

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790217

研究課題名（和文）

自発発火特性を制御する新規ナトリウム透過性チャネル NALCN の心臓における機能

研究課題名（英文）

Physiological roles of NALCN channel, the sodium leak channel, in the heart

研究代表者

伊藤 政之（ITO MASAYUKI）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20442535

研究成果の概要（和文）：本研究では洞房結節に存在する心ペースメーカー細胞において自動能の発現に重要である持続性内向き電流（*I_{st}*）の分子基盤となるイオンチャネルの同定を目指した。RT-PCR 法により洞房結節において L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル Cav1.3 の新規アイソフォームである Cav1.3(1b) が高発現していることを見出した。しかし、この Cav1.3(1b) をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ電気生理学的な解析を行ったが、*I_{st}* を再構成することは出来なかった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to elucidate the molecular mechanisms underlying sustained inward current (*I_{st}*), a pacemaker cell specific current in sinoatrial node. RT-PCR analysis revealed that the recently identified new Cav1.3(1b) isoform was specifically expressed in the sinoatrial node, but not Cav1.3(1a). Heterologous expression of Cav1.3(1b) in *Xenopus* oocytes induced Ca^{2+} currents, but failed to induce Na^{+} currents similar to *I_{st}*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：イオンチャネル・心ペースメーカー細胞・持続性内向き電流・NALCN

1. 研究開始当初の背景

心拍数は洞房結節に存在するペースメーカー細胞の自発的な興奮サイクルによって制御されている。これまでの膨大な電気生理学的研究の成果に基づき、ペースメーカー細胞の活動電位各相における様々なイオンチ

ャネルの機能についてコンピュータシミュレーションを使った定量的な議論ができるようになってきた。しかしながら、「ペースメーカー細胞の発火頻度を決定する緩徐拡張期脱分極＝ペースメーカー電位を形成するイオン電流の主体は何か？」、という問題

については未だに議論が多く、イオンチャネル遺伝子のノックアウトマウスを使った実験でも決定的な証拠は得られていない。

持続性内向き電流 (*I_{st}*) は Noma らの研究グループによりペースメーカー細胞に特異的な電流として見出された (Guo ら, *JP 481*: 1, 1995)。彼らは、*I_{st}* は ① 脱分極により活性化されるが、膜電位依存的な不活性化をほとんど示さない、② 主な透過イオンは Na^+ である、③ TTX 感受性はないが、 Ca^{2+} 拮抗剤の感受性を持つ、④ アドレナリン受容体刺激により電流が増強することを報告した。*I_{st}* はその電気生理学・薬理学的な特性から、おそらく電位依存性 Na^+ チャネルや Ca^{2+} チャネル等と類似した S1-S6 の膜貫通ドメインが4回繰り返す $4 \times 6\text{TM}$ 構造を持つ分子であることが予想されるが、その発見から 10 年以上が経過した現在においても、このチャネルを構成する分子実体は全く不明のままであった。よって、ペースメーカー細胞の興奮サイクルの分子機構を詳細に議論するためには、持続性内向き電流 (*I_{st}*) の分子実体となるイオンチャネルの同定を始めた更なる研究の進展が必須であった。

2. 研究の目的

本研究では洞房結節に存在する心ペースメーカー細胞において自動能の発現に重要である *I_{st}* の分子基盤となるイオンチャネルを同定し、異所性発現系を用いて *I_{st}* の再構成することを目的とした。そのため ① マイクロアレイ法及び RT-PCR 法による洞房結節特異的なイオンチャネルの探索、② RT-PCR 法による洞房結節に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャネル Cav1.3 の新規分子種の探索、③ 異所性発現系を用いた Cav1.3 の新規分子種 Cav1.3(1b) の機能解析、の 3 点について主に実験を行った。

