小腸平滑筋細胞膜画分の ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み能

札幌医科大学 外科学第一講座

(主任 : 早坂 滉教授)

札幌医科大学 生理学第二講座

(主任 : 故 宮崎英策教授)

山 本 勝 裕

札幌医科大学 生理学第一講座

藪 英 世

ATP DEPENDENT CALCIUM UPTAKE ACTIVITY IN PLASMA MEMBRANE FRACTION OF INTESTINAL SMOOTH MUSCLE

Katsuhiko YAMAMOTO

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College, Sapporo.

(Chief: Prof. H. HAYASAKA)

Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical College, Sapporo.

(Chief: Prof. E. MIYAZAKI)

Hideyo YABU

Department of Physiology (Section 1), Sapporo Medical College, Sapporo.

Ca^{2+} binding and ATP dependent Ca^{2+} uptake by plasma membrane fraction were studied and the effect of treating plasma membrane fraction with trypsin, phospholipase c and neuraminidase on both activities was observed.

Results of the above tests are as follows;

1. Plasma membrane fraction possessed the ability to bind Ca^{2+} . The Scatchard plot of Ca^{2+} binding showed that plasma membrane had at least two types of Ca^{2+} binding sites of high and low affinity.

2. The amount of Ca^{2+} uptake by plasma membrane fraction was 18.51 ± 1.31 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min at 10^{-5}M Ca^{2+} . The Ca^{2+} concentration for half maximal activation in Ca^{2+} uptake was $3.7 \times 10^{-7}\text{M}$.

3. The ATP dependent Ca^{2+} uptake by the microsome isolated from guinea pig intestine was clearly stimulated by 4 mM $\text{K}_2\text{-oxalate}$ whereas that of plasma membrane fraction was not.

4. Trypsin and phospholipase c treatment led to a 40-88% reduction in the ATP dependent Ca^{2+} uptake. The Ca^{2+} concentration for half maximal activation Ca^{2+} uptake shifted to a high concentration. On the other hand, neuraminidase treatment resulted in a 43-93% increase in ATP dependent Ca^{2+} uptake. But, the Ca^{2+} concentration for half maximal activation in Ca^{2+} uptake was not shifted by neuraminidase treatment.

The results show that plasma membrane plays an important role in regulating the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. The results also suggest that a glycoprotein linked with sialic acid is involved in the flux of Ca^{2+} across the plasma membrane.

I. 緒 言

諸種平滑筋細胞においてその収縮蛋白質系を活性化する(収縮)のに必要な Ca^{2+} の供給源は、現在すくなくとも二つ—1) 細胞外液中のもの、2) 細胞内微小器官由来のもの—あると考えられている (Van Breemen ら 1966; Hudgins ら 1968; Godfraind ら 1969; Bohr, 1973). 前者については活動電流発生時、あるいは脱分極による細胞膜の Ca^{2+} 透過性の上昇による細胞外よりの流入、後者は細胞内諸種微小器官例えば小胞体などに貯蔵されている Ca^{2+} が細胞膜の興奮に対応して遊離する (E-C coupling 機構) (Hasselbach 1964; Peachey, 1965; Ebashi ら 1968), あるいは pharmacomechanical coupling 機構 (Somylo ら 1968) を介して細胞内に遊離されるものと考えられている。

一方、その弛緩は 1) 活動電位の消失による Ca^{2+} 流入の停止、2) 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位への Ca^{2+} の再結合、3) 細胞膜上に存在が想定されているエネルギー依存性 Ca^{2+} くり出し機構 (Ca^{2+} pump) の作動 (Van Breemen ら 1966; Hurwitz

言

ら 1973; Casteels ら 1975), などによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下が考えられる。

かように平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構の多様性は骨格筋に比べはるかに複雑な様相を呈し、したがってその解析を困難にしている。いずれにしても平滑筋の収縮—弛緩サイクルを Ca^{2+} の関与の点から理解するために、一つの手段として細胞膜の Ca^{2+} についての生化学的性質— Ca^{2+} 結合性、ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込みなど—を理解することが有効であると思われる。しかし、平滑筋細胞膜の分離精製は骨格筋や心筋の場合ほどには成功していないのが現状である。

著者らは前報 (山本ら, 1979b) においてモルモット小腸平滑筋の細胞膜画分を高純度に分離する方法について報告した。本報告においてはそのようにして得られた細胞膜画分の Ca^{2+} 結合能、ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み能の存在を確認し、ついでそれらの活性に対する trypsin, phospholipase c および neuraminidase 処理の効果を観察し興味ある結果が得られたのでここに報告する。

II. 実 験 方 法

A. 細胞膜に富む画分の変性法

体重 300~500 g のモルモットを頸椎脱臼、脱血による致死後ただちに全小腸を剥出、腸管内容物を除去した。低温条件下 ($0\sim4^{\circ}\text{C}$) で腸間膜附着部の脂肪組織を除き、 0°C に冷却した抽出液 (0.25 M mannitol, 0.25 mM ethylene diamine tetraacetic acid, 1 mM Tris-HCl pH 7.4) 中で腸管を3回洗浄した。腸管内にガラス棒を挿入し、Ambache (1954) の方法によりできるだけ速やかに筋層を剥離した。この剥離筋層を10倍量の冷抽出液中でハサミにより細切した後、Polytron PT-10 (Kinematica 社製, Luzern, Switzerland) により最高回転下で10秒間ホモジナイズし、さらに同量の冷抽出液を加え、再度 Polytron PT-10 により10秒間ホモジナイズした。この20倍筋ホモジネートを $3000\times\text{g}$, 10分間遠心分離

