OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Na+-K+依存性ATPaseの反応機構
Author(s)	斉藤, 昌之
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30083
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

【5】

氏名・(本籍)	斉藤昌之（さいとう まさゆき）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第1920号
学位授与の日付	昭和45年3月30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	**Na^+-K^+ 依存性 ATPase の反応機構**
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

細胞膜を通して Na^+ と K^+ が濃度勾配に逆って移動する（能動輸送）時に必要なエネルギーは ATP によって供給されているが，このエネルギー転換系は細胞膜に局在している。動物細胞のミクロソーム分画に Na^+ と K^+ によって活性化される ATP 加水分解酵素系が存在することが1957年 Skou によって発見されて以来，この Na^+-K^+ 依存性 ATPase がイオンの能動輸送に直接関っている事が多くの実験結によって示唆されてきた。そこでこの輸送系を ATPase の1つとみなして，その反応機構を Na^+ と K^+ の役割と併せて調べる事は，輸送機構を理解する重要な手段と考えられる。従来多くの研究者によって ATPase 反応の中間体としてリン酸化蛋白質（EP）の存在が提唱されて来た（$E+ATP \rightleftarrows EP+ADP \rightarrow E+Pi+ADP$）。この機構は主に，$\gamma$-labelled $AT^{32}P$ より ^{32}P が，TCA で沈殿する部分にとりこまれ，その量が Na^+ によって増加し，K^+ によって減少する事に依拠している。しかし現在までこれらは大部分定性的にしか調べられていない為，説得力に乏しいものである。本研究はこの点に関して最も直接的な方法を使って検討を加え，反応機構を考察した。即ち，over-all の反応速度〔$ATP \rightarrow ADP+Pi(v_o)$〕と部分反応の速度〔$ATP+E \rightarrow EP+ADP(v_f)$, $EP \rightarrow E+Pi(v_d)$〕を定量的に別々に測定した両者を反応速度論的に比較する事によって反応中間体を明らかにし各素反応の速度定数を決定した。又同時に，Na^+, K^+, ATP の作用についても明確な知見が得られた。

酵素標品として牛脳ミクロソームを NaI で処理したものを使用したが，前述の部分反応の速度は非常に速い為に，通常のピペット技術では測定困難であるので，まず簡単な mixing 装置を，シリンジ，ソレノイド，タイマーを組み合わせて製作し，0,1秒間隔で反応を追跡できるようにした。予め $E^{32}P$ を形成しておいた後，多量の EDTA 又は cold ATP を加えて $E^{32}P$ の生成を止めて，EP 分解の速度（v_d）を測定すると，K^+ 濃度によって著しく変化するが，Na^+

濃度には殆ど影響されなかった。一方 EP 生成の速度（v_f）は，Na^+, K^+ いずれによっても変化し，特に ATP 濃度が高くなると予想されるよりはるかに速くなり測定不可能となった。これらの結果を over-all の反応速度（v_o）と比較してまとめると次の如く考えられる。

低い ATP 濃度領域では次の様な機構で反応が進行する。

$$E+S \underset{k_{+1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftharpoons}} E_1S \xrightarrow{k_{+2}} E_2S \overset{K_3}{\rightleftharpoons} \underset{+\,ADP}{EP} \xrightarrow{k_{+4}} E+Pi+ADP$$

(step 1) (step 2) (step 3) (step 4)

ES は michaelis 複合体，E_2S はリン酸化中間体（EP）と準平衡にある非リン酸化中間体である。各反応速度定数及び平衡定数の値を v_o, v_d, v_f 等より求めて，比較して別表に示した。別々の測定方法によって求めた値が非常に良く一致しており上記の機構の正しさが定量的に証明された。K^+ は step 4 を促進すると同時に step 3 の平衡を E_2S 側にずらすが，他の step には影響を及ぼさない。一方 Na^+ は step 2 のみを促進し他の step には作用しない。各反応速度定数より明らかなように，over-all の反応は step 2 と step 4 によって律速されており，Na^+ と K^+ がそれぞれ調節している事が判る。

高い ATP 濃度領域では k_{+4}, K_3 の値は表で示されたものと同じであるが，step 2 の性質が低濃度領域の場合と大きく変っている事が示唆された。つまり ATP が単に基質として酵素系に作用するばかりでなく，調節因子として step 2 を著しく加速する働きを持っている可能性が高い。この点に関しては，ATP が基質として2ケの部位で酵素と結合し，共通の中間体 E_2S, EP を形成する可能性も残されており今後の課題である。

上述の反応機構から Na^+ と K^+ の輸送機作を推察するなら，Na^+ が step 2 と，K^+ が step 4 と，それぞれ共役して移動するモデルが考えられるがより明確な知見は，ATPase 反応とイオンの移動を同時に測定し比較する事によって得られるであろう。又，他の ATPase 反応に於ても，Na^+-K^+-依存性 ATPase 反応と基本的には同様な経過で反応が進行する事が，最近報告されており，生体でのエネルギー転換に関する興味ある問題と思われる。

表：Na^+-K^+-依存性 ATPase の速度定数

測定条件：1mM $MgCl_2$, 140mM NaCl, 0.6mM KCl, pH 8,5, 15°C, 低 ATP 濃度領域

定　数	値	測定及び計算方法
k_{+4}	4.43 sec^{-1} 4.4 sec^{-1}	常状態での v_o/〔EP〕 反応初期での EP 生成と Pi 遊離
K_3	0.96 1.2	v_d, v_o/〔EP〕 EP 減少量と Pi 遊離量
k_{+2}	2.1 sec^{-1} 1.73 sec^{1-} 1.62 sec^{-1}	EP 生成の Guggenheim plot v_f, K_3, ε* v_o, K_3, k_{+4}, ε*

k_{-1}/k_{+1}	3.6 μM 1.6 μM	v_f の ATP 濃度依存性 v_o の ATP 濃度依存性，k_{+2}，K_3，k_{+4}
k_{+1}	$\geqslant 5.5\times10^6\,M^{-1}\,sec^{-1}$	EP 生成の lag time，k_{-1}/k_{+1}
k_{-1}	$\geqslant 18\,sec^{-1}$	k_{+1}，k_{-1}/k_{+1}

* 酵素総濃度（ε）は、K^+ 濃度によって変化しない事から、1.57 mole/10^7g と計算された。

論文の審査結果の要旨

膜を通しての Na^+ および K^+ の能動輸送は膜に局在する ATP アーゼによる ATP 分解と共役して起る。斉藤君のこの論文はこのように重要な生理機能を持つ膜の Na^+−K^+ 依存性 ATP アーゼの機構を解明することを目的としたものである。

従来から ATP アーゼ反応の中間体としてリン酸化蛋白質（EP）の存在が提案されていたが，定性的な実験に基くものであり，極めて説得力の乏しいものであった。そこで斉藤君は特別な mixing 装置を自作し，それを用いて EP 形成の段階と EP 分解の段階を別々に測定することに初めて成功し，それらの結果と定常状態反応についての測定結果を比較し，この酵素反応が

$$E+S \underset{(1)}{\rightleftharpoons} E_1S \underset{(2)}{\longrightarrow} E_2S \underset{(3)}{\rightleftharpoons} EP \underset{(ADP)\,(4)}{\longrightarrow} E+Pi+ADP$$

に従って起ることを明確にした。ここにEは酵素，Sは ATP である。特に斉藤君の研究で重要な点は各段階の速度定数および平衡定数が部分反応および定常状態反応両者の解析から種々の方法で求められ，しかもそれらの値が互によく一致することから，この機構の正しいことを明確に示したことである。また斉藤君は上記反応式のように ATP はこの酵素反応の基質として作用するのみならず，反応の調節因子としても働き，段階(2)のみが高濃度 ATP ので促進されることを明確に示した。しかも注目すべきことには，反応機構についてのこれらの性質は筋収縮の担い手であるミオシン-ATP アーゼのそれと著しく似ていることが明らかにされた。

イオンの能動輸送と関係して重要なことは Na^+ および K^+ が異なる反応段階に作用することである。すなわち斉藤君は各段階に対するイオンの効果を研究し，段階(1)は Mg^{2+} のみに依存し，(2)は Mg^{2+} と Na^+ に依存し，(3)と(4)は K^+ のみに依存することを示した。

これらの結果は膜を通しての Na^+ および K^+ の能動輸送の分子機構の解明に新しい方向を開いたものであり，高く評価される。従って理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。