

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460294

研究課題名(和文)カルモジュリンによるL型Caチャンネルの活性制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)Ca²⁺ and calmodulin-dependent inactivation of the L-type Ca²⁺ channel and its mutants

研究代表者

蓑部 悦子 (Minobe, Etsuko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：00448581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：カルモジュリン(CaM)によるL型Caチャンネルの不活性化の分子機構について、CaMをリンクさせたチャンネル変異体を用いて、電気生理学的手法による解析を行った。チャンネル変異体は、Ca²⁺濃度に依存して不活性化し、Ca²⁺濃度を一定にした条件でもリンクCaMとは別に外部からCaMを付加することにより不活性化した。リンクCaMをCa²⁺非感受性に変えるとCa²⁺依存性の不活性化は失われたが、外部CaMによる不活性化は観察された。よって、複数のCaMがチャンネルに作用し、不活性化に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Calmodulin (CaM) binds to the channel directly and change channel activity in a Ca²⁺-dependent manner. We reported that the channel activity increases and decreases in a CaM-concentration-dependent manner. Based on our experiments, we propose a model for the regulation of Cav1.2 channel by two CaM binding sites, in which CaM binds to an activation site and then another CaM binds to an inactivation site. To test this hypothesis, we measured the channel activity of C-terminal deletion channel linked with CaM (CaM-linked-channel) and linked with Ca²⁺-insensitive CaM mutant (CaMmut-linked-channel), using the patch-clamp technique. In the whole-cell recording, the inactivation was diminished in CaMmut-linked-channel. In the inside-out recording, Ca²⁺-dependent inactivation was observed in the CaM-linked-channel, but not in the CaMmut-linked-channel. The CaM concentration-dependent inactivation was observed in both channels. These results support two-CaM binding site model.

研究分野：電気生理学、分子生物学

キーワード：カルシウムチャンネル カルモジュリン パッチクランプ法 inside-out カルシウムイオン ATP run-down リン酸化

1. 研究開始当初の背景

L型 Ca チャネルは、細胞内の Ca イオンにより制御されており、Ca²⁺濃度に依存した不活性化 (Ca²⁺-dependent inactivation: CDI) 現象が知られている。この調節機構の主因子がカルモジュリン (CaM) である。CaM は 4 つの Ca²⁺結合部位 (EF-hand モチーフ) をもち、細胞内 Ca²⁺濃度の変化を受けてチャネル活性を調節する。しかし、その分子的機序は明らかになっていない。CaM の結合部位については、チャネル C 末端部に IQ モチーフがあるが、それ以外にも複数の親和性の高い部位が報告されており、チャネル変異体を用いた解析が進行中である。

Mori et al. (2004) は、チャネル C 末端部アミノ酸 1671 番以降を除いた変異体 (C-terminal deletion) と、さらに CaM を結合させた変異体 (C-terminal deletion linked CaM) を作成し、電気生理学的手法の一つである whole-cell clamp 法により解析した。その結果、Ca チャネルの CDI は 1 分子の CaM により調節されており、細胞内の Ca²⁺濃度の変化が、CaM とチャネルの結合関係を変化させることが示された。

一方、我々の研究では、inside-out 法を用いた解析から、Ca チャネルは Ca²⁺濃度依存性の調節に加えて、CaM 濃度依存性の調節をうけることを見出した。また、チャネル断片ペプチドと CaM の結合実験 (pull-down assay) をもとに、複数の CaM が同時に作用する可能性を示した。

