

Title	心筋より心筋細胞の成長促進因子及び拍動不整改善因子の分離精製
Author(s)	赤井, 邦久
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32774
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【2】

氏名・(本籍)	赤 井 邦 久
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 2 4 9 号
学位授与の日付	昭和 56 年 3 月 25 日
学位授与の要件	薬学研究科 応用薬学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	心筋より心筋細胞の成長促進因子及び拍動不整改善因子の 分離精製
論文審査委員	(主査) 教授 青 沼 繁 (副査) 教授 鎌 田 皎 教授 岩田平太郎 教授 三浦 喜温

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

1912年 Burrows はニワトリ胚心臓片を培養した際、移殖組織より遊出してくる細胞中に自動拍動を示すものの存在を見出した。それ以後細胞培養法の開発改善に伴い、トリプシン等の蛋白分解酵素で心筋を処理して得た個々の細胞を適当な条件下で培養すると、細胞の成長、分化、拍動、薬物に対する感受性等生体における心臓と同様の機能を示すことが明らかにされつつあり、培養心筋細胞系は生体における心臓の示す正常あるいは異常な諸性質の解析に広く用いられている。また近年、培養細胞の機能が種々のホルモン及び液性因子の影響を受け、生体におけるこれらの物質の作用を反映していることが明らかにされている。そこで培養心筋細胞系を用い心臓機能を制御する物質を検索し、心筋細胞自身が活性物質を放出していることを認め、活性本体の分離精製を行なった。

本 論

第一章 ラット心筋培養液の心筋細胞機能への影響

ラット心筋を細片とした後 Eagle MEM を加え 37° において 5% CO₂-95% air 中で 4 日間培養し培養液を得た。Table I に示すようにラット心筋培養液は心筋細胞の成長の指標である spreading 及び beating 機能を促進するとともに拍動不整改善作用を示した。また培養日数を長くすると活性の上昇と平行して培養液中の蛋白含量が増加し、活性物質が培養液中に遊離されることが示唆された。

第二章 心筋細胞成長促進因子の精製

ニワトリ胚心筋細胞より放出される成長促進因子は高分子蛋白質であることが報告されていること

Table I. Effects of Culture Filtrates on Spreading, Beating and Arrhythmic Movement of Myocardial Cells in Culture

Filtrate ^{a)}	Spreading		Beating		Effect on arrhythmic movement induced by 3.0 mM calcium
	Spreading %	Well-spreading %	Relative beating %	Relative beating rate	
Solvent	17.0 ± 0.4	16.1 ± 1.4	29.9 ± 2.5	13.4 ± 3.5	
Neonatal	28.8 ± 3.7 ^{b)}	50.3 ± 3.7 ^{b)}	147.7 ± 6.6 ^{c)}	58.0 ± 7.4	Improvement ^{d)}
Adult	42.8 ± 9.2 ^{b)}	69.0 ± 4.6 ^{c)}	43.6 ± 4.7 ^{b)}	43.7 ± 5.9 ^{b)}	Improvement ^{d)}

Each value represents mean ± s.e. (n = 5).

a) Added 1 ml for neonatal and 0.3 ml for adult into each dish

b) $p < 0.05$: significantly different from solvent value

c) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

d) The arrhythmia was incompletely suppressed.

Table II. Effects of Heart Extracts on Spreading and Beating of Rat Myocardial Cells in Culture

Sample ^{a)}	Spreading		Beating	
	Spreading %	Well-spreading %	Relative beating %	Relative beating rate
Solvent	16.5 ± 1.6	19.8 ± 2.7	32.1 ± 11.0	19.6 ± 6.2
Rat	38.4 ± 2.3 ^{b)}	51.5 ± 10.5 ^{c)}	100.3 ± 21.4 ^{c)}	39.3 ± 4.9 ^{c)}
Bovine	28.2 ± 0.8 ^{b)}	67.3 ± 5.0 ^{b)}	82.6 ± 15.7 ^{c)}	75.7 ± 1.2 ^{b)}
Rabbit	24.3 ± 0.6 ^{c)}	40.6 ± 1.7 ^{b)}	75.4 ± 10.7 ^{c)}	56.2 ± 9.7 ^{c)}

Each value represents mean ± s.e. (n = 5).

