

ザリガニ単一骨格筋線維のK拘縮に対する
外液Ca⁺濃度の影響

—特に mechanical activation ならびに
inactivation に関して—

高橋延昭 高橋正樹
札幌医科大学附属臨海医学研究所

Effect of External Calcium Concentration on Potassium-induced
Contracture in Single Muscle Fibers of Crayfish

— With Special Reference to Mechanical
Activation and Inactivation —

Nobuaki TAKAHASHI and Masaki TAKAHASHI
Marine Medical Institute, Sapporo Medical Colledge

The effect of alternating external calcium concentrations on potassium-induced contracture, with special reference to mechanical activation and inactivation curves, was examined using single muscle fibers taken from the walking leg muscles of crayfish (*Cambarus clarkii*) and the following results were obtained.

1) Although two methods used for the measurement of inactivation are already known in frog twitch fibers (cf. Hodgkin and Horowitz 1960, Frankenhaeuser and Lännergren 1967), a considerable difference between these two methods regarding the degree of inactivation for a given time in this preparation may be seen.

2) Inactivation, which depends on the conditioning of potassium concentration, first attains a stable value of inactivation with the conditioning time, and then slowly rises to level of full inactivation.

3) Under a condition of low calcium concentration (5 mM), activation and inactivation curves are shifted to lower potassium concentrations. The extent or degree of the shift of the inactivation curve is larger than that of the activation.

4) An increase of the calcium concentration (36.5 mM) shifts both curves to higher potassium concentrations. The extent of the shift of both curves is approximately similar.

5) The time course of K-contracture (200 mM K⁺) is affected by alternating calcium concentration as follows. In low calcium concentrations (5 mM), the ascending rate of the tension increased and the time course is shortened. On the other hand, in higher concentrations (36.5 mM), the former is decreased and the latter is prolonged.

6) The peak tension of K-contracture (200 mM K⁺) increases with the increase of calcium concentration from 1 to 5 mM. In higher calcium concentrations over 36.5 mM the peak tension decreases although the concentration range from 5 to 36.5 mM gives maximal tension.

7) The size of area of 200 mM-K contracture increases with the increase of calcium concentration from 1 to 13.5 mM. Under the calcium concentration from 13.5 mM up to 36.5 mM, a stable value is maintained. However, higher calcium concentrations over 36.5 mM leads to a sudden increase of size of the area.

On the basis of these results, the phasic nature in potassium-induced contracture of crayfish muscle fibers was discussed in comparison with that of frog twitch fibers.

(Received March 30, 1978 and accepted June 6, 1978)

1 緒 言

Gainer¹⁾ および Hagiwara and Nagai²⁾ らは、それぞれイセエビおよびイガイの筋線維束で ⁴⁵Ca influx 実験を行い K 拘縮を説明し得るに十分な Ca⁺ の細胞内流入を認めている。また Chiarandini *et al.*³⁾ は、ザリガニ単一骨格筋線維で caffeine 拘縮後に K 拘縮が充分生起することから、生理的条件下における influx Ca⁺ の activating Ca⁺ としての作用を示唆している。このように無脊椎動物筋線維の activating Ca⁺ は主として Ca influx に由来する。

以前、Zachar and Zacharova⁴⁾ はザリガニ骨格筋線維の K 拘縮が比較的緩慢ながら一過性である性質を、Hodgkin and Horowitz⁵⁾ や Lüttgau⁶⁾ らがカエル速筋線維の K 拘縮の time course を説明するために仮定した activation と inactivation process とに対比し、ザリガニ筋においても同様な両 process のあることを示唆した。しかし、activating Ca⁺ が主として Ca influx に由来するとされるザリガニ骨格筋とそれが主として筋小胞体⁷⁾にあるというカエル速筋の K 拘縮の性質が本質的に類似しているか否かの検討は充分なされていない。

そこで本実験はザリガニ骨格筋の K 拘縮における activation および inactivation とこれらに対する外液 Ca⁺ の影響とをカエル速筋線維のそれらの成績とを比較すべく検討を行った。

2 材料および方法

2.1 材料: アメリカザリガニ (*Cambarus clarkii*) の歩脚を構成する屈曲筋を、一方に外骨格他方に accessory flexor tendon を付着させたまま摘出し、その筋束から単一筋線維を分離して使用した。

2.2 機械的応答の記録: 標本を容量 3 ml のアクリル製容器内に横たえ、外骨格は虫ピンで固定し、tendon はストレンゲージ (日本光電工業社製, SB-1T-H) のレバーにアロンアルファ A (東亜合成化学社製) で接着し、軽度の伸展を与えた。筋の機械的応答はインク書きオシログラフ (日本光電工業社製, WI-180) により記録された。

2.3 試験液

2.3.1 正常 Ringer 液: Chiarandini *et al.*⁸⁾ のザリガニ Ringer 液に準じ、200 mM NaCl, 5 mM KCl, 13.5 mM CaCl₂, 2 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に調製された。

2.3.2 potassium Ringer 液: 正常 Ringer 液の NaCl を各種濃度の KCl と交換することにより作製された。本実験は [Na⁺+K⁺] 一定の条件である。

外液各種 Ca⁺ 濃度は 2.3・1 および 2.3・2 液の CaCl₂ を試験濃度に調製することによりきめられた。また、Ca free Ringer 液においては 2 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) が添加された。なお、容器内液交換は注射筒で試験液を 5 ml 注入することにより 1 秒以内に交換できた。

本実験はすべて室温下 (15~23°C) で行なった。

3 成 績

3.1 K 拘縮の mechanical activation ならびに inactivation の測定方法の比較

mechanical inactivation の測定に関し、Hodgkin and Horowitz⁵⁾ は full inactivation からの一定時間での回復の程度を、Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾ は一定時間内に生じている inactivation の程度を、それぞれ各 K⁺ 濃度に関して求めている。Zachar and Zacharova⁴⁾ は前者の方法に準じ、ザリガニ筋での inactivation を求め、各 K⁺ 濃度においてカエル筋のそれより高い値を得ている。その理由を明らかにするため、本標本で各 K⁺ 濃度における回復の程度と後者の方法に準じた inactivation の進行の程度を時間経過をもって比較した。

まず前者の方法を検討するに際し、本実験では full inactivation (200 mM K⁺, 30 秒浸漬) からの、各 K⁺ 濃度下 (conditioning solution) による回復の時間経過を 200 mM-K 拘縮 (test) の tension height で測定した (Fig. 1)。5 mM K⁺ 濃度下の回復の程度は full inactivation から 15 分後に 0.95 とほぼ完全に回復した。しか

