The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Phosphorylated Intermediates of Ca^<2+>,Mg^<2+>-Dependent ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle |
| Author(s) | Takisawa, Haruhiko |
| Citation | 大阪大学, 1979, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/24455 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【10】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 滝澤温彦（たきさわはるひこ） |
| 学位の種類 | 理学博士 |
| 学位記番号 | 第 4532 号 |
| 学位授与の日付 | 昭和54年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科 生理学専攻<br>学位規則第5条第1項該当 |
| 学位論文題目 | **骨格筋小胞体 $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-依存性ATPアーゼのリン酸化中間体** |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 殿村 雄治<br>教授 原 富之 教授 佐藤 了 |

## 論文内容の要旨

骨格筋小胞体(SR)$Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$一依存性ATPase反応において形成されるリン酸化中間体(EP)の性質を調べた。はじめにSR膜標品を用いて初期状態における反応を測定し，次の結果を得た。

反応初期に起るEP overshootに伴って起るリン酸のburstがほぼ完了した後に，見掛けのEP分解定数の時間変化に由来するリン酸burstが出現した。反応を$Ca^{2+}$＋ATPで開始するか，あるいはSRにあらかじめ$Ca^{2+}$を取り込ませておいた後，ATPで反応を開始するとEP overshootとそれに伴って起るリン酸burstは消失した。リン酸遊離の時間変化は顕著なlag phase, burst phaseを含み，見掛けのEP分解定数は反応時間とともに複雑な変化を示した。以上の結果から，SR $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-依存性ATPase反応の初期に起るEP overshootおよびリン酸のburstはATPase分子の膜における存在状態態に依存した現象であることが結論された。このことはSR膜を可溶化すると反応初期のEP overshootおよびリン酸burstが見られなくなることからも支持された。つぎに反応解析がより容易である可溶化したSR $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-依存性ATPase反応を測定し次の結果を得た。

定常状態におけるATPase反応速度，およびEP量，さらにEP形成初速度のATP濃度依存性は，いずれもMichaelis-Mentenの式に従った。ATP再生系としてクレアチンキナーゼ，クレアチンリン酸を用いて，定常状態でATPaseに結合しているADP量を測定した結果，ADPの結合している反応中間体は存在しないことが結論された。

ADPはATPase活性を非拮抗的に阻害し広いADP濃度範囲でEP分解定数は不変であった。このことからADPと反応して減少するEP中間体の存在が示唆されたので，EPとADPの反応を測定し次の結果を得た。

ATPaseにATPを加えると，まずADP-感受性EPが形成され，ついでADP-非感受性EPが形成された。これら2種類のEPの$CaCl_2$，$MgCl_2$濃度依存性から，ADP-感受性EPはモル当り2モルの$Ca^{2+}$の結合した$Ca_2$EPであり，ADP-非感受性EPはモル当り2モルの$Mg^{2+}$の結合した$Mg_2$EPであることが示唆された。また，EPにおける$Ca^{2+}$に対する$Mg^{2+}$の親和性はEにおけるその値よりも著しく大きくなっていることが示唆された。ADP-非感受性EPの分解は低濃度の$MgCl_2$により活性化され，逆に高濃度の$MgCl_2$で阻害された。しかし$CaCl_2$はADP-非感受性EPの分解段階には作用しなかった。ADP-感受性EPの非感受性EPへの転換は1次反応に従い，その速度定数は$MgCl_2$でほとんど影響されなかった。ADP-非感受性EPの-感受性EPへの転換およびADP-感受性EPのE・ATP複合体への転換の時間経過は2相性を示した。これらの結果は，$Ca_2$EPおよび$Mg_2$EPがともに少くとも2つのコンホメーションをとることを示唆した。また，ATPaseをN-エチルマレイミド処理することにより，ADP-.感受性EPからADP-非感受性EPの転換が阻害された。

## 論文の審査結果の要旨

筋細胞内に存在する筋小胞体は刺激によって$Ca^{2+}$を小胞体外へ放出し，放出した$Ca^{2+}$をATP分解と共役して再吸収する。これらの反応がそれぞれ筋の収縮および弛緩を引き起こすことはよく知られている。近年，筋小胞体膜に$Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-依存性ATPaseが存在し，このATPaseの反応中間体としてリン酸化蛋白質(EP)が発見され，ATP分解と$Ca^{2+}$輸送の共役機構の研究が活発に行われるようになった。

滝沢君は従来の研究者によって用いられてきた筋小胞体膜系のATPaseの初期相に見られるEP形成のovershootおよびPi発生の initialburstなど，解析を困難にする複雑な現象が可溶化酵素では消失し，反応解析が容易にできることを明確に示した。

滝沢君は安定な可溶化筋小胞体ATPaseを調製することに成功し，それを用いてEP中間体の詳細な反応論的性質を初めて明確にした。即ち，同君はまずEPにADP-感受性と-非感受性の2種類が存在すること，前者が形成されてからあとで後者が形成されることを示した。また，前者にはモルあたり2モルの$Ca^{2+}$を結合しており，後者には2モルの$Mg^{2+}$を結合していること，EP中間体と$Ca^{2+}$および$Mg^{2+}$の親和性の比は中間体形成以前のそれに比して著しく減少しているという興味ある結果を得た。さらに，ADP-感受性EPから-非感受性EPへの変換が Nethylmaleimideで阻害されることを示した。同君が示した筋小胞体$Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$-ATPaseの2種類のEP中間体の性質は形質膜の$Na^+$, $K^+$-ATPaseのそれと極めて類似したものであり，カチオンポンプに共通した性質として注目される。

以上のように，滝沢君の業績は生理学上極めて重要なカチオンの能動輸送の分子機構，特にカチオン輸送における反応中間体に関し多くの有用な知見を与えたものであり，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。