

培養 鷄胚 筋細胞의 分化에 따른 數種 筋特異
蛋白質의 合成에 관하여

河斗鳳·兪炳濟·孫鍾京·姜鎬聖·李永婁
(서울大·自然大 動物學科)

Synthesis of Muscle-Specific Proteins During the Differentiation
of Chick Embryonic Muscle Cells in Culture

Doo Bong Ha, Byoung Je Yoo, Jong Kyung Sonn, Ho Sung Kang and Young Sub Lee
(Department of Zoology, Seoul National University)
(Received October 19, 1982)

SUMMARY

The synthesis of myosin, actin, tropomyosin and troponin in the cultured muscle cells of chick embryo during the differentiation were analyzed.

The synthesis of myosin and actin were very active prior to the myoblast fusion while the troponin synthesis became active after the fusion. Tropomyosin was synthesized practically constantly throughout the culture period.

Several proteins were detected in the muscle-conditioned medium strongly suggesting that the cells in culture released polypeptides which might act on the membrane of neighboring cells to initiate the fusion.

序 論

細胞의 分化는 形態學的으로는 未分化 受精卵에서 特定構造 또는 形態를 갖춘 組織細胞로의 變化이며, 生理學的으로는 特定蛋白質의 選擇의 合成 및 蓄積 그리고 그에 연유한 特定化學反應의 速度調節등을 통한 機能의 變化이나 (Buckingham, 1977). 構造 또는 形態의 變化는 特定蛋白質의 選擇의 合成 및 蓄積의 結果라고 解釋되므로 단순한 構造와 機能의 變化는 相互 不可分의 關係에 있으며, 이러한 變化는 窮極的으로 遺傳子 發現의 時間的 空間的 調節에 의하여 일어난다. 따라서 細胞分化의 機作에 대한 研究는 遺傳子 發現調節의 機作研究에 直結되는 것이라고 생각된다.

細胞分化의 研究에서 骨格筋細胞는 대단히 좋은 材料이다 (Buckingham, 1977). 骨格筋本 研究는 文敎部 研究助成費(1981)에 의하여 이루어진 것임.

細胞는 未分化 筋原細胞 (myoblast)에서 시작하여 細胞의 伸長과 融合을 거쳐 紡錘形 多核 橫紋筋 細胞로 分化되어 간다. 이 過程에서 미오신과 악틴등 筋細胞特異 蛋白質의 合成이 왕성히 일어나 筋纖維가 形成된다. 이러한 一連의 변화는 培養 筋細胞에서도 용이하게 관찰할 수 있다. 즉 鷄胚의 胸筋部位의 筋原細胞를 摘出하여 배양을 하면 圓形 未分化 筋原細胞가 紡錘形으로 伸長을 거듭한 後, 細胞融合을 통하여 多核 근세포로 발전하고, 培養 약 5日 후에는 자연 收縮과 弛緩을 한다. 그리고 이 分化의 過程에서 各種 蛋白質의 合成과 蓄積이 일어난다 (Ha *et al.*, 1979). 이러한 分化의 過程은 時間的인 差異는 있으나 生體內 分化과정과 本質的으로는 同一하다고 생각된다.

이러한 蛋白質의 合成과 蓄積은 遺傳子의 時差的 發現 調節의 結果이고, 또 바로 그것이 細胞의 分化이므로 蛋白質 合成의 順序와 相對的 蓄積量의 分析은 근세포 分化의 機作研究에 基礎資料가 될 것이다. 筋特異 蛋白質의 時差的 合成에 대해서는 여러가지 異說이 있다. 즉 이들 단백질 합성은 細胞의 融合과는 전혀 관계없이 일어난다는 報告 (Moss and Strohmman, 1976; Vertel and Fischman, 1976)가 있는 반면, 細胞融合과 筋特異 蛋白質의 蓄積은 밀접한 관계가 있다는 報告 (Allen *et al.*, 1978; Devlin and Emerson, 1978; Ha *et al.*, 1979; Devlin and Emerson, 1979)도 있다. 또 이들 筋特異 蛋白質의 合成은 相互 調節性이어서 한 단백질의 합성이 다음 단백질의 합성을 誘導調節함으로써 一連의 連鎖反應을 거친다는 報告 (Devlin and Emerson, 1979; Zevin-Sonkin and Yaffe, 1980)도 있다. 이들 筋特異 蛋白質의 合成이 相互關聯性을 갖는지의 여부, 그리고 細胞融合과 상호관계가 있는지의 여부를 알기 위해서는, 세포융합 前後에 이들의 合成順序와 相對的 含量을 정밀히 調査할 필요가 있을 것이다. 따라서 本研究의 目的의 하나는 이들 蛋白質의 合成順序 및 合成量, 蓄積量을 測定하는 데 있다.

일면 筋細胞의 培養에 있어서 培養細胞의 初期 密度가 어느 정도 이하가 되면 培養의 持續 및 細胞融合이 되지 않는다는 報告가 있다 (Yeoh and Holtzer, 1977). 또 培養液을 지나치게 자주 갈아주면 세포의 融合이 지연된다는 報告도 있다 (Konigsberg, 1971). 이러한 보고들은 培養細胞에서 融合을 促進 또는 媒介하는 어떤 物質의 放出이 있음을 示唆하는 것이다. 그리고 실제로 어떤 培養系에서는 소위 融合促進物質이 細胞內에서 合成되어 培養液 속으로 擴散되어 나와 주변세포의 融合을 促進시킨다는 報告가 나와 있으며 (L_6H_9 line의 세포, Delian *et al.*, 1981), 鷄胚 培養筋細胞에서 細胞融合을 促進하는 筋特異 物質이 分泌된다는 報告도 있다 (Doering *et al.*, 1977). 本 實驗에서는 鷄胚의 培養 筋細胞에서도 이러한 融合 促進物質의 放出이 있는지의 여부를 확인하기 위하여 正常培養液에서 筋細胞를 培養하다가 일정시간에 培養液을 minimum essential medium 또는 Earl's balanced salt solution으로 바꾼 후 이들 溶液 속에 존재하는 蛋白質을 分析하였다.

材料 및 方法

1. 筋細胞의 培養

本 實驗에서 培養에 사용한 筋細胞는 孵卵 12日제인 鷄胚胸筋細胞이다. 孵卵 11日제의 受精卵을 구입하여 本 實驗室에서 하루를 경과 시킨 후, 鷄胚의 胸筋部位에서 筋組織을 摘出하여 O'Neill과 Stockdale (1972)의 方法에 따라 培養하였다. 培養의 상세한 過程은

Ha et al. (1979)의 論文에 기재되어 있다.

일정시간 培養한 筋細胞는 培養器에서 긋어내어 glass homogenizer 또는 超音波裝置로 均質化한 다음 電氣泳動 等 실험에 사용하였고, 수일간의 보존이 필요할때는 -70°C 의 冷凍機 속에 保管하였다. 또 일부의 培養筋細胞는 形態的 觀察을 위하여 收穫 直後 haematoxylin으로 染色하여 光學顯微鏡으로 형태적 分化狀態를 檢鏡하였다.

細胞의 融合指數 (fusion index)는 培養細胞를 에탄올·포르말린·아세트산(20:2:1) 混合液으로 固定시켜 Erlich's haematoxylin으로 5分間 染色한 다음 600倍 顯微鏡아래에서 細胞核을 헤아려 細胞融合을 한 筋細胞 속의 核 數를 全體 核 數로 나눈 값으로 나타내었으며 (%), 세포 增殖度는 위의 染色細胞의 核 數를 헤아려 最長 培養時間에서의 전체 核 數를 100으로 하고 각 시간에서의 핵 수의 比로 나타내었다.

