

厚生省神経疾患研究委託費

筋ジストロフィー症解明のための
遺伝子発現の基礎的研究

野々村班

昭和59年度研究報告書

昭和60年3月

緒 言

班 長 野々村 禎 昭

総 論

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

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

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

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

第1のグループは生理学的な手法を用いて筋の分化の問題にせまる。

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

第2のグループは主として生化学的手法で筋構造蛋白質の分化の問題にせまる。

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

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

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

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

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

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

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

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

本年度の研究の概要

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

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

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

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

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

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

ロフィーの異常遺伝子発現を明らかにすることに焦点が合わさってきている。

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

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

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

目 次

緒 言

野々村 禎 昭

I 細胞生理とその分化

1. 筋小胞体の機能, とくに Ca による Ca 遊離機構の臓器差 3
遠 藤 実
2. 筋に対する神経の trophic 効果 10
長谷川 修 司
3. 筋発生異常における神経側の要因 16
大 塚 正 徳

II 筋構造蛋白質とその分化

4. ジストロフィー鶏胸筋に存在する特異蛋白質(30K蛋白質)について 23
小 林 良 二
5. ニワトリ骨格筋におけるミオシンとC蛋白質アイソフォーム
発現に及ぼす除神経支配の影響 32
大日方 昂
6. ニワトリ正常遅筋とジストロフィー速筋にみられた筋細胞増殖因子 39
松 田 良 一
7. 骨格筋の弾性タンパク質コネクチン 44
丸 山 工 作
8. 胚筋, 再生筋および除神経筋におけるトロポニン — T 48
嶋 田 裕

III 細胞生物学・細胞工学的研究

| | |
|---|----|
| 9. ジストロフィー筋病態と細胞骨格 | 55 |
| 石川 春 律 | |
| 10. 筋変性モデルに関する一考察 | 59 |
| 小 沢 鎧二郎 | |
| 11. リソゾームチオールプロテアーゼとその内在性インヒビターの組織分布 | 63 |
| 勝 沼 信 彦 | |
| 12. カルシウム依存性プロテアーゼの構造, 機能 ならびに活性に関する研究 | 67 |
| 鈴 木 紘 一 | |
| 13. 細胞の増殖と分化に関する細胞遺伝学的研究 | 70 |
| 清 水 信 義 | |

IV 遺伝子発現とその研究方法

| | |
|--|----|
| 14. モノクローナル抗体を用いた筋ジストロフィー鶏筋膜と 正常鶏筋膜の抗原性の差異の解析 | 77 |
| 黒 田 洋一郎 | |
| 15. 疾患モデル動物の研究における胚操作法の応用 | 81 |
| 勝 木 元 也 | |
| 16. 筋ジストロフィー症遺伝子発現の標識 | 84 |
| 香 川 務 | |
| 17. 筋ジストロフィー症における筋分化のおくれと遺伝子調節機構 | 87 |
| 真 崎 知 生 | |

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

V 遺 伝 子 解 析

19. クリスタリン遺伝子の組織特異的発現機構の解析 99
岡 田 節 人
20. 膜結合タンパク質のcDNA及び遺伝子DNAクローニング 103
藤 井 義 明
21. ヒト染色体の分離と染色体特異的遺伝子ライブラリーの作製 107
渡 辺 武
22. 筋ジストロフィー症の筋組織における遺伝子発現の解析 110
奥 田 拓 道

