



Title	血管平滑筋からのカルデスモンとミオシン軽鎖キナーゼの精製，およびその性質，細胞内分布の検討
Author(s)	山崎， 恵司
Citation	大阪大学，1987，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35765
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	やま	ざき	けい	し
	山	崎	恵	司
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7902	号	
学位授与の日付	昭和62年10月13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	血管平滑筋からのカルデスモンとミオシン軽鎖キナーゼの精製, およびその性質, 細胞内分布の検討			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	藤田	尚男	教授 多田 道彦

論文内容の要旨

【目 的】

近年, 平滑筋収縮における Ca^{2+} 制御は, アクチン側およびミオシン側の両側制御によりなされていることが明らかになるつつある。血管平滑筋のミオシン側制御の存在は明らかであるが, アクチン側制御に関しては, まだ十分な知見が得られていない。そこで今回, 血管平滑筋アクチン-ミオシン系の Ca^{2+} 制御を明らかにする目的の一環として, 砂のう平滑筋アクチン側制御の主役をなすカルデスモン (以下 CaD と略す) とミオシン側制御に重要なミオシン軽鎖キナーゼ (以下 MLCK と略す) の血管平滑筋からの簡易精製法を開発し, 両蛋白質の性質および血管平滑筋細胞における分布を検討した。

【方法ならびに結果】

1. 血管平滑筋 CaD, MLCK の精製

新鮮な牛頸動脈平滑筋100gをミンチし, 3倍容の抽出液 (50mM imidazole-HCl (pH6.9), 1mM DTT, 300mM KCl, 2mM ATP, 0.5mM MgCl_2 , 0.25mM PMSF, leupeptin $5\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1mM diisopropyl fluorophosphate, SBTI $20\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え, Waring blender でホモジナイズした後, 40,000xg で30分間遠心し, その上清を硫酸分画 (30-50%飽和) した。得られた分画を, 100mM KCl を含む緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM DTT, 0.2mM CaCl_2 , leupeptin $5\mu\text{g}/\text{ml}$) で溶解し, 105,000xg 30分間遠心した上清をカルモデュリンアフィニティカラムにアプライし, Ca^{2+} 依存性にカルモデュリンに結合する分画を得た。次いで, この分画から TSKgel DEAE-5PW カラムを用いた HPLC により, KCl 濃度 200mM で溶出される粗 CaD 分画を得た。さらに, KCl 濃度を増加して 200-250mM の濃度勾配溶出法により MLCK を精製した。MLCK 活性は, $[\text{}^{32}\text{P}] \text{ATP}$ を用いてニフト

り砂のうミオシン軽鎖のリン酸化能により測定した。粗CaD分画を再度DEAE-5PWカラムにアプライし、KCl濃度100, 200, 300mMのstepwise elutionを行ない、200mM KClでCaDを溶出した。精製したCaDおよびMLCKは、SDSゲルのデンストメーターによる測定で、各精製度がそれぞれ98%, 97%であった。収量は、血管平滑筋100g当り各々8-9mg, 2-4mgであった。蛋白定量はLowry法により行った。

2. 性質（ニワトリ砂のう平滑筋との比較）

SDSゲル電気泳動およびゲルクロマトグラフィーによる測定で、砂のうCaDは150KDa/147KDaのヘテロ二量体であるのに対し、血管CaDは148KDaのホモ二量体であった。血管MLCKの分子量は160KDaであり、砂のうMLCKの135KDaに比し、はるかに大きかった。血管CaD, MLCKは、砂のうCaD抗体および砂のうMLCK抗体を用いたイムノブロット法により、砂のう両蛋白質と免疫学的交叉性を示した。血管MLCKは、砂のうMLCKと同様 Ca^{2+} 、カルモデュリン依存性に活性化能を示した。砂のうミオシン軽鎖を基質としたときの血管MLCK活性は、 $K_m=9.5\mu\text{M}$, $V_{\max}=12.5\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ で、砂のうMLCKとほぼ同値であった。遠心法により、血管および砂のうCaDはともにF-アクチンと結合し（ $K_a=1.3\sim 1.7\times 10^7\text{M}^{-1}$, $B_{\max}=1\text{CaD}/12-14\text{アクチン}$ ）、 K_a および $B_{\max}$ に有意の差は認められなかった。また、両者ともに Ca^{2+} 濃度に依存してカルモデュリン、F-アクチン間で結合性の変換（フリップ・フロップ結合）を示した。血管および砂のうMLCKはともにF-アクチンに結合するが、血管MLCK（ $K_a=5.1\times 10^6\text{M}^{-1}$, $B_{\max}=1\text{MLCK}/12-13\text{アクチン}$ ）の方が砂のうMLCK（ $K_a=9.0\times 10^6\text{M}^{-1}$, $B_{\max}=1\text{MLCK}/12-13\text{アクチン}$ ）よりもF-アクチンに対する親和性が高かった。

3. 細胞内分布

初代培養ラット大動脈平滑筋細胞において、CaD抗体、MLCK抗体を用いた間接免疫蛍光法による細胞内分布を検討したところ、両蛋白質ともアクチン線維束であるストレス線維に局在していた。

〔総括〕

血管平滑筋収縮における Ca^{2+} 制御機構を解明する第一段階として、その調節系の主役をなすと考えられるCaD, MLCKの簡易精製法を開発し、それぞれがニワトリ砂のう平滑筋のものと非常に似た性質を有していることを明らかにした。また、血管平滑筋細胞における分布が、両蛋白質ともストレス線維に局在していることから、CaD, MLCKともにアクチンフィラメントとの機能的関連を通してアクトミオシン系制御に関与している可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、砂のう平滑筋アクトミオシン系の収縮制御因子であるカルデスモン、ミオシン軽鎖キナーゼを、血管平滑筋より同時に精製する方法を開発し、さらに両蛋白質の性質、細胞内分布を明らかにしたものである。

これまで、血管平滑筋アクトミオシン系の Ca^{2+} 制御機作は明らかになっていなかったが、本研究によりその制御因子の存在が示されたもので、今後の Ca^{2+} 制御機構解明に寄与するものと評価される。