

細胞内繊維構造体の構造と機能解明 ー カルポニンに関する研究ー

藤井敏弘

信州大学 繊維学部 感性工学科

1. 緒言

細胞内の繊維構造体はその太さと構成成分から、6 nm のアクチン繊維、10 nm の中間径繊維、24 nm の微小管に大別されている。これらは、細胞内膜から核に至るまで隈無く分布している。このため細胞の形態形成と維持、運動、分泌、顆粒の輸送などの機能をはたすものと考えられている。

カルポニン (CaP) は分子量約 33 kDa のアクチン (Act)/カルモデュリン (CaM) 結合蛋白質で平滑筋の収縮-弛緩の調節因子として見いだされた。その後の研究において微小管 (MTs) の主成分のチューブリン (Tub)、中間径フィラメントの成分であるデスミン (Des) と相互作用することが知られている。これらに加え、ミオシン、S100、カルデスモン、ある種のリン脂質との結合性も報告されている。この中で、S100、リン脂質、微小管との相互作用は私たちにより見いだされ報告されている。これらのことは、CaP が3種の細胞内繊維構造体の成分を含めた様々な蛋白質等と相互作用をする多機能型蛋白質であることを示唆している。この分子メカニズムを調べることはこの種の蛋白質の制御やデザインに有意義と考えられる。

本研究では、1. Tub の CaP との結合における分子種と結合ドメインの解析 2. 鶏由来の CaP (cCaP) の cDNA を大腸菌で発現させ (rCaP)、精製法の確立、同定、生化学的な性質について検討した。

2. 実験方法

2.1 蛋白質の調製

cCaP, Des は鶏砂囊、Act は兎骨格筋より、Tub, MAP2, タウ, CaM は豚脳より精製した。

2.2 rCaP の同定

SDS-PAGE, DE MALDI-TOF/MS, イムノブロットを用いて行った。

2.3 CaP と各蛋白質およびリン脂質との相互作用

結合は sedimentation assay, 濁度法, affinity chromatography, chemical cross-linking 反応, イムノブロット, MALDI TOF-MS など で測定した。

3. 結果及び考察

3.1 CaP との結合 Tub 分子種の分析

Tub は α と β サブユニットから構成され、各6～7個の多重遺伝子によりコードされている。また、翻訳後、リン酸化、アセチル化、グルタミル化、チロシン化などの修飾を受ける (Fig. 1)。そこで、EDC によって架橋される CaP-Tub 複合体を Tub の抗体と反応させた結果、複合体は α よりも β の抗体と強く反応した。 β 分子種としては、 $\beta I + \beta II \gg \beta III$ の反応性を示した。さらに、アセチル化とチロシン化 Tub を認識する抗体とはほとんど反応しなかった。

3.2 酸性ポリアミノ酸、MAP2、限定分解の CaP-Tub 相互作用への影響

CaP の微小管との結合は酸性ポリアミノ酸や MAP2 の添加により阻害を受けた。また、ズブチリシン処理した微小管 ($\alpha\beta$ s) との結合は抑えられた。そこで、Tub 分子上での MAP2, タウとの結合部位 (α -KE & β -YG) 及びズブチリシンのより遊離される部位 (β -GA) の3種類のポリペプチドを結合部位と考えられるためそれらを合成した (Fig. 1)。

3.3 合成ペプチドの CaP との結合性と CaP-Tub 相互作用に与える影響

3種類の合成ペプチドを CaP と混ぜ EDC 処理後、TOF/MS で分析したところ、3種とも CaP との結合が見られた。特に β -GA においてはモル比 5 までの複合体の形成が見られた (Fig. 2)。次にこれら合成ペプチドの CaP-Tub 相互作用に与える影響を調べたところ、sedimentation assay ではモル比 300 までいずれも影響が見られなかった。しかしながら、化学架橋反応においては、 α -KE と β -GA において濃度依存的な阻害が見られた。

3.4 rCaP の調製と同定

CaP は低分子量で熱安定性にすぐれ、取り扱い易い蛋白質の 1 種である。そこで、CaP 側の分子メカニズムを調べるためには、遺伝子組換えテクニックの使用が有意義であるものと考えた。

rCaP は鶏 CaP-cDNA を pAED4 発現ベクターに組み込み、E.coli (BL21) にトランスフォームした (大阪府立成人病センター 高橋克仁博士より供与)。菌体を LB 培地にて培養し、さらに IPTG による蛋白合成を誘導した。菌体粗抽出液を陽イオン交換樹脂 (Accel CM) カラム、ゲルろ過 (AcA54) により精製した。500 ml の培溶液からの収量は、約 5 mg であった。

SDS-PAGE により、rCaP 標品がほぼ単一であり、cCaP のバンドと同じ位置に検出した。TOF/MS で分子量を測定した結果、cCaP, rCaP での分子量は 32,321.6, 32,309.2 を示した。電気泳動の結果と合わせ cCaP と rCaP はほぼ同じ分子量をもつ蛋白質であることが示された。また、イムノプロットの結果、両者は免疫化学的にも同一物であることが判明した。