Inside-out 法ではテスト溶液を任意に変えることが可能である。CaM 濃度を一定にした条件で、チャネルの活性は Ca²⁺濃度に依存して上昇、下降の 2 相性を示す。また Ca²⁺濃度を一定にした条件でも、チャネルの活性は CaM 濃度に依存して上昇、下降の 2 相性を示す。これらの調節機構を説明するために、我々は 2 分子の CaM が活性化サイトと不活性化サイトの 2 つの結合部位に結合し作用すると仮定した 2 サイトモデルを提唱した [Kameyama et al., Shao et al., Minobe et al., 2014: 雑誌論文, 学会発表,]。これまでに他研究室から報告されたモデルでは、1 分子の CaM が Ca²⁺/CaM になり、チャネルを不活性化に導くとされており、複数の CaM による調節の可能性について検討されていない。不活性化状態のチャネルと CaM の結合様式については、チャネル C 末端領域での変化を示したモデルと、チャネル N 末端と C 末端を繋ぐ様式のモデルが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、電気生理学的手法を用いて、CaM によるチャネルの調節機構を解明することを目的とした。Ca²⁺非感受性 CaM 結合チャネルの活性を Inside-out 法 (cell-free 系) で記録し、Ca²⁺依存性の不活性化と CaM 濃度依存性の不活性化について調べる。Whole-cell clamp 法での解析結果との対応づけを行うことにより、CaM の作用機序について検討する。

3. 研究の方法

HEK293 細胞に、Ca チャネル (Cav1.2) の、2a, 2 サブユニットを共発現させ、whole-cell clamp 法と inside-out 法で活性を記録する。サブユニットは、野生型、1671 番アミノ酸以降を除いた変異体 (C-terminal deletion: 1C)、1C にグリシン鎖を介して CaM をリンクさせた変異体 (C-terminal deletion linked CaM: 1C CaM)、Ca²⁺非感受性 CaM をリンクさせた変異体 (1C CaMmut) を使用した。各チャネルサブユニットのプラスミドは、Mori et al. により作成されたもの [Mori et al., (2004) Science] を改変して使用した。チャネルの発現効率は、プラスミドに組み込まれた蛍光タンパク GFP により確認した。CaM は、HEK293 からクローニングし、大腸菌 BL21 で合成した後、疎水性カラムを用いてゲル濾過精製した。これまでの研究をふまえ、基準となるチャネル活性は、1 μM CaM、3 mM ATP、80 nM Ca²⁺に調整したテスト溶液 (細胞内液に相当) で測定した。Inside-out の状態 (cell-free 系) でチャネルの活性を維持するためには CaM と ATP が必須である。

以下の実験を行った。

(1) チャネルと CaM を繋ぐグリシン鎖の長さについての検討：
先行研究 [科研費課題 2009-2010] から、48 残基のグリシン鎖では、CDI はあるが、CaM 濃度依存性の不活性化が見られず、72 残基のグリシン鎖では、リンクした CaM のみでは CDI が見られず、CaM 濃度依存性の不活性化はあるという結果を得ている。そのため、リンクした CaM により CDI がおき、かつ CaM 濃度依存性の不活性化のある適当な長さのグリシン鎖を設定した。

(1) Ca²⁺非感受性 CaM をリンクさせた変異体 (1C CaMmut) の作成：
CaM の 4 つの Ca²⁺結合部位のうち、N 末端側 2

か所に変異を加えた N-lobe 変異体 (CaM12)、C 末端側 2 か所に変異を加えた C-lobe 変異体 (CaM34)、全てに変異を加えた Ca²⁺非感受性変異体 (CaM1234) を作成した。

(2) Whole-cell clamp 法による解析:
CDI を解析するために、Ba²⁺電流と Ca²⁺電流を測定した。

(3) Ca²⁺濃度とチャネル活性の関係:
Inside-out 法で、野生型、変異体チャネルの Ca²⁺依存性不活性化について調べた。
テスト溶液の Ca²⁺濃度を変え (0, 80 nM, 2 μM, 10 μM)、CDI を検討した。活性を安定させるために 3 mM ATP 存在下で実験を行った。

(4) CaM 濃度とチャネル活性の関係:
Inside-out 法で、野生型、変異体チャネルの CaM 濃度依存性不活性化について調べた。テスト溶液の CaM 濃度を変え (0, 1 μM, 10 μM)、CaM 依存性の不活性化を検討した。活性を安定させるために 3 mM ATP 存在下で実験を行った。

