

江橋節郎先生と筋弛緩

小 川 靖 男

順天堂大学医学部薬理学教室

(受付 平成19年7月18日)

PROFESSOR SETSURO EBASHI AND HIS ACHIEVEMENTS IN THE STUDY MUSCLE RELAXATION

Yasuo OGAWA

Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine

This review article aims to trace the achievements of Professor Ebashi in elucidating the mechanism of muscle relaxation, identifying the vesicular relaxing factor, and establishing the pivotal role of Ca^{2+} in the regulation of muscle contraction, and isolating troponin C, the first Ca^{2+} receptor protein to display binding activity and effector functions. The central role played by Ca^{2+} in various cell signaling processes as well as muscle activation is accepted. Through re-examination of arguments concerning the Ca^{2+} -ATPase reaction mechanism in relation to the terms “ Ca^{2+} binding” and “ Ca^{2+} transport,” the significance of ATP-ADP exchange reaction was revisited and the initial step of formation of the phosphorylated intermediate $\text{E} \sim \text{P} \cdot \text{Ca}$ was found to be critical in relaxation from muscle twitch. This finding is in marked contrast to the finding that cycling of the whole reaction of ATP hydrolysis is important for relaxation from tetanus.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 215-20)

Key words: relaxing factor, Ca^{2+} -ATPase, ATP-ADP exchange reaction, phosphorylated intermediate

平成18年末に栗原 敏、馬詰良樹両教授のお世話で開催された「筋生理の集い」において、故江橋節郎先生のご業績についてお話しさせていただく機会を得ました。また、今回、栗原 敏教授のご努力により、東京慈恵会医科大学雑誌に印刷物として出版されることとなり、その時の講演内容に多少の加筆訂正したものをここに記します。

江橋先生のご業績を始めに簡単に概観いたします¹⁾と A. Szent-Györgyi, “Chemistry of Muscular Contraction” (1947) を読み、「筋収縮は ATP 存在下での actin と myosin との相互作用である」という簡潔な結論に深い感銘を受け、同書第

2 版 (1951) のグリセリン処理標本の作製法に従って作製したグリセリン筋で研究を始めました。すぐにこの標本は収縮するが弛緩しない事に気付きました。しかし短時間グリセリン処理した筋では弛緩が起こります。弛緩は単なる収縮の抑制ではなく、弛緩を起こす因子 (弛緩因子) が必要であるとの結論に達しました。この結論は実は既に 2, 3 の欧米の研究者により報告されており、過剰の ATP が弛緩効果を示すという所見と併せて ATP 再生系酵素がその本体であるという考え (可溶性弛緩因子説) が有力でした。しかし筋ホモジェネート上清のうち ATP 再生系酵素が多く含まれる 30-40 g/dl 硫酸で沈降する画分では弛緩せず、10-20 g/dl 硫酸で沈降する画分が必要である事を報告いたしました。またこの画分はリン脂

平成18年12月9日、学外共同研究“筋生理の集い”研究集会での江橋節郎先生追悼記念講演会における講演内容

質に富み、かつ Kielley-Meyerhof の ATPase 活性があることから、筋小胞体由来の膜小胞であることが示唆されました(小胞性弛緩因子説)。筋原繊維の収縮モデルである超沈殿活性が微量の Ca^{2+} (1 μM オーダー、当時 0.1 mM で「微量」と言われていた)で調節される事を見いだす一方、分画遠心法で調製したマイクロソームが ATP 依存的に Ca^{2+} を結合することを始めて見いだしました(江橋先生は専ら“ Ca^{2+} binding”を用いた。なぜ多くの研究者が用いる“ Ca^{2+} transport”でなく、“ Ca^{2+} binding”かは後述)。 μM オーダーの Ca^{2+} によりアクトミオシンの ATPase 活性が活性化されることを最初に報告した A. Weber と二人だけの Ca^{2+} theory の誕生でした。しかし純粋な actin と myosin にはこの Ca^{2+} 感受性がなく、江橋の結果は不純物の混入によるものと非難されました。これは actin 標品によって Ca^{2+} 感受性に差異があることが分かっていたので、この actin 標本について検討を加えた結果 tropomyosin と troponin とが actin-myosin 相互作用に Ca^{2+} 感受性を付与する Ca^{2+} 制御系であることを明らかにしました。さらに troponin は troponin C, I, T の 3 成分の複合体であり、troponin C が Ca^{2+} 受容蛋白(Ca^{2+} を結合し、生物学的効果を惹起する蛋白)であることを明らかにしました。

遠藤先生が Ca^{2+} theory 誕生・確立までの経過について詳しく述べています。また大槻先生が troponin C-troponin について詳しく述べます。私は筋小胞体 SR の Ca^{2+} 結合について江橋先生の成果を述べるとともに私の結果も補足させていただきます。

江橋先生は筋弛緩因子の本体が SR である²⁾という一応の成果を収めたものの、新しい研究の展開を求めてロックフェラー大学に留学する機会を得ました。Lipmann 教授の指示はこれまでの研究の続行でした。江橋先生がよく言うことは「Lipmann 先生は Mg^{2+} は受け入れるが Ca^{2+} は嫌いである。」1970 年代前半私も Lipmann 研に留学させて貰いましたが、Lipmann から“Ebashii, Ca^{2+} , wonderful! But, why do you like Ca^{2+} so much?”と言われ、大変なショックを受けたことを思い出します。江橋先生は一年足らずの留学で

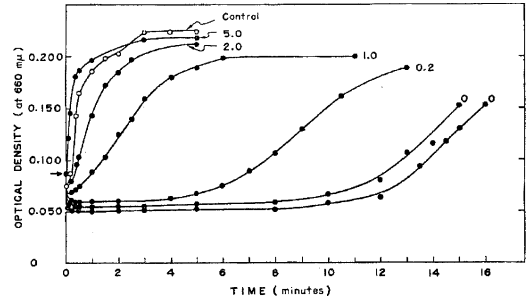


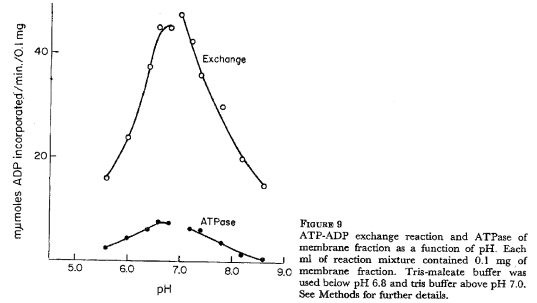
Fig. 1. Superprecipitation of EDTA-washed actomyosin and its response to Ca^{2+} . Figures attached to curves represent Ca^{2+} concentrations (in μM) added to the medium. It is astonishing that contaminating Ca^{2+} was as low as 0.1 μM or less without usage of EGTA- Ca^{2+} buffer (from reference #3).

二編のすばらしい論文を発表なさいました。その一つはボスが反対のため、単名で J. Biochem.³⁾ に発表したものですが、私は一番高く評価いたします。その結論は以下の四点に要約されます。① 超沈殿、アクトミオシン ATPase 活性を指標として、アクトミオシンは μM オーダーの Ca^{2+} により活性化される (Fig. 1)。② この活性化の程度はアクトミオシン中の Ca^{2+} 結合量とよく平行する。③ EDTA などのキレート試薬の筋弛緩効果はその見掛けの Ca^{2+} 親和性とよく平行する。④ 筋小胞体の ATP 依存 Ca^{2+} 結合は EDTA に匹敵する筋弛緩効果を示す。現在の Ca^{2+} theory を確立するのに必要な証拠が揃っているすばらしい論文です。私が始めに読んだときはフンフンと読んだだけでしたが、実験を始めて見ると襟を正して読まなければという気持ちになり、Lipmann 研の当時の状況を推測すると涙なくしては読めません。江橋先生が深夜に実験する習慣になった切掛けだと仰っておりました。図 1 はアクトミオシンが μM オーダーの微量の Ca^{2+} で活性化される事を超沈殿で示したデータです。このデータの凄いところは EGTA- Ca^{2+} 緩衝液を用いずに Ca^{2+} 濃度を 0.1 μM 以下にしているところです。側をヒトが通っただけで 1 μM Ca^{2+} 以上のコンタミが生じます。アクトミオシンのみならず、水(器具の洗浄用ばかりでなく、もっとも大量に使う試薬)、すべての試薬、ガラス器具、濾紙などすべてを Ca^{2+} -free にしなければなりません。実験室の

環境も改善しなければなりません。当時はガラス器具も軟質のものが多く、ガラス器具から Ca^{2+} が漏出します。ガラスは水飴みたいなものと江橋先生は良く仰います。水はミリ-Q のような装置はなく、蒸留しなければなりません。気をつけないとすぐに μM オーダーの Ca^{2+} がコンタミします。もう一つの特徴は超沈殿を測るのに濁度変化の時間経過を用いている点です。これにより弛緩効果を簡単に再現性良く測定出来ます。江橋先生終生のルーチンの実験ツールであります。

もう一つは Lipmann と連名の筋小胞体による ATP 依存 Ca^{2+} 結合を示した論文です⁴⁾。江橋先生は Lipmann が名前を連名にしてくれたのは江橋先生への義理だと仰います。しかし私は再度読み直してみても、後述するように ATP-ADP 交換反応が存在することを示したからだだと思います。その結論を纏めると ① 筋小胞体由来の膜小胞は ATP 依存 Ca^{2+} 結合を示すが、この効果は aging により速やかに失活する。これと平行して筋弛緩効果も aging により失活しやすい。② ATP 依存 Ca^{2+} 結合の結果、内腔に Ca^{2+} が取り込まれ約 1,400 倍に濃縮される。③ ATPase 活性の aging による失活は僅少である。④ ATPase 活性の数倍高い ATP-ADP 交換反応が見られた (Fig. 2)。この交換反応は aging により速やかに低下する。⑤ ATP 結合も見られた。ATPase 活性より ATP-ADP 交換反応が筋弛緩効果により重要であると結論いたしました。ATP-ADP 交換反応が存在することは $\text{E} \sim \text{P} \cdot \text{Ca}$ 中間体 (EP) の存在が推定され、これが筋弛緩には重要であると結論しました。この事を強調して「 Ca^{2+} 結合」と呼んでおりました。一方、多くの研究者は小胞体内腔への Ca^{2+} 濃縮に注目して Ca^{2+} 取り込みまたは輸送と呼んでいます。EP は 1967 年に Yamamoto & Tonomura⁵⁾ により acyl-P として同定されました。

江橋先生は当時名古屋大学理学部に在籍していた大西 勁博士と共同で Ca^{2+} 指示薬であるムレキッド存在下に 2 波長分光光度計を用いて筋小胞体の Ca^{2+} 取り込み経過を測定できること、急速混合装置を併用すると可成り速い時間経過を調べることが出来ることを報告しました⁶⁾。ちょうどその頃私が大学院学生として入室いたしました



394 THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY · VOLUME 14, 1962

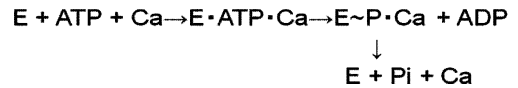


Fig. 2. ATP-ADP exchange reaction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle SR as a function of pH. This clearly indicates that ATPase reaction follows the reaction steps as shown above (from reference # 4).

