

Title	骨格筋アクトミオシン-ATP系の反応機構
Author(s)	木下, 直和
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29685
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	木 下 直 和 きの した なお かず
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 6 3 3 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 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
学位論文題目	骨格筋アクトミオシン-ATP系の反応機構
論文審査委員	(主査) 教 授 阿 部 裕 (副査) 教 授 西 川 光 夫 教 授 吉 田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

骨格筋の収縮の基本となる分子反応は、アクチンと ATP 加水分解酵素であるミオシンと ATP の三者の相互反応であることが既に明らかにされている。そこで、私は筋収縮の分子レベルでの機作を考察するために、既に示されている骨格筋ミオシン-ATP 系の反応機構について、新たに反応生成物の速度論的解析と化学修飾とから検討を加え、新しい反応経路を明らかにした。さらにこの反応経路とアクトミオシン型 ATPase 及び超沈殿との関連性についても検討した。

〔方 法〕

ミオシン及びF-アクチンは成熟家兎の骨格筋から単離した。ミオシンの p-Nitrothiophenol (NTP) による化学修飾は、ミオシンを 2 mM ATP, 10 μ M MgCl₂, 0.6MKCl, 50mM Tris-maleate 緩衝液 (pH 6.5), 25°C の条件で、2 mM NTP と 15~120分間反応させて行った。ミオシン ATPase の測定には、ATP 分解により発生する無機磷酸 (Pi) を、反応を適当な時間々隔で 5%トリクロル酢酸 (TCA) により停止後 Martin-Doty 法で定量し、ADP の発生はミオシン-ATP 系に pyruvate kinase 系を共役させて pyruvate の発生として定量した。また H⁺ の発生は、pH 8.2 附近で pH 指示薬としてクレゾール赤を用い 570m μ 附近の吸収変化を、rapid mixing chamber を用いて stopped flow 法により測定した。再構成アクトミオシンの ATPase はミオシンと同様の方法で Pi 発生を測定し、ATP による超沈殿はアクトミオシン溶液の濁度の測定により観察した。

〔成 績〕

1) ミオシンに ATP を添加したとき、反応が定常状態に達する前に非常に速かな TCA 不安定性 Pi (考察の項参照) の発生が見られた。その速かな Pi 発生 (initial-burst) 量は、高イオン強度で室温の条件では MgCl₂ 濃度に強く依存した。即ち、MgCl₂ 濃度が 1mM 以上のときはその値はミ

オシン 1 モル当り 1 モルであり, $MgCl_2$ 濃度を 1mM より低下させたとき initial-burst 量は次第に増加して, 約 $10\mu M MgCl_2$ 存在下で最大値 $10\sim 20$ モル/モルミオシンとなった。 $MgCl_2$ 濃度をさらに低下させるとその値は減少し, 1mM EDTA 存在下では 0 となった。この低濃度 (1mM 以下) の $MgCl_2$ 存在下での, stoichiometric initial-burst を越える多量の Pi の initial-burst を以後 extra-burst と呼ぶ。extra-burst はミオシンの活性断片においても観察された。

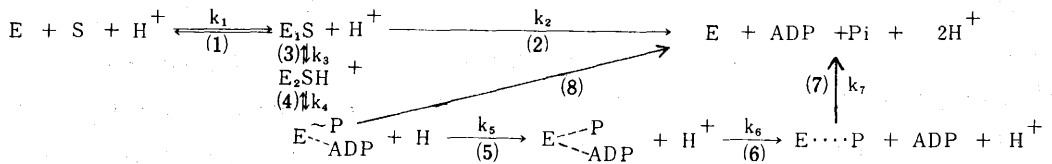
2) Pi の extra-burst と同時に, Pi よりもミオシン 1 モル当り 1 モルだけ少い量の遊離の ADP の速かな発生が見られ, また多量の H^+ の速かな発生も伴った。

3) 高濃度 $MgCl_2$ 存在下での stoichiometric initial-burst の完了後に EDTA を添加して遊離の Mg^{++} 濃度を低下せしめても, extra-burst はおこらなかった。この実験と同じ濃度の $MgCl_2$ と EDTA をはじめから共存せしめたときには, extra-burst が観察された。

4) extra-burst のおこっている条件でミオシンを NTP により修飾した。ミオシン 1 モル当り約 2 モルの NTP 結合によって, extra-burst は完全に阻害された。しかし stoichiometric initial-burst はほぼ完全に残っており, 定常状態 ATPase 活性も影響されず, F-アクチンとの結合能も保たれていた。この NTP-ミオシンと F-アクチンとから再構成したアクト-NTP-ミオシンは ATP による超沈殿をおこさず, その ATPase 活性はミオシンと F-アクチンの結合があまり強くない条件では対照と比して少しく抑制されていたが, 両者の結合が非常に強い条件にするとその抑制が非常に顕著になった。

