



Comparison of catalytic units of muscle and liver adenosine 3' : 5'-monophosphate-dependent protein kinases

山村, 博平

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1973-05-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙0267

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000267>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	やま　むら　ひろ　へい　平 (兵庫県)
学位の種類	医　学　博　士
学位記番号	医　博　ろ　第 210 号
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位授与の日付	昭 和 48 年 5 月 16 日
学位論文題目	COMPARISON OF CATALYTIC UNITS OF MUSCLE AND LIVER ADENOSINE 3' : 5' — MONOPHOSPHATE — DEPENDENT PROTEIN KINASES (骨格筋及び肝臓における Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の触媒成分の比較研究)

審 査 委 員　主 査 教 授　西 塚 泰 美

教 授　井 村 裕 夫　教 授　木 幡　陽

論 文 内 容 の 要 旨

序　　文

Cyclic AMP は種々のホルモン作用の細胞内伝達物質として提唱されたが、1970年著者ら及び米国の三研究室において高等動物におけるその少くとも第一義的作用機序が解明された。即ち、Cyclic AMP は細胞内で特定の蛋白質磷酸化酵素を活性化するが、本酵素は触媒成分と調節成分とから構成されており、Cyclic AMP は調節成分にアロステリック様に結合することにより触媒成分を遊離させ、酵素活性を発現させる (Yamamura et al, (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 675; Kumon et al, (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 1290)。その後ウサギ筋肉及び白ネズミ肝臓を含む大部分の哺乳動物組織及び臓器において、少くとも二種類以上の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素が存在することが、幾多の研究室より報告された。著者らはひきつづきこれらの多数に存在する Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素は、調節成分の多様性に基づいており、触媒成分は単純であることを明らかにした (Yamamura et al, (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1560)。例えばウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓を含む多くの哺乳動物組織の触媒成分について比較検索を行なった結果、それらは互いに極めて類似した酵素化学反応性を保持し、かつ巾広い基質特異性を有すること、さらに本酵素の作用は細胞内で多数の調節酵素や機能蛋白質を一斉に磷酸化し、それらの諸機能をプライオトロピックに調節して細胞の固有機能発現へと導くものであることを明らかにし、これらを予報として報告した (Yamamura et al, (1971) J. Biol. Chem. 246, 1544)。本論文はこれらの詳報であり、ウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の触媒成分の比較及び調節成分との交叉反応について記載したものである。

実験方法

(省略)

実験結果

I ウサギ骨格筋の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の精製及び性質

ウサギ骨格筋ホモジネートの上清液を 50% 硫酸処理後、乾燥粉末としその溶解液を超遠心し上清を DEAE セルロースに吸着させ塩濃度勾配にて溶出、さらにこの溶出液をハイドロキシルアパタイトカラムにかけ磷酸緩衝液にて溶出すると、Cyclic AMP 非依存性 (Protein kinase B₀) 及び二種類の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素 (Protein kinase B₁ 及び B₂) が得られた。Cyclic AMP 結合蛋白質は Protein kinase B₁ 及び B₂ に一致して存在するが、Protein kinase B₀ には存在しなかった。遊離の Cyclic AMP 結合蛋白質は、前述の二種のカラムクロマトグラフィーにて Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の含まれていない標品を得た。上述の得られた三種類の Protein kinase B₀, B₁ 及び B₂ を Cyclic AMP 存在下にて同じハイドロキシルアパタイトにかけると、全く同一の部位、即ち Protein kinase B₀ の溶出部位に一致して現われ、かつ Cyclic AMP 結合蛋白質は共に存在しなかった。この三者の触媒成分 (Protein kinase B₁ 及び B₂ から得られた活性型酵素及び Protein kinase B₀) の諸性質を比較すると種々の点で全く区別されなかった。即ち (i) 共に Cyclic AMP と結合あるいは Cyclic AMP にて活性化されない。(ii) 50°C の熱処理にて速やかに失活する。(iii) ヒストンの磷酸化量は等しい。(iv) ヒストンの同一部位を磷酸化する (フィンガープリントが同じ)。この他酵素化学的諸性質も全く同一であること等により、これらの触媒成分は同一の蛋白質であることが示唆され、白ネズミ肝臓同様ウサギ骨格筋に存在する二種の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素は、結合している Cyclic AMP 結合蛋白質 (調節成分) の多様性に基づいており、触媒成分は単純であることが明らかとなった。

II ウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓 Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の比較及び交叉反応

次にウサギ骨格筋の触媒成分と白ネズミ肝臓の触媒成分の性質について比較検討を行なった。

1) 磷酸受容蛋白質とその磷酸化部位

両酵素はヒストン、リボゾーム蛋白質、Glycogen phosphorylase b kinase 並びに Glycogen synthetase を良い基質とし、プロタミン及びカゼインも磷酸化した。共に磷酸受容蛋白質の主にセリン及び少量のスレオニン残基に ATP の γ 位の磷酸を移した。また一定量のヒストン及びリボゾーム蛋白質を基質とした場合、両酵素による磷酸化は等量であった。従って両酵素共受容蛋白質の同一部位を磷酸化することが示された。

2) Glycogen phosphorylase b kinase の活性化及び Glycogen synthetase の不活性化

骨格筋の Glycogen phosphorylase b kinase の ATP による磷酸化反応及びそれに基づくグリコーゲン分解は、両酵素共に同じであった。同様に骨格筋 Glycogen synthetase はその磷酸化によって不活性化された。従って両酵素共にグリコーゲン合成を抑え分解を促進するという糖質代謝にとって極めて重要な酵素に等しく作用していることが明らかとなった。

