

学 位 論 文 題 名

心筋 Ca チャンネル及び Ca 放出チャンネルの  
機能部位構造に関する研究

学位論文内容の要旨

心臓は生まれてから死ぬまでたゆまず収縮・弛緩を続ける臓器である。心筋の収縮弛緩は生体内情報伝達物質である  $\text{Ca}^{2+}$  の周期的動員除去によっている。この  $\text{Ca}^{2+}$  の動員では形質膜の脱分極が起こってから細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストア筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されるまでの間が主要な経路である。この過程で重要な役割を果たしている分子が形質膜の電位依存性 Ca チャンネルと筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 放出チャンネルである。

本研究において筆者は、 $\text{Ca}^{2+}$  動員に主要な二つの分子について心筋のものに焦点をあて、その分子構造や機能構造部位について調べた。その概要を以下に示す。

まず心筋電位依存性 Ca チャンネルのサブユニット構成を調べ、その分子性状を明らかにした。心筋電位依存性 Ca チャンネルを構成するサブユニットコンポーネントは基本的には骨格筋チャンネルと同様、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 5 種類のサブユニットから構成されるが、骨格筋に比べかなりヘテロな複合体を形成していた。これらどのサブユニットもプロテインチナーゼ A (PKA) によってリン酸化されなかったことから、心筋細胞に PKA を注入したとき観察される L 型 Ca 電流の顕著な増大は、PKA によるチャンネルタンパクの直接リン酸化を介さないで起こっている可能性が示唆された。

第 2 に代表的 Ca 拮抗薬 1, 4-ジヒドロピリジン (DHP) の結合部位を光アフィニティーラベル法にて Ca チャンネル  $\alpha 1$  サブユニット上 2 ヶ所の部分を心筋では初めて同定した。それらは骨格筋チャンネル上の DHP 結合部位と対応するリピートⅢの S 5-S 6 リンカー部とリピートⅣの S 6 を含む領域であった。したがって両チャンネルの DHP 結合親和性の違いは結合部位構造中の所々にみられるアミノ酸置換によるものと考えられた。

第 3 に精製したリアノジン受容体をリボソームに組み込んだ再構成実験系を確立し、これを用いてリン酸化による機能変化を調べた。その結果、PKA、カルモジュリンキナーゼ (CaMK) によって受容体がリン酸化され、このとき Ca 放出チャンネルの開口確立が増大することを明らかにした。

かにした。PKA による活性化は電気生理学的実験からも確認できた。CaMK のみならず PKA によっても  $\text{Ca}^{2+}$  放出能が変化することを見いだした。

さらに、それぞれの蛋白質リン酸化酵素でリン酸化される部位をリアノジン重要の一次構造上で明らかにした。PKA は Ser2031 を、CaMK は Ser2809 をリン酸化していた。このリン酸化部位には E-F ハンド、カルモジュリン結合部位など活性調節部位が存在することから、リン酸化部位近傍はリアノジン受容体の機能調節上、重要な領域を構成していることが示唆された。また両リン酸化部位は一次構造上 700 残基以上もはなれているが、抗ペプチド抗体による解析から高次構造上で接近していると考えられた。

本研究においてポリアクリルアミドゲル電気泳動後の  $[^3\text{H}]$  標識ペプチドフラグメントを polyvinylidene difluoride に転写した後、imaging plate を用いるラジオルミノグラフィによって検出する手法を開発した。従来のフルオログラフィに比べ高感度かつ短時間でオートラジオグラフィが達成できた。

形質膜および筋小胞体 Ca チャンネルタンパク質の構造と機能について、上記のようないくつかの新しい知見を得ることができた。この結果を指標に今後さらにチャンネル機能と構造相関について site-directed mutagenesis などの遺伝子工学的研究により詳細な解析が行われるものと期待される。

## 学位論文審査の要旨

|     |     |         |
|-----|-----|---------|
| 主 査 | 教 授 | 野 村 靖 幸 |
| 副 査 | 教 授 | 栗 原 堅 三 |
| 副 査 | 助教授 | 中 山 仁   |
| 副 査 | 助教授 | 徳 光 幸 子 |

刺激を受けた筋細胞が最終的に細胞応答としての収縮へ到達する過程、いわゆる興奮-収縮連関では生体内情報伝達物質  $\text{Ca}^{2+}$  が深く関与しており、その詳細な分子構造の解明が重要な課題となっている。この細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員において重要な役割を担う分子が、形質膜の電位依存性 Ca チャンネルと筋小胞体の Ca 誘発性 Ca 放出チャンネル（＝リアノジン受容体）である。本研究は、同じ筋細胞ながら骨格筋に比べて研究が遅れている心筋の上記 2 つの Ca チャンネル分

