

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07263

研究課題名(和文) 電位依存性Caチャネルのカルモジュリンによる調節の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the regulation of Cav1.2 channels by calmodulin

研究代表者

亀山 正樹 (Kameyama, Masaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60150059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：電位依存性Cav1.2型Caチャネル(以下Caチャネル)は、種々の調節機構を持っているが、その一つであるカルモジュリン(CaM)による活動調節は、Ca<sup>2+</sup>依存性活性化(CDF)や不活性化(CDI)を始め多岐に亘る。本研究は、その調節の分子機構を解明しようと計画された。研究の結果、Ca<sup>2+</sup>-free CaM(apoCaM)は、チャネルC末端とのみ結合すること、Ca<sup>2+</sup>/CaMは、チャネルの近位C末端およびN末端、I-IIリンカーと結合することが確認され、また、N、C両末端が、Ca<sup>2+</sup>/CaMにより架橋されることが確認された。さらにC末端に2分子のCaMが結合して起こすCDIも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、Cav1.2チャネルのCa<sup>2+</sup>依存性不活性化は、チャネルのN末端とC末端がCa<sup>2+</sup>結合カルモジュリン(Ca<sup>2+</sup>/CaM)によって架橋され、それによりチャネルが構造変化を起こしてCDIになるという説と2分子のCa<sup>2+</sup>/CaMがチャネルのC末端と結合した結果、チャネルが構造変化を起こしてCDIになるという説とが対立して論争している状態である。本研究は、両説共に存在し、並行して起こりうることを示したものであり、学術的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Voltage-dependent Cav1.2 channel (Ca<sup>2+</sup> channel) has a number of regulatory systems. Among them, calmodulin (CaM)-mediated regulatory systems are important, but their molecular mechanisms are largely unknown. This study was aimed to investigate the molecular mechanisms underlying regulations of Ca<sup>2+</sup> channels by CaM. We have confirmed that Ca<sup>2+</sup>-free CaM (apoCaM) binds only to the proximal C-terminal tail (CT) of Ca<sup>2+</sup> channel with a high affinity, while Ca<sup>2+</sup>/CaM binds to the N-terminal tail (NT), the I-II loop and CT. We have also confirmed that NT and CT are bridged by Ca<sup>2+</sup>/CaM. Furthermore, it is found that 2 molecules of CaM bind to CT and produce CDI, suggesting the existence of two conformations of CDI.

研究分野：生理学

キーワード：カルシウムチャネル カルモジュリン カルシウム依存性不活性化 カルシウム依存性活性化 パッチクランプ プルダウン法 蛋白質構造シミュレーション

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Cav1.2 型 Ca チャネル (以下 Ca チャネル) は、神経系においてはシナプス後膜の興奮や細胞内  $Ca^{2+}$  シグナリング (興奮-代謝連関や興奮-転写連関) に重要で、また、心臓においてはペースメーカー細胞の自動能や作業筋における興奮収縮連関に必須である。更に、平滑筋や分泌細胞においても、重要な役割を担っている。このため、Ca チャネルは、生体の様々な状況に対応できるように種々の調節機構を持ち、その活動を調節している。この中で、蛋白リン酸化、Ca 結合蛋白質カルモジュリン (CaM)、ATP、酸化・還元 (redox) による調節は、特に重要であると考えられる。CaM による活動調節には、チャネルの開口準備 (repriming)、 $Ca^{2+}$  依存性活性化 (CDF) や  $Ca^{2+}$  依存性不活性化 (CDI)、チャネル輸送 (trafficking) など多岐にわたるが、その分子機構については CaM の Ca チャネルへの結合様式やそれに伴う構造変化がどうなっているかなど未解明の部分が多い。

本研究ではそれら、CaM によるチャネルの調節機構に焦点を当て、蛋白質立体構造予測シミュレーション法と分子・細胞生物学的技法およびパッチクランプ法を組み合わせた研究により、以下の3点の解明を目指すとして計画された。特に、CaM の結合様式については、Ca チャネルとの結合を構造シミュレーション法と pull-down 法等の分子生物学的技法とを組み合わせた研究により解明しようとして計画された。

