膀胱平滑筋細胞内収縮機構の研究

—skinned fiber 法による検討—

福島県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 白岩康夫教授)

金 谷 昇 二 郎

STUDY OF THE INTRACELLULAR CONTRACTILE MECHANISM OF THE URINARY BLADDER SMOOTH MUSCLE USING SKINNED FIBER TECHNIQUE

Shojiro Kanaya

Department of Urology, Fukushima Medical College

(Director: Prof. Y. Shiraiwa)

The intracellular contractile mechanism of the urinary bladder smooth muscle was studied using the saponin-treated skinned fiber in which cell membrane was chemically removed.

The chemically skinned bladder muscle showed a tension development which was dependent on Ca^{2+} -concentration. The minimal Ca^{2+} -concentration for the tension development was 2×10^{-7} M Ca^{2+} . The maximal tension was induced at 10^{-5} M. This maximal tension was approximately the same as the K^{+} -induced tension development observed in the intact muscle. In addition, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the contractile proteins were still preserved in the saponin-treated bladder smooth muscle. The Ca^{2+} -concentration-tension response curve shifted to the left with an increase in MgATP concentration (from 3 mM to 7 mM), indicating that the sensitivity of the skinned muscle was affected by MgATP .

Mg^{2+} above 6 mM caused a slow tension development by itself in the absence of Ca^{2+} .

Ca^{2+} -induced tension development was blocked by the addition of W-7 (calmodulin antagonist).

This result suggested that calmodulin (Ca^{2+} -binding protein) regulates the actin-myosin interaction in the urinary bladder smooth muscle.

Caffeine solution (25 mM) caused a rapid tension development in the skinned bladder smooth muscle which was loaded with Ca^{2+} -concentration, however, this tension development decreased when the loaded Ca^{2+} -concentration exceeded 10^{-6} M.

It seems from this result that "Ca-induced-Ca release mechanism" also exists in the urinary bladder smooth muscle.

Key words: intracellular contractile mechanism, skinned fiber, Ca^{2+} .

要旨: 膀胱平滑筋における細胞内収縮機構の解明を目的に, 家兎膀胱の細胞膜のみを化学的に破壊した筋線維"skinned fiber"を作製し, 種々の検討を加えた。また少数例ではあるが, ヒト膀胱についても同様の実験を行なった。膀胱 skinned fiber は一定濃度の Mg^{2+} , MgATP の存在下に, Ca^{2+} 濃度に依存性の収縮を示した。この時の Ca^{2+} 濃度は細胞外液中に比較し, きわめて低濃度であり, 収縮閾値は 2×10^{-7} M であった。また最大張力は 10^{-5} M で観察された。この最大張力は, 生筋の状態における K^{+} 収縮とほぼ同程度であり, SDS-ゲル法における収縮蛋白の分析では, 生筋と skinned fiber との間に差は認められなかった。skinned fiber の Ca^{2+} -sensitivity は収縮液中の MgATP 濃度によって変化した。一方, Ca^{2+} free の条件下であっても, Mg^{2+} 濃度の増加は skinned fiber の静止張力を増大させた。calmodulin は細胞内 Ca^{2+} 結合蛋白として, 各種の細胞機能発現に深く関与していると考えられているが, calmodulin 阻害剤 W-7は skinned fiber の収縮を濃度依存性に抑制した。

一定時間 Ca^{2+} 溶液に浸漬した膀胱 skinned fiber は, Ca^{2+} free の caffeine 溶液の投与によって, 一過

性の収縮反応を呈した。これは膀胱平滑筋 skinned fiber においても Ca-store が存在することを示す。また 10^{-6}M 以上の Ca^{2+} 濃度では、この収縮反応はむしろ減少したことより、“Ca-induced Ca release mechanism”が示唆された。

キーワード：細胞内収縮機構，スキンドファイバー，カルシウムイオン

結 言

膀胱平滑筋の収縮機構に関する研究は、種々の排尿障害時における膀胱の様々な病態を理解する上で基礎となり、また治療薬の選択や開発の指針ともなり、今後ますます重要になるものと思われる。現在では自律神経作動薬に対する反応¹⁾に加え、閉塞膀胱や除神経膀胱における muscarinic receptor の定量や性質までが検討されており²⁾³⁾、膀胱平滑筋の細胞膜レベルにおける収縮機構は次第に明らかとなりつつある。

一方、膀胱平滑筋の収縮を細胞内レベルで捉えようと、結局は収縮蛋白であるアクチンとミオシンの相互反応の結果生じたものであると言える。すなわちカルシウムイオン（以下 Ca^{2+} と略）の存在下でアクチンとミオシンフィラメントが ATP を消費しながらお互いに滑走することである⁴⁾⁵⁾。このような細胞内収縮機構は、他の平滑筋や骨格筋など筋組織一般に共通する収縮の基本的プロセスと考えられている⁶⁾。ところが膀胱平滑筋については、先述した細胞膜レベルでの機序は比較的良好に研究されてきたのに対し、この細胞内収縮機構についてはほとんど知られていないのが現状である。一般に筋細胞内における収縮機構を検討する場合、細胞膜の持つ特異的機能は研究上大きな障害となるため、細胞膜のみが取り除かれ、細胞内収縮システムがほぼ完全な形で維持されている“skinned fiber”が必要となる。そこで著者らは大槻らの考案したサポニン処理法⁷⁾を用いることにより、膀胱 skinned fiber を作製し、その細胞内システムを詳細に検討したので報告する。

実験材料及び方法

ネンブータル麻酔下に体重約3kgの雄日本白色家兎から膀胱を摘出し、実体顕微鏡下で筋の走行に沿って約 $0.2 \times 3\text{mm}$ の筋束標本を切離した。筋束は両端を6-0 絹糸にて結び一方を organbath 内のフックに、他端を isometric transducer（日本光電社）に固定、95% $\text{O}_2 + 5\%$ CO_2 の混合ガスを通気した 20°C の Lock 液（155.2mM NaCl, 5.3mM KCl, 3.6mM NaHCO_3 , 1.8mM CaCl_2 , 2.8mM glucose）中に垂直懸垂した。この organbath の容量は約3ml で溶液の排出、注入を

図1 膀胱 skinned fiber の発生張力測定法

速やかに行なえる側孔を取り付けてある（図1）。

初めに organbath 内溶液を2/3K Lock 液（Lock 液中の Na の2/3を K で置換した溶液）に交換し、生筋の状態における K^+ 収縮を記録した。次に、Lock 液で筋束を再び洗浄した後、skinned fiber の作製にとりかかった。膀胱 skinned fiber は、この筋束を $100\mu\text{g/ml}$ のサポニンを加えた4mM-EGTA 弛緩液（130mM KCl, 20mM Tris-maleate, 5mM MgCl_2 , 3mM ATP, 4mM EGTA, pH 6.8, 20°C ）中で30分間処理して作製した。ヒト膀胱に関しては恥骨上前立腺摘出術、あるいは膀胱全摘時の膀胱筋層部分より筋束標本を切離し、同様の方法でサポニン処理を行なった。膀胱平滑筋 skinned fiber は、そのまま organbath 内で張力トランスデューサーに固定されているので、種々の条件下で起こる収縮蛋白の生化学的相互反応を張力の発生として観察することができる。

実験は筋収縮システムの Ca^{2+} に対する感受性の検討から始めた。この際、種々の濃度の Ca^{2+} を含む収縮液は、2mM EGTA 弛緩液（弛緩液中の EGTA を2mM にしたもの、他は4mM EGTA 弛緩液と同組成）に Imai らの方法に準じて CaCl_2 を加えて調整した⁸⁾。

また、MgATP が skinned fiber の Ca^{2+} 依存性収縮へ与える影響を調べると共に、マグネシウムイオン（以下 Mg^{2+} と略）単独の効果についても検討を加えた。さらに、細胞内の Ca^{2+} 受容蛋白である calmodulin の関与について、calmodulin 阻害剤である W-7を用いて解析した。

