

令和 4 年 5 月 26 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：19K07303

研究課題名（和文）2分子のカルモジュリンによるCav1.2チャンネル不活性化機構の解明

研究課題名（英文）Inactivation of Cav1.2 channel by 2 molecules of calmodulin

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Cav1.2チャンネルのCa²⁺依存性不活性化には、カルモジュリンの濃度に依存した不活性化機構が含まれることを報告した。本研究では、カルモジュリンによるCav1.2チャンネルの不活性化の分子機構を、アミノ末端側細胞内ドメインを欠如したチャンネル変異体にパッチクランプ法を適用して解析した。また、チャンネルのカルボキシル末端細胞内ドメイン断片とカルモジュリンをグリシン鎖で繋いだペプチドを作成し、カルモジュリンとの結合実験を行った。その結果、カルモジュリン濃度依存性のチャンネル不活性化では、チャンネルのアミノ末端配列は必須ではなく、カルモジュリンがチャンネルのカルボキシル末端に複数個結合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チャンネルを含むL型Caチャンネルは、心筋、骨格筋、神経系や分泌細胞に分布し、筋収縮、遺伝子発現、シナプス伝達、ホルモン分泌などにおいて重要な役割を持つため、本研究により得られた知見を広く応用できる。また、カルモジュリンにより制御されるチャンネルはCaチャンネルの他に多数あり、それらの作用機序の解明に貢献できる。カルモジュリンの遺伝子異常から病態につながる例も報告されており、カルモジュリンによるチャンネルの活性調節は重要な位置づけにある。

研究成果の概要（英文）：calmodulin (CaM) is essential for the regulation of Cav1.2 channel activity. We reported that the Ca²⁺ dependent inactivation of the channel included the CaM-concentration-dependent manner but the molecular mechanism is still unclear. In this study, amino-terminal domain deletion channel maintained the CaM dependent inactivation measured by patch-clamp current recording. The carboxyl-terminal domain peptide linked with a CaM by Glycine linker bound with additional CaM. These results suggest that CaM-concentration-dependent inactivation induced without amino-terminal domain of the channel and with two CaM binding to carboxyl-terminal site.

研究分野：イオンチャンネル

キーワード：Cav1.2チャンネル 電気生理学実験 パッチクランプ カルモジュリン カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cav1.2 チャンネルは、心筋ペースメーカー細胞（洞房結節細胞）における活動電位の自発的発生や心房筋、心室筋細胞における活動電位プラトー相の形成、興奮性細胞における興奮収縮連関（E-C Coupling）、転写制御（E-T Coupling）、分泌制御（E-S coupling）において重要な役割を果たしている。その分子機構については未解明な点が多い。

カルモジュリンは、Ca²⁺センサー蛋白であり、Cav1.2 チャンネルの制御に不可欠である。チャンネルポア（孔）を形成する 1 サブユニットに 1 分子のカルモジュリンが恒常的に結合しており、Ca²⁺ 依存的に結合様式を変化させ、チャンネルの活性を調節するモデルが一般的である。Ca²⁺ 結合カルモジュリンはチャンネルを不活性化し、細胞内への過剰な Ca²⁺ 流入を抑制する。その結合様式は、チャンネルのカルボキシル末端部にカルモジュリンが結合するモデルと、チャンネルのアミノ末端部とカルボキシル末端部をカルモジュリンが架橋するモデルに分かれる。また、チャンネルのカルボキシル末端部に 2 分子のカルモジュリンが結合した結晶構造が報告されたが、その機能については言及されていない。

2. 研究の目的

Ca チャンネルの調節機構は、N 型（Cav2.1）や P/Q 型（Cav2.2）など L 型（Cav1.1-1.4）以外においても電気生理学実験や分子生物学実験によって研究が進められている。各々の研究室からモデルが提唱されているが、十分な証明はなされていないのが現状である。我々はパッチクランプ法の一つである Inside-out patch 法を用いて Ca チャンネルの調節におけるカルモジュリンの役割を追究してきた。Inside-out patch 法は、Ca²⁺ 濃度やカルモジュリン濃度を任意に変換でき、付加のタイミングなどを的確に操作できるため、詳細な条件設定のもとチャンネル応答を記録することが可能である。この方法により、カルモジュリン濃度依存性の変化、つまり Ca²⁺ 濃度非依存性の調節機構をも実験的に再現できることを報告した [Journal of Pharmacological Sciences (2010): 引用文献]。

