。ノイズレベルの大きい時は付属のデータ処理装置を用い積算をすることによりSN比の改善を行なった。CD測定後、活性の測定できる試料は失活していないことを確認した。用いた溶媒は、20 mM トリシュー塩酸緩衝液, 0.1 M 塩化ナトリウム, 0.1 mM ジチオスライトール, 0.1 mM EDTA, pH 7.5 である。

UV差スペクトルはユニオン技研のスペクトロメーターを用いて測定し、CDと同じ溶媒系を用いた。

### 実験結果

1. カルボキシメチル化CANP (以下CM-CANP) の特徴

CANPに活性発現に十分な濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を作用させると瞬時に自己消化をおこし、 $\text{Ca}^{2+}$  の役割を

表1 CANPとCM-CANPのSH基の存在様式

分 類	CANP			CM-CANP		
	-	80K	30K	-	80K	30K
IAAによりCM化されたSH基 <sup>1)</sup>	-	-	-	1.3	1.4	0
DTNBで滴定できるSH基						
クラスI <sup>2)</sup>	5.9	3.9	1.4	4.7	2.6	1.9
クラスII <sup>2)</sup>	1.1	0.7	0	1.0	0.6	0
クラスIII <sup>2)</sup>	1.8	2.3	0	2.1	1.9	0
合 計	8.8	6.9	1.4	9.1	6.5	1.9

1) <sup>14</sup>C-IAAの取り込まれる数から求めた

2) 本文参照

検討することが事実上不可能となる。しかし、過剰（モル比にして100倍以上）のE-64存在下では自己消化はほとんどおさえられる。この条件下でCANPはCa<sup>2+</sup>存在、非存在下で大きくその挙動を異にすることが、ディスク電気泳動（pH8.3）ならびにDEAE-セルロース（pH7.5）によるクロマトグラフで明らかになった。そして、この現象は（1）Ca<sup>2+</sup>（Sr<sup>2+</sup>）に特異的であること、（2）IAAでSH基を修飾し、失活させたCANP（CM-CANP）についても全く同様におこることが明らかとなった。種々の実験を行なうにあたって、IAAはさまざまな支障をもたらすことが考えられる。できればIAAは存在しない方が望ましい。そこで、CM-CANPを用いていくつかの検討を行なうこととした。その前にCM-CANPを用いることが妥当か否かの検討を行なった。CM-CANPと未修飾のCANPとを主にSH基の存在様式を調べ比較した結果を表1に示す。

ニワトリ骨格筋のCANPのSH基をDTNBで修飾すると三種類に分類できることは以前報告した。<sup>4)</sup>すなわち、容易に滴定できるグループ（クラスI）、Ca<sup>2+</sup>存在下で滴定可能となるグループ（クラスII）、変性させてはじめて滴定のできるグループ（クラス

III）である。ウサギ骨格筋のCANPについても同様であり、CM-CANPについてもほぼ同様であった。ただしクラスIのSH基一個がCM化されている点が異なっていた。このSH基が活性に強く関与しているものと考えられる。本酵素は分子量8万（80K）と3万（30K）のサブユニットよりなっていることは昨年報告した。80K、30K、それぞれを単離し、再構成系を用いて処理したそれぞれのサブユニットに関する結果もあわせて示した。

CM-CANPの場合でも、またCM-80Kの場合でもいずれもクラスIIのSH基が存在する。また表1の結果以外にも後で述べるように等電点、CDスペクトルなどで、CM-CANPと未修飾のCANPとの間に有意差は見られなかった。すなわち、CM-CANPはその触媒活性がおさえられているものの、以上調べた範囲では、未修飾のCANPとほとんど異ならないと考えられる。そこで、CM-CANPを用いて触媒活性に関する以外のCa<sup>2+</sup>の役割を調べてもさしつかえないと考えられ、以下の検討を行なった。

2. Ca<sup>2+</sup>による（CM-）CANPの構造変化  
2-1.等電点の変化：前項で述べたようにディスク電気泳動の移動度ならびにDEAE-セルロースの

Electrophoretic Mobilities of CANPs

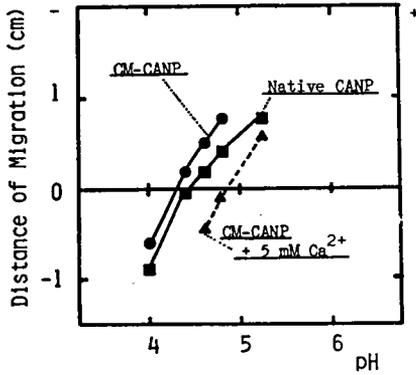


図 1

CD Spectra of CANPs with or without Ca<sup>2+</sup>

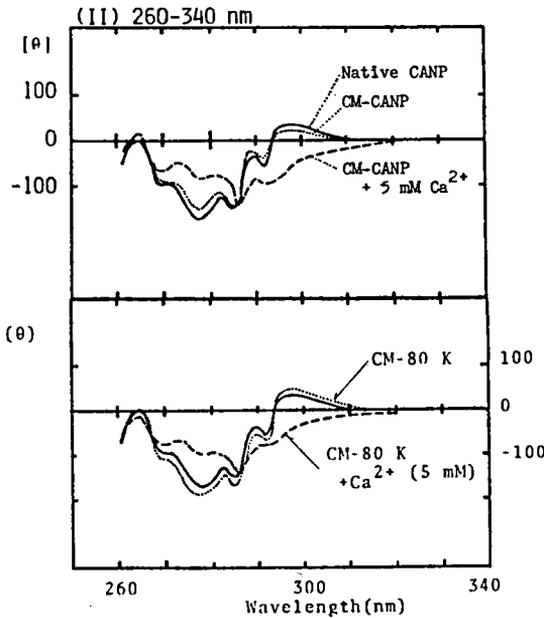


図 3

クロマトグラフがCa<sup>2+</sup>存在、非存在によって大きく異なることから、Ca<sup>2+</sup>存在下で酵素の等電点が変化することが予想される。事実、図1に示した如く、等電点の変化が認められた。各pHにおけるセルロースアセテート膜上での泳動距離から等電点を求めると、CANPとCM-CANPはほとんど同じ等電点を示すが、Ca<sup>2+</sup>存在下ではCM-CANP

CD Spectra of CANPs with or without Ca<sup>2+</sup>

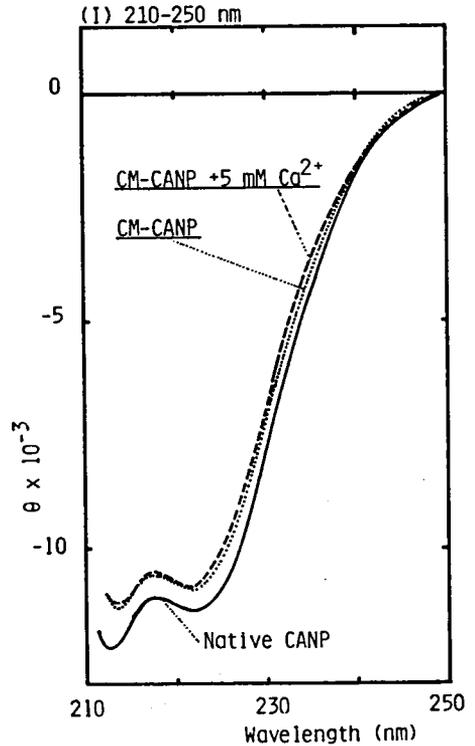


図 2

はおよそ0.5ほど等電点が動いていることが明らかとなった。

Ca<sup>2+</sup>が酵素分子上の負イオンを打ち消し見かけ上等電点を上げていることも考えられるが、表1にも示したようにCa<sup>2+</sup>存在下で新たに一つのSH基が修飾可能となることから、Ca<sup>2+</sup>がプロテアーゼに何らかの変化をおこさせ、その結果として等電点が変わったものとも考えられる。実際にどのような変化がもたらされるのか検討を行なった。その結果を以下に示す。

2-2.CDスペクトルの変化：二次構造の情報の得られる波長領域(200~250nm)では、CANPならびにCM-CANPいずれもほぼ同じCDスペクトルを与える(図2)。また、5mMのCa<sup>2+</sup>(活性発現に十分な濃度)存在下でも顕著な変化は見られなかった。すなわち、Ca<sup>2+</sup>によって二次構造が大きく変化することはないものと考えられる。また、Trp, Tyr, Phe, Cys-Cys残基の存在状態につ

