

令和元年6月13日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05140

研究課題名(和文) Ca<sup>2+</sup>チャネル-エピジェネティクス連関を司る機構とその意義の解明研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms and significance of Ca<sup>2+</sup> channel-epigenetics coupling

研究代表者

森 泰生 (Mori, Yasuo)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：80212265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：長期記憶の形成機構を解明するために、電位依存性Caチャネルと遺伝子転写に重要なヒストン修飾との連関を追究した。Caチャネル副サブユニットbetaが核内において、転写因子TCF4と結合し、TCF4とbeta cateninとの相互作用を妨げ、遺伝子転写を抑制することがわかった。また、phosphatase 2Aの活性制御サブユニットであるB56deltaとbetaが形成する複合体の生理的意義の解明も進め、本複合体が核に移行し、G1/S期の遷移を進行させ、細胞増殖を促進させることがわかってきた。前シナプスのCaチャネル-RIM-シナプス小胞の複合体形成にも、betaが要であることも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳神経系が活動した時にどのようにして脳神経系に蓄えられるかを明らかにするために行ってきた。この研究により、ヒトを含む動物にどのような刺激が加わると、どのように異なった変化が脳神経系に起こるかを、現象論だけでなく、明確な分子の定量的な変化によって示すことができる。また、ストレスは、過剰に加えられると脳神経系にダメージをもたらすが、適度なストレスはむしろ脳神経系の機能を亢進する。この線引きはどこにあるかといったような問いにも、重要なヒントを与えうる。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism underlying long-term memories, I investigated the coupling of voltage-dependent Ca channels with epigenetic histone modification. In the nucleus, the Ca channel accessory subunit beta binds to the transcription factor TCF4 and suppresses transcription of genes via perturbation of TCF4-beta-catenin interaction. B56delta, the enzyme subunit of phosphatase 2A, interacts with the beta subunits to enhance cell proliferation by stimulating the G1 to S transition. The beta subunit is also critical for the formation of presynaptic complex comprising Ca channels, RIM, and synaptic vesicles.

研究分野：分子生理学

キーワード：カルシウムチャネル エピジェネティクス ヒストン修飾 記憶 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Ca チャンネルにおいては、筋肉系での「興奮 - 収縮」連関の制御を始め、神経系での「興奮 - 転写」連関を介した記憶の形成、それ以外の組織での発生・分化の誘導等において、透過した Ca が誘導する Ca<sup>2+</sup>シグナルが最重要課題と理解されてきた。特に、後二者については、Ca 依存性転写因子の活性化による記憶或いは発生・分化に関連する遺伝子群の転写制御の解明が注目されてきた。研究遂行者は、前シナプスにおいて神経伝達物質の放出に必須の役割を担う、電位依存性 Ca チャンネル(P/Q 型)のポアを形成する主要サブユニット alpha1 を世界に先駆け同定し、副サブユニット beta の alpha1 への細胞質からの会合が、Ca チャンネルの機能と形質膜への発現を調節することを明らかにした。また、beta と Rab3-interacting molecules (RIMs)との会合が、神経伝達物質を含むシナプス小胞の近傍に電位依存性 Ca チャンネルを係留させることを突き止めた。イオンチャンネルとエピジェネティクスとの間の連関は、その解明がようやく端緒についたばかりである。研究遂行者は、透過したイオン(Ca)が誘導するシグナル経路とは異なる新規経路を世界に先駆け発見した。本経路では、ポアを形成しない beta サブユニットのサブタイプの一つである beta4 が、phosphatase PP2A、甲状腺ホルモン受容体 TR $\alpha$ 、及びヒストン結合タンパク質 HP1 $\gamma$ 等からなる複合体のプラットフォームとして働き、ヒストン H3(Ser10)の脱リン酸化により Tyrosine Hydroxylase 遺伝子の転写を神経活動依存的に抑制することを示した。

## 2. 研究の目的

イオンチャンネルの最も重要な機能的定義はイオン透過である。本研究では、イオンチャンネルがイオン透過とは「異なる」機構を介して、どのように重要な転写制御様式の一つであるエピジェネティクスと連関し、生物学的役割を担うかを探究する。即ち、電位依存性 Ca チャンネルの Ca 透過性に直接関与しない beta サブユニットが、ヒストン H3 脱リン酸化酵素及び H3・H4 アセチル化酵素等のヒストン修飾酵素と複合体を形成することに注目し、それらが司る神経活動依存的なシグナル経路及び遺伝子転写の活性化を解明する。

## 3. 研究の方法

イオンチャンネル - エピジェネティクス連関の統合的理解を目指し、ヒストン修飾反応(リン酸化、アセチル化)の関わる転写制御を視野に、電位依存性 Ca チャンネル beta4 サブユニットとヒストン修飾酵素を中心とした複合体の形成機序及び生物学的意義を追究する。即ち、複合体タンパク質構成の生化学的同定、及び複合体の細胞内形成と核移行の動態イメージングを行う。また、構成タンパク質の発現・機能を欠失・阻害させて、それにより生じる修飾不全のヒストンとクロマチンを形成する遺伝子の解析を行う。

## 4. 研究成果

Ca チャンネル - エピジェネティクス連関における要である、電位依存性 Ca チャンネル副サブユニットである beta サブユニットの役割を解明した。まず、電位依存性 Ca チャンネル beta サブユニットによる Wnt - beta catenin シグナル経路の調節に関する解析を進めた。核内において、beta サブユニットは転写因子である TCF4 と結合することにより、TCF4 と beta catenin との相互作用を妨げることがわかってきた。その結果、beta サブユニットは Wnt - beta catenin シグナル経路による遺伝子転写制御を阻害することがわかった。また、以前から解析を続けてきた phosphatase 2A (PP2A)の活性制御サブユニットである B56delta と電位依存性 Ca チャンネル beta4 サブユニットが形成する複合体の生理的意義の解明も進めた。本複合体が核に移行し、G1/S 期の遷移をしんこうさせ、細胞増殖を増進させることがわかってきた。さらに、beta サブユニットはプラットフォームとしてヒストンアセチル化酵素 HAT、HSC70/ヒストン脱アセチル化酵素会合体 HDAC 等と動的なタンパク質複合体を形成することがわかった。活動電位が生じ

た際に、電位依存性 Ca チャンネル本体である alpha1 サブユニットから離れた beta サブユニットが、HAT と相互作用して転写抑制するか或いは HSC70/HDAC 会合体と相互作用して転写促進するかは、活動電位のパターンが大きく影響を与えることが考えられた。

前シナプスの足場タンパク質である RIM には long 型の RIM1 と RIM2、short 型の RIM3 と RIM4 があり、前者は alpha1 と beta 両者に、後者は beta のみに会合する。RIM1 と RIM2 は、神経伝達物質を含むシナプス小胞が前シナプス膜に融合する Active Zone の極近傍に、融合に必要な Ca を供給する Ca チャンネルを係留させる。また、long 型、short 型ともに Ca チャンネルの不活性過程を強く抑制し、前シナプスへの Ca 流入活性を維持させる。今回は、alpha1 と beta が、RIM1 或いは RIM2 との複合体形成により、どのようにして電位依存性 Ca チャンネルの不活性過程を強く抑制するかを解析した。RIM2 は RIM1 に比べても、より強く Ca チャンネルの不活性過程を抑制する。これには、alpha1 の C 末端領域が重要である。この C 末端領域の欠失により、RIM1 による不活性過程の抑制の程度は影響されないが、RIM2 による不活性過程の抑制は RIM1 によるそれと同程度まで減弱することから、alpha1 C 末端領域は RIM2 独自の相互作用により Ca チャンネルの機能調節に重要であることが分かった。一方、beta は alpha1 の I - II linker に会合し、C 末端領域の欠失によっても依然として RIM1 と RIM2 は Ca チャンネルの不活性過程を強く抑制することから、Ca チャンネル - RIM - シナプス小胞の複合体形成においては、beta が要の役割を担うことが分かった。alpha1 はむしろ補助的である。一方、膵 beta 細胞の興奮 - 分泌連関において beta サブユニットは、Active Zone タンパク質 ELKS と相互作用し、局所的な Ca 流入を亢進しインシュリン分泌の第一相を促進することを見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

Hirano M, Takada Y, Wong CF, Yamaguchi K, Kotani K, Kurokawa T, Mori MX, Snutch TP, Ronjat M, De Waard M & Mori Y.

C-terminal splice variants of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel Ca<sub>v</sub>2.1 α<sub>1</sub> subunits are differentially regulated by Rab3-interacting proteins.

*J. Biol. Chem.* 292, 9365-9381 (2017). doi: 10.1074/jbc.M117.778829.

Rima M, Daghani M, De Waard S, Gaborit N, Fajloun Z, Ronjat M, Mori Y, Brusés JL & De Waard M.

The β<sub>4</sub> subunit of the voltage-gated calcium channel (Cacnb4) regulates the rate of cell proliferation in Chinese Hamster Ovary cells.

*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 89, 57-70 (2017). doi: 10.1016/j.biocel.2017.05.032.

Rima M, Daghani M, Lopez A, Fajloun Z, Lefrancois L, Dunach M, Mori Y, Merle P, Brusés JL, De Waard M & Ronjat M.

Down-regulation of the Wnt/β-catenin signaling pathway by Cacnb4.

*Mol. Biol. Cell* 28, 3699-3708 (2017). doi: 10.1091/mbc.E17-01-0076.

Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Yamauchi H, Yoshida M, Mori MX, Hida Y, Tran HN, Ohkura M, Abe M, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Hara K, Sakimura K, Nagamatsu S, Mori Y, Nakai J, Kakei M & Ohtsuka T.

ELKS/voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel-β subunit module regulates polarized Ca<sup>2+</sup> influx in

pancreatic  $\beta$  cells.

*Cell Rep.* 26, 1213-1226 (2019). doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.106.

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者 該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。