

江橋先生と筋興奮収縮連関のCa説

—— その確立まで ——

遠 藤 實

埼玉医科大学

(受付 平成19年7月30日)

PROFESSOR EBASHI AND HIS CALCIUM THEORY OF EXCITATION-CONTRACTION COUPLING —— THE ROAD TO ITS ACCOMPLISHMENT ——

Makoto ENDO

Saitama Medical University

The steps through which Professor Ebashi achieved his epoch-making accomplishment in the field of excitation-contraction coupling and molecular mechanism of physiological contraction of striated muscle were thoroughly reviewed. In the early 1950s Ebashi discovered, independently of Marsh, a relaxing factor in muscle homogenates capable of inducing relaxation of glycerinated muscle fibers that had been contracted by ATP. The essential part of the relaxing factor was found to reside in the particulate fraction, later found to be fragmented sarcoplasmic reticulum. Since EDTA was known to cause relaxation, Ebashi compared the Ca^{2+} -binding activity and relaxing activity of various chelating agents and found that they were exactly parallel. He further demonstrated that the relaxing factor strongly accumulated Ca^{2+} in the presence of ATP. He also demonstrated that the contractile reaction of the actomyosin system requires micromolar quantities of Ca^{2+} . Ebashi concluded that the relaxing factor causes relaxation by removing Ca^{2+} from the contractile system. He further discovered that for the Ca^{2+} requirement of the myosin-actin system the presence of tropomyosin and of troponin, a new protein that he discovered, is necessary. Tropomyosin and troponin are present along with actin filaments and in the absence of Ca^{2+} cooperate to exert inhibitory action on actin to prevent it from interacting with myosin. Ca^{2+} binds to troponin, and the resulting conformational changes of troponin molecules are transmitted through tropomyosin to actin to remove the inhibition and allow the contractile reaction. Thus, Professor Ebashi elucidated the mechanism of physiological contraction.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 201-13)

Key words: calcium ion, relaxing factor, sarcoplasmic reticulum, troponin, excitation-contraction coupling

I. はじめに

筋肉研究のみならず生命科学全般にわたって、

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

わが国の偉大な先達であった江橋節郎先生が亡くなられて一年、未だに喪失感は拭い去れない。生命科学において今や常識となっているCaイオンの細胞内情報伝達のメッセンジャーとしての役割は、先生によって初めて確立されたという事実を知らない若い研究者も増えてきている昨今、先生

がどのようにしてあの画期的な仕事を完遂されたのかを正確に跡づけておくことは、その経緯のかかなりの部分を傍から垣間見ることのできる立場にあった私にとっての義務でもあろうと考えていた。ここにその機会を与えて下さった東京慈恵会医科大学、栗原敏学長に心から感謝したい。

II. 筋肉研究に入るまで¹⁾

昭和17(1942)年7月13日、医学部2年生であった江橋先生は夏休みの基礎研究室配属で薬理学教室に行き、割り振りの結果、熊谷洋先生(当時講師)と「運命的な」出会いをされた。熊谷研究室には明るい自由な雰囲気があって、先生は講義よりも研究室にいるのを楽しまれたという。しかし戦争も激しくなり、熊谷先生は昭和18(1943)年ジャカルタ医科大学に教授として赴任、江橋先生も昭和19(1944)年9月医学部を繰り上げ卒業、海軍軍医として従軍された。上海で終戦を迎えた先生は昭和21(1946)年7月、廃墟になった東京に戻り、その足で研究室へ向かって熊谷先生と再会されたという。

「芋の買い出しと靴の修理」で瞬く間に時が過ぎたが、昭和22(1947)年の秋頃、無麻酔犬の子宮運動研究を再開した熊谷先生が、その電気生理的な面をやってみないか、と江橋先生に勧められた。江橋先生は、生理学教室の時実利彦先生(当時講師)の門を叩いて理論から実験までを学ばれたが、「鉛蓄電池の保守から始めた」という話や、時実先生からの「宿題」への答えが先生の最初の原著論文となったが、その表題「C-R 結合増幅器による記録曲線の補正方法について」²⁾などが、時代を雄弁に物語っている。

その後病に倒れ、年余の療養生活を送っていた先生は、昭和25(1950)年秋に「一期一会といってもよい」三つの論文に出会った。A. Szent-Györgyi(1947)の *Chemistry of Muscular Contraction*³⁾、Hodgkin & Katz(1948)の神経興奮のNa説の最初の論文⁴⁾、及びJ.H. Burn(1950)の“local hormone”の総説⁵⁾である。Szent-Györgyiには「大いに感激したが自分がそれに関係することになるとは、夢思わなかった」、Hodgkin & Katzには「感動して、興奮のあまり熊谷先生に『電気生理学は終わりました』と申し上げたものである」と

は先生自身の言である。

結局、アセチルコリンが局所で産生される局所調節因子であるというBurnの考えに惹かれて、それを検討しようということで電気生理学から生化学に転向を決意した先生は、まず生化学教室で「ユープング」を受けることとした。当時の生化学教室「二研」の雰囲気は先生は生化学教室創設百周年記念誌に活写しておられる⁶⁾。こうして先生は、コリンアセチラーゼの研究を進め、その成果は優れた3編の論文となって残っている⁷⁻⁹⁾。しかし、酵素学全盛という時代の影響下、薬物はすべて細胞内の酵素に作用してその効果を発揮するものだということを疑っていないBurnの思考に先生は疑問を持った。大部分の薬物は膜に作用する(とくに当時の薬物はそうであった)ではないか、というのである。膜の重要性は現在では常識であるが、1950年代前半、未だHodgkin, Huxley, Katzが常識となる以前の酵素学隆盛の時代にそれを喝破した洞察力は先生ならではのものである。昭和33(1958)年薬理学の大学院生となった筆者は、当時助手であった江橋先生の薬理学の講義(外遊中の熊谷教授の指名による代役であった)を拝聴し、「薬物は多くは膜に作用する」ことを含めて、度々眼から鱗の落ちる思いをしたものである。

コリンアセチラーゼへの意欲を急速に失った先生の頭に甦ったのがSzent-Györgyiの本であった。1951年出版の第2版¹⁰⁾の末尾に“glycerol extracted psoas”というのを見つけて、これなら蛋白化学の素養がなくても、グリセリン筋をマグヌス管に入れ、槓杆でキモグラフィオン上の煤紙に書かせるという薬理的な手法で、当時としては最先端のトピックの一つ、アクトミオシン-ATP系の働きを目のあたりに見ることができる、ということで、先生の筋肉研究は始まった。

III. 筋弛緩因子の発見

グリセリン筋の実験は、当時教室に学位論文の仕事に来ていた腕の良い外科医の藤田完吉氏が担当した。実験を始めてやがて、江橋先生はATPで収縮したグリセリン筋はATPを洗っても弛緩が起らないことに注目した。不可逆の現象なら生理的ではない、ATPによる変性かも知れないと