3. 研究の方法

① マイクロアレイ法及び RT-PCR 法による洞房結節特異的なイオンチャネルの探索
洞房結節において高発現するイオンチャ

ネルおよびその関連タンパクの検索を行うため、マウス洞房結節および右心房から Trizol を用いて total RNA を調製し、これを用いてマイクロアレイ法及び RT-PCR 法による遺伝子発現解析を行った。

② RT-PCR 法による洞房結節に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャネル Cav1.3 の新規分子種の探索

①の結果を受け、マウス洞房結節の RNA を用いて RT-PCR 法により数種類のプライマーセットを用い Cav1.3 の洞房結節特異的な新規アイソフォームの探索を行った。これに加え、電位依存性 Ca^{2+} チャネル β サブユニット及び $\alpha 2\delta$ サブユニットについても、洞房結節特異的なアイソフォームが発現している可能性も踏まえ RT-PCR 法による発現解析を行った。

③ 異所性発現系を用いた Cav1.3 の新規分子種 Cav1.3(1b) の機能解析

②の結果を受け、アフリカツメガエル卵母細胞に Cav1.3(1a) 又は Cav1.3(1b)、さらに補助サブユニットとして種々の β サブユニット、及び $\alpha 2\delta$ サブユニットの cRNA をマイクロインジェクションにより注入し、異所性に発現させたイオンチャネルの電流を二本刺し膜電位固定法により電気生理学的解析を行った。尚、アフリカツメガエル卵母細胞には内在性の Ca^{2+} -activated Cl^- チャネルが発現しているため、しばしば異所性発現させたイオンチャネルの電流記録の障害となることがある。これを防ぐため BAPTA を細胞質にマイクロインジェクション後、更に Cl^- チャネルブロッカー DIDS を加えた細胞外液中で記録を行った。

4. 研究成果

① マイクロアレイ法及び RT-PCR 法による洞房結節特異的なイオンチャネルの探索

主に電位依存性の Na^+ チャネルおよび Ca^{2+} チャネルに着目すると、Scn7a が 2.1 倍、Scn4b が 3.1 倍、Cacna1d (Cav1.3) が 1.7

倍、Cacna1g (Cav3.1) が 1.8 倍、Cacna2d2 ($\alpha 2\delta 2$) が 1.3 倍、Cacnb4 ($\beta 4$) が 2.6 倍洞房結節において発現量が高いことが分かった。また、電位依存性の Na^+ チャネルおよび Ca^{2+} チャネル同様に $4\times 6\text{TM}$ 型の構造を持ち Na^+ リークチャネルとして知られている NALCN は 1.14 倍、洞房結節において発現量が高いことが分かった。

この NALCN はポア部位のアミノ酸が EEKE で、電位依存性 Ca^{2+} チャネル及び Na^+ チャネルのポアの性質を併せ持つ非選択的な陽イオンチャネルで、S4 の膜電位センサーを有するが電位依存性を示さないリークチャネルとして機能することや、TTX 感受性はないが Ca^{2+} 拮抗剤の感受性を有するため、我々は NALCN が単独で、もしくは洞房結節に特異的に発現する未知の分子が NALCN に電位依存性を付与することで、*Ist* として機能する可能性に当初は注目していた。しかし、洞房結節において発現量が確認されたものの、上述のマイクロアレイ法の結果に加え、RT-PCR 法による発現解析においても右心房と比較して洞房結節における NALCN の顕著な高発現を確認できなかった。よって他の候補分子の解析を先に行うこととした。

②RT-PCR法による洞房結節に発現する電位依存性 Ca^{2+} チャネル Cav1.3 の新規分子種の探索

①の結果を受け、これまでの研究で知られている *Ist* の電気生理学的・薬理学的特性からまずは Cav1.3 に着目し、RT-PCR 法によりどの Cav1.3 アイソフォームが洞房結節においてドミナントなのか数種類のプライマーセットを用いて検索を行った。結果、心臓において Cav1.3 は選択的スプライシングによって生じる N 端部分の異なる 2 種の分子 (Cav1.3(1a)および Cav1.3(1b)) が発現し、特に Cav1.3(1b)は洞房結節に顕著に高発現していることを見出した。Cav1.3(1b)は 2002 年に同定された新規アイソフォームで DHP 系カルシウムチャネルブロッカーの感受性が Cav1.3(1a)よりやや低いこと以外は両者

の機能的な差異についての報告はなされていない (Klugbauer ら, *Eur. J. Pharmacol.* **447**: 279, 2002, Xu ら, *JBC* **278**: 40837, 2003)。今回、この Cav1.3(1b)が洞房結節に特異的に発現することが分かったので、まずは Cav1.3(1b)を *Ist* の分子基盤となるイオンチャネルの第一候補分子とすることにした。

これに加え Cav1.3(1b)の洞房結節における補助サブユニットとなるような β サブユニット及び $\alpha 2\delta$ サブユニットについても RT-PCR 法により検索を行った。主に心臓で発現していることが知られている分子種に着目し、 β サブユニットでは $\beta 2b$, $\beta 2d$, $\beta 2e$, $\beta 3$, $\beta 4$ を、 $\alpha 2\delta$ サブユニットでは $\alpha 2\delta 1$, $\alpha 2\delta 2$ について実験を行ったが、どのサブユニットにおいても洞房結節に特異的なもの、または洞房結節に顕著に高発現する分子種を見出すことは出来なかった。

③異所性発現系を用いた Cav1.3 の新規分子種 Cav1.3(1b)の機能解析

アフリカツメガエル卵母細胞に Cav1.3(1a)又は Cav1.3(1b), 補助サブユニットとして $\beta 3$, $\alpha 2\delta 1$ (Cav1.3 の実験でもっともよく使用されている補助サブユニットの組み合わせ)を発現させ、二本刺し膜電位固定法により電気生理学的解析を行った。結果、Cav1.3(1a)および Cav1.3(1b)のどちらの場合でもすでに報告されているような Ca^{2+} 電流もしくは Ba^{2+} 電流が観察された。しかし、*Ist* の大きな特徴の一つである 0.1 mM Ca^{2+} (または Ba^{2+})下で観察される非選択的な 1 価陽イオン電流は観察することができなかった。また、*Ist* のもう一つの特徴である DHP 系カルシウムチャネルブロッカーの感受性を調べたところ、*Ist* は 1 μM のニカルジピンでほぼ完全に遮断されるのに対し、Cav1.3(1a)および Cav1.3(1b)のどちらも 10 μM のニカルジピンでも完全に阻害されることはなかった。

更に Cav1.3(1b)がある特定の補助サブユニットと会合したときに *Ist* として機能する可能性も踏まえ、洞房結節での発現の確認ができた補助サブユニットとして β サブユニットでは $\beta 2b$, $\beta 2d$, $\beta 2e$, $\beta 4$ を、 $\alpha 2\delta$ サブユニットでは $\alpha 2\delta 1$, $\alpha 2\delta 2$

を様々な組み合わせで共発現させて同様の実験を行ったが、現時点でポジティブな結果が得られる組み合わせの発見には至らなかった。

今後は洞房結節特異的な Cav1.3 が更なる新奇な補助サブユニットと共に Ist を形成する可能性、まだ着手していない洞房結節に高発現のイオンチャネルが Ist を形成する可能性の両者を踏まえ Ist の分子基盤の解明につなげたい。

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 1 件)

Takano, M., Kinoshita, H., Shioya, T., Itoh, M., Nakao, K., and Kuwahara, K. Pathophysiological remodeling of mouse cardiac myocytes expressing dominant negative mutant of neuron restrictive silencing factor. *Circ. J.* **74**, 2712-2719 (2010), 査読有

[学会発表] (計 1 件)

伊藤 政之, 鷹野 誠
パルミチン酸化による HCN チャネルの機能制御
第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 29 日,
長野県松本文化会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 政之 (ITOH MASAYUKI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号 : 20442535

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :