

平成 22 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590202
 研究課題名（和文）：電位依存性カルシウムチャンネルベータサブユニットの心筋収縮における役割の解明
 研究課題名（英文）：Functional analysis of the voltage-dependent calcium channel β subunit in cardiac myocyte.
 研究代表者
 村上 学（MURAKAMI MANABU）
 秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：80302090

研究成果の概要（和文）：

電位依存性カルシウムチャンネル β サブユニットの交感神経制御機構における重要性を、遺伝子改変動物を用いて解析を行った。
 交感神経による心筋収縮制御機構はカルシウムチャンネルを介して行われている。電位依存性カルシウムチャンネル $\beta 3$ サブユニット欠損マウス、および過剰発現マウスを作製し、生きた個体を用いて、交感神経への影響を調べたところ、遺伝子欠損マウスにおいては交感神経トーンスの低下、さらに過剰発現マウスにおいてはトーンスの亢進を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Using gene-manipulated mice, we evaluated importance of voltage-dependent calcium channel β subunit in sympathetic nerve regulation system.
 It is well known, that cardiac myocytes are regulated by sympathetic nerve system through voltage-dependent calcium channel. To evaluate the importance of the voltage-dependent calcium channel β subunit in the sympathetic nerve control, we made null-mutant and overexpression transgenic mice of β subunit. The null-mutant showed significantly decreased sympathetic nerve tonus, while the overexpression mice revealed increased nerve tonus, indicating the importance of the β subunit in the sympathetic nerve control system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜・チャンネル・トランスポーター・能動輸送

1. 研究開始当初の背景

交感神経の亢進、および心臓における効

果器である β アドレナリン受容体、細胞内シグナル伝達系(cAMP増加に伴う標的タンパ

クのリン酸化)は、医学の歴史において主要なテーマであり続けて来た。この刺激伝達系は、フォン・オイラーによる交感神経伝達物質の同定や、ブラックらによるβブロッカーの開発などを列記するまでもなく、極めて重要である。臨床的にも、βブロッカーは慢性心不全に対するスタンダードな治療法である。

交感神経刺激によるカルシウムチャネルのリン酸化は1960年代のロイターの研究により明らかとなった。カルシウムチャネルはα1, β, γ, α2/δサブユニットから成る複合体である。Catterall(米), Haase(独)らの研究により、α1とβがリン酸化されることが明らかとなっている。総括すると、交感神経亢進による心筋収縮力増加機構の中で、生理的リン酸化を受けるカルシウムチャネルの構成分子はβ2と予想されるが、現在まで確定されていない。つまり、どのチャネルサブユニットがリン酸化されるかは不明のままである。そこで、βサブユニット欠損マウスを作製し、交感神経における重要性を検討する目的で研究を組織した。

2. 研究の目的

心筋収縮における電位依存性カルシウムチャネル、特にβサブユニットの重要性を、遺伝子改変マウスを用いて明らかにするのが、本研究の主目的であった。

3. 研究の方法

本研究において、電位依存性カルシウムチャネルβ3サブユニット欠損マウスおよびβ3サブユニット過剰発現マウスの解析を行い、さらにβ2サブユニット欠損マウスを作製した。カルシウムチャネル、あるいは陽イオンチャネルの単離、機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) カルシウムチャネルの機能解析

電位依存性カルシウムチャネルβ3サブユニット過剰発現マウスを作製し、欠損マウスと比較検討することにより、交感神経制御におけるβ3の重要性を再確認した(Murakami et al., *J.B.C.*, 2008)。

交感神経系のトーンスが低下しているカルシウムβ3サブユニット欠損マウスの解析を行った。副腎髄質のカテコラミン産生細胞における総電流量が低下していること、電流量の低下はL, N型チャネル電流量、およびチャネル数の低下によることを発表した。交感神経系の制御機構に異常を持つN型カルシウムチャネル欠損マウスの解析を通し、同欠損マウスにおける交感神経制御がR型カルシウムチャネルにより行われていることを、心超音波、ランゲンドルフ心、テレメトリー心電図等による解析により明らかに

