

論 文 要 旨

CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin

〔 CavMK II は Cav1.2 型 Ca チャネル C 末部をリン酸化し、
チャネルとカルモジュリンとの相互作用を修飾する 〕

王 午陽

【序論および目的】

Cav1.2 型 Ca チャネルは、心筋や平滑筋、神経細胞の細胞膜に存在して Ca シグナリングの一翼を担い、筋収縮などの細胞機能に重要な役割を果たしている。同チャネルの活性は、カルモジュリン (CaM) や Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) により調節されているが、CaMKII による調節の分子メカニズムについてはリン酸化部位を含め不明な点が多い。そこで、このチャネル調節の分子メカニズムを解明することを目的として、チャネルのリン酸化部位の同定を試みた。さらに、チャネルのリン酸化によりチャネル活性がどのように変化するかを検討した。

【材料および方法】

- (1) 遺伝子組み換え法により、Cav1.2 型 Ca チャネルの C 末部 3 領域および同変異体の GST 融合蛋白質を作成し、それら融合蛋白質の CaMKII によるリン酸化を抗リン酸化セリン抗体および抗リン酸化スレオニン抗体を用いたイムノブロット法と ³²P を用いたオートラジオグラフ法により検討した。
- (2) Chinese hamster ovary (CHO) 細胞に野生型および変異型 Ca チャネル遺伝子を導入して、チャネルを発現させ、CaMKII のリン酸化によるチャネル機能の変化をパッチクランプ法により検討した。
- (3) チャネル C 末部の GST 融合蛋白質への CaM の結合が CaMKII によるリン酸化でどのように変化するかを、glutathione ビーズを用いた pull-down 法で検討した。

【結 果】

- (1) CaMKII は Cav1.2 型 Ca チャネルの C 末部にある複数のセリンおよびスレオニン残基をリン酸化した。C 末部の近位部にあるスレオニン 1603 をアラニンに置換した融合蛋白質ではリン酸化が見られなかったため、スレオニン 1603 がリン酸化部位の一つであることが判明した。
- (2) Ca チャネルは cell-free 条件下でその活性が減弱し、CaM により活性が回復するが、CaMKII によるチャネルリン酸化は CaM の作用を増強した。

- (3) スレオニン 1603 をアラニンに置換した変異型チャンネルでは、CaM によるチャンネル活性化が減弱し、アスパラギン酸への置換では、cell-free 条件下でのチャンネル活性が比較的高く維持され、CaM 効果も野生型と同程度だったので、この部位がチャンネルの basal activity に関与していると示唆された。
- (4) チャンネル C 末部融合蛋白質への CaM 結合を CaMKII によるリン酸化後と脱リン酸化後とで比較したところ、リン酸化後では、CaM の結合が約2倍になることが判明した。

【結論及び考察】

以上の結果より、CaMKII がチャンネル蛋白のリン酸化を介してチャンネルの電気生理学活性を調節していることが示唆された。そのリン酸化部位の一つは、スレオニン 1603 であることが判明した。同部位はチャンネルのゲート機能に深く関与している Ca 結合部位 (EF-hand 部位) と CaM 結合部位 (IQ-motif 部位) の間に位置するので、同部位のリン酸化が CaM の結合などに影響を与えてチャンネルのゲート機能を調節することが推定される。事実、スレオニン 1603 のアミノ酸変異は、チャンネル機能や CaM 結合に大きな影響を与えることが示された。おそらく、CaMKII によるリン酸化はチャンネルの構造を変えて、CaM の結合を増強させ、チャンネルの活性を増大させるのであろうと推定される。これらの考察を基に、CaMKII と CaM によるチャンネル活性調節のモデルが提唱された。

The Journal of Physiological Sciences, 2009 (in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 66 号		学位申請者	王 午 陽
審査委員	主査	小 澤 政 之	学位	博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	宮 田 篤 郎	副査	原 田 秀 逸
	副査	桑 木 共 之	副査	原 口 み さ 子

CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2
Ca²⁺ channel and modulates interaction of the channel with calmodulin

(CaMKII は Cav1.2 型 Ca チャネルの C 末部をリン酸化し、
チャネルのカルモジュリンとの相互作用を修飾する)

