

学 位 論 文 題 名

平滑筋ミオシンフォスファターゼの研究

学位論文内容の要旨

筋肉は、ミオシンとアクチンの二種類の蛋白質が相互作用することによって収縮する。その相互作用は、筋肉の種類や生物種により、異なる反応機構によって制御されている。軟体動物の平滑筋や、脊椎動物の血管に存在する平滑筋の収縮、弛緩の制御には、ミオシンの制御軽鎖のりん酸化、脱りん酸化が関与していると、考えられている。平滑筋が、収縮、弛緩を繰り返すためには、りん酸化した制御軽鎖が、適当な時期に脱りん酸化を行ない、次のりん酸化の機会に備えることが必要であると思われる。それにもかかわらず、ミオシンを脱りん酸化する酵素（フォスファターゼ）に関する報告は、ミオシンをりん酸化する酵素（キナーゼ）に比べて非常に少ない。

本研究では、軟体動物の一種であるホタテ貝の平滑筋と、ブタの大動脈平滑筋から、生体内で、ミオシンの制御軽鎖を脱りん酸化していると考えられるフォスファターゼを精製し、その性質を明らかにすることを、目的とした。

ホタテ貝柱平滑筋ミオシンフォスファターゼ

ホタテ貝柱平滑筋では、生筋や、スキンドファイバーを用いた実験と、*in vitro*での実験結果から、細胞内のカルシウム濃度が増加した時に、制御軽鎖が脱りん酸化されることが、期待される。本研究の第一部においては、ホタテ貝柱平滑筋から、 Ca^{2+} 濃度に依存して活性を調節するミオシンフォスファターゼの精製法、およびその性質について述べた。精製は硫酸分画、DEAE-Toyopearl 650Sによるイオン交換クロマトグラフィー、Sephacryl S-300によるゲルろ過を組み合わせて行なった。精製した酵素のSDS-PAGEパターンは、主として、60kDaと19kDaの位置に、二本のバンドを示した。

精製した酵素活性のpH依存性や、二価カチオン濃度依存性を調べたところ、その性質は、ウシの脳から精製された Ca^{2+} -CaM依存性フォスファターゼ（カルシニューリン）に非常に類似していた。

ブタ大動脈平滑筋ミオシンフォスファターゼ

今までに、様々な脊椎動物平滑筋から精製されたミオシンフォスファターゼは、その性質も様々である。ミオシンフォスファターゼ活性に及ぼす二価カチオンの影響だけを挙げてみても、Patoらが、七面鳥砂囊やウサギ子宮から精製したフォスファターゼ活性は、二価カチオンによって阻害されるのに対して、Werthらがウシ大動脈から精製したフォスフ

ァターゼや、Yoshida & Yagiがニワトリ砂囊から精製したフォスファターゼの活性は、二価カチオンによって活性化される。

また、今までに精製されたミオシンフォスファターゼは、そのほとんどが、低イオン強度の溶液によって抽出されているのに対して、最近、Chisholm & Cohenは、高イオン強度の溶液で抽出を行なうことにより、骨格筋や心筋から、ミオシンと強く結合し、ミオシンに対して高い活性をもったフォスファターゼが抽出されることを報告した。そこで、第二部においては、ブタ大動脈平滑筋から、低イオン強度溶液と、高イオン強度溶液によって抽出されるフォスファターゼを精製し、生体内でミオシンを脱りん酸化するフォスファターゼが、どのような性質であるのかを調べようと考えた。精製された酵素については、特に、二価カチオンが活性に与える影響について詳しく調べた。

低イオン強度抽出液から、硫酸分画、DEAE-Toyopearl 650Sによるイオン交換クロマトグラフィーと、チオリン酸化LC₂₀ Sepharose 4Bによるアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせて精製されたフォスファターゼのSDS-PAGEパターンは、69kDaと38kDaの位置に、強い二本のバンドを示した。一方、高イオン強度抽出液から、硫酸分画、DEAE-Toyopearl 650Sによるイオン交換クロマトグラフィー、Red Agaroseによるクロマトグラフィー、Mono Q陰イオン交換クロマトグラフィーを組み合わせることによって精製されたフォスファターゼのSDS-PAGEパターンは、主として35kDaのバンドを示した。

