

# Tissue Culture Studies on Acetylcholine Receptor Metabolism and its Pharmacological Modification

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7883">http://hdl.handle.net/2297/7883</a>

## 組織培養法によるアセチルコリン受容体蛋白質の 代謝回転とその修飾因子に関する研究

金沢大学医学部附属病院神経内科 (主任: 高守正治教授)

糸 氏 薫

(昭和61年6月18日受付)

自己免疫疾患である重症筋無力症において、その抗原となるアセチルコリン受容体蛋白 (acetylcholine receptor protein, AChR) の崩壊と合成に対する薬理学的修飾を、ニワトリ骨格筋初代培養法を用い検討した。AChR の崩壊は、筋管細胞の AChR を  $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-bungarotoxin}([^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTX})$  で特異的に標識した後、培養液中に放出された AChR 崩壊産物の放射活性と、筋細胞に結合したままの  $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTX-AChR}$  複合体の放射活性を測定し、一定時間内に培養液中に放出された放射活性を全放射活性で割ったパーセントでその崩壊率を算出した。次に、求めた崩壊率を薬剤添加および無添加の細胞間で比較することによって、各薬剤の影響を検討した。AChR 合成率は、AChR 結合部を非放射性  $\alpha\text{-BuTX}$  で占拠させた後、薬剤添加または無添加で培養し、次に、新しく合成された AChR を  $[^{125}\text{I}]-\alpha\text{-BuTX}$  で標識して、新しい AChR の放射活性の全 AChR の放射活性に対する割合から算出した。対照では、AChR の半減期は  $27.0 \pm 2.3$  時間 ( $n=30$ ) であった。ライソゾームのカテプシン群の阻害剤であるロイペプチンは、半減期を 1.6 倍に延長し、ライソゾームが受容体崩壊に関与していることを示唆した。プラスミンは、その阻害剤である  $\epsilon\text{-aminocaproic acid}$  とトラジロールが半減期を延長しないことより、AChR 崩壊への関与は否定的であった。カルシウム依存性中性蛋白分解酵素 (calcium-activated neutral protease, CANP) 阻害剤メルサリル、ホスホリパーゼ阻害剤メパクリンは、AChR 崩壊を各々 1.3 倍、3.1 倍に抑制し、非ライソゾーム系蛋白分解酵素やホスホリパーゼが AChR 代謝に一役を担っていることが考えられた。プロスタグランジン (prostaglandin, PG)  $E_2$  やアラキドン酸は同様の実験系で AChR 崩壊に影響を与えず、ホスホリパーゼの作用は、PG  $E_2$  産生を介さないものと思われた。一方、同じ培養系において PG  $F_{2\alpha}$  は AChR 合成を促進したが、このことから、アラキドン酸カスケードが AChR 合成を促すという示唆を得た。2,4-dinitrophenol は AChR の半減期を 3.1 倍に延長し、AChR 崩壊に ATP 依存性の過程が存在することが考えられた。以上の諸結果は、筋無力症抗体により促進されると言われる AChR の代謝について一つの情報を提供するとともに、同膜成分に対する自己免疫反応に続く細胞内諸過程を解き明かす鍵になると考えられる。

**Key words** acetylcholine receptor, calcium-activated neutral protease, phospholipase, prostaglandins, ATP-dependent system

正常骨格筋の筋蛋白代謝は、ホルモン、栄養、神経支配など数々の因子の影響を受けており<sup>1)~8)</sup>、また、脱神経、甲状腺機能亢進症、筋ジストロフィー症などの病的骨格筋では、筋蛋白崩壊が異常に亢進し合成を凌

駕しているとされている<sup>1)3)6)~8)</sup>。Goldberg ら<sup>9)~11)</sup>は、筋ジストロフィー症や種々のミオパチーのこうした筋蛋白代謝異常の過程を明らかにし、その機序を筋疾患の病態解明や治療に結びつけようとした<sup>12)~19)</sup>。

Abbreviations: AChR, acetylcholine receptor protein;  $\alpha\text{-BuTX}$ ,  $\alpha\text{-bungarotoxin}$ ; CANP, calcium-activated neutral protease; CMF solution, calcium and magnesium-free solution; 2,4-DNP, 2,4-dinitrophenol; EACA,  $\epsilon\text{-aminocaproic acid}$ ; Eagle MEM, Eagle minimum essential medium; PG, prostaglandin.

神経筋シナプスの構成要素であり筋細胞膜の一部をなすアセチルコリン受容体蛋白 (acetylcholine receptor protein, AChR) を病態の主座とする重症筋無力症でも、免疫学的機序<sup>20)~24)</sup>による蛋白 (AChR) 崩壊の促進がその病因論上注目されている。AChR の崩壊機序の生化学的、組織化学的検討は、Devreotes らによって始まったが<sup>25)26)</sup>、病的免疫反応に引き続く AChR の蛋白代謝回転を含めて重症筋無力症の病態を解析し把握するために、培養筋細胞の AChR の代謝過程とその修飾因子を研究する意義は大きいと思われる。

筋細胞はその細胞内に種々の蛋白分解酵素を含有しており、これら酵素の細胞内局在部位がほぼ明らかにされている<sup>27)~32)</sup>。一方、筋ジストロフィー症においては、筋組織内でライソゾーム内カテプシン群やカルシウム依存性中性蛋白分解酵素 (Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease, CANP) の活性が亢進していることが知られており<sup>12)18)</sup>、病的な筋蛋白崩壊にかかわるこれら酵素の役割が論じられてきた<sup>13)15)16)</sup>。しかし、このような筋組織内の酵素活性を測定する方法では、組織への浸潤細胞内の酵素活性をも測定している可能性がある<sup>30)33)</sup>。そこで、筋以外の細胞の影響を除外するため、筋細胞内蛋白の崩壊を定量する実験系に対する、酵素、基質、代謝物や酵素阻害剤の影響をみる方法が重要視されるようになった<sup>9)~11)14)17)19)</sup>。膜蛋白である AChR の代謝についても、同じ方法を用いて生化学的に検討されるようになったが<sup>25)34)35)</sup>、細胞内構造蛋白に関するほど詳細ではない。そこで、著者は AChR の崩壊過程におけるライソゾームのカテプシン群、CANP、プラスミン系、ATP 依存系、プロスタグランジン (prostaglandin, PG) 系の関与を図 1 のように想定し、検討を加えた。すなわち、<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxin

(BuTX) を AChR 標識マーカーとしたニワトリ骨格筋培養細胞を用い、この培養系に諸薬剤を添加することによって AChR 崩壊機序を検討した。添加薬剤 (図 1 に □ で示す) としては、ライソゾーム系酵素、プラスミン、CANP、3 者の阻害剤としてロイペプチン<sup>27)~31)</sup>、抗プラスミン剤として  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA)<sup>36)</sup> とトラジロール<sup>37)</sup>、CANP 特異的阻害剤としてメルサルリル<sup>10)</sup>、アラキドン酸カスケード<sup>38)</sup>の中からアラキドン酸と PG E<sub>2</sub>、同系に関与する酵素のうちホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の阻害剤としてメパクリン<sup>39)40)</sup>、シクロオキシゲナーゼ (アラキドン酸から PG E<sub>2</sub> を含めた種々の PG を産生) の阻害剤としてインドメタシン<sup>41)</sup>、ATP 合成阻害剤として、2,4-dinitrophenol (2,4-DNP)<sup>29)</sup>を用いた。また、同様の培養系を用いて受容体の合成過程を定量し、筋構造蛋白の合成を促すと言われる PG F<sub>2 $\alpha$</sub>  についてその影響を調べた。

