ラット子宮筋 Actomyosin-ATPase 活性に対する 筋細胞膜外からの Ca^{++} イオンの影響

東京医科歯科大学 産科婦人科学教室
(主任：藤井久四郎教授)

加藤宏一・根岸駿夫・植田早苗・新井志保子

EFFECT OF CALCIUM ION TRANSPORTED INTO UTERINE MUSCULAR CELL THROUGH CELL MENBRANE ON ACTOMYOSIN- ATPase OF UTERINE MUSCLE OF RAT

Koichi KATO, Toshio NEGISHI, Sanae UEDA and Shihoko ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Tokyo Medical & Dental University

It has been evidenced already that the contracting factor of uterine muscle is calcium ion and microsome is the relaxing factor.

In this paper, it is demonstrated that calcium ion cannot enter into muscular cell during pregnancy, but can do during delivery.

緒 言

in vitro の実験でラット子宮筋より抽出した actomyosin (AM)-ATPase 活性が Ca^{++} により賦活される。ことは、加藤・平川¹⁾、中西²⁾ らにより報告し、また estrogen, progesterone の AM-ATPase 活性に対する影響、妊娠・分娩時の AM-ATPase 活性の変動についても、加藤・杉山³⁾、中西²⁾ らにより、既に報告した。さらに加藤・

中西⁴⁾、中西²⁾ らにより Ca^{++} がラット子宮筋 AM の収縮因子であることも報告した。今回は、実際に分娩に際して、筋収縮因子であるが Ca^{++} がどのような経路を経て AM と結合するのかを検討するため、この実験を行った、新知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 材料

(1.) 妊娠または分娩時のラットの子宮を傷をつけない様に注意して全摘出し、左右子宮角にわけて、子宮内容物はそのままにして、1側は Ca を除去した Ringer-Locke 氏液に室温にて 10 分間浸し、他側は Ca のみ規定量の 2 倍量を加えた Ringer-Locke 氏液中にて室温にて 10 分間浸した後、それらの子宮をとり出し、子宮筋を蒸留水で充分洗滌し、その子宮筋より AM を作製した。

(2.) glycerol 筋の場合は妊娠または分娩時のラット子宮を摘出し、直ちに 50% glycerol 液中に浸し、 0°C にて 24 時間放置後、50% glycerol 液を交換して更に 24 時間 0°C に放置し、その後さらに 50% glycerol 液を交換して、その液中に子宮筋を浸し、 -20°C に保存して出来た glycerol 筋を使用した。Ca 処置法は glycerol 筋

を 10^{-3}M Ca Cl_2 液に 30 分 incubation したものである。

2. AM 作製法

Szent-Györgyi 法⁵⁾ により作製した。

3. AM-ATPase 活性測定法

われわれの教室で日常行なっている方法⁶⁾ で、AM-ATPase の作用により ATP から遊離した無機磷酸を Youngberg-Youngberg 法⁷⁾ で測定して活性度を示した。表中数値の単位は mcg である。また数値は 3 例の平均である。実験に用いた AM の濃度は 1mg/ml である。

4. 蛋白量測定法

湿性灰化を行って後、Nessler 試薬で呈色し、比色定量した。

5. Ca 量測定法

日立製原子吸光分光光度計で測定定量した。

実 験 成 績

1. 正常子宮筋を用いた場合

非妊、妊娠中期、分娩時のラット子宮筋を無傷の状態
で摘出し、無 Ca-Ringer-Locke 液に浸したものと、含
Ca-Ringer-Locke 液に浸したものとから抽出した AM の
ATPase 活性を比較した。また、in vitro の実験の他に、
in vivo の実験として、妊娠中期ラットの腹腔内に含 Ca-
Ringer-Locke 液 10ml を注入し、10 分後子宮を摘出し
て、同様 AM-ATPase 活性を測定した。

表 1. 正常子宮筋に in vitro または in
vivo で Ca を添加した場合の
ラット子宮筋 AM-ATPase 活性
の比較

		無 Ca-Ringer- Locke 液に 浸した場合	含 Ca-Ringer- Locke 液に 浸した場合
妊 娠 中 期	in vitro	1.45 mcg	1.35 mcg
	in vivo	—	1.45
分 娩	in vitro	1.95	2.50
非 妊	in vitro	1.55	1.60

37°C, 10 分 incubation
遊離 P 量 : mcg

妊娠中期ラットを用いて、in vitro で Ca を添加した
場合と、未添加の場合との比較で、AM-ATPase 活性は
全く有意差なく、また in vivo で Ca を添加した場合も
全く有意差を認めなかった。然るに分娩時ラットの場合
は妊娠時に比較して AM-ATPase 活性は高値を示し、
また、分娩時ラット AM-ATPase についての in vitro の
実験で Ca 添加の場合と、未添加の場合では、Ca 添加
の方が明らかに AM-ATPase 活性が高値を示した。非
妊の場合には、in vitro での Ca 添加の場合と、未添加
の場合とで有意差を示さなかった。

