

Title	ミオシンATP aseの活性中心に関して : ジアゾ-1H-テトラゾールによる化学修飾
Author(s)	島田, 隆道
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29715
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	島 田 隆 道 しま だ たか みち
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 1 6 0 9 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	理 学 研 究 科 生 理 学 専 攻 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
学位論文題目	ミオシン ATP ase の活性中心に関して ——ジアゾ-1H-テトラゾールによる化学修飾——
論文審査委員	(主査) 教 授 殿 村 雄 治 (副査) 教 授 神 谷 宣 郎 教 授 奥 貫 一 男

論 文 内 容 の 要 旨

ミオシン ATP ase の活性中心の化学的性質を知ることは筋収縮機構を分子レベルで理解するのに非常に重要なことである。ミオシンの各々の機能に含まれる活性基をより直接的に決定する方法として化学修飾がある。

今までに多くの人々により試みられ、2種類のSH基(修飾されると不活性化をおこす基と、活性化をおこす基の)がミオシン ATP ase の活性中に存在することが知られ、lys基が活性中心に含まれることが Kubo, Tokuyama らにより報告され、さらに His 基活性中心近傍に存在することが Sekiya らにより報告されている。また、Tyr 基のミオシン ATPase の活性中心での関与の可能性がH-メロミオシン-ATP系の紫外吸収の研究(Sekiya ら, Morita)とATP類似物質とアクトミオミン系の反応の研究(Tonomura ら)から暗示された。しかしながらミオシンの Tyr 基の化学修飾はまだ行なわれていない。最近 Horinishi らにより Diazo-1H-tetrazole(DHT)が蛋白の His 基と Tyr 基に特異的に反応して、有色の mono azo- と bis azo- 生成物をつくり、分光法により定量できることが示された。そこで、DHT 修飾によりミオシン分子中の Tyr 基の役割について検討した。

〔材料及び方法〕

ミオシンはうさぎの骨格筋から perry の方法を部分的に改良して調製した。H-メロミオシン(HMM), L-メロミオシン fr. 1 (LMM fr. 1) は Szent Györgyi の方法で調製した。DHT 修飾は 0.5M KCl を含む 120 mM bi Carbonate buffer (pH 8.8) 中で行い、透析により蛋白に結合していない DHT を除いた。修飾をうけた His と Tyr 基は分光法で定量した。蛋白濃度はビュレット反応と屈折率の測定より求めた。ATPase 活性は TCA で反応を止めた後 Martin Doty 方法により測定した。

〔結果及び考察〕

1) ミオシンの DHT 修飾と SH 基

DHT 修飾したミオシンの ATP ase 活性の測定から SH 基が DHT と反応していることが暗示されたので、DHT 修飾したミオシンの SH 基を Boyer の方法で測定したところ、多くの SH 基が消失していた。ミオシンの SH 基をジチオジプロピオン酸 (DPA) で block したミオシンとしないものについて DHT 処理したミオシンの吸収曲線を求めた。SH 基を block しないものでは、DHT 処理により $320\text{m}\mu$ に強い吸収帯がみられ、この吸収は Cysteine を DHT 処理した時の吸収と一致する。他方、SH 基を block したものでは、この吸収はみられなかった。従って SH 基の修飾を防ぐために、まず SH 基を可逆的に block することが必要である。

2) ミオシンの SH 基の blocking とその可逆性

ミオシンの SH 基を S-S 結合に変えることによる blocking を試みた。試薬として、ジチオグリコール酸ジメチルエステル (DGM), と DPA を用いた。DPA の場合、生物活性の回復が不完全であったので、DGM を主として用いた。DGM はミオシンの SH 基と非常に良く反応した。ミオシン (15mg/ml) を 0.5M KCl , 50mM Tris-HCl (pH 8.8) で SH 量の10倍量の DGM と50時間反応させた。Ca⁺⁺-ATP ase 活性は完全に失活した。この時、ミオシンの SH 基はミオシン 1 モル ($4 \times 10^5\text{g}$) 当り 2ヶを残して block された。この DGM 処理ミオシンを 0.5M KCl , 50mM Tris-HCl 中でミオシンの SH 基の400倍の β -メルカプトエタノール (β -ME) と pH 9.3 で、又100倍量のジチオスライトール (DTT) と pH 8.8 で20時間反応させることにより、Ca⁺⁺-ATP ase 活性は完全に回復し、その他の生物活性も又回復した。ミオシンの SH 基は未処理ミオシンの74%に回復した。

