

Title	クモ毒由来新規ペプチド $\omega$ -Agatoxin-TKの構造ならびに $\omega$ -Agatoxin-TK感受性カルシウムチャネルの電気生理学的特性に関する研究
Author(s)	寺本, 哲之
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40428">https://hdl.handle.net/11094/40428</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"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	寺本哲之
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第13267号
学位授与年月日	平成9年3月25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	クモ毒由来新規ペプチド $\omega$ -Agatoxin-TKの構造ならびに $\omega$ -Agatoxin-TK感受性カルシウムチャネルの電気生理学的特性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範  (副査) 教授 馬場 明道    教授 前田 正知    教授 東 純一

## 論文内容の要旨

電位依存性カルシウムチャネル( $Ca^{2+}$ チャネル)は、電気生理学および薬理学的性質に基づいて6種類のサブタイプ(T, L, N, P, Q, Rタイプ)に分類され、個々のサブタイプとその生理機能との連関が明らかにされつつある。近年、小脳のPurkinje細胞において同定されたPタイプ $Ca^{2+}$ チャネルは、ジョウゴグモの毒液由来のペプチドである $\omega$ -agatoxin IVA( $\omega$ -Aga-IVA)により選択的に阻害されること、またこのペプチドは高濃度KC1により誘発されるラット脳シナプトソームからのグルタミン酸の遊離を抑制することが報告された。しかし、グルタミン酸の遊離は比較的高濃度の $\omega$ -Aga-IVAによってのみ抑制されたこと、ならびに小脳顆粒細胞において $\omega$ -Aga-IVAに対する感受性がPタイプよりも低い、Qタイプチャネルが存在したことから、グルタミン酸の遊離にはQタイプが関与する可能性が示唆された。本研究はグルタミン酸作動性の中枢神経細胞において、 $\omega$ -agatoxin感受性を示す電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルの電気生理学的特性ならびにそのシナプス伝達への関与を明らかにすることを目的とした。

私はジョウゴグモの毒液から、Pタイプチャネルを選択的に阻害する新規ペプチド $\omega$ -agatoxin-TK( $\omega$ -Aga-TK)を発見した。 $\omega$ -Aga-TKは、 $\omega$ -Aga-IVAと同様に48アミノ酸残基からなるペプチドであり、4つのジスルフィド結合により密に折り畳まれた部分と、12残基のアミノ酸からなるC末端部分からできていた。また、 $\omega$ -Aga-TKは $\omega$ -Aga-IVAと71%のアミノ酸配列相同性を示し、Pタイプチャネル阻害活性も同等であった。一方、 $\omega$ -Aga-TKの毒液中の含量は $\omega$ -Aga-IVAに比べて12倍多く、薬理学的ツールとしてより有用であった。

次に $\omega$ -Aga-TKのペプチド合成を行った。その結果、合成した $\omega$ -Aga-TKは天然の $\omega$ -Aga-TKに比べて、Pタイプチャネル阻害活性が1/55に減弱した。詳細な構造検討の結果、天然の $\omega$ -Aga-TKは46残基位置にD-Serを含有することが判明した。また、合成および天然ペプチドにおいてV8プロテアーゼによるGlu<sup>43</sup>-Gly<sup>44</sup>結合の切断の受け易さに差があったこと、および理論的立体配座解析により両ペプチドのSer<sup>46</sup>-Ala<sup>48</sup>残基が異なった配向を取ったことから、合成および天然ペプチドのC末端領域、特にSer<sup>46</sup>残基周辺の立体配座は異なることが示唆された。さらに、 $\omega$ -Aga-TKのC末端領域を除去したペプチド(1-43残基)およびC末端ペプチド(44-48残基)は、いずれもPタイプチャネル阻害活性を示さなかったことから、D-Ser<sup>46</sup>残基を含むC末端領域、およびジスルフィド結合により密に折り畳まれた部位の両方が同一分子内に存在することが、活性発現に必須であることが示唆された。このように $\omega$ -Aga-TKは、クモから最初に発見されたD-アミノ酸を含有する生理活性ペプチドであり、しかも

D-アミノ酸であることが活性発現において重要であるという極めてユニークな構造特性を持つことが明らかとなった。

$\omega$ -Aga-TKを薬理的ツールとして用いパッチクランプ法を適用して、PタイプおよびQタイプチャンネルの相違について検討した。本研究ではPタイプは培養ラット小脳Purkinje細胞のPタイプを、QタイプはBHKBI 147細胞に安定発現したBIチャンネルを指標とした。その結果、Qタイプ $Ca^{2+}$ 電流はPタイプに比べて、 $\omega$ -Aga-TKに対する感受性が低く、不活性化速度が速く、 $\omega$ -Aga-TK除去後の電流の回復性が速いことが分かり、これら3種のクライテリアに基づいて両チャンネルを区別できた。特に、 $\omega$ -Aga-TK除去後の電流の回復性の違いに基づいて両チャンネルを区別する場合には、 $\omega$ -Aga-TKの方が $\omega$ -Aga-IVAに比べてより有用であった。

