

Title	筋小胞体のカルシウム遊離機構
Author(s)	宮本, 宏
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2162
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

筋小胞体のカルシウム遊離機構

宮 本 宏

筋小胞体のカルシウム遊離機構

宮本 宏

目次

要旨	3
第1章 序論	5
第2章 実験方法 および材料	12
第1節 材料	12
第2節 実験方法	14
第3章 実験結果	25
第1節 Leeの実験の追試およびこれに対する反論実験	25
第2節 能動輸送でとりにんたCaの脱分極による遊離	35
第3節 ATPを使わずに拡散でとりにんたCaの遊離	50
第4節 筋小胞体のCa結合部位の非対称分布および 体積について	60
第4章 議論	78
付録	89
謝辞	91
付記	91
参考文献	92

要 旨

骨格筋の収縮制御機構は分子レベルでの解明が非常によく進んでいるが、その重要な一部をなす興奮収縮連関と呼ばれる過程すなわち筋細胞膜が興奮してから筋小胞体によるカルシウム遊離が行われ筋収縮が起こるまでの過程の中で T-system と呼ぶ筋細胞表面膜のかん入部から筋小胞体へいかなる情報伝達が行なわれているのか、また筋小胞体はどのような機構でカルシウムを遊離するのかという点はまたよくわかっていない。本研究はウサギ骨格筋から抽出した筋小胞体フラグメントを用いてこのカルシウム遊離機構を解明することを目的としている。

本論文で扱っている内容は実験結果の所で4節に分けたように主に4つからなっている。第1は以前に K. S. Lee らによって筋小胞体サスペンションに直接電極を挿入して電気刺激を行なうとカルシウムが遊離されたという報告がなされているのに対する反論で、彼らの実験でカルシウム遊離としているのは電気分解に伴って発生した塩素が膜に作用してフンバク質を変性させ、その結果カルシウム蓄積機能を維持できなくなり、カルシウムが出てきたものであることを明らかにした。第2は筋小胞体フラグメントから脱分極によりカルシウムが遊離されることを示した。筋小胞体フラグメントは小さく(平均直径 0.1 μ m)微小電極を挿入することはとてもできないので、透過性の異なるイオンのおきかえをすることにより膜に脱分極をおこさせた。あわせてこの反応が膜の破裂によるものではないこととこの反応の性質を明らかにした。この実験がATPを使って能動輸送でとり込んだカルシウムの遊離反応をみたのに対し第3にはATP等のエネルギーを使わず、拡散で筋小胞体の中に入ったカルシウムの遊離反応を調べ、脱分極を与えるとカルシウムに対する膜透過性のみが内外両方向について増大するという性質を明らかにした。ATPを使ってとり込んだカルシウムについての実験といくつか異なる結果が得られたがこれについては第4章で議論する。

オ4には 筋小胞体膜のカルシウム結合部位とその性質を膜の内外を区別して調べた。その結果 外側には2種の 内側には4種類の結合部位があり、これらの解離定数と最大結合量を単離した筋小胞体タンパク質のそれと比較して 筋小胞体タンパク質の膜内配置について議論した。またこの結果を使って 筋小胞体内腔におけるカルシウムの存在状態を推定することができるようになった。

第1章 序論

骨格筋の収縮弛緩制御機構はその素過程を分子レベルから解明するという点で非常に研究が進んでいる分野の一つである。以下にその概要を述べると、運動神経で発生した活動電位 (action potential) はその神経末端で伝達物質であるアセチルコリンを筋細胞表面の endplate と呼ばれる神経・筋接合部に放出させる。アセチルコリンを受容したアセチルコリンレセプターは何らかの機構で膜のイオン透過性を増大させ発動器電位 (generator potential) を筋細胞膜に発生させる。発動器電位 (generator potential) がある閾値に達すると筋細胞膜は自発的な活動電位 (action potential) を発生し、それは筋表面膜を伝播して筋表面膜のかん入部である T-system (Transverse tubule membrane system) にまで達する。T-system の脱分極はそれをとりにくように位置している筋小胞体の terminal cisternae に何らかの刺激 (現在では脱分極性の電気刺激の可能性が最も強く示唆されている) を与え、それにより筋小胞体は自らの内部に蓄積していたカルシウムイオンを筋細胞中に放出させ $10^{-6} M$ 以下であった Ca 濃度を $10^{-6} \sim 10^{-5} M$ へと上昇させる。カルシウムイオンは筋肉のアクチンを主成分とする細いフィラメント上に規則正しく配置しているトロポニンに結合、トロポニンからトロポミオシン、細いフィラメント全体へと構造変化が伝わり、細いフィラメントのアクチンと太いフィラメントのミオシン頭部とが相互作用を開始し、フィラメント間のすべり (sliding) が生じ、筋収縮が開始される。弛緩は神経からの刺激が止むと結局筋小胞体からの Ca 放出が止まり、逆に筋小胞体は自ら ATP を使って Ca イオンを内側へ能動輸送し、筋細胞内のカルシウムイオン濃度を低くし、アクチン-ミオシン相互作用を停止させることにより行なわれる。(1-9)

これから全過程の中で筋小胞体から Ca イオンが放出される機構は解明が残されている最も重要な問題の一つである。特に筋小胞体がカルシウムイオンを能動輸送する

機構についてはそのポンプの役割をしているタンパク質が同定され
その反応機構に到るまで詳しく解析されている(1.3-6.9)のに対し、
カルシウムイオン放出機構についてはわからぬことが多いことが多かった。
問題はオ1に筋小胞体は T-system からどのような刺激を受けて
反応するのかという点であり、オ2にその刺激によってどうや
って Ca 放出が起こるのか、そこにはどのような分子が関与
しているのかという点である。オ1の点についてすなわち
T-system から筋小胞体への情報伝達の方式については細胞
間のシナプスとの類似から電氣的結合および化学的結合の
少なくとも2種類の様式が考えられてきた。しかしここで
シナプス様の電氣的伝達 (gap junction あるいは tight
junction, 今日ではこれら2種の結合様式は基本的に同じものと
考えられている) が行なわれている可能性は非常に小さい。
その理由としては (i) 電子顕微鏡による観察では T-system
と小胞体の間の構造は通常電氣的シナプスのそれと形態学
的に異なる。(10) (ii) 筋細胞膜の電氣容量の測定や種々の
物質の筋細胞内外への流入の測定からも T-system と筋小胞
体間に効果的な電氣的結合があるとは考えられない。(1)
の2つがあげられる。それでは化学物質による伝達の可能性
はどうかといえは、少なくとも構造上化学的シナプスとは
全く異なっており、神経細胞の化学的シナプスと同じ機
構である可能性はない。ただし伝達物質が T-system
膜興奮に伴って細胞内へ T-system 内腔から流入してくる
あるいは T-system 膜内面に結合していた物質が興奮によつて
やはり細胞内へ遊離してくるという可能性は指摘されている。(11)
この伝達機構に関連して最近以下のような興味深いいくつか
の報告がなされている。(i) 筋線維の電氣生理的測定により、
筋小胞体の Ca 遊離と非常に相関のよい一過性の電流 (charge
movement) がみつかつた。これは時間経過、閾値電位共
筋収縮と一致し、しかもその動く荷電の数と筋小胞体の

terminal cisternae から T-system に向って出ている feet (10) とロキは"れる突起の数がほぼ対応するという。(12) (ii) また筋収縮時の光学的測定により筋小胞体膜電位の変化と思われるシグナルを検出したという報告がなされている。一つは Nile blue というケイ光色素で染めた筋細胞において、表面膜の活動電位よりは遅く、収縮による張力発生には先だつケイ光強度変化が観測されたというものである。(13) もう一つは筋細胞の収縮時の複屈折変化を調べやはり張力発生に先だち、表面膜の活動電位よりは遅い複屈折変化が観測されたというものである。(14)

一方筋小胞体に実際に電氣的刺激を与えて Ca イオン放出が起こるかどうかが確かめる実験が skinned fiber (筋細胞の表面膜をとり去った筋原繊維の束) 及び抽出した筋小胞体フラグメントを用いて行なわれた。名取 (15-18) および Costantin & Podolsky (19) は名取式の skinned fiber を用いてこれに直接電氣刺激をかけることにより、筋収縮が起こることを確かめた。これらの実験により彼らは internal membrane system (T-system と筋小胞体) が電氣刺激に応答して Ca 放出が起こり筋収縮が起ったと結論している。一方遠藤は Podolsky らのやり方では筋細胞膜をはぐときに T-system をそのまま残しておくので" 外に出ている先が閉じて全体として T-system が閉じた膜胞を形成している可能性があり、もしそうだとすれば" 電氣を流して刺激した時この膜胞 (T-system が自発的に活動電位を出すことはわかっている (20)) が電氣刺激を感受し、活動電位を発生、その結果筋小胞体へ刺激が伝わり、収縮が起こることになると考えた。そこで確実に筋小胞体の電氣的応答性を調べ得るように遠藤らは新たなやり方で skinned fiber をつくり、実験した。この skinned fiber は筋細胞をそのままですべてに裂いたものでこうすることにより筋細胞内が外液に接するようにして表面膜電位が発生しないようにしたのと同時に T-system もまだ残っている表面膜部分では外液に

開口部を持っているので T-system 膜にも電位が発生しないようにできた。(17) このような skinned fiber に電気刺激を与えると、podolsky らの結果と異なり収縮は起こらなかった。ところが後に述べるようにこの fiber でもイオンのおきかえによる脱分極を筋小胞体に与えると収縮が起こる。即ち podolsky らの結果は筋小胞体の電氣的応答でなく膜胞を形成した T-system の電氣的応答をみているにすぎないという可能性が強い。また抽出した筋小胞体を用いてこのサスペンションに直接電極を挿入し、電気刺激を与える試みが Lee らによって行なわれた。(21) その結果確かに筋小胞体からカルシウムイオンの放出が起こるのであるが、それは本論文でも述べる通り、電極で発生した塩素により、筋小胞体が不可逆な変性を受け、カルシウムイオン蓄積維持能力を失うためによるのであり、生理的に考えられるカルシウムイオン放出ではない。アーティファクトであることが明らかとなった。(22)

また一方中東, Schwartz は少し異なった立場から筋小胞体からの Ca 放出の実験を水素イオン濃度を変えることにより行なった。(23,24) 抽出した筋小胞体フラグメントの水素イオン濃度を高い方へ変えると中に蓄積されていたカルシウムイオンが放出される。彼らはこれにより、筋小胞体は脱分極したときに局所的に溶液の水素イオン濃度が変わり、それによってカルシウムイオンが筋細胞内に放出されるという機構を推定している。しかしそのときのカルシウムイオンの放出速度は必ずしも速いものではなく、われわれはこれに対して若干の追試と批判を行なった。(25) (詳しくは参考論文を参照)

こうした状況のもとで、一体筋小胞体は脱分極に対して反応し得るか否かが大きな関心であった。これに対し遠藤, 中島は先に述べた skinned fiber を用いて (26) 葛西, 宮本は抽出された筋小胞体 vesicle を用い (27,28) イオン組成を変えることにより筋小胞体からカルシウムイオンを遊離することに成功した。これらは共に筋小胞体膜が脱分極したことによりカルシウムイオンが遊離されたと考えられる。本論文においては筋小胞体 vesicle による

カルシウム遊離の実験について述べる。

才2の点すなわちどのようにしてカルシウムが遊離されるのか、またそこに関与する分子はいかなるものかという点についてはまだほとんどわかっていない。筋小胞体には7種類のタンパク質があることが MacLennan らによって示されている。(29,30) これらのタンパク質のうち機能のはっきりわかっているのは分子量約105000のCa・Mg-ATPaseのみで、これはカルシウムイオン能動輸送のポンプであることが完全に人工的な脂質と抽出したATPaseタンパク質とから能動輸送機能を再現されたことにより示された。(31,32) 他のタンパク質についてはCa結合能や分子量、若干の性質が測られているのみで、筋肉の収縮弛緩制御機構の中でのどのような役割を果たしているのか明らかではない。またこれらのタンパク質の膜内配置についても最近ようやく明らかになってきた段階である。(33,34)

本研究は骨格筋から抽出した筋小胞体を用いて筋小胞体のCa遊離機構を解明することを才1の目標としている。すなわち果して脱分極によってカルシウムイオンが遊離されるか否か、またそれが生理的な筋収縮制御作用としてのCa遊離機構であるかどうかを明らかにする。さらにCaはどこからどのようにして出るのか、それに関与している分子はいかなるものであるのかという点を次々と明らかにしていくことを目標としているが、この点では研究はまだ一段階を期したのみであり、引き続き研究が必要とされている。したがってここに述べるのは最終的な目標に対する中間報告とも言える。

才2にこのCa遊離機構の解明を通じて膜のイオン透過機構特に興奮性膜が膜電位変化を感受して、一定の時間依存性をもって特有のイオン透過性変化を示す機構の解明に何らかの寄与を行ない得ると考えられる。興奮性膜のイオン透過性変化を起す機構については化学的興奮の研究の方が多く行われている。葛西らにより電気ウナギの電気器管から抽出した膜フラグメントを用い

試験管中で興奮性が再現された。すなわち アセチルコリン又はその擬似物質により Na 等のイオン透過性の増大が確かめられた。(35-38) さらに アセチルコリンを受容するタンパク質が レセプターとして同定されその性質がさらに調べられている。(39-41) 一才電氣的興奮では主に電気生理学的研究により現象論的記述は多くなされており、その段階での法則性は Hodgkin-Huxley の channel theory (42-46) や Tasaki に代表される phase transition model (47) という形で説明されている。しかしそれらの実体が何かという点になるとまた"また"わからなくなっている。 Na チャネルや K チャネルをとったという話はあるけれども多くの人を納得させるようなデータは示されていない。筋小胞体が果して興奮性膜と言えるかどうかは全くわからないが、その膜電位感受性(脱分極が真に起っていると考えると) およびカルシウムイオンに対する選択的透過性増大を考えると膜興奮と Ca 遊離の間に共通点も多い。しかも筋小胞体の膜構成タンパク質の種類は比較的少なく、またそれらを各々単離することもできている。故に筋小胞体を用いてイオン透過性増大の機構およびその機能を果す分子を同定することは他の興奮性膜を用いて研究するよりもはるかに有利であり、その可能性が大きい。そしてこれができれば"膜興奮現象を分子レベルで把握する上で画期的な前進が見られることになる"と予想される。本研究では以上のような観点をもあわせて持ちつつ研究を進めてきた。そしてこの目標に近づく道筋を見通せる所まで接近することができたと思う。

本論文の第3章実験結果の所ではまず第1節で Lee らが行なった筋小胞体に対する直接の電気刺激による Ca 放出の結果に対し、その追試と反論の実験について述べる。第2節および第3節はイオン組成変化による筋小胞体膜脱分極とそれに伴う Ca 遊離反応について解析した結果を示す。第2節は ATP を使って能動輸送した系での Ca 遊離をまた

オ3節では ATP を使わず、拡散で内側へ入った Ca の遊離を調べた。オ4章で述べるように両者の間には共通点もかなりあるが無視できない差がいくつかあり、一括して議論できない面がある。オ4節では筋小胞体膜のカルシウムイオン結合能を膜の内外を区別して求め全体として6種類の結合部位の性質を求めた実験を述べる。これを抽出したタンパク質のカルシウムイオン結合能と比較することによりタンパク質の膜内配置を議論する。

第2章 実験方法 および材料

第1節 材料

筋小胞体膜フラグメント : ウサギ骨格筋(背筋および後脚の筋肉の内赤筋は除く) 約 350g をとり出し 氷で冷却後 4倍量の抽出液 (0.1M NaCl, 5mM Tris maleate pH 7.0 4°C) を加えてミキサー (Toshiba MX-1700) で2分間ホモゲナイズした。これを低速遠心機で $4,000 \times g$ (6,500rpm) 20分間遠心分離し、沈殿した筋原繊維、核等を除く。上澄をさらに $8,000 \times g$ (10,000rpm) で30分間遠心しミトコンドリアを除く。この上澄を $53,000 \times g$ (25,000rpm) で50分間超遠心を行なう。沈殿に20~30倍量の 0.6M KCl, 5mM Tris maleate (pH 6.5) の溶液を加えてテフロンホモゲナイザーでけん濁し $53,000 \times g$ で50分間超遠心を行なう。できた沈殿に 0.1M KCl 5mM Tris maleate (pH 6.5) を約20倍量加えて同様にけん濁させ $53,000 \times g$ で50分間再度超遠心を行なう。こうしてできた沈殿を 0.1M KCl 5mM Tris maleate (pH 6.5) あるいは 5mM Tris maleate (pH 6.5) のみにけん濁させる。このときタンパク濃度を 15~30 mg/ml とするようにした。第3章第4節で述べるカルシウム結合能を測る実験では混入しているカルシウム濃度を下げするため必要な場合、1回目の超遠心の後沈殿に加える 0.6M KCl 溶液に 1mM EGTA を加えておきその後 0.1M KCl 5mM Tris maleate でけん濁、遠心する操作をもう一回多くして EGTA をよく除いて試料を調製した。得られた試料は 0°C で保存し、抽出後1週間までのものを実験に用いた。

抽出された筋小胞体は筋肉細胞中では直径約 $1 \mu\text{m}$ の筋原繊維を網目状にとりまわっている細胞内器管であったものが破れてその膜片が再び袋状に閉じたものである。この膜を電子顕微鏡で観察すると平均直径 $0.1 \mu\text{m}$ の袋状をなしており、外側は一層の単位膜でとり囲まれ、中は中空に見える。そしてこの膜の表裏についてはそのすべてが筋細胞中にある時と同じ方向を向いていると考えられている。

肝臓ミクロソーム : ウサギ肝臓に4倍量の抽出液
(0.1M KCl, 5mM Tris maleate pH 6.5)を加え2分間ミキサーで
ホモゲナイズ。これを10,000×gで20分間遠心し、この上澄
を78,000×gで90分間遠心した。この沈殿を0.1M KCl
5mM Tris maleate (pH 6.5) 溶液にサスペンドし0°Cで
保存した。

クレアチンフォスフォトランスフェラーゼ : Nodaらの方法(48)
に従いウサギ骨格筋より調製した。

放射性同位元素及び放射性同位元素でラベルした化学薬品は
各々以下の所から購入した。

^{45}Ca : International Chemical & Nuclear Corporation, Burbank
Calif.

^{22}Na , [carboxylic acid- ^{14}C] inulin, [1- ^{14}C] propionate (sodium
salt) ^{36}Cl : Radiochemical Centre, England

^{42}K : Japan Atomic Energy Research Institute, Japan

[Acetic-2- ^{14}C] EDTA : New England Nuclear, Mass.

[^{14}C] Sucrose : Commissariat à l'Énergie Atomique, France.

ATP, Creatine phosphate は Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.

から購入した。他の薬品は試薬特級を用いた。

第2節 実験方法

はじめに

筋小胞体は $\text{Ca} \cdot \text{Mg}$ -ATPase 活性を持っており、ATP 1分子を加水分解するとそれと並行してカルシウムイオン2個が筋小胞体内にとりこまれる。このときとりこまれる Ca の量は外液の Ca 濃度に依存する。 Ca 濃度が $0.01 \mu\text{M}$ をこすととりこみか" はじまり、 $1 \mu\text{M}$ で最大値に達しそれ以上 Ca 濃度が高くてもとりこみ量は一定である。この最大とりこみ量は試料により多少異なるが $150 \sim 200 \text{ n mole/mg protein}$ である。

そこで 0.1 M KCl , $20 \text{ mM Tris-maleate (pH 6.5)}$, 2 mM MgCl_2 , 2 mM ATP , $30 \mu\text{M CaCl}_2$ 0.2 mg/ml 筋小胞体の条件で Ca とりこみを行なうと約30秒で最大とりこみ量に達しその後10分ほどはこのレベルが保たれる。このときにはもはや溶液中には Ca がほとんど残っていない、加水分解されていない ATP はまたたくさん残っている状態となっている。 Ca の膜透過性は低いので少しずつリークしてくる Ca はた" うちに再とりこみされ一定時間最大とりこみレベルが維持されるわけである。

(1) Lee の実験の追試 およびこれに対する反論実験

カルシウムのとりこみ および放出のやり方については Lee の述べている方法によって行なった。抽出した筋小胞体をとこみ溶媒 0.1 M KCl , $20 \text{ mM Tris maleate}$, 2 mM MgCl_2 , 3 mM ATP , $30 \mu\text{M CaCl}_2 + {}^{45}\text{CaCl}_2$ それに 1 mM クレアチンリン酸 0.1 mg/ml のクレアチンフォスフォトランスフェラーゼ" 中に加えてとりこみを開始させた。このとき筋小胞体は 0.2 mg/ml の濃度になるようにした。なお $1 \text{ mM Creatine phosphate}$, 0.1 mg/ml クレアチンフォスフォトランスフェラーゼ" は加え、あるいは除くことにより結果に変化が見られなかったため後の実験では加えず" に行なった。また拡散でカルシウムをとこませる場合は 0.1 M KCl , $20 \text{ mM Tris maleate (pH 6.5)}$, 2 mM MgCl_2 , $1 \text{ mM CaCl}_2 +$

$^{45}\text{CaCl}_2$ の溶液中に筋小胞体 20 mg/ml を 1 晩 インキュベートする。
これを 0.1 M KCl, 20 mM Tris maleate, 2 mM MgCl_2 溶液で 100 倍に希釈して反応を開始する。

ほとんどの実験は 1 ml のサスペンションをミリポアフィルターを敷いたシリンジの中に直接入れ、後に述べる電極を挿入し、電気刺激を与えた後、ポアサイズ 0.45 μm のミリポアフィルター (Millipore Corp., Bedford, Mass. ^{31}P HAWP 025) でろ過した。フィルターに残っている量を測定する場合はその後 3 ml の洗浄液 (0.1 M KCl, 20 mM Tris maleate, 2 mM MgCl_2) で洗い、残っている外側のカルシウムを洗い流した。

筋小胞体に対する電気刺激

電気刺激のやり方は Lee の方法になるべく忠実に従った。電極は白金電極 (巾 4 mm, 長さ 7 mm, 間隔 3 mm) をシリンジチューブに入れて用いた。これに電気刺激装置 (MODEL MSE-3R Nihon Kodan, Tokyo, Japan) で矩形波パルスを様々な電圧, 持続時間, 周波数で与えた。このとき電圧, 電流, 周波数, パルスの持続時間, 波形を同時にオシロスコープ (MODEL SS5050 Iwatsu, Tokyo, Japan) で測定した。またいくつかの実験では白金電極の代わりにそれと同じ形の銀-塩化銀電極を用いた。

紫外差スペクトル測定は分光器 (Hitachi MODEL 139 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。この場合溶液のバッファーは吸収をさげるため Tris maleate の代わりに 20 mM リン酸バッファー (pH 6.5) を用い、また ATP は入れずに測定した。

(2) ATP を使ったトリコンタTMカルシウムの遊離実験

抽出した筋小胞体を反応を開始する前にあらかじめ約 30 分間 20 mM Tris maleate (pH 6.5), 2 mM MgCl_2 溶液中に結果を示す

ような各種の塩（とりこみを行なう時と同じ塩）の中にインキュベートする。このとき筋小胞体の濃度は特にことわらない限り 2.2 mg/ml である。カルシウムとりこみは各種の塩と 20 mM Tris maleate, 2 mM MgCl₂, 30 μM CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂ 1 mM ATP を含む溶液中にさきに述べた筋小胞体サスペンションを加えて反応を開始させる。ほとんどの実験は 3 分後にそこから 1 ml をとりミリポアフィルターで (pore size 0.45 μm) を通す。ここでイオン組成を変化させるためおよむ残っている外側のカルシウムを除くために 3 ml の各種溶液で洗う。この溶液は各種塩と 20 mM Tris maleate 2 mM MgCl₂ を含む。この方法はイオン組成を変化させる手段として "washing method" と呼ぶ。また別に "dilution method" と呼ぶやり方でイオン組成変化をおこさせた。これはとりこみを各種塩, 20 mM Tris maleate (pH 6.5), 2 mM MgCl₂, 300 μM CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂ それに 500 μM ATP の溶液に筋小胞体を 2.2 mg/ml にするように加えて反応を開始させる。3 分後に "washing method" で用いられた洗浄液すなわちカルシウム、ATP の入っていない溶液で 11 倍に希釈する。その後 1 ml ずつをとりミリポアフィルターでこし、3 ml の同じ溶液で洗う。いずれの方法もろ過後フィルターに付着した筋小胞体中に残っているカルシウムの量をラジオアイソトープのカウントにより測定する。

(3) 拡散でとりこませたカルシウムの遊離実験

筋小胞体を各種塩, 20 mM Tris maleate (pH 6.5), 2 mM MgCl₂ 1 mM CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂ の中で 4°C 1 晩インキュベートする。このときの筋小胞体の濃度は 15~30 mg/ml である。これを結果に示すような色々な溶液の中に筋小胞体の最終濃度が 0.2 mg/ml になるよう 10~100 倍にうすめ、カルシウム遊離の時間経過をはかる。希釈後適当な時間に 1 ml ずつをとり、ミリポアフィルターでこし、3 ml の洗浄液で洗う。これは (2) で述べたのと同じ

やり方である。こうしてミリポア フィルター上に残っているカルシウムの量を測定する。

またいろいろなイオン種や分子の膜透過性を測定するためにカルシウムの代わりにラジオアイソトープラベルした Na^+ , K^+ , Cl^- , プロピオン酸 $^-$, ショ糖, イヌリン 等を入れた溶液の中に1晩インキュベートし、カルシウムの場合と同様希釈しその後の時間経過を測定した。またこのカーブを時間0へ外そうすることにより平衡状態で筋小胞体中に入っていた分子、イオンの量がわかる。これらのマーカーの量をマーカーの濃度で割ったものが筋小胞体の内側の見かけの体積 V_{app} を与える。 V_{app} は以下の式から計算した。

$$V_{app} = \frac{R_0}{R} \cdot \frac{10^3}{C_p} \quad (\mu\text{l}/\text{mg protein})$$

R : 筋小胞体サスペンション 1 ml 当りの カウント

R_0 : 筋小胞体中の アイソトープのカウントを時間0へ外そうした値

C_p : 筋小胞体サスペンションの希釈前のタンパク濃度
(mg protein/ml)

カルシウムの内向きの透過性を測定するためにはカルシウムを加えていない濃い筋小胞体サスペンションを ^{45}Ca を含む各種塩溶液に加えて時間経過を遊離の場合と同様に測定した。

(4) 筋小胞体の Ca 結合能の実験

筋小胞体膜の外側に結合したカルシウムの量を α , 内側に結合した量を β 内側のスペースに結合せずにフリーで存在する量を γ とする

$\alpha + \beta$ の測定

調製した筋小胞体フラグメントを 0.1 M KCl 5 mM Tris maleate , 2 mM MgCl_2 として様々な濃度の $\text{CaCl}_2 + {}^{45}\text{CaCl}_2$ の中に1晩 4°C でインキュベートする。遊離カルシウムの濃度が低い範囲で実験を行なう場合には上記溶液にさらに様々な濃度の EGTA を加えてインキュベートする。ここから $100\mu\text{l}$ をとり全体のカルシウム濃度を測定する。また別に $100\mu\text{l}$ をとり $\beta + \gamma$ の測定に使う。これについては後に述べる。残りのサンプルを $90,000\times g$ で30分間遠心し、上澄のカルシウム濃度を測定する。カルシウム濃度の測定は2通りの方法で行なった。一つは $100\mu\text{l}$ としてその中の ${}^{45}\text{Ca}$ のカウントを測る。もう一つは原子吸光分光器 (Atomic Absorption Spectrophotometer PERKIN-ELMER 107) を用いてカルシウム濃度の絶対測定を行なった。インキュベートした溶液中の全カルシウム量は膜に結合している量と free の量の和であるから $\alpha + \beta$ は次式で与えられる。

$$[\text{Ca}] \cdot V = (\alpha + \beta) C_p \cdot V + [\text{Ca}]_f (V - V_s)$$

故に

$$\alpha + \beta = \left\{ [\text{Ca}] - [\text{Ca}]_f \left(1 - \frac{V_s}{V} \right) \right\} \frac{1}{C_p} \quad (\mu\text{mole/mg protein})$$

ただし $[\text{Ca}]_f = \frac{b}{a} [\text{Ca}]$

$[\text{Ca}]$ サスペンション全体のカルシウム濃度 (mM)

$[\text{Ca}]_f$ サスペンションの遊離カルシウム濃度 (mM)

a サスペンション全体の ${}^{45}\text{Ca}$ のカウント

b 上澄の ${}^{45}\text{Ca}$ のカウント

V サスペンションの体積

V_s サスペンション中に占める膜の体積

C_p 筋小胞体のタンパク濃度 (mg protein/ml)

カルシウム濃度を下げるために EGTA を加えた場合は若干複雑になり以下の式で $d + \beta$ が与えられる

$$d + \beta = \left\{ [Ca] - [Ca]_e \left(1 - \frac{V_e}{V}\right) - [Ca]_f \left(1 - \frac{V_s}{V}\right) \right\} \frac{1}{c_p}$$

$$[Ca]_e + [Ca]_f = \frac{b}{a} [Ca]$$

$$\frac{[Ca]_f ([E] - [Ca]_e)}{[Ca]_e} = K_{EGTA}$$

$[Ca]_e$	上澄中の Ca-EGTA 結合体の濃度 (mM)
V_e	EGTA に対する筋小胞体の排除体積
$[E]$	加えた EGTA 濃度 (mM)
K_{EGTA}	EGTA の Ca^{2+} に対する解離定数 小川によつて 0.1 M KCl 20 mM Tris maleate pH 6.5 の条件下で測定された値 $3 \times 10^{-6} M$ の値を採用した。(49)

$\beta + \gamma$ の測定

遠心する前に先に分けてとっておいたカンフォル 100 μ l を 50 倍に希釈し、カルシウムが出こくる時間経過をはかり、そのカーブを時間 0 へ外挿することにより、平衡状態で内側にある Ca の量を求める。基本的なやり方は (3) 拡散でとりこませたカルシウムの遊離実験の所で述べたものと同じで希釈溶液には 0.1 M KCl, 20 mM Tris maleate (pH 6.5) 2 mM $MgCl_2$ を使う。またフィルターで洗う時に必要な場合 1 mM EGTA がさらに入った溶液を使う。このようにして膜の外側に結合しているカルシウムはほぼ完全に取り除くことができる。

$$\beta + \gamma = \frac{R_0}{R} \frac{[Ca]}{C_p}$$

R_0 時間 0 へ外挿した筋小胞体中のカルシウムのカウント

R 希釈した後の溶液 1ml 中のカルシウムのカウント

EGTA 排除体積 V_e と膜の体積 V_s の決定

◦ V_e EGTA 排除体積 : EGTA はラジオアイソトープラベルしたものがないので EGTA に対する排除体積と EDTA に対する排除体積は等しいものとして $[^{14}C]$ EDTA を用いて実験を行った。筋小胞体を 0.1M KCl, 5mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM $MgCl_2$, 1mM $[^{14}C]$ EDTA の中に室温で 30 分間 インキュベートする。そしてこのサスペンション 100 μ l と遠心した後の上澄 100 μ l をとってカウントをはかる。遠心は $90,000 \times g$ で 30 分間行なう。ここで EDTA の排除体積は以下の式より求めることができる。

$$\frac{V_e}{V} = \left(1 - \frac{a}{b}\right) \quad V_e' = \frac{V_e}{V} \frac{10^3}{C_p} \quad (\mu\text{l}/\text{mg protein})$$

この式を用いて V_e' を求めると 6.0 $\mu\text{l}/\text{mg}$ となった。

V_e' mg protein 当りの排除体積

a サスペンション全体の ^{14}C EDTA のカウント

b 上澄の ^{14}C EDTA のカウント

他は先に述べた通り

◦ V_s 膜の体積 : 膜の占める体積は筋小胞体膜の乾燥重量測定とショ糖密度勾配による密度の測定におよぼされる。乾燥重量はタンパク濃度を既に測定した膜サスペンション 1ml を $90,000 \times g$ で 30 分間遠心し、上澄をすてる。ペレットを遠心チューブごとデシケーターの中へ入れ乾燥させる。

乾燥剤としては濃硫酸を用い、2-3日 80°C でペレット重量が減少しないようになるまで行なう。こうして乾燥したペレットの重量をチューブごと自動てんびん METTLER (Type H 20) で測る。この値から先に同じ条件で測定しておいたこの遠心チューブの空の重量をひいてペレット重量を求める。こうして得られた mg protein 当りの乾燥重量は

$$W_s' = 1.8 \text{ mg/mg protein}$$

であった。

ショ糖密度勾配による筋小胞体膜の密度測定は以下の通り行なった。遠心チューブに 4ml ずつの 0.4 M, 0.8 M, 1.2 M, 1.6 M, 2.0 M のショ糖で不連続勾配を形成する。筋小胞体膜をこの勾配の上にもせ 63,000 × g で 2時間遠心する。その結果筋小胞体膜は 0.8 M ($d = 1.105$) から 1.2 M ($d = 1.155$) にかけて分布し、その平均密度は $d = 1.13$ と求まった。この値は他の報告ともよく一致している。(50) この値を使って膜の mg protein 当りの体積を計算すると

$$V_s' = \frac{W_s'}{d} = 1.6 \mu\text{l/mg protein}$$

となる。 V_s と V_s' の関係は以下の通り

$$\frac{V_s}{V} \frac{10^3}{C_p} = V_s'$$

筋小胞体によるシュウ酸カルシウムの最大とりこみ容量の測定

筋小胞体はシュウ酸存在下で Ca とりこみを行なうと小胞体内側で濃縮された Ca と拡散で入ってきたカルシウムが沈殿を形成する。そこで沈殿の最大値から筋小胞体内腔の体積が推定できると考え、シュウ酸中における Ca とりこみを調べた。

シュウ酸カルシウムのとりこみを以下の溶液条件で行った。
0.1M KCl, 20mM Tris maleate (pH 6.5), 5mM MgCl₂, 2mM ATP
1mM ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂, 2mM EGTA, 5mM シュウ酸ナトリウム
及こいほ様々な濃度の筋小胞体をこのとりこみ溶液に加える
ことにより開始した。30分後 1ml をとって ミリポアフィルター
でこし、3ml の洗淨液で洗った。細かいやり方は(2)で
述べた Ca とりこみのやり方と同じである。とりこまれた
シュウ酸カルシウムの量は ⁴⁵Ca のカウントを測定して求めた。

以上 $\alpha + \beta$ 等の Ca 結合量及び膜の体積等は実験
の範囲でタンパク濃度按比例しており単位タンパク
当りという形で常にほ一定の値が得られた。

(5) その他の測定

(i) 放射能カウントの測定

サンプルが水溶液の場合 2通りの方法を用いた。(1)の
Lee の追試関係の実験では Dioxane をシンチレーション溶媒
として用いた。この場合はサンプル溶液 0.1ml を直接 10ml の
Dioxane 溶媒 (ナフタレン 60g, PPO 4g, POPOP 0.2g
メタノール 100ml エタレングリコール 20ml ジオキサン 950ml) に
入れて測定した。その他の実験ではシンチレーション溶媒
としてトルエンとトリトンの溶媒 (トルエン 1420ml, Triton X-100
500ml, PPO 8g, POPOP 0.1g) を用いた。この場合 100 μ l
のサンプル溶液は塩濃度を下げるためにあらかじめ蒸留水で
5倍にうすめそれをシンチレーション溶媒に入れて測定した。
ミリポアフィルターの場合は赤外線ランプのもとで乾燥させ、これを
10ml のトルエンシンチレーション溶媒 (トルエン 1,000ml, PPO
3g, POPOP 0.3g) の中にひたして測定する。カウントは
液体シンチレーションカウンター (HORIBA LS-500 Kyoto
Japan) で測定した。

(ii) ATPase 活性の測定

ATPase 活性はカルシウムトリ込みと同じ条件で Tausky and Shorr の方法 (51) に従って測定した。

(iii) タンパク濃度の測定

タンパク濃度はビュレット反応により求めた。

(iv) SDS ゲル電気泳動

SDS ゲル電気泳動は Fairbanks らの方法 (52) に従って行なった。染色剤としては Coomassie brilliant blue R を使った。ゲル濃度は 5.6%。カラムの長さは 12cm 直径は 5mm でこの上に 5 μ g のタンパク質を各カラムにのせて泳動を行なった。分子量のマーカーとしては ミオグロビン (M.W. 17,800) キモトリポシン (25,000) ovalbumin (45,000) Bovine serum albumin (67,000) を使った。ゲルはデンシトメーター (Narumi Type C) を使って白色光で走査した。シートに画かれた各バンドを切り出して自動天秤で重量をはかり筋小胞体の各タンパク質の含有割合を求めた。

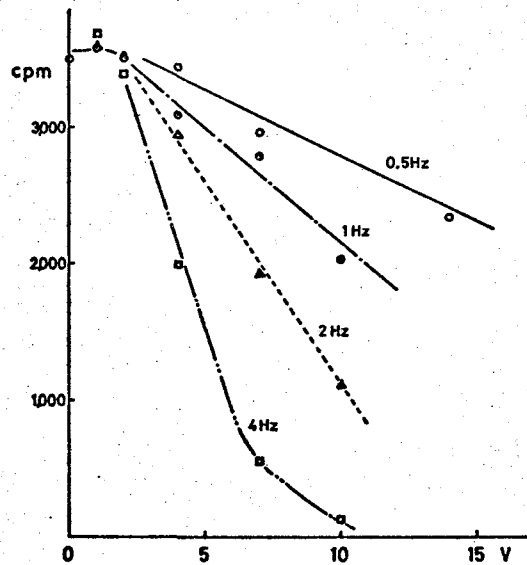


Fig. 1 筋小胞体のCaとりこみに対する電気刺激(電圧, 周波数)の効果

実験はすべて 0.1M KCl, 20mM Tris-maleate (pH 6.5), 2mM MgCl₂

3mM ATP, 0.2mg/ml 筋小胞体, 30μM CaCl₂ (CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂) の溶液

条件で行なった。電気刺激パルスの持続時間は 10 msec で横軸に

示してある電圧はオシロスコープで測った電極間の電圧である。電気刺

激はCaとりこみを開始して30秒後から2分30秒間行なった。縦軸

は筋小胞体中にとりこまれているCaの量を⁴⁵Caの放射能で示した。

電気刺激を与えない対照実験では95%以上のCaがとりこまれた。

第3章 実験結果

第1節 Lee の実験の追試およびこれに対する反論実験

K.S. Lee らは以下のような実験を行ないそれにもとづいて筋小胞体に直接電気刺激を与えることで Ca^{2+} の遊離をひきおこすことができた」と結論づけている。(21)

実験結果を要約すると ① 筋小胞体フラグメントをとりこみ溶媒に入れるとすばやく Ca^{2+} をとり込むが、そのとき同時に矩形波パルスで電気刺激を与えると Ca^{2+} のとりこみが減少する。

② Ca^{2+} をとり込んだらから電気刺激をかけると Ca^{2+} が遊離され刺激を止めると再びとり込む ③ Ca^{2+} とりこみの阻害と Ca^{2+} 遊離の程度は刺激の電圧と周波数に依存する。

④ また奇妙なことに 2相性の矩形波を与えた場合にはその効果は非常に弱い ⑤ 筋小胞体とグリセリン筋の兩者について実験を行ない一致する結果が得られた。の5点となる。

そこでこれらが真に膜が電気刺激を受容して Ca に対する透過性を増大させたことによるのか否かを確かめる実験を行なった。

(1) Ca^{2+} とりこみと電気刺激の効果

筋小胞体フラグメントをとりこみ溶液中に入れ反応開始後30秒から電気刺激を開始する。電圧、周波数を変えパルスの持続時間 10 msec の矩形波パルスも2分30秒間与えた後ミリポアフィルターでろ過する。実験は電気刺激を与えない場合には1分以内に溶液中のカルシウムがほぼすべてとりこまれ、このレベルが10分は維持される条件で行なった。ところが電気刺激を与えると Fig. 1 に示すように電圧、周波数に依存してとりこみのレベルが下がり、とりこみが阻害されていることが示された。この結果は Lee らによって得られているものとほぼ同じであるが、いくつか異なる点もある。Lee らはいくら電圧や周波数を上げてもとりこみ量は約半分にまでしか落ちないと述べているが、この実験では電圧、周波数を上げるとほぼ完全にとりこみが阻害される。

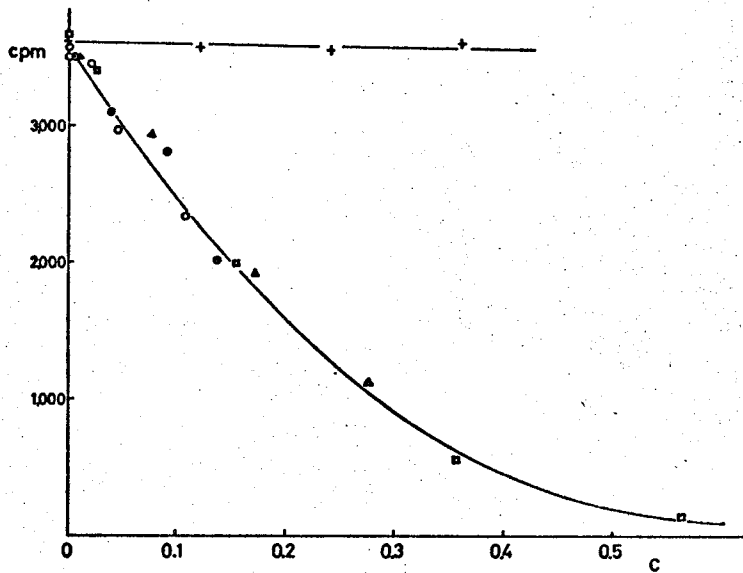


Fig. 2 筋小胞体のCaとリニミに対する電気刺激の効果
 曲線上のすべての点はFig. 1のデータをサスペンションを流れた総電気量に対してプロットしたものである。各記号はFig. 1で用いたものと同じである。銀塩化銀電極を用いて電気刺激を行なった場合が(—+—)で示してある。この場合溶液条件はFig. 1に示したものと同じで電気刺激はパルスの持続時間10 msec 周波数2 Hzである。

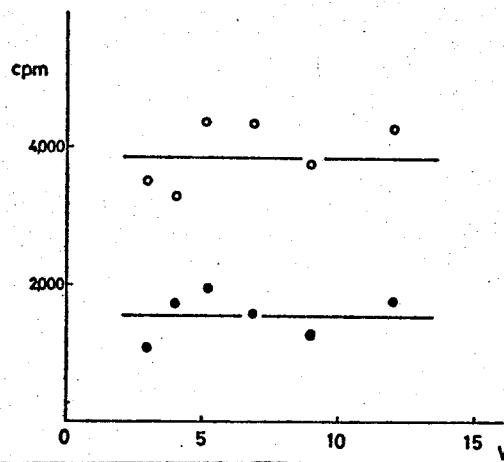


Fig. 3 電気刺激中に流れる総電気量を一定にしたときの刺激電圧変化の影響
 —○— : 総電気量 0.15 C , —●— ; 総電気量 0.3 C 周波数2 Hz で電圧とパルスの持続時間を変化させた。他の条件はFig. 1と同じ

また Lee らは 0.5V 程度でも効果があると報告しているが
図からもわかるように 1.5V 以下ではとりこみ阻害の効果は
見られなかった。このとき電圧、周波数、パルスの持続時
間と同時に電流もオシロスコープで測定したが、1.5V 以下
では電流は流れず、それ以上電圧をあげると 1.5V の点から
直線的に電流の上昇が見られた。この時使用しているのは
白金電極であり、この電圧は白金の“分解電圧”に対応する
と考えられる。

ここで Fig. 1 に示された各点をこのとき流れた総電気量
に対してプロットする。すると Fig. 2 に示すように電圧、
周波数をいろいろと変えてとった点がかすべて一つの曲線に
のる。さらにパルスの持続時間を変えてとったも同じ曲
線の上にある。この結果から電気刺激の効果は電圧に
依存するというよりは電極を通じ溶液に流れた全電気量に
依存していると考えられる。このことをさらにはっきりさせる
ためにパルスの形すなわち電圧とパルスの持続時間を流
れた電気量が一定になるようにしながら変えて電気刺激を
行なったときその効果は電圧に依存しないことが Fig. 3
に示された。

次に電流を筋小胞体サスペンションに流すとなぜ“カルシウム
とりこみ”が阻害されるのかという点について調べるため電極
を白金電極から銀塩化銀電極に変えて実験を行なった。
白金電極と同じ形の電極を用いたところ加えた電圧に対し
流れた電流はさきの場合とほぼ同じであった。白金電極
の場合と同様に筋小胞体に対し電気刺激を電圧を変えて
行なった結果を Fig. 2 の上の方の曲線(+)で示す。
白金電極の場合と同じだけの電流を流しているにもかかわらず、
この場合はカルシウムとりこみの阻害は起こらなかった。
この電極の違いによる差異は次のように説明できる。白金電
極を用いた場合電流を流すと溶液中で KCl の電気分解

