

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590200

研究課題名（和文） 交感神経によるCaチャンネルβ2サブユニットのリン酸化

研究課題名（英文）

Analysis of the voltage-dependent calcium channel β subunit in response to sympathetic nerve dependent phosphorylation.

研究代表者

村上 学（MURAKAMI MANABU）

弘前大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80302090

研究成果の概要（和文）：

電位依存性カルシウムチャンネルβサブユニットの交感神経制御機構における重要性を、遺伝子改変動物を用いて解析を行った。

交感神経による心筋収縮制御機構はカルシウムチャンネルを介して行われている。心筋において最も発現している電位依存性カルシウムチャンネルβサブユニットはβ2である。この遺伝子の欠損マウスモデル（β2サブユニット欠損マウス）を作製し、生きた個体を用いて、交感神経への影響を調べた。β2遺伝子欠損マウスにおいては交感神経刺激による心筋収縮の増強作用が低下していることを確認した。さらに電流量の増加反応が認められないことを確認した。電位依存性Caチャンネルβ2サブユニットのリン酸化部位に変異を導入し、変異遺伝子を過剰に発現するマウスモデルを作製した。（Murakami et al., 現在論文投稿中）

研究成果の概要（英文）：

Mice with β₂ subunit-null mutations exhibited reduced cardiac muscle contraction in response to isoproterenol, and did not exhibit significant increases in Ca²⁺ channel currents upon PKA-dependent phosphorylation. These findings indicate that the primary target for PKA by the sympathetic nervous system might be the β₂ subunit.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	900000	270000	1170000
2012年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

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

交感神経の亢進、および心臓における効果器であるβアドレナリン受容体、細胞内シグナル伝達系(cAMP増加に伴う標的タンパクのリン酸化)は、医学の歴史において主要なテーマであり続けて来た。この刺激伝達系は、オイラーによる

交感神経伝達物質の同定や、ブラックらによるβブロッカーの開発などを列記するまでもなく、極めて重要である。臨床的にも、βブロッカーは慢性心不全に対するスタンダードな治療法である。

2. 研究の目的

交感神経亢進時、心筋L型CaチャネルがPKAによりリン酸化を受け、Ca流入が増加、心筋収縮力が増強する。このリン酸化を受ける分子がCaチャネルのβ2サブユニットであることを研究代表者は見出した。そこで、β2のリン酸化部位に変異を導入したトランスジェニックマウスを作製し、β2のどのセリン残基が生理的リン酸化を受けるのか、 個体レベルで精査するのが目的である。

3. 研究の方法

本研究ではβ2遺伝子のリン酸化が予想されるアミノ酸(2ヶ所)に変異を導入し、過剰発現マウスを作製する。できたマウスをβ2欠損マウスと交配し、外来性β2遺伝子のみを発現する遺伝子改変マウスを作製・解析することにより、β2遺伝子のどのアミノ酸がPKAリン酸化を受け、生理的な交感神経制御機構の作用点となるのかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 電位依存性Caチャネルβ2サブユニットのリン酸化部位に変異を導入し、変異遺伝子を過剰に発現するマウスモデルを作製した。このマウスモデルにおいては、交感神経刺激による陽性変力作用が減弱していることが判明した(Murakami et al., 現在論文投稿中)。

(2) ペプチドによるCaチャネル制御を研究する過程で、循環ペプチドであるアドレノメジュリンやアミンによる制御機構について、総説を発表した。(Kuwasako et al., 2013)

(3) Naチャネルによる交感神経髄質細胞制御機構に関する研究を行い、日本薬理学会等で発表した。(Nemoto et al., 2012, Yanagita et al., 2012) 循環ペプチドであるエンドセリンが電位依存性Naチャネルの発現を制御することにより、脱分極の発生を抑え、カテコールアミン分泌を抑制することを示した。(Nemoto et al., 2012, in press)

(4) 脳内ペプチドであるオレキシンが副腎髄質で産生されていること、カテコールアミン分泌を刺激し、局所の交感神経制御機構を構成している可能性を示した。(Nemoto et al., 2013, in press)

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)

① Nemoto T., Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, Ohba T, Yanagita T., Watanabe H, Shirasaka T, Tsuneyoshi I, Ishida Y, Hirota K, Sawaguchi A, Murakami M. Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. *Pharmacology*, 2013, in press 査読有

② Kuwasako K., Kitamura K, Nagata S, Murakami M., Kato J.

Agonist-mediated activation and trafficking of the RAMP-based Family B GPCRs.

Curr Protein and Peptide Science 2012, in press. 査読有

③ Matsumoto-Miyai K., Kagase A., Yamada E., Yoshizumi M., Murakami M., Ohba T., Kawatani M.

Store-operated Ca²⁺ entry suppresses distention-induced ATP release from urothelium.