I 細胞生理とその分化

1. 筋小胞体の機能, とくにCaによるCa遊離機構の臓器差 3
2. 筋に対する神経の trophic 効果 10
3. 筋発生異常における神経側の要因 16

1 筋小胞体の機能，とくにCaによる Ca遊離機構の臓器差

遠藤 實*

研究協力者 大島 宜子 堀内 桂輔 飯野 正光

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

実験方法

材料は主としてモルモットの筋を用いたが比較のためにアフリカツメガエル骨格筋やヒト骨格筋生検標本なども用いた。モルモットの骨格筋は長趾伸筋から単一筋線維を、また心筋は心室乳頭筋を細くして直径約100 μ m束をいずれも弛緩液中で取り出し、50 μ g/mlのサポニンで約30分間処理し、skinned fiberとして用いた^{4,5)}。線維または線維束の両端は絹糸でしばり、2本の金属のフックにそれぞれ固定した。一方のフックはストレーン・ゲージ(エイカース AE80)に接続して、等尺性張力を測定し、ペン・レコーダー上に記録した。標本を浸した溶液は図1のように、免疫反応の検出などに用いるプラスチックの板にあいた穴の中に入れてあるが、液面が少し盛り上がるようにしてあるので必要な時に板を水平に移動すると、速やかに液交換ができる。温度はプラスチックの板の直下を20 $^{\circ}$ Cの水で灌流し一定に保った。CaによるCa遊離の実験は既に報告した通り⁶⁾ 図2のような手順で行った。あらかじめ標本中の小胞体から後述の方法でCaを全部放出させてから実験を始める。まず、標本を一定濃度のCa²⁺を含む液中に一定時間浸し、(通常 2×10^{-7} M Ca²⁺, 2分間)一定量のCaをCaポンプATPaseの作用により小胞体中に取り込ませる。次にその小胞体に種々の濃度のCa²⁺を種々の時間適用してCaによるCa遊離を起こさせるのであるが、この時同時にCaポンプが働くとCa遊離と並行してCa取り込みも起こってしまうので、純粋にCa遊離だけを観察するために、まずMg

* 東京大学医学部・薬理学第二講座

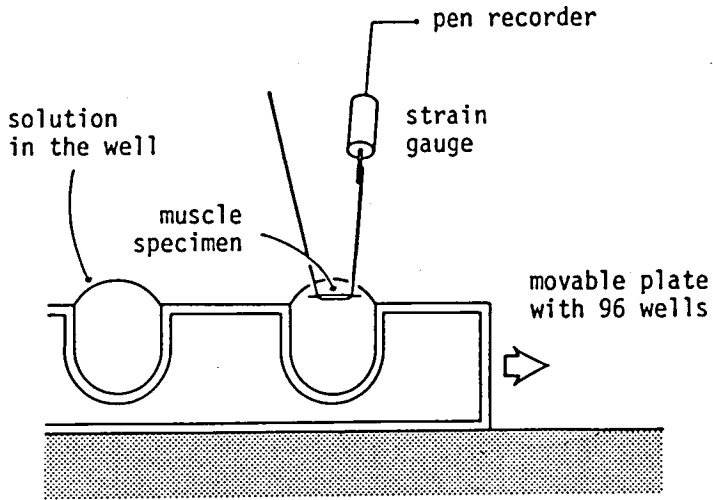


図1. 実験装置概要の模式図。

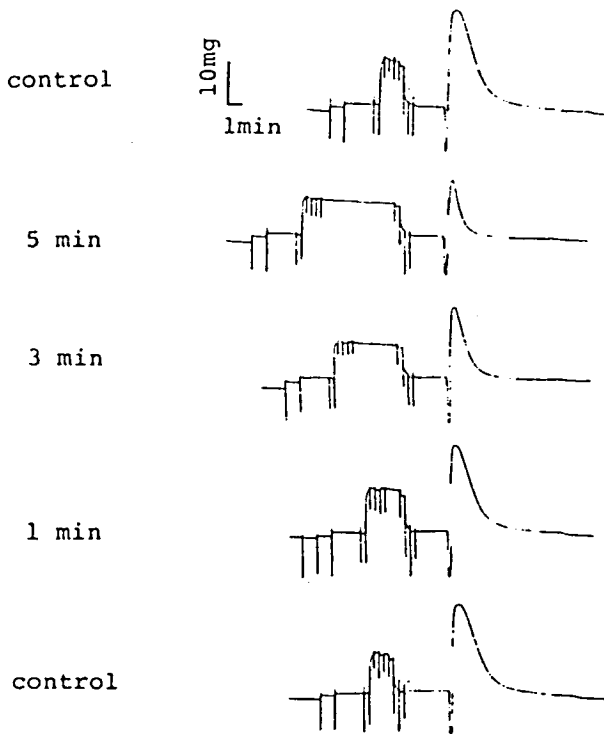


図2. CaによるCa遊離速度測定の実験手順。説明本文。

ATPを完全に除去してCaポンプを働かなくしてから Ca^{2+} を適用する。Mg ATPが十分に減少すると、筋の収縮蛋白系はいわゆる硬直状態に陥るので、張力発生によってそれを知ることができる。

