様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号： １１１０１
研究種目： 基盤研究(C)（一般）
研究期間： 2013～2015
課題番号： ２５４６０２９３

研究課題名（和文） 交感神経制御におけるＣａチャネルβサブユニットの重要性

研究課題名（英文） Sympathetic nerve control with the voltage-dependent calcium channel beta subunits.

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：電位依存性カルシウム(Ｃａ)チャネルの遺伝子改変動物（β３欠損マウス、β２欠損マウスマウス）、あるいは遺伝子変異動物（電位依存性カルシウムチャネルβ４欠損マウス、電位依存性カルシウムチャネルCaV2.1変異マウスなど）を用いて、心臓の調律に関する研究を展開した。研究の過程で心臓の調律に関与する遺伝子や、薬物などの影響を解析し、相当数の研究を報告した。他にカルシウムチャネルを修飾する因子であるヒスタミン受容体やオレキシンに関する報告も行った。

研究成果の概要（英文）：The P/Q-type channels are composed principally of heterologous multimeric subunits including CaV2.1 and CaVβ4. ECG analysis showed that the T wave was high in 8-week-old lh mutants (CaVβ4-null mice). Upon pharmacological ECG analysis, lh mutants exhibited reduced responses to a β-blocker and a muscarinic receptor antagonist. Analysis of heart rate variability revealed that the R-R interval was unstable in lh mutants and that both the low- and high-frequency components had increased in extent, indicating that the tonus of both the sympathetic and parasympathetic nervous systems was modified.
We also analyzed calcium channel modifying factors, such as histamine receptor and Orexin, which is neural peptide. With Histamine receptor type 1-null mice, we found signify involvement of H1 receptor in the sympathetic nerve regulation. We also found involvement of Orexin system in the sympathetic nerve control.

研究分野： calcium channel

キーワード： calcium　channel　mouse　sympathetic nerve

１．研究開始当初の背景

交感神経亢進時，心筋の電位依存性カルシウム(Ｃａ)チャネルがリン酸化され，Ｃａ電流が増加することが，心収縮力増強の一因である．Ｃａチャネルは５つのサブユニットで構成される複合体であるが，交感神経亢進時の生理的リン酸化標的分子は特定されていない．申請者はこの標的分子がβ2 である可能性が高いことをβ2 遺伝子欠損マウスで見い出した．

２．研究の目的

Protein Kinase A(PKA)によるリン酸化を妨げる遺伝子変異を電位依存性カルシウムβ2 に導入し，変異β2 遺伝子の過剰発現マウスモデルを作製・解析し，交感神経トーヌス亢進時のβ2 リン酸化の生理学的重要性を明らかにすることが目的である．

３．研究の方法

電位依存性カルシウムβ2 遺伝子のリン酸化部位（Ser459Ala，およびSer478Ala/Ser479Ala）に変異を導入する．マウス受精卵にこれらβ2 遺伝子を注入し，それぞれの変異β2 遺伝子を過剰に発現するマウスを作製し、カルシウムチャネルの生理学的検討を行う．

４．研究成果

遺伝子変異マウスを作製した。

現在、論文投稿中である。

マウスの生理学的研究をするため、心電図を指標にして、麻酔薬の検討を行った。マウス心電図の解析のため、多数のマウスを用いて基礎データを作成した。イソフルレンによる吸入麻酔が研究を遂行する上で、有効かつ、簡便であり、事故の頻度も低いことを報告した。麻酔薬による不整脈の発生なども検討した。麻酔薬については、その後もハローセン、セボフルラン、エトレンなどについても順次解析を続けており、現在、論文投稿中である。その他、カルシウムチャネル遺伝子変異マウス等を用い、様々な研究成果を報告した。

電位依存性カルシウムチャネルβ４遺伝子欠損マウスにおける心調律以上を報告した。β４サブユニットが心臓の洞胞結節で発現していること、電位依存性カルシウムチャネルαサブユニットとカルシウムチャネルを構成する可能性を示した。さらに、上頸神経節におけるβ４サブユニットの発現を確認し、交感神経制御における同サブユニットの重要性を示した。

