筋・神経線維の配向 SH タンパク質についての研究

Studies on the Orientation of the Sulfhydryl Proteins in
Muscle and Nerve Fibers.

加 藤 君 代*

KIMIYO KATO, B. Sc.

蛍光 SH 標識試薬, N-(1-anilino-naphthyl-4) maleimide (ANM) および対照としての疎水域探索試薬, 1, 8-anilino-naphthalenesulfonate (ANS) を用いて, 蛍光偏光解消の角度分布測定による筋・神経線維の表在 SH タンパク質の配向を調べ, 次の結果を得た.

1. けい光の強さから求めた配向成分の, ランダム成分をも含めた全けい光強度に対する割合 (配向率) は, すべての ANM 標識標本で20%弱, ANS 標本で17%程度であった. 試料を乾燥すると, この値は ANM 標本では僅かに, ANS 標本では大きく増加した.
2. 配向率は長期間グリセリン処理であまり変化しなかったが, 筋線維の ANM 標本では1日処理で一時増加した. 新鮮神経はANSで染色できなかったが, グリセリン処理で配向成分 (7%) が出現し, 乾燥によってさらに増加した. トリプシン処理では ANM 標本でのみ60秒後に一過性の増大を示した.
3. ザリガニの腹部神経 (無髄) では全く配向成分は認められなかった.
4. 配向形式は, ほぼ線維走向と平行および直角の完全二軸配向であった. このパターンは乾燥によって変化しなかった.
5. 新鮮標本では, 多くの場合直角成分が平行成分より多かった (神経では等しい) が, 乾燥によりさらに増加, グリセリン処理で逆に減少した.

以上の結果から, 筋線維・外筋周膜・神経線維に, 線維軸に平行および直交する SH 基含有タンパク質の存在を証明した.

近年細胞膜の構造と機能が医学・生物学上特に重要視され, 多くの研究が報告されている¹⁻³⁾. 従来膜のタンパク質は脂質の二重層の間に固定されているものとみなされていたが, Singer および Nicolson によってタンパク質は脂質二重層の間に浮かんでおり, 膜中を自由に動いているという流動モザイクモデルが提出された⁴⁾. とすれば, 膜中でのタンパク質の配向は全く考えられないが, 果して膜のすべてのタンパク質が流動しうるものであるかどうかについては知られていない. そのようなタンパク質で配向性をもったものが認められれば, 膜の構造と機能について新しい展望が開けるものと期待される⁵⁾.

我々は固体中に分散している光分子の配向形式を決定する西島らの方法⁶⁻⁸⁾を初めて生体試料に応用して, この問題を解くことを試みた. タンパク質には存在するが脂質には決して存在しない SH 基に注目して, SH 基に特異的に反応し, かつ反応して初めて発光する新しいけい光試薬 N-(1-anilino-naphthyl-4) maleimide (ANM)^{9,10)}を用いて, シスチンを含んだタンパク質を標識し, その配向を調べた. また構造が ANM と非常に良く似ているが, 非共有結合で膜成分に吸着する疎水域プローブ 1, 8-anilino-naphthalenesulfonic acid (ANS) についても比較検討した. その結果, 外筋周膜・筋線維束・神経線維などにわずかであるが配向成分の存在がみとめられたので, ここに報告する.

* 順天堂大学医学部助手 (生化学教室)
Department of Biochemistry, Juntendo
University, School of Medicine.
[Oct. 6, 1977 受付]

試料ならびに方法

試料 材料として外筋周膜はカエル (*Rana nigromaculata*) の縫工筋 *M. sartorius* (約15mm×2mm), 骨格筋線維束はウサギ腸腰筋 *M. psoas* の小片 (約 15mm× 1mm), 有髄神経はカエル座骨神経 *N. ishiadicus* (約 15mm 長), 無髄神経はアメリカザリガニ (*Cambaras clarkii*) 腹部神経 ventral cord (約 10mm 長) の新鮮材料を用いた。また染色前に新鮮材料を -20°C で50%グリセリン中に一週間から数カ月放置したグリセリン処理試料を用いた。