いての情報が得られる波長領域 (250 ~ 340 nm) における各CANPのCDスペクトルを図3に示す。ここでもCANPならびにCM-CANPいずれもほぼ同じCDスペクトルを与える。一方、活性発現に十分な濃度のCa<sup>2+</sup>が存在するとCM-CANPのCDは大きく変化した。297nmの山は無くなり、270、278、292nmの谷の深さが変化した。TyrもしくはTyr残基の環境が変化したことを示し、Kd ≈ 1.2 mMの一段階の変化であることを図4は示している。そして、このCa<sup>2+</sup>依存性は同一条件下におけるCANPの活性のCa<sup>2+</sup>依存性とよく一致した(図4)。また、この変化のpH依存性を調べて見るとこれも活性のそれとよく一致した(図5)。以上の結果は、CD変化をもたらす構造変化は活性の発現と関連があることを示唆している。

2-3. UV差スペクトル: CDで見られたCa<sup>2+</sup>依存性の変化はUV差スペクトルでも確認でき(図6)活性のそれとよく対応していた。

2-4.30Kとの関連: 以上の実験事実から、Ca<sup>2+</sup>によりCANPは何らかの構造変化をおこすこと、そして、その変化は活性の発現に関与していることが考えられる。ところで昨年報告したように本酵素は80Kと30Kのサブユニットから成っている。図3に示したように、80K単独でもCa<sup>2+</sup>によるCD変化は見られ、また、表1に示したように一つ

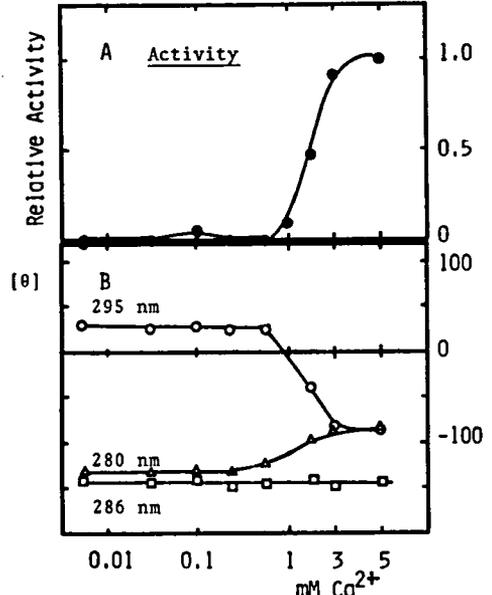


図4

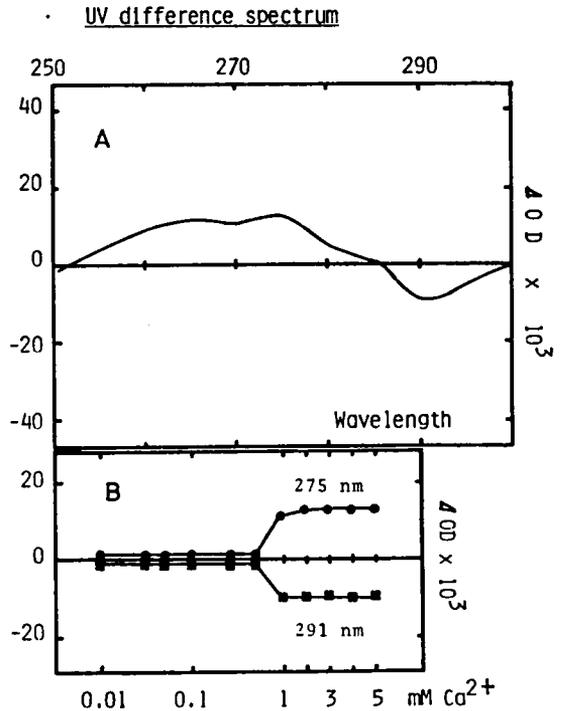


図6

のSH基が外へ露出してくることから、2-1~2-3で述べた結果は、80Kと30Kへの解離を反映しているのではなく、80K側の何らかの構造変化を示しているものと考えられる。

