

## 江橋先生とトロポニン研究

大 槻 磐 男

九州大学名誉教授  
東京慈恵会医科大学客員教授

(受付 平成 19 年 7 月 17 日)

### PROFESSOR EBASHI AND TROPONIN RESEARCH

Iwao OHTSUKI

*Kyushu University Professor Emeritus  
The Jikei University School of Medicine (Visiting Professor)*

This article consists of a lecture given in commemoration of the late Professor Setsuro Ebashi, at the muscle physiology meeting held at The Jikei University, Tokyo, December 9, 2006. Understanding of the molecular biology of calcium regulation of striated muscle contraction started with the discovery of troponin by Professor Ebashi in 1965. Troponin was soon found to be the  $\text{Ca}^{2+}$ -receptive protein of physiological  $\text{Ca}^{2+}$ -activated contraction and to be distributed regularly along the thin filament. It was then established that, under physiological conditions, the contractile interaction between two contractile proteins, myosin and actin, is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  through two  $\text{Ca}^{2+}$ -regulatory proteins, troponin and tropomyosin. Through biochemical studies, troponin was shown to be composed of three different components: troponins C, I, and T. Properties of troponin components have been comprehensively studied, and this protein is now known as a representative regulatory protein in living organisms. This article presents an overview of the characteristic structure and function of troponin. Recent progress in the functional studies of genetic disorders caused by cardiac troponin mutations is also discussed.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2007; 122: 221-34)

Key words: troponin, muscle contraction, calcium ion, troponin C, I and T, hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy

江橋節郎先生と筋収縮のカルシウム説について、これまで遠藤、小川両先生が興奮収縮連関を中心に話をされました。3番目の演者である私は“江橋先生とトロポニン研究”という題でお話します。“江橋先生と”という表現は、私の場合には英語で言えば“with”と“and”の両方の意味をこめておりまして、江橋先生と共にトロポニン研究を行った初期の思い出と、それから現在に至る発展の経過のことでありますが、時間が限られて

おりますので、私自身が現在までに携わった仕事を中心に話を進めていくことにしたいと思います。

筋肉繊維細胞膜興奮に始まる興奮収縮連関の過程において最終的にCaが放出されます(Fig.1)。このCaが筋原繊維に作用して収縮反応を引き起こす分子機構を江橋先生が追究されてトロポニンを発見されましたが、その経過を簡単にたどってみますと、江橋先生がアクトミオシン収縮の試験管内モデルである超沈殿に対してCaが効くことを最初に見出だしたのはアメリカのロックフェラー大学留学中のことでありました。当時の日本

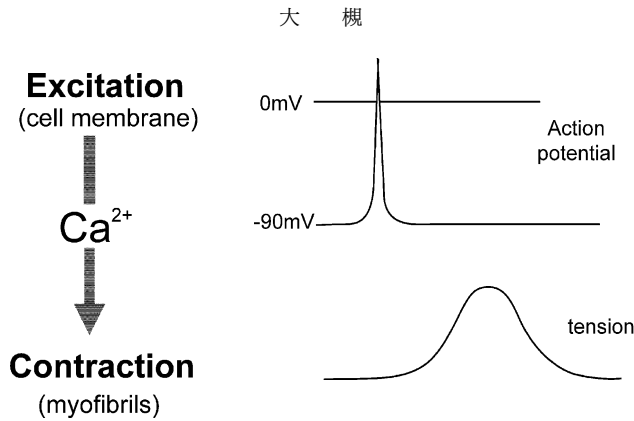


Fig. 1. Physiological muscle contraction

ではこういう込み入った難しい実験は出来なかったと聞いています。やはり良い研究環境に恵まれることが重要な要件であることが実感されます。このとき  $10^{-6}$  M 以下の非常に低濃度の Ca がアクチン収縮系を活性化するというを観察するのに成功されたのが出発点になっています。帰国後にこの原因を探っていく中で、アクチンとミオシンの収縮反応に Ca 感受性が発現するためには、これ以外にタンパク性因子の存在が必要なことを先生は突き止めたのです。1963年に報告されたこのタンパク因子は非常にねばねばした粘調なタンパク質で、既に英国のベイリー教授 (K. Bailey) が発見してから 20 年近くもその役割がわからないままだったトロポミオシン (tropomyosin) という繊維状タンパク質に生化学的な性質が似ていたので、おそらくトロポミオシンの活性型に違いはないと考えられて活性トロポミオシン (native tropomyosin) と名付けられました。

1963年に私が大学院生として江橋研究室に入った当時は、江橋先生は文子夫人と共に連日のようにこの活性トロポミオシンの生化学実験をされていました。日中は大学の業務で忙しく夜遅くに仕事を始めて徹夜になるのが日常的であったことが思い出されます。最初、活性トロポミオシンから、Bailey 型のトロポミオシンを予想通りに分離することが出来ましたが、Ca 感受性を与えるかどうか調べると、それが全く作用がありませんでした。トロポミオシンは、pH 4.6 の酸性条件下で等電沈殿してきますので、この性質を利用して精製するのですが、まもなく沈殿せずに残った上清

の方に未知の蛋白質があることが分かってきたのです。さらさらしたトロポミオシン溶液にこの上清蛋白を加えると活性トロポミオシンの特徴的な粘調な性質が復活して、Ca 感受作用も復活してきました。この上清蛋白がトロポニン (troponin) と命名されたのです。この所見が報告されたのが 1965 年のことで、トロポニン発見の記念すべき年でありました。また生物界における初めての Ca 受容タンパク質の報告でもあったわけです。この時点で生きた筋肉の中での収縮弛緩の過程は、収縮タンパク質のミオシンとアクチンだけではなく、Ca 調節タンパク質のトロポニンとトロポミオシンが加わった総計 4 つのタンパク質によって行われるという生理的な筋収縮の基本機構が確立されたこととなります。

ここでトロポニンの性質に関して研究の初期に明らかになった主要な所見を三つ挙げておきます。まずトロポニンの生化学的な性質を要約しますと、粘度が低くさらさらした水溶性タンパク質であります。トロポミオシンが粘度が高い繊維状蛋白質であるのに比べると対照的な性質です。またトロポニンは非常に強い Ca 結合性を示しますが、これは Mg にはあまり影響を受けない Ca に特異的な結合であるます。またトロポニンはトロポミオシンと強い相互作用を示しますがアクチンとは結合しないといった性質を示すことが分かりました。

第 2 番目には、トロポニンが Ca 受容蛋白であることを示した比較生化学的な実験が挙げられます。これには Ca と同様に筋収縮を活性化することがわかっているストロンチウムの有効濃度、つ

