日本産両棲類 8 種の骨格筋の組織化学的解析

II. ミオシン ATPase 活性と pH の関係

真鍋 昇*・佐藤 英明*・丸山一子**・石橋武彦*

Histochemical Analysis of Skeletal Muscle Fibers in Eight Species of Japanese Amphibians. II. PH Stability of Myosin Adenosine Triphosphatase. Noboru MANABE*, Eimei SATO*, Kazuko MARUYAMA** and Takehiko ISHIBASHI*

Effects of different pH on myosin adenosine triphosphatase (myosin ATPase) activity in M. gastrocnemius in eight species of amphibians (*Cynops pyrrhogaster*, *Hyla japonica*, *Rana nigromaculata*, *Rana brevipoda*, *Rana rugosa*, *Rana limnocharis*, *Rhacophorus buergeri*, *Rhacophorus arboreus*) were estimated histochemically. The pH stability of myosin ATPase activity varies with the types of muscular fibers; namely, the range of pH stability at an acidic pH range in SO fibers was more extensive than in the other types of fibers. PH stability of myosin ATPase activity in the same fiber type varied with species, but the pattern of the stability after various pH treatments coincided in *Rana nigromaculata* and *Rana brevipoda*, and in *Rana rugosa* and *Rana limnocharis*.

酵素活性と pH には密接な関係があるが、骨格筋の収縮に関与する myosin adenosine triphosphatase (ミオシン ATPase) 活性も pH によって調節される (永井, 1971)。近年ミオシン ATPase の特性について組織化学的な検討がされ、ミオシン ATPase は酸やアルカリで短時間処理されるだけで活性が変化することが明らかにされている (Brooke and Kaiser, 1970; Müntener, 1979; Soukup et al., 1979)。運動にともない筋線維内の pH は変化すると考えられるので、ミオシン ATPase 活性と pH の関係とは筋収縮のメカニズムを知る上で重要である。両棲類 8 種の筋線維型については前報 (真鍋ら, 1980) で述べたが、今回ミオシン ATPase 活性におよぼす pH の影響を組織化学的に検討したので報告する。

材料および方法

この実験での筋肉材料は前回の実験 (真鍋ら, 1980) に用いた動物から採取したものである。すなわち京都府下で捕獲したイモリ、アマガエル、トノサマガエル、ダルマガエル、ツチガエル、ヌマガエル、カジカガエル、モリアオガエルの成体各 6 匹から得た腓腹筋である。腓腹筋は整形した後、ドライアイス・イソペンタン中で凍結し、コールドトームで 10 μ の連続凍

* 606 京都市左京区北白川追分町, 京都大学農学部畜産学教室

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyoku, Kyoto 606.

** 606 京都市左京区北白川追分町, 京都大学理学部動物学教室

Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto University, Kitashirakawa, Sakyoku, Kyoto 606.

結切片を作成し, Guth and Samaha (1970) の方法に従ってミオシン ATPase 活性を検出したが, 検出前に切片を種々の pH を示す緩衝液に浸漬し, pH 処理の影響を調べた。すなわち前報(真鍋ら, 1980)に従い, 切片をアジ化ナトリウムで処理してミトコンドリア ATPase 活性を阻害し, ついで pH3.6から 11.0まで 0.2ずつ異なった緩衝液に15分間浸漬した後, ミオン

Fig. 1. The pH stability of ATPase reaction in amphibian muscle fibers. Intensity of histochemical reactions: white rectangle slight, dotted moderate, striped strong, dark very strong. The branches at both ends of the bars show the variations of intensity of reactions.

ン ATPase 活性を検出した。なお種々の pH を示す緩衝液は 50mM 酢酸・水酸化カリウム (pH 3.6~6.0), 50mM トリス・塩酸 (pH 6.2~9.0) および 50mM 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール・塩酸 (pH 9.2~11.0) で調整した。また一方で前報 (真鍋ら, 1980) に従い, 9 種類の酵素活性を調べ, 腓腹筋筋線維を種々の筋線維型に分類し, それぞれの筋線維型におけるミオシン ATPase 活性と pH の関係を検討した。なお反応はすべて 20°C で行なった。

結 果

骨格筋筋線維は酵素反応によって, Slow-twitch-oxidative (SO) 型, Fast-twitch-oxidative-glycolytic (FOG) 型, Fast-twitch-glycolytic (FG) 型の 3 種のメインタイプに, さらに染色性の強弱によって, それぞれ 3 種類のサブタイプの計 9 種類に分類することができる (真鍋ら, 1980)。今回の実験に用いた腓腹筋においても, 3~5 種類は明瞭に区別できる。

第 1 図はミオシン ATPase 活性に対する pH 処理の影響を示したものであるが, 筋線維型の相違によって反応が異なったので各筋線維型に分けて記載した。両端に分岐部のみられるものは同一の筋線維型においても若干活性に変異がみられたものについて示したものである。

イモリでは SO₂, FOG₂, FG₃ 型ともに pH 5.4~10.6 の緩衝液で処理しても, その後の活性は変わらず, 非常に強く反応したが, SO₂ 型のミオシン ATPase は FOG₂ 型や FG₃ 型にくらべ, 酸性側において中等度ないし弱く反応する域が広いことが観察された。

アマガエルでは, FOG₂, FG₂ 型ではそれぞれ pH 5.0~10.6, 5.2~10.4 の領域で非常に強く反応するが, SO₃, FOG₃ 型では非常に強く反応する領域はみられない。ミオシン ATPase の安定域は筋線維型によって異なり, SO₃ 型では酸性側での安定域が広がっている。

