

## 論文の内容の要旨

獣医薬理学専攻

平成9年度博士課程入学

氏名 善本亮

指導教官 唐木英明

### 論文題目

カルボニンの生理機能の解析：遺伝子欠損マウスを用いた解析を中心に

カルボニン (h1 カルボニン) は分子量 33-34kda の塩基性タンパク質であり、ニワトリ筋胃よりアクチン・カルモデュリン結合タンパク質として発見された。その後、別の遺伝子上にコードされた中性および酸性のアイソザイムが発見されそれぞれ h2 カルボニンと acidic カルボニンと命名された。h1 カルボニンは分化した平滑筋細胞のアクチンフィラメント上に多く認められ、アクチン活性化ミオシン ATPase を抑制すること、またプロテインキナーゼ C や  $Ca^{2+}$ -カルモデュリンキナーゼ II でリン酸化されたカルボニンは ATPase 活性を抑制しないことなど、様々な生化学的データが報告されており、h1 カルボニンが平滑筋収縮に何らかの役割を担っていることが示唆されている。そこで本研究は h1 カルボニン遺伝子欠損マウスを用いることによってその平滑筋収縮における生理学的役割を解明することを目的として行った。更にはこれまで殆ど調べられていない h2 カルボニンと acidic カルボニンの生化学的性状についての検討も行った。

### 第1章 h1 カルボニンの平滑筋収縮機構における役割の検討

平滑筋収縮は細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇の結果、ミオシン軽鎖がリン酸化され、ミオシン ATPase 活性が増加し、ミオシン頭部が回転運動をしながらアクチンと相互作用をすることによって惹起されると考えられている (ミオシンリン酸化説)。しかし、等張性 KCl によって刺激された平滑筋のリン酸化ミオシン量と発生張力を同時に測定するとリン酸化ミオシン量は刺激後初期に最大値に達し、その後減少していくのに対し、張力は増加し続ける。Murphy らはこの発生張力とリン酸化ミオシン量の乖離を説明するために、「脱リン酸化されたミオシンもアクチンと相互作用することができ

る」というラッチ説を提唱した。その後、ラッチ説を補足説明する説は様々提唱されたが、基本的に平滑筋収縮はミオシンのリン酸化説で説明されている。一方、生体内の様々なアゴニストで平滑筋を刺激すると、等張性 KCl による収縮と比べて同程度の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇で、より大きい収縮を引き起こす。また、一部のアゴニストはミオシンリン酸化量をほとんど上昇させないで収縮を発生させる。このようなミオシンリン酸化量と収縮の不一致はリン酸化説だけでは説明できず、それ以外の調節機構の存在を示唆するものである。h1 カルボニン はアクチンに結合し、アクチン活性化ミオシン ATPase 活性を抑制することから平滑筋収縮を調整している可能性が示唆されているタンパク質である。そこで h1 カルボニン遺伝子欠損マウスを用いて h1 カルボニンの平滑筋収縮制御機構における役割を検討した。

野生型マウス (h1CP+/+) と h1 カルボニン遺伝子欠損マウス (h1CP-/-) より大動脈を単離し KCl で刺激すると、同程度の収縮張力が発生した。刺激後初期及び、後期でそれらのクロスブリッジの活性を検討すると、h1CP+/+ は後期でその活性が低下しラッチ状態を示したが、h1CP-/- は後期になってもクロスブリッジの活性は高いままであった。なお、KCl 刺激後、いずれの時間でも細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、ミオシンリン酸化量の変化に両者で違いは認められなかった。

輸精管平滑筋を単離し KCl で刺激すると細胞内  $Ca^{2+}$  濃度、リン酸化ミオシン量とも両者で同程度に上昇したが、最大筋短縮速度が h1CP-/- で有意に上昇していた。

大動脈を 4 種の受容体作動薬及びホルボールエステルで刺激すると、それぞれの薬物は h1CP+/+ と h1CP-/- の間で同程度の張力を発生した。次に、回腸縦走筋を  $\alpha$ -toxin で脱膜化し  $Ca^{2+}$  によって直接筋を収縮させた。この時、両者の間で  $Ca^{2+}$  感受性と最大発生張力の大きさに違いは認められなかった。GTP $\gamma$ -S 及びホルボールエステル存在下で同様の実験を行うと、h1CP+/+ と h1CP-/- は同程度の  $Ca^{2+}$  感受性の増加、最大発生張力の増加を示した。

アクチン-ミオシンの反応速度は脱リン酸化ミオシンのアクチンからの解離に依存すると考えられている。輸精管、大動脈とも KCl 刺激による反応速度が h1CP-/- で増加していたことから、h1 カルボニンが脱リン酸化ミオシンのアクチンからの解離を抑制するタンパク質、すなわちラッチブリッジを形成するタンパク質であることが示唆された。

一部の受容体作動薬やホルボールエステルはリン酸化ミオシン量をほとんど増加させずに平滑筋を収縮させることが知られている。これらの系には G タンパクやプロテインキナーゼ C の関与が報告されている。また、脱膜化平滑筋では GTP $\gamma$ -S と

ホルボールエステルはそれぞれ rho キナーゼ、プロテインキナーゼ C を活性化し、平滑筋収縮を引き起こす。rho キナーゼ、プロテインキナーゼ C とも h1 カルボニンを *in vitro* でリン酸化することが知られているため、受容体作動薬刺激による平滑筋収縮制御に h1 カルボニンの関与が示唆されてきた。しかし本研究では生筋に対する 4 種の受容体作動薬と DPB、及び脱膜化標本における GTP $\gamma$ -S、PDBu による平滑筋収縮の大きさに h1CP+/+ と h1CP-/- の間で差違が認められなかった。従って、受容体作動薬やホルボールエステル刺激による平滑筋収縮には h1 カルボニンは関与していない可能性が示唆された。

## 第 2 章 h2、acidic カルボニンの生化学的性状解析

h1 カルボニンのアイソザイムである h2 及び acidic カルボニンについての研究は非常に少なく、その生化学的性状すら殆ど明らかにされていない。そこで大腸菌発現系を用いて両アイソザイムのリコンビナントタンパク質を作成し、その生化学的性状を検討した。

両アイソザイムとも F-アクチンに結合した。F-アクチンに対する解離定数はどちらも 4  $\mu$ M 程度であった。次にカルモデュリン結合能を検討した。両アイソザイムとも Ca<sup>2+</sup> 依存的にカルモデュリンと結合した。h2 及び acidic カルボニンそれぞれのカルモデュリンに対する解離定数は 10  $\mu$ M、30  $\mu$ M であった。h1 カルボニンは Ca<sup>2+</sup> 依存的タンパク質分解酵素である  $\mu$ -カルパインのよい基質となることが報告されている。そこで次に h2 及び acidic カルボニンが  $\mu$ -カルパインの基質となるかどうか検討したところ、どちらも  $\mu$ -カルパインによって加水分解をうけることが明らかになった。多くのカルモデュリン結合タンパク質は  $\mu$ -カルパインの基質となることが報告され、カルモデュリン存在下ではその分解が促進されたり、分解パターンが変化したりすることが知られている。そこで、カルモデュリン存在下で h2 と acidic カルボニンを  $\mu$ -カルパインで処置した。しかし、どちらのカルボニンもカルモデュリン存在下、非存在下で分解パターン、速度に違いは認められなかった。更に、両アイソザイムのアクチン活性化ミオシン ATPase 活性に対する影響を検討した。両アイソザイムとも ATPase 活性を抑制した。その IC<sub>50</sub> 値は h1 カルボニンと比較すると 4 倍ほど大きかった。h2 カルボニンと acidic カルボニンは F-アクチンに対する親和性も h1 カルボニンより 4 倍ほど低かったため、対アクチン結合比で考えると、3 種のカルボニンはアクチン活性化ミオシン ATPase 活性を同程度に抑制することが示唆された。

まとめ

本研究によって h1 カルボニンが平滑筋収縮における脱リン酸化ミオシンのアクチンからの解離を抑制するタンパク質、すなわちラッチブリッジを形成するタンパク質であることが明らかとなった。また、GTP $\gamma$ -S あるいはホルボールエステルで認められ平滑筋収縮の Ca<sup>2+</sup>感受性の増加には h1 カルボニンは関与していないことが示唆された。しかしながら、輸精管においては刺激後初期の段階から h1CP+/+ と h1CP-/- の間でクロスブリッジの活性に違いが認められたのに対して、大動脈では刺激後しばらくたって初めて違いが認められた。また、大動脈と回腸縦走筋では h1CP+/+ と h1CP-/- の間で発生張力に変化が認められなかったのにも関わらず、h1CP-/- の輸精管では KCl 収縮が明らかに h1CP+/+ と比べて減少していた。これらの乖離が両者の収縮制御の違いによっているものなのかそれ以外の要因に由来するものなのかは更なる検討が必要だと思われる。

h2 及び acidic カルボニンはカルモデュリンに Ca<sup>2+</sup>依存的に結合したが、その親和性は報告されている h1 カルボニンの親和性と比較すると 100 倍近く低かった。カルモデュリンは酸性タンパク質であるため、この親和性の差違がカルボニンの電荷性によるものなのか、それとも特異的なアミノ酸配列の相違によるものなのかは更なる解析が必要である。また、この低親和性が  $\mu$ -カルバインのカルモデュリンによる制御の違いに現れた可能性もある。一方、h2 カルボニンと acidic カルボニンともアクチン活性化ミオシン ATPase 活性を抑制することが明らかになった。それぞれの IC<sub>50</sub> 値は h1 カルボニンのそれより 4 倍ほど低かったが、対アクチン結合比で考える抑制程度は同程度であった。従って、h2 カルボニン及び acidic カルボニンも h1 カルボニンと同様な機構で ATPase 活性を抑制しているものと考えられる。本研究でにより h2 および acidic カルボニンも h1 カルボニンと生化学的に類似の性状を持つことが明らかとなった。これら 3 種類のカルボニンは組織間分布にはかなりの相違が認められることから、生体内ではそれぞれ固有の役割を果たしていることと思われる。