細胞内 Ca^{2+} の性質を検討する実験では Ca^{2+} の主な貯蔵部位と考えられている筋小胞体が、サポニンや EGTA に対して不安定であることが知られているため⁷⁾、サポニン処理の際の弛緩液は 2mM EGTA を使用し、またサポニンの濃度は 40~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、20~30 分間の処理によって skinned fiber を作製した。また、 Ca^{2+} 溶液の調整は 0.1mM EGTA 弛緩液を使用し、skinned fiber の洗浄も 0.1mM EGTA 溶液を使用した。この条件下で、Ca-store から Ca^{2+} を放出させる作用がある caffeine (25mM) を skinned fiber に投与し、収縮反応を分析した。最後に実験に使用した skin-

ned fiber 5 個についてそれぞれホモジナイズし、SDS ゲル電気泳動法により収縮蛋白の泳動分離を行ない、生筋と比較した。

結 果

1) 生筋と skinned fiber の比較

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis によって、skinned fiber の収縮蛋白の組成を生筋と比較した(図 2)。その結果、サポニン処理が加えられていてもアクチンおよびミオシンは分解されず生筋と同じ泳動パターンを示し、skinned fiber の収縮蛋白はよく保存されていることが明らかとなった。

膀胱平滑筋 skinned fiber では、bath 内の弛緩液を Ca^{2+} を含んだ収縮液に置換すると著明な張力発生が観察された(図 3)。この発生張力は一度上昇したのち

図 2 SDS ゲル泳動法による収縮蛋白の分析。A: 生筋, B: サポニン処理後の skinned fiber サポニン処理された skinned fiber でもアクチン・ミオシンのバンドが生筋と同様に分離されている。

図 3 生筋と skinned fiber の収縮の比較

左は生筋の 2/3K Lock 液による K^{+} 収縮, 右は同一標本のサポニン処理後の 10^{-5}M Ca^{2+} による収縮, W は洗浄を表す。

図 4 各濃度の Ca^{2+} 溶液に対する膀胱 skinned fiber の収縮

A: 家兔膀胱 skinned fiber, B: ヒト膀胱 skinned fiber, W: 洗浄

プラトーになり、 Ca^{2+} が存在する限りその張力は比較的よく維持された。次に bath 内を弛緩液で洗浄し Ca^{2+} 溶液を排除すると、張力は徐々に低下し、もとの静止レベルまで戻った。膀胱 skinned fiber の発生張力を生筋のそれと比較すると、 10^{-5}M の Ca^{2+} で発生する張力の大きさは生筋における K^{+} 収縮とほぼ同程度であったが、収縮および弛緩速度は生筋よりも遅かった (図 3)。

2) skinned fiber の Ca^{2+} 感受性と MgATP の効果
膀胱 skinned fiber の発生張力と Ca^{2+} 濃度との関係を、 Mg^{2+} を 2mM 、 MgATP を 3mM と一定にした条件下で検討した。ウサギ膀胱の skinned fiber では、 $2 \times 10^{-7}\text{M}$ の Ca^{2+} 濃度から張力発生がみられ、発生張力の大きさ及び収縮速度は Ca^{2+} 濃度が増すごとに増加し、 10^{-5}M の濃度で最大収縮が得られた (図 4A)。また、ヒト膀胱の skinned fiber でも同様の所見が得られた (図 4B)。

以上より膀胱 skinned fiber の Ca^{2+} 濃度—張力関係は、 10^{-7}M から 10^{-5}M に至る比較的広い範囲で変動する S 字状曲線となった (図 5)。

次に、 MgATP の張力発生に対する影響を観察するために、収縮液中の Mg^{2+} 濃度を 2mM に固定したまま MgATP の濃度を標準の 3mM から 7mM に増加させ、

図 5 skinned fiber の発生張力と Ca^{2+} 濃度の関係
縦軸(tension)は 10^{-5}M による最大収縮張力を 100% とした各濃度における張力を表わす。
横軸の pCa は Ca^{2+} 濃度を示し、 $-\log[\text{Ca}^{2+}\text{濃度}]$ で表わした。

同様の実験を行なった。その結果 MgATP の濃度が増加した状態では、同一の Ca^{2+} —張力曲線は左方に偏位した (図 5)。すなわち、 MgATP は膀胱 skinned fiber の Ca^{2+} に対する感受性を増大させることが明らかとなった。

3) Mg^{2+} 依存性収縮

図 6 Mg^{2+} による収縮 (Ca^{2+} free 条件下) と Ca^{2+} による収縮の比較 (MgATP 濃度はすべて 3mM に固定)

A: 家兎膀胱 skinned fiber, 2mM Mg^{2+} 弛緩液で張力安定後、 Mg^{2+} 濃度のみを 6mM , 8mM と増加させると、濃度依存性にゆるやかな張力の発生を記録できる。これらの張力は Ca^{2+} (10^{-5}M) による収縮と比較するときわめて小さい。

B: ヒト膀胱 skinned fiber について同様の実験結果を示す

図7 W-7による skinned fiber の収縮抑制効果

A：家兎膀胱, 10^{-6}M Ca^{2+} で収縮させた張力が平衡に達した後, W-7 ($100\mu\text{M}$) を投与すると, Ca^{2+} 存在下でも skinned fiber は弛緩する. W-7の濃度を $300\mu\text{M}$ まで増加させると弛緩速度はさらに増す.
B：ヒト膀胱, W-7 $300\mu\text{M}$ の収縮抑制効果を示す.

以上の Ca^{2+} に対する収縮の他に, Mg^{2+} 依存性収縮が膀胱 skinned fiber にも存在するかについて検討した. skinned fiber の静止張力が安定したところで, 弛緩液中の MgATP を標準の 3mM に固定したまま Mg^{2+} の濃度を増加させて張力変化を記録した. ウサギ膀胱 skinned fiber は, Mg^{2+} 濃度が 6mM 以上になると緩徐な張力発生を示した(図6A). この張力の大きさは Ca^{2+} による発生張力と比較するときわめて小さいものであったが, skinned fiber は Ca^{2+} が存在しなくとも Mg^{2+} 単独で収縮することができた. ヒト膀胱 skinned fiber でも同様の Mg^{2+} 依存性収縮が観察された(図6B).

4) calmodulin 阻害剤 (W-7) の効果

細胞内収縮機構における calmodulin の関与をその阻害剤である W-7 を用いて検討した. 膀胱 skinned fiber を 10^{-6}M 濃度の Ca^{2+} で収縮させ, 張力が平衡になったところで, W-7 を含んだ同一濃度の Ca^{2+} 溶液で bath 内を置換すると, 著明な弛緩反応が認められた(図7A). そこで W-7 の弛緩効果を, 最初の収縮張力の半分まで弛緩するのに要する時間, すなわち張力の下降速度で評価した. W-7 の濃度が $100\mu\text{M}$ のとき, この Half Time (=T) は平均 $18.2 \pm 1.25\text{min}$ で, $300\mu\text{M}$

表1 W-7 投与時の skinned fiber の収縮張力半減時間の比較

W-7 Concentration	Half Times of Relaxation (T)
100 μM	$18.2 \pm 1.25 \text{ min (n=5)}$
300 μM	$7.4 \pm 0.58 \text{ min (n=5)}$

$p < 0.01$

にすると平均 $7.4 \pm 0.58\text{min}$ とさらに短縮し, 両者の間に有意の差が証明された(表1). このように, W-7 は skinned fiber の Ca^{2+} 収縮に対し, 濃度依存性に弛緩速度を増加させた. またヒト膀胱では, $300\mu\text{M}$ W-7 の効果を検討したところ, 同一の弛緩現象が記録された(図7B).

5) 膀胱 skinned fiber における Ca-store の評価

初めに, skinned fiber に対し, Ca^{2+} を含まない 25mM caffeine 溶液 (25mM caffeine, 0.1mM EGTA, 130mM KCl, 20mM Tris-maleate, 5mM MgCl_2 , 3mM ATP) を投与し, Ca-store から Ca^{2+} を放出させた. 次に skinned fiber を Ca^{2+} 溶液に5分間浸漬し, Ca-store 内に Ca^{2+} を貯留させた. このように Ca^{2+} を負荷した skinned fiber に対し, 25mM caffeine 溶液を

図8 Caffeine による skinned fiber の収縮

saponin 処理後、いったん caffeine 投与にて Ca-store 内の Ca^{2+} を放出させる。次に Ca-store 内に各濃度の Ca^{2+} を負荷後 caffeine による収縮を順次記録した。caffeine による収縮は store へ負荷される Ca^{2+} 濃度が 10^{-6}M までは増加するが、 10^{-5}M 負荷後はむしろ減少した。

