

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 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790206

研究課題名（和文）心筋 L 型カルシウムチャネルのクラスタリング機構の解明

研究課題名（英文）Junctional membrane-targeting mechanism of cardiac L-type calcium channel.

研究代表者

中田 勉 (NAKADA TSUTOMU)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：70452141

研究成果の概要（和文）：骨格筋や心筋が正常に収縮するために、L 型カルシウムチャネル（LTCC）とリアノジン受容体が形質膜・筋小胞体膜接合部（接合部）に集積することが必要不可欠である。本研究では心筋型 LTCC が接合部に集積するメカニズムを明らかにするための検討を行った。その結果、心筋型 LTCC の α_{1C} サブユニットの C 末端部位 1681-1700 に存在するアミノ酸配列が、接合部への局在に必要なモチーフであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In cardiac myocytes, L-type calcium channels (LTCC) form a functional signaling complex with ryanodine receptors at the junctional membrane (JM). Although the specific localization of LTCCs to JM is critical for excitation-contraction coupling, their targeting mechanism is unclear. To identify the sequences of α_{1C} responsible for the JM-targeting, we generated various mutants of α_{1C} subunit, and studied their targeting properties in dysgenic (α_{1S} -null) GLT myotubes. The results revealed that amino acids ¹⁶⁸¹LQAGLRTL¹⁶⁸⁸ and ¹⁶⁹³PEIRRAIS¹⁷⁰⁰ predicted to form two adjacent α -helices in the proximal C-terminus are necessary for the JM-targeting of α_{1C} .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：L型カルシウムチャネル，リアノジン受容体，心筋

1. 研究開始当初の背景

横紋筋における L 型 Ca^{2+} チャネル (LTCC) は、形質膜・筋小胞体膜接合部（接合部）でリアノジン受容体と機能的複合体を形成している。心室筋の接合部は、形質膜に 1 つの筋小胞体膜が近接する diad に存在する。心筋の接合部では、活動電位に伴う LTCC の開口により流入した Ca^{2+} がリアノジン受容体

(RyR) を開口させ、 Ca^{2+} 信号の増幅が起こる (Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出, CICR)。一方、骨格筋では、接合部は T 管の形質膜に 2 つの筋小胞体膜が近接する triad に存在する。骨格筋の LTCC と RyR 受容体は接合部で直接関連し、活動電位を細胞内 Ca^{2+} 信号に変換する (膜電位依存性 Ca^{2+} 放出, VDCR)。このように、小胞体からの Ca^{2+} 放出を起こす様式は異なるも

の、心筋と骨格筋の LTCC が接合部に局在することは、効率的な興奮収縮連関に不可欠である。しかし心筋の LTCC がどのように接合部へ局在するかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究の目的は心筋 LTCC の接合部への局在機構を明らかにすることである。心筋 LTCC の解析のために、本研究では GLT 細胞という細胞株を用いる。GLT は骨格筋型 LTCC を構成する α_{1S} サブユニットを欠損したマウス由来の骨格筋細胞株であり、正常な興奮収縮連関を起こすことが出来ない。しかし GLT 細胞に α_{1S} を強制発現させると、 α_{1S} は接合部に集積し VDCR を生じる。驚くべきことに、同細胞株に心筋細胞の LTCC を構成する α_{1C} サブユニットを強制発現させても、接合部に集積し CICR を生ずる。この結果は、骨格筋と心筋における α_1 サブユニットの接合部への局在機構が共通であり、したがって GLT 細胞を用いて α_{1C} サブユニットが接合部に局在する機序を解析できることを示唆している。そこで α_{1C} サブユニットの変異体を作製し、GLT 細胞に強制発現させることで、接合膜構造への集積に必要なモチーフの同定を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：GLT 細胞は既報の条件に従って培養した。細胞はカーボンコートしたカバーガラスに播種し、増殖用培地（10%ウシ胎児血清，10%ウマ血清含有 DMEM）で培養した。2 日後に分化用培地（2%ウマ血清含有 DMEM）に置き換え、4 日後に Fugene HD を用いたリポフェクション法により、発現ベクターをトランスフェクションした。播種後 8–10 日後に免疫染色を行った。

(2) プラスミド構築：キメラ遺伝子は SOEing 法によって、欠失変異体および点変異体は Site directed mutagenesis 法により作製した。PCR の鋳型にはウサギ α_{1C} サブユニット、ウサギ α_{1A} サブユニット、イェバエ α_{1M} サブユニットを使用した。