(5) ATP の作用について:
以前に ATP の作用はリン酸化を介するものではなく、チャネルに直接結合することによって、CaM の作用を補助していることを報告した [Feng et al., 2014: 雑誌論文, Feng et al., 2013, Kameyama et al., 2014: 学会発表, ,]。さらにフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸により、野生型チャネルに対する ATP の作用は代替されたが、C-terminal deletion チャネルでは、その効果は見られなかった [科研費課題 2011-2012]。本研究では、ATP の作用を更に検討するために、PP2A 阻害剤 (500 nM fostriecin) と PP2B 阻害剤 (1 μM cyclosporine A + 1 μM cyclophilin A) を用いて、チャネル活性に対する影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 変異体 1C CaM のグリシン鎖の長さを Inside-out 法で検討した。野生型チャネル 1C は inside-out の状態にすると、数分のうちにその活性が減衰、消失する。それに対して、1C CaM は inside-out 後も、一定の活性を保つ。これは、1C では inside-out の後、チャネルから CaM が解離し、その活性が維持されないのに対し、1C CaM では、inside-out 後もリンクした CaM がチャネルに作用することを示唆する。

1C、1C、60 グリシン鎖の 1C CaM、72 グリシン鎖の 1C CaM において、高濃度 CaM の付加によりチャネルの活性が抑制された。12 グリシン鎖と 48 グリシン鎖の 1C CaM では高濃度 CaM によるチャネルの活性の変化はなかった。1C、1C、72 グリシン鎖の 1C CaM では、CaM 付加なしでは活性は見られなかった。以上の結果から、CaM 濃度依存性の抑制と Ca²⁺濃度依存性の抑制がみられる 1C CaM のグリシン鎖の長さは 60 残基であった。

(2) 1C CaM の CaM の Ca²⁺結合部位に変異を加え、チャネル活性への影響を whole-cell clamp 法で検討した。チャネルの不活性化の程度は以下ようになった。1C = 1C = 1C CaM = 1C CaM12 > 1C CaM34 > 1C CaM1234。この結果から、チャネルの不活性化には CaM の C-lobe への Ca²⁺の結合がより重要であることが示唆された [Kawaji et al., 2016: 学会発表]。

(3) Inside-out 法で Ca²⁺濃度の変化によるチャネルへの影響を調べた。1C CaM は、2 μM、10 μM と Ca²⁺濃度が高くなるにつれてチャネルの活性が抑制された。3 つの 1C CaMmut では、Ca²⁺濃度の変化によるチャネル活性への影響はなかった。この結果から、チャネルの不活性化には全ての CaM の Ca²⁺結合部位に Ca²⁺が結合することが必須であることが示唆された。

(4) Inside-out 法で CaM 濃度の変化によるチャネルへの影響を調べた。1C CaM、1C CaM12、1C CaM1234 は、10 μM CaM によりチャネル活性の抑制がみられた。1C CaM34 は CaM 濃度の変化によるチャネル活性への影響はなかった。CaM 濃度依存性の不活性化は、複数の CaM による調節モデルを支持する [袁部 et al., 2015: 学会発表]。1C CaM34 に対する高濃度 CaM の作用については今後の検討が必要である。

(5) Ca チャネルの C 末端にはフォスファターゼ (PP2A, PP2B) が結合しており、チャネルの活性制御に関与すると考えられている [Xu et al., 2015: 雑誌論文]。先行研究では、Inside-out の状態で CaM + ATP によりチャネルの活性が維持されることを報告した [科研費課題 2011-2012]。さらに ATP はオカダ酸で代替できることを報告した。そこでより特異的なフォスファターゼ阻害

剤を用いて ATP の作用について検討した。CaM + PP2A 阻害剤でチャネルの活性は維持され、CaM + PP2B 阻害剤ではチャネルの活性は失われた。この結果は野生型チャネル 1C でのみ認められ、C-terminal deletion 変異体では見られなかった。よって、チャネル C 末端部に結合している PP2A がチャネルを脱リン酸化することにより CaM の作用が失われることが示唆された。リン酸化と CaM の作用の関係については、多くの報告があるので、引き続き検討を要する [Lu et al., Xu et al., 2015: 学会発表,]。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

