

Title	副腎髓質のミオシン軽鎖リン酸化とアクチンにより活性化されるATPase
Author(s)	神田, 啓子
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34666
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	か 神	だ 田	けい 啓	こ 子
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6808	号	
学位授与の日付	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	副腎髄質のミオシン軽鎖リン酸化とアクチンにより活性化される ATPase			
論文審査委員	(主査) 教授	坂本 幸哉		
	(副査) 教授	田中 武彦	教授	吉田 博

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

副腎髄質からのカテコールアミン分泌は Ca^{2+} と ATP を必要とし、分泌機作が筋収縮 (“excitation-contraction coupling”) と類似していることから、“stimulus-secretion coupling” と呼ばれている。実際、筋収縮同様に、カテコールアミン分泌においても収縮系蛋白質の関与が示唆されてはきたが、その分離精製および制御系に関する知見は全くなかった。そこで、副腎髄質より Ca^{2+} 感受性を有するアクトミオシン系を分離し、その Ca^{2+} 制御機構を明らかにしたので報告する。

(方 法)

1. 副腎髄質 Ca^{2+} 感受性アクトミオン及びミオシンの精製 200g の牛副腎髄質をミンチし、これに2倍容の抽出液 (0.34M sucrose, 10 mM Tris·HCl (pH 7.5), 10 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 10 mM ATP, 0.25 mM PMSF) を加え、POLYTRON[®] でホモジナイズした。ホモジネートは pH を 7.5 に維持して、45分間、ゆるくかくはんしながら抽出を行った。抽出後、50000×g で60分間遠心し、その上清に $MgCl_2$ と ATP を最終濃度 10 mM になるように加えた後、硫酸分画 (25-60%) した。得られた分画を高イオン強度 (0.6 MKCl を含む) 緩衝液で溶解し、6000×g で15分間遠心した上清を低イオン強度緩衝液 (60 mM KCl を含む) で一晩、透析した。透析したサンプルは、最終濃度が 10 mM になるように $MgCl_2$ を加え、0.4% 酢酸で pH を 6.3 にした後、20000×g 30分間遠心し沈澱を得た。この沈澱をさらに高イオン強度の緩衝液で溶かし、上記操作をもう一度くり返して、 Ca^{2+} 感受性のあるアクトミオンを得た。ミオシンはこの Ca^{2+} 感受性のあるアクトミオンを Mg, ATP を含む高イオン強度緩衝液で抽出し、105000×g 60分遠心後の上清をイオン強度を下げるため10倍希釈

し、40000×g 30分間遠心沈澱し、この沈澱を高イオン強度緩衝液で再び抽出して、Sepharose 4B カラムでゲルクロマトグラフィーを行い、精製した。

2. 副腎髄質ミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase, 略してMLCK) の部分精製

新鮮な副腎髄質 (100g) に 0.3 MKCl を含む 3 倍容の抽出液を加え、POLYTRON[®] でホモジナイズし、50000×g 30分遠心した上清を硫酸分画 (20-60%) し、0.1 MKCl を含む緩衝液で溶かし、Ca²⁺ を加え (最終濃度 0.2 mM)、カルモデュリンアフィニティカラムにアプライし、Ca²⁺ 依存性に結合する分画を得た。次いで、この分画を DEAE-cellulose カラムにて KCl 濃度 30-400 mM の linear gradient 分離を行った。MLCK 活性は、ニワトリ砂のうのミオシン軽鎖を基質として、³²P の取り込みをモニターし、MLCK 分画を得た。

3. その他の蛋白の精製 アクチンはウサギ骨格筋より、カルモデュリンは牛脳より精製した。ニワトリ砂のう平滑筋のミオシン軽鎖、MLCK およびミオシンフォスファターゼは既に報告された方法に従って精製した。

4. ATPase 活性 ATPase 活性は ATP を基質として、30°C、5分間、インクベーションを行い、放出された Pi 量を Youngburg and Youngburg 法により定量した。測定条件は 20mM imidazole·HCl (pH 6.9)、10 mM MgCl₂、0.5 mM dithiothreitol、60mM KCl、0.1mM CaCl₂ ないし 1 mM EGTA、1 mM ATP、副腎髄質ミオシン (0.4 mg/ml)、カルモデュリン (20 μg/ml)、副腎髄質又は砂のう平滑筋 MLCK (25 μg/ml) および骨格筋アクチン (0-0.3 mg/ml) で行なった。反応の停止はトリクロル酢酸にて行い、遠心除蛋白後 Pi 量を測定した。

5. その他の方法 部分精製した副腎髄質 MLCK 分画中の MLCK の同定はウサギに対して作製した抗ニワトリ砂のう平滑筋 MLCK 抗体を用いたイムノレプリカ法により行なった。また MLCK による副腎髄質ミオシン軽鎖のリン酸化は尿素ゲル電気泳動上での軽鎖の移動度の違いで調べた。蛋白定量はすべてマイクロビュレット法で行なった。

(結 果)

1. 副腎髄質より Ca²⁺ 感受性を有するアクトミオシンおよびミオシンの精製 副腎髄質より分離精製したアクトミオシンは Mg²⁺-ATPase 活性および超沈澱現象のいずれにおいても 10⁻⁶ M 以上の Ca²⁺ により活性化された。SDS ゲル電気泳動では、ミオシンとアクチンが主たる蛋白成分であった。精製したミオシンは SDS ゲル電気泳動上で Mr 20000 と 16500 の 2 種類のミオシン軽鎖を有することを明らかにした。

2. 副腎髄質 MLCK の同定 部分精製した MLCK 分画中では抗砂のう MLCK 抗体と免疫学的交差性を示すポリペプチドは Mr 165000 ポリペプチドのみであった。この Mr 165000 ポリペプチドは、7.5% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で副腎髄質 MLCK 分画中の 27% を占めた。部分精製した MLCK の比活性は 0.5 μmol Pi transferred/mg/min であった。この MLCK 分画によって、精製した副腎ミオシンが Ca²⁺-カルモデュリン依存性にリン酸化されることを SDS ゲル電気泳動による ³²P 取り込みと、尿素ゲル電気泳動のミオシン軽鎖の移動度の差で確認した。また上記電気泳動法で 2 種類のミオシン軽鎖中 Mr 20000 がリン酸化されることを確認した。

3. 副腎髄質ミオシンのアクチンにより活性化される Mg^{2+} -ATPase 活性と MLCK によるミオシンリン酸化との関係 ミオシン Mg^{2+} -ATPase 活性のアクチン添加による活性化をみると、 Ca^{2+} -カルモデュリン依存性にリン酸化されたミオシンでは、対照 (Ca^{2+} 非存在群) に対して2倍以上の活性化がみられた。副腎髄質 MLCK のかわりに、砂のう MLCK を用いても同様の結果が得られた。精製したミオシンがすでに約20%リン酸化されていることから、MLCK のかわりにミオシンフォスターゼを加えると、アクチン添加による ATPase の活性化は完全に抑制された。

(総括)

副腎髄質より、抗砂のう平滑筋 MLCK 抗体と免疫学的交差性を示す MLCK を部分精製し、この MLCK により副腎髄質ミオシンが Ca^{2+} -カルモデュリン依存性にリン酸化されるとアクチンによるミオシン ATPase の活性化がおこることを示した。これにより、副腎髄質アクトミオシン系において、平滑筋同様に Ca^{2+} -カルモデュリン依存性 MLCK によるミオシンのリン酸化が Ca^{2+} 制御機構に重要な役割を果たしていることを示した。

論文の審査結果の要旨

本研究は初めて、副腎髄質のアクトミオシン系が Ca^{2+} -カルモデュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼによるミオシン側制御によって調節されていることを明らかにしたものである。副腎髄質のアクトミオシン系蛋白質はカテコールアミン分泌に関与しており、その Ca^{2+} 制御機構の解明はカテコールアミン分泌における Ca^{2+} の役割を研究する上で価値のあるものと評価される。