



Title	アデノシン3' : 5'-モノリン酸 (cAMP) 依存性プロテインキナーゼによる心筋小胞体Ca依存性ATPaseの促進機構. 22,000ダルトン蛋白質の役割
Author(s)	大森, 文夫
Citation	大阪大学, 1980, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32951
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

【 9 】

氏名・(本籍)	おお 大 森 文 夫
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 9 9 8 号
学位授与の日付	昭 和 55 年 5 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	アデノシン3':5'-モノリン酸 (cAMP) 依存性プロテインキナーゼによる心筋小胞体 Ca 依存性 ATPase の促進機構. 22,000 ダルトン蛋白質の役割
論文審査委員	(主査) 教 授 阿 部 裕 (副査) 教 授 中 馬 一 郎 教 授 垂 井 清 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

カテコラミンの心筋収縮性調節に際して、cyclic AMP (cAMP) が、細胞内メッセンジャーとして働くと考えられ、cAMP の細胞内での役割が注目されている。心筋小胞体 Ca^{2+} 能動輸送の活性が、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (cAMP-PK) の phospholamban (PN, 分子量, 22,000) リン酸化を介して、著明な影響を受けることから PN が Ca 輸送 ATPase の調節因子として働く可能性が示唆された。しかし、これが如何なる機序によるかは不明であった。今回、これを明らかにするため、Ca 輸送 ATPase の素反応段階が、PN リン酸化でどのように変化するかを検討した。

〔方 法〕

cAMP-PK による PN リン酸化：犬心筋小胞体 (2 mg/ml) を 1 mg/ml cAMP-PK, 1 μM cAMP, 60 mM KCl, 20 mM histidine/HCl (pH 6.8), 25°C で 2 mM MgCl_2 あるいは 2 mM EDTA 存在下で 1 mM ATP と反応させた。 MgCl_2 存在下では著明なリン酸化形成をみ (0.6—0.8 $\mu\text{mol/g}$)、EDTA 存在下では有意のリン酸化をみないので、前者をリン酸化小胞体、後者を対照とした。2—5 分後反応液を Dowex 1 \times 8 カラムを通して (4°C) 未反応の ATP, 産生された ADP, P_i を除去し、Ca 輸送 ATPase 活性の測定に供した。

Ca 輸送 ATPase のリン酸化中間体形成：リン酸化および対照小胞体を 10^{-8} — 10^{-4} M Ca^{2+} (Ca/EGTA buffer), 1 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 5 mM NaN_3 , 10 mM imidazole/HCl (pH 7.0), 0—30°C で 1—1000 μM [γ - ^{32}P] ATP (10—100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) と反応させ、リン酸化中間体 (EP) 形成量, ADP, P_i 放出量を測定した。

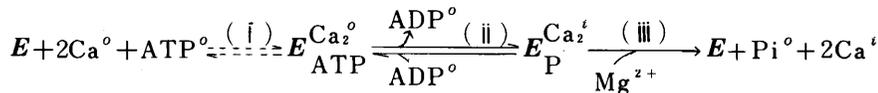
EP分解速度の測定：EPを形成させた後、2mM EGTA添加によりCa²⁺を除去してEP形成を停止させ、その後のEP分解の速度を迅速混和装置により（0.05—3秒）測定した。

[結果]

1. EP中間体はアシル磷酸で、NH₂OHおよび高温で容易に分解されるのに反し、cAMP-PKによるPN磷酸化はエステル磷酸で、NH₂OHで分解されず、両者の化学的性質は全く異なっていた。
2. PN磷酸化により、ATP分解速度は、特に高ATP濃度領域で著明に促進した。ATPase活性のLineweaver-Burkプロットから得られたV_{max}は、PN磷酸化により低ATP濃度（1—5 μM）で1.5倍、高ATP濃度（10—1000 μM）で2.1倍に促進された。
3. EP形成量とPi遊離速度（v）のCa濃度依存性をみると、低Ca濃度領域でPN磷酸化は、EP形成を減少させ、vを促進させた。その結果、v/[EP]値は、PN磷酸化で2倍の促進を受け、これはEP分解速度促進を示唆した。
4. EP分解速度の直接測定から、PN磷酸化がEP分解速度を2倍に高めることを見た。その一次定数（kd）の温度依存性からArrheniusプロットを得たところ、18℃に屈曲点を有する2相性を示し、その活性化エネルギーは低温域で19.2kcal/mol、高温域で11.4kcal/molであった。PNのkd促進の際、活性化エネルギーの変化は見られなかった。

[考察および総括]

心筋小胞体Ca²⁺輸送はATPase酵素（E）の磷酸化中間体EPの生成・分解により仲介され、これを次式のように表わすことができる（iとoは小胞体膜の内側と外側を表わす）：



小胞体膜外側でE 1モル当り、2モルのCa²⁺と1モルのATPが結合したMichaelis複合体E_{ATP}^{Ca₂^o}形成につづいて、磷酸化中間体E_P^{Ca₂ⁱ}が形成される。この際、小胞体外から内へのCa²⁺転位が起こり、EP中間体はMg²⁺で分解されCa²⁺の転位が完了する。ATP、Ca²⁺濃度が高い時、EP生成過程（ステップi、ii）は極めて迅速で、EP分解（ステップiii）が律速段階であると考えられる。PN磷酸化によるV_{max}の促進はEP分解のパラメータ（v/[EP]、kd）の促進を伴うので、かかる条件下ではステップiiiの速度の上昇により、反応全体のターンオーバー速度が上昇すると考えられる。これによりCa²⁺転位速度も著明に促進されるものと考えられる。PNが如何なる分子的機序でEP分解速度を促進するかは、この膜の再構成等で今後検討される必要がある。

以上から、cAMPはPK-PN系を介してATPase酵素に働き、この際PNがATPaseの調節因子の役割をはたすことが示唆される。

論文の審査結果の要旨

本論文は、心筋細胞の興奮収縮連関において重要な役割をはたすと考えられる心筋小胞体のCa輸

送が, cyclicAMPと心筋小胞体膜蛋白質フォスフォランパンにより調節されていることを, Ca 輸送 ATPaseの素反応過程より明らかにしたものである。これは, 心臓におけるカテコルアミンの強心作用の細胞内機序の一部を説明するものであり, 心筋の生理・薬理学上, 重要な成果である。