

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840032

研究課題名(和文) 電位依存性カルシウムチャネルによる活動電位依存的遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Regulation of gene transcription by the voltage gated calcium channels activation.

研究代表者

黒川 竜紀 (Kurokawa, Tatsuki)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40527701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現制御の破綻が神経疾患発病の一因であると考えられおり、活動電位と遺伝子発現との関係についての詳しいメカニズム解明は、脳の発達や可塑性の理解を深める点で重要な課題である。最近、電位依存性Ca²⁺チャネルの4サブユニットが活動電位に伴い核に移行し、遺伝子発現を抑制する新しい経路が同定された。本研究では、この機構を解明することにより、電位依存性Ca²⁺チャネルによる遺伝子発現制御について新たな知見を得ることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Recently, our laboratory showed a new signaling pathway that the voltage gated calcium channels (VGCC) 4 subunit accumulates in the nucleus and acquires a gene regulatory function under membrane depolarization (Tadmouri et al EMBO J., 2012). These findings demonstrate that an intact VGCC subunit acts as a repressor recruiting platform to control neuronal gene expression. The aim of this project is to resolve the mechanism of a new and important signaling pathway that links the VGCC activation to gene transcription.

研究分野：生化学

キーワード：イオンチャネル カルシウム 膜電位

1. 研究開始当初の背景

脳の機能や筋肉の収縮など多くの生体現象は、膜電位が信号として使われている。この膜電位変化を介した細胞内への信号伝達は、イオンチャネル等の膜タンパク質の働きに支えられている。応募者が所属する研究室では長年、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (voltage-gated Ca^{2+} channel: VGCC) の研究を行ってきた。VGCC は、生体膜電位の変化に応じてイオン透過孔の開閉を調節し、選択的に Ca^{2+} を透過させる。VGCC は、 α_1 、 α_2/δ 、 β および γ サブユニットから構成されている。 α_1 サブユニットには 10 種類のアイソフォームが存在する。その中で P/Q 型 Ca^{2+} チャネル α_{1A} サブユニット (Cav2.1) は、脳や脊髄や神経筋接合部に発現し、神経伝達に関わっている。また、細胞質側からの α_1 サブユニットに会合する β サブユニットは VGCC の活性に必要不可欠なサブユニットであり、 α_1 サブユニットの小胞体からの形質膜への輸送に重要である。

最近、応募者が所属する研究室では、 β_4 サブユニットが活動電位と遺伝子発現を共役する以下のような新しいシグナル経路を見出した(図1)(Tadmouri et al. (2012) *EMBO*

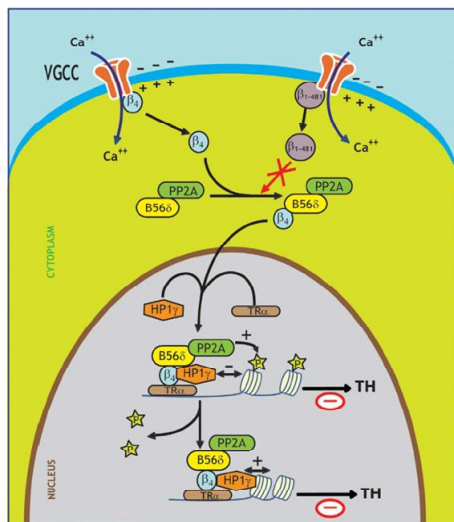


図1: β_4 サブユニットによる遺伝子発現制御

Tadmouri et al. (2012) *EMBO J.* 31:3730-3744より転載
J. 31:3730-3744)。

- 1) 活動電位により β_4 サブユニットが α_{1A} サブユニットから解離した後、protein phosphatase 2A (PP2A) と細胞質で結合する。
- 2) β_4 /PP2A 複合体が核に移行する。
- 3) 核内で β_4 /PP2A 複合体が転写因子甲状腺ホルモン受容体 (TR α) とヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1 γ) と結合することによりチロシン水酸化酵素 (TH) の遺伝子発現を抑制する。
- 4) さらに PP2A がヒストン H3 を脱リン酸化することによりヘテロクロマチン構造が形成されることにより、TH 遺伝子の発現が抑制される。VGCC による遺伝子発現制御は、 Ca^{2+} によるシグナル伝達の他にも、 α_{1A}

サブユニットの C 末端領域や β_4 サブユニットのスプライズバリエーション β_{4C} などによる制御も報告されている。しかし、 β_4 サブユニットを介した活動電位による遺伝子発現制御は、VGCC 活性に必要不可欠な β_4 サブユニットがその役割を変え、新しい遺伝子発現調整因子になるという点でまったく新しい機構である。

