

【 2 】

氏 名 (本 籍)	■ 牧 岡 朝 夫 (新潟県)
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	博 甲 第 2 号
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 53 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻 の 名 称	生 物 科 学 研 究 科 生 物 物 理 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Properties of muscle regulatory proteins from chicken gizzard (ニワトリ砂囊より分離した筋調節タンパク質の性状)

論 文 の 概 要

筋収縮の分子機構は骨格筋で詳しく調べられており、収縮性構造タンパク質であるアクチンを主成分とする微小線維とミオシンを主成分とする微小線維間での sliding がその基本過程であり、ミオシンによる ATP の分解をエネルギー源としている。収縮の調節機構として、アクチン・フィラメント側の調節機構とミオシン側の調節機構の二種類の存在が知られ、そのいずれもがカルシウムに依存している。前者は、トロポニン-トロポミオシン系による調節であり、トロポニンはトロポニン-C (カルシウム結合タンパク質)、トロポニン-I (Mg^{2+} -ATPase 阻害タンパク質)、トロポニン-T (トロポミオシン結合タンパク質) とよばれる独自の機能をもった三種類のタンパク質の複合体である。後者は、軟体動物においてみられるミオシンL鎖による調節である。

本研究で用いた砂囊 (平滑筋) の収縮調節機構に関しては、アクチン・フィラメント側の調節機構あるいはミオシン側の調節機構の存在を示す報告がなされているが、両者に関連づける研究はなされておらず、まだ統一した結論は得られていない。最近、砂囊におけるトロポニン-C様タンパク質の存在が報告されたが、それに機能上拮抗するトロポニン-I様タンパク質の存在は報告されていない。

このような状況から、本研究では、平滑筋である砂囊に骨格筋でみられるトロポニン-Iやトロポニン-Cに相当するタンパク質が存在するかどうか、またそれらはそれぞれどんな性状と機能をもつかについて検討し、平滑筋における筋収縮の調節機構を解析することを目的とした、その実験結果を以下に述べる。

骨格筋トロポニン調製法 (江橋法) をニワトリ砂囊筋に応用したところ、凍結保存した砂囊筋から

得られたタンパク質分画は再構成ウサギ骨格筋アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性を強く阻害することが明らかになった。しかし、凍結しない新鮮な砂囊筋からのタンパク質分画は全くこの阻害効果を示さなかった。凍結筋及び非凍結筋を混合した場合には、阻害効果を示さないタンパク質分画が得られたので、非凍結筋中のタンパク質分解酵素によって、阻害作用を担うタンパク質（阻害タンパク質）が分解されることが示唆された。そこで、凍結筋より得られた分画を DEAD-セファデックス A-50 のクロマトグラフィー（20mM Tris-HCl, pH7.5, 6M 尿素, 15mM メルカプトエタノール）にかけ、その素通り分画を集め、更にこれを同じ溶液でゲルろ過（セファデックス G-100）法により精製したところ、分子量 40,000 の阻害タンパク質を得た。このタンパク質のアクトミオシン Mg^{2+} -ATPase の阻害効果は骨格筋トロポニン-C によってカルシウム存在下においてのみ除かれ、その ATPase のカルシウム感受性が回復した。しかし、この阻害タンパク質は骨格筋トロポニン-I とは異なり、トロポミオシンの存否に無関係の阻害効果をもたらした。また、最高阻害効果を骨格筋トロポニン-I と比較すると、阻害タンパク質の方が幾分低いが、50% 阻害をおこすのに必要なタンパク質量はほぼ同じであった。一方、骨格筋トロポニン-I はアクチンと結合することによってアクチンとミオシンの相互作用を阻害することが知られているので、阻害タンパク質とウサギ骨格筋アクチンとの結合を調べてみた。すなわち、0.1 M KCl 溶液中で F-アクチンは 100,000 xg 遠心によって沈殿するという性質を利用して検討したところ、阻害タンパク質はこの条件下で単独では沈殿しないが、これに F-アクチンを加えることによって共沈することが判明した。この結果から、阻害タンパク質はアクチンと結合することによって、 Mg^{2+} -ATPase 活性を阻害すると考えられる。

再構成ウサギ骨格筋アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性をこの阻害タンパク質が抑制することは明らかになったが、砂囊筋から得られたアクトミオシンの系でも同様な作用があるかどうかを次に検討した。しかし、砂囊筋から得られた天然アクトミオシンのカルシウム感受性は約 50% と低く、これからカルシウム感受性を全く示さないアクトミオシンを調製することは成功しなかった。しかし、カルシウム感受性を部分的に除去したアクトミオシン標品を用いた実験から、阻害タンパク質がこのアクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性を充分阻害しうる性質をもつことが判明した。

次に、この阻害タンパク質に特異的な抗血清をウサギで調製し、これを用いて蛍光抗体間接法により阻害タンパク質の局在を調べた。その結果、このタンパク質は結合組織に隣接する密な砂囊筋組織に分布していることが判明し、その分布域は抗砂囊トロポミオシンを用いて得たトロポミオシンの分布域と一致した。また、寒天内免疫拡散法により砂囊の筋原線維、天然アクトミオシン及び天然アクチン・フィラメントと抗砂囊阻害タンパク質抗体の反応を検討したところ、すべて反応し阻害タンパク質と共通な一本の沈降線を生じた。この抗血清は砂囊トロポミオシンとも骨格筋トロポニンとも全く反応しなかった。これらのことから、この阻害タンパク質は砂囊筋原線維由来の構成タンパク質で、おそらくアクチン・フィラメントに含まれているものと考えられる。

一方、カルシウム存在下及び非存在下においてそれぞれ一次及び二次の電気泳動を行う方法を用いて、砂囊の 8 M 尿素抽出液にトロポニン-C 様タンパク質が存在することも明らかにすることができた。すなわち、カルシウム存在下で一次電気泳動を行うとトロポニン-C 様タンパク質は何らかの塩

基性タンパク質（トロポニン-I様タンパク質）と複合体を形成し、この複合体は全く泳動ゲル中に移動しない。一方カルシウム非存在下で一次電気泳動を行ったものではゲルの下端部にトロポニン-C様タンパク質が現われた。しかも前者は二次電気泳動の結果、一次の泳動ゲルの上端部に存在する複合体からトロポニン-C様タンパク質が出現し、そのバンドが下端部に現われることが明らかになった。このようなカルシウム依存性を示す電気泳動パターンは凍結砂囊筋を用いた場合にのみみられ、非凍結筋を用いた場合にはカルシウム依存性を示さず、一次電気泳動をカルシウム存在下で行った場合にもトロポニン-C様タンパク質に相当する位置にバンドが生じた。これはタンパク質分解酵素により複合体が不安定になったことによると考えられる。

上述の電気泳動条件では尿素が泳動ゲルに含まれているが、これをグリセリンに置き換えることにより、トロポニン-C様タンパク質が他のタンパク質よりもより早く泳動することが判明した。従って、このグリセリンを用いた調製用電気泳動によって、容易に純粋なタンパク質を単離することが可能となった。得られたトロポニン-C様タンパク質の分子量は15,500であり、その値は骨格筋トロポニン-C（18,500）よりも小さく、筋肉中に存在する他のカルシウム結合タンパク質であるパルブアルブミン（11,000-13,000）よりも大きい。

次に、このトロポニン-C様タンパク質の性状を検討した。8 M尿素を含むアルカリ・ゲル電気泳動において、このタンパク質は骨格筋トロポニン-Cと同様、カルシウム非存在下よりも存在下においてより大きい移動度を示した。しかし、グリセリンを含むアルカリ・ゲル電気泳動では、逆にカルシウム非存在下においてより大きな移動度を示し、尿素ゲルの場合と同じ挙動を示す骨格筋トロポニン-Cとは異なっていた。また、トロポニン-C様タンパク質は骨格筋トロポニン-Iあるいはトロポニン-Tとカルシウム依存性複合体を形成しうることが判明した。機能的には、骨格筋トロポニン-Cと同様に、骨格筋トロポニン-Iによる再構成ウサギ骨格筋アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性の阻害を除きうるが、骨格筋トロポニン-Tも加わった条件下で、カルシウム感受性を与えなかった。この点において、このタンパク質は骨格筋トロポニン-Cとは異なっていた。

このトロポニン-C様タンパク質と前述の阻害タンパク質の相互作用を検討した結果、アルカリ・ゲル電気泳動において、両者はカルシウム依存性複合体を形成しうることが判明した。更に、後者による Mg^{2+} -ATPase活性の阻害は前者を加えることによって除きうることも明らかになった。

これらの結果から、平滑筋である砂囊から得られた阻害タンパク質は、骨格筋トロポニン-Iと分子量は異なるが、次の点で類似した性質をもっている。すなわち、(1)塩基性タンパク質である、(2)カルシウムの存否に関係なくアクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase活性を抑制し、その阻害効果は骨格筋トロポニン-Cによって除かれる、(3)アクチン・フィラメントに含まれていると考えられる、という点である。

一方、砂囊から得られたトロポニン-C様タンパク質についても、骨格筋トロポニン-Cと比較することにより、次の類似点を挙げることができる。(1)分子量の小さい酸性タンパク質である、(2)骨格筋トロポニン-Iあるいはトロポニン-Tとカルシウム依存性複合体を形成しうる、(3)骨格筋トロポ

ニン-Iによる Mg^{2+} -ATPase 活性の阻害を除きうる, という点である。

このトロポニン-C様タンパク質と上述した阻害タンパク質は, カルシウム依存性複合体を形成することができ, 後者による Mg^{2+} -ATPase 活性の阻害は前者によって除きうるという相互作用を行うことも明らかである。

以上のことから, 骨格筋におけるトロポニン-I及びトロポニン-Cと酷似した機能をもつタンパク質として, 砂囊においてはそれぞれ阻害タンパク質(トロポニン-I様タンパク質)とトロポニン-C様タンパク質を挙げることができ, 両者の相互作用が平滑筋収縮の調節に何らかの重要な役割を担っている可能性が強い。

審 査 の 要 旨

筋収縮の分子機構はアクチン繊維とミオシン繊維との間に起る“滑り”がその基本過程でミオシンによる ATP の分解をエネルギーとしている。収縮の調節機構としては現在2種類のものが知られており, 一方は骨格筋でよく調べられているアクチンに関連した機構ともう一方は軟体動物の貝柱筋などにみられるミオシン側の機構とである。そのいずれもが Ca^{2+} に依存している。前者はトロポミオシン-トロポニン系によるものでトロポニンの3種のサブユニット; TNC (Ca^{2+} 結合タンパク質), TNI (ミオシンの Mg^{2+} -ATPase 阻害タンパク質), TNT (トロポミオシン結合タンパク質), の相互作用をとおした調節であり, 後者はトロポニンは存在せずミオシンL鎖の Ca^{2+} 結合性での調節である。平滑筋の収縮調節に関しては両機構のどちらかを支持する報告がなされているが未だ明白な結論が出されていない。

本論文では平滑筋である砂囊に骨格筋でみられる TNC や TNI に相当するタンパク質が存在するかどうか, またそれらはそれぞれどんな性状と機能を持つかなどについて詳細な実験を行い以下に述べる新知見を得ている。

- (1) ニワトリ砂囊よりウサギ骨格筋合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase を阻害する分子量 40,000 のタンパク質を分離精製することに成功した。この阻害タンパク質を骨格筋の TNI と対比すると, 同等な ATPase 阻害効果を持つこと, Ca^{2+} 存在下で骨格筋 TNC によりその阻害が回復すること, F-アクチンとの結合が起ることなどの共通性が明らかになった。しかし, トロポミオシン存在下での阻害効果で両者は明らかに異なる性質も持っていた。
- (2) ニワトリ砂囊からの阻害タンパク質は砂囊からの合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase も阻害する性質があった。
- (3) 上記の阻害タンパク質に対する特異的な抗血清を調製し阻害タンパク質の存在部位を検討した結果, アクチン繊維上に存在すること, また蛍光抗体法で砂囊組織での分布をみると抗トロポミオシン血清を用いた時とほぼ同じ分布域を持つことが判明した。
- (4) 一方, ニワトリ砂囊より TNC 様の Ca^{2+} 結合性タンパク質が存在することをスラブゲル電気

泳動で確かめ、この方法を用いて分子量 15,500 のタンパク質を単離することに成功した。

- (5) この TNC 様のタンパク質は、尿素ゲル電泳動上での Ca^{++} 感受性、骨格筋 TNI や TNT との Ca^{++} 依存性複合体形成、合成アクトミオシン Mg^{++} -ATPase の TNI による阻害に対する解除など、骨格筋 TNC とほぼ同様な性質を持つことが判明した。しかし、非尿素ゲルでの Ca^{++} 感受性や TNT 存在下の TNI による Mg^{++} -ATPase 阻害に対する解除に関して、砂囊からの TNC 様タンパク質は骨格筋の TNC とは異なった性質を持っていることも明らかにした。
- (6) 本論文で初めて分離しえた阻害タンパク質と TNC 様タンパク質とは Ca^{++} 依存性複合体を形成すること、また阻害タンパク質によるアクトミオシン Mg^{++} -ATPase の阻害は TNC 様タンパク質の添加によって除かれることも明白に示した。

筋収縮の分子レベルでの調節機構が未だ不明確な平滑筋に於て、ミオシン L 鎖の Ca^{++} 感受性によることを主張する学派とトロポミオシン-トロポニン系の Ca^{++} 感受性によることを主張する学派とに二分されている。後者の立場では、砂囊から分子量 80,000 の Ca^{++} 感受性を示すタンパク質が江橋らによって分離されその性質が調べられているがその相手となるべき TNI 様のタンパク質は平滑筋からは殆んど検出も分離もされていないのが現状であった。しかし、要旨で述べた如く著者は骨格筋の TNI や TNC に酷似した機能をもつそれぞれのタンパク質を平滑筋の砂囊で初めて分離精製することに成功し、種々の性質を明らかにすることができた。特にこの 2 種の新タンパク質は筋収縮の調節機能を明らかに持っているのみならず、両タンパク質の機能発現に必須と思われる相互作用が Ca^{++} に依存して起ることを証明した。これらのことは平滑筋収縮の分子機構に大きな意味を持っており、この 2 種の新タンパク質が筋収縮の調節に重要な役割を担っている可能性が高いことを示したものである。従って、本論文はこの分野の発展に貢献するところが大きい業績として高く評価される。

上記の論文審査と最終試験の結果に基づき、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認められる。

昭和 53 年 2 月 17 日

主査	筑波大学教授	理学博士	渡	辺	良	雄
副査	筑波大学教授	理学博士	江	原	有	信
副査	筑波大学教授	理学博士	渡	辺		浩
副査	筑波大学教授	理学博士	内	藤		豊
副査	筑波大学助教授	理学博士	平	林	民	雄