Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Membrane-associated adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and its substrates in human erythrocytes

下村, 怜子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1974-07-17
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙0317
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2000317

※ 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。

〔15〕

氏名・（本籍）	下村 怜子（大阪府）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ 第255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49年7月17日
学位論文題目	**MEMBRANE-ASSOCIATED ADENOSINE 3', 5'-MONOPHOSPHATE-DEPENDENT PROTEIN KINASE AND ITS SUBSTRATES IN HUMAN ERYTHROCYTES** **（人赤血球膜に結合した Adenosine 3', 5'-Monophosphate 依存性蛋白質燐酸化酵素とその基質蛋白質の性状について）**
審査委員	主査 教授 西塚泰美 教授 岡本彰祐 教授 木幡陽

論文内容の要旨

生体膜反応の生理的意義を理解するために，膜局在成分の詳細な情報を把握してその分子機構を明らかにする目的で，細胞内オルガネラを含有せず純粋な膜の得やすい人赤血球を用いた。膜に結合した Adenosine 3′, 5′-Monophosphate（以下「C-AMP」と略す）依存性蛋白質燐酸化酵素とこの酵素の内在性基質蛋白質を見出し，その分布と性状の詳細を検索した。膜に局在する C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素は全酵素活性の約30%であり，その酵素の全内在性基質蛋白質の約60%は膜に結合していた。膜に結合した蛋白質燐酸化酵素は EDTA を含む高張塩溶液で可溶化すると catalytic unit のみ抽出され，regulatory unit は膜にとどまる。catalytic な性質及び基質特異性は他の哺乳動物組織に存在する可溶性の C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素と同じであった。膜に結合した基質蛋白質は性状を異にするいくつかの蛋白質より構成されている。高張塩溶液で容易に可溶化する蛋白質は SDS-gel 電気泳動法により分子量12,000より30,000と推定される比較的小分子の蛋白質よりなる。膜構造に強固に結合した不溶性の基質蛋白質は熱に安定であり，lithium diiodosalicylate で可溶化した。推定分子量は65,000であった。いずれも燐酸化部位は主として serine であり，threonine の燐酸化は1%以下であった。

実験方法

酵素活性：蛋白質燐酸化酵素活性は，glass fiber filter（Whatman GF 83）を用い，仔牛胸線ヒストンにとりこまれた〔r-^{32}p〕ATP の放射能活性を測定した。〔r-^{32}p〕ATPの比放射能活性は$30-80\times10^{6}$ cpm／μmole である。

測定方法：^{32}p の放射能測定は Nuclear Chicago Geiger Muller gas flow counter, Model 4338 を用いた。蛋白質の測定は Lowry 法により，牛血清アルブミンを標準蛋白とした。

その他：sepharose column による gel 沪過は 1時間 2 *ml* の流速で 2% SDS を含む10mM Tris-Cl 緩衝液（pH 7.5）で溶出した。

polyacrylamide gel 電気泳動法による分子量の測定は，Weber & Osborn 法により 0.1% SDS を含む 10% gel を用い，human r-globulin（L—及びH—鎖），ovalbumin, horse heart cytochrome C を標準蛋白とした。ヒストンを基質として〔r-^{32}p〕ATP で十分燐酸化し，トリプシン消化後 1-butanol-pyridine-acetic acid-H_2O（15：10：3：2）を展開剤として沪紙クロマトグラフィーを行い，次いで高圧沪紙電気泳動法により二次展開したものを auto-radiography した。

赤血球 ghost の調製：抗凝固剤ヘパリンを加えた人新鮮血を 0.9% 生理食塩水で 3 回洗滌し，CO_2 飽和水で溶血後少なくとも 5 回洗滌を繰返して ghost を得た。最終的に得た沈澱を 6 mM 2-mercaptoethanol と 5mM EDTA を含む10mM Tris-Cl 緩衝液（pH 7.5）に懸濁した。

