The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	天然型カルシウムチャネル阻害性ペプチドの作用機序に関する研究
Author(s)	安田, 修
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39021
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

【43】

氏　　名	安田　修（やすだ　おさむ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11795　号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**天然型カルシウムチャネル阻害性ペプチドの作用機序に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　荻原　俊男 （副査） 教　授　松沢　佑次　　教　授　矢内原千鶴子

論文内容の要旨

【目的】

Calciseptine（CaS）はコブラ科の蛇であるblack mambaの毒より単離されたペプチドである。60個のアミノ酸より構成され，4個のdisulfide結合を有し，ラット門脈より子宮の自発性収縮抑制，ラット大動脈の40 mM KCLによる収縮抑制，また大動脈平滑筋細胞のL型カルシウム電流の抑制から，L型カルシウムチャネルに対する阻害作用をもつことが考えられていた。FS_2は3アミノ酸を除いてCaSと同じ構造を有し同じくblack mambaの毒より単離されたペプチドである。一方，電位依存性カルシウムチャネルにはL，N，T，P型の少なくとも4種類が存在し，このうちL型カルシウムチャネルは生体に最も広く分布するカルシウムチャネルで神経伝達物質の分泌や平滑筋の興奮収縮連関にとって重要な役割を有している。このL型カルシウムチャネル阻害薬にはnitrendipineに代表される1，4-dihydropyridine誘導体，diltiazemに代表されるbenzothiazepine誘導体，verapamilに代表されるpapaverine誘導体の3種類が知られている。今回，CaS及びFS_2のL型カルシウムチャネルに対する阻害様式につき検討した。

【方法】

①カルシウムチャネルに対する標識リガンド結合実験：雄性Wistarラットより得た全脳をhomogenizeし，1,000 x gで10分間遠心後の上清を40,000 x g 20分間遠心し，沈渣をシナプトソーム膜分画として使用した。L型およびN型カルシウムチャネルに対する標識リガンド〔^{3}H〕nitrendipineおよびω-〔^{125}I〕conotoxin GⅣAの特異的結合をScatchard plotにより解析した。またCaSおよびFS_2の〔^{3}H〕nitrendipine結合に対する影響をLineweaver-Burk plotにより解析した。

②細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定：L型カルシウムチャネルの発現が知られているラット胎児大動脈平滑筋細胞株A7r5細胞の$[Ca^{2+}]_i$をカルシウム蛍光試薬fura-2を用いて測定した。4 μMのfura-2 AMを50分間負荷し，洗浄後340，380 nmの励起光による495 nmの蛍光強度を測定した。

③大動脈および左心房張力測定：ラット大動脈および左心房標本を95%O_2，5%CO_2を通気したKrebs-Henseleit液を満たしたbath内に懸垂し，張力を測定した。大動脈は40 mM KCIにて刺激後，左心房は5 msec.，0.2～2 Hzの短形波刺激による収縮に対するCaSおよびFS_2添加の影響を検討した。

【結果】

①ラット脳シナプトソーム膜は〔^{3}H〕nitrendipineおよびω-〔^{125}I〕conotoxin GⅣAに対する特異的結合部位を有していた。Scatchard plotにより解離定数（K_d）および最大結合（B_M）は〔^{3}H〕nitrendipineで0.22 nM，0.19nmol／mg蛋白，ω-〔^{125}I〕conotoxin GⅣAで31 pM，0.34 pmol／mg蛋白であった。

②Lineweaver-Burk plotよりCaSおよびFS_2は〔^{3}H〕nitrendipineのラット脳シナプトソーム膜結合に対して競合阻害を示し，その解離定数はそれぞれ290 nM，210 nMであった。

③神経細胞に存在するN型カルシウムチャネルの阻害性ペプチドであるω-〔^{125}I〕conotoxin GⅣAの同シナプトソーム膜への結合に対し，両ペプチドは全く影響を与えなかった。

④A7r5細胞の〔Ca^{2+}〕$_i$の基礎値は108±6 nM（平均±標準偏差，n=30）であった。Bay K8644 10^{-6}M添加により〔Ca^{2+}〕$_i$は持続性に上昇を示し，5分後平均186 nMに達した。Bay K8644添加5分前より前処理したCaS，FS_2およびnitrendipineは濃度依存性に〔Ca^{2+}〕$_i$の上昇を抑制し，そのIC_{50}値はそれぞれ2.7×10^{-8}M，2.3×10^{-8}M及び4.4×10^{-8}Mであった。

⑤1 Hz電気刺激によるラット左心房収縮に対してCaS，FS_2およびnitrendipineは濃度依存性に抑制し，そのIC_{50}値はそれぞれ9.9×10^{-9} M．3.2×10^{-9}M，3.0×10^{-7}Mであった。一方，40 mM KCIによる大動脈収縮に対し，CaS，FS_2，nitrendipineは濃度依存性に抑制し，そのIC_{50}値は3者とも約3×10^{-8}Mであった。

⑥Nitrendipineによる左心房収縮抑制は明らかな収縮頻度依存性増強を示した。一方，CaS，FS_2による左心房収縮抑制においては収縮頻度依存性は認められなかった。

【総括】

①結合実験によりCaS，FS_2はともにL型カルシウムチャネルに対し1，4-dihydropyridine誘導体のnitrendipineと同一の部位に結合するものの，nitrendipineよりも約1,000倍低親和性であった。一方，両ペプチドはN型カルシウムチャネルに対しては結合性を有さなかった。

②L型カルシウムチャネルを発現していることが知られているA7r5細胞においてL型カルシウムチャネル作動薬Bay K8644により上昇した〔Ca^{2+}〕$_i$に対してCaS，FS_2は結合解離定数付近のIC_{50}値にて抑制し，〔Ca^{2+}〕$_i$の動態からもL型カルシウムチャネル阻害性ペプチドとしての作用を発揮すると考えられる。

③Nitrendipineは静止膜電位が浅い細胞に対してL型カルシウムチャネル抑制作用が増強することが知られており，心筋よりも大動脈収縮に対し抑制硬化は大きく，また心筋では収縮頻度が多くなるに従い抑制作用増強が認められる。これに対し，両ペプチドは静止膜電位非依存性の収縮抑制作用を示した。

④以上よりCaS，FS_2はL型カルシウムチャネルに対して特異的な作用様式を示す天然型カルシウムチャネル阻害性ペプチドであると考えられた。

論文審査の結果の要旨

L型カルシウムチャネルは生体に最も広く存在するカルシウムチャネルであり，L型カルシウムチャネル拮抗薬は高血圧や心疾患の治療に広く用いられている。本研究は近年発見された天然に存在する蛇毒由来のペプチドであるカルシセプチン（CaS）およびFS_2の作用および作用機序の解明に関するものである。CaSおよびFS_2はL型カルシウムチャネル上で1，4-dihydropyridineと同一の部位に拮抗的に結合し，細胞内へのカルシウムの流入を濃度依存性に阻害する。またDiltiazem，VerapamilのL型カルシウムチャネルへの結合に対してCaS，FS_2は1，4-dihydropyridineと同様に増減させることを明らかにした。しかしCaS，FS_2は1,4-dihydropyridineと異なりL型カルシウムチャネルへの解離定数よりも低濃度から細胞内へのカルシウムの流入を抑制する。本研究はCaS，FS_2の作用およびその機序について新しい知見を提示したものであり学位の授与に値すると考えられる。