

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700345
 研究課題名（和文） 痙攣性疾患治療薬としてのカルシウム活性化カリウムチャネル開口薬の探索
 研究課題名（英文） Ca^{2+} -activated K^+ channels as a target for anticonvulsant drugs

研究代表者
 山村 寿男（YAMAMURA HISAO）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：80398362

研究成果の概要：大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ （BK）チャネル開口薬は、高血圧や気管支喘息、緊張性膀胱、脳血管循環の改善に有効である。一方、中枢 BK チャネルは、創薬の標的としては発展途上である。本研究では、全反射蛍光顕微鏡を利用して、生細胞膜表面に発現する BK チャネルをナノ分子画像解析した。本研究成果は、BK チャネルの生理機能の発揮やイオンチャネル創薬を目指す上で、非常に有益な情報を提供し得ると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学&神経薬理学

キーワード：イオンチャネル、カルシウム活性化カリウムチャネル、カリウムチャネル開口薬、神経細胞、血管平滑筋細胞、全反射蛍光顕微鏡、パッチクランプ、創薬

1. 研究開始当初の背景

大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル（BK チャネル）は、骨格筋や平滑筋、腺細胞及び神経等の興奮性細胞に特に多く分布しており、これらの組織の興奮時における脱分極と電位依存性 Ca^{2+} チャネル開口を介した細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き金として活性化する。BK チャネル開口に伴って生じる過分極により、細胞膜興奮と細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を制限するので、BK チャネルは細胞膜興奮に対する負帰還機構を担うと考えられている（Imaizumi et al, 1998, 1999; Ohi et al, 2001;

Morimura et al, 2006）。そのため、BK チャネル開口薬の開発は臨床的にも注目され、高血圧をはじめ、気管支喘息や緊張性膀胱等の平滑筋緊張が増加したような疾患や脳血管循環の改善にも有効であると考えられ、平滑筋を標的とした BK チャネル制御薬の開発は、我々の研究グループ（Yamamura et al, 1999, 2001, 2002）も含め精力的に行われている（Ghatta et al, 2006）。一方、中枢神経系にも豊富に発現する BK チャネルは、その生理的意義に未解明な部分を多く含んでいるため、創薬の標的としては発展途上である。BK チ

チャンネルは、活性本体である α サブユニットと機能的修飾を担う β サブユニットで構成されている (Lu et al, 2006)。 β サブユニットは、組織特異的な発現 (主な分布: $\beta 1$ = 平滑筋、 $\beta 2$ = 膵分泌組織、 $\beta 3$ = クロマフィン細胞、 $\beta 4$ = 脳) を示すことから、格好の創薬分子標的であると考えられている。

本研究では、全反射蛍光顕微鏡 (TIRF 顕微鏡) を利用して、生細胞膜表面に発現する BK チャンネルの 3 次元動態をリアルタイムでナノ分子画像解析し、その情報をイオンチャンネル創薬に応用することを目指す。ナノ分子イメージングは、分子生物学的手法と蛍光顕微鏡技術の進歩に伴い、ナノテクノロジーを生物系領域と融合させて、ごく最近になって開拓された分野である。これらの技術を応用することによって、ホ乳類細胞の機能タンパク (イオンチャンネルや受容体、細胞内小器官) やシグナル分子を生細胞のまま直接観察して機能解析することが可能になってきた (Ueda et al, 2001; Nakada et al, 2003; Demuro & Parker, 2005; Oancea et al, 2006)。細胞膜上の受容体や酵素タンパクを標的としたナノ分子イメージングは、国内外の数グループによって精力的に進められているが、イオンチャンネルの一分子可視化分野は未開拓領域が多く、本研究の推進によって、新たな知見が得られる可能性が高い。さらに、この技術を応用したイオンチャンネル創薬は、今後の治療薬開発に端緒を築くと考えられる。