トノサマガエルとダルマガエルでは全く同一のパターンを示し, SO₃ 型におけるミオシン ATPase 活性の酸性側における安定域が他の筋線維型にくらべ広いことがうかがわれる。

ツチガエルとヌマガエルでもミオシン ATPase 活性は同一パターンを示したが, SO 型の酸性側での安定域は他の筋線維型にくらべ広く, また SO₁ と SO₂ 型, FOG₁ と FOG₃ 型では活性の強度は異なるが安定域は一致している。

カジカガエルとモリアオガエルにおいても SO 型筋線維のミオシン ATPase 活性の酸性側での安定域は FOG や FG 型にくらべて広がっている。カジカガエルの SO₂ 型では広領域で活性の異なるミオシン ATPase が観察される。なおカジカガエルのミオシン ATPase 活性を第 2 図に示した。

今回得られた結果の主なものは, 筋線維型が異なるとミオシン ATPase 活性の pH 安定域は異なり, SO 型では FOG, FG 型にくらべて酸性側での安定域が広いこと, また筋線維型構成の一致したトノサマガエルとダルマガエル, ツチガエルとヌマガエルではミオシン ATPase 活性の pH 安定域は一致するが, 同一型に分類された筋線維型でも種が異なるとミオシン ATPase 活性の pH 安定域は必ずしも一致しないということの 2 点である。

考 察

ラット, ウサギ, ヒツジ, ウシ, ヒトなどにおいても筋線維型が異なるとミオシン ATPase 活性の pH 安定域は異なることが明らかにされている (Brooke and Kaiser, 1970; Suzuki,

Fig. 2. Serial transverse sections of *M. gastrocnemius* in *Rhacophorus buergeri*. x100. Myosin ATPase activities preincubated at pH 4.2 (photo. 1), 4.4 (photo. 2), 4.6 (photo. 3), 4.8 (photo. 4), 10.0 (photo. 5), 10.2 (photo. 6), 10.4 (photo. 7), and 10.6 (photo. 8), showing various pH stability of myosin ATPase activity with the types of muscular fibers. SO: slow-twitch-oxidative type fiber; FOG: fast-twitch-oxidative-glycolytic type fiber; FG: fast-twitch-glycolytic type fiber.

1976; Müntener, 1979; Soukup et al., 1979)。ラットではSO型筋線維のミオシン ATPase 活性はFOG型やFG型にくらべ、より酸性側で安定であることが知られている (Soukup et al., 1979)。ミオシン ATPase 活性の pH 安定域は固定剤、pH 処理液の温度や時間によって異なるので、今回調べた両棲類 8 種の結果と単純に比較することはできないが、SO型筋線維のミオシン ATPase 活性が他の型にくらべてより酸性側で安定であるという結果は哺乳類における結果と一致するものである。

SO型筋線維は Peter et al. (1972) によると疲労しにくい筋線維といわれている。運動にともない酸素の供給が不十分になると筋線維内に乳酸が蓄積し、筋線維内の pH は低下する (飯田, 1966)。SO型筋線維がより酸性側の pH で処理されても活性が安定なことは、筋線維内の pH がより酸性側に傾いても筋収縮が阻害されないことを意味しており、SO型筋線維が疲労しにくい筋線維であるという事実はミオシン ATPase 活性の pH 安定域の問題と関係あるように思われる。

同一の筋線維型でも種が異なるとミオシン ATPase 活性の pH 安定域も異なる傾向を示したが、このことは分類学的へだたりは筋線維型構成に反映する (真鍋ら, 1980) のみならず、ミオシン ATPase 分子の物理化学的性質にも反映していることを示している。種によるミオシン ATPase 分子の変異についてはさらに検討を要する。

要 約

イモリ・アマガエル・トノサマガエル・ダルマガエル・ツチガエル・ヌマガエル・カジカガエル・モリアオガエルの腓腹筋のミオシン ATPase 活性におよぼす pH の影響を組織化学的に調べたところ、筋線維型によって、ミオシン ATPase 活性の pH 安定域が異なり、SO型では FOG 型や FG 型にくらべ酸性側での安定域が広いこと、また pH 安定性は同一筋線維型でも種の特異性がみられたが、トノサマガエルとダルマガエル、ツチガエルとヌマガエルでは全く一致することが明らかにされた。

引 用 文 献

- Brooke, M.H. and K.K. Kaiser. 1970. The "myosin ATPase" systems: The nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18: 670-672.
- Guth, L. and F.J. Samaha. 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28: 365-367.
- 飯田勲. 1966. 動物生理学. 森北出版, 東京. 326 p.
- 真鍋昇・佐藤英明・丸山一子・石橋武彦. 1980. 日本産両生類 8 種の骨格筋の組織化学的解析 I. 筋線維の酵素組織化学的分類. *爬虫両棲類学雑誌* 8: 112-124.
- Müntener, 1979. Variable pH dependence of the myosin ATPase in different muscles of the rat. *Histochemistry* 62: 299-304.
- 永井寅男. 1971. 筋収縮の化学 (新生理学, 上巻, 問田直幹, 内菌耕二編) 第 3 版. 医学書院, 東京 1006 p.
- Peter, J.B., R. Barnard, V. Edgerton, C. Gillespie and K. Stempel, 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627-2633.
- Soukup, T., J. Vydra and M. Cerny. 1979. Changes in ATPase and SDH reactions of the rat extrafusal and intrafusal muscle fibres after preincubations at different pH. *Histochemistry* 60: 71-84.
- Suzuki, A. 1976. The pH stability of myofibrillar adenosine triphosphatase of five fiber types in skeletal muscles of the sheep and cattle. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 47: 95-103.