

インタラクトーム解析を用いた新しい細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達機構の網羅的探索

徳光 浩, 曲 正樹

岡山大学大学院自然科学研究科

概要 Calmodulin (CaM) は真核生物において最も高度に保存されたタンパク質の一つであり、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 結合モチーフである4つの EF hand 構造から構成されている。CaM は Ca^{2+} 依存的に標的タンパク質へ結合することで、それら標的分子の生理機能を変化させることにより筋収縮、免疫応答、遺伝子発現、神経発生、分泌などの多様な生理応答を制御している。現在までの 40 年間の研究から、タンパク質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、細胞骨格系タンパク質、アデニル酸シクラーゼ、膜受容体など多くの CaM 標的分子が同定された。現在においても、さらに新規な CaM 標的分子が発見されていることから、未解明なカルシウムシグナル伝達経路の存在が示唆されている。私達は近年プロテオミクス解析を用いた網羅的同定研究により、ラットの脳組織中から Wolframin や PRG-1 などの新規な CaM 標的分子を同定することができ、新規な Ca^{2+} /CaM 依存的なシグナル伝達経路の存在を明らかにしてきた。一方、CaM 標的分子を同定するプロテオミクス解析は、CaM 架橋担体を用いて組織抽出液から CaM 標的分子を精製し、LC-MS/MS (質量分析法) により同定するものであるため、本手法では CaM 標的分子とそれに相互作用する分子とを区別できない問題点がある。本研究においては、カルシウムシグナル伝達を担う Calmodulin (CaM) の新規な標的分子を同定するために、我々は新しく開発したゲノムワイド CaM 結合スクリーニングをヒト由来 19676 種類の GST 融合タンパク質に対して行った。結合スクリーニングの結果、新規な CaM 標的分子として striated muscle activator of Rho signaling (STARS) を同定し、その CaM 結合能を解析した。試験管内および培養細胞において Ca^{2+} /CaM 複合体が化学量論的に STARS の N 末端 (Ala13-Gln35) で相互作用することが明らかとなった。また STARS 分子の変異体解析により、Ile20 と Trp33 が CaM との結合に必須な疎水性アミノ酸であることが明らかとなった。さらに STARS の CaM 結合能欠損変異体 (Ile20Ala, Trp33Ala) は、SRF 依存的な転写活性を高める知見を得ることができた。これらの結果は、心筋特異的発現分子である STRAS の機能である筋肉タンパク質の遺伝子発現調節と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴う興奮-収縮連関とを機能的に繋げる可能性を示唆するものとなった。

1. 研究背景

Calmodulin (CaM) は真核生物において最も高度に保存されたタンパク質の一つであり、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 結合モチーフである4つの EF hand 構造から構成されている。CaM は Ca^{2+} 依存的に標的タンパク質へ結合することで、それら標的分子の生理機能を変化させることにより筋収縮、免疫応答、遺伝子発現、神経発生、分泌などの多様な生理応答を制御している。現在までの 40 年間の研究から、タンパク質リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、細胞骨格系タンパク質、アデニル酸シクラーゼ、膜受容体など多くの CaM 標的分子が同定された。現在においても、さらに

新規な CaM 標的分子が発見されていることから、未解明なカルシウムシグナル伝達経路の存在が示唆されている。私達は近年プロテオミクス解析を用いた網羅的同定研究により、ラットの脳組織中から Wolframin や PRG-1 などの新規な CaM 標的分子を同定することができ、新規な Ca^{2+} /CaM 依存的なシグナル伝達経路の存在を明らかにしてきた。一方、CaM 標的分子を同定するプロテオミクス解析は、CaM 架橋担体を用いて組織抽出液から CaM 標的分子を精製し、LC-MS/MS (質量分析法) により同定するものであるため、本手法では CaM 標的分子とそれに相互作用する分子とを区別できない問題点がある。そこで

ロテオミクス解析の欠点を改善するために、私達はヒト完全長 cDNA ライブラリー由来の 19676 種類の発現タンパク質を搭載したタンパク質アレイ (Protein Active Array®) を用いて、CaM 結合スクリーニングを行った。本手法により行った新規な CaM 標的分子群の網羅的かつゲノムワイドな同定法について報告するとともに、新規な CaM 標的分子 (STARS) についての個別機能解析から新たな細胞内カルシウム情報伝達経路の発見について報告する。

