

6) サポニンによる chemically skinned fiber

—ジストロフィー筋への応用の基礎—

江橋節郎*

研究協力者 遠藤 実** 北沢俊雄**
八木 忍** 高木昭夫***

要 旨

(1)ジストロフィー筋小胞体の機能を skinned fiber 標本により追究するための基礎実験として, chemically skinned fiber を作る方法を探索した。

(2)サポニンは $5 \mu\text{g/ml}$ 以上で細胞膜透過性を増大せしめたが, 小胞体機能は $100 \mu\text{g/ml}$ 以上ではじめて障害された。収縮蛋白系は $500 \mu\text{g/ml}$ でも影響を受けなかった。

(3)以上の結果から, サポニン $5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 処理によって, 小胞体の機能を正常に保った骨格筋 chemically skinned fiber を作る事ができることが分った。

(4)サポニン以外の界面活性剤は, 細胞膜透過性を増大せしめる最小濃度で, すでに小胞体機能を障害した。

目 的

ジストロフィー罹患筋の小胞体機能が低下していることは, Sugita et al. (1966) の研究以来すでに明らかにされている。しかし, それが実際にジストロフィー筋の機能障害とどのようにかかわっているかを明らかにするためには, 正常筋および罹患筋の小胞体機能をできるだけ生理的な条件下で調べ, 比較することが必要である。このために, 我々は, Natori (1954) の skinned fiber 法を応用し

てジストロフィー筋線維の収縮蛋白および小胞体の機能を調べ, すでに本班々会議で結果を報告した(遠藤・北沢, 1974)。しかし, この方法は, (1)単一筋線維を用いる実験であるため, ジストロフィー筋中に混在する機能的にはほぼ正常な線維と機能の恐らく低下した線維とを random にとり出せる保証がなく, 全体像がつかめないこと, (2)機能障害を受けていると考えられる細い線維は skinned fiber にする際の機械的損傷が相対的に強いと考えられるので, その損傷の artifact を見る可能性があること, などの難点を有しており, 研究は停滞していた。

ところで, skinned fiber を作る目的は細胞膜という拡散障壁を除くことにある。もし, 細胞膜にのみ選択的に作用してその透過性を十分に増す物質があれば, それによって拡散障壁を取り除いた, chemically skinned fiber を作る事ができる。この場合には線維に機械的損傷を与えることもないし, また全筋を用い, その全線維を一時に skinned fiber にすることも可能であって, 上記の難点が解決される。ただし, 小胞体の性質を調べることが目的であるから, その物質は小胞体機能に影響を与えないものでなければならないことはもちろんである。このような物質を探す目的で, 種々の界面活性剤の筋細胞膜, 小胞体膜, 収縮蛋白系に対する作用を調べた。

方 法

全筋標本はカエル *Rana japonica*, *Rana*

* 東京大学医学部薬理

** 東北大学医学部薬理

*** 東京大学医学部脳研神経内科

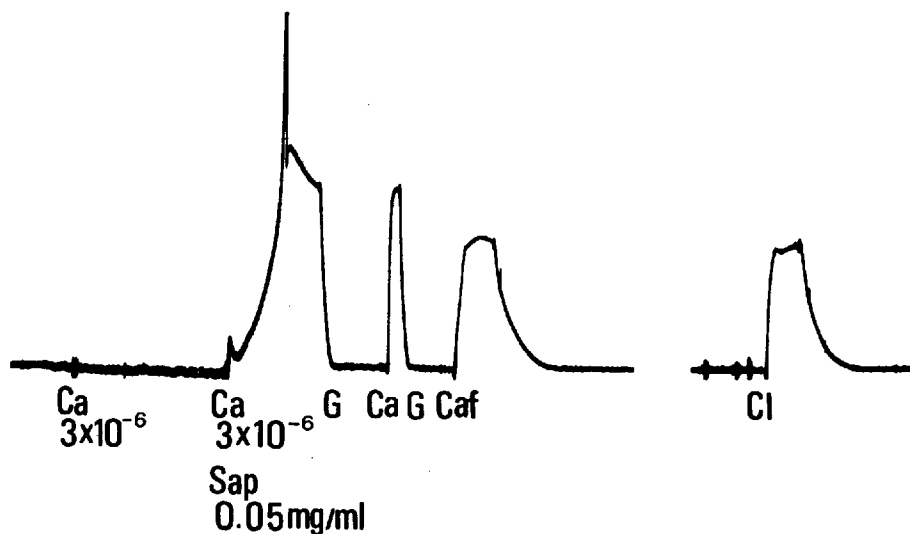


図1 単一筋線維に対するサポニンの作用. 説明本文. $\text{Ca}3 \times 10^{-6}$, $\text{Sap}0.05\text{mg/ml}$ による収縮中に増幅器のゲインを半分にした.