Caf: 25mM caffeine, W: 洗浄

投与し、store から遊離された Ca^{2+} によって惹起される収縮張力を記録した(図8)。caffeine による収縮は、 Ca^{2+} を負荷したときの収縮よりきわめて速く、負荷した Ca^{2+} 濃度が $2 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、 10^{-6}M と増加するに従って大きくなった。しかし、 10^{-5}M 負荷後の収縮張力は、 10^{-6} 負荷後の収縮張力よりも小さかった(図8)。

考 察

平滑筋はその性質上、機械的な処理による skinned fiber の作製が困難である。そこで一時期グリセリン処理法が用いられたが¹⁰⁾、生筋に比較し、細胞内収縮システムの維持には問題があった。これに対し、斉田、野々村らはサポニン処理法が平滑筋の skinned fiber 作製にきわめて有用であることを報告している¹¹⁾。本実験でも生筋と skinned fiber の比較を行なってみたが、SDS ゲル法による収縮蛋白のパターンは、両者の間に差を認めず、また skinned fiber の Ca^{2+} による最大収縮張力は、生筋の状態における K^{+} 収縮の大きさとほぼ同程度であった。これらの結果は、サポニン処理が加えられても収縮に関与する細胞内のシステムはよく保持されていることを示している。したがってサポニン処理による膀胱平滑筋 skinned fiber は本研究の目的にあった優れた標本であると思われる。ただし、skinned fiber の収縮および弛緩速度は、生筋よりもやや劣っていた。この傾向は使用した筋束が太いほど明瞭で skinned fiber では Ca^{2+} などの各種イオンの拡散が生筋よりも時間を要するためと考えられた。

膀胱 skinned fiber は、 Ca^{2+} に対して著明な張力発生反応を示すのが特徴であった。他のイオン条件を 2mM Mg^{2+} 、3mM MgATP と固定した状態で、膀胱 skinned

fiber の張力発生は $2 \times 10^{-7}\text{M}$ の Ca^{2+} 濃度からみられ、 Ca^{2+} 濃度が増すごとに発生張力も大きくなり、 10^{-5}M で最大収縮を示した。この Ca^{2+} 濃度と発生張力との関係から、膀胱平滑筋の細胞内収縮システムも、他の平滑筋と同様に Ca^{2+} によって制御されていると言うことができる。すなわち、筋収縮の基本であるアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの滑走は、膀胱平滑筋においても細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存していると考えられる。このアクチンとミオシンの生化学的相互反応には、生体エネルギー物質である ATP を必要とする。ATP は脱リン酸化されて筋収縮エネルギーを提供するが、実際の収縮においては Mg^{2+} と結合した MgATP の形でミオシンの基質として働く⁸⁾。そこでこの MgATP が skinned fiber の張力発生に与える影響を検討したところ、 MgATP の量が多いほど一定濃度の Ca^{2+} によって発生する張力が有意に増加した。このような MgATP による skinned fiber の Ca^{2+} 感受性の増大は、腸管平滑筋などにおいても報告されており¹¹⁾、膀胱平滑筋においても MgATP は細胞内収縮システムにおいて重要な役割をもつものと考えられる。一方、平滑筋収縮システムが Mg^{2+} によって活性化されることは、ミオシン B の超沈澱などで指摘されてきた¹²⁾。この現象を平滑筋 skinned fiber でみると、 Mg^{2+} による張力発生として観察できることが知られている¹¹⁾。著者の検討でも、膀胱平滑筋 skinned fiber は、 Mg^{2+} 濃度を 2mM から 6mM まで増加させると、 Ca^{2+} が存在しないにもかかわらず、緩徐な張力発生を記録することができた。この Mg^{2+} による張力発生は、現時点においてまだ解明されていない現象の一つである。最近の研究では、平滑筋細胞内でミオシンはかなり不安定な状態にあり、ミオシンが筋収縮装置としてフィラメント構造をとるためには Mg^{2+} が必要であると言われている¹³⁾。しかしこの問題については、ミオシンフィラメント形成に関する電顕的研究も含めて、今後一層の検討が必要と思われる。

平滑筋の細胞内収縮システムが骨格筋と最も異なる点は、 Ca^{2+} 受容蛋白である calmodulin の関与であるとされている¹⁴⁾。すなわち、細胞内で一定濃度以上となった Ca^{2+} は、直接アクチンやミオシンなどの収縮蛋白に作用するのではなく、細胞内に存在する calmodulin に結合する。この Ca^{2+} と calmodulin の結合体が、ミオシン軽鎖キナーゼを活性化し、ミオシンがリン酸化され、アクチンと相互反応することによって筋収縮が起こる¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、これらの収縮制御機構は

