

カイコ蛹の環状GMP依存性タンパク質リン酸化酸素について

楠田, 潤
九州大学農学部蚕糸化学教室

古賀, 克己
九州大学農学部蚕糸化学教室

林, 勝哉
九州大学農学部蚕糸化学教室

<https://doi.org/10.15017/23215>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 30 (4), pp.179-189, 1976-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

カイコ蛹の環状GMP依存性タンパク質 リン酸化酵素について

楠田 潤・古賀克己・林 勝哉

九州大学農学部蚕糸化学教室

(1976年1月31日受理)

Studies on a Cyclic GMP Dependent Protein Kinase from the Pupae of *Bombyx mori*

JUN KUSUDA, KATSUMI KOGA and KATSUYA HAYASHI

Laboratory of Sericultural Chemistry, Faculty of
Agriculture, Kyushu University, Fukuoka

ホルモンと物質代謝との関係は興味ある問題であるが、その間の作用機構については不明な点が多い。哺乳動物において、この関係を最も詳しく解明した例として、環状-3', 5'-アデニル酸（以下環状AMPと略す）の関与する代謝系があげられる (Robison *et al.*, 1968)。すなわち、パプチドホルモンやカテコールアミンが標的細胞に作用すると、細胞膜上のアデニルサイクラーゼを活性化し、環状AMPを生成する。この環状AMPはさらに環状AMPに依存性のタンパク質リン酸化酵素に作用する (Walsh *et al.*, 1968)。この酵素は regulatory subunit と catalytic subunit から成つていて、これらの複合体では活性を示さないが、前者に環状AMPが結合して後者が複合体から解離すると活性を現わす (Kumon *et al.*, 1970)。その結果、この酵素は細胞質のホスホリラーゼキナーゼ (Walsh *et al.*, 1971)、グリコーゲン合成酵素 (Soderling *et al.*, 1970)、リパーゼ (Huttunen *et al.*, 1970)などをリン酸化し、それらの酵素活性を変化させることにより、エネルギー代謝を調節すると考えられている。一方、生物界に存在するもう一つの重要な環状ヌクレオチドは、環状-3', 5'-ゲアニル酸（環状GMP）である。このヌクレオチドは、生体内で環状AMPと逆の作用を持つという結果が報告されている (Hadden *et al.*, 1972)。この環状GMPの生理的効果のひとつは環状AMPと同じように、タンパク質リン酸化酵素の活性化であると思われる。事実、いくつかの生物種から環状GMPに依存性のあるタンパク質リン酸化酵素が検出されている (Kuo and

Greengard, 1970; Kuo *et al.*, 1970)。この酵素については、研究の歴史が浅いこと、精製が難しいことなどのために、その活性化や触媒の機構はまだ明らかにされていない。一般に哺乳動物の組織では、肺や脳をのぞいて環状GMPの含量は環状AMPのそれよりも低く、タンパク質リン酸化酵素についても、環状GMPに依存性のものは活性が低い。これに対して、昆虫、エビ・カニなど節足動物の組織では環状GMPがより多く存在し (Ishikawa *et al.*, 1969)、これに依存性のタンパク質リン酸化酵素の活性も、環状AMP依存性のそれより高い (Kuo *et al.*, 1971)。

本実験では、カイコ (*Bombyx mori*) の蛹から環状GMP依存性のタンパク質リン酸化酵素を分離・精製し、性質を調べた。すなわち、この酵素の活性化剤である環状ヌクレオチドならびに基質であるATPの2種類のヌクレオチドと酵素活性との関係を、阻害剤などを用いて詳しく研究し、この酵素の活性化と触媒作用との関係を追及した。

終始ご指導をいただいた向井助教授、実験の一部を担当された柴田、池田両君、そして本報告の作成にご協力いただいた教室の方々へ感謝の意を表す。材料を提供された九州大学の土井良助教授と木原氏に、また農林省蚕糸試験場九州支場の方々に謝意を表す。

材料と方法

材料 カイコ (*Bombyx mori*) の交雑種を用いた。蛹化脱皮ののち約7日目に環状GMP依存性の酵素活性が最高となり、またこの時環状AMP依存性の酵素

活性はきわめてわずかに検出されるにすぎなかつた(楠田ら, 未発表)ので, この時期の蛹を酵素精製の材料に用いることにした。

基質ヒストンの調製法 ヒストンは仔牛の胸腺より Johns (1964) の方法に従って酸および有機溶媒で分別抽出し, アミノ酸組成の値が文献値とほぼ一致することを確かめた。

[γ - ^{32}P]ATP の調製 [γ - ^{32}P]ATP (および [γ - ^{32}P]GTP) は, Glynn and Chappel (1968) の方法に従って標識化し, 高圧濾紙電気泳動によつて精製した。

タンパク質リン酸化酵素の活性測定法 活性の測定は Reiman *et al.* (1971) の方法を改変して行なつた。その原理は, ATP の γ 位からタンパク性基質に転移するリン酸基の量を定量するものである。Table 1 に示すような組成を持つ反応混液を 30°C で 10 分間反応させたのち, マイクロピペットで 30 μl を取り, 円形濾紙 (直径 2.4 cm, Whatman 3 MM) にスポットし, 冷 10% トリクロル酢酸溶液に 30 分間浸して反応を停止した。この濾紙を同溶液で 3 回洗滌して未反応の [γ - ^{32}P]ATP を除いた。続いて 99% エタノール, さらにエチルエーテルで洗滌したのち乾燥し, 4% のジフェニールオキサゾール (PPO) を含むトルエン 10 ml を加え, シンチレーションカウンター (Beckman 社製, LS-250 型) で計測した。酵素液中には測定を妨害するホスホジエステラーゼ, ホスホプロテインホスファターゼ, ATP アーゼなどの混入が予想されたので, これらの阻害剤として, それぞれテオフィリン, フッ化ナトリウム, EDTA およびエチレンジグリコルビス-(β -アミノエチルエーテル)-N, N'-テトラ酢酸 (EGTA) を反応混液中に加えた。

酵素活性の表示 まず基質である [γ - ^{32}P]ATP の 15 nmole あたりの比放射能を測定しておき, 反応後, 酸不溶性のタンパク質に残存する放射能から, タンバ

