厚　生　省

神経疾患研究委託費

筋の発生と分化に関する基礎的研究

江　橋　班

昭和56年度研究報告書

昭和57年3月

研究報告書の作成に当って

本年も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研究の報告書をお送りすることになりました。

過去3年間「筋ジストロフィー症の基礎的研究班」として多くの研究成果を挙げてきた班を発展的に解消し，新に二名の班員を加え「筋の発生と分化に関する基礎的研究班」として本年度より出発致しました。新しい班の名称には「筋ジストロフィー症の研究」という言葉は表面的には入っておりません。しかしこれは筋ジストロフィー症の研究の最も重要な方向の一つを便宜的に班の名称を用いたものにすぎません。筋ジストロフィー症の研究には一日の懈怠も許されません。従って班の名称は上記のようではありますが，我々の目的とするところはあくまでも筋ジストロフィーという難病を如何にして解決するかということであります。

我々はこの目的のために，これまで用いていた筋ジストロフィー症ニワトリのほかに同症ハムスターを導入し，本年は差当ってその基礎データを集めることを目的としました。そしてすでにいくらかの新しい結果を得ております。

本年度から出発する新しい班が組織されたのは56年の初夏のことでありますが，研究費の配分が可能になったのは12月に入ってからのことでありました。このような事情にもかゝわらず，12月初旬に開かれた班会議では，この報告書にみられるような高度の研究成果が発表されました。このことはいうまでもなく班員および研究協力者各位の筋ジストロフィー症解決に対する熱意と努力の賜物であります。

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。多忙な中を執筆下さいました班員各位に御礼申し上げます。また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，国立武蔵療養所，日本筋ジストロフィー協会の方々に御礼申し上げます。

昭和57年3月

班長　江　橋　節　郎

目　　次

I　特別レポート

1.　ジストロフィ・ハムスターに関する知見 …… 3
野々村　禎　昭

II　発生生物学・細胞培養

2.　哺乳動物の発生初期で起こる
細胞間のCompactionに関係する細胞表面分子 …… 11
岡　田　節　人

3.　バクテリオファージ入にパッケージした
遺伝子の培養細胞への挿入 …… 14
岡　田　善　雄

4.　家鶏ジストロフィー筋の培養法による研究 …… 16
米　沢　　猛

5.　筋ジストロフィー(dy/dy)マウス筋芽細胞の
分裂能低下の機作の研究 …… 19
香　川　　務

6.　トランスフェリンと筋細胞の成長 …… 26
小　沢　鋏二郎

III　Whole Animal

7.　ジストロフィー筋などの移植に関する研究
―　筋再生に及ぼす神経支配の影響 …… 33
寺　尾　寿　夫

8. ジストロフィーおよび正常チキンにおける
筋線維数の経時変化 …… 39
大 塚 正 徳

9. 筋ジスマウスの筋線維の成熟成長障害 …… 44
戸 塚 武

10. 三つの筋神経系異常マウスにおける
指標酵素の活性変動の比較 …… 49
松 下 宏

Ⅳ 生 理 学

11. L 6 筋芽細胞培養における
テトロドトキシン感受性活動電位の発達 …… 59
加 濃 正 明

12. 筋細胞膜における膜興奮機能の発生 …… 64
高 橋 國太郎

13. 両生類骨格筋の遅速両筋線維の比較 …… 69
遠 藤 實

Ⅴ アセチルコリンセプター

14. 眼瞼型重症筋無力症における抗—ＡＣｈＲ—抗体 …… 79
栗 山 熙

15. 培養筋細胞のAChレセプターの代謝安定性と神経細胞由来因子 …… 82
萩 原 彌四郎

16. 培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化 …… 86
杉 山 博 之

17. 発生初期におけるジストロフィー筋の
アセケルコリンレセプターの代謝速度 …… 91
堀田　健

Ⅵ 微 細 構 造

18. 鶏骨格筋の凍結割断像について …… 101
岩崎祐三

19. 細胞骨格の分化発達 ― 急速凍結エッチングレプリカ観察 …… 106
石川春律

Ⅶ 構造蛋白・その他

20. ミオシンH鎖及びL鎖isoformの発生過程における発現様式 …… 113
江橋節郎

21. ウサギ骨格筋トロポニン成分の局在 …… 124
大槻磐男

22. 再生筋における筋蛋白質の分化 …… 127
嶋田　裕

23. 骨格筋の発生・成長に伴うミオシンアイソザイム
及びC―タンパク質の分子種変異 …… 135
大日方　昂

24. ニワトリ胸筋の“Native High MW Protein” …… 141
丸山工作

25. ジフテリア毒素によるEF2の
ADPリボシル化を抑制する因子と筋発生におけるその変化 …… 144
真崎知生

26. 脱神経及び神経再生による支配筋の
分離筋小胞体膜のCa－uptake筋について …… 149
酒井敏夫

Ⅷ Proteinase

27. ニワトリ発生における筋組織プロテアーゼの動態 …… 157
高橋健治

28. 骨格筋のチオールプロテアーゼインヒビターの
諸性質と筋ジストロフィー症における活性変動 …… 162
勝沼信彦

29. 筋肉代謝網に対する酵素阻害物質の影響 …… 168
青柳高明

30. 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割 …… 173
今堀和友

31. Ca依存性プロテアーゼの生体内での作用 …… 178
杉田秀夫

I　特別レポート

1　ジストロフィ・ハムスターに関する知見　3

1　ジストロフィ・ハムスターに関する知見

野々村　禎　昭

ジストロフィ・ハムスターは 1962 年，Homburger らによってはじめて導入された。[1]
ジストロフィ実験動物としてはマウス，鶏に遅れて検討されたわけであるが，そのいくつかの特徴によって筋ジストロフィ実験動物としては秀れたものであり，我国においても今後もっと利用すべきものと考える。先ず簡単にこれ迄得られている知見をまとめておく。

遺伝型はもっとも単純な常染色体劣性型である。はじめは BIO 1.50 line としてとられたが，現在は BIO 14.6 line という系が広く用いられており，この系は白色化してあるので利別が容易である。ジストロフィ・マウス，鶏と較べて異常の発現が筋細胞に限局されるのが特徴であり，骨格筋だけでなく心筋にも障碍が発現する。

筋障碍の発現は緩徐であり，心筋障碍に対する代償として心肥大が生後100日位よりはじまり，心不全をおこして死に到るが180日位から死亡するものが出，一年位の経過でほゞ全て死亡する。この間血中 CPK 値は生後30日目頃より上昇しはじめ70～80日頃ピークに達し以後少し減少したまま或る高値を維持する。他の初期診断法としては筋肉の生検法，水浴運動法などがあるが容易ではない。最近，舌の下側部に 1 ～ 5 ㎜の白斑の出現が舌筋障碍の可視化であり，心筋障碍の発現と平行化するといわれている。[2]

心筋障碍に関して Bhan らは[3]ミオシン軽鎖－2に特異的な蛋白分解酵素がジストロフィ・ハムスターの心筋では増加していることを報告しその精製を行った。心筋障碍が進行し，壊死部分が広がっていくと共に心筋ミトコンドリア中のカルシウムイオン含量が増加していく。[4]

本研究においてはジストロフィ・ハムスターの主として骨格筋の各種を経時的に光顕レベル及び電顕レベルで観察し組織的変化を概観することを試みた。

材料と方法　材料として BIO 14.6 ジストロフィ・ハムスター雄を用いた。各種筋を腱付きでとりだし，歯科用ワックス上に生体長迄伸展して固定し，4％グルタールアルデヒド，0.135 Mカコジル酸緩衝液で1時間前固定し，緩衝液で洗い標本をはずし，細切する。1％オスミック酸・カコジル緩衝液で45分後固定後，水洗，1％酢酸ウランでブロック染色後アルコール・アセトン脱水しエポンに包埋した。標本は厚切してトルイジンブルー染色し光顕下で観察し，薄切したものは鉛染色して電顕下で観察した。心臓は動脈切断後そのまゝグルタールアルデヒド固定し，30分後心房，心室にわけ，細切してさらに30分固定し，以下他骨格筋と同様に処理した。骨格筋の障碍程度を測るのは主として横断切片光顕観察をもちい，縦断切片のものもこれに加えた。

骨格筋組織障碍度の判定は光顕下観察でHomburger ら[5]に従い，光顕で不確かなところは連続切片の電顕観察で確認した。判定は次の様になる。

正常(+)　異常全くなし

疑異常(±)　縦断 100細胞中 4 以下核列状配列，又は横断 100細胞中 4 以下の中心核，筋紡錘，核周辺空孔数の増加

軽度異常(+)上記同様の変化及び 100細胞中 4 以上

＊東京大学医学部第二薬理

の核列状配列と中心核

中程度異常(卄)　長い核列状配列と100横断細胞中8以上の中心核
空胞化を伴った核の細胞外突出

高度異常(卌)　多数の中心核，pyknosis やfragmentation，hyperchromatosis 等の核異常

極度異常(卍)　壊死細胞出現，再生細胞の出現，マクロフアージの浸出，間質組織の増殖

一応この判断規準に従って，77日，97日，110日各時期の各種骨格筋を判定した。同時に心筋も心房筋，心室筋にわけて骨格筋同様固定包埋し切片をつくって観察した。77日の数種の筋をホモジェナイズして，微量二次元電気泳動にかけ，主として酸性蛋白質側についてコントロールとジストロフィーの収縮蛋白質パターンについて検討した。

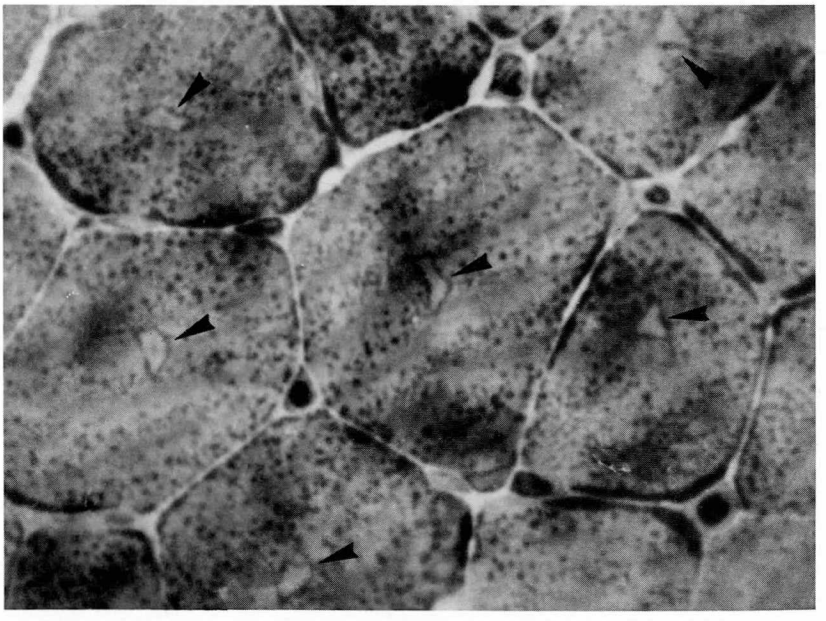
結果と考察　各時期にわたって心房筋には著しい変化は認められなかった。心室筋は全く正常の場所もあった。この様に比較的正常な場所でのIntercalated-Diskについても特に間隙が広くなっているようなことはなかった。独立したブロックの約半数の心室筋では異常が認められた。これらの場所ではポリゾームが増加していた。細胞内間隙がみられ，異常の強いところでは空胞変性が認められた。この様な場所では，Intercalated-Disk間隙が広がっていたが，これは細胞変性の結果のように思われた。

骨格筋としては上肢筋，肩筋，腹直筋，横隔膜各種下肢筋と，食道横紋筋の12種の筋を調べた。最終結果は表1に示すが，全ての筋が少くとも77日以降においては異常像を示していた。

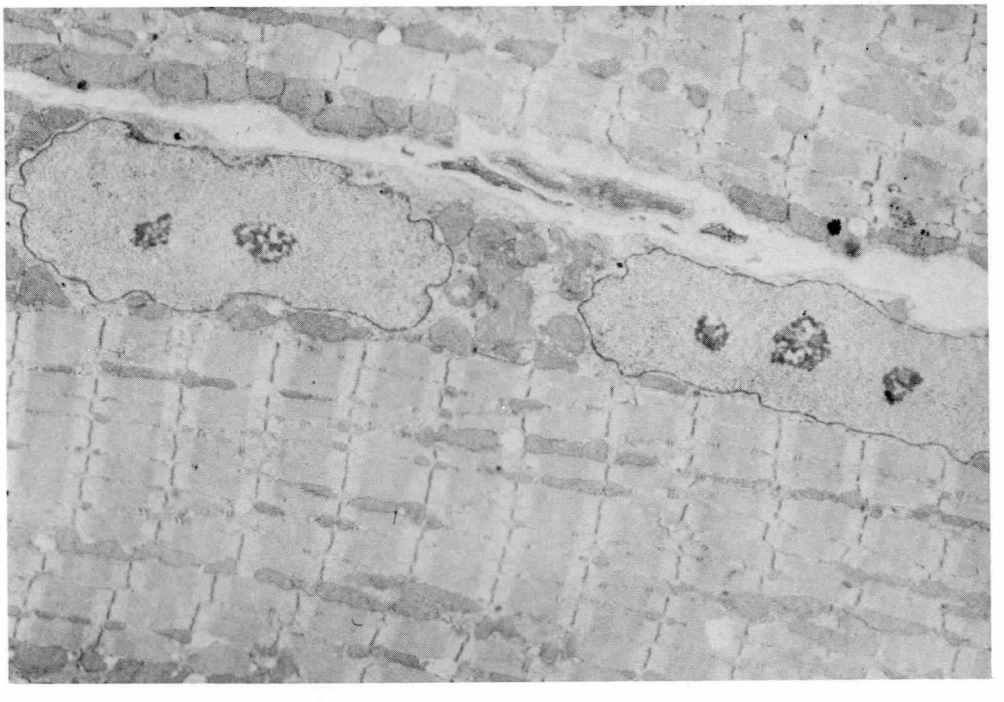
中心核は異常の判定にもっとも容易である（第1図）。再生細胞に中心核が認められることから，中心核の存在を再生現象を考えるグループもあるが，少くともジストロフィーハムスターにおいては再生とは全く関係なく生来このような状態に筋細胞があったと思われる。理由は全ての組織に中心核をもった細胞が認められ，肩筋や背筋の様に異常度の高い組織では全ての細胞が中心核をもっている。これを再生とすると全て再生細胞ということになってしまう。一方一部中心核がある細胞組織でも，いわゆる幼若，未熟型の再生細胞が共存しているような像はほとんどなく，真の再生像の中に中心核があるようなパターンが認められていない。以上の様な理由でジストロフイハムスター骨格筋に認められる中心核は特徴的な変化で本来発達途上で周辺核となるべき機構が失われて中心核のまゝ細胞が成長してしまったと考えられる。本来の骨格筋でない食道横紋筋にも異常が認められた。この細胞は直径が小さいので横断像では中心核を決めるのが難しいと考えられるが，実際は周辺核とはかなり異なっているので比較的容易に判定出来る。食道横紋筋は下端附近迄存在しているが，異常は中心核だけでなく壊死細胞を含んでいるものまであり，又縦断像では第2図にみるように仮りに核が周辺にあっても列状配列をしているので容易に異常といえる。この列状配列は長く続くことが多いので，横断像で正常の周辺核の出現頻度に較べて圧倒的に中心核の出現が多くみえる理由である。第2図にみられるような核小体の多数が認められることが多い。核の異常としては核周辺空孔があるが，Homburger はこれを(土)より入れているが，むしろ(卄)以上の異常度の高いものに多い。

中心核の他はほとんど正常の細胞が多い。しかし電顕観察によってポリゾームが正常に較べて多数存在することがわかる。さらに膜結合型リボゾーム又は粗面小胞体も存在することもわかる。これは正常筋では生後70日以降ではほとんど認められないものである。筋紡錘が多出するといわれているが，確かに比較的頻ぱんに筋紡錘を認めることが出来た。

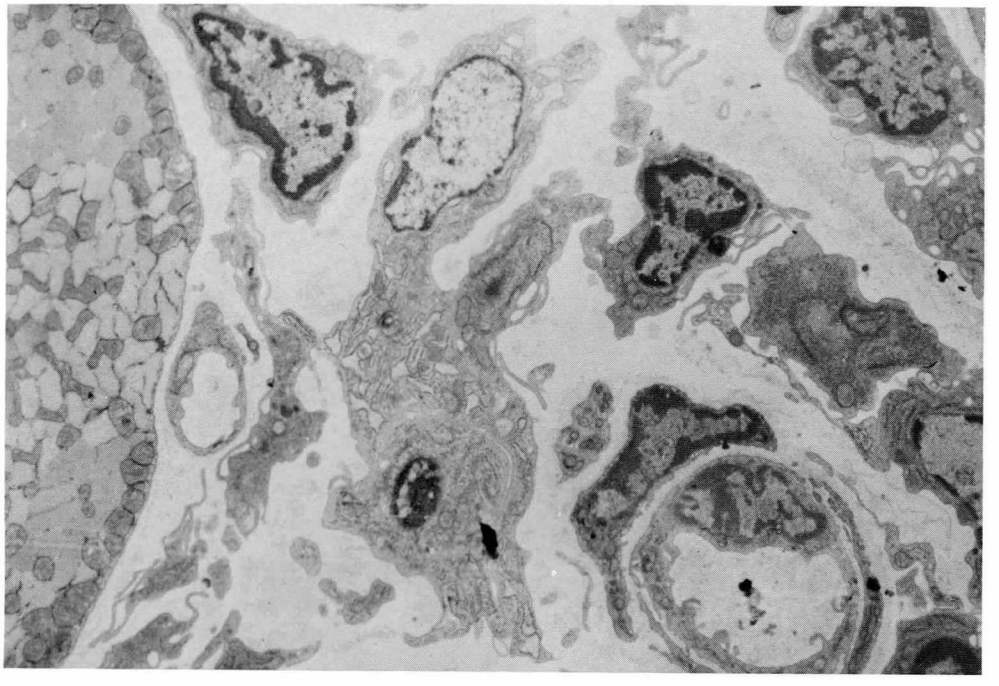
壊死を生じている細胞の現われ方に3種類認められた。ひとつは比較的異常の少い細胞群の中に突然壊死細胞が出現しているような型で，この時は空胞変性的なものが多い。他は異常度の高い細胞群の中に生じるもので，筋線維走行の乱れの著しいものであるが，縦断像でこの経過をたどって



第1図　中心核を示す。骨格筋横断光顕像ジストロフィ・ハムスター肩筋の横断切片をトルイジンブルー染色したもの。矢印は中心核を示している。ほとんど全ての細胞が中心核を示していることに注意。



第2図　核列状配列を示す。骨格筋縦断電顕像ジストロフィ・ハムスター横隔膜の縦断超薄切片を鉛染色したもの。核が列状配列しているところを示している。核内には核小体が示されている。筋原線維は全く正常像を示している。



第3図　広範な組織透明化変性を示した異常部と正常部境界の電顕像。
左端に筋細胞横断像（正常部境界）が示され，他は透明化変性をおこした部分で主として間質細胞，線維芽細胞から成る。小血管，コラーゲンも含まれている。

みると，空胞の出現，やがて異常収縮，超収縮，ついに筋線維の乱れと移り変っていく。周辺の細胞も中心核，一断面2，3核の存在，核周辺空孔も多くみられる。第3のものは可視的にも生後90日以降のものに認められるもので，筋組織の一部が透明化，白蠟化している。この様な部分の正常部との境界を固定したものが第3図に示される。この図の左はしにみえる筋細胞は正常部の境界で以下左側には中心核は存在するが一見正常な筋細胞群が続く。透明化した部分は実は第3図にみられるような線維芽細胞又は間質細胞群であり，この処々に僅かに筋細胞が残っている。この筋細胞は肥大，空胞変性をおこしているものもあるが，中心核の点を除いては一見正常のものもある。このような変化がどのような機序で生じたかは全く不明である。浸潤のように徐々に筋細胞が変性し線維芽細胞におきかわっていったのが，はじめからこのような組織であったのか，現在のところ確かめる方法はない。

第一表から一般に上肢筋は比較的軽い異常，肩背筋は強度，横隔膜もやゝ強度，下肢筋は中等度の変化といえるかもしれないが，もう少し例数をみるべきであろう。経時的変化もこの例では少なすぎるが，傾向としては生後77日ではすでにかなりな障碍度に達しており，以後日を追って異常度は増すというよりすでにピークに達して横ばい気味というべきであろう。

77日目の心室筋，心房筋，下肢筋（M. soleus M. extensor digitorum longus）について正常及びジストロフィー筋の各々一部をとりホモジェナイズして二次元電気泳動で観察した。主として酸性側蛋白質（アクチン，トロポミオシン，ミオシン軽鎖1, 2, 3及びトロポニンC）について正常とジストロフィーについて比較検討したが，ほとんど差を見出せなかった。Bhan らがいうような心室筋ミオシン軽鎖1の分解などは全く生じて

いなかった。すなわち正常に対してジストロフィー筋での収縮蛋白相対量の減少はなかったし，新らしい蛋白の出現等も見出せなかった。

このようにジストロフィーハムスターでは骨格筋の全てに中心核を主とした異常が出現する。しかし筋自体としては目立った変化は少く，筋蛋白レベルで異常を見出すことは出来ない。変性も一部で生じるが，生後100日以後著しく増加するわけではない。むしろ安定した状態が異常をもったまゝ長く続くといって良いであろう。ジストロフィーモデル動物として安定して異変が筋に限局されるという意味では使い易いが，変化を何を規準にするかという意味では良い指標を求める基礎的研究をつみ重さねる必要がある。

第1表　各種骨格筋の異常

	77d	97d	110d	130d
上肢筋				
M. extensor digitorum communis			±	
M. extensor carpi radialis brevis				++
肩　筋				
M. omotransversarius		+++*	+++*	
M. omobrachialis				+++
背　筋				
M. lumbodorsal aponeurosis				+++*
腹　筋				
M. external abdominal oblique			+	
食道筋				
M. esophagus		+*	+	
横隔膜				
M. diaphragma		+++	++*	
下肢筋				
M. semitendinosus		++	+	
M. soleus	++			
M. extensor digitorum lougus	+++			
M. sartorius	++			++

*は変性細胞の出現を示す。

文　献

1) Homburger, F. et al., (1962) *Med. Exp.* 6, 339.
2) Handler, A.H. et al., (1975) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 573.
3) Bhan, A. et al., (1978) *J. Mol. Cell. Card.* 10, 769.
4) Strobeck, E. et al., (1979) *Ann. N.Y. Acad Sci.* 317, 59.
5) Bajusz, E. et al., (1966) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 138, 213.

Ⅱ　発生生物・細胞培養

2　哺乳動物の発生初期で起こる
細胞間のCompactionに関係する細胞表面分子　11

3　バクテリオファージ入にパッケージした遺伝子の培養細胞への挿入　14

4　家鶏ジストロフィー筋の培養法による研究　16

5　筋ジストロフィー（dy/dy）マウス筋芽細胞の分裂能低下の機作の研究　19

6　トランスフェリンと筋細胞の成長　26

2　哺乳動物り発生初期で起こる細胞間のCompactinに関係する細胞表面分子

岡　田　節　人
研究協力者　小　合　宗　一　　吉　田　知加子

1. はじめに

多くの哺乳動物胚では受精卵が3～4回の分裂を繰返した後に，Compactin と呼ぶ現象が起こる。これは，それまでは割球は殆んど球形であってお互いの接着面がごく僅かであったのが，急に割球間の接着面が広がって胚全体の形状にも著しい変化の起こるような現象をいうのである。胚の発生において細胞間の相互の関係が生じ，多細胞体制としての組織と呼ぶ系が最初に確立するのは，このcompactinによってであると考えてよい根拠がある。従って，この現象は初期発生における極めて重要なイベントとして最近強く注目されているのである。compactinは個々の細胞の変形によって起こる現象であるから，これが個体発生でみられる最初の細胞収縮の現象であろう，という見地からの研究も少なからず行なわれつゝある。われわれは，この現象に直接機能する細胞表面分子の存在することを見出し，かつそのような分子の同定に成功したので，それらの結果について報告する。

2. マウス奇形がん腫細胞における細胞間接着分子

多細胞動物において細胞間の接着が，その機能がCa の存在に依存するかどうかによって判然と区別される，2つの異なったクラスの細胞表面基の存在によっていることは，1977年以来われわれの一連の研究によって明らかにされてきた。[1) 2)] この〝細胞接着の2元仮説〟は現在では一般的に受け入れられている。

マウス初期胚を生化学的に研究する材料として129系マウスに生ずる奇形がん腫細胞をモデル的に利用すると多くの便があるので，まずこの腫瘍細胞について細胞接着の機構を調べた。[3)]その結果，奇形がん腫細胞の表面にも2つの異なったクラスの細胞接着基が存在し，特にそのうち Ca に依存して機能するクラスのもの（Calcium－dependeut site，CDSと略記する）が多くある。とりわけ，分化能力を欠いたF9株[4)]には多量のCDSが存在しているので，この細胞を抗原として得た抗血清を吸収して，CDS に対する抗体を得ることができた。

この抗体を利用してCDS 分子を電気泳動ゲル上で同定することが可能である。その結果，CDSは細胞表面に存在する分子量140Kの蛋白質であることが判った。[4)]しかし，このF9細胞を抗原として得られた抗CDSは，もろもろの繊維芽細胞の細胞株とは交叉反応しない。後者の細胞にも，もちろんCDS分子は存在しているがこれらは分子量150Kのもの別の蛋白質である。

従って細胞接着という同じ機能をもったCDSと呼ぶクラスの分子は一種類でなく，分子的に多様性がある。以下では奇形がん腫細胞のものをt－CDS，繊維芽細胞のものをf－CDSと呼んで区別することとする。

＊京都大学理学部生物物理学教室

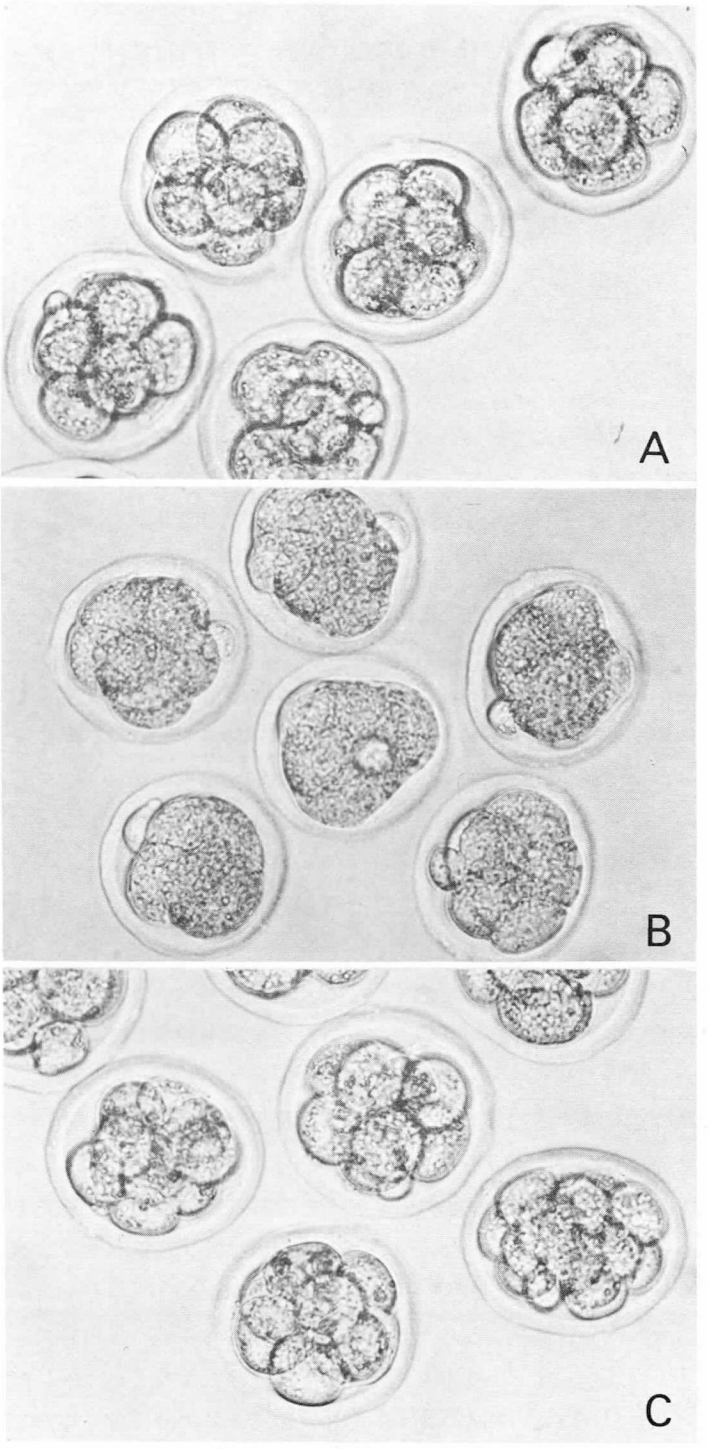


図1　(A)　Compactin直前の8細胞期のマウス　。
(B)　やがてCompactinが起こる。
(C)　Compactinを起こした胚を抗t-CDSのFabで処理するとde-compactinが起こる。

3. マウス初期胚のＣＤＳ分子

それではマウス初期胚にもＣＤＳは存在するのだろうか？　存在するとすればｔ－ＣＤＳであろうか，ｆ－ＣＤＳであろうか？　この問題に答えるため，抗ｔ－ＣＤＳのFabフラグメントの初期胚細胞の集合阻止活性の有無を調べた。すると，このような抗体のFabは集合阻止の働らきがあるが，その活性はｆ－ＣＤＳをもっている細胞で吸収しても除去されない。しかし，奇形がん腫細胞で吸収すると非活性となる。従って，マウス初期胚にはＣＤＳ分子は存在し，それはｔ－ＣＤＳであって奇形がん腫細胞と共通のものであることが明らかとなった。なお，ｔ－ＣＤＳは分割前から胚盤胞の時期までにその存在が確認された。[5]

4. CompactinとＣＤＳの機能

マウス初期発生において細胞接着に関係した重要な現象はcompactinである。この現象にＣＤＳが機能しているかどうかを知るために，８細胞期の胚（図１Ａ）がcompactinを起こした直後（図１Ｂ）に，抗ｔ－ＣＤＳのFabを含む培地においた。すると，compaction の状態は維持されず各割球間の接着は再びルーズなものとなって，de－compactinが起こるのである。抗ｔ－CDSのFabのもつこのような効果は可逆的であって，de－compactinを起こした胚を正常培地に戻すと再びcompactinが見られる。

抗ｔ－ＣＤＳのde－compactinを起こさせる効果は，奇形がん腫細胞で吸収すれば非活性となるが繊維芽細胞で吸収しても全く低下しない。従って，compactinにはｔ－ＣＤＳ分子が特異的に機能していると結論される。

すでに述べたように，ｔ－ＣＤＳは未分割卵から存在している。compactinが３回の分裂後で初めて起こる原因は，この時期でｔ－ＣＤＳの合成がさかんになるのか，或は多量のｔ－ＣＤＳが割球の表面に露出するのかによると想像される。

5. ま と め

マウス初期胚には奇形がん腫細胞とは共通であるが，分化した体細胞とは別の分子量140Ｋの細胞接着分子が存在する。この分子が細胞の変形によって起こるcompactinに機能していることが，抗体Fabを用いた実験から明らかにされた。

文　　献

1) Takeichi, M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell Biol.*, 75, 464-474.
2) Takeichi, M., Ozaki, H.S., Tokunaga, K., and Okada, T.S. (1979). Experimental manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms. *Develop. Biol.*, 70, 195-205.
3) Takeichi, M., Atsumi, T., Yoshida, C., Uno, K., and Okada, T.S. (1981). Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca-dependent sites. *Develop. Biol.*, 87, 340-350.
4) Yoshida, C. and Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: Identification of a cell surface protein involved in calcium dependent cell aggregation. *Cell* (in press).
5) Ogou, S.-H., Okada, T.S., and Takeichi, M. (Cleavage stage mouse embryos share a common cell adhesion system with teratocarcinoma cells. *Develop. Biol.* (in press).

3　バイテリオファージ入にパッケージした遺伝子の培養細胞への挿入

岡田善雄*
研究協力者　内田　　驍*　石浦正寛**

1. はじめに

遺伝病細胞を用いた遺伝子解析の研究は，遺伝病そのものを理解する上からも，ヒト遺伝子そのものを理解する上からも今後必須の道である事は論をまたない。その作業としては，遺伝病細胞の機能失調を回復させ得る遺伝子をヒト遺伝子バンクから選別するのが第1のステップとなる。然し1/100万の確率しかない困難な作業で，これを成功さすためには遺伝子の細胞内注入，及び遺伝子発現の頻度をできるだけ上げる技術開発が必要である。現在までの方法としては，DNA断片を直接リン酸カルシウムでゲル化して細胞に添加する方法が一般的で，その他SV40に遺伝子を組込ませたのち細胞に感染させる方法も開発されている。然し効率その他の面で遺伝病細胞に利用するには不満である。また細胞核に，微小ガラス管を用いて，直接DNAを注入する方法もあるが，これは1回に高々1,000ケの細胞が処理できるぐらいのもので，1/100万の頻度の遺伝子選別に利用できる一般方法とはなり得ない。

私共はヘルペスウイスのチミジンキナーゼ構造遺伝子（HSV−1 tk gene）をマーカー遺伝子とし，マウスL tk^- 細胞を用いて遺伝子挿入頻度を上昇させる方法を種々検討しているが，その中の1つが有効な頻度上昇を示すものとなったのでこゝに報告する。

*大阪大学・微研
**国立基礎生物学研究所

2. 方　　法

HSV−1tk遺伝子（2kb）を組込んだpBR322プラスミドをEco R1で限定分解し，Charon 4AのアームにT4−DNA ligaseで連結したのち，入ファージ粒子内にパッケージした。この組換えファージを大量に採取し実験に供した。

ファージは250mM $CaCl_2$を含むpH 7.9のバッファーに浮液させ，等量の1.5mM Na_2HPO_4を含むpH 6.87のバッファーと混合し，25°C 10分置いてゲル化した。このリン酸カルシウムゲル1mlをL tk^- 細胞の単層培養（P10シャーレ）に加え37°24時間して洗い新らしい培地を加えて更らに37°で40時間培養した。その後 tk^+ 細胞を選別するためのHAT培地に代え，10日培養で現われる細胞のコロニー数を計測し，tk遺伝子の細胞内発現頻度とした。

3. 結　　果

ファージに遺伝子をパッケージした形のまゝで，リン酸カルシウムゲル法を用いて，極めて高い遺伝子挿入，発現頻度の得られることがわかった。即ち

/transformant/10^5 phage/10^6 Ltk^- cells

の頻度が得られ，ファージ数の増加に比例して発現細胞数は直線的に増加し5×10^7 phageまでその傾向は続いた。これは今迄の方法に比べて10〜100倍の高頻度であることを示すもので，ヒト遺伝子バンクから特定の遺伝子を選別するのに有効な頻度の少くとも下限に入るものであ

る。

この方法での頻度上昇に関係する大きな因子がリン酸カルシウムゲルを作るときのpHと放置時間である事も判明した。ゲルが大粒子になると効率は極端に落ち，できるだけ微粒子で，しかも充分の沈澱の得られる事が必要条件のようで，ゲル化のために加えるバッファのpHが6.87が最適で，放置時間は25℃7分～20分が適当と結論された。

4. おわりに

現在までヒト遺伝子の切り出しは主に特殊に分化した組織細胞からのmRNAをスタート材料とし，cDNAを経て成功したものであるが，この方法は特別なもの以外，一般化できる方法ではない。遺伝病の機能欠損を利用して，ヒト遺伝子バンクからの選別の道こそがより自由度の高いものである事は論をまたない。そのための1つの新しい技術として入ファージにパッケージしたヒト遺伝子バンクを利用して，遺伝子注入発現を可能にする具体的方法が開発されたと考えられる。

5. 発　　表

Phage particle-mediated gene transfer into cultured mammalian cells.

Mol. cellular Biology

投　稿　中

4　家鶏ジストロフィー筋の培養法による研究

米沢　　猛

著者等は培養法により家鶏ジストロフィー筋の研究を行って来たが，今回その微細構造の検索や，ペルオキシダーゼ法を用いた筋内空胞と外部との交通性などの結果をも併せてジストロフィー病変の成立について検討を加えた。

〔実験方法〕

ジストロフィー家鶏（Califolnia Davis413）及び対照の健康鶏（同412）の9－11日鶏胚より脊髄及び浅胸筋を取り出し次の如きグループに分けて脊髄及び筋の同時培養を行った。

A：健康動物脊髄及び健康筋

B：健康動物脊髄及びジス筋

C：筋ジス動物脊髄及びジス筋

D：筋ジス動物脊髄及び健康筋

E：健康筋

F：ジス筋

培養には径22㎜円形のカバーグラスにラット尾より抽出したコラジェンを塗布し，ゲル化せしめたものの上に上述の脊髄と筋とを約1㎜の間隔をもつように植えつけた。培養はMaximow の二重カバーグラス法により，培養液は

Gey氏塩類溶液	9
Eagle 氏 MEM	9
馬血清	9
鶏胚抽出液	9
10％ブドー糖	2

のものを用い，毎3日に培養を塩類溶液で洗滌後，新しい培養液を加えた。

微細構造の検索には塩類溶液で洗滌（5分間）後，2.5％グルタールアルデハイド溶液（pH7.4）塩類溶液で洗滌（30分），1％オスミウム固定（pH 7.4，30分）脱水後，ヴェストパールに包埋した。これらはカバーグラスに附着した培養をカバーグラスのまま処理し，包埋剤を固めた後，－80℃フリーザー内にてカバーグラスをはずす方法をとった。

また培養経過の種々の時期に0.25／㎖ペルオキシダーゼ溶液を培養に加え，約3時間後ＢＳＳにて洗滌，2.5％グルタール溶液にて固定，更にＢＳＳにて一昼夜洗滌し，0.2％ H_2O_2 存在下にて発色せしめた。

〔実験結果〕

(1)　筋組織を単独で培養した場合，対照筋，ジス筋ともに12時間後には双極性の筋原細胞が遊出し，活発な分裂増殖を示した。2日目頃よりこれらの細胞の融合による筋管形成が始まり，2－3日のうちに急速な伸長を示した。融合直後の筋管は胞体が乏しく，横径は不均一で核は中心位をとっている。その後4－5日目には胞体が増大し，内部に縦走する筋原線維を認めるようになり，自発性収縮が始まる。そして横径は次第に均一化し，横紋が形成され，次いで核は次第に筋膜直下へと移動する。この発育過程は培養開始後10～14日で完了するが，時間的経過は対照とジス筋との間に殆んど差は認められなかった。

(2)　脊髄を加えて培養を行った場合，筋組織片よりの筋原細胞の遊出と，その融合開始までの時間的経過は筋単独培養の場合と同様である。一方脊髄片から，植え付け12時間頃よりグリア細

＊京都府立医科大学病理学教室

胞及びシュワン細胞の増生とともに運動神経軸索の延長が認められる。この軸索は当初裸のままのこともあるが，次第にシュワン細胞が髄伴してくる。いずれにせよ運動神経軸索は，培養開始後2日目には筋管細胞との接触を示し，その後間もなく，筋管の周期性収縮が開始される。そして筋胞体は急速に増大し，4日目頃までには，ほとんど全ての筋線維で横紋形成と核の筋膜直下への移動が行われ，7日目までにこれらの変化が終了し，ほぼ成熟した形態を示してくる。しかし支配神経に髄鞘形成が見られるのは，なお1～2週間を要する。

このように脊髄を加えて筋の培養を行った場合は，加えない場合に比して，運動神経が筋線維に接触した後に筋の成熟が促進される。この促進は健康筋とジス筋との間で差は見られなかった。

ジス筋における変化：ジス筋に於てはその発育と成熟に伴って種々の変化が出現する。そのうちジス筋特有の変化と見做されるものを挙げると

① 筋芽細胞融合の異常：ジス筋では筋管形成に際して，筋芽細胞の集合融合が対照に比し不規則であり，従って形成された筋管の径にばらつきが多く，かつ，全般に径の細いものが多かった。11日目鶏胚浅胸筋を単独培養した場合，培養開始後3週目で筋線維の最大径の平均は対照群13.80±0.79 μm（P＜0.01）であるのに対し，ジス筋では9.77±1.20 μm（P＜0.01）で有意に細い事が明らかにされた。また個々の筋線維においても，太い部分と細い部分の差が著しい。

② 空胞形成：脊髄添加の有無に拘らず，浅胸筋培養開始後，4～5日頃より一部の筋線維に大小の空胞形成がみられる。このような空胞の周囲には筋漿は変性を伴う事は殆どない。これら空胞はＨＲＰ処理染色によって外表との交通性が証明され，Ｔ管の拡張によるものと思われる。この空胞は必ずしもジス筋特有の変化ではなく，健康筋においても同様の時期に少数ではあるが認められる。

③ 筋の表面膜の細孔形成と細胞外との異常な交通性：培養約2週以降になると筋の表面膜は細孔形成が認められるが，このような部ではＨＲＰによって筋内の管構造と外界との異常な交通が認められ，ＨＲＰに対する透過性が亢進している。屢々胞体の浮腫状変化によると思われる腫大が見られる。そしてSarcomere の過収縮と縦配列のズレが認められる。

このような部では，それまで同期して収縮，弛緩を繰り返していた筋線維群内に，過度の収縮や弛緩過程の緩徐な筋線維が出現してくる。その他過収縮を示しているいわゆる opaque fiberの出現も認める事が出来る。

このような過収縮に伴い，上記の異常な交通性のある部では，筋の収縮異常の出現後，Sarcomere の配列に乱れが生じ，横紋が不鮮明となり，やがて筋線維の断裂および融解が生ずる。
それと相前後して，その部の筋胞体は次第に顆粒状を呈して壊死に陥る。この壊死性変化は，通常，筋線維の一部に限局しており，節性壊死（segmental necrosis）と呼ばれる状態をとる。このように外界との異常交通性を示す部位で，筋の過収縮及び節性壊死の変化が進行するわけである。

〔考　　案〕

この対照筋およびジス筋の in vitro での増殖・成熟に関し，その時間的経過より見る限り両者間に有意の差は認められない。この事はWilson らによる in vitro での増殖・代謝の解析においても同様の結果が報告されている。これらの事実から，この家鶏筋ジストロフィーにおける遺伝的欠陥は筋の増殖・分化能力に関与する生合成系には大きな異常をもたらさない事が示唆される。

骨格筋の分化および保持に関し，運動神経支配が重要な役割を有しているが，脊髄添加に伴う神経支配とそれによる成熟過程への影響は，対照およびジス筋とも同様であり，この事はジストロフィーおよび対照鶏間の脊髄と筋肉との組み換え培養実験において，神経因子の異常にもとずく病変出現は認め得なかった。ジス筋に特有な変化は，

発生の比較的初期に筋芽細胞の融合の異常として認められる。この異常そのものは変性壊死と直接結びつくものではないが，ジス鶏の遺伝的欠陥の細胞膜上での表現として理解出来るものであろう。この膜異常は，ヒトのDuchenne型筋ジストロフィー症においても赤血球膜での異常が指摘されている事実とともに，これらジストロフィー症群では，膜を介して異常な形質の表現がなされるという共通性がある。ジス筋での壊死性変化は表面膜の細孔形成およびそれと密に関連したＨＲＰの異常なとり込みを示す部位から進展する。また，この壊死性変化のみならず筋原線維の過収縮およびそれにもとずく筋原線維の断裂などもこのＨＲＰの取り込みの昂進した部に認められる。

このようにジス筋変性に際して見られる節性壊死や過収縮などの変化は何れもＨＲＰの取り込みで示される如く，筋細胞への外液の侵入と貯溜と関係している。この事はＴ管内でのCa^{++}濃度の上昇による筋原線維過収縮や，蛋白分解酵素の賦活化による節性壊死の原因となるのであろう。また，ジス病変出現には，筋線維の成熟を要する。この成熟には，神経支配は必須ではないが，神経支配が筋組織の成熟を促進している。そしてこのことが筋線維での変性の出現を促進せしめていると思われる。

〔要　　約〕

筋ジストロフィー鶏（California Davis 413）とその対照鶏の９－13日鶏胚浅胸筋と脊髄とを培養し，ＨＲＰ法による筋線維内管構造と外液との交通性を検討し，併せて電顕による検索を行った。その結果，①ジス鶏の特異なジス病変として，筋発生早期に筋芽細胞の融合の異常が認められ，対照に比し筋径の大小不同および小径線維の出現が有意に高い。②ジス病変としては培養約１週後頃より筋表面の細孔形成，Ｔ管の異常拡張が見られ，この部はＨＲＰ法により外液の侵入と貯溜が昂進している。③このＨＲＰ侵入部位では筋線維の過収縮や節性壊死が見られる。この事は筋でのこれらの病変は筋の外界との異常な交通性に基因するものと思われる。④このようなジス病変の出現には筋の神経支配は必ずしも必要ではないが，神経支配のある筋では成熟や分化が促進され，かつ壊死性病変がすみやかに大量に出現する。

文　　献

1) Askanas, V. & Hee, D.: Histochemistry and tissue culture studies of dystrophic and experimentally denervated animal muscles. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* **33**: 541-551, 1974.
2) Baskin, R.J.: Ultrastructure and calcium transport in dystrophic chicken muscle microsomes. *Lab. Invest.* **23**: 581-589, 1970.
3) Kar, N.C. & Pearson, C.M.: Muscular dystrophy and activation of proteinases. Muscle & Nerve **1**: 308-313, 1978.
4) Liberius, R., Lundquist, I., Templeton, W. & Thesleff, S.: Intracellular uptake and degradation of extracellular tracers in mouse skeletal muscle in vitro. The effect of denervation. *Neuroscience* **3**: 641-647, 1978.
5) Liberius, R., Jirmanova, I., Lundsquist, I., Thesleff, S. & Bernard, E.A.: T tubule endocytosis in dystrophic chicken muscle and its relation to muscle fiber degeneration. *Acta Neuropath.* **48**: 31-38, 1979.
6) Morki, B. & Engel, A.G.: Duchenne dystrophy, electron microscopic findings pointing to early abnormalities in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurol.* **25**: 1110-1120, 1975.
7) Wilson, B.W., Peterson, D.W., Stinnet, H.O., Nelson, T.K. & Hamilton, W.H.: Growth and metabolism of normal and genetically dystrophic chick embryo cells on a phosphate buffered medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**: 954-958, 1968.

5. 「筋ジストロフィ（dy/dy）マウス筋芽細胞の分裂能低下の機作の研究」

香川　務*
研究協力者　智片英治*　巽　典之**
橋本孝二**

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。我々は筋ジストロフィ症の病因の解析の為に，最も顕著な変化を示す筋組織に研究の対象を絞り，既に以下の事について報告した。(1)正常成熟(+/+）及び筋ジストロフィ発症（dy/dy）マウスから単核筋芽細胞を分離し，各々の *in vitro* における筋線維分化の実験系を開発した。[1] (2)この実験系を利用して，正常及び筋ジストロフィ発症マウス由来筋芽細胞の培養（dispersed cell culture）を行い，いづれも，*in vitro* で収縮性を示す筋線維に分化する事を明らかにした。[1,2] (3) dy 遺伝子発現の結果とされた筋ジストロフィ(dy/dy)マウス筋の，*in vitro* における pseudostraps 形成[3]は，dy 遺伝子を持たない正常(+/+）マウス筋の培養に於いても，培養条件によって見られる事を証明し，pseudostraps形成はdy遺伝子と関係のない事を明らかにした。[4] (4)正常筋，ジストロフィ筋の定量的な比較を可能とする為に，正常（+／+）及び筋ジストロフィ（dy/dy)再生筋由来細胞の筋クロン培養の方法を開発した。[5] (5)筋クロン培養を利用して，正常（+／+）及び筋ジストロフィ（dy/dy）再生筋由来単核細胞の分裂能を定量的に比較した。その結果，筋ジス再生筋由来筋芽細胞は，正常再生筋由来筋芽細胞に比較して，その分裂能が有意に低下している事，一方，線維芽細胞の分裂能は，正常，筋ジスの間で有意の差のない事を明らかにした。[6] 以上の各結果をふまえて，次の各実験を計画した。

Ⅰ〕筋ジストロフィ再生筋由来筋芽細胞の分裂能低下の機作の解析

(a) 正常及び筋ジス再生筋芽細胞の各成長曲線をとる。

(b) 正常及び筋ジス骨格筋のサテライト細胞の培養。

Ⅱ〕正常（+／+）及び筋ジストロフィ（dy/dy）マウス骨格筋の *in vivo* における再生

今年度は〔Ⅰ〕(a)，〔Ⅰ〕(b)について行ったが，〔Ⅱ〕(b)については未だ発表するだけのデータを得ていないので〔Ⅰ〕(a)について報告する。

材料と方法

再生筋，8～12週令の正常（C 57 B1/6+/+）及び筋ジストロフィ発症（C 57 B 1/6 J 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0.1 mℓ／肢，[1] 筋ジスマウスでは各0.05 mℓ／肢[2]）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 を入れた硝子遠心管に加え，ピペット撹拌法[7]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[1] を適宜加え，細胞数

＊国立療養所刀根山病院
＊＊大阪市立大学医学部

Table 1

Average number of cell divisions (0-7 days)

	Culture 1	Culture 2	Culture 3
Norm.	6.21±2.08 (43)	5.02±2.04 (31)	5.24±2.18 (23)
Dyst.	3.80±1.73 (29)	2.37±1.11 (16)	4.25±1.86 (26)
t-stat.	p 0.01	0.01	NS

t-stat.: t-statistics. ( ): Number of colonies used for the count of number of cell divisions. NS: not significant.

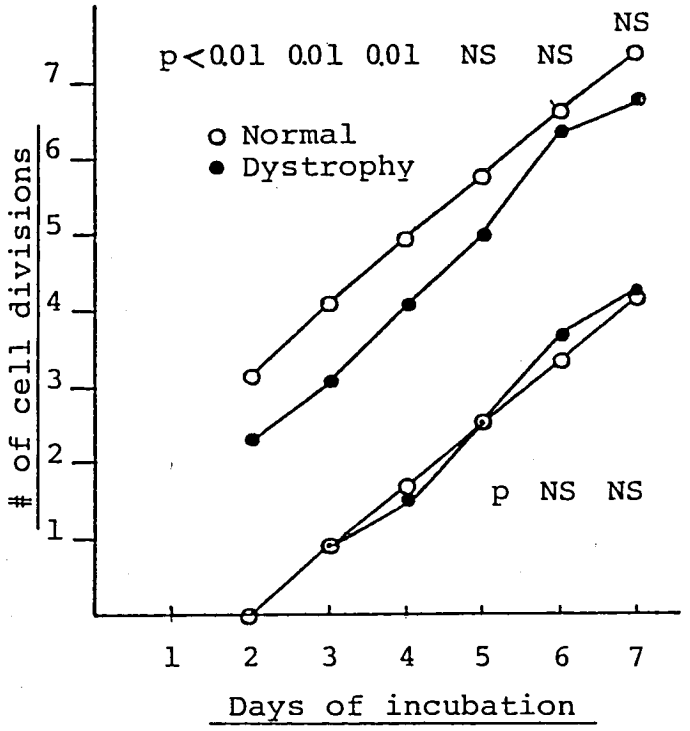


Figure 1

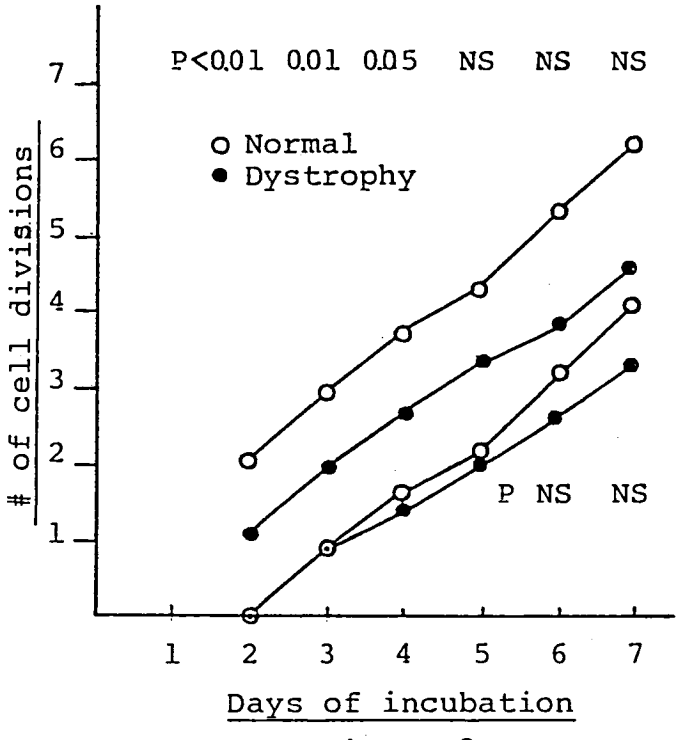


Figure 2

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，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[1)]で培地交換を行い，更に6日間培養し，固定した。培養条件は37℃，湿度100％，CO_2 5％，空気95％である。

培地の組成

(1) Fresh medium[1)] Eagle's MEM 85％
馬血清 10％
鶏胚抽出液 5％

(2) Growth medium[1)] ※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。

培養開始2日目，倒立顕微鏡上で観察しながら培養皿の底面から，各コロニーを円で囲み，番号をつけた。各コロニーの細胞数を培養2日目から7日目まで毎日算定し，次の式で定義されるXを各コロニーの細胞分裂回数とした。$X = \log N / \log 2$　N：各コロニーの細胞数。成長曲線をとる為の培養は3回行った。細胞数の算定を始めて後，細胞数の増加を認めないコロニーは除外した。又培養の途中で細胞数の増加の停止，或いは，細胞数の減少を見たコロニーはその後の細胞分裂回数の計算から除外した。従って，正常，筋ジスのいづれの培養においても，分裂回数の計算に用いたコロニーの数は，培養日数と共に減少した。増殖を示すコロニーの数及び，その細胞数から，次の各パラメータを求め，正常及び筋ジストロフィ筋芽細胞の間で比較した。

(1) 細胞分裂回数の平均：各コロニーで同調的に細胞分裂が起ったと仮定し，各コロニーの最大

Table 2

Average number of cell divisions (2-7 days)

	Culture 1	Culture 2	Culture 3
Norm.	3.06±1.89 (43)	2.99±1.86 (31)	2.93±1.63 (23)
Dyst.	1.45±1.47 (29)	1.32±0.92 (16)	2.51±1.50 (26)
t-stat.	p 0.01	0.01	NS

t-stat.: t-statistics. ( ): Number of colonies used for the count of number of cell divisions. NS: not significant.

細胞数に達する迄の細胞分裂回数の平均。

(2) 細胞分裂速度：その時点迄細胞増殖を示したコロニーの平均分裂回数を時間（日数）に対してプロットし，その時の勾配を平均細胞分裂速度とした。

(3) 増殖能を示すコロニーの数：その時点迄持続的に細胞数の増加を示したコロニーの数。

結　果

培養は3回繰り返し行った（培養1，培養2，培養3）。

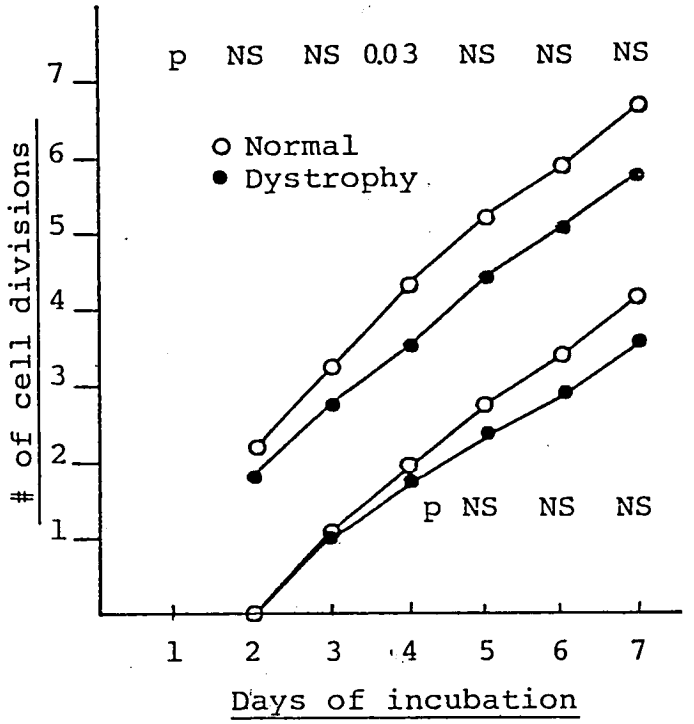


Figure 3

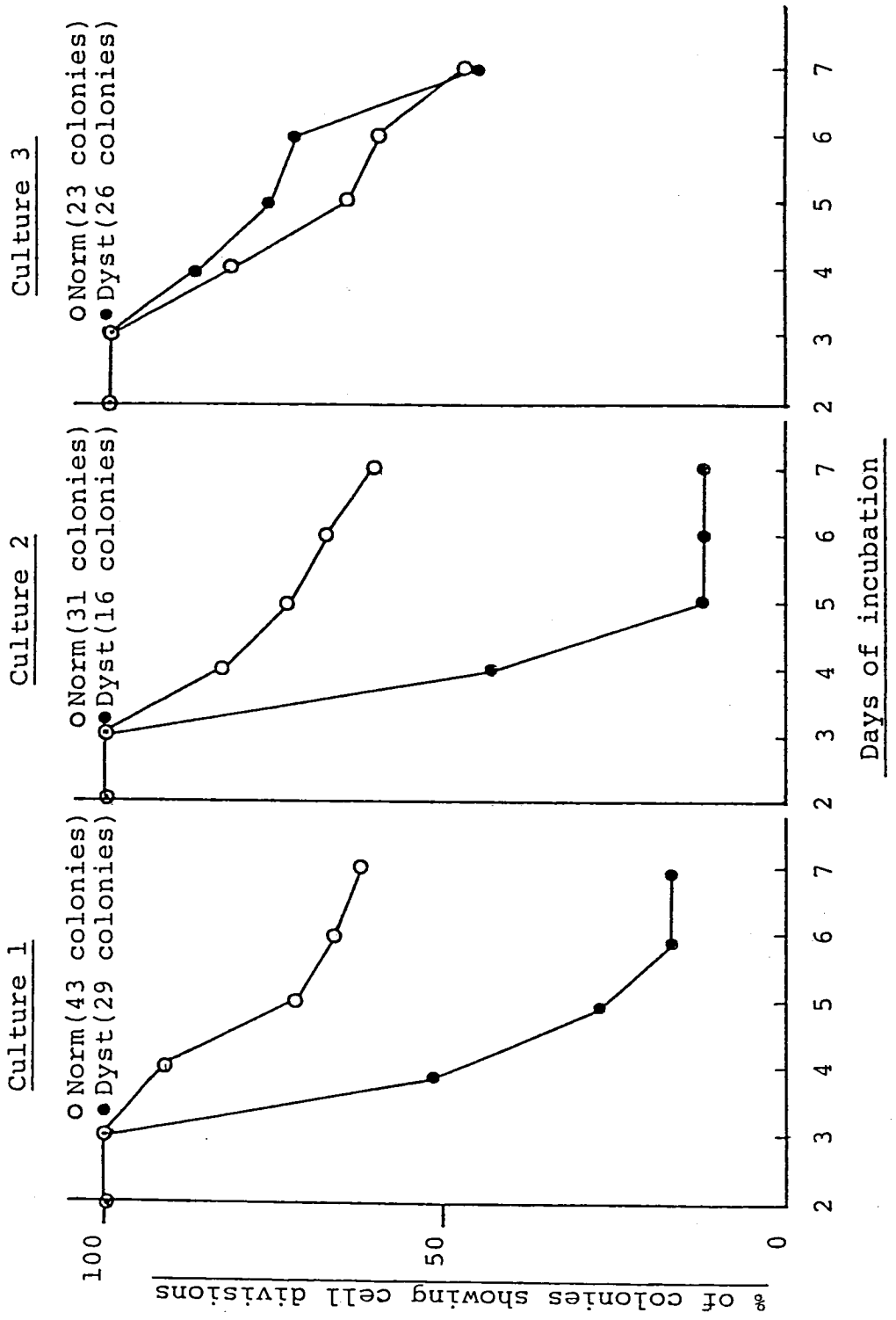

Culture 1
○ Norm (43 colonies)
● Dyst (29 colonies)
Culture 2
○ Norm (31 colonies)
● Dyst (16 colonies)
Culture 3
○ Norm (23 colonies)
● Dyst (26 colonies)
% of colonies showing cell divisions
100
50
0
2
3
4
5
6
7
Days of incubation

Figure 4

(1)　細胞分裂回数

培養開始から培養7日目迄に見られた正常及び筋ジス筋芽細胞の分裂回数の平均値を（Table 1）にまとめた。全ての培養において，筋ジス筋芽細胞の分裂回数の平均値は，正常筋芽細胞のそれよりも小さく，培養1，2でその差は有意であった。培養開始2日目に，培養1及び2において，正常，筋ジス筋芽細胞の間でその分裂回数に有意の差を認めた（Figs. 1, 2）。この差の原因として，(a)筋ジス筋芽細胞は正常筋芽細胞に比較して，細胞分裂を起す迄の lag time が長い，(b)正常筋芽細胞のコロニーの中には，いくつかのコロニーが融合して，細胞数が多くなったものがある，の2つの可能性が考えられる。(b)の可能性は少いが否定出来ない。(b)の原因による誤りを除外する為に培養2日目以後の分裂回数を求めTable 2にまとめた。培養2日目以後の分裂回数の平均値も，いづれの培養に於ても，筋ジス筋芽細胞の培養で小さく，培養1，2でその差は有意であった。以上の結果は我々の昨年度の報告の結果[6]と一致する。

(2)　細胞分裂速度

正常及び筋ジス筋芽細胞の細胞分裂速度をFigs. 1, 2, 3に示した（各グラフの勾配）。正常及び筋ジス筋芽細胞の細胞分裂速度の平均値の差の有意性の検定をする為に培養2日目の細胞数を各コロニー共1個と仮定し，その後の正常及び筋ジス筋芽細胞の各培養日における各平均分裂回数を求め，各々の間で平均値の有意性の検定を行い，その結果をFigs. 1, 2, 3 に示した。3回行った全ての培養において，正常及び筋ジス筋芽細胞の平均分裂回数の間に有意の差を認めなかった。即ち，正常及び筋ジス筋芽細胞の分裂速度の間に有意の差がないと結論出来る。

(3)　増殖能を示すコロニーの数

前記の様に，正常，筋ジスのいづれの培養においても，増殖能を示すコロニーの数は，培養日数と共に減少した。各培養日数での増殖能を示すコロニーの数をFig. 4にまとめた。培養1, 2では筋ジス培養での増殖能を示すコロニーの数は，正常培養のそれに比べて，著しく急速に減少した。しかし，培養3では，正常と筋ジスの間で，差を認めなかった。

検　討

培養1, 2, 3の内，培養1, 2に於いて筋ジス筋芽細胞の平均分裂回数は正常筋芽細胞のそれよりも有意に少なかった。筋芽細胞の平均分裂速度は3回行った全ての培養において，正常と筋ジスとの間で有意の差を認めなかった。筋ジス筋芽細胞の平均分裂回数が有意に減少していた培養1, 2において，筋ジス培養の増殖能を示すコロニー数の減少は，正常培養のそれに比較して著明であった。以上の結果から，筋ジス筋芽細胞の平均分裂回数の減少があるとすればそれは細胞分裂速度の減少（世代時間の延長）によるものでなく，筋ジス筋芽細胞は正常筋芽細胞に比し，より早期に細胞分裂を停止する事によると考えられる。又，Figs. 1, 2, 3に示す様に，培養開始後，細胞分裂を起す迄の lag time が筋ジス筋芽細胞において延長している事もその原因の1つとして考えられよう。全く同じ条件で3回の培養を行ったが，培養1, 2と培養3との間で，一致した結果を得る事は出来なかった。用いた血清（馬血清，牛胎児血清），鶏胚抽出液，基礎培地は，3回の培養で同じロットのものを使用した。しかし，細胞培養には細胞分離操作，培地の条件化等，未だ完全に同じ条件下で行う事が不可能な過程を含む。この様な事情が関与しているかも知れない。

結　論

(1)　正常（＋／＋）及び筋ジストロフィ（dy/dy）筋芽細胞の細胞分裂速度（又は世代時間）には有意の差を認めなかった。

(2)　3回行った培養の内2回の培養で，筋ジス筋芽細胞のコロニーは，正常筋芽細胞のコロニーに比較して，著しく早期に細胞の増殖を停止した。

References

1) Kagawa, T., Chikata, E., and Tani, J. (1977). *Develop. Biol.* 55, 402.

