

■原 著■

軟体動物タツナミガイ体壁縦走筋ダイアド接合部の構造解析

木南雅暁¹ 鈴木季直^{1,2}

Structural Analysis of Dyadic Contacts in the Longitudinal Body Wall Muscle of a Mollusc *Dolabella auricularia*

Masaaki Kinami¹ and Suechika Suzuki^{1,2}

¹ Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² To whom correspondence should be addressed. E-mail: suechika-bio@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: The ultrastructure of dyads in the longitudinal body wall muscle (LBWM) of a mollusc *Dolabella auricularia* was studied to elucidate electro-mechano coupling in the dyadic contacts of somatic smooth muscles, and to make clear the morphological homology with the triadic contacts of skeletal muscles. In LBWM fibers, the sarcoplasmic reticulum (SR) in vesicular forms was mostly located underneath the plasma membrane, and constructed dyads, not only along the fiber surface but also around the tubular invaginations (Sugi and Suzuki, 1978)¹⁾ which resemble the transverse tubule of skeletal muscles in shape. In the junctional gap of dyads, electron-dense foot-like structures were arrayed at regular intervals. In dyads found along the fiber surface, the diameter of the foot-like structures was 18.3 nm, the center-to-center distance was 30.5 nm, and the junctional gap was 9.7 nm. While, in triads found around the tubular invaginations, those dimensions were 18.6 nm, 30.4 nm and 9.6 nm, respectively. No significant difference was found between the respective dimensions of the two types of dyads, indicating that they are fundamentally the same in construction. On the other hand, the measured dimensions of dyadic contacts coincided well with those of the triadic contacts of skeletal muscles. Furthermore, as found in skeletal muscle triads, a two-dimensional orthogonal array of foot-like structures on the SR junctional membrane was also confirmed by observing serial sections 35 nm thick. These results indicate that the foot-like structures are truly feet, and the dyadic contacts of LBWM fibers are homologous in structure and possibly in function with the triadic contacts of skeletal muscles. This view was further supported by these experiments, proving the existence of calsequestrin in SR demonstrated by immunoelectron microscopy and the high quantity (3.02%) of fractional SR volume per fiber volume measured by the montage method.

Keywords: longitudinal body wall muscle (LBWM) of *Dolabella auricularia*, structural analysis of dyadic contacts, foot, calsequestrin, fractional SR volume

序論

骨格筋では、運動神経の興奮が神経接合部で伝達物質のアセチルコリンを介して筋線維に伝達されると、筋線維形質膜が活動電位を発生し、その活動電位は筋線維表面を伝播し、筋線維形質膜の陥入構造である横行小管(transverse tubule、T管)を経て筋線維中心部に伝わり、Ca²⁺貯蔵構造である筋小包体

(sarcoplasmic reticulum、SR)から Ca²⁺が放出され、収縮が引き起こされると考えられている²⁾。この興奮収縮連関(excitation contraction coupling、EC連関)の諸過程のうち、T管とSR終末槽で構成されるtriad(三つ組)におけるT管膜とSR膜間の興奮伝達はelectro-mechanical coupling(EM連関)説によ

り説明されている^{3, 4)}。EM 連関では、T 管膜に局在する L 型 Ca^{2+} チャネルであるジヒドロピリジン受容体 (DHPR) が膜電位変化にともない分子構造変化を起こし^{5, 6)}、SR の T 管に面した膜に局在する Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) に接触してチャネルを開かせ、筋線維内に Ca^{2+} を遊離する⁷⁾と考えられている。RyR は、従来の電顕観察により T 管膜と SR 膜の接合部間隙で見出された foot⁸⁾と同一のものであることが明らかにされている^{9, 10)}。EM 連関説は、triad における T 管膜内の DHPR と T 管に面した SR 膜内の RyR (= foot) が物理的に接触できることが前提になっており、種々の骨格筋で triad の T 管-SR 接合部における両受容体の膜内分布が研究され、それぞれの膜内における二次元配列や T 管膜-SR 膜間の対向配列の様式が明らかにされている^{6, 11, 12)}。

一方、平滑筋では、筋収縮を引き起こす Ca^{2+} 、いわゆる活性化 Ca^{2+} は SR のみに由来せず、筋形質膜内表面からの遊離や外液からの流入によっても供給されるため^{13, 14)}、その EC 連関の諸過程についてはまだ不明な点が多い。骨格筋とは異なり、T 管構造を持たない平滑筋では、SR は、形質膜直下に小胞として広く分布し、形質膜と dyad (二つ組) を形成している。多くの平滑筋で、形質膜とそれに対向する SR 膜とで構築される接合部間隙に骨格筋の foot に良く似た粒状構造が観察されており、その微細構造学的類似性から、平滑筋でも、この部分で EM 連関機構が機能している可能性が示唆されている^{1, 14)}。1978 年に Suzuki and Sugi は、軟体動物タツナミガイ *Dolabella auricularia* の体壁縦走筋 (LBWM : longitudinal body wall muscle) の収縮調節機構について生理学及びピロアンチモン酸法を用いた細胞化学的実験を行い、この平滑筋では、筋形質膜内表面および SR が活性化 Ca^{2+} の貯蔵構造として機能していることを示した¹³⁾。彼らは、また、この筋が、形質膜直下に平滑筋としては良く発達した多くの SR を含み、T 管に良く似た形質膜の管状陥入構造に SR が近接して triad や dyad 様の構造を形成し、それらの接合部間隙には foot に良く似た粒状構造が局在することも報告している¹⁾。類似の構造は、タツナミガイに近縁のアメフラシの体壁筋でも観察されている¹⁵⁾。これらの構造上の特徴は、この体壁縦走筋が、平滑筋における EC 連関、さらには EM 連関の研究に極めて適した素材であることを示している。本研究では、平滑筋 dyad と骨格筋 triad の形態学的類似性を明確にするために、タツナミガイ体壁縦走筋を用いて dyad の微細構造観察を行い、連続切片観察法により接合部膜面での foot 様構造の二

次元配列について検討した。また、この筋の活性化に対する SR の寄与を明確にするために、筋線維内に占める SR の容積を測定し、免疫電顕法により SR 内 Ca^{2+} -結合タンパク質の同定を試みた。

材料と方法

筋線維標本作製と微細構造観察法

神奈川県三浦郡葉山町の柴崎海岸で採集し、26°C の循環海水で飼育したタツナミガイ *Dolabella auricularia* を背側正中線で切開し、内臓を全て摘出した後、頭部から体壁に沿って走行する体壁縦走筋 (LBWM) から直径約 1 mm の筋線維束を単離した。

