慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	モルモット結腸紐に対するCaイオノフォアならびにレクチンの作用について
Sub Title	Effects of Ca ionophore and some lectins on the smooth muscle of guinea pig taenia coli
Author	中山, 雪麿(Nakayama, Yukimaro)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1980
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.25 (1980.) ,p.61- 66
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000025-0061

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

共立薬科大学
Annu. Rep. Kyoritsu
Coll. Pharm.

モルモット結腸紐に対するCaイオノフォアならびにレクチンの作用について*,**

中山　雪麿

Effects of Ca Ionophore and Some Lectins on the Smooth Muscle of Guinea Pig Taenia Coli

Yukimaro NAKAYAMA

(Received October 1, 1980)

The effects of Ca ionophore, A23187, and two kinds of lectins, WGA (Wheat germ agglutinin), Con A (Con canavalin A), on the E-C coupling system of the smooth muscle of the guinea pig taenia coli were investigated by the mechanogram, and sucrose gap method.

Muscle was suspended in a small chamber, 0.05 ml, and was stimulated by AC current (50 Hz, 5 V/cm, 5 sec) with platinum electrodes. Active tension was recorded on a recticorder with mechano-electric transducer. Membrane potential and tension were recorded simultaneously.

Potassium contracture was potentiated by A23187. Sustained depolarization and time course of spike discharges diminished with increasing potassium concentration with independent of A23187. Caffeine intensified the active tension trangiently and then reduced rapidly for depletion of the intracellular released Ca. However, this decrement of tension was controlled by a dose of WGA. Con A produced the synchronized spike and maximum tension after one minute latency. This response was characterized as a Con A response in the experiment.

はじめに

Caイオノフォアは外液中のCaイオンと特異的に結合し，細胞内Ca濃度の増加をもたらすとされている。したがって，筋線維に適当な濃度のCaイオノフォアを作用させると，張力の増強が起こることから，Ca透過性促進因子と考えられている。特に最近，抗生物質の一種であるA 23187やX 537 Aが，Caイオノフォアとして，電気的中性のもとで筋小胞体を介して，外液またはCa貯蔵部などにあるCaイオンと結合し，これを筋線維内部に輸送し遊離することにより張力の増強をもたらすことが，軟体動物の筋線維やラットの横隔膜筋などを用いた研究によって明らかにされた (Hainaut & Desmedt 1974[1], Desmedt & Hainaut 1976[2], Levy, Cohen & Inesi 1973[3])。とりわけ，A 23187は筋線維以外のリンパ球でも，Ca influxの促進因子であると考えられ，その動的効果が注目されている (Leukasen, White & Kersey 1974[4], Maino & Green 1974[5])。

---

* 第57回　日本生理学会 (1980年3月) で発表

** 日本薬学会，第100年会 (1980年4月) で発表

1) K. Hainaut & J.E. Desmedt : Nature, **252**, 407 (1974)
2) J.E. Desmedt & K. Hainaut : J. Physiol., **257**, 87 (1976)
3) J.V. Levy., J. A. Cohen & G. Inesi : Nature, **242**, 461 (1973)
4) J.R. Luekasen, J. G. White. J.H. Kersey : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 5088 (1974)
5) V.C. Maino, N.M. Green, M. J. Crumpton : Nature, **251**, 324 (1974)

一方，血球凝集素であるレクチンの一種，Con A(Con canavalin A) や WGA (Wheat germ agglutinin) もリンパ球活性化能を有することから，生体膜の動的反応の研究に用いられているが，これらの物質は分子量が大きいにもかかわらず，膜に対する作用物質として Ca イオノフォアと同様，リンパ球膜内への Ca 取り込み能の増加促進因子であることが暗示されている (Parker 1975[6])。

本実験は，興奮性組織であるモルモット結腸紐平滑筋を用いて，Ca イオノフォアやレクチンの生理作用を中心に，膜電位ならびに張力変化を指標として膜のイオン輸送機構への影響について検討した。

方　　法

モルモット結腸紐を約 10 mm の長さで摘出し，35℃ に維持された Krebs 液中に 95% O_2+5% CO_2 を飽和させながら 2 時間 incubate した後，容積 0.05 ml の微少容器中に吊して固定し，50 Hz, 5 V/cm, 5 sec という交流電場刺激で発生した活動張力をペンレコーダで描記した。またこの電場刺激による活動張力の大きさを比較するため，灌流 Krebs 液中の K 濃度を段階的に増すことにより，その K 拘縮を得た。さらに膜電位については sucrose gap 法により，その経時的変化を記録し，各因子の膜に対する影響について検討した。Ca イオノフォアは A 23187 を DMSO に溶解し，Krebs 液中に 1～12 μg/ml の濃度に調整し作用させた。また，レクチンについては NaCl 溶液中に溶かして保存し，これを Krebs 液に加えて 1～4 μg/ml の濃度で筋に作用させた。

結果と考察

A 23187 の作用について

外液の K 濃度を，5倍，10倍，20倍と増し，そのときの膜電位と張力変化を同時記録した(Fig 1)。その結果，A 23187 を作用することにより，最大 40% 拘縮高が増大することが分った。特に K 濃度が 30 mM のとき最大値を示し，K 濃度の増加に伴って増強率は減少した。

A 23187 の濃度変化に対しては，1～12 μg/ml まで段階的に増して調べたが，8 μg/ml のときに最大となり，12 μg/ml では逆に張力は減少することが分った。一方，膜電位の変化については，spike の大きさ，頻度，持続時間など，いずれも A 23187 の有無に拘らず有意差が認められなかったことは注目に値する。しかし正常の Krebs 液中における K 拘縮高は K 濃度の高い方が当然大きく，反対に持続性脱分極や spike の持続時間は K 濃度の増加に伴って短くなった。さらに張力の時間経過は，spike に伴う速やかな張力と，持続性脱分極による緊張性張力が区別された。両者の興奮-収縮連関効率は spike によるものの方が高く，とりわけ A 23187 を作用した際の効率の改善が著しかった。

レクチンの作用について

A 23187 を 1 μg/ml を筋に作用すると，交流刺激による活動張力は約 10% 増加する。そして引き続き WGA を同じく 1 μg/ml 作用すると，活動張力はさらに 30～40% も増加する。WGA 単独作用では自発性収縮が誘発されるに過ぎないので，WGA による張力増強効果は A 23187 の前処置によるものと考えられる。他方 Con A については，WGA のような増強効果は観察され

6) C. W. Parker : Biochem. Biophys. Res. Commun., **66**, 1498 (1975)

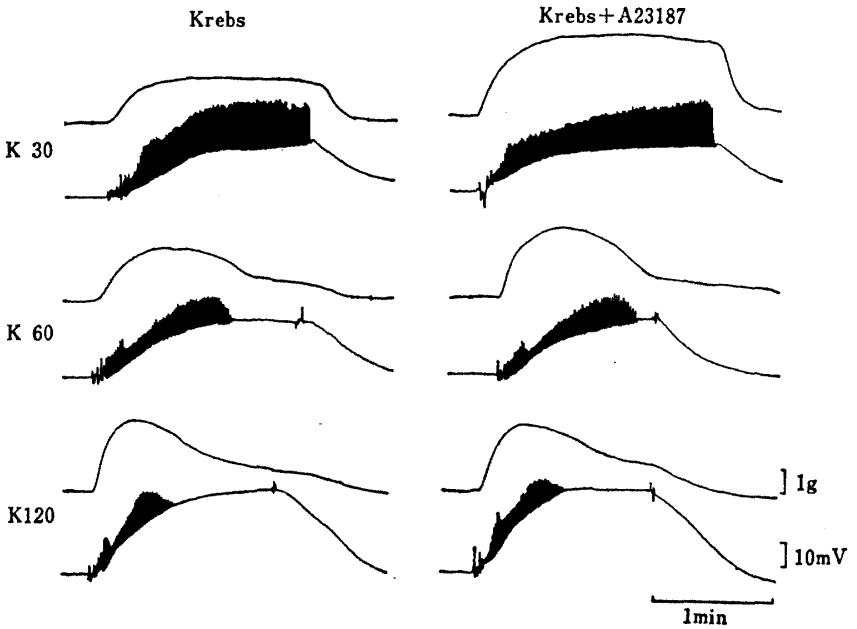

Fig. 1 Potassium contracture was gradualy enhanced by Ca ionophore, A23187. Sustained depolarization and time cource of spike discharges diminished with increasing potassium concentration but it was independent from existance of A23187.

