論文審査の結果の要旨

申請者氏名　泉　　正憲

心筋の興奮収縮連関、情報伝達、病態についても遺伝子操作を利用した研究が増加しつつある。これらは多くの場合マウスを使って行われる。しかしマウス心筋の興奮収縮連関の基本的な性格や受容体作動薬などによる修飾に関する研究はきわめて乏しい。本研究の内容は2部に大別される。第1部は、マウスの心室筋の興奮収縮連関の基本的な性状を明らかにすること、また第2部では、近年心血管系で各種の病態と関連すると考えられているエンドセリン－1（ET-1）のマウス心室筋興奮収縮連関への影響を明らかにすることを目的としており、実験結果は以下の通りである。

第1部　マウス心室筋の基本的性状

マウス心室筋の単収縮時の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は一過性であり、モルモットなどで見られる持続相は観察されなかった。またそのために収縮の持続時間も短かった。リアノジンにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、収縮ともにほとんど消失した。従って $[Ca^{2+}]_i$ トランジェントの成分のほとんどが筋小胞体からの Ca^{2+} 放出に依存していることが示唆された。

ところで、心筋では刺激頻度を変えることにより単収縮の収縮張力が変化する。マウス右心室筋では刺激頻度の上昇に伴って単収縮の収縮張力は減少した。これは刺激頻度の増加に伴い筋小胞体に取り込まれる Ca^{2+} 量が減少するためと考えられた。

一方、マウス心室筋の活動電位にはプラトー相が存在せず、持続時間が短かった。電位依存性全電流を測定すると、脱分極刺激に伴い、テトロドトキシン感受性の一過性の内向き電流（Na^+ 電流）とその後に続く4-AP感受性の大きな外向き電流（K^+ 電流）が観察された。この大きな外向き電流が存在するために、マウス心室筋の活動電位にはプラトー相がないものと考えられた。

第2部　ET-1のマウス心室筋興奮収縮連関への影響

1）ET-1の陰性変力作用

0.5Hzの頻度で電気刺激を行ったマウス右心室筋の単収縮をET-1は濃度依存性に抑制した。この抑制は ET_A 受容体拮抗薬であるBQ-123により拮抗された。また、ET-1は $[Ca^{2+}]_i$ トランジェントを抑制した。しかし、ET-1は内向き Ca^{2+} 電流を抑制せず、活動電位にも影響を及ぼさなかった。従って、ET-1は Ca^{2+} 流入ではなく、筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量を減少させるものと考えられた。

外液の Ca^{2+} 濃度を変化させると、それに応じて $[Ca^{2+}]_i$ トランジェントの大きさと収縮張力が増減する。こうして得られる $[Ca^{2+}]_i$ 収縮張力の関係にET-1は影響しなかった。従ってET-1による収縮抑制には収縮タンパク質の Ca^{2+} 感受性の抑制は関係しないと考えられた。

PKC阻害薬であるビスインドリルマレイミドIは収縮張力を増加させた。さらに阻害薬存在下でET-

1を投与しても収縮抑制は観察されなかった。また、ET-1は細胞膜分画のPKC量を増加させた。一方、PKC活性化薬であるPDBuは収縮を抑制した。従って、ET-1による収縮抑制はPKCの活性化を介して起こることが示唆された。

p38阻害薬であるPD169316もまた収縮張力を増加させた。一方、PD169316はET-1あるいはPDBuによる収縮抑制を阻害した。また、ET-1はp38のリン酸化を促進した。従って、ET-1はPKCの活性化を経てp38を活性化し、収縮を抑制するものと考えられる。

以上の結果より、低頻度刺激時にはET-1はET_A受容体を介しPKC、p38を活性化し、$[Ca^{2+}]_i$トランジェントを抑制することにより収縮を抑制することが示唆された。

2）ET-1の陽性変力作用

高頻度刺激時（2Hz）にはET-1による陽性変力作用が見られた。一方、ビスインドリルマレイミドI存在下ではET-1は収縮張力を顕著に増加させた。従って、高頻度刺激時にもET-1はPKCの活性化を介して収縮を抑制する機構を動かすものの、収縮を増強する別の機構も働くため、全体としては収縮をやや増強するものと考えられた。

刺激頻度の増加に伴い、静止時の［Ca^{2+}］$_i$が増加していた。刺激頻度0.5Hzの状態で外液Ca^{2+}濃度を10mMまで上昇させてもなお、静止時の［Ca^{2+}］$_i$の増加が観察された。この条件下では、ET-1は［Ca^{2+}］$_i$トランジェントの大きさを減少させるにもかかわらず収縮張力を増強した。2Hzで刺激した標本ではET-1を投与すると、一部の標本では［Ca^{2+}］$_i$トランジェントは変化せずに収縮張力が増加した。以上の結果はET-1によるCa^{2+}感受性の増加を意味する。刺激頻度2Hz、ビスインドリルマレイミドI存在下では、一部の標本では［Ca^{2+}］$_i$トランジェントと収縮張力の両者が増加した。従って、静止時の［Ca^{2+}］$_i$が上昇した条件下では、Ca^{2+}感受性の増加以外にも［Ca^{2+}］$_i$トランジェントを増強する機構が働くものと考えられた。しかし、PKCを抑制しない状態では［Ca^{2+}］$_i$トランジェントの抑制という逆の機構も働くため、両者のバランスで［Ca^{2+}］$_i$トランジェントの変化が決定されると考えられた。

以上、本論文はマウスの心室筋の興奮収縮連関の性状ならびに、各種の病態と関連すると考えられているET-1のマウス心室筋興奮収縮連関への影響を明らかにしたものである。これらの知見の学術上の重要性はいうに及ばないが、今後ますます多くの医学生物学分野で広く用いられるようになるであろうマウスの生物学、薬理学の確立の先駆けともいえる研究であり、ゲノム創薬という範疇の中で病態の解明や治療法の開発にも役立つ応用性の高い研究と考えられる。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の論文として価値あるものと認めた。