Studies on Myocardial Cyclic Adenosine3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase Ⅰ. Enzyme Properties of Myocardial Cyclic Adenosine3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase in Dog Heart

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7790

金沢大学十全医学会雑誌　第94巻　第3号　437－446（1985）

心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性蛋白リン酸化酵素に関する研究

I．イヌ心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）
東京都養育院付属病院内科
坂　井　　誠

（昭和60年3月29日受付）

動物組織に広く存在する cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate（cyclic AMP）依存性蛋白リン酸化酵素のイヌ心筋における酵素学的性質を検討した．イヌ心筋のホモジェネートを29,000×g で20分遠心し，その上清を硫安分画して酵素標品とした．蛋白リン酸化酵素活性の至適 pH は6～7で，活性には二価の金属イオンを必要とし，マグネシウムが最も有効であった．その km 値は0.7 mM で，cyclic AMP 添加の有無で差を認めなかった．ヒストンのリン酸化に対する cyclic AMP のみかけの km 値は30 nM で 5×10^{-8}M で3倍の酵素活性の上昇がみられたのに対し，cyclic AMP 以外の他のヌクレオシドでは 5×10^{-6}M で cyclic AMP に近い活性を示した．基質であるヒストン，アデノシン三リン酸の km 値はそれぞれ100 μg/ml，20 μM で，cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった．ヒストン以外の基質としてプロタミンを使用した場合には cyclic AMP 依存性活性はヒストンの1/4であった．DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで蛋白リン酸化酵素は溶出塩濃度の違いによりタイプIとタイプIIのアイソザイムに分離することが知られているが，イヌ心筋蛋白リン酸化酵素は0.1～0.2 M の高い塩濃度で溶出し，タイプIIであることが明らかとなった．以上よりイヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の性質は他の動物心のそれと類似し，そのアイソザイムの型はヒト，ウシなどの大動物心と一致した．

Key words　心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素，基質，Michaelis 定数（Km），蛋白リン酸化酵素アイソザイム．

Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate（cyclic AMP）依存性蛋白リン酸化酵素は種々の蛋白をリン酸化する酵素で，cyclic AMP によって著明に活性が上昇する．リン酸化をうけるのは蛋白質のセリンまたはスレオニン残基といわれている．本酵素は生理的濃度の cyclic AMP によって賦活され，広く動物組織に存在することから cyclic AMP によるホルモン効果は大部分本酵素の活性化を通じて発現することが示唆されてきた[1]．そしてその活性化反応は次式の如く，蛋白リン酸化酵素のホロ酵素の subunit の一方の regulatory subunit（R）に cyclic AMP が結合すると，catalytic subunit（C）が遊離するためにおこることが確認されている[2)3)]．

RC＋cyclic AMP ⇄ R·cyclic AMP＋C

心筋組織においても本酵素は cyclic AMP の標的酵素として，種々の動物心に存在することは証明されているが[3)~5)]，イヌ心筋の本酵素についての知見は乏しい．そこで著者はイヌを用いた cyclic AMP を介するホルモンのモデル実験の基礎的検討としてイヌ心筋における本酵素の酵素学的性質を検討した．

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; C, catalytic subunit of protein kinase; cyclic AMP, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate; cyclic CMP, cyclic cytidine 3', 5'-monophosphate; cyclic GMP, cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate; cyclic IMP, cyclic

また蛋白リン酸化酵素にはアイソザイムが存在し，DEAEセルローズカラムクロマトグラフィーで溶出塩濃度の違いによりタイプIとIIのアイソザイムに分離され，種々の性質が異なることが判明している[6]．そこでイヌ心筋の本酵素のアイソザイムパターンについても検討を加えた．

材料および方法

1．イヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の調製

雑種成犬をペントバルビタール麻酔で開胸後，直ちに心臓を摘出し，心房，小血管を除いた心室筋を重量1g当たり5倍の5mMリン酸カリウム，2mM EDTA (pH 7.0) で，4°C下2分間ワーリングブレンダーを用いて粉砕した．29,000×g で20分間遠心して得た上清に15mg/dlの硫酸プロタミンを添加し，10分間攪拌後遠心した．次にその上清に32g/dlの硫酸アンモニウムを加え，30分攪拌後遠心した．沈渣を100倍量の5mMリン酸カリウム，2mM EDTA (pH 7.0)に溶解し，一晩透析を行い，その透析液を酵素標品とした．一部の実験では，この粗酵素標品をさらに5mMリン酸カリウム，2mM EDTA (pH 7.0) で平衡させた2.6×40cmのDEAEセルローズカラムで，0～0.3M塩化ナトリウム直線勾配緩衝液にて溶出し，アイソザイムを分離した．

