

## 7) 筋成熟過程でのミオシン分子の変化

大日方 昂\*

研究協力者 真崎 知生\*\* 高野 弘美\*\*

はじめに

ミオシンが骨格筋タンパク質の中で最も多量に存在するタンパク質であることを考えると、筋の変性時や遺伝子性筋疾患などの場合筋におこる変化がこのタンパク質の分解や正常にないミオシンの出現として現われる可能性が考えられる。特にミオシンは後述の様にその特徴的サブユニット組成や免疫学的特性によってタンパク質分子レベルでの変化を把握しやすい利点がある。

ミオシンは分子量約50万の高分子タンパク質で、H鎖及びL鎖サブユニットからなることが知られている。このサブユニット組成は電気泳動により容易に明らかになり、種々の筋ミオシンはそれぞれの特徴的パターンを示す。骨格筋のうちFast muscleのミオシンは3種のL鎖をもち(以下L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>と略称)、各分子量が2.4万、1.8万、1.6万である。一方Slow muscleミオシンのL鎖は2種のみで(以下SL<sub>1</sub>, SL<sub>2</sub>と略称)、分子量2.7万、2.0万である。心筋ミオシンはSlow muscleの場合とほぼ同じL鎖パターンを示す(以下このL鎖をCL<sub>1</sub>, CL<sub>2</sub>と略称する)。平滑筋ミオシンはこれらとは更にことなった様相を示すことが知られている。H鎖に関しては、いずれのミオシンの場合もほぼ等しい分子量をもつが、それぞれ個有の抗原性をもち、免疫学的に識別されることが知られている。(Masaki; 1974<sup>1)</sup>) さてこの様に電気泳動

により知られるサブユニット組成のパターンや免疫学的特性を指標として、筋発生、成熟過程、或いは筋変性過程でのミオシンの違い又は変化が追求され、既にいくつかの報告があるが、必ずしも一致した結論が得られていない。幼若なFast muscleミオシンの特徴の1つとして、L鎖サブユニットの組成が成熟ミオシンとことなること、即ち、成熟筋ミオシンに存在するFL<sub>3</sub>を欠いていることが指摘されている(Dow and Stracher, 1971<sup>2)</sup>, Chi et al 1975<sup>3)</sup>)。一方Masakiら(Masaki and Yoshizaki, 1974<sup>4)</sup>, Masaki and Kinoshita 1974<sup>5)</sup>)はH鎖サブユニットを指標として、免疫学的手法を用いた実験から、発生初期の若い骨格筋ではFast muscleタイプ、Slow muscleタイプ、心筋タイプの少なくとも3種のミオシンがともに合成され、成熟につれてFast muscleタイプミオシン1種に限定されていくことを示した。これに対して、最近、L鎖サブユニットの泳動パターンを指標とした実験から、幼若なSlow muscleではSlow muscle及びFast muscleタイプのミオシンが共存するのに反し、Fast muscleの場合には、発生初期からFast muscleタイプのミオシンのみが存在していること、即ち、ミオシンについてみる限り、成熟過程でFast muscleの変質は起らないという報告が出されている(Pelloni-Mueller et al 1976<sup>6)</sup>, Rubinstein et al 1977<sup>7)</sup>)。このような従来の研究をふまえて、本研究では特にL鎖サブユニットに注目してFast muscleの成熟過程でのミオシン分子の変化を検討した。実験を進

\* 千葉大学理学部生物、東京都臨床研究所

\*\* 東京都臨床研究所

めるに当り、厳密な結論を得るために、まず胚ミオシンの精製に留意し、L鎖サブユニットの異同を定めるために、電気泳動法及び免疫学的方法を使用した。

#### 実験方法

10-20日目ニワトリ胚の肢の筋肉よりPerry (1955)の方法に従ってミオシンを抽出した。アクチン・トロポミオシン・トロポニンなどミオシンL鎖サブユニットに近い分子量をもつタンパク質の混入を除くために、ミオシンを0.6M KI (5mM ATP, 1mM DTT, 50mM Tris, pH 7.5を含む)で処理した後、Biogel-A50のカラムクロマトにより精製した。免疫学の実験のために親ニワトリ胸筋(Fast muscle)ミオシンよりL鎖サブユニット(L<sub>1</sub>,

