

学 位 論 文 題 名

家兎骨格筋筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase 分子内振動に及ぼす磷脂質の影響

学位論文内容の要旨

研究目的

骨格筋筋小胞体(Sarcoplasmic reticulum;以下SR)の Ca^{2+} -ATPaseはSR膜の磷脂質二重層に保持されて、筋細胞中のカルシウムイオン濃度の調節に対する重要な役割を果たしている。 Ca^{2+} -ATPaseの活性はその周辺の磷脂質の量に依存すると共に、磷脂質鎖長が短くなると、 Ca^{2+} -ATPaseの活性は低くなることが知られている。分子量115000ダルトンの骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPaseの親水部分内に位置する磷酸化ドメインは分子内振動しているといわれている。しかし、骨格筋の速筋の Ca^{2+} -ATPase磷酸化ドメインの振動と磷脂質層の性状との関連については明らかにされていない。本研究は磷脂質層の組成成分を変えることにより、骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPase磷酸化ドメインの振動がどの様に変化するかを明らかにすることを目的とし、家兎骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPaseの純化、再構成及び磷脂質置換を行い、主としてナノ秒時間分解蛍光法による解析から検討した。

実験方法

Ca^{2+} -ATPaseの精製： 雄性日本白兎(体重2.0-2.5kg)の白筋(60~90g)をNembutal麻醉下に切出し、定法によりSRを採取し、得られたSRを2% Deoxycholate(DOC)を含むTris-HCl緩衝液で可溶化させ、105000×gで60分間超遠心し、上清を更に20

1000×gで60分間超遠心して沈殿としてCa²⁺-ATPaseを得た。

Ca²⁺-ATPaseの再構成：SRの脂質をChloroform-Methanol(2:1)で抽出して真空乾燥する。精製したCa²⁺-ATPaseをDOC/lipids(w/w=1:1)の溶液に添加する(蛋白質/脂質=0.3)。ついで、100倍容のTris-HCl緩衝液での透析によりCa²⁺-ATPaseベシクルを再構成した。

磷脂質の置換：2mg/ml phosphatidylcholine(PC)を2%DOCを含むSucrose-KCl-Tris緩衝液に溶解させる。この溶液に蛋白質量として0.5 mg/mlの Ca²⁺-ATPaseベシクルを加え、0℃で15分間解置する。対照は上記の緩衝液にPCを加えることなく、Ca²⁺-ATPaseベシクルに同様な処理を行う。ついで、45000×gで60分間の超遠心を繰り返して洗浄した。

Ca²⁺-ATPase活性の測定：Fiske-Subbarow法により行った。

精製Ca²⁺-ATPase純度の検定：SDS-PAGE(7.5%)により行った。

磷脂質鎖長の分析：Native及び再構成磷脂質置換されたベシクルの磷脂質を抽出し、ガスクロマトグラフにより分析した。

動的微細構造のナノ秒時間分解蛍光法による解析：Ca²⁺-ATPase分子内振動を検討するため、試料をAnilino-naphthylmaleimide (ANM)を含むKCl-TES緩衝液に浮遊させ、37℃で40分間の解置により標識した。

Ca²⁺-ATPaseベシクル膜磷脂質層の動的微細構造を検討するため、試料をDiphenylhexatriene (DPH)を含むKCl-TES緩衝液に浮遊させ、25℃で30分間解置し、棒状蛍光分子DPHを磷脂質層に取り込ませて標識した。

教室製のナノ秒時間分解蛍光計を用いて、蛍光プローブで標識した試料を25℃で測定した。得られた異方性減衰曲線から磷脂質層の粘性、磷脂質分子の揺動角及びCa²⁺-ATPase分子内振動を表わす蛍光異方性減衰の半減期等を計算した。

実験成績

1. Ca²⁺-ATPaseの精製及びベシクルの再構成

超遠心法で得られたSRからCa²⁺-ATPaseを分離した。精製度は1.76であり、収

率は56.7%であった。SDS-PAGEで分析すると、精製された Ca^{2+} -ATPase標本は小さい分子がなくなり、分子量115kダルトンの黒い帯と160kダルトンの薄い帯が見られた。画像処理装置での解析によると得られた蛋白質の約97%が Ca^{2+} -ATPaseであった。精製した Ca^{2+} -ATPaseをSRの磷脂質へ再構成したベシクルでは、膜の形成及び Ca^{2+} -ATPaseが膜に組込まれたことを超薄切片とFreeze fractureの電子顕微鏡観察で確認した。

