

# 論文要旨

A region of calpastatin domain L that reprimers cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels  
(心筋L型カルシウムチャネルの活性化に關与するカルパスタチンドメインL内の領域)

藪部 悦子

## 【序論および目的】

L型カルシウムチャネルの活性維持には、細胞内因子が必要であり、その一つにカルパスタチンがあげられる。カルパスタチンはカルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインの阻害蛋白で、その阻害作用はC末端側に位置し相同的な繰り返し配列からなるドメイン1-4に起因することが知られている。しかし、そのN末端側に位置し約150個のアミノ酸から成るドメインLの機能は長年不明のままであった。近年、我々はドメインLがカルシウムチャネル調節作用を持つことを見出した。また、ドメインLにはスプライシングによる種々のイソフォームが存在し、組織により発現が異なることが報告されている。そこで、本研究では、ドメインLのチャネル調節作用について、イソフォーム間の比較と活性領域の同定を試みた。

## 【材料および方法】

単離心筋細胞は、モルモット心臓にランゲンドルフ法によりコラゲナーゼを作用させて調整した。L型カルシウムチャネルの活動は、単離心室筋細胞にパッチクランプ法を適用して記録した (cell-attached mode と inside-out mode)。カルパスタチンドメインLのイソフォーム (TypeI、TypeII、TypeIII、および TypeIII $\Delta$ 3) は、GST 融合タンパクとして作成した。種々の断片ペプチドは、GST 融合タンパク (L3-148 [アミノ酸 3-148 番のペプチド、以下同じ]、L3-68、L57-148) または合成ペプチド (L17-36、L45-64、L54-64、L66-80、L78-85、L89-102、L103-122、L118-137) として作成した。各々の断片ペプチド (10  $\mu\text{M}$ ) を inside-out mode でチャネルに作用させ、cell-attached mode での開口確率と比較した。Inside-out mode でのチャネル活性測定には ATP が必須であるため、全ての電気生理実験は 3 mM ATP 存在下で行った。本研究は、鹿児島大学組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の承認を得て行った。

## 【結果】

ブタのカルパスタチンイソフォームは、同程度のチャネル活性効果を示し、ヒトのカルパスタチンドメインLの効果と同様であった。ヒトのカルパスタチンドメインL断片ペプチドにおいては、L3-68、L17-36、L66-80、L78-85、L89-102、L103-122、L118-137 は、inside-out mode におけるチャネル活性を対照 (2 mg/ml GST および 10  $\mu\text{M}$  BSA) と比し有意に上昇させなかった (cell-attached mode での開口確率の 8 %以下)。L3-148、L57-148、L45-64、

# 論文要旨

L54-64 は有意に高い効果を示した (cell-attached mode での開口確率の 10-14 %)。有意な効果を示したペプチドは、アミノ酸 54-64 番を含む点で共通していた。

## 【結論及び考察】

ブタのカルパスタチンイソフォームの効果を比較することにより、心筋 L 型カルシウムチャンネルの活性維持にはドメイン L が特異的な作用を持ち、またエクソン 3 からなる領域は重要ではないことが確認された。カルパスタチンイソフォームの組織特異的な発現が報告されていることから、イソフォームの局在と L 型カルシウムチャンネルの活性調節作用との関連が示唆される。ヒトカルパスタチンのドメイン L 断片ペプチドを検討した実験により、アミノ酸 54-64 番の領域が重要と判明した。この領域は動物種間において比較的保存されていることも判明した。断片ペプチドがチャンネル活性化作用を持つことは、カルパスタチンがプロテアーゼ等により断片化された場合でも、カルシウムチャンネルの活性調節に関与しうることを示し、病態生理学的にも興味あるものと思われる。

(Biochemical and Biophysical Research Communications 2006 年 掲載予定)

# 論文審査の要旨

報告番号	医研第 633 号	氏名	養部 悦子
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	中河 志朗	宮田 篤郎

## A region of calpastatin domain L that reprimers cardiac L-type $\text{Ca}^{2+}$ channels

(心筋 L 型カルシウムチャネルの活性化に関与するカルパスタチンドメイン L 内の領域)

カルパスタチンは、カルパイン ( $\text{Ca}^{2+}$ 依存性システインプロテアーゼ) の特異的阻害作用を持ち、臓器組織に普遍的に存在し、カルパイン-カルパスタチン系として、細胞骨格タンパク質や各種レセプターの限定分解、PKC の活性化、アポトーシス等、 $\text{Ca}^{2+}$  を媒体とした情報伝達系への関与が推測されている。カルパスタチンは、N 末端側から 150 アミノ酸からなるドメイン L、140 アミノ酸の相同性の高い 4 つの繰り返し構造であるドメイン 1-4 からなり、カルパイン阻害作用はドメイン 1-4 によることが知られている。一方、ドメイン L は心筋 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性を調節することが発見されたがその詳細は明らかでない。本研究は、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性維持に効果の高いカルパスタチン内の領域を検討するとともに、その作用機序について調べることを目的として行われた。

モルモット心室筋に発現している  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性をパッチクランプ法を用いて記録した。Cell-free 状態にしたチャネルに断片化したカルパスタチンを作用させ、その効果を比較した。

本研究で得られた知見は次の 5 点である。

1. カルパスタチンイソフォームとその断片ペプチドの実験結果から、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性維持にはドメイン L 内のエクソン 5 によりコードされる領域が重要であることが示唆された。
2. エクソン 5 によりコードされる領域は動物種間において比較的保存されていた。
3. カルパスタチンイソフォームの組織特異的な発現が報告されていることから、イソフォームの局在と  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性調節作用との関連が示唆された。
4. 断片ペプチドがチャネル活性化作用を持つことは、カルパスタチンがプロテアーゼ等により断片化された場合でも  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性調節に関与しうることを示し、病態生理学的にも興味あるものと思われる。
5. カルモジュリンとカルパスタチンを同時に付加した実験から、カルパスタチンがカルモジュリン同様、直接的に  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに作用することが示唆された。

本研究は、心筋 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの活性化にカルパスタチンが関与し、その作用にドメイン L の特定領域が重要であることを明らかにした。また、本研究は、カルパスタチンの新たな働きとして、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに直接的に作用してその活性を調節することを示した。これらの知見は、複雑な  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル調節機構の解明に寄与するものであり、ひいては心筋電気活動調節の解明に繋がるものである。よって、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 633 号	氏名	養部 悦子
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	中河 志朗	宮田 篤郎
<p>主査および副査の3名は、平成18年8月22日、学位請求者 養部悦子君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 実験に用いた心室筋細胞の種類をどのような方法により判別しましたか。心室筋の分類として刺激伝導系と固有心筋がありますが、それらを区別して実験に使用しましたか。</p> <p>(回答) 特に区別しませんでした。心室の細胞のほとんどは固有心筋細胞でごく一部が Purkinje 線維などの特殊心筋細胞であるので、実験に用いた単離細胞が特殊心筋細胞である割合は確率的に低いと考えられます。</p> <p>質問2) 特殊心筋である Purkinje 線維と固有心筋に発現している <math>Ca^{2+}</math>チャネルに違いはありますか。</p> <p>(回答) 発現しているチャネルの数に違いがありますが、個々のチャネルの性質は同じサブタイプであるので違いはないと考えられます。</p> <p>質問3) 心筋細胞に発現する <math>Ca^{2+}</math>チャネルは何種類ありますか。またそれらの <math>Ca^{2+}</math>チャネルに対するカルパスタチンの作用はありますか。</p> <p>(回答) L型とT型の電位依存性 <math>Ca^{2+}</math>チャネル、小胞体膜に在る <math>Ca^{2+}</math>放出チャネル (RyR2)、電位非依存性チャネル (TRP型) があります。実験に用いたL型 <math>Ca^{2+}</math>チャネル以外のチャネルに対するカルパスタチンの作用については分かっていません。</p> <p>質問4) モルモットの心筋細胞に対する効果をヒトとブタのカルパスタチンで検討していますが、モルモット、ブタ、ヒトのカルパスタチンのアミノ酸配列には違いがありますか。特に 54-64 番アミノ酸に違いがありますか。</p> <p>(回答) モルモットのカルパスタチン配列は報告がありませんが、既にクローニングされたヒト、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウスではドメインL全体で17%、54-64番アミノ酸配列の相同性は27%です。</p> <p>質問5) 生体内のATP濃度はどのくらいですか。</p> <p>(回答) 3-5 mMです。実験では3 mMを使用しました。</p> <p>質問6) 生体内のカルパスタチン濃度はどのくらいですか。</p> <p>(回答) 細胞膜直下と細胞質内では異なることが推測されますが、その生理的な濃度は分かりません。実験では10 <math>\mu</math>Mを使用しました。</p> <p>質問7) L3-68は54-64番アミノ酸を含むが、チャネル活性回復効果に関し、コントロールとして使った2 mg/ml BSA (Bovine serum albumin)や10 <math>\mu</math>M GST (Glutathione S-transferase) の効果と比較して有意差がない理由をどのように考えますか。</p> <p>(回答) 理由は不明です。実験の例数を増やすと、有意差のある値に落ち着くかもしれません。または、N末側の配列に抑制効果がある可能性があります。詳細については検討していません。</p> <p>質問8) 合成タンパクの純度検定をどのように行いましたか。切り離れたGSTが混入し、実験結果に影響</p>			

