

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26860145

研究課題名(和文) カゼインキナーゼ2による心筋L型Caチャンネル活性制御の生理・病態生理的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological and pathophysiological roles of casein kinase 2 in the regulation of cardiac L-type Ca channels

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：心室筋細胞のCaV1.2 L型Ca²⁺チャンネル(LTCC)は、興奮収縮連関の要である。我々は最近、AT1アンジオテンシン受容体を介して駆動されるカゼインキナーゼ2(CK2)がLTCCの制御に重要であることを見出した。そこで本研究では、CK2によるLTCC活性化制御の分子機構とその生理・病態生理的意義を検討した。本研究より我々は、CK2がCaV1.2の1704番目のトレオニンをリン酸化することでLTCCを強力に活性化させること、またアンジオテンシンがAT1受容体/ -arrestin2/Src/CK2を介して成体ではなく幼若な心筋細胞のLTCCを強力に活性化させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：CaV1.2 L-type Ca²⁺ channels (LTCC) play an essential role in cardiac excitation-contraction coupling. We recently found that LTCC activity is regulated by casein kinase 2 (CK2) in immature cardiac myocytes. Here, we examined the molecular mechanism underlying the regulation of LTCC activity by CK2. In this study, we revealed that CK2 determines LTCC activity through phosphorylating threonine 1704 of CaV1.2, and that angiotensin II strongly activates LTCC through AT1 receptor/ -arrestin2/Src/CK2 in immature but not adult cardiac myocytes.

研究分野：イオンチャンネルの分子生理・薬理学

キーワード：L型カルシウムチャンネル 心筋 タンパク質リン酸化酵素 心筋興奮収縮連関 アンジオテンシン

1. 研究開始当初の背景

心室筋細胞の T 管の Cav1.2 L 型 Ca²⁺チャネル (LTCC) は、興奮収縮連関の要である。研究代表者らは最近、心不全では G_{i/o} タンパク質と共役する β₂ アドレナリン受容体や M₂ ムスカリン性受容体が、過剰なタンパク質脱リン酸化酵素 2A の活性化を介して T 管の LTCC の基礎活性を半減させ、心収縮力を低下させることを見出した。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している。一方、この脱リン酸化の前提となる LTCC のリン酸化には、AT₁ アンジオテンシン受容体を介して駆動されるカゼインキナーゼ 2 (CK2) が重要な役割を果たすことも新たに見出した。そこで本研究では、CK2 による LTCC 活性制御の分子機構を明らかとし、この反応の心不全での病態生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

心室筋細胞の Cav1.2 L 型 Ca²⁺チャネル (LTCC) は、T 管膜と表面細胞膜の両方に存在する。心室筋細胞では、活動電位は T 管を伝って細胞の深部に迅速かつ一様に到達し、そこで LTCC を開口し細胞外 Ca²⁺を細胞内に流入させる。流入した Ca²⁺は、T 管の LTCC の近傍にあるリアノジン受容体を開口させ、筋小胞体から Ca²⁺遊離を生じ心収縮を引き起こす。したがって、心室筋細胞の興奮収縮連関において T 管の LTCC は表面細胞膜の LTCC より重要な役割を果たす。

これまでに研究代表者らは、T 管と表面細胞膜の LTCC 活性を区別した検討を行った結果、正常マウスでは T 管は表面細胞膜より約 5 倍高い LTCC 活性を有しているが、心不全マウスでは T 管の LTCC 活性は半減していることを見出した。さらにこの異常は、β₂ アドレナリン受容体と M₂ ムスカリン性受容体が G_{i/o} タンパク質を介し、タンパク質脱リン酸化酵素 2A を活性化して T 管の LTCC を過剰に脱リン酸化するためであることを見出した。このことは、心室筋細胞の 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。そこで研究代表者は、LTCC のリン酸化を司るキナーゼの検索を行った。その結果、マウス単離心室筋細胞においてカゼインキナーゼ 2 (CK2) が重要であることを見出した。

そこで本研究では、CK2 による LTCC 活性制御の分子機構を明らかとし、さらにこの反応の心不全での病態生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) AII による心室筋細胞の LTCC 活性化の解析

新生児及び成体マウスの単離心室筋細胞

を得て、3 μM の AII 刺激が LTCC 活性に与える効果をパッチクランプ法で検討した。(2) AII による LTCC の活性化に関わる CK2 サブユニットの同定

CK2 は、α、α' 触媒サブユニット 2 つと β 調節サブユニット 2 つからなる異種 4 量体である。そこで、マウス不死化心房筋細胞株 HL-1 を用いて、α、α'、β の shRNA をレンチウィルスベクターで導入し、これらのノックダウンが AII による LTCC 活性化に与える効果を検討した。

