

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790199

研究課題名（和文）Cav-Cav相互作用による洞房結節L型Caチャンネルの構造機能的多様性の検討

研究課題名（英文）Structural diversity of L-type Ca<sup>2+</sup> channel in sinoatrial node -the possibility of Cav-Cav interaction-

研究代表者

豊田 太 (TOYODA FUTOSHI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90324574

**研究成果の概要（和文）**：洞房結節にはL型カルシウムチャンネルを構成する2種類のポア構成タンパク質（Ca<sub>v</sub>1.2とCa<sub>v</sub>1.3）が発現している。本研究は、両タンパク質がヘテロ会合し、洞房結節に特異的に存在するペースメーカー電流（ $I_{st}$ ）を構成する可能性を検討した。Ca<sub>v</sub>1.2ならびにCa<sub>v</sub>1.3をHEK細胞に共発現し、チャンネル電流の解析を行ったところ、両者の機能的会合を示す新しい性質の膜電流は記録できなかった。一方、キメラチャンネルを用いた機能解析により、両タンパク質のヘテロ会合により $I_{st}$ のような電流を構成する可能性は低いことがわかった。

**研究成果の概要（英文）**：In the present study, we examined the possibility of the functional assembly of Cav1.2 and Cav1.3 subunits to yield the sustained inward Na<sup>+</sup> current ( $I_{st}$ ), a pacemaker current in sinoatrial node. Heterologous coexpression of Cav1.2 and Cav1.3 in HEK cells resulted in an ensemble of Ca<sup>2+</sup> currents attributed to each Cav channel. On the other hand, the chimeric channel consisting of repeat I and II from Cav1.2 (or Cav1.3) and repeat III and IV from Cav1.3 (or Cav1.2) elicited a rapidly inactivating Ca<sup>2+</sup> current but failed to evoke a Na<sup>+</sup> current similar to  $I_{st}$ . Taken together, it is not likely that the heteromeric assembly of Cav1.2 and Cav1.3 subunits underlies  $I_{st}$  in sinoatrial node.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

洞房結節や房室結節に特異的に発現する持続性内向き  $\text{Na}^+$ 電流 ( $I_{\text{st}}$ ) は、自発性活動電位の緩徐脱分極相で活性化されることからペースメーカー活動に重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。しかしながら、選択的阻害剤がないこととその分子実体が不明であることから、 $I_{\text{st}}$ の生理的意義の解明は進んでいないのが現状である。 $I_{\text{st}}$ は $\text{Na}^+$ によって運ばれる電流であるが、その薬理的性質は心筋L型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流 ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) に酷似していることから、それを担うチャネルタンパク質も $I_{\text{Ca,L}}$ チャネルと構造的に類似していると考えられる。一方、洞房結節には、 $I_{\text{Ca,L}}$ を構成する膜電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル $\alpha_1$ サブユニットとして、心筋型 $\text{Ca}_v1.2$ のみならず神経組織に多くみとめられる $\text{Ca}_v1.3$ も発現していることが知られているが、このような特異なサブユニット発現パターンと $I_{\text{st}}$ の関連は不明である。

4量体でポアを構成する $\text{K}^+$ チャネルではしばしば異なるアイソフォーム間でヘテロチャネルが構築されることが知られており、イオンチャネルの機能的多様性をもたらす重要な生理的プロセスであると考えられている。一方、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルや $\text{Na}^+$ チャネルのポアサブユニットは4つの類似した繰り返し構造(リピート)がタンデムにつながっており、単独でひとつのポアを形成すると考えられている。しかしながら、1) 機能的なチャネル構築は必ずしもタンデム構造に依存しないこと(リピートII-IIIリンカーを切断しても機能的なチャネルが構成)、2) dominant negative 効果を発揮する $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの変異が存在すること、さらには3) 心筋組織から $\text{Ca}_v$ タンパク質が2量体で精製される事実は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル $\alpha_1$ サブ

ユニットの会合様式やストイキオメトリに新たな疑問を投げかけるものであり、 $\text{Ca}_v$ - $\text{Ca}_v$  interactionにより多様な性質の機能的ヘテロチャネルが構築される可能性も十分考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、 $I_{\text{st}}$ チャネルの分子実体を模索するひとつの試みとして、 $\text{Ca}_v$ - $\text{Ca}_v$  interactionが洞房結節の $I_{\text{Ca,L}}$ チャネルの構造的、機能的多様性をもたらす可能性を検討する。具体的には、洞房結節に2種類の $I_{\text{Ca,L}}$ チャネル $\alpha_1$ サブユニット( $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$ )が発現する特殊性に着目し(他の心筋組織は $\text{Ca}_v1.2$ のみ)、これらの $\alpha_1$ サブユニットが機能的 $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$ ヘテロチャネルの構築するかを検証する。また、 $\text{Ca}_v1.2$ ならびに $\text{Ca}_v1.3$ のリピートI-IIあるいはリピートIII-IVを置換したキメラチャネルを用い、ヘテロチャネルの電気生理学的性質を詳細な解析し、 $I_{\text{st}}$ チャネルとの関連を検討する。

