

## 講演

## 細胞内カルシウムと血管機能

日高 弘義\*

**座長** カテコールアミンの中でカルシウムの筋小胞体からの放出，外からのカルシウムの流入に関して  $\alpha$  の刺激がメインロードしているとの話を辻本先生からいただきましたので，第2席として日高先生から「細胞内カルシウムと血管の収縮」のお話をいただこうと思います。

日高先生は三重大学薬理学教授ですが，昭和38年名古屋大学をご卒業になり，名古屋大学の生理系生化学大学院，そのまま生化学の助手に就任され，その後 NIH へご留学，ロッシュ分子生物学研究所でも分子薬理学の分野の研究，コロラド大学の薬理学教室で Dr. オースティンと一緒に研究され，京大医学部薬理学教室助教授を経て，53年に現職の三重大学薬理学教室の教授にご就任なされています。

先生はカルシウム代謝を中心にした血管の動き，血管内でのカルシウムの動きということで国際的に通ずるお仕事，また“Journal of Cyclic Nucleotide Research” その他の各種の国際的雑誌の編集委員また日本では雑誌「血管」の編集長もなさっており，公の面でも非常に活動的であり，薬理学会でこの面で指導的な方だと思います。

先生，よろしく願いいたします。

**日高** きょうは血管機能とカルシウムについて述べたいと思います。辻本先生が総説的な仕事を紹介されましたので導入部を大分省略することができます。

細胞内の伝達機構については辻本先生のご紹介で話が尽きるのですが，細胞膜上の受容体の仕事が進んでいるのに比べて細胞内の伝達機構についてはわからない点が非常に多くあります。カル

シウムについても最近是非常におもしろいことが発見されています。例えばカルシウム経路というものがあります。カルシウム経路遮断剤をよく使いますが，カルシウム経路には少なくとも3つあることが最近議論されています。それは L=long, T=transit, N=neuronal という3つの名前が冠せられています。一般的にカルシウム拮抗剤という薬物は大体Lに作用し，Nには余り作用しない。したがって神経末端に存在する経路にはいわゆるカルシウム遮断剤は作用しないわけです。

ところが研究を進めると，L経路が神経にもあることが幾つかわかってきました。特に神経細胞体にあることになると，例えばアルコール中毒の場合の反射亢進，ナロキソン中毒の投薬中止症候群の場合にカルシウム拮抗剤が非常に著効を示す。これは神経細胞体にあるL経路に効くのではないかとされています。したがって，カルシウム経路遮断剤は心臓疾患にだけではなく，神経系にもある状態で作用し得るのではないかと。今後はカルシウム経路遮断剤も経路の種類によってそれぞれ特殊なものを研究し得るということであり，非常に多くの研究者が関心を持つようになってきています。これは非常に最近の話であります。

そういうことからカルシウム経路遮断剤もいろいろな研究室で鎬を削っており，どこが見つかるかが今話題になっています。あちこちから幾つかの予備的なデータが出ていますが，まだ最終的に決まったわけではないようです。こういう事情を考えると，カルシウム経路に関しても研究が進み，それぞれの経路の構造が違うことになってくると，そこで初めてまた新しい機構がわかってくることになるのではないかと思います。

もう一つカルシウムに関する最近のトピックス

\*三重大学医学部薬理学教室教授

(本年8月より名古屋大学医学部薬理学教室教授)

は、辻本先生のご紹介にもあった酵素、プロテインキナーゼCです。これもカルシウムの細胞内の伝達機構に非常に重要な酵素ですが、私どもの教室以外に世界で2つ、全部で3つの研究室でほとんど同時にCキナーゼのクローニングをしました。私どもは3種類のプロテインキナーゼCがあることを核酸の組成から見つけ、それに $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ と名づけましたが、アメリカの2つの研究室でも似たような、1, 2, 3または私どもとは順番の違う $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の名前をつけています。

そこでもはっきりわかることは、プロテインキナーゼCには3種類ある。その3種類が細胞によって分布が違うことが話題になっています。したがってカルシウム伝達機構も細胞によって異なり、経路にも違いがあるし、経路から先、カルシウム濃度が変化しているいろいろな伝達機構が働くときにも、伝達機構の一つであるプロテインキナーゼCにも細胞でそれぞれ違いがあるのではないかという問題がまた提起されているわけでありす。

日進月歩の世の中で、それを追い将来を予測することは非常に難しいことですが、そういうことは別に、今のところ細胞内の伝達としてはカルシウムが最も大事であることに関しては疑いがないというのが一致した見解であります。

本日はその意味でカルシウムが細胞の中で非常に重要な第2次伝達物質であるという前提のもとで、カルシウムはどういう働きをしているか、どういった働きを通して細胞機能に寄与しているかを述べたいと思いますが、細胞内は実にブラックボックスであって余りわかっていない。先ほど辻本先生が少し示された筋肉細胞でのミオシンのリン酸化、アクチンとミオシンの反応における機能が一番よくわかっています。それ以外カルシウム依存的なリン酸化でわかっているのは糖代謝の一部です。