(3) 免疫染色：細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBS で洗浄し、5%ウシ血清含有 PBS でブロッキングを行った。続けて一次抗体を反応させ、蛍光標識二次抗体で検出を行った。一次抗体には抗 GFP 抗体、抗 HA 抗体、抗 RyR 抗体を用いた。HA タグは細胞外領域に挿入したため、抗 HA 抗体の反応は膜透過処理を行わず、細胞膜に移行したキメラタンパク質のみを検出した。二次抗体には Alexa 標識の抗マウス IgG 抗体、抗ラット IgG 抗体、抗ウサギ抗体 IgG 抗体を用いた。標本の観察には Zeiss LSM5 を使用した。

(4) Ca^{2+} イメージング：筋管に分化した GLT 細胞に細胞内 Ca^{2+} 指示薬 Fluo-4 を常法に従い

取り込ませた後、電気刺激（50 V，1ms，0.3 Hz）を与え細胞の蛍光強度を測定した。標本の観察には Zeiss LSM7 LIVE を使用した。

4. 研究成果

これまでの報告により、GLT 細胞に α_{1C} サブユニット（心筋型 LTCC）を強制発現させると、接合部に局在するのに対し、 α_{1A} サブユニット（神経 P/Q 型カルシウムチャンネル）は局在しないことが明らかになっている。そこで α_{1C} サブユニットの細胞内領域である N 末端、I-II ループ、III-IV ループ、C 末端を、 α_{1A} サブユニットの相同領域に置換したキメラ遺伝子を作製した（ $\alpha_{1C}NT_A$ 、 $\alpha_{1C}I-II_A$ 、 $\alpha_{1C}III-IV_A$ 、 $\alpha_{1C}CT_A$ ）。II-III ループに関しては、 α_{1A} サブユニットのアミノ酸残基数が α_{1C} の 3 倍以上と巨大なため、チャンネルの構造に影響が出ることが考えられた。そのため、 α_{1A} の代わりに、GLT 細胞にトランスフェクションしても接合部に局在しないことが知られているイェバエの α_{1M} サブユニットの相同領域を使用した（ $\alpha_{1C}II-III_M$ ）。それぞれの遺伝子には N 末端に GFP タグを付加し検出に用いた。これらの遺伝子を GLT 細胞に発現させた結果、 $\alpha_{1C}NT_A$ 、 $\alpha_{1C}I-II_A$ 、 $\alpha_{1C}II-III_M$ 、 $\alpha_{1C}III-IV_A$ が、野生型 α_{1C} と同様に接合部でクラスターを形成し、RyR と共局在するのに対し、 $\alpha_{1C}CT_A$ はクラスターを形成しなかった（図 1）。この結果から α_{1C} サブユニットの接合部への局在には、C 末端が必要であることが明らかになった。

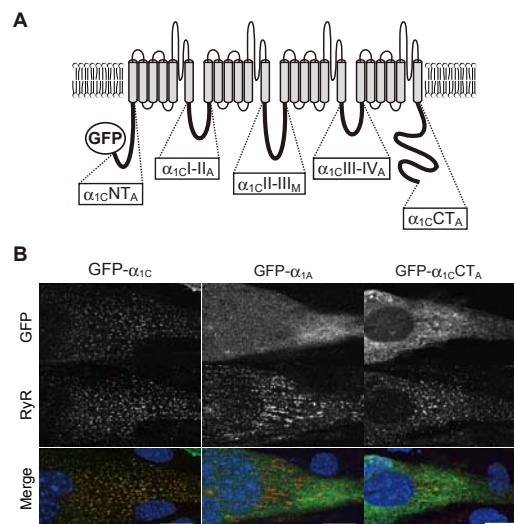


図 1: α_{1C}/α_{1A} キメラの筋管内での局在。A. 実験に使用したキメラの二次構造を示した模式図。太線で表した部位をそれぞれ α_{1A} の相同部位と置換した。B. 野生型およびキメラチャンネルの細胞内局在。 α_{1C} は RyR と接合部（ドット状に分布）で共局在するが、 α_{1A} は共局在しない。C 末端部位のキメラ（ $\alpha_{1C}CT_A$ ）は接合部に局在しなくなった。他の部位のキメラ（ $\alpha_{1C}NT_A$ 、 $\alpha_{1C}I-II_A$ 、 $\alpha_{1C}II-III_M$ 、 $\alpha_{1C}III-IV_A$ ）は α_{1C} と同様に接合部に分布した（図示せず）。

