



# 論文内容要旨

## 第一章 緒 論

筋小胞体は、筋細胞の中で収縮系を取りまいて一つの細胞器官である。筋小胞体は、筋ホモゲネートから分別遠心分離によってミクロソーム分画として単離できる。

この筋ミクロソーム（以下、筋小胞体膜と呼ぶ。）は、100 nm程度の直径をもつ小胞であり、MgイオンおよびATPの存在下で、反応混液中のCaイオンをその内胞に取り込む。このCaイオンの取り込み（輸送）は、ATPの加水分解と共役した能動輸送であることが知られており、その生理作用は、筋細胞内のCaイオン濃度を低下させ、収縮系の弛緩を起すこととされている。

筋小胞体膜のCaイオン輸送の機構についての研究は、その膜成分が比較的単純なことから、高度に機能分化した材料であることもあって広汎に行なわれてきた。そして、多くの研究結果が、膜のタンパク質成分の60～90%を占めるCa-Mg ATPaseが、輸送の中心的役割を担っていることを明らかにしてきた。

1971年に、Tonomuraらが提唱したCaイオンの輸送機構は、まず、膜の外側でCaイオンとMg・ATPが、順序性もたずに、Ca-Mg ATPase (E)に結合する。 $E \xrightarrow{Mg \cdot ATP} E_{Ca}^{Mg \cdot ATP}$ 複合体は、自発的に $E \xrightarrow{Ca} E_{Ca}^{P}$ となり、結合したCaイオンを内側に輸送する。内側では、Caイオンと、MgイオンあるいはKイオンが交換し、Caイオンは内腔に遊離される。次に、 $E_{Ca}^{P} \xrightarrow{Mg, K} E_{Mg, K}^{P}$ 複合体は、自発的に無機リン酸、MgイオンあるいはKイオンを外側に放出するというものである。すなわち、Ca-Mg-ATPaseが輸送の総ての反応（Caイオンの認識、輸送、遊離、エネルギー変換）を行なうとするものである。

現在までのところ、この機構と全面的に矛盾する結果の報告はないが、その詳細な点はまだ不明確である。その他、Ca-Mg ATPaseの分子運動、エネルギー交換機構、あるいは少量のタンパク質成分がどのようにCaイオン輸送に関与するか、等の問題が残されている。

Caイオン輸送においては、Ca-Mg ATPaseとその調節因子である金属イオン（Ca, Mg, K）との高次な複合体が、本質的な意味をもつわけであるが、著者は、この複合体の構造維持と機能発現における、これら金属イオンの作用機作を究明することを試みた。はじめに、従来からその存在が報告されていた筋小胞体膜の内在性（洗じょう後も残存する）Caイオンに着目し、このCaイオンをキレート剤などで除くことによりCaイオン輸送がどのように変化するかを調べた。同様の実験を精製したCa-Mg ATPaseについても試み、内在性Caイオンが、膜および酵素タンパクの構造維持に不可欠であるという結論を得た。さらに、Kイオンも、Ca-Mg ATPaseの構造と機能の両面で効果をもち、Caイオン輸送における重要性が示唆された。

## 第二章 実験材料および方法

筋小胞体膜は、原則的にはE bashi あるいはTonomura らの調製方法に従い、家兎の骨格筋ホモゲネートから分別遠心分離でミクロソーム分画として得た。筋小胞体膜Ca-MgATPaseは、筋小胞体膜を0.5 MKCl 存在下でDeoxycholate (DOC) で可溶化し、その可溶性部分をSephadex G-100 でゲル濾過することにより精製した。

内在性Ca イオンのCa イオン輸送に及ぼす効果は、試料をEDTA (あるいはEGTA, 酸性pH) で処理し、Ca イオンを除去することにより、試料の酵素活性がどのように変化するか、また、Ca イオンの試料への再結合により酵素活性が回復するかどうかにより調べた。また、K イオンの効果は、EDTA 処理時に共存することにより、酵素活性にどのような効果をもたらすか、あるいは、試料をK イオンを含まない緩衝液で遠心懸濁をくり返して洗うことによって試料溶液からK イオンを除いた時に酵素活性にどのような変化があるかをみることで調べた。

以上のように、構造的な面から調べる一方、より機能的な面でのCa イオン、K イオンの効果は、酵素活性測定の際の反応混液にあって、これらのイオンがどのような効果をもつかをみることで調べた。