3) Protein kinase B₀ (触媒成分) と Cyclic AMP 結合蛋白質 (調節成分) の交叉反応

ウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓の触媒成分と調節成分が互いに交叉反応を示した。即ち、ウサギ骨格筋

の触媒成分は白ネズミ肝臓の調節成分によってその活性が抑えられたが、Cyclic AMP の添加によって元の活性に戻った。逆に白ネズミ肝臓の触媒成分はウサギ骨格筋の調節成分と交叉反応を同様に示した。

4) 他の性質の比較

共に前述の如く極めて類似した性質を示しているが、この他酵素化学反応的性格も区別できぬほど類似することが明らかとなった。即ち、ATP に対する $K_m: 5 \times 10^{-6} M$, 至適 pH: 7, 50% 熱安定性: $50^\circ C \times 2$ 分間, 分子量: 35,000, 等両酵素共に同じ値であった。

5) 触媒成分の電気泳動分析

両酵素 (共に触媒成分) を等電点電気泳動すると, pH 7.4 及び pH 8.2 の二つの成分が得られた。両臓器の Protein kinase B₁ 及び B₂ は同じ pH 5.2 の等電点をもつが, Cyclic AMP 存在下にて泳動するとすべて pH 7.4 と 8.2 の二つの成分が得られた。この二成分は酵素化学反応的に同じ性質を示した。即ちプロタミン及びヒストンを基質とした場合, それぞれ同じ部位を磷酸化し, 共に Glycogen phosphorylase b kinase 及び Glycogen synthetase を磷酸化し, 前者を活性化し後者を不活性化した。分子量は共に 35,000 であった。この触媒成分が異なる二種の等電点で存在する理由は, 精製途上の人工産物あるいは天然に存在するものか, 現在のところ不明である。以上の如く, ウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓の触媒成分は, 基質特異性, 調節成分との交叉反応, 酵素化学反応性, 分子量, 等電点分析等が等しく, 少なくとも機能的には同一の酵素と考えられる結果を得た。

考察並びに結語

種々の哺乳動物における Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素に多様性が存在することは, 幾多の研究室より報告されている。さきに白ネズミ肝臓の Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素の多様性は調節成分の多様性に由来することを明らかにしたが, ウサギ骨格筋の酵素の多様性も同様に調節成分の多様性に由来する。しかしながら, この多様性が精製途上における人工産物か, あるいは生体内に存在しているものか不明である。またウサギ骨格筋及び白ネズミ肝臓の活性型酵素 (触媒成分) は著しく酵素化学反応性が類似しており, 互いに区別され得ない。両酵素とも極めて広い, かつ同じ基質特異性を示す。さらに互いの触媒成分は他の調節成分と交叉反応を示す。これらの事実から Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素は種特異性並びに臓器特異性のない, 少なくとも機能的には同一の酵素と思われる。従来の実験事実では, Cyclic AMP が種々のホルモンの細胞内伝達物質として働き, 細胞内の生化学的反應を調節することを示している。本報告は, 必ずしも Cyclic AMP の作用のすべてが Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素を介するとは限らぬであろうが, ホルモン作用はアデニールサイクラーゼ及び Cyclic AMP 依存性蛋白質磷酸化酵素を連続的に活性化することにより増巾され, 各々の標的細胞においてそれぞれの生化学的反應を調節しており, 多彩なホルモン作用の機構を生化学的に解明する緒口をなすものと思われる。

論文審査の結果の要旨

Cyclic AMP は当初においてグルカゴン・エピネフリン等ホルモン作用の細胞内伝達物質として提唱されたが、今日では単にその意義を遙かに越えて代謝の制御はじめ幾多の生命現象の調節物質として著しく注目を集めている。山村は1969年 Cyclic AMP の細胞内第一義的作用点として重要な蛋白質磷酸化酵素の活性化現象を見出し、この酵素の解析によって1970年始めて Cyclic AMP の作用機構の解明に成功した。この酵素は catalytic unit と regulatory unit の2つのサブユニットから構成されており、Cyclic AMP は regulatory unit に allosteric に結合する事によって catalytic unit を遊離させ、活性を発動させるというユニークな機構である。今日提出された山村の論文はこの機構の解明に基づいて更にホルモンに対する細胞の基本反応様式を明らかにする事を目的としており、特に兎骨格筋と白鼠肝臓を代表的な組織として異なった動物の異なった組織の蛋白質磷酸化酵素について系統的な酵素化学、蛋白質化学的比較研究を行なったものである。その結果はこれらの catalytic unit は臓器特異性のみでなく、種特異性に乏しく、等電点の2種の酵素（アイソザイムの可能性がある）の存在する以外には機能的に区別出来ぬ単一の酵素である事を提示した。また、この酵素の基質特異性が著しく広く、一度 Cyclic AMP によって活性を発現すれば細胞内のエネルギー代謝系酵素をはじめ多くの酵素や機能蛋白質を一斉に磷酸化し、それらの諸機能を同調的に調節して細胞全体の機能や形質を変換していく可能性を示した。本研究はホルモンの示す多彩な生物学的作用の化学的背景を始めて理解しうる端緒を開いたものとして重要な貢献である。よって、本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。