α_{1C} サブユニットの C 末端領域のどの部位が接合部へのターゲティングに必要であ

るかを明らかにするために、詳細な変異体を作製し検討を行った。これ以降の実験については、細胞外領域に HA タグを付加した遺伝子を用い、抗 HA 抗体によって検出を行った。はじめに 1822 番目、1733 番目、1666 番目のアミノ酸残基から C 末端までの部位を欠失した変異体 ($\alpha_{1C}\Delta 1822$, $\alpha_{1C}\Delta 1733$, $\alpha_{1C}\Delta 1666$) を作製し、検討を行った。その結果、 $\alpha_{1C}\Delta 1822$ と $\alpha_{1C}\Delta 1733$ は正常に接合部に局在したが、 $\alpha_{1C}\Delta 1666$ では接合部への移行が認められなかった。この結果から、1733 番目のアミノ酸残基以降の C 末端部位は、 α_{1C} のクラスタリングに必須ではないことが明らかになった (図 2)。

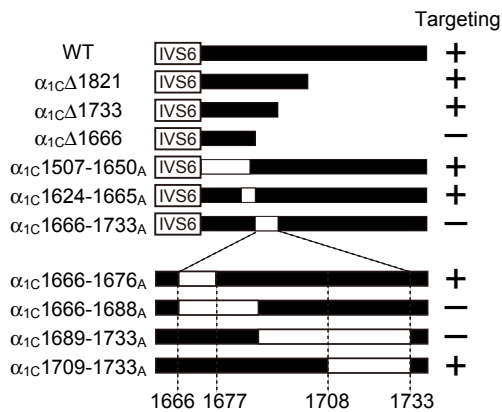


図 2: α_{1C} の C 末端部位変異体の模式図。IVS6 は最も C 末端側の膜貫通部位、白い四角部分は α_{1A} の相同配列に置換した部位を示す。それぞれの右の「+」、「-」はそれぞれのチャンネルが接合部に集積したかどうかを表している。

次に、 α_{1C} の C 末端領域の上流側を 3 カ所に分け、 α_{1A} の相同部位に置きかえたキメラを作製した ($\alpha_{1C}1507-1650_A$, $\alpha_{1C}1624-1665_A$, $\alpha_{1C}1666-1733_A$)。これらのキメラ遺伝子を GLT 細胞に発現させた結果、 $\alpha_{1C}1507-1650_A$ および $\alpha_{1C}1624-1665_A$ は接合部へ局在したが、 $\alpha_{1C}1666-1733_A$ はしなかった (図 2)。これらの結果から、 α_{1C} サブユニットの接合部ターゲットモチーフはアミノ酸残基 1666-1733 に存在すると考えられた。そこで、この部位についてさらに詳細なキメラを作製 ($\alpha_{1C}1666-1676_A$, $\alpha_{1C}1666-1688_A$, $\alpha_{1C}1689-1733_A$, $\alpha_{1C}1709-1733_A$) し、検討を行ったところ、 $\alpha_{1C}1666-1688_A$ と $\alpha_{1C}1689-1733_A$ の 2 つのキメラでは、接合部への局在が認められなかった (図 2)。これらの結果から、1677-1708 に存在する 32 個のアミノ酸残基が、 α_{1C} の接合部へのターゲットモチーフであることが示唆された。

次に、変異体を用いて決定したターゲットモチーフのうち、どのアミノ酸残基が重要であるかを明らかにするために、アラニン置換を行った。4 つの連続したアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体 ($\alpha_{1C}1677AAAA1680$, $\alpha_{1C}1681AAAA1684$,

$\alpha_{1C}1685AAAA1688$, $\alpha_{1C}1689AAAA1692$, $\alpha_{1C}1693AAAA1696$, $\alpha_{1C}1697AAAA1700$, $\alpha_{1C}1700AAAA1704$, $\alpha_{1C}1705AAAA1708$) を作製し、強制発現を行った結果、1681-1684、1685-1688 をアラニン置換したものでは、接合部への局在が強く抑制された。また 1689-1692、1693-1696、1697-1700 を置換したもので有意に抑制された (図 3)。

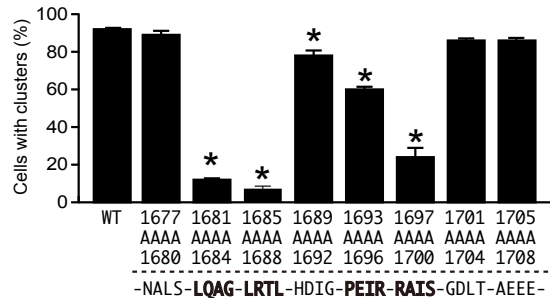


図 3: α_{1C} の接合部局在モチーフのアラニン置換。接合部局在化モチーフを 4 アミノ酸残基ずつアラニンに置換した。それぞれの変異体は GLT 細胞に発現させ、免疫染色法により、接合部への局在を確認した。グラフは接合部への局在が認められた細胞の割合を表す。下部は野生型のアミノ酸配列を示す。

また、接合部への局在が著しく阻害された $\alpha_{1C}1685AAAA1688$ 変異体を発現させた細胞では、電気刺激によって生じる Ca^{2+} トランジェントを起こす細胞の割合が、野生型と比べて有意に減少していた (図 4)。

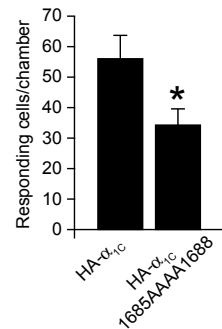


図 4: 接合部局在化モチーフの変異によるカルシウム トランジェントの低下。野生型と変異体を GLT 細胞に発現させ、電気刺激に反応する細胞数を比較した。

今回の検討により、心筋型 LTCC の α_{1C} サブユニットが接合部へターゲットングするために、C 末端に存在する 1681 から 1700 番目までのアミノ酸残基が重要な役割を果たすことが明らかになった。また、アラニン置換実験の結果、このモチーフのなかでも $^{1681}LQAGLRTL$ と $^{1693}PEIRRAIS$ の 2 カ所の配列が、特に重要であることが示唆された。この領域の配列は GLT 細胞で接合部に局在する α_{1C} サブユニットおよび α_{1S} サブユニットの間で良く保存されているのに対し、 α_{1A} サブユニットとの相同性は低かった。しかし骨格筋型 LTCC の α_{1S} サブユニットにおける同モチーフの相同部位を α_{1A} サブユニットに

置換しても、接合部への局在が正常に起きることが報告されている。これらの結果は、 α_{1C} サブユニットと α_{1S} サブユニットの接合部局在機構が、完全に同一ではないことを示唆している。

コンピュータシミュレーションによる立体構造予測では、この部位がそれぞれ異なる α -ヘリックスを形成していると予想されており、他のタンパク質との相互作用に関わる可能性もある。今後、このモチーフがどのように接合部への局在を制御しているかを明らかにすることで、心筋の興奮収縮連関の分子基盤を明らかにできる可能性がある。

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 2 件)

①Kashihara T, Nakada T, Shimojo H, Horiuchi-Hirose M, Gomi S, Shibazaki T, Sheng X, Hirose M, Hongo M, Yamada M., Chronic receptor-mediated activation of $G_{i/o}$ proteins alters basal t-tubular and sarcolemmal L-type Ca^{2+} channel activity through phosphatases in heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302: H1645-H1654. (2012) 査読あり
DOI: 10.1152/ajpheart.00589.2011

②Hirose M, Takeishi Y, Niizeki T, Nakada T, Shimojo H, Kashihara T, Horiuchi-Hirose M, Kubota I, Mende U, Yamada M., Diacylglycerol Kinase ζ Inhibits Ventricular Tachyarrhythmias in a Mouse Model of Heart Failure, *Circ. J.*, 75: 2333-2342 (2011) 査読あり
DOI: 10.1253/circj.CJ-10-1213

[学会発表] (計 1 件)

①中田 勉, Bernhard E Flucher, 生 暁娜, 柏原俊英, 柴崎利英, 山田充彦. 心筋 L 型カルシウムチャネルの結合膜局在化モチーフの探索. 第 84 回日本薬理学会年会, 横浜 (2011 年 3 月 16 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 勉 (NAKADA TSUTOMU)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 70452141

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: