

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590271

研究課題名(和文) L型カルシウムチャネルの結合膜局在化におけるジャンクトフィリンの役割

研究課題名(英文) Localization and function of L-type calcium channels in skeletal muscle is regulated by junctophilins.

研究代表者

中田 勉 (NAKADA, Tsutomu)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70452141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋のL型カルシウムチャネル(LTCC)は、形質膜と筋小胞体膜が近接する結合膜構造に局在している。この分布は筋収縮に不可欠であるが、その詳細な局在化機構は不明である。本研究では、ジャンクトフィリン(JP)分子が、LTCCの細胞内局在と機能にどのように関係しているかを調べた。骨格筋芽細胞株のJPをノックダウンすると、LTCCの結合膜への局在、カルシウム電流などが阻害された。免疫沈降法およびGSTプルダウン法により、LTCCのCaV1.1サブユニットのC末端に、JP結合部位が存在することが分かった。本研究により、LTCCの正常な機能と局在に、JPが重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：L-type calcium channels (LTCC) form a signaling complex with ryanodine receptors at the junctional membrane (JM) in skeletal myocytes. Although junctophilins (JPs) are known to contribute to the stabilization of the JM complex by bridging between the plasma membrane and sarcoplasmic reticulum, the roles of JPs on the JM-targeting and function of LTCC are still unclear. To clarify the roles of JPs, we treated C2C12 and GLT myotubes with siRNA against JP1 or JP2. Knockdown of JPs inhibited the proper JM-targeting and function of LTCC in skeletal myocytes. Co-immunoprecipitation study showed that CaV1.1 interacted with JP1 and JP2 in mouse skeletal muscle. Pull down assay with GST-fusion proteins bearing several partial fragments of CaV1.1 revealed that 12 amino acid residues in the proximal C-terminus are necessary for the binding of CaV1.1 and JPs. These results suggested that interaction of this part of CaV1.1 and JPs is important for the proper localization and function of LTCC.

研究分野：薬理学，生理学

キーワード：L型カルシウムチャネル ジャンクトフィリン 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

横紋筋(骨格筋と心筋)には細胞膜と筋小胞体膜が近接する結合膜構造と呼ばれる部位が存在し、細胞膜上の L 型 Ca^{2+} チャネル(LTCC)と、筋小胞体膜上のリアノジン受容体(RyR)は、この部位でクラスターを形成し機能的複合体を形成している。骨格筋では、結合膜で LTCC と RyR が直接関連し、活動電位を細胞内 Ca^{2+} 信号に変換する(膜電位依存性 Ca^{2+} 放出)。心筋の結合膜では、活動電位に伴う LTCC の開口により流入した Ca^{2+} が RyR を開口させ、 Ca^{2+} 信号の増幅が起こる(Ca^{2+} 依存性 Ca^{2+} 放出)。このようにシグナル伝達様式が若干異なるものの、骨格筋と心筋の結合膜構造はほぼ共通の分子群で構成されており、どちらも正常な興奮収縮連関に必須である。しかし、LTCC が結合膜部位に集積する機構は明らかにされていない。

一方、この結合膜構造を維持する重要な分子として、ジャンクトフィリン(JP)が知られている。JPには4つのサブタイプ(JP1-4)が存在し、骨格筋・心筋にはJP1とJP2が主に発現している。JPはC末端に筋小胞体膜貫通部位を、N末端に細胞膜脂質に結合する部位を有している。JPはこの2つのドメインにより細胞膜と筋小胞体膜を物理的に架橋し、結合膜構造を維持していると考えられている。

本研究はこれらの事実から、LTCCの局在や機能に、JPがどう関わっているのかについて検討した。

2. 研究の目的

本研究では、LTCCの結合膜局在化機構とJPの関係を明らかにする。

具体的な実験としては、1)JPとLTCCの結合の有無・結合様式、2)LTCCの局在と機能に対するJPのノックダウンによる影響、などについて分子生物学、電気生理学的な手法を用いて明らかにする。この実験では骨格筋の研究に頻用される、マウス骨格筋芽細胞株C2C12とともに、GLT細胞という細胞株を用いる。GLTは骨格筋型LTCCを構成する $Ca_v1.1$ サブユニットを欠損したマウス由来の骨格筋細胞株であり、正常な興奮収縮連関を起こすことが出来ない。しかしGLT細胞に $Ca_v1.1$ を強制発現させると、 $Ca_v1.1$ は結合膜に集積し、正常な興奮収縮連関を起こすことが可能となる。この細胞を用いることで、内因性 $Ca_v1.1$ の作用が無い状態で、外来性遺伝子の機能を解析することが可能である。またGLT細胞由来の筋管は、結合膜構造が可視化しやすいため、チャネルの局在を確認するための優れたツールである。

3. 研究の方法

(1)細胞培養: GLT細胞およびC2C12細胞は既報の条件に従って培養した。GLT細胞はカーボンコートしたカバーガラスに播種し、増殖用培地(10%ウシ胎児血清、10%ウマ血清含

有DMEM)で培養した。2日後に分化用培地(2%ウマ血清含有DMEM)に置きかえ、4日後にFugene HDを用いたリポフェクション法により、発現ベクターをトランスフェクションした。C2C12細胞はコラーゲンコートしたカバーガラスに播種し、増殖用培地(10%ウシ胎児血清含有DMEM)で培養した。2日後に分化用培地(2%ウマ血清含有DMEM)に置きかえ、4日後にLipofectamine RNAiMAXを用いたリポフェクション法により、siRNAをトランスフェクションした。両細胞とも播種後8-10日後に免疫染色、パッチクランプ、カルシウムイメージングを行った。

(2)プラスミド構築: 骨格筋LTCCのウサギ $Ca_v1.1$ サブユニットのcDNAはインスブルック医科大学(オーストリア)のGrabner博士より供与頂いた。このcDNAはN末端にGFPが付加されるように設計されている。GST融合タンパク質の発現ベクターは、PCR法を用いて部分配列を増幅し、GST配列を組み込んだpColdベクターに挿入した。

(3)大腸菌によるタンパク質発現: $Ca_v1.1$ の部分配列を組み込んだGST-pColdプラスミドをBL21株に導入し増殖させた後、IPTG存在下、15、オーバーナイトで培養し、タンパク質の発現を誘導した。GST融合タンパク質はグルタチオンビーズを用いて精製した。

(4)免疫染色: 細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBSで洗浄し、5%ウシ血清・0.1% Triton X100含有PBSでブロッキングを行った。続けて一次抗体を反応させ、蛍光標識二次抗体で検出を行った。一次抗体には抗GFP抗体、抗RyR抗体、抗JP1抗体、抗JP2抗体を用いた。二次抗体にはAlexa標識の抗マウスIgG抗体、抗ラットIgG抗体、抗ウサギ抗体IgG抗体を用いた。標本の観察にはZeiss LSM5を使用した。

(5)パッチクランプ: JP1もしくはJP2をノックダウンした筋管を用いてパッチクランプ解析を行った。L型カルシウム電流の電流-電圧関係、およびゲーティングチャージムーブメントについて、ホールセルモードで解析を行った。

(6) Ca^{2+} イメージング: 筋管に分化したGLT細胞に細胞内 Ca^{2+} 指示薬Fluo-4を常法に従い取り込ませた後、電気刺激(50V, 1ms, 0.3Hz)を与え細胞の蛍光強度を測定した。標本の観察にはZeiss LSM7 LIVEを使用した。

(7)免疫沈降およびGSTプルダウン: マウス骨格筋をホモジネーションバッファー(20mM HEPES, 320mM Sucrose)中でホモジナイズ後、5000g, 15分, 4で遠心し、デブリスを沈殿させた。採取した上清を100,000g, 60分, 4で遠心した。上清を取り除き、沈殿をリスバッファーで懸濁した。懸濁液を10,000g, 30分, 4で遠心し、不溶成分を取り除き、ミクロソーム画分とした。

免疫沈降では、このミクロソームに抗 $Ca_v1.1$ 抗体、抗 $Ca_v1.1$ 抗体、コントロールIgGをそれぞれ反応させ、プロテインA/Gセ

ファロースビーズを結合させた。オーバーナイトで反応させた後、1%PBS で 5 回洗浄し、SDS を含むサンプルバッファーを添加し、ウェスタンブロッティングを行った。

プルダウンでは、大腸菌に発現させた GST 融合タンパク質をグルタチオンビーズに結合させ、これにミクロソームとオーバーナイトで反応させた。1%PBS で 5 回洗浄し、SDS を含むサンプルバッファーを添加し、ウェスタンブロッティングを行った。

(8) ウェスタンブロッティング：サンプルを 37 で 60 分間変性させた後、常法に従って SDS-PAGE で電気泳動した。これを PVDF 膜に転写し、ブロッキングを行った後、一次抗体を反応させた。洗浄後、二次抗体を反応させ、化学発光によってシグナルを検出した。

4. 研究成果

(1) LTCC の細胞内局在に対する JP のノックダウンの効果

GLT 細胞の JP1, JP2 を siRNA によってノックダウンした結果、LTCC の結合膜への局在が有意に抑制された (図 1)。また、同様の結果が C2C12 細胞でも確認された。これらの結果から JP が LTCC の局在に重要な役割を果たしていることが示唆された。

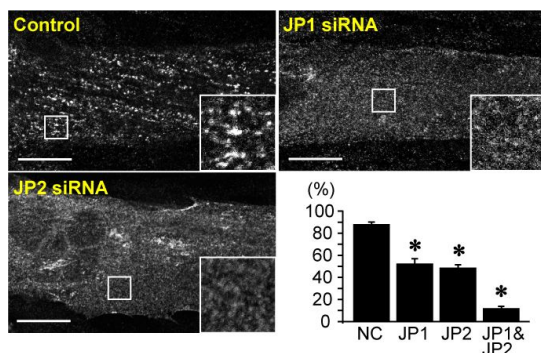


図 1 LTCC の細胞内局在に対する JP ノックダウンの影響。GLT 細胞の JP1 および JP2 をノックダウンした後、LTCC の局在を免疫染色法により観察した。バーは 20 μm 。右下のグラフは、LTCC のクラスターが観察できた筋管の数を定量したもの。Mean \pm SE. *: $p < 0.05$ 。

(2) LTCC の機能に対する JP のノックダウンの効果

C2C12 細胞の JP1 または JP2 をノックダウンしたところ、JP2 をノックダウンすると、LTCC によるカルシウム電流が抑制されることが明らかになった。JP1 のノックダウンはカルシウム電流に影響を与えなかった。また細胞膜に存在する LTCC 量の指標であるゲーティングチャージについては、JP のノックダウンの影響は認められなかった (図 2)。

次にカルシウムイメージングによる検討を行ったところ、JP1 および JP2 のノックダウンで、電気刺激に反応してカルシウム上昇を起こす細胞数が、有意に減少していた。また、カルシウム上昇が認められた細胞でも、

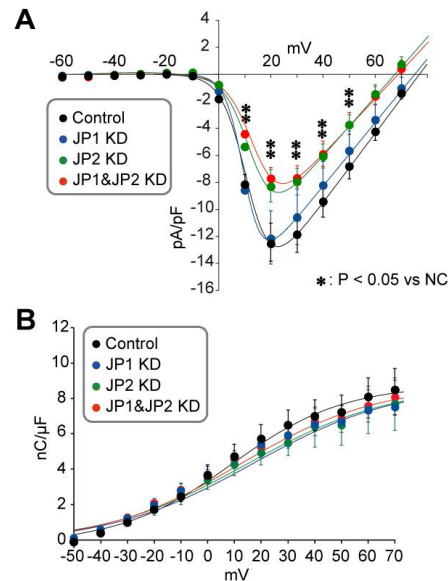


図 2 C2C12 細胞由来筋管の LTCC 電流およびゲーティングチャージに対する JP ノックダウンの影響。A, L 型カルシウム電流と電圧の関係。Mean \pm SE. **: $p < 0.01$. B, ゲーティングチャージムーブメントと電圧の関係。Mean \pm SE.

peak amplitude が有意に減少していた。また、JP2 のノックダウンは、カフェインによって誘導されるカルシウムトランジェントを有意に抑制した (図 3)。

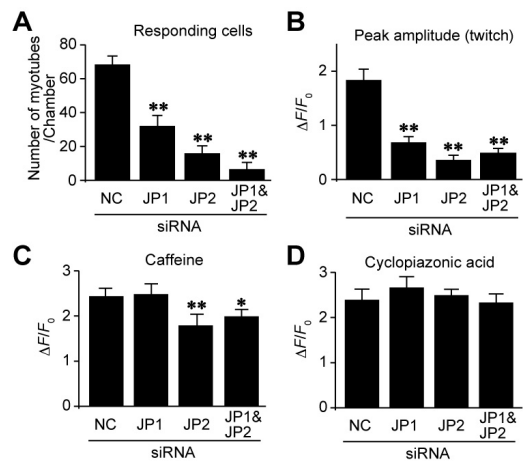


図 3 C2C12 細胞由来筋管のカルシウムトランジェントに対する JP ノックダウンの影響。A, 電気刺激に反応してカルシウムトランジェントを起こした細胞数。B, 電気刺激によるカルシウムトランジェントの peak amplitude. C, カフェイン刺激によるカルシウムトランジェントの peak amplitude. D, シクロピアゾン酸刺激によるカルシウムトランジェントの peak amplitude. Mean \pm SE. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

これらの結果は、JP が LTCC や RyR の正常な機能に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(3) JP と LTCC の相互作用

これまでの実験で、JP が LTCC の正常な局在と機能に、重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、JP と LTCC が物理的に結合しているかどうかを明らかにするた

めに、マウス骨格筋のマイクロソーム画分を用いて共免疫沈降を行った。その結果、LTCC と RyR が、JP1 と JP2 の双方に結合していることが明らかになった(図4)。

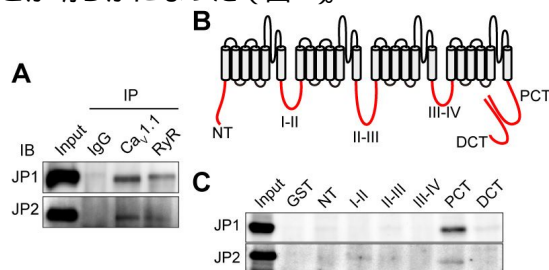


図4 LTCC と JP の結合。A, Ca_v1.1, RyR と JP の共免疫沈降。Ca_v1.1 および RyR の抗体を用いて免疫沈降を行い、JP に対する抗体でウェスタンブロッティングを行った。B, Ca_v1.1 サブユニットの模式図。NT:N 末端, PCT:近位 C 末端, DCT:遠位 C 末端。C, Ca_v1.1 の細胞内領域のリコンビナントタンパク質を用いた GST プルダウン。

次に、LTCC のどの部位が JP と結合しているかを明らかにするために、GST 融合タンパク質を用いたプルダウンアッセイを行った。LTCC の Ca_v1.1 サブユニットの細胞内領域配列(N末端, I-IIループ, II-IIIループ, III-IVループ, 近位 C 末端, 遠位 C 末端)を、それぞれ GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、プルダウンを行った。その結果、近位 C 末端が、特異的に JP と結合することが分かった。さらに結合部位を特定するために、近位 C 末端の配列を各部位に分け、リコンビナントタンパク質を作成した。その結果、近位 C 末端の後半に存在する 12 アミノ酸残基が、JP との結合に重要であることが分かった(図5)。また、この部位をアラニン置換した多くの変異体では、JP との結合が減弱した。この結果から、この部位が JP 結合ドメインであることが示された。

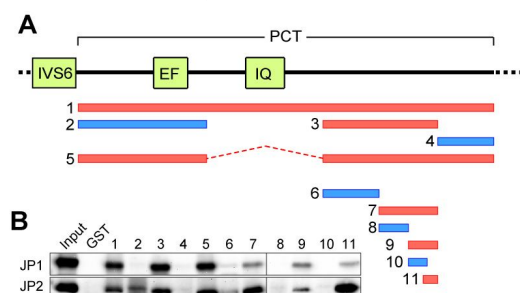


図5 JP 結合ドメインの同定。A, Ca_v1.1 の近位 C 末端と作成したリコンビナントの位置を表す模式図。B, 近位 C 末端のリコンビナントタンパク質を用いた GST プルダウンアッセイ。レーン上の番号は A の模式図の番号に対応している。

(4) JP 結合部位変異体チャネルの解析

JP 結合ドメインに変異を導入したチャネル遺伝子を GLT 細胞に強制発現し、局在を観察した。その結果、変異チャネルは野生型と比較して、結合膜への局在が減弱することが

確認された(図6)。

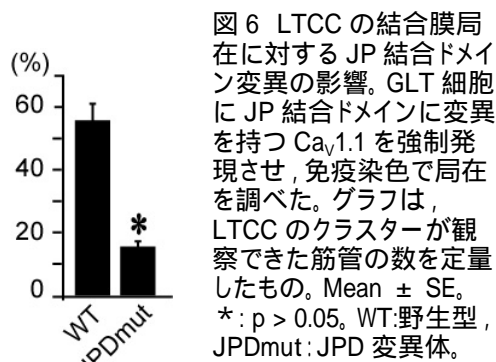


図6 LTCC の結合膜局在に対する JP 結合ドメイン変異の影響。GLT 細胞に JP 結合ドメインに変異を持つ Ca_v1.1 を強制発現させ、免疫染色で局在を調べた。グラフは、LTCC のクラスターが観察できた筋管の数を定量したものの、Mean ± SE。*: p > 0.05。WT:野生型, JPDmut:JPD 変異体。

これらの結果から、Ca_v1.1 サブユニットの C 末端と JP の結合が、LTCC の正常な局在と機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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3件)

中田 勉, 山田 充彦. 横紋筋 L 型カルシウムチャンネルの結合膜局在化機構. 日本薬理学雑誌, 144, 217-221, 2014. 査読無し

DOI: 10.1254/fpj.144.217

Kashihara T, Hirose M, Shimojo H, Nakada T, Gomi S, Hongo M, Yamada M. α_2 -Adrenergic and M_2 -muscarinic receptors decrease basal t-tubular L-type Ca²⁺ channel activity and suppress ventricular contractility in heart failure. Eur J. Pharmacol. 724: 122-131, 2014. 査読有り

DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.12.037

Nakada T, Flucher BE, Kashihara T, Sheng X, Shibasaki T, Horiuchi-Hirose M, Gomi S, Hirose M, Yamada M. Proximal C-terminus of α_1C subunits is necessary for junctional membrane-targeting of cardiac L-type calcium channels. Biochem J. 448, 221-231, 2012. 査読有り

Doi: 10.1042/BJ20120773.

[学会発表](計2件)

中田 勉, Bernhard Flucher, 柏原俊英, 小松雅俊, 山田 充彦. Ca_v1.1 のジャンクトフィリン結合ドメインへの点変異導入は、骨格筋 L 型カルシウムチャンネルの結合膜構造への集積を阻害する。第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場, 神戸

中田 勉, Bernhard Flucher, 柏原俊英, 小松雅俊, 山田 充彦. 横紋筋 L 型カルシウムチャンネルの結合膜局在化機構。第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 20 日, 仙台国際センター, 仙台

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-yakuri/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

中田 勉 (NAKADA, Tsutomu)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：70452141

(3)連携研究者

山田 充彦 (YAMADA, Mitsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：10263237

柏原 俊英 (KASHIHARA, Toshihide)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：20552334

鈴木 季直 (SUZUKI, Suechika)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：10082174