

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31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390059

研究課題名（和文）：心筋Caチャンネルの調節機構間相互作用

研究課題名（英文）：An interrelation among regulatory mechanisms of cardiac Ca²⁺ channels

研究代表者：亀山 正樹 (Kameyama Masaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60150059

研究成果の概要（和文）：

L型CaチャンネルのCaMおよびリン酸化による調節について検討した。CaMはチャンネルC末部のpreIQとIQ領域に1分子ずつ結合した。PKAによるリン酸化部位は、既存のSer1927（モルモット）に加えて、Ser1574とSer1626とが新たに判明した。CaMKIIによるPreIQ領域にあるThr1603のリン酸化によりCaM作用が増強され、両調節機構の間にクロストークが存在することが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated regulation of L-type Ca²⁺ channels by calmodulin (CaM) and phosphorylation. CaM bound to preIQ and IQ regions in the C-terminal of the channel. PKA phosphorylated Ser1574 and Ser1626 as well as Ser1927 (guinea-pig). The facilitatory effect of CaM was enhanced by CaMKII-mediated phosphorylation of Thr1603, suggesting a cross-talk between the CaM's effect and channel phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	6,400,000	1,920,000	8,320,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜、チャンネル、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

電位依存性L型Ca²⁺チャンネルは、神経、筋、分泌組織などに広く分布して、細胞機能に重要な役割を果たしており、Ca²⁺/カルモジュリン(CaM)系、cAMP依存性蛋白キナーゼ(PKA)やCa²⁺/CaM依存性蛋白キナーゼII型(CaMKII)などによる蛋白リン酸化、G

蛋白質の直接作用（促進及び抑制）などで複雑に調節されている。心筋L型Ca²⁺チャンネルに関しては、PKAやCaMKIIなどのリン酸化による調節と細胞内Caイオンによる調節が最も重要である。しかし、これらの調節機構の分子メカニズムや調節機構間の相互作用については、不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

本計画では、(1) L型 Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性促進 (CDF) と Ca^{2+} 依存性不活性化 (CDI) について、 Ca^{2+} センサーである CaM のチャネルにおける作用部位を同定する。(2) L型 Ca^{2+} チャネルの調節に関わる PKA および CaMKII のリン酸化部位を同定する。(3) CaM の作用とチャネルリン酸化とのクロストークを明らかにし、両機構間の相互作用を解明する、の3点を研究目的として電気生理学および分子生物学的実験を行った。

3. 研究の方法

(1) 単離心筋細胞の調整

モルモット心臓を麻酔下で切離し、ランゲンドルフ灌流下で、コラゲナーゼにより心室筋細胞を解離させた。単離心筋細胞は、storage 液中に 4°C で保存した。Tyrode 液の組成は、(単位 mM) 135 NaCl, 5.4 KCl, 0.33 NaH_2PO_4 , 1 MgCl_2 , 5.5 glucose, 1.8 CaCl_2 , 10 Hepes で、NaOH で pH 7.4 に調整した。Storage 液の組成は、(単位 mM) 70 KOH, 50 glutamic acid, 40 KCl, 20 KH_2PO_4 , 20 taurin, 3 MgCl_2 , 10 glucose, 10 Hepes, 0.5 EGTA で、KOH で pH 7.4 に調整した。

(2) パッチクランプとデータ解析

単離心筋細胞にガラス管電極を吸着させ、cell-attached パッチおよび inside-out パッチ条件下で Ca^{2+} チャネル電流を記録した。電極内液(ピペット液)の組成は、50 (mM) BaCl_2 , 70 tetraethylammonium (TEA)-Cl, 0.5 EGTA, 0.003 Bay K 8644, 10 Hepes-CsOH buffer (pH 7.4) であった。Inside-out パッチ実験での細胞内液 (IO 液) の組成は、120 (mM) potassium aspartate, 30 KCl, 1 EGTA, 0.5 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 (free $[\text{Ca}^{2+}]$ は 80 nM), 10 Hepes-KOH buffer (pH 7.4) であった。得られた電流波形は、パソコンに保存し、off-line で解析した。

(3) GST 融合ペプチドの作成

Ca^{2+} チャネル α サブユニットの細胞内領域 (N末部、リピート I~IV 間にある3つの細胞内ループ [LI-II, LII-III, LIII-IV]、および C末部) の断片ペプチドと GST との融合ペプチドの発現ベクターを作成し、大腸菌に発現させ、グルタチオンビーズ法にて融合ペプチドを精製した。

(4) その他の蛋白の調整

CaM, calpastatin (全長および L 領域)、CaMKII は遺伝子組み換え法により大腸菌に GST 融合蛋白として発現させ、グルタチオンビーズに結合させて精製した後、Precission

プロテアーゼ (GE Healthcare 社) で目的蛋白を切断して遊離させた。PKA は、Sigma-Aldrich 社の製品を使用した。

(5) Pull-down 法

グルタチオンビーズに固定された GST 融合ペプチドと CaM を混合し、遠心処理により遊離の CaM を除去した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、GST 融合ペプチドに結合した CaM を分離同定した。

