

論文内容の要旨

論文題目

電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネル $\text{Ca}_v1.2$ を介した Ca^{2+} シグナル制御機構の研究
— 相互作用蛋白を介した Ca^{2+} チャンネル制御機構の解析 —

氏 名

名 黒 功

【背景】

電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルは筋細胞、神経細胞など興奮性細胞の細胞膜に存在し、膜の脱分極により開口し細胞外からの Ca^{2+} 流入を担う分子である (Fig. 1)。L 型 Ca^{2+} チャンネルは α_1 、 β 、 α_2/δ など複数のサブユニットからなる。L 型 Ca^{2+} チャンネルを形成する α_1 サブユニットは、現在までに $\text{Ca}_v1.1$ から $\text{Ca}_v1.4$ まで 4 種類の遺伝子が同定されており、このチャンネルファミリーは高血圧治療薬としても知られる Ca^{2+} 拮抗薬により阻害されるという共通の特徴をもつ。L 型 Ca^{2+} チャンネルは脳、網膜、心臓、血管、膵臓、骨格筋など様々な組織に発現し、このチャンネルを介して流入した Ca^{2+} は部位に応じて筋収縮、小胞分泌、遺伝子発現のように多岐に渡る生理機能を担っている。最近、ヒトにおいて先天性の発達異常、不整脈、免疫不全、低血糖、自閉症を併発する疾患である Timothy syndrome の原因が $\text{Ca}_v1.2$ の遺伝子変異である事が同定されるなど、L 型 Ca^{2+} チャンネルの生理機能における多機能性、重要性はこれまでに多くの研究により示されてきた。

しかしながら、同じ L 型 Ca^{2+} チャンネルがどのようにして組織特異的な生理応答につながる Ca^{2+} シグナルを担えるのかについて、その分子機構はほとんど明らかになっていない。また、脳や心臓では $\text{Ca}_v1.2$

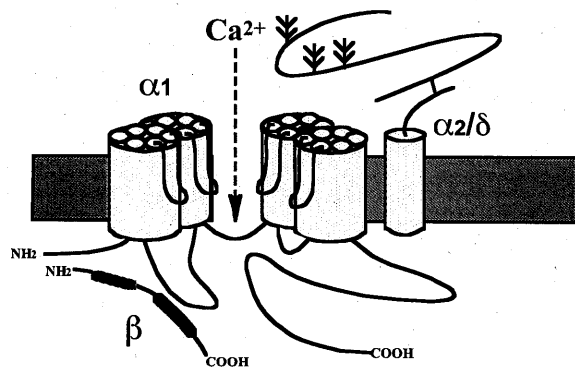


Fig. 1 電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの模式図

と $\text{Ca}_v1.3$ など複数種の L 型 Ca^{2+} チャネルが発現しているが、それらの使い分けがどのようになされているかについて未だ十分な理解がなされていない。このような特異的な Ca^{2+} シグナルの使い分けの背景には、組織またはチャネル特異的な分子複合体の存在が予想される。その解明は組織特異的な Ca^{2+} シグナル制御機構の理解につながり、L 型 Ca^{2+} チャネルの関与する病態治療の新たなターゲットになりうると思われる。そこで本研究では、L 型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$ に相互作用する分子を同定しその機能を解析することにより、多様な生理機能に関与する $\text{Ca}_v1.2$ が担う Ca^{2+} シグナルの使い分けの制御機構を解明することを目的として実験を行った。

【結果】

1. $\text{Ca}_v1.2$ 結合分子 (PCTP-L) の同定

L 型 Ca^{2+} チャネル $\text{Ca}_v1.2$ に結合する分子を酵母 two-hybrid 法により探索した。bait として L 型 Ca^{2+} チャネルファミリー内で相同性の低い $\text{Ca}_v1.2$ の細胞内 II-III loop および C 末端領域を用い、マウス胎生 11 日の cDNA ライブラリーから結合分子の探索を行った。その結果、C 末端領域を bait として用いたスクリーニングから phosphatidylcholine transfer protein-like protein (PCTP-L) の全長を含む cDNA が陽性クローンとして同定された (Fig. 2)。PCTP-L は脂質結合モチーフとして START ドメインを持つ分子群 START ファミリーに属し、脂質の輸送を担う分子 phosphatidylcholine transfer protein (PCTP) に相同性の高い分子として報告されていたが、機能は未知の分子であった。そこでまず、PCTP-L が哺乳類細胞において細胞膜上の $\text{Ca}_v1.2$ チャネルと相互作用するかについて BHK 6 細胞を用い、培養細胞発現系で検討した。 Ca^{2+} チャネルの β_{1a} 、

α_2/δ サブユニットを安定発現している BHK6 細胞に PCTP-L を一過性に発現させ細胞内局在を観察したところ、細胞膜近傍および細胞質の一部に局在が確認された。BHK6 細胞において $\text{Ca}_v1.2$ と共に発現させると、細胞膜上に存在する $\text{Ca}_v1.2$ と PCTP-L が共存していた。共免疫沈降法により BHK6 細胞における PCTP-L と $\text{Ca}_v1.2$ の結合を検討した結果、 $\text{Ca}_v1.2$ は PCTP-L と共に免疫沈降されることが明らかになり、細胞内での相相互作用が示唆された。

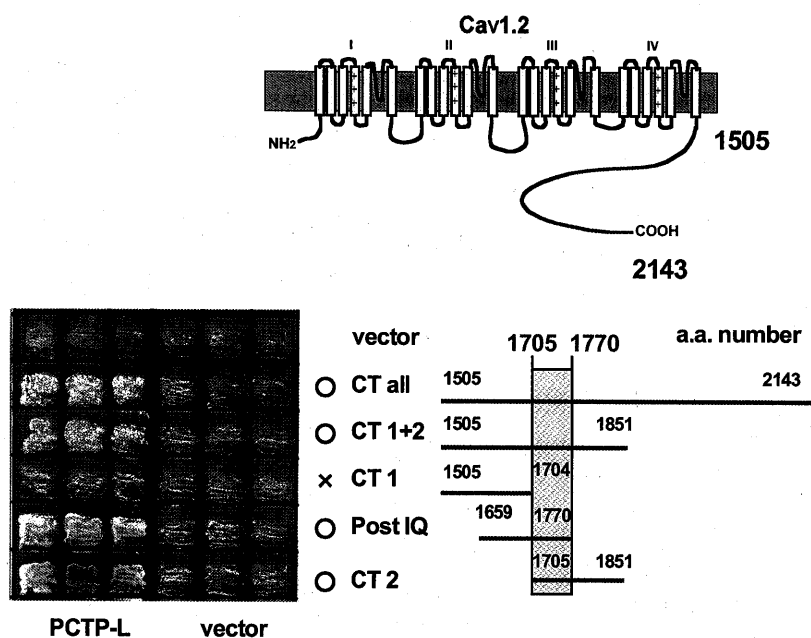


Fig. 2 $\text{Ca}_v1.2$ の C 末端における PCTP-L の結合部位
酵母 two-hybrid 法による結合領域の同定

2. $\text{Ca}_v1.2$ チャネルに対する PCTP-L の影響

次に PCTP-L が $\text{Ca}_v1.2$ と相互作用することで、 Ca^{2+} チャネルの機能に与える影響を検討する目的で、ホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。BHK6 細胞に発現させた $\text{Ca}_v1.2$ の Ca^{2+}

チャンネル電流を測定した結果、PCTP-L の共発現により Ca^{2+} チャンネルの電位依存性不活性化の指標である steady-state inactivation (SSIN) curve が約 7 mV 脱分極側にシフトした (Fig. 3A)。これは Ca^{2+} チャンネルが不活性化し難くなっていることを示しており、チャンネル開口時の Ca^{2+} 流入が増加する方向に働く。一方、チャンネル活性化電位の指標である電流-電圧曲線 (I-V curve) は PCTP-L の共発現に影響を受けなかった。これらのことから PCTP-L は $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} チャンネルの不活性化機構に特異的に影響を与え、チャンネルの不活性化を抑制することが明らかになった。

3. PCTP-L は脊椎動物の L 型 Ca^{2+} チャンネル $\text{Ca}_v1.2$ を特異的に制御する

Two-hybrid screening に用いた $\text{Ca}_v1.2$ の C 末端領域 (CT all) は L 型 Ca^{2+} チャンネルファミリーにおいて相同性の高い領域と低い領域が存在する。PCTP-L による Ca^{2+} チャンネルの制御が $\text{Ca}_v1.2$ 特異的なものであるかどうか調べる目的で PCTP-L 結合部位の同定を yeast two-hybrid 法により行った。

その結果、PCTP-L は $\text{Ca}_v1.2$ の 1705 番目から 1770 番目のアミノ酸を含む配列に主に結合することが明らかになった (Fig. 2)。この領域は脊椎動物の $\text{Ca}_v1.2$ には良く保存されていたが、その他の L 型 Ca^{2+} チャンネルには保存されていなかった。このことは PCTP-L による制御が L 型 Ca^{2+} チャンネルのうち $\text{Ca}_v1.2$ に特異であることを示唆している。この仮説を検証するために、 $\text{Ca}_v1.2$ のカルボキシル末端を $\text{Ca}_v1.3$ のカルボキシル末端と置換したキメラチャンネル (CTD) を作製した (Fig. 3 A)。

CTD を PCTP-L と共に BHK 6 細胞に発現させると、 $\text{Ca}_v1.2$ と同様に PCTP-L と共に共免疫沈降された。このことは、 $\text{Ca}_v1.2$ と PCTP-L の相互作用は $\text{Ca}_v1.2$ のカルボキシル末端以外にも存在することを示唆している。PCTP-L は CTD とも相互作用できたが、電気生理学的解析により不活性化曲線を測定すると、CTD の不活性化は PCTP-L の存在に影響を受けなかった (Fig. 3)。このことから、PCTP-L が Ca^{2+} チャンネルの不活性化を抑制するためには、 $\text{Ca}_v1.2$ のカルボキシル末端が必要であることが明らかになった。従って、PCTP-L による Ca^{2+} チャンネル不活性化の抑制は L 型カルシウムチャンネルのうち $\text{Ca}_v1.2$ に特異的であると考えられる。 $\text{Ca}_v1.2$ のカルボキシル末端の相互作用配列はセンチュウ、ハエ、ホヤなど無脊椎動物のもつ L 型カルシウム

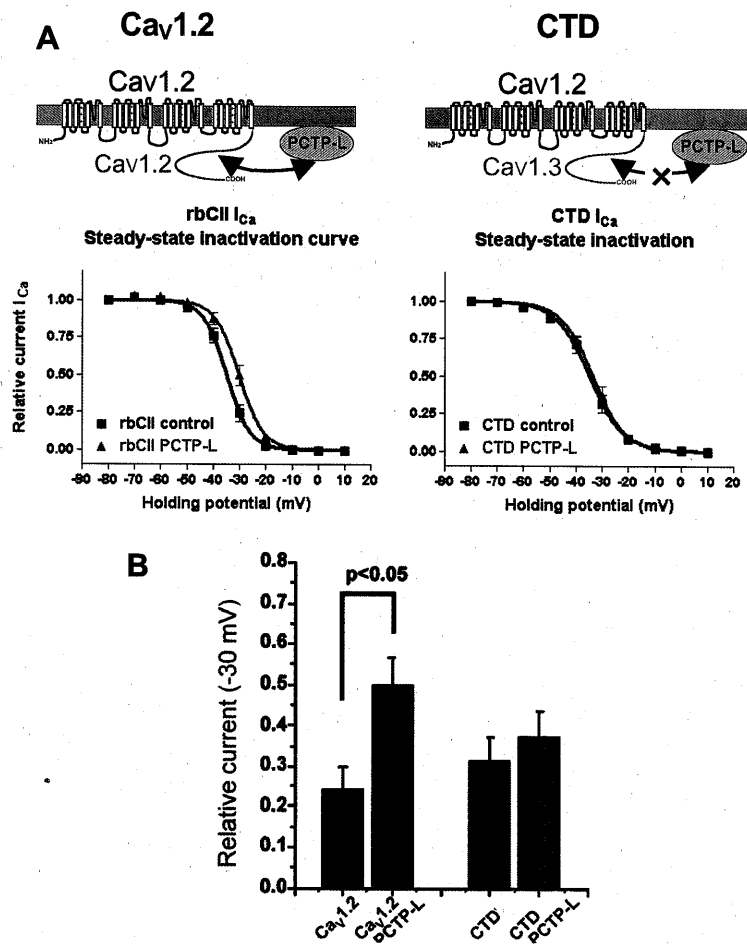


Fig. 3 PCTP-Lによる Ca^{2+} チャンネルの不活性化の変化 $\text{Ca}_v1.2$ では不活性化の抑制が観察されたが、CTD では不活性化曲線に変化は無かった。B, 棒グラフは-30 mVの相対電流値

チャンネルホモログには存在しなかったため、L型カルシウムチャンネルと PCTP-L の相互作用は脊椎動物のみがもつチャンネル制御メカニズムであると考えられた。

4. PCTP-L と $Ca_v1.2$ の相互作用の生理的意義

PCTP-L による $Ca_v1.2$ の制御が生体内のどの組織においてなされているか検討するため、Northern blot 法と Western blot 法を用いて、それぞれ mRNA 発現と蛋白発現について組織分布を検討した。その結果、PCTP-L は心臓、脳、肝臓、腎臓、精巣で発現していることが確かめられた (Fig. 4)。特に心臓では PCTP-L の発現は心房特異的であり、心室には認められなかった。 $Ca_v1.2$ も心臓に発現していることから、以下では心臓における $Ca_v1.2$ と PCTP-L の相互作用の意義について解析した。

幼若心筋のモデルとして胎生 10.5 日のマウスから単離した心筋細胞および、心筋に分化誘導したマウスの ES 細胞において PCTP-L の発現を細胞免疫染色法により解析したところ、内在性の PCTP-L が細胞膜領域に観察された。このことから、PCTP-L は発達の初期の段階から心筋細胞に発現していることが明らかになった。

ラット新生仔心房筋細胞を単離し、 $Ca_v1.2$ と PCTP-L の発現を観察したところ、両者は心房筋細胞の細胞膜領域で共存していた (Fig. 5A)。さらに、成熟ラットの心房において $Ca_v1.2$ 抗体で免疫沈降を行うと、PCTP-L が共免疫沈降されてきた (Fig. 5B)。これらの結果から $Ca_v1.2$ と PCTP-L の相互作用は心房筋細胞に存在することが示された。心房筋細胞で $Ca_v1.2$ は PCTP-L の制御を受け、心房筋特異的な役割を担う可能性が考えられる。また、心房筋細胞には $Ca_v1.2$ と $Ca_v1.3$ が発現しているが、先の結果から心房筋細胞において PCTP-L は $Ca_v1.2$ を特異的に制御していると考えられる。心房筋での PCTP-L の役割を解析するため、PCTP-L に対する RNAi を行った。アデノウイルスにより shRNAi を発現させたところ、心房筋細胞における内在性の PCTP-L は約 75% 程度まで減少した。蛋白の減少の程度は少なかったが、PCTP-L の RNAi を行った心房筋細胞で自発的興奮による Ca^{2+} トランジェントを測定すると、コントロールのものに比べて約 1.8 倍に Ca^{2+} トランジェントの頻度が上昇していた。これは PCTP-L が減少した結果、 $Ca_v1.2$ の不活性化が促進され早く再分極した結果、次の活動電位が早く起こせるようになったためと考察される。PCTP-L をノックダウンした心房筋細胞で実際に $Ca_v1.2$ の不活性化がどの程度早くなっているか詳しい解析が今後必要であるが、この結果から、PCTP-L は心房筋細胞において $Ca_v1.2$ を制御して興奮性の調節を行って

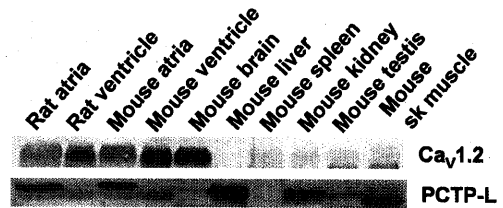


Fig. 4 成体ラット、マウスにおける $Ca_v1.2$ 及び PCTP-L 蛋白の発現分布 (Western blotting)

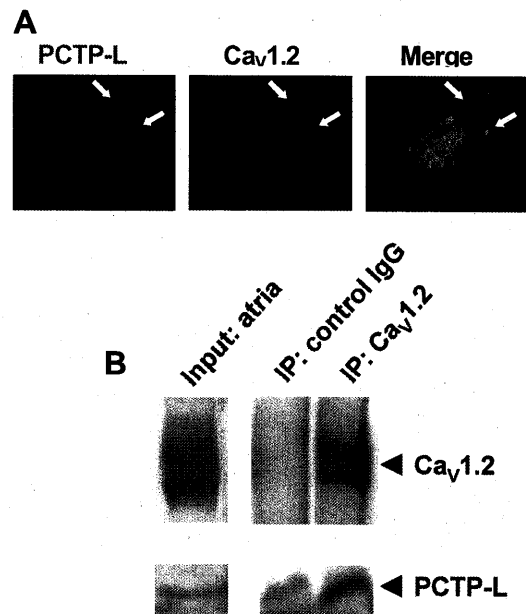


Fig. 5 心房における $Ca_v1.2$ と PCTP-L の共局在
A, ラット新生仔心房筋における $Ca_v1.2$ と PCTP-L の局在。
B, ラット心房における $Ca_v1.2$ と PCTP-L の共免疫沈降

る可能性が示唆された。心房筋の興奮性は、不整脈などの病態を理解する上で重要な機能であり、今後 $\text{Ca}_v1.2$ と PCTP-L の相互作用が、心房細動などの病態で変化しているかについては興味ある問題である。

【まとめ】

本研究において、私は L 型 Ca^{2+} チャンネル $\text{Ca}_v1.2$ の C 末端領域に結合し、チャンネルの不活性化を抑制する分子として PCTP-L を同定した。また、PCTP-L は L 型 Ca^{2+} チャンネルのうち $\text{Ca}_v1.2$ の C 末端の特異的な配列を介して相互作用することで Ca^{2+} チャンネルの機能を制御している可能性を見出した (Fig. 6)。このことから PCTP-L は脊椎動物の L 型 Ca^{2+} チャンネルをファミリーにおいて $\text{Ca}_v1.2$ を特異的に制御しているものと考えられる。

また、PCTP-L は心臓において心房特異的に発現し、 $\text{Ca}_v1.2$ と相互作用していることを明らかにし、その相互作用は興奮性の制御に関与する可能性を示した。このことから心房筋細胞における PCTP-L と $\text{Ca}_v1.2$ の相互作用は心房細動などの病態に関与する可能性がある。

以上の結果は、多様な生理機能を担う $\text{Ca}_v1.2$ が担う Ca^{2+} シグナルの制御機構について PCTP-L という相互作用分子との関係から解析した全く新しいものである。今後、心房筋細胞をはじめ $\text{Ca}_v1.2$ と PCTP-L が相互作用している組織において、この相互作用の生理的意義、および病態への関与について解析することで、 $\text{Ca}_v1.2$ を介する Ca^{2+} シグナルの制御について新たな知見が得られるものと期待される。

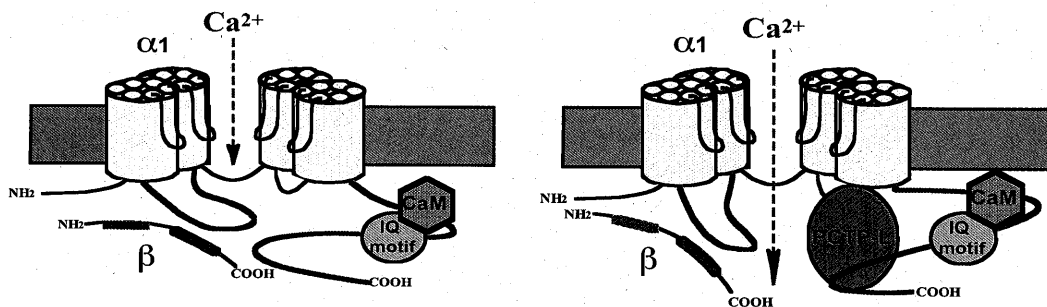


Fig. 6 PCTP-L による $\text{Ca}_v1.2$ の不活性化抑制のモデル

L 型 Ca^{2+} チャンネルの不活性化は細胞内ループとカルボキシル末端が協調して起こる。PCTP-L は $\text{Ca}_v1.2$ のカルボキシル末端に相互作用することでこの不活性化メカニズムを抑制していると考えられる。