



Title	心筋小胞体膜カルシウム輸送調節蛋白質ホスホランバンの甲状腺ホルモン及びカテコラミンによる発現調節
Author(s)	木村, 佳弘
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38111
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

氏 名	木 村 佳 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 3 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 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	心筋小胞体膜カルシウム輸送調節蛋白質ホスホランバンの甲状腺ホルモン及びカテコラミンによる発現調節
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 多田 道彦 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 松田 暉

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

心筋小胞体膜蛋白質ホスホランバンは、cAMP 依存性磷酸化を受けることにより小胞体カルシウムポンプを活性化し、小胞体へのカルシウム取り込みを亢進させ、カテコラミン β 作用時の心筋収縮力増大と弛緩速度の増加をもたらす。我々は、ホスホランバンによる心筋小胞体カルシウムポンプの活性調節を酵素反応論的・蛋白質化学的に解析し、両蛋白質間の直接相互作用によってホスホランバンがカルシウムポンプを抑制しており、ホスホランバン磷酸化は、相互作用を脱抑制することを明らかにしてきた。このカルシウムポンプ抑制作用は、両蛋白質の相対量に依存するため、カルシウムポンプ活性は、両蛋白質の量比を介して蛋白質の発現レベルでも調節されている可能性がある。そこで本研究は、ホスホランバンの発現調節に関わる因子についての検討を行った。

ホスホランバン遺伝子は既にクローニングされており、その 5' 隣接領域に cAMP response element (CRE) 様配列を持つことが特徴として指摘されている。また、心筋を含め筋肉細胞は、甲状腺ホルモンによって強い遺伝子発現調節を受けることが知られている。甲状腺機能亢進状態では、心筋収縮力及び弛緩速度の増大、小胞体カルシウム輸送能の亢進がみられ、逆に甲状腺機能低下時には心筋収縮力が低下する。このことは、ホスホランバン-カルシウムポンプ系が甲状腺ホルモンによる発現調節を受ける可能性を示唆する。そこで本研究では、カテコラミン β_1 刺激と甲状腺ホルモンによるホスホランバンの発現調節を検討し、カルシウムポンプと比較した。

(方法ならびに成績)

ラット心筋初代培養系を五島の方法に従って作成した。10% FCS 存在下に 48 時間培養した後、無血清培地に置換、さらに 48 時間培養して、カテコラミンまたは甲状腺ホルモンを負荷し、48 時間目まで経時的に細胞を液体窒素で凍結して、acid-guanidium thiocyanate-phenol-chloroform 法にて RNA を抽出し、northern blot を行った。

カテコラミンは、epinephrine ($10^{-7} \sim 10^{-5} \text{M}$), isoproterenol ($10^{-7} \sim 10^{-5} \text{M}$), 及びそのアナログとして受容体を介さずに細胞内 cAMP 濃度を上昇させる forskolin (10^{-5}M), dBcAMP (10^{-4}M) を用いた。甲状腺ホルモンは、3, 3', 5-triiodothyronine (T_3 , $10^{-12} \sim 10^{-6} \text{M}$) を用いた。ラットホスホランバン DNA は、ラットゲノム DNA から PCR によって得た。この 0.3kbp の PCR fragment を dideoxy 法にて両鎖を sequence したところ、ウサギホスホランバンと同一のアミノ酸配列をコードしていたため、プローブとして用いた。カルシウムポンプは、ウサギ心筋型小胞体カルシウムポンプの約 0.7kbp の PstI fragment (2617-3360) を、内部標準としてヒト β アクチンゲノムの第 4 エ

クソンを含む約0.4kbpのHinfl fragmentをプローブとして用いた。mRNA量は、Bioimage-analyzerを用いて β アクチンで基準化し、無負荷状態に対する相対量として求めた。

カテコラミン負荷により、薬理作用として自己拍動数の増加・細胞収縮率の増大が観察されたが、いずれの時間(30分~48時間)でも、またいずれの濃度でも、ホスホランバン及びカルシウムポンプ mRNA 量に有意な変化はみられなかった。Forskolin, dBcAMP にても両 mRNA 量の有意な変化はみられなかった。

T_3 負荷によって、経時的にホスホランバン mRNA 量は漸減し、24 時間後には約 $1/2$ に減少して 48 時間後まで持続した。一方、カルシウムポンプ mRNA 量は 6 時間後から有意な増加を示し、その後漸増して 48 時間後には 50 %以上の増加となった。48 時間後でみた T_3 の ED50 は、ホスホランバンについては約 10^{-10} M, カルシウムポンプについては約 10^{-11} M であった。

(総括)

ホスホランバンは、遺伝子の 5' 隣接領域に CRE 様配列を持つが、カテコラミン β 刺激が発現調節に働いていることを示す所見は得られなかった。

一方、甲状腺ホルモンによってホスホランバンの発現は抑制され、逆にカルシウムポンプの発現は増加した。甲状腺ホルモンに対してホスホランバンの発現調節はカルシウムポンプに比し時間的により早く反応するが、調節域はより高濃度側に偏していた。

以上より、甲状腺ホルモンは心筋小胞体カルシウム輸送系に対し、カルシウムポンプのみならずその調節蛋白質ホスホランバンの発現調節を介して効果を増幅している、即ち、ホスホランバンとカルシウムポンプに対し逆の発現調節作用を持つため、甲状腺機能亢進時には、ホスホランバンの抑制作用が減弱してカルシウムポンプ活性が亢進し、逆に低下時にはカルシウムポンプ活性が低下すると考えられる。この現象は、心筋小胞体カルシウムポンプ-ホスホランバン系が甲状腺機能異常状態における心機能障害の要因の一つとして関わっていることを示唆する。

論文審査の結果の要旨

心筋小胞体カルシウム輸送調節は、心筋の興奮-収縮関連において心筋収縮・弛緩特性の両方を規定するとともに、カテコラミン刺激による強心作用発現にもあずかっており、心機能調節のうえで重要な因子である。本論文は、心筋小胞体カルシウム輸送調節系蛋白質の液性因子による発現調節を詳細に検討し、カルシウム輸送調節メカニズムについての新しい考え方を甲状腺機能との関連において示したものとして評価でき、学位に値すると考える。