〔考 察〕

ミオシンの Mg^{++} -ATPase の反応機構は従来より, 下式 (但し(8)の経路を除く) で示されている。即ち, ミオシンは ATP を単純な加水分解 ((2)を経る) と, リン酸化中間体 $E\sim P_{ADP}$, $E\cdots P_{ADP}$, $E\cdots P$ を経る ((3)→(7)) 経路との 2 経路で分解する (E: ミオシン, S: ATP)。この各反応段階の速度定数は, 高イオン強度, かつ 1mM 以上の Mg^{++} 存在下では,



$k_1, k_3 \gg k_4, k_5 \gg k_2, k_6 \gg k_7$ であることも示されている。上述の 1mM 以上の $MgCl_2$ 存在下での Pi の stoichiometric initial-burst は, ミオシンと ATP の反応で速かに生じた中間体 $E\sim P_{ADP}$ が TCA に不安定で分解されることに由来し, その後に続く定常状態の ATPase は主に ATP の単純分解によることが示されて来た。また, F-アクチンにより $E\cdots P_{ADP}$ の分解が非常に促進され, アクトミオシン型 ATPase といわれる高い ATPase 活性が発現することも示されて来た。

ところで, 本研究で見出された低濃度 $MgCl_2$ 存在下での extra-burst の現象を含む Mg^{++} -ATPase の種々の性質を説明するには, 従来の反応機構では必ずしも充分ではない。そこで, 私は中間体 $E\sim P_{ADP}$ が非常に反応性に富み, 従来の分解経路の他に直接 $E + ADP + Pi + H^+$ に分解される経路が

あると仮定し（その経路を上式の(8)で示す）、 k_5 と k_8 の関係が 1mM 以上の Mg^{2+} 存在下では $k_5 \gg k_8$ 、 1mM 以下の Mg^{2+} では $k_5 \simeq k_8$ になるものと仮定すると、種々の濃度の Mg^{2+} 存在下での実験結果がよく説明出来ることを見出した。即ち、 1mM 以上の Mg^{2+} では $k_5 \gg k_8$ であるので経路(8)は殆んど反応に関与せず、stoichiometric initial-burst が前述の反応機構でおこる；他方、 1mM 以下の Mg^{2+} では $k_5 \simeq k_8$ となるので、 $E \sim \overset{P}{\text{ADP}}$ の一部は少しく反応性の低い $E \cdots \overset{P}{\text{ADP}}$ に変換されるが、残部は直接 $E + \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$ に分解され、生じた E は再び ATP と反応して $E \sim \overset{P}{\text{ADP}}$ を形成する；この $E \sim \overset{P}{\text{ADP}}$ を経るすみやかな ATP 分解反応は全ての間体が $E \cdots \overset{P}{\text{ADP}}$ に変換されるまで続く。従って低濃度 Mg^{2+} 存在下では stoichiometric initial-burst の他に extra-burst がおこるのである。

P_i の extra-burst に遊離の ADP と H^+ の速かな発生が伴い、また高濃度 Mg^{2+} 存在下で $E \cdots \overset{P}{\text{ADP}}$ が $E \sim \overset{P}{\text{ADP}}$ に変換された後では Mg^{2+} 濃度を低下させても extra-burst がおこらなかったことは、この反応機構を支持する。さらに、extra-burst のおこる条件でミオシンの NTP 化が可能で、それにより extra-burst のみが選択的に阻止されたことも、この経路(8)の存在を裏づける。

この様に NTP 化で extra-burst のみを完全に阻止したミオシンを用いて再構成したアクト- NTP -ミオシンでは、その ATPase 活性と超沈殿が抑制或いは阻止された。この結果は、以前我々が行ったアクトミオシンと ATP の反応に関する 2, 3 の検討結果とも併せ考えると、一般に筋収縮に共役するとされているアクトミオシン型 ATPase や筋収縮のモデルと考えられている超沈殿が、 $E \cdots \overset{P}{\text{ADP}}$ を経る ATP の速かな直接分解反応の繰り返し ((1)→(3)→(4)→(8)→(1)) によっておこっていることを示唆している。

〔結 論〕

- 1) ミオシンの Mg^{2+} - ATPase の種々の性質が、従来のミオシン- ATP 系の反応機構に、新たに上式の(8)の経路を加えた新しい反応機構でよく説明される。
- 2) この(8)の経路を経る速かな ATP 分解反応が、アクトミオシン型 ATPase と超沈殿に関与していることが示唆される。

論文の審査結果の要旨

本論文では、筋収縮機構の解明のため、家兎骨格筋の収縮性蛋白質アクチン、ミオシンならびに ATP の三者の反応が検討された。その結果、筋収縮に直接共役すると考えられているアクトミオシンの ATPase ならびに *in vitro* の筋収縮モデルとされているアクトミオシンの超沈殿の発現に関与するミオシン ATPase の新しい反応経路が見出され、さらにその反応機構も提出された。これらは極めて有意義と考えられる。