



Title	心筋小胞体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
Author(s)	乾, 誠
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33297
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

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	誠
学位の種類	医学博士	
学位記番号	第 5977 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 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 Ca^{2+} は主要な役割を果しており、心筋の収縮・弛緩は、主として心筋小胞体への Ca^{2+} 蓄積および心筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離によって制御されると考えられている。このうち、心筋小胞体への Ca^{2+} 蓄積は、 Ca^{2+} 依存性 ATPase 酵素による 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、カテコラミンによる細胞内 cyclic AMP (cAMP) の増加に際し、cAMP 依存性磷酸化酵素 (cAMP-PK) による PLN の磷酸化が、 Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性の上昇を介して心筋小胞体の 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 Ca^{2+} および 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 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 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 0.6M KCl による洗浄をくり返した。CaM 依存性の PLN 磷酸化は、心筋小胞体 (1 mg/ml) を 5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CaM, 0.2~50 μM Ca^{2+} , 5 mM MgCl₂, 0.1M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.8), 25°C で 5 mM ATP あるいは [γ -³²P]ATP 存在下に 10 分間反応させて行なった。cAMP 依存性の PLN 磷酸化は、心筋小胞体 (1 mg/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。 [γ -³²P]ATP は、PLN 磷酸化量の測定に用い、非放射性 ATP は、

心筋小胞体 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, Piを除去し、心筋小胞体を含む分画を測定に供した。 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。 Ca^{2+} 輸送速度の測定は、ミリポアフィルターを用い ^{45}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依存性磷酸化酵素 (CaM-PK) により磷酸化された。この磷酸化は、熱およびアルカリに安定でcAMP-PKによる磷酸化と同一の化学的安定性を示した。
2. CaM-PKによるPLN磷酸化は、 Ca^{2+} 濃度依存性を示すのに対し、cAMP-PKによる磷酸化は、 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磷酸化は、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磷酸化が起つた。
3. 心筋小胞体における Ca^{2+} 依存性ATPaseとPLNの存在様式をATPaseの磷酸化中間体EPおよびPLN磷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により磷酸化されうるPLNは等量存在した。
4. CaM-PKによるPLN磷酸化によって、心筋小胞体 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磷酸化の Ca^{2+} 輸送促進効果と同程度に起つた。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. Ca^{2+} 依存性ATPase活性も、CaM-PKおよびcAMP-PKによるPLN磷酸化により、 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 Ca^{2+} に対する親和性を増加させるもので、両PKによるPLN磷酸化で親和性の増加は同程度に起こり、同時に両PKで磷酸化された時には、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 Ca^{2+} とCaM存在下に内因性のCaM-PKによっても磷酸化されうる。PLN磷酸化が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種類の異った磷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磷酸化が心筋小胞体 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 Ca^{2+} 輸送系にはPLN磷酸化を介した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 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個の磷酸化部位を持った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 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Ca²⁺輸送ATPaseが、cyclic AMP-ホスホランバン系に加え、Ca²⁺、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Ca²⁺輸送が二つの主要なsecond messengerであるcyclic AMPとCa²⁺の相互作用により調節されうるこ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。