2. 実験方法

2.1 Protein active array® (PAA) による CaM 結合スクリーニング

PAA には、ヒト完全長 cDNA ライブラリー由来 19676 種類の発現タンパク質が搭載されている。これらヒトタンパク質はコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により合成され、N 末端に GST タグと FLAG タグが付加されている。合成されたタンパク質は、GST 磁気ビーズと吸着しアレイの底にあるマグネットプレートに固定化されている。この 1536well アレイの 1well には 1 種類ずつタンパク質が搭載されており、さらに duplicate でタンパク質が搭載されているため、合計 27 枚の PAA を結合スクリーニングに使用した。

(試薬)

- Buffer A / Wash buffer : 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM CaCl₂
- Blocking buffer : Buffer A + 5% BSA

- 一次反応剤 : Buffer A + Biotinylated Calmodulin (Biomedical Technology, Inc) (1/1000)
- 二次反応剤 : Buffer A + Streptavidin-HRP (GE Healthcare, Inc) (1/2000)
- 発色剤 : Western Lightning ECL Pro (PerkinElmer, Inc) + 1mM CaCl₂

PAA の四隅からゆつくりと Blocking Buffer 10 mL を加えて、室温で 1 時間振盪した。その後 Blocking buffer を丁寧に取り除き、一次反応剤を 10 mL を加え 4°C で一晩振盪した。その後、一次反応剤を丁寧に取り除き、Wash Buffer を 10 mL 加え、10 分間振盪した。この洗浄を 3 回繰り返した。続いて、二次反応剤を 10 mL 加え、室温で 1 時間振盪した。その後、二次反応剤を丁寧に取り除き、Wash Buffer 10 mL を加え、10 分間振盪した。この洗浄を 3 回繰り返した後、発色剤をゆつくりと 10 mL 加え CCD カメラによって化学発光を検出した。

2.2 STARS plasmid の構築

STARS 発現 plasmid 作製に用いた PCR primer セットは Table 1 に記す。

2.3 GST-STARS-His₆ の発現精製

pGEX-KG-PreS ベクターの XbaI, SmaI 制限酵素サイトに human STARS cDNA をサブクローニングした vector を用いて BL21 Star によりタンパク質発現を行い、Ni セファロースクロマトグラフィー及び Ni セファロースクロマトグラフィーにより精製した。

Table 1. STARS 発現 plasmid 作製に用いた PCR primer セット

GST-STARS (wild type)-His₆, 5'-ggtctagacatggcgactgtggca-3'/5'-atgagacaatgatggtcgggggttcacgggt-3':
 GST-STARS (13-381)-His₆, 5'-ggtctagacgccaagagcgcctccggaag-3'/5'-atgagacaatgatggtcgggggttcacgggt-3':
 GST-STARS (18-381)-His₆, 5'- ggtctagaccggaagatacgcaca-3'/5'-atgagacaatgatggtcgggggttcacgggt-3':
 GST-STARS (22-381)-His₆, 5'- ggtctagacacagccaccctggtc-3'/5'- atgagacaatgatggtcgggggttcacgggt-3':
 GST-STARS (37-381)-His₆, 5'-ggtctagacgcaatgagaacagcatcagg-3'/5'- atgagacaatgatggtcgggggttcacgggt-3':
 GST-STARS (1-50)-His₆, 5'-ggtctagacatggcgactgtggca-3'/5'- gccttaggctcctgggctg-3':
 GST-STARS (1-35)-His₆, 5'-ggtctagacatggcgactgtggca-3'/5'- ctgctgccaacctgggcca-3':
 GST-STARS (1-32)-His₆, 5'-ggtctagacatggcgactgtggca-3'/5'- acctcgggccaagctgatgac-3'
 GST-STARS (Leu17Ala)-His₆, 5'- agcggcgcctggaagatacgcacagcc-3'/5'- ctccgagcggcgtcttggctggcc-3':
 GST-STARS (Ile20Ala)-His₆, 5'- aaggccgcacagccacctgtgcatc -3'/5'- ccggagggcgtcttggctgg -3':
 GST-STARS (Trp33Ala)-His₆, 5'-atcagcttggccccaggtgcccagcagtg-3'/5'-gaccaggggtgctgtgctatctccggag -3':

