

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20570158

研究課題名 (和文) 出芽酵母のカルシウムチャネルホモログ Cch1 の機能解析と制御分子の  
解明研究課題名 (英文) Analysis of yeast Cch1, a homologue of animal voltage-gated calcium  
channel pore subunit, and its regulatory factor Mid1.

研究代表者

飯田 和子 (IIDA KAZUKO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：40151229

研究成果の概要 (和文)：動物の電位作動性カルシウムチャネル (VGCC) の $\alpha_1$  ポアサブユニットの出芽酵母ホモログである Cch1 とその制御因子と予想される Mid1 の複合体のチャネル活性を、培養細胞ならびに酵母細胞スフェロプラストでパッチクランプ法により検出することを試みた。Mid1 は全長にわたって N 型糖修飾されており、C-末端側に 1 2 個のシステイン残基を含むモチーフがあることから、動物の VGCC の制御サブユニットの一つである $\alpha_2/\delta$ の機能的ホモログである可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Cch1 is a yeast homologue of the pore-forming  $\alpha_1$  subunit of animal voltage-gated calcium channels (VGCC), and Mid1 is an essential component together with Cch1 for the high-affinity calcium uptake in yeast. We tried to detect electric currents through the Cch1/Mid1 channel expressed in cultured mammalian cells or in yeast spheroplasts by the patch-clamp method. Mid1 is heavily N-glycosylated all over the length, and Mid1 has a cysteine-rich motif in the C-terminal region. These characteristics suggest that Mid1 is a functional homologue of the  $\alpha_2/\delta$  subunit of animal VGCCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：生体膜、受容体、カルシウムチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 電位作動性カルシウムチャネル (VGCC) は様々な動物の細胞で発現しており、とりわけ脳神経細胞や筋細胞などの興奮性細胞において非常に良く研究され、VGCC 遺伝子に突然変異が生じると骨格筋の興奮-収縮連関の消失や視覚異常などの重篤な病気 (カルシウ

ムチャネロパチー) が引き起こされることが知られている。近年のゲノム解析により様々な動物で VGCC の遺伝子が特定され、出芽酵母やカビ類でも VGCC  $\alpha_1$  ポアサブユニットの候補遺伝子 *CCH1* が見つかっている (Paidhungat and Garrett, *MCB* 17:6339-6347, 1997)。*CCH1* 遺伝子は、我々が「低カルシウ

ム培地で性フェロモン刺激により死ぬ」という表現系で単離した *mid* 変異株 (mating pheromone-induced death, Iida *et al.*, *MCB* 14:8259-8271, 1994) のうちの一つ、*mid3* 変異株、の原因遺伝子であり、*cch1* 欠損株は性フェロモン刺激後の  $Ca^{2+}$  流入が起こらずに死ぬ。系統分類学上高等動物と遠く離れている出芽酵母の *Cch1* が、どのような性質のチャネルでどのようにして活性化されるのかを調べることは、真核生物の VGCC- $\alpha_1$  の多様性や分子進化を理解する上で重要である。しかし、*CCH1* は大腸菌に対して毒性があるためにクローニングができず解析が進んでいなかった。我々は、大腸菌の代わりに酵母細胞内相同組換えを利用して *CCH1* 遺伝子のクローニングに成功し (Iida *et al.*, *FEBS Lett.* 576:291-296, 2004)、さらに、大腸菌を利用するベクターへのクローニングにも成功した (Iida *et al.*, *JBC* 282:25659-25667, 2007)。それにより *CCH1* 遺伝子を培養細胞等に発現させてそのチャネル活性を電気生理学の手法を用いて解析することが初めて可能になった。

(2) 高等動物の VGCC は、ポアサブユニット  $\alpha_1$  と調節サブユニット  $\alpha_2\delta$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  から構成されているが、出芽酵母ではこれらの調節サブユニットのホモログは見つかっていなかった。*CCH1* と同じスクリーニングで同定された *MIDI1* 遺伝子の産物 *Mid1* (Iida *et al.*, 1994) は、出芽酵母の高親和性カルシウム取込み過程に *Cch1* とともに必須な因子であるが (Muller *et al.*, *Genetics* 159:1527-1538, 2001)、動物では *Mid1* ホモログは見つかっておらず、*Mid1* がどのような役割を担っているのかはわかっていなかった。そこで、*Mid1* のタンパク質構造上の特徴からその機能を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

動物の電位作動性カルシウムチャネル (VGCC) の  $\alpha_1$  ポアサブユニットの出芽酵母ホモログである *Cch1* のチャネル活性をパッチクランプ法により検出し、チャネル特性を明らかにする。また、*Cch1* と共に高親和性カルシウム取込み過程に必須な因子である *Mid1* が、*Cch1* のチャネル活性にどのように関わっているのかを明らかにする。さらに、それらの知見に基づき、広く真核生物の VGCC ファミリーの機能的多様性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 出芽酵母の *Cch1* と *Mid1* を培養細胞に発現させるベクターの作製は以下のように行った。*CCH1* は大腸菌に対して毒性を示すため通常の市販のベクターにクローニング