2. 研究の目的

遺伝子発現制御の破綻が神経疾患発病の一因であると考えられおり、活動電位と遺伝子発現との関係についての詳しいメカニズム解明は、脳の発達や可塑性の理解を深める点で重要な課題である。最近、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの β_4 サブユニットが活動電位に伴い核に移行し、遺伝子発現を抑制する新しい経路が同定された。しかし、活動電位に伴う α_1 サブユニットからの β_4 サブユニットの解離について、詳細な機構はまだ分かっていない。本研究では、この機構を解明することにより、電位依存性 Ca^{2+} チャネルによる遺伝子発現制御について新たな知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 2 つの課題について明らかにすることにより、 β_4 サブユニットによる遺伝子制御の詳細な機構の解明に繋げる。

課題 1) 膜電位変化による α_{1A} サブユニットからの β_4 サブユニット解離現象の可視化

活動電位による α_{1A} からの β_4 の解離について、イメージングにより直接確認する。TIRF 観察は、エバネッセント光を励起光とすることにより、カバーガラスから数 100 nm とごく近傍の蛍光分子のみを光らせる方法である。これにより、 α_{1A} サブユニット近傍のみの現象を観察することが可能になる。HEK293 細胞に β_4 サブユニットのみを発現させると、 β_4 は核に局在するが、 α_{1A} と β_2/β_3 サブユニットと共発現させると核への局在は見れなくなる。これは、 β_4 が膜タンパク質である α_{1A} に結合するためであると考えられる。そこで本実験では、ラットの β_4 に蛍光タンパク質 EGFP を融合させた β_4 -EGFP と α_{1A} と β_2/β_3 サブユニットを HEK293 細胞に共発現させ、脱分極刺激による蛍光変化を TIRFM で観察する。脱分極刺激は、140 mM KCl を含む溶液で行う。もし、脱分極刺激により β_4 が α_{1A} より解離するならば、蛍光強度の減少が見られるはずである。 β_4 -EGFP や α_{1A} 、 β_2/β_3 サブユニットはすでにクローニング済みであり、すぐに使える状態である。上述の実験では、脱分極刺激に高濃度の KCl を用いた。しかし、この方法だと膜電位の詳細な制御は出来ないため、より詳細な膜電位の制御にはパッチクランプ法を用いるべきである。しかし、当研究室にはパッチクランプ法と TIRF

観察が同時に出来る装置がないため、別の方法が必要である。そこで本実験では、パッチクランプ法とFRET法を同時に行い、 α_4 の $1A$ からの解離を観察する。本実験では、このFRET観察にパッチクランプ法を組み合わせる。もしFRETが観察出来ない場合は、CFPを α_4 サブユニットの結合部位であるI-IIリンカーの位置に導入するなどFRETに最適な位置を探索する。

課題2) α_4 サブユニット解離機構の解明

α_4 の解離機構について、 $1A$ から流入した Ca^{2+} の影響や $1A$ の構造変化などが考えられる。主にこの2点について、 $1A$ の機能を阻害する変異体や阻害剤を用いて検証する。 1 サブユニットは、6回膜貫通領域(S1-S6)の構造単位が4回繰り返す構造を有している(図2)。各構造単位のS5とS6領域が Ca^{2+} を選択的に透過させるポア領域を、S1-S4領域は電位センサー領域を形成する。膜電位変化を電位センサー領域が感知するとそのシグナルがポア領域に伝達され、イオンの透過が制御されると考えられている。特にS4のアルギニン残基は、膜電位感知に重要である。

α_4 サブユニットが結合する $1A$ サブユニットのI-IIリンカーは、前半領域は α -helix構造をとることから、ポア領域のS6からI-IIリンカーの前半までは一続きの α -helixとして連動していると考えられている。したがって、脱分極による $1A$ サブユニットの構造変化がI-IIリンカーを介して、 α_4 サブユニ

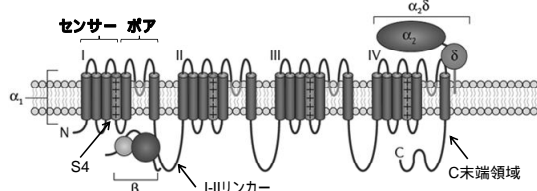


図2: 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの構造

Dolphin (2012) *Nat. Rev. Neurosci.* 13:542-555より改変

ットに伝わり、解離する可能性がある。

この点を検証するため、本実験では、S4のアルギニン残基に変異を入れて、センサーの動きを止めるミュータントを作製し、課題1)で確立した方法により α_4 の $1A$ からの解離を観察する。このミュータントの他にも、I-IIリンカーの前半領域の α -helix構造に数個グリシン残基を挿入しS6との連動を阻害したミュータントについても、解析を行う。また、変異体に加えて、P/Q型 Ca^{2+} チャネルを阻害する α -agatoxin IVAも使用する。この阻害剤は、電位センサーに結合することで、チャネルを阻害することが報告されている。課題1)で観察方法が確立出来なかった場合は、 α_4 サブユニットとPP2Aのサブユニット間の相互作用を共免疫沈降法に評価する。高KCl濃度の場合、この2つの相互作用が強く

