OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ミオシンのリン酸化と筋収縮
Author(s)	中村, 浩
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29717
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

【18】

氏名・(本籍)	中村(なかむら)　浩(ひろし)
学位の種類	理学博士
学位記番号	第1615号
学位授与の日付	昭和44年3月28日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ミオシンのリン酸化と筋収縮**
論文審査委員	(主査) 教授 殿村　雄治 (副査) 教授 奥貫　一男　教授 佐藤　了

論文内容の要旨

筋収縮はミオシン-アクチン-ATP 系の反応で起ることは Szent-Györgyi をはじめとする多くの人々の研究によって一般に認められている。また，Huxley らは筋原繊維の収縮がミオシンフィラメントへのアクチンフィラメントのもぐりこみ (sliding) で起るとする結果を得，このもぐりこみは両フィラメントの結合点と ATP との相互作用によるとしている。しかし，収縮の際にこれらの蛋白質のフィラメントで起る変化の分子機構についてはまだ未解決の点が多い。殿村らにより，ミオシンが ATP によりリン酸化されることが筋収縮に必要であり，このリン酸化ミオシンのF-アクチンによる分解の促進が，いわゆるアクトミオシン型の ATPase に対応していることが示されている。

そこで，筋収縮の機構を分子レベルで理解するためには，ミオシン-ATP系の反応機構，特にATPによるミオシンのリン酸化中間体形成の反応機構を明確にすることが必要であり，あわせてミオシンとF-アクチンが一定の規則的な配列をしている筋原繊維の ATPase（アクトミオシン型 ATPase）による ATP 分解と収縮量の関係を明らかにすることは重要であると考えられる。この論文ではこれらの点を考慮に入れ，以下に述べる3つの実験を行い，これらの実験結果に基づいて筋収縮におけるリン酸化ミオシン中間体の重要性を，筋原繊維の収縮に共役したアクトミオシン型の ATPase による ATP 分解に関係づけ検討した。

1. 〝活性ミオシン-リン酸結合物〟と ATP 間のリン酸交換反応

ミオシン-ATPase の反応機構の解析から，下のスキームで示されるようにミオシン（E）は ATP (S) を二つの経路，すなわちミカエリス中間体 (ES) の単純加水分解の経路と活性ミオシン-リ

$$E + S \rightleftarrows ES \rightarrow E + ADP + Pi$$
$$\downarrow$$
$$EP \cdots (ADP)$$

ン酸結合物（EP）を経る経路で分解することはすでに明らかにされている。

EP は反応初期にミオシン1モルあたり1モル形成され TCA 不安定性であることはすでに示されているが，この結合物においてリン酸がミオシンと共有結合で結合しているとすべき明確な証拠はなかった。

そこで，(γ-^{32}P) ATP と EP との間のリン酸交換反応が調べられた。2.8 M KCl, 10 mM $MgCl_2$ 存在下 0°C での ATP 添加後30～60秒における全 EP 中の ATP とリン酸交換反応をし得る中間体の割合を測定したところ15～20%であった。全 EP 中のこのリン酸交換反応をするものの割合は KCl 濃度を下げると減少した。すなわち 1.1 M KCl 中ではこの割合いはミオシン標品によってかなり変動し，0～10%の範囲にあった。しかし，反応温度を 0° から 15°C に上げても，また 0.1 mM $CaCl_2$ を加えても，あるいは 0.1 mM EGTA を加えてこの系から Ca^{2+} を除いても交換量はほとんど変化しなかった。

さらに，1.1 M KCl 中で EP-ATP 間のリン酸交換反応の認められない標品を用いて EP の寿命を測定した。その結果，上記条件下では EP の分解速度は ES の単純加水分解の速度の約 1/5 であることが示された。

