

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15030

研究課題名(和文)リン酸化修飾による血管平滑筋型ATP感受性カリウムチャンネル制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism underlying the regulation of vascular smooth muscle-type ATP-sensitive K⁺ channels by modification of phosphorylation

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)受容体作動薬投与による血管平滑筋型ATP感受性カリウム(KATP)チャンネルのリン酸化修飾について検証を行った。マウス門脈平滑筋を用いた等張性収縮実験法を行い、GLP-1(7-36)amideを投与すると自発的筋収縮は濃度依存的に抑制され、弛緩反応が観察された。またこの弛緩反応はGlibenclamideの追加投与にて抑制された。他のGLP-1受容体作動薬としてExendin-4またはLiraglutideを投与した場合でも、同様の反応が観察された。これらの結果から、GLP-1受容体作動薬による血管平滑筋型KATPチャンネル活性化が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、血管平滑筋に関する研究領域において分子生物学的手法および免疫組織化学染色法を用いた『形態学的解析』のみならず、細胞内cAMP動態計測法および電気生理学的手法を用いた『機能学的解析』を行っている研究グループは国内外で非常に少ない。本研究にて血管平滑筋型KATPチャンネルにおけるリン酸化によるチャンネル修飾機序が明らかになる意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文): In this study, we examined the modification of phosphorylation of vascular smooth muscle-type ATP-sensitive K⁺ (KATP) channels by administering glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists.

In an isotonic contraction experiment using smooth muscle cells of mouse portal vein, administration of GLP-1 (7-36) amide showed a concentration-dependent suppression of spontaneous muscle contraction and subsequent induction of a relaxation response. However, this relaxation response was suppressed upon administration of glibenclamide. Similar responses were observed when other GLP-1 receptor agonists such as exendin-4 or liraglutide were administered.

These results strongly suggested that GLP-1 receptor agonists activate vascular smooth muscle-type KATP channels.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：薬理学 血管平滑筋 イオンチャンネル ATP感受性カリウムチャンネル リン酸化修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

K_{ATP} チャンネルの分子構造はチャンネル孔 (ポア) を形成する 2 回膜貫通型の内向き整流性 K^+ チャンネル (Kir6.x) の 4 量体と 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 (右図の図 1 を御参照下さい)。

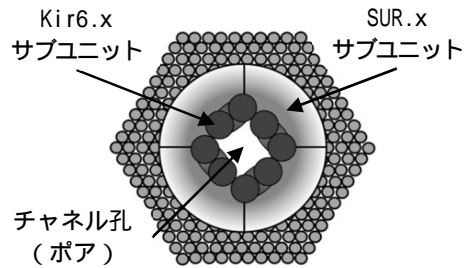


図 1 K_{ATP} チャンネルの分子構造の模式図

Kir6.x サブユニットに関しては Kir6.1 および Kir6.2 の 2 種類のサブタイプタンパク質が、また SUR.x サブユニットには SUR1、SUR2A および SUR2B の 3 種類のサブタイプタンパク質が各々存在する。 K_{ATP} チャンネルを構成する Kir6.x と SUR.x の各々のサブユニットの組み合わせ (Kir6.x/SUR.x) は各種臓器間で異なり、その結果、臓器特異性を呈していると考えられている。例えば、膵細胞型 K_{ATP} チャンネルは Kir6.2/SUR1、心筋型 K_{ATP} チャンネルは Kir6.2/SUR2A の組み合わせと報告されている (Flagg *et al.*, *Physiol. Rev.*, 2010)。

近年、研究代表者は血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルのサブユニットタンパク質の組み合わせは Kir6.1/SUR2B であり、血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルは“膜電位を一定に保つフィードバック機構”を有し、血管のトーン (筋緊張) および血管径の維持・調節に重要な役割を果たしていると報告した (Yamamoto *et al.*, 2015, 2017)。また血管作動性因子は、血管平滑筋における K_{ATP} チャンネル活性を protein kinase C (PKC) 活性や cAMP 依存性 protein kinase A (PKA) 活性を介したリン酸化にて制御している。例えば、アンジオテンシン II はアンジオテンシン II 受容体を介して PKC を活性化し、 K_{ATP} チャンネル活性を抑制する。一方、 β_2 受容体刺激による PKA の活性化は K_{ATP} チャンネル活性を増大させる (Tinker *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, 2014)。さらに K_{ATP} チャンネルの強制発現系を用いた実験にて Kir6.1/SUR2B 両サブユニットに PKA によるリン酸化部位 (Kir6.1 では Ser385、SUR2B では Thr633、Ser1387、Ser1465) が存在することがアミノ酸配列レベルで明らかとなった (Quinn *et al.*, *Circ. Res.*, 2004; Shi *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2007)。すなわち、血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルは常時、直接的に血管作動性因子によるリン酸化制御を受け、『血管径の fine tuner (微調整装置)』として血管の筋緊張を維持し、各組織への血流供給や血圧の調節に深く関与していると考えられる。

一方、2 型糖尿病は心血管イベント発症の重要な危険因子であり、イベント抑制に向け、有効な治療戦略および新規治療法の早期確立が喫緊の課題とされている。そこで現在、特に臨床的に注目されているのが、新規 2 型糖尿病治療薬として広く臨床応用されるようになったインクレチン製剤である。そのうちの 1 つである「GLP-1 受容体作動薬」はこれまでの基礎研究 (動物・培養細胞実験等) において抗動脈硬化作用および抗酸化作用を有することが報告され (Arakawa *et al.*, *Diabetes*, 2010; Picatoste *et al.*, *PLoS ONE*, 2013) また大規模臨床試験 (LEADER 試験、SUSTAIN-6 試験等) においても『心血管イベント抑制効果』が示され、今後、心血管保護作用が大いに期待されている。しかし未だ「GLP-1 受容体作動薬」の血管制御に対する分子レベルでの作用機序については、ほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究課題の研究目的は「GLP-1 受容体作動薬」投与による細胞内シグナル伝達機序として想定される PKA シグナル経路をより詳細に解明するため、PKA の活性化薬および阻害薬を併用し、最新技術の時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET 法: Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) にて細胞内 cAMP 濃度を定量し、さらに蛍光バイオセンサーを用いた生細胞イメージングの手法にて細胞内 cAMP 濃度の変化 (cAMP 動態) を経時的に測定することで血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルのリン酸化修飾機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

「GLP-1 受容体作動薬」投与による血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルのリン酸化修飾を検証し、PKA の活性化薬および阻害薬の存在/非存在下において、1) 等張性収縮実験法による「GLP-1 受容体作動薬」の薬理学的作用の評価や、2) TR-FRET 法による細胞内 cAMP 濃度の定量、3) 蛍光バイオ

センサーを用いた細胞内 cAMP 動態の経時的観察、4) シングルチャンネル記録法による K_{ATP} チャネル活性計測を行い、細胞内シグナル伝達機序を明らかにする。また5) 新規購入する『遺伝子導入装置』を介し「RNA 干渉」技術を用いて GLP-1 受容体遺伝子ノックダウン細胞を作成し、GLP-1 受容体を介した応答の有無により、下流へのシグナル伝達機構に違いが生じるか、否かについて明らかにする。

(1) 画期的な TR-FRET 法にて cAMP 濃度を簡便かつ正確に定量する

ユウロピウム (Eu) に代表されるランタノイドは、一般的な蛍光物質の約 20 万倍という非常に長い蛍光寿命を持ち、その結果、自家蛍光およびバックグラウンドによる影響が、最小限に抑えられるという物質特性を有する。本アッセイ法はランタノイドキレートによる時間分解蛍光技術および FRET 技術を応用した「TR-FRET 法」を基盤としたイムノアッセイ法 (蛍光標識抗 cAMP モノクローナル抗体に対する Eu キレート標識 cAMP トレーサーおよびサンプル中の cAMP の競合的結合反応) であり (下図の図 2 を御参照下さい)、「GLP-1 受容体作動薬」投与にて産生される細胞内 cAMP 濃度を RI 装置とほぼ同等以上の高感度かつ優れた信号対バックグラウンド比で測定することが可能である。

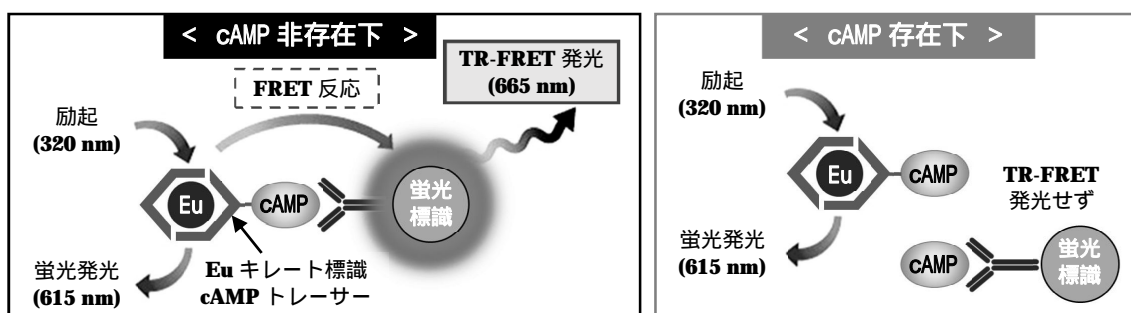


図 2 TR-FRET 法による cAMP 測定 の原理

(2) 生細胞イメージング法を駆使し、細胞内 cAMP 動態の変化を経時的に測定する

cAMP と特異的に結合することで蛍光強度が変化する蛍光タンパク質 (cADDiS cAMP センサー) をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターを血管平滑筋細胞内へ導入し、蛍光顕微鏡を用いた画像解析システムにて生細胞における cAMP 動態の変化を簡便かつ経時的に測定する。従来の cAMP 測定法では細胞溶解等、煩雑な作業や反応段階が非常に多く、かつ一時点の測定時間に絞られたエンドポイントアッセイであるため、これまで細胞内 cAMP 動態変化の経時的測定やその局所的観察が、ほとんど不可能であった。一方、本法は細胞内 cAMP 動態について生細胞の状態でかつリアルタイムにて測定することが可能であり、外部刺激に対する細胞レベルでの細胞内シグナル応答変化の記録に極めて適したアッセイ法である。

4. 研究成果

本研究課題にて主に下記の研究成果を得ることが出来た。

(1) Real-time PCR 法による GLP-1 受容体遺伝子の発現解析

マウス門脈平滑筋細胞およびヒト冠動脈平滑筋細胞における GLP-1 受容体の mRNA 発現について、real-time PCR 法を用いて定量的解析を行った。マウス門脈平滑筋単離細胞では Glp1r mRNA 発現が認められた一方、ヒト冠動脈平滑筋由来の初代培養細胞 (CASMC) では GLP1R mRNA 発現は殆どみられなかった。近年、ヒト冠動脈内皮細胞、平滑筋細胞において GLP1R mRNA 発現が認められない (Baggio LL *et al.*, *Endocrinology*, 2018) と報告されており、今回のヒト検体における実験結果を支持するものである。

(2) 等張性収縮実験法による「GLP-1 受容体作動薬」の作用評価

マウス門脈平滑筋を用いた等張性収縮実験法により、「GLP-1 受容体作動薬」の薬理的作用的評価を行った。生体内にも存在する GLP-1 (7-36) amide を投与すると、自発的筋収縮は濃度依存的に抑制され、弛緩反応が観察された。また、この弛緩反応は K_{ATP} チャネル阻害薬である Glibenclamide の追加投与にて抑制された。同様に、他の「GLP-1 受容体作動薬」である Exenatide (Exenatide) または Liraglutide を投与した場合でも、濃度依存的かつ Glibenclamide 感受性弛緩反応が観察された。すなわち、「GLP-1 受容体作動薬」と「血管平滑筋型 K_{ATP} チャネル活性化」との関連性が強く示唆された。

(3) TR-FRET 法および生細胞イメージング法による細胞内 cAMP 動態の検証

TR-FRET 法による細胞内 cAMP 濃度測定や RNA 干渉技術を用いた遺伝子ノックダウン細胞の作成といった実験系が確立できたものの、実験系の効率化を図るために、マウス門脈平滑筋細胞からヒト冠動脈平滑筋細胞 (CASMC) へ実験サンプルの移行を試みたところ、TR-FRET 法では「GLP-1 受容体作動薬」投与による細胞内 cAMP 濃度の有意な増加が認められなかった。CASMC の基礎的培養条件に種々の検討を加える他、新たに購入した別ロットの細胞での検証を継続して行っている。

これらの結果は、「GLP-1 受容体作動薬」による血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネル活性化を示唆するものであり、血管平滑筋型 K_{ATP} チャンネルにおけるリン酸化によるチャンネル修飾機序が明らかになる意義は大きいと考えられる。今後、更なる実証実験を行い、原著英文論文にまとめる計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uchida K, Nomura M, Yamamoto T, Ogawa Y, Teramoto N	4. 巻 471
2. 論文標題 Rab8a is involved in membrane trafficking of Kir6.2 in the MIN6 insulinoma cell line	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 877-887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00424-018-02252-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamamoto T, Takahara K, Uchida K, Teramoto N
2. 発表標題 Subunit composition of native ATP-sensitive K ⁺ channels in mouse portal vein smooth muscle
3. 学会等名 第91回日本薬理学会年会, 第18回国際薬理学・臨床薬理学会議（WCP2018）合同開催（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----