

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08491

研究課題名(和文) 骨格筋の興奮収縮連関を調節するジャンクトフィリンの新たな機能

研究課題名(英文) Role of junctophilins on excitation-contraction coupling of skeletal muscles

研究代表者

中田 勉 (Nakada, Tsutomu)

信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授

研究者番号：70452141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋には結合膜構造と呼ばれる部位が存在し、形質膜上のL型カルシウムチャンネル(LTCC)と、筋小胞体膜上のリアノジン受容体は、この部位で機能的複合体を形成している。LTCCの結合膜への集積は正常な筋収縮に必須である。本研究では、LTCCの正常な局在や機能におけるジャンクトフィリン(JP)分子の役割について検討を行った。JPのC末端を欠失した変異体をマウス骨格筋に発現させると、LTCCと内在性JPの結合が阻害され、カルシウム上昇、筋収縮力などが低下することが明らかになった。この結果は、JPとLTCCの物理的結合が正常な筋収縮に不可欠であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、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が、ジャンクトフィリンとの直接的な結合によって調節されていることを、生体を用いた実験で初めて示した。骨格筋の収縮メカニズムを理解することは、正常状態の筋生理のみならず、様々な病態生理を説明する上で重要である。また、骨格筋と心筋の結合膜構造には多くの共通点があり、本研究で得られた知見は、心筋の収縮機構についても応用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Close physical association of CaV1.1 L-type calcium channels (LTCCs) at the sarcolemmal junctional membrane (JM) with ryanodine receptors of the sarcoplasmic reticulum (SR) is crucial for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. However, the molecular mechanism underlying the JM targeting of LTCCs is unexplored. Junctophilins (JPs) 1 and 2 stabilize the JM by bridging the sarcolemmal and SR membranes. A JP1 mutant lacking the C-terminus including the transmembrane domain (JP1<sup>CT</sup>) interacted with the sarcolemmal/T-tubule membrane but not the SR membrane. Expression of this mutant in adult mouse muscles impairing LTCC-JP coupling at triads, and substantially reducing Ca<sup>2+</sup> transients without affecting SR Ca<sup>2+</sup> content. Moreover, the contractile force of the JP1<sup>CT</sup>-expressed muscle was dramatically reduced compared with the control. Taken together, JPs recruit LTCCs to the JM through physical interaction and ensure robust ECC at triads in skeletal muscle.

研究分野：生理学

キーワード：興奮収縮連関 骨格筋 L型カルシウムチャンネル ジャンクトフィリン リアノジン受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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、形質膜上のL型カルシウムチャネル(LTCC)と、筋小胞体膜上のリアノジン受容体(RyR)が、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。筋細胞に活動電位が発生すると、LTCCは構造を変化させ、その刺激をRyRに伝え開口させる。RyRは筋小胞体内のカルシウムイオンを細胞質に放出し、これにより筋収縮が引き起こされる。このようにLTCCとRyRが結合膜構造に共同在することは、電気信号をカルシウム信号に変換するために必須であり、その異常は致死的である。しかし、LTCCがどのように結合膜に集積し、その機能を維持しているかについて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、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末端に形質膜の脂質に結合するドメインを有している。JPはこの2つのドメインにより、形質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。これまでの培養細胞を用いた検討により、ジャンクトフィリン(JP)がLTCCに物理的に結合し局在や機能を調節していることを見いだしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、このLTCCの局在や機能を調節する分子として、JPに注目し、生体内での詳細な役割を明らかにする。JPはこれまで、形質膜と筋小胞体膜を架橋する物理的な役割を果たすと考えられてきた。しかし研究代表者は、培養細胞を用いた検討により、JPがLTCCに物理的に結合し局在や機能を調節するという、これまでに知られていない機構が存在することを見いだした。本研究ではこの機構の詳細な分子メカニズムを明らかにするための検討を行った。

### 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)に置き換え、4日後にFugene HDを用いたり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。播種後8-10日後に免疫染色を行った。

(2)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FLAG抗体、抗CaV1.1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IgG抗体を用いた。標本の観察にはLecica TCS SP8を使用した。

(3) Proximity ligation assay: proximity ligation assayは2つの分子の近接性を切片上で検出する実験法である。この実験は、sigmaのDuolink PLA kitを用い、説明書通りの方法で行った。一次抗体は免疫染色と同じものを用いた。

