

## 9) 筋蛋白の分化の調節機構

江橋節郎\*

研究協力者 眞崎知生\*\*

筋ジストロフィー症にみられるような筋の退行性変性の過程をみてみるといくつかの点で筋の幼若型と思われるような像がみられることがある。生体の不可逆性から言ってこのような筋の退行性変性が筋の発生、成長過程を全く逆行するということはあり得ないと思われる。おそらく再生現象と考えられる。しかしいずれにせよ、このような問題を追究するにあたっては正常の筋の発生、分化の過程あるいは筋の構造形成の解明が如何に大切であるかがうかがえる。

### 従来までの経過

さて我々は今後筋の発生分化の機構をあきらかにするためには以前から相当詳細に研究されている形態学的なアプローチよりも生化学的手法を用いて動的な立場からこの問題を追究するのがより有効であると考えた。そこで我々は筋細胞の最終的な発現形質である筋の構造蛋白に注目し免疫化学的手法を用いて実験を行った。筋の構造蛋白の抗原性についてはあらかじめ検討した結果、組織特異性の面から言ってミオシンのH鎖に対する抗体が最も特異性が高いことがわかったのでこれを用いて実験を行った。従来までに公表したこれらの実験の結果をまとめると以下のようになる。

すなわち蛍光抗体法を用いてニワトリ胚を調べると **fast white muscle** のミオシンの

H鎖に対する抗体(抗S(W))が発生のごく初期の心筋にも反応すること、そして胚の成長につれてこの心筋との反応性は次第に失われ孵化したヒヨコの心臓には全く反応しないこの現象は心筋のミオシンのH鎖に対する抗体(抗C)あるいは **slow red muscle** のミオシンのH鎖に対する抗体(抗S(R))を用いても本質的に同じである。つまり心筋であれ骨格筋であれ発生初期のニワトリ胚の各筋はこれら3種類の抗体に反応し得るが、胚の成長に伴いそのひとつを残して他は反応しなくなる。またこのような初期の胚の各筋に存在する3種の抗原はそれぞれ別々の細胞内に存在するのではなく同一の細胞内に存在することを二重蛍光染色法を用いて証明した。

次の問題はこれら3種の抗原が同一の分子上に存在するのか、それとも別々のミオシン分子上に存在するのかという問題である。この問題は次のような方法を用いて各々別々の抗原をもった少なくとも3種類のミオシンが存在するためであることがわかった。つまり胚の胸筋よりミオシンを合成するといわれるポリリボゾームの分画をとり、これによって *in vitro* で<sup>14</sup>C-アミノ酸をとり込ませる。そしてこの<sup>14</sup>C-ペプチドを3種類の抗体で定量した。その結果各ミオシン抗体に特異的に反応する互いに全く独立な分画が存在することがわかった。また胚発生のいろいろな時期の胸筋について同様な実験を行い各分画を経日的に追ったところ胚の成長につれて胸筋中の **slow muscle** 型、心筋型のミオシンの合成能は日とともに低下してくる。同様な経過は心

\* 東京大学医学部薬理

\*\* 筑波大学医学部基礎医学系薬理

筋の発生過程においても認められる。

ミオシン分化の要因

さてそれではこのようなミオシンの合成能の選択的な変化はどのような要因でおこるの

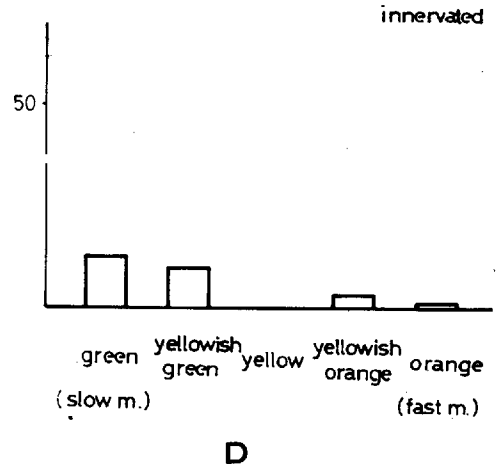
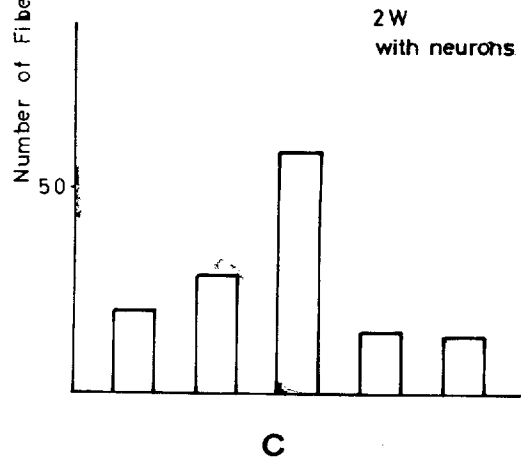
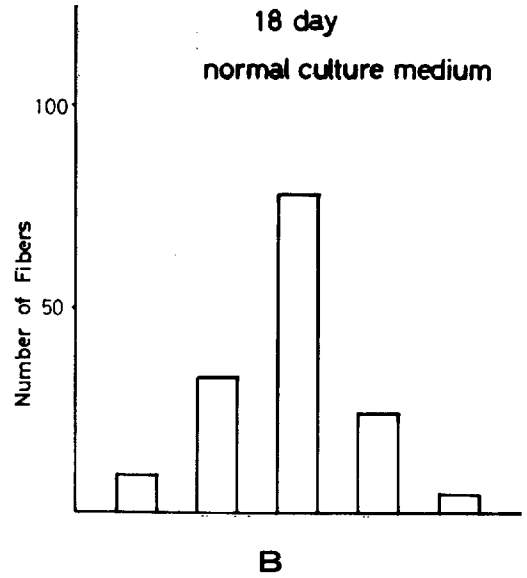
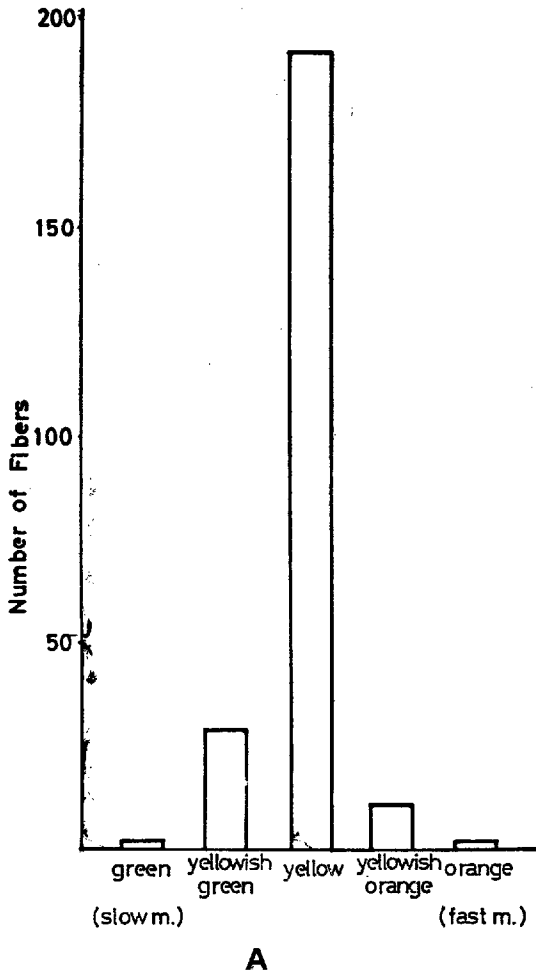


図1 11日目胸筋由来の筋培養細胞を蛍光抗体法で染色しその色調を5段階にわけてそのmyotubeの数を数えたもの、A:正常培養液中で5日間培養したもの、B:正常培養液中で18日間培養したもの、C:卵卵7日目脊髄由来細胞と2週間混合培養したもの、D:Cの中で形態学的に神経支配をおこしたmyotubeだけについて数えたもの、抗S(R)をFITCで抗S(W)をtetramethyl Rhodamine isothiocyanateで標識してある。

だろうか。この問題を解決するためにこの実験系をより単純化する目的で筋の培養細胞を用いた。11日目のニワトリ胸筋由来の培養細胞を種々の期間培養した後グリセリン処理し、その中におけるミオシンの分化の程度を抗S(R)と抗S(W)を用いた二重蛍光染色法で検索してみると、培養開始初期の myotube ではこの2種類のミオシンがひとつの細胞中に共存する。さらに図1 A, Bに示すようにこの培養筋細胞を16日間培養し続けてもそれ自身である程度は分化するが全体としては分化しない。また培養をこれ以上続けても変りないまた成長したニワトリ胸筋を培養液中でホモジェナイズしこの遠心上清中で筋細胞を培養する。筋抽出液は2日目毎に新鮮なものとりかえた。しかし蛍光抗体法で調べた結果では、この中で2週間以上培養してもミオシンのパターンは対照群と差がなかった。つまり分化はおこらなかった。

11日目のニワトリ胚胸筋と7日目の脊髄由来の神経細胞とを混合培養すると筋に神経支配がおこる。そこで形態学的に明確な神経支配がおこった筋を抗S(R), 抗S(W)を用いて二重蛍光染色法により調べてみると、どちらの抗体にでも反応するというのではなく、いづれかの抗体に優位に反応する。つまり図1 Dに示すように神経細胞と筋細胞を混合培養すると対照群とくらべた場合いくらか緑色あるいは橙色に染まるものが増えてくる。

表1 ミオシンを合成する polysomal RNA の特異性

100,000×g上清 モノゾーム	skeletal (cpm)	cardiac (cpm)
skeletal	306	536
cardiac	357	569

解卵17日目ニワトリ胚胸筋のミオシン合成能をもつ polysomal RNA に、同じ時期の胸筋(skeletal)あるいは心筋(cardiac)由来のモノゾームあるいは100,000×g上清を加えて<sup>14</sup>C-アミノ酸の取り込みをみたもの(骨格筋、心筋の特異性はない)

つまりこの事実は神経支配のおこった筋のミオシンは分化していることを示している。

なお成長した親の筋の性質と神経支配との関係についてはいくつかの興味ある結果が報告されている。白筋、赤筋の筋の性質の決定に神経が重要な影響を持つと主張する学者の間では、その神経のパルス頻度あるいは神経から分泌される何かある物質のいずれが影響力を持っているかということが問題になっている。

### ミオシン分化の調節機構

それではこのようなミオシンの合成能の選択的な変化はどのような機構によって調節されているのであろうか。筋細胞におけるミオシン分子そのものの発生が mRNA の翻訳の段階で調節され得る可能性が一部分存在することがわかっているが、心筋型と骨格筋型のミオシンの分化に関してはこの翻訳の段階における蛋白因子の関与はない。このことは次の実験からわかる。17日目のニワトリ胚胸筋からミオシンを合成する大きな polysomal RNA と同じ胸筋からとった100,000g上清、リボゾームおよび17日目ニワトリ胚心筋からとった100,000g上清とリボゾームをいろいろな組合せで反応させてその mRNA の活性発現をみてみるとその結果は表1に示すように蛋白因子によらず全く mRNA 依存の型で活性発現が行われていることがわかった。一方

表2 解卵11日目および17日目のニワトリ胚胸筋のミオシン合成を行なう polysomal RNA の各ミオシン合成能の比較

polysomal RNA from	抗血清(cpm)	
	抗心筋ミオシン	抗白筋ミオシン
11day	111	162
17day	79	265

各 polysomal RNA に17日目胸筋より調製した100,000×g上清、リボゾームを加えて<sup>14</sup>C-アミノ酸を取り込ませ、合成されたペプチド中の各ミオシン分画を各抗血清によって定量した。

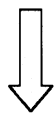
11日目と17日目のミオシン合成の polysomal RNA にそれぞれ17日目の100,000g 上清とモノゾームを加えた場合に取り込まれた<sup>14</sup>C-アミノ酸を抗C, 抗S(W)で定量すると表2のようになる。つまりこの結果も全く mRNA 依存の型である。

#### ま と め

以上の結果から筋構造蛋白であるミオシンのH鎖に注目して筋の分化の過程をみてみると、培養細胞ではこの分化はおこりにくく、神経の支配がおこなわれている場合に分化がおこることから神経が重要な役割を果していると考えられる。そしてこの要因によっておこる分化は蛋白合成の段階でなくそれ以前の段階における調節の結果であると考えられる。我々はさらにこの神経細胞のどのような因子がこの分化の誘導に関与するのか、またその際の調節機構は遺伝子治性発現のどの段階であるかを究明中である。

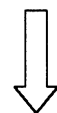
#### 文 献

- 1) Ebashi S. Masaki T. Tsukui R. : Cardiac Contractile Proteins, The Myocardium, Adv. Cardiol, 12, S. Karger Basel 1974 pp59-69.
- 2) Masaki T. : Immunochemical comparison of myosins from chicken cardiac, fast white, slow red and smooth muscle. J. Biochem, 76, 441~449, 1974.
- 3) Masaki, T. Yoshizaki C. : Differentiation of myosin in chick embryos. J. Biochem 76, 123~131, 1974.
- 4) Masaki T. Kinoshita T. : Synthesis of cardiac myosin by a polyribosome fraction from chick embryonic skeletal muscle J. Biochem. 75, 1193~1195 (1974).
- 5) Masaki T. Kinoshita T. : Change of the properties of myosin-synthesis during development (準備中).
- 6) Masaki, T. : Differentiation of myosin in cultured muscle cell from chick breast muscle (準備中).
- 7) Masaki T. : Effect of innervation on myosin differentiation in cultured muscle cell (準備中).



## 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



筋ジストロフィー症にみられるような筋の退行性変性の過程をみてみるといくつかの点で筋の幼若型と思われるような像がみられることがある。生体の不可逆性から言ってこのような筋の退行性変性が筋の発生、成長過程を全く逆行するということとはあり得ないと思われ、おそらく再生現象と考えられる。しかしいずれにせよ、このような問題を追究するにあたっては正常の筋の発生、分化の過程あるいは筋の構造形成の解明が如何に大切であるかがうかがえる。