3.5 rCaP の生化学的な性質と cCaP との比較

Act, MTs, Des との相互作用: F-Act, MTs, Des は細胞内繊維構造体であり、cCaP がこれら 3 種類のフィラメントと共沈する条件で rCaP の結合性を調べると、cCaP 同様な相互作用が見られた。cCaP はこれらフィラメントの構成成分である Act, Tub と EDC による反応により 1:1 の複合体を形成する事が知られている。rCaP においても複合体の形成が見られた。

CaM との相互作用: CaM は CaP の 3 種のフィラメントとの結合をカルシウム存在下において抑制する。共沈法を用いて rCaP のこれらフィラメントとの結合への影響を調べたところ、同様な阻害作用が見られた。また直接の相互作用は EDC による化学架橋反応において見られた。

リン脂質との相互作用: リン脂質リボソームの中で、cCaP は PS, PI, PIP2 とは結合するが PC とは結合性を持たないことを我々は報告している。今回 PS のみを用いて調べたところ rCaP においても結合性が見られた。

4. 結論

1. CaP の Tub との結合部位は Tub の MAP2, タウ, キネシンとの結合部位と一部重複することが考えられる。

2. 大腸菌で発現させ精製した rCaP は鶏砂囊か

らの cCaP とほぼ同じ性質を示すことから、deletion mutant を作成し CaP 結合蛋白質との結合部位を決定し、多機能性の分子メカニズムを解明する予定である。

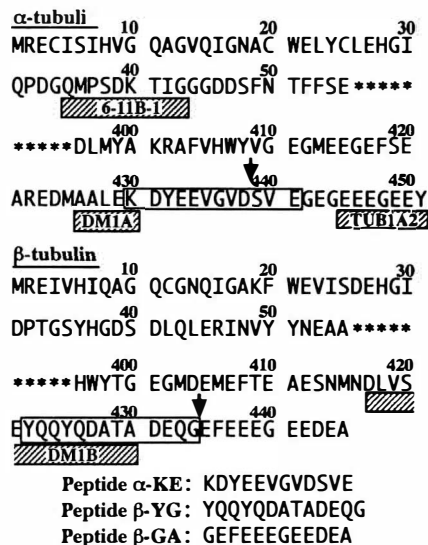


Fig. 1 Schematic illustration of epitope locations, cleavage sites, and binding sites for MAP2 on C-terminal sequence of porcine α and β tubulins.

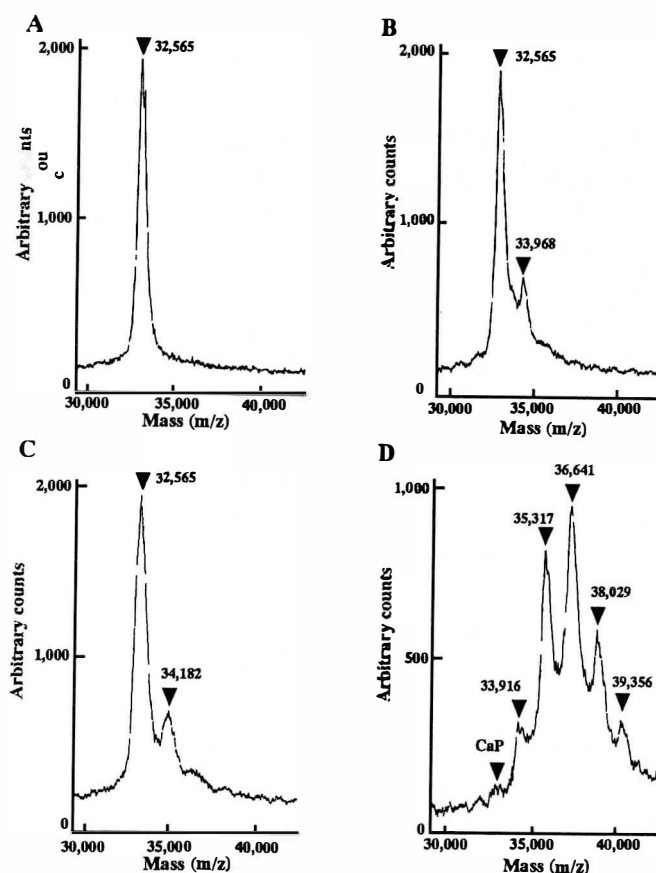


Fig. 2 Analysis of cross-linked products of calponin and synthesized peptides using DE MALDI-TOF mass spectrometry. The synthetic peptides of α-KE (KDYEEVGVDVSVE), β-YG (YQQYQDATADEQG), and β-GA (GEFEEEGEEDEA) derived from α and β tubulins (See Fig. 1) were cross-linked with EDC to calponin (7.3 μM). A, CaP; B, CaP+α-KE; C, CaP+β-YG; D, CaP+β-GA.