(3) CK2 による Cav1.2 のリン酸化部位の同定

tsA201 細胞に心筋型 LTCC を再構築して、パッチクランプ法で LTCC 電流を測定した。CK2α'β の強制発現が、野生型 Cav1.2 の LTCC 電流を増加させることを確認した後、CK2 のリン酸化部位である Cav1.2 の 1704 番目のトレオニンのアラニン置換体の効果を検討した。

(4) CK2α'β と Cav1.2 の相互作用の解析

tsA201 細胞に CK2α'β と Cav1.2 を強制発現させ、そのホモジナイズを得て、共免疫沈降法で CK2α'β と Cav1.2 の相互作用を調べた。

(5) AII 刺激による CK2α'β を介した LTCC 活性化のシグナル伝達経路の解析

HL-1 細胞を用いて、G_{q/11} 及び Barrestin1/2 のノックダウンと Src tyrosine kinase (Src) の阻害因子である C-terminal Src kinase (CSK) の強制発現が AII による LTCC の活性化に及ぼす効果を検討した。

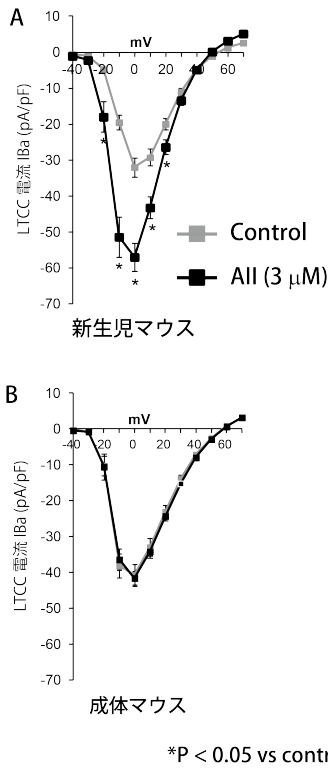
4. 研究成果

新生児及び成体マウスの単離心室筋細胞を用いて LTCC に対する AII の効果を検討した。AII は、新生児の心室筋細胞では LTCC 活性を約 2 倍に増加させたが、成体の心室筋細胞では有意な効果を示さなかった (図 1)。

次に、幼若な心筋細胞の特徴を有する HL-1 細胞を用いて、CK2α、α'、β のそれぞれのノックダウンが AII 刺激による LTCC 活性の増加に与える効果を検討した。CK2α' と β サブユニットのノックダウンはそれぞれ AII 刺激による LTCC 活性の増加を有意に抑制したが、α サブユニットのノックダウンは有意な効果を示さなかった。これより、AII 刺激による心筋 LTCC の活性化には CK2α'β が重要であることが示唆された。

CK2 による Cav1.2 のリン酸化部位をリコンビナント LTCC を用いて調べた。CK2α'β の強制発現はリコンビナント LTCC の活性を著明に増加させた。しかし、CK2α'β は、Cav1.2 の 1704 番目のトレオニンのアラニン置換体を活性化させなかった (図 2)。すなわち CK2α'β は Cav1.2 の 1704 番目のトレオニンをリン酸化するこ

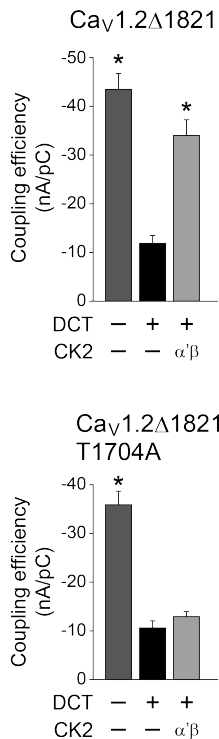
図1 A, B, 心室筋細胞の LTCC 電流に対する AII の効果



とで LTCC を活性化させることが分かった。

共免疫沈降法で CK2 と Cav1.2 の結合を検討した。CK2 α' β は、1821 番目以降の C 末端を欠失させた Cav1.2 とは結合したが、1821 番目以降の C 末端 (DCT) とは結合

図2 CK2 α' β による心筋 LTCC の活性化

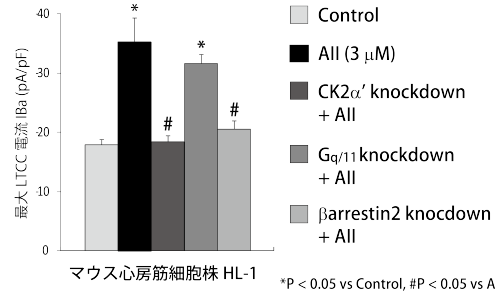


*P < 0.05 vs DCT

しなかった。また、CK2 α' 単独では Cav1.2 と結合しなかった。これより CK2 α' β は、 β を介して Cav1.2 の遠位 C 末端以外の領域と相互作用することが示唆された。

最後に、AII 刺激による CK2 α' β を介した LTCC 活性化のシグナル伝達経路の検討を、HL-1 細胞で行った。この反応で AT₁ 受容体と共役する分子を同定するために、HL-1 細胞の G_{q/11} 及び β arrestin1/2 のノックダウンを検討した。その結果、AT₁ 受容体は β arrestin2 を介して LTCC を活性化させることが分かった (図3)。次に、AT₁ 受容体/ β arrestin2 の下流のシグナル伝達経路の検討を行った。 β arrestin2 は Src と相互作用して様々なシグナル伝達経路を制御することが知られている。そこで、Src の阻害因子である CSK の強制発現の効果を検討した結果、CSK は AII による LTCC の活性化を有意に抑制した。

図3 AII による LTCC 活性化機構の解析



本研究より、幼若心筋細胞では AII は AT₁ 受容体/ β arrestin2/Src/CK2 α' β を介して LTCC を強力に活性化させることが明らかとなった。したがって、AII は、成人では G_{q/11} 信号を介して心不全を悪化させるネガティブな因子と捉えられがちであるが、小児では β arrestin2/CK2 を介して収縮力を増強させる重要な循環調節因子と考えられた。

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2件)

Gautam M., Fujita D., Kimura K., Ichikawa H., Izawa A., Hirose M., Kashihara T., Yamada M., Takahashi M., Ikeda U., Shiba Y. (2015) Transplantation of adipose tissue-derived stem cells improves cardiac contractile function and electrical stability in a rat myocardial infarction model. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 81:139-149 査読有 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.02.012
Matsushita N., Kashihara T., Shimojo H., Suzuki S., Nakada T., Takeishi Y., Mende U., Taira E., Yamada M., Sanbe A., Hirose M. (2014) Cardiac overexpression of constitutively active

Galpha q causes angiotensin II type1 receptor activation, leading to progressive heart failure and ventricular arrhythmias in transgenic mice *PLoS One*, 29;9(8):e106354 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0106354

〔学会発表〕(計6件)

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Mitsuhiko Yamada

Angiotensin II activates L-type Ca^{2+} channels through removing inhibition of casein kinase $2\alpha\beta$ by $p27^{KIP1}$ in immature cardiac myocytes

第89回日本薬理学会年会

2016年3月9日~2016年3月11日

神奈川県横浜市西区 パシフィコ横浜 会議センター

柏原俊英、中田勉、山田充彦

カゼインキナーゼ2による幼若心筋細胞の L型 Ca^{2+} チャネル活性化の分子機構

第25回日本循環薬理学会

2015年12月4日

奈良県奈良市水門町 東大寺総合文化 センター金鐘ホール

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Xiaoguang Guo, Mitsuhiko Yamada

Regulation of L-type Ca^{2+} channels by angiotensin II type 1 receptor/ β -arrestin-2 biased signaling through casein kinase 2 in immature cardiomyocytes

第92回日本生理学会大会

2015年3月21日~2015年3月23日

兵庫県神戸市中央区 神戸国際会議場

Toshihide Kashihara, Tsutomu Nakada, Xiaoguang Guo, Mitsuhiko Yamada

Angiotensin II type 1 receptor/ β -arrestin2 biased signaling activates L-type Ca^{2+} channels in immature cardiac myocytes

第88回日本薬理学会年会

2015年3月18日~2015年3月20日

愛知県名古屋市熱田区 名古屋国際会議場

柏原俊英、中田勉、郭曉光、山田充彦

AT_1 アンジオテンシン 受容体/ β アレスチン2 バイアスシグナルは $\alpha\beta$ 型カゼインキナーゼ2の活性化を介して幼若心筋細胞の L型 Ca^{2+} チャネルを活性化させる

第24回日本循環薬理学会

2014年12月5日

山形県山形市双葉町 山形テルサ

Toshihide Kashihara and Mitsuhiko Yamada

Failure to deactivate ventricular L-type Ca^{2+} channels in the phase 3

hyperpolarization is the direct cause of early afterdepolarization and *torsade de pointes*

第29回日本不整脈学会学術大会/第31回日本心電学会学術大会 合同学術大会

2014年7月22日~2014年7月25日

東京都港区 ザ・プリンスタワー東京

6. 研究組織

研究代表者

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