主に血管平滑筋,あるいはニワトリの砂嚢などを用いて検討されたものであり,,膀胱平滑筋ではまだ実証されていない。本研究では calmodulin 阻害剤の中でも特に選択性の高い W-7¹⁶⁾を用いて,膀胱平滑筋収縮における calmodulin の関与を検討した。その結果,膀胱 skinned fiber の Ca^{2+} による収縮は, W-7 の濃度に応じて抑制されることが明らかとなった。特に W-7 300 μM の条件では収縮はほぼ完全に抑制された。ヒト膀胱 skinned fiber では, 十分な数の標本が得られなかったが, 300 μM の W-7 による著明な収縮抑制効果を観察できた。したがって, 膀胱平滑筋においても calmodulin が細胞内 Ca^{2+} 結合蛋白として筋収縮システムに深く関与していると考えられた。

最後に細胞内 Ca-store に関する実験を, 膀胱 skinned fiber を用いて行なった。筋細胞には細胞内において Ca^{2+} を貯蔵, 遊離するシステムがあり, 骨格筋においては収縮制御の重要な因子となっている⁵⁾。平滑筋においては, その主たる貯蔵部位と考えられている筋小胞体の発達が骨格筋に比較し劣り¹⁷⁾筋収縮における役割は充分解明されていない。そこで筋小胞体より Ca^{2+} を遊離する作用がある caffeine を膀胱 skinned fiber に作用させることにより, 膀胱平滑筋における Ca-store を検討した。 Ca^{2+} 負荷後の caffeine による skinned fiber の収縮は, Ca^{2+} が直接細胞内で store から放出されるため収縮速度はきわめて速く, また一過性であった。この caffeine 投与による skinned fiber の収縮は, 負荷した Ca^{2+} 濃度に対し, 10^{-6}M までは dose dependent に増大したが, 10^{-5}M の Ca^{2+} を負荷すると, caffeine 収縮はむしろ減少する傾向にあった。これは, ある濃度以上の Ca^{2+} を負荷すると, Ca^{2+} 自体が store の Ca^{2+} を遊離していることを示し, 膀胱平滑筋においても“Ca induced Ca release mechanism”¹⁸⁾¹⁹⁾ が存在することが示唆された。

以上, skinned fiber を用いて, 膀胱平滑筋における細胞内収縮システムについて検討した。細胞内収縮システムは, これまでの結果に示されるように, Ca^{2+} を主体として調節されている点が特徴である。したがって細胞内で Ca^{2+} 動態をコントロールできる薬剤は, 従来臨床で使用されてきた細胞膜レベルで Ca^{2+} を制御するものとは異なった作用機転を持ち, 膀胱収縮に対しても新たな位置づけがなされる可能性がある。この意味で skinned fiber 法は, 細胞内収縮システムの研究のみならず, 細胞内で作用する薬剤の開発などに用いることのできる有力な手法となる。たとえば本研究で

明らかにしたように, W-7 の著明な抑制効果は, 細胞膜の受容体が変化してしまった病的膀胱においても, calmodulin 阻害剤はその収縮を充分抑制できることを示唆している。現在 calmodulin 阻害剤の他にも, Ca-store からの Ca^{2+} 遊離を阻害する薬剤²⁰⁾や, ミオン軽鎖キナーゼ阻害剤等の研究も進められており²¹⁾, 今後この分野における進歩発展は, 臨床的にも大きな利益をもたらすものと期待される。

結 語

サポニン処理法により膀胱 skinned fiber を作製し, 細胞内収縮機構について検討を加え, 次の結果を得た。

① サポニン処理は, 膀胱平滑筋においても細胞内収縮システムが良好に保持される有用な実験方法である。

② 膀胱平滑筋の細胞内収縮システムは, Ca^{2+} によってコントロールされており, また Mg^{2+} MgATP は細胞内収縮システムの重要な因子である。