けい光標識法 染色は 10^{-5}M ANS または $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$ ANM, 40mM リン酸緩衝液 (pH6.85), 0.15M KCl またはリンゲル液の反応液中に 2°C で一夜反応させ, 試料を 0.15M KCl またはリンゲル液で充分に洗浄後測定した。

試料の乾燥およびトリプシン処理 膜の状態を変えるため, 原長を保ちながら染色後一日から数日空气中に放置して乾燥させる操作, および 40mM リン酸緩衝液 (pH 6.85), 0.15 M KCl 反応液中, 25°C での 0.01%トリプシンによる消化処理を試みた。グリセリン処理標本は 0.15M KCl またはリンゲル液に 1時間以上浸してグリセリン除去後, トリプシン消化は 0.15M KCl で充分洗浄後上記のように染色し測定した。

試薬 金岡らの方法⁹⁾ により合成された ANM (図1) および ANS (和光純薬, 特級) の 10^{-3}M モノグライム溶液を 2°C に保存し, 使用時さら

にモノグライムで希釈して, 反応液中最終モノグライム濃度が 10%以下になるよう調製した。ANMはそれ自身全く無けい光性であるが, SH 基と反応すると初めて強いけい光を発する (図1)。

スペクトルの測定 試料をセルの位置に励起光に対し 45° の角度に固定し, 日立分光けい光光度計 MPF-3A で励起・けい光スペクトルを測定した。

けい光偏光強度成分の角度分布の測定系 けい光の偏光強度成分の二次元角度分布を測定するために, 西島らの理論^{6~8)} に基づき島津の光散乱計

Fig. 2. Optical system for measuring angular distribution of fluorescence polarization. The rotatable sample holder RH is placed vertically on the plane of this paper with the angle $\theta (=45^{\circ})$. The multiplier phototube PM is fixed to face the surface of the sample perpendicularly. F_1 ; monochromate filter, F_2 ; cut-off filter, S; light source. P_1 , polarizer, and P_2 , analyser, are normally horizontal and horizontal for I_{11} or vertical for I_1 , respectively.

ANM
1 - anilinonaphthalene - 4 - maleimide

501 / 351

Fig. 1. Reaction of ANM with SH compound. The numbers show emission wavelength /excitation w.l.

Fig. 3. Circular coordinate diagram of the whitex-dispersed polyethylene film stretched along the perpendicular biaxes (left). right; after further extension along the axis indicated with the marker. Circle, $P=0.25$.

を利用した光学系を用いた (図2)。光源には360 nmに輝線をもつ超高压水銀ランプ (S) を用い、光源側にUV干渉フィルター ($F_1 = 360\text{nm}$, 透過率20%), 測光側にカットフィルター (F_2 , 450nm, 透過率50%) を置いた。試料面と光路のなす角 (θ) を 45° に固定し、試料の回転は毎分一回転の同期モーターで行なった。生体試料のため光透過性が悪いこと、また吸収による誤差を除くため反射光強度を測定した。試料は棒にセロテープで固定し、これを回転板の中心に貼付した。

我々の自作した測定系を検定するため、けい光色素ホワイテックスをポリエチレン中に分散させ、ネッキングしたフィルム (日本電子機提供) の偏光度分布曲線を求めた (図3 左は直交二軸方向伸展, 右はそのうちの一方方向をさらに伸展したもの)。左図はほとんど理論曲線 (図7B) に一致しており、この測定系を用いて分子配向が測定できることが確かめられた。

測定値の取扱い 図4にこの測定系による ANM標識ウサギ骨格筋の実測データを示す。図に示すように、 360° 回転ごとのけい光強度の平行成分 ($I_{||}$) および直角成分 ($I_{\perp}$) の再現性もよく、また無染色試料による盲けい光はほとんどみられなかった。試料中に存在するけい光分子の配向成分と

Fig. 4. A typical example of the recorded chart. $I_{||}$ and $I_{\perp}$ show the intensities of unstained muscle fiber.

非配向成分の比率を、得られた測定値から理論的に算出することは困難であるので、 $I_{||}$ の最高値から $I_{\perp}$ の最少値を差引いた部分0を配向成分によるものと仮定し、これの $I_{||}$ の最高値 T に対する比率によって配向率の大きさ $[O/T] \times 100$ を示した (図5)。また $I_{||}$ と $I_{\perp}$ の微小の違いを明確にするため、偏光強度成分 ($I_{||}$, $I_{\perp}$) の代りにこれから得られる偏光度 $P(I_{||} - I_{\perp} / I_{||} + I_{\perp})$ の角度分布から、配向軸方向および配向形式を解析した。

Fig. 5 Calculation of the orientation ratio. T ; total light intensity, O ; oriented light intensity.

実験結果

1. けい光色素 ANM と ANS の励起・けい光スペクトルについて

ANM および ANS をグリセリン処理したウサギ腸腰筋とカエル縫工筋に標識したときのスペクトルを図6に示す。ANM は湿状態では励起光とけい光スペクトルの最大波長が 368nm と 468nm であり、乾燥状態にすると 377nm と 428nm であった。Stokes シフトは 100nm から乾燥状態にすると 50nm と半分になる。ANS は湿状態ではそれぞれ 362nm と 514nm であり、乾燥状態にすると 380nm と 458nm となった。Stokes シフトは 152nm から乾燥させると 78nm と半分になった。ANM も ANS も乾燥させることにより極大波長が青方移動することから、水分の除去によりけい光分子を取りまく環境がより non-polar な状態になったことを示す^{9,11)}。また青方移動に伴な

Fig. 6. Excitation (.....) and emission (—) spectra. a. ANM. b. ANM, wet : glycerinated rabbit psoas muscle fiber, dry (barred) ; glycerinated frog M. sartorius. The numbers show emission wave length/excitation w. l.

ANS

wet 514 / 362
dry 458 / 380

Sample	conditions	ANM		ANS	
		wet	dry	wet	dry
Rabbit psoas muscle	fresh	19	24	13	24
	glycerinated for 2 weeks	25	22	19	25
	glycerinated for 6 months	20	24	17	29
frog M. sartorius	fresh	17	18	17	27
	glycerinated for 2 weeks	18	24	15	25
frog N. ishiadicus	fresh	19	25	none*	—
	glycerinated for 80 days	12	19	7	17

Table I. Orientation ratio of ANM-and ANS -stained samples.

* not labeled.

い、けい光強度は約10倍に増大した。

2. 標識 ANM 分子の配向率およびその変化

図4に示した I_{11} の最大値から I_1 の最少値を差引いた部分を、配向成分に由来するけい光強度と仮定して、その I_{11} の最大値に対する比率（配向率）を各試料について計算した結果を表Iに示す。ANM 標識試料の配向率は約20%で、試料による差は殆どみられなかった。長期間グリセリン処理による影響はカエル座骨神経が19%から12%へ（配向率としては約30%）と大きく減少しているが、他は殆ど変化がみられなかった。したがって、グリセリン抽出によって除かれる低分子SH

化合物（グルタチオンなど）や原形質中の自由に動くSHタンパク質の寄与は殆ど無視され则认为られる。乾燥させると4~7%（配向成分としては20~40%）増大した。そのうちカエル座骨神経のグリセリン処理が一番大きく増大した（配向成分としては約60%）。ANS 標識試料ではカエル座骨神経を除いて15~20%で、ANM の場合とほぼ同じであった。グリセリン処理による影響もほとんどみられなかった。カエル座骨神経はそのままでは染色不可能であったが、長期間グリセリン処理することにより染色可能となったがその配向率は少なかった。乾燥させると10~20%（配向成

Duaration of glycerine treatment ^a	ANM	ANS
fresh ^b	19	13
one day	29-33	35
2 weeks	25	19
5-6 months	20	17

Table II. Effect of glycerine-treatment on the orientation ratios of ANM- and ANS-stained rabbit psoas fibers.

a. stored in 50% glycerine at -20°C.

b. immediately after staining.

Duaration of digestion ^a (min)	ANM	ANS
0	19	13
0.5	21	13
1.0	25	13
10.0	14	15

Table III. Effect of tryptic digestion on the orientation ratios of fluorescence-labeled rabbit psoas fibers.

a. digested with 0.01% trypsin (w/w).

分としては100~140%)と増大し、ANMにくらべ著しい変化がみられた。

グリセリン可溶タンパク質の関与を知るため、50%グリセリン処理による時間変化を観察したところ、一日処理ではANM(12%増加)もANS(22%増加)も著しく増大し、その後処理時間が長くなると徐々に処理前の値まで減少することがわかった(表II)。

膜タンパク質を変化させるもう一つの方法として、トリプシン消化を試みた結果を表IIIに示す。新鮮なウサギ骨格筋線維束を23°Cでトリプシン消化後けい光標識した結果、ANM染色では一過性に増加して(配向成分として30%)10分後には処理前の値より大きく減少したが、ANS標識では変化はみられなかった。

3. ANM分子の配向形式

各試料で得られた偏光度の角度分布図を、西島らの式⁸⁾に従って計算した数種のモデル(図7)と比較検討してみた。数字は標準円の偏光度を示

Fig. 7. Theoretical angular distribution of the degree of fluorescence polarization, P. Perfect uniaxial (A) and symmetrical biaxial orientation (B) calculated from the Nishijima's equations on an ideal fluorescent molecule with perfect anisotropy. The dashed line shows negative P values.

Fig. 8. Angular distribution patterns of rabbit fresh psoas muscle (left; ANM, right; ANS). The direction of the muscle fibers is vertical. Circle, $P = 0.100$.

Fig. 9. Patterns after dry (left; ANM, right; ANS). The same sample as Fig. 8. dried overnight at room temperature. Circle, $P = 0.100$.

し、斜線部分は偏光度のマイナス成分を示す。

ウサギ骨格筋線維束：図8に新鮮な標本の偏光度角度分布の円グラフを示す。ANM, ANS標識標本とも直交二軸配向形式をおもわせる(図7B)。

Fig. 10. Effect of the glycerine treatment (left; ANM, right; ANS). The psoas muscle fibers were soaked in 50 % glycerine for about 6 months at -20°C . —; wet,; dry overnight. Circle, $P=0.120$.

Fig. 11. Angular distribution patterns of frog sartorius muscle (left; ANM, right; ANS). —; wet,; dried in air overnight. oblique lined; negative polarization. Circle, $P=0.100$ (ANM), 0.125 (ANS).

Fig. 12. Patterns of ANM-stained frog *N. ishiodicus*. A. fresh and dried. B. glycerine-treated for 80 days at -20°C . —; wet,; dried. Circle, $P = 0.125$ (A), 0.100 (B).

図9は上記の試料を乾燥させた後測定したもので、線維軸と直交する一軸配向に傾く。図には示していないが、配向形式に対するトリプシン消化、数週間以内のグリセリン処理の影響はほとんど

Fig. 13. Patterns of two random orientation samples A rabbit liver slice B. ventral cord of *Cambaras clarkii* ●; ANM, $P=0.161$ (A), 0.110 (B), ○; ANS, $P = 0.111$ Circle, $P=0.25$,

どみられなかった。次に50%グリセリン中に約6カ月放置し原形質中の溶性タンパク質が殆ど除去されているとみなされるウサギ骨格筋線維束標本について測定したところ、線維軸と平行な成分が優勢となった。グリセリン処理標本をさらに乾燥させると、グリセリン未処理の場合と同様もとの一軸配向形式に戻った(図10)。

カエル縫工筋：図11に新鮮標本で得られた配向形式を示す。すでに簡単に報告⁵⁾したとおり、ANM, ANS染色ともに同じ形を示し一軸に大きくかたよった完全直交二軸配向形式をとる。図には示さないが、二週間50%グリセリン処理した試料でも同じ結果を得た。

カエル座骨神経(有髄線維)：湿状態の新鮮標本では明瞭な形が得られなかった。乾燥させると図12Aに示されるような形が得られたが、複雑な配向を示していて解析不能であった。50%グリセリン処理により、ラセン配向が示唆されたが、乾燥させると完全直交二軸配向形式の形に近くなった。ANSは新鮮な状態では染色が不可能であり、グリセリン処理すると染色可能となったが、明瞭な形が得られず解析はできなかった。

ザリガニ腹部神経(無髄線維)：カエル座骨神経同様ANMのみ染色可能であった。その分布形式は図13bに示すように完全ランダム配向であった。図13aに無配向試料としてウサギ肝臓切片の角度分布を示す。

4. 線維方向と配向軸との関係

線維方向と角度分布軸のなす角 (θ) ならびに線維軸に対して平行に近い成分 F_{11} と直角に近い成分 F_1 の比 $R=F_{11}/F_1$ を表IVに示す. この表より次の4点が挙げられる. 1) 前述のごとく, 多くの場合完全直交二軸配向を示したが, その主成分の配向方向はANM, ANS共に線維軸に対してほぼ直角であり, 乾燥させても殆ど変らなかった.

2) 乾燥によりR値は大きく減少し直交二軸配向から一軸配向(主成分は F_1)への転換がみられた. この傾向は縫工筋外筋周膜よりも骨格筋線維束でより強かった. 3) 神経を除いて, グリセリン処理により逆にR値は増大する, すなわち線維軸に平行な成分が相対的に増加する傾向がみられた. ウサギ骨格筋線維束では長期間グリセリン処理することにより, 線維軸に一致する成分が優勢になり ($\theta \sim D^\circ$, $R > 1$), 乾燥させると新鮮標本と同じように直角成分が優勢となった ($\theta \sim 90^\circ$, $R \ll 1$). 4) この表からみればかぎりではANMとANS標本の配向とその変化は, 互いに類似している. ただし, ANS標本では骨格筋線維束のグリセリン処理二週間で, すでに線維軸に一致する成分と直角成分の比が逆転した ($R > 1$). また縫工筋の乾燥により, ANS標本のみがR値の増大を示した.

考 察

我々の実験結果より, 筋線維・外筋周膜・神経線維ともに配向性のSHタンパク質が存在していることが明らかとなった. すなわち, ある種のタンパク質分子が膜のマトリックスの中で一定方向に配列しているが, SH基をもったタンパク質性の線維が存在しているか, あるいは細胞内の配向性タンパク質が標識されたかのいずれかである. 筋線維の実験で, グリセリン処理して膜および原形質の可溶性タンパク質を除去した後も, 配向率, 形式および配向軸方向に大きな変化がなかったことは, 膜タンパク質そのものによる可能性は少ないと思われる. 岡本らは他のけい光性SH試薬 N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl) maleimide を用いてグリセリン筋を標識し, ミオ

シンを抽出すると配向率が消失することを見出した¹²⁾. 試薬によって膜透過性が大きく異なるので直接の比較はできないが, ANM分子の配向がミオシンに基づく可能性がある.

一方, タンパク質性線維としては筋肉にも存在しているコラーゲンおよびエラスチンはSH基をもたないから, これら以外の未知の線維が存在している可能性も否定できない. 最近, 丸山らは筋線維中に新しい線維状タンパク質を発見し, これが筋収縮力学モデルにおける弾性成分であり, 筋線維を腱に結びつけているものと考え, コネクチン(connectin)と命名した¹³⁾. この新しいタンパク質はアミノ酸1000残基に対してシステインを2個含むことがわかったが, この線維成分は網状に分布しているので, われわれの観察しているのはコネクチンではない. またSH基含有線維としては筋・肝・腎などのレチクリン(reticulin)が知られている^{14,15)}. グリセリン処理, トリプシン消化あるいは乾燥によって配向率, 配向軸があまり変化しないこともこの考えを支持する. 今のところどちらとも断定できないが, グリセリン処理筋ではミオシンが, 外筋周膜では線維状SHタンパク質が配向の主役を演じている可能性が大きいと思われる.

乾燥によって配向率がわずかに増加することは(表I), ランダム成分が運動の自由度を失い, 細胞のマトリックスに沿って少しづつ配位してくる可能性を示唆している. グリセリン処理による一過性の配向率の上昇(表II)は, ランダム配向性のタンパク質が除去されたと考えられ, 長期保存によって再び低下するのは, 残存している構造タンパク質の配向の乱れによるものであろう.

新鮮筋標本では, 線維軸に直角な発光軸をもつANM分子と平行な発光軸をもつ分子の比が大体1:1に近い(表IV). このことは同一のタンパク質の異なったSH基に標識されたANM分子の方向が互いに直角であるのか. または二種類のタンパク質が筋線維軸に平行および直角に存在するかである. 表IVに示されているように乾燥によってR値が著しく小さくなることは, 直角に走行し

Sample	Angle ^a		ratio ^b	
	ANM wet	dry	ANS wet	dry
Rabbit psoas muscle (fresh)	80	90	86	91
glycerinated for 2 weeks	87	83	— 6	82
for 6 months	— 4	90	— 5	85
frog M. sartorius (fresh)	86	85	88	85
glycerinated for 2 weeks	86	90	90	97
frog N. Ipsiadicus (fresh)	86	85	—	—
glycerinated for 80 days	90	85	—	90

Table IV. Direction of the orientated fluorophores.

a. the angle between the emission axis of main orientated fraction and fiber axis.

b. $P_{\parallel}/P_{\perp}$

ているタンパク質のみが乾燥によって折りたたまれと考えると説明できることから、後者の考えの方が可能性があると思われる（このとき、けい光分子の発光軸は直角に走行しているタンパク質の走行に対して直角と考える）。この考えに従えば、縫工筋は乾燥によりその幅があまり短縮しないので、R値があまり変わらないという事実をよく説明できる。

カエル座骨神経においても、配向性は筋線維や外筋周膜ほど良くないが、確かに配向成分がみられることは、神経膜にも配向性のタンパク質が存在していることを示している。このタンパク質が筋肉にみ出されたコネクチンあるいはレチクリンそのものか、あるいはまったく異なったタンパク質であるかは、今のところ不明である。

筋線維については今のところ、ANM分子の配向が線維によるものか、あるいはミオシンのような収縮性構造タンパク質に由来するものかは決定することができなかった。もし線維に由来するものであれば、その配向形式との変化から線維の生理学的意義を明らかにする途が開かれよう。また収縮性タンパク質に由来するものであれば、収縮

・弛緩・強縮などの状態に対応する配向変化から、筋収縮機構についての新しい知見を得ることが出来るものと期待される。また電顕によらず、伸展などによる変化の測定など、動的解析が可能である点、けい光偏光解消の角度分布測定の生体試料への応用という全く新しいアプローチは、病的材料の解析にも役立つものと思われる。

終りに、終始一貫御懇切なる御指導を賜った順天堂大学医学部生化学教室関根隆光教授に心から感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) "The enzymes of biological membranes", ed by A. Martonosi, Plenum Press, New York and London, 1976.
- 2) A.R. Oseroff, P.W. Robbins and M.M. Burger: The cell surface membrane: Biochemical aspects and biophysical probes, Annu. Rev. Biochem., 42, 647-682, 1973.
- 3) C. Tanford and J.A. Reynolds: Characterization of membrane proteins in detergent solutions, Biochim. Biophys. Acta (MR), 457, 133-

- 170, 1976.
- 4) S. J. Singer and G. L. Nicolson : The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**, 720-731, 1972.
 - 5) T. Sekine and K. A. Kato : Interaction of fluorescence probes to the membranes of cell and subcellular particles, *Acta Histochem. Cyt-
ochem.*, **9**, 29-33, 1976.
 - 6) T. Nishijima, Y. Onogi and T. Asai : *J. Polym. Sci. C15*, 237-250, 1966.
 - 7) 西島安則 : 蛍光法による分子配向の測定, 分光研究, **18**(3), 133~140, 1969.
 - 8) 西島安則 : 蛍光法による高分子の構造と分子運動の研究, 工業化学誌, **73**(7), 1311~1318, 1970.
 - 9) Y. Kanaoka, M. Machida, M. Machida and T. Sekine: Fluorescent thiol reagents VI. N-(1-anilinonaphthyl 1-4)maleimide: a fluorescent hydrophobic probe directed to thiol groups in protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 563-568, 1973.
 - 10) T. Ohyashiki, T. Sekine and Y. Kanaoka : Studies on calcium ion-induced conformation changes in the actin-tropomyosin-troponin system by fluorimetry. II. Effect of tropomyosin, troponin and calcium ion on conformation of anilinonaphthyl maleimide-labeled F-actin, *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 214-223, 1974.
 - 11) G. Weber and D. J. R. Laurence: Fluorescent indicators of adsorption in aqueous solution and on the solid phase, *Biochem. J.*, **56**, xxxi, 1954.
 - 12) Y. Okamoto and T. Sekine : in preparation. *J. Biochem.*,
 - 13) K. Maruyama, R. Natori and Y. Nonomura: New elastic protein from muscle, *Nature*, **262**, 58-60, 1976. K. Maruyama : Connectin, an elastic protein from myofibrils, *J. Biochem.*, **80**, 405-407, 1976.
 - 14) M. Pras and L. E. Glynn : Isolation of non-collagenous reticulin component and its primary characterization, *Brit. J. Exp. Path.*, **54**, 449-456, 1973.
 - 15) N. A. Kefalides : Structure and biosynthesis of basement membranes, *Internat. Rev. Connective tissue Res.*, **6**, 63-104, 1973.

Summary

Studies on the Orientation of the Sulfhydryl Proteins in Muscle and Nerve tissues

The orientation of the SH-proteins in muscle and nerve tissues was analyzed by measuring the angular distribution of fluorescence depolarization of the dyes labeled on the samples, using a novel fluorescent thiol reagent, N-(1-anilinonaphthyl-4) maleimide (ANM) together with 1,8-anilinonaphthalene sulfonate (ANS) as a hydrophobic probe.

1. The fraction of the fluorescence intensity of the oriented components, orientation ratio (R_o), was approximately 20% in ANM-labeled samples and 17% in ANS-labeled ones regardless of the kind of samples; rabbit muscle fiber bundles, glycerinated muscle fibers, frog sartorius muscles and frog N. ischiadicus. When the samples were dried on air, the values increased slightly in ANM-labeled samples and considerably in ANS-labeled ones.

2. The R_o values of muscle fibers was slightly elevated by soaking in glycerine at -20°C , for several months, while that of fresh ANM-stained fibers increased after one day and then decreased by the same treatment. Fresh frog nerve was not stained by ANS, but an oriented fraction of about 7% appeared after glycerination. The fraction further increased by drying. The R_o values of ANM-labeled muscle fibers increased until 60 sec after the addition of trypsin and then decreased.

3. No oriented fraction was observed in the ventral cord of *Cambaras clarkii*.

4. All of the samples showed symmetrical biaxial orientation which was parallel and perpendicular with the axis of the fibers. This mode was not essentially altered by drying.

5. In the most of the fresh samples, the perpendicular fraction was larger than the parallel one. The difference between the two fractions increased by drying, while it decreased by the treatment with glycerine.

The present experimental results clearly show that a part of the SH-proteins is oriented on the surface of these fibers.

KIMIYO KATO, B. Sc.

Department of Biochemistry, Juntendo University School of Medicine,