2. 研究の目的

細胞膜機能タンパクであるイオンチャンネル自身の動態に着目したアプローチによって、高親和性かつ組織特異的な結合様式を有する中枢神経型 BK チャンネル開口薬の創製を目指す。まず、一分子可視化技術を用いて、生細胞内で機能する BK チャンネル 1 分子の 3 次元リアルタイム動態を解析する。BK チャンネルは、 α サブユニット (1 種類) と β サブユニット (主な分布: $\beta 1$ = 平滑筋、 $\beta 2$ = 膵分泌組織、 $\beta 3$ = クロマフィン細胞、 $\beta 4$ = 脳) の 4 量体で機能的チャンネルを構成している。特に、機能的修飾と組織特異的な多様性を担う β サブユニットの膜表面分布を一分子可視化した後、その分子情報を基盤にして、既存の BK チャンネル開口薬よりも高親和性で組織選択的な化合物を探索する。特に、中枢神経に特徴的な BK チャンネルサブユニット (特に $\beta 4$) を標的とした化合物は、癲癇や難治性痙攣発作等の痙攣性疾患治療薬に応用できる可能性がある。

本研究の特色は、TIRF 顕微鏡システムを利用して、生細胞膜表面に存在するイオンチャンネルの 3 次元動態をリアルタイムで観察し、その分子情報をイオンチャンネル創薬に組み込むことである。イオンチャンネルの細胞膜表

面上での挙動は、現在のところ、全く想像の域を出ないため、本研究において、イオンチャンネルの生細胞膜上でのダイナミックな動態が明らかとなり、その分子基盤に基づいた創薬が成立すれば、イオンチャンネルや受容体、酵素等の膜機能タンパクを標的とした創薬や疾患治療法の開拓につながると考えられる。

3. 研究の方法

TIRF 顕微鏡システムを利用した一分子可視化技術によって、生体から単離した細胞や再構築培養細胞の大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャンネル (BK チャンネル) 1 分子の生細胞膜表面上での 3 次元動態をリアルタイムで蛍光観察する。BK チャンネルの構成タンパクで機能修飾と組織特異的な多様性を担う β サブユニットの膜表面分布も一分子可視化する。この過程で必要となる BK チャンネルの蛍光標識体は作製する。さらに、パッチクランプ法も同時に適用して、生細胞の正常興奮時や静止時、痙攣性疾患や発作性疾患を想定した異常興奮時における BK チャンネルの挙動の相違や、 β サブユニットによるチャンネル動態の制御や相互作用にも注目して機能解析する。それらの結果から、BK チャンネル開口薬の最も効率が良く、効果的なイオンチャンネル - 分子結合様式を β サブユニット (= 組織) 毎に導出する。一方で、BK チャンネルの α サブユニットや各種 β サブユニットに選択的に結合する化合物を検索し、結合様式を分子レベルで解明する。

(1) BK チャンネルのナノ分子イメージング

ラット BK チャンネルの α サブユニット ($K_{Ca1.1}$) の C 末端に黄色蛍光タンパク (YFP) を融合させた cDNA を作製する。さらに、その β サブユニット ($\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$) の青色蛍光タンパク (CFP) 標識体も作製する。蛍光標識した BK チャンネルの cDNA をヒト胎児腎臓由来 293 細胞 (HEK 細胞) に遺伝子導入し、TIRF 顕微鏡システムを用いて、再構築させた BK チャンネル 1 分子の細胞膜表面における 3 次元動態をリアルタイムで蛍光観察する。同時にパッチクランプ法も適用して、正常な細胞興奮時や静止時、痙攣性疾患や発作性疾患を想定した異常興奮時における BK チャンネルの挙動の相違や、 β サブユニットによるチャンネル動態の制御や相互作用にも注目して機能解析する。

(2) 単離細胞における BK チャンネルの 1 分子画像解析

ラットから血管平滑筋細胞 ($\beta 1$ 型) や分泌細胞 ($\beta 2$ 型)、神経細胞 ($\beta 4$ 型) を酵素処理によって単離し、作製した BK チャンネル分子用蛍光プローブを用いて、そのイオンチャネ

ル動態を一分子可視化法によって蛍光観察する。特に、組織多様性を担うβサブユニットの挙動が、各細胞間(=各サブユニット間)でどの程度の相違があるのかに注目する。それらの機能解析から、BK チャンネルに対して最も効率が良く、かつ最も効果的な結合様式を組織ごとに導出する。

4. 研究成果

ラット由来 BKαと BKβ1 (図 1) を、それぞれ黄色蛍光タンパク (YFP) や青色蛍光タンパク (CFP) で標識した後、ヒト胎児腎臓由来 293 細胞 (HEK 細胞) に一過性に遺伝子導入し、TIRF 顕微鏡 (図 2) を用いて細胞膜表面に発現する BK チャンネル 1 分子の分布や挙動を画像解析した。

