

# 細胞内繊維構造体の構造と機能解明

## — カルポニンとデスミン中間径フィラメントとの相互作用 —

藤井敏弘

信州大学 繊維学部 感性工学科

### 3. 結果及び考察

#### 1. 緒言

3種の細胞内の繊維構造体の中で直径 10 nm の中間径フィラメントは多様な構成成分をもち、ほとんど全ての細胞に含まれている。このフィラメントは細胞内に網目状に分布し外的圧力に抵抗性を有することがノックアウトマウスを使った研究などから知られている。このため細胞や組織の形態形成と維持などの機能に深く関係する。

カルポニン (CaP) はアクチン/カルモデュリン結合蛋白質として平滑筋において見いだされた分子量 32,333 の塩基性蛋白質である。多くの研究は収縮の調節因子としての生理機能に重点をおいて行われたが、免疫組織化学からの研究では CaP は収縮ゾーンのみならず細胞骨格ゾーンにも分布することを示した。実際、デスミン 中間径フィラメント、微小管、ミオシン、S100、リン脂質などとの結合性が報告されてきている。このことは、全ての細胞内の繊維構造体 (マイクロフィラメント、微小管、中間径フィラメント) と相互作用を示すコーディネート分子として CaP を位置づけできる。

本研究は、CaP のデスミン中間径フィラメントとの相互作用に注目して、その諸性質を検討した。次に、デスミン分子上での結合部位を調べた。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 蛋白質の調製

CaP, デスミン, トロポミオシン, SM22 は鶏砂囊より、ビメンチンは牛水晶体より精製した。アクチンは兎骨格筋より、微小管, チュープリン, カルモデュリン, S100 は豚脳より精製した。

##### 2.2 CaP と各蛋白質との相互作用

結合は sedimentation assay, 濁度法, 電子顕微鏡観察, affinity chromatography, アミノ酸シーケンス, chemical cross-linking 反応, MALDI TOF-MS などで測定した。

##### 3.1 CaP とデスミン中間径フィラメントの結合の性質

CaP はデスミン中間径フィラメントと共沈した。結合モル比は約 1 で、見かけ上の  $K_d$  値は  $5.3 \times 10^{-6}$  M であった (Fig. 1)。結合は、高速遠心 ( $100,000 \times g$  for 30 min) の条件下ばかりか、低速遠心 ( $14,000 \times g$  for 30 min) の条件でも観察された。両者の混合液は各々の溶液よりはるかに高い濁度を示した。電子顕微鏡観察において、デスミンのフィラメントが束状になり、太いフィラメント像が得られた。以上の結果、CaP が個々のデスミン繊維の側面で結合し、束形成を引き起こしていることが判明した。

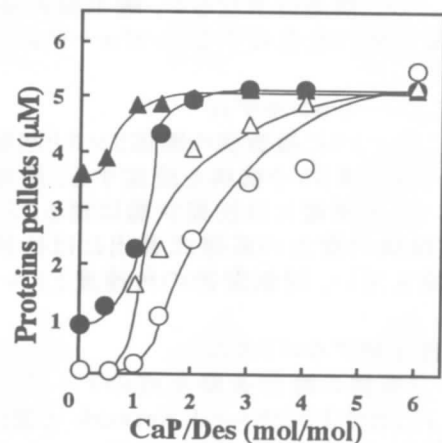


Fig. 1. Sedimentation analysis of the interaction of calponin with desmin filaments.

Desmin was incubated with various concentrations of calponin. The binding of calponin to desmin filaments was examined by the low-speed and high-speed sedimentation methods in which the protein compositions of supernatants and pellets were analyzed by 10% SDS-PAGE. The amounts of calponin (○, △) and desmin (●, ▲) in the pellets obtained by low-speed (○, ●) and high-speed (△, ▲) sedimentation were determined by densitometry.

##### 3.2 関連蛋白質による相互作用への影響

CaP 結合蛋白質であるカルモデュリン, S100, アクチン, チュープリン, トロポミオシンと関連蛋白質である SM22 による CaP-デスミン相互作用への影響を調べた。CaP のデスミンとの結合はカルモデュリン, S100 によりカルシウム存在下で抑制される傾向を示した。チュープリンに

において弱い結合阻害が見られたが、他の蛋白質は影響を与えなかった。

### 3.3 デスミン分子上での結合部位の分析

鶏砂囊デスミンは 463 個のアミノ酸から成る分子量 53,279 の蛋白質でその分子構造は head, rod, tail の3つのサブ構造に分けられる (Fig. 2)。キモトリプシンによる限定分解により得られた rod domain-rich デスミンはフィラメントを形成し、CaP と共沈した。しかしながら、さらなる分解は、フィラメント形成能が消失するため、CaP immobilized affinity chromatography による実験を行った。この結果、26 kDa と 18 kDa のフラグメントに結合性が見られた。そのアミノ酸配列を決定したところ、Glu74～と Arg139～のポリペプチドであることが明らかとなった。

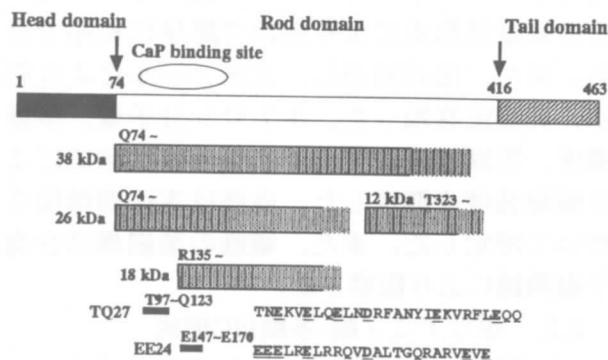


Fig. 2 Localization of chymotryptic fragments and synthesized peptides in the rod domain of desmin  
The diagram shows the head, rod, and tail domains of the desmin molecule. The positions of chymotryptic fragments and the peptides TQ27 and EE24 are indicated.

### 3.4 合成ペプチドの分子設計と生理作用

デスミンと同じタイプ (Ⅲ型) で、最も一般的な中間径フィラメントであるビメンチンは CaP との結合性を示した。また、この結合はポリ-L-グルタミン酸により阻害されることがわかった。これらの結果から、デスミン分子上 Thr(T)97～Gln(Q)123 と Glu(E)147～Glu(E)170 に結合部位があるのではと推定して、これに相当するペプチド TQ27: TNEKVELQELNDRFANYIEKVRFLFLEQQ と EE24: EEELRELRRQVDALTGQRARVEVE を合成した (Fig. 2)。TQ27 と EE24 両者とも CaP と結合性を有することが chemical cross-linking + SDS-PAGE あるいは TOF/MS による分析で明らかとなった (Fig. 3)。次に、sedimentation assay を用い結合への影響を調べたところ、TQ27 はカルボニンとのモル比 150 まで何の影響も与えないが、EE24 はモル比 50 で約 30% 結合を抑制した。

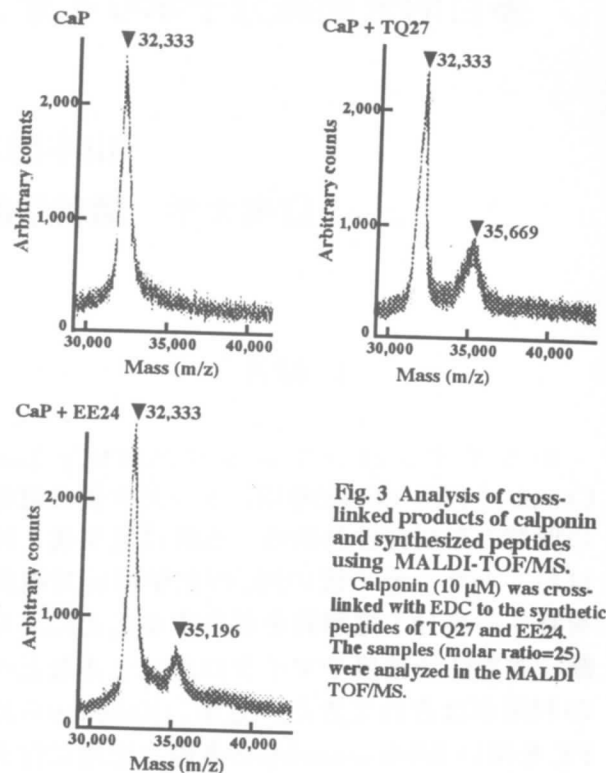


Fig. 3 Analysis of cross-linked products of calponin and synthesized peptides using MALDI-TOF/MS.  
Calponin (10  $\mu$ M) was cross-linked with EDC to the synthetic peptides of TQ27 and EE24. The samples (molar ratio=25) were analyzed in the MALDI TOF/MS.

## 4. 結論

1. CaP の デスミンへの結合は、このフィラメントの束形成を引き起こすことを見いだした。この生理機能から CaP は、デスミン-結合蛋白質の1種との見方を可能とする。
2. デスミン分子上での CaP との結合は、その rod domain 中の酸性領域に含まれていた。合成ペプチド研究の結果等から、rod domain 中の N 末側がターゲットと考えられる。
3. TQ27 とオーバーラップするペプチド (Lys100～Leu134) がデスミンフィラメントを脱重合させる能力が報告されているが、TQ27 にはこのような作用が見られなかった。中間径フィラメントのアンタゴニストの類はほとんど知られていないので、細胞内の中間径フィラメントの構築をコントロールする物質の開発にもつながることが期待される。