きょうは蛋白のリン酸化をカルシウムと絡めて説明したいと思います。

なぜカルシウムが重要であるかについては、よくわからないのですが、細胞の中の構造がカルシウムを重要とするようにつくられていることは確かであります。例えば、今まで我々がカルシウムを考える場合は骨、歯が中心であり、細胞内のカルシウムについて考える習慣はできていませんでした。ところが最近では細胞内のカルシウムが非常

に大事であることから、カルシウムという細胞内のカルシウムと考えることが多くなりました。人間は1.2 kg という平均値が出ていますが、大体1 kg ぐらいのカルシウムを持っています。そのうちの2~3 g が細胞内または細胞外、いわゆる骨と歯以外のカルシウムです。したがってほとんどの量は骨と歯にあり、0.2~0.3%が細胞、我々の体が必要とする調整的カルシウムとして働いているわけでありす。

おもしろい点は、カルシウムは細胞外と内に分かれます。細胞外カルシウムはほとんどはリンパ液も含めた血中にあります。血中の濃度は数mmol であり、いろいろなホルモで恒常的に調節されているのですが、細胞外のカルシウム濃度の変化は微妙に細胞内のカルシウムに変化を与えるわけで、カルシウム濃度が非常に高くなるとテタヌス等が起こり、低くなっても同じようなことが起こります。細胞外の濃度は内に非常に大きい影響を与えるのですが、細胞外のカルシウムと細胞内のカルシウムの濃度差が本当にあるかということになると、総量としては濃度差はありません。例えば心臓では、心臓の組織、細胞の中に4 mmol、肝臓が大体1.7 mmol、脳が1.4 mmol のカルシウムを含んでいます。

血中は2 mmol というレベルなので細胞外と細胞内のカルシウムの濃度に差はないのです。しかしそれはカルシウムの総量であり、イオン化した $\text{Ca}^{2+}$ では細胞外は約50%、2 mmol ではその半分、1.2 mmol ではその半分がイオン化している。ところが細胞内のカルシウムは0.1%しかイオン化していない。したがって、イオン化したカルシウムの点では細胞の内外で非常に大きい差がある。これをカルシウムの場合にはまず識別して考えていただきたい。

我々がカルシウムを要求する場合にも、食物をとってカルシウムを吸収しますが、非常に吸収されにくいタイプのカルシウムとされやすいタイプのカルシウムがあります。それは細胞の、特に小腸あたりでカルシウムが吸収されるときにカルシウムを運ぶ担体プロテインがありますが、イオン化する必要がある。イオン化しないで、例えば骨の格好では一部しか吸収されない。骨に水酸化リン石灰の格好でついていても一部は解離するので吸収されますが、イオン化している必要があるわ

けです。

細胞内でイオン化しているカルシウムが非常に低いのはなぜかということが非常に大きな問題になります。それはわからないのですが、重要なことは細胞内のイオン化カルシウムが非常に高いと細胞が死んでしまいます。

理由はいろいろありますが、一番大きなものは、我々の細胞の中ではリンが非常に重要であります。ATP はエネルギー源ですが、ATP が合成されるときリンが必要となります。カルシウムの濃度が高いとそのリンが化合物をつくって不溶性になり、利用するリンがなくなって ATP ができなくなってしまふのが一番大きい理由です。

もう1つの理由は、逆説的ですが、カルシウム濃度が高いと細胞内で伝達物質として働き得なくなる。少ないから稀少価値があるということで、伝達物質として働くためには常に低濃度で保たれる必要があります。どうしたら低濃度に管理できるかが問題です。それが細胞外と細胞内の違いです。

細胞内で低い濃度で管理される一番大きい理由は、細胞内に非常に強くカルシウムと結合する ligand があることです。それは蛋白及び脂質の一部です。たくさんの成分があり、カルシウムと強固につき得るものの一つにカルシウム結合蛋白があります。蛋白質は大体(-)荷電を持っています。例えばアスパラギン酸、グルタミン酸はカルボキシル基 (COOH) を持っています。その蛋白質の O の(-)とカルシウムの (+) が引き合って、カルシウムがつかます。したがって、細胞外、例えば血中にカルシウムが存在するときも非常に緩い格好で蛋白のカルボン酸とついて流れています。細胞内でももちろんそういうことはありますが、そういう場合の親和性は非常に弱いのです。ちょっとした pH の変化で外れてしまう。

カルシウムと固く結合するには一定の構造が必要です。その構造が最近のカルシウム結合蛋白の研究でわかってきました。カルシウム結合蛋白は EF ハンド構造と呼ばれるカルシウム結合部位の基本構造をもつことが X 線結晶解析により明らかとなりました。一次構造的には、 $\alpha$  ヘリックスとループ構造の繰り返しとなっています。ループの中にはグルタミン酸、アスパラギン酸等強い酸性のアミノ酸があり、(-)荷電の酸素を持っていま

