The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	cDNAクローニングによる犬心筋ホスホランバンのアミノ酸配列
Author(s)	藤井, 順逸
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36024
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

【29】

氏名・(本籍)	藤井順逸（ふじい じゅんいち）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8106 号
学位授与の日付	昭和63年3月25日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**cDNAクローニングによる犬心筋ホスホランバンのアミノ酸配列**
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦 (副査) 教授 和田 博　教授 谷口 直之

論文内容の要旨

［目　的］

心筋小胞体（ＣＳＲ）Ca－ATPaseはＣＳＲ膜に存在する膜蛋白質ホスホランバンによって活性が調節されている。ホスホランバン（26kDa）はcAMP依存性キナーゼにより燐酸化されCa－ATPaseは活性を促進する均一なモノマー（6kDa）から成る5量体であることが示唆されている。そこでこのホスホランバンの分子構造を明らかにし，更にCa－ATPaseの調節機構を解明する目的で犬心筋ホスホラバンの部分アミノ酸配列を決定し，これを基にcDNAをクローニングした。更に兎心筋及び骨格筋よりホスホランバンcDNAをクローニングし，臓器による遺伝子発現の違いについて検討した。

［方法ならびに成績］

犬心室筋よりＣＳＲ膜分画を調製し，ホスホランバンを精製した。この精製ホスホランバンをBrCN及びＴＰＣＫ処理トリプシンにて切断し逆相ＨＰＬＣにより分離した。得られたペプチドのアミノ酸組成を調べ気相式シークエンサーを用いてアミノ酸配列を決定した。その結果，Ｎ末端から45残基目まで36と41番目を除いて，そのアミノ酸配列を決定することができた。マススペクトロメトリーと逆相ＨＰＬＣによる分析からＮ末端はアセチル－Metであることが明らかとなった。この部分アミノ酸配列（Glu－Met－Pro－Gln－Gln－Ala）に基づいて32種類のプローブＤＮＡを合成し，これを用いて犬心室筋のcDNAライブラリーよりホスホランバンをコードするcDNAクローンを選別した。約3,000コロニーより3クローンを得，その中の1つについて全塩基配列を決定し，アミノ酸配列を推定した。その結果ホスホランバン単量体は下記の様にMetから始まる52個のアミノ酸（分子量6,080）から成るポリペプチドであると推定された。

1　　10
Met－Asp－Lys－Val－Gln－Tyr－Leu－Thr－Arg－Ser－Ala－Ile－Arg－Arg－Ala－Ser－Thr－

20　　30
Ile－Glu－Met－Pro－Gln－Gln－Ala－Arg－Gln－Asn－Leu－Gln－Asn－Leu－Phe－Ile－Asn－

40　　50　52
Phe－Cys－Leu－Ile－Leu－Ile－Cys－Leu－Leu－Leu－Ile－Cys－Ile－Ile－Val－Met－Leu－Leu

このcDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列は化学的に決定された43個のアミノ酸配列を完全に含んでいた。本ポリペプチドはシグナル配列を欠き，N端側には親水性アミノ酸が，C端側には疎水性アミノ酸が多く分布している典型的な両親媒性の特徴を有していた。アミノ酸配列から二次構造を予想したところ，ホスホランバン分子は大部分α－ヘリックスから成ることが示唆された。次に，この犬ホスホランバンcDNAをプローブとして兎心筋よりcDNAクローンを得，更にこれを用いて骨格筋遅筋よりcDNAをクローニングした。その結果，心筋及び骨格筋遅筋より単離されたクローンは同じ塩基配列をしており，両組織が同じホスホランバン遺伝子を発現していることが明らかとなった。

〔総　　括〕

ホスホランバンが膜蛋白質であることから，N端側（ドメインⅠ）は細胞質側に面し，C端側約22アミノ酸残基（ドメインⅡ）がＣＳＲ膜中に埋もれていると考えられる。Simmerman等の報告からSer16とThr17が，それぞれＡ－キナーゼ及びカルモジュリン依存性キナーゼによる燐酸化部位であると考えられる。この燐酸化部位のC端側Pro21の部分でドメインＩが更に二つのドメイン，ＩＡとＩＢに分けられる。ドメインＩＡは外側に親水性残基を，内側に疎水性残基を向けることによって分子間相互作用を可能ならしめていると考えられ，燐酸化がこのドメインＩＡに大きな構造変化を起こすと思われる。心筋と骨格筋遅筋は，同じCa－ATPase遺伝子を発現していることが知られており，ホスホランバン遺伝子も両組織で発現されていることが明らかとなったので，両筋組織の細胞内Caが同じ機構で調節されていると推定される。ホスホランバンの構造及びCa－ATPaseとの相互作用を更に詳細に解明する為には，部位特異的突然変異と両遺伝子の同時的発現による解析が必要と考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究は，心筋小胞体Ca輸送ATPaseの調節因子ホスホランバンの一次構造を蛋白質のアミノ酸配列分析及びcDNAのクローニングにより決定し，ATPaseに対する作用機構について考察したものである。

その結果，ホスホランバンモノマーはアセチル化されたメチオニンで始まる52アミノ酸（分子量6,080）から成ること，分子は主にα－ヘリックスから成り，N端は親水性でSer16，Thr17がそれぞれcAMP及びカルモデュリン依存性キナーゼによ燐酸化されることを明らかにした。更に，この部分が燐酸化されると21番目のプロリンを境として構造変化が起こり，その結果ATPaseに対するホスホランバンの抑制作用が解除されATPase活性が著名に亢進するもの考えられる。

以上の知見は，ホスホランバンによるCa輸送ATPaseの調節機構を分子レベルで説明するものであ

り，カテコラミンの心筋拍動調節機構を解明する手掛かりとして重要であり，学位論文に値すると考えられる。