

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07277

研究課題名(和文)細胞外電解質が制御するイオンチャネル発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for extracellular electrolyte-dependent regulation of ion channel expression

研究代表者

小野 克重 (Ono, Katsushige)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：40253778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外K⁺はKCNJ2チャネルの機能的発現を増加することが示された。In Silico 解析によって目的チャネルの転写に関わる可能性のある転写因子と転写補助因子が同定され、Luciferase assayで作用を確認した。心筋細胞と異種発現系の両方でイオンチャネル、転写因子、及びカリウム結合蛋白(Kbp, YgaU)の発現が変化するかを電解質異常細胞培養液の元で確認した。これらの結果により、電解質の存在がイオンチャネルタンパクの発現を制御する「電解質-転写連関」という新規細胞制御の概念が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内電解質、特にK⁺とCa²⁺は細胞機能の直接的な制御を担うだけでなく、長期的に細胞機能の制御に関わることが示された。特にK⁺の作用は細胞内K⁺濃度を規定するK⁺チャネルの発現を正に制御するというfeedback機構の形成に関与することを示したものであり画期的な発見である。本実験は心筋細胞と異種発現系の両方でイオンチャネルと転写因子の作用がどのように変化するかを実証したものであり、一般細胞全体の普遍的機能であると考えられる。これらの結果により、電解質の存在がイオンチャネルタンパクの発現を制御する「電解質-転写連関」という新規の細胞制御の概念が証明された。

研究成果の概要(英文)：K⁺ out of the cell was shown to increase the functional expression of KCNJ2 channel. A transcription assistance factor was identified with the transcription factor which might affect the transcription of the purpose channel by In Silico analysis and confirmed action in luciferase assay. I confirmed it by the cause of the electrolyte abnormality cell culture whether expression of an ion channel, a transcription factor and the potassium-binding protein (Kbp, YgaU) changed in both cardiac muscle cell and different kind expression system. A concept of the new cell control called "electrolyte - transcription linkage" that the existence of the electrolyte controlled expression of ion channel protein by these results was shown.

研究分野：Electrophysiology

キーワード：potassium KCNJ2 kbp YgaU

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルは細胞内外のイオン濃度差を感知し細胞膜を横切るイオン流を制御して細胞の恒常性を維持する。その一方、イオン濃度勾配がイオンチャンネルの数を変化させるような仕組みは存在しない。しかしながら、ヒト心房筋に発現する遺伝子を検索する過程で、高カリウム血症患者の心房筋の遺伝子発現プロフィールが正常カリウム濃度群患者のそれと異なることを見いだした。この現象は、イオンチャンネルは単にゲーティングを介して細胞内外のイオン環境を保つだけでなく、チャンネルの数そのものを変化させ、環境の変化に対応している可能性が示唆される。我々の予備研究の結果、ラット心室筋を単離し培養する際に培養液のカリウム(K^+)濃度を変化させて 24 時間後に KCNJ2 (Kir2.1)チャンネルの mRNA の発現を評価すると、細胞外 K^+ 濃度が高いほど、KCNJ2 チャンネルの発現が増え、その結果、外向き電流の大きさが変化する可能性が示された。パッチクランプ法を用いた実験で、細胞外液を急速に変化させ、細胞外 K^+ 濃度の上昇を図ると I_{K1} チャンネルのコンダクタンスが増し、外向き電流は増大することが知られているが、細胞外液の変化による長期的なイオンチャンネルの発現そのものが変化することを示した報告はない。従って我々のこの予備研究は極めて新奇性が高いものであると言える。我々の予備研究で、イオンチャンネルの mRNA の変化を解析したデータによると、培養液の K^+ 濃度の上昇に伴い、KCNJ2 チャンネル mRNA の発現が増えることが示された。この変化は単に mRNA の増減のみを評価したものであるが、更に検討を進め細胞外 K^+ の増加が KCNJ2 チャンネル蛋白質を増やすか否かを予備的に検討した結果を示すものが求められる。我々の次の予備検討では、細胞培養液にカリウムを追加添加し、細胞全体の KCNJ2 チャンネル蛋白質の変化を western blot で確認して定量化したものである。その本結果を得て、細胞外 K^+ が何らかの機序で KCNJ2 蛋白質を増加させる働きがあることを我々は確信した。本研究では特に K^+ 結合蛋白(Kbp, YgaU 他)の関与に注目している。KCNJ2 蛋白質の増加は同 mRNA の増加を伴っており、KCNJ2 チャンネルの転写過程が細胞外 K^+ によって制御されると考えられる。この細胞機能制御現象を我々は、「電解質 - 転写連関」(Electrolyte-Transcription Coupling)と呼ぶことになっており、本研究の着想と背景となっている。

2. 研究の目的

電解質異常は様々な原因によって生じ、主に神経や筋という興奮性細胞の機能を損なう。例えば、高カリウム血症では知覚過敏筋力低下という神経・筋症状の他、不整脈や心停止等の重症循環器症状を呈する。このような症状の多くは細胞内外の K^+ 濃度差の減少と細胞外 K^+ の作用による K^+ チャンネルのイオン透過性(コンダクタンス)の上昇によるものと考えられてきた。しかしながら、本研究の予備実験成果によると、細胞外 K^+ はイオンチャンネルの発現そのものを制御し、細胞の長期環境順化の1つの対応機序として作用する可能性が示唆されている。このような細胞適応の概念はこれまで報告されたことがなく、新規のイオン制御機構であると考えられる。これらの予備検討では細胞外 K^+ が K^+ チャンネル発現を制御する可能性が示されており、本研究では更に曾於検討を進め、体系的に細胞外液電解質の作用とイオンチャンネル発現の制御を解明することを目的とする。一方、細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})はセカンド・メッセンジャーとしてシグナル伝達に深く関わるが、その他の電解質、例えば生体に多く存在するナトリウム(Na^+)やマグネシウム(Mg^{2+})という陽イオンが長期的にイオンチャンネルの発現を制御する可能性がある我々は考えている。よって、細胞外 K^+ が K^+ チャンネル(これまでの成果では Kir2.1 チャンネル)の発現を正に調節する現象を手がかりに、細胞内外のイオンがイオンチャンネルの発現、特に転写過程を制御するという、「電解質が電解質制御に直接関与する」という新規概念の確立を本研究は目指す。

3. 研究の方法

- (1) 細胞外環境を、高 Na^+ 、高 K^+ 、高 Mg^{2+} 、高 Ca^{2+} 、高 Cl^- としてラット心筋細胞を培養して DNA Array を用いて網羅的に全遺伝子の発現動向を解析する。
- (2) In Silico 解析によって目的チャンネルの転写に関わる可能性のある転写因子と転写補助因子を同定し、luciferase assay で作用を確認する。
- (3) 確定転写因子を心筋細胞(ラット、ヒト心房筋)と HEK 293 細胞に導入し、心筋細胞と異種発現系の両方で目的イオンチャンネル、転写因子、及びカリウム結合蛋白(Kbp, YgaU 他)の発現が変化するかを電解質異常細胞培養液の元で確認し、機能異常をパッチクランプ法他で確認する。
- (4) 高 K^+ 血症モデルラット(5/6 腎摘ラット)、及び高 Mg^{2+} 血症ラット(浸透圧ポンプ法)、低