材料および方法

I. 骨格筋初代培養 (図 2)

受精後 12~13 日目の white leghorn chicken の embryo 浅胸筋を用い、初代培養を行なった。浅胸筋を結合組織を除きつつ無菌的に取り出し、メスを使って十分に細切したあと遠心管に取り、0.3% トリプシン液を加え、5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C 下で 30 分反応させて筋組織を単細胞に分離した。遠心管内のトリプシン液を CMF 液 (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.36 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12.0 mM, glucose 5.56 mM) に変えて洗った細胞を培養液中に浮遊させ、直径 60 mm のプラスチックディッシュ (Falcon) の 1%ゼラチン液でコーティングしたものに細胞数が 0.5~1 × 10<sup>7</sup> コ/ディッシュとなるように注入して、5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C 下で 12~24 時間培養した。次に室温下

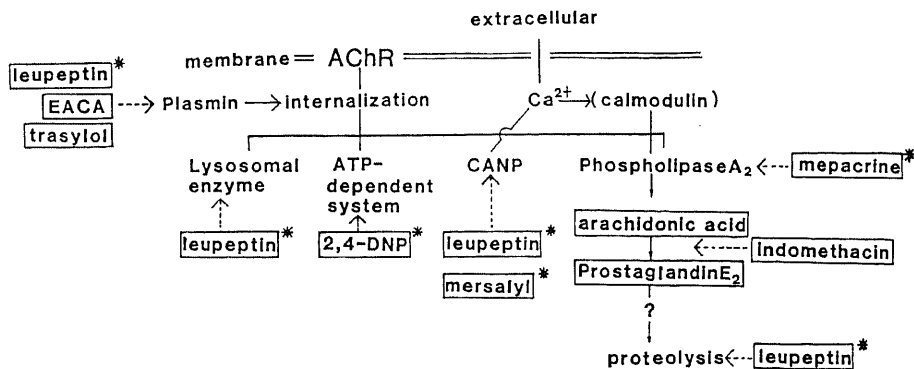


Fig. 1. Hypothetic pathways for AChR degradation. □, drug used; \*, effective drug.

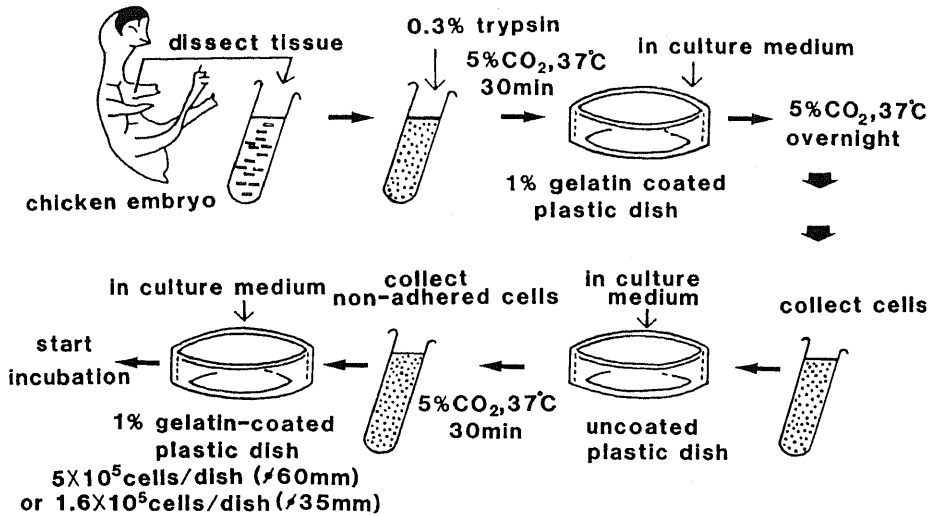


Fig. 2. Methods for primary culture of chick skeletal muscle.

でディッシュ底面の細胞を CMF 液で洗い赤血球を除去した後、0.03% トリプシン液で処理し、細胞を再び単細胞浮遊液として遠心管に集めた。続いて、培養液中に細胞を浮遊させ、プラスチックディッシュの底面に対する筋芽細胞と線維芽細胞の付着度の差を利用して線維芽細胞を除去するために、コーティングのないプラスチックディッシュに注入後 30 分培養し、筋芽細胞に富んだ上清を集めた。最後に、細胞を培養液で稀釈し、1%ゼラチン液でコーティングしたディッシュに注入して（直径 60 mm のプラスチックディッシュには細胞数  $5 \times 10^5$  コ/ディッシュ、直径 35 mm のプラスチックディッシュには細胞数  $1.6 \times 10^5$  コ/ディッシュ）、5%  $\text{CO}_2$ , 95% air, 37°C 下で培養を開始した。トリプシンは Difco 製（1 : 250）、ゼラチンは Difco 製を用い、培養液はウマ血清（Gibco）17%、Embryo Extract 3%、ペニシリン G (P-L, Biochemicals Inc.) 5 万単位/l、ストレプトマイシン（Sigma）50 mg/l を含む、グルタミン入り Eagle MEM（ニッスイ）を用いた。Embryo Extract は受精後 8 ~ 9 日目の white leghorn chicken の embryo を Tyrode 液（NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.36 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.80 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.49 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12.0 mM, glucose 5.56 mM）で 4 倍に稀釈してホモジェナイズした後、毎分 15,000 回転で 30 分間遠心して上清を集めたものである。2 ~ 3 日毎に培養液の交換を行なった。

## II. AChR 崩壊速度の検討

$[^{125}\text{I}]$ - $\alpha$ -BuTX で標識した細胞表面の AChR は、

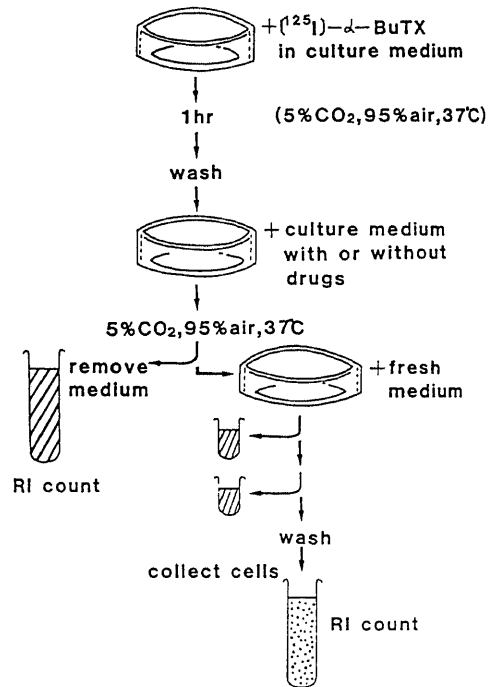


Fig. 3. Assay for AChR degradation in muscle cells.

細胞内に取り込まれ代謝された後 tyrosine を細胞外へ放出するので、培養液中の  $[^{125}\text{I}]$ -tyrosine の放射活性を経時的に測定して、AChR 崩壊速度を間接的に評価し<sup>25)</sup>、AChR の一定時間毎の崩壊率、残存率を算

出、また、これに対する諸薬剤の影響をみた。

### 1. AChR 崩壊率及び残存率の測定法 (図3)

培養後4~5日目のニワトリ骨格筋培養細胞を使用し、培養液中に4nMの $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BuTX (Amersham)を入れ1時間培養して $^{125}\text{I}$ でAChRを標識した後上清を捨て、細胞をCMF液で3回洗浄しAChRと結合していない $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BuTXを除去した。次に、薬剤無添加または添加した培養液を加え、5%  $\text{CO}_2$ , 95% air, 37°Cで培養を開始した。以後一定時間毎に、各々の培養ディッシュの培養液をすべて採取し、代わりに同じ条件(薬剤無添加または添加)の新しい細胞液を同量加えて培養を継続した。採取した培養液各々について、オートウェルタイプカウンター(アロカ ARC 505)で $^{125}\text{I}$ の放射活性を測定し、最後に、細胞に結合したまま残っている $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BuTX量を調べるために、各々のディッシュ底面に付着している細胞をrubber policemanで同量のグルタミン入りEagle MEMを使って集め、その放射活性を測定した。各一定時間毎に崩壊したAChRの割合は、その時間内に培養液中に放出された $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ -tyrosine)の放射活性を、全培養時間内に培養液中に放出された $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ -tyrosine)の放射活性と細胞に結合したまま残っていた $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BuTX)の放射活性を加えたもの( $^{125}\text{I}$ で標識された全AChRの放射活性)で割って求めた。すなわち、