American Journal of Physiology - Renal Physiology, F716-720, (2011). 査読有

④ Yanagita, T., Satoha, S., Uezono, Y., Matsuo, K., Nemoto, T., Maruta, T., Yoshikawa, N., Iwakirid, T., Minami, K., and Murakami, M.

Transcriptional up-regulation of cell surface NaV1.7 sodium channels by insulin-like growth factor-1 via inhibition of glycogen synthase kinase-3β in adrenal chromaffin cells: enhancement of ²²Na⁺ influx, ⁴⁵Ca²⁺ influx and catecholamine secretion.

Neuropharmacology, 61, 1265-1274, (2011). 査読有

⑤ Nemoto T., Yanagita T., Satoh S, Maruta T, Kanai T, Murakami M., Wada A.

Insulin-induced neurite-like process outgrowth: Acceleration of tau protein synthesis via a phosphoinositide 3-kinase-mammalian target of rapamycin pathway. *Neurochem Int.* 59, 880-888, (2011). 査読有

⑥ Murakami M.
N-type voltage-dependent calcium channels in the sympathetic nervous system. *Hiroaki Medical Journal* 2011; 62: S32-40. 査読有

⑦ Nakagawasai, O., Onogi, H., Mitazaki, S., Sato, A., Watanabe, K., Saito, H., Murai, S., Nakaya, S., Murakami, M., Takahashi, E., Tan-No, K., Takeshi Tadano, T.
Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the N-type Ca²⁺ channel α1B subunit. *Behavioural Brain Research* 208, 224-230, (2010). 査読有

- ⑧ Ohta, T., Ohba, T., Suzuki, T., Watanabe, H., Sasano, H., Murakami, M.
Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca^{2+} channel $\beta 3$ subunit-null mice.
Biochemical & Biophysical Research Communications, 394, 464-469, (2010).
査読有
- ⑨ Kusaba, T., Okigaki, M., Matui, A., Murakami, M., Ishikawa, K., Kimura, T., Sonomura, K., Adachi, Y., Shibuya, M., Shirayama, T., Tanda, S., Hatta, T., Sasaki, S., Moria, Y., and Matsubara, H.
Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107, 19308-19313, (2010). 査読有
- ⑩ Makabe, S., Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ohba, T., and Ito, H.
Fluvastatin protects vascular smooth muscle cells against oxidative stress through the Nrf2-dependent antioxidant pathway.
Atherosclerosis, 213, 377-384, (2010).
査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yanagita et al.,
Encouragement of role - play : effectiveness of the student role - play in the pharmacology education at the school of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences
2013年3月21-23日. 福岡, 日本薬理学会年会.
- ② Yanagita et al.,
Trial of practical pharmacotherapy education using role - play with third - year medical students act as physicians and patients
2013年3月21-23日. 福岡, 日本薬理学会年会.

- ③ Yanagita et al.,
Regulation of homodimerization of insulin receptor and insulin - like growth factor - 1 receptor by heat shock protein 90 oligomerization
2013年3月21-23日. 福岡, 日本薬理学会年会.
- ④ Nemoto et al.,
Endothelin - 1 - induced down - regulation of $Na_v1.7$ expression in adrenal chromaffin cells : attenuation of catecholamine secretion and tau dephosphorylation.
2013年3月21-23日. 福岡, 日本薬理学会年会.
- ⑤ Sugita C, Yanagita T, Nemoto T, Yamashita A, Matsuura Y, Iwakiri T, Okuyama N, Asada Y, Murakami M. Elevated plasma factor VIII enhances venous thrombus growth in rabbit
2013年3月21-23日. 福岡, 日本薬理学会年会.
- ⑥ 根本 隆行, 柳田 俊彦, 村上 学
インスリンによる tau 蛋白合成促進
2011年12月17-18日. 日光シンポジウムトランスポーター研究会, 日光.
- ⑦ Nemoto T, Yanagita T, Murakami M.
Insulin-induced neurite-like process outgrowth.
Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting
2011年11月12-16日. Washington DC, USA, USA.
- ⑧ 村上 学
電位依存性カルシウムチャンネルと交感神経
第5回トランスポーター研究会九州部会
2011年9月17日. 宮崎 (招待講演).
- ⑨ Murakami M et al.,
Decreased calcium channel currents and facilitated epinephrine release in the Ca^{2+} channel $\beta 3$ subunit-null mice.
Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting
2010年11月13-17日. San Diego, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 学 (MURAKAMI MANABU)
弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 80302090

(2) 研究分担者

尾野 恭一 (ONO KYOICHI)
秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 70185635

大場 貴喜 (OHBA TAKAYOSHI)
秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号: 80431625

根本 隆行 (TAKAYUKI NEMOTO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 90506833

柳田 俊彦 (TOSHIHIKO YANAGITA)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号: 60295227

飯島俊彦 (TOSHIHIKO IIGIMA)
秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授
研究者番号: 30004724