2．cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性の測定

cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性の測定はKuoら[7]の方法により行った．標準の反応溶液は50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)，5mM酢酸マグネシウム，5mMフッ化ナトリウム，0.1mM EGTA，0.1mMγ-^{32}P-ATP (20,000 cpm/n mol)，2mMテオフィリン，2mg/ml子牛胸線ヒストン，2.5μM cyclic AMPの存在または非存在下に酵素標品を加えて総量200μlとした．30°Cで30分間反応させた後，4mlの5%トリクロール酢酸(TCA)，0.25%タングステン酸ナトリウム (Na_2WO_4) 液 (pH 2.0) を加えて反応をとめた．3000rpm，10分間で遠心した沈渣を1N水酸化ナトリウム (NaOH) 0.1mlで溶解し，再びTCA，Na_2WO_4液を加え，1.2N硫酸0.1mlを加えた，3000rpmで10分間遠心し，この操作をもう一度くりかえしたあと，沈渣を1N NaOH 50μlで溶解し，10mlのシンチレーター溶液(7%トルエン，30%トリトンX－100の混液1l中に4gのPPO，0.1gのPOPOPを含む)を加え，液体シンチレーションカウンター(Packard, Model 3385) にて測定した．活性はpmoles Pi incorporated/μg protein or tube/minで示した．なお反応溶液中に2.5μMないし5μM cyclic AMPを加えた時の活性を総活性とし，cyclic AMPを加えない時の活性との差をcyclic AMP依存性蛋白リン酸化酵素活性と表現した．蛋白量はLowry法[8]により測定した．

cyclic AMP結合能はGilman[9]の方法により測定した．

γ-^{32}p-ATPはAmersham Searle社，子牛胸線ヒストンはSigma社，DEAEセルローズはWhatman社から得た．

成　　績

1．酵素活性測定条件の検討

1）酵素量

酵素量をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定すると(図1)，cyclic AMP添加による蛋白リン酸化酵素総活性は30μgまで，cyclic AMP非添加時の活性は60μgまで活性は直線的に上昇した．従って以下の実験では蛋白リン酸化酵素活性の測定に10～30μgの蛋白量を用いた．

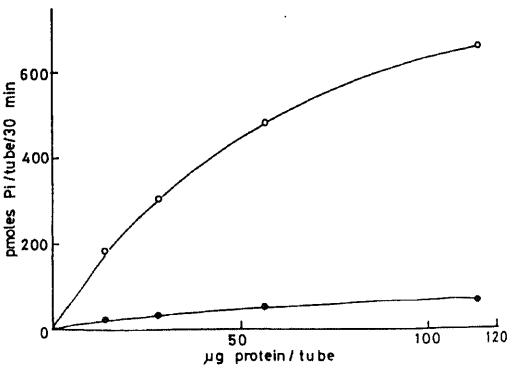


Fig. 1. The effect of enzyme concentration on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in enzyme concentration.

inosine 3', 5'-monophosphate; cyclic UMP, cyclic uridine 3', 5'-monophosphate; dibutyryl cyclic AMP, N^6-2'. 0-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether) -N, N'-tetraacetic acid;

2）反応時間

蛋白リン酸化酵素活性を時間を追って調べた成績を図2に示す．cyclic AMP を加えない場合も，加えた場合もヒストンのリン酸化は 50 分までほぼ直線的に増加することが示された．従って，以後の実験では反応時間は 15 分または 30 分に設定した．

3）至適 pH

蛋白リン酸化酵素活性に対する pH の影響を調べた成績を図3に示す．リン酸緩衝液に比べ酢酸緩衝液の方が高い酵素活性を示した．両緩衝液とも cyclic AMP の存在下で酵素活性は約3倍上昇した．至適 pH は 6～7 であった．

2．基質および effector の濃度と酵素活性

1）ヒストン

基質であるヒストンの濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図4に示す．ヒストン濃度が 0.4 mg/ml までは蛋白リン酸化酵素総活性，cyclic AMP 非添加時活性はともに上昇したが，それ以上の濃度では総活性は減少した．half maximal phosphorylation から計算した km 値は 100 μg/ml で，cyclic AMP の有無で差を認めなかった．また Vmax は cyclic AMP 添加時 11.4 pmoles Pi/μg protein/30 分，非添加時 2.1 pmoles Pi/μg protein/30分であり，cyclic AMP 添加により酵素と基質の親和性は変化せ