(4)免疫沈降およびウェスタンブロッティング: マウス骨格筋をホモジネーションバッファー(20 mM HEPES, 320 mM Sucrose)中でホモジナイズ後、5000 g, 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、沈殿をリソソーム画分とした。このミクロソームに抗CaV1.1抗体、抗CaV1.1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。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) In vitroにおけるC末端欠失JP1変異体(JP1ΔCT)の作用

これまでの検討により、JP1やJP2の発現をsiRNAで抑制すると、LTCCの結合膜構造への集積が阻害されることを見いだしていた。しかし、この方法は結合膜構造自体に影響を及ぼす可能性が無視できない。

一方竹島らの報告によれば、JP1の筋小胞体膜貫通部位を欠失させた変異体は、結合膜には局在せず、細胞膜全体に局在することが示されている(Takeshima et al., Mol Cell., 2000)。研究代表者は、これと類似した変異体を筋細胞に強制発現させれば、この変異体がLTCCと結合し、内因性のJPとの結合を阻害できるのではないかと考えた。そこで、JP1の筋小胞体膜貫通部位を含むC末端を欠失させた変異体(JP1ΔCT)を作製し、培養筋管に発現させた。その結果、JP1ΔCTの発現はLTCCの結合膜への局在を有意に抑制した。

#### (2) In vivoにおけるC末端欠失JP1変異体(JP1ΔCT)の作用

①アデノ随伴ウイルスを用いたJP1ΔCTの発現: In vitroの実験で、JP1ΔCTの発現がLTCCの結合膜への集積を阻害することが明らかになった。そこで、JP1ΔCTの遺伝子をアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)に組み込み、マウス骨格筋への強制発現を試みた。前脛骨筋および短趾

屈筋に JP1ΔCT-AAV を筋注し, 20 日後に免疫染色を行ったところ, 80%以上の筋線維で JP1ΔCT の発現が認められた。

①LTCC の局在への影響: 短趾屈筋線維を単離し, 免疫染色を行った。コントロール群の筋線維では T 管上に強い LTCC のシグナルが認められたが, 表面細胞膜にはほとんど発現が認められなかった。一方, JP1ΔCT を強制発現した筋線維では, LTCC の表面細胞膜への強い発現が認められた。強制発現した JP1ΔCT は表面細胞膜における発現が確認された。これらの結果から JP1ΔCT が LTCC の異常な局在を誘導していることが示唆された (図 1)。

②LTCC と JP との結合への影響: LTCC と内因性の JP との結合に, JP1ΔCT の発現がどのように影響しているか明らかにするために, proximity ligation assay と共免疫沈降法の 2 つの方法で検討を行った。その結果, どちらの方法でも, LTCC と JP の結合が 1/3 程度まで減少していることが明らかになった (図 2)。

③カルシウムトランジェントへの影響: 短趾屈筋線維を単離し, Fluo-4 を用いたカルシウムイメージングを行ったところ, JP1ΔCT を発現した筋線維では, 電気刺激によって惹起されるカルシウムトランジェントの減弱が見られた。しかし筋小胞体カルシウム放出薬によるカルシウムトランジェントには変化が観察されなかった。これらの結果は JP1ΔCT の発現が, 筋小胞体内のカルシウム含量には影響せず, 興奮収縮連関のみを阻害していることを示唆している。

④筋収縮力への影響: 電気刺激に伴う前脛骨筋の収縮力について検討を行った。その結果, JP1ΔCT を発現させた前脛骨筋の特異張力は, コントロール群のものと比較して, 半分程度まで減少していることが明らかになった (図 3)。

### (3) 考察

本研究により, JP1ΔCT を強制発現したマウス筋では LTCC と JP の結合が阻害され, その結果, カルシウム代謝と筋力の低下が起こることが示された。これらの結果は, 骨格筋の正常な興奮収縮連関に, JP と LTCC の物理的結合が必要であることを示唆している。JP が結合膜構造の維持のみならず, LTCC の局在や機能を直接調節している可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計4件)

Zhang H, Kashihara T, Nakada T, Tanaka S, Ishida K, Fuseya S, Kawagishi H, Kiyosawa K, Kawamata M, Yamada M: Prostanoid EP4 Receptor-Mediated Augmentation of Ih Currents in Aβ Dorsal Root Ganglion Neurons Underlies Neuropathic Pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 368: 50-58 (2019) (査読有)

