

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19020

研究課題名(和文)血管平滑筋型ATP感受性カリウムチャネルのサブユニット構造の決定とその機能解析

研究課題名(英文)Structural and functional analyses of vascular smooth muscle-type ATP-sensitive K⁺ channels

研究代表者

山本 格士(Yamamoto, Tadashi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80762187

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、血管平滑筋型KATPチャネルのサブユニット構造の決定を目的として免疫組織学的解析を実施した。

マウス門脈平滑筋細胞において、抗SUR2B抗体、抗KIR6.1抗体を用いた『Proximity Ligation Assay(PLA)法』を行い、SUR2BおよびKIR6.1タンパク質の組織学的共局在を呈する免疫蛍光シグナルが観察された。一方、一次抗体の省略または抗体吸収試験を行い、同様の実験を実施したが、PLAシグナルは殆ど観察されなかった。これらの結果から、マウス門脈平滑筋細胞におけるKATPチャネルのサブユニット構造の組み合わせはSUR2B/KIR6.1であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文):Immunohistochemical analyses were performed to investigate the molecular subunit composition of vascular smooth muscle-type KATP channels.

In single smooth muscle cells dispersed from mouse portal vein, an in situ Proximity Ligation Assay (PLA) using primary antibodies against SUR2B and KIR6.1 detected positive signals of immunofluorescence, suggesting that SUR2B and KIR6.1 subunit proteins were closely co-localized. In contrast, immunofluorescence signals were not detected when PLA was performed in which the primary antibodies were omitted. Moreover, immunofluorescence signals were not detected when PLA was carried out in the presence of selective blocking peptides for the SUR2B and KIR6.1 proteins.

These results strongly suggest that native KATP channels in mouse portal vein myocytes are likely to be composed of SUR2B and KIR6.1 subunit proteins.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：薬理学 血管平滑筋 イオンチャネル ATP感受性カリウムチャネル Proximity ligation assay

1. 研究開始当初の背景

血管作動性因子(ノルアドレナリン、アンジオテンシン II、エンドセリン等)は、血管平滑筋の筋緊張(血管トーン)の維持のみならず、静止膜電位や血管収縮時の血管径の調節や血圧の維持に重要な役割を果たしている。近年、これらの血管作動性因子は血管平滑筋における ATP 感受性カリウムチャネル(K_{ATP} チャネル)のチャネル開閉を protein kinase C (PKC) や cAMP 依存性 protein kinase (PKA) 活性を介したリン酸化にて制御していることが明らかとなった(Tinker *et al.*, Br. J. Pharmacol., 2014, 171, 12-23)。すなわち、血管平滑筋型 K_{ATP} チャネルは常時、血管作動性因子による調節を受け、『血管径の fine tuner (微調整装置)』として各組織への血流供給や血圧の調節に直接、関与している。一方、血管平滑筋型 K_{ATP} チャネルは狭心症治療薬、ニコランジルの薬理的標的分子でもあり、チャネル開口を介して強力かつ持続的な血管拡張作用を引き起こし、臨床的にも極めて重要な役割を果たしている(Wu *et al.*, PLoS One, 2013, 8, e78231)。

近年の研究から K_{ATP} チャネルの分子構造は、ABC トランスポーターに属する 17 回膜貫通型のスルフォニル尿素受容体 (SUR.x) の 4 量体とチャネルポア(孔)を形成する 2 回膜貫通型の内向き整流性 K^+ チャネル($K_{IR6.x}$)の 4 量体の、ヘテロ 8 量体の複合体構造であり、少なくともこれら 2 つの異なるタンパク質分子同士が近接し、相互的に作用している。SUR.x サブユニットには SUR1、SUR2A および SUR2B の 3 種類のサブタイプが、また $K_{IR6.x}$ サブユニットに関しては $K_{IR6.1}$ および $K_{IR6.2}$ の 2 種類のサブタイプが存在する。 K_{ATP} チャネルを構成する SUR.x と $K_{IR6.x}$ の各々のサブユニットの組み合わせは各種臓器間で異なり、その結果、臓器特異性を呈すると考えられている。例えば、膵細胞型 K_{ATP} チャネルは SUR1/ $K_{IR6.2}$ 、心筋型 K_{ATP} チャネルは SUR2A/ $K_{IR6.2}$ の組み合わせと報告されている(Flagg *et al.*, Physiol. Rev., 2010, 90, 799-829)。

一方、平滑筋型 K_{ATP} チャネルに関しては平滑筋組織を丸ごとすり潰し、そこから抽出した mRNA を用いた RT-PCR 法にて各サブユニットの transcript の有無から、SUR2A/ $K_{IR6.1}$ 、SUR2B/ $K_{IR6.1}$ や SUR2B/ $K_{IR6.2}$

