博士（理学）　松　浦　　功

学位論文題名

カルモデュリンの標的酵素活性化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

カルモデュリンは真核生物に存在する Ca^{2+} 結合蛋白質で、Ca^{2+} 依存的に様々な酵素と相互作用しその活性を調節している。本研究では主に蛋白質化学及び蛋白質工学の手法を用いてカルモデュリンが標的酵素を活性化する分子機構について検討した。

カルモデュリン分子は二つの球状ドメイン（N-ドメインと C-ドメイン）とそれらをつなぐ一本のαヘリックス部分（セントラルヘリックス）からなり、二つのドメインはそれぞれ更に一対の EF-ハンドと呼ばれる Ca^{2+} 結合ドメインからなっている。カルモデュリンは酸性アミノ酸を多く含み、分子全体では負に帯電している。また一般にカルモデュリンの一次構造は様々な生物種間で非常によく保存されており、機能も見分けがつかない（例えば本論文中でしばしば脊椎動物カルモデュリンの代わりに用いた、軟体動物である帆立貝カルモデュリンの高次構造や機能は脊椎動物カルモデュリンのものと区別できない）。その中で真核生物の中でも最も下等である菌類に属するパン酵母（Saccharomyces cerevisiae）カルモデュリンは例外的で、その一次構造は脊椎動物のものなどに比べて非常に異なっている。本文第一部では酵母からカルモデュリンを精製し、この様な一次構造の大きな違いがカルモデュリンの機能にどのような影響を与えるかを検討した。一般にカルモデュリンは 1 モル当り 4 モルの Ca^{2+} を結合するが、酵母カルモデュリンは 3 モルしか結合しなかった。多くのカルモデュリンの標的酵素のうちから cAMP ホスホジエステラーゼ（PDE）とミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）を選んで酵母カルモデュリンによる活性化をニワトリカルモデュリンによる活性化と比較した。PDE では最大活性（V_{max}）は両カルモデュリンで変わらなかったが V_{max} の 1/2 を与えるカルモデュリン濃度（K_{act}）は酵母カルモデュリンの方が 100 倍以上大きかった。一方、MLCK では酵母カルモデュリンによる K_{act} が 1,000 倍以上大きい上、V_{max} の著しい減少もみられた。このように酵母カルモデュリンに起こっているアミノ酸残基の置換が二種類の酵素に対して異なる影響を与えたことからカルモデュリンによるそれぞれの酵素の活性化機構は異なっている可能性が考えられた。

そこで我々は酵母とニワトリカルモデュリンの機能の違いに関与する具体的な部位及びアミノ酸残基を検討することによりカルモデュリンによる酵素活性化機構を明ら

かにすることができると考えた。そのために酵母カルモデュリンとニワトリカルモデュリンを出発材料として、遺伝子操作によりそれぞれのカルモデュリンのアミノ酸残基の入れ替えを行い、得られた変異体の諸性質を調べた。そこで先ず酵母及びニワトリカルモデュリンの遺伝子を組み込んだ発現プラスミドの構築と大腸菌内での発現系の作成を行った。また、その系を使って、塩基特異的置換法及び遺伝子組み換えにより作製した種々のカルモデュリン変異体を得た。これらの結果は本文第二部で示される。

次にこれらの変異体の高次構造と機能について検討した。

第三部では先ず酵母カルモデュリンの第四ドメインを取り除いた変異体が酵母カルモデュリン同様 1 モル当り 3 モルの Ca^{2+} を結合することを示し、酵母カルモデュリンにおいて Ca^{2+} 結合能を失っているドメインが第四 Ca^{2+} 結合ドメインであることを明らかにした。

次に酵母とニワトリカルモデュリンの第四 Ca^{2+} 結合ドメインを相互に交換した変異体を作成し、それらの Ca^{2+} 結合と PDE 及び MLCK 活性化の測定、そして変異体の分子全体としてみた表面の親水（疎水）性を評価するため、逆相カラムへの保持時間を測定した。その結果 PDE の正常な活性化には Ca^{2+} を結合することによるカルモデュリン分子表面の大きな親水性の増加を伴う構造変化が決定的に重要で、必ずしも第四ドメインに Ca^{2+} が結合する必要がないことが分かった。一方 MLCK に対しては Ca^{2+} を結合することによる分子表面の親水性の変化も必要だが、それ以上に第四ドメインへの Ca^{2+} 結合が重要であることが分かった。第四ドメインへの Ca^{2+} 結合による C-ドメインでの局所的な疎水性核の形成が重要であると考えられた。

第四部ではカルモデュリンの第四ドメイン以外の部分の標的酵素活性化に対する寄与を調べるためカルモデュリンを大きく N-ドメインと C-ドメイン、及びそれらのリンカー部分（セントラルヘリックス）という三つの部分に分けてニワトリと酵母カルモデュリン間でそれぞれの部分を交換した変異体を作成し、それらの諸性質を検討した。PDE 活性化においては酵母カルモデュリンの C-ドメインをニワトリ型にするだけでホタテガイ（ニワトリ）型の活性化曲線を与えた。逆にニワトリカルモデュリンの C-ドメインを酵母型にすると活性化は酵母型になった。従って第三部の結果と合わせ、PDE の活性化に関しては C-ドメイン、特に第四ドメインの構造が特に重要であり、他の部分の構造的制約は緩いという結論に達した。MLCK については C-ドメインばかりではなく N-ドメインやセントラルヘリックスの交換によってもまたそれぞれの効果が現れ、PDE の場合とは異なった結果を与えた。MLCK の活性化についてはカルモデュリンの分子全体の構造の制約が強いと考えられた。

