

| | |
|--------------|---|
| Title | 心筋小胞体 Ca ポンプATPase-ホスホランバン系に対する抗ホスホランバン単クローン抗体の効果 |
| Author(s) | 大東, 正明 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | none |
| URL | http://hdl.handle.net/11094/39651 |
| DOI | |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | おお 大 ひがし 東 まさ 正 あき 明 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 1 9 8 9 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 7 年 5 月 1 6 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 | 心筋小胞体CaポンプATPase-ホスホランバン系に対する抗ホスホランバン単クローン抗体の効果 |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 多 田 道 彦 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 祖 父 江 憲 治 |

論 文 内 容 の 要 旨

【 目 的 】

心筋小胞体に存在する膜蛋白質ホスホランバンは、cAMP依存性の磷酸化を受けることにより心筋小胞体への能動的Ca²⁺輸送を促進し、β受容体刺激作用による心筋収縮力の増強と弛緩速度の亢進における細胞内情報伝達を担っている。我々は、ホスホランバンを単離精製し蛋白質一次構造を決定した結果、本蛋白質が52アミノ酸残基(分子量6,080)より成る単一ポリペプチドであることが判明した。この分子は、オリゴマーを形成して機能すると考えられるが、この単量体は両親媒性で、細胞質(N末端)側にcAMP依存性磷酸化部位を持つ親水性のドメインIが、小胞体膜内(C末端側)に疎水性のドメインIIが位置すると考えられる。また、CaポンプATPaseとの再構成系による研究からホスホランバン-CaポンプATPase系は緊密な機能単位を心筋小胞体膜内で形成していると考えられる。

本研究は、ホスホランバンの分子作用機作を明らかにするため、抗ホスホランバン単クローン抗体のうち、ドメインIの磷酸化部位(Ser16, Thr17)近傍のArg9を含む領域をエピトープとするものを用いてホスホランバンを修飾し、かかる条件下でCaポンプATPase活性の定常状態及び前定常状態における速度論的解析を行った。

【 方 法 なら び に 成 績 】

抗ホスホランバン単クローン抗体による前処置：抗ホスホランバン単クローン抗体と心筋小胞体を0℃氷上にて前処置した後、CaポンプATPase活性を測定した。単クローン抗体の濃度依存性及び時間依存性の解析において、抗体とATPaseとの蛋白質重量比1以上、前処置時間10分以上において、抗体による活性促進効果は飽和した。

CaポンプATPase活性測定およびCa²⁺取り込み活性測定：Ca/EGTA緩衝液により、0.1から25 μMのCa²⁺濃度を調製し、CaポンプATPaseの定常及び前定常状態解析を施行した。心筋小胞体によるCa²⁺取り込み活性は、ATP、⁴⁵Ca²⁺およびoxalate存在下に、ミリポアフィルター濾過法にて行った。

その結果、CaポンプATPase活性およびCa²⁺取り込み活性の促進が、より低いCa²⁺濃度において認められ、CaポンプATPaseのCa²⁺に対する親和性の増加(K_{0.5} = 1.24から0.62 μMへ)を示した。この抗体による効果がcAMPによりホスホランバンが磷酸化された場合よりも大きいこと、抗体と磷酸化の両処置を共存させても、更なる効果は認め

られないことより、抗体によるCaポンプATPaseの活性化はその最大値に達していると考えられる。これら定常状態の解析にて、 Ca^{2+} 取り込み量とATP分解量との量比（ストイキオメトリー）は約1であり、抗体による効果は Ca^{2+} 輸送の効率の変化ではなく、CaポンプATPase反応サイクルのターンオーバー促進によるものであると考えられた。そこで、ATPase酵素反応サイクルのうち、如何なる素反応段階が促進されるかを明らかにするため、CaポンプATPase反応中間体の形成初期反応を、Froehlichタイプの超高速混和装置（10 - 200msec）を用いて測定した。

CaポンプATPaseは、 Ca^{2+} に低親和性の E_2 状態より、 Ca^{2+} に高親和性の E_1 状態を経て、磷酸化中間体（EP）を形成すると考えられている。この際、 Ca^{2+} とEGTAの初期濃度によって、磷酸化反応を E_1 あるいは E_2 状態から開始することが可能である。両反応条件におけるCaポンプATPaseの反応中間体形成速度を、中間体最大形成量の1/2を得る時間（ $t_{1/2}$ ）で表すと、抗ホスホランバン単クローン抗体の存在により、 E_2 スタートの際には、 $t_{1/2}$ が39msecから24msecへと短縮されたのに対し、 E_1 スタートの際には明らかな短縮が認められなかった。すなわち、CaポンプATPase反応のなかで律速段階の一つである E_2 から E_1 への反応段階が抗ホスホランバン単クローン抗体により顕著な影響を受けた。以上の結果より、ホスホランバンによるATPaseの促進効果は、蛋白質-蛋白質相互反応を介しており、抗ホスホランバン単クローン抗体は、かかる相互作用に影響すると考えられる。

【総括】

本研究は、心筋小胞体CaポンプATPase及び Ca^{2+} 取り込みの定常状態反応が抗ホスホランバン単クローン抗体の添加により著明に促進され、その結果CaポンプATPaseの Ca^{2+} に対する親和性が増加することを示した。かかる促進効果は、CaポンプATPaseのターンオーバー速度の促進によりもたらされたと考えられた。さらに、前定常状態反応の解析により、CaポンプATPase反応の律速段階である E_2 から E_1 状態への反応が、抗ホスホランバン単クローン抗体により促進されることを示した。

今回の結果は、抗ホスホランバン単クローン抗体が、ホスホランバンとCaポンプATPaseとの蛋白質間相互作用に影響を及ぼした可能性を示唆する。すなわち、抗ホスホランバン単クローン抗体のエピトープ領域近傍がCaポンプATPaseとの相互作用に重要な役割を果たしており、抗体の結合によりCaポンプATPaseとの間に立体的に大きな隔たりが生じることとなり、ホスホランバンのCaポンプATPase活性阻害作用が解除（脱抑制）された結果、CaポンプATPase活性が促進したと考えられる。

論文審査の結果の要旨

心筋小胞体のCa輸送調節機構は、心筋の興奮収縮連関において心筋収縮・弛緩特性の両方を規定するとともに、 β 受容体刺激による強心作用発現にもあずかっており、心機能調節の上で大変重要な因子である。本論文は、心筋小胞体のCa輸送調節系蛋白質における蛋白質間相互作用を、モノクローナル抗体という特異的蛋白質の存在下に酵素反応速度論的手法を用いて詳細に検討し、Ca輸送調節メカニズムについての構造・機能連関の解明に新しい方向を示したうえで意義深いものであり、学位の授与に値すると考える。