

Title	PIP3 inhibition of RGS protein and its reversal by Ca ²⁺ /calmodulin mediate voltage-dependent control of the G protein cycle in a cardiac K ⁺ channel.
Author(s)	石井, 優
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46264
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	いし 井 まさる 石 井 優
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19686 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 28 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	PIP ₃ inhibition of RGS protein and its reversal by Ca ²⁺ /calmodulin mediate voltage-dependent control of the G protein cycle in a cardiac K ⁺ channel. (フォスファチジルイノシトール 3 リン酸による RGS 蛋白質の抑制と、そのカルモデュリンによる脱抑制が心筋 G 蛋白質サイクルの電位依存性制御を行う)
論文審査委員	(主査) 教授 倉智 嘉久 (副査) 教授 高井 義美 教授 三木 直正

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

G 蛋白質制御 K⁺ チャネル (G protein-gated K⁺ channel : K_G) は、G 蛋白質の βγ サブユニットが直接結合することにより活性化される内向き整流性カリウムチャネル (Kir) である。心臓では洞房結節や心房筋に存在し、アセチルコリン (ACh) の刺激を受けたムスカリン (m₂) 受容体から遊離される Gβγ サブユニットによって活性化され、膜を過分極させることにより徐脈を惹起する。心房筋上に存在し ACh で誘導される K_G 電流には、relaxation と呼ばれる特徴的なゲート機構が存在することが以前から報告されていた。即ち、膜電位を脱分極状態 (例えば +40 mV) で一定時間 (1 秒程度) 固定しその後急に過分極 (例えば -100 mV) させると、脱分極中は内向き整流性により外向き電流はほとんど見られないが、過分極させると瞬間的にある値まで内向き電流の増加が見られ、その後緩徐な時間経過 (1 秒程度) で電流増加が見られる。この電位-時間依存性の電流変化を relaxation というが、この性質は他の Kir には認められない。電位センサーをもたない K_G チャネルが如何にしてこのような電位依存性ゲーティング機構を示すのか全く不明であった。この relaxation の分子機構を明らかにし、その機構の重要性について検討することが本研究の目的であった。

〔 方法ならびに成績 〕

1. 単離ラット心房筋における native K_G 電流及びアフリカツメガエル卵母細胞において異所性発現させた K_G 電流の測定を行った。その結果、(1)アフリカツメガエル卵母細胞に m₂ 受容体と K_G チャネルを発現させて再構成された K_G では relaxation は見られなかったが、GTPase 活性を促進し三量体 G 蛋白質シグナルを負に調節する因子である RGS (Regulators of G protein signalling) を発現させると relaxation を再構成することができた。(2)心房筋細胞で細胞外 Ca²⁺ 除去及び細胞内 BAPTA 投与により膜電位依存性の細胞内 Ca²⁺ 上昇を抑制すると relaxation が消失した。(3)RGS は RGS domain において Ca²⁺ 依存性にカルモデュリン (CaM) と結合するが、CaM の阻害剤及び CaM と結合するが GTPase 活性を促進しない変異 RGS も relaxation を抑制した。(4)精製した RGS 蛋白は K_G 電流を抑制するが、この RGS の効果は膜上のホスホリン脂質の 1 つであるホスファチディルイノ

シトール(3,4,5)3リン酸(PtdIns(3,4,5)P₃)の存在下では減弱されるが Ca²⁺/CaM を加えることにより回復した。以上のことより relaxation の分子機構を次のように推定した。脱分極による細胞内への Ca²⁺ 流入が RGS と CaM の結合を促し、これにより RGS が PtdIns(3,4,5)P₃ による抑制から回復されて活性化し、G 蛋白質サイクルが負に調節され活性型 K_G の数が減少する。過分極時には上記の逆が起こり、活性型 K_G の数は緩徐に増加し relaxation を形作ると考えられた。

2. PtdIns(3,4,5)P₃ やカルモデュリンが如何にして RGS 蛋白質の機能を制御するかについて明らかにするため、精製した RGS 蛋白質とホスホリン脂質との結合実験を行い、それに対する CaM の効果について検討した。その結果、RGS 蛋白質はホスホリン脂質の中でも PtdIns(3,4,5)P₃ に特異的に結合し、カルモデュリンの存在によりその結合が減弱することがわかった。さらに定量的な実験により、PtdIns(3,4,5)P₃ とカルモデュリンは RGS 蛋白質に競合的に結合することがわかった。さらに RGS 蛋白質の変異体を用いた実験により、PtdIns(3,4,5)P₃ とカルモデュリンはともに RGS ドメイン上の正電荷クラスターに結合することを明らかにした。

[総 括]

この実験系では K_G チャネルの電気生理学的測定により、三量体 G 蛋白質サイクルの動的変化をリアルタイムに捉えることができたのであって、その結果は決して K_G チャネルシステムに限定されたものではなく、その他の三量体 G 蛋白質を介する細胞シグナル (アデニル酸シクラーゼやホスホリパーゼ C など) においても同様の現象が存在することを強く示唆される。三量体 G 蛋白質サイクルは、細胞内シグナル伝達の最も基本的で重要な機構であり、これまで数多くの受容体・効果器とその機能が明らかにされてきた。本研究は RGS 蛋白質などの生理的な調節因子の作用様式を明らかにすることにより、三量体 G 蛋白質シグナルの領域でこれまで看過されてきた実細胞での生理的調節機構についての深い理解が得られたと考えている。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、三量体 G 蛋白質により活性化されるカリウムチャネルを電気生理学的手法にて測定することにより、生細胞での三量体 G 蛋白質サイクルの動的な可視化に成功した。その結果、心筋細胞などの興奮性膜をもった細胞において、三量体 G 蛋白質サイクルの調節因子である Regulators of G protein signaling (RGS) 蛋白質が、細胞膜のリン脂質の一種であるフォスファチジルイノシトール3リン酸によって機能が抑制されており、細胞内のカルシウム濃度が上昇すると、カルモデュリンを介してこの脱抑制が生じ活性化するという生理的機構が存在することを明らかにした。三量体 G 蛋白質サイクルは、細胞内シグナル伝達の最も基本的で重要な機構であり、これまで数多くの受容体・効果器とその機能が明らかにされてきた。本申請者の研究は RGS 蛋白質などの生理的な調節因子の作用様式を明らかにすることにより、三量体 G 蛋白質シグナルの領域でこれまで看過されてきた実細胞での生理的調節機構について深い理解を与えるものであり、学位に値するものと認める。