2. アクトミオシンの超沈殿にともなうアクチンに結合したヌクレオタイドの交換反応

〝活性ミオシン-リン酸結合物〟（EP）の形成がアクトミオシン型の ATPase 活性とアクトミオシンの超沈殿とに必要であることはすでに明らかにされている。最近，A.G. Szent-Györgyi らは F-アクチンに結合した ADP がアクトミオンの超沈殿に伴って溶媒中のヌクレオタイドと交換されることを見い出した。この交換反応が，F-アクチンに結合したヌクレオサイドニリン酸に EPからリン酸が転位されヌクレオサイド三リン酸が形成された結果起るかどうかは，アクトミオシン系での EP の関与する反応機構を明らかにする上で興味のある問題である。もし上記のようにヌクレオサイド三リン酸が形成されるとすれば，F-アクチンに (^{14}C) ADP あるいは (^{14}C) IDP をあらかじめ結合させておいて交換反応を行なわせると，一部は ATPase の作用で分解されるにしても溶媒中に (^{14}C) ATP あるいは (^{14}C) ITP が検出されるはずである。そこで，アクトミオシンの超沈殿が起る条件下，すなわち低イオン強度，Mg^{2+} の存在下で F-アクチン-(^{14}C) ADP-ミオシン-ATP 系と F-アクチン-(^{14}C) IDP-ミオシン-ATP 系の双方を用いてヌクレオタイドの交換反応を調べた。その結果，F-アクチンに結合した (^{14}C) ADP あるいは (^{14}C) IDP は反応溶液中のヌクレオタイドとヌクレオサイドニリン酸の形で交換し，〝活性ミオシン-リン酸結合物〟（EP）におけるリン酸の受容体となっていないことが明らかとなった。

3. 分離された筋原繊維フラグメントの ATP 分解と収縮

アクトミオシン型の ATPase がグリセリン処理筋の ATP による収縮に必要であり，収縮力は ATP の分解速度に比例することが Weber らによって示されている。

そこで，生筋におけるのと似かよったイオン環境下，すなわち低イオン強度で Mg^{2+} 存在下で筋原繊維フラグメントのアクトミオシン型 ATPase 活性（EP を経る ATP の分解）と，あわせて ATP 添加後筋原繊維の I-band が消失するのに要する時間を測定した。チキンの胸筋，ウサギの脚の赤筋，および背の白筋から得た筋原繊維フラングメントの ATPase 活性はあまり差が認められず，例

えば 15°C においては約 100 μ moles ATP 分解/g. 蛋白. min 前後であった。

最後に，これら3つの実験に基づいて，〝ミオシン-リン酸結合物〟(EP) の形成の重要性を筋原繊維の収縮に共役したアクトミオシン型 ATPase による ATP 分解と関連させ検討した。

論 文 の 審 査 結 果 の 要 旨

筋収縮における最も重要な生化学的反応が筋構造蛋白質ミオシンと ATP の反応であることは一般に認められている。最近になってミオシンによる ATP の加水分解反応は直接 H_2O かミカエリス中間体に反応する単純な加水分解と，APT によってミオシンがまずリン酸化され，このリン酸化中間体が分解する反応の2経路により成っていることが明らかにされた。

中村君の論文は，このようなミオシン-ATP 系の反応機作をより明らかにすることを目的としたものである。同君は γ-^{32}P-ATP とリン酸化ミオシン中間体との間のリン酸交換反応を巧妙な方法を用いて証明した。さらにリン酸化ミオシン中間体の寿命の測定を行い，ミオシンによる ATP の分解が2つの経路を経て起ることにより確かにした。

同君は，また筋収縮においてミオシンとともに重要な働きをしている F-アクチンの作用に関係して，ミオシンのリン酸化中間体が F-アクチンに結合している ADP にリン酸を受け渡す可能性が考えられていたが，この可能性を検討し，否定した。さらにこのリン酸化ミオシン中間体の分解は F-アクチンにより促進されアクトミオシン型の ATPase 活性を発現することが示されているが，このアクトミオン型の ATPase による ATP の分解量は筋原繊維の収縮した長さに比例するとする結果を得た。

以上のように中村君の論文はミオシンと ATP 反応について新しい重要な知見を加えたもので筋収縮の生化学に貢献するところも大きい。従って理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。