

## 8) ジストロフィー筋の受動的張力発生と 弾性蛋白質コネクチン

丸山 工 作<sup>\*</sup>

研究協力者 杉田 秀 夫<sup>\*\*</sup> 遠藤 実<sup>\*\*\*</sup>

筋肉には収縮性要素と弾性要素とが存在すると、生理学者は筋肉の機能を理解するうえで長い間仮定してきた。前者についてはアクチン・ミオシン系として多くの研究がなされているが、後者については、ごく最近まで不明のままであった。

1976年になって、筋肉には受動的な張力の発生にあづかる弾性蛋白質があることが、名取の *skinned fiber* を用いて実証された<sup>1)</sup>。この弾性蛋白質はコネクチン *connectin* と名づけられ、筋原線維のみならず細胞膜下にも存在して、筋肉の弾性をにになっていることが示された<sup>2)</sup>。その後、弾性をあたえるのは、結合組織のコラーゲンにみられるのと同様なペプチド間の架橋結合(リジンの誘導体)であることが判明した<sup>3)</sup>。

ジストロフィー筋における筋機能の低下は、この弾性蛋白質構造がそこなわれるためでないかとの仮定のうえにたつて、本研究が計画された。すなわち、受動的な張力発生が低下しているのではないか？ コネクチン含量が減少しているのではないか？ 生理学、生化学、細胞生物学的手法によってこれらの問題が追究された。結論は、まず予想どおりであ

り、まったく新しいアプローチがジストロフィー筋を理解するうえでなされることになった。

### 実験方法

生理学的方法 ニワトリ (No. 413) の PLD から単一筋線維をとりだし、機械的(名取法)または化学的(サポニン法)方法によって、*skinned fiber* を調製し、いろいろな長さに伸長して、発生する張力をトランスデューサー (RCA 5734) あるいは、ストレンゲージによって測定した<sup>4)</sup>。

生化学的方法 ニワトリ胸筋100gから筋原線維を調製し、それからコネクチンをアルカリ法ならびに SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 法によって純化した<sup>2)</sup>。その1部はアミノ酸分析にかけられた。

細胞生物学的方法 ニワトリ胸筋をクリオスタットで切片にして、蛍光色素 (FITC) 抗コネクチンで処理した。Nikon Biophot 蛍光顕微鏡で観察した。用いた抗血清は、ニワトリ・コネクチンをウサギに注射して得られたものである<sup>2)</sup>。

### 結 果

1. ジストロフィー筋 (*skinned fiber*) の受動伸長にともなう張力の発生  
筋線維を引っばると張力を発生することは

\* 千葉大学理学部生物学科

\*\* 東京大学医学部脳研究所神経内科

\*\*\* 東北大学医学部薬理学教室

よく知られているが、どちらかという、筋線維をおおっているコラーゲン・ファイバーによるのではないかとみられていた。名取は、彼の手になる *skinned fiber* を用いて、この受動的弾性が筋原線維または細胞内部膜によることを示した<sup>5)</sup>。最近、この筋肉の受動的弾性はコネクチン構造によることが明らかにされた<sup>2), 6)</sup>。そこで、本研究ではニワトリのジストロフィー筋の受動的弾性が正常筋に比して損なわれているかどうかがためされた。*skinned fiber* は名取法またはサポニン法に

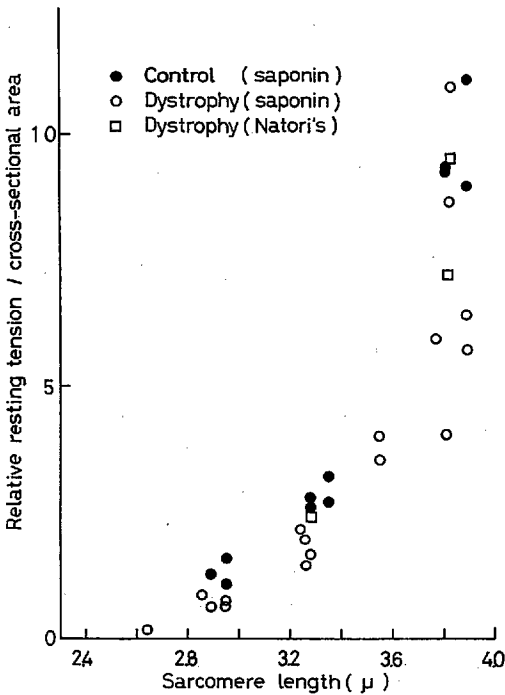


図1 ニワトリジストロフィー筋ならびに正常筋の *skinned fiber* の受動伸長にもなう張力発生

20°C, 107mM KCH<sub>3</sub>CO<sub>3</sub>, 4mM MgSO<sub>4</sub>, 2mM EGTA, 4mM ATP, 20mM Tris-maleate, pH6.8. サポニン処理は上記液に40μg/mlの濃度で行なった。ファイバーの長さおよび断面積はレーザー光線を用いて測定した。(mg/100μ.λ)