L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>)を単離し、又ALD (Slow muscle)及び心筋ミオシンよりL鎖(SL<sub>1</sub>, CL<sub>1</sub>)を単離し、これらをウサギに注射して各L鎖サブユニットに対する抗体を作成した。胚ミオシンのL鎖サブユニットはSDS・アクリルアミドゲル泳動(10%アクリルアミドゲルを使用)により分析し、更に免疫学的検討のためには、泳動終了後、直ちに泳動ゲルを1.5% agarose プレート(0.9% NaCl 20mM Tris pH7.5を含む)に埋めこみ、ゲルに平行に作った溝に抗血清を添加し、免疫拡散法によりL鎖サブユニットの免疫学的特性を調べた。

#### 結果

(1) 電気泳動による観察：10-20日目ニワト

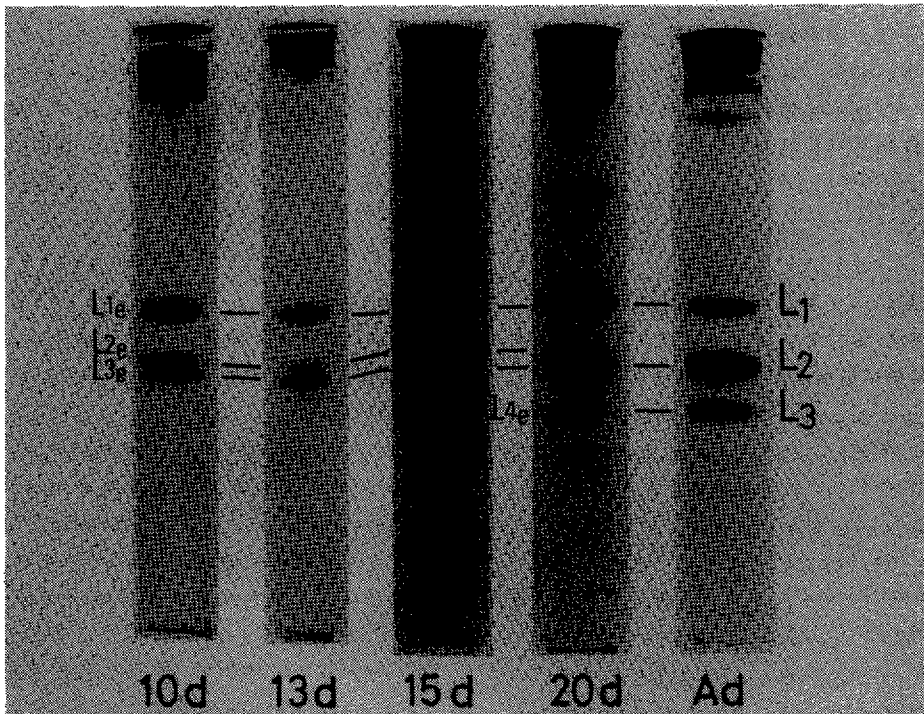


図1 いろいろな発生段階のニワトリ胚ミオシンのSDS-アクリルアミドゲル電気泳動パターン

10d~20d：10日~20日胚ミオシンを示す。

Ad：親ニワトリ胸筋ミオシン。

L<sub>1e</sub>, L<sub>2e</sub>, L<sub>3e</sub>, L<sub>4e</sub>：胚ミオシンのL鎖サブユニット。

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>：親FastミオシンのL鎖サブユニットを示す。

り胚の肢筋より得たミオシンの泳動パターンを図1に示す。ここに見られる様に、10-13日胚ミオシンには明らかに3種のL鎖サブユニット(L<sub>1e</sub>, L<sub>2e</sub>, L<sub>3e</sub>)がみられた。各分子量は、それぞれ2.4万、2.0万、1.8万である。従ってL<sub>1e</sub>は親Fast muscleのL<sub>1</sub>に、L<sub>3e</sub>が親Fast muscleのL<sub>2</sub>に相当することが推測される。胚ミオシンのL<sub>2e</sub>に相当するものは親Fast muscleミオシンにはみられない。又、親のL<sub>3</sub>に相当するものは10-13日胚ミオシンにはなく、15-20日胚ミオシンで微量検出されるようになる(図1中のL<sub>4e</sub>)。親ミオシンにおけるL<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>の量比は、モル比で1:2:1であることが知られているが、胚ミオシンでは明らかに異なり10日胚ミオシンではL<sub>1e</sub>が最も多量に存在し、L<sub>2e</sub>・L<sub>3e</sub>はほぼ同量である。発生が進むにつれ、

L<sub>3e</sub>の量が次第に増し、逆にL<sub>2e</sub>は減少していくのが認められた。

胚ミオシンのL鎖サブユニット、L<sub>1e</sub>, L<sub>2e</sub>, L<sub>3e</sub>をより厳密に同定するために、胚ミオシンに精製した親のSlow muscle, 心筋ミオシン及び単離した親Fast muscleミオシンL鎖サブユニット(L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>)を混ぜて泳動した。その結果を図2に示す。先の推測の様に、胚のL<sub>1e</sub>, L<sub>3e</sub>は親Fast muscleのL<sub>1</sub>, 及びL<sub>2</sub>にそれぞれ完全に一致している。又、胚のL<sub>2e</sub>は親Slow muscleのSL<sub>2</sub>及び心筋のCL<sub>2</sub>と一致することが明らかになった。SL<sub>1</sub>又は(L<sub>1</sub>は胚ミオシンのどのバンドとも一致しない。この様に、親ではFast muscleとなる部位の骨格筋でも、幼若期には親と異なり、そのミオシンにはFast muscleタイプのL<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>が存在するが、L<sub>3</sub>はないか、