- (1) CaM と Ca チャネルとの結合様式 (特に低  $Ca^{2+}$  状態時) を解明する。
- (2) CaM の結合による Ca チャネルの構造変化を解明する。
- (3) この調節機構の、虚血や Ca 過負荷などの病態における関与を解明する。

## 2. 研究の目的

当初、上述の様に CaM によるチャネルの調節機構のチャネルの開口準備 (repriming) 即ち CaM の  $Ca^{2+}$ -free 状態時 (apoCaM) のチャネルへの結合を重点的に研究する予定であった。しかし、2020 年に、我々が長年提唱している CDI のモデル (2CaM 仮説) 即ち、Ca チャネルの細胞内開口部周辺の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇した時、2 分子の  $Ca^{2+}$ /CaM がチャネル CT (CT) に結合して CDI を起こすという仮説 [1] を否定する論文が Ben-Johny のグループから発表された [2]。それは、第 2 の  $Ca^{2+}$ /CaM は、たとえチャネルに結合したとしても生理作用を発揮せず、1 分子の  $Ca^{2+}$ /CaM によるチャネルの N 末部 (NT) と CT の架橋により CDI が起こるといった趣旨の内容であった。そこで、これに対応した実験を行うことが重要であると考え、CDI の時のチャネル-CaM 構造について優先的に研究することにした。併せて、第 3 の仮説、即ち、CaM によるチャネルの NT と CT の架橋は、低  $Ca^{2+}$  濃度の時に起こり、 $Ca^{2+}$  濃度の上昇によりその架橋は解離するというもの [3] も併せて検討することにした。

## 参考文献

1. Han DY, Minobe E, Wang WY, Guo F, Xu JJ, Hao LY, Kameyama M. Calmodulin- and  $Ca^{2+}$ -dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2  $Ca^{2+}$  channels in guinea-pig ventricular myocytes. *J Pharmacol Sci* 112: 310-319, 2010
2. Chakouri N, Diaz J, Yang PS, Ben-Johny M. CaV channels reject signaling from a second CaM in eliciting  $Ca^{2+}$ -dependent feedback regulation. *J Biol Chem* 295: 14948-14962, 2020
3. Guggenheimer AB, Almagor L, Tsemakhovich V, Tripathy DR, Hirsch JA, Dasca I N.

Interactions between N and C termini of 1C subunit regulate inactivation of Cav1.2 L-type Ca<sup>2+</sup> channel. Channels (Austin) 10: 55-68, 2016

### 3. 研究の方法

(1) シミュレーション: CaM の Ca チャネルへの結合の構造シミュレーションを、I-TASSER や ClusPro を使用して行った。複数の CaM 結合モデルを作成し、また、CaM 結合に影響の出るチャネルのアミノ酸残基を特定した。

(2) Pull-down 実験: Ca チャネルの CaM 結合部位 (CT の preIQ と IQ 領域や NT の NSCaTE 領域、I-II ループ、また対照として II-III、III-IV ループ) の GST 融合ペプチドと CaM との結合を Ca<sup>2+</sup>-free および高 Ca<sup>2+</sup>条件下で行った。また、シミュレーションで結合に重要と予測されたアミノ酸残基に変異を加えた GST 融合ペプチドと CaM との結合を調べた。

(3) パッチクランプ実験: Ca チャネルの C 末端に Gly リンカーを介して CaM を融合させた変異体を作成した。更に、その変異体から NT を削除した変異体も作成した。変異チャネルを、HEK 細胞に発現させて inside-out パッチクランプ法により CaM による調節機構を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) ApoCaM のチャネルへの結合

チャネル細胞内分画と CaM の蛋白質立体構造予測シミュレーションでは、チャネル NT および CT の preIQ、IQ 領域のそれぞれと apoCaM との結合で結合に重要と思われるアミノ酸残基が特定された。しかし、pull-down 実験では、apoCaM は近位 CT のみと結合し他の分画とは結合しないことが判明した。なお、シミュレーションで指摘された apoCaM との結合で重要と思われるチャネル CT のアミノ酸残基に変異を加えたチャネル断片ペプチドとの結合実験は期間中に終了せず、継続することとなった。

