

骨格筋スキンドファイバーを低分子量溶質が圧縮する： 多価アルコールの効果

木村 雅子 竹森 重

東京慈恵会医科大学分子生理学講座

(受付 平成19年4月13日)

SMALL SOLUTES COMPRESS SKINNED FIBERS OF SKELETAL MUSCLE: EFFECTS OF BUTANOLS AND PENTANOLS

Masako KIMURA and Shigeru TAKEMORI

Department of Molecular Physiology, The Jikei University School of Medicine

The effects of butanols (1-butanol, 1,2-butanediol, 1,3-butanediol, and 1,2,4-butanetriol) and pentanols (1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, and 1,2-pentanediol) on the thickness and contractility of skinned fibers of frog skeletal muscle were studied. Thickness was measured as the optical cross-sectional area of the fibers. Contractility was evaluated as active force development in artificial intracellular salt solutions of various Ca^{2+} concentrations. Both butanols and pentanols were found to compress skinned fibers and to suppress maximal force development at a saturating Ca^{2+} -activation level. At submaximal Ca^{2+} -activation levels, the alcohols increased the Ca^{2+} sensitivity of the fibers for force development. Their effects on maximal force and Ca^{2+} sensitivity were almost completely reversible, whereas their effects on fiber thickness were irreversible. The ability of butanols to compress skinned fibers showed a close correlation with the concentration of CH_2 groups that are not attached to hydroxyl groups. Comparison of the compressing abilities of butanols and pentanols suggested that the intramolecular distribution of hydroxyl groups is important for the fiber-compressing ability of the molecules. The effects of butanol and butanediols on the contractility of skinned fibers varied considerably at a comparable fiber-compression level. This finding indicates that the fiber-compressing ability of alcohols involves a mechanism completely different from their effect on contractility. Because any significant effect on sarcomere proteins that are directly involved in contraction would modify active force development and because sarcomeres of mechanically skinned, Triton-treated fibers contain only a small amount of proteins that are not directly involved in contraction, an effect of alcohols on sarcomere proteins is unlikely to directly cause fiber compression. Instead, fiber compression would be a consequence of modification in the field formed in sarcomeres that maintains the physiological organization of sarcomere structure in skeletal muscle.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 155-64)

Key words: mechanically skinned fiber, alcohol, hydrophobic group, myofilament lattice

I. 緒 言

骨格筋の細胞膜除去標本、いわゆる名取のスキンドファイバー¹⁾は、細胞膜という拡散障壁を持たないから細胞内液環境を容易に人為制御でき

る。このことからスキンドファイバーは筋肉生理・薬理学研究の欠かせない実験系として、世界的に広く用いられ続けている。しかし名取がスキンドファイバーの開発当初から懸念していたように細胞膜を除去することで生じる変化は拡散障壁

がなくなることだけではない。すでに知られている代表的な変化の中に、筋線維幅の増大がある²³⁾。筋収縮は筋線維中に規則正しい六方格子構造を作って並ぶ、太いミオシンフィラメントと細いアクチンフィラメント間の収縮性相互作用で実現されるから、筋線維の太さの増大はこれらのフィラメント間距離の増大を意味し⁴⁾、収縮性相互作用に重大な意味を持つことが想像されている⁵⁾。特に心臓においてはスターリングの法則を実現する機構として、等容積的な筋細胞の伸展による筋フィラメント間隔の減少が、拡張期心室容積に応じた強い血液駆出力を發揮させているのではないかという強い期待がある⁶⁾。筋フィラメント間隔の筋収縮能に対する効果については、スキンドファイバーをデキストラン T-500 やポリビニルプロピレン K-30 などの高分子溶質で圧縮する実験で調べられて来ているが⁵⁾⁷⁾⁸⁾、骨格筋と心筋の違いもあってまだ一定の見解には至っていない。

細胞膜が除去されることによって生じるもうひとつの大きな変化は、細胞内可溶性タンパク質の漏出⁹⁾である。可溶性タンパク質は筋フィラメント間の収縮性相互作用の直接的な物理障壁になりうるが、それと同時に細胞内液の粘度を上昇させるという水に対する影響を介しても収縮性相互作用に影響すると考えられる。Endo ら¹⁰⁾は筋フィラメント格子内に十分浸透する小分子量物質による粘度の上昇が収縮張力低下につながることを報告している。

粘性物質のひとつであるエチレングリコールも可逆的にスキンドファイバーの収縮に影響することが報告されている¹¹⁾。このエチレングリコールは、MgATP を取り除いて硬直状態にしたスキンドファイバーを有意に圧縮することを Tregear らのグループ¹²⁾が X 線回折実験によって報告している。エチレングリコールは弛緩時のスキンドファイバーをも濃度依存的に圧縮する¹³⁾¹⁴⁾。エチレングリコールはその分子量(62)からして筋フィラメント格子内に容易に十分浸透しうると考えられるから、筋フィラメント格子間隔を狭めながら漏出した可溶性タンパク質を代替する溶質として人工細胞内液に応用できるかもしれない。

エチレングリコールは飽和二価アルコールであ

るから、本研究ではよりよい可溶性タンパク質代替溶質を探すことを念頭において炭素数 4,5 のアルコール類(ブタノール類, ペタノール類)のスキンドファイバーに対する効果を系統的に調べることにした。これらの溶質のもとでスキンドファイバーの太さと収縮能とが個別に影響されることがわかった。

