



Title	心筋ミオシンBのATPase活性と超沈澱
Author(s)	多田, 道彦
Citation	大阪大学, 1968, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29555
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	多 田 道 彦
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1383 号
学位授与の日付	昭 和 43 年 3 月 28 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文名	心筋ミオシン B の ATPase 活性と超沈澱
論文審査委員	(主査) 教授 阿部 裕 (副査) 教授 吉田 博 教授 中馬 一郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

骨格筋の収縮はミオシンーフィラメントとアクチンーフィラメントとの sliding によって起こり、ミオシンとアクチンと ATP の反応がその際の基本的な分子反応であることがすでに明らかにされている。一方、心筋の収縮に際しても、両フィラメントの sliding の行なわれることが電子顕微鏡観察から示唆されている。そこで、私は心筋収縮機構の問題を分子レベルで考察するために、心筋アクチンーミオシン-ATP 系の反応を ATPase 活性、超沈殿及び電子顕微鏡観察の三面より検討し、さらにミオシンと ATP との反応機構にも検討を加えた。

〔方 法〕

心筋ミオシン（天然アクトミオシン）及びミオシンは、骨格筋に用いられる方法を参考にして、犬心室筋より単離した。ミオシン B の ATPase と超沈殿は、通常 0.8 mg/ml ミオシン B, 0.05 M KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, 20 mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 7.0), 25°C の条件下で行なった。ミオシン B 及びミオシンの ATPase 活性は、ATP が分解して発生した無機磷酸 (Pi) を Martin-Doty 法で定量するか、または発生した ADP を pyruvate kinase (PK) と phosphoenolpyruvate (PEP) を共役させて、pyruvate の発生として定量 (Lu 法) することによって決定し、ミオシン B またはミオシンの単位重量当たり単位時間内に発生した Pi または ADP 量で活性を示した。AT³²P を用いる場合は、発生した ³²Pi を Packard scintillation counter で定量した。ミオシン B の超沈殿は ATP 添加後のミオシン B 溶液の混濁度の変化を Cary 自記分光光度計で測定した。ミオシン B の電子顕微鏡写真は Huxley の方法 (negative-staining 法) を用いて撮影した。

〔成 績〕

電子顕微鏡観察：ミオシン B の二種のフィラメント（アクチン及びミオシンーフィラメント）の相

互関係は、KCl 濃度や ATP 濃度に依存した。KCl 濃度の高い時は、極性をもった所謂 “arrowhead” 構造が見られた。ATP を添加すると、“arrowhead” 構造は消失し、通常のアクチーフィラメントのみが見られたので、上記の構造はアクチーフィラメントに多数のミオシン分子が結合して形成されたものと考えられる。KCl 濃度の低い時は、clearing response の起こるような高濃度の ATP 存在下では、アクチーフィラメントの他に、ミオシンーフィラメントが見られたが、超沈澱の起こるような低濃度の ATP 存在下では、両フィラメントは互いに集合して、大きな凝集物が多数形成された。

超沈澱と ATP ase 活性：ミオシンBの超沈澱と ATP ase の速度は、KCl の比較的低濃度範囲 (0.025—0.075 M) で最大値を示したが、KCl 濃度がそれ以上に増加するに伴って減少し、ある臨界濃度（約 0.15 M）を越えると、超沈澱は起こらなくなり、ATP ase 活性はミオシンそのものの値に殆ど等しくなった。充分量の PK と PEP の存在下では、ミオシン 1 モル当たり約 1 モルの ATP で、ミオシンBの超沈澱は完全に起こった。ミオシンBの ATP ase 活性と超沈澱の速度及び程度は、ATP の比較的低濃度範囲 (1~20 μM) では、ATP 濃度の増大に伴って増大したが、ある臨界濃度以上では、ATP ase の基質阻害及び clearing response が起こった。骨格筋のミオシンBにおいては、このような基質阻害と clearing response は過剰の ATP によってアクトミオシンがアクチンとミオシンとに解離することに基づく現象と考えられているが、心筋ミオシンBの ATP ase の基質阻害はあまり著明でなく、高濃度の ATP による典型的な clearing response に際しても、ATP ase はしばしばアクトミオシン型の高い活性を示した。