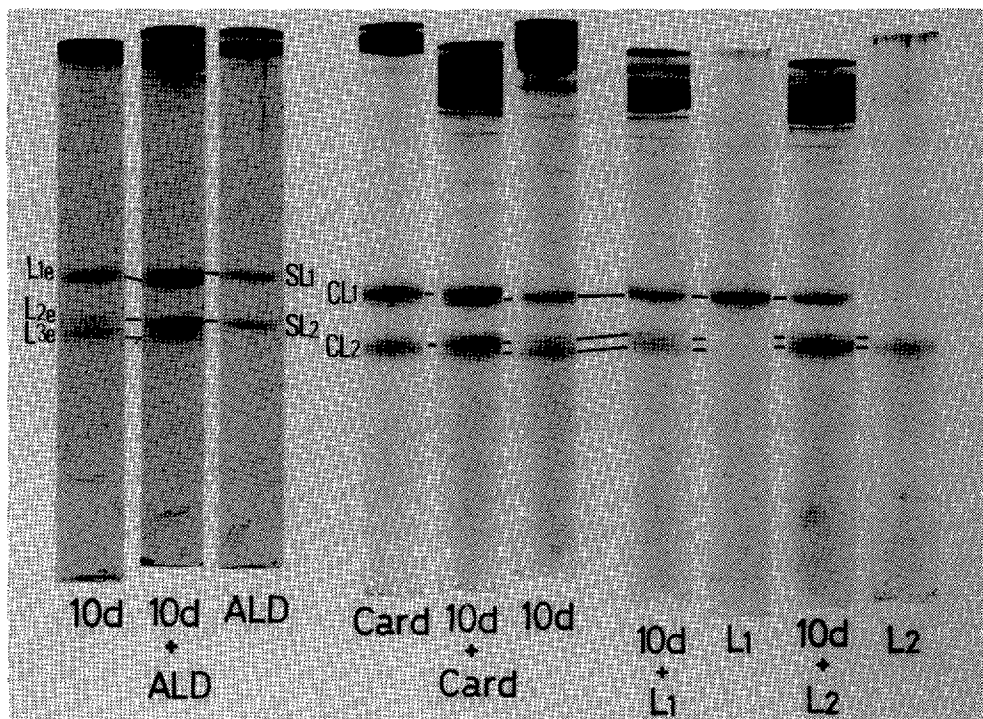


図2 胚ミオシンL鎖サブユニットとFast, Slow及び心筋ミオシンL鎖との比較。10d:10日胚ミオシン, ALD:Slow muscle (anterior latissimus dorsi muscle) ミオシン, Card:心筋ミオシン, L<sub>1</sub>とL<sub>2</sub>:Fast muscle(親胸筋)ミオシンより分離したL鎖サブユニット。

ごく微量しかないこと、Slow muscle タイプ又は心筋タイプのL鎖サブユニットが共存すること（但し、泳動的にはSL<sub>1</sub>又はCL<sub>1</sub>は検出されない）。更にL鎖サブユニットの量比の面で胚と親ミオシンの間で違いのみられることが知られた。

(2) 免疫学的解析：ミオシンL鎖の検出、同