子を取りあげ、分子構造と機能部位、および機能調節機構について主に生化学的手法によって検討し、以下のような新しい知見を得たものである。

(1)心筋 Ca チャンネルとサブユニット構成の分子性状：骨格筋の L 型 Ca チャンネルは十分に精製され、サブユニット構成も判明しているが、心筋の同チャンネルの構成については、cDNA の塩基配列から一次構造が解析された  $\alpha 1$  サブユニット以外にはよくわかっていなかった。申請者はブタ心筋 Ca チャンネル複合体を認識するが特異性が異なる 2 種類の抗体を用いて解析し、そのサブユニット構成を明らかにした。その結果、基本的には骨格筋のものと同様、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 5 種類のサブユニットで構築されるが、2 種類の  $\beta$  と 3 種類の  $\gamma$  が存在する。さらに  $\alpha 1$  には分子両のコンポーネントがジスルフィド結合した成分が 15–20% 存在するといったように、骨格筋に比べかなりヘテロな分子構築であることが判明した。さらにこの解析法を応用して従来判然としなかった問題、心筋 Ca チャンネルが直接 PKA でリン酸化されるか否かを検討し、その可能性は極めて低いことも示した。

(2)心筋 Ca チャンネルの結合部位：降圧薬、抗不整脈薬として臨床的にも汎用される代表的な Ca 拮抗薬 DHP 誘導体は、心筋 Ca チャンネルを一つの主要ターゲットとしているが、Ca チャンネル一次構造上どこに結合するのかは不明であった。申請者は [ $^3\text{H}$ ] diazepam を用いた光アフィニティラベル法によってブタ心筋 Ca チャンネルの  $\alpha 1$  サブユニットを特異的にラベルし、切断特異性の高いプロテアーゼ消化した後、ラベルペプチド断片をチャンネルタンパクの上の特定の一次構造を特異的に認識する種々の抗ペプチド抗体で探索した。その結果、主要ラベル部位はリピートⅢの S 5–S 6 リンカー部分とリピートⅣ S 6 を含む部分の 2 箇所であると特定でき、心筋 Ca チャンネル上の DHP 結合部位を初めて同定した。その 2 箇所は、既に同定されている骨格筋チャンネルと対応する部位であったことから、両者の比較により、結合部位を構成するアミノ酸の多少の違いが両チャンネルの DHP に対する結合親和性の違いをもたらすとの考察ができた。

(3)リアノジン受容体のリン酸化による活性調節：ブタ心筋から精製したリアノジン受容体をリポソームに埋め込む再構成系を確立した。この経緯において受容体を 2 種のプロテインキナーゼでリン酸化した時の効果を  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  インフラックスアッセイと [ $^3\text{H}$ ] リアノジン結合で調べた。PKA、CaMK でも各々 30% の活性上昇がみられ、両酵素で処理すると相加的な活性上昇が認められた。平面膜法による単一チャンネル記録によりこの活性上昇はチャンネル開口確率の増大によることが明らかになった。

(4)リアノジン受容体リン酸化部位の同定：上記活性上昇をもたらすリン酸化部位を，リン酸化部位指向性抗体および単離した [ $^{32}\text{P}$ ] 標識ペプチドのアミノ酸配列分析によって解析した結果，PKA は Ser-2031 を，CaMK は Ser-2809 をそれぞれリン酸化していることを明らかにした。これらの部位近傍には  $\text{Ca}^{2+}$  結合サイトとみなされている E-F ハンド構造やカルモジュリン結合部位が認められ，さらに上記抗体を用いた実験から，2つのリン酸化部位は高次構造上で近接して存在することもわかった。したがって，同定したリン酸化部位近傍は本受容体機能に深く係る構造体が局在していることが示された。

以上のように，本研究は筋細胞の興奮-収縮関連機序の中でも Ca 動員に主要な役割を果たしている二つの分子，電位依存性 Ca チャンネルと Ca 放出チャンネルをとりあげ，前者ではそのサブユニット組成と DPH 結合部位を初めて同定し，また後者ではリン酸化によってチャンネル機能が上昇すること並びにそのリン酸化部位を明らかにする，といった成果を挙げた。ここで得られた新知見はこの分野の研究に資するものであり，博士（薬学）の学位を授与するに足る内容をもつものと認定した。