

博士学位論文

活性イオウ分子による
カルモデュリンキナーゼ II 活性制御

平成 31 年

昭和薬科大学大学院 薬学研究科

薬学専攻 博士課程

荒木 笙馬

目 次

1. 序論.....	1
2. 実験材料と方法.....	11
2-1. 試薬.....	11
2-2. プラスミドの構築.....	11
2-3. 抗体.....	12
2-4. 細胞培養、遺伝子導入、活性イオウ分子処置.....	12
2-5. Bacmid/バキュロウイルスの作製、組み換え CaMKII の発現、精製.....	13
2-6. 細胞の可溶化、免疫沈降法.....	13
2-7. CaMKII 活性測定.....	14
2-7. 電気泳動およびウェスタンブロッティング.....	14
2-8. 変法ビオチンスイッチアッセイ.....	15
2-10. CSE/シスチンによる CysSSH 産生及び、蛍光プローブによる活性イオウ分子産生の検出.....	15
2-11. 統計処理.....	16
3. 結果.....	17
3-1. 活性イオウ分子処置による CaMKII 活性への影響.....	17
3-2. Ca ²⁺ /CaM 及び自己リン酸化 CaMKII に対する活性イオウ分子の影響..	19
3-3. 活性イオウ分子による CaMKII 活性阻害の可逆性.....	22
3-4. 活性イオウ分子による CaMKII 阻害様式の検討.....	24
3-5. 活性イオウ分子による CaMKII 修飾部位の検討.....	26
3-6. 内在性 CaMKII 活性に対する活性イオウ分子処置の影響.....	30
3-7. RAW264.7 細胞における LPS 及び PAG の CaMKII 活性への影響.....	32

4. 考察.....	34
5. 結論	39
6. 参考文献	40
7. 謝辞	48
8. 本論文内容の誌上発表	49

CysSSH は、生体内において含硫アミノ酸代謝酵素であるシスタチオンβ-シンターゼ (Cystathionine β-synthase: CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (Cystathionine γ-lyase: CSE) によって、シスチンを基質に、ピリドキサルリン酸 (Pyridoxal 5'-phosphate: PLP) を補酵素にして産生されることが報告されている⁶⁾。また、近年 CBS や CSE に加えて、システイン tRNA 合成酵素 (Cysteinyl-tRNA synthetase: CARS) によって、システインを基質に、より効率的に CysSSH が産生されることが明らかとなった⁷⁾。興味深いことに、CysSSH は CARS によってタンパク質の翻訳過程でアミノアシル tRNA に組み込まれることで、翻訳時修飾としてタンパク質に組み込まれることもわかっている⁷⁾ (Fig. 2)。

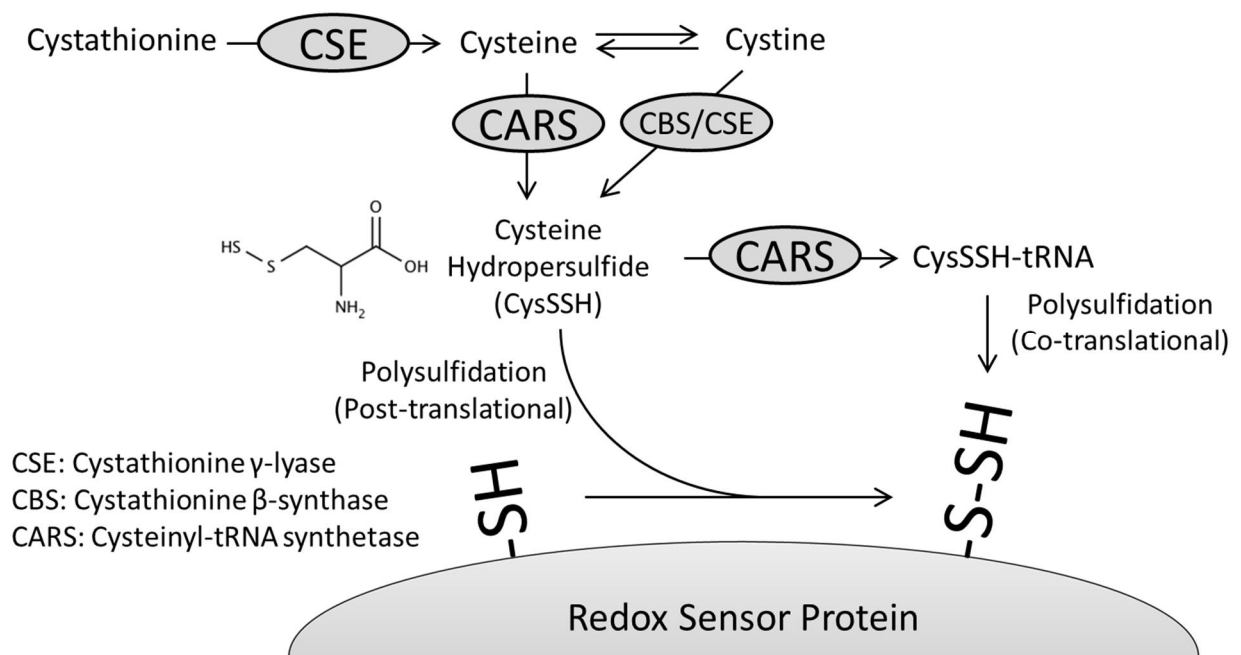


Fig. 2. 活性イオウ分子の産生とタンパク質ポリスルフィド化

「*Nat. Commun.* 8,1177 (2017) .」⁷⁾より引用改変。

シスチンを基質としたシスタチオニン β -シンターゼ (CBS)、シスタチオニン γ -リアーゼ (CSE) によるシステインハイドロパー sulfid 産生と、CSE によるシスタチオニンからのシステイン供給を介したシステイン tRNA 合成酵素 (CARS) による CysSSH 産生を示した。加えて、産生された CysSSH によるイオウ転移反応を介した翻訳後のタンパク質ポリスルフィド化と、CARS による tRNA 合成に際して、CysSSH が tRNA に取り込まれることにより生じる翻訳時のタンパク質ポリスルフィド化について示した。

ポリスルフィド化修飾の意義について、細胞の分化、増殖に関与するリン酸化酵素である分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (Mitogen activated protein kinase: MAPK) シグナルの一員である MAPK kinase 1 (MEK1) は Cys³⁴¹ のポリスルフィド化により下流のキナーゼである細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular regulated protein kinase: ERK) のリン酸化及び、核移行を促進し、ポリ (ADP) リボースポリメラーゼ-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1: PARP1) の活性化を介して DNA 損傷の修復を促している⁸⁾。また、チロシン脱リン酸化酵素 1B (Protein tyrosine phosphatase 1B: PTP1B) は、小胞体ストレス条件下において Cys²¹⁵ がポリスルフィド化され、その活性が阻害されることが報告されている⁹⁾。これらのことから、活性イオウ分子はタンパク質のポリスルフィド化を介してリン酸化シグナルを制御していることが考えられる。また、リン酸化シグナルの他にも、細胞の老化、長寿に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (Sirtuin1) など、多くのタンパク質がポリスルフィド化のターゲットとなっている¹⁰⁾。

活性イオウ分子によるポリスルフィド化は、親電子物質の一種である一酸化窒素 (NO) による、*S*-ニトロシル化と同部位のチオール基に生じる例が報告されている。内皮型の NO 合成酵素 (Endothelial NO synthase: eNOS) においては、Cys⁴⁴³ の *S*-ニトロシル化によりその活性が阻害されるのに対して、同部位のポリスルフィド化はその活性に影響を及ぼさない。しかしながら、eNOS は Cys⁴⁴³ がポリスルフィド化されることで、*S*-ニトロシル化による活性阻害を受けなくなる¹¹⁾。また、肝細胞やマクロファージにおいて、腫瘍壊死因子 α (Tumor Necrosis Factor α : TNF α) 刺激により CSE、誘導型 NO 合成酵素 (Inducible NOS: iNOS) が順次発現誘導される。このとき、CSE の発現誘導に伴い、核内因子 κ B (Nuclear factor- κ B: NF- κ B) のサブユニットである p65 タンパク質は

Cys³⁸がポリスルフィド化されることで活性化される。次いで iNOS が発現誘導されると、同部位が S-ニトロシル化されることで不活化される¹²⁾。したがって、TNF α 刺激による NF- κ B シグナルは、活性イオウ分子と NO による同部位の修飾を介して時間的な調節を受けている。また、ポリスルフィド化と S-ニトロシル化は、いずれも Acid-base motif という独特な配列のもとに生じやすいことが報告されている¹³⁾。これらのことから、タンパク質の同一のシステイン残基における活性イオウ分子と NO のクロストークが示唆されている。

カルモデュリンキナーゼ II (Calcium/calmodulin dependent protein kinase II: CaMKII) は、Ca²⁺/カルモデュリン (Calmodulin: CaM) 複合体により活性化されるセリン/スレオニンタンパク質リン酸化酵素である。CaMKIIには、 α 、 β 、 γ 、 δ の4つのアイソフォームが存在し、 α 、 β は中枢神経系に、 γ 、 δ は末梢組織に発現している¹⁴⁾。また、それぞれ幅広い基質特異性を有していることから、多機能キナーゼとして多くの生理・病態への関与が知られている。CaMKIIは、N末端から、キナーゼドメイン、調節ドメイン、会合ドメインで構成され、会合ドメインによりオリゴマーを形成する (Fig. 3)¹⁵⁾。

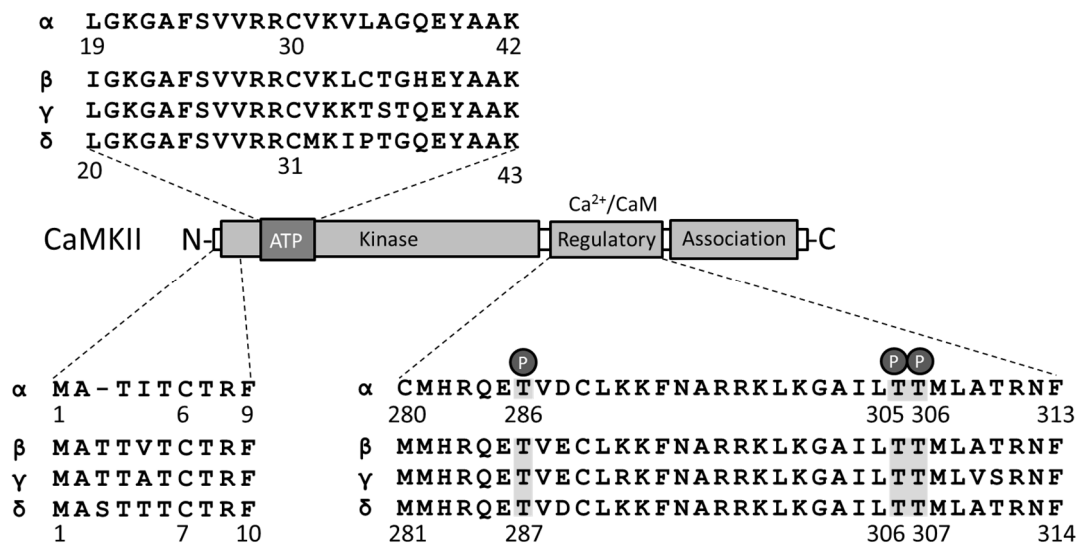


Fig. 3. CaMKII の一次元構造及びリン酸化部位の模式図

「*J. Biol. Chem.* 264, 17907–17912 (1989) .」¹⁵⁾、 「*PLoS Biol.* 8, (2010) . 」

¹⁶⁾より引用改変。

CaMKIIの一次構造をリボンで示した。CaMKII α 、 β 、 γ 、 δ アイソフォームの配列を、S-ニトロシル化部位である Cys⁶または Cys³⁰を含む領域と調節ドメインについて示した。自己リン酸化部位であるスレオニン残基をグレーで示した。

