Osaka University Knowledge Archive

Title	骨格筋弛緩因子のATP ase反応機構
Author(s)	山本, 泰望
Citation	大阪大学, 1969, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29718
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【22】

氏名・(本籍)	山本泰望（やまもとたいぼう）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 1619 号
学位授与の日付	昭和44年3月28日
学位授与の要件	理学研究科生理学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**骨格筋弛緩因子の ATPase 反応機構**
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治 (副査) 教授 神谷 宣郎 教授 本城市次郎

論文内容の要旨

兎骨格筋より抽出した筋弛緩因子 (S. R) に於ける Ca^{++} の能動輸送の機構を解明するためにそれと密接な関連を持つ SR-ATPase の速度論的研究を試み，以下のような結果を得た。

単離された SR の Ca-uptake 能は反応液中から oxalate を除くと著しく低下する。しかし，それにもかかわらず ATPase の Ca^{++} による活性化は oxalate 存在下での Ca^{++}-uptake に伴う ATPase 活性 (extra-ATP splitting)とほぼ等しかった。又，同様の現象は Triton 100x を微量反応系に加えると oxalate 存在下に於いても観察された。これらのことは SR-ATPase の Ca^{++} による活性化が膜の外側で生じていることを示めした A. Weber や Hasselback 及び Makinose 等の実験結果を支持している。EGTA (Ethylene glycol bis-(β-aminoethyl ether)-N. N′-tetraacetic acid) を反応液中に加え Ca^{++} を除くと SR-ATPase 活性は著しく低下するが，EGTA 濃度 0.1mM 以上ではその活性は変らなかった。高濃度 EGTA 存在下での ATPase 活性を basic ATPase 活性と呼び，一方，ATPase 総活性から basic ATPase 活性を差引いた値を Ca-dependent ATPase 活性の値とした。Ca^{++}-dependent ATPase の ATP 濃度依存性を ATP の広い濃度領域で測定した結果，ATP 濃度の低い領域 (1～30 μM) と高い領域 (0.1～1 mM) とで顕著な差が認められた。そこで kinetics はこの二つの領域で各々行なわれた。SR-ATPase の外液 Ca^{++} 濃度依存性は Mg^{++} 濃度を 0.5～5 mM と変えても影響が見られなかつた。このことは Mg. ATP complex が ATPase の真の基質であることを示めしていると考えられ，以下の実験では反応液中の Mg^{++} 濃度を 3 mM 或いは 5 mM に固定した。低基質濃度領域での Ca-dependent ATPase に関する kinetics の結果，Ca^{++} の低い濃度領域での Ca^{++}-dependent ATPase 活性 (v) の外液 Ca^{++} 濃度及び ATP 濃度依存性は下記の式で与えられた。

$$v = \frac{V}{1 + \frac{\phi_2}{[Ca]} + \frac{\phi_1 \phi_2}{[Ca]\,[ATP]}} \qquad (1)$$

ϕ_1, ϕ_2 は各々 ATP 及び Ca^{++} に関する常数でその値は 5 μM 及び 0.4μM となった。又，最大速度（V）は約 0.2μ moles Pi/mg. min が得られた。

Ca^{++} 濃度を 10μM 以上に高めると ATP ase 活性は阻害され，他方，この阻害は ATP 濃度を高めることによって回復した。高 Ca^{++} 濃度領域での Ca^{++}-dependent ATP ase 活性（v）の Ca^{++} 及び ATP 濃度依存性は

$$v = \frac{V}{1 + \phi_3 [Ca] + \phi_4 \frac{[Ca]}{[ATP]}} \qquad (2)$$

で表わされた。従がって Ca^{++} の全濃度領域での ATP ase 活性の Ca^{++} 及び ATP 濃度依存性は

$$v = \frac{V}{1 + \frac{\phi_2}{[Ca]} + \frac{\phi_1 \phi_2}{[Ca]\,[ATP]} + \phi_3 [Ca] + \frac{\phi_4 [Ca]}{[ATP]}} \qquad (3)$$

