

10) 発生過程における筋原線維の形成について

大日方 昂*

研究協力者 鳴田 裕**

よく知られている様に、骨格筋の筋原線維では2種類のフィラメントが正しい方向性をもって立体的かつ規則的に配置され、それによって各フィラメントを構成するアクチン・ミオシンの規則性のある相互作用が可能となり、収縮機能が営まれている。ところが、筋分化の過程で筋原線維の素材となる各構成タンパク質が合成された後、どの様にして規則的構造へ形づくられるかについては、電子顕微鏡による筋原線維形成過程の形態的観察はあるものの、構造形成の調節のしくみを明らかにしようとする試みは従来あまり行なわれなかった。ごく最近、Hayashi (1974) は、精製されたアクチン、ミオシンを用いて、*in vitro* で筋原線維と類似したアクチン・ミオシンフィラメントの立体的配列を再構成する試みに成功し、アクチンとミオシンの相互作用が筋原線維の構造形成の最初の段階で、重要な調節的役割を果すことを示唆した。又、石川 (1969) や Pollard (1974) は、未分化筋細胞や非筋細胞内のアクチンフィラメントをH-メロミオシンで標識して同定する方法を用いて、これらの細胞内のアクチンフィラメントの分布や polarity を検討した。これらの研究を背景として、本研究では培養条件化において分化しつつある筋細胞内で、筋原線維が形づくられていく過程で(1)どのようにして、アクチンとミオシンフィラメントの規則性のある組み合わせが形づくられていくのか、又そ

の際アクチンフィラメントの方向性に規則性がみられるかといった点に着目しながら筋原線維過程を電顕的に観察し、更に(2)完成された筋原線維に存在する調節タンパク質が発生過程でいつ筋原線維上に構造的にくみこまれるかという点に焦点を合わせつつ、ミオフィラメントの分化の問題を調べた。

1. 筋原線維形成の初期過程におけるアクチンフィラメントの polarity (方向性)の検討
孵卵12日目のニワトリ胚の大腿部から横紋筋組織を摘出し、トリプシン処理により単一細胞に解離し、細胞懸濁液を得た。あらかじめ選択的細胞培養法 (Shimada, 1975) により筋芽細胞以外の細胞をできるだけ除去した後、 10^6 /ml 培養液の細胞濃度で、単層細胞培養を行なった。培養液はイーグルの基本培養液80%、馬血清15%、ニワトリ胚抽出液5%、L-グルタミン1 mM、ペニシリン50単位/ml ストレプトマイシン50 μ g/ml のものを用いた。培養6日目の細胞(ほとんどが筋管細胞を形成している)を0.1%サポニン-0.1M カコジル酸緩衝液(pH7.0)で室温30分間処理(Ohtsuki, 1975の方法)又は、50%グリセリン(0.1MKCl, 1mM MgCl₂, 10mM トリス-マシエート緩衝液 pH7.0 を含む)で24時間以上(Ishikawa, 1969の方法)して原形質膜をこわした後、5 mg/ml のH-メロミオシンを用いて4°Cで、15時間処理することにより、アクチンフィラメントを修飾し、固定、包埋した後、切片を作成し、電子顕微鏡観察を行なった。

*千葉大学理学部生物

**千葉大学医学部解剖

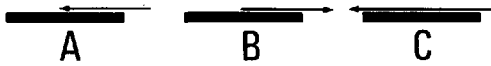


図1 アクチンフィラメント(細い方)とミオシンフィラメント(太い方)の組合わせ。矢印はH-メロミオシンの結合("Arrow head")によって現れる polarity の向きを示す。

用いた培養6日目の筋細胞内で、種々の筋原線維形成段階のものが、同時に観察された。観察された筋原線維の形成程度を便宜的に分けると、(i)ミオシンフィラメントがほとんど存在せず、アクチンフィラメントのみが単独で分散している場合。(ii)少数のミオシンフィラメント及びアクチンフィラメントが並列して束をなし、筋原線維形成の最も初期段階と思われる場合、(iii)多数のアクチン、ミオシンフィラメントが集合して大きな束をなし、筋原線維形成がかなり進んでいると思われる場合などである。これらのいずれの場合でも、アクチンフィラメントはH-メロミオシン処理により完全に修飾され、矢じり状構造("Arrow head")が形成された。H-メロミオシンで修飾されたアクチンフィラメントの polarity の判別は、超薄切片の試料で観察する場合、かなりの努力が必要とされたが、特にフィラメントが密度高く集合している場合には polarity の判断は実際上不可能に近いこと、及び本研究では、筋原線維形成の最も初期段階を重視する意味から上記の(i)及び(ii)の場合のアクチンフィラメントの polarity に着目して観察した。(i)の場合の様に、アクチンフィラメントだけが分散して存在する場合、矢じり状構造 (arrow head) によって示されるアクチンフィラメントの polarity は一様でなく、近傍のフィラメントの間で polarity の向きについて相関関係はみられなかった。但し、この種のアクチンフィラメントが将来筋原線維形成に関与するものか、それとも未筋肉細胞にも広くみられるような細胞表層に分布するアクチンで、筋原線維に関与しないものか明らかではない。一方、筋原線維形成が開始されたと考えられる(ii)の場合の様に、

アクチンフィラメントがミオシンフィラメントと近接して、平行に並んで存在している時、フィラメントどうしの位置の関係及びアクチンフィラメントの向きを考慮に入れると、両種のフィラメントの組合わせには異なる3つのタイプが考えられる。(図1参照)。アクチンフィラメントの polarity に着目すると、並列して存在しているアクチン及びミオシンフィラメントの相対的位置関係には、3通りの場合が考えられる(図1参照)。即ち、第一のタイプ(図1のA)はアクチンフィラメントがミオシンフィラメントと並列しながら、しかし、ミオシンフィラメントの一方の側にのみ片寄って存在し、同時にアクチンフィラメントの "Arrow head" の向きが、ミオシンフィラメントの両端から中心に向っているもの。この様なフィラメントの組合わせは完成された筋原線維におけると同じである。第2のタイプ(図1のB)は、フィラメントどうしの位置関係は第1のタイプと同じだが、アクチンフィラメントの向きがミオシンフィラメントの中心から両端方向へ向いているもの。第3のタイプは、一定の polarity をもったアクチンフィラメントがミオシンフィラメントの全長にわたって並列して存在しているものである。従って、この場合は、アクチンフィラメントの向きをミオシンフィラメントの上で、中心向きか、両端を向いているかという様には表現できない。ミオシンフィラメントと並列しているアクチンフィラメントについて、その位置関係及び polarity がA,B,C,のどのタイプとなっているか、多数の例を調べた所、Aタイプが圧倒的に多く、71例中62例(88%)で、Bタイプ、Cタイプはそれぞれ6例(8%)、3例(4%)で少数であった。切片試料の場合、アクチン、ミオシンフィラメントの全長をとらえることは困難であるので、できるだけ長いフィラメントを重視する意味で、上記の観察例は0.8 μ m以上の長さをもつミオシンフィラメントをとりあげ、これと並列したアクチンフィラメントを検討の対象とした。

この実験の観察結果からすると、一旦ミオ

シンフィラメントが出現し、筋原線維形成が開始される時、最も最初の段階で、既にアクチンフィラメントはミオシンフィラメントの周囲に、位置的にも、polarityの面でも、成熟した筋原線維におけると同様に正しく配置されていると考えることができる。このような配置へ至る過渡的段階はほとんど観察されていない。ミオシンフィラメントの出現が、アクチン・ミオシンフィラメントの規則正しい配列を形づくる上で、重要な役割を果していることが当然考えられよう。換言すれば、アクチンとミオシンの相互作用が筋原線維形成の最初の過程をコントロールしているといえる。分化しつつある胚の筋細胞内で、規則性のあるアクチン・ミオシンフィラメントの束が形づくられるプロセスは、2つの可能性が想定される。一つは Hayashi (1974) が *in vitro* での筋原線維の収縮ユニットの再構成実験の結果から指摘した様に、ミオシンフィラメントが出現した後、これとの相互作用の下で、G-アクチンからF-アクチンへの重合が起って、フィラメントが形成される仕方、もう一つは、あらかじめ細胞内に形成されたアクチンフィラメントが、後に出現したミオシンフィラメントの周辺に吸着されて、都合のよい空間的配列に整えられるといった仕組みである。本研究での観察からは、この点に関して明確な結論を出しえないが、アクチン・ミオシンフィラメントが束を形成しはじめる最も初期段階から、前述の様に既に規則的方向性をもって配置されている点を注目すると、前者の可能性を考えた方が理解が容易の様に思われる。

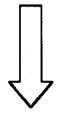
2 筋原線維形成過程におけるミオフィラメントの分化について

本実験では、I-フィラメントに焦点をあて、成熟した筋原線維のI-フィラメントに局在している調節タンパク(トロポニン・トロポミオシン)が、筋原線維形成過程のどの時期から、このフィラメントに存在する様に

なるかを調べた。まず予備的実験として、Obinata (1974) の方法により、13日目ニワトリ胚大腿部横紋筋より天然のアクチンフィラメントを分離して調べた。方法は、分離した筋組織を0.05M KCl, 2mM MgCl₂, 10mMリン酸緩衝液(pH7.0)(KMP)溶液中でホモジェナイズし、10,000g, 15分の沈澱をKMP溶液でよく洗った後、弛緩溶液(0.1mM EGTA, 5mM ATPを含むKMP溶液)で処理することにより天然アクチンフィラメントを遊離させて得た。一方、トロポニン及びトロポミオシンを親ニワトリ胸筋より抽出し、ウサギに注入して得た抗トロポニン、抗トロポミオシン血清を、エタノール分画により抗体成分(α_2 -グロブリン)を得た。胚の天然のアクチンフィラメントに、抗トロポニン又は、抗トロポミオシンを添加すると白濁を生じ、明らかに沈澱を生じた。このようにして生じた沈澱物をネガティブ染色し、Ohtsukiの方法(1974)に従って、電子顕微鏡で観察した所、アクチンフィラメントどうし並列して集合し、束を形成しているのが観察された。特に抗トロポニンをを用いた場合、アクチンフィラメントの集合物内に、軸方向に約400Å弱の周期がみられた。このことは発生13日目のニワトリ胚の肢の筋肉では、アクチンフィラメントに既に調節タンパクが含まれていることを示している。この方法を用いることにより、培養筋細胞中での筋原線維形成の様々な段階に対応させながら、I-フィラメントの分化を引き続き検討中である。

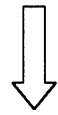
文 献

- 1) Obinata, T., Hayashi, I., and Fischman, D. A. *Develop. Growth Different.*, 16, 105 (1974).
- 2) Ohtsuki, I. *J. Biochem.*, 75, 753 (1974).
- 3) Shimada, Y. and Fischman D. A. *Develop. Biol.* 43, 42-61 (1975).
- 4) Ishikawa, H., Bischoff, R. and Holtzer, H. *J. Cell Biol.* 43, 312-328 (1969).



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



よく知られている様に、骨格筋の筋原線維では 2 種類のフィラメントが正しい方向性をもって立体的かつ規則的に配置され、それによって各フィラメントを構成するアクチン・ミオシンの規則性のある相互作用が可能となり、収縮機能が営なまれている。ところが、筋分化の過程で筋原線維の素材となる各構成タンパク質が合成された後、どの様にして規則的構造へ形づくられるかについては、電子顕微鏡による筋原線維形成過程の形態的観察はあるものの、構造形成の調節のしくみを明らかにしようとする試みは従来あまり行なわれなかった。ごく最近、Hayashi (1974) は、精製されたアクチン、ミオシンを用いて、*in vitro* で筋原線維と類似したアクチン・ミオシンフィラメントの立体的配列を再構成する試みに成功し、アクチンとミオシンの相互作用が筋原線維の構造形成の最初の段階で、重要な調節的役割を果すことを示唆した。