ある時間内のAChR崩壊率(%)

$$= \frac{\text{区間時間内の培養液内の放射活性}}{\text{各区間時間の培養液内放射活性の合計} + \text{培養細胞に残った放射活性}} \times 100$$

である。また、一定時間までのAChR崩壊率の合計を100%より差し引いたものを、その時点でのAChR残存率とした。すなわち、

一定時間でのAChR残存率(%)

$$= 100 - \text{一定時間までのAChR崩壊率の合計}$$

である。各実験は、常に薬剤無添加培養液を使ったディッシュとの組み合わせで行ない、培養条件が一定であることを確かめた。1回の実験で諸薬剤各濃度につき2~3ディッシュずつ検討したが、最終的に同じ条件下でのディッシュの合計数をnとし、一定時間でのAChR残存率につき、その平均と標準偏差値を求め、片対数グラフ上にプロットした。実験中、全ディッシュを立体顕微鏡下に検鏡し、細胞に変性や死滅のないことを確かめた。

### 2. 添加薬剤

使用した培養液添加用薬剤は、ロイペプチン(Sigma), EACA(Sigma), トラジロール(Sigma),

メルサルリル(Sigma), メバクリン(Sigma), インドメタシン(Sigma), アラキドン酸(和光), PG E<sub>2</sub>(フナコシ), 2,4-DNP(和光)である(図1参照)。このうち、アラキドン酸, PG E<sub>2</sub>については、エタノールに溶解してから培養液中に混合した。エタノール含有率は培養液100 ml中25  $\mu\text{l}$  (0.025%)を最高量とした。なお、エタノール添加の影響をみるため、薬剤無添加培養液にエタノールを0.025%加えた時のAChR崩壊速度を調べた。

### 3. 実験データの統計処理法

対照との有意差の判定は、培養後40時間のAChR残存率につき、分散分析後、Duncanの多重比較法によって検定し、p値0.05以下を有意とした。

### III. AChR合成速度の検討(図4)

筋細胞AChRの崩壊と合成は平行して進行しており、その差が細胞表面のAChRの増減となって表われる。合成速度の測定には、非放射活性の $\alpha$ -BuTXで細胞表面のAChRを完全に占拠した後培養を続け、一定時間後に $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -BuTXで細胞を標識することによって、新しく作られたAChR量を間接的に知ることができる<sup>28)</sup>。まず、培養4~5日目のニワトリ骨格筋培

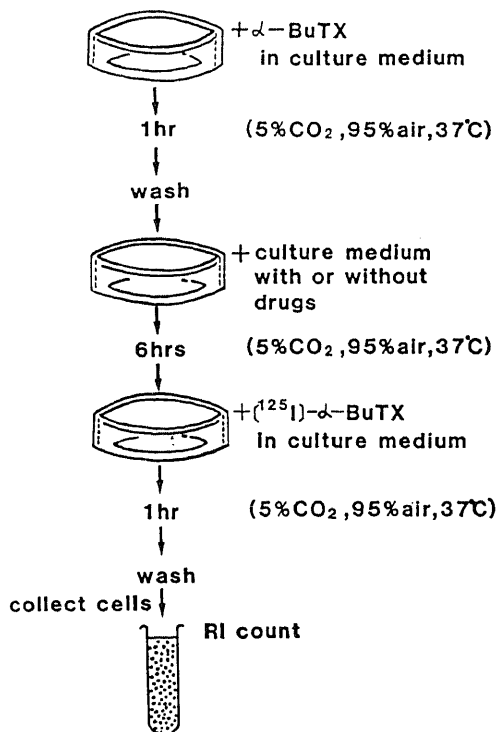


Fig. 4. Assay for AChR synthesis in muscle cells.

養細胞 (35 mm ディッシュ) を、 $2 \mu\text{M}$  の非放射性  $\alpha$ -BuTX を加えた培養液下で 1 時間培養し、全 AChR を  $\alpha$ -BuTX で占拠させた後上清を捨て、細胞表面を CMF 液で 3 回洗い、AChR と結合していない  $\alpha$ -BuTX を除去した。次に、薬剤無添加または PG F<sub>2 $\alpha$</sub>  (フナコシ) を添加した培養液を加え、5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C 下に培養を開始した (0 時間)。培養開始後 6 時間で各々のディッシュの培養液を除き、4 nM の [<sup>125</sup>I] - $\alpha$ -BuTX 入り培養液を加え 1 時間培養した後、再び培養液を除去して細胞を CMF 液で 3 回洗い、細胞に結合していない [<sup>125</sup>I] - $\alpha$ -BuTX を除いた。最後に、細胞をグルタミン入り Eagle MEM を使って rubber policeman で集め、細胞に結合した [<sup>125</sup>I] - $\alpha$ -BuTX の放射活性を、オートウェルタイプ  $\gamma$  カウンター (アロカ ARC 505) を用いて測定し、これを新しく合成された AChR の放射活性とした。一方、細胞表面の AChR 全量を間接的に知るため、 $\alpha$ -BuTX 未処理の培養細胞を各実験毎に 2~3 ディッシュ用意し、[<sup>125</sup>I] - $\alpha$ -BuTX 4 nM 入り培養液で 1 時間標識し、非細胞結合性 [<sup>125</sup>I] - $\alpha$ -BuTX を 3 回の洗浄で除いた後、細胞を rubber policeman で集め、放射活性を測定し、その平均値をとった。PG F<sub>2 $\alpha$</sub>  はエタノールに溶解してから使用し (培養液 100 ml 中エタノールを最大で 25  $\mu$ l : 0.025% 含有)、対照としてエタノールを加えない薬剤無添加培養液と、0.025% のエタノールを加えた薬剤無添加培養液の 2 種をおいた。実験 1 回で、対照及び PG F<sub>2 $\alpha$</sub>  の各濃度につき、2~3 ディッシュずつ新しい AChR を示す放射活性の測定を行なった。新しく合成される AChR は、少なくとも 15 時間までは時間に比例して出現する<sup>25)</sup>ので、AChR の合成速度は、6 時間内に合成された新しい AChR の放射活性の、 $\alpha$ -BuTX 未処理培養細胞から得られる全放射活性の平均値に対する割合 (%) を、1 時間あたりで求めた。すなわち、

AChR の合成速度 (%/時間)

$$= \frac{\text{6時間内に合成された新しい AChR の放射活性}}{\alpha\text{-BuTX 未処理細胞から得る全放射活性 (全 AChR の放射活性)}} \times \frac{1}{6} \times 100$$

である。PG F<sub>2 $\alpha$</sub>  の各濃度について、全ディッシュの合計数を  $n$  とし、AChR 合成速度 (%/時間) の平均と標準偏差値を求め、対照と比較した。対照との有意差の判定は、分散分析後、Duncan の多重比較法によって検定し、 $p$  値 0.05 以下を有意とした。

## 成 績

### 1. 薬剤無添加培養液での AChR 崩壊速度

薬剤無添加での AChR 残存率の平均値は、片対数グラフ上ほぼ直線を示し、half-life time (T 1/2) は  $27.0 \pm 2.3$  (平均値  $\pm$  標準偏差) 時間で、40 時間後の残存率は  $35.7 \pm 3.9$  (平均値  $\pm$  標準偏差) % ( $n=30$ ) であった。(図 5~9 の control)。0.025% エタノール添加培養液では、エタノール無添加培養液との間に有意差を認めず (40 時間後の AChR 残存率は  $34.8 \pm 2.8$ %,  $n=16$ )、エタノール添加の影響は無視できると思われた。