まり Sr 感受性が心筋と骨格筋の収縮系で違うという特徴を利用しています。つまり比較生化学的に骨格筋と心筋の Ca 調節タンパク質と収縮タンパク質、つまりトロポニン、トロポミオシン、アクチン、ミオシンの 4 種類を全部組み合わせたハイブリッドの Sr 感受性を調べると、トロポニンが骨格筋の場合には Sr 感受性は骨格筋型となり、心筋トロポニンのときには他の蛋白が何であれ心筋型の Sr 感受性を示すという事実が明らかになり、これから収縮系の Ca 受容蛋白がトロポニンであるという結論が下されたのであります。

第 3 にトロポニン分子の筋肉の中での局在が電子顕微鏡的に明らかになったことが挙げられます。トロポニンに対する抗体を使って筋肉の超薄切片での局在を電子顕微鏡的に見てみたのがこのスライドの写真でありまして、筋原繊維の中でアクチンフィラメント領域全長にわたって約 400 Å (正確には 382 Å) 周期の縞模様が形成されていることが分かります (Fig. 2)。これはアクチンフィラメントに沿ってトロポニンが 400 Å の周期で配列していることを意味しています。次の図は筋肉からミオシンを取り除いたアクチンフィラメントの束の電子顕微鏡像ですが、中央の Z 線の両側にアクチンの束が伸びています (Fig. 3)。この標品をトロポニンの抗体で染めてみますと、やはりトロポニン分子がそれぞれのフィラメントに 400 Å の周期でならんでいることをはっきりと見ることができます。この知見は細胞構造中で Ca 受容蛋白の分布を示した最初の例として当時いろいろところで話題にしていたものです。ト

ロポニン分子はしかしながら分子量からみて 400 Å の周期全体をカバーするほど大きくなく、トロポニンだけでこのような周期を作ることは考えられません。当時、実はもう一つの Ca 調節タンパク質であるトロポミオシンがちょうど 400 Å の長さの繊維状タンパク質であることが既に報告されていました。そしてトロポミオシンは端端結合によってつながり長いフィラメントを作ることも出来ます。つまりトロポニンを一定の位置に結合したトロポミオシン分子がアクチン二重ラセンフィラメント上に分布する結果、トロポニンの周期的な配列が発現していることが考えられます。このように考えて最初に作ったのがここに示す構造で、アクチン二重ラセンの二つの溝に沿って、トロポニンを結合したトロポミオシンが繋がって作るフィラメントがまとわりついた構造をとっています (Fig. 4)。

またトロポミオシンとトロポニンの間の構造的な相互関係についてですが、まずトロポミオシンが狭いバンドと広いバンドが交互に並ぶ双極性の丁度 400 Å 周期のパラクリスタル構造を作ることを利用して、その断端部分の解析から内部の分子配列を決めることができました (Fig. 5)。そしてトロポニンはちょうど広いバンドの中央部分に結合しますから、トロポミオシンの細長い分子の大凡三分の一のところにトロポニンが結合することを結論できました。なお一つの 400 Å 周期にはトロポニンとトロポミオシンがそれぞれ二分子ずつ存在しますが、アクチン二重ラセンの対称性から考えると上記の最初に考えた構造では対称性が

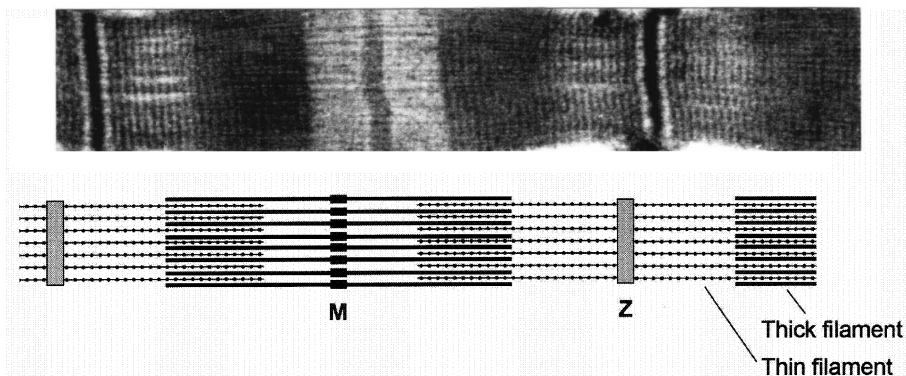


Fig. 2. Periodic distribution of troponin in myofibrillar structure<sup>1)</sup>

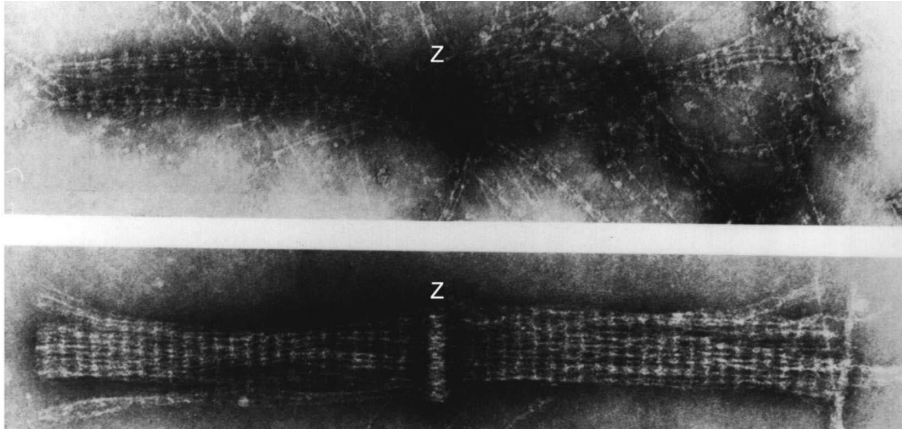


Fig. 3. Periodic distribution of troponin along separated thin filament bundles<sup>2)</sup>

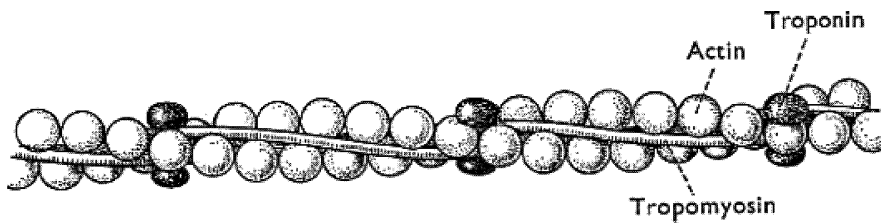


Fig. 4. Structure of thin filament<sup>1)</sup>

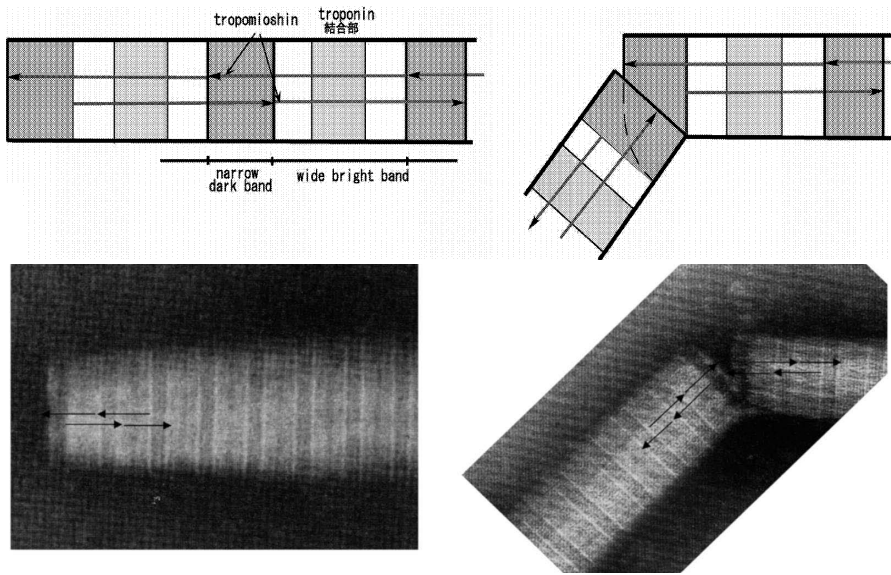
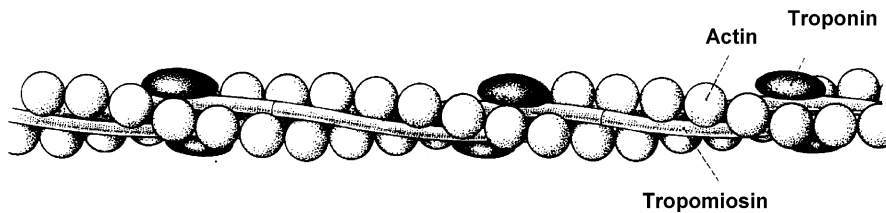
保たれておらず、対称性を保つためには同じ周期内のトロポニン二分子をアクチン分子の二分の一個分ずらす必要があります (Fig. 4)。したがってトロポミオシンも当然同じだけずれることになります。このようにしてはじめてフィラメント全体としての安定した構造の対称性が保てます。第6図に示す構造はこのような精密化を行ったモデルでありまして、これが現在の細いフィラメントの分子構造の基礎になっているものです (Fig. 6)。また細いフィラメントの先端がトロポニンの位置から  $400 \text{ \AA}$  周期の  $\frac{2}{3}$  の長さだけ離れていることを考えると、この図では細いフィラメントは左側がフィラメントの先端で、右側がZ帯寄りであることも分かります。細いフィラメントのCa調節タンパク質にはっきりとしたフィラメント軸に沿った方向性があることを示すものであります。

Caの作用しない条件では、トロポニン-トロポミオシン系はアクチンフィラメントのミオシンとの収縮反応を抑制していますが、Caがトロポニン

に作用しますと、その抑制性の作用が脱抑制されてミオシンとアクチンとの収縮反応が活性化される、というのがCa調節の基本機構であり、上記の構造モデルはこれを具体的に可視化したものであります。

これまでにお話してきたのは1960年代に行われた一連の仕事でありまして、これらによって現在のCa収縮分子機構の基礎が確立されたのであります。

さてトロポニンは当初は単一タンパク質だと考えていたのですが、1968年にアメリカにおいて二つの成分に分けられるという報告が出ました。そして一連の研究によって最終的にはトロポニンがトロポニンC、I、Tの三つの成分によって構成される複合タンパク質であることが判明したのであります。トロポニンCがCa結合成分(Ca<sup>2+</sup>-binding component)で、このタンパク質は狭い意味でのCa受容蛋白です。なお1969年には垣内史朗先生がトロポニンCの相同タンパク質であるカルモジュリンを発見されました。脳のフォスフォダ

Fig. 5. Molecular arrangement in tropomyosin pracrystal<sup>2)</sup>Fig. 6. Structural model of thin filament<sup>3)</sup>

イエステラーゼの粗標品はCaによって活性化されますが、精製を進めて加熱に極めて弱いタンパク性の補助因子を除くとCa感受性が消失し、再び補助因子を加えると復活してきます。その補助因子がカルモジュリンと命名されたわけですが、トロポニンCとは相同タンパク質でどちらもCaを四個結合するいわゆるEFハンドタイプタンパク質の代表例であることが現在で知られています。またCaの細胞内作用が筋肉だけでなくいろいろな種類の細胞組織へとカルモジュリンを介してその後広がって行くことになったのは皆さんよくご存知の通りです。

トロポニンI (inhibitory component) は、トロポニンの作用の中でCaのない時の収縮系抑制作用を分担しています。第3の因子であるトロポニンT (tropomyosin binding component) はトロポニン複合体全体をトロポミオシンに結合する性

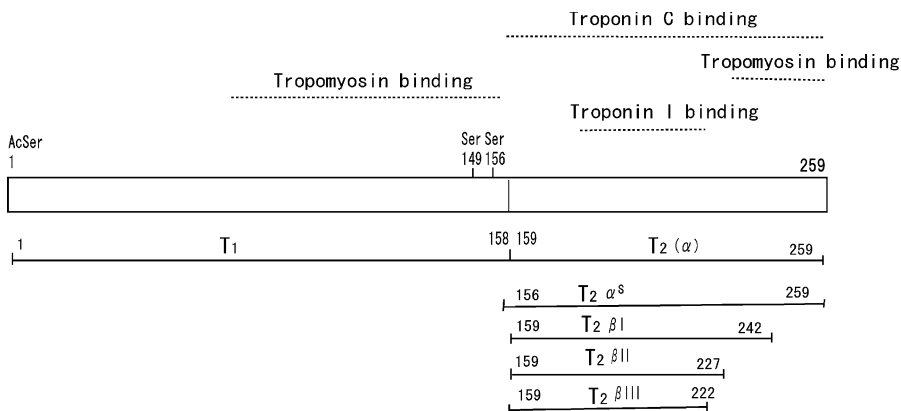
質を持っています。このように三つの成分のそれぞれが相異なるトロポニンの特徴的な性質を分担しているのです (Fig. 7)。

トロポニンの3成分が見つかってトロポニン研究は大変な国際競争となり、1970年代に世界中で研究が飛躍的に進展したわけであります。当時の代表的な研究室を挙げておきますと、トロポニンCについてはアメリカのボストンのガーグリー (J. Gergely) 研究室で研究が進展しましたし、それからトロポニンIについては、英国のバーミンガム大学のペリー教授 (S.V. Perry) の研究室で生化学的な研究が進行しましたし、トロポニンTについては我国において研究が行われています。

