

カルモジュリンと ATP による Cav1.2 カルシウムチャンネルの制御機構

菘部悦子¹, 韓 冬雲¹, アスマラ ハディムリヤ¹, 封 瑞^{1,2}, 徐 建軍¹, 亀山正樹¹ (鹿児島大学大学院歯学総合研究科神経筋生理学, ²中国医科大学薬学院薬物毒理学)

電位依存性カルシウムチャンネル (Cav1.2) は、興奮収縮連関や遺伝子発現調節において重要な働きをする。その活動は、チャンネルの副サブユニットや調節因子によって修飾される。細胞内 Ca²⁺ 濃度の変動は、Ca²⁺ 依存性の促進作用 (CDF) と抑制作用 (CDI) として、チャンネルの活性を制御する。カルモジュリン (CaM) に Ca²⁺ が結合し、CaM とチャンネルの結合様式が変化し、チャンネルの活性が調節されると考えられており、様々なモデルが提唱されているが、一致した見解は得られていない。

我々は、パッチクランプ法を用いて Cav1.2 チャンネルの活性を記録し、その調節機構を検討した。チャンネルの活性は inside-out パッチ移行により低下、消失する (run-down 現象) が、CaM と ATP を付加することによりその活性を維持することが可能である [1]。そのため、CaM によるチャンネルの活性調節に加え、ATP の役割について検討した。Cell-attached での開確率を基準とし、inside-out での活性を解析した。モルモットの単離心筋細胞の Cav1.2 チャンネルの Ca²⁺ 濃度依存性を調べた結果、1 μM CaM と 3 mM ATP 存在下で、低濃度 Ca²⁺ (<200 nM) では活性化傾向を示し、高濃度 Ca²⁺ (>200 nM) では抑制傾向を示した [2]。この 2 相性の応答は、CaM 濃度依存性においても観察された。80 nM Ca²⁺ と 3 mM ATP 存在下で、CaM 濃度とチャンネル活性との関係は 2 μM で最大効果を示すベル型となった [2, 4]。ATP の作用としては、80 nM Ca²⁺ と 1 μM CaM 存在下で、濃度に依存したチャンネルの活性化傾向のみが観察された (<9 mM)。これらの濃度依存性は、生理的範囲内である。これらの関係は、Cav1.2 (α1 サブユニット), β サブユニット, α2δ を発現させた HEK293 細胞からの電流記録においても観察された。チャンネル C 末端遠位部を除いた変異体においても同様に観察された。よって、チャンネル活性の 2 相性については、その他の調節因子や、チャンネル C 末端配列による自己抑制の関与は低いといえる。

CaM と ATP の結合部位を検討するために、Cav1.2 チャンネルの細胞内ドメインペプチドを作成し、pull-down 実験を行った。CaM と ATP は、複数のペプチドに Ca²⁺ 濃度依存的に結合した

[3-5]。また、チャンネルの C 末端近位部では CaM と ATP の結合は競合することが示唆された [5]。

これらの結果から、CaM と ATP が直接的にチャンネルに結合し、Ca²⁺ 濃度依存的にチャンネルの活性を制御すること、CaM と ATP の濃度バランスがチャンネルの活性に影響することが示唆された。しかし、分子機構については更なる検討が必要である。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Xu JJ et al: Am J Physiol Cell Physiol **287**: C1717-C1724, 2004
2. Han DY et al: J Pharmacol Sci **112**: 310-319, 2010
3. Asmara H et al: J Pharmacol Sci **112**: 397-404, 2010
4. Minobe E et al: J Biol Chem **286**: 39013-39022, 2011
5. Feng R et al: Am J Physiol Cell Physiol **306**: C856-C863, 2014

小胞体カウンターイオンチャンネルを介した血圧調節機構

山崎大樹^{1,2}, 陶 晟辰², 竹島 浩^{1,2} (京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット, ²京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野)

