



Title	心筋小胞体Ca <sup>2+</sup> 輸送におけるcyclic AMPとカルモデユリンの作用機序に関する研究
Author(s)	乾, 誠
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33297">https://hdl.handle.net/11094/33297</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【 4 】

氏 名 ・ (本籍)	乾 <small>いぬい</small> 誠 <small>まこと</small>
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 5 9 7 7 号
学位授与の日付	昭 和 58 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送における cyclic AMP とカルモデュリン の作用機序に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 阿 部 裕 (副査) 教 授 垂井清一郎 教授 吉田 博

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

心筋興奮収縮連関において $\text{Ca}^{2+}$ は主要な役割を果たしており、心筋の収縮・弛緩は、主として心筋小胞体への $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積および心筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離によって制御されと考えられている。このうち、心筋小胞体への $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積は、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性ATPase酵素による $\text{Ca}^{2+}$ 能動輸送で、分子量22,000の膜蛋白質ホスホランバン (PLN) による特異な調節機構を有することが明らかにされている。すなわち、カテコルアミンによる細胞内cyclic AMP (cAMP) の増加に際し、cAMP依存性リン酸化酵素 (cAMP-PK) によるPLNのリン酸化が、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性ATPase活性の上昇を介して心筋小胞体の $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積を著明に促進するというものである。これに対し、種々の細胞機能調節に $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{Ca}^{2+}$ 受容蛋白質カルモデュリン (CaM) を介した調節機構が広汎に存在することが明らかとなってきた。そこで、心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送調節系におけるCaMの役割を明らかにする目的で、CaMのPLN および心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送への効果を調べるとともにcAMPとの相互作用について検討を加えた。

〔方 法〕

心筋小胞体は、犬心室筋ホモジネートを分画遠心することにより調製した。この際、内因性のCaMを除く目的で0.6MKClによる洗浄をくり返した。CaM依存性のPLNリン酸化は、心筋小胞体 (1mg/ml) を5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  CaM, 0.2~50 $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1MKCl, 20mM Tris-maleate (pH 6.8), 25℃で5 mM ATPあるいは $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下に10分間反応させて行なった。cAMP依存性のPLNリン酸化は、心筋小胞体 (1mg/ml) に対し50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  cAMP-PK (catalytic subunit) を用い上記と同様の条件で行なった。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATPは、PLNリン酸化量の測定に用い、非放射性ATPは、

心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送速度および ATPase 活性測定の前処理として用いた。後者の場合には、Sephadex G-50 カラムにて反応後の ATP, ADP,  $\text{P}_i$  を除去し、心筋小胞体を含む分画を測定に供した。 $\text{Ca}^{2+}$  輸送速度、ATPase 活性の測定では、ATP 再生系 (phosphoenolpyruvate-pyruvate kinase) 存在下に反応を行なった。 $\text{Ca}^{2+}$  輸送速度の測定は、ミリポアフィルターを用い  $^{45}\text{Ca}$  の蓄積量から求めた。ATPase 活性は、pyruvate の産生量から求めた。

#### [結 果]

1. PLN は、CaM 存在下に心筋小胞体に存在する内因性 CaM 依存性リン酸化酵素 (CaM-PK) によりリン酸化された。このリン酸化は、熱およびアルカリに安定で cAMP-PK によるリン酸化と同一の化学的安定性を示した。
2. CaM-PK による PLN リン酸化は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性を示すのに対し、cAMP-PK によるリン酸化は、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存せず一定であった。また、CaM-PK および cAMP-PK による PLN リン酸化は、両 PK が個々に作動する条件で互いに独立して起こり、両 PK が共に作動する条件では相加的にリン酸化が起った。
3. 心筋小胞体における  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase と PLN の存在様式を ATPase のリン酸化中間体 EP および PLN リン酸化量の比較から検討したところ、EP に対し CaM-PK および cAMP-PK によりリン酸化されうる PLN は等量存在した。
4. CaM-PK による PLN リン酸化によって、心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送速度は、著明に促進された。この促進効果は、cAMP-PK による PLN リン酸化の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送促進効果と同程度に起った。両者による促進効果は、互いに独立かつ相加的に認められた。
5.  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase 活性も、CaM-PK および cAMP-PK による PLN リン酸化により、 $\text{Ca}^{2+}$  輸送速度促進と同様に促進された。この促進様式は、ATPase の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性を増加させるもので、両 PK による PLN リン酸化で親和性の増加は同程度に起こり、同時に両 PK でリン酸化された時には、さらに増加した。

#### [考案および総括]

心筋小胞体の PLN は、cAMP-PK のみならず  $\text{Ca}^{2+}$  と CaM 存在下に内因性の CaM-PK によってもリン酸化されうる。PLN リン酸化が CaM-PK および cAMP-PK により互いに独立かつ相加的に起こることから、PLN には 2 種類の異ったリン酸化部位が存在すると考えられる。CaM-PK および cAMP-PK による PLN リン酸化が心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送および ATPase 活性に互いに独立かつ相加的に促進効果を及ぼすことから、心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送系には PLN リン酸化を介した 2 種類の調節系が存在すると考えられる。心筋小胞体膜では、2 分子の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 ATPase (うち 1 分子が EP の状態にあると想定される) に対して CaM-PK と cAMP-PK とによる 2 個のリン酸化部位を持った PLN が対応して、その効果を発揮すると考えられる。しかし、PLN の分子構造および ATPase との構造上の相互作用については、単離・精製された蛋白質および再構成膜での検討が必要である。

以上から、心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  輸送 ATPase は、cAMP-PLN 系および CaM-PLN 系による二重調節 (dual control) を受けていることが示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送ATPaseが、cyclic AMP-ホスホランバン系に加え、 $\text{Ca}^{2+}$ カルモデュリンによってもホスホランバン磷酸化反応を介して調節されることを示し、心筋小胞体 $\text{Ca}^{2+}$ 輸送が二つの主要なsecond messengerであるcyclic AMPと $\text{Ca}^{2+}$ の相互作用により調節されうることとを明らかにしたものである。この知見は、心筋収縮調節機構の分子レベルでの作用機序を解明する上で、生理・薬理学上重要な成果である。