2. 磷脂質置換による膜磷脂質層の変化

1) ガスクロマトグラフでの分析：家兎骨格筋SR磷脂質分子の平均鎖長は炭素数として17.9個であった。磷脂質置換を行うと、50～71%の磷脂質が置換された。di(12:0)PCでの磷脂質置換により、磷脂質分子の平均鎖長は12.8個炭素に大幅短縮され、不飽和度も著しく低下した。

2) DPHでのナノ秒時間分解解析：対照及び磷脂質置換を行った Ca^{2+} -ATPaseベシクル膜磷脂質層の動的微細構造をDPHを用いて検討した。磷脂質置換された Ca^{2+} -ATPaseベシクルの蛍光異方性減衰曲線は対照に比すると明らかな差が見られ、短鎖になるほど異方性の減衰は速やかになった。鎖長の短縮に伴い、定常光異方性(r_s)と膜の粘性(η)は低下し、磷脂質分子の揺動角(θ_c)は増大した。

3. 磷脂質置換に伴う Ca^{2+} -ATPase分子内振動の変化

1) ANM蛍光スペクトルの解析：ANMは疎水性蛍光分子であり、 Ca^{2+} -ATPaseの磷酸化ドメインの344と367の-SH残基にmaleimideが共有結合する。励起波長が355 nmとすると $\lambda_{em. max}$ が423 nmであった。磷脂質置換を行った Ca^{2+} -ATPaseの $\lambda_{em. max}$ が対照の $\lambda_{em. max}$ より僅かずつ長くなり、対照に比べて、red shiftした。これはANM結合部位附近の疎水性の減ずることを示唆している。

2) Ca^{2+} -ATPase活性の変化：磷脂質置換により Ca^{2+} -ATPase活性は磷脂質鎖長の短縮に伴い急激に減じた。また、ANMによる標識によって Ca^{2+} -ATPase活性もある程度低下した。

3) ANMでのナノ秒時間分解解析：磷脂質置換により Ca^{2+} -ATPaseの蛍光強度と異方性曲線は対照より速やかに減衰した。定常光異方性も減少したので、稠密性の減少は明らかであった。

ANM 蛍光異方性減衰曲線は半減期が約2 nsecの速い成分と50 nsecを越える遅い成分とに分けられた。これは結合したANMの発光軸の振動が磷酸化ドメインの振動だけではなく、より局所的な振動にも依存していることを示唆しており、遅い主成分が磷酸化ドメインの振動を示していると考えられる。

異方性減衰の遅い成分の半減期は磷脂質置換により徐々に短縮し、di(16:1)PC, di(14:1)PC, di(12:0)PCによる磷脂質置換で対照に対して有意差となった。このことは磷脂質分子の鎖長が短くなることにより、 Ca^{2+} -ATPaseの分子構築が変わって、磷酸化ドメインの振動が激しくなるため、ATPから燐を受け取る能率が低下し、 Ca^{2+} -ATPase活性は低くなることを示唆している。一方、精製 Ca^{2+} -ATPaseを再構成することなく、直接ANMで標識すると、蛍光異方性の遅い成分の半減期が 23 ± 7 nsecであり、再構築された Ca^{2+} -ATPaseの 72 ± 4 nsec及びdi(12:0)PCで置換した場合の 49 ± 2 nsecより遙かに速やかである。このことはdi(12:0)PCで磷脂質置換した再構成膜でも、 Ca^{2+} -ATPase蛋白の微細構造は磷脂質二重層によって尚強く制限されていることを示している。

結語

家兎骨格筋SR由来の Ca^{2+} -ATPaseの分子内振動はその周辺の磷脂質分子のアシル鎖の短縮により増大することが明らかとなった。 Ca^{2+} -ATPaseの疎水性セグメントを保持する、いわば基盤となる磷脂質層を短鎖磷脂質で置換すると、磷脂質層から離れて位置する親水性セグメント内の磷酸化ドメインの分子振動が激しくなるということである。この運動性の増加を伴う動的微細構築の変化により、ATPから燐を受け取る能率が低下するため、 Ca^{2+} -ATPase活性の低下の生じる可能性が示唆された。即ち、 Ca^{2+} -ATPaseは適当な長さ(平均18個炭素)によって保持されていることが最適な動的微細構築と酵素活性の維持に必要と考えられるのである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 富 康

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 牧 田 章

学位論文題目

家兎骨格筋筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase分子内振動に及ぼす磷脂質の影響

骨格筋筋小胞体(Sarcoplasmic reticulum;以下SR)の Ca^{2+} -ATPaseはSR膜の磷脂質二重層に保持されて、筋細胞中のカルシウムイオン濃度の調節に対する重要な役割を果たしている。 Ca^{2+} -ATPaseの活性はその周辺の磷脂質の量に依存すると共に、磷脂質鎖長が短くなると、 Ca^{2+} -ATPaseの活性は低くなることが知られている。分子量11万ダルトンの骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPaseの親水部分内に位置する磷酸化ドメインは分子内振動しているといわれているが、骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPase 磷酸化ドメインの振動と磷脂質層の性状との関連については明らかにされていない。本研究は磷脂質層の組成成分を変えることにより、骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPase 磷酸化ドメインの振動がどの様に変化するかを明らかにすることを目的とし、家兎骨格筋SRの Ca^{2+} -ATPaseの純化、再構成及び磷脂質置換を行い、主としてナノ秒時間分解蛍光法による解析から検討した。

Ca^{2+} -ATPaseは超遠心法で得られたSRから、精製度1.76、収率は17.4%を以って分離した。SDS-PAGEで分析すると、精製された Ca^{2+} -ATPase標本では分子量11万ダルトンの黒い帯と16万ダルトンの薄い帯が見られ、画像処理装置での解析によると得られた蛋白質の約97%が Ca^{2+} -ATPaseであった。

ガスクロマトグラフによる磷脂質の脂質鎖の分析によれば、原SRを構成する磷脂質は平均鎖長17.9個炭素、不飽和度は1.192であった。磷脂質置換を行うと、50~71%の磷脂質が置換され、di(18:1)PCでの置換により、平均鎖長18個炭素、不飽和度は1.115となった。di(12:0)PCでの磷脂質置換により、磷脂質分子の平均鎖長は12.8個炭素に大幅短縮され、不飽和度も著しく低下した。

Ca^{2+} -ATPaseベシクル膜磷脂質層の動的微細構造は脂質親和性の高い棒状の蛍光分子DPHを用いて検討した。磷脂質置換された Ca^{2+} -ATPaseベシクルのDPH蛍光異方性減衰曲線は対照に比すると明らかな差が見られ、短鎖になるほど異方性の減衰は速やかになった。鎖長の短縮に伴い、定常光異方性と膜の粘性は低下し、磷脂質分子の揺動角は増大した。一方、磷脂質置換により、 Ca^{2+} -ATPase活性は磷脂質鎖長の短縮に伴い急激に減じた。

磷脂質置換に伴う Ca^{2+} -ATPase分子内振動の変化は-SH基と結合する疎水性蛍光分子ANMを用いて検討した。ANMは川北らの方法により、 Ca^{2+} -ATPaseと反応させ、親水性部の磷酸化ドメインに結合させる。磷脂質置換を行った Ca^{2+} -ATPaseの $\lambda_{\text{em. max}}$ が対照の $\lambda_{\text{em. max}}$ より僅かずつ長くなり、対照に比べて、red shiftした。これはANM結合部位附近の疎水性の減ずることを示唆している。

磷脂質置換によりベシクルを構成する磷脂質の短鎖化に伴い、ANM標識した Ca^{2+} -ATPaseの蛍光強度と異方性曲線はより速やかに減衰するようになった。定常光異方性も減少したので、稠密性の減少は明らかであった。ANM蛍光異方性減衰曲線の半減期は二成分に分けられ、遅い主成分が磷酸化ドメインの振動を示していると考えられる。異方性減衰の遅い成分の半減期は対照で 72 ± 4 nsec; di(18:1)PC置換により 69 ± 3 nsec; di(16:1)PCで 61 ± 4 nsec; di(14:1)PCで 54 ± 4 nsec; di(12:0)PCで 49 ± 2 nsecと、短鎖化と共に短縮し、分子内振動の増強することが想定された。

Ca^{2+} -ATPaseは α -helixからなる疎水部周辺の磷脂質層により適当な三次元構築を維持している。しかし、周囲の磷脂質分子の鎖長が短くなることにより、 Ca^{2+} -ATPaseの分子構築が変わって、分子内振動が有意に増強する。そのためATPから燐を受け取る能率が低下し、 Ca^{2+} -ATPase活性は低くなることを示唆している。 Ca^{2+} -ATPaseは適当な長さ(平均18個炭素)によって保持されていることが最適な動的微細構築と酵素活性の維持に必要と考えられるのである。

口頭発表に当り、石橋教授より、 Ca^{2+} -ATPaseの活性が同酵素を再構築di(12:0)PC置換したベシクルのATPase活性よりも高いと言う成績になったのか、牧田教授より、不飽和度の影響は如何、また一部の表現が不適切ではないかとの御指摘をいただいたが、申請者はほぼ妥当な説明をなしたと思われる。また、両教授より個別に審査をいただき、合格とのご返事を戴いた。本論文は膜蛋白の動的微細構造に対する磷脂質の影響を明らかにしたものであり、博士の学位に値すると判定した。