

6) ジストロフィーチキンの発生過程における 蛋白合成能の変化

眞崎 知生^{*,**}

研究協力者 吉川 昭^{**} 原田 記子^{**}
篠崎 温彦^{**}

はじめに

ヒトの進行性筋萎縮症の病因解明の研究の目的でジストロフィーチキンを用いることはいくつかの点で有利である。その理由のひとつは材料である筋を比較的少量に得やすいこと、またニワトリ骨格筋の性質がウサギのそれとよく似ており、したがってよく研究されており、また発生過程における筋の変化についても従来の正常ニワトリにおける多くのデータがそのまま参考になる点である。

筋の蛋白代謝の問題は、筋収縮機構の問題と共にきわめて重要な問題である。しかし後者の問題に関してここ十数年来めざましい発展があったのに反して前者の問題に関してはまだほとんどわかっていないといってよい。特に筋萎縮の問題を考えると筋蛋白代謝の問題は重要である。また最近筋ジストロフィー症における筋蛋白分解酵素の問題が話題になっているが、我々は筋蛋白合成能に問題があるかどうかについて検討した。従来までにジストロフィーチキンの筋蛋白合成能の問題について論じた論文はいくつかある。いずれも蛋白合成能が多少高いようなデータが出されているが明確な結論は得られておらず、ま

た用いた実験系が不完全であるように思われる。

方法および結果

13日目ニワトリ胚胸筋を 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.25M KCl, 5 mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl (pH7.4) (A溶液) 溶液中で Daunce 型ホモジェナイザーで 5 回破碎する。これを 10,000g 10 分間遠心し、その上

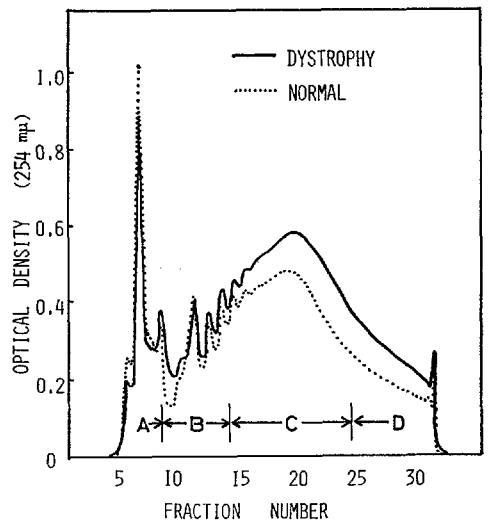


図1 正常 (.....) およびジストロフィー鶏13日目胚胸筋よりとった polyribosome の連続蔗糖密度勾配 (本文参照)

* 筑波大学基礎医学系
** 東京都臨床研

清を 0.25M KCl, 5 mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl(pH7.4)を含む 2 M, 0.5M蔗糖の不連続密度勾配の上層に重ね、ベックマン超遠心機, 45Ti ローターを用い45,000 rpm 6時間遠心する。沈澱をA溶液で溶かしA溶液を含む15~40%の蔗糖連続密度勾配上にのせてSW 27.1ローターで27,000 rpm 2時間遠心しその分画パターンを比較すると、ジストロフィーは正常なものにくらべ蛋白合成能が多少高いがそれほど大差ないことがわかる。

(図1)

またこの正常およびジストロフィー鶏18日目胚のポリゾームをそれぞれ遠心によって集めこれに同じ正常18日目胚より調製した100,000g上清および親の正常鶏より調製したtRNAを130mM KCl, 2 mM ATP, 0.1 mM GTP, 15mM creatin 燐酸, 5 mM MgCl₂, 0.4mg/ml creatine phosphokinase, 20mM Tris-HCl (pH7.4) 存在下で¹⁴C標

識アミノ酸を取込ませると、図2右側に示すようにジストロフィーチキンの方が正常にくらべて多少蛋白合成能が高い結果が得られるデータもあるが、多くの場合差は明確には認められない。また正常鶏18日目胚のポリゾームに、同様に正常およびジストロフィー鶏の100,000g上清をそれぞれ加えてみると図2左側に示すように、ジストロフィー鶏の100,000g上清を用いた方が蛋白合成能が高い。