Cav1.2 型 Ca チャネルは骨格筋においては電位センサーとして、心筋及び平滑筋においては収縮に必要な細胞内カルシウムストアのカルシウム供給経路として生理的意義を持つ。同チャネルの活性は、カルモジュリン (CaM) や Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) により調節されているが、CaMKII による調節の分子メカニズムについてはリン酸化部位を含め不明な点が多い。そこで、学位申請者らは、このチャネル調節の分子メカニズムを解明することを目的として、チャネルのリン酸化部位を抗リン酸化セリン抗体および抗リン酸化スレオニン抗体を用いたイムノブロット法と ³²P を用いてオートラジオグラフ法により検討した。さらに、CaMKII のリン酸化によるチャネル機能の変化をパッチクランプ法により検討した。また、チャネル C 末部の GST 融合蛋白質への CaM の結合が CaMKII によるリン酸化でどのように変化するかを、glutathione ピーズを用いた pull-down assay を行って調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- (1) CaMKII は Cav1.2 型 Ca チャネルの C 末部にある複数のセリンおよびスレオニン残基をリン酸化した。C 末部の近位部にあるスレオニン 1603 をアラニンに置換した融合蛋白質ではリン酸化が見られなかったため、スレオニン 1603 がリン酸化部位の一つであることが判明した。
- (2) Ca チャネルは cell-free 条件下でその活性が減弱し、CaM により活性が回復するが、CaMKII によるチャネルリン酸化は CaM の作用を増強した。
- (3) スレオニン 1603 をアラニンに置換した変異型チャネルでは、CaM によるチャネル活性化が減弱し、アスパラギン酸への置換では、cell-free 条件下でのチャネル活性が比較的高く維持され、CaM の作用も増強されたので、この部位がチャネルの basal activity に関与していると示唆された。
- (4) チャネル C 末部融合蛋白質への CaM 結合を CaMKII によるリン酸化後と脱リン酸化後とで比較したところ、リン酸化後では、CaM の結合が約2倍になることが判明した。

以上の知見より、CaMKII がチャネル蛋白のリン酸化を介してチャネルの電気生理学活性を調節していることが示唆された。そのリン酸化部位の一つは、スレオニン1603であることが判明した。同部位はチャネルのゲート機能に深く関与している Ca 結合部位 (EF-hand 部位) と CaM 結合部位 (IQ-motif 部位) の間に位置するので、同部位のリン酸化が CaM の結合などに影響を与えてチャネルのゲート機能を調節することが推定される。事実、スレオニン 1603 のアミノ酸変異は、チャネル機能や CaM 結合に大きな影響を与えることが示された。申請者らは、CaMKII によるリン酸化はチャネルの構造を変えて、CaM の結合を増強させ、チャネルの活性を増大させるのであろうと考え、CaMKII と CaM によるチャネル活性調節のモデルを提唱している。

以上より、本研究は心筋 Ca チャネルの調節において、CaMKII が重要な役割を果たしていることを明らかにしたものであり、学位論文として十分な価値があるものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 66 号		学位申請者	王 午 陽
審査委員	主査	小 澤 政 之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	宮 田 篤 郎	副査	原 田 秀 逸
	副査	桑 木 共 之	副査	原 口 みさ子

主査および副査の5名は、平成 21年3月9日、学位申請者 王 午陽 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。

1. L型 Ca チャネルはAキナーゼ (PKA) 等によっても調節されるが、今回の CaMKII によるリン酸化との関係は？

(回答) PKA も CaMKII と同様、リン酸化によりチャネル活性を上昇させるが、そのリン酸化部位は Ser1927 であり、CaMKII のリン酸化部位とは異なっている。

2. PKA と CaMKII が同時に作用した場合、どのような結果になると予想するか？

(回答) 実験の報告がないので全くの想像だが、additive に効くと思う。

3. CaMKII は脳神経系に多いという話だが、心筋ではどうなっているか？

(回答) CaMKII には四つのサブタイプ α 、 β 、 γ と δ がある。 α と β は神経に分布し、 γ と δ は広い組織分布をしている。心筋では、 δ タイプが主である。

4. この研究で、神経に多い CaMKII α を使った理由は？

(回答) α のみがあったからである。CaMKII の触媒部位のサブタイプ間の相同性は高く、基質特異性の差は殆どない。従って、活性型ならどのタイプでも同じ結果が得られると考えた。