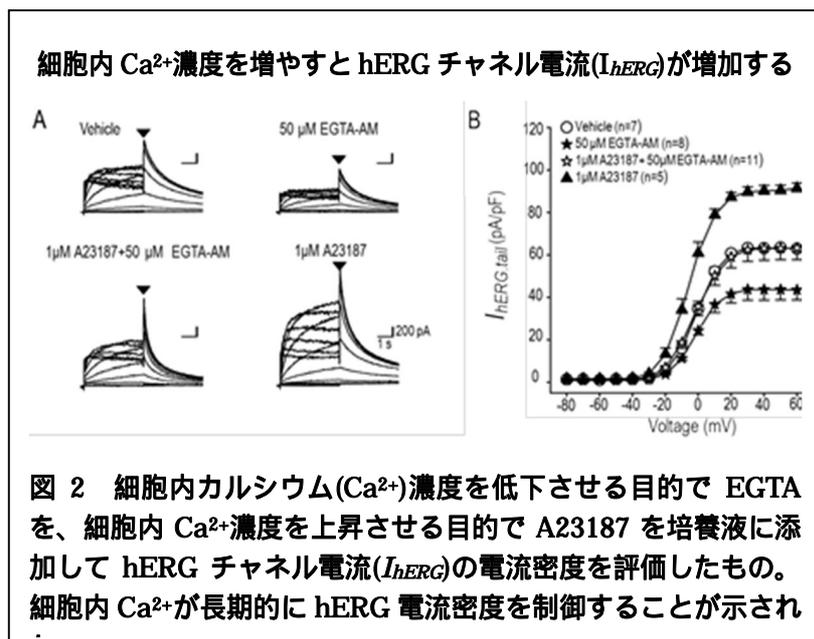
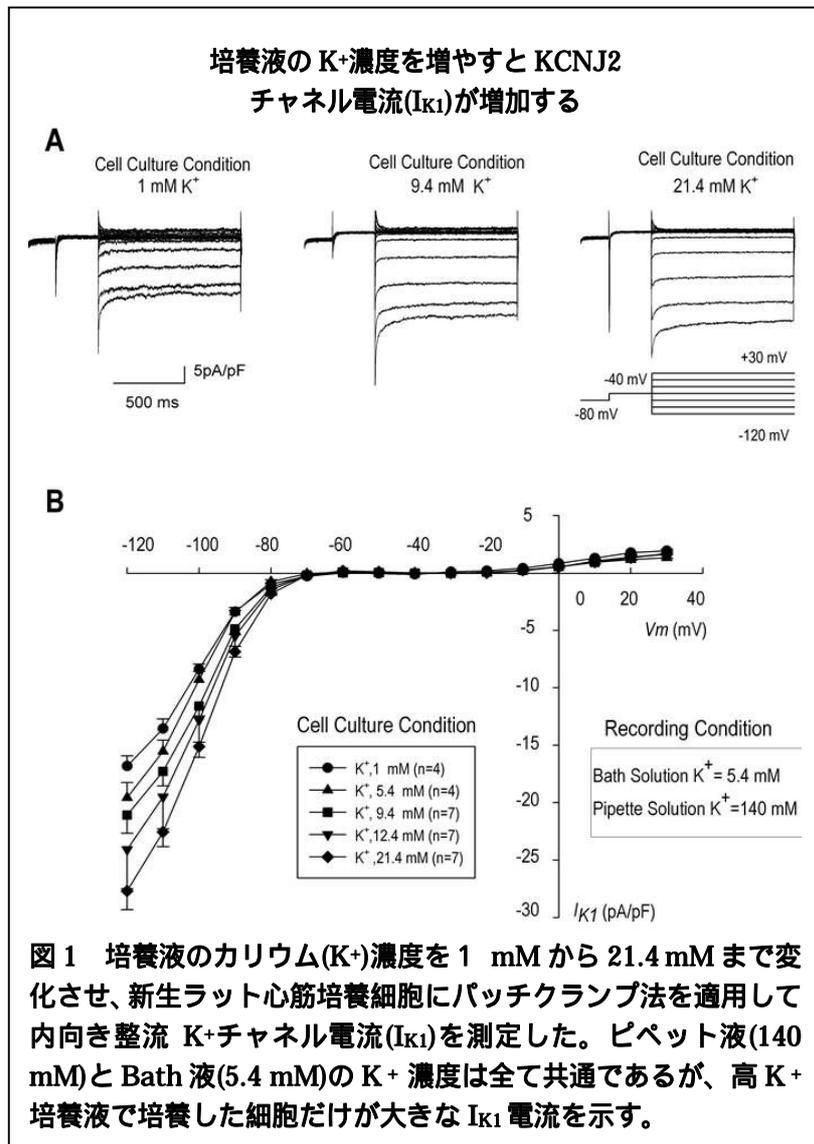
Mg²⁺血症ラット(無 Mg²⁺食)の心筋の網羅的遺伝子解析(DNA Array)とwestern blotによる In Vitro 実験の確認。In Vivo 実験の一部は予備実験により確認が進行している。K⁺結合蛋白(Kbp, YgaU 他)の発現変化が認められれば、Kbp ヘテロ欠乏マウスを作成し(外注)、チャンネル失調を確認する。

4. 研究成果

細胞内電解質、特に K⁺と Ca²⁺は転写制御の過程で様々な機能を発揮する。図1は新生ラット心筋細胞を多様な K⁺濃度を有する培養液で24時間培養後に同細胞にパッチクランプ法を施行して細胞膜電流の内向き整流カリウムチャンネル電流(I_{K1})密度を測定しグループデータとしてまとめたものである。膜電流を測定する際の細胞外 K⁺濃度はいずれも 5.4mM である。従って本実験データからは心筋細胞の I_{K1} 電流密度が24時間の培養中に変化したことを示している。すなわち、細胞外の K⁺濃度の上昇が発現 I_{K1} チャンネル密度を上昇させるという結論が導き出された。

細胞内のカルシウムイオン(Ca²⁺)が長期的にイオンチャンネルの発現を制御することも本研究の結果、証明された。図2は Kv11.1 発現系細胞(hERG- HEK 細胞)を様々な細胞内 Ca²⁺濃度条件で培養後にその細胞にパッチクランプ法

を施行して hERG 電流(I_{hERG}) を記録しその密度の比較を行ったものである。対照(Vehicle)と比較すると細胞内の Ca²⁺をキレートして細胞内 Ca²⁺濃度を低下させた条件(EGTA-AM)では



I_{hERG} 密度が小さく、細胞膜に Ca^{2+} を選択的に通過させる小孔を形成させる Ca^{2+} イオノフォアを添加した条件 (A23187) では I_{hERG} 密度が大きく記録されている。一方、EGTA-AM と A23187 の同時添加はそれぞれの作用が相殺され、 I_{hERG} 密度は Vehicle とほぼ同一の I_{hERG} 密度が記録されることが示された。この作用はラット心筋細胞、及び hERG-HEK 細胞の両方で確認されており、細胞内 Ca^{2+} が関与する普遍的な機序であることが示唆される (図 3)。

図 4 に細胞内 Ca^{2+} がいかにして Kv11.1 チャンネルの発現を制御するかに関する仮説シエマを示す。細胞内の Ca^{2+} はカルモジュリン (CALM) 系と MEK1/2-Erk1/2 系の独立した 2 系統の作用で Kv11.1 チャンネルの転写を制御することが明らかとなった。これは細胞内の CALM を抑制する薬剤 (Bepiridil または W-7) が A23187 の作用を部分的にしか抑制しないことにより支持される。一方、MEK1/2 を抑制する PD98059、及び Erk1/2 を抑制する FR80204 も A23187 の作用を部分的にしか遮断しない。FR180204 と W-7 の同時投与は A23187 の作用を完全に遮断するため、CALM と MEK1/2-Erk1/2 系は独立して Kv11.1 チャンネルの発現を制御することが明らかとなった。CALM の細胞内作用は多様であるが、CALM がカルシニューリン (CaN) とその下流シグナル NFAT を介して Kv11.1 チャンネルの発現を制御する可能性は否定されている。すなわち、CaN 阻害剤 (FK506, Rapamycin) や NFAT 阻害剤 (NFAT inhibitor) は A23187 の作用に全く影響を及ぼさなかった。一方、カルモジュリンキナーゼ (CaMK) 阻害剤である KN93 の存在下では A23187 の作用は CALM 阻害剤 {Bepiridil, W-7} の作用と同等に A23187 の作用を抑制しており、CALM は CaMK を介在シグナルとして Kv11.1 チャンネルの作用を制御していることが証明された。なお、細胞内の筋小胞体からのカルシウム放出を阻害する Thapsigargin や Cyclopiazonic Acid の存下では A23187 の作用が減弱されるため細胞内に流入した Ca^{2+} は直接的に CALM を活性化させる経路、及び Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出 (CICR) 機構を介した機序の両作用によってチャンネル蛋白の制御に関与することも証明された。

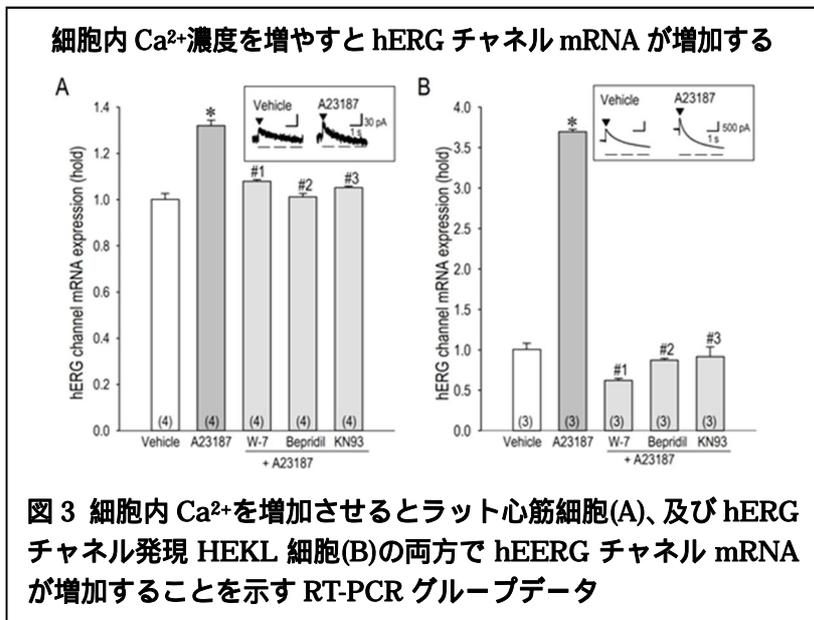


図 3 細胞内 Ca^{2+} を増加させるとラット心筋細胞(A)、及び hERG チャンネル発現 HEK293 細胞(B)の両方で hERG チャンネル mRNA が増加することを示す RT-PCR グループデータ

細胞内 Ca^{2+} が長期的に hERG チャンネル(KV11.1)を制御する分子メカニズムの仮説

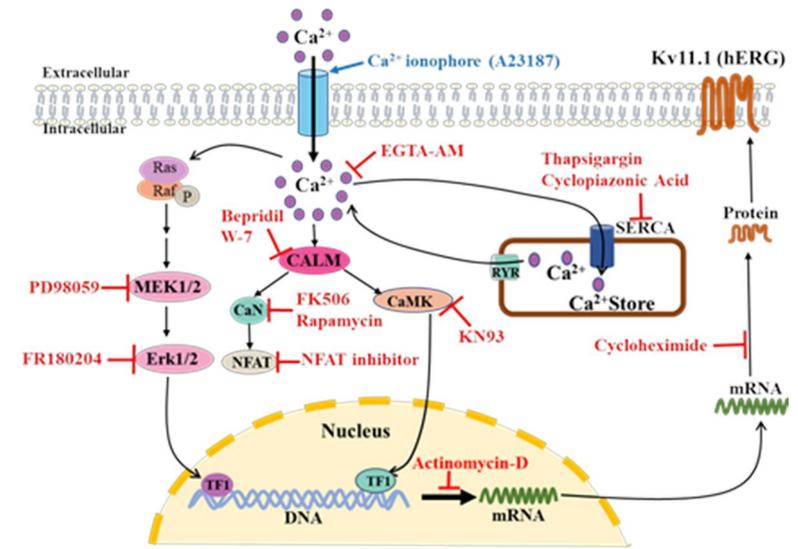


図 4 細胞内カルシウム(Ca^{2+})が Erk1/2 経路とカルモジュリンキナーゼ(CaMK)経路の 2 系統の協調によって Kv11.1 チャンネルの制御を担うことを模式的に示したもの。Kv11.1 チャンネルの転写を担う転写因子(TF)は未だに同定されていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morishima M, Fujita T, Osagawa S, Kubota H, Ono K	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhanced BDNF actions following acute hypoxia facilitate HIF-1 α -dependent upregulation of Cav3-T-type Ca ²⁺ channels in rat cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 11070470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/membranes 11070470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang P, Wei M, Zhu X, Liu Y, Yoshimura K, Zheng M, Liu G, Kume S, Morishima M, Kurokawa T, Ono K	4. 巻 11
2. 論文標題 Nitric oxide down-regulates voltage-gated Na ⁺ channel in cardiomyocytes possibly through S-nitrosylation-mediated signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90840-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu YS, Wei M, Wang L, Liu G, Ma GP, Ono K, Cao ZL, Yang M, Zheng MQ	4. 巻 21
2. 論文標題 The impact of subclinical hypothyroidism on long-term outcomes in older patients undergoing percutaneous coronary intervention	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Endocr Disord	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12902-021-00702-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Morishima M, Ono K	4. 巻 36
2. 論文標題 Serum microRNA-30d is a sensitive biomarker for angiotensin II-induced cardiovascular complications in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 1597-1606
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00380-021-01853-8	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 該当する

1. 著者名 Morishima M, Tahara S, Wang Y, Ono K	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxytocin down-regulates the Cav1.2 L-type Ca ²⁺ channel via Gi/cAMP/PKA/CREB signaling pathway in cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes 11040234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang P, Zhu X, Wei M, Liu Y, Yoshimura K, Zheng M, Liu G, Kume S, Kurokawa T, Ono K	4. 巻 36
2. 論文標題 Disruption of asparagine-linked glycosylation to rescue and alter gating of the Nav1.5-Na ⁺ channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 589-596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-020-01736-4	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 該当する

1. 著者名 Suzuki R, Morishima M, Nakada C, Miyamoto S, Ono K	4. 巻 36
2. 論文標題 Manifestation of gene expression profiles in human right atrial myocardium caused by mechanical stretch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 577-588
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-020-01724-8	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 該当する

1. 著者名 Morishima M, Tahara S, Wang Y, Ono K	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxytocin down-regulates the Cav1.2 L-type Ca ²⁺ channel via Gi/cAMP/PKA/CREB signaling pathway in cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 10.339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11040234	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 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野克重
2. 発表標題 『Mechanism for binge-alcohol-drinking-induced atrial fibrillation』
3. 学会等名 第8回国際心脳血管フォーラム（8th International Cardiocerebrovascular From）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大分大学医学部病態生理学講座 http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------