ク性基質にとり込まれたリンの量 (nmole) を逆算した。なお先に述べた反応条件下において 1 分間に [γ - ^{32}P]ATP から 1 pmole の γ - ^{32}P をタンパク性基質に転移する酵素量を 1 単位 (unit) とした。

活性の表示法は次のとおりである。反応液から環状スクレオチドを除いたときの活性は, 環状スクレオチドに非依存性のタンパク質リン酸化酵素活性を示し, 環状スクレオチドを加えたときの活性は環状スクレオチド非依存性の活性と環状スクレオチド依存性の活性の和を表わす。なお, 反応液から酵素液を除いたものの値を対照値として各測定値より差し引いて補正した。

タンパク質濃度 タンパク質濃度は紫外吸収法, または Lowry *et al.* (1951) の方法で測定した。

酢酸カルシウム処理 懸濁した組織抽出液に 0.1 M になるように固体酢酸カルシウムを加え, pH を 6.5~7.0 に保持すると, 懸濁物は沈澱するので, これを遠沈して除けば清澄な上清が得られる。これはカルシウムが, 抽出液中の有機酸, リン酸などと結合して沈澱するとき, 懸濁物を共沈, もしくは吸着する性質を利用した処理法である (萩原, 1955)。

イオン交換セルロースの活性化 弱塩基性陰イオン交換セルロースとして, DEAE-セルロース (交換容量 0.8~1.0 meq/g 乾燥体, Brown 社製) を用いた。使用に際しては, 0.5 N 塩酸, 蒸留水, 0.5 N カセイソーダ, 蒸留水の順に処理し, 所定の緩衝液であらかじめ平衡化した。

セファデックス G-200 カラムの充填 ゲル濾過には, セファデックス G-200 (ベッド容積/乾燥セファデックス: 30~40 ml/g, 粒度 40~120 μ , Pharmacia 社製) を用いた。蒸留水中, 100°C で加熱しながら, 8 時間膨潤させ, 数回の傾瀉により, 細かい粒子を除き, 所定の緩衝液で平衡化したのち, カラムに充填した。

[^3H]環状 GMP 結合活性の測定 この測定には Gilman (1970) の方法を改変したものを用いた。反応混液の組成を Table 2 に示す。測定する試料を加えることにより反応を開始した。30°C で 10 分間インキュベートしたのち, 0.04 M MgCl_2 を含む 0.01 M トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 を 5 ml 加えて反応を停止し, ミリポアフィルター (pore size: 0.45 μ) で濾過した。フィルターをさらに 5 ml の同緩衝液による洗滌ののち, 80°C で 2 時間乾燥し, PPO-トルエン 10 ml 中でシンチレーションを計測した。なお, RCC 製の [^3H]環状 GMP (10 Ci/mmol) を用いた。

Table 1. Assay mixture for protein kinase activity.

β -Glycerophosphate-HCl buffer, pH 7.0	50 mM
Sodium fluoride	20 mM
Ethylene glycol bis-(β -aminoethyl-ether)-N,N'-tetraacetic acid	0.3 mM
Ethylenediamine tetraacetic acid	0.2 mM
Theophylline	2 mM
Magnesium acetate	10 mM
[γ - ^{32}P]ATP	0.3 mM
Histone or other proteins	4 mg/ml
Cyclic nucleotide	0.5 μM
Enzyme	10 μl
Total	50 μl

Table 2. Reaction mixture for cyclic GMP binding.

Cyclic [³ H]GMP	0.2 μM
Phosphate buffer, pH 7.5	0.02 M
Magnesium acetate	0.001 M
Enzyme	10 μl
Total	50 μl

結 果

酵素の精製

蛹化の後6~7日目の蛹に、その重量の3倍量の冷却した0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ワーリングブレンダーで4,000回転/分、5分間摩擦し、三重ガーゼで濾過し、濾液を遠心分離 (10,000×g, 30 min) して沈澱物を除いた。この抽出液に終濃度が0.1 M となるように固体酢酸カルシウムを加え、攪拌しながら、pH 6.8 に調整した。16時間放置後、遠心分離 (10,000×g, 30 min) して沈澱物を除いた。上清に固体硫酸を45% となるように加え、30分間放置し、生じた沈澱を遠心分離 (10,000×g, 30 min) して集め、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶かし、同緩衝液に対して16時間透析した。この溶液について各pHでの安定性を調べたところ、この酵素はpH 4.5~pH 7.5 で48時間安定であることが明らかとなった。このような性質を利用してpHによる分別沈澱を行なった。前記の透析内液に1 N 酢酸を加えてpHを4.8に調整した。30分間放置したのち、生じた沈澱を遠心分離 (10,000×g, 30 min) して除き、1 N アンモニア溶液を加えて、pHを7.0にもどした。この酵素液に、固体硫酸を25% 飽和となるように加えた。4時間の放置の後、遠心分離 (10,000×g, 30 min) により沈澱を除いた。上清液に硫酸を35% 飽和となるように加えた。生じた沈澱を遠心分離 (10,000×g, 30 min) によって集め、少量の0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、同緩衝液に対して透析した。この酵素画分を0.025 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) であらかじめ平衡化したDEAE-セルロースカラムに添加した。同緩衝液で十分に洗滌した後、塩化ナトリウム濃度を0から0.4 M まで直線的に増加させて溶出を行なった。流速を15 ml/hr に調節し、溶出液は8 ml ごとにフラクションコレクターで分取した。各画分のタンパク質濃度と酵素活性を測定し、Fig. 1 に示す結果を得た。この操作により比活性は約17倍に上昇した。

つぎにクロマトグラフィーの活性画分をコロジオンバッグ (Sartorius-Membranfilter 社製) によつて濃縮した後、セファデックス G-200 によるゲル濾過を

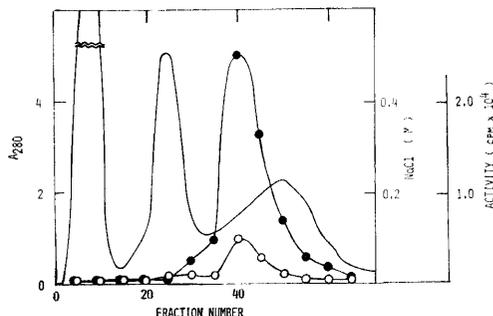


Fig. 1. Chromatography of pupal protein kinase by a column of DEAE-cellulose. Details are as described in text. Activity was measured in the presence or absence of cyclic GMP. — absorbance at 280 nm; ●—● activity with cyclic GMP; ○—○ activity without cyclic GMP.