この処理のあと Ca^{2+} を十分洗い流してから、小胞体中に残っているCa量を測定する。この測定には30~50mMの高濃度カフェインを適用すると小胞体中のCaがほとんど全量一気に放出される事

実を利用する。放出された Ca は結局は標本の外へ拡散して薄まってしまうが、その途中で標本の収縮蛋白系を刺激するので標本は一過性に張力を発生する。この一過性のカフェイン収縮の大きさ

(張力曲線下の面積) から放出された Ca 量、すなわち、カフェイン適用時に小胞体中に存在した Ca 量を推定した。最初に取り込ませる Ca 量を一定にしてあるので残っている Ca 量がすくなくれば

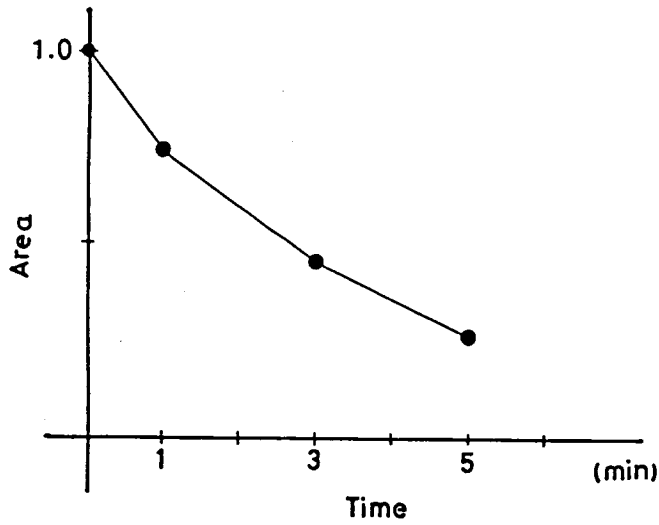


図3. モルモット骨格筋小胞体の Ca による Ca 遊離の時間経過。説明本文。図2と同じ実験。

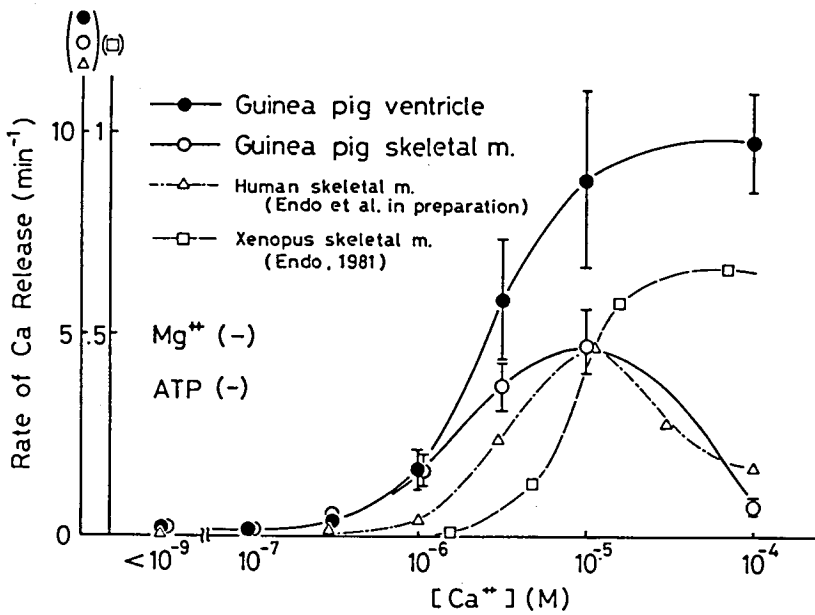


図4. 種々の筋肉から作ったskinned fiberの小胞体のCaによるCa遊離速度の Ca^{2+} 濃度依存性。

すくないほど多量のCaが遊離したのだということが分る。

標準弛緩液はPIPES 20mM, Mg^{2+} 1.5mM, Mg ATP 3.5mM, EGTA 2mM, を含み, pH 7.0でイオン強度 0.20Mとなるようメンタンスルホン酸および K^+ (KOH)を加えた。遊離 Ca^{2+} 濃度はHarafuji & Ogawa⁷⁾によるCa-EGTAの見かけの結合定数を用いて計算した。

結 果

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

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

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

性を検討しなければならない。

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

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

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

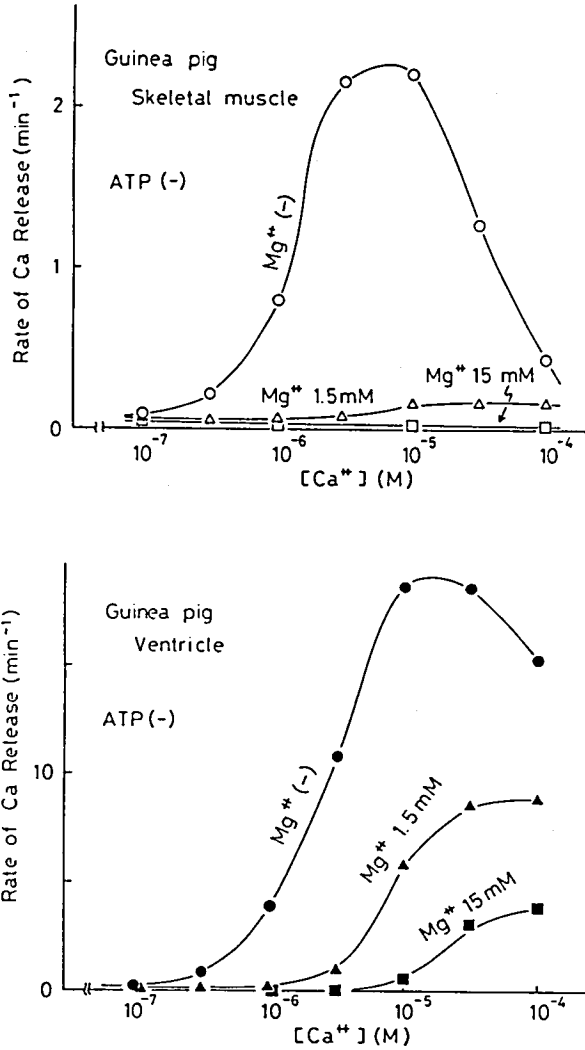


図5. モルモット骨格筋および心筋小胞体のCaによるCa遊離に対するMg²⁺の抑制作用。

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

考 察

skinned fiberを用いて筋小胞体のCaによるCa遊離機構を骨格筋(速筋)と心筋とで比較した。ヒト骨格筋においては速筋と遅筋でCaによるCa遊離機構の性質にほとんど差がないので⁶⁾、もしモ

ルモット骨格筋でもその点が同様であるとすれば、本実験は骨格筋一般と心筋との比較と考えてよいことになる。

心筋小胞体のCaによるCa遊離は、その大まかなCa感受性、Mg²⁺およびプロカインによる抑制、ATPないしそのアナログ並びにカフェインによる促進など定性的には骨格筋小胞体のそれと全く同じであった。しかし、定量的には、要約すると次の二点に心筋と骨格筋とで差異が見られた。(1)Caによる最大Ca遊離速度は心筋の方が骨格筋

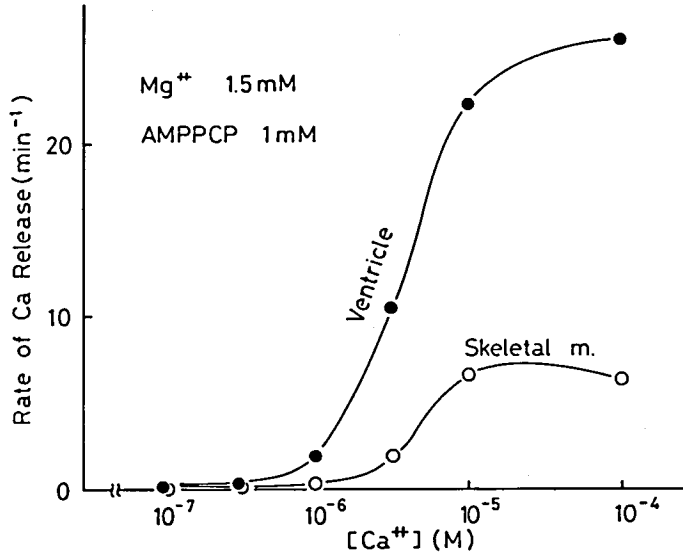


図6. モルモット骨格筋および心筋小胞体の生理的条件下 (Mg^{2+} 濃度, アデニンヌクレオチド濃度に関して)におけるCaによるCa遊離。

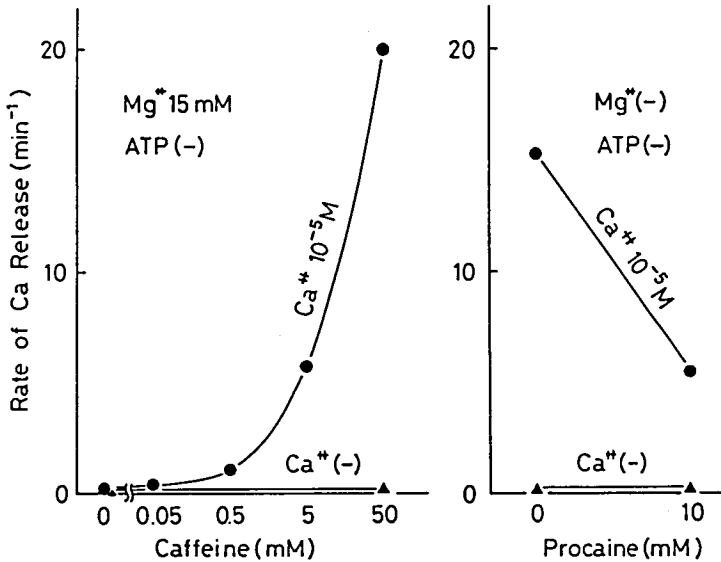


図7. モルモット心筋小胞体のCaによるCa遊離機構に対するカフェインの促進作用とプロカインの抑制作用。

より大きい。(2) Ca^{2+} 濃度を十分に上げるとCa遊離速度がむしろ減少するが、その減少は骨格筋で強く心筋で弱い。また、 Mg^{2+} による最大Ca遊離速度の減少も骨格筋で強く心筋では比較的弱い。これらの2価イオンの抑制作用の機序は、もちろ

んまだよく分っていないが、一つの考えとしてCaによるCa遊離は Ca^{2+} によって小胞体膜に存在する Ca^{2+} イオンチャンネルのゲートが開く結果であり、2価イオンはその Ca^{2+} イオンチャンネルを閉塞する、という可能性が考えられている。もし、

そのように考えるなら、上記の(1), (2)の骨格筋と心筋の定量的差異は、いずれもCa²⁺イオンチャンネルが心筋で大きいとすれば最大Ca遊離速度も大きく、また2価イオンで閉塞され難い、と説明することができる。しかし、もちろん他にも種々の説明があり得よう。いずれにしても上記の骨格筋と心筋間の定量的な差異は、CaによるCa遊離に關与する(恐らくは)小胞体膜蛋白質に差のあることを示している。CaによるCa遊離機構の生理的意義はまだ明らかでないが、この小胞体“膜蛋白質”の臓器差は蛋白レベルではどこにあるか、発生過程でその分化はどのように進むか、他のたとえば収縮蛋白質の分化とどのような位相的関連を有するか、それらの遺伝子発現機構はどのように制御されているか、などが今後の目指すべき方向である。

文 献

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

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

長谷川 修 司*

研究協力者 黒 見 担*

はじめに

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

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

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

実験方法

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

* 千葉大学医学部脳機能研究施設 神経薬理研究部

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

結 果

3-1 神経・筋接合部での AChR cluster の形成

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

3-2 神経・筋接合部での AChR cluster の形成速度

神経・筋接合部での AChR cluster の形成される速さを決定するため、15個の AChR cluster を選び、その面積を経時的に測定した (例えば、

図1 b-e, 4 の矢印, 図1 b-c, 5, 6 の矢印)。神経・筋接合部での AChR cluster 形成の平均速度は個々の cluster で異なり、 $0.1 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ 以下から $2.3 \mu\text{m}^2/\text{hr}$ であった (mean 値は $0.7 \mu\text{m}^2/\text{hr}$; $N=21$) (表-1)

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

3-4 除神経後の AChR 分布の変化

神経・筋接合部での AChR cluster 形成に対する神経の役割をさらに明らかにするため、除神経後の AChR の分布をしらべた。除神経はレーザー光線を神経細胞体に照射して行った。図2に示されている如く、除神経後、神経・筋接合部での大きな AChR cluster は小さい cluster に分解し (図2, B, C 3, 4, 5 の矢印, 図2 C, D 6 の矢印)、消失した。また大きさが小さくなり消失した (図2 B-E, 7, 8, 9 の矢印, 図2 B, C, 1, 2 の矢印)。除神経後、神経・筋接合部の外に、AChR の cluster が出現することもあった (図2, D, E 11 の矢印, 図2, D 10 の矢印)。

3-5 培養日数の異った神経・筋接合部での AChR cluster の消失

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

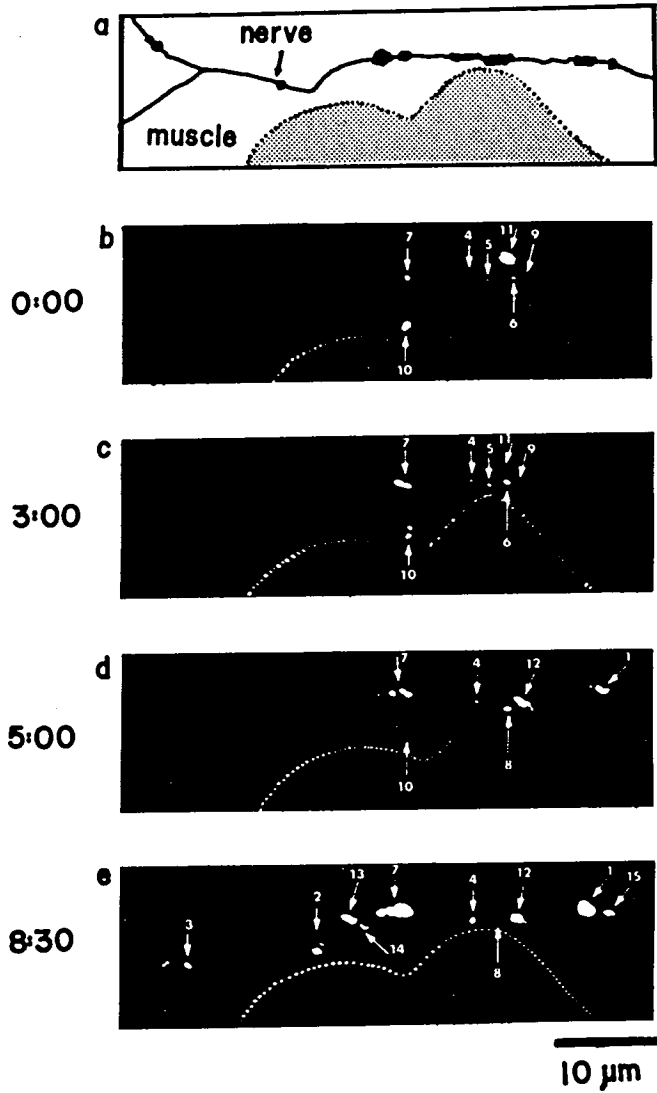


図1 神経・筋接合部でのAChR clusterの出現, a; 神経・筋細胞の図式(0:00時), b-e; 蛍光顕微鏡写真(白いところがAChR cluster, 黒い部分はAChRがdiffuseに分布している)。カッコ内は比較的(時:分)。(6)

表1 神経・筋接合部でのAChR clusterの形成速度

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

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

表2 AChRの拡散

| 培養数 | 拡散定数 ($10^{-10} \text{ cm}^2/\text{sec}$) | 回復値 (%) |
|-----------|--|----------------|
| 筋細胞のみ | 2.37 ± 0.07 | 68.2 ± 5.5 |
| 神経支配をうけた筋 | 2.50 ± 0.35 | 61.1 ± 6.4 |

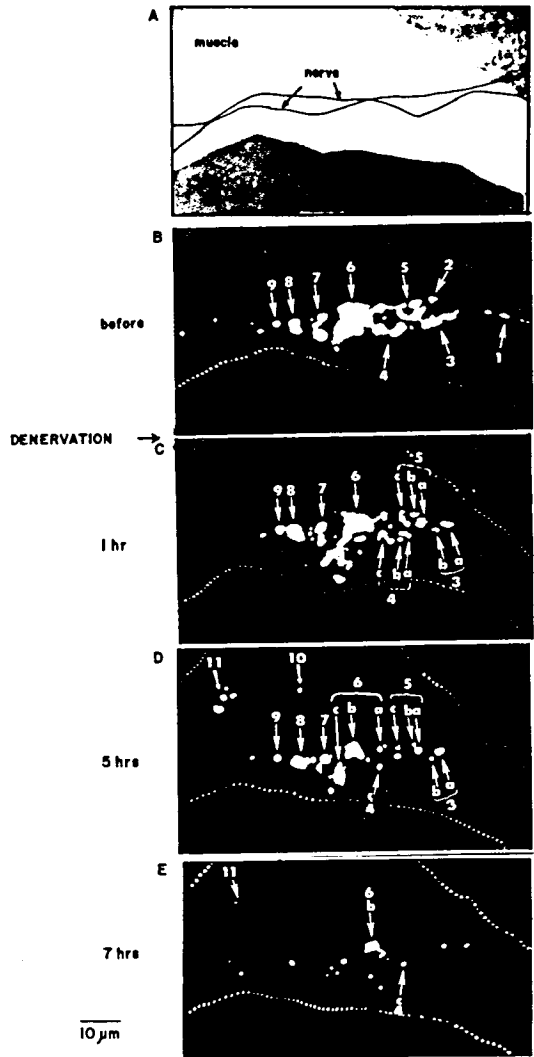


図2 除神経後のAChR clusterの変化⁽⁵⁾

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

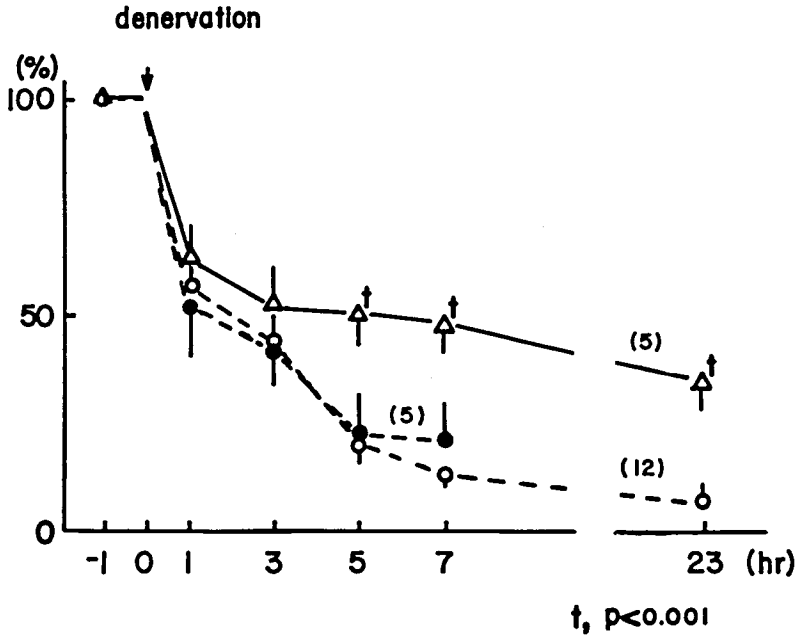


図3 除神経後のAChR cluster 消失の時間経過・縦軸；除神経前の神経・筋接合部でのAChR cluster の面積を100としてある。横軸；除神経後の時間。神経と3日共培養した4日培養筋（—△—）。神経と1日共培養した4日培養筋（---○---），2日培養筋（---●---）⁽⁵⁾

考察と結論

神経・筋接合部にAChR分子が高密度(cluster)で分布する機構としては、一時期、神経が筋のAChR clusterを捜し、そこに接合部を形成するためであるとされていた。現在は、神経は筋の適当な場所に接合部を形成し、その後その接合部にAChR clusterが形成されるという説明が受け入れられている。今回の実験で示されたように、経時的にAChRの分布をしらべてみると、接合部でのAChRは、それまでまったくclusterがみられなかったところでも、clusterが出現してきた。このことは、神経・筋接合部でのAChR clusterは神経がもったAChR clusterに一致したためではなく、接合部形成後に形成されたのであるという上の説をはっきりと支持する。神経・筋接合部が形成された後、そこにAChR

clusterが形成される機構として現在2つの説が提出されている。(1)接合外のAChR clusterが接合部に移動してくる。(2)diffuseに分布しているAChR分子は自由に拡散しているので、接合部に会うとそこでtrapされる。(2)の説を排除する強い理由として、AChR分子の拡散の速さが遅すぎて、実際にみられる接合部でのcluster形成の速さを説明できないというものであった。しかし、今回、AChR分子の拡散の速さをFluorescence Photobleaching Recovery法で測定し、それによるAChR clusterの形成速度を計算した(表1の理論値)。一方、経時的に観察したAChR clusterの面積から、実際のAChR clusterの形成の速さを計算した(表1の蓄積速度)。その結果、これまで想像された結果と反対に、AChR clusterの形成速度は、AChR

