

氏 名 (本 籍)	戸 田 裕 之 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 4 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Stimulatory action of protein kinase C isoform on the slow component of delayed rectifier K ⁺ current in guinea-pig atrial myocytes (モルモット心房筋細胞におけるプロテインキナーゼC アイソフォームによる緩除活性型遅延整流性K ⁺ チャンネル電流の増大反応)
審 査 委 員	主 査 教 授 堀 池 喜 八 郎 副 査 教 授 柏 木 厚 典 副 査 教 授 岡 村 富 夫

論文内容要旨

※整理番号	554	(ふりがな) 氏名	とだ ひろゆき 戸田 裕之
学位論文題目	Stimulatory action of protein kinase C ϵ isoform on the slow component of delayed rectifier K ⁺ current in guinea-pig atrial myocytes (モルモット心房筋細胞におけるプロテインキナーゼ C ϵ アイソフォームによる緩徐活性型遅延整流性 K ⁺ チャネル電流の増大反応)		
<p>【研究の目的】</p> <p>今日プロテインキナーゼ C (PKC) は様々な組織で 1 2 種類以上発見され、その構造と活性化メカニズムによって conventional PKC、novel PKC、atypical PKC の 3 つのグループに分類されている。PKC は、様々な神経伝達物質、ホルモン、細胞外伝達分子による心筋機能の調整に関与している。心臓の異なる病態ごとに PKC の発現量に差があることや、心肥大、心不全、虚血耐性への関与が報告されている。</p> <p>緩徐活性型遅延整流性 K⁺チャネル電流 (I_{Ks}) は、心臓における主要な再分極電流の一つで PKC の活性化によって調整されている。しかし、心筋において実際にどの PKC アイソフォームがその調整に関与しているのかは知られていない。この研究の目的は、α_1-アドレナリン受容体 (α_1-受容体) 刺激による I_{Ks} の増大反応がどの PKC アイソフォームを介するのかを PKC の特異的阻害薬を使い解明することである。</p> <p>【方法】</p> <p><心房筋細胞の単離></p> <p>モルモット (3-8 週令 体重 250~350g) の心臓をランゲンドルフ装置で灌流し、酵素を使い心房筋細胞を単離した。</p> <p><溶液、薬品></p> <p>細胞外灌流液には normal Tyrode 溶液に L 型 Ca²⁺チャネル ($I_{Ca,L}$) 阻害薬の nisoldipine (0.4 μM) と急速活性型遅延整流性 K チャネル (I_{Kr}) 阻害薬の E-4031 (5 μM) を加え、$I_{Ca,L}$ と I_{Kr} を抑制した。細胞外灌流液には α_1-受容体刺激薬のフェニレフリン、非特異的 PKC 刺激薬の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、各種特異的・非特異的 PKC 阻害薬を添加し使用した。PKC のペプチド性特異的阻害薬は電極内の溶液に添加して使用した。</p> <p><全細胞パッチクランプ法></p> <p>心房筋細胞を 36°C の細胞外灌流液で灌流後、全細胞パッチクランプ法を用いて心房筋細胞から電流を測定した。保持電位は -50mV とし、+30mV、2 秒間の脱分極パルスを与えた。電流は数分間の安定の後測定した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

【結果】

フェニレフリン(30 μ M)は I_{Ks} を 97.1%増大させ、その反応は α_1 -受容体阻害薬のプラゾシン(1 μ M)でほぼ完全にブロックされた。フェニレフリンの I_{Ks} 増大作用は非特異的 PKC 阻害薬の bisindolylmaleimide I で完全とまではいかないが、かなりブロックされた。このようなフェニレフリンの作用をブロックする効果は、PKC ϵ のペプチド性特異的阻害薬 ϵ V1-2 で認められたが、他の PKC アイソフォームの特異的阻害薬である Gö-6976、Gö-6983、rottlerin や conventional PKC に対する同じペプチド性特異的阻害薬である β C2-4 では認めなかった。また、非特異的 PKC 刺激薬の PMA(100 nM)は I_{Ks} を 64.2%増大させた。PMA の I_{Ks} 増大作用も同様に PKC ϵ のペプチド性特異的阻害薬 ϵ V1-2 でブロックされ、conventional PKC のペプチド性特異的阻害薬 β C2-4 でブロックされなかった。

【考察】

フェニレフリンによる I_{Ks} 増大作用は、bisindolylmaleimide I でブロックされることから、PKC の活性化が α_1 -受容体刺激による I_{Ks} の調節に関与していることが強く示唆された。さらにその反応は種々の特異的 PKC 阻害薬の中で PKC ϵ 特異的阻害薬 ϵ V1-2 でのみブロックされることから、PKC ϵ が主に関与していると考えられた。

他方、培養細胞やウシから抽出した PKC α を使用した実験で PKC ϵ の他に PKC α の関与が報告されている。PKC アイソフォームの発現は種差や病態、薬剤の刺激で変わることが知られており、過去の報告が今回の結果と矛盾するものではない。

今回、bisindolylmaleimide I は PMA による I_{Ks} の増大反応をほぼ完全にブロックしたが、フェニレフリンによる増大反応に対しては約 6 割の抑制にとどまった。これは α_1 -受容体刺激による I_{Ks} の調整に PKC の活性化以外の機構があることを示唆している。 α_1 -受容体-Gq-PLC 系の下流で、細胞膜の phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate が I_{Ks} の調整に関与していることが以前に報告されており、今回の結果と合致すると考えられた。

【結論】

本研究は、モルモットの心筋において PKC の活性化が α_1 -受容体刺激による I_{Ks} の調節に関与していること、その PKC が主に PKC ϵ であることを示唆した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	554	氏名	戸田 裕之
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>緩徐活性型遅延整流性 K^+チャネル電流 (I_{Ks}) は、心臓における主要な再分極電流の一つであり、プロテインキナーゼ C (PKC) によって調節されている。PKC には現在 12 種類以上の分子種が見いだされている。</p> <p>本研究は、α_1-アドレナリン受容体刺激による I_{Ks} の増大反応が PKC のどの分子種によるのかを検討したものである。</p> <p>すなわち、モルモット心房筋細胞の I_{Ks} を全細胞パッチクランプ法で測定し、α_1-受容体刺激薬フェニレフリンによる I_{Ks} の増大作用は、PKC の分子種 ϵ の特異的阻害薬 (ペプチド) である $\epsilon V1-2$ でのみブロックされることを明らかにした。</p> <p>このように本論文は、心筋の緩徐活性型遅延整流性 K^+チャネルの調節に $PKC\epsilon$ が関与することを示したものであり、心疾患の病態解明や治療法開発に寄与するものである。よって、博士 (医学) の学位論文に値する。</p>			
(平成 19 年 2 月 2 日)			