4. 研究成果

(1) CaM の結合部位

チャネル断片の GST 融合ペプチドと CaM との結合を pull-down 法で調べた結果、CaM はチャネルの C 末部、N 末部、LI-II に結合する事が示された。さらに、CaM 濃度-結合量の関係を調べて CaM に対する親和性を検討した結果、親和性の高い順に、チャネル C 末部 > N 末部 > LI-II であることが判明した。

(2) CaM の C 末部への結合

上の結果に基づき、チャネル C 末部を近位部 (CT1)、中位部 (CT2)、遠位部 (CT3) に細分化して、それぞれの GST 融合ペプチドを作成し、CaM との結合を調べると、CaM は preIQ 領域と IQ 領域に結合することが判明した。CaM-チャネルペプチド結合の mol 比はほぼ 1 であり、CaM が preIQ、IQ 領域にそれぞれ 1 分子ずつ結合する事が示唆された。

(3) CaM とカルパスタチンの競合

カルパスタチンの L 領域ペプチド (CSL) が Ca^{2+} チャネルを部分的に活性化し、また、チャネル C 末部の IQ 領域に結合することが判明しているため、CaM とカルパスタチンの競合について検討した。パッチクランプの inside-out 条件下で、CSL は CaM のチャネル活性化作用を濃度依存的に阻害した。一方、pull-down 実験において、CSL は、CaM のチャネル IQ 領域への結合を競合阻害した。これらの結果は、CSL が CaM の IQ 領域結合を介するチャネル活性化において、部分アゴニストとして働いていることを示唆している。

(4) PKA のリン酸化部位

PKA のチャネル蛋白リン酸化については、当初、チャネル C 末部に幾つかの候補部位があるとの示唆が得られたが、チャネル C 末近位部 (CT1) の GST 融合ペプチドが凝集しやすく結果が不安定であった。そこで、GST-CT1 の可溶性向上に取り組み、安定に可溶化された GST-CT1 ペプチドを得ることに成功した。この CT1 と、CT2、CT3 の GST 融合ペプチドを用いて PKA によるリン酸化

を検討したところ、CT1 と CT2 がリン酸化された。

次いで、CT1 と CT2 にあるリン酸化可能部位をセリン（またはスレオニン）からアラニンに変異させえたチャンネル変異体を作成し、HEK 細胞に発現させ、フォルスコリン（アデニル酸シクラーゼ刺激薬）への応答を検討したところ、Ser1574、Ser1626 および Ser1927（モルモット Cav1.2 のアミノ酸番号）の変異でフォルスコリン応答が減弱した。これらの結果は、チャンネルの機能的リン酸化部位が複数あることを示唆している。

（5）チャンネルリン酸化と CaM 作用との相互作用

Ca チャンネルを inside-out パッチ法で記録し CaMKII を作用させると、CaM のチャンネル活性化作用が増強されることが判明している。そこで、CaMKII のリン酸化部位を点変異導入法により検索したところ、複数あるリン酸化部位の一つがチャンネル C 末部の preIQ 領域内の Thr1603 であることが判明した。Thr1603 を含む CT1 への CaM の結合を調べると、CT1 の CaMKII によるリン酸化処理により、CaM 結合が増加した。さらに、Thr1603 をアラニンに置換したチャンネル変異体では、CaM のチャンネル活性化作用の CaMKII に増強が消失した。これらの結果により、Ca チャンネルのリン酸化による調節と CaM の作用との間にはクロストークが存在することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者、連携研究者に下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

1. Minobe E, Asmara H, Saud ZA, and Kameyama M. Calpastatin domain L is a partial agonist of the calmodulin-binding site for channel activation in Cav1.2 Ca²⁺ channels. J Biol Chem 286(45): 39013-39022, 2011 (査読有り)
2. Asmara H, Minobe E, Saud ZA, Kameyama M. Interactions of calmodulin with the multiple binding sites of Cav1.2 Ca²⁺ channels. J Pharmacol Sci 112(4), 397-404, 2010 (査読有り)
3. Han DY, Minobe E, Wang WY, Guo F, Xu JJ, Hao LY, Kameyama M. Calmodulin- and Ca²⁺-dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca²⁺ channels in guinea-pig ventricular myocytes. J Pharmacol Sci 112(3), 310-319, 2010 (査読有り)
4. Guo F, Minobe E, Yazawa K, Asmara H, Bai

XY, Han DY, Hao LY and Kameyama M. Both N- and C-lobes of calmodulin are required for Ca²⁺-dependent regulations of Cav1.2 Ca²⁺ channels. Biochem Biophys Res Comm 391(2): 1170-1176, 2010 (査読有り)

5. Hao LY, Wang WY, Minobe M, Han DY, Xu JJ, Kameyama A, Kameyama M. The distinct roles of calmodulin and calmodulin kinase II in the reversal of run-down of L-type Ca²⁺ channels in guinea-pig ventricular myocytes. J. Pharmacol. Sci., 111(4): 416-425, 2009 (査読有り)
6. Wang WY, Hao LY, Minobe E, Saud ZA, Han DY, Kameyama M. CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin. J Physiol Sci, 59(4):283-90, 2009 (査読有り)