単離した LBWM 筋線維束を pH7.2 の 0.1M カコジル酸緩衝液で希釈した 6% のグルタルアルデヒド (GA) 液および 2% の四酸化オスミウム (OsO_4) で固定した。エタノール系列およびプロピレンオキサイド (PO) で脱水した後、Epoxy 樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) を用い、樹脂ブロックから、通常の微細構造観察用の厚さ 70 nm の超薄切片と、foot 様構造二次元配列観察用の厚さ 35 nm の連続超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

電子顕微鏡で撮影したフィルム画像はスキャナーでデジタル画像に変換した。モニタージュ法¹⁶⁻¹⁸⁾による筋線維内 SR 容積の測定にはデジタル画像解析ソフトの NIH Image を用いた。また、連続切片像をもとに三次元画像構築ソフトの VG Studio MAX (Volume Graphics 社) で LBWM の dyad 領域を三次元再構成し、dyad 接合部膜面での foot 様構造の二次元配列について解析した。

免疫電子顕微鏡法

Ca^{2+} 結合蛋白質を同定するために、LBWM の筋線維束を pH 7.2 の 0.1 M 燐酸緩衝液で希釈した 4% のパラホルムアルデヒド (PF) 液で固定、エタノール系列で脱水し、Lowicryl K4M 樹脂に包埋した後、-20°C で 3 日間、室温で 24 時間紫外線を照射して樹脂を重合させた。ウルトラミクロトーム (Reichert Ultracut-N) で厚さ約 70 nm の超薄切片を作製し、Ni-150 メッシュに載物し、切片の免疫染色を行なった。0.02 M グリシン液で 30 分間処理して試料中のアルデヒド基を中和し、燐酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、1% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 30 分間処理して非特異的反応を軽減させ、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗カルシクエストリン抗体 (rabbit anti goat IgG, Upstate Biotechnology Inc.) で 1 時間免疫染色した。0.05% Tween20 と PBS で洗浄した後、直

径 10 nm の金粒子を標識した IgG 抗体 (goat anti rabbit IgG, Amersham) で 30 分間処理し、0.05% Tween20 と PBS で洗浄した。PBS で希釈した 2.5% の GA 液で 10 分間処理して抗原抗体反応を補強した後 PBS で洗浄し、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色して透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM2000EX) で観察した。

結果

LBWM 筋線維の微細構造観察

図 1 は LBWM 筋線維の横断切片像を示している。筋線維は、既に報告されているように¹⁾、一般の平滑筋より太く直径 10~20 μm であり、筋形質中央部には核と多数のミトコンドリアが局在する領域があり、それ以外の筋形質の殆どは太いフィラメントと細いフィラメントで占められていた。形質膜は多数の小陥凹を形成しており(図 2A)、様々な大きさの小胞状 SR が形質膜直下に局在していた(図 2, 矢印)。また、形質膜は随所で筋形質内に陥入して骨格筋の T 管に似た構造を形成していた(図 2C)。この T 管様

構造の形質膜直下にも SR が局在しており、これらの SR は形質膜に面した膜が形質膜と接合部を形成して dyad を構成し、その接合部間隙では、しばしば規則的間隔で並んだ foot 様構造が観察された(図 2B-D)。T 管様構造は、隣接する細胞との細胞間隙が広い場合に見られ、細胞間隙が狭い領域では観察されなかった。形質膜と dyad を構成している SR の内腔には高電子密度の粒子が多数観察された(図 2D)。それらの粒子は、内腔中央部や包膜内表面付近で密に集合していたが、dyad 接合部膜の内表面付近には観察されなかった。これらの結果は、これまでの報告¹⁾と良く一致していた。

免疫電子顕微鏡法による Ca^{2+} -結合蛋白質の検出

抗カルシクエストリン抗体で免疫染色した切片では、抗原局在の指標となる二次抗体の金粒子は、SR 以外の細胞小器官や形質膜には観察されず、SR 内腔内の中央部や包膜内表面付近で、通常固定切片像の SR 内に観察された高電子密度の粒子上に局在していた(図 3)。免疫染色の非特異的反応の有無を検証

