

ウサギ骨格筋筋原繊維 ATPase Ca 感受性の研究

中川, 英一郎
九州大学医学部臨床薬理学教室

野村, 真一
九州大学医学部臨床薬理学教室

福山, 聡
九州大学医学部臨床薬理学教室

白石, 富美恵
九州大学医学部臨床薬理学教室

他

<https://doi.org/10.15017/7333723>

出版情報：福岡醫學雑誌. 84 (10), pp.433-435, 1993-10-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



ウサギ骨格筋筋原繊維 ATPase Ca 感受性の研究

九州大学医学部臨床薬理学教室 (指導: 大槻磐男教授)

中川英一郎・野村真一・福山 聡

白石富美恵・畠中正光

The Change in Ca^{2+} -sensitivity of Rabbit Skeletal Myofibrillar ATPase Activity under Various Conditions

Eiichiro NAKAGAWA, Shin'ichi NOMURA, Satoru FUKUYAMA,
Fumie SHIRAISHI and Masamitsu HATAKENAKA

Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine Kyushu University 60, Fukuoka 812

Effect of the composition of the reaction mixture on the Ca^{2+} -sensitivity of myofibrillar ATPase of rabbit skeletal muscle was investigated. The Ca^{2+} -concentrations necessary for the half maximum ATPase activation were 2.95×10^{-6} M at 50 mM KCl, 4.37×10^{-6} M at 90 mM KCl and 5.25×10^{-6} M at 130 mM KCl. Thus the Ca^{2+} -sensitivity was definitely lower at higher KCl concentrations. The Ca^{2+} -sensitivity was about 2 times higher at pH 7.3 (pCa_{50} 5.65) compared to the Ca^{2+} -sensitivity at pH 6.8 (pCa_{50} 5.36). The change in the Mg-ATP concentration between 0.5 mM and 3.5 mM, did not significantly affect the Ca^{2+} -sensitivity of myofibrillar ATPase, but affected biphasically the maximum ATPase activity. These change in the Ca^{2+} -sensitivity at various conditions is considered to be due mainly to the property of troponin C, the Ca^{2+} -receptive protein of myofibrils.

はじめに

骨格筋の蛋白が収縮するときの重要なセカンドメッセンジャーとなっているものは、 Ca^{2+} である。 Ca^{2+} は、トロポニンCに結合することにより、アクチン、ミオシン間の反応を開始させる¹⁾。すなわち、筋の収縮を起こさせることになるわけであるが、このアクチン、ミオシンが反応するとき、ミオシンのheadに存在するATPaseが、ATPを分解して反応が進行していくことになる。そうすると、種々の条件を変化させるとすると、どのようにCa感受性が変化するかということに興味がかれた。そこでATPが分解されるとき、生成されるリン酸を測定することにより、種々の条件において、 Ca^{2+} のトロポニンに対する感受性を調べることにした。

実験方法

はじめの素材となる物はウサギの背筋、大殿筋、腸腰筋から調製した。そしてcold roomで筋膜、腱、神経、脂肪、結合組織を取り除いた後、肉ひきにかけて、これを、針谷法によって筋原繊維を調製した²⁾。そして

50%グリセリン溶液に入れて -20°C で保存した。

ATPase 活性測定用の標準溶液の組成は、90 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM MOPS (pH 6.8), 1 mM EGTA, 2 mM ATP, 0-1 mM CaCl_2 で、これに0.2 mg/ml 筋原繊維を加えた。

グリセリンづけになっている筋原繊維を60 mM KCl, 1 mM NaHCO_3 , 14 mM 2-MEで懸濁して2500 rpm, 2°C , 8分間遠心した。残った沈殿を60 mM KCl, 1 mM NaHCO_3 で懸濁した。蛋白濃度は牛血清アルブミンを標準液としてビウレット反応によって測定した。反応は 25°C でATPを加えて開始し、氷冷した4%アスコルビン酸を含んだ20% TCAを1.5 ml 加えて終了させた。遊離した無機リン酸はBaginskiの方法で測定した¹⁾。

実験結果

ATPaseの最大活性は、KCl濃度(50 mM, 90 mM, 130 mM)によって一定の変化を示さなかった。最大活性はKCl濃度の低いものが大きくなったり、高いものが小さくなったりと、日によって違ったり、また実験者によって変化したりした。Ca感受性について

は、一定の傾向を示した。KCl 濃度が上がれば pCa_{50} は低下した。すなわち、KCl 濃度が上昇すると Ca 感受性が低下することが解かった。Hill 係数 (n) については一定の結果は得られなかったが、KCl 濃度が 130 mM (最も生理的条件に近い場合である) の時は、Hill 係数 (n) が大きな値を取ることはいえそうだ (図 1)。

図 2 は pH 7.3 と 6.8 における ATPase 活性を示している。最大活性にはさほど変化がみられず、Hill 係数 (n) にもあまり変化は見られなかったが、 pCa_{50} は pH 7.3 のほうが 6.8 に比べて大きくなりグラフが左にシフトした。

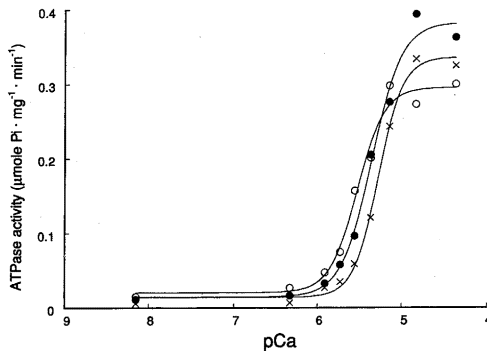


図 1 Ca 感受性筋原繊維 ATPase に対する KCl 濃度の影響

- : KCl 50 mM (n , 2.70; pCa_{50} , 5.53)
- : KCl 90 mM (n , 2.45; pCa_{50} , 5.36)
- ×: KCl 130 mM (n , 3.02; pCa_{50} , 5.28)

