

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：17701
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23790251
研究課題名(和文) カルモジュリンをリンクさせた変異体を用いたL型Ca <sup>2+</sup> チャンネルの活性調節機構の解析
研究課題名(英文) Properties of the L-type Ca <sup>2+</sup> channel and its mutants
研究代表者 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

## 研究成果の概要(和文)：

L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルとその変異体の活性をinside-outパッチ法を用いて比較し、カルモジュリン(CaM)による調節について検討した。野生型チャンネルは、CaM+ATPまたはCaM+オカダ酸で同程度の活性を示した。変異体チャンネルでは、ATPがチャンネルのslowな不活性化を抑制し、活性を維持するのに対し、オカダ酸による効果は認められなかった。このことからATPの作用はリン酸化に関連するものではないこと、オカダ酸は、変異体にはないチャンネルC末端遠位部による作用を抑制することが示唆された。

## 研究成果の概要(英文)：

Properties of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel and its mutants were explored using inside-out patch-clamp technique. Activity of these channels was induced by calmodulin plus ATP. A protein phosphatase inhibitor okadaic acid could substitute for ATP in wild-type channels, but it not in the mutant channels. It was suggested that the effects of ATP and okadaic acid, although apparently similar, were mediated by different mechanisms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

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、ATP、run-down、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルは、細胞内のCa<sup>2+</sup>イオンにより制御されており、それらの調節機構にはカルモジュリンの働きが必須である。カルモジュリンは4つのCa<sup>2+</sup>結合部位(EF-handモチーフ)をもち、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を受けてチャンネル活性を調節する。しかし、それらの分子機序の全体像は明らかになってい

ない。

Mori et al. (2004) は、チャンネルC末端部アミノ酸1671番以降を除いた変異体(C-term deletion channel)と、さらにカルモジュリンを結合した変異体(CaM linked C-term deletion channel)を作成し、電気生理学的手技の一つであるWhole-cell clamp法により解析した。これらのチャンネルを用い

て、我々はカルモジュリンによる L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの活性制御機構を検討した。その結果、チャンネルの活性化にはカルモジュリンの結合が必須であること、野生型ではカルモジュリンに加え ATP が必要であるのに対し、変異体ではカルモジュリンのみで活性を示すこと、活性の長期安定化には ATP が有効であることが示唆された [Minobe et al., 2011: 学会発表⑩]。

## 2. 研究の目的

本研究では、電気生理学的手法を用いてカルモジュリンによるチャンネルの調節機構を解明することを目的とした。野生型チャンネルと変異体チャンネルの活性を比較することにより、カルモジュリンの作用機序、それを修飾する因子について検討した。

## 3. 研究の方法

L 型 Ca チャンネル (Cav1.2) の  $\alpha$ 、 $\beta 2a$ 、 $\alpha 2\delta$  サブユニットを HEK293 細胞に共発現させ、パッチクランプ法を用いてチャンネル活性を解析した。Cell-attached mode でチャンネルのコントロール活性を測定し、inside-out mode でテスト溶液をチャンネルに付加し、その効果を相対比で求めた。 $\alpha$  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-term deletion channel: Cav1.2  $\Delta$ )、Cav1.2  $\Delta$  に 8 残基のグリシンを介してカルモジュリンを繋いだ変異体 (CaM-linked C-term deletion channel: Cav1.2  $\Delta$  CaM) を使用した。各チャン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 [Mori et al. (2004) Science]。チャンネルの発現効率、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。

カルモジュリンは HEK293 細胞からクロニングした DNA をもとに、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。

これまでの研究結果から、基準となる活性は  $1 \mu\text{M}$  カルモジュリン、 $3 \text{mM}$  ATP、 $80 \text{nM}$   $\text{Ca}^{2+}$  に調整したテスト溶液を inside-out で付加することにより測定した。

