

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07285

研究課題名(和文) Molecular mechanism of self-regulation of Cav1.2 channel by channel cytoplasmic fragments

研究課題名(英文) Molecular mechanism of self-regulation of Cav1.2 channel by channel cytoplasmic fragments

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Caチャネルの調節におけるチャネルの細胞内領域の役割を解明することを目的として実施された。チャネルのN末(NT)、C末(CT)、リピートI-II、II-III、III-IV間のループ(LI-II、LII-III、LIII-IV)へのCaM結合を調べた。高Ca²⁺濃度で、CaMがCT、NT、LI-IIに結合した。CaMのC lobeはCTに、N lobeはNTに対して最も高い結合親和性を示した。さらに、NTとCTはCa²⁺/CaMによって架橋されることが示唆された。電気生理学的実験ではC lobe CDIが主要なCDIに、N lobe CDIはマイナーなCDIに寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cav1.2カルシウムチャネル(Cav1.2チャネル)は、心臓、脳、内分泌細胞、平滑筋で広く発現しており、その機能不全が心不全、不整脈、神経精神障害などの多系統障害を引き起こす可能性がある。従って、Cav1.2チャネルの調節機構を解明することは、これらの疾患の新しい治療戦略を開発するために重要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the interaction between cytoplasmic fragments of Cav1.2 channel, and elucidated the role of fragments in the regulation of the channel. Using pull-down assay, we examined CaM binding to N terminus (NT), proximal C terminus (CT1), the loop between repeat I-II, II-III and III-IV (LI-II, LII-III and LIII-IV). We found that at high Ca²⁺, CaM bound to CT1, NT and LI-II. C lobe of CaM had highest binding affinity for CT1 while N lobe for NT. There was no direct interaction between NT and CT1, however, N and C terminus were bridged by Ca²⁺/CaM with N lobe/N terminus and C lobe/C terminus interactions. In addition, there was a direct interaction between NT and LI-II, independent of Ca²⁺/CaM. The electrophysiological experiments with WT CaM (N lobe-C lobe) and its mutants N-N CaM (N lobe-N lobe), C-C CaM (C lobe-C lobe) indicates that C lobe CDI contributes to major CDI, while N lobe CDI is responsible for minor CDI. Both N and C lobe are required for complete CDI.

研究分野：神経筋生理学

キーワード：カルシウムチャネル 心筋細胞 カルモジュリン pull-down assay パッチクランプ法 自己調節 イオンチャネル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cav1.2 カルシウムチャンネル(Cav1.2 チャンネル)は、心臓、脳、内分泌細胞、平滑筋で広く発現しており、その機能不全が心不全、不整脈、神経精神障害などの多系統障害を引き起こす可能性があります。従って、Cav1.2 チャンネル調節機構を解明することは、これらの疾患の新しい治療戦略を開発するために重要である。最近の研究では、チャンネル活性の調節における Cav1.2 チャンネルの分子内相互作用の重要な役割が注目されていますが、その機構はまだ不明である。

Cav1.2 チャンネルの特徴の1つは、全細胞記録または inside-out 記録での rundown であり、これは以前のチャンネルの研究の支障でした。申請者は、Cav1.2 チャンネルの rundown は Calmodulin(CaM)と ATP の喪失に起因することを発見した(Xu et al., Am J Physiol Cell Physiol, 2004)。CaM と ATP を補うことにより、rundown を克服した Cav1.2 チャンネルの実験システムを開発した。この実験システムは、GST pull-down assay と組み合わせて、Cav1.2 チャンネルの調節における調節因子とチャンネルとの相互作用の役割を調べることができる。Pull-down assay の実験により、Cav1.2 チャンネルの C 末近位部 (CT1) に結合することが確認されました(Saud et al., Biochem Biophys Res Commun, 2007; Asmara et al., J Pharmacol Sci, 2010)。パッチクランプ実験は、CaM 濃度または結合親和性を増加させることによる CaM 結合の増強が、Cav1.2 チャンネルの促通および不活性化を引き起こすことを示し、CaM 結合が Cav1.2 チャンネル活性を決定することを示唆された。その後、酸化還元およびリン酸化/脱リン酸化による CaM 結合と Cav1.2 チャンネル活性の調節を調べた。結果は、これらの細胞内因子が CaM 結合の変化を介して Cav1.2 チャンネルを調節することを示唆された。更に最近、Cav1.2 チャンネル活性の調節におけるチャンネルの細胞内断片間の相互作用の重要な役割を注目されている。C 末端遠位部と近位部の相互作用は、CaM 結合と Cav1.2 チャンネル活性を抑制することを発見し、チャンネルの断片間の相互作用がチャンネルへの CaM 結合を変化することで、チャンネル活性を調節するという仮説を支持する。従って、Cav1.2 チャンネルの細胞内断片間の相互作用、および CaM 結合とのそれらの crosstalk をさらに解明する必要があります。