結　　果

1）赤血球 ghost そのものの燐酸化反応

人赤血球 ghost に存在する C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素は，膜に内在するいくつかの蛋白質を基質として燐酸化反応を行うが，蛋白質燐酸化酵素を添加すれば反応は一層促進される。燐酸化した ghost の酸分解により，燐酸化部位は主として serine であり，threonine の燐酸化は僅か 1%以下であった。

2）蛋白質燐酸化酵素と基質蛋白質の分布

赤血球の全蛋白質燐酸化酵素の約30%が ghost に含まれ，水溶性部分より30倍も高い比活性を示した。10mM EDTA を含む 0.5M KCl 溶液で、95%以上が溶出した。一方赤血球に内在する基質蛋白質の約 60%が ghost に局在し，蛋白当りの燐酸のとりこみは可溶性部分より大きい。高張塩溶液により溶出し得る蛋白質は約20%であり，40%の蛋白質は膜構造に強固に結合している。

3）膜に結合した蛋白質燐酸化酵素の部分的精製と性状

高張塩溶液により蛋白質燐酸化酵素の catalytic unit のみ溶出されるが，regulatory unit は膜に残留する。透析後 DEAE-cellulose と hydroxylapatite カラムクロマトグラフィーで約20倍に精製され，白鼠肝臓 C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素と全く等しい catalytic な性質及び基質特異性を有することが明らかとなった。

4）膜に結合した基質蛋白質の性状について

a）燐酸化反応

膜に強固に結合した ATPase は燐酸化反応を阻害し直線性が得がたいため，60℃で 2 分間加熱処理して不活性化した。この条件で基質蛋白質は熱に安定であった。

b）安定性と溶解性

0～4℃でクロロホルム—メタノール（1：1），クロロホルム—メタノール—水（20：1：1），メタノール，アセトンで抽出すると脂質は除去され，ATPase 及び蛋白質燐酸化酵素は不活性化される。基質蛋白質は不溶性の凝塊となるが C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素の基質となり得る。中性 pH で数分間煮沸しても，燐酸化反応の基質として熱に安定である。SDS に可溶であり，80%フエノール，高濃度の蟻酸，酢酸にかなり溶解する。

c）膜に強固に結合した基質蛋白質の分析

脂質を抽出する前に，デオキシコール酸 Na 塩，SDS，Triton X-100 のような detergent で溶解し，脂質抽出後糖蛋白質は lithium diiodosalicylate で溶解した。透析後燐酸化した試料を sepharose 4 B と 2B で gel 沪過分析したが，SDS の存在ではじめて一つの主成分と，いくつかの小さな成分に分離し得た。SDS を含む polyacrylamide gel 電気泳動法により主成分の分子量は約65,000と推定された。

d）高張塩溶液に抽出された基質蛋白質の分析

EDTA を含む高張塩溶液により，基質蛋白質と C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素の catalytic unit が溶出し，燐酸化反応は速やかに進み，外から由来を異にする蛋白質燐酸化酵素を添加しても反応は高められなかった。phosphoprotein kinase が混在し内在性基質蛋白質と反応するので，〔r-^{32}p〕ATP を用い，膜に結合する intrinsic な蛋白質燐酸化酵素で燐酸化し，SDS-gel 電気泳動を行うと多数のピークが得られた。60℃で2分間熱処理を行い phosphoprotein kinase を不活性化した試料に，由来を異にする蛋白質燐酸化酵素を加えて燐酸化すれば，いくつかのピークが消失した。しかし内在性基質蛋白質の熱変性による影響も考えられる。SDS-gel 電気泳動法による分子量は 12,000 から 30,000 と推定され，比較的分子量の小さい多数の蛋白質よりなることが明らかとなった。

結　論・考　按

人赤血球膜には C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素と，その酵素の基質となるかなりの量の蛋白質が結合していることが明らかとなった。この膜成分に局在する蛋白質酸化酵素は，他の哺乳動物組織に広く分布する可溶性の C—AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素と catalytic な性質も基質特異性も等しかった。高張塩溶液で溶出すれば，catalytic unit のみ抽出され regulatory unit は強固に膜に残るものと思われる。一方本酵素の膜に結合した基質蛋白質は，溶解性及び分子量を異にする熱に安定な蛋白質よりなり，高張塩溶液で溶出してもかなりの蛋白質が膜にとどまり，膜構造と強固に結合していることを示した。