以下の観察を行った。

(1) ATP とオカダ酸によるチャンネル活性に与える影響の比較：

カルモジュリンと共に、 $3 \text{mM}$  ATP または  $1 \mu\text{M}$  オカダ酸を付加し、チャンネル活性を比較し

た。さらに ATP とオカダ酸を同時に加え、チャンネル活性を解析した。

(2) 不活性化状態 (run-down) からの回復と有効因子について：

cell-attached の状態から cell-free (inside-out) にすると、チャンネルの活性は 1-3 分のうちに消失する (run-down)。そこで、inside-out から 5 分後にテスト溶液を付加し、チャンネルの不活性化状態からの回復を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 野生型チャンネルは、カルモジュリン + ATP、カルモジュリン + オカダ酸ともに同程度の活性を示した。ATP とオカダ酸の相乗効果はなかった。変異体チャンネル (Cav1.2  $\Delta$  と Cav1.2  $\Delta$  CaM) は、オカダ酸では、ATP で観察されるような活性維持効果が見られなかった。

野生型チャンネルと変異体チャンネルの差は、C 末端領域の作用にあると考えられるため、C 末端領域にある自己抑制ドメインの活性阻害作用を ATP またはオカダ酸によって維持されているリン酸化が抑えていることが示唆される。Ca チャンネルにはフォスファターゼや ATP の直接結合 [Feng et al., 2012, 2013: 学会発表②, ③]、複数のリン酸化部位 [Minobe et al., 2012: 学会発表⑦] があると考えられる。これらによる調節の詳細については、今後の検討が必要である。

(2) 野生型チャンネルは inside-out の後、1-3 分で不活性化し、5 分後に CaM + ATP を付加しても回復しなかった。変異体チャンネル Cav1.2  $\Delta$  は inside-out の 5 分後に付加した CaM + ATP により活性を回復した。カルモジュリン単独での回復効果は見られなかった。

カルモジュリン、ATP、(またはオカダ酸) のいずれかの存在下で不活性化した野生型チャンネルは、カルモジュリンと共に ATP (またはオカダ酸) を付加することにより、活性が回復した。変異体チャンネルでは、不活性化からの回復には ATP が必要であることが判明した。ATP の作用機序については、これまでも報告がなく、今後の検討が必要である。

モルモット心室筋細胞を用いた電気生理学的解析において、チャンネルのリン酸化とカルモジュリンの作用との関連が示唆される結果が得られている [Xu et al., 2013, 2011: 学会発表①, ⑧, Yu et al., 2012: 学

会発表④]。これらは、本研究からも示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

① Etsuko Minobe, Hadhimulya Asmara, Zahangir A. Saud, Masaki Kameyama. Calpastatin L is a partial agonist of the calmodulin-binding site for channel activation in Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels. The journal of biological chemistry, Vol. 286, No. 45, 2011, pp. 39013-39022. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M111.242248

[学会発表] (計18件)

① Jianjun Xu, Etsuko Minobe, Lei Yang, Lifeng Yu, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa, Masaki Kameyama. PKA modulate the Ca<sup>2+</sup>-channel activity induced by calmodulin in guinea-pig ventricular myocytes. 第90回日本生理学会大会 2013.3.27-29. 東京

② Rui Feng, Jianjun Xu, Etsuko Minobe, Asako Kameyama, Li-Ying Hao, Masaki Kameyama. ATP directly binds to cardiac Ca<sup>2+</sup> (Cav1.2) channels. 第90回日本生理学会大会 2013.3.27-29. 東京

③ 封 瑞、徐 建軍、菘部 悦子、亀山 亜砂子、はお 麗英、亀山 正樹 Cav1.2 Ca<sup>2+</sup>チャンネルにATPが直接結合する 生理学研究所研究会 2012.11.21-22. 岡崎

④ Li-Feng Yu, Jian-jun Xu, Etsuko Minobe, Lei Yang, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa, Li-Ying Hao, Masaki Kameyama. Phosphorylation state determines calmodulin-induced activity of Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels. 第63回西日本生理学会 2012.10.19-20. 大分

⑤ Lei Yang, Jianjun Xu, Etsuko Minobe, Rui Feng, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa, Masaki Kameyama. Mechanism underlying the modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel by hydrogen peroxide in guinea-pig ventricular myocytes. 第89回日本生理学会大会 2012.3.29-31. 松本

⑥ Etsuko Minobe, Hadhimulya Asmara, Zahangir A. Saud, Masaki Kameyama. Competitive regulation by calpastatin and calmodulin on Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channel activity.

第89回日本生理学会大会 2012.3.29-31. 松本

⑦ Etsuko Minobe, Sachiko Maeda, Jianjun Xu, Li-Ying Hao, Rui Feng, Kazuto Yazawa, Asako Kameyama, Masaki Kameyama. Multiple functional phosphorylation sites of protein kinase A in the C-terminal tail of Cav1.2 channel. 第89回日本生理学会大会 2012.3.29-31. 松本

⑧ Masaki Kameyama, Etsuko Minobe, Hadhimulya Asmara, Zahangir A. Saud, Dong-yun Han, Jian-Jun Xu, Asako Kameyama and Li-ying Hao. Multiple molecules of calmodulin are involved in the regulation of Cav1.2 channel. The Japan-Korea Joint Symposium on Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles 2012.2.17-19. 慶州

⑨ 馬嶋 秀行、犬童 寛子、鈴木 ひろみ、石岡 憲昭、富田 和男、榊田 大輔、菘部 悦子、亀山 正樹、岸田 昭世、矢野 幸子、永松 愛子、谷垣 文章、島津 徹、今岡 朝世、柴田 恭子、安孫子 宜光 ヒト神経細胞を用いたISS-Kibo 宇宙実験 宇宙利用シンポジウム (第28回) 2012.1.23-24. 東京

⑩ 馬嶋 秀行、犬童 寛子、宮田 和男、石岡 憲昭、鈴木 ひろみ、島津 徹、矢野 幸子、谷垣 文章、永松 愛子、榊田 大輔、今岡 朝世、柴田 恭子、安孫子 宜光、菘部 悦子、亀山 正樹 ヒト神経様 SK-N-SH 細胞の国際宇宙ステーションに滞在における影響 第2回国際放射線神経生物学会大会 2011.12.3. 群馬

⑪ 菘部 悦子、Hadhimulya Asmara, Zahangir A. Saud, 亀山 正樹 カルパスタチンのL領域は、Cav1.2 Ca<sup>2+</sup>チャンネルのカルモジュリンによる活性化部位の部分アゴニストとして働く 生理学研究所研究会 2011.11.29-30. 岡崎

⑫ Hiroko P. Indo, Noriaki Ishioka, Hiromi Suzuki, Toru Shimazu, Sachiko Yano, Fumiaki Tanigaki, Aiko Nagamatsu, Daisuke Masuda, Etsuko Minobe, Masaki Kameyama, Hideyuki J. Majima. Effects of 14 and 28 days exposure of human neuro cells in Space; Neuro Rad Experiments. SFRBM's 18th Annual Meeting 2011.11.16-20. Atlanta

⑬ 馬嶋 秀行、犬童 寛子、富田 和男、石岡 憲昭、鈴木 ひろみ、島津 徹、矢野 幸子、谷垣 文章、永松 愛子、榊田 大輔、今岡 朝

世, 柴田 恭子, 安孫子 宜光、蓑部 悦子、  
亀山 正樹 宇宙放射線および微小重力がヒ  
ト神経細胞に及ぼす影響 宇宙生物科学会  
2011.10.30-11.1. 横浜

⑭ Lei Yang, Jianjun Xu, Etsuko Minobe,  
Rui Feng, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa,  
Masaki Kameyama. CaMKII-dependent and  
independent facilitation of L-type  $Ca^{2+}$   
channels by hydrogen peroxide in  
guinea-pig ventricular myocytes. 第62回  
西日本生理学会 2011.10.14-15. 佐賀

⑮ Lei Yang, Jianjun Xu, Etsuko Minobe,  
Rei Feng, Asako Kameyama, Kazuto Yazawa,  
Masaki Kameyama. Facilitation of L-type  
 $Ca^{2+}$  channels by hydrogen peroxide in  
guinea-pig ventricular myocytes. The  
joint conference of SFRR-Asia, ASMRM and  
J-mit 2011.8.30-9.4. 鹿児島

⑯ 犬童 寛子、石岡 憲昭、鈴木 ひろみ、島  
津 徹、矢野 幸子、谷垣 文章、舩田 大輔、  
蓑部 悦子、亀山 正樹、馬嶋 秀行 宇宙放  
射線および微小重力が哺乳細胞に及ぼす影響  
第64回日本酸化ストレス学会学術集会  
2011.7.2-3. 北海道

[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・大学院医歯学総合研究科・  
助教  
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