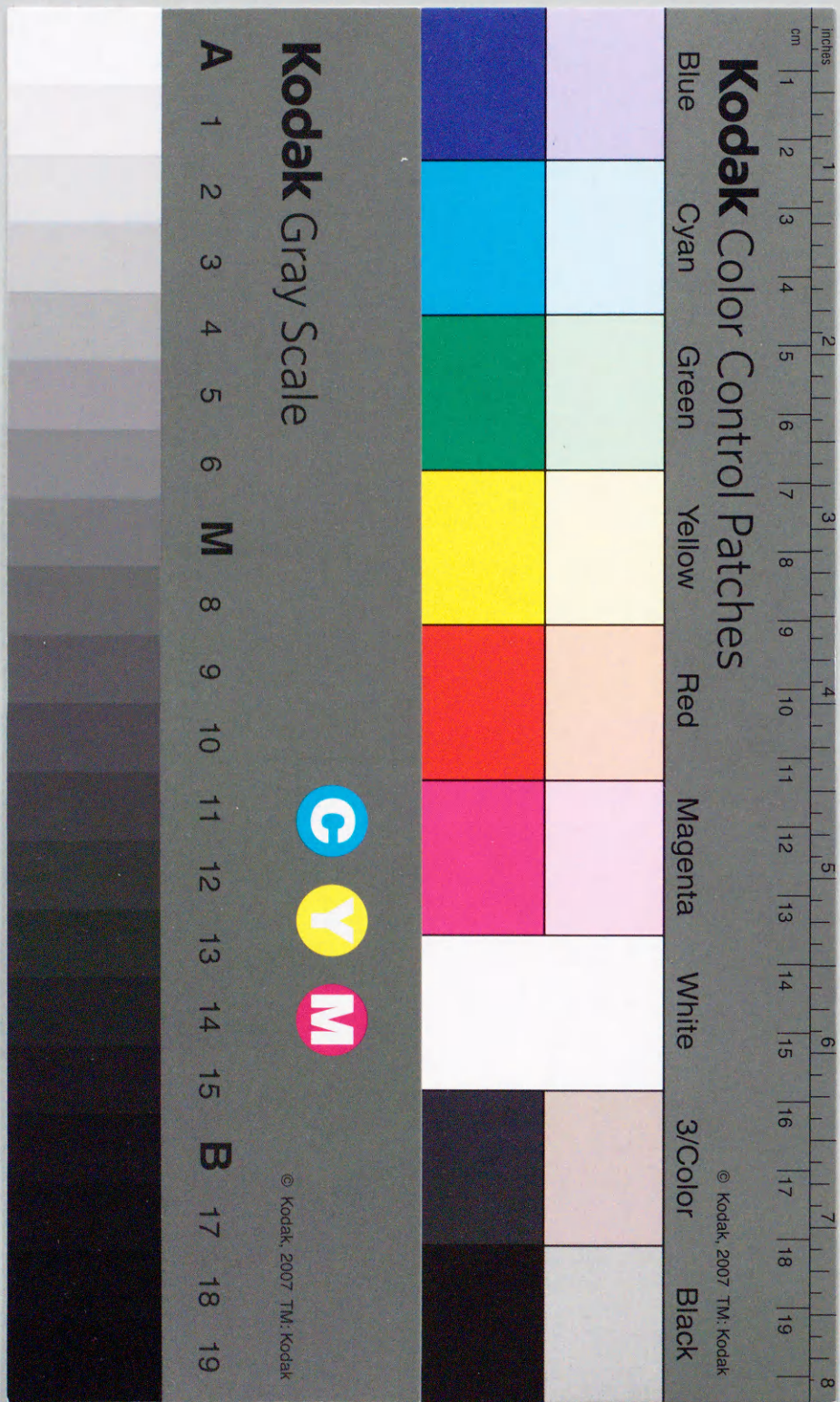


蛇毒マイオトキシン $\alpha$ を用いた骨格筋  
筋小胞体におけるカルシウム遊離  
の分子制御機構の研究

東北大学大学院薬学研究科  
生物薬品製造学講座

大倉 正道



①

蛇毒マイオトキシン $\alpha$ を用いた骨格筋  
筋小胞体におけるカルシウム遊離  
の分子制御機構の研究

東北大学大学院薬学研究科  
生物薬品製造学講座

大倉 正道

目次	
第1章 緒言	1
第2章 MYTX 結合蛋白質の精製	7
2-1 序論	7
2-2 HSR および LSR における MYTX 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 遊離	7
2-3 HSR の各種分画画分に対する <sup>125</sup> I-MYTX の結合	9
2-4 考察	10
第3章 MYTX 結合部位の性質	11
3-1 序論	11
3-2 HSR における <sup>125</sup> I-MYTX 結合部位の性質	11
3-3 MYTX 誘発性およびカフェイン誘発性 Ca <sup>2+</sup> 遊離の性質	15
3-4 考察	18
第4章 MYTX 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 遊離における RyR および CS の関与	22
4-1 序論	22
4-2 MYTX 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 遊離における RyR の関与	22
4-3 MYTX 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 遊離における CS の関与	23
4-4 考察	26
第5章 総括	28
第6章 実験材料および方法	30
6-1 試薬	30
6-2 第2章付属実験	31
6-3 第3章付属実験	33
6-4 第4章付属実験	36
謝辞	39
引用文献	40

## 略語表

本文中で用いた略語は以下のとおりである。

- AMP-PCP、adenosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -methylene)triphosphate  
*p*-APMSF、*p*-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride  
BSA、bovine serum albumin  
CHAPS、3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate  
CICR、Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release  
CS、calsequestrin  
DHPR、dihydropyridine receptor  
DICR、depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> release  
DPO、2,5-diphenyloxazole  
DTT、(±)-dithiothreitol  
EGTA、O,O'-bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
HSR、heavy fraction of sarcoplasmic reticulum  
IP<sub>3</sub>、inositol 1,4,5-trisphosphate  
IP<sub>3</sub>R、IP<sub>3</sub> receptor  
LSR、light fraction of sarcoplasmic reticulum  
MBED、9-methyl-7-bromoeudistomin D  
MOPS、3-(N-morpholino)propanesulfonic acid  
MYTX、myotoxin  $\alpha$   
NPo、the mean number of open channels  
PEG、polyethyleneglycol 6,000  
PEI、polyethyleneimine P-70  
POPOP、1,4-bis[2-(phenyloxazolyl)]benzene  
RyR、ryanodine receptor  
SDS-PAGE、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamido gel electrophoresis  
SR、sarcoplasmic reticulum  
TC、terminal cisternae  
TRN、triadin  
 $\Delta V$ 、peak change in voltage

本学位論文の基礎となる原著論文

- 1. Calsequestrin Is a Major Binding Protein of Myotoxin  $\alpha$  and an Endogenous Ca<sup>2+</sup> Releaser in Sarcoplasmic Reticulum**  
Masamichi Ohkura, Ken-Ichi Furukawa, Anthony T. Tu and Yasushi Ohizumi  
*Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. (Rapid Commun.)* **268**, R1-R2 (1994)
- 2. The Properties of Specific Binding Site of <sup>125</sup>I-radioiodinated Myotoxin  $\alpha$ , a Novel Ca<sup>++</sup> Releasing Agent, in Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum**  
Masamichi Ohkura, Ken-Ichi Furukawa, Keishi Oikawa and Yasushi Ohizumi  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **273**, 934-939 (1995)
- 3. Calsequestrin Is Essential for the Ca<sup>2+</sup> Release Induced by Myotoxin  $\alpha$  in Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum**  
Masamichi Ohkura, Toru Ide, Ken-Ichi Furukawa, Takashi Kawasaki, Michiki Kasai and Yasushi Ohizumi  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**, 1181-1185 (1995)

本学位論文の参考となる原著論文

**1.  $\text{Ca}^{2+}$  Release Induced by Myotoxin  $\alpha$ , a Radio-labellable Probe Having Novel  $\text{Ca}^{2+}$  Release Properties in Sarcoplasmic Reticulum**

Ken-Ichi Furukawa, Kaori Funayama, Masamichi Ohkura, Yoshiteru Oshima, Anthony T. Tu and Yasushi Ohizumi

*Br. J. Pharmacol.* **113**, 233-239 (1994)

**2. Properties of  $\text{Ca}^{++}$  Release Induced by Puff Adder Lectin, a Novel Lectin from the Snake *Bitis arietans*, in Sarcoplasmic Reticulum**

Masamichi Ohkura, Yosuke Miyashita, Toshiaki Nikai, Junko Suzuki, Yumiko Komori, Hisayoshi Sugihara and Yasushi Ohizumi

*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1043-1048 (1996)

**3. Characteristics of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  Release Induced by Quinolidomicin  $\text{A}_1$ , a 60-membered Macrolide from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum**

Masamichi Ohkura, Yosuke Miyashita, Masae Kakubari, Yoichi Hayakawa, Haruo Seto and Yasushi Ohizumi

*Biochim. Biophys. Acta* **1294**, 177-182 (1996)

第1章 緒言

骨格筋の筋小胞体 (SR; sarcoplasmic reticulum) は筋原線維を取り巻く袋状の構造を有し、筋細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を調節することにより筋収縮を制御する  $\text{Ca}^{2+}$ ストアである (Fig. 1-1)。運動神経からの脱分極刺激が、筋細胞膜を経て、筋細胞膜が陥入して形成された横行小管 (T管; transverse tubule) に到達すると、T管が両側から SR という別の膜により挟まれた構造部 (triad junction) において何らかの信号変換が起こり、SR から瞬時に  $\text{Ca}^{2+}$ が遊離され、筋収縮が起こる。遊離された  $\text{Ca}^{2+}$ は、SR の  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) の働きにより SR 内へ取り込まれ、収縮した筋肉は弛緩する。骨格筋の興奮収縮連関の中で、triad junction での信号変換機構、および SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は非常に重要なステップであるが、その詳細は未だ解明されていない。

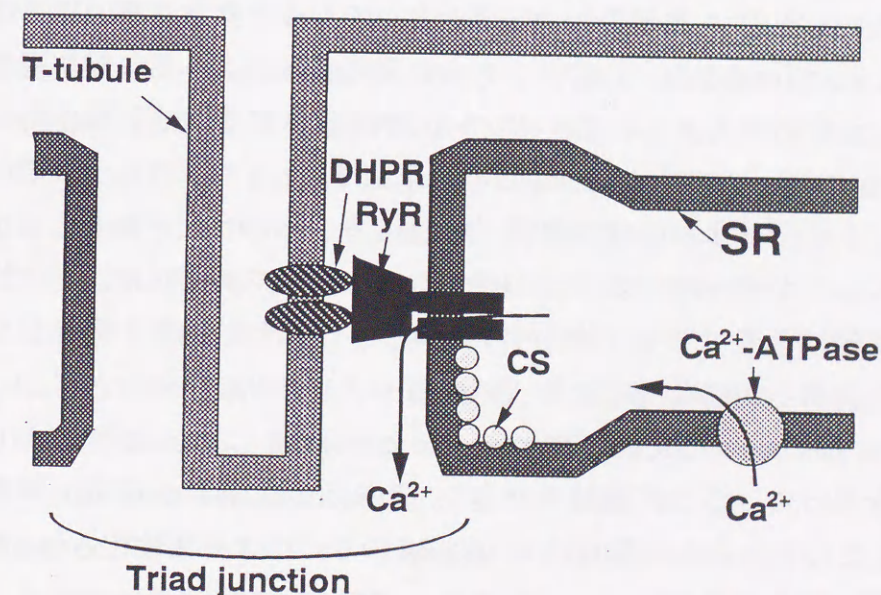


Fig. 1-1. Schematic model of the excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Depolarization of the transverse-tubule (T-tubule) induces conformational change of the dihydropyridine receptor (DHPR), which leads to  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum (SR) by being mediated through the ryanodine receptor (RyR). Rise in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration triggers muscle contraction. Released  $\text{Ca}^{2+}$  is sequestered into the SR by the  $\text{Ca}^{2+}$  pump ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) and stored mainly by binding to calsequestrin (CS), followed by muscle relaxation.

Triad junction の T 管側には電位依存性の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (DHPR; dihydropyridine receptor) が局在していることが知られている (Fosset ら、1983)。このチャンネルは、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの中でもっとも不活性化が遅く (Nowycky ら、1985; Bean、1989)、ニフェジピンに代表される dihydropyridine 系、ジルチアゼムに代表される benzothiazepine 系、さらにベラパミルに代表される phenylalkylamine 系の薬物により阻害される (Galizzi ら、1986; Takahashi、1989)。また、cAMP 依存性リン酸化酵素 (PKA; protein kinase A) によるリン酸化により活性化される (Flockerzi ら、1986)。チャンネルの実体は、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  および  $\delta$  サブユニットのヘテロ 5 量体であり (Takahashi ら、1987; Campbell ら、1988)、すべてのサブユニットの 1 次構造は解明されている (Tanabe ら、1987; Ellis ら、1988; Jay ら、1990)。中でも  $\alpha_1$  サブユニットの 1 次構造は  $\text{Na}^+$  チャンネルのものと非常に高い相同性を示すこと (Tanabe ら、1987)、さらに電気刺激による筋収縮作用を示さないマウスへの  $\alpha_1$  サブユニット mRNA 注入による筋収縮作用の発現 (Tanabe ら、1988)、Xenopus 卵母細胞での  $\alpha_1$  サブユニット蛋白質合成によるチャンネル活性の発現 (Mikami ら、1989) などから、 $\alpha_1$  サブユニットがチャンネルポアを形成する本体として興奮収縮連関において本質的に重要であり、他のサブユニットは補助的機能を果たしていることが明らかになってきた (Mikami ら、1989; Wei ら、1991)。

Triad junction の SR 側 (TC; terminal cisternae) には、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を担っている  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネル (RyR; ryanodine receptor) が存在する。このチャンネルの開口は 1-100  $\mu\text{M}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  により活性化され、それ以下でも以上でも開口しない。また、カフェインやアデニンヌクレオチドにより活性化され、 $\text{Mg}^{2+}$ 、ルテニウムレッド、プロカインにより阻害される (Endo ら、1970; Ford と Podolsky、1970; Endo、1977; Nagasaki と Kasai、1983; Meissner、1984)。さらに、カルモジュリン (CaM; calmodulin) (Meissner、1986; Smith ら、1989) や FKBP12 (Jayaraman ら、1992; Timerman ら、1993) による制御も報告されている。このチャンネルは、中性アルカロイドであるリアノジンと高い結合親和性 ( $K_D =$

10 nM 以下) を示し (Imagawa ら、1987)、電気生理学的にもリアノジンが、低濃度 (nM- $\mu\text{M}$ ) ではコンダクタンスをおよそ半分のレベルに開口固定し、高濃度 (100  $\mu\text{M}$  以上) では阻害することが知られている (Rousseau ら、1987)。このリアノジンの結合を指標として RyR が精製され (Imagawa ら、1987; Inui ら、1987; Lai ら、1988)、400-500 kDa 蛋白質のホモ 4 量体であることが分かった (Lai ら、1988)。RyR は、5037 アミノ酸残基からなる分子量約 565 k の蛋白質であり、その 1 次構造も解明された (Takeshima ら、1989)。RyR は、後に発見されたイノシトール 3 リン酸 ( $\text{IP}_3$ ; inositol 1,4,5-trisphosphate) レセプター ( $\text{IP}_3\text{R}$ ;  $\text{IP}_3$  receptor) (Furuichi ら、1989) と構造的に類似した部分が多く、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を担う  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルファミリーとして考えられている。分子生物学的手法により、哺乳動物において少なくとも 3 種類の遺伝子レベルで異なる RyR サブタイプ、すなわち骨格筋型 (RyR1) (Takeshima ら、1989)、心筋型 (RyR2) (Nakai ら、1990; Otsu ら、1990) および脳型 (RyR3) (Giannini ら、1992; Hakamata ら、1992) が存在することが明らかになっている。RyR の構造に関する知見が蓄積されていく一方、未だその内因性アゴニストは明らかにされていない。サイクリック ADP リボースが内因性アゴニストとして有力な候補だが、これはアソシエート蛋白質を介して心筋型 RyR (RyR2) に選択的に作用しているとの見解が定着してきた (Meszaros ら、1993; Walseth ら、1993)。

TC に多量に存在する蛋白質としてカルセクエストリン (CS; calsequestrin) が知られている (Ikemoto ら、1971; MacLennan と Wong、1971; Meissner ら、1973; Slupsky ら、1987)。CS は SR 内腔側から SR 膜に結合している 63 kDa の蛋白質で、比較的親和性は低い ( $K_D \approx 1$  mM) にもかかわらず、1 分子で 40-55 個の  $\text{Ca}^{2+}$  を結合させる。早くからその 1 次構造は解明されていたが、 $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵以外に明確な役割が分かっていなかった。しかし最近、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を制御するのではないかとの報告がなされている (Ikemoto ら、1989; Kawasaki と Kasai、1994)。

以上の蛋白質を含めていくつかの triad junction における蛋白質が同定もしくは精製されているが、その機能の詳細は不明な点が多い。

1970年に Endo らにより、筋細胞中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇による SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離 (CICR;  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) が発見され (Endo ら、1970; Ford と Podolsky、1970)、T 管から流入した  $\text{Ca}^{2+}$  により SR から  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が起こるといふモデルが注目されるようになった。しかし後に、脱分極に伴う T 管からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入速度が遅いこと (Endo、1977)、実際に脱分極時に  $\text{Ca}^{2+}$  流入を担う  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの数が筋細胞に存在する DHPR の 1/10 以下であること (Rios と Brum、1987)、筋細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  を除去して  $\text{Ca}^{2+}$  流入が起こらない条件下でも筋収縮が起こること (Brum ら、1988) などが報告され、CICR の生理的意義は薄れてきている。また  $\text{IP}_3$  などのセカンドメッセンジャーの関与も、現在まで実証されるには至っていない。

それに対し、チャージムーブメントと呼ばれる現象を根拠に、triad junction でのメカニカルカップリングモデルが提唱された (Schneider と Chandler、1973)。チャージムーブメントとは筋細胞膜脱分極時に観測される、DHPR の構造変化に伴う蛋白質内電荷移動に起因する一過性の細胞膜電流のことである。この現象の有無が筋収縮と非常によい相関を示すことから、DHPR の脱分極時に起こる構造変化が直接 SR 膜に伝わり、RyR が開口するというモデルが支持されつつある。

Triad junction の電子顕微鏡による解析により DHPR と RyR が相補的な配置をしている (Block ら、1988) ことが明らかにされ、2つの  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが直接結合していると考えられてきたが、それを支持する生化学的データは当初は報告されなかった。最近、DHPR  $\alpha_1$  サブユニットと RyR の両方に結合する 95 kDa の SR 膜蛋白質、トリアジン (TRN; triadin) が見出され、その興奮収縮連関における重要性が示唆されている (Brandt ら、1990; Kim ら、1990)。

SR からの生理的な  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は、筋細胞膜の脱分極により惹起され、さらに上述の経緯から少なくとも、トリガーとしての  $\text{Ca}^{2+}$  は必要としないと考えられている。しかし、SR からの T 管脱分極に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  遊離

(DICR; depolarization-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) に関する報告は少なく (Ikemoto ら、1984)、それを証明するための実験系が未だ確立されていないのが現状である。新たに見出された内在性因子の機能的役割を解明するためにも 1つのブレイクスルーが必要である。

本研究では未だ解明されていない生理的  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の詳細を明らかにするため、ガラガラヘビ毒より単離された筋毒性ポリペプチド、マイオトキシニン  $\alpha$  (MYTX; myotoxin  $\alpha$ ; Fig. 1-2) (Cameron と Tu、1977; Fox ら、1979) を用いてその  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用を解析した。MYTX はきわめて低濃度において SR から  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を惹起し、その  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が既知の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離阻害薬に対して異なる感受性を示す点で興味深い薬物である (Furukawa ら、1994)。MYTX の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用は  $\text{Ca}^{2+}$  電極および  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を用いて検討した。またその  $^{125}\text{I}$  標識体 ( $^{125}\text{I}$ -MYTX) を調製し、RyR を多く含む SR の重い画分 (HSR; heavy fraction of SR) およびその各種分画画分に対する  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合実験を行った。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルの開口活性を、人工脂質膜へ再構成したチャンネルのシングルチャンネルレコーディング法および  $^3\text{H}$ -リアノジン (RyR が開口状態のときに結合する) 結合法により検討した。

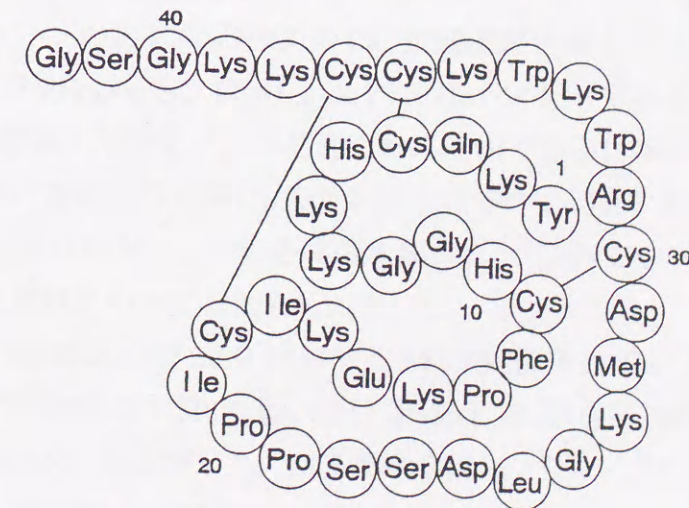


Fig. 1-2. Chemical structure of MYTX.

本研究の結果、MYTX が HSR において特異的に  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を惹起するが、その結合部位が RyR ではなく、CS の豊富な画分であること（第2章）、MYTX の結合部位が既知の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬のそれとは異なっており、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ およびスペルミンに対する感受性を有し、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に関与している RyR 以外の蛋白質であること（第3章）、さらに MYTX の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離のある成分は RyR を介するものであり、その作用に CS が必須であること（第4章）を見出した。これらの結果は、SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の過程において CS が内在性制御蛋白質として機能していることを強く支持する。MYTX は生理的な  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構を解明する上で、きわめて有効な薬理学的ツールであると思われる。

## 第2章 MYTX 結合蛋白質の精製

### 2-1 序論

これまでに骨格筋 SR における  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に影響を及ぼす薬物としてもっとも汎用されてきたのは、キサンチン誘導体のカフェインである (Endo, 1977)。カフェインは SR の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を増加させることによって CICR、すなわち RyR を介する  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を促進することが明らかにされている (Nagasaki と Kasai, 1983; Ikemoto ら, 1989)。しかし、カフェインはその作用濃度が mM オーダーと比較的高いため、結合実験に使用するリガンドとしては不適當であった。そこで低濃度かつ特異的に本機構に作用する薬物を見出し、その  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用や結合部位の性質を解析することは、生理的  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の全貌解明への1つのアプローチとして有効であると思われる。

MYTX は北アメリカに生息するガラガラヘビ *Crotalus viridis viridis* の毒腺より単離された、3つのジスルフィド結合を含む42アミノ酸残基からなる分子量4620の筋毒性ポリペプチドである (Fox ら, 1979)。電子顕微鏡による解析により、MYTX は骨格筋 SR を空胞化し、筋原線維の破壊を引き起こすことが知られている (Cameron と Tu, 1977)。我々は、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に影響する天然物のスクリーニングの過程で、MYTX がカフェインの約1000倍強力な  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離促進作用を示すことを明らかにした (Furukawa ら, 1994)。MYTX はペプチドであるため、これを  $^{125}\text{I}$ 放射標識してレセプター結合実験に使用できる。本章では、MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離活性の高い、RyR を多く含有する SR の重い画分である HSR を出発材料とし、その各種分画画分に  $^{125}\text{I}$ -MYTX の結合部位が存在する可能性について検討を行った。

### 2-2 HSR および LSR における MYTX 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離

ウサギ骨格筋より SR の重い画分 (HSR) および軽い画分 (LSR; light fraction of SR) を調製した。前者では RyR/  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの含有比率が大きいが、後者ではその比率が小さい。30°C にて  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプが共役している系で  $\text{Ca}^{2+}$ 電極実験を行い、50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ を封入させた HSR あるいは LSR の MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離活性を測定した。HSR を用いた場合、



MYTX は 0.3  $\mu\text{M}$  より高濃度において  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を引き起こした (Fig. 2-1A)。MYTX 添加による  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離後に HSR の  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込み活性が変化していないことから、MYTX の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用は  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを阻害することによるものではないと思われる。一方、LSR を用いた場合には MYTX は 10  $\mu\text{M}$  の高濃度においても効果を示さなかった (Fig 2-1B)。  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプが作動しない  $0^\circ\text{C}$  での  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 遊離実験において、MYTX の HSR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用における  $\text{EC}_{50}$  値を算出したところ、約 0.5  $\mu\text{M}$  であった。

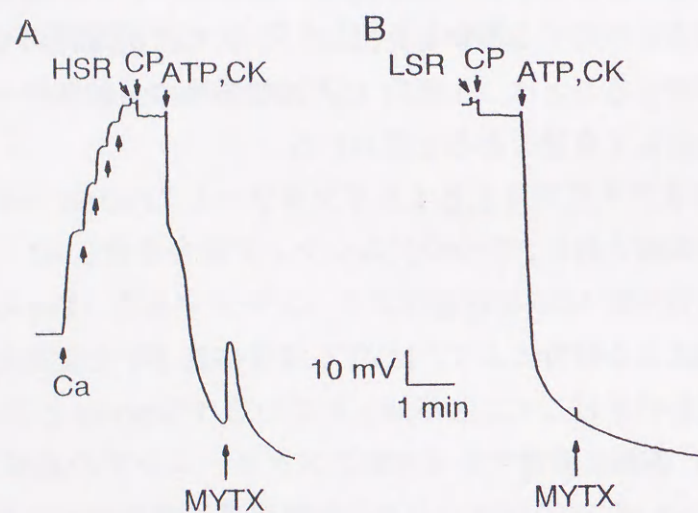


Fig. 2-1. Effects of MYTX on  $\text{Ca}^{2+}$  release from the heavy (A) and light (B) fractions of SR (HSR and LSR, respectively). The concentrations of extravesicular  $\text{Ca}^{2+}$  were monitored at  $30^\circ\text{C}$  with a  $\text{Ca}^{2+}$  electrode in the assay solution containing 0.05 mM  $\text{CaCl}_2$ , 90 mM KCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM MOPS-Tris (pH 7.0), 1 mg/ml HSR or LSR, 5 mM creatine phosphate (CP), 0.13 mg/ml creatine kinase (CK) and 0.5 mM ATP. At the beginning of each experiment, 0.01 mM  $\text{CaCl}_2$  was added stepwise 5 times as the internal standard. The reaction of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was started by a simultaneous addition of CK and ATP. CP and CK were added to regenerate ATP. The vertical calibration bar marks the response to a voltage change of 10 mV corresponding to a unit of 0.3 pCa. A, HSR plus MYTX (0.3  $\mu\text{M}$ ); B, LSR plus MYTX (10  $\mu\text{M}$ ). Ten HSR or 4 LSR preparations from different animals were used.

### 2-3 HSR の各種分画画分に対する $^{125}\text{I}$ -MYTX の結合

2-2 より MYTX の結合部位は HSR 中に局在していると判断されたので、 $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合活性を指標として HSR における MYTX 結合蛋白質の精製を行った。 $^{125}\text{I}$ -MYTX は HSR に対して特異的に結合した ( $K_D = 0.4 \mu\text{M}$ ;  $B_{\text{max}} = 6 \text{ nmol/mg}$  of protein、ただし  $K_D$  および  $B_{\text{max}}$  は各々解離定数および最大結合量を示す)。HSR を CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) により可溶化してスペルミンアガロースカラムを用いて分画したところ、興味深いことに RyR や  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを多く含む画分ではなく、CS を多く含む画分においてほぼすべての  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合活性が回収された (Fig. 2-2)。そこで精製した CS に対する結合実験を行ったところ、 $^{125}\text{I}$ -MYTX がそれに特異的に結合することが判明した ( $K_D = 1.0 \mu\text{M}$ ;  $B_{\text{max}} = 110 \text{ nmol/mg}$  of protein)。

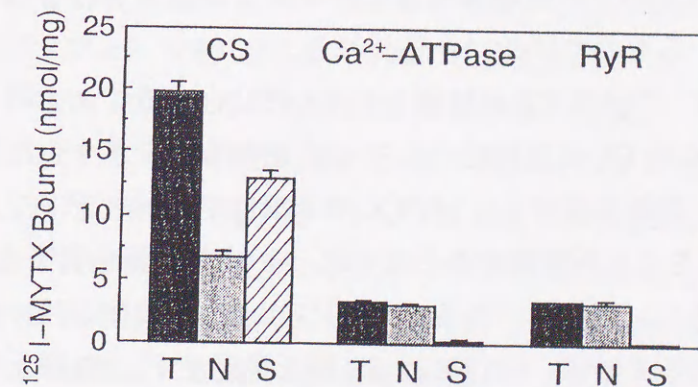


Fig. 2-2.  $^{125}\text{I}$ -MYTX binding to CS-,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase- and RyR-rich fractions. Each fraction (20-200  $\mu\text{g/ml}$ ) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -MYTX (0.3  $\mu\text{M}$ ) for 60 min at  $0^\circ\text{C}$  and then the amount of  $^{125}\text{I}$ -MYTX bound was measured, as described in "experimental procedures." Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ). T, total binding; N, non-specific binding; S, specific binding.

## 2-4 考察

SRからのCa<sup>2+</sup>遊離を促進する既知の薬物であるカフェインやアデニンヌクレオチドは、いずれもRyRに直接作用する(MeissnerとHenderson, 1987; FleischerとInui, 1989; McPhersonとCampbell, 1993)。生理的Ca<sup>2+</sup>遊離機構におけるRyRの関与はよく研究されてきたが、RyRのアソシエート蛋白質とその機能に関しては未だ不明な点が多い。本章ではRyR/Ca<sup>2+</sup>ポンプの含有比率の小さいLSRにおいてではなく、その比率の大きいHSRにおいて特異的にMYTXがCa<sup>2+</sup>遊離作用を示すこと、および<sup>125</sup>I-MYTXがRyRやCa<sup>2+</sup>ポンプを多く含む画分ではなく、CSを多く含む画分において高い結合活性を示すことを明らかにした。

クロスリンク実験によりMYTXがCa<sup>2+</sup>ポンプに結合することが報告されている(Utaisincharoenら, 1991)。この矛盾は実験条件の違いによる可能性があるが、今後検討する余地がある。しかし、HSRにおけるMYTX誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離の際にCa<sup>2+</sup>ポンプ活性が影響を受けないこと、またMYTXがLSRにおいてCa<sup>2+</sup>遊離作用を示さないことを考え併せると、MYTXのCa<sup>2+</sup>遊離作用はCa<sup>2+</sup>ポンプが阻害されることによって起こっているものではないと思われる。

本章において、<sup>125</sup>I-MYTXが精製したCSに結合することを明らかにしたが、MYTXがCSに直接結合してCa<sup>2+</sup>遊離作用を示すと結論づけるには注意深い判断を要する。MYTXは水溶性ポリペプチドであり、SR膜を通過することが困難であるためにSR内腔の蛋白質であるCSにアクセスできない可能性がある。実際に抗MYTX抗体を用いた電子顕微鏡による解析の結果、MYTXはSR膜を通過せず、SR膜上において結合していることが明らかになっている(TuとMorita, 1983)。MYTXがCSに結合することとMYTX誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離との関連については、さらなる検討を要する。

本章により少なくとも、既知のCa<sup>2+</sup>遊離試薬とは異なり、MYTXがRyR以外の蛋白質に結合してHSRにおいてCa<sup>2+</sup>遊離作用を示す、新しいタイプのCa<sup>2+</sup>遊離試薬であることが判明した。MYTXは生理的Ca<sup>2+</sup>遊離機構の解明のためのきわめて有用なツールになるものと思われる。

## 第3章 MYTX結合部位の性質

### 3-1 序論

前章において、既知のCa<sup>2+</sup>遊離試薬とは異なり、MYTXがRyR以外の蛋白質に結合してHSRからCa<sup>2+</sup>遊離を引き起こすという、新しいタイプのCa<sup>2+</sup>遊離試薬であることを述べた。カフェイン誘発性あるいはアデニンヌクレオチド誘発性のCa<sup>2+</sup>遊離作用はRyRを介するCa<sup>2+</sup>誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離(CICR)の典型的な阻害薬であるMg<sup>2+</sup>、ルテニウムレッド、プロカインのいずれによっても完全に阻害される(Endoら, 1970; FordとPodolsky, 1970; Endo, 1977; NagasakiとKasai, 1983; Meissner, 1984)。しかし、MYTX誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離作用は、高濃度プロカインを処理した場合でもごく一部抑制を受けるに過ぎないことが明らかされた(Furukawaら, 1994)。このMYTXによる新しいタイプのCa<sup>2+</sup>遊離作用は、HSRにおけるMYTX結合部位の性質を反映したものであると考えられる。

本章ではMYTXの作用機構を明らかにする目的で、HSRにおけるMYTX結合部位の性質について詳細に検討するとともに、MYTX誘発性およびカフェイン誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離の性質を比較した。

### 3-2 HSRにおける<sup>125</sup>I-MYTX結合部位の性質

HSRに対する<sup>125</sup>I-MYTX結合は、非標識体MYTXにより濃度依存的に阻害された。HSRに対する<sup>125</sup>I-MYTX結合のScatchard解析を行ったところ、<sup>125</sup>I-MYTXの濃度上昇に伴って単位蛋白質あたりの結合量は飽和型の曲線を描いて増加し(Fig. 3-1A)、Scatchard plotで示すと各点は同一の直線上に位置した(Fig. 3-1B)。この結果は単一の高親和性結合部位の存在を示しており、K<sub>D</sub>値およびB<sub>max</sub>値は各々0.4 μMおよび6 nmol/mg of proteinと求められた(Fig. 3-1B)。このK<sub>D</sub>値がMYTX誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離作用のEC<sub>50</sub>値に近かったことから、<sup>125</sup>I-MYTX結合とMYTX誘発性Ca<sup>2+</sup>遊離がよく相関していることが示唆された。

HSRに対する<sup>125</sup>I-MYTX結合は1 M KClあるいは1 M NaClにより顕著に阻害された(Fig. 3-2)。一方Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>は、1 mM以下の生理的濃度においてHSRに対する<sup>125</sup>I-MYTX結合に影響を及ぼさなかつ

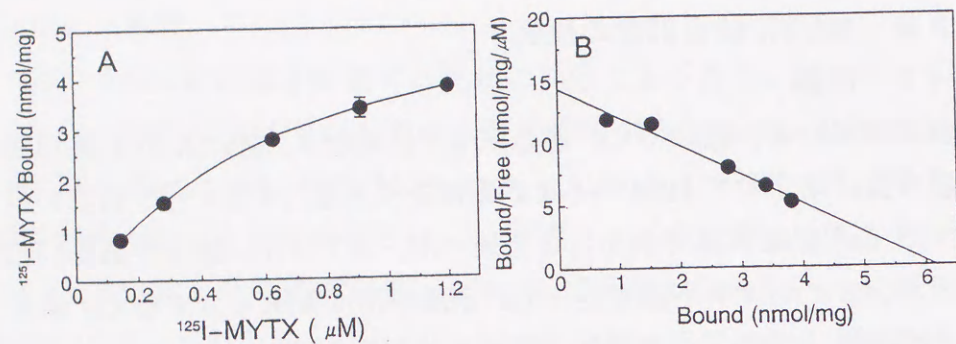


Fig. 3-1. Saturation (A) and Scatchard (B) plots of  $^{125}\text{I}$ -MYTX binding to the HSR. The HSR (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -MYTX at various concentrations for 60 min at  $0^\circ\text{C}$  and then the  $^{125}\text{I}$ -MYTX bound was measured. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

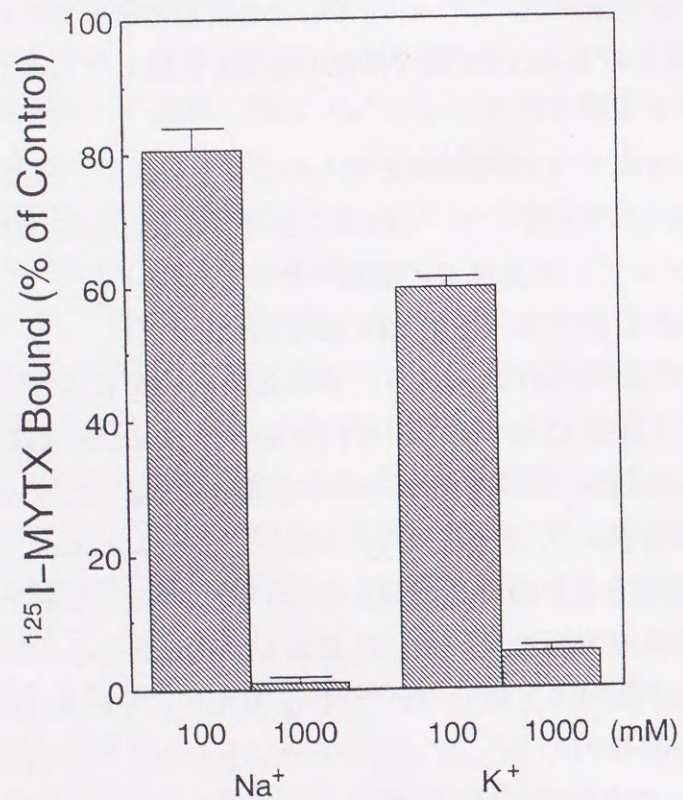


Fig. 3-2. Effects of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  on  $^{125}\text{I}$ -MYTX binding to the HSR. The HSR (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -MYTX (0.3  $\mu\text{M}$ ) for 60 min at  $0^\circ\text{C}$  in the presence or absence of  $\text{Na}^+$  or  $\text{K}^+$ . Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

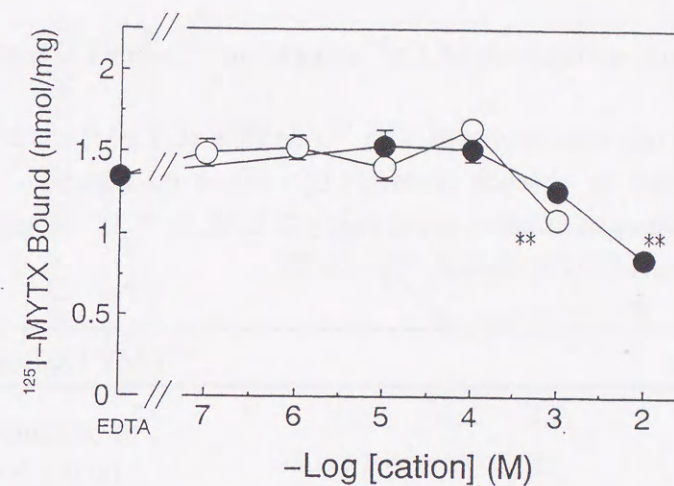


Fig. 3-3. Effects of various concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on  $^{125}\text{I}$ -MYTX binding to the HSR. The HSR (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -MYTX (0.3  $\mu\text{M}$ ) for 60 min at  $0^\circ\text{C}$  in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\circ$ ) or  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\bullet$ ). Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ). Significantly different from 1 mM EDTA control,  $**p < 0.01$ .

たが、1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  および 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  では  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合が各々 27% および 36% 阻害された (Fig. 3-3)。これらの  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合部位の性質は、 $^3\text{H}$ -リアノジン結合 (RyR の開口活性の指標として汎用される) 部位のそれとは異なっている (Fleischer と Inui, 1989; McPherson と Campbell, 1993)。

$\text{Ca}^{2+}$  遊離の促進薬および阻害薬が、HSR への  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合に及ぼす影響を検討した (Table 3-1)。カフェイン様の強力な  $\text{Ca}^{2+}$  遊離促進薬である MBED、および非加水分解性の ATP のアナログである AMP-PCP は MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用を増大させるのに対し、阻害薬である  $\text{Mg}^{2+}$ 、プロカイン、ルテニウムレッドおよびスペルミンはこの作用を減弱させることが報告されている (Fleischer と Inui, 1989; McPherson と Campbell, 1993)。使用したこれらの薬物の中では唯一スペルミン (100  $\mu\text{M}$ ) が  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合を 69% 阻害したが、その他の薬物は影響を及ぼさなかった。

Table 3-1.

**Effects of various modulators of Ca<sup>2+</sup> release on <sup>125</sup>I-MYTX binding to the HSR.**

The HSR (50 µg/ml) was incubated with <sup>125</sup>I-MYTX (0.3 µM) for 60 min at 0°C in the presence or absence (control) of various modulators. Values, expressed as percents of control, are means ± S.E.M. (n = 3). Significantly different from 1 mM EDTA control, \*\*p < 0.01.

Modulators	<sup>125</sup> I-MYTX Bound
	% of Control
Control	100.0 ± 2.63
Caffeine (2 mM)	93.5 ± 10.10
MBED (10 µM)	106.5 ± 1.36
AMP-PCP (100 µM)	100.1 ± 6.22
IP <sub>3</sub> (10 µM)	104.1 ± 2.80
Procaine (10 mM)	113.4 ± 5.93
Ruthenium Red (1 µM)	96.2 ± 2.66
Spermine (100 µM)	31.0 ± 3.78**
Dantrolene (10 µM)	98.8 ± 3.22

HSR への <sup>125</sup>I-MYTX 結合に対するスペルミンの効果の濃度依存性を検討した結果を Fig. 3-4 に示す。スペルミンは濃度依存的に HSR への <sup>125</sup>I-MYTX 結合を阻害し、その IC<sub>50</sub> 値は 20 µM であった。次いでスペルミンによる阻害の様式を検討するため、Scatchard 解析を行った (Fig. 3-5A, 3-5B)。100 µM スペルミン存在下では、その非存在下の場合と比べると K<sub>D</sub> 値に変化はみられなかったが、B<sub>max</sub> 値が 1/4 倍にまで減少したことから、スペルミンによる阻害の様式は非競争的であることが明らかとなった (Fig. 3-5B)。

<sup>125</sup>I-MYTX が RyR を多く含む画分に対して結合しないことを前章に述べたが、本章ではさらに、精製した RyR に <sup>125</sup>I-MYTX が結合する可能性について検討を加えた。精製した RyR では、HSR を用いた場合に比べて単位蛋白量あたりの <sup>3</sup>H-リアノジン結合活性が 30 倍高かったが、精製した RyR における <sup>125</sup>I-MYTX 結合活性は認められなかった。

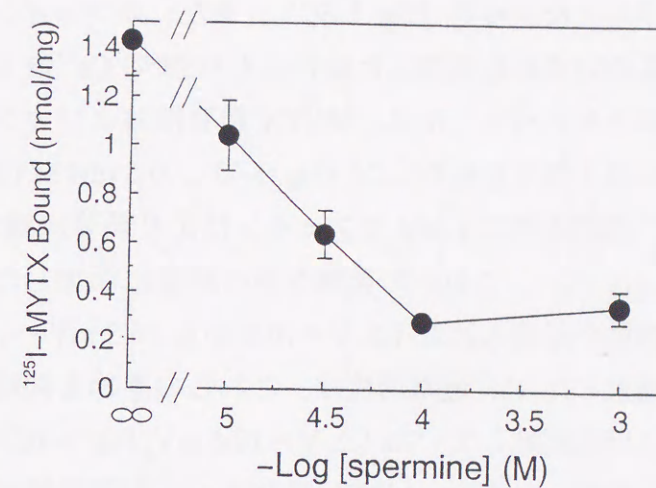


Fig. 3-4. Inhibition of <sup>125</sup>I-MYTX binding to the HSR by spermine at various concentrations. The HSR (50 µg/ml) was incubated with <sup>125</sup>I-MYTX (0.3 µM) for 60 min at 0°C in the presence or absence of spermine. Values are means ± S.E.M. (n = 3).

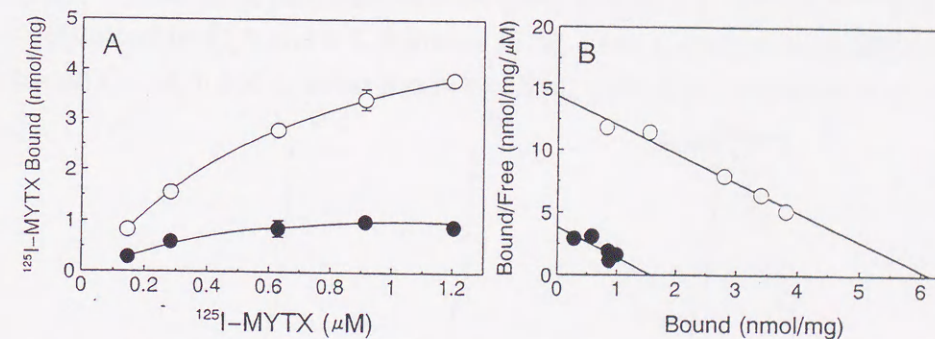


Fig. 3-5. Saturation (A) and Scatchard (B) plots of <sup>125</sup>I-MYTX binding to the HSR in the presence or absence of spermine. The HSR (50 µg/ml) was incubated with <sup>125</sup>I-MYTX (0.3 µM) for 60 min at 0°C in the presence (●) or absence (○) of spermine (100 µM). Values are means ± S.E.M. (n = 3).

**3-3 MYTX 誘発性およびカフェイン誘発性 Ca<sup>2+</sup>遊離の性質**

Ca<sup>2+</sup>電極実験において、1 mM カフェインの場合と同様に、1 µM MYTX は HSR から強力に Ca<sup>2+</sup>遊離を惹き起こした (Fig. 3-6A, 3-6B)。MYTX をヨウ素標識した場合 (I-MYTX) でも MYTX の Ca<sup>2+</sup>遊離活性

に影響は見受けられなかった (Fig. 3-6C)。また、カフェイン、MYTX および I-MYTX のいずれを添加した場合にも HSR の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み活性には影響を及ぼさなかった。次に、MYTX 誘発性およびカフェイン誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の相互作用を検討した (Fig. 3-7)。0.5  $\mu\text{M}$  MYTX により惹起された  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は 1 mM カフェインにより顕著に増大し ( $\Delta V = 5.4$  から 16.3 mV へ)、これらの薬物を逆の順番に添加した場合においても同様の効果が認められた ( $\Delta V = 10.0$  から 16.3 mV へ; Fig. 3-7A, 3-7B)。この増大した  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は、これらの薬物を同時に添加した場合の活性にほぼ匹敵していた ( $\Delta V = 19.6$  mV; Fig. 3-7C)。100  $\mu\text{M}$  スペルミンを前処理した場合、MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は完全に阻害されたが ( $\Delta V = 0$  mV)、カフェイン誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性はわずかに抑制を受けただけである ( $\Delta V = 4.7$  mV; Fig. 3-7D, 3-7E)。さらに、MYTX およびカフェインにより相乗的に増大した  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は、100  $\mu\text{M}$  スペルミンの存在下において著しく減少した ( $\Delta V = 16.3, 16.3$  および 19.6 mV から  $\Delta V = 9.1, 9.9$  および 13.1 mV へ; 各々 Fig. 3-7D から 3-7F に対応)。

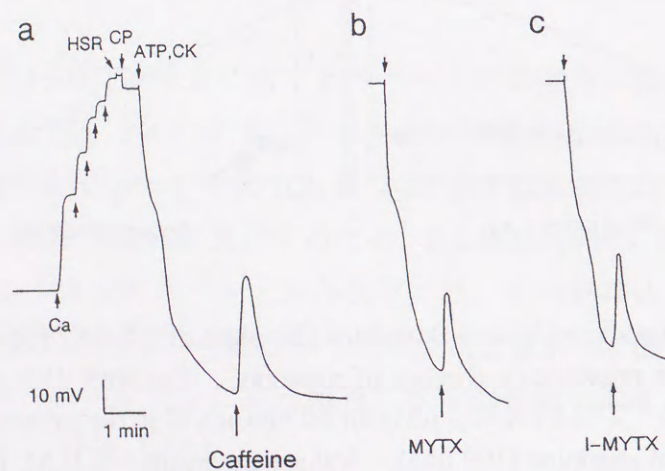


Fig. 3-6.  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by caffeine, MYTX and I-MYTX from the HSR. The extravesicular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was monitored at 30°C with a  $\text{Ca}^{2+}$  electrode. The vertical calibration bar marks the response to a voltage change of 10 mV corresponding to 0.3 pCa. a, caffeine (1 mM); b, MYTX (1  $\mu\text{M}$ ); c, I-MYTX (1  $\mu\text{M}$ ). Five HSR preparations from different animals were used. CP, creatine phosphate; CK, creatine kinase.

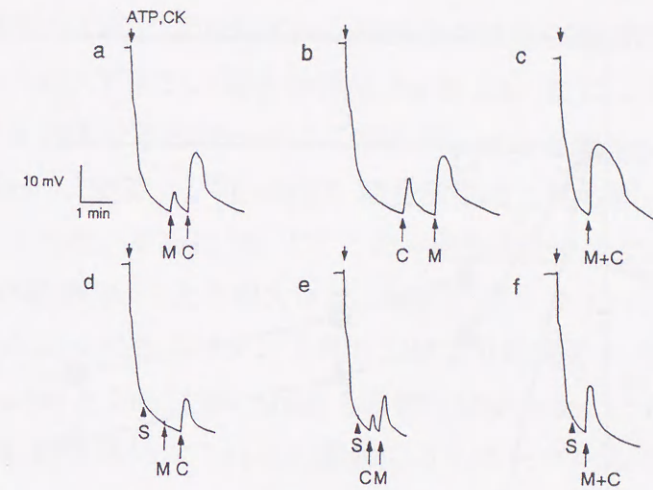


Fig. 3-7. Interrelations between the  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing activities of MYTX and caffeine in the presence or absence of spermine in  $\text{Ca}^{2+}$  electrode experiments on the HSR. Methods were the same as those described in Fig. 3-6. M, MYTX (0.5  $\mu\text{M}$ ); C, caffeine (1 mM); S, spermine (100  $\mu\text{M}$ ); CK, creatine kinase. Five HSR preparations from different animals were used. a and d, M followed by C; b and e, C followed by M; c and f, simultaneous addition of M and C. a, b and c, in the absence of S; d, e and f, in the presence of S.

$^{45}\text{Ca}^{2+}$  遊離実験においても、MYTX 誘発性およびカフェイン誘発性の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離における相互作用の可能性を検討した (Fig. 3-8)。MYTX 誘発性およびカフェイン誘発性の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  遊離における最大反応は各々 10  $\mu\text{M}$  および 10 mM において得られた。10  $\mu\text{M}$  MYTX により惹起された最大  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  遊離活性は、10 mM カフェインの添加によりやはり相乗的に増大した。

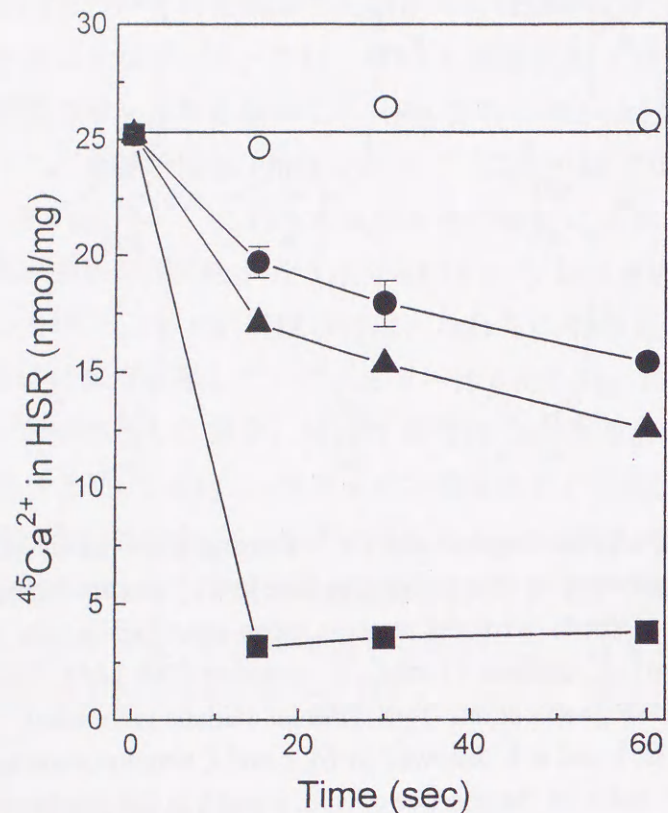


Fig. 3-8. Interrelations between the  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing activities of MYTX and caffeine in  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  release experiments on the HSR. The  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  content of HSR was measured at  $0^\circ\text{C}$  by the filtration method. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ). ○, control; ●, MYTX (10  $\mu\text{M}$ ); ▲, caffeine (10 mM); ■, MYTX (10  $\mu\text{M}$ ) plus caffeine (10 mM).

### 3-4 考察

本章では、HSRにおいて新しいタイプの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用を示すMYTXの結合部位の性質について検討を加えた。MYTXを $^{125}\text{I}$ 標識して結合実験に使用したが、MYTXと標識MYTXの間に $\text{Ca}^{2+}$ 遊離活性の差は認められなかった。HSRに対する $^3\text{H}$ -リアノジン結合活性は顕著な $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を示すことが報告されているが(Pessahら、1985; FleischerとInui、

1989; McPhersonとCampbell、1993)、 $^{125}\text{I}$ -MYTX結合活性は1 mMという高濃度の $\text{Ca}^{2+}$ によりわずかに抑制を受けたに過ぎない。またHSRに対する $^3\text{H}$ -リアノジン結合活性は $\text{Na}^+$ および $\text{K}^+$ により増大されることが報告されているが(Pessahら、1986; FleischerとInui、1989; McPhersonとCampbell、1993)、 $^{125}\text{I}$ -MYTX結合活性はこれら両イオンにより顕著に阻害された。さらに $^3\text{H}$ -リアノジン結合活性はカフェイン、MBEDおよびAMP-PCPにより増大され、 $\text{Mg}^{2+}$ 、プロカイン、スペルミン、ルテニウムレッドおよびダントロレンにより阻害されるが(Pessahら、1986; FleischerとInui、1989; Seinoら、1991; McPhersonとCampbell、1993)、 $^{125}\text{I}$ -MYTX結合活性はこれらの薬物のうち唯一スペルミンにより阻害されただけである。以上の結果は、 $^{125}\text{I}$ -MYTXの結合部位の性質が $^3\text{H}$ -リアノジンのそれとは異なることを示している。

HSRに対する $^{125}\text{I}$ -MYTX結合は、非ラベル体MYTXにより濃度依存的に阻害された。HSRに対する $^{125}\text{I}$ -MYTX結合のScatchard解析の結果、その $K_D$ 値0.4  $\mu\text{M}$ がMYTX誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用の $\text{EC}_{50}$ 値0.5  $\mu\text{M}$ にほぼ匹敵したことから、 $^{125}\text{I}$ -MYTX結合とMYTX誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離がよく相関していることが明らかとなった。HSRに対する $^{125}\text{I}$ -MYTX結合はスペルミンにより濃度依存的に阻害された。スペルミンの有無における $^{125}\text{I}$ -MYTX結合のScatchard解析の結果、スペルミンによる結合阻害の様式が非競合的であることが明らかになった。CICRの阻害薬であるスペルミンはMYTX誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を顕著に阻害したが、カフェイン誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離はわずかにしか阻害されなかった。MYTX誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離のスペルミンによる阻害作用は、HSRに対するMYTX結合の抑制によるとも考えられる。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態に対するスペルミンの作用機構の理解は、生理的 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の解明につながる可能性を秘めており、興味深い。

遊離された $\text{Ca}^{2+}$ は、たとえ $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬が存在していても、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの作用により再びHSR内に取り込まれる。HSRにおいて各種 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬の $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用が一過性を示す理由は不明だが、開口後のチャネルが負のフィードバック因子による調節を受けるためあるいは

チャンネル自身が開口後直ちに閉じる機構を有しているためであると考えられる。

RyR を介する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離については、CS や TRN を含め、各種 SR 内在性蛋白質により制御されていることが示唆されてきた。HSR に対する  $^{125}\text{I}$ -MYTX 結合の  $B_{\max}$  値 (6 nmol/mg of protein) は、 $^3\text{H}$ -リアノジン結合の  $B_{\max}$  値より約 1,000 倍大きかった。 $\text{Ca}^{2+}$  電極実験および  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  遊離実験の結果により MYTX およびカフェインの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用は相乗的であることが明らかになったが、このことは少なくとも MYTX の結合部位が RyR 上のカフェインのそれとは異なっており、しかも MYTX およびカフェインが各々の結合部位を介して相互作用していることを示唆している。それらの結合部位が相互作用していることを示唆している。 $\text{Ca}^{2+}$  電極実験において、MYTX およびカフェインをこの順番あるいは逆順に添加して、これら薬物の単独投与により惹起される  $\text{Ca}^{2+}$  遊離作用の間の相乗的効果を見出したが、2 番目に添加した薬物により惹起される  $\text{Ca}^{2+}$  遊離活性の増大は、 $\text{Ca}^{2+}$  ポンプの経時的な失活に由来しているわけではない。その理由として、1) ATP の枯渇が少なくとも添加後 10 分間は見受けられなかったこと、および 2) MYTX およびカフェイン添加後の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み速度が添加前のそれとほとんど変化していなかったことが挙げられる。

$^{125}\text{I}$ -MYTX は精製した RyR に対し結合活性を示さなかった。MYTX は  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプおよび 57 kD の蛋白質に結合することが報告されている (Utai sincharoen ら、1991)。しかし、400  $\mu\text{M}$  という高濃度の MYTX を添加した場合でも  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプ活性はごくわずかに抑制を受けただけに過ぎなかったため (Furukawa ら、1994)、MYTX が  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプを介して  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させる可能性は除外される。これらの結果は、MYTX が RyR および  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプとは異なる蛋白質に結合して HSR において  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を惹起することを示唆するものである。従って、MYTX 結合部位は 1) 新しいタイプの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネル、あるいは 2)  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルの調節因子であると推定される。

本章では、MYTX の結合部位が  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  およびスペルミンに対する

感受性を示す、 $\text{Ca}^{2+}$  遊離に関与している RyR 以外の蛋白質であることが示唆された。MYTX を用いることにより、新しいタイプの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルあるいは  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャンネルの調節因子の解明が進展するものと期待される。

## 第4章 MYTX 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離における RyR および CS の関与

### 4-1 序論

CS の主要な役割は、SR 内へ取り込まれた  $\text{Ca}^{2+}$ を貯蔵することであるとこれまで考えられてきたが、最近 SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を調節している可能性が報告されはじめている (Ikemoto ら、1989)。Triad junction の SR 側 (TC; terminal cisternae) に RyR とともに CS が局在することだけではなく、人工脂質膜に再構成した HSR において、精製した CS の添加が RyR の開口活性の増大をもたらすことが明らかにされた (Kawasaki と Kasai、1994)。

第2章および第3章で述べたように、既知の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬とは異なり、MYTX は RyR に対して結合を示さず、CS の豊富な画分において結合を示す。このことは MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離において CS が重要な役割を果たしていることを予想させる。CS の作用が RyR と関連していることも考慮し、本章では MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に RyR および CS が関与している可能性を検討した。

### 4-2 MYTX 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離における RyR の関与

HSR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離における MYTX の作用は、HSR 外の遊離  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を  $\text{Ca}^{2+}$ 電極でモニターすることにより検討した。ATP 添加によって  $\text{Ca}^{2+}$ が HSR 内に取り込まれ、HSR 外の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が約  $0.1 \mu\text{M}$  レベルまで減少した時点で  $3 \mu\text{M}$  MYTX を添加したところ、顕著な  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が認められた ( $\Delta V = 36 \pm 3.2 \text{ mV}$ ; Fig. 4-1a)。この MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離は、 $10 \mu\text{M}$  リアノジンの前処理によりほとんど消失した ( $\Delta V = 1.7 \pm 0.3 \text{ mV}$ ; Fig. 4-1b)。

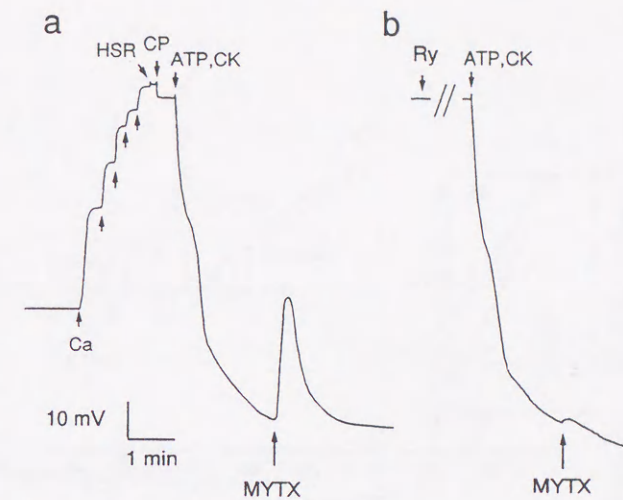


Fig. 4-1.  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by MYTX from the HSR in the presence or absence of ryanodine. The extravesicular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was monitored at  $30^\circ\text{C}$  with a  $\text{Ca}^{2+}$  electrode. The vertical calibration bar marks the response to a voltage change of  $10 \text{ mV}$  corresponding to  $0.3 \text{ pCa}$ . In Fig. 4-1b, the trace is shown only after the addition of ATP. a, MYTX ( $3 \mu\text{M}$ ); b, MYTX ( $3 \mu\text{M}$ ) after treatment with ryanodine ( $10 \mu\text{M}$ ) for 3 min. Five HSR preparations from different animals were used. Similar responses were observed in 5 of 5 independent experiments. Significant difference: Fig. 4-1b versus Fig. 4-1a,  $p < 0.01$ . CP, creatine phosphate; CK, creatine kinase; Ry, ryanodine.

### 4-3 MYTX 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離における CS の関与

MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離における CS の関与は、ストップフロー法を用いて HSR のコリン透過性を測定することにより検討した。 $\text{pCa } 7$ でのネイティブな HSR におけるコリン透過性は  $1 \mu\text{M}$  MYTX の添加により顕著に増大したが (Fig. 4-2a)、CS を解離させた HSR を用いた場合、MYTX のコリン透過性増大作用は消失した (Fig. 4-2b)。一方、CS を解離させた HSR にそれを再結合させた HSR を用いると、MYTX の作用が回復した (Fig. 4-2c)。



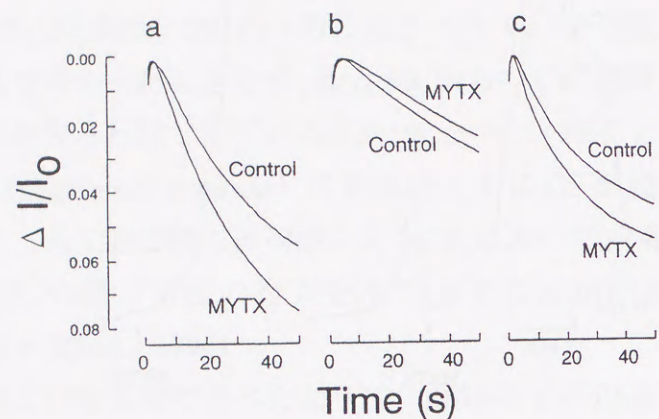


Fig. 4-2. Effects of MYTX on the choline<sup>+</sup> permeability of native, CS-dissociated and CS-reassociated HSR. The osmotic volume change of the HSR was monitored by measuring the scattered light intensity. The change in the scattered light intensity ( $\Delta I$ ) is considered to be proportional to the volume change of the HSR, which reflects the choline<sup>+</sup> influx. The ratio of  $\Delta I$  to the intensity of the incident beam ( $I_0$ ) is shown. Traces under the conditions of control at pCa 7 and plus MYTX (1  $\mu$ M) are indicated as Control and MYTX, respectively. a, native HSR; b, CS-dissociated HSR; c, CS-reassociated HSR. These experiments were performed 5 times. Similar responses were observed in 5 of 5 independent experiments.

次に、MYTX 誘発性 Ca<sup>2+</sup>遊離における CS の関与をシングルチャネルレベルで検討するために、HSR を人工脂質膜に組み込んでチャネル電流を電気生理学的に測定した。シス（細胞質側）の Ca<sup>2+</sup>濃度を pCa 7 から pCa 5 へ上昇させるとチャネル電流が増加し (NPo = 0.25 から NPo = 1.21 へ)、その電流はルテニウムレッド処理により顕著に減少した (NPo = 0.04)。シスが pCa 7 およびトランス (SR 内腔側) が pCa 3

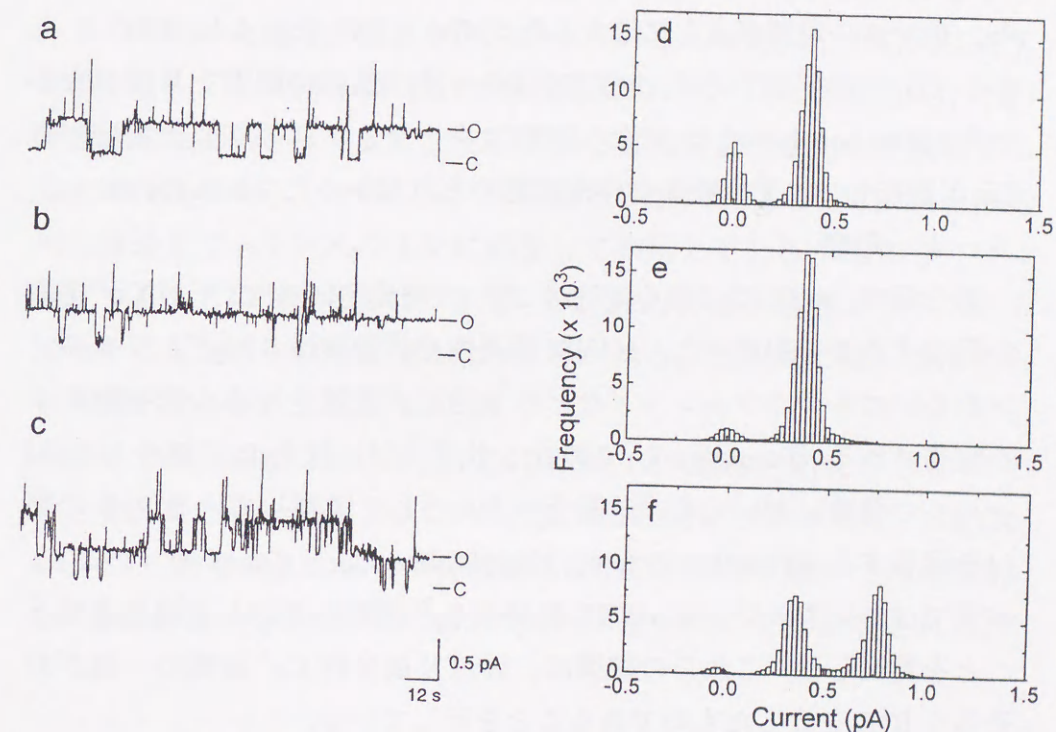


Fig. 4-3. Effects of MYTX and CS on the gating activity of Ca<sup>2+</sup> release channels of the HSR in a planar bilayer system. The HSR was added to the *cis* solution and current was recorded in a symmetrical solution as described in "experimental procedures." Current records (a-c) and amplitude histograms (d-f) are shown. C and O indicated closed state and open state, respectively. a and d, control at pCa 7 (*cis*); b and e, CS (50  $\mu$ g/ml, *trans*); c and f, CS (50  $\mu$ g/ml, *trans*) plus MYTX (1  $\mu$ M, *cis*). These experiments were performed 10 times. Similar responses were observed in 10 of 10 independent experiments. Significant difference: Fig. 4-3b and Fig. 4-3a and Fig. 4-3d,  $p < 0.05$ ; Fig. 4-3c and Fig. 4-3f versus Fig. 4-3b and Fig. 4-3e,  $p < 0.05$ .

という条件下において、精製した CS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) をトランスに添加したところ、チャンネル電流が増大した ( $\text{NPo} = 0.25$  から  $\text{NPo} = 0.93$  へ; Fig. 4-3a, 4-3b, 4-3d, 4-3e)。この時点でシスに 1  $\mu\text{M}$  MYTX を添加したところ、チャンネル電流がさらに増大した ( $\text{NPo} = 1.49$ ; Fig. 4-3c, 4-3f)。しかし CS の非存在下では、MYTX はチャンネル電流に影響を及ぼさなかった (data not shown)。また、MYTX をトランスに添加した場合には、CS が存在していても顕著な作用は認められなかった (data not shown)。

#### 4-4 考察

第2章で、LSR ではなく HSR において特異的に MYTX が  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を惹起することを述べた。MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離は、 $\text{Mg}^{2+}$ 、プロカインあるいはルテニウムレッドなどの RyR/ $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャンネル阻害薬により阻害される (Furukawa ら、1994)。リアノジンは RyR に結合し、 $\mu\text{M}$  レベルの濃度において  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャンネルとして機能している RyR の開口を阻害する (Fleischer と Inui、1989; McPherson と Campbell、1993)。本章では、リアノジンが MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離をほとんど消失させることを見出した。これらの結果は、MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の一部がおそらく RyR を介したものであることを示している。

SR の TC 部分の膜である junctional face membrane を蛍光プローブで標識し、そのコンフォーメーション変化のモニターの結果に基づき、CS が膜に結合していることが  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用にとって重要であることが明らかにされている (Ikemoto ら、1989)。最近、CS は  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵蛋白質としてだけでなく、RyR の開口制御蛋白質としても機能していることが報告された (Kawasaki と Kasai、1994)。本章では、RyR の開口活性の指標の 1 つとして評価される、コリン透過性を測定した (Yamamoto と Kasai、1981)。本実験の結果、MYTX による HSR のコリン透過性の増大が CS と関連していることが明らかとなった。一方シングルチャンネルレベルでの MYTX の作用の解析の結果、CS が  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャンネルの開口活性を増大させること、またその増大された活性が、トランスではなくシスに添加された MYTX によりさらに増大することが明らかになった。しかし CS の非存在下では、MYTX はチャンネル活

性に影響を及ぼさなかった。以上の結果は、MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離において CS が必須であり、CS が HSR における  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の過程において重要な生理的役割を果たしていることを支持している。MYTX をトランスに添加した場合、顕著な作用がみられなかった。この結果に対する解釈として、MYTX が CS の存在下においてのみ、シスから、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用発現にとって重要な SR 膜蛋白質に結合するためと説明することが可能である。しかし、シスに添加した MYTX が、SR 膜を部分的に貫通してトランスの CS に結合して作用している可能性を完全に否定することは現時点ではできないが、MYTX が水溶性ポリペプチドであることからその可能性は低いと思われる。この点に関してはさらに検討する必要がある。

本章では、HSR における MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が RyR を介していること、またその作用には CS が必須であることが示された。MYTX が、CS による RyR の開口制御機構の解明のための、強いては生理的  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の解明のための優れたツールとなることが期待される。

## 第5章 総括

本研究では、骨格筋 HSR から  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を惹起するカフェインやアデニンヌクレオチドとは異なる、新しいタイプの薬物である MYTX をツールとして用いて、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の分子制御機構の検討を行った。

第2章においては、RyR/ $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの含有比率の小さい LSR においてではなく、その比率の大きい HSR において特異的に MYTX が  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用を示すこと、および  $^{125}\text{I}$ -MYTX が RyR や  $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを多く含む画分ではなく、CS を多く含む画分において高い結合活性を示すことを明らかにした。既知の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬はいずれも RyR に結合して  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離作用を発現することから、MYTX が RyR 以外の蛋白質に結合することは興味深い。MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が新しい機構を介して惹起されている可能性が示された。第3章では、HSR における MYTX の結合部位が既知の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離試薬のそれとは異なっており、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ およびスベルミンに対する感受性を示す、 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に関与している RyR 以外の蛋白質であることを明らかにした。さらに MYTX の結合部位が少なくとも RyR 上のカフェインのそれとは異なっており、しかもそれらの結合部位が相互作用していることを見出した。以上の章を受けて第4章では、HSR における MYTX 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が RyR を介していること、またその作用には CS が必須であることを明らかにした。

MYTX の作用の一部は RyR を介しているが、おそらく RyR のアソシエート蛋白質に結合して作用していると考えられる。RyR のアソシエート蛋白質として、カルモジュリン (CaM) (Meissner, 1986; Smith ら, 1989) や FKBP12 (Jayaraman ら, 1992; Timerman ら, 1993) が報告されている。これらは各々  $\text{Ca}^{2+}$ および免疫抑制剤 FK506 を結合し、いずれも細胞質側の RyR の開口調節因子として機能している。一方、本研究では MYTX の作用機構および結合の性質が明らかにされ、特に SR 内在性蛋白質 CS を介する  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の分子制御機構の存在の可能性がある点が注目された。MYTX が SR 外からの添加にも関わらず、直接的か間接的かは不明だが、CS に作用して RyR を開口促進している点は興味深い。CS は RyR とともに triad junction の SR 側 (TC; terminal

cisternae) に局在しているが、このことは SR 内腔に貯蔵された  $\text{Ca}^{2+}$ を RyR を介して遊離させる際に好都合と思われる。

HSR に高い親和性で結合する  $^{125}\text{I}$ -MYTX は、その結合部位の性質や分子の実体を明らかにする上できわめて有用であり、 $^{125}\text{I}$ -MYTX を用いた本研究で得られた知見が、新しいタイプの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構に関連した蛋白質の発見につながることを期待される。今後、SR 内腔の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度、あるいは SR 内外の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度のバランスを感知して、CS などの SR 内在性蛋白質によっていかに RyR の開口制御がなされているのかという点に興味を持たれる。なお本文中では触れなかったが、CS と RyR に介在する可能性から注目されている SR 内在性蛋白質であるトリアジン (TRN) を精製して使用し、CS が TRN と相互作用して  $^3\text{H}$ -リアノジン結合の  $\text{Ca}^{2+}$ 感受性を増大させることを見出している。このことは、TRN も CS とともに MYTX の作用機構に関与している可能性を支持するものである。HSR における、新しいタイプの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構に関連した、MYTX 結合部位の分子の実体あるいは生理的意義の解明が今後に残された課題である。

## 第6章 実験材料および方法

### 6-1 試薬

#### 1 MYTX および $^{125}\text{I}$ -MYTX の調製

MYTX の調製は、Cameron と Tu の方法 (1977) に従った。*Crotalus viridis viridis* の粗毒 1 g を溶出緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 9.0, 22°C)) 5-6 ml に溶解し、これを Sephadex G-50 (4 x 115 cm) カラムに付し、0.1 M KCl を含む溶出緩衝液で流速 0.5 ml/分にて溶出した。分取した各画分 (5 ml) の 280 nm における吸光度を測定して得られた第2ピーク画分を凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルを約 4 ml の溶出緩衝液に溶解し、これを CM-Sephadex C-25 (1.6 x 15 cm) カラムに付し、0.1 M KCl を含む溶出緩衝液で洗浄後 0.75 M KCl を含む溶出緩衝液で溶出した。分取した各画分 (5 ml) の 280 nm における吸光度を測定後、MYTX を含む画分を水で透析し、これを凍結乾燥した。得られた MYTX は -80°C で保存した。用時水に溶解した MYTX は 4°C で保存し、2 ヶ月以内に使用した。

$^{125}\text{I}$ -MYTX の調製は以下に示す方法により行った。まず 1 mM MYTX 5  $\mu\text{l}$  を 37 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  を含む 0.4 M Na-phosphate (pH 7.5) と混合した。これに 3.8 mM chloramine T 10  $\mu\text{l}$  を添加して MYTX の  $^{125}\text{I}$  標識化反応を開始した。Chloramine T は、反応開始後 30 秒および 60 秒の時点で再度添加した。反応開始後 120 秒の時点で 2.5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  100  $\mu\text{l}$  を添加し、反応を停止した。粗  $^{125}\text{I}$ -MYTX を Sephadex G-25 (1.5 x 5.8 cm) カラムに付し、2 mg/ml BSA を含む 0.4 M Na-phosphate (pH 7.5) で溶出した。分取した各画分 (1 ml) より 5  $\mu\text{l}$  を SDS-PAGE に付してオートラジオグラフィーを行い、 $^{125}\text{I}$ -MYTX を含む画分を確認してこれを保存した。調製した  $^{125}\text{I}$ -MYTX は 4°C で保存し、2 ヶ月以内に使用した。

#### 2 試薬

MBED は Kobayashi らの方法 (1988) によって合成されたものを使用した。その他の試薬は以下から入手した。AMP-PCP、aprotinin、benzamidine、BSA (fraction V albumin, fatty-acid free)、chloramine T、creatine kinase、crude venom of prairie rattlesnakes (*Crotalus*

*viridis viridis*)、dantrolene、heparin agarose (type I)、lecithin (大豆製、type IV-S)、leupeptin、pepstatin A、spermine、spermine agarose (以上 Sigma)、*p*-APMSF、caffeine、choline chloride、*n*-decane、DTT、PEG、PEI、phenylmethanesulfonyl fluoride、procaine、ruthenium red、soybean trypsin inhibitor (以上和光)、ATP、creatine phosphate (以上オリエンタル酵母)、CHAPS、DPO、EDTA、EGTA、 $\text{IP}_3$ 、MOPS、POPOP (以上同仁)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (東京化成)、ryanodine (S.B.Penick)、asolectin (日本製薬)、CM-Sephadex C-25、Sephadex G-25、Sephadex G-50 (以上 Pharmacia Biotech)、 $^{45}\text{CaCl}_2$  (25.9 Bq/pmol)、 $^3\text{H}$ -ryanodine (2.22 kBq/pmol)、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  (95.3 kBq/pmol) (以上 Du Pont New England Nuclear)。

### 6-2 第2章付属実験

#### 1 HSR および LSR の調製

HSR の調製は、Kim らの方法 (1983) に従った。ウサギ (日本白色、雄、2.5-4.0 kg、宮緬) を断頭後、背部より白筋を摘出し、5 倍量の溶液 1 (5 mM Tris-maleate (pH 7.0)、76.8  $\mu\text{M}$  aprotinin、0.83 mM benzamidine) を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心 (トミーRS-20 IV、5,000 x g、15 分、4°C) し、4 重にしたチーズクロスを用いて上清を回収した。次にこの上清を遠心 (トミーRS-20 IV、12,000 x g、30 分、4°C) して沈査を回収し、これをさらに溶液 2 (90 mM KCl、5 mM Tris-maleate (pH 7.0)、76.8  $\mu\text{M}$  aprotinin、0.83 mM benzamidine) で懸濁して遠心 (日立 SCP85G、70,000 x g、40 分、4°C) した。得られた沈査を溶液 2 で 20 mg/ml となるように懸濁し、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。用時溶解した HSR は 4°C で保存し、3 日以内に使用した。

LSR の調製は、Seino らの方法 (1991) に従った。HSR 調製時の 5,000 x g での上清を遠心 (トミーRS-20 IV、10,000 x g、30 分、4°C) して上清を回収し、これをさらに遠心 (日立 SCP85G、70,000 x g、50 分、4°C) して沈査を回収した。これをさらに溶液 3 (0.3 M sucrose、0.6 M KCl、5 mM Tris-maleate (pH 7.0)、76.8  $\mu\text{M}$  aprotinin、0.83 mM benzamidine)

で懸濁して遠心（日立 SCP85G、100,000 x g、70 分、4°C）した。得られた沈査を溶液 2 で 20 mg/ml となるように懸濁し、液体窒素で凍結後 -80°C で保存した。用時溶解した LSR は 4°C で保存し、3 日以内に使用した。

## 2 Ca<sup>2+</sup>電極実験

HSR あるいは LSR 外の Ca<sup>2+</sup>濃度の Ca<sup>2+</sup>電極による測定は、Nakamura らの方法（1986）に従った。溶液 4（50 μM CaCl<sub>2</sub>、90 mM KCl、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、50 mM MOPS-Tris（pH 7.0）、5 mM creatine phosphate）に 1 mg/ml の HSR あるいは LSR を加え、0.13 mg/ml creatine kinase および 0.5 mM ATP の添加により SR 内への Ca<sup>2+</sup>取り込みを開始した。Ca<sup>2+</sup>取り込みが安定して、SR 外の Ca<sup>2+</sup>濃度が約 0.1 μM まで低下したところで Ca<sup>2+</sup>遊離試薬を添加して Ca<sup>2+</sup>遊離を惹起し、Ca<sup>2+</sup>遊離によるピークの電位変化（ΔV）を測定した。

## 3 スペルミンアガロースカラムによる CHAPS 可溶化 HSR の分画

HSR の CHAPS 可溶化は、Shoshan-Barmatz と Zarka の方法（1992）に従った。2 mg/ml HSR を溶液 5（1.2% CHAPS、1 M NaCl、100 μM CaCl<sub>2</sub>、25 mM MOPS-Tris（pH 7.4）、0.3 mM phenylmethanesulfonyl fluoride、0.8 mM benzamidine、0.5 μg/ml aprotinin、0.5 μg/ml pepstatin A、1 μg/ml leupeptin、10 μg/ml soybean trypsin inhibitor、0.5 mM EGTA、1 mM DTT）に懸濁し、インキュベート（20 分、4°C）した後、遠心（日立 SCP85G、40,000 x g、30 分、4°C）して上清を回収した。CHAPS 可溶化 HSR は、CHAPS および NaCl の濃度が各々 0.4% および 0.2 M となるようにして 5 倍希釈し、次のスペルミンアガロースカラム分画用として使用した。スペルミンアガロース（0.8 x 5 cm）カラムは溶液 6（0.4% CHAPS、0.2 M NaCl、10 mM MOPS-Tris（pH 7.4）、0.3 mM phenylmethanesulfonyl fluoride、0.8 mM benzamidine）により平衡化した。流速約 0.3 ml/分にて 5 倍希釈済の CHAPS 可溶化 HSR をカラムに付し、Ca<sup>2+</sup>ポンプに富む素通り画分を得た。次いで溶液 6 でカラム洗浄後、2 mM スペルミンを含む溶液 6 での溶出により、RyR を多く含む画分を得た。さらに 5 mM スペルミンを含む溶液 6 での溶出により、CS を多く含む画分を得た。

得られた画分は 4°C で保存し、3 日以内に使用した。

## 4 CS の精製

CS の精製は、Cala と Jones の方法（1983）に従った。1 mg/ml HSR を 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>（pH 11.4）に懸濁し、インキュベート（30 分、0°C）した後、遠心（日立 SCP85G、100,000 x g、30 分、4°C）して上清を回収し、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可溶化 HSR を得た。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可溶化 HSR は、0.5 M NaCl、50 mM MOPS-Tris（pH 7.0）、1 mM DTT に懸濁されているように 2 倍希釈して中性に戻し、次のフェニルセファロースカラムでの精製用として使用した。フェニルセファロース（1.5 x 4 cm）カラムは溶液 7（0.5 M NaCl、0.1 mM EGTA、10 mM MOPS-Tris（pH 7.4）、1 mM DTT）により平衡化した。流速約 0.3 ml/分にて、中性に戻した Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 可溶化 HSR をカラムに付して素通り画分を得た後、溶液 7 でカラム洗浄し、10 mM CaCl<sub>2</sub> を含む溶液 7 での溶出により、精製 CS を得た。得られた CS は溶液 8（1 M KCl、5 mM Tris-HCl（pH 7.4））にて透析後、液体窒素で凍結して -80°C で保存した。用時溶解した CS は 4°C で保存し、20 日以内に使用した。

## 5 <sup>125</sup>I-MYTX 結合実験

<sup>125</sup>I-MYTX 結合実験は遠心カラム法（Penefsky、1979）により行った。HSR（50 μg/ml）あるいは各種分画画分（20-200 μg/ml）を、200 μl の <sup>125</sup>I-MYTX（0.15-1.2 μM）を含む溶液 9（90 mM KCl、CaCl<sub>2</sub> equivalent to 100 nM free Ca<sup>2+</sup>、50 mM MOPS-Tris（pH 7.4））とインキュベート（60 分、0°C）した。そのうち 100 μl を、あらかじめ水で平衡化して遠心（日立 05PR-22、100 x g、2 分、4°C）した Sephadex G-50（0.4 x 8 cm）カラムに付してただちに遠心（日立 05PR-22、100 x g、2 分、4°C）した。カラムから溶出されたサンプルより 50 μl をとり、その放射能をオートウェルカウンターで測定した。特異的結合量は、以上のようにして得られる <sup>125</sup>I-MYTX の結合量（総結合量）から、20 μM の非標識 MYTX の存在下で得られる値（非特異的結合量）を差し引いて得た。

## 6-3 第 3 章付属実験

## 1 HSR の調製

6-2-1 の場合と同様に行った。

## 2 RyR の精製

RyR の精製は次のようにして行った。3 mg/ml HSR を溶液 10 (4% CHAPS、2% lecithin、1 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、2 µg/ml leupeptin、2 mM DTT) に懸濁し、インキュベート (10 分、0°C) した後、遠心 (日立 SCP85G、220,000 x g、30 分、4°C) して上清を回収し、CHAPS 可溶化 HSR を得た。CHAPS 可溶化 HSR は、まず 5% および 20% sucrose を含む溶液 11 (1% CHAPS、0.5% lecithin、1 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 µg/ml leupeptin、2 mM DTT) を用いた連続 sucrose 密度勾配遠心 (ベックマン XL-90、100,000 x g、16 時間、4°C) により分画した。各画分を SDS-PAGE に付して銀染色を行い、RyR を含む画分を確認してこれを回収した。RyR を含む画分を、0.3 M sucrose、1% CHAPS、0.5% lecithin、0.1 M NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 µg/ml leupeptin、2 mM DTT に懸濁されているように 10 倍希釈し、次のヘパリンアガロースカラムでの精製用として使用した。ヘパリンアガロース (1.5 x 5.8 cm) カラムは 0.1 M NaCl を含む溶液 12 (0.3 M sucrose、1% CHAPS、0.5% lecithin、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1 µg/ml leupeptin、2 mM DTT) により平衡化した。流速約 2 ml/分にて、希釈済の RyR を含む画分をカラムに付して素通りさせた後、溶液 12 でカラム洗浄した。次いで 0.1 M および 0.8 M NaCl を含む溶液 12 を用いた連続 NaCl 濃度勾配での溶出により分画した。各画分を SDS-PAGE に付して銀染色を行い、RyR が濃縮されている画分を確認してこれを保存した。得られた RyR は Vivapore 10 ml concentrator (Vivascience) を用いて濃縮後、溶液 13 (0.3 M sucrose、1 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 µg/ml leupeptin、1 mM DTT) にて透析し、これを液体窒素で凍結して -80°C で保存した。用時溶解した RyR は 4°C で保存し、2 日以内に使用した。

## 3 <sup>125</sup>I-MYTX 結合実験

6-2-4 の場合と同様に行った。

## 4 <sup>3</sup>H-リアノジン結合実験

<sup>3</sup>H-リアノジン結合実験は、Seino らの方法 (1991) を一部改変して行った。HSR (100 µg/ml) あるいは精製 RyR (1 µg/ml) を、500 µl の <sup>3</sup>H-リアノジン (10 nM) を含む溶液 14 (0.3 M sucrose、0.1% lecithin、1 M KCl、CaCl<sub>2</sub> equivalent to 100 µM free Ca<sup>2+</sup>、20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 µM *p*-APMSF) とインキュベート (120 分、37°C) した。ただし精製 RyR を用いた場合は、インキュベート終了前 30 分間、10% PEG を添加した。インキュベート後、あらかじめ 3% PEI で前処理しておいたガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/B) で減圧下ろ取した。次いで 50 mM Tris-HCl (pH 7.4、0°C) で洗浄 (5 ml x 2) した後に液体シンチレーションカクテル 8 ml (25% Triton X-100、3% エチレングリコール、14% エタノール、57% キシレン、0.9% DPO、0.06% POPOP) を添加し、フィルター上に残った放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。特異的結合量は、以上のようにして得られる <sup>3</sup>H-リアノジンの結合量 (総結合量) から、10 µM の非標識リアノジンの存在下で得られる値 (非特異的結合量) を差し引いて得た。

## 5 Ca<sup>2+</sup>電極実験

6-2-2 の場合と同様に行った。

## 6 <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>遊離実験

HSR からの <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>遊離実験は、Nakamura らの方法 (1986) を一部改変して行った。20 mg/ml HSR を溶液 15 (5 mM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>、90 mM KCl、50 mM MOPS-Tris (pH 7.0)) とインキュベート (12-20 時間、0°C) し、HSR 内腔に <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を封入した。5 µl の <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>封入 HSR を 0°C において 500 µl の溶液 16 (0.5 mM CaCl<sub>2</sub>、8.02-0.451 mM EGTA to set free Ca<sup>2+</sup> to 10 nM-100 µM、90 mM KCl、50 mM MOPS-Tris (pH 7.0)) で 100 倍希釈して <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>遊離反応を開始した。一定時間が経過したところで 125 µl の溶液 17 (25 mM LaCl<sub>3</sub>、25 mM MgCl<sub>2</sub>、90 mM KCl、50 mM MOPS-Tris (pH 7.0)) を添加して反応を停止し、あらかじめ溶液 18 (5 mM LaCl<sub>3</sub>、5 mM MgCl<sub>2</sub>、90 mM KCl、50 mM MOPS-Tris (pH 7.0)) で処理しておいたミリポアフィルター (HAWP タイプ、0.45 µm ポアサイズ) で減圧下ろ取した。次いで溶液 18 で洗浄 (5 ml) した後に白熱灯下で 1 時間