〔学会発表〕（計 19 件）

1. 楊磊、徐建軍、藪部悦子、封瑞、龜山亜砂子、矢沢和人、龜山正樹. モルモット心室筋細胞における L 型 Ca²⁺ チャンネルの過酸化水素による活性調節機構. 第 89 回日本生理学会大会、2012. 3. 29-31、松本
2. 藪部悦子、前田佐知子、徐建軍、はお麗英、封瑞、矢沢和人、龜山亜砂子、龜山正樹. Cav1.2 Ca²⁺ チャンネル C 末端部には、複数の機能的 A キナーゼリン酸化部位がある. 第 89 回日本生理学会大会、2012. 3. 29-31、松本
3. 藪部悦子、Hadhimulya Asmara, Zahangir A. Saud, 龜山正樹. Cav1.2 Ca²⁺ チャンネルの活性調節におけるカルパスタチンとカルモジュリンの競合作用. 第 89 回日本生理学会大会、2012. 3. 29-31、松本
4. Yang L, Xu J-J, Minobe E, Feng R, Kameyama A, Yazawa K, Kameyama M. CaMKII- dependent and independent facilitation of L-type Ca²⁺ channels by hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes. The 62th meeting of the Physiological Society of West Japan. 2011. 10. 14-15, Saga
5. Yang L, Xu J-J, Minobe E, Feng R, Kameyama A, Yazawa K, Kameyama M. Facilitation of L-type Ca²⁺ channels by hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research (SFRR)-Asia and The 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 2011. 8. 31-9. 4. Kagoshima
6. Minobe E, Mori MX, Kameyama M. Effect of Ca²⁺ and calmodulin on activity of

- calmodulin-linked Cav1.2 channel. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. J. Physiol. Sci. 61: S124, 2011. 3 (大震災のため誌上開催)
7. Xu J-J, Saud ZA, Liu Y, Yang L, Minobe E, Kameyama A, Yazawa K, Hao L-Y, Kameyama M. Both PKA-mediated phosphorylation and calmodulin interaction are required for basal activity of cardiac L-type Ca²⁺ channel. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. J. Physiol. Sci. 61: S122, 2011. 3 (大震災のため誌上開催)
 8. Xu J-J, Saud ZA, Liu Y, Yang L, Minobe E, Kameyama A, Yazawa K, Hao L-Y, Kameyama M. PKA-mediated phosphorylation modulates the interaction of calmodulin with cardiac Cav1.2 channels. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2010. 11. 25-28, Kagoshima
 9. Minobe E, Mori MX, Xu J-J, Kameyama M. Ca²⁺-dependent modulation in calmodulin-linked Cav1.2 channels. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2010. 11. 25-28, Kagoshima
 10. Minobe E, Mori MX, Kameyama M. Roles of calmodulin and the C-terminal tail of Cav1.2 channel in its activity. 第 87 回日本生理学会大会、2010. 5. 19-21、盛岡
 11. Asmara H, Minobe E, Saud ZA, Kameyama M. Multiple molecules of calmodulin bind to the Cav1.2 Ca²⁺ channel. The 60th meeting of the Physiological Society of West Japan. 2009. 11. 6-7, Fukuoka
 12. Kameyama M, Hao L-Y, Minobe E, Xu J-J, Han D-Y, Nie H-G, Saud ZA, Wang W-Y, Asmara H, Yazawa K. Regulation of Cav1.2 Ca²⁺ channels by Ca²⁺, calmodulin and CaMKII. IUPS Satellite Symposium on Ion channels: function, structure and physiology. 2009. 8. 2-4, Hiei/Kyoto.
 13. Asmara H, Minobe E, Saud ZA, Wang W-Y, Kameyama M. Multiple binding sites of calmodulin in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca²⁺ channel. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009. 7. 27-8. 1, Kyoto
 14. Han D-Y, Hao L-Y, Minobe E, Wang W-Y, Xu J-J, Kameyama M. Facilitatory and inhibitory effects of calmodulin on activity of Cav1.2 Ca²⁺ channel. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009. 7. 27-8. 1, Kyoto
 15. Minobe E, Saud ZA, Han D-Y, Asmara H, Wang W-Y, Hao L-Y, Kameyama M. Calpastatin domain L competes with calmodulin on IQ region of Cav1.2 channel. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009. 7. 27-8. 1, Kyoto
 16. Kameyama M, Hao L-Y, Minobe E, Xu J-J, Han D-Y, Nie H-G, Saud ZA, Wang W-Y, Asmara H. Ca²⁺ channels and cardiac functions. The 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009. 7. 27-8. 1, Kyoto
- [その他]
ホームページ等
URL:<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol2/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 亀山 正樹 (Kameyama Masaki)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：60150059
 - (2) 研究分担者
 矢沢 和人 (Yazawa Kazuto)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
 研究者番号：90212274
 蓑部 悦子 (Minobe Etsuko)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：00448581
 - (3) 連携研究者
 徐 建軍 (Xu Jian-jun)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：10581689
 - (4) 研究協力者
 亀山 亜砂子 (Kameyama Asako)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・客員研究員