

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590228

研究課題名（和文） P/Q型カルシウムチャネルカルボキシ末端フラグメントの生成機構とその生理機能

研究課題名（英文） Mechanism and physiological role for generation of the carboxyl terminal fragment of the P/Q-type calcium channel

研究代表者

三枝 弘尚（SAEGUSA HIRONAO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90261205

研究成果の概要（和文）：遺伝性神経疾患である脊髄小脳変性症6型の発症に関わると考えられる Cav2.1 カルボキシ末端フラグメント(CT と略)は、全長 Cav2.1 タンパク質から切り出されてできると考えられている。本研究ではそのプロセスに関わるプロテアーゼの同定を試みた。また Cav2.1CT の果たす役割についても検討した。caspase 6, cathepsin L, calpain small subunit 1 といった分子が Cav2.1CT 生成に関わる候補として考えられたが、今後の更なる検討が必要である。また、Cav2.1CT は多くの細胞に対し毒性を示す事、何らかの遺伝子発現の抑制に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Generation of Cav2.1 carboxyl terminal tail (Cav2.1CT) is thought to be causally related to spinocerebellar ataxia type 6, a hereditary neurological disease. Cav2.1CT is generated by cleavage of the full-length Cav2.1 protein. But the exact mechanism underlying the generation of Cav2.1CT and the function of this CT fragment remain to be clarified. In the present study, I have tried to clarify the mechanism to generate the Cav2.1CT from full-length Cav2.1 protein. Also, I have studied the functional role of the Cav2.1CT in some in vitro systems. As a result, the following molecules are candidates for the protease responsible for the Cav2.1CT generation: caspase 6, cathepsin L, and calpain small subunit 1, but further studies are necessary to conclude this. Cav2.1CT was found to be toxic to cells and it is possible that Cav2.1CT possess transcription repressing activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Cav2.1, カルボキシ末端、プロテアーゼ、脊髄小脳変性症6型、SCA6

1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Ca チャネル(VDCC)は細胞膜の脱分極により開き、細胞外からの Ca^{2+} イオンの流入を引き起こす。即ち膜の脱分極という電気的信号を Ca^{2+} イオンという化学的信号へと変換する分子である。そして多くの細胞機能の制御において重要な役割を果たしている。VDCC は少なくとも 4 種類のサブユニットからなり、その中で α_1 サブユニットがチャネルポアを形成する最も重要なサブユニットである。哺乳類ゲノムには 10 種類の α_1 サブユニットをコードする遺伝子が存在することが知られており、それらは一次構造の相同性に基つき 3 つのファミリーに分類されている。本研究に関わる Cav2.1 は Cav2 ファミリーに属し、電気生理学的、薬理的性質から P/Q 型チャネルを形成すると考えられており、神経伝達物質制御において必須の分子であることが知られている。

脊髄小脳変性症 6 型(SCA6)は高齢発症の小脳性運動失調を呈し、小脳プルキンエ細胞の選択的脱落を特徴とする遺伝性神経疾患である。SCA6 は Cav2.1 をコードする遺伝子の 3'側のエクソン内の CAG リピート (ポリグルタミンをコードする) が軽度に伸長することにより引き起こされることが明らかとなっているが、発症メカニズムについては不明な点が多い。例えば、非神経系培養細胞に SCA6 変異導入 Cav2.1 を発現させると正常 Cav2.1 と比較して異なったチャネル特性を示すという報告がいくつかなされたが、SCA6 と本質的に関わると考えられる小脳プルキンエ細胞において SCA6 変異型 Cav2.1 を発現させた場合にはそのような変化が見いだされなかった。従って SCA6 の発症機序にはチャネル特性の変化以外のメカニズムが想定される。

そのような観点から Cav2.1 のカルボキシ末端側約 60-70kDa のフラグメント(C 末端フラグメントと略)が生成されそれが細胞の核へ移行する性質があるらしいという報告は非常に興味深い。この C 末端フラグメントがどのような酵素により生成されるのか? 核内でどのような機能を持つのか? ポリグルタミンリピートの長さがその機能にどのように影響するのか? といったことを明らかにすれば、SCA6 の発症機序の解明に大きく貢献するのではないかという考えが研究当初の背景である。