よってつくられたが、いずれも Ca イオンによる等尺収縮のさいに30~40 mg/100μλの張力を発生し、ジストロフィー筋と正常筋の間に差はみられなかった。

受動伸長による張力発生は、図1に示されているように、正常筋に比してやや低いものがかなりみとめられた。しかし、サルコメアの長さが3.8μm ぐらいのところでは、対照とほとんど同じ張力を発生したジストロフィー筋線維があった。

## 2. ジストロフィー筋のコネクチン

コネクチンをジストロフィー筋ならびに正常筋からアルカリ抽出法と SDS 抽出法の2つの方法でとりだしてみると、表1に示してあるように、30%から40%の減少がみられた。

表1 CONNECTIN CONTENT OF NORMAL AND DYSTROPHY CHICKEN SKELETAL MUSCLES

	Normal	Dystrophy
Alkali ext.	650 mg	470 mg
SDS ext.	600 mg	360 mg

per 100 g of muscle

コネクチンのアミノ酸組成をしらべてみると、正常筋のもジストロフィー筋のもほぼ同様であったが、Hyp, Gly, Pro 含量ではっきりした差がみられた(表2)。すなわち、ジストロフィー筋では Hyp, Gly, Pro 含量がいずれも正常筋より多かった。これは、ジストロフィー筋のコネクチンにコラーゲンの混在が多いためである。コネクチンには、わずかであるがコラーゲンの混在がある<sup>7)</sup>。Hyp の量からみると、その混在パーセントは正常筋のコネクチンで5.2%、ジストロフィー筋で15.25%であった。これからみても、コネクチン含量がジストロフィー筋で減少していることが明白である。

表2 AMINO ACID COMPOSITION OF CONNECTIN FROM  
NORMAL AND DYSTROPHY CHICKEN MUSCLES

	Normal		Dystrophy	
	alkali	SDS	alkali	SDS
Hyp	5	2	15	25
Asp	90	91	89	83
Thr	64	65	60	54
Ser	57	56	57	55
Glu	118	123	116	110
Pro	66	63	72	73
Gly	86	78	106	149
Ala	79	78	79	83
Cys/2	2	3	2	2
Val	72	69	69	58
Met	26	27	23	20
Ile	61	62	55	48
Leu	70	71	69	63
Tyr	34	35	29	25
Phe	30	32	32	29
Lys	67	69	63	57
His	18	21	17	16
Arg	55	55	47	50

per 1000 residues

### 3. ジストロフィー筋におけるコネクチンの局在

コネクチンは、筋原線維のまわりにある網目構造ならびに細胞下の構造として存在するものと考えられている<sup>2)</sup>。

ニワトリの正常胸筋ならびにジストロフィー胸筋の凍結切片を蛍光ラベル抗コネクチンで処理したところ、筋細胞膜のところは染色されていた(図2)。ジストロフィー筋の方は筋細胞が損傷をうけていて、抗コネクチンによる染色も同一条件下で活性も弱く且つ部分的ではあるが染色されない筋細胞もありコネクチンの減少は比較的早期から出現する様な印象をうける。これらの所見コネクチン含量の減少(表1)と一致する。

### 考 察

ジストロフィー筋にあっては、同一の筋肉内で筋線維によってその病気の進行の程度が異なることが知られている。したがって、一本一本の筋線維についてしらべてみると、その性質に差のあることはむしろ期待されることである。したがって、図1にみられるように、受動伸長のさいの張力発生が対照と同じものからかなり低下したものまで分布していることはさほどおどろくに値しない。もっと多数の例によってたしかめなくては、はっきり結論できないが、ニワトリのジストロフィー筋にあっては筋原線維の弾性の低下しているもののあることは事実である。