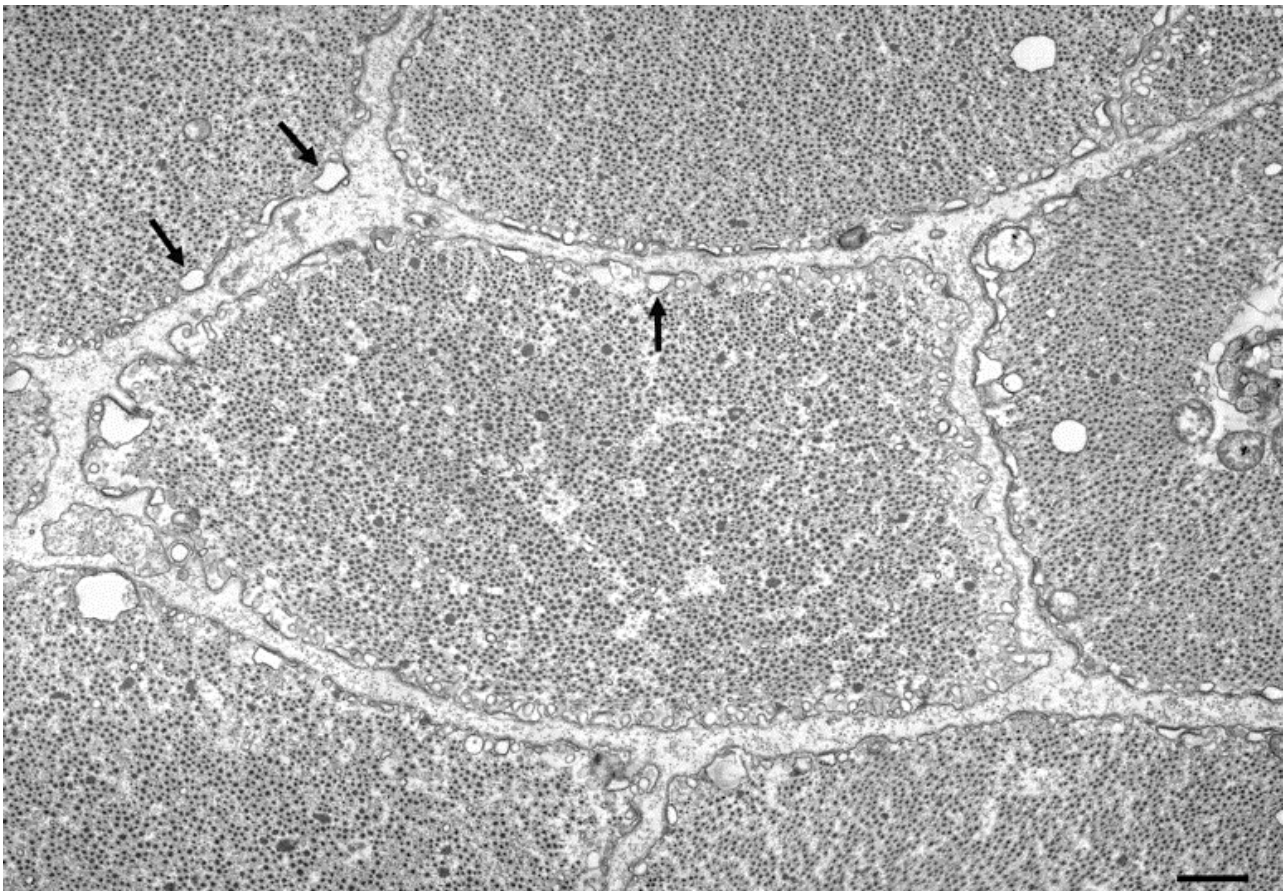


図 1. LBWM 筋線維の横断切片像。形質膜直下には、形質膜と dyad を構成する SR が多数見られる(矢印)、スケール: 1 μm 。

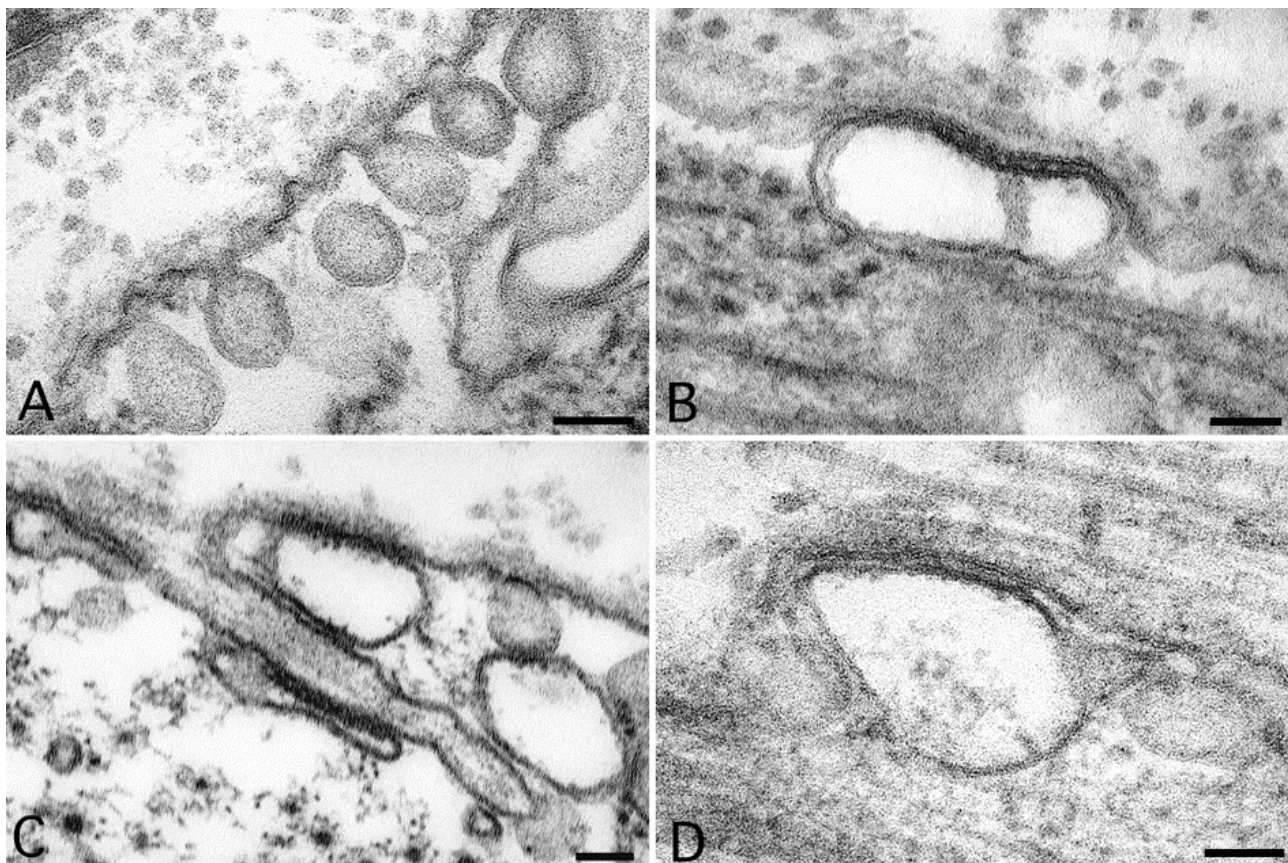


図2. LBWM筋線維の形質膜周辺の拡大像. A. 小陥凹. B. 筋線維表面形質膜と dyad を形成する SR, 接合部間隙には foot 様構造が観察される. C. T管様構造およびその形質膜と dyad を形成する SR 接合部間隙には foot 用構造が観察される. D. 内腔内に高電子密度の粒子を含む SR. スケール: 100 nm.



図3. 抗カルシクエストリン抗体で免疫染色した LBWM 筋線維の縦断切片像. 金粒子は SR 内腔や包膜上に見られる. スケール: 200 nm.

表 1. LBWM 筋線維 dyad 各部のサイズ

Dyad 各部	SR と筋線維表面形質膜 からなる dyad (nm)	SR と T 管様構造形質膜 からなる dyad (nm)	有意水準
Foot 様構造の幅	18.3 ± 1.5 (n=229)	18.6 ± 1.8 (n=110)	>0.05
Foot 様構造中心間距離	30.5 ± 2.5 (n=175)	30.4 ± 3.2 (n= 83)	>0.05
形質膜と SR 膜間距離	9.7 ± 0.9 (n=183)	9.6 ± 0.8 (n= 81)	>0.05

値は平均値±標準偏差(n=12)

するために染色過程で一次抗体である抗カルシクエストリン抗体を用いずに二次標識抗体のみを反応させた切片では、金粒子は一切観察されなかった。

Dyad 構築要素の構造解析

LBWM 筋線維に見られる dyad と骨格筋の triad との構造上の類似性を検討するために、その構築要素となる foot 様構造の幅と中心間距離、および形質膜と SR 膜間の接合部間隙距離を測定した。表 1 はその結果を纏めたものである。SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅は 18.3 nm、