す。ループは大体10~12個のアミノ酸で形成されカルシウムは(-)荷電の酸素と6配位結合をつくりループにはまり込みます。そういう一定の構造をとると、普通のアスパラギン酸、グルタミン酸の(-)荷電にカルシウムがつかまるよりさらに鋭敏につく。カルシウム探索子といい、非常に少量のカルシウムでもつかまえることができる。そういう構造を持った蛋白質が体の中にあることがわかってきました。その口火になった蛋白がカルモデュリンであります。

カルモデュリンの前にパルブアルブミン、トロポニンC等の蛋白がわかっていました。しかしこれらの蛋白は非常に限られた組織にしかなかったわけです。トロポニンCは骨格筋、心筋の一部、パルブアルブミンは昔は鯉のアルブミンのような血清中にしかなかったのですが、現在の研究によるとヒトの骨髄にもあることがわかってきましたが、それにしても骨格筋、脳の一部等限られたところにしかない。

ところがカルモデュリンを精製して調べてみると全組織にあり、植物にまであり、どこの組織にもあるから多分カルシウム受容体であろうということになってきました。それでカルシウムの研究には必ずカルモデュリンが登場するわけでありま

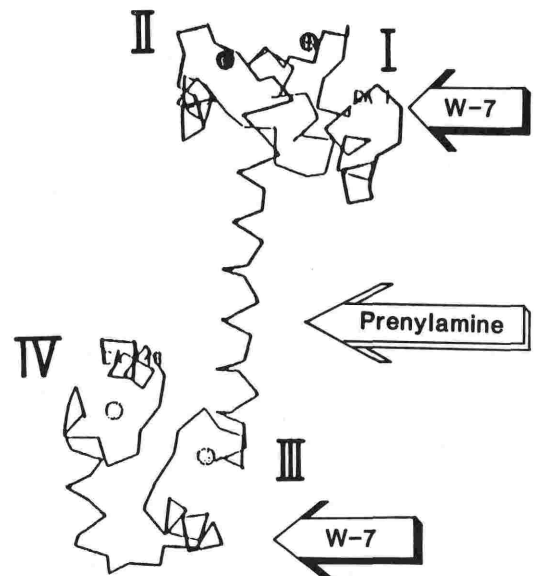


図1 カルモデュリン阻害剤の結合部位

図1に示しましたのが、アラバマ大の Babu によって報告されたカルモデュリンの立体構造です。立体写真で見るとよくわかるのですが、前後関係なくかいてしまうとこのようになります。カルモデュリンは1モル当り4モルのカルシウムが結合することができますが、立体構造上にもこの数にみあったカルシウム結合部位がみられます。先述致しました通り EF ハンド構造と呼ばれるこれらの  $Ca^{2+}$  結合サイトを図1ではアミノ末端側から順にドメイン I, II, III および IV と示しました。

このカルモデュリンの研究にいい道具になるのがカルモデュリン阻害剤です。カルモデュリン阻害剤にはいろいろなものが知られていますが in vivo で使えるカルモデュリン阻害剤は少なく、プレニラミンはカルシウム経路遮断剤でもあります。カルシウム経路遮断剤の幾つかはカルモデュリン拮抗剤です。ただし、私どもが10年ほど前に合成した W-7 というカルモデュリン阻害剤はループの部分に作用しますが、プレニラミンはむしろ  $\alpha$ -ヘリックスのところのところに作用する点で、作用部位が違うのです。これは最近私どもの研究でわかったことです。

そのようなことで、同じカルモデュリン阻害剤でも結合する場所が違うことがわかってきました。それもカルモデュリンの構造がわかってきたからですが、これに類した蛋白は最近10以上わかっています。最近新しいのではカルレギュリン、シネキシンなどです。

例えばアドレナリンで  $\alpha 1$  を刺激すると PI 代謝により細胞膜の成分であるホスファチジルイノシトールが代謝を受け、その膜の成分であるホスファチジルイノシトールが壊れて、それが伝達物質となってカルシウムの細胞内の濃度を高めるといふ働きをします。細胞膜の成分の伝達物質がカルシウムの出現を要求するとカルシウム濃度が高まりますが、そうしたカルシウム濃度の高まりはカルシウム受容体という一連の蛋白で pick up されるわけですが、その代表がカルモデュリンであります(図2)。

このカルモデュリンとほかのカルシウム結合蛋白と圧倒的に違う点はカルモデュリンという蛋白は、次にミオシン軽鎖リン酸化酵素から始まって、多機能プロテインキナーゼに至るまで少なくとも

