

7) Chemically skinned fiber によるジストロフィー筋機能の研究

遠藤 実*

研究協力者 北沢俊雄* 八木忍*
飯野正光* 角田康典**

我々は従来、ジストロフィー罹患筋の収縮蛋白ならびに小胞体の機能が *in vivo* でどのように変化しているか、および、その変化が病像の進展と共にどのように移り変わって行くかを明らかにすることを目的として、これら収縮蛋白および小胞体がほぼ生理的条件下にあると考えられる *skinned fiber* (名取) を用いて研究を行って来た。

初期の *mechanically skinned fiber* を用いた研究においては、多くの線維で正常筋 *skinned fiber* との間に差を認めることができなかつたが、一部のジストロフィー筋線維では単位断面積当りの発生張力が非常に小さいものが存在した。また、小胞体の Ca とりこみ能力が小さいと思われる線維を一部に認めたり、しかし、これらの変化は、ジストロフィー筋では一部の線維は細くなっているために、*skinned fiber* を作る際の機械的損傷が相対的に強く出たための *artifact* であるという可能性が完全には否定できなかつた。

この不確かさを避けるため、および、筋全体としての平均的性質を見るため、我々は次いで全筋を用い、その全線維をサポニンにより *chemically skinned fiber* にして、その

性質を調べた^{2, 3)}。その結果、①ジストロフィー筋では単位断面積当りの最大発生張力が小さい、②ジストロフィー筋では収縮系の見かけの Ca 感受性が高く、低 Ca 濃度領域での相対的な発生張力が大きい、③ジストロフィー筋で小胞体の Ca とりこみ能力が低下している、などを示唆する実験結果が得られた。しかし、この場合まだ実験方法が不完全で、全筋の厚みを通して ATP などの基質が十分に筋内部にまで拡散によって供給されているか否かの点に問題があつた。したがつて、上記の結果は単にジストロフィー筋がうすく、溶質の筋内部への拡散がより容易であるための結果に過ぎない可能性を否定できなかつた。

今回は、先の2つの方法の長所を合わせ、拡散の問題のない単一筋線維を、機械的損傷を起こさないサポニン処理 *chemically skinned fiber* にしてその性質を検討した。

実験方法

C57 BL 系マウスの長趾伸筋をとり出し、弛緩液中において 25-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサポニンで約 60 分処理した後、サポニンを含まない弛緩液中で単一筋線維を分離して用いた。上記のサポニン処理で十分に *chemically skinned fiber* になっていることを確かめるため、一部の単一筋線維には分離後さらに同様なサ

* 東北大学医学部薬理

** 東北大学医学部第一内科

ポニン処理をくり返したが、結果はくり返さないものと同様であった。

サポニン処理単一筋線維の1-5mmの部分の両端を絹糸でしばり、一方は実験槽中に固定し、他方はストレインゲージ(Uゲージ)に接続して等尺性張力を記録した。筋節長は光学顕微鏡で測定し、約2.8 μ mにおいて実験を行った。

線維の断面積は Zeiss 透過光型干渉顕微鏡を用い、周囲の液との光路差の、線維を横断する方向に沿った積分値として求めた^{4,5)}。この値は断面における平均蛋白量に比例し、したがって筋節長に反比例する。そこで、すべての断面積の値は、筋節長2.80 μ mにおける値に補正して用いた。

skinned fiber 筋小胞体中の Ca 量は、適当な濃度のEGTAを含んだ弛緩液中で50mMカフェインを適用してほとんど完全に遊離させ、その際起こる収縮反応の大きさから相対量を推定した。

使用した溶液の組成は、ほぼすでに報告した通りである。実験は室温、約25°Cで行った。

結 果

(1) サポニン処理単一筋線維の Ca 感受性

図1は正常およびジストロフィー筋のサポニン処理単一筋線維の Ca 濃度-張力関係を、 10^{-4} M Ca によって発生する張力を1としてプロットしたものである。全体として、正常筋線維とジストロフィー筋線維とで、図に見られる通りほとんど差がなかった。しかし詳細に見ると、統計的に有意ではないが、ジストロフィー筋線維において曲線が低 Ca 濃度側に尾を引く傾向が見られた。たとえば、 5×10^{-7} M Ca によって、正常筋線維は少くとも調べた9本の線維全部が全く収縮を起こさなかったが、ジストロフィー筋線維では16本中4本に、はっきりした収縮が認められた。