そこで正常白色レグホン13日目胚胸筋のポリゾームを同様に調製、これを溶液B(50mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM 酢酸マグネシウム, 100mM NH₄Cl, 0.1mM DTT, 0.1 mM GTP)にとかし260nmの吸収が500.0/mlとなるようにする。37°C30分間処理後さらに等量の溶液C(50mM Tris-HCl(pH7.5), 5 mM 酢酸マグネシウム, 100mM NH₄Cl, 0.1mM DTT, 1 M KCl, 0.2mM puromy-

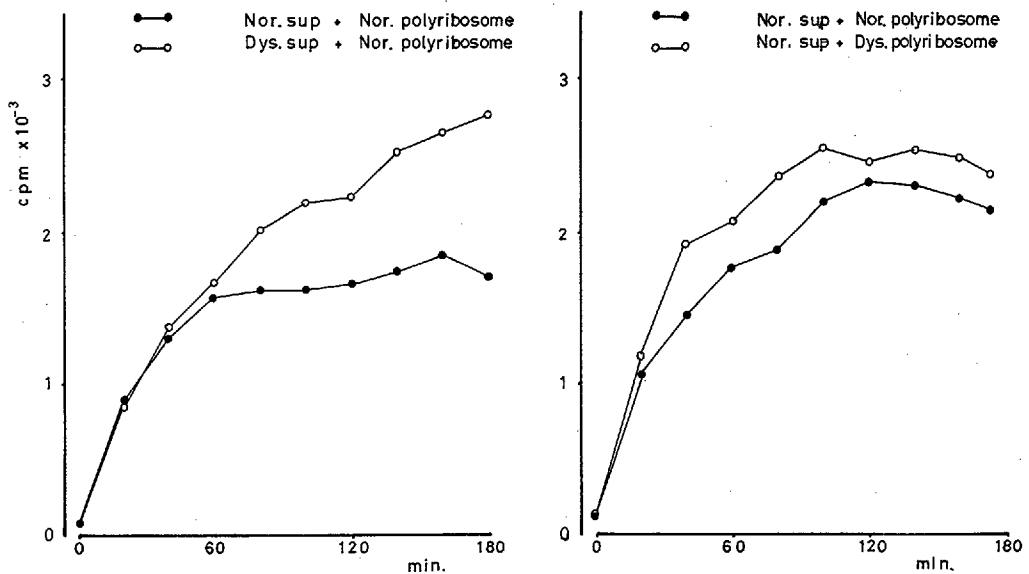


図2 正常およびジストロフィー鶏18日目胚胸筋より調製したポリゾームと100,000g上清による¹⁴C-標識アミノ酸の取り込み能(蛋白合成能),横軸:反応時間,縦軸:ペプチドに取り込まれた¹⁴C-標識アミノ酸放射活性

cin) を加えて37°C30分間処理する。これを溶液D (0.02M Tris-HCl (pH7.5), 3mM 酢酸マグネシウム, 0.3M KCl) を含む1M および0.4M 蔗糖の不連続密度勾配上にのせ60Tiローターで50,000 rpm 16時間遠心する。この沈澱を0.1M KCl, 10mM NH₄Cl, 10mM Tris-HCl (pH7.4) にとかし, 同液に透析する。この puromycin 処理リボゾームは使用するまで-80°Cに保存しておく。このリボゾーム, 4A₂₆₀ 単位を50mM KCl, 12mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl (pH7.4), 0.1mM GTP, 4mM ATP, 15mM クレアチン燐酸, 0.4mg/ml creatine phosphokinase 存在下で100,000g 上清の濃度を変えて poly U による¹⁴C-phenylalanine の取り込みを行なわせる。図3に示すようにジストロフィー鶏の上清中の因子は正常鶏の上清中に含まれる因子にくらべて

polyphenylalanine 合成能が高く, しかも正常鶏上清の量を増加しても蛋白合成能の最高値はジストロフィー鶏の場合のそれにくらべてかなり低いことから両者の間に質的な差があることが推定できる。なおこの上清中のprotease, RNAase 活性は正常, ジストロフィー両鶏の場合に関して差はない。

polyphenylalanine 合成能のこの差はこれら2つの上清を種々に混合し, それによる¹⁴C-phenylalanine の取り込みを比較した結果からも推定できる。

