

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590789
 研究課題名 (和文) 心筋におけるプロテインキナーゼ C とカルモデュリン依存性キナーゼのカップリング
 研究課題名 (英文) Coupling of protein kinase C and Ca/calmodulin dependent protein kinase II in cardiac muscle
 研究代表者
 小武海 公明 (KOMUKAI KIMIAKI)
 東京慈恵会医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60360145

研究成果の概要 (和文)：心筋におけるプロテインキナーゼ C (PKC) とカルモデュリン依存性キナーゼ (CaMKII) のカップリングについて検討した。ET-1 刺激に対する L 型 Ca 電流の反応を穿孔パッチクランプ法で測定した。ET-1 は L 型 Ca 電流を増大させた。この変化は、ETA 受容体拮抗薬 BQ-123 で抑制され、ETB 受容体拮抗薬 BQ-788 では抑制されなかった。また、PKC 阻害薬キレリスリンで抑制され、CaMKII 阻害薬 KN-93、AIP で抑制された。これらの事から、ET-1 は ETA 受容体-PKC-CaMKII の経路で L 型 Ca 電流を増大させると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the effect of endothelin-1 (ET-1) on L-type Ca current (ICa) of rat ventricular myocytes using perforated patch clamp technique. ET-1 (10 nM) increased ICa. This increase was blocked by a selective ETA antagonist BQ-123 but not by a selective ETB antagonist BQ-788. The increase was blocked by a PKC inhibitor chelerythrine and a CaMKII inhibitor KN-93 but not by its inactive analogue KN-92. The increase was blocked by another CaMKII inhibitor AIP. These results suggested that ET-1 increased ICa via an ETA-PKC-CaMKII pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	2,600,000	510,000	3,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：エンドセリン, カルシウム電流, 心筋, シグナル伝達, CaMKII, プロテインキナーゼ C, パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

(1) 内因性, 外因性の物質, あるいは伸展などの機械的刺激が心臓に作用するとき

は, 細胞内の情報伝達系を介して反応を惹起する. 多くの場合, 細胞内の蛋白のリン酸化を介して反応が生じる. 交感神経 $\beta 1$ 受容体

刺激は膜直下の Gs 蛋白を介してアデニル酸シクラーゼを活性化して細胞内の cAMP を上昇させ、最終的にはプロテインキナーゼ A が細胞内の蛋白をリン酸化して作用を発現する。交感神経 $\alpha 1$ 受容体刺激は膜直下の Gq 蛋白を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化してプロテインキナーゼ C (PKC) が細胞内の蛋白をリン酸化して作用を発現すると考えられている。この Gq 蛋白は $\alpha 1$ 受容体だけでなく、アンジオテンシン AT1 受容体やエンドセリン ETA 受容体とも共役して、病態生理時の心筋の調節にも深く関与している。

(2) 従来これらの Gq 関連受容体の刺激は Gq 蛋白を介して PLC を活性化し、ホスファチジルイノシトール 2 リン酸の加水分解により、イノシトール 3 リン酸とジアシルグリセロールを産生して、ジアシルグリセロールがプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、最終的にプロテインキナーゼ C が Ca チャネルなど各種蛋白をリン酸化することにより作用を発現すると考えられていた。

(3) 我々はこの系にカルモデュリン依存性キナーゼ (CaMKII) が関与していると考えた。そこで、Gq 関連受容体を刺激したときに、PKC が CaMKII, CaMKII が各種蛋白をリン酸化して作用を発現するとの仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究ではこの仮説を証明するために、Gq 関連受容体刺激時に L 型 Ca 電流が上昇するか、それが CaMKII 阻害薬により消失するかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の単離

ラットをエーテル麻酔後、ペントバルビタールでさらに麻酔し、心臓を摘出し、ランゲンドルフ法で灌流を行う。十分に灌流したところでコラゲナーゼ処理を行い、心筋細胞を単離する。ET-1 の効果は細胞の cAMP レベルの影響を受けるので、ラットにストレス無く心臓を摘出し、十分な灌流が重要である。本研究は本学動物実験委員会の承認を受け (19-013)、代表者は、動物実験教育訓練 (第 19-252 号)、遺伝子組み換え実験安全講習および病原体等取り扱い講習 (第 19-83 号) を受講・履修済みであり、動物に苦痛を与えないよう配慮して実験を行う。

(2) L 型 Ca 電流の測定

L 型 Ca 電流は穿孔パッチクランプ法で測定を行う。この際には、通常のホールセル法を使用するよりも抵抗の低い、先端抵抗が 1-2 M

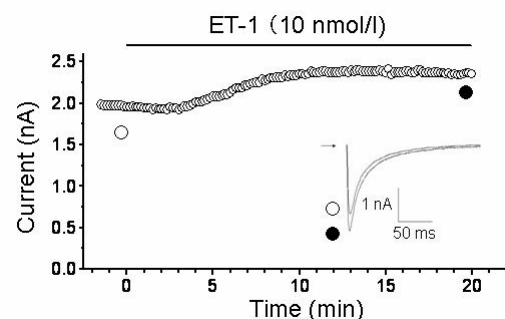
Ω のものを使用する。穿孔パッチクランプ法は、1 価のイオンのみをパッチ膜にあけて細胞内にアクセスする方法なので、ピペット内液に Ca 緩衝薬を使用しない。よって、細胞内 Ca を介した反応を測定するのに最適である。ピペット先端に細胞内液、その後ろにアンホテリシン B を含む細胞内液を充填し、ギガセルを作成する。その後 10 mV の過分極パルスを与え、細胞に穴があき十分なアクセスが得られるまで待つ。膜電位を -40 mV に固定し、0 mV まで脱分極パルスを与え、L 型 Ca 電流を測定する。脱分極は十分なりカバリーを待つために 10 秒に 1 回与える。電流-電圧曲線を得るときには、-30 mV から +40 mV までの脱分極パルスを 10 mV おきに与える。

(3) 蛋白の測定

ラット単離心筋を超遠心し、細胞膜分画を抽出する。電気泳動の後、ウェスタンブロットにて ETA, ETB の抗体を用いて、これらの蛋白が細胞膜に存在するかを検討する。

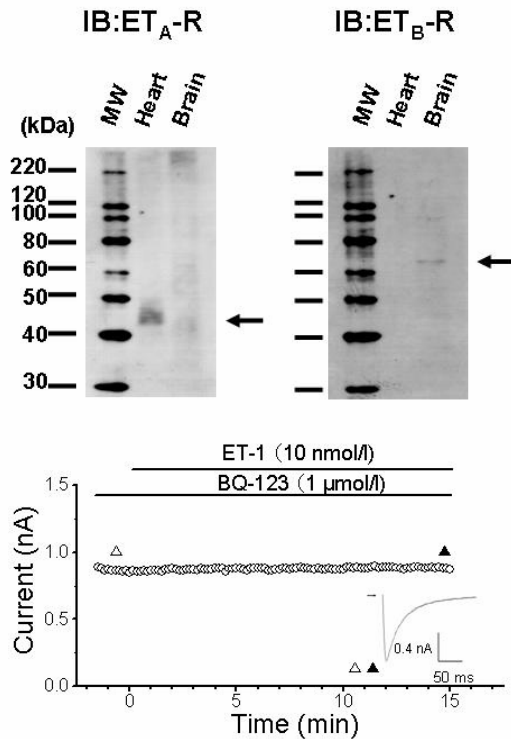
4. 研究成果

(1) ET-1 (10 nM) は一相性に電流を上昇させた。電流は 1.21 ± 0.17 nA から 1.53 ± 0.19 nA に、28.9% 上昇した。ET-1 投与後 15 分と 20 分の値に有意差はなく、15 分の時点で定常状態に達すると考え、以降の実験では 15 分値を測定した。



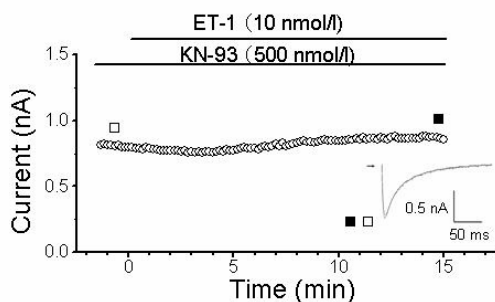
(2) まず、ET-1 の効果がエンドセリン受容体のどのサブタイプを介するかを検討するため、ETA 受容体、および ETB 受容体の選択的阻害薬である、BQ-123 (1 μ M) および BQ-788 (1 μ M) 存在下で ET-1 の効果を検討した。BQ-123 存在下では、ET-1 の作用は消失したが、BQ-788 存在下では非存在下と同様の電流の上昇を認めた。

(3) ラット心室筋の膜分画を用い、ウェスタンブロットを行い、ETA および ETB 蛋白の発現を検討した。ETA は心室筋に発現していたが、ETB は発現していなかった。膜電流の結果とあわせ、ET-1 の効果は ETA 受容体を介すると考えられた。



(4) 次に PKC 阻害薬であるキレリスリン (5 μM) 存在下で ET-1 の効果を検討したところ、ET-1 の作用が消失した。

(5) 次に、CaMKII の選択的阻害薬である、KN-93 (500 nM) およびその不活化アナログである KN-92 (500 nM) 存在下で検討を行った。KN-93 存在下では ET-1 の効果は消失したが、KN-92 存在下では ET-1 は L 型 Ca 電流を上昇させた。