2. estradiol または progesterone を投与した去勢非 妊ラット子宮筋に対して in vitro で Ca イオンを添加し た場合の子宮筋 AM-ATPase 活性の比較

非妊成熟雌ラットを去勢し、1 週間後より毎日 estradiol benzoate 2mcg、または progesterone 1mg を連日 4 日間投与後子宮を摘出し、実験 1) と同様検討した。結果は表 2 に示す如くである。

progesterone 投与例の場合およびホルモン無投与の対
照例の場合は、in vitro での Ca 添加の有無にかかわら
ず、AM-ATPase 活性は有意差を示さず、estradiol 投与
例では Ca 添加の場合は、未添加の場合に比較して明ら

かに AM-ATPase 活性の上昇を示した。

3. glycerol 筋を用いた場合

表 2. estradiol または progesterone
を投与した去勢ラット子宮筋に
in vitro で Ca イオンを添加した
場合の子宮筋 AM-ATPase 活性
の比較

	無 Ca-Ringer- Locke 液に 浸した場合	含 Ca-Ringer- Locke 液に 浸した場合
estradiol 投 与	1.80	2.25
Progesterone 投 与	1.00	1.06
無 投 与	1.60	1.65

37°C 10 分 incubation
遊離 P 量 : mcg

表 3. in vitro で Ca イオンを添加した
場合のラット子宮 glycerol 筋
AM-ATPase 活性の比較、および
AM 中の Ca 含量

	対 照		10 ⁻³ M CaCl ₂ 添加	
	AM-ATPase 活 性	Ca 量	AM-ATPase 活 性	Ca 量
妊娠末期	0.45	1.88×10 ⁻³	0.62	4.35×10 ⁻³
分 娩 中	0.70	3.77×10 ⁻³	0.95	5.64×10 ⁻³

AM-ATPase 活性 : mcg
Ca 量 : mg/AMmg

妊娠時および分娩時のラット子宮筋より作製した
glycerol 筋をそのまま水洗したもの、および 10⁻³M-Ca
Cl₂ 液に 30 分浸したのち水洗したものより抽出した
AM-ATPase 活性の比較および AM 中の Ca 含有量

正常子宮筋の場合と異なり、glycerol 筋の場合は、妊
娠時も分娩時もともに Ca 液で浸した筋より抽出した
AM-ATPase 活性は、Ca 液に浸さなかった例に比較し
て高値を示した。また AM1mg 中の Ca 含有量も Ca 液
に浸した例は対照に比較して高含有量を示した。しかし
Ca 含有量と AM-ATPase 活性が完全に比例しないの
は、何か他の原因があるのかもしれない、含有 Ca が
全て AM-ATPase 活性賦活のためにのみ働いているの
ではないのかもしれない。

考

加藤らにより、ラット子宮筋 AM について種々検討が加えられている。Ca が子宮筋 AM の収縮因子でありまた AM-ATPase 活性を賦活することは報告した。また、妊娠中 AM-ATPase 活性が低値を維持しているのか、分娩時に急激に高活性になること、および *in vitro* での筋収縮現象である超沈澱現象と ATPase 活性が平行することも報告した。ここで Ca が収縮因子であり、筋収縮が AM, ATP, Ca, Mg の関与する一連の現象であるとする、筋収縮、弛緩には Ca が重要な役割を果たしていると考えらるべきである。常に収縮、弛緩を繰り返している骨格筋と違い、子宮筋の場合、妊娠時は分娩時の様な強力な筋の収縮はなく、長時間に亘る妊娠持続の後に急速な且つ強力な筋収縮を起す必要がある。ここで骨格筋の場合のように収縮因子としての Ca が常に必要ではなく、むしろ収縮に必要な Ca は妊娠時には不必要であり、分娩時にのみ最大有効量が必要である。この Ca が常に筋細胞内に多量存在することは不合理で、分娩時のみ、多量を必要とするのである。然らば、子宮収縮に必要な Ca はどのような態度を示すかを検討する必要がある。当然、分娩時のみ多量の Ca が必要であるならば、Ca は分娩時に急速に AM と結合すればよいわけで、そのためには筋細胞外からの Ca の取り入れが是非必要となるわけである。このため筋細胞外の Ca が果たして筋細胞膜を通して、筋細胞内に入るか否かを検討する必要がある。

今回の実験により示した如く、妊娠時で筋細胞膜が無傷の場合、*in vitro* の実験で AM-ATPase 活性は筋細胞外での Ca 添加の有無にかかわらず、同値であるということは、妊娠状態という条件下では Ca は筋細胞内に入らないことを意味しているものである。何故ならば、Ca が細胞内に入るならば、Ca は AM-ATPase 活性を賦活し、高活性を示すはずである。これは *in vitro* での Ca 添加の場合でも、腹腔内に Ca を注入した場合でも全く同様であった。然るに分娩時には、妊娠時と全く違った態度を示した。即ち、AM-ATPase 活性が分娩時には高値を示すことは勿論、*in vitro* で Ca 液に分娩時の子宮筋を浸した場合、AM-ATPase 活性が明らかに上昇したことである。このことは、妊娠時には Ca は筋細胞膜を通して、細胞膜の内に入れなかったのが、分娩時の条件下では Ca が細胞膜内に入り込み、AM-ATPase 活性を賦活したことを示したものである。即ち、分娩時の状態にある子宮筋細胞は、細胞外部より Ca を導入して、

案

子宮筋収縮を行うことを示したものである。この妊娠時と分娩時の条件は如何なるものかを検討する必要がある。普通雌ラットは estrogen と progesterone の hormone 環境下におかれているが、妊娠時は更にこれら hormone が増加し、estrogen と progesterone との平衡の下で妊娠を維持している。特に progesterone は子宮筋を弛緩状態に維持する力が強く、妊娠維持の主役を演じているが、分娩時に至って急激に progesterone は減少する。且つ estrogen と progesterone は持続的作用を持つものである。それ故、Ca が筋細胞膜を通過するか否かを支配するものが、estrogen および progesterone であるかどうかを検討するため、これら hormone の影響をみた。成熟雌ラットを去勢し、卵巢からの estrogen, progesterone の影響を全くとり除いて後に、estradiol または progesterone を投与して、実験 (1) と同様、Ca 添加の影響をみた。即ち去勢後無処置の例および progesterone 投与例では、Ca の影響は全くみられず、妊娠時と同傾向を示し、estradiol 投与例では、Ca 添加例では AM-ATPase 活性が上昇し、分娩時と同傾向を示した。これは妊娠、分娩時の結果の相違は、estrogen, progesterone の筋細胞膜に対する作用により現われたものといえよう。この筋細胞膜の問題は、次の glycerol 筋を使用した実験で更に確立された。glycerol は細胞蛋白質を変性せずに細胞膜を破壊するものであり、glycerol 筋の AM は殆んど完全な筋線維の構造を保っていると考えられている。この細胞膜を破壊した glycerol 筋を用いた場合、分娩時の子宮筋は勿論妊娠時の子宮筋より抽出した AM の場合でも、Ca 液に浸した場合は、Ca 液に浸さなかった場合と比較して、AM-ATPase 活性は高値を示した。この無傷の正常子宮筋と、glycerol 筋との相違は AM の相違ではなく、筋細胞膜の有無の相違である。Ca 含有量を測定しても、glycerol 筋の場合は、妊娠時も分娩時も共に Ca 添加で AM 中の Ca 量は増量した。これより考えると、glycerol 筋の場合 Ca が筋細胞内の AM に結合するための一つの障害物である筋細胞膜がとりのぞかれたため、外部から Ca が入り込み、AM-ATPase 活性を賦活すると考えるべきである。この様にして、子宮筋収縮の場合、妊娠維持、分娩という大きな変化を示す現象を考える時、Ca は妊娠中から収縮に充分な量だけ筋細胞膜内に存在するのではなく、分娩時に収縮に充分な量が筋細胞外より、細胞内に入ると考えるべきである。

結 論

筋収縮因子 Ca^{2+} は分娩時になって始めて、分娩に必要な収縮を行うために子宮筋細胞内に、細胞外から入ることを証明した。

稿を終るに当たり、校閲を賜った藤井久四郎教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 加藤宏一, 平川浩一: 妊娠子宮筋収縮に関する酵素学的研究, 日産婦誌, **11**, 50, 1959; 同上 **12**, 216, 1960.; 平川浩一: 妊娠子宮筋 Actomyosin の酵素学的研究, 日産婦誌, **17**, 793, 1965.
- 2) 中西資郎: 子宮筋 Actomyosin-ATPase 活性および起沈澱に対する性 Steroid Hormone 並びに Ca^{2+} , Mg^{2+} の影響について, 日産婦誌, **21**, 1969.
- 3) 加藤宏一, 杉山信雄: ラット子宮筋 Actomyosin の酵素活性と性 steroid ホルモン, 日産婦誌, **17**, 166, 1964.
- 4) 加藤宏一, 中西資郎: 子宮筋 Actomyosin の超沈澱と ATPase 活性の関連性について, 日平滑筋誌 **4**, 173, 1968.
- 5) Szent-Györgyi, A: *chemistry of muscular contraction*. Acad. Press, New York, 1947.
- 6) 東恭彦: 胎盤より抽出せる子宮筋 Actomyosin-ATPase 酵素活性賦活物質について, 日産婦誌 **19**, 8, 1967.
- 7) Youngberg, G. E. & Youngberg, M. V.: Phosphorus metabolism. J. Lab. clin. Med., **16**, 158, 1930.

(1969年5月27日受付)