

学 位 論 文 題 名

蛙下顎下制筋線維の機能的種類と興奮収縮連関入力機構

学位論文内容の要旨

【目的】

ヒトの下顎骨は、咀嚼を主として嚥下、嘔吐、会話時等において非常に複雑で微妙な高次の運動を行っており、その運動は身体中で最も複雑なもののひとつとされている。そこで、このような顎運動の複雑性に対応して、顎筋の収縮性にも高度な分化が見られるのではないかと考え、蛙下顎下制筋を用いて、筋細胞レベルでの収縮特性およびその機構について調べた。

筋の収縮機構については、筋表面の形質膜に発生した活動電位が、表面膜が筋細胞内に陥入した構造体であるT管（横行小管）に波及し、何らかの情報変換過程を経た後、内部の筋小胞体終末槽に伝わり、そこから Ca^{2+} が遊離されるとフィラメント間に滑走をおこすことが知られている。1952年、Sandowはこの活動電位の電気的な変化が力学的なフィラメント滑走に変換される過程を興奮収縮連関 excitation-contraction (E-C) coupling と命名した。興奮収縮連関の狭義的な場はT管および筋小胞体終末槽には含まれた feet（三者を合わせて三連構造 triad）にあると考えられるものの、その構造体は筋細胞外部からは観察できないためそこにおける情報変換過程の解明は困難とされてきた。しかし、1989年、Fujinoらは concanavalin A-ferritin (Con A-F) を用いて興奮収縮連関入力機構を調べ、興奮収縮連関の最初のステップは、feet が付着するT管膜の管腔 feet 面にある糖鎖の膜電位変化に応じた機械的な動きであることを見だし、情報変換過程解明の糸口を与えた。

これまで興奮収縮連関を含む筋生理学の研究では、一般的に蛙下肢骨格筋が用いられており顎筋を用いた研究報告は少ない。また、筋研究においては、収縮活動を一つの細胞単位で把握することから単一筋線維を用いるのが最良の方法とされているが、その分離は困難であり熟練を必要とする。今回著者は、下顎下制筋単一線維の分離に成功し、これを用いて下顎下制筋の収縮性について調べた。まず、興奮収縮連関の研究の基礎となる張力-膜電位関係を調べたところ、各筋線維には膜の脱分極に応じて発生する張力にかなりの差が見られることがわかった。この差の原因は、興奮収縮連関の場にあると考えられるため、次にその入力機構における機能的差異につ

いて電気生理学的手法および電子顕微鏡学的手法を用いて詳しく検討を行った。

【実験材料および方法】

実験材料：

実験材料にはニホンアカガエルの下顎下制筋単一線維を用いた。下顎下制筋は、哺乳類以外の大部分の四足動物に存在する筋で哺乳類では顎二腹筋と相同の筋と考えられており、咬筋と拮抗的に作用し、口を開く働きをしている。この下顎下制筋の筋束を実体顕微鏡下、リングル液（筋分離用、110mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.8mM CaCl_2 , 2.5mM NaHCO_3 ）中にて摘出した後、単一筋線維を分離した。

張力－膜電位関係の測定方法：

分離した単一筋線維は、リングル液（2.7mM K^+ ：2.7K 以下同様）で満たされた筋バスにマウントした。浴液のリングル液のK濃度を15K, 20K, 30K, 50K, 111.1K, 190Kに置換し、発生張力を測定するとともに微小電極法により膜電位を測定した。

筋線維の電顕的観察方法：

単一筋線維は、1%および3%グルタルアルデヒド固定液にて前固定を行った後、1%オスミウム酸にて後固定を行い、エタノール系列で脱水してエポンに包埋した。これを、ウルトラミクロトーム（PORTER-BLUM MT 2-B, SORVALL 製, 米国）にて超薄切をおこなった後、酢酸ウラニルと Reynolds 染色液にて二重染色を行い、電子顕微鏡（JEM-100C, 日本電子製）で観察を行った。

興奮収縮連関入力機構の検討方法：

張力－膜電位関係より各筋線維の膜電位変化に対する発生張力の大きさ（膜電位感受性）の高、中、低を決定した後、興奮収縮連関入力機構の分子動態を調べる目的で筋線維に酸性（pH5.6）下にて Con A-F を10分間作用させた。筋線維を静止状態および活動状態で固定し、電顕で三連構造を観察し、T管内に ferritin が存在するものを写真撮影した。この写真上で feet 中心軸の延長線とT管膜との交点から ferritin までの距離を計測し、T管内における ferritin の位置を模式図にプロットしてその分布を観察した。

【結果】

(1) 中性リングル（pH7.2）下でのK濃度－膜電位関係では、静止電位はK濃度の対数にはほぼ比例し、しかも筋線維間に差がなかった。一方、K濃度－張力関係では、同一K濃度すなわち同一膜電位に対する発生張力の違いにより筋線維は3群に分類された。各群の張力発生閾値は、その発生張力の大きい群から15mM, 20mM, 30mM であり、最大張力の約50%の張力が発生す

るK濃度は、それぞれ20mM, 30mM, 50mMだった。この3群をそれぞれ膜電位感受性高, 中, 低の群とすると、収縮曲線の形状にも差があり、膜電位感受性の高い群ほど、活性化、不活性化過程も速い傾向を示した。各群に属する筋線維の出現頻度は、膜電位感受性高が51% (n = 19), 中が38% (n = 14), 低が11% (n = 4) だった。筋線維の太さについては、各群間に有意差は認められなかった。

(2) 一方、膜電位変化によらないカフェイン拘縮には3群間で差を認めなかった。また、3群の筋線維の電顕像はすべてM線やH帯が明瞭で、三連構造もよく発達しており速筋線維の像を示した。興奮収縮連関の場合である三連構造にも形態的差異は認められなかった。

このことより、興奮収縮連関の入力部である外液と接するT管膜表面には興奮収縮連関に関与する分子レベルの機構の存在が示唆され、膜電位感受性の差はその機構の機能的差異によるのではないかと考えられた。

(3) そこで、T管内にCon A-Fを作用させ、電顕的に3群の筋線維の興奮収縮連関入力機構の機能的差異を調べた。その結果、筋の静止状態では、膜電位感受性の低い群ほど、Con A-F結合部位は、よりT管中央方向に位置していた。また、活動(興奮)状態では、結合したCon A-Fは3群ともT管外側方向に移動したが、その移動量は感受性の高い群ほど大きかった。このことから、膜電位感受性の差は、Con Aと結合する興奮収縮連関入力機構に関与する機能構造体(糖タンパク分子)の静止状態での位置および活動状態での移動量の差による可能性が示唆された。

【結論】

下顎下制筋線維は、同一膜電位に対する発生張力の違い、すなわち膜電位感受性の違いにより3群に分類された。興奮収縮連関入力部であるT管膜表面には膜電位を感受する構造体(糖タンパク分子)が存在しており、膜線維間の膜電位感受性の差はこの構造体の静止状態での位置および活動状態での動きの大きさの違いによるものであることが示された。この興奮収縮連関入力機構部における電気-機械変換過程で変換された機械的信号は、feetを介しそのまま Ca^{2+} 貯蔵部位である筋小胞体終末槽に情報として伝わり、筋線維の有する膜電位感受性の差は Ca^{2+} 遊離量の違いとして現れるものと考えられた。そして、その Ca^{2+} 遊離量の違いは筋収縮の大きさおよび速度に関与し、これが筋の収縮性の違いとして現れるものと考えられた。

下顎下性筋線維間の膜電位感受性の差異は、脳から発せられたインパルスに対しての各筋線維の反応性および収縮性の差に結びつくものと解され、この膜電位感受性の差異の原因として興奮収縮連関入力機構の分子レベルの構造体の動態の相違の関与が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博
副 査 教 授 亀 田 和 夫
副 査 教 授 松 本 章

主査・副査全員が一堂に会し、口頭にて論文審査を行った。まず、本論文提出者に研究内容の説明を求めた。提出者は以下の内容を説明した。

筋の収縮機構については、筋表面の形質膜に発生した活動電位が、表面膜が筋細胞内に陥入した構造体であるT管に波及し、ここで何らかの情報変換過程を経て、内部の筋小胞体終末槽に伝わり、そこから Ca^{2+} が遊離されるとミオシン・フィラメントとアクチン・フィラメントとの間に滑走を生じることが知られている。しかし、この膜活動電位の電気的な変化が力学的なフィラメント滑走に変換される際の、T管形質膜と筋小胞体終末槽の間における情報変換過程（興奮収縮連関）に関しては、いまだ不明な点が多い。

本論文提出者は、顎運動が非常に複雑で微妙な高次の運動を行っていることに注目し、顎運動の複雑性に対応して顎筋の収縮性にも高度の分化が見られるのではないかと考え、蛙下顎下制筋を用いて、筋細胞レベルでの収縮特性およびその機構について研究した。

実験方法

ニホンアカガエルの下顎下制筋から筋単一線維を分離し、これを実験材料とした。単一筋線維をリンゲル液（2.7mMK⁺：以下、2.7Kと記す。）で満たした筋バスにマウントし浴液のリンゲル液のK濃度を15K、20K、30K、50K、111.1K、190Kに置換し、発生張力を測定するとともに、微小電極法により膜電位を測定し、張力－膜電位関係を求めた。さらに、興奮収縮連関入力機構の分子動態を調べる目的で、トレーサーとして concanavalin A-ferritin (Con A-F) を筋線維に作用（pH5.6, 10分間）させ、筋線維を静止状態および活動状態で固定し、電顕的に観察し、T管内における ferritin の位置を検討した。

実験結果

(1) 中性リンゲル下でのK濃度－膜電位関係では、静止電位はK濃度の対数にほぼ比例し、しかも筋線維間に差がなかった。一方、K濃度－張力関係では、同一K濃度すなわち同一膜電位に対する発生張力の違いにより筋線維は3群に分類された。各群の張力発生閾値は、その発生張力の大きい群から15mM、20mM、30mMであり、最大張力の約50%の張力が発生するK濃度は、

それぞれ20mM, 30mM, 50mM だった。収縮曲線の形状にも差があり、膜電位感受性の高い群ほど、活性化、不活性化過程も速い傾向を示した。各群に属する筋線維の出現頻度は、膜電位感受性高が51%, 中が38%, 低が11%だった。なお、筋線維の形態的所見には差がなかった。

(2) 一方、膜電位変化によらないカフェイン拘縮には3群間で差が認めなかった。

(3) 筋の静止状態では、膜電位感受性の低い群ほど Con A-F 結合部位は、よりT管中央方向に位置していた。また活動状態では、結合した Con A-F は3群ともT管外側方向に移動したが、その移動量は感受性の高い群ほど大きかった。

結論

下顎下制筋線維は、形態的には全く同様に見える単一筋線維が、膜電位感受性の違う3群に分類されることが明らかとなった。さらに、T管膜表面には、膜電位を感受する、CoAにより認識される糖タンパク分子からなる構造体が存在し、3群の筋線維間の膜電位感受性の差は、この構造体の静止状態での位置および活動状態での動きの大きさの違いによるものであることが明らかとなった。

続いて、主査・副査より、実験方法とその結果を中心に幅の広い種々の質問がされた。論文提出者はこれらの質問に対して、それぞれ適切に解答した。さらに、本研究に関してしっかりした将来展望を有していた。本論文提出者が本研究内容、および専門分野に対して十分な知識があることが認められた。本研究は筋の収縮機構における、興奮収縮連関を解明する上で、重要な研究と評価され、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。