

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790092

 研究課題名（和文） 血管平滑筋のカルシウムマイクロドメインを安定化させる  
新規足場構造の同定

 研究課題名（英文） Scaffolding structure in functional calcium microdomain  
in vascular smooth muscles

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・准教授

研究者番号：80398362

研究成果の概要（和文）：本研究では、全反射蛍光顕微鏡を用いて、カルシウムマイクロドメインに集積する分子群を可視化解析し、このような複合体を安定化させる足場構造の同定を目指した。その結果、大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネルの分子動態は、細胞骨格やラフト構造によって抑制的に制御されていることが示された。本研究成果は、血管平滑筋の興奮性を規定するカルシウムマイクロドメインの生理的意義の解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）： To clarify the molecular dynamics of large conductance calcium-activated potassium channels in the functional calcium microdomain, we examined the single-molecule imaging using total internal reflection fluorescence microscopy. These results indicate that the molecular dynamics are strongly restricted by cytoskeleton and direct interaction with caveolin in vascular smooth muscle cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

 キーワード：カルシウム動態、マイクロドメイン、血管、全反射蛍光顕微鏡、  
カリウムチャネル、カベオラ、アクチン、平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内  $Ca^{2+}$  動態は、時間的・空間的に多様な挙動を示し、発生機序や生理機能から  $Ca^{2+}$  スパーク、 $Ca^{2+}$  ホットスポット、 $Ca^{2+}$  ウェーブなどと呼ばれている（今泉ら，2008；Cheng & Lederer，2008）。心筋で最初に発見された  $Ca^{2+}$  スパーク（半値幅 50 ms で最大径 1  $\mu m$  程度の一過性の局所  $Ca^{2+}$  濃度上昇）は、心筋興奮収縮連関時の  $Ca^{2+}$  誘発性  $Ca^{2+}$  遊離（CICR）を反映している（Cheng et al，1993；Lederer et al，2004）。一方、平滑筋でも細胞膜直下に位置する特定の筋小胞体（SR）上のリアノジン受容体（RyR）を介して周期的に生じる  $Ca^{2+}$  スパークが観察された（Nelson et al，1995；Ohi et al，2001）が、心筋とは異なり、 $Ca^{2+}$  スパークが近傍細胞膜上の大コンダ

クタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル（BK）チャネルを活性化することにより、自発一過性外向き電流（STOCs）を発生させて、静止膜電位を保持することに寄与している（Imaizumi et al，1999；Jaggar et al，2000；Imaizumi et al，2003）。多くの血管平滑筋は、生理的条件下で自発性緊張を有し、それは静止膜電位に強く依存することが知られている。BK チャネル遺伝子欠損マウスでは、高血圧や膀胱過緊張の様な平滑筋収縮異常が生じること（Brenner et al，2000；Meredith et al，2004）から、 $Ca^{2+}$  スパークと BK チャネル活性の機能協関は、静止膜電位を維持する重要な因子として考えられている。これまでの平滑筋  $Ca^{2+}$  スパークの研究結果（Ohi et al，2001）から、非常に興味深いことに、 $Ca^{2+}$  スパーク

発生領域は、組織によって若干の差異があるものの、細胞内の特定の数ヶ所から数十ヶ所程度であることが分かっている。それは細胞膜とSRが近接した特定の微細構造に由来すると推測されているが、生細胞でそのようなCa<sup>2+</sup>マイクロドメインを構成する機能タンパクを単一分子レベルで可視化した例は無い。

本研究では、局所Ca<sup>2+</sup>シグナルやチャンネル活性と同時に機能分子を全反射蛍光(TIRF)顕微鏡下で1分子可視化することで、それらの生理的意義を直接的に証明できると考えた。さらに、これらの分子がCa<sup>2+</sup>マイクロドメイン内で機能的に共役するためには、構造的な分子基盤(足場構造)が存在している可能性が高い。そこで、TIRF画像解析技術を応用して、足場構造を構成する新規分子の同定および機能解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、血管平滑筋細胞において、Ca<sup>2+</sup>スパーク発生の際であるCa<sup>2+</sup>マイクロドメインに集積するタンパクの1分子可視化とそこで機能協関する分子群の安定化に必要であると推測される足場構造の解析をTIRF顕微鏡下で行った。蛍光標識した化合物(標的分子に特異的に結合するAlexa蛍光複合体)やチャンネルタンパク(標的分子のCFP/YFP/RFP蛍光融合体)を作製して、Ca<sup>2+</sup>シグナル解析によって同定されたCa<sup>2+</sup>マイクロドメイン部位と蛍光標識分子との構造的・空間的配置や機能連関を単一分子レベルで機能解析した。次に、細胞膜ラフト構造(カベオラ構造やカベオリン分子)や細胞骨格(アクチン)なども可視化して、細胞構造上の観点から、Ca<sup>2+</sup>マイクロドメインの支持基盤(足場構造)を新たに同定した。

以上により、血管平滑筋Ca<sup>2+</sup>マイクロドメインを構造的・機能的に規定する分子群を可視化解析して、血管平滑筋の静止膜電位調節と血管緊張制御のより具体的かつ詳細な機構解明を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 標的分子の蛍光標識

血管平滑筋型BKチャンネルの $\alpha$ サブユニット(KCNMA1A)のNおよびC末端に蛍光タンパク(CFP/YFP/RFP)を融合させたcDNAは既に作製したものを使用した。本研究では、新たにCa<sup>2+</sup>マイクロドメインを構造的に支持すると推測されている細胞膜ラフト構造の一種であるカベオラを構成するカベオリン(カベオリン1)やアクチンなどの細胞骨格をAlexaもしくはCFP/YFP/RFPで順次蛍光標識した。

### (2) Ca<sup>2+</sup>マイクロドメインとカベオラ構造

ラット胸部大動脈から酵素処理により単離した平滑筋細胞に蛍光標識した分子を遺伝子導入(リポフェクション法)して2日間培養する。その後、TIRF顕微鏡(図1)を用いて、再構築した機能分子や足場構成分子の1分子レベルでの細胞膜表面または細胞膜直下における局在をリアルタイムで可視化解析した。同時にパッチクランプ法も適用して、BKチャンネル活性も測定した。

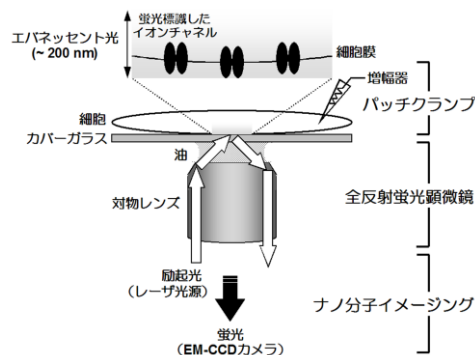


図1 TIRF顕微鏡による一分子可視化法の原理

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)におけるイオンチャンネルなどの膜タンパク1分子レベルでの分布や挙動をナノスケールの分解能で検出することが出来る。

### (3) Ca<sup>2+</sup>マイクロドメイン形成に必須である新たな足場構成分子の同定

平滑筋Ca<sup>2+</sup>動態を制御すると推測されている細胞膜Ca<sup>2+</sup>マイクロドメイン構成分子群から、その足場構成に関与すると考えられる分子に着目して、その構造的分子基盤となり得るかを検討した。まず、蛍光標識したアクチン(細胞骨格)を用いて、細胞構造上の観点から、この分子がCa<sup>2+</sup>マイクロドメインの支持基盤であるかを機能解析した。

## 4. 研究成果

### (1) BKチャンネルの分子動態

TIRFイメージングによって、非常に興味深いことにBK $\alpha$ 分子がダイナミックに細胞膜上を移動する様子を可視化できた(図2)。ヒト胎児由来腎臓293(HEK)細胞に発現させたBK $\alpha$ -YFPの拡散係数は $6.7 \times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$ だった。HEK細胞にBK $\alpha$ -YFPとBK $\beta$ 1-CFPを共発現させた時、BK $\alpha$ の分子動態はBK $\beta$ 1との複合体形成で顕著に減少することから、 $\beta$ サブユニットは機能的修飾だけでなく分子動態も制御することが分かった。一方で、大動脈平滑筋細胞のBK $\alpha$ -YFPの拡散係数は $0.29 \times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$ であり、HEK細胞に共発現させたBK $\alpha$ /BK $\beta$ 1の分子動態よりもかなり制限されていた。