II. 対象と方法

1. 標本の調整

ウシガエル縫工筋の筋線維から実体顕微鏡下で機械的に細胞膜を剥離し、スキンドファイバーを作成した。長軸方向の断面積がなるべく均一になるように細胞膜とともに剥離される筋原線維が最小になるように注意を払った。作成したスキンドファイバーはすべて測定前に 0.5% Triton X100 を含む人工細胞内液に 15 分以上浸漬して筋小胞体やミトコンドリアなどの内部膜系を破壊した。実験中の筋節長は He-Ne レーザー光回折を用いて 2.4 μm に調整した。

2. 溶液の調整

用いた人工細胞内液(弛緩液, 収縮液, 低 EGTA 液)の組成を以下に示す。弛緩液: KMs 26.1, Mg (MS)₂ 5.7, Na₂ATP 4.4, CP 10, EGTA 10, PIPES 20 (単位 mM)。収縮液(pCa 4.4): KMs 6.1, Ca(Ms)₂ 10, Mg(Ms)₂ 5.6, Na₂ATP 4.4, CP 10, EGTA 10, PIPES 20 (単位 mM)。低 EGTA 溶液: KMs 54, Mg(Ms)₂ 5.6, Na₂ATP 4.4, CP 10, EGTA 0.5 and PIPES 20 (単位 mM)。ここで Ms はメタンスルホン酸基-CH₃SO₃ を表す。すべての溶液は 20°C で KOH を用いて pH 7.0 に調整し、pCa 4.6 以上の溶液は弛緩液と収縮液との混合により得た。上述の溶液類を以下では標準液とよぶことにする。試験アルコール入りの溶液は、上記の各溶液に目的とするアルコールを重量% で加えて作成した。用いたアルコール類の種類と分子量は Table 1 にまとめてある。アルコールを加えた後の溶液は KOH か HMs で pH 7.0 に再調整したが、アルコール添加により pH が 0.2 以上変動することはなかった。

3. ファイバー横断面積の測定

スキンドファイバーの横断面積の測定は Takemori¹⁵⁾に詳述してある手法に CCD カメラつ

Table 1. Tested solutes

tested solutes	molecular weight	origin
butanols	1-butanol	74 Wako pure chemical industries, Tokyo
	1,2-butanediol	90 Wako pure chemical industries
	1,3-butanediol	90 Wako pure chemical industries
	1,2,4-butanetriol	106 Wako pure chemical industries
pentanols	1-pentanol	88 Kanto Kagaku, Tokyo
	2-pentanol	88 Kanto Kagaku
	3-pentanol	88 Kanto Kagaku
	1,2-pentanediol	104 Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo

きの画像解析システム (HCC-574, Flobel, Tokyo) を加えて行った。方法の概略を述べると、スキンドファイバーの一部分にスリット状の光を当て、この照明された部分をファイバーの長軸方向から顕微鏡で観察する。CCD カメラで取り込んだ顕微鏡像のスキンドファイバーの輪郭を CRT ディスプレイ上で 4 から 6 回トレースしてその面積の平均値を得た。ファイバーの長軸に沿った横断面積のばらつきは 0.5% 以下で小さいが、今回の測定はいつもファイバーの同じ位置で行った。溶液の交換はファイバーを浸漬している実験槽の溶液をすばやく抜いて約 1 秒以内に次の溶液を加えることで行った。個々のスキンドファイバー標本については一種類のアルコールの効果だけを試し、アルコール濃度は累加的に高めていって、最後にアルコールなしの標準液での測定を繰り返して可逆性を調べた。すべての横断面積測定は室温 (20°C) で行った。

4. 収縮張力測定

張力測定は基本的には Horiuti ら¹⁶⁾ の手法を採用した。概略を述べると張力トランスデューサー (UL-2, NMB, Tokyo) にタングステン線を介してスキンドファイバーの一端を固定し、他端をマニピュレータで保持した。このマニピュレータを操作することにより、レーザー光回折でモニタした筋節長を調整できる。ファイバーの両端は絹の単一線維で結び付けた。

測定のプロトコールは以下の通りである。まず最初にアルコールを含まない標準弛緩液と標準収縮液とを適当な割合で混ぜ、いろいろな Ca^{2+} 濃度の人工細胞内液を得た。混合割合に応じた Ca^{2+} 濃度の計算には Smith & Martel¹⁷⁾ に掲載されている結合定数を基にしたプログラムを用いた⁶⁾。各 Ca^{2+} 溶液中でファイバーを活性化したときの収縮張力を測定するには、標準弛緩液中のファイバーをひとまず標準低 EGTA 液に浸漬してファイバー内の EGTA 濃度を下げておき、それから目的とする Ca^{2+} 溶液に移してファイバー内の Ca^{2+} 濃度を急激に高めるようにした。ファイバーの不可逆的な疲労変性を最小に抑えるために、 Ca^{2+} 溶液中での収縮張力が頭打ちになるやいなやすばやくファイバーを標準弛緩液に戻した。最大の収縮張力が得られるまで、段々に高い Ca^{2+} 溶液を試し、 Ca^{2+} 濃度をそれ以上に上げても収縮張力が増大しなくなったとき標準収縮液中での最大収縮張力を得たこととする。この一連の実験で横軸に Ca^{2+} 濃度をモル濃度の常用対数に -1 をかけたもの (pCa) で表してとり、縦軸に収縮張力をとって pCa-張力関係が得られる。続いて同じ手順でアルコール入りの試験 Ca^{2+} 液中での pCa-張力曲線を得た。このときには弛緩液にも低 EGTA 液にも同濃度のアルコールを入れた液 (試験液) を用いた。アルコールを含まない標準液からアルコールを含む試験液へファイバーを移した

ときには溶質のファイバー内浸透のために10分以上時間をおいてから測定を開始した。横断面積測定のとときと同様に、収縮張力測定でも個々のスキンドファイバー標本については一種類のアルコールの効果だけを試し、アルコール濃度は累加的に高めていって、最後にアルコールなしの標準液での測定を繰り返して可逆性を調べた。すべての張力測定は5°Cで行った。

ファイバーの長さ方向の硬さ(スチフネス)を測る時には、張力トランスデューサを高周波数に応答するAE801(Aksjeselskapet, Horten, Norway)に変え、マニピュレータとファイバー端の間にピエゾ素子(LVPZ Translator, Physik Instrumente, Waldbronn, Germany)を挿入した。ピエゾ素子をパワーアンプ(E501, Physik Instrumente)で500 Hzで駆動し、ファイバーの一端をファイバー長の0.5%正弦波で振動させた。この長さ振動に対するファイバー他端での張力応答を張力トランスデューサで拾い、印加した長さ振動との同相成分をロックインアンプ(5610B, NF-Electronics Instrument, Yokohama)で検出して増幅し、スチフネスとして評価した。

III. 結 果

1. ブタノール類のファイバー圧縮効果

Fig. 1はスキンドファイバーの横断面積に対するブタノール類の効果を示している。Fig. 1aは標準弛緩液から7.5% 1-ブタノールに浸漬したときのファイバーの横断面積変化の時間経過を示す一例である。屈折率の変化により溶液交換直後はばらつきが大きくなっていて詳細な検討は難しいが、横断面積はおよそ指数関数的に減少しておりその時定数は約3.5分と見積もられた。1,2-ブタンジオール、1,3-ブタンジオールとも3-4分の時定数だった。

Fig. 1bは濃度に伴う圧縮効果を示している。本研究で調べた4種類のブタノール類のすべてについて、スキンドファイバーは濃度依存的に圧縮された。単位濃度あたりでのファイバー圧縮効果は一価のアルコールである1-ブタノールが最も強く、二価のアルコールでは水酸基の位置に依らずおおよそ同じで、三価のアルコールは濃度あたりの圧縮効果が弱かった。このことは、分子内に水

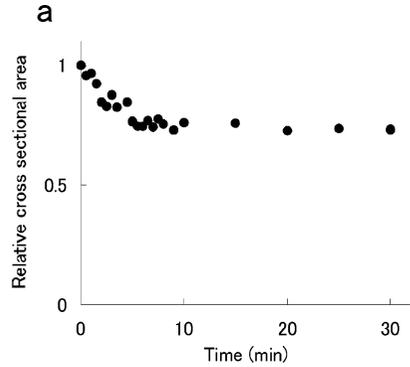


Fig. 1a. A representative time course of fiber compression in 7.5% 1-butanol. Cross-sectional area reached a plateau within 6-7 min.

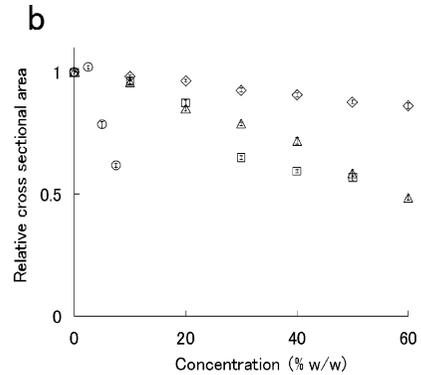


Fig. 1b. Cross-sectional areas of skinned fibers in the presence of 1-butanol, (circles), 1,2-butanediol (squares), 1,3-butanediol, (triangles) and 1,2,4-butanetriol (diamonds). Plots are made against weight/weight concentration of the butanols. Areas are expressed relative to the original value in plain relaxing solution.

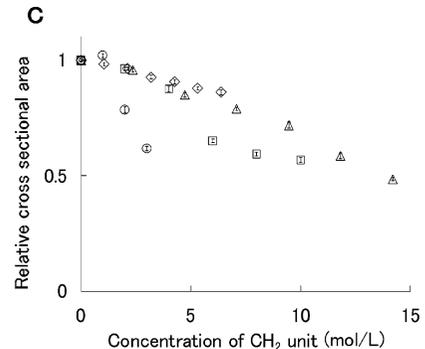


Fig. 1c. Data in Fig. 1b are plotted against the molar concentration of $-\text{CH}_2-$ units without attached-OH. Symbols are the same as in Fig. 1b.

酸基がついていない $-\text{CH}_2-$ が多いアルコールほどスキンドファイバー圧縮能が高いことを示す。水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ の数が同じ二価アルコールの1,2-ブタンジオールと1,3-ブタンジオールの結果を詳細に見ると、20% までの低濃度領域では濃度あたりの圧縮効果が二つのブタンジオールでほぼ同じであったが、30-40% の高濃度領域では1,2-ブタンジオールの濃度あたりの圧縮能のほうが1,3-ブタンジオールの圧縮能よりもわずかながら有意に高かった。また1-ブタノールは2.5% の低濃度では筋線維の圧縮は認められず、ファイバー圧縮効果が出始める閾の濃度があることが示唆された。

各ブタノール類分子の濃度あたりでのファイバー圧縮効果の水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ の数が強く左右したことから、Fig. 1b の結果を横軸に水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ 濃度にとってプロットしてみたのが Fig. 1c である。すると各ブタノール類分子のファイバー圧縮能は重量濃度でプロットしたときよりもはるかにばらつきを減じ、単一の関係に近づいた。このことから、ブタノール類のファイバー圧縮効果は水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ 濃度と強く相関することがわかった。

2. ペンタノール類のファイバー圧縮効果

ブタノール類についてのスキンドファイバー横断面積測定結果から、アルコール類のスキンドファイバー圧縮効果は基本的には水酸基がついていない $-\text{CH}_2-$ の濃度で決まる、という仮説を立てた。この仮説を検証するために、次にペンタノール類のスキンドファイバー圧縮効果を調べた。

ペンタノール類の圧縮の時間変化はブタノールとほぼ同様に指数関数的で、その時定数は1-ペンタノールで3分、2-ペンタノールで2.5分であり、ブタノール類とほぼ同等であった。

Fig. 2a にペンタノール類のスキンドファイバー圧縮効果を重量濃度に対して示した。ブタノール類と同様に濃度が増すと筋線維圧縮効果が認められたが、いずれのペンタノール類についても1-ブタノールのときのような圧縮が生じ始める閾濃度が存在した。この閾の濃度はアルコールの種類によって異なっており、同じ一価のペンタノールでも、分子の末端に水酸基がついている1-ペンタノールで閾濃度が低く (1.5%)、水酸基が

分子の末端にない2-ペンタノールと3-ペンタノールでは2-3% のより高濃度に閾濃度があった。二価アルコールである1,2-ペンタジオールではさらに閾濃度が高く10% までファイバー圧縮効果を認めなかった。仮説にしたがって Fig. 2b では Fig. 2a のデータを水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ の濃度に対してプロットしてある。ファイバー圧縮能と水酸基のつかない $-\text{CH}_2-$ 濃度の間にはブ

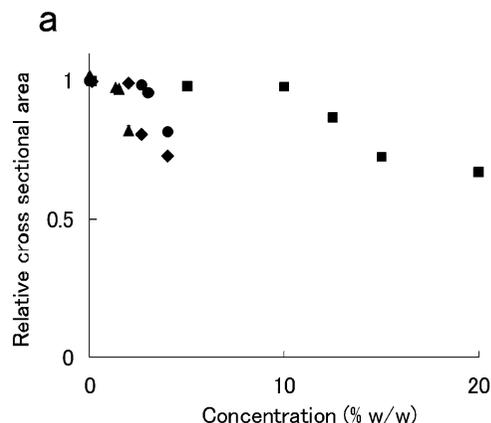


Fig. 2a. Cross sectional areas of skinned fibers in the presence of 1-pentanol (closed triangles), 2-pentanol (closed circles), 3-pentanol (closed diamonds) and 1,2-pentanediol (closed squares). Plots are made against weight/weight concentration of the pentanols. Areas are expressed relative to the original value in plain relaxing solution.

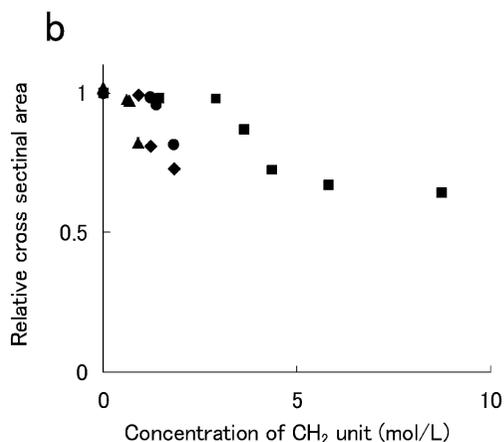


Fig. 2b. Data in Fig. 2a are plotted against the molar concentration of $-\text{CH}_2-$ units without attached $-\text{OH}$. Symbols are the same as in Fig. 2a.

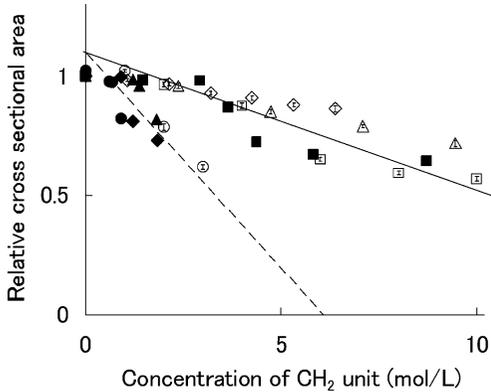


Fig. 3. Data in Fig. 1c and Fig. 2b are combined in the same graph. 1-butanol and 2-pentanol, 1,2-butanediol and 1,2-pentanediol showed similar compressing ability and the dashed and solid lines show extrapolation of the relationships. The lines were drawn by eye.

タノール類ほど強い相関を認めなかった。

Fig. 3にはFig. 1cとFig. 2bとを重ねて表示してある。すると意外なことに一価アルコールである1-ブタノールと1-ペンタノールが、また両端に並んで二つの水酸基を持つ1,2-ブタンジオールと1,2-ペンタンジオールが極めて類似した関係を示した。このことは、単に水酸基がつかない $-\text{CH}_2-$ の濃度だけでなく、分子内での水酸基の配置がファイバー圧縮効果に対して重要な意味を持つことを示唆する。これら二組の圧縮効果を無限希釈に外挿してみると、ほぼ同じ点に収束した(Fig. 3破線と実線)。このことは、おそらくファイバーの太さ増大に対する物理的な強い制約があるために低アルコール濃度でのファイバーの太さは上限に達しており、 $-\text{CH}_2-$ のファイバー圧縮効果はこの上限の太さ以下にファイバーが圧縮されたときにはじめてあらわになることを示唆している。

三価アルコールである1,2,4-ブタントリオールのファイバー圧縮効果はほぼ完全に可逆で、20%溶液中で80%以下にファイバーを圧縮した後でも、標準弛緩液に戻すと断面積は最初の96%にまで回復した。他のブタノール類、ペンタノール類のファイバー圧縮効果はほぼ完全に不可逆で、標準弛緩液に戻した後60分以上観察しても断面積測定の際につき0.5%を超える太さの回復は認められなかった。

3. ファイバーの収縮能に対する1-ブタノールの効果

5%の1-ブタノールはスキンドファイバーの横断面積を約80%にまで圧縮したが、まずこの濃度の1-ブタノールがファイバーの収縮能に与える効果を検討した。

1-ブタノールは十分な Ca^{2+} によってファイバーを最大に活性化したときの収縮張力(最大収縮張力)を対照の標準液中での張力の $45 \pm 2\%$ (平均±標準誤差, $n=3$)まで抑制した。一方、最大活性化に達するまでの低い Ca^{2+} 濃度領域での収縮張力に対して、1-ブタノールは Ca^{2+} 感受性を高める効果を示した。収縮張力発生過程における協同性を仮定したHillプロットによってファイバーの張力発生に対する Ca^{2+} 感受性を最大張力の50%の大きさの張力を発生する Ca^{2+} 濃度($p\text{Ca}_{50}$)で評価すると、その値は1-ブタノールによって0.35ユニット増大した。張力発生の総合的な協同性の強さをあらわすHill係数には顕著な違いは見られなかった。

ファイバーの一端をファイバー長の0.5%分だけ500 Hzで正弦波状に長さ変化させた時の他端での張力応答の同相成分として見積もったファイバーのスチフネスは、1-ブタノールを含む液中でも Ca^{2+} の有無にかかわらず標準液中と変わらなかった(標準収縮液中でのスチフネスに対して5%1-ブタノール入り収縮液中のスチフネス $102 \pm 4\%$; 平均±標準誤差, $n=3$)。このことから1-ブタノール溶液中でも硬直様のミオシン-アクチン間結合は形成されておらず、収縮溶液中では標準液中にほぼ匹敵する数のミオシンがアクチンとの相互作用に入るが、個々のミオシンとアクチンの収縮性相互作用により発生する張力が半分弱に減弱しているものと考えられた。

4. ブタノール以外のアルコール類のファイバー収縮能に対する効果

上に調べた5%の1-ブタノールと同程度にスキンドファイバーの横断面積を圧縮する30%の1,2-ブタンジオールと1,3-ブタンジオールがファイバーの収縮能に及ぼす効果を次に検討した。

いずれのブタンジオールも収縮張力発生をほぼ完全に抑制した。いずれのアルコールについても Ca^{2+} で活性化する前の静止張力には明らかな影

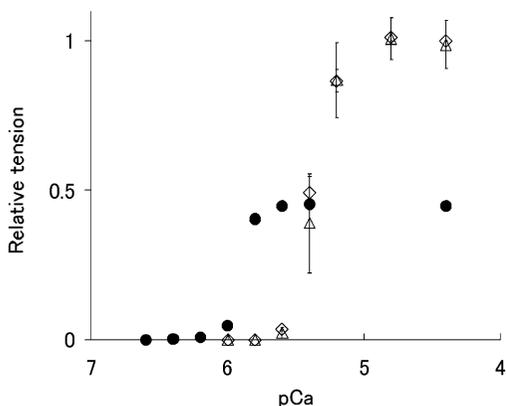


Fig. 4. Ca^{2+} -activated tension of skinned fibers with and without 5% 1-butanol. Active tension relative to maximal tension in the absence of 1-butanol is plotted against $\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$ to show pCa -tension curve. Closed circles represent tension in the presence of 1-butanol, diamonds and triangles represent controls without 1-butanol obtained before and after the series of activation in the presence of 1-butanol.

響を及ぼさなかった。ファイバーのストレッチは Ca^{2+} 非存在下では1-ブタノールの場合と同様に標準弛緩液中と同等であったが、収縮液中では1,2-ブタンジオールで $22 \pm 2\%$ 、1,3-ブタンジオールで $37 \pm 3\%$ (いずれも平均 \pm 標準誤差, $n=3$) に抑制されていた。このことから、いずれのブタンジオールのもとでも硬直様のミオシン-アクチン間結合は形成されていないが、収縮液中では収縮張力発生だけでなく、ミオシンとアクチンの相互作用そのものがかなり抑制されていることがわかった。

また、同程度にファイバーを圧縮する4% 2-ペンタノールは最大収縮張力を40%に抑制し、カルシウム感受性を pCa_{50} にして0.71ユニット分高めた。この半分の濃度の2% 2-ペンタノールでは、ファイバーの圧縮は認めなかったが最大収縮張力が70%ほどに抑制され、カルシウム感受性も pCa_{50} にして0.44ユニット分高まった。2-ペンタノールについて、収縮能への効果はおおよそ濃度に比例していることがわかった。

アルコール類のファイバーの収縮能に対する効果はほぼ完全に可逆で、ブタンジオールによって完全に収縮張力発生が抑制された後でも、標準液に戻せばアルコールを作用させる前と同等の最大

収縮張力(1,2-ブタンジオールで89%, 1,3-ブタンジオールで85%)を発生し、カルシウム感受性もアルコールを作用させる前と有意な差を示さなかった (Fig. 4)。

IV. 考 察

1. アルコールのスキンドファイバー圧縮能

ブタノール類とペンタノール類がスキンドファイバーを圧縮することがわかった (Figs. 1 and 2)。デキストラン T-500 やポリビニルプロピレン K-30 などの高分子溶質の場合は、筋フィラメント格子に入るにはこれらの分子は大きすぎて物理的に排除されると考えられる⁷⁾⁸⁾。しかし今回使用したアルコール類は低分子量(74~106)なので、これらのアルコール類によるファイバー圧縮効果が筋フィラメント格子からの物理的排除による浸透圧効果である可能性はない。

このファイバー圧縮効果はアルコールの重量%よりも水酸基がついていない $-\text{CH}_2-$ の濃度と分子内での水酸基の配置とに強く影響されたから、アルコールが代替した分の水濃度の減少によるものとも考えにくい。

まず、水酸基がついていない $-\text{CH}_2-$ の濃度とファイバー圧縮能とが強く相関したことは、 $-\text{CH}_2-$ が一般に疎水基とされていることに深く関係するだろうと想像される。疎水性相互作用はタンパク質の折れ畳みばかりでなく、筋フィラメント格子内を含めた細胞一般の広い細胞内液環境に強い影響力を持つと期待されるからである。細胞質全体を大きな疎水コロイドと捉えれば、その含水率に対して疎水基である $-\text{CH}_2-$ が競合的に作用することは教科書的な疎水コロイドの振る舞いに合致するものである。しかし、今回見出された結果は次の二点で筋細胞質標本であるスキンドファイバーを単なる疎水コロイドと見る視点を与える以上に興味深いことを示唆している。

第一に、少なくともブタノール類に関しては $-\text{CH}_2-$ が一つの分子上に何個あるかよりも、溶液中に $-\text{CH}_2-$ がどれだけの密度で存在するかがファイバー圧縮能を大きく左右した。このことは、個々の $-\text{CH}_2-$ が分子内での強い共有結合に束縛されているにもかかわらず独立に効果を発揮することを示しており、この情報は $-\text{CH}_2-$ が疎水基と

して作用するメカニズムを絞り込むことを可能にする。すなわち、個々の $-CH_2-$ が自由に運動することを疎水メカニズムは前提としないことがわかる。

第二に、水酸基は単に $-CH_2-$ の疎水的性質をキャンセルする存在ではなく、その配置によってファイバーの圧縮経過を興味深く修飾した。ペンタノール類においてこの水酸基の配置の効果があらわになった。すなわち、水酸基の数は1個だが分子内の位置が異なる1-, 2-, 3-ペンタノールのうち1-ペンタノールが最も強い圧縮能を持つことから、分子の中で疎水基と親水基が偏在することが重要な要素になることが示唆される。1-ブタノールと2-ペンタノールがこれについて同等の圧縮能をもち、分子の端に二つの水酸基が集まっている1,2-ブタンジオールと1,2-ペンタンジオールの圧縮能がより弱い同等の圧縮能を持ち、水酸基が離れた位置に複数ついている1,3-ペンタンジオールではずっと弱い圧縮能しか持たなかったこと (Fig. 3) からすると、単一の水酸基の親水効果は単一の $-CH_2-$ の疎水効果よりも広い空間をカバーするものであることが想像される。またこの二つのグループを $-CH_2-$ の無限希釈に外挿すると、ほぼ一点に収束する。筋フィラメント間隔には上限があるという報告³⁾¹⁹⁾があるので低濃度での圧縮能が頭打ちになるのはファイバー全体あるいは個々のサルコメアの構造による機械的な制約によると考えられる。仮想的にこの上限の制約が解除されれば、水酸基の分子内での位置を考慮して $-CH_2-$ の密度を評価することでアルコールのファイバー圧縮効果が説明できるであろう。さらにコンピュータシミュレーションによって水酸基と $-CH_2-$ のまわりでの水分子の動きを追えば、これらの基の筋圧縮効果のメカニズムをさらに絞り込めるかもしれない。

2. アルコールの収縮変調効果

筋線維のカルシウム感受性や最大張力が筋フィラメント間隔に依存することは広く知られている¹⁹⁾。しかし、1-ブタノールのファイバーの収縮張力に対する効果(最大収縮張力48%, Ca^{2+} 感受性増大)は、これとファイバー圧縮率がほぼ同じになる濃度の1,2-ブタンジオール、1,3-ブタンジオールの収縮張力抑制効果(完全抑制)とは大き

く異なっていたから、アルコール類のファイバー収縮能に対する効果は筋フィラメント間隔への効果だけでは説明できない。さらに決定的なことは、アルコールによる収縮変調効果はほぼ完全に可逆であったのに対して、ファイバー圧縮効果は不可逆であったことである。この可逆性の乖離は、アルコール類の収縮変調効果と筋圧縮効果とは完全に異なるメカニズムを介していることを示唆する。実験溶液に用いている Ca^{2+} キレート剤EGTAと Ca^{2+} との結合に今回用いたアルコール類が与える影響は収縮変調効果を説明できないので(未発表データ)、アルコール類の収縮変調効果は筋収縮タンパク質に対する、フィラメント間隔非依存性の効果である。

3. アルコール類の作用メカニズム

Highsmithら²⁰⁾によると炭素鎖3~10のアルコール類は、筋肉の収縮性相互作用の主役のひとつであるミオシンの頭部にあたるS1部分に疎水性相互作用で結合してS1の構造変化を誘導し、ATPase活性を上昇させるという。もしブタノール類やペンタノール類がS1のみでなく筋フィラメント格子内のさまざまな部位と疎水性相互作用しているならば、その結果さまざまなタンパク質に構造変化が誘導され格子の狭小化も収縮変調も起こりえよう。

しかし、ファイバー圧縮効果が不可逆にもかかわらず収縮変調がほぼ可逆であったことは、圧縮効果は収縮張力発生にかかわるアクチン、ミオシン、制御タンパク質系以外の構造タンパク質(例えばM線やZ線を構成するタンパク質)に不可逆な変化を起こしたものと考えられる。ところが、M線やZ線部分を構成するタンパク質は筋節全体の構造タンパク質の中では小さな割合しか占めておらず、この小さな部分の構造変化が筋節全体を、ひいてはファイバー全体を横断面積にして半分近く、筋フィラメント格子間隔に換算するなら70%近くにまで圧縮することは考えにくい。事実Akiyamaら²¹⁾は硬直時の筋節ではM線やZ線の太さ方向の硬さはその周辺の筋節部分にも波及するものの、弛緩時の筋節ではZ線やM線の硬さを検出することすら容易ではないと報告しており、M線やZ線の構造そのものが直接にフィラメント間隔やファイバーの太さを圧縮するとは考え

られない。

本研究に用いたのは機械的に細胞膜を除去したスキンドファイバーであるから、界面活性剤で化学的に処理して作成したときのような細胞膜の遺残は存在しない。したがって、細胞膜の遺残物にアルコール類が作用してファイバーを圧縮した可能性はない。

機械的に細胞膜を除去したスキンドファイバーでも、筋節構造の集合体である筋原線維を取り巻く筋原線維間構造物は存在する。この筋原線維間物質のうち筋小胞体やミトコンドリアは実験に先立つ界面活性剤処理により破壊してあるがその遺残物は存在する。しかし、今回用いた Triton X-100 は電顕的には筋原線維間の遺残物をほとんど認めないほどに筋原線維間構造物をよく溶出すると報告されている²²⁾ので、このわずかな遺残物にアルコール類が作用してファイバーを圧縮したことも考えにくい。

以上の考察から、ファイバー圧縮は収縮に直接関わらないタンパク質に対するアルコールの直接作用をたとえ間接的に介するとしても、最終的にファイバーを圧縮しているのは筋節全体が作る場をアルコール類が不可逆的に変調させた結果であろうと推論する。

一方、ファイバーの収縮能の可逆変調は何によって誘導されたのだろうか。Endo ら¹⁰⁾によると、収縮液の粘度が上昇するにつれてスキンドファイバーの収縮張力は減少するが、この減少度合いは粘度で一義的に決まるのではなく、粘度を増大させるために加える物質によって大きく異なるという。

1,2-ブタンジオール溶液と1-ブタノール溶液について報告されている粘度測定の結果²³⁾²⁴⁾から内挿すると、ブタノール類の最大張力抑制効果は、Endo ら¹⁰⁾が示した粘度上昇に伴う最大張力抑制の範囲内に収まる。しかし Endo ら¹⁰⁾によれば粘度の高い溶液は最大以下の収縮張力発生時の Ca^{2+} 感受性を低下させるというが、1-ブタノール溶液では Ca^{2+} 感受性が上昇していた (Fig. 4)。1-ブタノールの Ca^{2+} 感受性の変化は粘度変化に伴う Ca^{2+} 感受性の変化としては特異なものといえよう。

筋フィラメント格子内の水の粘度がどのような

状態にあるかを考えるとき、バルクの溶液の粘度とその溶液が浸透した筋フィラメント格子における収縮張力発生とを結びつけることには無理があることがわかる。そもそも細胞内の水は細胞外の水とはまったく異なる性質を持っており²⁵⁾²⁶⁾、筋フィラメント格子内に溶質が浸透したときの格子内局所の粘度は溶液の粘度と異なると考えられるからである。筋フィラメント格子内局所の水の状態を核磁気共鳴法やラマン分光法を用いて調べ、この溶質による水の状態変化と収縮変調や筋圧縮効果とを相関させたときに初めてこれらの溶質のスキンドファイバーに対する作用メカニズムが解明に向かうものと思われる。

V. 結 語

1. ブタノール類、ペンタノール類がスキンドファイバーを圧縮することを見出した。その効果は水酸基の付かない $-\text{CH}_2-$ 基の濃度と、溶質分子中の水酸基の配置に強く依存する。

2. スキンドファイバー圧縮効果は、アクチン、ミオシンや制御タンパク質系へのアルコール類の作用ではなく、他の構造 (M 線や Z 線など) を介した、筋節全体が作る「場」への影響と考えられる。

3. ブタノールとブタンジオールの最大張力抑制効果は報告されている粘度効果の範囲内であったが、ブタノールによるカルシウム感受性の上昇はこれまで報告されている粘度の効果とは逆であった。筋節局所の水の状態を評価して、筋収縮能やフィラメント格子間隔との相関を調べることが今後の課題である。

文 献

- 1) Natori R. The role of myofibrils, sarcoplasm and sarcolemma in muscle contraction. *Jikeikai Med J* 1954; 1: 18-28.
- 2) Rome E. X-ray diffraction studies of the filament lattice of striated muscle in various bathing media. *J Mol Biol* 1968; 37: 331-44.
- 3) April EW, Brandt PW, Elliott GF. The myofilament lattice: studies on isolated fibers. II. The effects of osmotic strength, ionic concentration, and pH upon the unit-cell volume. *J Cell Biol* 1972; 53: 53-65.

- 4) Umazume Y, Onodera S, Higuchi H. Width and lattice spacing in radially compressed frog skinned skeletal muscle fibers at various pH values, magnesium ion concentrations and ionic strengths. *J Muscle Res Cell Motil* 1986; 7: 251-8.
- 5) Umazume Y, Higuchi H, Takemori S. Myosin heads contact with thin filaments in compressed relaxed skinned fibers of frog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1991; 12: 466-71.
- 6) McDonald KS, Moss RL. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca^{2+} sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res* 1995; 77: 199-205.
- 7) Godt R, Maughan DW. Swelling of skinned muscle fibers of the frog. *Biophys J* 1977; 19: 103-16.
- 8) Millman BM, Wakabayashi K, Racey TJ. Lateral forces in the filament lattice of vertebrate striated muscle in the rigor state. *Biophys J* 1983; 41: 259-67.
- 9) Konishi M, Watanabe M. Molecular size-dependent leakage of intracellular molecules from frog skeletal muscle fibers permeabilized with beta-escin. *Pflügers Arch* 1995; 41: 131-6.
- 10) Endo M, Kitazawa T, Kakuta Y. Effect of "viscosity" of the medium on mechanical properties of skinned skeletal muscle fibers. In: Sugi H, Pollack GH, editors. *Cross-bridge mechanism in muscle contraction*. Tokyo: University of Tokyo Press; 1979. p. 365-76.
- 11) Maruyama T, Kometani K, Yamada K. Modification of the contractile properties of rabbit skeletal muscle by ethylene glycol. *J Biochem* 1989; 105: 1009-13.
- 12) Clarke ML, Roger CD, Tregear RT. Modification of crossbridge states by ethylene glycol in insect flight muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1984; 5: 81-96.
- 13) Kimura M, Takemori S. Effect of small molecular solutes on the volume and function of skinned skeletal muscle. *Jpn J Physiol* 2005; 55: S122.
- 14) 木村雅子, 鈴木優一, 高岸勝繁, 竹森 重. 骨格筋スキンドファイバー断面積に対するポリオールの効果. *生物物理* 2004; 44: S76.
- 15) Takemori S. Influence of osmotic swelling on cross section and resting tension in isolated skeletal muscle fibers. *Jpn J Physiol* 1990; 40: 595-611.
- 16) Horiuti K, Highchi H, Umazume Y, Konishi M, Okazaki O, Kurihara S. Mechanism of action of 2,3-butanedione 2-monoxime on contraction of frog skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1988; 9: 156-64.
- 17) Smith R, Martel AE. *Critical stability constants*. Vol. 1-5. New York: Plenum Press; 1974-82.
- 18) 堀内桂輔, 馬詰良樹. 心筋スキンドファイバー. 永野 充, 今井昭一 編. *心筋代謝実験法*. 東京: 医歯薬出版株式会社; 1988. p. 393-7.
- 19) Reuben JP, Lopez E, Brandt PW, Grundfest H. Muscle: volume changes in isolated single fibers. *Science* 1963; 142: 246-8.
- 20) Highsmith S. On the mechanism of detergent modification of myosin structure and function. *J Biochem* 1990; 107: 554-8.
- 21) Akiyama N, Ohnuki Y, Kunioka Y, Saeki Y, Yamada T. Transverse stiffness of myofibrils of skeletal and cardiac muscles studied by atomic force microscopy. *J Physiol Sci* 2006; 56: 145-51.
- 22) Aldoroty RA, April EW. Donnan potentials from striated muscle liquid crystals. *Biophys J* 1984; 46: 769-79.
- 23) Hawrylak B, Andreycyk S, Gabriel CE, Gracie K, Palepu R. Viscosity, surface tension, and refractive index measurements of mixtures of isomeric butanediols with water. *J Solution Chem* 1998; 27: 827-41.
- 24) D'Aprano A, Donato ID, Caponetti E, Agrigento V. Viscosity studies of solutions of water in n-aliphatic alcohols at various temperature. *J Solution Chem* 1979; 8: 793-800.
- 25) Kimura M, Takemori S, Yamaguchi M, Umazume Y. Differential osmotic behavior of water components in living skeletal muscle resolved by 1H -NMR. *Biophys J* 2005; 89: 1143-9.
- 26) Takemori S, Yamaguchi M, Kimura M. Skinning effects on skeletal muscle myowater probed by T_2 relaxation of 1H -NMR. *Biophys J* 2007; 92: 3610-4.