カルシウムチャネルを制御する因子として、ヒスタミン受容体に着目し、ヒスタミン受容体（H1，H2，H3）欠損マウスを用いて、ヒスタミンが自律神経制御機構に関与すること、さらにH1受容体の重要性を示した。H2受容体の関与をも確認した。

電位依存性カルシウムチャネルαサブユニットのリン酸化を修飾する因子としてAKAPに着目した。AKAPはプロテインキナーゼのリン酸化における足場タンパクとして最も重要と考えられている。AKAP欠損マウスにおいて、交感神経刺激に対する反応性が、心拍、心拍の揺らぎから計測する自律神経において、低下していることを明らかにし、論文報告した。イソプロテレノールによる交感神経β受容体への刺激に対しては、反応性の低下が認められたが、β受容体遮断薬に対する反応に異常は認められなかった。同欠損マウスにおいては心臓における交感神経系のβ受容体遺伝子の発現に異常を認めず、副交感神経の受容体であるM２受容体の発現にも異常は認められなかった。PKAによる反応系は最終的にはCREBの反応に集約されるわけであるが、CREBの遺伝子発現も保たれていた。電位依存性カルシウムチャネルαサブユニットのリン酸化を修飾する因子としてカルモジュリンキナーゼにも着目した。カルモジュリンキナーゼ欠損マウスにおいては交感神経刺激に

対する反応性が心拍数や収縮力について低下しており、カルモジュリンキナーゼが交感神経刺激によるリン酸化反応に関与することが明らかとなった。詳しいメカニズムを調べるために、現在も研究を継続中である。

さらに糖尿病ラットにおける自律神経系の精査を行い、２型糖尿病モデルである GK ラットにおいて、神経症発症以前から、自律神経系、特に副交感神経に異常が認められることを明らかにし、現在論文投稿中である。