なることが報告されている。もしS4ミュータントで相互作用が強くならなければ、 α_4 の解離に $1A$ サブユニットの構造変化が関連していると示唆される。

4. 研究成果

平成26年度は、膜電位変化による $1A$ サブユニットからの α_4 サブユニット解離現象の可視化を目指した。まず、全反射蛍光顕微鏡(TIRFM)による α_4 サブユニットの観察を行った。ラット α_4 に蛍光タンパク質EGFPを融合させた α_4 -EGFPと $1A$ と $2/$ サブユニットをHEK293細胞に共発現させ、140 mMのKClを含む溶液による脱分極刺激を与えた時の蛍光変化をTIRFMで観察した。脱分極刺激により α_4 が $1A$ より解離するならば、蛍光強度の減少が見られるはずであったが、蛍光強度の変化は観察することが出来なかった。これは、KClでは脱分極刺激としては不十分であったためと考えられる。次に、パッチクランプ法と蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法による観察法の確立を目指した。まず $1A$ サブユニットのC末端領域にCFPを、 α_4 サブユニットにYFPを付けることにより、FRET観察を試みたが、この組合せではFRETが観察出来なかった。現在CFPを α_4 サブユニットの結合部位であるI-IIリンカーの位置に導入するなどFRETに最適な位置を探索している。

平成27年度では、 α_4 に蛍光タンパク質EGFPを融合させた α_4 -EGFPと $1A$ と $2/$ サブユニットをHEK293細胞に共発現させ、脱分極刺激による蛍光変化を全反射蛍光顕微鏡で観察した。すると、脱分極刺激による蛍光の減少が見られたことから、脱分極刺激による $1A$ サブユニットからの α_4 サブユニット解離を観察することに成功した。また、この現象は細胞外の Ca^{2+} がない条件では観察することが出来ないことから、 α_4 サブユニット解離には $1A$ サブユニットからの Ca^{2+} 流入が必要であることも確認することが出来た。

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6件)

Mori Y, Takahashi N, Polat OK, Kuroakwa T, Takeda N, Inoue M. Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation. *Pflugers Archive-European Journal of Physiology* 468, 85-97 (2016)
査読有

DOI: 10.1007/s00424-015-1716-2

Ogawa N, Kurokawa T, Fujiwara K, Polat OK, Badr H, Takahashi N, Mori Y.

Functional and structural divergence in human TRPV1 channel subunits by oxidative cysteine modification. *Journal of Biological Chemistry* 291, 4197-4210 (2015) 査読有
DOI:10.1074/jbc.M115.700278

Takaya J, Mio K, Shiraishi T, Kurokawa T, Otsuka S, Mori Y, Uesugi M. A potent and site-selective agonist of TRPA1. *Journal of the American Chemical Society* 137, 15859-15864 (2015) 査読有
DOI: 10.1021/jacs.5b10162

Kurokawa T, Mori Y. Sensing of redox stress via TRP channels. *Anti-aging medicine* 11, 705-712 (2015) 査読有

Mori MX, Itsuki K, Hase H, Sawamura S, Kurokawa T, Mori Y, Inoue R. Dynamics of receptor-operated Ca^{2+} currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P₂-PLC signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology* 6, 22 (2015) 査読有
DOI: 10.3389/fphar.2015.00022

黒川竜紀、森泰生、カチオン・カルシウムチャネルの農薬ターゲットとしての実際と可能性、*日本農薬学会誌* 40、68-74 (2015)

[学会発表](計 4件)

黒川竜紀、内山誠、木村祐、森恵美子、清中茂樹、森泰生、ジアミド型化合物による生物種選択的リアノジン受容体活性化機構の分子基盤、第93回日本生理学会大会、2016年03月22日~2016年03月24日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Makoto Uchiyama, Tatsuki Kurokawa, Tasaku Kimura, Emiko Mori, Shigeki Kiyonaka, Yasuo Mori, Gating mechanism of diamide insecticide-induced Ca^{2+} release, *Biophysical Society 60th Annual Meeting*, 2016年02月27日~2016年03月02日, Los Angeles Convention Center (USA)

黒川竜紀、清中茂樹、中田栄司、遠藤政幸、小山祥平、森恵美子、矢野将太郎、鈴木勇輝、日高久美、川田正晃、佐藤主税、杉山弘、森井孝、森泰生、DNA origami を用いたイオンチャネル集積化法の開発、第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月01日~2015年12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

木村祐、黒川竜紀、犬飼佳代、坂田和之、森恵美子、清中茂樹、森泰生、ジアミド型化合物における昆虫種選択的生物活性の分子基盤、第87回日本生化学会大会、2014年10月16日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ
<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 竜紀 (KUROKAWA, Tatsuki)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 405277041