

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790210

研究課題名(和文)心不全の心室筋でT管のL型カルシウムチャネルの基礎活性が低下する分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying regulation of basal activity of t-tubular L-type Ca channels in ventricular myocytes

研究代表者

柏原 俊英 (KASHIHARA, Toshihide)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：20552334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：最近の薬物療法の発展にも関わらず、心不全の予後は依然悪く、新たな作用機序を持った治療薬の開発が必要である。最近我々は、心筋L型カルシウムチャネル(LTCC)の基礎活性がカゼインキナーゼ2(CK2)により制御されていることを見出した。そこで本研究は、その分子機構の詳細を検討した。その結果、心筋のLTCCの基礎活性を担うキナーゼの一つが、 $\beta$ 2型CK2であることが分かった。心不全ではT管のLTCCの基礎活性が低下し心機能が低下している可能性が考えられるため、 $\beta$ 2型CK2を活性化するような方法は新たな心不全治療法になることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Despite recently advanced medical therapies, heart failure is one of the leading risks of death in developed nations. T-tubular L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels (LTCC) in ventricular myocytes play a crucial role in cardiac excitation-contraction coupling. Decreased basal activity of t-tubular LTCC is involved in cardiac dysfunction. We recently found that basal activity of LTCC is supported by casein kinase 2 (CK2). Here, I examined the molecular mechanisms underlying regulation of basal LTCC activity by CK2. In the result, I found that CK2 $\beta$  determines the basal activity of cardiac LTCC.

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：L型カルシウムチャネル 心筋 タンパク質リン酸化酵素 心不全 T管 興奮収縮連関

## 1. 研究開始当初の背景

最近の薬物療法の発展にも関わらず、心不全の予後は依然悪く、新たな作用機序を持った治療薬の開発が必要である。申請者は最近世界で初めて、心不全で心室筋細胞の興奮収縮連関の要であるT管のL型カルシウムチャネル(LTCC)の基礎活性がタンパク質脱リン酸化酵素(PP)2Aの過剰な作用により半減していることを見出した。このことは、心筋のLTCCの基礎活性が、病態に応じてリン酸化と脱リン酸化によりダイナミックに調節されていることを意味する。ごく最近申請者は、カゼインキナーゼ2(CK2)がLTCCの基礎活性を調節していることを見出した。本研究は、これらの知見に最近報告されたLTCC遠位C末端(DCT)によるCav1.2 LTCC活性化制御に関する知見を加えて、心不全におけるT管のLTCCの異常をCK2とPP2Aの作用のアンバランスで説明使用とするものである。

## 2. 研究の目的

最近の薬物療法の発展にも関わらず、心不全の予後は依然悪く、新たな作用機序を持った治療薬の開発が必要である。申請者は最近世界で初めて、心不全で心室筋細胞の興奮修復連関の要であるT管のLTCCの基礎活性がPP2Aの過剰な作用により半減していることを見出した。このT管のLTCCの基礎活性の低下は不全心の心機能の低下に有意に寄与していると考えられるが、その分子機構の解明は十分でない。

心筋のLTCCは、主たるCav1.2サブユニットと付随的な $\beta_2$ および $\alpha_2\delta$ サブユニットから構成される。Cav1.2のC末端は、翻訳後何らかの酵素により1,800番目付近のアミノ酸で切断され、近位側C末端(PCT)と遠位側C末端(DCT)に分かれる。その後、PCTとDCTは、静電的作用で非共有的に再結合する。このDCTのPCTへの再結合は、LTCC活性を自己抑制する。一方、PCT上のDCT結合部位に存在する1,700番目のセリン(Ser1700)と1,704番目のトレオニン(Thr1704)のリン酸化は、この静電的結合を阻害してチャネル活性を高める。すなわち、DCTによる自己抑制は、キナーゼとPPで制御される。LTCCを活性化することでよく知られるAキナーゼやCa<sup>2+</sup>/カルモデュリンキナーゼは、Ser1700をリン酸化する。一方、Thr1704はCK2によりリン酸化され、LTCCの基礎活性に関与すると考えられている。さらに、DCTにはPP2Aが直接結合しており、申請者はPP2AがSer1700やThr1704を脱リン酸化する可能性があると考えている。

