

Title	Identification of Functional Domain and Novel Binding Partners of STIM Proteins
Author(s)	齊藤, 則充
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58098
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	齊藤 則充
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 24391 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Identification of Functional Domains and Novel Binding Partners of STIM Proteins (STIM 蛋白の機能ドメインおよび新規会合蛋白の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 謙 (副査) 教授 楽木 宏実 教授 下村伊一郎

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

チロシンキナーゼ型受容体や G 蛋白質共役型受容体が活性化された場合、Ca²⁺が小胞体内から細胞質へ放出され一過性の細胞内 Ca²⁺の上昇が惹起される。一方、小胞体内 Ca²⁺が枯渇すると、Store-operated calcium channel (SOC channel) が開放され細胞外から大量の Ca²⁺流入がもたらされる。この細胞内カルシウム(Ca²⁺)変動はセカンドメッセンジャーとして働き、細胞機能の調節に幅広く関与することが知られている。Stromal interaction molecule 1 (STIM1) や STIM2 は、当研究室で同定された分子であるが、近年、小胞体内 Ca²⁺の枯渇を感じし SOC チャネルを開放する唯一のセンサーであることが明らかにされてきた。この間、小胞体内 Ca²⁺濃度低下に伴い、STIM 蛋白は立体構造を変化させ細胞膜直下に集積することが必要である。しかし、STIM 蛋白の細胞内局在や立体構造変化など不明な点が多々存在する。本研究は、Ca²⁺センサーとして重要な STIM 分子機構を解明することを目的として、STIM 分子内ドメインの機能解析と STIM 結合蛋白の網羅的解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

STIM 分子は、N 端にシグナルペプチドがあり 1 つの膜貫通領域(TM)を持つ I 型膜蛋白である。細胞外あるいは小胞体内領域(EX)には Ca²⁺結合部位である EF-hand が存在し、細胞質領域には Coiled-Coil ドメイン(CC)や Ser/Thr-rich ドメイン、Lysine-rich ドメインが存在する。STIM 分子内各ドメインの役割を解

析するために、C 端側から各ドメインを欠損させた変異 STIM 蛋白を発現する 4 種のプラスミドを作製した: STIM1 (Full), STIM1 (EX+TM+CC), STIM1 (EX+TM), STIM1 (EX)。HeLa 細胞株に各変異 STIM 蛋白を発現させ、培養上清および細胞表面への蛋白発現をウェスタンブロットにて解析した。培養上清中には STIM1 (EX) 蛋白のみが存在した。一方、細胞表面膜蛋白をビオチン化した後のウェスタンブロットでは、細胞質領域を欠く STIM1 (EX+TM) 蛋白のみが著明にビオチン化されおり、Ser/Thr-rich ドメイン、Lysine-rich ドメインの有無に関わらず Coiled-Coil ドメインが存在する変異蛋白[STIM1 (Full), STIM1 (EX+TM+CC)]の細胞表面への発現は極限られたものであった。これら STIM1 変異蛋白の細胞内局在は共焦点顕微鏡にて確認できた。即ち、STIM1 (Full)や STIM1 (EX+TM+CC)は主に小胞体内に局在しているものの、STIM1 (EX+TM)は必ずしも小胞体に局在しない像が得られた。さらに、STIM1 (Full)や STIM1 (EX+TM+CC)を発現させた細胞では小胞体は膨化した形状を示し、これら蛋白が小胞体内に蓄積されることが想定された。そこで、各 STIM1 変異蛋白の半減期を S35 メチオニンパルスチェイスアッセイにて解析した。結果、STIM1 (Full)や STIM1 (EX+TM+CC)蛋白の半減期は約 19 時間であったのに対し、STIM1 (EX+TM)蛋白の半減期は 11 時間で有意に短縮していた。以上、Coiled-Coil ドメインは、STIM 蛋白の小胞体内局在および蛋白安定化に重要であることが明らかとなった。

STIM1 の機能や蛋白性状に種々の結合蛋白が影響を与える可能性が示唆されている。そこで、293T 細胞株に STIM1 (Full)-FLAG 蛋白を過剰発現させた後抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行った。その免疫沈降物の電気泳動・ゲルの銀染色・特異的バンドの切り出し・トリプシン処理を行った後に、各ペプチドを質量分析にて解析した。80-90kDa の特異バンドからは STIM1 以外に Calnexin が、100-110kDa の特異バンドからは Exportin1, Transportin1 が検出された。これら STIM1 と Calnexin, Exportin1, Transportin1 の結合は HeLa 細胞株に存在する内在性蛋白間で確認された。また、これら 3 分子は STIM2 とも結合することも判明した。Calnexin は小胞体シャペロンとして知られ、特異な糖鎖を介して新生糖蛋白の folding に関わっているとされる。しかし、糖鎖修飾を受けない STIM1 変異 STIM1 (del Gly) においても Calnexin との結合能が残存しており、糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin 処理細胞においても STIM1 と Calnexin の結合が認められた。このことから STIM1 と Calnexin の結合は糖鎖を介さないことが考えられ、Calnexin はシャペロン機能を超えて STIM1 に結合する可能性が示唆された。以上、新しい STIM 結合蛋白として Calnexin, Exportin1, Transportin1 を同定できた。

〔 総 括 〕

Coiled-Coil ドメインの役割および STIM 結合蛋白に関する新しい情報は、STIM 蛋白の機能・性状に関する分子機構解明に繋がると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Stromal interaction molecule 1 (STIM1) は EF hand や Coiled-Coil domain 構造をもつ種々の細胞に発現する小胞体蛋白であり、ストア作動性カルシウム流入を起こす小胞体内のカルシウムセンサーである。今回我々は STIM1 の細胞内局在や作用メカニズムを明らかにすることを目的として、STIM 各ドメインの役割と STIM 会合蛋白を解析した。種々の変異 STIM を用いた実験により、Coiled-Coil domain が小胞体局在や蛋白安定性に関与することが明らかになった。さら

にSTIM1の免疫沈降物に対し質量分析を行うことでSTIM1結合蛋白を網羅的に解析した結果、STIM1にCalnexinという小胞体シャペロンのほか、Exportin1およびTransportin1という核内外輸送タンパク質が結合することを見出した。これらの知見は、STIM1を中心とした細胞内カルシウム調節メカニズムの解明の一助になると思われる。以上の内容は学位に値すると考えられる。