

平成22年 5月27日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790208

研究課題名（和文） 心筋細胞内カルシウム輸送調節因子ホスホランバンの筋小胞体局在メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Localization mechanism of a Ca²⁺ pump modulator, phospholamban in cardiac sarcoplasmic reticulum

研究代表者

本田 健 (HONDA TAKESHI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：30457311

研究成果の概要（和文）：ホスホランバン（PLN）は心筋小胞体膜に局在する蛋白質で心筋収縮を負に調節している。その小胞体への局在を制御できれば、心機能の改善ひいては新たな心不全治療に繋がる。本研究では PLN の小胞体局在に C 末端のアミノ酸配列が重要である示唆を得た。また、この部位に結合して「PLN の局在を制御する蛋白質」の探索を試みると同時に、その支援技術として PLN に特異的に結合する新しい分子ツール・アプタマーを開発した。

研究成果の概要（英文）：Phospholamban (PLN) is a regulator of the myocardial contractility in cardiac sarcoplasmic reticulum (SR). Controlling the subcellular localization of PLN leads to the prospect for new therapy of heart failure. In this study, it was suggested that the C-terminal region of PLN is critical for localization of PLN to SR. Based on this finding, the identification of a putative protein interacting to the C-terminal region of PLN was attempted. Furthermore, a novel PLN-targeted aptamer was successfully developed as the useful molecular tool for detection of the PLN-binding protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：化学架橋、筋小胞体、心不全、ホスホランバン

1. 研究開始当初の背景

心筋小胞体は心筋細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位であり、心臓の収縮・弛緩の制御においては、その小胞体への Ca^{2+} 輸送が主要な役割を果たす。この Ca^{2+} 輸送は Ca^{2+} ポンプ ATPase (SERCA) によりなされ、その調節は心筋小胞体の膜蛋白質・ホスホランパン (PLN) が蛋白質間相互作用を介して行っている。その作用機序は、「PLN が直接相互作用して SERCA の働きを抑制する。また PLN がリン酸化されると抑制が解除されて SERCA が活性化される」というものである。うつ血性心不全病態では PLN の発現に変化があり、PLN の機能制御が心肥大や心不全の改善に有効であることも示されている。その結果、PLN を標的とする心不全の治療法には世界的な注目が集まっている。しかしながら、PLN が機能すべき心筋小胞体膜にどのようなメカニズムで局在するか？という基本的問題は未だ明らかでない。一般的に小胞体蛋白質は、その小胞体局在のための典型的構造を持つが、PLN にはその構造が無い。そのため、PLN の心筋小胞体への局在には、新しいメカニズム (未知の局在制御因子 X の存在など) の関与が想定されている。一方、PLN のホモログであるサルコリピンでは、小胞体局在に C 末端配列が重要であることが判明している。さらに、詳細な機能は不明ながら、その C 端部位にヒートショック蛋白質が結合し、局在制御に関与することも示唆されている。これらを鑑みると、PLN においても類似の機構が想定される。しかしながら、両者の C 端領域では相同性が低いことや、PLN の C 末端構造はサルコリピンのように小胞体膜から明瞭に突出していない、といった構造的相違もあり、PLN についてはその想定以外の小胞体局在様式も考慮する必要がある。

2. 研究の目的

ホスホランパンは心筋細胞の小胞体に局在することで心筋の収縮弛緩活動を調節しており、その異常は心不全等の疾患に繋がる。現在、心不全に使用される全ての強心薬は、主として細胞外から細胞質内への Ca^{2+} 流入の増加によって強心作用を現わす。その結果、不全心では十分な心筋弛緩が得られず、有効な心拍出量が得られないことがしばしばある。この限界を克服する強心薬には、細胞外からの Ca^{2+} 流入を伴わず、十分な筋弛緩に裏打ちされた収縮力の増強作用が求められる。その理想的な薬物作用点として考えられるのが、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ (SERCA)-PLN 系である。SERCA は細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体の膜に存在し、細胞質から小胞体への Ca^{2+} 輸送を担う。一方、PLN は SERCA に結合することでその Ca^{2+} ポンプ機能を抑制する。従って、PLN が SERCA を抑制するには、その小胞体膜への局在が必須であるが、その局在を自在に制御できれば、PLN による SERCA 抑制作用の“解除”が可能となる。そのため、重症心不全などに対する新たな治療方策と

なる可能性がある。そこで本研究では PLN の小胞体局在における分子機構解明を目標に据え、そのために以下を本研究における目的とする。(1) PLN における小胞体局在に重要な構造要因を探索する。(2) その局在に重要な部位と相互作用しうる未知蛋白質 (局在制御因子) を同定する、平行して (3) その因子の検出を効率化しうる新しい支援分子ツールを開発する。

3. 研究の方法

本研究では、PLN の心筋小胞体への局在・保持のメカニズムを明らかにするため、まず種々の変異 PLN を作製し、それらの細胞内局在を解析して小胞体局在・保持に必要な構造要因を決定する。(図1参照)

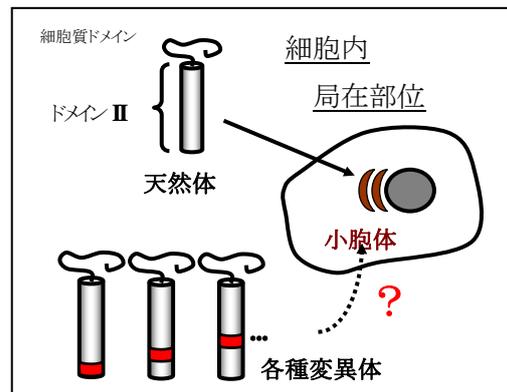


図1. ホスホランパンの構造-局在相関解析

PLN は、アミノ酸52残基からなる膜蛋白質で、N 末端を含む細胞質側に存在するドメイン I (1-30位)と膜貫通領域のドメイン II (31-52位)に分けられる。これらの構造のどの部位が小胞体局在に重要であるかを調べるため、以下の実験を行った。

PLN 内のアミノ酸数個からなる配列またはアミノ酸一残基を削除もしくは別のアミノ酸に置換するなどした種々の PLN 変異体をデザインした。変異 PLN の作製に当たっては、野生型 PLN をコードした DNA を鋳型として、変異点を含んだプライマーを用いて PCR 法により目的の変異体 DNA を増幅した。得られた PCR 産物はプラスミドに組み込み、大腸菌内で増幅させた。さらに、このプラスミド内の PLN 変異体コード領域をホ乳類細胞タンパク質発現用ベクターに再組み込みした。これをポリカチオン性遺伝子導入剤ポフエクタミンにより、ヒト由来細胞に遺伝子導入し、目的の PLN 変異体を発現させた。細胞を固定化後、各種一次抗体、蛍光標識二次抗体を用いて、発現した PLN 変異体の細胞内局在を蛍光免疫染色法により解析した。

(1) ホスホランパンの各種変異体作製:

まず、N 末端側の細胞質ドメイン I の機能を見るため、ドメイン I を FLAG 配列に置き換えた変異体を作製した。以降の変異体は主に細胞質ドメ

イン I→FLAG 配列の置換体を用い、ドメイン II に焦点を絞って変異体を作製した。PLN の類似蛋白質であるサルコリピンでは C 末端5残基配列が小胞体保持に重要とされる。これを踏襲し、以下に示すような変異体コンストラクトを作製した。

