

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

薬理学研究室 荒木笙馬

【諸言】

システインヒドロパースルフィド (CysSSH)に代表される活性イオウ分子は分子内にイオウ原子が連なった構造を有している。活性イオウ分子は生体内に豊富に存在し、CysSSHはシスタチオニン γ -リアーゼ (CSE) によって直接的、間接的に産生される。興味深いことに、CysSSHはタンパク質の構成システイン残基にも見られ、これによりタンパク質機能が制御されている (タンパク質ポリスルフィド化)。

一方、カルモデュリンキナーゼ II (CaMKII) は Ca^{2+} /カルモデュリン (CaM) 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り、広い基質特異性を有することから多機能リン酸化酵素として知られている。これまでに当研究室では CaMKII の活性制御について一酸化窒素 (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。したがって CaMKII の Cys⁶ はレドックス応答性システイン残基であり、活性制御において重要なシステイン残基であると考えられる。そこで、本研究では活性イオウ分子によるポリスルフィド化に着目し、新規の CaMKII 活性制御について検討した。

【結果・考察】

1. 活性イオウ分子による CaMKII 活性制御のメカニズム

CaMKII を昆虫細胞系により発現精製し、活性イオウ分子である Na_2S_n ($n=2-4$) を処置の酵素活性への影響を検討した。すると、 Na_2S_n の濃度依存的に CaMKII 活性は阻害された。また、ポリスルフィド化の解析により、CaMKII は活性イオウ分子により、可逆的なポリスルフィド化を介して阻害されることが明らかとなった。この阻害様式について検討したところ、 Na_2S_4 による CaMKII 活性阻害は ATP と競合することがわかった (Fig. 1)。これは NO による CaMKII 活性阻害と同一の阻害様式であることから、SNO 化部位である Cys⁶ の Ala 変異体を作製し活性イオウ分子に対する感受性を検討した。すると、活性イオウ分子は NO と同様に Cys⁶ を介して CaMKII 活性を阻害することが明らかとなった。また、COS-7 細胞を用いた CaMKII 過剰発現系においても Na_2S_4 により、Cys⁶ を介して CaMKII 活性は阻害された (Fig. 2)。以上より、活性イオウ分子は NO と同様に CaMKII の Cys⁶ の可逆的なポリスルフィド化を介して、CaMKII の ATP 親和性を低下させることでその活性を制御することが明らかとなった。

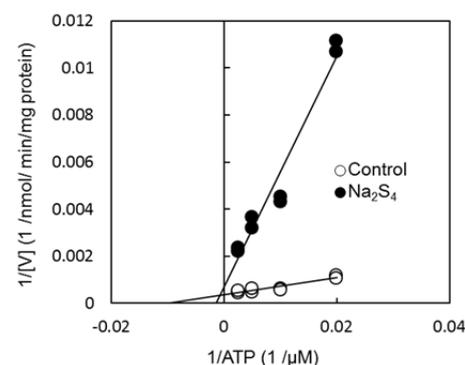


Fig.1.活性イオウ分子は ATP と競合的に CaMKII 活性を阻害する。

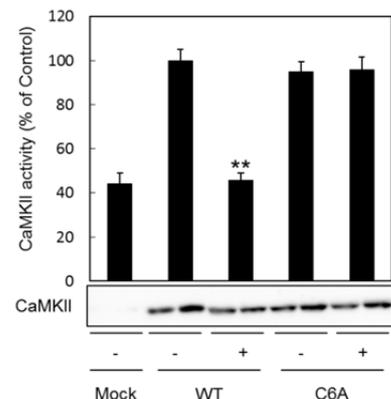


Fig.2.培養細胞系において活性イオウ分子は Cys6 を介して CaMKII 活性を阻害する

2. 活性イオウ分子による内在性 CaMKII 活性制御

マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) に内在する CaMKII に対する活性イオウ分子の影響について CaMKII を免疫沈降し検討した。Na₂S₄ 処置により RAW264.7 の CaMKII 活性は濃度依存的に阻害された。

RAW264.7 ではリポポリサッカライド (LPS) により、CSE が発現誘導されるので、LPS 及び CSE 阻害剤であるプロパルギルグリシン (PAG) の CaMKII 活性への影響について検討した。LPS により CSE に加えて、CaMKII が発現誘導され (Fig.3A)、このとき CaMKII 活性は発現量に伴って増強していた。また、PAG は LPS によって亢進した発現量に影響を及ぼすことなく CaMKII 活性を増強した (Fig.3B)。

このことから、RAW264.7 において LPS は CaMKII δ の発現誘導を介して CaMKII シグナルを亢進する一方で、CSE の発現誘導を介して CaMKII 活性を抑制していることが示唆された (Fig. 4)。

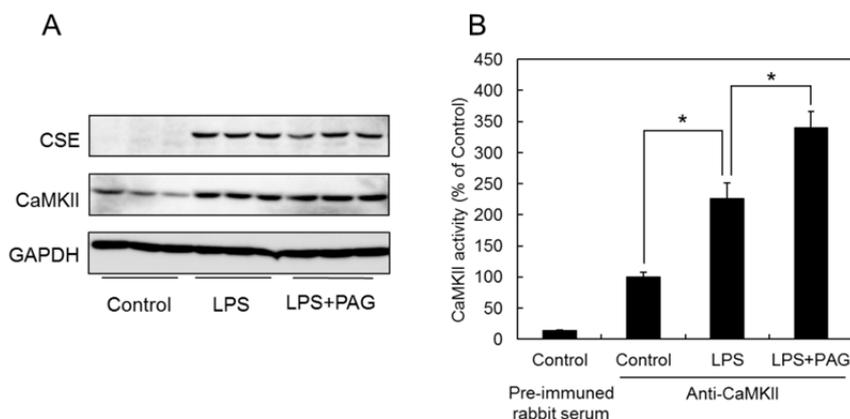


Fig. 3. RAW264.7 に内在する CaMKII に対する LPS 及び PAG の影響

【結論】

本研究により、活性イオウ分子は Cys⁶ のポリスルフィド化を介した新規の CaMKII 制御因子であることが明らかとなった。また、マクロファージにおいて LPS 処置により誘導される CSE は、同時に誘導される CaMKII シグナルを抑制していることが示唆された。マクロファージにおける CaMKII はアポトーシスの促進を介した動脈硬化の進展や、炎症性サイトカインの産生に関与しているため、本研究はこれらの病態における活性イオウ分子の意義を明らかにする上で有益なものであると考えている。

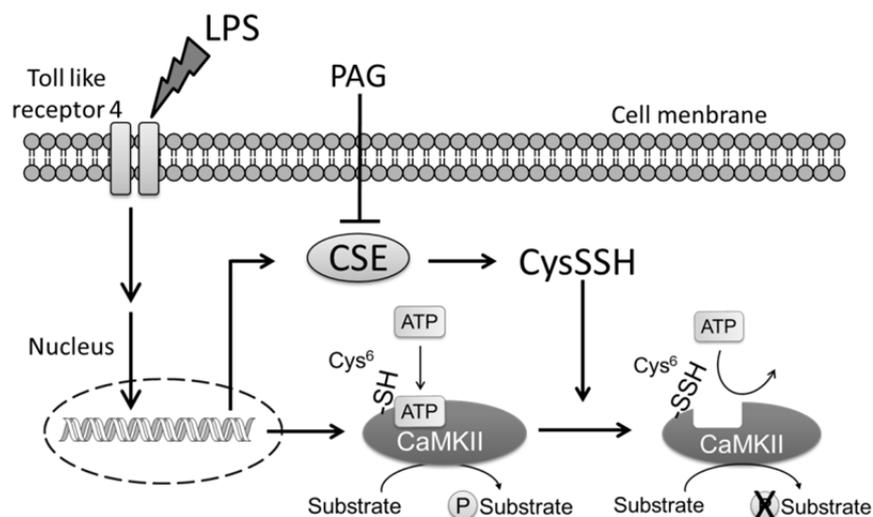


Fig. 4. CaMKII 活性は LPS によって誘導される CSE によって阻害される

【本研究の誌上発表】

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