更に、これらの精製した酵素の活性測定中に、基質として用いたブタ大動脈LC₂₀りん酸化ミオシンにも、内在性のフォスファターゼ活性が含まれていることが判明した。

これらの精製フォスファターゼと、ミオシン結合フォスファターゼの活性は、いずれも Mg^{2+} 、 Mn^{2+} によって阻害された。最大活性の半分を与える Mg^{2+} 及び Mn^{2+} 濃度は、いずれも区別なく、2.6から5.5mMの範囲にあった。また、高イオン強度抽出液から精製されたフォスファターゼと、ミオシン結合フォスファターゼの活性の、 Ca^{2+} 濃度依存性や、一般的なフォスファターゼの阻害剤であるATPやオカダ酸による阻害も類似した結果を示した。最大活性の半分を与えるオカダ酸濃度は450~700nMであった。このような酵素の性質は、Patoらが、七面鳥砂囊や、ウサギ子宮から精製したミオシンフォスファターゼに、よく似ていた。また、オカダ酸による阻害の結果から、これらのフォスファターゼは、タイプIフォスファターゼに分類されられると考えられる。このように、異なる抽出液から精製されたフォスファターゼと、ミオシンに結合したフォスファターゼの活性の性質がいずれも類似していたことから、これらのフォスファターゼは、全て同じ種類のフォスファターゼであり、それらが存在している場所の違いから、異なる抽出液によって抽出されたり、ミオシンに結合したりしているのではないかと考えている。これらのフォスファターゼの抽出、精製中には、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} などの二価カチオンによって活性化されるような性質のフォスファターゼは、認識されなかった。従って、ブタ大動脈中では、Werthらや、Yoshida & Yagiが示したような、二価カチオンで活性化されるミオシンフォスファターゼではなく今回、精製、認識した二価カチオンによって活性が阻害されるフォスファターゼが、ミオシンを脱りん酸化していると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 杉 本 和 則

副 査 教 授 菊 池 九二三

学 位 論 文 題 名

平滑筋ミオシンホスファターゼの研究

細胞運動において、エネルギー変換を行い、モーターの働きをする分子は、蛋白質ミオシンである。運動開始の情報を受容するとミオシン分子が活性化され運動が始まる。また不活性化の信号により運動が停止する。活性化や不活性化の情報伝達の最終段階として、ミオシン分子を構成するサブユニットの一種である分子量 20,000 程度の制御軽鎖のりん酸化が挙げられる。りん酸化が情報伝達的手段となりうる条件としてこれをもとの状態へもどす脱りん酸化過程が共役する必要がある。申請者は、りん酸化ミオシン制御軽鎖を加水分解して脱りん酸化する反応を触媒する酵素、ミオシン制御軽鎖ホスファターゼ (MLCP) を精製しその性質を明らかにした。論文は二部より成る。

第一部ではりん酸化がミオシンを不活性化する軟体動物平滑筋の MLCP について述べられている。軟体動物平滑筋では刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が増大すると、 Ca^{2+} が直接ミオシン制御軽鎖に結合して、活性化状態に入る。その後 Ca^{2+} 濃度が低下しても筋張力を持続させるキャッチ状態に入り、キャッチ状態は cAMP 濃度の増加により弛緩する。軟体動物の一種ホタテ貝柱平滑筋には cAMP に依存してミオシン制御軽鎖をりん酸化する内在性のキナーゼが存在する。申請者はこのキナーゼによってりん酸化したホタテ貝平滑筋ミオシン制御軽鎖を Ca^{2+} に依存して脱りん酸化する内在性ホスファターゼが存在することを見出した。そこで抽出液の薄層分画、カラ

ムクロマトグラフィー、ゲル濾過等の手段を組み合わせ、精製を行った。その結果、この酵素のサブユニットは、分子量 60,000 と 19,000 の二種から成り、脳で見いだされたホスファターゼであるカルシニユリン或いはホスファターゼ 2 B と類似している事が示された。 Ca^{2+} - カルモデュリンによる活性化において最大活性の 1/2 を与える Ca^{2+} 濃度は $1 \mu\text{M}$ であった。これらの結果は、ホタテ貝柱平滑筋においては、cAMP の増加に伴いミオシン制御軽鎖のりん酸化が起り、キャッチ状態の弛緩を起こすが、再び Ca^{2+} 濃度が増加すると、この Ca^{2+} 依存性ホスファターゼが活性化されて、制御軽鎖は脱りん酸化されるという機構を支持している。

第二部においてはブタ大動脈平滑筋内の MLCP について述べられている。哺乳類平滑筋においてはミオシン制御軽鎖のりん酸化がミオシン分子を活性化して、運動が開始する。りん酸化制御軽鎖を脱りん酸化するホスファターゼ活性をりん酸化大動脈平滑筋ミオシンを基質にして追跡した。硫酸分画、種々のクロマトグラフィーなどを組み合わせ、精製を行った。その結果、このホスファターゼは分子量 67,000 および 38,000 の二種のサブユニットを持ち、その活性は Mg^{2+} 、 Mn^{2+} などの二価金属イオンにより阻害される事が見出された。又、プロテインホスファターゼの特異的な阻害剤であるオカダ酸によって阻害され、1/2 に阻害されるオカダ酸濃度は 450 nM であった。この事から、申請者はこの酵素はタイプ 1 ホスファターゼに分類されると推定している。ホタテ貝平滑筋で見出された MLCP は生理的な Ca^{2+} イオンにより制御されるタイプであったのに反し、大動脈の MLCP では制御因子は見出されなかった。活性化のシグナルを解除するためのホスファターゼには制御因子が存在しないのか、或いは存在するとすれば Ca^{2+} で阻害されるタイプであろうと期待されるが、これらの問題を解明することが今後の課題と思われる。

二種の平滑筋細胞から異なるタイプのミオシン軽鎖ホスファターゼを精製し、その性質を明かにした事は、細胞運動に係る一連の分子機構の解明に大きな寄与をなすものと評価される。審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認めた。