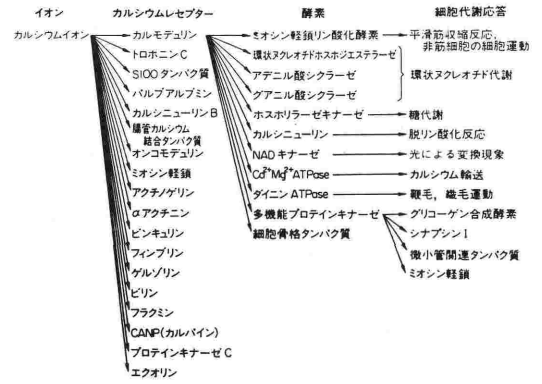


図2 細胞内カルシウム情報伝達系とカルシウムレセプター

10の酵素を活性化する作用があります。最近わかっているほかのカルシウム結合蛋白はいずれもカルモデュリンのように複数の酵素を活性化することができません。したがってカルシウムの受容体の定義の仕方によっては他のものはカルシウム受容体かどうかかわからないわけで、それは今後の研究を待つしかありません。少なくともカルモデュリンはカルシウムの濃度変化を察知してカルシウムをつかまえる。つかまえると、少なくとも10くらいの酵素の活性に変化を与える。一般的には活性を上げるわけです。

その活性化の結果、それぞれの酵素によっていろいろな蛋白質がリン酸化されるか、または基質が分解され糖代謝が盛んになる、細胞骨格の蛋白がリン酸化されれば細胞の形が変わる等の変化が起こるわけです。

ところが、ほかの蛋白質はそういう酵素活性がないのですが、研究が足りないためにないのか元来ないのか話題になります。それはよくわかっていません。しかし、多分、重要な働きとして初めに述べたように、細胞内では99.9%のカルシウムは結合型です。すると99.9%のカルシウムは全部捕獲してどこかへ閉じ込めておかねばならない。すると閉じ込めておくためにたくさんのカルシウム結合蛋白があってもいいのではないかという考えも成り立ちます。したがってこれらの蛋白が必ずしも酵素活性がなくてもいいだろう。しかし、例えばトロポニンCは酵素活性は上げませんけれども、アクチンとミオシンの相互作用がしやすいように働く点では独自の蛋白であります。し

たがって、必ずカルモデュリン以外の蛋白がカルシウムの貯蔵であるとも一概には言えませんが、今後はそういう方向の研究が大いになされるであろう。またあるものはカルモデュリンと同じように酵素の活性化因子にもなり得るだろうということです。この研究はまだ最近始まったところであり、

4年に1度の国際会議を来年は日本で、江橋先生が名誉会長で私どもがお世話して開くことになっていますが、カルシウム結合蛋白の3次構造を含むすべての構造についての研究と、それがどういう機能であるのかが今後大いに研究されるだろうと思います。先ほどの辻本先生のお話にもあったように、受容体以後の研究をしていく上で今後チェックするべきものにカルシウム結合蛋白とそれが影響を与える酵素系またはそれに類する、それに共役しているいろいろな蛋白系または基質である低分子の organic な成分の代謝が注目されるわけであり、

その研究の方法として、遺伝学の技術のほかにはいわゆる分子学的な構造の研究もありますが、忘れてならないのは薬理学であろう。薬理的な研究は研究の一つの方向を確立するのに非常に重要であろうと私どもは考えますが、例えば先ほど述べたようにカルシウムがカルシウム結合蛋白 (calcium binding protein) を介して酵素系に働き、さらに基質を分解するなり修飾するという流れをとると、私どもが W-7 という薬物を使って、カルモデュリンの作用を完全に遮断したらどういうことが起こるかを調べてみると、非常に強力な薬理作用があります。したがって、カルモデュリンは明らかに重要な蛋白であることはわかります。

したがって自信を深めてカルモデュリンの研究をしているわけですが、こういうカルモデュリン

拮抗剤を使ってカルモデュリンの作用を抑えてやると、酵素系を全部抑える可能性がある。もちろん、細胞によっては、圧倒的にミオシン軽鎖酸化酵素の活性が高いような平滑筋等の臓器もありますが、いずれにしてもカルモデュリンによって管理される酵素系が全部遮断されてしまい、図3の箱で囲ってあるようなことが全部だめになってしまう。

したがって、カルモデュリンの生理作用を研究する場合に個々の機構を検討するのは非常に難しいということで、カルモデュリン拮抗剤よりももう少し先の酵素系を阻害するものが何かないかということで、私どもは蛋白リン酸化酵素を個々に阻害することを試みたわけであり、

ここにあるような ML-9、ミオシン軽鎖キナーゼを選択的に抑える化合物を見つけました。これはカルシウム・カルモデュリンによって作動する酵素であることはわかっていますが、以前はこれが本当に細胞内で重要な働きをしているかはまだ確証がありませんでした。

最近初めて私どもの研究室で見つけられた ML-9 を用い薬理的手法を用いると、やはりこれは重要な経緯であることが結論的には証明されています。

ナフタレン骨格についた側鎖の炭素数をNとしますとNが6のものが W-7 ですが、この活性構造相関を研究している間にNを2から10まで伸ばすと、Nを2より大きくするとカルモデュリン抑制剤としての作用がどんどん強くなるのですが、短くするとカルモデュリンに対する作用が弱くなり、逆にプロテインキナーゼを直接阻害する作用が強くなってきます。N=2 が非常にプロテインキナーゼCを阻害するのに大事な長さであることがわかり、N=2 を変えないでいろいろな誘