以上の一連の研究を通して PDE はカルモデュリン分子表面の親水性の変化を伴う構造変化を認識して活性化されることが示唆された。一方 MLCK は PDE 程カルモデュリン分子表面の親水性を認識していず、正常な活性化にはカルモデュリンの第四ドメインに Ca^{2+} が結合することが不可欠であることがわかった。

学位論文審査の要旨

主査　教授　盛田フミ
副査　教授　杉本和則
副査　教授　東　市郎
副査　助教授　矢沢道生

学位論文題名

カルモデュリンの標的酵素活性化機構に関する研究

カルモデュリンは、細胞内反応の調節機能に関わる代表的なカルシウム結合蛋白質であり、分子量17,000の分子内にEFハンドと呼ばれる構造を持つ4つのカルシウムイオン結合サイトを含んでいる。ホルモン等による外界からの刺激により、休止状態では0.1 μMであった細胞内のカルシウムイオン濃度は10 μMにまで迅速に上昇する。このようなカルシウム濃度変化として伝えられた情報は、カルモデュリンの4つのサイトへのカルシウム結合と蛋白質分子の立体構造変化を経て、酵素反応の迅速なカスケード展開に結び付けられる。カルモデュリンの標的となる酵素蛋白質は20種類以上知られているが、カルモデュリンがこれらの酵素をそれぞれ認識し、活性化する分子機構はまだ解明されていない。

本研究は、遺伝子工学的な手法を用いて酵母カルモデュリンのアミノ酸を置換し、得られたカルモデュリン変異蛋白質の性質を調べることにより、カルモデュリンの酵素活性化機構の解明に取り組んだものである。論文は四部からなり、第一部は出発物質としての酵母カルモデュリン分子の性質について、第二部はカルモデュリン及びカルモデュリン変異蛋白質を大腸菌体内に産生させるための発現システムの作製について、第三部と第四部は得られた変異蛋白質の性質の検討を中心にまとめられている。

第一部に於ては、パン酵母からカルモデュリンを精製し、脊椎動物のカルモデュリンと著しく異なることを明らかにした。アミノ酸配列の同一性が６０％しかなく、カルシウムイオンを３モルしか結合できない等のため、脊椎動物由来の標的酵素を活性化する能力が低いことを示した。遺伝子工学的な手法を用いて、性質がはっきり異なるアミノ酸の置換を順に脊椎動物にみられる残基に変えることで酵素の活性化に関与する部位がわかり、酵素の活性化機構が解明できると推定した。これに基ずいて、第二部では、酵母カルモデュリン、脊椎動物（鶏）カルモデュリン、及びこれらを使ったカルモデュリン変異蛋白質を大腸菌体内に産生させるシステムを作り上げた。

第三部では、アミノ末端から４番目のカルシウム結合サイトに関する変異カルモデュリンの性質を述べている。まず、酵母カルモデュリンではこのサイトにカルシウムが結合できないことをあきらかにした。しかしながら、このサイトを取り除いた変異カルモデュリンでは酵母カルモデュリン同様に３モルのカルシウムを結合できるにも拘らず標的酵素を活性化できないこと等から、酵素の活性化とその特異な高次構造を保つためにはこの部分が必須であることを明らかにした。次に酵母カルモデュリンと鶏カルモデュリンの第４カルシウム結合サイトを相互に交換した変異体を作製し、それらのカルシウム結合と酵素活性化を測定した。また逆相カラムへの保持時間の大きさからカルシウム結合による分子の親水性の変化を推定した。

第４部ではカルモデュリン分子を、Ｎ－ドメイン、セントラルヘリックス、Ｃ－ドメインの３つの部分に分け、鶏と酵母カルモデュリンの間でそれぞれの部分を相互に交換した変異体を作製して、それぞれの部分の酵素活性化に対する寄与を検討した。

以上の結果から、ホスホジエステラーゼの活性化には第４カルシウム結合サイトを中心としたＣ－ドメインの構造が重要であること、また、カルシウム結合にともなって出来る分子表面の親水性領域がこの酵素との相互作用に重要であることを指摘した。これに対して、ミオシン軽鎖キナーゼの活性化にはＣ－ドメインだけではなくＮ－ドメイン、セントラルヘリックスも含めた分子全体の構造の制約がより大きいこと、４つのカルシウムの結合が必須であることが示された。

申請者は、カルモデュリン分子の異なる領域が異なる標的酵素を認識して活性化するという考え方を提出した。これはカルモデュリンの酵素活性化機構の解明に重要な提案であり、審査員一同申請者は、博士（理学）の資格を得るに十分であると認めた。