小胞体にはタンパク質・脂質合成, Ca²⁺ 貯蔵, Ca²⁺ 放出などの機能が備わっている。中でも各刺激に応じた Ca²⁺ 放出は、筋収縮や神経伝達物質の放出など様々な生理機能を制御する。小胞体にはリアノジン受容体 (RyR) 及びイノシトール三リン酸受容体 (IP₃R) という 2 つの Ca²⁺ 放出チャンネルが存在する。これらを介して細胞質中へ Ca²⁺ が放出されると小胞体内腔に負電荷が発生する。効率的な Ca²⁺ 放出が持続するには、この負電荷を中和する機構が必要であり、その機構としてカウンターイオンチャンネルの存在が示唆されてきた。その実体は長らく不明であったが、2007 年に当研究室にてカウンターイオンチャンネル機能の一端を担う TRIC (trimeric intracellular cation) チャンネルが同定された [1]。TRIC チャンネルサブタイプには A 及び B の 2 つが存在し、TRIC-A は脳や心臓、骨格筋などの興奮性組織に高発現する。一方で、TRIC-B は普遍的な組織分布を示す。TRIC-A 及び -B の両方を欠損した *Tric*-DKO マウスは胎生 10.5 日ほどで心筋細胞小胞体内の Ca²⁺ オーバーロードにより死亡する [1]。Tric-b 欠損マウスは、II 型肺胞上皮細胞におけるサーファクタント合

成・分泌不全による肺胞形成不全の結果、出生直後に呼吸困難で死亡する [2]。一方で、*Tric-a* 欠損マウスは正常に生育・繁殖するが、骨格筋における Ca²⁺ ハンドリング異常により alternan 収縮が観察されることがすでに報告されている [3]。

我々は、興奮性組織に高発現する TRIC-A を欠損した *Tric-a* 欠損マウスが若年性高血圧を示すことをすでに報告した [4]。その発症機序は血管平滑筋細胞における過分極シグナル障害である。発端となるのが細胞膜直下に局在する筋小胞体膜上 RyR からの自発的かつ一過的な Ca²⁺ 放出、いわゆる Ca²⁺ スパーク頻度の減少である。Ca²⁺ スパーク頻度の減少は細胞膜上の大コンダクタンス Ca²⁺ 活性化 K⁺ チャンネル開口による自発的一過性外向き電流 (STOCs) 頻度を減少させ、静止膜電位を脱分極させる。脱分極により電位依存性 Ca²⁺ チャンネルを介した Ca²⁺ 流入が増大し、定常状態の Ca²⁺ レベルが上昇することで血管が恒常的に収縮し、高血圧に至ることを明らかにした。*Tric-a* 欠損により血管平滑筋細胞において Ca²⁺ スパーク頻度が減少することから TRIC-A と RyR が機能的に共役している可能性が示唆された。これを確かめるため我々は平滑筋特異的 *Tric-a* 過剰発現 (*Tric-a* Tg) マウスを作製し、TRIC-A の血圧調節への寄与ならびに RyR との機能的共役について検討した。*Tric-a* Tg マウスは *Tric-a* 欠損マウスとは逆に低血圧を示した [5]。単離血管平滑筋における Ca²⁺ スパーク頻度は顕著に上昇し、それに伴い STOCs 頻度も上昇していた。さらに静止膜電位の過分極シフト及び定常状態 Ca²⁺ レベルの低下が観察されたことから、過分極シグナルの全ての過程で *Tric-a* 欠損マウスとは正反対の現象が観察されることが明らかとなった [5]。*Tric-a* 欠損により RyR を介した Ca²⁺ スパーク頻度が減少し、*Tric-a* 過剰発現により Ca²⁺ スパーク頻度が増加したことから、TRIC-A と RyR が機能的に共役していると考えられ、また血管平滑筋における TRIC-A の発現量・密度が血圧制御に寄与することが示唆された。

愛媛大グループが中心となり構築した日本人集団の高血圧ケース-コントロール試験において一塩基多型 (SNPs) を検討した結果、TRIC-A 遺伝子を中心とする約 100 kb に分布する連鎖 SNPs が本態性高血圧リスクを上昇させることが明らかとなった。TRIC-A エキソン領域の上流に位置する高血圧リスク SNP 部位 rs17796739 には、日本人ゲノム集団において C (シトシン) 74%, T (チミン) 26% の頻度で分布する。この部位での低頻度 T 型ホモ接合体は 14 人に 1 人の確率で存在し、統計上有意に高血圧を発症するとともに

($p=0.018$)、約 18% 発症リスクが上昇するものと算出された。また、rs17796739 と連鎖する rs901792 においても、低頻度 C 型ホモ接合体で有意に高血圧を発症するとともに ($p=0.048$)、約 14% 発症リスクが上昇すると算出された。また、国立循環器病研究センターが中核となり、汎用される降圧薬であるサイアザイド利尿薬、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬と Ca²⁺ チャンネル阻害薬を高血圧患者約 130 名に処方し、それぞれの降圧効果を検討するとともに、血液試料から遺伝子多型を検査する臨床試験 (GEANE (gene evaluation for antihypertensive effects of drugs) study) が行われた。この臨床試験において TRIC-A 遺伝子多型に注目したところ、TRIC-A 高血圧リスク多型が降圧薬の感受性を規定することが示された。例えば、rs901792 に注目すると、高血圧リスク C 型 (シトシン) のホモ接合体は上記 3 剤の降圧作用に対して抵抗性を示す。また、rs901792 と連鎖する rs10403969 においても、低頻度ホモ接合体において降圧薬への抵抗性が確認された。以上より、TRIC-A 遺伝子多型検査が高血圧予防、降圧薬の選択や用量決定などの個別化医療に貢献することが期待される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Yazawa M et al: Nature **448**: 78-82, 2007
2. Yamazaki D et al: Development **136**: 2355-2361, 2009
3. Zhao X et al: J Biol Chem **285**: 37370-37376, 2010
4. Yamazaki D et al: Cell Metab **14**: 231-241, 2011
5. Tao S et al: J Biol Chem **288**: 15581-15589, 2013

心筋細胞における核内および細胞質内 Ca²⁺ 制御とその生理的意義: NCS-1 の役割について

中村一西谷友重, 中尾 周, 若林繁夫 (国立循環器病研究センター分子生理)

心臓は、毎秒、収縮・弛緩を繰り返しているが、それに必須の細胞内機構としてカルシウム (Ca²⁺) レベルの増減 (Ca²⁺ トランジエント) が起こっている。すなわち、活動電位により電位依存性 Ca²⁺ チャンネルが開口し、これが引き金となって筋小胞体 SR から大量の Ca²⁺ が放出され筋収縮が導かれる (EC カップリング)。細胞内 Ca²⁺ トランジエントとは、一般的にこのようなグローバルな細胞質内 Ca²⁺ レベルの増減として捉えられてきた。一方これとは別に、核やミトコンドリアなど細胞内局

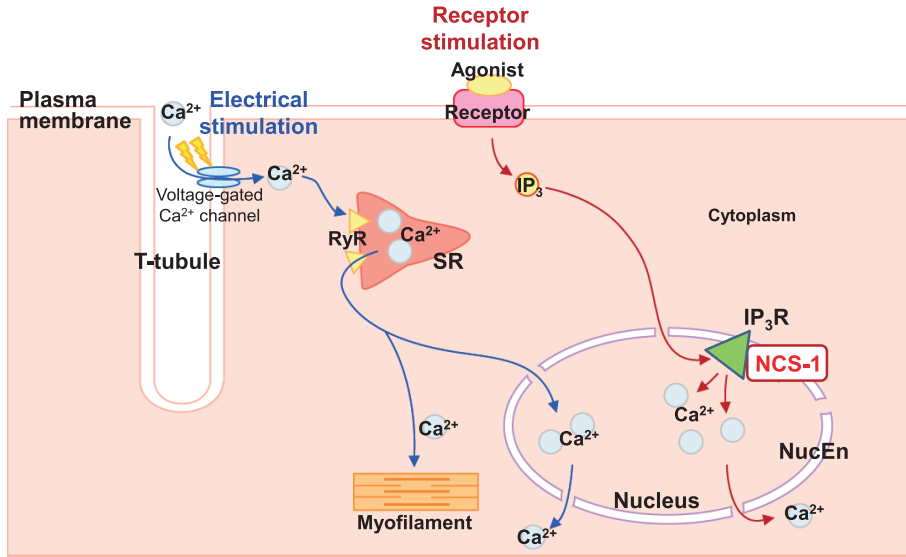


図 Distinctive mechanisms for nuclear calcium regulation in cardiomyocytes

所においても Ca^{2+} レベルの増減が起こり、遺伝子発現や細胞死など様々な細胞機能に寄与することが近年報告されている。例えば、ホルモン刺激により、細胞質内 Ca^{2+} のみならず核内 Ca^{2+} レベルの上昇が認められ、心肥大などに寄与することが近年明らかにされつつある。しかし、拍動ごとに細胞質内 Ca^{2+} 濃度が大きく変動する心筋細胞において、核内 Ca^{2+} 濃度がどのように個別に制御され、どんなタンパク質がそれに関与し、どのような生理機能に寄与するのか、など詳細は明らかでない。これらを明らかにする目的で、同一心筋細胞における核内および細胞質内 Ca^{2+} 濃度を同時測定できる新規蛍光 Ca^{2+} プロブ GECO および Fluo-4 を用いて、電気刺激または受容体刺激した際の核内・細胞質内 Ca^{2+} トランジエントを比較した。その結果、興味深いことに電気刺激により細胞質内のみならず収縮装置を持たない核内 Ca^{2+} 濃度も同期して増減したが、そのキネティクスは核内で遅延していた。詳細な解析から、電気刺激によりまず細胞質内 Ca^{2+} レベルが上昇するが、余分の Ca^{2+} は細胞質から核内へも（おそらく核膜孔を通して）移動することを示唆する結果を得た。すなわち EC カップリングの際は、SR のみならず核も細胞質内 Ca^{2+} の buffer として機能しているのではないかと考えられた。一方、IGF-1 による受容体刺激の場合、細胞質よりもむしろ核に優先的に Ca^{2+} レベルの上昇が認められた。これは、IGF-1 受容体が存在する T-管と核が物理的に近接

しているためという最近の知見 [1] に合致している。阻害剤による実験から、これは細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルであるイノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) を介して、細胞内 Ca^{2+} ストアの一つである核膜内から核内へ Ca^{2+} が流入することにより生じる可能性が示された。すなわち、EC カップリングの際は細胞質で、また受容体刺激の際は核内でより優先的に Ca^{2+} レベルが上昇し、それぞれ筋収縮、遺伝子発現など異なる細胞機能に寄与しているのではないかと考えられた。

一方、私達は心臓において IP_3R と相互作用する因子として、 Ca^{2+} 結合タンパク質である Neuronal Ca^{2+} sensor-1 (NCS-1) を以前見出していた [2]。NCS-1 は、イオンチャネル制御 [3] などを介して様々な神経機能に重要な役割を担うが [4, 5]、心臓における役割は長らく不明であった。私達は、Ncs1 欠損 (KO) マウスを用いて NCS-1 が IP_3R の活性化を介して心肥大を調節することを報告した [2]。そこで今回、NCS-1 が IP_3R との相互作用を介して心筋細胞の核内 Ca^{2+} 制御にも寄与するかどうかを検討した。その結果、NCS-1 は IP_3R と心筋細胞の核膜内および核周囲で共局在しており、受容体刺激により両者の相互作用が増加することが明らかとなった。また、IGF-1 刺激により誘発した核内 Ca^{2+} 濃度の増加は、WT と比べて KO で顕著に小さかったことから、おそらく NCS-1 が IP_3R 活性を増加させることによって核内 Ca^{2+} 濃度の増加に寄与していることが示唆された。

以上の結果は、未だ詳細なメカニズムが完全にはわかっていない核内 Ca^{2+} 制御の新たな調節機構のみならず、心肥大を導く遺伝子発現の新規経路を示すものと考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Ibarra C et al: *Circ Res* **112**: 236-245, 2013
2. Nakamura TY et al: *Circ Res* **109**: 512-523, 2011
3. Nakamura TY et al: *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12808-12813, 2001
4. Nakamura TY et al: *J Cell Biol* **172**: 1081-1091, 2006
5. Nakamura TY et al: *Trends in Cell & Molecular Biology* **7**: 99-110, 2012

ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換体 NCLX を介した心筋ミトコンドリアー筋小胞体 Ca^{2+} クロストークと自動能制御

竹内綾子, 松岡 達 (福井大学医学部統合生理学)

ミトコンドリアは、主な ATP 合成部位であるとともに、細胞内 Ca^{2+} の貯蔵庫としての役割を果たす。ミトコンドリアの Ca^{2+} 動態は、 Ca^{2+} ユニポータを介した取り込みと、 Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体、 H^+ - Ca^{2+} 交換輸送体を介した排出のバランスで決定される。近年、これらのミトコンドリア Ca^{2+} 輸送担体の分子実体が相次いで同定され、ミトコンドリア Ca^{2+} 動態や細胞の生理機能における寄与が明らかになりつつある [1-4]。我々は、ミトコンドリアからの Ca^{2+} 排出を担うミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換輸送体 NCLX が、筋小胞体に効率的に Ca^{2+} を供給することによって筋小胞体からの Ca^{2+} リークを調節し、心房筋由来培養細胞 HL-1 の拍動リズムを制御することを報告した [5]。すなわち、NCLX はミトコンドリアー筋小胞体 Ca^{2+} クロストークを介して HL-1 細胞の自動能制御に関与する。しかし、実心臓のペースメーカーである洞房結節細胞の自動能発生機序ははまだ結論を得ておらず、ミトコンドリア Ca^{2+} 輸送担体の寄与についても不明の点が多い。

洞房結節細胞の自動能は膜電位の自発的な興奮に起因すると考えられてきた [6, 7]。しかし近年、筋小胞体からの自発的な Ca^{2+} 放出に依存した細胞膜 Na^+ - Ca^{2+} 交換電流の増加が発火頻度を決定するという「 Ca^{2+} クロック」仮説が提唱され [8]、これまでの学説は「膜クロック」仮説と呼ばれる

ようになった。我々は膜クロックモデルとして Himeno model [6] を、 Ca^{2+} クロックモデルとして Maltsev and Lakatta model [8] を選択し、我々の開発したミトコンドリア Ca^{2+} 動態コンポーネント (ミトコンドリア Ca^{2+} ユニポータ、ミトコンドリア Na^+ - Ca^{2+} 交換 NCLX、ミトコンドリア Ca^{2+} 緩衝) を新たに導入した。これらの数理モデルを用いて、洞房結節細胞の自動能発生における NCLX の役割について解析を行った。NCLX の機能分子数に相当するパラメータを減少させ、NCLX ノックダウンシミュレーションを行ったところ、 Ca^{2+} クロックモデルでは活動電位発生間隔が延長したのに対し、膜クロックモデルでは短縮した。膜クロックモデルでは細胞内 Na^+ 濃度の減少に伴う内向き陽イオン電流 (I_{Na}) の活性化が活動電位発生間隔の短縮をもたらすが、 Ca^{2+} クロックモデルではその効果は小さいものであった。すなわち、洞房結節細胞の拍動リズムにおける NCLX の寄与は、細胞膜チャネルと筋小胞体 Ca^{2+} 動態のバランスで異なることが明らかとなった。一方、いずれのモデルでも、NCLX の発現量減少により筋小胞体 Ca^{2+} 含量が減少した。これは、HL-1 細胞と同様に洞房結節細胞においても、筋小胞体への Ca^{2+} 取り込みのかなりの部分に NCLX を介するミトコンドリアからの Ca^{2+} フラックスが関与することを示唆する。さらに、マウスより単離した洞房結節細胞では、心房筋細胞や心室筋細胞と同様にミトコンドリアと筋小胞体が入り組んで局在していた。以上の結果から、心筋細胞機能の制御因子として提唱されてきたミトコンドリアと筋小胞体を介した Ca^{2+} クロストークが、洞房結節細胞機能においても重要な役割を果たすことが示唆された。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. De Stefani D et al: *Nature* **476**: 336-340, 2011
2. Baughman JM et al: *Nature* **476**: 341-345, 2011
3. Palty R et al: *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 436-441, 2010
4. Jiang D et al: *Science* **326**: 144-147, 2009
5. Takeuchi A et al: *Sci Rep* **3**: 2766, 2013
6. Himeno Y et al: *J Physiol Sci* **58**: 53-65, 2008
7. Severi S et al: *J Physiol* **590**: 4483-4499, 2012
8. Maltsev VA et al: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**: H594-H615, 2009