した(Murakami et al., *B.B.R.C.*, 2007)。循環器系における主要な電位カルシウムチャネルを構成するCaV1.2の心筋タイプ(CaV1.2a)、および平滑筋タイプ(CaV1.2bおよびd)のcDNAを単離した。

(2) 陽イオンチャネル解析の一環として、TRPチャネルファミリーにも注目した。

TRPチャネルファミリーであり、store-operated channel (SOC; 細胞内カルシウムストア枯渇時に細胞外液からカルシウムを流入させる経路)を構成するTRPC1が心肥大ラットモデルにおいて遺伝子発現が増加していること、さらにTRPC1発現をsiRNAにより抑制することで、心肥大発現を抑えることを示した(Ohba et al., *J.M.C.C.*, 2007)。さらにTRPC1が血管平滑筋の肥大にも関与することを示した(Takahashi et al., *Atherosclerosis*, 2007)。

新規カチオンチャネルを構成するOrai 遺伝子、およびSTIM1 遺伝子を報告した(Takahashi et al., *B.B.R.C.*, 2007)

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20件)

- ① Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Sato, T., Ono, K., and Ito, H.
Essential role of STIM1 in the development of cardiomyocyte hypertrophy
Biochemical & Biophysical Research Communications 389, 172-176, (2009).
- ② Nakagawasai, O., Onogi, H., Mitazaki, S., Sato, A., Watanabe, K., Saito, H., Murai, S., Nakaya, S., Murakami, M., Takahashi, E., Tan-No, K., Takeshi Tadano, T.
Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the N-type Ca²⁺ channel α1B subunit.
Behavioural Brain Research in press, (2010).
- ③ Ohta T, Ohba T, Suzuki T, Watanabe H, Sasano H, Murakami M.
Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca²⁺ channel β3 subunit-null mice.
Biochemical & Biophysical Research Communications, in press, (2010).
- ④ Koyama, T., Ono, K., Watanabe, H., Ohba, T., Murakami, M., Iino, K., and

- Ito H.
Molecular and Electrical Remodeling of L- and T- type Ca²⁺ Channels in Rat Right Atrium with Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension
Circ. J. 73, 256-263 (2009)
- ⑤ Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., and Ito, H.
The pathological role of TRP channels in heart disease
Circulation Journal in press (2009)
- ⑥ Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Radovanovic, M., Iino, K., Ishida, M., Tosa, S., Ono, K., and Ito, H.
Amlodipine inhibits cell proliferation via PKD1-related pathway
Biochemical & Biophysical Research Communications 369, 376-381, (2008).
- ⑦ Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, and Ito H.
TRP channel and cardiovascular disease.
Pharmacology & Therapeutics, 118, 337-351, (2008).
- ⑧ Murakami, M., Ohba, T., Xu, F., Satoh, E., Miyoshi, I., Suzuki, T., Takahashi, Y., Takahashi, E., Watanabe, Ono, K., Sasano, H., Kasai, N., Ito, H., and Iijima, T.
Modified sympathetic nerve system activity with over-expression of the voltage-dependent calcium channel β 3 subunit
J. Biol. Chem. 283, 24554-24560, (2008).
- ⑨ Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima T., and Ito, H.
Up-regulation of TRPC1 in the Development of Cardiac Hypertrophy.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 42, 498-507, (2007).
- ⑩ Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., Radovanovic, M., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H.
Involvement of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) in Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy.
Atherosclerosis 195, 287-296, (2007).
- ⑪ Murakami, M., Ohba, T., Wu, T-W., Fujisawa, S., Suzuki, T., Takahashi, Y., Takahashi, E., Watanabe, H., Miyoshi, I., Ono, K., Sasano, H., Ito, H. and Iijima T.,
Modified sympathetic regulation in N-type calcium channel null-mouse.
Biochemical & Biophysical Research Communications. 354, 1016-1020, (2007).
- ⑫ Shiraiwa, S., Kashiwayanagi, M., Iijima, T., and Murakami, M.
Involvement of the calcium channel beta3 subunit in olfactory signal transduction.
Biochemical & Biophysical Research Communications. 355, 1019-1024, (2007).
- ⑬ Takahashi, Y., Murakami, M., Watanabe, H., Hasegawa, H., Ohba, T., Munehisa, Y., Nobori, K., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H.
Essential role of the N-terminus of murine Orail in store-operated Ca²⁺ entry.
Biochemical & Biophysical Research Communications. 356, 45-52. (2007).
- ⑭ Murakami, M., Nakagawasai, O., Yanai, K., Nunoki, K., Tan-No, K., Tadano T. and Iijima, T.
Modified behavioral characteristics following ablation of the voltage-dependent calcium channel β 3 subunit.
Brain Research, 1160, 102-112, (2007).
- ⑮ Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ono, K., Munehisa, Y., Koyama, T., Nobori, K., Iijima, T., and Ito, H.
Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells
Biochemical & Biophysical Research Communications. 361, 934-940, (2007)
- ⑯ Murakami, M., Ohba, T., Ono, K., Watanabe, H., Ito, H., and Iijima, T.
Genomic organization and expression of murine calcium channel subunit α 1C.
Saito Ho-on Kai Museum of Natural History, Research Bulletin, 72, 1-10, (2007)

