

平成22年 5月28日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770110

研究課題名 (和文) 多機能分子 CaM による Ca チャネル制御の構造的基盤の解明

研究課題名 (英文) Structural Insight for Ca channel Regulation by Calmodulin

研究代表者

森 誠之 (MORI MASAYUKI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：80342640

研究成果の概要 (和文)：

カルシウム結合蛋白質カルモジュリン (CaM) とカルシウムを透過する Ca チャネルの制御機構に関して研究を行った。カルシウムフリーの apoCaM と Ca チャネル断片 (電位依存性 L 型) に対して行い、構造的基盤を明らかにすることを試みた。変異型 apoCaM を用いてチャネルと apoCaM の複合体結晶を得るべくスクリーニングを行い、幾つかの結晶を得ることに成功している。再現性と解析を進める必要がある。また、細胞内カルシウムに依存した CaM とチャネルの相互作用を観測するため、Fura-2 と FRET の準同時計測システムの開発を行った。この方法により、カルシウム依存的な CaM のチャネルに対する作用を細胞内にて精度の高く観察することが可能になってきた。広くカルシウムシグナルと関連した生理的な研究に使用されるものと期待される。

研究成果の概要 (英文)：

The overall aim of the proposed studies was to understand the mechanism of activation, inhibition and regulations of Ca channels by Calcium-binding protein Calmodulin (CaM). The primary focus was structural determination of the calcium free form apoCaM and Channel IQ domain complex. Until today, we have a couple of crystals, those will be needed to check reproducibility and their structure. For the imaging of Ca²⁺ and CaM- channel interaction, we have succeeded to develop new system combined with Fura-2 and FRET. By using this system we could establish Ca²⁺ titrative experiment in vivo with high fidelity. We hope that this approach will be often to use in the field wide range of the physiological science to reveal Ca²⁺ related molecular dynamics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：生理学、シグナル伝達、カルシウム、イメージング、構造

1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウムと関連したイオンチャネル制御機構が生理学的に重要な現象と結びついてることが知られている。近年、カルシウムシグナルを仲介するカルシウム結合蛋白質カルモジュリン (CaM) の直接的作用によるイオンチャネル制御に重要な影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

既に我々は Ca^{2+} 結合型 CaM と P/Q-type Ca チャネルの IQ ドメインとの結晶構造を報告した (Mori et al., 2008, Structure)。このことを踏まえ、今度はカルシウムフリーの apoCaM とチャネル複合体構造を明らかにし、その構造的な理解を深めようと考えた。また、一方で動的な情報を得るため、細胞内 Ca^{2+} と分子間相互作用の同時測定の開発を行うことなどが必要ではないかと考えられていた。

2. 研究の目的

(1) CaM によるイオンチャネル制御機構に関する分子構造については多くの点で不明である。カルシウムフリーの状態でも CaM はチャネルと結合している。この初期状態を明らかにすることは極めて重要なことと考え、結晶構造解析を行うことにした。

(2) CaM とチャネルとの相互作用を生細胞を使って観察することは重要な課題と考えられた。蛍光分子間エネルギー移動 (FRET) を使った系を確立することにした。

(3) 我々はチャネル近傍に CaM が高濃度に局在する可能性をみいだした。この現象について原理を探ることで分子集積の基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

X 線結晶構造解析：

大腸菌を用いてラット CaM を大量発現させ、高純度に精製する。一方チャネル IQ ドメインはペプチド合成により得る。これら二つを混ぜ合わせ、複合体フラクションを精製し、結晶化を行う。その結果、カルシウムフリーの状態からカルモジュリンとカルシウムチャネル IQ 断片の結晶化させる。この結晶に X 線を照射し、回折像から構造解析を行う。

Fura-2、FRET をつかった細胞内カルシウム-分子間相互作用に関する実験系を確立し、イオンチャネルと CaM の相互作用を細胞内にて計測する。

4. 研究成果

(1) カルシウムフリーの状態から CaM とチャネル IQ ドメインの複合体を作らせ、結晶を作成した。結晶は分子置換法を用いた X 線構造解析によりその構造を決定した (研究協力者九州大学神田大輔教授のグループによる)。解析の結果、結晶は apoCaM の二量体を形成のみで、Ca チャネルの断片を同定するには至らなかった。そこで、変異型 apoCaM を用いてチャネルと apoCaM の複合体結晶を得るべくスクリーニングを行った。幾つかの結晶が得られている。構造解析には至っていない。一方 apoCaM の二量体形成が細胞内でありえるのか *in vivo* FRET を用いて検討を行った。CaM を強制発現させると確かに若干 FRET が上昇することが明らかとなった。このことから細胞内において apoCaM が二量体形成をしている可能性は十分に考えられる。今後の検討課題のひとつである。また、電位依存性 Ca チャネルや Na チャネルの C 末領域 (IQ ドメインを含む) は CaM と相関性があることが知られている。このことから、apoCaM 二量体の一方をチャネル C 末に置き換え、シュミレーションにより apoCaM-Ca チャネル C 末ドメイン複合体構造解析の可能性について現在検討中である。

(2) 一方、細胞内カルシウム濃度に依存した CaM とチャネルの細胞内での相互作用を観測し、動的状況を理解するシステムの開発が望まれた。そこで、Fura-2 と FRET による細胞内カルシウムと FRET の相互作用の準同時計測システムを開発した (Semi-simultaneous Imaging system)。本手法により、カルシウム依存的な CaM のチャネルに対する作用を細胞内で観察することが可能になりつつある。(図1参照)。ポイントとしては、Fura-2 計測として ex 340 nm / 360nm をつかうこと、また、その Fura-2 比率 (Ca^{2+} 濃度を示す) に応じて FRET イメージ像から Fura-2 シグナルを差し引くことなどが上げられる。さらに、この準同時的イメージングの具体的な成果として、イオンチャネル断片-CaM 複合体におけるカルシウム感受性はイオンチャネルごとに大きく異なっていることが新たに明らかになった (図2参照)。異なっていることに生理的意義がそれぞれあると考えている。現在、この方法論、とイオンチャネルとの相互作用についてまとめた論文を作成中である。

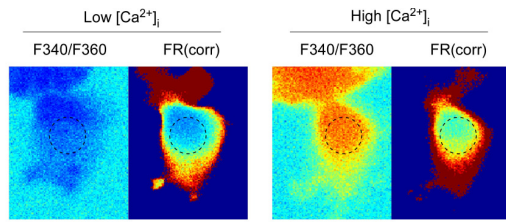


図1 カルシウム (F340/F360) と FRET (FR) の細胞内同時測定。左 2 つは低カルシウム、右 2 つは高カルシウム時に撮影。右のほうでは F340/F360, FR が共に上昇している。細胞は人腎臓由来 HEK293 細胞を使用。HEK293 細胞に CFP-CaM と YFP-P/Q チャネル IQ ドメインを強制発現し、Fura-2AM 体を細胞外から添加し細胞内に取り込ませた。カルシウムイオノフォア、イオノマイシンを細胞外液に加え細胞内カルシウム濃度を上げている。

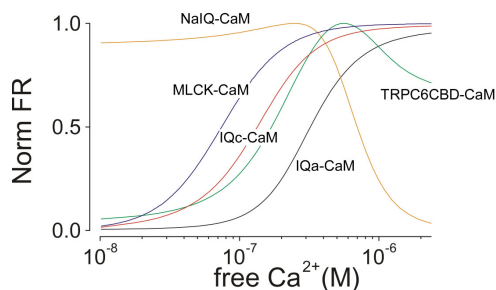


図2 イオンチャネルと CaM のカルシウム依存的相互作用。P/QtypeCa チャネル IQ ドメイン (IQa)、LtypeCa チャネル IQ ドメイン (IQc)、ナトリウムチャネル IQ ドメイン (NaIQ)、TRPC6 チャネル CaBindingDomain (TRPC6CBD) と CaM の相互作用。チャネル毎に異なったカルシウム依存性を示している。

(3) チャネル近傍における CaM の局在に関する研究についてはほとんど、実験を行えなかった。これについては結晶構造においてチャネル断片が見つからないなど幾つかの問題が発生し、そのために労力を裂く必要があったことが原因のひとつである。今後、個別な時間を見つ、取り組む必要がある。

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 4 件)

- 井上隆司、瓦林靖広、森誠之 心血管 TRP チャネルを巡る病態生理の新展開 2009, (29), 11-21 (査読なし)

- 井上隆司、森誠之、瓦林靖広、菅忠 受容体機械刺激協働による心血管 Ca²⁺流入チャネル TRPC6 の活性化増幅機構 日本薬理学雑誌 2009, (134), 116-121 (査読なし)

- Inoue R, Jensen LJ, Jian Z, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salomonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y, Ito Y. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipaseC/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res.* 2009, 104,1399-409. (査読あり)

- Takahashi S, Lin H, Geshi N, Mori Y, Kawarabayashi Y, Takami N, Mori MX, Honda A, Inoue R. Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6. *J Physiol.* (2008) 586, 4209-4223 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

- 森誠之 細胞内カルシウムと Ca²⁺チャネル - Calmodulin 作用の準同時的イメージング 西日本生理学会 2009年11月7日 福岡県 福岡市 福岡県歯科医師会館

- 森誠之 カルシウムと Ca チャネル-カルモジュリン相互作用の定量的同時イメージング 日本生化学会 年会 2009年10月24日 兵庫県 神戸市 神戸国際会議場

- 森誠之 Fundamental molecular mechanism of TRPC6 channel with Calmodulin interaction 国際生理学会 2009年6月27日 京都府 京都市 京都国際会議場

- 森誠之 Structural basis for calmodulin mediated Ca²⁺ entry channel 国際シンポジウム 国際生理学会 2009年6月24日 愛知県 名古屋市 名古屋市立大学

[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〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/physiol/staff/staff2.htm>

http://resweb2.jhk.adm.fukuoka-u.ac.jp/FukuokaUniv/R101J_Action.do

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 誠之 (MORI MASAYUKI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号： 80342640

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：