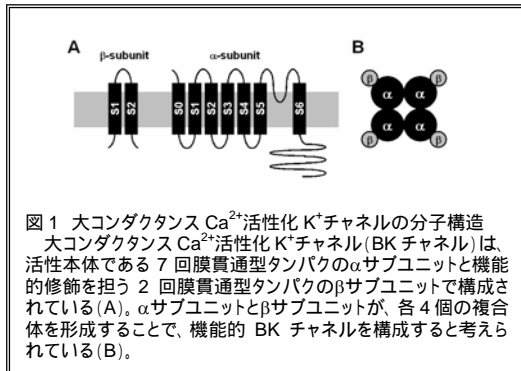


図 1 大コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャンネルの分子構造
大コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャンネル (BK チャンネル) は、活性本体である 7 回膜貫通型タンパクの α サブユニットと機能的修飾を担う 2 回膜貫通型タンパクの β サブユニットで構成されている (A)。α サブユニットと β サブユニットが、各 4 個の複合体を形成することで、機能的 BK チャンネルを構成すると考えられている (B)。

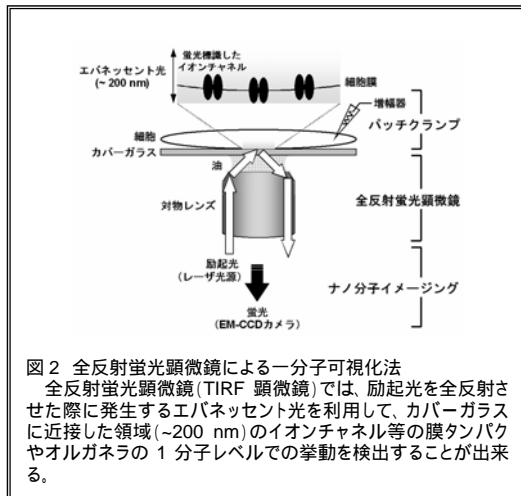


図 2 全反射蛍光顕微鏡による一分子可視化法
全反射蛍光顕微鏡 (TIRF 顕微鏡) では、励起光を全反射させた際に発生するエバネッセント光を利用して、カバーガラスに近接した領域 (~200 nm) のイオンチャンネル等の膜タンパクやオルガネラの 1 分子レベルでの挙動を検出することが出来る。

BKα 単独発現系では BKα の 1 分子あるいは、その集積による蛍光が、HEK 細胞膜表面に点状に分布しているのが観察された。BKα 蛍光粒子面積の総和は、細胞膜表面の 0.06 % を占めていた。BKα の機能発現は、ホールセルパッチクランプ法による膜電流測定により確認した。非常に興味深いことに BKα 分子はダイナミックに細胞膜上を移動することが明らかとなった。本実験条件下において BKα 分子の拡散係数は $6.7 \times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$ だった (図 3)。BKβ1 単独発現系においても、同様の分子動態を観察することが出来た。BKα に

加えて機能修飾サブユニットである BKβ1 を共発現させた HEK 細胞では、BKα の拡散係数が単独発現系と比較して 38 % に低下していた。HEK 再構築系でのチャンネル動態が native 細胞でも観察できるかを検討するために、初代培養したラット大動脈平滑筋細胞に蛍光タンパクラベルした BKα を一過性発現させた後、TIRF 画像の解析を行った。膜電流測定および蛍光抗体染色の結果から、発現 BKα は内因性の BKα と大部分置き換わり、BKβ1 と結合して BKαβ1 複合体を形成すると推測された。血管平滑筋細胞での BKα の拡散係数は HEK 細胞に共発現させた BKα/BKβ1 と比べて、有意に低かった。

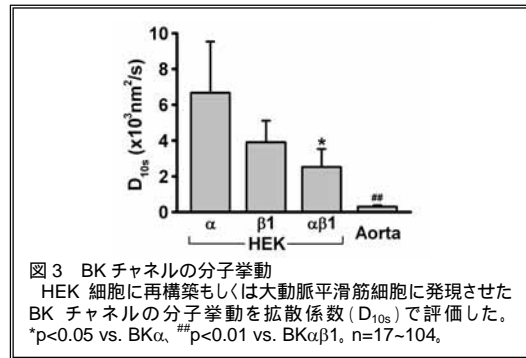


図 3 BK チャンネルの分子挙動
HEK 細胞に再構築もしくは大動脈平滑筋細胞に発現させた BK チャンネルの分子挙動を拡散係数 (D_{10s}) で評価した。
*p<0.05 vs. BKα, **p<0.01 vs. BKαβ1, n=17-104.

次に、細胞骨格の一種であるアクチンの重合を阻害するサイトカラシン D を血管平滑筋細胞に前処置すると、BKα の拡散係数がある程度増加した (図 4)。

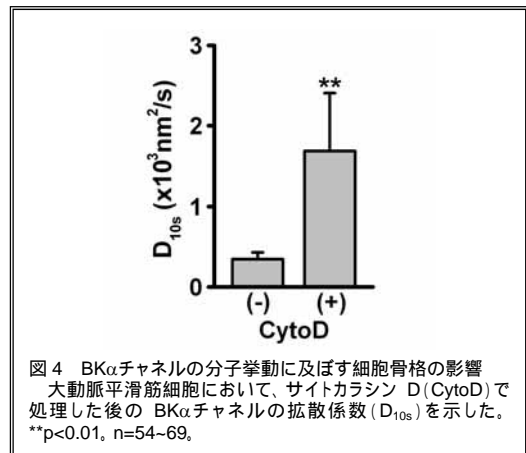
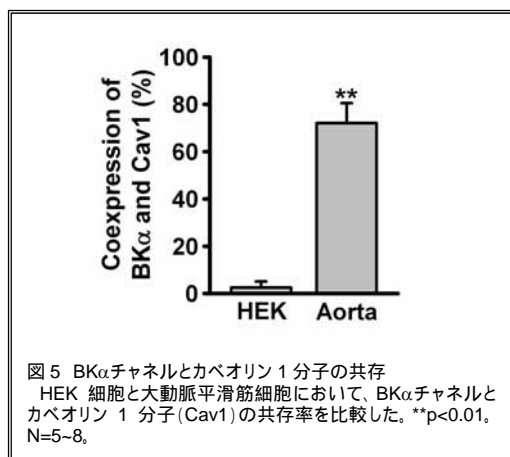


図 4 BKα チャンネルの分子挙動に及ぼす細胞骨格の影響
大動脈平滑筋細胞において、サイトカラシン D (CytoD) で処理した後の BKα チャンネルの拡散係数 (D_{10s}) を示した。
**p<0.01, n=54-69.

また BK チャンネルを含めた様々なイオン輸送体やシグナル分子等が、細胞膜ラフト構造の一種であるカベオラに集積して、機能複合体 (マイクロドメイン) を形成することにより効率的に細胞機能を制御していることが明らかになりつつある。そこで、血管平滑筋細胞のカベオラに特異的に発現するカベオリン 1 (CFP ラベル) と BKα (YFP ラベル) の細胞膜表面での分布を検討した結果、血管平滑筋細胞では、72 % の蛍光粒子が共存していることが分かった (図 5)。一方、HEK 細

胞では、この両者の共存はほとんど認められなかった。さらに、血管平滑筋細胞に発現させた BK α の分子挙動は、カベオラ構造を破壊するメチル- β -シクロデキストリンの投与によって有意に増加した。



以上より、血管平滑筋細胞の細胞膜上に発現するBKチャンネルがカベオラに集積されること、また細胞骨格によっても挙動が制御されることを、一分子可視化解析法を用いて初めて明らかにすることに成功した。カベオリンが細胞でのCa²⁺動態および興奮性調節において、機能分子の集積を介して極めて重要な役割を担っていることを裏付ける結果と考えられる。またHEK細胞へ遺伝子導入により強制発現させたイオンチャンネル分子は、その局在や動態がnativeな細胞と比較して大きく異なることも明らかとなった。本手法がイオンチャンネルやその他の膜タンパクの局在と動態解析および機能集積体としての性質の解明や、疾患での集積分子の機能連関異常の解明に極めて有効であることが示された。

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11件)

Ohno A, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Regulation of ryanodine receptor mediated Ca²⁺ release in vas deferens smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*, in press. 【査読有】

Matsushita Y, Ohya S, Suzuki Y, Itoda H, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Inhibition of Kv1.3 potassium current by phosphoinositides and stromal-derived factor-1 α in Jurkat T cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, in press. 【査読有】

Ohno A, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Gender difference in BK channel expression in amygdala complex of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 378:867-71 (2009). 【査読有】

今泉祐治, 大矢進, 山村寿男. 血管平滑筋における興奮収縮連関. *血管医学*, 9:247-54 (2008). 【査読無】

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M, Joh T, Shimada S. Epithelial Na⁺ channel δ subunit is an acid sensor in the human oesophagus. *Eur J Pharmacol*, 600:32-6 (2008). 【査読有】

Tanaka R, Muraki K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Itoh Y, Imaizumi Y. TRPV4-like non-selective cation currents in cultured aortic myocytes. *J Pharmacol Sci*, 108:179-189 (2008). 【査読有】

Matsushita Y, Ohya S, Itoda H, Kimura T, Suzuki Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Molecular mechanisms for Kv1.3 potassium channel current inhibition by CD3/CD28 stimulation in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 374:152-7 (2008). 【査読有】

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Morita A, Shimada S. TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295:C296-301 (2008). 【査読有】

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Nagao M, Shimada S. Epithelial Na⁺ channel δ subunit mediates acid-induced ATP release in the human skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 373:155-8 (2008). 【査読有】

Inagaki A, Ugawa S, Yamamura H, Murakami S, Shimada S. The Cav3.1 T-type Ca²⁺ channel contributes to voltage-dependent calcium currents in rat outer hair cells. *Brain Res*, 1201:68-77 (2008). 【査読有】

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Shimada S. Expression analysis of the epithelial Na⁺ channel δ subunit in human melanoma G-361 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 366:489-92 (2008). 【査読有】

[学会発表](計13件)

山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋Ca²⁺スパークに關与する分子集積群のTIRF可視化解析. 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都.

山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋Ca²⁺スパークドメインに集積する分子群のTIRF可視化解析. 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月18日, 横浜.

山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋細胞で発生するCa²⁺スパークに關与する分子群のTIRF画像解析. 平成20年度生理研研究会「イオンチャンネル・トランスポーターと心血管機能: 学際的取り組みによる新戦略」, 2008年11月19日, 岡

崎 .

山村寿男、大矢進、今泉祐治 . 血管平滑筋で発生する Ca^{2+} スパークとその分子基盤の TIRF 画像解析 . 特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 20 年度第 1 回班会議、2008 年 9 月 24 日、淡路 .

山村寿男、池田知佳子、大矢進、今泉祐治 . 血管平滑筋細胞における BK チャネルの一分子動態解析 . 第 85 回日本生理学会大会、2008 年 3 月 25 日、東京 .

山村寿男、今泉祐治 . 平滑筋細胞における局所 Ca^{2+} 変動の TIRF 画像解析 . 第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 18 日、横浜 .

Yamamura H, Imaizumi Y. Visualization of local Ca^{2+} transients in smooth muscle cells using total internal reflection fluorescence microscope. Pan-Pacific International Partnership Conference on Pharmaceutical and Life Sciences (The 4th US-Japan Joint Conference), 2008.2.22 (Nagoya, Japan).

Yamamura H, Imaizumi Y. TIRF imaging of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells. Biophysical Society 52nd Annual Meeting, 2008.2.3 (Long Beach, USA).

山村寿男、今泉祐治 . 全反射蛍光顕微鏡を用いた平滑筋局所 Ca^{2+} 動態の可視化解析 . 特定領域「G タンパク質シグナル」& 「膜輸送複合体」合同若手ワークショップ、2008 年 1 月 26 日、箱根 .

山村寿男、池田知佳子、大矢進、今泉祐治 . 大動脈平滑筋細胞における BK チャネルの一分子動態可視化解析 . 第 17 回日本循環薬理学会、2007 年 11 月 30 日、大阪 .

山村寿男、大矢進、今泉祐治 . 血管平滑筋での Ca^{2+} スパークによる膜電位調節機構解明の新たな展開 . 生理研研究会「イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：学際的取り組みによる新戦略」、2007 年 11 月 14 日、岡崎 .

山村寿男、今泉祐治 . 平滑筋 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離の TIRF 画像解析 . 生体機能と創薬シンポジウム 2007、2007 年 9 月 13 日、金沢 .

山村寿男、今泉祐治 . 平滑筋 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離機構の TIRF 画像解析 . 特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 19 年度第 1 回班会議、2007 年 7 月 24 日、葉山 .

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysg/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山村 寿男 (YAMAMURA HISAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：80398362

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし