The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Cloning of cDNA Encoding the Ca2+ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum
Author(s)	大津, 欣也
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38267
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

【 50 】

氏　　名	大　津　欣　也（おお つ きん や）
博士の専攻分野の名称	博　士　（医　学）
学 位 記 番 号	第　1 0 3 9 0　号
学位授与年月日	平成 4 年 9 月 17 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Molecular Cloning of cDNA Encoding the Ca^{2+}Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Cardiac Muscle Sarcoplasmic Reticulum （心筋小胞体に存在するカルシウム遊離チャンネルの cDNA クローニング）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　多田　道彦 （副査） 教 授　鎌田　武信　　教 授　辻本　賀英

論 文 内 容 の 要 旨

＜目　的＞

心筋と骨格筋では，興奮収縮連関機構は異なり，前者でCa^{2+} 誘発性Ca^{2+} 遊離機構，後者では脱分極誘発性Ca^{2+}遊離機構が想定されている。筋小胞体からのCa^{2+}遊離はチャンネルを介している。その活性はCa^{2+}，Mg^{2+}，ATP カルモジュリン等により調節されており，心筋と骨格筋ではこれらに対する感受性が異なる。本研究では心筋Ca^{2+}遊離チャンネルの cDNA をクローニングし，その一次構造を骨格筋のそれと比べることにより分子構造上の相違を明らかにしようとした。

＜方法ならびに成績＞

心筋より精製したCa^{2+}遊離チャンネルに対するモノクローナル抗体を用いてウサギ心筋から作成した cDNA 蛋白質発現ライブラリーをスクリーニングした。抗体に反応するクローンをプローブとし，スクリーニングを繰り返したところ，4つのオーバーラップする，5' 末より始まる全長13.7kb の cDNA を単離した。3' 末を含むクローンは遺伝子増幅法により得た。これらのクローンの塩基配列をサンガー法により決定した。

Ca^{2+}遊離チャンネル cDNA は GC に富む，307bp の5' 非翻訳部分，14,707bp の翻訳部分とポリAテイルで終わる AT に富む 1 ,318bp の3' 非翻訳部分から成っていた。翻訳開始のメチオニンコドン部分のシークエンス GAGCCATGG は真核細胞での翻訳開始のコンセンサス配列に一致していた。ポリアデニレーションシグナルはポリアデニレーション部位から13bp 上流に位置していた。

この cDNA は4,969個のアミノ酸から成るポリペプチドをコードしており，その推定分子量は564,711であった。これは骨格筋アイソフォームの分子量に近似しており，アミノ酸レベルのホモロジーは66%であった。骨格筋アイソフォームと同様，疎水性の高いアミノ酸配列が C末側に12カ所あり，いずれもが膜を貫通するのに充分な長さを持っていた。従って，Ca^{2+}遊離チャンネル蛋白質の C末側は筋小胞体膜内でチャンネル孔を形成し，N末側は筋小胞体と T管を接合しているフット構造に対応すると考えられる。両アイソフォームの二次構造は極めて類似しており，全体として共通の立体構造を持つと予想される。

アデニン結合部位に共通なコンセンサス配列はアミノ酸残基4345-4350に見い出された。EFハンド様の高親和性カルシウム結合部位は存在しなかった。カルモジュリン結合部位のコンセンサス配列はアミノ酸残基2775-2807，2877-2898，2998-3016にあった。cAMP依存性蛋白質リン酸化酵素によるリン酸化部位のコンセンサス配列はアミノ酸残基2809に見い出された。

心筋及び骨格筋型のCa^{2+}遊離チャンネルの組織分布をノーザンブロットにより調べた。心筋型アイソフォームは心臓と脳に発現していたが，速筋，遅筋には検出できなかった。一方，骨格筋型は速筋，遅筋にのみ発現していた。子宮平滑筋，腎臓，肝臓にはいずれのmRNAも存在していなかった。

ヒトーマウス融合細胞ＤＮＡを用いサザーンブロットを行なうことにより，心筋Ca^{2+}遊離チャンネルの遺伝子座を決定した。12種類の融合細胞を分析したところ心筋Ca^{2+}遊離チャンネル遺伝子は，ヒト第1染色体に存在し，第19染色体にある骨格筋アイソフォームをコードする遺伝子とは異なることが明らかになった。

＜総　括＞

ウサギ心筋小胞体におけるCa^{2+}遊離チャンネルcDNAのクローニング，シークエンスを行なった。そのcDNAは16,532bpで4,969のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列は骨格筋タイプのものと66%のホモロジーを持ち，2次構造には有意な差はみられず，同じ立体構造を示すと示唆された。予想されるＡＴＰ結合部位，リン酸化部位，カルモジュリン結合部位はアミノ酸残基2619-3016に存在しており，この領域がモジュレーター結合部位と考えられた。ノーザンブロットにより，心筋アイソフォームは心臓と脳に発現しており，一方，骨格筋アイソフォームは速筋，遅筋に発現していた。両アイソフォームは，異なる遺伝子にコードされており，心筋アイソフォーム遺伝子座はヒト第1染色体上にあった。

論文審査の結果の要旨

本研究は心筋小胞体に存在するカルシウム遊離チャンネルcDNAをクローニング，シークエンスしたものである。

その結果，骨格筋と心筋のカルシウム遊離チャンネルの類似点，相違点が明らかになり，また遺伝子座を同定することにより両者が異なる遺伝子産物であることを示した。アミノ酸配列を検索することにより活性調節部位を推定できた。ノーザンブロットにより両カルシウム遊離チャンネルの組織分布を明らかにした。

本研究は世界で初めての心筋小胞体カルシウム遊離チャンネルcDNAのクローニングの報告であり今後の心筋での興奮収縮連関の機序及びその調節機構解明のうえでも意義深いものであり博士論文に値するものと認める。