

Title	筋小胞体輸送ATPaseへのCa <sup>2+</sup> とATPの結合
Author(s)	中村, 洋一
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33266">https://hdl.handle.net/11094/33266</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【12】

氏名・(本籍)	なか 中	むら 村	よう 洋	いち 一
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	5592	号	
学位授与の日付	昭和57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	筋小胞体輸送ATPaseへのCa <sup>2+</sup> とATPの結合			
論文審査委員	(主査) 教授	殿村 雄治		
	教授	柴岡 弘郎	教授	岸本 卯一郎

### 論文内容の要旨

筋小胞体輸送 ATPase は小胞膜上に存在し、Ca<sup>2+</sup>の能動輸送を行い、筋収縮の制御において重要な役割を果たしている。本研究はATPase へのCa<sup>2+</sup>及びATPの結合が酵素反応中に如何に変化するかを測定し、ATPase反応とCa<sup>2+</sup>輸送のカップリング機構をより詳細に明らかにすることを目的とする。

(1) ATP非存在下でCa<sup>2+</sup>は酵素の活性部位当り2 molの高親和性部位に協同的に結合し、そのCa<sup>2+</sup>はEGTA添加により容易に除去できた。AMPPNP存在下でも酵素に結合したCa<sup>2+</sup>は容易に除去できたが、ADP感受性リン酸化中間体(E<sub>1</sub>P)に結合したCa<sup>2+</sup>は非常にゆっくりとしか除去できなかった。

ATP添加後の結合Ca<sup>2+</sup>量の変化を種々の条件で測定した。形成されるEPが殆どE<sub>1</sub>Pである条件ではATP添加により結合Ca<sup>2+</sup>量は7から10μmol/gに増加した。ところが形成されるEPが殆どADP非感受性(E<sub>2</sub>P)である条件ではATP添加により結合Ca<sup>2+</sup>量は8μmol/gから少し増加の後ゆっくりと4μmol/gまで減少した。この減少量はその時形成されるE<sub>2</sub>P量とほぼ一致した。

これらの結果は酵素に結合したCa<sup>2+</sup>がE<sub>1</sub>Pの形成に伴って容易に除去できない状態(occluded form)となり、その後E<sub>2</sub>Pへの変換に伴って酵素から遊離されることを示す。

(2) Ca<sup>2+</sup>非存在下でATPは酵素の活性部位当り1 molの高親和性部位と1 molの低親和性部位に結合した。KCl濃度が高い条件ではCa<sup>2+</sup>の添加により高親和性部位への結合ATPは消失したが、低KClの条件ではかなりの結合ATPが残った。その結合はtight EATP複合体の形成によるものであることがkineticalに示された。

リン酸化した酵素にADPを添加するとEPは減少し一定値を保った。その時ATPが形成されていた。

その後さらにクレアチンリン酸とクレアチン・キナーゼを加え ADP を反応液から除去すると速かに EP 量が増大し、元の EP 量を超えた。

これらの結果は EP は tight EATP 複合体と平衡にあり、tight EATP からの ATP の遊離が非常に遅いことを示す。また、その平衡は高濃度の ATP の存在により EP 側にかたよることも示された。

## 論文の審査結果の要旨

筋小胞体膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプは純度の高い標品が容易に得られ、反応中間体であるリン酸化酵素量が容易に測定できる等の理由でカチオンの能動輸送の研究に最も有用な材料となっている。従って近年  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ ATPase の反応機構の詳細な研究が行われ、カチオン能動輸送の分子機作について多くの興味ある知見が得られている。しかし、まだ ATP 分解と  $\text{Ca}^{2+}$ 能動輸送の共役の分子機作についてはいくつかの未解決の問題が残されている。中村洋一君はこれらの問題を解決するため、ポンプ蛋白質への  $\text{Ca}^{2+}$ および ATP の結合を直接測定することを試みた。

すなわち、ポンプ蛋白質への  $\text{Ca}^{2+}$ の結合を特殊な口過法で測定し、ポンプ蛋白質に 2 モルの  $\text{Ca}^{2+}$ と 1 モルの ATP が random sequence で結合し、次いで ADP-感受性リン酸化中間体が形成されると、これらの  $\text{Ca}^{2+}$ はポンプの構造内にとりこまれたいわゆる occluded 型となり、さらにリン酸化中間体が ADP 感受性のものから非感受性のものに変化すると、ポンプ蛋白質より遊離することを示した。次いで、ATPase 反応中のポンプ蛋白質への ATP の結合を測定し、2 種類の ATP 結合が存在することを見出した。第 1 のものは活性部位への結合であり、これには loose な酵素-ATP 結合体および ADP-感受性リン酸化中間体と平衡にある tight な酵素-ATP 結合体が存在する。第 2 のものは調節部位への結合であり、この結合によって酵素のコンフォメーションが変化し、ATPase 反応が促進されることを明確にした。

以上のように、中村君の研究はポンプ蛋白質へのリガンドの結合を直接測定することによって、 $\text{Ca}^{2+}$ の能動輸送の分子機作に関するいくつかの重要な問題について明確な解答を与えたものであり、生体膜の生理学に寄与するところが大きい。従って、理学博士の学位論文として十分の価値あるものと認める。