The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The state of the acylphosphate group in the active site of Na+, K+ -ATPase
Author(s)	丑丸, 眞
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41012
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	丑丸　眞（うしまる　まこと）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　13992　号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	The state of the acylphosphate group in the active site of Na^+, K^+−ATPase （Na^+, K^+−ATPase活性部位内のアシルリン酸基の状態について）
論文審査委員	（主査） 教　授　小倉　明彦 （副査） 教　授　二井　将光　　教　授　徳永　史生　　助教授　山本　泰望

論文内容の要旨

Na^+, K^+−ATPaseなどP型 ATPase は，ATP加水分解反応中に，ATPのγ位のリン酸基が酵素の Asp残基に転移したリン酸化中間体を形成することを特徴とするイオン輸送酵素である。このリン酸化中間体は，イオン輸送においても重要な役割を担っている。イオン輸送機構の解明には，この酵素の導入されたリン酸基とアミノ酸側鎖との相互作用に関する知見が不可欠である。その端緒として，酵素中のリン酸基及びその周囲の状態について，求核試薬ヒドロキシルアミンと活性酵素内のリン酸基との反応性を指標として，検討を行った。以下に示した結果は，リン酸化部位に存在するリン酸基と求核試薬との反応性という直接的方法により，リン酸基及びその周囲の状態を明らかにしたものである。

ヒドロキシルアミンは変性リン酸化酵素のリン酸基と求核置換反応し，ヒドロキサム酸を形成する。しかし，活性リン酸化中間体とヒドロキシルアミンとの反応機構は不明であった。まず，リン酸化中間体の分解に対するヒドロキシルアミンの反応機構を明らかにした。ヒドロキシルアミンは，E_1P, E_2Pのどちらのリン酸化中間体の分解も促進したが，ヒドロキシルアミンの前処理により酵素活性は阻害されなかった。この結果は，ヒドロキシルアミンが活性酵素のリン酸基と，ヒドロキサム酸を形成する変性酵素との場合と異なる機構，即ち，リン原子を求核中心とした求核反応を行っていることを示唆していた。この反応機構に従うならば，ヒドロキシルアミンとリン酸化中間体の反応の結果，N-P結合をもつリン酸化ヒドロキシルアミンの生成が予想された。^{31}P-NMRによる反応生成物の分析の結果，N-P結合をもつ化合物の生成が確認された。従って，ヒドロキシルアミンは，活性リン酸化酵素と，そのアシルリン酸基のリン原子を求核中心とする求核反応を行うことが明らかとなった。

変性リン酸化酵素と活性リン酸化酵素ヒドロキシルアミンとの求核反応機構の違いは，両者のリン酸基の状態の違いを反映していると考えられた。リン酸化酵素の最も簡単なモデル物質としてアセチルリン酸を用い，種々の条件下での求核中心の位置を指標に，酵素の活性部位内のリン酸基の状態を推測した。アセチルリン酸は，ヒドロキシルアミンとの反応において，リン酸基の解離状態やMg^{2+}の配位により影響を受けず，炭素原子が求核中心となった。また，非経験的分子軌道法による計算から，周囲の分子と相互作用のない状態のアセチルリン酸は，リン原子が求核中心になる傾向にあることが示唆されている。以上，周囲の分子と相互作用のない状態の時リン原子が求核中心となること，リン酸基の解離状態が求核中心を変更しないことから，リン酸化酵素内のリン酸基は，リン酸基部分で蛋白質と相互作用している可能性があるが，カルボニル酸素はアミノ酸側鎖と水素結合などの相互作用をしていないと考え

られる。

Na^+, K^+－ATPaseは，特異的阻害剤Ouabainの結合によりE_2Pが，二価金属イオンの結合部位からの除去によりE_1Pが，それぞれ安定化され，活性が阻害される。これらのリン酸化酵素のリン酸基の状態を，ヒドロキシルアミンにより検討した。いずれの場合も，リン酸基はヒドロキシルアミンと反応しなかった。これは，安定化されたリン酸化中間体のリン酸基は，酵素分子の外からは隔離された状態にあることを示唆した。しかし，この外界からの隔離が酵素活性阻害の第一原因であるかは不明である。

Na^+, K^+－ATPase以外のP型ATPaseのリン酸化中間体に対するヒドロキシルアミンの作用を検討した。骨格筋$SRCa^{2+}$－ATPaseのE_1P，E_2Pいずれのリン酸化中間体も，ヒドロキシルアミンによる分解の促進はされなかった。これらのP型ATPaseのヒドロキシルアミンに対する反応性の違いは，活性中心の構造の違いを反映しているのではないかと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞内のイオン環境はさまざまな分子装置によって一定に保たれている。そのうち重要なものにイオンポンプ(イオン輸送性ATPアーゼ）がある。イオンポンプがイオンを輸送する際の構造変化を知るため，丑丸君はヒドロキシルアミンという試薬を用い，Na^+イオンポンプが機能する際のアシルリン酸中間体（ポンプ分子のアスパラギン残基にATPの化学エネルギーが一時的に移された形）の状態を解析した。その結果，反応中心の立体配置が従来想定されていたものとは違ったものであることを明らかにした。また，ポンプの阻害剤ウワバインの作用機構が，このリン酸基の配位を変化させることにあることも明らかにした。これらの研究は，イオンポンプ研究に新たな局面を拓くものであり，理学博士の学位論文として十分な価値をもつものと認める。