

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	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39651
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">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

# Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

-[9]-

 まま
 ひがし
 まさ
 あき

 氏
 名
 大
 東
 正
 明

博士の専攻分野の名称 博 士 ( 医 学 )

学位記番号 第 11989 号

学位授与年月日 平成7年5月16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

(主査)

論 文 審 査 委 員 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 依存性の燐酸化を受けることにより心筋小胞体への能動的  $Ca^2$ ・輸送を促進し、 $\beta$  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 依存性燐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I 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の燐酸化部位(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】

<u>抗ホスホランバン単クローン抗体による前処置</u>: 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  $Ca^2$  \* 取り込み活性測定:Ca / EGTA 緩衝液により,0.1 から  $25~\mu$  M の  $Ca^2$  \* 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  $Ca^2$  \* 取り込み活性は,ATP, $^4$   $Ca^2$  \* および oxalate 存在下に,ミリポアフィルター瀘過法にて行った。

その結果、Ca ポンプ ATPase 活性および  $Ca^{2+}$  取り込み活性の促進が、より低い  $Ca^{2+}$  濃度において認められ、Ca ポンプ ATPase の  $Ca^{2+}$  に対する親和性の増加( $Kc_a=1.24$  から  $0.62~\mu$  M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燐酸化された場合よりも大きいこと、抗体と燐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,Ca² \*に低親和性の E₂ 状態より,Ca² \* に高親和性の E₁ 状態を経て,燐酸化中間体(EP)を形成すると考えられている。この際,Ca² \* と EGTA の初期濃度によって,燐酸化反応を E₁ あるいは E₂ 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,E₂ 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,E₁ 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 E₂ から E₁ 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ると考えられた。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、 B 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。