



Title	Molecular Cloning of cDNA Encoding the Ca ²⁺ 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

氏名	大津欣也
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第10390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ニングをプローブとし、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' 末を含むクローニングは遺伝子增幅法により得た。これらのクローニングの塩基配列をサンガーフラッシュ法により決定した。

Ca^{2+} 遊離チャネル 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+} 遊離チャネル蛋白質の C 末側は筋小胞体膜内でチャネル孔を形成し、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+} 遊離チャネルの組織分布をノーザンプ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。

ヒトマウス融合細胞DNAを用いサザーンプロットを行なうことにより、心筋 Ca^{2+} 遊離チャ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。ノーザンプロットにより、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。ノーザンプロットにより両カルシウム遊離チャ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。