Komatsu M, Nakada T, Kawagishi H, Kato H, Yamada M: Increase in phospholamban content in mouse skeletal muscle after denervation. *J Muscle Res Cell Motil.* 39: 163-173 (2018) (査読有)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Kojima K, Takeshita T, Yamada M: Physical interaction of junctophilin and the Cav1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115: 4507-4512 (2018) (査読有)

Guo X, Kashihara T, Nakada T, Aoyama T, Yamada M: PDGF-induced migration of synthetic vascular smooth muscle cells through c-Src-activated L-type Ca<sup>2+</sup> channels with full-length Cav1.2 C-terminus. *Pflugers Arch.* 470: 909-921 (2018) (査読有)

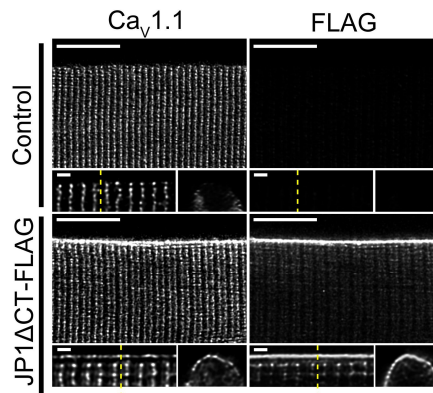


図 1: 短趾屈筋における LTCC の Cav1.1 と JP1ΔCT の局在。Cav1.1 は Cav1.1 に対する抗体で, JP1ΔCT は FLAG タグが付加をしているため, FLAG タグを FLAG 抗体で検出した。それぞれの画像の下段左は高拡大画像, 右は点線部の断面画像。

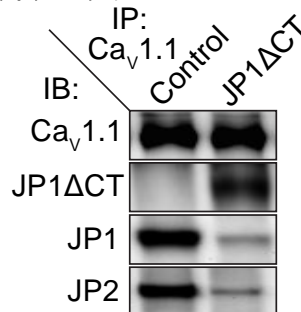


図 2: 前脛骨筋の共免疫沈降の結果。コントロールおよび JP1ΔCT を発現させた前脛骨筋からミクロソーム画分を精製し, 実験材料とした。Cav1.1 抗体で免疫沈降したサンプルを, 左に記載された抗体でイムノプロットした。

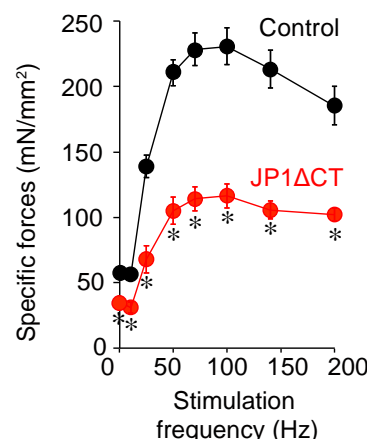


図 3: 前脛骨筋の特異張力の測定結果。コントロールおよび JP1ΔCT を発現させた前脛骨筋を各周波数で電気刺激し, 収縮力を測定した。測定後に断面積を測定し, 特異張力を計算した。

\* p<0.01, mean ± SE. n=6.

〔学会発表〕(計6件)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Yamada M. Interaction of junctophilins and the CaV1.1 is essential for the skeletal muscle contraction. The 9th Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies, Kobe, Japan (Mar, 2019)

中田 勉, 柏原俊英, 小松雅俊, 山田充彦. 骨格筋の正常な興奮収縮連関にはL型カルシウムチャンネルとジャンクトフィリンの物理的結合が必要である。第4回日本筋学会学術集会, 倉敷(2018年8月)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Yamada M. Physical interaction of junctophilins and CaV1.1 subunits is essential for the excitation-contraction coupling of the skeletal muscle. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, Japan (Jul, 2018)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Yamada M. Interaction of junctophilins and the C-terminus of CaV1.1 subunits regulates localization and function of L-type calcium channels in skeletal muscle. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease, Awaji, Japan (Oct, 2017)

中田 勉, 柏原俊英, 山田充彦. 膜貫通ドメイン欠失型ジャンクトフィリン1は, L型カルシウムチャンネルの結合膜への局在を阻害し, 筋力を低下させる。第90回日本薬理学会年会, 長崎(2017年3月)

Nakada T, Kashihara T, Komatsu M, Yamada M. Physical interaction of junctophilins and the C-terminus of CaV1.1 subunits is crucial for the excitation-contraction coupling of the skeletal muscle. 61th Biophysical Society Annual Meeting, New Orleans, USA (Feb, 2017)

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。