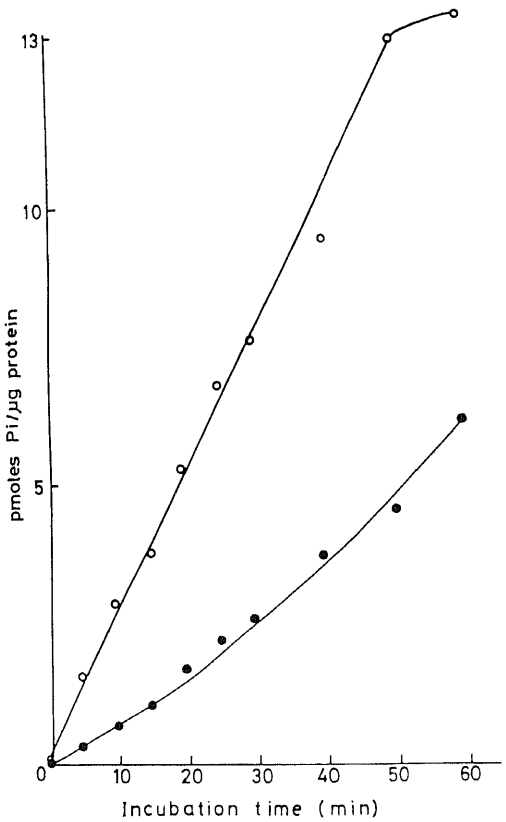


Fig. 2. The effect of incubation time on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in incubation time. The amount of enzyme used was 20 μg.

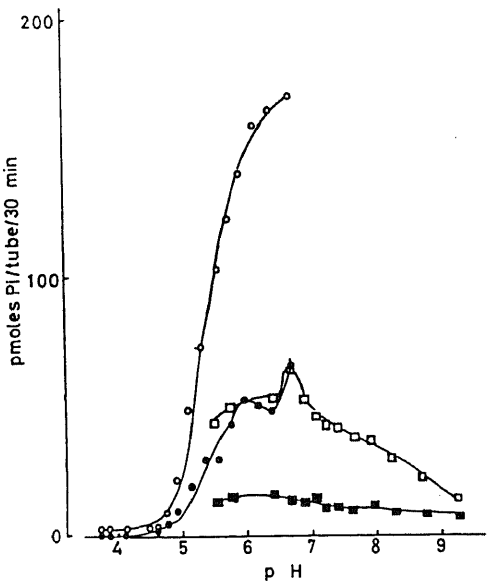


Fig. 3. The effect of pH on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 5 μM cyclic AMP using 50 mM sodium acetate in incubation mixture and in the absence (■—■) or presence (□—□) of 5 μM cyclic AMP using 50 mM potassium phosphate in incubation mixture. Incubation condtions were as described in the text, except for the variation in pH of 50 mM sodium acetate and potassium phosphate. The amount of enzyme used was 15 μg.

Km, Michaelis's constant ; POPOP, 1, 4-bis [2- (4-methyl-5-phenyloxazoyl)] benzene ; PPO, 2, 5-diphenyloxazole ; R, regulatory subunit of protein kinase ; RC, holoenzyme of protein kinase ; Vmax, maximal velocity of enzyme reaction.

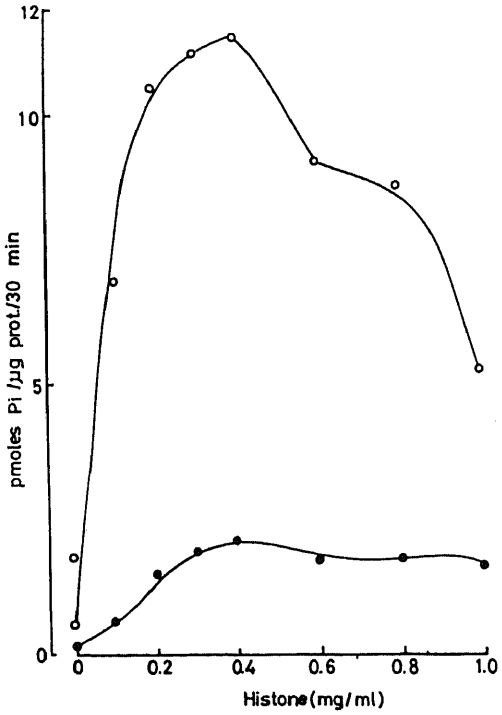
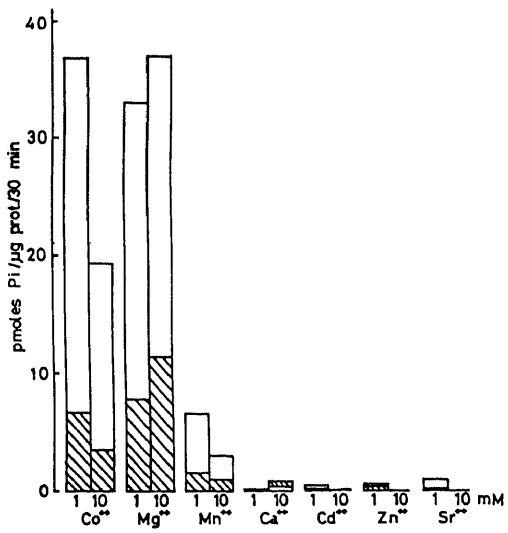


Fig. 4. The effect of histone concentration on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of cyclic AMP as indicated. The amount of enzyme used was 20 μg.



