

ほたて貝柱筋肉の Cholinesterase, Adenosinetriphosphatase 及び Acid Labile Phosphate に就いて

宮崎 英策 大江 正純 湯田坂八重子
今野 章 水原 良樹 伊藤 登
札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

On the Cholinesterase, Adenosinetriphosphatase Activity and Acid Labile Phosphate of Pecten Muscle

By

EISAKU MIYAZAKI, MASAZUMI ŌE, YAEKO YUTASAKA,
AKIRA KONNO, YOSHIKI MIZUHARA & NOBORU ITO.

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine.
(Chief: Prof. TORAO NAGAI)

I. 緒 言

近年 A. Szent-Györgyi 一派¹⁾²⁾ により筋蛋白質中その収縮に密接に関係するといわれる contractile protein (actin, myosin, actomyosin) の研究に於て劇的な発展が示され、筋収縮単位として actomyosin が取りあげられている。Szent-Györgyi によると筋収縮は adenosinetriphosphate (以下 ATP と略す) の添加により actomyosin の荷電を変える結果収縮を生じ、次いで myosin に附着している所の protin が ATP 分解酵素 (adenosinetriphosphatase, 以下 ATPase と略す) として働いて ATP を分解し、ATP から phosphate が分離する時の energy を以て弛緩するといわれている。又 acetylcholine (以下 Ach と略す) が神経の興奮傳導の化学的傳達者としての役割³⁾ の外、局所的に組織の活性度を調節する物質即ち「局在ホルモン」⁴⁾ としても重要な役割を演ずる事が唱えられている。

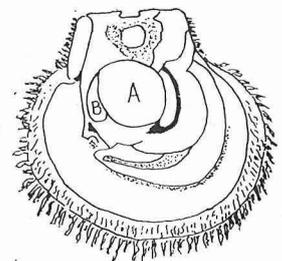
ほたて貝 (Pecten, yessensis Jay) の閉殻筋は機能を異にする筋、即ち第 1 図の如く large striated muscle (以下 L.S.M. と略す) と、smaller smooth

muscle (以下 S.S.M. と略す) との 2 種に區別され、前者は骨格筋的構造を有して殻の開閉運動を司り、後者は平滑筋的構造を有して閉殻後の「支え機能」に與るものである事が知られている⁵⁾。他種の貝類にては 1 個の貝柱筋中に混在しているが、ほたて貝にては両者が分離して存在しているので両者の生化学的研究を行うに好適の材料である。従来ほたて貝筋肉の解剖学的形態学的な研究はなされてはいるが、その生化学的な研究は全く無い。先に教室の横山⁶⁾ が actomyosin の精度の立場より研究したが、吾々は以上の如き観点から両筋の機能及び構造上の差異を生化学的な性質の面から追究せんとして以下の実験を行つた。

II. 実験方法

A. 実験材料

捕獲地が実験室と可成り地理的に離れているため、季節も 8 月で輸送期間 (10 時間余) に死滅するものがあつたので、生死の判別



第 1 図

A: L.S.M. B: S.S.M.

1) Szent-Györgyi: Chem. of Muscl. Contract. (1947).
2) Szent-Györgyi: Nature of Life (1948).
3) Dale: J. Physiol., 87, 394 (1936).

4) Burn: Physiol. Rev., 30 (2), 177 (1950).
5) Uexküll: Zeitschr. of Biol., 58, 22 (1912).
6) 横山 稔: 札幌医大紀要, 2 (5・6), 259 (昭27).

は開殻後針にて筋を刺戟し、速かに閉殻運動を行い、且つそれが可成り長時間閉殻しているものを選んだ。生存を確かめた材料を貝殻より取り出し、L.S.M. と S.S.M. とに分けた。

B. 実験方法

1) Cholinesterase 測定法

i) 酵素液：4~5箇のほたて貝より両筋を各貝より同量宛採り、蒸溜水で軽く洗つて濾紙で充分に水を取り去り、次いで秤量し精製金剛砂を加えて乳鉢で磨碎し、Ringer 氏液を L.S.M. は 1.0 cc 中組織 0.025 g, S.S.M. は 1.0 cc 中組織 0.125 g 含有する様に加えて氷室に 10 時間放置して抽出し、次に 3000 回 30 分遠心沈澱、次いで濾過し、その濾液を実験に供した。

ii) 測定法及び測定条件：Warburg 装置を用いる Ammon 氏法⁷⁾で測定した。測定に当つては、基質濃度による特異性決定の爲には、容器の主室に酵素液 4.0 cc, 側室に塩化 Ach-Ringer 氏液 1.0 cc (Ach 量を終濃度 0.025 M と 0.0025 M の 2 段階に分けた) を入れる。両液は予め 5% 炭酸瓦斯と 95% 窒素瓦斯の混合瓦斯で 10 分間通氣しておく、瓦斯腔も此の混合瓦斯で充填した。恒温槽の水温は 37.5°C (±0.02°C), 振盪回数は毎分 90 内外、圧が平衡に達してから (約 10 分間) 側室の内容を完全に主室に移して混合させ、10 分毎に圧の変化を読み、対照には酵素液の代りに Ringer 氏液を用いたものをとり Ach 自解量を以て補正した。斯くして 30 分間の炭酸瓦斯発生量を測定し酵素活性度とした。両筋の酵素活性度比較の爲には上記条件に於て Ach 終濃度 0.0025 M になる様にし、其の他は上述と同条件で測定した。用いた Ringer 氏液の組成は次の如くである。

9.0 g/l NaCl 液	100 cc (終濃度	0.124 M)
11.5 g/l KCl 液	2 cc (終濃度	2.48×10^{-3} M)
13.0 g/l NaHCO ₃ 液	20 cc (終濃度	2.4×10^{-2} M)
12.2 g/l CaCl ₂ 液	2 cc (終濃度	1.77×10^{-3} M)

2) ATPase 測定法

i) 酵素液：蒸溜水抽出液は 1.0 cc 中組織 0.1 g, Herbst 氏液抽出液は 1.0 cc 中組織 0.05 g 含有する様に加え、他は前述の 2) i) と同じ方法で作製す。用いた Herbst 氏液の組成は次の如くである。

全液量 100 cc に対し

NaCl	3.0 g (終濃度	0.513 M)
KCl	0.08 g (終濃度	0.107 M)

MgSO ₄	0.66 g (終濃度	0.548 M)
NaHCO ₃	0.05 g (終濃度	0.0595 M)
CaCl ₂	0.13 g (終濃度	0.117 M)

ii) 測定法及び測定条件：酵素液 0.25 cc, ベロナール緩衝液 0.5 cc (最終 pH 8.0 にす), 蒸溜水 0.25 cc (無機塩の影響を見る場合に此の蒸溜水の代りに各無機塩溶液を用いた) を混ぜて 38°C 5 分間温浴、次いで ATP 液 0.5 cc (終濃度 1.3×10^{-3} M) を加えて 38°C 30 分間温浴し、次いで三塩化醋酸 3.5 cc (終濃度 5% になる如くす) を加えて反応を停止させた。次いで濾過、その濾液 1.0 cc を採つて中和、水を加えて全量 6.0 cc となし、無機磷を Bodansky 氏法⁸⁾で呈色し、Pulfrich's Photometer (Küvette 1.0 cm Filter S-72) で測定した。総無機磷量より ATP 自家分解量と組織無機磷量を減じて酵素活性度とした。ATP は Szent-Györgyi の方法⁹⁾により家兎筋肉から抽出し、Kerr の方法⁹⁾に従い純度 68% の Ba 塩を用いた。使用時には ATP-Ba 塩を蒸溜水で溶かし Na 塩として用いた。

3) Acid Labile Phosphate 定量法

-20°C の低温室で数箇のほたて貝より同量宛両筋を採つて総量 2.0 g とし、凍らせてある 10% 三塩化醋酸 20.0 cc の中に入れ精製金剛砂を加えて磨碎、-5°C の低温室で 10 分間抽出し、次いで濾過、その濾液 2.5 cc 採つて Borbír & Szent-Györgyi の方法¹⁰⁾に従い定量した。此の方法で定量したのを Szent-Györgyi は ATP として記載しているが、此の方法では ATP の外に adenosinediphosphate も測定していると思われるので吾々は acid labile phosphate (以下 7P と略す) として記載した。

4) 組織無機磷測定法

上記 2) i) の酵素液 1.0 cc に三塩化醋酸 4.0 cc (終濃度 5% にす) 加え、10 分間放置後濾過し、その濾液 2.0 cc を採つて中和し、蒸溜水を加えて全量 6.0 cc にし、Bodansky 氏法⁸⁾で呈色し、Pulfrich's Photometer を用いて測定した。

III. 実験成績

1) 両筋の ChE 特異性と分布

L.S.M. は組織 0.1 g 当り、S.S.M. は組織 0.5 g 当りの Ach 終濃度 0.025 M と 0.0025 M に於ける 30 分間の発生炭酸瓦斯量を示すと第 1 表の如く両筋共に 0.0025 M に於ける活性度が 0.025 M に於けるより高くなつてゐる。今野¹¹⁾に従い比活性度 (比活性度 (RA) = $\frac{0.025 \text{ M に於ける ChE 値}}{0.0025 \text{ M に於ける ChE 値}}$)

7) Ammon: Pflüg. Arch. f. d. Ges. Physiol., **233**, 486 (1934).

8) Bodansky: J. Biol. Chem., **99**, 197 (1932), **101**, 93 (1933).

9) Kerr: J. Biol. Chem., **139**, 121 (1941).

10) Borbír and Szent-Györgyi: Biol. Bull., **96**, 162 (1949).

11) 今野 章: 札幌医大紀要, **2**(5・6), 254 (昭27).

を求めると L.S.M. も S.S.M. も 0.65 となつた。尚両筋の活性度は第 2 表の如く L.S.M. は S.S.M. より約 10 倍活性度が高くなつた。

第 1 表 Ach 濃度による ChE 活性度

筋肉名	Ach 濃度	CO ₂ 量 (mm ³)		RA
		例 数	平 均	
L.S.M.	0.025 M	44.5	46.6	0.65
		42.2		
		53.2		
L.S.M.	0.0025 M	63.8	71.2	0.65
		70.9		
		78.8		
S.S.M.	0.025 M	24.4	21.6	0.65
		19.2		
		21.3		
S.S.M.	0.0025 M	36.5	33.0	0.65
		32.2		
		30.3		

第 2 表 ChE 分布

実験番号	組織 0.1 g 当り 發生 CO ₂ 量 (mm ³)	
	L.S.M.	S.S.M.
1	63.8	7.3
2	70.9	6.4
3	78.8	6.1
4	90.3	9.3
5	96.7	8.5
平均	80.1	7.5

[組織 0.1 g, Ach 終濃度 0.0025 M, 37.5°C 30 分間温浴]

2) ATPase 分布

両筋各々 0.1 g 当り 30 分間に於ける ATP 分解遊離無機燐量を γ を以て示すに第 3 表の如く水抽出液では L.S.M. と S.S.M. の間には殆んど差は無いが, Herbst 氏液抽出液

第 3 表 ATPase 分布

実験番号	蒸留水抽出 0.1 g 当り 分解遊離無機燐量 (γ)		Herbst 氏液抽出 0.1 g 当り 分解遊離無機燐量 (γ)	
	L.S.M.	S.S.M.	L.S.M.	S.S.M.
1	217.3	210.6	632.0	133.3
2	157.0	116.6	620.0	102.7
3	129.2	106.6		
4	112.3	101.2		
平均	154.0	133.8	626.0	118.0

[組織 0.0125 g, ATP 終濃度 1.3×10^{-3} M, pH 8.0, 38°C 30 分間温浴]

では L.S.M. の活性度が S.S.M. の約 5 倍高い値を示した² 又個体差が著しかつた。

3) 7P 量

両筋各々 0.1 g 当り 7P 量を γ を以て示すに第 4 表の如く L.S.M. は S.S.M. より約 2 倍量多く含有す。又個体差が著しかつた。

第 4 表 7P 含有量

実験番号	組織 0.1 g 当り 7P 量 (γ)	
	L.S.M.	S.S.M.
1	303.6	203.6
2	422.0	193.8
3	263.6	120.0
4	198.0	80.2
平均	296.8	149.4

4) 組織無機燐量

両筋各々 0.1 g 当り無機燐含有量を γ を以て示すに第 5 表の如く 7P 量と同じく組織無機燐量も L.S.M. は S.S.M. より約 2 倍量多く含有す。又個体差が著しかつた。

第 5 表 組織無機燐含有量

実験番号	組織 0.1 g 当り無機燐含有量 (γ)	
	L.S.M.	S.S.M.
1	133.2	62.4
2	115.6	81.2
3	109.3	67.3
4	108.0	34.3
5	96.3	38.6
平均	112.5	56.8

5) ATPase に及ぼす無機燐の影響

両筋の ATPase に対し検圧法指定 Ringer 氏液中の濃度の CaCl₂ 及び CaCl₂ と同濃度の MgCl₂ と, 人工海水といわれる Herbst 氏液中の濃度の CaCl₂ 及び MgCl₂ の影響を見るに, 無機燐を入れない場合の ATPase 活性度を 100% とし, 無機燐を入れた場合の活性度を比活性度で表わすに第 6 表の如くである。

i) 蒸留水抽出液: 本酵素液に於ては L.S.M. は CaCl₂ の濃度が高まるにつれて活性化されているが, S.S.M. では CaCl₂ により殆んど影響を受けていない。斯くの如く水抽出 ATPase は CaCl₂ に対し両筋は異なつた傾向を示した。MgCl₂ により両筋共濃度の高まるにつれて活性化されているが, L.S.M. は S.S.M. よりも非常に強く活性化されている。

第6表 ATPase に及ぼす $MgCl_2$ 及び $CaCl_2$ の影響

塩濃度	蒸溜水抽出液相対活性度 (%)		Herbst氏液抽出液相対活性度 (%)	
	L.S.M.	S.S.M.	L.S.M.	S.S.M.
0.00177 M $CaCl_2$	120	92		
0.117 M $CaCl_2$	160	100	70	50
0.234 M $CaCl_2$			50	26
0.00177 M $MgCl_2$	170	140		
0.55 M $MgCl_2$	420	180	100	162
1.096 M $MgCl_2$			100	162

[無機塩入れざる場合の ATPase 活性度を 100% とす。]

ii) Herbst 氏液抽出液：本酵素液に於ては両筋の ATPase は共に $CaCl_2$ の濃度が高まるにつれて活性度は抑制されているが、S.S.M. の方がより強く抑制されて行くのが見られた。 $MgCl_2$ に対しては L.S.M. は影響無く、S.S.M. は活性化されて居り、0.55 M 以上になつても活性化されたまま一定である。L.S.M. と S.S.M. の ATPase は $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ に對し以上の如く明かに異つた傾向を示した。

IV. 総括並びに考按

1) ChE 特異性並びに分布

吾々の成績を総括すれば、貝柱筋は特異的 ChE を含む。ChE の活性度は L.S.M. は S.S.M. より約 10 倍の高値を示した。又哺乳動物の臓器と比較すれば、若林等¹²⁾はモルモットの小腸は 317、心筋は 31 なる事を報じている。L.S.M. は 80.1、S.S.M. は 7.5 で、L.S.M. は小腸の約 1/4、心筋の約 2 倍半、S.S.M. は小腸の約 1/40、心筋の約 1/4 である。従来 ChE は特異的と非特異的のに分けられて居り、その特異性決定に當つては特殊の基質及び抑制剤が用いられてるいが、教室の今野¹¹⁾は之等の特殊の薬剤を使用しなくても Ach 終濃度 0.025 M と 0.0025 M での両者の分解度より分けられる事を報告している。今野によれば RA が 1 より大なる組織は非特異的 ChE を多く含み、RA が 1 より小なる組織は特異的 ChE を多く含んでいる事を明らかにしている。吾々の場合 L.S.M. も S.S.M. も共に 0.65 で 1 より小さく、従つて之

等の筋は共に特異的 ChE を多く含んでいる組織であることを示すものである。Nachmansohn¹³⁾に従つて ChE の多い所 Ach も多量にあるとすれば L.S.M. は S.S.M. より Ach を多量に含み、之等は又「局在ホルモン」としても筋の活動と緊張を統御しているものであらうと考えられる。何れにしろ之等両筋の ChE が何れも特異的 ChE が主であり且つ機能的に活動的な L.S.M. の方が S.S.M. より ChE の遙かに多い事は両筋の機能上より見て興味ある事と思われる。

2) ATPase 及び 7P

i) 分布

吾々の成績を総括するに 7P 量は L.S.M. は S.S.M. より約 2 倍量多く含有し、一方 ATPase 活性度は、水抽出液に於ては L.S.M. と S.S.M. の間に殆んど差は無いが、Herbst 氏液抽出液では L.S.M. の活性度は S.S.M. のその約 5 倍高かつた。

水抽出液での ATPase 活性度を大江¹⁴⁾による犬の骨格筋、小腸平滑筋の水抽出 ATPase の成績と比較するに、L.S.M. は 154.0 γ 、S.S.M. は 133.8 γ で骨格筋の 40.5 γ の約 3 倍半、腸平滑筋の 332.4 γ の約半分の活性度を示した。

7P 量を大江¹⁴⁾による犬の骨格筋、小腸平滑筋についての成績と比較するに L.S.M. は 296 γ 、S.S.M. は 149.4 γ であり、腸平滑筋は 161 γ 、骨格筋は 410.3 γ で S.S.M. の量は犬の小腸平滑筋とほぼ等しく、L.S.M. は犬の骨格筋の約 7/10 であつた。然し大江の犬についての実験で ATPase 活性度と 7P 量との相關々係が逆になつてゐるのにほたて貝ではそれが平行している事は興味ある事と思われる。

ii) 無機塩による影響

水抽出液に於て L.S.M. の ATPase は Herbst 氏液濃度の Ca^{++} により活性化されるが S.S.M. は殆んど影響無く、又 Herbst 氏液濃度の Mg^{++} による影響は、前者は後者よりも約 2 倍以上活性化された。即ち L.S.M. は Ca^{++} 、 Mg^{++} に対して活性化されるが S.S.M. は Mg^{++} のみ活性化され而

12) 若林・佐藤：生化学, 21(2), 81 (1949).

13) Nachmansohn, Coates and Cox: J. Gen. Physiol.,

25, 75 (1941).

14) 大江：札幌医大紀要 (印刷中).

もその度合は L.S.M. に比して弱い。従来 ATPase は Swanson¹⁵⁾ によれば数種類あるものとされている。又 Szent-Györgyi¹²⁾ によれば Myosin ATPase は Ca^{++} により賦活され、 Mg^{++} で抑制を受ける事を報告しているが之に対する反対も多い。吾々の報告においても Ca^{++} 、 Mg^{++} 両者により活性化される現象を犬の筋肉において見ている¹⁴⁾。Szent-Györgyi¹⁶⁾ 等は又兎のグリセリン処理筋肉の ATPase は 0.1M KCl の存在では Mg^{++} により活性化され、多量の KCl では反対の結果を得ている。蒸溜水抽出 ATPase は Myosin ATPase と等しいが、それと Herbst 氏液抽出 ATPase は等しきか否かは不明である。吾々の成績で水抽出 ATPase は両筋の間に殆んど差異無いのに Herbst 氏液抽出 ATPase では L.S.M. の方が活性度が高いのは無機塩による影響の爲と思われる。横山⁶⁾ によると、ほたて貝柱筋 actomyosin の ATP による粘度変化は季節により差ある事を報じているが、吾々の8月に採取した材料についてのみ行つたものである。何れにせよほたて貝柱筋の ATPase のイオン効果を見ると明らかに両筋に含有される ATPase の酵素学的性質が異なる事を思われ、両筋の機能の差からして意義あるものであろう。今後更に両筋の ATPase を分離し酵素化学的研究を行つてみる必要がある。

3) 無機燐分布

吾々の成績では L.S.M. は S.S.M. の約2倍量多かつた。大江¹⁴⁾ の犬についての骨格筋、小腸平滑筋の無機燐含量と比較するに、L.S.M. は 112.5 γ 、S.S.M. は 56.8 γ であり、骨格筋は 95.8 γ 、小腸平滑筋は 117.5 γ で L.S.M. は腸平滑筋とほぼ等しく骨格筋よりやや多い。S.S.M. は骨格筋、腸平滑筋の約半分量である。即ち犬に於て無機燐量は腸平滑筋が骨格筋より多いのに、ほたて貝では逆に骨格筋的な L.S.M. の方が平滑筋的な S.S.M. より多かつた。之は犬の腸平滑筋に於ては混在する腸粘膜が吸収の化学過程を司る関係から多量の無機燐を含有するに反し、S.S.M. には大きな物質代謝

の変化が行われ無い爲にその含有量も少ないのであろうと考えられる。

以上の結果より L.S.M. に於ては S.S.M. より遙に物質代謝が旺盛なる事を示し、7P、ATPase 及び無機燐の多量なる事からして特に糖代謝系列の大なるを思わしめる。此の事は L.S.M. が貝殻を開く力に対して抵抗し、張力を発生して収縮するが、S.S.M. は収縮状態で筋内にある張力を保ち外からの力に対抗する即ち「支え機能」に與り、此の支え機能に於ては張力を保つには殆んど物質代謝も安静時と変り無く、従つて疲労する事も電氣的変動も殆んど無いと言われていること¹⁷⁾ からみて普通の筋収縮の機序と異なる過程があると思われ、その解明の一端としても興味ある成績と思われる。教室の横山⁶⁾ は両筋の actomyosin の粘度は夫々哺乳動物の actomyosin では見られぬ特異な現象を示す事を報告している。又高等動物の平滑筋では収縮機能と共に「支え機能」が働くのに、此の様な下等動物では支え機能が純粹に現われる。従つて横山の観察した特異な現象を解明する上からも、又平滑筋機能を明らかにする上からも今後ほたて貝柱筋に関する斯かる生化学的研究は増々重要であらう。

V. 結 論

- 1) ほたて貝柱の L.S.M., S.S.M. は特異的 ChE を含む。
- 2) L.S.M. の ChE 活性度は S.S.M. のその約10倍高い。
- 3) 両筋の ATPase は質的に差異あるもの様である。
- 4) L.S.M. は S.S.M. より ATPase, 7P 及び無機燐を多量に含む。

稿を終るに当り、材料採取に御援助を戴いた佐呂間村、菊地周藏氏並びに、佐呂間湖漁業組合の方々に感謝の意を表わす。

15) Swanson: J. Biol. Chem., 192 (2), 577 (1951).

16) Sarkar, Szent-Györgyi and Varga: Enzymologia,

14, 267 (1950).

17) 名取禮二: 筋生理学, 169 (1951).

Summary

We have measured cholinesterase (by Ammon's method), adenosintri-phosphatase activity and acid labile phosphate (Borboró and Szent-Györgyi's method) of pecten muscle obtained in August and have obtained the following results.

- 1) Large striated muscle (L.S.M.) and smaller smooth muscles (S.S.M.) contained true cholinesterase.
- 2) The cholinesterase activity of L.S.M. was about 10 times more than that of S.S.M..
- 3) It seems that adenosintri-phosphatase of L.S.M. was different from that of S.S.M. in quality as a result of observing the influence of inorganic salts.
- 4) L.S.M. had a higher adenosintri-phosphatase activity, contained more acid labile phosphat eand inorganic phosphate than S.S.M..