大腸菌培養及びタンパク質発現

GST-STRAS 発現 vector (pGEX-STARS-His₆) 及び変異体発現 vector によって形質転換された BL-21 Star を 100 mL LB/Amp 培地に植菌し、37°C で一晩培養した。続いて菌液 20-40 mL を 1L LB/Amp 培地へとスケールアップし、OD₆₀₀ 値 = ~0.8 となるまで 37°C で振盪培養を行った。その後、Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を終濃度 1 mM となるように添加して 3 時間振盪培養することで、タンパク質の発現誘導を行った。

タンパク質発現大腸菌の集菌及び破碎

(試薬)

- B- buffer : 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM KCl, 1mM DTT
- Lysis buffer : 10mM イミダゾール + B-buffer + 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

タンパク質発現後の大腸菌液を 500mL 遠心ボトルに回収し、遠心分離 (4°C, 5,000g, 15 分間) によって得られた菌体沈殿を PBS 20 mL を用いて洗浄した。得られた菌体へ Lysis buffer を 30 mL 加え懸濁し、50 mL 遠心管に移して、超音波破碎を施した (冷却しつつ 10 秒×6 回)。

Ni-セファロースカラムクロマトグラフィー

(試薬)

- 平衡化 buffer (Ni 用) : Lysis buffer
 - Wash buffer (Ni 用) : Ni-buffer + 20 mM イミダゾール
 - Elution Buffer (NI 用) : Ni-buffer + 300 mM イミダゾール
- 菌体破碎液を遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 15 分間) してタンパク質を含む破碎上清を得た。続いて 1 mL 量の Ni セファロースを充填したカラムを平衡化 buffer 15 mL にて平衡化後、破碎上清を供した。Wash buffer 30 mL で余分なタンパク質を洗浄し、Elution buffer で目的の GST-STARS を溶出させた (1 段階目)。

グルタチオンセファロースカラムクロマトグラフィー

(試薬)

- 平衡化 buffer (Glu 用) : B-buffer
 - Wash buffer (Glu 用) : 平衡化 buffer (Glu 用)
 - Elution buffer (Glu 用) : B-buffer + 10mM グルタチオン
- 500 μL 量のグルタチオンセファロースを充填したカラムに平衡化 buffer を 10 mL 加え平衡化した後、Ni-セファロースカラム溶出画分を供した。Wash buffer (Glu 用) 20 mL で洗浄し、目的の GST-STARS を溶出させた (2 段階目)。

2. 4 CaM セファロースカラムクロマトグラフィー法

(試薬)

- 平衡化 buffer : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM CaCl₂, 1 mM DTT
- Wash buffer : 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.2 mM CaCl₂ 1 mM DTT
- Elution buffer : 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM EGTA, 1 mM DTT

200 μL 量の CaM セファロースを充填したカラムに平衡化 buffer 10 mL を加え平衡化した後、GST-STARS (40 μg) 及び GST-SAMS (40 μg) を反応させた。その後、wash buffer 2 mL を加え洗浄した。この洗浄を 5 回繰り返した。最後に Elution buffer を加え CaM 担体とその標的分子を解離させた。

続いて溶出画分 10 μL 量を SDS-PAGE 法で解析し、それぞれの溶出画分のタンパク質濃度を Bradford 法により定量化した。

2. 5 CaM-overlay 法

(試薬)

- Overlay buffer (Ca 用/EGTA 用) : 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM CaCl₂ or 2 mM EGTA
- ブロッキング剤 : Overlay buffer + 5% スキムミルク
- 一次反応剤 : Overlay buffer + Biotinylated Calmodulin (1/2000)
- 二次反応剤 : Overlay buffer + Streptavidin-HRP (1/2000)
- 発光試薬 : Western Lightning ECL-Plus (PerkinElmer, Inc)

SDS-PAGE 後のゲル及びニトロセルロース膜を転写 buffer で湿らせた濾紙 (セルドライゲルパッド) で挟み、転写機を用いて 90 分間 10 V 低圧転写を行った。続いてブロッキング (常温振盪 1 時間もしくは 4°C 振盪一晩)、一次反応 (常温振盪 1 時間)、overlay buffer wash (常温振盪 15 分)、二次反応 (常温振盪 1 時間)、overlay buffer wash (常温振盪 15 分間) の順に操作を行い CCD カメラによって化学発光を検出した。

2. 6 GST pull-down 法

(試薬)

- TTBS (0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 0.05% Tween)

- 平衡化 buffer : B-buffer
- wash buffer (Ca 用/EGTA 用) : TTBS + 2 mM CaCl₂ or 5 mM EGTA

CaM (10 μg)+GST (10μg) or GST-STARS (10 μg) の反応系に平衡化したグルタチオンセファロースを 25 μL 量加え、4°Cで一晩転倒混和した。その後遠心分離(4°C, 3,000 rpm, 1 分間)し、グルタチオンセファロースを吸わないように上澄みを丁寧に除去した。続いて wash buffer 1 mL を加え、4°Cで 10 分間転倒混和した。この洗浄を 5 回繰り返した。洗浄後、遠心分離後(4°C, 3,000 rpm, 1 分)の上澄みを丁寧に取り除き、1×sample buffer 50 μL 加え、SDS-PAGE 法により解析した。

2.7 免役沈降法

(試薬)

- プレート wash buffer : 0.15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH7.5)
- 細胞回収 buffer (Ca 用/EGTA 用) : TTBS + 0.2 mM PMSF + 2 mM CaCl₂ or 5 mM EGTA
- Protein G sepharose (GE Healthcare, Inc)
- ビーズ wash buffer : 細胞回収 buffer(Ca 用/EGTA 用)
- PBS

Transfection 後、培養プレート wash buffer により洗浄し、細胞回収 buffer 300 μL を加え 1.5 mL エッペンチューブへ細胞を回収し、超音波破碎を施した(冷却しつつ 10 秒×2回)。遠心分離後(4°C, 15,000 rpm, 10 分間)、PBS により平衡化された Protein G sepharose を 25 μL 量加え、4°C で 1 時間倒混和した。その後遠心分離(4°C, 3,000 rpm, 1 分)して得られた上澄みを、丁寧に新しい 1.5 mL エッペンチューブへ移し、FLAG 抗体 5 μg 加え、4°C で 1 時間転倒混和した。続けて PBS により平衡化された Protein G sepharose を 25 μL 量加え、4°C で一晩転倒混和した。その後遠心分離後(4°C, 3,000 rpm, 1 分間)して得られた上澄みを丁寧に取り除き、ビーズ wash buffer を 1 mL 加えた。この洗浄を 5 回繰り返した。洗浄後、遠心分離後(4°C,

3,000 rpm, 1 分間)の上澄みを丁寧に取り除き、1×sample buffer 50 μL 加え、10 分間加熱(95°C)し、得られたサンプルを FLAG 抗体及び HA 抗体により Western blot 解析を行った。

2.8 ルシフェラーゼアッセイ

(試薬)

- Luciferase Assay Reagent II(50 μL/well)
Luciferase Assay Substrate を Luciferase Assay Buffer II 10 mL に溶解した。
300 μL ずつ分注し、-80°Cで保存した。
- Passive Lysis Buffer (100 μL/well)
5×Passive Lysis Buffer を MilliQ で 1/5 倍に希釈した。
- Stop & Glo® Reagent(50 μL/well)
必要量に応じて、Stop & Glo® substrate と 50 倍量の Stop & Glo® buffer を混合した。
- Wash buffer : PBS

※Luciferase Assay には Dual-Luciferase® Reporter Assay System (プロメガ社)を使用。

Transfection 後、培養プレートを PBS で洗浄後、Lysis buffer 100 μL を加え、室温で 15 分間以上浸透した。その細胞溶解液を 0.6 mL エッペンに全量加え、遠心分離(4°C, 15,000 rpm, 3 分間)した。それを新品の 0.6 mL エッペンに丁寧に移して氷上に置いた。続いて、サンプル本数分の基質を 1.5 mL エッペンに 50 μL ずつ分注して氷上に置いた。このサンプルをルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定した。

