



Title	溶解状態および筋線維における収縮系のミオシン分子とATPの相互作用
Author(s)	尾西, 裕文
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30714
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

【4】

氏名・（本籍）	お 尾	にし 西	ひろ 裕	ふみ 文
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	2726	号	
学位授与の日付	昭和48年3月24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	溶解状態および筋線維における収縮系のミオシン分子とATPの相互作用			
論文審査委員	(主査) 教授	殿村 雄治		(副査) 教授
	教授	神谷 宣郎	教授	浜口 浩三

論文内容の要旨

我々の研究によって、ミオシン(E)のATP(S)加水分解反応の経路、およびミオシン-ATPaseの反応中間体とF-アクチンの相互作用についてはかなり明らかになっている。すなわち、ミオシン-ATPase反応は次の機構に従う

$E + S \rightleftharpoons E_1S \rightleftharpoons E_2S \rightarrow E^{ADP} \rightarrow E + ADP + Pi \rightarrow E + ADP + Pi(I); {}^\circ E \text{ (or } E) + S \rightleftharpoons {}^\circ ES \text{ (or } ES) \rightarrow {}^\circ E \text{ (or } E) + ADP + Pi(II)$ ・ATPの加水分解は二つの異なった経路を通して起こる。低イオン強度、F-アクチンの存在下では、 E^{ADP} の分解が促進され、アクトミオシンのATP加水分解反応は主に経路(I)を通る。そこで E^{ADP} 生成、分解の機構およびその構造を明らかにすることは、筋収縮の分子機作の解明に役立つであろう。この論文の第1部は、ミオシンの活性断片であるH-メロミオシンから螢光性ATPアナログである1,N⁶-エテノアデノシン3リン酸(ϵ ATP)への励起エネルギーの転移を研究して、H-メロミオシンとATPの相互作用を明らかにすることを目的としたものである。

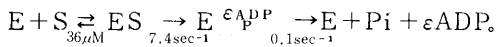
生体では、ミオシンは重合して太いフィラメントを形成し、F-アクチンは細いフィラメントを構成する。両フィラメントの重なり領域では、太いフィラメント側から出た突起が細いフィラメントと結合して、クロスブリッジを形成している。筋収縮は、ATPの加水分解に伴って、両フィラメントが相手の上を滑り、相対的な位置を変化させることによって起こる。そこで第2部ではグリセリン処理した筋線維束の動的粘弾性を研究し、筋線維におけるアクチンとミオシンの相互作用のATPによる影響を明らかにすることを目的とした研究結果を述べる。

結果および考察

(I) H-メロミオシンと ϵ ATPの反応

ミオシンによる ϵ ATPの加水分解と、H-メロミオシンによる ϵ ATPの螢光の変化の反応速度論的研究を、IMKCl, 2mMMgCl₂, pH 7.5, 20℃で試みた。反応初期にみられるTCAで不安なPiの急激な遊離

の量は、ミオシン 1 モル当り約 1 モルであった。ミオシン- ϵ ATPase の最大速度と Michaelis 定数は、それぞれ 0.13 sec^{-1} および $0.93 \mu\text{M}$ であった。H-メロミオシンによる ϵ ATP の蛍光の変化の最大速度と Michaelis 定数は、それぞれ 7.4 sec^{-1} および $36 \mu\text{M}$ であった。 蛍光変化の回復過程の速度定数は 0.1 sec^{-1} であった。従って ϵ ATP の蛍光変化の結果は次の簡単化された機構で書くことが出来る。



ϵ ATP の存在する時の、UV の差吸収、蛍光スペクトル、およびトリプトファン残基の蛍光の KI 消光を測定した。 ϵ ATP による H-メロミオシンの差吸収は、ATP の約 80% であった。 ϵ ATP を H-メロミオシンに加えた時、288nm で励起された蛍光スペクトルは、340nm 付近で減少し、410nm 付近で増加した。KI で消光されないトリプトファン残基の蛍光の ϵ ATP による増加量は、全トリプトファン残基の蛍光の ATP による増加量の約 80% であった。これらの結果は、いくつかのトリプトファン残基が ϵ ATP と反応すると、KI 消光を受けなくなるが、 ϵ ATP への励起エネルギーの転移は、蛋白表面に露出したトリプトファン残基のみから起こることが明らかになった。

(II) 筋線維の粘弾性

ATP の存在しない時、グリセリン処理筋の引っぱりに対する貯蔵および損失弾性率は、 0.001 Hz から 1 Hz の測定範囲ではほとんど変化しなかった。ATP を加えると、貯蔵および損失弾性率の周波数分散は 0.001 Hz 付近にかなり広がった緩和時間の分布を示した。この分散は、太いフィラメントと細いフィラメント相互のずれ運動に由来する。ATP 濃度はアクチンとミオシンの結合の強さに影響を与える。緩和時間の ATP 濃度依存性から、太いフィラメントと細いフィラメントの重なり単位当りのクロスブリッジの数が減少するに従って、緩和時間は減少するが、貯蔵弾性率の高周波側の極限值は、変らないことが結論された。一定の ATP 濃度で、筋線維の長さを変えて行なった実験から、貯蔵および損失弾性率は、太いフィラメントと細いフィラメントの重なりの程度に比例して増加するが、周波数分散の形は重なりの程度に依存しないことが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

筋収縮の最も基本的な反応が ATP の加水分解と共役したミオシン分子の形体変化であることは広く認められているところである。しかし、このミオシン分子の形体変化がどのような機作で起るかはまだ明らかになっていない。尾西君はこの問題を明らかにするために次の 2 つの実験を行った。

まず第一に、ミオシンの ATPase 活生中心を含む活性部分である H-メロミオシンと蛍光性 ATP アナログ、1, N⁶-エテノアデノシン 3 リン酸 (ϵ ATP)、との反応解析を行った。すなわち ϵ ATP の H-メロミオシンへの結合による蛍光変化を利用して、 ϵ ATP の加水分解の反応段階を明らかにした。また、特に収縮のために必要な反応中間体であると考えられているミオシン・リン酸・ ϵ ADP 複合体の構造を励起エネルギーの転移を用いて研究した。その結果、この複合体の形成に伴って 2 及至 3 個のトリプトファン残基が蛋白質の表面から内部に埋められるにもかかわらず、 ϵ ATP への励起エ

エネルギーへの転移は蛋白質表面に露出したトリプトファン残基のみから起るという結論が得られた。この結果は上記複合体の形成が大きいミオシン分子の形体変化を伴うことを強く示唆するものである。

第2にグリセリン処理筋の貯蔵および損失弾性率の周波数分散を種々のサルコメヤーの長さで、また種々の温度とATP 濃度の下で測定した。そしてミオシンとアクチンの間のクロスブリッジの数が高ATP 濃度、低温で減少すると緩和時間は減少するが貯蔵弾性率の高周波側の極限值は変わらないこと、サルメヤーの長さを変えるとミオシンフィラメントとアクチンフィラメントのかさなりの程度に比例して両弾性率は減少するが、周波数分散はほとんど一定であることなどを明らかにした。これらの結果もまた筋線維におけるミオシン分子の運動の解析を進めるにあたって興味ある知見を加えたものである。

以上のようにこの研究は筋収縮の分子機作の解明に貴重な貢献をなすものであり、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。