ず，両者の分子量の差が膜のイオン透過性の上に影響をおよぼしているものと考えられる。また，交流刺激による膜の脱分極も，Ca influx の増強効果を促進しているものと思われる。

上記の点について膜電位と張力を同時描記することにより，それらの事実を裏づける実験を試みた。その結果，膜の自発性活動について観察している限りでは，A 23187 や WGA が 1 μg/ml では，膜の閾値を下げて自発性活動を誘発するが，張力が 30～40% も増強することは観察されず，わずかに自発性張力の持続時間が 30～40% 延長することが，作用後の変化として認められた (Fig. 2 A)。これに反して，WGA 作用後に A 23187 を作用した場合には，張力の増強は起こらず 30～40% 小さな張力発生が見られたに過ぎなかった (Fig. 2B)。予め自発活動のある筋でも同様なことが観察されることから，これらの化学物質の作用機作が，膜電位の深さとは相関の少ないことを物語っている。また作用後正常の Krebs 液で洗滌すると，数分で回復することからも，これらの物質の作用部位が細胞表面膜にあることが理解される。さらに WGA は 4 μg/ml で張力発生を抑制することから，膜の脱分極に対して積極的に作用し，脱分極阻害を惹き起こすことも考えられる。したがって張力だけの記録と，蔗糖隔絶法による記録との間に異なった結果が得られるのも，交流刺激による積極的な膜の脱分極の有無に原因があるものと推測している。

次に Caffeine との共存における各作用物質の効果について検討した。これまで Caffeine は骨格筋などでは筋小胞体に蓄えられた Ca を遊離させ，細胞内 Ca 濃度を増加させる働きのあることが分っているが，Fig. 3 に示すように，平滑筋についても Caffeine の作用により，交流刺激による活動張力が一過性に 30～40% 増大し，その後急激に減弱することが観察された。そこで，A 23187 とレクチンを作用させてみたところ，Caffeine 作用直後の一過性張力増大は残っているものの，その後の急激な減少が抑えられることが分った。とりわけ，Caffeine 10 mM を作用した場合には，WGA の投与に対して張力の減少は 7 分後でもわずか 1/4 の低下に留まっていた。

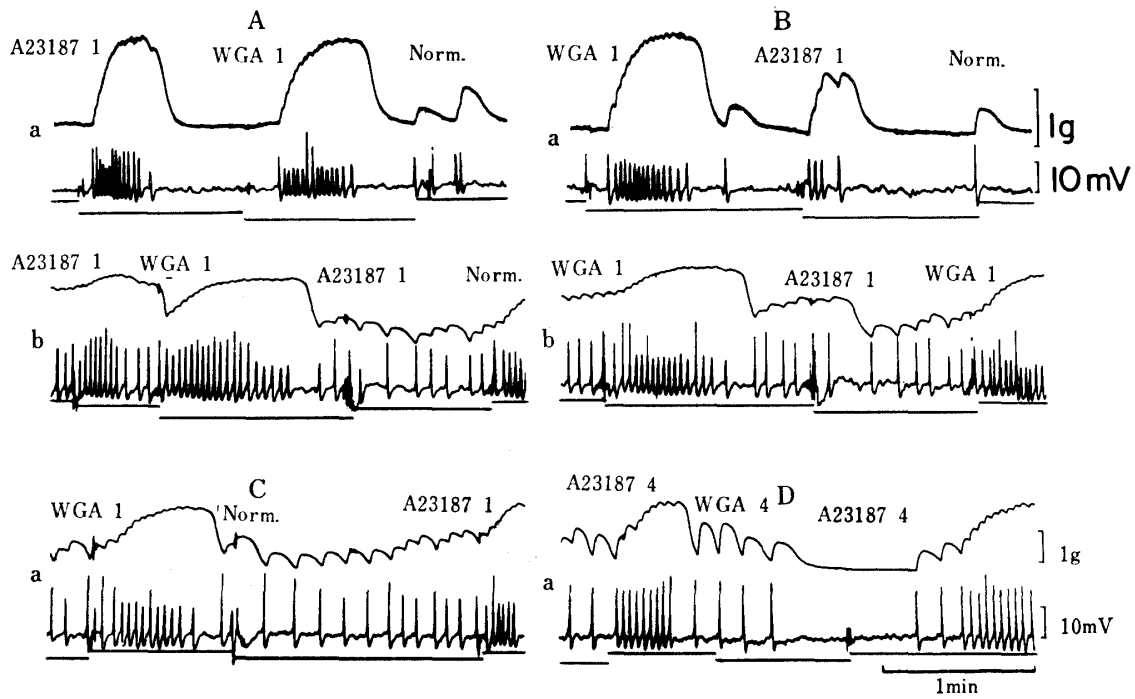

Fig. 2 Spontaneous contracture was potentiated by WGA after exposure to A23187, and was deppressed by a dose of the reverse order. Higher concentration of WGA (4 μg/ml) stopped the spike discharge and the tension entirely.

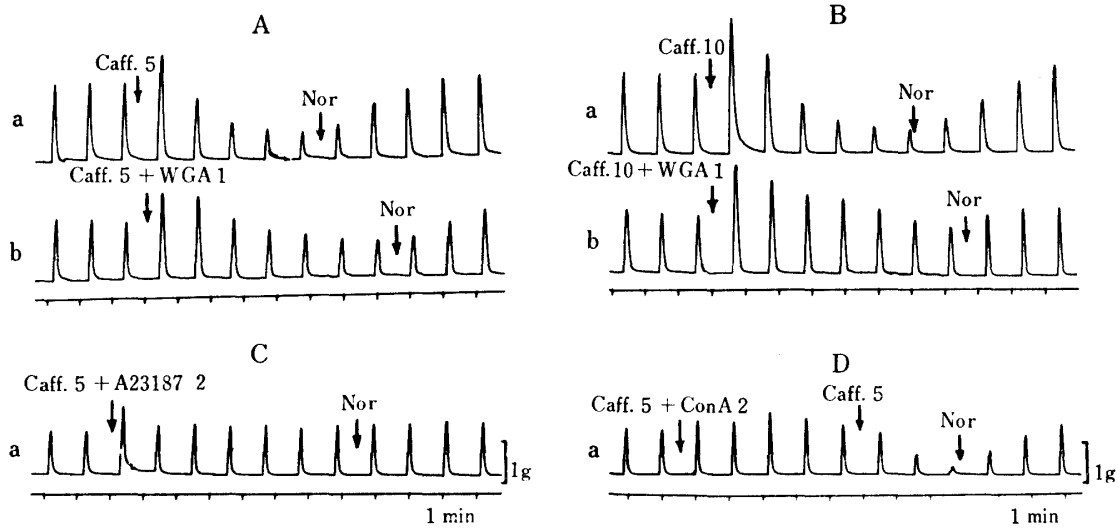

Fig. 3 The effect of caffeine (5 mM, 10 mM) on active tension by AC (50 Hz, 5 V/cm, 5 sec) stimulation. Active tension increased trangiently and then decreased rapidly. However, the rapid decrement of active tension was controlled by coexistence of WGA.

同様に A 23187, ConA の場合にも張力減少が抑えられ，ConA については，逆に張力が漸増する傾向さえ観察された。このように各作用物質は，Caffeine 作用後の急激な張力減少を抑えるように働くが，WGA だけは，Caffeine 本来の張力増強効果を打ち消すことなく，しかもその物質の作用をも顕著に現わしている。そして ConA は短時間で Caffeine の作用を打ち消し，ConA 自身の効果を強力に現わすことが分った。すなわち，レクチンの種類により興奮性膜への作用効果が異なること，それが単なる分子量の違いだけでなく，膜の結合部位の違いによることを暗示している。つまり A 23187 と ConA は共通した作用効果を有しているが，WGA はまったく別の機序で膜に作用しているものと思われる。しかしいずれの作用物質も単独，または他の物質との共存下において膜の活動を促進するという点では共通性を持っていることから，Ca influx 促進因子であると理解している。

