



| | |
|--------------|---|
| Title | 骨格筋興奮収縮連関の分子機構の研究 |
| Author(s) | 川崎, 隆史 |
| Citation | 大阪大学, 1993, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38229 |
| 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 川 崎 隆 史

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 7 9 5 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

基礎工学研究科物理系専攻

学 位 論 文 名 骨格筋興奮収縮連関の分子機構の研究

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 葛西 道生

(副査)
教 授 柳田 敏雄 教 授 村上富士夫

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋の興奮収縮連関における横行細管 (T 管) から筋小胞体 (SR) への (T-SR) 情報伝達機構及び SR からの Ca^{2+} 放出機構は明らかではない。本研究では、この点に注目し、SR の Ca^{2+} 放出チャネル (Ryanodine (Ry) 受容体) に対し、機能的影響を与える内在性の因子を同定し、興奮収縮連関に関与する可能性を示唆する事を目的とした。

まず EDTA (EGTA) 溶液中で筋小胞体の重い分画 (HeavySR, HSR) からの Ca^{2+} induced Ca^{2+} release による Ca^{2+} Response が消失することがわかった。この現象は、pCa 7 以上の溶液中で起こり、過剰な Ca^{2+} を含んだ溶液によりある程度復活させることができる。又、100mM オーダーの KCl により消失を防ぐことができる。 Ca^{2+} Response がなくなる時に HSR から遊離する、という相関をもつ蛋白を探索すると、Calsequestrin (CSQ) が最もよい相関を示した。 Ca^{2+} Response 消失に比較的長時間を要すること、 Ca^{2+} により消失した Ca^{2+} Response を復活させることができることなどを考え合わせ、CSQ の Ca^{2+} Response 消失に対する直接の関与、更には CSQ が Ca^{2+} 放出チャネルの制御蛋白であることを示唆した。

更に CSQ, Ry 受容体の間に介在する蛋白を、両蛋白のアフィニティカラムを作成する事により探索した。その結果、候補として分子量 210 kDa, 96 kDa, 30 kDa, 25 kDa の各蛋白が有力であった。中でも 96 kDa 蛋白は、マウス小脳イノシトール 3 リン酸受容体 (IP_3 受容体) に対するモノクローナル抗体 18 A10 によって認識され、ほかの様々な性質は最近報告された "Triadin" 様であった。

次に、96 kDa 蛋白の機能を探るため、Corbett らの報告を参考にして Triad からの脱分極依存性 Ca^{2+} 放出を検出した。その結果、Corbett らの報告と異なり、比較的浅い脱分極でも Ca^{2+} 放出が起こること、脱分極を起こさない条件ではカフェインが Ca^{2+} 放出を起こすこと、更には Ruthenium Red によって阻害されることがわかった。又、18 A 10 が脱分極依存性の Ca^{2+} 放出を増大させることから、96 kDa 蛋白が T-SR 間の情報伝達に関与することが示唆された。

スチルベン誘導体が Ca^{2+} 放出チャネルに対し、不可逆的に結合することにより、開口固定することがわかった。オートラジオグラフィにより、スチルベン誘導体の結合蛋白を調べた結果、 Ca^{2+} 放出チャネル自身は否定的であり、分子量 106 kDa, 30 kDa の両蛋白が有力であった。

その他、Ry 受容体に関する生化学的基礎研究、 Ca^{2+} 放出チャネルのイオン (物質) 透過機構に関する研究等も行った。前者からは、Ry 受容体が 640 kDa 蛋白の 4 量体であることがわかった。又、後者からは中性分子である Glucose

がイオン強度に依存して Ca^{2+} 放出チャネルを通ること、イオンでも Glucosamine が Glucose 型の透過性を示すこと、更に、 Ag^+ 等は低イオン強度でも Glucose を透過させることができること等がわかった。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の骨格筋の収縮は次のように制御されている。まず、運動神経が興奮すると神経終末でアセチルコリンが放出され、これが筋細胞膜上のアセチルコリン受容体に結合する。これによって筋細胞膜に終板電位が発生する。それがある閾値を越えると活動電位が発生し、この活動電位は筋細胞の横行細管 (T管) に伝えられる。T管膜が興奮すると、それに対峙する筋小胞体 (SR) から Ca^{2+} が筋細胞質内に放出される。この Ca^{2+} によって収縮蛋白系が活性化され筋が収縮する。また、筋小胞体が筋細胞質内の Ca^{2+} を取り込むと筋は弛緩する。この T管膜の興奮が SR 膜に伝えられる過程を狭い意味での興奮収縮連関と呼ぶが、その分子機構については、今のところ T管に存在する DHP 受容体という Ca^{2+} 放出チャネルが活性化されると、SR 膜に存在する ryanodine 受容体という Ca^{2+} 放出チャネルから Ca^{2+} が放出れることが解っているが、この T管の興奮がどのようなメカニズムで ryanodine 受容体に伝えられ Ca^{2+} が放出されるかはまだ明らかではない。

まず、申請者はこの T管の信号を ryanodine 受容体に伝達する分子を検索した。筋小胞体を EDTA (EGTA) で処理すると Ca^{2+} 放出能が消失し、これが筋小胞体に局在する Calsequestrin (CSQ) の流失によることを突き止め、CSQ が ryanodine 受容体の Ca^{2+} 放出の制御に関係していることを明らかにした。しかし、CSQ と ryanodine 受容体は直接相互作用していないことから、ryanodine 受容体と CSQ を仲介する分子を両タンパク質のアフィニティカラムを使って検索し、分子両 96 kDa のタンパク質を同定した。これは IP3 に対するモノクローン抗体 18 A 10 で認識され、Triadin として報告されているものに似ていることを明らかにした。更に、Triad からの Ca^{2+} 放出を、この 18 A 10 が増強することから、このタンパク質が T管膜から SR 膜への信号伝達に寄与していることを示した。

また、スチルベンの誘導体が Ca^{2+} 放出チャネルを開口固定することを発見し、それが ryanodine 受容体に対する直接作用ではなく、間接的に 106 kDa と 30 kDa のタンパクによることを示した。更に Ca^{2+} 放出チャネルの透過性を始めとする生化学的研究を行い、新しい事実を明らかにした。

以上のように、本論文は興奮収縮連関に関与する分子の検索において新しい分子の発見、その同定法を確立したもので、分子生理学の分野に重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。