ず，約5倍の Vmax の増大がみられた．

2）アデノシン三リン酸（ATP）

図5は，ATP の濃度をかえて（hot ATP は一定で cold ATP をかえて調整）蛋白リン酸化酵素活性を調べた成績で，ATP の濃度を高めることにより，蛋白リン酸化酵素の総活性，cyclic AMP 非添加時活性とも

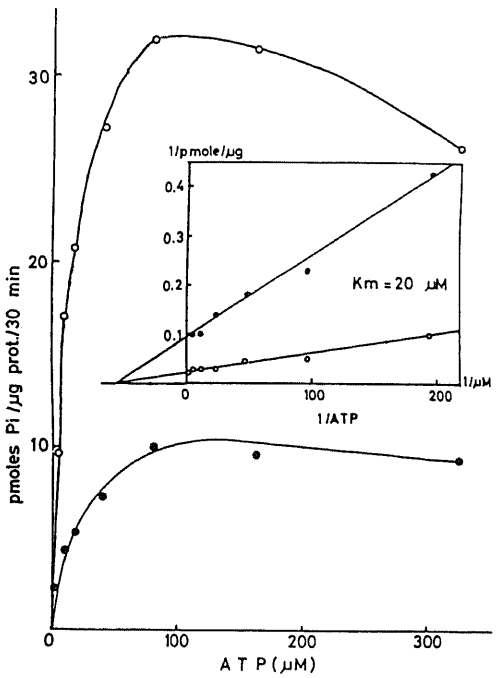


Fig. 5. The effect of ATP concentration on protein kinase activity.
Various ATP concentrations were prepared by the addition of cold ATP. Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of ATP as indicated. Km value for ATP was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was 18 μg.

Fig. 6. The effect of various divalent cations on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (crosshatched bars) or presence (plain bars) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for 1 and 10 mM concentration of various divalent cations as indicated. The amount of enzyme used was 15 μg.

に増加を示し，約 100 μM でプラトーに達した．double reciprocal plot によるとその km 値は 20 μM で，cyclic AMP の有無で差を認めなかった．Vmax は cyclic AMP 添加時 32 pmoles Pi/μg protein/30分，非添加時 10 pmoles Pi/μg protein/30 分と cyclic AMP 添加により約 3 倍の増大がみられた．

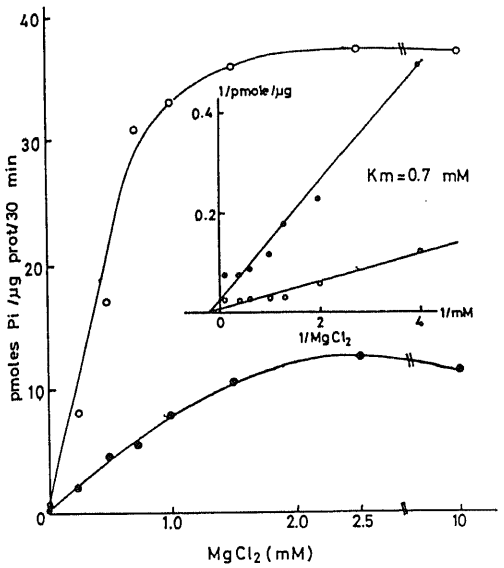


Fig. 7. The effect of magnesium concentration on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of magnesium as indicated. Km value for magnesium was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was 22 μg.

3）マグネシウム

蛋白リン酸化酵素はその活性に二価の陽イオンを必要とする．図 6 に示すように 1×10^{-2}M ではマグネシウムで活性が最も高く，コバルトでは 1×10^{-3}M で最も有効であった．マグネシウムの濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 7 に示す．マグネシウムに対する km 値は 0.7 mM で，cyclic AMP の有無でほとんど差を認めなかった．

4）cyclic AMP

cyclic AMP の濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 8 に示す．cyclic AMP による蛋

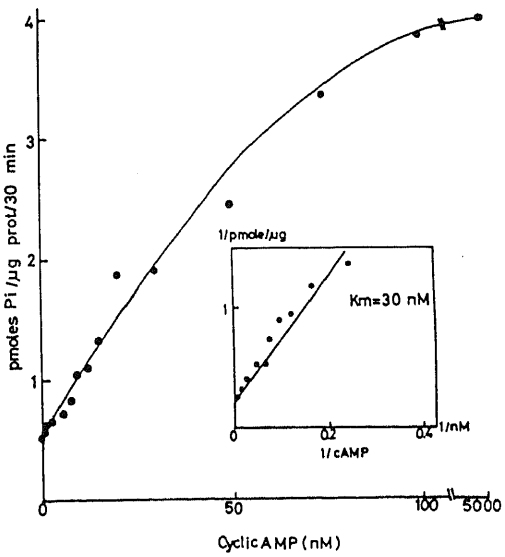


Fig. 8. The effect of cyclic AMP concentration on protein kinase activity.
Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of cyclic AMP as indicated. Km value for cyclic AMP was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was 15 μg.