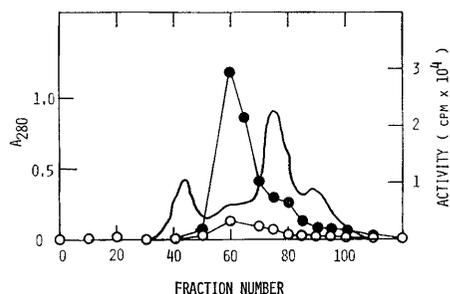


Fig. 2. Gel-filtration of protein kinase through a column of Sephadex G-200. For details, see text. Symbols for drawings are the same as those in legend to Fig. 1.

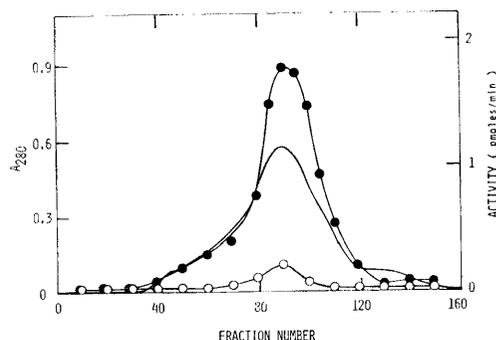


Fig. 3. Re-filtration by Sephadex G-200. See text for details. Symbols are the same as designated in legend to Fig. 1. The filtrate, which was the purest preparation of the enzyme, was thoroughly used for further experiments.

Table 3. Summary of purification of cyclic GMP dependent protein kinase from pupae.

Fraction	Volume (ml)	Total activity (pmoles/min) × 10 ⁴			Total protein (mg)	Specific activity for cyclic GMP (pmoles/min/mg protein)	Recovery of activity for cyclic GMP (%)	(c-a)/(b-a)
		(a) No addition	(b) Plus cyclic AMP	(c) Plus cyclic GMP				
Crude extract	3200	330	915	1075	52000	207	100	1.27
Ca-acetate precipitation	2970	30	71	279	41700	67	26.0	6.07
First AmSO ₄ fractionation	450	79	151	729	23900	305	67.8	9.03
Acid treatment	460	63	109	593	17250	344	55.2	11.5
Second AmSO ₄ fractionation	292	62	88	484	9140	530	45.0	16.2
DEAE-cellulose fraction	280	15	28	531	578	9190	49.4	39.7
First Sephadex G-200 filtrate	54	11	17	334	145	23000	31.1	53.8
Second Sephadex G-200 filtrate	58	12	17	258	119	21700	24.0	18.9

行なった。その結果を Fig. 2 に示す。酵素活性は素通り直後の画分にみられた。この操作により比活性は 2 倍に上昇した。ゲル濾過の活性画分をコロジオンバッグで濃縮したのち、セファデックス G-200 カラムにより再ゲル濾過を行なった。結果を Fig. 3 に示す。タンパク質の溶出曲線と活性のそれとがほぼ一致した。

精製の各段階における酵素の回収率、および比活性の上昇率を Table 3 に示す。精製の全過程を通じて、比活性は約 105 倍に上昇し、酵素活性の回収率は 24 % であつた。また、最終ステップのゲル濾過により単一な溶出曲線を得たが、この画分は、ゲル電気泳動によつて数本のタンパク質のバンドを与えたので、まだ均一ではないものと思われた。しかし、二度目のゲル濾過では、比活性が低下する傾向にあつたので、すでにこの段階で、酵素は不安定になつていようと思われた。また、考えられる範囲で試みた安定化剤の添加による効果は、期待に反して小さかつた。その上、ここにあげた方法以外の精製の方法、たとえばハイドロキシアパタイトや、ホスホセルロースによるクロマトグラフィー、アンフオラインや調製用ディスクによる電気泳動などについても検討したが、良好な成績を得ることはできなかつた。したがつて、現段階ではこれ以上、精製の操作を重ねることは困難であると思われたので、この段階で酵素の性質を調べることにした。

酵素の基本的性質

本酵素の基本的性質を Table 4 にまとめた。これらはすでに種々の動物組織から精製された環状 AMP 系の酵素と類似しており、また、Nishiyama *et al.* (1975) の得たカイコ蛹の環状 GMP 依存性酵素とも、ATP に対する K_m 値をのぞいては、ほぼ一致していた。

Table 5. Specificity of nucleoside triphosphate for histone-phosphorylation.

Nucleoside triphosphate	Activity (pmoles/min)		
	No addition	Cyclic AMP	Cyclic GMP
[γ - ³² P]ATP	33.92	59.10	295.40
[γ - ³² P]GTP	1.38	1.74	0.03

リン酸供与体であるヌクレオシドトリリン酸に対する特異性

この酵素は活性化にも、また基質にもヌクレオチドを必要とする。これらのヌクレオチドと酵素活性との関係を調べた。まず、基質であるヌクレオシドトリリン酸について検討した。つぎに環状ヌクレオチドについて調べた。[γ -³²P]ATP および [γ -³²P]GTP をそれぞれ終濃度が 0.3 mM となるように反応液に加え、酵素活性を測定した。結果を Table 5 に示す。[γ -³²P]ATP をリン酸供与体として用いた場合、³²P

Table 4. Properties of protein kinase from pupae.