測定方法

細胞溶解液 10 μL を基質 50 μL へ加えてピペッティングを 5 回行った後、ルミノメーターで測定した。その後、STOP&Glo® 50μL を加えて 3 秒間 Vortex し、ルミノメーターで測定を行った。

2.9 Western Blot 解析

使用した抗体とブロッキング剤及び抗体希釈溶液は **Table 2** に記述する。

Table 2. 使用した抗体とブロッキング剤及び抗体希釈溶液

一次抗体	二次反応剤	ブロッキング剤
anti-GST(1/2000)	anti-goat IgG-HRP(1/3000)	5%スキムミルク
anti-HA(1/2000)	anti-mouse IgG-HRP(1/5000)	5%スキムミルク
anti-Calmodulin(1/2000)	anti-mouse IgG-HRP(1/2000)	5%スキムミルク

3. 結果

・PAAによるCaM標的分子のスクリーニング

まず、既知のCaM標的分子を搭載したPAAを用いてCaM結合シグナルをPAA上で検出できるかを検証した。PAAには6つのCaM依存性リン酸化酵素(CaMKII δ -2, CaMKI α , CaMKII δ -3, CaMKI δ , CaMKK α , CaMKIV)と非CaM標的分子(Venus, IgG)が搭載されている。このPAAに対しCaM結合スクリーニングを行った結果、全ての既知CaM標的分子の結合シグナルのみ検出できた。酵母杯無細胞タンパク質合成系により合成された6つのCaM依存性リン酸化酵素と非CaM標的分子はCaM overlay法とWestern blot解析(GST抗体)により検出した。19676種類のヒト完全長cDNAライブラリー由来のタンパク質を搭載したPAAを用いてCaM結合スクリーニングを行った結果、多くのCaM結合シグナルが検出された。ここでは、同じアレイ上のはっきりとした3種のヒトタンパク質のCaM結合シグナルを提示した(CaMKII β -2, the striated muscle activator of Rho signaling[STARS], LIM homeobox 2[Lhx2])。

・STARS及びLhx2のCa²⁺/CaMの結合検出 *in vitro*

CaM結合スクリーニングで得られたSTARS及びLhx2がCa²⁺/CaMと結合できるかを検証するために、CaMセファロースカラムクロマトグラフィー法を行った。その結果、GST-STARS及びGST-Lhx2はカルシウム依存的にCaMと結合することが明らかとなった。これは非変性条件下のCa²⁺/CaMとの相互作用を意味する。ネガティブコントロールのGST-SAMSは溶出各分に溶出されていないことから、Ca²⁺/CaMと結合していなかった。次にCaM overlay法により、変性条件下におけるCa²⁺/CaM結合を検証した。その結果、GST-STARSのみCa²⁺/CaM結合シグナルが検出された。一方、GST-Lhx2はCa²⁺/CaM結合シグナルは検出されなかった。この時、ネガティブコントロールGST-SAMSはCa²⁺/CaMと結合していなかった。確かに2つの新規なCaM標的分子としてSTARS及びLhx2が同定されたが、CaMとの結合能は明らかに異なっていた。したがって、変性条件下においてもCa²⁺/CaMとの結合親和性が強いSTARSを詳細に調べていくことにした。

・STARSのCa²⁺/CaM結合領域の同定

化学架橋法により、Ca²⁺存在下のみGST-STARSとCaMが架橋して77kDaの位置に架橋産物が検出された。

GST-STARSは64kDaの位置にあることから、これらの分子量の差より、Ca²⁺/CaM1分子がGST-STARSへ結合していることが明らかとなった。続いてSTARSのCa²⁺/CaM結合領域を同定するために多様なN末端欠損変異体(13-381, 18-381, 22-381, 37-381)及びC末端欠損変異体(1-32, 1-35, 1-50)を作成した。CaM Overlay法により、13-381変異体はCa²⁺/CaM結合が検出されたのに対し、18-381変異体ではCa²⁺/CaM結合を検出できなかった。一方、1-35変異体はCa²⁺/CaM結合が検出されたのに対し、1-32変異体ではCa²⁺/CaM結合を検出できなかった。これらの結果より、STARSのCa²⁺/CaM結合領域は13-35アミノ酸領域内に存在することが明らかとなった。次に、Ca²⁺/CaM-STARSの相互作用を検出するためにGST pulldown法を行った。GST-STARS(wild-type)はCa²⁺依存性CaMとの相互作用を検出できた。一方、37-381変異体及びGSTではCa存在下とEGTA存在下の両方でCaMとの相互作用を検出できなかった。これらの結果より、STARSのCa²⁺/CaM結合領域はN末端に存在することが確かめられた。さらにCaMは標的分子の2つの疎水性アミノ酸と結合することが知られているので、STARSの13-35アミノ酸領域内の疎水性アミノ酸をAlaに置換した点変異体を作成し、どの疎水性アミノ酸がCa²⁺/CaM結合に重要であるか、CaM-overlay法により検証した。その結果、STARS点変異体のIle20Ala変異体とTrp33Ala変異体でCa²⁺/CaM結合能がwild typeに比べて非常に減少した。一方、Leu17Ala変異体ではCaM結合は減少しなかった。これらの結果より、Ile20及びTrp33がCaM結合に必須であることが明らかとなった。STARSとCaMとの結合様式は、CaM結合形態の1つである1-14motifと非常によく似ていることが明らかとなった。興味深いことにこの1-14motifは脊椎動物(mouse, chicken, zebra fish)において保存されていたが、無脊椎動物(*C.elegans*, *D.melanogaster*)では保存されていなかった。

・動物細胞内におけるSTARSとCa²⁺/CaMの相互作用

次に培養動物におけるSTARSとCa²⁺/CaMとの相互作用を検証するために、COS-7細胞でHA-STARS(wild type)もしくはHA-STARS変異体(Ile20Ala, Trp33Ala)を一過性発現させ、その細胞ライセートに対しCaM-overlay法を行った。その結果、大腸菌にて発現させたSTARS同様、培養細胞にて発現させたSTARSもN末端領域でCa²⁺依

存的に CaM と結合した。HA-STARS 変異体 (Ile20Ala, Trp33Ala) では $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と結合できないことを確認した。続いて培養細胞を用いた免疫沈降法を行った。その結果、HA-STARS は Ca^{2+} 存在下でのみ FLAG-CaM と相互作用して免疫沈降された。このことは、培養細胞中において STARS と $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が相互作用していることが示唆された。

・ $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が STARS を介する転写調節に及ぼす影響

STARS は転写因子 SRF を活性化することにより SM22-promoter を介して転写調節をすることが知られている。したがって HA-STARS 変異体 (Ile20Ala, Trp33Ala) を用いて $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより検証した。その結果、HA-STARS (wild type) は SM22 ルシフェラーゼ活性を約 11 倍増加させた。更に、HA-STARS 変異体 (Ile20Ala, Trp33Ala) では、SM22 ルシフェラーゼ活性を約 23 倍増加させた。これらの結果は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が STARS を介する転写調節を負に抑制していることを示唆している。

4. 考 察

ゲノムワイドスクリーニングを用いた新規ヒト Calmodulin 標的分子の探索により、新規 CaM 標的分子 STARS を発見することができた。STARS はアクチンと結合する筋繊維・心筋特異的な分子として同定され、ラット心臓の大動脈を結紮することで、STARS の mRNA レベルが左心臓で up-regulate することが知られている。STARS の生理機能はアクチン結合を通じて、SRF 依存的に転写活性を刺激し、筋肉細胞の分化・増殖・成長を制御している。最近の研究では、STARS の mRNA 量は筋肉に負荷をかけるトレーニングを行うことで増加させ、一方老化したマウスの筋肉では STARS の発現量の減少が報告されている。これらの知見より、STARS の発現量は筋肉肥大や筋肉細胞分裂の減少と関係があることを示唆している。しかしながら、筋収縮による刺激がどのように STARS の機能を制御しているかは不明である。我々の研究結果は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が STARS の機能にとって重要な制御因子であることを強く示唆している。実施した多くの CaM 結合実験を通じて *in vitro* 及び培養細胞において、STARS は N 末端領域で Ca^{2+} 依存的に CaM と結合することが明らかとなった。