CaMKIIの活性化機構は、他のCaMKであるCaMKI、CaMKIVとは異なっている。CaMKI、CaMKIVは、Ca²⁺/CaM結合とCaMKキナーゼ（CaMKK）によるリン酸化（CaMKIではThr¹⁷⁷、CaMKIVではThr¹⁹⁶）により最大活性化される。一方、CaMKIIは、Ca²⁺/CaMにより活性化されると、自身のThr²⁸⁶をリン酸化する。CaMKIIのThr²⁸⁶のリン酸化はCaMKIIの最大活性には影響しないが、Thr²⁸⁶がリン酸化されることで、Ca²⁺濃度が低下し、CaM結合が解除されても、一部活性が維持される（Fig.4）。

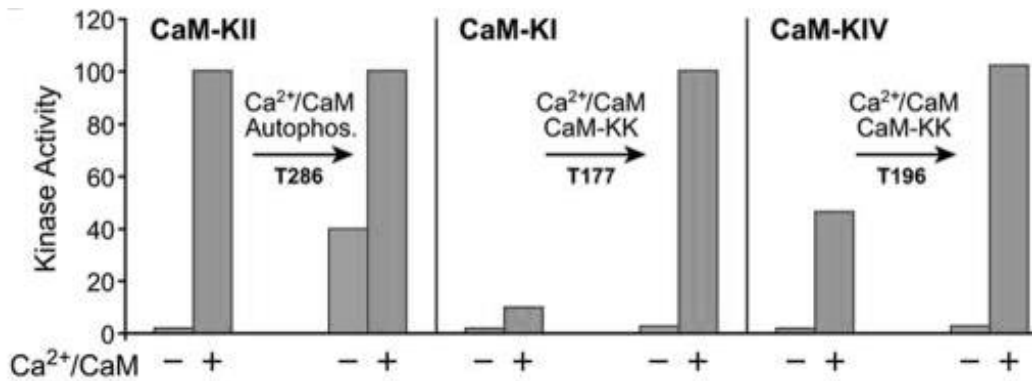


Fig. 4. CaMKs のリン酸化による活性化

「*Neuron* 59, 914–31 (2008) .」¹⁷⁾ より引用改変。

CaMKII と CaMKI、CaMKIV の非リン酸化体、及びリン酸化体の Ca²⁺/CaM 存在下、非存在下における活性を図示した。CaMKII が、Thr²⁸⁶ のリン酸化により Ca²⁺/CaM 非存在下においても、活性が維持されることを示した。

CaMKII は、細胞内カルシウム濃度が低い、いわゆる定常状態では、触媒領域に自己制御領域が蓋をする形で存在し、自らの活性を抑制している (Fig. 5A)。イオンチャネルを介して、細胞外や小胞体から細胞質内へカルシウムが流入すると、自己制御領域に $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が結合し、自己抑制が外れることで活性化される。CaMKII が活性化されると基質タンパク質の (-R-X-X-S/T) をリン酸化する (Fig. 5B)。また、基質のリン酸化と同時に、自己制御領域に位置する Thr²⁸⁶ が自己リン酸化される (Fig. 5C)。Thr²⁸⁶ がリン酸化された状態では、細胞内カルシウム濃度の低下に伴う CaM との結合が解除されてもキナーゼの活性化状態を部分的に維持することができ、(50-80%) $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的な活性を示す (Fig. 5D) ¹⁸⁾。Thr²⁸⁶ の Ala 変異体 (T286A) は野生型と同程度の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存的活性化を示すが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的活性を示さない。加えて、T286A ノックインマウスは海馬の長期増強を示さないことから、記憶形成には CaMKII の自己リン酸化による $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的活性が重要である ¹⁹⁾。また、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的活性による CaMKII の CaM 結合部位である Thr^{305/306} のリン酸化は CaM 結合を阻害し、Thr^{305/306} のリン酸化により CaMKII は完全に $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的酵素となる (Fig.5E) ²⁰⁾。

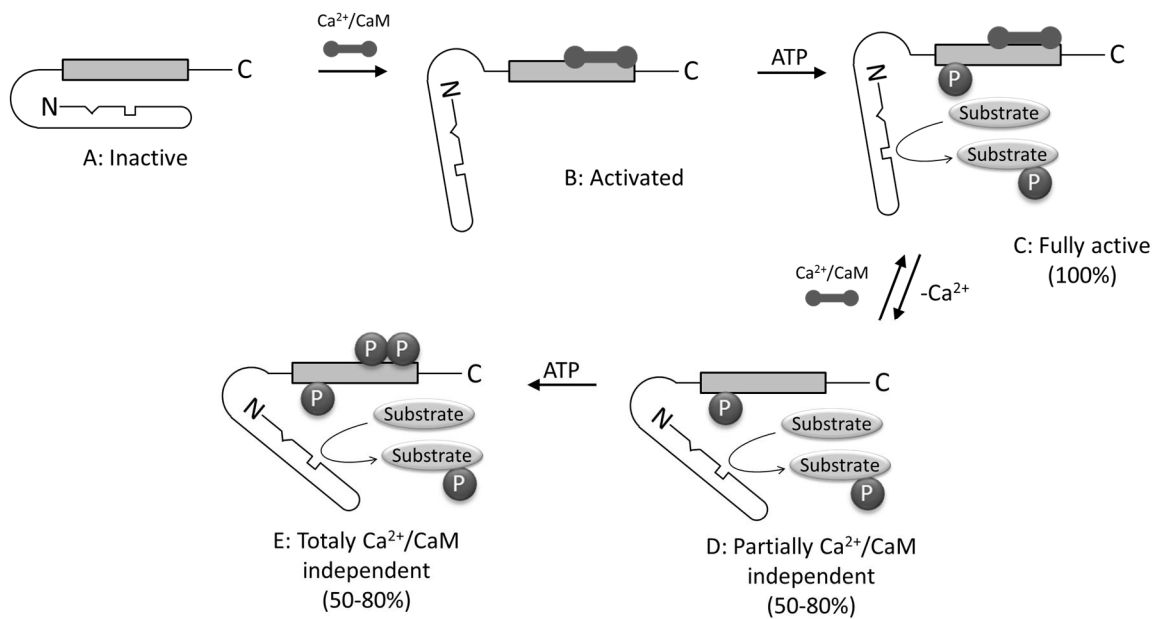


Fig. 5. CaMKII の活性化の模式図

「*Curr. Top. Cell. Regul.* 31, 181–221 (1990).」²¹⁾より引用改変。

CaMKII の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 及び自己リン酸化による活性化機構について CaMKII の活性化状態の模式図を示した。N 末端の ATP 結合部位を三角形の溝で、触媒部位を四角形の溝で示した。自己制御領域はグレーの四角形で示した。

(A) $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非結合時の CaMKII (B) $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合 CaMKII (C) $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合、 Thr^{286} 自己リン酸化 CaMKII (D) Thr^{286} 自己リン酸化 CaMKII (E) Thr^{286} ,

305, 306 自己リン酸化 CaMKII

これまでに当研究室では、NOによるCys⁶の*S*-ニトロシル化を介したCaMKII活性阻害が細胞外の過剰なグルタミン酸による興奮毒性時の神経型NO合成酵素の活性によるものであることを報告してきた²²⁾。一方で、Ca²⁺/CaM存在下における短時間のNOドナーの処置は、CaMKII α のThr²⁸⁶近傍のCys^{280/289}、CaMKII δ ではCys²⁹⁰を*S*-ニトロシル化することで、Ca²⁺/CaM非依存的活性を惹起することが報告されている^{23,24)}。また、Cys²⁷³の*S*-ニトロシル化はCaMKII δ のCaMによる活性化を阻害することも報告されている²⁴⁾。したがってCaMKIIはレドックスセンサーとして機能し、CaMKIIのシステイン残基の修飾は活性制御において重要な役割を果たしていることが考えられる。本研究では、活性イオウ分子による部位特異的なシステイン残基のポリスルフィド化修飾を介したCaMKIIの活性制御について検討を行った。

2. 実験材料と方法

2-1 試薬

ラット CaM は pET-CM ベクターと BL21 (DE3) を用いてこれまでに当研究室で発現精製したものを使用した²²⁾。 Dithiothreitol (DTT) は和光純薬工業(社) より購入した。 [γ -³²P] ATP (6,000 Ci/mmol) は Perkin-Elmer (社) より購入した。 ECL prime ウェスタンブロッティング検出試薬、 Protein G agarose は GE Healthcare (社) より購入した。 Na₂S₂、 Na₂S₃、 Na₂S₄、 biotin-HPDP, a water soluble は同仁化学研究所より購入した。 Neutravidin-agarose は Thermo Fisher scientific (社) より購入した。 その他実験に使用した試薬は全て特級品を使用した。

2-2 プラスミドの構築

CaMKII α (J02942) を pME18S、 pFast Bac にクローニングし、用いた。 Cys⁶、 Cys³⁰ の Ala 変異体 (C6A、 C30A) は野生型 (WT) を鋳型に下記のプライマーと KOD-Plus-Neo (東洋紡 (社)) を用いて作製した (Table 1)。 Cys⁶、 Cys³⁰ の両方の Ala 変異体 (C6, 30A) は、 C6A を鋳型にして C30A プライマーを用いて作製した。 変異体の配列は、 Big dye cycle sequence kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した。

C6A	F	5'	GGCTACCATCACCGCCACCCGATTTCACGG	3'
	R	5'	CCGTGAATCGGGTGGCGGTGATGGTAGCC	3'
C30A	F	5'	CGTGGTGCGCAGGGCTGTGAAGGTGCTGG	3'
	R	5'	CCAGCACCTTCACAGCCCTGCGCACCACG	3'

Table 1. CaMKII 変異体作製に用いたプライマー

2-3 抗体

マウス Anti-CaMKII 抗体は BD Bioscience (社) より購入した。ウサギ Anti-CaMKII δ 抗体は Trans Genic Inc. (社) より購入した。ウサギ Anti-GAPDH 抗体は Cell Signaling Technology (社) より購入した。ウサギ Anti-CSE 抗体は筑波大学環境生物学研究室 熊谷嘉人教授より分与していただいた。Anti-rabbit IgG-HRP および Anti-mouse IgG-HRP は GE Healthcare (社) より購入した。

2-4. 細胞培養、遺伝子導入、薬物処置

アフリカミドリザル腎細胞 (COS-7) 及びマウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) は 10% Fetal bovine serum (Cell Culture Bioscience (社)) を添加した DMEM 培地 (Nacalai Tesque (社)) を用いて 6 cm dish で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。ヨトウガ卵巣細胞 (Sf-9) 細胞は 10% Fetal bovine serum を添加した Grace's Insect Medium (GIBCO (社)) を用いてスピナーフラスコで攪拌しながら 37°C で培養した。pME18S-CaMKII は Lipofectamine LTX (Invitrogen (社)) を用いて遺伝子導入し、36-48 時間培養した。その後無血清培地に置換し 18 時間後、Krebs-ringer-HEPES buffer (pH 7.4) に置換し 1 時間後、活性イオウ分子を処置した。処置終了時間に、培地を吸引除去し、細胞を液体窒素にてすばやく凍結した。Lipopolysaccharide (LPS)、Propargyl glycine (PAG) は、細胞を無血清培地に交換後処置し、24 時間培養後回収した。