(2) 単位断面積当りの最大発生張力

図2はサポニン処理単一筋線維の断面積と、その線維が 10^{-4} M Ca 存在下に発生した張力(最大張力、図1参照)との関係を示したものである。かなりばらつきはあるが、全体として、断面積にほぼ比例して張力が発生して

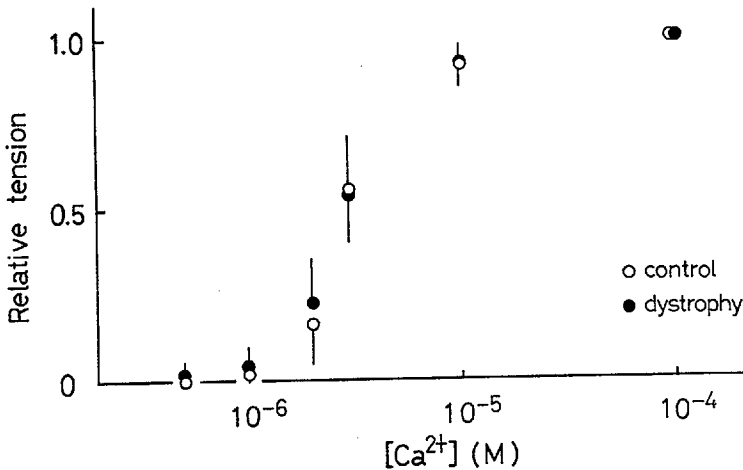


図1 正常およびジストロフィーマウスのサポニン処理単一筋線維の Ca 濃度-張力関係。

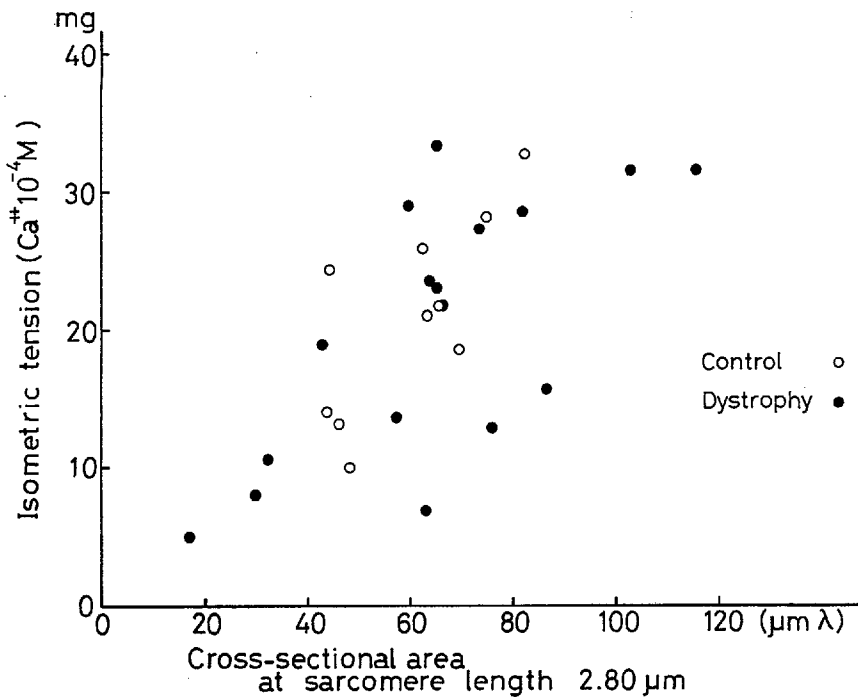


図2 正常およびジストロフィーマウスのサポニン処理単一筋線維の断面積と最大発生張力。

いることが分る。

図2においても、正常筋線維とジストロフィー筋線維とであまり著明な差は見られないが、ジストロフィー筋で平均より張力発生の小さい線維が二、三認められる。

(3) サポニン処理単一筋線維小胞体の性質

図3は、50mMカフェインであらかじめ空にしたサポニン処理線維の小胞体に種々のCa濃度を含む液からCaをとりこませ、その時間を種々に区切って、とりこまれたCa量を、0.5mM EGTA存在下に50mMカフェインを適用して測定したものである。10⁻⁶M Ca、1~2分の処理により最大のCaとりこみが得られることが分る。

図には示されていないが、10⁻⁵M以上のCaでは少くとも30秒までのCaとりこみ量は、3×10⁻⁶Mよりもさらに少い。このよ

うに3×10⁻⁶M以上のCaでむしろCaとりこみ量が減るのは、おそらくCaによるCa遊離機構が同時に働くことが主因をなしているであろう⁷⁾。

各線維間の小胞体のCaとりこみ能力を次のように比較した。小胞体を10⁻⁶M Caで2分処理して最大量のCaをとりこませる(図3)。種々の濃度のEGTA存在下に50mMカフェインを適用して、そのCaをほぼ全部放出させる。放出されるCa量は同一線維では同じはずであるが、EGTA濃度の増加と共にそれによって起る収縮反応は小さくなる

(図4)。もしも、ジストロフィー筋で、筋の単位体積当りの小胞体の最大Caとりこみ量が少なければ、より低濃度のEGTAでこのカフェイン収縮が見えなくなると考えられる。図4では、0.25mM EGTA存在下における