2. 研究の目的

上述のように SCA6 の発症機序はポリグルタミン伸長による Cav2.1 のチャネル特性の変化とは別のものである可能性が高い。そこで最も考えやすいのは Cav2.1 には VDCC としての機能以外にも別の機能があり、それがポリグルタミン伸長により影響を受けるとい

うことである。Cav2.1 の C 末端フラグメントはチャネルタンパク質全長から切り出されて細胞核へ移行するという事実から、次のような可能性が考えられる。即ち Cav2.1C 末端フラグメントが細胞核内で何らかの機能を持ちそれがポリグルタミン伸長により障害されることが SCA6 発症につながるのではないかという可能性である。本研究では SCA6 発症機序の解明の一端として、Cav2.1C 末端フラグメントがどのようなメカニズムで生成されるのか、Cav2.1C 末端フラグメントは細胞核内でどのような機能を持つのかと言う点を明らかにする事を目的とする。より具体的に言うと、Cav2.1C 末端フラグメント生成に関わるプロテアーゼの同定を試み、Cav2.1C 末端フラグメントに転写制御因子としての活性があるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

COS7, HEK293 (およびそれに由来する細胞) は 10% 牛胎児血清を含む DMEM を用い、37°C、5% CO_2 存在下で培養した。

(2) トランスフェクション

プラスミドベクターの導入には Lipofectamine LTX (Invitrogen) を、プラスミドベクターと siRNA の同時導入には Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いた。

(3) プラスミド

EGFP-Cav2.1FLAG の発現ベクターは、CAG プロモータ制御下にこれを発現するもので、以前報告したものである (Hu et al., 2005)。

Cav2.1 C 末端フラグメントが転写制御能を持つかどうかを検討するためのベクターとして以下の物を作製した。

pM3' S13 および pM3' L24

これらは GAL4 DNA 結合ドメインと Cav2.1 C 末端フラグメントとの融合タンパク質を発現するベクターであり、pM3 ベクター (Promega) をもとに作製した。pM3' S13 はポリグルタミンリピート 13 回を、pM3' L24 はポリグルタミンリピート 24 回を持つ。

(4) 遺伝子改変マウス

① Cav2.1FLAG ノックインマウス

C 末端に FLAG-tag を付加したヒト Cav2.1 をマウス内在性 Cav2.1 の代わりに発現するノックインマウスは以前報告したものとほぼ同様のものである (Saegusa et al., 2007)。

② Cav2.1C 末端フラグメント発現トランスジェニックマウス

CAG プロモータの下流に Cav2.1 C 末端フラ

グメントの配列を連結したプラスミドを作製し (ポリグルタミンリピートの長さ 13 と 28 の 2 種類を作製)、この発現ユニットを C57Bl/6 系マウス受精卵の前核に注入しトランスジェニックマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) Cav2.1 C 末端フラグメント生成のメカニズム

①Cav2.1 ノックインマウスにおける Cav2.1C 末端フラグメントの存在

まず Cav2.1FLAG ノックインマウスを用いて、Cav2.1C 末端の生成に領域特異性があるかどうかを検討した。ノックインヘテロマウスの脳を大脳、小脳その他というように大まかに分画し、それぞれからタンパク質を抽出し、FLAG 抗体による免疫沈降および Cav2.1C 末端に対する抗体を用いたイムノブロットにより解析した。その結果、分子量約 70kDa の Cav2.1 C 末端フラグメントは小脳サンプルにおいてのみ検出された、各部位での発現量の差を補正しなければならないが、Cav2.1 C 末端の生成機構に領域特異性がある可能性が考えられ、SCA6 におけるブルキンエ細胞の選択的脱落の機構との関連で非常に興味深い結果である。しかしこのフラグメントを質量分析等により解析し、切断部位についての情報を得るには膨大な量の出発材料が必要であると推定された。

②Cav2.1 C 末端フラグメント生成に関わるプロテアーゼの同定の試み

上述のように生体から C 末端フラグメントを精製して質量分析を行うというアプローチは現実的ではなかったため、候補となるプロテアーゼを予測し、それらが実際に Cav2.1 全長から C 末端を切り出す活性があるかどうかを検討するというアプローチに切り換えた。