2) Kagawa, T., Chikata, E., Tani, J., and Tsutamune, T. (1978). *Develop. Biol.* 65, 526.
3) Parsons, R. (1974). *Nature* 251, 621.
4) 香川務（1979），第12回日本発生生物学会溝演要旨集 A49
5) 香川務（1980），第13回日本発生生物学会溝演要旨集 20A4
6) 香川務（1981），第14回日本発生生物学会溝演要旨集
7) 香川務，智片英治，谷淳吉，蔦宗俊明（1977），第30回日本細胞生物学会予稿集A－28

6. トランスフェリンと筋細胞の成長

小 沢 鏃二郎
研究協力者 木 村 一 郎　斎 藤 公 司　萩 原 康 子
伊 井 一 夫　長谷川 孝 幸

培養ニワトリ筋細胞が成長するためには，培養液としてEagleのminimum essential medium（MEM）とウマ血清とニワトリ胚抽出物（EE）の混合液が適しており，広く用いられている。我々はEEの代りにニワトリ血清を，さらにニワトリ血清の構成成分である筋成長因子（MTF）を用いてもよいことを繰返し発表して来た。MTFは，筋芽細胞の増殖を促進し，筋管細胞の変性を抑制してクレアチンキナーゼ（CK）活性の蓄積を促進する物質である。分子量80K dalton，鮭紅色の蛋白である。酸性において脱色されると同時に，蛋白はflocculationとなり，遠沈によって集めることができる。この蛋白には筋細胞成長促進能はない。しかし塩基性で蛋白と上清とを混合すると鮭紅色は回復し，筋細胞成長促進能も回復する。分子量や色調はトランスフェリン（Tf）のそれと一致する。またTfは酸性でFeを遊離し，塩基性で結合することを考慮に入れると，MTFはTfである可能性が考えられた。

以下の報文では，MTFがTfであること，筋細胞成長促進にはTfはFeを結合した形が必要であること，Feイオンそのものでも有効であること，Tfには哺乳類，鳥類間では類特異性があることを示した。

材料と方法

培養細胞：11日目ニワトリ胚胸筋を機械的に解けて細胞を分散させて単細胞を得た。細胞を85%MEM，15%ウマ血清から成る培養液（avian basal culture medium，ABCM）に浮游し，ゲラチンをぬった35mmのプラスチックシャーレに1～3×10^5 cell/dishに播いた。培養液量は2.5mlでこれに適当量の附加物を加え，CO_2インキュベーターで4日培養し写真を撮り筋管細胞中に含まれるCK活性を測定するために細胞を集めた。

生後2日目ラット後肢筋をYaffeの方法に従ってトリプシン処理をして単細胞をとり，ニワトリ筋細胞と同じようにして培養を行った。ただし培養液は，85%MEN，15%ニワトリ血液の混合液（mammalian basal culture medium，MBCM）を用いた。

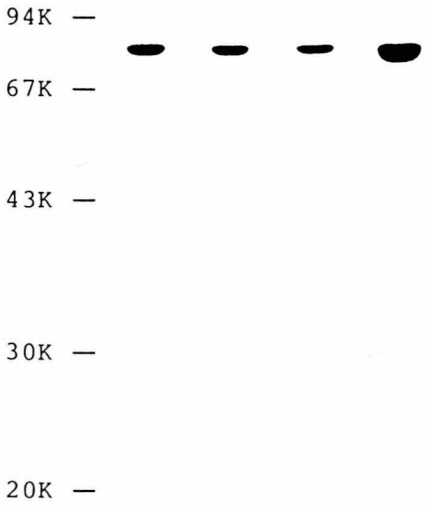
MTFは以前報告した方法[1]，ニワトリTfはLeilmanとAisenのリヴアノールを用いた方法[2]で精製し，オヴオトランスフェリン（OT）は卵白のアセトン粉末から抽出した。その他のTfはMTFの精製法にほゞ等しい方法によったが，アセトン処理を省略し，DEAE Sephadexの代りにCM Sephadexを用いた。

EEは12日ニワトリ胚を，等量の0.9%NaCl中でホモジェナイズし，その遠沈上清を用いた。

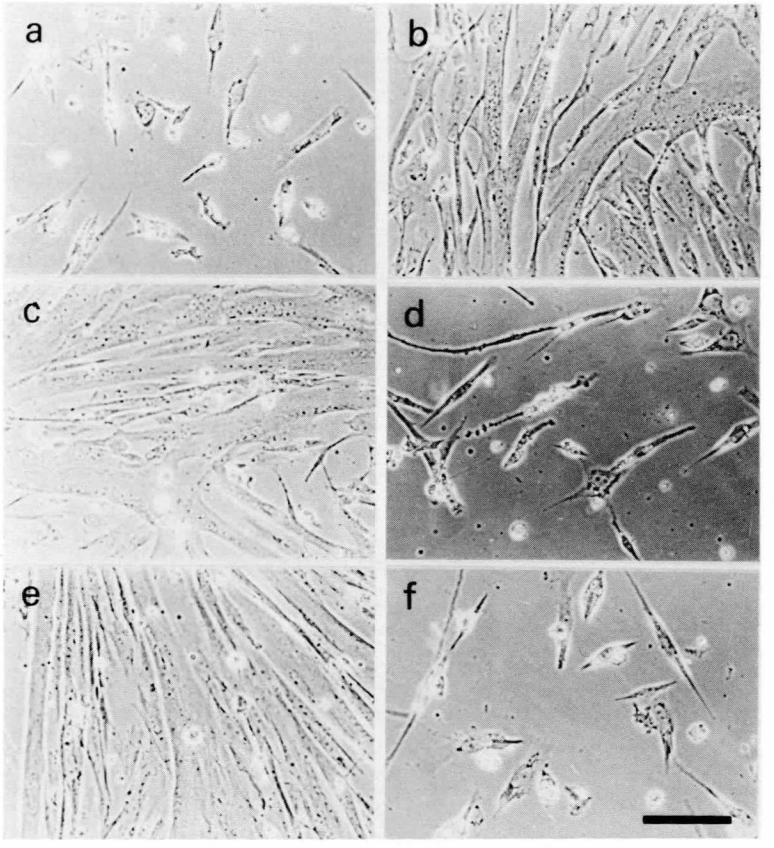
免疫血清はTfやOTを雄家兎に注射することによって得た。

CK活性は，クレアチン燐酸とADPからATPを合成させ，最終的にNADPHを測定する方法と，ATPとクレアチンとからクレアチン燐酸を合成させ，移った燐酸量を測定する方法とを用いた。

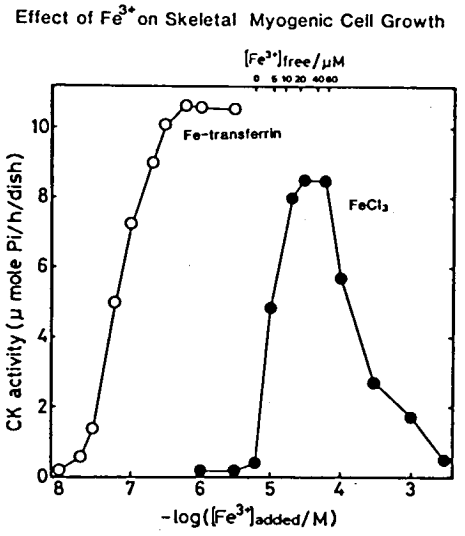
＊国立武蔵療養所神経センター，機能研究部



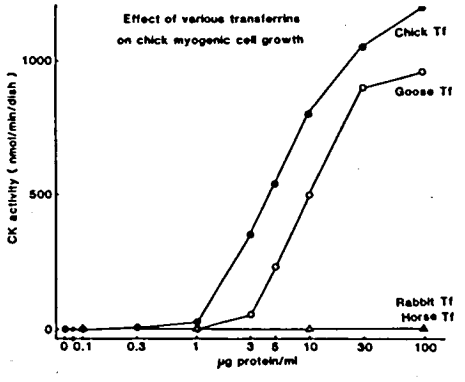
第1図 ニワトリトランスフェリンのＳＤＳゲル電気泳動パターン[3)]
左から分子量マーカーの位置，ＭＴＦ，ＭＴＦとTf の混合試料，Ｔｆ，とＯＴ。ＭＴＦとTf は区別できないがＯＴは分子量がやゝ小さいところに現われた。



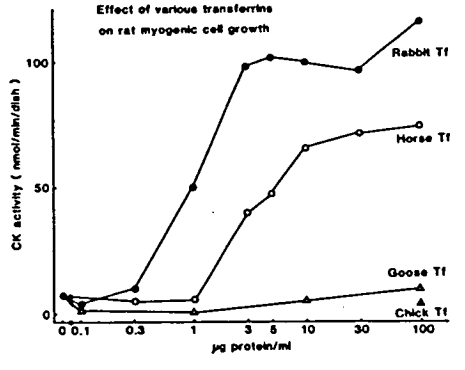
第2図 トランスフェリンの筋細胞成長促進作用[3)]
a) 0.9％NaCl. b) MTF. c) Ｆｅを結合したＴｆ，d) Ｆｅを結合しないＴｆ。
e) Ｆｅを結合したＯＴ，f) Ｆｅを結合しないＯＴをそれぞれ10μｇ／㎖加えて培養した筋細胞
Ｂａｒ：100 μm



第3図　TfとFeのニワトリ筋細胞成長に対する用量反応曲線。[4]
図の上線の横軸は，加えたFe から培養液中に存在するウマapoTf を引いた値



第4図　ニワトリ筋細胞成長に対する各種動物のTf の用量反応曲線[5]



第5図　ラット筋細胞成長に対する各種動物のTf の用量反応曲線[5]

ＣＫ活性は殆んどすべて筋管細胞に由来し，単核細胞には極くわずかしか含まれない。筋管細胞は筋芽細胞が分裂した後融合して形成されるので，ＣＫ活性は筋細胞の成長の度合を示す指標として用いることができる。

結　　果

ニワトリＭＴＦ，Ｔｆ，ＯＴは，何れもＳＤＳゲル電気泳動上単一バンドを示した（第１図）。ＭＴＦ，Ｔｆは分子量80Ｋで，二つを混合して泳動した場合にも単一バンドを示した。ＯＴの分子量はやゝ低い値を示した。

ＭＴＦ，Ｔｆ，ＯＴの蛋白構造の異同の大よその目安をつけるために，α−chymotrypsinやpapainで処理した後，ＳＤＳゲル電気泳動を行ってペプチドマップを作ったところ，三種の物質は区別できないパターンを示した。

抗Ｔｆ及び抗ＯＴウサギＩｇＧに対するＭＴＦ，Ｔｆ，ＯＴの反応をOuchterlonyの二重拡散法で検討した。何れの組合せでも単一の沈降線を生じそれらはお互に融合した。

以上から三種の蛋白は同一性質を持つと思われるが，この三種の蛋白とＦｅの結合性と筋細胞成長促進作用との開係を調べた。

ＭＴＦ，Ｔｆを0.1Ｍ Na−Acetate，0.2Ｍ Na−phosphate，10mM EDTA（pH 4.5）に透析してＦｅを除き，apoＭＴＦ，apoＴｆを作った。ＯＴはＦｅを持っていない。三種の蛋白に一定量のＦｅを与えた後結合しないＦｅをゲル沪過をして除いた。与えるＦｅの量が増すにつれて結合したＦｅの量も増加し，465mμm（Ｆｅを結合したトランスフェリンに特徴的であるとされる波長）の吸収が増加した。蛋白量１モル：Ｆｅ２モルに与えた時に最高に達しそれ以上のＦｅを与えてもＦｅの結合は増さなかった。このモル比はトランスフェリンの性質として報告されているＦｅの結合量と一致する。このようにしてＦｅを結合した蛋白の筋細胞成長促進能は，結合したＦｅの量と比例して増加しモル比１：２の点で最高に達し以後プラトーになった。（第２図参照）

Ｔｆには種々の金属イオンが結合することが分っているが，ＯＴにＦｅの代りにＣｕやＭｎを結合させたものでは筋細胞成長促進能は認められなかった。

トランスフェリン蛋白に結合していないＦｅイオンの筋細胞成長促進能を調べた。Ｔｆに結合したＦｅの約200Ｘの濃度のＦｅイオンにはかなりの作用が認められた。ＡＢＣＭには，ウマ血清が含まれているので，当然ウマＴｆが大量に含まれている。そのうちほゞ⅓はapoＴｆであるし，apoＴｆのＦｅ結合能は非常に高いので少量のFeはウマapoＴｆにとられることになる。従ってこの効果を差引いて考えなければならない。（第３図）

ニワトリ筋細胞はＡＢＣＭ中では成長しない。このことはウマＴｆがニワトリ筋細胞には有効でないことを示す。事実ＭＥＭとウマ血清の割合を広範囲にかえてみても，ＡＢＣＭにウマＴｆを加えてみても，その中ではニワトリ筋の成長はみられなかった。

ニワトリ筋細胞をＡＢＣＭに各種動物のＴｆを加えた培養液で培養した。ニワトリ，ガチョウ，シチメンチョウのＴｆは有効であったが，ウマ，ウサギのＴｆは無効であった（第４図）。ラット筋細胞をＭＢＣＭに各種動物のＴｆを加えた培養液で培養した。ウマ，ウサギのＴｆは有効であったが，ニワトリ，ガチョウ，シチメンチョウのＴｆは無効であった（第５図）。ウシのＴｆは高い濃度ではニワトリ，ラットの筋細胞に対して有効であったが，程度は低かった。

筋細胞成長促進という作用に関しては，ＥＥとＴｆとは類似の作用を呈するので，ＥＥとＴｆの関係を調べた。[6] ＥＥを抗ニワトリＴｆ ＩｇＧで処理し沈降物を除いたものや，ＥＥを酸性で透析しＴｆに結合したＦｅを除く条件で処理したものは，ＥＥは筋細胞成長促進能を失った。しかしこれにニワトリＴｆか，Ｆｅを加えると成長促進能が回復した。またＥＥからＴｆを精製することも可能であった。一方Ｔｆを除いたＥＥのみでは成長促進能はないが，

Tf を加えると加えた Tf の持つ成長促進能よりもずっと大きな成長促進能を示した。従ってＥＥはTfを増強する物質も含んでいる。

考　　察

Carrel[7]が 1911 年初めてＥＥを導入して以来その本体をになっている物質を知ろうとする試みは，繰返して行われた。しかし何れも成功するに至らなかった。上に述べたように我々はＥＥの最も重要な因子の一つが Tf であることを明らかにした。しかもそれは Tf 蛋白そのものではなく，蛋白についているFeに本質的な意味があり，Tf は Fe の担体として細胞表面のレセプターにつき，何らかの方法で細胞へ Fe を与える役割を行うと考えられる。我々はすでに筋原細胞に Tf に対するレセプターが存在していることを確認した。

我々は Tf が筋芽細胞の増殖に必要であることのみならず，筋原細胞特に大きな筋管細胞の〝健康〟を保つために必要であることを示した。すなわち，一度成長した筋管細胞も，Tf を培養液から除くことによって変性してしまう。我々はこの変化が Fe イオンによってもある程度阻止し得ることを認めた。

これらの in vitro 研究の結果をただちに in vivo の筋疾患と結びつけて考えることは困難にしても，筋疾患の一つの原因として Fe の欠乏を挙げ得る可能性は顧慮してもよいだろうと思われる。我々は Fe 欠乏というと貧血を考え勝ちであるし，それは又正しい。しかし骨髄における造血組織は血清そのものと接触するためにかなり大量の Tf の供給が可能である。一方筋細胞は組織液と接触するだけなのでかなり稀釈された Tf が供給されるにすぎない。従ってわずかの血清 Tf の低下が，筋細胞に供給される Fe の絶対量の低下を来たす可能性は存在すると思われる。なお組織液の一種と考えられる脊髄液中に含まれる Tf の濃度が，培養液で必要とされる Tf の濃度とほゞ同じ桁であることは，Tf の生理機能を知る上での一つの手がかりとなるだろう。

文　　献

1) Hagiwara, Y. et al: Develop. Growth and Differ. **23**, 249, 1981.
2) Leibman, A.J. and Aisen, P.: Archiv. Biochem. Biophys. **122**, 717, 1968.
3) Kimura, I. et al.: Proc. Japan Acad. **57(B)**, 200, 1981.
4) Hasegawa, T. et al.: *ibid.* **57(B)**, 206, 1981.
5) Ozawa, E. and Hagiwara, Y.: *ibid* **57(B)**, 406, 1981.
6) Ii, I. et al.: *ibid.* **57(B)** 211, 1981.
7) Carrel, A.: J. Exper. Med. **14**, 244, 1911.

Ⅲ　Whole Animal

7　ジストロフィー筋などの移植に
　関する研究 ― 筋再生に及ぼす神経支配の影響　33

8　ジストロフィーおよび正常チキンにおける筋線維数の経時変化　39

9　筋ジスマウスの筋線維の成熟成長障害　44

10　三つの筋神経系異常マウスにおける指標酵素の活性変動の比較　49

7. 筋再生に及ぼす神経支配の影響

寺 尾 寿 夫*
研究協力者 増 野 和 子* 大 沢 仲 昭**

目　　的

動物の筋肉を取り出し，これを再びもとの動物に移植したり，またはヌードマウスなどの他の動物に移植した場合，これがどの様な変化を受け，再生してくるかについて研究を行なってきた。移植された筋肉はsatellite cellよりmyotubeが形成され，さらに横紋が作られて，成熟した筋線維となる。しかし，もとの筋線維にくらべ，とくに異なるのは再生して出来た筋線維の直径が細いことである。この現象は皮下に小筋肉を移植した場合も，Studitskyの方法によりminced fragmentを移植した場合も，ＥＤＬなどの筋肉をそのまゝの形で移植した場合も同様である。

これらの再生筋の直径の増大には，血流の回復や筋に加わるtensionなどが関係していることは明らかであるが，これと共に重要なのは移植筋に対する神経の再支配，すなわち，host側からの神経の再生と再生筋への連絡も重要なものと考えられる。

この研究は，このような神経の再支配が筋の再生に及ぼす影響を知るために行なったものである。

方　　法

筋肉の移植には種々の方法があるが，この研究ではラットのＥＤＬを用いてorthatopical autotransplantationを行なった。すなわち，ネンブタール麻酔下にラットの長指伸筋を，これに入れる深腓骨神経などをなるべく長く残して切り出し，その後すぐにその部位に軽いtensionをかけて移植を行なった。この移植は左右のＥＤＬについて行ない，さらにその際に一側の坐骨神経を背部の大腿骨頭附近で切断し，約5㎜に亘って切除した。

移植筋は，種々の時間後に左右とも取り出し重量など測定の後，クリオスタットを用いて薄切しH.E.，Trichromeなどによる通常の染色とＡＴ Pase，DPNH，SDHなどの組織化学的染色を行なって，control側とdenervation側とを比較した。

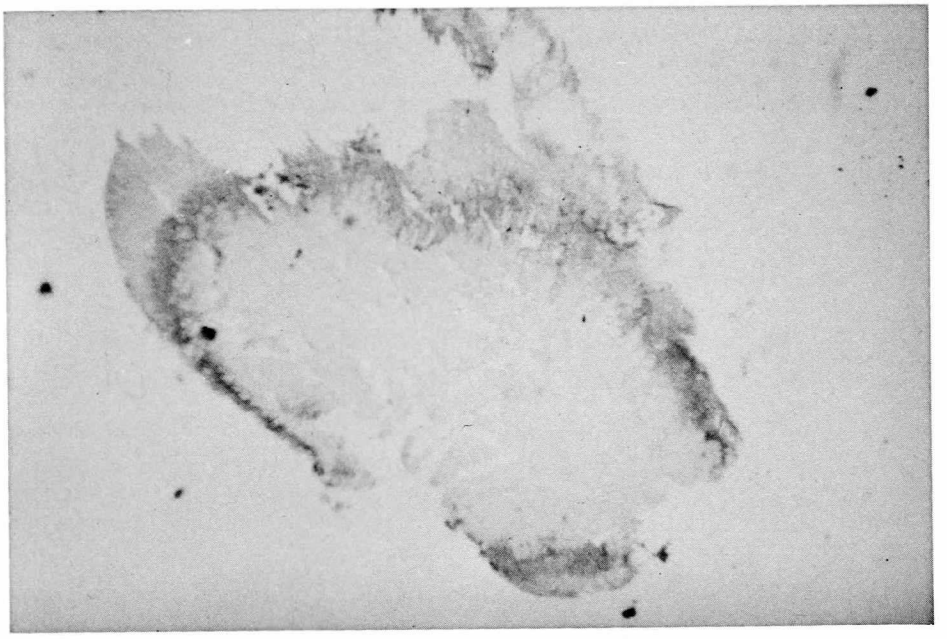
結　　果

移植後の変化を時間を追ってみてみよう。

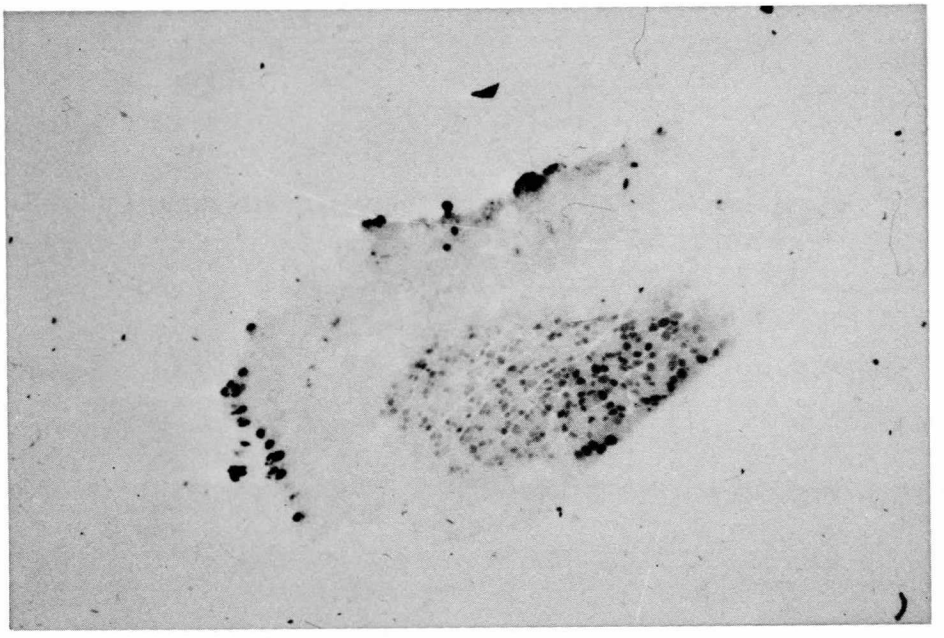
1) 移植後４日目の移植筋を見ると，中心部にはもとのＥＤＬの筋線維が残存している。しかし，graft周辺部にはfilroblast，myoblast，macrophageなどの細胞が増し，核の増加がみられる。これをヘマトキシリンのみで染色してみると第１図の如く，graft周辺部に環状に核の濃染する帯がみられる。それらの変化は除神経側とコントロール側でほとんど差がみられなかった。

2) さらに，移植後１週を経過すると，この細胞分裂帯の輪は中央に向って進み，その後に再生筋がみられるようになる。これをＡＴ Pase染色（pH 9.4）でみると，最外層にすでに酵素活性を有する再生筋がとりまき，中央部はなお残存するＥＤＬによるcheckerboard patternが残っている。第２図はcontrol側の移植１週目のＡＴＰase染色を示したものである。これをdenervation側と比べると，denervation側でやゝ筋の再

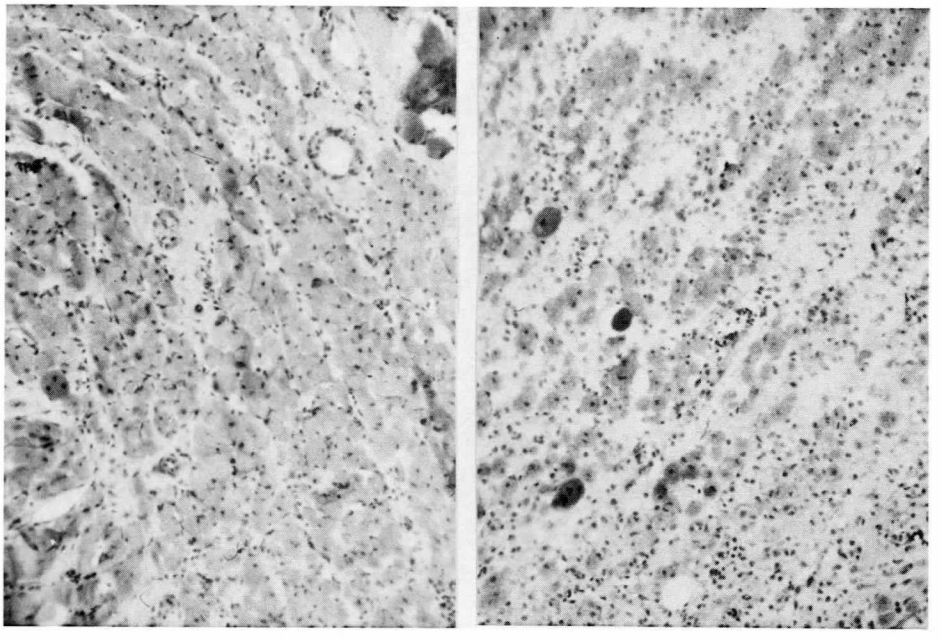
＊帝京大学第一内科
＊＊東京大学第三内科



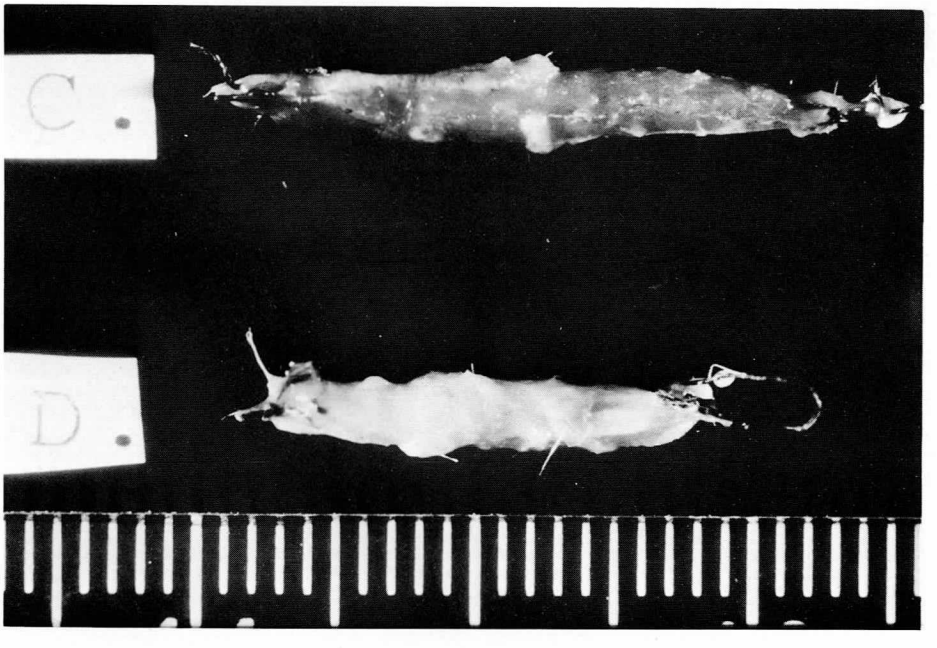
第1図　移植後4日目の再生筋　ヘマトキシリン染色



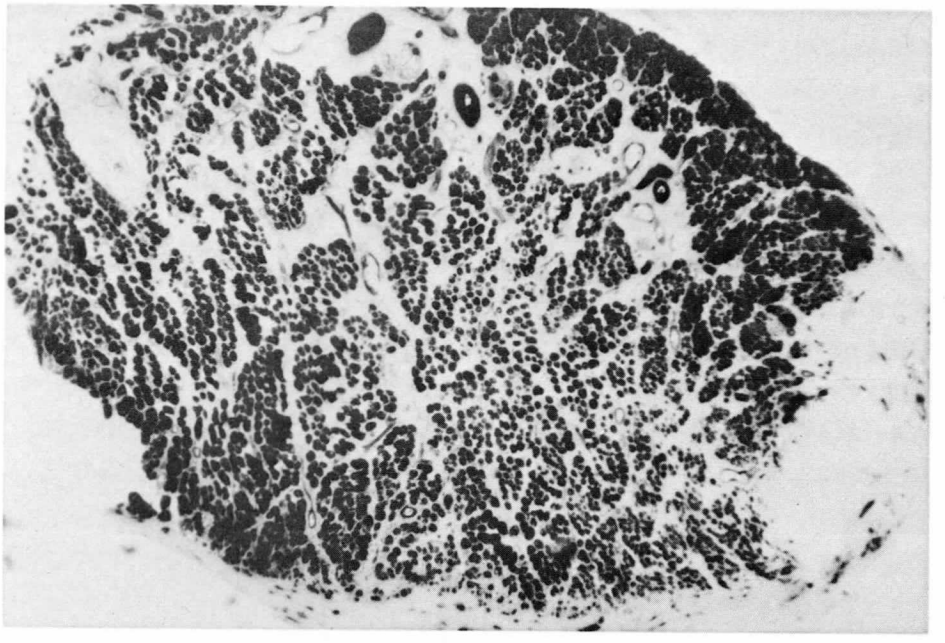
第2図　移植後1週目の再生筋　ATPase染色（pH 9.4）



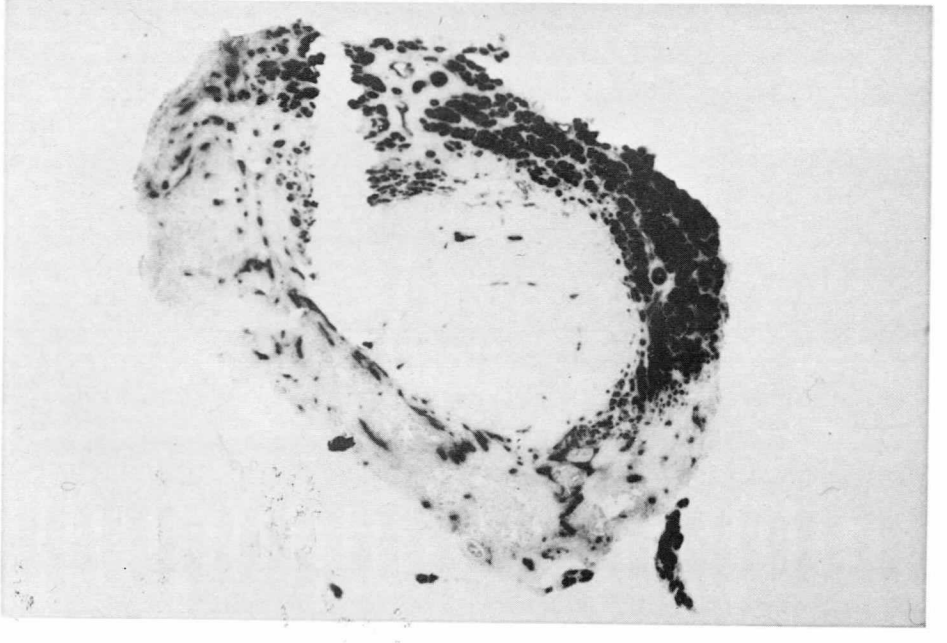
第3図　移植後2週目の再生筋　左：コントロール側，右：除神経側



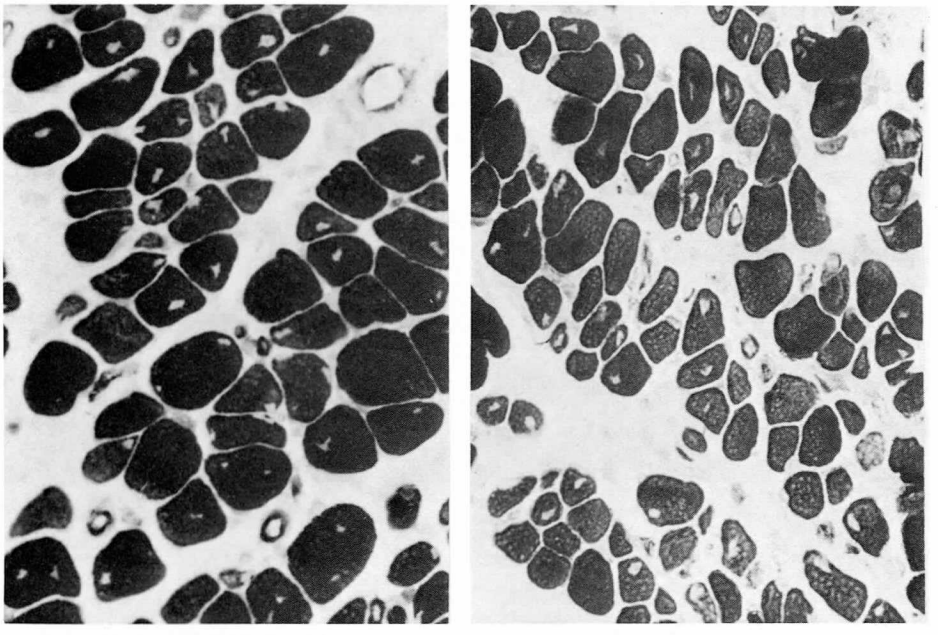
第4図　移植後3週目の再生筋　上：コントロール側，下：除神経側



第5図　移植後3週の再生筋（コントロール側）　ATPase染色



第6図　移植後3週の再生筋（除神経側）　ATPase染色



第7図 移植後3週目の再生節 ATPase染色
左：コントロール側，右：除神経側

生がおくれる傾向はあるが，control側との間に大きな差はみられなかった。

3) 2週目：移植後2週目のものを見ると，graftの中心部まで完全に再生筋で埋まるようになる。これらの再生筋は組織化学的に見ると，すべての再生筋線維がATPase活性を有しており，同時にDPNH，SDHなどの活性も有している。第3図はdenervation側とcontrol側とを比較したものゝ1例であるが，一般にdenervation側の再生筋はcontrol側より細い傾向があった。この時間までは両者間の差は軽度であるが，それ以降は両者の差が目立つようになる。

4) 3週以降：第4図は移植後3週目の再生筋をとり出し，denervation側とcontrol側とを比較したものである。これにみるように再生筋の外観ではdenervation側は明らかにcontrol側より小さくなっている。この差は時間が経つと共に明らかになり，移植後4週目ではcontrol側再生筋重量は約50㎎前後なのにdenervation側の重量は半分以下のことが多い。

組織化学的にはATPaseなどの酵素活性は第2週のものに比し，より強くなっており，また一部にはすでにfiber typeのdifferentiationがみられる所もある。しかし大部分の再生筋はこの時期でもATPase，DPNH，SDHなどのすべての酵素活性を有している。3週目の再生筋をcontrol側（第5図）とdenervation側（第6図）とを比較してみると，denervation側の再生状態は悪く，結合織が多く，とくに中心部はしばしば線維化を示していた。

また再生筋線維の数がdenervation側で減少しているのみでなく，個々の再生筋線維をみても，control側は第7図に示すように比較的直径の揃った再生筋線維がみられるがdenervation側では再生筋線維の直径にばらつきがあり，また細いものが目立った。

考　　察

除神経が筋の再生に如何なる影響を及ぼすかについては既にいくつかの研究が行なわれている。しかし，その結果には相反するものもあり，かならずしも意見の一致をみていない。この様な異る結果をもたらす理由の第1は実験法の差によるものであり，第2は実験動物の差によるものであろう。

Saundersらは，神経切断後3週目の筋にcrush injuryを与え，その再生を観察したが，筋再生には神経の存在は無関係であったと述べている。Vidikの報告では，結紮による筋損傷後の再生は，除神経筋では正常筋より再生過程の遅延がみられ，また再生筋線維の配列の不規則がみられる以外変化がなかったという。これに対し，Denny-Brownはネコの除神経筋と正常筋に損傷を与えその再生を比較した所，除神経後3週までは差がないが，それを過ぎた除神経筋ではmyotubeまでしか再生しなかったと報告している。

Studitskyらによれば，再生している筋にとって神経支配は不可欠であり，再生筋に神経支配がないとmyoblastic stageで退化消失するという。これに対し，Zhenevskayaはラットの腓腹筋をcrushし，その再生を正常の神経支配下と腓骨神経を切断した後で比較した。その結果は，神経の支配は筋の再生に重要ではあるが，除神経筋での分化はmyoblastic stageでとまってしまうことはないと報告している。我々の研究は筋全体を移植するものであり，筋の一部をcrushする場合よりも，筋の再生に関して結果の判定が容易である。そしてこの観察でもmyoblast, myotubeの形成は神経支配の影響を受けていないことを示していた。しかし時間と共に再生筋の発達は除神経側では障害され始める。現在は更にその後の長期間の影響について研究中である。

結　　果

本研究はラットのEDLのautotransplantationによる再生を坐骨神経を切断した場合と，しない場合とで比較した。myoblast, myotubeの形成は除神経で影響されないが，2週目以降では再生筋は数も直径も減ずることが明らかになった。今後更に長期の観察を続ける予定である。

文　　献

1) Gutmann, E.: The denervated muscle. Publishing house of the Czechoslovak Academy of Science, Prague, 1962. p.121.
2) Saunders, J.H. and Sissions, A.: The effect of denervation on the regeneration of skeletal muscle after injury. *J. Bone and Joint Surg.*, **35B**: 113, 1953.
3) Denny-Brown, D.: The influence of tension and innervation on the regeneration of skeletal muscle. *J. Neuropath.* **10**: 94, 1951.

8. ジストロフィーおよび正常チキンにおける筋線維数の経時変化

大塚正徳*
研究協力者 弘中哲治** 五十里良生**
宮田雄平*

ニワトリの筋ジストロフィー症の発症原因およびその桟序の解明を目的として正常およびジストロフィーチキン（line 412および413）の筋の収縮力および形態の経時変化を比較検討した結果，主としてその筋線維数において両者の間に著しい差違が存在することが明らかとなった。すなわち，ジストロフィーチキンでは筋線維数が正常チキンにくらべて有意に減少しており，その原因は孵化後1～2週間にみられる約70%におよぶ筋線維数の増加がジストロフィーチキンにおいて強く抑えられていることによるものであった。この孵化後初期における筋発生異常が成長後の筋におよぼす影響についても考察する。

方法

正常およびジストロフィーチキンをほゞ同数孵化し，以下の実験に用いた。アトロピン前処置（100 μg/kg, i.p.）後，酸素吸入下にエーテル麻酔を行ない，ニワトリを背位に固定した。皮膚を切り開き長橈側手根伸筋を露出し，切開した皮膚を利用してパラフィンプールをつくり筋の温度を41～42℃に保って等尺性収縮を記録した。麻酔の深度は眼球運動の停止と安定した呼吸運動を目安に調節した。

白金電極を用い持続0.5 msec の矩形波刺激をsupramaximal の強度で筋に直接与えることにより発生させた単収縮をオッシロスコープ上に観察し，X－Yレコーダーにスコープメモリーを介して記録した。筋の収縮を記録した後，筋を摘出し，重量を測定した後ホルマリンで固定した。固定した筋の近位端から約⅓の部位を横断しHE染色を行ない筋線維の数を顕微鏡下に測定した。

結果

筋成長の比較： 筋成長の過程をより定量的に比較するために相対成長式(1)を利用して分析した。[1)]

$$y = bx^k \qquad (1)$$

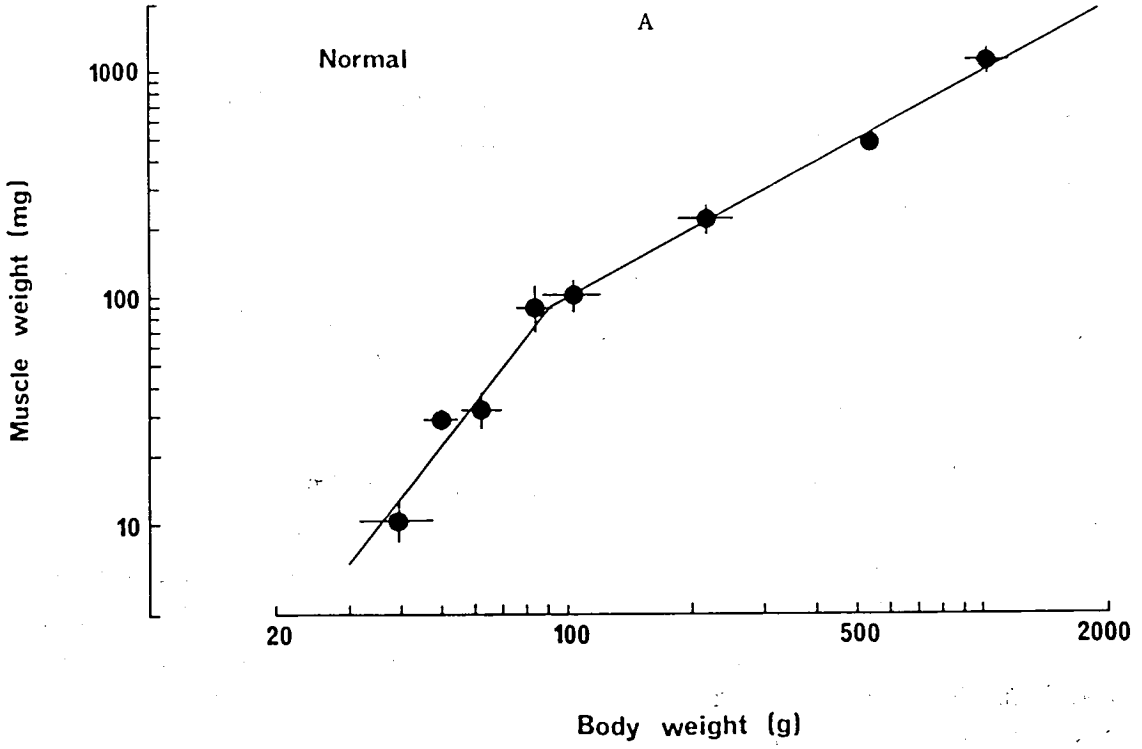
こゝにkは平衡定数を，bは初成長指数を示している。式(1)の両辺の対数をとると，

$$\log y = \log b + k \log x \qquad (2)$$

となり一次式の形に変換され，最小二乗法によりkおよびbを決定することができる。

図1は横軸に体重(g)，縦軸に筋重量（mg)の対数をプロットしたものであり正常，ジストロフィーチキンとも2つの直線成分から成る関係が得られた。成長の初期の段階における第1の成分の平衡定数（勾配）は正常およびジストロフィーチキンで2.28および2.31であり大きな差はみられなかったが，初成長指数はそれぞれ0.0028，0.0036でありジストロフィーチキンにおいて約1.3倍大であった。第2の成分の平衡定数はそれぞれ0.965，0.902であり，ジストロフィーチキンでやゝ小さい値を示したが初成長指数はそれぞれ1.13，1.86であり逆にジストロフィーチキンの方が約1.6倍

*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



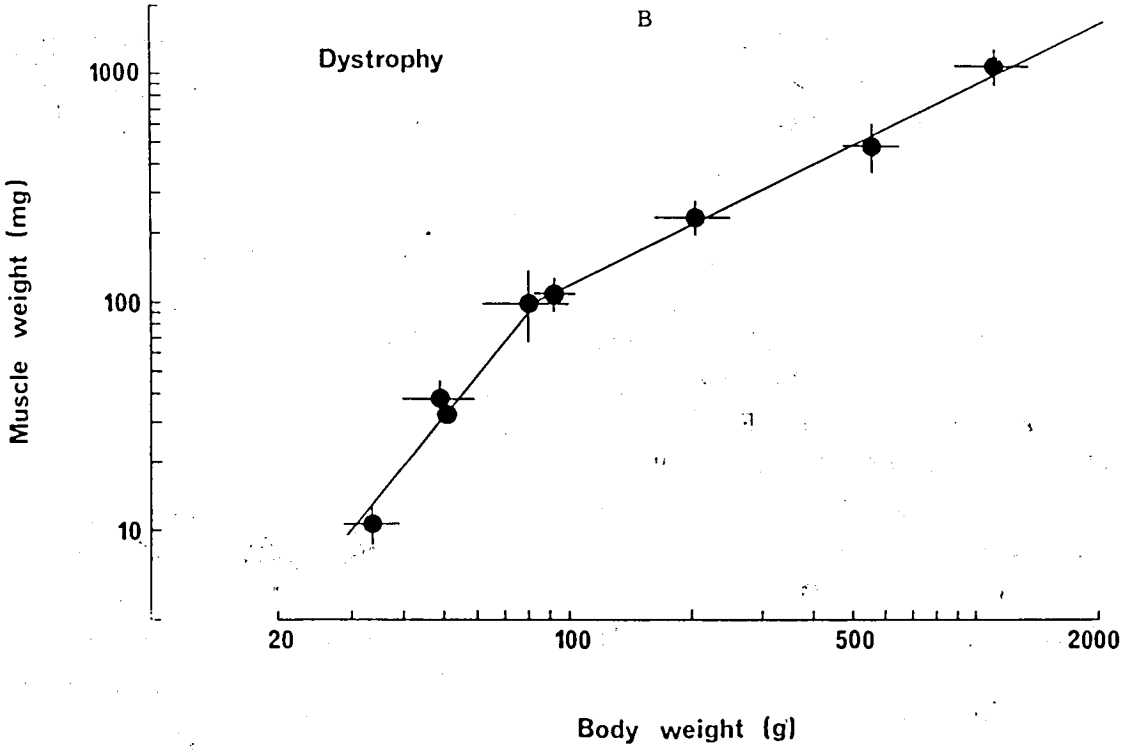


図1. 体重と長橈側手根伸筋の相対成長　A　B
孵化後2日から65日にわたる成長期にあるニワトリを対象とした。

大であった。すなわち，相対成長の全過程においてジストロフィーチキンの初成長指数が増大していることが明らかとなった。体重の経時的変化は本実験で取り扱った正常およびジストロフィーチキンにおいて認めるべき差がなかった（図2）ことから上記の両者間における差違は筋におけるジストロフィー変化を表現しているものと思われる。

筋線維数の経時変化： 図3は正常(●)およびジストロフィー（○）チキンにおける長橈側手根伸筋の筋線維数の経時的変化を示したものである。孵化後2～3日においては両者とも約15,000本で認めるべき差がなかったが，13日目では両者とも筋線維数が増加し，ジストロフィーではその増加の程度が抑制されていることがわかった。以後その数は正常，ジストロフィーとも漸減し，60日目位までには一定の値に達した。この減少の仕方を下記の(3)式で解析した。[2)]

$$N = \frac{No}{1 + \exp\left[-k'(\tau - t)\right]} + N\infty \quad (3)$$

こゝにNoは変性脱落して行く筋線維の総数を，Nは時間tにおける生存数，N∞は成長後一定になった時期の筋線維数を表わす。実際の計算にあたっては(3)式を変形し，対数をとることにより一次式の形に直して最小二乗法によりk′およびτを決定した。図3の曲線はこのようにして得られた理論曲線である。図3にみられるようにk′およびτについて正常およびジストロフィー間に認めるべき差はなかった。しかし500日目あたりの高齢では正常チキンは線維数の減少をみたが（矢印），ジストロフィーチキンではその減少はみられなかった。すなわち，ジストロフィーでは孵化後の筋発生に異常が存在するが，加齢による老化的変化はむしろ少ないことが明らかとなった。

単収縮の経時変化の比較： 図3で調べた筋線

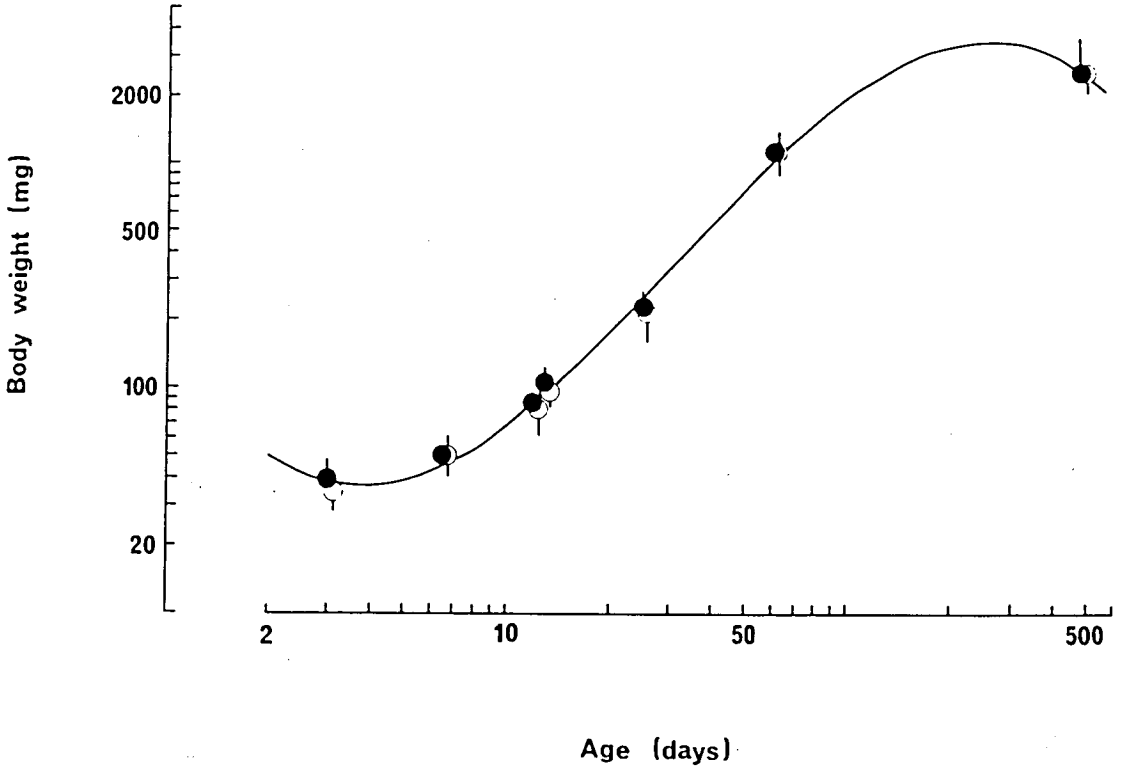


図2 体重の経時変化
●，正常チキン； ○，ジストロフィーチキン。
曲線は3次のpolynomial regressionを示す。

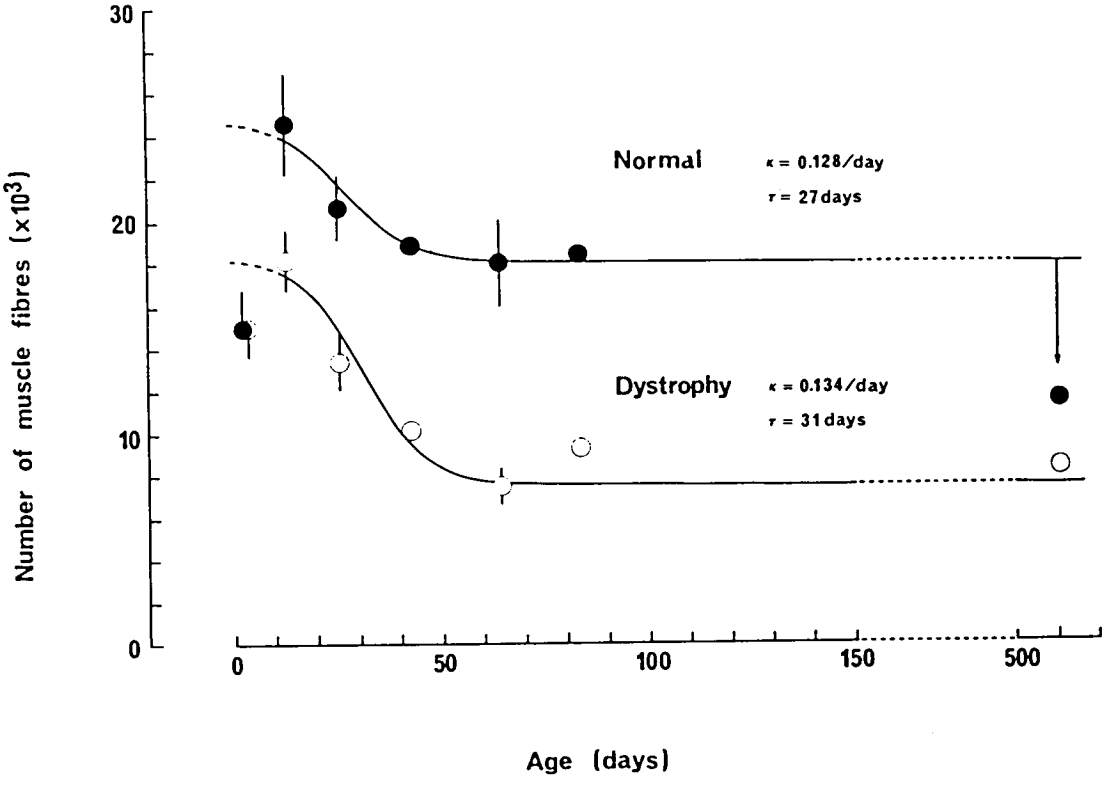


図3　長橈側手根伸筋の線維数の経時変化
●，正常チキン；　○，ジストロフィーチキン。縦棒はS.E.を示す。

維数を用いて筋線維1本当りの単収縮を図4に示した。図にみられるように，ジストロフィーチキンにおける著しい筋線維数の減少にもかゝわらず1本当りの筋収縮力の平均はほとんど変わらないことが明らかとなった。

考　　察

本実験で明らかとなった正常チキンとジストロフィーチキンにおけるきわだった差違は筋の線維数の違いであった。従来，筋の変性，再生の過程がジストロフィー筋において顕著であるとされているが[3]，図3に示されたように正常チキンでも同じように筋の変性，消失が起こっているので，この筋線維数の差はジストロフィーチキンにおける孵化後の初期筋発生の抑制によってもたらされたものであることがわかる。ジストロフィーチキンで筋線維数が少ないにもかゝわらず（図3），筋重量には正常チキンとの間に大きな差がなかった（未発表データ）ことから，ジストロフィーチキンで筋線維のサイズが著しく増大していることが考えられる。

ジストロフィーチキンでは老化による筋の変性消失がみられなかった（図3矢印参照）。正常チキンで老化に伴って起こる筋線維の減少と，ジストロフィーチキンで孵化直後に発生が抑えられた細胞とが対応している可能性があるが，結論を得るには今後の研究に待たねばならない。成鶏を用いた実験においてはこの老化による変化の差をジストロフィーによるものと間違えないようにする必要があろう。

図4に示したように筋線維1本当りの収縮力はジストロフィーチキンでも正常と同程度に保たれている。このことは別の見方をすると肥大した筋肉は収縮力の増大に寄与していないことが考えら

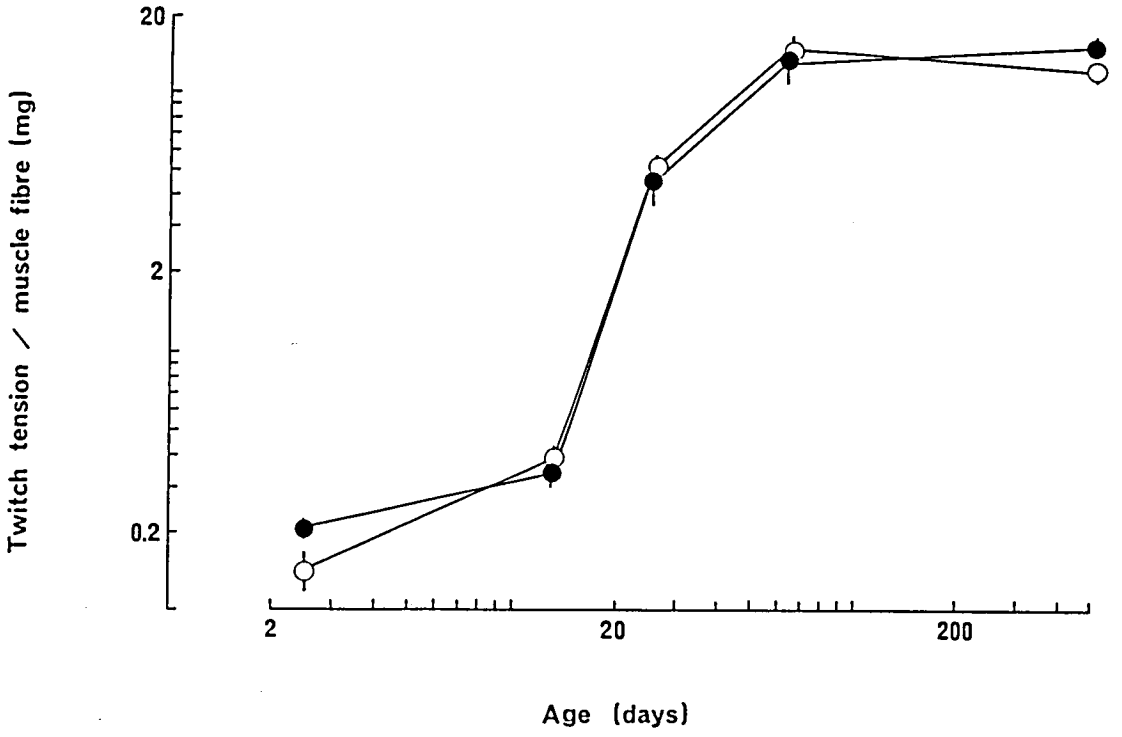


図4　筋線維1本当りの単収縮の経時変化
●，正常チキン；　○，ジストロフィーチキン縦棒はS.E.を示す。

れる。いずれにしても，ジストロフィー筋の収縮力減弱の一義的原因は孵化後の初期筋発生の欠陥にあることが強く示唆される。

ラットにおいてもやはりpostnatalに筋の発生が進むことが報告されている。[4) 5)] この時期はまたpolyinnervation－eliminationの行なわれる期間でもあり，[6)] 発生異常の起こる確率が高いことが予想される。

ジストロフィーチキンの孵化後の筋発生異常が筋自体に原因があるのか，この筋群を支配する神経側にあるのか，あるいは両方に異常が存在するのかについては今後の研究にまたねばならないが，この点に関して我々が先に報告した異常放電をするニューロンがジストロフィーチキンの中枢神経系に存在する事実[7)]は興味あることと思われる。

文　　献

1) Huxley, J.S. (1924). Constant differential growth-ratios and their significance. *Nature* **114**, 895-896.
2) Johnson, F.H., Eyring, H. and Stover, B.J. (1974). The theory of rate processes in biology and medicine. John Wiley & Sons, New York.
3) Yorita, T., Nakamura, H. and Nonaka, I. (1980). Satellite cells and muscle regeneration in the developing dystrophic chicken. *Expl. Neurol.* **70**, 567-575.
4) Betz, W.J., Caldwell, J.H. and Ribchester, R.R. (1979). The eize of motor units during postnatal development of rat lumbrical muscle. *J. Physical.* **297**, 463-478.
5) Ontell, M. and Dum, R.F. (1978). Neonatal muscle growth: A quantitative study. *Am. J. Anat.* **152**, 539-556.
6) Bennett, M.R. and Pettigrew, A.G. (1974). The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol.* **241**, 515-545.
7) Miyata, Y., Morimoto, S., Ikari, Y., and Hironaka, T. (1981). Origin of the spike discharges observed in muscles of dystrophic chickens. *Biomed. Res.* **2**, 664-672.