胚発生の各段階および孵化して後の種々の段階における胸筋から調製した100,000g 上清のこの¹⁴C-phenylalanine の取り込み能力を比較してみると, この能力は臨床的症狀の発現するかなり前の段階にすでに認められることがわかる。

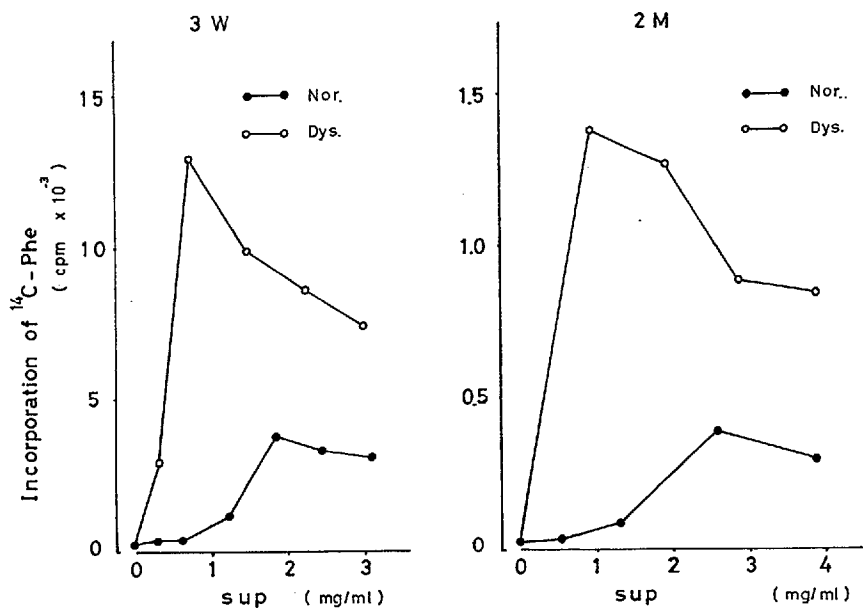


図3 白色レグホン13日目胚胸筋の puromycin 処理リボゾームと poly U による poly-phenylalanine 合成能, 100,000g 上清に正常(—)およびジストロフィー鶏のものを用い比較してある。横軸: 上清濃度, 縦軸: ¹⁴C-polyphenylalanine 放射活性孵化後3週目(左側), および2ヶ月目(右側)のニワトリ胸筋よりの上清を用いた。

次にこの上清よりポリペプチドの延長因子の粗分画を調製し ^{14}C -phenylalanine - tRNA の取り込み能を比較した。この際、

^{14}C -phenylalanine の取り込みの場合の溶液中の MgCl_2 濃度は 7 mM とした。図 4 に示されるように $100,000\text{ g}$ 上清の実験系で示さ