さらに、心筋収縮の誘起物質と考えられている Ca[#] の効果について検討した。ミオシンBの ATP ase 活性と超沈澱は CaCl₂ で促進され、EGTA で阻害されたが、ミオシンBの標品調製後の時日の経過とともに、CaCl₂ 及び EGTA に対する感受性は失なわれた。CaCl₂ 及び EGTA* に対する感受性を全く失なった、調製後10~12日目の標品に、活性トロポロミオシンを加えると、その ATP ase 活性と超沈澱は、再び CaCl₂ で促進され、EGTA で阻害されるようになった。

ミオシン ATP ase：ミオシンBの主成分である、ミオシンの ATP ase が、骨格筋のそれと同様に、double-headed enzyme であることを示唆する以下の結果が得られた。ミオシンと ATP との反応初期に、ミオシン 1 モル当たり 1 モルの Pi が急激に発生したが、これは中間体 “磷酸化ミオシン” の形成を示唆すると考えられる。また、定常状態においては、ミオシン ATP ase 反応は Michaelis-Menten の式に従い、その Michaelis 定数は 3.5 μM、最大速度は 2.6 μmoles ADP/g/min. であった。

〔総括〕

1、心筋ミオシンBの二種のフィラメントの形態は生筋の筋原線維のフィラメントと殆ど同じであり、それらのフィラメントの収縮と弛緩に対応した状態を電子顕微鏡で観察することが出来た。

2、心筋ミオシンBの ATP ase と超沈澱の速度は KCl の比較的低濃度範囲で最大値を示した。

3、ATP 再生系 (PK-PEP 系) が存在すると、極く微量の ATP (ミオシン 1 モル当たり約 1 モル) で、心筋ミオシンBの超沈澱は完全に起こった。一方、高濃度の ATP 存在下では、ミオシンBの ATP ase の基質阻害と clearing response が見られた。

4, 心筋ミオシンBの超沈澱と ATP ase 活性は収縮の誘起物質である Ca^+ によって促進されたが、ミオシンBの標品に含まれる活性トロポミオシンが非活化すると、このような Ca^+ に対する感受性は消失することが示された。

5, 心筋ミオシンと ATP との反応初期に中間体『燐酸化ミオシン』が形成されることが示唆された。定常状態のミオシン ATP ase は Michaelis-Menten の式に従った。

論文の審査結果の要旨

筋収縮は生体エネルギー変換という非常に興味ある問題を含んでいる。骨格筋の収縮に関しては、すでに sliding theory を中心とした優れた収縮理論が展開されているが、心筋のそれは骨格筋のアーログとして扱われており、系統的に行なわれた研究は少ない。しかし、心筋の収縮機構の解明は、心筋の生活機能及びその病態を研究する基礎として不可欠の問題である。ここにおいて、筆者はその収縮機構を分子レベルで検討することを目的として、収縮の基本反応と考えられる、心筋構造蛋白質アクチン及びミオシンと ATP との反応を電子顕微鏡、超沈澱現象及び ATP 分解反応の面より解析した。

まず、ミオシンにアクチンが結合する条件を選ぶと、その ATP ase がアクトミオシン型を示し、また両者が解離する条件下では、ATP ase はミオシン型を呈することを示した。第2に、心筋アクトミオシンの ATP ase と超沈澱が、収縮誘起物質である Ca^+ によって促進され、EGTA で Ca^+ をキレートする阻害されることに示した。また、 Ca^+ の効果は、筋原線維の第3の蛋白質、活性トロポミオシンの存在下においてのみ発揮されることを示唆した。第3に、心筋ミオシンによる ATP の分解反応が、ミカエリス中間体を経る単純な加水分解反応と、燐酸化中間体が分解する反応の2経路より成ることを示唆した。

以上のように、この論文は心筋アクチン-ミオシン-ATP 系の性質について新知見を得たものであり、医学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。