



Title	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -依存性ATPアーゼのリン酸化中間体の形成と共役した筋小胞体膜のCa ²⁺ イオンのトランスロケーション
Author(s)	澄田, 道博
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31561
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉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

【17】

氏名・(本籍)	澄 田 道 博
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3 5 5 5 号
学位授与の日付	昭 和 51 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	Ca^{2+} , Mg^{2+} -依存性 ATP アーゼのリン酸化中間体の形成と 共役した筋小胞体膜の Ca^{2+} イオンのトランスロケーション
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治 (副査) 教授 神谷 宜郎 教授 佐藤 了

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋小胞体 (SR) における Ca^{2+} イオンの能動輸送の反応機構を研究して、次の三つの結果が得られた。

[I] SR に ATP を加えて ATPase の酸安定性反応中間体 (EP) を形成させた後、EGTA を添加してその形成を止め、EP 分解の時間経過を測定した。EP 分解の速度定数、 k_d は反応開始後 EGTA 添加までの時間、 t の関数として次式で与えられた。

$k_d = (K_{d,initial} - K_{d,steady}) \times \exp(-K_{tr}t) + K_{d,steady}$, $K_{d,initial}/K_{d,steady} = 7.3$; $K_{tr} = 0.5 \text{ sec}^{-1}$,
ここで $K_{d,initial}$ および $K_{d,steady}$ はそれぞれ反応開始直後および定常状態での EP 分解の速度定数、 k_{tr} は k_d の転移の速度定数である。この k_d 値は非放射性的 ATP を加えて $E^{32}P$ 形成を止めて測定しても同じであった。この結果から ATPase 反応初期相での P_i 放出のバーストは k_d の転移に由来することが明かにされた。

[II] SP への Ca^{2+} 取り込みが ATPase 反応の EP 形成段階に共設して起こることが以下の観察から証明された。 $20 \mu M CaCl_2$ 存在下 $MgCl_2$ 無添加、 0° の条件下で SR に ATP を加えて反応を開始した後、EGTA を加えて EP 形成および Ca^{2+} 取り込みを止めた。(1)EGTA と共に $2.5 \text{ mM } MgCl_2$ を加えると形成された EP は $E + P_i$ へと速やかに分解した。この時 Ca^{2+} の取り込みの時間経過に速い初期相と遅い定常相とがみられ前者は EP 形成に後者は EGTA + $MgCl_2$ 添加時での P_i 発生に対応し、 Ca^{2+} の取り込み量とそれらのモル比は $1/2$ であった。(2)EGTA と共に 0.25 mM ADP を加えると EP と ADP とから ATP が急速に形成され、EGTA + ADP での P_i 発生に対し、モル比約 $1/2$ の Ca^{2+} 取り込みがみられた。しかし EP 形成に対する速い初期相の Ca^{2+} 取り込みはみられなかった。(3)EGTA と共に $2.5 \text{ mM } MgCl_2$ を添加した後の EP → E + P_i 反応の過程で種々の時間に 0.25 mM ADP を加えると、ATP

添加時に残存している EP と ADP とから E+ATP が形成されたが、これに伴って起こる Ca^{2+} リークも EP の減少に伴って減少してゆくという時間経過が測定された。

[Ⅲ] Ca^{2+} 輸送時の ATPase の SR 膜中での運動を示唆する、抗体の Ca^{2+} 輸送への影響が観察された。抗体はトリの SR から精製した ATPase をウサギに免疫して得た。抗血清の γ -グロブリン分画に主に ATPase と結合する抗体が含まれていた。SR たんぱく質 1 mg に対し、0.1 ml の抗血清の添加で Ca^{2+} 取り込みは約 30% に阻害された。しかし Ca^{2+} の受動的リークはみられなかった。SR たんぱく質 1 ml の抗血清を添加しても ATPase 活性はほとんど影響されなかった。

論文の審査結果の要旨

筋小胞体は ATP を加水分解し、 Ca^{2+} イオンを膜外から内へとりこむことはよく知られている。さらに、筋小胞体の全蛋白質の 80% が ATPase であること、ATPase 反応が酵素-ATP 結合物, EATP, およびリン酸化中間体, EP, を経て起ることが明らかにされ、筋小胞体はカチオンの能動輸送の分子機作を研究するのに最も有利な材料となっている。

澄田君はこの論文でまず、筋小胞体 ATPase に見られる *lag phase, burst phase, steady phase* が反応中間体としての EP 形成および EP 分解速度の反応初期における変移によって定量的に説明できることを示した。特に *burst phase* が一部の研究者が主張している酵素と Pi の結合物の形成によるものでなく、EP 分解速度の大きい変移によることを明確に示した。さらに、ATPase 反応を EATP 形成反応、EP 形成反応および EP 分解反応の 3 段階に分け、同時に Ca^{2+} イオンの膜外から膜内へのトランスロケーションを測定することに成功した。特に Ca^{2+} 輸送を EGTA+ADP および EGTA+ Mg^{2+} で止めた時の Ca^{2+} の輸送量と EP の形成および分解反応を比較し、EATP から EP が形成される段階で Ca^{2+} イオンが膜外から膜内にトランスロケーションされることを明かにした。この研究はカチオン能動輸送の素反応段階を解明した最初の仕事として高く評価される。さらに、筋小胞体における Ca^{2+} 輸送に対する ATPase の抗体の作用についての従来の研究は余り明確なものでなかったが、澄田君はよい ATPase 抗体をつくることに成功し、これによって Ca^{2+} 輸送が殆んど完全に阻害されることを示し、 Ca^{2+} 輸送において ATPase 分子の運動が起るとする考えを支持した。

以上のように、本論文は生体膜におけるカチオンの能動輸送の分子機構について新しい知見を加えたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。