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

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

文 献

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

3 筋発生異常における神経側の要因

大塚 正徳*

研究協力者 弘中 哲治** 五十里 良生**

我々は筋ジストロフィー症の発症の原因を究明する目的で、正常チキン (line 412) およびジストロフィーチキン (line 413) の長橈側手根伸 (ECRL) 筋を用いて実験を行ってきた。ECRL筋の交換移植の実験から、筋の発生・成長において筋外性の要因、とくに神経原性の要因、が重要であることを示す結果が得られた。¹⁾ 一方、ECRL筋の生理学的および解剖学的性質の経時変化を調べた実験から、孵化後初期 (~13日) にみられる筋線維数の増加がジストロフィーチキンで著しく抑制されていることが分かった。²⁾

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

我々はこれまでに、ジストロフィーチキンの中

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

方 法

孵化後1~13日目の正常チキン (line 412) とジストロフィーチキン (line 413) を用いた。Phenobarbital (20, 30mg/kg) およびpentylene tetrazol (20mg/kg) を毎日1回、前者は就寝前 (夕方6時頃)、後者は朝 (10時頃) 腹腔内に投与した。13日目にエーテル麻酔下にECRL筋を摘出し、ホルマリンで固定した後、近位端から1/3の所で横断切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。染色標本を適当な大きさに拡大して写真を撮り、サンプリング法により筋線維数を計測した。^{1), 2)}

結 果

薬物がヒヨコの動態に与える急性効果：

Phenobarbital 20~30mg/kg 投与後ヒヨコの動きが少なくなり“眠い”様子を示したが、刺激に

* 東京医科歯科大学医学部薬理学教室

** 帝京大学医学部薬理学教室 (研究協力者)