白鼠赤血球ではカテコールアミンとプロスタグランディン E_2 により C-AMP の合成が促進され，また白鼠赤血球膜の基質蛋白質の燐酸化は C-AMP 及びホルモンによって促進されたという報告もある。しかし一方ホルモン感受性の adenylate cyclase は赤血球膜には存在しないという報告もある。今回は赤血球膜に結合する C-AMP 依存性蛋白質燐酸化酵素とその基質蛋白質の分布と性状について明らかにしたが，生体膜の C-AMP 依存性燐酸化反応のもつ生理的意義について今後明らかにしていきたい。

論文審査の結果の要旨

cyclic AMP は当初グルカゴンやエピネフリンなど，ホルモン作用の細胞内伝達物質として発見されたが，今日では単にホルモン作用の意義を遙かに越えて，代謝の制御をはじめ，多数の生理現象の調節物質として働くことが判明している。cyclic AMP の多彩な生理作用の発現機構に関しては現在ではそれが特定の蛋白質燐酸化酵素をユニークな機作で活性化し，活性を顕わした本酵素が細胞内の多数の酵素や機能蛋白質を燐酸化し，それらの機能を巾広く pleiotropic に調節して細胞のもつ固有の機能を発揮させ，形質を転換させていくと考えられている。

この種の蛋白質燐酸化酵素は全ての臓器，組織に存在しているが，その細胞内分布，臓器特異性や種特異性，また燐酸化反応により制御される側の基質蛋白質については不明の点が多く，個々の標的臓器における具体的なホルモン作用の発現機構はなお明らかではない。本研究者は従来より，この種の蛋白質燐酸化酵素の活性化機作の研究に従事していたが，その途上，細胞膜，小胞体膜などに蛋白質燐酸化酵素が著しく多量存在する事実に気づき，物質輸送，吸収，分泌等の多くのホルモン作用における生体膜の役割との関連から，膜成分の酵素とその基質蛋白質の解析を行った。この目的から生体膜として，最も単純なシステムと思われる赤血球膜について分析を行ったが，本研究者の得た知見を要約すると以下のごとくである。

〔A〕生体膜局在の蛋白質燐酸化酵素

（i）蛋白質含量にして全体の数％に満たない膜成分に全酵素活性の30％以上が局在し，比活性は細胞質より約30倍高い。

（ii）細胞内可溶性酵素と同じく，微量の cyclic AMP によって catalytic unit と regulatory unit とに解離し活性化をうけるが，生体膜の regulatory unit は膜構造に強固に結合しているという特長がある。

（iii）生体膜局在の本酵素の最も重要な触媒機能は可溶性酵素と同一であり，かつ臓器特異性，種特異性を示さないことが大きな特長である。

〔B〕生体膜局在の基質蛋白質

（i）蛋白質燐酸化酵素の作用点である内因性の全基質蛋白質のうち，60％以上が膜に存在する。

（ii）この膜蛋白質の主成分は，分子量約65,000と推定され，著しく不溶性であって，生体膜に強く integrate された蛋白質である。

（iii）同様の膜成分は赤血球以外の組織，例えば肝臓細胞形質膜，神経系シナップス膜などにも認められる。

即ち，本研究者は従来より，あまり考慮されていなかった生体膜成分の蛋白質燐酸化酵素とその基質を解析した結果，極めて多量の酵素と基質が膜成分に局在し，cyclic AMP，即ち外からのホルモン刺戟によって活性が調節されながら燐酸化されている可能性を提示したものである。

本研究者が今回得た知見はこの種現象が赤血球膜にとどまらず一般に生体膜において認められることを示唆しており，その具体的なホルモン作用における意義を解明してはいないが，物質の能動輸送，吸収，分泌といったホルモン作用における生体膜の機能亢進の生化学的基盤を理解する端緒を開いたものとして価値ある知見の集積であると認める。

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。