

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790206

研究課題名(和文) L型Caチャンネルの活性制御におけるカルモジュリンの役割とその調節機構

研究課題名(英文) Regulation of L-type Ca²⁺ channel activity by calmodulin

研究代表者

蓑部 悦子(MINOBE ETSUKO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00448581

研究成果の概要(和文)：

カルモジュリンによるL型Caチャンネルの調節機構を解明することを目的とし、電気生理学的手法を用いて、チャンネル変異体の活性を解析した。結果から、チャンネルの活性化にはカルモジュリンの結合が必須であること、野生型ではカルモジュリンに加えATPが必要であるのに対し、変異体ではカルモジュリンのみで活性を示すこと、カルモジュリンとATPがチャンネルC末端近位部に結合し、その作用はC末端遠位部により抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

We measured activity of L-type Ca²⁺ channel and its mutants, C-terminal deletion (delta CT) and delta CT linked with calmodulin (CaM), using patch-clamp technique (inside-out mode). We found that binding of CaM to the channel was required for the channel activity. Unlike the wild type channel, the mutants did not require ATP for the channel activity. It was suggested that CaM and ATP interacted with a proximal part of C-terminal thereby producing the channel activity, which was modulated negatively by a distal part of C-terminal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：電気生理学、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カルシウムチャンネル、カルモジュリン、パッチクランプ法、inside-out、run-down、カルシウムイオン、ATP

1. 研究開始当初の背景

L型Caチャンネルは、細胞内のCaイオンにより制御されており、Caイオン濃度に依存した促通(Ca²⁺-dependent facilitation: CDF)と不活性化(Ca²⁺-dependent inactivation:

CDI)現象が知られている。それらの調節機構の主因子としてカルモジュリンが注目されている。カルモジュリンは4つのCa²⁺結合部位(EF-handモチーフ)をもち、細胞内Ca²⁺濃度の変化を受けてチャンネル活性を調節す

る。しかし、その分子的機序は明らかになっていない。カルモジュリンの結合部位については、チャンネルC末端部にIQ配列があるが、それ以外にも複数の親和性の高い部位が報告されており、チャンネル変異体を用いた解析が進行中である。さらに、リン酸化などのカルモジュリン以外の因子による修飾作用を考慮すると、実際の作用機序は複雑であることが予想される。これまでに、電気生理学の実験や、光学的手法による結合実験、チャンネルペプチドの結晶化解析が報告されているが、全体像は明らかになっていない。

Mori et al. (2004) は、チャンネルC末端部アミノ酸1671番以降を除いた変異体 (C-terminal deletion) と、さらにカルモジュリンを融合させた変異体 (C-terminal deletion linked CaM) を作成し、電気生理学的手法の一つである Whole-cell clamp 法により解析した。その結果、CaチャンネルのCDIは1分子のカルモジュリンにより調節されており、細胞内のCaイオン濃度の変化が、カルモジュリンとチャンネルの結合関係を変化させることが示唆された。

一方、我々の研究では、Inside-out法を用いた解析から、L型Caチャンネルの制御はCDI、CDFに加えて、カルモジュリン濃度依存性の不活性化があることを見出した [Han et al., 2010: 発表論文②; Guo et al., 2010: 発表論文③]。また、チャンネル断片ペプチドとカルモジュリンの結合実験 (pull-down assay) を基に [Asmara et al., 2010: 発表論文①]、複数のカルモジュリンが同時に作用しチャンネルの活性を制御する新規のモデルを提唱した。

2. 研究の目的

本研究では、電気生理学的手法を用いてカルモジュリンによるチャンネルの調節機構を解明することを目的とした。チャンネル変異体の活性をinside-out法 (cell-free系) で記録し、whole-cell clamp法での解析結果との対応を行うことにより、カルモジュリンの作用機序について検討した。

