

氏 名 森 誠 之

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第480号

学位授与の日付 平成12年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Interaction between the Voltage-Dependent Sodium
Channel and Calmodulin

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 池 中 一 裕
教 授 井 本 敬 二
教 授 永 山 國 昭
助 教 授 飯 尾 隆 義 (名古屋大学)

論文内容の要旨

活動電位はニューロンや筋細胞などの興奮性細胞に見られる特有の膜電位変化である。この活動電位の発生には幾つかのチャンネル分子が関与しているが、彼は、このうちの一つである電位依存性ナトリウムチャンネルについて研究を行ってきた。彼の目的はこの活動電位の発生機構の詳細を調べる為にこのナトリウムチャンネルに結合する蛋白質を探し、機能への関与を検討することにあった。まず最初に脳に最も多く発現しているナトリウムチャンネルのカルボキシル末端ドメインを用い、これに結合する蛋白質をラット脳から探索した。方法として、細胞内の環境に近い形でスクリーニングするため、酵母 Two-Hybrid 法を用いた。

その結果、新規結合分子としてカルモジュリンを同定した。カルモジュリンはカルシウムシグナル系の中心的分子であるが、細胞が興奮する際に機能する点においてナトリウムチャンネルと共通性を持っていることから、興味深い分子間相互作用であると思われる。そこで更にナトリウムチャンネルと、カルモジュリンの相互作用を解析した。その結果、カルモジュリンがナトリウムチャンネルの 1901~1938 アミノ酸残基の領域に結合することを明らかにした。またナトリウムチャンネル由来の融合蛋白質を用いてカルシウム依存性について検討したところ、カルシウム依存的に起こるカルモジュリンの一般的な結合とは異なり、カルシウム存在、非存在下、何れにおいてカルモジュリンはナトリウムチャンネルの C 末に 1:1 の割合で結合していた。加えて、興味深いことにカルシウム非存在下においてより強い結合を示していた。この様に珍しい性質をもつ分子間相互作用を検討するため、ナトリウムチャンネル由来のペプチドを用いて詳細に解析した。この結果、カルモジュリンとペプチドの複合体の構造上の差異を、ダンシルカルモジュリンを用いた蛍光スペクトルの変化から初めて見出すことができた。更にこの複合体の 2 次構造を円偏光二色法を用いて比較したところ、両者の相違は約 5 アミノ酸残基分のアルファヘリックスに相当していることが明らかになった。これらのことを総合的に判断するとナトリウムチャンネルとカルモジュリンは、構成的に複合体を形成しており、カルシウム依存的に複合体の構造を変化しているものと考えられた。

昨年、ナトリウムチャンネルと最も相同性の高い電位依存性カルシウムチャンネルにおいて、カルモジュリンがやはり C 末ドメインに結合し、そのカルシウム依存的なチャンネルの不活性化に関与していることが相次いで報告された。そこで、これらの結果を踏まえ、カルモジュリンのナトリウムチャンネルへの関与を電気生理学的な実験を行い検討した。現在、基本的なチャンネル活性について解析を行ってきたが、今のところ大きな変化は得られていない。しかしながら、本研究で用いているナトリウムチャンネルの以外のサブタイプにも本研究で明らかとなったカルモジュリン結合部位は高い相同性を持って存在している。このことから、今後も他のサブタイプも踏まえ、カルモジュリンのナトリウムチャンネルへの関与について研究を続行したいと考えている。

論文の審査結果の要旨

活動電位はニューロンや筋細胞などの興奮性細胞に見られる特有の膜電位変化である。この活動電位の発生には幾つかのチャンネル分子が関与しているが、申請者は、このうちの一つである電位依存性ナトリウムチャンネルについて研究を行ってきた。申請者の目的はこの活動電位発生機構の詳細を調べる為にこのナトリウムチャンネルに結合する蛋白質を探し、機能への関与を検討することにあった。まず最初に脳に最も多く発現しているナトリウムチャンネルのカルボキシル末端ドメインを用い、これに結合する蛋白質をラット脳から探索した。方法として、細胞内の環境に近い形でスクリーニングするため、酵母 Two-Hybrid 法を用いた。

その結果、新規結合分子としてカルモジュリンを同定した。カルモジュリンはカルシウムシグナル系の中心的分子であるが、細胞が興奮する際に機能する点においてナトリウムチャンネルと共通性を持っていることから、興味深い分子間相互作用であると思われた。そこで更にナトリウムチャンネルと、カルモジュリンの相互作用を解析した。その結果、カルモジュリンがナトリウムチャンネルの 1901~1938 アミノ酸残基の領域に結合することを明らかにした。またナトリウムチャンネル由来の融合蛋白質を用いてカルシウム依存性について検討したところ、カルシウム依存的に起こるカルモジュリンの一般的な結合とは異なり、カルシウム存在、非存在下、何れにおいてカルモジュリンはナトリウムチャンネルの C 末に 1:1 の割合で結合していた。加えて、興味深いことにカルシウム非存在下においてより強い結合を示していた。この様に珍しい性質をもつ分子間相互作用を検討するため、ナトリウムチャンネル由来のペプチドを用いて詳細に解析した。この結果、カルモジュリンとペプチドの複合体の構造上の差異を、ダンシルカルモジュリンを用いた蛍光スペクトルの変化から初めて見出すことができた。更にこの複合体の 2 次構造を円偏光二色法を用いて比較したところ、両者の相違は約 5 アミノ酸残基分のアルファヘリックスに相当していることが明らかになった。これらのことを総合的に判断するとナトリウムチャンネルとカルモジュリンは、構成的に複合体を形成しており、カルシウム依存的に複合体の構造を変化しているものと考えられた。

現在、イオンチャンネルの局在や活性調節にカルシウムが非常に重要な働きをしていることが明らかとなりつつあるが、どのような機序で行われているか不明であった。申請者の発見はこの問題解決のために大きな 1 歩となるものであり、評価できる。また、学位論文は十分に洗練された英語で書かれており、内容の一部は既に Biochemistry に受理されているので、内容、語学力ともに学位を与えるのに充分であると判断された。

また、学位論文の内容と一般生理科学の知識について口頭発表の形式で試験が行われた。学位論文およびその関連分野の知識について非常によく把握していた。本論文は英語で書かれており、また申請者を筆頭著者とする英文論文が既に刊行されていることから、英語力も十分なものと判定した。以上、総合的に判断し学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判断した。