

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	63- 第6号	氏名	劉 衍恭
審査委員会委員		主査氏名	高橋 尚彦
		副査氏名	中川 幹子
		副査氏名	油布 邦夫
<p>論文題目 Asparagine-linked glycosylation modifies voltage-dependent gating properties of Cav3.1-T-type Ca²⁺ channel (アスパラギン結合型糖鎖は Cav3.1-T 型 Ca²⁺チャネルの電位依存性チャネルゲーティングを制御する)</p> <p>論文掲載雑誌名 The Journal of Physiological Sciences</p> <p>論文要旨：本研究ではCav3.1 T型Ca²⁺チャネルのN型糖鎖形成を阻害し、糖鎖に依存するチャネル開閉機構、すなわちゲーティング機構にN型糖鎖がいかに関与するかを検討した。【方法】 Cav3.1 T型Ca²⁺チャネルを強制発現させたHEK293細胞 (HEK-Cav3.1細胞) にパッチクランプ法 (Voltage-clamp法) を用いてT型Ca²⁺チャネル電流を記録した。HEK-Cav3.1細胞は、N-アセチルグルコサミンリン酸転移酵素 (GlcNAc phosphotransferase (GPT)) の選択的阻害剤であるツニカマイシンの存在下で培養し、ツニカマイシン非存在下で同条件の培養の元に記録した。【結果】 1) HEK-Cav3.1細胞のT型Ca²⁺チャネル電流密度はツニカマイシンの作用時間の長さ依存して減少し、その最大内向き電流値はツニカマイシン作用24時間で72.5%減少した。2) HEK-Cav3.1細胞のT型Ca²⁺チャネル電流の活性化曲線はツニカマイシンの作用時間の延長と共に脱分極側に偏位した。3) HEK-Cav3.1細胞のT型Ca²⁺チャネル電流の最大内向き電流値を指標とした50%阻害濃度 (IC50)は2.01x10⁻³ g/lであった。4) T型Ca²⁺チャネル電流の半値活性化電位 (V1/2-activation) と半値不活性化電位 (V1/2-inactivation) に対するツニカマイシンの濃度依存性作用を評価した結果、半値活性化電位は10⁻³ g/l濃度以上で偏位は明らかとなり、半値不活性化電位は濃度範囲 (10⁻⁶ g/l 10⁻² g/l) で有意な偏位を示さなかった。5) Cav3.1 T型Ca²⁺チャネルは薬剤非存在下でも使用依存性遮断を示した。トレーン刺激0.4 Hzの条件では対照、及びツニカマイシン作用下でCav3.1 T型Ca²⁺チャネル電流は使用依存性遮断を示さなかったが、2.5Hz刺激、及び4.0 Hz刺激で両者は共に使用依存性遮断を示し、ツニカマイシン作用下では有意に大きな遮断量を示した。6) Cav3.1 T型Ca²⁺チャネル電流の不活性化からの回復過程の時間依存性を評価したところ、速い回復の時定数と遅い回復の時定数の両方がツニカマイシン作用下で増大した。7) Cav3.1 T型Ca²⁺チャネルが形質膜に発現した後にその糖鎖を切除するPNGase Fを作用させたが、最大内向き電流値、定常状態不活性化曲線、活性化曲線のいずれも影響を受けなかった。【考察、結語】 Cav3.1 T型Ca²⁺チャネルのN型糖鎖はチャネルの翻訳後修飾機構としてチャネル電流値を減少させ、チャネルの特定のゲーティングに影響を持つという新知見を本研究は初めて明らかにした。</p> <p>本研究により、N型糖鎖のCav3.1 T型Ca²⁺チャネルゲーティングに対する作用はチャネルの立体化の分子機序を理解する上で有益な情報となりうると考えられる。本研究は学術的にも意義あるものと考えられ、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第 ⁶³ 巻 第6号	氏名	劉 衍恭
審査委員会委員	主査氏名	高橋 尚彦	
	副査氏名	中川 幹子	
	副査氏名	油 布 邦 夫	
<p>学位審査申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 自動能を有する組織には、洞結節だけでなく接合部、プルキンエ線維があるが、Cav3.1T型Caチャンネルはこれらの組織に同じように分布するのか、部位による発現の違いはあるのか。 2. In Vivo ラットで見られた著明な心拍数減少には、ツニカマイシンのT型Caチャンネル抑制効果とIfチャンネル抑制効果のどちらが優位に効いているのか。 3. ツニカマイシンは、T型Caチャンネル電流以外の主要なチャンネル電流(NaチャンネルやKチャンネル)には影響しないのか。 4. 洞不全症候群は高齢者に多く認められる。加齢とともにCav3.1T型Caチャンネル電流が減少したとする報告はあるか。 5. Fig. 2で、ツニカマイシンはCav3.1T型Caチャンネル電流の定常状態不活性化曲線を脱分極側にシフトさせることを示している。これは生理的条件下でCav3.1T型Caチャンネル電流を減じる方向に作用すると考えていいか。 6. In Vivo ラットでツニカマイシンの投与によって著明な心拍数減少が見られた時相で、ラットの全身状態はどうであったか。 7. T型Caチャンネルは洞結節と心房に主として発現する。In Vivo ラットのテレメトリーのトレンド上、ツニカマイシン投与後のHRとPQ間隔に変動が見られるが、上室性の不整脈が出現したのではないか？ 8. Cav3.1T型Caチャンネルの変異が、先天性の洞不全症候群やその他の不整脈の原因となるという報告はあるか？ 9. ツニカマイシンは現在、臨床上で治療薬として使用されているのか？ 10. ツニカマイシンは使用依存性遮断作用を有するが、もし抗不整脈薬として使用されるなら、どのような不整脈が対象になると思うか？ 11. ツニカマイシンは抗菌薬のひとつである。今回得られた結果はツニカマイシンに特異的なものなのか、あるいは同じような作用を有する他の抗菌薬もあるのか？ 12. 洞調律の心不全患者において、心拍数を減少させると予後が改善することが多く報告されている。たとえば、洞結節自動能の司るIfチャンネルを抑制するイバブラジンは最近、心不全治療薬として日本でも発売された。T型Caチャンネルを抑制して心拍数を減少させることは心不全治療をもたらすのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 劉 衍 恭

論 文 題 目

Asparagine-linked glycosylation modifies voltage-dependent gating properties of Cav3.1-T-type Ca^{2+} channel
(アスパラギン結合型糖鎖は Cav3.1-T 型 Ca^{2+} チャネルの電位依存性チャネルゲーティングを制御する)

要 旨

【緒言】

低電位活性型 Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャネルは特殊心筋細胞における自動能形成に関わるだけでなく、不全心や梗塞後心で病態生理学的機能に関与することが知られている。一方、翻訳後修飾の一種である糖鎖修飾 (N-結合型、O-結合型) は、分岐パターン、結合様式 (α 、 β) によって、非常に複雑な構造多様性を生み出すことが報告されている。N 型糖鎖は、タンパク質の安定性や輸送、機能などの制御に重要な役割を果たす。役目を終えた糖タンパク質 (N 型糖鎖で修飾されたタンパク質) は細胞内のリソソームに運ばれた後、アミノ酸と糖にまで分解される。N 型糖鎖の分解が正しく行われないと、さまざまな疾患が引き起こされる。その一方、糖鎖の不完全な形成はタンパク質の立体構造の欠損、立体配座欠損、形質膜への trafficking 不全等の様々なタンパク質の機能不全の原因となる。本研究では Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャネルの N 型糖鎖形成を阻害し、糖鎖に依存するチャネル開閉機構、すなわちゲーティング機構に N 型糖鎖がいかに関与するかを検討した。

【方法】

Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャネルを強制発現させた HEK293 細胞 (HEK-Cav3.1 細胞) にパッチクランプ法 (Voltage-clamp 法) を用いて T 型 Ca^{2+} チャネル電流を記録した。HEK-Cav3.1 細胞は、糖タンパク質の合成の最初の段階で UDP-N-アセチルグルコサミンから N-アセチルグルコサミン-1-リン酸をドリコールリン酸へ転移するのを触媒する酵素である N-アセチルグルコサミンリン酸転移酵素 (GlcNAc phosphotransferase (GPT)) の選択的阻害剤であるツニカマイシンの存在下で培養し、ツニカマイシン非存在下で同条件の培養の元に記録した HEK-Cav3.1 細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル電流とそのチャネルキネティクスを比較した。また N 結合型糖タンパク質から高マンノース、ハイブリッド型オリゴ糖、複合型オリゴ糖の一番内側の GlcNAc 残基とアスパラギン残基の間を切断するアミダーゼである PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) を作用させた HEK-Cav3.1 細胞の T 型 Ca^{2+} チャネル電流とそのチャネルキネティクスを対照群、及びツニカマイシン作用下のそれと比較・評価した。