STARS 点変異体により STARS の CaM 結合形態は 1-14motif (Myosin Light Chain Kinase の CaM 結合様式様) と非常によく似ていることが判明した。以上の結果は、STARS の機能が筋収縮を誘導する Ca^{2+} イオン濃度上昇により調節される可能性が示唆される結果となった。さらに我々は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合能を欠損した変異体が SM22-promoter 活性をさらに上昇させることを確認したので、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が STARS/SRF 経路によって調節される筋肉遺伝子の転写を負に制御しているかもしれない。Calcineurin や CaMKII を含むカルシウムシグナル伝達経路は、遺伝子発現において重要な役割を担っており、心筋肥大の原因であることが報告されている。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ による STARS を介する転写調節の抑制は、筋肉細胞のカルシウムを介した遺伝子発現の微調整のために病理学的にも重要かもしれない。以前の報告と本研究結果を考慮すると、我々は骨格筋・心筋特異的な発現分子である STRAS の機能である筋肉分子の遺伝子発現調節と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴う興奮収縮連関とを機能的に繋げる可能性があることを、本研究から提唱することができた。

5. 謝 辞

本研究は公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団研究助成 (1543) により遂行することが可能となり、本研究の一部は以下の学術論文として Cell Calcium 誌に 2016 年 4 月 13 日付け掲載受理が決定しました。ここに謹んで謝意を表します。

Identification of Striated Muscle Activator of Rho Signaling (STARS) as a Novel Calmodulin Target by a Newly Developed Genome-Wide Screen

Yusui Furuya¹, Miwako Denda², Kyohei Sakane¹, Tomoko Ogusu¹, Sumio Takahashi³, Masaki Magari¹, Naoki Kanayama¹, Ryo Morishita², and Hiroshi Tokumitsu^{1,*} (#Corresponding author)

¹Division of Medical Bioengineering and ³Department of Biology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

²CellFree Sciences Co., Ltd., Matsuyama, 790-8577, Japan
Cell Calcium (2016) *in press*

Comprehensive Identification of Novel Ca²⁺-Signal Transduction Pathways by Interactome Analysis

Hiroshi Tokumitsu, Masaki Magari

Okayama University

Summary

Calmodulin (CaM) is one of the most highly conserved proteins in eukaryotic cells. It is composed of four EF-hand Ca²⁺-binding motifs. CaM shows Ca²⁺-dependent interaction with target proteins and consequent alteration in the biochemical functions of those proteins, resulting in the regulation of a large number of physiological responses including muscle contraction, gene expression, immune response, secretion and regulation of the central nervous system mediated by an increased intracellular Ca²⁺ concentration. Extensive studies for over 40 years have identified intracellular target proteins for CaM, including Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases; phosphatase; adenylate cyclase; cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase; nitric oxide synthase; membrane receptors such as NMDA receptor and IP₃ receptor; scaffold proteins such as A kinase-anchoring protein AKAP79 and Gravin (AKAP250) and cytoskeletal proteins including unconventional myosin and actin-binding protein. Presently, CaM binding proteins continue to be discovered, suggesting that the physiological functions of CaM-mediated intracellular Ca²⁺ signaling pathways remain to be investigated. Previous studies using a proteomic approach have successfully identified CaM binding proteins from the mouse and rat brain including novel CaM targets, indicating the existence of novel Ca²⁺/CaM-dependent signaling pathways. To search for novel target(s) of the Ca²⁺-signaling transducer, calmodulin (CaM), we performed a newly developed genome-wide CaM interaction screening of 19,676 GST-fused proteins expressed in human. We identified striated muscle activator of Rho signaling (STARS) as a novel CaM target and characterized its CaM binding ability and found that the Ca²⁺/CaM complex interacted stoichiometrically with the N-terminal region (Ala13–Gln35) of STARS *in vitro* as well as in living cells. Mutagenesis studies identified Ile20 and Trp33 as the essential hydrophobic residues in CaM anchoring. Furthermore, the CaM binding deficient mutant (Ile20Ala, Trp33Ala) of STARS further enhanced its stimulatory effect on SRF-dependent transcriptional activation. These results suggest a connection between Ca²⁺-signaling via excitation-contraction coupling and the regulation of STARS-mediated gene expression in muscles.