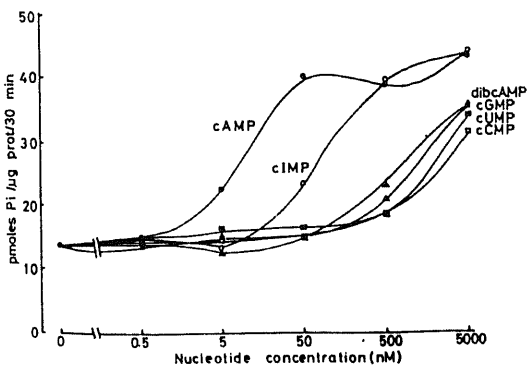


Fig. 9. The effect of various cyclic nucleotide concentration on protein kinase activity.
Incubation conditions as described in the text, except for the variation in the amount of various cyclic nucleotides as follows; ●—●, cyclic AMP (cAMP); ○—○, cyclic IMP (cIMP); △—△, dibutyryl cyclic AMP (dibcAMP); ▲—▲, cyclic GMP (cGMP); ■—■, cyclic UMP (cUMP); □—□, cyclic CMP (cCMP). The amount of enzyme used was 20 μg.

白リン酸化酵素活性の上昇は 5×10^{-8}M でみられ，5×10^{-6}M で約 8 倍の活性上昇を示した．double reciprocal plot によるとみかけの km 値は 30 nM であった．

5）cyclic AMP 以外のヌクレオシド

各種ヌクレオシドの蛋白リン酸化酵素活性に与える影響を cyclic AMP の効果と比較した（図 9）．cyclic AMP は 5×10^{-8}M で蛋白リン酸化酵素活性を 3 倍に上昇させ，最大効果を示した．次いで cyclic AMP が有効で，dibutyryl cyclic AMP, cyclic GMP, cyclic UMP, cyclic CMP では酵素活性の賦活に 5×10^{-6}M という高濃度を要し，あまり効果がなかった．

6）基質特異性

ヒストン以外に基質となるプロタミン，カゼイン，アルブミンを用いて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 10 に示す．ヒストンでは cyclic AMP の添加

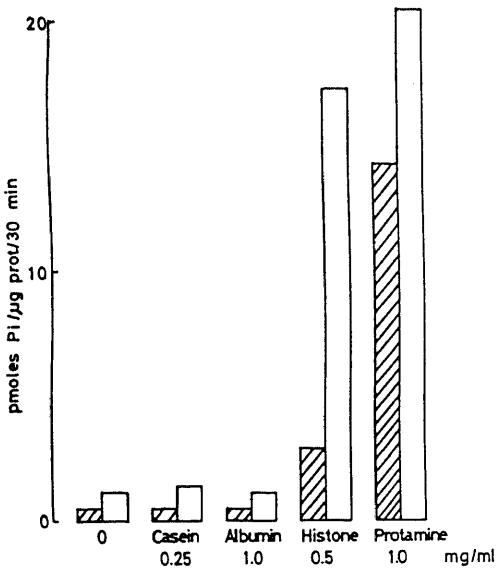


Fig. 10. The effect of various substrates on protein kinase activity.
Protein kinase activity was measured in the absence (crosshatched bars) or presence (plain bars) of 2.5 μM cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the concentration of substrates as indicated. The amount of enzyme used was 18 μg.

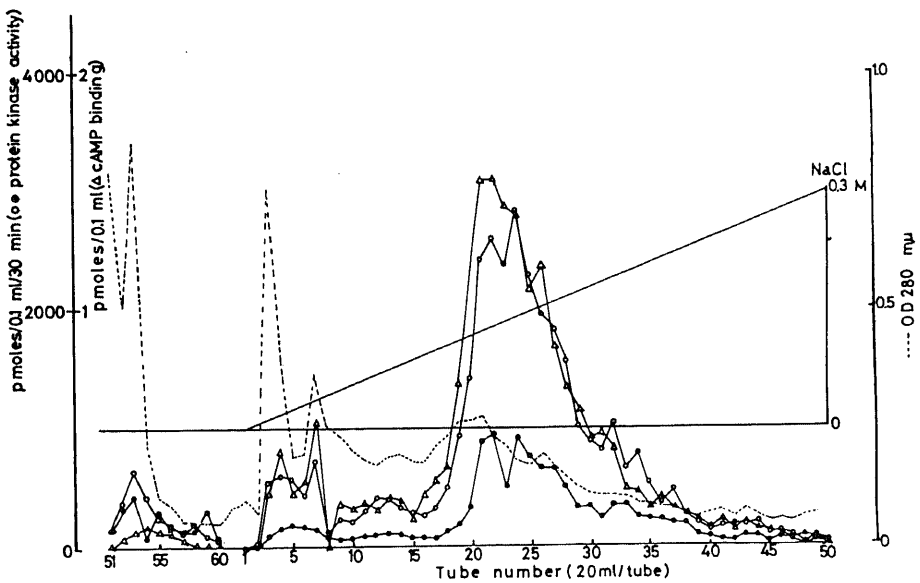


Fig. 11. DEAE-cellulose column chromatography of the dog heart protein kinase.
DEAE-cellulose column (2.6×40 cm) was previously equilibrated with 5 mM potassium phosphate (pH 7.0) containing 2 mM EDTA and 500 mg of partially purified protein kinase preparations were applied. After washing the column with 200 ml of the same buffer, protein kinase activity was eluted with a linear gradient of 0 to 0.3 M NaCl at a flow rate of 30 ml per hour in 20 ml fractions. After dialysis against the buffer, protein kinase activity of each fraction was assayed in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μM cyclic AMP and cyclic AMP binding (△—△) was measured by the method of Gilman[9]. Protein concentration (···) was monitered by absorbance of optical density at 280 mμ.

により6倍の活性増加が認められたが，プロタミンでは1.5倍と cyclic AMP による活性増加に差を認めた．酵素標品のみの対照と比べて，カゼイン，アルブミンを基質として加えてもほとんどリン酸化の増加はなく，カゼイン，アルブミンはリン酸化をうけなかったものと考えられた．

3．蛋白リン酸化酵素のアイソザイムパターン

酵素標品のアイソザイムパターンを知るために行った DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを図11に示す．イヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素はほとんど0.1～0.2Mの高い塩濃度の部分に溶出しており，そのアイソザイムは Corbin ら[6]のいうタイプIIであった．蛋白リン酸化酵素は cyclic AMP によって約3倍の活性上昇を示し，そのピークは cyclic AMP 結合能と一致した．なお DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーで分離したタイプIIアイソザイムの酵素学的性質は粗酵素標品のそれと同一であった．

考　　察

cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素は，Walsh ら[10]によりウサギ骨格筋に見い出されて以来，cyclic AMP の標的酵素として広く動物組織に存在することが証明されてきた．そして，cyclic AMP の多彩な作用がこの酵素の活性化を通じて行われる反面，この酵素自体には臓器特異性，種特異性が乏しいことが知られている．表1に示す如く，著者らが測定したラットおよびヒトの心筋蛋白リン酸化酵素とイヌ心筋蛋白リン酸化酵素の酵素学的な性質には高い類似性が認められた[11][12]．また cyclic AMP に対するみかけの km 値は $0.7\sim3.0\times10^{-8}$M で cyclic AMP の平均組織内濃度である 1×10^{-6}M[13]に比し1/100低い値であった．従って細胞内に均等に cyclic AMP が分布するとすると，心筋蛋白リン酸化酵素は cyclic AMP により飽和され，cyclic AMP による調節がおこりにくいと考えられる．しかし実際には cyclic AMP と蛋白リン酸化酵素の細胞内の分布は局在しており，cyclic AMP による調節がなされていると考えられる[14]．ATP，マグネシウム，ヒストンに対する km 値は cyclic AMP の有無で差を認めなかった．このことは cyclic AMP 依存性および cyclic AMP 非添加時の蛋白リン酸化酵素の構造および機能は変らないことが示唆される．また DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーの溶出パターン（図11）にみられるごとく，両活性は同じ位置に溶出している．従って cyclic AMP 非添加時の活性化は RC → R＋C の解離が反応液中のヒストンにより生ずるためと考えられる．

Kuo ら[15]はヒストン以外にプロタミン，カゼインなどを基質に用いて種々の臓器から抽出した蛋白リン酸化酵素によるリン酸化を調べた．それによると RC の解離の程度はヒストン＞プロタミン＞カゼインの順であり，cyclic AMP による反応の促進はヒストンでは10倍，プロタミンでは1～4倍であるのに対して，カゼイン基質では認められなかったとしている．本実験でイヌ心筋蛋白リン酸化酵素においても同様の結果が得られた．Kuo ら[15]はカゼインでも濃度をあげると cyclic AMP 添加によるリン酸の促進がみられたとしているので，イヌ心筋の蛋白リン酸化酵素についても同様のことがおこる可能性はある．また基質によって cyclic AMP 添加による活性増加に差があるのは基質自体が RC → R＋C の解離に作用し，かつその程度が異なるためにと思われる．