3. 研究の方法

HEK293細胞に、L型Caチャンネル (Cav1.2) の α 、 β 、 $\alpha 2\delta$ サブユニットを共発現させ、活性をinside-out法で観察する。 α サブユニットは、野生型、1671番アミノ酸以降を除いた変異体 (C-terminal deletion channel: Cav1.2 Δ)、Cav1.2 Δ に8残基のグリシンを介してカルモジュリンをリンクさせた変異体 (C-terminal deletion linked CaM channel: Cav1.2 Δ CaM)、Ca²⁺非感受性カルモジュリンをリンクさせた変異体

(Cav1.2 Δ CaMmut)を使用した。各チャンネルサブユニットのプラスミドは、Mori et al.

により作成された [Mori et al., (2004) Science]。チャンネルの発現効率、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精製した。これまでの研究から、基準となる活性は1 μ Mカルモジュリン、3 mM ATP、80 nM Ca²⁺に調整したテスト溶液 (細胞内液に相当) をinside-outで付加する事により測定した。

以下の観察を行った。

(1) Run-downの特徴について:

L型Caチャンネルはinside-out後、数分以内にその活性が減衰する (run-down現象)。本研究では、inside-outから3-5分間 (fast phase) 7-9分間 (late phase) の平均チャンネル活性を、cell-attachの2分間の平均活性 (生理的な細胞内環境での活性状態) と比較評価した。

(2) カルモジュリンの作用について:

野生型とCav1.2 Δ にカルモジュリンを付加し、その活性をCav1.2 Δ CaMと比較した。

(3) ATPの作用について:

各々のチャンネルにATPを付加し、その活性を比較した。

(4) Ca²⁺濃度とチャンネル活性の関係について:

テスト溶液のCaイオン濃度を変化させ (10 nM - 10 μ M)、CDIを観察した。また、Cav1.2 Δ CaMmutの活性を観察し、カルモジュリンのCa²⁺感受性による影響を検討した。

(5) カルモジュリン濃度とチャンネル活性の関係について:

テスト溶液のカルモジュリン濃度を変化させ (0 - 10 μ M)、カルモジュリン濃度の上昇によるチャンネルの不活性化現象を観察した。

(6) チャンネルとカルモジュリンを繋ぐグリシン鎖の長さについて:

長さの異なるリンカー (4, 8, 12, 48, 72グリシン残基) のCav1.2 Δ CaMを比較し、グリシン鎖の長さによるチャンネル活性への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) Cav1.2 Δ は、inside-out後、野生型と同様にチャンネル活性が減衰した。Cav1.2 Δ CaMの活性はinside-out後も維持された。このことから、チャンネルからカルモジュリンが外れることによってrun-downが誘起されることが示された。Cav1.2 Δ CaMのlate phaseでの活性は、fast phaseと比較して減少したため、チャンネルの活性維持には

カルモジュリン以外の因子が必要であることが示唆された。

(2) Cav1.2 Δ は、カルモジュリンを付加することにより Cav1.2 Δ CaM と同程度の活性を示した。野生型はカルモジュリンのみでは、活性を示さない。過去の報告からも野生型では、カルモジュリンと同時に ATP の付加が必須であることが判明している。ATP の作用については、リン酸化を介したものではないことが、これまでの実験から判明しているが、その詳細は明らかでない。以上の結果から、C 末端配列のない変異体では、カルモジュリンのみでチャンネルの活性化が可能であることが示された。C 末端遠位部の役割について本研究では直接的な実験を行っていないが、自己抑制ドメインや PKA によるリン酸化部位があり、チャンネルの活性調節との関係について、更に検討が必要である。

(3) 野生型と Cav1.2 Δ は ATP のみでは、活性を示さない。Cav1.2 Δ CaM は、ATP を付加することにより、特に late phase での活性が上がった。Cav1.2 Δ は、カルモジュリンと ATP を付加することにより、Cav1.2 Δ CaM と同程度の活性を示し、late phase での活性もカルモジュリンのみによる活性と比較すると Cav1.2 Δ CaM と同様に上昇した。これらの結果から、チャンネル活性の長期の安定化には ATP が有効であることが示唆された。

野生型は、カルモジュリンと ATP を付加することにより活性を示したが、変異体との比較では活性レベルは低かった。Whole-cell clamp 法による解析では、C 末端配列を除くことにより、チャンネルの電流密度が上昇するという報告があるが、分子機構については明らかでない。以上のことから C 末端遠位部の作用について今後の課題として検討する必要がある。

(4) Ca²⁺濃度の上昇により、野生型、Cav1.2 Δ 、Cav1.2 Δ CaM の活性は減衰した。これは CDI 現象を再現していると考えられる。Cav1.2 Δ CaMmut では、CDI は見られなかった。その原因としてカルモジュリンが Ca²⁺非感受性であるために、Ca²⁺濃度の上昇にチャンネルが反応しないことが挙げられる。このことから、カルモジュリンの Ca²⁺センサーとしての働きを確認できた。さらに高濃度の Ca²⁺条件下は、Cav1.2 Δ CaMmut の活性が抑制された。これは、カルモジュリン以外に Ca²⁺を感知する仕組みがチャンネルに備わっていることを示唆する結果である。

(5) カルモジュリン濃度の上昇に伴い、野生型、Cav1.2 Δ の活性は減少した。Cav1.2 Δ CaM では、カルモジュリン濃度の上昇による活性

の変化は見られなかった。Cav1.2 Δ CaM に對する第 2 のカルモジュリン（外部から付加されるカルモジュリン）が影響しない点については、whole-cell clamp 法による解析結果に矛盾しない。しかし、野生型、Cav1.2 Δ で不活性化がおきる点については、複数のカルモジュリンが同時にチャンネルに作用するという我々のモデルを支持する結果である。

(6) Cav1.2 Δ CaM のグリシン鎖の長さが 48 残基以下では、8 残基の Cav1.2 Δ CaM と同様に CDI を示し、カルモジュリン濃度の上昇による不活性化は見られなかった。72 残基では、Cav1.2 Δ と同様にカルモジュリンなしでは活性がなく、カルモジュリン存在下で CDI を示し、カルモジュリン濃度の上昇に伴う不活性化が見られた。これらの結果から、チャンネルとカルモジュリンを繋ぐグリシン鎖が、立体構造の変化に影響していることが考えられるため、変異体の立体構造を含めた解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Hadhimulya Asmara, Etsuko Minobe, Saud A. Zahangir, Masaki Kameyama. Interactions of Calmodulin with the multiple binding sites of Cav1.2 Ca²⁺ channels. Journal of pharmacological sciences, 査読有, Vol. 112, 2010, 397-404.
- ② Don-yun Han, Etsuko Minobe, Wu-yang Wang, Feng Guo, Jian-jun Xu, Li-ying Hao, Masaki Kameyama. Calmodulin- and Ca²⁺-dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca²⁺ channels in guinea-pig ventricular myocytes. Journal of pharmacological sciences. 査読有, Vol. 112, 2010, 310-319.
- ③ Feng Guo, Etsuko Minobe, Kazuto Yazawa, Hadhimulya Asmara, Xiao-yan Bai, Dong-yun Han, Li-ying Hao, Masaki Kameyama. Both N- and C-lobes of calmodulin are required for Ca²⁺-dependent regulations of Cav1.2 Ca²⁺ channels. Biochemical and biophysical research communications. 査読有, Vol. 391, 2010, 1170-1176.
- ④ Wu-yang Wang, Li-ying Hao, Etsuko Minobe, Zahangir A. Saud, Dong-yun Han, Masaki Kameyama, CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin. The Journal of physiological sciences. 査読有, Vol. 59, 2009,

283-290.

- ⑤ Li-ying Hao, Wu-yang Wang, Etsuko Minobe, Dun-yun Han, Jian-jun Xu, Asako Kameyama, Masaki Kameyama. The distinct roles of calmodulin and calmodulin kinase II in the reversal of run-down of L-type Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes. Journal of pharmacological sciences. 査読有, Vol. 111, 2009, 416-425.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Etsuko Minobe, Masayuki Mori, Jian-jun Xu, Masaki Kameyama. Ca^{2+} dependent modulation in calmodulin-linked Cav1.2 channels. The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2010.11.25-28. 鹿児島島
- ② Jian-jun Xu, Saud A. Zahangir, Yan Liu, Lei Yang, Etsuko Minobe, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa, Masaki Kameyama. PKA-mediated phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with cardiac Cav1.2 channels. The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2010.11.25-28. 鹿児島島
- ③ 蓑部 悦子、森 誠之、徐 建軍、亀山 正樹 カルモジュリンをリンクさせた Cav1.2 型 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性調節 生理学研究所研究会、2010.11.4-5. 岡崎
- ④ 蓑部 悦子、森 誠之、亀山 正樹 Roles of calmodulin and the C-terminal tail of Cav1.2 channel in its activity. 日本生理学会大会、2010.5.19-21. 盛岡
- ⑤ 亀山 正樹、Hadhimulya Asmara、蓑部 悦子、Zahangir A. Saud、韓 冬雲、郭 鳳、王 午陽、は お 麗英 カルモジュリンの心筋 Ca^{2+} チャネル (Cav1.2) に対する二重作用 生理学研究所研究会、2009.11.25-26. 岡崎
- ⑥ Hadhimulya Asmara, Etsuko Minobe, Zahangir A. Saud, Masaki Kameyama. Multiple molecules of calmodulin bind to the Cav1.2 Ca^{2+} channel. 西日本生理学会. 2009.11.6-7. 福岡
- ⑦ Masaki Kameyama, Li-ying Hao, Etsuko Minobe, Jian-jun Xu, Dong-yun Han, Hong-guang Nie, Zahangir A. Saud, Wu-yang Wang, Hadhimulya Asmara, Kazuto Yazawa. Regulation of Cav1.2 Ca^{2+} channels by Ca^{2+} , calmodulin and CaMKII. The IUPS 2009 satellite symposium. 2009.8.2-4. 京都
- ⑧ Etsuko Minobe, Zahangir A. Saud, Dong-yun Han, Hadhimulya Asmara, Wu-yang Wang, Li-ying Hao, Masaki Kameyama.

Calpastatin domain L competes with calmodulin on IQ region of Cav1.2 channel, International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1. 京都

- ⑨ Dong-yun Han, Li-ying Hao, Etsuko Minobe, Wu-yang Wang, Jian-jun Xu, Masaki Kameyama. Facilitatory and inhibitory effects of calmodulin on activity of Cav1.2 Ca^{2+} channel. International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1. 京都
- ⑩ Zahangir A. Saud, Yan Liu, Etsuko Minobe, Kazuto Yazawa, Masaki Kameyama. PKA modulates the effects of calmodulin on L-type Ca^{2+} channels in guinea-pig ventricular myocytes. International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1. 京都
- ⑪ Hadhimulya Asmara, Etsuko Minobe, Zahangir A. Saud, Wu-yang Wang, Masaki Kameyama, Interaction of calmodulin with the Cav1.2 Ca^{2+} channel. International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1. 京都
- ⑫ Masaki Kameyama, Li-ying Hao, Etsuko Minobe, Jian-jun Xu, Dong-yun Han, Hong-guang Nie, Zahangir A. Saud, Wu-yang Wang, Hadhimulya Asmara. Ca^{2+} channels and cardiac functions. International Congress of Physiological Sciences. 2009.7.27-8.1. 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓑部 悦子 (MINOBE ETSUKO)

鹿児島大学・歯学総合研究科・助教
研究者番号：00448581

(2) 研究協力者

森 誠之 (MORI MASAYUKI)

福岡大学・医学部・講師
研究者番号：80342640