nigromaculata の縫工筋, 単一筋線維はアフリカツメガエル *Xenopus laevis* 腸腓筋からの筋線維を用いた. mechanically skinned fiber は単一筋線維を弛緩液 (メタン sulfonium カリウム 107mM , トリス 20mM - マレイン酸 20mM - KOH 緩衝液 [pH6.8], 硫酸マグネシウム 4mM , $\text{ATP}4\text{mM}$, $\text{EGTA}4\text{mM}$) 中で縦に2つに裂いて作った (Endo & Nakajima, 1973). 全筋の収縮は等張性にすず紙上に, 単一筋線維および skinned fiber の収縮は等尺性に東芝5734Aを用いてペン書きオシログラフ上に記録した. skinned fiber のその他の実験法はすでに報告した通りである (Endo & Nakajima, 1973, 遠藤・北沢, 1974).

結 果

(1) サポニンの骨格筋線維に対する作用

図1は単一筋線維細胞膜に対するサポニンの透過性増加作用を示したものである. 単一筋線維の等尺性張力を測りながら, 外液を正常リンゲルから弛緩液に置き換える. その際後者の主な陽イオンが K^+ であるため, 脱分

極収縮が起こるが, それが不活性化によって弛緩してから図1の実験を行った. 図に見られるように, 外液の Ca^{2+} 濃度を, 収縮蛋白質系に直接作用すれば最大収縮の70~80%を起こし得る濃度, $3 \times 10^{-6}\text{M}$ (Ca - EGTA 緩衝液 [全 $\text{EGTA}10\text{mM}$] 使用) に上げても, 細胞膜が存在するので Ca は細胞内に入らず, 収縮反応は全く起こらない. しかし, 同じ濃度の Ca 存在下にサポニン $50\mu\text{g/ml}$ を加えると, すぐに著明な収縮が起こる. この収縮は fiber を EGTA で洗って外液の Ca 濃度を十分に下げれば弛緩するので, サポニンによる膜透過性上昇の結果, Ca が細胞内に流入したためのものであることが分る. 透過性増加は不可逆的で, サポニンを除いても元に戻らず, その後も Ca 適用による収縮, その除去による弛緩をくり返すことができる (図1).

このサポニン処理筋線維において, 筋小胞体中には Ca が保持されていることは, カフェインによって小胞体中の Ca を遊離させると一過性収縮が起こることで示される. また, 同じ線維で小胞体中に Ca をとりこませて後, 小胞体膜を Cl で“脱分極”すると, 普通の

skinned fiber と同様に Ca 遊離が起こる(図 1)。これらのことから、サポニン処理によって表面膜の透過性が上昇した筋線維においても、筋小胞体の機能は少くとも定性的に保たれていることは明らかである。

(2)他の界面活性剤との比較

種々の界面活性剤について図 1 と同様の実験を行った。Ca 3×10^{-6} M を含む液中においたカエル縫工筋を 15 分間以内に Ca 流入による収縮を起こさせる界面活性剤の最小濃度と、その最小濃度で処理した筋における小胞体機

表 1 筋細胞膜および小胞体膜に対する界面活性剤の作用 (説明本文)

界面活性剤	細胞膜に対する最小有効濃度	最小有効濃度処理後の Cl 反応
Triton X-100	0.5 (mg/ml)	-
Brij-58	0.5	-
Saponin	0.005	+

能残存の有無を、小胞体の Cl “脱分極”の結果の Ca 遊離による収縮の有無で調べた結果の一例を表 1 に示した。これから明らかのように、サポニン以外の Triton X-100, Brij-58 などは、細胞膜の透過性を増加させる最小濃度ですでに筋小胞体の機能を障害し、正常な Cl “脱分極”反応を消失させる。

なお表 1 に示した通り、サポニンの表面膜透過性増加作用は $5 \mu\text{g/ml}$ ですで見られた。

(3)小胞体膜機能に障害を与えるサポニンの濃度

以上の結果から、サポニンだけが chemically skinned fiber を作る方法として有望であることが分るが、サポニンも高濃度を用いれば小胞体膜機能も当然障害を受けることが考えられる。小胞体の性質を調べるのが最終目的であるから、小胞体機能に障害を起こさないサポニンの濃度範囲を明確にするために次の実験を行った。mechanical に作った

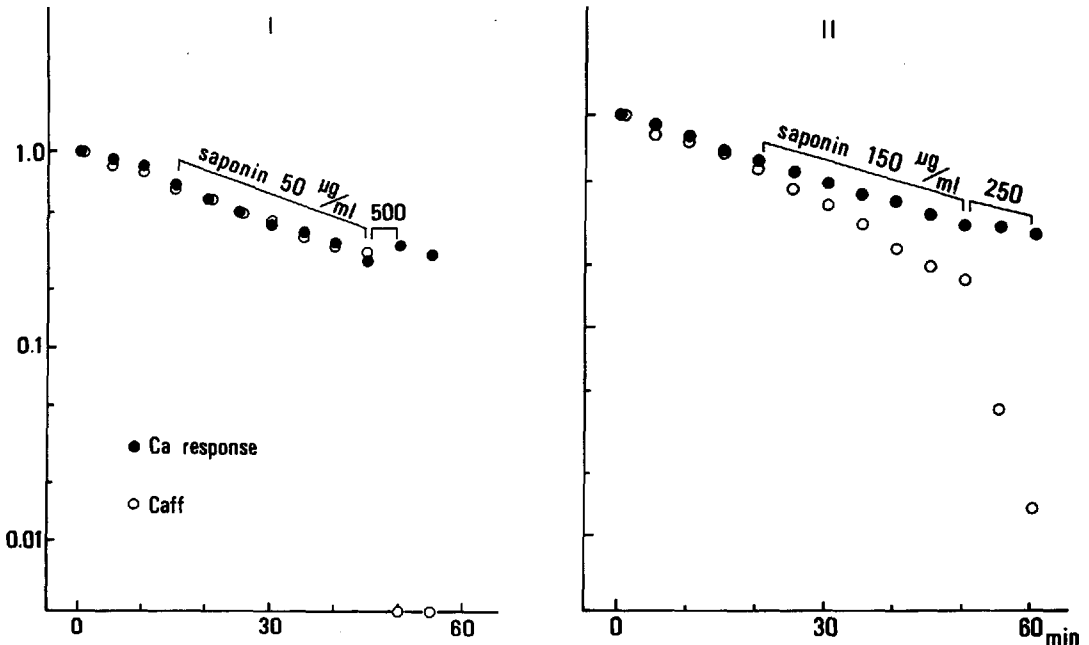


図 2 mechanically skinned fiber の小胞体および収縮蛋白系に対するサポニンの作用。説明本文。

skinned fiber に一定間隔毎に $\text{Ca } 3 \times 10^{-6} \text{ M}$ を30秒間適用し、その収縮反応を見る。このCa収縮の終了直後に毎回、その30秒間に小胞体にとりこまれたCaをカフェイン25mMによって全部放出させ、その結果の収縮を調べる。図2に示すように、くり返しと共にこれらの収縮はいずれも、ほぼ指数函数的に小さくなるが、これは線維の劣化を示すものである。図に示す如く、無処理標本ではカフェイン収縮劣化の程度は、Ca収縮の劣化と全く同程度であった。このことは、小胞体の機能にはほとんど劣化が起こらず、カフェイン収縮の漸減は収縮蛋白系の劣化ですべて説明できることを示している。

さて、図2, I に示すように、サポニン50 $\mu\text{g/ml}$ を適用しても、少くとも30分以内では収縮反応漸減の時間経過には何の変化もなかった。しかし、図2, II に見られるように、サポニン150 $\mu\text{g/ml}$ 以上ではCaによる収縮、すなわち収縮蛋白の劣化の時間経過にはやはり変化がなかったが、カフェイン収縮は明らかにCa収縮よりも速やかに減少した。別の実験ではサポニン100 $\mu\text{g/ml}$ で同様な小胞体への影響が見られた。サポニンのこの影響は濃度が高いほど著明であった。