一方，cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素にはアイソザイムが存在し，DEAE セルローズカラムクロマ

Table 1. Comparison on enzyme properties of myocardial protein kinase in rat, dog and human

Effector and substrate		Km value		
		Rat[11]	Dog	Human[12]
cAMP		0.7	3.0	2.0 ($\times10^{-8}$M)
ATP	+cAMP	1.9	2.0	4.0 ($\times10^{-5}$M)
	−cAMP	1.5	2.0	4.0 ($\times10^{-5}$M)
Magnesium	+cAMP	0.87	0.7	2.0 ($\times10^{-3}$M)
	−cAMP	0.82	0.7	2.0 ($\times10^{-3}$M)
Histone	+cAMP	200	100	110 (μg/ml)
	−cAMP	300	100	500 (μg/ml)

Km values for ATP, magnesium and histone were measured in the subsence (−cAMP) or presence (+cAMP) of 2.5 or 5 μM cyclic AMP (cAMP).

トグラフィーで低イオン強度で溶出するタイプIと強イオン強度で溶出するタイプIIに分離され，種々の性質が異なることが判明している[6]．またアイソザイムの分布は動物種差，組織における差が知られており，動物心においてはマウス，ラットのアイソザイム分布はIが優位で，ネコ，ウサギ，イヌ，ブタ，ウシ，ヒトではIIが優位である[6)16)]．Corbin ら[6)]は心筋蛋白リン酸化酵素アイソザイムのI，IIの性質の差異につき，I，IIは分子量は等しく，ヒストンによる subunit への解離（RC → R+C）はIで速く，IIで緩徐であるが，エピネフリンによる蛋白リン酸化酵素の活性化反応はアイソザイムにより差はないと述べている．

また骨格筋において筋収縮速度の速い白筋ではIが多く，筋収縮速度の遅い赤筋ではIIが多いことが知られている[17)18)]．この赤筋，白筋の生理的特性と蛋白リン酸化酵素アイソザイムの機能的意義を関連づけてみると興味深い．すなわちIが優位であるラット，マウスなどの小動物では心拍数も多く，心筋収縮速度が速く，ミオシン ATPase 活性は高く，ミオシン ATPase の特性も白筋的である．大動物になるにつれ，心拍数および心筋収縮速度は遅くなり，ミオシン ATPase 活性も低くなり，ミオシン ATPase 特性も赤筋型になる．このように心筋の蛋白リン酸化酵素アイソザイムの生理的機能も赤筋，白筋的機能と何らか関連したものと推量され，またアイソザイムIが基質により RC → R+C がおこりやすいとすれば，cyclic AMP による調節はIの多い白筋ではIIの多い赤筋に比して相対的に弱いことが推定される．

以上のようにイヌ心筋蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質ならびにアイソザイム分布は大動物心，特にヒト心筋と類似し，cyclic AMP を介するホルモンのモデル実験としてイヌを用いることは適切と考えられた．

結　　論

イヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質を検討した．

1．蛋白リン酸化酵素活性に対するリン酸カリウムおよび酢酸ナトリウム緩衝液の至適 pH は 6～7 であった．活性には二価の金属イオンを必要とし，1×10^{-2}M ではマグネシウム，コバルト，マンガンの順に有効であった．マグネシウムに対する km 値は 0.7 mM で，cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった．

2．ヒストンのリン酸化に対する cyclic AMP のみかけの km 値は 30 nM で，5×10^{-8}M で 3 倍の酵素活性の上昇がみられたのに対し，cyclic AMP 以外の他のヌクレオシドは 5×10^{-6}M で cyclic AMP に近い活性を示した．

3．基質であるヒストン，ATP の km 値はそれぞれ 100 μg/ml，20 μM で，cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった．ヒストン以外の基質としてプロタミンを使用した場合には cyclic AMP 添加時の活性上昇はヒストンの 1/4 であり，カゼイン，アルブミンではほとんど基質としてのリン酸化を認めなかった．

4．DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーによるアイソザイムの分離においてイヌ心筋蛋白リン酸化酵素は高い塩濃度で溶出し，アイソザイムタイプIIを示した．

謝　　辞

稿を終わるに臨み，本研究の直接の御指導，御教示を賜わりました養育院付属病院松下　哲循環器科長に深く謝意を表します．また御校閲を賜わりました竹田亮祐教授，種々の御支援，御教示を賜わりました養育院付属病院村上元孝名誉院長，蔵本　築副院長，福井循環器病院三船順一郎副院長に深く御礼申し上げます．

文　　献

1) **Kuo, J. F. & Greengard, P.**: Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. IV. Wide spread occurrence of cyclic AMP-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **64**, 1349-1355 (1969).

