



Title	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
Author(s)	國安, 明彦
Citation	北海道大学. 博士(薬学) 甲第3196号
Issue Date	1993-03-25
DOI	10.11501/3092975
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/49871
Type	theses (doctoral)
File Information	000000265334.pdf



[Instructions for use](#)

①

心筋CaチャンネルおよびCa放出
チャンネルの機能部位構造に関する
研究

北大印刷 内 2084

國安 明彦

目次	- 1
略語表	- 3
序	- 5
第I章 心筋Caチャンネルの構造と分子性状	- 8
I-1 実験材料および実験方法	- 9
I-2 実験結果	-15
I-2-1 ブタ心筋Caチャンネルの四段階精製	-15
I-2-2 1,4-Dihydropyridine結合タンパク分子	-16
I-2-3 特異的抗体を用いたサブユニットコンポーネントの解析	-17
I-2-4 PKAリン酸化実験	-21
I-3 考察	-23
第II章 心筋Caチャンネルの1,4-dihydropyridine結合部位の同定	-28
II-1 実験材料と実験方法	-29
II-2 実験結果	-34
II-2-1 骨格筋と心筋チャンネルの1,4-dihydropyridine結合親和性	-34
II-2-2 [³ H]Diazipineによる心筋α1サブユニットの光アフィニティラベル	-35
II-2-3 [³ H]Diazipineラベルα1サブユニットの調製	-36
II-2-4 酵素消化	-36
II-2-5 部位特異的抗体によるラベルフラグメントの同定	-37
II-3 考察	-41
第III章 心筋リアノジン受容体のリン酸化と活性調節	-45
III-1 実験材料と実験方法	-46
III-2 実験結果	-50
III-2-1 心筋リアノジン受容体の精製とリボソームへの再構成	-50

III-2-2	再構成受容体の特性 (1) ⁴⁵ Ca ²⁺ influx測定	-50
III-2-3	再構成受容体の特性 (2)[³ H]Ryanodine結合	-52
III-2-4	PKAおよびCaMKによる再構成受容体のリン酸化	-53
III-2-5	リン酸化によるCaチャンネルの活性化 (1) ⁴⁵ Ca ²⁺ influx測定	-54
III-2-6	PKAリン酸化によるCaチャンネルの活性化 (2)平面膜法による単一チャンネルレコーディング	-56
III-2-7	リン酸化によるCaチャンネルの活性化 (3)[³ H]Ryanodine結合活性の変化	-57
III-3	考察	-59
第IV章 心筋リアノジン受容体のリン酸化部位の同定		-64
IV-1	実験材料と実験方法	-65
IV-2	実験結果と考察	-69
IV-2-1	心筋リアノジン受容体のリン酸化部位指向性ペプチド抗体の調製	-69
IV-2-2	リン酸化ペプチドマッピング	-71
IV-2-3	CaMKリン酸化部位の同定	-73
IV-2-4	PKAリン酸化受容体の調製	-74
IV-2-5	PKAリン酸化ペプチドの精製と同定	-74
IV-2-6	抗ペプチド抗体によるリン酸化阻害	-78
IV-2-7	リン酸化部位とチャンネル機能についての考察	-79
結語		-81
引用文献		-83
謝辞		-88

略語表

本論文において、以下の略語を使用した。

ABC	Avidin biotin complex
AP	Alkaline phosphatase
API	<i>Achromobacter lyticus</i> protease I
ATP	Adenosine 5' -triphosphate
Azidopine	2-(4-Azidobenzoyl)aminoethyl ethyl 2,6-didimethyl-4-(2-trifluoromethyl) phenyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
BCA	Bicinchoninic acid
Boc	<u>tert.</u> -Butoxylcarbonyl
BSA	Bovine serum albumin
BTZ	Benzothiazepine
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca/calmodulin-dependent kinase II
CBB	Coomassie brilliant blue
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid
CHO	Chinese hamster ovary
Diazipine	2-[4-(1-Azi-2,2,2-trifluoroethyl)benzoyl]amino ethylethyl 2,6-dimethyl-4-(2-trifluoromethyl) phenyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
DFP	Diisopropyl fluorophosphate
DHP	1,4-Dihydropyridine
DMF	N,N-Dimetylformamide
DT	Digitonin-Tris
DTT	Dithiothreitol
EDTA	[Ethyleneglycol-bis-(2-amino-ethylester)]tetraacetic acid
EGTA	[Ethylenebis(oxyethylenitrilo)]tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FCA	Freund's complete adjuvant
FIA	Freund's incomplete adjuvant
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamine
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperidineethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HRPO	Horseradish peroxidase

IgG	Immunoglobulin G
IP	Imaging plate
IP ₃	D- <u>myo</u> -Inositol 1,4,5-trisphosphate
NEM	N-Ethylmaleimide
MBS	<u>m</u> -Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester
PAA	Phenylalkylamine
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate buffer saline
PC	L- α -Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyethylene glycol
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Protein kinase C
PKG	cGMP-dependent protein kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PN200-110	Isopropyl methyl 4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PS	Phosphatidylserine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RR	Ruthenium Red
SDS	Sodium dodecylsulfate
TBS	Tris-buffered saline
TFA	Trifluoroacetic acid
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tricine	N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine
T-tubules	Transverse tubules
V8	<u>Staphylococcus aureus</u> V8
WGA	Wheat germ agglutinin

序

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 Ca^{2+} の周期的動員除去によっている。この Ca^{2+} の動員では、形質膜の脱分極が起こってから細胞内 Ca^{2+} ストア筋小胞体より 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(=リアノジン受容体)である。この二つの分子のカップリング様式は、心筋と骨格筋ではいくつかの点で異なっている。骨格筋ではCaチャンネルとリアノジン受容体は、直接カップルしており、前者は電位センサー(49)として働き後者に刺激を伝搬させる。一方、心筋では、形質膜が脱分極することによってCaチャンネルを介した細胞外 Ca^{2+} の流入がまず起こる。この Ca^{2+} がリアノジン受容体を刺激し、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が起きる(67)。したがって、心筋では Ca^{2+} そのものが Ca^{2+} 放出のトリガーとなる点で骨格筋と異なっている。

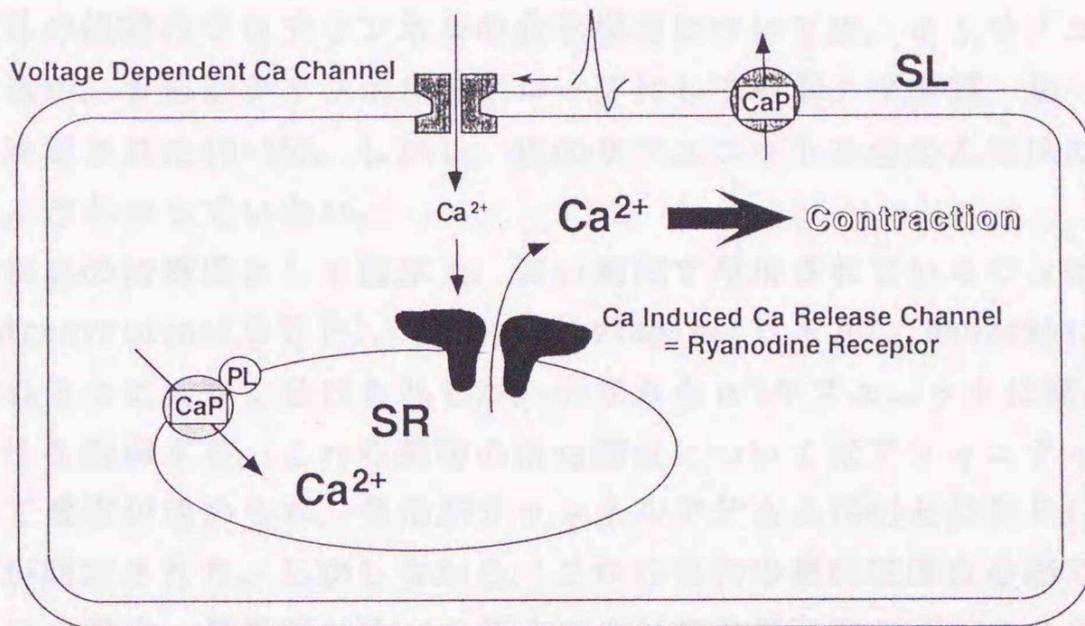


図1、心筋細胞での Ca^{2+} 動員と除去

細胞内 Ca^{2+} 動員は、形質膜Caチャンネルを介する Ca^{2+} 流入が引金となって、リアノジン受容体を開口させ筋小胞体から大きな Ca^{2+} 放出が起こることによる。

一方、細胞内 Ca^{2+} の除去は、筋小胞体と形質膜の Ca^{2+} ポンプによって速やかに行われる。

SL;形質膜、SR;筋小胞体、CaP;Caポンプ、PL;ホスホランバン

電位依存性Caチャンネルは、心筋や骨格筋以外の興奮性細胞にも広く存在し、細胞応答に重要な役割を果たしている。電気生理学的、薬理学的性質の違いから区別され、少なくともL, N, T, P型の4つに分類されている(1, 2, 3)。このうち筋収縮に重要な役割を担うL型チャンネルの研究は、特異的アンタゴニストがあることから最も進んでいる。骨格筋Caチャンネルの分子構造は生化学的研究により $\alpha 1$ (155-200 kDa), $\alpha 2$ (130-150 kDa), β (52-65 kDa), γ (30-35 kDa), δ (30-35 kDa)の5つのサブユニットから構成されていると考えられている(3, 4)。cDNAクローニングにより骨格筋では、全てのサブユニットについてその一次構造が明らかとなった(5, 6, 7, 8)。 $\alpha 1$ サブユニットはCaアンタゴニストの受容体であり、 Ca^{2+} 透過口を形成している主要なコンポーネントである。一次構造上四つの繰り返し構造(リピートI-IV)があり、それぞれ α ヘリックス構造をとると考えられる6つの膜貫通領域(S1-S6)を有する。アミノおよびカルボキシ末端は、膜の細胞質側に存在すると推定されている。一方、 $\alpha 2$ は糖タンパク質で、ジスルフィド結合を介し δ と複合体を形成している。遺伝子工学的研究により、 $\alpha 1$ サブユニットと骨格筋の $\alpha 2$ 、 β 、 γ をともに発現させるとチャンネル機能が増大することもわかってきた(37, 38, 39)。骨格筋以外の組織のCaチャンネルの分子構造については、 $\alpha 1$ サブユニットの一次構造が、骨格筋チャンネルをプローブにして心筋、平滑筋、脳、膵臓 β 細胞でも決定された(9-15)。しかし、他のサブユニットを含めた全体の分子構造はほとんどわかっていない。

循環器疾患の治療薬として临床上、高い頻度で使用されているCa拮抗薬は1,4-dihydropyridine(DHP)、phenylalkylamine(PAA)、benzothiazepine(BTZ)の3つに大きく分けられるが、いずれも $\alpha 1$ サブユニットに結合しチャンネル活性を制御する。これら薬物の結合部位について光アフィニティラベル法によって検索が進められ、骨格筋チャンネルでPAA(44)とDHP(45, 46)の結合部位が同定された。しかしながら、これら薬物の標的組織は心筋であることやDHPの場合、骨格筋に比べ心筋のほうが結合親和性が高いことなどから、心筋チャンネルの薬物結合部位の同定は、基礎的理解を深めるためにも、より優れた薬物の開発を目指す上からも重要な課題である。

心筋や骨格筋に β アドレナリン作働薬を作用させると、アデニル酸シクラーゼが活性化されてcAMPレベルが上昇し Ca^{2+} 電流が増大する(22, 23)。細胞内にcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の触媒サブユニットを注入すると、 Ca^{2+} 電流が増大することが知られている。逆にPKA阻害剤やホスファターゼを注入すると、cAMPの作用が抑制される。このことから、心筋および骨格筋Caチャンネルの機能調節には、PKAによるリン酸化反応が関与し

ていると考えられる。骨格筋チャンネルの場合には、精製チャンネルをPKAで処理すると、リン酸基の導入とチャンネル機能の活性化が観察されているが(41,42,43)、心筋ではリン酸化される基質タンパク質が見つかっておらず、その活性化機構については不明である。

Ca^{2+} 動員を担うもう一つの分子である筋小胞体Ca誘発性Ca放出チャンネルは、近年植物アルカロイド、ryanodineの受容体として骨格筋(52,53,54)と心筋(55,56,57)から精製され、cDNAクローニングによって一次構造も明らかとなった(78,79)。 Ca^{2+} 放出活性は、 μM オーダーの Ca^{2+} やmMオーダーのATPによって促進されるが、mMオーダーの Mg^{2+} 、 μM オーダーのルテニウムレッド(RR)やカルモジュリン(CaM)によって抑制される。これら活性調節因子による機能制御機構や機能部位についての研究は、電位依存性Caチャンネルの場合に比べかなり遅れている。心筋細胞では、 β アドレナリン刺激により筋収縮速度と張力の増大および弛緩速度の促進が観察される。この β アドレナリン刺激の効果は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増減速度の促進と細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、細胞内 Ca^{2+} トランジェントが変化したことで説明される。心筋リアノジン受容体は、実際にPKAでリン酸化されることが知られているが(60,61,62)、Caチャンネル活性がどう変化するかについては不明である。

本研究において筆者は、心筋における Ca^{2+} 動員に主要な役割を果たしている二つの分子;形質膜Caチャンネルと筋小胞体Ca放出チャンネルについて、その分子構造と機能構造部位について調べた。その概要を以下に記し、この順番で述べる。

第I章では、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。cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の基質となるか否かも調べた。

第II章では、代表的Ca拮抗薬1,4-dihydropyridineの結合部位を光アフィニティーラベル法によって同定し、骨格筋チャンネルやDHP非感受性チャンネルと比較し、DHP結合様式と結合部位構造について考察を加えた。

第III章では、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、カルモジュリンキナーゼ(CaMK)のみならずPKAによっても Ca^{2+} 放出能が変化することを見いだした。

第IV章では第III章をうけ、リアノジン受容体の両キナーゼによってリン酸化される部位の同定を行い、それらがチャンネル機能発現に重要であると考えられる部位の近傍に位置することを明らかにした。

興奮性細胞において電位依存性 Ca チャンネルは、多くの細胞応答を引き起こす上で重要な役割を担っている。電位依存性 Ca チャンネルは電気生理学および薬理学的特性から、少なくとも L, T, N, P 型と名づけられた 4 種のタイプに区別されている (1, 2, 3)。このうち L 型チャンネルは、Ca 拮抗薬 1, 4-dihydropyridine (DHP) が結合することから、この結合活性を指標に研究が進み、骨格筋において精製がなされ $\alpha 1, \alpha 2, \beta, \gamma, \delta$ の 5 つのサブユニットから構成されていることがわかった (図 2)。近年、遺伝子工学的手法により、 $\alpha 1$ をはじめとしてすべてのサブユニットの一次構造が決定された (5, 6, 7, 8)。また骨格筋の cDNA をプローブを用いて、心筋 (9), 平滑筋 (10), 脳 (11, 12, 13, 14), 膵臓 β 細胞 (15) の $\alpha 1$ サブユニットについても次々と明らかとなった。しかし、骨格筋以外の組織のチャンネルタンパク分子については、いくつかのグループによって精製が試みられているが未だ十分でなく、したがって、そのサブユニット構成を明確に示したという例はない (16, 17, 18)。免疫学的検索により心筋や脳においても $\alpha 2$ サブユニットが存在するといった報告 (19, 20) があるにすぎない。

電気生理学的研究により、心筋細胞内に cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の触媒サブユニットを注入すると、L 型 Ca^{2+} 電流が著明に増大することが観察されている (22, 23)。この Ca チャンネル活性化機構の一つとして、Ca チャンネルタンパク質が PKA により直接リン酸化されることによる可能性があげられている。しかし、Ca チャンネルタンパク分子が不明であるため、実際 PKA によってリン酸化を受けるのかについて明確に示した例はない。

本研究において、筆者はまず、特異的に Ca チャンネル複合体を免疫沈降しうる 2 つの抗体と DHP 誘導体による光アフィニティラベルによって心筋 Ca チャンネルの構成コンポーネントを明らかにした。続いて、この Ca チャンネルコンポーネントが PKA によってリン酸化をうけるかどうかについて調べ、骨格筋 Ca チャンネルにはみられない、いくつかの興味ある知見を得た。

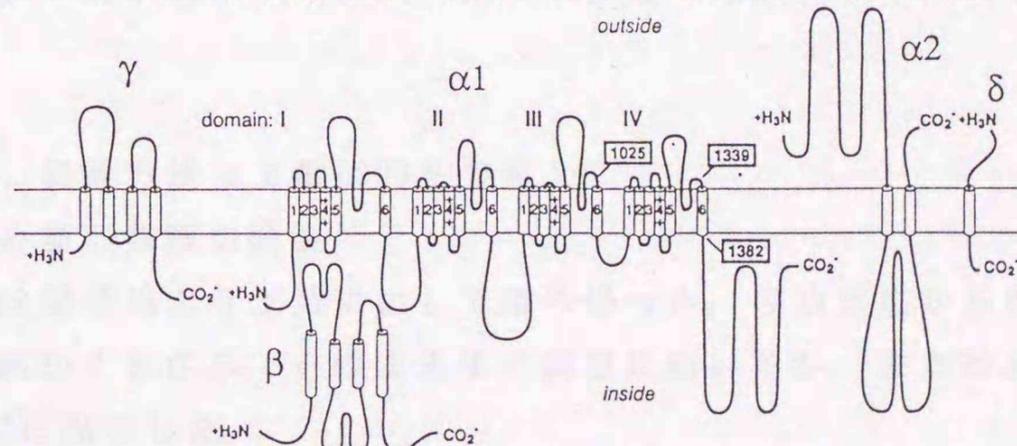


図 2、骨格筋 Ca チャンネルの構成コンポーネント (文献 3 より引用)

I - 1 実験材料と実験方法

I-1-1 実験材料

本章で用いた実験材料とその入手先は次の通りである。

(+)[³ H]PN200-110 (86 Ci/mmol)	(NEN)
[γ - ³² P]ATP (3,000 Ci/mmol)	(NEN)
[¹²⁵ I]Bolton-Hunter reagent (4,400 Ci/mmol)	(NEN)
[³ H]Diazipine (21 Ci/mmol)	当研究室において文献(48)にしたがい合成した
(±)PN200-110	Sandoz社から恵与された
MCC-1 (ハイブリドーマ上清)	新潟大学脳研、阿部輝雄助教授から恵与された
[¹²⁵ I]Protein A (57.7 mCi/mmol)	(ICN)
ウサギ抗マウスIgG	(Cappel)
ヤギ抗マウスIgG-Sepharose CL-4B	(Cappel)
Protein A-Sepharose CL-4B	(Pharmacia)
Catalytic subunit of PKA	(Sigma)
Heparin-agarose (Type II)	(Sigma)
Digitonin (生化学用)	(和光純薬)
GlcNAc	(Nacalai Tesque)
DTT	(Boehringer Mannheim Biochemica)
NEM	(東京化成)
ブタ心臓	(ホクレン, 江別市角山)
WGA-Sepharose 4B	WGA(Sigma)を2 mg/mlのタンパク濃度でTresyl-Sepharose 4Bに結合させた
SDS-PAGE高分子量マーカー	(Bio-Rad)

I - 1 - 2 実験方法 (文献(90)を参照)

(1) ブタ心筋形質膜の調製

ブタ心臓は屠殺場より氷詰めにして持ち帰った。左心室筋から脂肪と結合組織を除き、細かくきざみ、そのまますぐ調製に用いるか、または液体窒素で凍結し、-80°Cに保存した。

形質膜を多く含む膜画分の調製は、Jonesの方法(24)を多少改変して行った。

すべての操作は、4°Cで行った。改変した点は以下の3点である。1つ目は、調製操作中のタンパク質分解を防ぐために、すべてのbufferにタンパク質分解阻害薬(0.1 mM PMSF 0.1 mM benzamidine, 1 μg/ml leupeptin / pepstatin A / soybean trypsin inhibitor(STI))を添加した。第2に、ホモジナイザー遠心を繰り返した後の沈査をMedium IIで再懸濁し、ポリトロンホモジナイザー遠心で上清を得る操作を2回繰り返した(原法では1回)。この操作を繰り返すことで膜画分の結合活性、タンパク量の回収率はともに50%増大した。第3は、シヨ糖密度勾配遠心で得られる膜画分を懸濁するbufferを、0.25 M sucrose, 10 mM L-histidineから0.25 M sucrose, 25 mM Tris-HCl(pH 7.2)に代えた。

次に調製法の一例を示す。4個分のブタ心臓を細かくきざみ(540 g), 90 gずつ6等分した。各々に270 mlのMedium I(0.8 M NaCl, 10 mM L-histidine)を加え、ポリトロン PTA-36/2で肉片が部分的に残る程度の弱いホモジナイズをした(ダイアルセット 5, 5秒間)。ホモジネートを日立RPR9-2ローター 8,300 rpm, 20分間遠心して沈査を得、これにMedium Iを同量加え再懸濁して同じように遠心を行った。さらにMedium II(10 mM NaHCO₃, 5 mM L-histidine)で再懸濁し、同じ操作を繰り返しbuffer交換した。得られた沈査にMedium IIを270 ml加え、ポリトロンPTA-36/2で強いホモジナイズを行った(ダイアルセット 6, 30秒間、3回)。このホモジネートを日立RPR9-2ローターで 8,300 rpm, 20分間遠心した。上清は4層のガーゼを通してビーカーに回収し(上清①)、一方の沈査は再度、Medium IIを250 mlずつ加え、再懸濁した後、強いホモジナイズを行い、同様に遠心操作をした。これで得られた上清②を上清①と一緒にし、日立RP42ローターで30,000 rpm, 20分間遠心して沈査を得た(粗ミクロソーム画分)。これをガラステフロンホモジナイザーを用いて、1.0 M sucrose, SDG-buffer(0.1 M Tris-HCl, 50 mM sodium pyrophosphate, 0.3 M KCl(pH 7.2)) 200 mlに再懸濁した。この懸濁液(16 ml)の上層に、0.6 M sucrose, SDG-buffer(24 ml)と0.25 M sucrose, SDG-buffer(16 ml)を重層し、日立RP42ローターで36,000 rpm, 2.5時間、非連続シヨ糖密度勾配遠心分画を行った。遠心終了後、0.25 Mと0.6 M sucroseの白い界面を回収し、Medium Iで3倍希釈して105,000 X g_{max} 1時間遠心した。この沈査を0.25 M sucrose, 25 mM Tris-HCl(pH 7.4)で再懸濁した後、小分けして液体窒素で凍結し、使用するまで-80°Cで保存した。約540 gの左心室筋から膜タンパク質量として約80-130 mgの形質膜が得られた。

(2) (+) [³H]PN200-110プレラベル心筋Caチャンネルの可溶化

形質膜画分(100 mg, 150 pmol)を25mlの結合buffer(2 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4))中、10 nM (+) [³H]PN200-110と37°C, 1時間インキュベート

して、ブレラベルした。氷上で4°Cにした後、結合buffer 15 ml, 2.0 M NaCl 20 ml, 4%(w/v) digitonin 20 mlを順次加え、可溶化した(総容量80 ml, タンパク濃度 = 1.25 mg/ml, 界面活性剤/タンパク質の重量比 = 8, digitoninの終濃度 = 1%)。40分間、水中に静置後、105,000 X g_{max} , 45分間遠心して上清を得、メンブランフィルター(アクロディスク 0.22 μ m, Gelman)を通し、これをdigitonin-抽出画分(80 ml)とした。

(3) 四段階精製

Digitonin-抽出画分を0.5 M NaCl, DT-buffer(0.1% digitonin, 1 mM $CaCl_2$, 25 mM Tris-HCl(pH 7.4))であらかじめ平衡化しておいたWGA-Sepharose 4B (20 ml gel)にかけた。1時間循環させた後、ゲルを0.5 M NaCl, DT-buffer 50 ml、続いて0.1 M NaCl, DT-buffer 70 mlで洗った。溶出は、6% GlcNAc, 0.1 M NaCl, DT-bufferで行い、2 mlずつ分画した。各画分の(+)[3 H]PN200-110結合活性測定を行い、活性画分ピークを集めた(WGA-画分、20 ml)。次に、これを0.1 M NaCl, DT-bufferで平衡化したHeparin-agarose (1 ml)にかけて、30分間循環させた。0.1 M NaCl, DT-buffer 10 mlで洗った後、0.1-0.5 M NaClの直線濃度勾配(5 ml - 5 ml)で溶出させた。この活性画分を1st Heparin-画分とした。続いて、1st Heparin-画分(3 ml)を5-20%の直線濃度勾配のsucrose, 0.1 M NaCl, DT-bufferの上層にのせて、日立RP50VFパーティカルローターで50,000 rpm, 1.5時間遠心した。遠心終了後、チューブ上層から2 mlずつAutomatic liquid charger(アドバンティック)を用いて分画した。放射活性測定をし、その放射活性ピーク画分(8 ml)をSDG-画分とした。これを再度、Heparin-agaroseにかけ精製・濃縮を行った。この場合、0.5 M NaCl, DT-bufferによるバッチ法で溶出を行い、0.5 mlずつ分取した。この2nd Heparin-画分(1.8 ml)を心筋精製標品とした。

骨格筋Caチャンネルの精製はCurtisとCatteralの方法(89)で行った。

(4) 光アフィニティラベル

上記の(2)のように(+)[3 H]PN200-110と同じ条件で[3 H]diazipineを用いて形質膜画分にブレラベルした。これを1% digitoninで可溶化し、WGA-Sepharoseで精製した。WGA-画分(12 ml)をプラスチックディッシュ 2枚に移し、氷上に静置し、距離5 cm, Panasonic 20W Blue Black lampで20分間光照射した。この後、Heparin-agarose(1 ml)にかけ、0.5 M NaClで溶出を行い、精製・濃縮した。さらに、Centricon-100 (Amicon)を用い濃縮した。標品は5-20%ポリアクリルアミド濃度勾配ゲルを用いたSDS-PAGEを行い、CBB染色した後に、ゲルスライス法

によってラベルタンパク質を検出した。ゲルスライス法について簡単に記す。ゲルを各泳動レーン毎に3 mm幅でスライスし、ゲル片をガラスバイアルに移したのち、30% H₂O₂を750 μl加え、80°Cで約16時間インキュベートすることで溶解した。これにACS IIを9 ml加え、2時間放置後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

(5) 抗体の調製

抗P5抗体はII-1-2-(1)に示した方法で作成した。この章の実験には抗血清からprotein A-Sepharoseによって精製したIgG画分を用いた。

単クローン抗体MCC-1は、Hayakawaらにより調製されたハイブリーマの培養上清(21)を用いた。

(6) イムノブロット

ブタ心筋およびウサギ骨格筋精製標品を4-12%ゲルを用いたSDS-PAGEを行った。SDS-PAGE後、Nova Blot(LKB-Pharmacia)を用いてPVDF膜(Millipore)に定電流、0.4 mA/cm²、12時間、4°Cで電気泳動ブロットした。転写した膜を室温、30分間2% skim milk, TBS (10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl) でブロッキングし、TBS-Tween (0.1% Tween 20, TBS) で5分間、3回よく洗った。次にPVDF膜と抗P5抗体(1 μM IgG)またはMCC-1(ハイブリドーマ上清)をパラフィルム上で室温、2時間反応させた。反応後、PVDF膜をTBS-Tweenで5分間、3回洗い、続いてパラフィルム上で [¹²⁵I]protein A(7.0 X 10⁵ cpm/ml), TBS-Tweenと室温、30分間反応させた。この後、3回以上膜を洗い、風乾してからFuji New RX Filmと密着させて-80°Cで2日間、露出し、オートラジオグラフィーを行った。バンドの定量はQuick Scan (ヘレナ)で行った。なお、MCC-1の場合は、 [¹²⁵I]protein Aを反応させる前にウサギ抗マウスIgG(1/2000 希釈)と1時間反応させてから行った。

(7) 心筋精製標品の¹²⁵I 標識

心筋精製標品(5 pmolのDHP結合部位を含む)を0.1 M borate-NaOH(pH 8.4)に透析後、Centricon-100で濃縮した。濃縮溶液60 μlを [¹²⁵I]Bolton-Hunter reagent(250 μCi)と4°C、1.5時間ゆっくり回転混和させて反応させた(Bolton-Hunter reagentは窒素ガスを吹き付け、溶媒(benzene)を完全に除いてから用いた)。反応停止は1 M Tris-HCl(pH 8.0)を5 μl加え、氷中で30分間、インキュベートして行った。次に、この反応溶液を0.1 M NaCl, DT-bufferで平衡化したSephadex G-25 (11 ml)にかけて、標識タンパク質と試薬を分離した。溶出

画分の放射活性をガンマカウンターで測定し、最初に溶出されてくる放射活性画分 (^{125}I -標識タンパク質画分 (2.7×10^8 cpm, 4.2 ml)) を集め、小分けした後、液体窒素で凍結し、使用するまで -80°C に保存した。

(8) 放射標識 Ca チャンネルの免疫沈降

抗P5抗体の場合は4倍量の抗血清を protein A-Sepharose CL-4B と、MCC-1 の場合は等量の培養上清をヤギ抗マウス IgG-Sepharose 4B と 4°C , 2時間インキュベートした。それぞれゲルを氷冷した TBS で洗い、抗体ビーズとした。

抗体ビーズ (約 $50\text{--}80 \mu\text{l}$) を ^{125}I -標識標品 ($50 \mu\text{l}$) 又は ^{32}P -リン酸化標品 ($200 \mu\text{l}$) とエッペンドルフチューブ (1.5 ml 容) 中、 4°C , 3時間おだやかに回転混和して反応させた後、 1 ml の 0.2% digitonin, TBS で6回洗った。沈降した放射活性標識タンパク質の検出は、ビーズから SDS-sampling buffer で沈降物を抽出した後、SDS-PAGE にかき、オートラジオグラフィによって検出した。ビーズからの抽出は2倍濃度の SDS-sampling buffer を加え、 60°C , 10分間加温してから行った。

$[^3\text{H}]$ PN200-110 結合 Ca チャンネルの免疫沈降は各種濃度の IgG を protein A-Sepharose とインキュベートして抗体ビーズを作製し、これと心筋精製標品を反応させた。ビーズを直接バイアル瓶に移し、ACS II を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

(9) PKA によるリン酸化実験

精製 Ca チャンネル標品 ($1 \mu\text{g}$) を $80 \mu\text{l}$ の反応溶液 (TBS (pH 7.4), 0.05% digitonin, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 20 mM NaF, catalytic subunit of PKA (20 units), $10 \mu\text{M}$ [γ - ^{32}P]ATP (28 Ci/mmol)) 中、 30°C , 30分間リン酸化した。反応は ATP 添加で開始し、 $20 \mu\text{l}$ の $200 \mu\text{M}$ EDTA, 0.2% digitonin, TBS を加えて停止した。

形質膜画分 (1 mg) は $150 \mu\text{l}$ の反応溶液 (TBS (pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 20 mM NaF, $50 \mu\text{M}$ [γ - ^{32}P]ATP (9 Ci/mmol), catalytic subunit of PKA (500 units)) 中、 30°C , 10分間、リン酸化を行った。反応停止は $100 \mu\text{l}$ の 100 mM EDTA, 100 mM NaF と $100 \mu\text{l}$ の 170 mM Tris-HCl (pH 7.4) を加えて行った。免疫沈降実験には、これを I-1-2-(2) に記した様に可溶化してから用いた (可溶化上清は $800 \mu\text{l}$)。

(10) 結合活性測定

(+) $[^3\text{H}]$ PN200-110 は光分解しやすいため、実験は黄色の蛍光灯下で行った。

膜画分の結合活性測定は、GlossmannとFerryの方法(26)によって行った。膜画分(10~50 μg)を100 μl の結合buffer(2 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl(pH 7.4))中、各種濃度の(+)[^3H]PN200-110(86 Ci/mmol)とともに30°C,40分間インキュベートした。3 mlの氷冷したTBSを加え反応を停止した後、直ちにBrandel M-24を用いて急速濾過を行い、ガラスフィルター(Whatman GF/C)に膜片をトラップした。ガラスフィルターは3 mlのTBSで3回,すばやく洗った後、バイアル瓶に移した。0.1% Triton X-100 1 mlを加え1~2時間インキュベートして膜片を可溶化後、ACS II(Amersham)を9 ml加え液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。非特異的結合は、10 μM PN200-110存在下で同様の結合活性測定を行い求めた。

可溶化後の結合活性測定は、Takiら(27)にしたがい遠心ゲル濾過法で行った。

(11) タンパク質定量

膜画分は、Smithらの方法(28)にしたがいBCAタンパク質定量キット(Pierce)を用いて行った。膜画分を0.5 N NaOHで可溶化した後、アッセイ溶液を加えた。

可溶化標品は、Bradfordの方法(29)にしたがいprotein assay dye concentrate(Bio-Rad)を用いて行った。

(13) SDS-PAGE

Laemmliの系(30)を用いて行った。Sampling bufferは非還元条件下用に20 mM NEM、還元条件下用に20 mM DTTを含んだ2% SDS, 8 mM EDTA, 4% sucrose, 20 mM Tris-HCl(pH 7.6)を用いた。

分子量マーカーはhigh molecular weight protein standard(Bio-Rad)を用いた。

第 I 章 実験結果

I-2-1 ブタ心筋Caチャンネルの四段階精製

ブタ心筋形質膜画分を出発材料とし、1,4-dihydropyridine誘導体(+) [³H]PN 200-110の結合活性を指標に心筋Caチャンネルの精製を行った。ブタ心筋形質膜画分は(+) [³H]PN200-110の結合飽和実験から1つの高親和性DHP結合部位を持っていた ($K_d = 0.1 \text{ nM}$, $B_{\text{max}} = 1.5 \text{ pmol/mg}$)。心筋のDHP結合活性は可溶化後では失われてしまうことから、あらかじめ膜標品をプレラベルしてから可溶化した。こうして得られるDHP受容体複合体は、4°Cでは可溶化後も安定であり、その解離半減期は約10時間であると報告されている(16)。

1% Digitoninで可溶化すると、タンパク質として41%、受容体活性として27%が形質膜から抽出された。可溶化抽出後、Table 1 に示すように、小麦胚芽レクチン(WGA)-Sepharose, Heparin-agarose, ショ糖密度勾配遠心法, Heparin-agaroseの四段階法によって精製した。この方法によって、比活性は約230倍、上昇した。最終精製標品である2nd Heparin-agarose溶出画分の純度は、完全精製したとき得られる理論的的最大比活性2,700 pmol/mgから計算すると、約13%であった(理論的的最大比活性は心筋Caチャンネル複合体の分子量370 kDa(32)から求められた)。ただし、この純度は精製中、受容体から解離するリガンド量については考慮していない。

Table 1、ブタ心筋Caチャンネルの精製

ブタ心筋形質膜を10 nM (+) [³H]PN200-110でプレラベルしてから可溶化した。各値は平均値 ± S.D. (n = 3) 精製操作中のリガンドの解離は補正していない。

Purification step	Receptor pmol	%	Protein mg	Specific activity pmol / mg	Purification fold
Sarcolemmal membrane	150	100	100	1.5 ± 0.1	-
Digitonin extract	40.9	27.3	41.3	1.3 ± 0.1	0.9
WGA Sepharose	36.7	24.5	4.8	11.1 ± 3.1	7.4
Heparin agarose (1st)	22.4	14.9	0.545	49.8 ± 4.2	33.2
Sucrose gradient	14.1	9.4	0.051	251.0 ± 54.4	167.3
Heparin agarose (2nd)	8.7	5.8	0.026	345.2 ± 69.1	230.1

次にいくつかの精製段階の標品について、その中に含まれるポリペプチド鎖をSDS-PAGEにかけた後、銀染色を行い分析した(図3)。比較のためウサギ骨格筋Caチャンネルも示した。最終精製標品には、270 kDa, 190 kDa, 150 kDa, 100 kDaのバンドと50 kDa以下の多数のバンドが検出された。この中で270 kDa, 190 kDa, 150 kDa以下のいくつかのバンドは、段階が進むにしたがいenrichされてきた。DTT処理による還元条件下では270 kDaが消失し、数本の低分子バンドの染色が強調された。

骨格筋の精製標品では、 $\alpha 1$ (170 kDa), $\alpha 2$ (150 kDa), β (55 kDa), γ (35 kDa), δ (30 kDaと25 kDa)の5つのサブユニットが検出された。しかし、心筋には $\alpha 1$ (170 kDa)に対応する領域にはバンドは検出されなかった。

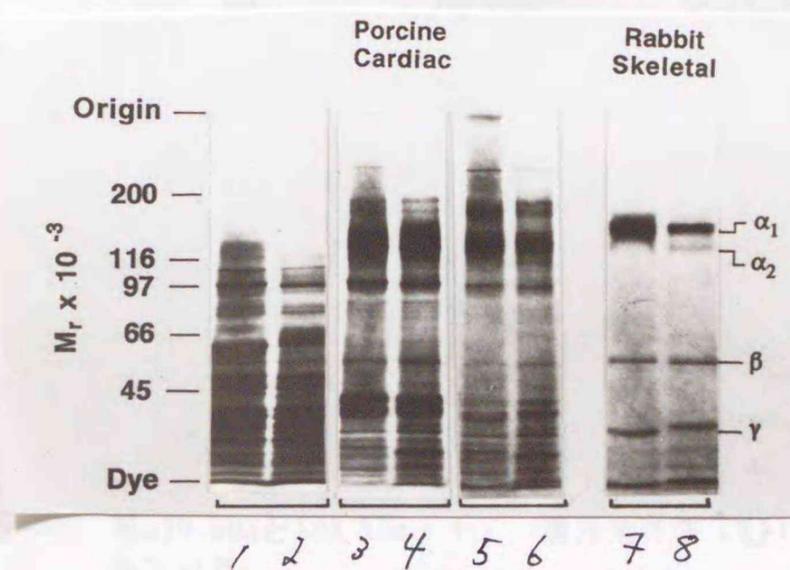


図3、SDS-PAGEによる精製Caチャンネルのポリペプチド解析

標品は20 mM NEM(非還元条件、奇数のレーン)または20 mM DTT(還元条件下、偶数レーン)で処理し、5-15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、銀染色を行いタンパク質バンドを検出した。
 ブタ心筋形質膜(3 μ g, lane 1と2)
 1st Heparin-画分(1.5 μ g, lane 3と4)
 2nd Heparin-画分(0.5 μ g, lane 5と6)
 骨格筋精製標品(0.5 μ g, lane 7と8)
 各laneの奇数は非還元条件下、偶数は還元条件下で泳動した。

I-2-2 1,4-Dihydropyridine結合タンパク分子

骨格筋Caチャンネルでは、Ca拮抗薬DHPは $\alpha 1$ サブユニットに結合することが知られている(1,2,3)。心筋CaチャンネルのDHP結合タンパク分子($\alpha 1$ と仮称する)を同定するために、光反応性DHP誘導体 $[^3\text{H}]$ diazipineでラベルした心筋精製標品を用いて、光アフィニティラベル実験を行った。光ラベルされたタンパク質分子の検出は、SDS-PAGE後ゲルをスライスし放射活性を測定することで行った。図4に示すように還元条件下では、190 kDaの単一の放射活性ピークとして検出された。非還元条件下では、190 kDa以外に270 kDaにも放射活性ピークが観察された。この \sim 270 kDaの成分は特異的に光ラベルされる量の約15~20%を占めていた。これらのことより、心筋DHP受容体($\alpha 1$)は190 kDa分子であり、これに光ラベルされない小さな分子がジスルフィド結合

した分子種（～270 kDa）が15～20%存在することが分かった。この心筋でラベルされる分子（190 kDa）は、骨格筋でラベルされる α 1サブユニット170 kDaに比べ明らかに分子量が少し大きい。

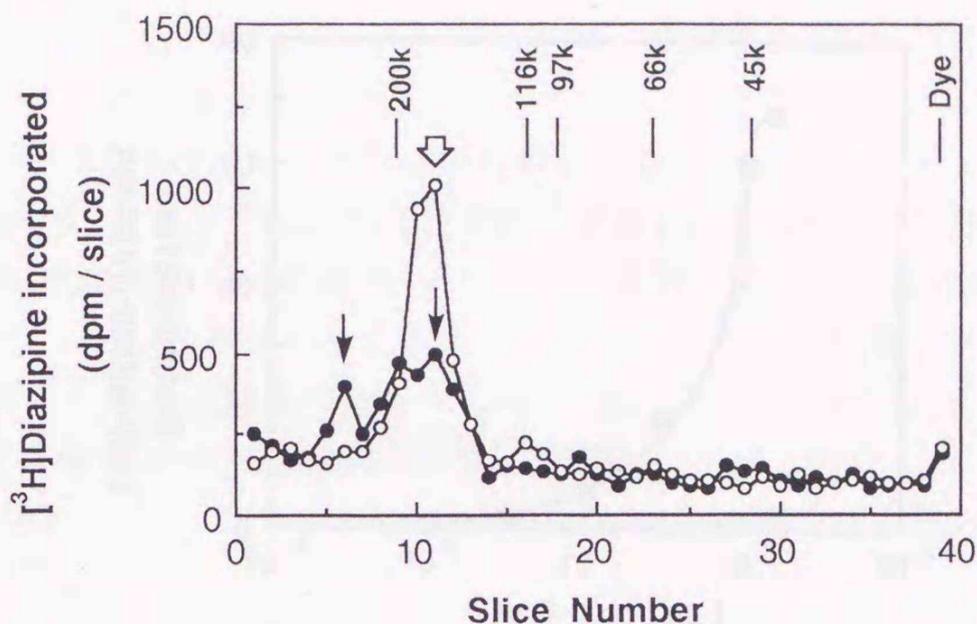


図4、 $[^3\text{H}]$ Diazipineによる心筋Caチャンネルの光アフィニティラベル

$[^3\text{H}]$ Diazipineでプレラベルし、WGA-Sepharoseで精製したCaチャンネル標品を実験項(I-1-2-(4))に記したように光ラベルした。

光照射後のサンプル(15 μg)を非還元条件(●)または還元処理(○)を行った後、5-15%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。SDS-PAGE後、ゲルをCBB染色して各レーンを確認し、3 mm幅で切った。ゲル片は H_2O_2 で溶かした後、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。非還元条件下では分子量270 kDaと190 kDa(↑)、還元条件下(⤴)では190 kDaが特異的に光ラベルされていた。

I-2-3 特異的抗体を用いたサブユニットコンポーネントの解析

心筋Caチャンネルのサブユニットコンポーネントを明らかにするために2つの抗体を用意し、精製標品で調べた。一つは、cDNAシーケンスから決定されたウサギ心筋DHP受容体(9)のアミノ酸残基1691-1707に対応するペプチド(P5)に対する抗ペプチド抗体(抗P5抗体)である。もう一つは、抗P5抗体とは特異性が異なる骨格筋 α 2- δ サブユニットに対する単クローン抗体(MCC-1)である。抗P5抗体は図5に示すように、ブタ心筋Caチャンネル(+) $[^3\text{H}]$ PN200-110結合活性成分を抗体用量依存的に免疫沈降した。その最大沈降量は、全放射活性中の70%に達した。また、抗原ペプチドを共存させて沈降反応を阻害すると、非免疫IgGのコントロールと同じように沈降はみられなくなった。このことから、抗P5抗体はアミノ酸配列特異的に心筋DHP受容体複合体と反応していること

が確認された。したがって、ブタ心筋にもウサギ心筋のDHP受容体 $\alpha 1$ のP5ペプチド配列と同一か、あるいはホモロジーの非常に高いアミノ酸配列が存在することがわかった。

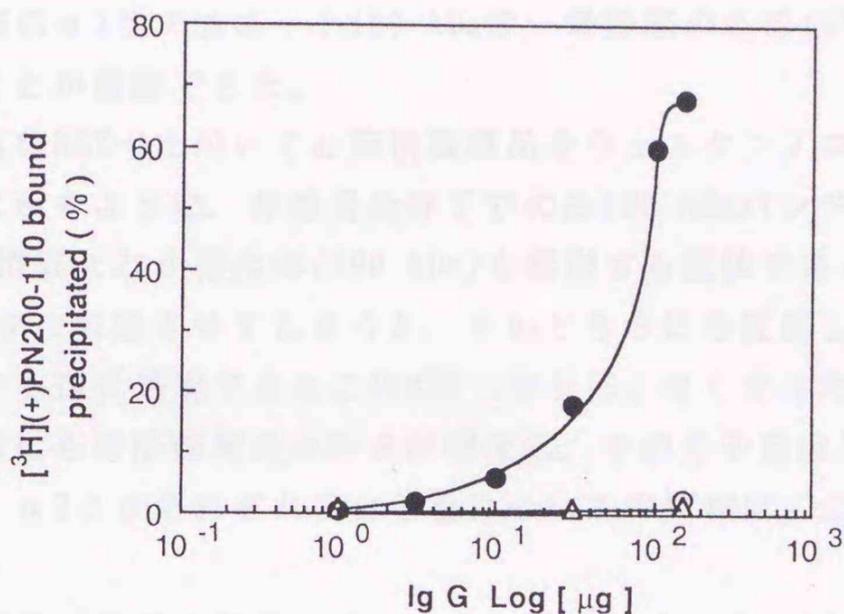


図5、 $[^3\text{H}]$ PN200-110でプルラベルした可溶性心筋DHP受容体の抗P5抗体による免疫沈降

精製IgG(4-200 μg)をprotein A-Sepharose CL-4B(50 μl gel)吸着させ、これと可溶性 $[^3\text{H}]$ PN200-110結合心筋DHP受容体(3,000 dpm)をP5ペプチド(10 μM)存在(○)、非存在下(●)で4 $^{\circ}\text{C}$,2時間インキュベートした。インキュベート後、ビーズをTBS-0.2% digitoninで洗った後、ビーズの放射活性を測定した。コントロールとして、非免疫IgG(Δ)でも行った。

一方、MCC-1はすでにHayakawaらによって、ウサギ骨格筋のみならずウシ脳および心筋のDHP結合活性成分をも免疫沈降することが示されている(21)。すなわち、 $\alpha 2-\delta$ を含むCaチャンネル複合体を免疫沈降できる。このブタ心筋標品を用いた場合も、MCC-1は抗P5抗体と同程度DHP結合活性を免疫沈降できた。

(1) ウェスタンブロット法による $\alpha 1$ 及び $\alpha 2-\delta$ サブユニットの同定

心筋精製標品を用いてウェスタンブロット法による解析を行った(図6)。抗P5抗体は、非還元条件下の270 kDaと190 kDaのポリペプチドを認識した。この比率は1:4であった(lane 1)。還元条件下では270 kDaは消失し、190 kDaと66 kDaの新しいバンドが免疫染色された(lane 2)。66 kDaのバンドは、抗原ペプチドP5を共存させて抗体との反応を阻害しても消失しないことから、非特異的染色である(lane 4)。したがって、190 kDaと270 kDaがDHP受容体($\alpha 1$)

といえる。また、P5ペプチドのアミノ酸配列は骨格筋Caチャンネル $\alpha 1$ とも相同性が高いので、抗P5抗体を用いてウサギ骨格筋Caチャンネル精製品についてもウェスタンブロット解析を行った。その結果、還元および非還元で変化しない分子量170 kDaが、特異的に抗P5抗体で免疫染色された(図6, B)。したがって、ブタ心筋の $\alpha 1$ サブユニット190 kDaは、骨格筋のもの(170 kDa)に比べ分子量は大きいことが確認できた。

単クローン抗体MCC-1を用いて心筋精製標品をウェスタンブロットすると、図6, Aのlane 5に示すように、非還元条件下でのみ190 kDaバンドが免疫染色された。MCC-1は骨格筋 $\alpha 2-\delta$ 複合体(190 kDa)を認識する抗体であるが、還元処理によって $\alpha 2$ と δ に解離させてしまうと、そのどちらにも反応しなくなる(21)。心筋精製標品でも還元処理するとこのMCC-1は反応しなくなった(lane 6)。この結果から、心筋にも骨格筋様の $\alpha 2-\delta$ が存在し、その分子量は190 kDaであることがわかった。 $\alpha 2$ と δ それぞれの分子量についての情報は、この実験からは得られなかった。

以上の結果より、ブタ心筋Caチャンネルは少なくとも $\alpha 1$ と $\alpha 2-\delta$ サブユニットをもっていることが示された。

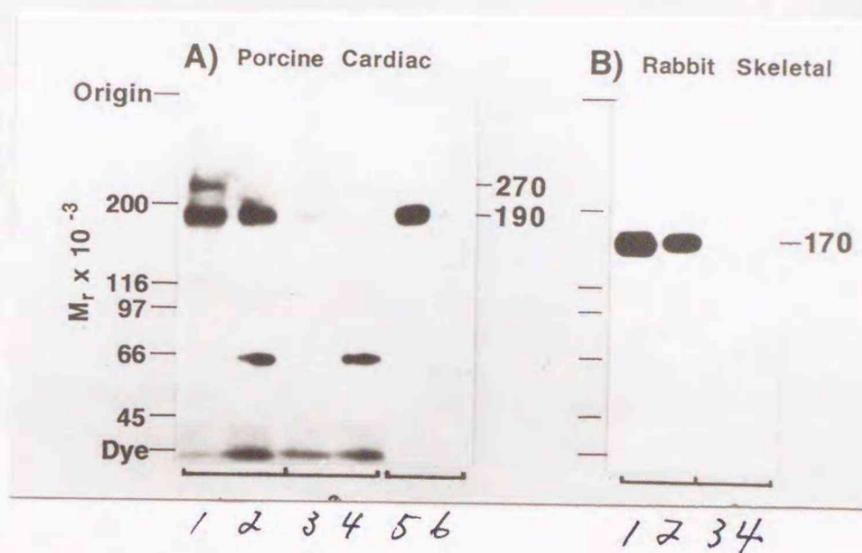


図6、抗P5抗体、MCC-1による $\alpha 1$ および $\alpha 2-\delta$ サブユニットの同定

ブタ心筋精製標品(A)とウサギ骨格筋精製標品(B)を4-12%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、PVDF膜に転写した。PVDF膜はブロッキングした後、 $10 \mu\text{M}$ P5ペプチド非共存(A)および(B)のlane 1, 2)、共存(A)と(B)のlane 3, 4)下、抗P5抗体と反応させた。また、MCC-1(A)のlane 5, 6)とも反応させた。洗浄後、 $[^{125}\text{I}]$ protein Aと反応させてオートラジオグラフィを行った。

還元条件下、出現する66 kDaのバンド(A)のlane 2)はペプチドP5共存下でも観察される(A)のlane 4)ことから非特異的染色である。

各laneの奇数は非還元条件下、偶数は還元条件下で泳動した。

(2) 免疫沈降

心筋精製標品をBolton-Hunter法(33)によって ^{125}I で標識した後、2つの抗体によってCaチャンネル複合体を免疫沈降した。免疫沈降物はSDS-PAGEを行った後、オートラジオグラフィーによって検出した。図7, Aは、抗P5抗体による沈降物を分析したものである。非還元条件下では、 ~ 270 kDa, 190 kDaの2つの大きなポリペプチドと60, 55, 35, 30, 25 kDaの小さいポリペプチドが検出された(図7, A, lane 1)。還元条件下では、新たに150, 79, 66 kDaの3つのバンドが出現し、270kDaバンドは消失した(lane 2)。66 kDaバンドはP5ペプチド共存下で免疫沈降反応を行った場合でも、沈降してくることから非特異的なものである(lane 4)。

また、MCC-1を用いて同様の免疫沈降を行った場合でも、抗P5抗体と同一の結果を得た(図7, B)。非特異的沈降物には若干の違いがみられた。還元条件下で見られる57 \sim 30 kDaの間のバンドは、コントロールの非免疫マウス抗血清でもみられた(lane 2, 4)。還元条件下で見られる30 kDaのバンドについては、特異的なものと非特異的なもの2つが混ざっているようである。

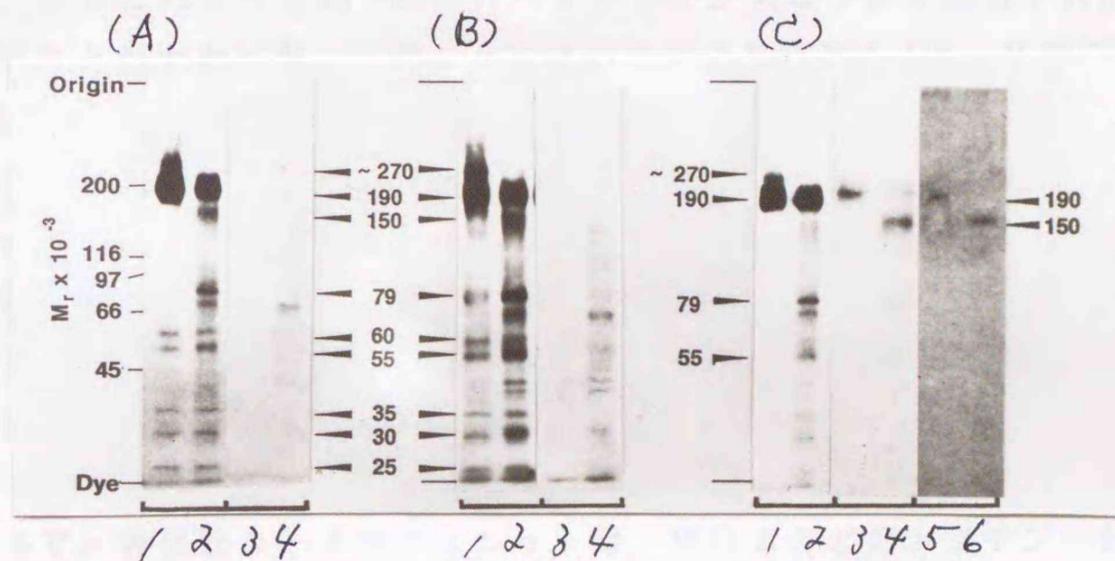


図7、 ^{125}I 標識心筋Caチャンネル構成コンポーネントの免疫沈降

(A)、 ^{125}I 標識心筋精製標品(3×10^6 cpm)をP5抗体ビーズ($50 \mu\text{l}$)を用いてペプチドP5非存在下(lane 1, 2)または存在下(lane 3, 4)で免疫沈降した。沈降した分子をSDS-PAGEを行った後、オートラジオグラフィーにより検出した。

(B)、(A)と同様にMCC-1(lane 1, 2)または非免疫マウス抗体(lane 3, 4)を用いて、 ^{125}I 標識心筋Caチャンネル精製標品を免疫沈降したものである。

(C)、 ^{125}I 標識心筋Caチャンネル精製標品を1% Triton X-100で2時間、 4°C で処理した後、抗P5抗体(lane 1, 2)とMCC-1(lane 3, 4)で免疫沈降した。

また、(A)と同様に抗P5抗体で沈降した後、ビーズから1% SDSで抽出した標品をWGA-Sepharose 4B($50 \mu\text{l}$)とインキュベートして吸着される糖鎖含有ポリペプチドを解析した。

各laneの奇数は非還元条件下、偶数は還元条件下で泳動した。

以上の結果を整理すると、2つの抗体によって特異的に沈降するポリペプチドは共通しており、非還元条件下で $\sim 270, 190, 60, 55, 35, 30, 25$ kDa、還元条件下で $190, 150, 79, 60, 55, 35, 30, 25$ kDaである。これらがブタ心筋Caチャンネルの構成コンポーネントである。

ウサギ骨格筋Caチャンネルの各サブユニット $\alpha 1$ と $\alpha 2$ および β, γ は界面活性剤digitoninの存在下では強固に結合しているが、Triton X-100やSDSでは各々のサブユニットに解離することが知られている(4)。心筋でも同様の結合様式であろうと仮定し、 $[^{125}\text{I}]$ -標識した心筋Caチャンネル複合体をTriton X-100で処理した後、2つの抗体で免疫沈降を行い $\alpha 1$ および $\alpha 2-\delta$ 、それぞれのポリペプチド構成を調べた(図7, C)。

まず $\alpha 1$ サブユニットを認識する抗P5抗体で免疫沈降し解析した(lane 1, 2)。非還元条件下では $\sim 270, 190$ kDaが、還元条件下では $190, 79, 55$ kDaのバンドが観察された。この結果から、還元前後で分子量の変化しない 190 kDaが $\alpha 1$ サブユニットの主要成分であり、またウェスタンブロットや $[^3\text{H}]$ diazipineによる光ラベルによっても検出されたマイナー成分 ~ 270 kDaポリペプチドは、 190 kDaポリペプチドに 79 または 55 kDaポリペプチドがジスルフィド結合で付加したものであることがわかった。一方、 $\alpha 2-\delta$ に対する抗体MCC-1は、非還元条件下で 190 kDa、還元条件下で 150 kDaを示すポリペプチドを免疫沈降した(lane 3, 4)。還元条件下 150 kDaを示す分子は、 $\alpha 2$ サブユニットであり、これに低分子量のコンポーネントがジスルフィド結合を介し付加し、 190 kDaの分子を構成すると考えられる。この実験では、 $\alpha 2$ サブユニットに付加している低分子量のコンポーネント δ サブユニットは検出できなかった(lane 4)。それは骨格筋Caチャンネルの場合(4)と同様、心筋の δ サブユニットも ^{125}I 標識され難いためと考えられた。

ところで、骨格筋 $\alpha 2-\delta$ サブユニットは、WGAなどのレクチンが結合することから糖鎖を持っていることが示されている(4)。心筋Caチャンネルのコンポーネント中、WGA-Sepharoseに吸着される分子を調べた(lane 5, 6)。非還元条件下で 190 kDa、還元処理すると 150 kDaに減少するポリペプチドが吸着された。この挙動は $\alpha 2-\delta$ サブユニットと同じであった。したがって、心筋の $\alpha 2-\delta$ サブユニットも糖タンパク質であることが示された。

I-2-4 PKAリン酸化実験

In vitroで骨格筋Caチャンネルは、 $\alpha 1, \beta$ サブユニットが速やかにPKAでリン酸化される(34)。これに対して可溶化部分精製した心筋Caチャンネル標品では、SDS-PAGE上 $\alpha 1$ サブユニットの分子量に対応する領域にはPKAによ

りリン酸化される分子は見つかっていない(16,17,20)。心筋Caチャンネルコンポーネントが、PKAによって直接リン酸化されるかどうか、精製標品と形質膜を用い $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下リン酸化し、抗P5抗体とMCC-1の2つの抗体でCaチャンネルコンポーネントを免疫沈降し、リン酸化されているか調べた。

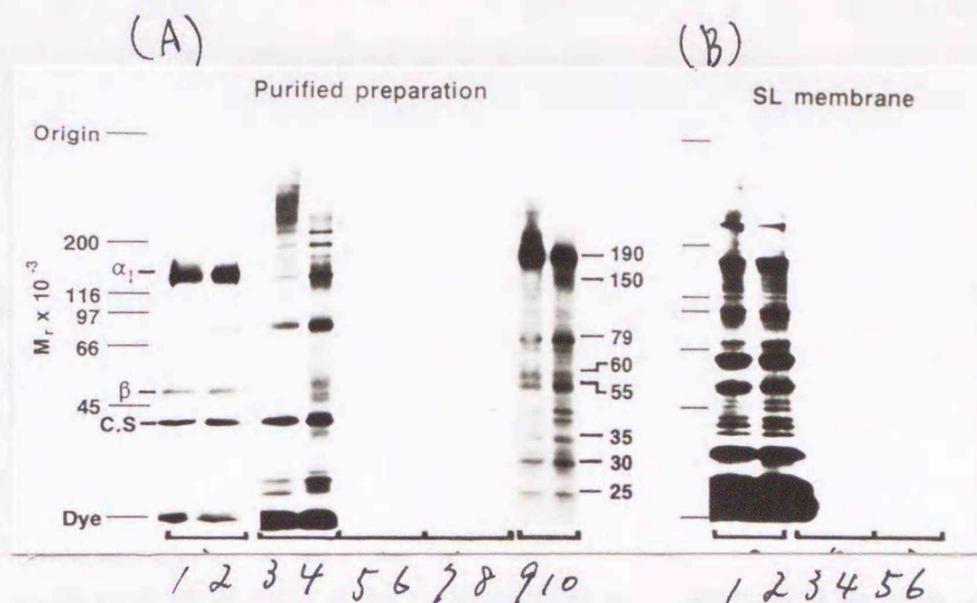


図8、心筋精製Caチャンネル標品および形質膜画分のリン酸化ポリペプチドのSDS-PAGEによる解析

(A)、精製心筋Caチャンネル標品を $10\ \mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とPKA触媒サブユニット(C.S)でリン酸化した。このリン酸化標品(lane 3, 4)を抗P5抗体(lane 5, 6)、またはMCC-1(lane 7, 8)で免疫沈降し、その沈降物を5-15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、オートラジオグラフィを行った。比較のため、MCC-1で免疫沈降した ^{125}I 標識心筋Caチャンネル標品(lane 9, 10)とリン酸化骨格筋Caチャンネル(lane 1, 2)を示した。

(B)、ブタ心筋形質膜画分(1 mg)をPKA触媒サブユニットでリン酸化した後、1% digitoninで可溶化した。可溶化リン酸化膜標品(lane 1, 2)を抗P5抗体(lane 3, 4)とMCC-1(lane 5, 6)で免疫沈降した。沈降物と可溶化膜標品はSDS-PAGEを行った後、オートラジオグラフィでリン酸化バンドを検出した。各laneの奇数は非還元条件下、偶数は還元条件下で泳動した。

コントロールに用いた精製骨格筋Caチャンネル標品では、すでに報告(34)されているようにPKAの触媒サブユニットとともに還元処理非感受性の170 kDa(α_1)と55 kDa(β)のリン酸化が確認された(図8, A, lane 1と2)。一方、心筋精製標品では、300-97 kDaと35-25 kDaの領域にいくつかのリン酸化バンドが観察された。しかし、 α_1 サブユニットがある190 kDaの領域には、著明にリン酸化されているバンドは見られなかった(lane 3と4)。よりはっきりした結果を得るため、 ^{32}P リン酸化した心筋精製品を、異なるエピトープを持つ抗P5抗体と

MCC-1によって免疫沈降して解析した。I-2-3-(2)で示したように両抗体は心筋Caチャンネルを構成する各種のコンポーネントを免疫沈降することができる(図8, A, lane 9と10)。それにもかかわらず、両抗体の免疫沈降物の中にリン酸化されたタンパク分子はまったく見つからなかった(lane 5, 6と7, 8)。

また、心筋形質膜画分をPKAでリン酸化した後、可溶化してから免疫沈降した場合も、多くの膜タンパク質がリン酸化されているにもかかわらず、2つの抗体により沈降する心筋Caチャンネルコンポーネントの中には、リン酸化されているものは見つからなかった(図8, B, lane 1と2)。

III-3 考察

本研究において、ブタ心筋Caチャンネル複合体を免疫沈降する2つの特異的抗体を用いることによって、心筋Caチャンネルの分子構造に関し、いくつかの新たな知見を得ることができた。

第1に、心筋Caチャンネルは、少なくとも7つのポリペプチドから構成されていることである。190 kDa($\alpha 1$)と150 kDa($\alpha 2$)の大きなポリペプチドと、60, 55, 35, 30, 25 kDaの β , γ サブユニットに対応する5つの小さなポリペプチドから構成されている。このほか $\alpha 2$ にジスルフィド結合を介して付加している δ サブユニットに対応するポリペプチドの存在も間接的に確認した。

第2に、 $\alpha 1$ サブユニットの中には、ジスルフィド結合で55または79 kDaのポリペプチドが付加した250~270 kDa(~270 kDa)の分子型が10~20%の割合で存在することである。~270 kDa分子が190 kDa($\alpha 1$)の前駆体か否かは本実験結果からは結論できないが、少なくとも心筋の $\alpha 1$ は190 kDaと~270 kDaの不均一な分子種として存在することがわかった。

第3に、心筋Caチャンネルコンポーネントは、PKAにより直接リン酸化をうけないことである。このことから、PKAリン酸化による心筋Caチャンネルの活性調節機構は、チャンネルタンパク質の直接リン酸化以外の経路による可能性が考えられた。

心筋Caチャンネルは今までいくつかのグループによって、精製や免疫学的な解析が試みられてきた(16, 17, 18)。これらのグループは精製を進めることによって、骨格筋チャンネルの $\alpha 1$ または $\alpha 2$ - δ サブユニット様の分子が心筋Caチャンネルにも存在することを示した。しかしほとんどの場合、心筋精製標品の純度は骨格筋の標品と比べ低く、いずれもサブユニット構造についての情報

を得るまでには至っていない。筆者も心筋Caチャンネルの精製の検討を行い、Heparin-agaroseが従来用いられてきた陰イオン交換クロマトグラフィーに比べ、回収率が5倍以上高い上、精製率も劣らないことから、心筋Caチャンネルの精製に効果的であることを見出した。このHeparin-agaroseによる精製を骨格筋で行われている従来法の一部に組み込み、ブタ心筋形質膜を出発材料として心筋Caチャンネルの精製を行った。比活性は約230倍上昇し、既報(16-18)に比べても高い方であった。SDS-PAGEで分析すると、 $\alpha 1$ と考えられる190 kDaポリペプチドなどが精製された(図3)。しかし、まだ多数のポリペプチド鎖が見られ、心筋Caチャンネルの構成サブユニットを明確するに至らなかった。心筋Caチャンネルの場合、骨格筋に比べ膜画分中の含量が低い(約50分の1程度)こともあり、conventionalな方法で精製を進め、構成コンポーネントを同定することは困難であると判断した。そこで、この問題を解決するため2つの特異性の異なる抗体を用いたimmunopurificationに基づく手法と $[^3\text{H}]$ diazipineによる光アフィニティラベル法を組み合わせ、心筋Caチャンネルコンポーネントを解析した。用いた抗体の一つは、すでに一次構造が明らかとなっているウサギ心筋 $\alpha 1$ サブユニットのアミノ酸配列1691-1707に対応するペプチド抗体である。もう一つは、骨格筋 $\alpha 2-\delta$ サブユニットに対する単クローン抗体MCC-1である。

光アフィニティラベルと抗P5抗体によるウェスタンブロットによる解析の結果、Caチャンネル本体のDHP受容体は190 kDaのポリペプチドであり、10~20%の割合で~270 kDaの分子型も存在することが明らかとなった。この~270 kDaポリペプチドは、免疫沈降物の解析から79 kDaまたは55 kDaのポリペプチドがジスルフィド結合を介し、190 kDaポリペプチドに付加しているものであることがわかった。

ブタ心筋 $\alpha 1$ サブユニットの前駆体が、クローニングされたウサギ心筋 $\alpha 1$ と同じ分子量(250 kDa)であるならば、同定した190 kDaは約60残基程小さいことになる。したがって、post-translationalなプロセッシングを受けている可能性が考えられる。190 kDaポリペプチドは抗P5抗体が反応することから、少なくともアミノ酸残基1691-1707の間は含んでいることになり、切断が起きているとすれば1691以降である。すると残りのフラグメントの分子量はcDNAから決定された一次構造から計算すると464~480残基分に相当する56~58 kDaとなる。これは~270 kDaポリペプチドに付加している55 kDaポリペプチドとほぼ一致する。このことから、~270 kDaは190 kDaポリペプチドの前駆体である可能性がある。しかし、もう一方の79kDaでは、少し大きすぎるので前駆体そのものではないのかも知れない。

MCC-1により免疫沈降される190 kDaポリペプチドは、WGA-Sepharoseに吸着さ

れることから糖タンパク質複合体であり、150 kDaの $\alpha 2$ サブユニットに δ サブユニット（推定分子量 40 kDa）がジスルフィド結合を介して結合しているものであることがわかった。 ^{125}I 標識したCaチャンネル標品を用いた免疫沈降によっても δ サブユニットは直接観察できなかったが、これは、Bolton-Hunter reagentによるヨード化反応が進まなかったためと考えられる。このことは骨格筋でも報告されている(4)。

抗P5抗体、MCC-1ともに $\alpha 1, \alpha 2$ - δ サブユニット以外に60, 55, 35, 30, 25 kDaの5つのポリペプチドが免疫沈降してきた。これらポリペプチドの分子量は、骨格筋 β (55 kDa)と γ (~30 kDa)に対応することから、それぞれ $\beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$ と名付けた。このように複数の β サブユニットが見られることは驚くことではない。精製されたラット脳N型Caチャンネルでも $\beta 1, \beta 2$ の2つの β サブユニットが見い出されている(35)。ごく最近、遺伝子工学による検索で、心筋には骨格筋と異なる新たな β サブユニットが複数存在することも報告された(36))。本研究で見い出された、心筋チャンネルには複数の β サブユニットが存在するという結果を強く支持している。なお、心筋 γ サブユニットについては、その存在を明らかにした例はまだない。

以上の結果をふまえ、ブタ心筋のDHP感受性Caチャンネルモデルを図式化してみた(図9)。

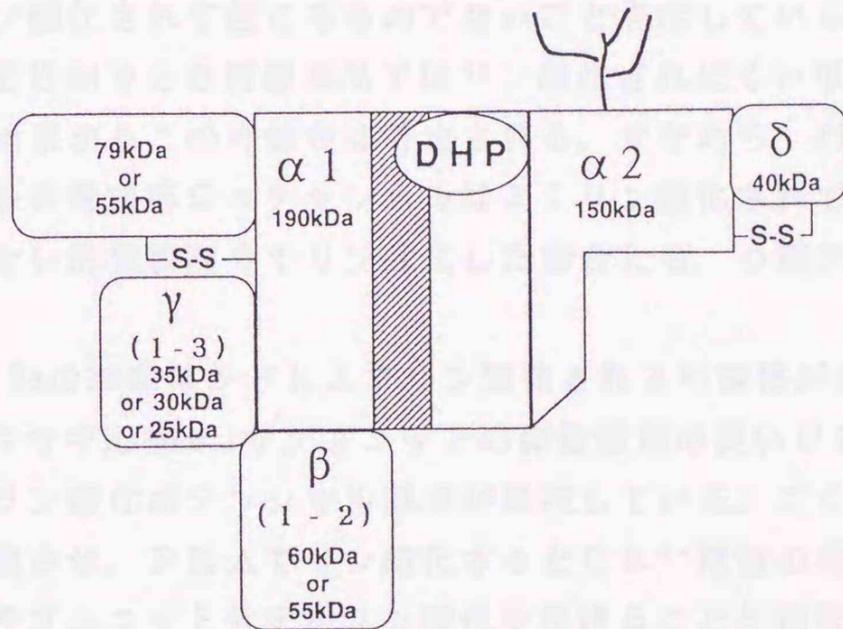


図9、ブタ心筋Caチャンネルのサブユニット構造モデル(文献(90)を改変した)

$\alpha 1$ サブユニットはDHP受容体であり、Caチャンネルポア(□で示す部分)を形成していると考えられる。15-20%の割合で79 kDaまたは55 kDaポリペプチドをS-S結合で付加していると考えられる。

$\alpha 2$ サブユニットと δ サブユニットはS-S結合を介して結合している糖タンパク質である。 $\alpha 1, \alpha 2$ - δ, β, γ はそれぞれ非共有結合で結合し、複合体を形成している。

基本的にはTakahashiが提案した骨格筋のモデル(4)と同じであるが、 $\alpha 1$ サブユニットに79または55 kDaポリペプチドが付加したものが10~20%存在すること、および β , γ サブユニットが複数存在することが心筋の特徴である。最近、骨格筋または心筋Caチャンネルの $\alpha 1$ サブユニット遺伝子を発現させたとき、骨格筋 $\alpha 2$, β とともに発現させると Ca^{2+} 電流は増大し、 γ の場合はそのキネティクスを変えることが報告されている(37,38,39)。このことは、 $\alpha 1$ 以外のサブユニットによりCaチャンネル活性が調節されていることを示している。心筋Caチャンネルでは、 β や γ サブユニットが複数存在することから $\alpha 1$ サブユニットとの組み合わせは多数考えられる。もしそうならば、心筋では構造の少しずつ異なったCaチャンネル複合体が複数存在していることになり、それらの機能も少しずつ異なっている可能性がある。

最後にブタ心筋精製標品及び心筋形質画分をリン酸化した場合、免疫沈降するCaチャンネル複合体構成コンポーネント中には、リン酸化されているものは見つからなかった。同様の観察はヒヨコやブタ心筋から部分精製されたCaチャンネル標品でも報告されているが(16,18)、我々は免疫沈降によってそのサブユニットコンポーネントをはっきり示しているだけに、より明確な結論を得たものとする。この結果は、電気生理学的研究で観察されているPKAリン酸化による心筋Caチャンネル電流の増大は、Caチャンネルコンポーネントが直接PKAでリン酸化されて起こるものでないことを示している。心筋Caチャンネルが界面活性剤を含む精製標品ではリン酸化されにくい可能性も考えられるが、以下の結果からこの可能性は否定される。すなわち、digitonin存在下でもコントロールの骨格筋Caチャンネルはよくリン酸化されており、また界面活性剤の含まない形質膜画分でリン酸化した場合にも、心筋チャンネルはリン酸化されない。

ところで、190k Daの前駆体がPKAでリン酸化される可能性がある。cDNAクローニングされたウサギ心筋 $\alpha 1$ サブユニットの細胞質側の長いC末端領域には、いくつかのPKAリン酸化ポテンシャル部位が局在している。ごく最近、心筋 $\alpha 1$ をCHO細胞に発現させ、PKAでリン酸化すると Ca^{2+} 電流の増大がみられ、かつ250 kDaの $\alpha 1$ サブユニット分子がリン酸化を受けることが報告された(40)。しかしながら、190 kDaの前駆体と考えられる250 kDa分子は形質膜画分中には極めて少量しかなく(5% >)、実際の心筋細胞で観察されるPKAリン酸化による10倍もの Ca^{2+} 電流の増大(22)をすべて説明できるとは考えられない。したがって、PKAによるCaチャンネルの活性化の一部はこの前駆体のリン酸化で説明できるかもしれないが、主な活性化機構は直接のPKAによるリン酸化を介するものではないと考える。その一つの機構として、未知の細胞内コン

ボーンがPKAによってリン酸化された結果、心筋Caチャンネルを活性化するという可能性がある。今後、心筋Caチャンネルのリン酸化による活性化機構について、in vitroのみならず、in vivoの実験で検証される必要がある。

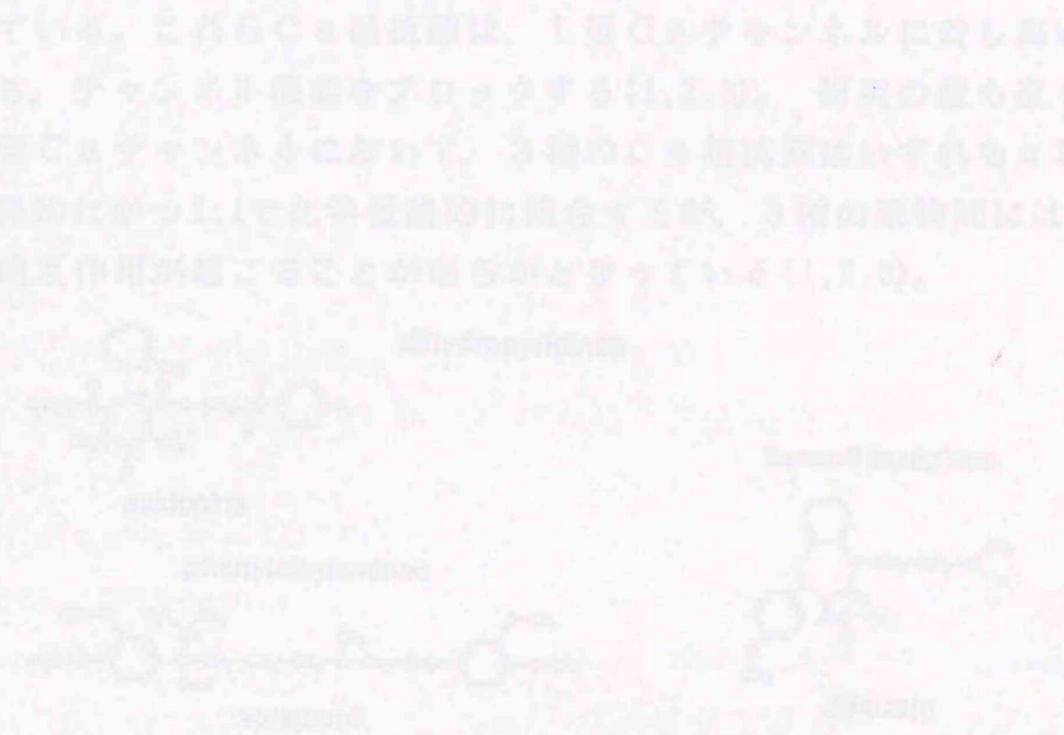


図10. 心筋Caチャンネルのリン酸化による活性化機構の模式図。

直前、カズブイニアールとPKAの相互作用が同定され、それら相互作用を阻害することが観察された(14,15)。これらの結果はCaチャンネルの構造と機能を理解するうえで重要な知見であった。

心筋Caチャンネルの構造と機能を各細胞種で比較した場合、PKAやDHP結合部位の位置は異なるが、DHPは心筋や平滑筋で管腔側より結合能が高い(16)。この違いは、心筋CaチャンネルのDHP結合部位を構成する残基の異なることによるものと考えられている。

最近、遺伝子工学的手法によって平滑筋細胞のCaチャンネルのDHP結合部位の残基をCaチャンネルのDHP結合部位の残基と置き換えることで、平滑筋CaチャンネルのDHP結合部位の構造と機能を解析することができた。心筋CaチャンネルのDHP結合部位を同定することは、DHP結合部位の構造と機能を解析する上で大きな進展を待たせ、さらに、心筋Caチャンネルの構造と機能を心筋と平滑筋で比較することから、平滑筋Caチャンネルの構造と機能を解析する上で大きな進展を待たせると考えられる。

本稿では、心筋Caチャンネルを用いたカズブイニアールとPKAの相互作用を阻害する薬剤の開発について、心筋CaチャンネルのDHP結合部位を同定し、DHP結合部位の構造と機能を解析することにした。

第II章 心筋Caチャンネルの1,4-dihydropyridine結合部位の同定

図10に示す薬物は、1,4-dihydropyridine(DHP), phenylalkylamine(PAA), benzothiazepine(BTZ)はCa拮抗薬と呼ばれ、临床上高血圧や狭心症の治療に類用されている。これらCa拮抗薬は、L型Caチャンネルに対し高い結合親和性を持ち、チャンネル機能をブロックする(1,2,3)。研究の最も進んでいる骨格筋L型Caチャンネルにおいて、3種のCa拮抗薬はいずれも α 1サブユニットに特異的にかつ1:1で化学量論的に結合するが、3種の薬物間にはアロステリックな相互作用が起こることが明らかとなっている(1,2,3)。

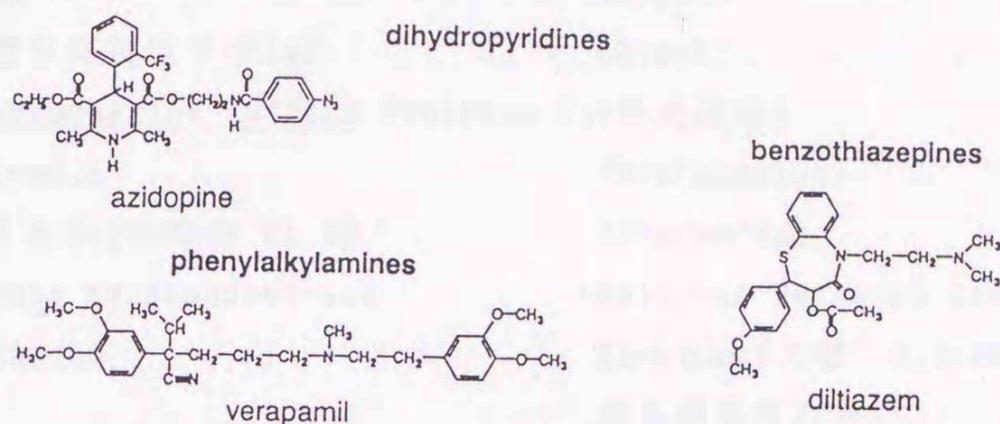


図10、Caチャンネルアンタゴニスト代表的な3種を示す。

近年、光アフィニティラベル実験により、PAAとDHPの結合部位が同定され、それらは異なる結合部位を持つことが確認された(44,45)。これら結果はCaチャンネルの構造と機能を理解するうえで重要な知見となった。

Ca拮抗薬の結合親和性を各組織間で比較した場合、PAAやBTZではそれほど変わりはないが、DHPは心筋や平滑筋で骨格筋より約10倍高い(2)。この違いがまったく異なる結合部位をもつためなのか、結合部位内のアミノ酸の違いによるものなのかは分かっていない。

最近、遺伝子工学的手法によって骨格筋以外の組織のL型Caチャンネル(9-11,15)やDHP非感受性のN,P型Caチャンネル(12-14)の一次構造が次々に明らかにされてきた。多くのCaチャンネルの一次構造が比較できるようになった現在、心筋CaチャンネルのDHP結合部位を同定することは、DHP感受性の違いや薬物作用機序を理解する上で大きな意義を持つ。さらに、Ca拮抗薬の临床上の標的組織が心筋と平滑筋であることから、結合部位を明らかにすることは新しい薬物の開発にもつながる可能性もあると考えられる。

本章ではdiazipineを用いた光アフィニティラベルと抗ペプチド抗体によるマッピングの組合せによって、心筋CaチャンネルのDHP結合部位を同定し、すでに明らかとなっている骨格筋チャンネルのそれと比較することにした。

II-1 実験材料と実験方法

II-1-1 実験材料

本実験で新たに用いたものを以下に示す。

Boc-アミノ酸、PAM-resin	(ABI)
ペプチドP9、ペプチドP0、ペプチドP7	(ペプチド研究所)
チログロブリン、	(Sigma)
Heparin-agarose (Type II)	(Sigma)
FCA、FIA	(DIFCO)
HRPO標識ヤギ抗ウサギIgG	(Zymet)
API (<i>Achromobacter lyticus</i> Protease I)	(和光純薬)
TPCK-trypsin	(Worthington)
Protein A-Sepharose CL-4B	(Pharmacia)
Prestained MW standard-Low	(Bethesda Research Laboratories)
(-)Azidopine	Innsbruck大学、H.Glossmann教授 から恵与された
Diazipine	当研究室で文献(48)にしたがい 合成した
pCAS9 inclusion bodies	京都大学医学部、竹島浩博士及び 三菱化成生命研、高橋正身博士より 恵与された
WGA-Sepharose 4B	Tresyl活性化Sepharose 4Bに WGA 15 mg/ml gelで固定化した

II-1-2 実験方法

(1) ペプチド合成と抗体の作製

抗原ペプチドとしてウサギ心筋Caチャンネルの $\alpha 1$ サブユニット(9)の部分アミノ酸配列707-720(P2), 1507-1525(P9), 1691-1707(P5)と骨格筋 $\alpha 1$ (15)の1401-1414(P0)を選択した。キャリアータンパク質との結合に用いるために、P2とP5はN末端にCysを、P0はC末端にCys-Gly、P9はN末端にGly-Cysを付加した。

各ペプチドはMerrifieldの固相法(25)にしたがい、ペプチド自動合成機(ABI model 450A)を用いて合成した。原料のアミノ酸はBoc-アミノ酸を、レジンはC末端にすでにアミノ酸が結合しているPAM-レジンを用いた。合成後のレジンからのペプチドの切り出しと側鎖保護基の脱保護はHFを用いて行った。精製後の

ペプチドについては、それぞれアミノ酸分析とシーケンス分析を行い、目的ペプチドであることを確認した。

抗原ペプチドはキャリアタンパク質にMBSを用いて架橋し、コンジュゲートとした。簡単に調製法を記す。チログロブリン15 mgを2 mlのPBS(pH 7.3)に溶解し、MBS 5 mgを加えて室温で1.5時間反応させた。PBSに対して透析し過剰の試薬を除いた後、ペプチド10 mgを加え室温で2時間反応させ、再度透析を行いコンジュゲートを得た。

免疫はコンジュゲート溶液1 ml(3 mg)をフロイント完全アジュバント(FCA) 1.2 mlとよく混ぜ合わせ油中水型のエマルジョンにし、これを3羽のウサギ(日本白色、オス)の背中に皮下注射した。初回は2倍量(6 mg)を注射し、3週間後に2回目の免疫を行い、以降は2週間おきに合計6回免疫した。3回目以降の免疫は免疫補助剤をフロイントの不完全アジュバント(FIA)にかえた。6回目免疫の1週間後、頸動脈切開により全採血を行い抗血清を得た。

CAS9抗体は、ウサギ心筋 α 1サブユニットC末端549残基をコードするプラスミドpCAS9を大腸菌で発現させて得られたfusionタンパク質(pCAS9 inclusion bodies)に対する抗体である。Fusionタンパク質を7.5% SDS-PAGEにかけ、ゲルをCBB染色し66 kDaの目的とするタンパク質バンドを切り取った。ゲルにPBSを加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。このゲルホモジネートとFCAと混和しエマルジョンにし、ウサギの背中に皮下注射した。初回はFCAを用いて一羽当たり0.26 mg、2,3回目はFIAで0.15 mgのタンパク質を免疫した。

抗体産生の確認はペプチドまたはfusionタンパク質を抗原とするELISAにより確認した。抗原を1 μ g/mlとなるように0.1 M 炭酸buffer(pH 9.6)に溶かし、96穴マルチプレートにウェルあたり50 μ lずつまきこみ、4°Cで一晩インキュベートして固相に吸着させた。各ウェルをTBS(pH 7.4)(100 μ l)で3回洗い、2% skim milk, TBSで室温, 2時間ブロッキングを行った。TBS-Tween(0.1% Tween 20を含むTBS)200 μ lで3回洗浄後、TBS-Tweenで段階希釈した抗血清(50 μ l)を加えて室温, 2時間反応させた。TBS-Tween(100 μ l X 3)で洗浄後、HRPO標識ヤギ抗ウサギIgG(5,000分の1希釈) 50 μ lを室温, 2時間反応させた。TBS-Tween(100 μ l X 3)とTBS(100 μ l)で洗った後、*p*-phenylene diamine(0.4 mg/ml), 0.03% H_2O_2 , 0.1 M クエン酸buffer(pH 5.0)を加えて発色させた。発色後の反応停止は6 N 硫酸を25 μ l加えて行った。マイクロプレートリーダー(Bio-Rad)により492 nmの吸光度を測定した。

(2) 競争阻害実験

心筋形質膜(20 μ g), 骨格筋T管膜(5 μ g)を、100 μ lのbuffer(25 mM Tris

-HCl(pH 7.4), 2 mM CaCl₂)中、170 pM (+) [³H]PN200-110と各種濃度の(±)PN200-110, (±)diazipine, (-)azidopine存在下、37°C, 40分間反応させた。I-1-2-(10)にしたがい、Whatman GF/Cガラスフィルターを用いて急速濾過法により、結合活性を測定した。各種DHP化合物はEtOHで希釈し、EtOH終濃度は全体の5%以下にした。

(3) [³H]Diazipineによる心筋Caチャンネルの光アフィニティラベル

[³H]Diazipineによる心筋Caチャンネルの光アフィニティラベルは、I-1-2-(2)と同様、あらかじめ形質膜画分でプレラベルした後、可溶化を行い、WGA-Sepharose精製標品に対して行った。光照射後、Heparin-agaroseでさらに濃縮した。ラベルタンパク質の検出はSDS-PAGEを行った後、ラジオルミノグラフィまたはゲルスライス法(I-1-2-(4))によって行った。

抗ペプチド抗体によるマッピング用ラベルタンパクは以下に記すように膜標品200 mg (200 pmol)を用い、可溶化物はWGA-Sepharose 4B(10 ml gel)で精製後、光照射し直ちに液体窒素で凍結した。光ラベル実験を計3回行い調製した。3回分まとめてHeparin-agarose(3 ml)にかけ濃縮した。このHeparin-画分を水に対して4°Cで12時間透析後、終濃度0.1%になるようにSDSを加えた。これを3等分してアシストチューブに移し、凍結乾燥後、-30°Cに保存した。

WGA-画分 1.2 × 10⁷ dpm, 40.6 mg、Heparin-画分 6.2 × 10⁶ dpm, 6.2 mgのタンパク質を回収した。

Nakayamaら(45)にしたがい、ヘパリン画分を還元カルボキシメチル化し、ゲル濾過HPLCによりラベルα1を部分精製した。この操作の主たる目的は、α1サブユニットにラベルされた以外の放射活性を除くためである。操作は以下のように行った。アシストチューブ中の凍結乾燥ヘパリン画分を約300 μlのH₂Oに溶解した。Tris-HCl(pH 8.3) 0.1 M, β-mercaptoethanol 1%, SDS 1.5% となるように順次加え、室温, 30分間インキュベートした後、ICH₂COONaを84 mMとなるように加え、遮光して室温, 1時間反応させた。反応終了後、遠心操作を行い不溶物を除き、上清(600 μl)を回収した。その上清を200 μlずつゲル濾過HPLCにインジェクトした。カラムはTSK G4000SW (7.5 × 600 mm)を用い、溶媒は0.1% SDSを含む20 mM NaH₂PO₄-NaOH(pH 7.2)で、0.5 ml/minの流速で行った。分取は1分毎に行い、各フラクションから5 μlを取って放射活性を測定した。放射活性ピーク画分は直ちに小分けし、凍結乾燥後、-80°Cで保存した。還元カルボキシメチル化は1日以内にHPLCで処理できる量で行った。Heparin-画分よりラベルタンパク質として6.1 × 10⁵ dpmを回収した。

(4) 酵素消化

酵素消化をする前にSDSを除く操作を行った。ゲル濾過HPLC精製画分の凍結乾燥品を少量の水を加え、超音波処理しながら溶解した。遠心操作後の上清を透析チューブ(50 kDa cut off, スペクトラ/ポア 6, 12 mm幅(Spectrum))を用いて、10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (pH 7.2), 6 M urea, 0.1 mg/ml Dowex 1-X8 (Bio-Rad) に対して透析を低温室で12時間行った(1 l X 2回交換)。さらに0.05% Triton X-100, H_2O に対し透析を12時間行った。透析した標品から遠心して不溶物を除き、その上清を"ラベル α 1"とした。ラベル α 1は直ちに実験に用いるか、小分けして凍結保存した。この標品は沈澱を生じ易いので何回も凍結融解することは避けた。各ステップでの回収率は凍結乾燥標品を100%とすると以下の通りだった。水に溶かす操作で97%、透析終了後の遠心上清で86%だった。

ラベル α 1(~ 40000 dpm, 85 μg)の酵素消化は、以下に記す条件で37°C, 24時間、ヒートブロック(Metal Block Bath, ヤマト)中でインキュベートして行った。API消化は、100 μl の0.05% SDS, 0.05% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl(pH 9.0)の溶液中に8.5 μg のAPIを加えて行った。トリプシン消化は、100 μl の0.05% Triton X-100, 5 mM CaCl_2 , 100 mM Tris-HCl(pH 8.0)の溶液中に80 μg , TPCK-trypsinを加えて行った。各酵素はそれぞれ12時間おきに2回に分けて加えた。基質:酵素の重量比(S/E比)は、APIは10、TPCK-trypsinは1とした。インキュベート終了後、酵素消化溶液を遠心し、上清をAPI消化物、トリプシン消化物とした。この操作の回収率は約80%だった。トリプシン消化では沈澱が生じたが、放射活性はほとんど上清に回収された。

(5) 免疫沈降

Nakayamaらの方法(45)にしたがい行った。すべての反応は、エッペンドルフチューブ(1.5 ml容)中で行った。Protein A-Sepharose CL-4B(100 μl)を洗浄buffer(0.1% Triton X-100, 1% BSAを含むTBS(pH 7.4))で洗った(洗浄Buffer 1 mlを加え懸濁した後、遠心操作を行い上清を除く操作を示す)。ビーズの5倍容量の抗血清500 μl を加え、低温室で2時間、転倒混和して抗体をビーズに吸着させた。洗浄bufferで5回繰り返しビーズを洗い、これを抗体ビーズとした。ラベル α 1または酵素消化物を100 μl の洗浄buffer中、100 μl の抗体ビーズと室温, 2.5時間反応させた。反応後、洗浄bufferで3回洗った。

抗体ビーズに吸着したラベルペプチドの検出は次のように行った。免疫沈降率を求める場合は、ビーズを0.1 M クエン酸buffer(pH 3.0)で懸濁し、バイアル瓶に移し、液体シンチレーションカウンターで直接、放射活性を測定した。

ラベルペプチドの分子量を求める場合には、ビーズをさらにTBSで洗い、できる限り上清を取り除いた後、SDS-sampling bufferを加え90°C, 3分間インキュベートして抽出を行い、この抽出物をTricine SDS-PAGEで分析した。ラベルペプチドの検出はゲルスライス法または電気泳動後、PVDF膜に電気泳動プロットし、イメージングプレート(IP)を用いたラジオルミノグラフィ法で行った。

(6) Tricine SDS-PAGE

Schaggerとvon Jagowの方法(31)にしたがい行った。濃縮ゲルは4% T, 3% C、スパーサーゲルは10% T, 3% C、分離ゲルは16.5% T, 6% Cを用いるシステムで行った。分子量マーカーはブレスティンマーカー(BRL)を用いた。

Ovalubumin, 43 kDa

Carbonic anhydrase, 29 kDa

β -Lactoglobulin, 18.4 kDa

Lysozyme, 14.3 kDa

Bovine trypsin inhibitor, 6.2 kDa

Insulin β chain, 3.5 kDa

(7) タンパク質定量

可溶化後の標品はBradford法(29)で定量した。標準タンパク質はBSAを用いた。



II-2 実験結果

II-2-1 骨格筋と心筋チャンネルの1,4-dihydropyridine結合親和性

DHP誘導体diazipine(48)はジアジリン基を光反応基に持つ、新規光アフィニティラベル試薬である(図11)。

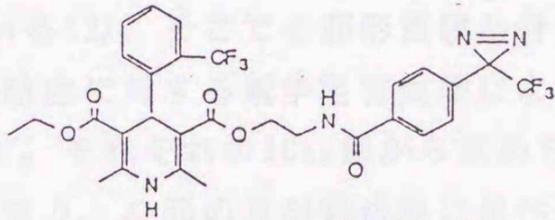


図11、Diazipineの構造

骨格筋Caチャンネルを用いた実験から、従来から使用されているazidopineと比べ結合親和性は同じだが、光ラベル効率が2倍高く、ラベル後の安定性も優れていることが知られている(27)。この試薬の心筋Caチャンネルへの適用を考え、まず、心筋DHP受容体に対する親和性を心筋形質膜画分を用い、DHP誘導体(+) [³H]PN200-110の結合に対する競争阻害実験で求め、さらに、従来のDHP化合物と比較した(図12)。

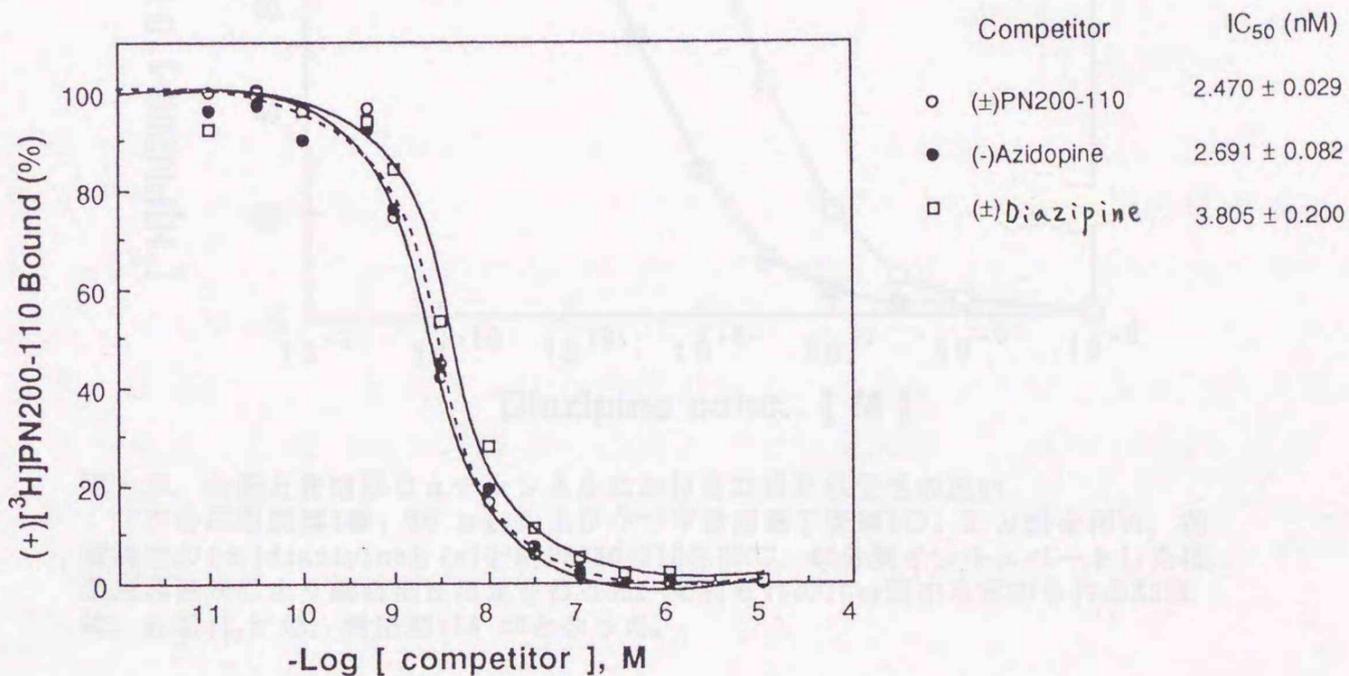


図12、心筋形質膜を用いたDHP化合物の(+) [³H]PN200-110の競争阻害実験
 ブタ心筋形質膜画分を用い、各種濃度のDHP化合物((±)diazipine (□), (-)azidopine (●), (±)PN200-110 (○))と0.17 nM (+) [³H]PN200-110をインキュベートし、急速濾過法で結合活性を測定した。
 右側はそれぞれの化合物のIC₅₀値を示す。(2回の実験の平均値)

Diazipineは濃度依存的に(+) [^3H]PN200-110 の結合を阻害し、 $\text{IC}_{50} = 3.81$ nMとなった。(+) [^3H]PN200-110の Kd 値 110 pM (結合飽和実験から求めた値)と使用濃度10 nMから計算し得られた Ki 値は1.48 nMであった。この結合親和性は、光ラベル試薬の光学活性体(-)azidopine(1.05 nM)と(±)PN200-110(0.96 nM)の Ki 値とほぼ同等の値であった。

一般にDHPの結合親和性は、骨格筋に比べそれ以外の組織では高いことが知られている(2)。そこで心筋形質膜と骨格筋T管膜標品を用いて、(+) [^3H]PN200-110の結合に対する競争阻害実験によってdiazipineの結合親和性を比較した(図13)。それぞれの IC_{50} 値から求められる Ki 値は、心筋 1.5 nM、骨格筋 14.0 nMとなり、心筋の方が骨格筋に比べ約10倍高く、diazipineを用いた場合でもDHP類一般にみられるのと同様、両者の親和性に違いが見られた。したがって、このdiazipineを用いて光ラベルし、そのラベルされる部位を直接比較することで、心筋と骨格筋のCaチャンネルのDHP親和性をもたらす構造的要因を明らかにすることができると考えた。

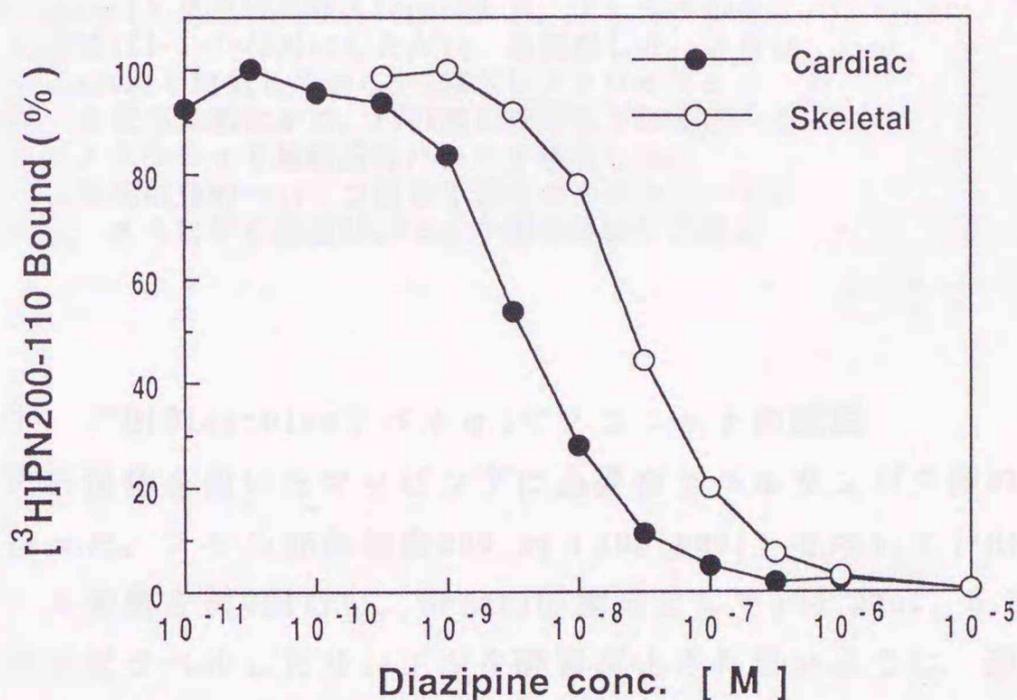


図13、心筋と骨格筋CaチャンネルにおけるDHP感受性の違い
ブタ心筋形質膜(●, 50 μg)およびウサギ骨格筋T管膜(○, 2 μg)を用い、各種濃度の(±)diazipineと(+) [^3H]PN200-110を25°C, 40分間インキュベートした後、急速濾過法により結合活性測定を行った。それぞれの IC_{50} 値から求められる Ki 値は、心筋;1.5 nM, 骨格筋;14 nMとなった。

II-2-2 [^3H]Diazipineによる心筋 $\alpha 1$ サブユニットの光アフィニティラベル

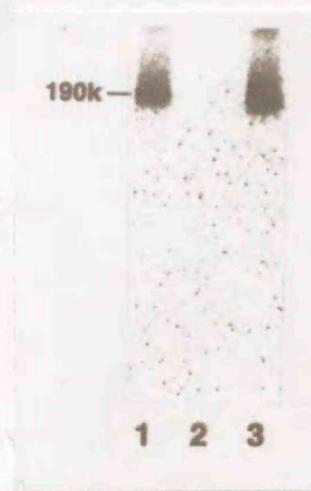
第I章でも述べたが、心筋Caチャンネルは可溶化してしまうとDHP結合能がほとんど消失してしまう。したがって、DHPを膜面分中で結合させてから、可溶化する方法(16,17,18)が一般に用いられている。以上のことを考慮し、Diazipineによる心筋Caチャンネルの光ラベルは以下のように行った。

形質膜画分(比活性 約1 pmol/mg)に10 nM [³H]diazipineを結合させた後、1% digitoninで可溶化した。これをWGA-Sepharoseにかけ過剰のリガンドを除き、かつ部分精製を行った。光ラベルはこのWGA溶出画分に対し、20W Black lampで30分間、光照射して行った。光照射後、Heparin-agaroseでさらに精製と濃縮を行った。還元条件下でSDS-PAGEを行った後、PVDF膜に電気泳動プロットしてラジオミノグラフィーによる³H標識ポリペプチドを解析を行った。その結果、図14のlane 1, 2に示すように190 kDaのα1サブユニットが特異的に光ラベルされていた。また、SDS-PAGE後、ゲルスライスして光照射によってα1サブユニットに取り込まれた³Hdiazipineの割合を求めると、全結合量の15%となった。一般に光アフィニティラベル法で取り込まれる割合は数%程度にすぎないので、diazipineの光ラベル効率はかなり高いといえる。

図14、³H Diazipineによる心筋Caチャンネルのα1サブユニットの特異的光ラベル

ブタ心筋形質膜に10 nM [³H]diazipineで(±)PN200-110非共存(lane 1)または共存(lane 2)下、プレラベルを行い、実験項(II-1-2-(2))にしたがい、光照射した。さらにHeparin-agaroseで精製してから5-15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にかけ、PVDF膜に転写してIPを用いるラジオミノグラフィーで放射活性バンドを検出した。

lane 3は光照射後のヘパリン画分を還元カルボキシメチル化してから、さらにゲル濾過HPLCにより部分精製した標品



II-2-3 [³H]Diazipineラベルα1サブユニットの調製

抗ペプチド抗体を用いたマッピングに必要なラベルタンパク質の調製を以下のように行った。ブタ心筋形質膜200 mg (200 pmol)を用いて³Hdiazipineによる光ラベル実験を計3回行い、Heparin-画分として133 pmol, 6.2 X 10⁶ dpmを得た。次に光ラベルしたサンプルを酵素消化され易いように、還元カルボキシメチル化し、0.1% SDS存在下ゲル濾過HPLCで部分精製し、ラベルα1を得た。回収放射活性量は6.1 X 10⁵ dpmで、Heparin-画分の約10%であった。これは光ラベル効率とほぼ一致していた。HPLCで精製した標品のラジオミノグラフィーは図14, lane 3に示す。

II-2-4 酵素消化

ゲル濾過HPLCで精製したα1サブユニットを、基質特異性の高い2種のプロテアーゼ *Achromobacter lyticus* protease I (API) とトリプシンで消化した。消化によって、より小さなフラグメントが生成することを目的とし、基質と酵

素の重量比 (S/E) を API では 10, トリプシンでは 1 とした。37°C, 24時間消化後、生成するペプチドフラグメントを Tricine SDS-PAGE とゲルスライス法によって検出すると、図15のようになった。API 消化では8.0 kDaと4.5 kDa、トリプシン消化では6.3 kDaと3.0 kDaと、それぞれ2つの主要なラベルフラグメントが生成していた (図15)。

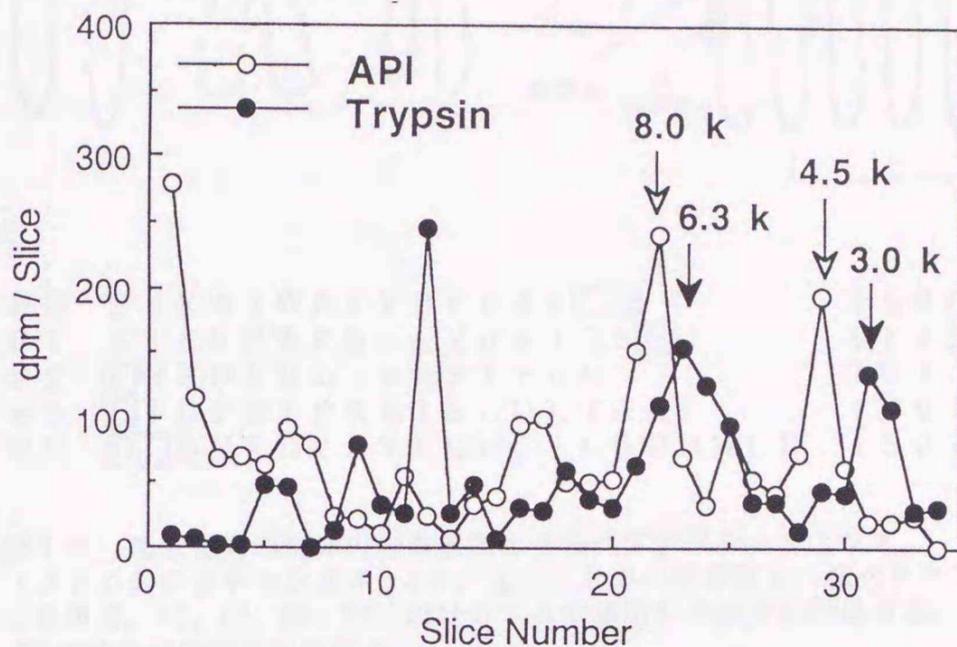
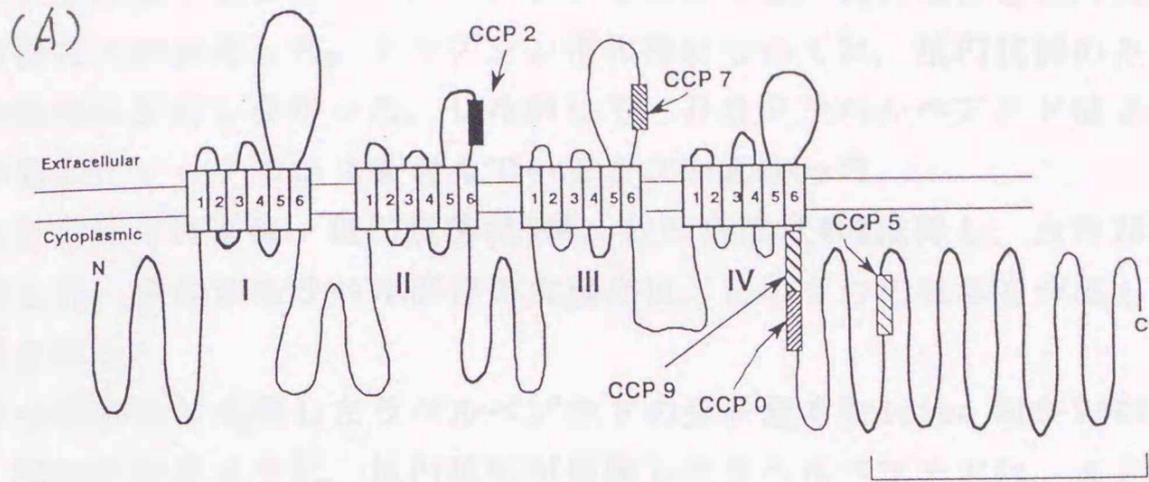


図15、ラベル $\alpha 1$ のAPI消化またはトリプシン消化によって生成するラベルフラグメントの分子量
 心筋ラベル $\alpha 1$ をAPI (○, S/E=10) またはTPCK-trypsin (●, S/E=1) で37°C, 24時間酵素消化した。生成したラベルフラグメントの分子量をTricine SDS-PAGEで分析した。放射活性はゲルスライス法(I-1-2-(4))によって検出した。

II-2-5 部位特異的抗体によるラベルフラグメントの同定

API, トリプシン消化で生成したラベルフラグメントの解析を行うにあたり、既に明らかになっている骨格筋DHP結合部位の結果を考慮し、部位特異的ペプチド抗体を心筋 $\alpha 1$ サブユニット上の図16, Aに示す6ヶ所の部位に対して用意した。抗体調製に作製した各ペプチドの名称とアミノ酸配列は図16, Bに列記した。

各々の抗体は、固相合成したペプチドとキャリアタンパク質 (BSAまたはチログロブリン) を架橋したコンジュゲートをウサギに免疫して、抗血清として得た。CAS9抗体は、心筋 $\alpha 1$ サブユニットのC末500残基に相当する大腸菌発現タンパク質をウサギに免疫して作製したものである。これらの抗体とラベルペプチドとの反応性をprotein A-Sepharoseを用いた免疫沈降法によって調べた。各抗体は沈降率に多少の差はあるが、酵素消化前の還元カルボキシメチル化したラベル $\alpha 1$ サブユニットをいずれも効率よく免疫沈降した (図17)。



(B)

P0	E F K A I W A E Y D P E A K C G	1526-1539
P7	S T F E G W P Q L L Y R A I D S C	1142-1157
P2	C N F D E M Q T R R S T F D N	707-729
P5	C I G P E I R R A I S G D L T A E E	1691-1707
P9	G C D N F D Y L T R D W S I L G P H H L D	1507-1525

図16、部位特異的抗体を作製箇所とそのペプチドシーケンス

(A) 心筋Caチャンネル $\alpha 1$ サブユニットの一次構造上、抗ペプチド抗体を作製した領域。P2, P7, P9, P0, P5はカラムで表示した部分に対応する。CAS9はC末端549残基の領域に対応する。

(B) 抗原ペプチドのシーケンスと対応する心筋Caチャンネル $\alpha 1$ サブユニットのアミノ酸残基番号

□で囲んだアミノ酸は実験の都合上、付け加えたかまたは置換したものを示す。

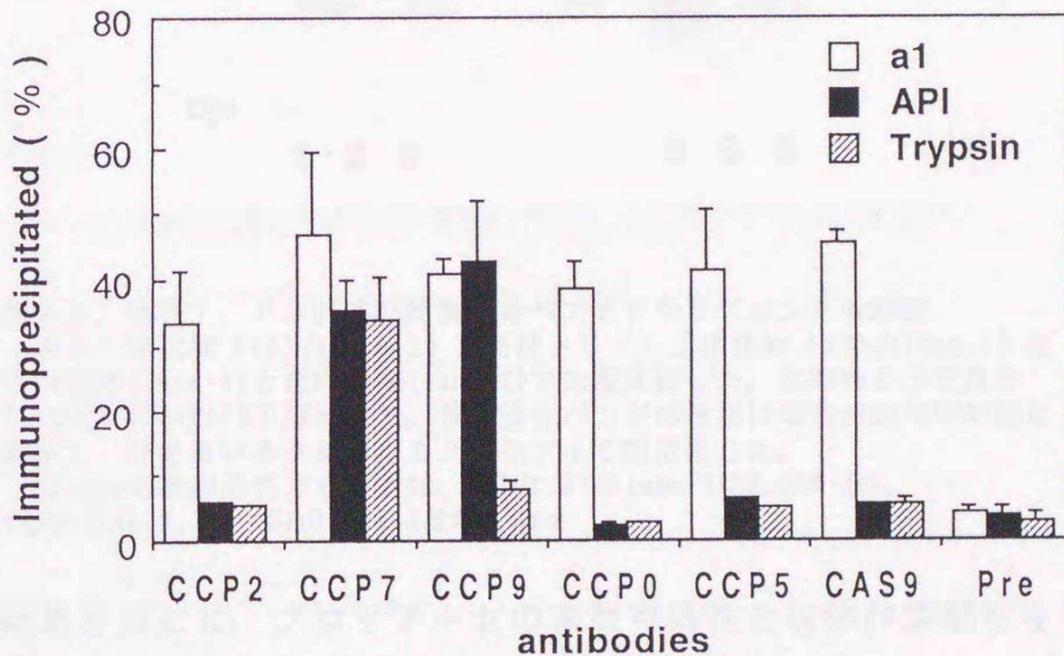


図17、免疫沈降法による部位特異的抗体とラベルペプチドの反応性

酵素消化前(□)とAPI消化後(■)またはトリプシン消化後(▨)の心筋ラベル $\alpha 1$ (3,000 dpm)を各抗体ビーズ(100 μ l)と室温、2時間、インキュベートして免疫沈降実験を行った。沈降した放射活性を測定してその割合を求め、グラフ化した。

API消化で生じたラベルペプチドに対しては、抗P7抗体と抗P9抗体の2つの抗体だけが反応した。トリプシン消化物については、抗P7抗体のみ反応し、抗P9抗体は反応しなかった。したがって、DHPラベルペプチドは2つの抗体を作製したシーケンスを含んでいることがわかった。

API消化物では、抗P7抗体は35%、抗P9抗体は40%沈降し、合計75%の沈降率を示した。すなわちラベル部位の大部分は、この2つの抗体を作製した箇所を説明される。

2つの抗体で沈降したラベルペプチドの分子量をTricine SDS-PAGEで測定した。図18に示すように、抗P7抗体が認識したラベルペプチドは、API消化物中4.5 kDa、トリプシン消化物中3.0 kDaであった。抗P9抗体では、API消化物中8.0 kDaであった。トリプシン消化物の6.3 kDaは抗体によって認識されなかったが、API消化物8.0 kDaに由来するものであることは後述する。

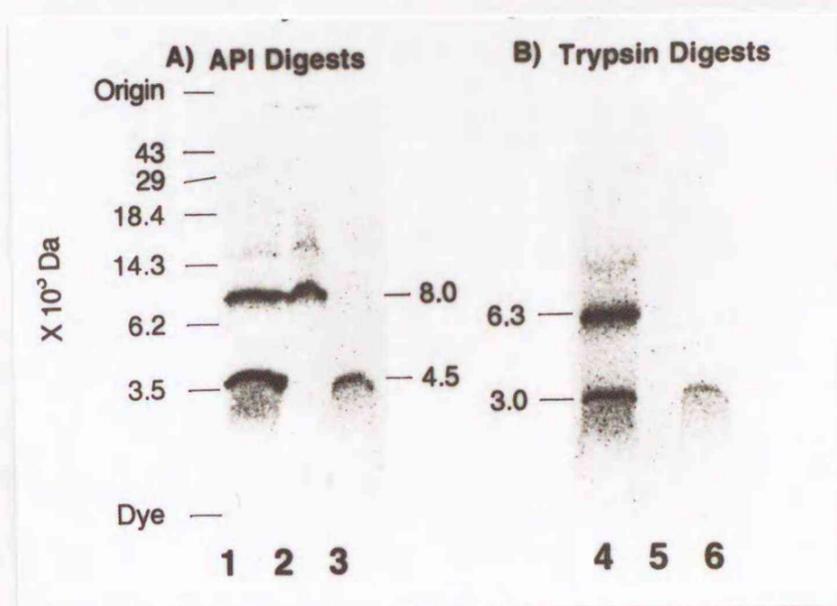


図18、抗P7、P9抗体が認識するペプチドフラグメントの同定

API消化物(A)のlane 1)またはトリプシン消化物(B)のlane 1)を抗P7抗体(lane 3)と抗P9抗体(lane 2)で免疫沈降した。沈降物の分子量をTricine SDS-PAGEで解析した。放射活性バンドの検出は電気泳動後PVDF膜に転写し、IPを用いるラジオグラフィで視覚化した。

各laneの放射活性カウントは、(A)と(B)のlane 1は2,000 dpm、(A)のlane 2, 3と(B)のlane 2は800 dpm

以上の結果をもとに、プロテアーゼの基質特異性と抗体作製部位を考慮し、それぞれのラベル部位について一次構造上の帰属を行った。

抗P7抗体で認識される部位を図19, Aに示す。API消化物4.5 kDaは、Phe(1126)-Lys(1162) (計算分子量4.3 kDa)であり、トリプシン消化物3.0 kDaは、Phe(1126)-Arg(1153)に対応し、計算分子量3.3 kDaとなる。一方、抗P9抗体で

認識される部位を、図19, Bに示す。抗P0抗体が反応しないことから、API消化物8.0 kDaはCys(1461)-Lys(1530) (計算分子量7.9 kDa) と帰属された。

トリプシン消化物6.3 kDaには抗P9抗体が反応しなかったが、これは抗P9抗体エピトープ中のArg(1516)の後で切断が起こったため、抗体の反応性が低下したと推測した。したがって、この6.3 kDaフラグメントは、Cys(1461)-Arg(1516) (計算値6.1 kDa) に相当すると見なされる。

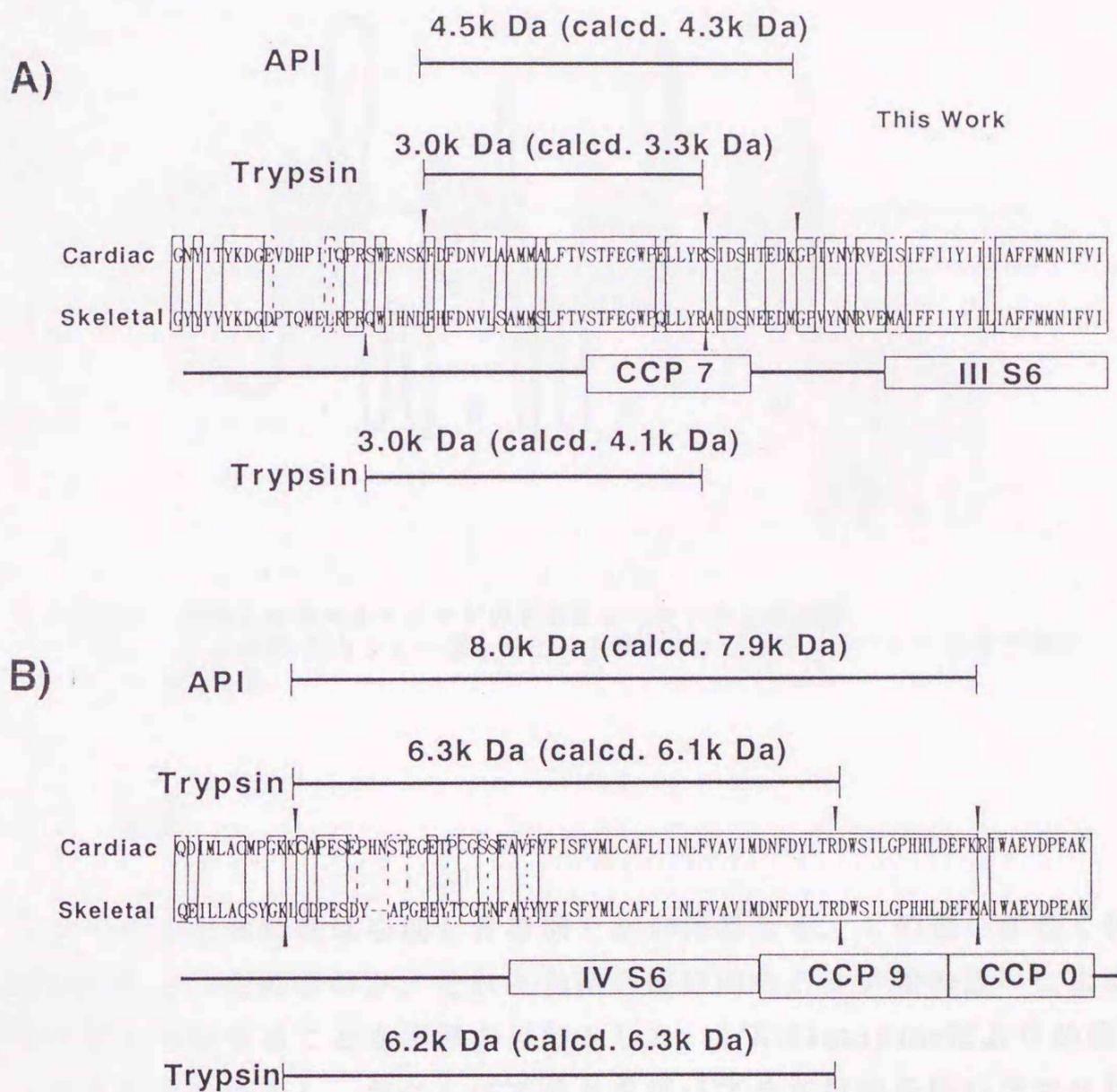


図19、心筋Caチャンネルα1サブユニットの一次構造の帰属と骨格筋チャンネルのラベル部位との比較

心筋と骨格筋それぞれのα1サブユニットのアミノ酸配列を比較した。実線で囲んだところは同一のアミノ酸、破線で囲んだアミノ酸は相同性の高いアミノ酸を示す。

同定した心筋チャンネルのラベル部位を上部に、骨格筋チャンネルのラベル部位を下部に示した。↓印の箇所では切断されていると推測される。

(A)、抗P9抗体の認識するペプチドフラグメント
リピートIIIのS5-S6のリンカー部である。

(B)は抗P9抗体の認識するペプチドフラグメント
リピートIVのS6トランスメンブレンを含む部分である。

心筋の ^3H diazepamラベル部位はトポロジーモデル上、太線で示すようにリピートIIIのS5-S6リンカー部およびリピートIVのS6を含んだ領域の2ヶ所であった(図20)。この2ヶ所の部分は骨格筋で同定したラベル部位(45)と基本的に同じである。心筋の2ヶ所のラベルペプチド内で、骨格筋チャンネルとアミノ酸配列のホモロジーを比較してみると、トリプシン消化物の3.0 kDaは85.7% (28残基中24残基同一)、トリプシン消化物の6.3 kDaは72.2% (54残基中39残基同一)であった。

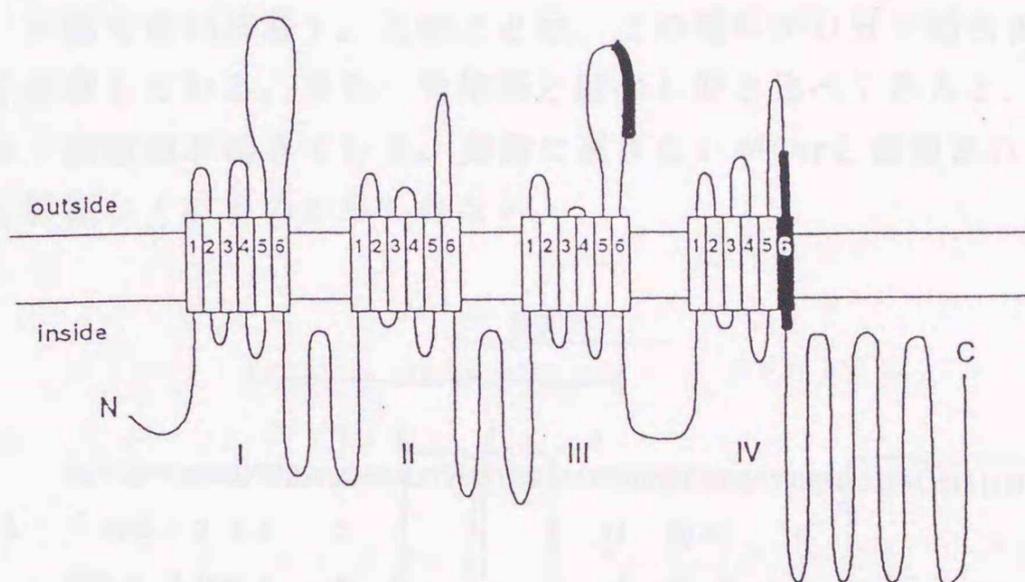


図20、同定したラベルペプチドのトポロジーモデル上の位置
 リピートIIIのS5-S6リンカー部とリピートIVのS6トランスメンブレンを含む部分の2ヶ所である。

II-3 考察

DHPの結合親和性は心筋と骨格筋で約10倍異なる。この違いが全く異なる結合部位をもつためなのか、それとも結合部位内のアミノ酸の違いによるものなのか明らかにすることを本章の目的とした。 ^3H diazepamにより心筋Caチャンネルを光ラベルし、ラベルペプチドを抗ペプチド抗体を用いたマッピングにより同定し、DHP結合部位は一次構造上リピートIIIのS5-S6リンカー部分とリピートIVのS6トランスメンブレンを含む領域の2ヶ所であることを明らかにした。この2ヶ所は骨格筋で同定された部位と対応することから、心筋と骨格筋のDHP感受性の違いは結合部位内のアミノ酸の違いによるものと結論された。

近年、cDNAクローニングにより多くの組織や種類の異なる電位依存性Caチャンネルの一次構造の明らかになってきた(5-15)。心筋で同定したラベル部位

に相当する部分のアミノ酸配列を骨格筋、脳のL型チャンネル、脳のDHP非感受性のNおよびP型チャンネルで比較した(図22)。

まず、図21,Aに示したリピートIIIのS5-S6リンカー部について、ラベル部位の前後を含め全体的に見てみると、DHP感受性のL型は非常に良く保存されているが、DHP非感受性のN型とP型ではあまり保存はされていない。ラベル部位内でもイオン透過口を形成するとされるSS1とSS2の部分(49)を除けばL型に比べ置換されているアミノ酸は多い(骨格筋と脳L型は18残基中4残基に対し、N型、P型では11残基)。このことは、この場所がDHP結合部位であることを強く示唆している。また、骨格筋と脳のL型と比べてみると、ところどころにアミノ酸置換が起きている。推測に過ぎないがSerと置換されているAlaが親和性に影響しているのかもしれない。

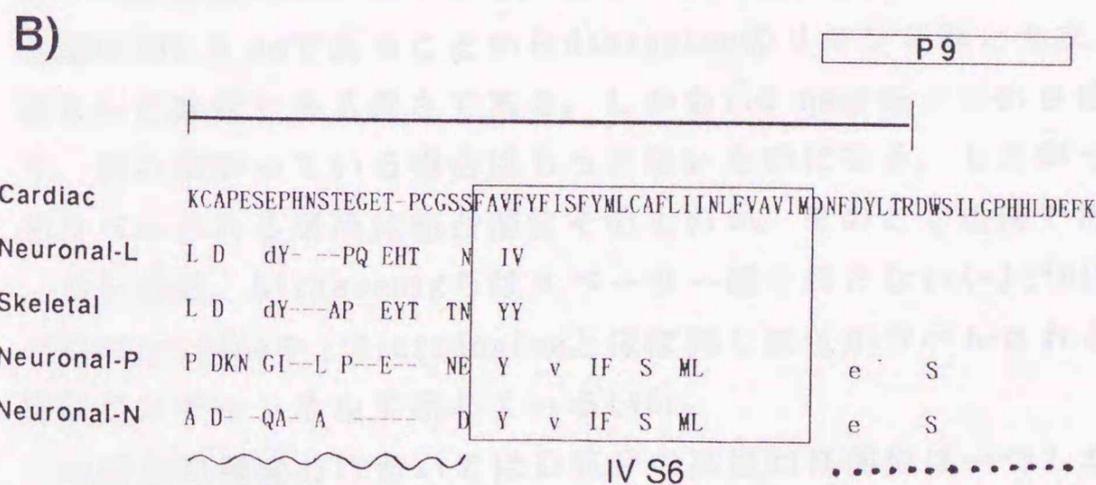
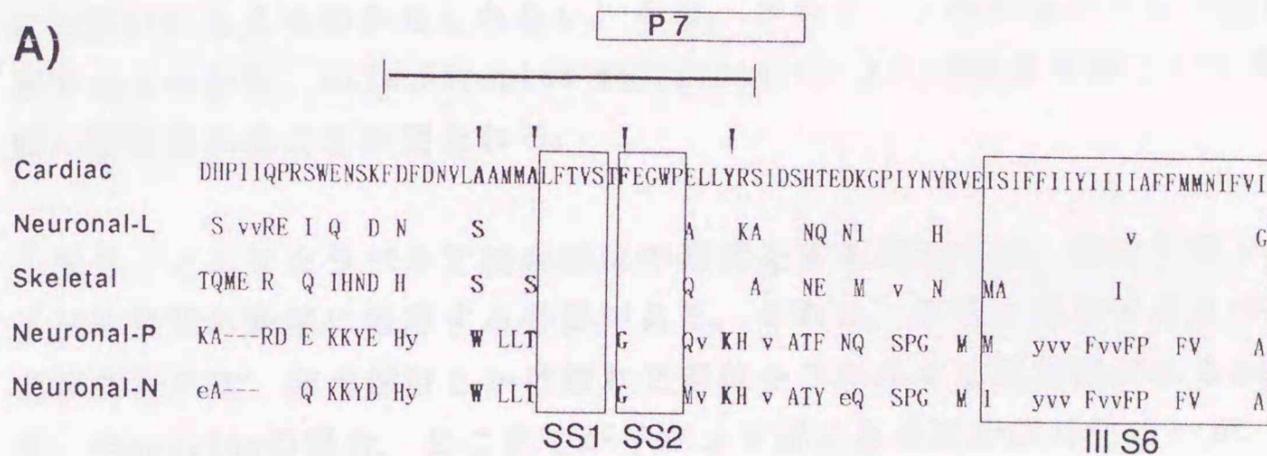


図21、心筋ラベル部位領域の種々の電位依存性Caチャンネルにおける一次構造の比較

心筋以外の組織のチャンネルについては異なるアミノ酸のみを表示した。
各ラベルフラグメントは———で示した。
(A) リピートIIIのS5-S6リンカー部
SS1,SS2はイオン選択フィルターと推測されている部分。
(B) リピートIVのS6トランスメンブレンを含む部分
~~~~~はDHP結合部位、.....はPAA結合部位と考えられる部位

一方、図21, Bに示すリピートIVのS6トランスメンブレン部を含む領域のうちN末端側の細胞外に出ているとされる部分のホモロジーは、各チャンネルの間で低いが、C末端側の細胞質側に面している部分のホモロジーはかなり高い。チャージを持ったDHP誘導体を用いたKassらの実験により、DHPは細胞の外側からCaチャンネルに接近し、イオン透過をブロックすることが示唆されている(47)。このことから、細胞外に出ている部分の方にDHPは結合していると考えられる。細胞質側の部分は、骨格筋でPAAの結合部位として同定された部分である(44, 図22を参照)。この部分はL型チャンネル間では100%保存されている。このことはPAAの結合親和性がL型Caチャンネル間で変わらないことを反映している。これに対し、リピートIVのDHP結合部位ではかなりの部分でアミノ酸置換が起こっており、先に述べたリピートIIIのS5-S6リンカー部と比べても多い。したがって、DHPの結合親和性の違いはこちらの部位の違いによるものかもしれない。今後、どのアミノ酸残基がDHP結合に重要であるのかは、site-directed mutagenesisによる点変異実験などでさらに詳細に解析されることが望まれる。

光アフィニティラベルで結合部位の研究をする場合には、常にリガンド部と光反応基間の距離に留意する必要がある。それは、両者を連結するスペーサー部が長ければ、結合部位とかけ離れた部位をラベルする危険性があるからである。Diazipineの場合、どこまでがリガンド部であるのか決めにくい。ジヒドロピリジン環をリガンド部とすれば、その中心からカルベンを発生させる炭素までの距離は約1.4 nmである。分子モデル上、Lys残基の $\alpha$ 炭素と $\epsilon$ アミノ基の距離は約0.6 nmであることからdiazipineのリガンド部と光反応基の間の距離はほとんど無視できる長さである。しかも1.4 nmは最大に引き延ばした場合であり、折れ曲がっている場合はもっと短いものになる。したがって、diazipineで光ラベルされる場所は結合部位そのものか、そのごく近傍であるといえる。

つい最近、Striessnigらはスペーサー部を持たない(+)[ $^3\text{H}$ ]PN200-110でも、[ $^3\text{H}$ ]diazipineや[ $^3\text{H}$ ]azidopineとほぼ同じ部位がラベルされることをウサギ骨格筋Caチャンネルで示している(46)。

心筋形質膜画分においてはDHPの高親和性部位は一つしかない。このことから骨格筋で提唱されているようにこの2ヶ所の部分は $\alpha 1$ サブユニットの高次構造上寄り添うようにして1ヶ所のDHP結合部位を形成していると考えられる(図22)。

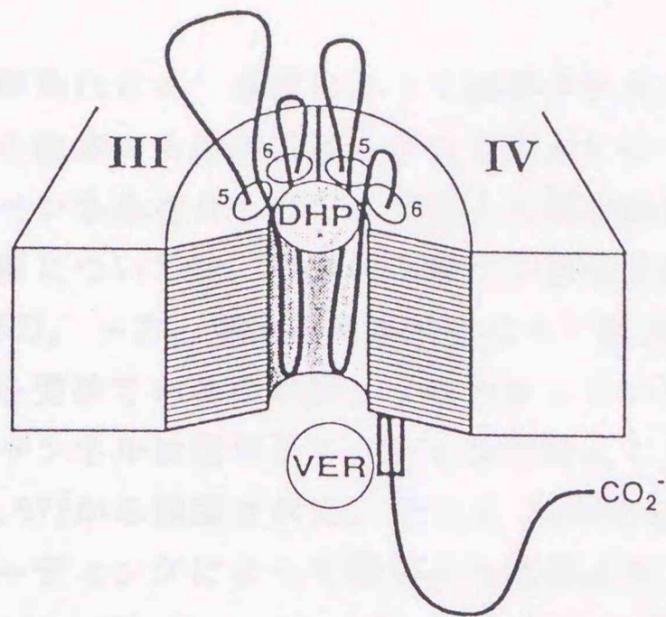


図22、DHPとPAAの結合部位(文献(45)より転載)

DHPは細胞の外側からチャンネルに結合し、イオン透過口付近に結合する。  
一方、PAAは細胞の内側にその結合部位を持つ。

各リピートのS5-S6リンカー部の一部はチャンネルの内側に入り込み、イオン透過口形成に関与していると考えられる。

光アフィニティラベル法と部位特異的ペプチド抗体を組み合わせリガンド結合部位を解析する方法によって、本研究で示したように十分な精製が行えずかつ微量しか得られない心筋Caチャンネルでも、そのリガンド結合部位を同定できた。リガンドとしてCaアゴニストやbenzothiazepine誘導体を用いても適用可能と考えられ、今後の展開が期待される。

### 第Ⅲ章 リアノジン受容体のリン酸化と活性調節

心筋細胞の収縮は、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度によって調節される。細胞内 $Ca^{2+}$ は細胞外からの流入と筋小胞体からの放出および取り込みによって調節されている。形質膜L型Caチャンネルを介した $Ca^{2+}$ 流入と筋小胞体Caポンプによる $Ca^{2+}$ 取り込み調節については、タンパク質リン酸化反応が重要であることが知られている(50,51)。一方、筋小胞体からの $Ca^{2+}$ 放出ではあまり報告がなく、どのような制御を受けているのか詳しくはわかっていない。

筋小胞体Ca放出チャンネルは近年リアノジン受容体として、骨格筋(52,53,54)および心筋(55,56,57)から精製された。 $^{45}Ca$  flux測定や、平面膜法による単一チャンネルレコーディングによって得られた結果より、Ca放出チャンネル活性は、 $\mu M$ オーダーの $Ca^{2+}$ 、 $mM$ オーダーのATPで活性化され、 $mM$ オーダーの $Mg^{2+}$ 、 $\mu M$ オーダーのRRやCaMにより阻害されることが示されている(58,59)。

最近、2,3のグループによって心筋リアノジン受容体が種々のタンパク質リン酸化酵素の基質となることが報告されてきた(60,61,62)。それらはリアノジン受容体がリン酸化をうけることで機能変化することを観察しているが、相反する結果もみられている。

そこで筆者は、リン酸化によるリアノジン受容体の活性制御機構を調べるために、精製受容体をリボソームに埋めこんだ再構成系において、cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)とカルモジュリンキナーゼ(CaMK)によって受容体をリン酸化し、その影響を $^{45}Ca^{2+}$  influx測定、平面膜法による単一チャンネルレコーディングおよび $[^3H]$ ryanodine結合によって調べた。

### III-1 実験材料と実験方法

#### III-1-1 実験材料

この章で新たに用いた試薬類を示す。

|                                                                    |                                  |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| [ <sup>3</sup> H] Ryanodine (60.5 Ci/mmol)                         | (NEN)                            |
| <sup>45</sup> Ca (25.4 mCi/mg)                                     | (NEN)                            |
| CHAPS                                                              | (同仁)                             |
| EGTA                                                               | (同仁)                             |
| Ryanodine                                                          | (和光純薬)                           |
| Ruthenium red                                                      | (和光純薬)                           |
| Polyethylene Glycol #6000                                          | (Nacalai Tesque)                 |
| L- $\alpha$ -Phosphatidylcholine (PC)<br>(from soybean, type II-S) | (Sigma)                          |
| Bovine $\gamma$ -globulin                                          | (Sigma)                          |
| Valinomycin                                                        | (Sigma)                          |
| Rat brain CaMK II                                                  | 都立神経総合研、山内卓博士から恵与された             |
| Bovine catalytic subunit of PKA                                    | Okunoらの方法(63)で調製した。              |
| Calmodulin (CaM)                                                   | Gopalakrishunaの方法(64)でウシ脳から精製した。 |

#### III-1-1 実験方法

##### (1) ブタ心筋ミクロソーム画分の調製

I-1-2-(1)にしたがい行い、シヨ糖密度勾配遠心をする前の沈殿を0.6 M KCl 10 mM L-histidineで懸濁し、105,000 X  $g_{max}$ , 1時間遠心を行い、再度沈殿させ0.25 M sucrose, 0.2 M NaCl, 25 mM Hepes-Tris(pH 7.2)で再懸濁した。これをこの章の”ミクロソーム”とした。ミクロソームはセラムチューブ(住友ベークライト)に小分けし、液体窒素で凍結した後、-80°Cで保存した。

##### (2) 心筋リアノジン受容体の精製とリボソームへの再構成

精製はすべて4°Cで行い、用いたすべてのbufferにはタンパク質分解酵素阻害薬(0.1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 1  $\mu$ g/ml leupeptin)を入れた。

心筋リアノジン受容体の精製は、Inuiらの方法(55)とLaiらの方法(56)を組み合わせで行った。ブタ心筋ミクロソーム画分(120 mg)を60 mlの1 M NaCl, 1%

CHAPS, 0.5% PC, 20 mM Hepes-Tris(pH 7.2)中、氷上、1時間、インキュベートした(界面活性剤/タンパク質の重量比は 5、タンパク質濃度は2 mg/ml)。インキュベート後、 $105,000 \times g_{max}$ , 45分間遠心して可溶化画分を得た。可溶化画分を5 mlずつ10~30% sucrose, 0.5 M NaCl, 0.5% CHAPS, 0.25% PC, 20mM Hepes-Tris(pH 7.2) 32ml(計12本)の上層にのせ、日立SRP28-SAスウィングローターで26,000 rpm  $\times$  16時間、遠心した。遠心終了後、各チューブの上層側から Automatic liquid charger(アドバンティック)とペリスタポンプ(アトー)を用いて2 mlずつ分画した。各画分から50  $\mu$ lを取り、それぞれ $[^3\text{H}]$ ryanodine結合活性を測定し、放射活性ピーク画分(約100 ml)を回収した。これに等量の0.5% CHAPS, 0.25% PC, 20 mM Hepes-Tris(pH 7.2)を少しずつ加えてゆき、NaClの濃度を0.25 Mまで下げた。これを0.2 M NaCl, buffer A(0.5 % CHAPS, 0.25% PC 0.25 M sucrose, 20 mM Hepes-Tris(pH7.2))であらかじめに平衡化しておいた Heparin-agarose(3 ml gel)に通した。続いてカラムを0.2 M NaCl, buffer A (30 ml)ですばやく洗った後、0.8 M NaCl, buffer Aでリアノジン受容体を溶出した(流速;1 ml/min)。分取は1 mlずつ行い、吸光度280 nmでタンパク質をモニターしてピーク画分を集め、Heparin-画分とした。約900  $\mu$ gのタンパク質が得られた。リボソームへの再構成は直ちに行い、再構成実験以外の目的に使用する場合は、液体窒素で凍結し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

リボソームへの再構成はFerrisらの方法(65)を参考にして行った。再構成は Heparin画分を凍結保存せず精製後、直ちに行った。ここに典型的な実験例を示す。1 mlのHeparin-画分(300  $\mu$ g/ml)にタンパク質:脂質の重量比が1:50になるように4% PC, 0.5% CHAPSを380  $\mu$ l加えた。この混合溶液(220  $\mu$ g/ml) 1.38 mlを透析buffer(0.1 M KCl, 10 mM Hepes-Tris(pH 7.4))に対して、24時間、透析した。この間、bufferは5回交換した。また、透明だった混合溶液は白濁した。透析後、超音波処理(bath型、10秒  $\times$  2回)を行い、 $3,000 \times g_{max}$  3分間、遠心して不溶化物を除き、得られた上清を”再構成受容体”として以後の実験に用いた。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx測定、 $[^3\text{H}]$ ryanodine結合活性測定は、再構成後直ちに行った。保存する場合は、0.25 Mになるようにsucrose加え、液体窒素で凍結し、 $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

### (3) 再構成受容体のリン酸化

再構成受容体(50-80  $\mu$ g/ml)をphosphorylation-buffer(70 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Hepes-Tris(pH 7.2))中で、50  $\mu$ Mまたは1 mM  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とともに0~60分間、 $30^\circ\text{C}$ でインキュベートした。PKAによるリン酸化は、20  $\mu$ g/ml catalytic subunit of PKAを、CaMKの場合には、3  $\mu$ M CaM, 2.4  $\mu$ g

/ml CaMK II, 1 mM EGTA, 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>をphosphorylation-buffer中に共存させてリン酸化を行った。一定時間後、SDS-sampling bufferを加え反応を停止させた。次に、これを6%ゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。ゲルはCBB染色後、乾燥させ、Fuji New RX Filmを用いてオートラジオグラフィまたは、イメージングプレート(IP)を用いてFujiバイオイメージングアナライザー(Bas 2000)によりリン酸化タンパク質を検出した。受容体タンパク質への<sup>32</sup>Pの取り込みは400 kDaのバンドを切り取り、液体シンチレーションカウンターで測定した。

<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influxと [<sup>3</sup>H]ryanodine結合活性を測定する場合には、次のようにしてリン酸化受容体を調製した。再構成受容体を1 mM ATPを用いて上記の条件下30分間リン酸化した。反応終了と同時に、あらかじめflux-bufferで平衡化しておいた2 mlのSephadex G-50を詰めたミニカラム(セパコールミニ, 生化学工業)に通した。カラムにかけた後、直ちにflux-bufferで受容体を溶出させた。ATPを含まない再構成受容体は、600-1200 μlのところに出てくる(濁っているの分かる)。各測定にはこの画分を用いた。このカラム操作は4°Cで行った。

#### (4) <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx測定

再構成受容体(50 μg/ml)を含むflux-buffer(0.1 M KCl, 10 mM Hepes-Tris (pH 7.2), 0.1 μM valinomycin)に1/10容量の100 μM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>, flux-bufferを加え、リボソーム内への<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influxを開始させた(10 μM <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>)。氷上で一定時間インキュベートした後、反応溶液中から一定量を一部とり、ガラスフィルター(Whatman GF/C)上に注ぎ、急速濾過によってfluxを止めた。この時、マニホールド内には、あらかじめ、3 mlのstop-buffer(10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM RR, flux-buffer)を溜めておき、反応溶液はその上に注いだ。フィルターを直ちに3mlのstop-bufferで3回洗った後、フィルター上にトラップされたリボソームの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

MgCl<sub>2</sub>やRRによる阻害実験の時には、100 μM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>を加える前にあらかじめ再構成受容体と30分間インキュベートしておいて、それからflux反応を開始した。濾過装置はHoefer Model FH-2240V 10連マニホールドを用いた。

#### (5) [<sup>3</sup>H]Ryanodine結合活性測定

ミクロソーム画分(30 μg/100 μl)を結合活性測定buffer(1 M KCl, 1 mM EGTA, 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Hepes-Tris(pH 7.2))中、20 nM [<sup>3</sup>H]ryanodine (60.5 Ci/mmol)とともに30°C, 1時間インキュベートした後、I-1-2-(10)にしたがい、Brandel M-24を用いて急速濾過法により結合活性を測定した。非特異的結合は10 μM ryanodene存在下、またはCaCl<sub>2</sub>を除いたbuffer中で測定した。

可溶化後標品の結合活性測定は、MaedaらのPEG法(66)によって行った。0.5% CHAPS, 0.25% PCを含む100  $\mu$ lの結合活性測定buffer中で、ミクロソームと同様にインキュベートした。次に、反応溶液を氷上で4°Cにし、50 mg/ml bovine  $\gamma$ -globulinを5  $\mu$ l、続いて30% PEG #6000を100  $\mu$ l加え、よく混和してから、水中に10分間静置した( $\gamma$ -globulinとPEGの終濃度は1.25 mg/mlと15%、総容量205  $\mu$ l)。遠心操作により共沈させ、上澄みを注意深く取り除き、沈殿をH<sub>2</sub>Oで再懸濁した。これをバイアル瓶に移し、ACS IIを加えて、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

再構成受容体(2  $\mu$ g/100  $\mu$ l)はミクロソームと同条件でインキュベートした後、MaedaらのPEG法(66)により結合活性を測定した。

結合飽和実験は、上記の条件で<sup>3</sup>H]ryanodineの濃度を1-40 nM範囲で変化させて行った。Ca<sup>2+</sup>依存性を調べる実験は、KCl濃度を1.0 Mまたは0.12 Mとし、Ca<sup>2+</sup>濃度はCa<sup>2+</sup>-EGTA bufferで変化させて行った。

#### (6) 単一チャンネルレコーディング

PE/PS = 7/3 の脂質組成からなる平面膜をfolding法によって形成した。Trans側チャンバーに47 mM Ba(OH)<sub>2</sub>, 250 mM Hepes(pH7.4)、cis側チャンバーに900 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10-20 mM Hepes-Tris(pH 7.4)の組成からなる溶液を満たし、cis側にPE/PC/PS/ergosterol/Nystatin = 5/1/2/2/0.15 (モル比)からなるリボソームに再構成した精製受容体を加えて、平面膜に融合させた。cis側を灌流して1 mM Ca<sup>2+</sup>-EGTA([Ca<sup>2+</sup>] = 約8  $\mu$ M), 250 mM Hepes-Tris(pH 7.4)に置換し、transからcis側に流れるBa<sup>2+</sup>電流を測定した。ATP, Mg<sup>2+</sup>や酵素はcis側から加えた。

#### (7) SDS-PAGE

Laemmliの系(30)でI-1-2-(13)にしたがって行った。

#### (8) タンパク質定量

ミクロソームはI-1-2-(11)と同様に、Smithらの方法(28)により定量した。

可溶化精製標品はBradfordの方法(29)により行った。

再構成受容体は0.5 N NaOHでリボソームを可溶化してから、Bradfordの方法によって定量した。この場合、タンパク質の組み込んでいないリボソームも同時に定量し、バックグラウンドとした。標準タンパク質はBSAを用いた。

## III-2 実験結果

### III-2-1 心筋リアノジン受容体の精製とリボソームへの再構成

リアノジン受容体の精製はさまざまな方法によって達成されている(52-57)。筆者は、ブタ心筋ミクロソーム画分から1 M NaCl, 1% CHAPS, 0.5% ホスファチジルコリン(PC)で可溶化した後、0.5% CHAPS, 0.25 %PC存在下で10~30%連続シヨ糖密度勾配遠心法, 続いてHeparin-agaroseを用いたクロマトグラフィを行い、2段階精製した。120 mgのミクロソームからHeparin-agarose溶出画分をタンパク質量として約1 mg回収した。この精製標品について [ $^3\text{H}$ ] ryanodine結合活性を測定し、Scatchard解析すると、比活性は215 pmol/mgとなり、ミクロソーム画分(3 pmol/mg)に比べ、約70倍、精製度は上昇していた。SDS-PAGEにより解析すると、図23に示すように分子量400 kDaのほぼ単一のバンドとして検出された。デンストメーターによる定量では、90%の純度であった。二段階の短行程で、純度の高い標品が得られる点がこの精製法の利点である。

RyR → 

受容体のリボソームへの再構成は、精製終了後、直ち 図23、精製標品  
に行った。精製標品に、PCとタンパク質の重量比が50:1

になるようにPCを追加し、タンパク質濃度を約200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、この混合溶液から透析によってCHAPSを除き、PCから成るリボソームに受容体を埋め込んだ。

透明だった溶液は、透析を行うにしたがい次第に白濁し、リボソームの形成が確認できた。白濁溶液を超音波処理した後、遠心操作を行い、再構成されなかった不溶化受容体を除いた。遠心後の上清を“再構成受容体”として用いた。

### III-2-2 再構成受容体の特性 (1) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx測定

Caチャンネル活性は、リアノジン受容体の持つ機能の中でも主要なものである。再構成受容体がCaチャンネル活性を保持しているか、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ をトレーサーに用いたCa $^{2+}$  influx測定によって調べた(図24)。Ca $^{2+}$  influx測定は、10  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{Ca}^{2+}$ で再構成受容体を活性化し、チャンネルを開口させて、この開口したチャンネルを介してリボソーム内に流入する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 量を、一定時間毎に測定するものである。

受容体を埋め込んだ再構成リボソームは、タンパク質を含まないリボソームに比べ、速やかでかつ顕著なCa $^{2+}$  influxが観察された(図25)。

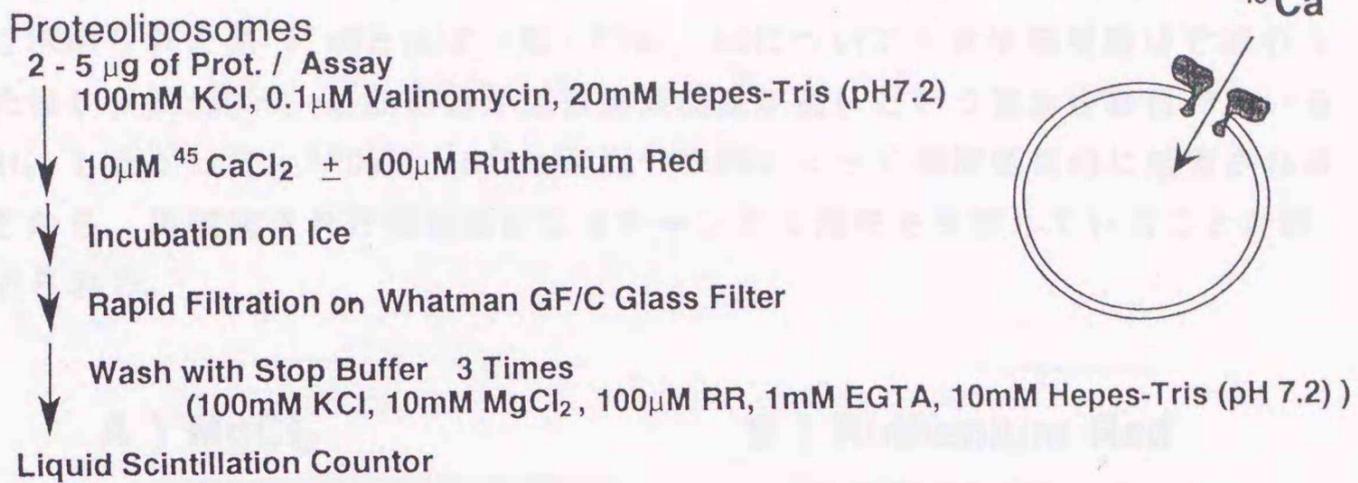


図24、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx測定の方法

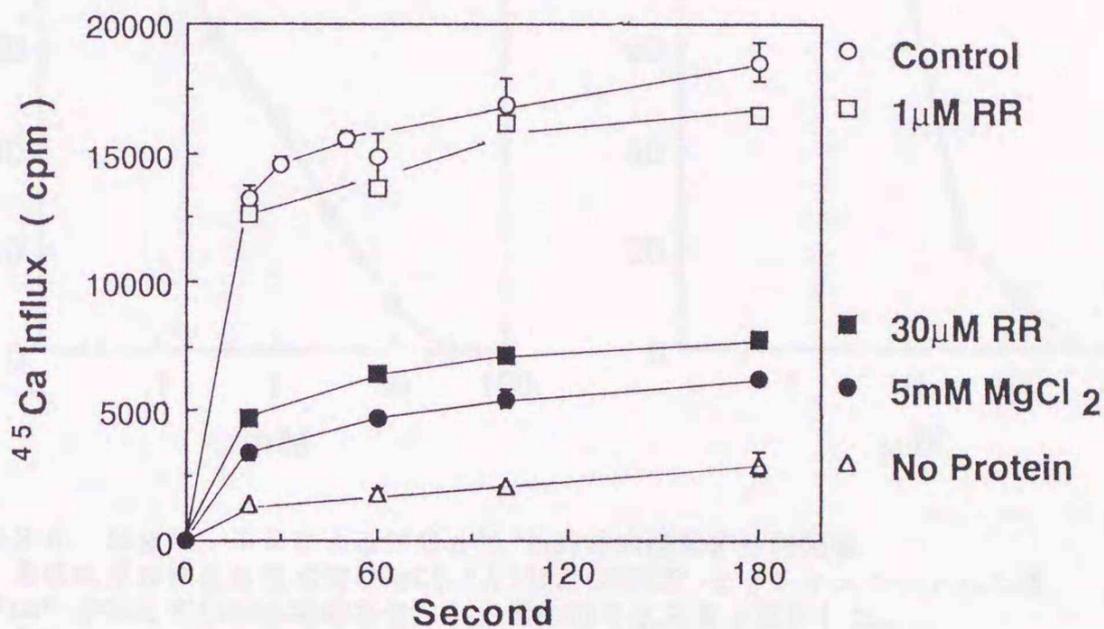


図25、再構成リアノジン受容体を介する $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx

心筋リアノジン受容体を再構成したリボソーム溶液に10  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を加え、リボソームに取り込まれる $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の量を一定時間毎に急速濾過法によって測定した(○)。1  $\mu\text{M}$ (□)、30  $\mu\text{M}$ (■)のRR、5 mM  $\text{MgCl}_2$ (●)と30分間、インキュベートしてから $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を加えた場合は、取り込みが阻害された。また、受容体を組み込んでいないリボソーム(△)では有為な取り込みは起こらなかった。

各値は平均値  $\pm$  S.D. (n = 3)

Ca誘発性Ca放出を阻害する $\text{Mg}^{2+}$  (5 mM)とあらかじめインキュベートしてから測定した場合には、このリボソームへの $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx量は減少し、阻害が観察された。また、ルテニウムレッド(RR)も阻害することが知られている。RRは1  $\mu\text{M}$ ではごくわずかの阻害しかかからなかったが、30  $\mu\text{M}$ では5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ と同程度の阻害を示した。そこで $\text{Mg}^{2+}$ とRRの阻害効果について、濃度依存性を

調べた(図26, AとB)。両者はともに $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influxを濃度依存的に阻害した。それぞれの $\text{IC}_{50}$ 値は1 mMと20  $\mu\text{M}$ であり、 $\text{Mg}^{2+}$ の値はイヌ心筋リアノジン受容体で求められた値3 mMとほぼ一致し(58)、RRについても骨格筋受容体で求められた値1  $\mu\text{M}$ に比べ、心筋の方が阻害効果濃度が高いという報告を裏付けている(59)。したがって、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influxが $\text{Mg}^{2+}$ やRRによって濃度依存的に阻害されることから、再構成された受容体がCaチャンネル活性を保持していることが確かめられた。

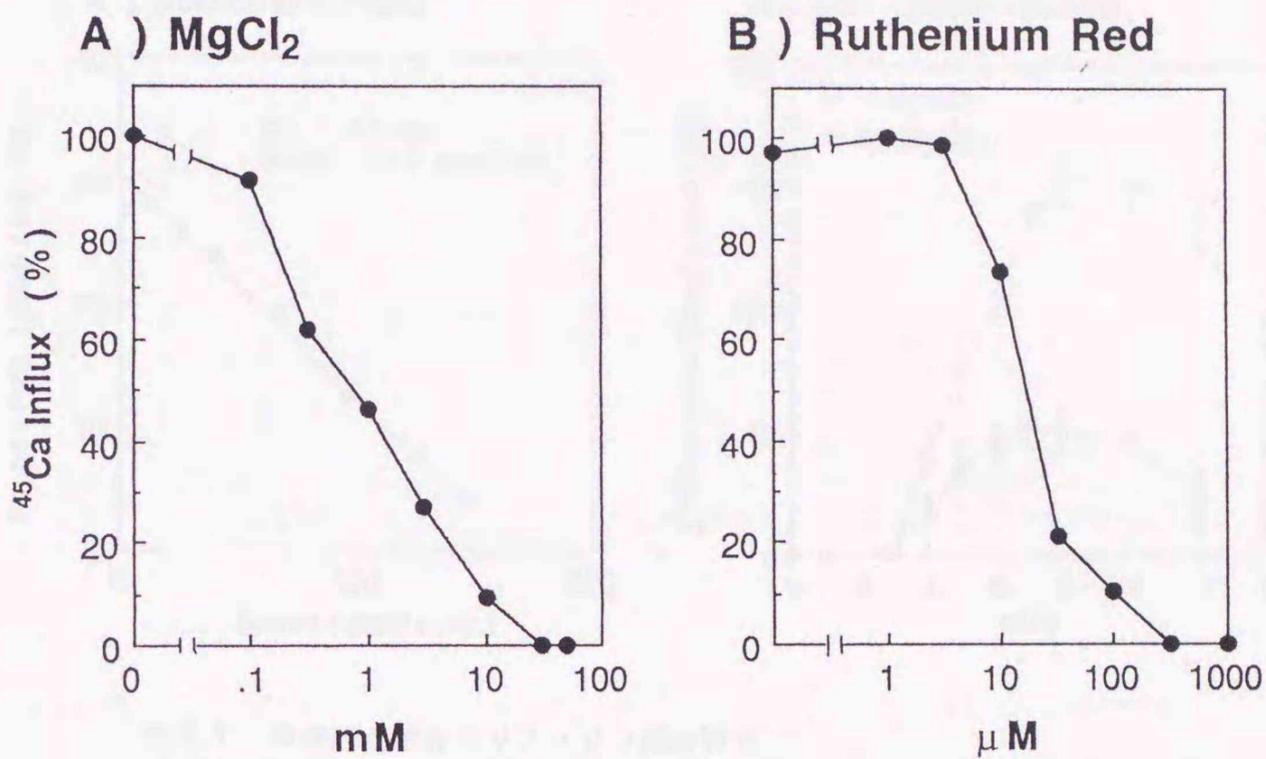


図26、 $\text{Mg}^{2+}$ 、RRによる $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influxの濃度依存的阻害  
 再構成受容体を各種濃度の $\text{MgCl}_2$ (A)およびRR(B)とインキュベートした後、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を加えてfluxを開始させ、30秒間の取り込み量を測定した。それぞれの $\text{IC}_{50}$ は $\text{MgCl}_2$ , 1 mM、RR, 20  $\mu\text{M}$ であった。2回の実験の平均値で表した。

### III-2-3 再構成受容体の特性 (2) [ $^3\text{H}$ ]Ryanodine結合

再構成した受容体の性質を [ $^3\text{H}$ ]ryanodine結合活性を指標に調べた。結合飽和実験を行い、Scatchard解析すると $K_d$ 値と $B_{\text{max}}$ は、それぞれ5.8 nMと171 pmol/mgとなった(図27, A)。この $K_d$ 値は、ミクロソーム画分(6.0 nM), 精製受容体(7.3 nM)の値とほぼ同じ値であった。 $B_{\text{max}}$ は精製受容体に比べ若干低下していたが、これは再構成操作中に失活したものと思われる。Ryanodineの結合量は、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存して変化するが(57)、次に、この再構成受容体の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性を調べた。生理的塩濃度に近い0.12 M KCl存在下では図27, Bのようにベル型

の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的結合を示した。 $\text{pCa} = 6.5$ で最大となり、高 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度では結合量に減少した。最大結合量の1/2を与える $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は $\sim 300 \text{ nM}$ となった。また、受容体へのryanodineの結合は塩濃度を高くすると増大するが、再構成受容体の場合も $1 \text{ M KCl}$ 存在下では顕著に増大を示した。この時の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性については、 $0.12 \text{ M KCl}$ 存在下の場合と大きな違いはなかった。

以上の結果より、再構成受容体は、 $[^3\text{H}]$ ryanodine結合の親和性および $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存性においても、本来の受容体の性質をそのまま保持していることが確かめられた。

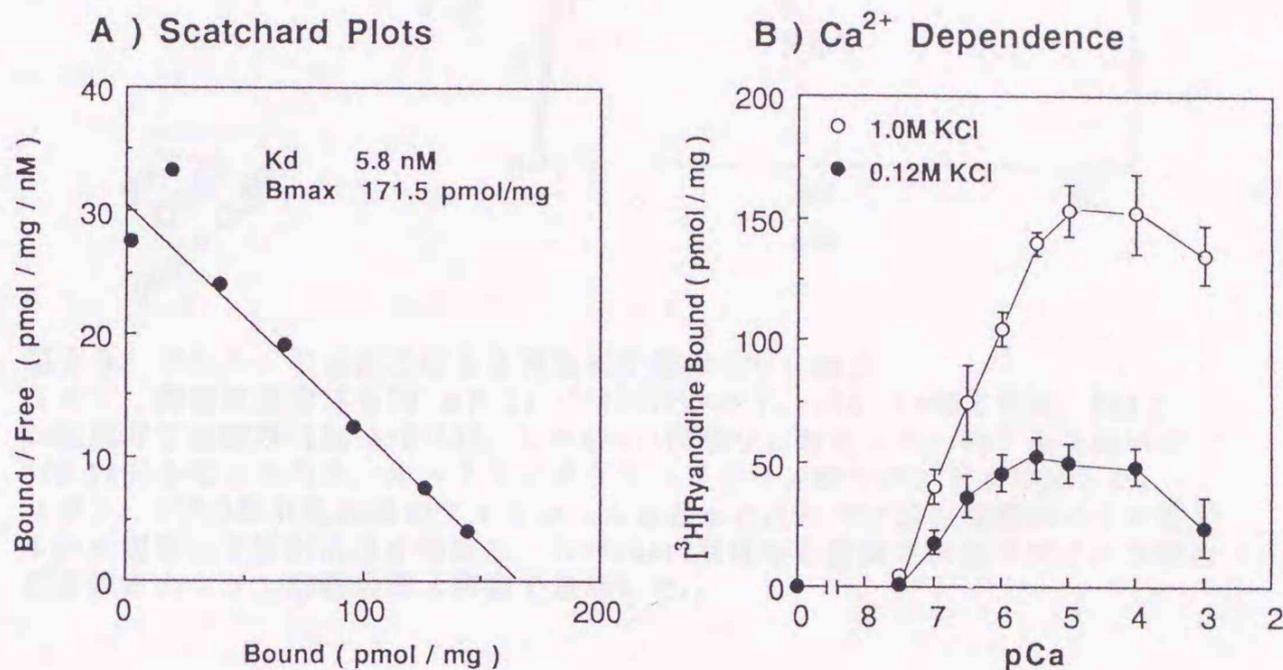


図27、再構成受容体のリアノジン結合特性

(A)  $[^3\text{H}]$ Ryanodine結合のScatchard解析

再構成受容体を $1 \text{ M KCl}$ ,  $10 \mu\text{M Ca}^{2+}$ ,  $0.5\text{--}40 \text{ nM } [^3\text{H}]$ ryanodine存在下、 $30^\circ\text{C}$ , 2時間インキュベートした後、実験項(III-1-2-(5))にしたがいPEG法により結合活性を測定した。非特異的結合は $10 \mu\text{M ryanodine}$ 存在下、結合活性測定を行い求めた。結合飽和実験の結果をもとにScatchard解析を行った。

(B)  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的 $[^3\text{H}]$ ryanodine結合

再構成受容体を $1 \text{ M}(\text{O})$ または $0.12 \text{ M}(\bullet)$ の $\text{KCl}$ ,  $20 \text{ nM } [^3\text{H}]$ ryanodine,  $0\text{--}1 \text{ mM Ca}^{2+}$ の条件で(A)と同様に結合活性測定を行った。

図の各点は3回の実験の平均値  $\pm$  S.D.で表した。

### III-2-4 PKAおよびCaMKによる再構成受容体のリン酸化

PKAとCaMKによるリアノジン受容体のリン酸化を $50 \mu\text{M } [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下で行い、調べた(図28, A)。リン酸化タンパク質はSDS-PAGE後、オートラジオグラフィを行い検出した。PKAとCaMKはともに分子量 $400 \text{ kDa}$ のリアノジン受容体をリン酸化した。Witcherら(60)やTakasagoら(61)もイヌ心筋ミクロソーム画分を用いて同様の結果を得ている。ところでPKAとCaMKの両方でリン酸化すると、どちらか一方の酵素でリン酸化した場合よりも強くリン酸化されているのが観察された。

ゲルから400 kDaのバンドを切り取り、その放射活性を測定して $^{32}\text{P}$ の取り込み量を時間毎に求めた(図28, B)。

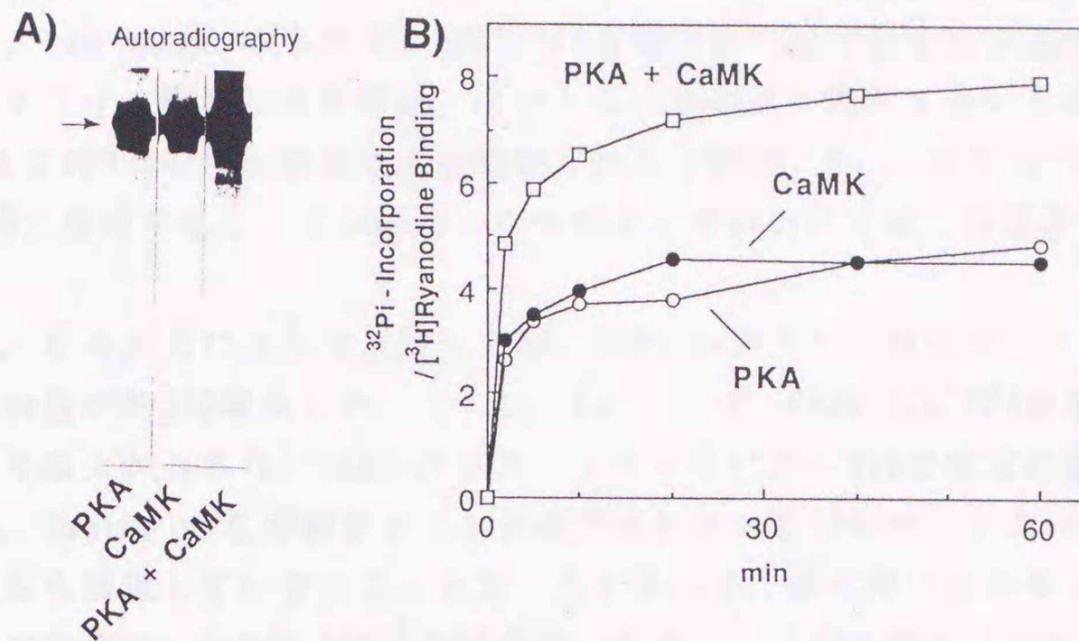


図28、PKA, CaMKによる再構成受容体のリン酸化

(A)、再構成受容体を $50\ \mu\text{M}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP存在下、PKA, CaMKまたは、PKAとCaMK両方で実験項(III-1-2-(3))にしたがい1時間リン酸化した。6%ゲルを用いたSDS-PAGEを行ったのち、オートラジオグラフィでリン酸化バンドを検出した。

(B)、 $^{32}\text{P}$ の取り込み量のタイムコースをとった。リアノジン受容体バンドをゲルから切取って放射活性を測定し、Scatchard解析から計算されるリアノジン結合部位数あたりリン酸基の導入個数で表示した。

リアノジン受容体の両キナーゼによるリン酸化は速やかに起こっており、約10分でプラトーに達した。両キナーゼ同時に作用させた場合も同様に速やかであった。最終的な $^{32}\text{P}$ の取り込み量を[ $^3\text{H}$ ]ryanodine結合部位数に対して求めると、PKA, CaMK単独では約4.5 モル/モル、両方の酵素でリン酸化した場合には8 モル/モルとなった。両酵素でリン酸化すると単独の場合よりも約2倍、 $^{32}\text{P}$ が取り込まれることがわかった。リアノジン受容体はnativeな状態では400 kDaのサブユニットの四量体を形成している。Ryanodineは四量体につき1個結合することから、リン酸基は400 kDaサブユニットあたり、PKAおよびCaMKそれぞれ単独でリン酸化した場合には1個、両方では2個導入されたことになる。また、リン酸化の際のATP濃度を $50\ \mu\text{M}$ および $1\ \text{mM}$ で比較したが、取り込み量には差はみられなかった。

### III-2-5 リン酸化によるCaチャンネルの活性化 (1) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ influx測定

再構成受容体をPKAおよびCaMKでリン酸化した時の $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx量を図29, AとBに示す。再構成受容体を $1\ \text{mM}$  ATP,  $5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 存在下、catalytic

subunit of PKAまたはCa<sup>2+</sup>, CaM, CaMK IIを加え、30°C, 30分間, インキュベートしてリン酸化した。リン酸化終了後、Sephadex G-50に通し、測定に影響を与えうる過剰のATP, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>等を除き、Ca<sup>2+</sup> influx測定を行った。10 μM <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>, 100 mM KClの条件下、1および2分間後の<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>取り込み量を測定した。

PKAでリン酸化したものは、コントロールのリン酸化しないものに比べ、1分間後で約30%のflux量の増大が観察された(図29, A)。またinfluxは、100 μM RRで処理すると、リン酸化したものとしらないものでは、同程度まで阻害された。

一方、CaMKによるリン酸化では、CaMのみの非リン酸化コントロールに比べ、flux量が約30%増大した。さらに、Ca<sup>2+</sup>, CaM, CaMK IIにPKAを加えたものは、より増大がみられ、CaMのみのコントロールに比べ50%の増大が観察された。ただし、CaMはfluxを抑制することが報告されている(56)が、このinflux測定では、なにも処理していないコントロールと比べて、逆に取り込み量は多くなった。この理由は、CaMが<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>と複合体を形成し、この一部がフィルターアッセイ時に吸着してしまうためである。したがって、リン酸化の効果を観察するには、CaMが入っているものをコントロールとして用いた。

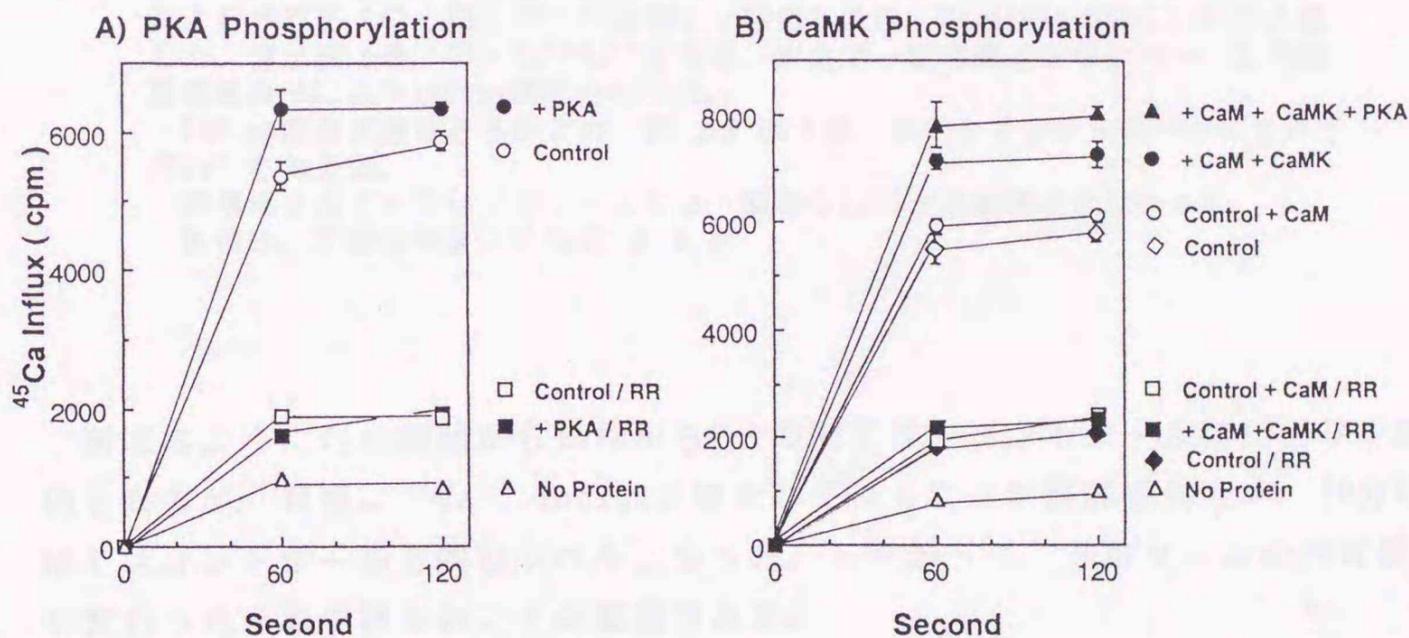


図29、PKAおよびCaMKリン酸化による<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx量の増大

(A) 再構成受容体を1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>とともにcatalytic subunit of PKA存在(●, ■)および非存在(○, □)下、30分間リン酸化した後、Sephadex G50ミニカラムを通した。溶出液(●, ○)に<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を加え、氷上で一定時間インキュベートしたのち急速濾過法によりinflux測定を行った。Influx阻害実験はあらかじめ100 μM RR(■, □)とインキュベートしてから<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を加えた。

(B) 再構成受容体を1 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM Ca<sup>2+</sup>の条件下、なにも添加しないか(◆, ◇)、CaM(○, □)、CaMとCaMK(●, ■)または、CaM, CaMKとPKA(▲)とともにインキュベートした後、(A)と同様に<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> influx測定を行った。100 μM RR阻害は(A)と同様に行った(◇, □, ■)。

再構成されていないリボソーム(△)では、顕著なinfluxは観察されなかった。

値は、3回の実験の平均値 ± S.D.で表した。

リン酸化によるflux量の増大が、リン酸化処理による人為的なものでないことを確認する実験を行った。リン酸化処理によってリボソームの容量が変わっていないか、flux量の変化を時間スケールを広げて、PKAの場合について調べた(図30)。

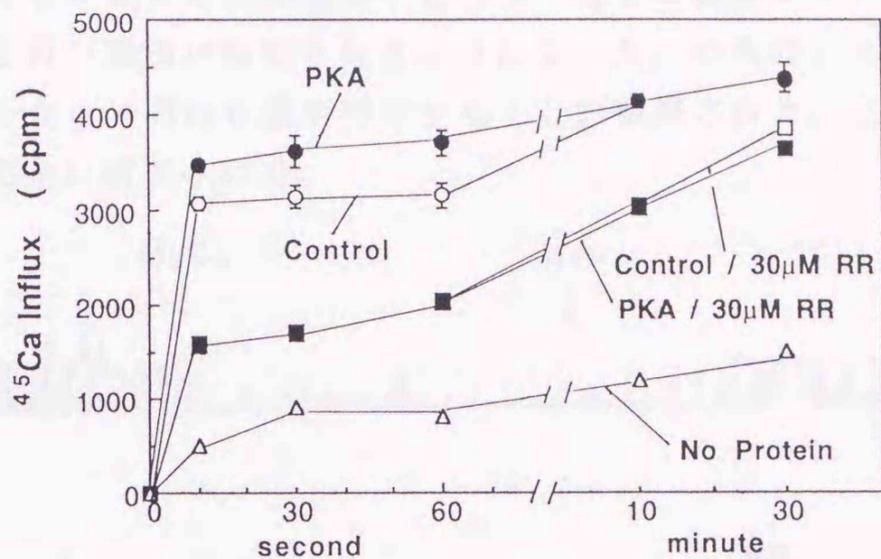


図30、PKAリン酸化によるinflux量の経時変化

再構成受容体を1 mM ATP, 20 µg/ml catalytic subunit of PKA存在(●, ■)および非存在(○, □)下、30分間リン酸化した後、Sephadex G50ミニカラム通した。溶出液(●, ○)に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を加え、氷上で一定時間インキュベートした後急速濾過法によりinflux測定を行った。

Influx阻害実験はあらかじめ、30 µM RR(■, □)とインキュベートしてから $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を加えた。

再構成されていないリボソームでは、顕著なinfluxは観察されなかった。

各値は、3回の実験の平均値 ± S.D.

前述のようにflux開始から10秒から2分の間では、コントロールに比べリン酸化した方が、有意に $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influxが増大していることが確認されたが、10分以後ではコントロールと同じレベルになった。したがって、リボソームの容量が変わったためではないことが確認された。

以上の結果より心筋リアノジン受容体はPKA, CaMKによってリン酸化されると活性化され、その活性化は両キナーゼでリン酸化されたときにより大きくなることがはっきりと確認された。

### III-2-6 PKAリン酸化によるCaチャンネルの活性化 (2)平面膜法による単一チャンネルレコーディング

リン酸化によるリアノジン受容体のCaチャンネル機能変化を平面膜法を用いた電気生理学的解析によって調べた(九州大学・薬学部、桐野研究室で解析

していただいた)。

再構成受容体を含むリボソームを平面膜に組み込み、transからcis側に流れる $Ba^{2+}$ 電流を記録した(図31)。まず、平面膜に受容体が組み込まれると、75-100 pSのコンダクタンスを持つ電流が観察された。次に、平面膜のcis側から3 mM  $MgCl_2$ を添加すると電流は小さくなり阻害が観察された。そして1 mM ATPを加えると再び電流が観察されるようになった。さらにPKAを加えると開口確率は高くなり、開口状態が持続することが観察された。この電流はRRを加えることで完全に阻害された。

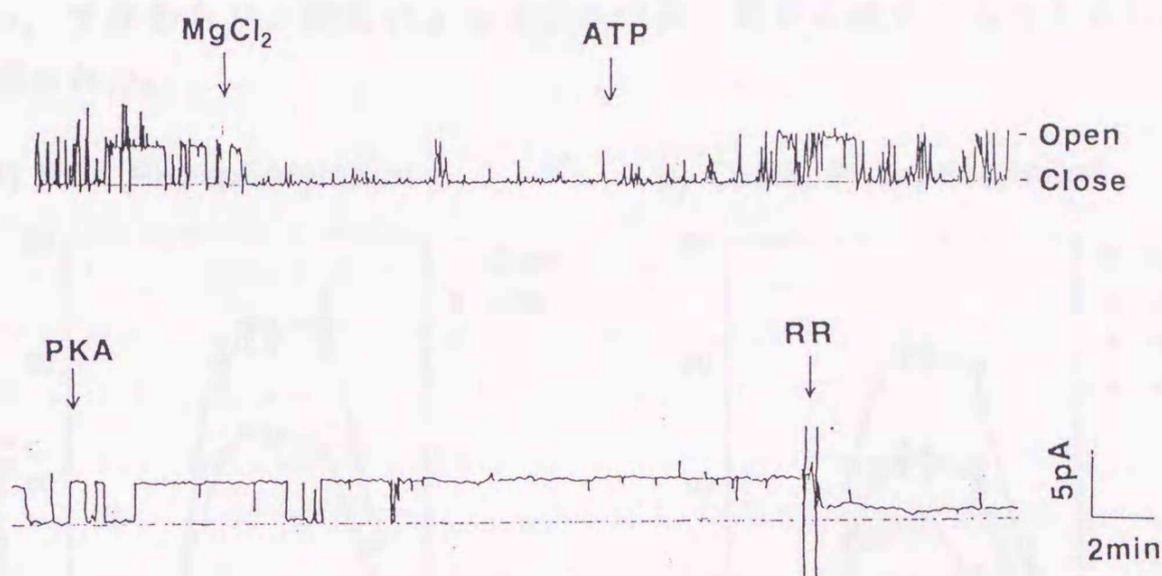


図31、平面膜法による単一チャンネルレコーディングによる解析

平面膜にcis側から再構成受容体を加え、融合させた。Trans側からcis側に流れる $Ba^{2+}$ 電流を観察した。3 mM  $MgCl_2$ 、1 mM ATP、catalytic subunit of PKAをcis側から加え、最後にRRを加えた。

### III-2-7 リン酸化によるCaチャンネルの活性化 (3) [<sup>3</sup>H]Ryanodine結合活性の変化

Ryanodineは開口状態にある受容体(Ca放出チャンネル)に結合し、開口状態を保持する作用を持つことが知られている(67)。そこでIII-2-5, III-2-6で観察されたリン酸化による活性化(開口確率の増大)が、ryanodine結合に反映されているかどうか調べた(図32, AとB)。再構成受容体をIII-2-4に述べたようにリン酸化した後、120 mM KCl存在下、<sup>3</sup>H]ryanodine結合における $Ca^{2+}$ 依存性を調べた。図32, Aに示すように、PKAによるリン酸化は<sup>3</sup>H]ryanodine結合量を有意に約30%増大させた。この時の $Ca^{2+}$ 依存性には、大きな差は観察されなか

った。一方、図32, Bに示すようにCaMを加えたものは、コントロールに比べ約40%結合量が減少した。しかし、CaMK IIを加えてリン酸化したものでは、もとのコントロールと同じ結合量を取り戻した。すなわち、CaMを加えたものに比べ、CaMK IIを加え、リン酸化したものは、約40%増大したことになる。また、CaM, CaMK IIにPKAも加え、両酵素でリン酸化した場合には、さらに結合量は増大し、コントロールの38%、CaMのみの場合と比べると86%の増大を示した。

以上の結果より、心筋リアノジン受容体のPKAとCaMKによるリン酸化は、 $[^3\text{H}]$ ryanodine結合量の増大をもたらすが、この時の $\text{Ca}^{2+}$ 依存性には影響を与えない、すなわちリン酸化により受容体の開口確率の増大がもたらされたことが確認された。

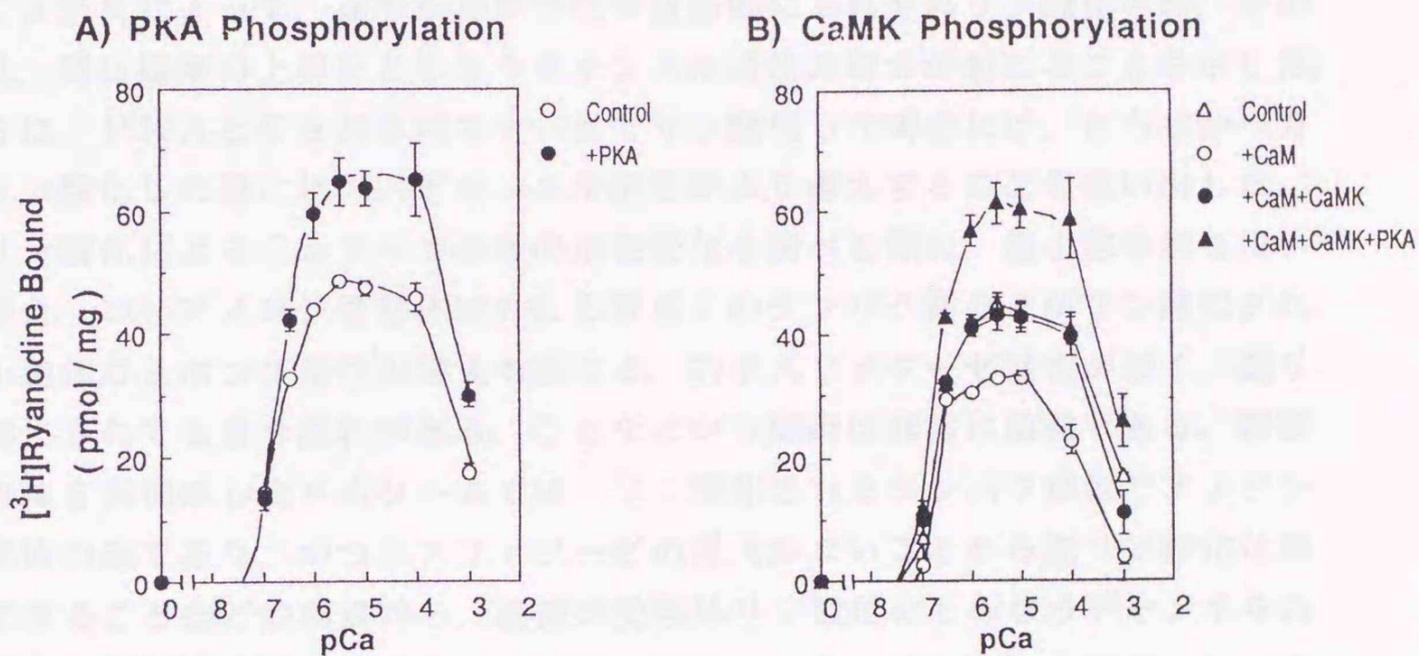


図32、リン酸化による $[^3\text{H}]$ ryanodine結合の変化

再構成受容体を1 mM ATPとPKA(A)またはCaMK(B)で、30°C、30分間リン酸化した。Sephadex-G50ミニカラムを通した後、0.12 M KCl存在下、 $[^3\text{H}]$ ryanodineと種々の濃度の $\text{CaCl}_2$ -1 mM EGTAとインキュベートした。結合活性測定をPEG法で行った。

(A)、PKAリン酸化(●)および非リン酸化(○)

(B)、無処理(△)、CaM存在下(○)、CaMKリン酸化(●)、CaMKとPKAでリン酸化(▲)

### III-3 考察

心筋リアノジン受容体は、筋小胞体Ca放出チャンネルであることが明らかとなり、そのCaチャンネル活性は、 $Ca^{2+}$ やATPで活性化され、 $Mg^{2+}$ 、RRやCaMで抑制されるなど、種々の調節因子によって活性制御されることはよく知られている(67)。しかし、タンパク質リン酸化反応による活性制御についてはあまり知られていない。

筆者は、心筋リアノジン受容体を精製してリボソームに再構成を行い、これを用いPKAとCaMKによるリン酸化の影響を、Caチャンネル活性と $[^3H]$ ryanodine結合活性を指標に調べた。その結果、心筋リアノジン受容体はPKAとCaMKによって、速やかにかつ化学量論的にそれぞれリン酸化され、その結果、開口確率の上昇にともなうチャンネル活性の増大が起こることを示した。さらに、PKAとCaMK両キナーゼでリン酸化した場合には、どちらか一方でリン酸化した時に比べ、チャンネル活性がより増大することも見出した。

リン酸化によるCaチャンネルの活性変化を調べる際に、筋小胞体膜を用いた場合、1)リアノジン受容体以外にも数多くのタンパク質分子がリン酸化され、筋小胞体Caポンプ活性の増大も起こる、2)ホスファターゼ活性が強く、脱リン酸化されてしまう恐れがある、ことなどから解析は非常に困難である。精製受容体を再構成したリボソームでは、リン酸化されるタンパク質はリアノジン受容体のみであり、かつホスファターゼの混入がないことから脱リン酸化は無視できることなどの利点から、直接の受容体リン酸化にともなうチャンネルの機能変化が明確に観察できる。

精製した再構成受容体は、図27に示すように生理的濃度のPKAとCaMKによって速やかにリン酸化され、ホスファターゼ阻害薬を加えない条件下でも、脱リン酸化はまったく観察されなかった。このリン酸化は化学量論的に起こり、受容体のリン酸化量はryanodine結合最大量のおよそ4倍となった。リアノジン受容体はnativeな条件下では、400 kDaのサブユニットモノマーが集合し四量体を形成している。そしてryanodineは、この四量体につき1分子結合すると考えられている(68)。この結果に基づくと、PKAまたはCaMKでリン酸化されるのは、400 kDaサブユニットモノマーにつき、それぞれ1個であると計算される。PKAとCaMK両方でリン酸化した場合は、サブユニットあたり2個リン酸基が導入されたことになる。この結果は、PKAとCaMKでリン酸化される部位が、それぞれ異なっていることを示唆している。

再構成受容体のチャンネル活性を調べるには、放射活性トレーサーや蛍光色素を用いたinflux測定、平面膜に組み込んで単一チャンネルを記録するなどの

方法が通常用いられる。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ をトレーサーとして用いるinflux測定は、チャンネルを介してリボソーム内に流入する $^{45}\text{Ca}$ の取り込み量の差として、比較的容易にCaチャンネル機能が測定できる。一方、単一チャンネルレコーディングは、短い時間スケールでチャンネルの開閉が観察でき、influx測定では測定困難なチャンネルコンダクタンスや、開口確率を求めることができる。

再構成した精製受容体のCaチャンネル活性を $^{45}\text{Ca}^{2+}$  flux測定で調べると、 $\text{Mg}^{2+}$ やRRで抑制されるリアノジン受容体を介したinfluxが観察されたことから、本来の機能を保持したまま再構成されていることがわかった。PKAやCaMKでリン酸化処理すると $^{45}\text{Ca}^{2+}$  flux量は図28のようにコントロールに比べ有意に増大した。さらに、PKAとCaMKの両方でリン酸化すると、活性は単独でリン酸化した場合に比べ、さらに増大した。この増大は相加的であった。このPKAのリン酸化によるflux量の増大が、リン酸化処理によるリボソームへの非特異的な $^{45}\text{Ca}$ の吸着やリボソームの性質そのものが変わってしまったなど的人為的な効果によるものでないことは、図29で示されるように否定される。すなわち、早い時間内（～120 secまで）では、コントロールと差があるが、時間が経ち10分後では同レベルのflux量になるという事実は、リボソームへのinfluxは、チャンネルを介したものであることを示している。しかしながら、リン酸化によって引き起こされる増大量の割合は、たかだかコントロールの30～40%である。この理由として、実験操作上の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が10  $\mu\text{M}$ と高濃度であるためと考えられる。つまり、この条件下では、大部分のチャンネルが開口しているため $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入速度は速く、測定している時間帯（10～120 sec）では、リボソーム内外の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 濃度が平衡に近い状態まで達しているためと思われる。リボソーム1個にチャンネルが1個組み込まれたと仮定した場合に、この条件下で $\text{Ca}^{2+}$ がリボソームベシクル内を満たすのにかかる時間を計算してみた。その結果、約50 msecでベシクル内外の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がほぼ等しくなることがわかった。したがって、数msecオーダーで $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx測定を行い、流入速度として測定できれば、リン酸化による活性増大はより著明に観察できると思われる。

それにはrapid mixing法や、リボソームサイズを大きくする方法などが考えられるが、前者の方法では特殊な装置が必要とされ、後者では再構成を行う際、凍結溶解を繰り返す操作が必要なためチャンネル活性を損ねてしまう。したがって、これらの方法を今回の実験に適用することはできなかった。今後の検討課題である。又、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度をもっと低くすることも考えられるが、現在市販されている $^{45}\text{Ca}$ の放射比活性や実験器具から混入する $\text{Ca}^{2+}$ の問題から困難であり、画期的な工夫が必要である。

今回の $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx測定で得られた受容体リン酸化による活性の増大率は必ずしも大きくなかったが、それでも依然、有意なCaチャンネル活性の増大が確かめられた。同様の活性増大が $^3\text{H}$ ryanodine結合実験でも確かめられた。

Ryanodienは、チャンネルが開口している状態に結合し、開口状態に固定する(67)。単一チャンネルレコーディングから得られるCaチャンネルの開口確率と $^3\text{H}$ ryanodine結合活性は、相関していると報告されている(69)。したがって、PKAおよびCaMKによるリン酸化は、チャンネルの開口率を上げることでCaチャンネルを活性化しているとみなすことができる。この推論は平面膜法による単一チャンネルレコーディングの結果からも支持される。すなわち、図30に示すように、PKAによるリン酸化においては、ATP,  $\text{Mg}^{2+}$ 存在下でPKAを加えると、チャンネルは開口状態が持続することが観察された。平面膜法を用いた単一チャンネルレコーディングによる、チャンネル活性に対するリン酸化の効果については、現時点では詳細な解析を行うまでには至っていない。再現性よくチャンネル活性を観察できる条件を設定することが今後の課題である。

Takasagoらはイヌ心筋ミクロソーム画分を用いて、PKA, PKC, PKGによって $^3\text{H}$ ryanodine結合量が増大し、内在性CaMKによっては減少すると報告している(61)。一方、Witcherらは、イヌ心筋ミクロソームおよび部分精製したリアノジン受容体を、外来性CaMKでリン酸化するとCaチャンネル活性が促進することを、平面膜法を用いる単一チャンネルレコーディングによって示した(60)。リボソームに再構成した精製受容体を用いた筆者の実験結果は、PKAによるリン酸化でチャンネル活性が増大するという点ではTakasagoらの結果と一致する。しかし、CaMKによるリン酸化では、彼らとは反対の結果であり、Witcherらの結果と一致する。この違いは内在性と外来性のCaMKの作用の違いによる可能性が考えられるが、Witcherらと筆者(未発表データ)は内在性と外来性CaMKによるリアノジン受容体のリン酸化部位は同一であることを示している。このことから、ミクロソーム画分においては、CaMKによるリアノジン受容体調節機構には、直接のリン酸化による活性化機構の他に、未知の経路を介した抑制機構が存在しているのかもしれない。

今回明らかにしたPKAによるCa放出チャンネルの活性上昇は生理学的にも重要な意味を持つものと考えられる。心筋におけるPKAによる $\text{Ca}^{2+}$ 動員分子の活性調節については、すでに以下のようなことが明らかにされている。 $\beta$ アドレナリン刺激によってPKAが活性化され、リン酸化を介した形質膜のL型Caチャンネル活性の上昇が起こり、筋収縮は促進する(51)。またPKAは筋小胞体膜Caポンプの制御タンパク質であるホスホランパンをリン酸化し、この結果、Caポンプ活性は促進する(50)。そして、陽性変力作用(positive

inotropic effect) は、筋小胞体内への  $Ca^{2+}$  取り込みが促進された結果、貯蔵される  $Ca^{2+}$  量が増大し、より大きな  $Ca^{2+}$  放出が引き起こされるためと考えられている(50)。

図28, 29, 30で示したようにPKAによる心筋リアノジン受容体のリン酸化は、 $Ca^{2+}$ チャンネル活性の開口確率を上げることでCa放出を促進する。この結果は、Ca放出チャンネルタンパク質レベルでリン酸化による機能制御機構が存在することを示し、本チャンネル自身が交感神経刺激で引き起こされる陽性変力作用の一部を担うという興味深い可能性を示したものと見える。生理的条件下におけるこの制御機構の一部は、いくつかのグループによっても観察されている。例えばエピネフリンやイソプレナリンなどを心筋細胞に投与すると、筋小胞体からの $Ca^{2+}$ 放出量が増大し、 $Ca^{2+}$ トランジェントが大きくなること(27, 28)や、心筋スキンドファイバーを用いた実験で、cAMP刺激すると筋小胞体への $Ca^{2+}$ 蓄積の増加にともない $Ca^{2+}$ 放出の方も促進されてることが示されている(29)。

一方、CaMKによるリン酸化は、図32, Bに示したようにしたようにCaMで抑制された $[^3H]$ ryanodine結合活性をコントロールのレベルまで引き上げる。CaMは、 $Ca^{2+}$ の共存にかかわらず直接リアノジン受容体に結合することが示されている(61)ことから、通常ではリアノジン受容体はCaMにより抑制されていると考えられる。したがって、CaMKによるリアノジン受容体のリン酸化は、CaMによる抑制を解除する役割を果たしているのかもしれない。

ところで、 $\beta$ アドレナリン刺激をすると、筋小胞体ホスホランバンはPKAのみならずCaMKによってもリン酸化されることが示されている(73)。この機序が同じ筋小胞体上のリアノジン受容体にも当てはまるなら、 $\beta$ アドレナリン刺激によりリアノジン受容体も、PKAとCaMKの両方によってリン酸化される可能性があり、 $Ca^{2+}$ 放出活性はより増大すると考えられる。近年、培養心筋細胞を $\beta$ アドレナリン刺激すると、リアノジン受容体分子がリン酸化されること(62)が報告されている。しかし、この場合どちらのキナーゼでリン酸化されているのかは不明である。本研究結果をもとに、この解析を行うことは興味あることである。

リアノジン受容体の心筋型アイソフォームは脳においても見い出されており(74)、同じCa放出チャンネルファミリーである $IP_3$ 受容体(75)との関連や役割分担について興味を持たれている。最近、脳リアノジン受容体もPKA(76)やCaMK(77)によってリン酸化されることが明らかとなった。神経系においてリアノジン受容体のリン酸化は、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を引き上げ、神経伝達物質の遊離を促進させている可能性がある。心筋リアノジン受容体との機能的な

比較の上からも興味ある今後の課題である。

本研究で示したように、精製受容体をリボソームに埋め込んだ再構成系では、直接リン酸化した受容体の機能変化を、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx測定や $[^3\text{H}]\text{ryanodine}$  結合量の変化として容易に観察できた。この実験系は、PKCによるリン酸化の影響も調べることが可能である。タンパク質リン酸化酵素のクロストークを理解する上でも、PKCによる心筋リアノジン受容体のリン酸化を調べる必要があるであろう。

#### 第IV章 心筋リアノジン受容体のリン酸化部位の同定

第III章において筆者は、心筋リアノジン受容体のCa放出チャンネル活性がPKAやCaMKによるリン酸化によって正の調節を受けることを示した。

心筋リアノジン受容体は、近年cDNAクローニングが行われ分子量565,000の巨大ポリペプチドであることが明らかとなった(78,79)。その一次構造の中には、EFハンド様のアミノ酸配列やヌクレオチド結合コンセンサス配列、CaM結合ポテンシャル配列がいくつかみられる。また、PKAやCaMKによってリン酸化を受けると推測される部位も数多く存在することが指摘されている。

リアノジン受容体の活性調節の分子機構を解明するには、Ca<sup>2+</sup>、ATPやCaMなどの活性制御因子の結合部位やリン酸化部位の同定が必要であると考えられる。現在のところ、これら部位についてはほとんど知見がなく、CaMKのリン酸化部位についてのWitcherらの報告(60)が一例あるにすぎない。

そこで筆者は、PKAのリン酸化部位について直接リン酸化ペプチドを精製し、シーケンス解析をすることで、初めて同定を行った。また、CaMKについても抗ペプチド抗体を用いた検索により同定し、Witcherらの報告と一致していることを確認した。さらに、これらリン酸化部位とリアノジン受容体の機能部位との関連について考察を行った。

## IV-1 実験材料と実験方法

### IV-1-1 実験材料

|                                      |                                  |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| ペプチド RyP2                            | (ペプチド研究所)                        |
| Vectastain ABC-AP kit                | (Vector)                         |
| $\beta$ -Naphthylphosphate           | (Sigma)                          |
| Polyvinylpyrrolidone (PVP)-40        | (Sigma)                          |
| Iminodiacetic acid-agarose           | (Sigma)                          |
| Fast Blue B                          | (Merck)                          |
| Ponseau S                            | (Nacalai Tesque)                 |
| <u>S. aureus</u> V8 Protease (Glu-C) | (Boehringer Mannheim Biochemica) |

### IV-1-2 実験方法

#### (1) 心筋ミクロソーム、精製受容体および再構成受容体の調製

心筋ミクロソームはIII-1-2-(1)にしたがい調製した。

心筋精製リアノジン受容体と再構成受容体はIII-1-2-(2)にしたがい調製した。ウサギ骨格筋リアノジン受容体はImuiらの方法(52)により、Heparin-agaroseを用い一段階精製した。

#### (2) 抗リン酸化部位指向性抗体の作製

抗原ペプチドとして、ウサギ心筋リアノジン受容体の一次構造中のアミノ酸残基2798-2816および2049-2065に対応する部分ペプチドを選択し、それぞれペプチドRyP1、RyP2とした。RyP1はC末端に、RyP2はN末端にCysを付加し、固相合成した。抗体の作製およびELISAによる抗体価の評価はII-1-2-(2)と同様に行った。キャリアタンパク質はいずれもチログロブリンを用いた。

抗体はprotein A-Sepharose CL-4Bにより精製したIgG画分を用いた。

#### (3) ウェスタンブロッティング法

心筋ミクロソーム(50  $\mu$ g/lane)を5%ゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。I-1-2-(6)にしたがい、PVDF膜にウェスタンブロットした。抗体認識分子の検出は $[^{125}\text{I}]$ -protein Aの代わりにVectastain ABC-AP kitを用いて、 $\beta$ -naphthylphosphateとFast Blue Bによって染色することで行った。

#### (4) 免疫沈降

[<sup>3</sup>H] Ryanodine結合活性の免疫沈降実験は、心筋および骨格筋の精製受容体を10 nM [<sup>3</sup>H] ryanodineと30°C, 1時間インキュベートし結合させた後、種々の濃度の抗体(IgG画分)を加え、4°C, 2時間反応させた。次に、protein A-Sepharose CL-4Bと4°Cで30分間、インキュベートして受容体-抗体複合体を吸収し、ビーズの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

<sup>32</sup>P-リン酸化ペプチドの免疫沈降はII-1-2-(5)のDHPラベルペプチドの場合と同様に行った。ビーズに吸収された放射活性はチェレンコフカウントで測定した。Tricine SDS-PAGE後のリン酸化ペプチドの検出は、オートラジオグラフィによって検出した。

#### (5) リン酸化ペプチドマッピング

精製受容体(15 μg/100 μl)を5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES-Tris(pH 7.2), 70 mM NaCl, 0.5% CHAPS, 0.25% PCの溶液中 25 μM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (2 Ci/mmol)存在下、30°C, 45分間インキュベートし、PKAまたはCaMKでIII-1-2-(3)と同様にしてリン酸化した。反応は25 μlの5倍濃度のSDS-sampling buffer(pH 7.6)を加えて止めた。125 μlを4%ゲルを用いたSDS-PAGEにかけた。泳動後、ゲルをニトロセルロース膜(0.45 μm, Millipore)に密着させ、0.05% SDS, 192 mM Glycine, 25 mM Tris(pH 8.3)のtransfer-buffer中でトランスファーセル(和科盛)を用いて電気泳動プロットした(定電流、200 mA、24時間)。転写した膜を、0.1% Ponceau-Sで染色してリアノジン受容体バンドを切り出し(3 mm X 10 mm)、Ferrisら(88)にしたがい、6 M urea, 50 μM DDT, 100 μM iodoacetamideで順次処理し、最後に0.5% PVP-40でブロッキングした。膜はよく水洗いした後、さらに細かく切り刻んでエッペンドルフチューブに移し、酵素消化を行った。

酵素消化は膜細片(1 mm X 1 mm)を以下の溶液 100 μl中で37°C, 24時間インキュベートして行った。API消化は、50 mM Tris-HCl(pH 9.0), 8 μg/ml API、V8プロテアーゼ消化は5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, 8 μg/ml Glu-Cで行った。酵素消化は1 mM DFPを加えて止めた後に、溶液を回収した。<sup>32</sup>P-リン酸化ペプチドの回収率は、APIでは約70%、V8プロテアーゼでは約60%だった。

二つのキナーゼのリン酸化ペプチドの分子量をTricine SDS-PAGEによって比べた。さらに抗ペプチド抗体による免疫沈降実験に用いた。

#### (8) PKAリン酸化リアノジン受容体の精製

再構成リアノジン受容体(6.6 mg)を9 mlの反応溶液(5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA 60 μg/ml catalytic subunit of PKA, 50 μM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(0.5 Ci/mmol))中で30°C, 1時間リン酸化した。1% SDSで反応を止めた後、透析チューブ(50 kDa

cut-off)に移し、0.2 mM DTT, 5 mM Tris-HCl(pH 8.3)に対して12時間、透析を行った。透析終了後、SDSを0.5%になるように加え、2等分し、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品(2本のうちの1本分)を800  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oと80  $\mu$ lの10% SDSを加えて溶解し、遠心(3,000 X g<sub>max</sub>, 3分間)後の上清を200  $\mu$ lずつ5回に分けてゲル濾過HPLCにインジェクトした。カラムはTSK G4000SW(7.5 X 600 mm)を用い、溶媒は0.1% SDS, 0.2 mM DTT, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH 7.3)とし、流速は0.5 ml/minで行った。吸光度280 nmでタンパク質をモニターして、フラクションコレクター(アドバンティック)を用い1分毎に分取した。チェレンコフカウントによる放射活性測定とSDS-PAGEによるポリペプチド分析により、リン酸化リアノジン受容体を検出した。2回分をまとめて凍結乾燥し、これを精製リン酸化受容体画分とした。

#### (9) リン酸化ペプチドの精製とシーケンス分析

精製リン酸化受容体を2 mlのH<sub>2</sub>Oに溶かし、1 lの6 M urea, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH 7.3), 5 mg/ml AG 1-X8 に対して12時間、低温室で透析した(2回、透析液を交換した)。さらに50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.1 mM DTTに対して、同様に12時間透析した。透析後の標品はタンパク質定量した後、2等分して凍結乾燥した。約800  $\mu$ gのタンパク質が得られた。

精製リン酸化受容体(400  $\mu$ g)を200  $\mu$ lの反応溶液(10 mM Tris-HCl(pH 8.3), API 4  $\mu$ g)中で37°C,12時間、酵素消化した。90°C,3分間インキュベートしAPIを失活させた後、さらにTPCK-trypsin 20  $\mu$ gを加え24時間消化を続けた。反応は1 mM DFPで停止した。S/E比はAPIでは100、TPCK-trypsinでは10となった。消化の進み具合は一定時間ごとに2  $\mu$ lずつとり、Tricine SDS-PAGEで確認した。

Witcherら(60)にしたがい、Fe<sup>3+</sup>-iminodiacetic acid(IDA)-agaroseを用いてリン酸化ペプチドの精製を行った。酵素消化物(400  $\mu$ l)をCH<sub>3</sub>COOHでpHを3.0に合わせた後、0.1 M CH<sub>3</sub>COOH(pH 3.0)で平衡化したFe<sup>3+</sup>-IDA-agarose(0.4 ml)にかけた。ゲルの3倍量の各buffer; 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH(pH 3.0), 0.1 M ammonium acetate(pH 6.9), 0.1 M ammonium acetate(pH 8.6), 0.1 M EDTA(pH 8.0)で順次溶出をした。放射活性は、pH 8.6溶出画分に86%が回収されてきた。この画分を凍結乾燥し、H<sub>2</sub>Oで溶解した後、再び凍結乾燥した。これを100  $\mu$ lの0.1%

TFA, H<sub>2</sub>Oに溶かし、逆相系HPLC ODS(2.1 X 50 mm, YMC)にインジェクトし、流速0.5 ml/mlで、0.1% TFAを含むH<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>CNの直線濃度勾配によって溶出を行い、ペプチドを精製した。分取は吸光度215 nmでペプチドをモニターして一つのピークごとに行い、チェレンコフ法で放射活性を測定し、<sup>32</sup>P-リン酸化ペ

プチドを検出した。放射活性画分は直ちに凍結乾燥し、シーケンス解析する直前まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

シーケンス解析は、精製ペプチドを遠心エバポレーターで $200\ \mu\text{l}$ まで濃縮し、シーケンサーにかけた。

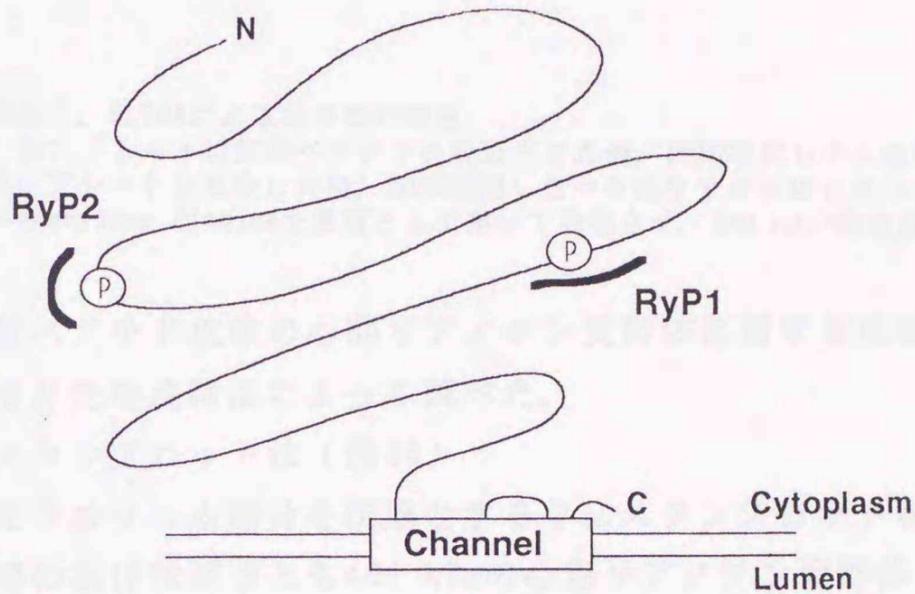
#### (10) 抗ペプチド抗体によるリン酸化阻害実験

ブタ心筋ミクロソーム画分をTBSで洗い、 $2\ \text{mg/ml}$ になるようにTBSで再懸濁した。ミクロソーム画分 $15\ \mu\text{l}$ に各種濃度の抗体IgG画分を $15\ \mu\text{l}$ 加え、 $4^{\circ}\text{C}$ , 2時間回転混和した。この混合溶液( $30\ \mu\text{l}$ )をIII-1-2-(3)の条件下、PKAとCaMKでリン酸化した(最終溶液量は $40\ \mu\text{l}$ )。リン酸化は $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ( $50\ \mu\text{M}$ )を加え反応を開始し、5分後にSDS-sampling bufferを加え停止した。6%ゲルを用いたSDS-PAGEを行った後、オートラジオグラフィーによりリン酸化タンパク質を検出した。受容体に取り込まれた $^{32}\text{P}$ の定量は、リアノジン受容体バンドをゲルから切り出し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定して求めた。

## IV-2 実験結果

### IV-2-1 心筋リアノジン受容体のリン酸化部位指向性抗体の作製

心筋リアノジン受容体の一次構造中(78,79)には、PKAによってリン酸化を受けやすい基本モチーフB-B-X-S/T (Bは塩基性アミノ酸残基Arg又はLys, Sはセリン, Tはスレオニン, Xは任意のアミノ酸)が細胞質側に全部で8ヶ所存在する。このうち2ヶ所の部分を選択し、その部分を含むように抗原ペプチドRyP1 (2798-2816), RyP2(2049-2065)を合成した(図34)。これらペプチドのN末端又はC末端にはキャリアタンパク質との結合に用いるためのCysを付け加えた。2つペプチドはキャリアタンパク質(チログロブリン)と架橋を行いコンジュゲートを調製し、ウサギへの免疫に供した。



2809

RyP1    ALYNRTRRISQTSQVSYDC

2056

RyP2    CESDSRKSSTLQQLISET

図34、リン酸化部位指向性抗体の作製部位とそのペプチドシーケンス  
トポロジーモデル上、Foot部の2ヶ所を選択した。ペプチドはキャリア  
タンパク質との結合に用いるためN末端またはC末端にCysを付加した。  
下線はPKAによってリン酸化リン酸化されやすい配列(B-B-X-S/T、  
BはArg, Lys, S/TはSerまたはThr)を示す。

抗RyP1, 抗RyP2抗血清ともにペプチドを抗原としたELISAを行うと、ペプチドに対しては高い力価が得られていることがわかった(図35, AとB)。

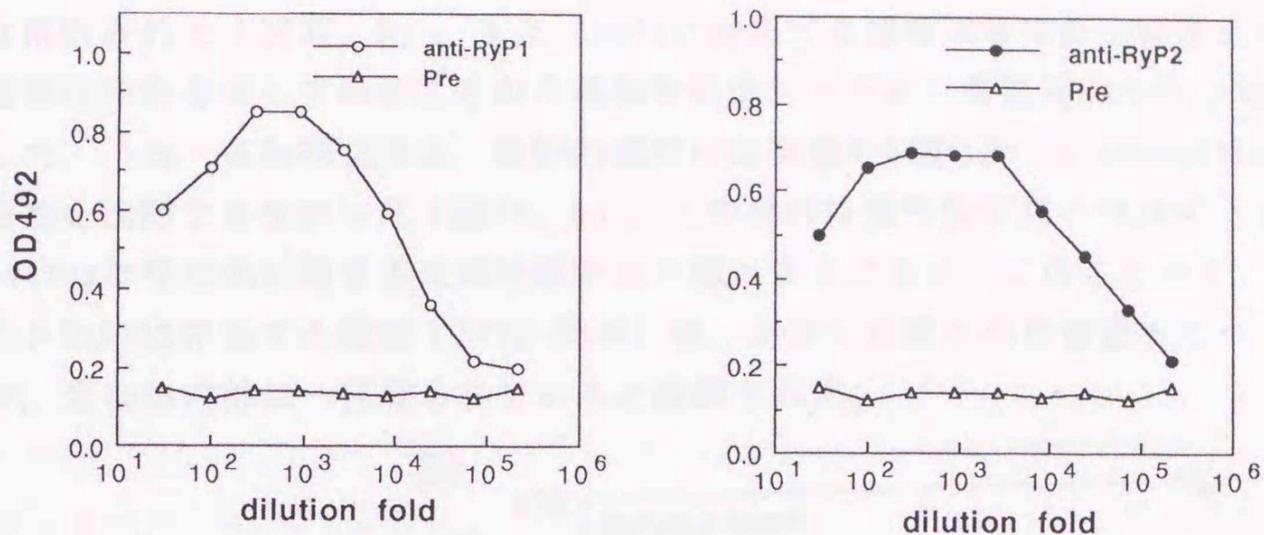


図35、ELISAによる抗体価の測定

96穴プレートに抗原ペプチドを吸着させた後、段階希釈した抗血清と反応させた。プレートを洗浄した後、HRPO標識したヤギ抗ウサギ抗体と反応させ、洗浄後、o-phenylene diamineを基質として用いて発色させ、492 nmの吸光度を測定した。

得られた抗ペプチド抗体の心筋リアノジン受容体に対する反応性をウェスタンブロット法と免疫沈降法によって調べた。

(1) ウェスタンブロット法(図36)

ブタ心筋ミクロソーム画分を抗原とするウェスタンブロットを行った結果、作成した2種の抗体は両方とも400 kDaの心筋リアノジン受容体と反応することが示された。

図36、ウェスタンブロット法による抗ペプチド抗体の心筋リアノジン受容体との反応性

ブタ心筋ミクロソーム(80 μg/lane)を5%ゲルを用いてSDS-PAGEを行い、PVDF膜に電気泳動ブロットした。PVDF膜を抗RyP1抗体(A)、抗RyP2抗体(B)、コントロールIgG(C)と反応させた後、ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGと反応させ、β-naphtylphosphate, Fast Blue Bを用いてABC法で免疫染色した。



(2) [<sup>3</sup>H]リアノジン結合受容体の免疫沈降(図35)

精製受容体に [<sup>3</sup>H]ryanodineを結合させた後、各抗体と反応させた。そこで、抗原-抗体複合体をprotein A-Sepharose CL-4Bによって吸収した。Protein A-

Sepharose CL-4Bに吸収された $^3\text{H}$ ryanodine結合量を測定し、免疫沈降量とした。抗RyP1抗体は効率よく $^3\text{H}$ ryanodine結合活性を免疫沈降した(図37, A)。この抗RyP1抗体による沈降は、抗体濃度依存的に増加し、抗原ペプチドの共存下では阻害された(図37, B)。また、RyP1に対応する領域は骨格筋受容体とも、ある程度相同性を有していることから親和性は低かったが、骨格筋のものとも反応した。一方、抗RyP2抗体は、抗RyP1抗体の沈降量の18%しか $^3\text{H}$ ryanodine結合活性を沈降できなかった(図37, A)。この抗体は変性受容体とは反応するが、nativeな受容体に対する反応性はかなり低いようである。このことから、ペプチドRyP2に相当する領域(2798-2816)は、かなり複雑な高次構造をとっているか、受容体内部に一部埋もれていると推測された。

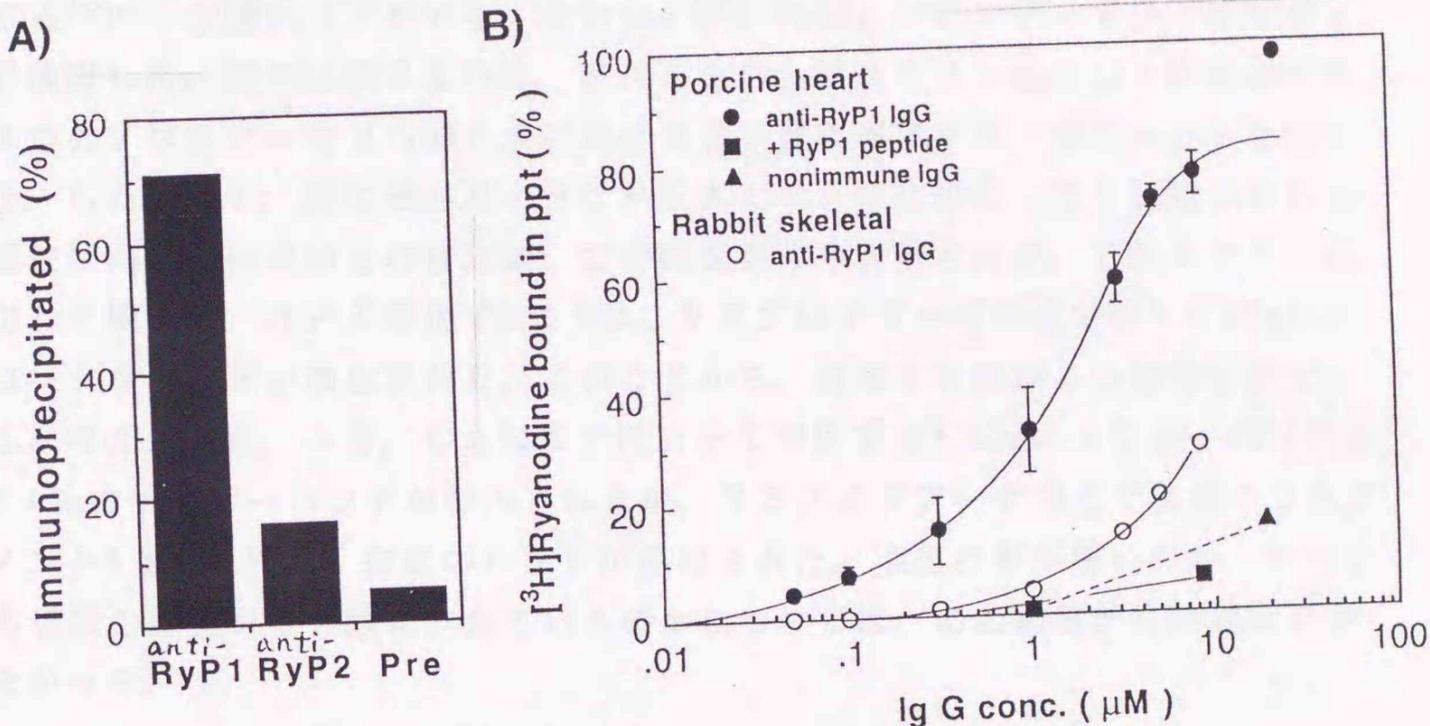


図37、抗ペプチド抗体による心筋リアノジン受容体の免疫沈降

心筋または骨格筋精製リアノジン受容体と $^3\text{H}$ ryanodineを反応させた後、抗ペプチド抗体または非免疫抗体を反応させた。次にProtein A-Sepharose CL-4B(50  $\mu\text{l}$ )を加え、30分反応させた。そこでビーズに吸収された放射活性を測定した。

(A) 心筋受容体と各抗ペプチド抗体(100  $\mu\text{M}$ )の反応性

(B) 抗RyP1抗体による濃度依存的免疫沈降

心筋受容体と種々の濃度の抗RyP1抗体をRyP1ペプチド存在下(■)または非存在下(●)反応させて、沈降を観察した。非免疫抗体(▲)をコントロールにとった。

また、抗RyP1抗体と骨格筋受容体と反応させた場合(○)は、用いた濃度内では沈降するには十分ではなかった。

#### IV-2-2 リン酸化ペプチドマッピング

第III章で示したように、心筋リアノジン受容体は、PKAまたはCaMKによって、サブユニットあたり1個リン酸化される。さらに両キナーゼで同時にリン酸化したときには2個リン酸基が導入される。これよりPKAとCaMK

のリン酸化部位はそれぞれ異なった部位であると予想された。

そこで心筋リアノジン受容体をPKAおよびCaMKでリン酸化し、プロテアーゼ消化を行い、それぞれ生成するホスホペプチドフラグメントの分子量の比較を行い確かめることにした。

精製受容体を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下、PKAおよびCaMKでリン酸化した後、SDS-PAGEにかけた。泳動後、ニトロセルロース膜へ電気泳動ブロッティングし、膜上で受容体のプロテアーゼ消化を行った。膜への転写効率は約50%と低かったが、これは本受容体が400 kDaもの高分子であることによる。プロテアーゼは基質特異性の厳格な*Achromobacter lyticus* protease I (API)と*S. aureus* V8プロテアーゼ(V8プロテアーゼ)を用いた。切断を受け、膜上から遊離する $^{32}\text{P}$ -リン酸化ペプチドを、Tricine-SDS PAGEにかけてオートラジオグラフィで検出した。図38に示すように、PKAとCaMKでリン酸化した受容体では、2つのプロテアーゼとも明らかに異なる分子量のペプチドフラグメントを与えた。したがって、先に述べたようにPKAとCaMKによってリン酸化される部位は同一ではないとの推定は、この結果からも支持された。PKAでリン酸化した場合は、API消化で6.0 kDa、V8プロテアーゼ消化では3.0 kDaにブロードなバンドが検出された。このことから、ほぼ1ヶ所がリン酸化されていると考えられた。一方、CaMKではAPI消化では5 kDaのメジャーバンドと8 kDaのマイナーバンドが検出されたが、V8プロテアーゼ消化では最小フラグメント4 kDa以外に、複数のバンドが検出された。消化効率が悪いのか、それとも複数の部位がリン酸化されているのかについては、この結果からは判断できなかった。

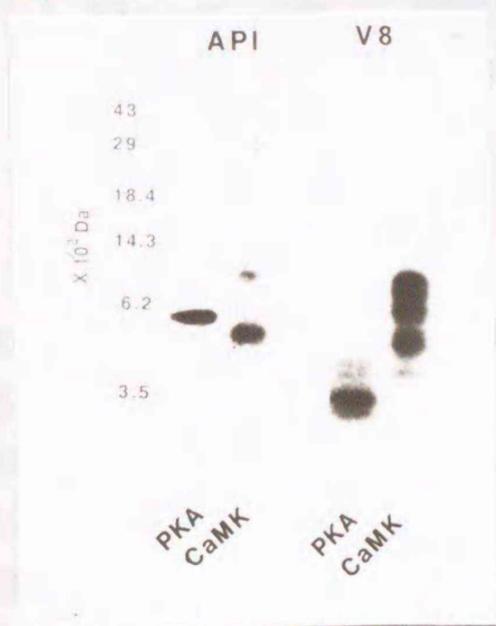


図38、APIとV8プロテアーゼによるリン酸化ペプチドマッピング

ブタ心筋精製リアノジン受容体を $250\ \mu\text{M}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下、PKAまたはCaMKで $30^\circ\text{C}$ 、45分間リン酸化した。SDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜に転写し、酵素消化を膜上で行った。 $8\ \mu\text{g/ml}$  APIまたはV8プロテアーゼで、 $37^\circ\text{C}$ 、24時間消化し、膜から遊離してくるリン酸化ペプチドをTricine SDS-PAGEにかけた後、オートラジオグラフィで分析した。

#### IV-2-3 CaMKリン酸化部位の同定

リン酸化部位指向性抗体の用いた応用の一つにリン酸化部位の同定のためのツールとしての利用があげられる。この方法は第II章で述べたCaチャンネルのDHP結合部位の検索に用いた方法と基本的に同じである。すでに、骨格筋Caチャンネル(80)や小脳IP<sub>3</sub>受容体(81)で実際に行われている。2種の抗ペプチド抗体(抗RyP1抗体, 抗RyP2抗体)を用い、それぞれの酵素によってリン酸化した受容体をAPI消化し、この消化物について免疫沈降実験を行った。2つの抗体はPKAのリン酸化基本モチーフ(84)に対して作製したものであるが、いずれもPKAリン酸化ペプチドを免疫沈降しなかった。ところが予想に反し、抗RyP1抗体は図39, Aに示すように、CaMKリン酸化ペプチドの全放射活性のうちの半分以上の65%を免疫沈降した。免疫沈降したリン酸化フラグメントの分子量は、5 kDaであった(図39, B)。

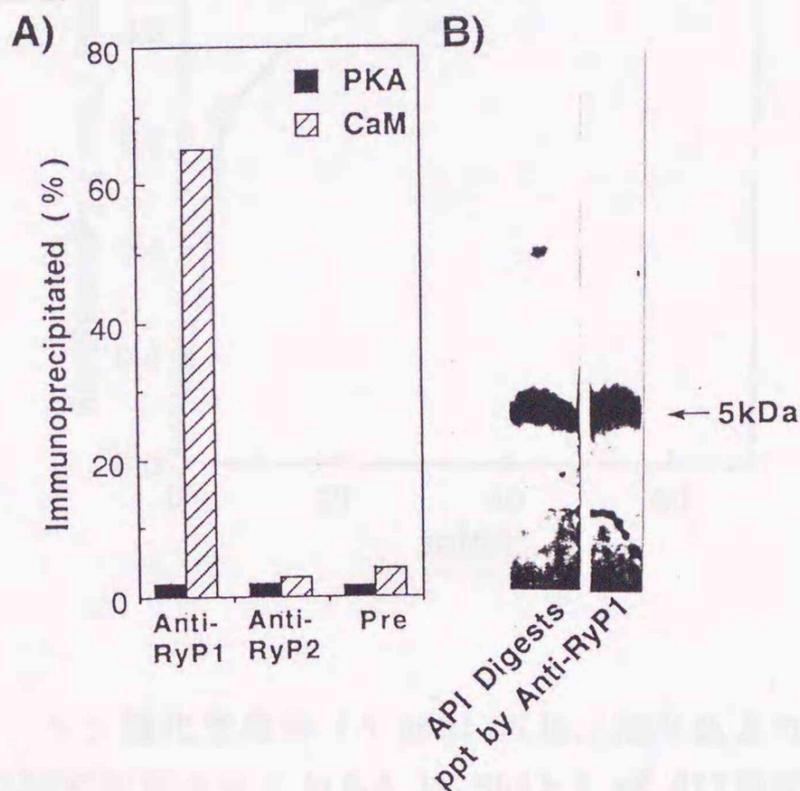


図39、抗ペプチド抗体とリン酸化ペプチドとの反応性およびCaMKリン酸化ペプチドの同定

(A) 抗ペプチド抗体をprotein A-Sepharose CL-4Bと反応させ抗体ビーズを図38に記したように調製した。PKAおよびCaMKでリン酸化心筋受容体のAPI消化物を、このビーズと室温、2時間反応させ免疫沈降反応を行った。ビーズは洗った後、チェレンコフ法で放射活性を測定した。  
(B) 抗RyP1抗体で沈降したフラグメントの分子量をTricine SDS-PAGEで分析した。API消化で生成する5 kDaのフラグメントを免疫沈降していた。

この5 kDaのフラグメントは、受容体の一次構造上Thr(2780)-Arg(2823)に対応すると考えられる。この5 kDaフラグメント中でCaMKリン酸化の基本モチーフのR/K-X-X-S/T配列を探すと、RyP1ペプチド内に含まれるR-R-I-Sしか存在しない。したがって、リン酸化されたのはSer 2809であると考えられる。本研究の進行中にWitcherらは、イヌ心筋ミクロソーム画分をCaMKでリン酸化し、リアノジン受容体のリン酸化部位を直接シーケンス解析することで同定した(60)。その結果、CaMKでリン酸化されるのはSer 2809 1ヶ所のみと結論している。したがって、本研究で得られた結果は、彼らの結果と一致している。

#### IV-2-4 PKAリン酸化受容体の調製

心筋リアノジン受容体のPKAリン酸化部位を、リン酸化ペプチドを精製し、そのアミノ酸配列分析を行って同定するために、まず受容体を調製的スケールで精製、再構成した。再構成受容体をタンパク量として6.6 mg, [<sup>3</sup>H]ryanodine結合部位にして1.4 nmol (120 mgのミクロソームから精製を約7回行って得られる量) 調製した。この再構成受容体をPKAと[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP存在下、1時間リン酸化した。第III章でも述べたが、PKAによる再構成受容体のリン酸化はこの場合でも、図40に示すように速やかに起こり、約15分でプラトーに達した。最終的に導入されたリン酸基の数は、400 kDaサブユニットあたりほぼ1個に近い0.9個だった。

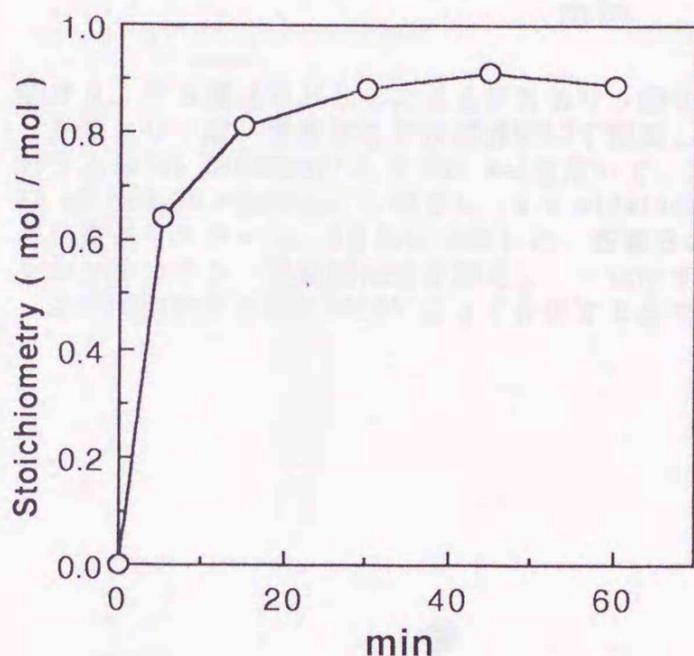


図40、再構成受容体のPKAによるリン酸化

再構成受容体を実験項(III-1-2-(8))に示した条件で、PKAで30°C, 60分間リン酸化した。

反応溶液中から、一定時間毎に一部採取し、SDS-PAGEにかけ、ゲルスライスして、受容体への<sup>32</sup>Pの取り込み量を求めた。

[<sup>3</sup>H]Ryanodine結合部位数あたりで表示した。

リン酸化受容体 (5 nmol; 以後、取り込まれたリン酸基の数で表示する) は、SDSで変性させてから0.1% SDSと2 mM DTT存在下、ゲル濾過HPLC(TSK G4000SW)で精製した。これによって、SDS-PAGE上、均一な400 kDaポリペプチドとして得ることができた。(図41)

#### IV-2-5 PKAリン酸化ペプチドの精製と同定

ゲル濾過HPLCによって得られた精製受容体 (3.6 nmol, 72%の回収率) を透析でSDSを除いた後、APIで37°C, 12時間、続いてトリプシンで24時間消化を行った。基質と酵素の重量比 (S/E) はAPI 100、トリプシン 10とした。図42に示すように消化が進行した。

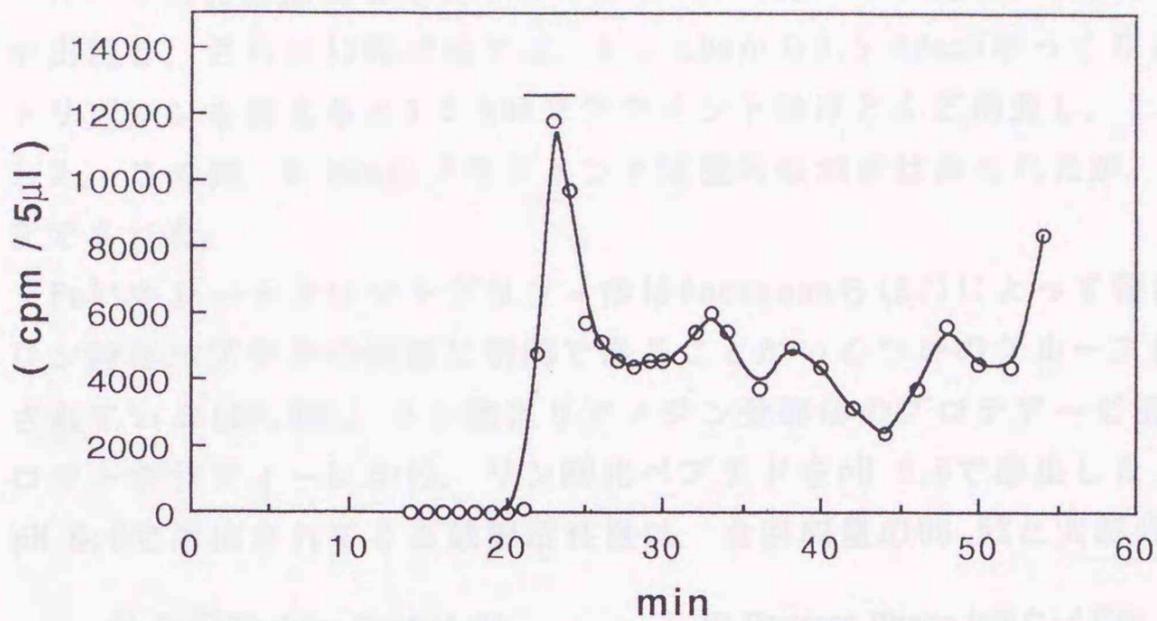


図41、ゲル濾過HPLCによるPKAリン酸化リアノジン受容体の精製

PKAリン酸化受容体をゲル濾過HPLCで精製した。

カラムはTSK G4000SW(7.5 X 600 mm)を用いて、溶媒は0.1% SDS, 0.2 mM DTT, 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH(pH 7.3)とし、0.5 ml/minの流速で行った。280 nmでタンパク質をモニターし、1分毎に分取した。各画分の一部(5 μl)を採取し、チェレンコフカウントで放射活性を測定し、—に示す画分を集めた。

この精製画分をSDS-PAGEによって分析すると均一のバンドであった。

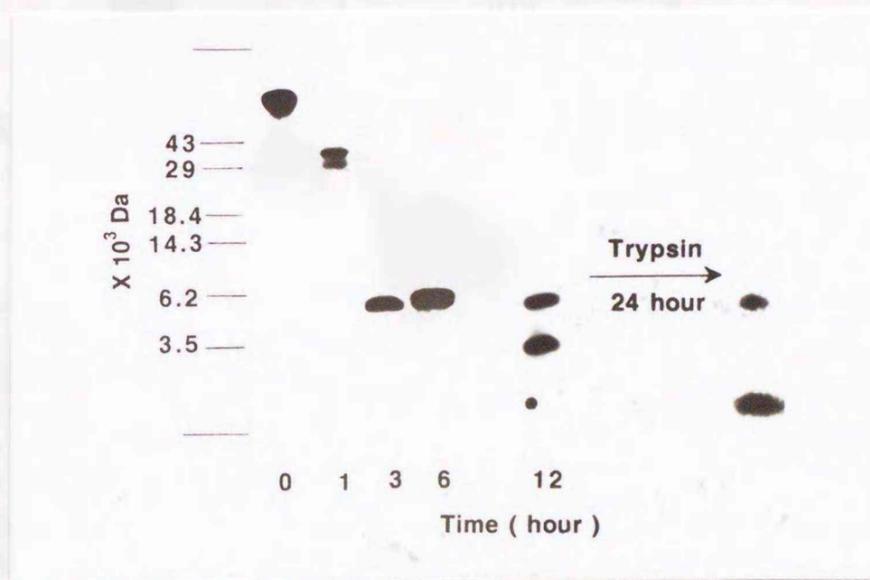


図42、PKAリン酸化ペプチドの酵素消化

PKAリン酸化受容体(400 μg)を200 μlの溶液中、API (S/E比 = 100)で12時間行った後、さらにトリプシン (S/E = 10)で12時間、消化を行った。

一定時間毎、2 μl採取し、Tricine SDS-PAGEにかけた後、オートラジオグラフィーでリン酸化フラグメントを検出した。

A P I 消化開始とともにすみやかに6.0 kDaのリン酸化ペプチドフラグメントが出現し、さらに12時間後では、6.0 kDaから3.5 kDaがゆっくりと生じてきた。トリプシンを加えると3.5 kDaフラグメントはほとんど消失し、1.5 kDaが生成した。この時、6 kDaのフラグメントは量的な減少はみられたが、依然残ったままであった。

Fe<sup>3+</sup>キレートクロマトグラフィ法はAndersonら(82)によって報告されて以来、リン酸化ペプチドの分画に有効であることがいくつかのグループによって証明されている(60,80)。リン酸化リアノジン受容体のプロテアーゼ消化物をこのクロマトグラフィーにかけ、リン酸化ペプチドをpH 8.6で溶出した(図43, A)。pH 8.6で溶出されてくる放射活性量は、全回収量の86.5%と大部分を占めた。

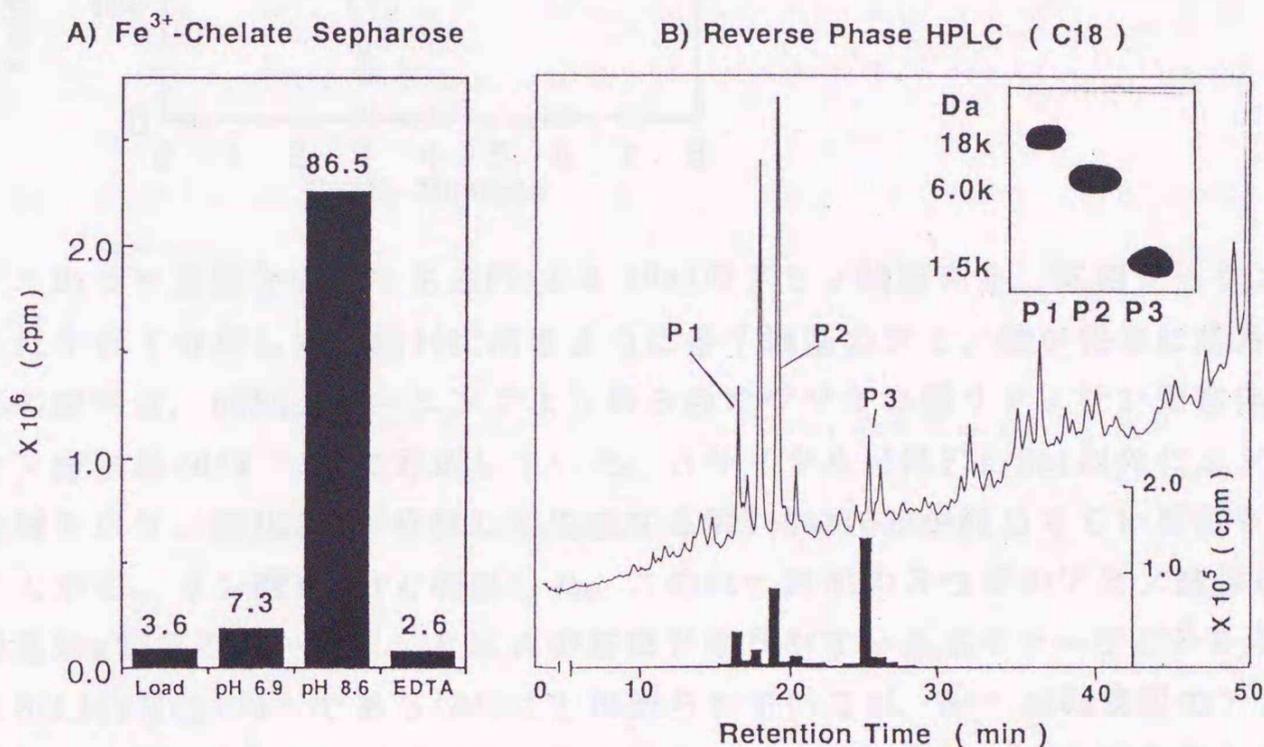


図43、リン酸化ペプチドのFe<sup>3+</sup>キレートカラムおよび逆相HPLCによる精製

(A)、Fe<sup>3+</sup>キレートカラムからの放射活性の回収率

酵素消化後のリン酸化受容体を0.4 mlのFe<sup>3+</sup>-IDA-Sepharoseに注ぎ、各種pHのbufferで溶出した。チェレンコフカウントで放射活性を測定し回収量を求めた。各バーの上の値は、回収率を示す。

(B)、逆相HPLC(ODS)からの溶出パターン

溶媒: 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN, 流速: 0.5 ml/min, カラム: YMC ODS 2.1 X 50 mm  
吸光度215 nmでペプチドをモニターしながら分取を各ピーク毎に行い、チェレンコフカウントで放射活性を測定した。

図中に組み込んだオートラジオグラフィは、各精製ペプチドのTricine SDS-PAGEによる分子量の測定を行ったものである。

次にpH 8.6溶出画分(2.8 nmol)を逆相系HPLCにかけ、0.1% TFAを含む水-アセトニトリルの系で溶出した(図43, B)。放射活性ピークは3つに分かれ、それぞれ溶出順にP1, P2, P3とし、精製分取した。精製画分をそれぞれTricine

SDS-PAGEにかけ分子量を測定すると、P1(18 kDa), P2(6.0 kDa), P3(1.5 kDa)であった。また、それぞれの比率はP1:12%, P2:29%, P3:46%であった。

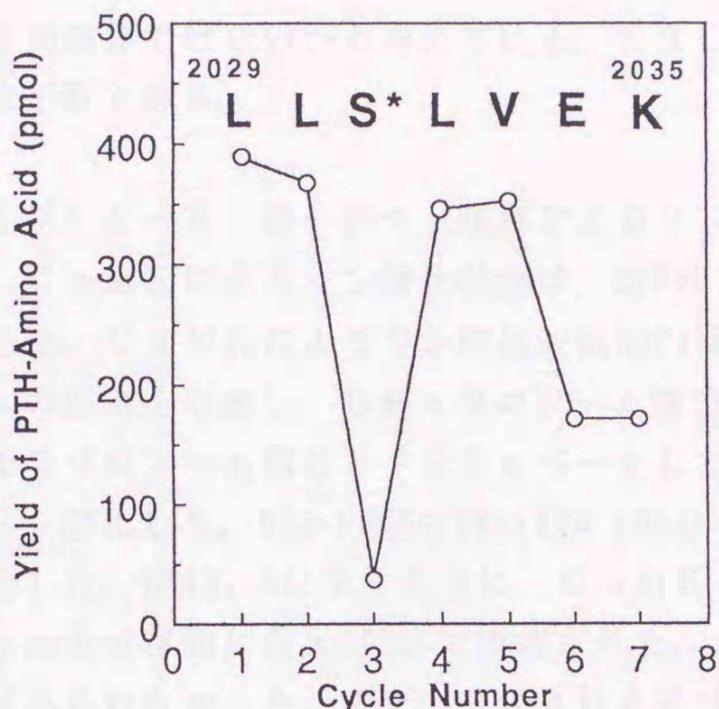


図44、P3ペプチドのシーケンス解析

このうち主要な成分であるP3(1.5 kDa)のアミノ酸配列を、気相シーケンサーにかけて分析した。図44に示すように全7残基のアミノ酸が完全に読みとれ、この配列は、cDNAクローニングより得られたウサギ心筋リアノジン受容体のアミノ酸残基2029-2035に対応していた。3サイクル目はPTH-Ser以外にエドマン分解中にリン酸化Serが分解して生成するDTT-Ser(83)が同じくらい検出されたことから、リン酸化Serと判断した。このSer 2031の3つ前のアミノ酸は塩基性残基Argである。一般に、PKAの基質となりやすい基本モチーフはB-B-X-S/T (BはArg又はLys)である(84)ことが知られているが、Ser 2031周辺のアミノ酸配列I-R-G-R-L-L-S-L-V-E-Kは、この基本モチーフに相当する配列を含んでいない。

しかし、R-X-X-S/TでもPKAの基質になりうる(84)とされており、R-L-L-Sはこれを満たす。R-X-X-Sは通常CaMKのリン酸化基本モチーフ(85)とされているが、実際にPKAによってリン酸化された例もいくつかある(86,87)。また、Ser 2031の5番目前にもArgがあり、より塩基性が強まっているためにPKAの基質になり易かったとも考えられる。シーケンス解析の結果とこれらの考察から心筋リアノジン受容体はPKAによりSer 2031がリン酸化されたと結論した。一方、P2(6.0 kDa)はシーケンス解析を行ったが、エドマン分解は進まず、全く読みとれなかった。P2(6.0 kDa)はプロテアーゼ消化中にN末端がブロックされた可能性がある。例えばピログルタミル化などである。現時点では、推測に過ぎないが心筋リアノジン受容体の一次構造中、B-B-X-S/TやB-X-X-S/Tを含

む6 kDaのトリプシン消化ペプチドフラグメントは見つからないことや、サブユニットあたりに導入されるリン酸基は1個であること、さらに6.0 kDaはプロテアーゼ消化が進みにくいという観察から、Ser 2031を含む1.5 kDaフラグメントの前駆体ではないかと考えている。ただし、N末端のブロックの様式については不明である。

#### IV-2-6 抗ペプチド抗体によるリン酸化阻害

CaMKによるリン酸化部位は、抗RyP1抗体が認識する配列中のSer 2809である。CaMKによるリン酸化が抗RyP1抗体で阻害できるか調べた。in vivoへの応用を考慮し、心筋ミクロソーム画分を用いて調べた。抗RyP1抗体IgG画分をミクロソーム画分とインキュベートした後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ とCaMKを加えリン酸化した。SDS-PAGEを行い400 kDa分子のバンドを切り取り、放射活性を測定した。図45, Aに示すように、CaMKによるリアノジン受容体リン酸化は抗体濃度依存的に最大80%まで阻害された。コントロールIgGではこのような阻害はみられなかった。また、PKAによるリン酸化についても同時に調べたところ、この抗体はCaMKの場合同様、抗体濃度依存的にリン酸化を阻害することが観察された(図45, B)。

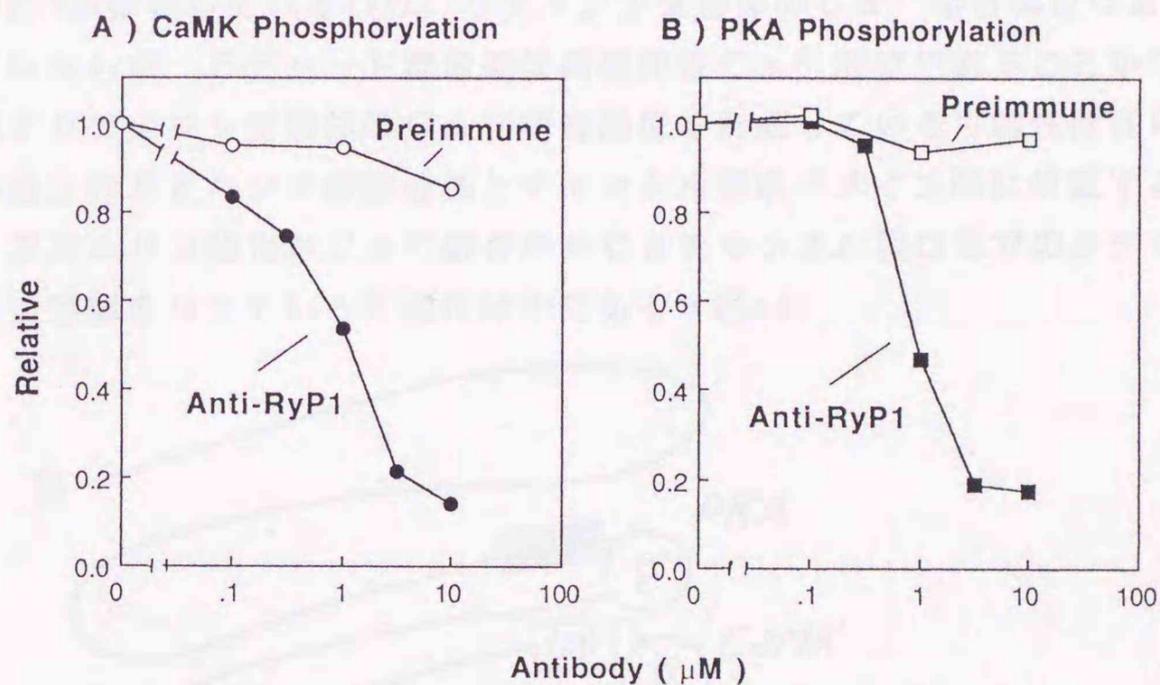


図45、抗RyP1抗体によるPKAおよびCaMKリン酸化阻害

心筋ミクロソーム画分を種々の濃度の抗RyP1抗体(●, ■)とあらかじめインキュベートした後、CaMK(A)およびPKA(B)でリン酸化した。SDS-PAGE後、ゲルからリアノジン受容体バンドを切り取り、放射活性を測定した。コントロールとして非免疫抗体IgG(○, □)を用いた。

ミクロソーム中には多数のリン酸化されるタンパク質があるにもかかわらず、この抗RyP1抗体はリアノジン受容体のリン酸化のみ阻害した。したがって、この抗体はin vitroのみならず、in vivoの系でもリアノジン受容体のリン酸化の解析において応用可能であると考えられる。

#### IV-2-7 リン酸化部位とチャンネル機能についての考察

心筋リアノジン受容体はPKAとCaMKによって、それぞれサブユニットあたり1個リン酸化され、Caチャンネル活性が増大する。本章において気相シーケンス法および抗ペプチド抗体を用いる方法によって、PKAとCaMKのリン酸化部位をそれぞれ同定した。PKAはSer 2031を、CaMKはSer 2809と、各キナーゼは異なったSer残基をリン酸化することが明らかとなった。CaMKのリン酸化部位については、Witcherらがすでに同じ結果を報告している(60)がPKAについては初めての報告である。

PKA、CaMKリン酸化部位はリアノジン受容体の一次構造から推測されるトポロジーモデル上、細胞質側に位置し、いわゆる"Foot"領域中に存在する。一次構造上、PKAのリン酸化部位Ser 2031の上流にはEFハンド様の領域(2010-2021)が存在している(79)。リアノジン受容体のCa<sup>2+</sup>結合部位はまだ同定されていないが、EFハンド様構造は高親和性Ca<sup>2+</sup>部位であることから、この領域がリアノジン受容体のCa<sup>2+</sup>結合部位を形成している可能性は高い。Ser 2031はこのEFハンド様構造部とチャンネル形成ドメイン間に位置することから、PKAリン酸化がCa<sup>2+</sup>結合からCaチャンネル開口までのシグナル伝達過程に影響を与えている可能性は十分ある(図46)。

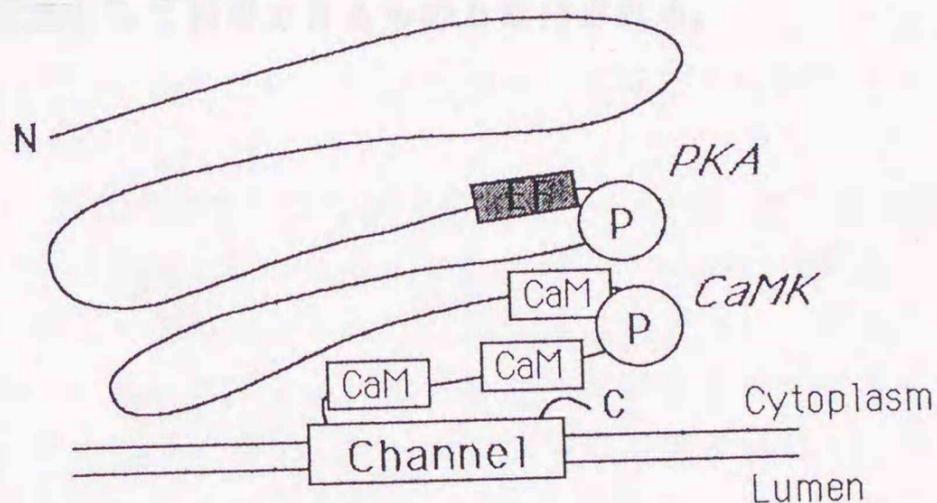


図46、リン酸化部位とリアノジン受容体構造における位置

- EF は、EFハンド様構造部位
- CaM は、CaM結合ポテンシャル部位
- P は、リン酸化部位

リン酸化部位同士が近接していることに注意。

一方、CaMKリン酸化部位Ser 2809はPKAリン酸化部位Ser 2031よりも778残基C末端側に位置している。Ser 2809の周辺にはCaMが結合すると考えられる部位が2775-2807, 2877-2898, 2998-3016と前後に存在する。CaMはチャンネル活性を抑制する作用をもつことから、CaMKリン酸化部位とCaM結合部位の位置する領域もまたCaチャンネルの機能調節に重要であると考えられる。

抗ペプチド抗体を用いたリン酸化阻害実験の結果より、Ser 2031とSer 2809は一次構造上約800残基近く離れているが、高次構造上では近接している可能性が示唆された(図45)。ただし、抗体は大きい分子(150 kDa)なので、リン酸化部位が近接しているから共に阻害されたというよりも、抗体のかさ高さによる阻害効果にすぎないとも考えられる。しかしながら、小脳IP<sub>3</sub>受容体のリン酸化部位に対する抗ペプチド抗体は、2つのリン酸化部位が比較的近い位置にあるにもかかわらず、片方の部位のリン酸化しか阻害しないことが示されている(81)。このことから、少なくともリアノジン受容体のリン酸化部位Ser 2809とSer 2031はまったく反対方向を向いているとか、高次構造上、極端に離れているとは考えにくい。抗体によるリン酸化阻害がIgG画分のみならず、より小さなFab画分でも起こりうるか調べれば、この二つのリン酸化部位の位置関係についてより詳しい情報が得られると思われる。

本章では、*in vitro*の系でPKA又はCaMKによって再構成受容体をリン酸化し、それぞれのリン酸化部位を同定した。*in vivo*の系においても同じ部位がリン酸化されているかどうか調べるのが今後の課題である。

抗RyP1抗体はPKAとCaMKによるそれぞれのリン酸化を阻害できるので、*in vivo*の系においてリアノジン受容体のリン酸化による機能変化を解析する際の有用な道具として利用できるものと期待される。

## 結語

心筋細胞での $Ca^{2+}$ 動員に、主要な役割を果たしている2つの分子、形質膜電位依存性Caチャンネルと筋小胞体リアノジン受容体の構造と機能について調べ、以下のことを明らかにした。

1) 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を明らかにし、その分子性状を調べた。基本的には、骨格筋チャンネルと同様 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2-\delta$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の5種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ずに起こっている可能性が示唆された。

2) 光アフィニティラベル法により、Caチャンネル $\alpha 1$ サブユニット上の1,4-dihydropyridine結合部位として2ヶ所の部分を心筋では初めて同定した。それらは、骨格筋チャンネルのDHP結合部位と対応するリピートⅢのS5-S6リンカー部とリピートⅣのS6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。

3) 心筋リアノジン受容体を精製しリボソームへ埋め込み再構成した。リン酸化による機能変化を調べた結果、PKAやCaMKによって受容体がリン酸化され、この時Ca放出チャンネルの開口確率が、増大することを明らかにした。PKAによる活性化は、電気生理学的実験からも確認できた。

4) 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、心筋リアノジン受容体の一次構造上で明らかにした。PKAはSer 2031を、CaMKはSer 2809をリン酸化していた。このリン酸化部位近傍には、EFハンド様構造やカルモジュリン結合ポテンシャル部位など活性調節部位が存在する。このことから、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残基以上も離れているが、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。

5) 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PVDF膜に転写した後、イメージングプレート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考案した。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行うことができた。

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。

また、本研究で明らかとなった活性制御機構がin vivoの系でも起こっているのか検証していくことも重要な課題である。

引用文献

- 1) Hess, P. (1990) *Annu. Rev. Neurosci.* **13**, 337-356
- 2) Glossmann, H. and Striessnig, J. (1988) *Vitam. Horm.* **44**, 155-328
- 3) Catterall, W. A., and Striessnig, J. (1992) *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 349-354
- 4) Takahashi, M., Seagar, M. J., Jones, J. F., and Catterall, W. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5478-5482
- 5) Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987) *Nature* **328**, 313-318
- 6) Ellis, S. B., Williams, M. E., Ways, N. R., Brenner, R., Sharp, A. H., Leung, A. T., Campbell, K. P., McKenna, E., Koch, W. J., Hui, A., Schwartz, A., and Harpold, M. M. (1988) *Science* **241**, 1661-1664
- 7) Ruth, P., Rohrkasten, A., Biek, M., Bosse, E., Regulia, S., Meyer, H. M., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989) *Science* **245**, 1115-1118
- 8) Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 3287-3293
- 9) Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Miri, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989) *Nature* **340**, 231-233
- 10) Biel, M., Ruth, P., Bossse, E., Hullin, R., Stuehmer, W., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1990) *FEBS Lett.* **269**, 409-412
- 11) Snutch, T. P., Leonard, J. P., Gillbert, M. M., Lester, H., and Davidson, N. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3391-3395
- 12) Snutch, T. P., Tomlinson, W. J., Leonard, J. P., and Gilbert, M. M. (1991) *Neuron* **7**, 45-57
- 13) Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maruofi, A., McCue, A. F., Veliquelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992) *Science* **257**, 389-395
- 14) Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M. -S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshoba, K., Imoto, K., Tanabe, T., and Numa, S. (1991) *Nature* **350**, 398-402
- 15) Seino, S., Chen, L., Seino, M., Beondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H., and Bell, J. I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 584-588
- 16) Haase, H., Striessnig, J., Holtzhauser, M., Vetter, R., and Glossmann, H. (1991) *Eur. J. Pharmacol.* **207**, 51-59
- 17) Schneider, T., and Hofmann, F. (1988) *Eur. J. Biochem.* **174**, 369-375
- 18) Chang, F. C., and Hosey, M. M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18929-18937

- 19) Copper, C. H., Vadaele, S., Barhanin, J., Fosset, M., Lazdunski, M., and Hosey, M. M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 509-512
- 20) Yoshida, A., Takahashi, M., Fujimoto, Y., Takisawa, H., and Nakamura, T. (1990) *J. Biochem.* **107**, 608-612
- 21) Hayakawa, N., Morita, T., Yamaguchi, T., Mitsui, H., Mori, K.J., Saisu, H., and Abe, T. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 483-490
- 22) Kameyama, M., Hescheler, J., Mieskes, F., and Trautwein, W. (1986) *Pflügers Arch.* **407**, 461-463
- 23) Osterrieder, W., Brum, G., Hescheler, J., Trautwein, W., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1982) *Nature* **298**, 576-578
- 24) Jones, L. R. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 85-99
- 25) Merrifield, R. B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154
- 26) Glossmann, H. and Ferry, D. R. (1985) *Methods Enzymol.* **109**, 521-550
- 27) Taki, M., Nakayama, H. and Kanaoka, Y. (1991) *FEBS Lett.* **283**, 259-262
- 28) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. N., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
- 29) Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- 30) Laemmli, U. T. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 31) Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
- 32) Horne, W. A., Weiland, G. A., and Oswald, R. E. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3588-3594
- 33) Takahashi, M. and Catterall, W. A. (1987) *Biochemistry* **26**, 5518-5526
- 34) Roehrkasten, A., Meyer, H. E., Nastainczyk, W., Sieber, M., and Hofmann, F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15325-15329
- 35) McEnery, M. W., Snowman, A. M., Sharp, A. H., Adams, M. E., and Snyder, S. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 11095-11099
- 36) Castellano, A., Perez-Reyes, E., Baggstrom, E., and Birnbaumer, L. (1992) *FASEB J.* **6**, A245
- 37) Varadi, G., Lory, P., Schultz, D., Varadi, M., and Schwartz, A. (1991) *Nature* **352**, 159-162
- 38) Lacerda, A. E., Kim, H. S., Ruth, P., Perez-Reyes, E., Flockerzi, V., Hofmann, F., Birnbaumer, L. and Brown, A. M. (1991) *Nature* **352**, 527-530

- 39) Itagaki, K., Koch, W. J., Bodi, I., Klockner, U., Slish, D. F., and Schwartz, A. (1992) *FEBS Lett.* **297**, 221-225
- 40) Yoshida, A., Takahashi, M., Nishimura, S., Takeshima, H., and Kokubun, S. (1992) *FEBS Lett.* **309**, 343-349
- 41) Nunoki, K., and Catterall, W. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6816-6820
- 42) Hymel, L., Striessnig, J., Glossmann, H., and Schindler, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4290-4294
- 43) Chang, C. F., Gutierrez, L. M., Munda-Weilman, C., and Hosey, M. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 1639-1640
- 44) Striessnig, J., Glossmann, H., and Catterall, W. A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9108-9122
- 45) Nakayama, H., Taki, M., Striessnig, J., Glossmann, H., Catterall, W.A., and Kanaoka, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9203-9207
- 46) Striessnig, J., Murphy, B. J., and Catterall, W. A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10769-10773
- 47) Kass, R., Arena, J. P. and Chin, S. (1991) *J. Gen. Physiol.* **98**, 63-75
- 48) Taki, M., Kuniyasu, A., Nakayama, H. and Kanaoka, Y. (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 1860-1862
- 49) Guy, H. R., and Conti, F. (1990) *Trends Neurosci.* **13**, 201-206
- 50) Tada, M. and Katz, A. M. (1982) *Annu. Rev. Physiol.* **44**, 401-423
- 51) Schult, G., Rosenthal, W., Hescheler, J., and Trautwein, W. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 275-292
- 52) Inui, M., Saito, A. and Fleischer, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1740-1747
- 53) Imagawa, T., Smith, J. S., Coronado, R., and Campbell, K. P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16636-16643
- 54) Lai, F. A., Erickson, H., Rousseau, E., Liu, Q. Y. and Meissner, G. (1988) *Nature* **331**, 315-319
- 55) Inui, M., Saito, A. and Fleischer, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 15637-15642
- 56) Lai, F. A., Anderson, K. A., Rousseau, E., Liu, Q. Y., and Meissner, G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 441-449
- 57) Imagawa, T., Takasago, T., and Shigekawa, M. (1989) *J. Biochem.* **106**, 342-348
- 58) Meissner, G., and Henderson, J. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3065-3073
- 59) Hymel, L., Schindler, H., Inui, M., and Fleischer, S. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 308-314

- 60) Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., and Jones, L. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11144-11152
- 61) Takasago, T., Imagawa, T., Furukawa, K., Ogurusu, T., and Shigekawa, M. (1991) *J. Biochem.* **109**, 163-170
- 62) Yoshida, A., Takahashi, M., Imagawa, T., Shigekawa, M., Takisawa, T., and Nakamura, T. (1992) *J. Biochem.* **111**, 186-190
- 63) Okuno, S., and Fujisawa, H. (1989) *Biophys. Acta. Acta.* **1038**, 204-208
- 64) Gopalakrishna, R., and Anderson, W. B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 830-836
- 65) Ferris, C. D., Haganir, R. L., Supattapone, S. and Snyder, S. H. (1989) *Nature* **342**, 87-89
- 66) Maeda, N., Niinobe, M., and Mikoshiba, K. (1990) *EMBO J.* **9**, 61-67
- 67) Fleischer, S., and Inui, M. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 333-364
- 68) Anderson, K., Lai, F. A., Liu, Q.-Y., Rousseau, E., Erickson, H. P., and Meissner, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1329-1335
- 69) Rousseau, E., and Meissner, G. (1989) *Am. J. Physiol.* **256**, H328-H333
- 70) Boller, M., and Pott, L. (1989) *Eur. J. Physiol.* **415**, 276-288
- 71) Callewaert, G., Cleemann, L., and Morad, M. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2009-2013
- 72) Fabiato, A. and Fabiato, F. (1975) *Nature* **253**, 556-558
- 73) Wegener, A. D., Simmerman, H. K. B., Lindemann, J. P., and Jones, L. R. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 11468-11474
- 74) Ashley, R. H. (1989) *J. Membr. Biol.* **111**, 179-189
- 75) Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N., and Mikoshiba, K. (1989) *Nature* **342**, 32-38
- 76) Yoshida, A., Ogura, A., Imagawa, T., Shigekawa, M., and Takahashi, M. (1992) *J. Neurosci.* **12**, 1094-1100
- 77) Witcher, D. R., Striffler, B. A., and Jones, L. R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4963-4967
- 78) Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. J., Zorzato, F., Green, N. M., and MacLennan, D. H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13472-13483
- 79) Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H., and Numa, S. (1990) *FEBS Lett.* **271**, 167-177
- 80) Rotman, E. I., De Jongh, K. S., Florio, V., Lai, Y., and Catterall, W. A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16100-16105
- 81) 岡幸蔵. 修士論文 (北海道大学)

- 82) Anderson, L., and Porath, J. (1986) *Anal. Biochem.* **154**, 250-254
- 83) Wang, Y., Fiol, C. J., Depaoli-Roach, A. A., Bell, A. W., Hermodson, M. A., and Roach, P. J. (1988) *Anal. Biochem.* **174**, 537-547
- 84) Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., and Krebs, E. G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 567-613
- 85) Beavo, J. A., Bechtel, P. J., and Krebs, E. G. (1975) *Methods Enzymol.* **38**, 299-308
- 86) Yeaman, S. J., Cohen, P., Watson, D. C., and Dixon, G. H. (1977) *Biochem. J.* **162**, 411-421
- 87) Keutmann, H. T., Ratanabanangkoon, K., Pierce, M. W., Kitzmann, K., and Ryan, R. J. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14521-14526
- 88) Ferris, C. D., Cameron, A. M., Brecht, D. S., Haganir, R. L., and Snyder, S. H. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 192-198
- 89) Curtis, B. M., and Catterall, W. A. (1984) *Biochemistry* **23**, 2113-2118
- 90) Kuniyasu, A., Oka, K., Ide-Ymada, T., Hatanaka, Y., Abe, T., Nakayama, H., and Kanaoka, Y. (1992) **112**, 235-242

## 謝辞

本研究を行うに際し、直接御指導、御助言、並びに御鞭撻を賜りました中山仁助教授に厚く御礼申し上げます。

終始お励し頂き、有益な御助言を賜りました金岡祐一北海道大学名誉教授に深く感謝いたします。

有益な御助言および討論を頂きました東日本大学薬学部・谷沢和隆教授、富山医科薬科大学・畑中保丸助教授、青森大学工学部・佐藤英助教授に深く感謝します。

電気生理学的解析を行って頂き、有益な御助言、御討論をして頂きました九州大学薬学部・桐野豊教授、安西和紀博士に感謝いたします。

貴重な抗体並びに酵素を恵与して頂きました新潟大学脳研究所・阿部輝雄助教授と東京都立神経総合研究所・山内卓博士に感謝いたします。

pCAS9 inclusion bodiesを恵与して頂きました京都大学医学部・竹島浩博士ならびに三菱化成生命研究所・高橋正身博士に感謝します。

バイオイメージングアナライザーを使わせて頂いた北海道大学薬学部遺伝子有機化学講座・大塚栄子教授に心より感謝いたします。

[<sup>3</sup>H]標識タンパク質の視覚化の開発を快く引き受けて下さり、御協力頂いた富士写真フィルム株式会社バイオイメージングアナライザーグループの森啓司さん、佐藤茂さんに感謝いたします。

御助言、御協力を頂きました瀧基彦博士、吉田栄一博士、岡幸蔵君をはじめとする北海道大学薬学部、旧薬品合成化学教室ならびに生体機能化学教室で一緒に過ごした皆さんに感謝いたします。特に抗体作製をともに行って頂いた渡辺寿郎君、そして苦しいflux測定を手伝って頂いた武田真一君に感謝します。

1993年2月

國安明彦



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

|      |      |       |        |     |         |       |         |       |
|------|------|-------|--------|-----|---------|-------|---------|-------|
| Blue | Cyan | Green | Yellow | Red | Magenta | White | 3/Color | Black |
|      |      |       |        |     |         |       |         |       |

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

|          |   |   |   |   |   |   |          |   |   |    |    |    |    |    |    |          |    |    |    |
|----------|---|---|---|---|---|---|----------|---|---|----|----|----|----|----|----|----------|----|----|----|
| <b>A</b> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | <b>M</b> | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | <b>B</b> | 17 | 18 | 19 |
|          |   |   |   |   |   |   |          |   |   |    |    |    |    |    |    |          |    |    |    |