### 2. ロイペプチン添加培養液での AChR 崩壊速度

ロイペプチン添加濃度 10, 40  $\mu\text{M}$  で、濃度依存性に AChR 崩壊抑制効果がみられ (相関係数  $r=0.984$ )、40  $\mu\text{M}$  で推定 T 1/2 を約 1.6 倍に延長した (図 5)。ロイペプチン 10, 40  $\mu\text{M}$  での培養 40 時間後の AChR 残存率はそれぞれ  $43.8 \pm 1.2$  % ( $n=6$ )、 $53.2 \pm 0.7$  % ( $n=6$ ) で対照 ( $35.7 \pm 3.9$ %,  $n=30$ ) との間に有意差を認めた ( $p < 0.01$ )。

### 3. EACA, トラジロール添加培養液での AChR 崩壊速度

EACA 100, 200, 1,000  $\mu\text{M}$  各添加濃度での 40 時間後の AChR 残存率は、それぞれ  $35.2 \pm 4.0$  % ( $n=6$ )、 $34.3 \pm 3.6$  % ( $n=10$ )、 $34.9 \pm 2.8$  % ( $n=10$ ) で、いずれも対照 ( $35.7 \pm 3.9$ %,  $n=30$ ) との間に有意差を認めなかった。トラジロール 5, 10  $\mu\text{M}$  添加でも、40 時間後の AChR 残存率はそれぞれ  $36.0 \pm 5.1$  % ( $n=$

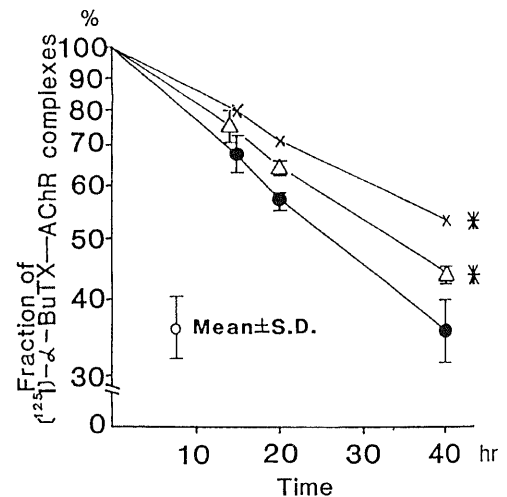


Fig. 5. AChR degradation modified by leupeptin. ●, control ( $n=30$ );  $\Delta$ , 10  $\mu\text{M}$  leupeptin ( $n=6$ );  $\times$ , 40  $\mu\text{M}$  leupeptin ( $n=6$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D.. Leupeptin prolonged the half-life of AChR in a dose-dependent manner. \*  $p < 0.01$  vs. control.

6),  $35.6 \pm 2.9\%$  ( $n=6$ ) で対照 ( $35.7 \pm 3.9\%$ ,  $n=30$ ) との間に有意差は認めなかった. 図 6 に EACA  $1,000 \mu\text{M}$ , トラジロール  $10 \mu\text{M}$  添加の場合の経時的 AChR 残存率を示す.

4. メルサルリル添加培養液での AChR 崩壊速度

メルサルリル添加濃度  $40, 80, 160, 200 \mu\text{M}$  のうち  $80 \mu\text{M}$  で,  $T_{1/2}$  は約 1.3 倍に延長し有意な AChR 崩壊抑制効果を見た (40 時間後の AChR 残存率は  $44.5 \pm 2.6\%$ ,  $n=10$  で対照との有意差  $p < 0.01$ ). 添加濃度  $160 \mu\text{M}, 200 \mu\text{M}$  の場合は, 細胞は変性または死滅し, 生化学的検討に供することができなかった. 図 6 に, メルサルリル  $80 \mu\text{M}$  添加の場合の経時的 AChR 残存率を示す.

5. メパクリン, インドメタシン添加培養液での AChR 崩壊速度

メパクリン添加濃度  $5, 40 \mu\text{M}$ , インドメタシン添加濃度  $2.8, 28 \mu\text{M}$  について AChR 崩壊速度に対する影響を見た. メパクリン  $5 \mu\text{M}$  では AChR 崩壊速度に有意な変化はなかった (培養 40 時間後の AChR 残存率は  $37.0 \pm 2.3\%$ ,  $n=10$ ) が,  $40 \mu\text{M}$  で推定  $T_{1/2}$  が対照の約 3.1 倍に延長する強い抑制効果を見た (40 時間後の AChR 残存率は  $68.8 \pm 6.7\%$ ,  $n=10$  で対照との有意差  $p < 0.01$ ). インドメタシンでは, 各濃度とも崩

壊速度に影響をみなかった (40 時間後の AChR 残存率は  $2.8, 28 \mu\text{M}$  でそれぞれ,  $37.2 \pm 5.3\%$ ,  $n=10$ ;  $36.0 \pm 4.9\%$ ,  $n=10$ ). 図 7 にメパクリン  $40 \mu\text{M}$ , インドメタシン  $2.8 \mu\text{M}$  での経時的 AChR 残存率を示す.

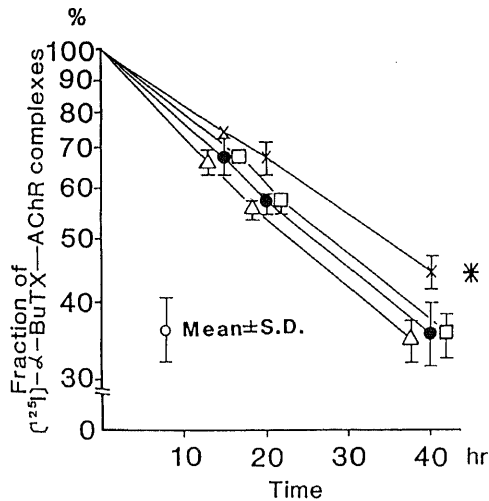


Fig. 6. AChR degradation modified by EACA, trasylol and mersalyl. ●, control ( $n=30$ ); △,  $1,000 \mu\text{M}$  EACA ( $n=10$ ); □,  $10 \mu\text{M}$  trasylol ( $n=6$ ); ×,  $80 \mu\text{M}$  mersalyl ( $n=10$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. EACA and trasylol had no effect on the degradation. Mersalyl slowed the degradation significantly. \*  $p < 0.01$  vs. control.

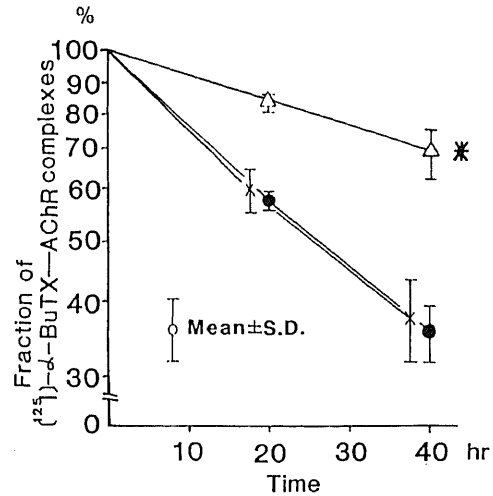


Fig. 7. AChR degradation modified by mepacrine and indomethacin. ●, control ( $n=30$ ); △,  $40 \mu\text{M}$  mepacrine ( $n=10$ ); ×,  $2.8 \mu\text{M}$  indomethacin ( $n=10$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. Mepacrine slowed the degradation, but indomethacin had no effect.

\*  $p < 0.01$  vs. control.

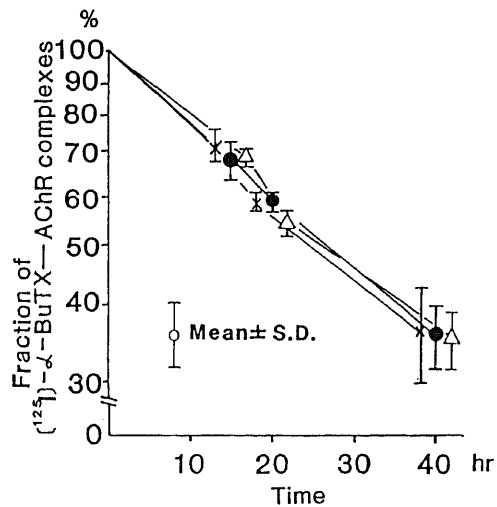


Fig. 8. AChR degradation modified by arachidonic acid and PG  $E_2$ . ●, control ( $n=30$ ); △,  $2.8 \mu\text{M}$  arachidonic acid ( $n=10$ ); ×,  $2.8 \mu\text{M}$  PG  $E_2$  ( $n=10$ ). Each bar represents the mean  $\pm$  S.D. Arachidonic acid and PG  $E_2$  had no effect on AChR degradation.

6. アラキドン酸, PG E<sub>2</sub> 添加培養液での AChR 崩壊速度

アラキドン酸 2.8, 28 μM, PG E<sub>2</sub> 2.8, 28 μM について AChR 崩壊への影響をみたがいずれも対照との間に変化を認めなかった (40 時間後の AChR 残存率は 各々 35.5 ± 4.1%, n=10; 33.7 ± 4.0%, n=10; 36.5 ± 6.0%, n=10; 37.0 ± 3.3%, n=10)。図 8 に各薬剤の 2.8 μM における経時的 AChR 残存率を示す。

7. 2,4-DNP 添加培養液での AChR 崩壊速度

2,4-DNP 500, 1,000 μM の添加で, AChR 崩壊速度は濃度依存性 (相関係数 r=0.944) に抑制を受け (培養 30 時間後の AChR 残存率は 各々 60.5 ± 4.0%, n=

6; 77.1 ± 1.5%, n=6 で対照 44.9 ± 3.8%, n=6 との間に有意差 p<0.01), 1,000 μM では推定 T<sub>1/2</sub> は約 3.1 倍に延長した。図 9 に, 対照とそれぞれの濃度での経時的 AChR 残存率を示す。

8. AChR 合成速度に対する PG F<sub>2α</sub> の影響

薬剤無添加での AChR 合成速度は 3.4 ± 0.5%/時間 (n=6), エタノール 0.025% 添加培養液では 3.6 ± 0.7%/時間 (n=6) で, 両者間に有意差を認めなかった。これに対し, エタノールに溶解した PG F<sub>2α</sub> 2.8 μM を加えた時の受容体合成速度は 4.6 ± 0.3%/時間 (n=6), 28 μM 加えた時の同速度は, 4.5 ± 0.6%/時間 (n=6) であり, 対照に比較して合成は促進される傾向を示し, 対照 (3.6 ± 0.7%/時間, n=6) との間に有意差を認めた (2.8 μM, 28 μM でともに p<0.05)。PG F<sub>2α</sub> 両濃度間に有意差はなかった (表 1)。

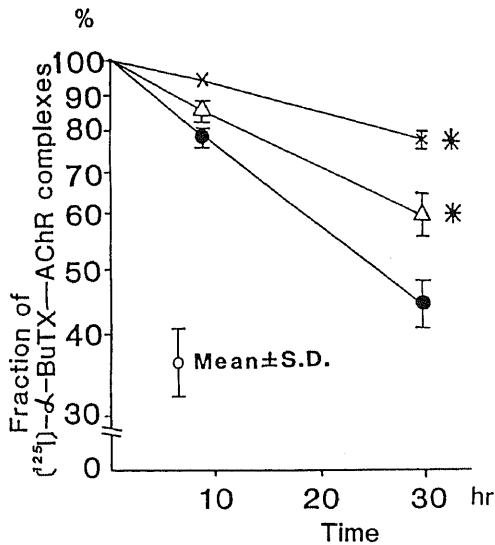


Fig.9. AChR degradation modified by 2,4-DNP. ●, control (n=6); △, 500 μM 2,4-DNP (n=6); ×, 1,000 μM 2,4-DNP (n=6). Each bar represents the mean ± S.D.. 2,4-DNP slowed the degradation in a dose-dependent manner. \* p<0.01 vs. control.

Table 1. Effect of prostaglandin F<sub>2α</sub> on AChR synthesis

	Percentage change/hr
Control	3.6 ± 0.7 <sup>a</sup> (n=6)
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	2.8 μM 4.6 ± 0.3* (n=6)
	28 μM 4.5 ± 0.6* (n=6)

<sup>a</sup>mean ± S.D., \*p<0.05 vs. control.

考 察

AChR 代謝の組織学的検討, すなわちオートラジオグラフィによる電子顕微鏡像で [<sup>125</sup>I]-α-BuTX を結合した AChR を追跡する方法により, Fambrough ら<sup>26)</sup>(42)(43)(45)および Bursztajn ら<sup>44)</sup>は, AChR は細胞表面より小胞 (coated vesicle)内に陥入(internalization)し, 2次性ライソゾームで崩壊されると提唱した。これに対し, 培養細胞を用いた生化学的検討法によっても, 彼らの説を支持する諸結果が次々に報告された。Libby<sup>34)</sup>は, ライソゾーム系酵素カテプシン群の阻害剤ロイペプチンが, AChR 合成に影響することなく受容体崩壊を抑制する事実から, AChR 崩壊へのライソゾームの関与を推定した。また彼らは, ロイペプチンで処理した筋ではその細胞質内に [<sup>125</sup>I]-α-BuTX-AChR 複合体が蓄積しており, 未処理筋の 3~6 倍の coated vesicle を含んでいること, 細胞表面の全 AChR 量は変化しないことから, オートラジオグラフィによる所見からの推察と同様, AChR は先ず coated vesicle に取り込まれた後ライソゾームで分解されると考えた。また同時に, ロイペプチンはライソゾームと coated vesicle の融合を阻止する役割も担っているものと推察した。受精鶏卵から得た骨格筋培養細胞を用いた著者の実験でも, ロイペプチンによる受容体崩壊の life-time 延長を認め, ライソゾーム系の関与を実証した。

ロイペプチンは, チオール系蛋白分解酵素であるカテプシン群だけでなく, セリン系蛋白分解酵素のプラスミンも阻害するが, このプラスミン系も AChR 代謝に関与するという報告がある<sup>46)(47)</sup>。そこで著者は, 選択的抗プラスミン剤 EACA, トラジロールの効果を調べることによって, 本実験系でのロイペプチンの効果が



抗プラスミン作用を介するものであるか否かを調べた。その結果、トラジロール、EACAはAChR崩壊速度に影響を与えず、AChR崩壊とプラスミン系の関連性を支持する証拠は得られなかった。Miskinらは、oncogenic virusで処理されたニワトリ骨格筋細胞の培養で、多量のプラスミノゲン・アクチベーターが培養液中に放出されると同時にAChRの崩壊が促進されること<sup>48)49)</sup>、ニワトリ骨格筋培養細胞の培養液中にプラスミンやプラスミノゲンを加えるとAChR崩壊が促進されること<sup>46)</sup>から、受容体の崩壊にプラスミン系が関与していると述べた。Romstedtらは、マウス骨格筋継代培養細胞(G 8)から多量のプラスミノゲン・アクチベーターが放出され<sup>47)50)</sup>、同培養細胞のAChR崩壊が、抗プラスミン剤トラジロールで、ロイペプチンに比べ軽度ではあるが有意の抑制効果を受け、同じく抗プラスミン剤であるEACAでは影響を受けないことから、プラスミン系関与の部位はAChRの細胞内陥入(internalization)の過程にあると推察した<sup>47)</sup>。著者の用いた培養筋細胞は、virus処理筋や継代培養細胞に比べ低活性のプラスミノゲン・アクチベーターを含有していることが推定されるが<sup>49)50)</sup>、実験の結果は、Hatzfeldら<sup>46)</sup>と同様、Romstedtら<sup>47)</sup>がG 8継代培養細胞で認めたようなトラジロールによるAChR崩壊抑制効果は見出し得ず、EACAも受容体崩壊に影響を与えなかった。従って本実験系のような低プラスミン状態では、AChR代謝へのプラスミン系の関与はほとんどないものと思われた。すなわちプラスミン系は、細胞の代謝が賦活され、その活性が亢進した場合でのみ、AChRの崩壊機序の一部(細胞内陥入)に有意に関与するものと考えられた。