酵素活性のうち、ATPase 活性は、ATP の加水分解により生じた無機リン酸をAllen の中村変法で定量し求めた。また、Ca イオンの取り込み活性は、<sup>45</sup>Ca イオンを用い、ミリポアフィルタ法により測定した。ATPase のリン酸化中間体の形成反応は、基質に(γ-<sup>32</sup>P) ATP を用い、通常Ca イオン存在下、0℃で行なった。グリコーゲンホスホリラーゼ活性は、原則的にHedrick とFischer の方法で測定した。

タンパク質の定量は、Lowry らの方法で、また、ポリアクリルアミド電気泳動は、原則的にWeber とOsborn の方法に従い行なった。

## 第三章 結果および考察

まず、実験に先立ち、材料の単一性を調べたところ、"方法"により得られる筋小胞体膜標品には、グリコーゲンホスホリラーゼが夾雑していることがわかった。このグリコーゲンホスホリラーゼは、筋小胞体膜標品をショ糖密度勾配遠心にかけることにより大部分除去できた。この酵素がなぜミクロソーム分画に混入するかについては、いくつかの報告があり、Meyer らによれば、この酵素はグリコーゲン顆粒に結合しているという。ところで、調製後4、5日を経た標品であれば、ショ糖密度勾配遠心にかけるまでもなく、1回の超遠心で、上清部にはグリコーゲンホスホリラーゼ、沈澱部には筋小胞体膜のみが回収できた。この理由としては、グリコーゲン顆粒の分解、グリコーゲンと酵素の結合の切断、などが考えられる。以上2つの方法により、ほぼ単一の筋小胞体膜試料が得られた。

一方、筋小胞体膜Ca-MgATPaseは、"方法"で記したようにして精製したが、電気泳動的に、まだ少量の夾雑が認められた。

次に、内在性Caイオンの役割について調べた結果、内在性Caイオンは、次の2種類あることがわかった。

その1つは、低濃度のEDTAにより除去されるCaイオンで、その除去は、Caイオン輸送の脱共役（Caイオン取り込み活性が低下し、同時にCa-Mg ATPase活性が上昇する現象）を起こした。DugganとMartonosiが指摘したCaイオンに相当し、筋小胞体膜の非透過性の維持に関与していると考えられる。このCaイオンをCa Iとした。

もう1つは、比較的高濃度のEDTAにより除去されるCaイオンで、その除去に伴い、Caイオン取り込み活性およびCa-Mg ATPase活性は、ともに低下した。Ca-Mg ATPaseに内在しており、酵素タンパクの安定化に寄与し、酵素活性発現のために不可欠な要素として作用していると考えられる。このCaイオンをCa IIとした。また、Ca IIは、酵素活性が発現される条件下で酵素タンパクから急速に遊離されることから、輸送部位に結合したCaイオンである可能性が示唆された。すなわち、Ca IIは、自ら輸送されるCaイオンであり、しかも次のCaイオンの輸送のために不可欠であることが示唆された。

Ca I、Ca IIの量は、ともに約10 nmol/mg筋小胞体膜タンパク質であった。ただし、Ca IIは、Ca-Mg ATPase 1モル当り1モルと算定された。

次に、Caイオン輸送に及ぼすKイオンの効果については、その異なる作用部位により、次の2種類に分けられた。

その1つは、高親和性でKイオンに特異的な部位であり、Ca-Mg ATPase活性を阻害するCaイオンと拮抗し、酵素活性を活性化する。また、試料をKを含まない緩衝液で洗じようするとCa-Mg ATPaseの失活が起ったが、この時、酵素の最大安定化の1/2を与えるKイオン濃度が、酵素活性の最大活性化の1/2を与えるKイオン濃度と類似していることから、試料溶液中にあって酵素タンパクの安定化に寄与しているKイオンの作用部位も、この部位であろうと考えられる。

もう一つは、低親和性で非特異的な部位であり、リン酸化中間体形成を促進するCaイオンの作用部位にアロステリックに作用し、リン酸化中間体量（反応に参加する酵素量）を増加させる。また、リン酸化中間体の分解を抑制する部位（ATPase活性を阻害する部位）も同一部位であろうと考えられる。さらに、EDTA処理時にKイオンが共存すると、内在性Caイオンが除去されても酵素の失活がある程度抑制されたが、この場合に、酵素タンパクの安定化に寄与するKイオンの作用部位もこの部位であることが、その最大安定化の1/2を与えるKイオン濃度の値から示唆された。

#### 第四章 総合考察

筋小胞体膜のCaイオン輸送において、内在性Caイオンの膜および酵素タンパクの構造に及ぼす安定化作用が明らかになった。特に、Ca-Mg ATPaseに内在するCa IIについては、他に

報告がなく、その存在と役割がはじめて明らかになった。従来より、Ca イオンをその構造の安定化に不可欠とする酵素としては、 $\alpha$ -アミラーゼ、サーモライシン等が知られている。そして、この場合、Ca イオンの除去は、タンパク質のヘリックス構造を崩壊させ酵素の失活を起こすことが報告されており、Ca II の場合も同様な効果が期待される。

一方、Ca I は、例えば、タンパク質の酸性残基あるいは酸性リン脂質の間で架橋的役割をすることにより、膜構造の安定化に寄与しているものと考えられる。

また、Ca イオン輸送に及ぼすK イオンの効果が明らかになったが、高親和性作用部位での効果は、Ca イオンの阻害効果を抑制するものとする点でHasselbach らの考えと一致しており、リン酸化中間体の分解を促進する点では、最近のShigekawa らの結果と同様であり、大筋ではTonomura の機構と矛盾しない。現在までの報告は、この部位での作用として包括できる。

一方、高濃度K イオンが作用を発現する低親和性部位での効果、特に、リン酸化中間体量を増加させる作用については、他に報告がなく、筋細胞内のK イオンが100~200 mMであることを考えるとこの作用部位も、生理的意味をもつことが示唆される。例えば、その非特異的な性格から、Ca-Mg ATPase に及ぼす環境的要因としての効果が考えられる。

以上のように、膜の構造維持にはCa I が、また、Ca-Mg ATPase の構造維持と機能発現にはCa II とK イオンの両者が不可欠であり、さらに、Ca イオン輸送の正常な発現のためには、それら金属イオンの総てが必要であることが示された。

筋小胞体のもつ弛緩因子としての能力は、著者が示した金属イオンによる調節機構はもとより、酵素活性に不可欠な特定の脂質の関与、少量成分のCa イオン輸送への関与、あるいは、膜の透過性、膜のもつ区画化という性格、などが組み合わされてはじめて発現されるものと考えられる。

## 第五章 要 約

引 用 文 献

謝 辞

図 表

## 論文審査の結果の要旨

本論文は筋小胞体膜と、それから精製した、Ca-Mg-ATPaseに内在するCaイオンの、Caイオン輸送とATPase活性における役割について報告したものである。

研究に使用した筋小胞体膜標品は、ウサギ骨格筋からマイクロソームとして調製し、夾雑するグリコーゲンフォスホリラーゼを除去するための操作を行っている。Ca-Mg-ATPaseは筋小胞体膜から0.5 MKCl中でdeoxycholateで可溶化し、Sephadex G-100でゲル濾過し精製している。

まず、小胞体膜の内在性Caイオンは、2種類に分類出来るとしている。その1つは $10^{-5} \sim 10^{-4}$  M EDTAで除去され、その除去により、Ca-Mg-ATPase活性の上昇とCaイオン輸送の低下がもたらされるもので、Ca(I)と仮称している。Ca(I)は膜の構造維持に寄与していると指摘している。他は $10^{-4}$  M以上のEDTAではじめて除去され、その除去によりCa-Mg-ATPaseの活性低下を導くものでCa(II)と仮称している。Ca(II)はCa-Mg-ATPaseの構造維持に必要であるとしている。Ca(I)、Ca(II)は筋小胞体膜タンパク質1 mgあたり、それぞれ約10 nmolesである。精製したCa-Mg-ATPaseにはCa(II)のみが内在し、その量はATPase 1 moleあたり約1 moleと算出されている。

次に、100 mM以上のKイオンの存在下で、高濃度EDTAで洗浄すると、Ca(II)が除去されるにもかかわらず、ATPase活性が保持されることを見出している。また、それに関連して、Caイオン輸送、Ca-Mg-ATPaseにおけるKイオンの役割を検討している。その結果、ATPaseのKイオン作用部位には、高親和性と低親和性の2種類あり、前者はATPaseを阻害する $10^{-4}$  M以上のCaイオンと拮抗して、ATPaseを活性化する部位であり、後者はATPaseの反応中間体であるリン酸化中間体の形成、分解に関与するものであることを明らかにした。

さらに、これらの観察にもとづき、Ca-Mg-ATPaseにおけるCa(II)、高親和性K部位、低親和性K部位の相互関係についてのモデルを提唱している。このモデルは本論文での結果のみならず、これまで多くの研究者によって部分的に報告されて来た、Kイオンおよび内在性Caイオンの寄与の結果も包括的に説明しようとしている。

以上、この報告は、筋小胞体膜の研究で、従来断片的にのみ報告され、その役割が充分明らかにされていなかった、内在性CaイオンおよびKイオンの寄与に関し、新たな知見を加えるとともに、相互関係をも明らかにしたものである。

この研究は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって、遠藤雄一提出の論文は、理学博士の学位論文として合格と認める。