

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291026

研究課題名(和文)非興奮性細胞の電位作動性カルシウムチャネルのサブユニット間相互作用の領域と役割

研究課題名(英文)Role of regions responsible for the interaction between subunits of a voltage-gated calcium channel of non-excitable cells

研究代表者

飯田 秀利 (IIDA, Hidetoshi)

東京学芸大学・教育学部・名誉教授

研究者番号：70124435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは、非興奮性細胞である酵母の電位作動性Ca²⁺チャネル(voltage-gated Ca²⁺ channel = VGCC)ホモログの構造と機能を研究した。このVGCCホモログはCch1とMid1という主要サブユニットから構成されているので、まず両者の相互作用に必須なアミノ酸残基をそれぞれのサブユニットで明らかにした。また、Mid1の全長548アミノ酸残基のうちN末端から209アミノ酸残基を切り詰めても、Cch1のCa²⁺流入機能を仲介できること、N末端には20個のアミノ酸残基からなるシグナル配列が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have studied the structure and function of Cch1 and Mid1, two major subunits of a voltage-gated calcium channel homologue of non-excitable yeast cells. We have determined amino acid residues in each subunit, which are essential for the interaction between the two subunits. In addition, we have found that N-terminal 209 amino acid residues of Mid1 are not required for the function of Mid1, which is composed of 548 amino acid residues, although Mid1 has the N-terminal signal peptide composed of 20 amino acid residues.

研究分野：分子生物学

キーワード：電位作動性カルシウムチャネル サブユニット タンパク質間相互作用 出芽酵母 電位依存性カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

電位作動性 Ca^{2+} チャネル (voltage-gated Ca^{2+} channel = VGCC) の研究は、主にヒトやマウスなどの興奮性細胞 (神経細胞、筋細胞など) に存在する VGCC を対象として行われ、その構造と機能、一部の補助サブユニットの役割などが明らかにされてきた。しかし、VGCC は動物だけに存在するのではなく、酵母やカビなど、非興奮性の細胞にも存在するが、その構造と機能などはほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、非興奮性細胞である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いて、ほ乳類 VGCC の Ca^{2+} 透過能をもつ α_1 サブユニットの酵母ホモログ (Cch1)、およびほ乳類の α_2/δ サブユニットに類似の酵母タンパク質 (Mid1) に焦点を当て、両者間の相互作用、および Mid1 による Cch1 の活性化機構を解明することを目的とする。Cch1 と Mid1 は Ca^{2+} 透過に必須のサブユニットであるので、その解明により、非興奮性細胞であるカビ・酵母類の VGCC の理解を進展させるだけでなく、これまでおろそかにされてきたほ乳類の VGCC も含めた全 VGCC ファミリーの α_1 サブユニットと α_2/δ サブユニットの構造・機能協関に新しい視点を与えることが期待される。

3. 研究の方法

1) *In vitro* 部位特異的変異導入法

Cch1 と Mid1 タンパク質が互いに相互作用するために必要なアミノ酸残基を特定するために両タンパク質の遺伝子にアミノ酸置換のための変異を導入する。

また、Mid1 タンパク質上のどの領域が Cch1 の活性化に必要なかを調べるために、Mid1 タンパク質の N 末端から順次切り詰めた変異 Mid1 タンパク質を作るためにもこの方法を用いた。

2) 共免疫沈降実験

上記の方法でアミノ酸置換変異を導入した Cch1 タンパク質が、Mid1 タンパク質と物理的相互作用をできるか否かを調べるために、Mid1 抗体で免疫沈降させたサンプルに変異導入 Cch1 が含まれているかどうかを調べた。また、その逆に、Cch1 抗体で免疫沈降させたサンプルに Mid1 が含まれているかどうかも調べた。

同様の実験は、上記の方法でアミノ酸置換変異を導入した Mid1 タンパク質についても行った。

3) $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み実験

上記の方法でアミノ酸置換変異を導入した Cch1 と Mid1 タンパク質が、 Ca^{2+} 透過活性

をもつか否かを調べるために、それらのタンパク質を酵母細胞で発現させ、その細胞の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込み能を調べた。

4. 研究成果

1) Mid1 との相互作用に必要な Cch1 上のアミノ酸残基の特定

Mid1 は細胞外に位置しているため、Cch1 が Mid1 と相互作用するためには Cch1 の細胞外領域が大切である。多くの VGCC のアミノ酸配列の比較から、その領域には進化の過程でよく保存されたシステイン残基 (Cys) が 6 個存在していることが分かった。この 6 個を *in vitro* 部位特異的変異導入法でアラニン (Ala) に変えて、活性と Mid1 との相互作用を調べた。その結果、この 6 個の Cys はいずれも $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 取り込みに必要であることが分かった。しかし、Mid1 との相互作用に必要なのは、その 6 個のうち domain III と呼ばれる領域に存在する 2 個だけであった。

そこで、その domain III が Mid1 との相互作用に重要だと推測し、この領域に PCR 法でランダムに変異を導入して、この領域で Mid1 との相互作用に必要な他のアミノ酸残基を特定することを試みた。その結果、上記の 2 つの Cys 残基の他に、アスパラギン酸、イソロイシン、セリンの 3 残基が Mid1 との相互作用に必要なことが分かった。