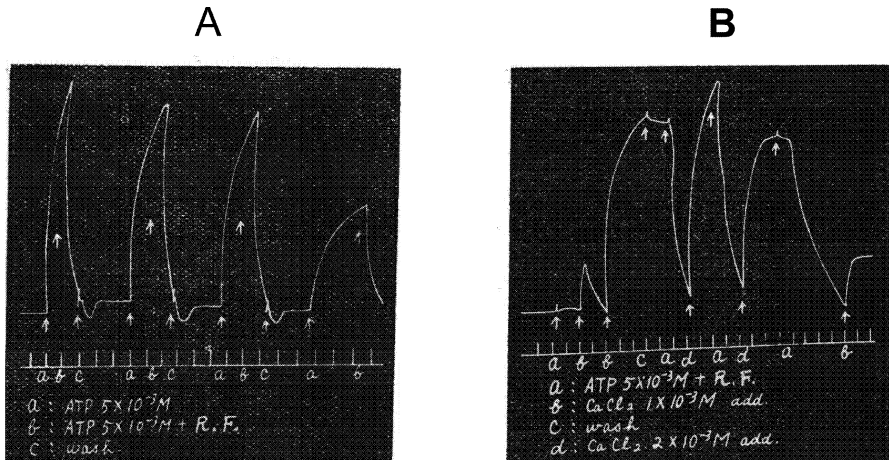


Fig. 1. A. Contractions and relaxations of glycerinated psoas muscle of the guinea pig by the application of ATP and of ATP plus relaxing factor (R.F.) respectively.

B. Contractions and relaxations of glycerinated psoas muscle of the guinea pig by the application of calcium ion and of ATP plus relaxing factor, respectively. Time: 1 minute per division¹²⁾.

思った先生に生理学教室にいた医学部同級の高木貞敬先生が、収縮したグリセリン筋は高濃度のATPによって弛緩するというBozler (1951)の論文¹¹⁾を教えてくれた。変性ではないと分かったが、筋細胞の中でATP濃度が大きく変わる筈がない。たとえばADPのようなATP中の不純物が弛緩を妨げているのではないかと考えた先生は、兎の筋肉からのATP抽出精製の努力を続けた。ATPの純度を上げた方が確かに弛緩は良いが、生理的機構を説明するには程遠い。3ヶ月ほど実験を続けて諦めかけた頃に先生がふと気付いたことは、新鮮なグリセリン筋はよく弛緩するのに、長くグリセリン中に置いたものは全く弛緩しないことであった。生きた筋肉の中には弛緩を引き起こす何かがあるに違いないと考えた先生は、カエル筋のホモジェネートを遠心して、その上清をATPと一緒に収縮したグリセリンにかけると実に見事に弛緩した。そしてCaを加えると収縮に反転する。この「弛緩因子」の発見を先生は、名取禮二先生の主宰する「筋生理の集い」で発表した。昭和27 (1952)年のことである。

この仕事は、藤田完吉氏の単独名の学位論文として、日本薬理学雑誌¹²⁾に発表されている。Fig. 1に藤田論文の代表的な結果を示す。グリセリン筋がATPで収縮し、ATP同濃度下に弛緩因子RFを加えると弛緩することが繰り返し見られる

(Fig. 1A)。また、弛緩した筋はCaの添加によって収縮に反転し、RFによって再び弛緩する (Fig. 1B)。

IV. 弛緩因子の本体

年が明けて熊谷先生が良く似た仕事があるとBendallの論文¹³⁾を教えてくれた。その論文をたどると、すでに1951年にMarshが「弛緩因子」を発見してNature誌に報告¹⁴⁾していることが分かった。これには若かった先生はもちろん落胆したが、一方で、「自分の仕事が少しは遅れたものの世界と並んでいたということは、戦後の打ちひしがれた心理状態にとっては一つの光明であり、もはやプライオリティはないにしても、この弛緩のメカニズムはやる価値のあるテーマと思われた」ということである。なお、先生は後年「もし自分が勉強家で、Marshの仕事を知っていたら、意地でもその追試はしなかったろう¹⁵⁾」と述べておられる。先生の研究というものに対する考え、強烈なオリジナリティーへの想いが伝わってくる言葉である。

いずれにしても、こうして先生は弛緩因子本体の追究を始めた。当時は、高濃度のATPが弛緩を起こす事実から、myokinaseやcreatine phosphokinaseなどのATP再生酵素系が弛緩因子そのものであるという見解¹⁶⁾⁻¹⁸⁾が一般的であっ

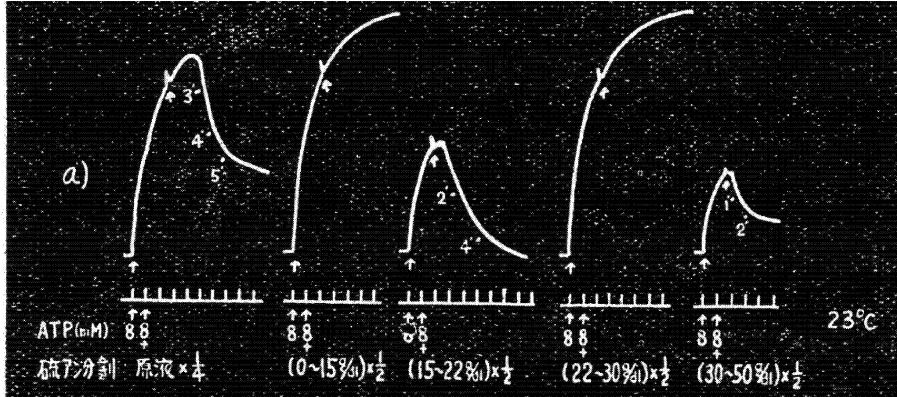


Fig. 2. Relaxing effect of original relaxing factor (leftmost) and its various fractions fractionated with ammonium sulfate. Glycerinated psoas muscle of the guinea pig. Time: 1 minute per division¹⁹⁾.

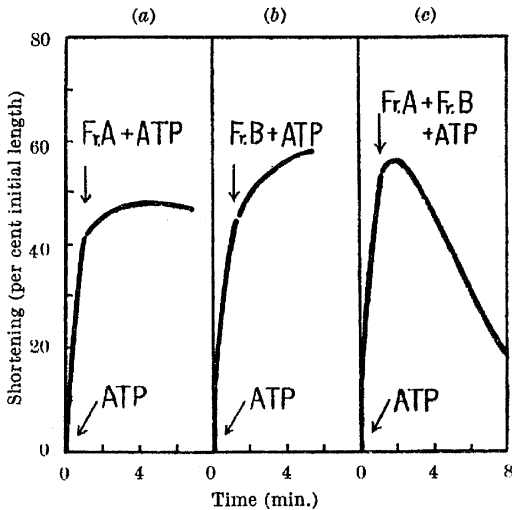


Fig. 3. Effect of fractions A and B on a muscle fiber shortened in ATP. For further explanation, see the text²¹⁾.