5. 神経組織の L 型 Ca チャネルでも同じ結果が考えられるか？

(回答) 脳神経系には CaMKII が豊富にあり、Cav1.2 チャネルも多く発現しているので、心筋 Ca チャネルと同様の調節機構が働いている可能性が十分にある。

6. CaMKII によるチャネルのリン酸化は、CaM とチャネルの結合を増強するということだが、その生理的な意義は？

(回答) CaM はチャネルとの結合を介してチャネル活性を調節しているので、CaMKII は間接的に Ca チャネルの活性を調節し、それにより心筋の拍動数や収縮力を制御すると考えられる。

7. Pull-down 実験では断片ペプチドを用いているが、チャネル全長または膜貫通領域を含むペプチドを用いた実験は行ったか？

(回答) この研究では行ってない。重要な点なので、今後の研究で検討したい。

8. Thr1603 の近傍に EF-hand 部位があるが、これがあるためにリン酸化され易いのか？

(回答) EF-hand 部位がリン酸化の効率に関係するという報告はない。この EF-hand 部位の機能については、チャネルの Ca 依存性不活性化に関係するとの報告があるが、詳細は不明である。

9. チャネルがリン酸化されると、全体の構造としてどのように変化があるか？

(回答) X線解析等の構造解析がないので想像であるが、チャンネルはリン酸化によりその構造が変化して開口確率が上がり、より多くの Ca²⁺ イオンが細胞内に流入するようになると考えられている。

1 0. Thr1603 がリン酸化されると、CaM の結合が増加する理由は？

(回答) Thr1603 のリン酸化によって、チャンネルの C 末端部の構造が変化し、CaM の結合が増加すると考えている。

1 1. 5 分間 inside-out 状態にすると CaM の作用が減弱するが、その理由は？

(回答) 5 分間以上 inside-out 状態にすると、おそらく脱リン酸化などによってチャンネルの構造が変化し、CaM に対する親和性が減弱したためと考えている。

1 2. Inside-out の 5 分間に加えた CaMKII はどういう働きをしているか？

(回答) CaMKII はチャンネルのリン酸化によって、チャンネルの構造を維持していると考えている。

1 3. 他の研究室から Ser1575 がリン酸化されると報告されているが、今回この Ser1575 のリン酸化が検出されなかった理由は？

(回答) 理由は不明であるが、一つの可能性として、CT1 ペプチドは難溶性であるので、その高次構造に研究室間で微妙な差異があるかも知れないと考えている。

1 4. それでは、CT1 部位はチャンネル全体の中でどのような構造をとっているのか？

(回答) この点は非常に重要な問題であるが、現在のところ不明である。

1 5. CaMKII に対する CaM の効果は考慮したか？

(回答) CaMKII の活性化には Ca²⁺/CaM を必要とするが、CaM にはチャンネルに対する直接作用もあるので、二つの作用を分けることが肝要である。そのために、既に活性化されたタイプである変異 CaMKII (CaMKIIT286D) を使った。

1 6. Thr1603 をアラニンとアスパラギン酸に置換した変異型チャンネルで、CaMKII の効果を検討すると、Thr1603 だけの効果かどうか判断できるのではないか？

(回答) その通りである。今回の結果で、CT2 にも少なくとも 2 つのリン酸化部位があることが判明した。変異チャンネルで CaMKII の効果が出れば、これらの部位もチャンネルの調節に関与することを示唆する。今回は Thr1603 に焦点を当てたので、その実験は行っていない。

1 7. CT1、CT2、CT3 の Coomassie Blue 染色で、複数の band が検出されたのはなぜか？

(回答) CT1、CT2、CT3 はそれぞれのレーンの最大サイズのバンドで、より小さいサイズの複数のバンドは断片化したペプチドと考えている。

1 8. Inside-out の 5 分間に phosphatase 阻害剤を作用させる実験を行ったか？

(回答) フォスファターゼ阻害剤オカダ酸の効果を見た実験がある。CaM のチャンネル活性化作用が維持されるという結果が得られている。

1 9. 外液には phosphatase を入れてないのに、なぜ脱リン酸化が起こるのか？

(回答) phosphatase が細胞膜に結合しているためと考えている。

2 0. なぜ CHO 細胞を使った？

(回答) 特に理由はないが、チャンネルの発現が良好だったので、CHO 細胞を使った。

以上の結果から、5 名の審査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。