DGM によるミオシンの SH 基の blocking は β -ME 又は DTT で非常によく、生物活性を回復することがわかった。この処理をしたミオシンを以下 control ミオシンと言う。

3) DGM 処理ミオシンの DHT 修飾

DGM 処理ミオシンがいろいろの濃度の DHT で処理され、そして β -ME 処理すると、DHT 濃度をまずにつれ、Ca⁺⁺-ATP ase と Mg⁺⁺-ATP ase 活性が減少した。PCMB 滴定される SH 基の量は DHT 修飾によりほとんど減少は見られず、control ミオシンと同じであった。又この ATP ase 活性の阻害は lys 基の DHT 修飾による可能性は、Tokuyama らにより報告されているように、ミオシン ATP ase 活性中心近くに存在する一つの lys 基を修飾すると高 KCl 濃度で、Mg⁺⁺-ATP ase の活性化がみられることから、ほとんど考えられない。mono azo-His の吸収帯は (pH 10.0 で $360\text{m}\mu$) 観察されなかった。さらに、Bis azo-His, bis azo-Tyr も Ca⁺⁺-ATP ase 活性が完全に失活した時において、ほとんどみられなかった。他方、ATP ase 活性は mono azo-Tyr の量に比例して減少し、ミオシン当りほぼ 1 モルの mono azo-Tyr の形成により完全に失活した。なお DGM 処理ミオシンを基質 (Mg-ATP) 存在下で DHT 修飾したものではかなりの ATP ase 活性が残っており、又 mono azo-Tyr の量も Mg-ATP なしで処理した時より、いくぶん少なかった。

さらに azo-ミオシンのトリプシン分解により得た azo-HMM の吸収曲線は azo-ミオシンに見られる $320\text{m}\mu$ の吸収が完全に消失し、SH 基は intact であった。ただ mono azo-Tyr のみが含まれていて、その量は蛋白当りにして、もとの azo-ミオシンに含まれると同じだけ含まれていた。その Ca⁺⁺-ATP ase 活性はもとの azo-ミオシンと同じように失活していた。

又 azo-ミオシン, azo-HMM に強く結合している低分子量蛋白 (globular subunit) をアルカリ処理 (pH 11.1) 法とサクシニル化法で分離したところ, g-subunit を含まない fibrous subunit に本質的にもとの azo-ミオシンと azo-HMM に含まれると等量 mono azo-Tyr のが含まれていた。

これらのことからミオシン 1 モル当り, 1 モルのモノアゾ-Tyr の形成に伴い, ATPase 活性の消失がみられ, その mono azo-Tyr がミオシン分子内の HMM 部分を構成する f-subunit に局在することが結論される。ミオシン 1 モル当り 1 モルの活性中心を含むことはすでに Tokuyama らにより報告されている。又最近, Ohe らも同じ結果を得ている。

しかしながら, azo-ミオシンの旋光分散法で求められたヘリックス含量は control の 93% で, HMM を DGM, DHT, DTT 処理すると, かなりの量の蛋白が 0~43% 飽和硫酸で沈澱した。この区分の azo-HMM のヘリックス含量は control HMM の 75% であった。他方, LMM fr. 1 はこれらの処理により, ヘリックス含量の変化はほとんどみられなかった。これらのことから, ミオシン分子内の HMM 部分の Conformation change が Tyr 基の DHT 修飾によりおこることも考えられる。

一方, HMM-ATP 系の紫外吸収の研究と ATP 類似物質とアクトミオシン系の反応の研究から, ATP のプリン塩基と Tyr 基の結合の可能性が示されている。

上のようなことから, ミオシン分子内の HMM 部分の特異的に DHT 修飾をうける, 1 ケの Tyr 基がミオシン ATPase 活性の中心又はその近傍に含まれることが結論される。

