

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08181

研究課題名(和文)L型Caチャンネル調節機構の総合的研究

研究課題名(英文)Study on the regulatory mechanisms of L-type Ca²⁺ channels

研究代表者

亀山 正樹 (KAMEYAMA, Masaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60150059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：L型Caチャンネルの調節機構について研究を行った。その結果、Caチャンネルはinside-outバッチ状態でもAキナーゼ(PKA)や蛋白フォスファターゼを結合していることが判明した。また、CaチャンネルのC末近位部と同遠位部の新たな結合を発見し、これがチャンネルのCaM結合を低下させることを見出した。更に、PKAリン酸化がこの結合に与える影響について検討した結果、C末近位部のリン酸化は、この結合およびチャンネルのCaM結合に影響を与えることが判明した。これは、PKAによるCaチャンネル活性化の一機構をなすと示唆される。

研究成果の概要(英文)：We have investigated mechanisms underlying Cav1.2 Ca²⁺ channel regulation. We have found that: 1) the Ca²⁺ channels bind with protein kinase A (PKA) and protein phosphatases even in the inside-out mode; 2) there is a new interaction between CaM-binding region in the proximal C-terminal (CT1) and a region in the distal C-terminal (CT3) of alpha1C subunit; 3) PKA phosphorylation of CT1 affects the binding not only between CaM and CT1 but also the new proximal-distal (CT1-CT3) interaction. These results suggest that PKA phosphorylation regulate the Cav1.2 channel activity, at least partially, via affecting the CaM-CT1 interaction.

研究分野：生理学

キーワード：Caチャンネル Aキナーゼ カルモジュリン 心筋

1. 研究開始当初の背景

Cav1.2 型 Ca チャネルは、神経系においてはシナプス後膜の興奮や細胞内 Ca^{2+} シグナリング (興奮-代謝連関や興奮-転写連関) に重要で、また、心臓においてはペースメーカー細胞の自働能や作業筋における興奮収縮連関に必須である。更に、平滑筋や分泌細胞においても、重要な役割を担っている。このため、Cav1.2 型 Ca チャネルは、生体の様々な状況に対応できるように種々の調節機構を持ち、その活動を調節している。この中で、蛋白リン酸化、CaM、ATP、redox による調節は、特に重要であると考えられる。

蛋白リン酸化による Cav1.2 型 Ca チャネルの調節は、cAMP/A キナーゼ (PKA) や Ca^{2+} /CaM 依存性キナーゼ II (CaMKII) による活性増加作用がよく知られているが、リン酸化部位が研究者間で異なり確定していない。また、調節の分子機構も不明の点が多い。申請者は、PKA と CaMKII の新規のリン酸化部位を報告している [1,2]。CaM は、 Ca^{2+} /CaM として CaMKII を活性化する以外に、直接チャネルに結合してその活動を正と負との二重に調節している。申請者は、CaM がチャネルの run-down を防ぎ活性を維持することを報告したが [3-5]、その分子機構には不明な点が多い。ATP も CaM と同様に、チャネルの活性に必須である [3,6]。さらに、申請者は、ATP がチャネルに直接結合することを明らかにしたが [7]、結合部位の詳細は未解明である。また、Cav1.2 型 Ca チャネルの活動が酸化還元薬により影響を受けることが長年知られているが [8,9]、その分子機構の解明は未だ初期段階である [10]。

以上のように、申請者は、これまで Ca チャネルのリン酸化 (PKA および CaMKII) による調節と CaM や ATP による調節の研究などについて成果をあげてきたが、未解明の部分が多いと感じている。

本研究は、これまでの研究成果を基に、Ca チャネルの種々の調節機構を分子レベルで解明し、さらに、それら調節機構間の相互作用を明らかにするとともに、病態におけるチャネルの調節機構の変調も解明して、Cav1.2 型 Ca チャネルの調節機構についての総合理解を得ようとする目的で計画された。

参考文献

1. Minobe E et al. A new phosphorylation site in cardiac L-type Ca^{2+} channels (Cav1.2) responsible for its cAMP-mediated modulation. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 307: C999-C1009, 2014
2. Wang WY et al. CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca^{2+} channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin. *J Physiol Sci*, 59:283-90, 2009
3. Xu JJ et al. Calmodulin reverses

run-down of L-type Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 287: C1717-C1724, 2004

4. Han DY et al. Calmodulin- and Ca^{2+} -dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Sci* 112: 310-319, 2010

5. Minobe E et al. Calpastatin domain L is a partial agonist of the calmodulin-binding site for channel activation in Cav1.2 Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 286: 39013-39022, 2011

6. Yazawa K et al. ATP regulates cardiac Ca^{2+} channel activity in a mechanism independent of protein phosphorylation. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 433: 557-562, 1997

7. Feng R et al. Adenosine triphosphate regulates the activity of guinea pig Cav1.2 channel by direct binding to the channel in a dose-dependent manner. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 306: C856-C863, 2014

8. Lacampagne A et al. Effect of sulfhydryl oxidation on ionic and gating ... *Cardiovasc Res* 30: 799-806, 1995

9. Zima AV et al. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res* 71: 310-321, 2006

10. Yang L et al. Mechanisms underlying the modulation of L-type Ca^{2+} channel by hydrogen peroxide in guinea pig ventricular myocytes. *J Physiol Sci*, 63: 419-426, 2013

2. 研究の目的

当初、Cav1.2 型 Ca チャネルの PKA や CaM による調節の総合な理解を目指したが、初年度に PKA による調節の新しい分子機構の存在が示唆される実験結果が得られたので、次年度以降は、その解明に集中することに方針を変更した。

PKA による Cav1.2 型 Ca チャネルのリン酸化部位は、当初、チャネルサブユニット C 末部の Ser¹⁹²⁸ (ウサギのアミノ酸配列) が報告されたが、その後、Catterall らは C 末近位部の Ser¹⁷⁰⁰ を提唱した。一方、我々は Ser¹⁵⁷⁵ と Ser¹⁶²⁷ のリン酸化を見出している。しかし、この PKA によるリン酸化部位は確定しておらず、また調節の分子機構も不明の点が多い。一方、CaM のチャネルへの直接作用は、 Ca^{2+} 依存性促進 (CDF) と Ca^{2+} 依存性不活性化 (CDI) として知られるが、PKA による調節との関連は未詳である。

そこで、両者の関連を検討したところ、PKA のリン酸化が CaM の調節作用に影響を与えるという結果が得られた。これは、PKA リン酸化によるチャネル活性の増強作用が

CaM の調節作用の修飾を介してなされるといふ新しい分子機構の存在を示唆している。そこで、本研究は、その解明を目指すことにした。

3. 研究の方法

Pull-down 実験：CaM と Ca チャネル C 末端部の断片ペプチド(近位部：CT1 と CT1B; 遠位部：CT3 と CT3D)は、それらの GST 融合ペプチドをコードする cDNA を大腸菌に発現させ、ホモジネートを glutathione Sepharose 4B に通して精製した。CaM および CT1、CT1B は、PreScission プロテアーゼにて GST を切断した。GST 融合 CT3 または CT3D を glutathione Sepharose 4B に固定して、CT1 または CT1B を混合し、それらの結合を pull-down 法にて調べた。また、それらに結合に及ぼす CaM の影響をしらべた。

電気生理学的実験：実験はモルモット心室筋細胞および Ca チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いて行った。