9. 筋ジスマウスの筋線維の成熟成長障害

戸塚　武*
研究協力者　渡辺貴美*　浦本　勲*
清野茂博*　大島章子*
水谷　昭*　嶋田勝彦**

マウスの筋ジストロフィー症（dy）は，骨格筋の成長が阻害されることによる疾患であることを，実験的に明らかにしてきた。成長の停止した筋が，成長を続ける骨によって引き伸ばされる（加齢に伴う筋一骨の不均衡の増大）ことが症状と密接に関連していると考えられる（Fig. 1）。実際に，我々は，小人症遺伝子（dw）を用いてdy マウスの成長を抑制することで，dy 症状の不顕化に成功した。[1] 最近，Zatz らは，Duchenne 型筋ジス症とGH欠乏による小人症の重複疾患児で，筋ジス症状が軽いことを報告している。[2] また，King らは，抗甲状腺剤の一つであるプロピルチオウラシル投与で，筋ジスニワトリの症状を軽減することに成功している（筋線維の異常肥大を抑える目的で抗甲状腺剤を使用した）。[3]

我々はまた，dy マウスの筋成長阻害が，筋線維の成熟成長阻害によることを，生化学的，形態学的に明らかにしてきた。[4] このことをさらに確かめるために，本研究を行った。

材料と方法

筋ジストロフィー症（dy）マウス（C57BL/6J dy/dy）と，正常マウス（dy/+と+/+）を用いた。

電気生理学的研究

ウレタン（1.0－1.5 g/kg，i.p.）で麻酔したマウスの坐骨神経刺激による腓腹筋の誘発筋電位を，針電極で単極導出した。刺激は双極電極を用いて0.05msec の矩形波を0.5または5 Hz で与えた。刺激強度は，最大振巾の誘発筋電位が得られた強度の2倍に設定した。誘発筋電位は10－20コ重ね焼きし，尖頭間振巾などを計測した。[5]

生化学的研究

マウスから前肢筋（triceps）を摘出し，0.02％NaN_3と0.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride を含む50 mM Na・P・buffer（pH7.4）中で，Polytron PT-10を用いてホモジナイズし，28,000 g×30minの遠心分離で得られた沈渣を上記bufferに懸濁した後，－20℃で凍結保存した。適時，凍結試料に1/25容量の50mM EDTA（pH 7.4）を加えた後解凍し，超音波処理をして以下の実験に使用した。

湿重で2.5 mg（1月齢より若いマウスについては1.25mg）の筋と1 nMの^{125}I－α－bungarotoxin（α－BGT）を50mMのNa・P・buffer（pH 7.4，2mg/ml のBSA，0.02％のNaN_3を含む）中で37℃1時間振盪加温し，それをミリポアフィルターで沪過した。試験管およびフィルターをBSAとNaN_3を含むNa・P・bufferで洗った後，フィルター上の放射能をγ－カウンターで測定した（R_1）。反応液中に1 μMの非標識α－BGTが存在した時の値（R_2）を同様に測定し，R_1からR_2を引いた値を^{125}I－α－B/GTの特異的結合とした。

＊愛知県心身障害者コロニー，発達障害研究所
＊＊名古屋市立女子短期大学

A BONE-MUSCLE IMBALANCE HYPOTHESIS

Gene dy

?

The growth of skeletal muscles
Is arrested:
Maturational defects of muscle fibers.

The growth of bones
Is almost normal.

Age-related increase in bone-muscle imbalance:
Progress of the disease?

POSSIBLE SYMPTOMATIC TREATMENTS?

I. Hypophysectomy* or anti-CH drugs.
II. Thyroidectomy or anti-thyroid drugs**.

Fig. 1. A bone-muscle imbalance hypothesis for the pathogenests of murine muscular dystrophy and possible symptomatic treatments?

*Latent dystrophic symptom in genotypically dystrophic-dwarf mice (Totsuka, T. et al., 1981), and a similar clinical case (Zatz, H. et al., 1981).

**Improved activity in propylthiouracil-treated dystrophic chickens (King, D.B. et al., 1981).

結　　果

電気生理学的研究

まず，0.5Hz刺激を行い，誘発筋電位の波形の特徴などを調べ，振巾値（尖頭間）を，罹患群，正常群で比較した。誘発筋電位は，高振巾の2相性の波（Fig.2，Aの上図）で，罹患群，正常群とも，外側より内側（同一腓腹筋では）で大きかった。[5] また，正常群に比べると，罹患群の振巾は少し小さめで，しかも個体間の変動が大きかった。すなわち，正常群に近い大きさ（例えば2月齢で80mV弱）のものや，⅔の大きさにも満たない（45mV）ものもあった。

つぎに，刺激の頻度を5Hzに上げたところ，Fig.2，Aの下図とB（各点は平均値）に示す通り，正常群の2月齢，7月齢のものでは，急激に振巾が減少した。しかし，正常群の16日齢，罹患群の16日齢と2月齢，のものは，5Hzの反復刺激に抵抗性を示し，あまり顕著な振巾の減少はみられなかった。特に，2月齢の例にみられるように，罹患群のなかには，振巾が増大するもの（試した14匹中7匹）さえ観察された。

生化学的研究

2週齢から8週齢のマウスを用いて，前肢筋のα－BGT結合活性の加齢に伴う変動を調べた（Fig.3）。dyマウスの発症（2週齢頃）後，初期の時点では，まだ正常群と罹患群の間にほとんど差はみられなかった。1月齢を過ぎる頃から，罹患群は，正常群に比べて異常に高い値を示すようになった（筋湿重あたり）。しかし，加齢に伴う変化としてこれを観察すると，正常群の値は加齢に伴い減少する傾向にある一方，罹患群の値は加齢と無関係にほぼ一定の傾向にあることが認められた。

形態学的研究

後肢筋（biceps）については，マウスの生後成長に伴い，正常群の筋線維の太さが10日齢（20μm位）から3月齢（40μm位）にかけて急激に増大する一方，罹患群の大部分の筋線維の太さは20μm位に止まっていることを，さきに明らかにした。[6] 前肢筋については，まったく報告がない。

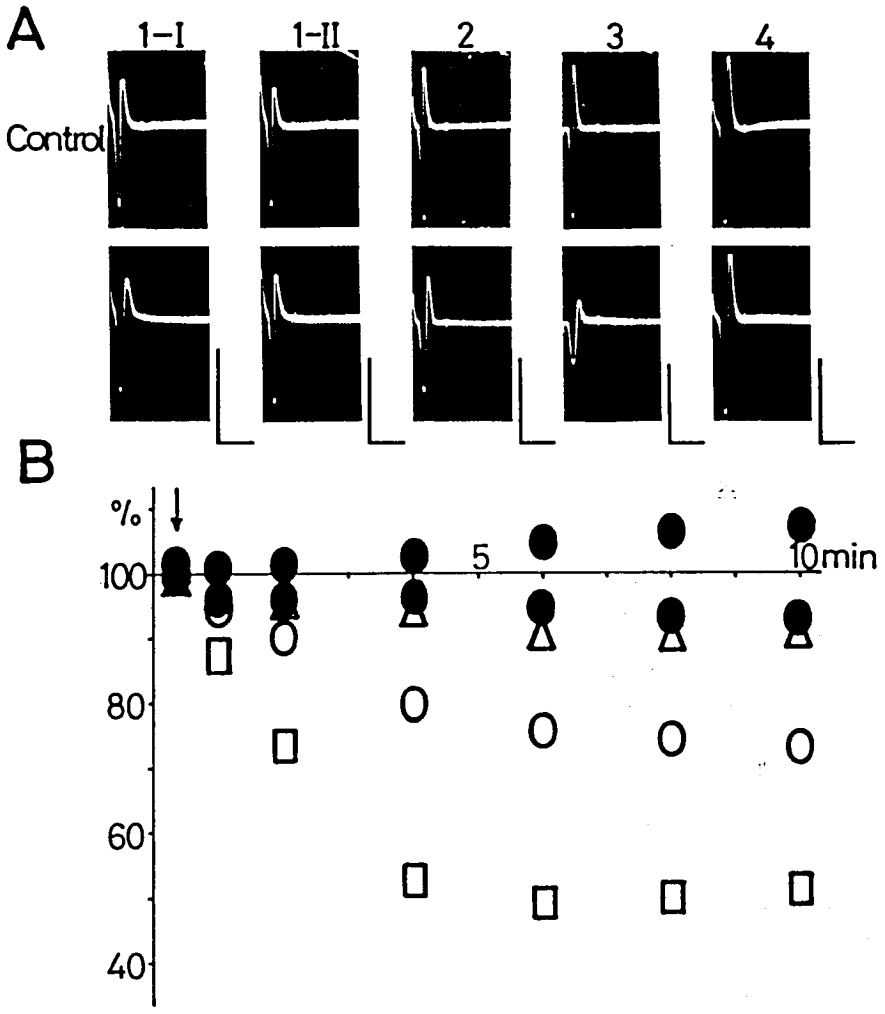


Fig. 2. Muscular potentials of gastrocnemius evoked by sciatic-nerve stimulation in dystrophic and normal mice.

A) Representative patterns by 0.5 Hz- (upper) and 5 Hz-stimulation (lower). 1-I and 1-II; 16-day- and 2-month-old dystrophic mice. 2, 3 and 4; 2-month-, 7-month- and 16-day-old normal mice. Calibration; 40 mV-4 msec.

B) Time-courses of changes in muscular potentials during 5 Hz-stimulation. An arrow indicates that these values were obtained immediately after the start of 5 Hz-stimulation. ●; 2-month-old dystrophic mice (n = 7 and 7). △, ○ and □; 16-day- (n = 8), 2-month- (n = 13) and 7-month-old (n = 7) normal mice. Means (%) at various times are plotted.

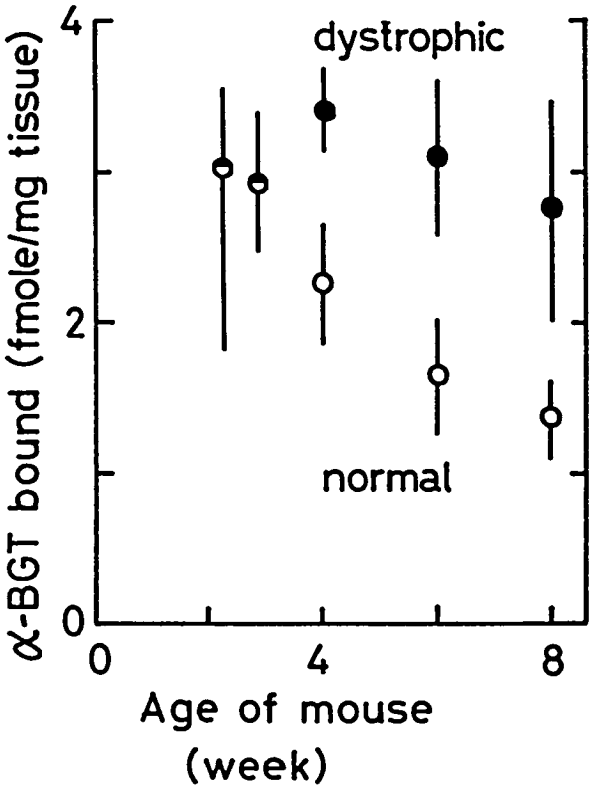


Fig. 3. Age-related changes in uptake of ^{125}I-α-BGT by homogenized muscles (forelimb, triceps) of dystrophic and normal mice.

そこで前報[6]と同様の方法（パラフィン，横断切片ＨＥ染色）で，２～３月齢の罹患マウスと正常マウスの前肢筋（triceps）の筋線維の太さを測定した。正常群の筋線維の太さ，37.1±10.7 μm（mean±S. D.，n＝716）に対して，罹患群の筋線維の太さは，22.5±11.5（n＝1,100）と顕著に細いことが分かった。生後成長との関連はまだ調べていないが，本結果と後肢筋の結果を合わせ考えると，前肢筋についても，正常マウスでは生後成長に伴う筋線維の肥大成長があり，罹患マウスでは筋線維の肥大成長が停止してしまっているらしいことが推察される。

考　　察

成熟マウスで，５Ｈｚの坐骨神経刺激に対する腓腹筋の反応性は，正常群と罹患群で大きく異なっていた。誘発筋電位の振巾からみるかぎり，正常群が見掛け上急速に疲労する一方，罹患群にはほとんど疲労がみられなかった。ただ，正常群の減衰後の振巾値が罹患群の振巾値に近かったことは，正常群の振巾の可変域は，罹患群の振巾を越えて正常成熟マウスが獲得した余裕分（優秀さを示す？）とも思われる。今回の実験結果は，Sandow＆Brust（1962）の結果（筋の直接刺激による筋張力測定→"dy筋は疲労に強い"）と相通ず

るものと思われる。

若いマウスでは，5 Hz の刺激に対する腓腹筋の反応性が，正常群，罹患群とも，成熟罹患マウスの場合とよく似て，誘発筋電位の振巾の減衰がわずかであった。これらの結果を総合して考えると，〝dy筋は疲労に対して強い抵抗性をもつ〟というよりは，〝dy筋では成熟成長が停止している〟とみるべきであると思われる。

我々は，dy マウスの前肢筋と後肢筋がいろいろな観点から，ほぼ同時に病に冒されることを明らかにしてきた[6]。今回の形態学的研究も，これを支持している。したがって，正常マウス前肢筋の加齢に伴うα－BGT結合量（筋湿重あたり）の減少は，筋線維容量の増大に伴う表面積の相対的な減少によると推察される。2－8週齢にかけて，前肢筋線維の太さが2倍（前肢筋，後肢筋の結果からの予測）になったとすれば，容量に対する表面積の比はほぼ½になると考えられ，筋湿重あたりのα－BGT結合量が½になったことが説明される。前肢に関する形態学的研究は，今後さらに詳しく行うつもりである。dyマウス後肢筋のα－BGT結合能が異常に高まっている（筋による差もある）ことは，Howeらが報告している（5－12週齢の129 strain のマウスでの in vivo実験[8]）。

結　　論

1. 成熟マウスで，ウレタン麻酔下5 Hzの坐骨神経刺激による腓腹筋の誘発筋電位の振巾は，正常マウスの場合時間と共に急速に減衰（一種の疲労？）したが，筋ジスマウスでは，少し変動（減衰する個体と増大する個体があった）がみられただけであった。この点に関する加齢変化を調べたところ，若いマウスでは，筋ジスマウスはもちろん，正常マウスでも誘発筋電位の振巾の減少傾向は非常に小さかった。このことから，筋ジスマウスの筋が見掛け上疲労に強いのは，筋の成熟度が低く，若い筋の状態に止まっているからだろうと推察された。

2. 筋ジスマウス前肢筋のα－BGT結合量（筋湿重あたり）は，加齢と無関係にほぼ一定であった（今回の実験条件下で）。正常マウス前肢筋のα－BGT結合量は，2－3週齢では筋ジスマウスの値とほぼ同様であったが，その後加齢に伴い減少した。これは，筋線維が成熟成長（肥大，伸長）するためであろうということを討論した。

文　　献

1) Totsuka, T., Watanabe, K. and Kiyono, S.: Masking of a dystrophic symptom in genotypically dystrophic-dwarf mice. *Proc. Japan Acad.*, **57B**: 109-113 (1981).
2) Zatz, M., Betti, R.T.B. and Levy, J.A.: Benign Duchenne muscular dystrophy in a patient with growth hormone deficiency. *Amer. J. Med. Genet.*, **10**: 301-304 (1981).
3) King, D.B., King, C.R. and Jacaruso, R.B.: Avian muscular dystrophy: Thyroid influence on pectoralis muscle growth and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Life Sci.*, **28**: 577-585 (1981).
4) Totsuka, T., Watanabe, K. and Kiyono, S.: Maturational defects of muscle fibers in the muscular dystrophic mouse. *Cong. Anom.*, **21**: 253-259 (1981).
5) 浦本勲，渡辺貴美，戸塚武，清野茂博：筋ジストロフィー症マウスの誘発筋電位：反復刺激による経時的変化．脳研究会誌，印刷中.
6) Totsuka, T. and Watanabe, K.: Some evidence for concurrent involvement of the fore- and hindleg muscles in murine muscular dystrophy. *Exp. Anim.*, **30**: 465-470 (1981).
7) Sandow, A. and Brust, M.: Effects of activity on contractions of normal and dystrophic mouse muscles. *Am. J. Physiol.*, **202**: 815-820 (1962).
8) Howe, P.R.C., Livett, B.G. and Austin, L.: Increased binding of α-bungarotoxin in dystrophic mouse muscle. *Exp. Neurol.*, **51**: 132-140 (1976).

10. 「三つの筋神経系異常マウスにおける指標酵素の活性変動の比較」

松下　宏
研究協力者　辻　繁勝

筋の発生と分化を研究する手段の一つとして，先天性の筋異常形質を発現する実験動物を用いて正常形質と比較対照し両形質間に在る差異を分析する方法が考えられる。更に同一動物種内で生じた類似の筋異常形質を数多く集めて，相互の発現形質の差異を比較検討することによってより微細な変化を追求出来るものと思われる。マウスの筋異常形質としては従来，dyおよびdy^{2J}形質が専ら利用されて来たが，最近に至って，muscle deficient (mdf), muscular dysgenesis (mdg) motor end-plate disease (med), myodystrophy (myd) などの筋異常突然変異形質が次々に見出されて，筋の発生と分化の研究に好適な材料として利用されるようになって来ている。我々はこれらの異常形質の中で発現症状がdy形質に最も近いmydマウス[1]，および金沢大学(早川純一郎助教授）で見出された新しい筋異常突然変異体（new mutant，仮称）とdyマウスの三形質を用いて主として筋の分化に対する神経系の影響に就いて研究を進めたいと計画している。本年度は，発現症状の未だよく判っていないmydマウスおよびnew mutantに就いて骨格筋，血清，中枢神経系などの臓器における疾病の指標酵素群の活性変動を測定しdyマウスのそれと比較検討した。

材料と方法

dyマウスはC57BL/6J-dy，mydマウスはMYD/J-myd系統をJackson研究所より輸入し，当教室で目家繁殖したものを，又new mutantは金沢大学医学部動物実験施設より提供して載いたものをそれぞれ実験に使用した。使用時のマウスの週令は6～12週である。血清は断頭採血後30分間室温静置後2,000rpm, 10分間遠心分離して取出したものを酵素標品として使用した。骨格筋，脳および脊髄神経組織は断頭瀉血後速やかに10倍容（骨格筋）又は20倍容（神経組織）の0.32M蔗糖液に入れ，テフロンホモジナイザーでホモジナイズする。以下筋ホモジネートは通常のSchneider法に従って可溶分画を分離し，又神経組織のホモジネートはNorton法[2]に従ってpurified myelin分画を分離しそれぞれ酵素標品として使用した。酵素活性の測定はCPKはHessらのUV法[3]，GOTおよびGPTはKarmen法[4]LDHはWroblewski法[5]，PKはTanakaらの方法[6]，CNPはSogin法[7]，CEHは遊離したコレステロールをコレステロールオキシダーゼ法によって定量する方法[8]，がそれぞれ用いられた。尿中のクレアチン・クレアチニン量測定はJafféの方法[9]，酵素標品中の蛋白含量はLowry法によって測定した。

結果

尿中クレアチン・クレアチニン含量：まず3突然変異体マウスの尿中クレアチンおよびクレアチニン排泄量を測定したところ表1の如く3形質共に著しいクレアチン尿症を呈していることが認め

＊和歌山県立医科大学，第二生理学教室

Table 1. Urine creatine and creatinine contents of mice with neuromuscular mutations

	Creatine	Creatinine	Ratio
Dystrophy	14.01 ± 2.56	6.54 ± 2.24	2.24
Normal	5.95 ± 0.38	7.39 ± 0.45	0.81
Pr.	P < 0.01	N.S.	P < 0.01
Myodystrophy	12.73 ± 2.53	8.83 ± 1.54	1.45
Normal	6.03 ± 1.08	9.81 ± 1.08	0.61
Pr.	P < 0.01	N.S.	P < 0.01
New mutant	11.42 ± 1.36	8.24 ± 1.03	1.39
Normal	6.52 ± 0.81	10.17 ± 1.49	0.63
Pr.	P < 0.01	N.S.	P < 0.01

Unit: mg/dl

Table 2. CPK activities in muscles and sera of mice with neuromuscular mutations

	Serum	M/N x 100	Pr.	Muscle	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	3.05 ± 0.07	128.1	P < 0.05	11.7 ± 2.8	54.9	P < 0.01
Normal	2.38 ± 0.25			21.3 ± 3.3		
Myodystrophy	5.14 ± 1.39	257.0	P < 0.01	4.3 ± 0.4	17.4	P < 0.01
Normal	2.00 ± 0.21			24.7 ± 5.7		
New mutant	5.50 ± 0.70	194.3	P < 0.01	10.2 ± 2.4	41.0	P < 0.01
Normal	2.83 ± 0.87			25.0 ± 2.6		

Unit; mg Pi/mg protein or ml serum/30 min.

Table 3. PK activities in muscles and sera of mice with neuromuscular mutations

	Serum	M/N x 100	Pr.	Muscle	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	5.73 ± 1.37	329.3	P < 0.01	3.7 ± 0.2	25.6	P < 0.01
Normal	1.74 ± 0.42			14.6 ± 0.4		
Myodystrophy	8.04 ± 1.58	643.2	P < 0.01	7.3 ± 2.4	61.9	P < 0.01
Normal	1.25 ± 0.33			11.8 ± 1.04		
New mutant	2.60 ± 0.38	89.0	N.S.	7.2 ± 0.5	50.2	P < 0.01
Normal	2.92 ± 0.59			14.4 ± 2.1		

Unit: △O.D./mg protein or ml serum/min.

Table 4. LDH activities in muscles and sera of mice with neuromuscular mutations

	Serum	M/N x 100	Pr.	Muscle	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	3.75 ± 1.28	107.4	N.S.	64.3 ± 3.4	72.9	P < 0.01
Normal	3.49 ± 1.59			88.1 ± 9.0		
Myodystrophy	8.33 ± 1.15	247.2	P < 0.01	48.8 ± 10.5	58.3	P < 0.01
Normal	3.37 ± 0.45			83.7 ± 9.1		
New mutant	3.69 ± 0.61	69.5	P < 0.05	110.0 ± 3.9	99.6	N.S.
Normal	5.31 ± 0.70			110.5 ± 3.7		

Unit: Wroblewski U./μg protein or μl serum/min.

Table 5. GOT activities in muscles and sera of mice with neuromuscular mutations

	Serum	M/N x 100	Pr.	Muscle	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	6.2 ± 0.1	112.7	N.S.	23.5 ± 1.3	207.9	P<0.01
Normal	5.5 ± 1.1			11.3 ± 1.1		
Myodystrophy	10.7 ± 0.5	201.8	P<0.01	14.1 ± 0.9	111.9	N.S.
Normal	5.3 ± 1.0			12.6 ± 0.6		
New mutant	5.2 + 1.2	89.6	N.S.	10.2 ± 1.1	46.1	P<0.01
Normal	5.8 ± 1.0			22.1 ± 3.2		

Unit: Karmen U./μg protein or μl serum/10 min.

Table 6. GPT activities in muscles and sera of mice with neuromuscular mutations

	Serum	M/N x 100	Pr.	Muscle	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	45.3 ± 10.2	234.1	N.S.	423 ± 18	251.1	P<0.01
Normal	19.3 ± 1.2			168 ± 47		
Myodystrophy	18.2 ± 6.8	272.9	N.S.	390 ± 71	216.6	P<0.01
Normal	6.7 ± 1.4			180 ± 13		
New mutant	16.8 ± 2.5	75.0	N.S.	684 ± 40	230.6	P<0.01
Normal	22.4 ± 1.8			297 ± 25		

Unit: Karmen U./mg protein or ml serum/2 min.

Table 7. CEH and CNP activities in brains of mice with neuromuscular mutations

	CEH	M/N x 100	Pr.	CNP	M/N x 100	Pr.
Dystrophy	14.3 ± 0.7	52.3	P < 0.01	11.5 ± 0.9	66.7	P < 0.01
Normal	25.7 ± 3.4			17.3 ± 1.6		
Myodystrophy	47.6 ± 12.5	125.4	N.S.	14.8 ± 3.2	72.3	P < 0.01
Normal	37.9 ± 12.6			20.4 ± 2.4		
New mutant	16.3 ± 1.4	40.8	P < 0.01	16.4 ± 4.3	105.8	N.S.
Normal	39.9 ± 5.2			15.5 ± 5.6		

Units: CEH; μM oleate/total myelin/min.
CNP; μmoles NADP/total myelin/min.
Age of mice used: 6-12 weeks.

られた。又，クレアチン・クレアチニン比もいずれの場合にも正常対照の2倍以上に増加しており，dy マウスが最も高く，mydマウスとnew mutantはほぼ同程度であった。

骨格筋および血清中の酵素活性：CPK活性は表2の如く，3形質共に骨格筋で低下し，血清中で上昇するという，同じ傾向を示していたが，中でもmydマウスで最も顕著な変化が認められた。new mutantはdyマウスに近い変化を示していた。次にPK活性の変化は表3に示される如く，骨格筋の場合，3形質共に著しい減少を見せているのに対して血清中への漏出がnew mutantでは全く認められなかった。表4はＬＤＨ酵素の活性に就いての結果であるが，mydマウスでは骨格筋中で減少し，血清中に多量に漏出するという典型的なパターンが見られるのに対して，dy マウスでは骨格筋中での低下は認められたが血清中の変化は有意差が無く，又new mutantでは両臓器で共に大きな変化が見られなかった。ＧＯＴ酵素の活性変化は表5の如く，dyマウスとmyd マウスで共に骨格筋中と血清中で増加の傾向を示しているのに対してnew mutant では両臓器で共に減少するという，他の2形質とは異った変化を示していた。一方ＧＰＴ活性の変化は3形質共に骨格筋中で有意に増加をしているが，血清中での変化にはバラ付きが大きくて統計的な有意差が無いという同一のパターンを示していた（表6）。

中枢神経組織中の酵素活性：dy マウスでは既に中枢神経系中のミエリン分画に存在するＣＥＨ酵素およびＣＮＰ酵素の活性が著しく変化している事実が認められている[10]ので，他の2形質に就いても，これら酵素の活性測定を行い，dy マウスの場合と比較した。結果は表7の如く，mydマウスの場合はＣＮＰ活性が有意に低下しているのに対して，ＣＥＨ活性には変化がなく，又new mutantの場合はＣＥＨ活性が著しく低下しているのに対してＣＮＰ活性には変化が見られないという3者3様の結果が得られた。

考　　察

尿中のクレアチン・クレアチニン比がいずれの場合も著しく高くなっていることから，これら3形質の骨格筋ではクレアチン保持能力の低下が存在することがうかがわれる。又骨格筋中および血清中の指標酵素の活性変動からいずれの形質も進行性筋萎縮症状を発現していることは明らかである。然し，その中でmydマウスの血清中指標酵素の変化は所謂仮性肥大型の筋ジストロフィー症に類似したパターンを示しているのに対して，他の2形質ではやや異なった変化を示しているのが注目される。又，血清中へのＰＫ酵素の漏出に就いて，3形質の間に相違が見られたことは，3形質の間に膜の透過性の異常に関して差異があることを示唆しており，更にnew mntantではＰＫとＣＰＫで血清中への漏出程度が全く異ることから，この変化がＰＫ酵素の分子量がＣＰＫ酵素の3倍大きいという事に由来するのか，或いはnew mutantでは糖代謝に関して他の2形質とは違った変化をしているのかなどの疑問が残り，筋ジストロフィー症状発現におけるＰＫ酵素の役割，或いは血清中指標酵素としての意義を知る上で興味ある変化と考えられる。中枢神経系中の2酵素の活性変動に就いては，mydマウスに見られたＣＮＰ活性の低下は脊髄根部にミエリン鞘の欠落した神経軸索がdy マウスの場合と同様に，束になって存在するという報告[11]があり，うなずける結果である。一方new mutantではＣＥＨ活性が正常対照の半分以下になっており，中枢神経系のミエリン分画におけるコレステロール代謝に欠陥が存在する可能性を示唆している。この点に関してはdy マウスも類似の変化を示しており，今後両者の比較研究に興味が持たれる。

要　　約

(1) myodystrophy（myd）マウスおよび新たに見出された筋神経系突然変異体（new mutant）の骨格筋，血清および中枢神経系中の指標酵素の活性変動を測定し，dy マウスの場合と比較検討

した。いずれの変異体マウスも進行性筋萎縮症特有の変化を示していたが，mydマウスと他の2形質では変化のパターンがやや相違しているのが認められた。

(2) new mutantの変化は種々の点で dy マウスと類似しているが，症状進行速度，血清漏出酵素のパターンなどに関して差異が認められた。

文　　献

1) Lane, P.W., Beamer, T.C. and Myers, D.D.: Myodystrophy, a new myopathy on chromosome 8 of the mouse. *J. Hered.* **67**: 135-138, 1976.
2) Norton, W.T. and Poduslo, S.E.: Myelination in rat brain, Method of myelin isolation. *J. Neurochem.* **21**: 749-757, 1973.
3) Hess, J.W., Murdock, K.J. and Natho, G.J.W.: Creatine phosphokinase, a spectrophotometric method with improved sensitivity. *Am. J. Clin. Pathol.* **50(1)**: 89-97, 1968.
4) Karmen, A., Wroblewski, F. and LaDue, T.S.: Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* **34**: 126, 1955.
5) Wroblewski, F. and LaDue, J.S.: Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **90**: 210-213, 1955.
6) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H.: Cristallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. *J. Biochem.* **62**: 71-91, 1967.
7) Sogin, D.C.: 2',3'-cyclic NADP as a substrate for 2',3'-cyclic 3'-phosphohydrolase. *J. Neurochem.* **27**: 1333-1337, 1976.
8) Richmond, W.: Preparation and properties of cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **19(12)**: 1350-1356, 1973.
9) Taussky, H.H.: A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* **208**: 853-861, 1954.
10) Tsuji, S. and Matsushita, H.: 2',3'-cyclic nuceotide 3'-phosphohydrolase and cholesterol ester hydrolase in brain and spinal cord of dystrophic mice. Current Research in Muscular Dystrophy, Japan. **1**: 47-48, 1979.
11) Rayburn, H.B. and Peterson, A.C.: Naked axons in myodystrophic mice. *Brain Res.* **146**: 380-384, 1978.

Ⅳ 生　理　学

11　Ｌ６筋芽細胞培養におけるテトロドトキシン感受性活動電位の発達　59

12　筋細胞膜における膜興奮機能の発生　64

13　両生類骨格筋の遅速両筋線維の比較　69

11　L 6 筋芽細胞培養におけるテトロドキシン感受性活動電位の発達

加　濃　正　明*
研究協力者　山　崎　捨　夫*　佐　藤　諦　吉*
山　本　三　恵*

脊椎動物成体の骨格筋で発生する活動電位は，Na チャンネルの作用によるスパイク電位であることは周知のことである。このNa チャンネルは非常に低濃度（10^{-7}～10^{-8}M)のテトロドキシン（ＴＴＸ）により遮断されるのが特徴である[1,2]。しかし，ラットやマウスの骨格筋においては，神経支配を断つことにより，このTTX 感受性の Na チャンネルが，TTX 抵抗性のNa チャンネルに変化することが知られている[2,3]。さらに，生後間もないラットの骨格筋では，Na チャンネルの殆んどがTTX 抵抗性であり，生後神経支配の完成に伴なって，TTX感受性のNa チャンネルへと変化していく[4]。Na チャンネルには，TTX 抵抗性及び，TTX 感受性という二種類の異なるタイプのものが存在し，前者から後者への分化には神経支配が重要な役割を果していることがわかる。ラット由来の筋芽細胞株（Ｌ６）[5]を用いての細胞培養骨格筋においては，単核細胞の融合がおこると，スパイク電位を発生する性質が急速に発達する[6,7]。この多核の筋管でみられるスパイク電位は，外液のNa イオンの除去で消失するのでNa チャンネルの作用による電位である。しかし，10^{-6}M程度の濃度のTTXによっては遮断されず，TTX 抵抗性のNa チャンネルの作用によるものである[6,7]。これは除神経されたラットやマウスの成体骨格筋に相当し，神経支配がない為と考えられる。最近，神経支配の代りに神経性組織の抽出液をマウス骨格筋の器官培養に加えることによって，TTX感受性Naチャンネルの減少が抑制されるという報告があり，神経支配を代行する栄養物質の存在が確かめられている[8]。さらに，ニワトリ胚由来の培養骨格筋に於ても，培養液にニワトリ神経組織の抽出液を加えることによって，TTX感受性Na チャンネルの発達が促進される[9,10]。ラット筋芽細胞株（Ｌ６）を用いての培養においても，神経性組織抽出液を加えることによってTTX感受性Na チャンネルの発達が起こるのではないかと考えられる。

本研究では，このことを確めるべく，Ｌ６株細胞の培養に，ラット胎児の脳抽出液を加えて，スパイク電位の TTX 感受性を調べてみた。

方　　法

細胞培養：　ラット由来の筋芽細胞株（Ｌ６）は，三菱化成生命科学研究所の天野武彦先生からの贈与を受けた。これを，ダルベコ変法イーグル培地（DMEM）にウシ胎児血清10％を加えた培養液を用いて継代培養して増殖させたのち，上述の培養液に１０％のジメチルスルホキシドを添加した液中で細胞を凍結して，これを－80℃で保存し，必要に応じてこれを融解して使用した。

凍結保存されたＬ６筋芽細胞は37℃の水槽内で手早く融解し，培養液を加えて遠心することによってジメチルスルホキシドを除去した後，継代培養して実験用の細胞を得た。実験用培養は，10％

＊北里大学医学部生理

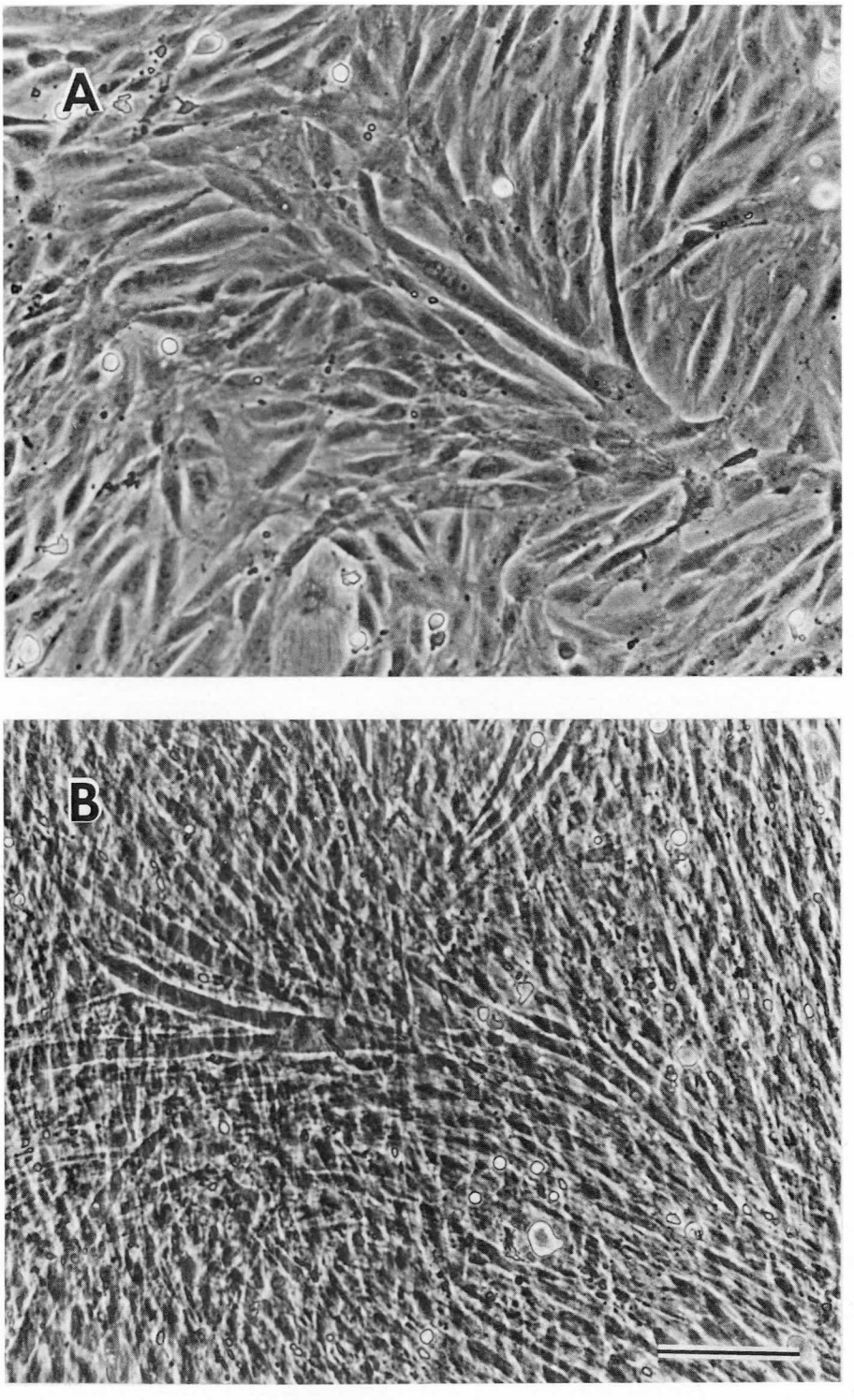


図1　L 6筋芽細胞株を用いての培養。脳抽出液を加えない対照培養の写真で，Aは培養4日目のもので，多核の筋管が形成されている。Bは培養11日目のもので長い筋管が多数みられる。Bにあるスケールは 100μmを示す。

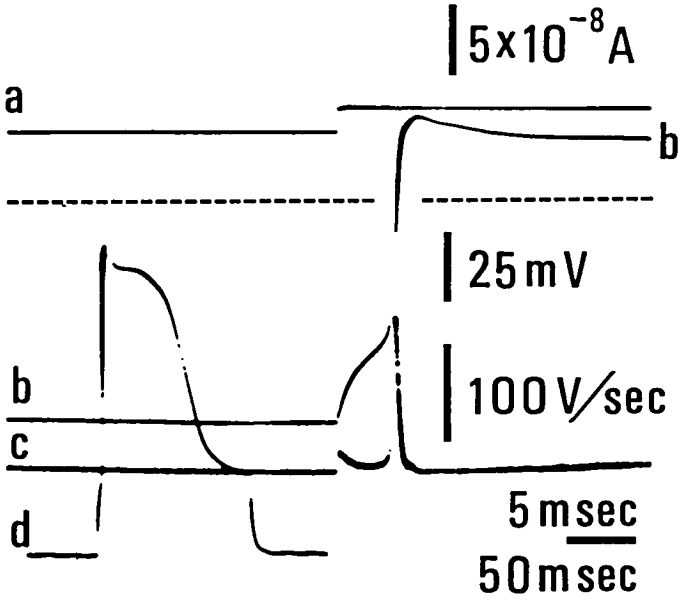


図2　L 6 筋芽細胞株を用いての培養17日目でえられた筋管からの活動電位の記録。脳抽出液を加えない対照培養における例である。通電により静止膜電位を－80mVに移動させた後脱分極性電流刺激（a）を行ない，発生した活動電位を速い掃引速度（b）と遅い掃引速度（d）で同時記録した。（c）は活動電位の微分波形を速い掃引速度で示したものである。点線はトレース（b）に対する0電位を示している。

表1　培養 17～18 日目の筋管におけるスパイク電位の最大立上り速度（V／sec）。

	Normal Saline	TTX Containing Saline
Control	132.50 ± 10.72 (14)	122.23 ± 15.54 (13)
Br. Extract	153.34 ± 10.23 (16)	78.75 ± 9.04 (16) *

Values are Mean ± SE. Numbers in the parentheses are myotubes examined. * indicates a significant decrease.

対照培養と脳抽出液を加えた実験培養について，正常塩類溶液およびTTX（10^{-6}M）を含む塩類溶液の両方の外液中で測定した。

の馬血清を含むDMEMを用い，細胞濃度を10^6 cells/mlとした後，これをコラーゲン塗布した60mmのプラスチック培養皿に3ml加えて培養を行った。培養液交換は，8日目まで半量の交換を2日毎に行ない，15日目に全量の交換を行なった。尚対照群には馬血清を，実験群にはラット胎児脳の抽出液を，全培養期間中2日毎に各100μlづつ加えた。本培養は，培養17～18日目で次に述べる電気生理学的実験に供された。ラット胎児脳の抽出液は妊娠20日令のウィスター系ラットより胎児を無菌操作の下で取り出し，さらに脳のみを集めこれに2倍量のタイロイド溶液を加えてホモジナイザーにかけ，それを遠心してえられた上清である。

電気生理学：　上述したように，17～18日令の培養を用い，培養液を塩類溶液に置換した後に倒立顕微鏡下で実験を行なった。実験は，培養細胞を約37℃に保ち，酸素の供与を行ない乍ら行なわれた。培養で形成された多核の筋管一本に，二本の細胞内電極を挿入して，一方より通流を行ない，他方で膜電位を記録した。活動電位の記録に際しては，あらかじめ静止膜電位を通流によって－80mVにして，Naチャンネルの不活性化を除いた後，脱分極性の電流刺激を行ない，最大の活動電位が得られる様に配慮した。

結　　果

図1は，L6筋芽細胞の培養状態を示す例である。本図は馬血清を加えた対照培養における筋細胞発生を示したものである。Aは培養4日目のものであり，この前後から筋芽細胞の融合により長い多核の細胞（筋管）の形成が始まり，日を追って次第にその数が増加してゆく。又，この筋管の長さも増してゆくことが多い。Bは培養11日目のものであるが，この頃ではまだ横紋の見られることは少ない。しかし，長い筋管の数はかなり増加している。さらに培養を続けていくと，14日目頃から時々横紋を持つ筋管が見られるようになり，培養3週目では，殆んどの筋管に横紋が出現する。ここでは図示されていないが，培養液中にラット胎児から得た脳抽出液を加えた実験群の培養の場合には，この筋管の発達が促進される。すなわち，培養日数の同じものでは，脳抽出液を加えた培養の方が筋管の数が多く，横紋の形成も早い。この場合の培養では，2週目で半数以上の筋管に明瞭な横紋が見られたが，対照培養ではこの時期で，横紋は非常に稀であり，あっても不明瞭である。

17～18日令のL6株細胞培養での電気生理学的知見は以下の様であった。先づ，静止膜電位をみると，対照群及び脳抽出液を加えた実験群の両方共，同じ様な値を示しており約－50mVであった。

図2は，培養17日令の対照培養の筋管で得られた活動電位を示したものである。(a)は刺激電流，(b)は活動電位，(c)はこの活動電位波形を微分したもので，活動電位の立上り速度を得ることができる。(d)は，(b)の活動電位を$1/10$のスピードで記録したものである。図からわかる様に，L6株細胞の培養で得られる骨格筋細胞においては，二種類の活動電位の成分が見られる。一つは立上がりの速い持続の短いスパイク電位で，他はこのスパイク電位に続く持続の長いプラトー電位である。培養17日令は，トレース(b)に示される様にオーバーシュートを示す活動電位が殆んどである。Kidokoro[7]やLand[6]らによれば，この活動電位のうちスパイク電位は，Na依存性の活動電位であるが，10^{-6}M程度のTTXに対しては影響されず，TTX抵抗性Naチャンネルの作用によるものである。一方，プラトー電位の方は，Caチャンネルの作用によるものである。我々は，ここで，このNaチャンネルによる活動電位の発達を見る為に，図2(c)に示されているスパイク電位の立上がり速度の最大値を計測して，これをNaチャンネルの発達の指標とした。表1はこの結果をまとめたものである。馬血清を加えた対照群では，その最大立上がり速度が約132V/sec前後となっており，TTX（10^{-6}M)を投与しても，有意な減少は見られなかった。一方，胎児脳の抽出液を加えた実験群

では，TTX投与前で，対照群よりやや高い最大立上がり速度を示しているものの，有意な差は見られなかった。しかし，TTXを前述と同様の濃度で投与することによって，この最大立上がり速度は約半分に低下し，統計的に有意な差が認められた。

考　　察

本実験では，スパイク電位の最大立上がり速度を指標として，L 6筋芽細胞株の培養における，Naチャンネルの発達を見てきた。Naチャンネルの発達は，馬血清を培養液に加えた対照群では殆んどがTTX抵抗性のものであることがわかった。これはLandら[6]や，Kidokoro[7]によって報告されているものと同じと考えられる。しかし，本実験で示された様に，培養液にラット胎児脳の抽出液を加えることによって，TTX感受性のNaチャンネルの出現がみられる。このことは，TTX投与（10^{-6} M）で，スパイク電位の最大立上がり速度が有意に減少することによって分かる。つまり，神経性組織の抽出液は，培養条件下で，神経支配を代行しうるものであると考えられ，神経栄養物質がその中に含まれていると考えられる。これは，我々が今まで行なって来たニワトリ胚由来の骨格筋細胞培養での知見[9,10]と一致するものである。

文　　献

1) Narahashi, T., Deguchi, T., Urakawa, N. and Ohkubo, Y. (1960) Stabilization and rectification of muscle fiber membrane by tetrodotoxin. *Amer. J. Physiol.* 198: 934-938.
2) Harris, J.B. and Thesleff, S. (1971) Studies on tetrodotoxin resistant action potentials in denervated skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 83: 382-388.
3) Redfern, P. and Thesleff, S. (1971) Action potential generation in denervated rat skeletal muscle. II. The action of tetrodotoxin. *Acta Physiol. Scand.*, 82: 70-78.
4) Harris, J.B. and Marshall, M.W. (1973) Tetrodotoxin-resistant action potentials in newborn rat muscle. *Nature New Biol.* 243: 191-192.
5) Yaffe, D. (1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. N.A.S.* 61: 477-483.
6) Land, B.R., Sastre, A. and Podleski, T.R. (1973) Tetrodotoxin-sensitive and -insensitive action potentials in myotubes. *J. Cell. Physiol.* 82: 479-510.
7) Kidokoro, Y. (1973) Development of action potentials in a clonal rat skeletal muscle cell line. *Nature New Biol.* 241: 158-159.
8) Kuromi, H., Gonoi, T. and Hasegawa, S. (1979) Partial purification and characterization of neurotrophic substance affecting tetrodotoxin sensitivity of organ-cultured mouse muscle. *Brain Research* 175: 109-118.
9) Kano, M., Suzuki, N. and Ojima, H. (1979) Neurotrophic effect of nerve extract on development of tetrodotoxin-sensitive spike potential in skeletal muscle cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 99: 327-332.
10) Yamazaki, S. and Kano, M. (1981) Development and maintenance of tetrodotoxin-sensitive action potential in cultured muscle cells from dystrophic and normal chickens. *Exp. Neurol.* 74: 408-418.

12　筋細胞膜における膜興奮機能の発生

高　橋　國太郎
研究協力者　平　野　丈　夫

脱分極によってCaイオン透過性が増加して細胞内にCaイオン流入をひき起こす機構すなわちCaチャンネルは興奮性膜の重要な成分であり，個体発生的にみても，系統発生的にみても広い分布をしめしている[1]。たとえば脊椎動物成体の骨格筋は従来典型的なNaスパイクを発生し，殆んどCaチャンネルはないと考えられていたが，最近の研究によるとTTXおよびTEA存在下で電圧固定をおこない電流を解析すると明らかにNa電流とはことなった時間経過を示すCaイオン依存性の電流が見られている。もちろん心筋・平滑筋におけるCaチャンネルの存在はすでに多くの報告がある。骨格筋についても発生初期の筋管細胞膜においてはNaスパイクとともに長い持続をもつCaプラトーからなる複合電位がみられている[2]。したがって興奮性膜として骨格筋細胞が分化する際に，Caチャンネルの質的・量的な変化がともなっていることは充分予想できる。

一方甲殻類の横紋筋で発見され，シナプス前部・軟体動物の神経節細胞などに見られるCa電流は持続がきわめて長く不活性化が少ないのが特徴である[1]。またこれらのCa電流は外液のCaイオンをBaイオンでおきかえるとさらに持続の長いBa電流となり，電流振巾も増大するので，そのCaチャンネルはBaイオンに対し透過性が高いと考えられている[1]。またCaチャンネルの場合には不活性化過程は透過するイオンにより差があり，Ca電流ではBa電流よりも電流の減少が大きく，電流依存性の不活性化が見られることが最近報告されている[1]。これはCaチャンネルを透過するCaイオンが細胞膜内面にたまり，Caチャンネルの開放が抑制されることによると考えられている。

ところが我々の研究によるとホヤ・ウニ・ヒトデ・ハツカネズミなど各種の卵細胞に見られるCaチャンネルではSrイオンに対し透過性が高く，かつ電流の時間経過はチャンネルを通過するイオンの種類にはよらず，不活性化の時定数も比較的短くNaチャンネルに見られるようなHodgkin－Huxley型の電圧依存型不活性化が見られる[3]。他の興奮性膜に見られるCaイオン依存性の不活性化は考えにくい。すなわち卵細胞のCaチャンネルは明らかに他の分化した細胞に見られるものと異なっている。卵細胞は発生という面から見ると出発点に属し，この時点でのCaチャンネルが発生分化につれて出来上って行く興奮性膜にみられるものとどのように関係するのかは興奮性膜の分化という面から極めて重要な問題である。

ホヤ発生卵においては8細胞から16細胞胚などの初期に細胞分裂を停止しても，大型の割球にそれぞれの分化がおこり，予定領域の運命にしたがって興奮性膜の分化が見られることはすでに報告した[4]。最近さらに初期の1細胞・2細胞・4細胞胚でサイトカラシンBで分裂停止した場合には体細胞のすべての膜の性質がモザイク的に表面に現れるのではなくて一定の細胞に見られる形質すなわち表皮細胞型の活動電位が発生することがわかった。この活動電位はSr溶液中で観察すると持続がきわめて長く，他の興奮性膜におけるCa

＊東京大学医学部脳研究施設神経生物学研究室

チャンネルによる活動電位とよくにていることがわかった。したがって，この発生直後に分裂を停止した未分裂ホヤ発生卵における膜の分化過程を観察して，卵細胞型から分化型のCaチャンネルへの発生にともなう変化を解析することを目的とした。

研究方法

低温海水槽（1.5～2.5℃）に保存してある抱卵ホヤを一昼夜高温海水（11～12℃）で飼うと放卵する。この卵と他の個体が放精した精子海水を混合して受精をおこなった。受精後は8℃の恒温槽に受精卵を入れたシャーレを入れて発生させた。受精卵のうち一部は対照としてそのまま発生させ，残りは第一分裂開始前にサイトカラシンB 2μg/mℓを含有する海水に入れて飼育した。この未分裂発生胚を対照の発生卵から幼生が孵化する時点まで飼育すると細胞膜が分化して興奮膜となる。

未受精卵および未分裂発生胚のコリオン膜は，プロネース10mg/mℓを含む海水に30分以上浸してから解剖針をもちいて除去した。この裸になった卵あるいは胚細胞を100mM $SrCl_2$，400mM NaCℓ，10mM KCℓ，5mM PIPES-Na（pH 7.0），10mg/mℓ BSA，2μg/mℓ サイトカラシンBからなる基準人工海水中に入れ，電圧固定法をもちいて膜電流の解析をおこなった。電圧固定は通常の二本の3MKCℓガラス微小電極を刺入しておこない，その装置については他にすでに発表してある。[5] またCaチャンネルの不活性化の過程で解析する際に，外向き電流の影響を除外するためにCa電流のTail電流を測定しこれより内向き電流の時間経過を解析した。

研究結果

(1)未分裂発生胚を対照の発生卵が孵化するまでの時間サイトカラシンB含有海水中で飼育したのち，この実験で基準とした100mM Sr人工海水中で記録すると，静止電位は約−70mVでK平衡電位に近く，また−30mV以上脱分極すると持続2秒以上もある活動電位を発生した。活動電位は外液のNaイオンを除去しても変化せずSrイオン依存性でオーバーシュートは40～50mVであった。遅延整流特性を示唆する急速な下降期は見られなかった。この活動電位はすでに報告した分裂停止8細胞胚・16細胞胚においても見られ，その場合には予定表皮細胞域で発生するので表皮細胞型活動電位として報告したものである。

(2)未分裂発生胚を100mM Sr基準人工海水中で電圧固定して解析すると図1に示すように−30mVから内向き電流が流れ始め，＋15mVで最大になった。Mn溶液中では漏れ電流のほかは外向き電流はみられず，膜電流は殆んど純粋のCaチャンネル電流であることがわかった。電流の時間経過は同じSr溶液中での卵細胞の電流に比べて遅く，電流電圧曲線も卵細胞にくらべて負の方向に15mVほど移動していた。分化した未分裂発生胚のCaチャンネル電流は他の興奮性膜において見られるのと同様にLaイオンなど多価イオンで効果的に抑制された。

(3)分化した未分裂発生胚を100mM Ca溶液(基準人工海水のSrイオンをCaイオンで置換したもの）中で電圧固定すると膜電流はCaイオンによる内向き電流とKイオンによる外向き電流の二相性となった。この外向き電流は遅延整流性K電流ではなく，電流電極に1M $EGTAK_2$電極をもちいて細胞内にEGTAを注入すると消失し，Ba溶液中でも消失したのでCa依存性K電流であることがわかった。（図2）。

(4)1M $EGTAK_2$電流電極から細胞内に1mM程度にEGTAを注入してから，Ca・Sr・Ba溶液中で次々に電圧固定し，卵細胞の膜電流と比較したのが図3である。卵細胞においてはCaチャンネルのイオン選択性はCa≒Ba＜Srの順であり，閾値はBa＜Sr＜Caの順に高くなった。これに反して分化した未分裂発生胚ではCa＜Sr＜Baの順で透過し，閾値はBa＜Sr＜Caの順で高くなった。時間経過はBa溶液・Sr溶液中では卵細胞の方が早い不活性化過程をしめす。Ca電流につ

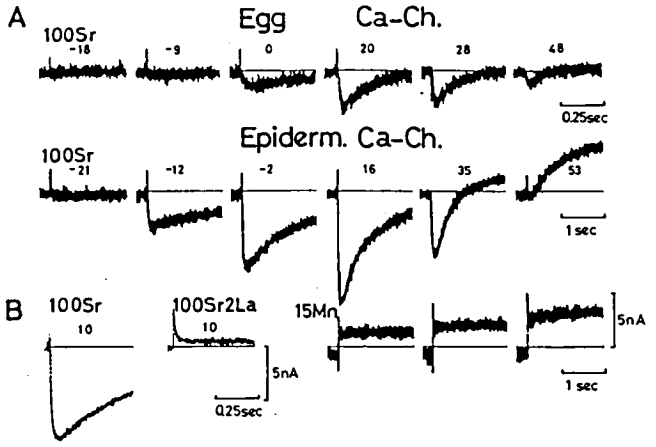


図1 卵細胞および表皮型に分化した未分裂発生胚におけるCaチャンネル電流。基準人工海水（100mM Sr）および15mM Mn人工海水中で記録したもの（A）。2mM Laによる表皮型Caチャンネル電流の抑制（B）。各電流トレース上の小数字は膜電位をミリボルトで表したもの。

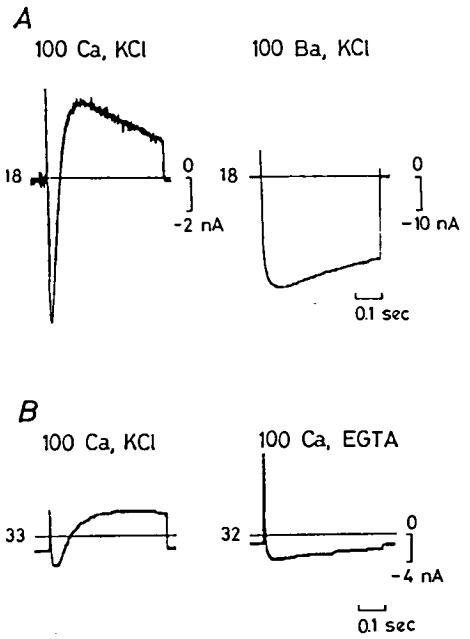


図2 表皮型に分化した未分裂発生胚の100mM Ca溶液中あるいは100mM Ba溶液中での膜電流（膜電位は＋18mV）。電流電極は3MKCℓでEGTAは注入していない（A）。同じく100mM Ca溶液中の膜電流のうち外向き電流成分がEGTA電流電極からEGTAを細胞内に注入することにより消失することを示す（B）。

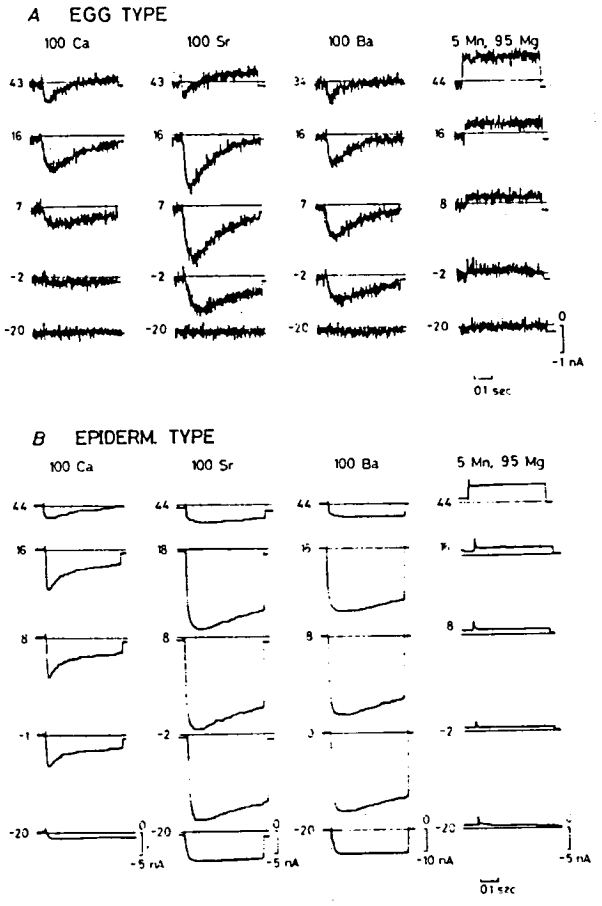


図3　卵細胞（A）および表皮型に分化した未分裂発生胚（B）のCaチャンネル電流の比較。溶液はCa，Sr，Ba，Mn－Mg 溶液中でそれぞれ比較した。

いては分化した未分裂発生胚でも不活性化が認められるが，これは卵細胞にみられるような電圧依存性はなく電流依存性で他の興奮性膜のCa電流で報告されているCa依存性Ca電流抑制であることがわかった。

研究の考察

以上述べた様に卵細胞膜にみられるCaチャンネルと分化した未分裂発生胚にみられるCaチャンネルイオン選択的透過性，不活性化過程の膜電位依存性と細胞内Ca依存性において質的にことなっていた。予備的な実験によれば分化した未分裂発生胚のCaチャンネルはホヤの分化した筋細胞におけるCaチャンネルと同一の性質を示すこともわかっている。したがって卵細胞膜のCaチャンネルが他の興奮膜にみられるものと質的にことなっていたのは，単に動物種差によるものではなく，分化した興奮性膜と未分化の卵細胞膜での差異によると考えられた。このことはウニ卵・ハツカネズミ卵のCaチャンネルはホヤ卵のそれときわめてよくにている点からも支持される。

また未分裂発生胚におけるCaチャンネルの量的変化を予備的に調べたところによると，対照の正常胚が嚢胚になるまでの初期発生時点で卵細胞膜にあったCaチャンネルは一旦殆んど消失するが，オタマジャクシ幼生の尾部が50％ほど成長した時点で再びCaチャンネルが増加し，さらにその直後にCaチャンネルの性質が急激に分化型

のそれとなって後，量的に増加することがわかった。この特異的な時点は正常胚で始めて筋細胞に全か無のCa活動電位が発生する時期に相当する。このことは筋細胞膜等が興奮性膜として分化を完成する際に，Caチャンネルの量的増加の他に質的変化も重要であることを示唆した。

文　　献

1) Hagiwara, S. & Byerly, L. (1981). Calcium channel. *Ann. Rev. Neurosci.* 4: 69-125.
2) Kano, M. (1975). Development of excitability in embryonic chick skeletal muscle cells. *J. Cell. Comp. Physiol.* 86: 503-510.
3) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yamashita, N. (1977). Ionic currents through the membrane of the mammalian oocyte and their comparison with those in the tunicate and sea urchin. *J. Physiol.*, 267: 465-495.
4) Takahashi, K. & Yoshii, M. (1981). Development of sodium, calcium and potassium channels in the cleavage-arrested embryo of an ascidian. *J. Physiol.*, 315: 515-529.
5) Okamoto, H., Takahashi, K. & Yoshii, M. (1976). Membrane currents of the tunicate egg under the voltage-clamp condition. *J. Physiol.*, 254: 607-638.

