

5) 筋肉の弾性タンパク質

江橋節郎*

研究協力者 丸山工作**

序 論

筋肉—骨格筋—は、その名の示すようにけんを通じて骨につながっており、筋肉の収縮は骨を動かして運動を可能とする。筋肉とけんの結合様式は、まだくわしく知られていないが、収縮系と結合組織の弾性線維のコラーゲンとはなんらかのしくみによってつながっているものとみなされている。

昔から生筋の収縮にともなう張力発生を研究してきた生理学者は、筋肉内に弾性要素が存在していると主張してきた。第1に、筋肉細胞内の筋原線維が収縮して両端で力を発生するためには弾性要素で全体が連結されていなくてはならない。第2に筋肉をいちじるしく伸長させて、ミオシンとアクチンのフィラメントがすっかりはなれてしまってもなお張力を発生し(受動的張力発生)、はなせば、もとにもどってゆく。これは、Z膜間になにか弾性要素の存在することをつよく示すものである。

しかし、そんな弾性要素は構造的に示されたことはないし、また弾性タンパク質も知られていなかった。漠然として、筋細胞をおおっているコラーゲン線維膜が弾性にあずかっているのであろうといわれてきた。しかし、筋肉細胞内に弾性要素の存在することが、名取の *skinned fiber* でみごとに示された!)細胞膜をのぞいた部分でも、すなわち筋原線維でも伸長による張力発生がみとめられたので

ある。彼はその弾性要素を内部膜とよび、SRやT管系を考えた。これらが収縮や受動伸長にともなう張力発生をまかなえるとは思えない。じじつ、T管系をこわしたグリセリン筋や、SRをこわした Brij 処理筋でも受動伸張によって張力発生がみとめられる?)

筆者はグリセリン処理筋原線維の ATP による収縮性をしらべているうちに、奇妙なことに気づいた。Hasselbach-Schneider 溶液でミオシンをのぞいてZ膜とアクチン・フィラメントだけにしても線維のつながりはそのままである。さらに0.6MKIで処理してアクチンを溶出してもZ膜はあきらかにつながっているのである!もちろん光学顕微鏡下ではなにもみえないのにである。なにかZ膜間をつなぐものがあるにちがいないと考え、いろいろしらべてみた結果うすい酸やアルカリにも耐える弾性タンパク質がそのものであることをつきとめた?)

本論文では、コネクチン(connectin)と名づけられたその弾性タンパク質についての研究の概要をのべ、さらに筋ジストロフィーにおけるその役割を推察してみたいと思う。また、ウニ卵でもその皮層部から筋肉と同じような弾性タンパク質のとれたことから細胞の形の維持にも関与しているものと思われる。本研究は、慈恵会医大の名取礼二学長をはじめ多くの方々のご協力をまけてできた?)

弾性タンパク質の調製

ウサギ、ニワトリ、ネズミ、カエルの骨格筋、ウシ、ニワトリ、カエルの心筋から筋原

* 東京大学医学部薬理

** 京都大学理学部生物物理

線維を調製し、それから、Hasselbach-Schneider 溶液、1 mMNaHCO₃、0.6MKI 溶液で徹底的に抽出した残渣 (stroma)⁴⁾から出発してつくる。

Stromaを1N Acetate, 0.1N NaOH で処理したのち、Phenolで抽出する。不溶性タンパク質をよく水洗する。筋肉 1 kgから約5gのタンパク質が得られる。これは、筋原線維タンパクの約5%にあたる。

弾性タンパク質の化学的性質

このタンパクは、6 M Urea, 3 M KSCN, 3 MKI, 6 M guanidine-HClなどタンパクを変性溶解する reagent で、ゲル化するだけで溶けない。1N NaOHで加熱すれば部分的加水分解のため溶ける。またエタノール、クロロホルムなど有機溶媒でも溶けない。0.1%~1% SDS でも溶けない。したがって SDS gel electrophoresis でも band を示さない (ときに4.3万ダルトンの impurity をふくむことがある)。

これらの性質は血管の弾性タンパク質エラスチンとよく似ている。

アミノ酸、6 NHCl 110° 24時間加水分解後定量された。これについては次にする。糖や脂質を合せて15%ぐらいふくんでいる。

弾性タンパク質のアミノ酸組成

表1にニワトリの筋肉の弾性タンパク質コネクチンのアミノ酸組成があげてある。比較のために当研究室でつくったニワトリのけんのコラーゲンならびに大動脈のエラスチンのアミノ酸組成も示されている。まず第1に気をつけることは、グリシン含量がエラスチンやコラーゲンの1000残基中300以上に対して、コネクチンのそれは100以下とずっと少ない点である。ヒドロキシプロリンもふくまれてはいるが、ずっと少ない。プロリンもやや少ない。これに対して、アスパラギン酸、スレオニン、セリン、グルタミン酸、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニ

表1 ニワトリの弾性タンパク質のアミノ酸組成

	エラスチン	コラーゲン	コネクチン
Hypro	31	100	12
Asp	2	55	86
Thr	5	23	58
Ser	3	38	57
Glu	12	78	113
Pro	118	100	71
Gly	366	313	95
Ala	182	109	87
Val	177	27	73
Met	0	9	25
Ile	20	16	54
Leu	55	23	78
Tyr	6	7	29
Phe	21	17	41
Lys	0	26	54
His	0	6	15
Arg	2	53	57

表2 脊椎動物骨格筋のコネクチンのアミノ酸組成

	カエル	ニワトリ	ネズミ	ウサギ
Asp	93	87	99	85
Thr	58	59	59	58
Ser	64	58	61	56
Glu	121	114	114	110
Pro	60	72	55	55
Gly	115	96	99	79
Ala	82	88	78	93
Val	52	74	57	81
Met	23	25	28	31
Ile	49	55	53	61
Leu	71	79	88	93
Tyr	26	29	29	29
Phe	31	35	40	41
Lys	80	58	58	55
His	16	18	20	15
Arg	59	53	62	58

ルアラニン、リジン、ヒスチジンはいずれも多くふくまれている。一見して、コネクチンは、他の弾性タンパク質のコラーゲン、エラスチンとは異なったタンパク質であることがわかる。

表2にカエル、ニワトリ、ネズミ、ウサギの骨格筋のコネクチンのアミノ酸組成がまとめられている。これらは、おたがいによく似ていることが明白である。20%以上異なるのは、グリシン(カエルが多い)、バリン(ウサギが多い)、メチオニン(ウサギが多い)、イソロイシン(ウサギが多い)、ロイシン(ウサギが多い)、フェニルアラニン(ネズミとウサギが多い)、リジン(カエルが多い)くらいのものである。

さて、ここで問題になるのは、ヒドロキシプロリンである。コラーゲンは1000残基中100ふくんでいるので、これがコネクチン中に10%混在していれば10ぐらいふくまれていることになる。コネクチンの調製法からいって架橋結合にとんだコラーゲンは除去できないものとみなしてよい。

そこで、結合組織のもっとも少ないウサギのPSOAS筋(グリセリン筋として用いられる)から筋原線維を調製してしらべてみた。ところが意外なことがわかった。いわゆる“筋原線維”標品では、筋線維(細胞)の破片がたくさん混在していた。筋線維のまわりには細胞膜があり、その上にコラーゲン線維のシートがかぶさっている可能性がある。当研究室で純粋な筋原線維を分離するショ糖濃度勾配遠心法が開発され、筋線維破片と筋原線維とがわけられた⁵⁾その両者からコネクチンをつくり、含量をくらべてみた。両者ともにコネクチンをふくんでおり、筋原線維は全タンパクの5.5%、筋線維破片は7.3%の含量であった。このことは、コネクチンが筋原線維中にたしかにふくまれていることをたしかめたと同時に、筋線維の周辺にもあることを示している。

さて、両者のコネクチンのアミノ酸組成はというところほとんど同じであった。そして1000

残基中ヒドロキシプロリンを筋原線維は7、破片は12ふくんでいた。よってコラーゲンの混在によるためではないことがわかった。

コネクチンの架橋結合

コラーゲンやエラスチンでは、分子内(サブユニット間)や分子間の架橋結合がくわしくしらべられている⁶⁾⁷⁾両者に共通するのは lysinonorleucine や hydroxylysinonorleucine である。エラスチンでは desmosine が知られている。

コネクチン20gを200mlの6N HClで reflux 法で加水分解し、不溶性のものを除き Dowex-50W のカラムに吸着させ、0.35M citrate buffer, pH5.28 で溶出した。中酸性のアミノ酸がまずでてきて、ついでリジンを主成分とするピークと、リジン、アンモニアをふくむだらだらピークがつづく。後の2つの主な分画を Dowex-50W のカラムで再クロマトして少量の架橋結合にあずかるアミノ酸をとりだし、薄層クロマトグラフィならびに自動アミノ酸分析法により同定した。lysinonorleucine, hydroxylysinonorleucine はわかったが、未知の成分2つがあり、同定に努力中である。

コネクチンの弾性

フェノール処理後水洗したコネクチンは固まりとなる。これは短ざく形に切って、引っぱると伸び、はなせばもとにもどる。もとの長さの20%以内に伸ばせば可逆的に張力を発生させることができる。そのヤング率は3~5×10⁶dyne/cm²で、生ゴムの値と同じである(硬化ゴムはその10倍)。ヤング率はコラーゲン線維では1700×10⁶dyne/cm²におよび、コネクチンはその1/300以下で、ずっと引っぱりやすい。

ゴム弾性かどうかの check に、温度を変化させたときの張力変化をしらべてみた。tension temperature coefficient $\left(\beta, \frac{dP}{P \Delta T}\right)$ は正であった。すなわち温度が下れば張力もへり、逆に温度を高くすると張力が上

った。これはゴム弾性であることを示している。なお、 β 値は **skinned fiber**と同様な値を示し、長さの変化による対応も同様であった⁸⁾

Skinned fiberでの研究

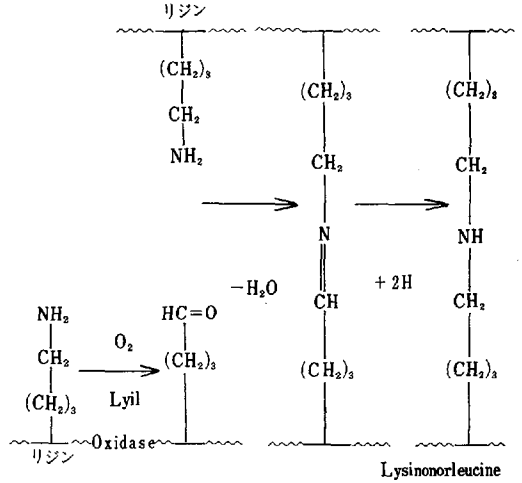
カエルの筋肉の **skinned fiber**を名取法によって切りだし、アルカリ (pH12) 処理によって溶性タンパク質を全部とってしまう。それでも引ばれば伸び、はなせばもとにもどる。すなわち弾性は、コネクチンさえあれば失われない。

定量的な研究は、筋原線維の受動伸長にもなう張力発生はサルコメアの長さが短いときはミオシンがかなり貢献しているが、3~4 μm をこえるとコネクチンの関与が明白なことを示した。ただし pH12のアルカリ処理はかなり張力発生を減少させる。pH10.5ではあまり変化がなかった(名取, 私信)。したがってコネクチンの構造がアルカリ処理で変わるものと思われる。

コネクチンの局在

これまでの研究からみて、コネクチンが筋原線維にあることはまちがいない。しかし、局在を明確にするために抗体法が適用された。すなわち、ニワトリの骨格筋のコネクチンをウサギに注射して抗血清を得た。その γ グロブリンに FITC 蛍光色素を結合させてしらべてみた。ニワトリの筋原線維ならびに筋線維の周辺が染色された。

残念なことに、電子顕微鏡レベルでは、まだコネクチンの局在はわかっていない。おそらく、筋原線維のまわり、および細胞膜の直下に **network** をなして存在しており、**stain** がうすく、みえないのであろう。ちなみにネズミの骨格筋の“細胞膜”標品のアミノ酸組成⁹⁾をみると、コラーゲン70%とコネクチン30%からなっているように思われる(著者はコラーゲンといっている)。



Lathyrismusの実験

ニワトリやネズミに β -aminopropionitrile を投与すると、腰がぬける **lathyrismus** が起こり、コラーゲンが可溶化するためとされている¹⁰⁾。これは、架橋結合にあずかる **lysyl-oxidase** の阻害のためである¹¹⁾

したがって、コネクチンの架橋結合中に **Lysinonorleucine** などリジン起原の **cross-link** があれば **lysyl oxidase** 阻害によってコネクチンは可溶化し、その弾性は失われるはずである。

そこでラットに1日100mgのわりで30日間 β -aminopropionitrile を注射したところ、**lathyrismus** になり、コネクチン含量が半減することがわかった。しかし、可溶化した成分はつかまえていない。

議 論

筋肉細胞内にコネクチンと命名された弾性タンパク質が存在し、それが生理学で仮定されていた **parallel elastic component** の実体であることは、まずまちがいない。ただし、筋原線維をネットのようにとりまきZ膜を結合させているのかといった様子は、まだわかっていない。もしかしたらZ膜とZ膜とをつなぐ細いフィラメントがあると **Hoyle** らが主張したことがあるが¹²⁾、そのものである可能性も否定できない。いずれにしても抗体法

(たとえばフェリチン・ラベル)で電顕下での観察をまたなければならない(目下進行中)。

コネクチン自体に関しては、そのモノマーがどんなサイズなのかが当面の問題となる。エラスチンでもケラチンでもプロトマーについては結着がついていないから、困難な問題である。単離したコネクチンは、エラスターゼ、コラゲナーゼはじめふつうのプロテアーゼで分解をうけないのでよけいむずかしい。この点はさらに検討を要する。というのは、skinned fiber ではコラゲナーゼ処理で elasticity の減少がみられているからである。¹³⁾ この名取らの観察は二重の点で注目値する：intact のコネクチンは protease の作用をうけやすい可能性のあることと、コネクチンに Hypro-Gly-O-Pro というコラゲナーゼが attack するアミノ酸配列のある可能性とである。

生理的に重要な点は、筋肉とけんととの連結のしくみの問題である。とにかく筋肉の発生した張力はけんを通じて骨に伝えられる。とすれば、コネクチンとコラーゲンとが直接結合しているという筆者のアイデアも否定しきれない。その実証はむずかしい。ただひとつ示唆をあたえるのは、最近の中尾¹⁴⁾の研究によれば筋けん接合部でいりくんだ筋肉の細胞膜の一部がやぶれたようになってコラーゲン線維に直接接しているところがあるということである。筋肉側は Z 膜につづいた electron dense 部である。それは、コネクチンからできているのかもしれない。この点は lathyritis 筋での微細構造の変化の解明ならびに抗体法によるコネクチンの局在の研究が解決のいとぐちとなろう。

筋ジストロフィーとの関連

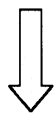
筋ジストロフィーにおける筋肉構造の deterioration のごく初期は、細胞膜におこるとのみかたが有力になりつつあるが、もしかし

たら、弾性構造によるのではないかとの可能性が本研究から考えられる。もちろん、収縮系がそこなわれる後期では、Z 膜の位置のくずれからみてコネクチンの構造がくずれていることは十分予測される。

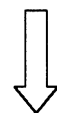
東大医学部の杉田秀夫博士と協同して、筋ジストロフィーにおけるコネクチンの消長を研究すべく、目下材料をあつめている。この研究の難点は最小限 1 g の筋肉がいることである。むしろ、グリセリン筋を調製して、受動張力発生測定を行なう方が簡単であるかもしれない。

文 献

- 1) R. Natori, *Jikeikai Med. J.* 1, 18 (1954)
- 2) M. Kawai and P.W. Brandt, *Fed. Proc.* 32, 374A (1973)
- 3) 丸山工作, 名取礼二, 村上文子, 飯田静夫, 大橋一世, 黒田正明, 野々村禎昭, 村松繁, 松原三郎, 動物生理学シンポジウム(東京)
- 4) K. Maruyama, *J. Biochem.*, 69, 369(1971)
- 5) M. Kuroda, K. Maruyama, *J. Biochem* 投稿予定 (1976)
- 6) M. L. Tanzer, *Science*, 180, 561 (1973)
- 7) A. J. Bailey, S. P. Robins and G. Balian, *Nature*, 251, 105 (1974)
- 8) S. Matsubara, *Jap. J. Physiol.*, 25, 227 (1975)
- 9) T. Konosu and S. P. Colowick, *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 520 (1961)
- 10) C. I. Levene and J. Gross, *J. Exp. Med.*, 110, 771 (1959)
- 11) R. C. Siegel, S. R. Pinnell, G. R. Martin, *Biochemistry*, 9, 4486 (1970)
- 12) G. Hoyle, A. McNeil, B. Walcott and A. Selverston, *Symp. Biol. Hung.*, 8, 34 (1968)
- 13) R. Natori, Y. Umazume and T. Yoshioka, *Jikeikai Med. J.* 21, 135 (1975)
- 14) T. Nakao, *Anat. Rec.*, 182, 321 (1975)



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



序論

筋肉 - 骨格筋 - は、その名の示すようにけんを通じて骨につながっており、筋肉の収縮は骨を動かして運動を可能とする。筋肉とけんの結合様式は、まだくわしくしらべられていないが、収縮系と結合組織の弾性線維のコラーゲンとはなんらかのしくみによってつながっているものとみなされている。