2-5 Bacmid/バキュロウイルスの作製、組み換え CaMKII の発現、精製

pFastBac CaMKII を DH10Bac (Invitrogen (社)) に導入し、Bacmid を作製した。作製した Bacmid を、Cellfectin II Reagent (Invitrogen (社)) を用いて Sf9 に導入し、培養上清をバキュロウイルス溶液として回収した。大量培養した Sf9 細胞に、バキュロウイルス溶液を加え、2 日間培養後、細胞を回収した。回収した CaMKII 発現 Sf9 細胞を、Lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.1 mM EGTA、0.1 mM EDTA、0.5 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 、1 mM Dithiothreitol) 中で、超音波処理によって可溶化した。可溶化液中の CaMKII を、CaM-agarose を用いて分離後、EGTA 含有 Lysate buffer で溶出した²²⁾。

2-6. 細胞の可溶化、免疫沈降法

凍結した細胞を TNE buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1 mM EDTA、10 µg/ml Aprotinin、10 mM Sodium pyrophosphate、25 mM Sodium fluoride、1 mM Sodium orthovanadate、1% Nonidet P-40) で回収し、超音波処理した後、17,700×g で 15 分間遠心し上清をライセートとして回収した。ライセートに Protein G agarose を加え 4°C 、30 分間転倒混和することで、Protein G agarose に抗体非依存的に結合する不純物を除いた。遠心にて、洗浄に用いた Protein G agarose を除去し、上清に新たに Protein G agarose と免疫前のウサギ血清または anti CaMKII δ 抗体を加えて 4°C で 2 時間転倒混和した。遠心によりゲルを沈降させ、上清を除去した後、400 µL TNE buffer で 1 回、NP-40 非含 TNE buffer で 2 回洗浄した。得られたゲルを CaMKII として酵素活性測定に用いた。また、ゲルに吸着したタンパク質を SDS-PAGE sample buffer で溶出し、ウェスタンブロッティングにより解析した。

2-7 CaMKII 活性測定

精製 CaMKII α (200 nM) を緩衝液中 (250 mM HEPES-NaOH pH7.5、0.5 mM EDTA) で活性イオン分子と 30°C、10 分間インキュベートした。CaMKII (50 nM) 活性は活性測定溶液 (40 mM HEPES-NaOH pH 7.5、10 mM Mg(CH₃COO)₂、1 mM CaCl₂、1 μ M CaM、10 μ M [⁻³²P]ATP、100 μ g/ml BSA、50 μ M Syntide-2 (CaMKII 合成ペプチド基質 : PLARTLSVAGLPCKK) に CaMKII を加え、全量を 20 μ L とし、30°C で 3 分間インキュベートした。反応液のうち 15 μ L を Whatman P-81 Phosphocellulose paper (GE Healthcare) にスポットし、75 mM Phosphoric acid で洗浄後、³²P の取り込み量を液体シンチレーション計測法により測定した²⁵⁾。CaMKII の自己リン酸化は精製 CaMKII (200 nM) を反応液 (250 mM HEPES-NaOH pH7.5、10 mM Mg (CH₃COO)₂、4 mM CaCl₂、4 μ M CaM、100 μ M ATP and 400 μ g/ml BSA) 中、氷上で 10 分間インキュベートした。リン酸化 CaMKII 活性は先述の活性測定溶液中で 5 mM EGTA の存在下または非存在下において 30°C、3 分間インキュベートした。

2-8. 電気泳動およびウェスタンブロッティング

可溶化液中のタンパク質量を Bradford 法により測定した後、1/4 量の 5 x SDS-PAGE sample buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8、8% SDS、40% Glycerol、0.02% Bromophenol blue、10% 2-Mercaptoethanol) と混和して 95°C で 5 分間加熱し、一定量のタンパク質を SDS-PAGE によって分離した。これを PVDF 膜に転写した後、各種一次抗体およびそれに対応する二次抗体でラベルし、ウェスタンブロッティング検出試薬 ECL prime を用いて検出した。

2-9 変法ビオチンスイッチアッセイ

CaMKII を過剰発現させた COS-7 細胞を HEN バッファー (250 mM HEPES-NaOH pH 7.7、1 mM EDTA、0.1 mM Neoquproine) で可溶化した。ライセート (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Protein) を Na_2S_4 (100 μM) で 30°C、10 分間インキュベートした後、4 倍量のブロッキングバッファー (16 mM *S*-Methyl methanethiosulfonate (MMTS)、2.5% SDS 含有 HEN バッファー) を加え、50°C、20 分間混和しながらインキュベートした。余剰な MMTS をアセトン沈殿により除去し、沈殿を HENS バッファー (1% SDS 含有 HEN バッファー) で再溶解した。1 mM Biotin-HPDP を加えて 25°C、3 時間回転混和した後、アセトン沈殿により、余剰なビオチンを除去した。ビオチン化タンパク質を Neutravidin agarose で回収し、ゲルに結合したタンパク質を SDS-PAGE sample バッファーで溶出した。溶出したサンプルについて Anti-CaMKII 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した¹¹⁾。

2-10. CSE/シスチンによる CysSSH 産生及び、蛍光プローブによる活性イオウ分子産生の検出

精製 CSE (1 μg) を反応液中 (40 mM HEPES-NaOH pH 7.5、50 μM PLP、1 mM Cystine) で 37°C、60 分間インキュベートし、活性イオウ分子を産生させた。生じた活性イオウ分子は、反応液を 20 mM Tris-HCl pH 7.4 中で、10 μM Sulfane sulfur probe4 (SSP4) 及び 50 μM Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) と 25°C で 30 分間反応させた。生じた蛍光をマイクロプレートリーダーにて測定した (λ_{ex} 482/ λ_{em} 515)²⁶⁾。

2-11. 統計処理

データは平均値±S.E. (N≥3) で示した。統計処理は分散分析 (ANOVA) テストにより行った。

3.結果

3-1.活性イオウ分子処置による CaMKII 活性への影響

カルシウム非含有条件下において、組み換え CaMKII に活性イオウ分子である Na_2S_2 , Na_2S_3 , Na_2S_4 を 0-1000 μM で 30°C、10 分間処置し、酵素活性への影響を検討した。いずれの活性イオウ分子も濃度依存的に CaMKII 活性を阻害した (Fig. 6A)。このとき、イオウ含有数の多い活性イオウ分子ほど低い IC_{50} を示した (Fig. 6B)。

次に、CSE によって酵素的に産生される活性イオウ分子が CaMKII 活性を阻害するのか検討した。まず、1 mM Cystine を CSE 存在下または非存在下において 50 μM PLP 含有中で 37°C、1 時間反応させ、活性イオウ分子反応性の蛍光プローブである SSP4 を用いて生じた活性イオウ分子を検出した。Cystine 単独時ではなく、CSE と Cystine の反応時に活性イオウ分子が産生された (Fig. 6C)。このときの反応産物を CaMKII (200 nM) に 30°C、10 分間処置し、酵素活性を測定したところ、Cystine 単独の処置によっても 75%ほどまで低下が見られたが、CSE と Cystine の反応産物は 32%まで CaMKII 活性を低下させた (Fig. 6D)。

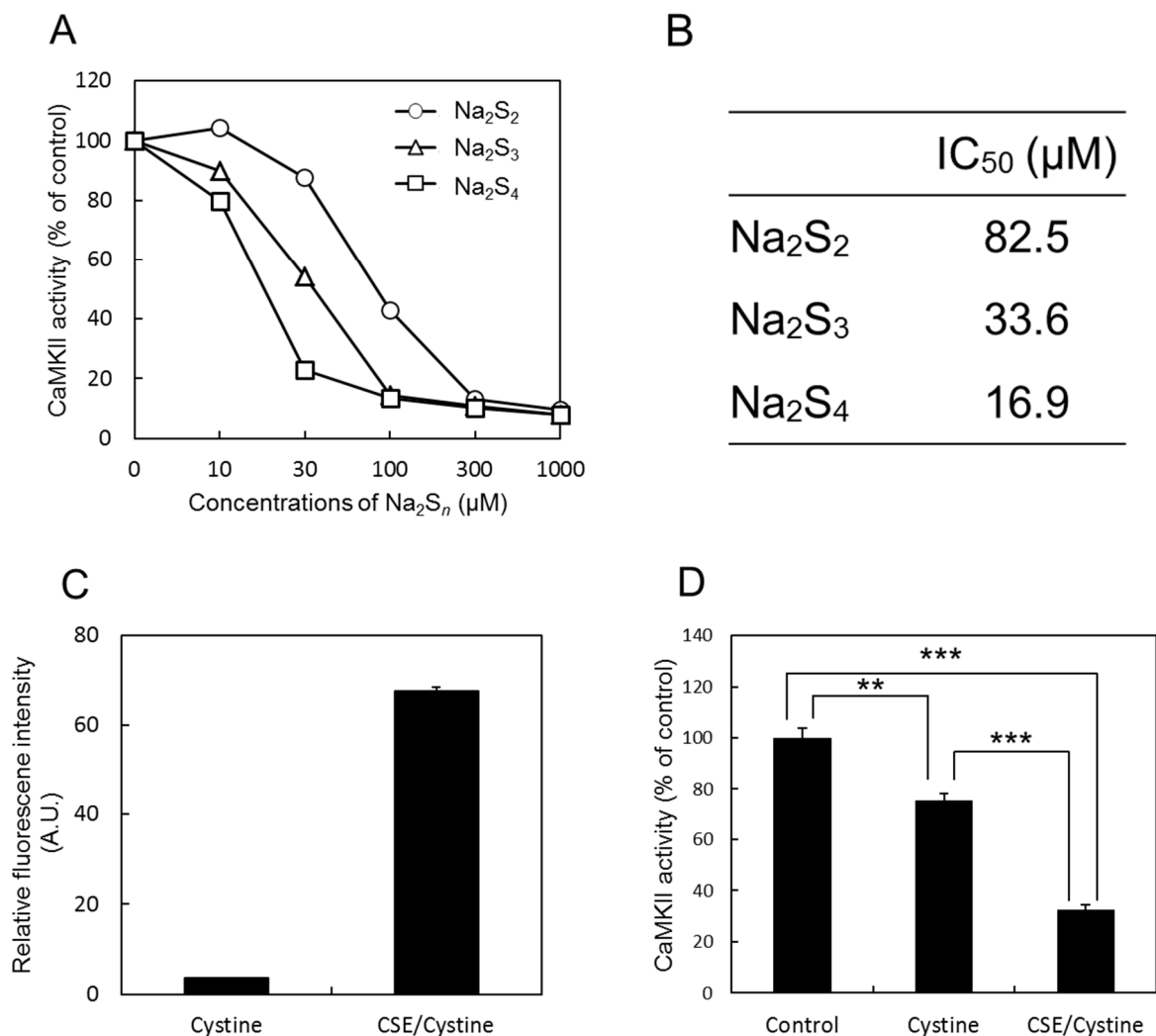


Fig. 6. CaMKII 活性に対する活性イオウ分子の影響

(A) CaMKII (200 nM) に Na₂S_n (n=2-4) を 30°C、10 分間処置後 CaMKII (50 nM) 活性を反応液中で 30°C、3 分間インキュベートし測定した。(B) (A) で得られた結果から見かけ上の IC₅₀ を算出した。(C) 1 mM Cystine を CSE (1 μg) の存在下または非存在下において 37°C、1 時間反応後の活性イオウ分子を SSP4 により測定した。(D) (C) で得られた反応産物を CaMKII (200 nM) に 30°C、10 分間処置し、CaMKII (50 nM) 活性を (A) と同様の方法で測定した。*p<0.05、***p<0.005

3-2. Ca²⁺/CaM 結合及び自己リン酸化 CaMKII に対する活性イオウ分子の影響

以上の実験系では、カルシウム/マグネシウム非含有条件 (EDTA 存在下) において、活性イオウ分子の CaMKII 活性への影響について検討してきた。

CaMKII は Ca²⁺/CaM により構造を大きく変化させるため、Ca²⁺/CaM 存在下では、活性イオウ分子に対する感受性が異なることが想定される。そこで、Ca²⁺/CaM 存在下において、CaMKII に対する活性イオウ分子の影響を検討した。0.5 mM EDTA 存在下または 1 mM Ca²⁺/1 μM CaM 存在下で CaMKII に 10、30 μM Na₂S₄ を 30°C、10 分間処置後活性を測定した。Ca²⁺/CaM の存在下、非存在下のいずれの条件での処置においても Ca²⁺/CaM 依存性の CaMKII 活性は阻害された (Fig. 7A)。

次に、Thr²⁸⁶ の自己リン酸化体に対する活性イオウ分子の影響を検討した。自己リン酸化 CaMKII は、EGTA 存在下、つまり Ca²⁺非存在下において、40% 程の Ca²⁺/CaM 非依存的活性を示した (Fig. 7B)。自己リン酸化 CaMKII に 30 μM Na₂S₄ を 30°C、10 分間処置後、EGTA 存在下において活性を測定したところ、Ca²⁺/CaM 依存的活性も Na₂S₄ により阻害された (Fig. 7B)。

これまでに、Ca²⁺/CaM 存在下において短時間の NO ドナー処置によりリン酸化部位近傍の Cys^{280/290} の *S*-ニトロシル化を介して Ca²⁺/CaM 非依存的活性を惹起することが報告されている^{23,24)}。そこで、同条件での活性イオウ分子処置による効果を検討した。4 mM Ca²⁺/4 μM CaM 存在下において 0-30 μM Na₂S₄ を 30°C、3 分間処置し、Ca²⁺/CaM 依存性ならびに非依存的活性を測定した。結果、活性イオウ分子によって CaMKII の Ca²⁺/CaM 非依存的活性が誘導されることはなく、Ca²⁺/CaM 依存的活性は Na₂S₄ 濃度依存的に阻害される傾向がみられた (Fig. 7C)。これらのことから活性イオウ分子は CaMKII の活性化状態に関わらず、CaMKII 活性を阻害することが明らかとなった。

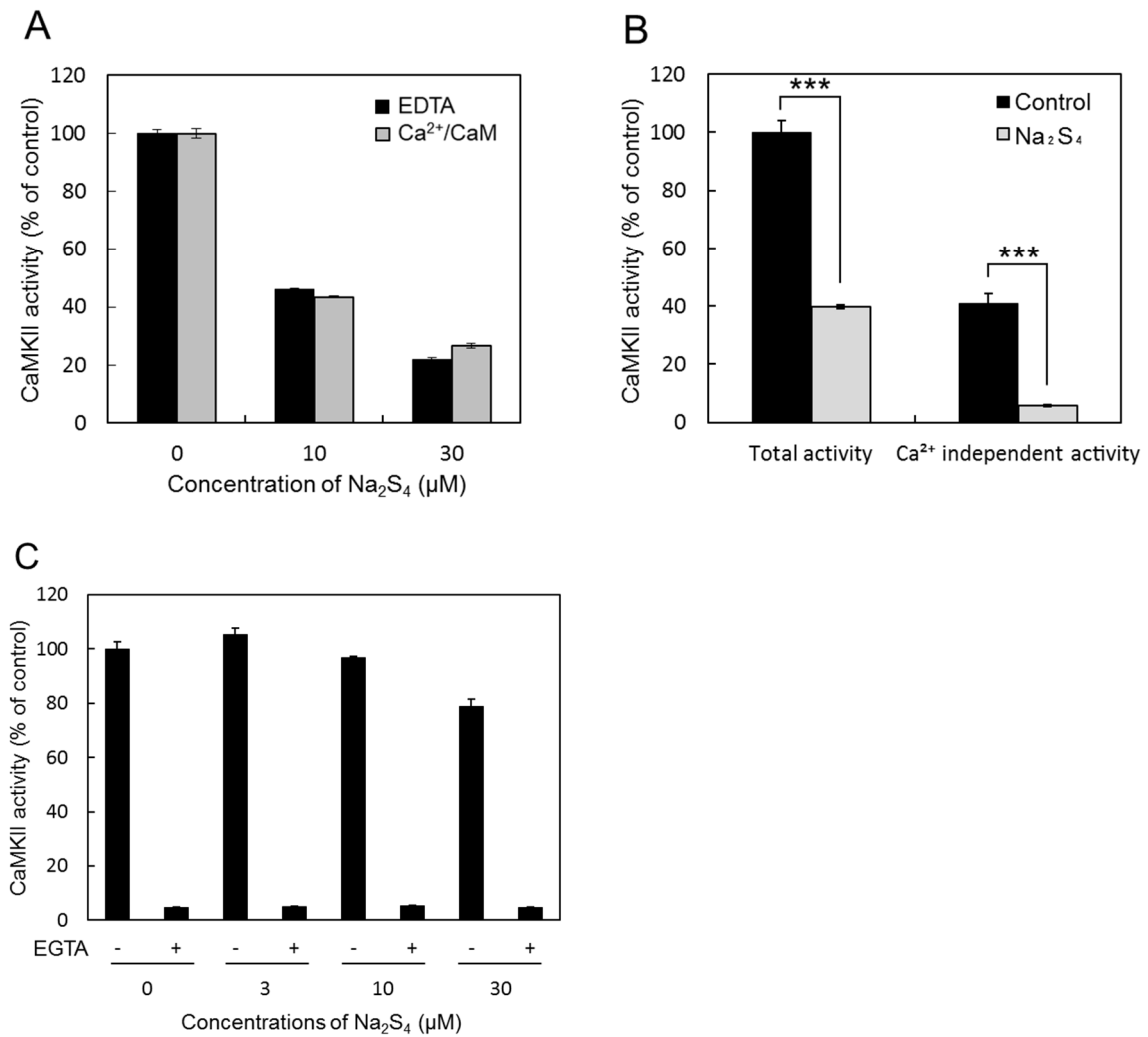


Fig. 7. Ca²⁺/CaM 結合及びリン酸化 CaMKII に対する活性イオウ分子の影響

(A) CaMKII (200 nM) を 1 mM Ca²⁺/1 μM CaM 存在下または、0.5 mM EDTA 存在下において図に示した濃度で 30°C、10 分間処置した。処置後の Ca²⁺/CaM 存在下での CaMKII (50 nM) 活性を Fig. 6A と同様の方法で測定した。(B) CaMKII (200 nM) を 4 mM Ca²⁺/4 μM CaM 存在下において 100 μM ATP と氷上で 10 分間インキュベートした (Thr²⁸⁶ の自己リン酸化)。その後 30 μM Na₂S₄ を 30°C、10 分間処置した。処置後の CaMKII (50 nM) 活性を 5 mM EGTA 存在下 (Ca²⁺ independent activity) または、1 mM Ca²⁺/1 μM

CaM 存在下 (Total activity) で Fig. 6A と同様の方法で測定した。(C) CaMKII (200 nM) を 4 mM Ca²⁺/4 μM CaM 存在下において Na₂S₄ を図に示した濃度で 30°C、3 分間処置した。処置後の CaMKII (50 nM) 活性を 5 mM EGTA 存在下または、1 mM Ca²⁺/1 μM CaM 存在下で Fig. 6A と同様の方法で測定した。

***p<0.005

3-3 活性イオウ分子による CaMKII 活性阻害の可逆性

活性イオウ分子によるポリスルフィド化はジスルフィド結合 (-S-S-) を介しているため、還元剤処置により切断される。そこで、活性イオウ分子による CaMKII 活性阻害について修飾の検出ならびにその可逆性について検討した。CaMKII (200 nM) に 30 μ M Na₂S₄を加え、30°C、10 分間インキュベートした後、20 mM DTT を 30°C、10 分間後処置し、CaMKII 活性阻害の可逆性を検討した (Fig. 8A)。Na₂S₄処置により 17%まで低下した CaMKII 活性は DTT の後処置により 80%まで回復した。次に、ポリスルフィド化の検出は、CaMKII を過剰発現させた COS-7 細胞のライセートに 100 μ M Na₂S₄を 30°C、10 分間処置した後、20 mM DTT 存在下、非存在下において 30°C、10 分間インキュベートし、変法ビオチンスイッチ法により行った (Fig. 8B)。Na₂S₄の処置により、CaMKII のポリスルフィド化が検出され、DTT の後処置により消失した。これらのことから CaMKII は活性イオウ分子により、ポリスルフィド化を介して可逆的な活性阻害を受けることが明らかとなった。

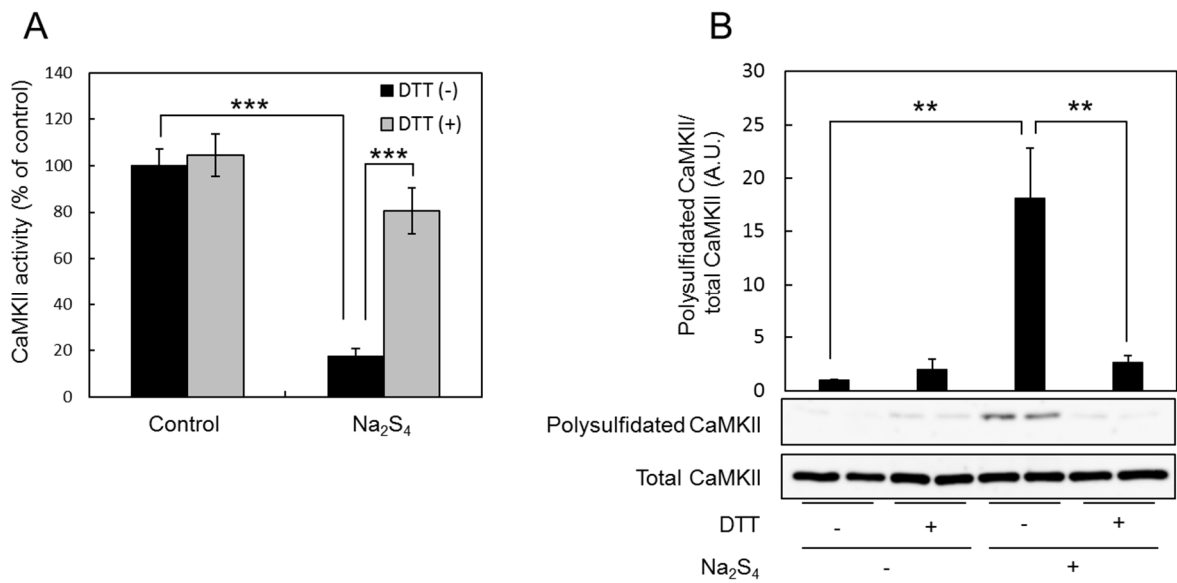
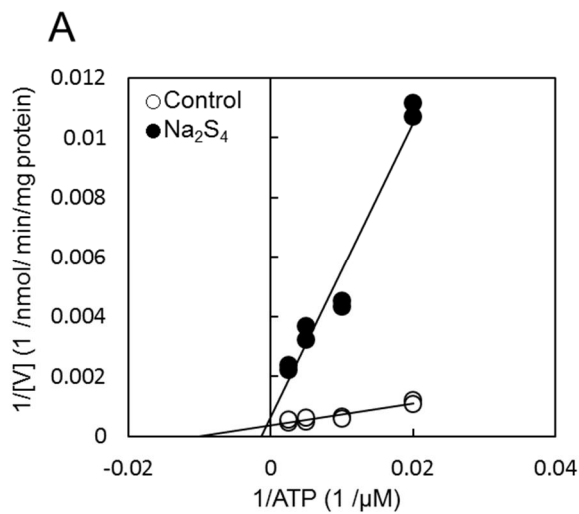


Fig. 8. Na₂S₄による CaMKII 活性阻害の可逆性

(A) CaMKII (200 nM) に 30 μM Na₂S₄ を 30°C、10 分間処置後、20 mM DTT を 30°C、10 分間処置した。CaMKII (50 nM) の活性を Fig. 6A と同様の方法にて測定した。(B) CaMKII を過剰発現させた COS-7 細胞のライセートに 100 μM Na₂S₄ を 30°C、10 分間処置後、20 mM DTT 含有 (+)、非含有 (-) にて 30°C、10 分間処置した。CaMKII のポリスルフィド化は変法ビオチンスイッチ法により検出した。**p<0.01、***p<0.005

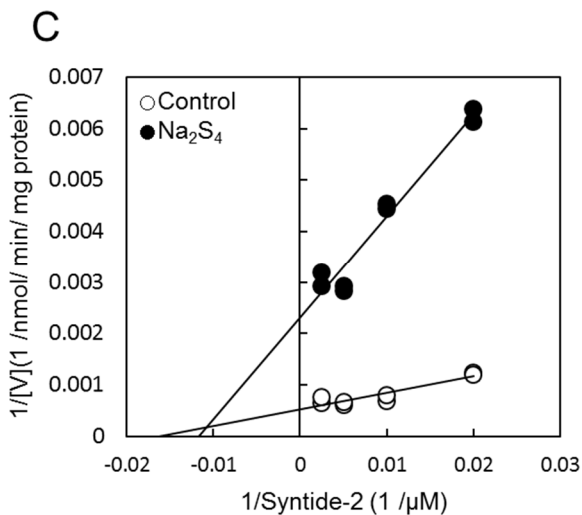
3-4. 活性イオウ分子による CaMKII 阻害様式の検討

Fig. 7A より、活性イオウ分子が $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の存在下、非存在下において同程度に活性 CaMKII 活性を阻害したことから活性イオウ分子による CaMKII 活性阻害には CaM 結合は関与しないと考えられる。また、Fig. 7B より、自己リン酸化による CaMKII の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存的活性を阻害したことから、自己リン酸化の関与もないと考えられる。そこで、CaMKII のリン酸化反応におけるリン酸基の供与体である ATP とペプチド基質である Syntide-2 濃度について Lineweaver-Burk Plot を作成しその阻害様式を検討した。ATP についてのプロットは競合阻害の形を示した (Fig. 9A)。CaMKII の ATP に対する K_m は Na_2S_4 処置により $90 \mu\text{M}$ から $700 \mu\text{M}$ と約 8 倍になったことから Na_2S_4 により CaMKII の ATP 親和性が低下したことがわかる。また、 V_{max} については Control 群と Na_2S_4 処置群では $2500 \text{ nmol/min/mg protein}$ と $1400 \text{ nmol/min/mg protein}$ となった (約 1.7 倍) (Fig. 9B)。一方、Syntide-2 のプロットは非競合阻害の形を示した (Fig. 9C)。CaMKII の Syntide-2 に対する K_m は Control 群と Na_2S_4 処置群では $64 \mu\text{M}$ と $86 \mu\text{M}$ であった (約 1.3 倍)。 V_{max} については、Control 群では $2000 \text{ nmol/min/mg protein}$ であったのに対して Na_2S_4 処置群では $462 \text{ nmol/min/mg protein}$ と約 5 分の 1 まで低下していた (Fig. 9D)。



B

ATP	Control	Na ₂ S ₄
Km (μM)	90.9	700.7
Vmax (nmol/min/mg CaMKII)	2500	1428.5



D

Syntide-2	Control	Na ₂ S ₄
Km (μM)	64	86.3
Vmax (nmol/min/mg CaMKII)	2000	434.7

Fig. 9. Na₂S₄による CaMKII 活性阻害様式の検討

Control (○) または 100 μM Na₂S₄ 処置群 (●) について、それぞれ下記の条件で CaMKII 活性を測定し、両辺逆数プロット (Lineweaver-Burk Plot) を作成した。(A) Syntide-2 濃度を 400 μM に固定し、ATP の濃度を 50、100、200、400 μM で測定した。(B) (A) で得られたグラフから Km, Vmax を算出した。(C) ATP 濃度を 400 μM に固定し、Syntide-2 の濃度を 50、100、200、400 μM で測定した。(D) (C) で得られたグラフから Km, Vmax を算出した。

3-5. 活性イオウ分子による CaMKII 修飾部位の検討

3-4 から、活性イオウ分子による CaMKII の活性阻害にはキナーゼドメインに位置する ATP 結合部位が影響を受けていることが考えられる。NO による CaMKII 活性阻害についても同様の阻害様式であることから²⁷⁾、活性イオウ分子は S-ニトロシル化と同一のシステイン残基の修飾を介して CaMKII 活性を阻害していることが考えられる。当研究室では、Cys⁶ の Ala 変異体 (C6A) は NO による活性阻害に対して強い抵抗性を示すことを報告している²²⁾。また ATP 結合ドメインに位置する Cys³⁰ の Ala 変異体 (C30A) も NO による活性阻害に対してわずかに抵抗性を示すことがわかっている²²⁾。そこで、C6A、C30A 及び 2 か所の Cys に変異を持った C6, 30A 変異体を作製し活性イオウ分子に対する感受性について検討した。

Coomassie Brilliant Blue による染色により、すべての組み換え CaMKII が 90%以上の精製度であった (Fig. 10A)。

CaMKII 活性について、野生型 (WT) または変異体 CaMKII (200 nM) に 10、30 μ M Na₂S₄ を処置し、検討した。WT と C30A では Na₂S₄ により活性が阻害されたが、C6A、C6, 30A では抵抗性を示した (Fig. 10B)。

また、ポリスルフィド化を検出するために、WT 及びそれぞれの変異体を過剰発現させた COS-7 細胞を用いた変法ビオチンスイッチ法により行った。WT、C6A、C30A では Na₂S₄ 処置によりポリスルフィド化が検出されたが、C6,30A では検出されなかった (Fig. 10C)。したがって、活性イオウ分子によってポリスルフィド化される部位は CaMKII の Cys⁶ 及び Cys³⁰ であり、中でも活性制御に重要であるのは Cys⁶ であることが明らかとなった。

また、培養細胞系においても Cys⁶ が活性イオウ分子の標的となる可能性について、WT または C6A を過剰発現させた COS-7 細胞に Na₂S₄ を処置し、検討

した。Na₂S₄処置後、細胞を可溶化し、10 μM [γ-³²P] ATP と 50 μM Syntide-2 を用いて活性を測定した (Fig. 10D)。Na₂S₄処置により、WT では活性阻害が見られたのに対して C6A は抵抗性を示した。このことから、細胞内においても Cys⁶は活性イオウ分子の標的となっていることが明らかとなった。

以上より、Cys⁶の修飾が ATP と競合することが予想されるため、C30A を用いて、ATP について阻害様式の検討を行った (Fig. 10E)。Na₂S₄は C30A においても ATP と競合的に CaMKII を阻害した。

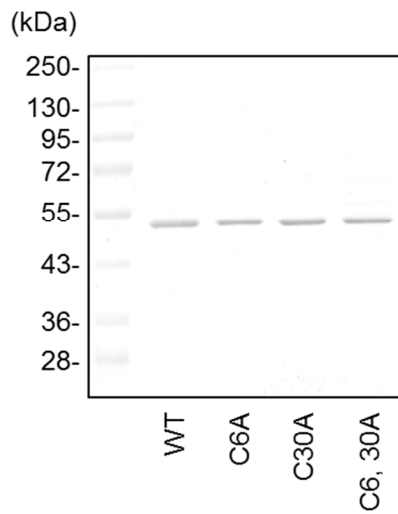
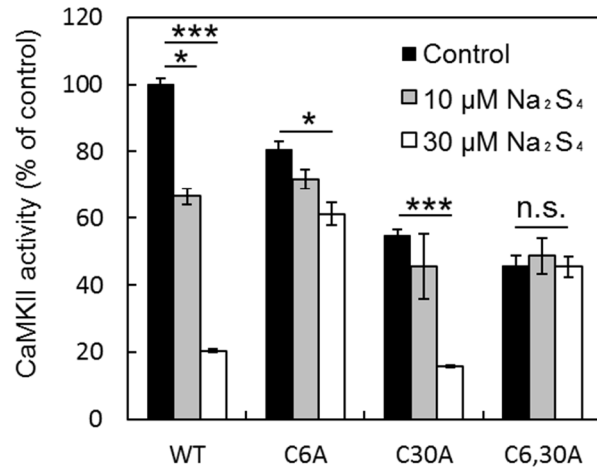
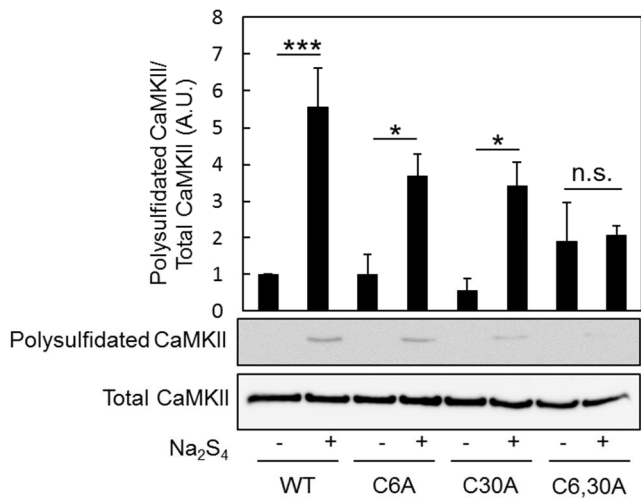
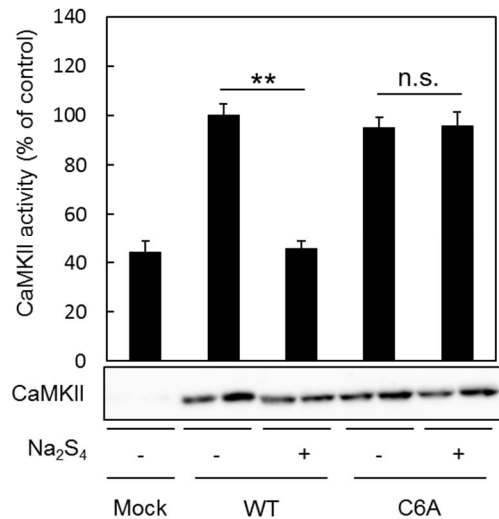
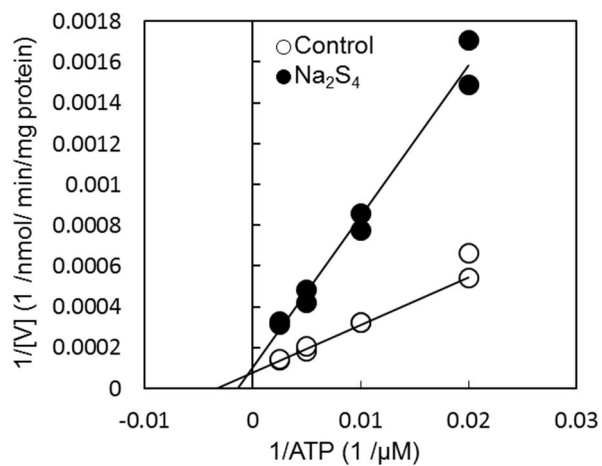
A**B****C****D****E**

Fig. 10. CaMKII 変異体に対する Na_2S_4 の影響

(A) 精製 CaMKII 変異体を、SDS-PAGE (0.5 μg protein) 後、Coomassie Brilliant Blue にて染色した。(B) 精製した CaMKII WT または変異体 (C6A、C30A、C6, 30A) (200 ng) に Na_2S_4 を表示した濃度で 30°C、10 分間処置し、CaMKII (50 nM) 活性を Fig. 6A で示した方法で測定した(C) COS-7 細胞に WT または変異体を過剰発現したライセートに 100 μM Na_2S_4 を 30°C、10 分間処置後、変法ビオチンスイッチ法によりポリスルフィド化を検出した。(D) CaMKII WT または C6A を過剰発現させた COS-7 細胞に、1000 μM Na_2S_4 を 37°C、10 分間処置した。細胞を TNE バッファーで可溶化し、8 μg のライセートの酵素活性を Fig. 6A と同様の方法で測定した。(E) CaMKII C30A を用いて、Control (○) または、100 μM Na_2S_4 処置群 (●) について Fig. 9A と同様に ATP 濃度を振り、Lineweaver-Burk plot を作成した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.005$

3-6. 内在性 CaMKII 活性に対する活性イオウ分子処置の影響

次に、RAW264.7 に内在する CaMKII 活性に対する活性イオウ分子処置の影響について検討した。これまでの実験結果より、活性イオウ分子が Cys⁶ を標的として CaMKII の活性を阻害することが明らかとなった (Fig. 10)。Cys⁶ は RAW264.7 細胞に内在する CaMKII δ をはじめ、CaMKII のすべてのアイソフォームにおいて保存されていることから、(Fig. 3) RAW264.7 細胞においても活性イオウ分子の処置により CaMKII 活性が阻害されることが想定される。

RAW264.7 細胞に 0-1000 μ M Na₂S₄ を 37°C で 10 分間処置し、回収した。細胞を可溶化し、免疫前のウサギ血清または、CaMKII δ 抗体と protein G sepharose を用いて免疫沈降した。免疫複合体中の CaMKII δ は、CaMKII δ 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより確認した (Fig. 11 下図) このとき、Na₂S₄ 処置により、免疫複合体中の CaMKII 量に変化は見られなかった。この免疫複合体を CaMKII として 10 μ M [γ -³²P] ATP と 50 μ M Syntide-2 を用いて活性を測定した。Na₂S₄ の処置により RAW264.7 に内在する CaMKII 活性は濃度依存的に阻害された (Fig. 11 上図)。

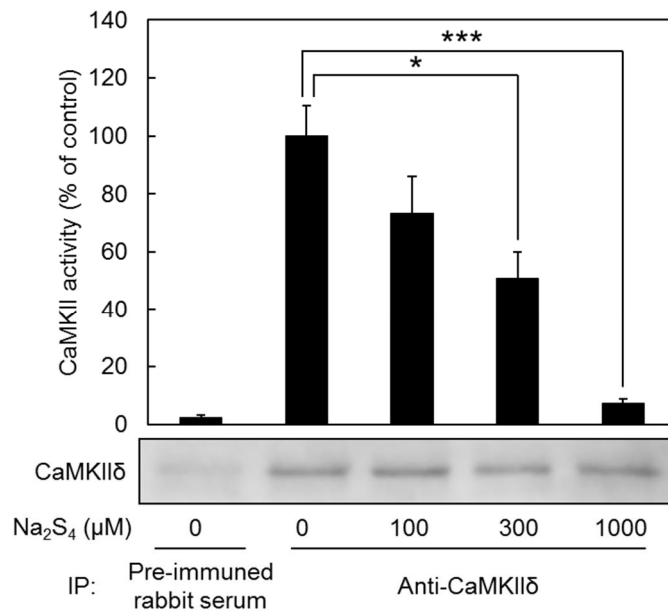


Fig. 11. RAW264.7 細胞に内在する CaMKII に対する Na₂S₄ の影響

RAW264.7 細胞を Na₂S₄ で 37°C、10 分間、示した濃度で処置した。細胞を可溶化し免疫前のウサギ血清 (Pre-immuned rabbit serum) または、CaMKIIδ1-4 抗体 (Anti-CaMKIIδ) と protein G agarose を用いて免疫沈降を行い、[γ-³²P] ATP と Syntide-2 を用いて活性を測定した (上図)。ゲルに結合したタンパク質を SDS-PAGE sample buffer で溶出し、CaMKIIδ1-4 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した (下図)。*p<0.05、***p<0.005

3-7. RAW264.7 細胞における LPS 及び PAG の CaMKII 活性への影響

RAW264.7 細胞において、LPS の処置により CSE が発現誘導され、硫化水素イオン量が増加することが報告されている²⁸⁾。CaMKII 活性は CSE から産生される活性イオウ分子によって阻害される (Fig. 6D)。そこで、LPS 処置により CSE の発現誘導を介して CaMKII 活性が影響を受けるのか検討した。

RAW264.7 細胞に 10 ng/mL LPS 処置を処置することで CSE の発現誘導が見られ、さらにこのとき、CaMKII δ の発現誘導も起こっていた (Fig. 12A)。また、CSE 阻害剤である PAG は CaMKII δ の発現量には影響しなかった。

このときの CaMKII δ 活性を 3-6 と同様に、免疫沈降法を用いて測定した (Fig. 12B)。LPS 処置群は、CaMKII δ 発現誘導に伴って高い活性を示した。さらに PAG を LPS と併用することで、CaMKII 活性は LPS 単独と比較して増強した。さらに、PAG 単独処置の CaMKII δ 活性への影響を検討したところ、PAG 単独では CaMKII 活性を増強させなかった (Fig. 12C)。LPS 非処置群では CSE の発現が認められなかったことから、(Fig. 12A) LPS による CSE 発現依存的な CaMKII δ 活性阻害が生じていることが考えられる。以上より、LPS 処置によって、発現誘導を介して亢進される CaMKII δ のシグナルは、CSE/活性イオウ分子によって阻害されていることが示唆された。

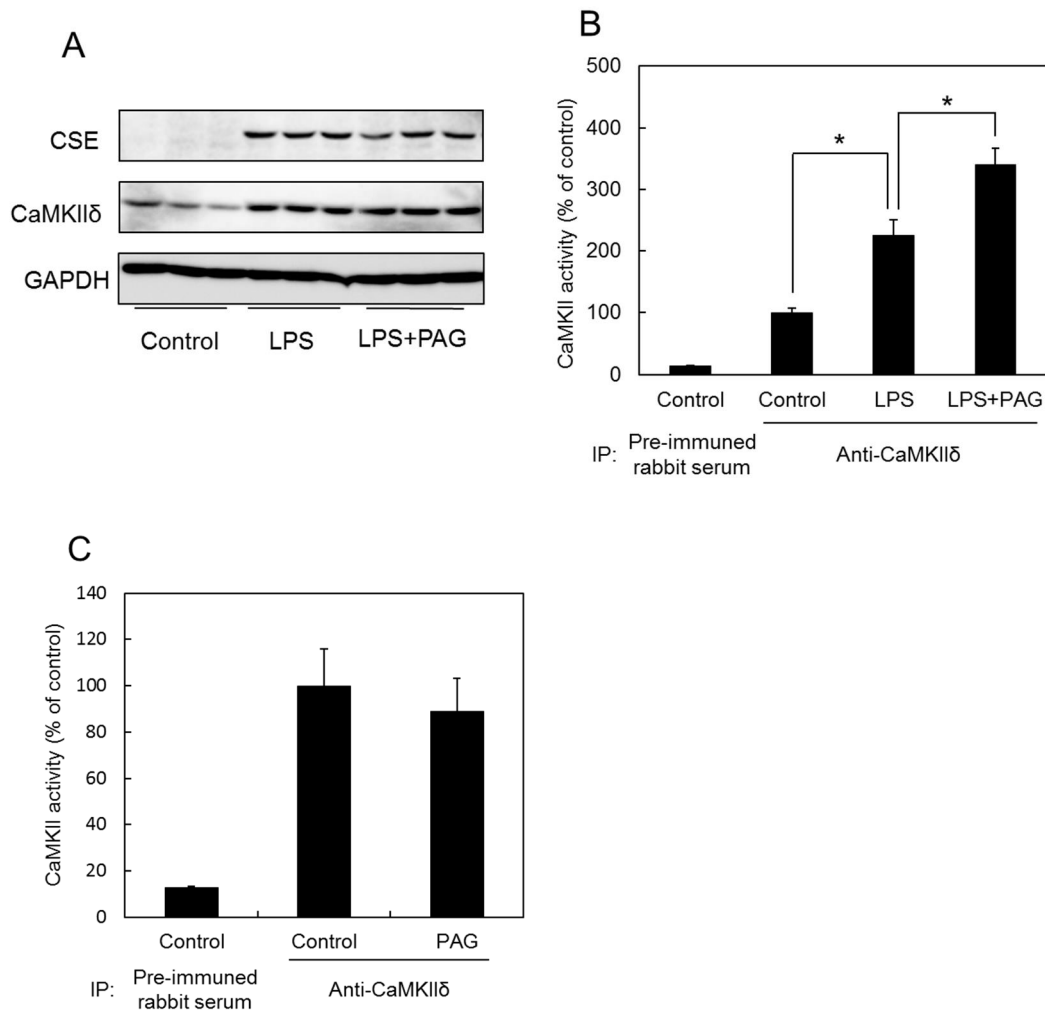


Fig. 12. RAW264.7 細胞における LPS 及び PAG の CaMKII 活性への影響

(A) RAW264.7 細胞に 10 ng/mL LPS を 24 時間処置した。PAG 処置群は LPS 処置と同時に 3 mM PAG を処置した。細胞を可溶化し、CSE、CaMKII δ 、GAPDH のタンパク質発現をウェスタンブロッティングにより検出した。(B) (A) の細胞ライセートを用いて、免疫沈降法により CaMKII δ 活性を Fig. 11 と同様の方法で測定した。(C) PAG を 24 時間処置後の CaMKII δ 活性を (B) と同様の方法で測定した。* $p < 0.05$

