



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

氏名	やすだ 修
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 萩原 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。FS₂ 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 および FS₂ 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 [³H] nitrendipine および ω -[¹²⁵I] conotoxin G IV A の特異的結合を Scatchard plot により解析した。また CaS および FS₂ の [³H] 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 ([Ca²⁺]_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 [Ca²⁺]_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% O₂, 5% CO₂ 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 KCl 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 FS₂ 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 [^3H] nitrendipine および ω -[^{125}I] conotoxin GIV A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 [^3H] nitrendipine で 0.22 nM , 0.19 nmol/mg 蛋白, ω -[^{125}I] conotoxin GIV A で 31 pM , 0.34 pmol/mg 蛋白であった。

②Lineweaver-Burk plot より CaS および FS₂ は [^3H] 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 GIV A 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たなかった。

④A 7 r 5 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の基礎値は $108 \pm 6 \text{ nM}$ (平均士標準偏差, $n=30$) であった。Bay K8644 10^{-6} M 添加により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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, FS₂ および nitrendipine は濃度依存性に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ $2.7 \times 10^{-8} \text{ M}$, $2.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 及び $4.4 \times 10^{-8} \text{ M}$ 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, FS₂ および nitrendipine は濃度依存性に抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ $9.9 \times 10^{-9} \text{ M}$, $3.2 \times 10^{-9} \text{ M}$, $3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。一方、 40 mM KCl による大動脈収縮に対し、CaS, FS₂, nitrendipine は濃度依存性に抑制し、その IC_{50} 値は 3 者とも約 $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 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, FS₂ 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, FS₂ 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 A 7 r 5 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対して CaS, FS₂ は結合解離定数付近の IC_{50} 値にて抑制し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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發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, FS₂ 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 FS₂ 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 FS₂ 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, FS₂ 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, FS₂ 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, FS₂ 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。