- PLN の C 端から逐次アミノ酸を削除した変異体
- アミノ酸側鎖の影響を調べる為に、C 端のアミノ酸をアラニン(側鎖;メチル基)に順次置換した変

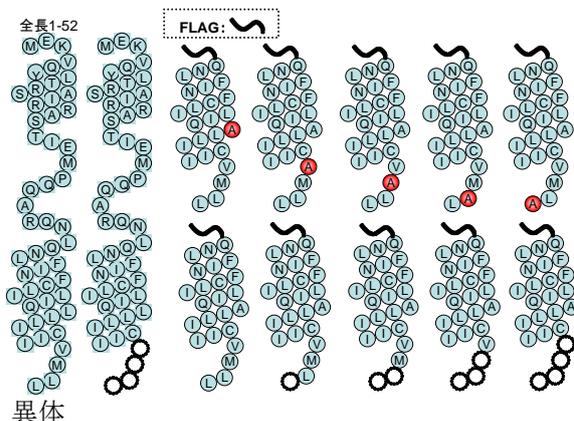


図2. ホスホランパン変異体の例

(2)ホスホランパン変異体の細胞内における局在部位の解析:

PLN 変異体の細胞内局在様式は、HeLa 細胞における免疫染色法にて検証した。通常、HeLa 細胞に野生型 PLN を発現させると、小胞体(心筋細胞の筋小胞体に相当)に局在を示す。各変異体の N 末端細胞質ドメイン I は FLAG 配列に置換しておき、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色した。同時に小胞体特異的のマーカ蛋白質(カルレチキュリン)についても免疫染色を行い、細胞質内における小胞体の特定に用いた。共焦点レーザー顕微鏡により両者の染色パターンを比較して、FLAG 由来シグナルがカルレチキュリン由来シグナルと一致すれば、その変異体は小胞体に局在すると判断した。

(3)ホスホランパンの局在を制御する蛋白質Xの分離・抽出のための新規分子ツール開発:

PLN の C 端領域と相互作用する蛋白質 X を細胞共雑物から分離する手法に免疫沈降法を用いるため、まず PLN の N 端領域(PLN の小胞体局在に影響しない部位)を認識する抗体を調製した。後述するが、この免疫沈降法による蛋白質 X の分離・検出が難航したため、より特異的かつ強固に PLN に結合する新たな分子ツールを支援技術として開発した。従来の免疫沈降法では、蛋白質である抗体が大量に系に混入するが、これは蛋白質 X の分離・検出時のノイズに繋がり、解析精度を著しく低下させる。そこで非蛋白質成分で構成され、かつ PLN に特異的に結合する核酸(DNA)アプタマーの開発を SELEX 法

(図3)により試みた。

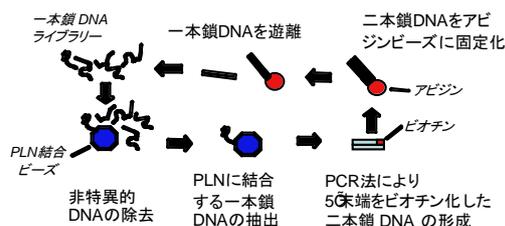


図3. SELEX 法によるホスホランパン特異的 DNA アプタマーの作製

まず、PLN(細胞質ドメイン)を結合させたビーズと 40 塩基のランダム配列からなる一本鎖 DNA ライブラリーを調製した。両者を混ぜ、ビーズを洗浄後、PLN に結合する一本鎖 DNA を抽出した。次に、一本鎖 DNA を遊離させ、PCR 法により増幅させた。その際、一方の DNA 鎖がビオチン化された二本鎖 DNA を形成させた。さらにそれをアビジンビーズに結合させ、洗浄後に一本鎖 DNA を遊離させ、再び次のセレクションへと使用した。これを繰り返すことによって、PLN に結合するアプタマーを選別していき、目的とする DNA アプタマーを得た。

(4)ホスホランパンの局在制御蛋白質Xの検出: 小胞体局在には PLN の C 端領域が重要であるとの知見を元に、“PLN の C 端領域と結合し、その局在を制御する蛋白質 X”の同定を試みた。まずは蛋白質 X を抽出すべく、抗 PLN 抗体を用いた免疫沈降を常法に従って行った。具体的には、PLN を発現させた HeLa 細胞から小胞体膜面分を分離し、その可溶性抽出液を抗 PLN 抗体と抗体をトラップするプロテイン A 結合ビーズを用いて免疫沈降する。無関係な抗体を陰性対照として用い、沈降した蛋白質を SDS ゲル電気泳動により分離する。対照とのバンド比較から PLN と特異的に共沈降してきた蛋白質を選定し、質量分析計(MALDI-TOF MS/MS)を用いて同定する。以上が実験の流れとなるが、この手法に加えてより安定かつ確実に PLN 結合蛋白質をトラップすべく、化学架橋法を併用した。架橋反応は、非特異的架橋結合の危険性が少ないチオール基とアミノ基間で行い、PLN をチオール基ドナー、蛋白質 X 側をアミノ基ドナーとした(図4)。(アミノ基-アミノ基間では蛋白質内に多数存在するため、非特異的架橋が増加しやすい。)まず PLN の C 末端にチオール基を持つシステイン残基を導入し、架橋起点とした。(この変異が PLN の小胞体局在に影響しないことは、先の免疫染色法により確認した。)架橋反応後、PLN-蛋白質 X を免疫沈降させ、抗 PLN 抗体によるイムノプロットを実施し、PLN 単独よりも分子量の大きな抗体陽性バンド(PLN の架橋複合体に相当)の検出を試みた(図4)。

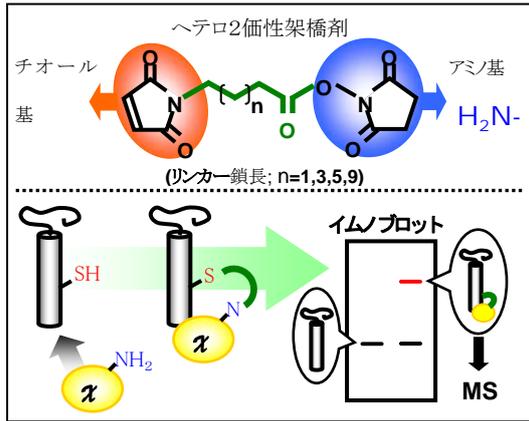


図4.化学架橋法を利用した検出法

4. 研究成果

(1)ホスホランパンの小胞体局在に重要な構造要因の探索:

まず、PLNの全配列のうち、N末端側の細胞質ドメイン I を FLAG 配列に置き換えた変異体について局在を観察したところ、この変異体は野生型と同様に小胞体に局在した。即ち、ドメイン I は小胞体局在には関与していない。そこで以降の PLN 変異体は主に FLAG 置換体を適用し、FLAG 抗体で検出できるようにした。続いて、ドメイン II において前項に示した各種変異体を作製し、細胞内局在パターンを解析した(図5)。

その結果、最末端の 52 位ロイシンについては削除やアラニン置換を施しても局在に影響が無いことが分かった。しかしながら、51-52 位の削除体では小胞体局在が不明瞭になり、さらに 50 位、49 位と削除していくと、小胞体における局在はほぼ確認できなくなった。また、アラニン置換でも同様に、49、50 位の置換体では小胞体局在は認められず、51 位置換体においても小胞体局在率が減少した。一方、48 位置換体では小胞体局在が認められた。これらの結果より、C 端領域 49 位～51 位アミノ酸構造の破壊は PLN の小胞体局在に大きく影響することが判明した。この領域は膜貫通部分に近接した部位であり、変異によるドメイン全体のトポロジー崩壊が局在異常に繋がる可能性は否定できないが、少なくとも PLN の C 端領域配列は PLN の小胞体への局在化に重要であることは確認された。PLN の小胞体局在に関する詳細な知見はこれまでになく、今回の結果はそのメカニズム解明に寄与する可能性がある。先に述べたように、PLN の類似タンパク質であるサルコリピンは C 末端 5 残基配列が小胞体局在に重要である。今回の PLN での結果はサルコリピンのそれと相似したものである。ただし PLN の場合、その C 末端 52 位アミノ酸残基は局在に関与しないなど、サルコリピンとは異なる点も存在し、両者の局在制御メカニズムが大きく異なる可能性も考慮すべきである。

FLAG-PLN ₂₉₋₅₂	Anti-FLAG	Anti-calreticulin	Merge
2 52			
2 51-52			
2 50-52			
2 49-52			
52A			
51A			
50A			
49A			

図5. ホスホランパンおよび変異体の細胞内局在の様子

(2)ホスホランパンに特異的に結合する DNA アプタマーの開発:

ホスホランパンの小胞体局在を制御する蛋白質があるとすれば、それは直接 PLN と相互作用すると思われる。これを同定するにあたり、第一段階として細胞ライセートの雑多な生体分子群から、PLN を特異的に分離・抽出する免疫沈降などの操作が必須となる。ここでは PLN を如何に効率よく特異的に分離・抽出するかが鍵となる。今回、抗体を用いた免疫沈降法による PLN 結合蛋白質の探索と平行して、より効率的かつ特異的な PLN 分離を目指し PLN を認識する核酸 (DNA) アプタマーの開発を試みた。これは非蛋白質成分から構成されるため、先述したような PLN 結合蛋白質の検出時における“ノイズ”を回避できる大きなメリットがある。SELEX 法により、40 塩基のランダム配列からなる一本鎖 DNA ライブラリーから 9 サイクルのセレクションを経て、45 クローンのアプタマーを得た。これらについて配列解析した結果、表 1 に示す 11 種類のアプタマーを得た。

表1. ホスホランパン結合アプタマー配列

No.	sequence	frequency
Apt-1	TGCCTGGCCTCTATCCCTGTGTCATTTATCCCTCCTTTCA	2/45
Apt-2	ACACTCGTCCCAGTAGGTGTCGTACCCGTTTTTCGACTGT	11/45
Apt-3	ATTGCACGCGCTCACTTTAACCGCATCGACCTATCCTGT	18/45
Apt-4	GGCCCTATGGACGTGGGGCACAGATCTCGCGCTAGGTA	2/45
Apt-5	CGTCCGTCGGCTCTGAACGGCCTTTTCGCTCCCGCCTGT	1/45
Apt-6	TACAGAGTGTTTTGGCGCGCGCCTTGCCTGTTC	6/45
Apt-7	TGTAACGCCGTGAATTTTGGACTGCCTACCCATACATGT	1/45
Apt-8	TAGTACGTCACTGGCCAAGCCTGCACGCATGATTATAATG	1/45
Apt-9	TTGGGAGGGGCACTGGGCACTGAATTTACGAAAGCGAG	1/45
Apt-10	TAACCTCCCTACCGAGCTATGTAAGTTTATATACAGATC	1/45
Apt-11	GTAGTGTGGGGCGAATGGACCAGGGACAGAGTAGTGA	1/45

得られた各アプタマーについて、心筋小胞体を用いた Ca^{2+} 依存性 ATPase 活性を測定した。これは、PLN による ATPase 活性の抑制を、アプタマーが PLN に結合することで、その抑制をどの程度解除できるかを評価したものである。スクリーニングの結果、最も有望であった Apt-9 について、PLN に対する詳細な結合試験を行った。解離定数 K_d 値は 50nM であり、PLN に高い親和性を持つことを確認した(図6A)。続いて、Apt-9 の PLN に対する沈降能力について調べた。ビーズに結合させた Apt-9 を心筋小胞体画分に混ぜてビーズを沈降させ、ビーズを洗浄後、ビーズから溶離させた蛋白質を電気泳動により解析した(図6B)。ビーズのみ、および Apt-9 配列のランダム変換アプタマー(Scrambled Apt-9)を陰性対照に、また抗 PLN 抗体を陽性対照とした。その結果、Apt-9 では抗 PLN 抗体と同様に PLN を特異的に沈降させることが確認された(図中矢印)。今回開発した Apt-9 は、本研究の遂行上有用な分子ツールであり、抗体を用いる際に発生する“蛋白質ノイズ”を回避できることから非常に有効な支援ツールとして期待できる。

