

平成21年 3 月 31日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590210

研究課題名 (和文) L型 Ca チャネルの Ca 依存性促進と不活性化の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-dependent facilitation and inactivation of L-type Ca²⁺ channels

研究代表者

亀山 正樹 (KAMEYAMA MASAKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60150059

研究成果の概要：

本研究は、L型 Ca チャネル活動に対する CaM や CaMKII の作用機序を Ca 依存性促進と不活性化との関連で解明することを目的として実施された。CaM については、これ迄の研究で、CaM が L型 Ca チャネル $\alpha 1$ サブユニット (Cav1.2) の N 末部 (NT)、リピート I-II 間の細胞内ループ (LI-II)、C 末部の IQ モチーフ領域 (IQ) および pre-IQ 領域 (CB) を含む近位部 (CT1) に結合することが判明している。本研究では、Ca チャネルの NT、LI-II および CT1 領域への CaM 結合の Ca 依存性について pull-down 法で検討した。CaM の NT、LI-II および CT1 への結合の親和性は Ca 濃度の高低両条件下で、CT1 > NT > LI-II であった。これより、CaM 結合の親和性は Ca 濃度に関わらず CT1 が最も高く、この部位がチャネル活性の CaM による調節に最も重要であることが示唆された。一方、モルモット単一心筋細胞を用いたパッチクランプ実験では、CaM および Ca 結合能を消失させた変異 CaM (CaM₁₂₃₄) が cell-free 状態 (inside-out パッチ) により rundown させた Ca チャネル活性を濃度依存的に回復させることが判明した。このチャネル活性化作用は野生型 CaM では Ca²⁺依存性を示したが、CaM₁₂ (N-lobe の Ca 結合能を無くした変異体)、CaM₃₄ (C-lobe の Ca 結合能を無くした変異体)、CaM₁₂₃₄ では Ca²⁺非依存性であった。これより、CaM の Ca 依存性作用には、N-lobe と C-lobe との両者が必要であると示唆された。さらに、Ca チャネルに対する CaMKII の作用についても検討した。その結果、チャネル C 末部に CaMKII のリン酸化部位があること、同部位のリン酸化により CaM の結合が増加することが判明した。

これらの結果は、Ca イオン、CaM、CaMKII が複雑かつ協調的に作用して L型 Ca チャネルの活動を調節していることを示している。また、Ca 依存性促進には Ca²⁺/CaM の直接作用と CaMKII によるリン酸化の両者が関与し、不活性化には主に Ca²⁺/CaM が関与するという仮説を支持する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経筋生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Ca チャネル、心筋細胞、パッチクランプ、カルモジュリン、カルモジュリン依存性蛋白キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

L型 Ca チャネルは、神経、筋、分泌組織など広範な組織に分布して、細胞機能に重要な役割を果たしており、その調節機構を解明することは、細胞機能制御の観点において非常に重要である。Ca チャネルの調節は、細胞内 Ca イオンによる facilitation (促進) 及び不活性化、A キナーゼなどによるリン酸化、G 蛋白質の直接作用 (促進及び抑制) に加え、細胞内 Mg、イノシトールリン脂質、カルモジュリン (CaM)、細胞骨格蛋白などの関与が報告されており、その機構は想像以上に複雑多岐である。加えて、分子レベルでの調節機構やそれらの相互作用については未解明の部分が多い。

申請者らは、これまで Ca チャネル研究の分野で実績を挙げてきたが、同分野の進展にはチャネル活動が cell-free 系で消失するという rundown 現象の克服が必要であると考え研究を行い、Ca チャネルの rundown が細胞内蛋白因子と ATP の喪失に起因することを発見した (Kameyama et al., Pflügers Arch '97; Yazawa et al., Pflügers Arch '97)。その蛋白因子の一つがプロテアーゼ阻害蛋白であるカルパスタチンであることを見出し (Kameyama et al., Pflügers Arch '98; Hao et al., J Physiol '99)、更に最近、もう一つの蛋白因子が CaM であることを見出した (Xu et al., Am J Physiol Cell Physiol '04)。これらの知見に基づき、rundown 現象を克服した Ca チャネルの実験系を開発した。そして、この実験方法を用いて、CaM と中間レベルの Ca 濃度 (100-300 nM) により、cell-free 実験系でチャネルの Ca 依存性 facilitation を再現することに成功した。その後の研究により、CaM は、一方でチャネルの Ca 依存性不活性化や facilitation に関与し、他方でチャネルの活性を維持するという、二面的な作用を持つことが示唆された。この背後には、CaM とチャネル蛋白 (α サブユニット) との相互作用が細胞内 Ca 濃度やチャネルのリン酸化状態などによって複雑に変化することがあると推定されるが、詳細は不明である。このように、CaM の Ca チャネル活動調節に関わる分子機構の解明が大きな課題となっている。

2. 研究の目的

これまでの研究成果から、CaM は、一方でチャネルの Ca 依存性不活性化や facilitation に関与し、他方でチャネルの活性を維持するという、二面的な作用を持つことが示唆されている。この背後には、CaM とチャネル蛋白 (α サブユニット) との相互作用が細胞内 Ca 濃度やチャネルのリン酸化状態などによって複雑に変化することがあると推定されるが、詳細は不明である。そこで、この新たな疑問を明らかにすべく、本計画では下記の3点を研究目的とした。

- ① L型 Ca チャネルに対する CaM の活性維持作用について、その作用部位を同定し、その作用の分子機構を解明する。
- ② L型 Ca チャネルの Ca 依存性 facilitation と不活性化について、CaM の作用部位を同定し、その作用の分子機構を解明する。
- ③ Ca チャネルと CaM 間の相互作用に対する細胞内 Ca やチャネルリン酸化による調節作用を解明する。

3. 研究の方法

a. チャネル断片の作成と CaM との結合：当研究室でクローニングされたモルモット $\alpha 1$ サブユニットを用いて、遺伝子組換え法により N 末部、LI-II、C 末近位部、中間部、遠位部の GST 融合ペプチドを作成し、それらのペプチドと CaM との結合を pull-down 法で検討した。

b. CaM 変異体の作成：CaM の4つの Ca 結合領域 (N-lobe に2コ、C-lobe に2コ) に着目して、それらの Ca 結合能を消失させた種々の変異 CaM を作成する。

c. チャネル断片と CaM との結合に対するチャネルリン酸化の影響：L型 Ca チャネルの CaM 結合部位の GST 融合ペプチドを CaMKII またはフォスファターゼ (アルカリフォスファターゼ) で処理した後、CaM との結合の変化を pull-down 法で検討した。

d. 電気生理学的実験：モルモット単一心筋細胞をコラゲナーゼ分散法により調製し、パッチクランプ法により Ca チャネルの活動を記録する。Ca チャネル

活動を cell-free 状態 (inside-out パッチ) で rundown させた後、野生型 CaM および変異 CaM を作用させて「チャンネルの活性維持」、facilitation、不活性化の CaM 濃度依存性、Ca 濃度依存性を解析した。また、CaMKII の作用については、cell-attach 条件下で細胞内 Ca 濃度を上昇させ、その時の Ca チャンネル活動に対する CaMKII 阻害薬の作用を見ることにより検討した。さらに、inside-out パッチにおいて、チャンネルに活性化 CaMKII を直接作用させ、その効果を検討した。

4. 研究成果

1. Ca チャンネルの NT、LI-II および CT1 領域への CaM 結合の Ca 依存性について pull-down 法で検討した。CaM の NT、LI-II および CT1 への結合の親和性は低 Ca 濃度条件下で、CT1 > NT > LI-II であった。高 Ca 濃度条件下では、各ペプチドへの親和性が增大するが、順序は同じであった。これより、CaM 結合の親和性は Ca 濃度に関わらず CT1 が最も高く、この部位がチャンネル活性の CaM による調節に最も重要であることが示唆された。

2. モルモット単一心筋細胞を用いたパッチクランプ実験では、CaM および Ca 結合能を消失させた変異 CaM (CaM₁₂₃₄) が cell-free 状態 (inside-out パッチ) により rundown させた Ca チャンネル活性を濃度依存的に回復させることが判明した。このチャンネル活性化作用は野生型 CaM では Ca²⁺依存性を示したが、CaM₁₂ (N-lobe の Ca 結合能を無くした変異体)、CaM₃₄ (C-lobe の Ca 結合能を無くした変異体)、CaM₁₂₃₄ では Ca²⁺非依存性であった。これより、CaM の Ca 依存性作用には、N-lobe と C-lobe との両者が必要であると示唆された。

3. Ca チャンネルに対する CaMKII の作用についても検討した。その結果、チャンネル C 末部に CaMKII のリン酸化部位があること、同部位のリン酸化により CaM の結合が増加することが判明した。

これらの結果は、Ca イオン、CaM、CaMKII が複雑かつ協調的に作用して L 型 Ca チャンネルの活動を調節していることを示している。また、Ca 依存性促進には Ca²⁺/CaM の直接作用と CaMKII によるリン酸化の両者が関与し、不活性化には主に Ca²⁺/CaM が関与するという仮説を支持する。

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 7 件)

1. Wang WY, Hao LY, Minobe E, Saud ZA, Han DY, Kameyama M. CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin. J Physiol Sci. 2009 (in press、査読あり)
2. Hao LY, Xu JJ, Minobe E, Kameyama A, Kameyama M. Calmodulin kinase II activation is required for the maintenance of basal activity of L-type Ca²⁺ channels in guinea-pig ventricular myocytes. J Pharmacol Sci. 108: 290-300, 2008 (査読あり)
3. Wang J, Ou SW, Wang YJ, Zong ZH, Lin L, Kameyama M, Kameyama A. New variants of Nav1.5/SCN5A encode Na⁺ channels in the brain. J Neurogenet. 22 (March): 1-19, 2008 (査読あり)
4. Yazawa K, Wang JW, Hao LY, Onoue Y, Kameyama M. Stonefish venom, verrucotoxin, modulates calcium channel activity in guinea-pig ventricular myocytes. British J Pharmacol. 151: 1198-1203, 2007 (査読あり)
5. Wang JW, Yazawa K, Hao LY, Onoue Y, Kameyama M. Verrucotoxin inhibits K_{ATP} channels in cardiac myocytes through a muscarinic M₃ receptor-PKC pathway. Eur J Pharmacol. 563: 172-179, 2007 (査読あり)
6. Saud ZA, Minobe E, Wang WY, Han DY, Horiuchi M, Hao LY, Kameyama M. Calpastatin binds to a calmodulin-binding site of cardiac Cav1.2 Ca²⁺ channels. Biochem Biophys Res Comm. 364: 372-377, 2007 (査読あり)
7. Nie HG, Hao LY, Xu JJ, Minobe E, Kameyama A, Kameyama M. Distinct roles of CaM and Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase II in Ca²⁺-dependent facilitation and inactivation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. J Physiol Sci 57: 167-173, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. 亀山 正樹. L型 Ca チャンネルの生理と心筋機能. 東京慈恵会医科大学第 1 回分子循環器セミナー. 2008.12.17. 東京
2. 郭 鳳, 藁部 悦子, 矢沢 和人, Asmara H, 韓 冬雲, はお 麗英, 亀山 正樹. Cav1.2 Ca²⁺ チャンネルの CaM による調節機構. 熱処理は PKA 活性化を介して心筋細胞 L 型 Ca²⁺ 電流を増大させる. 生理学研究所研究会. 2008.11.19-20. 岡崎
3. Guo F, Minobe E, Yazawa K, Asmara H,

Han DY, Hao LY, Kameyama M. Calcium- and concentration-dependent effects of calmodulin and its mutants on CaV1.2 Ca²⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes. 第 59 回西日本生理学会. 2008.10.3. 熊本

4. 亀山 正樹. 心筋 Ca チャネルの調節機構. 第 11 回札幌高血圧セミナー. 2008.7.4. 札幌
5. Nie HG, Hao LY, Xu JJ, Minobe E, Kameyama A, Kameyama M. Distinct roles of CaM and Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase in Ca²⁺-dependent facilitation and inactivation of cardiac L-type Ca²⁺ channels. 第 85 回日本生理学会 (JPS Award Symposium). 2008.3.25-27. 東京
6. 蓑部 悦子, 前田 佐知子, はお 麗英, 王 午陽, 徐 建軍, 亀山 正樹. Functional phosphorylation sites for modulation by protein kinase A in Cav1.2 Ca²⁺ channels. 第 85 回日本生理学会. 2008.3.25-27. 東京
7. Asmara H, Minobe M, Saud ZA, Wang WY, Kameyama M. Interactions of N- and C-lobes of calmodulin with the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channels. 第 85 回日本生理学会. 2008.3.25-27. 東京
8. 王 建武, 矢沢 和人, Zahangir A. Saud, 山岡 薫, 亀山 正樹. 熱処理は PKA 活性化を介して心筋細胞 L 型 Ca²⁺ 電流を増大させる. 第 81 回日本薬理学会年会. 2008.3.17-19. 横浜
9. 亀山 正樹, 韓 冬雲, 蓑部 悦子, 王 午陽, はお 麗英. Cav1.2 チャネルのカルモジュリンおよび Ca 依存性調節. 生理学研究所研究会. 2007.11.13-14. 岡崎
10. 蓑部 悦子, 韓 冬雲, Zahangir A. Saud, 王 午陽, はお 麗英, 亀山 正樹. L 型 Ca チャネルの活動調節におけるカルパスタチンとカルモジュリンの競合. 第 58 回西日本生理学会. 2007.10.19-20. 福岡
11. 亀山 正樹, 韓 冬雲, 蓑部 悦子, 王 午陽, 聶 宏光, はお 麗英. 心筋 L 型 Ca チャネルのカルモジュリンによる調節. 第 24 回日本心電学会学術集会. 2007.10.5-6. 名古屋
12. Kameyama M, Hao LY, Han DY, Minobe E, Wang WY, Nie HG, Saud ZA. Regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels by calmodulin and CaMKII. Akita International Symposium. 2007.5.20. Akita

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀山 正樹 (KAMEYAMA MASAKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60150059

(2) 研究分担者

矢澤 和人 (YAZAWA KAZUTO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 90212274

蓑部 悦子 (MINOBE ETSUKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 00448581

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

はお 麗英 (Hao Li-ying)

中国医科大学・薬学院・教授

亀山亜砂子 (Kameyama Asako)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・元講師

徐 建軍 (Xu Jian-jun)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

Saud Zahangir. A.

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

王 午陽 (Wang Wu-yang)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

聶 宏光 (Nie Hong-guang)

中国医科大学・基礎医学院・大学院生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・短期留学生

韓 冬雲 (Han Dong-yun)

中国医科大学・基礎医学院・大学院生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・短期留学生

白 曉彦 (Bai Xiao-yan)

中国医科大学・基礎医学院・大学院生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・短期留学生

郭 鳳 (Guo Feng)

中国医科大学・基礎医学院・大学院生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・研究生

劉 彦 (Lie Yan)

中国医科大学・基礎医学院・大学院生

鹿児島大学・医歯学総合研究科・短期留学生