することはできない。そこで、培養細胞に目的蛋白質と形質転換マーカー-EGFP を独立に発現させるための市販のベクター-pCMS-EGFP (Clontech Co.) を改変し、大腸菌中でのコピー数が少ない pBCMS-EGFP を構築した。また、*Mid1* を *Cch1* と同時に発現させた培養細胞を蛍光顕微鏡下で識別するために、pCMS-EGFP の EGFP を蛍光特性の異なる HcRed に置換えた pCMS-HcRed を構築した。これらのベクターに *Cch1* と *Mid1* の ORF を組み込み、BHK6 細胞 (Yaguchi *et al.*, *JBC* 275:41504-41511, 2002) に発現させた。発現の確認は、それぞれのタンパク質のオリゴペプチドを抗原として作製した特異抗体を用いたウエスタンブロットで行った。

(2) *Cch1* または *Mid1* を酵母で高発現するプラスミドは、酵母発現用シャトルベクターに、強力な *TDH3* プロモーターとその下流に *CCH1* または *MIDI1* の ORF を組み込んで作製した (発表論文③)。染色体上の *CCH1* および *MIDI1* のプロモーターを強力な *TDH3* プロモーターから高発現する株は、それぞれの遺伝子の開始コドンの直前に強力な *TDH3* promoter を挿入し、重複させた 3' terminator 領域の中間に *URA3* 遺伝子を挿入した DNA 断片を作製し、相同組換えを利用して染色体に組み込み作製した。野生株と、*Cch1*/*Mid1* チャネルに対して抑制的に働くカルシニューリンの調節サブユニットの *CNBI* 遺伝子を破壊した株 (*cnb1Δ*) を親株とし、コロニー-PCR により目的株を選択後、5-Fluoroorotic Acid を用いて *URA3* 遺伝子を欠落した株を選択した。*Cch1* と *Mid1* を高発現していることはウエスタンブロットで確認した。酵母細胞のパッチクランプは、ザイモリエース処理により細胞壁を取り除いたスフェロプラストで行った。

(3) 部位特異的変異 DNA の作製は、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo Co.) を用いた Inverse PCR 法で行った。

(4) *Mid1* の C-末端の膜トポロジーは、His4p および *Suc2p* の一部との融合タンパク質を利用して決定した (Kim *et al.*, *JBC* 278:10208-10213, 2003)。なお、*Suc2p* は *Mid1* の 16 カ所の N 型糖鎖修飾配列の N の全てを Q または V に置換した *Mid1N0* の C-末端につないだ。

## 4. 研究成果

(1) 培養細胞発現系のパッチクランプ実験 *CCH1*, *MIDI1* クローニング用に改変したベクターに *CCH1* 遺伝子と *MIDI1* 遺伝子の ORF をそれぞれ組み込み、ウサギの  $\alpha_2\delta$  と  $\beta$  を発現している BHK6 細胞に形質導入した。*Cch1* と *Mid1* が BHK6 細胞で実際に発現していることは、ウエ

スタンプロットで確認した。パッチクランプ実験は、東邦大・医・薬理の赤羽悟美准教授に行っていたが、Cch1/Mid1 の発現に依存したチャンネル活性は検出できなかった。

## (2) 酵母細胞のパッチクランプ実験

① Cch1 と Mid1 を *TDH3* プロモーターから高発現させるプラスミドで形質転換した *cnb1* 破壊酵母株 (*MATa cnb1Δ CCH1ox MID1ox*) は、野生株に比べ数十倍の  $Ca^{2+}$  取込み能を示した (図 1)。

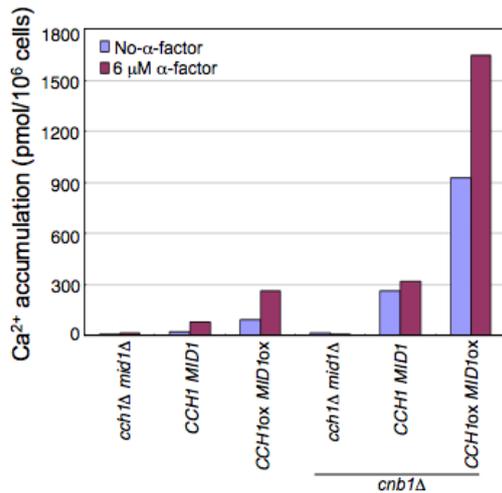


図 1 Cch1、Mid1 高発現株の  $Ca^{2+}$  取込み

② 連携研究者飯田秀利の博士課程の大学院学生が、2009年4月より7月までの4ヶ月間、酵母のパッチクランプ実験の第一人者である米国ウィスコンシン大学の Ching Kung 教授の元でパッチクランプ実験を行った。①の株から調製したスフェロプラストを用いて、出芽酵母の既知のイオンチャンネルである Tok1 チャンネル (Depolarization-activated K<sup>+</sup> channel) と Gustin チャンネル (Mechanosensitive ion channel) の電流を確認することができたが、Cch1/Mid1 に依存した電流は検出できなかった。Cch1/Mid1 のチャンネル活性を上昇させる性フェロモン ( $\alpha$ -factor) 添加や ER ストレスを引き起こす Tunicamycin 処理した細胞でも測定を行ったが同様であった。

③ ザイモリエース処理により調製したスフェロプラストの Cch1 と Mid1 をウエスタンブロットで検出したところ、Cch1 のバンドは変化がなかったが、Mid1 は未処理酵母で検出される 95 kD 付近のバンドが減少し、60 kD 付近に新たなバンドが検出された。Mid1 (548 アミノ酸残基) には、16カ所の N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列があり、糖鎖修飾を受けて 95 kD 付近に泳動される。この糖鎖修飾

は Mid1 の活性に必要である。そこで、パッチクランプ法で Cch1/Mid1 チャンネルの電流が検出できなかったのは、ザイモリエース中に少量混在しているグリコシダーゼによって Mid1 の糖鎖が切断されて失活したためであると考え、ザイモリエース処理時に糖鎖切断酵素に対する各種の阻害剤 (mannan, mannosinagstatin, nagstatin, pochonicine) を加えて、Cch1/Mid1 チャンネル活性を保持したスフェロプラストを調製することを試みたが、良い条件を見いだすことはできなかった。

## (3) Mid1 のタンパク質構造上の特徴の解析

Mid1 は、出芽酵母の高親和性カルシウム取込み過程に Cch1 とともに必須な因子であるが、動物には Mid1 ホモログは見つかっておらず、Mid1 がどのような役割を担っているかはわかっていない。そこで、Mid1 のタンパク質構造上の特徴の解析を行い、以下の成果を得た。

① Mid1 には、その全長にわたって 16カ所の N 型糖鎖修飾のコンセンサス配列 (NXS/T) があり、SDS-PAGE での見かけの分子量は、N 型糖鎖を切断するエンドグリコシダーゼ H (Endo H) 処理により、約 95 kD から約 60 kD へと大きくシフトする。それぞれの部位が実際に糖鎖修飾を受けているかどうか分かれば、Mid1 のどの部分が細胞外または ER 内腔にあるのかが分かる。そこで、16カ所のうちの 11カ所の N (Asn) を Q (Gln) に置換した変異体 N5 をベースに、1カ所ずつ Q を N に戻すか、または、さらに 1カ所の N を Q に置き換えた変異体を作製し、それぞれの SDS-PAGE での移動度を比較したところ、16カ所のほとんどが酵母細胞で実際に N 型糖鎖修飾されていた (図 2)。この結果は、Mid1 タンパク質の大部分は細胞外または ER 内腔にあることを示している。

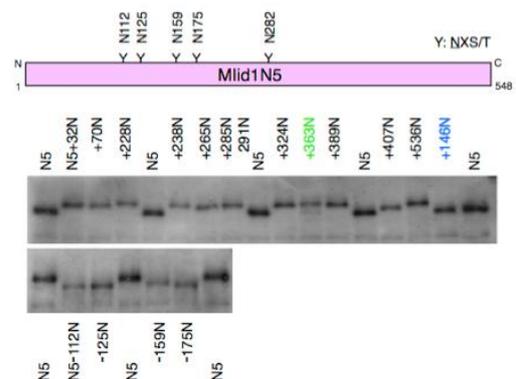


図 2 Mid1 の N 型糖鎖修飾 16カ所のうちの 11カ所の N 型糖鎖修飾コンセンサス部位の N を Q に置換した Mid1N5 を基準とした。



, Terashima, A., Iida, K., Kojima, I., Katagiri, T., Shinozaki, K., and Iida, H.: MCA1 and MCA2 that mediate  $Ca^{2+}$  uptake have distinct and overlapping roles in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 査読有, **152**: 1284-1296 (2010)

- ③ Teng, J., Goto, R., Iida, K., Kojima, I. and Iida, H.: Ion-channel blocker sensitivity of voltage-gated calcium-channel homologue Cchl in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 査読有, **154**: 3775-3781 (2008)

[学会発表] (計15件)

- ① 飯田秀利、中野正貴、原茂恵美子、今村朋美、飯田和子、重松秀樹、永山國昭：カルシウム透過性機械受容チャネルの構造と機能、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月8日、神戸
- ② Teng, J., Izumi-Nakaseko, H., Iida, K., Ito, M., Kojima, I., Adachi-Akahane, S. and Iida, H.: Role of glycine residues highly conserved in the domain I/II S2-S3 linkers of voltage-gated calcium channel  $\alpha_1$  subunits. XXXVIth International Congress of Physiological Sciences、2009年7月27日、京都
- ③ 藤金風、中瀬古(泉)寛子、飯田和子、小島至、赤羽悟美、飯田秀利:電位作動性カルシウムチャネル $\alpha_1$ サブユニット S2-S3 リンカーに保存されている Gly 残基の役割、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会、2008年12月9日、神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯田 和子 (IIDA KAZUKO)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
研究者番号：40151229

### (2) 研究分担者

飯田 秀利 (IIDA HIDETOSHI)  
東京学芸大学・教育学部・教授  
研究者番号：70124435

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

藤 金風 (TENG JINFENG)  
群馬大学・医学系研究科・博士課程院生  
研究者番号：