トロポニンTの研究についてももう少し詳しく説明しておきますと、このタンパク質は3成分の中で一番分子量が大きく、二つのドメイン構造 (TnT<sub>1</sub> と TnT<sub>2</sub>) を持つのが特徴です。ウサギ骨

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>Troponin C (TnC)</b> | <b>Ca<sup>2+</sup>-binding</b>  |
| <b>Troponin I (TnI)</b> | <b>Inhibition of contractile response<br/>between myosin and actin<br/>(in the presence of tropomyosin)</b> |
| <b>Troponin T (TnT)</b> | <b>Tropomyosin binding</b>  |
|                         | <u>Chymotryptic subfragments</u>  |
|                         | TnT <sub>1</sub> ; N-terminal subfragment   |
|                         | TnT <sub>2</sub> ; C-terminal subfragment   |

Fig. 7. Troponin components

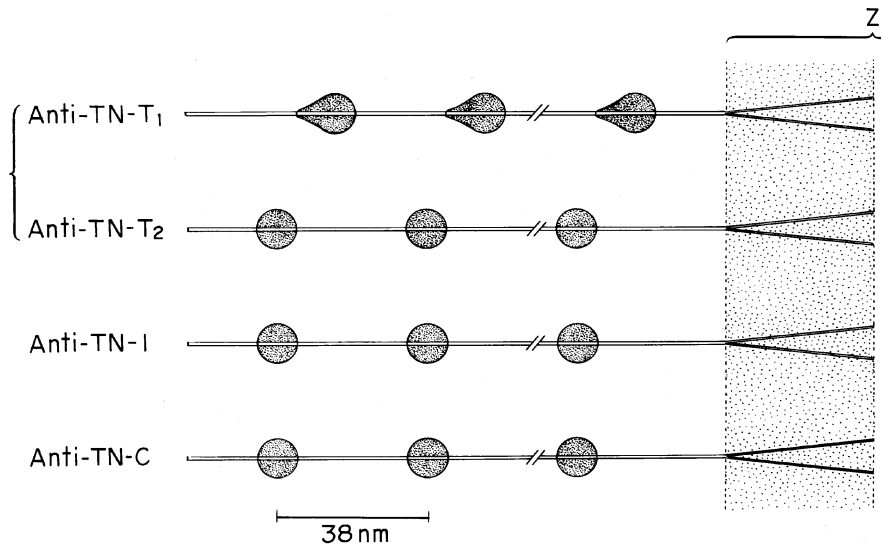
Fig. 8. Distribution of interacting properties along amino acid sequence of rabbit skeletal troponin T<sup>4)</sup>

格筋のトロポニン T の 259 残基のアミノ酸配列上で、N 端側の 158 残基が T<sub>1</sub> ドメインで、C 端側の 101 残基が T<sub>2</sub> ドメインです (Fig. 8)。トロポニン T は生理的な低イオン強度では難溶性で取り扱い難いタンパク質ですが、キモトリプシン処理で TnT<sub>1</sub> 領域と TnT<sub>2</sub> 領域をそれぞれサブフラグメント化すると、どちらも水溶性になるため詳しい生化学的な性質を調べられます。その結果、トロポニン T 分子の Ca 制御活性は C 端側の T<sub>2</sub> ドメインに保存されていることが分かりました。この部分がトロポニン I とトロポニン C、それにトロポミオシンと相互作用するのに対して、N 端側のトロポニン T<sub>1</sub> はトロポミオシンと非常に強く結合する性質を示すのが特徴です。トロポニン T 分子の中 C 端部分のトロポニン T<sub>2</sub> ドメインが Ca 制御の中心になる複合体コアダメイン形成に関与していることを示しています。

またトロポニン T 分子の二つのドメイン構造

は、細いフィラメント軸にそって配向していることが電子顕微鏡的に判っています (Fig. 9)。これはトロポニンのそれぞれの成分の抗体で細いフィラメント上の局在の模式図でありませんが、トロポニン C とトロポニン I の場合に、400 Å の周期のなかに単一の存在部位であるのに対して、トロポニン T の場合は一つの周期の中に二つの存在部位が出来る、その二つのペアをトロポニン T<sub>1</sub> とトロポニン T<sub>2</sub> のそれぞれの抗体を作って染めた結果を示しますと、T<sub>1</sub> ドメインは Z 線寄りに、そして T<sub>2</sub> ドメインが先端側の部分を占めることが判明したのです。つまりトロポニン T の細長い分子が、細いフィラメント軸に沿って配向していることから、トロポニン分子全体の分子配置の手掛かりが出来てきました。

筋肉から単離したトロポニンを電子顕微鏡で見ると、時日を経るにつれてその形状が変わってきて多形性を示します (Fig. 10)。取り出し



(1979)

