The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの機能解明
Author(s)	宇山, 侑希
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76619
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　宇山侑希　）	
論文題名	心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼの機能解明 (Analysis of the mechanism of cardiac myosin light chain kinase activity)

論文内容の要旨

心臓特異的ミオシン軽鎖キナーゼ（cMLCK）は心室型ミオシン調節軽鎖（MLC2v）をリン酸化することで心筋収縮性を増強する。ヒトやマウスにおいて、その活性低下から拡張型心筋症（DCM）を発症する事が報告されているが、活性制御機構や心筋細胞における機能は不明な点が多い。

まず、活性測定系を確立する為にcMLCK、MLC2v、及びCaMを精製し、これら蛋白質を用いて二種類の測定系（Phos-tag SDS-PAGE、ADP-Glo Kinase Assay System）を確立した。次に、cMLCKドメインが活性に与える影響を調べる為に、各部位の欠損変異体を作製し、上記の2種類の方法で調べた。その結果、MLCKファミリー間で保存性が高いC末端領域のcalmodulin-binding domain（CaMBD)、及びregulatory domain（RD）欠損変異体では活性が著しく低下することが確認された。さらに、骨格筋型または平滑筋型MLCKのRDをcMLCKに置換したキメラ変異体を作製し、活性を測定したところ骨格筋型RDキメラ変異体では野生型と同等以上の活性が確認された。一方で、平滑筋型RDを有するキメラ変異体では活性は認められなかった。また、保存性の低いN末端領域では全長819アミノ酸の内、N末端から480 アミノ酸まで欠損させた変異体では活性は保持されていた。次に、このN末端欠損変異体を用いて高純度のcMLCK-CaM複合体を精製し、蛋白質結晶を得ることでX線結晶構造解析を行った。その結果、C末端の調節ドメインにCaMが巻き付くように結合することで活性調節ドメインが大きく開き、触媒ドメインの活性中心部位へのアクセスを可能とすることが実証された。細胞実験では、cMLCK発現抑制したラット新生児心筋細胞に野生型cMLCK、又はDCM関連遺伝子として報告されたp.Pro639Valfs*15-cMLCK変異体を導入するknockdown-rescue（KDR）システムを確立した。このKDR条件下でメカニカルストレス（圧負荷、伸展刺激）を与えたところ野生型cMLCKのみが心筋細胞の高度なサルコメア形成促進させることが明らかになった。また、高速撮影機能を備えた顕微鏡による培養心筋細胞のmotion vector analysisを導入することで、培養心筋細胞における収縮評価系を確立した。この系を用いて、ラット心筋細胞、及びヒトiPS心筋細胞に野生型cMLCKを発現させることで心筋細胞の収縮性の上昇が確認できた。一方で、p.Pro639Valfs*15-cMLCK変異体では収縮性の変化は認められなかった。

以上の結果より、cMLCK のN末端領域から480アミノ酸までは活性に影響を与えなかったが、変異体、及び構造解析よりC末端領域は活性に大きく影響を与えることが分かった。さらに、心筋細胞においてcMLCKによるMLC2vのリン酸化がメカニカルストレスに対するサルコメア形成促進、及び収縮力に直接関わっていることも示すことが出来た。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（宇山　　侑希）			
論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主 査	教授	高島　成二
	副 査	教授	深川　竜郎
	副 査	教授	長澤　丘司
	副査	准教授	岡本　浩二

論文審査の結果の要旨

cardiacMLCK は心臓に特異的に発現するリン酸化酵素で、ミオシン軽鎖をリン酸化することにより心筋の収縮性を上昇させる。心不全患者では cardicacMLCK の発現量が低下してミオシン軽鎖のリン酸化が低下することが予後の悪化につながることが知られている。そのため、cardiacMLCK の生化学的解析は新たな心不全治療薬の開発につながると期待される。本論文では cardiacMLCK タンパク質の Calmodulin 結合下での結晶化に成功し、解像度 2.7Å の構造を得た。結果、世界で初めて Calmodulin による酵素活性制御の分子構造基盤が明らかになった。Calmodulin が結合することにより活性制御されるタンパク質はおおいがその制御機構は構造的にまだ不明な点が多い。酵素活性データと合わせ検討した本論文は生化学的価値が高い。学位授与にふさわしいと考える。