申請者は、最近心筋細胞で、CK2がLTCCの基礎活性を調節していることを見出した。したがって、申請者は、正常な心室筋細胞では、LTCCの基礎活性はCK2によるThr1704のリン酸化で保たれているが、心不

全のT管では、PP2A活性の亢進によりThr1704が過剰に脱リン酸化され、LTCC活性の自己抑制が強まり、LTCCの基礎活性が半減しているのではないかと考えている。本研究では、この仮説に基づき、心不全でT管のLTCCの基礎活性低下が生じる分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) CK2がDCTにより自己抑制されたCav1.2 LTCCに与える効果の解析

CK2は $\alpha$ 、 $\alpha'$ 触媒サブユニットと $\beta$ 調節サブユニットからなるヘテロ4量体で構成されるセリン・トレオニンキナーゼである。本実験では、tsA201細胞に心筋で認められるようなDCTによるCav1.2 LTCCの自己抑制機構を再構築して、CK2によるLTCCの制御機構を、以下の方法で解析した。

tsA201細胞のCK2の発現レベルを、Western blot法で調べた。

CK2の選択的阻害薬キナリザリン及びCK2のsiRNAが、Cav1.2 $\Delta$ 1821 + DCTの活性化効率に与える効果を検討した。TsA201細胞にCK2の $\alpha$ ・ $\alpha'$ ・ $\beta$ サブユニットを種々の組合せで強制発現させてCav1.2 $\Delta$ 1821 + DCTの活性化効率が増加するかパッチクランプ法で調べた。PCTにあるCK2のリン酸化サイトであるThr1704をAlaに置換した変異体(Cav1.2 $\Delta$ 1821 T1704A)を作成し、Cav1.2 $\Delta$ 1821 T1704A + DCTの活性化効率をパッチクランプ法で調べた。

(2) 心筋におけるCav1.2 LTCCのCK2による制御機構の解析

TsA201細胞を用いたリコンビナントLTCCの解析で明らかにした $\alpha_2\beta_2$ 型CK2による心筋型LTCCの基礎活性制御機構が、心筋細胞で認められるかどうか、マウス心筋細胞株HL-1細胞を用いて解析した。

HL-1細胞にCK2 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 、 $\beta$ が存在するかどうかWestern blot法で調べた。

HL-1細胞においてキナリザリンがLTCC電流に与える効果を検討した。

心筋でCK2 $\alpha'$ を活性化することが報告されているアンジオテンシンII(AngII)刺激がHL-1細胞のLTCC活性に与える効果を解析した。

## 4. 研究成果

(1) Western blot法でtsA201細胞におけるCK2の各サブユニットの発現を確認した結果、 $\alpha$ ・ $\alpha'$ ・ $\beta$ サブユニットの発現が認められた。CK2の選択的阻害薬キナリザリンはリコンビナントLTCCの基礎活性(Cav1.2 $\Delta$ 1821 + DCT)を有意に抑制した。TsA201細胞にCK2 $\alpha$ ・ $\alpha'$ ・ $\beta$ サブユニットの発現が認められたため、siRNAでそれぞれのサブユニットをノックダウンさせた結果、 $\alpha'$ と $\beta$ のノックダウンはリコンビナントLTCC

の基礎活性を半減させた。しかし、 $\alpha$ のノックダウンはそれを抑制しなかった。これより、tsA201細胞においてCK2 $\alpha'$ と $\beta$ はリコンビナント LTCC の基礎活性を制御することが示唆された。次に、CK2 の $\alpha \cdot \alpha' \cdot \beta$ サブユニットを種々の組合せで tsA201 細胞に強制発現させた結果、 $\alpha'$ はリコンビナント LTCC の基礎活性を僅かに有意に増加したが、 $\alpha' + \beta$ はそれをより強くほぼ最大限に増加した。しかし、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\alpha + \beta$ の強制発現はそれを有意に増加しなかった。これより、CK2 $\alpha'\beta$ 複合体はリコンビナント LTCC を最大限に活性化することができる可能性が示された。CK2 $\alpha'\beta$ による LTCC 活性化の分子機構を明らかにするため、Cav1.2 $\Delta$ 1821 T1704A を用いた検討を行った結果、CK2 $\alpha' + \beta$ の強制発現による LTCC 活性の増加は Cav1.2 $\Delta$ 1821 T1704A + DCT では全く認められなかった。これより、CK2 $\alpha'\beta$ は PCT の Thr1704 のリン酸化を介して DCT による LTCC の自己抑制を解除することで LTCC の基礎活性を制御することが示された。

(2) Western blot 法で HL-1 細胞における CK2 の各サブユニットの発現を確認した結果、 $\alpha \cdot \alpha' \cdot \beta$ サブユニットの発現が認められた。CK2 阻害薬キナリザリンは HL-1 の LTCC 電流を有意に抑制しなかった。HL-1 細胞では、通常時の CK2 $\alpha'$ の活性が低い可能性が示唆された。心筋で CK2 $\alpha'$ を活性化することが報告されている AngII 刺激は HL-1 細胞の LTCC 活性を濃度依存的に2倍近く増加させた。キナリザリンは AngII 誘発性の LTCC 活性の増加をほぼ完全に抑制した。これより心筋においても CK2 $\alpha'$ は LTCC 活性を制御することが示された。

本研究より、心筋の LTCC の基礎活性を担うキナーゼの一つが CK2 $\alpha'\beta$ であることが初めて分かった。また、心筋細胞において AngII が CK2 $\alpha'\beta$  を介して LTCC を活性化する可能性が見出された。心不全では T 管の LTCC の基礎活性が低下し心機能が低下している可能性が考えられるため、CK2 $\alpha'\beta$ を活性化するような方法は新たな心不全治療法になることが期待できる。今後はこのメカニズムの詳細を明らかにすると共に、*in vivo* 解析に発展させ、新たな心不全治療法の考案を目指す。

#### 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1件)

Kashihara T., Hirose M., Shimojo H., Nakada T., Gomi S., Hongo M., Yamada M.  $\beta_2$ -Adrenergic and  $M_2$ -muscarinic receptors decrease basal t-tubular L-type  $Ca^{2+}$  channel activity and suppress ventricular contractility in heart failure.

*Eur J Pharmacol*, 724:122-131, 2014 査読有 DOI:10.1016/j.ejphar.2013.12.037.

[学会発表](計7件)

Toshihide Kashihara, Gomi Shimmon, Mitsuhiro Yamada  
Casein Kinase 2  $\alpha' \beta$  Determines the Basal Activity of  $Ca_v1.2$  Cardiac L-type  $Ca^{2+}$  Channels  
第78回日本循環器学会学術集会  
2014年3月23日  
東京国際会議場

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiro Yamada  
Regulation of the basal activity of  $Ca_v1.2$  cardiac L-type  $Ca^{2+}$  channels by casein kinase 2  $\alpha' \beta$   
第87回日本薬理学会年会  
2014年3月19日  
仙台国際センター

柏原俊英、中田勉、山田充彦  
カゼインキナーゼ2による心筋  $Ca_v1.2L$  型  $Ca^{2+}$ チャネルの基礎活性制御の分子機構の解析  
第23回日本循環薬理学会  
2013年12月6日  
福岡大学

柏原俊英、中田勉、五味志文、山田充彦  
カゼインキナーゼ2による心筋型 L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの基礎活性制御の分子機構  
第30回日本心電学会学術集会  
2013年10月11日  
リンクステーションホール青森

柏原俊英、中田勉、五味志文、弘瀬雅教、山田充彦  
慢性的で過剰な  $\beta_1$  アドレナリン受容体刺激が心室筋の興奮収縮連関を修飾する分子機構序について  
第90回日本生理学会大会  
2013年3月29日  
タワーホール船堀

柏原俊英、中田勉、五味志文、山田充彦  
カゼインキナーゼ2による  $Ca_v1.2$  心筋型 L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの基礎活性の制御  
第86回日本薬理学会年会  
2013年3月21日  
福岡国際会議場

柏原俊英、中田勉、五味志文、山田充彦  
スタウロsporin感受性キナーゼとカゼインキナーゼ2による心室筋 L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの基礎活性の制御  
第29回日本心電学会学術集会  
2012年10月12日  
幕張メッセ国際会議場

6 . 研究組織

研究代表者

柏原 俊英 (KASHIHARA, Toshihide)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 20552334