#### (2) Ca<sup>2+</sup>/CaM のチャネルへの結合

Pull-down 実験で、Ca<sup>2+</sup>/CaM が近位 CT および NT、I-II リンカーと結合することが確認された。I-II リンカーとの結合は比較的弱かった。そこで、CaM の C-lobe を N-lobe に置換したものの (NN-CaM) と N-lobe を C-lobe に置換したものの (CC-CaM) を使って、Cav1.2 チャネル NT および CT に対する N、C 各 lobe の結合親和性を Ca<sup>2+</sup>存在下で調べた。その結果、N-lobe はチャネル NT に対して、また、C-lobe は CT に対して他の末端部より結合親和性が高かった。また、Ca<sup>2+</sup>/NN-CaM と CT との結合の親和性は、他のどんな組み合わせよりも低かった。この結果から、チャネルの N、C 両末端部が Ca<sup>2+</sup>/CaM により、CaM の N-lobe は NT と、および CaM の C-lobe は CT との結合を介して架橋される可能性が示された。一方、NT-CT 間の直接の架橋は起こらず、Ca<sup>2+</sup>/CaM を介して起こることが確認された。

Patch clamp の実験では、野生型 CaM による Cav1.2 チャネルの完全な CDI と比較して、NN-CaM が小さな CDI しか起こさなかったのに対し、CC-CaM はほぼ同等の CDI を起こすことが判明した。また、チャネル C 末端に CaM をリンクさせた変異体や NT を欠損する変異体を使って、CDI の 2 つの様式、即ち、1 分子の Ca<sup>2+</sup>/CaM による NT-CT 架橋によるものと CT に 2 分子の Ca<sup>2+</sup>/CaM が結合するもの、を実験的に再現することができた。

#### (3) その他の実験結果

チャネル細胞内分画間 (NT、I-II リンカー、II-III リンカー、III-IV リンカー、CT) で Ca<sup>2+</sup> および CaM 依存的に相互作用する組み合わせを探索した結果、新たな組み合わせが発見された。また、NT と I-II ループが直接結合することが明らかとなった。この直接結合の生理学的意義は継続して検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xu JJ, Minobe E, Kameyama M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> Dyshomeostasis Links Risk Factors to Neurodegeneration in Parkinson's Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2022.867385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jia Wanying, Liu Junyan, Yu Zhiyi, Zhang Xiaohong, Xu Xiaoxue, Wang Yuting, Gao Qinghua, Feng Rui, Wan Yujun, Xu Jianjun, Minobe Etsuko, Kameyama Masaki, Wang Wuyang, Guo Feng	4. 巻 46
2. 論文標題 Properties of Calmodulin Binding to NaV1.2 IQ Motif and Its Autism-Associated Mutation R1902C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 523-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-020-03189-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kameyama M, Minobe E, Shao D, Xu J, Gao Q, Hao L.	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of Cardiac Cav1.2 Channels by Calmodulin.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 6409-6436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24076409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 亀山正樹
2. 発表標題 Dawning age of the Physiological Society of West Japan
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 袁部悦子、徐 健軍、亀山正樹.
2. 発表標題 カルモジュリンを介したCav1.2チャネルの2つの不活性化機構.
3. 学会等名 第73回西日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 袁部 悦子、徐 建軍、亀山 正樹.
2. 発表標題 Two molecules of calmodulin also contribute to Ca <sup>2+</sup> -dependent inactivation and its responsible binding site in Cav1.2 channel.
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023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	徐 建軍  (Xu Jianjun)  (10581689)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師   (17701)	
研究 分担者	袁部 悦子  (Minobe Etsuko)  (00448581)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師   (17701)	

	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 協力者	高 青華  (Gao Qinhu)	中国医科大学・薬学院・講師	

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			
中国	中国医科大学			