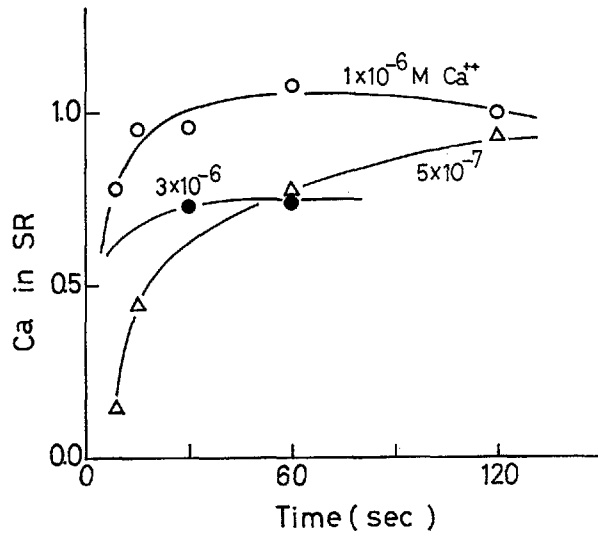


図3 ジストロフィーマウスのサポニン処理単一筋線維小胞体のCaとりこみ。

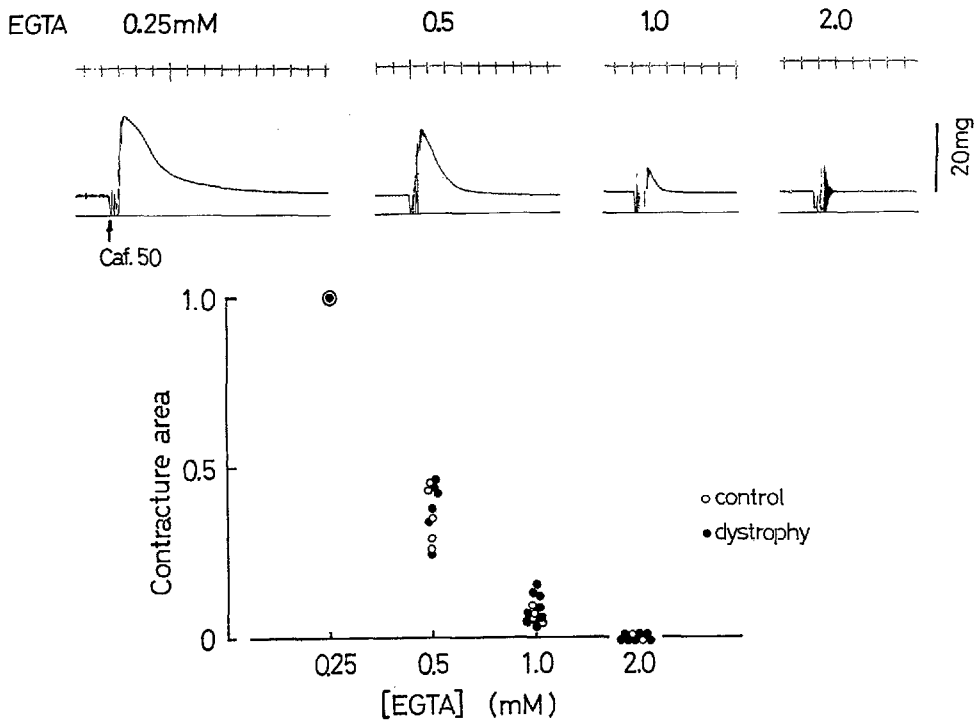


図4 正常およびジストロフィーマウスのサポニン処理単一筋線維小胞体のCaとりこみの最大容量を調べる実験。説明本文。

カフェイン収縮の反応を1として、種々のEGTA濃度下の反応の大きさをプロットしてあるが、正常筋線維とジストロフィー筋線維とで、差が全く認められなかった。

考 察

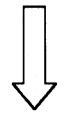
上記のサポニン処理単一筋線維を用いた我々の実験結果は、ジストロフィー筋においても多くの筋線維の機能は正常であるという一般的理解をさらに裏付けるものである。

今回の結果は、(1)収縮系のCa感受性は、ジストロフィー筋で僅かに高い傾向を示す線維が見られたものの、昨年度に我々の報告したサポニン処理全筋の結果よりはるかに正常筋との差が少い。(2)単位断面積当りの張力についても同様のことが言える。(3)小胞体のCaとりこみ能力は全筋では差があることを示唆する結果が得られたが、今回は全く差が見られなかった。今回の実験に当って、ジストロフィー筋からはできるだけランダムに線維をとり出すよう努力はしたが、それでも生理的機能に変化を来たした線維が選ばれ難い傾向があったのか、あるいは昨年度の結果が溶質拡散の不十分さから来る artifact なのかは、今後検討されねばならない。そのためには、

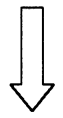