(1965 年)。私の研究テーマは次の 2 つでした。

- ① 定常状態では筋小胞体の Ca^{2+} 取り込みで筋弛緩が説明される。しかし、 Ca^{2+} 結合速度で筋弛緩速度が説明できるか否か検討すること。強縮 tetanus からと単収縮 twitch からとでは筋弛緩速度が 2-3 倍異なり、後者の方が断然速い。また、単収縮でも充分時間静止した直後と反復後とでは弛緩速度が異なる。これを説明すること。
- ② 筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離 (放出) について研究すること。

今回は ① に限って私の研究を敷衍して述べさせていただきます。② について一言いたしますと、当時は取り込みの抑制が即遊離 (放出) と広く考えられておりましたが、江橋先生は当初から Na^+ , K^+ -ATPase と Na^+ -channel とが独立であることから Ca^{2+} 取り込みと Ca^{2+} 遊離 (放出) とは独立であると考えておりました⁷⁾。リアノジン受容体が単離精製された今日、江橋先生の結論が正しかったことになります。

図 3 はウシガエル骨格筋筋小胞体の Ca^{2+} 取り込みの初期相です⁸⁾。0.4 秒までに取り込まれる Ca^{2+} 量は 35 nmole/mg protein となり、この速度は小胞体含量、 Ca^{2+} -ATPase 活性の Ca^{2+} 濃度依存性、単収縮時の細胞質内 Ca^{2+} 濃度推定値などを考慮すると強縮からの筋弛緩速度を説明出来る

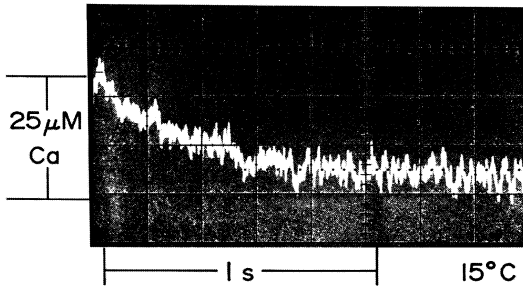
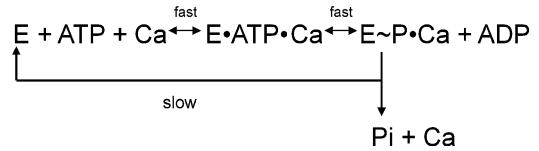


Fig. 3. Transient time course of Ca^{2+} -uptake by the heavy fraction of the SR from frog skeletal muscle. One syringe contained 0.72 mg protein/ml of SR and the other syringe, 1.0 mM MgATP. Equal volumes of the two media were mixed rapidly at 15°C and the following time course of the $[\text{Ca}^{2+}]$ change was detected by murexide (from reference # 8).

程度でした。この測定値は ATPase cycle が回っている状態です。ATPase 機構については詳しく研究されていますが、その基本的概要は Fig. 4 に要約されます。E~P·Ca までは非常に速いのですが、その加水分解過程が律速になっております。言い換えれば図 3 の結果はこの律速過程で規定されることとなります。ATPase 蛋白は細胞質内には 0.1-0.2 mM 存在いたしますので、 Ca^{2+} 除去の観点からすれば E~P·Ca 形成までのステップでよいこととなります。しかしこの場合 Ca^{2+} -ATPase (E) が基質である ATP, Ca^{2+} とどのような順序で反応するかが問題となります。多くの研究者の意見は Fig. 4 の反応様式 1 または 3 が有力であります。E は元々 Ca^{2+} に対して高親和性であり、小胞体内腔に Ca^{2+} を放出するために E~P·Ca の加水分解時のエネルギーを使って低親和性に変換すると考えています。低親和性状態から高親和性状態への復元は遅く、律速の要因になっています。この転換に ATP は必須ではないが促進的に働くと考えています。この説では新たに Ca^{2+} が除去されるためには律速である EP 加水分解過程が入ることになります。一方、江橋先生は反応様式 2 を主張されています。即ち ATP により E が活性化されその結果 Ca^{2+} 親和性が高まり Ca^{2+} を結合すると考えております。この説ならば EP 加水分解は Ca^{2+} 除去に必ずしも必要ではありません。この説を支持する結果がいくつかあります。その一つを述べます。 Ca^{2+} 取り込み



1. $\text{E} \cdot \text{Ca} + \text{ATP} \longrightarrow \text{E} \cdot \text{ATP} \cdot \text{Ca}$
2. $\text{E} \cdot \text{ATP} + \text{Ca} \longrightarrow \text{E} \cdot \text{ATP} \cdot \text{Ca}$
3. 1 + 2

Fig. 4. Possible reaction sequences of substrates in Ca^{2+} -ATPase and its partial reactions

は ATP のみならず、AMPCPOP (ATP を AMPOPOP と略記すると α -と β -P 間の O がメチレン基になっている)、ITP, ヌクレオチド以外のリン酸化合物 (アセチルリン酸, カルバミルリン酸, p-ニトロフェノールリン酸など) でも Ca^{2+} 取り込みを起こします。最大取り込み量は大差有りませんが、取り込み速度, Ca^{2+} 濃度依存性から推定した見掛けの Ca^{2+} 親和性が大きく異なります。両者は直線関係にあります。この関係は低 ATP 濃度でも同様でした⁹⁾。もう一つの有力な根拠は ATP-ADP 交換反応の Ca^{2+} 濃度依存性です¹⁰⁾。 Ca^{2+} 濃度の単純増加関数ならば反応様式 1 または 3 ですが、2 相性で且つ高濃度 Ca^{2+} で反応がゼロになれば反応様式 2 です。結果は EP レベルが減少を来さない Ca^{2+} 濃度範囲で 2 相性でしたが、完全にゼロとはなりません。反応様式 1 は除外され、2 または 3 が考えられます。

既製の市販装置では酵素と 2 種類の基質とを任意の順序、プレインキュベーション時間で反応経過を測定することが困難ですので、Dr. Froehlich (NIH) から彼の装置の blue print をいただき、急速反応停止装置を自作し、Fig. 5 に示すように E と ATP, Ca^{2+} の混合順序を変えたり、E を Ca^{2+} または ATP と一定時間プレインキュベーションした後に他の基質を加えたときの EP 形成時間を調べました¹¹⁾。Fig. 5 では、第 1 の因子と 20 ms preincubation 後に第 2 の因子を加え反応開始させたときの反応時間 (横軸, ms 単位) と EP 形成レベル (縦軸) との関係プロットしました。SR

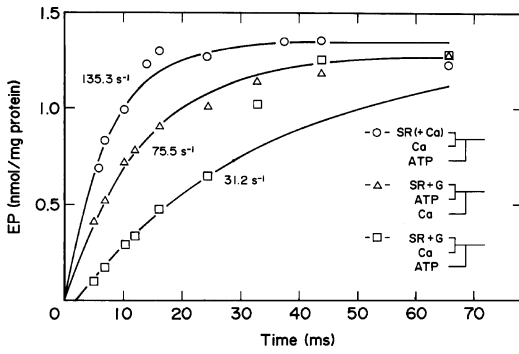


Fig. 5. Transient kinetics of EP formation and its dependence on substrate addition sequence. Note that a delay in EP formation was observed in the case of Ca^{2+} preincubation of 20 ms. No delay, however, was not seen after a longer preincubation of 86 ms (from reference # 11).

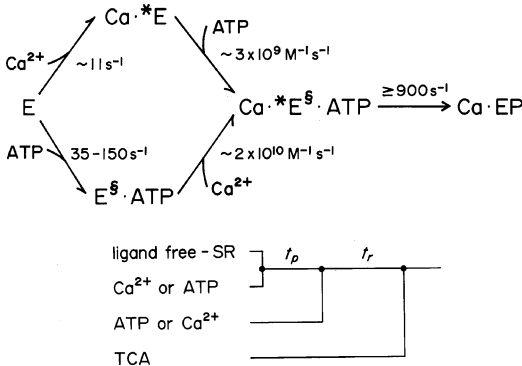


Fig. 6. Summary of transient kinetic experiments of EP formations as shown in Fig. 5. This study shows ATPase protein can be activated by Ca^{2+} or ATP, but ATP activation is very rapid to form EP intermediates with occluded Ca^{2+} which is critical for rapid relaxation from the twitch (from reference # 11).

標品には Ca^{2+} がコンタミしていますので EGTA を加えて Ca^{2+} レベルを下げた SR に ATP, Ca^{2+} を加える順序を変えて測定いたしました。EP 形成は始めに ATP を加えてから Ca^{2+} を加えた方が逆の順序より可成り速い事が分かりました。 Ca^{2+} を先に加えた場合、delay が見られました。この delay は preincubation 時間を例えば 86 ms に長くすれば消失いたします。条件をいろいろと変えて同様な実験をした結果を纏めた解釈を図 6 に示します。結論として反応様式 3 に従いますが、細胞内では静止時には $\text{E} \cdot \text{ATP}$ と活性化された状

態にあり、単刺激により Ca^{2+} 濃度が高まると $\text{E} \sim \text{P} \cdot \text{Ca}$ が形成される部分反応が主で、その結果弛緩が起こると考えられます。刺激が反復されると結合が寄与する割合が減少し ATPase cycle の寄与が大きくなると結論されます。江橋先生の推定が正しかったことが結論されます。付言すると $\text{E} \sim \text{P}$ に結合する Ca^{2+} の stoichiometry が未解決です。一般的には 2 と信じられていますが、確定するには測定方法の確立が必須です。江橋先生の眩きによれば 70-80 も想定されます。今後の研究に俟たねばなりません。

文 献

- 1) Ebashi S. Relaxing factor, sarcoplasmic reticulum and troponin: a historical survey. In: Fleischer S, Tonomura Y, editors. Structure and function of sarcoplasmic reticulum. Orlando: Academic Press; 1985. p. 1-18.
- 2) Kumagai H, Ebashi S, Takeda F. Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatine phosphokinase. Nature 1955; 176: 166.
- 3) Ebashi S. Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. J Biochem 1961; 50: 236-44.
- 4) Ebashi S, Lipmann F. Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. J Cell Biol 1962; 14: 389-400.
- 5) Yamamoto T, Tonomura Y. Reaction mechanism of the Ca^{++} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from rabbit skeletal muscle. I. Kinetic studies. J Biochem 1967; 62: 558-75.
- 6) Ohnishi T, Ebashi S. The velocity of calcium binding of isolated sarcoplasmic reticulum. J Biochem 1964; 55: 599-603.
- 7) Ogawa Y, Harigaya S, Ebashi S, Lee KS. Sarcoplasmic reticulum: calcium uptake and release systems in muscles. In: Schwartz A, editor. Methods in pharmacology, Vol 1. New York: Appleton-Century-Crofts; 1971. p. 327-46.
- 8) Ogawa Y, Kurebayashi N, Irimajiri A, Hanai T. Transient kinetics for Ca uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle with reference to the rate of relaxation of living muscle. In: Varga E,

- Kövéér A, Kovács T, Kovács L, editors. Molecular and cellular aspects of muscle function (Advances in Physiological Sciences, Vol. 5). Budapest: Pergamon Press, and Akadémiai Kiadó; 1981. p. 417-35.
- 9) Ogawa Y, Ebashi S. Ca^{2+} uptake and release by fragmented sarcoplasmic reticulum with special reference to the effect of β , γ -methylene adenosine triphosphate. In: Nakao M, Packer L, editors. Organization of energy-transducing membranes. Tokyo: University of Tokyo Press; 1973. p. 127-40.
- 10) Ogawa Y, Kurebayashi N. ATP-ADP exchange reaction by fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1982; 3: 39-56.
- 11) Ogawa Y, Harafuji H. Transient kinetics of formation of phosphorylated intermediate (EP) by fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle: Ligand addition sequence-dependent rate of EP formation. *J Biochem* 1986; 100: 1319-28.