フィルターを乾燥した。乾燥したフィルターに液体シンチレーションカクテル 8 ml (0.347% DPO、0.0433% POPOP を含むトルエン) を添加し、フィルター上に残った放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 遊離反応開始前の HSR 内腔の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  含量は、あらかじめ溶液 17 を添加しておいた溶液 16 に  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  封入 HSR を希釈し、以後同様の操作を行って測定した。

#### 6-4 第4章付属実験

##### 1 HSR の調製

6-2-1 の場合と同様に行った。

##### 2 CS を解離させた HSR および CS を再結合させた HSR の調製

CS を解離させた HSR および CS を再結合させた HSR の調製は、Kawasaki と Kasai の方法(1994)に従った。まず HSR に 10 倍量の 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) を添加した後に遠心 (ベックマン TLX、15,000 x g、30 分、4°C) して沈査を回収し、これを 10 mg/ml HSR となるように 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) で再懸濁した。再懸濁した HSR に 1 mM EGTA を添加してインキュベート (20 時間、0°C) した後、遠心 (ベックマン TLX、15,000 x g、30 分、4°C) して沈査を回収した。得られた沈査を溶液 2 で 20 mg/ml となるように懸濁し、これを CS を解離させた HSR として使用した。一方、1 mM EGTA にてインキュベートした HSR にさらに 2 mM  $\text{CaCl}_2$  を添加してインキュベート (20 時間、0°C) した後、遠心 (ベックマン TLX、15,000 x g、30 分、4°C) して沈査を回収した。得られた沈査を溶液 2 で 20 mg/ml となるように懸濁し、これを CS を再結合させた HSR として使用した。いずれの標品についても調製後は 4°C で保存し、3 日以内に使用した。

##### 3 $\text{Ca}^{2+}$ 電極実験

6-2-2 の場合と同様に行った。ただしリアノジンの効果を検討する場合は、creatine kinase および ATP の添加前 3 分の時点でリアノジンを添加した。

##### 4 ストップドフロー実験

MYTX の有無における HSR のコリン透過性のストップドフロー法による測定は、Kasai と Nunogaki の方法 (1988) に従った。まず HSR に 10 倍量の 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) を添加した後に遠心 (ベックマン TLX、15,000 x g、30 分、4°C) して沈査を回収し、これを 10 mg/ml HSR となるように 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) で再懸濁した。再懸濁した HSR を 0.5 mg/ml となるように 10 mM Tris-maleate (pH 7.0) で希釈したもの、およびこれと等量の溶液 19 (10 mM Tris-maleate (pH 7.0)、 $\text{Ca}^{2+}$ -EGTA to give 100 nM free  $\text{Ca}^{2+}$ ) を調製し、これらをストップドフロー分光光度計 (ユニオン技研 RA-401) の試料用チャンバー、および希釈溶液用チャンバーに各々セットした。窒素ガスの気圧 (4 kg/cm<sup>2</sup>) によって 2 つの溶液の同量をダブルミキシングセル中で瞬時に混合し、その際生じる波長 450 nm の光に対する散乱光強度の経時的変化を、入射方向に対して 90° の方向からニュートラルフィルター (バンドパス幅 14 nm) を透して測定した。1  $\mu\text{M}$  MYTX の効果を検討する場合は、上記の溶液 19 に 2  $\mu\text{M}$  MYTX を添加したものを使用し、以下同様にして行った。

##### 5 シングルチャンネルレコーディング実験

人工脂質膜の形成は、Mueller と Rudin の方法 (1969) に従った。ポリスチレン製カップの一部に穴をあけ、すでに直径 100-500  $\mu\text{m}$  の小孔をあけておいたポリプロピレン製フィルムを貼った。このカップを適当な外筒に収め、直径 100-500  $\mu\text{m}$  の小孔で遮られた 2 つのチャンバーを形成した。次いで両方のチャンバーにおいて同じ水位となるように 0.1 M  $\text{Cs}^+$ -HEPES (pH 7.4) を添加し、15 mg/ml アズレクチンを含む *n*-デカン溶液を少量吹き付けることにより脂質膜を形成した。ここで HSR を一方のチャンバー (シス) から添加し、脂質膜に組み込んだ。RyR は、他方のチャンバー (トランス) が SR 内腔側に相当する方向性をもって、脂質膜に融合される。シスの電位がトランスの電位に対して -30 mV となるように印加し、RyR を介するトランスからシスへの  $\text{Cs}^+$  電流を測定した。チャンネル電流は、増幅器で  $10^{10}$  倍に増幅してペンレコーダー (松下電気産業 VP-6523A) で出力するとともに、実験用に改

良したビデオデッキ(ソニーdigital audio processor PCM-501ES およびビクターHiFi stereo video cassette recorder BR-2400)によりビデオテープに記録した。

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、東北大学薬学部教授 大泉 康博士に謹んで感謝申し上げます。

また絶えず有益な御指導、御助言を戴きました、東北大学薬学部助教授 中畑 則道博士、東北大学薬学部助手 古川 賢一博士に深く御礼申し上げます。

一部の実験(第4章)につきましては、大阪大学基礎工学部教授 葛西 道生博士、大阪大学基礎工学部助手 井出 徹博士、山口 直宏修士の御協力を戴きました。ここに御礼申し上げます。

本研究で用いた RyR の精製方法は、国立循環器病センター研究所循環分子生理部門室員 木島 祥行博士に御指導戴きました。謹んで感謝申し上げます。

本研究で用いた MBED は、東北大学薬学部助手(現 東北大学薬学部教授) 大島 吉輝博士、高橋 有希子修士が主にその合成を担当して下さいました。両氏に深く感謝致します。

日本生化学会で本研究の一部を口頭発表した際、非常に有意義な議論をして下さいました熊本大学薬学部教授 中山 仁博士、熊本大学薬学部助手 国安 明彦博士に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行する上で、特別研究員(平成7年度 DC2)としての待遇、多大なる御援助をして戴きました日本学術振興会、また全般にわたり御協力を戴きました東北大学薬学部生物薬品製造学講座の皆様に感謝致します。



引用文献

- Bean, B.P. (1989) *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 367-384
- Block, B.A., Imagawa, T., Campbell, K.P. and Franzini-Armstrong, C. (1988) *J. Cell Biol.* **107**, 2587-2600
- Brandt, N.R., Caswell, A.H., Wen, S.-R. and Talvenheimo, J.A. (1990) *J. Membr. Biol.* **113**, 237-251
- Brum, G., Rios, E. and Stefani, E. (1988) *J. Physiol.* **398**, 441-473
- Cala, S.E. and Jones, L.R. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11932-11936
- Cameron, D.L. and Tu, A.T. (1977) *Biochemistry* **224**, 89-96
- Campbell, K.P., Leung, A.T. and Sharp, A.H. (1988) *Trends Neurosci.* **11**, 425-430
- 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
- Endo, M. (1977) *Physiol. Rev.* **57**, 71-108
- Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y. (1970) *Nature* **228**, 34-36
- Fleischer, S. and Inui, M. (1989) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **18**, 334-364
- Flockerzi, V., Oeken, H.-J., Hofmann, F., Pelzer, D., Cavalie, A. and Trauwein, W. (1986) *Nature* **323**, 66-68
- Ford, L.E. and Podolsky (1970) *Science* **167**, 58-59
- Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E. and Lazdunski, M. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6086-6092
- Fox, J.W., Elzinga, M. and Tu, A.T. (1979) *Biochemistry* **18**, 678-684
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. and Mikoshiba, K. (1989) *Nature* **342**, 32-38
- Furukawa, K.-I., Funayama, K., Ohkura, M., Oshima, Y., Tu, A.T. and Ohizumi, Y. (1994) *Br. J. Pharmacol.* **113**, 233-239
- Galizzi, J.P., Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1393-1397
- Giannini, G., Clementi, E., Ceri, R., Marziali, G. and Serrentino, V. (1992)

*Science* **257**, 91-94

- Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. and Imoto, K. (1992) *FEBS Lett.* **312**, 229-235
- Ikemoto, N., Antoniu, B. and Kim, D.H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 13151-13158
- Ikemoto, N., Bhatnagar, G.M. and Gergely, J. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1510-1517
- Ikemoto, N., Ronjat, M., Meszaros, L.G. and Koshita, M. (1989) *Biochemistry* **28**, 6764-6771
- Imagawa, T., Smith, J.S., Coronado, R. and Campbell, K.P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16636-16643
- Inui, M., Saito, A. and Fleischer, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1740-1747
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E., Vedvick, T.S., Harpold, M.M. and Campbell, K.P. (1990) *Science* **248**, 248-249
- Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H. Tempst, P. and Marks, A.R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 9474-9477
- Kasai, M. and Nunogaki, K. (1988) *Methods Enzymol.* **157**, 437-468
- Kawasaki, T. and Kasai, M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1120-1127
- Kim, D.H., Ohnishi, S.T. and Ikemoto, N. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9662-9668
- Kim, K.C., Caswell, A.H., Talvenheimo, J.A. and Brandt, N.R. (1990) *Biochemistry* **29**, 9281-9289
- Kobayashi, J., Taniguchi, M., Hino, T. and Ohizumi, Y. (1988) *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 62-63
- Lai, F.A., Erickson, H.P., Rousseau, E., Liu, Q.-Y. and Meissner, G. (1988) *Nature* **331**, 315-319
- MacLennan, D.H. and Wong, P.T. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1231-1235

McPherson, P.S. and Campbell, K.P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13765-13768

Meissner, G. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 2365-2374

Meissner, G. (1986) *Biochemistry* **25**, 244-251

Meissner, G., Conner, G.E. and Fleischer, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 246-269

Meissner, G. and Henderson, J.S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3065-3073

Meszáros, L.G., Bak, J. and Chu, A. (1993) *Nature* **364**, 76-79

Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. and Numa, S. (1989) *Nature* **340**, 230-233

Mueller, P. and Rudin, D.O. (1969) Laboratory techniques in membrane biophysics. Edited by Passow, H. and Stampfli, R., Springer-Verlag, Berlin., pp. 141-156

Nagasaki, K. and Kasai, M. (1983) *J. Biochem.* **94**, 1101-1109

Nakai, J., Imagawa, T., Hakamata, Y., Shigekawa, M., Takeshima, H. and Numa, S. (1990) *FEBS Lett.* **271**, 169-177

Nakamura, Y., Kobayashi, J., Gilmore, J., Mascal, M., Rinehart, K.L.Jr., Nakamura, H. and Ohizumi, Y. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4139-4142

Nowycky, M.C., Fox, A.P. and Tsien, R.W. (1985) *Nature* **316**, 440-443

Otsu, K., Willard, H.F., Khanna, V.K., Zorzato, F., Green, N.M. and MacLennan, D.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13472-13483

Penefsky, H.S. (1979) *Methods Enzymol.* **56**, 527-530

Pessah, I.N., Waterhouse, A.L. and Casida, J.E. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 449-456

Pessah, I.N., Francini, A.O., Scales, D.J., Waterhouse, A.L. and Casida, J.E. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8643-8648

Rios, E. and Brum, G. (1987) *Nature* **325**, 717-720

Rousseau, E., Smith, J.S. and Meissner, G. (1987) *Am. J. Physiol.* **253**, C364-C368

Schneider, M.F. and Chandler, W.K. (1973) *Nature* **242**, 244-246

Seino, A., Kobayashi, M., Kobayashi, J., Fang, Y.-I., Ishibashi, M., Nakamura,

H., Momose, K. and Ohizumi, Y. (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 861-867

Shoshan-Barmatz, V. and Zarka, A. (1992) *Biochem. J.* **285**, 61-64

Slupsky, J.R., Onishi, M., Carpenter, M.R. and Reithmeier, R.A.F. (1987) *Biochemistry* **26**, 6539-6544

Smith, J.S., Rousseau, E. and Meissner, G. (1989) *Circ. Res.* **64**, 352-359

高橋 正身 (1989) 実験医学 **7**, 712-718

Takahashi, M., Seager, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F.X. and Catterall, W.A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5478-5482

Takeshima, H., Nishimura, S., Matsumoto, T., Ishida, H., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H., Ueda, M., Hanaoka, M., Hirose, T. and Numa, S. (1989) *Nature* **339**, 439-445

Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J.A. and Numa, S. (1988) *Nature* **336**, 134-139

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

Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A.R. and Fleischer, S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22992-22999

Tu, A.T. and Morita, M. (1983) *Br. J. Exp. Pathol.* **64**, 633-637

Utainsincharoen, P., Baker, B. and Tu, A.T. (1991) *Biochemistry* **30**, 8211-8216

Walseth, T.F., Aarhus, R., Kerr, J.A. and Lee, H.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26686-26691

Wei, X., Perez-Reyes, E., Lacerda, A.E., Schuster, G., Brown, A.M. and Birnbaumer, L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 21943-21947

Yamamoto, N. and Kasai, M. (1981) *J. Biochem.* **90**, 1351-1361