他方、ジストロフィー筋の弾性蛋白質のコ

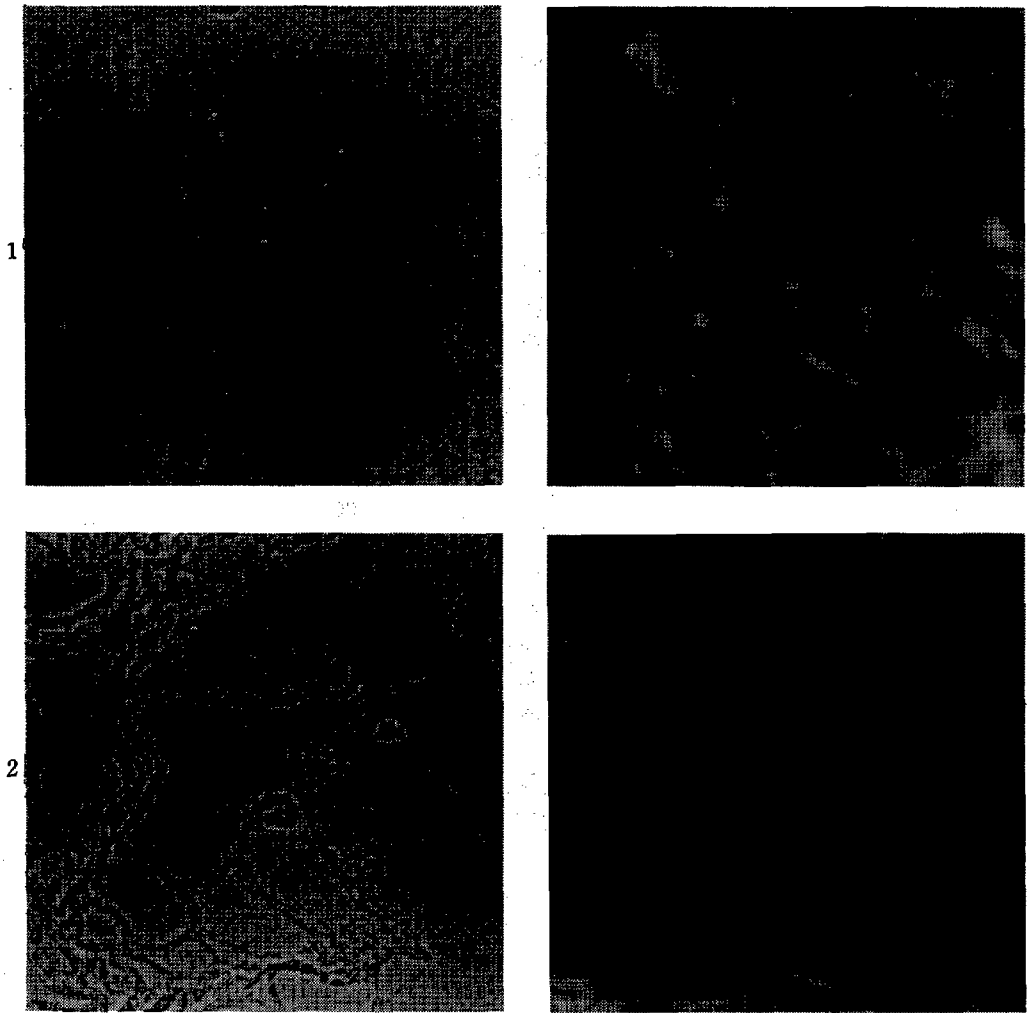


図2 1 a : 正常胸筋の位相差顕微鏡像  
 1 b : 同部位のコネクチンの蛍光抗体像  
 2 a : 筋ジストロフィー胸筋の位相差顕微鏡像  
 2 b : 同部位のコネクチンの蛍光抗体像

ネクチン含量は30~40%対照に比して減少していることが示された(表1)。免疫学的方法によって、細胞膜下のコネクチンが量的に少なくなっていることが観察された(図2)。

これらの結果は、ジストロフィー筋のコネクチン構造が損傷をうけており、その力学的能力の低下を示唆するものである。

この原因としては、コネクチン構造が蛋白

分解酵素によってよいにこわされることから<sup>2)</sup>、ジストロフィー筋における蛋白分解酵素 CAF の活性増加<sup>3)</sup>によるのではないかと考えられる。この点を実験的に確めることが今後必要である。

要 約

(1)ニワトリのジストロフィー筋の skinned

fiber の受動伸長による張力発生は正常筋のそれよりも低下しているものがあつた。

(2)ジストロフィー筋のコネクチン含量は対照に比して30~40%減少していた。しかもジストロフィー筋のコネクチンはコラーゲンの混在が多かつた。

(3)ジストロフィー筋の凍結切片を蛍光色素ラベル抗コネクチンで染色したところ、細胞膜のところの染り方が対照に比して弱かつた。

#### 文 献

- 1) Maruyama, K., Natori, R., Nonomura, Y. (1976). New elastic protein from muscle. *Nature*, 262 : 58-60.
- 2) Maruyama, K., Matsubara, S., Natori, R., Nonomura, Y., Kimura, S., Ohashi, K., Murakami, F., Handa, S., Eguchi, G. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and function. *J. Biochem.*, 82 : 317-337.
- 3) Fujii, K., Kimura, S., Maruyama, K. (1978). Crosslinks in connectin, an elastic protein of muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Submitted.
- 4) 遠藤実 (1975). 名取ファイバー. 生化学実験法15巻筋肉 (江橋節郎, 丸山工作編) pp. 293-312. 東京化学同人.
- 5) Natori, R., Umazume, Y., Yoshioka, T. (1974). Viscous elastic properties of internal membrane of skeletal muscle fibers. *Jikeikai Med. J.*, 21 : 135-150.
- 6) Matsubara, S., Maruyama, K. (1977). Role of connectin in the length-tension relation of skeletal and cardiac muscles. *Jap. J. Physiol.*, 27 : 589-600.
- 7) Kimura, S., Akashi, Y., Kubota, M. (1978) *J. Biochem.* 83 : 321-323.
- 8) Kar, N. C., Pearson, C. M. : (1976) A calcium-activated neutral protease in normal and dystrophic muscle. *Clin. Chim. Acta*, 73 : 293-297.

↓ **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

筋肉には収縮性要素と弾性要素とが存在すると、生理学者は筋肉の機能を理解するうえで長い間仮定してきた。前者についてはアクチン・ミオシン系として多くの研究がなされているが、後者については、ごく最近まで不明のままであった。