

氏名・(本籍)	ふる　ごおり　たか　ひろ 古　郡　隆　弘
学位の種類	理　学　博　士
学位記番号	理博第265号
学位授与年月日	昭和46年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院理学研究科 (博士課程)生物学専攻修了
学位論文題目	Studies on Some Properties of Myosin Band Adenosine Triphosphatase Activity of Myosin of Myosin of Sea-Cucumber Longitudinal Muscle (ナマコ縦走筋から抽出されるミオンBの諸性質、及びミオシンのATPase活性について)
論文審査委員	(主査) 青木　　廉 教授 樋渡宏一 教授 小西和彦 助教授

論　文　目　次

序

Parv I ミオシンBの諸性質

Parv II ミオシンのATPase活性

文　献

図と表

論文内容要旨

序

筋収縮の中心的役割をもつ構造タンパク質であるミオシンについての研究は 1939 年のミオシンの ATPase 活性の発見以来、数多く行なわれてきた。ウサギ横紋筋を材料としたミオシンについては、現在ではかなり詳細な点まで明らかにされている。

一方筋肉は横紋筋の外、平滑筋が存在し、主として内臓等の運動を担当している。平滑筋の構造タンパク質についての研究は、横紋筋の場合に比べてきわめてわずかしかな行なわれていないのが現状である。一般に平滑筋は極く少量しか存在しないこと、又夾雑物が多く、タンパク質の調製に困難な面があり、ミオシンを抽出するのに適した平滑筋の検討が充分になされていない。われわれはミオシン抽出のための平滑筋として以下の理由でナマコ縦走筋が適当な材料であると判断した。

即ち、ナマコ縦走筋は次のような特徴を持っている。

(1)平滑筋であり、横紋筋の変形とみられる斜紋筋構造を持っていない。(2)筋肉のみを単離することができ、又結締組織の混入がすくない。(3)筋繊維が平行に走っており、グリセリン処理による筋標本を作ることが容易なため、将来生理学研究を行なうことが可能である。(4)ナマコは無脊椎動物のため、脊椎動物平滑筋から得られるミオシン等と比較的研究することもできる。

著者はナマコ縦走筋から得られたミオシン B ならびにミオシンの諸性質ならびにグリセリン処理筋作製の可能性について実験を行なった。第一部では、ミオシン B の諸性質ならびにグリセリン処理筋について、第二部ではミオシン ATPase について報告する。

Part I ミオシン B の諸性質

1. ミオシン B の調製

ミオシン B の抽出はマナマコ (*Sticopus japonicus*) 縦走筋 15~20 g をホモゲナイズしたのち、Weber - Eddsall 溶液で 24 時間抽出し、沈澱、溶解を二回繰返し、夾雑物を除いて調製した。この方法で生筋 1 g 当り約 12mg のタンパク質を得ることができた。

ミオシン B の ATPase 活性測定は 10mM tris-maleate-KOH 緩衝液 (pH 7.0) 又は 20 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)、1mM ATP、タンパク質溶液 0.2~0.4 mg/ml の条件で effector(s) を適当量加えて行なった。測定温度は 28° であった。ATP の分解により生成する無機リン酸は Allen 法の中村変法により測定した。

2. 結 果

ミオシン B ATPase 活性測定を妨害するような夾雑酵素 (apyrase, adenylate kinase) の混入は認められなかった。ナマコ縦走筋より得られるミオシン B の ATPase 活性はウサギ横紋筋からのミオシン B に比べると低いが、10 mM CaCl₂ を添加するとウサギ横紋筋ミオシン B とほぼ同程度まで活性は上昇する。

ナマコミオシン B ATPase 活性に対する KCl, pH の影響はウサギ横紋筋ミオシン B の場合と

わめて類似していた。しかし pH の影響において酸性側ではきわめて活性が低く、pH5.5 ではかなり量の失活さえも認められた。

Ca^{++} はナマコミオシン B ATPase を強く活性化した。その活性化の割合はウサギ横紋筋ミオシン B の場合よりはるかに大きい。他方 Mg^{++} は調べたいかなる条件においてもナマコミオシン B ATPase を活性化せず、阻害作用のみを示した。EDTA は高濃度の KCl 条件下で、ナマコミオシン B ATPase を活性化せず、阻害作用のみを示した。EDTA は高濃度の KCl 条件下でナマコミオシン B ATPase を活性化した。EDTA の効果はウサギ横紋筋の場合と全く同様であった。

グリセリン処理筋を作製するために、ウサギ腰筋の場合の方法を用いた。つまり適当に弛緩したナマコを固定し、開腹して縦走筋を両端を残して体壁からはずし、ガラスの添棒に固定して取り出し、50% グリセリン溶液に漬けることによってグリセリン処理筋を作製した。グリセリン処理筋を針で細い繊維に分け、これを ATP 溶液につけるとこの筋肉は収縮することがわかった。そこで無自荷のまま ATP による収縮を調べた結果、高濃度の Mg^{++} (1mM) が収縮に良い結果をもたらし、 Ca^{++} は混入する濃度 (10^{-6} M 以上) 以上では収縮に影響を与えないことがわかった。

Part II ミオシンの ATPase 活性

1. ミオシンの調製

ナマコ縦走筋30~40g をホモゲナイズしたのち、抽出液 (0.45M KCl 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5), 2mM EDTA) で30分間抽出した。この抽出液を沈澱 溶解を行ない、更に溶液状態で 105,000g, 60分間遠心して夾雑物を除き、再び cysteine を含む溶液で沈澱、溶解を二回繰返した。最後に 150,000g, 90分間遠心して溶液部分の上部 2/3 の部分を sample として得た。この方法で生筋 1g 当り 3mg/ml のタンパク質が得られた。ミオシン ATPase 活性の測定はミオシン B の場合とほぼ同じ条件で行なった。

2. 結 果

ナマコ縦走筋から得られるミオシンの ATPase 活性は各種動物の横紋筋から得られるミオシンと比較して活性が低かったが、脊椎動物平滑筋から得られたミオシンとはほぼ同程度の活性を示した。

ATPase 活性に対する KCl, pH の影響はウサギ横紋筋のミオシンの場合とほとんど類似していた。 Ca^{++} はナマコミオシン B ATPase の場合同様 ATPase 活性を強く促進した。

又、 Mg^{++} は ATPase 活性を阻害した。EDTA ならびに GEDTA は高 KCl 濃度条件下で ATPase 活性を促進した。特に EDTA は強い付活効果を示したが、これは夾雑している Mg^{++} を除いたためと推定される。

低濃度の尿素 (0.6 M) はこのミオシン ATPase 活性を強く活性化した。尿素によるミオシン ATPase の活性化は平滑筋から得られる場合のみ認められる現象である。しかし、脊椎動物平滑筋ミオシンで認められた guanidine - HCl での活性化は認められなかった。

脊椎動物横紋筋から得られるミオシンはトリプシン消化による分子構造の切断によってもその ATPase 活性には影響を受けないことが知られている。一方脊椎動物平滑筋から得られるミオシンの場合は、トリプシン消化によってその ATPase 活性が大きく増大する。又無脊椎動物横紋筋ミオシンの場合はトリ

ブシン消化によってその ATPase 活性は失われてしまうことが報告されている。ナマコ縦走筋ミオシンに対するトリブシンの効果を今まで報告されている条件と同様にして調べたところ、ATPase活性は経時的に失われた。そこでミオシンとトリブシンの量比を下げ、500 : 1 (w/w) にすると、ATPase 活性は約2倍に増加した。1,000 : 1 の場合も同様であったが、最大活性を示すまでの消化時間は約2倍を要した。

低濃度 PCMB はウサギ横紋筋ミオシンの ATPase 活性を増加させることが知られているが、他の材料よりのミオシン ATPase 活性に対する効果は報告されていなかった。ナマコ縦走筋ミオシン ATPase に対する PCMB の効果はきわめて低い濃度 (10^{-7} M) で活性化があり、それ以上の濃度では阻害するという結果を得た。

考 察

ATPase活性の一般的性質はミオシンB、ミオシンの場合共ウサギ横紋筋からのミオシンB、ミオシンときわめて類似しているが、二価陽イオンに対する振舞いは異っていた。特に脊椎動物横紋筋での筋収縮の中心的役割を表現するものと考えられているミオシンB ATPase 活性の Mg^{++} による活性化はわれわれの用いた材料でも見い出されなかった。しかし次のような点からナマコ縦走筋のミオシンは横紋筋のそれに比べてタンパク質それ自体が変性しやすいものと考えられるだろう。

(1)トリブシン消化による ATPase の活性化が低いトリブシン濃度でみられたこと。又 overdigestion による ATPase 活性の失活があること。(2) PCMB による ATPase の活性化がきわめて低い濃度で行なわれたこと。(3)低濃度尿素による活性化があること。(4)この sample はあまり貯蔵には耐えられないこと。

従って Mg^{++} による活性化が表現されなかったのは、ナマコ縦走筋ミオシンが調整中に若干の構造変化をうけたと考えるのが妥当であろう。

これらのことはナマコ以外の平滑筋から得られたミオシン、又は無脊椎動物横紋筋から得られたミオシンにもあてはまると思われる。更に、無脊椎動物横紋筋からのミオシンがトリブシン消化によって失活のみがおこることが報告されているが、これは使用したトリブシン濃度がそのミオシンに対して用いるには濃すぎたためか、調製から活性測定までの間にトリブシン消化による活性化の部分が失われてしまったのではないかと思われる。

ナマコ縦走筋ミオシンは脊椎動物横紋筋のミオシンと比べると、その構造が不安定であるため、種々の特徴的な差異が現われるものと思われる。

論文審査結果の要旨

筋肉収縮の機構は、収縮性蛋白質と ATP の相互作用の面から研究され、その分子論的機構はかなり解明されている。しかし、これらの研究は、主として横紋筋の収縮性蛋白質を用いてなされたもので、生体内で重要な役割を担っている平滑筋についての研究は少く、殊に無脊椎動物の平滑筋に関しては、その収縮性蛋白質の諸性質及び収縮機構に関する研究はほとんどなされていない。平滑筋、特に無脊椎動物の平滑筋の収縮性蛋白質を明らかにすることは、筋収縮機構のより普遍的解明に重要なことである。

本論文の研究では、ナマコ縦走筋が夾雑物が少い平滑筋であることから、この筋肉からミオシン B (アクトミオシン) 及びミオシンの抽出を試み、それらの ATPase の諸性質を調べたものである。ミオシン B ATPase については、活性はウサギ骨格筋ミオシン B ATPase より低いが、10mM Ca イオン添加でウサギミオシン B ATPase 活性にはほぼ等しくなった。KCl, pH の効果はウサギミオシン B と同様であるが pH 5.5 で失活が著しい。Mg イオンによる活性化は見られず、Ca イオンによる活性化は著しい。

ミオシン ATPase については、各種動物の横紋筋から得られたミオシンより活性は低いが、平滑筋より得られたミオシンとはほぼ等しい活性を示した。

0.6M 尿素でミオシン ATPase は著明に活性化されたが、グアニシン塩酸では活性化は見られなかった。また、トリプシン濃度が低いとき ATPase は活性化され、また -SH 試薬である PCMB での活性化は横紋筋ミオシンの場合に比べ、はるかに低い濃度で観察された。以上の実験結果とナマコ縦走筋のミオシン B 及びミオシンが精製後変性しやすいことから、このミオシン及びミオシン B はウサギ骨格筋ミオシンとほぼ同様の性質をもっているが構造が不安定なため、特徴的性質があらわれるであろうと推論した。

この研究は、従来詳細な研究のなかった無脊椎動物の平滑筋ミオシン、ミオシン B ATPase の性質の幾つかを明らかにしたもので、筋生化学上、重要な研究であり、博士の学位論文として適当である。

よって、古郡隆弘提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。