先行実験では、チャンネルのアミノ末端ドメインを除去し、カルボキシル末端にカルモジュリンを繋いだチャンネルでは、Ca²⁺ 濃度依存性の不活性化は消失するが、カルモジュリン濃度依存性の不活性化は観察された。よって Ca²⁺ 濃度依存性の不活性化にはアミノ末端ドメインは不要であることが示唆された。しかし、Ca²⁺ 濃度依存性不活性化に対するカルモジュリン濃度依存性の不活性化の位置づけはできていない。本研究では、パッチクランプ法によるチャンネル電流解析と、チャンネル断片ペプチドとカルモジュリンの結合実験により、カルモジュリン濃度依存性の活性調節の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) パッチクランプ法による解析

HEK293 細胞に、Cav1.2 チャンネルの主サブユニットである 1C、副サブユニットである 2a と 2 を共発現させる（野生型）。発現効率はプラスミドに組み込まれた蛍光タンパク GFP により確認した。カルモジュリンは HEK293 細胞からクローニングし、大腸菌 BL21 で合成した後、疎水性カラムを用いてゲル濾過生成したものをを用いた。

チャンネルの電流解析は、プラスミドの導入後 24 時間から 72 時間の間でおこなった。パッチクランプ法の cell-attach mode（細胞内環境が保たれた状態）と inside-out mode（cell-free の状態）で記録し、cell-attach mode でのチャンネル活性を 100% として inside-out mode での活性を評価した。これまでの研究から、inside-out mode でチャンネルの活性を維持するためには、1 μ M カルモジュリンと 3 mM ATP が必須であるため、80 nM Ca²⁺ とともに基準溶液とした [The Journal of Physiology, (2017): 引用文献]。

初めに cell-attach mode で数分間のチャンネル電流の記録を行い、その後、基準溶液の Ca²⁺ 濃度 (nM) を 0、80、250、500、2000 に置換し、inside-out mode でチャンネル電流の記録を行った。これによって、Ca²⁺ 濃度依存性のチャンネル不活性化の観察が可能となる。または、基準溶液のカルモジュリン濃度 (μ M) を 0、0.3、1、3、10 に置換し、カルモジュリン濃度依存性のチャンネル不活性化を観察する。

Cav1.2 チャンネルのアミノ末端側細胞内ドメインを除いた サブユニット（変異体）を作成した。野生型と比較することにより、アミノ末端側細胞内ドメインの不活性化への関与を調べる。

Cav1.2 チャンネルのカルボキシル末端側細胞内ドメインの遠位側約 3 分の 2 を除き、切断部にグリシン鎖を介してカルモジュリンを繋いだ変異体（チャンネル-カルモジュリン複合体）を作成した。グリシン鎖の長さは 8、12、24、48、60 とする。グリシン鎖の長さはカルモジュリンの自由度に対応すると考える。

(2) チャネル断片ペプチドとカルモジュリンの結合実験

Cav1.2 チャネルのカルボキシル末端側細胞内ドメインの近位側約 3 分の 1 とグリシン鎖を介してカルモジュリンを繋いだペプチドを作成した。グリシン鎖の長さはパッチクランプ実験で用いたチャネル - カルモジュリン複合体に倣って 8、12、24、48、60 とする。対照として、カルボキシル末端側細胞内ドメインペプチドを用いる。各ペプチドは大腸菌 BL21 で合成し、可溶性をあげるために GST 融合タンパクとした。これらの GST 融合タンパクとカルモジュリンの結合を、カルモジュリン濃度を変えて調べた。反応液の Ca^{2+} 濃度は 1 mM とした。

4. 研究成果

(1) チャネル変異体の活性は、野生型と同じように、0 から 80 nM Ca^{2+} でわずかに増加し、80-2000 nM で減少した。野生型との比較では、高濃度 Ca^{2+} で差が生じることを予想したが、確認できなかった。さらに実験数を重ねて検討する必要がある。

Inside-out でのチャネル活性の最大値は 70% 程度で、過去にモルモット心室筋細胞を用いた結果 (100-120%) と比べて低いが、原因は不明である。カルモジュリン、ATP の他に、チャネルの活性調節に関わる因子があることが示唆された。

(1) チャネル-カルモジュリン複合体は、グリシン鎖の長さに応じて、カルモジュリン濃度依存性の不活性化が大きくなった。グリシン鎖 8 と 12 では、ほぼ不活性化は見られず、チャネル活性は 100% を維持した。

(2) チャネルペプチドとカルモジュリンは、パッチクランプ実験で用いた変異体に倣ってグリシン鎖でつなぐ計画であったが、大腸菌での蛋白合成が困難であったため、グリシン鎖を同じ長さのチャネルのカルボキシル末端側細胞内ドメインの遠位部の配列 (アミノ酸残基数: リンカー 12 と 60) に置き換えた。それらの配列は立体構造をとらない、極性のない配列を選んだ。

GST 融合タンパクは、大腸菌内在性のプロテアーゼで切断されやすく、純度と量を確保するための条件検討が必要であった [Protein Expression and Purification (2019): 引用文献]

リンカー 12 では、高濃度カルモジュリンを加えても、ほぼカルモジュリンは結合しなかった。リンカー 60 では、カルボキシル末端側細胞内ドメインペプチド (対照) と比較して、カルモジュリンとの親和性はやや低くなったが、カルモジュリンの最大結合量は同程度であった。

(1) のパッチクランプ実験に対応させると、短いリンカーでは、リンクさせたカルモジュリンがチャネルペプチドと結合しており、2 個めのカルモジュリンが結合しにくいために不活性化がおきないことが考えられる。長いリンカーでは、野生型と同等に不活性化がみられ、対照と同等にカルモジュリンの結合がみられることから、チャネルカルボキシル末端側細胞内ドメイン近位部へ 2 分子のカルモジュリンが結合することが、カルモジュリン依存性の不活性化の分子機序であることが示唆された。しかし、カルモジュリンがチャネルのアミノ末端部とカルボキシル末端部を架橋する可否については結論できない。

< 引用文献 >

Han DY, Minobe E, Wang WY, Guo F, Xu JJ, Hao LY, Kameyama M. Calmodulin- and Ca^{2+} -dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 112, 310-319, 2010.

Minobe E, Mori MX, Kameyama M.: Calmodulin and ATP support activity of the Cav1.2 channel through dynamic interactions with the channel. *The Journal of physiology*, 595(8), 2465-2477, 2017.

Gao Q, Minobe E, Kameyama M, Xu J. Purification of insoluble GST-fused and GST-cleaved Cav1.2 channel fragment by denaturation and renaturation. *Protein Expression and Purification*. Volume 160, 7-10, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jia Wanying, Liu Junyan, Yu Zhiyi, Zhang Xiaohong, Xu Xiaoxue, Wang Yuting, Gao Qinghua, Feng Rui, Wan Yujun, Xu Jianjun, Minobe Etsuko, Kameyama Masaki, Wang Wuyang, Guo Feng	4. 巻 46
2. 論文標題 Properties of Calmodulin Binding to NaV1.2 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 Qinghua Gao, Etsuko Minobe, Masaki Kameyama, Jianjun Xu	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 -

〔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 Etsuko Minobe, Jianjun Xu, Masayuki X Mori, Masaki Kameyama
2. 発表標題 Ca ²⁺ dependent inactivation of Cav1.2 channel induced by two molecules of calmodulin
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

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⁺ + チャンネル (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回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科研究室紹介
<https://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/advanced-therapeutics/f101/02.html>
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経筋生理学教室ホームページ
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/index.html>

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
研究協力者	徐 建軍 (Xu JianJun)		

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
---------	---------