- ⑰ Murakami, M., Matsui, H., Shiraiwa, T., Suzuki, T., Sasano, H., Takahashi E., and Kashiwayanagi, M.
Decreases in pheromonal responses at the accessory olfactory bulb of mice with a deficiency of the $\alpha 1B$ or $\beta 3$ subunits of voltage-dependent Ca^{2+} -channels.
Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 437-442, (2006).
- ⑱ Wu TW, Ono K, Murakami M, Iijima T.
Involvement of Voltage-Dependent Ca Channel beta3 Subunit in the Autonomic Control of Heart Rate Variability. *Pharmacology*. 76, 170-179, (2006).
- ⑲ Murakami, M., Ohba, T., Takahashi, Y., Watanabe, H., Miyoshi, I., Nakayama, S., Ono, K., Ito, H., and Iijima T.
Identification of a cardiac isoform of the murine calcium channel $\alpha 1C$ ($Ca_v1.2-a$) subunit and its preferential binding with the $\beta 2$ subunit.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 41, 115-125, (2006).
- ⑳ Ohba, T., Watanabe, H., Takahashi, Y., Miyoshi, I., Nakayama, S., Satoh, E., Iino, K., Mori, Y., Kuromitsu, S., Imagawa, K., Saito, Y., Iijima, T., Ito, H., and Murakami, M.
Regulatory role of neuron-restrictive silencing factor in the expression of TRPC1.
Biochemical & Biophysical Research Communications. 351, 764-770, (2006).

[学会発表] (計 5 件)

- ① Murakami M, Ohba T, and Ono K:
Modified autonomic regulation in mice with a P/Q-type calcium channel mutation.
Society for Neuroscience, 39th Annual Meeting, Chicago, USA, (2009)
- ② Murakami M, Ohba T, and Ono K:
Modified sympathetic nerve system activity with over-expression of the voltage-dependent calcium channel $\beta 3$ subunit.
Congress of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, (2009)

- ③ Murakami M, Ohba T, and Ono K:
Modified sympathetic nerve system activity with over-expression of the voltage-dependent calcium channel $\beta 3$ subunit.
Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting, Washington DC, USA, (2008)
- ④ Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ono K, Watanabe H, Ito H and Iijima T:
Cloning of novel isoforms of murine cardiac calcium channel $\alpha 1$ subunit and their different binding affinities with $\beta 2$ subunit.
Society for Neuroscience, 37th Annual Meeting, San Diego, USA, (2007)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 学 (MURAKAMI MANABU)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80302090

(2) 研究分担者

尾野 恭一 (ONO KYOICHI)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70185635
大場 貴喜 (OHBA TAKAYOSHI)
秋田大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80431625
飯島 俊彦 (IIJIMA TOSHIHIKO)
秋田大学・名誉教授
研究者番号：30004724