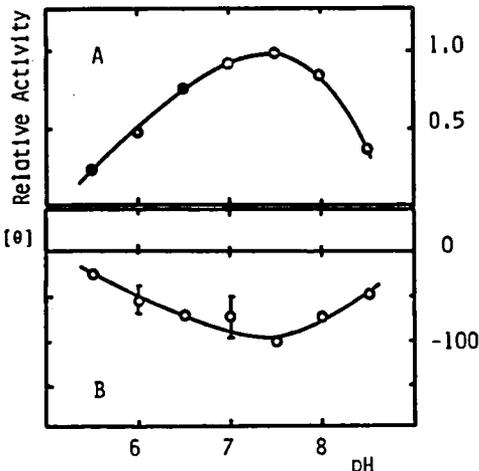


図5

以上の結果をまとめると、CANPは $\text{Ca}^{2+}$ と相互作用をすることにより、80K側に構造変化が生じ、その結果として、等電点、TyrかつまたはTrp残基ならびに一つのSH基の環境が変化し、その結果として活性を発現するようになるものと考えられる。

### 考 察

修飾した酵素を使っての解析は、酵素本来の性質ではなく修飾酵素にのみ見られるいわばアーティファクトを得る場合がある。我々の場合は以下の事実によりアーティファクトを観測しているのではないと考えている。

(1)未修飾のCANPでもE-64存在下で同じ結果が得られること、(2)未修飾のCANPとCM-CANPとの間に有意な差は、活性以外には何ら見出しえないこと、以上二点である。したがって、我々はCANPが本来的に持っている性質、すなわち、 $\text{Ca}^{2+}$ によって不活性型から活性型への構造変化がもたらされることを明らかにしたのと考えている。

ところで、この変換にはほぼ数mM程度の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が必要で細胞内で通常みられる $\text{Ca}^{2+}$ 濃度とは隔りがある。このためCANPが細胞内で作用するためには、CANPの構造変化をもたらすような何らかの未知の因子の存在が十分に考えられる。また

最近、低濃度 $\text{Ca}^{2+}$ により活性化される第二のCANPの存在が明らかとなり、<sup>7)</sup>このCANPとの関連をも含めて現在詳細に検討中である。

### 文 献

- 1) Dayton, W.R., Goll, D.E., Stromer, M.H., Reville, W.J., Zeece, M.G., & Robson, R.H.: Some properties of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated protease that may be involved in myofibrillar protein turnover. *Proteases and Biological Control* ed. by Reich, E., Rifkin, D.B., and Show, E., pp 551, Cold Spring Harbor Laboratory, 1975.
- 2) Ishiura, S., Sugita, H., Nonaka, I. & Imahori, K.: Calcium-activated neutral protease. Its localization in myofibril, especially at the Z-band. *J. Biochem* 87: 343, 1980.
- 3) 今堀和友: 筋肉の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性プロテアーゼ, 代謝, 16, 139. (1979)
- 4) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K., & Imahori, K.: Studies of a calcium activated neutral protease from chicken muscle. I. Purification and characterization *J. Biochem*, 84: 225, 1978.
- 5) Suzuki, K., Ishiura, S., Tsuji, S., Katamoto, T., Sugita, H., & Imahori, K.: Calcium activated neutral protease from human skeletal muscle. *FEBS Letters*, 104: 355, 1979.
- 6) Barrett, A.J.: Introduction: the classification of proteinases. *Protein degradation in health and disease. Ciba Foundation Symposium*. 75: pp. 1, 1980.
- 7) Mellgren, R.L.: Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Letters*. 109: 129, 1980.

## 29 筋蛋白質代謝回転に及ぼす蛋白質分解酵素阻害剤の影響

江 橋 節 郎\*

研究協力者 小 浜 一 弘\* 白 尾 智 明\*

三 谷 昌 平\*

低濃度 ( $1 \sim 5 \times 10^{-6} g/ml$ ) の蛋白質分解酵素阻害剤を生筋に細胞膜を介して投与した場合の効果を、蛋白質代謝回転を指標に検討した。