## 3. 研究の方法

ラット $\text{Ca}_v1.2$ ならびに $\text{Ca}_v1.3$ のcDNAはそれぞれ小林先生・當瀬先生(札幌医科大学)ならびに清野先生(神戸大学)から入手した。また、PCR法により各 $\text{Ca}_v$ のリピートII-IIIリンカー部分にMunI制限酵素認識配列(acgcgt)を挿入し、当該部位で切断した $\text{Ca}_v1.2$ (あるいは $\text{Ca}_v1.3$ )のリピートI-II部位と $\text{Ca}_v1.3$ (あるいは $\text{Ca}_v1.2$ )のリピートIII-IV部位とを相互に入れ換えたキメラチャネルDNAを作製した。これらのDNAはほ乳類細胞発現ベクター(pIRESやpCR3.1)にサブクローニングし、リポフェクタミン法によりHEK293細胞あるいはCHO細胞に導入した。

異種性発現系に発現したチャネルの機能解析はホールセルパッチクランプ法による電流記録で行った。細胞外液には  $\text{Ca}^{2+}$  を 1.8 あるいは 0.1 mM 含む Tyrode 液を用い、電極内液には、バックグラウンドの  $\text{K}^+$  コンダクタンスを除去するために  $\text{Cs}^+$ -rich 溶液を用いた。イオン選択性、膜電位依存性ならびに不活性化キネティクスを解析することで  $I_{st}$  チャネルとの関連を検討した。

#### 4. 研究成果

(1)  $\text{Ca}_v1.2$  ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  チャネルの電気生理学的性質

$\text{Ca}_v1.2$  あるいは  $\text{Ca}_v1.3$  を共発現した HEK 細胞あるいは CHO 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電流の解析を行った。いずれの  $\text{Ca}_v$  チャネルも、脱分極刺激により活性化され、速やかに不活性化する一過性内向き電流を誘発した。この電流は  $\text{Ca}^{2+}$  に選択的で、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を 1.8 mM から 0.1 mM に減少させることで、ほとんどが消失した。活性化の閾膜電位ならびに最大電流値が得られる膜電位は、 $\text{Ca}_v1.2$  チャネルにおいて、それぞれ -35 mV ならびに -5 mV 付近であり、 $\text{Ca}_v1.3$  チャネルにおいては、いずれも  $\text{Ca}_v1.2$  のそれらに比べ約 10 mV 過分極側にあった。

(2)  $\text{Ca}_v1.2$  ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  の共発現実験  
 $\text{Ca}_v1.2$  ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  の DNA を 1:1 の量比で HEK 細胞にトランスフェクションし、ホールセルパッチクランプ法により電流を記録した。共発現した細胞から誘発した膜電流は、やはり不活性化が速く、高い  $\text{Ca}^{2+}$  選択性を示した。また、活性化の膜電位依存性は、 $\text{Ca}_v1.2$  と  $\text{Ca}_v1.3$  のちょうど中間であり、共発現細胞から記録される膜電流は  $\text{Ca}_v1.2$  ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  を各々単独で発現したときに生じる電流の単純な合算であると考えられた。

#### (3) $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$ キメラチャネル

$\text{Ca}_v1.2$  と  $\text{Ca}_v1.3$  の会合を想定し、各サブユニットのリピート I-II あるいはリピート III-IV を置換したキメラチャネルを作製し、機能解析を行った。 $\text{Ca}_v1.2$  (リピート I-II) /  $\text{Ca}_v1.3$  (リピート III-IV) ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  (リピート I-II) /  $\text{Ca}_v1.2$  (リピート III-IV) のいずれも機能的なチャネルを構成した。しかしながら、誘発される電流は、やはり不活性化の速い  $\text{Ca}^{2+}$  電流であり、 $I_{st}$  のような  $\text{Na}^+$  によって運ばれる電流も観察できなかった (図 1)。

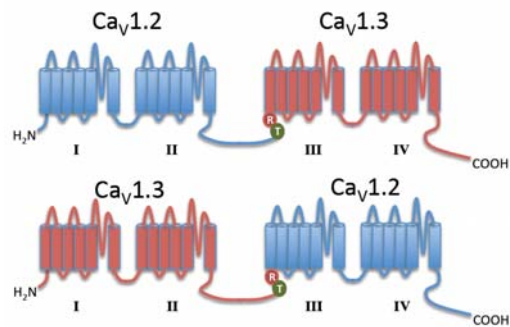


図 1.  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  キメラチャネル  
 いずれも HEK 細胞に発現すると  $\text{Ca}^{2+}$  選択性が高く、不活性化の速い電流を構成し、 $I_{st}$  のような持続性  $\text{Na}^+$  電流は構成しなかった。

これらの結果から、異種性発現系において  $\text{Ca}_v1.2$  ならびに  $\text{Ca}_v1.3$  によるヘテロチャネルが構成される可能性は低いと考えられた。また、両者の会合が物理的に生じても、それが洞房結節細胞の  $I_{st}$  の分子メカニズムに関わることはないことがわかった。

## 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 10 件)

- (1) Himeno Y, Toyoda F, Satoh H, Amano A, Cha CY, Matsuura H, Noma A. Minor contribution of cytosolic  $Ca^{2+}$  transients to the pacemaker rhythm in guinea pig sinoatrial node cells. *Am J Physiol.* 300: H251-61, 2010. (査読有)
- (2) Ding WG, Toyoda F, Ueyama H, Matsuura H. Lysophosphatidylcholine enhances  $I_{Ks}$  currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 50: 58-65, 2010. (査読有)
- (3) Toyoda F, Ding WG, Zankov PD, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Horie M, Matsuura H. Characterization of the rapidly activating delayed rectifier potassium current,  $I_{Kr}$ , in HL-1 mouse atrial myocytes. *J Memb Biol.* 235: 73-87, 2010. (査読有)
- (4) Wu J, Shimizu W, Ding WG, Ohno S, Toyoda F, Itoh H, Zang WJ, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Nademanee K, Brugada J, Brugada P, Brugada R, Vatta M, Towbin JA, Antzelevitch C, Horie M. KCNE2 modulation of  $Kv4.3$  current and its potential role in fatal rhythm disorders. *Heart Rhythm.* 7: 199-205, 2010. (査読有)
- (5) Nishio Y, Makiyama T, Itoh H, Sakaguchi T, Ohno S, Gong YZ, Yamamoto S, Ozawa T, Ding WG, Toyoda F, Kawamura M, Akao M, Matsuura H, Kimura T, Kita T, Horie M. D85N, a KCNE1 polymorphism, is a disease-causing gene variant in long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 54: 812-819, 2009. (査読有)
- (6) Okumura N, Imai S, Toyoda F, Isoya E, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y. Regulatory role of tyrosine phosphorylation in the swelling-activated chloride current in isolated rabbit articular chondrocytes. *J Physiol.* 587: 3761-3776, 2009. (査読有)
- (7) Zankov DP, Yoshida H, Tsuji K, Toyoda F, Ding WG, Matsuura H, Horie M. Adrenergic regulation of the rapid component of delayed rectifier  $K^+$  current: implications for arrhythmogenesis in LQT2 patients. *Heart Rhythm.* 6: 1038-1046, 2009. (査読有)
- (8) Zankov DP, Toyoda F, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Horie M. Angiotensin II type 1 receptor mediates partially hyposmotic-induced increase of  $I_{Ks}$  current in guinea pig

atrium. *Pflügers Arch.* 458:837-849, 2009. (査読有)

- (9) Jiang M, Xu X, Wang Y, Toyoda F, Liu XS, Zhang M, Robinson RB, Tseng GN. Dynamic partnership between KCNQ1 and KCNE1 and influence on cardiac  $I_{Ks}$  current amplitude by KCNE2. *J Biol Chem.* 284: 16452-16462. 2009. (査読有)
- (10) Ohno S, Toyoda F, Zankov DP, Yoshida H, Makiyama T, Tsuji K, Honda T, Obayashi K, Ueyama H, Shimizu W, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Kita T, Horie M. Novel KCNE3 mutation reduces repolarizing potassium current and associated with long QT syndrome. *Hum Mutat.* 30: 557-563, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. A sodium-permeable  $Ca_v1.3$  mutant channel exhibits electrophysiological properties characteristics of the sustained inward current in sinoatrial node cells. 第 87 回日本生理学会, 平成 22 年 5 月 19 日, 盛岡
- (2) Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. Generation of sodium-permeable  $Ca_v1.3$  channel: insights into the molecular basis for the sustained inward current in cardiac pacemaker cells. Biophysical Society 54<sup>th</sup> Annual Meeting. 平成 22 年 2 月 22 日, 米国サンフランシスコ
- (3) Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. The role of KCNE3 in the regulation of cardiac KCNQ1 potassium channel. 36<sup>th</sup> International Congress of Physiological Science. 平成 21 年 7 月 28 日, 京都
- (4) 豊田 太・丁 維光・松浦博,  $Na^+$ 透過性  $Ca_v1.3$  チャネルの作製- $I_{st}$  の分子基盤の解明を目指して-, 日本心電学会, 平成 21 年 7 月 3 日, 京都

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
豊田 太 (TOYODA FUTOSHI)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90324574