2) **Brostrom, C. O., Corbin, J. D., King, G. A. & Krebs, E. G.**: Interaction of the subunits of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase of muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **68**, 2444-2447 (1971).

3) **Rubin, C. S., Erlichman, J. & Rosen, O. M.**: Molecular forms and subunit composition of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase purified from bovine heart muscle. J. Biol. Chem., **247**, 36-42 (1972).

4) **Brostrom, M. A., Reiman, E. M., Walsh, D. A. & Krebs, E. G.**: A cyclic 3', 5'-AMP stimulated protein kinase from cardiac muscle. Adv. Enzyme Regul., 8, 191-203 (1970).

5) **Corbin, J. D., Keely, S. L. & Park, C. R.**: The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in adipose, cardiac and other tissues. J. Biol. Chem., **250**, 218-225 (1975).

6) **Corbin, J. D. & Keely, S. L.**: Characterization and regulation of heart adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase isozyme.

J. Biol. Chem., **252**, 910-918 (1977).

7) **Kuo, J. F., & Greengard, P.**: An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **244**, 3417-3419 (1969).

8) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

9) **Gilman, A. G.**: A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **67**, 305-312 (1970).

10) **Walsh, D. A., Perins, J. P. & Krebs, E. G.**: An adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem., **243**, 3763-3774 (1968).

11) **Matsushita, S., Sakai, M., Kuramoto, K. & Murakami, M.**: Studies on protein kinase of the rat heart (abstract). Jpn. Circ. J., **38**, 587 (1974).

12) **Matsushita, S., Sakai, M., Kaku, T., Nakano, T., Kuramoto, K. & Murakami, M.**: An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from human heart, p 273-278, *In* T. Kobayashi, T. Sano & N. S. Dhalla (ed.), Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, University Park Press, Baltimore, 1978.

13) **Exton. J. H., Lewis, S. B., Ho, R. J., Robinson, G. A. & Park, C. R.**: The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon and insulin in the control of liver metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci., **185**, 85-100 (1971).

14) **Corbin, J. D., Sugden, P. H., Loncoln, T. M. & Keely, S. L.**: Compartmentalization of adenosine 3', 5'-monophosphate and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. J. Biol. Chem., **252**, 3854-3861 (1977).

15) **Kuo, J. F., Krueger, B. K., Sanes, J. R. & Greengard, P.**: Cyclic nucleotide dependent protein kinase V. Preparation and properties of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from various bovine tissues. Biochim. Biophys. Acta., **212**, 79-91 (1970).

16) **松下　哲・品川達夫・賀来　俊・坂井　誠・萬木信人・蔵本　築・村上元孝**: 各種動物心におけるサイクリック AMP 依存性蛋白燐酸化酵素アイソザイムの研究. 代謝異常治療研究基金研究業績集, **6**, 40-48 (1979).

17) **Buchell, A., Cohen, P. T. W. & Cohen, P.**: Distribution of isoenzymes of the glycogenolytic cascade in different types of muscle fibre. FEBS Letters, **67**, 17-22 (1976).

18) **Sreter, F. A., Seidel, J. C. & Gergely, J.**: Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. J. Biol. Chem., **241**, 5772-5780 (1966).

Studies on Myocardial Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase I. Enzyme Properties of Myocardial Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase in Dog Heart

Makoto Sakai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo – J. Juzen Med. Soc., **94**, 437–446 (1985).

Key words: myocardial cyclic AMP dependent protein kinase, substrate, Michaelis's constant (Km), protein kinase isozyme.

Abstract

The present study was pursued to examine the enzyme properties of myocardial cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) dependent protein kinase in the dog heart. The protein kinase was assayed on the partially purified preparations (dialyzed ammonium sulfate fractions) of the 29,000×g supernatant of the myocardial homogenate. The optimum pH to the protein kinase activity was between 6 and 7. The divalent cation was required for the protein

kinase activity and magnesium was most effective for the protein kinase activity. The Km value for magnesium was 0.7 mM with or without cyclic AMP. The protein kinase was activated threefold by 5×10^{-8} M cyclic AMP and the apparent Km Value for cyclic AMP was 30 nM. Other cyclic nucleotides showed a similar effect at least at 5×10^{-6}M.The Km Value for adenosine triphospate was 20 μM with or without cyclic AMP. Histone was more phosphorylated than protamine. When DEAE cellulose column chromatography was performed with a linear gradient of 0 to 0.3M NaCl, the main peak of the protein kinase was eluted between 0.1 and 0.2M, which is referred to as type II isozyme. These results delineate that the cyclic AMP dependent protein kinase in the dog heart showed similar properties to those of various mammalian tissues.