### 1) 総蛋白質分解速度に及ぼす影響

成熟雄ラットのひらめ筋を腱をつけたまま両足より遊離した。一方は 0.5mM シクロヘキシミドを含むリンゲル液 (3 ml) 中に、他方は  $2.5 \times 10^{-6} g/ml$  の蛋白質分解酵素阻害剤及び 0.5mM シクロヘキシミドを含むリンゲル液 (3 ml) 中に加え、95%酸素-5%炭酸ガスを通気しながら 38°C で振とう保温した (2 時間)。リンゲル液中に筋細胞よりもれ出るチロシン量を測定した。これは筋総蛋白質分解速度をあらわすと考えられている (1)。

表 1 に示されるごとく、E 6 4 C ( $2.5 \times 10^{-6} g/ml$ ) の存在下では、遊離されたチロシン量は有意 ( $P < 0.05$ ) に低下していた。即ち、E 6 4 C は細胞内での総蛋白質分解を抑制すると結論される。

E 6 4 C を含まない場合に遊離されるチロシン量に対するそれを含む場合に遊離されるチロシン量の比は、表 1 より 0.83 である。ペプスタチン ( $2.5 \times 10^{-6} g/ml$ )、ロイペプシン ( $2.5 \times 10^{-6} g/ml$ )、E 6 4 ( $2.5 \times 10^{-6} g/ml$ )、E 6 4 C ( $2.5 \times 10^{-7} g/ml$ ) 存在下の同様のチロシン量比はそれぞれ、0.76、1.16、0.90 及び 0.66 であった。E 6 4 C ( $2.5 \times 10^{-6} g/ml$ ) 以外のものについても、今後例数をふやして効果の有無を明らか

にしたい。

### 2) 筋構造蛋白質分解速度に及ぼす影響

ニワトリ胚胸筋より筋芽細胞を遊離し、同一細胞数を数多くの培養皿に播種した (2)。培養皿上筋細胞を十分に増殖させたのち (約 3 日後)、 $H^3$  ラベルのロイシンを筋細胞にとり込ませた。培養皿を二群に等分し、一方は、アイソトープを含まない培養液にて、他方はアイソトープを含まないが E 6 4 C を  $1 \times 10^{-6} g/ml$  含む培養液にてさらに 2 日間培養を継続した。培養皿ごとに筋細胞を収穫し 1 mM ジイソプロピール・フルオロフォスフェイト (DFP) を含む 0.1 MKCl 中にて細胞を破壊した。10,000 × g 10 分間の遠心をする、筋構造蛋白質は沈殿する。沈殿を 0.2 N NaOH に溶解し、液体シンチレーション・カウンターにより放射能を測定した。蛋白質の放射能総量の多いことは、それだけ筋細胞内で構造蛋白質の分解が抑制されていることを意味する。

表 2 に示されるごとく、構造蛋白質には E 6 4 C ( $1 \times 10^{-6} g/ml$ ) 存在下では非存在下よりも有意 ( $P < 0.01$ ) に多くの放射能が保持された。即ち、E 6 4 C は構造蛋白質の分解を抑制すると結論される。

### 3) アクチン及びミオシン H 鎖の分解速度に及ぼす影響

2) に示したプログラムで培養された筋細胞を収穫する際、培養皿ごとに個別に収穫するのではなく、E 6 4 C を含むものと含まないものとに大別して筋

\* 東京大学医学部薬理学教室

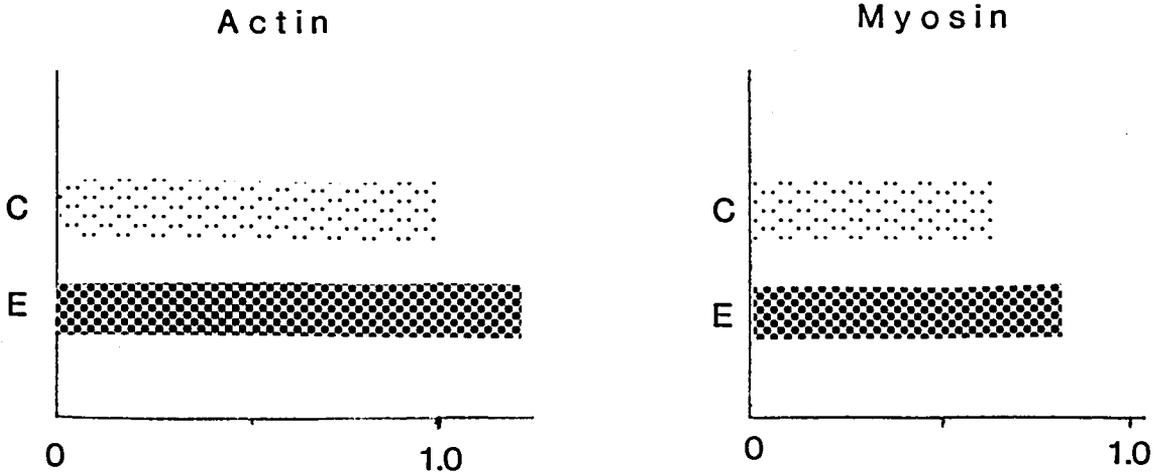


図1 アクチン及びミオシンH鎖の分解速度に及ぼすE64C ( $5 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ ) の影響  
表2の説明通りに $^3\text{H}$ ロイシンでパルス・チエーンされた培養筋細胞より、アクチン及びミオシンH鎖を遊離した。これら蛋白質に残在する比放射能(任意単位)を示す。

細胞をプールした。細胞をその重量の5倍量の1mM DFPを含むグバ・ストラウブ液にてアクト・ミオシンを抽出した。粗製アクト・ミオシンはグバ・ストラウブ液の9倍の冷水を加えることによって沈殿させた(3)。沈殿蛋白質をSDS存在下のポリアクリル・アミド・ゲル中に電気泳動し(4)、クマジー・ブリリアント・ブルー(CBB)にて染色した。アクチン(分子量43,000ダルトン)及びミオシンH鎖(分子量230,000ダルトン)のバンドをカミソリで切り出した。蛋白質量は蛋白質に結合しているCBBを25%ピリジンで抽出したのち比色により、そして放射能はポリアクリルアミド・ゲルを過酸化水素水にて溶解したのち液体シンチレーション・カウンターにより測定した。

図1は各蛋白質の比放射能を示す。アクチン及びミオシンH鎖の比放射能は、培養液にE64C ( $5 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ )が存在すると、存在しない場合に比較して高い。蛋白質分解酵素によるこれら蛋白質の筋細胞内での分解が抑制されていると考えられるが、今後例数を重ねて結論を下したい。

#### 謝 辞

表1に示したチロシン測定による筋総蛋白質分解速度の測定法を御教示下さった亀山恒夫先生(順天・医)、表2の要因分析をブロック・デザインにより計算して下さった佐久間昭先生(医歯大・難研)に感謝します。

B/V	C	E
1	252	103
2	388	292
3	195	199
4	203	180
5	188	184
6	447	362
7	230	214
8	221	246
9	283	117
10	209	228
11	168	166
12	112	103
13	170	156
列和	3066	2550

	C	E
実験 1	842	782
	838	869
	802	834
	773	843
	816	878
実験 2	773	971
	866	870
	918	875
	907	915
	837	930
実験 3	869	909
	797	955
	925	1040
	885	992
	933	
	1011	

要因	SS	f	V
V	16241	1	10241*
B	143677	12	—
B×V	17900	12	1492
BV	177818	25	—

$$F_{cal} = 10241/1492 = 6.86 > F_{12}^1 (0.05)$$

表 1 チロシン測定による総蛋白質量の分解速度に及ぼす E64C ( $2.5 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ ) の影響

表は行なったすべて実験データを集計したもので、筋単位重量 (mg) 当りリンゲル液中に放出されたチロシンの総量 (n moles) を示す。下表中 C 及び E は、それぞれ E 64C を含まないもの及びそれを  $2.5 \times 10^{-6} \text{g/ml}$  含むものを示す。B の列の数は実験回数を示す。下表は要因分析表を示す。計算 F 値 (F cal) は 6.86 で F 検定上 5% 水準で有意な薬効が認められた。

$$F_{cal} = 8.56 > F_{24}^1 (0.01)$$

表 2 構造蛋白質の分解速度に及ぼす E64C ( $1 \times 10^{-6} \text{g/ml}$ ) の影響

組織培養された構造蛋白質に  $\text{H}^3$ ロイシンをパルスした。チェース時に E64C の不存下 (E) と存在下 (C) の 2 群に分けた。表は行なったすべての実験データを示し、構造蛋白質全体中に残存する放射能 ( $10^3 \text{cpm/dish}$ ) を示す。くり返しのある 2 元配置でかつデータに欠損のある要因分析をブロック・デザインを用いて行なった (5) 計算された F 値 (F cal) は 8.56 で、F 検定上 1% 水準で有意な薬効が認められた。

#### 文 献

- 1) Fulks, R. M., Li, J. B. and Goldberg, A. L. *J. Biol. Chem.* 250: 292, 1975.
- 2) Kohama, K. and Ozawa, E. *Develop., Growth, and Differ.* 19: 139, 1977.
- 3) Kohama, K. and Holtzer, H.: *J. Biochem.* 89: 341, 1981.
- 4) Laemmli, U. K. *Nature* 227: 680, 1970.
- 5) 佐久間昭: 薬効評価 — 計画と分析 — I, 東京大学出版 (1977)

## 「筋ジストロフィー症の基礎的研究」班分担研究者一覧

氏名	所属	住所
班長 江橋 節郎	東京大学医学部薬理学教室	〒113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
幹事 今堀 和友	東京大学医学部生化学教室	113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
勝沼 信彦	徳島大学医学部酵素研究施設	770 徳島市蔵本町3-18-15 0886(31)3111
野々村 禎昭	東京大学医学部薬理学教室	113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
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2620 0423(41)2711
監事 米沢 猛	京都府立医科大学病理学教室	602 京都市上京区河原町通広小路上 る梶井町465 075(251)5320
班員 青柳 高明	微生物化学研究所	141 東京都品川区上大崎3-14-23 03(441)4173
石川 春律	東京大学医学部解剖学教室	113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
岩崎 祐三	国立武蔵療養所神経センター微細構造研究部	187 東京都小平市小川東町2620 0423(41)2711
遠藤 実	東北大学医学部薬理学教室	980 仙台市星陵町2-1 0222(74)1111
大塚 正徳	東京医科歯科大学医学部薬理学教室	113 東京都文京区湯島1-5-45 03(813)6111
大日方 昂	千葉大学理学部生物学教室	260 千葉市弥生町1-33 0472(51)1111
岡田 節人	京都大学理学部生物物理学教室	606 京都市左京区北白川 075(751)2111
岡田 善雄	大阪大学微生物病研究所	565 吹田市大字山田上 06(877)5121
香川 務	国立療養所刀根山病院	560 豊中市刀根山5-1-1 06(853)2001
加濃 正明	北里大学医学部生理学教室	228 相模原市北里1-15-1 0427(78)9158
栗山 熙	九州大学医学部薬理学教室	812 福岡市東区馬出3-1-1 092(641)1151
酒井 敏夫	東京慈恵会医科大学生理学教室	105 東京都港区西新橋3-25-8 03(433)1111
嶋田 裕	千葉大学医学部解剖学教室	280 千葉市亥鼻1-8-1 0472(22)7171
杉田 秀夫	東京大学医学部脳研神経内科	113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
高橋 健治	国立武蔵療養所神経センター疾病研究第一部 京都大学霊長類研究所生化学研究部門	187 東京都小平市小川東町2620 0423(41)2711 484 愛知県犬山市官林 0568(61)2891

氏名	所属	住所
班員 高橋国太郎	東京大学医学部脳研神経生物学教室	〒113 東京都文京区本郷7-3-1 03(812)2111
寺尾 寿夫	帝京大学医学部第一内科学教室	173 東京都板橋区加賀2-11-1 03(964)1211
戸塚 武	愛知県心身障害者コロニー, 発達障研	480-03 愛知県春日井市神屋町713-1 0568(88)0811
堀田 健	名古屋市立大医学部生理学教室	467 愛知県名古屋市瑞穂区川澄町1 052(851)5511
真崎 知生	筑波大学基礎医学系	300-31 茨城県新治郡桜村 0298(53)3061
松下 宏	和歌山県立医科大学生理学教室	640 和歌山市九番丁9 0734(31)2151
丸山 工作	千葉大学理学部生物学教室	280 千葉市弥生町1-33 0478(51)1111
公募班員 大槻 磐男	九州大学医学部臨床薬理学教室	812 福岡市東区馬出3-1-1 092(641)1151