た。しかし、先生の目指す方向は違っていた。弛緩因子原液を硫酸アンモニウムで分画して、その各々について作用を検討し、弛緩作用が 10-20 g/dl 分画 (Fr.A) と 30-40 g/dl 分画 (Fr.B) に存在することが見出された。Fig. 2 は江橋、武田、熊谷論文¹⁹⁾ に示されている典型的な結果である。原液と 15-22 g/dl 分画及び 30-50 g/dl 分画に弛緩作用が見られる。両分画は合わせると相乗的な弛緩作用を示した。さらにそれぞれの分画の性質を追究した結果、Fr.A は 20,000 g の遠沈で沈殿するミクロソーム分画であり、Kielley & Myerhof

(1948) が報告した ATPase²⁰⁾ に他ならないこと、Fr.B は溶性の ATP 再生酵素系であること、両者が合わると強い弛緩作用を示すが、Fr.A の存在が弛緩に本質的であることが明らかにされた²¹⁾⁻²³⁾。Fig. 3 はそれを示した Nature 論文²¹⁾ の見事なデータである。この弛緩因子本体の解明はその後欧米の科学者に追認され²⁴⁾、先生は世界に注目されることになった。

V. 弛緩因子による弛緩作用のメカニズム

1. キレート剤の Ca 結合能と弛緩能の平行性
ミクロソーム分画の弛緩因子の作用本態については、そのような大きな顆粒が直接収縮蛋白と相互作用するとは考え難いので、多くの研究者は、顆粒から溶性の小分子 (溶性弛緩因子) が出てそれがアクチンと作用するのではないかと考えた²⁵⁾²⁶⁾。しかし、先生はその考えはとらず、Ca に注目した。

当時、Ca をマイクロピペットで筋細胞内に注入すると収縮が起きることが鎌田ら²⁷⁾や Heilbrunn ら²⁸⁾によって示されていたこともあり、生理学者は収縮と Ca の関係に注目していた。しかし、生化学的には、アクチンによる ATP による収縮には Mg は必要であるが Ca は全く不要であるとされていた (これは当時の実験液中には常に Ca が混入していたためであることが先生によって後に示されることになる)。従って、弛緩因子による弛緩が Ca によって収縮に反転するのは、

Caが弛緩因子を抑制するためであると解釈されていたのである。

先生は、EDTAが充分量のMg存在下に弛緩因子と同様のグリセリン筋弛緩作用を示すというBozler²⁹⁾とWatanabe³⁰⁾の報告に注目した。Mgは充分量存在するので、収縮に必要なMgがキレートされるためではない。Caをキレートすることと弛緩作用とが関係があるのではないかと考えた先生は、数種のEDTA誘導体を入手して、Caキレート能と弛緩作用との関係を調べることにした。しかし予想に反して、Caキレート能と弛緩作用との間には全く相関が見られず、「EDTA弛緩が二価イオンとのキレートに基づくという推論は根本的に再検討されなければならない」という報告³¹⁾³²⁾になった。筆者が薬理学教室に入った最初の学会予演会で、そのネガティブな結果を演者の江橋文子先生が発表されたのを聞いて、相関しないという実験事実だけでCaの関与を否定してしまっても良いのだろうかという疑問に思っていたのを覚えている。しかし、あの江橋先生の結論であり、代わるべき説明を持ち合わせていたわけでもないのに発言しないで終わったが、せめて質問でもしておけば後で少しは威張れたのに、と後に思ったことであった。

しかし、先生はCaの関与にネガティブになるもう一つの理由を持っていた。それは、Caが問題であれば、弛緩因子はEDTAと同様にCaを強く結合するはずである。そこで弛緩因子のCa結合を測定してみたが結果はネガティブだったのである³³⁾。

1958年暮に江橋先生はリップマン研に留学した。ネガティブな結果に落胆した先生は、「弛緩因子の研究は完全に八方塞がりとなり、筋研究から逃れたい一心でロックフェラー研究所行きを志願した。modern biochemistryを勉強したいとの申し出へのリップマン先生の返事が『今の弛緩因子の仕事が続けろ』ということで、とんだことになったと、暗澹たる気持ちでロックフェラーの門をくぐった」とは先生後年の述懐である³⁴⁾³⁵⁾。

しかし、リップマン先生の指示は的を射ていた。ロックフェラーで真夜中に、江橋先生は重大なミスをしていたことに気づいた。グリセリン筋の実験は高濃度のMgの中で行っていたのに、Caキ

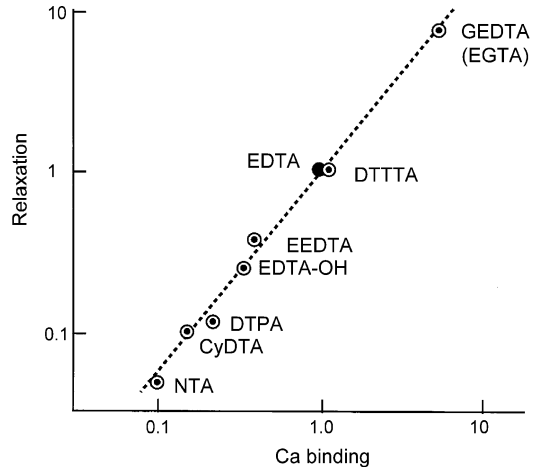


Fig. 4. Relationship between Ca-binding and relaxing activities of chelating compounds. Activity of each compound is expressed as its value relative to that of EDTA. Modified from 36).