CANP<sup>13)17)18)27)~29)</sup>や、PG E<sub>2</sub><sup>10)11)51)</sup>を介したアラキドン酸カスケードの筋細胞内構造蛋白崩壊への関与については、電気生理学的または生化学的な実験によるいくつかの報告があるが、膜蛋白についての検討はなされていない。著者はAChR崩壊に対するこれらの役割を調べることを目的として、先ずCANPの特異的阻害剤であるメルサルリル<sup>10)</sup>の影響をみたところ、培養系への添加濃度80 μMでAChR崩壊は有意に抑制された。しかし、その効果はロイペプチンの効果よりも小さかった。CANPはその大部分が細胞原形質中に、一部は膜系や筋原線維のZ帯に結合して存在し、pH 7.0~7.6で活性化されるCa<sup>2+</sup>依存性のチオール蛋白分解酵素である。本酵素は、筋細胞内free-Ca<sup>2+</sup>濃度が10<sup>-4</sup>M以上の環境下で、Z帯を崩壊させ、α-アクチニンを遊離させることが知られているが、このためには、筋細胞外から細胞内へのCa<sup>2+</sup>のinfluxが必要とされている<sup>27)~29)</sup>。CANPには、非生理的なCa<sup>2+</sup>濃

度でZ帯を崩壊するmCANPと、ほぼ生理的なCa<sup>2+</sup>濃度に近い状態で活性化されるμCANPの2種類があることが知られているが<sup>52)</sup>、後者についてはニワトリではまだ発見されていない。今回の実験結果から、AChR崩壊に対するCANPの若干の関与が証明されたが、ニワトリ骨格筋にμCANPがないとすれば、mCANPに必要な10<sup>-4</sup>M以上のCa<sup>2+</sup>濃度が本実験系の細胞内に含有されていることになる。本実験に用いた培養筋細胞膜が、成熟細胞のそれに比べCa<sup>2+</sup>のinfluxを生理的に可能とする状態にあるのか、あるいは、ニワトリ骨格筋にもμCANPに相当する酵素があり、これがAChRの代謝に関与しているのか、著者の成績に対する解釈は現在のところ推察の域を出ない。

次に、AChR崩壊へのアラキドン酸カスケードの関与について検討したところ、メバクリン<sup>39)40)</sup>で強い崩壊抑制効果を見、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の関与が示唆された。しかし、アラキドン酸、PG E<sub>2</sub>添加による崩壊促進効果はなく、PG合成阻害剤インドメタシン<sup>41)</sup>添加による抑制効果は認められず、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>とAChR代謝との間にアラキドン酸カスケードが介在するという証拠は得られなかった。細胞内ホスホリパーゼA<sub>2</sub>は主に膜結合性で、現在までにその作用として、膜リン脂質からリゾリン脂質や遊離脂肪酸、アラキドン酸を産生したり、ホスファチジルイノシトール代謝回転(PI response)を介してアラキドン酸を産生することが知られている<sup>53)54)</sup>。著者の実験の結果は、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>のAChR崩壊への関与の機序を、前述の作用機序のうち、同酵素が膜リン脂質からリゾリン脂質やアラキドン酸以外の遊離脂肪酸を産生する過程(脱アシル化)に求めざるを得ないが、脱アシル化が膜蛋白代謝にいかに関わるかは不明で、細胞内陥入(internalization)に関与しうるとする確証はない。また、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>の脱アシル化作用に必要な細胞外からのCa<sup>2+</sup> influx<sup>53)</sup>が、本実験系の細胞膜で起きているかどうか不明である。一方、メバクリンはホスホリパーゼCの阻害作用も持つことが報告されており<sup>55)</sup>、AChR崩壊にホスホリパーゼCが関与している可能性も考えられる。ホスホリパーゼCはCa<sup>2+</sup>をsecond messengerとして、受容体の刺激(ホルモンなどに続き、PI responseを引き起こすが<sup>56)</sup>、その活性に、細胞外Ca<sup>2+</sup>のinfluxは必要としないとの報告が多い<sup>53)56)</sup>。PI responseはアラキドン酸を合成したり、蛋白リン酸化を行なう。従って、本実験系でPI responseが活性化された状態にあるため、蛋白リン酸化がAChR蛋白代謝に関与しているという仮説も考えられるが、これ以上の言及については、今後の解明

に待たねばならない。以上、今回の結果は、膜蛋白、膜リン脂質間の代謝相互作用について、一つの問題を提起するものと考えられる。

Devreotesら<sup>25)</sup>やLibbyら<sup>30)</sup>は、ミトコンドリアの酸化のリン酸化の阻害剤である2,4-DNPやazideでAChR崩壊が抑制されることから、受容体の代謝はATP依存性であると述べたが、著者の実験でも同様の結果を得た。Wrogemannら<sup>57)</sup>は、蛋白崩壊におけるミトコンドリア内のCa<sup>2+</sup>蓄積を重視した。すなわち彼らは、Ca<sup>2+</sup>はATP依存性にミトコンドリア内に取り込まれるが、これが過剰になった時、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が不可逆的に障害され、Ca<sup>2+</sup>がミトコンドリアから細胞質に放出されるとともにCa<sup>2+</sup>の細胞外への放出(ATP依存)ができなくなり、その結果、細胞内free-Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、筋細胞構造蛋白の崩壊を引き起こすと仮説した。また、Ruigrokら<sup>58)</sup>は、心筋のcalcium paradoxにおける筋構造蛋白崩壊が電子伝達系阻害剤シアン化カリウムやATP欠損状態で阻止されることから、ミトコンドリアのATP依存性Ca<sup>2+</sup>取り込みの過程が、calcium paradoxの原因であろうと述べた。著者の実験で、AChR崩壊がシアン化カリウムや2,4-DNPなどのミトコンドリアでの呼吸阻害剤で阻止されたことは、細胞内蛋白同様、受容体崩壊においても、ミトコンドリアのATP依存性のCa<sup>2+</sup>取り込みが重要な意味を持っていることを示唆しているものと思われる。

AChR合成は、その崩壊過程とは独立しており<sup>25)</sup>、小胞体のポリゾームで作られGolgi体に送られる<sup>59)60)</sup>。筋細胞内蛋白合成に影響する諸条件については種々の報告があるが<sup>1)~5)</sup>、受容体合成についてはまだ充分でない<sup>42)43)45)</sup>。一方、PGは、生体内諸臓器で多くの生物活性が知られているが、その蛋白代謝調節作用については、Rodemannら<sup>11)</sup>が骨格筋蛋白に関して、PG E<sub>2</sub>に崩壊促進作用、PG F<sub>2α</sub>に合成促進作用をはじめて報告した。著者は、AChRについては前者の機序が存在しないことを述べたが、後者の機序の存否を検討した結果、PG F<sub>2α</sub>による有意な合成促進効果を見出した。PG F<sub>2α</sub>はE<sub>2</sub>と同様、アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼによって合成されるが<sup>30)</sup>、著者の実験では、筋構造蛋白同様、AChR代謝の特に合成の過程には、PG系の関与が無視できないことを示唆している。

免疫反応の結果としてAChRの減少をきたす重症筋無力症の治療にAChR崩壊を阻止する目的でロイペプチンを用いた結果、in vivoで実験的筋無力症に有効であったとの報告がある<sup>61)</sup>。一方、in vitroでは細胞表面のAChRの数を変化させなかったとの報告もある<sup>34)</sup>。従って、CANP、ホスホリパーゼ、ATP依存

系、PG F<sub>2α</sub>のAChR代謝への関与を示唆する著者の実験成績が、こうした治療面にどのような意味を持つかは今後の問題であるが、少なくとも、病的免疫反応の標的となる受容体の代謝回転を含めて重症筋無力症の病態を把握する上に、一つの情報を提供するものと考えられる。

