

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 250 号		学位申請者	楊 磊
審査委員	主査	桑木 共之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査	堀内 正久
	副査	栗原 崇	副査	柏谷 英樹

### Mechanisms underlying the modulation of L-type $\text{Ca}^{2+}$ channel by hydrogen peroxide in guinea pig ventricular myocytes

(モルモット心筋細胞における L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの過酸化水素による活性調節機構)

心筋の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは、心臓の歩調取りや収縮に中心的な働きをしているが、活性酸素種(ROS)によりその開口が修飾されることが知られている。このことは、細胞の酸化還元状態によるチャンネルの調節という観点から生理学的に重要であるが、同時に、心筋虚血などの際に産生される過剰な ROS が心筋障害や不整脈に関連しているため、病態生理学的にも重要である。しかし、ROS による L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活動の修飾機構については、不明の点が多い。そこで、本研究では、ROS の一種である過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) のモルモット心筋  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対する作用とその機序についてパッチクランプ法を用いて検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1.  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流は、cell-attached パッチ条件下で、細胞外より投与した 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  により有意に増大した。この促進作用は、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性蛋白キナーゼ II (CaMKII) の特異的阻害薬 KN-93 により一部抑制されたので、同作用には CaMKII 依存性と非依存性の両経路があると推察された。
2.  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル電流は、inside-out (cell-free) パッチ(カルモジュリン(CaM)と ATP 存在条件下)においても、 $\text{H}_2\text{O}_2$  により増大したが、KN-93 の抑制効果は認められなかった。これより、細胞質の無い inside-out パッチ条件下では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の CaMKII 依存性促進作用は消失し、非依存性作用のみが残ると考えられた。
3.  $\text{H}_2\text{O}_2$  で前処置した CaM には、非処置 CaM 以上のチャンネル活性化作用は認められなかった。この結果から、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の CaMKII 非依存性促進作用は、チャンネル蛋白の直接酸化による可能性が示唆された。
4. ROS の標的となるアミノ酸残基としてシステインとメチオニン残基が知られている。そこで、システイン残基の特異的酸化薬である DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) の作用を調べたところ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と同様の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル促進効果を示した。さらに、DTNB 作用後は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル促進効果が現れなくなったことから、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の作用は主にシステイン残基の酸化によることが示唆された。

以上の結果は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル促進作用には、これ迄知られていた CaMKII によるチャンネルリン酸化経路に加えて、チャンネル蛋白のシステイン残基を酸化する直接経路があることを示唆している。システイン残基の酸化は可逆的であるので、この経路は生理的な意義を持つ可能性があり、また、心筋虚血時の不整脈発生の一因ともなりうるため、病態生理学的にも重要と考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。