定のために、電気泳動法は必ずしも十分な感度と厳密性を備えているとはいえないので免疫学的手法で更に調べた。L鎖サブユニットを電気泳動的に分離させた後、これを免疫拡散法と組み合わせて、胚ミオシンL鎖の抗原性を調べた結果を図3、4に示す。用いた抗体、抗L<sub>1</sub>抗体、抗L<sub>3</sub>抗体は親ミオシンのL<sub>1</sub>、

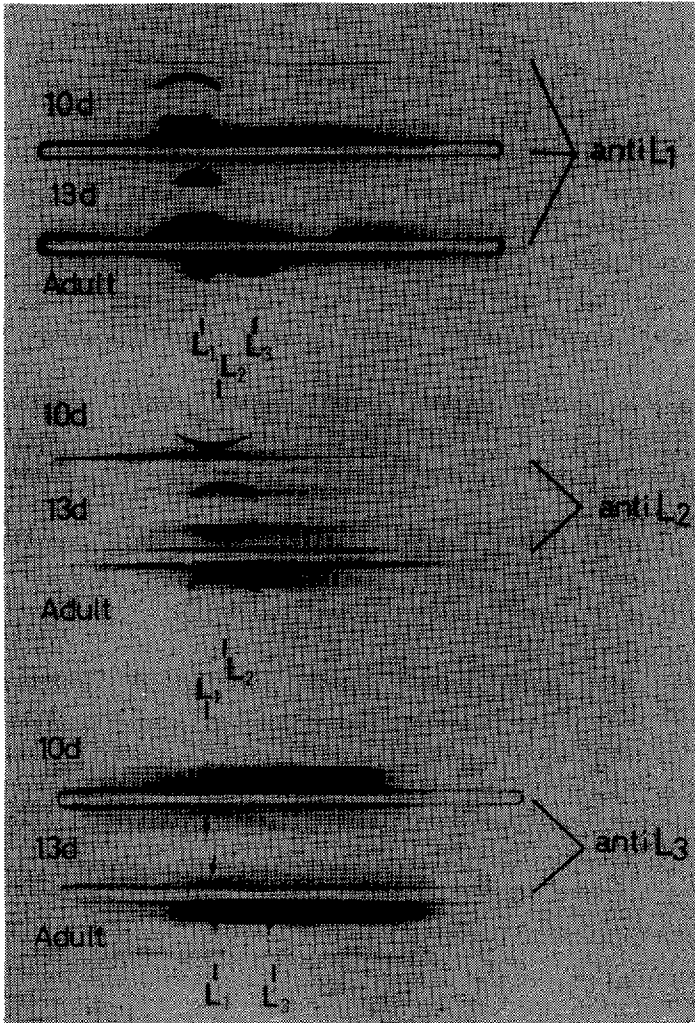


図3 SDS・ディスク免疫電気泳動によるL鎖サブユニットの解析。

10d, 13d, Adult : 10日, 13日胚及び親胸筋ミオシンの電気泳動ゲルの位置。

電気泳動におけるL鎖サブユニットの位置をL<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>により示した。

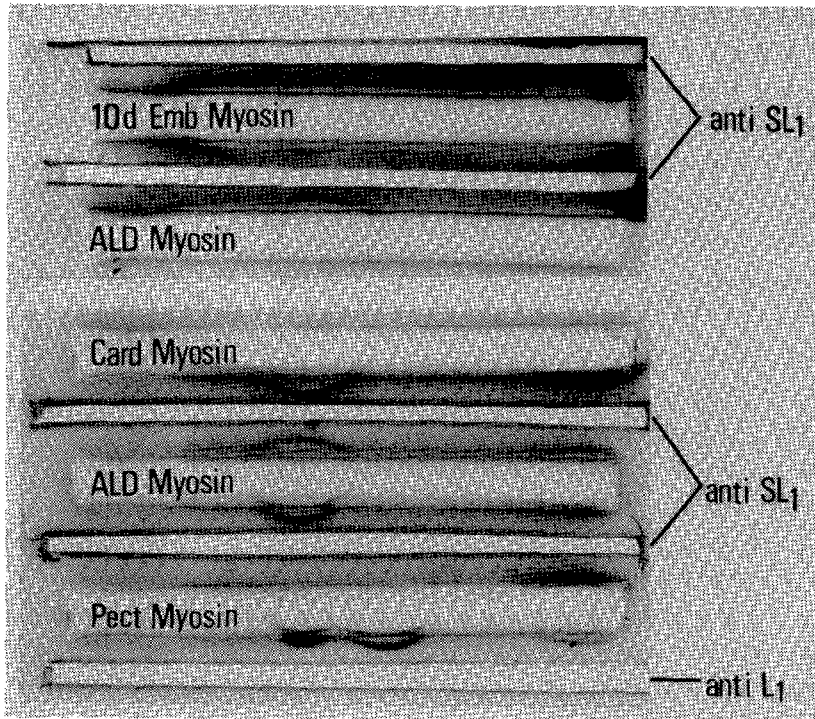


図4 SDS・ディスク免疫電気泳動によるL鎖サブユニットの解析.

Pect Myosin : 親胸筋ミオシン. 他の説明は図1~図3参照.

L<sub>3</sub>いずれとも反応性をもち、一方抗L<sub>2</sub>はL<sub>2</sub>とのみ特異的に反応する性質をもつ。10-13日胚ミオシンは、L<sub>1</sub>の泳動位置で抗L<sub>1</sub>、抗L<sub>3</sub>両者と反応し沈降線を形成するが、親と異なりL<sub>3</sub>の位置での反応はみられなかった。又、抗L<sub>2</sub>はL<sub>2</sub>の位置で反応し、明瞭な沈降線を生じた。15-20日胚ミオシンの場合、これらに加えてL<sub>3</sub>の位置で抗L<sub>1</sub>及び抗L<sub>3</sub>と反応して沈降線を生じた(図省略)。これらの結果は胚ミオシンにはFastミオシンL鎖L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>と免疫学的に同一のL鎖が存在すること、L<sub>3</sub>は発生初期にはなくふ卵15-20日目頃に出現するという先の泳動観察の結果に一致する。一方Slow muscle由来のL鎖(SL<sub>1</sub>)に対する抗体(抗SL<sub>1</sub>)を用いて調べた所、10日胚ミオシンは抗SL<sub>1</sub>と明瞭に反応し、SL<sub>1</sub>の泳動位置に沈降線を生じた(図4)。

この抗体(抗SL<sub>1</sub>)は親のFast muscleミオシンとは全く反応しないものである。既に述べた様に、胚ミオシン中にSL<sub>1</sub>の存在は電気泳動的には検出されなかったが、免疫学的にはこの様に明らかに検出される。なお図4に示した様に、抗SL<sub>1</sub>は心筋ミオシンのL鎖(CL<sub>1</sub>)とも明瞭に反応し、SL<sub>1</sub>とCL<sub>1</sub>が同一の抗原性をもつことを示している。従って厳密に言えば胚ミオシン中にSL<sub>1</sub>ではなくCL<sub>1</sub>か又はSL<sub>1</sub>及びCL<sub>1</sub>両者が共存していることもありうる。

#### 考 察

筋の分化、成熟過程でのミオシン分子の分化に関してまず考えられることは、筋の幼若期には種々のミオシン合成のための遺伝情報が発現され、本来成熟筋には存在しない数種

のミオシンが出現し、成熟につれてその筋固有のミオシンへ限定されていくことである。このことは既にいくつかの報告によって示されている(文献4)~9)。最近の2, 3の報告は Fast muscle には発生初期段階から既に Fast タイプのミオシンのみが存在していることを述べている(文献6).7)。これに対して本実験は Fast muscle においても、幼若期には Slow タイプのミオシンが共存し、成熟につれて完全な Fast muscle となることを示した。

神経支配がミオシンの分化に重要な役割を果たすことが想定されているが、ミオシンL鎖に関しては、神経支配があると思われる20日胚ミオシンでもなお Slow タイプのミオシンの存在が認められた。神経支配以外の要素もミオシン分子の分化の上で重要な役割を演じているであろう。

初期胚ミオシンがL<sub>3</sub>を欠いていることに関して、骨格筋ミオシンはL<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>をもつ分子とL<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>をもつ分子の2種のアイソザイムとして存在するという最近の考え方にたてば、発生初期にはL<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>ミオシンが主体で、L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>ミオシンは比較的後期に出現すると考えることにより説明できそうである。なお、胚ミオシンでは、L<sub>2</sub>(L<sub>2e</sub>)に比してL<sub>1</sub>(L<sub>1e</sub>)

が多く、SL<sub>2</sub>(L<sub>2e</sub>)に比してSL<sub>1</sub>が微量であることを考えると、L<sub>1</sub>, SL<sub>2</sub>を有するミオシン分子の存在も考えられよう。

筋変性時に、筋発生時の様なサブユニット組成の変化がみられるか、今後の課題である。

#### 文 献

- 1) Masaki, T. *J. Biochem.*, 76: 441-449 (1974)
- 2) Dow, J. and Stracher, A. *Biochemistry*, 10: 1316-1321 (1971)
- 3) Chi J. C. H., Rubinstein, N., Strahs, K. and Holtzer, H. *J. Cell Biol.* 67: 523-537 (1975)
- 4) Masaki, T. and Yoshizaki, C. *J. Biochem.*, 76: 123-131 (1974)
- 5) Masaki, T. and Kinoshita, T. *J. Biochem.*, 75: 1193-1195 (1974)
- 6) Pelloni-Mueller, G., Ermini, M. and Jenny, E. *FEBS Letters*, 67: 68-74 (1976)
- 7) Rubinstein, N. A., Pepe, F. A. and Holtzer, H. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 4524-4527 (1977)
- 8) Obinata, T., Hasegawa, T., Masaki, T. and Hayashi, T. *J. Biochem.*, 79: 521-531 (1976)
- 9) Obinata, T. and Takahashi, K. *J. Biochem.*, 75: 1183-1186 (1974)

↓ **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

ミオシンが骨格筋クンパク質の中で最も多量に存在するタンパク質であることを考えると、筋の変性時や遺伝子性筋疾患などの場合筋におこる変化がこのタンパク質の分解や正常にないミオシンの出現として現われる可能性が考えられる。特にミオシンは後述の様にその特徴的サブユニット組成や免疫学的特性によってタンパク質分子レベルでの変化を把握しやすい利点がある。