



Title	Molecular Mechanism of Regulation of Ca <sup>2+</sup> Pump ATPase by Phospholamban in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum
Author(s)	佐々木, 達哉
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37956">https://hdl.handle.net/11094/37956</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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

[27]

氏名	佐々木 達哉
博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )
学位記番号	第 10165 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 病理系専攻
学位論文名	<b>Molecular Mechanism of Regulation of Ca<sup>2+</sup> Pump ATPase by Phospholamban in Cardiac Sarcoplasmic Reticulum</b> (心筋小胞体におけるホスホランバンの Ca <sup>2+</sup> ポンプ ATPase 調節の分子機構)
論文審査委員	(主査) 教授 多田 道彦 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 三木 直正

## 論文内容の要旨

### (目 的)

心筋小胞体濾胞は、精製した心筋小胞体 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase に比べて Ca<sup>2+</sup> 濃度依存性 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase 活性の V<sub>max</sub> が低く、Ca<sup>2+</sup> 親和性が低いことが知られている。またそのリン酸化により V<sub>max</sub> および Ca<sup>2+</sup> 親和性が上昇することが報告されている。これらは心筋小胞体濾胞では膜蛋白質ホスホランバンが Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase に抑制をかけており、ホスホランバンのリン酸化(細胞質ドメインの Ser<sup>16</sup> のリン酸化)によってその抑制が解除されるためと考えられている。しかし、ホスホランバンの心筋小胞体 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase 調節の分子機構は未だ未解決である。

本研究では、部分ホスホランバン合成ペプチドを用いて心筋小胞体膜蛋白質ホスホランバンの心筋小胞体 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase 調節機構を解析した。

### (方法ならびに成績)

ホスホランバン単量体の N 末端の親水性部分(細胞質ドメイン: domain I) に相当する合成ペプチド(PLN 1-31) は、精製心筋小胞体 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase と incubate することによってその Ca<sup>2+</sup> 濃度依存性 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase 活性の V<sub>max</sub> を濃度依存性に低下させた。その最大効果(37%抑制)は 40 μg/ml の Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase に対し 0.4 mg/ml の濃度で得られた。一方、PLN 1-31 は Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase の Ca<sup>2+</sup> 親和性に影響を与えなかった。そこで、ホスホランバンの C 末端の疎水性部分(膜内ドメイン: domain II) の Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase に対する効果を検討した。ホスホランバン単量体の C 末端の疎水性部分に相当する合成ペプチド(PLN 28-47) をフォスファチジルコリンのリポソーム内に組み込み、精製 Ca<sup>2+</sup> ポンプ ATPase をふくむ濾胞と freeze-thaw-sonication 法で融合させ、PLN28-

47のCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseに対する効果を検討した。PLN 28-47は100:1のモル比でCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseと再構成すると、そのCa<sup>2+</sup>濃度依存性Ca<sup>2+</sup>ポンプATPase活性のV<sub>max</sub>を変化させずにCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseのCa<sup>2+</sup>親和性を低下させた(K<sub>Ca</sub>:0.52→1.33 μmol/mg・ml)。C末端の疎水性部分とN末端の親水性部分のリン酸化部位を含む合成ペプチド(PLN 8-47)も、非リン酸化状態ではCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseに対しPLN 28-47と同様な効果を示した。以上の結果から、ホスホランバンはCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseを分子内の二つの異なる部位で抑制しており、N末端の親水性部分はV<sub>max</sub>を、C末端の疎水性部分はCa<sup>2+</sup>親和性を低下させることが明らかとなった。

さらに、ホスホランバンのリン酸化によるCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseの調節機構について検討するため、PLN 1-31およびPLN 8-47をcAMP依存性蛋白質リン酸化酵素によりリン酸化して、それらのCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseに対する効果を検討した。PLN 1-31は0.72 mol of Pi/mol of peptideまでリン酸化され、リン酸化されたPLN 1-31はCa<sup>2+</sup>ポンプATPase活性を抑制しなかった。一方、PLN 8-47は0.81 mol of Pi/mol of peptideまでリン酸化され、リン酸化されたPLN 8-47は上記と同様にCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseと膜内に再構成してもCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseのCa<sup>2+</sup>親和性を低下させなかった。従って、ホスホランバンのリン酸化により上記の二通りの抑制が両方とも解除されることが明らかとなった。

(総括)

ホスホランバンはその分子内の二つの異なる部位で、それぞれ異なる様式でCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseを抑制した。すなわち、細胞質ドメイン(domain I)はCa<sup>2+</sup>ポンプATPaseのV<sub>max</sub>を、膜内ドメイン(domain II)はそのCa<sup>2+</sup>感受性をそれぞれ抑制した。さらに、ホスホランバンの細胞質ドメインのリン酸化により両方の抑制がともに解除された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、部分ホスホランバン合成ペプチドを用い、ホスホランバンの心筋小胞体Ca<sup>2+</sup>ポンプATPase調節の分子機構を解析したものであり、ホスホランバンはその分子内の二つの異なる部位で、異なる様式で(細胞質ドメインはV<sub>max</sub>を、膜内ドメインはK<sub>Ca</sub>を)Ca<sup>2+</sup>ポンプATPaseを抑制し、そのリン酸化により両方の抑制がともに解除されることが明らかとなった。本研究は、心筋細胞内Ca<sup>2+</sup>動態をコントロールする筋小胞体のCa<sup>2+</sup>取り込みの調節機構を解明する上で重要な成果であり、学位授与に値するものとする。