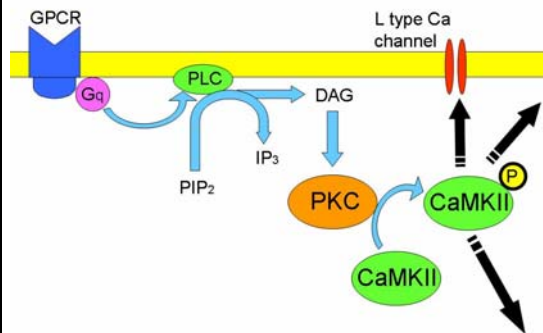
(7) 今回の主たる目的である CaMKII の関与について、KN-93 以外の阻害薬についても検討を行った。autocamtide-related inhibitory peptide (AIP) は、KN-93 と比べ、より非特異的作用が少ないペプチドである。

細胞を AIP (10 μM) で incubation し、さらに AIP 存在下で穿孔パッチクランプを行い ET-1 の効果を検討したところ、ET-1 の効果は消失した。

(7) これらから、ラット心室筋細胞において、ET-1 は ETA 受容体-PKC-CaMKII を介して L 型 Ca 電流を増大させていることがあきらかになった。

(8) これらの実験と並行し、α1A 受容体刺激時の L 型 Ca 電流の反応についても検討した。まず、α1A 受容体の選択的作動薬である A-61603 (0.1 μM) を投与したところ、L 型 Ca 電流が増大した。この反応は PLC 阻害薬 U73122 (1 μM) で抑制されたが、その negative control である U73343 では抑制されなかった。A-61603 による電流の上昇は、PKC 阻害薬 chelerythrine (10 μM)、CaMKII 阻害薬 KN-93 (0.5 μM) で抑制されたが、KN-93 の negative control である KN-92 では抑制されなかった。

(9) α1A 受容体、ETA 受容体ともに Gq に結合する膜 7 回貫通型受容体であり、Gq-PKC-CaMKII-L 型 Ca 電流の系が示唆された。



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 3 1 件)

- ① Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ current during endothelin-1 stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010 in press 査読有
- ② Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, Hoshina T, Kusakari Y, Komukai K, Sasaki H, Hongo K, Kurihara S. Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca(2+)

- leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun* 390:87-92, 2009 査読有
- ③ Kawai M, Hongo K, Komukai K, Morimoto S, Nagai M, Seki S, Taniguchi I, Mochizuki S, Yoshimura M. Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. *Hypertens Res* 32:604-610, 2009 査読有
- ④ Date T, Yamashita T, Iwasaki Y, Aizawa T, Aramaki Y, Komukai K, Taniguchi I, Yoshimura M. Infiltration of macrophages through the atrial endocardium in inflammation-induced rats: the contribution of fractalkine. *Circ J* 73:932-7, 2009 査読有
- ⑤ O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. Interaction of {alpha}1-Adrenoceptor Subtypes With Different G Proteins Induces Opposite Effects on Cardiac L-type Ca²⁺ Channel. *Circ Res* 102:1378-88, 2008 査読有
- ⑥ Kusakari Y, Hongo K, Kawai M, Konishi M, Kurihara S. Use of the Ca-shortening curve to estimate the myofilament responsiveness to Ca²⁺ in tetanized rat ventricular myocytes. *J Physiol Sci* 56:219-26, 2006 査読有
- ⑦ Hirano S, Kusakari Y, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Kurihara S. Intracellular mechanism of the negative inotropic effect induced by alpha1-adrenoceptor stimulation in mouse myocardium. *J Physiol Sci* 56:297-304, 2006 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Factors modulating the effect of endothelin-1 on L-type Ca current. 第 73 回日本循環器学会学術集会. 2010 年 3 月 7 日 京都.
- ② Komukai K, O-Uchi J, Hongo K, Kawai M, Morimoto S, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 increases L-type Ca current of rat ventricular myocytes via an activation of protein kinase C and Ca/calmodulin dependent protein kinase II. American Heart Association Scientific Session 2009. 18th November, 2009, Orlando, Florida.
- ③ Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S.

Endothelin-1 potentiates L-type Ca current by activating CaMKII in rat ventricular myocytes. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 28th July, 2009.

- ④ Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 increases L-type Ca current via an activation of Ca/calmodulin-dependent protein kinase II in rat ventricular myocytes. 第 72 回日本循環器学会学術集会. 2008 年 3 月 福岡.
- ⑤ Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Kurihara S. Effect of endothelin-1 on L-type Ca current in rat ventricular myocytes. 第 11 回日本心不全学会学術集会. 2007 年 9 月, 浦安

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小武海 公明 (KOMUKAI KIMIAKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60360145

(2) 研究分担者

本郷 賢一 (HONGO KENICHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00256447

川井 真 (KAWAI MAKOTO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：40277025