レート能の計算ではMgの干渉を考慮に入れていなかったのである。図書館に駆け込んでキレート定数を確かめ、Mgの存在を考慮に入れて改めて計算し直すと、見事な相関が見られるではないか(Fig. 4)³⁶⁾。実はそれまで先生は、EGTAのMgに対する結合定数の値を間違えて思い込んでいたという。もし正しい値(他のキレート剤に比べてMg結合能が異常に低い)が最初から頭に入っていれば、EGTAの極めて強い弛緩能と併せて、Mgの干渉を考慮に入れなかったミスに、もっと早い段階で気付いていた筈だ、と、この時先生は大いに悔やまれたとのことである³⁴⁾。

2. 弛緩因子のCa取り込み能

Fig. 4の見事な相関の結果を得て先生は、弛緩因子の作用機構はCaを取り込むことにある、と確信を持った。以前のネガティブだった弛緩因子のCa取り込み能の実験の時には重大なことを忘れていた。弛緩に関する実験は、すべてATPの存在下で行われることを考えると、弛緩因子とCaの結合というアクトミオシンをぬきにした実験の場合にも、ATPが直接弛緩因子に影響を与えている可能性がある。従って、弛緩因子のCa結合の実験はATPを加えた条件でもやってみなければならぬ筈である、と先生は考えた³³⁾。このことは正にその通りであった。Fig. 5に示すようにATP

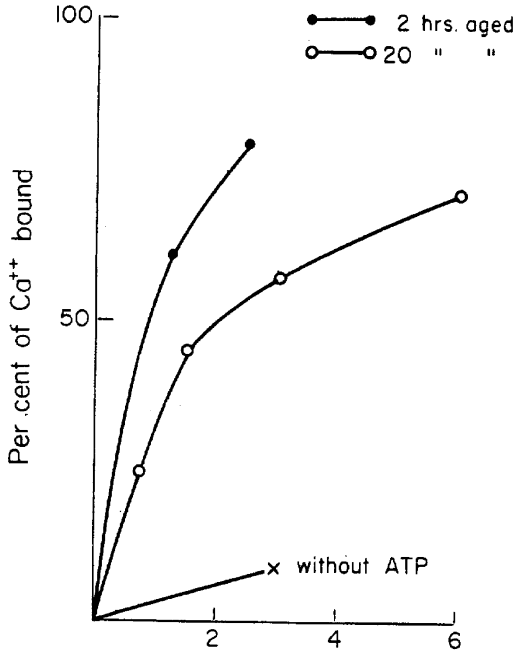


Fig. 5. ATP-dependent calcium ion binding with various concentrations of normal and aged membrane fraction³⁷⁾.

存在下では弛緩因子はCaを強く結合することが明らかにされた³⁷⁾。

この実験を先生がリップマン先生に報告したとき、リップマン先生の反応は、“You may be right, but I don't like calcium.”であったという³⁵⁾。リップマン先生ほどの大学者をも含めて当時の生化学者は、生命体の中で重要な機能を果たすのはすべて複雑な有機物質だという信念があり、単純なCaごときが筋の収縮弛緩に関わるなどは考え難かったようである。リップマン先生が納得するまでに時間がかかり、論文発表が2年ほど遅れて、後からの実験で発表が先になった Hasselbach & Makinose の報告³⁸⁾との間でpriorityに混乱が生じることになった。

3. ミオシンB(天然アクトミオシン)の超沈澱のCa依存性

EDTAと弛緩因子はCaを結合することによって弛緩を引き起こすのだとすれば、アクトミオシンのATPによる収縮反応は、当時の一般的な理解に反して、Caを必要とする筈である。Caを徹底的に除いて実験すればCaの効果を示すことができる筈だ、と先生は考えて、ガラス器具、蒸

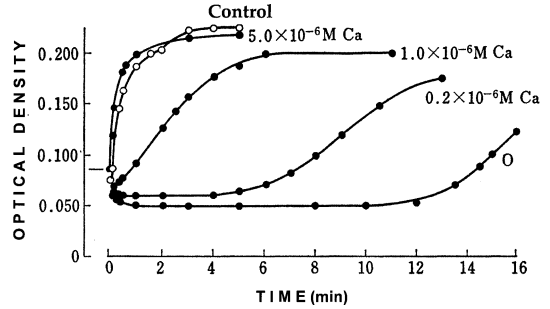


Fig. 6. Superprecipitation of EDTA-washed actomyosin and its response to calcium³⁹⁾.

留水、試薬などあらゆるものに注意を払って実験を行った。とくにアクトミオシンの調製に際して、残存する微量のCaを充分洗い去るには大変な苦勞が要った。その結果得られた Fig. 6 には、濁度を指標としたアクトミオシンのATPによる超沈澱はCaの不在下では全く起きず(アクトミオシンの収縮反応はATPが充分低濃度になるとCaがなくても起きるので、ミオシンのATPase作用によってATPがゆっくり分解される結果、Ca不在のところでも十数分後には超沈澱が起き始める。) μM レベルのCaによって強く促進されることが見事に示されている³⁹⁾。

最近はこのレベルのCa濃度の実験は混入Caがあっても低Ca濃度が得られるようにCa緩衝液を用いて行われるのが通常であるが、Fig. 6 のように僅か $0.2 \mu\text{M}$ のCaによる促進作用を明示する実験を、Ca緩衝液を使わずに行うには、Caの混入をほぼ完全に避けなければならず、それにはどれだけの注意と努力が必要であったか、苦勞がしのばれる。「あんな大変な実験は二度とやりたくない」とは先生自身から聞いた言葉である。

4. 弛緩因子と筋小胞体との同定

当時は電子顕微鏡の研究が盛んになり始めて、細胞の微細構造が明らかにされつつあった。骨格筋細胞の微細構造についても、筋原線維を筋小胞体に取り巻いているという19世紀の光学顕微鏡の知見が電子顕微鏡で確認されていた⁴⁰⁾。とくにT管を両側から小胞体が挟みこむ三つ組み構造は、Huxley & Taylorの有名な局所刺激の生理実験⁴¹⁾との関連で、興奮が収縮を引き起こす機構と関係があるのではないかと考えられていた。

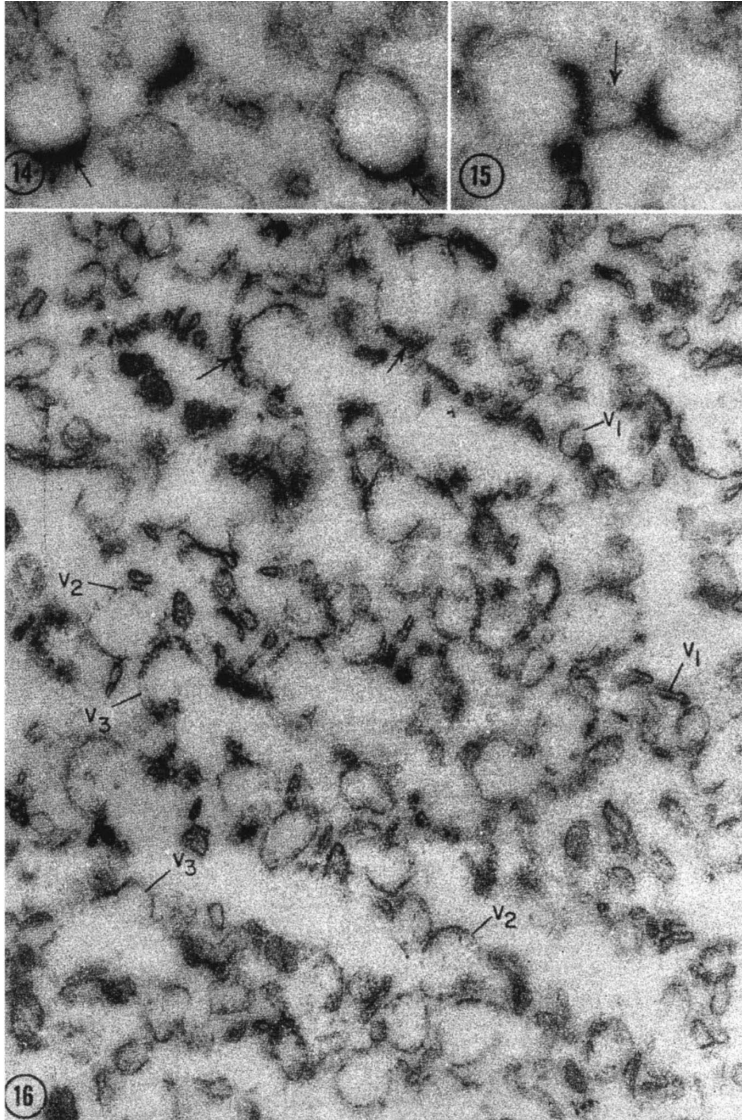


Fig. 7. Electron micrograph of the bottom layer of a particulate-fraction pellet.

14. The arrows indicate the local membrane thickening that characterizes the terminal cisternae. 15. The arrow indicates an intermediate vesicle between two terminal cisternae, as in the triads of intact muscle fibers. 16. A preparation aged for 6 days. V₁: apparently intact vesicles. V₂, V₃: limited or gross discontinuity of their limiting membranes. $\times 60,000^{37}$.

先生は、弛緩因子の Ca 取り込み能を確認した時点で、ロックフェラーにいた電子顕微鏡学者の GE Palade にその電子顕微鏡像をとって貰った。Fig. 7³⁷⁾はその電顕像であるが、膜小胞のフラグメントに他ならず、中には三つ組み構造も見ることができ(同図の左上⑮)、弛緩因子が筋小胞体のフラグメントであることが確認された。

VI. 興奮収縮関連機構の大筋の解明

弛緩は収縮の裏返しである。前節に述べた、弛緩因子によるグリセリン筋弛緩のメカニズムの裏返しだが、そのまま興奮収縮関連の道筋を示すと考えた先生は、1961年世界に先駆けて、興奮収縮関連過程について以下のような具体像を描いた⁴²⁾。

骨格筋細胞内の Ca は、弛緩時には筋小胞体(弛

緩因子) 内に取り込まれて、そこに高濃度に存在する。筋細胞に興奮が起きるとその情報が三つ組構造を通じて筋小胞体に伝えられ、筋小胞体からCaが放出されて、そのCaが収縮蛋白系の収縮反応を惹き起こす。興奮がとまると、Caは再び筋小胞体に取り込まれ、収縮蛋白系からCaが除かれて、筋は弛緩する。

この興奮収縮連関像は、もちろんそのまま現在の我々の認識である。

VII. Ca説に対する批判

以上述べた多くの明確な実験事実にもかかわらず、先生の考えが人々の、とくに生化学者達の、信じるころとなるまでには、なお時間が必要であった。

1962年、米国マサチューセッツ州ボストン郊外のDedhamで大規模な「筋収縮の生化学」のカンファレンスが開かれた。この会で弛緩因子のセッションを支配したのは、依然として溶性弛緩因子説であった。Ca説を支持したのは先生と、Caの重要性を独立に発見したA. Weberだけであった。セッションの終わりに座長であるA. Weberの父君H.H. Weberは、「このセッションの討議の結果、カルシウム説は明らかに否定された。」と厳かに宣言した。その場にいたジーン・ハンソン(H.E. Huxleyと共に収縮の滑り説を唱えた)の言によれば「座長がこの宣言を下すと、アンネマリー(A. Weber)は激高して絶叫し、江橋は日本語でわめいた。皆は腹をかかえて笑った」ということである³⁴⁾(このカンファレンスの記録の書物⁴³⁾には、上記のセッションの締めくくりは、座長が溶性弛緩因子論者を指名してその結論を改めて述べさせた、という比較的穏和な記述になっている。).

先にも述べたが、当時の生化学者には、収縮弛緩の調節といった重要な機能を果たすのは高級な有機物質である筈で、Caのような単純な無機イオンであるわけがないという思い込みが支配的であった。少し前にSutherlandの発見により華々しく登場したセカンドメッセンジャーcAMPの影響も大きく、若い研究者が第二のcAMPを目指して勢い込んだのも無理はない、とは先生後年の分析である⁴⁴⁾。

Ca説が素直に受け入れられなかった一つの重要な原因は、アクトミオシンの標品によっては、Caが全く作用しない場合があることであった。実際A. Weberはアクチンとミオシンを別々に調製し、それを合わせてアクトミオシンとして用いる実験では、アクチンの標品によってはCaの有無と全く無関係に収縮反応が起きる場合があることを認めていた⁴⁵⁾。Caが生理的に真に重要な働きをしているなら、常にその効果を見ることができる筈である、というのがCa説に対する有力な批判であった。

VIII. Caの収縮作用の分子機序の解明

1. 収縮に関与する第三の蛋白因子の発見

上記の批判を受けて先生は、Caが作用しないアクチン標品は変性アクチンではないかと考え⁴⁶⁾、変性しないアクチンを調製してそれを証明しようと決心をして、その旨を義理堅くA. Weberと日本のアクチン研究グループの総帥大沢文夫教授に宣言した。そして、カンファレンスから帰国後、直ちにその研究に打ち込んだ。

やがて予想とは少し違ったが、Ca感受性は、アクチンとミオシンの他に第三の蛋白因子が存在して初めて生じるものであることが分かった。Caに反応しないアクチンはむしろ問題がなく、反応するアクチン標品は第三の蛋白因子を含んでいたのである。この第三の蛋白因子は1946年にBaileyが筋肉中から抽出したトロポミオシン⁴⁷⁾と物理化学的な性質が非常に良く似ていたが、Baileyの方法でとったトロポミオシンにはCa感受性を賦与する作用はなかった(そのためにこの蛋白因子は、トロポミオシン様蛋白、あるいは天然トロポミオシンと呼ばれた)。また、トリプシン処理によって容易にCa感受性賦与機能が消失することも分かった。すなわち、第三の蛋白因子はトリプシンで容易に分解される性質を持っている。Fig. 8に以上の結果が、まとめて明確に示されている⁴⁸⁾⁴⁹⁾。通常のアクトミオシン標品(ミオシンB)は第三の蛋白因子を含んでいてCa感受性があるが(この点は図には直接示されていない)、それをトリプシンで処理すると、第三の蛋白因子の機能が失われて、Fig. 8Aに見るようにCaが存在しても(control)そのCaをキレート剤GEDTAでキ

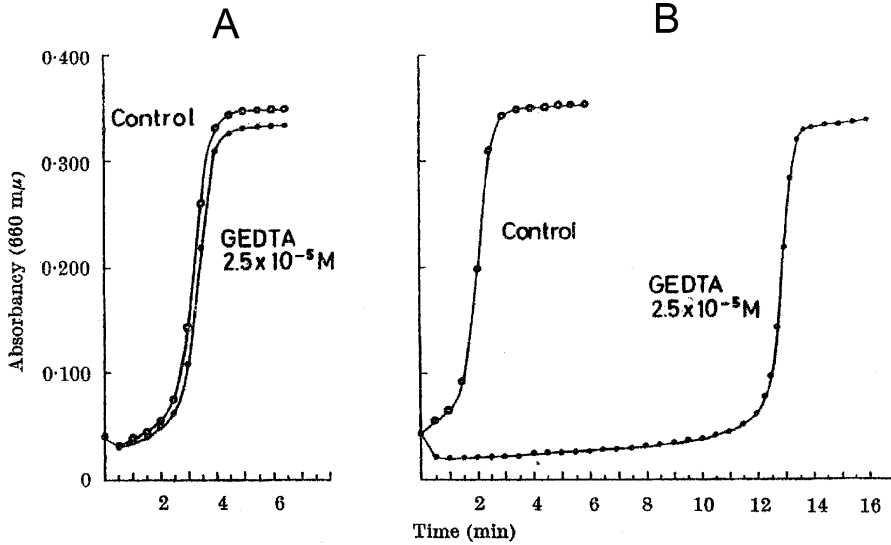


Fig. 8. Effect of tropomyosin-like protein on the response of trypsin-treated "natural actomyosin" to a chelating agent. A. The effect of glycoetherdiaminetetraacetic acid (GEDTA) on the trypsin-treated "natural actomyosin." B. The effect of GEDTA on the trypsin-treated "natural actomyosin" plus purified tropomyosin-like protein⁽⁴⁸⁾.

レートしてしまっても収縮反応（超沈殿）は変わらない。しかし、そこに第三の蛋白因子（トロポミオシン様蛋白）を加えると、GEDTAでCaをキレートした時には収縮反応が起きなくなる（Fig. 8B）。

この結果の速報がNatureに掲載されようとしていた頃、ロンドン王立学士院の筋に関するシンポジウムが開催された。ロンドンのA.F. Huxleyの下に留学中であった筆者はそれに参加する機会を得たのであるが、先生からpreprintを送って貰っていたので、その席上の討論において、この新発見を紹介する榮譽を担うことができた⁵⁰。

2. トロポニンの発見

その後、天然トロポミオシンとBaileyのトロポミオシンとの違いを追究した先生は、天然トロポミオシンをBaileyのトロポミオシンと新しい蛋白（トロポニンと名付けられた）とに分離することに成功した。先の、Ca感受性のないアクチン標品は変性しているのではないか、という予想がある意味で間違っていた教訓から、今度は最初から「天然トロポミオシン」には、Baileyのトロポミオシンに何か別の蛋白因子が加わっているに違いないと先生は見当をつけていたという。

トロポニンは、最初はトロポミオシンの会合を

促進する因子として分離された⁵¹が、やがて精製技術の向上と共にCa感受性賦与という生理作用も確かに有していることが明らかになった⁵²⁾⁵³。トロポニン単独にはその作用は見られないが、トロポミオシンとトロポニンの両者を精製したアクチンとミオシンからなる系に加えるとCa感受性が生じる（Fig. 9）⁵⁴。すなわち、天然トロポミオシンは、その構成からも機能的にもトロポミオシンとトロポニンの複合体であることが明らかになった。

3. Ca受容蛋白としてのトロポニン

天然トロポミオシンが強くCaを結合することは初期の頃から分かっていたが、そのCa結合部位はトロポミオシンではなく、すべてトロポニン側に存在することが分かった⁵⁴。しかし、Ca結合があるからと言って、それが生理的Ca作用の作用点であるとは限らない。真のCa受容部位、すなわち収縮蛋白系のどこに結合したCaが収縮を引き起こすかを決めるのは、必ずしも容易ではない。先生は、ATPで惹起されたミオシン・アクチン相互作用のある特定の段階でCaがミオシンに結合して作用を表す、という可能性を真剣に考えていた⁵⁵。後に、「筋化学者にとってミオシン信仰は牢固として抜き難く、自分も最終的にはミオシンが

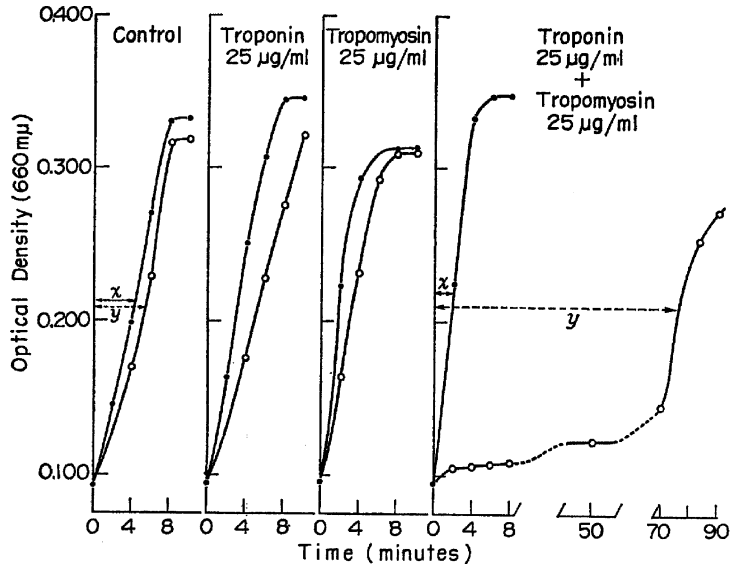


Fig. 9. Effect of troponin, tropomyosin, and their complex on the superprecipitation of native tropomyosin-free myosin B⁵⁴⁾.

Table 1. Comparison of relative sensitivities to Sr and Ca ion of contractile systems reconstituted from protein components of skeletal and cardiac muscle⁵⁴⁾.

Myosin B				Reciprocal ratio of equally effective concentration of Sr ⁺⁺ to Ca ⁺⁺	Type of response (skeletal type or cardiac type)
Actomyosin		Native Tropomyosin			
Myosin	Actin	Tropomyosin	Tropo- nin		
		S		1/20	(S)
		C		1/3	(C)
	C		S	1/20	S
	C		C	1/4	C
	S		S	1/23	S
	S		C	1/3	C
	C	S	S	1/19	S
	S	S	C	1/4	C
S	S	S	S	1/24	S
S	S	S	C	1/4	C
S	S	C	S	1/24	S
S	S	C	C	1/4	C

C: cardiac. S: skeletal

決定的な役割を果たすと信じていて、2年余りを無意味な実験に過ごしてしまったことを後悔している」と述懐しておられる⁵⁶⁾。

Caの作用は、定性的にはしばしばSrで置き換えることができるが、収縮惹起作用についてのCaとSrの定量的な比較から、この問題の解決が得

られた。骨格筋の速筋ではCaに比してSrの作用は弱く、同様の収縮作用をもたらすには約20倍の濃度を必要とするが、心筋ではSrはCaの3~4倍の濃度があれば同様の作用を示す。そこで、このCaとSrの差が骨格筋型になるか心筋型になるかをどの蛋白が決めているかを、ミオシン、ア

クチン、トロポミオシン、トロポニンのそれぞれを骨格筋と心筋とから各々調製して、それらを種々に組み合わせて調べてみた。結果は明瞭で、Table 1 に示すとおり、Ca/Sr 比は、トロポニンが骨格筋由来なら骨格筋型、心筋由来なら心筋型になり、その他の蛋白の起源には全く依存しない⁵⁴⁾⁵⁷⁾。この結果によって、トロポニンが収縮蛋白系のCa受容蛋白であることが見事に証明された。

4. トロポニン、トロポミオシンの局在

トロポニンとトロポミオシンがミオシン・アクチン系にCa感受性を賦与する際に、それがミオシン側に働くのかアクチン側に働くのか、あるいは両者から独立して働くのかは分子機構に関わる重要な問題である。

トロポミオシンはアクチンと結合することは古くから知られていた。トロポニンはトロポミオシンに結合するので、アクチン側に作用するのではないかと考えられる。実際、トロポニンは単独ではアクチンに結合も作用もしないが、少量のトロポミオシンが存在するとF-アクチンの粘度を著しく上昇させることが見出されている⁵²⁾。

また、筋原線維をトリプシンで処理して内在性の天然トロポミオシンを除いた後、蛍光ラベルした天然トロポミオシンを加えると、アクチンが主体の細いフィラメントに局在する蛍光が見られる。また、トロポニンに対する抗体とトロポミオシンに対する抗体を蛍光ラベルして筋原線維を染めることによって、いずれの蛋白も細いフィラメント上に(アクチンに結合して)存在することが示された⁵⁸⁾。さらに、トロポニンは細いフィラメント上に400 Åの間隔で周期的に存在することが分かった⁵⁹⁾。

5. Ca説の確立

以上の事実から、Caの収縮惹起作用の分子機序は、次のように結論することができた。

Ca濃度が充分低い時には、トロポニンはアクチンに抑制をかけ、それがミオシンと反応するのを妨げている。トロポニンはアクチンには直接結合しないし、400 Åの間隔を置いた存在ではすべてのアクチン分子に影響を与えることはできないので、その抑制作用はトロポミオシンを通じて行われると考えられる。Ca濃度が上がってCaがトロ

ポニンに結合すると、トロポニン分子に形態変化が起こり、それがトロポミオシンを通じてアクチンに伝えられ、抑制がはずれて、アクチンとミオシンの相互作用、収縮が始まる。このように、Caは収縮反応自体に必須なのではなく、生理的条件下において抑制機構の解除によって収縮を惹き起こすのである。Ca作用の解明が弛緩因子の研究を通じて明らかにされたのも必然であったと言えるかも知れない。

弛緩因子に始まってトロポニンを中心とする収縮弛緩制御の分子機序解明までの先生のこの一連の成果は、1968年に発表された総説⁵⁵⁾にまとめて詳しく提示され、広く受け入れられた。その説得力によって数年前にあれほど強かったCa説批判は雲散霧消した。この総説にはまた、先生のアイディアで明らかにされた、Caが収縮だけでなく、phosphorylaseの促進というエネルギー補給過程にも関係する事実⁶⁰⁾にも言及があり、Caのより一般的な機能が予言されている。さらに、1969年の総説⁶¹⁾では、アクチン、トロポミオシン、トロポニンから成る細いフィラメントのモデル(それは基本的には現在でも正しいと考えられている)が提示され、Caによる筋収縮弛緩制御の分子機構のイメージがより明確になった。筋興奮収縮連関のCa説はこの二つの総説をもって確立したといえることができる。

IX. おわりに

以上のとおり、江橋先生の筋興奮収縮連関のCa説確立の道程は波瀾万丈であった。その各々の局面における先生の思索と行動についての記述は、可能な限り先生ご自身の書かれた言葉を引用して正確を期した。

今ここに先生の偉業をたどり直し、研究者にとっての教訓を改めて多々見出した。新しいことを始める際の基礎からきっちり学ぶ姿勢、他人がやらないことをやらなければ意味がないというオリジナリティーへの意欲、天才的と思えるアイディアも実は鋭い洞察力の下で実験に実験を重ねる苦闘の成果であること、卓越した判断力と眼識を持った先生にしてのミスも、強い探求への意志と努力によってカバーされること、等々。