(1) モルモット心臓を麻酔下で摘出し、ランゲンドルフ式灌流を施行して、コラゲナーゼを作用させ、単離心室筋細胞を得た。単離細胞にパッチクランプを適用し、cell-attach 法および inside-out 法にて Ca チャネル電流を記録した。細胞外液には Tyrode 液を使用した。Inside-out 時の細胞内側液 (IO 液) の組成は (mM): K-aspartate, 90; KCl, 30; KH₂PO₄, 10; EGTA, 1; MgCl₂, 0.5; CaCl₂, 0.5; HEPES-KOH バッファー, 10 (pH 7.4, free [Ca²⁺] 80 nM)。ピペット内液は (mM): BaCl₂, 50; TEA-Cl, 70; EGTA, 0.5; BAY K 8644, 0.003; HEPES-CsOH バッファー, 10 (pH 7.4)。Inside-out での Ca チャネルの活性は IO 液に CaM と ATP を加えることにより維持した。チャネルの活性はパッチ内のチャネル数 (N) と平均開口確率 (P_o) の積 (NP_o) により表した。使用した試薬類は、CaM、ATP、PKA の catalytic サブユニット (PKAc)、オカダ酸 (非選択的蛋白フォスファターゼ抑制薬)、K252a (非選択的タンパクキナーゼ抑制薬)、PP1 inhibitor-2、fostriecin (PP2A 抑制薬)、cyclosporine A + cyclophilin A (PP2B 抑制薬) である。また、Ca チャネル C 末端部の断片ペプチド CT1B と CT3D も使用した。

(2) モルモット Cav1.2 型チャネルの野生型、C 末部を切除した変異型 (Δ1671) および同切除型の C 末に CaM を融合させた変異型を HEK293 細胞に発現させ、と同様の inside-out 法で CaM、ATP、オカダ酸の効果を調べた。

4. 研究成果

(1) Ca チャネルに inside-out パッチ状態で

PKA や蛋白フォスファターゼ 1 と 2A (PP1、PP2A) が結合して機能しているかを検討した。その結果、PKA を活性化する cAMP はチャネル活性を増加させ、また、PP1 や PP2A の阻害薬はチャネルの遅い run-down を抑制した。これらより、Ca チャネルは inside-out パッチ状態でも PKA や蛋白フォスファターゼ 1 と 2A (PP1、PP2A) を結合していると結論した。

(2) Ca チャネルの C 末近位部と同遠位部は相互作用してチャネル活性を抑制することが知られている。我々は、この相互作用部位 (C 末近位部の PCRD 部位と遠位部の DCRD 部位) 以外に新たな相互作用部位が存在するかどうかを検討した。その結果、C 末 PCRD より近位部にある CaM 結合部位と DCRD 部位より遠位側 (C 末側) にある CCD 部位とが結合して、チャネルの CaM 結合を低下させることを見出した。

(3) 前述の研究で、Ca チャネルの C 末近位部 (CT1) の CaM 結合部位と同遠位部 (CT3) の CCD 部位が結合して、チャネルの CaM 結合を低下させることを見出したので、PKA のリン酸化が CaM および CT3 の CT1 への結合に与える影響について検討した。その結果、高 Ca²⁺ 条件下で、CT1 の PKA リン酸化処理は、CaM の結合を有意に減少させたのに対し、低 Ca²⁺ 条件下では、CaM の結合を有意に増加させた。一方、CT3 の CT1 への結合は CT1 のリン酸化により有意に減少した。これらより、PKA による CT1 のリン酸化には 2 つの作用があることが示唆された。第一に、低 Ca²⁺ 条件下で、CT1 のリン酸化が CaM の CT1 への結合を直接的に促進すること、第二に、CT1 のリン酸化が CT1-CT3 結合を抑制して、間接的に CaM の結合を促進することである。これらの作用により、チャネル活性は増加すると考えられた。さらに、高 Ca²⁺ 条件下で、CT1 のリン酸化が CaM の結合を減少させることは、PKA リン酸化が Ca²⁺ 依存性不活性化を抑制することを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Minobe E, Mori MX, Kameyama M.

Calmodulin and ATP support activity of Cav1.2 channels by dynamic interactions. J Physiol 595 : 2465–2477, 2017 (DOI: 10.1113/JP273736) (査読あり)