等の様々な組み合わせがその分子実体であると報告されてきた。しかし、平滑筋組織中には平滑筋細胞以外にも自律神経線維や結合組織(コラーゲン・エラスチン・線維芽細胞)等の組織学上、異なる組織も多く混在しており、それらの組織由来の mRNA が混入している可能性も否定出来ない。さらに血管平滑筋型 K_{ATP} チャネルに関するタンパク質レベル(Western blotting 法・免疫組織化学染色法等)での研究は、これまでほとんど行われてこなかった。

研究代表者はマウス門脈急性単離平滑筋細胞を用い、1)パッチクランプ法によるシングルチャネル記録法、2)RT-PCR 法、3)real-time PCR 法 および 4)免疫組織化学染色法を用いた電気生理学的解析および遺伝子・タンパク質レベルでの分子生物学的解析の結果から、マウス門脈平滑筋細胞における血管平滑筋型 K_{ATP} チャネルのサブユニット構造の組み合わせは SUR2B/ $K_{IR6.1}$ である可能性が極めて高いと報告した(Yamamoto *et al.*, Vascul. Pharmacol., 2015, 75, 29-39.)。

2. 研究の目的

研究代表者は既に、従来の免疫組織化学染色法(蛍光二重染色法)を用い、マウス門脈平滑筋細胞において SUR2B タンパク質および $K_{IR6.1}$ タンパク質が共発現していることを明らかにした。しかし、両サブユニットタンパク質が互いに近接し、カップリング(共役)しているか、否かについては未だ不明のままであった。

そこで、細胞・組織における微量な内在性タンパク質の相互関係を画期的な増感技術で特異的に検出、可視化することが可能な『Proximity Ligation Assay (PLA) 法』を駆使し、マウス門脈平滑筋細胞における血管平滑筋型 K_{ATP} チャネルの分子サブユニット構造を決定することを研究目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

『PLA 法』は微量な標的タンパク質を特異的に検出する増感技術を応用した免疫組織化学染色法である(原理などは、図 1 を御参照ください)。

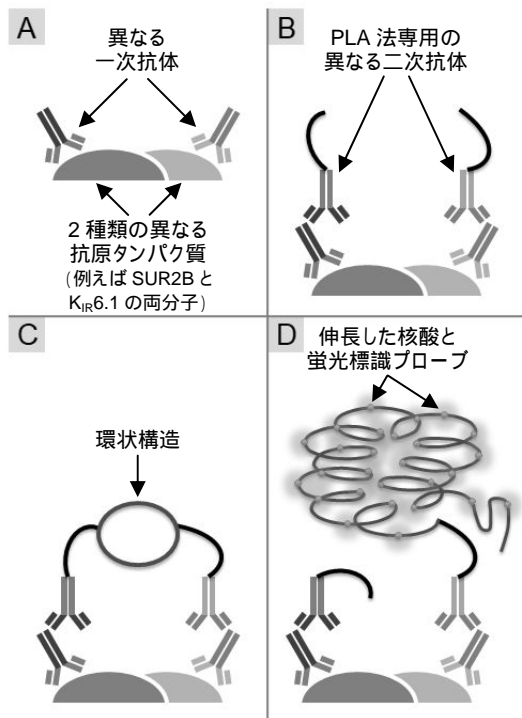


図1 PLA法の原理

- A：標的タンパク質（抗原）と一次抗体が結合
検出目的の2種類のタンパク質（抗原）と免疫動物種が異なり、かつ特異性を有する一次抗体が結合する。
- B：一次抗体とPLA法専用二次抗体が結合
オリゴヌクレオチドを連結した異なる2種類のPLA法専用二次抗体が、各一次抗体と結合する。
- C：PLAプローブのハイブリダイズとライゲーション反応で環状構造の形成
2種類のオリゴヌクレオチドを含有しているライゲーション溶液を添加し、徐々に環状構造が形成される。
- D：伸長反応と標識プローブのハイブリダイズ
により、蛍光スポットが検出
増幅溶液を添加すると環状構造に沿って1本鎖の核酸が伸長する。また増幅溶液には蛍光標識されたオリゴヌクレオチドが含まれており、伸長した核酸に相補的にハイブリダイズし、蛍光スポット（群）として蛍光顕微鏡下にて可視化される。

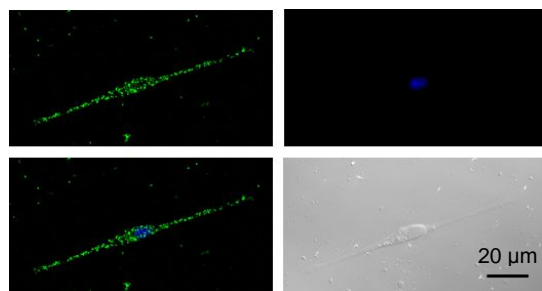
- ・近接した二分子間相互作用やその組織学的局在を検出することが可能な手法（二次抗体同士の距離が40 nm以下の場合のみ架橋され、環状構造が完成し、発光する）。
- ・検出された蛍光スポットを計測することで発現しているタンパク質の定量的な評価が可能。

『PLA法』の主な利点として、簡便な手技（高い簡便性） 実験の高い再現性、 蛍光顕微鏡を用いて観察可能（高い利便性） さらに蛍光スポットとして組織学的局在を明示（高い精度）が挙げられる。本申請研究において使用した Duolink In Situ 試薬は、検体に特異的な一次抗体の存在を高感度に検出するために、二次抗体を利用して開発されたものであり、『PLA法』のセットアップにおいて一次抗体の選択が重要となる。今回は、前述の報告で使用した優れた抗原特異性を有する2種類の一次抗体（ヤギ由来抗 SUR2B 抗体、ウサギ由来抗 Kir6.1 抗体）を用いた。

4. 研究成果

『PLA法』における一次抗体の染色条件の最適化のために、まず single recognition（それぞれ1種類の一次抗体による1種類のタンパク質の検出）を行い、固定化、抗原回復、ブロッキング溶液、抗体希釈液、一次抗体の希釈濃度等を決定した。それらの結果を開始条件として、同一のアッセイに両方の一次抗体を使用して、目的とするアッセイの最適化を実施した。

現有する両一次抗体（ヤギ由来抗 SUR2B 抗体、ウサギ由来抗 Kir6.1 抗体）を用いた『PLA法』にて、SUR2B、Kir6.1 タンパク質のカップリングを示すPLAシグナルの蛍光スポットが観察され（図2を御参照ください）BALB/c マウスから採取した門脈平滑筋単離細胞において SUR2B タンパク質および Kir6.1 タンパク質が共局在していることが示唆された。



蛍光スポット	DAPI
Merged	DIC

図2 抗 SUR2B 抗体、抗 Kir6.1 抗体を用いた PLA 法

また2種類の一次抗体のうち、どちらか一方のみ、もしくは両方を省略して使用せずに同様の実験を行ったが、バックグラウンドシグナルの発生は殆ど観察されなかった。

一方、これら両サブユニットタンパク質のカップリングの有無の確認実験として、当初は K_{ATP} チャンネルKOマウス(SUR2^{-/-}および $K_{IR}6.1$ ^{-/-})の門脈から得られた血管平滑筋単離細胞を用いて実施する計画であったが、連携研究者から供与予定であった当該マウスの継代が既になされていないことが初年度に判明した。そのため、当初の実験計画を変更し、(1)両一次抗体に対する抗原ペプチドを用いた抗体吸収試験を行い、吸収処理を終えた一次抗体を用いて『PLA法』を実施した。また(2)HEK293細胞に K_{ATP} チャンネルサブユニット(SUR2Bおよび $K_{IR}6.1$)のcDNAを強制発現させた実験系を構築し、遺伝子導入していない細胞サンプルをnegative controlとして同様の実験を実施した。さらに(3)マウス門脈平滑筋細胞にSUR2B遺伝子および $K_{IR}6.1$ 遺伝子を選択的に抑制するsiRNAを導入する実験系の構築にも取り組んでおり、同様の実験を予定している。これらの確認実験の結果は、『PLA法』により示されたSUR2B、 $K_{IR}6.1$ タンパク質のカップリングを概ね裏付けるものであった。

これらの結果の一部を英文原著論文としてまとめ、現在Journal of Cellular Physiologyに投稿中である。

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)

Takahara K, Yamamoto T, Uchida K, Zhu HL, Shibata A, Inai T, Noguchi M, Yotsu-Yamashita M, Teramoto N

Effects of 4,9-anhydrotetrodotoxin on voltage-gated Na⁺ channels of mouse vas deferens myocytes and recombinant Na_v1.6 channels.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 査読有, 2018, 391(5), 489-499.

DOI : 10.1007/s00210-018-1476-6.

Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N

ZD0947, a sulphonylurea receptor modulator, detects functional sulphonylurea receptor subunits in murine vascular smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channels.

European Journal of Pharmacology, 査読有, 2017, 800, 34-39.

DOI : 10.1016/j.ejphar.2017.02.023.

〔学会発表〕(計 2 件)

Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N

Actions of ZD0947 on the activity of ATP-sensitive K⁺ channels in murine vascular smooth muscles.

第90回日本薬理学会年会(長崎市)
Journal of Pharmacological Sciences, 2017, 133(3) : Supplement S138, 2-0-49.

Teramoto N, Yamamoto T, Uchida K, Inai T, Yamashita-Yotsu M

Effects of 4,9-anhydroTTX on voltage-gated Na⁺ channels expressed in murine vas deferens myocytes.

第90回日本薬理学会年会(長崎市)
Journal of Pharmacological Sciences, 2017, 133(3) : Supplement S115, 1-0-37.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 格士(Yamamoto Tadashi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号 : 80762187