

Title	Protein-protein Interaction of Detergent-solubilized Ca <sup>2+</sup> -ATPase during ATP Hydrolysis Analyzed by Lowangle Laser Light Scatterig Photometry Coupled with High-performance Gel Chromatograpy
Author(s)	木島, 祥行
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37153">https://hdl.handle.net/11094/37153</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

氏名・(本籍)	木 島 祥 行
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9085 号
学位授与の日付	平成 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Protein-protein Interaction of Detergent-solubilized Ca <sup>2+</sup> -ATPase during ATP Hydrolysis Analyzed by Low- angle Laser Light Scattering Photometry Coupled with High-performance Gel Chromatography (低角レーザー光散乱法による筋小胞体 Ca <sup>2+</sup> -ATPase の 分子集合状態の検討)
論文審査委員	(主査) 多田 道彦 教授 (副査) 岡本 光弘 教授 田川 邦夫 教授

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

筋小胞体 (SR) による Ca<sup>2+</sup> 輸送は筋肉の興奮収縮連関において中心的な役割を担っている。SR 膜に存在する Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ATPase) は、ATP の化学エネルギーを、SR 膜を介した Ca<sup>2+</sup> 濃度勾配 (浸透圧エネルギー) に変換する酵素で、Ca<sup>2+</sup> の SR 膜内への能動輸送を行っている。

従来、非イオン性界面活性剤 (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> など) で可溶化した ATPase では、モノマー (分子量 11 万) が ATP 加水分解の最小単位であると報告されている。一方、電子顕微鏡などの構造的解析および酵素学的解析は、ATPase の SR 膜内でのダイマー構造を示唆しており、その Ca<sup>2+</sup> 能動輸送の最小機能単位は未だ明らかでない。本研究では、このダイマー構造の生理的意義を明らかにする目的で、可溶化 ATPase の ATP 加水分解時における分子サイズを、低角レーザー光散乱法 (Low-angle laser light scattering photometry; LALLS 法) を用いて解析した。

#### 〔 方 法 〕

SR より精製した ATPase は、界面活性剤 C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> で可溶化後、LALLS 法にて解析した。本法は高性能ゲルクロマトグラフィーと 3 つの検出器、低角レーザー光散乱計 (LS)、示差屈折計 (RI)、紫外吸光度計 (UV) よりなり、以下の二つの式から、ポリペプチド部分の分子量 (MW) とそれに結合した界面活性剤・磷脂質の結合量 (δ) が決定できる。

$$MW = K1 \cdot A^{-1} \cdot LS \cdot UV \cdot RI^{-2}$$

$$0.134\delta + 0.187 = K2 \cdot A \cdot RI \cdot UV^{-1}$$

ここで LS, RI, UV は、それぞれ各検出器の出力を表わす。UV は 280 nm でモニターした。A は

280 nmにおけるATPaseの吸光係数で、定量的アミノ酸分析により  $1.11 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  と決定した。溶出緩衝液は  $0.3 \text{ mg/ml}$  C12E8,  $50 \text{ ug/ml}$  phosphatidylcholine,  $0.1 \text{ M}$  KCl,  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1.5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $1 \text{ mM}$  EGTA,  $3.1 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $20 \text{ mM}$  HEPES/imidazole (pH 7.0) とした。カラムは, TSK G3000SWXL (2本直列) で,  $0.3 \text{ ml/min}$  の流速で溶出した。更に,  $5 \text{ mM}$  ATP, ADP, AMP-PCP, および  $\text{CaCl}_2$  を適宜添加し同様の実験を行った。カラムおよびLSのセルは循環水にて恒温化した。ゲル濾過中のATPase活性は, 溶出液中のPi定量により評価した。

#### 〔成績〕

##### (i) ATP非存在下でのATPaseの分子サイズ

$0.8 \text{ mg}$  のATPaseは,  $0^\circ\text{C}$  でモノマー(M)とダイマー(D)に分離して溶出した。その分子量はそれぞれ  $125,000 \pm 2,100$  ( $n=3$ ) および  $211,300 \pm 7,300$  ( $n=3$ ) と評価された。 $\delta$  は, ATPase蛋白質  $1 \text{ g}$  当り Mは  $0.60 \text{ g}$ , Dは  $0.43 \text{ g}$  と計算された。 $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  ではATPaseは, 単一成分として溶出し, 分子量はMとDの中間値 ( $156,000$  および  $178,900$ ) を示した。

##### (ii) ATP加水分解時のATPaseの分子サイズ

$0^\circ\text{C}$  でMとDが分離する条件下で,  $5 \text{ mM}$  ATPを添加すると,  $1.6 \text{ mg}$  のATPaseは分子量  $168,000$  の単一成分として溶出し, MとDの融合が認められた。この際, 分子量は蛋白質濃度依存性にM, 中間値, Dと変化した。ATPase活性は, 約  $90 \text{ nmol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  で分子量にかかわらず一定であった。 $5 \text{ mM}$  ADPまたはAMP-PCP存在下ではMとDの融合は認められなかった。 $5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $5 \text{ mM}$  ATP共存下でATP加水分解速度を抑制すると ( $< 20 \text{ nmol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ), MとDは分離した。

#### 〔総括〕

本法においてATPaseのM $\rightleftharpoons$ D間の速い相互変換は, MとDの融合および中間値の分子量として観察される。可溶性ATPaseは $0^\circ\text{C}$  で相互変換が遅くMとDに分離するが, ATP加水分解時にはMとDの融合が観察され, M $\rightleftharpoons$ D間の速い相互変換が起こることが示された。また,  $5 \text{ mM}$  AMP-PCPあるいは $\text{CaCl}_2$ 存在下の実験から, ATPase蛋白質間相互作用は磷酸化中間体の生成過程ではなく, その分解過程で起こっている可能性が示された。以上の結果は, ATPaseによるSR内への $\text{Ca}^{2+}$ 能動輸送に際して, ATPaseの蛋白質間相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆する。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は, 可溶性膜蛋白質の分析に最適な低角レーザー光散乱法を用いて, ATP加水分解時の筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseの蛋白質間相互作用を解析したものである。可溶性 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaseはその酵素活性と密接に関連したモノマー・ダイマーの相互変換を示し, この蛋白質間相互作用が磷酸化中間体分解過程で起こる可能性が示された。これらの知見は, 筋小胞体膜での $\text{Ca}^{2+}$ 能動輸送に $\text{Ca}^{2+}$ -ATP

ase 蛋白質間相互作用が重要な役割を担っている可能性を示したもので、生体エネルギー変換機構を解明する上で重要な成果であり、学位に値するものと考えられる。