中心間距離は 30.5 nm、接合部間隙は 9.7 nm であった。一方、SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅は 18.6 nm、中心間距離は 30.4 nm、接合部間隙は 9.6 nm であった。SR が筋線維表面形質膜および T 管様構造形質膜とで形成する dyad の各部の測定値のうち、同一測定部の測定値間で t 検定を行ったところ、いずれの場合でも、両者に有意の差はなかった。

Dyad 接合部における foot 様構造の膜面上二次元配列を明らかにするために、連続超薄切片観察を行った。図 4 は、SR と筋線維表面形質膜とで構成

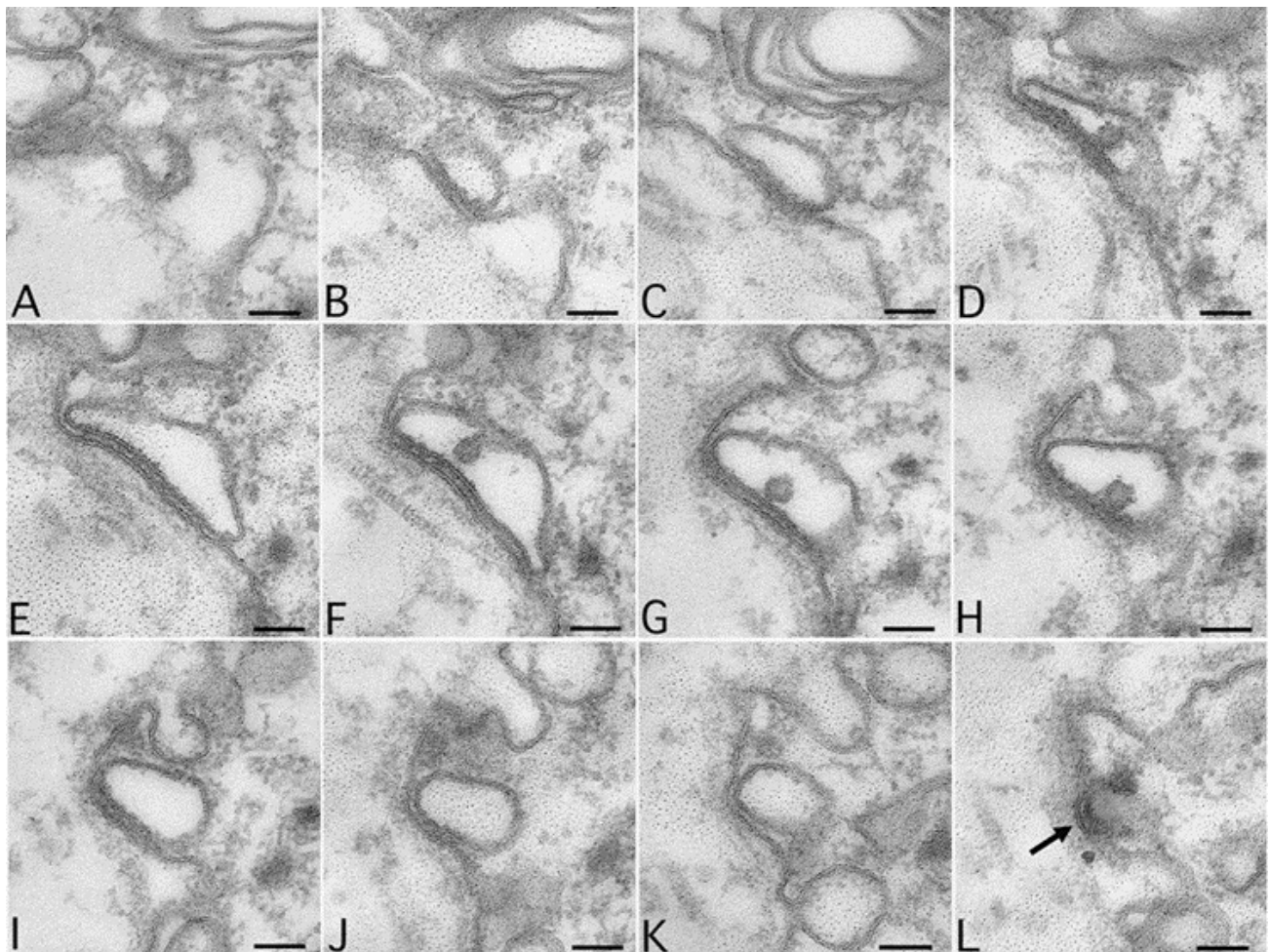


図 4. SR と筋線維表面形質膜とで構成される dyad 領域の連続切片像. A から L は薄切順を示す. L では dyad 接合部(矢印)でのみ SR 膜の断面が見られる. D から F では接合部間隙に foot 様構造が観察される.スケール: 100 nm.

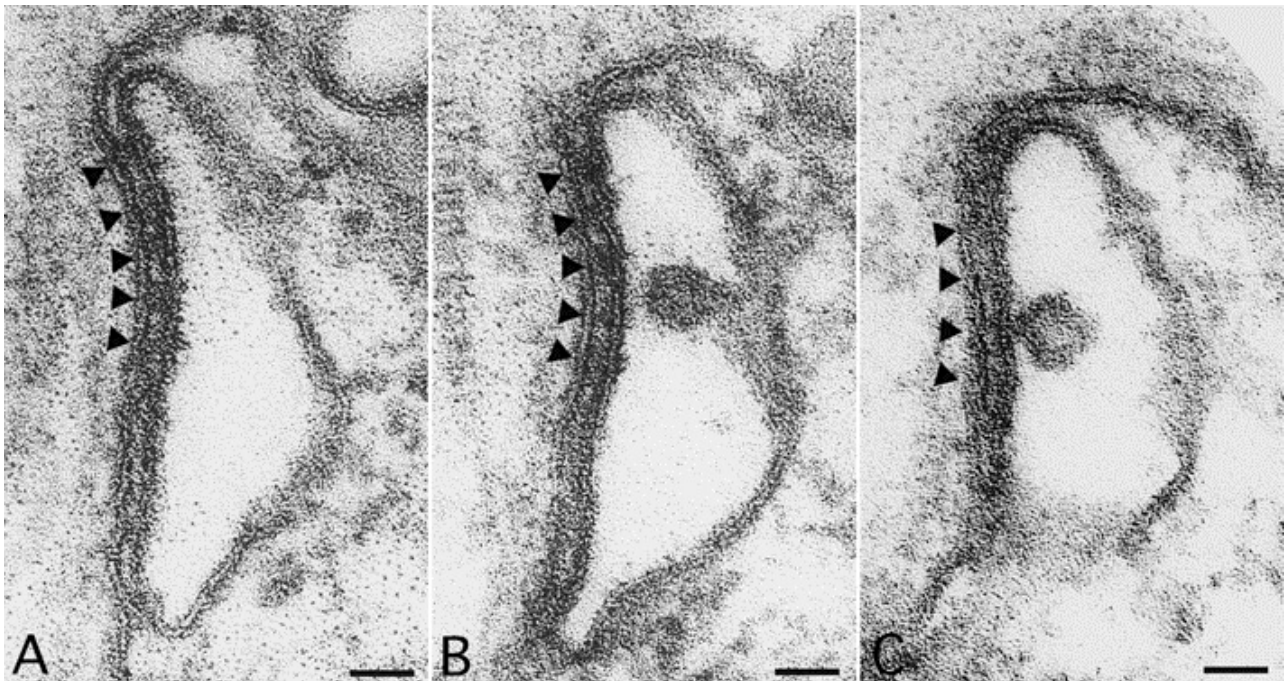


図 5. Foot 様構造(图中矢頭)が明瞭な図 4E(A), 図 4F(B), 図 4G(C)の dyad 拡大像. スケール: 50 nm.

される dyad の連続切片像である。A から L は切片が薄切された順を示し、順が進むにつれて片面凸のレンズ状 SR の切片像は徐々に大きくなり、F で最大となり、以後徐々に小さくなった。順最後の切片 L では、SR 包膜は切断像ではなく、電子密度の高い平面として観察された。また、E と F の切片では典型的な dyad の切片像が観察され、この SR の最大長径は約 370 nm であった。D、F、G、H の切片では SR の内腔に高電子密度の顆粒が観察され、その最大直径は約 58 nm であった。連続切片のうち、E、F、G の切片で明瞭な Foot 様構造が観察された(図 5)。Foot 様構造は、必ずしも接合面全体に分布していなかったが、局在領域では連続的に等間隔で並んでおり、切片 E と F で 5 個、切片 G で 4 個が確認された。

同様の結果は、SR と T 管様構造形質膜とで構成される dyad の連続切片観察によっても得られた。その一例を示す図 6 では、SR は T 管様構造の陥入先端部を包み込むようにして dyad を形成していた。薄切順 A から L の切片像のうち、C から J で dyad を構成する SR が観察され、さらに、D から I で接合部が確認された。SR 切片像は、G で最大になり、それ以降は徐々に小さくなった。F~I の切片は、典型的な dyad 像を示し、接合部では 6 個の foot 様構造が観察された(図 7)。T 管様構造とその筋線維表面からの陥入部は、図 6 の A から I の切片で連続的に観察された。T 管様構造の内径は約 70 nm で、その

形質膜上にも内径約 90 nm の多数の小陥凹が観察され、図 6 では、T 管様構造の筋線維表面からの深さは H の切片で最も大きく、約 1.1 μm であった。

図 8 は、三次元画像構築ソフトの VG Studio MAX により、図 4 の連続切片像を薄切順に重ねあわせて再構成した三次元画像と、その三次元再構成画像を、dyad 接合部付近で接合面と平行に再切断した切断面の像を示している。立体像上面は連続切片の最初の切片像(図 4A)と一致する。Foot 様構造が顕著に見られた図 4E~G の接合部膜面が観察できるように、立体像を切断し(図 4B)、回転させ(図 4C)、SR の接合部膜面を正面から透視した(図 4D)。三次元再構成では、切片の厚さが立体像の高さの情報として使われ、切片像の濃淡は単純にそのまま高さ(深さ)方向に反映される。従って、切片像で粒子やフィラメント等の電子密度が高い部位は立体像側面でも電子密度が高く表示される。連続切片像で電子密度の高い foot 様構造は、図 8D の切断面では必然的に濃い部分として示される。その結果、foot 様構造を示すと考えられる高濃度スポット(图中、○で標識)は、断面上で水平方向に 3 列観察され、連続切片 5 枚目(図 4E)に相当する水平位で 4 個、6 枚目(図 4F)に相当する水平位で 3 個、7 枚目(図 4G)に相当する水平位で 2 個観察された。連続切片像で観察された foot 様構造の数より少なかったが、3 列のスポットは、垂直方向ではおよそ同じ位置となるよう直線的に配列していた。

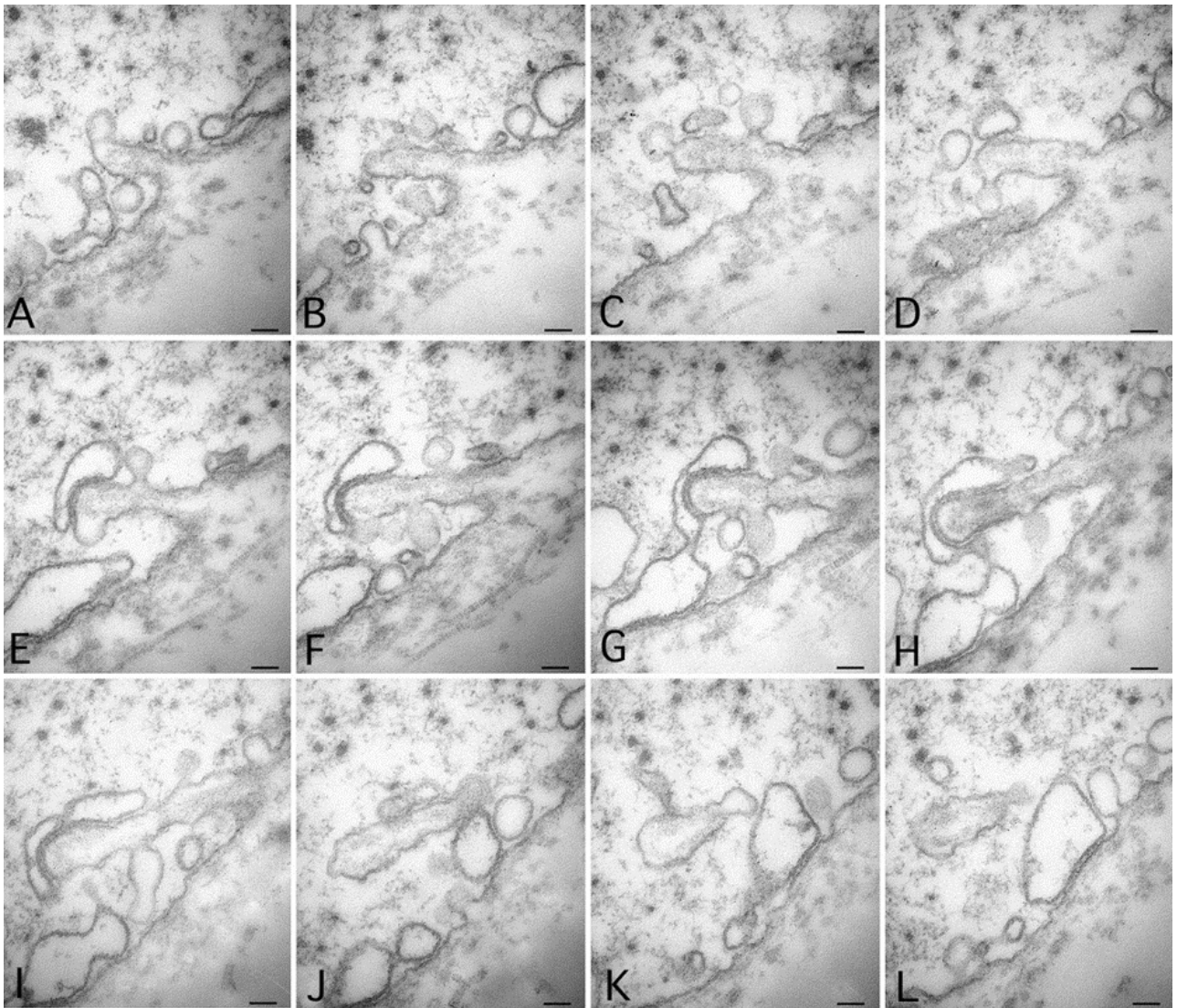


図 6. SR と T 管様構造形質膜とで構成される dyad の連続切片像. A から L は薄切順を示す. T 管様構造は小陥凹が連なって形成されているように見え(A, C), SR 膜と形質膜間の接合部間隙には foot 様構造が観察される(F-I). スケール: 100 nm.

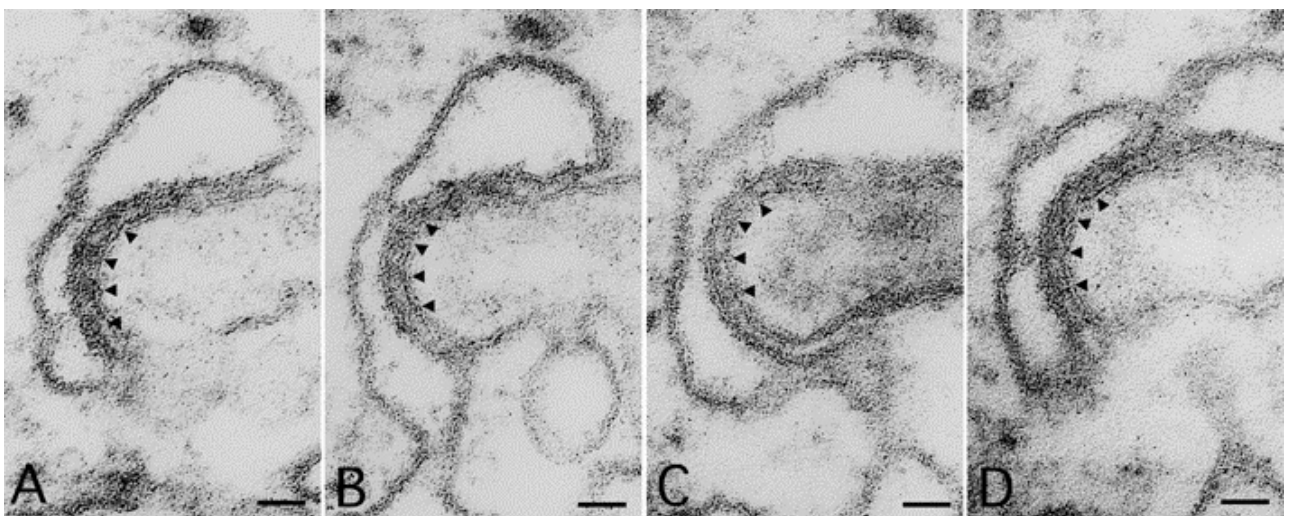


図 7. Foot 様構造(図中矢頭)が明瞭な図 6F(A), 図 6G(B), 図 6H(C), 図 6I(D)の dyad 拡大像. スケール: 50 nm.

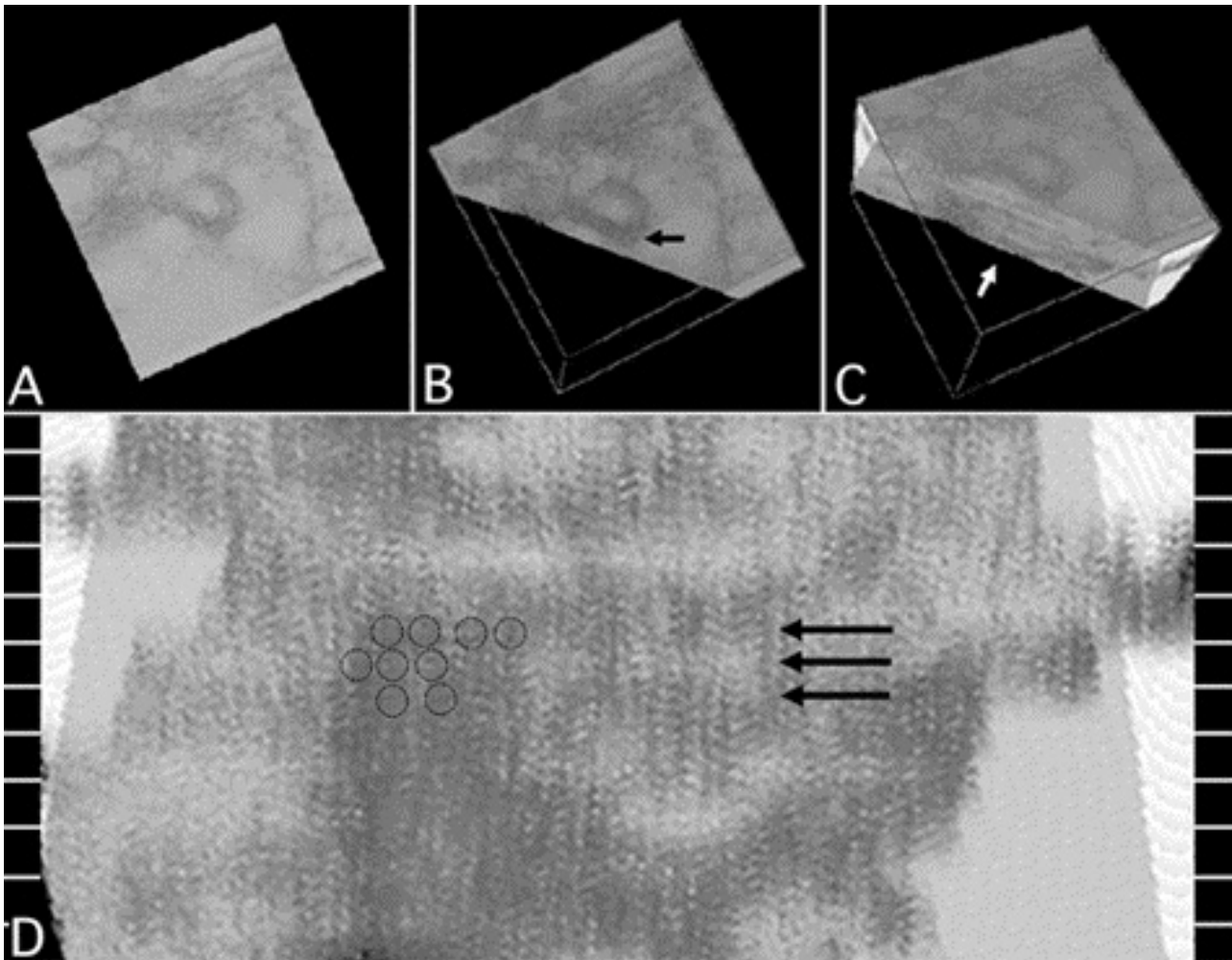


図8. 連続切片像(図4)を三次元再構成した立体像とその切断面の透視像. 電顕像を切片順に重ね(A), 接合部(B, 矢印)面に平行に切断し, 切断面(C, 矢印)が見られるように三次元的に回転し, 切断面を正面から透視(D). 切断面写真上の標識(○)は foot 様構造の局在を反映する高濃度スポットの位置. 矢印は、foot 様構造が明瞭に観察された図4の切片 E, F, G の位置. 縦軸目盛は切片の厚さ 35 nm の間隔を示す.

討論

LBWM 筋線維の dyad と foot 様構造

LBWM の筋線維で観察された dyad の接合部間隙は、SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では 9.7 nm で、SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では 9.6 nm であった。一方、骨格筋の triad や心筋の dyad の接合部間隙は、約 10.0 nm であることが知られており¹⁹⁾、今回測定された結果はこれとほぼ一致する。また、LBWM の dyad の接合部間隙で見られた foot 様構造については、SR と筋線維表面形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅が 18.3 nm、その中心間距離は 30.5 nm であり、SR と T 管様構造形質膜からなる dyad では、foot 様構造の幅が 18.6 nm、その中心間距離は 30.4 nm であった。t 検定の結果では、二種の dyad でこれらの値に有意の差はなかったため、両 dyad は構造的に全く同一のものと考えられる。骨格筋 triad の foot、すなわち、RyR は、SR 膜から接合部間隙に突出した膜外部と、SR 膜内

の Ca^{2+} 放出チャネル構造を持つ膜貫通部とからなり、膜外部の膜面に平行な平面像は各辺の中央がややへこんだ、一辺約 30 nm のほぼ正方形を示し、側面像は丸みを帯びた上下逆転の凸型で、中央の突出した部分は膜貫通部となり SR 内腔に向かって細くなっていることが知られている^{20, 21)}。また、既に知られている foot の幅は 15.0~18.0 nm、中心間距離は約 30.0 nm であり⁷⁾、今回の各測定数値と良く一致しており、LBWM の foot 様構造は骨格筋の foot と同じ構造をしていると考えられる。

図4と5で示したSRと筋線維表面形質膜からなる dyad の連続切片像では、foot 様構造は E と F の切片で5個ずつ見られ、G の切片では4個しか見られなかった。また、foot 様構造は他の切片では観察されなかった。Foot 様構造の中心間距離は約 30 nm であり、連続切片の厚さは 35 nm であるため、一枚の切片には foot 様構造がほぼ1個分おさまることになり、この dyad では、連続切片で観察されたもの

以外の foot 様構造があるとは考えられない。このことから、図 4 の dyad を構成する SR の接合部膜面には 4~5 個の foot 様構造が 3 列存在していると考えられる。一方、図 6 と 7 に示した SR と T 管様構造形質膜からなる dyad の連続切片像では、foot 様構造は F から I の切片で 6 個ずつ見られた。また、foot 様構造は他の切片では観察されなかった。このことから、この dyad を構成する SR の接合部膜面には 6 個の foot 様構造が 4 列存在していると考えられる。さらに、図 4 の連続切片像をもとに三次元再構成した立体像の接合部膜面に平行に切断した断面 (図 8D) では、SR の接合部膜面上に並走する 3 列の高濃度のスポットが確認された。この立体像断面では、連続切片像と同数のスポットは確認できなかったが、これは、三次元再構成で、欠落している深さの情報を切片像の濃淡に従ってそのまま補完するため、切片像に見られる foot 様構造以外の高電子密度の部分も類似の構造のように表示してしまうことで、スポットを明確に判定できなかったためである。以上の検討から、図 4 の dyad を構成する SR の接合部膜面では、foot 様構造は、縦方向に 3 列、横方向に 4~5 列で並んだ四角格子配列をしていると考えられる。また、同様の解析により、図 6 の diad を構成する SR 接合部膜面では、foot 様構造が縦方向に 4 列、横方向に 6 列並んだ四角格子配列をしていると考えられる。ザリガニやサソリでは、foot は SR 接合部膜上に等間隔で並んだ四角格子配列をしていることが知られており¹⁰⁾、LBWM の foot 様構造配列もこれと良く一致する。これらの微細構造上の類似から、LBWM の foot 様構造は骨格筋や心筋で観察されている foot と同等のものであると考えられる。

哺乳動物では RyR には骨格筋型の RyR1、心筋型の RyR2、脳型の RyR3 の 3 つのアイソフォームが知られている。鳥類、魚類、両生類では RyR に 2 種のアイソフォームとして α と β が見出されており、 α と β が一つ置きに配列しているという報告もある¹¹⁾。LBWM 筋線維の dyad 接合部に見られる foot が、従来知られている RyR アイソフォームのいずれに一致するかについては、免疫電子顕微鏡法などにより明らかにされるべき今後の課題である。

T 管様構造

LBWM 筋線維の T 管様構造は、陥入先端部も含めて T 管様構造形質膜に小陥凹が局在することから、この構造が小陥凹から形成される可能性を示唆した。骨格筋では、T 管形成は小陥凹の陥入から始まることが知られており²²⁾、LBWM でも骨格筋と同様に、小陥凹から T 管様構造が形成されると考えることは