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 19 件）

1. Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S, Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 458, 584-589, (2015).（査読あり）
2. Shintaku T, Ohba T, Niwa H, Kushikata T, Hirota K, Ono K, Matsuzaki Y, Imaizumi T, Sawamura D, Murakami M. Effects of isoflurane inhalation anesthesia on mouse ECG. ***Hirosaki Medical Journal*** 66, 1-7, (2015).（査読あり）
3. Murakami M, Niwa H, Kushikata T, Watanabe H, Hirota K, Ono K, Ohba T. Inhalation anesthesia is preferable for recording rat cardiac function using an electrocardiogram. ***Biol Pharm Bull.*** 37, 834-839 (2014).（査読あり）
4. Tamura R, Nemoto T, Maruta T, Onizuka S, Yanagita T, Wada A, Murakami M, Tsuneyoshi I. Up-regulation of NaV1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor-α in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons. ***Anesth Analg.*** 118, 318-324 (2014).（査読あり）
5. Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Yanagita T, Maruta T, Fujita H, Koshida T, Yonaha T, Wada A, Sawaguchi A, Murakami M. New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: amyloid-β1-42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3β. ***Cell Signal.*** 26, 253-259 (2014).（査読あり）
6. Imaizumi T, Numata A, Yano C, Yoshida H, Meng P, Hayakari R, Xing F, Wang L, Matsumiya T, Tanji K, Tatsuta T, Murakami M, Tanaka H ISG54 and ISG56 are induced by TLR3 signaling in U373MG human astrocytoma cells: possible involvement in CXCL10 expression. ***Neurosci Res.*** 84, 34-42 (2014).（査読あり）
7. Okamoto Y, Kawamura K, Nakamura Y, Ono K. Pathological impact of hyperpolarization-activated chloride current peculiar to rat pulmonary vein cardiomyocytes. ***J Mol Cell Cardiol.*** 66, 53-62 (2014).（査読あり）
8. Seya K, Murakami M, et al., (8th/10) 8-Methyltryptanthrin-induced differentiation of P19CL6 embryonal carcinoma cells into spontaneously beating cardiomyocyte-like cells. ***J Nat Prod.*** 77, 1413-1419 (2014).（査読あり）
9. 尾野恭一 心臓の生理的自動能と異常自動能：イオンチャネルクロックとカルシウムクロック. 臨牀と研究 91, 851-854 (2014).（査読あり）
10. Harada Y, Murakami M, et al., (8th/11) Osteogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 443, 1014-1020 (2914).（査読あり）
11. Murakami M, Nemoto T, Ohba T, Niwa H, Kushikata T, Ono K, Watanabe H, and Hirota K. Involvement of endothelin-1 in adrenal catecholamine regulation. ***Hirosaki Medical Journal*** 65, 218-226 (2014).（**第 99 回弘前医学会優秀論文賞受賞**）（査読あり）
12. Kiso H, Ohba T, Iino K, Sato K, Terata Y, Murakami M, Ono K, Watanabe H, Ito H. Sildenafil prevents the up-regulation of transient receptor potential canonical channels in the development of cardiomyocyte hypertrophy. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 436, 514-518 (2013).（査読あり）
13. 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*** 91, 250-258 (2013).（査読あり）
14. Nemoto T, Yanagita T, Maruta T, Sugita C, Satoh S, Kanai T, Wada A, Murakami M. Endothelin-1-induced down-regulation of NaV1.7 expression in adrenal chromaffin cells: attenuation of catecholamine secretion and tau dephosphorylation. ***FEBS Lett.*** 587, 898-905 (2013).（査読あり）
15. Nomura A, Seya K, Yu Z, Daitoku K, Motomura S, Murakami M, Fukuda I, Furukawa K. The role of CD34-negative mesenchymal stem-like cells as cellular origin on human.aortic valve calcification. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 440, 780-785 (2013).（査読あり）
16. Murakami M. Evaluation of DNA Plasmid Storage Conditions ***The Open Biotechnology Journal*** 7,10-14, (2013).（査読あり）
17. Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Murakami M, Kitamura K, Kato J. Functions of third extracellular loop and helix 8 of Family B GPCRs complexed with RAMPs and characteristics of their receptor trafficking. ***Curr Protein Pept Sci.*** 14, 416-428 (2013).（査読あり）
18. Adachi T, Shibata S, Okamoto Y, Sato S, Fujisawa S, Ohba T, Ono K. The mechanism of increased postnatal heart rate and sinoatrial node pacemaker activity in mice. ***J. Physiol. Sci.*** 63: 133-146 (2013).（査読あり）
19. Watanabe H, Iino K, Ohba T, Ito H. Possible involvement of TRP channels in cardiac hypertrophy and arrhythmia. ***Curr. Top Med. Chem.*** 13(3): 283-294 (2013).（査読あり）

〔学会発表〕（計　3件）

1. 村上　学　電位依存性カルシウムチャネルβ４サブユニットと自律神経　日本薬理学会北部会　9月18日　富山国際会議場（富山県　富山市）
2. 村上　学　電位依存性カルシウムチャネルβ４サブユニットと自律神経　日本生理学会東北談話会　10月30日　弘前大学医学部コミュニケーションセンター（青森県　弘前市）
3. 村上　学　電位依存性カルシウムチャネルβ４サブユニットと自律神経　日本薬理学会年会 3月10日　パシフィコ横浜（神奈川県　横浜市）

〔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　　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

６．研究組織
(1)研究代表者
村上　学　　(MURAKAMI, Manabu)
弘前大学　大学院医学研究科　教授
研究者番号：80302090

(2)研究分担者
尾野　恭一　(ONO, Kyoichi)
秋田大学　大学院医学研究科　教授
研究者番号： 70185635

大場貴喜　(OHBA, Takayoshi)
秋田大学　大学院医学研究科　助教
研究者番号：80431625

杉田千春　(SUGITA, Chiharu)
九州保健福祉大学　薬学部　助教
研究者番号：70632694

古川賢一　(FURUKAWA, Kennnichi)
弘前大学　大学院医学研究科　准教授
研究者番号：20165468

瀬谷和彦　(SEYA, Kazuhiko)
弘前大学　大学院医学研究科　助教
研究者番号：40281919

(3)連携研究者
(　　)

研究者番号：