



Title	INTERACTION ON MYOSIN OR ITS SUBFRAGMENTS WITH ACTIN AND ADENOSINE TRIPHOSPHATE
Author(s)	Takeuchi, Kikuko
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30659
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【21】

氏名・(本籍)	たけうち　喜久子
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 2477 号
学位授与の日付	昭和47年3月25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	ミオシンあるいはそのサブフラグメントのアクチン、ATPとの相互作用
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治
	(副査) 教授 神谷 宣郎 教授 松原 央

論文内容の要旨

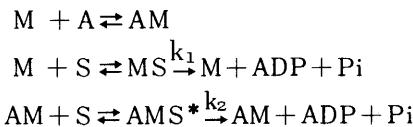
骨格筋の収縮に必要な二種類のせん維、すなわちミオシンせん維とアクチンせん維は、cross-bridgeで結合し、その結果、アクトミオシンATPaseを生じ、張力を発生させる。筋収縮はこれら両せん維自体の長さは変らず、両せん維の相対的位置のずれによって起ると考えられている。したがつて両せん維のcross-bridgeでの結合と解離のくりかえしは位置のずれの必然的結果である。

筋収縮機構を分子レベルで理解するためには、これらのせん維のin vitro analogueとしてのミオシンーアクチンーATP系の相互作用を明らかにすることが最も重要である。

筋収縮の必須の反応であるアクトミオシンATPaseは生理的環境に近い低イオン強度で発現するが、この様な環境下ではミオシン、アクトミオシンは不溶性なので物理化学的測定が困難である。故に低イオン強度で溶解性のH-メロミオシン-F-アクチン-ATP系を用い反応機構を解析した。さらにミオシンーアクチン相互作用の最も基本的問題の1つであるミオシンあるいはそのサブフラグメントのアクチン、ATPとの結合の化学量論的関係を調べ、ミオシンーアクチンの結合ー解離、ミオシン分子の構造と活性部位とも関連させ、以下の二つの実験によりミオシンーアクチン-ATPの相互作用を検討した。

1. 低イオン強度に於けるH-メロミオシンとF-アクチンの結合—低イオン強度でアクトーH-メロミオシン複合体にATPを添加すると90方向の散乱強度は両タンパク質の散乱強度の和よりも低いところまで減少するがこの様な条件でさえかなり高いアクトミオシン型ATPaseが観察された。さらにアクトーH-メロミオシンの光散乱の角度分布から求めた重量平均分子量はATP添加でわずかに減少したにすぎず、他方平均gyration半径は著しく増大したことからも、ATP存在下でもF-アクチンとH-メロミオシンは結合していることが明らかになった。90°方向散乱強度の最大減少値の $\frac{1}{2}$ を与えるATP濃度はイオン強度の減少、F-アクチン濃度の増大、H-メロミオシンのPC

MB- β -メルカプトエタノール処理により増大した。ATP 濃度の充分高い時、ATPase の最大活性は F-アクチン濃度の増大、およびイオン強度の減少に伴って増大し、最大活性の $\frac{1}{2}$ を与える ATP 濃度も増大した。これらの結果から次の反応機構が提出された



M、A は H-メロミオシン、F-アクチンの結合単位、S は MgATP、AMS* は アクト-H-メロミオシン複合体で分子量は AM と等しく、gyration 半径が AM より大きい。 k_1 、 k_2 は ミオシン、アクトミオシン型 ATPase の速度定数。これらの反応機構から導かれる結論は上の実験結果とよく一致する。

2. アクト-H-メロミオシンおよびアクトサブフラグメント-1 複合体の形成および ATP による解離——H-メロミオシンおよびサブフラグメント-1 のアクチンとの結合比を光散乱法および超遠心分離法により測定した。最大結合比は アクチン=量体あたり H-メロミオシン 1 モルおよびサブフラグメント-12 モルであった。この量比は アクチン調整方法、KC1, Mg⁺ 濃度を変化させても一定であった。F-アクチン上での結合 H-メロミオシンの分布を電子顕微鏡観察により解析した結果、アクチン調製品によりランダムな分布を示すものと co-operative な結合を暗示する様な分布を示すものとがあることがわかった。

H-メロミオシン-ATP およびサブフラグメント-1-ATP 系から遊離されるリン酸発生の “initial burst” 量は H-メロミオシンおよびサブフラグメント-1 1 モルあたりそれぞれ 1 および 0.5 モルでありイオン強度により影響されなかった。アクトミオシン、アクト-H-メロミオシンおよびアクトサブフラグメント-1 複合体に ATP を添加した後、その光散乱強度の減少量を stopped flow 法により測定した。光散乱強度の最大減少をひき起すに必要な最少 ATP 量は ミオシン H-メロミオシンおよびサブフラグメント 1 モルあたり 1, 2.2 および 1 モルであった。これらの結果から アクチン-ミオシン-ATP 間の結合解離の可能なモデルが提出され、H-メロミオシンの場合、分子は 2 つの頭部からなり各々が 1 つのアクチン結合部位をもち、その中一方の結合部位は H-メロミオシン-phosphate-ADP 複合体の形成によりアクチンから解離するが他の部位の結合は単なる ATP の結合反応により切れると結論された。

論文の審査結果の要旨

筋収縮は分子量 4.8×10^5 のミオシンと分子量 4.6×10^4 の単量体である G-アクチンが重合して形成される F-アクチンとの結合反応および結合によって形成されるアクトミオシンの ATP による解離が基本反応の一部となって起ることはよく知られている。ミオシンが巨大な分子であり、生理的イオン環境ではフィラメントを形成しているので、これらの反応をミオシンそのものを用いて解析する

ことは困難である。しかしミオシンのトリプシン処理によって得られる活性サブフラグメント、H-メロミオシン（分子量 3.4×10^5 ）およびS-1（分子量 1.1×10^5 ）はアクチンと結合し、ATPと反応する性質を保持しており、しかも生理的イオン環境でよく溶解する。そこで竹内さんはこれらミオシンの活性サブフラグメントを用いてミオシン、アクチン、ATPの3者の反応の化学量論的関係を決定した。

第1にアクチン2量体あたりH-メロミオシン1分子およびS-12分子が結合することが示された。さらに電子顕微鏡的観察によって純粋なアクチンとH-メロミオシンの結合は協同的に起り、他方種々の調節蛋白質を含むアクチンに対してはH-メロミオシン分子は互に独立に結合するという興味ある結果を得た。第2にアクチンとミオシンおよびその活性サブフラグメントの結合体をそれぞれの構成蛋白質に解離するのに必要なATP量を測定し、ミオシン、H-メロミオシンおよびS-11モルに対してそれぞれ1、2および1モルであることを示した。第3にアクチンとミオシンの結合物のATPによる解離をひき起すのには、ミオシン-リン酸-ADP複合体の形成されることが必要であることが分っているので、ミオシン、H-メロミオシンおよびS-1についてATPによる蛋白質-リン酸-ADP複合体の形成量を測定し、それぞれ1モルあたり1、1およ0.5モルであることを明確に示した。

竹内さんのこれらの研究はミオシン-アクチン-ATP系の反応における化学量論的関係を初めて確立したものであり、筋収縮の分子機構を考える上で重要な基礎となるものである。

以上述べたように竹内さんの業績は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。