2. Lyu L, Gao Q, Xu JJ, Minobe E, Zhu T, Kameyama M. A new interaction between proximal and distal C-terminus of Cav1.2 channels. J Pharmacol Sci, 133: 240-246, 2017 (査読あり)
3. Yu LF, Xu JJ, Minobe E, Kameyama A, Yang L, Feng R, Hao LY, Kameyama M. The role of protein phosphatases in the run-down of guinea-pig cardiac Cav1.2 Ca²⁺ channels. Am J Physiol 310: C773-C779, 2016 (DOI: 10.1152/ajpcell.00199.2015) (査読あり)
4. Xu JJ, Yu LF, Minobe E, Lu LT, Lei M, Kameyama M. PKA and phosphatases attached to the Cav1.2 channel regulate channel activity in cell-free patches. Am J Physiol 310: C136-C141, 2016 (DOI: 10.1152/ajpcell.00157.2015) (査読あり)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 蓑部悦子, 森誠之, 亀山正樹. カルモジュリンと ATP による Cav1.2 チャンネルの制御機構. 第 95 回日本生理学会大会 2018.3.28-30 高松
2. 高青華, 雷明, 徐建軍, 蓑部悦子, 朱曜南, 郝麗英, 亀山正樹. Cav1.2 型チャンネル C 末端の自己調節を基にした PKA リン酸化のチャンネル調節機序. 第 95 回日本生理学会大会 2018.3.28-30 高松
3. 高青華, 雷明, 徐建軍, 蓑部悦子, 朱曜南, 郝麗英, 亀山正樹. Cav1.2 型 Ca²⁺チャンネル C 末端部における PKA リン酸化のチャンネル活性調節機序. 第 68 回西日本生理学会 2017.10.6-7, 福岡
4. Xu JJ. Regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by PKA phosphorylation. International Symposium on Ion Channels and Related Disorder. May 12, 2017.5.12, Kagoshima
5. Minobe E. Regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by calmodulin and ATP: a study with calmodulin-linked channels. International Symposium on Ion Channels and Related Disorder. May 12, 2017.5.12, Kagoshima
6. 呂力婷, 高青華, 雷明, 徐建軍, 蓑部悦子, 亀山正樹. The mechanism for PKA-mediated facilitation of Cav1.2 channel: A new model. 第 94 回日本生理学会大会 2017.3.28-30, 浜松
7. 蓑部悦子, 森誠之, 亀山正樹. Regulation of Cav1.2 channels by calmodulin: A study on genetically mutated channels. 第 94 回日本生理学会大会 2017.3.28-30, 浜松
8. 亀山正樹. 神経細胞と Ca²⁺チャンネル. 鹿児島神経科学研究会 2017.2.18, 鹿児島
9. 高青華, 徐建軍, 呂力婷, 蓑部悦子, 郝麗英, 亀山正樹. Cav1.2 型 Ca²⁺チャンネル C 末端部のチャンネル活性調節機序. 生理研研究会 2016.10.24-25, 福岡
10. 高青華, 徐建軍, 呂力婷, 蓑部悦子, 郝麗英, 亀山正樹. Cav1.2 型 Ca²⁺チャンネル C 末端部のチャンネル活性調節作用. 第 67 回西日本生理学会 2016.10.7-8, 鹿児島
11. 亀山正樹. Cav1.2 channel の活性を調節する細胞内因子 (田原記念レクチャー). 第 93 回日本生理学会大会 2016.3.22-24, 札幌
12. 河路広大, 蓑部悦子, 森誠之, 亀山正樹. 2 サイトモデルによる Cav1.2 チャンネル調節の検討. 第 93 回日本生理学会大会 2016.3.22-24, 札幌

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

亀山 正樹 (KAMEYAMA, Masaki)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号： 60150059

(2)研究分担者

徐 建軍 (XU, Jianjun)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号： 10581689

(3)連携研究者

蓑部 悦子 (MINOBE, Etsuko)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号： 00448581

高 青華 (GAO, Qinghua)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・
特任研究員
研究者番号： 60813524

(4)研究協力者

森 誠之 (MORI, Tomoyuki)
京都大学・工学研究科・准教授

郝 麗英 (HAO, Liying)
中国医科大学・薬学院薬理毒理学・教授

朱 彤 (ZHU, Tong)
中国東北大学・機械工程及自動化学院・

教授

呂 力婷 (LYU, Liting)
中国東北大学・機械工程及自動化学院・
大学院生

雷 明 (LEI, Ming)
中国医科大学・薬学院薬理毒理学・
大学院生