(18PR-2 形日立高速冷凍遠心機, RP-18 ローター使用) 後、その上清を取り出し、 $77000\times\text{g}$ で60分間遠心分離 (65P 形日立分離用超遠心機, RP50-2 ローター使用) した。その沈渣を終濃度 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) に調整した 8.5% 蔗糖液 6 ml 中で polytron PT-10 により 60 秒間攪拌懸濁した。この懸濁液を終濃度 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) に調整した 25%, 33% および 38% 蔗糖液各々 6 ml を重層した不連続蔗糖密度勾配層の上に静かに重層し、RPS-25 ローターにて $90000\times\text{g}$ で 120 分間遠心分離した。遠心分離後、33% 蔗糖液層に浮遊平衡したバンドを遠心管底部に小孔をあけて滴下させ、他層が混入しないように静かに回収した。これに 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) 液を加え蔗糖終濃度 8.5% に希釈調整し、 $77000\times\text{g}$ で 60 分間遠心分離した。その沈渣を 1 mM Tris-

HCl (pH 7.4) 液に懸濁して細胞膜に富む画分 (以下細胞膜画分と呼ぶ) の試料とした。

B. ミクロソーム画分の変法

剝離筋層を10倍量の冷抽出液中でハサミにより細切後、Polytron PT-10によりset 8 (最高回転はset 10)で10秒間ホモジナイズした。同量の冷抽出液を加え、 $10000\times g$ で15分間遠心分離してその上清を取り出し、 $190000\times g$ で45分間遠心分離した。その沈渣を1 mM Tris-HC (pH 7.4) 液に懸濁してミクロソーム画分の試料とした。

C. 蛋白質濃度の測定

蛋白質濃度はLowry法(1951)で測定し、標準曲線の作成には牛血清アルブミンを使用した。

D. Ca^{2+} 結合量の測定

細胞膜およびミクロソーム両画分の Ca^{2+} 結合量は ^{45}Ca を用いて Millipore filtration 法 (Martonsi ら 1964) により測定した。反応液組成は 20 mM histidine-HCl (pH 6.8), 4 mM MgCl_2 , 132 mM KCl および $0.8 \mu\text{Ci}^{45}\text{Ca}$ を含む種々濃度の Ca^{2+} -EGTA (ethylene glycol-bis-(β -aminoethylether)-N',N-tetraacetic acid) 緩衝液であり、これに 30~60 μg 試料蛋白質を加え全量 1.2 ml とした。なお、一部の実験では 4 mM $\text{K}_2\text{-oxalate}$ および 5 mM NaN_3 を加えた。反応液中の Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} -EGTA 緩衝系 (Murphy ら, 1968; Godt, 1974) を用いて規定した。 Ca^{2+} -EGTA 緩衝液を調整する場合の解離恒数および計算式は小川 (1968; 1974) の報告によった。反応液の濾過に使用する Millipore filter (HA 0.45 μm , 25 mm) は予め 0.25 M KCl 液に浸し、使用に先だち脱イオン水にて洗浄した (Palmer ら, 1970; Moore ら 1975)。

反応は 37°C 恒温下、反応液に ^{45}Ca を含む Ca^{2+} -EGTA 緩衝液の添加により開始した。30 分後、

その中から 1 ml を filter を通して吸引濾過することにより停止した。引き続き 0.25 M 蔗糖を含む 20 mM histidine-HCl (pH 6.8) 液 10 ml を吸引通過させて filter 上の濾過残渣を洗浄した。その filter をバイアルビン中で Bray 液 6 ml に溶解し、それに含まれる ^{45}Ca の放射能を液体シンチレーションカウンター (Packard, LS-3255 型) で測定した。反応液中の ^{45}Ca 比放射能をもとに Ca^{2+} 結合を算出し、nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min で表示した。

E. Ca^{2+} 取り込み量の測定

D 項に述べた Ca^{2+} 結合量測定の反応液に 4 mM ATP [adenosine triphosphate] を加えて測定した。その測定手続きは Ca^{2+} 結合量測定の場合と同様であり、 Ca^{2+} 取り込み量は nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min で表示した。

F. 細胞膜画分の酵素処理

細胞膜画分を処理液 (20 mM histidine-HCl pH 6.8, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2) 4 ml に懸濁し、trypsin, phospholipase c および neuraminidase をそれぞれ加えて 37°C で 30 分間処理した。その酵素量は trypsin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, phospholipase c 5 unit/ml および neuraminidase 1 unit/ml とし、試料蛋白質 (0.35~0.50 mg/ml) を加えて全量 4 ml にて酵素処理を行った。酵素処理の停止に当って、trypsin 処理の場合は予め 0°C に冷却した trypsin inhibitor (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 4 ml と冷処理液 17 ml を加えて反応を停止した。一方、phospholipase c および neuraminidase 処理の場合は冷処理液 21 ml のみを加えて反応を停止した。これらの反応液を $190000\times g$ で 45 分間遠心分離し、その沈渣を 1 mM Tris-HCl (pH 7.4) 液に懸濁してそれぞれの酵素処理細胞膜画分として実験に供した。

III. 使用薬剤および試薬

ATP, trypsin, trypsin inhibitor, phospholipase c は Sigma 社, mannitol, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, histidine, ethylene diamine tetraacetic acid, ethylene glyco-bis-(β -aminoethylether)-N',N-tetraacetic acid, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ は半井化学の特級, sucrose はキンダ化

学の平衡密度勾配遠心分離用, CaCl_2 はキンダ化学の 1 M 標準液を使用した。neuraminidase は丸金醤油社, $^{45}\text{CaCl}_2$ は International Chemical and Nuclear 社, その他の試薬はすべて特級品を使用した。

IV. 実 験 結 果

10^{-6}M Ca^{2+} 濃度下における細胞膜画分の Ca^{2+} 結合量および Ca^{2+} 取り込み量の時間経過を図1に示した。 Ca^{2+} 結合量 (—△—) は反応開始後1分間に 0.72 ± 0.06 nmoles Ca^{2+} /mg protein であり, 5分後に約 1 nmoles Ca^{2+} /mg protein となり, それ以降 Ca^{2+} 結合量の増加は認められなかった. 図示しなかったが, Ca^{2+} 結合量に対して NaN_3 および $\text{K}_2\text{-oxalate}$ はなんら影響を及ぼさなかった. この細胞画分への Ca^{2+} 結合量は反応液中に ATP を添加することにより著明に増加した. すなわち, Ca^{2+} 取り込み量 (—○—) は反応開始後1分間に 2.06 ± 0.21 nmoles Ca^{2+} /mg protein であり, 最初の5分間は直線的に増加し, 20~30分後に平衡した. $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—●—) はこの Ca^{2+} 取り込み量を増加させた. しかし, NaN_3 (—×—) はこれに対しほとんど抑制を示さなかった. これらのことより, 以後の細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量および Ca^{2+} 取り込み量を測定する実験条件は NaN_3 不在, かつ反応時間30分で行った.

