



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)	ふじ 藤	い 井	じゅん 順	いち 逸
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8 1 0 6	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リン酸化され 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ン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 T P C K 処理トリプシンにて切断し逆相 H P L C 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ケ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。マスマスペクトロメトリーと逆相 H P L C 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 種類のプロープ 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。

¹Met-Asp-Lys-Val-Gln-Tyr-Leu-Thr-Arg-¹⁰Ser-Ala-Ile-Arg-Arg-Ala-Ser-Thr-
²⁰Ile-Glu-Met-Pro-Gln-Gln-Ala-Arg-Gln-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Phe-Ile-Asn-
³⁰Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Ile-Cys-Leu-Leu-Leu-Ile-Cys-Ile-Ile-Val-Met-Leu-Leu⁵⁰
⁵²

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まれていた。ホスホランパン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、ホスホランパン分子は大部分 α -ヘリックスから成ることが示唆された。次に、この犬ホスホランパン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パン遺伝子を発現していることが明らかとなった。

〔総括〕

ホスホランパ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。Simmernan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磷酸化部位であると考えられる。この磷酸化部位の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、磷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、ホスホランパ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。ホスホランパンの構造及び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パ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、ホスホランパ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及びカルモジュリン依存性キナーゼにより磷酸化されることを明らかにした。更に、この部分が磷酸化されると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パンの抑制作用が解除されATPase活性が著明に亢進するものと考えられる。

以上の知見は、ホスホランパンによる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思われる。