2. 研究の目的

我々の以前の研究は、CaM が Cav1.2 チャンネルへの直接結合し、チャンネルを調節することを示した。その後、チャンネルの細胞内断片を含む他の調節因子が CaM 結合を変化することを介してチャンネル活性を調節するという仮説を提起した。これまで、Cav1.2 チャンネルの細胞内断片間の相互作用は完全には調べられておらず、CaM 結合とチャンネル活性に対するそれらの調節は明らかではありません。本研究では、以下の3つの側面を明らかにすることを目的としている。

- (1) すべての細胞内断片の CaM 結合と CaM の N と C lobe への結合親和性を調べ、CaM 結合のオリエンテーションを解明する。
- (2) 細胞内断片間の可能な相互作用と CaM 結合に対するそれらの影響を調べ、細胞内断片と CaM 結合間の crosstalk を解明する。
- (3) Inside-out パッチにおける CaM 誘導したチャンネル活性に対する細胞内断片の影響を調べ、細胞内断片の相互作用による Cav1.2 チャンネルの調節機構を解明する。

3. 研究の方法

- (1) Cav1.2 チャンネルの細胞内断片の作成。Cav1.2 チャンネル α 1 サブユニットの N 末端(NT)、C 末端の近位部(CT1)、リピート I-II、II-III、III-IV 間の細胞内ループ(LI-II、LII-III、LIII-IV)の cDNA を構築し、GST 融合および GST 切断細胞内断片を精製し、細胞内断片間の結合を調べた。

- (2) CaM および CaM 変異体の作成。構築された野生型 CaM(N lobe-C lobe)と変異体 N-N CaM(N lobe-N lobe) および C-C CaM(C lobe-C lobe)の cDNA を pGEX6P-3 ベクターに挿入し、大腸菌 BL21 に形質転換されて、CaM 結合実験のためにタンパク質を精製された。
- (3) Pull-down assay でタンパク質間の結合実験。GST pull-down assay で細胞内断片への CaM の結合および細胞内断片間の相互作用を調べた。細胞内断片の存在下および非存在下での CT1 への CaM の結合を検討した。
- (4) 電気生理学的実験。コラゲナーゼ分散法により調製されたモルモット単一心室筋細胞および Cav1.2 チャネルを発現する BHK 細胞株を使用して、パッチクランプ法により Cav1.2 チャネルの活動を記録する。80nM および 1 μ M Ca²⁺での inside-out パッチにおける N-N CaM、C-C CaM および野生型 CaM 誘導されたチャネル活性を比較された。細胞内断片が存在するおよび存在しない場合のチャネル活性も比較された。