4) DHT 修飾によるミオシンのフィラメント形成能の変化

ミオシンの Tyr 基が 2~3 ケジアゾ化されると低塩濃度下で可溶性となった。そこでミオシンの溶解性に関して検討するため, ミオシンの代りにこれと同じ塩溶解性をもつ LMM fr. 1 を用いて実験した。LMM fr. 1 を DGM で処理して SH 基を block したのち, DHT 処理をし, そして, β -ME 処理をした。DHT による SH 基と His 基の修飾はほとんどみられず, LMM fr. 1 は mono azo-Tyr の形成に比例して可溶性となった。そして, LMM fr. 1 1 モル当り 1 モルの Tyr 基が修飾されると低塩濃度で完全に可溶性となった。この時, control. LMM fr. 1 で電顕的に観察されるフィラメント構造も消失した。なお, この時, LMM fr. 1 の旋光分散法により求めたヘリックス含量は control のものと変わらず, 又沈降定数は低塩濃度 (0.04M KCl) においても, 高塩濃度 (0.5M KCl) においても変化せず, もとの LMM fr. 1 と同じであった。即ち azo-LMM fr. 1 は低塩濃度においても重合しないことを示していた。これらのことから, LMM fr. 1 当り, 1 モルの Tyr 基が DHT 修飾をうけた時, 低塩濃度においても可溶性に変化し, LMM fr. 1 の相互作用は消失し, フィラメント形成能がなくなるものと考えられる。

《ま と め》

1) ミオシンを DHT 修飾することにより, ATPase 活性の低下がみられた。DHT による SH 基の修飾はあらかじめ, SH 基を blocking することにより除去された。リジン, ヒスチジン基の修飾による可能性も除かれ, ミオシン 1 モル当り, 1 モルの mono azo-Tyr 基の形成で完全に失活した。この mono azo-Tyr 基は HMM に含まれ, さらに f-subunit に含まれていた。しかしながら, DHT 修飾により, myosin の HMM の部分の構造変化がみられた。これらのことより, ミオシンの HMM 部分に含まれる 1 つの特異的 Tyr 基が ATPase 活性の中心又は中心近傍に含まれることが結論づ

けられた。

2) ミオシン1モル当り2~3モルの Tyr 基を修飾することにより、ミオシンが低塩濃度において可溶性となったが、ミオシンと同じ塩溶解性をもつ LMM fr. 1 は1モル当り1モル Tyr 基が DHT 修飾をうけ可溶性となりそのフィラメント形成能を消失した。この LMM fr. 1 に含まれる特異的 Tyr 基がフィラメント形成にかなり重要な働きをしているものと思われる。

論文の審査結果の要旨

島田君の論文は、筋肉の構造蛋白質としても最も重要なミオシンの diazonium-1 H-tetrazole (DHT) による化学修飾についての研究をまとめたものである。

島田君はまずミオシン1モル当り1モルのチロシンが DHT と特異的に反応すると、ミオシン-ATPase が完全に消失することを示した。さらにミオシンを蛋白質分解酵素によつて分解してフラグメントを取り出す等の方法を用いて、DHT と反応する上記のチロシンが ATPase を含むフラグメントに存在すること、このチロシンと DHT の反応が Mg-ATP によってかなりの程度保護されることを明らかにした。この島田君の研究と、従来から知られていたミオシン1モル当り1モルの ATP の結合によってチロシンの吸収が変化するという結果によってミオシン-ATPase の活性中心にチロシンが含まれていることは略々確かになった。

島田君はまたミオシン1モル当り2~3モルのチロシン残基が DHT で修飾されることによってミオシンが低濃度の塩溶液においても可溶性となることを見つけた。そこでミオシンと同じ溶解性をもつミオシンのフラグメント、L-メロミオシン³フラクシオン1、(L-MM, fr. 1) の DHT による修飾を試み、L-MM, fr. 1 1モル当り1モルのチロシン残基が DHT と反応すると水に可溶性となり、ミオシンが生理機能を発現するのに重要なフィラメント形成能を消失することを見つけた。この研究は生体の微細形体の形成の機構を明らかにするのに化学修飾が有用なことを示した点で高く評価される。

以上のように、島田君の論文はミオシンのチロシン残基がミオシンの2つの重要な生理機能、すなわち ATPase 活性とフィラメント形成の両者に必須の基であることを初めて示した点で筋生理学に貢献するものと思われる。従って、この論文は理学博士の学位論文として十分に価値があるものと認める。