で示めすことが出来る。

一方，高基質濃度領域で Ca^{++}-dependent ATP ase の Ca^{++} 及び ATP 濃度依存性を調べた結果，外液 Ca^{++} 濃度の低い領域では反応速度（v）は

$$v = \frac{V}{1 + \frac{\phi_2}{[Ca]} + \frac{\phi_1 \phi_2}{[Ca]\,[ATP]}} \qquad (4)$$

となり，低基質濃度領域で得られた実験式と全く同じであることが判った。しかし高基質濃度領域での，ϕ_1, ϕ_2 及び V の値は各々 160μM, 0.13μM 及び 0.5μ moles Pi/mg. min となり低基質濃度領域での値に比べ著しい相違が認められた。しかしながら，両基質濃度領域で Ca^{++}-dependent ATP ase の温度，pH, NEM 処理の影響を調べた結果，両者の間にはほとんど差異が認められなかった。以上の実験結果から，Km の異なる二つの Ca^{++}-dependent ATP ase は元来同一の酵素で，ATP 濃度の高い領域では ATP がこの酵素の基質として作用する他になんらかの effector として作用しているものと結論された。

Hasselbach と Makinose は SR の Ca^{++}-uptake 時に見られる extra-ATP 分解に伴い著しい ATP-ADP 交換反応を観察した。彼等はこの実験結果から SR の extra-ATP 分解反応中に燐酸化中間体が形成されることを示唆した。そこで γ-^{32}P ATP を用いて SR への ^{32}P のとり込みを調べて見た，その結果，Ca^{++} 存在下で SR を γ-^{32}P ATP と共に incubate し，反応を 5 % TCA で止めると，SR への著しい ^{32}P のとり込みが観察された。P のとり込み（以下 E-P と云う）は反応開始後数秒で最大となりその値は pH7 付近で 6 moles P/10^7g SR Protein と計算された。EP 量は外液の Ca^{++} 濃度に depend し 10μM 以下の Ca^{++} 濃度領域では Ca-dependent ATP ase の [Ca^{++}] 存在性とほぼ一致した。又，EP 量は外液の ATP 濃度に depend し，Ca-dependent ATP ase の基質濃度依存性と平行関係を示めした。Ca^{++} 存在下で形成される TCA stable EP が SR の Da-dependent ATP ase 反応の真の中間体であるか否かを明きらかにするため EP 分解及び形成に対する pH の影響を調べ steady state での Ca^{++}-dependent ATP ase の反応速度との比較を行なった。EP 量は pH

を上げるにつれ著しく増加し pH8.5 以上で最大値となった。一方，ATPase 活性は pH7 付近に極大を持つベル型の pH-activity 曲線を示めした。ATPase 活性を EP 量で割った値 (v/EP) を対数で各 pH に対して plot すると pH7 付近で交じわる直線が得られた。即ち pH7.2 以下では v/EP ratio は一定になるが pH 7.5 以上では H^+ の濃度に depend した。この結果から，EP の分解には pK7 付近のある functional group が関与していると予想される。一方，EP 形成後，反応液中に多量の EGTA を加えると，急激な EP の分解が見られた。EP 分解速度は pH を高めるにつれて遅くなった。こうして測定した EP 分解の速度常数は kinetical な方法 (v/EP ratio) から求めた値とよく一致した。又，EP 形成速度常数が pH に依存しないと仮定した時の EP 量の pH 依存性を示めす理論曲線は実測値 EP の pH 依存性とも一致した。以上の実験結果及び考察から，Ca^{++} 存在下で形成される TCA-stable EP が SR の Ca^{++}-dependent ATPase 反応に於ける真の中間体であることが強く示唆された。前述の kinetics より得られた結果及び EP 実験から得られた結果とから，SR の Ca^{++}-dependent ATPase の反応は下記の如く表わすことが出来る。

$$E + S \overset{K_1}{\rightleftarrows} ES$$

$$ES + Ca \overset{K_2}{\rightleftarrows} ESCa$$

$$ESCa \underset{k_{-3}}{\overset{k_{+3}}{\rightleftarrows}} EP + Ca + ADP$$

$$EP \overset{k_{+4}}{\rightarrow} E + Pi$$

$$EP + Ca \overset{K_5}{\rightleftarrows} EPCa$$

$$E + 2Ca \overset{K_6}{\rightleftarrows} ECa_2$$

E は SR, S は Mg. ATP, EP は TCA-stable EP を示めし，K 及び k は各 step での解離常数，速度常数を示めしている。これから steady state での Ca^{++}-dependent ATPase の反応速度 (v) の Ca^{++} 及び基質濃度依存性は

$$v = k_{+4} \cdot \varepsilon \Big/ \left\{ 1 + \frac{k_{+4}}{k_{+3}} + \frac{k_{+4}}{k_{+3}} \cdot \frac{K_2}{[Ca]} + \frac{k_{+4}}{k_{+3}} \cdot \frac{K_2 K_1}{[Ca][S]} + \frac{[Ca]}{K_6} + \frac{k_{+4}}{k_{+3}} \cdot \frac{K_1 K_2}{K_5} \cdot \frac{[Ca]}{[S]} \right\}$$

となり，SR ATPase の Ca^{++} 及び ATP 濃度依存性について行なった実験結果をよく説明することが出来る。

反応後，TCA を加えてとり出した EP の化学的性質を調べるために EP の安定性に対する pH 及び Hydroxylamine の影響を測定した。その結果，TCA を加えてとり出した EP は pH4 以下では比較的安定であるがそれ以上の pH 領域では，pH を高めるにつれ著しく不安定となり，燐酸が遊離した。又，この EP は 1M Hydroxylamine によって容易に分解される。pH5.2, 25°C で数分以内に蛋白と燐が完全に遊離した。これらの実験結果は ATP からの P が SR 蛋白へ acylphosphate としてとり込まれることを示唆している。

論文の審査結果の要旨

山本君の論文は筋マイクロソームの Ca^{2+} 依存性 ATP ase の反応機構を明らかにしたものである。この ATP ase は筋の弛緩の基本反応である Ca^{2+} の能動輸送と関係したものとして極めて重要であるにもかかわらず，その反応機構は従来明らかでなかった。そこで，山本君はまず本 ATP ase の反応速度論的研究を試みた。その結果，本酵素 (E) とまず ATP が結合し，その後で Ca^{2+} が結合して E. ATP. Ca^{2+} 結合物が形成され，それに続いて分解反応が起ることが明らかにされた。さらに ATP はこの酵素の基質であるばかりでなく，分解反応の速度の調節因子でもあることが推論された。

山本君は，さらに Ca^{2+} の存在下で筋マイクロソームを γ-^{32}P-ATP と反応させると，蛋白質 10^7g あたり 6 モルの ^{32}P がとりこまれることを発見した。とりこまれたリン酸化蛋白質 (EP) の安定性に対する pH およびヒドロキシルアミンの効果は，燐酸が蛋白質とアシル結合していることを示唆した。同君はさらにこの EP の形成と分解の速度を種々の条件で測定し，それらを定常状態の反応解析から得られた値と比較し，EP が真の反応中間体であることを証明した。これらの研究によって本 ATP ase に対し次の反応機構が提出された。

$$E + ATP \rightleftarrows E.\ ATP$$

$$E.\ ATP + Ca^{2+} \rightleftarrows E.\ ATP.\ Ca^{2+}$$

$$E.\ ATP.\ Ca^{2+} \rightleftarrows E.\ P + ADP + Ca^{2+}$$

$$EP \rightarrow E + Pi$$

山本君の研究は筋弛緩と極めて深い関係にある本 ATP rse の反応機極を明確にし，イオンの能動輸送の分子機構一般に対しても新しい知見を加えたものとして高く評価される。従って同君の論文は理学博士の学位論文として十分に価するものと認める。