Fig. 9. Localization of troponin components along thin filament<sup>5)</sup>

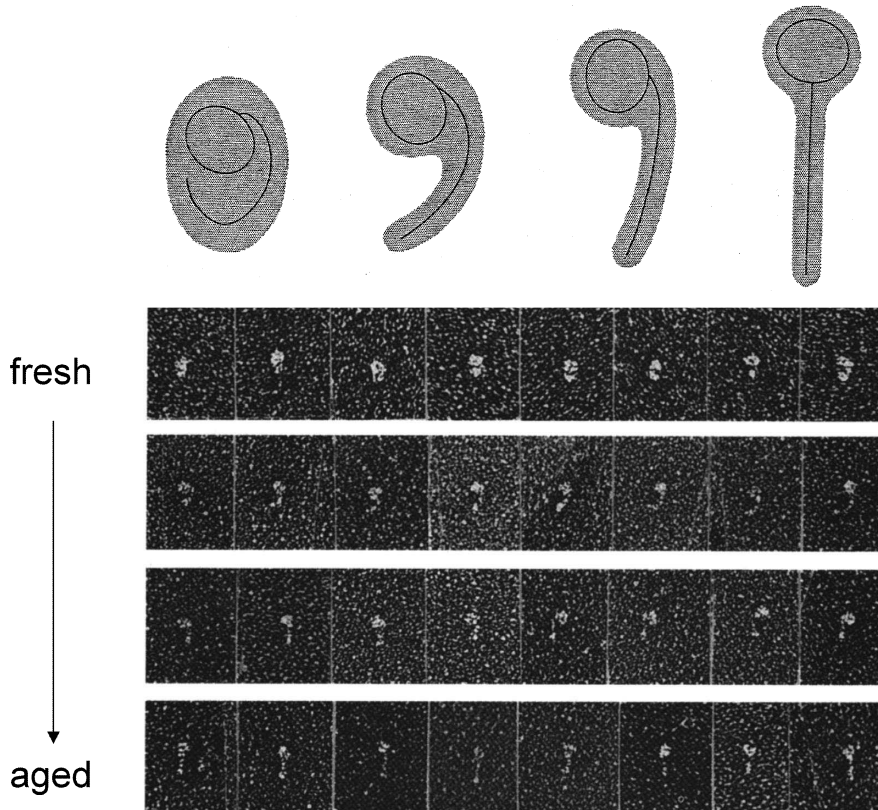


Fig. 10. Polymorphism of troponin molecules<sup>4)</sup>

た直後の新鮮標品の場合には卵型の分子形態を示しますが、何日か経つと細長い尾状部分がほぐれ出て来ます。頭の部分にまとわりついていた尻尾がほぐれてきて最終的にはまっすぐな尻尾になるといった変化を示すことがわかります。この中における分子配置ですが、トロポニンTが細長い17ナノメートルの長さの尾状部分を占めていて、頭部がトロポニンIとトロポニンCによって構成されることが判明しています。最近トロポニンのコアドメインの結晶解析が出来ていまして、トロポニンT<sub>2</sub>の部分にトロポニンIとCの頭部にくっこんでいることが判って来ましたが、基本的にはこういった分子配置をとることが判っています。カルシウム制御活性の観点から見ると、分離直後の卵形の分子が一番活性が高く、その後時日を経るにつれて活性が落ちてきます。卵形の分子ではトロポニンTの尻尾の部分に頭部のトロポニンI、Cの部分に巻きついた構造をとっています。1980年代の初めに高い活性を示す卵型のトロポニン分子の中のアミノ酸位置の4次構造予測モデルを長野晃三さんと組み上げました。これはもちろん決して構造的に単一の解答ではないのですが、当時結晶化がまだ実現していなかったので、こういったかなり大胆なことをやったわけです。これは原子レベルでカルシウムの作用を知りたいという私達の最終目標に何とか近付きたいという気持ちでやった試みです(Fig. 11)。なお最近では、実際にヒトの心筋トロポニンのコアドメインの結晶構造解析が理研播磨の構造生物学の研究室で成功しまして、この方向の研究の目途がたってきています。

当時考えたトロポニン成分の分子配置を細いフィラメント上で示したのが第12図です(Fig. 12)。この図では細いフィラメントをZ帯側から斜めに見ており、トロポニンT<sub>1</sub>ドメインが手前側に、そしてトロポニンT<sub>2</sub>ドメインがフィラメント先端側に配置して、その上にトロポニンIとCとが載る構造を示しています。Caイオンの作用しないときには、トロポニンIがアクチンに抑制的に作用しています。これはトロポニンIに対する競合的な親和性がトロポニンCとアクチン(およびトロポミオシン)との間に存在していて、Ca不在下ではアクチン側に親和性が傾いていること

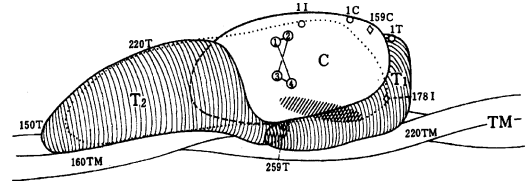


Fig. 11. Quarternary structure prediction model of troponin<sup>4)</sup>

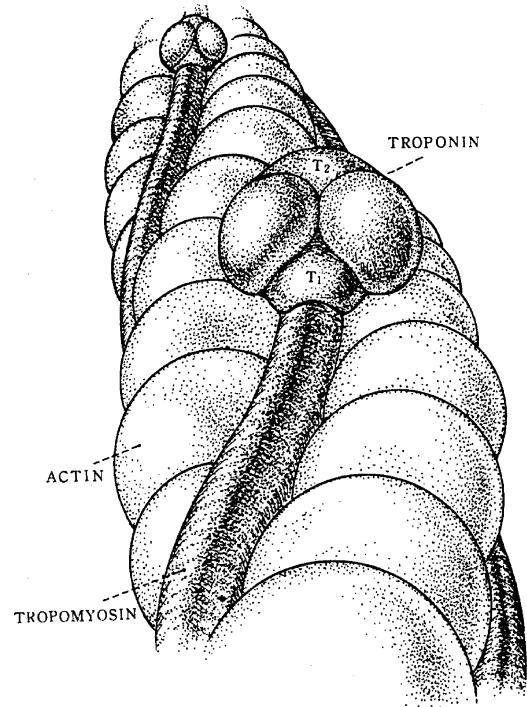


Fig. 12. Molecular arrangement of troponin components in thin filament<sup>6)</sup>

に由来します。CaイオンがトロポニンCに作用しますと、トロポニンCとトロポニンIとの相互作用が強化されて、その結果トロポニンIがアクチンからはずれて脱抑制されます。これがトロポニンによるCa制御の基本機構であることが1970年代に確立されてきたといつてよいと思います。

1970年代には世界中でトロポニンの三つの成分についていろいろな角度から研究が行われましたが、1979年に江橋先生が有名な河口湖国際筋肉シンポジウムを丸山工作先生と遠藤實先生の協力の下に開催され総まとめをされました。この画期的なシンポジウムは今でも語り継がれている有名なものです。先達を重んじる精神の強い江橋



## 家族性心筋症の遺伝子解析

1. 肥大型心筋症 (Hypertrophic cardiomyopathy; HCM)  
cardiac actin,  $\beta$ -myosin heavy chain, myosin light chain,  
**cardiac troponin T, cardiac troponin I, cardiac troponin C,**  
 $\alpha$ -tropomyosin, myosin binding C-protein, connectin
2. 拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy; DCM)  
cytoskeletal proteins; dystrophin, desmin, taffazin, lamin A/C,  
 $\delta$ -sarcoglycan  
myofibrillar proteins; cardiac actin,  $\beta$ -myosin heavy chain,  
**cardiac troponin T, cardiac troponin I**
3. 拘束型心筋症 (Restrictive cardiomyopathy ; RCM)  
**cardiac troponin I**

Fig. 13. Genetic analyses of inherited cardiomyopathies

先生は、このシンポジウムを開催するに際して、恩師の熊谷洋先生の75歳の誕生祝いと名取禮二先生のスキンドファイバー発表25周年を記念して行ったので、熊谷・名取シンポジウムと一般に呼ばれています。トロポニン研究の進歩あるいは興奮収縮連関と筋収縮蛋白ミオシンとアクチンの研究などについての成果が纏られたわけであり、会議録には現在に至る発展の基礎になっている知見が数多く載っていて今でも参考になる所が多々あります。

その後1980年代にはいって遺伝子工学的な手法が導入され、シンクロトロンなどの大型施設が出てきて研究が進展します。しかしながらその一方で制御機構が本来最もシャープに発現する生理的な条件下という立場から見るとかえって問題が難しくなってきた、そういった時期が80年代であったと考えております。

