

## 審査の結果の要旨

氏名 黒 功

電位依存性L型Ca<sup>2+</sup>チャネルは遺伝子としてCa<sub>v</sub>1.1からCa<sub>v</sub>1.4まで4種類のサブタイプを含むCa<sup>2+</sup>チャネルの総称であり、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<sup>2+</sup>流入を担う分子である。L型Ca<sup>2+</sup>チャネルは脳、網膜、心臓、血管、膵臓、骨格筋など様々な組織に発現し、このチャネルを介して流入したCa<sup>2+</sup>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Ca<sub>v</sub>1.2の遺伝子変異であることが同定されるなど、L型Ca<sup>2+</sup>チャ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<sup>2+</sup>チャネルが各組織においてどのように制御され、組織特異的な生理応答につながるCa<sup>2+</sup>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。本研究はこのL型Ca<sup>2+</sup>チャネルの一つCa<sub>v</sub>1.2に結合する分子の探索を行い、その相互作用のサブタイプ特異性や組織特異性を含めた解析から生理的意義を考察し、L型Ca<sup>2+</sup>チャネルの使い分けのメカニズムを解明することを目的として行った研究である。

### 1. Ca<sub>v</sub>1.2 結合分子 (PCTP-L) の同定

第1章では、L型Ca<sup>2+</sup>チャネルCa<sub>v</sub>1.2に結合する分子を酵母 two-hybrid 法により探索している。baitとしてL型Ca<sup>2+</sup>チャネルファミリー内で相同性の低いCa<sub>v</sub>1.2の細胞内II-III loop およびC末端領域を用い、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 を陽性クローンとして同定した。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Ca<sub>v</sub>1.2チャネルと相互作用するかについてBHK6細胞を用い検討している。その結果、BHK6細胞においてCa<sub>v</sub>1.2と共にPCTP-Lを発現させると細胞膜上に存在するCa<sub>v</sub>1.2とPCTP-Lが共存しており、Ca<sub>v</sub>1.2はPCTP-Lと共に免疫沈降されることが明らかになった。

### 2. Ca<sub>v</sub>1.2 チャネルに対する PCTP-L の影響

第2章からはPCTP-LとCa<sub>v</sub>1.2の相互作用に焦点を当て、まず、その相互作用がCa<sub>v</sub>1.2により構成されるCa<sup>2+</sup>チャネルの機能に与える影響を検討している。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い、BHK6細胞に発現させたCa<sub>v</sub>1.2のCa<sup>2+</sup>チャネル電流を測定した結果、PCTP-Lの共発現によりCa<sup>2+</sup>チャ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 脱分極側にシフトすることが明らかになった。これはCa<sup>2+</sup>チャネルが不活性化し難くなっていることを示しており、チャネル開口時のCa<sup>2+</sup>流入が増加する方向に働く。このことからPCTP-LはCa<sub>v</sub>1.2 Ca<sup>2+</sup>チャネルの不活性化機構に影響を与え、チャ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<sup>2+</sup>チャンネルCa<sub>v</sub>1.2を特異的に制御する

次にPCTP-LとCa<sub>v</sub>1.2の相互作用部位の同定を行い、その相互作用部位のアミノ酸配列からPCTP-LによるCa<sup>2+</sup>チャンネル制御のサブタイプ特異性について検討している。Ca<sub>v</sub>1.2のPCTP-Lとの結合部位の同定をyeast two-hybrid法により行い、PCTP-LはCa<sub>v</sub>1.2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。この領域は脊椎動物のCa<sub>v</sub>1.2には良く保存されていたが、その他のL型Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>チャンネルのうちCa<sub>v</sub>1.2に特異的であることを示唆している。この仮説を検証するために、Ca<sub>v</sub>1.2のカルボキシル末端をCa<sub>v</sub>1.3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。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ことから、PCTP-LがCa<sup>2+</sup>チャンネルの不活性化を抑制するためには、Ca<sub>v</sub>1.2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<sup>2+</sup>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Ca<sub>v</sub>1.2に特異的であると考えられる。また、Ca<sub>v</sub>1.2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る。

### 4. PCTP-LとCa<sub>v</sub>1.2の相互作用の生理的意義

PCTP-LによるCa<sub>v</sub>1.2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ところ、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。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<sub>v</sub>1.2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<sub>v</sub>1.2とPCTP-Lの相互作用の意義について解析している。

ラット新生仔心房筋細胞を単離し、Ca<sub>v</sub>1.2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。さらに、成熟ラットの心房においてCa<sub>v</sub>1.2抗体で免疫沈降を行うと、PCTP-Lが共免疫沈降されてきた。これらの結果からCa<sub>v</sub>1.2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<sub>v</sub>1.2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<sub>v</sub>1.2とCa<sub>v</sub>1.3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<sub>v</sub>1.2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を行い、心房筋細胞で自発的興奮によるCa<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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<sub>v</sub>1.2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<sub>v</sub>1.2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<sub>v</sub>1.2を制御して興奮性の調節を行ってい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要素であり、Ca<sub>v</sub>1.2とPCTP-Lの相互作用が心房細胞などの病態で変化しているかについては今後解析すべき問題である。

本研究ではL型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル  $\text{Ca}_v1.2$  のC末端領域に結合し、チャネルの不活性化を抑制する分子として新たにPCTP-Lを同定している。PCTP-LはL型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルのうち  $\text{Ca}_v1.2$  のC末端の特異的な配列を介して相互作用することで  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの不活性化を抑制していることが示唆された。このことからPCTP-Lは脊椎動物のL型  $\text{Ca}^{2+}$ チャ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、その相互作用は心房筋細胞の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  $\text{Ca}_v1.2$  の相互作用は心拍数の制御、および心房細動などの病態に関与することが考えられる。

以上の結果は、 $\text{Ca}_v1.2$  が担う  $\text{Ca}^{2+}$ 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が進むことで、 $\text{Ca}_v1.2$  を介する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの制御について新たな知見が得られるものと大いに期待される。本研究は多様な生理機能や病態に関与するL型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの制御機構に新たな知見を与えるものであり、その理解におおいに貢献するものとして、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。