③ Ca^{2+} -calmodulin 系は, 膀胱平滑筋においても, 細胞内収縮システムにおける主要な経路であることが示された。

④ 膀胱平滑筋においても Ca-store は存在し, また Ca^{2+} 濃度が 10^{-6}M 以上では, “Ca-induced Ca release mechanism” が働くものと思われた。

稿を終えるに当たり, 御校閲を賜った恩師白岩康夫教授に深く感謝の意を表します。

また直接御指導を賜った山口 脩講師に深謝いたします。なお, 本論文の要旨は第76回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Levin, R.M. and Wein, A.J.: Response of the in vitro whole bladder (rabbit) preparation to autonomic agonists. *J. Urol.*, 128, 1087—1090, 1982.
- 2) Levin, R.M., High, J. and Wein, A.J.: The effect of short-term obstruction on urinary bladder function in the rabbit. *J. Urol.*, 132, 789—791, 1984.
- 3) Speakman, M.J., Brading, A.F., Gilpin, C.J., Dixon, J.S., Gilpin, S.A. and Gosling, J.A.: Bladder outflow obstruction-A cause of denervation supersensitivity. *J. Urol.*, 138, 1461—1466, 1987.
- 4) Huxley, A.F. and Niedergerke, R.: Structural changes in muscle during contraction. (Interference microscopy living muscle fibers). *Nature*, 173, 971—973, 1954.
- 5) Ebashi, S. and Endo, M.: Calcium ion and

- muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 123—183, 1968.
- 6) Hartshorne, D.J. and Gorecka, A.: Biochemistry of the Contractile Proteins of Smooth Muscle. *Handbook of Physiology, the Cardiovascular System*, Chapter 4: 91—120, American Physiological Society. Washington, D.C. 1980.
 - 7) 大槻啓男：細胞のサポニン処理。生体の科学, 27, 62—66, 1976.
 - 8) Imai, S. and Takeda, K.: Effect of vasodilators upon the isolated taenia coli of the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 156, 557—564, 1967.
 - 9) Devine, C.E., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P.: Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.*, 52, 690—718, 1972.
 - 10) Filo, R.S., Bohr, D.F. and Ruegg, J.C.: Glycerinated skeletal and smooth muscle (Calcium and magnesium dependence). *Science*, 147, 1581—1583, 1965.
 - 11) Saida, K. and Nonomura, Y.: Characteristics of Ca^{2+} - and Mg^{2+} - induced tension development in chemically skinned smooth muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 72, 1—14, 1978.
 - 12) Murphy, R.A., Bohr, D.F. and Newman, D.L.: Arterial actomyosin (Mg, Ca. and ATP Ion dependencies for ATPase activity). *Am. J. Physiol.*, 217, 665—673, 1969.
 - 13) Wachsberger, P.R. and Pepe, F.A.: Purification of uerine myosin and synthetic filament formation. *J. Mol. Bio.*, 88, 385—391, 1974.
 - 14) 野々村禎昭：平滑筋の収縮制御。蛋白質核酸酵素 (臨臨増刊, 細胞運動と細胞骨格), 28, 340—349, 1983.
 - 15) Dabrowska, R., Sherry, J.M.F., Aromatorio, D. K. and Hartshorne, D.J.: Modulator protein as a component of myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochem.*, 17, 253—258, 1978.
 - 16) Hidaka, H., Asano, M., Iwadare, S., Matsumoto, I., Totsuka, T. and Aoki N.: A novel vascular relaxing agent, N-(6-Aminoethyl)-5-Chloro-1-Naphthalenesul-fonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 207, 8—15, 1978.
 - 17) Porter, R. and Franzini-Armstrong, C.: The sarcoplasmic reticulum. *Sci. Am.*, 212, 73—80, 1965.
 - 18) Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y.: Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers. *Nature*, 228, 34—36, 1970.
 - 19) Saida, K.: Intracellular Ca release in skinned smooth muscle. *J. Gen. Physiol.*, 80, 191—202, 1982.
 - 20) Asano, T. and Hidaka, H.: Vasodilatory action of HA1004[N-(2-Guanidinoethyl)-5-Isoquinolinesul-fonamide], a novel calcium antagonist with no effect on cardiac function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231, 141—145, 1984.
 - 21) Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M. and Hidaka, H.: Selective inhibitor of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *J. Biol. Chem.*, 262, 7796—7801, 1987.

(1989年11月15日受理)