J Xu, L Yu, E Minobe, L Lu, M Lei, M Kameyama. PKA and phosphatases attached to the Cav1.2 channel regulate channel activity in cell-free patches. American Journal of Physiology Cell Physiology. 査読有. Vol.310, No.2, 2016, pp.C136-41. DOI:10.1152/ajpcell.00157.2015

Y Sun, J Xu, E Minobe, S Shimoara, L Hao, M Kameyama. Regulation of the Cav1.2 cardiac channel by redox via modulation of CaM interaction with the channel. Journal of Pharmacological Sciences. 査読有. Vol.128, No.3, 2015, pp.137-143. DOI:10.1016/j.jphs.2015.06.003

S Liu, J Xu, E Minobe, Q Gao, R Feng, M Zhao, F Guo, L Yang, L Hao, M Kameyama. Nucleotides maintain the activity of Cav1.2 channels in guinea-pig ventricular myocytes. Biochemical and Biophysical Research Communication. 査読有. Vol.460, No.3, 2015, pp.813-818. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.03.111

M Kameyama, E Minobe, J Xu, D Han, H Asmara, A Kameyama, R Feng, S Liu, L Hao. Regulation of L-type (Cav1.2) Ca²⁺ channels by calmodulin and ATP. Nihon Yakurigaku Zasshi. 査読無. Vol.144, No.5, 2014, pp.222-226.

D Shao, M Zhao, J Xu, R Feng, F Guo, H Hu, X Sun, Q Gao, G He, W Sun, H Wang, L Yu, S Liu, Y Zhu, E Minobe, T Zhu, M Kameyama, L Hao. The individual N- and C-lobes of calmodulin tether to the Cav1.2 channel and rescue the channel activity from run-down in ventricular myocytes of guinea-pig heart. FEBS Letters. 査読有. Vol.588, No.21, 2014,

pp.3855-61.

DOI:10.1016/j.febslet.2014.09.029

E Minobe, S Maeda, J Xu, L Hao, A Kameyama, M Kameyama. A new phosphorylation site in cardiac L-type Ca²⁺ channels (Cav1.2) responsible for its cAMP-mediated modulation. American Journal of physiology Cell Physiology. 査読有. Vol.307, No.11, 2014, pp.C999-C1009.

DOI:10.1152/ajpcell.00267.2014

R Feng, J Xu, E Minobe, A Kameyama, L Yang, L Yu, L Hao, M Kameyama.

Adenosine triphosphate regulates the activity of guinea pig Cav1.2 channel by direct binding to the channel in a dose-dependent manner. American Journal of physiology Cell Physiology. 査読有. Vol.306, 2014, pp.C856-864.

DOI:10.1152/ajpcell.00368.2013.

W Sun, R Feng, H Hu, F Guo, Q Gao, D Shao, D Yin, H Wang, X Sun, M Zhao, E Minobe, Y Sun, G Jiao, M Kameyama, L Hao. The Ca²⁺-dependent interaction of calpastatin domain L with the C-terminal tail of the Cav1.2 channel. FEBS Letters, 査読有. Vol.588, No.5, 2014, pp.665-671.

DOI:10.1016/j.febslet.2014.01.019

L Yang, J Xu, E Minobe, L Yu, R Feng, A Kameyama, K Yazawa, M Kameyama.

Mechanisms underlying the modulation of L-type Ca²⁺ channel by hydrogen peroxide in guinea pig ventricular myocytes. Journal of physiological Sciences. 査読有. Vol.3, 2013, pp.419-426.

DOI:10.1007/s12476-013-0279-2

G He, F Guo, T Zhu, D Shao, R Feng, D Yin, X Sun, H Hu, A Hwang, E Minobe, M Kameyama, L Hao. Lobe-related concentration- and Ca²⁺-dependent interactions of calmodulin with C- and N-terminal tails of the Cav1.2 channel. Journal of physiological Sciences. 査読有. Vol.63, 2013, pp.345-353.

DOI:10.1007/s12576-013-0270-y

[学会発表](計 13 件)

K Kawaji, E Minobe, M Mori, M Kameyama. Two calmodulin binding site model for the regulation of Cav1.2 channel. 日本生理学会大会

2016.3.22-24. 札幌コンベンションセンター (北海道 札幌市)

L Lu, M Mei, J Xu, E Minobe, K Yazawa, M Kameyama. Mechanisms underlying PKA-mediated facilitation of cardiac Cav1.2 channels. 西日本生理学会 2015.10.9-10. 久留米大学筑紫会館イベントホール (福岡県 久留米市)

蓑部 悦子, 森 誠之, 亀山 正樹 Cav1.2 型チャンネル C 末端遠位部切断変異体に対するカルモジュリンと ATP の作用 西日本生理学会 2015.10.9-10. 久留米大学筑紫会館イベントホール (福岡県 久留米市)

J Xu, E Minobe, Y Sun, M Lei, K Yazawa, M Kameyama. PKA-mediated facilitation of cardiac Cav1.2 channel through uncovering calmodulin binding sites by distal C-terminus of $\alpha 1c$ subunit. 日本生理学会大会 2015.3.21-23. 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県 神戸市)

Y Sun, J Xu, E Minobe, S Shimoara, L Hao, M Kameyama. Regulation of cardiac Cav1.2 channel by redox via modulation of of CaM interactin with channel. 日本生理学会大会 2015.3.21-23. 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県 神戸市)

D Shao, M Zhao, 何 桂林, 郭 鳳, L Lu, 蓑部 悦子, 徐 建軍, 亀山 亜砂子, T Zhu, L Hao, 亀山 正樹. Cav1.2 Ca^{2+} チャンネルと CaM の相互作用の分子機構. 生理学研究学会 2014.9.4-5. 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター (愛知県 岡崎市)

D Shao, J Xu, M Zhao, E Minobe, L Hao, M Kameyama. Lobe-specific interaction of calmodulin with C-terminal tails of cardiac Cav1.2 channel. 西日本生理学会 2014.10.23-24. 琉球大学研究者交流施設 50 周年記念館 (沖縄県 那覇市)

R Feng, S Liu, J Xu, E Minobe, A Kameyama, L Hao, M Kameyama. Properties of the ATP-binding site responsible for regulation of cardiac Ca^{2+} channels. 西日本生理学会 2013.10.18-19. 産業医科大学ラマツイーニホール小ホール (福岡県 北九州市)

E Minobe, D Han, H Asmara, R Feng, J Xu, M Kameyama. Regulation and molecular mechanisms of Cav1.2 channel by calmodulin and ATP. 日本生理学会大会 2014.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパ

ス (鹿児島県 鹿児島市)

S Liu, J Xu, E Minobe, A Kameyama, Li Hao, M Kameyama. The role of nucleotides in regulation of cardiac Cav1.2 channel. 日本生理学会大会 2014.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県 鹿児島市)

M Kameyama, R Feng, S Liu, E Minobe, J Xu, A Kameyama, H Liying. Regulation of L-type Cav1.2 Ca^{2+} channel by ATP. 日本生理学会大会 2014.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県 鹿児島市)

D Shao, J Xu, M Zhao, Y Sun, E Minobe, G He, R Feng, S Xuefer, F Guo, M Kameyama, L Hao. The lobe-specific interaction of calmodulin with the cardiac Cav1.2 channel. 日本生理学会大会 2014.3.16-18. 鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県 鹿児島市)

M Kameyama, E Minobe, J Xu, D Han, H Asmara, A Kameyama, R Feng, S Liu, L Hao. Regulation of L-type (Cav1.2) Ca^{2+} channels by calmodulin and ATP. 日本薬理学会年会 2014.3.19-21. 仙台国際センター (宮城県 仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓑部 悦子 (MINOBE, Etsuko)
鹿児島大学・医歯学域系・講師
研究者番号: 00448581

(2) 研究協力者

森 誠之 (MORI, Masayuki)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 80342640