



Title	血管平滑筋収縮蛋白の収縮活性に対するサイクリックAMP依存性蛋白燐酸化酵素の影響
Author(s)	野坂, 修一
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34829
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

氏名・(本籍)	野	坂	修	一
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6679	号	
学位授与の日付	昭和59年12月27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	血管平滑筋収縮蛋白の収縮活性に対するサイクリックAMP依存性 蛋白磷酸化酵素の影響			
論文審査委員	(主査)	教授 吉矢 生人		
	(副査)	教授 和田 博	教授 多田 道彦	

論文内容の要旨

(目 的)

カテコールアミンの β 刺激作用により、血管は拡張することが知られている。しかし、その作用は、特に生化学的レベルにおいては、血管平滑筋でのadenyl cyclaseの活性化による平滑筋細胞のcyclic AMP (cAMP)が上昇し、cAMP依存性蛋白磷酸化酵素 (cAMP-キナーゼ)が活性化された結果生ずると推定されているにすぎない。たとえば、ミクロソーム分画のCa取込み能に対し、本酵素の活性化による磷酸化の影響をみた報告がみられる。一方、平滑筋の収縮性は骨格筋と異なり、ミオン軽鎖磷酸化酵素(M LCK)による20Kダルトン軽鎖の磷酸化を介して発現することが報告され、cAMP-キナーゼによるMLCKの磷酸化によりその活性を減弱するとの報告もみられる。しかし、収縮蛋白の収縮活性にこのような機序が直接に働くか否かについては不明で、特に血管平滑筋では全く報告がない。

そこで、著者は、まず①血管平滑筋におけるcAMP-キナーゼの存否、②同平滑筋の収縮蛋白系の収縮活性の発現機序をみ、その上で、③動脈収縮蛋白の収縮活性に対するcAMP-キナーゼの影響につき検討した。

このため、動脈平滑筋よりcAMP-キナーゼを抽出し、その活性化に対するcAMPの作用を確認した上で収縮蛋白系諸成分のmyosin B, native tropomyosin, myosinを抽出し、native tropomyosinにMLCKの存在を確認し、骨格筋actinをも精製した。そして、動脈収縮蛋白の収縮活性の特性を明らかにすると共に、cAMP-キナーゼの活性化による動脈収縮蛋白系の収縮活性の影響と機序を明らかにした。

(方法ならびに成績)

実験材料は新鮮な牛の頸動脈。

1. cAMP-キナーゼの抽出

Kuo等の方法を参照し、結合織、外膜を除いた動脈のホモジネート上清を硫酸処理した後、DEAE-celluloseクロマトにより部分精製した。cAMP依存性の活性部分は二相性に抽出され、Histoneを基質にした場合、cAMP 5 μ M存在下で500 pmoles Pi/min/mg protein (37°C)であった。以上より同頸動脈にcAMP依存性蛋白磷酸化酵素が存在することが確認された。

2. 収縮調節蛋白粗分画 (NTM) 存在下における収縮蛋白actomyosinに対するcAMP-キナーゼの影響

同頸動脈よりCa²⁺存在下に収縮活性を示す収縮蛋白粗分画myosin Bを得、これより江橋らの方法でCa²⁺に感受性のない収縮蛋白actomyosin (AM)と収縮調節粗分画native tropomyosin (NTM)を得た。AMのMg²⁺-ATPase活性はCa²⁺存在下でも低く、かつ、超沈殿活性は認められなかったが、Ca²⁺存在下でNTMを添加すると、Mg²⁺-ATPase活性は増大し、かつ、有意の超沈殿活性を発現した。そこで、Ca感受性をもち収縮活性増大作用を持つNTMとcAMP-キナーゼをcAMP存否下に反応させAMに添加、AMの収縮活性を検討したところ、cAMP無添加での反応系のMg²⁺-ATPase活性は73n moles pyruvate / mg protein / 5 min.で、cAMP添加時は66n molesと低下した。超沈殿活性もcAMP添加時にはATPase活性と同様、有意の低下を認めた。そこで、竹内らの方法により、myosinを抽出し、Spudichらの方法で得たうさぎの骨格筋actinを用い合成actomyosinを作成、同様の検討を行なった。この場合、cAMP-キナーゼは牛の心筋より抽出された同酵素の活性型 (catalytic unit) を使用した。cAMP-キナーゼ無処理のNTMを添加し増大したactomyosinのMg²⁺-ATPase活性を100%とした場合、catalytic unit 1.25及び2.5 μ gの存在下に10分間NTMを処理した場合の増大したactomyosinのMg²⁺-ATPase活性はそれぞれ84%、71%と低下した。超沈殿活性も同様の処置で著明に低下した。

3. ミオシン軽鎖磷酸化による収縮活性とcAMP-キナーゼとの関連

Ca²⁺存在下でのNTMによる合成actomyosinの収縮活性発現機序をPerryらの方法に従い、Urea gel電気泳動法によるミオシン軽鎖の磷酸化の検討の下に解析した所、NTMにMLCK活性があり、動脈平滑筋の収縮活性がミオシン磷酸化説に従うことが確認された。そして垣内らの方法によるchicken 砂囊平滑筋のMLCKに対する抗体を用いたimmune blotting法により、NTMに含まれる165K及び135Kダルトン両成分がMLCK抗体と反応することが判明し、これが動脈平滑筋MLCKと断定された。また、catalytic unitによるNTMの処理によってNTMの135KダルトンのMLCK成分がcAMP-キナーゼにより磷酸化されるということがHartshorneらの方法に従った [γ -³²P]ATPを用いた実験で判明した。そこで、上述したNTMによる動脈収縮蛋白の収縮活性に対するcatalytic unitの影響をUrea gel電気泳動法でのミオシン磷酸化との関連の下に検討した。NTMを一定にしcatalytic unitを変量して前処理し、収縮蛋白系に加えると、用いたcatalytic unitの濃度に比例してミオシン軽鎖の磷酸化の抑制がみられ、反応系の収縮活性および超沈殿活性の低下と相関した。

(総括)

1. 牛の頸動脈よりcAMP依存性蛋白磷酸化酵素を部分精製し、動脈平滑筋に本酵素の存在を確認した。 2. 動脈平滑筋収縮蛋白actomyosinは、抽出された収縮調節蛋白粗分画NTMに存在するCa²⁺依存性MLCKにより、myosinの20Kダルトン軽鎖の磷酸化をうけて、収縮活性、即ち、Mg²⁺-ATPase活性、並びに超沈殿活性の発現をみた。 3. この収縮活性はcAMP-キナーゼの存在下に抑制された。 4. 抽出さ

れた動脈の収縮調節蛋白粗分画NTMにはtropomyosin以外にMLCK活性成分を含有し、それは165 K, 135 Kダルトンの2成分であった。5. 精製された動脈myosinと骨格筋actinからなる合成actomyosinにおいても、 Ca^{2+} 存在下でNTMにより Mg^{2+} -ATPase活性、超沈殿活性が発現された。本活性はcAMPキナーゼの活性型catalytic unitで前処理したNTMにより抑制された。6. この処置による収縮活性抑制は、NTMに含有されるMLCKの135 Kダルトン成分のcatalytic unitによる磷酸化を介するミオシン磷酸化の抑制を介するものと結論された。

論文の審査結果の要旨

カテコールアミンの β 刺激作用による血管拡張作用を明らかにする目的で牛頸動脈を材料に収縮蛋白および収縮調節蛋白を抽出し、その収縮弛緩機構の面から検討した。

本収縮蛋白の収縮活性はミオシン軽鎖の Ca^{2+} 依存性磷酸化度と相関し、この磷酸化は収縮調節蛋白分画に含まれるミオシン軽鎖磷酸化酵素 (MLCK) により行なわれることを示した。

一方、本動脈よりcAMP依存性蛋白磷酸化酵素をも抽出し、その存在を明らかにし、 β 刺激によるその酵素の活性化でMLCKが磷酸化を受け、そのミオシン軽鎖磷酸化能を減じ、収縮抑制が招来されることを明らかにした。この研究は医学博士の授与に値する論文である。