즉, 融合指數 (%) = (筋細胞 속의 核 數 / 全體 核 數) \times 100

細胞增殖度 = 各 時間에서의 全 核 數 / 最長 培養時間에서의 全 核 數

2. 蛋白質 定量

모든 蛋白質의 定量은 標準 단백질로 소 혈청 알부민을 사용하여 Lowry (1951)의 方法으로 行하였다.

3. 蛋白質 分析

培養細胞와 培養液의 단백질 분석은 Laemmli (1970)의 方法에 따라 SDS polyacrylamide gel 電氣泳動法으로 실시하였다. 배양세포는 培養器에서 배양액을 제거하고 배양액과 同一量의 EBSS (Earl's balanced salt solution)로 세 번 洗滌한 다음 긋어 모아서 均質化시켜 遠心分離로 上澄液을 모아 전기영동 試料로 사용하였다. 培養液 내의 蛋白質 分析을 위해서는 일정시간 細胞를 배양한 正常培養液, MEM (minimum essential medium) 또는 EBSS를 받아 일단 원심분리로 浮遊細胞를 除去한 다음 最終濃度 10%의 trichloroacetic acid로 단백질을 沈澱시키고 이 단백질을 遠心分離를 통하여 10% TCA溶液으로 수회 씻은 다음 0.1 N NaOH로 滴定하여 溶解시킨 後 電氣泳動 試料로 사용하였다. 전기 영동을 完了한 겔은 0.2% Coomassie blue (50% 메탄올+10% 아세트산 용액)로 染色한 후, 35% 메탄올+10% 아세트산+1% 글리세롤 용액으로 脫色하여 乾燥시켰다.

전기영동 겔상에 나타난 蛋白質의 判別 및 分子量 推定은 미오신과 약틴은 筋小胞體에서 精製한 것을 標準으로 쓰고 (Ha, 1979), 트로포미오신, 트로포닌 등은 Spudich와 Watt (1971)의 方法과 Greaser와 Gergely (1971)의 方法으로 각각 精製하여 사용하였다.

電氣泳動 겔상의 각 단백질의 相對量 測定은 Transidyne社 製作의 densitometer로 scanning하여 구하였다.

4. 放射能 標識 및 放射線 檢出과 計數

細胞 내 蛋白質의 방사능 표지는 ^{35}S -methionine (New England Nuclear; specific activity, 1078 Ci/mmol)을 最終濃度 20 $\mu\text{Ci/ml}$ 로 培養液에 加하여 行하였다.

전기영동 겔상의 방사선의 검출은 Kodak X-Omat XR-5 필름을 使用한 自記放射法으로 行하였고, 自記放射필름 상에 나타난 밴드를 densitometer scanning 함으로써 相對量을 推定하였다.

結 果

1. 培養 筋細胞의 形態의 變化

融合指數

培養 筋細胞는 배양 36시간경까지는 細胞分裂만 왕성하게하여 細胞의 數를 增加시키나 細胞融合은 거의 하지 않는 것으로 관찰되고 있다 (Ha, 1979). 그리고 배양, 48시간 이후부터는 細胞分裂이 中止되고 급격한 細胞融合이 일어나서 多核 筋細胞로 발달한다. 이 培養 筋細胞의 分化에 따른 細胞融合指數를 Fig. 1A에 나타내었다. 어느 배양시기에도 세포융합 지수는 배양 3일에서의 값인 70%를 넘지 않는 것으로 나타났다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 培養 44시간까지는 0~20%이었던 融合指數가 2일~3일 사이에는 20%에서 67%의 급격한 增加를 나타내었으며, 그 후 대략 50%前後에서 維持되었다.

初期 細胞의 密度 (cells/ml)를 1×10^5 에서 7×10^5 사이의 여러 밀도로 하여 세포밀도와 융합지수의 관계를 보면 Fig. 2A와 같다. 그림에서 보면 융합지수는 세포의 밀도가 클수록 대체로 크다는 것을 알 수 있다.

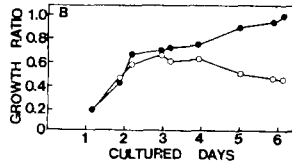
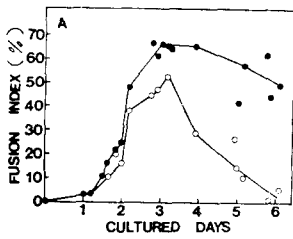


Fig. 1. Fusion index (A) and growth ratio (B) of cultured chick muscle cells.
—●—, cultured in normal medium;
—○—, cultured in 2% DMSO.

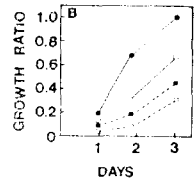
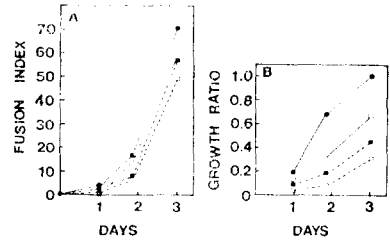


Fig. 2. Fusion index(A) and growth ratio (B) of cultured chick muscle cells at various initial densities; 7×10^5 (—●—), 5×10^5 (—○—), 2.5×10^5 (—■—), 1.0×10^5 (—□—)

細胞 增殖度

培養時間에 따른 細胞의 增殖度는 Fig. 1B와 같다. 培養 44시간까지는 細胞分裂이 급격히 일어나 細胞 數가 크게 增加하지만 그 이후는 증가추세가 극히 緩慢하고, 120시간만에 거의 完了된다. 細胞의 增殖度는 細胞의 初期培養密度 ($1 \times 10^5 \sim 7 \times 10^5$)에 따라 크게 달라져서, 細胞의 密度가 클수록 增殖度도 커짐을 알 수 있었다(Fig. 2B).

筋細胞 融合과 增殖度에 미치는 DMSO의 影響

初期 細胞의 密度가 5×10^5 cells/ml인 培養 筋細胞에 2% dimethylsulfoxide (DMSO)를 培養 24시간에 處理하여 細胞融合指數와 增殖度를 구한 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 2% DMSO 존재하에서는 細胞融合이 상당히 抑制되나 완전 억제되지는 않았다. 세포융합을 완전히 억제하는 DMSO의 最低 濃度는 4%이었으나, 이 농도에서는 細胞의 增殖度는 완전히 停止되었으므로 2%이상의 농도는 채택하지 않았다. 2% DMSO는 細胞의 融合을 상당히 抑制하나 初期 細胞의 增殖은 거의 抑制하지 않는 것으로 나타났다(Fig. 1 B).

2. 培養 筋細胞의 分化에 따른 蛋白質 合成

筋細胞를 培養하면서 여러 時間 間隔으로 細胞를 收穫하여 總蛋白質量을 測定한 結果를 Fig. 3에 나타내었다. 총단백질량은 배양접시당 mg 단백질로 表示하였는데, 培養初期부터 50시간까지 계속 增加하다가 細胞의 融合이 활발하게 일어나는 시기인 50~76시간 사이에는 증가가 전혀 없고, 融合이 60~70%에 이른 76시간 이후에 다시 급격하게 增加한다. 細胞融合 이후에는 세포의 分裂는 거의 없는 것으로 알려지고 있으므로, 76시간 이후의 總蛋白質의 증가는 주로 筋特異 蛋白質들의 合成增加에 基因하는 것으로 해석된다.

따라서 數 種의 筋特異 蛋白質의 量的 變化를 조사하였는데, 그 結果는 Fig. 4, Fig. 5와 같다. Fig. 4(p. 14)를 보면 培養 全 시기를 통하여 단백질 조성은 거의 같음을 알 수 있다. 그러나 전기영동 겔 상에 나타난 筋特異 단백질들을 densitometer로 scanning한 結果 (Fig. 5)를 보면 6가지 筋特異 蛋白質 (myosin, actin, troponin C, troponin T, troponin I, tropomyosin)의 含量이 培養時間이 경과함에 따라 增加하고 있음을 알 수 있었다. 이 6종의 蛋白質은 Fig. 6(p. 14)에서 보는 바와 같은 各種 標準蛋白質을 같이 전기영동에 걸어 判別하였다. 이 6가지 蛋白質의 含量변화의 樣相은 거의 비슷하여 培養 50시간까지는 量的 增加가 계속되고, 50~76시간 사이는 거의 변화하지 않거나 오히려 약간 減少되며, 76시간 이후 90시간 경까지 다시 급격히 增加하고 있다. 이러한 變化樣相은 總蛋白質의 변화양상과 일치하고 있다.

本 實驗에서 對象으로 한 6종의 筋特異 蛋白質이 總蛋白質量에 대한 비(%) (各 筋特異 蛋白質量/總蛋白質量)를 보면 Fig. 7과 같다. 이 그림에서 보면 63시간까지는 actin과 myosin의 含量이 상대적으로 增加하고 있고 다른 筋特異 蛋白質들은 대체로 변화가 없다

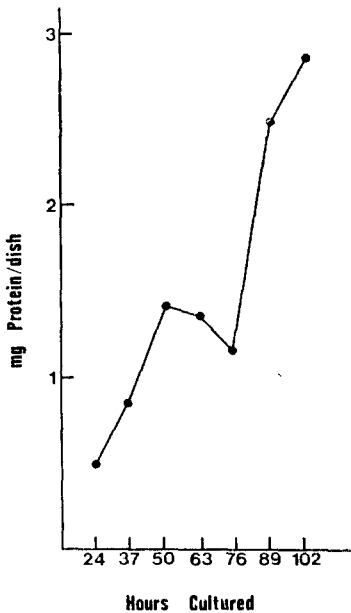


Fig. 3. Total protein of cultured chick muscle cells.

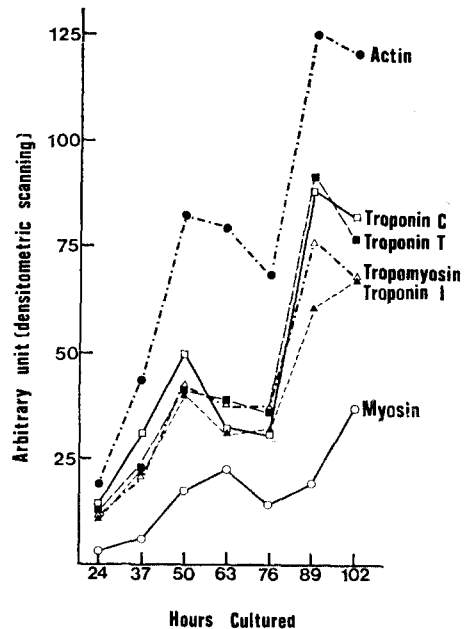


Fig. 5. Accumulation of muscle specific proteins of cultured chick muscle cells determined from densitometric scanning of electrophoresis gel.

(다만 troponin C는 약간의 增減이 있다). 그러나 63시간이 지난 후부터는 actin과 myosin의 含量이 상대적으로 떨어지는 반면 여타의 단백질 含量이 상승하고 있다. 따라서 actin과 myosin의 절대량은 증가하나 (Fig. 5) 상대량이 떨어지는 것은 部分的으로는 이들 4종의 蛋白質의 含量增加에 기인하는 것으로 해석된다.

培養 筋細胞와는 달리 生體 胚에서는 筋特異 蛋白質들의 상대량 변화가 현저하지 않다. 즉 孵卵 12日부터 18日까지의 鷄胚 筋細胞에서의 總蛋白質量에 대한 各 단백질의 상대량을 보면 (Fig. 8) 현저한 변화양상은 볼 수 없고, 다만 actin의 量이 후기에 增加하고 myosin의 量的 變化에 약간의 起伏이 보이는 것에 불과하다.

電氣泳動 겔을 Coomassie blue로 染色한 Fig. 4와 그것을 densitometer로써 scanning한 Fig. 5는 그 순간 순간 존재하고 있는 蛋白質의 존재와 상대량을 나타내지만 合成順序와 合成率을 나타내지는 못한다. 따라서 本 研究에서는 ³⁵S-methionine을 培養液에 첨가하여 일정시간 細胞를 배양하여 전기 영동으로 단백질을 分離한 다음 自記放射法으로 各 蛋白質

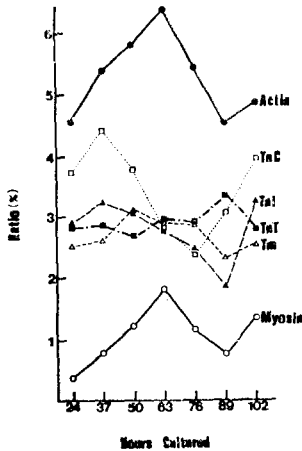


Fig. 7. The ratio of muscle specific proteins to total protein of cultured chick muscle cells.

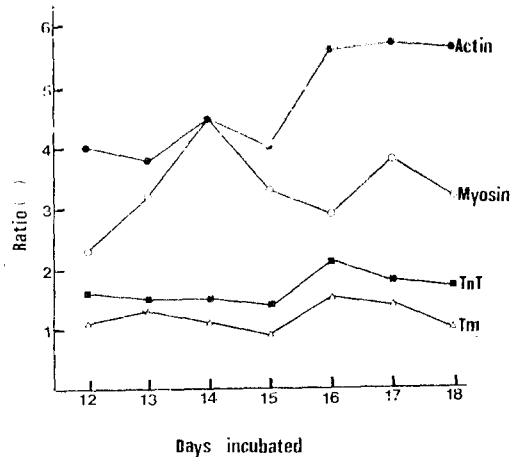


Fig. 8. The ratio of muscle specific proteins to total protein of chick embryo pectoralis muscle.

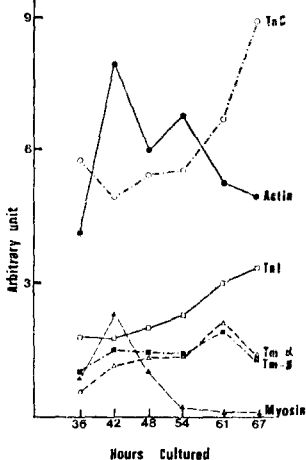


Fig. 11. The synthesis of muscle specific proteins of cultured chick muscle cells, measured from densitometric scanning of autoradiogram of Fig. 10.

의 합성순서와 합성율을 추정 하고자 하였다. Fig. 9(p.15)는 이 목적으로 단백질의 放射線을 自記放射 필름에 檢出하여 印畫한 것이다. 그림에서 48-4, 48-8, 48-12…… 등의 數字는 細胞를 48시간 동안 培養한 후 培養液에 ^{35}S -methionine을 첨가하여 4시간, 8시간, 12시간…… 동안 培養한 것이다. 그리고 72-4, 72-8,…… 등은 細胞를 72시간 培養한 후 同位元素 존재하에서 4, 8,…… 시간 배양한 것이다. 이것을 보면 蛋白質의 合成은 대단히 빨라서 最少 4시간의 放射能 배양에서도 거의 모든 단백질에 放射性 메치오닌이 編入됨을 알 수 있다. 또 48시간 培養한 細胞에서는 이미 모든 단백질이 거의 出現 完了하는 것으로 보인다.

따라서 放射能 標識를 더욱 短時間으로 줄이기 위하여 細胞를 36시간 培養한 후 2시간 동안 放射性 메치오닌으로 표지하고, 또 42시간 배양한 후 역시 2시간 동안 표지하는 식으로 표지법을 바꾸어 보았다. Fig. 10(p.15)은 그결과를 自記放射 필름의 印畫로 나타낸 것이다. Fig. 10에서 36, 42,…… 등은 방사능 첨가시의 細胞培養 時間 數이고 방사능 표지는 모두 2시간 썩이다. Fig. 11은 Fig. 10의 자기방사 필름을 densitometer에서 scanning한 것이다. 이것을 보면 培養初期 (36~44시간)에는 미오신과 악틴의 合成이 활발하고 44시간 이후에는 이 두 단백질의 합성은 거의 停止 내지 減少되고 대신 트로포닌의 합성이 增加하기 시작하는 것을 알 수 있다. 그리고 트로포미오신의 합성은 전 시기에 걸쳐 거의 일정하였다.

3. 培養 筋細胞로부터의 蛋白質 遊離

筋細胞를 일정시간 培養한 후 培養液을 最少基本培養液 (MEM)으로 바꾼 다음 이 最少 기본배양액(이하 muscle-conditioned medium의 뜻으로 MCM이라 약칭함)을 일정시간 간격으로 採取하여 電氣泳動으로 分析한 결과는 Fig. 12(p.16)와 같다. 여기에서 보면 이 MCM에 分子量 약 18,000과 20,000으로 추정되는 (화살표) 두 種의 단백질이 檢出되는 것을 알 수 있다. 이 두 種의 단백질은 細胞의 배양액(MEM으로 옮기기 전의 正常배양액) 속에 함유된 外來性 단백질이 아닌 정상배양액에서 MEM으로 바꿀때 세포를 씻은 EBSS, 정상배양액 속에 함유되어 있는 鷄胚抽出物 (EE)이나 말 血清 (HS) 등에서는 전혀 나타나지 않는 것으로 알 수 있다. 또 DMSO로 處理하여 細胞融合을 抑制시킨 培養 筋細胞의 MCM에서도 역시 나타나지 않았다.

이 두 단백질이 培養 筋細胞에서 유래하는 단백질이라는 것을 그림의 *MCM에서도 알 수 있다. 즉 細胞를 正常培養液에서 17시간 배양한 다음 ^{35}S -methionine을 함유하는 MEM에서 30시간 더 배양한 후 수집한 MCM을 전기영동한 후 이 겔을 自記放射法으로 放射線을 검출한 결과 (Fig. 13A, p.16) 뚜렷한 밴드를 볼 수 있는 것이다. 自記放射 필름상에는 이 두 단백질 외에도 15종가량의 밴드가 더 나타나고 있고, 그 중 몇 개는 cell homogenate에서의 밴드(Fig. 13B, p.16)와 일치한다.

MCM에 나타난 단백질들이 細胞를 MEM에서 培養하였기 때문에 세포들이 죽어서 그 내용물이 溶出된 것이 아닌가 하는 의문이 있을 수 있으나, 이것은 Fig. 14A,B(p.17)에서 解消될 수 있을 것이다. Fig. 14,A는 細胞를 정상배양액에서 48시간 배양한 후 새 정상배양액으로 바꾸고 이 새 배양액에 ^{35}S -methionine을 첨가하여 배양을 계속하면서 8시간마다 배양액의 일부를 採取하여 전기영동으로 단백질을 分離한 것이며 Fig. 14,B는 그 겔의 自記放射法에 의한 필름을 印畫한 것이다. 여기서 보면 전기영동상은 正常培養液 內에 含有된 단백질 (鷄胚抽出物과 말 血清의 단백질)이 모두 나와있으나 自記放射 필름에 나타나는 밴드는

$^{35}\text{S-methionine}$ 이 細胞 속으로 들어가서 단백질로 編入된 후 細胞 밖으로 나와서 正常培養液 속에 溶解된 것만 나타낸다. 따라서 自記放射 필름에 나타난 밴드들은 細胞에서 合成된 후 細胞 밖으로 나온 단백질인 것이다.

考 察

培養 筋細胞의 形態의 變化

本 研究에서 使用한 鷄胚의 培養 筋細胞는 一般的으로 기술되어 있는 형태적 分化過程을 忠實히 再現하고 있다고 생각된다. 즉 孵卵 12日째의 鷄胚에서 筋原細胞를 摘出하여 배양하면 배양 48~72시간 사이에 세포의 伸長과 融合이 最高度에 달하고 이후 多核 筋細胞로 의 分化를 次第히 完了하는 것으로 알려지 있다 (Hauschka, 1972; Bischoff, 1978). 本 實驗에서 보면 形態의인 觀察結果나 融合指數의 測定에서도 融合은 72시간에서 最高值에 달하였으며, 또 세포의 增殖度는 배양 48시간까지 가장 급속히 일어나고 融合이 개시되는 48~72시간 사이에는 대단히 낮다. 따라서 本 實驗에서 사용한 鷄胚 培養 筋細胞는 일반적인 근세포 分化의 과정을 밟고 있는 것이라고 생각할 수 있고, 이것을 材料로 하여 培養 筋細胞에서 일어나고 있는 現象을 나타내는 것이라고 생각할 수 있을 것이다.

細胞의 融合과 增殖度는 培養初期의 細胞密度에 따라 다른은 이미 알려져 있다 (Yeoh and Holtzer, 1977). 本 實驗에서도 1×10^5 에서 7×10^5 cells/ml사이의 몇 가지 밀도에서 融合指數와 增殖度를 비교 해 본 結果는 7×10^5 에서 兩者가 가장 높았다. 培養細胞의 密度가 細胞融合指數와 細胞增殖度에 큰 영향을 미친다는 사실은 어떤 物質을 媒介로 한 細胞相互間의 認識 및 情報交換이 있음을 示唆하고 있다. 이것에 대해서는 뒤에서 言及하기로 한다.

培養筋細胞의 融合을 抑制하는 수단은 몇 가지가 報告되어 있다. Shainberg 等 (1969)은 培養內 Ca^{2+} 의 濃度を 0.25 mM이하로 낮추어 줌으로써 배양근 세포의 융합을 억제시켰다고 보고하였으며, Ha *et al.* (1979)은 Ca^{2+} 을 0.05 mM로 낮추어 細胞融合을 억제시키면 여러가지 筋特異 蛋白質의 合成도 억제된다고 보고 하였다. Blau와 Epstein (1979)은 DMSO가 培養筋細胞의 分化를 可逆적으로 抑制시킨다고 하였다. 細胞의 分化에 따른 各種 生化學的 變化를 分析하는 데는 細胞分化를 同調化(synchronization) 시키는 것이 바람직하다. 그리고 이 同調化操作은 正常分化에 하등의 傷害를 주지 않는 것이어야 할 것이다. 培養液內 Ca^{2+} 의 濃度を 低下시키면 細胞融合은 효과적으로 억제 中止시킬 수 있지만 Ha *et al.* (1979)의 報告에서 보는 바와 같이 여러 筋蛋白質의 合成도 同時에 抑制된다. 따라서 低濃度の Ca^{2+} 이 融合을 抑制하기 때문에 筋特異 蛋白質의 合成도 抑制되는 것인지 또는 筋特異 蛋白質의 合成抑制로 말미암아 融合이 抑制되는 것인지 分明치 않다. 이에 반하여 DMSO는 可逆적으로 融合을 抑制하고 (Blau and Epstein, 1979), 또 融合이 抑制되어도 미오신 등의 合成도 進行된다는 報告 (Moss and Strohmman, 1976)도 있으므로 培養筋細胞의 分化를 同調化시키는 데에는 DMSO가 効果적인 것이라고 생각되었다. 그러나 本 實驗의 結果에서는 5% DMSO에서는 融合이 완전히 抑制되었으나, 顯微鏡 觀察에 의하면 細胞의 形態가 正常이 아니었고, 장시간 (48시간 이상)의 處理에서는 細胞의 崩壞가 현저함이 觀察 되었다. 또 DMSO를 除去한 후의 細胞의 形態의 分化過程이 반드시 正常的으로 回復되는 것으로는 보이지 않았다. 따라서 本人들은 細胞分化의 同調化에 DMSO를 使用하는 것을

적당치 않다고 판단한다.