Optimum pH	pH 6.5~7.5
Metal ion requirement	Mg ²⁺ or Co ²⁺
Specificity for protein substrates	Histone F _{2b}
K_m value for ATP	Plus cyclic GMP, 5.5×10^{-5} M; Minus cyclic GMP, 6.4×10^{-5} M
K_m value for histone F _{2b}	Plus cyclic GMP, 6.7 mg/ml; Minus cyclic GMP, 6.7 mg/ml

のタンパク質基質への転移はほとんど認められなかった。

環状ヌクレオチドの構造および濃度と活性化との関係

(1) 2', 3'-型および 3', 5'-型環状ヌクレオチドの活性化におよぼす影響 AMP および GMP の 2', 3'-環状型と 3', 5'-環状型のを、終濃度がそれぞれ $5 \times 10^{-7}M$ および $1 \times 10^{-5}M$ となるように反応液中加入し酵素活性を測定した。結果を Table 6 に示す。AMP および GMP のいずれにおいても、2', 3'-環状型のものでは活性化は起こらず、3', 5'-環状型でのみ 2~8 倍の活性化が見られた。したがって以後の環状ヌクレオチドに関する実験はすべて 3', 5'-環状型のものを用いた。

(2) 活性化における環状ヌクレオチド濃度の影響 (1) により AMP, GMP とも 3', 5'-環状型に強い活性化作用があることが明らかとなつたので、これらの濃度に対する依存性を調べた。環状 AMP と環状 GMP の各濃度における酵素活性を測定し、Fig. 4

Table 6. Activation by 3', 5'- and 2', 3'-cyclic nucleotides.

Cyclic nucleotide	Activity (pmoles/min)	
	$5 \times 10^{-7}(M)$	$1 \times 10^{-5}(M)$
No addition	3.2	3.2
2', 3'-Cyclic AMP	4.6	6.0
3', 5'-Cyclic AMP	7.2	18.4
2', 3'-Cyclic GMP	3.5	5.6
3', 5'-Cyclic GMP	26.2	26.2

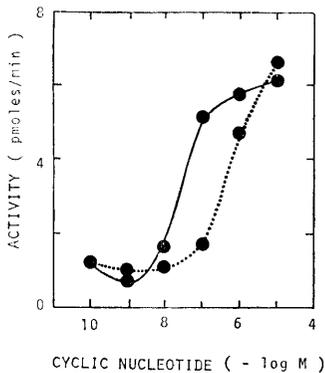


Fig. 4. Influence of cyclic GMP and cyclic AMP on the phosphorylation activity. Assay was made as stated in text, but with the various concentrations of cyclic nucleotides. ●—● with cyclic GMP; ●-----● with cyclic AMP.

に示す結果を得た。環状 GMP では $1 \times 10^{-7}M$ でほぼ完全に活性化された。これに対し、環状 AMP で同程度の活性化を得るには $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}M$ が必要であつた。

3H で標識化した環状 GMP の酵素への結合

(1) 酵素量と反応系の関係 $[^3H]$ 環状 GMP の結合量が酵素の量によつて、また酵素の熱処理によつて、どのように変化するかを調べた。結果を Fig. 5, Table 7 に示す。 $[^3H]$ 環状 GMP 結合量は酵素量の増加ともなつて直線的に上昇した。また $100^\circ C$ で 5 分間熱処理した酵素液では結合は認められなかった。

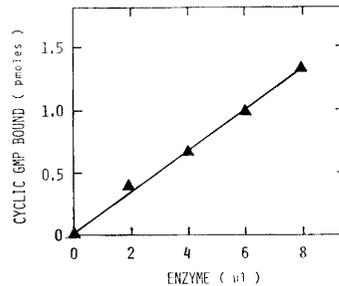


Fig. 5. Proportionality of cyclic $[^3H]$ GMP-binding to increasing amount of enzyme. The binding was assayed as accounted in text.

Table 7. Effect of heat-treatment of enzyme on cyclic $[^3H]$ GMP-binding.

Experimental number	Cyclic GMP	Un-treated enzyme	Heat treated enzyme	Cyclic GMP bound (pmoles)
1	+	-	-	0.015
2	+	-	+	0.005
3	-	+	-	0.006
4	+	+	-	0.789

(2) $[^3H]$ 環状 GMP 結合とタンパク質リン酸化活性における pH 依存性の比較 各 pH における $[^3H]$ 環状 GMP 結合量とタンパク質リン酸化活性を測定し、Fig. 6 に示す結果を得た。 $[^3H]$ 環状 GMP 結合量は pH 7.0 付近で最大となつた。またタンパク質リン酸化活性も、環状 GMP の存否にかかわらず、pH 7.0 付近で最大値を示した。

(3) $[^3H]$ 環状 GMP 結合におよぼす非標識環状ヌクレオチドの影響 Table 2 に示すように反応液には $2 \times 10^{-7}M$ の $[^3H]$ 環状 GMP が存在するが、さらに種々の濃度の非標識環状ヌクレオチドを加えて、 $[^3H]$ 環状ヌクレオチドの酵素への結合量におよぼす

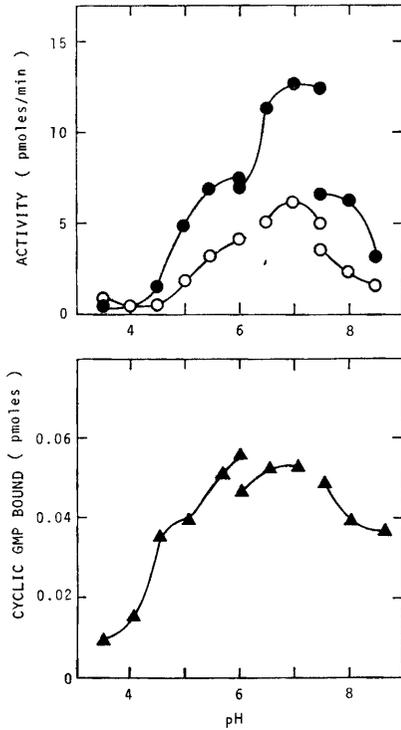


Fig. 6. Comparison of optimum pH for histone-phosphorylation and cyclic [^3H]GMP-binding. Both were assayed as indicated in text, with using the following pH buffers (20 mM): Sodium acetate buffer for pH 3~6, sodium phosphate buffer for pH 6.0~7.5, and Tris-HCl buffer for pH 7.5~8.5. ●—● phosphorylation with cyclic GMP; ○—○ do. without cyclic GMP; ▲—▲ cyclic GMP-binding.

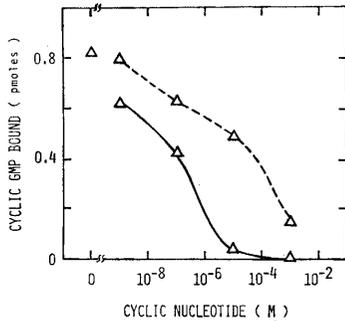


Fig. 7. Inhibition of cyclic [^3H]GMP-binding by non-labeled cyclic GMP and cyclic AMP. Assay was made as detailed in text, but with the changing amount of non-labeled cyclic nucleotides, Δ — Δ with cyclic GMP; Δ — Δ with cyclic AMP.

影響を調べた。結果を Fig. 7 に示す。反応系に加える非標識環状スクレオチドの濃度が増加するにつれて、[^3H]環状 GMP の結合は阻害された。また環状 AMP による阻害は環状 GMP のそれより強かつた。

アデニン系化合物によるリン酸化の阻害

哺乳動物からとられた環状 AMP に依存性のタンパク質リン酸化酵素は、アデニン系化合物によつて阻害されるものが多い。この阻害は環状 AMP による活性化の段階ではなく、ATP の γ 位のリンをタンパク質に転移する触媒過程に対するものであることが、酵素のサブユニット構造を利用して証明されている (Iwai *et al.*, 1972)。そこで、環状 GMP 依存性タンパク質リン酸化酵素についても種々のスクレオチドによる阻害を調べ、さらに酵素の活性化と触媒作用が同一の部位で行なわれるかどうかを検討した。

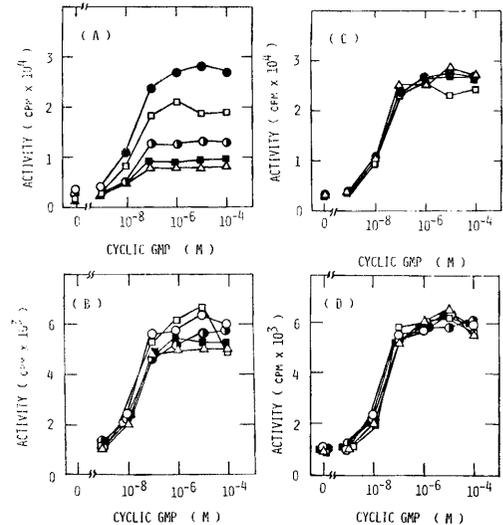


Fig. 8. Effect of adenine and guanine compounds on histone-phosphorylating activity. Incubation was made as mentioned in text, except that each of the compounds was added to the reaction mixture at $5 \times 10^{-4}\text{M}$, and the concentration of cyclic GMP was varied as indicated. (A), with adenine compound, ATP $3 \times 10^{-5}\text{M}$; (B), with adenine compound, ATP $5 \times 10^{-4}\text{M}$; (C), with guanine compound, ATP $3 \times 10^{-5}\text{M}$; (D), with guanine compound, ATP $5 \times 10^{-4}\text{M}$. ●—● control; ○—○ with base; ■—■ with nucleoside; □—□ with nucleoside monophosphate; Δ — Δ with nucleoside diphosphate.

アデニン系化合物およびグアニン系化合物のリン酸化への影響

(1) 環状 GMP で活性化した場合 本酵素は活性化に環状 GMP を必要とし、ATP を基質とするので、特にアデニン系とグアニン系化合物に着目し、これらの化合物を $5 \times 10^{-4}M$ となるように反応系に加えた。ATP の濃度は $3 \times 10^{-5}M$ または $5 \times 10^{-4}M$ に固定し、環状 GMP の濃度を $10^{-9} \sim 10^{-3}M$ にわたる範囲で変え、活性を測定した。結果を Fig. 8 に示す。アデニン系化合物は、基質 ATP 濃度の低いところで顕著な活性阻害を示した。ADP>アデノシン>アデニン>AMP の順で阻害効果が強かった。この効果は環状 GMP の濃度を上昇させても変化しなかったが、ATP の濃度を増加すると軽減された。一方、グアニン系化合物ではわずかに阻害が認められるにすぎなかった。

(2) 環状 AMP で活性化した場合 (1) の場合と同様に $5 \times 10^{-4}M$ となるようにアデニン系とグアニン系化合物を反応系に加え、ATP および環状 AMP の濃度を変えて酵素活性を測定した。結果を Fig. 9 に示す。ATP の濃度の低いところでは、ADP>アデノシン>アデニン>AMP の順で阻害効果が認められ

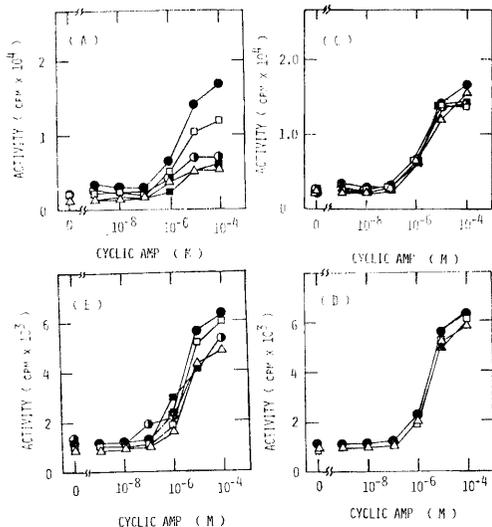


Fig. 9. Effect of adenine and guanine compounds on histone-phosphorylating activity. Incubation was made as mentioned in text, except that each of the compounds was added to the reaction mixture at $5 \times 10^{-4}M$, and the concentration of cyclic AMP was varied as indicated. Symbols are the same as Fig. 8.

たが、この阻害は環状 AMP の濃度には関係なく、ATP の濃度の上昇により軽減された。グアニン系化合物による阻害は、ほとんど認められなかった。

(3) その他の塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの影響 基質 ATP を $3 \times 10^{-5}M$ とし、環状ヌクレオチドについては、環状 GMP の場合 $1 \times 10^{-6}M$ 、環状 AMP の場合は $1 \times 10^{-4}M$ となるように反応液に加えた。さらに種々の塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドを $5 \times 10^{-4}M$ となるように加えて、酵素活性に対する影響を調べた。結果を Table 8 に示す。シチジン系化合物による阻害は、環状 GMP または環状 AMP のいずれを用いて活性化したときも、ADP による阻害に比べるとわずかであった。またデオキシアデノシンでは、リボース型のアデノシンと同程度の阻害がみられた。

Table 8. Effect of nucleotide compounds on histone-phosphorylation.