13　両生類骨格筋の遅速両筋線維の比較

遠　藤　　實
研究協力者　堀　内　桂　輔

両生類の骨格筋を構成する筋線維には，収縮の経過の遅いものとより速いものとの２種類の存在することが古くから知られており，両者の性質の違いについては単一筋線維標本を用いた生理学的の研究を含むかなり詳しい報告が数多く為されている。しかし，筋線維細胞の細胞膜を破壊してその細胞内容を露出させた「スキンドファイバ」標本を用いて，この筋収縮系を直接に活性化した時のその遅速両筋線維の態度の違いについての報告はこれまでにほとんど無い[1)]。そこで今回我われは，筋肉の分化の基礎的研究の手始めとして，両生類骨格筋に存在するこの２種類の筋線維の収縮系の性質がどのように異なるかを，スキンドファイバを用いて比較研究することにした。

実　験　方　法

標本。成長したアフリカツメガエルを材料とした。この腸腓骨筋をリンゲル液中に固定して，実体顕微鏡の下，そこから筋線維の細束を切出した。次いで細胞内環境に似せた適当な溶液，即ち弛緩液の中でそれを単一筋線維細胞にまで解剖した後これをピンセットでつまんで引裂くことによって或いは界面活性剤（0.5%w／v，Brij58）で処理することによって，その細胞膜を破壊し，スキンドファイバとした。

張力測定。このスキンドファイバ標本を小さな実験槽に移し，一端をストレンゲージ（Uゲージ２g用または20g用，新興通信）に接続，他端を固定した後，この両端の間の距離を適当に調節して，標本の筋節の長さが2.8ないし3.0 μmとなるようにした。このようにして標本の等尺性張力を計測しながら，実験槽内の弛緩液をCa^{2+}，Sr^{2+}あるいはBa^{2+}を適当に含んだ活性化液で置換し，その時に標本の発生する張力を測定した。即ち，この張力発生を指標として，そのイオンに対する収縮系の感受性を調べたのである。

短縮速度。これを測る時には，予め上記の標本の固定端側を，電流によって標本の長軸方向に駆動できるように設計した棒の先端につけ，最大のの張力の発生した時にこの棒を駆動し，標本の両端の間の距離を 1/3 だけ急激に短くなるようにした。すると図３に示すように，この急激な駆動によって標本は一旦弛んで張力が消失するが，時間を経てその短くした長さ分だけ標本の短縮が進むと，再び張力は回復してくる。そこで，この弛めてから力の再発生し始めるまでの時間を測定して，短縮速度の指標としたのである。

溶液。弛緩液（$Ca^{2+} < 10^{-9}$M)は，pH7.0，イオン強度(I) 0.15M，Mg^{2+} 1mM，MgATP 4mM，EGTA 10mM，PIPES 20mM で，この他のイオン種は主にK^{+}とメタンスルホン酸イオン(Ms^{-})となるように，$Mg(Ms)_2$ 5.4mM，$ATPNa_2$ 4.3 mM，KMs 53.2mM，EGTA 10mM，PIPES 20mMを合わせ，これにKOH適当量（約60mM)を加えてpHを当該温度において調整した。

Ca^{2+}，Sr^{2+}あるいはBa^{2+}を含む活性化液の作製法の概略は，EGTAとそれらのイオンの結合定数を各$10^{6.20}$，$10^{3.71}$，$10^{3.62}M^{-1}$として(これはI＝0.15 M 2℃の場合であり，12℃の時には各$10^{6.29}$，$10^{3.80}$，$10^{3.71}$，I＝0.29Mでは$10^{6.11}$，$10^{3.62}$，$10^{3.53}M^{-1}$とし

＊東北大学医学部薬理学第一教室

た[2]。計算した時に必要な量だけそれをメタンスルホン酸塩として弛緩液の組成に加え，これによるイオン強度の変化分はKMsを減らすことによって相殺するというものである。例えば，遊離Caイオン濃度が10^{-6}Mの活性化液（I＝0.15M，2℃）の組成は，$Ca(Ms)_2$ 6.0，$Mg(Ms)_2$ 5.2，$ATPNa_2$ 4.3，KMs 41.5，EGTA 10，PIPES 20，KOH約71 mMである。

なお高イオン強度の実験ではそれを0.29Mにまで，主としてKMsを多く加えることで高めた。またカフェインの効果を調べる時には上記の活性化液に無水カフェインを添加してそれが25mMとなるようにした。

温度。実験では実験槽の直下に2℃または12℃の冷却水を流すことによってその温度を調節した。

結　　果

1. 最初にこれまで普通に用いられてきた速筋線維のスキンドファイバのCa^{2+}とSr^{2+}に対する感受性を確認すると共に，新たにそのBa^{2+}感受性をも調べた。図1はその結果で，遊離イオン濃度―張力曲線である。これに見るように，速筋線維は数μMのCaで張力を発生したが，Srではその約30倍にして初めて力を発生し得た。Baを用いた時にはCaやSrと違って1mMにしても最大の張力の発生を見ることができなかった。

次に既にある報告[3]に照らして，外観から遅筋線維であろうと思われるものを切出し，そのスキンドファイバの性質を上と同様にして調べた。図2に結果を示す。これに見るように，これらの線維ではSrで活性化した時にもCaによる時とほとんど同じ濃度で相当の張力を発生し得た。そればかりか，Baでも0.1mMにするのみで，ほぼ最大の張力の発生をみた。

2. 以上のように，従来スキンドファイバの実験に用いられてきた速筋線維とはSrならびにBaに対する感受性の著しく異なる筋線維の存在することが判ったので，これがいわゆる遅筋線維であることを，スキンドファイバの短縮の速さを調べることによって確認した。即ち，「実験方法」の項で

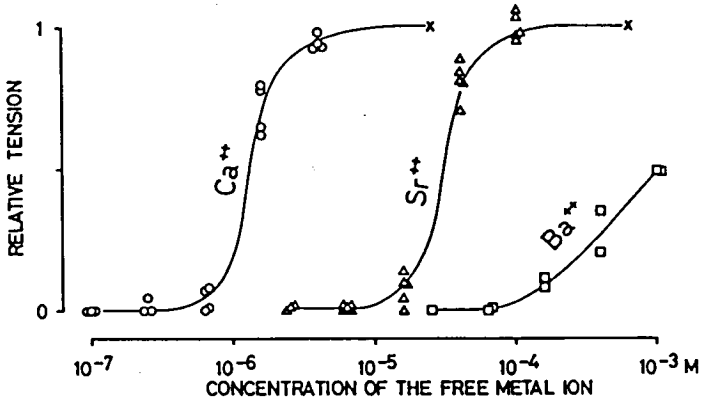


図1　速筋線維の2価イオン感受性曲線

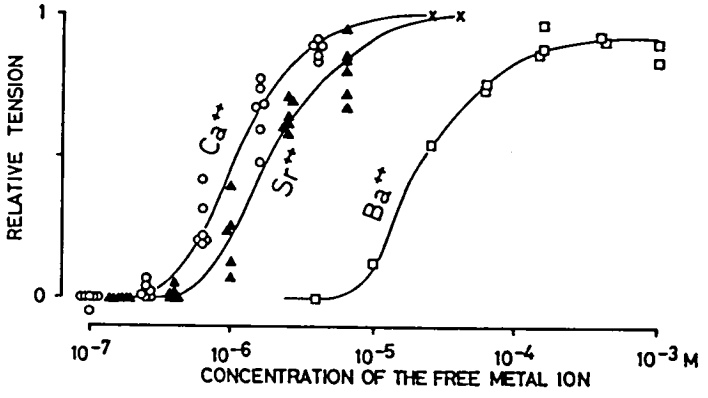


図2　遅筋線維の2価イオン感受性曲線

述べた様な，いわゆる弛ませ試験をスキンドファイバに施して，それが無負荷の下で筋節長3 μmから2 μmまで短縮するに要する時間を測定し，この時間を上記2群の筋線維の間で比較することにしたのである。

図3にはその弛ませ試験における記録の一例，高Sr感受性の筋線維の例を示すが，この線維は高々筋節毎1 μmの短縮を完了するのに約2秒を要している。図4にはこのような測定の結果をまとめてあるが，これに見るように，外観から遅筋線維と思われたSr感受性の高い線維の短縮に要する時間はどれも著しく長く，Sr感受性の低いものの約7ないし8倍も時間のかかることが判った。我われのこの実験は2℃におけるものであったが，ここで得られた速さの比は，20℃付近の生筋で測定したLännergren[4]の報告とほぼ一致するので，我々の得た高Sr感受性の筋線維は遅筋線維であると結論した。

3. ところでカフェインは筋小胞体からのCaの遊離を促す薬物として良く知られている。しかしこの薬物は筋収縮系にも直接に作用して，見掛けのCa感受性を少し高めるような効果をも生むことが，速筋線維のスキンドファイバで既に明らかにされていた。そこで我われは遅筋線維においてもこのカフェインの効果を確かめてみることにした。図5の下は遅筋線維12℃でのCa感受性曲線を，Caと共に存在する25mMのカフェインがどのように変化させるかを示している。これに見る

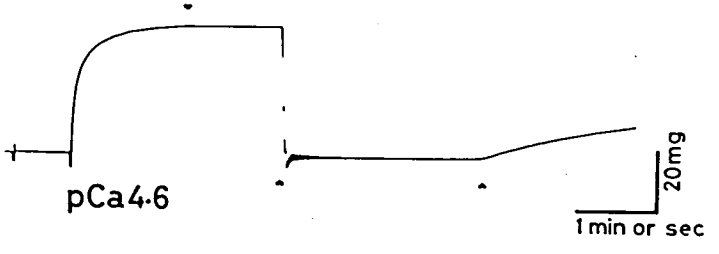


図3　弛ませ試験における記録の一例（高Sr感受性線維）

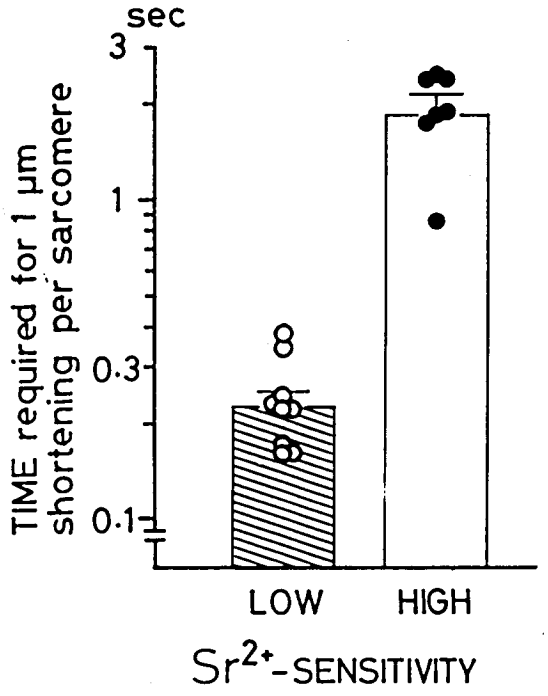


図4　Sr 感受性と短縮速度の関係

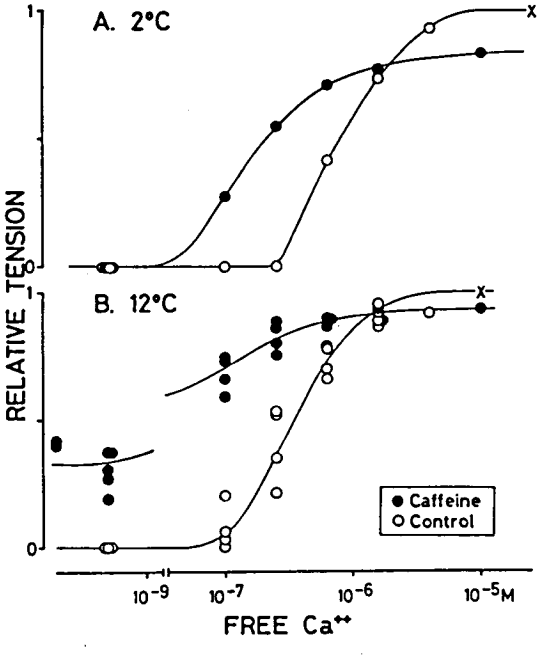


図5　遅筋線維のCa 感受性曲線に対するカフェインの効果（I = 0.15M）

ように，0.1 μMのCa^{2+}(遊離Caイオン濃度)のみではほとんど張力が発生しなかったにも拘らず,これにカフェインを加えると著しく大きな力が観察された。そればかりか1nM以下というほとんどCa^{2+}の存在しない溶液によっても，カフェイン25mMの添加されている時には最大の1/3にも達する張力が発生した。この実験における標本の筋小胞体は界面活性剤で完全に破壊されていたので，このカフェインによる張力の発生が筋小胞体からのCaの遊離を介していたという事はあり得ない。したがって，この遅筋線維で観察された事柄は，従来の速筋線維の実験で得られていた「カフェインは収縮系にも作用してその見掛けのCa感受性を高めるが，それは極くわずかの程度である」という知見とは確かに異なるものだった。

しかし同図の上に示すように，この遅筋線維におけるカフェインの張力発生を促す効果も，従来の実験が行われてきたような低温，例えば2℃においては減弱することが判った。そこで我われは速筋線維におけるこの効果を再検討することにした。結果を6図に示す。これに見るように，確かに速筋線維2℃におけるその効果は軽度だったが12℃にするとやはり少し著しくなることが判った。けれども「12℃, Ca^{2+}<1nM」においてカフェイ

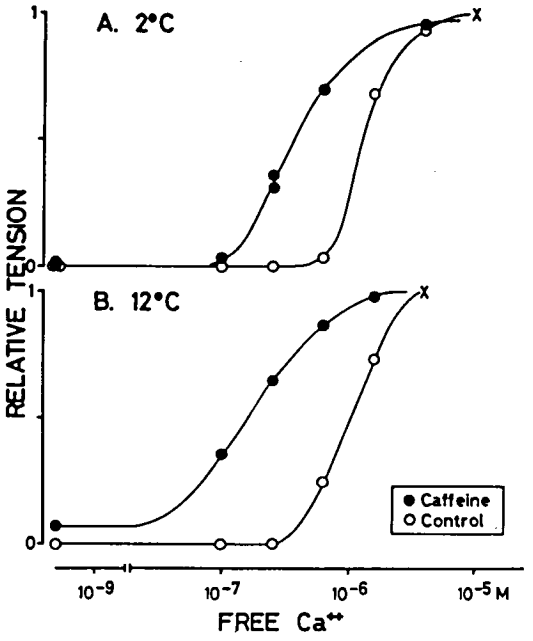


図6　速筋線維のCa感受性曲線に対するカフェインの効果（I＝0.15 M）

ンで発生する張力は速筋線維における方が確かに小さかった。

4.　ところで図5においても明らかな様に，カフェインにはCaによる最大張力を減少させる作用もあるが，これも実は速筋線維のスキンドファイバで既知のことだった。しかし，図5と図6を比較すると，このカフェインの効果もやはり遅筋線維で著しいようである。実際，図7に示すように張力発生を促進するカフェインの効果が弱まる，「I＝0.29 M，2℃」の条件下において，最大張力を

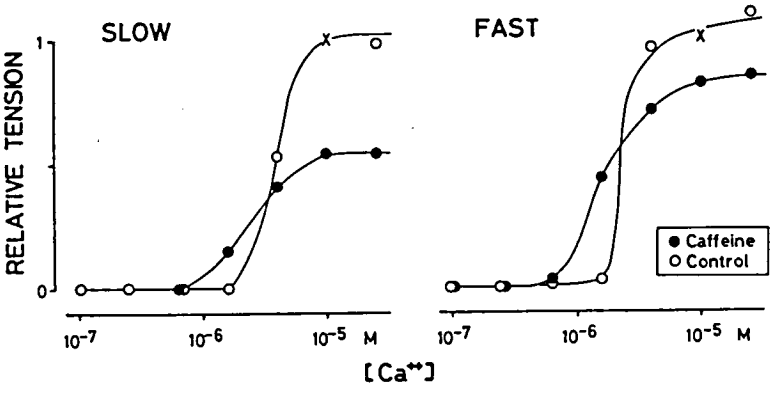


図7　カフェインによる最大張力抑制効果（I＝0.29M，2℃）

抑制する効果を両筋線維の間で比較しても，それは確かに遅筋線維における方が著しかった。

考　　察

両生類骨格筋の収縮系はCaのみならずSrやBaによっても活性化されて張力を発生するが，このSrやBaに対する感受性は遅筋線維における方が速筋線維におけるよりも著しく高いことが今回の研究で明らかになった。これと似たことは哺乳類のスキンドファイバにおいても知られており，その赤筋（遅筋）は白筋（速筋）よりもSr感受性の高いことが報告されている[5]。また興味深いことに，哺乳類の心筋も赤筋と同様にSr感受性の高いことがグリセリン筋を用いた実験で明らかにされている[6]。

ところでSr^{2+}やBa^{2+}は化学的にCa^{2+}に極めて近縁の，いわゆるアルカリ土類金属のイオンである。それであるから，これらのイオンによる収縮系の活性化は，生理的に収縮を制禦している,Ca結合蛋白トロポニンに，それらがCaの代替として結合することによって生じると考えられる。したがって，そのSrやBaに対する感受性が遅速両筋線維の間で著しく異なっているという事実は，両者のトロポニンのSrやBaに対する親和性の異なることを，また更に従ってそのトロポニンの化学構造の異なっていることを，反映していると考えるのが最も自然である。実際，生化学的に，哺乳類のトロポニンのSrに対する親和性は赤筋における方が白筋におけるよりも高いことが報告されている[7][8]。

それでは一体，骨格筋の収縮の制禦という同じ機能をもつトロポニンが，今回の研究の結果から示唆されるような2種類の互いに異なる構造に分化するのは発生のいかなる時期からなのだろうか。この問題は極めて興味深いものであるが，我われの行なったようなスキンドファイバのSr感受性を調べる実験を発生過程の筋肉について行なえばこれを解決できるかもしれない。

また，上の問題とは別に，一体どうして収縮の経過の速さの違う筋肉が分化するときに，それとは直接に関係しないと思われる制禦蛋白としてのトロポニンまでもふたつに分化する必要があったのかという疑問も生じる。しかし，この目的論的の疑問には，トロポニンによる収縮の制禦の機序がはっきり判るまでは答えられないと言えよう。

ところで今回，カフェインは筋収縮系に直接に作用して，低いCa濃度における張力を大きくしまた高い濃度のCaによって発生する張力を小さくする効果を現わすが，そのどちらの効果も遅筋線維における方が速筋線維におけるよりも著しいことが判った。ここには，上のSr感受性の違いと同様の発生・分化上の問題の他に，別の問題もある。即ち，カフェインがこのふたつの効果を生む時の作用点はどこか，またふたつの効果は同じ

作用点に働いた結果として生じるのか否かである。これについて論じるには，まだ研究が不足しているが，予備的の実験から次のようなことが判っている。

(1) イオン強度 0.15M，12℃，Ca^{2+}<1 nM で遅筋線維はカフェインによって張力を発生するが(5図)，その時線維は，Ca で相当の張力を発生している時と同じかむしろそれより大きい速度で短縮しうる。したがってこのカフェインによって発生する張力は低MgATPによって発生する張力とその性質を異にするようであるということ。

(2)イオン強度 0.15M，12℃，Ca^{2+}0.1 μM の条件下で，カフェインが遅筋線維に張力の発生を促す効果は 0.5mMから既に明らかであるのに対して，Ca^{2+}10μMによって発生する最大の張力をカフェインが抑制するのは 20mMにして初めて明瞭になるので，カフェインのこのふたつの効果は，別の作用の結果であるように思われる。したがって，最大張力の抑制はミオシン－アクチンの収縮蛋白系に対する作用の結果であり，低Ca濃度下における張力の発生を促進するのはトロポニン－トロポミオシンの制禦蛋白系に対する作用の結果であると考えておいても，現段階では良さそうであるということ。

文　　献

1) Constantin, L.L., Podolsky, R.J. & Tice, L.W. *J. Physiol.* **188**: 261-271, 1967.
2) Harafuji, H. & Ogawa, Y. *J. Biochem.* **87**: 1305-1312, 1980.
3) Smith, R.S. & Ovalle, Jr, W.K. *J. Anat.* **116**: 1-24, 1973.
4) Lännergren, J. *J. Physiol.* **283**: 501-521, 1978.
5) Takagi, A. & Endo, M. *Exp. Neurol.* **55**: 95-101, 1977.
6) Kitazawa, T. *J. Biochem.* **80**: 1129-1147, 1976.
7) Ebashi, S., Endo, M. & Ohtsuki, I. *Quart. Rev. Biophysics.* **214**: 351-384, 1969.
8) Kohama, K. *J. Biochem.* **86**: 811-820, 1979.

V　アセチルコリンリセプター

14　眼瞼型重症筋無力症における抗—ＡＣｈＲ—抗体　79

15　培養筋細胞のＡＣｈレセプターの代謝安定性と神経細胞由来因子　82

16　培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化　86

17　発生初期におけるジストロフィー筋の
　　アセチルコリンレセプターの代謝速度　91

14 眼瞼型重症筋無力症における抗－AChR－抗体

栗山　熙
研究協力者　伊東祐之　小田健一郎

序

全身型重症筋無力症（G. M. G.）患者血清中には高頻度で抗－AChR－抗体が存在する（Almon & Appel 1976, Lindstrom et al 1976, Oda et al, 1980）。しかし眼瞼型重症筋無力症（O. M. G.）患者血清中に抗－AChR－抗体が検出される頻度は全身型のそれに比べはるかに低く，さらにその抗体価も全身型に比し極めて低い（Lefvert et al 1978）。さらにG. M. G. 患者の筋麻痺症状は抗コリンエステラーゼ剤により改善されるが，ptosis, ophthalmoparesis等のO. M. G. の臨床症状を抗コリンエステラーゼにより制御するのは困難である。

我々は眼瞼型重症筋無力症の臨床症状発現に果たして抗－AChR－抗体が関与するのか否かを検索する目的で，従来，抗－AChR－抗体の検出に用いて来たラジオイムノアッセイ法の改良を試みた。本報告に於ては従来型及び改良型のラジオイムノアッセイ法により，全身型及び眼瞼型重症筋無力症患者血清中の抗－AChR－抗体を比較検討し，臨床像との関連について考察した。

方　法

検体：九州大学神経内科に於て全身型及び眼瞼型重症筋無力症と診断されたそれぞれ37名及び17名の患者血清，さらに10名の正常者血清を検体とした。

抗原：ヒト骨格筋のAChRを抗原とし，ラジオイムノアッセイ法により血清中の抗－AChR－抗体価を測定した。胸部外科手術中に得られたヒト骨格筋を細断し（1.0×1.0×2.0cm），0℃の緩衝液（NaCℓ 100mM, Tris-HCℓ 50mM, pH7.4）を加え，ホモジェナイズした。ついで10％Triton X－100溶液を最終濃度1％となるように添加し，室温で90分間撹はんし，その後4℃に冷却28,000 g で15分間遠心分離した。赤褐色の上清を粗AChR標品とした。

粗AChR標品に高濃度（400pmol）の ^{125}I－α－ブンガロトキシン（^{125}I－α－BuTx）を添加し，4℃で16時間反応させ，セファデックスG－200のカラムによりゲルろ過し，^{125}I－α－BuTx－AChR複合体分画を得た。この分画をAmicon PM 30を用いて0.4 pmol/mℓ及び2.0 pmol/mℓ濃縮し，従来型及び改良型ラジオイムノアッセイに用いた。

従来型ラジオイムノアッセイ：検体の血清をTriton－X－100 0.5％を含むリン酸緩衝液で10倍に希釈した。その10－50μℓアリクォットに500μℓの ^{125}I－α－BuTx－AChR（0.4 pmol/mℓ）を加えさらに450μℓのウサギ－抗ヒト－IgG血清を加え，最終容積をリン酸緩衝液により1mℓとし，4℃で16時間反応させ，2500回転5分間の遠沈により免疫反応沈澱物を採集し，リン酸緩衝液により3回洗滌後，免疫複合体の ^{125}I－活性をγ－カウンターにより測定した。

改良型ラジオイムノアッセイ：従来型ラジオイムノアッセイにより1 pmol/mℓ以下の抗－AChR－抗体価を示す血清については以下に述べる改良型ラジオイムノアッセイにより抗体価の再測定を行

＊九州大学医学部薬理学教室

った。希釈血清の250－500μℓを濃縮 ^{125}I－α－BuTx－AChR（2.0 pmol/mℓ）100μℓと免疫反応させ，ついで5－10倍に濃縮したウサギ－抗ヒト－IgG血清400μℓを加え（抗－AChR－抗体）－（^{125}I－α－BuTx－AChR）複合体を沈澱させ，その^{125}I－活性をγカウンターにより測定した。IgG，IgM IgA含有量の測定：血清中のIgA，IgM，IgA含有量をラジオイムノディフュージョンキットにより測定した。

結　　果

従来型ラジオイムノアッセイ法により37例のO.M.G.患者血清中35例に於て抗－AChR－抗体が検出され，その抗体価は0.44pmol/mℓ－252pmol/mℓの広範囲に分布し，その平均値は25.4±43.3 pmol/mℓ（±S.D.）であった。なおこの方法で測定した正常血清中の抗－AChR－抗体価は0－0.4 pmol/mℓであり，平均値は0.18±0.10pmol/mℓであった。一方O.M.G.患者血清17例に於てはわずか5例に於てのみ抗－AChR－抗体が検出され，その抗体価は0pmol/mℓ－11.24pmol/mℓの範囲に分布した。すなわち従来型ラジオイムノアッセイ法により測定した抗－AChR－抗体の出現率は全身型で90％，眼瞼型で30％と明らかな相違が観察された。しかし従来型ラジオイムノアッセイ法により抗－AChR－抗体が検出されないO.M.G.患者血清中に0.4pmol/mℓ以下の抗－AChR－抗体が存在すれば，その出現率は増加するはずである。

そこでラジオイムノアッセイ法の感度を増強する目的で，より大量の血清（250－500μℓ，従来型の10倍）を用いてラジオイムノアッセイを試みた。しかし大量の血清により抗原である^{125}I－α－BuTx－AChR及びウサギ－抗ヒト－IgG血清が希釈され，血清中の抗－AChR－抗体と^{125}I－α－BuTx－AChRの免疫複合体の形成が阻害されると推察できる。事実予備実験により抗原を3倍に希釈することにより，複合体の形成は正常時の1/2以下に減少することが判明した。そこで抗原（^{125}I－α－BuTx－AChR）及びウサギ抗ヒトIgG血清をAmicon PM 30を用いて従来型で用いた濃度の5－10倍に濃縮し，アッセイをくり返すと抗原及びウサギ血清の希釈効果により，抗原－抗体複合体の形成が影響されることはなかった。さらに大量の血清を用いることにより，^{125}I－α－BuTxの非特異的結合によるバックグランドノイズが減少し，ラジオイムノアッセイの感度が上昇した。すなわち正常血清の抗体価は0pmol/mℓ－0.04 pmol/mℓの範囲に分布し，その平均値は0.011±0.016（±S.D，n＝10）であり，従来型の約10倍の感受性を示した。そこで正常血清で観察された抗－AChR－抗体価の上限値以上が有意な抗体価であるという仮定のもとで，従来型ラジオイムノアッセイで1pmol/mℓ以下の抗体価を示したO.M.G.患者血清を用いて，ラジオイムノアッセイをくり返した。この方法により，従来型アッセイで抗体が検出されなかった12例のO.M.G.患者血清中8例に於て抗体が検出され，その値は0.042－0.16pmol/mℓを示した。従ってO.M.G.患者血清17例のうち13例で抗体が検出されたことになる。しかしながらO.M.G.患者血清に於ける抗－AChR－抗体価の平均値は1.79±3.18pmol/mℓ（±S.D，n＝13）であり，全身型のそれに比べ有意に低い値を示した。

O.M.G.患者血清中における抗－AChR－抗体の濃度は全身型に比し有意に低い。そこで全身型及び眼瞼型患者血清中のIgG，IgM，IgA，の濃度を比較検討した。G.M.G.及びO.M.G.患者血清中のIgGの含有量の平均値はそれぞれ1565±475 mg/dℓ（±SD，n＝34）と1613±399mg/dℓ（±SD，n＝17）であり有意差は認められなかった。さらに両グループにおけるIgMの含有量は243±177 mg/dℓ（±SD，n＝34）と239±131mg/dℓ（±SD，n＝17），そしてIgAは200±88mg/dℓ（±SD，n=34）と152±86mg/dℓ（±SD，n＝17）であり，何れにも有意差は認められなかった。

考　　察

重症筋無力症患者血清中の抗－AChR－抗体の検

出には従来1μℓ－5μℓの血清が用いられてきた。(Almon & Appel 1976, Lindstrom et al 1976, Oda et al 1980)。しかしこの範囲の血清量では ^{125}I－α－BuTxの非特異的結合に由来するバックグランドノイズにより0.40pmol/mℓ 以下の抗体の検出は不可能である。本実験に於ては約10倍量の血清を用い，さらに抗原（^{125}I－α－BuTx－AChR）とウサギ血清を濃縮することにより最終容量を従来型と同様の1mℓに保ち，アッセイを行い，その感度を従来型の約10倍に増加することが可能となった。この方法によると，約70%の眼瞼型患者血清に於て抗－AChR－抗体が検出された。全身型患者血清における検出率が90%であり，両グループにおける抗－AChR－抗体の出現率に有意差が存在するとは考えられない。しかしその抗体価は眼瞼型に於て著しく低いことが本実験から結論できる。さらに加良型ラジオイムノアッセイ法によっても眼瞼下垂等の臨床症状を有する4例のO.M.G.患者血清中に於て，有意な抗－AChR－抗体は検出されなかった。この結果は，O.M.G.に於てはⅰ）改良型ラジオイムノアッセイによっても検出できない微量の抗－AChR－抗体が血清中に存在する。ⅱ）種々臨床症状の発現にもかかわらず，抗－AChR－抗体が血清中には存在しない。ⅲ）抗原として用いたヒト胸節のAChRとO.M.G.患者血清に存在する抗－AChR－抗体の交差反応性が著しく低いという三つの可能性を示唆する。

O.M.G.に於て，微量の抗－AChR－抗体の存在あるいはその存在なしに眼瞼下垂といった臨床症状がどのような機序により発現するのか，あるいは何故これらの症状が抗コリンエステラーゼにより制御できないのか，今後の研究が待たれる。

文　献

1) Almon, R.R. & Appel, S.H. (1976). Serum acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **274**: 235-243.
2) Lindstrom, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittingham, S. & Duane, D.D. (1976). Antibodies to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *Neurology.* **26**: 1054-1059.
3) Oda, K., Goto, I., Kuroiwa, Y., Onoue, K. & Ito, Y. (1980). Myasthenia gravis; antibodies to acetylcholine receptor with human and rat antigens. *Neurology.* **30**: 543-546.
4) Lefvert, A.K., Bergström, K., Matell, G., Osterman, P.O. & Pirskanen, R. (1978). Determination of acetylcholine receptor antibody on myasthenia gravis; clinical usefulness and pathogenic implications. *J. Neural. Neurosury. Phychiat.* **41**: 394-403.

15　培養筋細胞のACh レセプターの代謝安定性と神経細胞由来因子

萩　原　彌四郎
研究協力者　長谷川　修　司

骨格筋のアセチルコリン・レセプター（AChR）の分布と代謝安定性は支配神経の影響を強く受けている。成熟した動物の骨格筋ではAChRは神経筋シナプスに限局して存在し，代謝的に安定でゆっくりと分解される。未熟な動物の筋ではAChRは筋線維の全長にわたって存在し，不安定ですみやかに分解される。また培養筋のAChRは未熟筋ににてすみやかに代謝されることが知られている。

筋にたいする神経のトロクイック支配の機構を明らかにすることは神経筋疾患の理解を深めるために重要である。われわれは，筋の発達にともない，AChRが代謝的に安定化するトロフィック機構に，神経細胞が産生し放出するある種の生理活性物質が関与していることを示唆する実験成績を得たので報告する。

実験材料と方法

クローン神経細胞NG108－15のconditioned medium（NCM）中でラット胎児の筋細胞を培養し，筋管表面のAChRの分解速度を測定した。

筋培養：ラット胎児骨格筋の培養はChristian[1]らの方法に従った。筋培養をNCMで処理する1日前にメジュウム中の馬血清を2mg/mlの牛血清アルブミンで置換した。メジュウムは次の組成である；90% Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）－10%馬血清－0.5μg/ml テトロドキシン－抗生物質。

NCMの調製；Bauerら[2]の方法に従って調製した。1週間以上培養したNG108－15細胞を血清を含まないメジュウム中でさらに24時間培養しメジュウムを分離する。これを濃縮・透析したのち凍結乾燥しNCM標品とした。培養筋をNCMで処理するとき，上記の牛血清アルブミンを含むメジュウムに終濃度0.4mg/mlに加えた。

AChR分解速度の測定：7－10日の筋培養をあらかじめNCMあるいはChloroquine（10μM）と16－35時間保温したのち，10nM ^{125}I－α－バンガロトキシン（ABT）と60分保温した。培養筋に結合しなかった^{125}I－ABTを取り除き，培養筋を充分に洗ったのち，一定時間毎にメジュウムをNCMあるいはChloroquineを含む新らしいメジュウムと交換し，メジュウム中にあらわれる^{125}I－ABT－AChR複合体の分解産物を測定した。^{125}I－ABT－AChR複合体が半減する時間$T_{\frac{1}{2}}$を算定しAChRの分解速度のパラメーターとした。なお，実験毎にコントロール筋の$T_{\frac{1}{2}}$を測定し，NCM処理筋の値は百分率であらわした。この方法で測定した^{125}I－ABT－AChR複合体の分解速度はABTに結合していないAChRの分解速度にほぼ等しいことがすでに知られている[3]。

細胞内部に蓄積した分解途中の^{125}I－ABT－AChR複合体：培養筋を^{125}I－ABTと1時間保温すると（short label）結合した^{125}I－ABTの大部分は細胞表面に存在する。24時間保温すると，（long label）分解途中の細胞内部にあるAChRもラベルされている。long labelとshort la－

＊千葉大学医学部脳機能研究施設　神経薬理研究部

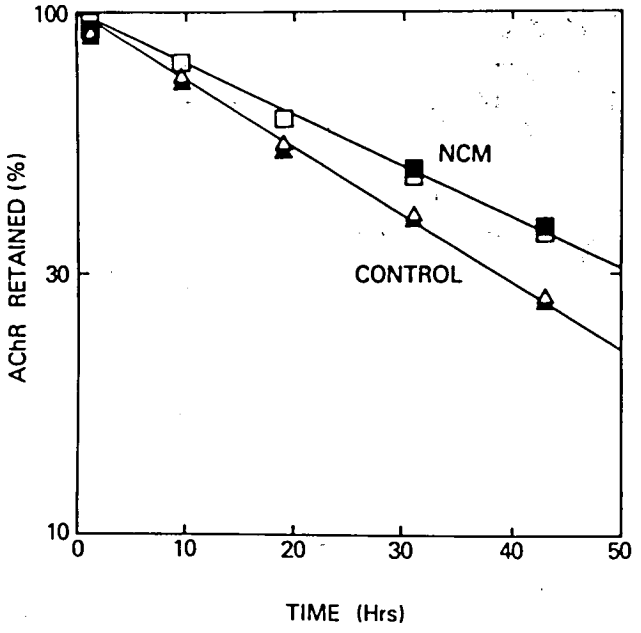


図1　AChRの分解速度
9日培養筋をNCMを加えて（□, ■）あるいは対照の（△ ▲）メジュウム中で，あらかじめ17時間保温したのち，AChRの分解速度を本文に記した方法で測定した。各シンボルはそれぞれ1枚の培養皿のデータである。

bel の差は細胞内部に蓄積した^{125}I－ABT－AChR複合体とその分解産物の量をあらわす。

実　験　結　果

分解されずに筋細胞に残った^{125}I－ABT－AChR複合体量を時間に対して対数でプロットすると，40時間まで直線となり（図1），AChRの分解は1次反応に従った。コントロール筋の^{125}I－ABT－AChR複合体の半減時間は実験によって異なり，16～30時間の範囲であり，平均22.6±0.9時間（n＝22）であった(表1)。ただし，図1にみるように同一実験内での培養皿によるばらつきは少なかった。NCMを添加した培養では^{125}I－ABT－AChR複合体の$T_{\frac{1}{2}}$はコントロールの132％に延長し，30時間であった(表1)。グリオーマ細胞C6BU－1のCM（GCM）を調製し，NCMの代りに加えた培養筋の$T_{\frac{1}{2}}$はコントロールとかわりなかった（表1）。このことはCM添加による筋細胞のAChRの半減時間の延長が神経細胞に特異的であることを示している。

NCMの代りにNG 108－15のホモジネート遠心上清を加えても^{125}I－ABT－AChR複合体の$T_{\frac{1}{2}}$は用量に依存して延長した。

NCMによる^{125}I－ABT－AChRの$T_{\frac{1}{2}}$の延長はAChRが細胞表面で安定化されたことによるのかあるいは細胞内での分解過程や分解産物を外部に放出するステップが遅延したことによるのか，この疑問を明らかにするために，細胞内部の分解途中のAChR量に及ぼすNCMの効果を調べた。対照としてlysozomeでのタンパク質の分解を阻害することが知られているchloroquineについて同様の実験をおこなった。NCMを加えた培養では短時間ラベルで培養筋に結合した^{125}I－ABTの量がコントロールにくらべて多いが，長時間ラベルと短時間ラベルの差はコントロールと同じであった(表2)。一方，chloroquine処理筋では，短時間ラベルでの結合量はコントロールと同じであったが，長時間ラベルとの差はコントロールの3倍で

表1 AChRの分解速度に及ぼすCMの効果

Conditioned medium	T 1/2 relative to control (%) (mean ± SE)	I-125-ABT bound relative to control (%) (mean ± SE)	N
NG 108-15	131.9 ± 3.9	114.7 ± 2.9	8
C6BU-1	97.1 ± 13.2	99.2 ± 9.8	3

T 1/2 of control cultures was 22.6 ± 0.9 (N=22)

表2 細胞内部に蓄積した^{125}I－ABT－AChR 複合体とその分解産物に対するNCMとChloroquineの効果

Condition	I-125-ABT bound (cpm) Long label	Short label	Difference
Control	30,580 (9)	21,740 (10)	8,840
NCM	35,582 (10)	27,670 (10)	7,912
Control	25,559 (4)	15,594 (6)	9,965
Chloroquine	42,708 (4)	14,072 (6)	28,636

あった。chloroquineを加えた培養で^{125}I－ABT－AChR複合体の$T_{\frac{1}{2}}$は880％に延長した。

ChloroquineとNCMはともにAChRの分解を遅くらすが，NCMの場合には，chloroquineのばあいと異なり，細胞内部の^{125}I－ABT－AChR複合体とその分解産物が増量しないことから，細胞内の分解過程と放出段階を阻害するのではない。NCMはAChRが細胞内部へ移行する速度を遅くし，AChRの分解をおくらすのであろう。

考　　察

以上の結果は神経細胞が産生しメジュウム中に放出した物質によって培養筋細胞のAChRの代謝が制御されていることを示す。本実験で用いたと同じNCM標品が培養筋細胞のAChRの凝集を促進することが報告されている[1]。NCM中のAChRを代謝的に安定化する物質とAChRの凝集を促す物質が同一であるかどうか明らかでない。筋の発生・成熟の過程でAChRが神経筋シナプスに限局し代謝的に安定化されるトロフィック機構にこれらの物質が関与している可能性は充分に考えられる。

結　　語

1. 神経細胞のCMは培養筋細胞のAChRの分解速度を遅くした。
2. この効果は神経細胞に特異的であり，用量依存的に作用した。
3. NCMによりひきおこされたAChR分解の遅

延は，AChRが細胞内部へ移行する速度が減少した結果である。

文　　献

1) Christian, C.N., Daniels, M.P., Sugiyama, H., Vogel, Z., Jacques, L. & Nelson, P.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 4011-4015, 1978.
2) Bauer, H.C., Daniels, M.P., Pudimat, P.A., Jacques, L., Sugiyama, H. & Christian, C.N. *Brain Res.*, 209: 395-404, 1981.
3) Devreotes, P.N. & Fambrough, D.M. *J. Cell Biol.*, 65: 335-358, 1975.

16 培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化

杉 山 博 之*
研究協力者 山 下 幸 子*

骨格筋のアセチルコリン受容体（AChR）は筋肉の発生とともに合成され，その含量が増大する。更に筋の分化が進み，運動神経の支配を受けるようになると，AChRは神経と筋の接合部に凝集し，その部位に局在するようになる。成熟筋の神経筋接合部に凝集局在したAChRを筋発生初期のAChRと比較すると，両者は基本的には極めて類似した膜タンパク質であるが，詳細な点でいくつか異った性質を示す。例えば前者は後者よりも代謝的に遥かに安定で，細胞膜上にとどまる時間がずっと長い。また両者は電気生理学的性質も微妙に異っており，アセチルコリンに反応してイオン透過性をコントロールする速度が異る。生化学的には，前者は後者よりも等電点がわずかに低く，分子構造の上でなんらかの違いがあると考えられる。

このように，AChRは筋の発生・分化に伴いこれら2つのタイプの間を分化変遷して行くが，その分化の制御機構や両タイプAChRの差異の実体相互関係等については，不明の点が多い。本研究では培養骨格筋細胞を用い，そのAChRの性質を検討した。特にその等電点に注目し，培養細胞において上記2タイプの等電点をもつAChRが合成されるか否か，合成の条件，動物種の違いによる種差等について検討した。また，細胞表面膜上のAChRと細胞内前駆体とを比較し，骨格筋細胞においてAChRが合成され，膜に挿入され分化する過程を検討することを試みた。

*生理学研究所細胞益官研究系

材 料 と 方 法

培養細胞としては，ウィスター系新生ラットまたは鶏胚（孵卵11日）の下肢筋より得た筋細胞，およびマウスのクローン化筋細胞株G8－1を用いた。培養法の詳細は既に発表した。[1]

AChRは全て^{125}Iまたは^{3}Hで放射性標識したα－ブンガロトキシン（αBT）[2]との放射性複合体として解析した。細胞表面膜上のAChRは培養中の培地に放射性αBTを加えることによって複合体を形成。細胞内αBT結合成分は，まず，表面AChRを非標識αBTで完全にブロックしたあと細胞をホモジェナイズし，その後放射性αBTと反応させて複合体とした。放射性複合体は，2％Triton X－100で可溶化し，ゲル濾過，ショ糖密度遠心，等電点電気泳動等による解析も全てTriton X－100の存在下で行った。

詳細な実験条件は予備的報告として一部すでに発表した。[3][4]

結 果

1. 細胞表面AChR

表面AChRはラット，マウス，ニワトリのいずれについてもゲル濾過的に均一な分子種から成る。図1に典型的な例としてラットAChRのSephacryl S－200によるゲル濾過図を示す。この分子種の沈降係数は9Sであることが知られている。

ゲル濾過的には均一なこの成分を，等電点電気泳動で分析してみると，ラットの場合，図2に示されているように等電点を異にする2成分より成

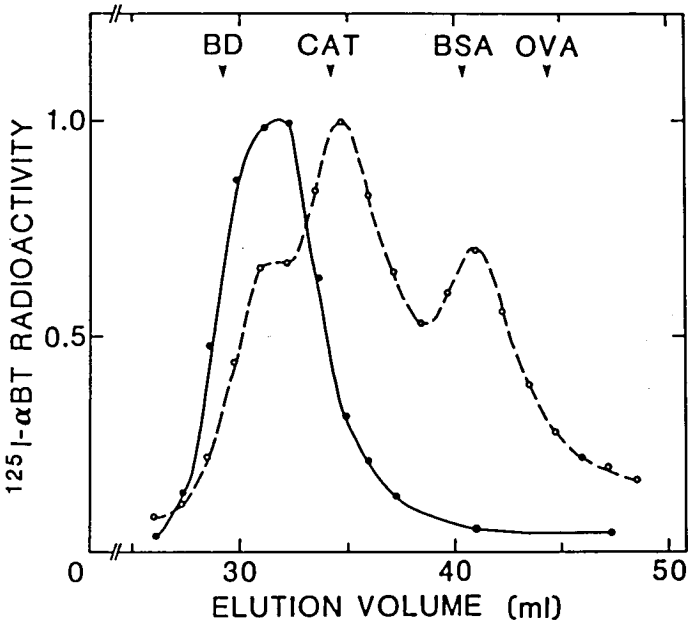


図1 ラット培養筋細胞AChRのSephacryl S－200によるゲルろ過。●，表面AChR．○，細胞内αBT結合成分。標準マーカーはBD，blue dextran；CAT，catalse；BSA，bovine serum albumin，OVA，ovalbumin．

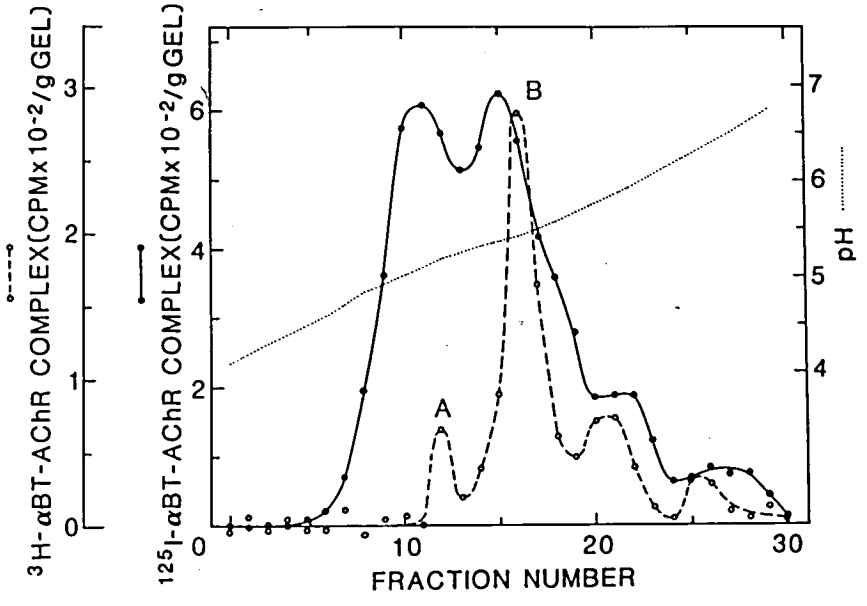


図2 ラット骨格筋AChRの等電点電気泳動による分析。●，培養細胞表面AChR．○，除神経横隔膜のAChR．AおよびBはそれぞれ，シナプス型および非シナプス型AChR．

ることがわかる。しかもこの両成分の等電点は，対照として用いた成熟ラット横隔膜（除神経処理したもの）よりのAChRのシナプス型と非シナプス型のものの等電点とほとんど同じ値を示す。こ

のことから，少くとも培養系においては，ラット骨格筋細胞は等電点に関する限り非シナプス型のみならずシナプス型に対応するタイプのAChRをも，神経の存在しない条件下で産出する，と考えることが出来よう。同様の結果は，マウスのクローン細胞G8−1についても観察される。

これに対して，ニワトリ胚よりの筋細胞の表面AChRは等電点的に非シナプス型に対応する成分一種類しか検出されない（図3）。ニワトリにおいては，ラットやマウスの場合と異り，シナプス型と非シナプス型のAChRの間に等電点的な差異は無いか，あっても極めて小さな差で我々の用いた方法では検出できない程度のものと考えられる。

2.　細胞内αBT結合成分

培養筋細胞は連続的にAChRを合成し，代謝回転している。従って細胞内には表面AChRの前駆体プールが存在し，これも放射性αBTと複合体を形成する。細胞内αBT結合成分をゲル濾過で調べてみると，図1に示されているように，分子量の異る3種の成分が見い出される。このうち最初に表面AChRと同じ位置に溶出される成分は，沈降係数も表面AChRと全く同じ（9S）で，表

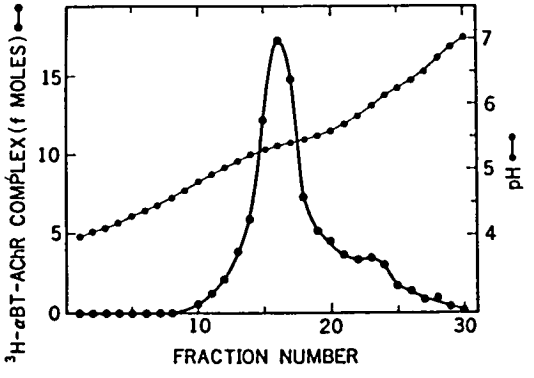


図3　ニワトリ培養筋細胞の表面AChRの等電点電気泳動。

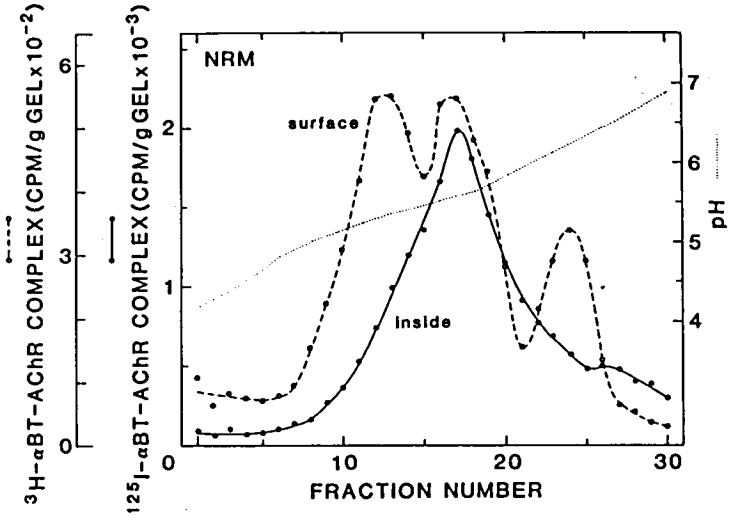


図4　ラット培養筋細胞AChRの等電点電気泳動。○，表面AChR.●，細胞内前駆体（9S成分）

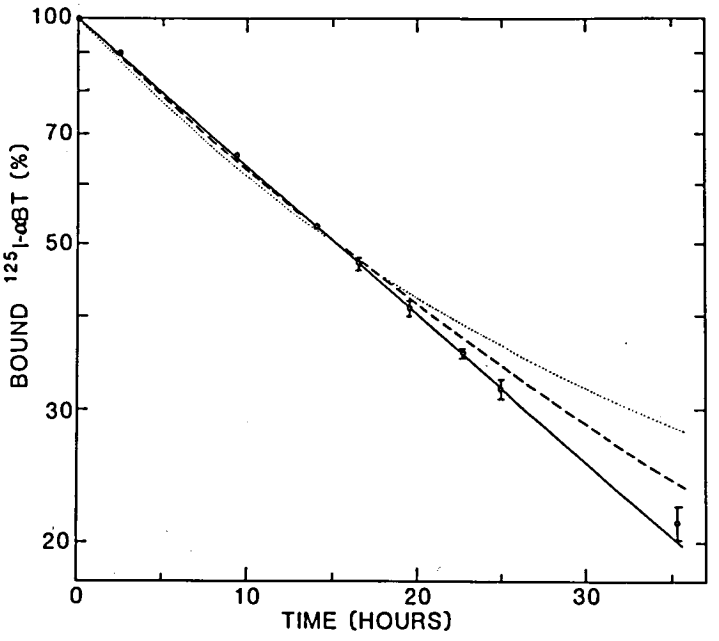


図5　ラット培養筋細胞表面AChRの代謝回転。
最初100%あった ^{125}I−αBT−AChR複合体が時間とともに代謝され減少して行く経過を示す。

面AChRへの直接の前駆体と考えられる。

第二の成分（CATとほぼ同じ位置に溶出される成分）は沈降係数が約5Sで，分子量は9S成分の1/2～1/3 程度と思われる。αBTの結合は特異的で，過剰の非標識αBTやカルバミルコリン，クラーレ等のコリン性リガンドで結合を阻害することができる。従って，この成分はAChRまたはその直接の前駆体と密接にかかわったものであると考えられる。これに対し，最後に溶出される成分はそのαBT結合がコリン性リガンドで拮抗されない。非特異的吸着によるものと考えられる。

これら細胞内αBT結合成分のうち表面AChRの直接の前駆体と考えられる9S成分を等電点電気泳動で分析した結果を図4に示した（ラットの場合）。表面AChRは前述のように2成分が見られるのに，同じ細胞の細胞内9S成分は等電点的には一種類のものが検出されるのみであり，その等電点は非シナプス型表面AChRのそれと極めて近い。

3.　表面AChRの代謝回転

ラットまたはマウスについては，筋細胞表面AChRが等電的にシナプス型と非シナプス型に対応する2成分より成ることが分ったので，両型のもつもうひとつの差異，代謝的安定性についても，不均一性が見られるか否かを検討した。図5にラット筋細胞表面AChRについての結果を示した。図に明らかなように，表面AChRの代謝回転速度は単一の指数函数でほぼ完全に記述できる。図には比較としてほぼ同量の2成分が異った代謝速度をもつと仮定した時期待される予想曲線を示した。（代謝速度が3倍－－－－，または6倍・・・，異る場合）。これから，ラット筋細胞表面AChRの上記2成分は，その代謝速度にほとんど差はな

く，仮りにあるとしてもその違いは3倍よりは小さいであろう，と考えられる。

考　　察

以上の結果を要約すると，次のようになる。骨格筋培養細胞は2種類の細胞内αBT結合成分をもつ。ひとつは沈降係数約5Sの成分，他のひとつは9Sで表面AChRとほとんど同じ分子量をもち，直接の前駆体と考えられる。細胞内9S成分は等電点的には，非シナプス型AChRのそれとほぼ同じ値をもつ成分が一つ検出されるのみである。細胞表面AChRは，分子量的には均一であるが（沈降係数9S），等電点的にはシナプス型と非シナプス型の両タイプにそれぞれ相当する等電点をもつ2成分より成る。しかし，この両成分の代謝回転速度にはほとんど差は見られない。

これらの結果は，次のように解釈される。

1. ラットおよびマウスの培養骨格筋細胞はシナプス型・非シナプス型の両型AChRと同じ等電点をもつ2種類の表面AChRを，神経の存在しない条件下で産生する。これに対し，ニワトリにおいては両型のAChRは等電点に差異はないかあっても極めて小さい。

2. ラット筋細胞表面の2種類のAChRは，非シナプス型AChRの等電点にほぼ等しい等電点をもつ共通の前駆体より由来し，表面膜に挿入される段階以降で何らかのpost－translational な修飾を受けて2種類の成分に分化すると考えられる。ニワトリの場合，この分化の機構が欠けているかまたはラットやマウスのそれとはかなり異ったものであろう。

3. 細胞内には，直接の前駆体と考えられる9S成分の他，分子量が約1/2～1/3程度の5S成分が見い出される。このものは，サブユニット構造が未だ完成していない，いわば「前駆体の前駆体」とも言うべきものである可能性が強い。これに他の成分が結合して9Sの前駆体になるのではないかと考えられる。

今後，これらの解釈の適否について更に検討を加えていく予定である。

文　　献

1) H. Sugiyama: Multiple forms of acetylcholinesterase in clonal muscle cells. *FEBS Lett.* **84**, 257-260, 1977.
2) H. Sugiyama and Y. Yamashita: Tritium labeling of α-neurotoxins with N-succinimidyl [^{3}H] propionate. *J. Biochem. (Tokyo)* **90**, 729-735, 1981.
3) H. Sugiyama: Heterogeneity of acetylcholine receptor molecules on the surface of clonal muscle cells. *Proc. Japan Acad.* **55B**, 75-78, 1979.
4) H. Sugiyama: Isoelectric focusing analysis of acetylcholine receptors in mouse and chick muscle cells in culture. *Biomed. Res.* **1**, 91-95, 1980.

17 発生初期におけるジストロフイー筋のアセチルコリンレセプターの代謝速度

堀田　健
研究協力者　冨田伸子

発生初期におけるdystrophy筋の異常を把握するためにわれわれは組織培養および細胞培養した筋の電気生理的，形態的性質を正常のそれと比較して追跡し，dystrophyでは筋管が形成されて間もなく，正常とのちがいがあらわれることを前報で報告した。[1)]

今回はアセチルコリンレセプターの代謝を指標として膜の構成成分に異常があるかどうか，又これがジストロフィーの発症にどんな意義をもっているかを考察した。

材料及び方法

Dystrophy（N. H. 413）及びNormal（412）Chick の受精卵を37℃で12日間孵化したembryo の胸部から筋をとり出し，コラーゲンを塗布した培養皿で培養を開始した。Control, Dystrophy は常にペアで培養し5～11日のものについて^{3}H－Erabutoxin 又は^{125}I－α－Bungarotoxin，^{3}H－α－Bungarotoxinを1時間作用させてレセプターに結合させる。過剰のToxin を洗い流したのち，新らしい培養液を加え，3～5時間毎に液を交換して代謝されて出てくる代謝産物の放射能を計測した。実際の手順は第1図に示す。

結　果

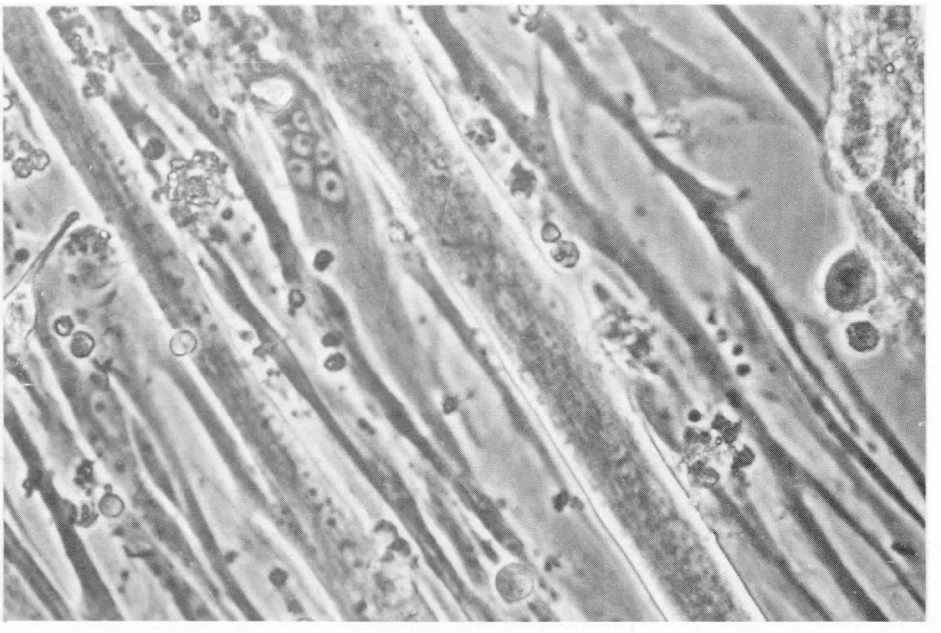
培養細胞の発育過程：植付けた細胞は培地中で急速に生長し，融合して5日目ごろまでに多数の筋管が形成される。第2図は培養開始後6日目のものであり，正常とdystrophy筋の間に目立った相違はないが，発育の状態は卵によってかなりのバラつきがあった。さらに培養をつづけると8日目あたりで横紋が観察されるようになり，筋細胞が完成する。第2図Cは9日目の正常筋であるが実験の再現性は培養6～7日目のものが最もよかった。

Erabutoxinによる結果：Erabutoxin を作用させ，結合しているものを正常とdystrophy で比較してみると，第3図aに示すようにToxin の結合量は正常の方が多く，dystrophyではその50～80％の範囲であることが分った。Receptor に結合したToxin のTotal 量をそれぞれ100として縦軸に残留している量の対数，横軸に時間をプロットすると，第3図bのように10時間あたりまでは直線的に減少する。傾斜はdystrophy筋の方が大きく，従ってはやく代謝されることが分った。第3図の実験例では半減期は正常とdystrophy 筋でそれぞれ9.3時間，8時間でありこれは再現性のある有意の差であると考えられる。異る試料についての結果をTable Ⅰにまとめた。

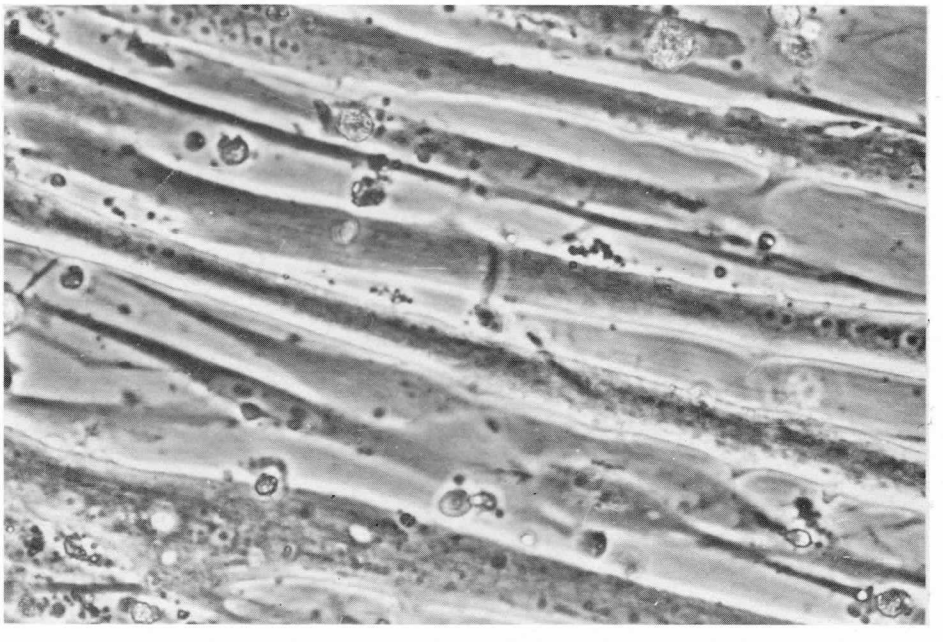
α－Bungarotoxin による結果：第4図aは^{3}H－α－Bungarotoxinを作用させてレセプターとの結合をみたものであるがErabutoxinと同様，dystrophy筋では正常の60％～70％の結合しかみられなかった。初期countを100として対数と時間をプロットすると減少はErabutoxinの場合よりずっとおそく，30時間まで追跡した限りで

＊名古屋市立大学医学部第一生理学教室

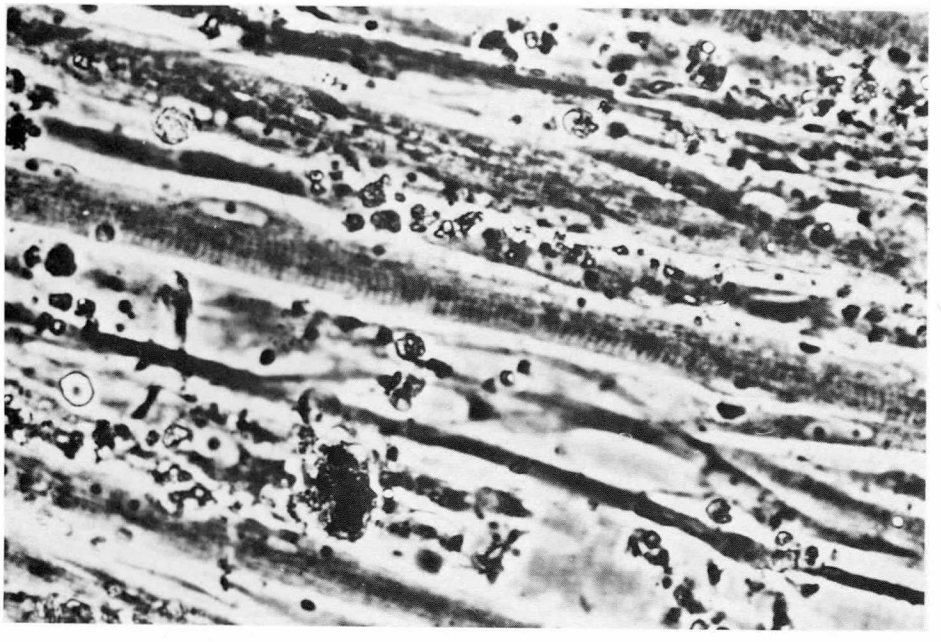
a



b



c



第1図　培養筋の位相差顕微鏡による観察　×200，12日間37Cでふ化したEmbryoから得た胸筋
a．正常筋，6日間培養　b．Dystrophy筋，6日間培養．c．正常筋，9日間培養

EXPERIMENTAL PROCEDURE

CHICK BREAST MUSCLE CELLS(12 days incubation, 5-7 days in culture)

MEM, Alb.
Etb(30nM) or
BgT(2 nM)
1 hour 37°C 5% CO_2

wash with MEM
(5 times)

incubation in MEM
change MEM → discard

every 3 - 5 hours → counting

30 hours → counting
+ SDS

residue → counting

MEM
Etb(30nM) or
BgT(2 nM)
dTc(1mM)
BACKGROUND

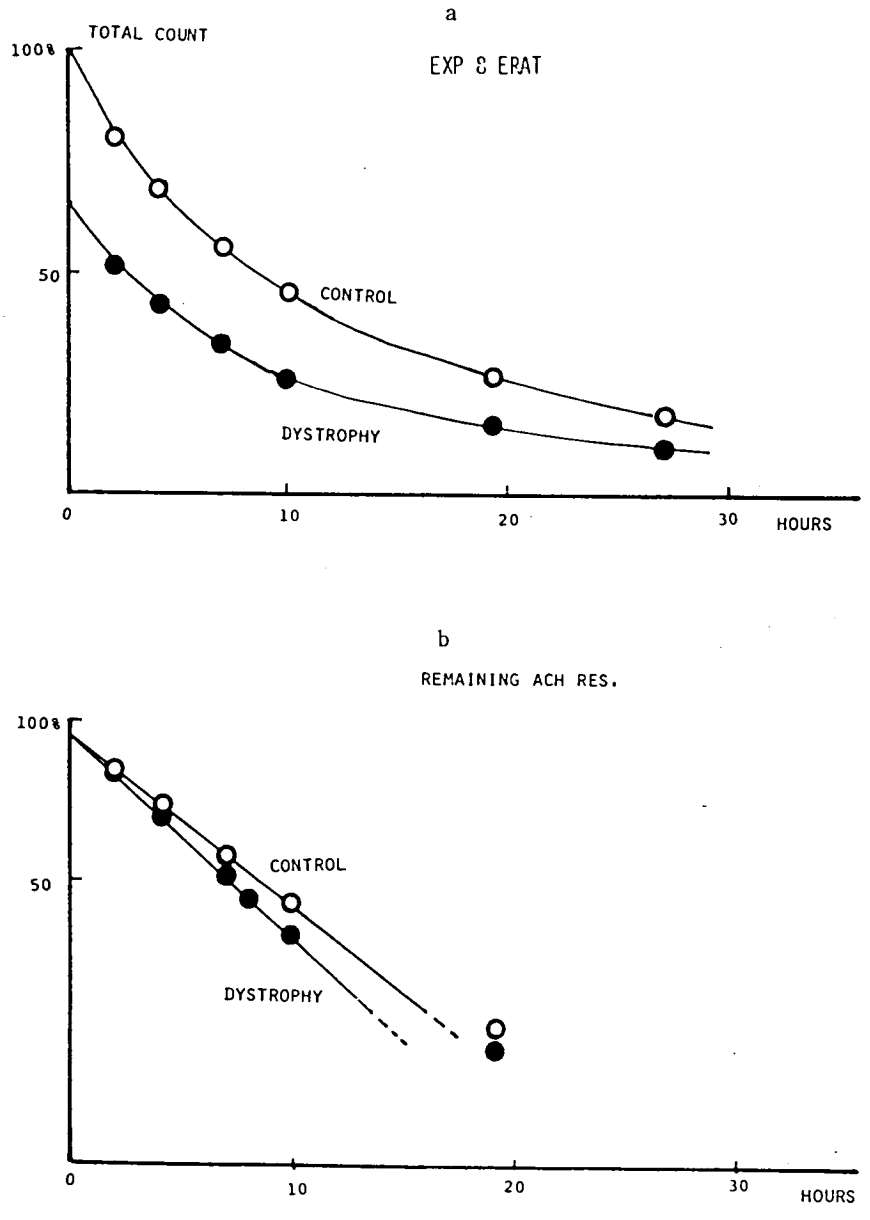
MEM(medium)
10% HS
3% FCS
2% CEE

Etb: Erabutoxin b
(^{3}H labelled)

BgT:α-bungarotoxin
(^{125}I or ^{3}H labelled)

dTc: d-tubocurarine

第2図　アセチルコリンセレプターの総量ならびに代謝速度測定手順。　HS：馬血清，FCS：仔牛血清，CEE：鶏胚抽出液

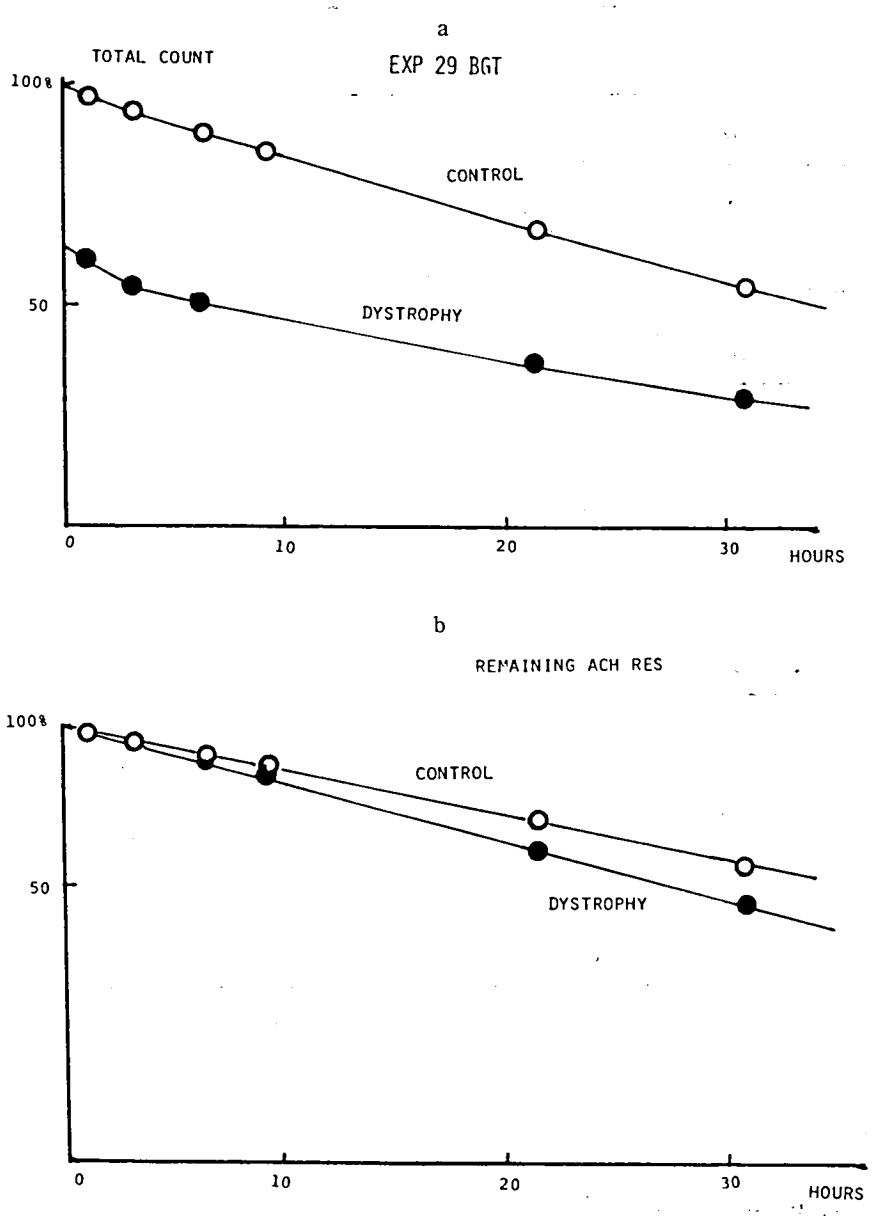


第3図　Erabutoxinの結合と減少率　○：正常筋，●：dystrophy 筋　a．結合量の割合，正常筋を100とする。　b．残留Toxinの時間経過。

は直線的であった。傾斜は，しかしながら,dystrophy の方が大きく，代謝速度は速いことが示唆された。この場合の半減期は正常筋34.2時間に対してdystrophyは26.7時間であった。6回の測定結果は第1表bのようにまとめられる。Exp. 21, 22, 24, は ^{125}I，27, 28, 29, は ^{3}H－ラベルのToxinを用いたが ^{125}Iを用いたものは正常との差は殆んど認められなかった。

考　　察

Embryoの発育状態は正常，dystrophy共に卵の新鮮度に依存すると思われるかなりのバラつき



第4図　Bungarotoxinの結合と減少率。記号は第3図に同じ

があった。このため一回の実験に4ケの卵を入卵して，そのなかから最も状態のよいものを選び，pairとして培養を開始した。平均の孵化率は50%前後であった。

培養開始後の生長，融合及び筋管形成過程においては正常とdystrophyの間に目立った相異はなかったが，総じてdystrophyの方が成育がわるくはやくこわれる傾向があった。

ここで用いた培養液は神経性因子を含んでいないので8－9日から横紋のあらわれる成長の過程は前報[1]の結果と比較しても順調であるということができる。

ERABUTOXIN B

Exp.	No.	8	9	11	12	17	18
Total	D/N	0.65	0.40	0.40	0.85	0.72	0.74
τ hrs	N	9.3	9	7.7	7.7	7.7	7.7
	D	8	8.3	6.1	6.7	6.5	5.7
	D/N	0.86	0.92	0.78	0.87	0.84	0.74

N : 8.3 ± 0.8
D : 7.1 ± 1.0

α-BUNGAROTOXIN

Exp.	No.	21	22	24	27	28	29
Total	D/N	0.62	0.61	0.36	1.0	0.78	0.68
τ hrs	N	39.2	34.4	31.8	41.5	31.0	34.2
	D	39.2	34.4	31.8	40.0	26.4	26.7
	D/N	1	1	1	0.96	0.84	0.80

N : 35.5 ± 4.0
D : 33.2 ± 5.7

第1表　測定結果のまとめ　N：正常筋，D：dystrophy筋，D/N：総結合量の比，τ：半減期

Erabutoxinとα－Bungarotoxinはいずれもアセチルコリンレセプターに特異的に結合するが結合力（親和性）は後者が約10倍強い[2]。いずれの場合も結合量がdystrophyにおいて少なく，正常の約65％（Table I）程度であったことはdystrophy筋のレセプターが少ない可能性を示すものである。代謝速度の指標である半減期はErabutoxinによる場合は1/3程度であったが，これはErabutoxinとレセプターの結合が弱く，結合したToxinがそのまま遊離してしまうためであろうと思われる。

然しながら得られた結果が極めてよい再現性を示したことはレセプターとToxinの親和性に，正常とdystrophyの間で差があることを示唆している。

α－Bungarotoxinによる測定で得られた半減期は約30時間で，哺乳動物で報告されている標準的な価（22時間程度[3]）に比してかなり長い。

これは種差によるものか，培養の条件その他によるものかははっきりしない。いずれにしてもこの条件ではDystrophyの方が代謝がはやく，不安

定であることは確かであろう。この傾向はDys－trophy 筋では細胞内蛋白分解酵素の活性が高く，蛋白合成[4]及び分解[5]が亢進しているという報告と同じ方向である。

今後培養条件をかえ，神経性因子の影響を追求し，あわせて電気生理的な性質を明らかにする。

謝辞

本研究は生理学研究所杉山博之助教授の御指導と御援助によりました。深く感謝の意を表します。

文　　献

1) 堀田　健，冨田伸子，杉山博之：培養法による鶏ジストロフィー筋の電気生理的，形態的及び代謝的特性について，筋ジストロフィー症の基礎的研究，昭和55年度報告書　89－96（1980）

2) 田宮信雄：神経毒とアセチルコリン受容体の結合，蛋白質，核酸，酵素 22 154－165（1977）

3) Steinbach, J.H., Merline, J., Heinemann, S. and Bloch, R.: Degradation of junctional and extra-junctional acetylcholine receptors by developing rat skeletal muscle, Proc. Natil. Acad. Sci. (USA) 76 3547 – 3551 (1979)

4) 眞崎知生，吉川　昭：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，筋ジストロフィー症の基礎的研究，昭和55年度報告書　103－107（1980）

5) 青柳高明，和田孝雄：筋ジスニワトリおよびマウス筋肉内各種酵素活性への対比，筋ジストロフィー症の基礎的研究，昭和55年度報告書　159－165（1980）

VI 微 細 構 造

18　鶏骨格筋の凍結割断像について　101

19　細胞骨格の分化発達 ― 急速凍結エッチングレプリカ観察　106

18　鶏骨格筋の凍結割断像について

岩　崎　祐　三
研究協力者　石　井　弘　子

骨格筋筋膜にみられるcaveolaeはその大きさに大小不同が顕著で，他の組織の組胞膜にみられるpinocytotic vesiclesとは異なるものと考えられているが，その生理学的意義については未だ明らかにされていない点が多い。

われわれは，このcoveolaeの変化に注目し，ジストロフィー鶏と対照鶏の骨格筋筋膜の構築のちがいを凍結割断法により検索をつづけてきた。昨年度は孵化直後から5週目までの幼鶏について観察した結果を報告した。孵化直後には，単位面積あたりのcaveolaeの数は対照鶏とジストロフィー鶏の間に有意な差がないが，浅胸筋では2週以降，下肢筋では5週目に，ジストロフィー鶏においてcaveolaeの数の顕著な増加がみられ，このような数の増加は排列の不規性の出現をともなっていた。今回は27週令の成鶏についての観察結果を各週令のジストロフィー鶏，対照鶏におけるcaveolaeの直径分布について報告する。

材料及び方法

ジストロフィー鶏（413株）と対照鶏（412株）の浅胸筋と後肢外転筋について検索した。ネンブタール麻酔下に採取した筋組織はリン酸緩衝液で希釈した2.5％グルタールアルデヒドで固定後，グリセリン処理を行ない，昨年度報告したごとく，エイコー社製凍結作製装置を用いて割断面のレプリカを作製した。

caveolaeの直径計測には40,000倍で撮影した写真を3倍に引き伸したものを用い，各サンプル約200個のcaveolaeについてコントロン社製画像解析装置を用いてその最小径を測定した。

結果と考察

トリ骨格筋のcaveolaeは径30−40nmのものと50nm以上のものに大分しうるようにみえる。一般に30−40nmの径のものは，これをP面でみた場合大きな径のものにくらべ，より深い陥入としてとらえられることが多い。今のところ，このような分類は便宜的なものにすぎないが，各筋群について10nm^{2}あたりの個数をサイズ別に分けたものをTable 1に示す。

まず浅胸筋についてみると孵化時にはジストロフィー鶏，対照鶏ともに，大部分のcaveolaeは50nm以下の小さなもので，その平均はジストロフィー鶏で43.7±6.5，対照鶏で36.8±6.1である。2週令，5週令の対照鶏では50nm以上の大きなcaveolaeが半数近くを占め，その平均は2週令で60.9±16.1，5週令で50.5±10.4である。一方，ジストロフィー鶏では，2週令，5週令で単位面積あたりのcaveolaeの数が対照鶏にくらべ有意に増加するが，この増加は49nm以下の小さなcaveolaeの増加によるもののようにみえる。したがってその平均も2週令で47.1±9.0，5週令で42.1±7.7と対照鶏にくらべ小さい値を示している。

次いで下肢筋についてみると，浅胸筋とは異なり，孵化時，すでに大部分のcaveolae.が50nm以上の大きなものであり，その平均は対照鶏で60.2±9.8，ジストロフィー鶏で73.3±14.3である。5

＊国立武蔵療養所神経センター

Table 1
Size Distribution of Caveolae

		< 25 nm	25 - 49nm	50 - 74 nm	> 75 nm
Superficial pectoralis muscle					
Day 0	Cont.	4	102	2	0
	Dys.	0	97	15	0
2 weeks	Cont.	0	37	71	19
	Dys	0	138	60	2
5 weeks	Cont.	0	87	55	3
	Dys.	2	206	39	0
Lateral adductor muscle					
Day 0	Cont.	0	15	85	6
	Dys.	0	4	62	39
2 weeks	Cont.	0	81	56	2
	Dys.	0	34	86	10
5 weeks	Cont.	0	11	108	22
	Dys.	26	155	102	3

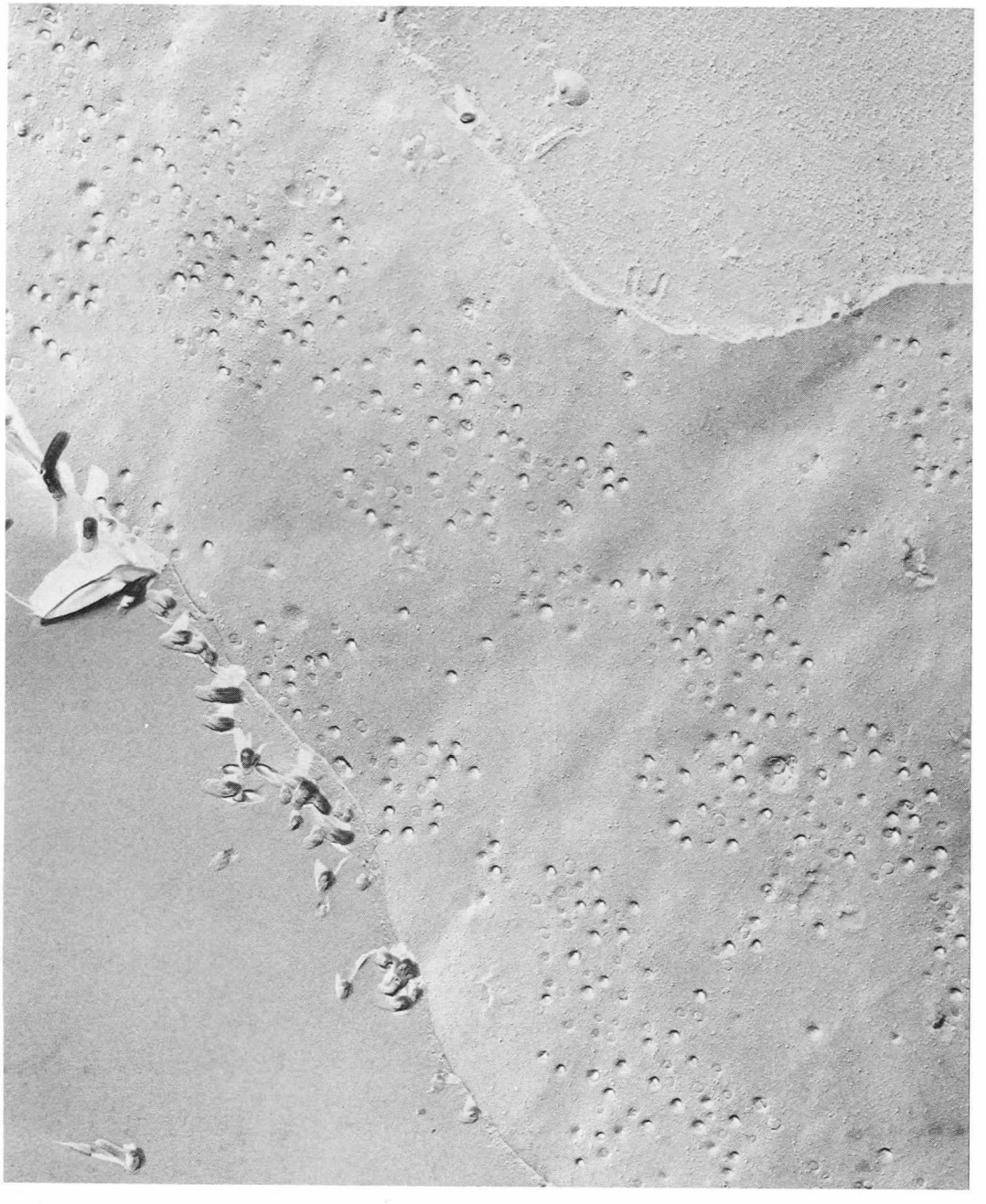


図1　27週令対照鶏，浅胸筋　×30,000

週令のジストロフィー鶏にみられるcaveolaeの顕著な増加は浅胸筋の場合と同様，49nm以下の小さなcaveolaeの増加によるもののようである。5週令における平均は対照鶏で64.6±11.3，ジストロフィー鶏で48.4±9.3であった。

Bonillaらはヒトのジストロフィー症について検索を行ない，病的筋にみられるcaveolaeの増加は小径のcaveolaeの増加によるものであると述べているが，同様のことが，生長期にあるジストロフィー鶏についても言えそうである。

Table 2

Superficial pectoralis muscle (27 weeks old)

	DENSITY per 10 μm^2	SIZE (nm)			
		25 - 49	50 - 74	75<	mean ± SD
CONTROL	202 ± 5	61 (30%)	137 (68%)	4 (2%)	54 ± 8
DYSTROPHIC	240 ± 6	24 (10%)	194 (81%)	19 (8%)	61 ± 8

ところがこれは27週令のジストロフィー成鶏については必らずしもあてはまらないようである。図は27週令の対照鶏の浅胸筋の一部である。ここにみられるように，対照鶏では成鶏になってもcaveolaeの配列の規則性は保たれている。一方，ジストロフィー鶏ではこのような配列の規則性は幼鶏，成鶏とも失なっている。したがって，caveolaeの配列の規則性についてみれば，ジストロフィー鶏と対照鶏のちがいは，幼鶏でも成鶏でも同じであると言えよう。しかし，caveolaeの大きさについてみるとTable 2 に示すごとく成鶏においては，幼鶏にみられたような対照鶏とジストロフィー鶏のちがいを見い出すことができないのである。

前述したごとく，caveolaeを径50nm以上のものとそれ以下のものに分ける特別な根拠があるわけではない。しかし，孵化時にT－systemを含め，他の筋にくらべ筋細胞の構築で未熟であると言われている浅胸筋では大多数のものが小径であったことは注目すべきであると思われるし，またジストロフィー鶏では生長期にある幼鶏に限って小径のcaveolaeが増加していた点も興味深い。現在，caveolaeの本態として最も確からしいT-systemの開口部に対応するものが大径のcaveolaeであると考えると孵化時，浅胸筋に大径のcaveolaeがほとんどみられないことを説明し得ると思われる。また，caveolaeをpinocytotic vesiclesであるとする考えは成熟した正常骨格筋については否定的であるがT－systemの発達が未熟な筋や病的状態ではpinocytotisも重要な役割をはたしており，pinocytotic vesiclesに対応するものが小径のcaveolaeであると仮定すればジストロフィー筋における小径のcaveolaeの増加が生長期にのみみられ，成熟した時期には目立たないことも説明し得るように思われる。

文　　献

1) 岩崎祐三，石井弘子：チキン骨格筋筋細胞膜の凍結割断像「筋ジストロフィー症の基礎的研究昭和55年度報告書」53－58, 1981
2) 徳臣晴比古ほか：筋の発達過程における変化――特に筋ジストロフィーチキンに横細管系について――「筋ジストロフィー症の臨床病態および疫学的研究成果報告書」336－343, 1979
3) Bonilla, E., Fischbeck, K and Schotland, D.L.: Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. *Amer. J. Path.* **104:** 167-173, 1981.
4) Costello, B.R. and Shafiq, S.A.: Freeze-fracture study of muscle plasmalemma in normal and dystrophic chickens. *Muscle & Nerve* **2:** 191-201, 1979.

19 細胞骨格の分化発達—急速凍結エッチングレプリカ観察

石川春律
研究協力者 臼倉治郎　月田承一郎
月田早智子

はじめに

細胞骨格は細胞を機械的に支持する細胞質構造の総称であり，細胞外形を維持し，細胞内オルガネラの分布や輸送をコントロールしている。細胞骨格では微小管，中間径フィラメントおよびマイクロフィラメントが主な構成要素である。近年，筋細胞について，とくに収縮活動や筋原線維の構成・配列との関連で，細胞骨格要素が注目されてきた。

われわれは，これまで，培養筋細胞についてその分化・発達過程で果す細胞骨格の役割を電子顕微鏡的に検索してきた。筋細胞の伸長や，筋原線維の発達に伴ない微小管や中間径フィラメントの一過性の増加が認められる。成熟筋細胞では，微小管の数は少ないが，しばしばI帯のレベルを横走しているのが観察される（図1）。

細胞骨格の形態学的研究はこれまで，ほとんど超薄切片法によるものであったが，最近になって新しく2つの方法が細胞骨格の研究に有力な手段となり得ることが明らかになった。一つは固定した培養筋細胞を無包埋のまま，乾燥試料として透過電子顕微鏡で観察するものである。細胞内部を露出するように試料を作製すれば，走査電子顕微鏡でも観察できる。もう一つは，無固定・新鮮材料を急速凍結し，凍結乾燥ののち，金属蒸着によるレプリカ試料として観察するものである。この凍結レプリカ法の問題点はいかに急速に凍結させても，氷晶をつくらない良好な凍結は凍結面直下の極くわずかな表層域に限られることである。したがって，通常の凍結レプリカ装置で，この表層域を割断ないし内部露出することは難しい。われわれは，この困難を克服すべく，ミクロトームによる凍結薄切法（クライオトミー）を応用して凍結の良い表層域を広く正確に割断，露出し，レプリカ膜を作製することができるようになったので，その手技と応用結果を報告する。[1)2)3)]

急速凍結エッチングレプリカ観察

手技と改良点

細切した筋や神経組織を凍結レプリカ装置専用ホルダーに載せ，液体窒素または液体ヘリウムにて冷却した純銅ブロックに接触（圧着）させ，急速凍結する。凍結時に組織片が強く圧平されないよう工夫した。試料ホルダーには濾紙を敷き，その上に組織片を載せるとともに，組織片を囲んでビニールテープ環を一層貼りつけた。次にこの凍結組織片をSorvall MT−2型ミクロトームに組込んだクライオキット（FTS/LTS−2）内に持ち込み，−110℃〜−120℃の液体窒素ガスの中で，ガラスナイフで組織最表層を切削し，除去する（図2）。クライオキット内では，ビニールテープ環を除き，テープの厚さだけ突出した組織片表層を切削することになる。通常，1μmの厚さで削っていき，液体窒素凍結組織では，3〜5 μm

＊東京大学医学部解剖学教室

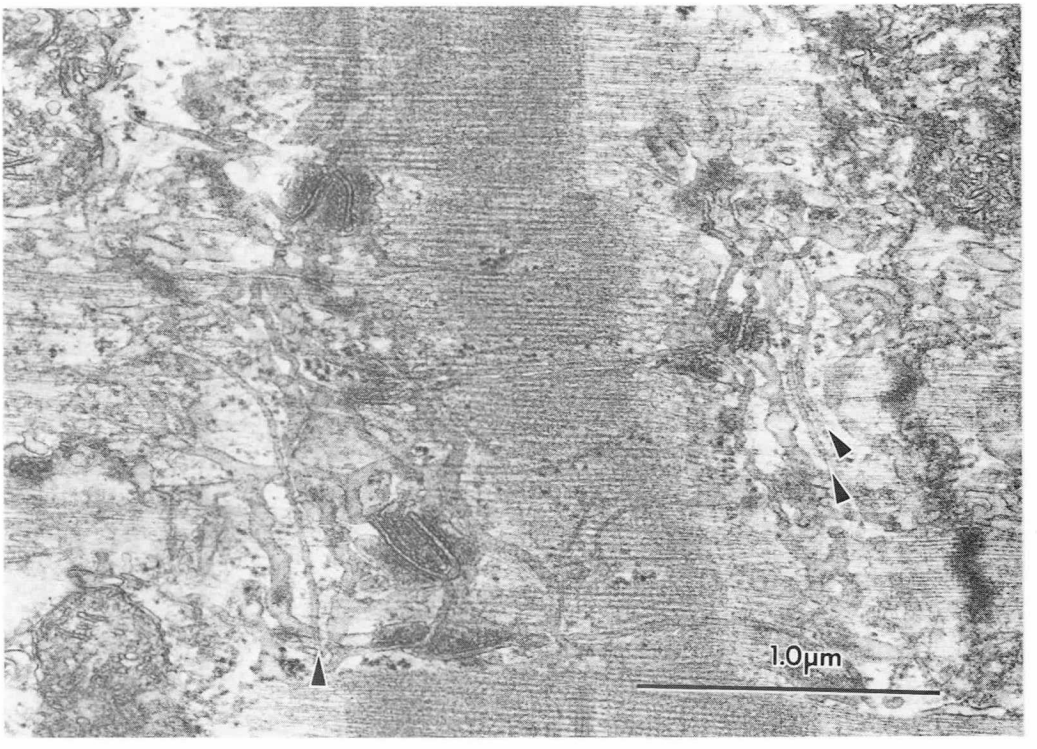


図1　ニワトリ縫工筋線維の縦断像。I帯に横走する微小管（矢印）が観察される。

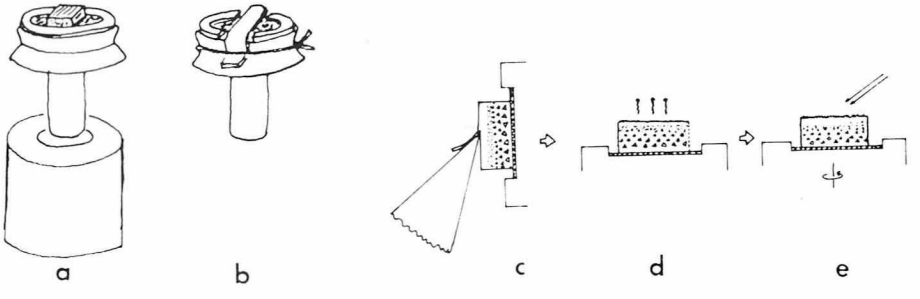


図2　急速凍結エッチングレプリカ法。a－b：試料ホルダーに載せた新鮮材料。筋組織の場合伸展位でホルダーに固定する。c：クライキット内で表層域を切削し，内部構造を露出させる。d：フリーズ・レプリカ装置内で，深いエッチングを施す。e：試料回転とともに白金を蒸着させる。

の深さ，液体ヘリウム凍結組織では，3～15 μmの深さ内で全面を露出させる。こうして，表層域を露出させた組織片をフリーズ・レプリカ装置（Eiko　FD－2S型)内に移し，高真空下で加熱により，深くエッチングしたのち，白金の回転蒸着により，レプリカ膜を作製する（図2）。

筋および神経への応用

材料として，筋ではマウス腓腹筋およびカエル縫工筋を用い，神経では，ラット三叉神経を用いた。筋をカミソリで帯状に切り出し，伸展位で，試料ホルダーに固定し，神経はカミソリで2分してホルダーに載せ，液体ヘリウム冷却による金属

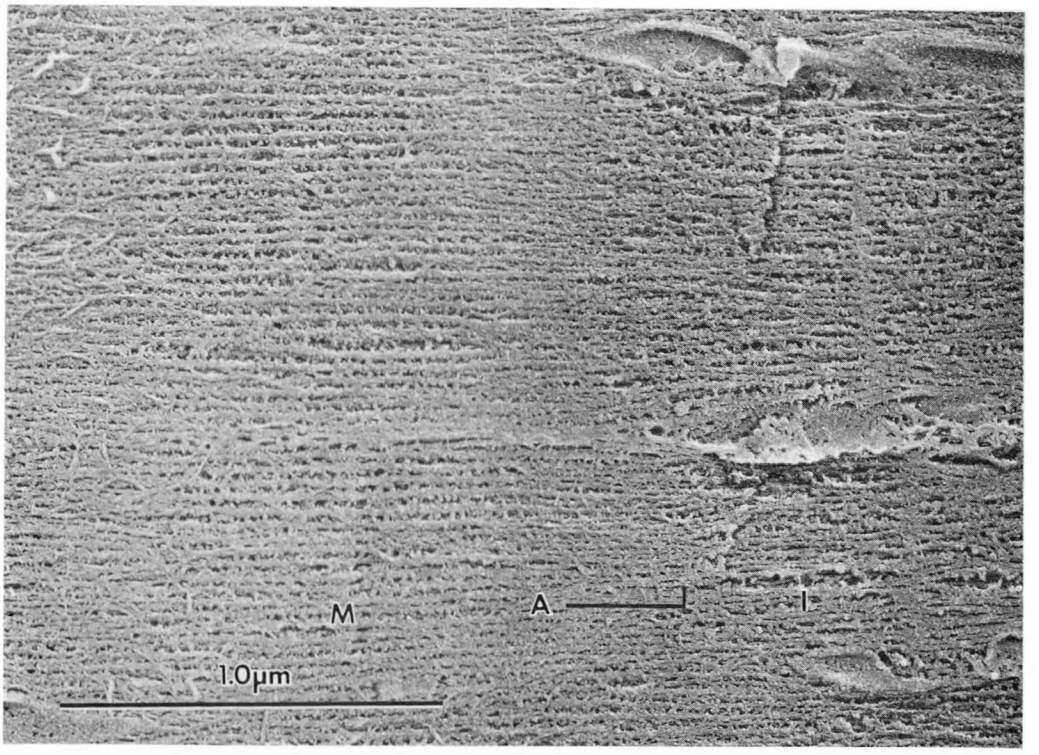


図3 骨格筋線維の急速凍結エッチングレプリカ像。新鮮無固定筋線維のレプリカ像で，筋原線維の横紋構造（A．I．M）も明瞭に観察される。カエル縫工筋。

接触法で急速凍結した。レプリカの観察に際しては，立体対写真を撮影し，立体鏡下で分析した。凍結レプリカ像でみる筋原線維の構造は基本的には超薄切片像とほぼ一致するものであった[2]。大・小2種の筋フィラメントが明瞭に観察され，筋原線維内で規則正しい配列を示した（図3）。個々の筋フィラメントの詳細もかなり高分解能かつ立体的に観察された。ミオシンフィラメント上には多数の粒状構造が認められ，これらの粒子は細糸に沿い約40nmの間隔で配列しており，クロスブリッジに相当すると考えられる。また，アクチンフィラメントやZ板，M線も明瞭に観察された。

神経軸索内の細胞骨格系は，このレプリカ法により，極めて保存よく，明瞭に観察された(図4)。長軸方向に密に配列した微小管やニューロフィラメントに加えて，横方向に連絡する微細な線維構造が発達しており，軸索内に密な格子様網目構造を呈していた[3]。

結　　語

以上，急速凍結エッチングレプリカ法の手技改良を行ない，この方法が細胞骨格の形態学的検索に有力な手段となることを示すことができた。今後，発達中の筋細胞に応用して，細胞骨格の役割を解明していきたい。

文　　献

1) Ishikawa, H., Usukura, J. and Yamada, E.: Application of cryomicrotomy to the freeze-etch replica method for unfixed tissues. *J. Electron Microsc.*, **30**, 215 (1981).
2) Usukura, J., Ishikawa, H. and Yamada, E.: Fine structure of unifixed frog sartorius muscle as revealed by deep–etch-replica and freeze substitution methods. *J. Electron Microsc.*, **30**, 237 (1981).
3) Tsukita, S., Usukura, J., Tsukita, S., and Ishikawa,

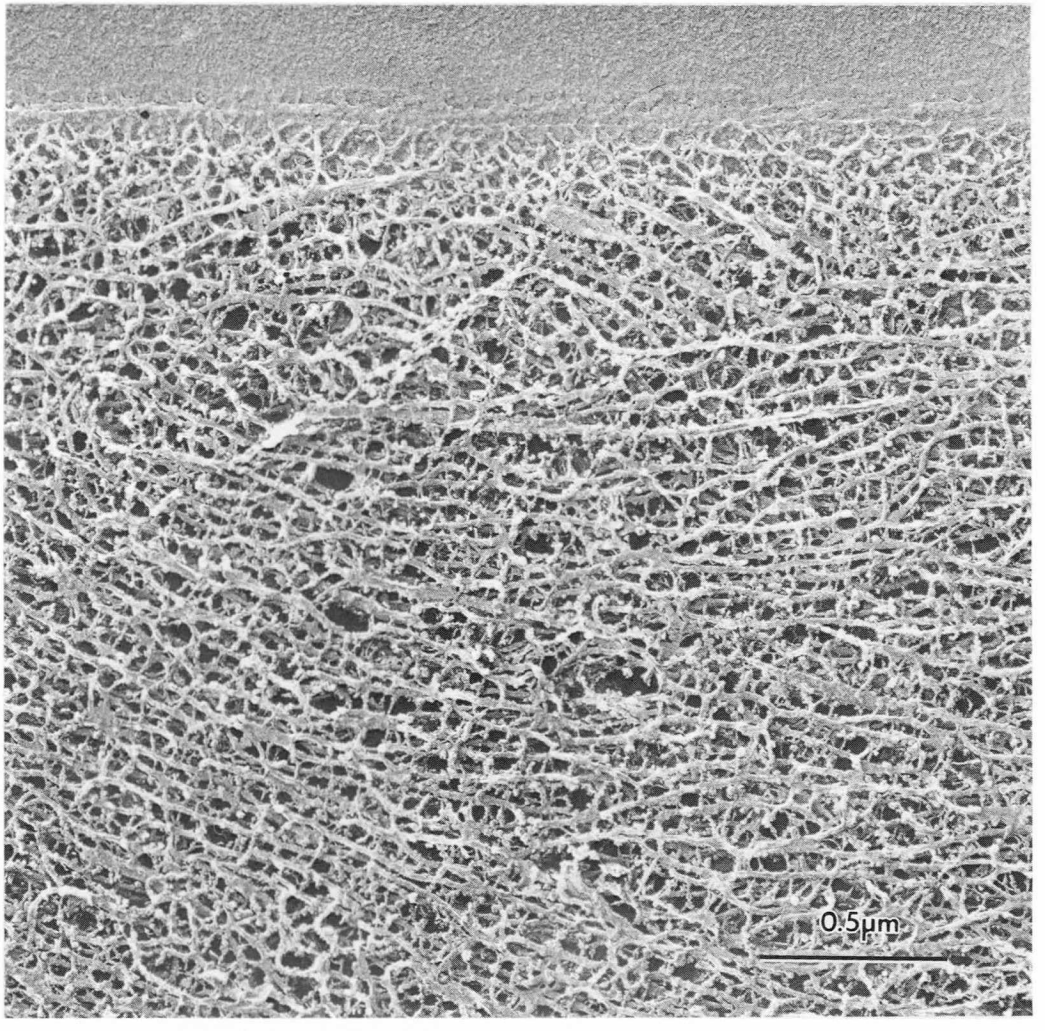


図4　有髄神経軸索の急速凍結エッチングレプリカ像。新鮮無固定の神経軸索内を埋めている細胞骨格網は，主としてニューロフィラメント，微小管，およびそれらを横に橋渡している微細線維構造からなる。膜成分も散在してみられる。上端は軸索膜の内表面とミエリン膜が見えている。ラット三叉神経。

H.: Quick-freeze, deep-etch, replica study on axonal cytoskeleton. *J. Electron Microsc.*, **30**, 263 (1981).

Ⅶ　構造蛋白・その他

20　ミオシンH鎖及びL鎖isoformの発生過程における発現様式　113

21　ウサギ骨格筋トロポニン成分の局在　124

22　再生筋における筋蛋白質の分化　127

23　骨格筋の発生・成長に伴う
　　ミオシンアイソザイム及びC－タンパク質の分子種変異　135

24　ニワトリ胸筋の"Native High MW Protein"　141

25　ジフテリア毒素によるEF2の
　　ADPリボシル化を抑制する因子と筋発生におけるその変化　144

26　脱神経及び神経再生による
　　支配筋の分離筋小胞体膜の Ca－uptake 筋について　149

20 ミオシンH鎖及びL鎖 isoformの発生過程における発現様式

江 橋 節 郎*
研究協力者 三 川 隆* 大日方 昂**
真 崎 知 生*** 大 室 弘 美****

Myosin は actin と共に動物細胞一般に存在し細胞運動に主要な機能を有する蛋白である。

1 moleのmyosin は分子量約 20 万の heavy chain (HC) 2moleと,分子量数万の最低2種類の light chain (LC) が2moleずつ会合してできる, 合計6moleのサブユニットからなる複合蛋白である。分化した細胞ではその運動機能の特異性に応じて特有のmyosin を利用している。現在のところ post-translational modification によるものを除くと, 同一個体内に (ニワトリの場合) HCに6種類, LCに7種類の isoform の存在することが知られている。HCと最低2種類のLCの組合せがランダムなものだとすると 270種にものぼるmyosin isoformの存在が仮定される。しかしながら実際に生体内で認められている組合せはその1割にも満たない。その理由の一つは, 例えばLCに関して言えば, 成体において7種のLC isoformの中から選択される組合せには3通りしかなく, これは各組合せに共通に利用される isoform がない為である。しかも分化した細胞ではその機能に応じて3通りの組合せの中から1つだけを選択して発現させている[1]。 複合蛋白であるmyosin の各サブユニットが多くの iso-form遺伝子のプールから比較的厳密なセットとして発現されており, この制御には少なくとも3つの構造遺伝子からの発現に対する全か無か的な調節が必要であろう。本研究では細胞分化の形質発現のマーカーとしてmyosin を取り上げ, 細胞機能に応じた特異分子を細胞が発生過程でどの様に獲得していくかを検索する。

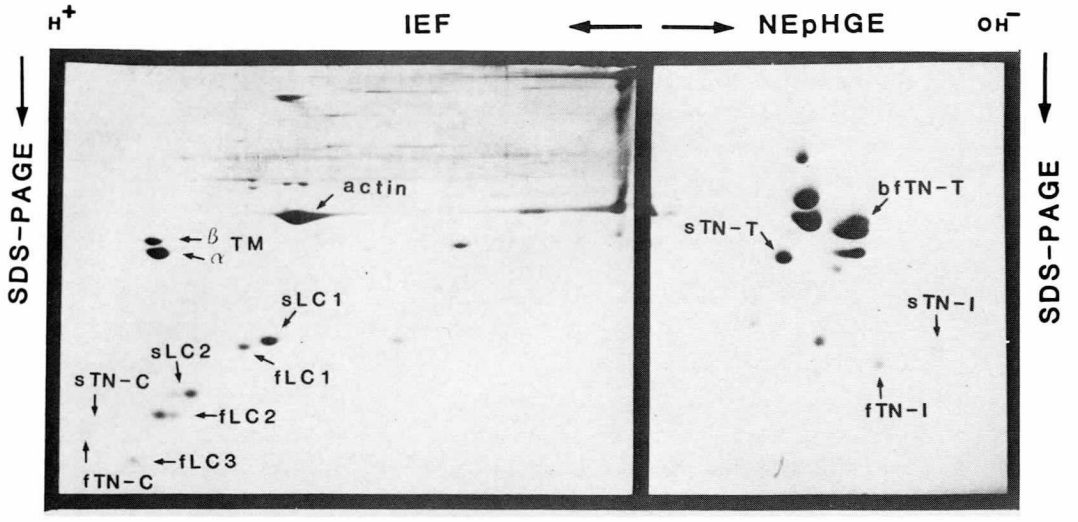
* 東京大学医学部薬理学教室
** 千葉大学理学部生物学教室
*** 筑波大学基礎医学系
**** 東京都臨床医学総合研究所

実 験 方 法

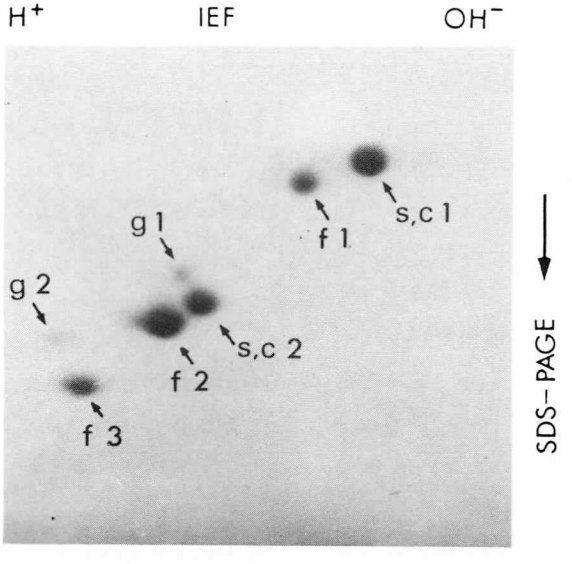
1) 材料：胚および孵化後種々の stage のニワトリ anterior latissimus dorsi 筋 (ALD筋)を実体顕微鏡下に, 採取し, ALD筋組織中に含まれる, 各 isoformについて分析した。

2) LC isoformの分析：(1)等電点, (2)分子量, (3)ペプチドマップ, (4)抗原性, の4点を指標に各 isoformの同定分析をおこなった。(1)と(2)は2次元電気泳動 (2D-PAGE[1]) 分析, (3)については等電点電気泳動 (IEF) 後, ゲルを蛋白分解酵素と反応させてから, 2次元目のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いた分析によった。蛋白スポットの染色はクーマシーブルー (CBB)法あるいは銀染色法[1]による。(4)に関しては 2D-PAGE 後展開した蛋白をニトロセルロース膜に電気泳動的に転写[2]し, 1% BSAでブロック後1次抗体と結合蛋白をFITCで標識した2次抗体で染色した。

3) HCの分析：myosin isozyme の分析に用いられるピロリン酸ゲル電気泳動 (PPi-PAGE[3]) によりmyosin を isozyme に分離後, 各 isozyme



a



(f) light chains of fast muscle myosin
(s) light chains of slow 〃
(c) light chains of cardiac 〃
(g) light chains of smooth 〃

b

図1 (a)2D−PAGE による収縮蛋白および調節蛋白のマップ (b)myosin LC isoform の 2D−PAGE によるマップ（低分子酸性部分のみを示す）

毎にゲルを切り出し蛋白分解酵素による限定分解の後，ペプチドのパターンをSDS−PAGE，銀染色により分析した。

4）isoformの定量：2次元に展開CBB染色されたLC isoformのスポットを切り出し25％ピリジンによりCBBを抽出し，比色定量した。HCに関してはPPi−PAGEにより分析したisozyme毎のCBB染色度をデンシトメータにより測定，定量した。

結果と考察

2D−PAGEにより収縮蛋白およびその調節蛋白のisoformが比較的分解能よく分析できる（図1）。図1−bに示すように7種類のLC isoformは全て異なる位置にマップされる。

胚と成鶏ALD筋よりurea−Nonidate P40可溶性分画を得，その全蛋白を2次元に展開して比較するとそのパターンには多くの相違点が認められる（図2）。LCだけに注目しても，成鶏のA

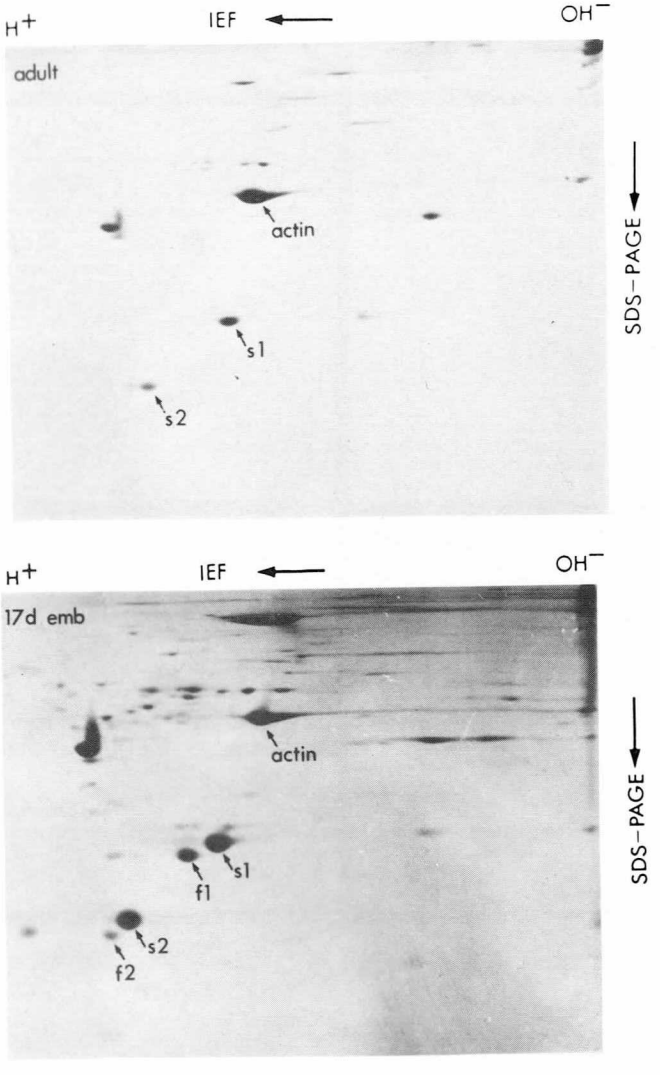


図2　成鶏および胚ALD筋の2D−PAGEによる構成蛋白の比較。

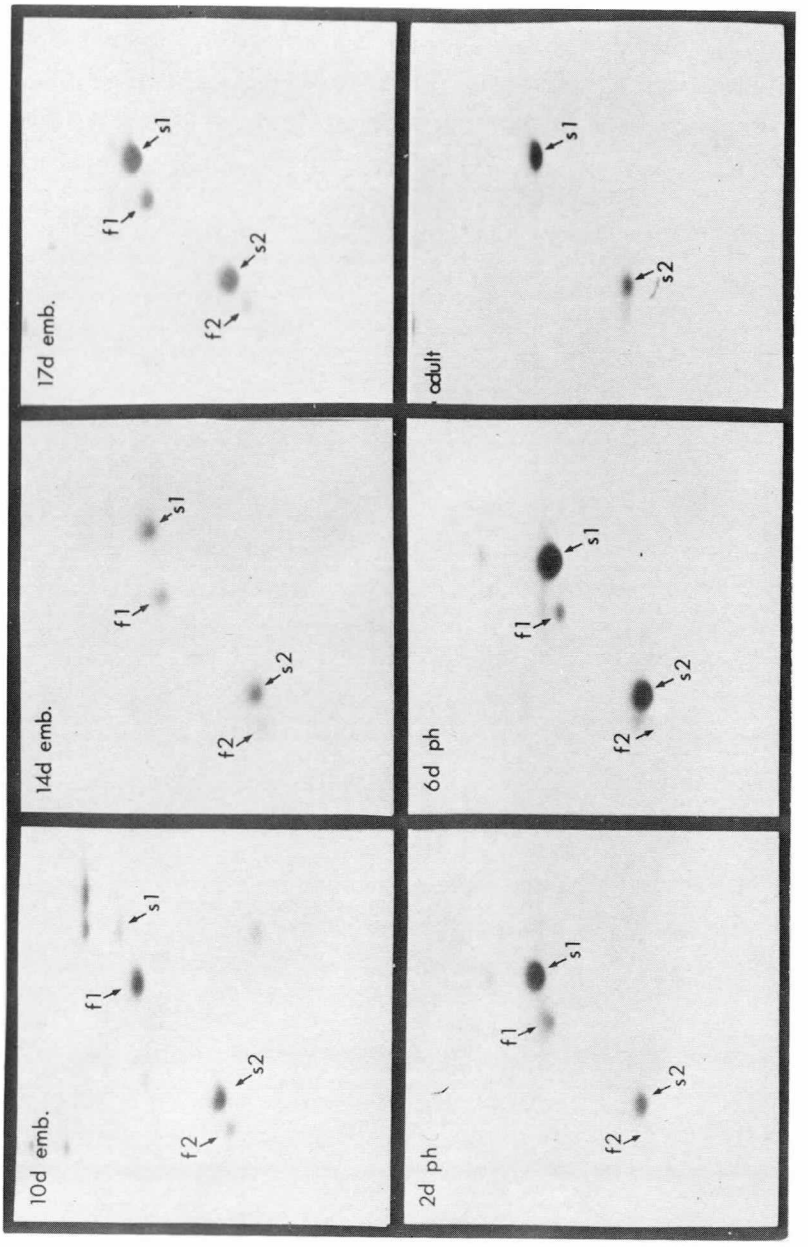


図3　発生過程におけるLC isoform パターンの変化

LD筋ではほぼ遅筋型（s型）のisoformが特異的に発現しているのに対し，胚の場合にはs型以外に速筋型（f型）のisoformに相当する2種のスポットが認められる。発生過程を追ってこれらのスポットのパターン変化を見ると（図3），10日胚ではf－1型とs－2型に相当するスポットが比較的多量存在し，s－1型およびf－2型の相対量は少ない。stageが進むにつれf－2型のスポットが急速に消失する。この過程で認められる最も動的な変化はf－1型とs－1型の相対量の置換である。孵化後，数日でf－1型のスポットは急速に消失してゆき，ほぼs－型だけとなりALD筋特異形質となる。

2D−PAGEでみる限り，即ち等電点および分子量を指標とする限り，胚ALD筋に成鶏ではみられないf型に相当するペプチドが存在している。しかし，このスポットがf型のLC isoformではなく単に等電点と分子量がf型に一致するような全く別の遺伝子産物である可能性を否定できない。そこでf－1型isoformに特異的なpolyclonal抗体を用い，f－1型に相当する位置にマップされるペプチドの抗原性を検索した。ここでpolyclonal抗体を用いるのは，単一ハプテンに対する相同性ではなく多くのハプテン，即ちできるだけ多くの一次アミノ酸配列上の相同性を検出したい為である。図4に示す様に胚ALD筋構成蛋白を2次元に展開しニトロセルロース膜に転写後，抗f－1型ウサギ抗体と反応させ，FITCで標識した抗ウサギIgG抗体で染色すると，f－1型に相当するスポットが抗原性を有することが明らかとなった。成鶏ALD筋ではこの手法では抗原性を示すスポットは検出できない。従って等電点，分子量，抗原性という独立した3つの性質を指標にして見る限り，胚のALD筋には成鶏にはないf型LC isoformが発現されていることになる。また図5に示す様に2D−PAGEで分離したスポットとLC isoformのα－キモトリプシンによる限定分解で得られるパターンも一致する。以上のことから胚より得られたurea–Nonidate P40可溶分画の

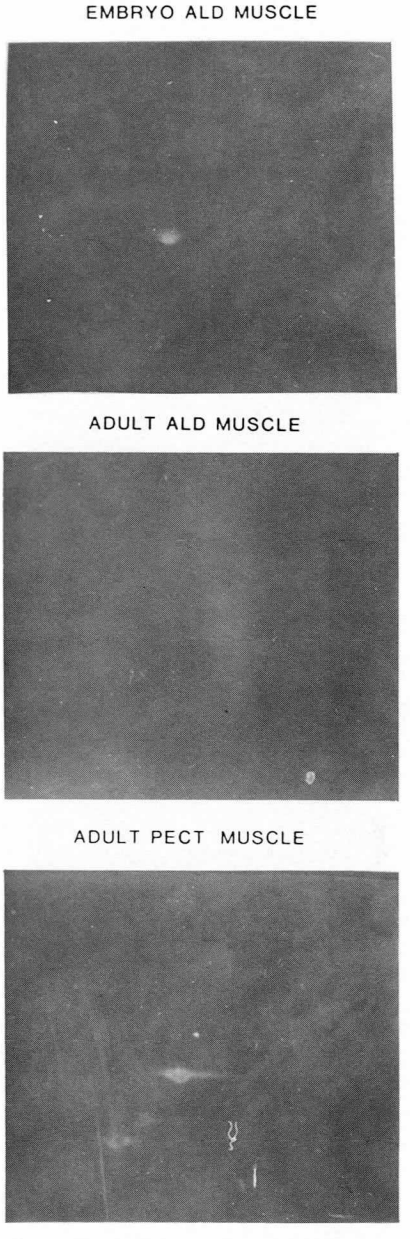
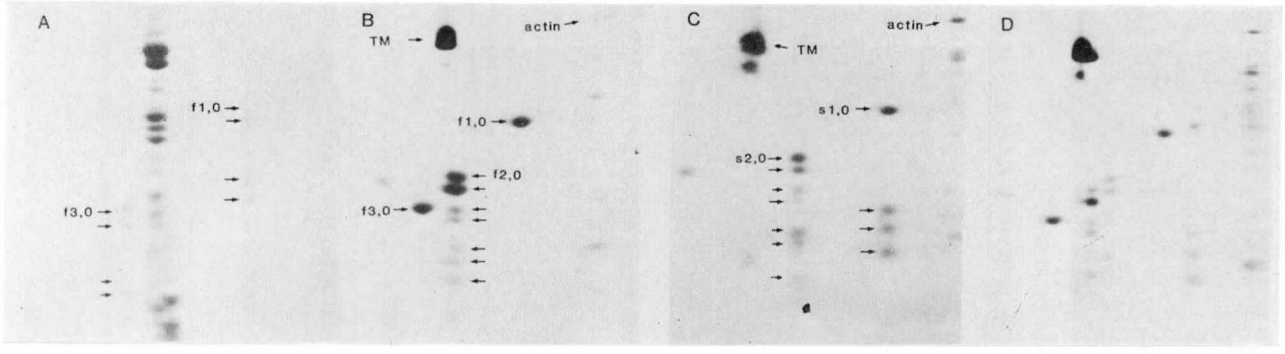
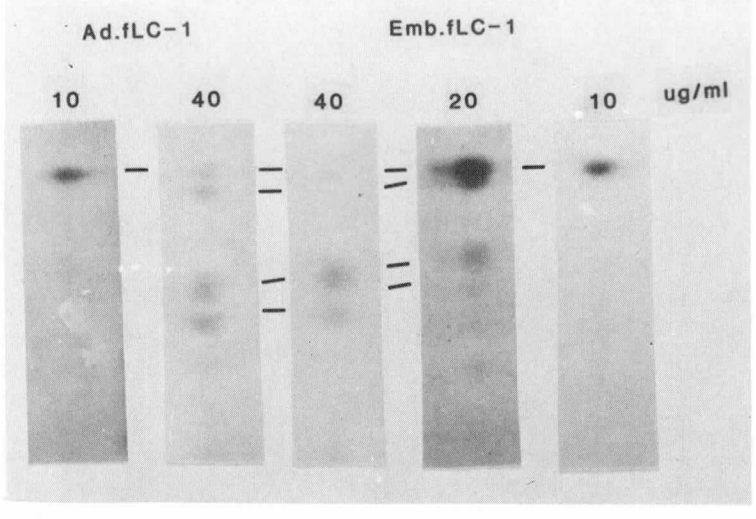


図4　抗f－1型抗体による抗体染色

2D−PAGEで固定された各LC−isoformに相当するスポットはLCを含んでおり，LCがそのスポットの主構成成分であるといえる。従って，2D−PAGEのパターン変化を見ることで，myosin LC isoformの形質発現の細胞特異性獲得の過程を追うことができる。transcription→splicing→translation→folding→assemblyという多く





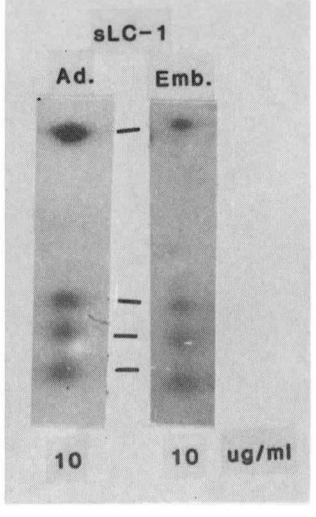


図5 α－キモトリプシンによるLC isoformのペプチドマップ。A，B，は速筋，Cは遅筋，DはB＋Cにより得られ各 isoform からのペプチドのパターン。Aは40μg/mℓ，B–Dは10μg/mℓ のα－キモトリプシンで37℃ 7分間反応させた。下図は胚の各スポットからの結果をまとめたもの。

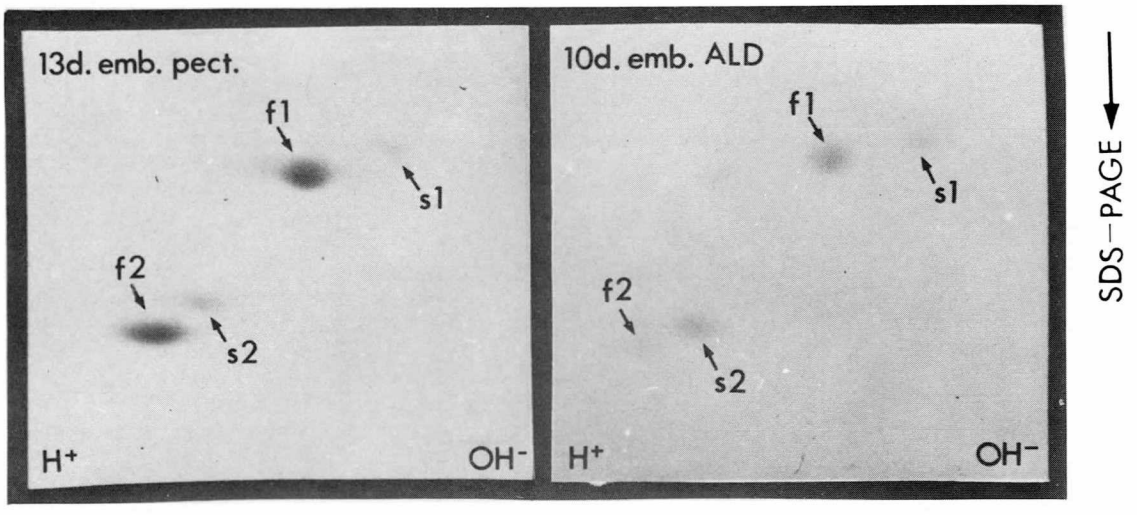


図6　胚myosinの2D−PAGEのパターン，LC部位のみを示した。Aは胸筋，BはALDより得た結果。

のステップの各々の中でtranslation以後のLC isoformの存在様式に関するもう1点の重要な問題はassemblyの様式である。発現されたLCが実際にmyosin分子に組込まれているか否かを確かめるために胚よりmyosinを調製し，そのLC組成を見たのが図6である。図3と比較すると，細胞内での存在パターンとほぼ同様の相対比で，myosin分子に会合している。成鶏ALD筋では1moleのmyosinのLC構成は2moleのs−1型と2moleのs−2型である。心筋も同様であり筋胃（平滑筋）では2moleのg−1型 2moleのg−2型である。一方速筋においては約1.3moleのf−1型，2moleのf−2型と0.7moleのf−3型がLCの構成成分である。s，f，g型が共存することは基本的にはなく，速筋の場合を除くとHC 2moleずつ当量的に結合している。速筋におけるf−1型：f−2型：f−3型＝1.3：2：0.7という比は一見寄妙であるが，これは速筋myosinがLC組成の異なる3種類のisozymeの混合したものである為である。[3] 即ち2moleのHCに対し2moleのf−1型と2moleのf−2型LCからなるisozyme（FM3），1moleのf−1型と2moleのf−2型と1moleのf−3型LCよりなるisozyme（FM2）2moleのf−2型と2moleのf−3型LCよりなるisozyme（FM3）以上3種類である。これら3種のisozymeを変性剤不在下，即ちHC・LCが会合状態のままmyosin分子としてPPi−PAGEを行なうと3種のisozymeが各々異なる移動度を示す（図7）。胚のALD筋に存在するLCはs型，とf型の混合物であり，これらがどのようにHCと会合しているかをppi−PAGEにより分析した。図8に示すように成鶏ALD筋のmyosinは単一バンドを示す。胚の主構成成分は成鶏型（Ad型）に比べ少し速い移動度を示す（Emb−1型）。Emb−1型よりさらに速い移動度を示す成分（Emb−2型）も少量存在する。発生初期のstage（例えば10日胚）ではEmb型が検出されるにすぎないがAd型も徐々に出現する様になり，それに伴いEmb−1型は，ふ化後16週においてもかすかに検出でき，Emb型からAd型への置換はLCの場合（図3）に比べ，かなり時間がかかる。各isozymeのLC組成を，PPi−PAGE後各バンドを切り出し，SDS−PAGEを行ない銀染色により検出した（図9）。10日胚のEmb−1型，Emb−2型ともLC組成の主構成成分はf−1型とs−2型でありLC組成の相対比に大きな違いは認められない。ふ化後6日目の場合にもEmb−1型，Ad型ともs−1型，s−2型以外にf−1

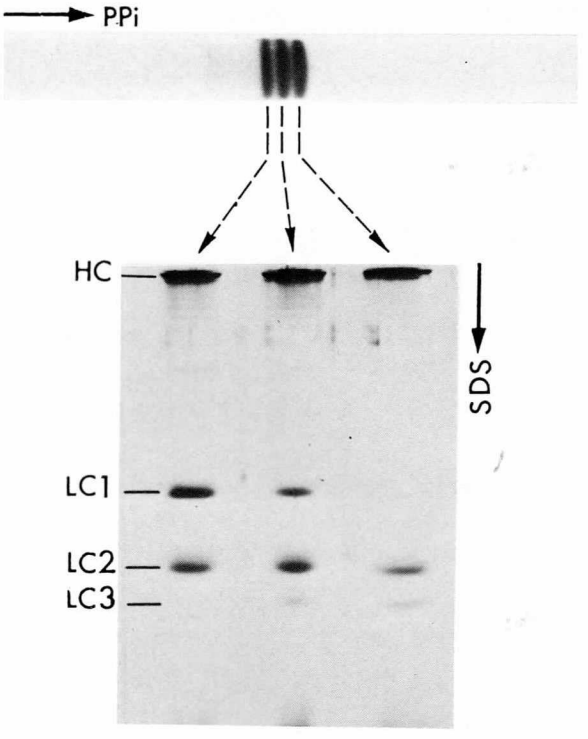


図7　速筋myosin のPPi－PAGEのパターンと各バンドのサブユニット組成

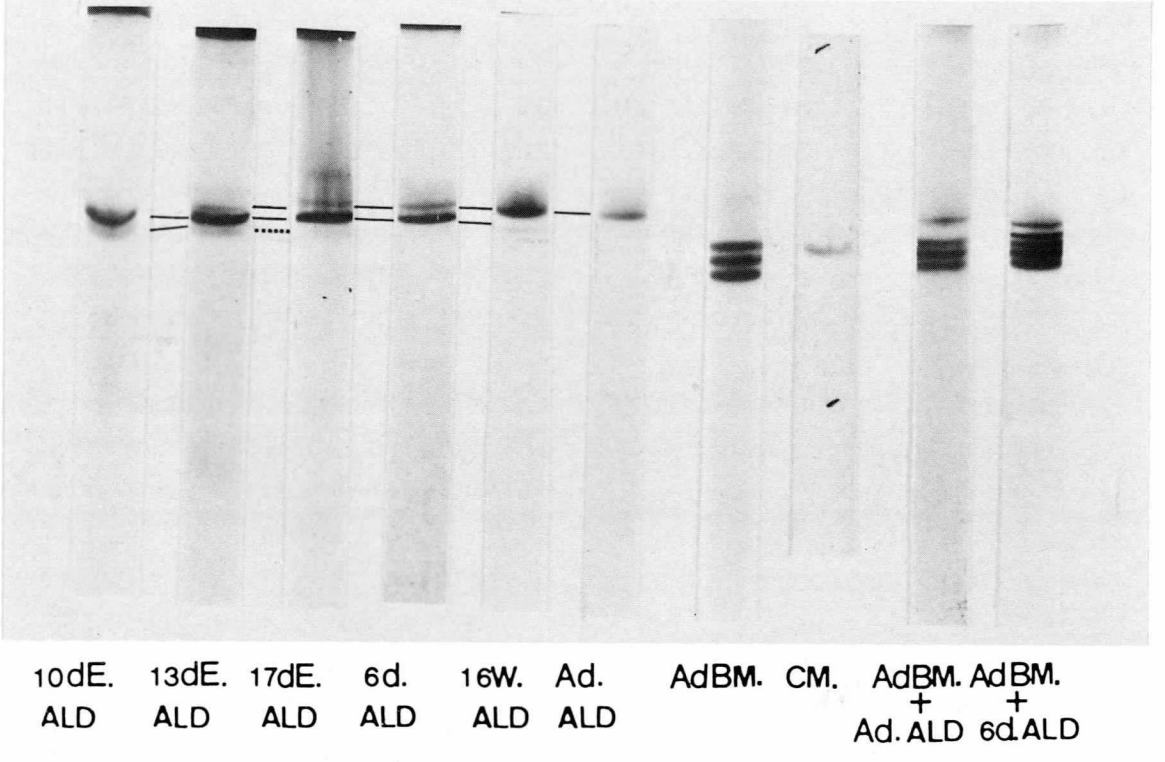


図8　各stage のPPi－PAGE パターン

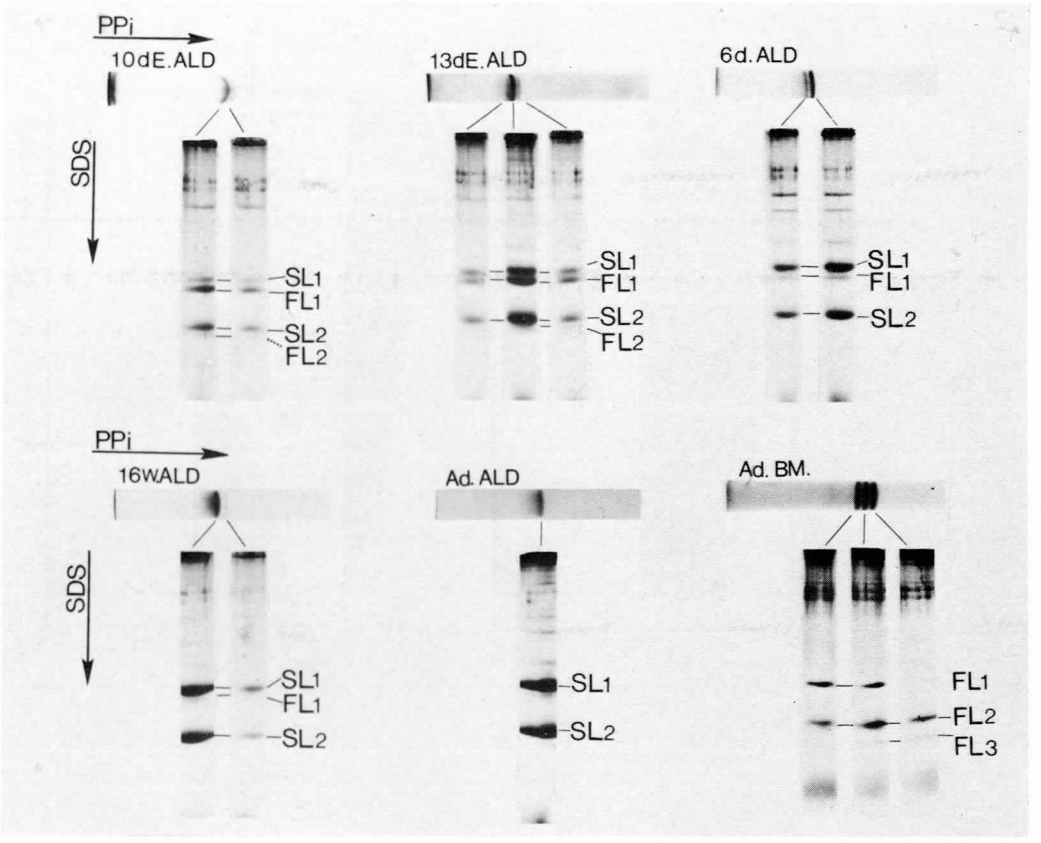


図9 各stageのPPi－PAGEの各isozyme のLC組成の比較，PPi －PAGEパターンはCBB染色，SDS－PAGEパターンは銀染色による。

型をLCサブユニットとして含み，LC組成に差は認められない。従ってAd型，Emb－1型，Emb－2型がPPi－PAGEで異なる移動度を示す原因はLC組成の相違によるものとは考えにくい。これはEmb型からAd型への移行がLCの場合に比べずっと遅れていることからも支持される。

Ad型，Emb型各成分のHC組成を比較する為にPPi－PAGE後各バンド毎に切り出し，α－キモトリプシンによる限定分解で得られるペプチドのパターンをSDS－PAGEにより分析した(図10)。Emb－1型とAd型でHCが異なっていることがわかる。ALD筋と心筋のmyosinはLC組成に差はないが，PPi－PAGEでは心筋myosinがより速い移動度を示す。心筋のmyosin HCのペプチドパターンはALD筋と異なりHCに差のある。従ってPPi－PAGEにおけるEmb型とAd型の移動度の差はHCの相異に由来するものであると考えられる。とすれば，HCにに関する細胞特異形質発現の獲得様式を発生過程を追って調べるにはPPi－PAGEのisozymeパターンを定量すればよいことになる。

以上の結果からLCおよびHC isoformの発生過程での発現様式を定量的に見ると図11の様になる。LC組成がALD筋特異性を獲得するのはほぼふ化時であるが，HCの特異形質発現が完了するにはさらに数ケ月を要する。

myosinという1つの分子が組織あるいは細胞特異性を獲得するまでに各サブユニット毎に全く固有の発現様式を示す。LCに関しては発生初期にはs型，f型が共に発現され，しかもs－1型，s－2型，f－1型，f－2型各々に相対的存在比の調節は固有の様相を示す。HCに関しては発生

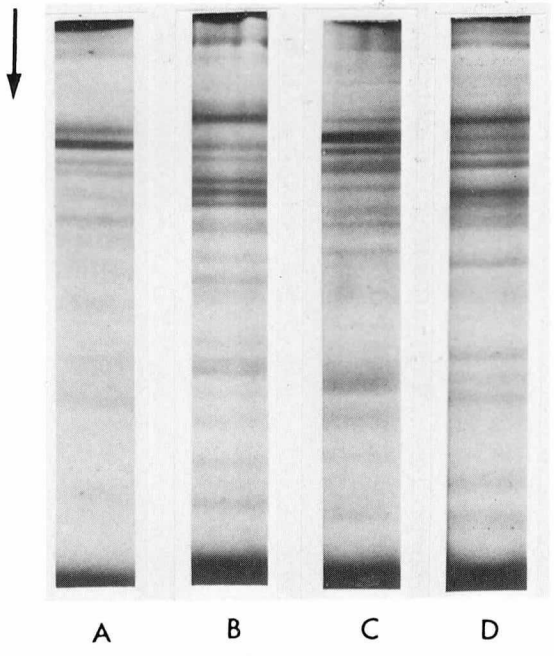


図10　PPi－PAGEにより分離した isozyme のα－キモトリプシンによるペプチドマップ
A．Emb型，B．Ad型，C．速筋型，D．心筋型

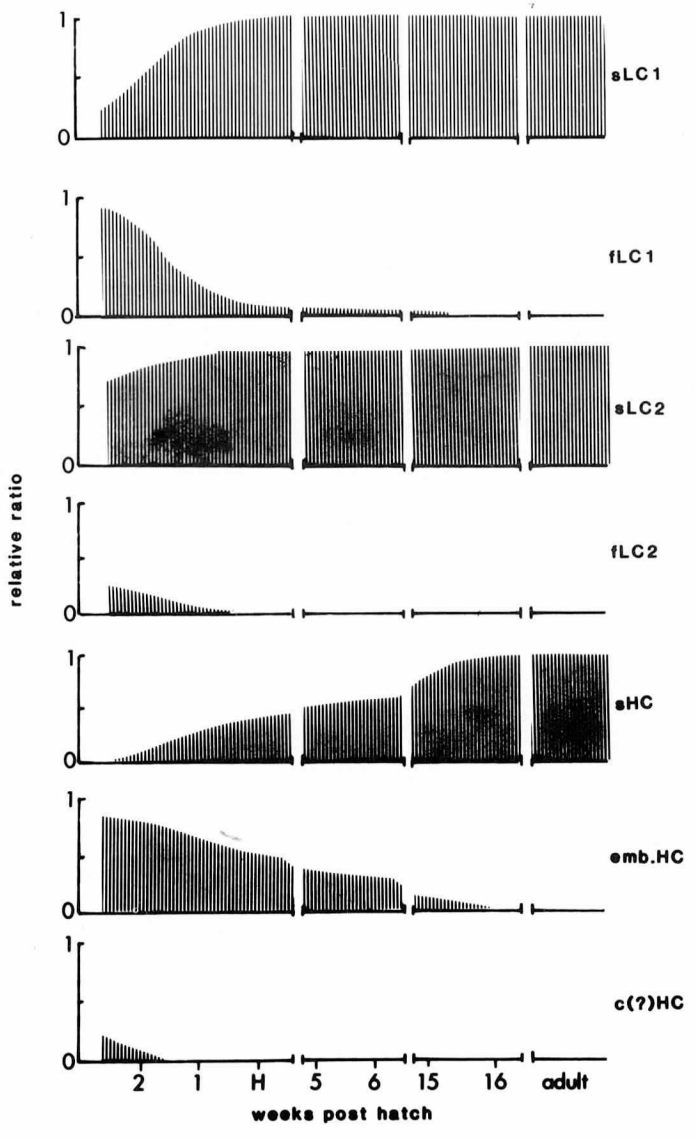


図11　発生過程におけるmyosin各 isoform の発現パターンの変化

初期には胚固有のisoformが発現され徐々に成鶏型へと置換してゆく。これらの調節の場としてはtranscription, splicing, translation, folding, assembly 各段階における代謝全てが候補として残るが，発生過程を追う限り，各サブユニットのisoformの厳密なセットとしての形質発現の調節が，各サブユニットに共通の協同的なものであるとは考えにくい。

文　献

1) T. Mikawa, S. Takeda, T. Shimizu, & T. Kitaura Gene Expression of Myofibrillar Proteins in Single Muscle Fibers of Adult Chicken: Micro Two Dimensional Gel Electrophoretic Analysis. *J. Biochem.* (1981) 89, 1951-1962.
2) H. Towbin, T. Staehclin & J. Gordon Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to mitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76, 4350-4354.
3) J.F. Hoh, P.A. McGrath, & R.I. White. Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscle of the chick. *Biochem. J.* (1976) 157, 87-95.

21　ウサギ骨格筋トロポニン成分の局在

大　槻　磐　男
研究協力者　小野山　佳　道

従来ニワトリ骨格筋の免疫電子顕微鏡観察によってトロポニンの分布につき以下の事が明らかとなった。筋肉構造の上でトロポニンは細いフィラメント全長にわたって38 nm間隔で分布しており，一本のフィラメントの局在部は常に24ケ所である。これは細いフィラメントが常に一定の長さに保持されていることも示すものである。他方，このように完成した筋原繊維ではなく，なお形成途上にある筋肉については，筋原繊維がもろいため観察が困難であったが，サポニン法によって可能である事が示され，その結果ニワトリの骨格筋では細いフィラメント上のトロポニンの局在部位が25～31個と多く，したがって細いフィラメントが長い事が判明した。孵化後3週程度で一定の長さに短縮することもわかった。筋ジストロフィーチキンを用いて検索すると孵化後5週を経てもなお短縮がおこっておらず，短縮化が著しく遷延していることが見出されている。

以上の様にトロポニンの局在の検索は細いフィラメントの構造形成をみる上に極めて優れた指標となることがわかった。本年度は，ウサギ骨格筋について同じような過程が存在するかどうかについて検討を行った。

材料と方法

a)抗体の調製：ウサギ骨格筋トロポニンから分離したトロポニンIを抗原とし，これにFreund complete adjuvant を等量懸濁して，ヤギの皮下に注射した。得られた抗血清はエタノール分画法によって精製し実験に使用した。

b)抗体染色：成熟ウサギ及び29日目胎児の腸腰筋から作製したグリセリン筋を用いて以下の二法を併用して観察を行った。i)解離フィラメント法。グリセリン筋の細束を解離溶液（0.1 M KCℓ，10mM $MgC\ell_2$，10mM K-phosphate (pH 7.0)，3 mM ATP，0.4 mM EGTA)中で機械的に懸濁することによって，細いフィラメント束を太いフィラメントから解離し，これに抗体処理後，カーボン蒸着を行ったグリッド上に採取した。ii)サポニン法。グリセリン筋細束をよく洗った後，10^{-4} g／mℓサポニンで10分間処理してから，解離溶液に溶解した抗体で6時間処理し，固定包理した。

c)電子顕微鏡観察：解離フィラメント標本は酢酸ウランでネガティブに染色して観察した。包理標本は超ミクロトームを用いて超薄切片を作製し酢酸ウランと鉛で二重染色を行って，電子顕微鏡下で観察した。

結果，考察

通常の成熟ウサギ腸腰筋に抗トロポニンI処理を行うと，第1図に示すように抗体は，細いフィラメント全長に38 nm間隔の横縞を形成した。横縞の数はニワトリの場合の24より多く，常に26である事が判明した。なお抗トロポニンT_1 でも全く同じ結果が得られた。

*九大・医・臨床薬理

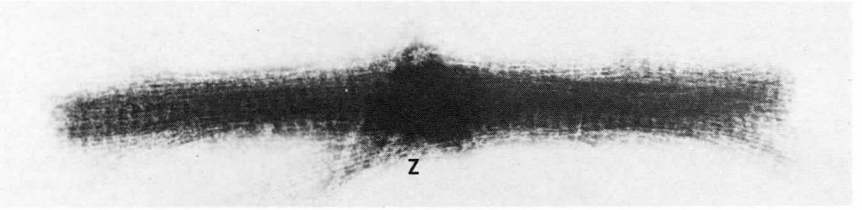
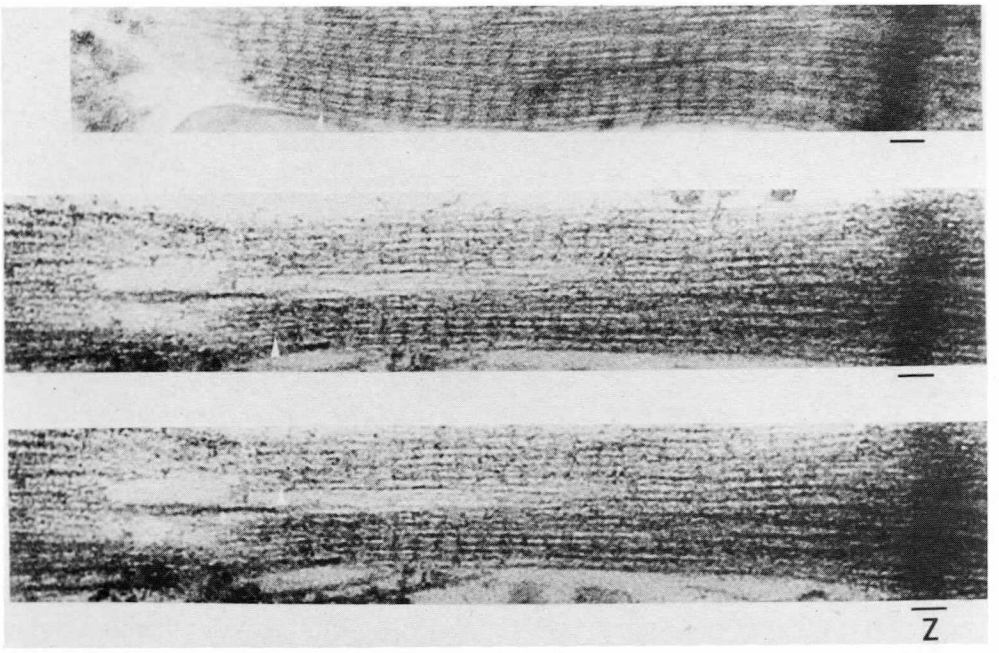


図1　ウサギ骨格筋解離フィラメント標本の抗トロポニンⅠ染色



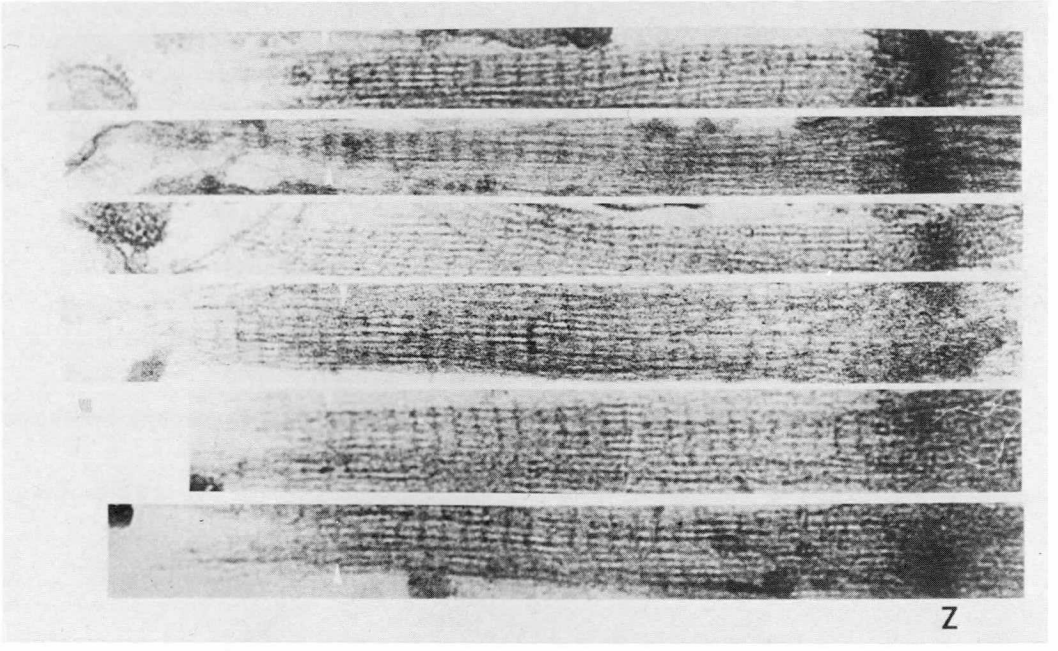


図2,3　ウサギ胎児腸標筋サポニン筋標本の抗トロポニンⅠ染色

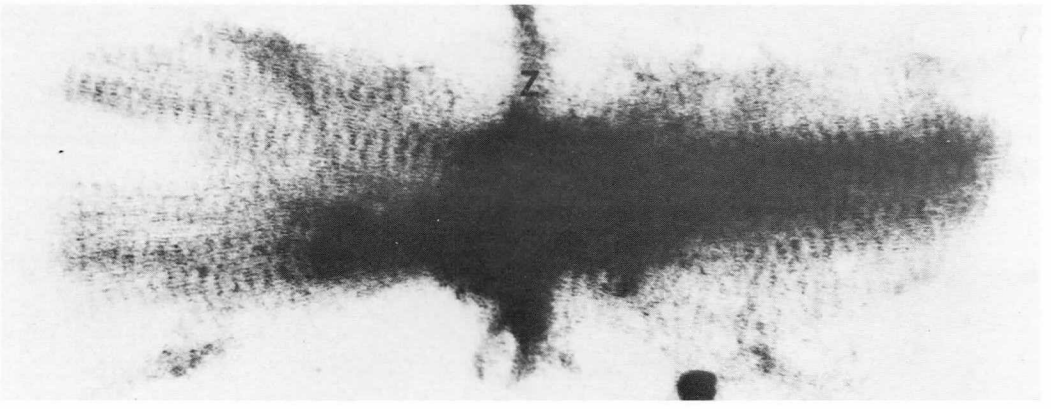


図4 ウサギ胎腸腰筋解離フィラメント標本の抗トロポニンⅠ染色

次に妊娠29日目のウサギの胎児の腸腰筋のサポニン筋で細いフィラメント束が太いフィラメントからはなれて，抗体周期及びフィラメント先端が明瞭にみえる部位について検索を行った（第2，3図）。抗トロポニンⅠは成熟ウサギの場合同様に細いフィラメントのほぼ全長に38 nm周期の横縞を形成する事がみとめられた。ただ一つのフィラメント束に沿った横縞の数は26より多く最高34個までを数える事ができた。但し，先端は必ずしも揃っていないので部位的にはもっと横縞の数が多い所も存在した。また解離フィラメント標本でも同じ結果が得られた（第4図）。これらの所見はニワトリ骨格筋の場合に同じく，発達過程のウサギ骨格筋では細いフィラメント長が揃っておらず，成熟後に比べて長い事を明示している。そして，筋肉細胞発達のかなり後期にフィラメントが短縮して一定の長さになる事を示している。

文　　献

1) Ohtsuki, I. *J. Biochem.* **75:** 755-765 (1974).
2) Ohtsuki, I. *J. Biochem.* **85:** 1377-1378 (1979).
3) Ohtsuki, I. Carrent Research in Muscular Dystrophy, Japan **2:** 23-24 (1981).

22 再生筋における筋蛋白質の分化

嶋田　裕*
研究協力者　豊田直二*　清水法子*
D. A. Fischman**

はじめに

損傷を受けた後の骨格筋において，筋再生には筋衛星細胞が関与することが知られている。しかし，再生筋において合成される筋蛋白質の性質について，まだ不明な点が多い。

本研究では遅筋と速筋の再生過程における筋蛋白質の変化を，骨格筋および心筋のTN成分（TN－T，I，C）に特異的な抗体，および親の速筋と胚の速筋のC－蛋白質にそれぞれ特異的な単一クローン性抗体を用いることにより，免疫組織学的に調べることを行った。さらに，再生筋の蛋白質について，二次元電気泳動法によっても調べ比較検討した。

材料と方法

再生筋組織

成熟したニワトリをネンブタール腹腔注射により麻酔した後，背部正中を切開して前および後広背筋（ALDおよびPLD）を露出した。液体窒素温度にまで冷却した3×4㎜の黄銅片を，各筋の表面に10秒間密着させ，術後2日～8週に損傷部位を標本として摘出した。

抗原の調製

TN成分は成熟したニワトリの心室筋および胸筋から江橋の方法[1]で精製した。C－蛋白質はOffer[2]の方法により，ニワトリ成体および胚の胸筋より精製した。

抗体の調製

TN成分に対する抗体の作製と，その特異性に関しては他の報告[3]に掲載ずみである。C－蛋白質の単一抗体はMilsteinと協同研究者らの方法[4]で作製した。

蛍光顕微鏡的観察

TN成分の抗体に対しては間接蛍光抗体法により観察した。すなわちグリセリン処理した筋組織をエタノールあるいはアセトンにて4℃，6－12時間固定し，クロロホルムに移した後，パラフィンに包埋し，横断連続切片を作製し，間接蛍光抗体法により観察した。

C－蛋白質の単一抗体には新鮮な標本にて凍結切片を作製し，直接蛍光抗体法にて観察した。

マイクロ二次元電気泳動

新鮮な再生筋を用いた。二次元電気泳動はMikawaの方法[5]の小型化された系を用いて，分析した。緩衝液等，ほとんどの手順はO'Farrellの二次元電気泳動と同じであるが，非常に微量の試料で短時間に分析を行なうことができる。一次元目の分離にはIEFとNEPHGEを用い，二次元目の展開にはSDS電気泳動をLaemmliの方法[6]を用いて行なった。ゲルはクマージーブリリアントブルーにて染色した。

* 千葉大学医学部解剖学第一講座
** Department of Anatomy and Cell Biology, SUNNY, Downstate Medical Center

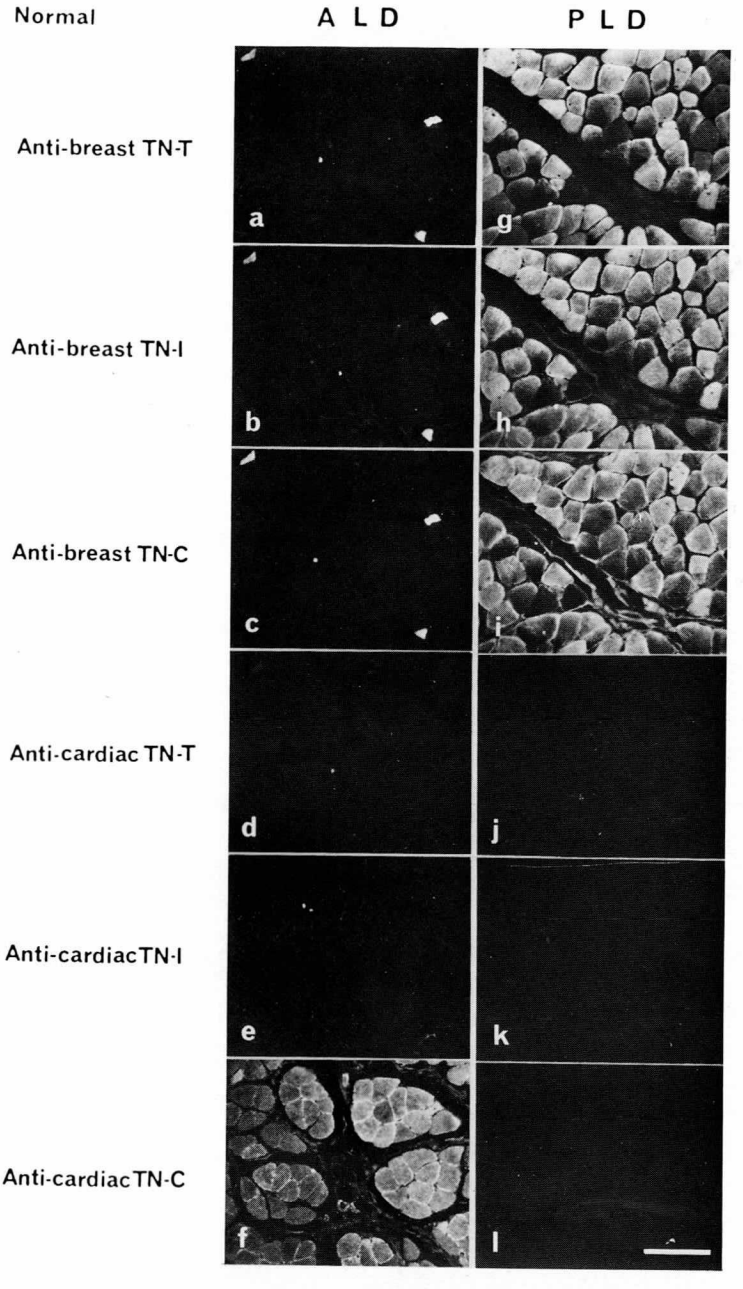


図1　正常なALDとPLD。ALDは心筋TN−C抗体とのみ反応した（f）。PLDは胸筋TN−T, I, C抗体によって反応したが心筋のTN 抗体とは反応しなかった（g−l）。

結　　果

蛍光顕微鏡的観察

正常なニワトリのＡＬＤは抗心筋ＴＮ－Ｃによって染色されたが，他の抗心筋ＴＮ－Ｔ，Ｉと抗胸筋TN−T，Ｉ，Ｃ抗体によっては染色されなかった。しかし，正常なＡＬＤの中に抗胸筋TN−T，Ｉ，Ｃと強く反応する細い筋線維が極く少数みられた。正常なＰＬＤは抗胸筋TN−T，Ｉ，Ｃ によって染色されたが，抗心筋TN−T，Ｉ，Ｃ では染色されなかった（図１）。

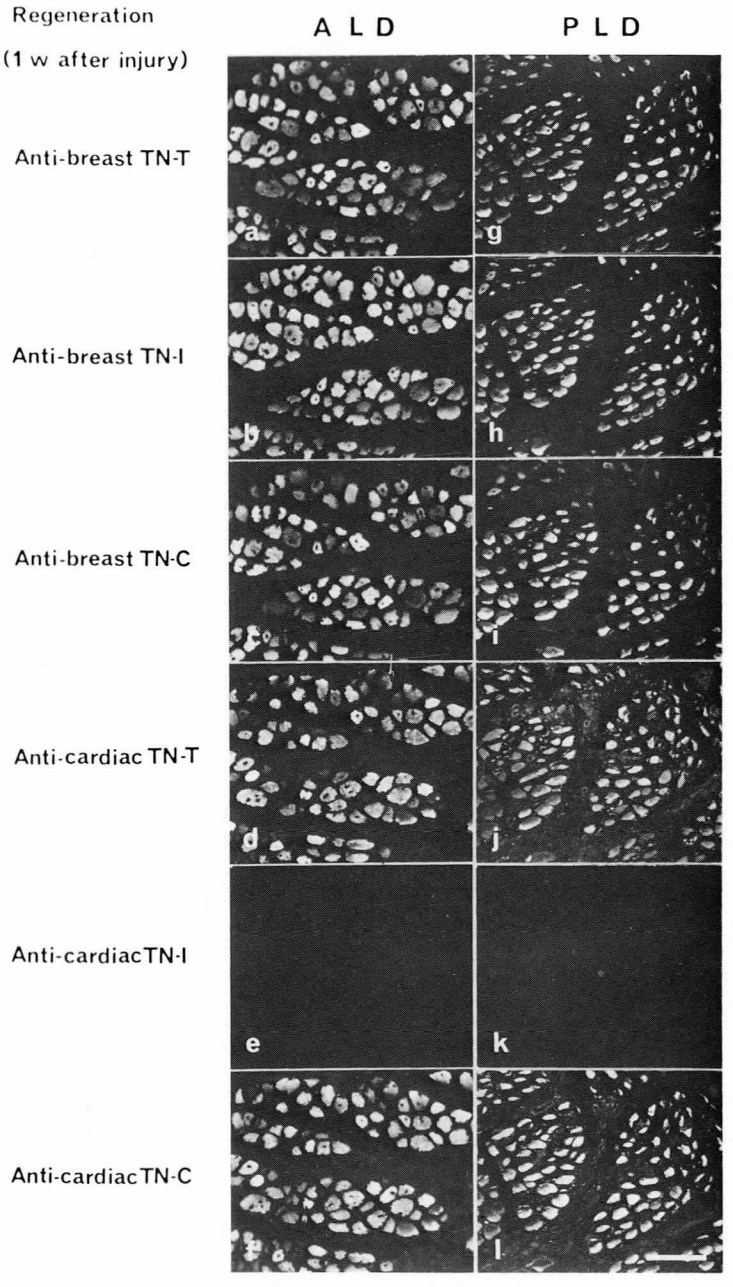


図2　低温による損傷の7日後のALDとPLD。ALD は心筋のTN−C抗体の他に，心筋のTN−T および胸筋のTN−T，I，C抗体によっても染色された。PLDは胸筋のTN−T，I，C 抗体のほかに，心筋のTN−T，C抗体とも反応した。

これらの筋が低温によって傷害されると，新らしい細胞が損傷部の付近に出現してくる。それらの新らしい細胞は，正常の親の筋線維より細く，また中央に核を持っており，さらに付近の損傷を受けてない筋線維とは染色性が異なっていた。このような細胞は衛星細胞由来の幼若な筋管であると考えられる。ＡＬＤでは，すべての再生している筋管は胸筋のTN−T，I，C抗体で染色される

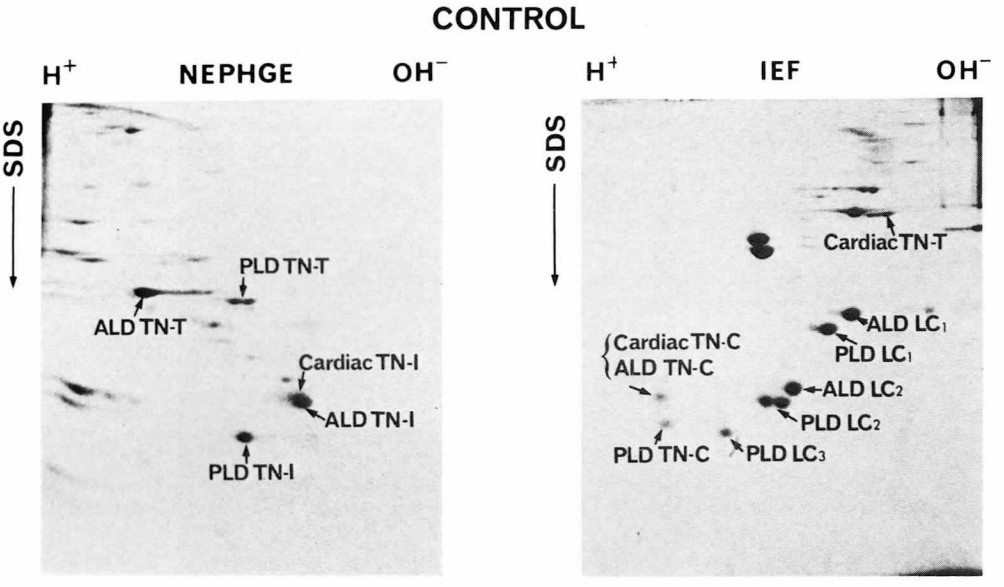


図3　心筋と胸筋のTN成分およびALD，PLD，心筋筋原線維の二次元電気泳動。ALD，PLD，心筋のTN−T，I，Cとミオシンの軽鎖LC_1，LC_2，LC_3を区別することができる。

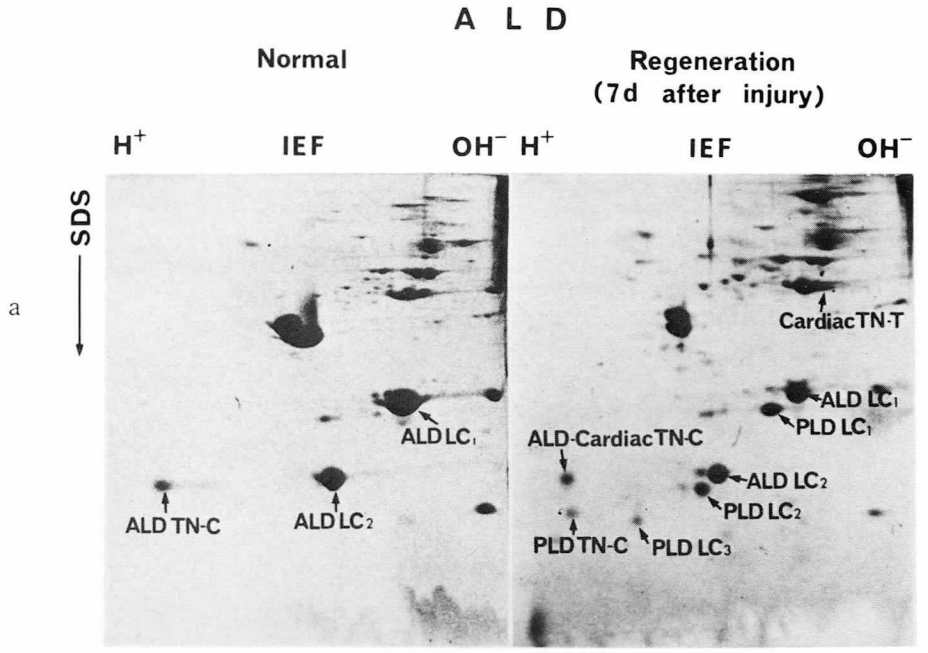
他に，心筋のTN−T，C抗体とも反応した。PLDにおいても，再生筋の細胞は胸筋の3つのTN抗体と反応する他に，心筋のTN−T，C抗体とも反応した（図2）。われわれは，すでに胚の骨格筋が胸筋のTN−T，I，C 抗体以外に心筋のTN−T，C抗体とも反応することを報告しているが[3]，当研究の結果は，TN抗体のALDとPLDの再生筋に対する反応性は，胚の骨格筋と同じであることを示している

正常な筋組織には結合しないこれらの抗体に対する反応性は，損傷後2日目から現われる。しかし4週までには，ALDは胸筋TN−T，I，C抗体，および心筋TN−T抗体との反応性は消失しPLDも心筋TN−T，C抗体と反応しなくなる。これは分化が進むにつれて，再生筋が異質の抗原性を失い，4週までにそれぞれの筋特有の蛋白質を合成するようになることを示している。

再生しているALDとPLDの横断切片を，親および胚の胸筋のC−蛋白質に対する単一抗体（MF−21，E101 D6）によって染色した。MF−21は正常なALDと反応しないが，正常な親のPLDとは反応する。E101 D6は正常な親のALDともPLDとも反応しない。しかしALDとPLDの再生筋はMF−21によっても，またE101 D6によっても染色された。

マイクロ二次元電気泳動

正常なALDおよびPLD，ならびに低温による外傷後7日の各筋について二次元電気泳動を行なった。ALD，PLDならびに心筋のTN成分とミオシン軽鎖の同定については，あらかじめ調製した心筋と胸筋のTNならびにALD，PLD，心筋の筋原線維を泳動して行なった。心筋とALDのTN−C ではスポットが重なり，区別できなかった（図3）。正常なALDではALD型のTN−T，I，C およびミオシン軽鎖LC_1，LC_2 がみられた。しかし低温損傷筋では正常の筋にみられる蛋白質以外に，PLD型のTN−T，I，C およびミオシン軽鎖LC_1，LC_2，LC_3と心筋型のTN−T，C が出現していた（図4a，b）。PLDの再生筋では心筋型のTN−Cが含まれていた（図5）。



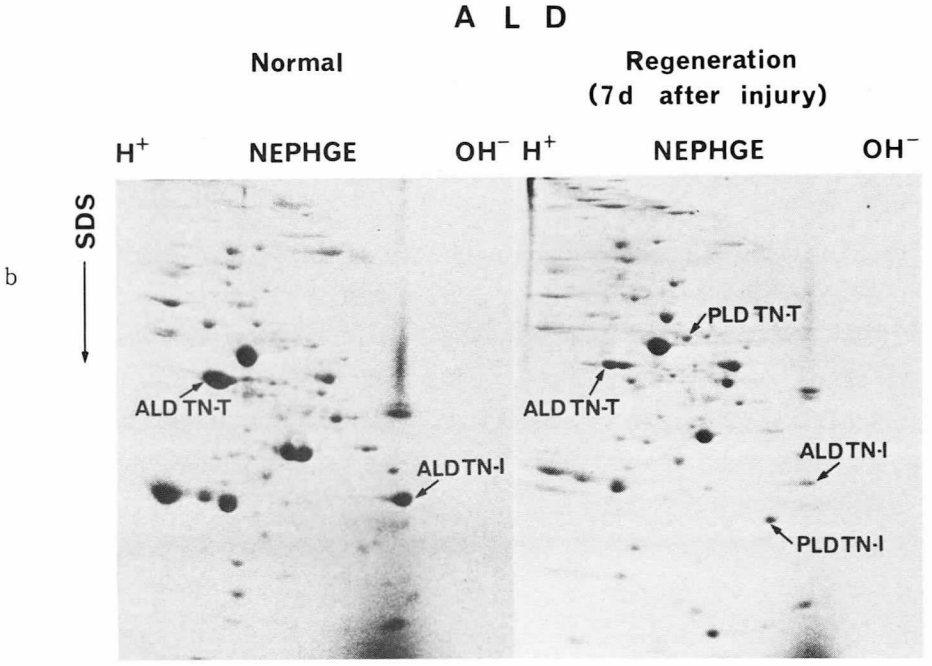


図4　ALDの正常と損傷後7日の二次元電気泳動。(a) ALD型のTN−Cおよびミオシン軽鎖LC_1, LC_2 (左) の他に心筋型TN−T, C, PLD型TN−C, LC_1, LC_2, LC_3が存在する(右)。(b) ALD型のTN−T, I (左)以外にPLD型のTN−T, I (右)がみられる。

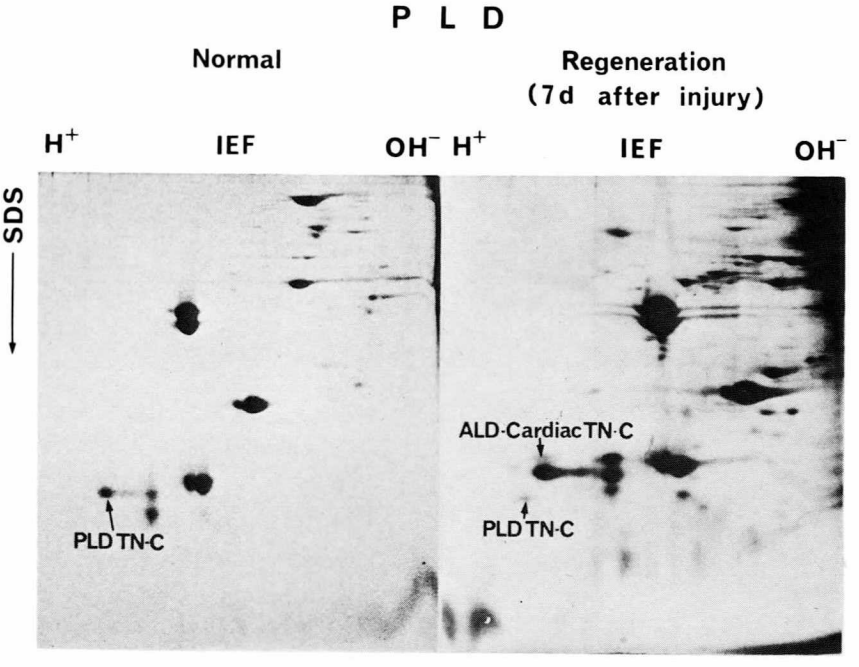


図5　PLDの正常と損傷後7日の二次元電気泳動。PLD型TN−Cのほかに(左),心筋型のTN−C(右)が存在する。

これらの結果を表1にまとめる。

考　　察

本研究によって，低温により損傷を受けた筋は2日後から筋蛋白質の合成を開始し，ALDとPLDの再生部分は心筋あるいは胸筋のＴＮ成分のいくつかと抗原性を共通にすることがわかった。また親および胚のＣ－蛋白質から作製した単一抗体の両方がＡＬＤの損傷部分と反応した。そして分化が進むにつれて再生筋は異質の筋に対する抗原性を失ない，その筋組織本来の蛋白質を合成するようになった。損傷を受けた筋が正常の筋と同じ性質をとりもどすのに少なくとも4週はかかった。

筋の発生過程において出現する蛋白質，主にミオシンの性質については多くの報告があるが，研究者によって結果が色々である。[7,8] しかし遅筋が分化してくる過程で，速筋型のミオシンおよびＴＮが出現してくる点では，多くの研究報告は一致している。[7,8,9] 本研究においても，ＡＬＤの再生部分が胸筋（速筋）のＴＮ成分の抗体と反応した。さらに心筋のＴＮ－ＴおよびＣ抗体とも反応した。二次元電気泳動も，ＡＬＤの再生部分にＰＬＤ型のＴＮ－Ｔ，Ｉ，Ｃ，心筋型のＴＮ－ＴとＣ，およびミオシン軽鎖LC_1，LC_2，LC_3が存在することが示された。また胸筋（速筋）のＣ－蛋白質から作製した単一抗体も再生ＡＬＤと反応した。これらの結果から，再生しているALDは胸筋（速筋）のＴＮ，ミオシンおよびＣ－蛋白質を含んでいることが明らかである。

PLDの再生筋に関しては，胸筋のTN抗体で染色される以外に，心筋のTN−TおよびＣ抗体によっても染色され，さらに二次元電気泳動でも心筋のTN−Cが確認された。しかしPLD再生筋の二次元電気泳動において，心筋のTN−T，ならびにALD型のミオシン軽鎖については不明である。今後さらに感度の良い方法を用いることが必要と考

表 1　Regeneration of myofibrillar proteins

Myofibrillar proteins	Methods		ALD Normal	ALD 1 w	ALD 4 w	PLD Normal	PLD 1 w	PLD 4 w
Troponin	Immuno-fluorescence & Two-dimensional electrophoresis	Breast TN-T	-	+	-	+	+*	+*
		Breast TN-I	-	+	-	+	+*	+*
		Breast TN-C	-	+	-	+	+	+
		Cardiac TN-T	-	+	-	-	+*	-*
		Cardiac TN-I	-	-	-	-	-*	-*
		Cardiac TN-C	+	+	+	-	+	-
C-protein	Immuno-fluorescence	MF-21 (Adult breast)	-	+		+	+	
		E101 D6 (Embryo breast)	-	+		-	+	
Myosin light chain	Two-dimensional electrophoresis	PLD LC_1	-	+		+	+	
		PLD LC_2	-	+		+	+	
		PLD LC_3	-	+		+	+	
		ALD-Cardiac LC_1	+	+				
		ALD-Cardiac LC_2	+	+				

*not confirmed with two-dimensional electrophoresis

えられる。

当研究によって観察された再生筋の筋蛋白質の性質は，胚を用いて報告されている筋蛋白質の分化の結果とよく一致している。[3,7,8] これらのことから，低温によって損傷を受けた筋が再生する時，再生筋は胚子期の筋の性質を獲得し，胚子期の筋蛋白質の合成が繰返されることが判明した。

文　　献

1) Ebashi, S., T. Wakabayashi and F. Ebashi, 1971. Troponin and its components. *J. Biochem.* (Tokyo). **69**: 441-445.
2) Offer, G. 1972. C-protein and the periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. In: Cold Spring Harbor Symp., 37, 87-93.
3) Toyota, N. and Shimada. 1981. Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescene microscopy. *J. Cell Biol.* **91**: 497-504.
4) Köhler, G. and C. Milstein, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature (London) **256**: 495-497.
5) Mikawa, T., S. Takeda and T. Shimizu. 1981. Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken: Micro two-dimensional gel electrophorestic analysis. *J. Biochem.* (Tokyo) **89**: 1951-1962.
6) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature (London) **227**: 680-685.
7) Masaki, T. and C. Yoshizaki, 1974. Differentiation of myosin in chick embryos. *J. Biochem.* (Tokyo) **76**: 123-131.
8) Rubinstein, N.A. and H. Holtzer, 1979. Fast and slow muscles in tissue culture synthesise only fast myosin. Nature (London) **280**: 323-325.
9) Dhoot, G.K., and S.V. Perry. 1980. The components of troponin complex and development in skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* **127**: 75-97.

