The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨格筋小胞体CA2+ポンプATP aseのタンパク質間およびタンパク質-脂質間相互作用
Author(s)	大保, 貴嗣
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1065
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【13】

氏名・(本籍)	大保貴嗣(だいほたかし)
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 8061 号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**骨格筋小胞体Ca^{2+}ポンプATP aseのタンパク質間およびタンパク質－脂質間相互作用**
論文審査委員	(主査) 教授 中村 隆雄 (副査) 教授 松原 央　教授 高木 俊夫　助教授 山本 泰望

論文内容の要旨

骨格筋小胞体（SR）膜には，ATPの加水分解に共役してCa^{2+}を輸送するCa^{2+}－ATP aseが存在することが知られているが，Ca^{2+}能動輸送との関連性は現在不明である。本研究では，非イオン性界面活性剤$C_{12}E_9$で単量体に可溶化したCa^{2+}－ATP aseとリン脂質からCa^{2+}輸送機能を再構成する方法の開発を試み，これを用いて膜結合状態におけるATP ase多量体形成について検討した。

SR ATP aseは，$C_{12}E_8$又は$C_{12}E_9$によって，ATP分解活性を保ったまま単量体に可溶化されるが，1mM程度以上のCa^{2+}がないと時間と共に不可逆的に失活する。他方，intact SRベシクル又は再構成ベシクルでは，その内側の5mM Ca^{2+}がCa^{2+}の取り込みを阻害することが明らかとなった。そこで，高濃度Ca^{2+}以外に可溶化ATP aseを安定化する条件を検討した結果，$C_{12}E_9$に比べて脂質濃度が充分低い条件でリン脂質が有効であることが見出された。この条件でCa^{2+}－ATP aseは単量体として存在していると考えられることから，この酵素のリン脂質による安定化は，タンパク質間相互作用よりも脂質－タンパク質間相互作用によるものと考えられる。

上記の発見により，Ca^{2+}非存在下でのCa^{2+}輸送の再構成が可能となった。即ち，Ca^{2+}非存在下で過剰量の$C_{12}E_9$でSRを可溶化し，アゾレクチンを加えた後，シュウ酸存在下でBio－Beads SM2で$C_{12}E_9$を除いた。得られた再構成標品は高いCa^{2+}取り込み活性を示し，また，intact SRと同様に1モルのATP加水分解あたり約1.5モルのCa^{2+}が取り込まれた。再構成時での脂質とATP aseの重量比を変えて得た再構成膜のCa^{2+}取り込み能の変化を解析し，以下の結論を得た。脂質二分子層を脂質で希釈し，膜上でのATP ase分子間の平均距離を5倍以上に増しても蛍光のエネルギー移動がATP ase分子間で起こることから，ATP aseが膜中で多量体として存在することが示唆された。又，リポソー

ム当りに１分子以下のＡＴＰ aseが存在する程度まで脂質を希釈するにつれ，Ca^{2+}取り込みを行うリポソームの割合の減少は酵素が二量体で機能すると仮定した場合の曲線に一致した。さらに，intact ＳＲと同様に再構成膜においてもＥＰがポリペプチドあたり0.5になることから，二量体ＡＴＰ aseの何れかのサブユニットが活性中心を持ち，他方がCa^{2+}輸送を制御している可能性も示唆された。

ＳＲ膜をトリプシン処理した結果，$C_{12}E_8$存在下ではＡＴＰ aseの消化断片が分離されることがＨＰＬＣで示された。これらの消化断片中にはＡＴＰアナログであるＴＮＰ－ＡＴＰの結合活性がみられた。また，酵素へのヌクレオチド結合を阻害するＦＩＴＣラベルによってこの結合が阻害されたことから，この小断片はヌクレオチド結合部位の構造を保っていることが示唆された。この方法はＡＴＰ ase分子相互作用部位を含め，種々の機能部位の立体構造を明らかにするする上で重要と思われる。

論文の審査結果の要旨

本研究はカチオン能動輸送における化学－浸透共役が厳密に保持された筋小胞体のポンプＡＴＰ aseを用いて，機能的な膜再構成の新しい方法を開発し，輸送膜における機能的単位形成過程および膜上でのポンプＡＴＰ aseの存在様式に関する重要な知見を得たものである。著者は更にカチオン輸送に伴うポンプＡＴＰ aseの膜中での動きを解明することにより，カチオン能動輸送の分子機構をより深く理解することが可能となった。またこの膜再構成法は筋小胞体以外の生体膜系からごく微量のポンプ蛋白質を単離する上で有用な手段となり得る。著者はまたポンプ蛋白質の酵素活性を維持したままで種々のサブフラグメントを得る新しい方法を考案し，膜に存在するポンプ蛋白質の立体構造について，より詳細な知見を得ることができた。

従って本研究は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認められる。