まず、プロテアーゼ切断配列データベースをもとに調べてみると、Cav2.1 C 末端側のアミノ酸配列中に caspase-1 により切断を受ける可能性のある配列が存在する事が分かった。そこで、COS-7 細胞に EGFP-Cav2.1 融合タンパク質 (C 末端を FLAG タグにより標識) を発現させ、それを GFP に対する抗体で免疫沈降することにより濃縮した後、精製 caspase-1 標品を作用させ、SDS-PAGE により展開して FLAG 抗体によるウエスタンブロットで C 末端フラグメントが検出されるかを検討した。しかし、caspase-1 により C 末端フラグメントが生成されるという証拠は得られなかった。

次に、マウス脳遺伝子発現データベースと我々の以前行った HEK293 由来細胞の cDNA マイクロアレイ解析の結果とをもとにして、マウス小脳ブルキンエ細胞で強く発現し HEK293

細胞でも発現が見られるプロテアーゼないしそのサブユニット遺伝子を検索した。その結果 caspase-6, cathepsin L, calpain small subunit 1 が解析すべき候補として挙げられた。

そこで、これらの遺伝子に対する siRNA を HEK293 に導入し RNAi によるノックダウンを行い、その下で EGFP-Cav2.1FLAG を発現させ C 末端フラグメントを認識する抗体によるウエスタンブロットを行った。実際 C 末端フラグメントの存在量の低下が見られたのだが、それはチャネルタンパク質の発現効率の低下によるものと思われ、明確な結論を得るには至らなかった。

Cav2.1C 末端フラグメントの生成は脳内の領域により特異性があり、おそらく小脳ブルキンエ細胞では他の領域に比べ多く生成されているものと推測される。このことが SCA6 発症に関連している可能性は高い。しかし、現状ではその C 末端フラグメントを全長のチャネルタンパク質から切り出すプロテアーゼの同定までには至っていない。

(2) Cav2.1 C 末端フラグメントの機能

①Cav2.1 C 末端フラグメント発現トランスジェニックマウス

leaner (1a) 突然変異マウスは重篤な運動失調を呈し、多くは離乳期までに死亡する。1a 変異は Cav2.1 C 末端をコードするエクソン近傍のイントロン内にあり、スプライシング異常を引き起こし、正常な Cav2.1C 末端が形成されなくなる。もし Cav2.1C 末端フラグメントが何らかの機能を持つならばこれを発現するトランスジェニックマウスを 1a と交配すれば 1a 変異をレスキューできるかもしれない。このような考えのもとに Cav2.1C 末端フラグメントを発現するトランスジェニックマウスを作製した。

多くの細胞で強力に発現することが知られる CAG プロモータの制御下で Cav2.1C 末端フラグメント (ポリグルタミンリピート 13 と 28 の 2 種類) を発現するトランスジェニックマウスを作製した。ポリグルタミン 13 (Q13 と略、正常の範囲) およびポリグルタミン 28 (Q28 と略、SCA6 疾患範囲) のいずれの場合もファウンダーマウスが得られたが、その数は Q13 の方が多かった。そしていずれも 1 系統がライン化されたが、トランスジーンを発現を調べてみると非常に低く、ウエスタンブロットで C 末端フラグメントタンパク質を検出するのが難しいレベルであった。結局 1a 変異マウスとトランスジェニックマウスとの交配実験はできなかったが、上述の事実は Cav2.1C 末端フラグメント (Q13、Q28 のいずれも) は多くの細胞に対して何らかの毒性を示し、それを高いレベルで発現すると致死になる可能性を示唆する。そしてポリグルタミン鎖長が 13 でも

28でも毒性を示し、Q28の方がより毒性が強いと推測される。

②Cav2.1 C 末端フラグメントと転写因子 HSF1 (heat shock transcription factor 1) との結合について

GFP-Cav2.1C 末端フラグメント融合タンパク質を恒常的に発現する HEK293 由来細胞株 (S13, L24) は、重金属ストレスを与えると、ポリグルタミンの長い Cav2.1CT を発現する L24 の方が細胞死を起しやすいくことを我々は明らかにした。そして、この脆弱性には HSF1 - HSP70 系の活性低下が関与すると考えられたが Cav2.1CT がどのように HSF1 - HSP70 系に影響するかは明らかではない。そこで Cav2.1CT が転写因子 HSF1 と直接的に相互作用するかどうかを免疫沈降法を用いて検討した。S13, L24 細胞の総タンパク質を抽出し、Cav2.1CT を GFP 抗体で免疫沈降させ、HSF1 抗体によるイムノブロットで解析した。しかし HSF1 が検出できる時とできない時があり再現性について問題があった。現時点では Cav2.1C 末端フラグメントと HSF1 とが直接相互作用する可能性が考えられるが、明確な結論を得るにはさらなる検討を要する。