## 結 論

ニワトリ骨格筋培養細胞を用い、諸種酵素阻害剤及びアラキドン酸とその代謝物PGの培養液中添加によるAChR蛋白の代謝回転を、アイソトープで定量し検討した。その結果、AChR崩壊については、ロイペプチン、メルサルリル、メパクリン、2,4-DNPの抑制効果から、それぞれ、ライソゾーム系カテプシン群、CANP、ホスホリパーゼ、ATP依存系の関与が示唆されたが、トラジロールやEACA、アラキドン酸、PG E<sub>2</sub>、インドメタシンでは影響を認めず、プラスミン系、PG系との関連性については、否定的であった。またAChR合成過程については、PG F<sub>2α</sub>が有意の促進効果を示した。これらの諸結果は、抗体によるアセチルコリン受容体蛋白の崩壊促進が重要な成因の一つとする考えが定着している重症筋無力症の病態を、免疫学的のみならず代謝的側面から把握する上に有用なものとして考察した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師高守正治教授に心からの謝意を表します。また、御助言、御指導をいただきました井手芳彦博士(金沢大学医学部神経内科)、並びに、培養の技術指導および御助言をいただきました嶋田裕教授(千葉大学医学部解剖学第一講座)に深く感謝いたします。

なお、本研究の要旨は、第2回神経治療学会(東京・1984年)および第27回日本神経学会総会(熊本・1986年)において発表した。また本研究の一部は、厚生省免疫性神経疾患調査研究助成金、同神経疾患研究委託費、財団法人東京生化学研究会研究助成金によって行われた。

## 文 献

- 1) Goldberg, A. L.: Protein turnover in skeletal muscle II: Effects of denervation and cortisone on protein catabolism in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3223-3229 (1969).
- 2) Goldberg, A. L. & St, John, A. C.: Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells II. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 747-803 (1976).
- 3) Goldberg, A. L., Griffin, G. E. & Dice, J. F.: Regulation of protein turnover in normal and

- dystrophic muscle, p376-385. *In* L. P. Rowland (ed.), Pathogenesis of human muscular dystrophies, Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.
- 4) **Frayn, K. N. & Maycock, P. F.** : Regulation of protein metabolism by a physiological concentration of insulin in mouse soleus and extensor digitorum longus muscles. *Biochem. J.*, **184**, 323-330 (1979).
  - 5) **Goldberg, A. L., Tischler, M., DeMartino, G. & Griffin, G. E.** : Hormonal regulation of protein degradation and synthesis in skeletal muscle. *Fed. Proc.*, **39**, 31-36 (1980).
  - 6) **Simon, E. J., Gross, C. S. & Lessel, I. M.** : Turnover of muscle and liver proteins in mice with hereditary muscular dystrophy. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 41-46 (1962).
  - 7) **Ionasescu, V., Stern, L. Z., Ionasescu, R. & Rubenstein, P.** : Stimulatory effects of drugs for protein synthesis on muscle cell cultures in Duchenne Dystrophy. *Ann. Neurol.*, **5**, 107-110 (1979).
  - 8) 庄司進一: 内科疾患におけるミオパチー. *Pharma Medica*, **2**, 55-61 (1984).
  - 9) **Libby, P. & Goldberg, A. L.** : Effects of chymostatin and other proteinase inhibitors on protein breakdown and proteolytic activities in muscle. *Biochem. J.*, **188**, 213-220 (1980).
  - 10) **Rodemann, H. P., Waxman, L. & Goldberg, A. L.** : The stimulation of protein degradation in muscle by  $Ca^{2+}$  is mediated by prostaglandin  $E_2$  and does not require the calcium-activated protease. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8716-8723 (1982).
  - 11) **Rodemann, H. P. & Goldberg, A. L.** : Arachidonic acid, prostaglandin  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1632-1638 (1982).
  - 12) **Iodice, A. A., Chin, J., Perker, S. & Weinstock, I. M.** : Cathepsins A, B, C, D and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chickens. *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 166-172 (1972).
  - 13) **Dayton, W. R., Goll, D. E., Zeece, M. G., Robson, R. M. & Reville, W. J.** : A  $Ca^{2+}$ -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*, **15**, 2150-2158 (1976).
  - 14) **McGowan, E. B., Shatig, S. A. & Stracher, A.** : Delayed degradation of dystrophic and normal muscle cell cultures treated with pepstatin, leupeptin, and antipain. *Exp. Neurol.*, **50**, 649-652 (1976).
  - 15) **Schwarz, W. N. & Bird, J. W. C.** : Degradation of myofibrillar proteins by cathepsin B and D. *Biochem. J.*, **167**, 811-820 (1977).
  - 16) **Dahlmann, B. & Reinauer, H.** : Purification and some properties of an alkaline proteinase from rat skeletal muscle. *Biochem. J.*, **171**, 803-810 (1978).
  - 17) **Kameyama, T. & Etlinger, J. D.** : Calcium-dependent regulation of protein synthesis and degradation in muscle. *Nature*, **279**, 344-346 (1979).
  - 18) **Klamut, H. J., Lin, C. H. & Strickland, K. P.** : Calmodulin content and Ca-activated protease activity in dystrophic hamster muscles. *Muscle & Nerve*, **6**, 436-441 (1983).
  - 19) **Jackson, M. J., Jones, D. A. & Edwards, R. H. T.** : Experimental skeletal muscle damage: The nature of the calcium-activated degenerative processes. *Eur. J. Clin. Inv.*, **14**, 369-374 (1984).
  - 20) **Appel, S. H., Anwyll, R., McAdams, M. W. & Elias, S.** : Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2130-2134 (1977).
  - 21) **Drachman, D. B., Angus, C. W., Adams, R. N., Michelson, J. D. & Hoffman, G. J.** : Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1116-1122 (1978).
  - 22) **Lindstrom, J. & Einarson, B.** : Antigenic modulation and receptor loss in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Muscle & Nerve*, **2**, 173-179 (1979).
  - 23) **Sahashi, K., Engel, A. G., Lambert, E. H. & Haward, F. M.** : Ultrastructural localization of terminal and lytic ninth complement (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. *J. Neuro-path. Exp. Neurol.*, **39**, 160-172 (1980).
  - 24) **Lennon, V. A. & Lambert, E. H.** : Monoclonal autoantibodies to acetylcholine receptors: Evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 75-95 (1981).
  - 25) **Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.** : Acetylcholine receptor turnover in membrane of developing muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **65**, 335-358

(1975).

26) **Devreotes, P. N. & Fambrough, D. M.:** Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 237-251 (1976).

27) 杉田秀夫: Z線構造蛋白とカルシウム依存性蛋白分解酵素. *日本臨床*, **35**, 3915-3921 (1977).

28) 石浦章一・今堀和友: 筋カルシウム依存性蛋白分解酵素とその抑制物質について. *日本臨床*, **35**, 3910-3914 (1977).

29) 今堀和友: CANPとE64. *神経進歩*, **24**, 807-813 (1980).

30) 野田 隆・勝沼信彦: 筋組織内蛋白分解酵素と筋ジストロフィー症—カテプシン B・セリンプロテアーゼを中心に—. *最新医学*, **35**, 894-900 (1980).

31) 青柳高明: ロイペプシン. *神経進歩*, **24**, 797-806 (1980).

32) **Bird, J. W. C., Carter, J. H., Triemer, R. E., Brooks, R. M. & Spanier, A. M.:** Proteinases in cardiac and skeletal muscle. *Fed. Proc.*, **39**, 20-25 (1980).

33) **Woodbury, R. G., Everitt, M., Sanada, Y., Katunuma, N., Lugunoff, D. & Neurath, H.:** A major serine protease in rat skeletal muscle: Evidence of its mast cell origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5311-5313 (1978).

34) **Libby, P., Bursztajn, S. & Goldberg, A. L.:** Degradation of the acetylcholine receptor in cultured muscle cells: Selective inhibitors and the fate of undegraded receptors. *Cell*, **19**, 481-491 (1980).

35) **Libby, P. & Goldberg, A. L.:** Comparison of the control and pathways for degradation of the acetylcholine receptor and average protein in cultured muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, **107**, 185-194 (1981).

36) **Alkjaersig, N., Fletcher, A. P. & Sherry, S.:**  $\epsilon$ -Aminocaproic acid: An inhibitor of plasminogen activation. *J. Biol. Chem.*, **234**, 832-837 (1959).

37) **Marx, R., Clemente, P., Werle, E. & Appel, W.:** Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytika. *Blut*, **5**, 367-375 (1959).

38) 鹿取 信: Prostaglandin 研究の最近の進歩—新しいアラキドン酸代謝物と阻害薬—. *日本臨床*, **40**, 232-246 (1982).

39) **Vargaftig, B. B. & DaoHai, N.:** Selective inhibition by mepacrine of the release of "rabbit

aorta contracting substance" evoked by the administration of bradykinin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 159-161 (1972).

40) **Blackwell, G. J., Duncombe, W. G., Flower, R. J., Parsons, M. F. & Vane, J. R.:** The distribution and metabolism of arachidonic acid in rabbit platelets during aggregation and its modification by drugs. *Brit. J. Pharmacol.*, **59**, 353-366 (1977).

41) **Ferreira, S. H., Moncada, S. & Vane, J. R.:** Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature, New Biol.*, **231**, 237-239 (1971).

42) **Devreotes, P. N., Card, D. J., Tepperman, K. G. & Fambrough, D. M.:** Metabolism of acetylcholine receptors in skeletal muscle, p97-110. *In* L. P. Rowland (ed.), *Pathogenesis of human muscular dystrophies*. Excerpta Medica, Amsterdam, 1977.

43) **Fambrough, D. M.:** Control of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **59**, 165-227 (1979).

44) **Bursztajn, S. & Fischbach, G. D.:** Coated vesicles in cultured myotubes contain acetylcholine receptors. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **5**, 1631 (1979).

45) **Pumplin, D. W. & Fambrough, D. M.:** Turnover of acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.*, **44**, 319-335 (1982).

46) **Hatzfeld, J., Miskin, R. & Reich, E.:** Acetylcholine receptor: Effects of proteolysis on receptor metabolism. *J. Cell Biol.*, **92**, 176-182 (1982).

47) **Romstedt, K., Beach, R. L. & Festoff, B. W.:** Acetylcholine receptor turnover in clonal muscle cells: Role of plasmin and effects of protease inhibitors. *Muscle & Nerve*, **6**, 283-290 (1983).

48) **Miskin, R., Easton, T. G., Maelicke, A. & Reich, E.:** Metabolism of acetylcholine receptor in chick embryo muscle cells: Effects of RSV and PMA. *Cell*, **15**, 1287-1300 (1978).

49) **Miskin, R., Easton, T. G. & Reich, E.:** Plasminogen activator in chick embryo muscle cells: Induction of enzyme by RSV, PMA and retinoic acid. *Cell*, **15**, 1301-1312 (1978).

50) **Festoff, B. W., Patterson, M. R. & Romstedt, K.:** Plasminogen activator: The major secreted neutral protease of cultured skeletal muscle cells. *J. Cell Physiol.*, **110**, 190-195 (1982).

51) **Takamori, M., Komai, K., Nitta, N. & Itouji,**

- K.: Role of prostaglandin E<sub>2</sub> in contractile abnormality induced by calcium ionophore, A23187. *Neurology (Cleveland)*, **34**, 91-94 (1984).
- 52) Waxman, L.: Calcium-activated proteases in mammalian tissues, p664-680. *In* L. Lorand (ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1982.
- 53) Billah, M. M., Lapetina, E. G. & Cuatrecasas, P.: Phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C activities of platelets: Differential substrate specificity, Ca<sup>2+</sup> requirement, pH dependence, and cellular localization. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10227-10231 (1980).
- 54) Billah, M.M., Lapetina, E. G. & Cuatrecasas, P.: Phospholipase A<sub>2</sub> activity specific for phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, **256**, 5399-5403 (1981).
- 55) Irvine, R. F., Hemington, N. & Dawson, R. M. C.: The hydrolysis of phosphatidylinositol by lysosomal enzyme of rat liver and brain. *Biochem. J.*, **176**, 475-484 (1978).
- 56) 竹縄忠臣: ホルモン受容体とイノシトールリン脂質代謝亢進. 蛋白質 核酸 酵素, **27**, 1291-1305 (1982).
- 57) Wrogemann, K. & Pena, S. D. J.: Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell necrosis in muscle disease. *Lancet*, **27**, 672-674 (1976).
- 58) Ruigrok, T. J. C., Boink, A. B. T. J., Spies, F., Blok, R. J., Maas, A. H. J. & Zimmerman, A. N. E.: Energy dependence of the calcium paradox. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **10**, 991-1002 (1978).
- 59) Fambrough, D. M. & Devreotes, P. N.: Newly synthesized acetylcholine receptors are located in the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, **76**, 237-244 (1978).
- 60) Merlie, J. P., Hofler, J. G. & Sebbane, R.: Acetylcholine receptor synthesis from membrane polysomes. *J. Biol. Chem.*, **256**, 6995-6999 (1981).
- 61) Valderrama, R., Chang, V. K., Stracher, A., Maccabee, P. J. & Kaldany, R. J.: Treatment of experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) in rabbits with a protease inhibitor, Leupeptin. *Neurology (Cleveland)*, **34** (Suppl 1), 240 (1984).

**Tissue Culture Studies on Acetylcholine Receptor Metabolism and its Pharmacological Modification** Kaoru Itouji, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, -*J. Juzen Med. Soc.*, **95**, 578-590 (1986)

**Key words:** acetylcholine receptor, calcium-activated neutral protease, phospholipase, prostaglandins, ATP-dependent system

#### Abstract

The pharmacologic effects of various agents on the degradation and synthesis of the acetylcholine receptor protein (AChR), which is a prime antigen in the autoimmune disease myasthenia gravis, was studied using primary cultures of chick myotubes. AChR degradation was measured by a method that utilizes the specific labeling of myotube AChRs with [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -bungarotoxin ([<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -BuTX), the release of radioactive material derived from degraded AChR into the cultured medium, and the radioactivity of the remaining cell-bound complexes. The rate of degradation was calculated as the percentage of the radioactivity released into the medium for a certain time divided by the total radioactivity. Results from myotubes cultured with and without drugs were compared. AChR synthesis was measured by occupying the binding sites of AChRs with non-radioactive  $\alpha$ -BuTX. After an incubation with or without drugs, newly synthesized AChRs were labeled with [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -BuTX. The calculation was based on the rate of new AChR radioactivity divided by total AChR radioactivity. In the control medium, the AChR half-life was 27.0 $\pm$ 2.3 hours (n=30). Leupeptin, an inhibitor of lysosomal cathepsins, prolonged the half-life by 1.6-fold, indicating that a lysosomal site is responsible for receptor degradation. Plasmin may not be implicated in AChR degradation since its inhibitors,  $\epsilon$ -aminocaproic acid and

trasylol, did not prolong the half-life. The AChR degradation was slowed 1.3-fold by mersalyl, an inhibitor of calcium-activated neutral protease, and 3.1-fold by mepacrine, an inhibitor of phospholipase. Non-lysosomal protease and phospholipase may thus intervene in AChR metabolism. The latter would not be through the production of prostaglandin  $E_2$  since it as well as arachidonic acid had no effect on AChR degradation when measured in the same manner as the inhibitor. The arachidonic cascade appears to promote AChR synthesis since prostaglandin  $F_{2\alpha}$  increased the rate of synthesis in our culture system. The ATP-dependent system also affects AChR degradation as evidenced by 2,4-dinitrophenol-induced 3.1-fold prolongation in the half-life of AChR. These results provide information about AChR metabolism which is accelerated by myasthenic antibody, and are clues to unveiling the subcellular process following the autoimmune attack against this membrane component.