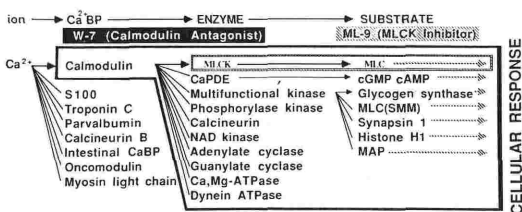


図3 Selective Inhibitors of Intracellular Ca<sup>2+</sup>-regulated Systems

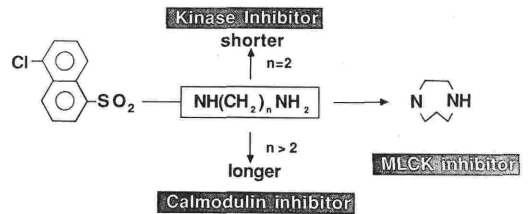


図4 Naphthalenesulfonamides as protein kinase inhibitors

導体を探したところ、ここにあるホモピペラジールの residue が非常にミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤として強いものであることがわかり、これをミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤に使っています(図4)。

その副産物としていろいろなことがわかりました。W-7 ではNが6個ですが、これをそのままホモピペラジンにしてやったものがミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤ということで、これの薬理作用の定型例は後で1つ示します。

ミオシン軽鎖キナーゼ、すなわちカルシウム・カルモデュリンで活性化される酵素のうち、非常に重要なものの1つだけを押さえることができます。このN端にフェニール核またはメチル核という疎水性の高いものをつけてやると、プロテインキナーゼCを非常に活性化する、ホルボールエステルと同じような作用があることがわかりました。

またナフタレン核をイソキノリンに変えてやるとミオシン軽鎖キナーゼを阻害するより、むしろCキナーゼを阻害するようになり、さらにホモピペラジンよりピペラジンが強いことがわかり、プロテインキナーゼCを比較的选择的に阻害することができる。これを直鎖にしてやると cAMP 依存性プロテインキナーゼを阻害することができることがわかってきました(図5)。

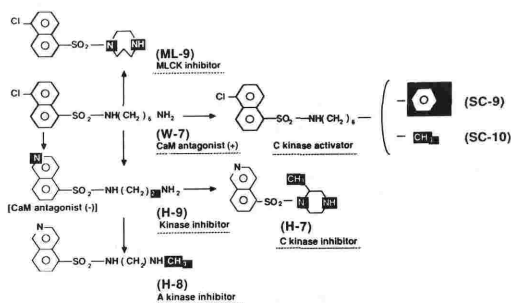
こういうスルホンアミド系統のものがプロテインキナーゼの阻害剤として非常に有用であり、選択性が違うことから、キナーゼをそれぞれの細胞内で阻害してやったらどういうことが起こるかをいろいろ実験してみました。私どもの研究室だけではなく、アメリカのグループ、日本の研究者もいろいろやっておもしろいデータが出てきてお

り、結論としてプロテインキナーゼはやはり生理的に重要であるということです。重要かどうか、生化学ではわからなかったのですが、薬物が登場し、確かにAキナーゼまたはCキナーゼを抑えるという作用が出現するというになると、そのキナーゼの作用が非常に重要であることの証拠になるわけであります。

ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) とCキナーゼはどちらもカルシウムに活性化される酵素であると言われていたのですが、MLCKの方は活性化機構が比較的良好にわかり、カルモデュリンがカルシウムとついたときに初めて MLCK と結合することがわかっており、この結合は疎水性の相互作用によることがわかっています。

ところが、Cキナーゼの方はリン脂質と相互作用をする。これも疎水性の相互作用であり、その意味ではカルモデュリン系と共通点があります(図6)。したがって、薬物によっては両方を阻害します。W-7 も濃度を非常に高くするとCキナーゼを阻害します。したがって薬理的な仕事をするとき非常に注意しなければならないのは、濃度によって特異性が変わってくることであります。

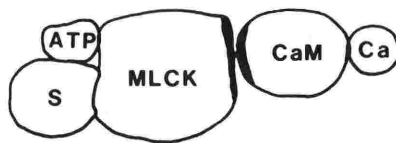
導入部でも述べましたが、私どもは去年の後半にCキナーゼの全構造を決めることに成功しました。図7がCキナーゼの全貌ですが、いわゆる触媒部分 (protein kinase domain) すなわち signal transfer の部分と signal acceptor の部分に分か



W-7 Blood Vessel (1978); ML-9 in preparation; SC-9, -10 Biochemistry (1986); H-9 J.B.C. (1985); H-7 Biochemistry (1984).

図5

Calmodulin System



Phospholipid System

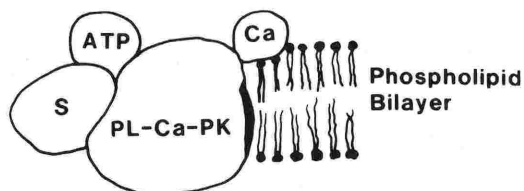


図6

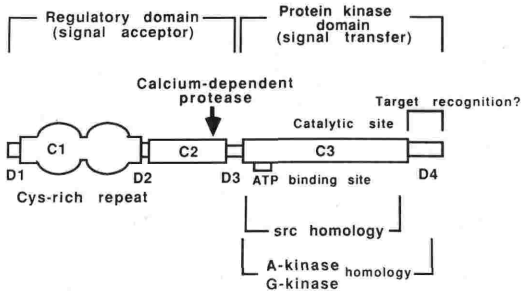


図 7

れます。signal transfer, プロテインキナーゼ活性の domain はチロシンキナーゼ, A キナーゼ, G キナーゼ等ほかのプロテインキナーゼと非常によく似ており, 80%以上並び方が似ています。signal acceptor の方はホルポールエステル, ホスファチジルイノシトールがつく部分であり, こちらには比較的違いがある。

さらに標的の認識において, 左側がN端で右側がC端ですが, C端の方に基質を認識する部分があり, ここの部分にアイソザイム間で違いがある。 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  という3つのアイソザイムを我々は見つけ, アミノ酸が $\alpha$ が673,  $\beta$ が671,  $\gamma$ が672と1個ずつアミノ酸の数が違うのですが, それぞれの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のC末端に非常に大きい違いがある。この末端は実は基質を認識する部分であり, したがってCキナーゼの $\alpha$ タイプと $\beta$ タイプと $\gamma$ タイプではそれぞれ識別する, リン酸化する基質が違うのではないかという仮説が出てきました。

それは仮説であって証明されているわけではないのですが, 今後はCキナーゼといっても1種類の話をしてはいけない。どのタイプであるかが要求される時代だと思います。

カルシウムはいろいろな作用があるけれども, その1つにリン酸化作用, リン酸化酵素の活性化に関与している。その典型的な例としてミオシンの軽鎖のリン酸化が一番よくわかっています。この反応が筋の収縮に必須かどうかという問題になります。

骨格筋にも心筋にもミオシン軽鎖のリン酸化が起こり, 起こす酵素はあるのですが, 平滑筋, 筋肉以外の細胞, 血小板, 脳細胞等と比べると骨格筋と心筋はやや様相が違ふ。骨格筋と心筋以外の細胞ではミオシン軽鎖リン酸化反応は重要であるようなデータが出ています。しかしいろいろな矛

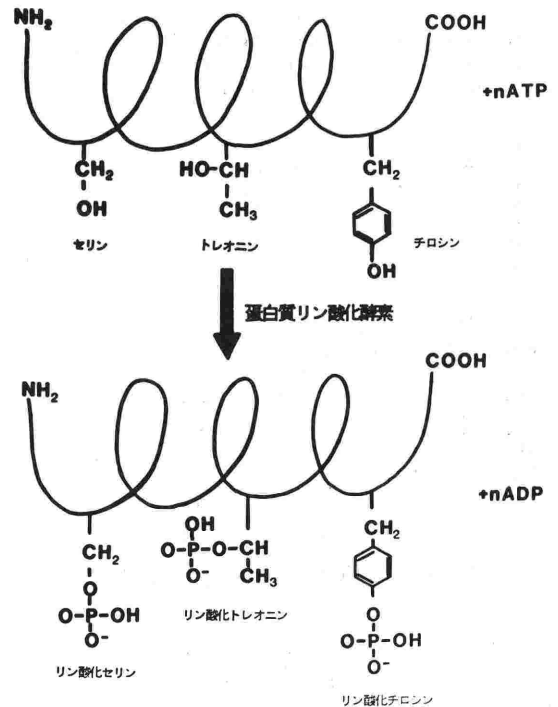


図 8

盾点があり, 本当かどうか議論されています。

蛋白リン酸化は非常に簡単なことです。蛋白質はアミノ酸からできていますが, アミノ酸の中でOH基を持ったものがあります。このOHのところをリンがつくのをリン酸化反応というのであり, OHを持ったアミノ酸は生体内には3つしかありません。一般的にcAMP依存性プロテインキナーゼ, Gキナーゼ, MLCK, Cキナーゼ等の酵素は大体セリンかスレオニンのところをリン酸化します(図8)。

ところがウイルスの遺伝子産物と言われているチロシンキナーゼまたは最近わかってきた一連のチロシンのresidueをリン酸化する酵素があり, これはチロシンの残基しかリン酸化しない。もっとよく研究すれば, どちらもするがこちらの方が強いということらしいのですが, この3種類のところにこのようにリン酸がつくと非常に強い(-)荷電があるので, 今までとは性質が変わり, リン酸がついたあたりの極性ががらりと変わります。したがって今までのウナギのような格好をしていた蛋白が突然折れ曲がってしまう等, 非常に大きな変化が起こります。これは容易に想像が付きま

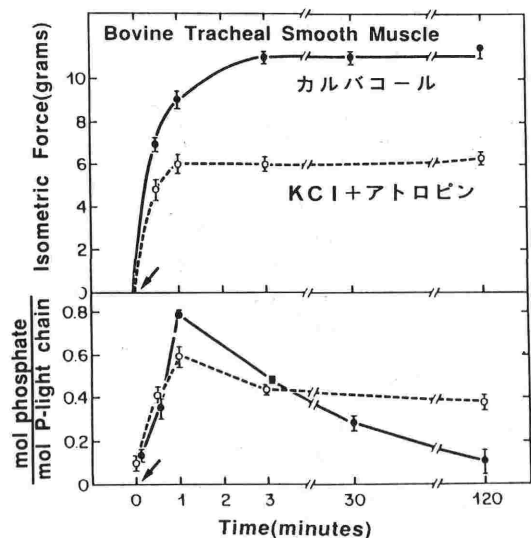


図9 平滑筋収縮反応とミオシン軽鎖リン酸化

もう一つは(一)荷電が非常に強いので、ここが部分的に水に溶けるようになってしまう。また(一)があるので(一)同士の反発が起こるとか、ここに大きい分子がつくので今までとはちよつと格好が変わるといふことで、蛋白が非常に大きい変化を起こすわけでありませう。

ミオシン軽鎖のリン酸化が平滑筋の収縮にどういふ影響を与えているかに対して有名な仕事が幾つかありますが、疑問もあります。これは必ずしもリン酸化だけで説明できないということです。

図9は気管支の平滑筋の実験ですが、テキサスのダラス大学の Stull らがしたものです。縦軸の上側は等長性の収縮力を示し、横軸は時間です。カルバコールを入れると気管支の平滑筋がこのように収縮します。その同じ標本に KCl とアトロピンを入れると、単なる脱分極だけで収縮が起こります(上図)。そのときに組織の中のミオシンのリン酸化を測ると、完全にリン酸化された状態を1としてカルバコールを入れたときのリン酸化の状態が下図の実線、KCl + アトロピンのときが点線です。リン酸化と収縮に因果関係があるならこれは平行関係になっていなければいけない。収縮が半分なのでリン酸化も半分でなければならないはずですが、そういうふうにならない。いわゆる緊張とリン酸化の度合いが一致しない。これは皆が実験をしてもそうなのです。リン酸化の量と力の出ぐあいはどうしても一致しない。

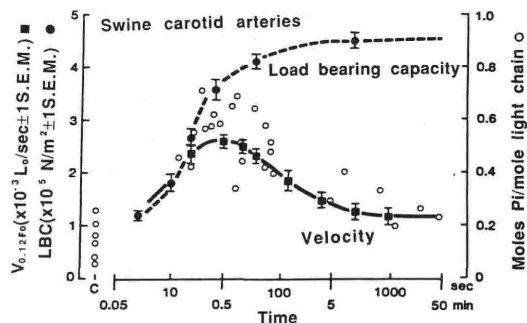


図10 平滑筋収縮反応のミオシン軽鎖リン酸化

1つの説明として、図10はバージニア大学の Murphy らが「Nature」という雑誌に出した大昔のデータで、血管条片の張力発生とミオシンのリン酸化の関係を調べたものです。これはブタの頸動脈を使ったものですが、起こっている緊張がだんだん増していくときの速度が(■)です。一定の張力負荷においてさらに緊張が増していくためには新しい力が加わる必要がある。したがって、あるところまではどんどん新しい張力発生がなければ収縮しないけれども、新しい力が生成される必要は、安定した段階になっていれば要らなくなる。これと(■)、ホタルが飛んだようになっているのはミオシンのリン酸化の度合いを示したのですが(○)、これが非常によく合う。したがって、緊張の維持に関係があるのではなく、力の生成とリン酸化が関係があるのではないかという説が出されています。このあたりはリン酸化説に対する今後の一つの大きな課題になっています。

図11は九州大学の栗山教授のグループに教えていただいて私どもがした実験です。これは血管の筋原線維です。サポニンで処理をして血管平滑筋

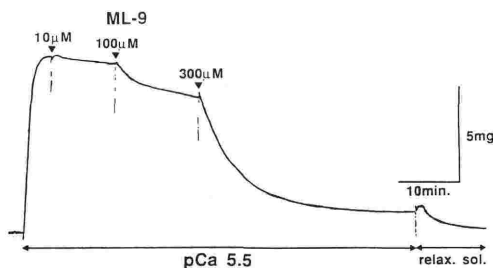


図11 Effect of ML-9 on  $Ca^{2+}$ -induced contraction in skinned (saponin-treated) vascular smooth muscle cells



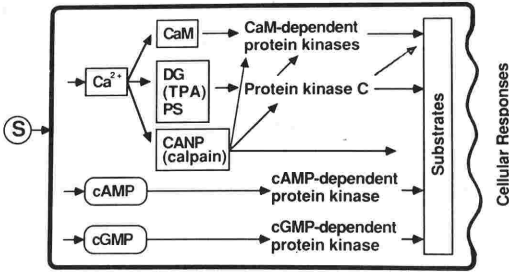


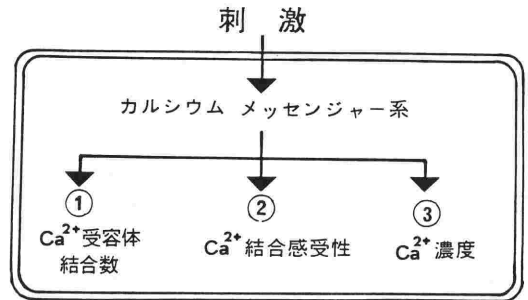
図12 Intracellular Messenger Systems

細胞の細胞膜に穴をあけました。するとカテコロールアミンを投与しても収縮しません。カルシウムを入れるとこのように収縮しますが除けば収縮は落ちてしまいます。カルシウムを入れたままにしておけば、我々が見ておる限りでは緊張が落ちません。そこへいろいろな薬物を入れます。カルシウム拮抗剤、Cキナーゼ抑制剤、Aキナーゼ抑制剤は無効果ですが、ミオシン軽鎖キナーゼ抑制剤を入れると弛緩が起こってきます。これはミオシンのリン酸化を抑えることと収縮と明らかに何か関係があるのではないかとという薬理学上の唯一のデータであります。これですべてミオシンのリン酸化を薬理的に解明したことにはなりません。リン酸化が生理的に重要であることは、このような抑制剤を使った実験で今後いろいろわかってくるのではないかと思います。

セカンドメッセンジャーの次にはプロテインキナーゼという名前の酵素系が並びます(図12)。これは昔からわかっていたのですが、本当に生理的意義があるかどうかはいつも基質、何をリン酸化するかが問題であると言われてきました。その割にはプロテインキナーゼ抑制剤はほとんど注目されていませんでしたが、こういうものを今後薬理的に処理することによって外から入った刺激からセカンドメッセンジャーの系統を1セット理解するのに非常にいいのではないかと。

特にカルシウム、cAMPがプロテインキナーゼに作用して、次にある種の基質をリン酸化して細胞反応が起こる。ここの部分を解明するのにこういう抑制剤が必要であろう。

最後のスライドです(図13)。今後の我々の課題として、カルシウムの情報伝達機構は3種類のカルシウム伝達系を通るわけですが、今述べたのはカルシウム濃度が変化する、この3番の部分で

図13  $\text{Ca}^{2+}$  の情報伝達機構

す。理論的には先ほど来のカルシウムの受容体の down regulation 等の問題がいろいろありますが、カルシウム受容体の方の結合数または受容体そのものの数、受容体そのものに分子的な変化が起こる系もあり得るし、1番の系のような研究も今後は出てくるだろう。

もう1つは、カルシウムの結合の感受性もファーストメッセンジャーでも議論されていますが、こういうことも細胞内であり得るかもしれない。3番が先に解明されて、まだわからない部分がある。今後はカルシウム伝達系に関してもっと研究が進む必要があるだろうと考える次第であります。

座長 日高先生、ありがとうございました。

本当に最新の、今出版されんとするところまでの内容のお話で、非常に難しい話をやさしくやっていたいただいたと思います。

初めから考えてみると、何 kg ある中で数 g の order のカルシウムが問題になっており、それがまたどう調節されるか。生命とは大変なものであると、調節機構について驚くばかりの仕事だと思えます。

ご質問、ご討議いただこうと思います。

小川(日本医科大学) 素朴な質問ですが、私も研究する場合はカルシウムが細胞の中に入るのを Quin-2 などを使って蛍光法などでふえたか減ったかを見ているレベルです。細胞内の濃度そのものが増えたというのは、先生が言われるようないろいろな調整機序に対しては意味があるとは思いますが、細胞の種類によって心筋、平滑筋と違いがあると思います。私は特に心筋の細胞内の Quin-2 の変化を見ており、心機能との関係その他を考える上では大きな意味があると思うので

すけれども、何かご意見がございましたら。

日高 先生の研究の方向は私は大変正しい方向だと思います。イオン化されたカルシウムの濃度を測る方法がだんだん確立してきて、アイソトープだけではなく蛍光で測るということは、私は aequorin, Fura-2, Quin-2 以外にもさらに新しい試薬が出てくることを願っていますが、少なくとも今ある試験だけでイオン化カルシウムを測って、それと機能をまず調べてみる。

その場合に考慮に入れることはイオン化カルシウムがどこから出てくるか。Fura-2 は Quin-2

より少量で蛍光が出るので全体濃度に余り影響を与えないと言われてはいますが、遊離したカルシウムが出てくる source が細胞によっても違い、場所によっても違います。私が今述べたようにいろいろな種類のカルシウム結合蛋白がありますので、将来はどここの reservoir からどういうふうにして出てくるかを研究していかれるといいと思います。今後、先生の今していただけるような研究を通してカルシウムの代謝の機序がたくさんわかってくるのではないかと思います。

小川 ありがとうございます。