4. 研究成果

- (1) NT、CT1、LI-II、LII-III、LIII-IV を含むすべての細胞内断片への CaM 結合を調べた。低 Ca²⁺濃度(0-100nM)では CT1 のみが CaM へ結合するが、高 Ca²⁺濃度(1 μ M \sim)では CaM は CT1、NT および LI-II への結合ができることを判明した。NT および LI-II は、CT1 への CaM 結合を濃度依存性に抑制することができる。LII-III および LIII-IV は CaM への結合できず、CT1 への CaM 結合に影響を与えませんでした。さらに、CaM 結合部位を含む 3 つの断片の中(NT、CT、LI-II)に、高 Ca²⁺濃度で C-C CaM は CT1 に対して、N-N CaM は NT に対して最も高い結合親和性を示し、C lobe はチャネルの C 末端に、N lobe はチャネルの N 末端に特異的に結合することを示唆された。
- (2) 細胞内断片の相互作用を調べた。初めに、CT1 は他の細胞内断片との相互作用を調べた。直接的な相互作用は見つかりませんでした。Ca²⁺/CaM の存在下では、CT1 と NT の相互作用ができた。しかし、CaM の半分(N lobe または C lobe)の存在下では、CT1 と NT の相互作用が無効になり、N-C 末端が Ca²⁺/CaM によって架橋されることを示唆された。Lobe の結合結果に基づいて、N-C 末端が CaM によって N lobe/N 末端および C lobe/C 末端結合を介して架橋されることを示唆された。また、NT と LI-II は Ca²⁺/CaM 非依存性に直接相互作用を判明した、これは、NT と LI-II の結合部位が CaM 結合部位とは異なることを示唆された。
- (3) パッチクランプ実験は、野生型 Ca²⁺/CaM が Cav1.2 チャネルを完全に不活性化するのに対し、N-N CaM はわずかに、C-C CaM は大幅に Cav1.2 チャネルを不活性化することを判明した。この結果は C 末端への Ca²⁺/CaM の結合が主要な CDI(C lobe CDI)に、N-C 末端ブリッジングはマイナー CDI(N lobe CDI)に寄与することを示唆された。完全な CDI には N lobe と C lobe の両方が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Jianjun Xu, Etsuko Minobe, Masaki Kameyama	4. 巻 16
2. 論文標題 Ca ²⁺ Dyshomeostasis Links Risk Factors to Neurodegeneration in Parkinson's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2022.867385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jia W, Liu J, Yu Z, Zhang X, Xu X, Wang Y, Gao Q, Feng R, Wan Y, Xu J, Minobe E, Kameyama M, Wang W, Guo F	4. 巻 46(3)
2. 論文標題 Properties of Calmodulin Binding to Na V 1.2 IQ Motif and Its Autism-Associated Mutation R1902C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 523-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-020-03189-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Jingyang Su, Qinghua Gao, Lifeng Yu, Xuanxuan Sun, Rui Feng, Dongxue Shao, Yuan Yuan, Zhengnan Zhu, Xuefei Sun, Masaki Kameyama, Liying Hao	4. 巻 318
2. 論文標題 The LQT-associated calmodulin mutant E141G induces disturbed Ca ²⁺ -dependent binding and a flickering gating mode of the Cav1.2 channel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 991-1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00019.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Gao QingHua, Minobe Etsuko, Kameyama Masaki, Xu Jianjun	4. 巻 160
2. 論文標題 Purification of insoluble GST-fused and GST-cleaved Cav1.2 channel fragment by denaturation and renaturation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 7-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2019.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亀山正樹、蓑部悦子、徐建軍、高青華
2. 発表標題 心筋の電位依存性Ca ²⁺ チャネル(Cav1.2) のCa ²⁺ 依存性不活性化の構造シミュレーション
3. 学会等名 第70回西生理学会、宮崎
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蓑部悦子、徐建軍、森 誠之、亀山正樹
2. 発表標題 2分子のカルモジュリンによるCav1.2チャネルのカルシウム依存性不活性化
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会、大分
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	亀山 正樹 (Kameyama Masaki) (60150059)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	蓑部 悦子 (Minobe Etsuko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高 青華 (Gao Qinghua)		
研究協力者	ハオ 麗英 (Hao Liying)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	中国医科大学	中国東北大学		
中国	中国医科大学	中国東北大学		