なお、図2においてサポニン250あるいは500 $\mu\text{g/ml}$ 適用後の最初のCa収縮が相対的に適用直前のCa収縮より大きくなっているのは、小胞体機能が障害されてCaとりこみができなくなったため、外部に与えられたCaが濃度を減ずることなく収縮系に作用した結果であると考えられる。

以上の実験から、サポニンは少くとも500 $\mu\text{g/ml}$ までは収縮系に対して影響を与えないが、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で筋小胞体の機能を障害することが明らかである。しかし、50 $\mu\text{g/ml}$ 30分処理では小胞体のCaとりこみおよび保持能力、またそのカフェインに対する反応性はほとんど影響を受けないと結論できる。

別の実験で、小胞体のCl⁻“脱分極”によるCa遊離を調べたが、やはりサポニン50 $\mu\text{g/ml}$ 30分処理で変化がなかった。

考 察

多くの界面活性剤は細胞膜透過性を増加せしめる濃度で筋小胞体にも作用するので、本研究で目的とするchemically skinned fiberを作るための手段とはならない。しかし、サポニンは5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞膜透過性を増加せしめるが、筋小胞体機能は50 $\mu\text{g/ml}$ 30分処理でも全く影響がなかった。収縮蛋白に対しては500 $\mu\text{g/ml}$ でも影響がなかった。したがって、5~50 $\mu\text{g/ml}$ の範囲のサポニンは小胞体並びに収縮蛋白系の機能を調べるためのchemically skinned fiberを作る手段として十分用いることができる。

サポニンによる透過性増加の程度は、上記の実験から、少くともCa, EGTA, CaEGTAなどを自由に通過せしめる程度であることは明らかであるが、Ohtsuki (1976)はフェリチン粒子も通過できることを示している。したがって、十分大きな孔が膜にあくものと考えられる。しかし、図1のEGTAでCaを除去したときの弛緩速度などは、同様な条件下のmechanically skinned fiberに比べるとかなり遅く、孔の数がそれ程多くないことを示唆する。この溶液交換、拡散にやや時間がかかることがmechanically skinned fiberに比べた欠点であり、今後解決されるべき問題点の一つである。

この拡散の点に問題はあつたものの、サポニンを用いれば機械的損傷なしに、細い筋線維でも、あるいは全筋の全線維を一時にでも、chemically skinned fiberにすることができる。したがって、目的の項で述べた、ジストロフィー筋小胞体機能のskinned fiberによる研究の前に横たわっていた障害は原則的には解決されたということが出来る。今後この方法を用いて、マウスのジストロフィー筋小胞体の機能の追究を再開する予定である。

なお、サポニンは骨格筋のみでなく、細胞のさらに小さい心筋や平滑筋に対しても、同様にchemically skinned fiberを作る方法として応用できる可能性が十分に存在する。ただし、これらの筋においては小胞体の性質が

種々の点において骨格筋のそれと異っている
ので、サポニン感受性が同じであるか否かは
不明である。この点を十分に検討した上でな
ければ用いられないことはもちろんである。

文 献

1) 遠藤実・北沢俊雄 (1974) 厚生省進行性筋ジス

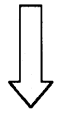
トロフィー症研究班業績集〔II〕, 219.

2) Endo, M. & Nakajima, Y. (1973) *Nature, New Biol.*, 246, 216.

3) Natori, R. (1954) *Jikeikai Med. J.*, 1, 119.

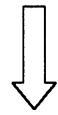
4) Ohtsuki, I. (1976) *J. Cell Biol.* in press.

5) Sugita, H., Okimoto, K. & Ebashi, S. (1966) *Proc. Jap. Acad.*, 42, 295.



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



要旨

(1)ジストロフィー筋小胞体の機能を skinned fiber 標本により追究するための基礎実験として,chemically skinned fiber を作る方法を探索した.

(2)サポニンは $5\mu\text{g/ml}$ 以上で細胞膜透過性を増大せしめたが、小胞体機能は $100\mu\text{g/ml}$ 以上ではじめて障害された.収縮蛋白系は $500\mu\text{g/ml}$ でも影響を受けなかった.

(3)以上の結果から,サポニン $5\sim 50\mu\text{g/ml}$ 処理によって、小胞体の機能を正常に保った骨格筋 chemically skinned fiber を作ることができることが分った.

(4)サポニン以外の界面活性剤は,細胞膜透過性を増大せしめる最小濃度で,すでに小胞体機能を障害した.