

Title	心筋小胞体Ca ²⁺ 輸送におけるCa ²⁺ 依存性ATPaseの前定常状態解析 : Cyclic AMP依存性プロテインキナーゼによるphospholamban燐酸化の効果
Author(s)	山田, 真
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33732
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

氏名・(本籍)	山 田 真
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 6 2 2 8 号
学位授与の日付	昭 和 58 年 12 月 1 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	心筋小胞体Ca ²⁺ 輸送におけるCa ²⁺ 依存性ATPaseの前定常状態解析 ——Cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼによる phospholamban 磷酸化の効果——
論文審査委員	(主査) 教授 阿部 裕 (副査) 教授 坂本 幸哉 教授 川島 康生

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

心筋収縮性調節においては、カテコラミンが重要な役割を果たす。この調節は興奮収縮連関過程において、カテコラミンが細胞内メッセンジャーである cyclic AMP (cAMP) を介して心筋小胞体(CSR)のCa²⁺輸送を制御することによってなされる。即ち、cAMPによりcAMP依存性プロテインキナーゼ(PK)が活性化されCSRの膜蛋白質 phospholamban (PN, 分子量 22,000)が磷酸化されると、CSRのCa²⁺輸送速度およびCa²⁺依存性ATPase(ATPase)活性が著明に促進される。この促進効果はPNによるATPase磷酸化中間体(EP)の分解促進と密接な関係にあることが示され、PNがATPaseの調節因子として働く可能性が示唆された。今回、PNがATPaseを調節する分子科学的機序を解明するため、PN磷酸化によりATPaseの素反応段階(特にEP形成過程)がいかなる影響を受けるかを超高速混和装置を用いて、ATPaseの前定常状態(5-200 msec)で検討した。

(方 法)

イヌ心室筋より調製したCSR(4.4-8.0 mg/ml)を1 μM cAMP, 2 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 20 mM histidine/HCl (pH 6.8), 25 °Cで、PK(2.2-4.0 mg/ml)の存在下(PN磷酸化; 磷酸化 CSR)あるいは非存在下(PN非磷酸化; 対照 CSR)で1 mM ATPと反応させた後、Dowex 1-X8 カラムに通し未反応のATP, 産生されたADP, Piを除去し、超高速混和装置を用い以下の測定に供した。

(1)ATPase 活性およびEP量の測定: [Ca²⁺-free CSR]カラムより溶出した磷酸化および対照CSR溶液をEGTA(0.2-4.64 mM)を含む緩衝液(3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 5 mM Na₂S₂O₈)

20mM Tris/maleate (pH 6.8), 20°C) に加えた後, 2-100 μM [γ - 32 P] ATP (10-100 μCi/μmol), 200 μM CaCl₂ を含む溶液と反応させ (最終Ca²⁺濃度: 0.2-14 μM), 32 Pi, E³²P量を測定した。〔Ca²⁺-bound CSR〕 磷酸化および対照 CSR溶液を 14 μM Ca²⁺ (CaCl₂/EGTA) を含む緩衝液 (上記) に加え Ca²⁺濃度を一定 (14 μM) に保ちつつ, 20 μM [γ - 32 P] ATP と反応させ, E³²P量を測定した。

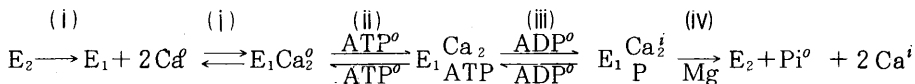
(2) Ca²⁺ 輸送の測定: [γ - 32 P] ATP, CaCl₂ の代わりに, 非放射性 ATP (20 μM), 放射性 46 CaCl₂ (200 μM; 3-4 μCi/μmol) を用い(1)と同様の条件下で反応を行い, CSR への Ca²⁺ 結合量をミリポアフィルター法にて測定した。

(結 果)

(1) EP 形成速度はPN 磷酸化により Ca²⁺-free CSR においては増加し, EPt_{1/2} (最大EP量の 1/2 が形成されるに要する時間) は著明に短縮したが (磷酸化 21 msec; 対照 43 msec), Ca²⁺-bound CSR においては変化しなかった (磷酸化 13 msec; 対照 12 msec)。Ca²⁺-free CSR の Ca²⁺ 輸送速度はPN 磷酸化により促進され, Ca t_{1/2} (最大Ca²⁺輸送量の 1/2 が達成されるに要する時間) は短縮した (磷酸化 21 msec; 対照 38 msec)。EP 形成の初速度と Ca²⁺ 輸送の初速度の比は 1:2 を示し, この stoichiometry はPN 磷酸化後も変化しなかった。(2) Ca²⁺-free CSR においては, EP t_{1/2} は Ca²⁺濃度 (0.2-14 μM) に依存せず一定であり, NP 磷酸化により著明に短縮した (磷酸化 平均 21.6 msec; 対照 平均 43.2 msec)。Ca t_{1/2} も Ca²⁺濃度に依存せず一定で, PN 磷酸化により著明に短縮した (磷酸化 平均 18.8 msec; 対照 平均 37.6 msec)。(3) Ca²⁺-free CSR において, PN 磷酸化により高ATP濃度 (≥10 μM) 領域では, 最大EP量 (200 msec におけるEP量) および見かけ上のEP形成初速度は増加した。低ATP濃度 (1-5 μM) 領域では, 最大EP量は減少したが, Pi 遊離速度は著明に促進された。

(考案および総括)

CSRでのCa²⁺輸送はATPase 酵素(E)の磷酸化中間体EPの形成・分解により仲介され, これを次式のように表わすことができる (E₂とE₁はそれぞれATPaseの低Ca²⁺親和性および高Ca²⁺親和性状態を示し, iとoは膜の内側と外側を示す):



CSRの外側で酵素E₂にCa²⁺が結合すると, E₂は低親和性から高親和性E₁へすみやかに状態変化する。E₁ 1モルにCa²⁺ 2モルとATP 1モルが結合したMichaelis 複合体形成につづいて, 磷酸化中間体 E₁Ca₂ⁱ が形成されCa²⁺がCSRの膜外から膜内に転位される。E₁Ca₂ⁱ はMg²⁺存在下で分解されCa²⁺の転位は完了する。PN 磷酸化によるEP形成速度の促進は, 反応がE₂から始まるCa²⁺-free CSRにおいてみられ, 反応がE₁から始まるCa²⁺-bound CSRではみられなかった。Ca²⁺-free CSRにおけるEP形成促進効果はCa²⁺濃度に依存せず一定であった。これは, E₂からE₁への変換過程 (ステップ(i))がPN 磷酸化で促進されることを示唆する。低ATP濃度領域ではPN 磷酸化によりEP

量は減少したが、低ATP濃度ではEP形成速度が低下するためPN 燐酸化によるEP 分解（ステップ(IV)）促進の効果が顕著に現われ、見かけ上EP 形成が減少するものと考えられる。PNはATPase 反応におけるEP 形成および分解の律速段階（ステップ(I'), (IV)）を促進し、その結果、ATPase 活性、Ca²⁺ 輸送速度が促進されるものと考えられる。

以上より、PNがATPase の調節因子として働くことが示唆される。

論文の審査結果の要旨

本研究は、心筋細胞の興奮収縮連関において中心的な役割をはたす心筋小胞体のCa²⁺輸送が、cyclic AMP および膜蛋白質ホスホランバンによって調節される機序を、Ca²⁺輸送 ATPase反応の前定常状態を解析することにより明らかにしたものである。

この知見は、心臓におけるカテコルアミンの強心作用の細胞内機序を解明する上で、心筋の生理・薬理学上重要な成果である。