

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K06683
 研究課題名(和文) 心筋カリウムチャネル複合体を介した心筋興奮終焉期の電気 Ca²⁺ 同期機構の検証

研究課題名(英文) Roles of molecular complex of IKs channel in plasma membrane depolarization - relaxation coupling in cardiac myocytes

研究代表者
 児玉 昌美 (Kodama, Masami)
 東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：30512248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：再分極相のタイミングを調節する心筋カリウム(IKs)チャネルと複合体を形成する分子を網羅的に探索し、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX1)を含む複数の細胞内Ca²⁺動態関連分子を同定した。IKsチャネルのC末端がNCX1の細胞内領域と相互作用するが、分子複合体の形成そのものにはCa²⁺は関与しないことが示唆された。両者の相互作用は、ヒトiPS由来の心筋細胞や野生型のモルモットやイヌの心筋細胞でも認められたことから、哺乳類動物に広く共通することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋興奮終焉期も再分極過程と筋弛緩は同期しているにも関わらず、興奮初期の興奮収縮連関のように、活動電位と細胞内Ca²⁺濃度が連関するかについての報告はない。本研究でIKsチャネルとの相互作用を見出したNCX1は、コードする遺伝子が、ゲノムワイド関連解析で、再分極相の延長による不整脈発作を所見とするQT延長症候群に感受性があることが報告されており注目に値する。両者の相互作用はヒトでも見いだされており、機能連関の解析を経て、心筋の恒常的な電気活動とその破綻である不整脈におけるIKsチャネル分子複合体の生理的意義を明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：The slow component of delayed rectifier potassium (IKs) channel regulates repolarization process. We employed a transgenic mouse overexpressing human IKs channel to identify IKs channel interacting proteins comprehensively with immunological technique and proteomic analysis. We identified 163 proteins as potential IKs channel binding partners, including whose biofunction were "Calcium signaling", such as Na⁺-Ca²⁺ exchange transporter (NCX1). GST pull down assay showed that a C-terminus of IKs channel contributed the interaction with NCX1 regardless of [Ca²⁺]. The interaction between IKs channel and NCX1 was also detected in human iPS cell-derived cardiomyocytes and cardiomyocytes of wild type guinea pig or dog, suggesting that molecular complex of IKs channel with NCX1 was widely common among mammal cardiomyocytes.

研究分野：分子生物学

キーワード：イオンチャネル 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心臓の正常なポンプ機能には、2つの周期性シグナル、活動電位と細胞内 Ca^{2+} 濃度 = 筋収縮 (収縮 弛緩) の同期が必須である。心筋興奮初期の、細胞膜の活動電位変異から筋収縮に至る過程 (興奮 収縮連関) では、活動電位に寄与する分子と細胞内 Ca^{2+} 濃度に寄与する分子がT管膜など筋細胞に特徴的な膜構造に集積し、「局所で電気と Ca^{2+} を機能連関させる」ことによって、脱分極と収縮の同期を可能にしている。一方、興奮終焉期は、再分極相と弛緩はほぼ同期しているが、再分極過程と筋小胞体への Ca^{2+} の取り込みが連関するかどうかについての報告はない。しかし、交感神経刺激によって心拍・筋収縮が増加する際、再分極相の短縮と筋弛緩の促進が同調することは、不整脈の回避に必須であり、また病態心筋では、再分極過程と細胞内 Ca^{2+} 濃度低下の同期に破たんが見られ、難治性不整脈の素因となることから、興奮終焉期においても両者の同期を裏打ちする精緻な分子機構があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、再分極相のタイミングを調節する心筋カリウム (I_{Ks}) チャンネルが細胞内 Ca^{2+} 動態関連因子と分子複合体を形成することによって、心筋興奮終焉期の電気 Ca^{2+} 同期システムとして機能する可能性を検証することである。

3. 研究の方法

(1) I_{Ks} チャンネル分子複合体の単離と構成因子の解析

成体ヒト I_{Ks} チャンネルトランスジェニック ($I_{\text{Ks}}\text{TG}$) マウスの心室細胞抽出液から、免疫沈降法で I_{Ks} チャンネル分子複合体を単離し、質量分析によって、相互作用する分子を新たに網羅的に探索する。野生型の他の哺乳類動物の心室細胞抽出液からも同様に、内在性 I_{Ks} チャンネル分子複合体を単離し、先述の質量分析で同定された細胞内 Ca^{2+} 動態関連分子との相互作用をウエスタンブロッティングで確認する。

(2) 相互作用領域の同定

I_{Ks} チャンネル、NCX1 は共に高分子量の膜タンパク質 で全長を発現・精製して用いることが難しいため、大腸菌を用いて、各種のヒト I_{Ks} チャンネルの細胞内領域-GST 融合タンパク質を作成し、野生型イヌの心室細胞抽出液を用いた GST プルダウンアッセイを行い、NCX1 との相互作用をウエスタンブロッティングで確認する。

(3) I_{Ks} チャンネル分子複合体形成に Ca^{2+} 与える影響の解析

(2)で行う GST プルダウンアッセイを、 Ca^{2+} 濃度の異なる緩衝液やカルシウムキレート剤を用いて行い、 Ca^{2+} が I_{Ks} チャンネル分子複合体形成に与える影響を評価する。

(4) 分子複合体の細胞内局在の定量化

同一の分子でも、細胞内局在によって活動電位波形に与える影響は異なる (J Mol Cell Cardiol. 50: 863-871: 2011) ことから、 I_{Ks} チャンネル分子複合体の細胞内局在比を抗 I_{Ks} チャンネル抗体および抗 NCX1 抗体を用いた Duolink 法 (定量的二分子間相互作用検出用染色法, Sigma-aldrich) によって明らかにする。

4. 研究成果

(1) I_{Ks} チャンネル分子複合体の単離と構成因子の解析

$I_{\text{Ks}}\text{TG}$ マウスの心室細胞抽出液から、抗 I_{Ks} チャンネル抗体を用いて免疫沈降法で I_{Ks} チャンネル分子複合体を単離し、LC-MS/MS 分析を行った結果、242 種のタンパク質を同定した。この内、 $I_{\text{Ks}}\text{TG}$ マウスでスコア値が高かった 163 種のタンパク質について、IPA を用いてパスウェイ解析を行ったところ、Calcium signaling のスコアが最も高く (表 1) 複数の細胞内 Ca^{2+} 動態関連分子が含まれていた。中でも $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX1) は、コードする遺伝子が、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) で、再分極相の延長による不整脈発作を所見とする QT 延長症候群 (LQT) に感受性がある (作用機序は不明) (Am J Human Genetics 91:180:2012) ことが報告されており、注目に値すると思った。内在性 I_{Ks} チャンネルと NCX1 の相互作用を検出するため、インシリコモデルの開発が進んでいるモルモット、および NCX1 研究で広く用いられているイヌの野生型心室細胞抽出液から、内在性 I_{Ks} チャンネル分子複合体を、抗 I_{Ks} チャンネル抗体を用いた免疫沈降法で単離したところ、いずれにおいてもウエスタンブロッティング法で NCX1 の共沈が認められたことから、 I_{Ks} チャンネルと NCX1 の相互作用は、哺乳動物に広く共通することが示唆された (図 1)。

(2) 相互作用領域の同定

野生型イヌの心室細胞抽出液と各種の I_{Ks} チャンネルの細胞内領域-GST 融合タンパク質を用いた GST プルダウンアッセイを行った結果、NCX1 との相互作用領域を I_{Ks} チャンネルの C 末端に絞り込

んだ。I_{Ks}チャンネル、NCX1は共に高分子量の膜タンパク質で全長を発現・精製して用いることが難しいが、この手法を確立したことで、全長のタンパク質を相手にした解析が容易になった。一方、大腸菌を用いた発現系では、ヒトI_{Ks}チャンネルの細胞内領域-GST融合タンパク質の種類によって著しく可溶性が低く、また分解産物の除去が難しいという問題が浮上した。今後の分子複合体の機能解析にも用いることを見据え、発現系を大腸菌からバキュロウィルスに、融合タンパク質をGSTからMBPに変えることによって、これらの問題を解消した。

(3) I_{Ks}チャンネル分子複合体形成にCa²⁺与える影響

(2)で同定したI_{Ks}チャンネル上のNCX1との相互作用領域は、報告されたカルモジュリンとの相互作用領域に極めて近いことから、Ca²⁺濃度の異なる緩衝液や、カルシウムキレート剤を用いてブルダウアッセイを行ったが、分子複合体形成におけるCa²⁺の影響は見られなかった。

(4) 分子複合体の細胞内局在

ヒトiPS細胞由来の心筋細胞で抗I_{Ks}チャンネル抗体および抗NCX1抗体を用いたDuolink法を行い、ヒト心筋細胞においてもI_{Ks}チャンネルとNCX1が共局在することを示した。iPS細胞由来の心筋細胞はサルコメア構造が不規則で、T管構造がないなど、未成熟心筋細胞様の特徴を示すことから、この実験においては分子複合体の細胞内局在比を求めることはできていない。モルモット心室筋細胞を用いて同様の実験を行い、細胞内局在比を明らかにしたい。また電気生理学的に機能連関を検討することで、心筋の恒常的な電気活動とその破綻である不整脈におけるI_{Ks}チャンネル分子複合体の生理的意義を明らかにしたい。

Canonical Pathways	-log(p-value)	同定されたタンパク質(種)
Calcium Signaling	1.24E+01	16
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.01E+01	16
Mitochondrial Dysfunction	8.18E+00	18
Oxidative Phosphorylation	8.02E+00	13
Tight Junction Signaling	6.26E+00	10

表1. LC-MS/MS解析で同定されたI_{Ks}チャンネル結合因子のパスウェイ解析

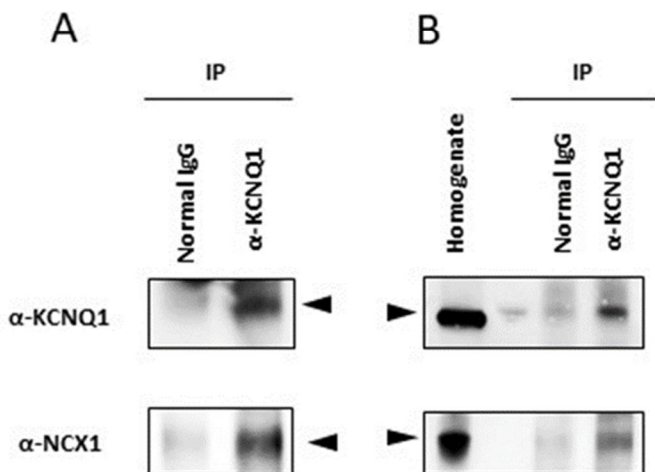


図1. 野生型のモルモット(A)およびイヌ(B)の心筋細胞においても内在性I_{Ks}チャンネルとNCX1の相互作用が検出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 稲田理毅、児玉昌美、山崎泰広、坂本多穂、黒川洵子
2. 発表標題 心筋KCNQ1チャネル分子複合体の病態生理学的意義に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sae Kimura, Masami Kodama, Shushi Nagamori, Takahiro Iwamoto, Satomi Kita, and Junko Kurokawa.
2. 発表標題 Roles of macromolecular complexes in calcium-sensitivity of the cardiac IKs channel.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田理毅、木村彩瑛、児玉昌美、永森収志、岩本隆宏、喜多紗斗美、山崎泰広、黒川洵子
2. 発表標題 心筋KCNQ1チャネルを中心とした分子複合体の探索
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村彩瑛、稲田理毅、児玉昌美、永森収志、岩本隆宏、喜多紗斗美、山崎泰広、黒川洵子
2. 発表標題 心筋IKsチャネルのCa ²⁺ 感受性における分子複合体の役割
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	黒川 洵子 (Kurokawa Junko) (40396982)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------