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 633 号	氏名	菘部 悦子
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	中河 志朗	宮田 篤郎

している可能性はありませんか。ゲル濾過や High performance liquid chromatography (HPLC)で純度をあげれば値が落ち着くかもしれません。

(回答) 正確な純度は測定していませんが、過去の full-size カルパスタチンの実験では高純度でも比較的大きなばらつきが報告されています。

質問 9) カルパスタチン断片ペプチドを高濃度で作用させた場合、活性回復効果は変化しますか。有意差を出すためには高濃度のほうが良いのではないですか。

(回答) 最大効果は 20-40%の活性回復であり、また、効果の高いペプチドは高濃度での効果に幅が出やすいので安定した回復効果が得られる 10  $\mu$ M を用いました。

質問 10) Full-size のカルパスタチンの効果はどのくらいですか。回復率が 100%にならない原因は別の細胞内因子に関係がありますか。

(回答) Full-size のカルパスタチンの効果は 30% 程度の回復率です。回復率を 100%にするためには、例えばカルモジュリンやカルモジュリン依存性キナーゼ II など他の活性化因子の相互作用が必要であると考えます。

質問 11) カルモジュリンとカルパスタチンの競合作用に関して、チャネルからカルモジュリンが離れることにより、run-down 現象がおきる可能性はありますか。

(回答) 可能性はあります。チャネルの同じ場所にカルパスタチンとカルモジュリンが結合する可能性を考えており、通常はカルモジュリンが多くのチャネルに結合していると推定されます。今後、結合実験などを行い検討する予定です。

質問 12) 骨格筋ではカルパインーカルパスタチン系がトランスポーターに作用し、グルコースの細胞への取り込みが促進されるという報告がありますが、同様に心筋細胞においても、グルコースの取り込みが進み細胞内の環境が改善されることから、間接的にチャネルの活性が上がるという可能性はありますか。

(回答) その可能性は否定できませんが、inside-out patch モードでは代謝の影響は無視できますので、カルパスタチンの直接作用のみが観察されたと思います。

質問 13) カルパスタチンが  $Ca^{2+}$ チャネルにどのように作用していると考えますか。

(回答) カルパスタチンがチャネルに結合し、その構造を変化させることが考えられます。カルモジュリンの例をあげると、チャネルの細胞内ドメインに複数の結合部位があり、結合の仕様によってチャネルの構造を活性型や不活性型に変化させるモデルが提唱されています。カルパスタチンとカルモジュリンとの結合は認められませんので、カルパスタチンもカルモジュリンと同様にチャネルに結合して構造変化を起こし、それによってチャネルの活性を調節していると考えます。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。