次に、中枢神経系の主要なグルタミン酸作動性神経として培養ラット海馬および大脳皮質神経細胞を用い、上記のクライテリアに基づき細胞体に存在する $Ca^{2+}$ チャンネルの分類を行った。その結果、海馬および大脳皮質神経細胞には $\omega$ -Aga-TKに対する感受性の高いPタイプチャンネルの他に、 $\omega$ -Aga-TKに対して低い感受性を示すQタイプ様チャンネルが存在すること、さらにQタイプ様チャンネルの不活性化速度は海馬および大脳皮質神経細胞において異なることが明らかとなった。海馬神経細胞に存在した不活性化速度の速いチャンネルを $Q_T$ タイプ (Transient Q channel) と分類し、大脳皮質神経細胞に存在した不活性化速度の遅いチャンネルを $Q_L$ タイプ (Long-lasting Q channel) と分類した。

また、培養ラット海馬および大脳皮質神経細胞においてグルタミン酸を介したシナプス伝達に關与する $Ca^{2+}$ チャンネルが、PタイプあるいはQタイプのどちらに相当するのかを明らかにするために、自発的に発生する興奮性シナプス後電流の頻度に対する $\omega$ -Aga-TKの影響について検討した。その結果、海馬神経細胞のシナプス伝達においては主にQタイプ様チャンネル ( $Q_T$ タイプ) が關与するのに対して、大脳皮質神経細胞のシナプス伝達においてはPタイプおよびQタイプ様チャンネル ( $Q_L$ タイプ) の双方が共に關与することが示唆された。このように、中枢神経細胞に存在する $\omega$ -Aga-TK感受性 $Ca^{2+}$ チャンネルには多様性が存在すること、またグルタミン酸を介したシナプス伝達に關与する $\omega$ -Aga-TK感受性 $Ca^{2+}$ チャンネルのサブタイプは、海馬および大脳皮質において異なることが明らかとなった。

さらに、グルタミン酸を介したシナプス伝達に關与する電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルのサブタイプ間の寄与度の違いを明らかにするために、ラット海馬スライスのCA3領域からCA1領域への興奮性シナプス後電位に対するLタイプ、Nタイプ阻害剤の作用を調べ、 $\omega$ -Aga-TKの作用と比較した。その結果シナプス伝達には、PタイプおよびLタイプチャンネルは關与せず、NタイプおよびQタイプ様チャンネルの双方が關与したが、Qタイプ様チャンネルの寄与度の方が大きいことが明らかとなった。

以上の知見は、中枢神経系において電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルには多様性が存在すること、およびシナプスにおいて神経伝達物質の遊離を制御する電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルもまた、脳の部位により多様であることを理解する上で非常に重要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

1992年にAdams等は、Pタイプのカルシウムチャンネルを強力かつ選択的に阻害する48個のアミノ酸残基からなるペプチド $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -Aga-IVA) をジョウゴグモの毒液から単離した。このペプチドは、ラット脳シナプトソームからの高濃度KC1により誘発されるグルタミン酸の遊離を抑制させる。グルタミン酸は中枢神経系において興奮性伝達物質として働いており、記憶・学習などの高次神経機能と密接に関連している事が知られている。著者らは、Pタイプチャンネルの中枢神経系における生理機能を解明すべく種々の検討を行い、その一貫として $\omega$ -Aga-IVAをクモ毒液から単離・精製する過程で、 $\omega$ -Aga-IVAと同様にPタイプチャンネルを強力かつ選択的に阻害する新規ペプチドを発見し、発見地である筑波にちなみ $\omega$ -agatoxin Tsukuba ( $\omega$ -Aga-TK) と命名した。さらに、 $\omega$ -Aga-TKのユニークな構造特性、および $\omega$ -Aga-TKに感受性をしめす $Ca^{2+}$ チャンネルの電気生理学的特性について種々の検討を行い、以下に述べる結果が得られた。

- 1) ラット小脳Purkinje 細胞のPタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルを選択的に阻害する48個のアミノ酸残基からなる新規ペプチド $\omega$ -Aga-TKをジョウゴグモの毒液から単離した。
- 2)  $\omega$ -Aga-TKは46残基位置にD-Serを含有しており、そのD-Serを含むC末端領域および、ジスルフィド結合により密に折り畳まれた部位とが分子内にも存在する事が、Pタイプチャンネルの阻害活性を発現するために必須である事を明らかにした。
- 3) 培養ラット海馬および大脳皮質神経細胞には、 $\omega$ -Aga-TKに対する親和性の高いPタイプCa<sup>2+</sup>チャンネルの他に、 $\omega$ -Aga-TKに低い親和性を示すQタイプ様チャンネルが存在し、さらにQタイプ様チャンネルは両神経細胞において、不活性化速度が異なる事を明らかにした。
- 4) グルタミン酸を介したシナプス伝達に關与する $\omega$ -Aga-TK感受性Ca<sup>2+</sup>チャンネルのサブタイプならびにその寄与度は、培養海馬および大脳皮質神経細胞では異なる事を明らかにした。
- 5) ラット海馬スライスのCA3からCA1へのグルタミン酸を介したシナプス伝達において、LタイプおよびPタイプチャンネルは關与せず、NタイプおよびQタイプ様チャンネルの双方が關与するが、シナプス伝達への寄与度はQタイプ様チャンネルの方が大きい事を明らかにした。

以上の知見は、中枢神経系において電位依存性Ca<sup>2+</sup>には多様性が存在する事、またシナプスにおいて神経伝達物質の遊離を抑制するCa<sup>2+</sup>チャンネルは、ある特殊なサブタイプに限られている事を理解する上で非常に重要なものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。