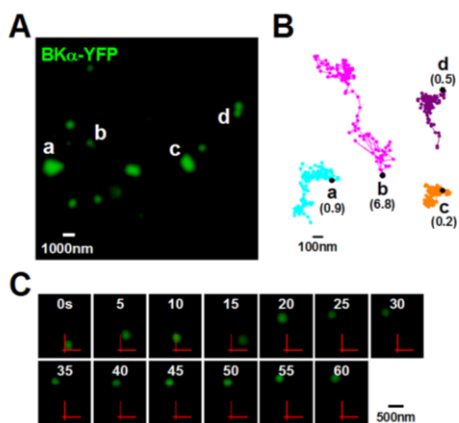


図2 BKチャンネルの一分子動態

HEK細胞に発現させたBK $\alpha$ サブユニットの細胞膜上での分布と分子動態をTIRF顕微鏡を用いて画像解析した。(A)細胞膜上にBK $\alpha$ -YFPの単一チャンネル分子もしくはその集合体(クラスター)が観察できた。(B)細胞膜上に点在する4個の単一BK $\alpha$ -YFP分子(画像Aの粒子a~d)の60秒間の軌跡を示した。括弧内には、拡散係数( $D_{10s}$ )の値を記した( $\times 10^3 \text{ nm}^2/\text{s}$ )。(C)BK $\alpha$ -YFP分子(画像A, Bの粒子b)の5秒毎の画像を示した。

#### (2)BKチャンネルの分子動態と細胞骨格

細胞骨格の一種であるアクチンの重合阻害薬であるサイトカラシンDを平滑筋細胞に前処置すると、BK $\alpha$ の拡散係数が増加した。一方、アクチンの重合促進薬であるジャスプラキノリドを処理した後、サイトカラシンDを添加しても、BK $\alpha$ の挙動は影響を受けなかった。

#### (3)BKチャンネルの分子動態とラフト構造

様々なイオン輸送体やシグナル分子が、脂質ラフト構造の一種で細胞膜表面に $\Omega$ 状の窪み構造(直径50~100nm)として存在す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、細胞膜ラフト構造の一種であるカベオラとその構成成分であるカベオリン(Cav1)分子に注目した。BK $\alpha$ -YFPとCav1-CFPを共発現させたHEK細胞において、その両者の共存率は20%程度だったのに対し、平滑筋細胞では約70%だった。カベオラ構造を破壊するメチル- $\beta$ -シクロデキストリンを平滑筋細胞に前処置すると、BK $\alpha$ の拡散係数が増加した。TIRF観察下でのFRET法により、BK $\alpha$ とCav1が相互作用していることが分かった。さらに、そのFRET効率は、HEK細胞よりも平滑筋細胞で有意に大きかった。

#### (4)まとめ

本研究成果により、大動脈平滑筋の細胞膜

上におけるBK $\alpha$ サブユニットの分子動態は、①修飾タンパクである $\beta$ サブユニットとの複合体形成、②細胞骨格を構成するアクチンとの分子間相互作用、③細胞膜表面のラフト(カベオラ)構造に集積するカベオリン分子、によって強く制限あるいは制御されることを見出した。TIRFイメージングやFRET解析によるBK $\alpha$ チャンネルの一分子レベル(ナノスケールの分解能)での可視化解析は、細胞膜やその直下に位置し、機能的に関連した分子複合体を形成する局所的なマイクロドメインに関する有益な生理的情報を提供すると考えられる。

#### (5)おわりに

細胞の生理応答には、細胞内Ca $^{2+}$ シグナルが必須であることが多い。現在、Ca $^{2+}$ シグナルやイオンチャンネル分子の時間的・空間的多様性を生み出す構造基盤として、Ca $^{2+}$ マイクロドメインが想定されている(図3;今泉ら, 2008)。このような部位では、特に膜電位や局所Ca $^{2+}$ 濃度の変化が他のシグナルへ効率的に変換されることが想定されている。TIRF顕微鏡によるイメージング技術は、Ca $^{2+}$ マイクロドメインの分子・構造基盤の同定と生理的意義の解明に強力な手法になると考えられる。また、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。