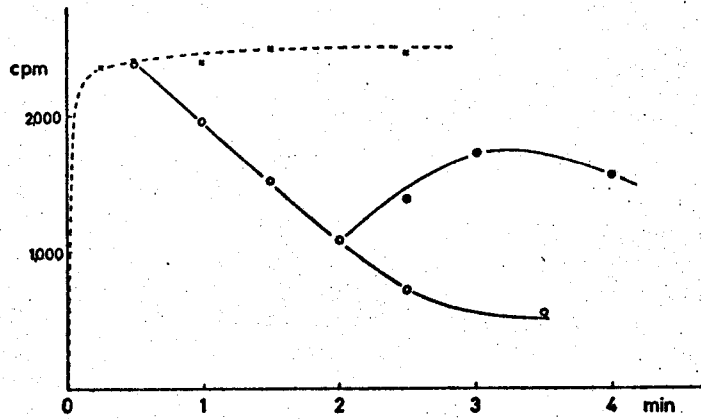


Fig.4 筋小胞体のCa遊離と再結合に対する電気刺激の効果

溶液条件は Fig.1 と同じ。Ca とりこみ開始後 30 秒から図に示した時間まで電気刺激 (10V 2Hz パルスの持続時間 10 msec) を白金電極で行なった。(—○—) またある場合は刺激開始後 1.5 分で電気刺激を止めた。(—●—) 電気刺激を行なわぬ対照実験を ---x--- で示す

が起る。陽極では塩素が発生し、陰極では水素が発生する。ところが銀-塩化銀電極であればこのような電気分解は起らない。陽極では $Ag + Cl^- \rightarrow AgCl + e^-$ の反応が、陰極ではその逆反応が起るのみである。したがって白金電極の場合のみ Ca とリニムの阻害が起ったことはこの現象が溶液の電気分解と深く関係していることが示唆される。たゞし Lee が銀-塩化銀電極を用いた場合にもリニムの阻害がみられたことを報告しているが、これは電極面積が小さいため電極表面での電流密度が高くなりすぎ、電気分解が起ってしまったことによると考えられる。そのような条件で実験した場合には銀-塩化銀電極を用いた場合でも確かにリニム阻害が起ることが確かめられた。Ca とリニム阻害の起る原因についてはしたがって電気分解産物が筋小胞体に作用して引き起こされていると考えると、その効果が流れた全電気量にのみ依存するという事もたやすく説明できる。

(2) 電気刺激停止後の Ca の筋小胞体への再結合

Lee の報告では電気刺激停止後再びカルシウムが筋小胞体に「とりこまれる」ことをもってこの反応が電気刺激に対する膜の応答を試験管内で再現したものであるとの強い論拠にしている。そこでこの実験を追試したところ Fig. 4 に示した如く電気刺激を停止するとカルシウムが再び「とりこまれる」という Lee と基本的に同じ結果を得た。たゞし Fig. 4 に見られるようにそのとりこみ速度は電気刺激前の最初のものに速いのに対して刺激停止後の再「とりこみ」は速度が遅い。これは最初のとりこみと電気刺激後の再「とりこみ」とではその機構が異なることを示唆している。そこで Ca 遊離反応をエネルギーを使っての能動輸送と切り離して調べるために次のような実験を行なった。

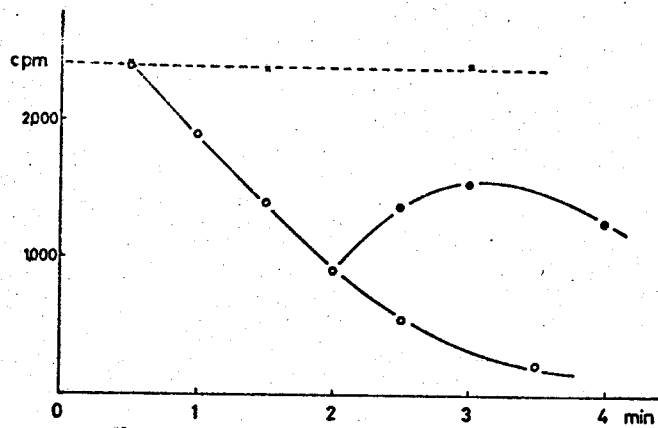


Fig. 5. 拡散でCaをとりにんだ筋小胞体からのCa遊離と再結合に対する電気刺激の効果 筋小胞体は 1mM CaCl_2 (Ca^{45}Ca), 0.1M KCl , 2mM HgCl_2 , 20mM Tris-maleate ($\text{pH} 6.5$) 20mg/ml 筋小胞体の条件で15時間インキュベートした。 $10\mu\text{l}$ のインキュベートした筋小胞体を 1ml の 0.1M KCl , 2mM HgCl_2 , 20mM Tris-maleate ($\text{pH} 6.5$) の中へ希釈し、電気刺激を行なうシリンジに入れる。電気刺激は希釈後30秒から開始した。他の条件は Fig. 4 と全く同じである。○; 刺激を持続した場合 ●; 1.5 min 後に刺激を止めた場合 X; 電気刺激を行わない対照実験

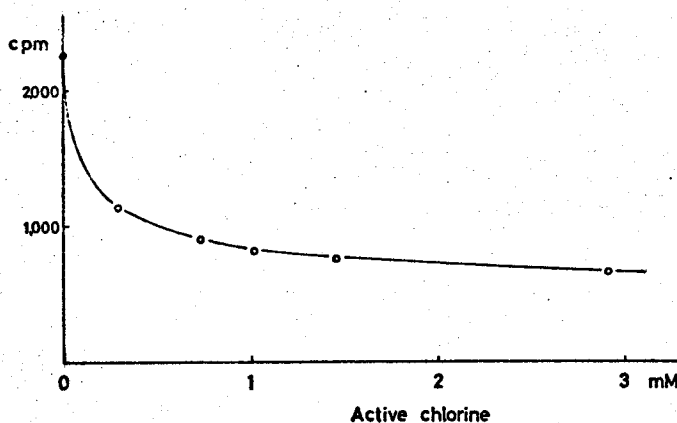


Fig. 6 Ca とりにみに対する塩素による酸化の効果 活性(原子状)塩素源としては次亜塩素酸を用いてCaとりこみをその存在下で測定した。他の条件は Fig. 1 に示したものと同一である。溶液の pH は 3mM 塩素の存在下で 6.5 から 6.7 へ上昇した。

筋小胞体フラグメントをあらかじめ 1mM Ca を含む 0.1M KCl 溶液の中に 4°C 1晩インキュベートしておき拡散でカルシウムをとりこませる。これを Ca , ATP の入っていない KCl 溶液にうすめ、能動輸送で Ca をとりこませた場合と同様に30秒後から電気刺激を開始し1分30秒刺激を止める。結果は Fig. 5. に示すように ATP を入れて能動輸送した場合と全く同様になる。すなわち ATP が入っていないにもかかわらず電気刺激を止めた後 Ca の「とりこみ」がみられる。すなわちこれはエネルギーを必要としない何らかの Ca 結合が行われたのであり、再「とりこみ」と考えられたものは能動輸送ではないことが明らかになった。

(3) 筋小胞体の性質の変化

さきの実験事実から筋小胞体からの Ca 遊離または Ca とりこみの阻害は電気分解によって生じた物質が筋小胞体の性質を変え、刺激停止後の Ca 再結合のような変性をもたらしたと考えられる。したがってこの原因は電気分解によって生じた塩素であることが強く示唆されるので、塩素等の酸化剤を筋小胞体に与えて結果の比較を行なった。

Ca をとりこみ中の筋小胞体サスペンションに次亜塩素酸ナトリウムを与えると Fig. 6. に示すように強いとりこみ阻害が起こる。これから少量の塩素が強い効果を及ぼすことがわかる。筋小胞体サスペンションに過酸化水素を加えた場合は 40mM 3分間で Ca とりこみが35% 阻害された。これは筋小胞体が酸化剤により変性させられたためである。そこでこの場合と電気刺激の効果とが筋小胞体タンパク質にどのような変化を与えているかをみるために両者を紫外差スペクトルで調べた。次亜塩素酸ナトリウムで酸化した筋小胞体は大きな差スペクトル変化を示した。次に電気刺激を与えた筋小胞体サスペンションもまた同様の大きな差スペクトル変化を

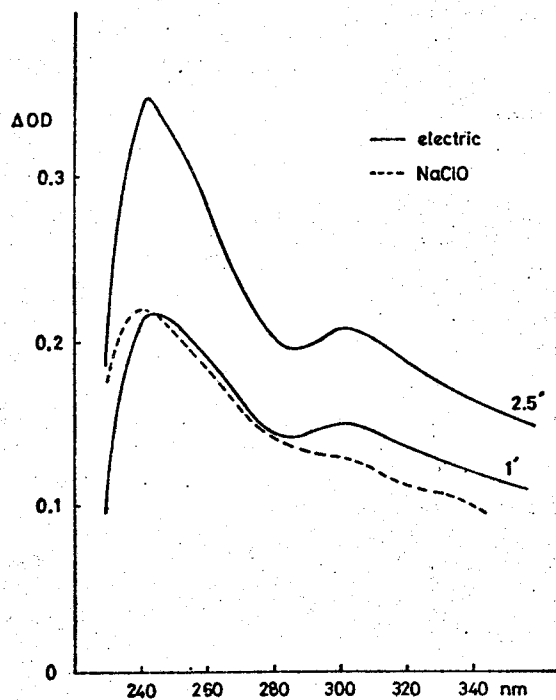


Fig.7 筋小胞体の酸化および電気刺激後の差スペクトル

電気刺激 (15 V, 4 Hz, 10 msec のパルス) を 20 mM リン酸バッファ (pH 6.5) 0.1 M KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mg/ml 筋小胞体の条件で図に示した時間行った。酸化剤による酸化の場合は筋小胞体を 0.25 mM 次亜塩素酸で 50 分処理した。他の溶液条件は電気刺激の場合と同じである。差スペクトルは何も処理していない筋小胞体サスペンションを対照にして測定した。——; 電気刺激 - - - - ; 酸化剤処理

示した。 Fig 7 から明らかのように両者の差スペクトルはその特徴をなすピークが共に 240 nm と 300 nm に現われることから全く同じ効果、すなわち「電気刺激」は生じた塩素による筋小胞体膜の酸化による変性をもたらすことが示された。

これらの結果により Lee の報告で論拠としていた電圧依存性、刺激停止後の再「とりこみ」が共にくずれ、逆にこのときの Ca 遊離、Ca とりこみ阻害は電気分解によって発生した塩素による膜タンパク質の酸化に伴った変性であることが結論づけられた。

なお 2 相性の矩形波パルスを与えた場合に効果が弱いと Lee によって報告されているのは電気化学の分野でよく知られている「電極表面の電流密度が小さい場合には交流では電気分解が起らない」という事実から容易に説明される。

Table I 筋小胞体のCa遊離に対するイオン環境変化の効果

実験方法の項で述べたように表の左側に示した塩を含む溶液中でCaトリニミを行ない、上に示した各塩を含む溶液で洗ってイオン環境を変化させた。なお(A)は0.3M (B)は0.15Mのイオン強度における実験である。示した数字はアンダーラインを引いた右対照実験において筋小胞体中に残っているCa量を100としたときの値である。

Uptake medium		Washing medium								
		Isoosmotic						Non-isoosmotic		
		KCl	KMS	K ₂ SO ₄	K propionate	LiCl	NaCl	Sucrose	Water	KCl (0.88 M)
(A)	KCl	<u>100</u>	94	98	93	97	101	96	35	98
	KMS	45	<u>100</u>	101	78		51	100	28	68
	NaCl	104					<u>100</u>		53	
	K ₂ SO ₄	54		<u>100</u>				100	26	
	K propionate	69			<u>100</u>				40	
(B)	KCl	<u>100</u>	96		96				69	
	KMS	70	<u>100</u>		95				57	

オ2節 能動輸送で"トリコンタ"Caの脱分極による遊離

オ1節では筋小胞体フラグメントに対して直接電気刺激を電流を流して行なう方法は変性がおこり、見られたCaの遊離は生理的なものと認められない旨の反論の実験について述べた。しかし筋小胞体が電気刺激に対して反応し得るか否かについて否定したわけではない。この節では筋小胞体膜サスペンションのイオン組成を変化させることにより膜に脱分極を与えてその結果カルシウムイオンが遊離されるという反応について述べる。

(1) 陰イオンおきかえによるCa²⁺の遊離

筋小胞体によるCaとリニミを0.3Mメタンスルホン酸カリ(以下KMSと略す)とリニミ溶液(0.3M KMS, 20mM Tris maleate pH 6.5, 2mM MgCl₂, 1mM ATP, 30μM ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂)中で3分間行なった後ミリポアフィルターで口通し3mlの0.3M KCl, 20mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM MgCl₂ (0.3M KCl洗淨溶液)で洗うとトリニミでいたカルシウムの約50%が遊離される。このときミリポアフィルターを洗う過程で陰イオンがメタンスルホン酸(MS⁻)からCl⁻におきかえられ3mlの洗淨溶液がフィルターを通過する間およそ5秒の間に50%のカルシウムが遊離される。このとき洗う溶液の量を10mlまで増やしておきかえの時間を長くしても結果は基本的に変わらない。5秒以内にカルシウムイオンの遊離が終っていることがわかる。

次にどのようなイオンのおきかえがカルシウム遊離に有効かを調べるためにTable Iに示したような組合せのトリニミ溶液と洗淨溶液で上と同じように調べた。その結果Table I(A)に示したようにMS⁻, SO₄²⁻, フロヒオン酸⁻をCl⁻でおきかえるとカルシウムイオンの筋小胞体からの遊離が起った。その逆にCl⁻をMS⁻, SO₄²⁻, フロヒオン

酸⁻でおきかえた場合には Ca 遊離は起こらなかった。またイオンのおきかえを行なわない場合にも Ca 遊離は起こらなかった。すなわち 大きな陰イオン中にインキュベートしていた筋小胞体を小さな陰イオン Cl^- におきかえたときにのみ Ca 遊離が見られた。この現象は以下のように解釈することができ。筋小胞体は Ca を内側へ能動輸送でとりこんでおり、このとき ATP 1分子が加水分解されることに 2コの Ca^{2+} が内側へ輸送され また 1コの Mg^{2+} が内側から外側へ輸送されると考えられている。膜の内外における電気的中性条件が保たれるためには残り2コの荷電が膜を通して移動せねばならないがこれらの荷電がどのようなイオンの動きによってまかなわれているのか。そしてそれらが Ca の輸送とカププルしているのか否かもわかっていない。殿村らは 2コの Ca^{2+} と交換されるのは $(1+n)Mg^{2+} + 2(1-n)K$ であると提案している(3)。ただし $n=0$ または 1 。いずれにしても筋小胞体が Ca をとりこむと膜の内外に Ca が非対称に分布することになる。すると電気的中性条件を保つために他のイオン 陽イオン 陰イオンを問わず、いずれかのイオンまたはそれらの複数が膜の内外で非対称分布しているはずである。また筋小胞体膜のイオン透過性については後にも述べる通り、 Ca^{2+} については小さく、 Na , K 等の1価陽イオンをはじめ Mg^{2+} やさらに陰イオンについても大きい。すなわち筋肉細胞中に存在する高分子イオンを除く普通のイオンの中では Ca についての透過性が最も低いと考えられる。そこで筋小胞体膜は Ca をとりこんだ状態では Ca を除く他のイオンの非対称分布に起因する拡散電位も発生していると予想される。この電位は陽イオン、陰イオンのいずれの拡散電位となっているかを問わず内側が正となる方向である。実際の筋小胞体の膜電位がどのような方向になっているかを考える上で次に考察が必要なのは Ca

ポンプの起電性である。現在のところ Ca 2 コの輸送にカッ
プルして輸送されるのは Mg 1 コが反対方向に輸送されることか
確かめられているだけである。残りの 2 コの荷電についても完
全にカップルしていればポンプ自体は起電的でなくなるが
少しでもカップルしない荷電があれば Ca ポンプは起電的
となる。この場合に発生する起電力の方向はやはり内側が
正になる方向である。最後に膜を透過することができ
ない大きなイオンや固定電荷によって発生する Donnan 電位
の問題がある。筋小胞体の内側には酸性タンパク質が
多く存在しており、中性の pH でこれらのカルボキシル基が
解離していると膜の内側が負になる方向に Donnan 電位
が発生することになる。これら 3 つの効果を重ねあわせ
実際の膜電位が形成されるので結局厳密には膜電位
がどちら向きに発生しているかわからない。しかし拡
散電位とポンプの起電力は内側正の傾向であるのに対し唯
一内側負の傾向を示す Donnan 電位がここでの実験条件
である 0.3 ~ 0.15 M のイオン強度のもとでしかも Ca が内側
に濃りにまれている条件のもとで大きく発生しているとは
考えにくい。したがってここでは一応膜電位が内側
正の向きに発生しているという予想のもとに議論をすすめる
こととする。

実験であらかじめ大きな陰イオン中にインクベ
トしていた筋小胞体を小さい陰イオンでおきかえると、
大きな陰イオンは透過性が低く、小さい陰イオンは透過性
が大きいため小さい陰イオンが先に内側へ入ろうとするこ
とにより内側がより負になり、膜電位が「脱分極」と
考えられる。したがってカルシウムは筋小胞体膜の「脱
分極」によって遊離されると考えるのが自然であり、先の方
なイオンおきかえの組み合わせでのみ Ca 遊離が起こることも
容易に説明できる。（「脱分極」は上記の議論からも明らか

Table II 陽イオン置換の筋小胞体からのCa遊離に及ぼす効果

全ての実験はTable Iに示したものと同一方法で行なった。各溶液の浸透圧は0.3M KClのそれに等しい。

Uptake medium	Washing medium				
	KMS	LiMS	K ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Li ₂ SO ₄
KMS	100	85			
LiMS	99	100			
K ₂ SO ₄			100	102	108

ように厳密にはある膜電位レベルから内側が負になる方向に膜電位が変化したことをこのように呼ぶ。) さらに実際に筋肉細胞内で筋小胞体からCaが遊離される時に筋小胞体膜が脱分極していることを示唆する報告が序論で述べた通り行なわれていることは脱分極説を有力なものにしている。

以上の実験は生理的なイオン強度より約2倍塩濃度の高い条件で行なったものであるが、同様の実験を主なものだけ生理的なイオン濃度でも行なった。結果はTable I(B)に示すように遊離されるCaの量は少ないが定性的には全く同じ様にCaの遊離反応が見られた。つまりイオン強度の高い条件で見えた結果は生理的なイオン濃度の条件のもとの反応と同じものであると結論できる。したがって以下の実験においては反応をよりはっきりと示すためにすべて0.3Mの塩濃度で行なった。

先に述べた実験はすべてCaのとりこみを行なうときに大きな陰イオン中で行ない、それを Cl^- でおきかえるというやり方であったがこのようなやり方が必ずしも必要なわけではない。0.3M KCl中でCaのとりこみを行なってその後例えばKMS溶液でおきかえさらにKCl溶液でおきかえを行なうとKMS中にインキュベートした時間が30秒以上であれば、はじめからKMS中でとりこみを行なったときとほぼ変りないCa遊離が見られた。すなわち反応にとって必要なのはあくまでも大きな陰イオンから小さな陰イオンへのおきかえの操作である。

(2) 陽イオンのおきかえ

抽出した筋小胞体に対して陽イオンのおきかえを行なってもCa遊離は見られなかった。0.3MのKClまたはNaCl中でとりこみを行ないKCl, NaCl, LiClにおきかえてもTable Iに示した如くCa遊離は起こらなかった。これは陰イオンである Cl^- の

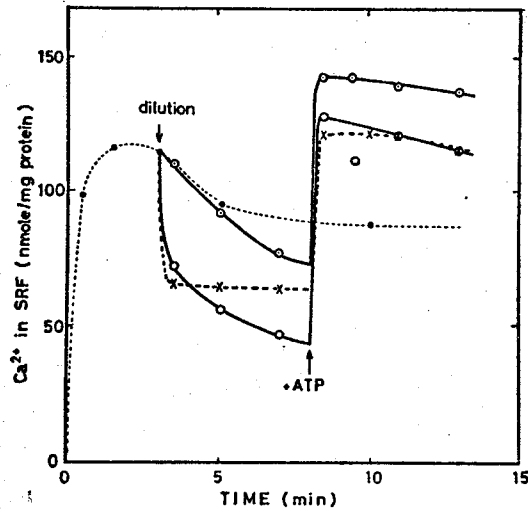


Fig. 8 筋小胞体からのCa遊離後の再とりこみ

Caとりこみは 1ml の 0.3M KMS, 20mM Tris-maleate (pH6.5) 2mM MgCl₂ 300μM ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂ 500μM ATP に筋小胞体濃度が 2.2 mg/ml になるように加えて行った。3分後 10ml の後に示す 3種類の溶液を加えて希釈、ここから 1ml をとり、図に示した時間にミリポアフィルターでろ過し希釈に使ったものと同じ溶液 3ml で洗った。希釈後 5分に僅い少量の ATP (最終濃度 500μM) を残っている溶液に加えた。●; 希釈を行わない 対照実験 ○; 0.3M KMS 溶液 ○; 0.3M KCl 溶液 x; 0 溶液で希釈 共通に 20mM Tris maleate (pH6.5) 2mM MgCl₂ を含む。

透過性が非常に大きいため脱分極を起さそうとイオンのおきかえをしても陰イオンの動きでたゞちに緩和されてしまうためにCa遊離が起らないのかもしれないと考えた。そこで陰イオンを Cl^- ではなくメタンサルホン酸あるいは硫酸イオンにおきかえて Table II に示したような組合せでCa遊離実験を試みたがどの組合せによっても有意なCa遊離は見られなかった。

(3) 浸透圧変化に伴うCaの遊離

浸透圧を下げる 市販の 0.3M または 0.15M の各種塩溶液中でとりこみを行なった後 20mM Tris maleate (pH 6.5) と 2mM $MgCl_2$ のみの溶液 (以下この溶液を O 溶液と呼ぶ) におきかえるとやはり速いCa遊離が見られた。この結果は Table I の右側に示した。これは浸透圧の低下に伴い水が筋小胞体フラグメント中に入り膜が破裂したことによるものと考えられる。後の節でこの反応と脱分極によるCa遊離とが基本的に異なる機構によって起っていることを示す。

(4) Ca遊離後のCaとりこみ活性維持

イオンおきかえによるCa遊離が少なくとも筋小胞体膜の変性等を起ささないことを確かめるため次のような実験を行なった。普通よりも11倍高い筋小胞体濃度 (2.2 mg/ml) で 0.3M KMS 中のCaとりこみを行なわせ3分後 0.3M KMS, 0.3M KCl, O の各溶液で11倍に希釈する。希釈後の時間経過を筋小胞体内に保持されているCa量で追跡し、希釈後5分にはじめに加えていたのと同じ量のATPを加える。Fig. 8 に示したようにこのような方法でイオンのおきかえを行なった時にもCaは遊離され、その後ATPを加えると遊離されたCaは再び急速にとりこまれる。浸透圧を下げたCaを遊離させた場合も

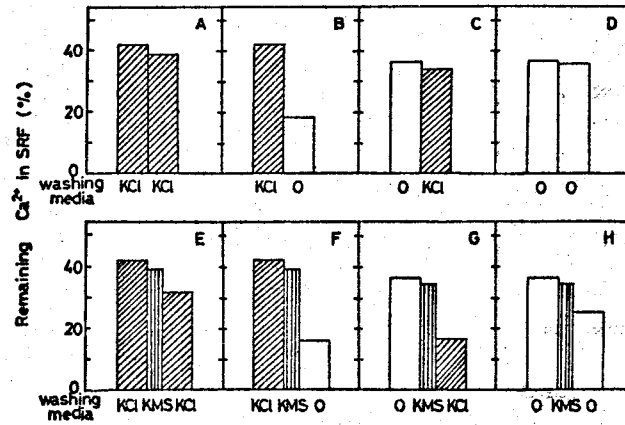


Fig. 9 筋小胞体からのCa遊離に対するくり返しのイオン置換の効果
 Caトリニミは1.1mlの0.3MKMSトリニミ溶液中で筋小胞体0.2mg/mlの条件で行なった。
 3分後その内1mlをミリポアフィルターでろ過し、3mlの各洗浄溶液で洗った。
 図中のKClは0.3MKCl KMSは0.3MKMS OはO溶液で各々交互に20mM
 Tris maleate (pH6.5) 2mM MgCl₂を含む。縦軸は筋小胞体中に残っているCa量の
 イオン置換を行なった1時を100としたパーセンテージで表わしてある。
 (0.3M KMS溶液で1回洗ったもの)

同様に Ca とりこみ能は失われぬ。

(5) 陰イオンおきかえによる Ca 遊離と浸透圧変化による Ca 遊離
0.3 M KMS 中で Ca をとりこんだ筋小胞体をミリポアフィル
ター上で 2~3 回各種溶液で洗うことによりくり返しイオン
のおきかえを行なった。

陰イオンのおきかえによる Ca 遊離と浸透圧変化による
Ca 遊離がはたして根本的に異なる反応であるか否かを確
かめることは陰イオンおきかえによる Ca 遊離反応の生理的
意義を考える上でも重要な問題である。0.3 M KMS とり
こみ溶液中で Ca をとりこんだ後 KCl 溶液でくり返し 2 回
洗うと 2 回目洗った時には極くわずかの Ca が遊離されない。
(Fig. 9 A) これは浸透圧も下げて 0 溶液でくり返し 2 回
洗った場合も同じである (Fig. 9 D)。これではイオンおき
かえによる Ca 遊離反応と浸透圧低下による反応は区別でき
ない。しかし Fig. 9 B に示すようにはじめイオンのおきかえを
行ないその後浸透圧変化を行なうと後の浸透圧変化に対
しても反応して Ca が遊離される。すなわち一度イオンのお
きかえに反応した筋小胞体は次には浸透圧変化に対してのみ
反応できる。よってイオンのおきかえと浸透圧低下とが
異なった効果を筋小胞体に対して及ぼしているといえる。
以上の反応をより厳密に調べるために 3 回くり返し洗うとい
う実験を行なった。このとき 2 回目は KMS で洗うすなわ
ち一度反応した筋小胞体の環境条件をもう一度もとの状態
にもどすという操作を加えてみる。そうすると同じ操作の
くり返しにイオンのおきかえと浸透圧低下の両方について行な
みると 2 回目のおきかえでは A, D と比べると多少有意な
Ca 遊離が起こる。しかし KMS で洗った場合でも多少リー
クによる Ca 含量の減少がみられることからこれを差引
いて考えると非常にわずかの Ca 遊離しか起らないと

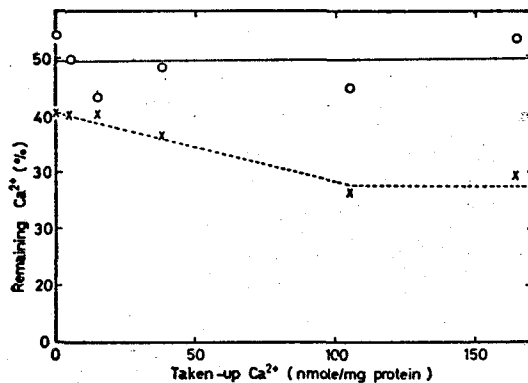


Fig.10 筋小胞体からのCa遊離のとりこみたCa量への依存性

0.3M KMS とりこみ溶液でCa濃度を変えてCaとりこみを行なった。他の条件はFig9と同じである。3分間とりこみを行なった後ミリポアフィルターでろ過し、3種類の洗浄溶液で洗った。○; 0.3M KCl 溶液 ×; 0溶液 縦軸は筋小胞体中に残存するCa量のパーセンテージ。0.3M KMS 溶液で洗った場合のCaレベルを100%とした。

言える。(Fig. 9 E, H) それに比して異なる操作を組み合せた場合、操作の順にかかわらず 2 回目の操作でも Ca が遊離される (Fig. 9 F, G)。すなわち一度イオンおきかえに反応した筋小胞体は次には浸透圧変化に対してのみ反応し得る。また一度浸透圧変化に反応した筋小胞体はイオンのおきかえに対してのみ反応できるといえる。Fig. 9 の (C), (G) を比較した場合間に KMS で洗うと 2 回目の反応で Ca が遊離されるようになることがわかる。したがって (C) の場合 KCl で洗ったときに Ca が遊離されなかったのはイオンのおきかえによって出る Ca がなかったのではなく、筋小胞体のイオン環境がイオンのおきかえの反応すなわち脱分極がでる条件になかったと考えられる。これらの結果からイオンのおきかえによる反応と浸透圧変化による反応とが異なることが確かめられた。同様の結果は KMS の代わりにプロピオン酸カリを用いても得られた。ただしその場合遊離された Ca の量は KMS の場合より少なかった。

(6) 遊離される Ca のとりこみ量依存性

筋小胞体の Ca とりこみを 0.3 M KMS とりこみ溶液中で Ca の濃度を変えて行ない、ミリポアフィルター上で洗うことによりイオンのおきかえを行なった。Fig. 10 に示すように陰イオンおきかえで出る Ca の量はとりこまれた Ca 量にほとんど依存せず約 50% であった。一方浸透圧減少によって遊離される Ca はとりこみ量が多いと次第に多くなる傾向があった。この結果もまたイオンのおきかえによる Ca 遊離機構と浸透圧変化による Ca 遊離の機構が異なることを支持している。

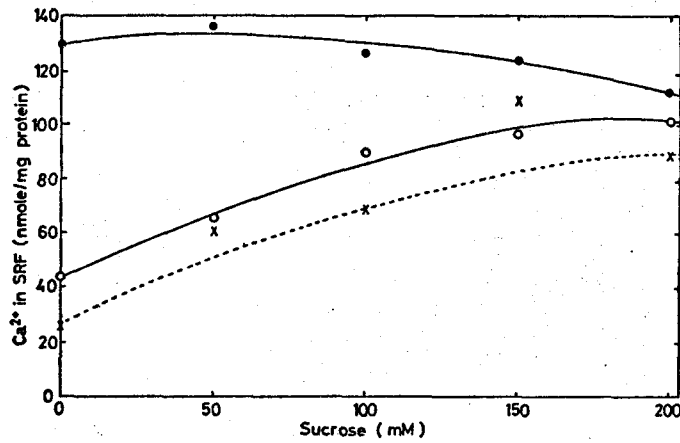


Fig. 11 筋小胞体からのCa遊離に対するショ糖の阻害効果

Caを種々の濃度のショ糖を含む0.3M KMSとリニミ溶液中でとりにませた。Ca遊離はFig. 10の場合と同様に行なった。このとき洗う溶液もリニミ溶液に加えたと同じショ糖濃度にした。●; 0.3M KMS溶液で洗った対照実験 ○; 0.3M KCl溶液 ×; 0溶液で各々洗った結果である。

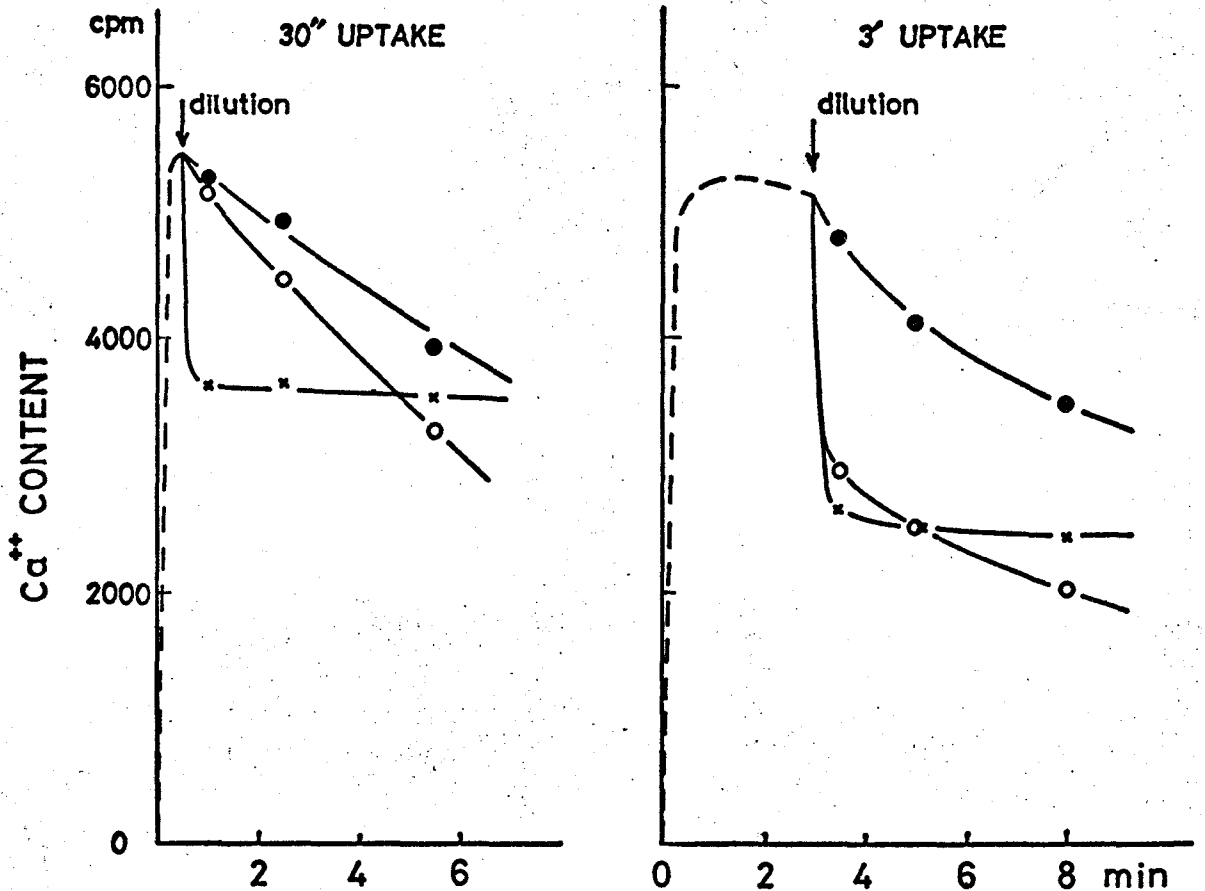


Fig. 12 Ca遊離のとりこみ時間依存性

0.3M KMS 中でのとりこみ後 ●: KMS, ○: KCl, × 0溶液の中へ各々希釈したものである

(7) 陰イオンおきかえによるCa遊離の阻害

興奮性膜のCaスパイクの発生は Co^{2+} , Mn^{2+} 等の遷移金属元素により阻害を受けることが知られている(53)。

そこで陰イオンのおきかえによるCa遊離とCaスパイクとの関係を調べるためにこれらのイオンの効果を調べた。

数mMの Co^{2+} や Mn^{2+} をおらかじめとりこみ溶液に加えておくといはイオンのおきかえを行なう溶液に入れておいてもイオンおきかえによるCa遊離は抑制されなかった。このことは筋小胞体のイオンおきかえによるCa遊離はCaスパイクにおけるCa透過性増大とは異なる現象であることを示している。

一方ショ糖をとりこみ溶液あるいは洗う溶液に加えるとイオンのおきかえによるCa遊離も浸透圧変化によるCa遊離もおさえられる。ショ糖の濃度を変えてとりこみ溶液と洗う溶液の両方に加えたときの阻害の効果をFig. 11に示す。50%の阻害をおこすショ糖濃度は約100mMであった。

(8) Ca遊離のとりこみ時間依存性

浸透圧変化によるCa遊離はCaとりこみの時間によって影響を受けないが、イオンおきかえによる遊離は短時間のとりこみ後すぐではCa遊離が起らない。(4)の実験と同様希釈するやり方でイオンのおきかえと浸透圧変化を行なった。Fig. 12に示すように3分間とりこみの後希釈を行なった場合はイオンのおきかえおよび浸透圧変化の両方に反応してCaを遊離するが、とりこみ30秒の後希釈しておきかえを行なうと浸透圧変化では出るがイオンのおきかえではCaは遊離しない。この原因については今のところわかっていないが、少なくともこのことは再びイオンのおきかえと浸透圧変化でCaが出る機構が異なることを示している。

(9) 他の膜のイオンおきかえに対する反応

イオンのおきかえによる Ca 遊離が筋小胞体に特異的であることを確かめるためウサギの肝臓ミクロソームを用いて同様の実験を行なった。実験方法の所で述べた方法にもとづいて抽出したウサギの肝臓ミクロソームは ATP を使って Ca をとりこむことができる。ただしとりこみ速度とりこみ容量は筋小胞体に比べ小さい。最大のとりこみ量は約 9 n mole/mg である。筋小胞体の場合と同じやり方でイオンのおきかえ、浸透圧変化を行ない反応を調べた。陰イオンを MS^- から Cl^- へおきかえたときは肝臓ミクロソームからは極くわずかの Ca しか遊離されなかった。(10%以下)ところが浸透圧変化で 60~70% の Ca が遊離された。すなわち肝臓ミクロソームはイオンのおきかえに対しては反応せず、浸透圧変化に対してのみ反応した。

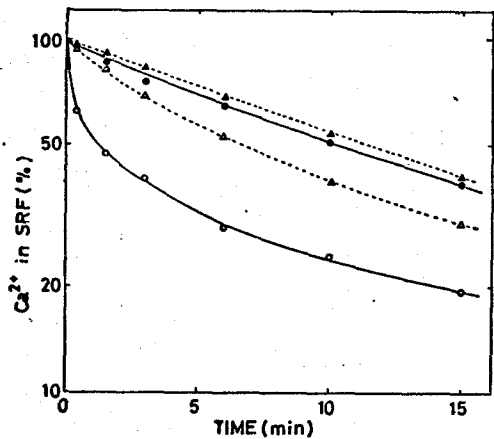


Fig. 13 様々な組合せにおける筋小胞体からのCa遊離の時間経過 筋小胞体(20mg/ml)を0.3M KMS または0.3M KClと20mM Tris-maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂を含む溶液中に約12時間4°Cでインキュベートした。それを20mM Tris maleate (pH 6.5)と2mM MgCl₂に加えて0.3M KMS または0.3M KClを含む溶液中に100倍に希釈し、筋小胞体中に残っているCa量をパーセントで表わした。●; KMSからKMSへ希釈, ○; KMSからKCl ▲; KClからKMS △; KClからKCl 時間0において筋小胞体中に入っているCa量は各場合とも約6.5 μmole/g SR proteinであった。

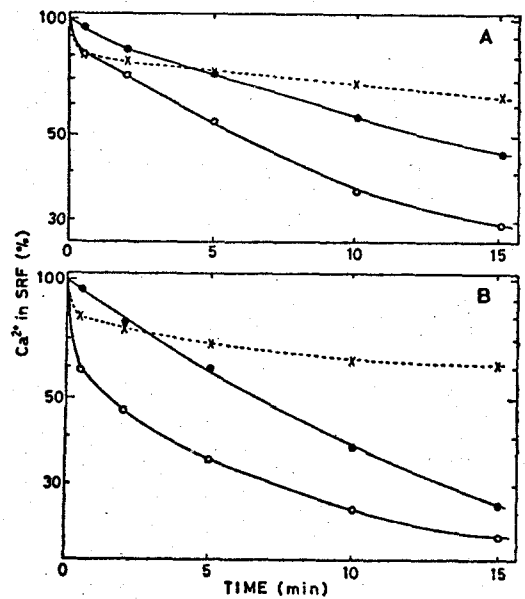


Fig. 14 筋小胞体からのCa遊離に対する塩濃度の効果 (A) 筋小胞体(22mg/ml)を0.15M KCl, 1mM CaCl₂+⁴⁵CaCl₂ 20mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM MgCl₂に12時間インキュベートした。これを0.15M KMS溶液(●), 0.15M KCl溶液(○), 0溶液(X)に希釈しCa遊離の時間経過を測定した。このとき筋小胞体の最終濃度は0.2mg/mlである。他の条件はFig. 13と同じである。(B) (A)と同じ実験を0.3Mのイオン強度において行ったものである。

オ3節 ATPを使わずに拡散でとりこまれたCaの遊離

オ2節ではATPを使って能動輸送されたCaのイオンおきかえに対する反応について述べたが、この節ではこのCa遊離現象を別の角度から検討するためATPを使わずに拡散でCaを筋小胞体の中へととりこませてATPの全くない状態すなわち能動輸送ポンプの働いていない状態でCa遊離反応を調べた。

(1) イオンのおきかえによるCa遊離

筋小胞体フラグメントを0.3MKMSまたは0.3MKClと20mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂の溶液中で1晩4°CでインキュベートしてCaをとりにませた。実験はこのサンプルを0.3MKMSまたは0.3MKClと20mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM MgCl₂の中へ希釈し筋小胞体中に残っているCa量の時間経過を測定する。希釈は最終の筋小胞体濃度が0.2mg/mlになるように行なった。その他操作の詳細はオ2節で述べた実験と全く同じである。インキュベートと希釈を各々KMSとKCl中で行なうので4通りの組合せができる。Fig. 13に示すようにCa遊離の透過性増大がみられるのは4通りの場合のうちKMS中にインキュベートしたものをKCl中にうすめ2イオンのおきかえを行なったときのみである。他の組合せではCaはゆっくりとリークしてくるのみである。この反応のしかたはATPを使ってCaをとりにした⁴⁵Caの場合と一致している。ただしCa遊離の速度はATPで能動輸送したCaと比べて遅い。

同様の実験を生理的塩濃度である0.15Mでも行なった。Fig. 14に示すようにこの場合陰イオンをMS⁻からCl⁻へおきかえて遊離されるCaの量は0.3Mの場合に比べ少ない。しかし反応は定性的に同じ結果を示しているので現象をよりはっきりと見ることができるようこれ以降の実験

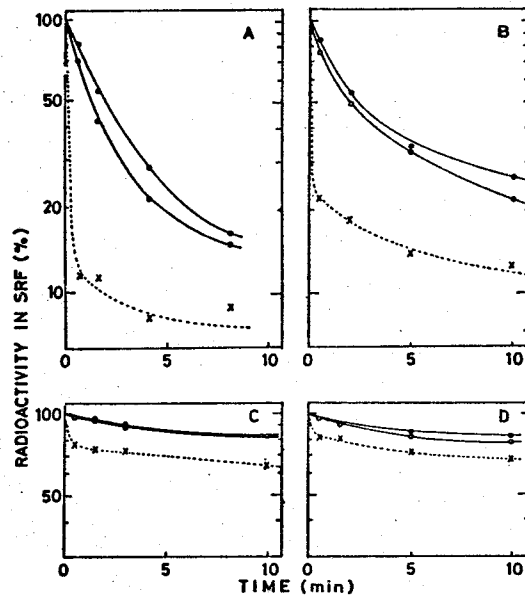


Fig. 15 種々のイオンまたは分子の筋小胞体からの遊離

各実験で筋小胞体は 0.3M KMS 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ と後述べる ラベルしたイオンまたは分子の中にインキュベートした。これらに 0.3 M KMS 溶液 (●), 0.3M KCl 溶液 (○) または 0 溶液 (×) に 各々希釈して遊離を行なわせた。このとき筋小胞体の最終濃度は 0.2mg/ml である。
 (A) K⁺ の遊離 (B) Na⁺ の遊離 インキュベート中の Na の濃度は 10mM である。
 (C) ショ糖 インキュベート中のショ糖の濃度は 10mM (D) イヌリン インキュベート中のイヌリンの濃度は 1mM であった。

はすべて 0.3M の塩濃度で行なった。

前節で述べた実験と同様に筋小胞体は浸透圧変化に対しても反応して Ca を遊離した。筋小胞体を 0.3M KMS を含む溶液に先に述べた場合と同様にインキュベートし、1晩の後 0 溶液 (20mM Tris maleate pH6.5, 2mM MgCl₂) へ希釈すると Fig. 14 に示したように一過性の Ca 透過性増大が見られた。この操作で出てくる Ca の量はイオンのおきかえの場合より少ない。また Ca 濃度 1mM 以下でインキュベートすると時によってはほとんど遊離されない場合もある。Fig. 14 はまた塩濃度が低いほど定常的な Ca の透過性が低いことも示している。

(2) イヌリン, ショ糖, Na⁺, K⁺ の筋小胞体膜透過性

イオンのおきかえによる Ca 遊離反応において Ca の透過性が増大したときに他の分子やイオンに対する透過性がどうなるかを、また浸透圧変化のときにどうなるかを調べた。前の実験と同様に筋小胞体を 0.3M KMS, 20mM Tris maleate (pH6.5), 2mM MgCl₂ と [¹⁴C] イヌリン, [¹⁴C] ショ糖, ²²Na, ⁴⁵K のいずれかを加えた溶液にインキュベートする。これを 50~100 倍の 0.3M KMS, 0.3M KCl, または 0 の希釈溶液にする。これらの分子、イオンが筋小胞体の内側から遊離してくる時間経過を測定した。結果は Fig. 15 に示すように各分子、イオンは MS⁻ から Cl⁻ へのイオンのおきかえでは Ca の場合と対照的に遊離されない。これに対し浸透圧変化では急速な遊離がおこる。ただし遊離される量については Na, K イオンはほとんどが一気に遊離されるのに対し、イヌリンとショ糖分子は一部しか遊離されない。なおイヌリンは拡散ではほとんど膜を透過しないので内側へ入れるためにテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした。

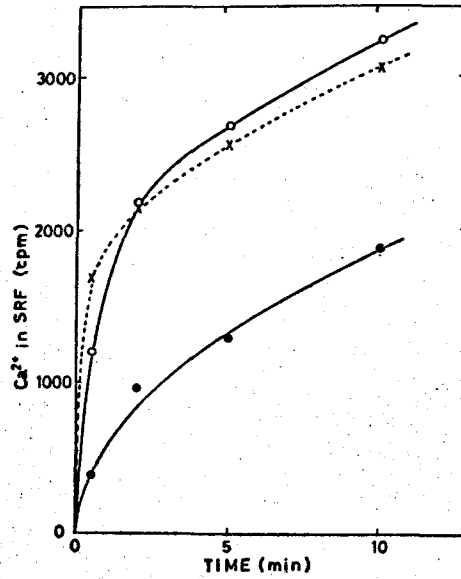


Fig. 16 種々の条件におけるCaの筋小胞体への流入

0.3M KMS 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ にインキュベートした筋小胞体 (20 mg/ml) を以下の溶液中へ10倍に希釈した。 0.3M KMS (●) 0.3M KCl (O) 0 溶液 (X) に各々共通に 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ 1mM CaCl₂ + ⁴⁵CaCl₂ を含む。 二つから 0.1ml を取りミクロアフィルターでろ過し、3ml の 0.3M KMS, 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ 1mM EGTA の溶液で洗った。

結局 Ca の遊離とは明らかに異なり、どのイオン、分子も陰イオンのおきかえによつては遊離されない。しかし浸透圧変化を行なうといずれも遊離が起こる。これは筋小胞体膜の破裂によるものと考えられる。これらの結果からイオンのおきかえによつては Ca の膜透過性のみが特異的に増加し浸透圧変化によつては各種イオン、分子の透過性が非特異的に増すと結論される。このことからイオンのおきかえによつて膜の破裂が起こっていることはなく、イオンのおきかえによつておこる Ca 遊離反応の Ca に対する特異性はその生理的重要性を示唆している。

(3) イオンのおきかえによる Ca の内向きフラックス増加

これまで行なつてきた実験はすべて筋小胞体の内側から外への流出をみてきたが次にイオンのおきかえや浸透圧変化を行なつたときの外側から内腔への Ca の流入速度を調べた。

筋小胞体を 0.3M KMS, 20mM Tris maleate, 2mM $MgCl_2$ の溶液中に Ca を加えないでインキュベートした。これを次の種類の溶液に希釈することにより Ca の流入速度を測定した。(1) 0.3M KMS (2) 0.3M KCl (3) 0 すべて溶液に共通して 20mM Tris maleate (pH 6.5), 2mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2 + ^{45}CaCl_2$ が入っている。結果は Fig. 16 に示すように MS^- を Cl^- でおきかえると Ca の内向きフラックスが急に増大した。この結果はイオンのおきかえをしたときの外向きフラックスの場合と極めて似ている。このことからイオンのおきかえによつて筋小胞体の膜は内外両方向の Ca 透過性を増大させていることがわかる。Ca の流入速度は浸透圧変化によつても増大する。これは流出の場合と多少異なっている。流出の場合には次の Fig. 17 に示すように Ca の濃度が低いと浸透圧変化を与えても Ca が遊離されないことが多い。これは筋小胞体の内側における free Ca 濃度が低い例えは 1mM のときには後に Fig. 21 に示

すように筋小胞体の内側に存在するCaの95%以上が膜に結合しており、freeで存在しているのは5%に満たない。そのため浸透圧変化により膜が一瞬破れてもほとんどCaが出てこないと解釈される。これに比して流入の場合には内側にCaを結合していない部位がたくさん存在している状態で膜を破裂させているのであるからCa濃度が低い方が割合としてはかえってよく内側へ流入すると予想される。したがってCaの筋小胞体膜を通じた流入と流出を測定すると非対称性が現われたものと考えられる。

(4) Ca遊離反応に対するインキュベーション溶液中のCa濃度依存性
種々の濃度のCaを含む溶液中にインキュベートした筋小胞体を(1)で述べた3種の希釈溶液にそれぞれCa遊離反応を調べた。Fig. 17に示したようにCa濃度が増大していくとイオンのおきかえによるCa遊離の割合は減少するが浸透圧変化によるCa遊離は逆に増大する傾向にある。Ca濃度が低いときは筋小胞体内では結合しているCaの割合が多いが、フリーの状態のCaは少ない。Ca濃度が上昇していくと結合しているCaの割合が減り、フリーの割合が増えたと考えられる。(これについては4節で詳しくふれる)従ってこの結果から浸透圧減少で遊離されるCaはフリーのCaが主にまたイオンのおきかえで遊離されるCaは膜に結合しているCaが主になっていると示唆される。

(5) イオンのおきかえによるCa遊離の外液Ca濃度の影響

これまでの実験はCa遊離を行なう溶液中のCa濃度をことさら指定しなかったが1mM Caでインキュベートした筋小胞体を100倍にうすめて実験したときは外液Ca濃度は約10 μ Mになっていたと考えられる。ここでは外液のCa濃度を変えてその効果を見た。1mMあるいは10mM Ca中でインキュベート

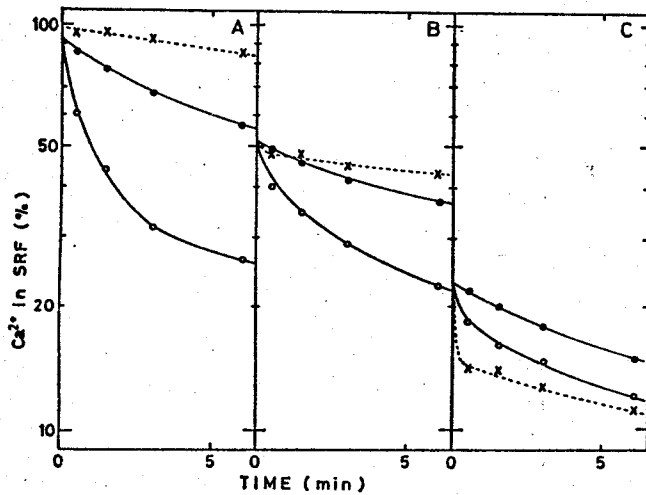


Fig. 17 インキュベーション溶液のCa濃度のCa遊離による影響

筋小胞体 (14mg/ml) を 0.3M KMS, 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ と種々の濃度の ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂ を含む溶液に約12時間 4°C でインキュベートした。0.3M KMS 溶液 (●) 0.3M KCl 溶液 (○) 0 溶液 (x) に希釈後の時間経過を Fig. 13 と同様に測定した。インキュベート時のCa濃度は (A) 1mM (B) 10mM (C) 100mM である。各実験の全放射能は一定にしてあるので各カーブの時間0の外挿した点におけるCa量はCaに対する筋小胞体内側の見かけの体積V_{app}を与える。

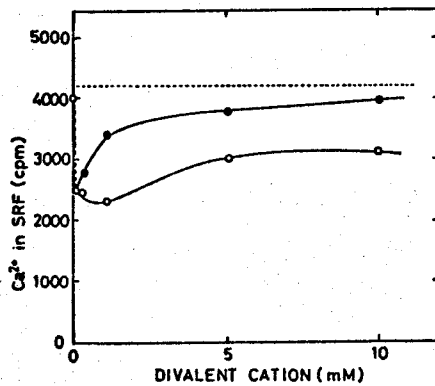


Fig. 18 筋小胞体からのCa遊離に対する二価陽イオンの効果

筋小胞体 (14mg/ml) を 0.3M KMS 20mM Tris maleate (pH 6.5) 2mM MgCl₂ 1mM ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂ の溶液にインキュベートした。種々の濃度の二価陽イオンを含む0.3M KCl 溶液に希釈後Ca遊離の時間経過を測定した。二価陽イオン濃度0の点は1mM EGTAを加えた場合である。縦軸は希釈後2分の筋小胞体中のCa量をとりためたものである。●; MnCl₂ ○; CaCl₂ 破線はKMS溶液で希釈した対照実験の場合を示す。

した筋小胞体を対照実験として KMS から KMS にうすめたとき外液 Ca 濃度を $10\mu\text{M}$ から 10mM まで変化させても Ca 遊離速度は変わらなかった。しかし KCl へうすめてイオンのおきかえを行なったときの Ca 遊離速度に対しては外液 Ca 濃度が大きく影響した。Fig. 18 に示したように Ca 濃度が少し増すと遊離速度が増しさらに Ca 濃度を高くするとかえって遊離速度が減少する。もっと Ca 濃度の低い所での反応を調べるためにうすめる溶液に 1mM EGTA を加え Ca 濃度を μM 以下にすると KMS 中での Ca 遊離速度はやはり影響を受けないのに対して KCl 中での Ca 遊離はほぼ完全に抑制される。つまりイオンおきかえによる速い Ca 遊離には外液に少し Ca が存在することが必要である。しかしこの結果はオ2節で述べた ATP を使って能動輸送でとりこまれた Ca の遊離の場合とは異なる。その場合には外液に EGTA を加えても Ca 遊離は抑制されない。

(6) イオンのおきかえによる Ca 遊離の阻害

Ca スパイクの阻害剤である Co^{2+} , Mn^{2+} のイオンおきかえによる Ca 遊離への影響を調べた。0.3M KMS 溶液中にインキュベートしておいた筋小胞体を様々な濃度の Mn^{2+} を含む溶液に希釈する。こうして Ca 遊離の時間経過を調べた。KMS 中での Ca 遊離速度は Mn^{2+} の影響を受けなかったが MS^- から Cl^- へおきかえたときの速い Ca 遊離は抑制された。Fig. 18 には KCl 中にうすめから 2 分後に筋小胞体中に残存している Ca 量を Mn^{2+} の濃度に対してとっているが、 1mM Mn^{2+} が Ca 遊離反応を 50% 抑制する。 Co^{2+} についても同様の濃度で阻害効果があった。この二価陽イオンの阻害効果は Ca スパイクに対するそれらの効果とよく似ている。この結果は能動輸送でとりこまれた Ca の遊離実験とは異なっているが、ショ糖の効果も逆の意味で違っている。オ2節

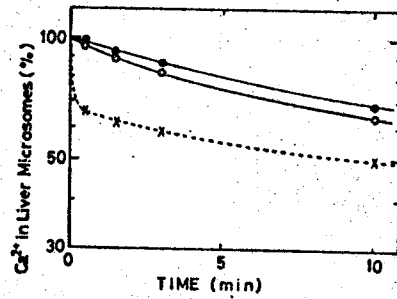


Fig. 19 肝臓ミクロソームからのCaの遊離

肝臓ミクロソーム (21.3 mg/ml) を 0.3 M KMS 20 mM Tris maleate (pH 6.5) 2 mM MgCl₂ 1 mM ⁴⁵CaCl₂ + CaCl₂ を含む溶液に 12 時間 4°C でインキュベートした。これを 0.3 M KMS 溶液 (●) 0.3 M KCl 溶液 (○) 0 溶液 (×) に希釈し Ca 遊離の時間経過を測定した。

では Co^{2+} , Mn^{2+} には阻害効果がなくショ糖が阻害効果を持つことを述べたが、この場合はショ糖をインキュベーションの溶液あるいはうすめる溶液に加えても阻害効果はみられなかった。

(17) 肝臓ミクロソームからの Ca 遊離

オ 2 節でも肝臓ミクロソームからの Ca 遊離をイオンのおきかえと浸透圧変化を行なって調べたが、拡散ゼリにまけた Ca についてもイオンのおきかえでは Ca 遊離が起こらないことを期待して実験を行なった。肝臓ミクロソームを 0.3M KMS 溶液の中に 1mM Ca と共にインキュベートし、0.3M KMS, 0.3M KCl, 0 の各溶液に希釈して Ca 遊離を調べた。結果は Fig. 19 に示したように期待通りイオンのおきかえ ($MS^- \rightarrow Cl^-$) では Ca は遊離されず浸透圧変化では急速な Ca 遊離がみとめられた。浸透圧変化の場合には筋小胞体の場合 (Fig. 14 B, Fig. 17 A) よりも遊離された Ca の割合は多い。

才4節 筋小胞体のCa結合部位の非対称分布および 体積について

これまでの節において筋小胞体からのCa遊離反応特に陰イオンのおきかえによるCa透過性増大の反応について様々な性質を調べ、それが筋収縮における生理的なCa遊離反応と考えてほぐまちがいなさそうだと"いうところまで"到達してきたが、さらにCa遊離反応の素過程さらにはその反応を担っている分子が何かという点に研究を進めるためにどうしても筋小胞体内でのCaの存在状態がどのようになっているかを知らなくては必要がある。そのために筋小胞体のCa結合部位を膜の表側と裏側を区別して求める実験を行なった。そしてその解析を通してCa結合部位をもつタンパク質分子の膜内配置についても一定の知見が得られた。筋小胞体膜のCa結合部位は実験方法の項で述べた方法を用い、次の5段階の測定および解析を通して求めた。

- (1) 筋小胞体の内側に結合したCaと内腔に遊離して存在するCaの量の和($\beta + \gamma$)をカルシウム濃度の高い領域にわたって(pCa 7~1)求めた。
- (2) 筋小胞体の内側に結合したCaの量 β と内腔で遊離しているCa量 γ を別に求めた筋小胞体の内容積を使って分離した。
- (3) 筋小胞体膜の外側に結合したCa量と内側に結合したCa量の和($\alpha + \beta$)を求めた。
- (4) 筋小胞体膜の外側に結合したCa量 α を $\alpha + \beta$ から(2)で求めた β を差引くことにより求めた。
- (5) 求めた α と β を解析して各々いくつかのコンポーネントに分離した。

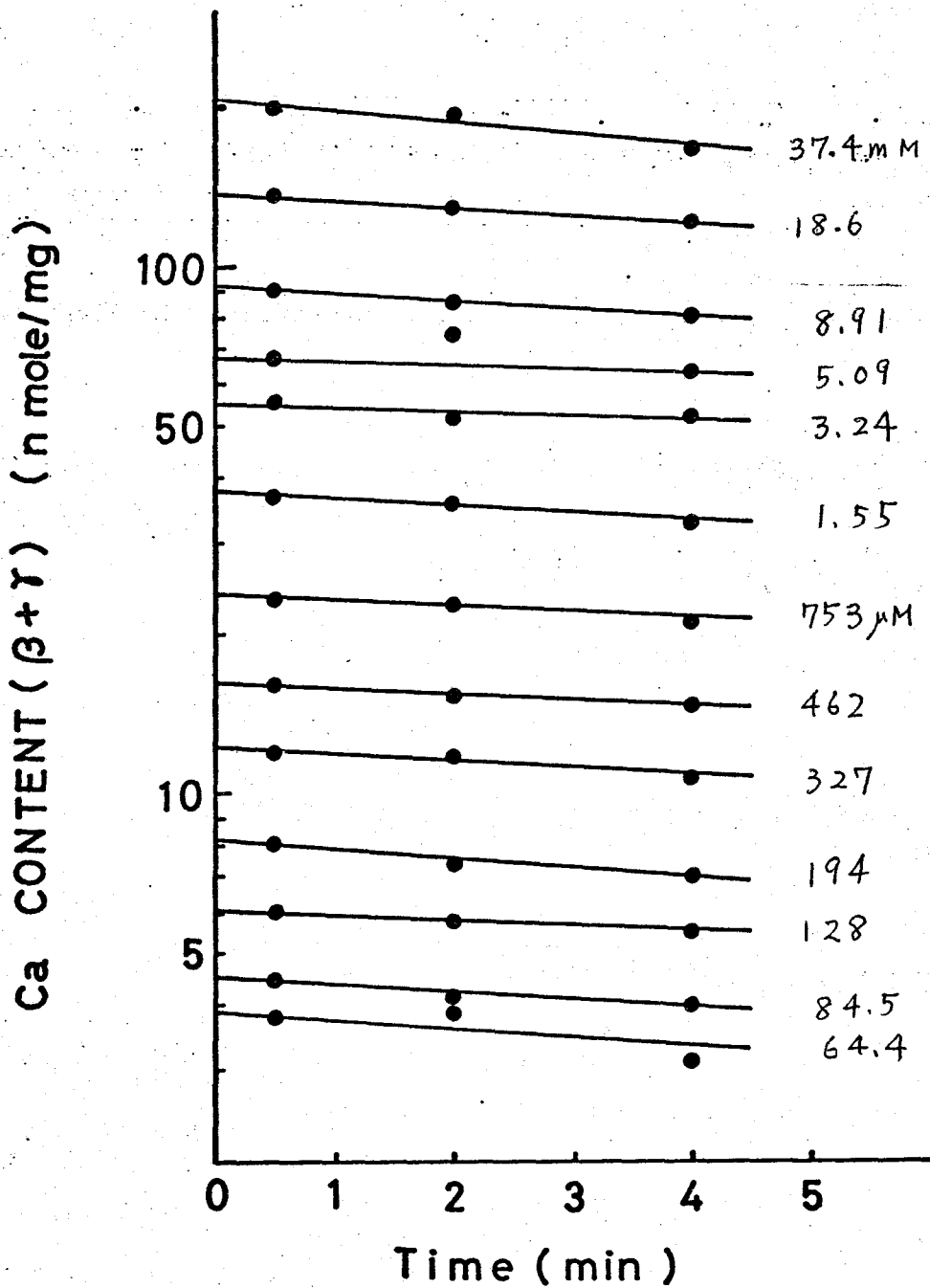


Fig. 20 $\beta + \gamma$ の測定

種々の濃度のCaにインキュベートした筋小胞体(0.1M KCl, 5mM Tris maleate pH6.5, 2mM $MgCl_2$)を同じ溶液に希釈した後Caのリークを測定した。カーブの左端への外挿点が $\beta + \gamma$ を与える。各カーブの右側に示した数字はインキュベート中のCa濃度である。

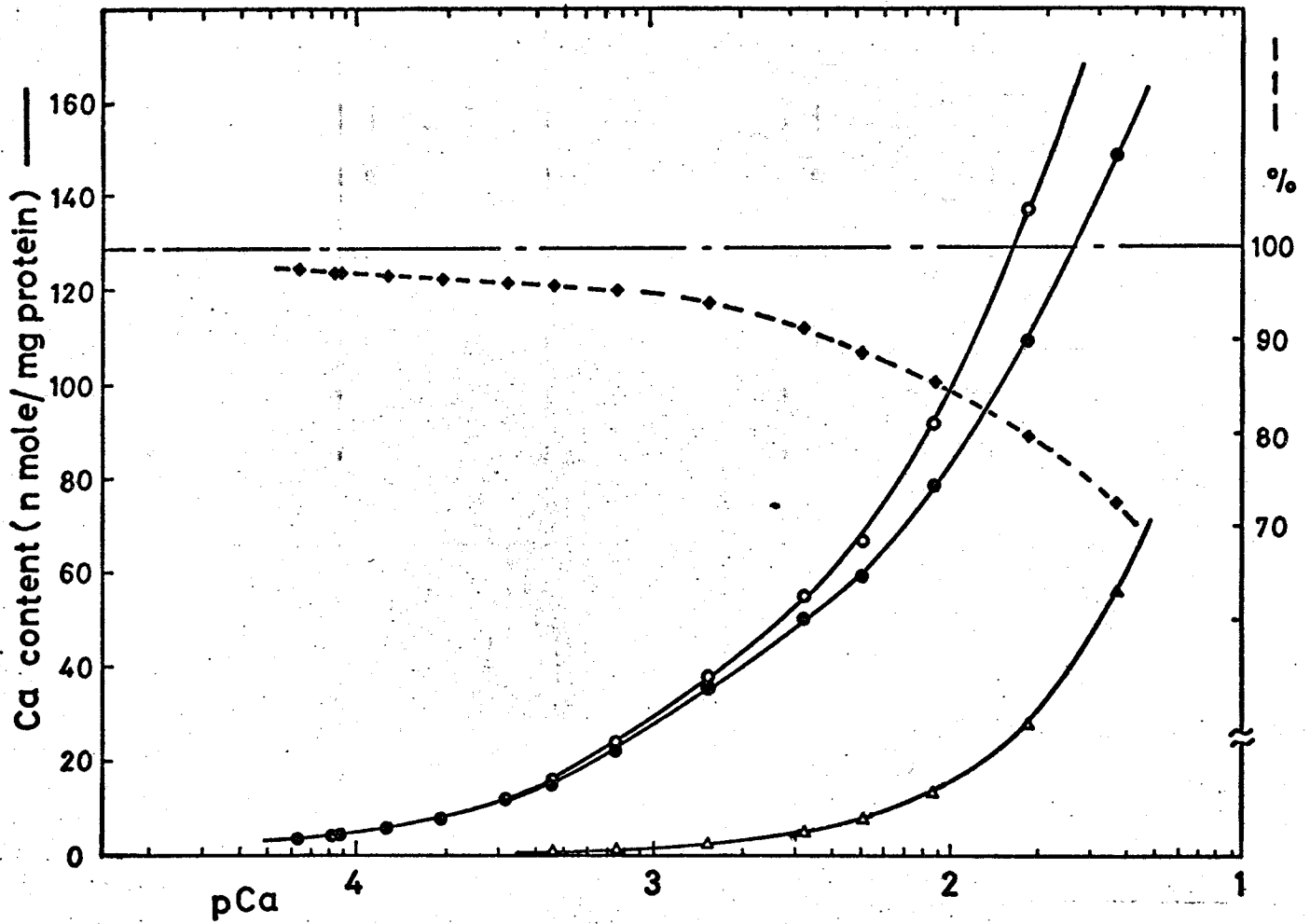


Fig. 21 平衡状態で筋小胞体フラグメントの内側に結合あるいは遊離して存在するCa量

横軸は pCa で表わした free Ca 濃度
 $\beta + \gamma$ (○), β (●), γ (Δ) の量の
 測定は本文に書いてある通り行なった。
 破線が表わした曲線は筋小胞体の内側
 で結合しているCaの割合を示す。($\beta / \beta + \gamma$)

Table III 種々のイオンや分子に対する筋小胞体のみかけの体積 (V_{app}) と膜透過性. 全てのデータは Fig. 15 と Fig. 17 からとったものである。

Species	Conditions	V_{app} (μ l/mg)	$\tau_{1/2}$ (min)	Permeability ratio
K^+		0.71	1.8	1 ^a
Na^+		0.87	2.6	0.7
Sucrose		1.36	30<	0.06>
Inulin		0.45	30<	0.06>
Ca^{2+}	1 mM $CaCl_2$	8.7 ^b	10	0.18
	10 mM $CaCl_2$	4.5 ^b	17	0.11
	100 mM $CaCl_2$	2.2 ^b	13	0.14

^a Permeability for K^+ was taken as 1. ^b Large V_{app} for Ca^{2+} is due to the binding of Ca^{2+} to SRF.