2) Cch1 との相互作用に必要な Mid1 上のアミノ酸残基の特定

上記の研究から、Cch1 では domain III に存在する 2 つの Cys 残基が Mid1 との相互作用に必要なことが分かったため、まず、Mid1 の Cys 残基が Cch1 との相互作用に必要なかどうかを調べた。Mid1 にはその C 末端領域に Cys 残基が豊富な領域があり、その領域内に Mid1 のはたらきに必要な 3 つの Cys 残基があることが既に知られている。そこで、この 3 つの Cys 残基が Cch1 との相互作用に必要なかを共免疫沈降実験で調べた。その結果、そのうちの 1 つが Cch1 との相互作用に必要なことが明らかになった。

3) Mid1 の機能に必要な領域の特定

Mid1 が Cch1 と相互作用し、Cch1 を活性化させるためには、Mid1 は細胞外に輸送されなければならない。その輸送には一般的に N 末端にあるシグナルペプチドが必要である。そこで、予想される Mid1 上のシグナルペプチドを探すために、酵母細胞から Mid1 タンパク質を精製し、その N 末端のアミノ酸を決定した。その結果、遺伝子から予想される N 末端アミノ酸であるメチオニンではなく、そこから 21 番目のアミノ酸であるロイシン残基が、精製した Mid1 タンパク質の N 末端であった。この結果は、Mid1 タンパク質は N 末端に 20 残基からなるシグナルペプチドをもつことを示している。

この 20 残基からなるシグナルペプチドが、

Mid1 活性に重要かどうかを調べるために、これを欠失させた Mid1 を作製し、その活性を調べた。その結果、意外なことに、このシグナルペプチドのない Mid1 も正常な機能をもっていた。

そこで、更に N 末端から順次切り詰めた欠失型 Mid1 を多種類作製し、その活性を測ったところ、驚いたことに N 末端から 209 個のアミノ酸を欠失させても依然として Mid1 は活性を維持していることが分かった。つまり、Mid1 は全長 548 個のアミノ酸残基からできているので、全長の 38% は Mid1 が細胞外に輸送されることと活性をもつことに不要であることが明らかになった。

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 3 件)

1. Iida, K., Teng, J., Cho, T., Yoshikawa-Kimura, S., and Iida, H. (2017) Posttranslational processing and membrane translocation of the yeast regulatory Mid1 subunit of the Cch1/VGCC/NALCN cation channel family. *J. Biol. Chem.* **292**, 20570-20582.
2. Kato, T., Kubo, A., Nagayama, T., Kume, S., Tanaka, C., Nakayama, Y., Iida, K., and Iida, H. (2017) Genetic analysis of the regulation of the voltage-gated calcium channel homolog Cch1 by the γ subunit homolog Ecm7 and cortical ER protein Scs2 in yeast. *PLoS ONE* **12**(7):e0181436. doi:10.1371/journal.pone.0181436.
3. Cho, T., Ishii-Kato, A., Fukata, Y., Nakayama, Y., Iida, K., Fukata, M., and Iida, H. (2017) Coupling of a voltage-gated Ca^{2+} channel homologue with a plasma membrane H^+ -ATPase in yeast. *Genes Cells* **22**, 94-104

[学会発表](計 6 件)

1. Iida, H., Hayashi T., Ohishi, K., Mimura, M., Iida, H. and Iida, H. Molecular interaction between two core subunits of a yeast calcium channel related to mammalian VGCCs and NALCNs. 3rd European Calcium Channel Conference. Alpbach, Austria, 9-12 May, 2018
2. 木村緑、飯田和子、飯田秀利 . 電位作動性 Ca^{2+} チャンネル α_1 サブユニットの出芽酵母ホモログ Cch1 のドメイン III 内変異の網羅的解析 . 第 39 回日本分子生物学会年会 . パシフィコ横浜 (横浜市) . 2016 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日

3. 長敏彦、飯田和子、飯田秀利 . 出芽酵母の Ca^{2+} チャンネルサブユニット Mid1 の N 末端配列とシグナル配列非依存的な小胞体内腔への輸送 . 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 . 神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸商工会議所 (神戸市) . 2015 年 12 月 3 日
4. 永山達也、桑慎一郎、田中力、中山義敬、久保彩、飯田和子、飯田秀利 . 出芽酵母の電位作動性 Ca^{2+} チャンネルの α_1 サブユニットホモログ Cch1 の小胞体膜タンパク質 Scs2 による制御 . 第 37 回日本分子生物学会年会 . パシフィコ横浜 (横浜市) . 2014 年 11 月 27 日 .
5. 林卓人、大石恵太、新免実咲、飯田和子、飯田秀利 . 電位作動性 Ca^{2+} チャンネルの出芽酵母ホモログのサブユニット間相互作用における細胞外システイン残基の役割 . 第 37 回日本分子生物学会年会 . パシフィコ横浜 (横浜市) . 2014 年 11 月 27 日 .
6. 加藤孝郁、久保彩、飯田和子、飯田秀利 . 出芽酵母の Ecm7 は電位作動性 Ca^{2+} チャンネルホモログの機能を正に制御する . 第 37 回日本分子生物学会年会 . パシフィコ横浜 (横浜市) . 2014 年 11 月 27 日 .

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ
<http://www.u-gakugei.ac.jp/~iida/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 秀利 (IIDA, Hidetoshi)
東京学芸大学・教育学部・名誉教授

研究者番号：70124435

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4)研究協力者

なし ()