最後に ConA の作用を膜電位の変化と張力発生の両面から調べてみた。Fig. 4 に示したように，ConA 5 μg/ml を筋に作用したところ，作用前の溶液如何にかかわらず ConA 作用後 1 分間は潜伏期となり，その後に同期した非常に大きな spike が発生した。したがって，それに伴う張力も最大張力が発生し ConA を作用している間持続した。すなわち，ConA の除去により spike は速やかに停止し，張力も完全に元の値に回復している。また同期 spike の頻度についても，低頻度から高頻度そして低頻度と変化する点も共通して観察された (Fig. 4)。

以上 Ca イオノフォアと二種のレクチンについて興奮性細胞膜に対する作用を検討した。Ca イ

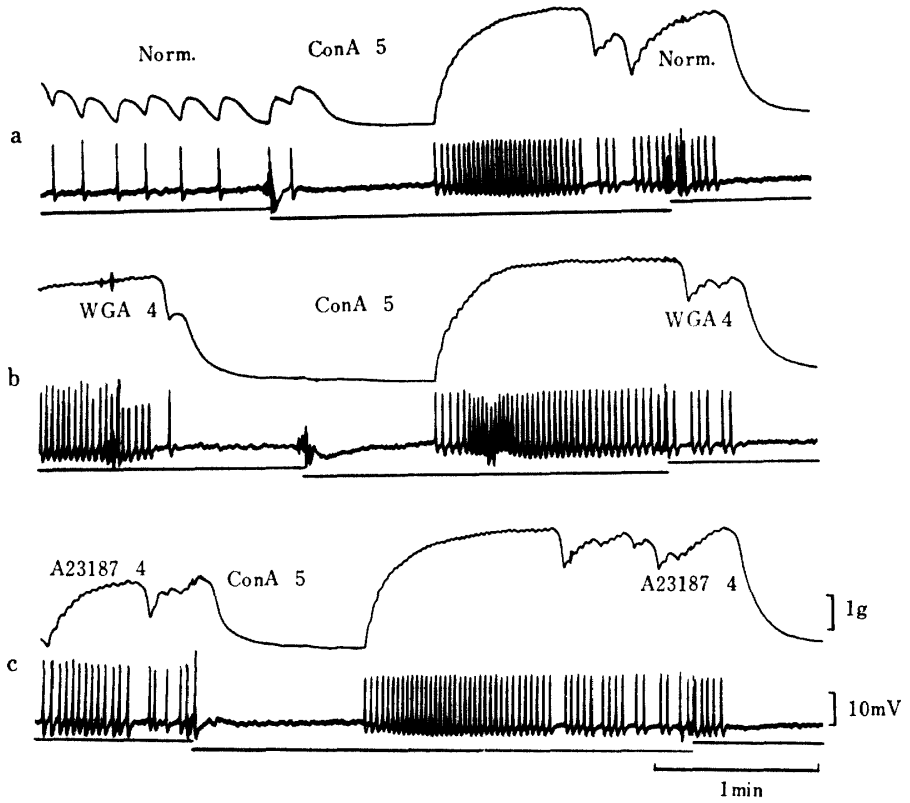

Fig. 4 The effect on spike discharge and tension produced by a dose of Con A (5 μg/ml). Synchronized spike and maximum tension appeared after the latency of one minute, and their responses were constant in all cases.

オノフォアである A 23187 は抗生物質であり分子量が 523 と最も小さく，WGA と ConA はそれぞれ 36,000 と 104,000 で，膜の作用物質としては著しく大きい。しかし WGA は純度の高いレクチンの中では最も分子量が小さく，血球凝集能が高いなど，ConA と並んで興奮性細胞膜に対するその作用機序の解明が待たれている。

一方 ConA についてはかなり広範囲の分野に用いられているレクチンで，特にリンパ球活性化の解明には多くの成果をあげている。1974年に Leukasen *et al* や Maino *et al* が Ca イオノフォアである A 23187 がリンパ球活性化能を有することを報告したことを契機に，ConA が膜に作用する際，その過程のどこかで Ca が何らかの形で関与するのではないかということが暗示された。本実験においても，ConA を作用することにより，いずれも似たような反応を示すことが明らかになり，これが興奮性膜に対するレクチンの典型的反応かどうかは今後の，より多くの実験例から判断されることであるが，少なくとも本実験結果が高分子タンパクの，膜に対する作用の一例であることは間違いないし，それが今後の研究に対する一つの指針になるものと思われる。