そして1990年代に入りますと、今度は遺伝子解析の進歩に伴ってトロポニンに関連する病気がわかってきたのがこれまでになかった新しい展開であります。心筋症はいろいろな原因によって起こる症候群ですが、その中に遺伝性のもも含まれていて家族性に発症してきます(Fig. 13)。最初にこの中の肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy ; HCM)について遺伝子解析が進行し、筋原繊維タンパク質の変異に起因することがわかってきて、トロポニンの変異もこのなかに含まれることが明らかになりました。特にトロポ

ニンTとIの変異が多く、現在ではトロポニンTが27種類、その後トロポニンIも26種類の変異の存在がみつかっています。トロポニンCでは変異二つと少ないのですが、その理由として考えられるのは、Ca結合に直接関わるタンパクですから、これに異常が起こると病気を乗り越えて大部分が致死的になるということなのかもしれません。また拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy ; DCM)については、最初は細胞骨格蛋白の変異が判明しましたが、2001年にトロポニンTの変異が見つかり、そのあと他の筋原繊維蛋白の変異も報告されています。さらに2003年にイギリスで拘束型心筋症(restrictive cardiomyopathy ; RCM)を発症する6家系の解析が行われて、その結果全家系ともトロポニンIの変異であることが判明しています。拘束型についてはまだ研究が始まったばかりで今後まだ他の変異が出てくる可能性が残されています。

トロポニンの病気についてはトロポニンが見つかった当時から探してきました。たとえばネマリン病とか筋ジストロフィーなどでこの可能性が考えられて探索的な研究が行われましたが、いずれも否定的な結果に終わりました。家族性心筋症はトロポニンが関与する疾患の初めての例として見逃すことの出来ない問題でありまして、すぐに九州大学の私の研究室で機能異常の解析を始めました。最初にその時に使った手法を説明しておきますと、私達はスキンドファイバーの中でトロポニ

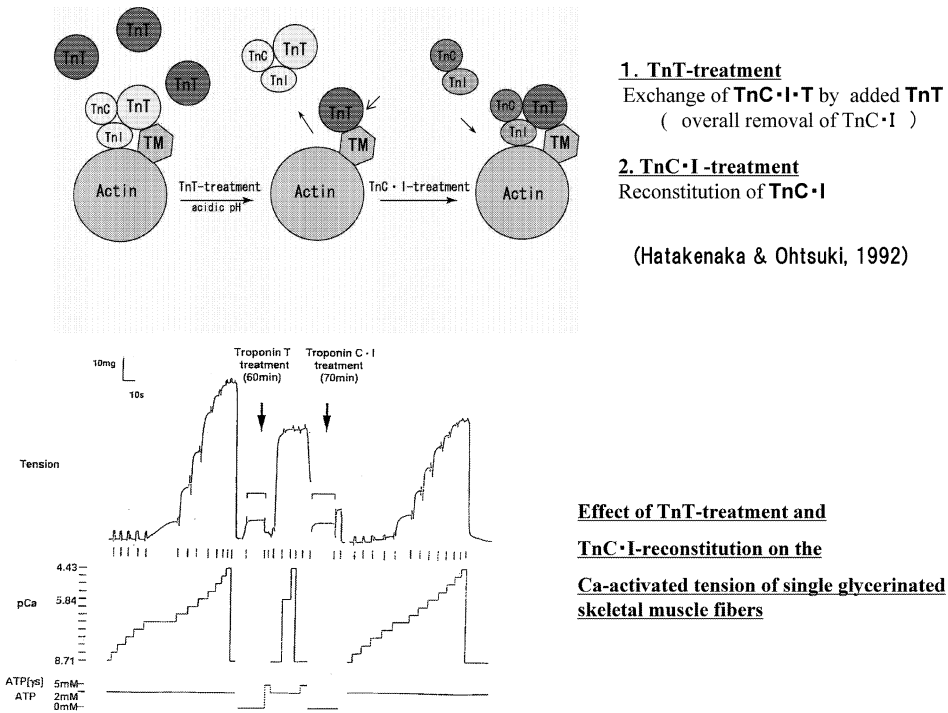


Fig. 14. Exchange of troponin components in skinned fibers<sup>7)</sup>

ンを入れ替える方法を1992年に丁度開発したところでしたので、この手法を適用して変異タンパクの作用をスキンドファイバーの張力を指標とした生理的な条件下で検討を行いました (Fig. 14)。トロポニンの入れ替えの原理を簡単に説明しますと、特定の条件下でスキンドファイバー外液中にトロポニンTを過剰に加えてやりますと、トロポニンTとスキンドファイバー中の内在性トロポニンT, I, C複合体とが入れ替わります。その結果差し引きトロポニンIとCがないスキンドファイバーが出来て、この状態ではCa濃度にかかわらず張力が発生するようになります。さらにトロポニンIとCを再構成すると元のCa感受性が復活します。非常に特異的な交換反応でありまして、トロポニンの生理的な分子機構研究への突破口となったもので現在では世界中で広く使われています。

トロポニンの変異としては、1994年に肥大型心筋症を引き起こすトロポニンTのミスセンス変異が二つ初めて報告されました。すぐにこの方法を利用して機能解析を開始しましたが、第15図に

示したのが最初に九大で森本幸生君達がやった実験の結果でありまして、二つのトロポニンTミスセンス変異タンパクのどちらもCa張力曲線を左側に平行移動する結果が得られました (Fig. 15)。Ca張力の変化はpHを下げると大きくなります。トロポニンTの変異によってCa感受性が増加するという結果が出てきましたが、ただ当時トロポニンTの変異は16種類ばかり見つかってきていて、二種類のCa感受性の変化が果たして病気に関係があるのだろうか、この点に自信が持てなかったのです。それでは思い切って全部の変異を調べてみようという云うことになりました。今から思いますと研究室の皆さんは大変だったと思いますが、ともかくも全部の変異タンパクを作ってスキンドファイバーで調べてみると、まったく予想外の結果が得られたのです。一般にタンパク質の相互作用をはじめとするいろいろな機能というのは、分子のアミノ酸配列に沿って局在するのが普通です。ところがトロポニンTの肥大型心筋症の変異は分子全体に分布していました。したがっておそらくいくつかの異なった作用異常が見つ

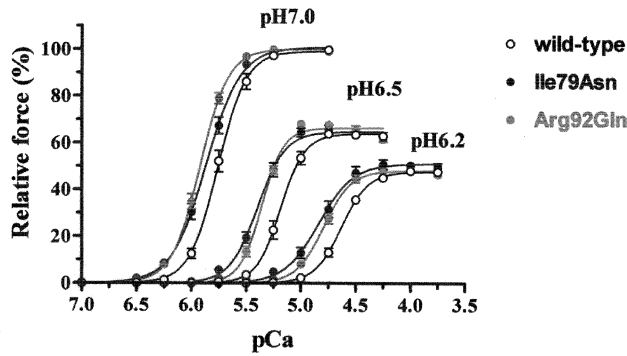


Fig. 15. Ca sensitization of force generation caused by two HCM-causing missense mutations of human cardiac troponin T<sup>8)</sup>

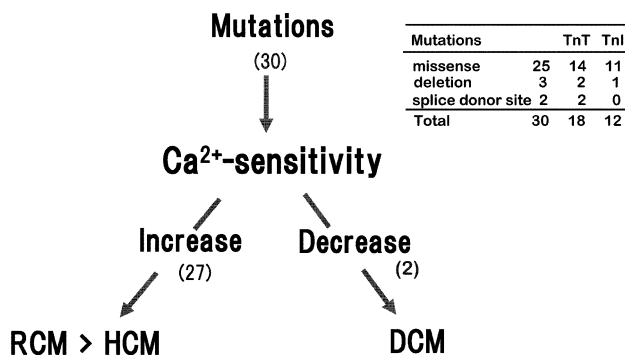


Fig. 16. Changes in Ca-sensitivity associated with HCM-, DCM- and RCM-causing mutations in genes of troponin components

ることを予想して解析をはじめたのですが、その予想に反して一つの変異だけを例外としてそのほかのすべての変異がCa感受性を同じように増強する結果となりました。

そのあと臨床症状が肥大型とは対照的な拡張型心筋症(DCM)について同様の解析をしましたが、この場合にはCa感受性が肥大型の場合とは逆に下がる結果が得られました。これもCa感受性の変化が発症に重要な役割を果たしていることを示すものでした。トロポニンIについて報告されていた肥大型および拘束型心筋症の変異を解析した結果も、どちらの変異もCa感受性を増強することを示しました。肥大型の症状をさらに重症にした性質を示す拘束型心筋症を引き起こす変異では、Ca感受性の増加が肥大型のそれに比べるとさらに大きいことも判明しています。30種類ばかりの変異を調べた結果をまとめてみますと、Ca感受性の変化が3種類の心筋症を引き起こす鍵を握っ

ていることを示しています(Fig. 16)。米国と英国で行われた研究でも同様の結果が得られていました。国際的なコンセンサスが得られたと云ってよい状況になってきています。

トロポニン変異によるCa感受性変動のメカニズムについては現在研究が進行中であります。第17図に示したのはヒト心筋のトロポニン複合体でありまして、コアドメインの結晶構造の結果を基礎としており、結晶化されていない部分は点線で補足して、それをアクチンとトロポミオシンの上に載せた模式図です(Fig. 17)。この場合トロポニンCにCaイオンが結合した活性状態になっていまして、トロポニンIの抑制領域(inhibitory region)とそのC端側の調節部分(regulatory segment)はH3ヘリックスを介してトロポニンCに結合しています。そのために抑制領域(inhibitory region)はアクチン(およびトロポミオシン)に抑制作用を発揮できない脱抑制状態(または活

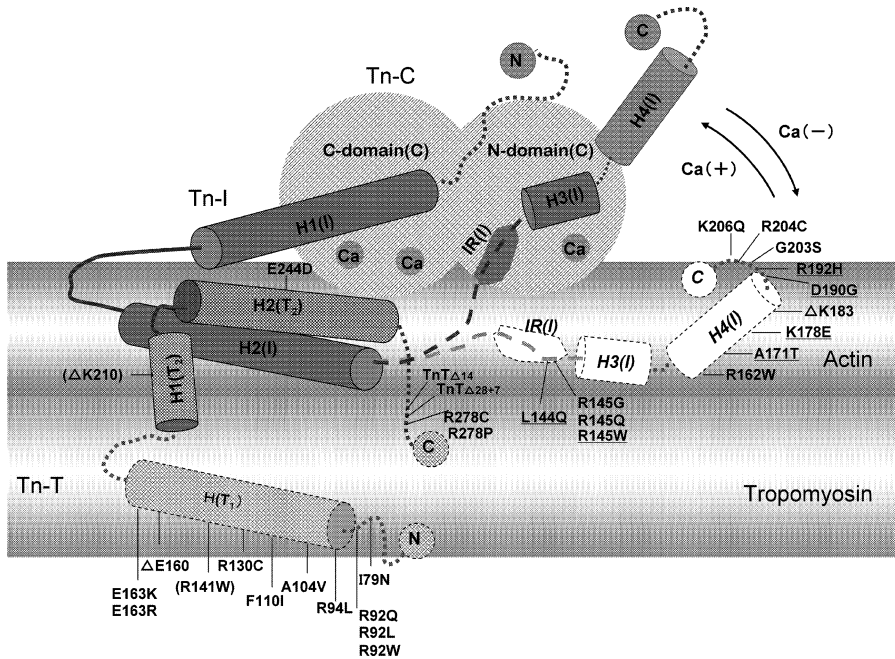


Fig. 17. Distribution of mutations associated with HCM, DCM and RCM in human cardiac troponin CIT-complex<sup>9)</sup>

性化状態)にあります。Ca イオンがトロポニン C から外れると H3 ヘリックスがトロポニン C からはずれる結果、抑制領域 (inhibitory region) がアクチンに抑制効果を発揮できるようになります。つまりトロポニン I 分子の抑制領域とその C 端寄りの部位に対するトロポニン C とアクチンとの間の Ca 依存性の競合的相互作用こそがトロポニン分子の Ca 制御の基本機構であることが明らかになっています。

このような構造の中で心筋症を引き起こす変異部位の分布をたどってみますと、結晶解析が行われたコアダメインの中には変異がほとんどないことが分かります。まるで変異がコアダメインを避けるように分布しているのです。そして殆どの変異が分布しているのが、アクチンとトロポミオシンの相互作用部位であることがはっきりしてきました。これはまた生理的な Ca 感受性がトロポニン分子の内部だけで決定されているのではなく、細いフィラメントのほかのタンパク質であるアクチンとトロポミオシンの相互作用が非常に重要な役割を担っていることを意味しています。このような部位のアミノ酸残基 1 個の側鎖を修飾

した結果起こるのが三種類の心筋症、つまり肥大型、拡張型および拘束型心筋症であると考えられます。これに対してトロポニン構造の中心であるコアダメインに変異が起ると、大部分がおそらく致死的になるのではないかと思います。これらの分子機構を解き明かすためにはまずいろいろな方法で構造を調べることが基本になりますが、トロポニンの NMR 解析の組織的な研究が始まっています。数多くある心筋症関連の変異の作用も近い将来には解明されることが考えられます。また病気の解析には疾患動物モデルを作ることが必須の要件ですが、九州大学で拡張型心筋症トロポニン T の欠損変異のノックインマウスモデルが最近開発されています<sup>10)</sup>。トロポニン変異による家族性心筋症の疾患モデルマウスの初めての成功例であり、心室壁がうすくなって心室内腔が拡張し心臓全体が拡大しています (Fig. 18)。心室筋のスキンドファイバーの Ca 感受性が低下していることもわかっています (Fig. 19)。また拡張型心筋症の特徴である突然死が頻発するなど疾患モデルとして優れた性質を持っていて今後の研究の進展が期待されるところであります。

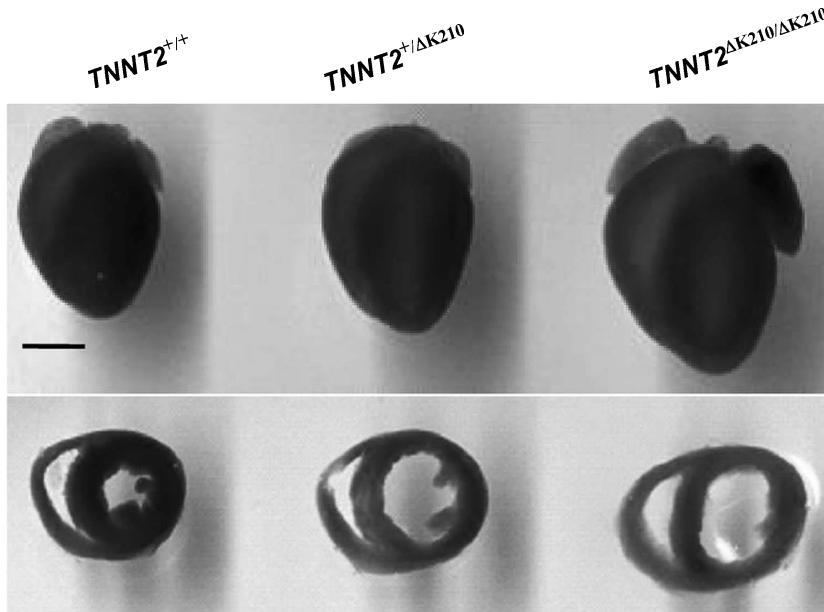


Fig. 18. Hearts of DCM-mouse models by K210 deletion mutation of cardiac troponin T

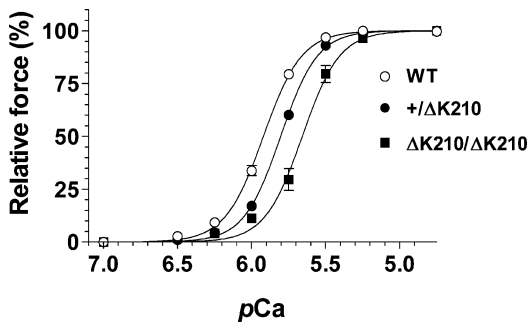


Fig. 19.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated force generation of skinned trabeculae from hearts of DCM-mouse models shown in Fig. 18

以上私たちが行ってまいりましたトロポニンの研究を中心に紹介してきました。心筋では本日お話した遺伝疾患だけでなく生理的な側面、たとえば心筋に特徴的な収縮の長さ効果などの問題についてもトロポニンの役割が分かっています。トロポニン研究もいよいよ構造生物学あるいは生化学・分子生物学を基礎とした医学、生理学の時代に入っていく状況になってきていることを示しています。

昨年の秋(2005年10月)には、トロポニン発見40周年を記念した記念国際シンポジウムが岡崎

の生理学研究所で開催されました。この会ではトロポニン研究の発展を中心に討論が行われました。江橋先生は40周年祝賀の席に出席されて、ご自身の60年に及ぶ研究生生活を顧みてこれほど嬉しいことはない、この岡崎で自分の研究生生活を集大成したい、と英語で挨拶をされて参会者の感動を誘ったことは本日この会場にいらっしゃるほとんどの方がご存知の通りであります<sup>11)</sup>。もうすぐ会議録も出版されることになっています<sup>12)</sup>。またシンポジウムが多くの方々のご協力の下に実現したことを申し上げたいと思います。これまでなかなか感謝の気持ちを表す機会がありませんでしたが、この席を借りて厚く御礼申し上げる次第です。

なお江橋先生は東大を退官してから岡崎の生理学研究所に移られましたが、研究所の管理運営に尽力されていて大変忙しい時期にも、また研究所を退官されてからも、一人の研究者として実験を続けておられました。このように生涯を通じて筋収縮調節機構解明の道を進まれ、あとに続く後輩達を身をもって励まし続けて下さった先生に深い敬意と感謝の気持ちを捧げて私の講演を終わることに致します。

御清聴有難うございました。

### 文 献

- 1) Ebashi S, Endo M, Ohtsuki I. Control of muscle contraction. *Q Rev Biophys* 1969; 2: 351-84.
- 2) Ohtsuki I. Localization of troponin in thin filament and tropomyosin paracrystal. *J Biochem* 1974; 75: 753-65.
- 3) Ebashi S. Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca-troponin-tropomyosin system. *Essays Biochem* 1974; 10: 1-36.
- 4) Ohtsuki I, Maruyama K, Ebashi S. Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv Prot Chem* 1986; 38: 1-68.
- 5) Ohtsuki I. Molecular arrangement of troponin T in thin filament. *J Biochem* 1979; 86: 491-7.
- 6) Ohtsuki I. Functional organization of the troponin-tropomyosin system. In: Ebashi S, et al., editor. *Muscle contraction; its regulatory mechanisms*. Japan Sci. Soc. Press Tokyo, Springer-Verlag Heidelberg; 1980. p. 237-50.
- 7) Hatakenaka M, Ohtsuki I. Effect of removal and reconstitution of troponins C and I on the  $Ca^{2+}$ -activated tension development of single glycerinated rabbit skeletal muscle fibers. *Eur J Biochem* 1992; 205: 985-93.
- 8) Morimoto S, Yanaga F, Minakami R, Ohtsuki I.  $Ca^{2+}$ -sensitizing effects of the mutations at Ile-79 and Arg-92 of troponin T in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1998; 275: C200-7.
- 9) Ohtsuki I. Molecular basis of calcium regulation of muscle contraction. In: *Adv Exp Med Biol* Vol. 565. Springer Science + Business Media, Inc.; 2005. p. 223-31.
- 10) Du CK, Morimoto S, Nishii K, Minakami R, Ohta M, Tadano N, et al. Knock-in mouse model of dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. *Circ Res* 2007; 101: 185-94.
- 11) 大槻磐男. トロポニン発見40周年記念シンポジウム. *日本生理学雑誌* 2006; 68: 315-7.
- 12) Ebashi S, Ohtsuki I, editors. *Regulatory mechanisms of striated muscle contraction*. (*Adv Exp Med Biol* Vol. 565, Springer Tokyo Berlin Heidelberg New York, 2007. : Proceedings of the international symposium celebrating the 40th anniversary of troponin discovery (33rd NIPS conference))