

Title	Ca ²⁺ -dependent Regulation of the Spectrin/ Actin Interaction by Calmodulin and Protein 4.1
Author(s)	田中, 敏彦
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37791
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	田中敏彦
博士の専攻分野 の名称	博士（医学）
学位記番号	第 9880 号
学位授与年月日	平成 3 年 8 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Ca ²⁺ -dependent Regulation of the Spectrin/Actin Interaction by Calmodulin and Protein 4.1 (スペクトリン-アクチン相互作用のカルモデュリンと 4.1 蛋白質 による Ca ²⁺ 依存性制御)
論文審査委員	(主査) 教授 祖父江憲治 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 荻原 俊男

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞膜を支える細胞膜裏打ち構造（膜骨格）は、細胞の形態維持だけでなく多彩な細胞膜機能ひいては細胞機能の発現と調節に重要な役割を担っている。この膜骨格の調節機構を解明するため、比較的単純な膜系である赤血球膜の主要な膜骨格成蛋白質（スペクトリン-アクチン-4.1 蛋白質）相互作用の Ca²⁺ カルモデュリン依存性調節を研究した。赤血球の変形能や Ca²⁺ 依存性の形態変化については、膜骨格系の Ca²⁺ 依存性が報告されているが、その機序はこれまで解明されていなかった。

〔方法ならびに成績〕

ヒト赤血球の細胞膜からスペクトリン（Sp）と 4.1 蛋白質を精製する段階で、4.1 蛋白質がカルモデュリン（CaM）に結合することを見だし、CaM 親和性カラム法・蛋白質架橋法・蛍光法でその動態を明らかにした。4.1 蛋白質と CaM は 1 : 1 に結合し、その Kd 値は 5.5×10^{-7} M で Sp 四量体-CaM 間の結合 ($Kd = 1.2 \times 10^{-4}$ M) より強固である。また、4.1 蛋白質-CaM の結合は Ca²⁺ 非依存性で、500mM 以上のイオン強度でようやく解離する。Ca²⁺ および Trifluoperazine 同時存在下では両者の結合が阻害された。

キムトリプシン限定分解による domin mapping では、4.1 蛋白質（80 kDa）の N 末端側の 30 kDa 部分に CaM 結合部位が存在することを明らかにし、また各種条件下での分解状態の変化や、架橋複合体の電気易動度変化から、Ca²⁺ の有無により 4.1 蛋白質-CaM 複合体の構造変化が生じることが推察された。

蛋白質結合実験と粘度測定により、蛋白質間の相互作用を観察した。4.1蛋白質はアクチンとSpの結合を強化し粘度上昇を促進させることが知られているが、それだけではCa²⁺感受性はなく、CaMの存在下で初めてCa²⁺依存性を示した。すなわち、アクチン/Sp/4.1蛋白質/CaM複合体の粘度は、10⁻⁶M以上のCa²⁺濃度で低下した。しかし、この粘度変化にもかかわらず、アクチン/Sp/4.1蛋白質/CaMの結合割合は変化しなかった。この実験系では、個々の蛋白質の濃度比およびCa²⁺値は、赤血球膜内の生理的状态にはほぼ一致している。

〔総括〕

以上の実験結果から、赤血球細胞膜骨格のCa²⁺依存性調節機構は次のようなものと考えられる。4.1蛋白質はスペクトリンのアクチン結合能およびアクチン架橋能を強化するが、これだけではCa²⁺感受性を発揮するようになる。このCa²⁺感受性は4.1蛋白質-CaM複合体の結合・解離によるものではなく、同複合体の構造変化により、スペクトリンのアクチン結合能を変化させずに、その架橋能のみを変化させることによる。

今回の結果は赤血球膜骨格のCa²⁺依存性制御に関するものであるが、非赤血球細胞においてもSp/4.1近縁蛋白質やCaMの存在はすでに確認されており、より広汎な膜骨格系Ca²⁺制御機構の基本となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞膜裏打ち構造は、細胞形態を維持するとともに、細胞機能調節に重要な役割を担っている。本研究は、赤血球裏打ち構造を構成する主要蛋白質（スペクトリン・アクチン・4.1蛋白質）間相互作用のCa²⁺依存性調節機構を解明したものである。

4.1蛋白質はスペクトリンのアクチン結合および架橋を強化するが、4.1蛋白質にカルモデュリンが結合してCa²⁺感受性を発揮するようになる。高Ca²⁺濃度では4.1蛋白質-CaM複合体の構造が変化し、アクチン結合能は変化させずに、その架橋増強のみを抑制する。さらに、非赤血球細胞の膜打ち構造においても、同様のCa²⁺依存性調節機構の存在を見いだした。

赤血球膜裏打ち構造は比較的単純であるが高度に機能分化したものであり、この調節機構の解明は、一般細胞での細胞膜を介した細胞現象の研究において、膜骨格からのアプローチに有力な根拠を与えるものであり、学位に値する考えられる。