4. 考察

本研究により、活性イオウ分子がポリスルフィド化を介した新規の細胞内 CaMKII 制御因子であることが明らかとなった。CaMKII は活性イオウ分子に加えて NO によっても同部位 (Cys⁶、Cys³⁰) の阻害を受ける。*S*-ニトロシル化の S-N の結合エネルギーは 12~20 kcal/mol であるのに対して、ポリスルフィド化の S-S の結合エネルギーは 60 kcal/mol と *S*-ニトロシル化の 3 倍ほど強い¹¹⁾。また、eNOS の Cys⁴⁴³においてポリスルフィド化チオールに NO を処置しても *S*-ニトロシル化は生じないが、*S*-ニトロシル化チオールは活性イオウ分子の処置により、ポリスルフィド化に置換されることが報告されている¹¹⁾。これらのことから、ポリスルフィド化は *S*-ニトロシル化よりも優位なレドックス修飾であることが考えられ、CaMKII においても活性イオウ分子と NO が共存する状態においてはポリスルフィド化が優位であることが考えられる。

イオウ含有数の多い活性イオウ分子ほどより低い IC₅₀を示した (Fig. 6B) 理由として、活性イオウ分子はイオウ含有数が多くなるほど pKa が低下し、反応性が高まることや²⁹⁾、単純に溶液中のイオウ原子の濃度が高くなったことが考えられる³⁰⁾。本研究では、変法ビオチンスイッチ法を用いて CaMKII が Na₂S₄によりポリスルフィド化修飾されたことを確認した。Na₂S₂、Na₂S₃についても、Na₂S₄と同様に CaMKII をポリスルフィド化修飾することが想定されるが、付加しているイオウ原子の数など、具体的な修飾を同定するには至っていない。そのため、イオウ含有数の増加による IC₅₀の低下が、修飾が異なることによるものである可能性を否定できない。今後、質量分析による解析を行い、具体的な修飾を検出することが必要であると考えている。

さらに CaMKII の活性化状態について、Ca²⁺/CaM 存在下、非存在下 (Fig. 5A,B) または、自己リン酸化体 (Fig. 5C, D) のそれぞれに対して Na₂S₄は阻

害効果を示した (Fig. 7A, 7B)ことから活性イオウ分子による阻害はこれらによる制御より優位な活性制御であるといえる。

また、本研究では、活性イオウ分子によるポリスルフィド化の可逆性について還元剤として DTT を用いて明らかにした (Fig. 8)。細胞内においてはチオレドキシシン系が脱ポリスルフィド化に関与し、これら細胞内還元系の阻害剤処置はポリスルフィド化を亢進するといわれている³¹⁾ことから CaMKII は、活性イオウ分子/チオレドキシシンにより可逆的に制御されていることが考えられる。

変異体を用いた解析から、ポリスルフィド化部位は Cys⁶ と Cys³⁰であることが明らかとなったが、WT と C6A、C30A のポリスルフィド化の程度に差は見られなかったのは、システイン一つ分の修飾の差は本研究条件下において検出限界以下のものであったと考えている (Fig. 10C)。C30A を用いた Na₂S₄による阻害様式の検討から、CaMKII において ATP 結合を制御しているのは ATP 結合領域にある Cys³⁰ではなく、ATP 結合領域外の Cys⁶であるという興味深い知見が得られた (Fig. 3、10E)。CaMKII の 3 次元構造において、Cys⁶は ATP 結合領域の裏側に位置しており、直接 ATP 結合を阻害していることは考えにくい。Cys⁶の修飾が ATP 結合ポケットに何らかの影響を与えているものと考えている。

CaMKII の 4 つのアイソフォームにおいて Cys⁶は保存されていることから、(Fig. 3) いずれのアイソフォームにおいても活性イオウ分子による阻害が起こると考えている¹⁵⁾。さらに、Cys⁶は近傍に Arg⁸、Glu^{81,82}が存在することから、S-ニトロシル化とポリスルフィド化の共通のモチーフである Acid-base motif があると想定される。さらに、このモチーフを形成する Arg⁸、Glu^{81,82}も CaMKII のアイソフォームで保存されていることから、全ての CaMKII アイソフォームが Cys⁶の S-ニトロシル化またはポリスルフィド化による阻害を受けると考えら

れる。NOによるCys⁶を介した活性阻害に加えて、CaMKII δ において、NOによるCys²⁷³のS-ニトロシル化を介して活性が阻害されることが報告されている²⁴⁾。CaMKII α ではCys²⁷³は保存されていないため、このメカニズムによる阻害は無いと思われるが、RAW264.7細胞を用いた実験系において活性イオウ分子がCys²⁷³を介してCaMKII δ 活性を阻害している可能性については否定できない。

また、細胞系において精製酵素での実験と比較してCaMKII活性を阻害するのにより高濃度のNa₂S₄を要した(Fig.10D)。これにはNa₂S₄の細胞膜透過性や安定性が関与していると考えている。細胞内においてNa₂S₄は、速やかにグルタチオンなどのチオールと反応し、硫化水素に変化してしまうことも大きな原因であると考えられる³²⁾。

活性イオウ分子によるCaMKII活性阻害はATPと競合することから(Fig. 9A)、虚血時など細胞内ATP濃度が低い状態ではCaMKIIの活性イオウ分子に対する感受性が強くなることが予想される³³⁾。

マクロファージに内在するCaMKIIはトランス脂肪酸によりもたらされる細胞死を促進し、動脈硬化の危険因子である³⁴⁾。そのため外因性活性イオウ分子の処置は動脈硬化の予防、治療のターゲットとなることが予想される。

RAW264.7細胞において、CSE阻害剤により、CaMKII δ 活性の亢進を確認したが、これには、CSEによるシスチンからの活性イオウ分子産生を介しているのか、またはCARSへのシステインの供給を介しているのかについては断言できない。

マクロファージにおいてLPS処置により誘導されたCaMKII δ が、マトリックスメタロプロテアーゼ-9(Matrix metalloproteinase-9: MMP9)の発現誘導を促すことが報告されている³⁵⁾。MMP9は細胞外マトリックスの分解のみなら

ず TNF α やインターロイキン 1 β (IL-1 β) の前駆体を基質として、活性本体へとすることが報告されている³⁶⁾。したがって、LPS に惹起される炎症反応は CaMKII δ の発現誘導を介した MMP9 の発現誘導を介して増悪化されると予想される。本研究では明らかとしていないが、CSE 阻害剤による CaMKII δ 活性の変化に伴った基質タンパク質のリン酸化や MMP9 の発現の変化を検出することで、CSE から産生される活性イオウ分子による CaMKII δ 活性阻害の意義を明らかにすることができると考えている。また、LPS や Na₂S₄ 処置時の CaMKII δ のポリスルフィド化を過剰発現系と同様の方法で検出を試みたがポリスルフィド化は検出できなかった (data not shown)。この理由として過剰発現系と比較して内在する CaMKII の量が少なく検出限界以下であったことが考えられる。実験系のスケールを拡大し、より多くのタンパク質を濃縮することで検出を行う必要があると考えている。

また、RAW264.7 細胞を LPS で処置すると iNOS が誘導される。したがって LPS 処置 RAW264.7 細胞は NO シグナル、活性イオウ分子シグナルが亢進している状態にあると考えられる。NO と活性イオウ分子が直接反応することで生じる Nitrosopersulfide (SSNO) は、活性イオウと NO いずれのドナーとしての活性を示すことや、NO の生物活性を持続化させることが報告されている^{37, 38)}。したがって、活性イオウ分子の生理作用を明らかにする上で NO シグナルの関与を考慮し、解析を進めていくことが重要であると考えられる。

その他の酸化修飾について、CaMKII の Cys⁶ はレドックスセンサーとして機能し、親電子物質の影響を受けやすいことが考えられる。解糖系の中間体であるフマル酸およびその誘導體であるジメチルフマル酸は親電子物質の一種であり、システイン残基を不可逆的に修飾することが知られている^{39, 40)}。しかしながら、フマル酸及びジメチルフマル酸は Ca²⁺/CaM の存在下、非存在下に関わ

らず CaMKII 活性に影響を及ぼさなかった (data not shown)。また、チオール基の酸化剤であり、*S*-グルタチオン化を誘導する Diamide と Glutathione の処置は CaMKII 活性を阻害するが、Cys⁶を介していないことを当研究室では報告している²⁷⁾。

また、CaMKII の調節ドメインの翻訳後修飾 (*S*-ニトロシル化、メチオニンの酸化、*O*-グリコシル化など) はリン酸化と同様に CaMKII の Ca²⁺/CaM 非依存的活性を惹起することが報告されている^{23, 41, 42)}。中でも、NADPH oxidase 由来の活性酸素は CaMKII のメチオニン残基の酸化を惹起し、これによりカルシウムシグナルによる制御を逸脱した CaMKII は心筋障害を引き起こすことが明らかとなっている⁴³⁾。また、Ca²⁺/CaM 存在下での短時間の NO ドナー処置により CaMKII δ の Cys²⁹⁰ (CaMKII α では Cys^{280/289}) の *S*-ニトロシル化を介して Ca²⁺/CaM 非依存的活性を誘導するという報告があるが^{23, 24)}、Ca²⁺/CaM 存在下での短時間の活性イオウ分子処置は CaMKII の活性化を引き起こさなかった (Fig. 7C)。すなわち活性イオウ分子は CaMKII 活性を負にのみ制御していることが想定される。

6. 結論

本研究により、NOに加え、活性イオウ分子がCaMKIIの新規の制御因子であることを明らかにした。分子レベルの解析により、Cys⁶がレドックスセンサーとして機能し、その修飾がATPと競合することを明らかにした。

また、マクロファージにおいてLPSによって亢進する内因性の活性イオウ分子産生系によってCaMKII活性が阻害されることを明らかとなり、以下のスキームを提案する (Fig. 13)。

マクロファージにおいてCaMKIIはトランス脂肪酸によるアポトーシスを促進し、動脈硬化の進展に関与することや、MMP9の発現誘導を介した炎症性サイトカインの成熟などに関与している。本研究成果はこれらの病態における活性イオウ分子の意義の解明において、有益な知見となると考えている。