単一筋線維の実験例を増すこと、および、全筋から少し小さな筋束を作り、拡散の問題を解決した上で多数の線維の平均値を得ること、の2方向から、この問題にとり組む予定である。

文 献

- 1) 遠藤実, 北沢俊雄 (1974) 厚生省進行性筋ジストロフィー症研究班業績集[II], 219.
- 2) 江橋節郎, 遠藤実, 北沢俊雄, 八木忍, 高木昭夫 (1976) 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究, 冲中班, 昭和50年度研究報告書, 58.
- 3) 江橋節郎, 遠藤実, 北沢俊雄, 八木忍, 高木昭夫 (1977) 筋ジストロフィー症の病因の究明に関する研究, 冲中班, 昭和51年度研究報告書, 68.
- 4) 遠藤実 (1967) 第17回日本医学会総会学術講演集, I, 193.
- 5) Endo, M. (1972) Nature (New Biol.) 237, 211.
- 6) Endo, M. & Nakajima, Y. (1973) Nature (New Biol.) 246, 216.
- 7) Endo, M. (1977) Physiol. Rev., 57, 71.



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



我々は従来,ジストロフィー罹患筋の収縮蛋白ならびに小胞体の機能が *in vivo* でどのように変化しているか,および,その変化が病像の進展と共にどのように移り変って行くかを明らかにすることを目的として,これら収縮蛋白および小胞体がほぼ生理的条件下にあると考えられる *skinned fiber*(名取)を用いて研究を行って来た.