

Title	Kinetic Properties of phosphorylated Intermediates in the Reaction of Na ⁺ -K ⁺ -dependent ATPase
Author(s)	Fukushima, Yoshihiro
Citation	大阪大学, 1975, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2660
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

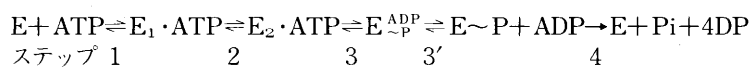
Osaka University

【13】

氏名・(本籍)	福 嶋 義 博
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3302 号
学位授与の日付	昭和50年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Na ⁺ -K ⁺ -依存性 ATPase 反応における リン酸化中間体の反応速度論的研究
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治 (副査) 教授 松原 央 教授 佐藤 了

論 文 内 容 の 要 旨

Na⁺-K⁺-依存性 ATPase[EC 3, 6, 1, 3] 反応機構として、以下に示す2つの実験に基づいて、次のものが提出された。



ここで、E₁・ATP及びE₂・ATPは2種類の酵素-基質複合体であり、E^{ADP}及びE~Pは各々ADPを結合した高エネルギーリン酸化中間体及びADPを結合していない高エネルギーリン酸化中間である。(以下リン酸化中間体をEPと記す)

1. NaCl存在下でATP添加によってEP形成を開始させ、形成されたEPにKCl+EDTAを添加する。この時のEPの減少は、KCl+EDTA添加初期の急激な減少とそれに続く一次反応的減少を示した。初期相の速いEPの減少に伴ってATPの形成が観察された。形成されたATP量は、ステップ3の平衡定数から予想される量とほぼ一致した。

2. NEM-処理酵素を用いて、ATP添加によってEP形成を開始させ、種々の時刻でADPを添加する。この時、反応開始後の時間が長くなるとともに、ADPによるEPの減少が顕著になった。

上述の反応機構に従って、高濃度Mg²⁺存在下で各素反応に対するNa⁺およびK⁺の影響が調べられた。(ステップ2, 3, 4)*

3. E₂・ATP形成速度, vf, は、種々のK⁺濃度存在下で、Na⁺濃度増大とともに増大し、最大値に達した後、さらに高濃度のNa⁺によって減少した。vfは次の式で表わされた。

※高濃度 Mg^{2+} 存在下では、EP のほとんどは E^{ADP} として存在し、またステップ 1 は Na^+ に非依存性である。

$$vf = \frac{Vf}{1 + \frac{\phi_A}{[Na^+]} + \frac{[Na^+]}{\phi_I}}$$

ここで $Vf = 8 + \frac{48}{1 + \frac{[K^+]}{0.6mM}}$ (モル/10⁷グラムたん白/秒),

$$\phi_A = \frac{10.3mM}{1 + \frac{[K^+]}{0.6mM}} \quad \phi_I = \frac{32mM}{1 + \frac{[K^+]}{2.7mM}}$$

4. 低濃度 Na^+ 存在下での、ステップ 3 の解離定数は、高濃度 Na^+ 存在下のそれよりも大きかった。
 5. EP 分解は低濃度の K^+ で促進され高濃度の Na^+ で阻害された。 Na^+ による阻害は K^+ によって一部サプレスされた。EP 分解の速度 $V_o/[EP]$ は次の式で表わされた。

$$\frac{V_o}{[EP]} = \left(\frac{V_o}{[EP]} \right)_{K^+=0} + \frac{18.4/(1+0.043mM/[K^+])}{1 + \frac{[Na^+]}{130[K^+]} + \left(\frac{[Na^+]}{190mM} \right)^2} \quad (\text{sec}^{-1})$$

ここで、 $(V_o/[EP])(V_o/[EP])_{K^+=0}$ は K^+ 非存在下の $V_o/[EP]$ 。

次にステップ 3 の性質と、熱力学的パラメーターが調べられた。

6. 次に記す種々の方法によって求めた K_3 (ステップ 3 の平衡定数の逆数) の値が一致することから、 $E_2 \cdot ATP$ と E^{ADP} 間に平衡が成立していることがさらに支持された。a) $V_o/[EP]$ と k_d の比として、 $1 + K_3$ を計算した。(V_o : 定常状態での ATP 加水分解速度, k_d : EP 形成停止後の EP の一次の減少速度定数) b) EP 形成停止後に遊離される P_i 量と EP 減少量の比から求めた K_3 。c) EP に EDTA + KCl を添加した時、添加初期に見られる急激な EP 減少は $E_2 \cdot ATP$ 側への平衡のずれによると仮定して求めた K_3 。
 7. 十分量の Na^+ が存在し、 K^+ が非存在の時のステップ 3 の ΔH^0 および ΔS^0 の値は、各々、+4~5 Kcal mole⁻¹ および +15~16 エントロピー単位 mole⁻¹ であった。

論文の審査結果の要旨

細胞膜を通しての Na^+ と K^+ の能動輸送が Na^+ , K^+ -ATPase の働きによって起こることは、この酵素の Skou による発見以来多くの研究によって認められるようになった。また ATPase のリン酸化中間体が Na^+ および K^+ の輸送と ATPase の共役反応の鍵を握る中間体であることは金沢ら、Post らの研究によって認められている。

福島君のこの論文は Na^+ , K^+ -ATPase のリン酸化中間体 (EP) の性質を明らかにすることを目的として行なわれた研究をまとめたものである。(1)福島君はまず EP が酵素-ATP 複合体 ($\text{E} \cdot \text{ATP}$) と平衡状態にあることを、EP を形成させた後そのイオン環境を変えるだけで ATP が形成されることから明らかにした。またこの平衡は外から ADP を加えても変わらないので、EP は結合 ADP を含む高エネルギーリン酸結合物、 $\text{E} \cdot \text{ADP}$ 、であると結論された。 $\text{E} \cdot \text{ATP}$ と EP の平衡は他の間接的な方法でも測定された。福島君のこの研究は既にイオン輸送の分子生理学の分野で高い評価を受けている。(2)福島君はこの平衡の温度依存性から、この反応段階のエントロピーとエンタルピーを求めたが、これらの値が運動の荷い手であるミオシンの ATPase 反応における最も重要な段階であるミオシン-ATP 複合体と活性ミオシン-リン酸-ADP 複合体間の平衡の値と一致するという興味ある結果が得られた。この結果は運動と輸送という一見異なった生理機能の分子レベルでの機作が互いに著しい類似性を持っていることを示唆している。(3)福島君は Na^+ , K^+ -ATPase の素反応段階に対する Na^+ と K^+ の作用を速度論的方法を用いて解析した。その結果 Na^+ と K^+ が各反応段階で協同的に作用することが明らかにされた。これは Na^+ , K^+ の能動輸送の分子模型として従来一般的に受け入れられていた Shaw の循環担体模型からの予測とは一致しないものであり、従来の模型を改変する必要があることを示した。

以上のように、福島君のこの論文は Na^+ , K^+ -ATPase の作用機作について生理学的に重要な新しい知見を加えるものであり、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。