Base, nucleoside or nucleotide	Relative activity (%)	
	Cyclic GMP	Cyclic AMP
No addition	100	100
Cytidine	103	97
Cytosine	101	94
CMP	98	99
CDP	101	91
CTP	102	88
ADP	20	21
Deoxyadenosine	22	27

アデニン系化合物による阻害機構

(1) リン酸化に対する ADP とアデニンの影響 前に示したようにアデニン系化合物の阻害は基質 ATP の濃度によって異なっている。ここでは ATP 濃度と阻害の関係をさらに詳しく検討した。阻害剤として ADP とアデニンを $5 \times 10^{-4}M$ となるように反応液に加え、ATP の各濃度における酵素活性を測定し、Fig. 10 に示す結果を得た。ATP のいずれの濃度においても ADP の方がアデニンより阻害度が強かった。各点における Lineweaver-Burk plot をとると Fig. 11 に示すような結果となった。それぞれの直線は縦軸上の 1 点で交差しており、阻害剤が ATP と拮抗的關係にあることを示している。

(2) リン酸化と $[^3H]$ 環状 GMP の結合におよぼすアデニン系化合物の影響 前の結果によるとアデニン系化合物は基質 ATP に対し拮抗的に作用すると思われるが、阻害点が活性化段階にあるのか、触媒機構にあるのかは、明確でない。この点を明らかにする

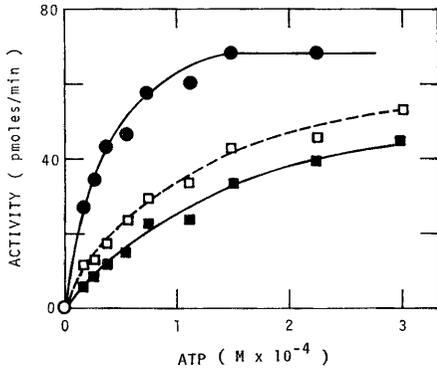


Fig. 10. Inhibition of histone-phosphorylating activity by ADP or adenine. Assay was made with the presence of various concentrations of ATP and 5×10^{-4} M of ADP or adenine. ●—● control; ■—■ with ADP; □---□ with adenine.

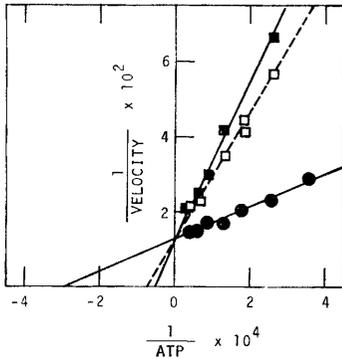


Fig. 11. Double reciprocal plots of histone-phosphorylation as a function of ATP concentration (Fig. 10). For details and symbols, see legend to Fig. 10.

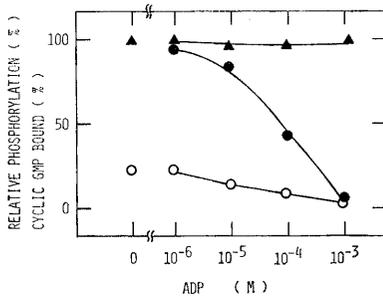


Fig. 12. Effect of ADP on cyclic $[^3\text{H}]$ GMP-binding and on histone-phosphorylation. Both were assayed as designated in text, with the presence of various concentrations of ADP. Data are expressed by percent of the maximum rate. ●—● phosphorylation activity with cyclic GMP; ○—○ do. without cyclic GMP; ▲—▲ cyclic GMP-binding rate.

ため、 $[^3\text{H}]$ 環状 GMP の酵素への結合に対するアデニン系化合物の影響を調べた。ATP 濃度 3×10^{-5} M、環状 GMP 濃度 1×10^{-6} M とし、種々の濃度の ADP を加えてタンパク質リン酸化酵素活性を測定した。 $[^3\text{H}]$ 環状 GMP 結合量は、材料と方法の項に示す反応液に種々の濃度の ADP を加えて測定した。結果は Fig. 12 に示す。タンパク質リン酸化活性は ADP 濃度の増加に伴って減少したが、 $[^3\text{H}]$ 環状 GMP の結合量は ADP のいずれの濃度でも変化が認められなかった。

考 察

豚の抽出液には脂肪が多量に含まれているため清澄な酵素液を得られず、したがって以後の精製操作が難しくなる。この懸濁物を除くのに超遠心分離機で遠沈する方法もあるが、本実験では酢酸カルシウムによる沈澱法を用いた。この操作によると、数時間で懸濁物は沈澱し、透明な上清を得ることができる。またこの段階のうちに総活性は低下したが、これは、 Ca^{2+} が本酵素を一時的に阻害するためと思われる。DEAE-セルロースクロマトグラフィーでは比活性が一挙に17倍も上昇し、かつ活性の回収もよく、用いた精製手段中、最も有効であった。

環状 GMP を加えたときと環状 AMP を加えたときの活性の比は、環状 AMP 依存性酵素の混入を知る一つの指標となる。精製の全過程を通じてみると、この比の値は組織抽出液では、きわめて小さい。この段階では、脂肪を含む懸濁物が多く、正確な測定値が得られ難いことにもよるのであろう。酢酸カルシウムから硫酸分画に至る段階においてはこの比の値はあまり変化しなかつたが、DEAE-セルロースクロマトグラフィーののち大きくなった。

精製された酵素は pH 7.0 付近に至適 pH を有し、活性の発現には Mg^{2+} が必要であった。また Ca^{2+} でも Mg^{2+} の 67% の活性が認められた。タンパク質基質としてヒストン F_{2b} が最適であった。プロタミンは、ヒストン同様、リンタンパク質であるが本酵素の基質とはなり得なかつた。

カイク卵にも環状 GMP 依存性タンパク質リン酸化酵素が見出されているが、この酵素はヒストンに比べてプロタミンをよりリン酸化し易い点で本酵素と異なるようである (Takahashi *et al.*, 1974)。

もう一つの基質である ATP に関する実験では、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ のかわりに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を用いても $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ の転移は起こらなかつた。雄鶏肝に存在するホス

ピチンリン酸化酵素は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の約 40% の効率で基質として利用出来ることが知られている (Goldstein and Hasty, 1973). しかし $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 以外のヌクレオシドトリリン酸を基質として利用できない酵素がほとんどである (Labrie *et al.*, 1971).

本酵素の活性化は AMP, GMP のいずれにおいても 3', 5' の環状型でのみ行なわれた。また環状 GMP と環状 AMP に対する活性化の依存性を見てみると、前者では後者の 1/10~1/100 の濃度で活性化できる。環状 AMP 系の酵素の場合には、この両ヌクレオチドへの依存性の差が、ちょうどこの逆の関係にある (Kuo *et al.*, 1971). 従つて本酵素は環状 GMP に依存性のタンパク質リン酸化酵素と見なすことができよう。

$[\text{H}^3]$ 環状 GMP と酵素との結合量は加えた酵素量と直線的関係にあり、この結合は熱に対し不安定であった。また $[\text{H}^3]$ 環状 GMP 結合量とタンパク質リン酸化活性は同じ pH 領域に至適 pH を持っていた。あらかじめ反応液に非標識環状ヌクレオチドを加えておくと $[\text{H}^3]$ 環状 GMP の結合は阻害されるが、この阻害は、環状 GMP, 環状 AMP のいずれでも起こり、前者を加えたときが後者を加えたときより 10~100 倍強かつた。このことは本酵素が環状ヌクレオチドで活性化される際の両ヌクレオチドの活性化能力を反映しているものであり、 $[\text{H}^3]$ 環状 GMP と酵素との結合が非特異的なものではないことを示すものである。

Fallon and Wyatt (1975) はサクサン (*Antheraea pernyi*) の蛹の抽出液を硫酸分画して、環状 GMP 結合タンパク質を得たと報告している。この結合タンパク質の活性の至適 pH は 4.0 付近であるという。このものは本実験で検討したタンパク質リン酸化酵素とは別の環状 GMP 結合活性を持つタンパク質であろうと考えられる。

環状 GMP 依存性タンパク質リン酸化酵素は哺乳動物の環状 AMP 依存性酵素と同じように、アデニン系化合物により強く阻害された。このような阻害は Guanin 系化合物やシトシン系化合物では認められず、アデニン系化合物に特異的なものと考えられる。その中でも $\text{ADP} > \text{アデノシン} > \text{アデニン} > \text{AMP}$ の順で阻害が強くなり、デオキシ型のものにも阻害活性が見られた。これらの結果は、アデニン系化合物の構成成分のうち、塩基部分が阻害作用に密接に関連していることを示している。また用いた化合物のうち ADP が最も強い阻害作用を示したが、これは生成物阻害によるもの

のと思われる。これらの阻害は環状ヌクレオチドの濃度には影響されず、基質 ATP 濃度により大きく異なっている。すなわちこの濃度が低い ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) ところでは 70~80% の阻害を起こすが、ATP 濃度を高める ($5 \times 10^{-4}\text{M}$) と阻害は 20~30% 程度に軽減された。また基質 ATP に対する K_m 値を比較して見ると、阻害剤は、ATP と拮抗する様相を呈していた。

さらに ADP 濃度が増加するにつれ、タンパク質リン酸化活性は低下したのに対し、 $[\text{H}^3]$ 環状 GMP の結合量には全く変化が認められなかつた。

これらの結果から、阻害剤の作用点は環状 GMP の結合する部位ではなく、ATP から r 位のリンをタンパク質に転移する触媒部位にあることが示唆される。

哺乳動物の環状 AMP 依存性タンパク質リン酸化酵素では、環状 AMP の結合するサブユニットとリン酸化を行なうサブユニットに分けることが可能であり (Kumon *et al.*, 1970), 活性化機構と触媒機構とが詳しく比較されている (Iwai *et al.*, 1972). 一方、環状 GMP 依存性酵素は未だ完全な精製が行なわれておらず、基質特異性や、活性化機構に不明な点が多い。箸本ら (1975) はカイコ蛹の環状 GMP 依存性タンパク質リン酸化酵素をトリプシン処理すると、環状 GMP 結合能のある画分と、タンパク質リン酸化能のある画分に分けられると主張している。しかしこの実験系ではトリプシン処理による両活性の失活が著しいという欠点がある。本実験で適用した $[\text{H}^3]$ 環状 GMP 結合活性とタンパク質リン酸化活性阻害のキネティックスの結果は、両部位が酵素上の別の位置にあるという仮説をさらに明確に支持するものである。

摘 要

カイコ蛹の環状 GMP 依存性タンパク質リン酸化酵素を、酢酸カルシウム沈澱、酸処理、硫酸分画、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーとセフテックス G-200 ゲル濾過により 105 倍に精製した。

精製した酵素は pH 6.5~7.5 に至適 pH を持ち、その活性には Mg^{2+} が必要であつた。ヒストン F_{26} が、調べた範囲で最も良い基質であつた。この酵素は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を基質として利用できなかった。環状 AMP と環状 GMP のいずれにおいても 2', 3' 型では活性化されず、3', 5' 型でのみ活性化された。

本酵素には $[\text{H}^3]$ 環状 GMP を結合する能力があり、この活性とタンパク質リン酸化活性は同じ pH 領域 (pH 6.5~7.5) に至適 pH を持っている。またこの結合活性は、非標識の環状 GMP と環状 AMP に

より阻害された。 10^{-7} ~ 10^{-4} M の濃度範囲では前者の方が、後者より阻害力が強かった。

またリン酸化活性はアデニン系化合物で阻害された。なおデオキシアデノシンにも阻害効果があつた。ゲアニン系化合物やシトシン系化合物によつては阻害されなかつた。アデニン系化合物においては ADP>アデノシン>アデニン>AMP の順で阻害力が強かつた。この阻害は環状スクレオチドの濃度を上昇させても変化しなかつたが、ATP の濃度を増加してやると軽減された。

ATP 濃度と反応速度とを逆数プロットしてみた結果、アデニン系化合物は ATP に対して拮抗的に阻害をしていることが示唆された。ADP の濃度が増加するにつれ、タンパク質リン酸化活性は低下したのに対し、 $[^3\text{H}]$ 環状 GMP の結合量には全く変化が認められなかつた。

このことは ADP の作用点が環状 GMP の結合部位ではなく、触媒部位にあること、したがつてこれらの部位が酵素上の別の位置にあることを示唆する。

文 献

- Fallon, A. M. and G. R. Wyatt 1975 An improved assay for cyclic GMP using an insect binding protein. *Anal. Biochem.*, **63**: 614-619
- Gilman, A. G. 1970 A protein binding assay for adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**: 305-312
- Glynn, I. M. and J. B. Chappel 1968 A simple method for the preparation of ^{32}P -labelled adenosine triphosphate of high specific activity. *Biochem. J.*, **90**: 147-149
- Goldstein, J. L. and M. A. Hasty 1973 Phosvitin kinase from the liver of the rooster. *J. Biol. Chem.*, **248**: 6300-6307
- Hadden, J. W., E. M. Hadden, M. K. Haddox and N. D. Goldberg 1972 Guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate: A possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 3024-3027
- 萩原文二 1955 酵素の精製法. 赤堀ら編: 酵素研究法 I. 朝倉書店, 東京, 101-173 頁
- 箸本英吉・黒田嘉和・中島三枝子・武田誠郎 1975 Cyclic nucleotide 依存性タンパク質リン酸化酵素によるヒストンのリン酸化部位. *生化学*, **47**, 427 頁 (要旨)
- Huttunen, J. K., D. Steinberg and S. E. Mayer 1970 ATP-dependent and cyclic AMP-dependent activation of rat adipose tissue lipase by protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**: 290-295
- Ishikawa, E., S. Ishikawa, J. W. Davis and E. W. Sutherland 1969 Determination of guanosine 3', 5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. *J. Biol. Chem.*, **244**: 6371-6376
- Iwai, H., M. Inamasu and S. Takeyama 1972 Inhibition of the protein kinase by adenosine compounds: Competitive inhibition with respect to ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 824-830
- Johns, E. W. 1964 Studies on histones. *Biochem. J.*, **92**: 55-92
- Kumon, A., H. Yamamura and Y. Nishizuka 1970 Mode of action of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate on protein kinase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**: 1290-1297
- Kuo, J. F. and P. Greengard 1970 Cyclic nucleotide dependent protein kinase. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3', 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.*, **245**: 2493-2498
- Kuo, J. F., J. R. Sanes and P. Greengard 1970 Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. V. Preparation and properties of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from various bovine tissues. *Fed. Proc.*, **29**: 601-602
- Kuo, J. F., G. R. Wyatt and P. Greengard 1971 Cyclic nucleotide dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **246**: 7159-7167
- Labrie, F., S. Remaire and C. Courte 1971 Adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.*, **246**: 7293-7302
- Lowry, O. H., N. J. Farr and R. J. Randall 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275
- Nishiyama, H., H. Katakami, H. Yamamura, Y. Takai, R. Shimomura and Y. Nishizuka 1975 Functional specificity of guanosine 3': 5'-monophosphate dependent protein kinase from silkworm. *J. Biol. Chem.* **250**: 1297-1300
- Reiman, E. M., D. A. Walsh and E. G. Krebs 1971 Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **246**: 1986-1995
- Robison, D. A., R. W. Butcher and E. W. Sutherland 1968 Cyclic AMP. In "Annual Review of Biochemistry," Vol. 37, ed. by E. E. Snell, Annual Reviews Inc., Palo

- Alto, pp. 149-174
- Soderling, T. R., J. P. Hickenbottom, E. M. Reiman, F. L. Hunkeler, D. A. Walsh and E. G. Krebs 1970 Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by muscle adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **245**: 6317-6328
- Takahashi, S., T. Kageyama, T. Ohoka and E. Ohnishi 1974 Guanosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from silkworm eggs. *Insect Biochem.*, **4**: 429-438
- Walsh, D. A., J. P. Perkins, C. O. Brostrom, E. S. Ho and E. G. Krebs 1971 Catalysis of the phosphorylase kinase activation reaction. *J. Biol. Chem.*, **246**: 1968-1976
- Walsh, D. A., J. P. Perkins and E. G. Krebs 1968 An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **243**: 3763-3765

Summary

A cyclic GMP dependent protein kinase was purified 105-fold from the pupae of *Bombyx mori*, by using calcium acetate precipitation, acid-treatment, ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose chromatography, and Sephadex G-200 gel filtration.

The purified enzyme was able to phosphorylate several proteins, among which histone F_{2b} was the best substrate as far as tested. The kinase was activated only by the 3', 5'-cyclic monophosphate of adenosine and guanosine, but not by their 2', 3'-isomers.

The enzyme exhibited an activity to bind cyclic [³H]GMP. The rate of binding increased in parallel with the increasing amount of the enzyme protein. Both of the phosphorylation activity and the binding activity showed an optimum at pH 6.5~7.5. The binding of cyclic [³H]GMP was inhibited by non-labeled cyclic GMP and cyclic AMP. The inhibition by the former was 100-times as large when compared to that by the latter at their concentrations between 10⁻⁷ and 10⁻⁴M.

The protein-phosphorylation activity was inhibited by derivatives of adenine including its deoxy-compounds. The inhibition by guanine or cytosine derivatives was slight if any. The order of inhibitory capacities of adenine derivatives was ADP>adenosine>adenine>AMP. The inhibition rate did not depend on the concentration of cyclic GMP or cyclic AMP, but it decreased as the amount of ATP was increased.

Double reciprocal plots of the phosphorylation rate against ATP concentration suggest that the adenine derivatives competed with ATP. On the other hand, cyclic [³H]-GMP-binding activity did not change according to the concentration of ADP, suggesting that the cyclic GMP-binding site and the protein-phosphorylation site are separately located in the enzyme protein.