【結果】

- 1) HEK-Cav3.1 細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル電流密度はツニカマイシンの作用時間の長さに依存して減少し、その最大内向き電流値はツニカマイシン作用 24 時間で 72.5% 減少した。一方、同条件で最大コードコンダクタンスは 67.5% 減少した。
- 2) HEK-Cav3.1 細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル電流の定常状態不活性化曲線はツニカマイシンの作用のによって変化しなかったが、活性化曲線はツニカマイシンの作用時間の延長と共に脱分極側に偏位し、ツニカマイシン 10^{-2} g/l 濃度の作用下では 5.0 mV の脱分極偏位を示した。
- 3) HEK-Cav3.1 細胞の T 型 Ca^{2+} チャンネル電流の最大内向き電流値を指標とした 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は 2.01×10^{-3} g/l であった。
- 4) T 型 Ca^{2+} チャンネル電流の半値活性化電位 ($V_{1/2}$ -activation) と半値不活性化電位 ($V_{1/2}$ -inactivation) に対するツニカマイシンの濃度依存性作用を評価した結果、半値活性化電位は 10^{-3} g/l 濃度以上で偏位は明らかとなり、半値不活性化電位は濃度範囲 (10^{-6} g/l - 10^{-2} g/l) で有意な偏位を示さなかった。
- 5) Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネルは薬剤非存在下でも使用依存性遮断を示す。保持電位 -100 mV から試験電位 -10 mV にトレーン刺激を加えるとその刺激頻度に依存して電流量は減少する。トレーン刺激 0.4 Hz の条件では対照、及びツニカマイシン作用下で Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネル電流は使用依存性遮断を示さなかったが、2.5 Hz 刺激、及び 4.0 Hz 刺激で両者は共に使用依存性遮断を示し、ツニカマイシン作用下では有意に大きな遮断量を示した。
- 6) Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネル電流の不活性化からの回復過程の時間依存性を評価するため回復電流値を二次指数関数で回帰曲線を求め、その時定数を比較したところ、速い回復の時定数 (τ_{fast}) と遅い回復の時定数 (τ_{slow}) の両方がツニカマイシン作用下で増大した。しかし不活性化からの回復における遅延依存度の割合は変化しなかった。
- 7) Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネルが形質膜に発現した後にその糖鎖を切除する PNGase F を作用させてチャンネルのゲーティングを評価したが、最大内向き電流値、定常状態不活性化曲線、活性化曲線のいずれも影響を受けなかった。

【考察、結語】

Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネルの N 型糖鎖はチャンネルの翻訳後修飾機構としてチャンネル電流値を減少させ、チャンネルの特定のゲーティングに影響を持つという新知見を本研究は初めて明らかにした。T 型 Ca^{2+} チャンネルの総電流の減少は同イオンチャンネルの形質膜への trafficking 量が抑制を受けていることを示唆する。一方、ツニカマイシンによって定常状態不活性化曲線は偏位を示さず、活性化曲線のみが脱分極側に偏位することはチャンネルの立体構造形成の過程で N 型糖鎖が活性化ゲートの構成に関与することを示す。一方、ツニカマイシンによってチャンネルの不活性化からの回復過程が遅延する事実はチャンネルの不活性化からの回復過程が定常状態不活性化と独立して N 型糖鎖の影響を受けることを示唆する。Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネルが正常な N 型糖鎖修飾を受けて形質膜に trafficking を受け、その後糖鎖を除去してもチャンネルゲーティングに影響を受けないという結果は、N 型糖鎖がチャンネルの分子立体化過程に作用し、その分子構造の完成後はチャンネルゲーティングに機能を持たないことを明らかにした。この N 型糖鎖の Cav3.1 T 型 Ca^{2+} チャンネルゲーティングに対する作用はチャンネルの立体化の分子機序を理解する上で有益な情報となりうると思われる。