

■原 著■

X-線マイクロアナリシスによるムラサキイガイ前足糸牽引筋の 形質膜内表面 Ca 局在に関する研究

鈴木季直^{1,2,3} 濱元千絵子¹ 柴山理恵²

X-ray Microanalysis Studies on the Calcium Localization along the Inner Surface of Plasma Membranes in the Anterior Byssus Retractor Muscle of *Mytilus edulis*

Suechika Suzuki^{1, 2, 3}, Chieko Hamamoto¹ and Rie Shibayama²

¹ Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika@info.kanagawa-u.ac.jp

Abstract: To investigate the role of plasma membranes in the regulation of intracellular Ca translocation in smooth muscles, the intracellular Ca localization in the anterior byssus retractor muscle (ABRM) of *Mytilus edulis* was examined by the quantitative X-ray microanalysis of cryosections. When the spot analysis was carried out successively along the plasma membrane in the cryosections of resting ABRM fibers, significant amounts of Ca (~8 mmol/kg dry wt) were frequently detected, although in some cases the Ca concentration was negative. Averaged Ca concentration detected was approximately 3.0 mmol/kg dry wt (n=25), while the Ca concentration was negligible at the myoplasm. By the pyroantimonate method including the semi-quantitative X-ray microanalysis, the intracellular Ca localization and its translocation during the contraction were also observed. These results indicate that, in the ABRM fibers, the plasma membranes accumulate Ca on their inner surface, and release Ca to cause contraction.

Keywords: ABRM of *Mytilus edulis*, intracellular Ca localization, plasma membrane, X-ray microanalysis of cryosection, pyroantimonate method

序論

筋肉の収縮と弛緩は細胞内 Ca 濃度の増減によって調節されており、平滑筋では、細胞内 Ca 濃度の増加は、細胞内 Ca 貯蔵構造からの Ca 遊離や細胞外からの Ca 流入によって引き起こされる。収縮をひきおこす Ca (活性化 Ca) の細胞内貯蔵構造として一般に考えられるのは筋小胞体であるが、その一方で、多くの平滑筋の形質膜内表面は Ca 貯蔵構造として機能していることが知られている¹⁻³⁾。例えば、ムラサキイガイの前足糸牽引筋(anterior byssus retractor muscle; ABRM)では、ピロアンチモン酸を用いた細胞化学法により、Sb-Ca の沈殿が静止時には形質膜内表面に局在し、収縮時には Ca 遊離と移動を反映して細胞内に一様に分散分布することが報告されており⁴⁾、最近ではその筋形質膜より分子量

450 kD の Ca 結合蛋白質(MCBP-450)が単離され⁵⁾、細胞化学法で示されてきた結果の妥当性が裏付けられている。さらに、外液に高濃度の Ca を加え、細胞内に過剰な Ca を蓄積させ、アクロレインでガス固定し急速凍結した ABRM の凍結切片の X-線マイクロアナリシスにより形質膜内表面から高濃度の Ca が検出されている⁶⁾。しかし、これまで、細胞の生きた状態をもっとも適切に反映すると考えられる無固定・急速凍結試料での凍結切片・元素分析法による研究はなされていない。本研究では、平滑筋の形質膜内表面結合 Ca による収縮・弛緩の調節メカニズムを明らかにするために、カサゴウキブクロ筋の収縮・弛緩にともなう Ca 動態研究において、筆者らによって確立された凍結切片・元素分析法⁷⁾により

ABRM の形質膜内表面結合 Ca 局在の事実を明確にし、収縮-弛緩サイクルにともなう細胞内 Ca 動態について検討した。

材料と方法

筋線維標本と実験液

ムラサキイガイ *Mytilus edulis* より ABRM を摘出し、 10^{-6} M の 5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) を含む液温 4 °C の人工海水 (ASW) を満たしたシャーレ (底部にシリコンラバー) 内に入れ、両端をピンで固定することにより筋長を生体長に維持しながら、さらに直径約 0.5 mm、長さ 20 mm の筋線維束を単離した。筋線維束の両端に外科用絹糸 (No.8) でステンレススチールのフックをとりつけた。

ASW の組成は、NaCl, 513 mM; KCl, 10 mM; CaCl_2 , 10 mM; MgCl_2 , 50 mM; pH 7.2 (NaHCO_3 で調整) とし、カリウム (K-) 拘縮にはこの組成の KCl 濃度を 400 mM に増加し、代わりに NaCl 濃度を 123 mM に減じた K-拘縮液を用いた。元素分析法で細胞内 Ca 濃度を測定するには細胞外 Ca が無いほうが望ましいので、急速凍結や化学固定など、適時必要に応じてその直前に外液を Ca-free 溶液 (ASW および K-拘縮液から CaCl_2 を除去し、等価イオン量の NaCl を増加し、さらに 2 mM の EGTA を加えた液) に置換した。筋収縮を引き起こすためには前述の Ca-free K-拘縮液と Ca-free ASW に 10^{-4} M の acetylcholine (ACh) を加えた ACh-拘縮液を用いた。なお、弛緩液として ASW、あるいは 10^{-6} M 5-HT を含む ASW を用いた。

通常の化学固定とピロアンチモン酸法による細胞化学固定

微細構造観察のために、ASW を満たした実験槽内で、ABRM の筋線維束を、両端にとりつけたフックを用いて張力トランスデューサー (UT-100、Shinnko-Tushinn) と固定レバーに接続した。増幅器 (RP-3、NihonKohden) を介してペンレコーダー (Mark VII WR3101、Graphtec) で等尺性張力を測定しつつ、静止時に 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈した 6% の glutaraldehyde 液で化学固定し、さらに、蒸留水で希釈した 2% の osmium tetroxide (OsO_4) で後固定した。細胞内 Ca 検出のために、同様に実験槽内に置かれた筋線維束を、静止時と ACh-拘縮の最大張力発生時に 2% の potassium pyroantimonate (K-PA; $\text{K} [\text{Sb}(\text{OH})_6]$) を含む 1% の OsO_4 液 (PAOs 液; pH 7.2) で固定した⁹⁾。固定試料は、ethanol 系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋して熱重合後にウルトラミクロトームで超薄切片を作

製し、uranyl acetate や lead citrate で電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX, JEM2000FXS) で観察した。細胞化学用に固定した試料の超薄切片の一部は電子染色せず、エネルギー分散型 X-線検出器 (TX3/58-8341M、NORAN Instruments) を装着した電子顕微鏡 (JEOL JEM 2000FXS) で観察し、切片像で見られる PA の沈澱を元素分析した。

急速凍結

凍結切片-元素分析のための試料の急速凍結は主にプロパンジェット法⁸⁻¹⁰⁾で行なった。ASW を満たした急速凍結装置装着の実験槽内に ABRM の筋線維束を等尺性にセットし、ASW を K-拘縮液に置換することによりテスト収縮を誘導し、その張力変化をトランスデューサー (UL-2GR、Shinnko-Tushinn) および増幅器 (RP-3、NihonKohden) を介してペンレコーダー (Mark VII WR3101、Graphtec) で記録した。次に、液交換により筋を弛緩させ、その後の静止時に液体プロパン (-190 °C) を噴出させ筋を急速凍結した。凍結直前には筋線維束の中央部を 2 枚の Gold-plate¹⁰⁾ ではさみこみ、マイクロピペット吸引で実験液を急速に除去した。凍結試料は凍結切片作製まで液体窒素中 (-196 °C) に保存した。急速凍結の評価のため、凍結試料の一部は 2% OsO_4 を含む -80 °C のアセトン中で凍結置換を施し、樹脂包埋後、超薄切片を作製し、ウランと鉛の電子染色を加えた後、通常の電子顕微鏡観察を行なった。

凍結切片の作製

急速凍結された ABRM から、クライオミクロトーム (LKB Cryo NOVA、試料温度 -130 °C) で厚さ約 100 nm の凍結切片を作製し、クライオチャンバー内で、支持膜としてカーボン薄膜をはった Ni-200 のグリッド上に載物し、もう一枚のグリッドをカーボン薄膜どうしが向かい合うように重ねて軽く圧を加えた後、これを凍結切片、凍結乾燥用の自家製コンテナ¹¹⁾ に収納した。さらに凍結乾燥装置 (VFD300、真空デバイス社) に収納し、-80 °C 以下でおよそ 12 時間乾燥した。乾燥終了後は直ちに切片表面にカーボンを薄く真空蒸着し、次の元素分析までデシケーター内に保存した。

凍結切片の定量元素分析

凍結乾燥後の切片を Be 製のクライオトランスファーホルダー (EM - CTH10 CRYO Transfer holder、JEOL) に装填し、コールドトラップに液体窒素を注入し、予めホールピースまわりを冷却し

ておいた透過型分析電子顕微鏡(JEM2000FXS、JEOL)内に挿入し、続いてホルダー自体も液体窒素で -130°C に冷却した。この冷却温度は分析時のコンタミとビーム照射による質量損失(mass-loss)が最も少ない温度を予備実験で確認して設定した。観察倍率 25,000 倍、加速電圧 80 kV で、径 $0.16\text{ }\mu\text{m}$ の電子ビームを凍結切片の分析対象領域に 100~200 秒間照射(試料電流、1.35 nA)し、発生した X-線をエネルギー分散型 X-線検出器(TX3/58-8341M 型、NORAN Instruments)で検出し、X-線スペクトルをコンピューター解析(TN-5450 EDX Analyzer、NORAN Instruments)し、各分析領域の元素濃度を乾燥重量(mmol/mg dry wt)で求めた⁷⁾。

一般に、定量は Hall (1971)¹²⁾ によって提案された理論式にもとづいて X-線スペクトルから計算されるが、個々の分析システムごとに異なるウェイトファクター(W_x)を予め求めなければならない¹³⁾。本研究では、Shuman *et al.* (1976)¹⁴⁾ の方法により、子牛の血清アルブミン(BSA)を溶媒にした種々の Ca 濃度標準試料を作成し、これらを前述の分析条件下で分析し、得られた X-線スペクトルの Ca スペクトルピークの強度(P; Peak)とバックグラウンド(B; Continuum, 4.5-5.5 KeV region)の強度比(P/B ratio; Peak /Continuum ratio)から Ca のウェイトファクター(W_{Ca})として 148.81 の値を得た(図 1)。なお、Ca 濃度標準試料の正確な濃度は、同一試料を高周波プラズマアナライザー(Spectrometer ARL 4310 型、Applied Research Laboratory)で分析して決定した。

結果

微細構造と細胞化学法による細胞内 Ca の局在と収縮時の移動

図 2 は、glutaraldehyde- OsO_4 で固定された ABRM の筋線維束の横断切片像である。筋線維の直径は $5\sim 10\mu\text{m}$ 程度で、筋線維中央部は収縮要素である太いフィラメントと細いフィラメントで占められており、周辺部には筋小胞体やミトコンドリアが局在していた。筋小胞体は、長径 $0.1\sim 0.5\text{ }\mu\text{m}$ の楕円体であり、形質膜と diad を構成していた。また、ミトコンドリアの多くは球状で、直径は大きなものではおよそ $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 程度であった。

静止時に PAOs 液で固定された筋線維では、既に報告されているように⁹⁾、形質膜内表面と筋小胞体膜に顕著な PA の沈澱が観察された(図 3a)。また、PA の沈澱はミトコンドリアや核にも見られた。一方、ACh-拘縮時に PAOs 液で固定された筋線維では、PA の沈澱は形質膜内表面や筋小胞体膜で著しく減

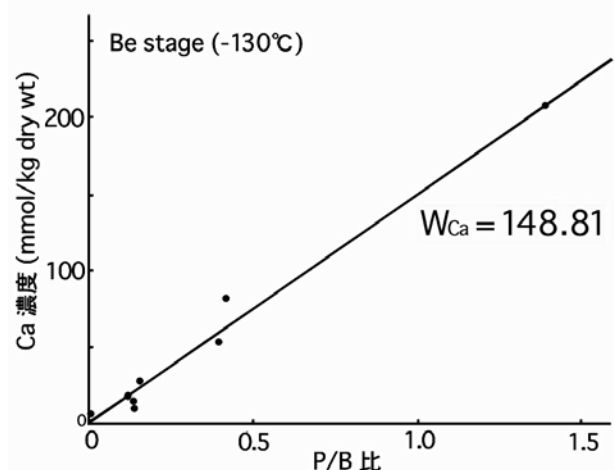


図 1. 元素分析システムにおける Ca のウェイトファクター(W_{Ca}).

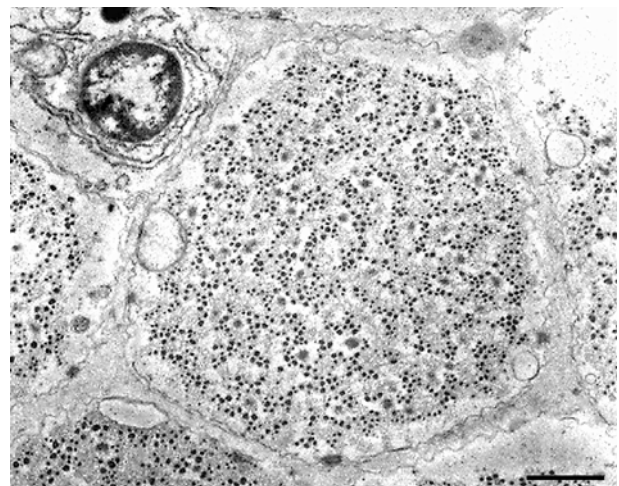


図 2. 化学固定された ABRM の横断切片像。筋線維中央に筋フィラメント、周辺部に筋小胞体とミトコンドリアがみられる。スケール: $1\text{ }\mu\text{m}$ 。

少しており、筋フィラメントで占められる筋線維中央の筋形質内に一様に分散分布していた(図 3b)。形質膜や筋小胞体での PA 沈澱の減少とは対照的にミトコンドリアや核では PA 沈澱の有意な減少は認められなかった。

PA は、生体内で種々の陽イオンと反応して沈澱を生ずることが知られており¹⁵⁾、電子顕微鏡下で観察された沈澱に Ca が含まれていることを明らかにするために X-線マイクロアナリシスを行った。図 4 は、その結果得られた典型的な X-線スペクトルを示している。静止時に固定された筋線維の筋形質膜上に見られた PA 沈澱の X-線スペクトル(図 4a)では、 $500\sim 4,500\text{ eV}$ のエネルギー範囲で、Os-M 線($1,914\text{ eV}$)と Cl-K α 線($2,621\text{ eV}$)のピークとともに、Sb-La 線のピーク値である $3,600\text{ eV}$ 付近に顕著なピークが見られた。Na-K α 線($1,041\text{ eV}$)のピークは見られず、Mg-K α 線($1,253\text{ eV}$)および K-K α 線($3,312\text{ eV}$)付近にはある程度の X-線強度は認められたが、顕著

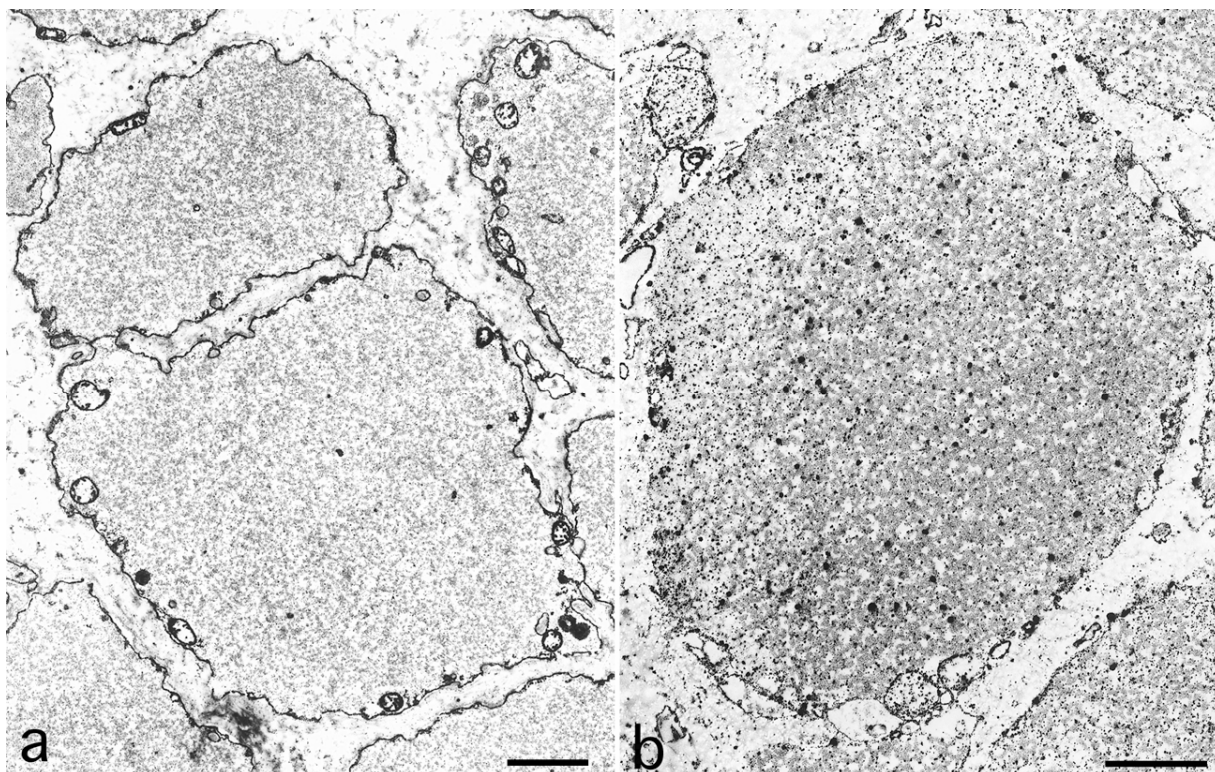


図3. ピロアンチモン酸(PA)法による細胞内局在と収縮時の移動. 静止時に PAOs で固定された筋線維(a)では, 形質膜内表面, 筋小胞体, ミトコンドリアに PA の沈澱が見られる. ACh-拘縮時に PAOs 液で固定された筋線維(b)では, PA 沈澱は主に筋形質中央部に分散分布しており, 形質膜内表面や筋小胞体では著しく少ない. ミトコンドリアでは沈澱の減少は見られない. スケール: 1 μm .

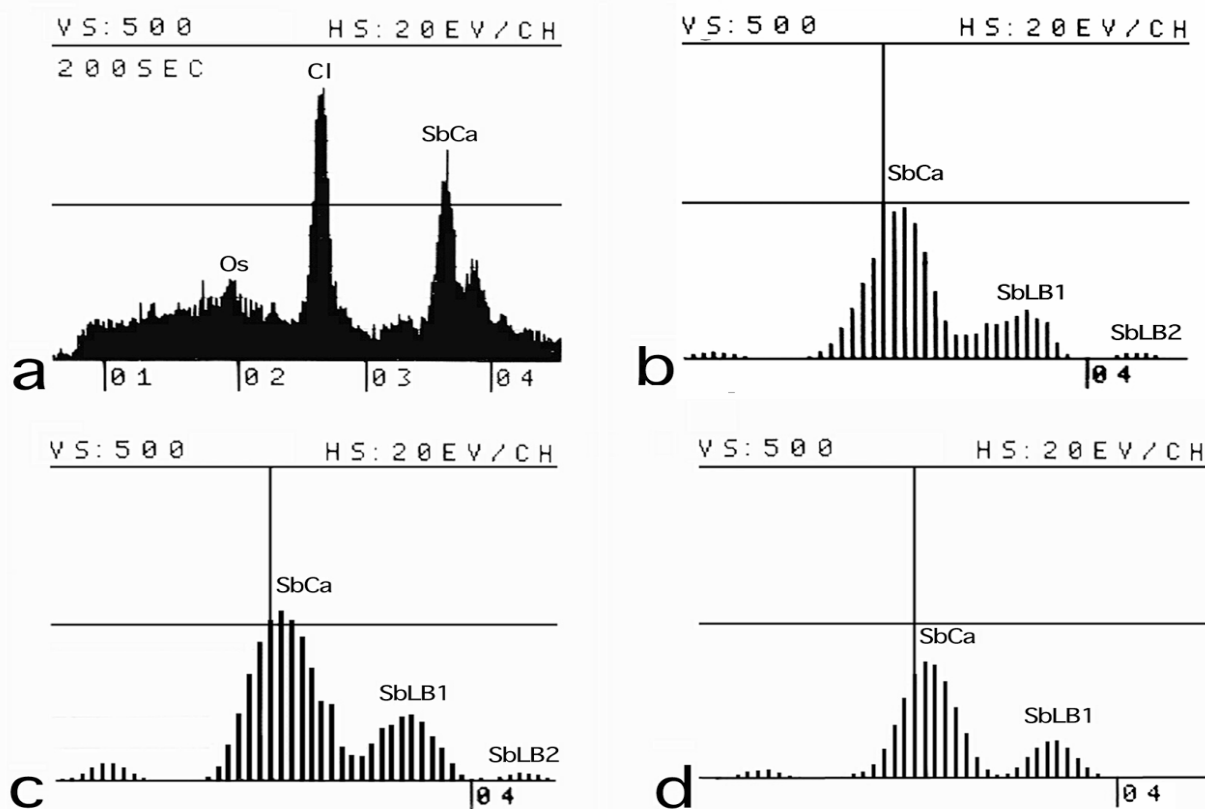


図4. 静止筋線維の形質膜(a, b)と筋小胞体(c)および収縮筋線維の筋形質(d)に見られる PA 沈澱から得られた X-線スペクトル. b 図は a 図の一部を拡大. 中央の垂直線は 3,600 eV を示す(b-d). Os: Os-M 線, Cl: Cl-K α 線, SbCa: Sb-L α 線と Ca-K α 線, SbLB1: Sb-L β 1 線, SbLB2: Sb-L β 2 線, VS: 縦軸(X-線カウント), 横軸: エネルギー値 (KeV; 20 eV/CH).

表 1. ムラサキイガイ ABRM の筋線維内 PA 沈澱に含まれる各元素の X-線強度比(相対濃度)

元素-線	強度比		
	静止筋線維		収縮筋線維
	形質膜	筋小胞体	筋形質
Sb-L α	1.00	1.00	1.00
Ca-K α	0.43 \pm 0.12	0.33 \pm 0.08	0.35 \pm 0.08
K-K α	0.12 \pm 0.05	0.13 \pm 0.06	0.15 \pm 0.04
Mg-K α	0.11 \pm 0.07	0.09 \pm 0.06	0.09 \pm 0.06
Na-K α	0.15 \pm 0.08	0.14 \pm 0.05	0.16 \pm 0.05

値は平均値 \pm 標準偏差(n=12)

なピークは見られなかった。図 4b は a 図のスペクトルから連続 X-線からなるバックグラウンド(B)を除去し、3,600 eV 付近のピークを中心にして横に拡大した図である。このピークのエネルギー値は 3,620~3,630 eV であり、これは Sb-L α 線と Ca-K α 線(3,690 eV)の合成ピークであった^{3,6,13,16)}。また、3,840 eV と 4,100 eV のピークは、それぞれ Sb-L β 1 線と Sb-L β 2 線のピークであった。同様の X-線スペクトルが、静止筋線維の筋小胞体(図 4c)と収縮筋線維の筋形質中央(図 4d)に見られた PA 沈澱の点分析で得られた。表 1 は、これらのスペクトルを Russ の計算式¹⁷⁾を組み込んだプログラムでコンピューター処理し、Sb-L α 線の X-線強度を 1 とした時の他の元素の比較定量値を示したものである。観察された PA 沈澱は、いずれも有意に Ca を含むことを示した。

凍結切片-元素分析法による細胞内 Ca 局在

静止時の ABRM 筋線維束を、等尺性張力を測定しながら-190℃の液体プロパンで急速凍結した。図 5 は、凍結記録の一例である。プロパンジェット凍結装置の実験槽内に満たされている ASW を K-拘縮液に交換し、テスト収縮を誘導して筋線維束の活性度を確認した後、外液を ASW に戻して弛緩させ、10 min 以上の十分な回復期¹⁸⁾を経た静止時に外液の ASW を除去して急速凍結した。

急速凍結によってどの程度細胞が生きた状態に近く保存されたかについての評価は凍結置換切片像の観察から得られた。図 6 は静止時の ABRM 筋線維束をプロパンジェット法で急速凍結し、-80℃の 2% OsO₄ を含むアセトン中で凍結置換し、Quetol 812 樹脂に包埋した後作製した超薄切片の電顕像である。各細胞内の筋フィラメントや基質の状態から、筋線維束の表層(写真上部)から筋線維束中心部に向かって、およそ 5 μ m までは極めて良好な凍結が得られていることが示された。これよりさらに深部では筋フィラメントの配列は徐々に乱れはじめ、基質も密

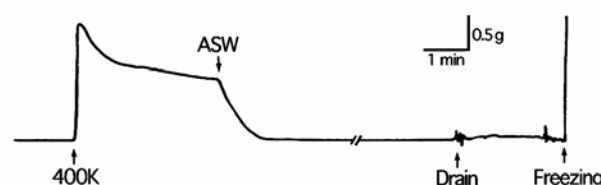


図 5. 静止時に ABRM の筋線維束がプロパンジェット法で急速凍結されるまでの等尺性張力記録。テスト収縮(400K)後の十分な回復期を経て、ASW を除去(Drain)し、急速凍結(Freezing)。凍結時の瞬間的な張力増加は液体プロパン噴出の衝撃を示す。



図 6. ABRM 筋線維束の凍結置換切片像。筋線維束表面(写真上部)から深さおよそ 5 μ m までは凍結良好である。スケール: 1 μ m。

から疎になり、凍結が次第に劣悪になることが示された。以上のような凍結置換の結果にもとづき、元素分析用の凍結切片は、筋線維束表面から 5 μ m 以

内の部分から作製した。

図7は凍結切片像の一例を示している。細胞内では多数の筋フィラメントが筋線維長軸に沿って平行に走行しており、形質膜付近にはしばしば筋小胞体と思われる小胞が観察された。凍結切片のグリッドへの載物は乾式で行なうので、グリッド上で切片が浮き上がらないよう凍結乾燥前に2枚のグリッドで挟み込み、圧を加えているが、グリッド表面のカーボン支持膜に密着させることは難しく、切片はかなり波うった状態であった。しかし、随所にカーボン支持膜に密着した部分も観察され、こうした部分を対象に元素分析を行なった。形質膜内表面に結合しているCaを検出するために、収束ビームを形質膜内側に照射し(図7、○印)、さらに、ビームを形質膜内表面に沿って連続的に移動させて点分析した。また、筋形質部分の分析では、細胞中央部で収束ビームをランダムに移動させて点分析した。X線スペクトルをもとに各元素の定量値を求めるにはグリッド、支持膜、外液等に由来するバックグラウンド(B)のX線強度の測定も必要であるため、細胞内点分析を行なった領域に最も近い細胞間隙または支持膜部分も同時に点分析した。

図8は静止時のABRM筋線維束の凍結切片を元素分析した結果得られたX線スペクトルの典型例を示している。形質膜内表面の点分析(図8a)では低

エネルギー領域から順次、Ni-L α 線(851 eV: Ni)、Na-K α 線(1,041 eV: Na)、Mg-K α 線(1,253 eV: Mg)、Si-K α 線(1,739 eV: Si)、P-K α 線(2,013 eV: P)、S-K α 線(2,307 eV: S)、Cl-K α 線(2,621 eV: Cl)、K-K α 線(3,312 eV: K)、Ca-K α 線(3,690 eV: Ca)のスペクトルピークが検出された。Ca-K α 線のスペクトルピークは実際には単独のピークではなく、K-K β 線(3,589 eV)のスペクトルピークとの合成ピークであった。Ca-K α 線のX線強度は、純粋なCaCl₂およびKCl試料を分析して得られる標準スペクトルの一次および二次微分波形で比較検討し、合成ピークをK-K β 線とCa-K α 線の二つのピークに分離させることによって求めた。筋形質内分析(図8b)でもほぼ同様のスペクトルピークが検出された。しかし、K-K β 線とCa-K α 線による合成ピークではCa-K α 線領域の強度が形質膜内面分析のスペクトル(図8a)より低い事が認められた。一方、バックグラウンドの分析スペクトル(図8c)ではノイズレベルのS、Cl、Kのピークの他は顕著なスペクトルピークは検出されなかった。ノイズレベルで検出されるS、Cl、Kはおそらく外液由来のものと思われる。定量計算ではこのスペクトルをバックグラウンドとして形質膜内表面の分析スペクトル(図8a)や筋形質内の分析スペクトル(図8b)から減算した。表1は静止時のABRM筋線維の筋形質内表面および筋形質の点分析によって得

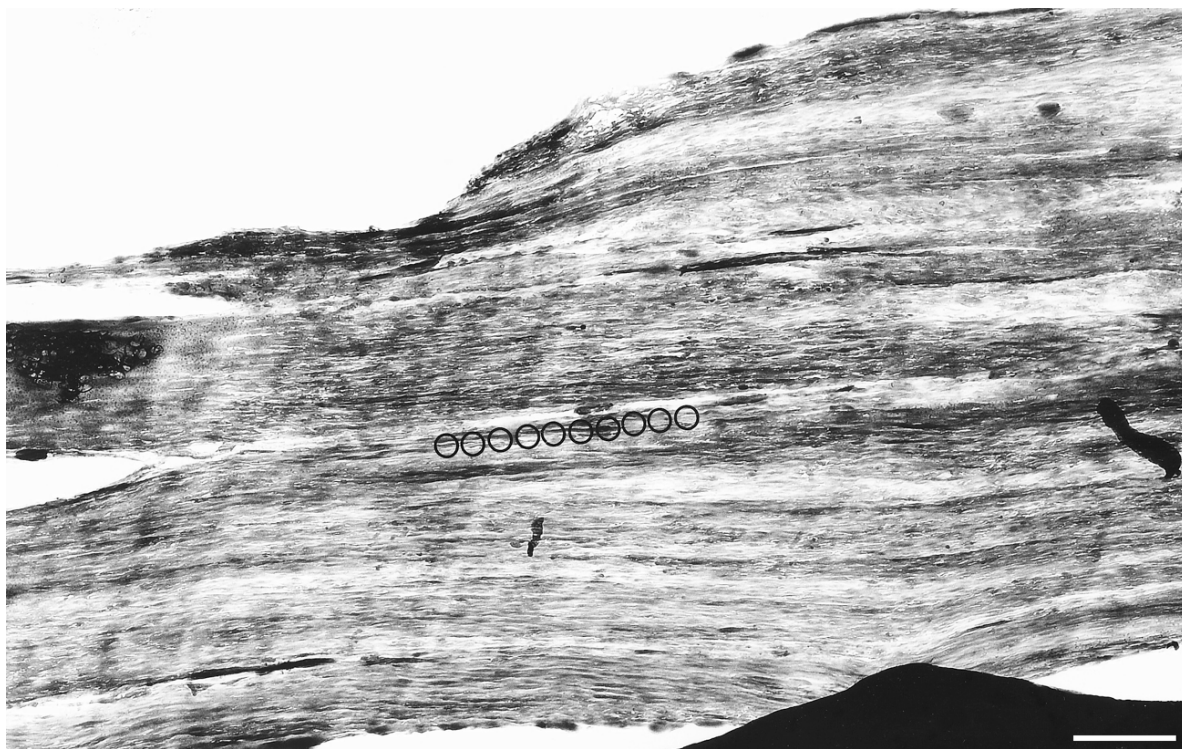


図7. ABRM筋線維束の縦断凍結切片像。○印は形質膜内表面に結合しているCaを検出するための点分析におけるビーム照射位置を示している。筋形質部分は細胞中央部で点分析、またバックグラウンド(B)として切片のない支持膜部分进行分析。スケール: 1 μ m。

られた主要元素の濃度を示したものである。筋形質内表面に沿った連続点分析で得られた Ca 濃度は 3.03 mmol/kg dry wt であり、一方、筋形質部分の Ca 濃度は 1.56 mmol/kg dry wt であった。分析では高濃度の K および Cl も検出されたが、その濃度は筋質膜内表面と筋形質とで有意の差はなかった。K と Cl に関するこの結果は、凍結切片-元素分析を行なったカサゴウキブクロ筋の結果⁷⁾と良く一致しており、これらの元素濃度が細胞内で高いことは試料の凍結処理によって筋線維が損傷を受けず、生き

ている状態と同じような状態で良好に凍結された事を示している。

討論

細胞化学法による Ca 動態と PA 沈澱分析

静止時に PAOs 液で固定された ABRM の筋線維では、筋形質膜内表面や筋小胞体膜に顕著な PA 沈澱が見られ(図 3a)、一方、収縮時に固定された筋線維では、これらの構造では PA の沈澱は減少し、代りに筋フィラメントが存在する細胞中心部に多数の分散分布した PA 沈澱が見られた(図 3b)。この結果は、Atsumi and Sugi (1976)の報告⁴⁾を再確認するもので、静止時に細胞内貯蔵構造に局在している Ca が収縮時に活性化 Ca として筋形質内に遊離される現象を反映していると考えられる。静止時と収縮時の PA 沈澱の変動が認められないミトコンドリアや核は Ca を貯蔵しても、筋の収縮-弛緩サイクルには関与していないと考えられる。同様の結果は、ムラサキイガイの他にも多くの無脊椎動物や脊椎動物の平滑筋で報告されており¹⁻³⁾、この考えの妥当性が支持されている。

細胞化学法としての PA 法は、1960 年代頃までは Na の検出にも使われていたように、PA は生体内で Ca 以外の陽イオンとも反応して沈澱することが知られており¹⁵⁾、PA 法による平滑筋の Ca 動態研究では、観察される PA 沈澱が実際に Ca を含んでいることを明確にする必要がある。この目的のためには、PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスが有効である^{6,16,19)}。ムラサキイガイの ABRM における Ca 動態を始めて明らかにした研究⁴⁾でも PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスが試みられているが、定量的解析は行なわれていない。PA 沈澱の X-線マイクロアナリシスでは、沈澱に Ca が有意の量で含まれていると、ピークエネルギー値が 3,610~3,640 eV となる Sb-Ca の合成スペクトルが検出されることが明らかにされている^{6,16,19)}。今回の分析結果は、いずれも、およそ 3,620 eV にピークをもつ合成スペクトルを示し(図 8)、それらのスペクトルにおいても、Ca-K α 線の X-線強度は Sb-L α 線のそれに対して大きな相対値を示した(表 1)ので、電子顕微鏡下で観察された PA 沈澱は確実に Sb-Ca の沈澱であり、細胞内の Ca 局在と収縮時の移動を示したものと考えられる。

PA 沈澱の X-線スペクトル(図 4a)では、500~4,500 eV のエネルギー範囲で、Os-M 線(1,914 eV)と Cl-K α 線(2,621 eV)のピークが見られた。Os-M 線は、固定液の OsO₄ に由来し、Cl-K α 線は試料を包埋している樹脂に由来する¹⁶⁾。X-線スペクトルにおいて、Na-K α 線、Mg-K α 線および K-K α 線の顕著な

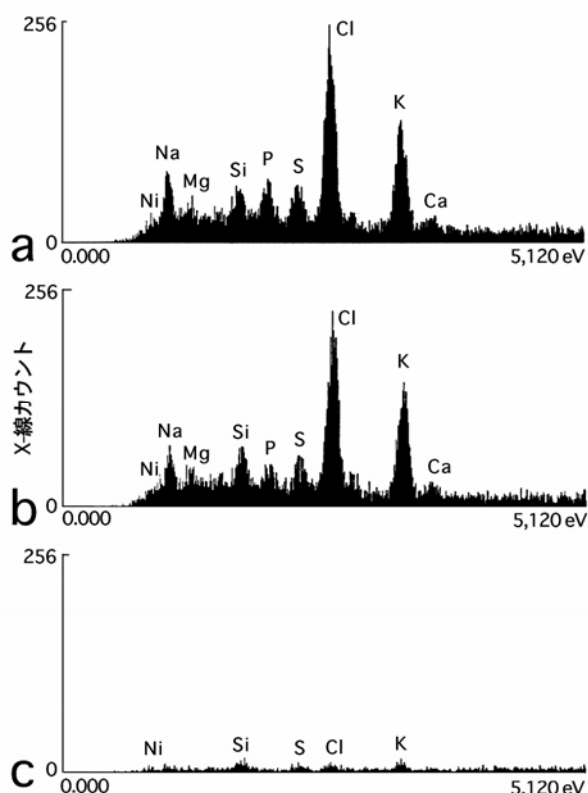


図 8. ABRM 筋線維束の凍結切片各分析領域の点分析で得られた X-線スペクトル. (a) 筋形質膜内表面(図 7, ○印)の分析 X-線スペクトル. (b) 筋形質の分析 X-線スペクトル. (c) 切片外領域の分析 X-線スペクトル(バックグラウンド). 縦軸は X-線カウント(0~256 counts), 横軸は eV (0.000~5,120 eV). スペクトル中のラベルは各元素による特性 X-線のピークを示す(詳細は本文参照).

表 2. ABRM 筋形質膜内表面と筋形質の元素濃度

元素	元素濃度 (mmol/kg dry wt.)	
	筋形質膜内表面 n=25	筋形質 n=8
Ca	3.03 ± 5.88	1.56 ± 2.43
K	315.55 ± 80.78	293.97 ± 64.33
Cl	335.52 ± 129.63	477.96 ± 72.20

値は平均値±標準偏差. Ca 濃度 0 の分析例も含む.

ピークは見られなかったが、定量解析では有意な相対強度が示された。しかし、これらの元素は、試料の固定、脱水および樹脂包埋の過程で二次的に PA と反応し、生理的な動態を反映したものではないことが明らかにされている⁶⁾。

形質膜局在の Ca とその収縮調節機構

静止時に急速凍結された ABRM 筋線維束の縦断凍結切片の筋形質膜内表面と細胞中央の筋形質部とを点分析した結果、検出された Ca 量の平均濃度は、筋形質膜内表面では 3.03 mmol/kg dry wt であり、一方、筋形質部では 1.56 mmol/kg dry wt であった(表 2)。外液の Ca は凍結時除去されているので形質膜内表面の点分析によって検出された Ca は内表面に結合した Ca によるものと考えられ、この結果は、より生体に近い状態での形質膜内表面の Ca 局在を明示するものと考えられる。しかし、筋形質内の平均濃度に比し、形質膜内表面局在の Ca 濃度はあまり高くなく、濃度差は顕著ではなかった。これは、形質膜を連続的に点分析した時に、各分析点間でかなり Ca 濃度に差があり、その計算濃度がゼロであったりマイナスを示すものも含まれているためである。既に述べたように、Ca は形質膜に局在する Ca 結合蛋白質⁹⁾に結合していると思われ、かつ、フリーズフラクチャーレプリカの観察では、結合蛋白質と思われる粒状構造が膜表面には高密度で見られない(未発表データ)ことから、定量値がゼロやマイナスを示す分析点があることは当然のことと思われる。すなわち、形質膜内表面の分析点の中には Ca 結合蛋白質が含まれず、Ca が存在しない部分も含まれていた可能性がある。そこで、考察のため、ゼロやマイナスの定量値を示した分析点の結果を除外し、有意な量の Ca が検出された分析例のみを抽出し、平均 Ca 濃度を求めた。表 3 はその結果を示したものであり、この場合、形質膜内表面の Ca 濃度は 7.58 mmol/kg dry wt となり、一方、筋形質での濃度は 2.50 mmol/kg dry wt で、両者に顕著な差が見られた。

表 3. ABRM 筋形質膜内表面と筋形質の元素濃度

元素	元素濃度 (mmol/kg dry wt.)	
	形質膜内表面 n=10	筋形質 n=5
Ca	7.58 ± 7.20	2.50 ± 2.66
K	292.25 ± 95.69	302.32 ± 67.80
Cl	379.79 ± 147.72	488.41 ± 81.41

値は平均値 ± 標準偏差. Ca が検出された分析例のみ抽出.

凍結切片・元素分析法で Somlyo *et al.* (1981)¹⁰⁾により報告されたカエル横紋筋(骨格筋)静止時の筋小胞体終末槽に含まれる Ca 濃度は ~129 mmol/kg dry wt であり、また、著者ら⁷⁾が同手法で硬骨魚カサゴのウキブクロ筋で得た濃度はおよそ 43 mmol/kg dry wt であった。この濃度差は細胞内に占める筋小胞体の容積と含水量によって補正し、湿重量あたりの濃度にするとはほぼ近い値になる。ABRM についてまだ利用できる含水量の値がないので湿重量あたりの濃度での比較はできないが、乾重量あたりの濃度で比較すると、形質膜内表面に結合している Ca 濃度は横紋筋の筋小胞体内 Ca 濃度よりはるかに低い。しかし、横紋筋の筋小胞体が閉鎖内膜系であり、終末槽に局在する Ca 結合蛋白質の calsequestrin により高濃度に蓄積されやすいのにくらべ、形質膜内表面での Ca 結合蛋白質への Ca 結合は開放系であるため横紋筋の筋小胞体のように高濃度に蓄積することは困難と考えられる。また、ABRM の活性化 Ca の貯蔵には形質膜内表面のみではなく筋小胞体も関わっている。このように、横紋筋との Ca 貯蔵様式の違いを考慮すれば、形質膜内表面のおよそ 8 mmol/kg dry wt の Ca は収縮を引き起こすためにかなり有効な量であると思われる。フリーズフラクチャーおよびエッチングレプリカの電子顕微鏡観察では、形質膜内表面上に、低角度回転蒸着法で観察された Ca 結合蛋白質(MCBP-450)と類似した粒状構造が確認されており(未発表)、Ca は、おそらく、静止時には膜表面から突出した Ca 結合蛋白質の一部に結合しており、収縮時には膜電位変化に影響された Ca 結合蛋白質の結合部位から筋形質内に遊離されると考えられる。

謝辞

本研究は、一部、文部科学省の科学研究費補助金(07670063)の援助を受けて行なわれた。

文献

- 1) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. In: *The Role of Calcium in Biological Systems, Vol. I.* Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 2) Sugi H and Suzuki S (1982) Physiological and ultrastructural studies on the intracellular calcium translocation during contraction in invertebrate smooth muscles. In: *Basic Biology of Muscles. A Comparative Approach.* Twarog BM, Levine RJC and Dewey MM, eds., Raven Press, New York. pp. 359-370.
- 3) 鈴木季直, 杉 晴夫 (1986) 興奮収縮連関-細胞化学的アプローチ. *新生理科学大系* 第4巻 筋肉の生理

- 学. 富田忠雄, 杉 晴夫 編, 医学書院, 東京. pp. 178-189.
- 4) Atsumi S and Sugi H (1976) Localization of calcium-accumulating structures in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis* and their role in the regulation of active and catch contraction. *J. Physiol.* **257**:549-560.
- 5) Yamanobe T and Sugi H (1993) Purification and characterization of a Ca²⁺-binding 450-kDa protein (MCBP-450) in the plasma membrane enriched fraction from a molluscan smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* **1149**: 166-174.
- 6) Suzuki S and Sugi H (1989) Evaluation of the pyroantimonate method for detecting intracellular calcium localization in smooth muscle fibers by the X-ray microanalysis of cryo sections. *Histochemistry* **92**: 95-101.
- 7) Suzuki S, Hino N and Sugi H (2004) Intracellular calcium translocation during the contraction relaxation cycle in scorpionfish swimbladder muscle. *J. Exp. Biol.* **207**:1093-1099.
- 8) Muller M, Meisner N and Moor H (1980) Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing. *Mikroskopie* **36**: 129-140.
- 9) Suzuki S and Pollack GH (1986) Bridgelike interconnections between thick filaments in skeletal muscle fibers observed by the freeze fracture method. *J. Cell Biol.* **102**: 1093-1098.
- 10) Suzuki S, Oshimi Y and Sugi H (1993) Freeze-fracture studies on the cross-bridge angle distribution at various physiological states and the thin filament stiffness in single skinned frog muscle fibers. *J. Electron Microsc.* **42**: 107-116.
- 11) 鈴木季直 (1992) 凍結技法, 第6章. よくわかる電子顕微鏡技術. 平野 寛, 宮澤七郎 監修, 朝倉書店, 東京. pp.137-148.
- 12) Hall TA (1971) The microprobe assay of chemical elements. In: *Physical Techniques in Biological Research*. Oster G, ed., Academic Press, New York, pp.157-275.
- 13) 鈴木季直 (1989) 電子顕微鏡による生物試料の元素分析法. 微生物 **5**: 32-42.
- 14) Shuman H, Somlyo AV and Somlyo AP (1976) Quantitative electron probe microanalysis of biological thin sections: Methods and validity. *Ultra-microscopy* **1**: 317-339.
- 15) Komnick H and Komnick U (1963) Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur funktionellen Morphologie des Ionentransport in der Sardine von *Larus argentatus*. *Z. Zellforsch. Anat.* **60**:163-203.
- 16) Suzuki S (1978) Quantitative and Semiquantitative X-ray microanalyses of pyroantimonate precipitate in molluscan smooth muscle, with special reference to the presence of calcium. *Teikyo Med. J.* **1**: 259-268.
- 17) Russ JC (1974) The direct element ratio model for quantitative analysis of thin sections. In : *Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues*. Hall T *et al.*, eds., Academic Press, New York. pp.269-276.
- 18) Sugi H and Suzuki S (1978) The nature of potassium and acetylcholine-induced contracture in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **61C**:275-279.
- 19) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-468.
- 20) Somlyo AV, Gonzalez-Serratos H, Shuman H, McClellan G and Somlyo AP (1981) Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron probe study. *J Cell Biol.* **90**:577-594