

Title	Protein Phosphorylation in Regulation of Cellular Calcium
Author(s)	吉田, 明
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37237">https://hdl.handle.net/11094/37237</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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)	よし 吉	た 田	あきら 明
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	9 6 4 8	号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日		
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	Protein Phosphorylation in Regulation of Cellular Calcium (細胞内カルシウム調節とタンパク質リン酸化)		
論文審査委員	(主査) 教授 中村 隆雄		
	(副査) 教授 畠中 寛 教授 浅野 朗		

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 1. 心筋の電位依存性L型Caチャンネル構成タンパク質の同定とそのリン酸化。

心筋L型Caチャンネルタンパク質の同定をその特異的な示標としてジヒドロピリジン(DHP)を用いて行った。まず、このDHP受容体を特異的に免疫沈降できるモノクローナル抗体(MACL1)を得た。<sup>125</sup>Iで標識した心筋膜タンパク質をMACL1と免疫沈降したところ、骨格筋DHP受容体の $\alpha_1$ 及び $\alpha_2$ サブユニットに相当する分子種が特異的に見いだされた。 $\alpha_1$ にはDHP結合活性が存在し $\alpha_2$ サブユニットには糖鎖が結合していることが明らかとなった。MACL1で免疫沈降を行ったDHP受容体をcAMP依存性キナーゼ(PKA)でリン酸化を行ったところ99kDaの分子種に顕著なリン酸化が見られたが、骨格筋で観察されているような $\alpha_1$ サブユニットのリン酸化は見い出せなかった。以上の結果は心筋のL型チャンネルは、骨格筋のとその分子構造は類似しているが、その活性を調節しているPKAによるリン酸化は $\alpha_1$ サブユニットではなく別の新しい99kDaの結合タンパク質に起きていることが明らかとなった。

#### 2. ホスホランバンの脱リン酸化制御。

心筋筋小体(SR)Caポンプの活性はそれに結合するタンパク質ホスホランバン(PL)のリン酸化によって調節を受けることが知られている。このPLの細胞内での脱リン酸化制御を明らかにするため、膜透過性を高めた心筋細胞を用いた。脱リン酸化の測定は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とcAMP存在下にスキンドセルをインキュベートし、PLを<sup>32</sup>Pで標識した後、PKA阻害剤を作用させるあるいは過剰のATPで稀釈することで行った。その結果、細胞内でPLの脱リン酸化はcAMPにより負の、Caにより正の調節を受けていることが明らかとなった。

### 3. 心筋 Ca 誘発性 Ca 遊離 (CICR) チャンネルのリン酸化。

スキンドセルを用い CICR チャンネルが細胞内でリン酸化されるか否かについて検討した。この系で CICR チャンネルは、 $\beta$  アドレナリン刺激時にそのリン酸化量は増加しその効果は  $\beta$  拮抗薬により抑制された。また、リン酸化量の増加は cAMP を加えた場合にも観察された。

### 4. 脳 CICR チャンネルの同定とリン酸化。

脳にも心筋型の CICR チャンネル (リアノジン受容体) の存在することを見出し、さらにその分子が *in vivo* や *in vitro* で PKA によりリン酸化されることを示した。また、CICR チャンネルの特徴であるカフェインによる Ca 放出を中枢からの培養神経細胞でも見出し、さらにカフェインによるその細胞内 Ca 上昇がフォルスコリンを作用させることにより増大すること観察した。以上の結果から、PKA によるリン酸化で CICR チャンネルが調節を受けることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は細胞の運動、情報伝達、活性物質の分泌や遺伝子の作用発現など多くの生物機能の調節に重要な役割を果たしているが、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞外から内部への  $\text{Ca}^{2+}$  の流入・排出、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの放出・とりこみのバランスの上に規定されている。吉田君の研究はこのような  $\text{Ca}^{2+}$  の出入に直接関与する機能タンパク質の活性のリン酸化を介する調節メカニズムを分子のレベルで明らかにしようとするもので、とくに心筋の電位依存性 L 型チャンネルタンパク質、心筋と脳の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャンネルタンパク質について抗体を利用した精製とサブユニット構造の解明を行った。またホルモン作用によって促進されるリン酸化が何れのサブユニットを標的としておこるかを同定し、実際の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送促進とリン酸化との定量的関係を確立した。

これらの研究の結果、リン酸化を受ける今迄未知のサブユニットを発見し、更にそのリン酸化反応に関与する酵素の性質を明らかにすることが出来たことは、細胞の機能調節のメカニズムを  $\text{Ca}^{2+}$  レベル調節の面から解明する上で重要な知見である。

以上により本論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。