細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量を種々の Ca^{2+} 濃度下で観察し, その結果を図2に示した. 使用した Ca^{2+} 濃度の範囲は 10^{-8} ~ 10^{-5}M であり, 実験方法の項で示した Ca^{2+} -EGTA 緩衝系を用いて規定した. 図2に示すごとく Ca^{2+} 結合量は Ca^{2+}

図2. 細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量に対する Ca^{2+} 濃度の影響 (実験数 13例, 結合量 $\pm$ SE)

濃度に依存して増加し, 10^{-5}M Ca^{2+} で最大値 (2.21 ± 0.11 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min) を示した. その閾値 Ca^{2+} 濃度は約 10^{-8}M であった. 図2に示した結果を Scatchard plot 法 (1957) に準じて再プロットし, これを図3に示した. 図中の横軸 (X 軸) は結合量 (n) を示し, 縦軸 (Y 軸) は nk (K は細胞膜と Ca^{2+} との結合

図1. 10^{-6}M Ca^{2+} における細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量および Ca^{2+} 取り込み量の時間経過

—△—: ATP (—), $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—), NaN_3 (—)

—○—: ATP (+), $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—), NaN_3 (—)

—●—: ATP (+), $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+), NaN_3 (—)

—×—: ATP (+), $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—), NaN_3 (+)

(実験数 5例, 結合量 $\pm$ SE)

図 3. 細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量の Scatchard plot (実験数 13 例, 結合量 $\pm$ SE)

図 5. ミクロソーム画分への Ca^{2+} 結合量の Scatchard plot (実験数 13 例, 結合量 $\pm$ SE)

図 4. ミクロソーム画分への Ca^{2+} 結合量に対する Ca^{2+} 濃度の影響 (実験数 13 例, 結合量 $\pm$ SE)

恒数)を示している。図に示すごとく各点を結ぶ線は二相性であり、このことは細胞膜画分の Ca^{2+} 結合部位がすくなくとも high および low affinity の二種類あることを示す。

ミクロソーム画分への Ca^{2+} 結合量に対する Ca^{2+} 濃度の影響を図 4 に示した。細胞膜画分と同様 Ca^{2+} 濃度に依存して Ca^{2+} 結合量は増加し、 10^{-5} M Ca^{2+} で最大値 (1.99 ± 0.16 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min)を示した。図 4 の結果を Scatchard plot 法により再プロットし、その結

果を図 5 に示した。細胞膜画分同様各点を結ぶ線は二相性であり、 Ca^{2+} 結合部位に high および low affinity の二種類あることを示した。

Scatchard plot 上の 2 つの直線成分をそれぞれ X および Y 軸に延長し、その X 軸との交点すなわち binding capacity (n) と、Y 軸との交点 (nk) の値から binding constant (K) を求めることが出来る。図 3 および図 5 から求めたそれぞれの binding capacity および binding constant を表 1 に示した。細胞膜画分の high affinity Ca^{2+} 結合部位の binding capacity および binding constant は、それぞれ 0.30 ± 0.03 nmoles Ca^{2+} /mg protein および $1.23 \pm 0.21 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり、low affinity Ca^{2+} 結合部位のそれらは 2.48 ± 0.13 nmoles Ca^{2+} /mg protein および $7.25 \pm 0.41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。一方、ミクロソーム画分では low affinity Ca^{2+} 結合部位の binding constant が細胞膜画分に比べやや低値を示した以外は類似の値を示した。

次に、ATP 存在下における細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する Ca^{2+} 濃度の影響を図 6 に示した。図のごとく、 Ca^{2+} 取り込み量は Ca^{2+} 濃度に依存して増加した。特に Ca^{2+} 取り込み量の増加は 5×10^{-7} M Ca^{2+} 以上で著明であり、 10^{-5} M Ca^{2+} でほぼ平衡に達した。その最大 Ca^{2+} 取り込み量は 18.51 ± 1.31 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min であり、half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は 3.7×10^{-7} M Ca^{2+} であっ

表 1. 細胞膜およびミクロソーム両画分の high および low affinity Ca^{2+} 結合部位の binding capacity および binding constant (実験数 13 例, $\pm$ SE)

	High affinity sites		Low affinity sites	
	Binding capacity (nmoles Ca^{2+} /mg prot.)	Binding constant (10^7M^{-1})	Binding capacity (nmoles Ca^{2+} /mg prot.)	Binding constant (10^5M^{-1})
Plasma membrane	0.30 ± 0.03	1.23 ± 0.21	2.48 ± 0.13	7.25 ± 0.41
Microsome	0.26 ± 0.01	1.18 ± 0.14	2.44 ± 0.15	4.60 ± 0.67

図 6. 細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する Ca^{2+} 濃度の影響 —○—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—)
—●—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
(実験数 13 例, 取り込み量 $\pm$ SE) 図 7. ミクロソーム画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する Ca^{2+} 濃度の影響
—×—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—), NaN_3 (—)
—○—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—), NaN_3 (+)
—●—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+), NaN_3 (—)
—△—: $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+), NaN_3 (+)
(実験数 6 例, 取り込み量 $\pm$ SE)

た, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ の添加により Ca^{2+} 取り込み量は増加し, $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ および 10^{-5} M Ca^{2+} でのその増加は 18% であった。

ミクロソーム画分について同様の実験を行いその結果を図 7 に示した。ミクロソーム画分への Ca^{2+} 取り込み量は Ca^{2+} 濃度に依存して増加し, 10^{-5} M Ca^{2+} でほぼ最大値を示した。この Ca^{2+} 取り込み量は反応液中への NaN_3 の添加により約 10% 減少した。このことはミクロソーム画分へミトコンドリアが多少なりとも混入していることを示す。 NaN_3 存在下での最大 Ca^{2+} 取り込み量は $27.61 \pm 1.04 \text{ nmoles Ca}^{2+}/\text{mg protein}/30 \text{ min}$ であり, その half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は $4.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。 $\text{K}_2\text{-oxalate}$ の添加によりミクロソーム画分への Ca^{2+} 取り込

図 8. 細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する trypsin 処理の効果
—○—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—)
—●—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
—△—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (—)
—▲—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
(実験数 8 例, 取り込み量 $\pm$ SE)

表 2. 細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量に対する trypsin, phospholipase および c neuraminidase 処理の効果 (実験数 8~13 例, 結合量 $\pm$ SE)

Ca ²⁺ concn. (M) Treatment	Ca ²⁺ binding (nmoles Ca ²⁺ /mg protein/30 min)						
	10 ⁻⁸	5 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	5 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
Control	0.03 ± 0	0.11 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.65 ± 0.05	1.07 ± 0.10	1.90 ± 0.13	2.21 ± 0.11
Trypsin	0.04 ± 0	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.62 ± 0.05	0.98 ± 0.09	1.63 ± 0.14	2.17 ± 0.18
Phospholipase c	0.04 ± 0	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.68 ± 0.06	1.18 ± 0.11	1.87 ± 0.15	2.19 ± 0.19
Neuraminidase	0.04 ± 0	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.66 ± 0.07	0.99 ± 0.07	1.80 ± 0.16	2.12 ± 0.18

図 9. 細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する phospholipase c 処理の効果

—○—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (-)
 —●—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
 —△—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (-)
 —▲—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
 (実験数 13 例, 取り込み量 $\pm$ SE)

み量は著明に増加した. $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 共存下の Ca^{2+} 取り込み能の至適 Ca^{2+} 濃度は 10^{-6} M であり, その Ca^{2+} 取り込み量は $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 不在時の 5.5 倍であった.

細胞膜の Ca^{2+} 結合部位の化学的性質を検討するために, 細胞膜画分を trypsin, phospholipase c および neuraminidase により処理し, 結合量に対する効果を検討し表 2 に示した. 上記 3 酵素により処理した細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量は対照と比較して変化はなかった. さらに反応液中へ $\text{K}_2\text{-oxalate}$ を添加しても同様であった.

細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する trypsin 処理の効果を図 8 に示した. trypsin 処理により Ca^{2+} 取り込み量は 10^{-8} ~ 10^{-5} M Ca^{2+}

図 10. 細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量に対する neuraminidase 処理の効果

—○—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (-)
 —△—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (-)
 —●—: 対照, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
 —▲—: 処理, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ (+)
 (実験数 8 例, 取り込み量 $\pm$ SE)

濃度下で 72~88% 減少した. その half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は 2.9×10^{-6} M となり, 対照 (3.7×10^{-7} M) と比較して高濃度側へ移動した. また, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 共存下でも同様の变化を示した.

図 9 に phospholipase c 処理の効果を示した. phospholipase c 処理により細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量は 5×10^{-6} M 以上の高 Ca^{2+} 濃度下では 9% 以内の減少を示すに止ったが, しかし, 10^{-8} ~ 10^{-6} M Ca^{2+} 濃度下でのその減少は 40~60% であり, half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は 1.5×10^{-6} M と高濃度側へ移動した. また, $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 共存下の Ca^{2+} 取り込み量は

$10^{-8} \sim 10^{-6} \text{M}$ Ca^{2+} 濃度範囲で $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 不在時と同程度の減少を示し、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上の Ca^{2+} 濃度下では 27~33% の減少を示した。

neuraminidase 処理した細胞膜画分についての観察結果を図 10 に示した。neuraminidase 処理により細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量は $10^{-8} \sim 10^{-5}$

M Ca^{2+} 濃度下で 43~93% 増加した。しかし、その half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は $2.4 \times 10^{-7} \text{M}$ であり、trypsin および phospholipase c 処理の場合とは異なり対照とは類似の値を示した。また、 $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 共存下の Ca^{2+} 取り込み量の増加の程度は 40~55% であった。

V. 考

われわれは本実験計画の初期において Oliveira ら (1974) の方法に準じ遠心分離法のみによりモルモット小腸平滑筋細胞より細胞膜の分離精製を試みた。しかし、細胞膜を多く含むと予想された画分の純度を主に指標酵素により吟味したところ、この細胞膜画分への他の画分、例えばミトコンドリアおよびミクロソームの混入がかなり大きいことが示された (山本ら, 1979 a)。このことは本実験の目的である細胞膜特有の Ca^{2+} 動態を決定する目的に対し、かように得られた画分はなお純度の点につき問題があることを意味する。その後、分離精製方法を改良し、遠心分離法に加うるに蔗糖密度勾配遠心分離法により分離精製を試み、高純度に細胞膜を含む画分を得ることができた (山本ら, 1979 b) ので、本報告ではその画分の Ca^{2+} についての諸性質を観察した。

A. 細胞膜画分の純度について

蔗糖密度勾配遠心分離法によると細胞膜の指標

按

酵素は多くの場合蔗糖濃度 28~33% 層に浮遊平衡すると報告されている (Kidwai ら, 1971; 1973; Wolowyk ら, 1971; Limas ら, 1973)。このことはわれわれも前報 (山本ら, 1979 b) において確認しており、また本報告においてもこの 33% 蔗糖層に浮遊平衡した成分を細胞膜画分として取扱った。

本細胞膜画分の純度についての各種指標酵素による吟味の結果を表 3 に示した。なお、これは前報 (山本ら, 1979 b) の観察結果をまとめたものである。ミトコンドリアの指標酵素である succinate cytochrome c reductase (Katz ら, 1970) の ppt 画分 (蔗糖密度勾配遠心分離法による遠心管底部の沈渣) の中での活性は、ホモジネート中でのそれに比べ約 3 倍であった。これに対し、細胞膜画分中での活性はホモジネートのその約 1/5 であり、ppt 画分のわずか 1/15 にすぎない。このことは細胞膜画分にはミトコンドリアの混入

表 3. 各画分の種々指標酵素活性分布 (カッコ内はホモジネートの活性を 1 とした場合の比活性) (実験数 11 例, 活性 $\pm$ SE)

Enzyme	Fraction			
	Homogenate	77000 $\times$ g	SDG centrifugation	
			33% sucrose	ppt
Succinate cytochrome c reductase (a)	27.77 $\pm$ 2.84 (1)	52.29 $\pm$ 4.41 (1.9)	5.99 $\pm$ 0.39 (0.2)	84.52 $\pm$ 3.43 (3.0)
NADH cytochrome c reductase (a)	47.46 $\pm$ 2.46 (1)	113.46 $\pm$ 8.42 (2.4)	82.70 $\pm$ 5.02 (1.7)	84.38 $\pm$ 6.37 (1.8)
K^+ activated p-nitrophenylphosphatase (b)	0.566 $\pm$ 0.041 (1)	1.319 $\pm$ 0.077 (2.3)	3.113 $\pm$ 0.103 (5.5)	1.083 $\pm$ 0.069 (1.9)
K^+ activated, ouabain sensitive p-nitrophenylphosphatase (b)	0.232 $\pm$ 0.025 (1)	0.627 $\pm$ 0.053 (2.7)	1.559 $\pm$ 0.122 (6.7)	0.476 $\pm$ 0.047 (2.1)
$\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ -ATPase (c)	0.031 $\pm$ 0.005 (1)	0.042 $\pm$ 0.011 (1.4)	0.172 $\pm$ 0.017 (5.5)	0.006 $\pm$ 0.003 (0.2)
Ouabain sensitive $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ -ATPase (c)	0.007 $\pm$ 0.002 (1)	0.021 $\pm$ 0.003 (3.0)	0.151 $\pm$ 0.012 (21.6)	0.011 $\pm$ 0.005 (1.6)

(a) nmoles reduced cytochrome c/mg protein/min

(b) μ moles p-nitrophenol/mg protein/30min

(c) μ moles Pi/mg protein/min

が著しく少いことを示している。また、本報告の実験結果でこの画分の Ca^{2+} 取り込み量が NaN_3 により抑制されなかったことによっても裏付けられた。

一方、ミクロソームの指標酵素である NADH cytochrome c reductase (Ernster ら, 1962; 長井, 1974) の細胞膜画分中での活性はホモジネート中に比で約 1.7 倍である。現在、平滑筋細胞膜の分離精製の分野で精力的に実験を進めている Kidwai ら (1971) は、子宮筋細胞膜画分中での本酵素活性はホモジネート中のその約 2.8 倍であったと報告している。このことは細胞膜画分へのミクロソーム混入が一段と少いこと、いいかえれば細胞膜についてはより高純度の画分をうることができたことを意味する。

このことは、また、細胞膜の代表的な指標酵素 (Judah ら, 1962; Kidwai ら, 1971; De Pierre ら, 1973) である K^+ activated, ouabain sensitive p-nitrophenylphosphatase および ouabain sensitive $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ -ATPase が細胞膜画分に高活性に分布していることによっても裏付けられた。前者の活性は細胞膜画分においてホモジネートに比べ約 6.7 倍であり、後者は実に 21.6 倍に濃縮されたことを示す。本報告での ouabain sensitive $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ -ATPase 活性の濃縮度の良さは、他の同種報告の実験結果と比べ顕著である。例えば、Hui ら (1976) によるとモルモット心筋より分離した細胞膜画分中でのこの酵素活性はホモジネートのそれに比べ約 4.1 倍であったと報告されている。

B. Ca^{2+} 結合能について

先に石山ら (1975) は生筋条片を用いた実験結果より、結腸紐平滑筋細胞膜には high および low affinity の二種類の Ca^{2+} 結合部位があり、neuraminidase 処理によりシアル酸残基を除去した筋条片は収縮力が低下するだけではなく、low affinity Ca^{2+} 結合部位が消失することを報告した。川村ら (1978) は石山らの結果と関連付けて、細胞表面標識剤として用いられるルテニウムレッドは糖蛋白質末端シアル酸残基付近に結合し、low affinity Ca^{2+} 結合部位を比較的強く抑制することを報告した。

本報告の目的の一つは結腸紐筋条片で得られた

細胞膜についての彼らの知見を分離細胞膜画分で検討し、さらに平滑筋細胞膜の Ca^{2+} 結合能および Ca^{2+} 取り込み能の特性を検討しようとするものである。図 2 に示したごとく、細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量は Ca^{2+} 濃度に依存して増加した。 10^{-5}M Ca^{2+} における Ca^{2+} 結合量は 2.21 ± 0.11 nmoles $\text{Ca}^{2+}/\text{mg protein}/30 \text{ min}$ であり、気管平滑筋から分離した細胞膜画分の値 (Sands ら, 1978) に類似する。また、石山ら (1975) および川村ら (1978) が生筋の細胞膜上に認めた二種類の Ca^{2+} 結合部位を、われわれの分離細胞膜画分においても Scatchard plot 法解析により確認した。

筋条片で確認された phospholipase c および neuraminidase 処理による Ca^{2+} 結合量の減少、さらに low affinity Ca^{2+} 結合部位の消失は、われわれの分離細胞膜画分においてやや抑制される傾向は認められたが、対照と比較して統計的に有意な差を認めることはできなかった。細胞膜画分における酵素処理の Ca^{2+} 結合能への効果については種々の報告がある。例えば、Shlatz ら (1972) はラット肝細胞膜画分への Ca^{2+} 結合量に対して蛋白分解酵素処理は効果がみられないのに、phospholipase c および neuraminidase 処理によっては著明に抑制することを示した。また、Hemminki (1974) はラット脳細胞膜画分において、pronase 処理によって Ca^{2+} 結合量が促進されるのに、phospholipase c, neuraminidase 処理では効果が得られなかったと報告している。さらに、Limas (1977) はラット心筋細胞膜画分の Ca^{2+} 結合量が pronase, trypsin 処理によって抑制され、phospholipase c, neuraminidase 処理では効果がないことを報告している。このように各種分離細胞膜画分に対する種々の酵素処理の Ca^{2+} 結合能への効果は必ずしも一致していない。この理由としては次のことがあげられる。1) 臓器差、2) 測定条件の差、3) 分離過程の操作による変化の可能性があげられる。なお、3) について細胞膜画分の vesicle 形成時、細胞膜内外の方向性が分離過程で変化しうることを Daniel (私信) は指摘している。すなわち、outside out, inside out の 2 つの可能性があることを示唆している。この種の可能性を含めて今後検討する必要がある。

C. Ca^{2+} 取り込み能について

図6に示すごとく、本細胞膜画分が Ca^{2+} 取り込み能を有することは重要である。この観察事実は平滑筋の細胞膜上にエネルギー要求性の Ca^{2+} 輸送系が存在することを示すものであり、その方向は細胞内より細胞外へ、すなわち Ca^{2+} くみ出し機構に関与すると思われる。先報(山本ら, 1979a)では粗細胞膜画分について Ca^{2+} 取り込み能および Ca^{2+} activated Mg^{2+} -ATPase 活性の平行性を論じた。

本報告において細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量は 10^{-5} M Ca^{2+} 濃度下で 18.51 ± 1.31 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min であり、気管平滑筋より分離した細胞膜画分(Sands ら, 1978)についての同種の測定値に類似する。同条件下でのミクロソーム画分への Ca^{2+} 取り込み量は、 27.61 ± 1.04 nmoles Ca^{2+} /mg protein/30 min である。また、 Ca^{2+} 取り込み量の half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は細胞膜画分では 3.7×10^{-7} M であり、ミクロソーム画分では 4.3×10^{-7} M であった。両画分への Ca^{2+} 取り込み能の特徴的な相違は $\text{K}_2\text{-oxalate}$ による促進効果の違いである。このことはすでに Janis ら (1976) の指摘したことであるが、本報告で $\text{K}_2\text{-oxalate}$ による細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量の促進はわずか 18% である。これに対し、ミクロソーム画分への Ca^{2+} 取り込み量の $\text{K}_2\text{-oxalate}$ による促進は骨格筋のそれに類似していた。すなわち、 10^{-6} M Ca^{2+} 濃度下において $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 共存下の Ca^{2+} 取り込み量は対照値の 5.5 倍に増強されている。なお、ミクロソーム画分の $\text{K}_2\text{-oxalate}$ による Ca^{2+} 取り込み量の促進は NaN_3 共存下で測定されているのでミクロソーム独自のものと考えられる。一方、Janis ら (1976) によるとラット子宮筋細胞膜画分の Ca^{2+} 取り込み能に対する $\text{K}_2\text{-oxalate}$ の促進効果は約 33% であった。細胞膜の Ca^{2+} 取り込み能の特徴の一つが $\text{K}_2\text{-oxalate}$ の促進効果の欠如にあるとすれば、本細胞膜画分の 18% と Janis らの 33% の差は細胞膜画分へのミクロソーム混入の多寡を示すことになるかも知れない。このように細胞膜およびミクロソーム両画分の Ca^{2+} 取り込み能に対する $\text{K}_2\text{-oxalate}$ の促進効果の相違は、あるいは両者の陰イオンとしての oxalate の透過性の相違である

かも知れない。すなわち、 $\text{K}_2\text{-oxalate}$ はミクロソーム vesicle 内には入るが、細胞膜に対しては透過性がない可能性である。

平滑筋細胞においてその最大収縮は $1 \sim 4 \times 10^{-6}$ M Ca^{2+} 前後で得られ、弛緩は 10^{-7} M Ca^{2+} 以下で起るとされている(宮崎ら, 1971; Yabu ら, 1971; Bozler, 1968)。本報告において細胞膜画分への $\text{K}_2\text{-oxalate}$ 不在時の 10^{-6} M Ca^{2+} 濃度下における 1 分間の ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み量 (Ca^{2+} 取り込み量より Ca^{2+} 結合量を差引いた量)は 1.34 nmoles Ca^{2+} /mg protein と計算される。さらにモルモット結腸紐における細胞外液量 (Goodford, 1970)、細胞体積、細胞表面積 (Gabella, 1976)、細胞膜の厚さおよびその密度 (Emmelot ら, 1962) を基に 1 kg 筋組織当たり存在する細胞膜成分の重量を計算すると、8.3 g 細胞膜/kg 筋組織と算出される。従って、 10^{-6} M Ca^{2+} 濃度下、1 kg 筋組織中に含まれる細胞膜の ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み量は 11.1 μ moles Ca^{2+} /kg 筋組織/min と算出される。かように算出した Ca^{2+} 取り込み能が細胞内 Ca^{2+} のくみ出し機構として作用しているならば、この Ca^{2+} 取り込み量は最大収縮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度を弛緩に必要な濃度まで低下させるためには充分となる。しかしながら、先に Godfraind (1976) は大動脈条片でノルアドレナリンによる最大収縮時には、実に 34 μ moles Ca^{2+} /kg 筋組織/min の Ca^{2+} 流入があると報告している。モルモット小腸でも最大収縮時に類似の流入量があるとする、上記細胞膜の ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み量は最大収縮時に流入した全 Ca^{2+} 量の 1/3 だけ細胞外へくみ出す能力を持つことになる。従って、ここでは細胞膜が平滑筋の収縮弛緩相に何らかの役割を演じている可能性を指摘するととどめたい。同時に収縮—弛緩相における調節能とは別に、細胞内 Ca^{2+} 濃度をたえず低濃度 (resting state) に維持するように働いている可能性もあろう。要するに本報告で重要なことは細胞膜にかなり強力な Ca^{2+} 取り込み能 (Ca^{2+} pump) があることを指摘できたことである。

細胞膜の ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み能の生化学的性質を検討するために細胞膜画分の酵素処理を行った。細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量は trypsin 処理により $10^{-8} \sim 10^{-5}$ M Ca^{2+} 濃度下に

において 72~89% 減少した。また、 Ca^{2+} 取り込み能の half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は対照と比較して高濃度側に移動した。このことは細胞膜構成物質中の蛋白質そのものが細胞膜の Ca^{2+} 取り込み能の主要成分であることを示している。しかし、細胞膜中でのこの蛋白質の形態についてはなお不明である。蛋白質が重要であることは Duffy ら (1973) が血球膜についての同種実験より得た帰結と類似する。また、細胞膜画分の phospholipase c 処理によっても Ca^{2+} 取り込み量は減少した。この減少は低 Ca^{2+} 濃度 (10^{-8} ~ 10^{-6}M) 下で著明であり、減少の程度は 40~60% に及んだ。さらに half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は trypsin 処理の場合と同様高濃度側に移動した。この phospholipase c 処理により Ca^{2+} 取り込み量が減少する事実は細胞膜構成物質中のリン脂質分子が単に細胞膜の基本構造であるだけではなく、 Ca^{2+} 能動輸送に重要な役割を演じていることを示唆する。

VI. 結

前報の方法により分離精製したモルモット小腸平滑筋細胞膜画分について、 Ca^{2+} 結合能および ATP 依存性 Ca^{2+} 取り込み能を測定し、ついでそれらの活性に対する trypsin, phospholipase c および neuraminidase 処理の効果を観察し、次の結果を得た。

1. 細胞膜画分は Ca^{2+} 結合能を有し、その Ca^{2+} 結合部位に high affinity と low affinity の二種類を認めた。上記 3 酵素処理により、細胞膜画分の Ca^{2+} 結合能は影響されなかった。

2. 細胞膜画分の Ca^{2+} 取り込み量は 10^{-5}M Ca^{2+} で 18.51 ± 1.31 nmoles $\text{Ca}^{2+}/\text{mg protein}/30$ min であり、その half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は $3.7 \times 10^{-7}\text{M}$ であった。

3. ミクロソーム画分の Ca^{2+} 取り込み量は $\text{K}_2\text{-oxalate}$ により著明に増加した。しかし、細胞膜画分のそれは増加しなかった。

このリン脂質の役割について Ca^{2+} 取り込み能の主要成分であるとする報告 (Shlatz ら, 1972) もある。

これに対し、neuraminidase 処理は細胞膜画分への Ca^{2+} 取り込み量を著明に促進した。しかし、half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は trypsin および phospholipase c 処理の場合と異なり、neuraminidase 処理の場合に対照と同値を示した。このことは neuraminidase sensitive な糖蛋白質成分が細胞膜の Ca^{2+} 取り込み能に対して何らかの抑制作用を発揮していた可能性を示唆する。すなわち、neuraminidase 処理は Ca^{2+} 取り込み能に対する抑制因子としての作用の除去ないしは減弱により、 Ca^{2+} 取り込み量の促進が引き起こされたのではなからうか。もしそうであるなら、シアル酸を含む成分は平滑筋細胞膜中でエネルギー依存性 Ca^{2+} 取り込み能の調整役として重要な役割を演じている可能性が示唆される。

語

4. 細胞膜画分の Ca^{2+} 取り込み量は trypsin および phospholipase c 処理により著明に減少した。また、両酵素処理により half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は対照に比べ高濃度側へ移動した。これに対し、neuraminidase 処理により Ca^{2+} 取り込み量は著明に増加し、その half maximal activation に要する Ca^{2+} 濃度は対照と類似の値を示した。

以上の結果をもとに、平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度調節機構に細胞膜が関与している可能性を考えた。また、糖蛋白質成分が細胞膜の Ca^{2+} 取り込み能に対して抑制的調整役として働いている可能性を示唆したい。

稿を終るに臨み、御指導・御校閲下さった本学第一外科学教室早坂滉教授、および第二生理学教室故宮崎英策教授に深謝致します。

文

献

- Ambache, N. (1954). Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet. *J. Physiol.* **125**: 53-55.
- Bohr, D.F. (1973). Vascular smooth muscle updated. *Circ. Res.* **32**: 665-672.
- Bozler, E. (1968). Control of the contractile mechanism of smooth and cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* **215**: 509-512.

- Casteels, R. and Van Breemen, C. (1975). Active and passive Ca fluxes across cell membranes of the guinea-pig taenia coli. *Pflügers Arch.* **395**: 197-207.
- De Pierre, J.W. and Karnovsky, M.L. (1973). Plasma membranes of mammalian cells. A review of methods for their characterization and isolation. *J. Cell Biol.* **56**: 275-303.
- Duffy, M.J. and Schwarz, V. (1973). Calcium binding by the erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **330**: 294-301.
- Ebashi, S. and Endo, M. (1968). Calcium ion and muscle contraction. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **18**: 125-183.
- Emmelot, P. and Bos, C.J. (1962). Adenosine triphosphatase in the cell-membrane fraction from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **58**: 374-375.
- Ernster, L., Siekevitz, P. and Palade, G. (1962). Enzyme-structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Cell Biol.* **15**: 541-562.
- Gabella, G. (1976). Quantitative morphological study of smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Cell Tiss. Res.* **170**: 161-186.
- Godfraind, T. (1976). Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum. *J. Physiol.* **260**: 21-35.
- Godfraind, T. and Kaba, A. (1969). Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmac.* **36**: 549-560.
- Godt, R.E. (1974). Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration. *J. Gen. Physiol.* **63**: 722-739.
- Goodford, P.J. (1970). Ionic interactions in smooth muscle. In Smooth Muscle, ed. by Bulbring, Brading, Jones and Tomita. p. 100-121, Arnold, London.
- Hasselbach, W. (1964). Relaxing factor and relation of muscle. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **14**: 167-222.
- Hemminki, K. (1974). Calcium binding to brain plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **363**: 202-210.
- Hudgins, P.M. and Weiss, G.B. (1968). Defferential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **159**: 91-97.
- Hui, C., Drummond, M. and Drummond, G.I. (1976). Calcium accumulation and cyclic AMP-stimulated phosphorylation in plasma membrane-enriched preparation of myocardium. *Arch. Biochem. Biophys.* **173**: 415-427.
- Hurwtiz, L. et al. (1973). Localization of calcium pump activity in smooth muscle. *Science* **179**: 384-386.
- Ishiyama, Y., Yabu, H. and Miyazaki, E. (1975). Changes in contractility and calcium binding of guinea pig taenia coli by treatment with enzymes which hydrolyze sialic acid. *Jap. J. Physiol.* **25**: 719-732.
- Janis, R.A., Crankshaw, D.J. and Daniel, E.E. (1977). Control of intracellular Ca activity in rat myometrium. *Am. J. Physiol.* **232**: c50-c58.
- Judah, J.D., Ahmed, K. and Mclean, A.E.M. (1962). Ion transprot and phosphoproteins of human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* **65**: 472-480.
- Katz, A.M. et al. (1970). Characterization of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum, (Na K)-activated ATPase and mitochondrial fragments. *Biochim. Biophys. Acta* **205**: 473-490.
- Kawamura, M. and Yabu, H. (1978). Selective inhibition of potassium contracture in guinea pig taenia coli by ruthenium red. *Jap. J. Physiol.* **28**: 447-460.
- Kidwai, A.M., Radcliffe, M.A. and Daniel, E.E. (1971). Studies on smooth muscle plasma membrane. I. Isolation and characterization of plasma membrane from rat myometrium. *Biochim. Biophys. Acta* **233**: 538-549.
- Kidwai, A.M. et al. (1973). Isolation and properties of skeletal muscle plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **298**: 593-607.
- Limas, C.J. (1977). Calcium-binding sites in rat myocardial sarcolemma. *Arch. Biochem. Biophys.* **179**: 302-309.
- Limas, C.J., Notargiacomo, A.V. and Cohn, J.N. (1973). Effects of cyclic 3,5-AMP on the (Na K)-ATPase of myocardial sarcolemma. *Cardiovasc. Res.* **7**: 477-481.
- Lowry, O.H. et al. (1951). Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Martonosi, A. and Feretos, R. (1964). Sarcomplasmic reticulum. 1. The uptake of Ca by sarcoplasmic reticulum fragments. *J. Biol. Chem.* **239**: 648-658.

- 宮崎英策, 藪 英世, 砂野 哲 (1971). 平滑筋の興奮と収縮. 日平滑筋誌, **7**: 83-97.
- Moore, L. et al. (1975). Energy-dependent calcium uptake activity of microsomes from the aorta of normal and hypertensive rats. *Biochim. Biophys. Acta* **413**: 432-443.
- Murphy, R.A. and Hasselbach, W. (1968). Calcium ion-dependent myofibrillar adenosine triphosphatase activity correlated with the contractile response. Temperature-induced loss of calcium ion sensitivity. *J. Biol. Chem.* **243**: 5656-5662.
- 長井幸史 (1974). 甲状腺上皮細胞膜の調整, 蛋白質核酸酵素. 別冊. 生体膜実験法 (下): 289-294.
- 小川靖男 (1974). 筋小胞体活性の測定法, 蛋白質核酸酵素. 別冊. 生体膜実験法 (下): 103-107.
- Ogawa, Y. (1968). The apparent binding constant of glycoletheridaminetetraacetic acid for calcium at neutral pH. *J. Biochem.* **64**: 255-257.
- Oliveira, M.M. and Holzhaecker, S. (1974). Isolation and characterization of smooth muscle cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **332**: 221-232.
- Palmer, R.F. and Posey, V.A. (1970). Calcium and adenosine triphosphate binding to renal membranes. *J. Gen. Physiol.* **55**: 89-103.
- Peachey, L.D. (1965). Transverse tubules in excitation-contraction coupling. *Fed. Proc.* **24**: 1124-1134.
- Sands, H. and Mascali, J. (1978). Effects of cyclic AMP and of protein kinase on the calcium uptake by various tracheal smooth muscle organelles. *Arch. int. Pharmacodyn.* **236**: 180-191.
- Scatchard, G., Coleman, J.S. and Shen, A.L. (1957). Physical chemistry of protein solutions. 7. The binding of some small anions to serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 12-20.
- Shlatz, L. and Marinetti, G.V. (1972). Calcium binding to the rat liver plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **290**: 70-83.
- Somylo, A.P. and Somylo, A.V. (1968). Vascular smooth muscle. 1. Normal structure, pathology, biochemistry, and biophysics. *Pharmacol. Rev.* **20**: 197-272.
- Van Breemen, C. and Daniel, E.E. (1966). The influence of high potassium depolarization and acetylcholine on calcium exchange in the rat uterus. *J. Gen. Physiol.* **49**: 1299-1317.
- Wolowyk, M.W., Kidwai, A.M. and Daniel, E.E. (1971). Sodium-potassium stimulated adenosinetriphosphatase of vascular smooth muscle. *Can. J. Biochem.* **49**: 376-384.
- Yabu, H., Uchida, I. and Miyazaki, E. (1971). Participation of native tropomyosin in the ATP-contraction an intestinal glycerinated muscle bundle. *Jap. J. Physiol.* **21**: 465-473.
- 山本勝裕, 藪 英世 (1979a). モルモット小腸平滑筋細胞膜の分離およびその特性についての検討. 札幌医誌, **48**: 251-259.
- 山本勝裕, 藪 英世 (1979b). モルモット小腸平滑筋の細胞膜に富む画分の分離と指標酵素活性. 日平滑筋誌, **15**: 337-351.

(1980年8月29日受付)