23 骨格筋の発生・成長に伴うミオシンアイソザイム及びC－タンパク質の分子種変異

大日方　昂*
研究協力者　大　室　弘　美**　真　崎　知　生**

骨格筋の筋原線維を構成するタンパク質には，それぞれ何種類もの異なる分子種（Isoform）があることが知られている。特にミオシン・アクチン・トロポニン・トロポミオシンなどについてIsoform間の違いの内容が詳しく明らかにされこれらIsoformの種々の筋組織における分布，又，非筋細胞の収縮性タンパク質との違いなども調べられている。成熟した速筋，遅筋，心筋などの横紋筋はそれぞれに固有のタンパク質分子種をもつことが示されてきた。我々は先に，ニワトリ胸筋の発生，成長過程で，ミオシン，アクチン，トロポニン，トロポミオシンなどの分子種が顕著に変異することを報告してきた[1,2,3]。今回更に，幼若なニワトリ胸筋に存在するミオシンの特性を明らかにし，又，ミオシンフィラメントに結合して存在する調節タンパク質であるC－タンパク質が明らかに筋成長に伴い，変異することを観察したので報告する。

実験方法

ミオシンについて：　ふ卵10日，13日，15日目のニワトリ胚，ふ化後10日のヒヨコ，及び成鶏より既述の方法[2]によりミオシンを調製し，各時期のミオシンアイソザイムをピロリン酸電気泳動法[4]で比較した。泳動条件はミオシンを50mMピロリン酸ソーダ（1mM DTT，2.5mM EGTA，50％グリセリン含む）pH8.8に溶かし，20mMピロリン酸ソーダ（pH 8.8）10％グリセリンを含む3.8％アクリルアミドゲルを用いて，約16時間電気泳動を行なった。この条件では，ミオシンアイソザイムは，H鎖，L鎖を含むミオシン分子として電気泳動されることが知られている[4]。各ミオシンアイソザイム中のL鎖サブユニットは，ピロリン酸ゲル上に分けられた各ミオシンアイソザイムを，2％SDS，2％2－メルカプトエタノールで処理した後，SDS－アクリルアミドゲル電気泳動で調べた。又，ピロリン酸電気泳動ゲルを，1.5％アガロースゲルに埋めこみ，並列して作成した溝に，抗ミオシンL鎖抗体を添加して，免疫拡散法によりミオシンL鎖を調べた。一方，ミオシンH鎖を比較するために，幼若筋，成若筋ミオシンをそれぞれα－キモトリプシンを用いて限定分解し，生じたペプチドフラグメントをO'Farrell 2次元電気泳動法で解析した。

C－タンパク質について：　種々の発生段階のニワトリ胚，又はヒヨコ胸筋から，SDS－メルカプトエタノール溶液（4％SDS－4％2－メルカプトエタノール－40mMリン酸緩衝液）を用いてタンパク質を抽出し，これをSDS－アクリルアミド電気泳動にかけ，分離されたタンパク質を，ニトロセルロース膜に転写し，更に，速筋型C－タンパク質，遅筋型C－タンパク質に対するモノクローン抗体及び ^{125}I－抗マウスIg抗体で処理し，オートラジオグラフィー法で，C－タンパク質のタイプを同定した。

*千葉大学理学部生物学科
**東京都臨床医学総合研究所

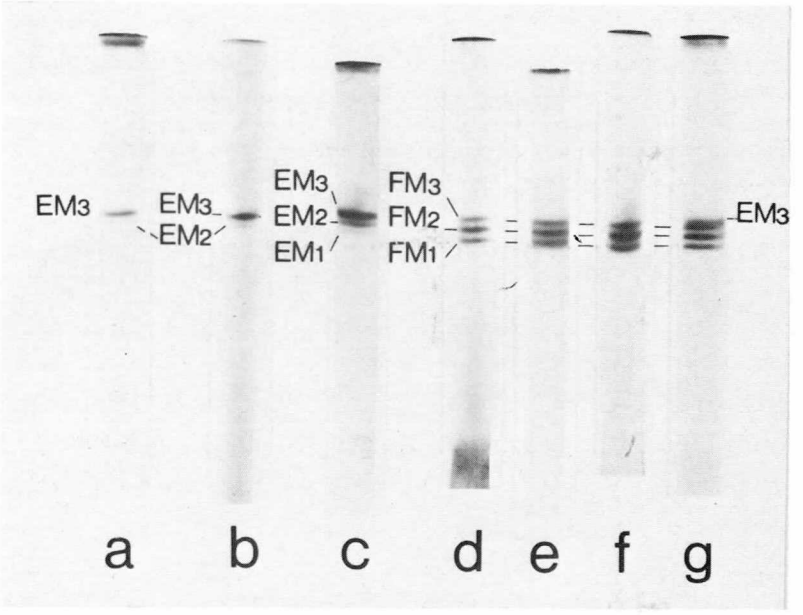


図1 ニワトリ胚及びふ化後のニワトリ胸筋から得たミオシンのピロリン酸ゲル電気泳動のパターン。(a) 10日胚, (b) 13日胚, (c) 15日胚, (d) ふ化後10日, (e) 成鶏, (f) (d)と(e)のミオシンを混合, (g) (b)と(f)のミオシンを混合。EM_1, EM_2, EM_3：胚のミオシンアイソザイム。FM_1, FM_2, FM_3：親胸筋の3種のミオシンアイソザイム。

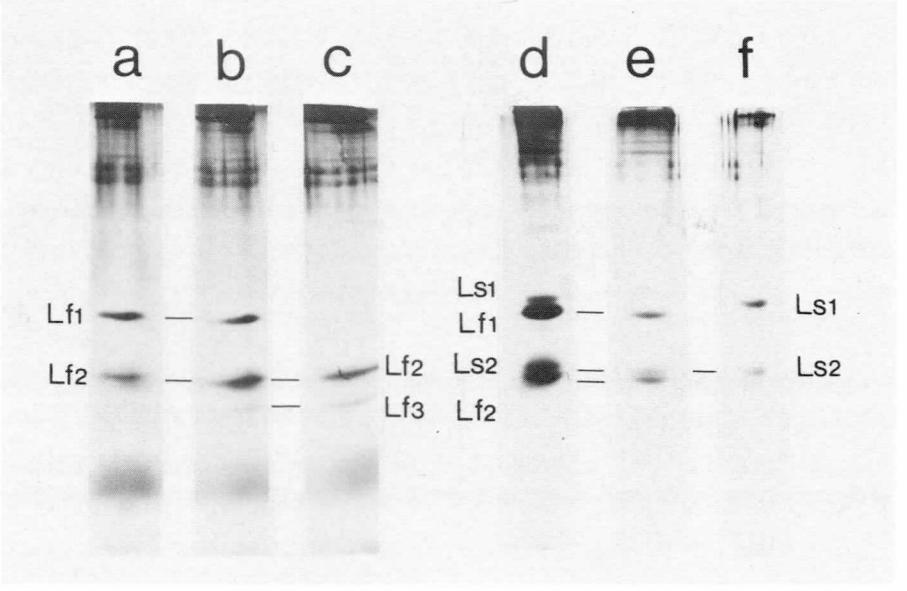


図2 ピロリン酸ゲル電気泳動で分離された各ミオシンアイソザイムに存在するL鎖サブニットの組成。SDS−ゲル電気泳動後, 銀染色法により, L鎖のパターンを示した。
(a) 親のFM_3, (b) 親のFM_2, (c) 親のFM_1, (d) 親の遅筋（ALD）ミオシン. Lf_1, Lf_2, Lf_3, 速筋ミオシンL鎖, Ls_1, Ls_2, ：遅筋型ミオシンL鎖。

結果と考察

1. 幼若筋のミオシンアイソザイム[5)]

図1に種々の発生段階のニワトリ胸筋から得たミオシンのピロリン酸電気泳動のパターンを示す。成熟胸筋ミオシンは，3種のアイソザイム（FM_3, FM_2，FM_1）を含むことが知られている（図1を参照）。ところが，10日胚のミオシンは，主に1本のバンドのみ（EM_3）を与える（図1 a）。発生の進行につれ，徐々に，他のミオシンアイソザイム（EM_2，EM_1）が出現し，15日胚で3種のアイソザイムが認められる。しかし，胚のミオシンアイソザイム（EM_3，EM_2，EM_1）を成熟筋ミオシン（FM_3，FM_2，FM_1）と比較すると，ピロリン酸ゲル上での移動度が一致しないことが明らかになった。特に，10日胚のEM_3は明瞭に，親ミオシンアイソザイムから識別される。ふ化10日を経たヒヨコのミオシンは，3本のバンドを示し親ミオシンとほとんど区別されなかった。これらの観察は，幼若胸筋のミオシンが，成熟筋ミオシンとは異なるものであることを強く示唆する。

そこで，次にミオシンアイソザイムを構成するサブユニットについて，胚と親とで比較した。図2に，胚と親ミオシンの各アイソザイムのL鎖パターンを示す。既に報告されているように[4)]，親胸筋の各ミオシンアイソザイムは，各々固有のL鎖パターンを示す。一方，胚胸筋ミオシンアイソザイムのL鎖パターンは，親のどのアイソザイムとも一致せず，速筋型（Lf_1，Lf_2），遅筋型（Ls_1，Ls_2）（又は心筋型）L鎖サブユニットが共存することが認められた。

ミオシンアイソザイムをピロリン酸ゲル電気泳動により分離した後，アガロースゲルに埋めこみ免疫拡散を行なったところ，ニワトリ胚のミオシンアイソザイム（EM_3）は抗速筋L鎖（Lf_1）及び抗遅筋L鎖（Ls_1）と反応して沈降線を形成した。従って，胚ミオシンアイソザイムには，速筋L鎖，及び遅筋L鎖（又は心筋L鎖）が共存することが免疫学的にも確認された。（図3）

図4にミオシンH鎖のα－キモトリプシン限定分解によって生じたペプチドの二次電気泳動のパターンを示す。この泳動条件では，ミオシンL鎖は，ゲルの先端に位置するので，図に示されたス

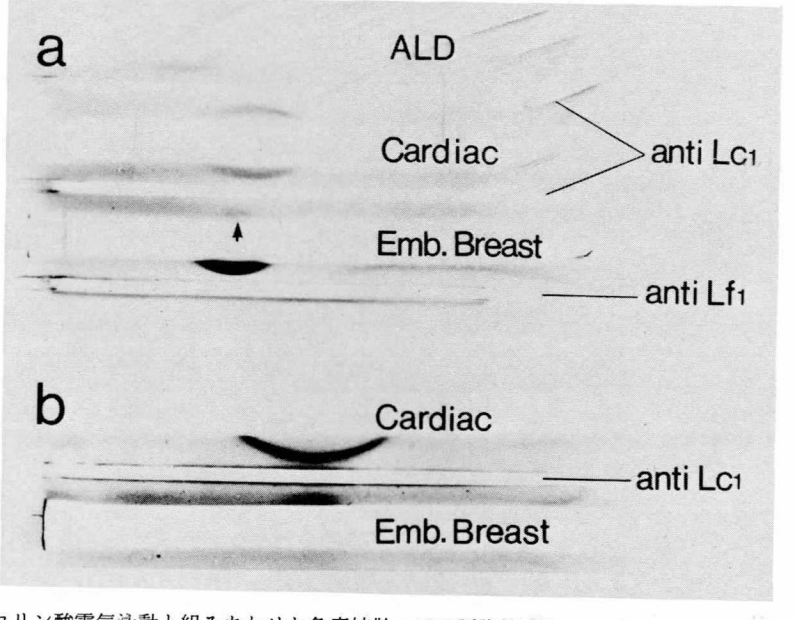


図3 ピロリン酸電気泳動と組みあわせた免疫拡散。13日胚胸筋ミオシン（Emb. Breast），心筋ミオシン（Cardiac）及び遅筋ミオシン（ALD），アイソザイムと抗連筋L鎖（anti Lf_2），抗心筋L鎖（anti Lc_1）との反応を示す。

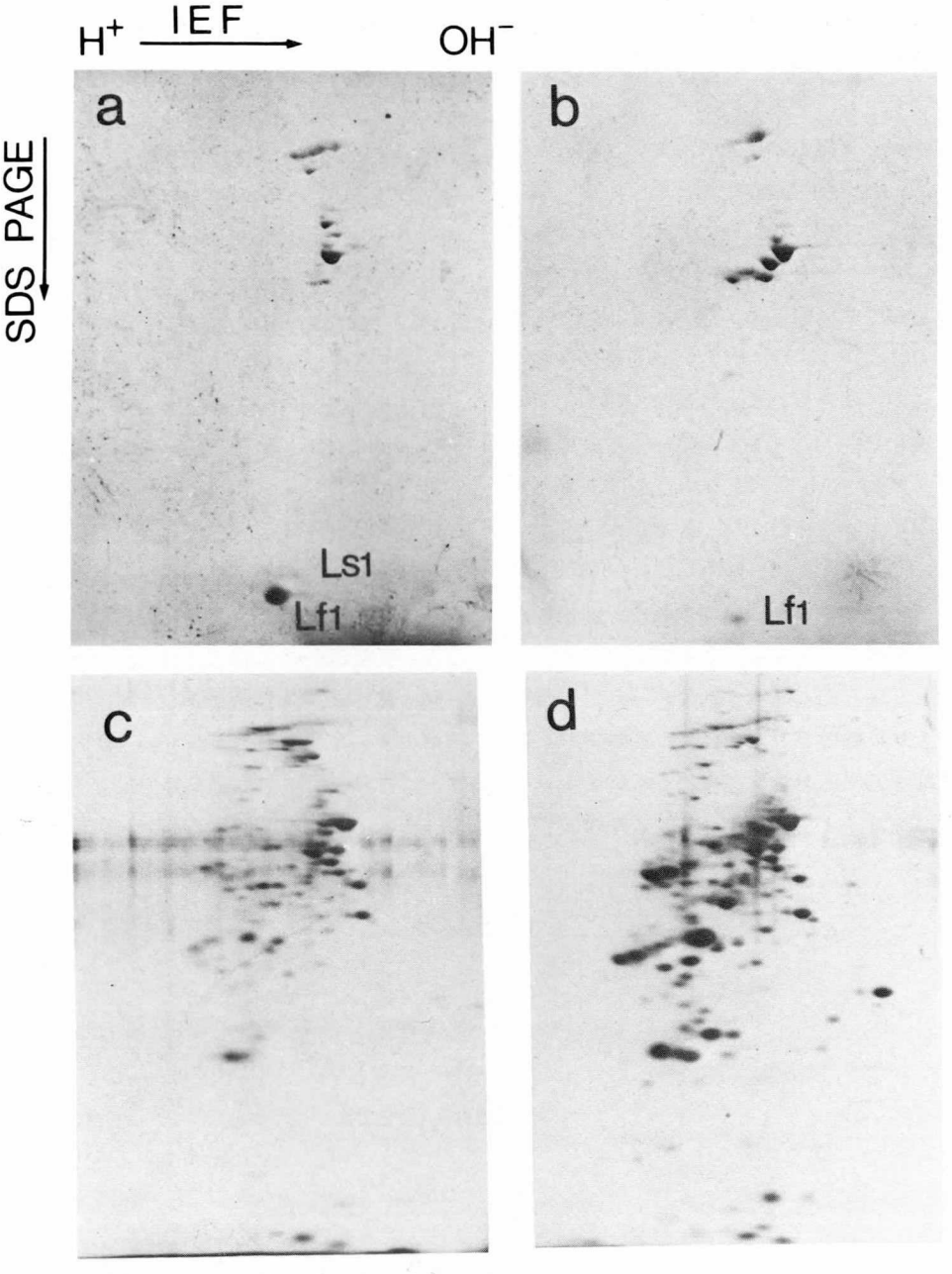


図4　13日胚（a，c）及び成鶏（b，d）胸筋ミオシンのα－キモトリプシンで処理した。
a，b はクマジー染色。c，d は銀染色法による。

ポットのほとんどは，H鎖に由来したものと考えることができる。非変性のミオシンをプロテアーゼ処理した時，ペプチドのパターンは，胚と親とで著しくことなった。しかし，ミオシンを熱，又は表面活性剤（SDS）により変性後プロテアーゼ処理した時生じたペプチドは，胚と親とでかなり似かよったパターンを示した。しかし，なお胚及び親に特異的と思われるスポットが認められた。胚ミオシンのペプチドのパターンは，遅筋ミオシン，心筋ミオシンのものとは著しくことなった。

表1 ニワトリの胚及び成鶏胸筋ミオシン・アイソザイムの構成成分，EMHC：胚ミオシンH鎖，FMHC：速筋型ミオシンH鎖，他のシンボルは図1，図2に同じ。

	Isozymes	Heavy Chain	Light Chain
Embryo	EM_3	EMHC	L_{f1}, L_{f2}, L_{s1}, L_{s2} (L_{c1}, L_{c2})
	EM_2	EMHC	L_{f1}, L_{f2}, L_{s1}, L_{s2} (L_{c1}, L_{c2})
	EM1	EMHC	L_{f2}, L_{f3}
Adult	FM_3	FMHC	L_{f1}, L_{f2}
	FM_2	FMHC	L_{f1}, L_{f2}, L_{f3}
	FM_1	FMHC	L_{f2}, L_{f3}

表2 種々の発生段階のニワトリ胸筋抽出物と抗速筋型及び抗遅筋型C－タンパク質抗体との反応性

	17日胚	20日胚	ふ化1日	ふ化7日	親
抗速筋Cタンパク質	＋	＋	＋	＋	＋
抗遅筋Cタンパク質	＋	＋	＋	±	－

＋：反応性あり　±：わずかに反応　－：反応性なし

これらのことから，幼若胸筋のミオシンH鎖は親胸筋の速筋ミオシンのH鎖と類似性が多いが，同一ではないと考えられる。非変性のnativeミオシンをプロテアーゼ処理した時のパターンが，胚と親ミオシンとでとりわけ異なることから考えると，両者のミオシンでは，L鎖サブユニットの違いや高次構造の違いがあり，このことにより，プロテアーゼによる分解が影響を受けたことが考えられる。

胚と親ニワトリ胸筋ミオシンアイソザイムの違いを表1にまとめた。両者はL鎖，H鎖サブユニットいずれにおいても違いがあるものと考えられる。

2. 筋成長に伴うC－タンパク質の変異

種々の発生段階のニワトリ胸筋から，タンパク質をSDS溶液で抽出し，SDS－アクリルアミドゲル電気泳動を行ない，電気泳動のバンドに抗速筋－Cタンパク，及び抗遅筋－Cタンパク質抗体を反応させて調べた結果，表2のような結果を得た。ふ卵17日以後ニワトリ胚の胸筋に，速筋型Cタンパ

ク質が検出された。更に，ふ化後数日までの時期の胸筋に遅筋型Ｃ－タンパク質も検出された。ふ化１週間をすぎると，胸筋中の遅筋型Ｃタンパク質は，ほぼ完全に消矢する。このようなＣ－タンパク質分子種の変異の起る時期は，既に報告したトロポニンＴ，トロポミオシン分子種の変異[3]の起る時期と一致して興味深い。

文　　献

1) 大日方昂：筋肉アクチン－ミオシン系(iii)発生・分化，生体運動 pp 173－199，学会出版センター，1982。

2) Obinata, T., Masaki, T. & Takano, H. Types of myosin light chains present during the development of fast skeletal muscle in chick embryo. *J. Biochem.* 87: 81-88, 1980.

3) Matsuda, R., Obinata, T. & Shimada, Y. Types of troponin components during development of chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.* 82: 11-19, 1981.

4) Hoh, J.F.Y. Developmental changes in chicken skeletal myosin isozymes. *FEBS Lett.* 98, 267-270, 1979.

5) Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Masaki, T. & Mikawa, T. Changes in myosin isozymes during development of chicken brest muscle. *J. Biochem.* in press.

24　ニワトリ胸筋の"Native High MW Protein"

丸　山　工　作*
研究協力者　木　村　澄　子*

脊椎動物骨格筋には，塩で溶出されない細いフィラメント構造が存在し，これを私たちは弾性タンパク質コネクチンと名づけた[1]。その本体は，分子量100万におよぶ高分子量成分と，43,000ダルトン成分から成るが，後者は，変性アクチンと判明した[2]。

高分子量成分は，グアジニン塩酸処理で可溶化され，単離された[3]。また筋線維や筋原線維を直接SDSで溶かし，ゲルろ過法で分離できる[4]。Wangs[4]は，これをチチンと呼んだが，コネクチンにほかならないことが示された[5]。

しかしながら，これまでコネクチンの高分子量成分は変性した状態でしか単離できなかった。これでは，本来示す活性なり機能は失われてしまっている。そこで，私たちは,"Native connectin"を得る努力をつづけてきた。今回報告するのは，その第一歩で，まだ方法が確立していないし，また得られたタンパク質がコネクチンと同定されていないので，"Native High MW Protein"と仮称することにした。

材料と方法

実験材料としては白色レグホンのニワトリ胸筋を主として用いた。ウサギ骨格筋，コイの筋肉でも同様の結果が得られている。

筋肉は50mMKCℓ，1mMNaHCO$_3$ の溶液でホモジナイズし，低速遠心で筋原線維をあつめた。これを最低10回くりかえした。この間10mMEGTA，0.1mMPMSFをずっと加えて，Proteinases活性を止めることも試みたが，結果は加えないときと同じであった。

筋原線維を5mMNaHCO$_3$で10回以上洗い，水溶性タンパク質（たとえばα－アクチニンなど）を徹底的に除く。しかるのちにDWで洗い，筋原線維をぼうじゅんさせる。このさいは14,000rpm 30分の遠心を行った。これを0.3MNaCℓになるよう，3MNaCℓを加え，1時間かきまぜ，ろ紙でこす。このろ液を以下の実験に用いた。

結　　果

ぼうじゅんした筋原線維に中性塩を加えると，筋原線維は収縮する。このさい，高分子量タンパク質が溶出される（もっとも，元来ある量のおよそ数十%である）。時によって異なるが，少量のミオシンとアクチンが溶出される。超遠心すると50,000rpm 2時間ていどで，高分子量タンパク質（HMW Proteinと略す）とアクチン，ミオシンは共沈する。その上清には少量のHMWprotein が残り，かなり純化されるが，収量が少ない。原抽出では，100gの筋肉から出発して，ほぼ0.1mg／mℓのHMW Protein を含む抽出液が200mℓほど得られる。

ときに90%以上の純度をもったNative HMW Protein が得られる。これをロータリー・エバポイターで濃縮して，いろいろな物理化学的性質をしらべた。

3%アクリルアミドを用いたSDS電気泳動の移動度は，筋原線維中に含まれるコネクチンと同じ

* 千葉大学理学部生物学科

第1表　アミノ酸組成

アミノ酸	アクチン	HMW	コネクチン 筋線維	コネクチン 筋残査	コネクチン HS抽出液
アスパラギン酸	97	102	95	93	94
スレオニン	72	71	75	66	77
セリン	61	68	69	67	60
グルタミン酸	116	122	116	118	108
プロリン	43	56	74	67	73
グリシン	81	82	71	76	74
アラニン	82	71	62	75	64
システィン	4	7	11	6	12
バリン	53	78	85	78	89
メチオニン	47	21	10	16	11
イソロイシン	76	59	59	56	60
ロイシン	75	68	67	76	66
チロシン	41	29	30	30	29
フェニルアラニン	31	28	27	29	28
リジン	53	77	82	79	85
ヒスチジン	18	14	15	18	15
アルギニン	50	47	55	50	55

で，みかけの分子量が100万以上であった。

アミノ酸組成は，第1表にみられるように，さまざまなコネクチンのそれと，ほぼ同様であった。プロリンがやや少なく，メチオニンがすこし多かった。しかし，アクチンとは，明らかに異なっていた。この表でＨＳ抽出液とあるのは，Havelbach－Schneider 溶液による筋抽出液をSDSで変性させたのち，ゲルろ過によってコネクチン成分を単離したものである。

HMW Proteinを醋酸ウランで逆染色して電子顕微鏡下でみると，多くは，うすい膜状ではっきりしないが，細いフィラメント状のものもみえた。とくに濃縮したときにできる“ひも”のはじには，フィラメント状のものがみえた。“ひも”を急速に凍結し，フラクチャーして，その断面をレプリカにしてみると，細いフィラメントのあつまりであることがわかった。そこで，まず，主成分は，コネクチン・フィラメントではないかと思われる。変性アクチンが混っていると，無定形のかたまりがフィラメント間にみられた。

Native HMW Proteinの0.5 mg/mℓ 溶液の粘度をOstwald 粘度計で測定したところ，相対粘度でわずか1.2であった。ところが，回転粘度計で低速度勾配で測定するとほとんど無限大となった。そこで、0.2 mg/mℓ で測定したところ，速度勾配0.1 s^{-1} で70cp，0.02 s^{-1} で 1000cp，0.008 s^{-1} で6000cp，0.002 s^{-1} で 11,000cp，0.0008 s^{-1} で17,000cpという高い値が得られた。これは，構造粘性で，シクソトロピーの性質である。細いフィラメントがからまりあっているためとみなされる。

なお，Native HMW Protein溶液は典型的なタンパク質の紫外部吸収曲線を示し，280 nmにピークがみられた。

議　　論

私たちは，コネクチンがミオシンフィラメントの両端にあって，サルコメア中央部に存在させるのにあづかっているものと考えている。[6] もちろんＺ線の間を走って，弾性に関係しているものもある。[1] Ａ帯をサルコメアから遊離させると，コネクチンフィラメントがまとわりついている。[6] そこでぼうじゅんした筋原線維を塩収縮させると，若干のコネクチンが可溶化するものと考え，ある程度実証に成功した。ただし，ミオシンやアクチンの混在をミニマムにする条件を吟味する必要がある。この点は、将来、きちんとしらべるつもりである。

Native HMW Proteinが，コネクチンのnative formであることが確立すると，ミオシンとの相互作用など，興味ある問題が研究可能となってくる。

ニワトリ胚の発生初期にはコネクチン含量が少ないことがわかっている。本法を適用すると，収量はわずかであろうが，成体のそれと比較できる点で興味ぶかい。

謝辞　Freeze－replica法でしらべていただいた東大医学部の沢田元博士にお礼申しあげる。

文　　献

1) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Handa, S. & Eguchi, G. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem.* 82: 317-337.
2) 山田　昇，池谷仁志，木村澄子，丸山工作（1981）：日本動物学会発表（札幌）
3) King, N.L. & Kurth, L. (1980) SDS gel electrophoresis studies of convectin. *Fibrous Proteins,* II, 43-56.
4) Wang, K., McClure, J. & Tu, A. (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* 76: 3698-3702.
5) Maruyama, K., Kimura, S., Kuwano, Y. & Ohashi, K. (1981) Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of titin with connectin. *J. Biochem.* 89: 701-709.
6) Ohashi, K., Fischman, D.A., Obinata, T. & Maruyama, K. (1981). Immunofluorescent staining of A bands isolated from chicken breast muscle with antibodies against myosin rod, connectin and troponin T. *Biomed. Res.* 2: 330-333.

25 ジフテリア毒素によるEF2のADPリボシル化を抑制する因子と筋発生におけるその変化

真崎知生*
研究協力者 吉川 昭**

我々は今まで翻訳段階における蛋白合成能を正常鶏および筋ジストロフィー鶏の間で比較検討してきた。その結果アミノアシルtRNA合成酵素活性およびポリ(U)依存ポリフェニルアラニン合成能が，筋ジストロフィー鶏で増加していることを見出し報告した[1,2]。この増加の原因が蛋白合成に関与するこれらの因子の量的な変化か質的な変化かを明らかにする実験の中で，蛋白合成延長因子2(EF2)含量をジフテリア毒素を用いて検討してきた。この過程で，ジフテリア毒素によるEF2のADPリボシル化反応を抑制する因子が骨格筋に存在することを見出した。今回はこの因子の性質および筋ジフトロフィー鶏と正常鶏における量的変化について報告し，この因子の生理的意義について併せて考察する。

材料と方法

ジストロフィー鶏(413系統)および正常鶏(412系統)の13日胚から生後7週の胸筋を用いた。胸筋に3倍量の溶液A(10mM $MgCl_2$，100mM KCℓ，6mMメルカプトエタノール，20mM Tris−HCℓ(pH 7.5)および0.25Mショ糖)を加え，ワーリングブレンダーにてホモジナイズした。ホモジネイトをSorvall GSAローターにて10,000rpm，30min遠心し，その上清を更にBeckman社製超遠心用ローター45Tiにて40,000rpm，4hr遠心し，その上清をとった。上清中にある細胞内NADを除くため，上清をさらに硫安分画(0−75%)し，その沈澱を溶液B(1mM EDTA，100mM KCℓ，6mMメルカプトエタノール，10mM Tris−HCℓ(pH7.5)および0.25Mショ糖)に透析し，EF2含量測定試料として用いた。

EF2の定量は，反応溶液0.1mℓ中に，4μmol DTT，5μmol Tris−HCℓ(pH7.5)，0.1mg BSA，2μmolヒスタミン，3μgジフテリア毒素，56pmol〔^{14}C〕NAD(534mCi/mmol)および測定用試料を含む溶液を37℃，15minインキュベーションし，〔^{14}C〕ADPリボシルEF2量を測定することによって行った。なおEF2リボシル化を阻害する因子の活性を測定する時は，精製したブタ肝EF2を反応溶液中に21μg加えた。測定は反応終了後，一定量の反応液をワットマン3MM濾紙に吸着させ，5%冷TCAで3回，99%エタノールで1回洗浄した後乾燥させ，液体シンチレーションカウンターにて計測した。

ジフテリア毒素によるEF2リボシル化反応を阻害する因子(以下INHと略す)の精製は下記の手順で行った。EF2含量測定用試料(75%飽和硫安沈殿物を溶液Bに透析したもの)をゲル濾過(セファクリルS−200，φ26mm×90cm)，硫安分画(66.6−75%)，ハイドロキシアパタイト(100−150mM燐酸緩衝液で溶出)，フェニルCL−セファロース4B(10mM Tris−HCℓ(pH

*筑波大学基礎医学系
**(財)東京都臨床医学総合研究所

7.4）で溶出）で処理することにより精製した。ジフテリア毒素は内田博士（阪大・微研），ブタ肝ＥＦ２は水本博士（東大・医科研）より頂いたものである。

結　　果

ジフテリア毒素により，ＡＤＰリボシル化反応を受ける蛋白は，真核細胞においてはＥＦ２のみが知られている。[3,4] 反応は図１のごとく，ＥＦ２１分子当り１分子のNADが反応するので一定試料中のＥＦ２の定量が可能である。ところが生後４週齢の鶏胸筋ホモジネートから得た試料において，筋ジストロフィー鶏の試料ではジフテリア毒素によるＥＦ２のリボシル化が起こるが，正常鶏では反応が抑制されることを見出した。このことは筋ジストロフィーと正常鶏のＥＦ２が量的に異なるとそのまま受けとってよいのか，または正常鶏胸筋中にこの反応を阻害する物質が存在するのかということを明らかにするため，筋ジストロフィー鶏上清に正常鶏上清を加えてみると，前者による反応が抑制された。そこでＥＦ２測定用試料の分画を試みた。ＥＦ２リボシル化反応を阻害する正常鶏試料のゲル濾過分画と，同一操作による筋ジストロフィー鶏試料の分画を電気泳動パターンで比較したところ，筋ジストロフィー鶏にはなく正常鶏にのみ認められるバンドが存在した。この正常鶏にのみ存在するバンドが，ジフテリア毒素によるＥＦ２のＡＤＰリボシル化を阻害する物質で

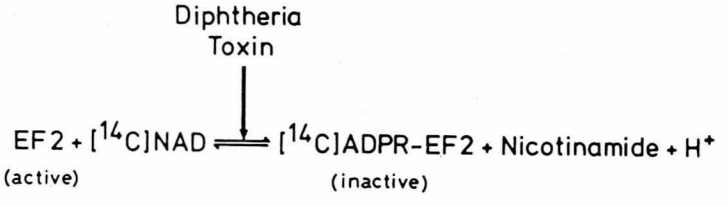


図１　ジフテリア毒素によるＥＦ２のＡＤＰリボシル化反応。

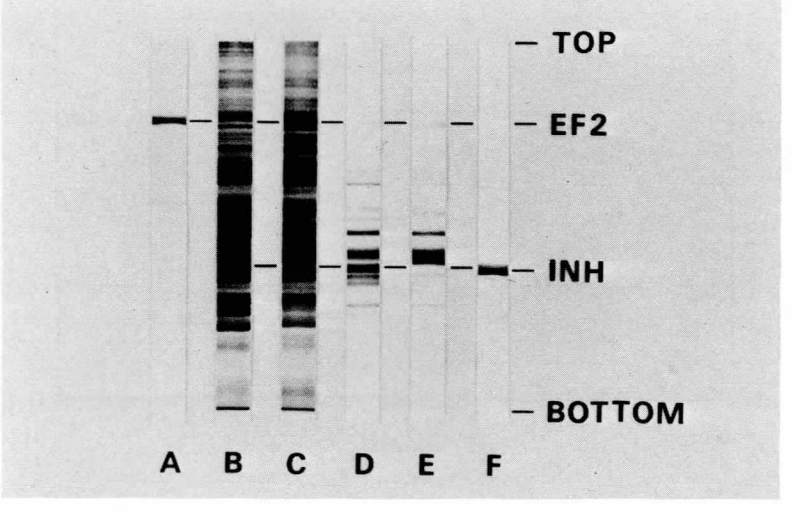


図２　ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるＩＮＨの解析。電気泳動はLaemmli の方法[15]により，10%アクリルアミドを用いた。Ａ：ブタ肝ＥＦ２，Ｂ：４週齢正常鶏のEF2含量測定用試料，Ｃ：４週齢筋ジストロフィー鶏のＥＦ２含量測定用試料，Ｄ：４週齢正常鶏のゲル濾過分画，Ｅ：４週齢筋ジストロフィー鶏のゲル濾過分画，Ｆ：４週齢正常鶏の精製したＩＮＨ。

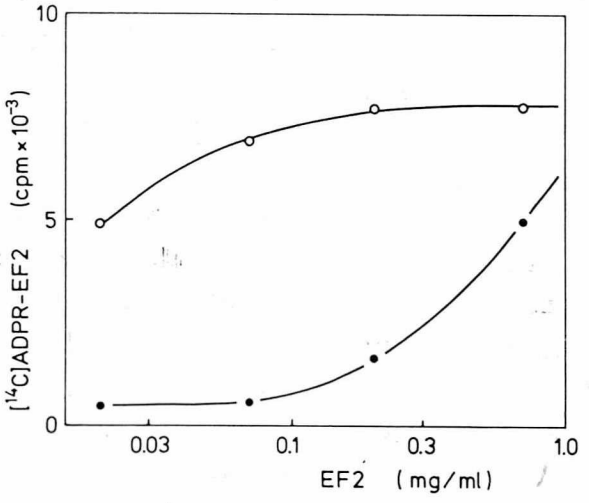


図3　INHによるEF2のADPリボシル化反応の抑制。
○：ジフテリア毒素によるブタ肝EF2のADPリボシル化。●：反応溶液0.1 mℓ中に40 MgのINHを含む時の，ジフテリア毒素によるブタ肝EF2のADPリボシル化。

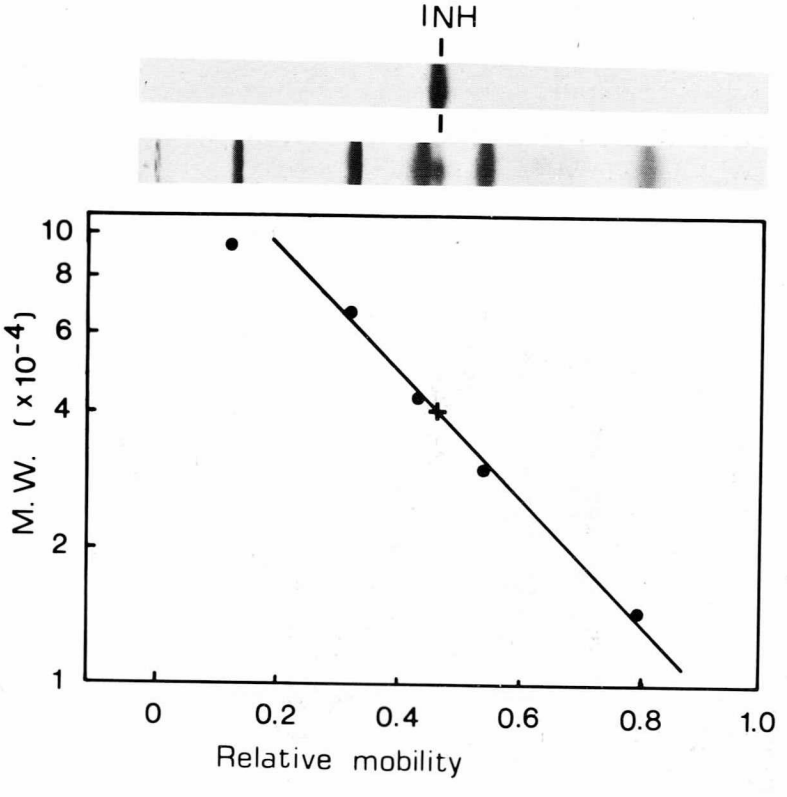


図4　SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるINHの分子量測定。電気泳動はWeber & Osborn[5]の方法により，10%アクリルアミドを用いた。指標としてPhosphorylase B; 94,000，BSA; 67,000，ovalubmine; 43,000，Carbonic anhydrase; 30,000，α－lactoalbumine; 14,400を用いた。

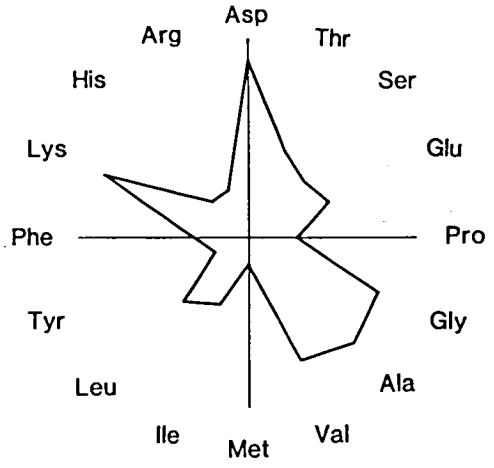


図５　ＩＮＨのアミノ酸組成のスター・ダイアグラム。

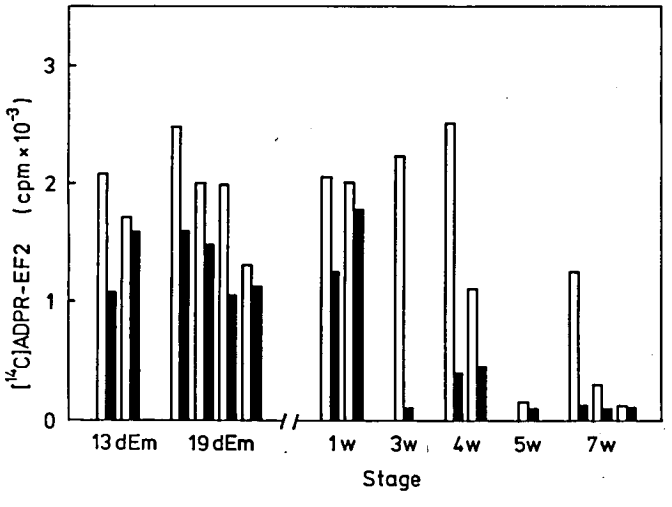


図６　各発生段階の鶏胸筋試料中のＥＦ２含量の測定。白カラム：筋ジストロフィー鶏試料，黒カラム：正常鶏試料。各カラムは１回の標本試料で，筋ジストロフィーと正常鶏を各回毎に平行して処理した。

あるかどうかを確かめるため“材料と方法”の項で記述した方法によりこの分画を精製した（図２）。図３に示すように，この物質（ＩＮＨ）はＥＦ２に競合的に拮抗し，反応液中のＥＦ２を増せば阻害作用はなくなる。一方反応液中のジフテリア毒素の量またはＮＡＤの量を変化させても阻害作用に影響はなかった。

ＩＮＨの分子量を，Weber & Osborn の方法[5]により電気泳動的に求めたところ図４に示したように約40,000 daltonであった。ＩＮＨを酸加水分解し，日立835型アミノ酸自動分析機でアミノ酸組成を調べた結果図５に示すようなスター・ダイアグラムを得た。

筋ジストロフィー鶏と正常鶏の試料中のジフテリア毒素によりＡＤＰリボシル化されたＥＦ２量を定量した結果を図６に示した。試料の単位蛋白量当りのＥＦ２量は，筋ジストロフィー試料の方が正常に比較し，多いかまたはほとんど同じであ

った。胚の時期ではＩＮＨはＳＤＳ電気泳動的にはほとんど認められず，成長するに従いＩＮＨの量が増加してくる。生後７週齢では電気泳動的に筋ジストロフィー試料中にもＩＮＨは認められＥＦ２のリボシル化は阻害される。試料によりバラツキは認められるが，生後３週～７週齢の間で筋ジストロフィー鶏と正常鶏の間にＥＦ２のリボシル化反応に顕著な差が生じる。これが正常鶏試料中のＩＮＨの出現と対応しているかどうか現在更に検討中である。

考　　察

ＡＤＰリボシル化反応の生理的意義については未だ確立されていないが，ヒストン，ノンヒストン蛋白等の核内物質のポリＡＤＰリボシル化が遺伝子発現を制御しており，また細胞内ＮＡＤレベルが発生・分化の調節の役割を担っている可能性が指摘されている。[6-8] 細胞質蛋白のＡＤＰリボシル化反応は，真核細胞においては，細胞外物質であるジフテリア毒素等によるＥＦ２の，コレラ毒素等によるアデニルシクラーゼの調節蛋白質のモノＡＤＰリボシル化が知られているのみで，細胞内物質のＡＤＰリボシル化反応は，ミトコンドリア中の酵素によるミトコンドリア蛋白のＡＤＰリボシル化以外報告されていない。[3,9-11] ジフテリア毒素によるＥＦ２のＡＤＰリボシル化のように，モノＡＤＰリボシル化反応の意義は，修飾される蛋白質の活性を変化させることである。

今回我々が報告したようなジフテリア毒素によるＥＦ２のリボシル化反応を阻害するような物質は，未だ知られていない。ＩＮＨは本来他の生理機能を果していると思われるが，(1)これが筋細胞に特有なものか，(2)細胞内物か細胞外物質か，(3)細胞内物質なら核内に存在するかどうか等の問題を明らかにする必要がある。これらの点に関しては抗体を作製し検討する予定である。ＩＮＨは現在までのところ，ＥＦ２の蛋白合成能に対して影響を及ぼさず，ジフテリア毒素によりＥＦ２がＡＤＰリボシル化を受ける部位を修飾している可能性が大であるが，詳細は不明である。

ＩＮＨと筋ジストロフィー症との関係では，結果で述べたように，胚の時期では筋ジストロフィー鶏，正常鶏ともにＩＮＨは存在しないか微量であり，成鶏では両者において存在すると思われる。生後１週～７週齢の間では，電気泳動パターンで調べた結果，正常では２～３週齢から，筋ジストロフィーでは５～６週齢からＩＮＨが顕著に認められるようになり，ジフテリア毒素によるＥＦ２リボシル化反応の抑制と結果がほぼ一致するが，これに関しては更に検討中である。筋ジストロフィー鶏におけるＩＮＨの出現の遅れは，大日方ら，[12] 野々村ら，[13] 杉田らが[14]報告しているように，筋ジストロフィー鶏は正常鶏に比較し分化が遅れることの証拠の１つにすぎないのか，あるいは筋ジストロフィー症発症に直接関係しているのか今後更に検討する予定である。

文　　献

1) Masaki, T. & Yoshikawa, A. (1977) Current Res. Muscul. Dys. Japan 22-23.
2) Yoshikawa, A. & Masaki, T. (1981) *J. Biochem.*, 90: 1775-1786.
3) Honjo, T., Nishizuka, Y., Kato, I., & Hayaishi, O. (1971) *J. Biol. Chem.*, 246: 4251-4260.
4) Hayaishi, O. & Ueda, K. (1977) *Annu. Rev. Biochem.*, 46: 95-116.
5) Weber, K. & Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244: 4406-4412.
6) Burzio, L.O. & Koide, S.S. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 1013-1020.
7) Yamada, M., Shimada, T., Nakayasu, M., Okada, H., & Sugimura, T. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 1325-1332.
8) Caplan, A.I. & Rosenberg, M.J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 1852-1857.
9) Cassel, D. & Pfeuffer, T. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 75: 2669-2673.
10) Gill, D.M. & Meren, R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 75: 3050-3054.
11) Kun, E., Zimber, P.H., Chang, A.C.Y., Puschendorf, B., & Grunicke, H. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72: 1436-1440.
12) Obinata, T., Takano-Ohmuro, H., & Matsuda, R. (1980) *FEBS Lett.* 120: 195-198.
13) Takeda, S. & Nonomura, Y. (1980) *Biomed. Res.* 1: 176-179.
14) 埜中征哉　杉田秀夫（1980）最新医学 35：907－915.
15) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685.

26 脱神経及び神経再生による支配筋の分離 筋小胞体膜のCa－uptake筋について

酒 井 敏 夫*
研究協力者 西 島 博 明* 今 井 孝 行*

筋ジストロフィー症（筋dys）の発症成因は筋原性説又は神経原説を示唆する実験が数多く提出され，直ちに結論を下す事は困難といえよう。この事は何れの考え方の根底には，genetic disorder が存在する事によると考えられる。また哺乳類の筋の分化は神経支配による事がわかっており，幼若筋の骨格筋は未分化である事が知られている。しかし，成長した筋では十分分化が完成しており，従って脱神経の効果は著明に現れる。

我々はこれまで，ジストロフィー成鶏胸筋（M. pectoralis）やfast posterior latismus dorsi muscle（PLD）,antirior latismus dorsi muscle（ALD）等のジストロフィー筋（dys筋）の筋小胞体膜を分離し,そのCa－uptake能を報告して来た。[3,4,5] 本実験では十分分化・発育したラット下肢筋のM. Extensor digiforu longs（EDL）やM. Soleus（Sol）が前述のPLD，ALDに対応する連筋，遅筋である事から，EDL，Sol筋支配神経の脱神経に伴う萎縮又は再神経接合による各筋の回復に伴う筋小胞体膜のCa－uptake能を調べ，ジストロフィー成鶏（dys成鶏）のPLD，ALDからの分離筋小胞体Ca－uptake能とどの様な関係を有するか調べた。さらに，EDL，Sol筋の各支配神経の切断分位に相違による，また再接合による各筋の分離筋小胞体膜のCa－uptake能を調べる事によって，神経と筋との間のtrophic interactionの介在をも考察した。

* 東京慈恵会医科大学第二生理学教室

実 験 方 法

使用した動物は体重120～130gの雄ラット（加令6週）である。このラット下肢片側のEDL,Sol各筋の筋進入部2㎜の部位で各々切断（EDL－N, fibralis Sol－N, fibralis）。切断後一定の時期に接合術を行った。次に，知覚及び運動神経をも含む数本のfunicuhesよりなるN, ichiadicを切断し，各期で再接合術を行った。尚，反対側肢を対照とした。又対照側肢のEDL，Sol，M, gastrocnemius，M, tibialis anteriol 等は患側肢の神経切断後8週の経過でも，その体重に示す重量比には変化がなかった。ラット下肢筋のEDL，Solからの筋小胞体膜分離はNishijima etal（1978）[1,2]の方法によった。Ca－uptake能の測定は，ミリポアフィルター法によって行った。反応溶液条件は0.1M KCℓ，3mM $MgC\ell_2$，20mM Tris－maleate butter pH6,8，0.1mM $^{45}CaC\ell_2$，1.0mM ATP，Tem 20℃で行った。反応溶液中のTotal Ca量は原子吸光によって測定した。

結 果 と 考 察

1. 筋小胞体膜の分離

ラット下肢筋からの筋小胞体膜の分離はジストロフィー筋（dys筋）とは異なり，脱神経筋（den筋）では正常時とホモジナイズ時の著明な液性の変化はなく，脱神経4週後の萎縮が進行した筋で

も正常な外観を持つ筋小胞体膜が得られた。8500～36500×Gで得られる筋小胞体膜のH－fractionの収量はden進行に従って筋1g当り10%程度の減少が認められるにすぎなかった。この事はdys筋での分離筋小胞体膜の収量とは著しく異なる事を示している[5]。また，本実験ではden筋でもL－fraction（36500×G以上）の収量が著しく小量であり，その脱神経進行に伴う変化が示唆されなかった。この事から，den筋内小胞体膜はdys筋の様な膜構造破壊の予測は出来なかった。

2. 脱神経による速筋（EDL），遅筋（Soleus）の分離筋小胞体膜Ca－uptake能の変化。

本実験では，Sol筋からの分離筋小胞体膜の最大uptake量は180×10^{-9}moles／mg protein程度であった。またEDLでは最大240×10^{-9}moles／mg protein前後を示した。両筋のCa－uptake rateはSolの方が小さく，その最大Ca－uptake量は約45秒で示され，EDLのそれより10－15秒遅く示される。このSol筋の場合に示される分離筋小胞体膜のCa－uptake能の遅れはdys成鶏胸筋，PLD，ALDでも示された。また幼若ラット下肢筋でも示され，加命と共に，早くなる事が判っている[6]。

脱神経による各筋（EDL，Sol）の分離筋小胞体膜のCa－uptake能は支配神経のみの切断ではSol，EDL両筋共に，その脱神経期間経過に伴って，同程度の低下を示している。しかし，Fig 1,2.

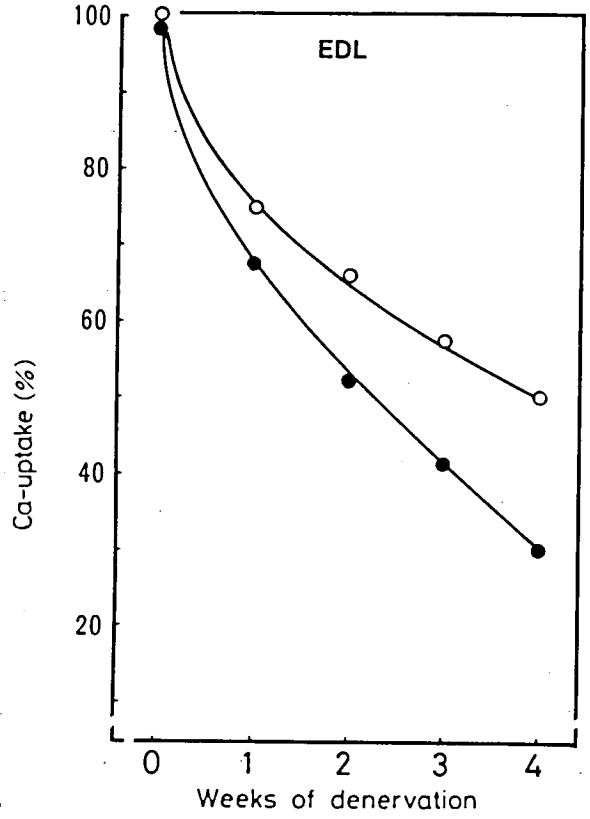


図1　脱神経によるEDL分離筋小胞体膜Ca－uptake能の変化。
N. tibialisの切断による
N. ichiadic　〃

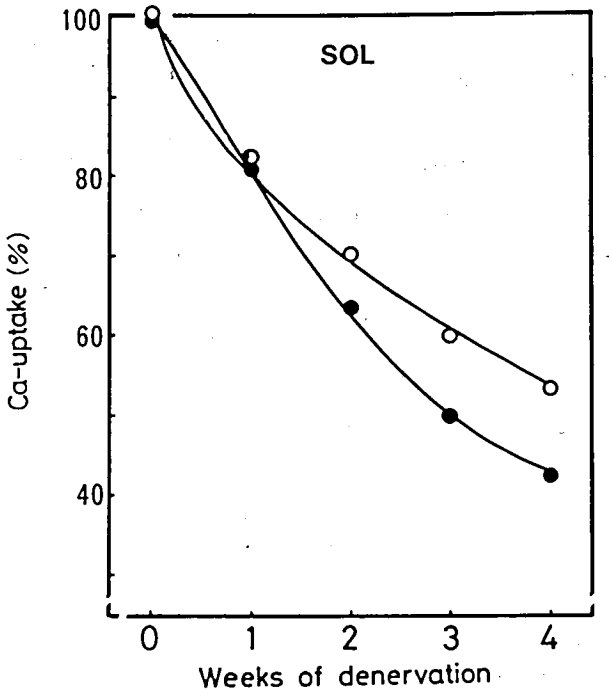


図2　脱神経によるsol分離筋小胞体膜Ca−uptake 能。
N. tibialisの切断による
N. ichiadic　〃

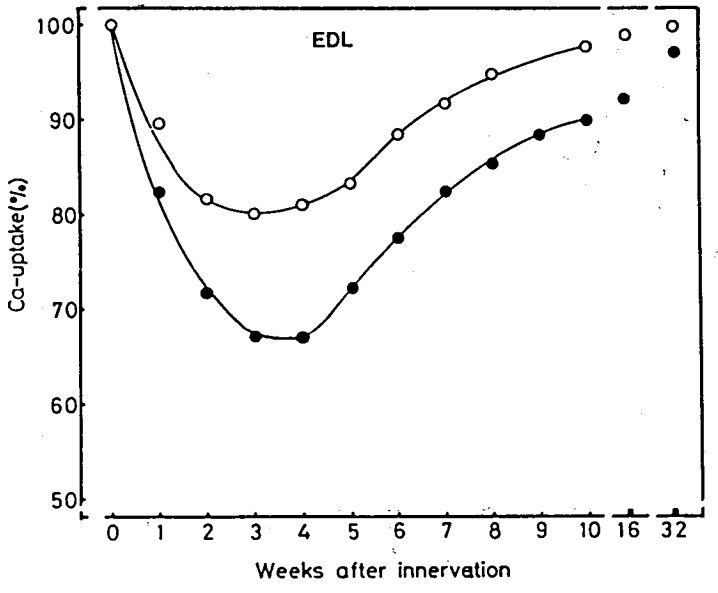


図3　脱神経直後の再縫合によるEDLの回復過程に伴う筋小胞体膜のCa−uptake 能の変化。
N. tibialisの切断・再縫合
N. ichiadic　〃

に示した様に，坐骨神経の場合には明らかにEDLのCa−uptake能の低下が示された。即ち，脱神経部位の相違によって，筋の小胞体膜Ca−uptake能に与える影響はM. SoleusよりもEDLの方に著明で，脱神経期間の経過と共に増大した。

一方，dys成鶏のPLD又はM. pecforalisの分離筋小胞体膜のCa−uptake能はジストロフィーの進行に伴って明らかにALDの場合よりもH−fractionにおいてCa−uptake rateの抑制が示された。[5] またL−fractionにおいてはuptake量の著明な低下が示されている。以上の事から，den筋やdys筋では速筋型の分離筋小胞体膜のCa−uptake能が低下する事が判った。

3. 神経再接合による再神経支配の分離筋小胞体膜Ca−uptake能の変化

神経再支配筋の筋小胞体膜のCa−uptake能の変化を求めるために，神経切断後再縫合術を行い，筋のdennervate様変化に続く筋の回復程度による筋小胞体膜のCa−uptake能を調べた。また，この脱神経直後の再神経縫合術を部位の異なる場所で行い，EDL，Sol各筋の分離筋小胞体膜のCa−uptake能の変化を調べた。Fig 3,4で示した様に，脱神経直後に再縫合してもEDL，Sol共にCa−uptake能の低下が示され，3週間はdenervation様の現象を程する事が判った。このCa−uptake能の低下はSol，EDL共に中枢側坐骨神経部位で脱神経・再縫合を行った場合の方が著しかった。この事は神経縫合による支配筋の再生過程におけるCa−uptake能の回復rateが同じであり，かつ，時間的相違のみであれば，脱神経・再縫合部位の相違による変化を神経と筋の距離によって説明する事が出来る。しかし，Fig 3,4に示した様に，Ca−uptake能の回復はEDL，Sol共に再縫合後の脱神経様のCa−uptake能の低下した下限量に逆比例して上昇している。しかもCa−uptake能の回復は脱神経部位にかかわらず術後3週から始まっている。

以上の事から脱神経による支配筋の筋小胞体膜のCa−uptake能の変化は脱神経部位と支配筋との距離または脱神経自体のfuniculusの数等に

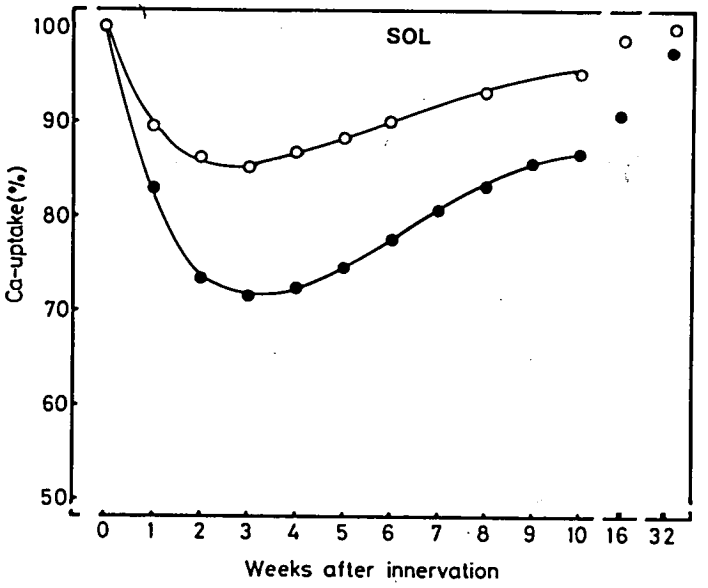


図4　脱神経直後の再縫合によるsolの回復過程に伴う分離筋小胞体膜Ca−uptake能の変化。
N. tibialisの切断・再縫合
N. ichiadic　　〃

よる相違だけでは説明する事は出来ない。むしろ筋一神経間のtrophic interactionによる可能性を示唆しているものと考えている。

本実験で示したラット下肢分離筋小胞体膜はdys成鶏分離筋小胞体のH−fractionに相当する。このdys筋のCa−uptake能はH−fraction においては大きな変化は示されず，dystrophy の進行に伴ってのuptake rate の抑制を示すにすぎなかった。しかし，このfraction より軽いL−fractionのCa−uptake能はdys筋で著明に低下する事はすでに報告している[4,5]。今回示したden遅筋，den速筋におけるH− fraction のCa−uptake能はdys筋の遅筋，速筋，両筋からの小胞体L−fractionのそれと著しく類似している変化を示していた。また，dennervate筋によるL−fractionとdys筋のH−fractionのCa−uptake 能は共に大きな変化を示していない点を考慮すると，den筋とdys筋では筋小胞体膜に与える影響は本質的に異なるものと推定出来る。

文　　献

1) H. Nishijima, T. Tani and U. Ogino. The method for the preparation of fragmented sarcoplasmic reticulum from small pieces of leg skeletal muscle of rats. *Jikeikai Med. J.* **25**: 287-290, 1978.

2) H. Nishijima T. Ito, H. Kuriyama, On the alcility of Ca-uptake in the fragmented sarcoplasmic reticulum extracted from the guine a pig masticatory muscle. *Proc. Jpn. Acad.* **49**: 367-371, 1973.

3) 酒井敏夫，西島博明，小林啓三，吉岡利忠，成沢三雄，ラット骨格筋の除神経の影響並びに成鶏ジストロフィー筋の筋小胞体について。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，59−68.

4) 酒井敏夫，西島博明，岩垣丞恒，小林啓三，服部昭仁，ジストロフィー成鶏胸筋筋小胞体膜の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54年度研究報告書，125−132.

5) 酒井敏夫，西島博明，今井孝行，渡辺雅之，岩垣丞恒，ジストロフィー成鶏胸筋小胞体膜のCa−uptake能と，その膜構成について。筋ジストロフィー症の基礎的研究江橋班昭和55年度研究報告書，136−143.

6) U. Ogino. Age changes on alcility of Ca-uptake on sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle of rats. Jikeikai Med. J. in preparation.

Ⅷ　Proteinase

27　ニワトリ発生における筋組織プロテアーゼの動態　157

28　骨格筋のチオールプロテアーゼインヒビターの
　　諸性質と筋ジストロフィー症における活性変動　162

29　筋肉代謝網に対する酵素阻害物質の影響　168

30　筋発生分化におけるプロテアーゼの役割　173

31　Ca依存性プロテアーゼの生体内での作用　178

27　ニワトリ発生における筋組織プロテアーゼの動態

高　橋　健　治*
研究協力者　市　原　慶　和*

動物の発生過程における組織プロテアーゼの動態に関する研究はまだあまり進んでおらず，殊に筋組織のプロテアーゼに関する研究は少い。本年度は，筋肉の発生と分化という問題に関連してニワトリのふ化前後における各種筋組織（肢筋，胸筋，心筋，砂嚢筋）中のカテプシンDおよび数種のアミノペプチダーゼ活性を，可溶性分画およびミクロゾーム分画について測定し，それらの動態特性を比較検索した。

実験材料および方法

筋組織は白色レグホーンを用い，発生開始後14日，19日（ふ化1日前）および27日（ふ化後1週間目）のニワトリから後肢筋，胸筋，心筋および砂嚢筋を得た。各筋組織を5倍容量の5mM Hepes緩衝液，pH 7.5（0.25Mショ糖および10mM 2-メルカプトエタノールを含む）を用い，Potter-Elvehjem型ホモジナイザーでホモジナイズした後，10,000×g，10分間遠心した上清をさらに78,000×g，60分間遠心し得られる上清（Sup）および沈殿のミクロゾーム分画（Ms），ならびにミクロゾーム分画をさらに1M KCl で洗った不溶性部分（KCl-Ms)についてプロテアーゼ活性を測定した。カテプシンD活性は，ヘモグロビンを基質として，pH 3.0，37℃で10時間反応させ，トリクロル酢酸可溶性部分の 280 nmの吸収を測定する方法によった。ジペプチジルアミノペプチダーゼⅣ活性は，グリシル-プロリン-4-メチルクマリン-7-アミドを基質として，pH7.5，37℃で15分間反応させ，蛍光測定（Ex. 380nm；Em. 480nm）する方法によった。また，アミノペプチダーゼ活性は，アラニン，ロイシンおよびアルギニンの各2-ナフチルアミドを基質として，pH 7.0，37℃で15分間反応させ，生成する2-ナフチルアミンをFast Garnet GBC を用いるジアゾ化法で比色定量（△A525nm)する方法によった。なお，14日および19日の試料は各20個体分，27日の試料は10個体分を合わせたものを使用した。

実　験　結　果

図1～5に得られた結果を示した。各図とも，Sup，Ms，およびKCl-Ms 分画についてはタンパク質（mg）当りの比活性を示してある。また，Sup＋MsはSup分画およびMs 分画中の組織重量(g)当りの活性の和を示したものである。

まず，カテプシンD活性の変動（図1）についてみると，Sup分画では肢筋と胸筋の比活性にあまり変動はみられなかったが，心筋と砂嚢筋の比活性はふ化直前またはふ化後に著しく増大するという結果が得られた。同様な比活性の上昇はMs分画でも認められ，砂嚢筋の場合KCl-Ms 分画でも同様であった。一方，肢筋および胸筋の比活性はMs およびKCl-Ms 分画ではほぼ並行して経時的に減少した。これらの傾向はSup+Ms 分画の組織重量当りの活性についても認められた。

ジペプチジルアミノペプチダーゼⅣ（図2）の場合には，大方の筋において，ふ化にむかって比活性が増大し，ふ化後は一定値を保つかあるいは

* 京都大学霊長類研究所生化学研究部門

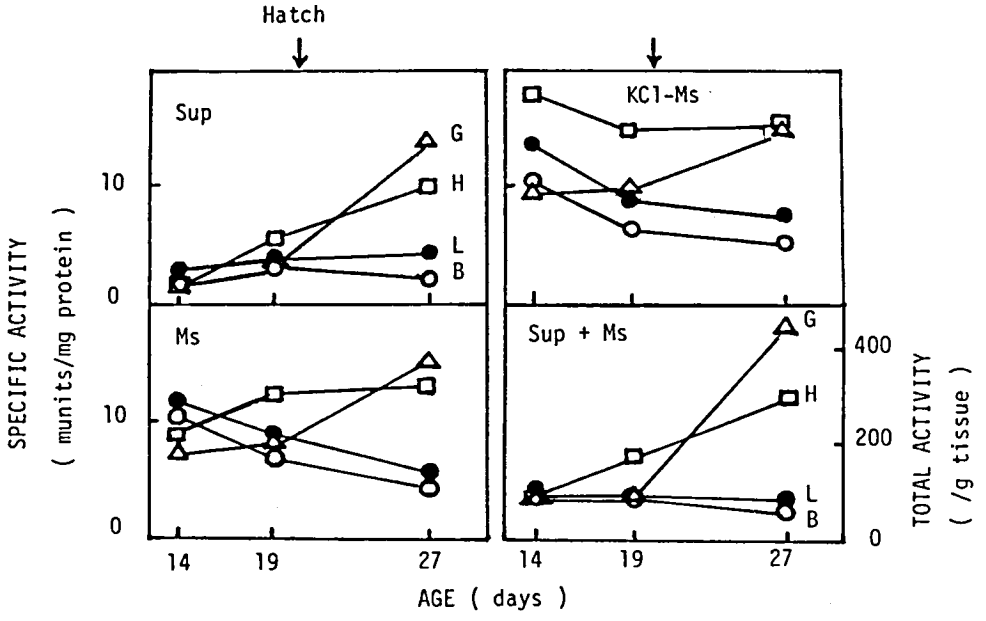


図1 ニワトリのふ化前後における筋組織カテプシンD活性の変動
Sup, 78,000×g上清分画；Ms，ミクロゾーム分画；KCl−Ms，1MKCl 不溶性ミクロゾーム分画；Sup +Ms，SupとMsの活性の和。L(●)，肢筋；B(○)，胸筋；H(□)，心筋；G(△)，砂嚢筋。表示法は図2〜5でも同様。

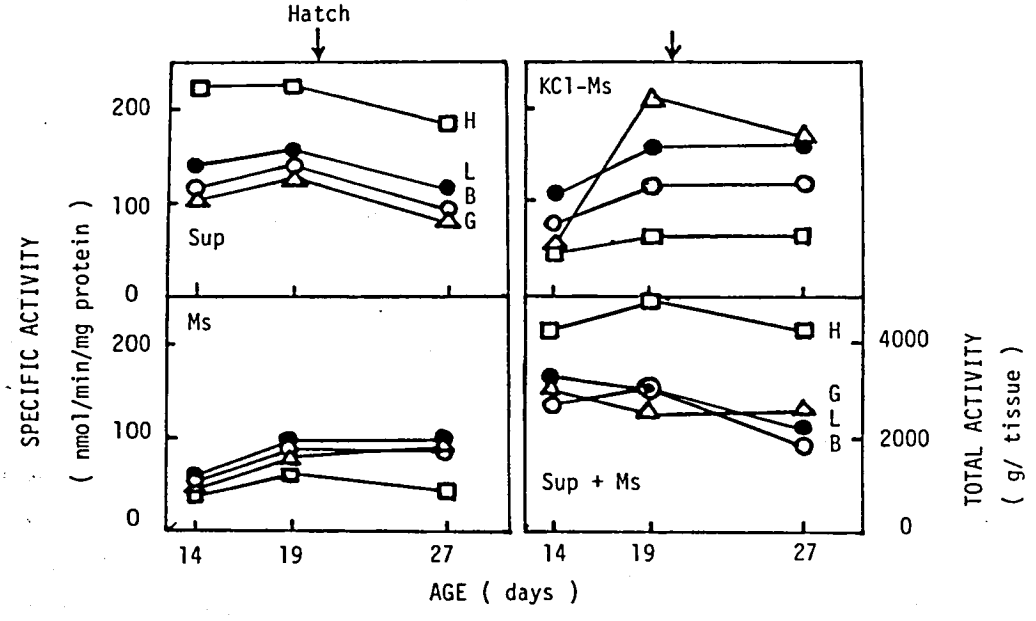


図2 ニワトリのふ化前後における筋組織ジペプチジルアミノペプチダーゼN活性の変動。

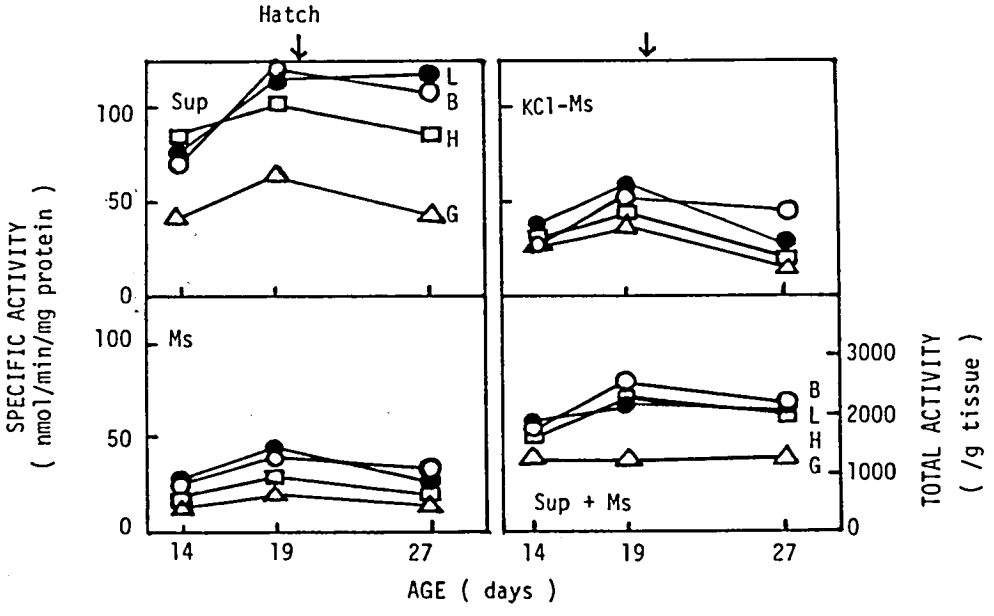


図3　ニワトリのふ化前後における筋組織アラニンアミノペプチダーゼ活性の変動。

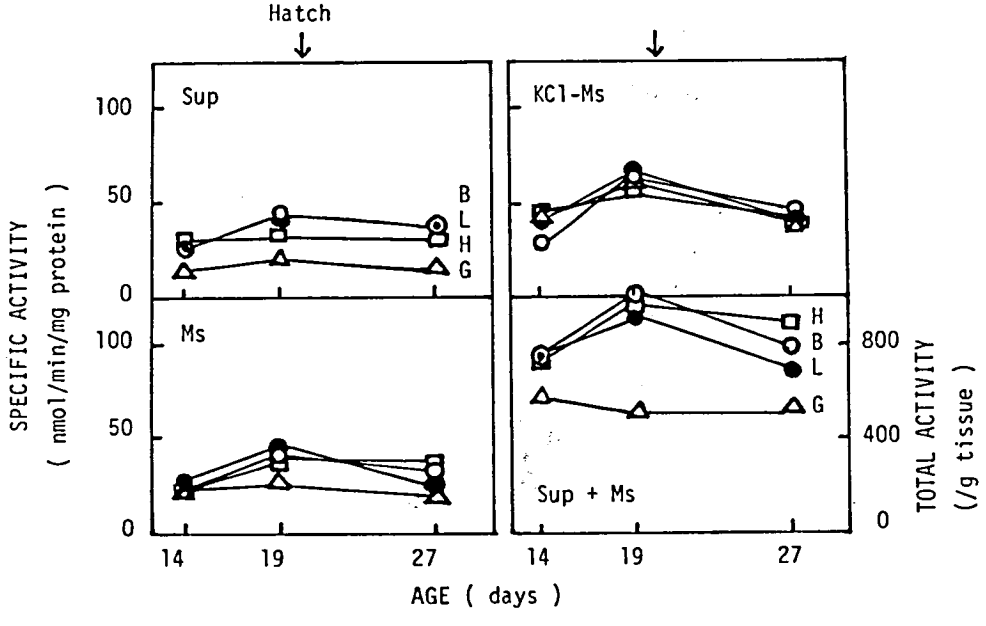


図4　ニワトリのふ化前後における筋組織ロイシンアミノペプチダーゼ活性の変動。

徐々に減少する傾向が認められた。ふ化にむかって増大する傾向は砂嚢筋のKCl−Ms 分画で特に顕著であった。また心筋のSup分画の比活性が他の筋の場合より2倍近く高い点が注目された。

アミノペプチダーゼ活性（図3〜5）は用いる基質により比活性にかなりの差が存在したが，3種の基質に対する比活性の経時的変動はジペプチジルアミノペプチダーゼⅣの場合に近く，各筋組織および分画とも大体の場合ふ化にむかってやゝ増大し，ふ化後一定値を保つか徐々に減少すると

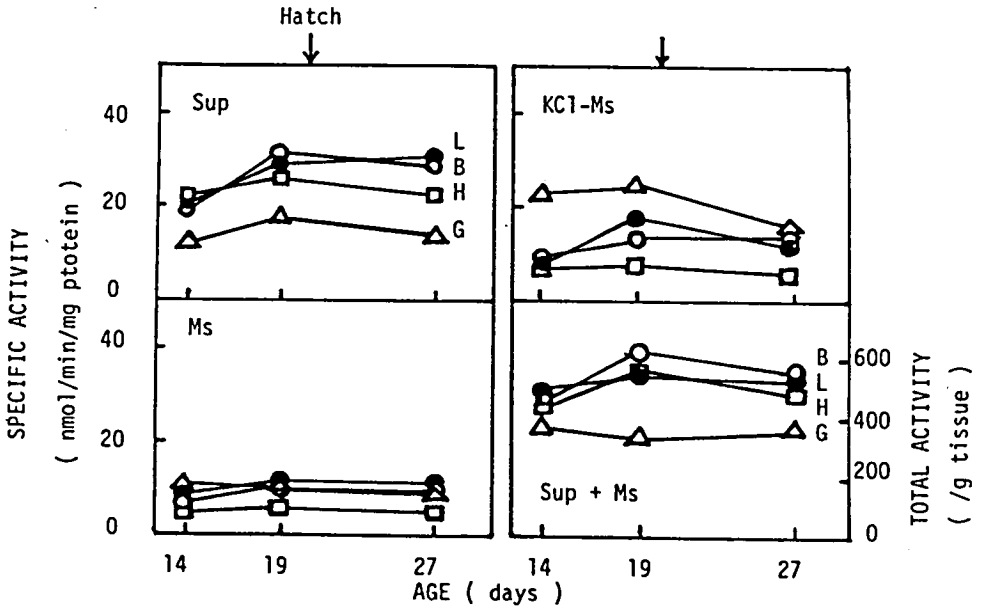


図5 ニワトリのふ化前後における筋組織アルギニンアミノペプチダーゼ活性の変動。

いうような一般的傾向が認められた。これらのアミノペプチダーゼの比活性は，それぞれの筋組織で比較的近い値であったが，砂嚢筋の比活性が他より多くの場合に顕著に低い点が注目された。

考　　察

測定した酵素の比活性は，いずれの場合も肢筋と胸筋の場合に最も近い値をとり，かつその変動も並行していた。これに対して，心筋と砂嚢筋の場合は肢筋および胸筋とはかなり異なる比活性と変動を示し，心筋と砂嚢筋の相互間でもかなり異なっていた。また，全体的にみて砂嚢筋の場合が他の三者から最も離れた挙動を示した。これらの結果の意味するところは十分明らかではないが，骨格筋，心筋，平滑筋の差を反映している点で興味深い。ふ化前後におけるそれぞれの筋組織でのタンパク質代謝にかなりの差があることを推定させる。今回はふ化前後の3時点でのみ測定したが，さらに測定点をふやすとともに成鶏にまで延長して，全体的な変動傾向を比較解析する必要があろう。また，特に変動の大きかったものを中心にして，その再現性の検討も必要である。今回測定したプロテアーゼ活性はエンドペプチダーゼとしてはカテプシンDのみであったが，エキソペプチダーゼ類よりも活性変動が顕著であった。組織のタンパク質分解速度の律速は，分解の最終段階に作用するエキソペプチダーゼ類よりもむしろ分解の初期に作用するエンドペプチダーゼ類によるところが大と考えられるので，今後さらに他のエンドプロテアーゼ類（カテプシンB類，Ca−依存プロテアーゼ，アルカリ性プロテアーゼ，膜結合中性プロテアーゼ[1]など）の活性変動の比較検索も重要となろう。また，プロテアーゼ活性の変動を問題とする場合，組織に内在するプロテアーゼインヒビターの性状，動態にも十分注意する必要があろう。一方，筋肉の発生・分化という面から考えると，発生・分化の諸段階における各個筋タンパク成分の分解機序と各プロテアーゼの関与様式の比較解明も重要な問題である。また，筋ジストロフィー症成鶏では各種のプロテアーゼ活性の上昇が知られているが[2,3]，その発生過程における変動を比較検索することも有意義であろう。

文　　献

1) Y. Ichihara, K. Sogawa, K. Takahashi: Occurrence and Some Properties of Membrane-Bound Neutral Proteinase in the Microsomal Fraction of Rat

Skeletal Muscle, *J. Biochem.* 91, 87-95, 1982.
2) 高橋健治，市原慶和，十川和博：筋組織の中性プロテアーゼに関する研究，筋ジストロフィー症の基礎的研究（江橋班）昭和55年度報告書，pp 166−171（1981）。
3) 青柳高明，和田孝雄：筋ジスニワトリおよびマウス筋肉中の各種酵素活性の対比，筋ジストロフィー症の基礎的研究（江橋班）昭和55年度報告書，pp 159−165（1981）。

28 骨格筋のチオールプロテアーゼインヒビターの諸性質と筋ジストロフィー症における活性変動

勝沼信彦*
研究協力者 木南英紀* 若松延昭*
磯貝和秀*

はじめに

リソゾームのチオールプロテアーゼであるカテプシンB，H，Lは全身臓器に分布しており，我々はこれらの精製・諸性質及び前2者の筋構成タンパクの分解の様式についてはすでに報告した。[1-4]最近我々は，これらチオールプロテアーゼの特異的阻害タンパクが細胞分画に存在することを見い出し，ラット肝より単一蛋白まで精製した。[5]今回はラット骨格筋よりの本インヒビターの諸性質と筋ジストロフィーハムスターにおけるリソゾーム・プロテアーゼ群及び内在性インヒビターの活性変動について報告する。

材料と方法

ラット肝及び骨格筋からのチオールプロテアーゼインヒビターの精製は概ね木南ら[5]の方法に従った。熱処理は行なわず，直接細胞質分画をパパイン（あるいはフィシン）のアフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した。インヒビターの活性測定はカテプシンHに対する阻害で測定した。活性の表現は木南らの方法[5]に従った。Z－Arg－Arg－βNA及びBZ－Arg－βNAの測定は，Barrett[6]の方法で，酸フォスファターゼはIgarashi[7]らの方法で，アルドラーゼ及び乳酸脱水素酵素はNADHの減少で測定した。[8,9]ジストロフィーハムスター（F_1 B系，BIO14.6系ともに15週令のもの）は大正製薬より供して頂いた。大腿四頭筋をPolytron（Kinematica GmbH，スイス）を用いて5倍量の20mMNaCℓを含む0.25Msucrose，pH 7.0でホモゲナイズし，12000×g，20分遠心し，上清をインヒビター，アルドラーゼ，乳酸脱水素酵素の測定に，沈殿は元と同量に同じバッファーでけん濁した後，凍結を2回くり返し，その遠心上清をリソゾームプロテアーゼ測定に供した。

結果及び考察

内在性チオールプロテアーゼインヒビターの諸性質について

ラット（Wister，♂，200g）肝及び骨格筋の細胞質分画を出発材料として，木南らの報告[5]を部分的に修飾して精製した。精製したインヒビターは，分子量12,000のモノメリックなタンパクであり，等電点は5.0－5.1にあった。本インヒビターの阻害のスペクトラムが表1に示されている。チオールプロテアーゼであるカテプシンB，L，H，C，パパインなどは程度の差はあるが，すべて阻害される。この中では，カテプシンBの阻害が一番弱い。しかし，同じくチオールプロテアーゼであるカルシウム依存性プロテアーゼが全く阻害を受けないことは，着目すべきことと思われる。他のセリングプロテアーゼ（トリプシン，キモトリプシン，マストセルプロテアーゼ），カルボキシプロテアーゼ（カテプシンD）は全く阻害を受けない。阻害の至適pHをカテプシンH，B及び

* 徳島大学医学部附属酵素研究施設酵素化学部門

表1

Inhibition Spectrum of Endogenous Thiol Proteinase Inhibitor from Rat Liver

Proteinase	Source	Inhibitor U / ml
Cathepsin H	rat liver	5.3
Cathepsin B	rat liver	1.7
Cathepsin L	rat liver	7.7
Cathepsin C	rat liver	6.6
Papain	papaya fruit	7.7
CANP	rat muscle	<0.2
Chymotrypsin	bovine pancreas	<0.1
Trypsin	bovine pancreas	<0.1
Mast cell proteinase	rat liver	<0.1
Cathepsin A	rat liver	<0.1
Cathepsin D	rat liver	<0.1

パパインについて調べると，カテプシンH及びパパインに対してはその活性の至適pHである6.0付近で阻害が最も強い。カテプシンBの至適活性が6.0付近にあるのに対し，その阻害の至適pHは6.5にあり，そのことはカテプシンBが阻害を受けにくいことと関係あるものと推察される。本インヒビターが細胞質に存在することを示したのが，表2であり，肝での細胞内分布について調べられている。骨格筋でも大部分は細胞質分画にあることをpreliminaryであるが確認している。肝のインヒビターに対する抗体をウサギを用いて作成し，骨格筋のインヒビターとの差異を免疫二重拡散法で分析した結果が図1に示されている。抗体に対し癒合した一本の沈降線が認められ，肝と骨格筋のインヒビターは免疫学的には同一と考えられた。尚，他の臓器のインヒビターも同様に肝インヒビターと免疫学的には区別できなかった。本インヒビターはチオールプロテアーゼを瞬時に阻害し，プロテアーゼインヒビター複合体を形成する。プロテアーゼのSH基とインヒビターの相互作用についてSDSを含まないポリアクリルゲル電気泳動を用いて解析した結果が図2に示されている。Band−1はカテプシンHでBand−3が精製したインヒビターである。Band−2は両者を混合したものであり，両者の中間にプロテアーゼインヒビター複合体が観察される。Band−4はカテプシンHにその阻害剤E−64を作用させたもので，バンドの移動度には変化がない。Band−5ははカテプシンH−E−64複合体に本インヒビターを添加したものであり，プロテアーゼのSH基が予めブロックされていると，プロテアーゼ・インヒビター複合体の形成が抑制されることを示して

表2

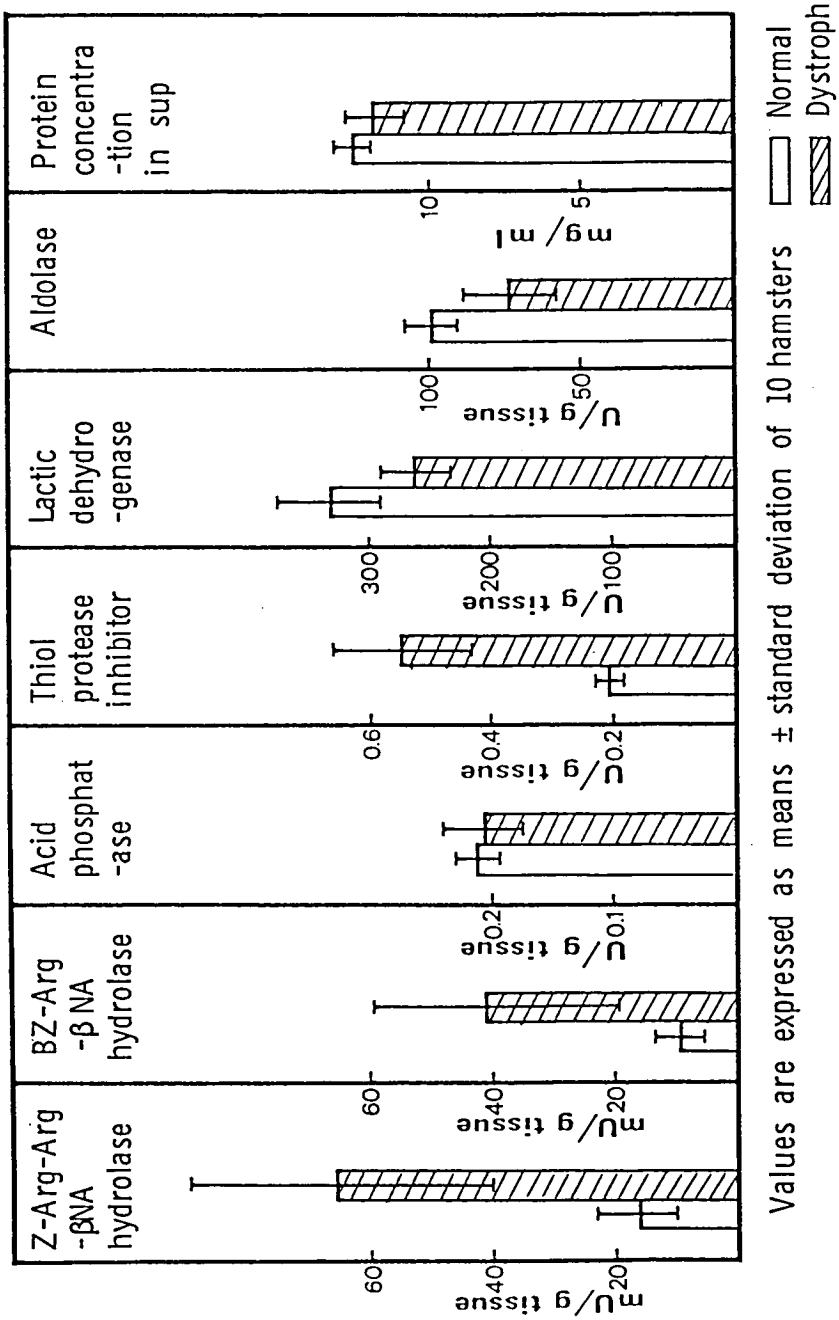
Subcellular distribution of thiol proteinase inhibitor in rat liver

Fractions	Specific activity	Percentage in fraction				
		Nuclear fraction	Large granules	Microsomal fraction	Final supernatant	Recovery %
Protein	220	16.9	31.7	17.2	34.2	97.2
Cytochrome oxidase	0.156*	20.6	73.1	5.4	0.9	89.1
Cathepsin D	0.011*	12.8	74.9	12.7	0	96.1
Catalase	239*	7.1	72.1	16.1	4.7	94.7
Glucose-6-phosphatase	1.97**	13.2	28.8	57.9	2.0	101
Inhibitor	0.27***	2.1	1.8	3.1	94.0	108

Specific activity ; * μmole/min/mg protein, ** Pi μg/min/mg protein, *** mU/mg protein

表3

Various Enzyme Activities in Skeletal Muscle of Normal and Dystrophic Hamsters



Values are expressed as means ± standard deviation of 10 hamsters

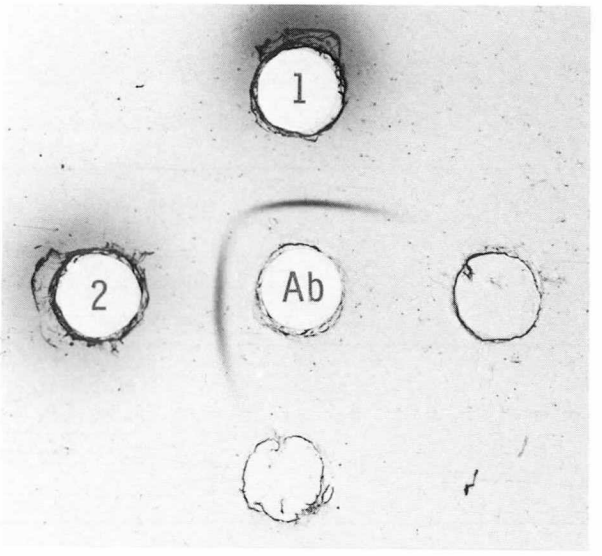


図1 Double Immunodiffusion Patterns of Thiol Proteinase Inhibitor from Liver and Skeletal Muscle

1 ; Inhibitor from liver
2 ; Inhibitor from skeletal muscle
3 ; Antiserum of liver inhibitor

いる。逆にプロテアーゼ・インヒビター複合体にE－64が結合できないことは ^{3}H－E－64を用いて証明してある。

ジストロフィーハムスターにおけるチオール性カテプシンとそのインヒビターの活性変動

12週令の筋ジストロフィーハムスター（BIO 14. 6）と対照としてのF_1 B_1 について，大腱筋のプロテアーゼとインヒビターの活性を測定した。筋ホモジネートを12000×g，20分間遠心し，沈殿分画を用いてプロテアーゼ活性を，上清分画を用いてインヒビター量を測定した。カテプシンBの特異的基質Z－Arg－Arg－βNA水解活性はジストロフィーハムスターでは著明な活性増加がみられる。BANA水解活性はカテプシンBとHの両方の活性を測定しているが，やはり著明な活性増加が認められる。他のリソゾームのマーカー・酸フォスファターゼ活性がジストロフィー症で増加していないことは，リソゾーム中のプロテアーゼ活性の上昇は特異的であり，リソゾームの数の増加はないことを示唆している。一方，チオールプロテアーゼインヒビターの量も増加しており，プロテアーゼの活性増加を抑制する一つの機作かもしれない。しかし，リソゾームプロテアーゼとは細胞内局在性も異なり，どのような機構でプロテアーゼ活性の調節に関与するかは全く不明である。他の細胞質の酵素，アルドラーゼや乳酸脱水素酵素はむしろジストロフィーで活性が低かった。なお，沈殿，上清分画のg組織当りの蛋白量は対照及びジストロフィー動物との間で差はなく，ジストロフィーにおけるプロテアーゼ及びそのインヒビターの活性増加は真の活性を測定したものと考

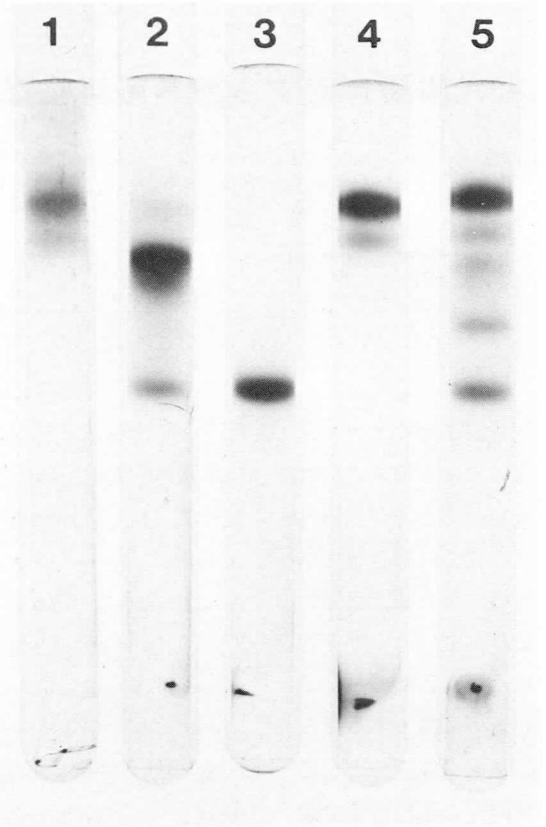


図2　Complex formation between cathepsin H and the inhibitor and its retardation by preincubation of cathepsin H with E 64

えられる。同じ動物での肝臓のインヒビターのレベルを測定すると，肝臓では全く活性の上昇はなく，ジストロフィー症が骨格筋に特異的に発症することと考え合わせると興味深い。

文　　献

1) Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D., and Katunuma, N.: Purification and properties of a new cathepsin from rat liver, *J. Biochem.*, **84**, 659, 1979.
2) Towatari, T., Kawabata, Y., and Katunuma, N.: Crystallization and properties of cathepsin B from rat liver, Eur. *J. Biochem.*, **102**, 279, 1979.
3) Noda, T., Isogai, K., Hayashi, H., and Katunuma, N.: Susceptibilities of various myofibrillar proteins to cathepsin B and morphological alternation of isolated myofibrils by this enzyme, *J. Biochem.*, **90**, 371, 1981.
4) 真田幸弘，勝沼信彦，野田隆：カテプシンHに対する筋原線維構成蛋白質の分解洋式，厚生省筋ジストロフィー症病因に関する臨床的研究第二班。昭和55年度　P. 27
5) Kominami, E., Wakamatsu, N., and Katunuma, N.: Endogenous thiol protease inhibitor from rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **99**, 568, 1981.
6) Barrett, A.J.: A new assay of cathepsin B_1 and other thiol proteinases, *Anal. Biochem.*, **47**, 280, 1981.
7) Igarashi, M., and Hollander, V.R.: Acid phosphatase from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **243**, 6084, 1968.
8) Rutter, W.J., Hunsley, J.R., Goves, W.E., Calder, J., Rajkumar, T.V., and Woodfin, B.M.: Fructose diphosphate aldolase, *Method Enzymol.*, **9**, 479, 1966.

29 筋肉代謝網に対する酵素阻害物質の影響

青柳高明
研究協力者 和田孝雄

緒言

筋ジストロフィー症の発症及び進展のメカニズムとして，蛋白分解酵素の異常による筋蛋白崩壊が重要な役割を演じているという考え方が可成り一般的になっている。我々は，従来注目されていたエンドプロテアーゼの異常のみならず，各種アミノペプチダーゼの異常も関与していることを報告して来た。[1,2]その考え方に基づき，各種のアミノペプチダーゼ阻害剤を本症の治療に導入する試みがなされ，その有効性が示唆されるに至った。[3]そこで今回，我々は当研究所で開発した低分子酵素阻害剤であるロイペプチン，[4]ベスタチン，[5]フォルフェニシノール[6]の三者を筋ジストロフィーマウスに投与し，その筋内代謝網に対して与える影響を検索した。[7]また，その結果を他の諸臓器内の代謝網に対する影響と比較検討した。本論文ではその代謝網変化の統計学的解析の結果を中心として報告する。

実験材料及び方法

3週令の筋ジスマウス（C57 BL/6J, dy/dy）を実験動物中央研究所より購入して使用した。ロイペプチン（500μg/日）を各々0.2ml の生理的食塩水中に溶解して腹腔内に投与した。これら阻害剤の投与は8日間続けられ，最終投与時の3時間后に動物を屠殺し，各種臓器を摘出し，測定時迄−20℃にて凍結保存した。臓器は10倍量の PBS（pH 7.2）の中で，Ultra−turrax を用いて1分間ホモジナイズした。5000rpm, 20分間の遠沈后，その上清を採取し酵素活性の測定に用いた。

酵素活性測定の為の基質としては以下のものを用いた。L−Glutamic acid β−naphthyl-amido hydrochloride（L−Glu・NA），L−Arg・NA, L−Pro・NA, L−Leu・NA, L−Phe・NA, L−Ser−L−Tyr・NA, Acetyl−L−alanyl−L−alanyl−L−alanine methyl ester（Ac（Ala)$_3$・ME），Gly−L−Pro−L−Leu・NA, N^{α}Benzoyl−L−arginine ethyl ester hydrochloride（BAEE），N^{α}−Acetyl−L−tyrosine ethyl ester（ATEE），P−Nitrophenylacetate(PNPA)，p−Nitro−phenyl−α−D−glucopyranoside（NP−Glc），p−Nitrophenyl−α−D−mannopyranoside（NP−Man），p−Nitrophenyl−N−acetyl−β−D−glucosaminide（NP−AG),p−Nitrophenyl phosphate（PNPP），1−^{14}C−creatine, Formyl−L−methionine−β−naphthylamide（fmet・NA）.

組織ホモジネートの遠沈上清を PBS 及び基質を含む小試験管に分注し，37℃，pH 7.2 の条件下で1時間インキュベートした。アミノペプチダーゼ，カテプシンC及びエンドペプチダーゼに関しては 525nm の吸光度を測定した。クレアチンキナーゼ（CPK）の活性はDowex 50 の非吸着分画内における分解産物の放射能測定を行なうことによって求めた。

各酵素活性の変化をコントロールを基準として，Student の t 値で表わしたものを，そのプラス値

＊微生物化学研究所

Table 1. Enzyme activity changes in forelimb muscle of dystrophic mice induced by low molecular inhibitors

Enzyme	Sp. Act. ± SD			
	None	Leupeptin	Bestatin	Forphenicinol
AP-A	1.29± 0.22	0.95± 0.60	1.26± 0.22	1.28± 0.06
AP-B	10.28± 1.61	8.39± 2.29	9.22± 1.14	9.08± 1.42
Pro-AP	2.97± 1.75	2.42± 0.49	1.45± 0.43	2.54± 0.85
Leu-AP	8.13± 0.90	5.68± 3.45	7.67± 0.74	7.58± 0.12
fMet-AP	5.33± 0.40	6.34± 1.41	5.17± 0.67	4.60± 0.07
Phe-AP	13.17± 0.91	10.87± 5.32	10.93± 2.31	13.59± 0.58
Gly-Pro-Leu-AP	1.00± 0.02	0.94± 0.48	0.97± 0.18	1.03± 0.15
Trypsin-like	86.62± 5.20	102.07±47.93	54.42±21.40	55.11±13.43
Chy-try-like	100.97±17.47	134.26±25.32	63.53±23.28	90.06± 5.96
Elastase-like	56.35± 7.78	48.74±18.50	45.76±18.82	54.11± 7.22
Cathepsin C	1.19± 1.01	2.37± 0.49	0.99± 0.19	1.38± 0.11
α-D-Glucosidase	1.04± 0.42	0.74± 0.16	0.40± 0.04	0.43± 0.00
α-D-Mannosidase	0.16± 0.28	0.31± 0.28	0.14± 0.03	0.19± 0.05
Glc-NH_2ase	2.67± 0.91	2.22± 1.07	1.22± 0.25	1.13± 0.14
CPK	22.51± 4.76	19.75±10.43	16.05± 2.74	19.27± 3.48
Phosphatase	6.27± 1.58	1.67± 1.23	1.46± 0.20	1.42± 0.19
Esterase	206.20±79.30	67.62±16.80	62.57± 2.85	57.31± 4.81

Glc-NH_2ase: N-acetyl-β-D-glucosaminidase

の大きいものから，マイナス値の大きいものへと順位づけし，その順位についての相関をSpearmanの順位相関係数(rs) として表わした。

$$rs = 1 - \frac{6\Sigma(Tix-Tiy)^2}{n^3-n}$$

$$n = 16$$

$$i = 1, 2, 3, \cdots\cdots 16$$

ここでTi はStudent のt値に関する順位であり，CPK を除く16種類の酵素活性について，第1位から第16位まで順位づけしたものである。またxとyは相関づける2群のマウスグループ（グループxとグループy）を表わすsuffix である。

結果及び考察

表1に筋ジスマウスの前肢筋の酵素活性の変化を示す。これに見られるように，ロイペプチンはf・Met−AP を除く各種アミノペプチダーゼ活性の低下を生じる。ベスタチンとフォルフェニシノールはアミノペプチダーゼだけでなく，エンドペプチダーゼ，グリコシダーゼの活性をも低下させる傾向を示した。同様の観察を後肢筋，心筋，脾，肝，腎などにおいても行ない，その活性変化をStudent のt値として表現したのが表2，表3である。t値が 2.15 以上の場合，コントロール群との差が有意となる（$P<0.05$)。

表2で明らかなことは，これら三者のインヒビターが，その in vitro における阻害活性とは無関係に，ほとんど全てのアミノペプチダーゼ活性の低下を生じていることである。また CPK もこれら3種の組織中において，インヒビターによって抑制された。

Table 2. Enzymatic changes, expressed as t-values, in limb muscles and heart

Enzyme	t-value								
	Muscle (forelimb)			Muscle (hindlimb)			Heart		
	Leup.	Besta.	Forph.	Leup.	Besta.	Forph.	Leup.	Besta.	Forph.
AP-A	-0.92	-0.17	-0.08	0.0	1.15	-0.70	0.16	0.41	-2.76
AP-B	-1.17	-0.93	-0.97	-1.47	-0.68	-1.78	-0.78	-1.92	-1.85
Pro-AP	-0.53	-1.46	-0.38	-1.59	-1.43	-0.31	-0.39	-1.55	-1.80
Leu-AP	-1.19	-0.68	-1.05	-3.62	-0.67	-1.32	-0.63	-0.73	-1.78
fMet-AP	1.19	-0.36	-3.11	0.04	-0.77	1.37	2.80	2.15	1.20
Phe-AP	-0.74	-1.56	0.67	-2.74	-2.17	-2.15	-0.19	-2.23	-2.12
Gly-Pro-Leu-AP	-0.22	-0.29	0.34	1.24	0.48	-1.50	0.78	0.27	1.14
Trypsin-like	0.56	-2.53	-3.79	1.17	-0.41	-0.72	-2.14	-0.83	-0.35
Chy-try-like	1.87	-2.23	-1.02	-0.16	-1.60	-0.07	0.12	-0.51	-0.20
Elastase-like	-0.66	-0.90	-0.37	0.30	0.23	-0.45	-0.64	-0.78	-0.59
Cathepsin C	1.82	-0.34	0.32	2.38	0.49	1.11	2.49	0.0	-2.27
α-D-Glucosidase	-1.16	-2.63	-2.52	-1.03	-1.33	-1.93	0.0	0.0	1.79
α-D-Mannosidase	0.66	-0.12	0.18	-1.19	-0.71	-1.82	0.0	0.0	1.40
Glc-NH_2ase	-0.55	-2.66	-2.90	1.63	0.14	0.0	0.99	0.0	1.54
CPK	-0.42	-2.04	-0.95	-0.74	-0.30	-0.05	-1.19	-2.24	-11.47
Phosphatase	-3.98	-5.23	-5.28	-0.10	0.25	-0.08	-1.57	0.22	0.83
Esterase	-2.96	-3.14	-3.25	-1.57	-1.68	-1.19	0.95	0.48	0.81

表3には脾，肝，腎における酵素活性変化を示す。これらの表から少くとも3種のインヒビターによる酵素変化には何らかの類似性があることが推察される。そこでその類似性を表わすパラメータとして，順位相関係数（rs）を用いた。これらの表に示したt値は，コントロール群からの変化の程度を表わすものであるから，その変化の程度に順位をつけることによって，あるインヒビターによる酵素変化のパターンを示すことが出来よう。

こうして出来た順位表を，各インヒビター間で比較し，お互いの相関の程度を調べることは有用と考えられる。そのために順位相関系数（rs）を採用したものである。

表4には，rsの値を示してある。これに見るごとく，これら三者のインヒビターの効果には臓器によっては可成り類似性があり，その類似性はin vitroの阻害の特徴とは無関係であるように思われた。

考　　察

ロイペプチン，ベスタチン，フオルフェニシノールなどの低分子性インヒビターは，その in vitroの活性からは説明しがたい効果を，in vivoにおいて示した。これはインヒビターがある特定の酵素系の input－output バランスを変化させることによって，その他の巾広い酵素網に対してホメオスターシス機構を介して大きな影響を及ぼすことによると考えられる。従って，in vivoにおけるインヒビターの効果には，in vitroにおける如き直接作用ではなく，むしろ間接作用によるものが大きな役割を占めていると考えられる。in vitroにおける活性が一見無関係と思わ

Table 3. Enzymatic changes, expressed as t-values, in spleen, liver and kidney

Enzyme	t-value								
	Spleen			Liver			Kidney		
	Leup.	Besta.	Forph.	Leup.	Besta.	Forph.	Leup.	Besta.	Forph.
AP-A	-0.43	-1.61	-0.10	1.34	-0.10	0.91	-2.28	-1.70	0.28
AP-B	-0.58	1.62	-0.77	-1.64	1.04	-0.88	-1.20	2.49	-0.02
Pro-AP	1.45	1.79	2.03	-1.42	0.97	-0.29	-0.42	0.10	2.53
Leu-AP	0.71	2.32	3.35	-1.71	0.54	-1.91	-0.34	0.79	0.24
fMet-AP	0.48	-0.84	-0.75	-2.51	0.50	-0.10	-0.80	0.81	2.08
Phe-AP	2.25	1.49	15.11	0.23	-0.78	-0.71	0.09	0.43	0.26
Gly-Pro-Leu-AP	2.37	4.42	6.12	-1.05	0.12	0.75	1.67	0.0	1.96
Trypsin-like	-1.36	-1.76	-1.83	0.71	0.26	-0.75	-0.15	-0.59	-1.26
Chy-try-like	-0.54	-2.27	-1.48	-0.10	0.52	-0.93	-2.84	-1.13	-3.95
Elastase-like	-0.32	-0.74	-0.22	-1.00	1.31	2.15	-2.18	-0.62	-0.03
Cathepsin C	2.17	-0.69	-0.82	10.03	1.95	0.12	0.02	1.38	1.19
α-D-Glucosidase	-1.08	-0.93	-4.36	0.79	0.44	0.73	0.56	1.56	2.60
α-D-Mannosidase	-0.95	-1.39	-4.27	-0.45	0.35	-0.19	0.41	0.76	2.27
Glc-NH_2ase	-1.00	-0.91	-1.21	7.25	-0.53	0.46	4.04	5.24	1.42
Phosphatase	1.47	0.30	1.04	-1.74	-0.95	-1.13	-1.32	2.09	-1.78
Esterase	1.29	1.42	14.44	1.19	0.74	1.50	-1.63	1.55	0.28

Table 4.

Correlations Among Enzymatic Changes Induced by Low Molecular Weight Inhibitors in Various Organs

Organs	x	Leupeptin		Bestatin
	y	Bestatin	Forphenicinol	Forphenicinol
Muscle				
Forelimb		0.12	0.05	0.69**
Hindlimb		0.69**	0.55*	0.31
Heart		0.66**	0.22	0.43(*)
Spleen		0.71**	0.81***	0.75***
Liver		-0.04	0.49(*)	0.13
Kidney		0.37	0.59*	0.21

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

Spearman's rank correlations (r_s-values) were calculated by the equations below.

$$r_s = 1 - \frac{6\Sigma(Tix - Tiy)^2}{n^8 - n}, \quad n = 16, \quad i = 1,2,3.....16$$

れるロイペプチン，ベスタチン，フオルフェニシノールの三者間においても，その作用の類似性があることも，上記の見解を支持する事実と考えられる。

既に筋ジストロフィー症の治療において，ロイペプチンおよびベスタチンの有用性がStracher，松下らによって示されたが，[3,8,9] 本研究の結果から考えると，フオルフェニシノールも，治療薬として試用する事は難病の解決のために有意義と考えられる。

結　　論

各種の低分子性酵素阻害剤は，生体内において巾広い酵素網への影響を示し，ホメオスターシス機構の解明ならびに，各種疾病の治療への応用が期待される。

References

1) Aoyagi, T., Wada, T., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. (1981) *J. Clin. Invest.* 67, 51-59.
2) Wada, T., Kojima, F., Nagai, M., Aoyagi, T. and Umezawa, H. (1981) *J. Pharm. Dyn.* 4, 184-190.
3) Matsushita, H. (1980) in Study on the Clinical Applications of Secondary Metabolites from Microbes (Annual report of muscular dystrophy committee, supported by Ministry of Health and Welfare), 45-50. (In Japanese)
4) Aoyagi, T., Miyata, S., Nambo, M., Kojima, F., Matsuzaki, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1969) *J. Antibiot.* 22, 558-568.
5) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T. (1976) *J. Antibiot.* 29, 97-99.
6) Aoyagi, T., Yamamoto, T., Kojiri, K., Kojima, F., Hamada, M., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1978) *J. Antibiot.* 31, 244-246.
7) Aoyagi, T., Wada, T., Iwabuchi, M., Kojima, F., Nagai, M. and Umezawa, H. (1982), Biochemistry International in press.
8) Stracher, A., McGowan, E.B. and Shafiq, S.A. (1979) *Science* 200, 50-51.
9) McGowan, E.B., Shafiq, S.A. and Stracher, A. (1976) *Exp. Neurol.* 50, 649-657.

30 筋発生分化におけるプロテアーゼの役割

今 堀 和 友*
研究協力者 鈴 木 紘 一** 辻 崇 一**
中 村 愛*

はじめに

筋の発生や分化に筋蛋白質の代謝が非常に重要な役割を果していることはいうまでもない。すなわち，ミオシンのL鎖に代表されるように，発生分化に伴って蛋白質の現出，消失がみられるからである。蛋白質の合成の面は遺伝子発現として容易に解釈されるものの，筋蛋白質の分解に関しては従来何一つ解明されていなかったといっても過言ではあるまい。1つの説明としてリソソーム中のカテプシン類がその役割を果すとも考えられたが，巨大分子量の蛋白質が容易にリソソームにとり込まれるとも考えられず，また酸性に至適 pH をもつカテプシンは細胞質中で作用するとは考えられない。

われわれは細胞質中に存在し，中性に至適 pH をもつプロテアーゼを探索し，ついにカルシウムで活性化される中性プロテアーゼ（CANP）の完全精製に成功した。[1] しかしながら，この酵素は mM 程度の Ca^{2+} を必要とする（したがってm－CANP とよぶ）ので，生理的条件下で作用するとは考えられない。他方，最近μM程度の Ca^{2+} で活性化されるCANP（μ－CANPという）の存在が報告された。[2,3] われわれはm－CANPとμ－CANP との関係こそ CANP の生理学的意味を明らかにする上で重要と考え，その解明に着手した。本報告ではμ－CANP はm－CANPの自己消化で生じるものであることを示す結果を報告する。併せて，CANP 活性の制御に重要な役割を果す，内在性インヒビターについても報告する。

* 東京都老人総合研究所
** 東京大学医学部第二生化学教室

材料および方法

トリ，ウサギ骨格筋の CANP は既報の方法により調製した。[1,4] 酵素活性はアルカリ変性したカゼインを基質とし，30℃に保温（2.4 mg／ml カゼイン，30mM 2－メルカプトエタノールを含む0.1 Mグリセロリン酸緩衝液，pH 7.5）に希望する量の $CaCl_2$ および CANP を加え，20分反応させた後，10%トリクロル酢酸を加えて反応を停止した。30分後遠心し，上澄の 280 nm における吸光度を測定する。この条件で1時間にOD 1.0 増大する酵素量を1単位とした。

カゼインカラムは活性化したセファロース 4B（3 g）に12 g のα－カゼインを反応させ，未反応のカゼインを洗い流して得た。

実験結果

1. カゼインカラムによる CANP の変換[5]

上記カゼインセファロースをカラム（1.2 × 4.5 cm）に充填し，24mM $CaCl_2$ を含む20mM Tris 緩衝液 pH 7.5 で平衡化した後，m－CANP を吸着させた。同じ緩衝液でカラムを充分洗い，未吸着の蛋白質を除いた後，2mM EGTA を含む20 mM Tris 緩衝液で CANP を溶出した。図1には，カゼインセファロースカラムにかける前（○）と後（•）の CANP の活性の Ca^{2+} 依存性を示し

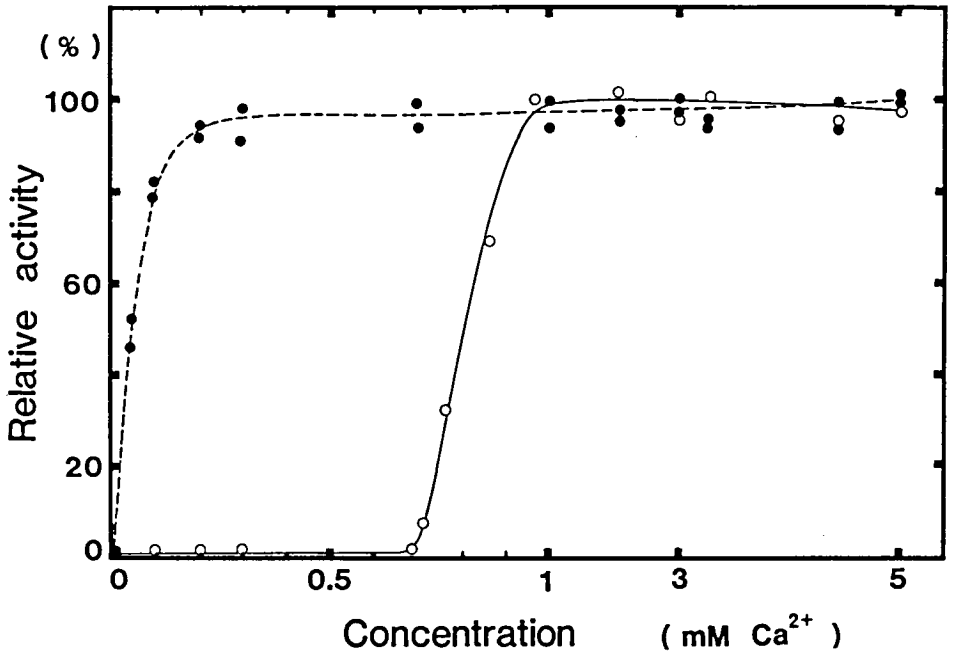


図1　m−CANP (○) と μ−CANP (•) とのカルシウム感受性

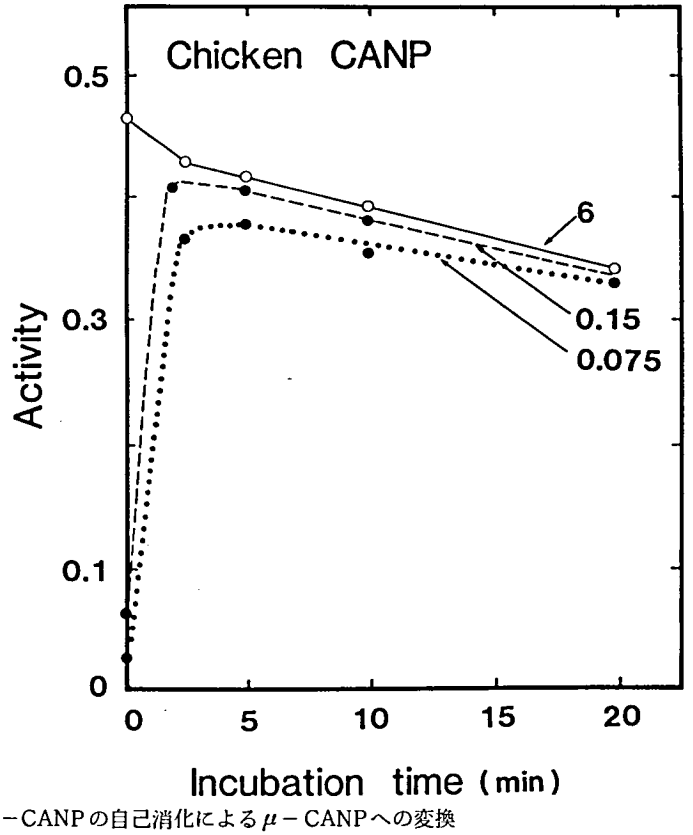


図2　m−CANPの自己消化によるμ−CANPへの変換
m−CANPを自己消化させ，横軸に示した時間後に一定量をとり出し，6mM（−○−）150 μM（−−•−−），75 μM（……•……）Ca^{2+} 存在下で活性を測定した。

てある。図から明らかな様にカラム以前のCANPのKa（最大活性の半値に活性化するに要する濃度）が0.8mM Ca^{2+}であるのに対し，カラム後のKaは30μMにまで下っている。カラム前後におけるCANPの総活性に差がないこと，カラムからの最初の流出部分にCANP活性が認められないことなどから，カラムを通すことにより，m－CANPからμ－CANPへの変換が起ったことが示唆される。ついでこの変換の実態を明らかにするために，m－CANPとμ－CANPとをSDSゲル電気泳動にかけた，m－CANPの分子量が82Kであるのに対し，μ－CANPの分子量は79Kに下っていた。このことはカラム中に存在するCa^{2+}イオンのため，m－CANPが限定的自己消化を起し，その結果μ－CANPが生じたことを示唆している。

2. 自己消化による変換[6,7]

m－CANPからμ－CANPへの変換が実際に自己消化によることを示すために，m－CANPの自己消化を試みた。自己消化は常温ではきわめて速く進行し失活するため，0℃で行った。結果を図2に示す，例えば75μM Ca^{2+}存在下での活性は自己消化開始と同時に急速に上昇し，3分で最大に達し，以降次第に減少する。一方，各時点での自己消化産物をSDSゲル電気泳動で解析した。3分後には82K（m－CANP）のバンドは消失し，代わりに79Kのバンドが現われるが，その後79Kのバンドは60Kのバンドとなり，ついには30－33Kのバンドになる。一方，これらの分子種をゲル濾過で分別してしらべてみると，79K，60Kはいづれも図1のμ－CANPと同じCa^{2+}感受性を示す。便宜上前者をμ－CANP Ⅰ，後者をμ－CANP Ⅱとよぶ，それに対し，30－33Kの分子種は全く不活性であった。また，m－CANPからμ－CANPへの変換反応のCa^{2+}依存性，pH依存性を調べたが，いづれもがm－CANP活性の依存性と一致した。以上のことから，μ－CANPはm－CANPの自己消化によることが明らかになった。また，m－CANP，μ－CANP Ⅰ，μ－CANP Ⅱは抗m－CANP抗体と交叉し，スパーを生じない。

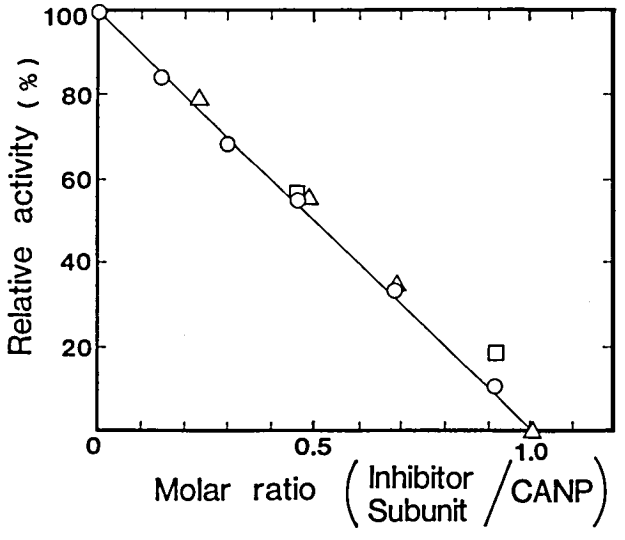


図3 内在性インヒビターによるCANPの阻害

他方，m−CANPにトリプシン，キモトリプシン，パパイン，ブロメライン，スブチリシン等のプロテアーゼを作用させて，そのμ−CANPへの変換を試みたが，いづれも成功しなかった。恐らく自己消化だけがm−CANPからμ−CANPへの変換に有効な方法といえるであろう。

3. 内在性インヒビター[8)]

筋の発生分化とプロテアーゼの関係を考えるとき，プロテアーゼ活性は必要に応じて発現され，抑制されるよう制御されていなければならない。その1つは上記のm−CANPからμ−CANPへの変換であり，今1つはインヒビターによる阻害である。われわれは筋組織より内在性インヒビターの精製を試みこれに成功した。方法は筋の粗抽土液をpH 4.9にしてCANPを沈澱し，その上澄にTCAを加えて蛋白を沈澱する。これを，DEAEセルロース，QAEセファデックス，クロマトフォーカシング，フェニルセファロースにかけることにより行った。得られた内在性インヒビターは，分子量7万の蛋白質で，3.5万のサブユニット2個よりなるダイマーである。インヒビターとCANPのモル比を種々変え，CANPの残存活性を測定すると，図3の様な結果が得られる。すなわち，インヒビターのサブユニット1つ当り，1分子のCANPが固く結合することにより，後者の活性を阻害するものである。なおこのインヒビターはm−CANP，μ−CANPの両方を同じ機構で阻害したが，いづれの場合にも，CANP活性発現に必要なCa^{2+}が存在しない限り複合体は形成されなかった。このインヒビターの阻害はCANPに特異的で，調べた限り他のどのプロテアーゼも阻害しなかったが，CANPに関してはどの生物種より得られたものも阻害した。

考　　察

筋の発生分化に関連するプロテアーゼの役割としては，単に筋蛋白質の消化に限らず，プロテインキナーゼの活性化等重要なものも含まれていると考えられる。しかし従来注目されていたm−CANPは非生理学的に高濃度のCa^{2+}を要求し，その生理的意義は疑問視されていた。今回のわれわれの研究よりすれば，m−CANPはμ−CANPの前駆体とも考えられ，必要に応じてこの変換が起り，μ−CANPが生理的役割を果すと考えられる。この変換をもたらすものは，瞬間的，あるいは局所的なCa^{2+}の細胞内への流入であろうが，この流入を制御する信号は何なのかは今後の問題として残されている。

m−CANPからμ−CANPへの変換について興味深いのは，カゼインカラムではμ−CANP Ⅰにのみ変換されるのに，自己消化ではμ−CANP Ⅱから次第に30Kにまで分解されてゆくことである。両者の差は基質の存在，非存在にある。細胞内のように基質が存在する条件下では，μ−CANP Ⅰで止まる可能性が大きい。

一方，不測のCa^{2+}の大量流入やμ−CANPへの変換に備えて，細胞はインヒビターを有するのであろう。従ってインヒビターが細胞内に局在するのかどうか，分化発生に伴ないどの様に消長するのかは興味ある問題であるが，これも今後にまつことにする。

文　　献

1) Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K. and Imahori, K.: Studies of a calcium activated neutral protease I. Purification and characterization. *J. Biochem.* 84: 225 (1978)
2) Mellgren, R.L.: Caine cardiac calcium-dependent protease. *FEBS Letters* 109: 129 (1980)
3) Kishimoto, A., Kajikawa, N., Tabuchi, H., Shiota, M., and Nishizuka, Y.: Calcium dependent neutral protease, widespread occurance of a species of protease active at lower concentration of calcium. *J. Biochem.* 90: 889 (1981).
4) Tsuji, S. and Imahori, K.: Studies on Ca^{2+} activated neutral protease of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* 90: 233 (1981).
5) Kubota, S., Suzuki, K. and Imahori, K.: A new method for the preparation of a calcium activated neutral protease highly sensitive to calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 100: 1189 (1981)
6) Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. and Imahori, K.: Limited autolysis of Ca^{2+}-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to

Ca^{2+} ions. *J. Biochem.* 90: 275 (1981)
7) Takahashi-Nakamura, M., Tsuji, S., and Imahori, K.: Purification and characterization of an inhibitor of calcium-activated neutral protease from rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* 90: 1583 (1981).

31　Ca依存性プロテアーゼの生体内での作用

杉田秀夫[*,**]
研究協力者　石浦章一[**]　三川　隆[***]
花田和紀[**]　埜中征哉[**]

ラット骨格筋を用い，細胞内のCa依存性プロテアーゼ（CANP）の作用を検討した。

1）ラット骨格筋のCANPの精製

ラット下肢筋300gよりCANPを精製した（表1）。精製標品は分子量73.000の単一ポリペプチドで，免疫的にニワトリ骨格筋の酵素と交叉することが免疫レプリカ法で明らかになった。この事実は，異種の酵素が同一な抗原決定部位を保持していることを示しており本酵素の生体内における重要性が示唆される。

ラット筋酵素は本質的に他種（ニワトリ，ヒト，ウサギ）と同じであるが，分子量のみが少々異なっているのみである。Caに対する要求性はKaが0.5mMと高いのも同様である。最近Suzukiらによって報告された自己消化によるCa感受性の変化はラット筋酵素でも見られた。

2）ラット臓器中のCANPの比較

現在ラットの種々の臓器にCANPが存在しているという報告があり，その確認が急がれているが，そのすべての報告が「Ca依存性にカゼインを水解する活性が臓器ホモジネート中に存在する」というのみで，それがCANPによるものなのか，他に何種かのCa依存性のプロテアーゼが存在するのか，またそれらはすべて混在する血球中のCANPによるものなのか，などが議論の対象になっていた。我々は，ニワトリCANPに対する抗体がラット酵素と交叉することを利用してその確認を行った。

まず，ラットから種々の臓器をとり出し，生食で洗滌した後，1mM EDTAを含むPBS中でホモジナイズし，遠心後その可溶性画分をとり出した。別に血清は分離しておいた。次に，同タンパク量をSDS電気泳動し免疫レプリカに供した。図1はその結果である。各臓器の可溶性画分に分子量73.000の免疫的に同一のバンドが見える。これはニワトリCANPの抗体と交叉する分子がラットの各臓器にただ1種存在し，しかも血清中にはないことを示している。また，ニワトリCANPの自己消化産物（分子量がCANPよりも数千小さいもの）に相当するものが見えないのも特徴である。現在，ELISAによる定量を検討中である。

3）生体中におけるCANPの作用の定量とその阻止についての試み。

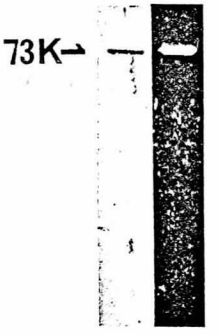
In vivoにおけるプロテアーゼ作用の検出には数多くの方法が考案されているが，それらについて二，三検討してみた。まず第1は，臓器中のプロテアーゼ活性を測定するという方法である。しかしこの方法の一番の弱点は，どのプロテアーゼがIn vivoでどのような働きをしているかについては全く情報を与えてくれない点である。しかしながら，インヒビター投与の効果は，そのホモジネート中の活性の低下で観測されるわけであるから一便法だといえるが，それとてホモジナイズの時点でインヒビターを含む血清が混入したのではないかという考え方も成り立つ。次の問題は，

* 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研究第一部
*** 東京大学医学部薬理学教室
**** 大正製薬株式会社総合研究所

表1

Purification of rat muscle CANP (300g)

	Protein (mg)	Total Act. (Units)	Sp.Act. (Units/mg)
Tissue Extract	13,500	N.D.	N.D.
DEAE-cellulose	340	1,536	4.5
Ultrogel	11.5	1,386	122
Hydroxyapatite	5.0	1,290	258



SDS電気泳動図，左はCBB染色，右はその免疫レプリカ像。

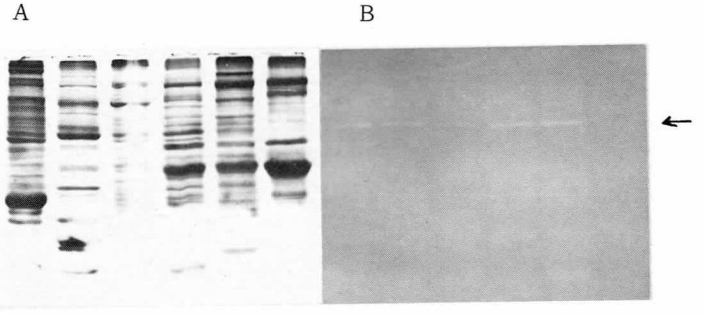


図1　AはSDS－電気泳動，Bはその免疫レプリカ。左より悩，骨格筋，肝臓，心筋，胃壁筋，及び血清。免疫レプリカ像で分子量73.000単一バンドが見える（矢印）。しかし血清にはない。

粗抽出液の活性が低い場合で，CANPの場合は特に効率の良い人工基質がないこと，また可溶性分画では内因性のインヒビターと複合体を形成しているため，インヒビターを分離する従来の方法では生体内で作用している量は測定不可能である。そこで第2の方法としてCANPの作用した証拠，つまり分解産物を検出すれば良いのであるが，これは困難である。ゆえに，生体内におけるCANPの作用を推定するためには，組織をこわさずに見るということが第1条件であり，しかもその作用がCANP特異的と言えなければならない。そこで，我々は，組織（ラットSoleus）をKrebs－Ringer液中でインキュベートすることによりその細胞内の状態を生きているままに保ち，かつその後，細胞内にCaを導入して起こる基質側の変化（形態変化）を確認した後にそれを定量化するという試みを行った。まずCaイオノフォアであるA23187を用いて細胞内Ca濃度を高めると，特異的にZ線の消失が見られた。これはCANPのin vitroの作用と同じであるので，細胞内でCANPが働いた結果だと解釈できる。そこでZ線の構成成分のα－アクチニンの消失の割合を定量することによりin vivoにおけるCANPの活性とした。

表2にその結果をまとめた。コントロールとしてはCaを含まないもの（+0.1mM EGTA）をとり，3時間後の外液に流出したα－アクチニンを定量したものである。Caがないとき，非特異

表2

The release of α-actinin from intact rat soleus muscle

Experiments	Additions	Released α-actinin (μg/3h)
Control	EGTA	9.1 ± 2.0 (n=5)
	$CaCl_2$	55.3 ± 5.2 (n=5)
	$CaCl_2$ + E-64-c	33.1 ± 7.4 (n=5)
E-64-c injected	EGTA	12.1 ± 3.2 (n=5)
	$CaCl_2$	56.1 ± 5.5 (n=5)

(Mean ± S.D.)

100mgのSoleus筋をKrebs-Ringer液中で3時間インキュベートした。A23187（25μg/ml）はすべてに含まれている。外液のα－アクチニン量は，SDS電気泳動法で定量した。

的な壊死による流出が9.1μgと少々見られたが，Caの共存下（1mM）では55.3μgと5倍になった（P<0.001）。外液にCaの他CANPの阻害剤であるE－64－Cを30μM入れておくと，α－アクチニンの遊離が40%阻止された。

次に，ラットに前もってE－64－Cを10mg/kg投与し，24時間後Soleusをとり出して同実験を行ったところ，表2に見られるごとくCaによるZ線の遊離は56.1μgと非投与のものと，かわらなかった。〔^{3}H〕E－64－cを使った実験によって24時間後には〔^{3}H〕E－64－cは0.23μg/gしか残存していないことが判明し，CANPに対するKi＝1.7μMよりに低いことから，1回投与においては生体内のCANPを抑えるだけの量が骨格筋には到達していないことがわかった。

本実験において，生体内のCa依存性プロテアーゼの作用を抑制するためには阻害剤の連続投与，または大量投与が必要であることが明らかになった。しかしながら，全臓器に存在する本酵素への影響や，その副作用を考慮に入れつつ実験を行わねばならない。

文　献

1) S. Ishiura, K. Hanada, M. Tamai, K. Kashiwagi & H. Sugita: The effect of an in vivo-injected thiol protease inhibitor, E-64-c, on the calcium induced degeneration of myofilaments. *J. Biochem.* 90, 1567-1570 (1981)
2) S. Ishiura, I. Nonaka & H. Sugita: Suppression of calcium-induced removal of the Z-lines by a thiol-protease inhibitor, E-64-c. *J. Biochem.* 90, 283-285 (1981).

「筋の発生と分化に関する基礎的研究」班分担研究者一覧

	氏名	所属	住所
班長	江橋　節郎	東京大学医学部第一薬理学教室	113 東京都文京区本郷7－3－1 03(812)2111
幹事	今堀　和友	東京都老人総合研究所	173 東京都板橋区栄町35－2 03(964)1131
	勝沼　信彦	徳島大学医学部酵素研究施設	770 徳島市蔵本町3－18－15 0886(31)3111
	野々村禎昭	東京大学医学部第二薬理学教室	113 東京都文京区本郷7－3－1 03(812)2111
運営幹事	小沢鐵二郎	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)5111
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追分町 075(751)2111
	岡田　善雄	大阪大学微生物病研究所	565 大阪府吹田市山田丘3－1 06(877)5121
	香川　務	国立療養所刀根山病院	560 豊中市刀根山5－1－1 06(853)2001
	加濃　正明	北里大学医学部生理学教室	228 相模原市北里1－15－1 0427(78)8111
	栗山　熙	九州大学医学部薬理学教室	812 福岡市東区馬出3－1－1 092(641)1151
	酒井　敏夫	東京慈恵会医科大学生理学教室	105 東京都港区西新橋3－25－8 03(433)1111
	嶋田　裕	千葉大学医学部解剖学教室	280 千葉市亥鼻1－8－1 0472(22)7171
	杉田　秀夫	東京大学医学部脳研神経内科 神経センター疾病研究第一部 国立武蔵療養所	187 東京都文京区本郷7－3－1 03(815)5411
	杉山　博之	岡崎国立共同研究機構生理学研究所 細胞器官研究系	444 愛知県岡崎市明大寺町西郷中38 0564(52)9770

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