

膜輸送分子複合体による心筋興奮終焉期の統合的制御

静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学教室

黒川 洵子

1. はじめに

興奮から心筋収縮までの過程は、活動電位発生から横行小管の脱分極、そしてL型Ca²⁺チャネルから流入したCa²⁺による筋小胞体からのCa²⁺放出を介した筋収縮へと移行する。この過程は興奮収縮連関機構と呼ばれ、電気シグナルから電気シグナルからCa²⁺シグナルシグナルという質的に異なるシグナル変換機構であり、これまで多くの科学者が研究対象としてきた。その結果、横行小管に集積する分子群による詳細な機構が存在することが分かり、そのメカニズム的理解は原子レベルの分子間相互作用、エネルギー動員機構との連関などにも向かっており、現在も最先端の研究課題である(1)。

一方、心筋が弛緩する過程では、筋弛緩をもたらす筋小胞体へのCa²⁺の取り込みと興奮終焉である活動電位の再分極過程はほぼ同期しているものの、緊密な連関を示唆する分子機構は報告されていない。その一因としては、興奮収縮連関機構の足場となる横行小管での分子集積のような特徴的な解剖学的所見が見つかっていないためと考えられる。しかし、病態心筋で再分極と筋弛緩が同期しないと難治性不整脈に移行することが臨床で報告され、その分子機構の解明が待たれる(2)。

心筋興奮弛緩期に、電気シグナルとCa²⁺シグナルを連関させる候補分子として、細胞内のカルシウムイオン濃度上昇によって活性化するI_{Ks}チャネルが挙げられる(3-5)。特に、心筋梗塞心筋などの病態心筋での不整脈には、このI_{Ks}チャネルのカルシウム感受性が重要であるという動物実験の結果も報告されている(6)。I_{Ks}チャネルは遅延整流性カリウムチャネルの遅い電流成分であり、電依存性カリウムイオン選択性チャネルとして機能し、活動電位の再分極相に寄与する。I_{Ks}チャネルの構成分子は、αサブユニットのKCNQ1とβサブユニットのKCNE1であり、いずれの分子も先天性QT延長症候群の原因となる変異体が報告されており、心筋電気活動に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。

I_{Ks}チャネルは、種々の細胞内シグナル応答により調節されることを特徴としている。細胞内Ca²⁺による活性化には、KCNQ1のCa²⁺による機能調節が関与している。申請者は、これまでに、交感神経刺激や性ホルモンにより惹起された細胞内シグナルが心筋I_{Ks}チャネルを調節する機構としてI_{Ks}チャネル分子複合体の存在を示してきた(7, 8)。このような背景から、I_{Ks}チャネルを中心とした電気-Ca²⁺シグナル連関機構が存在するかどうか興味を持ったので、まず膜タンパクに特化したプロテオミクス(阪大医・永森收志博士の特許技術)を用いて、I_{Ks}チャネルαサブユニット(KCNQ1)と複合体を形成する分子群を網羅的に探索した。その結果、カルシウムポンプを含む数百種類の分子を同定した。そこで(未発表のため分子名は伏せる)、この新規に同定された分子群によるCa²⁺ハンドリングがI_{Ks}チャネル活性化を制御して再分極過程を調節する、というCa²⁺-電気シグナル連関機構の存在を提案した。この機能連関を「収縮-脱興奮連関」と名付け、機能調節に関わる分子相互作用を明らかにし、不整脈との関連について調べることを本研究の目的とする。そして、本研究課題では、GWAS研究からQT延長の遺伝子多型との関連が指摘されたカルシウム輸送タンパク質(CPTX)について、I_{Ks}チャネルとの分子複合体形成の可能性について検討することを実験目的とした。

2. 方法

2-1. KCNQ1-CPTX分子複合体の解析

心筋に発現しているI_{Ks}チャネルをターゲットとしたIP-Westernブロット及びpull-down assayの実験により分子間相互作用を解析した。成体マウス心筋のI_{Ks}チャネル(KCNQ1+βサブユニットKCNE1)の発現が非常に低いため、KCNE1-KCNQ1融合タンパクを発現させたTGマウスを(8)分子間相互作用と機能の解析に利用した。これまで、抗KCNQ1抗体による免疫沈降物をLC/MS/MSおよびウェスタンブロットにより解析した結果、細胞膜上に発現しているCPTX分子と相互作用している可能性が示唆されてきた。そこで、イヌ、モルモットの心室筋標本を用いて、内因性I_{Ks}チャネルの解析を行った。CPTX阻害剤によりI_{Ks}電流が

調節されることを示唆するデータが予試験で得られたので、培養細胞にイオンチャンネルとトランスポーター分子を発現させたパッチクランプ法により分子間相互作用を薬理的に解析した。さらに、結合部位を探索するために、KCNQ1の細胞質部位のGST融合タンパクとCPTXのMBP融合タンパク質を用いて、pull-down assayを行った。

2-2. 病態モデル作成

細胞内Ca²⁺の異常亢進や心不全が誘導される横行大動脈縮窄術(TAC)およびストレプトゾトシン投与による高血糖モデルを作成し、I_{Ks}チャンネルを中心とした「収縮-脱興奮連関」と病態との関連を調べる準備を行った。病態モデルとして用いるマウスは、体重・肺湿重量およびエコーによる心収縮機能を計測した。

3. 結果 研究成果

3-1. KCNQ1-CPTX分子複合体の解析

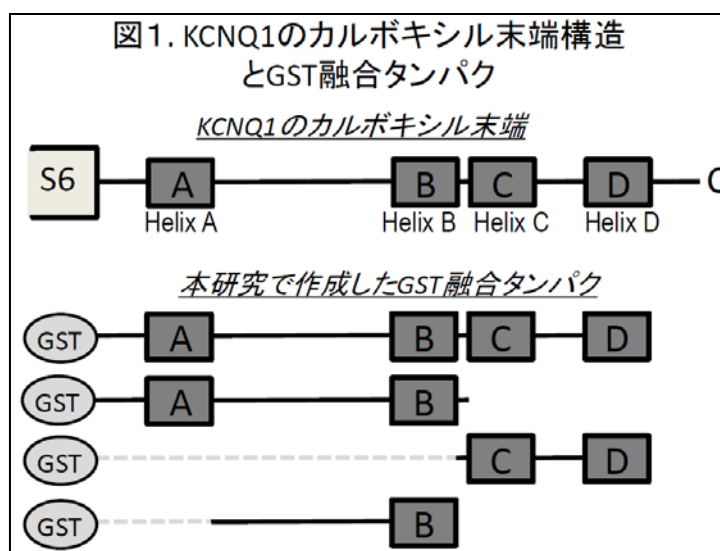
野生型のモルモット、イヌの心室細胞抽出液を用いた免疫沈降でも KCNQ1 と CPTX の共沈を確認し、異なる種間で複合体が保存されていた。

パッチクランプ法による CPTX 阻害剤実験では、モルモット心筋細胞から測定した I_{Ks} 電流は増大することを確認した。一方で、非心筋細胞である HEK 細胞を用いたチャンネル発現系実験では、CPTX 阻害剤の作用が微弱であり、測定中のランダウン減少により電流値が減少していく作用と区別することが出来なかった。そこで、機能解析を中心とした申請時の実験方針を変更し、生化学的手法により相互作用部位を同定することとした。

KCNQ1 上の CPTX 相互作用部位を同定するため、KCNQ1 N 末端、C 末端の細胞内領域の GST 融合タンパク質を作製し、イヌの心室細胞抽出液を用いて pull-down アッセイを行い、両分子に CPTX の共沈を確認した(図1)。

次に、N 末端を遠位部、近位部に分けて同様の実験を行ったところ、近位部に強い相互作用が確認された。C 末端を近位部、遠位部に分けた実験では近位部に CPTX の共沈を確認し、近位部に含まれる Helix-A、Linker、Helix-B を構造単位として実験を行ったところ、Linker から Helix-B に続く構造が CPTX と強く相互作用する事を確認した。

更に、より精製度の高い GST-His タグ融合タンパク質を用いた pull-down アッセイを行ったところ、同一の部位が CPTX との共沈を示し、CPTX との相互作用に必要である事が強く示唆された。



3-2. 病態モデル作成

TACおよび高血糖モデルを作成し、心筋細胞のサンプルを取得した。サンプルを取得した固体からは、エコーによる心機能解析を行っており、心機能低下を確認することが出来た。今後、分子間相互作用に重要な部位を同定した際には、本サンプル使用し、病態時に分子間相互作用が維持されるかどうか検討することとする。

4. まとめ

本研究期間には、KCNQ1の細胞内領域を介してCPTXと分子複合体を形成することを生化学的手法により示し、この分子複合体形成がI_{Ks}チャンネルの機能を調節する可能性が示唆された。

当初の予定では、パッチクランプ法による機能解析から、分子複合体の関与を調べていく予定であった。しかし、CPTX阻害剤によるI_{Ks}電流調節の結果は、心筋細胞と培養細胞で異なる結果が得られた。つまり、I_{Ks}チャンネルが発現している場として心筋細胞であることが、カルシウムシグナルと関連に重要であることを示唆する。実は、これまでの研究から、I_{Ks}チャンネルは心筋細胞横行膜に集積している興奮収縮連関を調節する分子群には含まれず、主に横行膜の外側に存在していることが示唆されている。従っ

て、分子間相互作用を生化学的に解析する実験計画に方向転換し、KCNQ1 側からも、そして CPTX を用いた pull-down assay によっても分子複合体の形成を確認することが出来た。さらに、結合部位を絞ることにより、精製ペプチドによる結合阻害実験や結合を破綻する TG マウスの作成により、心筋細胞における機能解析を行うことを予定している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助いただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会様に心より御礼申し上げます。私事、年度途中の 11 月より静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学教室の教授を拝命し、異動いたしました。移転の準備時期にも関わらず、本新規課題研究を進めることが出来たのは、本助成金のご支援があったからこそであります。このタイミングでご助成いただけたことに、重ねて御礼申し上げます。

5. 参考文献

1. Hong T, Shaw RM. Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiological reviews*. 2017; 97:227-52.
2. Ter Keurs HE, Boyden PA. Calcium and arrhythmogenesis. *Physiological reviews*. 2007; 87:457-506.
3. Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. KCNQ1 assembly and function is blocked by long-QT syndrome mutations that disrupt interaction with calmodulin. *Circulation research*. 2006 ;98:1048-54.
4. Shamgar L, Ma L, Schmitt N, Haitin Y, Peretz A, Wiener R, et al. Calmodulin is essential for cardiac I_{KS} channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations. *Circulation research*. 2006 ;98:1055-63.
5. Bai CX, Namekata I, Kurokawa J, Tanaka H, Shigenobu K, Furukawa T. Role of nitric oxide in Ca^{2+} sensitivity of the slowly activating delayed rectifier K^{+} current in cardiac myocytes. *Circulation research*. 2005 ;96:64-72.
6. Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovascular research*. 2000 ;48:34-43.
7. Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation*. 2005 ;112:1701-10..
8. Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, et al. Requirement of a macromolecular signaling complex for beta adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science (New York, NY)*. 2002;295:496-9.