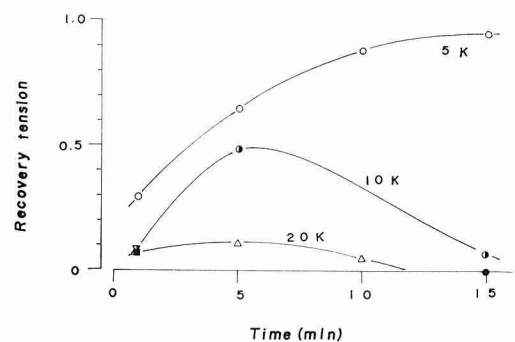
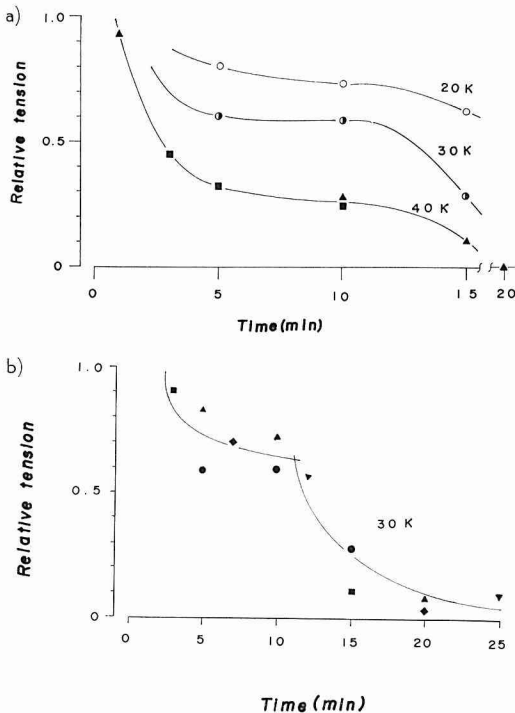


Fig. 1 Time course of recovery following the 200 mM-K contracture (first contracture).

Abscissa: interval between end of conditioning by alternated potassium concentration and beginning of secondary 200 mM-K contracture (test contracture). Ordinate: relative amplitude of test contracture as compared with first contracture. Same symbols denote values from the same fiber.

し、10 mM K^+ 濃度下のその値は5分後に0.5, 15分後に0.08と一旦は回復をみせたものの、その後また full inactivation へと向った。また、20 mM K^+ 濃度下においても5分後に0.1の回復をみせたが、15分後には full inactivation の状態を示した。Zachar and Zacharova⁴⁾は full inactivation (173 mM K^+ , 30秒浸漬)からの回復の時間を10分に固定し、その時の5 mM K^+ による回復の程度(0.8)を1として、各 K^+ 濃度のその値を求めている。Fig. 1に示された本実験の曲線から10分時点で回復の程度を測定すると、5, 10と20 mM K^+ 濃度でその値がそれぞれ1, 0.39と0.05となり、ほぼ彼らの値に近似する。

次に、各 K^+ 濃度の conditioning time における inactivation の程度を200 mM K^+ (test) 作用によるその tension height の減少から測定した (Fig. 2 a). 20, 30



Figs 2 a and b Time course of inactivation by the conditioning of alternated potassium concentration.

Abscissa: interval between end of conditioning of alternated potassium concentration and beginning of test contracture (200 mM K^+). Ordinate: relative amplitude of test contracture as compared with the 200 mM-K contracture of control. "Inactivation" is represented by one minus value of relative amplitude of test contracture. Same symbols denote values from the same fiber.

および40 mM K^+ 濃度において、conditioning 開始後5分から10分にかけて、それぞれ0.2, 0.4および0.7と inactivation の程度がほぼ一定値を示した。その後15分を境にして再び inactivation の値が徐々に増加した。そして、40 mM K^+ 濃度 conditioning time 20分で、full inactivation を示す標本もみられた (Fig. 2 a). このように mechanical inactivation は conditioning time に伴い、一定値に達する第1相とその後徐々に full inactivation に向う第2相のあることが知られる。

次に、第2相 inactivation の性質を30 mM K^+ 作用下で精査した (Fig. 2 b). 上述したごとく、第1相 inactivation が、5~10分で0.3~0.4とほぼ一定の値に達した後、13~15分から再度 inactivation が徐々に進行し、その値は15分で0.7, 20~25分で0.9を示した。このように、第2相 inactivation は時間とともに指数関数的な増加をみせることが明らかにされた。

以上の inactivation の時間経過から、20 mM K^+ 10分で両法による inactivation の程度を比較すると Hodgkin and Horowitz⁴⁾法で0.95, Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾法では0.25と相異なる値を示した。その差はザリガニ筋で回復速度が遅い一方、これに比較的速やかな inactivation の進行が加わったことがこの極端な差をもたらしたものと考えられる。なお、回復過程の inactivation の再度の進行に関しては、カエル速筋においてすでに Curtis¹⁰⁾ならびに Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾らに指摘されている。

3.2 K 拘縮の activation curve ならびに inactivation curve

前節で inactivation が conditioning time 5分から10分にかけてほぼ一定値を示すことを明らかにした。このことから、各種 K^+ 濃度の K-Ringer を筋標本に7分間作用 (conditioning) させた後、直ちに200 mM-K Ringer を作用 (test) させ、この時の peak tension を conditioning solution の K^+ 濃度に対して plot したものを inactivation curve, 同様に conditioning 時に発生した K 拘縮の peak tension を、その時の K^+ 濃度に対して plot したものを activation curve とした。

Fig. 3に示すように、K 拘縮の activation curve は sigmoidal であり、その threshold ならびに half max. value はそれぞれ15 mM K^+ , 30 mM K^+ であった。Zachar and Zacharova⁴⁾による $[K][Cl]$ product 一定下のその値は15 mM K^+ , 39 mM K^+ であり、ほぼ一致していた。

一方、inactivation curve について、half max. value ならびに max. value を与える K^+ 濃度はそれぞれ35

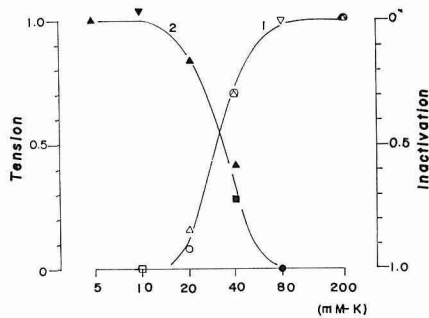


Fig. 3 Relation between potassium concentration and each of mechanical activation (curve 1) and inactivation (curve 2).

Abscissa: potassium concentration by a logarithmic scale. In a curve 1 (open symbols), the ordinate shows the relation induced by the conditioning solution against 200 mM-K contracture of control. In a curve 2 (filled symbols), the ordinate shows the relative tension of test contracture after 7 min conditioning by a given potassium concentration against 200 mM-K contracture of control. Ca^{++} concentration is 13.5 mM.

mM K^+ , 80 mM K^+ であり, Zachar and Zacharova⁴⁾ のその curve の各値は 12 mM K^+ , 30 mM K^+ を示し, その差の原因は前節で指摘した. なお, カエル筋^{5,6,9,11,12)} で示された half max. value は 38~48 mM K^+ で本実験もその範囲内にあるが, max. value は 40~60 mM K^+ で本標本の値は 80 mM K^+ と多少高 K^+ 濃度側にずれていた. しかしザリガニ筋において activation が 80 mM K^+ 付近で max. value を得ることから, カエル筋とのその差は余り問題にならないと思われる.

また, 両 curve の交点は 0.65 付近にあった. この値は Zachar and Zacharova⁴⁾ がザリガニ筋で示した 0.12 の値よりはるか上方に位置していたが, Hogdkin and Horowicz⁵⁾ や Lüttgau⁶⁾ のカエル筋での 0.6, 0.7 の値に近似していた.

3.3 mechanical activation ならびに inactivation に対する外液低 Ca^{++} 濃度の影響

3.3.1 外液低 Ca^{++} 濃度および Ca free 下の conditioning time と inactivation の関係 カエル速筋の Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾ や篠崎・太田¹¹⁾ の成績によると, 外液低 Ca^{++} subthreshold K^+ 濃度下に筋を conditioning すると inactivation の促進がみられるという. まず本実験では正常 K^+ 濃度下に, 外液 Ca^{++} 濃度の減少により inactivation が進行するか否かを精査した (Fig. 4).

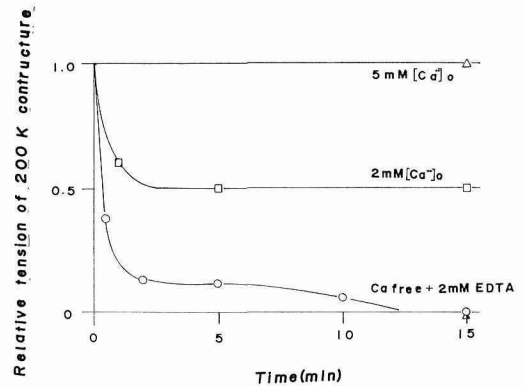


Fig. 4 Change of the peak tension of 200 mM-K contracture after the conditioning of various low calcium concentration.

Abscissa: interval between end of conditioning of various calcium concentration and beginning of test contracture (200 mM K^+). Ordinate: relative amplitude of test contracture including low calcium concentration as compared with the 200 mM-K contracture (13.5 mM Ca^{++}). Same symbols show values from the same fiber.

正常 Ringer 液の Ca^{++} 濃度を試験濃度に減少し, その conditioning の時間経過による 200 mM-K 拘縮の tension height の減少から inactivation を測定した. 5 mM Ca^{++} の場合, 15 分 conditioning しても peak tension は対照と差がなかった. 2 mM に減少すると 1 分, 5 分および 15 分でその tension height は 0.6, 0.5 および 0.5 と, ほぼ 2 分以降 inactivation は一定値を示した. しかし, Ca free + 2 mM EDTA 下では tension height が 15 分で 0 を示し full inactivation の状態を呈した. このように, 外液 Ca^{++} 濃度 2 mM, Ca free 下で inactivation が生じることが知れた.

3.3.2 activation curve ならびに inactivation curve に対する低 Ca^{++} 濃度の影響 本実験では 200 mM-K 拘縮の peak tension に影響を与えない 5 mM Ca^{++} 濃度を使用した. まず標本を 5 mM Ca^{++} 濃度に調製された Ringer 液に 5 分間浸漬し, その後 3.2 と同様な測定を行った.

K 拘縮の activation と inactivation の両 curve は対照 (曲線 1 と 2) のそれらに比し, いずれも左方向に移動した (Fig. 5). activation curve の移動の程度を threshold および half max. value について K^+ 濃度で示すとそれぞれ 5 mM K^+ であり, また inactivation curve の移動の程度を half max. value と max. value について示すと, それぞれ 20 mM K^+ および 50 mM K^+ であっ

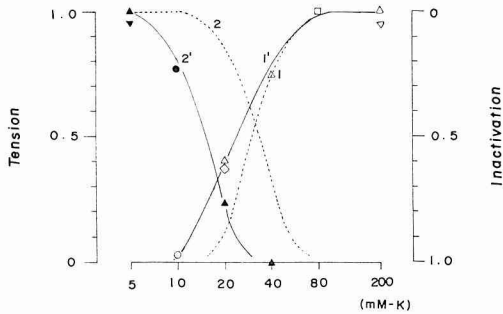


Fig. 5 Effect of low external Ca^{2+} concentration (5 mM) on mechanical activation (curve 1') and inactivation (curve 2'). Scale and various values of abscissa and ordinate in this graph are similar to those of Fig. 3. The fibers were soaked for 5 min in Ringer containing 5 mM Ca^{2+} before application of conditioning solution. Broken lines show the activation curve (1) and inactivation curve (2) of the control illustrated in Fig. 3.

た。また両 curve の交点 0.32 にあり、正常 Ca^{2+} 濃度のそれと比べて明らかに下方に移動したが、これは inactivation curve がより著明に左方に移動したことで説明されよう。

低 Ca^{2+} 濃度下で両 curve がともに左方に移動し、その程度が inactivation でより著明であった点は Franksen-haeusen and Lännergren⁹⁾ と篠崎・太田¹¹⁾ のカエル速筋の成績とよく一致した。

3.3.3 submaximal K^{+} 濃度下 inactivation の time course に対する外液 Ca^{2+} 濃度の影響 前章低 Ca^{2+} 下の inactivation curve における左方向への大きな移動に関し、20 mM $[\text{K}^{+}]_0 \cdot 5 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_0$ 条件下の conditioning time と inactivation の変化を精査した (Fig. 6)。なお、標本は上記実験に入る前に、5 mM Ca^{2+} を含む Ringer 液中に 5 分間浸漬された。

まず、対照として 5 mM $[\text{K}^{+}]_0 \cdot 5 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_0$ と 20 mM $[\text{K}^{+}]_0 \cdot 13.5 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_0$ 条件下に conditioning された筋標本の inactivation の時間経過を表示した。一方 submaximal K^{+} (20 mM) $\cdot \text{Ca}^{2+}$ (5 mM) 濃度下で筋標本を conditioning した場合、対照に比し、第 1 相の inactivation は急速に進行し、一定レベルに達することなく直ちにゆるやかな第 2 相へと移行した。このように低 Ca^{2+} 濃度は第 1 相 inactivation の速度を増し、第 2 相の開始時間を早めるように作用する。以上のことは低 Ca^{2+} 濃度下の inactivation curve の左方向への大きな移動に対し第 1 相および第 2 相 inactivation の著明な変化で説明さ

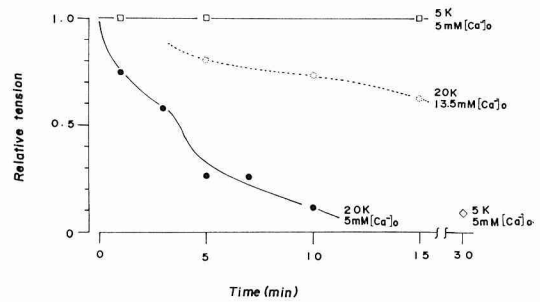


Fig. 6 Effect of low external Ca^{2+} concentration (5 mM) on the time course of inactivation.

Abscissa: interval between end of conditioning of 5 or 20 mM-K solution containing 5 mM Ca^{2+} and beginning of test contracture (200 mM K^{+} , 5 mM Ca^{2+}). Ordinate: relative amplitude of test contracture against the 200 mM-K contracture (13.5 mM Ca^{2+}). Broken line shows the control (20 mM K^{+} , 13.5 mM Ca^{2+}) illustrated in Fig. 2. Same symbols denote values from the same fiber.

れ、この変化はカエル速筋の低 Ca^{2+} 濃度下のその変化^{9,11)} とほぼ等しいと思われる。

なお、イセエビ筋において Gainer¹⁾ は Ca free および Ca free + 2 mM EDTA 下の静止電位が正常 Ca^{2+} 濃度 (24 mM) 下のそれとほぼ等しいと報告していることから、本実験の外液低および高 Ca^{2+} 濃度下の外液 K^{+} 濃度と膜電位の関係は正常濃度下とほぼ等しいとみなされる。

3.4 activation curve ならびに inactivation curve に対する外液高 Ca^{2+} 濃度の影響

Fig. 7 に示すように、外液 Ca^{2+} 濃度を 13.5 mM から 36.5 mM に増加させると、activation および inactivation の両 curve は対照 (曲線 1 と 2) に比し、ともに右方に移動し、その程度は activation curve の threshold および half max. value でそれぞれ 12 mM K^{+} と 18 mM K^{+} 、inactivation curve の half max. value, max. value でそれぞれ 22 mM K^{+} , 20 mM K^{+} であった。また両 curve の交点は 0.6 付近に位置し、正常 Ca^{2+} 濃度下のそれとほぼ等しかった。

これらの成績は Lüttgau⁶⁾、Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾ と篠崎・太田¹¹⁾ のカエル速筋の成績とほぼ一致した。

3.5 200 mM-K 拘縮の time course に対する外液 Ca^{2+} 濃度の影響

まず、正常 Ringer 中に浸漬している筋標本の 200 mM-K 拘縮の全経過を Fig. 8 a に示す。その拘縮は起始

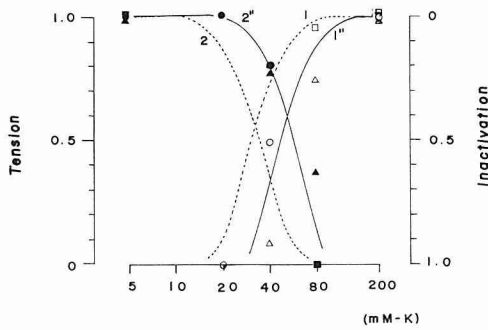


Fig. 7 Effect of higher external Ca⁺⁺ concentration (36.5 mM) on mechanical activation (curve 1') and inactivation (curve 2').

Scale and various values of abscissa and ordinate in this graphy are similar to those of Fig. 3. The fibers were soaked for 5 min in Ringer containing 36.5 mM Ca⁺⁺ before application of conditioning solution.

Broken lines are activation curve (1) and inactivation curve (2) of control illustrated in Fig. 3.

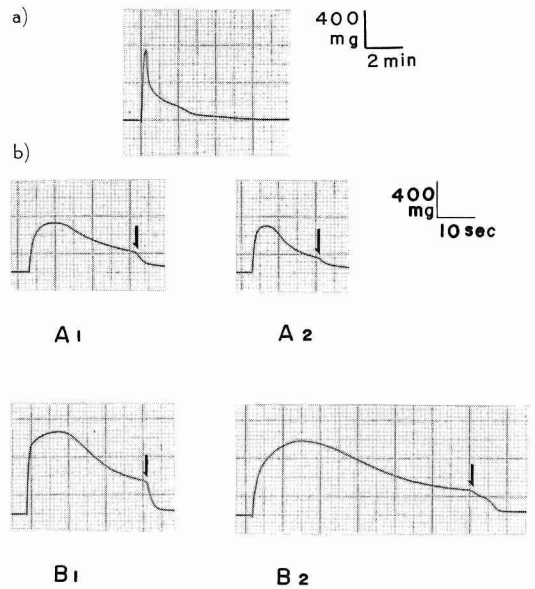
点から half relaxation point までに要する時間が 25 秒であるが、その後、非常に緩慢に弛緩し、拘縮の起始点から完全に弛緩し終るまではほぼ 6 分を要する。Zachar and Zacharova⁴⁾が指摘しているように maximal tension を得る拘縮においてもカエル速筋の様な明瞭な plateau の形状が認められない。

次に、拘縮の時間経過に対する外液 Ca⁺⁺ 濃度の影響を精査した。Fig. 8 b の代表例が示すように、200 mM K⁺ によって惹起された拘縮の peak tension は外液 Ca⁺⁺ 濃度、5 mM および 36.5 mM でほとんど影響されなかったが tension 発生速度および tension の起始点から half relaxation point に要する時間が以下のごとく著明に影響された。すなわち、5 mM Ca⁺⁺ 濃度下の tension 発生速度は 2 倍に増加し、tension の起始点から half relaxation point までの時間は約 0.5 倍に短縮した。これに対し高濃度 Ca⁺⁺ (36.5 mM) 下において前者は 0.6 倍に減少し、後者は 1.6 倍に著明に延長した。

以上の成績はカエル速筋の篠崎・太田¹¹⁾による高・低 Ca⁺⁺ 濃度下の 40 mM-K 拘縮の time course において peak tension の成績を除いてほぼ同様な傾向を示した。

3.6 200 mM-K 拘縮の外液 Ca⁺⁺ 濃度依存性とその性質

すでに Fig. 4 で指摘したように、外液 Ca⁺⁺ 濃度 2 mM では 200 mM-K 拘縮の peak tension は時間に依存して減少する。また、イセエビ筋で Gainer¹⁾は 100 mM-K



Figs. 8 a and b a: whole time course of 200 mM-K contracture containing 13.5 mM Ca⁺⁺. b: effect of alternated external Ca⁺⁺ concentration on the time course of K-contracture (200 mM K⁺). Ca⁺⁺ concentration is 13.5 mM in A₁ and B₁, 5 mM in A₂, and 36.5 mM in B₂. Each of A and B is recorded from the same fiber. A₁ and B₁ show the control against A₂ and B₂, respectively. In the case of A₂ and B₂, the preparations were soaked for 5 min in Ringer containing 5 and 36.5 mM Ca⁺⁺, respectively, before application of 200 mM-K contracture. Arrows show the point that 200 mM K⁺ is washed out with normal Ringer.

拘縮が 0 から 36 mM Ca⁺⁺ 濃度で著明な濃度依存性を示すことを明らかにした。そこで 0 から 135 mM と広範囲の Ca⁺⁺ 濃度で 200 mM-K 拘縮の濃度依存性の性質を精査した (Fig. 9)。

Ca free+2 mM EDTA Ringer 液中に 5 分間浸漬された筋標本が 200 mM K⁺ (Ca free+2 mM EDTA) で作用されても対照に比し、0.1 と低い値を示すにすぎなかった。外液 Ca⁺⁺ 1 mM から 5 mM の濃度範囲において、200 mM-K 拘縮の peak tension は急速に増加し、ほぼ 5 mM 付近で max. value に達した。さらに、5 mM から 36.5 mM の濃度範囲でその peak tension は max. value を維持したが、36.5 mM 以上では逆に減少する傾向をみせ、73 mM, 135 mM で peak tension の値はそれぞれ 0.7, 0.6 と max. value に比し低い値を示した。なお、正常 Ringer+100 mM choline-Cl 条件下に筋を 5 分間浸

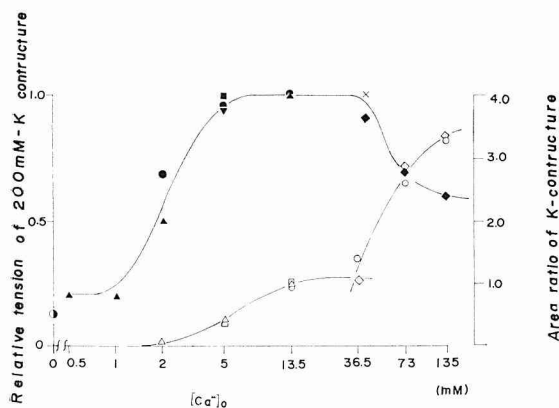


Fig. 9 Relation between 200 mM-K contracture and alternated external Ca^{2+} concentration.

Abscissa: external calcium concentration by a logarithmic scale. Left ordinate: relative amplitude of 200 mM-K contracture affected by various Ca^{2+} concentration against tension of 200 mM-K contracture including 13.5 mM Ca^{2+} . Right ordinate: relative area of 200 mM-K contracture under condition of various Ca^{2+} concentration against area of 200 mM-K contracture is conventionally defined by measuring the osillograpy from the beginning of tension up to the half relaxation point.

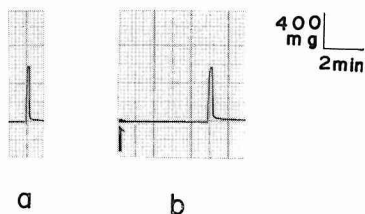


Fig. 10 Effect of 100 mM choline-Cl on 200 mM-K contracture.

a: K contracture (control). b: K contracture under potassium Ringer containing 100 mM choline-Cl. Arrow shows the conditioning point of 100 mM choline-Cl. The contractures of a and b were washed out with normal Ringer after taking the peak tension.

漬し、その後直ちに 200 mM K^{+} + 100 mM choline-Cl 作用による拘縮の tension height を検討したが、choline を含まない対照のそれと差がなかったことから (Fig. 10), 高 Ca^{2+} 濃度下の 200 mM-K 拘縮の peak tension の減少は Ca^{2+} 自身によってもたらされた可能性が強い。このように K 拘縮の peak tension は外液 Ca^{2+} 濃度に応じ

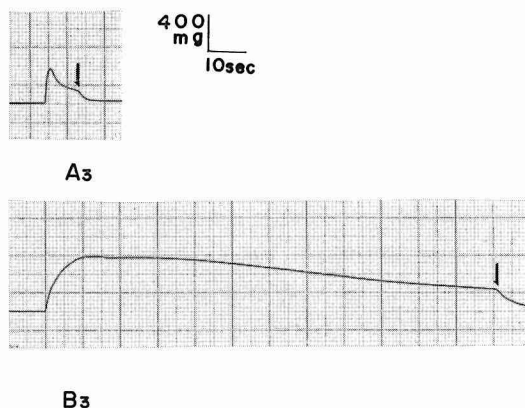


Fig. 11 Effect of alternated external calcium concentration on area of 200 mM-K contractures.

A_3 : K contracture under 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_0$. The osillography of control in A_3 is that of A_1 in Fig. 8. B_2 : K contracture under 73 mM $[\text{Ca}^{2+}]_0$. Control of B_2 is B_1 in Fig. 8 b. Arrows show the point that 200 mM K^{+} is washed out with normal Ringer.

て著明な変化をみせる。

上記実験と並行して、外液 Ca^{2+} 濃度と 200 mM-K 拘縮の面積比との関係を検討した (Fig. 9). まず、本実験は 200 mM-K 拘縮が tension の起始点から half relaxation point まで描いたオシログラフの曲線と基線間に生じた面積を描写した。そして、13.5 mM Ca^{2+} 濃度下のそれを 1 とし各外液 Ca^{2+} 濃度で生じた面積とを重量法で比較した。その結果、外液 Ca^{2+} 濃度 2 mM (Fig. 11), 5 mM (Fig. 8 b) でそれぞれ 0.1, 0.4 の値を示し、13.5 mM 以上 36.5 mM (Fig. 8 b) までのその濃度範囲で 1.0~1.1 とほぼ一定値に達した。しかし、36.5 mM Ca^{2+} 濃度以上で、面積重量比は急速に増大し、73 mM (Fig. 11), 135 mM でそれぞれ 2.7, 3.4 の値を示した。

4 考 察

脊椎動物速筋の興奮収縮連関のしくみは、膜の脱分極にはじまり、それが T-system を介して何らかの形で内部に波及し細胞内の activating Ca^{2+} の上昇をうながし、収縮要素を活性化するという大筋に要約される。また、その activating Ca^{2+} の由来に関し、外液からの Ca influx は定量的に筋の収縮を説明し得ないという事実、あるいはオートラジオグラフィによる Ca^{2+} の局在と移動の形態学的所見から、筋小胞体とその遊離と取り込みの主役を荷っていると考えられている (永井・太田⁷⁾, 参照)。

一方、無脊椎動物筋線維において、Gainer¹⁾ が甲殻類の

イセエビ骨格筋束を用いた ^{45}Ca influx 実験で、K 拘縮を説明し得るに充分な Ca^{2+} の流入を認め、かつその influx Ca^{2+} 量は外液 Ca^{2+} 濃度に依存することを報告した。さらに、軟体動物イガイの前収足筋で同種の実験を試みた Hagiwara and Nagai²⁾ も、K 拘縮に伴い、充分な収縮を起こすに足る Ca の細胞内流入を確かめている。また、Chiarandini *et al.*³⁾ はザリガニ骨格筋の caffeine 拘縮と K 拘縮の関係を精査し、caffeine 拘縮後に K 拘縮が充分生起することから、収縮発現ならびに細胞内 Ca store の補充に対する influx Ca^{2+} の作用を重視している。さらに Chiarandini *et al.*³⁾ と同様著者ら¹³⁾ も Ca spike を抑制するという Mn^{2+} を用いてザリガニ骨格筋の 200 mM-K 縮が 10 mM でほぼ完全に抑制される成績を得ている。このように ^{45}Ca を用いた定量実験ならびに収縮応答の記録を主とした生理学的実験の双方とも無脊椎動物筋線維における influx Ca^{2+} の activating Ca^{2+} としての作用を示唆している。これらのことから、本実験の K 拘縮の諸性質を考察するに際し、Gainer¹⁾ および Hagiwara and Nagai²⁾ らの Ca 流入説の見解に従う。

4.1 K 拘縮の activation ならびに inactivation

ザリガニ骨格筋の K 拘縮はカエル速筋のそれに比し、比較的緩慢ながら一過性であることが知られている^{4,14)}。Zachar and Zacharova⁴⁾ は彼らの成績において、両 process で示された curve の交点が 0.12 と低いことに関し、回復過程の conditioning depolarization による store 内からの activator の再遊離とその遊離機構の inactivation の 2 点を考慮することによって Hodgkin and Horowitz⁵⁾ の第 1 の見解、すなわち両 process は密接な関係のもとに生じ、activation は、ある一定量の activator store から activator が遊離される過程に相当し、inactivation は activation の結果もたらされる store 内の activator の減量により遊離速度が減退して行く過程に相当するという見解を拡張して支持した。Zachar and Zacharova⁴⁾ は full inactivation からの一定時間内の回復の程度をもって inactivation を測定したが、本実験で指摘したように回復過程に速やかな inactivation の進行がみられることから、その測定法で得られた彼らの結論は再検討の余地があるように思われる。

本実験で得られた成績のうち、activation および inactivation curve の交点が 0.5 付近に位置したこと、低 Ca^{2+} 濃度下で inactivation が生じること (activator の枯渇)、高 Ca^{2+} 濃度下の両 curve の交点の位置が対照に比し、それほど変動しなかったことなどは Hodgkin and Horowitz⁵⁾ の第 1 の見解を支持し得るかも知れない。しかし、次の 3 点は第 1 の見解と矛盾する。1) 低 Ca^{2+} 濃度

下の activation および inactivation curve の移動の程度が inactivation のそれにおいてより左方向へ大きく移動したこと。このことは篠崎・太田¹¹⁾ が指摘しているように第 1 の見解の場合、その交点はつねに同じでなければならない。2) 回復過程における subthreshold K^{+} および Ca free 条件下において“activation なしの full inactivation”の現象が生じること。この現象はカエル筋においてすでに指摘され⁹⁾、特に篠崎・太田¹¹⁾ はこのことから第 1 の見解を否定した。3) conditioning depolarization 下で inactivation が 2 相性を示すこと。この 2 相性の性質は第 1 の見解のみでの解釈に不充分であることを示す。以上のことから、ザリガニ骨格筋の K 拘縮の time course を説明し得るのに activator の崩壊 (Ca uptake) を考慮した上で、第 1 の見解のみでは不足であることがわかる。しかし、Hodgkin and Horowitz⁵⁾ の第 2 の見解、すなわち store 内の activator 量が一定に保たれているが activation に対するある inhibitory process が徐々に進行することで inactivation を説明しようとする見解に立つ場合においても同様な困難が生じる。すなわち、ザリガニ骨格筋において低 Ca^{2+} 濃度下で inactivation が生じるという性質 (activator の枯渇)、さらに inactivation の第 1 相と第 2 相がともに activation と全く無関係に生じているという理由がないことである。このようにザリガニ骨格筋の K 拘縮の一過性の性質は Hodgkin and Horowitz⁵⁾ による第 1 と第 2 の一方の見解のみでは説明され得ない現象と思われ、新たな見解を必要とするように思われる。

4.2 本骨格筋の K 拘縮の性質とカエル速筋のそれとの比較

類似点：ザリガニ骨格筋の K 拘縮の性質と、それに対する外液 Ca^{2+} 濃度の影響を検討した本成績はカエル速筋の Hodgkin and Horowitz⁵⁾、Lüttgau⁶⁾、Frankenhaeuser and Lännergren⁹⁾、篠崎・太田¹¹⁾ と Kosaka *et al.*¹⁵⁾ らの成績と次の諸点で一致した。1) activation ならびに inactivation curve における鏡像関係、2) 高・低 Ca^{2+} 濃度下の activation ならびに inactivation curve の移動方向とその程度、3) 高・低 Ca^{2+} 濃度下の K 拘縮の形状変化、4) conditioning K^{+} 濃度下で inactivation が 2 相性を示す性質。このように、activating Ca^{2+} が主として Ca influx に由来するザリガニ筋とそれが主として筋小胞体にあるカエル速筋との間に多くの類似点が認められ得ることは、従来問題にされていた mechanical activation と inactivation の局在に関し、多くの示唆を与えるように思われる。この点についてすでに篠崎・太田¹¹⁾ がカエル速筋で考察しているように Ca influx の

time course が K 拘縮の time course とよく一致していることから、その step で mechanical activation と inactivation が生じている可能性のあること。さらに、T-system を介する Ca influx を特異的に抑制するとされる dantrolene sodium が K 拘縮の activation の抑制ならびに inactivation の促進をもたらすという事実¹⁶⁾とともに本成績も Ca influx の step に activation と inactivation が生じている可能性のあることを支持する。

なお、Ca influx の step がどの部位に局在しているかはカエル速筋で詳細に検討され、特に Oota and Nagai¹⁷⁾は T-disrupted fiber の ⁴⁵Ca influx について検討し、それが主として T-system にあることを明らかにした。さらに、太田 (永井¹⁸⁾, 参照) はカエル筋の T-disruption と同様のことがカニ骨格筋で生じるか否かを検討し、その現象を形態学的に認め、その条件下で caffeine 拘縮が生起するにも拘らず、K 拘縮が抑制されることも指摘した。これらのことは甲殻類骨格筋も Ca influx の step が T-system に局在していることを示唆している。

相異点：前節類似点とは別に本骨格筋の K 拘縮の性質がカエル筋に比し 2, 3 異なっている点もみられる。1) K 拘縮の peak tension が外液 Ca⁺⁺ 濃度の増加に伴い著明な変化をみせること、2) conditioning K⁺ 濃度下の第 2 相 inactivation の進行速度がカエル筋に比し遅いこと、3) Ca free あるいは 2 mM Ca⁺⁺ 濃度・Na⁺ 存在下で K 拘縮の peak tension が 30 秒以内に速やかに減少し始めることである。3) の点に関し、最近 Kosaka *et al.*¹⁵⁾ はカエル速筋で Ca⁺⁺ free・Na⁺ 存在下の K 拘縮の形状ならびに peak tension の変化を精査し 15 分を境にその peak tension が減少することを報告した。このように本骨格筋との間にその減少の開始時間に著しい差のあることが知れる。以上、1) と 3) の相異点は両動物間の興奮収縮連関のしくみの違いを反映しているものと考えられ、ザリガニ骨格筋においては Ca 流入説の証左の 1 つに上げられよう。また、2) の第 2 相 inactivation の進行速度が遅い点はそれが早い速筋の inactivation 2 (Kosaka *et al.*¹⁵⁾, 参照) の step とザリガニ骨格筋の第 2 相 inactivation の step とに相異があるか、もしくは本実験が [Na⁺+K⁺] 一定の条件下のため、脱分極に伴い Cl⁻ が徐々に細胞内に流入し多少の repolarization が生じたためにそれが遅くなったのかなど問題は残される。

4.3 K 拘縮の外液 Ca⁺⁺ 濃度依存性の性質

濃度作用曲線の適否：本成績は低 Ca⁺⁺ 濃度域で K 拘縮の peak tension は著明な濃度依存性をみせ、5 mM [Ca⁺⁺]₀ で maximal value を得ることを示した。この成績は Hagiwara and Takahashi¹⁹⁾ がフジツボ骨格筋の

Ca spike の spike height が外液 Ca⁺⁺ 濃度の増加に伴い、その spike height 増加し、徐々に saturation する現象を濃度作用曲線から解析した研究に対比できるように思われる。しかしながら、彼らの解析が直ちに K 拘縮の tension height に対する解析として使用できない点は Ca spike が外液 Ca⁺⁺ 濃度の増加に伴い、その spike height ならびに立上り速度を増加させるが、K 拘縮は上述した Ca⁺⁺ 濃度域でその増加に伴い tension height を増加させるもののその立上り速度を減少する点にある。しかし、Gainer¹⁾ によって外液 Ca⁺⁺ 濃度の増加に伴い K 拘縮を生起し得る influx Ca⁺⁺ 量も増加するという成績が示されているので、influx Ca⁺⁺ 量が外液高 Ca⁺⁺ 濃度域でその増加と無関係に徐々に saturation の現象をみせれば濃度作用曲線の解析の余地も残される。そこで著者らは Hodgkin and Horowicz⁵⁾ がカエル速筋で mechanical inactivation を測定するのに、190 mM-K 拘縮が描いた面積を activating Ca⁺⁺ 量として相対的にとらえようとした点に注目し、activating Ca⁺⁺ が主として influx Ca⁺⁺ による本骨格筋において、外液 Ca⁺⁺ 濃度と 200 mM-K 拘縮の面積との間の関係を検討してみた。その結果、外液 Ca⁺⁺ 濃度 13.5 mM~36.5 mM の範囲でその面積比が一定値に達することが知れた。このことは本骨格筋において、外液 Ca⁺⁺ 濃度 13.5 mM 以上でその増加と無関係に一定量の Ca⁺⁺ が細胞内に流入していないことを示唆している。この K 拘縮に寄与する influx Ca⁺⁺ 量の saturation の現象は、Hagiwara and Takahashi¹⁹⁾ が Ca spike height の saturation から濃度作用曲線の解析をほどこし、そして spike に寄与する Ca⁺⁺ の receptor の概念を適応できたことと同様に、本実験においても K 拘縮に寄与する influx Ca⁺⁺ に対し、濃度作用曲線の解析が可能で、influx Ca⁺⁺ に対する receptor の概念の適応も可能と思われる。しかし、この点に関しては外液 Ca⁺⁺ 濃度に応じた ⁴⁵Ca influx 実験により、定量的に明らかにされた成績に対して濃度作用曲線の解析をほどこすべきであろう。

以上のように、K 拘縮に寄与する influx Ca⁺⁺ の receptor の存在が示唆されるが、ここでフジツボ骨格筋でみられた Ca spike に寄与する Ca⁺⁺ の receptor との異同が問題になる。この点に関し、本実験の各外液 Ca⁺⁺ 濃度下における K 拘縮の変化と、Hagiwara and Takahashi¹⁹⁾ の Ca spike の成績とを Ca⁺⁺ 濃度で比較する必要がある。両成績で注目すべき相異は K 拘縮の tension height および面積比が saturation をみせるその外液 Ca⁺⁺ 濃度は 5~10 mM であるが、Ca spike height が saturation をみせるそれは 100 mM と 10 倍ほどの高濃度を示している点である。この相異は Ca⁺⁺ がある receptor に対する

結合恒数が同じであると仮定した場合、K 拘縮の面積比は外 Ca^{2+} 液濃 100 mM 度付近まで比例関係がなくてはならず、本成績の 10 mM 付近でのその曲線の saturation を説明し得ない。このことから、K 拘縮に寄与する Ca^{2+} の receptor に対する結合恒数と、Ca spike に寄与する Ca^{2+} の receptor に対するそれとの間に相違のあることが示唆され、それらの receptor の局在が同一でも Ca^{2+} の吸着 site に違いがあることを意味し、機能的な相異を示唆しうるかも知れない。

興奮収縮連関における Ca^{2+} の生理的意義：通常、甲殻類骨格筋の収縮応答は graded response を示すとされている。このことは Hagiwara and Takahashi¹⁹⁾ の実験が細胞内 Ca^{2+} 量を任意に低下し all or none の Ca spike を生起させていることから、生理的にはそれが認められないことを示唆している。そこで、彼らもこの点に注意し、Ca spike に寄与する Ca^{2+} の生理的意義を以下のごとく指摘している。彼らの成績において、外液 Ca^{2+} 濃度の増加に伴い Ca spike height が増加し、saturation する現象と並行して spike に対する threshold も positive 側に増加し、100 mM Ca^{2+} 濃度以上で saturation し始めることにほぼ対応することから、Ca spike に寄与する Ca^{2+} は生理的には主として stabilizing action を示すと考えている。

一方、本実験のような K^{+} 作用下に生起する拘縮は生理的な拘縮のモデルとされているので、本成績で議論した influx Ca^{2+} は Ca spike の Ca^{2+} と機能的な面からも区別されうるものである。上述したように、Ca spike の Ca^{2+} は K^{+} 作用下にも膜に吸着しており、その stabilizer としての作用が K 拘縮の諸性質に反映しうる可能性がある。このことは本成績のうちで、外液 Ca^{2+} 濃度の増加に伴い K 拘縮の threshold の上昇、立上り速度の減少、ひいては高 Ca^{2+} 濃度下の peak tension の低下ならびに面積比の諸変化をもたらしているものと考えられる。

このように、 Ca^{2+} に対し、2つの吸着 site がありその互いは機能的な相異をもち、一つは前節の考察から、T 膜に存在し、主として activating Ca^{2+} としての機能をもち他方、もう一つは筋表面膜・T 膜に存在し、生理的には主として stabilizing action としての機能を有していると考えられる。

稿を終えるに臨み、御校閲下さった本学第一生理学講座永井寅男教授に深謝いたすとともに御助言下さった同講座高氏昌講師、太田勲助手、小坂功助手ならびに御協力いただいた本研究所周島、雨森両嬢に感謝いたします。

文 献

- Gainer, H.: The role of calcium in excitation-contraction coupling of lobster muscle. *J. Gen. Physiol.* **52**, 88-110 (1968).
- Hagiwara, E. and Nagai, T.: ^{45}Ca movements at rest and during potassium contracture in *Mytilus* ABRM. *Jap. J. Physiol.* **20**, 72-83 (1970).
- Chiarandini, D. J., Reuben, J. P., Girardier, L., Katz, G. M. and Grundfest, H.: Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. II. Refractoriness and factors influencing recovery (repriming) of contractile responses. *J. Gen. Physiol.* **55**, 665-687 (1970).
- Zachar, J. and Zacharova, D.: Potassium contractures in single muscle fibers of the crayfish. *J. Physiol.* 596-618 (1966).
- Hodgkin, A. L. and Horowicz, P.: Potassium contracture in single muscle fibres. *J. Physiol.* **153**, 386-403 (1960).
- Lüttgau, H. C.: The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. *J. Physiol.* **168**, 679-697 (1963).
- 永井寅男, 太田 勲: 興奮収縮連関の問題点, 一特にカルシウムイオンの役割について一. *札幌医誌* **43**, 394-406 (1974).
- Chiarandini, D. J., Reuben, J. P., Brandt, P. W. and Grundfest, H.: Effects of caffeine on crayfish muscle fibers. I. Activation of contraction and induction of Ca spike electrogenesis. *J. Gen. Physiol.* **55**, 640-664 (1970).
- Frankenhaeuser, B. and Lännergren, J.: The effect of calcium on the mechanical response of single twitch muscle fibres of *Xenopus laevis*. *Acta Physiol. Scand.* **69**, 242-254 (1967).
- Curtis, B. A.: The recovery of contractile activity following a contracture in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **47**, 953-964 (1964).
- 篠崎文彦, 太田 勲: カエル twitch muscle fiber の K-contracture について—Mechanical activation と inactivation の関係—. *札幌医誌* **45**, 41-50 (1976).
- Lüttgau, H. C. and Oetliker, H.: The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. *J. Physiol.* **194**, 51-74 (1968).
- 高橋延昭, 高橋正樹: ザリガニ単一骨格筋線維の K 拘縮に対する数種の 2 価カチオンの影響 (未発表).
- Matsumura, M.: Electro-mechanical coupling in crayfish muscle fibers examined by the voltage

- clamp method. *Jap. J. Physiol.* **22**, 53-69 (1972).
15. Kosaka, I., Oota, I., Suzuki, T. and Nagai, T.: Time and Na-dependent effects of Ca depletion on potassium contracture in frog twitch muscle fiber. *Jap. J. Physiol.* **27**, 511-524 (1977).
16. 高氏 昌, 永井寅男: Dantrolene による K 拘縮の inactivation の促進. *日本生理誌* **39**, 285 (1977).
17. Oota, T. and Nagai, T.: Effect of T-disruption on radiocalcium influx in frog sartorius muscle. *Proc. Int. Union Physiol. Sci. New Delhi*, **11**, 248 p (1974).
18. 永井寅男: 筋の生理学. 朝倉書店, 東京 (1974).
19. Hagiwara, S. and Takahashi, K.: Surface density of calcium ions and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane. *J. Gen. Physiol.* **50**, 583-601 (1967).