

Title	骨格筋興奮収縮連関を制御する内在性因子の研究
Author(s)	山口, 直宏
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41488
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山 口 直 宏 <small>やま ぐち なお ひろ</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 4 7 6 1 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学研究科物理系専攻
学位論文名	骨格筋興奮収縮連関を制御する内在性因子の研究
論文審査委員	(主査) 教授 葛西 道生 (副査) 教授 柳田 敏雄 教授 村上 富士夫

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋興奮収縮連関におけるT管と筋小胞体(SR)との間での信号伝達機構やSRからのCa²⁺放出機構は明らかではない。本研究ではこの信号伝達機構を内在性因子間のチェインリアクションとして捉えるために、因子の同定とその役割の解析を行った。

SRCa²⁺チャンネルはスチルベン誘導体のDIDSにより活性化され、その結合因子はSRの30kDaタンパク質(30k)であった。30k周辺での分子構築を生化学的に調べた結果、30kはカルセケストリン(CSQ)、ジャンクチンといったチャンネル制御因子と複合体を成してSRCa²⁺チャンネルを制御していると考えられた。30kの部分アミノ酸配列はミトコンドリアのADP/ATP交換輸送体(AAT)とほぼ同一であった。マーカー酵素アッセイと抗体反応より、この30kはミトコンドリアの混在ではなく、確かにSRに存在することがわかった。また、AATの抗体や阻害剤のアトラクチロシドがSRCa²⁺チャンネル活性に影響を及ぼすことから、このタンパク質の興奮収縮連関における重要性が確認できた。最後に、ウサギ骨格筋AATのcDNAのクローン化に成功し、発現させたAATはCSQと結合した。以上のことから、30kとAATはおそらく同一であると考えられた。

上記とは別に、興奮収縮連関における内在性因子の役割を調べるための系を確立した。骨格筋からT管とSRが結合した膜複合体を調整し、T管に脱分極刺激を与えたときのSRからのCa²⁺放出(DICR)を測定した。DICRは2成分から成り、速度解析より速い成分はSR内の局所的なCa²⁺プールにより制御されることが示唆された。次に、他の組織でCa²⁺動員を引き起こす細胞内メッセンジャーの効果を調べた。cyclic ADP-ribose(cADPR)とIP₃は、脱分極刺激下でCa²⁺放出量を増大させたが、カフェインによるCa²⁺放出はcADPRのみが増強を起こした。つまりcADPRとIP₃はどちらもチャンネルをより開きやすくさせるが、その作用点は異なると考えられた。更に、cADPRはカルモジュリンとの協同的な制御であることがわかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

脊椎動物の骨格筋では、運動神経からの刺激によって筋細胞膜が興奮し活動電位が筋細胞の横行細管(T管)に伝えられ、T管膜が興奮すると、それに対峙する筋小胞体(SR)からCa²⁺が筋細胞質内に放出され、このCa²⁺によ

て筋収縮が起こる。このT管膜の興奮がSR膜に伝えられる過程を興奮収縮連関と呼ぶが、その分子機構については、T管に存在するDHP受容体が活性化されると、アロステリックな相互作用によってSR膜に存在するryanodine受容体というSRCa²⁺チャンネルからCa²⁺が放出されることが解っているが、不明な点が多い。近年、その制御に種々の内在性因子が関与することが示唆されてきた。本論文はそのような内容性因子の同定と機能の解析を行ったものである。

先ず、SRCa²⁺チャンネルはスチルベンの誘導体のDIDSによって活性化されるが、その結合因子はSRの30kDaタンパク質(30k)であることを明かにした。次いで、この30k付近の分子構築を生化学的に調べた結果、30kはカルセケストリン(CSQ)、ジャンクチンといった制御因子と複合体を成してSRCa²⁺チャンネルを制御していることを明らかにした。更に、この30kのアミノ酸配列を調べたところミトコンドリアのADP/ATP交換輸送体(AAT)とほぼ同じであった。しかし、マーカー酵素アッセイによってこのタンパク質はミトコンドリアの混在ではなく、確かにSRにこのタンパク質が存在すること示した。また、AATの抗体や阻害剤であるアトラクチロシドがSRCa²⁺チャンネル活性に影響を及ぼすことを示した。更に、ウサギ骨格筋のAATのクローン化に成功し、大腸菌で発現させたところ、発現したAATはCSQと結合することを示した。これらのことから、AATと同じタンパク質が2つの機能を持っている可能性を示唆した。

これとは別に、興奮収縮連関における内在性因子の役割を試験管内で調べるための系を確立した。すなわち、骨格筋からT管とSRが結合した膜複合体を調整し、イオン置換によってT管膜を興奮させたときにSRからのCa²⁺放出(DICR)を測ることに成功した。その結果、DICRには2成分があり、速い成分はSR内の局所的なCa²⁺プールによって制御されていることを示唆する結果を得た。この系を用いて、cyclic ADP-ribose, IP₃, カルモジュリンによる制御機構を明らかにした。

以上のように、本論文は興奮収縮連関に関与する内在性分子の検索において新しい分子の発見、更にそれらの機能の測定法を確立したもので、分子生理学の分野に重要な知見を与えるものであり、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。