S13, L24 細胞において EGFP-Cav2.1C 末端フラグメントの存在部位はほとんど核内であり、しかも点状に存在していることから、何らかのタンパク質と複合体を形成している事が推測される。今後はその結合タンパク質を明らかにする事が重要と思われる。HSF1 の可能性も含めて、網羅的解析が進展することが望まれる。

③Cav2.1 C 末端フラグメントは転写制御因子としての活性を持つか？

まず Cav2.1C 末端フラグメントが転写活性化能を持つかどうかを GAL4 DNA 結合ドメインと Cav2.1C 末端フラグメントとの融合タンパク質を発現するベクターを作製して検討した。レポーターとして UAS 配列下流にアルカリフォスファターゼ (SEAP) 遺伝子を持つ pG5SEAP を COS7 細胞にコトランスフェクションし、3 日後 SEAP 活性を測定した。他のグループが報告した Cav1.2 の C 末端フラグメントとは異なり、Cav2.1C 末端フラグメント単独では SEAP 活性は検出されなかった。すなわち、Cav2.1C 末端フラグメント単独で、レポーター遺伝子の転写促進をするということはなさそうである。

ところが、転写活性化能を有する陽性対照 pM3VP16 と pM3' S13 あるいは pM3' L24 を同時に導入すると、pM3VP16 単独の場合に比べて著しく SEAP 活性が低下した。コントロールとして Cav2.1C 末端フラグメントと分子量が類似した Cav2.2 の C 末端フラグメントを用いた場合にはこれほどの転写抑制は見られなかった。したがって Cav2.1C 末端フラグメント

は転写抑制活性を有する可能性が考えられる。

しかしこの実験は GAL4 DNA 結合ドメインとの融合タンパク質を作って、いわば無理矢理 DNA に結合させているという人為的な条件下のものであり、Cav2.1C 末端フラグメントが生体内でも転写抑制活性をもつかどうかを結論するには今後更なる検討が必要である。クロマチン免疫沈降のような実験により実際に Cav2.1C 末端フラグメントが DNA に結合する事、そしてどのような遺伝子に結合するのかを明らかにする事がまず重要であろう。しかし、Cav2.1C 末端フラグメントが転写抑制活性を示す可能性を示唆する今回の結果は今後の研究の布石として大きいと考えられる。

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 3 件)

① Sakurai, E., Kurihara, T., Kouchi, K., Saegusa, H., Zong, S. and Tanabe, T.

Upregulation of casein kinase Iε in dorsal root ganglia and spinal cord after mouse spinal nerve injury contributes to neuropathic pain
Molecular Pain, **5** (2009) 74 査読有り

② Li, L., Saegusa, H. and Tanabe, T.
Deficit of heat shock transcription factor 1-heat shock 70 kDa protein 1A axis determines the cell death vulnerability in a model of spinocerebellar ataxia type 6
Genes to Cells, **14** (2009) 1253-1269 査読有り

③ Kondo, D., Saegusa, H., Yabe, R., Takasaki, I., Kurihara, T., Zong, S. and Tanabe, T.
Peripheral-type benzodiazepine receptor antagonist is effective in relieving neuropathic pain in mice
Journal of Pharmacological Science, **110** (2009) 55-63 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① Tanabe, T. et al., Down regulation of particular miRNAs is responsible for the cell death vulnerability of Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)
The 41st annual meeting of the Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 12-16 日、Washington DC, USA

② Tanabe T. et al., Involvement of miRNA

in the pathogenesis of Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)
8th IBRO World Congress of Neuroscience,
2011年7月14-18日、Florence, Italy

③ Li L. et al., Down-regulation of heat shock transcription factor 1-heat shock 70kDa protein 1A axis and increased caspase-dependent apoptosis in a cell model of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)

日本分子生物学会 2009年12月9日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

[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.tmd.ac.jp/med/mphm/Yakuri.HTM>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三枝 弘尚 (SAEGUSA HIRONAO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90261205

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし