

論 文 要 旨

Interactions of calmodulin with the multiple binding sites of Cav1.2 Ca²⁺ channels

カルモジュリンと Cav1.2 型カルシウムチャネルの
複数結合部位との相互作用

Hadhimulya Asmara

【序論および目的】

我々は、カルモジュリン (CaM) が Ca チャネルを活性化することを電気生理学的手法により明らかにした (Xu et al., Am. J. Physiol. 2004)。さらに、最近では、高濃度の CaM がチャネルの活性を抑制することを見出した。これらの結果から、CaM が Ca チャネルの調節機構の主な因子であり、濃度依存的に促通と抑制の二重作用をもつという仮説を提唱した。そのためには、それぞれの作用に独立した結合様式があると予想される。これまでに、CaM と Ca チャネルの結合について定性的な解析を行った報告は多数あるが、分子的機序は確立していない。本研究では、Ca チャネルの細胞内ドメインペプチドを作成し、CaM の結合部位を pull-down 法を用いて準定量的に解析し、その結合特性について調べた。また、これまでに活性制御との関連が報告されているチャネル C 末端側領域のアミノ酸部位に点変異を加え、CaM の結合への影響について調べた。

【材料および方法】

チャネルペプチドとカルモジュリンタンパクの作成

チャネルペプチドは、モルモットからクローニングした cDNA (GenBank AB016287) を鋳型に PCR を行い、細胞内ドメイン (N 末端、I-II ループ、C 末端) を GST (Glutathion-S-transferase) 融合タンパクとして大腸菌を用いて合成し、アフィニティー精製した。CaM は、HEK (Human embryonic kidney) 細胞からクローニングし、チャネルペプチドと同様に GST 融合タンパクとして精製後、GST 部分を特異的プロテアーゼで除いて使用した。作成したタンパクは使用前に Bradford 法を用いて定量し、純度は SDS-PAGE で確認した。

チャネル C 末端側ペプチドの点変異体作成

チャネル C 末端側ペプチド (PreIQ、IQ、PreIQ-IQ) の点変異体を PCR 法を用いて作成した。変異体はシーケンサーで配列を確認した後、野生体と同様に GST 融合タンパクとして精製した。

GST-pull-down 法

GST 融合体として精製したカルシウムチャネルペプチドをグルタチオンビーズに固定し、CaM (0.02-21.8 μM) を加え、ローターで攪拌しながら 4°C で 3 時間反応させた。この時、Ca²⁺濃度は 2 mM に固定した。非特異的結合を除いた後、SDS-PAGE で結合を検出した。ゲルをスキャナで読み取り、バンドの濃さを ImageJ で数値化し、既知タンパク量を基準にした検量線に乗せ、チャネルペプチドと結合 CaM のモル比を求めた。CaM 濃度とチャネルへの結合の関係を示したグラフでは、解離定数 (Kd) と最大結合量 (Bmax) の解析を KELL で行った。

【結果】

CaMの結合部位として、チャンネルのN末端側ドメイン、I-IIループドメイン、C末端側ドメイン(PreIQ領域とIQ領域)が報告されているが、定量的な検討はなされていない。よって、GST融合ペプチドを作成しCaMのaffinityを調べた。各チャンネルペプチドに対するCaMのaffinityはKd値を求めた結果から、IQ領域 > PreIQ領域 > I-IIループ > N末端となった。Bmax値からPreIQ領域とIQ領域を含むペプチド(PreIQ-IQ)は2分子のCaMと、その他のペプチドは1分子のCaMと結合することが示唆された。

preIQ(1599-1639)の配列で、チャンネル活性の制御に重要であると報告のあるアミノ酸に変異を導入し、CaMの結合を調べた。検討した変異体は以下のとおりである。I1618D(I/D), E1612K(E/K)+I/D, E/K+I/D+LL1629-30RR(LL/RR)変異の導入箇所の増加に伴いCaMの結合(Bmax)が減少したことから、PreIQ領域のこれらのアミノ酸がCaMとチャンネルの相互作用に重要であることが示唆された。次にCaMの結合配列として確立しているIQ(1648-1668)ペプチドについて変異体(I1653E)を作成したところ、CaMの結合が消失した。さらにpreIQ-IQ(1599-1668)ペプチドの変異体について検討したところ、IQペプチドのI/E変異体では完全にCaMの結合が消失したのに対して、preIQ-IQ(I/E)では、64%(野生型を100%として)が結合した。短いペプチドで有効であったPreIQ配列のE/K+I/D+LL/RRとIQ配列のI/Eの変異をpreIQ-IQペプチドに導入したところ、予想に反し29%が結合した。

【結論及び考察】

カルシウムチャンネルには複数のCaM結合部位があり、2個のCaMが同時にC末端部のPreIQ領域とIQ領域に結合することを見出した。短いペプチド(PreIQとIQ)と長いペプチド(PreIQ-IQ)の変異体を比較することにより、CaMの結合はチャンネルの立体構造変化に伴い、動的に変化することが示唆された。これらの結果は、CaMがチャンネルのC末端部に結合し、チャンネルの促進と抑制を制御するという仮説を支持する。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 98 号	学位申請者	Asmara Hadhimulya
審査委員	主査	小澤政之	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	桑木共之	副査 宮田篤郎
	副査	堀内正久	副査 原口みさ子

Interactions of calmodulin with the multiple binding sites of Cav1.2 Ca²⁺ channels

(カルモジュリンと Cav1.2 型カルシウムチャネルの複数結合部位との相互作用)

Ca チャネルは、神経細胞や筋細胞の細胞膜にあって、シナプス伝達や筋収縮における Ca シグナリングに重要な役割を果たしている。Ca チャネルは、カルモジュリン (CaM) によって活性化、ならびに不活性化されることが知られているが、CaM による Ca チャネル調節 (促進と不活性化) の分子の機序は不明な点が多い。本研究では、心筋 Ca チャネル (Cav1.2 型) の細胞内ドメイン由来の GST (glutathione-S-transferase) 融合ペプチドを作成し、CaM との結合を pull-down 法を用いて半定量的に解析し、その結合特性について検討している。また、これまでに活性調節との関連が報告されているチャネルの C 末端側領域のアミノ酸部位に点変異を加え、CaM の結合に対する影響について調べている。その結果、以下の様な所見が得られた。

1. Ca チャネルの細胞内ドメインである N 末端部、I-II ループ、C 末端部の preIQ 領域 (アミノ酸番号 1599-1639) と IQ 領域 (1648-1668) 由来の GST 融合ペプチドは、Ca イオン存在下で CaM と結合し、その親和性は IQ 領域 > preIQ 領域 > I-II ループ > N 末端部であった。これらの結合モル比は 1 と推定されたが、preIQ 領域と IQ 領域を含む長いペプチド (preIQ-IQ; 1599-1668) は 2 分子の CaM と結合すると示唆された。
2. PreIQ ペプチドに、チャネルの活性調節に重要であるとの報告がある 4 か所のアミノ酸 (E1612K, I1618D, LL1629-30RR) に変異を導入して CaM の結合を調べると、全ての変異導入で CaM 結合がほぼ消失した。IQ ペプチドについては、I1653E の点変異により CaM の結合が消失した。
3. PreIQ-IQ ペプチドでは、I1653E の変異体でも CaM 結合が 64% (野生型比) 残存し、これに preIQ 領域の三カ所の変異を加えても CaM 結合がまだ約 30% 残存していた。

これらの結果に基づいて、申請者らは、Ca チャネルには複数の CaM 結合部位があり、2 個の CaM が同時にそれぞれ PreIQ 領域と IQ 領域に結合すると結論している。この考えは、CaM がチャネルの活性化 (促進) と不活性化を制御するという仮説を支持する。これらの結果と考察は、心筋 Ca チャネルの CaM による調節機構の解明に新たな知見を加えたという点で興味深い。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 98 号		学位申請者	Asmara Hadhimulya
審査委員	主査	小澤政之	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	桑木共之	副査	宮田篤郎
	副査	堀内正久	副査	原口みさ子

主査および副査の5名は、平成22年3月4日、学位申請者 Asmara Hadhimulya 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) モルモット由来の Ca チャネルペプチドとヒト由来のカルモジュリン (CaM) を使っていますが、種間の差による問題はありませんか。

(回答) CaM のアミノ酸配列は種間の相同性が高いので、問題ないと考えました。

質問2) Ca チャネルサブタイプの中から Cav1.2 を選んだ理由を説明して下さい。

(回答) CaM による調節機構について研究が進んでいることと、心筋に主に発現しており重要であると考えたからです。

質問3) 他の Ca チャネルサブタイプでも CaM による調節は報告されていますか。

(回答) L型、P/Q型で報告されており、サブタイプ間で調節様式が異なります。

質問4) 生理的条件である pH7.4 ではなく、pH8.0 の buffer を使用したのはなぜですか。

(回答) 他の報告に従いました。pH7.4 との差はあまりないと考えています。

質問5) Buffer の Ca²⁺ 濃度を 2 mM に設定したのはなぜですか。

(回答) 平常時の生理的 Ca²⁺ 濃度 80 nM では、CaM は Ca²⁺ の結合していない状態 (apoCaM) であり、ペプチドへの affinity が低く、pull-down 実験では検出できません。CaM に対する Ca²⁺ の結合は Ca²⁺ 濃度が 1 μM 以上であれば飽和していると考えられますが、他の報告と同様に 2 mM に設定しました。

質問6) CaM の結合様式について説明して下さい。

(回答) 結晶構造解析などから、静電結合と疎水性相互作用の両者が関与すると報告されています。

質問7) CaM 変異体による結合実験は行いましたか。

最終試験の結果の要旨

(回答) CaM を N-lobe と C-lobe に切り離したペプチドの実験をしていますが、本研究には含めておりません。

質問 8) チャネルペプチド変異体は、どのように作りましたか。

(回答) Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いて PCR で変異を導入後、GST (glutathione-S-transferase) 融合ペプチドとして大腸菌で発現し、精製しました。変異の導入はシーケンスで確認し、精製したペプチドはゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) で純度を確認しました。

質問 9) ペプチドの立体構造はどうなっていますか。特にループ I-II ペプチドでは、断片化したことにより立体構造が実際と異なることが、実験結果に影響したのではないですか。

(回答) 本研究からは分かりませんが、立体構造が変化する可能性は考えられます。ループ I-II ペプチドについては、光学的方法を用いた実験においても affinity が低いことが報告されています。

質問 10) PreIQ-IQ ペプチドの結合実験での SDS-PAGE を示していないのはなぜですか。

(回答) PreIQ-IQ ペプチドは断片化される傾向があり、純度の点から図を示しませんでした。しかし、解析では、ペプチドの分子量を指標にして full-size のペプチドを正確に定量しました。

質問 11) PreIQ-IQ 変異体ペプチドでは、30% の CaM 結合があります。その理由を説明して下さい。

(回答) 複数の可能性があります。一つは、変異体ペプチドでも短いペプチド (preIQ と IQ) と異なり、affinity があまり低下せず一定の CaM が結合するというもの。もう一つは、preIQ と IQ の間の配列に CaM の結合能があるというものです。後者の可能性は、追加実験の結果から、低いと考えています。

質問 12) 長いペプチド (preIQ-IQ) の解離定数が短いペプチド (preIQ と IQ) より高いことについて説明して下さい。

(回答) 解析プログラムに従いベストフィットを求めた結果です。原因の一つとして、長いペプチドでは CaM 結合に関してネガティブな相互作用があることが考えられます。

質問 13) C 末端部全体のペプチドでは、解離定数はどうなりますか。

(回答) preIQ-IQ より長いペプチドでも同様な結果が得られています。

質問 14) チャネル C 末端配列に作用する調節因子が CaM 以外にありますか。

(回答) Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase II (CaMKII) や A キナーゼ (PKA) のリン酸化部位、CaMKII の結合部位があり、チャネルの活性調節を行っているとの報告があります。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。