a) Extract : precipitate salted out with 30-50 % saturated ammonium sulfate, added 0.55 mg for spreading and 11 mg for beating into each dish

b) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

c) $p < 0.05$: significantly different from solvent value

より、高分子分画を得る目的でラット、牛、家兎心筋より抽出を行なった。すなわち心筋を細片とした後、アセトンで乾燥し pH 8.0 の水で抽出を行った。抽出液につき硫酸分画を行ったところ Table II に示すように 30-50% 沈澱に培養液と同様 spreading 及び beating 機能促進活性を認めた。そこで牛心筋からのものについて精製を進めた。硫酸沈澱を DEAE セルロース、Sephadex G-100、CM セルロースにより順次分画し、活性分画として bovine ventricle protein (BVP) を得た。BVP は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において一本のバンドを与え、Sephadex G-100 によるゲル濾過法により分子量は 100000 と決定した。蛋白含量は 99.8% で糖は含まず、アミノ酸分析により 18 種のアミノ酸を含むことを認めた。また carrier ampholyte を用いた電気泳動的等電点分画により BVP は pH 6.4 に単一のピークを与え、単一性を確認すると同時にその等電点は pH 6.4 であることを認め (Table III)、また BVP はジスルフィド結合の開裂により分子量 70000 と 31000 の 2 成分に分かれ、この際活性が消失することを認めた。Table IV、V に示すように BVP は 10 μ g/ml の濃度で培養心筋細胞の spreading, beating を促進したが、血清存在下での beating には作用しなかった。さらに BVP が長期培養における心筋細胞の成長を明らかに促進することを確認するとともに (Fig. 1)、Fig. 2 に示すように虚血状態におけるラット摘出心臓の拍動性を正常に維持し、心筋細胞壊死に対しても有効であることを認め、またこのものの spreading 促進作用が細胞のもつ蛋白分解能阻害によるものではないことを明らかにした。さらに心筋細胞の拍動不整に対して BVP は改善作用を示さない

ことを認めた。

Table III. Physicochemical Properties of BVP

Molecular weight	100000 (gel filtration method using Sephadex G-100)			
Protein content	99.8 % (Lowry-Folin method)			
Amino acid composition	Asp(8.0) ^{a)}	Thr(9.1)	Ser(13.8)	Glu(13.2)
	Pro(4.2)	Gly(7.5)	Ala(4.2)	Cys/2(1.9)
	Val(12.2)	Met(0.7)	Ile(2.2)	Leu(7.2)
	Tyr(3.9)	Phe(2.1)	Lys(3.6)	His(1.4)
	Arg(2.7)	Trp(2.0)		
Carbohydrate content	negligible (phenol-H ₂ SO ₄ method)			
Isoelectric point	pH 6.4			

a) Molar ratio (%) of standard amino acid by hydrolysis with 6 N HCl at 110° for 24 hr and by ultraviolet absorption method for Trp

Table IV. Effect of BVP on Spreading of Myocardial Cells in Culture

Sample	Final concentration (µg/ml)	Spreading %	Well-spreading %
Solvent	0	18.0 ± 1.1	15.1 ± 0.7
BVP	1	22.0 ± 0.7 ^{a)}	17.8 ± 1.2
BVP	10	23.7 ± 0.8 ^{a)}	27.0 ± 0.8 ^{a)}

Each value represents mean ± s.e. (n = 3).

a) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

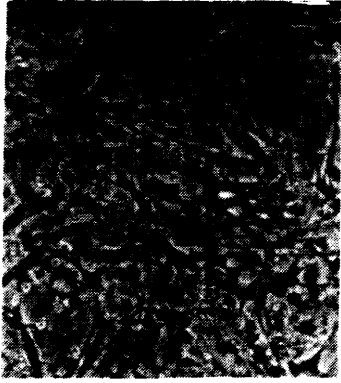
Table V. Effect of BVP on Beating of Myocardial Cells in Culture

Culture	Sample	Final concentration (µg/ml)	Relative beating %	Relative beating rate
Serum-free culture	Solvent	0	43.6 ± 5.0	23.0 ± 0.9
	BVP	1	70.4 ± 11.4	26.7 ± 2.2
	BVP	10	77.6 ± 4.0 ^{a)}	40.3 ± 4.6 ^{b)}
Culture with serum	Solvent	0	101.0 ± 3.4	100.3 ± 3.4
	BVP	10	117.6 ± 6.8	108.6 ± 4.6

Each value represents mean ± s.e. (n = 3).

a) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

b) $p < 0.05$: significantly different from solvent value



(a)



(b)

Fig. 1. Typical Morphologies of Myocardial Cells in 10 days Culture.

a) with 1% serum ; b) With 1% serum and BVP($10\mu\text{g}/\text{ml}$)

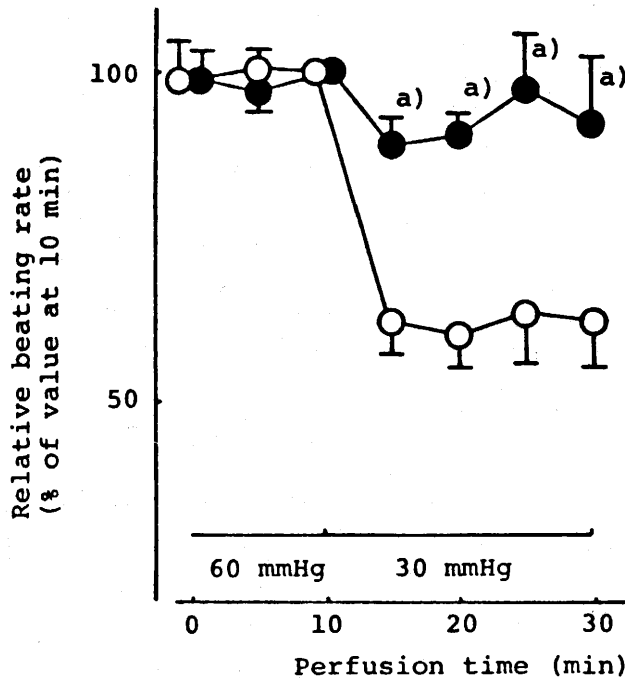


Fig. 2. Effect of BVP on Beating of Ischemic Perfused Rat Heart.

○ — After perfusion 10 min at 60mmHg, the hearts were perfused at 30mmHg.

● — After perfusion for 10 min at 60mmHg, the hearts were perfused with BVP ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) at 30mmHg.

Each point represents mean \pm s. e. (n = 4).

a) $p < 0.05$: significantly different from group without BVP.

第三章 拍動不整改善因子の精製

心筋培養液の高分子分画には拍動不整改善作用が見られないので、牛心筋より低分子分画を得る目的で熱水抽出を行い、培養液の低カリウム濃度により生じる拍動不整改善作用を指標に精製を行った。すなわち牛心筋をホモジナイズ後 pH 4.5 に調整し、100°, 20 分間加熱抽出を行い、抽出液を、Sephadex G-25, Dowex 50 W, Sephadex G-10 によるカラムクロマトグラフィーにより分画し、最後にペプチドマップ法により精製を行い antiarrhythmic peptide (AAP) を得た。AAP はダンシル化後のポリアミドシートによる 2 次元クロマトグラフィーにより単一であり、Fig. 3 に示すように Sephadex G-15 を用いたゲル濾過法により分子量は 450 であると決定した。AAP はニンヒドリン反応陽性で糖及び核酸を含まず、ダンシル-Edman 法、カルボキシペプチダーゼ法及びアミノ酸分析によりその一次構造は Fig. 4 に示すように Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly であると決定した。

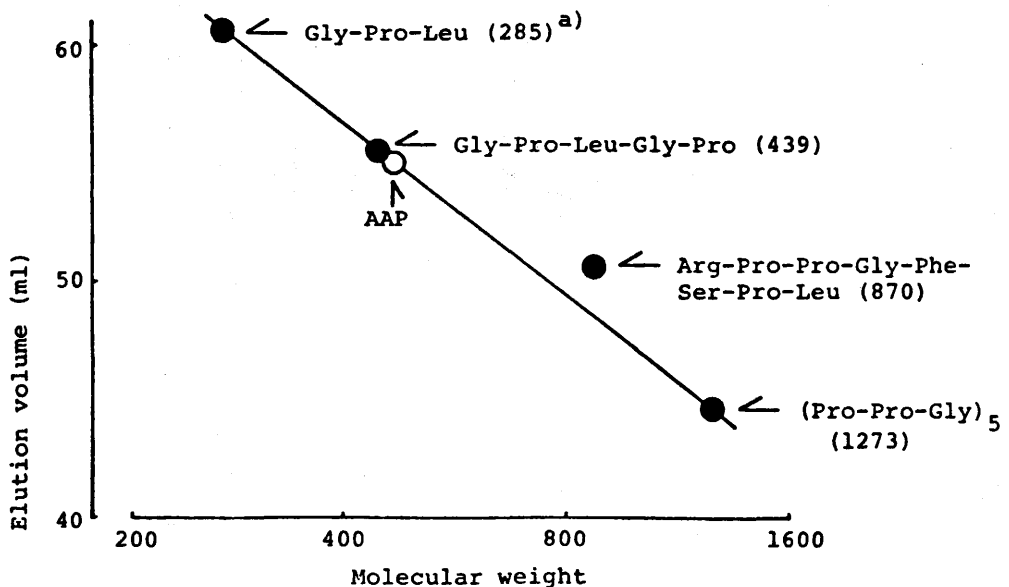


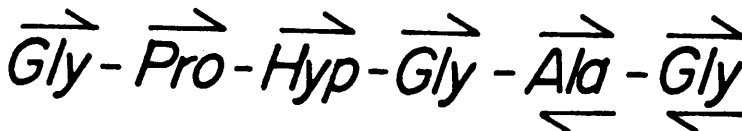
Fig. 3. Molecular Weight Determination of AAP on Sephadex G-15 Column

Column : 0.9×156 cm

Buffer : 0.2M sodium citrate buffer (pH 4.25)

Flow rate: 20ml/hr for buffer and 10ml/hr for ninhydrin

a) The molecular weight was given in parentheses.



→ Dansyl-Edman degradation

← Carboxypeptidase Y digestion

Fig. 4. Amino Acid Sequence of AAP

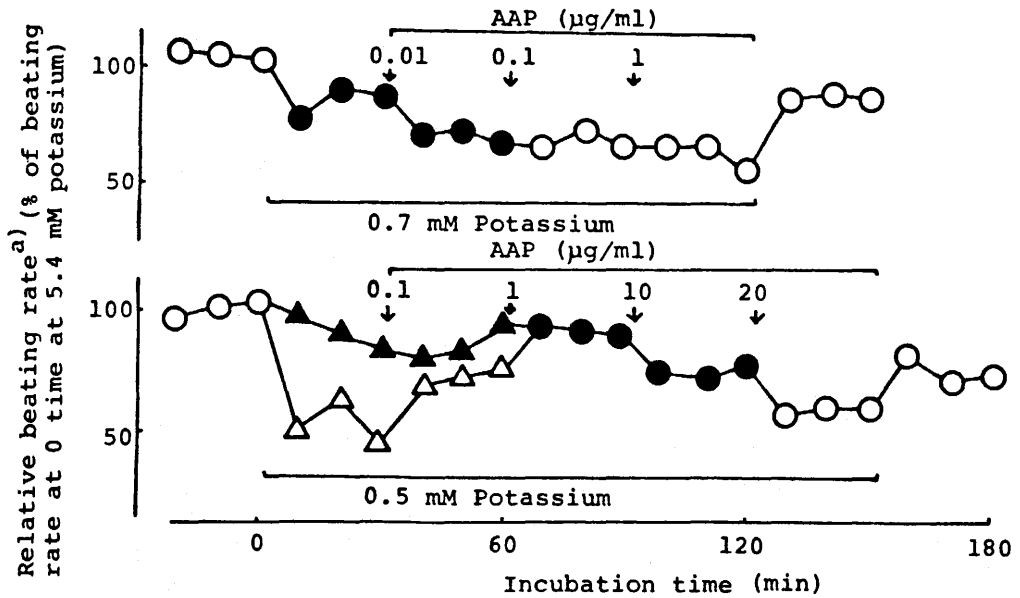


Fig. 5. Effect of AAP on Arrhythmic Movements of Myocardial Cells Induced by Low Potassium

(○) rhythmic beating, (●) rhythmic beating with continuous cellular fibrillation, (▲, △) irregular beating with continuous cellular fibrillation; (▲) strong and weak beating counted, (△) only strong beating counted.

a) The mean of 3 dishes (6 regions of cell clusters)

AAPはFig. 5に示すように低カリウム濃度で生じる心筋細胞の拍動不整に対して改善作用を示し、高カルシウムあるいはウアイン添加による拍動不整、さらに組織レベルでの拍動不整に対しても有効であることを認めた。AAPはこれまで知られている抗不整脈活性を有するペプチドとは化学的に異なっており、その構成アミノ酸としてHypが含まれているが生体内においてHypを含む物質であるコラーゲンとも異なることを認めた。またAAPはbeating機能を抑制し(Table VI)、キニジンと同様拍動性の抑制が拍動不整改善作用の一因となっていることが示唆された。さらにAAPはspreadingを促進し長期培養においてもBVPよりは弱い成長促進作用を示した。

Table VI. Effect of AAP on Beating of Myocardial Cells in Culture

Sample	Final concentration (µg/ml)	Relative beating %		Relative beating rate Culture with serum
		Serum-free culture	Culture with serum	
Solvent	0	43.1 ± 2.2	100.0 ± 2.1	98.8 ± 1.6
AAP	0.01	38.5 ± 2.9	103.5 ± 8.0	
AAP	0.1	38.0 ± 3.6	74.3 ± 9.4 ^{a)}	87.3 ± 3.0 ^{a)}
AAP	1	33.2 ± 2.6 ^{a)}	64.3 ± 6.7 ^{b)}	77.8 ± 4.6 ^{b)}

Each value represents mean ± s.e. (n = 5).

a) p < 0.05 : significantly different from solvent value

b) p < 0.01 : significantly different from solvent value

第四章 BVP及びAAPの作用機作に関する検討

BVP及びAAPは心筋細胞の蛋白合成を有意に促進し (Table VI), これらの物質の成長促進作用の機作の一つとして蛋白合成の促進が挙げられ, 心筋細胞の成長は他の細胞の場合と同様, 複数の因子により維持されていることが示唆された。また Table VIIに示すように心筋細胞内へのカルシウムの取り込みに対してBVPは作用しなかったが, AAPは拍動不整改善作用を示す濃度で明らかにカルシウムの取り込みを抑制し, これによって細胞内イオン濃度の異常が是正され拍動不整改善作用が起るものと考えられる。

Table VI. Effects of BVP and AAP on Macromolecular Synthesis of Myocardial Cells in Culture

Sample	Final concentration (M)	Incorporation of ^3H -compound into cells (cpm/ 10^5 cells)					
		Protein precursor	Protein	RNA precursor	RNA	DNA precursor	DNA
Solvent	0	260 ± 24	137 ± 22	9630 ± 376	4563 ± 591	697 ± 58	1215 ± 172
BVP	10^{-7}	270 ± 37	281 ± 9 ^{a)}	10564 ± 268	4050 ± 514	842 ± 116	1572 ± 268
AAP	10^{-7}	307 ± 29	345 ± 61 ^{a)}	8815 ± 923	3252 ± 438	1251 ± 213 ^{b)}	1388 ± 304

Cells (10^5 cells/dish) were incubated for 48 hr with ^3H -leucine (1 μCi), ^3H -uridine (1 μCi) or ^3H -thymidine (1 μCi). Each value represents mean ± s.e. (n = 5).

a) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

b) $p < 0.05$: significantly different from solvent value

Table VII. Effects of BVP and AAP on Incorporation of ^{45}Ca in Myocardial Cells in Culture

Sample	Final concentration (M)	Incorporation of ^{45}Ca (cpm/mg protein, mean ± s.e., n = 5)
Solvent	0	1462 ± 262
BVP	10^{-7}	1222 ± 323
AAP	10^{-7}	613 ± 323 ^{a)}

a) $p < 0.01$: significantly different from solvent value

結 論

- 1) 心筋細胞に直接作用しその機能を調節する物質として心筋より成長, 拍動性を促進する bovine ventricle protein (BVP) 及び拍動不整を改善する antiarrhythmic peptide (AAP) の 2 種の新規物質を単離することに成功した。
- 2) BVP は分子量 100000 の蛋白質で等電点は pH 6.4 であり, 分子量 70000 及び 31000 の 2 本鎖より成り立っており, この構造が作用の発現に必要なことを認めた。また AAP は Gly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Gly のアミノ酸配列を示す分子量 470 のヘキサペプチドであり, これらの物質は心筋に特異的に存在することを認めた。
- 3) BVP は単一心筋細胞の生存性, 細胞質の伸展及び蛋白合成を促進することで成長, 筋繊維束への組織化を促進し拍動数及び拍動細胞の割合を増加することにより拍動性を促進することを認め,

このものの成長促進作用は細胞の蛋白分解能の抑制によるものではないことを明らかにした。

- 4) A A Pは低カリウム濃度、高カルシウム濃度あるいはウアバイン添加により生じる拍動不整に対して改善作用を有し、この作用が拍動数及び拍動細胞の割合を減少させること、また細胞内へのカルシウム取り込みを抑制するとともに細胞内イオン濃度の異常を是正することに起因していることを認めた。

論文の審査結果の要旨

心筋細胞に直接作用しその機能を調節する物質として、心筋より成長・拍動性を促進する分子量100000の蛋白質（BVP）及び拍動不整を改善するヘキサペプチド（A A P）の2種の新規物質を単離することに成功し、特にA A PはGly-Pro-Hyp-Gly-Ala-Glyの新規物質であることを認め、その薬として有効性を確立した。よって薬学博士としての価値ある論文と認める。