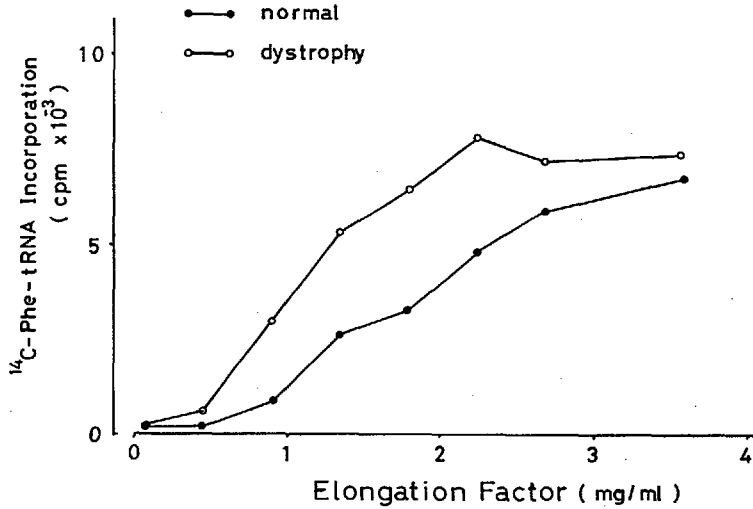


図 4 正常およびジストロフィー鶏の胸筋の蛋白合成延長因子の粗分画の poly U と puromycin 処理リボソーム系による ^{14}C -phe-tRNA の polyphenylalanine へのとり込み能

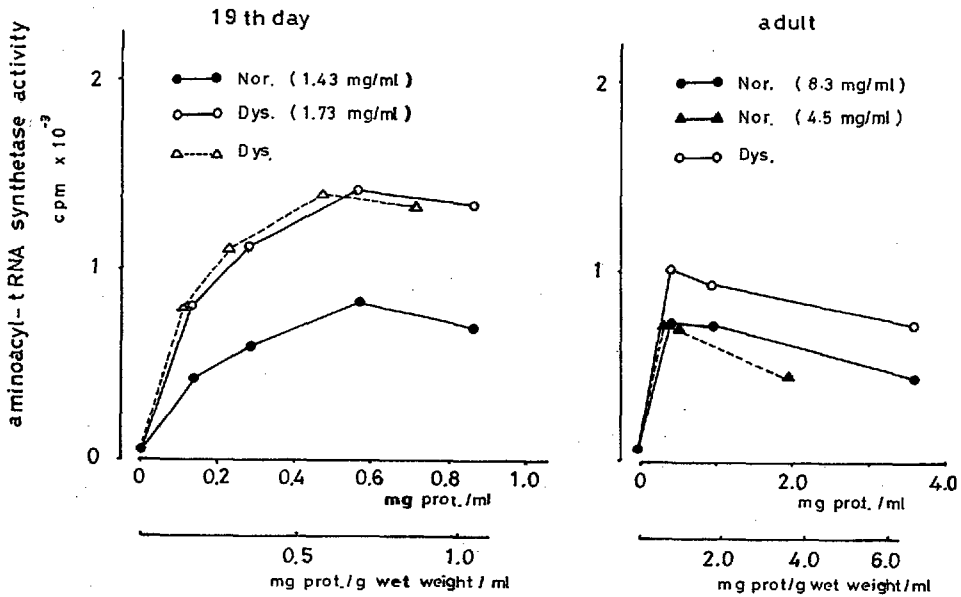


図 5 19日目胚および成長した正常およびジストロフィー鶏胸筋の $100,000\text{ g}$ 上清中におけるアミノアシル tRNA 合成酵素活性, 横軸: 上清の蛋白濃度, 横軸の下のスケールは筋の湿重量あたりに補正した上清の蛋白量

れたような著明な差は認められない。

また一方この上清中のアミノアシル tRNA 合成酵素の活性を測定した。1 mM ATP, 5 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM 酢酸マグネシウム, A₂₆₀ 5 単位の tRNA を加え ¹⁴C-phenylalanine の tRNA への結合を冷トリクロル酢酸沈澱物中の放射活性によって測定する。図 5 に示すようにジストロフィー鶏の場合の方が正常の場合にくらべてアミノアシル tRNA 合成酵素活性が高いことがわかる。

また、さらに puromycin 処理リボゾームと poly U および 100,000 g 上清存在下で ¹⁴C-phenylalanine, あるいは ¹⁴C-phenylalanine-tRNA を加えてその取り込みをみると、ジストロフィーと正常の場合の 100,000 g 上清で認められた差は ¹⁴C-phe-tRNA を用いた場合にも認められた。つまりアミノアシル tRNA 合成酵素の活性の差以外にもジストロフィーと正常の蛋白合成能の差を決める場所があることが推察される。

考 察

正常鶏にくらべてジストロフィー鶏筋の蛋白合成能は多少高いように思われるが、ポリゾーム自体には差はない。しかし poly U のように、大腸菌の蛋白合成系の場合にはかなり非特異的に蛋白合成が行なわれる人工 RNA を用いるとこの差が著明になることは、筋蛋白を合成する mRNA にもその蛋白合成能の特異性の程度がかなりまちまちであることを示唆しているように思われる。事実、¹⁴C-アミノ酸をジストロフィーチキンに注射して 24 時間後にその筋蛋白への取り込みをみた実験では正常とくらべてミオシンにはそれほど変化ないが、アクチンや 10S-アクチニンへの取り込みが高まる。したがって現在、筋の種々の蛋白に対する mRNA を用いて取り込みを行わせ、その蛋白合成能に差があるかどうかを検討中である。またこのジストロフィー鶏におけるアミノ酸取り込み能の高ま

りはひとつはアミノアシル tRNA 合成酵素にあることがわかったが、その他にもあることはほぼ確実である。ジストロフィー鶏の場合、特異的筋蛋白分解酵素の活性が高いことも知られていることから、蛋白の代謝回転の種々の場所におけるそれぞれの反応を行う酵素の活性が高まっていることが推定される。アクチン、10S-アクチニンのような蛋白は、その蛋白合成の調節系が比較的非特異的で、このような蛋白はこれらの酵素活性の高低の影響を直接的に受けやすいと考えることが可能かもしれない。つまりこれら“非特異的な”蛋白はジストロフィー鶏における蛋白合成能の増加の結果できた蛋白によって蛋白合成能の合成分解が高まっているのではないかという推定が成り立つ。それではこのような結果を引き起こした原因はどこにあるのだろうか。我々の考えではこの原因もやはり蛋白合成系の中にあると考える。つまり各蛋白因子の質的変化だけでは説明できない質的変化をきたしている因子があるのではないかと考え、現在その因子について検討中である。

結 論

正常の場合にくらべてジストロフィー鶏筋では筋蛋白合成能が高い。この差は臨床症状のあらわれるかなり以前から認められる。この筋蛋白合成能の原因は 100,000 g 上清中にある。アミノアシル tRNA 合成酵素もジストロフィー鶏の方が活性が高いがそれだけでなくそれ以降の段階の蛋白合成系にもこの差は存在する。

文 献

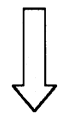
- 1) I. M. Weinstock and L. Markiewicz : Muscle protein synthesis during development of the normal and dystrophic chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 374 : 197, 1974
- 2) J. J. Morrissey and S. S. Kerwar : Studies on myofibrillar protein synthesis in chicken muscular dystrophy,

Life Sciences 20 : 1091, 1977

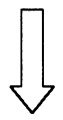
- 3) B. Batlle and J. R. Florini : Protein Synthesis in chicken muscular dystrophy, *Biochemistry* 12 : 635, 1973
- 4) D. Baieve and J. R. Florini : Effect of muscular dystrophy on the rate of RNA synthesis in chickens *Archiv*

Biochem. Biophys. 139 : 393, 1970

- 5) R. Petryshyn and D. M. Nicholis : Protein synthesis in dystrophic muscle activity of the pH5 supernatant fraction of muscle in dystrophic mice. *Biochim. Biophys Acta* 435 : 391, 1976



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

ヒトの進行性筋萎縮症の病因解明の研究の目的でジストロフィーチキンを用いることはいくつかの点で有利である。その理由のひとつは材料である筋を比較的多量に得やすいこと、またニワトリ骨格筋の性質がウサギのそれとよく似ており、したがってよく研究されており、また発生過程における筋の変化についても従来の正常ニワトリにおける多くのデータがそのまま参考になる点である。