培養筋細胞의 分化에 따른 蛋白質의 合成

여러가지 筋特異 蛋白質의 合成이 相互關聯性을 갖는지의 여부, 그리고 細胞融合과 相互關係가 있는지의 여부를 알기위해서는 細胞融合 前後에서의 이들의 合成順序와 相對의 含量을 精밀히 調査할 필요가 있을 것이다. 따라서 本 實驗에서는 筋細胞를 培養하면서 여러 時間間隔으로 細胞內 蛋白質을 電氣泳動과 自記放射法으로 分析하였다.

먼저 한개의 배양접시내의 총단백질의 量的 變化를 보면 細胞融合前까지 增加하다가 融合기간인 50~76時間 사이에는 거의 증가가 없고, 融合이 거의 끝난 後부터 다시 급격하게 증가한다 (Fig. 3). 이 結果는 前項에서 論議한 細胞融合指數와 增殖度の 測定結果와 일치하는 것으로서, 融合前의 총단백질량의 증가는 細胞의 增殖에 基因하는 것이고 融合後의 增加는 細胞內 筋特異 蛋白質의 合成增加에 基因하는 것으로 解釋된다.

그러나 本 實驗에서 다른 6가지 筋特異 蛋白質이 모두 培養初期 (배양개시 후 24시간)부터 電氣泳動上에 檢出되는 것으로 보아 이들의 合成은 筋原細胞 從부터 이미 개시되고 있다고 생각된다. 그러나 그들의 合成率은 시기적으로 같지 않음을 Fig. 7, Fig. 10, 그리고 Fig. 11로부터 알 수 있다. Fig. 7은 電氣泳動상에서 각 시료당 100 μ g의 蛋白質 속에 들어 있는 各 蛋白質의 相對量을 培養時間別로 나타낸 것인데 融合前까지는 악틴과 미오신의 相對量이 增加하고 있으며, 여타의 筋特異 蛋白質은 相對量이 거의 일정하다. 다만 트로포닌 C의 경우 약간의 起伏이 있을 뿐이다. 이것은 融合을 前後하여 이들 蛋白質의 合成率이 다름을 강력히 示唆하는 것으로 생각된다. 이것은 Fig. 10에서도 뒷받침되고 있다. 즉 電氣泳動板을 自記放射 필름에 露出시킨 Fig. 10에서 미오신과 악틴의 放射性 메치오닌의 含量 (放射能量)은 初期에 커지나 48 時間이후는 減少하고 있는 것이다. 이 自記放射 필름을 densitometric scanning한 Fig. 11에서 이러한 現象을 보다 明白히 볼 수 있다. 이와 같이 위의 그림들은 어느 경우나 培養初期에는 미오신과 악틴의 合成이 활발하고, 細胞融合이 일어나는 時期를 前後해서는 트로포닌의 合成이 활발하게 일어나는 것을 나타내고 있다. 그리고 트로포미오신의 合成은 時間的인 起伏이 적어서 分化의 全時期에 걸쳐 거의 一定한 速度로 일어나고 있음을 보이고 있다.

이러한 結果들에 基礎하여 筋의 分化時에 筋特異 蛋白質의 合成에는 時期的인 差異가 있어서 악틴과 미오신의 合成이 가장 먼저 일어나고, 그 뒤를 이어 트로포닌과 트로포미오신의 合成이 활발하게 일어난다고 判斷된다. 다만 트로포닌과 트로포미오신의 各 成分들의 合成順序에 대해서는 좀 더 精밀한 測定이 필요한 것으로 생각된다.

本 實驗에서는 트로포닌을 C, I, T로 區分하여 測定하였으나, 그 相對量은 分化의 全時期에 걸쳐 거의 一定하였다. 이 結果는 Matsuda等 (1981)의 結果와 상치하는 것인데, 그들은 成體와 生體鵝胚에서 胸筋과 脚筋의 트로포닌 成分이 다르고, 鵝胚에서는 發生이 進行됨에 따라 이들 成分의 比에 差異가 생긴다고 報告하고 있다. 本 實驗에서는 生體鵝胚에 대해서는 트로포닌 T밖에 測定하지 못하여 (Fig. 8) 培養筋과 生體胚 사이의 差異를 究明하지는 못하였다. 그러나 Fig. 8과 Fig. 9의 曲線들이 서로 다른 것으로 미루어 볼 때 培養筋에서의 觀察現象을 그대로 生體胚에 適用하는 데는 문제가 있다고 생각된다.

Allen等 (1980)은 미오신과 트로포미오신의 合成率이 細胞의 分化에 따라 달라진다고 報告하고 있는데 이것은 本 實驗의 結果와 一致하는 것으로서 合成率의 差異는 바로 合成時

期の 差異를 反映하는 것으로 解釋된다.

培養筋細胞로 부터의 蛋白質 遊離

筋細胞의 培養에 있어서 培養細胞의 初期密度가 어느 정도 이하이면 培養이 持續되지 않으며, 또 細胞의 融合도 일어나지 않는다는 것이 알려져 있다 (Yeoh and Holtzer, 1977). 또 오래전부터 細胞의 培養에서 培養液을 자주 갈아주면 細胞의 融合이 遲延된다는 것이 알려져 있다 (Konigsberg, 1971). 本 實驗에서도 細胞를 初期密度 1×10^5 에서 7×10^5 cells/ml의 範圍內에서 培養한 結果 融合指數와 增殖度는 7×10^5 에서 가장 높았다.

이러한 사실은 培養細胞가 培養 中에 어떤 物質을 培養液內에 放出함으로써 細胞融合을 同一時期에 誘導한다는 것을 示唆한다. 培養筋細胞의 分化를 誘導하는 物質로서는 神經細胞의 抽出物이 알려져 있다 (Oh, 1976; Markelonis *et al.* 1980, 1982; Bonner *et al.* 1982). 그러나 神經細胞의 存在없이 이루어지고 있는 筋細胞의 培養에서는 神經細胞로 부터의 融合促進 또는 增殖促進物質의 供給은 생각할 수가 없다. 물론 混入神經細胞로 부터의 微量供給의 可能性을 완전히 排除하기는 어려우나 顯微鏡下에서의 觀察結果에 의하면 그 可能性도 대단히 稀薄하다고 생각된다.

따라서 本 研究에서는 培養細胞 自體로 부터 어떤 蛋白質이 放出되는 것으로 생각하고 그 物質의 確認을 試圖하였다. 그 방법으로서는 근세포를 정상배양액에서 일정시간 培養한 다음, 배양액을 MEM으로 바꾸어 배양을 계속하였다. 그리고 一定時間 間隔으로 이 MCM을 採取하여 電氣泳動으로 蛋白質 分析을 하였다. MEM에는 단백질이 전혀 들어 있지 않으므로 MCM에서 檢出된 단백질은 培養細胞에서 遊離된 것이라고 생각할 수 있기 때문이다.

그 結果는 Fig. 12에서 보는 바와 같이 分子量 約 18,000과 20,000으로 推定되는 두 種의 蛋白質이 檢出되었다. 이 蛋白質은 培養細胞에서 遊離된 것임이 分명한 것은 “結果”에서 說明한 바와 같다.

또 細胞를 正常 培養液에서 培養한 다음 ^{35}S -methionine을 含有하는 MEM에서 계속 培養하면서 一定時間 間隔으로 MCM을 採取하여 電氣泳動과 自記放射法으로 放射能 標識 蛋白質을 檢出해 본 結果도 역시 數 種의 蛋白質이 標識되어 있었다 (Fig. 13, A, B). 이것으로도 培養筋細胞로부터 여러가지 peptide가 培養液속으로 放出됨을 짐작할 수 있다.

MCM에서 檢出된 이들 蛋白質은 물론 培養途中 崩壞한 細胞에서 溶出된 것이라고 생각할 수도 있으나 그 可能性도 상당히 稀薄하다. 그것은 MCM의 電氣泳動상이나 自記放射 필름이 cell homogenate의 것과 완전히 一致하지 않기 때문이다. 그리고 MCM속에 含有된 蛋白質의 量은 崩壞된 細胞속에서 放出된 蛋白質의 量으로 보기에 너무 많은 것이다. 또 하나의 證據는 DMSO를 處理한 MCM (Fig. 12, D-MCM)에 아무런 蛋白質이 檢出되지 않았다는 것이다. 다시 말하면, 細胞가 崩壞되어 蛋白質이 培養液으로 放出된다면 D-MCM에서도 檢出되어야 할 것이다. 그러나 D-MCM (Fig. 12)에는 아무런 蛋白質 밴드가 나타나지 않았다. 그러므로, MCM상에 나타난 蛋白質은 細胞의 崩壞에 의해 放出된 蛋白質이 아니고, 細胞에서 遊離된 蛋白質인 것이다.

그러나 MCM에 나타난 蛋白質들이 培養細胞로 부터 能動的으로 培養液內에 放出된 것임을, 그리고 이 物質들이 細胞融合을 促進하는 物質임을 證明하기 위해서는 이들을 純粹 濃縮한 다음 培養筋細胞에 加하여 細胞融合의 促進 效果를 確認해야 할 것이다.

또한 MCM에서 檢出된 蛋白質들이 細胞質에서 細胞膜을 통과하여 培養液內로 放出된 것이라고 생각하는 데는 無理가 있을 것 같다. 왜냐하면 分子量이 10,000이 훨씬 넘는 高分子들이 細胞膜을 통하여 放出된 것이라고 생각하는 것이 어렵기 때문이다. 따라서 이들 蛋白質은 細胞膜 外部를 構成하는 膜蛋白質일 可能性이 크다. 膜蛋白質이 細胞의 分化에 따라 化學修飾 (chemical modification) 또는 post-translational modification 을 거쳐 그 일부가 切斷되어 培養液속에 擴散되어 나가는 것이라고 생각하는 것이 보다 合理的이다. 그리고 이 切斷된 膜蛋白質이 隣接細胞의 膜蛋白質에 作用하여 細胞사이의 融合을 誘導하는 것이라고 생각되는 것이다.

이러한 假定을 證明하기 위해서는 培養筋細胞의 膜蛋白質을 選擇적으로 放射能 標識하여 MCM속의 標識蛋白質의 存在를 確認하여야 할 것이다.

要 約

細胞의 分化에 관한 研究의 一環으로 鷄胚의 筋細胞를 培養하면서 미오신, 악틴, 트로포미오신, 트로포닌 等 筋特異 蛋白質의 合成과 培養細胞에서 培養液內로 放出되는 蛋白質을 形態分化和 並行하여 分析하였다.

筋特異 蛋白質중 미오신과 악틴은 細胞融合前에 활발히 合成되며 融合後에는 相對적으로 떨어져지고, 트로포닌은 融合直後부터 활발히 合成되기 시작하며, 트로포미오신은 分化의 全期間에 걸쳐 合成율이 거의 一定하였다.

培養筋細胞는 細胞融合이 일어나기 前에 分子量 18,000 달톤과 20,000달톤 그리고 그 이상의 몇 가지 蛋白質을 培養液內에 放出시킨다는 것이 거의 確實하다. 이들 蛋白質은 培養筋細胞의 膜蛋白質일 것으로 推定되며 筋細胞의 同時的 融合을 誘導하는 機能을 가진 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Allen, R.F., M.H. Stromer, D.E. Goll and R.M. Robson, 1978. Synthesis of tropomyosin in cultures of differentiating muscle cells. *J. Cell Biol.* 76:98-104.
- Allen, R.F., M.H. Stromer, D.E. Goll and R.M. Robson, 1980. Disproportionate accumulation of myosin and tropomyosin in cultured muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.* 21:247-253.
- Bischoff, R., 1978. Myoblast Fusion. *In: Membrane Fusion* (G. Poste and C.L. Nicolson, ed.), pp. 128-172. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Blau, H.M. and C.J. Epstein, 1979. Manipulation of myogenesis *in vitro*: Reversible inhibition. *Cell* 17:95-108.
- Bonner, P.H. and T.R. Adams, 1982. Neural induction of chick myoblast differentiation in culture. *Develop. Biol.* 90:175-184.
- Buckingham, M.E., 1977. Muscle protein synthesis and its control during the differentiation of skeletal muscle cells *in vitro*. *In: Biochemistry of Cell Differentiation II* (J. Paul, ed.), Vol. 15, pp. 269-332. University Park Press, Baltimore.
- Delain, D., J.P. Wahrmann and F. Gros, 1981. Influence of external diffusible factors on myoge-

- nesis of the cells of the line L6. *Exp. Cell Res.* **131**:217-224.
- Devlin, R.B. and C.P. Emerson, 1978. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. *Cell* **13**:599-611.
- Devlin, R.B. and C.P. Emerson, 1979. Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation. *Develop. Biol.* **69**:202-216.
- Doering, J.L. and D.A. Fischman. 1979. A fusion-promoting macromolecular factor in muscle conditioned medium. *Exp. Cell Res.* **105**:437-443.
- Greaser, M.L. and J. Gergely, 1971. Studies of muscle development. *Arch. Biochem. Biophys.* **141**: 271-277.
- Ha, D.B., R. Boland and A. Martonosi, 1979. Synthesis of the calcium transport ATPase of sarcoplasmic reticulum and other muscle proteins during development of muscle cells *in vivo* and *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* **585**:165-187.
- Hauschka, S.D., 1972. Cultivation of Muscle Tissue. *In: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture* (G.H. Rothblat and V.J. Cristofalo, ed.), pp. 67-89. Academic Press.
- Konigsberg, I.R., 1971. Diffusion-mediated control of myoblast fusion. *Develop. Biol.* **26**:133-152.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr. and R.J. Randell, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Markelonis, G.J., V.F. Kemerer, and T.H. Oh, 1980. Sciatin: Purification and characterization of a myotrophic protein from chicken sciatic nerves. *J. Biol. Chem.* **255**:8967-8970.
- Markelonis, C.J., T.H. Oh, M.E. Eldefrawi and L. Guth, 1982. Sciatin: A myotrophic protein increases the number of acetylcholine receptors and receptor clusters in cultured skeletal muscle. *Develop. Biol.* **89**:353-361.
- Matsuda, R., T. Obinata and Y. Shimada, 1981. Types of troponin components during development of chicken skeletal muscle. *Develop. Biol.* **82**:11-19.
- Moss, P.S. and R.C. Strohman, 1976. Myosin synthesis by fusion-arrested chick embryo myoblasts in cell culture. *Develop. Biol.* **48**:431-437.
- Oh, T.H., 1976. Neurotrophic effects of sciatic nerve extracts on muscle development in culture. *Exp. Neurol.* **50**:376-386.
- O'Neill, M.C. and F.E. Stockdale, 1972. A kinetic analysis of myogenesis *in vitro*. *J. Cell Biol.* **52**:52-65.
- Shainberg, A., G. Yagil and D. Yaffe, 1969. Control of myogenesis *in vitro* by the Ca²⁺ concentration in the nutritional medium. *Exptl. Cell Res.* **58**:163-167.
- Spudich, J.A. and S. Watt, 1971. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.* **246**:4806-4871.
- Vertel, B.M. and D.A. Fischman, 1976. Myosin accumulation in mononucleated cells of chick muscle cultures. *Develop. Biol.* **48**:438-446.
- Yeoh, G.C.T. and H. Holtzer, 1977. The effects of cell density, conditioned medium and cytosine arabinoside on myogenesis in primary and secondary cultures. *Exp. Cell Res.* **104**:63-78.
- Zevin-Sonkin, D. and D. Yaffe, 1980. Accumulation of muscle-specific RNA sequences during myogenesis. *Develop. Biol.* **74**:320-334.

Explanation of Figures

- Fig. 4.** The protein composition of cultured chick muscle cells. Numerals at the top of each lane indicate the days of culture. Arrows on the left indicate the position of marker proteins: 1, myosin; 2, phosphorylase; 3, serum albumin; 4, actin; 5, creatine phosphokinase; 6, glyceraldehyde dehydrogenase; 7, lactic dehydrogenase; 8, myoglobin.
- Fig. 6.** Electrophoresis patterns of marker proteins. The right lane is electrophoresis pattern of cultured chick muscle cells (SDS-polyacrylamide, 6~12% gradient gel).
- Fig. 9.** Autoradiogram of cultured chick muscle cells labelled with ^{35}S -methionine. The first numerals under each lane indicate the time of culture when the tracer was added and the last numerals indicate the time of culture in labelled medium.
- Fig. 10.** Autoradiogram of cultured chick muscle cells labelled with ^{35}S -methionine for two hours. The numerals under each lane indicate the time of culture when the tracer was added.
- Fig. 12.** Electrophoretic patterns of proteins in the muscle-conditioned medium. After cells were cultured in normal medium for 17 hours and in minimum essential medium for 30 hours, the MEM (MCM) was collected and electrophoresized. EBSS, Earl's balanced salt solution used for washing cells at change of medium; D-MCM, MCM containing 2% DMSO; MCM*, MCM containing ^{35}S -methionine; MCE, EBSS used for culture instead of MEM; cell*, homogenate of cells cultured in MEM containing ^{35}S -methionine for 30 hours; EE, embryo extract added in normal medium; 8102*, normal medium containing ^{35}S -methionine and used for culture; HS, horse serum added in normal medium; Mb, myoglobin used as marker protein.
- Fig. 13.** Autoradiogram of Fig. 12.
- Fig. 14. A.** Electrophoretic patterns of proteins in the muscle-conditioned medium. The first numerals under each lane indicate the time when ^{35}S -methionine was added and the last numerals indicate the time of culture in labelled medium. HS, EE, cell*, and Mb are same with those of Fig. 12.
- Fig. 14. B.** Autoradiogram of Fig. 14 A.

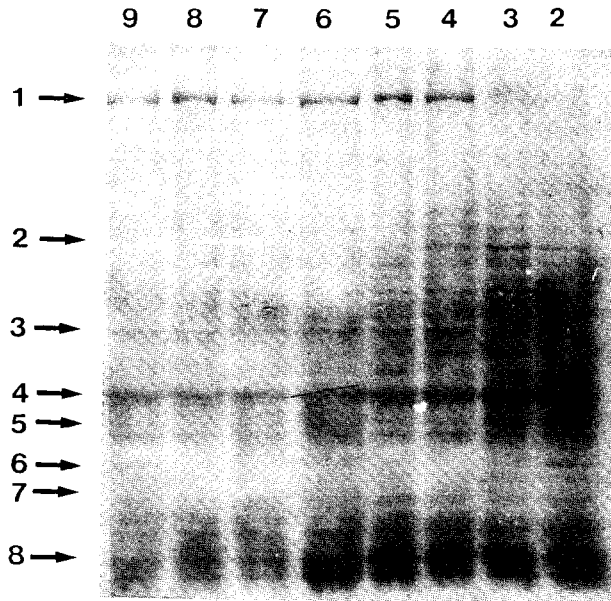


Fig. 4.

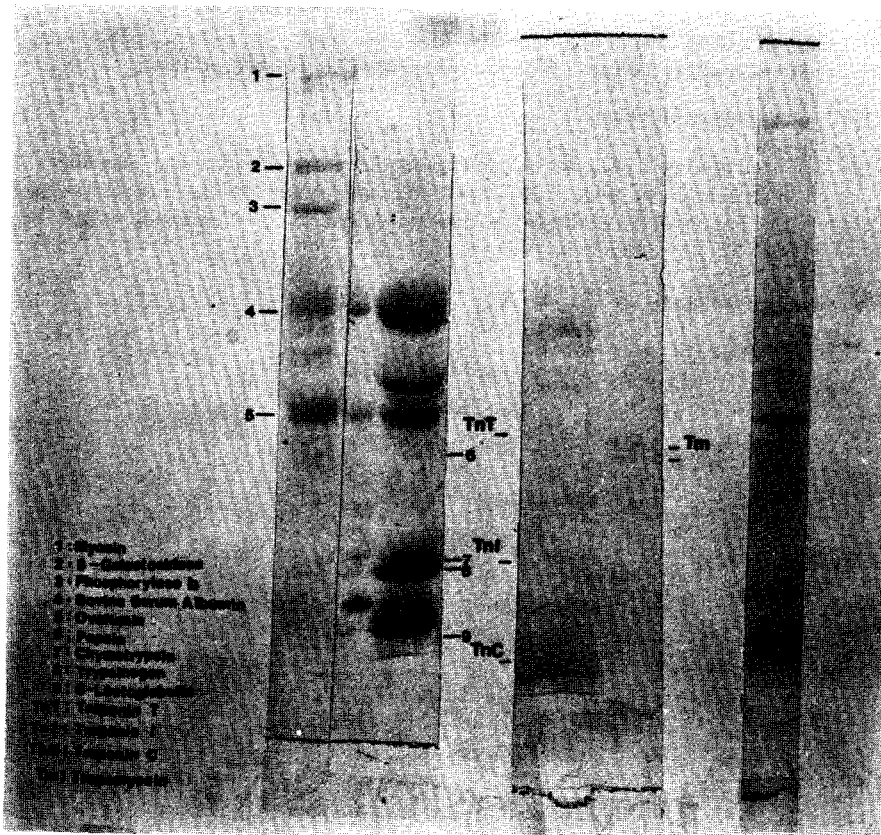
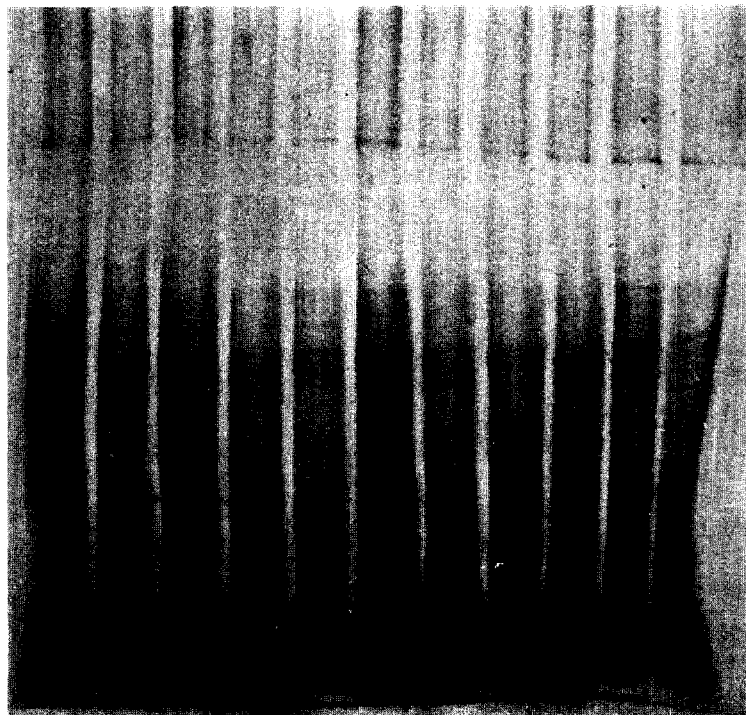


Fig. 6.



48-4 48-8 48-12 48-16 48-20 48-24 72-4 72-8 72-12 72-16 72-20
Fig. 9.



Fig. 10.

36 42 48 54 61 67

Fig. 12.

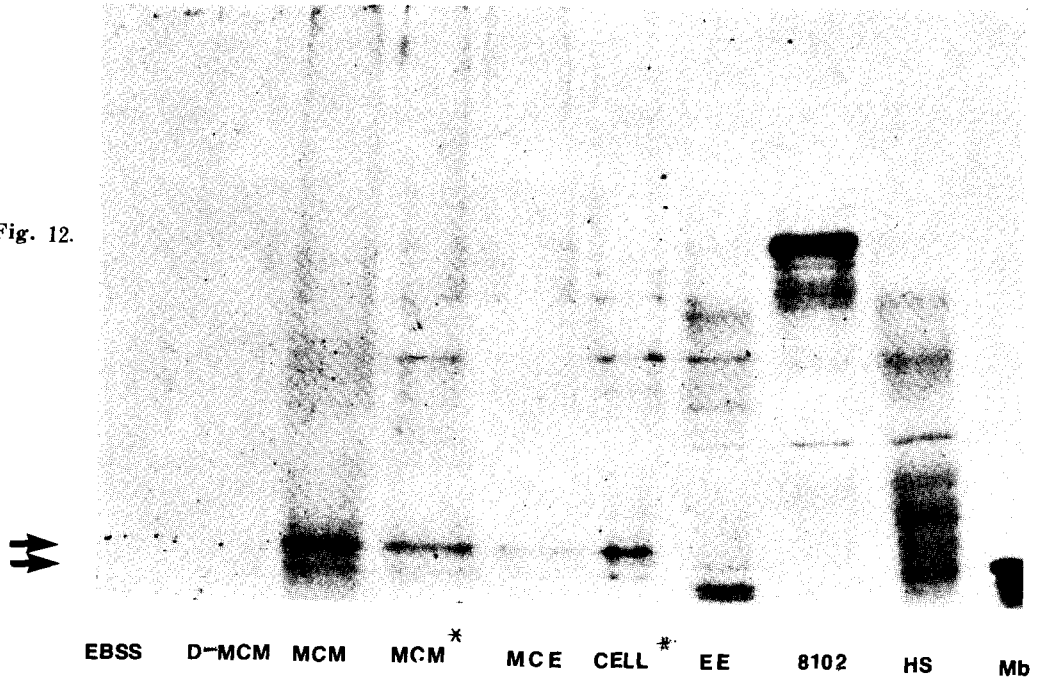


Fig. 13.

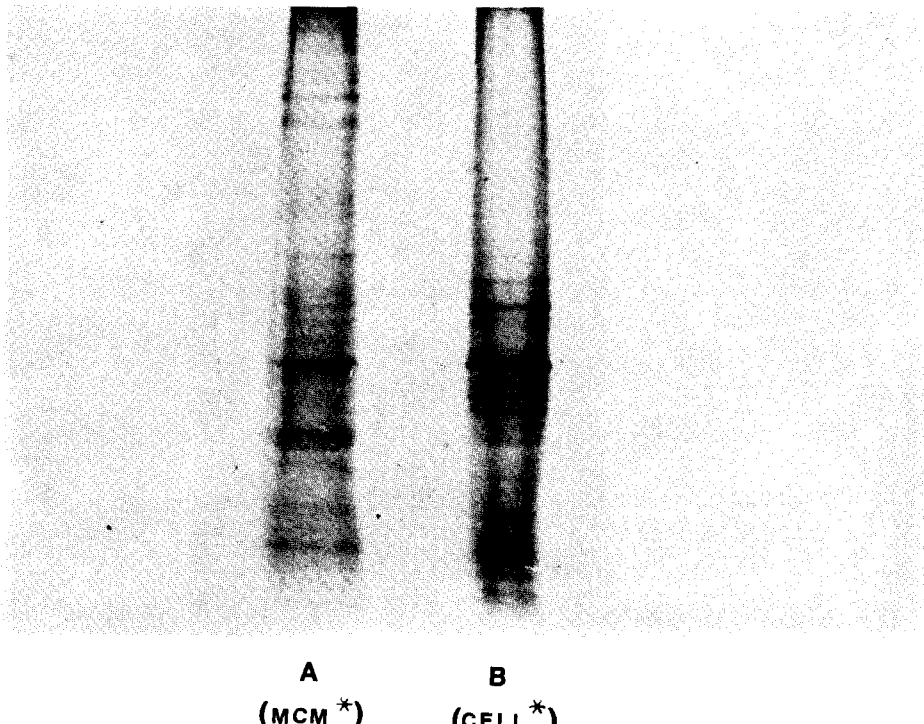
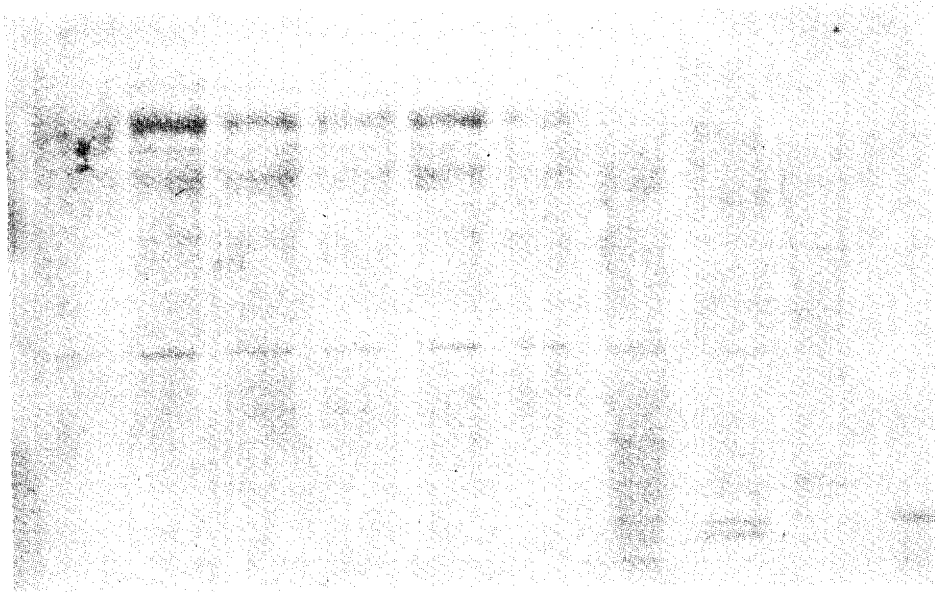


Fig. 14A.



48-8 48-16 48-24 72-8 72-16 72-24 HS EE CELL* Mb

Fig. 14B.