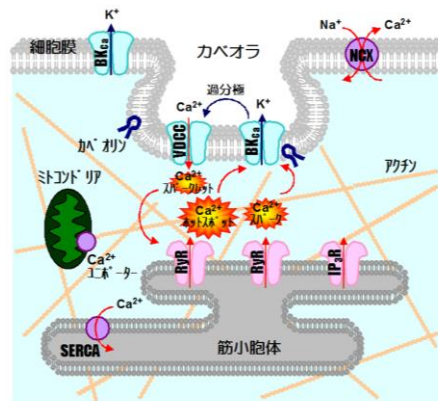


図3 細胞膜マイクロドメインにおけるCa $^{2+}$ 動態とイオンチャンネルの機能的連関

細胞膜ラフト構造であるカベオラにイオンチャンネルなどの機能性タンパクが集積し、近接する筋小胞体との間で局所Ca $^{2+}$ 動態を形成することが示唆されている。BK $\alpha$ 、大コンダクタンスCa $^{2+}$ 活性化K $^{+}$ チャンネル;VDCC、電位依存性Ca $^{2+}$ チャンネル;RyR、リアノジン受容体;IP $_3$ R、IP $_3$ 受容体;SERCA、筋小胞体Ca $^{2+}$ ポンプ;NCX、Na $^{+}$ /Ca $^{2+}$ 交換体。

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15件)

- (1) Ohya S, Nakamura E, Horiba S, Kito H, Matsui M, Yamamura H, Imaizumi Y. Role of the  $K_{Ca}$  3.1  $K^+$  channel in auricular lymph node  $CD4^+$  T-lymphocyte function of the delayed-type hypersensitivity model. **Br J Pharmacol**, in press (doi: 10.1111/bph.12215). 【査読有】
- (2) Ko EA, Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Yamamura H, Yoo HY, Tang H, Smith KA, Sundivakkam PC, Zeifman A, Ayon RJ, Makino A, Yuan JX. Functional characterization of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells: divergent effect of ROS. **Am J Physiol Cell Physiol**, in press (doi: 10.1152/ajpcell.00304.2012). 【査読有】
- (3) Yamamura A, Yamamura H, Guo Q, Zimnicka AM, Wan J, Ko EA, Smith KA, Pohl NM, Song S, Zeifman A, Makino A, Yuan JX. Dihydropyridine  $Ca^{2+}$  channel blockers increase cytosolic  $[Ca^{2+}]$  by activating  $Ca^{2+}$ -sensing receptors in pulmonary arterial smooth muscle cells. **Circ Res**, 112:640-50 (2013). 【査読有】
- (4) Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Direct molecular interaction of caveolin-3 with  $KCa1.1$  channel in living HEK293 cell expression system. **Biochem Biophys Res Commun**, 430:1169-74 (2013). 【査読有】
- (5) Yamamura H, Imaizumi Y. Total internal reflection fluorescence imaging of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in mouse urinary bladder smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 427:54-9 (2012). 【査読有】
- (6) Yamamura A, Guo Q, Yamamura H, Zimnicka AM, Pohl NM, Smith KA, Fernandez RA, Zeifman A, Makino A, Dong H, Yuan JX. Enhanced  $Ca^{2+}$ -sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Circ Res**, 111:469-81 (2012). 【査読有】
- (7) Niwa S, Ohya S, Kojima Y, Sasaki S, Yamamura H, Sakuragi M, Kohri K, Imaizumi Y. Down-regulation of the large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel,  $KCa1.1$  in the prostatic stromal cells of benign prostate hyperplasia. **Biol Pharm Bull**, 35:734-44 (2012). 【査読有】
- (8) Yamamura H, Ohya S, Muraki K, Imaizumi Y. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in the voltage-dependent regulation of the  $Ca^{2+}$  concentration in porcine coronary arterial smooth muscle cells. **J Pharmacol Exp Ther**, 342:486-96 (2012). 【査読有】
- (9) Fujii M, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Development of recombinant cell line co-expressing mutated Nav1.5, Kir2.1, and hERG for the safety assay of drug candidates. **J Biomol Screen**, 17:773-83 (2012). 【査読有】
- (10) Yamamura H, Ikeda C, Suzuki Y, Ohya S, Imaizumi Y. Molecular assembly and dynamics of fluorescent protein-tagged single  $KCa1.1$  channel in expression system and vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, 302:C1257-68 (2012). 【査読有】
- (11) Yamamura A, Yamamura H, Zeifman A, Yuan JX. Activity of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  channels contributes to regulating receptor- and store-operated  $Ca^{2+}$  entry in human pulmonary artery smooth muscle cells. **Pulm Circ**, 1:269-79 (2011). 【査読有】
- (12) Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogihara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, Takeshima H. TRIC-A channels in vascular smooth muscle contribute to blood pressure maintenance. **Cell Metab**, 14:231-41 (2011). 【査読有】
- (13) Kito H, Yamazaki D, Ohya S, Yamamura H, Asai K, Imaizumi Y. Up-regulation of  $K_{ir}2.1$  by ER stress facilitates cell death of brain capillary endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 411:293-8 (2011). 【査読有】
- (14) Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Involvement of dominant-negative spliced variants of the intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel,  $KCa3.1$ , in immune function of lymphoid cells. **J Biol Chem**, 286:16940-52 (2011). 【査読有】
- (15) 藤井将人, 大矢進, 山村寿男, 今泉祐治. イオンチャンネル標的創薬における

HTS の現状と展望. **日薬理誌**, 138:229-33 (2011). 【総説】【査読無】

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 山村寿男. 肺高血圧症におけるカルシウム感受性受容体の機能亢進. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜. 【シンポジウム講演】
- (2) 山村寿男. 膀胱平滑筋細胞における活動電位発生時のミトコンドリア  $Ca^{2+}$  取り込み機構. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜.
- (3) 山村寿男. イメージングによるイオンチャネル分子機能解析, 第 86 回日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 22 日, 福岡. 【シンポジウム講演】
- (4) 山村寿男. ブタ冠動脈平滑筋細胞における  $IP_3$  シグナルの電位依存性と  $Ca^{2+}$  依存性. 第 54 回日本平滑筋学会総会, 2012 年 8 月 3 日, 東京.
- (5) 山村寿男. 血管平滑筋細胞における電位依存のおよび  $Ca^{2+}$  依存性  $IP_3$  産生機構. 第 121 回日本薬理学会近畿部会, 2012 年 6 月 29 日, 徳島.
- (6) 山村寿男. 肺高血圧症における  $Ca^{2+}$  感受性受容体の発現増加と TRPC6 チャネルとの機能的連関. 第 8 回 TRP チャネル研究会, 2012 年 6 月 15 日, 岡崎.
- (7) 山村寿男. ヒト肺動脈平滑筋細胞において Jagged-1 はストア作動性  $Ca^{2+}$  流入を活性化させる. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌.
- (8) 山村寿男. ヒト肺動脈平滑筋細胞における Jagged-1 によるストア作動性  $Ca^{2+}$  流入の活性化. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 15 日, 京都.
- (9) 山村寿男. Jagged-1 enhances store-operated  $Ca^{2+}$  entry via two different mechanisms in human pulmonary arterial smooth muscle cells. 第 21 回日本循環薬理学会, 2011 年 12 月 2 日, 岡山.
- (10) Yamamura H. Functional coupling between notch signaling and store-operated  $Ca^{2+}$  entry in human pulmonary arterial smooth muscle cells. CCVR Research Day 2011, 12-Aug-11, Chicago, USA.
- (11) Yamamura H. Jagged-1 enhances store-operated  $Ca^{2+}$  entry in human pulmonary arterial smooth muscle cells. American Thoracic Society 2011, 16-May-11, Denver, USA.
- (12) Yamamura H. Characterization of  $Ca^{2+}$  oscillations in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial

hypertension. *Experimental Biology* 2011, 13-Apr-11, Washington DC, USA.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用

発明者: 今泉祐治、藤井将人、大矢進、山村寿男

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学、チャネロサーチテクノロジー

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2011/064967

出願年月日: 平成 23 年 6 月 29 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<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・准教授

研究者番号: 80398362

### (2) 研究協力者

今泉 祐治 (IMAIZUMI YUJI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 60117794