合理的である。一方、図 6 の連続切片では、T 管様構造はすべての切片でほぼ同じ位置に見られ、筋線維表面形質膜からの陥入部は A~I の切片で連続的に観察されることから、この構造の陥入部は切片とは垂直な方向にかなり広い空間を占めていると思われる。このことは、この構造が単なる管状構造に留まらず、時には甲殻類で見られるような列溝 (clef) を形成しうることを示唆する。

筋線維容積に対する SR の相対容積と活性化 Ca^{2+} LBWM 筋線維内に占める SR の容積を測定した結果、筋線維容積に対する SR の相対容積は $3.02 \pm 0.84\%$ (平均値 \pm 標準偏差、 $n=50$) であった。平滑筋では、活性化 Ca^{2+} は形質膜内表面や SR からの遊離や、細胞外からの流入で供給されると考えられているが、それらの中でも、一般に、SR からの Ca^{2+} 遊離は筋収縮への寄与が少ないと考えられている。これを反映し、平滑筋での SR の相対容積は小さく、例えば、モルモット結腸紐平滑筋²³⁾ では 2.4% であり、ウサギ門脈平滑筋¹⁷⁾ では 2.2% である。LBWM の SR の相対容積はこれらと比べるとかなり高い。Suzuki とその共同研究者による報告^{4, 13)} によれば、LBWM の活性化 Ca^{2+} は細胞外からの流入によるものより細胞内貯蔵部からの遊離によるものが多い。このことは、今回測定された LBWM の SR の相対容積がかなり大きいことと矛盾しない。一方、骨格筋の SR 相対容積は、例えば、マウス指長伸筋²⁴⁾ で 5.5% 、カエル縫工筋¹⁶⁾ で 13% 、カサゴウキブクロ筋¹⁸⁾ では最大値で 25.6% である。これらの SR 相対容積は各筋線維における収縮速度や収縮力の違いを反映していると考えられるので、平滑筋としてはかなり大きい LBWM の SR 相対容積は、タツナミガイが LBWM により体運動することと深く関係していると考えられる。

SR 内 Ca^{2+} -結合蛋白質

免疫染色の非特異的反応の有無を検証したところ、一次抗体を用いなかった切片では金粒子は一切見られず、一次抗体を用いた切片では金粒子が見られたことから、金粒子はカルシクエストリンのみと反応していると考えられる。二次抗体の金粒子は、専ら、SR の内腔や膜周辺部に見られ (図 3)、通常固定を行なった筋線維の切片像で SR の内腔にあることが確認された電子密度の高い粒子 (図 2D) 上に局在していたことから、これらの粒子はカルシクエストリンであり、LBWM の SR では骨格筋と同様に Ca^{2+} -結合蛋白質としてカルシクエストリンが機能していると考えられる。

結論

LBWM の筋線維では、骨格筋とは異なり、SR は形質膜と dyad を構成しているにすぎないが、骨格筋 triad と同じ要素で構成され、SR と形質膜間の接合部間隙で見られた foot 様構造は、構造特徴の一致から foot そのものであり、SR 内腔の Ca²⁺-結合蛋白質も骨格筋と同じカルシクエストリンであることなどから、EM 関連も骨格筋と同じ機構で作働すると考えられる。

謝辞

タツナミガイの採集にご助言下さいました神奈川大学理学部生物科学科の大和田正人氏に深く感謝致します。

文献

- 1) Sugi H and Suzuki S (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. I. Mechanical response and ultrastructure. *J. Cell Biol.* **79**: 454-466.
- 2) Ebashi S and Endo M (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys mol. Biol.* **18**:123-183.
- 3) Schneider MF and Chandler WK (1973) Voltage dependent charge movement of skeletal muscle. *Nature* **242**: 244-246.
- 4) Franzini-Armstrong C and Jorgensen AO (1994) Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 509-534.
- 5) Fosset M, Jaimovich E, Delpont E and Lazdunski L (1983) [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **258**: 6086-6092.
- 6) Jorgensen AO, Shen AC-Y, Arnold W, Leung AT and Campbell KP (1989) Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle *in situ*: an immunofluorescence. *J. Cell Biol.* **109**: 135-147.
- 7) Inui M, Saito A and Fleischer S (1987) Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structure of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **262**: 1740-1747.
- 8) Franzini-Armstrong C (1970) Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* **47**: 488-499.
- 9) Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kanagawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M and Hirose T (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439-445.
- 10) Saito A, Inui M, Radermacher M, Frank J and Fleischer S (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **107**: 211-219.
- 11) Loesser EK, Castellani L and Franzini-Armstrong C (1992) Dispositions of junctional feet in muscles of invertebrates. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**: 161-173.
- 12) O'Brien J, Valdivia HH and Block BA (1995) Physiological differences between the alpha and beta ryanodine receptors of fish skeletal muscle. *Biophys. J.* **68**: 471-482.
- 13) Suzuki S and Sugi H (1978) Ultrastructural and physiological studies on the longitudinal body wall muscle of *Dolabella auricularia*. II. Localization of intracellular calcium and its translocation during mechanical activity. *J. Cell Biol.* **79**: 467-478.
- 14) Suzuki S and Sugi H (1982) Mechanisms of intracellular calcium translocation in muscle. *In: The Role of Calcium in Biological System. vol. I.* Anghileri LJ and Tuffet-Anghileri AM, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 201-217.
- 15) Prescott L and Brightman MW (1976) The sarcolemma of *Aplysia* smooth muscle in freeze-fracture preparations. *Tiss. Cell.* **8**: 241-258.
- 16) Peachey LD (1965) The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog's sartorius. *J. Cell Biol.* **25**: 209-231.
- 17) Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell Biol.* **52**: 690-718.
- 18) Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N and Sugi H (2003) Ultrastructural organization of the transverse tubules and the sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle. *J. Electron Microsc.* **52**: 337-347.
- 19) Kelly DE (1969) The fine structure of skeletal muscle triad junctions. *J. Ultrastruct. Res.* **29**: 37-49.
- 20) Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M and Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of sarcoplasmic reticulum channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* **338**: 167-170.
- 21) Radermacher M, Rao V, Grassucci R, Frank J, Timerman AP, Fleischer S and Wagenknecht T (1994) Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J. Cell Biol.* **127**: 411-423.
- 22) Ishikawa H (1968) Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation. *J. Cell Biol.* **38**: 51-66.
- 23) Popescu LM, Diculescu I, Zelck U and Ionescu N (1974) Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell. Tiss. Res.* **154**: 357-378.
- 24) Luff AR and Atwood HL (1971) Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscle of the mouse during postnatal development. *J. Cell Biol.* **51**: 369-383.