若い研究者にとって、この一文が更なる飛躍へ

の刺激となり糧となることを願って、筆を擱く。

文 献

- 1) 江橋節郎. 薬理学研究の回顧と展望. 日薬理誌 1989; 93: 1-5.
- 2) 江橋節郎. C-R 結合増幅器による記録曲線の補正方法について. 科学 1949; 19: 266-7.
- 3) Szent-Györgyi A. Chemistry of Muscular Contraction. New York: Academic Press; 1947.
- 4) Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J Physiol 1949; 108: 37-77.
- 5) Burn JH. Relation of motor and inhibitor effects of local hormones. Physiol Rev 1950; 30: 177-93.
- 6) 江橋節郎. 生化学教室へ, 感謝を籠めて. 東京大学医学部生化学教室創設百周年記念誌. 東京: 東京生化学同人; 1997. p. 129-31.
- 7) Kumagai H, Ebashi S. Highly purified choline acetylase. Nature 1954; 173: 871-4.
- 8) Kumagai H, Ebashi S, Takeda F. Studies on choline acetylase (1). Jpn J Pharmacol 1954; 4: 24-31.
- 9) Ebashi S. Studies on choline acetylase (2). Jpn J Pharmacol 1954; 4: 32-40.
- 10) Szent-Györgyi A. Chemistry of Muscular Contraction. 2nd Ed. New York: Academic Press; 1951.
- 11) Bozler E. Mechanism of relaxation in extracted muscle fibers. Am J Physiol 1951; 167: 276-83.
- 12) 藤田完吉. 筋収縮に對する Adenosine 體の作用. 第2編 グリセリン處理筋と弛緩因子. 日薬理誌 1954; 50: 183-92.
- 13) Bendall JR. Effect of the 'Marsh Factor' on the shortening of muscle fibre models in the presence of adenosine triphosphate. Nature 1952; 170: 1058-60.
- 14) Marsh BB. A factor modifying muscle fibre syneresis. Nature 1951; 167: 1065-6.
- 15) 江橋節郎. カルシウムイオンをめぐる40年. からの科学 1984; 120: 28-32.
- 16) Bendall JR. The relaxing effect of myokinase on muscle fibres: its identity with the 'Marsh' Factor. Proc Roy Soc (Lond) 1954; B 142: 409-26.
- 17) Goodall MC, Szent-Györgyi AG. Relaxing factor in muscle. Nature 1953; 172: 84-5.
- 18) Lorand L. 'Adenosine-triphosphate-creatine transphosphorylase' as relaxing factor of muscle. Nature 1953; 172: 1181-3.
- 19) 江橋節郎, 武田文字, 熊谷 洋. 骨格筋弛緩因子の二成分への分離. 日薬理誌 1954; 51: 107-10.
- 20) Kielley WW, Meyerhof O. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase from muscle. J Biol Chem 1948; 174: 387-8.
- 21) Kumagai H, Ebashi S, Takeda F. Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatine phosphokinase. Nature 1955; 176: 166.
- 22) 江橋節郎, 武田文字, 大塚正徳, 熊谷 洋. 筋弛緩因子の酵素的性格. 酵素化学シンポジウム 1956; 11: 11-21.
- 23) Ebashi S. A granule-bound relaxation factor in skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 1958; 76: 410-23.
- 24) Portzehl H. Die Bindung des Erschlaffungsfaktors von Marsh an die Muskelgrana. Biochim Biophys Acta 1957; 26: 373-7.
- 25) Parker CJ, Gergeley J. Soluble relaxing factor from muscle. J Biol Chem 1960; 235: 3449-53.
- 26) Fuchs F, Briggs FN. Direct isolation of a soluble relaxing system from muscle. Biochem Biophys Acta 1961; 51: 423-5.
- 27) Kamada T, Kinoshita H. Disturbances initiated from naked surface of muscle protoplasm. Jpn J Zool 1943; 10: 469-93.
- 28) Heilbrunn LV, Wiercinski FJ. The action of various cations on muscle protoplasm. J Cell Comp Physiol 1947; 29: 15-37.
- 29) Bozler E. Relaxation in extracted muscle fibers. J Gen Physiol 1954; 38: 149-59.
- 30) Watanabe S. Relaxing effect of EDTA on glycerol-treated muscle fibers. Arch Biochem Biophys 1955; 54: 559-62.
- 31) 江橋文子, 江橋節郎. グリセリン筋弛緩物質について. 日薬理誌 1959; 55: 31 §.
- 32) Ebashi S, Ebashi F, Fujie Y. The effect of EDTA and its analogues on glycerinated muscle fibers and myosin adenosinetriphosphatase. J Biochem 1960; 47: 54-9.
- 33) 江橋節郎. 弛緩因子と筋収縮弛緩サイクル. 東京医学雑誌 1961; 69: 65-78.
- 34) 江橋節郎. カルシウム物語 (IV) EGTA の奇蹟. 最新医学 1992; 47: 2352-4.
- 35) 江橋節郎. カルシウム物語 (V) リップマン先生と私. 最新医学 1993; 48: 138-40.

- 36) Ebashi S. Calcium binding and relaxation in the actomyosin system. *J Biochem* 1960; 48: 150-1.
- 37) 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.
- 38) Hasselbach W, Makinose M. Die Calciumpumpe der 'Erschlaffungsgrana' des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-spaltung. *Biochem Z* 1961; 339: 94-111.
- 39) Ebsahi S. Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J Biochem* 1961; 50: 236-44.
- 40) Porter KR, Palade GE. Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3: 269-300.
- 41) Huxley AF, Taylor RE. Function of Krause's membrane. *Nature* 1955; 176: 1068.
- 42) Ebashi S. The role of "relaxing factor" in contraction relaxation cycle of muscle. *Progr Theoret Phys (Kyoto)* 1961; Suppl 17: 35-40.
- 43) Gergeley J, editor. *Biochemistry of Muscle Contraction*. Boston: Little Brown & Co.; 1964.
- 44) 江橋節郎. カルシウム物語 (III) 弛緩因子からカルシウムへ. *最新医学* 1992; 47: 2224-6.
- 45) Weber A, Winicur S. The role of calcium in the superprecipitation of actomyosin. *J Biol Chem* 1961; 236: 3198-202.
- 46) 江橋節郎. カルシウム物語 (VI) トロポミオシンを巡って. *最新医学* 1993; 48: 294-6.
- 47) Bailey K. Tropomyosin: a new asymmetric protein component of muscle. *Nature* 1946; 157: 368-9.
- 48) Ebashi S. Third component participating in the superprecipitation of 'natural actomyosin'. *Nature* 1963; 200: 1010.
- 49) Ebashi S, Ebashi F. A new protein component participating in the superprecipitation of myosin B. *J Biochem* 1964; 55: 604-13.
- 50) Endo M. Comment by M Endo. *Proc Roy Soc (Lond)* 1964; B 160: 500.
- 51) Ebashi S, Kodama A. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin. *J Biochem* 1965; 59: 425-6.
- 52) Ebashi S, Kodama A. Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J Biochem* 1966; 59: 425-6.
- 53) Ebashi S, Kodama A. Native tropomyosin-like action of troponin on trypsin treated myosin B. *J Biochem* 1966; 60: 733-4.
- 54) Ebashi S, Kodama A, Ebashi F. Troponin. I Preparation and physiological function. *J Biochem* 1968; 64: 465-77.
- 55) Ebashi S, Endo M. Calcium and muscle contraction. *Progr Biophys Molec Biol* 1968; 18: 123-183.
- 56) 江橋節郎. カルシウム結合蛋白覚え書き. *細胞工学* 1986; 5: 347-50.
- 57) Ebashi S, Ebashi F, Kodama A. Troponin as the Ca^{++} -receptive protein in the contractile system. *J Biochem* 1967; 62: 137-8.
- 58) Endo M, Nonomura Y, Masaki T, Ohtsuki I, Ebashi S. Localization of native tropomyosin in relation of striation patterns. *J Biochem* 1966; 60: 605-8.
- 59) Ohtsuki I, Masaki T, Nonomura Y, Ebashi S. Periodic distribution of troponin along the thin filament. *J Biochem* 1967; 61: 817-9.
- 60) Ozawa E, Ebashi S. Requirement of Ca ion for the stimulating effect of cyclic 3',5'-AMP on muscle phosphorylase b kinase. *J Biochem* 1967; 62: 285-6.
- 61) Ebashi S, Endo M, Ohtsuki I. Control of muscle contraction. *Quart Rev Biophys* 1969; 2: 351-84.