(1) $\beta + \gamma$ の測定は実験方法の所で述べたように一晩種々の Ca 濃度の溶液中にインキュベートしておいた筋小胞体サスペンションを 0.1 ml とし希釈溶液にうすめて開始する。ミリポアフィルター上で洗う過程で外側に結合したカルシウムはほとんどとれる。したがってミリポアフィルター上に筋小胞体と共に残るカルシウムは筋小胞体の内側に存在しているものである。希釈後の内側カルシウム量の時間経過をグラフにプロットしてこのカーブを時間 0 へ外挿すると平衡状態で膜の内側にあったカルシウムの量すなわち $\beta + \gamma$ が求まる。(Fig. 20) 得られた $\beta + \gamma$ を free Ca の濃度に対してプロットする。一例を Fig. 21 に示す。

(2) もし筋小胞体の内腔の体積がわかれば内側で free で存在している Ca の量すなわち γ がわかる。平衡状態において筋小胞体内側の free Ca の濃度は小胞体内側の free Ca の濃度と等しいと仮定すると外液の free Ca 濃度と内腔の体積の積が γ を与えることになる。

筋小胞体の内側の体積は以下の 2 通りの方法で求めた。

(A) ショ糖, Na^+ , K^+ の内腔に入った量から求めた体積

筋小胞体の内腔の体積はこれらのマーカーが平衡状態で内側に入っている量を測定することにより求められる。才三節 (2) で述べた実験においてイオン組成の変化を与えない対照実験のカーブを時間 0 へ外挿することにより内側に入っていた量を求めることができる。また内側の濃度は筋小胞体膜の外側での濃度と等しいという仮定にたつてこの量を外側の濃度で割ることにより体積が求まる。この結果を Table III に示す。 Na^+ , K^+ と ショ糖 では 2 倍近く異なるが ショ糖 の透過性は Na^+ や K^+ に比べて低いので ショ糖 分子を使って求めた体積の方が他の場合より正確であると考えられる。すなわち $1.36 \mu\text{l}/\text{mg}$ がこれらの中で最も信頼できる値といえる。

(B) 筋小胞体によるシュウ酸カルシウムの最大とりこみ量

内側の体積をはかる別の方法としてシュウ酸カルシウムのとりこみ実験を行なった。筋小胞体によるCaとりこみをシュウ酸存在下で行なうとCaのとりこみによって内側のCa濃度が上昇し、膜を透過してきたシュウ酸がCaと結合して沈殿をつくる。適当な条件を選べばこの沈殿が筋小胞体の内側でのみほとんどできる。そこで実験方法の項で述べたようにしてシュウ酸カルシウムの沈殿を最大限つくらせることにより最大とりこみ容量を求めるとこれが筋小胞体の内腔の体積を示すことになる。実験は筋小胞体の濃度を変えてとりこみを行なわせ1mg protein当りのとりこみ量を濃度に対してプロットしそのカーブを濃度0へ外挿することにより求めた。得られた最大とりこみ量は $8.9 \pm 0.1 \mu\text{mole/mg}$ であった。この値はATP, Ca濃度を実験方法で示した値より増やしてもほぼ変らなかった。

次にこのシュウ酸カルシウムの量を体積に換算する。一つの方法としてもしシュウ酸カルシウムが完全な結晶状態(結晶水のみを含む)であるとするとシュウ酸カルシウムの分子量146密度2.2から $8.9 \mu\text{mole}$ のシュウ酸カルシウムは $0.59 \mu\text{l}$ を占めることになる。ところが5mmoleのシュウ酸カルシウムを10mlの水の中で3500×g 1時間遠心し沈殿の体積を実際に求めてみると、これは1.14mlの体積を占めた。シュウ酸カルシウムの溶解度積は非常に小さい(2×10^{-9})なのでこの体積は5mmole全体の水中での沈殿の体積と考えてよい。この結果から計算すると $8.9 \mu\text{mole}$ のシュウ酸は $2.03 \mu\text{l}$ の体積を占めることになる。したがって実際の内腔の体積は0.59と $2.03 \mu\text{l/mg}$ の間にあるとみて間違いないだろう。

ショ糖等透過性物質が内側に入っている量から求めた体積の値は実際の体積の下限を示していることを考えれば、筋小胞体の内腔の体積は約 $1.5 \mu\text{l/mg}$ と考えられる。この値

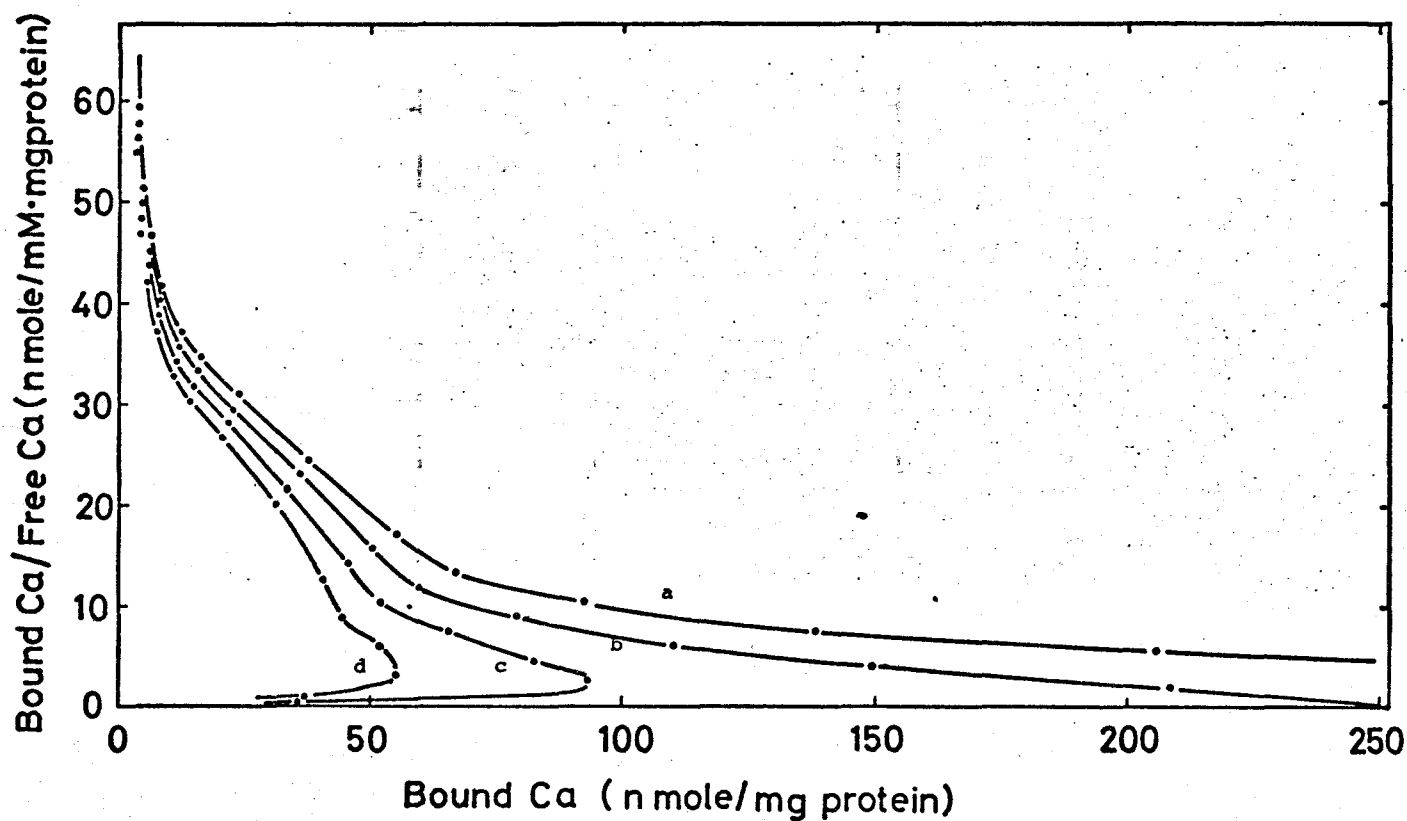


Fig.22 筋小胞体の内側の体積を各々 a:0, b:1.5, c:3.0, d:4.5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ と仮定したときの β (内側に結合した Ca 量) の Scatchard plot

の妥当性は次に述べるように Ca の結合実験 そのものからも確認される。(1) で $\beta + \gamma$ を求めたが 内腔の体積を 0, 1.5, 3.0, 4.5 ($\mu\text{l}/\text{mg}$) と仮定したときの γ を計算して、各体積に対する β を求めてみる。そしてこの 4 通りの β を Scatchard plot する。

結果は Fig. 22 に示すように 3.0 と 4.5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ の内腔体積に対応するカーブは低いアフィニティ付近で Ca 結合部位間の異常な正の相互作用を示す。これは説明できないので体積の値の仮定が正しくないことがわかる。一方内腔体積を 0 とおくと内側の Ca 結合部位が無限に存在することになってしまい明らかにおかしい。内側の体積 V_i の値を 1.5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ とした場合に妥当な曲線が得られる。これより大きな体積を仮定すると Fig. 21 の低いアフィニティ部分で正の相互作用があることを示す上側への曲線が現われることになる。これはほとんどあり得ないことなので、以上の実験と考察から体積を 1.5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ として以下の解析を行なうことにした。こうして β と γ を分けることができ各々を Fig. 21 に Ca free の濃度に対してプロットした。

(3) 次に $\alpha + \beta$ を実験方法の項で述べたやり方で測定した。マーカーとして入れた ^{45}Ca のカウントと全体の試料と遠心後の上澄と両方について測りこれとタンパク濃度から膜に結合した Ca 量が実験方法の所で述べた式により求められることができる。測定の精度を上げるためにタンパク濃度が濃い状態で実験しているため筋小胞体の占める体積等による補正が入ってやや複雑な式になっているが、この方法は基本的には透析による結合能測定の方法と同じである。こうして $\alpha + \beta$ が得られた。

(4) (3) で得られた $\alpha + \beta$ の Scatchard plot を Fig. 23, 24 に \circ で示した。 α は $\alpha + \beta$ から (2) のステップで求めた β を差引くことにより求められた。こゝで簡単に引き算で求め

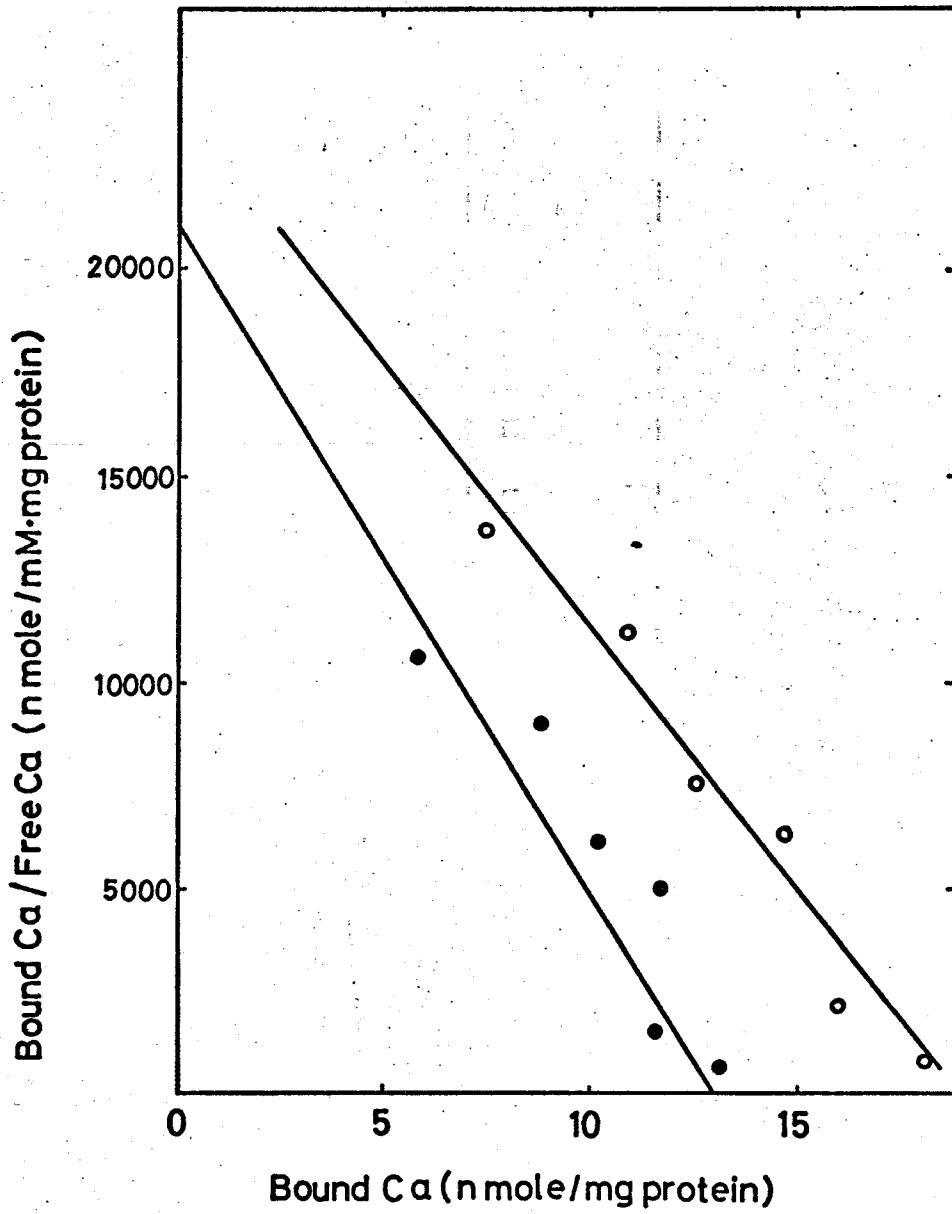


Fig. 23 $\alpha + \beta$ (○) と α (●) の アフィニティーの高い範囲での Scatchard plot.

測定した条件は実験方法で述べた通り

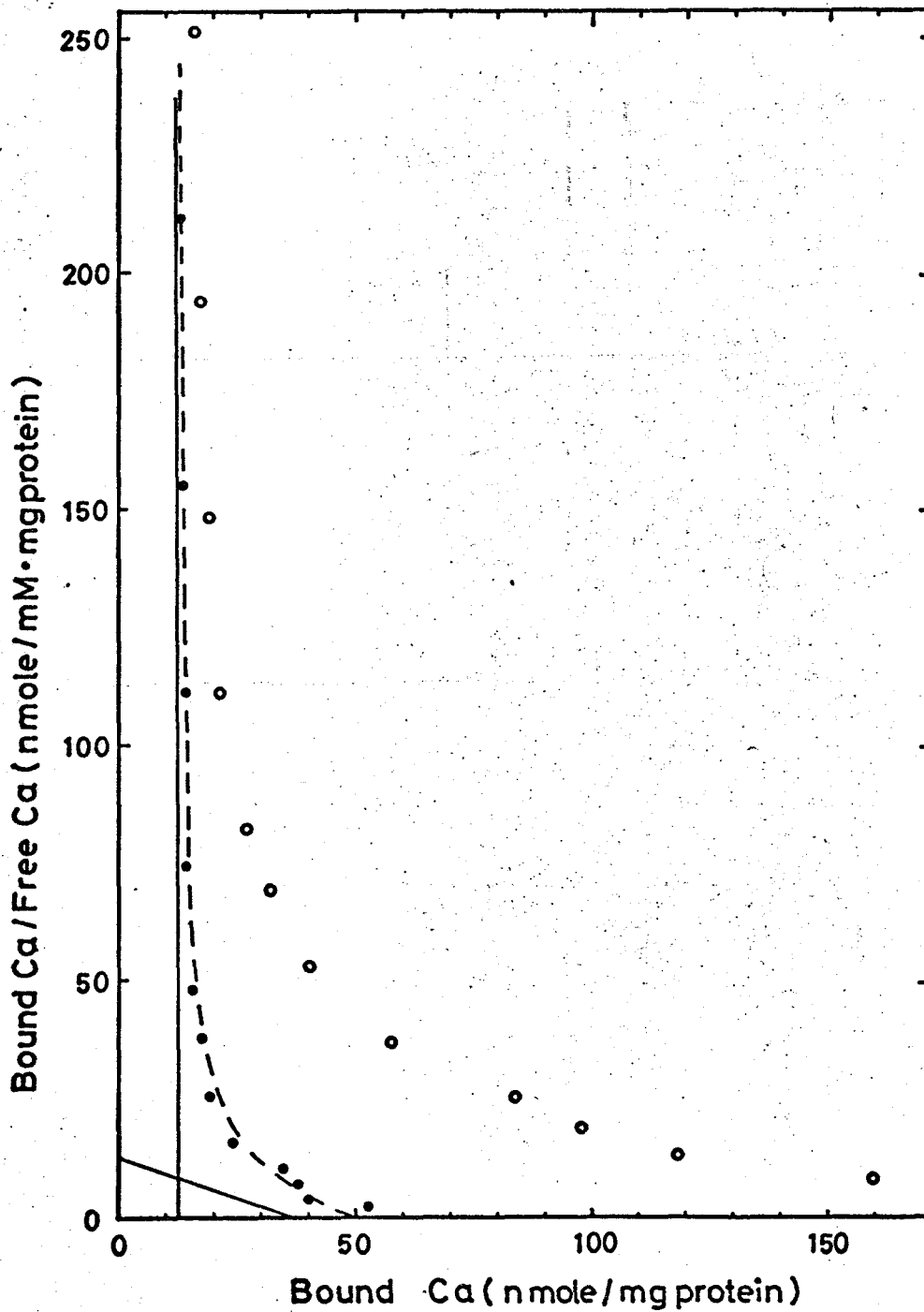


Fig. 24 $\alpha + \beta$ (○) と α (●) の低いアフィニティーの範囲での Scatchard plot.

破線は图中的の2つの直線を合成したもの。各直線は2種類のCa結合部位を示している。急な方の直線は Fig. 22の●に沿った直線に等しい。

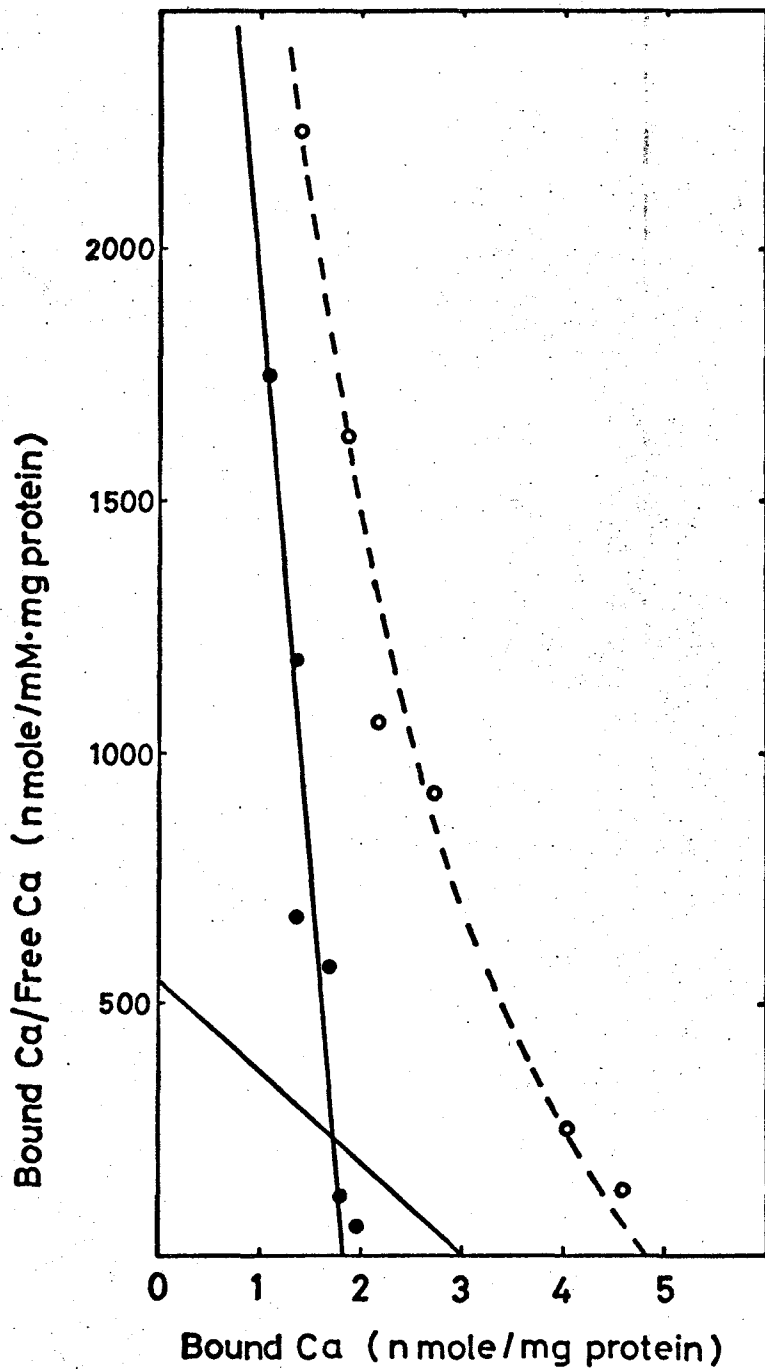


Fig. 25 $\beta(0)$ の高いアフィニティーの範囲での Scatchard plot
 破線は 図中の 2つの直線から合成したものである。
 ● は β から図中の低いアフィニティーの方のコンポーネント
 を差し引いた点で 高い方のアフィニティーのコンポーネント
 を示している。

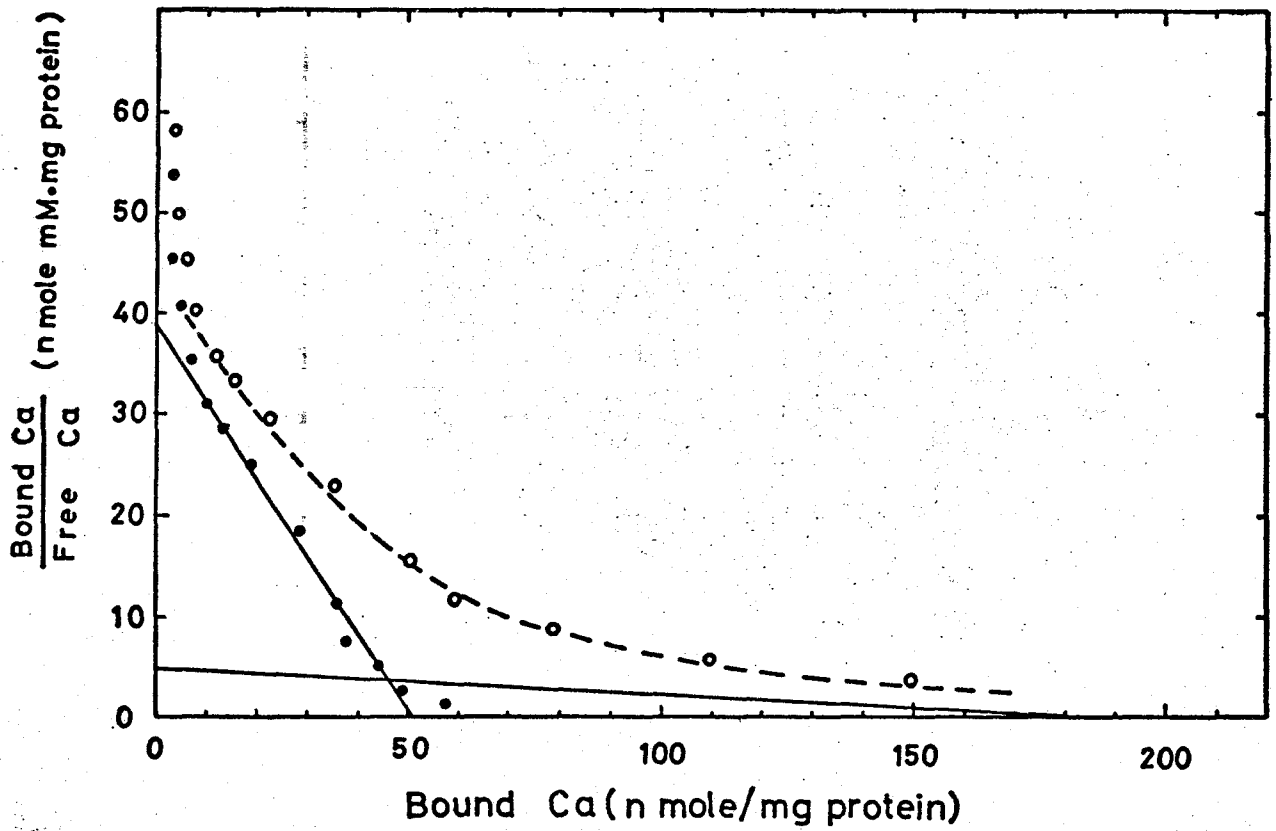


Fig. 26 低いアフィニティーの範囲での β の Scatchard plot
 破線は 図中の 2つの直線から合成したものである。
 最も低いコンポーネントを β から引いた残りを ● で示して
 ある。● が示している曲線の 図の上部分における
 直線からのずれは Fig. 24 に示されたよりアフィニティーの高い
 コンポーネントで説明される。

られるのは $\beta + \gamma$ の測定と $\alpha + \beta$ の測定が全く同じイソキニクベーション溶液を用いているので各点での free Ca の濃度が 2 つの測定で全く等しいことによる。したがってこのような方法で Ca 結合部位を正確に分けることが可能になっている。 α を Scatchard plot したものが Fig. 23, 24 に ● で示してある。 Fig. 23 はアフィニティーの高い領域、 Fig. 24 はアフィニティーの低い領域での結合の性質を示している。

(5) さて最終段階の解析に入る。 α も β もそれぞれいくつかの種類の結合部位からなる。膜の外側に結合している Ca すなわち α は Fig. 23 のように Scatchard plot による解析でアフィニティーの高い領域では一本の直線になる。このコンポーネントを α_1 とおく。また低いアフィニティーの領域では曲線となる。これから α_1 を差引くと低いアフィニティーのコンポーネント α_2 が現われる。外側に結合している Ca についてはこの α_1 と α_2 だけでほとんどすべて説明がつくことが Fig. 24 より明らかである。膜の内側に結合した Ca すなわち β を解析すると 4 種類の結合部位に分かれる。アフィニティーの高い領域では Fig. 25 に示すように 2 種類のコンポーネントが見られる。○ は β を表わす。この曲線は 2 本の直線に分けることができ、各直線は各結合部位の解離定数および最大結合容量を与える。このとき用いた解析方法は後に付録で述べる。この 2 種類の結合部位をアフィニティーの高い順に β_0, β_1 とおく。アフィニティーの低い領域では Fig. 26 に示したように 2 種以上のコンポーネントに分かれる。○ は β を示す。前と同様にしてこれを解析すると 2 種類の結合部位が 2 つの直線で表わされそれぞれより高いアフィニティーを示すコンポーネントについては Fig. 25 で示した β_0 および β_1 に対応している。これらの低いアフィニティーの 2 種の結合部位をアフィニティーの順に β_2, β_3 とおく。

Table IV 筋小胞体のCa結合部位

解離定数 K_d (M) と最大結合量 n (nmole/mg SR protein) は実験方法および本文で述べた手順により Fig. 23-26 から求めたものである。

SITE	cytoplasmic (outer)		cisternal (inner)			
	α_1	α_2	β_0	β_1	β_2	β_3
K_d	6.16×10^{-7}	3.4×10^{-3}	4.3×10^{-7}	5.6×10^{-6}	1.4×10^{-3}	3.9×10^{-2}
	1.11×10^{-6}	2.8×10^{-3}	1.0	1.3×10^{-5}	0.97	6.0
	1.10	2.8			1.06	2.8
		2.0			1.02	3.5
				0.98	5.0	
AV.	0.94×10^{-6}	2.8×10^{-3}	2.7×10^{-7}	9.3×10^{-6}	1.09×10^{-3}	4.2×10^{-2}
n	13	37	1.8	3.0	51	180
	11.7	37	1.0	1.1	45	160
	11.8	37			47	150
		32			62	150
					41	180
AV.	12.2	36	1.4	2	49	164

Table V 筋小胞体の各タンパク質のCa結合の性質とこれらの筋小胞体全体への寄与
各タンパク質のCa結合の性質はOstwaldとMacLennan(30)と池本(54,55)の論文より0.1M KClの条件で測定したデータを引用した。各タンパク質の筋小胞体中に占める割合はSDSゲルのデンスイターによる走査から本文に述べた方法で計算した。低分子量酸性タンパク質の分子量はMacLennanによって報告されている値とやや異なったがこれを分子量30,000の2種類に分けて計算した。

protein component	Dissociation constant K_d (M)	Calcium binding capacity (n mole/mg pr.)	protein content	calcium binding capacity (n mole/mg SR pr.)
Ca pump protein	$a_3 \times 10^{-7}$	18 - 20	44.2 %	8.0 - 8.8
High affinity calcium binding protein	3×10^{-6}	18	6.0 %	1.08
	5×10^{-3}	460		27.6
Calsequestrin	0.8×10^{-3}	850	8.3 %	70.6
	or 1.16×10^{-3}	985		81.8
Acidic protein (> 30,000)	1.4×10^{-3}	1000	5.2 %	52
	5.5×10^{-5}	45		2.3
Acidic protein (< 30,000)	0.78×10^{-3}	580	5.7 %	33.1
	2.6×10^{-5}	23		1.3

a; cited from Ikemoto's paper. other data was cited from Ostwald and MacLennan's paper

結局筋小胞体フラグメントは2種類の結合部位を外側 (cytoplasmic side) に4種類の結合部位を内側 (cisternal side) にもつことがわかった。何回かの実験において得られたこれら各結合部位の解離定数と最大結合量を Table IV にまとめて示す。

次にこれらの結合部位が筋小胞体のいかなる分子に対応するのかを考える。筋小胞体がおおよそ7種類のタンパク質分子を含んでいることは序論において述べたがこれらの各分子のCa結合能は「プロテオリポド」を除いて MacLennan や池本らによって測定されている。(30, 54, 55) これらのデータとここで得られた結果を比較するために以上の実験に用いた筋小胞体フラグメントの各タンパク質分子の含有比を求めた。実験は実験方法の所で述べたように SDS のゲル電気泳動を行ないこれをデンストマーにかけた。その結果Caポンプタンパク質と高アフィニティーCa結合タンパク質、カルセフェストリンははっきり見られ、低分子量の酸性タンパク質やプロテオリポドもみられた。これらの各コンポーネントの含有比を Table V に示した。全体的な分布の傾向は Ostwald, MacLennan によって得られたものとよく似ている。(30) MacLennan や池本らによって得られた抽出したタンパク質のCa結合の性質をアフィニティー、解離定数という形でまた最大結合量は今求めた各タンパク質の含有比を使って筋小胞体のタンパク質 mg 当たりという形で統一して整理すると Table V のようになった。これを Table IV に示した筋小胞体全体のCa結合部位と比較してみると非常によい相関が見られる。すなわち α_1 部位はCaポンプタンパク質に β_1 部位は高アフィニティーCa結合タンパク質に β_2 部位はカルセフェストリンにという様により対応がつけられる。ただし若干のずれはみられる。例えばCaポンプタンパク質の最大結合量 (8.0-8.8 n mole/mg SR protein) は α_1 部位のそれ (12.2 n mole/mg SR protein) に比べて多少

小さいが、これは筋小胞体中のCaポンプタンパク質の含量を過少に見積っているのかも知れない。Caポンプタンパク質の含有量は多いため SDSゲルのデンストメーターによる走査において飽和効果が現われる可能性は十分にある。また β_2 部位の解離定数 ($1.09 \times 10^{-3} M$) とカルセクエストリンのそれ ($0.8 \times 10^{-3} M$ または $1.16 \times 10^{-3} M$) は非常によい一致をみせているが、結合容量に関しては少し違いがみられる (β_2 : 49, カルセクエストリン: 70.6 または 81.8 nmole/mg SR protein) しかこの違いはカルセクエストリン分子の状態すなわち膜に結合した状態か、可溶化された状態かによっている可能性もある。 β_1 部位に関しては解離定数も結合容量も高アフィニティーCa結合タンパク質とそれほどよい一致を示しているわけではないが、互いに他には対応するものがないのと β_2 は測定上の誤差の問題もあり、対応していることはまず間違いないと考えられる。その他の結合部位については様々な対応の可能性を議論することはできるが(33) はっきりと結論することはできない。細かい議論はここでは省略する。

結局 Caポンプタンパク質の能動輸送における結合部位は膜の外側に面して位置しており、カルセクエストリンと高アフィニティーCa結合タンパク質のCa結合部位は共に膜の内側に位置している。カルセクエストリンおよび高アフィニティーCa結合タンパク質は共に強い酸性タンパク質であり、強い親水性を持つので膜のリポドの疎水部分に深くくっ込んで存在しているとは考えられず、両者共膜内側に吸着するような形で存在していると考えられる。

また Yu と Masoro はタンパク質の配置を別の方法すなわち ^{125}I -DDISA という物質で筋小胞体膜外側よりラベルを行ない、このマーカが膜を透過しない性質を利用して膜の外側に露出しているタンパク質のみをラベルし

たという報告を行なっている(34)。彼らの実験はウサギではなくラットの骨格筋を用いているが、その結果 Ca ポンプタンパク質が外側、カルセケストリンと高アフィニティー Ca 結合タンパク質は内側という推論を行なっておりこの結果はここに述べたものとよく一致している。

筋小胞体フラグメントの体積について

本論文ではオ4節の(2)で述べたようにいくつかの実験から筋小胞体の内側の体積を $1.5 \mu\text{l}/\text{mg}$ とした。そしてこの値を前提にして Ca 結合部位の解析を行ない、妥当な結果が得られたのではあるが、この値については再度若干の検討を加えておく必要がある。それは筋小胞体の全体の体積が $6 \sim 7 \mu\text{l}/\text{mg}$ であるという報告がなされており、この値とさきに述べた内側の体積と膜自身の体積の和が一致しないという問題があるためである。筋小胞体は袋状の膜であり、全体の体積は膜自身の体積と内腔の体積とからなっていると考えられている。そこで一部追試ではあるが全体の体積と膜の体積の測定を行なった。

(a) 筋小胞体フラグメントの全体の体積は膜を透過しないマーカによる排除体積として求めた。筋小胞体を ^{14}C -イヌリンを含む 0.1M KCl , 5mM Tris maleate ($\text{pH} 6.5$) の溶液中に数時間インキュベートする。このサスペンションを EDTA の排除体積を求めたときと同様に遠心してサスペンションと遠心後の上澄のカウントをはかる。この値とタンパク濃度とからイヌリンの排除体積は $6.3 \pm 0.5 \mu\text{l}/\text{mg}$ と求めた。この結果は ^{14}C -イヌリンと ^{14}C -テキストランを用いて測定を行なった報告と一致している(56)。

(b) 筋小胞体膜自身の体積は実験方法の項で述べたように膜の乾燥重量と密度の測定から求めた。その結果は

1.6 $\mu\text{l}/\text{mg protein}$ である。

さきに述べたようにこれら3種の体積の値の間には矛盾がある。膜自身の体積と内腔の体積をたしあわせるとイヌリンによる排除体積に達しない。排除体積が約6.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ であることは他の研究者によっても報告されているし、米谷によって測定された筋小胞体サスペンションの電気伝導度の測定からも同様の体積が見積られている。(米谷; personal communication) 他方膜自身の体積は測定方法が単純であり、また精度が比較的よいと期待されることから正確であると考えられる。得られた1.8 $\text{mg}/\text{mg protein}$ という質量の割合はタンパク質が筋小胞体の乾燥重量のうち54~71%を占めるという報告(6)とも一致している。もしこれら2つの値と考え方が正しければイヌリンの排除体積と膜の体積の差つまり $6.3 - 1.6 = 4.7 \mu\text{l}/\text{mg}$ が内腔の体積ということになる。しかし内腔の体積を与えるような以下の3種類の実験はすべてこれよりもかなり小さい値を示している。ショ糖、 Na^+ 、 K^+ の小胞体内に入った量から求めた値はもしミリポアフィルターでろ過する方法で測定できる時間範囲よりもずっと速い流出のコンポーネントがあったとすると実際の体積よりも小さく見積られていることになる。しかしラピッドミキシング装置を使ってイオンや分子の動きに伴う水のフラックスを光散乱変化によってほかでもそのような速いコンポーネントは見い出されていない(米谷, 葛西; to be published)。シュウ酸カルシウムの最大とりこみ量についても小さい値を示す。シュウ酸カルシウムを実際に沈殿させて求めた2.03 $\mu\text{l}/\text{mg}$ という値は内腔の体積の上限を示していると考えられる。なぜならば低速遠心で沈殿を形成させてもその中にはまだ水がたくさん入っており、この値はかなり水を含んだ体積となっている。カルシウムの筋小胞体に対する結合の実験でも1.5 $\mu\text{l}/\text{mg}$ という値が妥当なことを示

している (Fig. 22)。結局現在のところこれらの値の間のずれについては説明が「ついていないが」、ともかく筋小胞体がカルシウムを蓄積しているスペースが $4 \sim 5 \mu\text{l}/\text{mg}$ ほど大きくないことは確かである。電子顕微鏡によって筋小胞体 vesicle の直径の分布を測定し、平均直径が $0.1 \mu\text{m}$ であるという報告がなされている (57)。もし膜の厚さを 10 nm とし、膜が球殻をなしていると仮定すれば膜と内腔の体積比は $61/64$ つまり約 1 となる。これはここで求めた膜の体積と内腔の体積の比によく一致している。

第4章 議 論

これまで述べてきた実験結果の要点をまとめると (i) Leeらによる筋小胞体カスポンジオンに直接電流を流しての Ca 遊離実験はアーティファクトであることが確認された。(ii) ウサギ骨格筋より抽出した筋小胞体はメタンサルホン酸等大きな陰イオンから小さな陰イオンである Cl^- におきかえるとカルシウムイオンを遊離する。(iii) この Ca 遊離反応が膜の破裂によるものではないことは浸透圧変化に対して起る Ca 遊離と比較検討のために行なったいくつかの実験により明らかになった。(iv) イオンの置きかえによって筋小胞体膜が脱分極していると予想されることについては既に結果の第2節(1)にかなり詳しく述べたので繰り返さない。たゞさらに最近メタンサルホン酸と Cl^- の筋小胞体膜に対する透過性の比較を光散乱変化により測定して行なわれメタンサルホン酸の方が透過性が低いことが実際にラピッドミキシング装置を用いて確かめられた。(米谷 島西 to be published) したがってメタンサルホン酸を Cl^- で置きかえることにより筋小胞体膜に脱分極が起っている可能性はさらに強まったと言える。すなわち本論文の第3章第2節と第3節で述べた Ca 遊離反応は筋収縮のひきかねとなる生理的な Ca 遊離を試験管中で再現したものである可能性は非常に濃い。

ただしここで若干検討しておかぬばならない問題がある。それは第1に Ca 遊離の速度の問題である。ここに述べた反応が本当に筋収縮をひき起すに足る量の Ca を筋肉生理で既に明らかにされている筋細胞内の Ca 濃度変化(2)と同じ時間経過で遊離しているかどうかはその生理的意義を考える上で重要な問題である。第2に遠藤らによりカエルの skinned fiber を用いてイオンの置きかえにより筋収縮が起ることが確かめられそれが筋小胞体の脱分極によって起っていると確信するに足る結果が得られている。skinned fiber は抽出した筋小胞体と比べるとはるかに生理的状态に近い試料

であり、それを用いて得られている結果とこの論文で述べた結果を比較検討することはまた必要なことである。尤もに本論文第3章実験結果の第2節で述べた内容と第3節で述べた内容には多少異なる点がある。すなわち ATP によってとりこまれた Ca の反応と ATP なしに拡散でとりこまれた Ca の反応のしかたにはいくつかの異なる点がある。この点に関してもここで検討しておきたい。

(1) Ca 遊離速度

筋小胞体からの“脱分極”による Ca 遊離速度は ATP で能動輸送した Ca の場合と拡散で内側へとりこませた Ca の場合とで異なる。前者の場合第2節で説明したように約5秒後にはほぼ半分の Ca の遊離が終っていてそれ以上は遊離されない。普通にミリポアフィルターを使って測定している限りそれよりも速い反応の時間経過を追うことはできない。実際の筋肉細胞中での Ca 遊離速度は Jobsis & O'Connor によって筋細胞中に注入した色素 (murexide) の吸収変化を測定することにより測られた。(2) その結果 Ca 濃度は筋細胞膜を刺激後数ミリ秒のうちに増加し始め約55ミリ秒後にピークに達する(12°C)。この変化は張力発生に先だっており、筋細胞膜の活動電位よりは後に現われる。したがってこの時間スケールの速い解析で抽出した筋小胞体からの Ca 遊離速度を測ることは残された重要な課題の一つである。ただし遠藤らによってここに述べた実験と全く同じ操作(陰イオンのおきかえ)を skinned fiber に対して行なったときに実際に筋収縮が起きていることが報告されている(26)ので抽出した筋小胞体からも同等の速度で Ca 遊離が起きていることが強く予想される。

(2) skinned fiber の実験 と 抽出した筋小胞体 の実験

前述したように遠藤らによって skinned fiber を用いてイオンのおきかえによる筋小胞体からの Ca 遊離実験が報告されている。その主な結果を次に要約すると

(i) 表面膜が T-system 膜に膜電位が發生しないようにした skinned fiber は大きな陰イオンを小さな陰イオンでおきかえるあるいは小さな陽イオンを大きな陽イオンでおきかえることにより Ca が遊離（‘脱分極’による Ca 遊離）され筋収縮が起った。このときの遊離カルシウムの量を active 張力の大きさで生物検定した。

(ii) このとき遊離される Ca 量のとりこみ量に対する割合はとりこみ量によらずほぼ一定である。

(iii) ‘脱分極’による Ca 遊離はショ糖、ブドウ糖その他の糖類によって抑制された。

(iv) メタンスルホン酸を Cl^- でおきかえたとき Cl^- を与えたまゝでは Ca 遊離の不活性化が起るがこれは再びメタンスルホン酸におきかえることにより再活性化することができた。

(v) (i) ~ (iv) の結果は ATP を使わずに拡散でカルシウムをとりこませた場合にも全く同様の結果が得られた。またこの場合外向きの Ca フラックスだけでなく内向きの Ca フラックスも同様に増大することが確かめられた。

これらの結果は基本的な点で抽出した筋小胞体を用いた実験結果とよく似ている。すなわち筋小胞体の内側が負になるようなイオンのおきかえでのみ Ca 遊離が起ること。また遊離される Ca 量のとりこみ量に対する割合がほぼ一定であることおよびショ糖によって Ca 遊離が抑制されること（たゞし抽出した筋小胞体では ATP を使って能動輸送でとりこませたとき）等がよい一致を示している。このことは本論文で述べた筋小胞体フラグメントからの‘脱分極’による Ca 遊離が実際に筋肉細胞で起っている筋収縮

の引き金としてのCa遊離反応を試験管中で再現したものであることを強く支持している。

ただしいくつかの点でこれら両者の実験には違いもある。例1にskinned fiberで行なった場合には陽イオンのおきかえによってもCa遊離が起こるのに対し、抽出した筋小胞体では現在までのところ陽イオンのおきかえによるCa遊離には成功していない。またskinned fiberの場合でも陽イオンのおきかえは陰イオンに比べてCa遊離を引き起しにくいとされている。例2にCa遊離の不活性化はskinned fiberではメタンサルホン酸等大きな陰イオンにもとめただけで賦活されるが抽出した筋小胞体ではATPによる再トリニミを行わねば限り賦活されない。例3にskinned fiberではATPの有無により結果に全く差がないが抽出した筋小胞体では以下にまとめるようにいくつかの相違点がある。これらの相違が何によるかは現在のところわかっていないが、考えられることはskinned fiberはアフリカワメガエル (*Xenopus laevis*) で実験を行なっているのに対し抽出した筋小胞体はラサギを用いていること。また抽出した筋小胞体は筋肉をすりつぶして破れた膜が再び袋状に閉じたものを使用しているわけでその過程で何か失われている可能性もある。さらにその形状が違えば反応のしかたに差が生じる要因とほり得る。例えはskinned fiberでは多少性質の違う膜が全体として袋状になっているのに対し抽出した筋小胞体ではそれぞれ別々に閉じて小さな袋状になっていることにより相違が生じているとも考えられる。これらの原因を追求することはすべて今後の課題である。

(3) ATPでトリニミしたCaと拡散で入ったCaのふるまいの相違

実験結果の例2節と例3節ですでに述べたように抽出した筋小胞体の場合にはATPを使って能動輸送でCaを

とりこませた場合と拡散でとりこませた場合で Ca の遊離反応にいくつかの差異が認められる。陰イオンのおきかえに対して反応し、 Ca を遊離する点では実験したすべてのイオンの組合せのうちで Ca 遊離をおこす組合せは両者で全く一致した。ところが既にみたように Ca 遊離速度はインキュベートして Ca を拡散でとりこませた筋小胞体では明らかに遅い。また内側の Ca 存在量が多いほど“脱分極”で出る Ca 量の割合は少なくなる。これは ATP でとりこみをおこなった場合や skinned fiber ではほぼ割合が一定であるのに対し相違している。さらに抑制効果をもつ物質についても能動輸送でとり込んだ Ca の遊離はショ糖が抑制効果があり、 Co^{2+} , Mn^{2+} 等の Ca スパイク阻害剤は効かない。一方拡散でとりこまれた Ca の遊離にはショ糖は効果がなく、 Co^{2+} , Mn^{2+} により遊離が抑制される。このとき EGTA で外液 Ca 濃度を下げると Ca 遊離が完全に抑制される。これらの相違が何によっているのかについても現在のところわかっていないが、いくつかの可能性が考えられる。例えば (i) ATP を使って Ca をとりこんだときは膜電位が内側正になっていて、メタンサルホン酸から Cl^- の陰イオンおきかえは膜電位を内側正から負へ逆転させる。しかし拡散で Ca をとりこんだ場合は Donnan 電位を考えなければイオンのおきかえにより内側 0 から負へ電位変化が起っているのみである。Donnan 電位を考えた膜の内側に酸性タンパク質が多くあることから内側が正になっているとは考えにくい。そこで上に述べた結果の相違がイオンのおきかえを行なう前の膜電位に依存している可能性が考えられる。この点をはっきりさせるために KCl 中にインキュベートしておいた筋小胞体フラグメントを KCl 中に希釈し、フィルターで口過し一度 KMS 溶液で洗った後 KCl 溶液で洗う実験を行なった。こうすれば

KCl から KMS におきかわったとき膜の内側は正になり、それが再び KCl へのおきかえを行なったときに負になり電位の逆転が起こる。しかしこの結果 Ca はわずかに遊離されず、遊離速度はやはり遅いものであった。したがってこの可能性は当てはまらないようである。(ii) ATP を使ってとりこまれた Ca と拡散でとりこまれた Ca は何か状態が異なっているのかもしれない。(iii) 膜自身の化学的状態が ATP が存在して加水分解反応を行なっているときとそうでないときで異なっていてそれが Ca の遊離機能に何らかの影響を与えているのかもしれない。例えば Ca ホモプロタンパク質である Ca-Mg-ATPase の E-P 形成等。これらの点についても今後引き続き説明が必要である。

筋小胞体内部における Ca の存在状態

ここでは実験結果のオ4節で述べた Ca の結合実験のデータから筋小胞体内部における Ca の存在状態について議論する。Fig. 21 には free Ca の各濃度における β すなわち筋小胞体内側に結合した Ca 量と γ すなわち筋小胞体内腔で free のまま存在する Ca の量が示されており、結合量の内側にある全 Ca 量に対する割合が破線で示されている。このグラフからみると 1 mM free Ca の条件では約 95% が膜の内側に結合しており、5% が内腔で free のまま存在している。そのときの筋小胞体内側にある Ca の総量は約 25 n mole/mg protein であることがわかる。筋小胞体フラグメントが ATP で最大限とりこむ Ca 量はおよそ 160 n mole/mg である。とりこみを行なっているときの内側の Ca の状態が Ca 結合能をほかった場合と同じだとすればやはり Fig. 21 から $\beta + \gamma$ のカーブを使ってそのときの内側 free の Ca 濃度が約 23 mM と予想できる。おおよそ内側に結合している Ca 量は 125 n mole/mg で全体の Ca 量に対する

Table VI Caの結合分布と遊離されるCa

結合しているCaの分布は Table IVのデータを用いて計算した。各濃度における浸透圧変化と‘脱分極’により遊離されるCaの割合は Fig. 17の実験データから求めた。上段に Ca結合部位の結合量分布 下段に Ca遊離の割合をパーセントで示す。

[Ca] mM	γ	β_0	β_1	β_2	β_3 (%)	total (nmole/mg)
1.0	5	4	6	73	12	32
10	16	1	2	47	34	94
100	47	0.4	1	15	36	317.4
	浸透圧変化			‘脱分極’ (%)		
1.0	3			65		
10	13			49		
100	40			28		

割合は 78% となる。また Table IV を使えば、各 Ca 結合部位の結合量を次式

$$ES = \frac{nS}{K_d + S}$$

n : 最大結合量

K_d : 各結合部位の解離定数

から求めることができ

結合部位	結合量 ($\frac{\text{nmole}}{\text{mg}}$)	全体に対する割合 (%)
β_0	1.4	0.9
β_1	2	1.2
β_2	47	29
β_3	58	36

となる。このように筋小胞体内部における Ca の存在状態と推定できることは以下に述べるように Ca 遊離の分子機構を考える上で大きな手がかりを与えるものである。

Ca 遊離の分子機構に関する一考察

以上の議論をもとにして Ca 遊離を起す分子機構に関して若干の考察を行なう。

インキュベート時の Ca 濃度を変えると Ca 遊離にどのような影響が表われるかは Fig. 17 に示した通りである。この結果とそれらの濃度条件における各結合部位の Ca 結合量の計算とを比較検討することが葛西により行なわれた (personal communication)。以下に述べるのはその計算にもとづくものである。

Table VI に Ca の濃度が 1, 10, 100 mM における $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ の各結合部位に結合している Ca および内側に free で存在している Ca の計算された量を示す。また Fig. 17 から求めた各 Ca 濃度における浸透圧変化とイオン置換により遊離された Ca の量とをとりこまれた全 Ca 量に対するパーセンテージで表わしたものをあわせて示した。

これによると浸透圧変化で遊離されるCaの割合とfreeで存在している計算から求めたCa量とはよい一致を示す。一方‘脱分極’によって遊離されるCa量はカルセグエストリンに結合していると考えられる β_2 部位のCa量とよい一致を示す。特にCa結合部位の解離定数は0.1M KClの条件のもとで測定したデータであるのに対し、Ca遊離の実験は0.3M KMSの条件で行なっているため条件がかなり異なっていることを考慮に入れると両者の一致は非常によいと言える。

Ca遊離は筋小胞体の内側に存在するCaが遊離してくるのであるからこれらのCa結合部位のどれかまたはfreeで存在しているCaのいずれかが遊離してくることは間違いない。とすればこのTable VIを見て浸透圧変化および‘脱分極’によって遊離するCa量に対応する結合部位が他に存在しないこともまた明らかである。したがって浸透圧変化によって遊離するCaはfreeで存在しているものが、また‘脱分極’によって遊離するのはカルセグエストリンに結合しているCaが遊離すると考えても間違いないようである。

さらにこの考え方を支持するものとして以下の実験がある。本論文で扱っている筋小胞体は筋肉ホモジネート中遠心分離によって10,000×gから53,000×gの間に沈殿する成分を用いていることは実験材料の節で述べた通りである。

ところでこの範囲を6,000×gから70,000×gまで拡大し、それらを沈降速度の順に P_1 , P_2 , P_3 の3成分に分ける。 P_1 は6,000×g - 10,000×g P_2 は10,000×gから30,000×g P_3 は30,000×gから70,000×gに各々沈殿した成分である。これら3種類の膜分画はSDSゲル電気泳動でそのタンパク質の含有量を調べるとCaホモ70タンパク質であるATPaseはいずれも約50%存在しているのに対し、カルセグエストリンの含量には大きな違いがある。 P_1 は17% P_2 7% P_3 5% 各々

膜の全タンパク質中のカルセグエストリンの割合である。そこでこれらの種類の膜分画を用いて「脱分極」によるCa遊離実験を行なうとP₁が最も多く次にP₂, P₃の順に遊離されるCaの量が少なくなった。したがってこの結果もさきの「脱分極」によって遊離されるCaはカルセグエストリンに結合しているCaである」という推定を支持するものである。

ところで Fig. 9 に示したように 脱分極によって遊離されるCaと浸透圧変化によって遊離されるCaが起源を異にしている言葉を変えれば「脱分極によって遊離されるCaは浸透圧変化ではほとんど遊離されず、逆に浸透圧変化によって遊離されるCaは脱分極によって遊離されないと考えられる。このことは2種類のCa遊離においてその遊離のルートが異なっていることを意味している。すなわちカルセグエストリンに結合しているCaが「脱分極」によって遊離されるときには一度内側でfreeになってから膜を透過してくるのでなく、直接膜の外側へ遊離されねばならない。この推論をさらにすすめてCa遊離の分子的機構を推察すると浸透圧変化によるCa遊離は筋小胞体膜内側の浸透圧が外側よりも高くなることにより、膜を構成する脂質分子間あるいは脂質分子とタンパク質分子間の結合がゆるむあるいは破れることにより様々なイオン、分子を間接的に透過できるような穴または間隙が生じ、急激にこれらのイオンおよび分子が透過し、一瞬の後内外の浸透圧が平衡に達し膜はまたもとの状態にもどる。これに対し「脱分極」によるCa遊離は「脱分極」方向の膜電位変化を筋小胞体膜が受けるとカルセグエストリンのCa結合部位がそれまでとは内腔に面していたのか何らかの膜構造変化により外側に露出する。その結果Caが外液へ遊離されるという描像を描くことができる。このモデルは Fig. 16 に示したCaの流入についても同様に適用できる。浸透圧変化に

おいて流入する Ca は膜の破れ目から内腔へ入るのに対し
‘脱分泌’の場合は膜が構造変化を起して外側へその Ca
結合部位を露出させたカルセウエストリンに直接外側の
 Ca が結合すると説明できる。

付 録

複数コンポーネントがある場合の Scatchard plot の解析

実験結果の才4節で述べた Ca 結合能の実験で複数の結合部位がある場合の Scatchard plot を以下のような手続で解析しコンポーネントに分離した。

2種類 of 結合部位が各々 Langmuir 型の結合性質を持っているとした場合

各結合部位の解離定数を	K_m	K_n
各結合部位の最大結合量を	M_0	N_0

とおく。

測定された全体の結合量を X , free Ca の濃度を S とおくと、

$$X = \frac{M_0 S}{K_m + S} + \frac{N_0 S}{K_n + S} \quad (i)$$

である。

測定されるのは各 S の値に対する X の値である。これから最小二乗法で未知数である2組の解離定数と最大結合量を求めれば"よいのであるが"大型コンピューターが必要になるので簡便なやり方として以下のようにして求めた。

Scatchard plot には横軸 X に対し縦軸に $\frac{X}{S}$ がプロットされている。

$$\frac{X}{S} = \frac{M_0}{K_m + S} + \frac{N_0}{K_n + S} \quad (ii)$$

Scatchard plot のグラフからカーブを縦軸、横軸とに外挿した交点の値 (各々 H , A とおく) とその点におけるグラフの傾きを読めば"4つの方程式をたてること"ができる。

すなわち

$$H = \left(\frac{X}{S} \right)_{S=0} = \frac{M_0}{K_m} + \frac{N_0}{K_n} \quad (iii)$$

$$A = (X)_{S=\infty} = m_0 + n_0 \quad (iv)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\left(\frac{X}{S}\right)}{dX} &= \frac{d\left(\frac{X}{S}\right)}{dS} \frac{dS}{dX} \\ &= - \frac{m_0 (K_n + S)^2 + n_0 (K_m + S)^2}{m_0 K_m (K_n + S)^2 + n_0 K_n (K_m + S)^2} \end{aligned}$$

よって

$$\left[\frac{d\left(\frac{X}{S}\right)}{dX} \right]_{X=0} = - \frac{m_0 K_n^2 + n_0 K_m^2}{K_m K_n (m_0 K_n - n_0 K_m)} \quad (v)$$

$$\left[\frac{d\left(\frac{X}{S}\right)}{dX} \right]_{X=A} = - \frac{m_0 + n_0}{m_0 K_m + n_0 K_n} \quad (vi)$$

(iii) ~ (vi) を連立で解けばたちどころに m_0, n_0, K_m, K_n が求まるはずであるがこれを解くのもまた容易なことではない。そこでグラフから読みとって立てる式は (iii), (iv), (vi) の3つにする。そしておいて m_0 または n_0 どちらか一方を与えるとそれに対して3つの方程式から残りの3つの未知数は一意的に決まり合成した Scatchard plot を書くことができる。これと実験結果を比較しながら最も近いカーブを与えるようにパラメーター m_0 または n_0 を決定すればよい。すなわちはじめ4つあったパラメーターを各々色々の組合せで試すことは不可能であり、それを1つのパラメーターにしまつて動かせるようにしたわけである。実際にはカーブのまゝ比較するのは難かしいので測定された点から仮定した一方のコンポーネントを差引いて残りがもう一方のコンポーネントの直線に最も近くなるように試行錯誤で決定した。

謝 辞

本研究を行なうにあたり重要な助言と示唆を与えて下さり指導して下さいました大沢先生に深く感謝致します。また終始 共同した実験や議論を通して指導して下さいました葛西先生に心から感謝致します。またイオン分析の実験において心よく原子吸光分光装置を使わせて下さった大阪大学教養部の殿佐先生にお礼申し上げます。また有益な議論や実験上で便宜をはかっていただいた大沢研究室のスタッフ 大学院生のメンバーの皆さんに感謝致します。

昭和52年 2月 18日

付記 本論文の内容の一部は下記論文に掲載されている。

Miyamoto, H., Kasai, M. (1973) Reexamination of electrical stimulation on sarcoplasmic reticulum fragments in vitro. *J. Gen. Physiol.* 62, 773-786

Kasai, M., Miyamoto, H. (1973) Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment. *FEBS Lett.* 34, 299-301

Kasai, M., Miyamoto, H. (1976) Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. I. Release of calcium taken up upon using ATP. *J. Biochem.* 79, 1053-1066

Kasai, M., Miyamoto, H. (1976) Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. II. Release of calcium incorporated without ATP. *J. Biochem.* 79, 1067-1076

Miyamoto, H., Kasai, M. Asymmetric distribution of calcium binding sites of sarcoplasmic reticulum fragments. manuscript in preparation

参考文献

1. Ebashi, S., Endo, M. (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 18, 123-183
2. Jöbsis, F.F., O'Connor, M.J. (1966) Calcium release and reabsorption in the sartorius muscle of the toad. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 246-252
3. Tonomura, Y. (1972) *Muscle Proteins, Muscle Contraction, and Cation Transport.* pp. 305-356, University of Tokyo Press, Tokyo
4. Weber, A., Herz, R., Reiss, I. (1966) Study of the kinetics of calcium transport by isolated fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Z.* 345, 329-369
5. Hasselbach, W. (1964) Relaxing factor and the relaxation of muscle. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 14, 167-222
6. Inesi, G. (1972) Active transport of calcium ion in sarcoplasmic membranes. *Ann. Rev. Biophys. Bioengineer.* 1, 191-210
7. Ebashi, S. (1976) Excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 293-313
8. Tonomura, Y., Oosawa, F. (1972) Molecular mechanism of contraction. *Ann. Rev. Biophys. Bioengineer.* 1, 159-190
9. MacLennan, D.H., Holland, P.C. (1975) Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biophys. Bioengineer.* 4, 377-404
10. Franzini-Armstrong, C. (1970) Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* 47, 488-499
11. 遠藤 実 (1975) 筋収縮とカルシウム 生物物理 Vol.15 No.5 247-259
12. Schneider, M.F., Chandler, W.K. (1973) Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* 242, 244-246
13. Bezanilla, F., Horowicz, P. (1975) Fluorescence intensity changes associated with contractile activation in frog muscle stained with Nile blue A. *J. Physiol. London* 246, 709-735
14. Baylor, S.M., Oetliker, H. (1975) Birefringence experiments on isolated skeletal muscle fibres suggest a possible signal from the sarcoplasmic reticulum. *Nature* 253, 97-101
15. Natori, R. (1955) Repeated contraction and conductive contraction observed in isolated myofibrils. *Jikeikai Med. J.* 2, 1-5
16. Natori, R. (1965) Effects of Na and Ca ions on the excitability of isolated myofibrils. *Molecular Biology of Muscular Contraction.* ed. S.Ebashi, F. Oosawa, T. Sekine, Y. Tonomura, 9, 190-196 Tokyo & Amsterdam: Igaku Shoin and Elsevier
17. Natori, R. (1965) Propagated contractions in isolated sarcolemma-free bundle of myofibrils. *Jikeikai Med. J.* 12, 214-221
18. Natori, R. (1975) The electric potential change of internal membrane during propagation of contraction in skinned fibre of toad skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.* 25, 51-63
19. Costantin, L.L., Podolsky R.J. (1967) Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 50, 1101-1124

20. Costantin, L.L. (1970) The role of sodium current in the radial spread of contraction in frog muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 55, 703-715
21. Lee, K.S., Ladinsky, H., Choi, S.J., Kasuya, Y. (1966) Studies on the in vitro interaction of electrical stimulation and Ca^{++} movement in sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 49, 689-715
22. Miyamoto, H., Kasai, M. (1973) Reexamination of electrical stimulation on sarcoplasmic reticulum fragments in vitro. *J. Gen. Physiol.* 62, 773-786
23. Nakamaru, Y., Schwartz, A. (1970) Possible control of intracellular calcium metabolism by $[H^+]$. Sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 830-836
24. Nakamaru, Y., Schwartz, A. (1972) The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 59, 22-32
25. Kasai, M., Miyamoto, H. (1976) Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. II. Release of calcium incorporated without ATP. *J. Biochem.* 79, 1067-1076
26. Endo, M., Nakajima, Y. (1973) Release of calcium induced by 'depolarisation' of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature New Biol.* 246, 216-218
27. Kasai, M., Miyamoto, H. (1973) Depolarization induced calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane fragments by changing ionic environment. *FEBS Lett.* 34, 299-301
28. Kasai, M., Miyamoto, H. (1976) Depolarization-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum fragments. I. Release of calcium taken up upon using ATP. *J. Biochem.* 79, 1053-1066
29. MacLennan, D.H., Yip, C.C., Iles, G.H., Seeman, P. (1972) Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37, 469-477
30. Ostwald, T.J., MacLennan, D.H. (1974) Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249, 974-979
31. Racker, E. (1972) Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca^{++} -Adenosine Triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 247, 8198-8200
32. Warren, G.B., Toon, P.A., Birdsall, N.J.M., Lee, A.G., Metcalfe, J.C. (1974) Reconstitution of a calcium pump using defined membrane components. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 622-626
33. Miyamoto, H., Kasai, M. Asymmetric distribution of calcium binding sites of sarcoplasmic reticulum fragments. to be published
34. Yu, B.P., Masoro, E.J., Morley, T.F. (1976) Analysis of the arrangement of protein components in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 251, 2037-2043
35. Kasai, M., Changeux, J.-P. (1971) In Vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. I. Pharmacological properties of the excitable membrane fragments. *J. Membrane Biol.* 6, 1-23

36. Kasai, M., Changeux, J.-P. (1971) In Vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. II. The permeability change caused by cholinergic agonists. *J. Membrane Biol.* 6, 24-57
37. Kasai, M., Changeux, J.-P. (1971) In Vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. III. Comparison of the dose-response curves to decamethonium with the corresponding binding curves of decamethonium to the cholinergic receptor. *J. Membrane Biol.* 6, 58-80
38. Cartaud, J., Benedetti, E.L., Kasai, M., Changeux, J.-P. (1971) In Vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. IV. Ultrastructure, at high resolution, of the AcChE-Rich and ATPase-Rich microsacs. *J. Membrane Biol.* 6, 81-88
39. De Robertis, E. (1971) Molecular biology of synaptic receptors. *Science*, 171, 963-971
40. O'Brien, R.D., Eldfrawi, M.E., Eldfrawi, A.T. (1972) Isolation of acetylcholine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol.* 12, 19-34
41. Meunier, J.-C., Sugiyama, H., Cartaud, J., Sealock, R., Changeux, J.-P. (1973) *Brain Res.* 62, 307-315
42. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B. (1952) Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 424-448
43. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 449-472
44. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 473-496
45. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. *J. Physiol.* 116, 497-506
46. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544
47. Tasaki, I. (1968) *Nerve Excitation*. Charles C Thomas . Publisher Springfield Illinois U.S.A.
48. Noda, L., Kuby, S., Lardy, H. (1955) ATP-Creatine transphosphorylase. *Methods Enzymol.* 2, 605-610
49. Ogawa, Y. (1968) The apparent binding constant of glycoetherdiamine-tetraacetic acid for calcium at neutral pH. *J. Biochem.* 64, 255-257
50. Meissner, G., Fleischer, S. (1971) Characterization of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 241, 356-378
51. Taussky, H.H., Shorr, E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202, 675-685
52. 池原 征夫 加藤 敬太郎 (1974) SDS-ゲル電気泳動法による膜蛋白の分析法 別冊蛋白質核酸酵素 生体膜実験法(上) pp 230-237
53. Hagiwara, S., Nakajima, S., (1966) Differences in Na and Ca spikes as examined by application of tetrodotoxin, procaine, and Manganese ions. *J. Gen. Physiol.* 49, 793-806

54. Ikemoto, N. (1975) Transport and inhibitory Ca^{2+} binding sites on the ATPase enzyme isolated from the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 250, 7219-7224
55. Ikemoto, N., Nagy, B., Bhatnagar, G.M., Gergely, J. (1974) Studies on a metal-binding protein of the sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249, 2357-2365
56. Duggan, P.F., Martonosi, A. (1970) Sarcoplasmic reticulum. IX. The permeability of sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Gen. Physiol.* 56, 147-167
57. Arrio, B., Chevallier, J., Jullien, M., Yon, J., Calvayrac, R. (1974) Description by quasi elastic laser light scattering of a biological preparation: sarcoplasmic reticulum vesicles. *J. Membrane Biol.* 18, 95-112