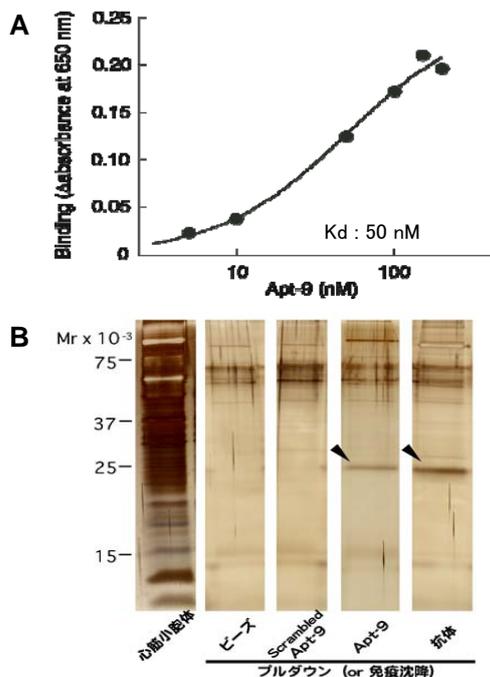


図6. ホスホランパンに対するApt-9の機能解析

(3)ホスホランパンの局在制御蛋白質の検出:
PLN と相互作用してその小胞体局在を制御する蛋白質を探索すべく、PLN と共沈降する蛋白質の同定を試みた。その試行錯誤の段階で、PLN はその特異な物理特性(非常に疎水性が高い、強固なホモ5量体を形成するなど)のために、常法による免疫沈降法では困難であることが判明した。小胞体膜において、PLN はその大部分が5量体として存在するが、実際に SERCA と相互作用してその生理機能を発揮するのは単量体である。そのため、PLN 単量体状態での相互作用蛋白質を検出したい場合、例えば強力な界面活性剤存在下での扱いを強いられる。このような状況下では特に疎水性部分の蛋白質間相互作用(抗原抗体反応や PLN と相互作用蛋白質間の相互作用)は極めて不安定化する。そこで、より安定かつ確実に PLN 結合蛋白質をトラップするため、化学架橋法を適用し、蛋白質間相互作用が不安定化する状況においても、安定な複合体を形成させることで改善を試みた。PLN と PLN 結合蛋白質間の特異的な相互作用に依存した架橋反応を成立させるには、架橋起点が PLN の相互作用部位近傍にあることが重要である。そこで、推定相互作用部位、即ち PLN の C 端領域、特に C 末端 52 位を架橋起点候補とした。幸運にも C 末端 52 位アミノ酸は PLN の小胞体局在に影響しないことが今回の研究で判明しており、ここに(架橋官能基である)チオール基を側鎖に持つシステイン残基を導入した。また、このシステイン置換 PLN が正常に小胞体へ局在することも確認した。

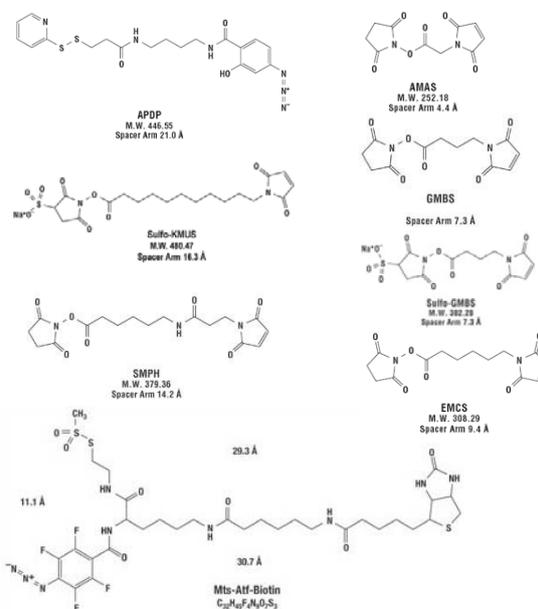


図7. 各種架橋試薬の化学構造

さて、架橋反応では、両蛋白質間の接近距離と架橋剤分子長がマッチすることが重要となる。そこで、図7に示すような様々な分子長の架橋剤を揃え、詳細な反応条件最適化を試みた。PLN を

多く含有する小胞体膜画分に対して、架橋反応の時間、温度、緩衝液の組成や pH、架橋試薬および画分のタンパク質の濃度、またその濃度比など、個々の架橋試薬に対して網羅的な検討を行った。しかしながら、PLN に特異的結合を示す蛋白質は同定されなかった。そこで、PLN 結合蛋白質側における PLN 相互作用部位の近傍には架橋反応が成立するアミノ基が適切な位置に存在しない可能性を考慮し、アミノ基感受性化学反応基から光感受性ラジカル反応基(特異的相互作用により相手蛋白質が近接した場合に光を照射すると、官能基に依存せず共有結合できる)に置き換えて同様の実験を行った。しかしながら、現在まで PLN に特異的結合を示す蛋白質の同定には至っていない。現在、開発した抗 PLN アプタマーを用いた高効率免疫沈降システムを支援技術として検討中である。

PLN のホモログであるサルコリピンは、その生理作用は未解明であるものの、PLN と構造が似ている点で興味深い蛋白質である。最近、このサルコリピンの C 端領域にあるアミノ酸数残基の配列に小胞体局在の制御に重要な機能があることが判明し、この部位にはヒートショック蛋白質が結合するとの報告がなされた。これを鑑みると、PLN においても、これと類似した機構が存在する可能性は十分に考えられる。本研究により、サルコリピン同様、PLN でもその C 端領域が小胞体局在に重要だとする知見が得られた。そのため、「PLN の C 末端領域に結合し、その小胞体局在を制御する蛋白質」の存在が想定された。

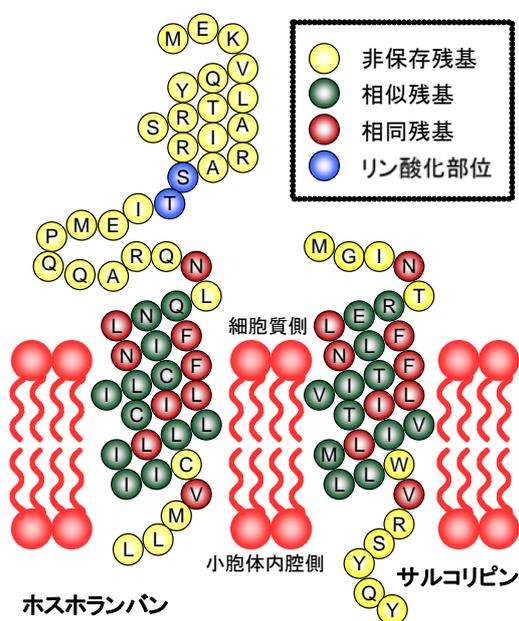


図8. PLN とサルコリピンの構造比較

しかしながら、図8に示すように、その C 末端領域においては配列相同性が低いことや、PLN の C 末端構造はサルコリピンのように小胞膜から明

瞭に突出していない、といった構造的相違もある。今回、PLN の C 端領域に特異的結合を示す蛋白質は同定できなかったが、上記の相違を考慮すると、PLN はサルコリピン様の小胞体局在の制御機構とは異なった分子機構を持つことが想定される。

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1件)

田中貴絵、本田 健、松浦健二、木村佳弘、乾誠、In vitro selection and characterization of DNA aptamers specific for phospholamban、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics、vol.229、p57-63、2009、査読有り

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 健(HONDA TAKESHI)

山口大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号:30457311

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし