



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39021">https://hdl.handle.net/11094/39021</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> 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 おさむ 安 田 修
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 9 5 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 [<sup>3</sup>H] nitrendipine および ω-[<sup>125</sup>I] 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 FS<sub>2</sub> の [<sup>3</sup>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<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> 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 FS<sub>2</sub> 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 [ $^3\text{H}$ ] nitrendipine および  $\omega$ -[ $^{125}\text{I}$ ] 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 [ $^3\text{H}$ ] nitrendipine で  $0.22\text{ nM}$ ,  $0.19\text{ nmol/mg 蛋白}$ ,  $\omega$ -[ $^{125}\text{I}$ ] conotoxin GIVA で  $31\text{ pM}$ ,  $0.34\text{ pmol/mg 蛋白}$  であった。
- ②Lineweaver-Burk plot より CaS および FS<sub>2</sub> は [ $^3\text{H}$ ] 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  $290\text{ nM}$ ,  $210\text{ nM}$  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  $\omega$ -[ $^{125}\text{I}$ ] 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 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> の基礎値は  $108 \pm 6\text{ nM}$  (平均  $\pm$  標準偏差,  $n=30$ ) であった。Bay K8644  $10^{-6}\text{ M}$  添加により [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> は持続性に上昇を示し、5 分後平均  $186\text{ nM}$  に達した。Bay K8644 添加 5 分前より前処理した CaS, FS<sub>2</sub> および nitrendipine は濃度依存性に [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> の上昇を抑制し、その IC<sub>50</sub> 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, FS<sub>2</sub> および nitrendipine は濃度依存性に抑制し、その IC<sub>50</sub> 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, FS<sub>2</sub>, nitrendipine は濃度依存性に抑制し、その IC<sub>50</sub> 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, FS<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> に対して CaS, FS<sub>2</sub> は結合解離定数付近の IC<sub>50</sub> 値にて抑制し、[ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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。