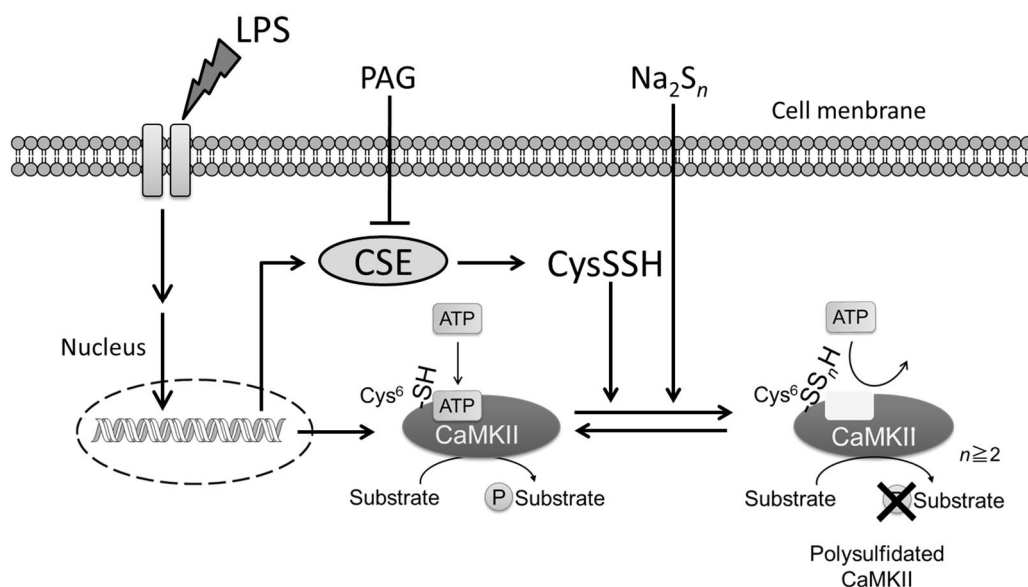


Fig. 13. マクロファージのLPS応答における活性イオウ分子によるCaMKII活性制御のスキーム

本研究で明らかにした活性イオウ分子によるCaMKII活性阻害についてそのメカニズムと、LPSにより誘導されるCSE活性によるCaMKII活性阻害の示唆を示した。

参考文献

1. Fukuto, J. M., Ignarro, L. J., Nagy, P., Wink, D. A., Kevil, C. G., Feelisch, M., Cortese-Krott, M. M., Bianco, C. L., Kumagai, Y., Hobbs, A. J., Lin, J., Ida, T. & Akaike, T. Biological hydropersulfides and related polysulfides – a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Letters* 592, 2140–2152 (2018).
2. Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitiño, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R. & Alvarez, B. Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *J. Biol. Chem.* 290, 26866–80 (2015).
3. Abiko, Y., Yoshida, E., Ishii, I., Fukuto, J. M., Akaike, T. & Kumagai, Y. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1301–1306 (2015).
4. Ihara, H., Kasamatsu, S., Kitamura, A., Nishimura, A., Tsutsuki, H., Ida, T., Ishizaki, K., Toyama, T., Yoshida, E., Hamid, H. A., Jung, M., Matsunaga, T., Fujii, S., Sawa, T., Nishida, M., Kumagai, Y. & Akaike, T. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1673–1684 (2017).
5. Ishii, I., Kamata, S., Hagiya, Y., Abiko, Y., Kasahara, T. & Kumagai, Y. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J. Toxicol. Sci.* 40, 837–41 (2015).

6. Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M. & Akaike, T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 7606–7611 (2014).
7. Akaike, T., Ida, T., Wei, F. Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J.M., Motohashi, H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.* 8, 1177 (2017).
8. Zhao, K., Ju, Y., Li, S., Altaany, Z., Wang, R. & Yang, G. S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Rep.* 15, 792–800 (2014).
9. Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J. & Tonks, N. K. Biochemistry: H₂S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal.* 4, 1–26 (2011).
10. Cai, J. & Lin, X. Sulfhydrated Sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by Hydrogen Sulfide. *Antioxid redox signal*, Epub ahead of print (2018).

11. Altaany, Z., Ju, Y., Yang, G. & Wang, R. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. *Sci. Signal.* 7, ra87 (2014).
12. Sen, N., Paul, B. D., Gadalla, M. M., Mustafa, A. K., Sen, T., Xu, R., Kim, S. & Snyder, S. H. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- κ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell* 45, 13–24 (2012).
13. Ju, Y., Fu, M., Stokes, E., Wu, L. & Yang, G. H₂S-mediated protein S-sulfhydration: A prediction for its formation and regulation. *Molecules* 22, 1–11 (2017).
14. Soderling, T. R., Chang, B. & Brickey, D. Cellular signaling through multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 276, 3719–3722 (2001).
15. Tobimatsu, T. & Fujisawa, H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.* 264, 17907–17912 (1989).
16. Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F. & Knapp, S. Structure of the CaMKII δ /calmodulin complex reveals the molecular mechanism of CaMKII kinase activation. *PLoS Biol.* 8, (2010).
17. Wayman, G. A., Lee, Y.-S., Tokumitsu, H., Silva, A. J., Silva, A. & Soderling, T. R. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59, 914–31 (2008).

18. Kwiatkowski, A. P., Shell, D. J. & King, M. M. The role of autophosphorylation in activation of the type II calmodulin-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 263, 6484–6486 (1988).
19. Soderling, T. R. & Derkach, V. A. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci.* 23, 75–80 (2000).
20. Stratton, M., Lee, I. H., Bhattacharyya, M., Christensen, S. M., Chao, L. H., Schulman, H., Groves, J. T. & Kuriyan, J. Activation-triggered subunit exchange between CaMKII holoenzymes facilitates the spread of kinase activity. *Elife* 3, e02490(2014).
21. Colbran, R. J. & Soderling, T. R. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Curr. Top. Cell. Regul.* 31, 181–221 (1990).
22. Song, T., Hatano, N., Kambe, T., Miyamoto, Y., Ihara, H., Yamamoto, H., Sugimoto, K., Kume, K., Yamaguchi, F., Tokuda, M. & Watanabe, Y. Nitric oxide-mediated modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 412, 223–231 (2008).
23. Coultrap, S. J. & Bayer, K. U. Nitric oxide induces Ca²⁺-independent activity of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). *J. Biol. Chem.* 289, 19458–65 (2014).
24. Erickson, J. R., Nichols, C. B., Uchinoumi, H., Stein, M. L., Bossuyt, J. & Bers, D. M. S-nitrosylation induces both autonomous activation and inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II δ . *J. Biol. Chem.* 290, 25646–25656 (2015).

25. Roskoski, R. Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99, 3–6 (1983).
26. Bibli, S.-I., Luck, B., Zukunft, S., Wittig, J., Chen, W., Xian, M., Papapetropoulos, A., Hu, J. & Fleming, I. A selective and sensitive method for quantification of endogenous polysulfide production in biological samples. *Redox Biol.* 18, 295–304 (2018).
27. Takata, T., Kimura, J., Tsuchiya, Y., Naito, Y. & Watanabe, Y. Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide* 25, 145–152 (2011).
28. Wang, X. L., Pan, L. L., Long, F., Wu, W. J., Yan, D., Xu, P., Liu, S. Y., Qin, M., Jia, W. W., Liu, X. H. & Zu, Y. Z. Endogenous hydrogen sulfide ameliorates NOX4 induced oxidative stress in LPS-stimulated macrophages and mice. *Cell. Physiol. Biochem.* 47, 458–474 (2018).
29. Ono, K., Akaike, T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D. A., Tantillo, D. J., Hobbs, A. J., Nagy, P., Xian, M., Lin, J. & Fukuto, J. M. Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 82–94 (2014).
30. Nagy, P. Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling. *Methods Enzymol.* 554, 3–29 (2015).
31. Ju, Y., Wu, L. & Yang, G. Thioredoxin 1 regulation of protein S⁻-desulfhydration. *Biochem. Biophys. Reports* 5, 27–34 (2016).

32. Liang, D., Wu, H., Wong, M. W. & Huang, D. Diallyl trisulfide is a fast H₂S donor, but diallyl disulfide is a slow one: The reaction pathways and intermediates of glutathione with polysulfides. *Org. Lett.* 17, 4196–4199 (2015).
33. Alberti, K. G. The biochemical consequences of hypoxia. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 11, 14–20 (1977).
34. Hirata, Y., Takahashi, M., Kudoh, Y., Kano, K., Kawana, H., Makide, K., Shinoda, Y., Yabuki, Y., Fukunaga, K., Aoki, J., Noguchi, T. & Matsuzawa, A. Trans-fatty acids promote proinflammatory signaling and cell death by stimulating the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-p38 pathway. *J. Biol. Chem.* 292, 8174–8185 (2017).
35. Scott, J. A., Klutho, P. J., El Accaoui, R., Nguyen, E., Venema, A. N., Xie, L., Jiang, S., Dibbern, M., Scroggins, S., Prasad, A. M., Luczak, E. D., Davis, M. K., Li, W., Guan, X., Backs, J., Schlueter, A. J., Weiss, R. M., Miller, F. J., Anderson, M. E., *et al.* The multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent Kinase II δ (CaMKII δ) regulates arteriogenesis in a mouse model of flow-mediated remodeling. *PLoS One* 8, e71550 (2013).
36. McCawley, L. J. & Matrisian, L. M. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Current Opinion in Cell Biology* 13, 534–540 (2001).
37. Cortese-krott, M. M., Fernandez, B. O., Kelm, M., Butler, A. R. & Feelisch, M. Nitric oxide on the chemical biology of the nitrite/sulfide interaction. *Nitric Oxide* 46, 14–24 (2015).

38. Cortese-Krott, M. M., Kuhnle, G. G. C., Dyson, A., Fernandez, B. O., Grman, M., DuMond, J. F., Barrow, M. P., McLeod, G., Nakagawa, H., Ondrias, K., Nagy, P., King, S. B., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., Singer, M., Kelm, M., Butler, A. R. & Feelisch, M. Key bioactive reaction products of the NO/H₂S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4651-60 (2015).
39. Blatnik, M., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Succination of proteins by fumarate: Mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 272–275 (2008).
40. Piroli, G. G., Manuel, A. M., Walla, M. D., Jepson, M. J., Brock, J. W. C., Rajesh, M. P., Tanis, R. M., Cotham, W. E. & Frizzell, N. Identification of protein succination as a novel modification of tubulin. *Biochem J* 462, 231–245 (2014).
41. Erickson, J. R., Joiner, M. ling A., Guan, X., Kutschke, W., Yang, J., Oddis, C. V., Bartlett, R. K., Lowe, J. S., O'Donnell, S. E., Aykin-Burns, N., Zimmerman, M. C., Zimmerman, K., Ham, A. J. L., Weiss, R. M., Spitz, D. R., Shea, M. A., Colbran, R. J., Mohler, P. J. & Anderson, M. E. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133, 462–474 (2008).
42. Erickson, J. R., Pereira, L., Wang, L., Han, G., Ferguson, A., Dao, K., Copeland, R. J., Despa, F., Hart, G. W., Ripplinger, C. M. & Bers, D. M. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature* 502, 372–6 (2013).

43. Erickson, J. R. Mechanisms of CaMKII activation in the heart. *Front Pharmacol* 5, 1–5 (2014).

7. 謝辞

本研究の遂行に際しまして、御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました昭和薬科大学薬理学研究室・渡邊泰男教授に深甚なる謝意を表すとともに、深く御礼申し上げます。

また、本論文の作成に際しまして、御指導頂きました昭和薬科大学衛生化学研究室・石井功教授、生化学研究室・伊東進教授、薬物治療学研究室・水谷顕洋教授に深謝申し上げます。

本研究に際し、建設的な御指導、御助言、御校閲を頂きました昭和薬科大学薬理学研究室・土屋幸弘講師、高田剛特任助教に深く感謝致します。

日本薬学会長井記念薬学研究奨励金（N-162901）に採用していただき、支援していただきました日本薬学会に感謝申し上げます。

本研究に際し、多大な御協力を頂きました昭和薬科大学薬理学研究室内の皆様に感謝致します。

最後に、大学院進学に理解を示し、さまざまな面で支援して頂いた家族に感謝致します。

8. 本研究の誌上発表

Shoma Araki, Tsuyoshi Takata, Yukihiro Tsuchiya, Yasuo Watanabe,
Reactive sulfur species impair Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
via polysulfidation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508, 550-555, (2019)