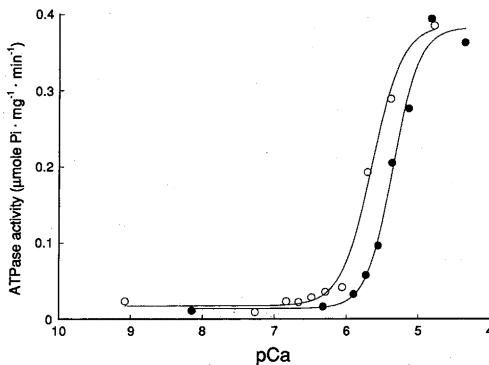


図 2 筋原繊維 Ca 感受性 ATPase に対する pH の影響

- : pH 7.3 (n , 2.06; pCa_{50} , 5.65)
- : pH 6.8 (n , 2.41; pCa_{50} , 5.36)

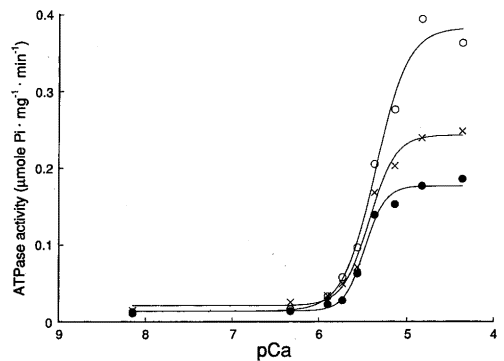


図 3 筋原繊維 Ca 感受性 ATPase に対する Mg-ATP 濃度の影響

- : Mg-ATP 0.5 mM (n , 3.14; pCa_{50} , 5.46)
- : Mg-ATP 2.0 mM (n , 2.25; pCa_{50} , 5.34)
- ×: Mg-ATP 3.5 mM (n , 2.62; pCa_{50} , 5.43)

図 3 は、 pCa を横軸に、ATPase 活性を縦軸にとって、両者の関係を示したものである。そこで、最大活性に注目すると、Mg-ATP 2 mM (control) の時は 0.25~0.4 の間の値となっており、Mg-ATP 0.5 mM では 0.15 前後~0.2 となっており、control の約半分となっていることがわかった。Mg-ATP 3.5 mM の場合は、最大活性は control に比しては減少したが、0.5 mM の時に比べると増大した。筋原繊維の Ca 感受性の指標となる pCa_{50} に着目すると、その値は、いかなる Mg-ATP 濃度のもとでも、概ね 5.4 となっていて有意差がみられない、即ち、筋原繊維の Ca 感受性は Mg-ATP 濃度の影響を受けないことがわかった。

考 察

収縮の主な流れは Ca^{2+} がトロポニン C に結合し、それによりアクチン-ミオシンの反応が開始するというものであるが、 K^+ 濃度 (イオン強度) が、どこに働きかけるかということとははっきりわかっていない。ただ、考えられることは K^+ が蛋白の周囲に位置するとタンパクの三次構造が不安定になることである。

今回の実験では pH は 7.3 と 6.8 の 2 つの場合で行った。結果の項でも述べたように 2 つを比較すると、最大活性、Hill 係数 (n) にはあまり変化が見られず、 pCa_{50} は pH が高い程大きくなった。つまり、左にシフトして Ca 感受性が上がった。逆に言えば、pH が低下すると Ca 感受性が低下するということであり、生体内では筋肉の疲労により乳酸が蓄積されてアシドーシスになった場合に相当する。このことは疲労して

くると筋肉が動かなくなってくるという経験と対応するのかもしれない。

Mg-ATP 濃度を変化させたときは、筋原繊維の Ca 感受性には変化がなく、Hill 係数 (n) においても濃度との相関性は認められなかったが、ATPase 最大活性は、0.5 mM の時は 2 mM の時の約半分に低下した。そこで、本実験の反応系において消費された Mg-ATP の割合を求めてみると、Mg-ATP 2 mM の場合は 20~30% であるのに対して、0.5 mM の時は 50~60% に上がることがわかった。0.5 mM のときに最大活性が低下するのは、相対的に Mg-ATP が多く消費されてしまうことに伴い、反応が遅延することによって考えられ、Mg-ATP 濃度による最大活性の変化を評価するには、クレアチン-ホスホキナーゼ系などの ATP 再生系を加えて、反応進行中に Mg-ATP 濃度の変動が起こらないような反応系にして実験を行うのが望ましいと考える。

謝 辞

本研究は、九州大学医学部の平成 5 年度学生基礎配置において行ったものです。御指導をして下さった臨床薬理学教室の大槻啓男教授に感謝します。

文 献

- 1) Baginski ES, Foa PP and Zak B: Determination of phosphate: Study of labile organic phosphate interference. Clin Chim Acta 15: 155-158, 1968.
- 2) Harigaya S, Ogawa Y and Sugita H: Calcium binding activity of microsomal fraction of rabbit red muscle. J Biochem 63: 324-331, 1968.
- 3) Ohtsuki I, Maruyama K and Ebashi S: Regulatory and cytoskeletal protein of vertebrate skeletal muscle. Adv Prot Chem 38: 1-67, 1986.
(受付 1993-8-3)