

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870891

研究課題名(和文) ムスカリン受容体の腸管運動制御におけるATP感受性Kチャンネルの役割とその分子実態

研究課題名(英文) Role of ATP sensitive K<sup>+</sup> channels in muscarinic regulation of intestinal contractility and its molecular identity

研究代表者

棚橋 靖行 (TANAHASHI, Yasuyuki)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：60582418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管に発現することが知られているATP感受性K<sup>+</sup>チャンネル(KATPチャンネル)の特徴および平滑筋収縮制御における役割とそのメカニズムについて検討した。その結果、腸管に発現するKATPチャンネルは血管平滑筋に発現するKir6.1/SUR2BタイプのKATPチャンネルと特徴が似ており、その活性はM3ムスカリン受容体サブタイプにより抑制的に制御されていることが明らかとなった。同抑制機構は、平滑筋の脱分極に寄与し、筋の収縮制御に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (KATP channels) in muscarinic regulation of intestinal contractility and its mechanism. In addition, the properties of this channel were characterised. The results suggested that (1) the properties of the KATP channel, expressed in the intestinal smooth muscles, are similar to those of the Kir6.1/SUR2B KATP channel in the vascular smooth muscles, and (2) M3 muscarinic subtype can inhibit the activities of the KATP channel, thereby contributing to the membrane depolarisation in smooth muscles, leading to their contraction.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：ATP感受性K<sup>+</sup>チャンネル ムスカリン受容体 コリン作動性神経 腸管運動 平滑筋細胞

1. 研究開始当初の背景

腸管平滑筋の収縮制御には内在性神経から放出されるアセチルコリンとその受容体であるムスカリン受容体が主要な役割を果たしている。同受容体が刺激を受けると、筋は興奮、収縮する。この現象は平滑筋細胞やカハール細胞に発現する各種イオンチャネルの活性が変化することにより起こる。これまでに、腸管平滑筋やカハール細胞において、ATP感受性K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>ATP</sub>チャネル)の発現が示唆されている。このことから、ムスカリン受容体と同チャネルの開閉活性を調節することにより、平滑筋の収縮を調節していることが予想される。しかし、これらの点については、これまで十分に検討されてきておらず、発現するチャネルの分子実態や薬理学的性質といった基本的な情報についても明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は腸管に発現するK<sub>ATP</sub>チャネルに着目し、その分子実態、薬理学的性質、生理学的役割を明らかにするものである。本研究により得られる情報は、未だに全容が解明されていない消化管運動調節メカニズムの解明に向けて、多くの基礎情報を提供しようと考えられる。

3. 研究の方法

M<sub>2</sub>またはM<sub>3</sub>ムスカリン受容体サブタイプ欠損型マウス、および、それぞれの野生型マウスを実験に供した。

(1) 小腸内容輸送速度の測定

炭末液をマウスに経口投与してから一定時間後に腸管を摘出した。摘出した腸管標本において輸送された炭末の先端までの長さを測定した。

(2) 張力測定

マウスから作製した小腸片標本において、発生する張力変化をマグヌス法により等尺性に記録した。

(3) 電気生理学的実験

マウスから単離した単一小腸平滑筋細胞標本において、膜電流反応、膜電位反応をホールセルパッチクランプ法およびナスタチンパッチクランプ法によりそれぞれ記録した。

(4) チャネルサブユニットの発現解析

マウスから単一小腸平滑筋細胞標本を作製し、K<sub>ATP</sub>チャネルを構成するサブユニットに対するプライマーや抗体を用いてRT-PCRおよび蛍光免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) チャネルの薬理学的性質

小腸平滑筋に発現するK<sub>ATP</sub>チャネルの薬理学的性質について検討するために、野生型マウスから単離した小腸平滑筋細胞標本において、同チャネルの選択的開口薬であるクロマカリム、ピナシジル、ジアゾキサイドを適用した時に発生する電流を、パッチクランプ法により記録した。また、発生した電流に対する同チャネル遮断薬であるグリベンクラミドの効果についても検討した。その結果、平滑筋細胞にはK<sub>ATP</sub>チャネルが機能的に発現しており、クロマカリム>ピナシジル>ジアゾキサイドの順に高い感受性を示すことが明らかになった。また、同チャネルの活性は比較的高濃度のグリベンクラミドにより抑制されることが明らかになった。これらの特徴は血管平滑筋細胞に発現するKir6.1/SUR2BタイプのK<sub>ATP</sub>チャネルの性質と類似している。さらに、同チャネルの活性はTRPCチャネルの遮断薬として知られるSKF96365 (SKF) によっても抑制されることが明らかになった(図1)。

ウスから単離した小腸平滑筋細胞標本において、同チャネルの選択的開口薬であるクロマカリム、ピナシジル、ジアゾキサイドを適用した時に発生する電流を、パッチクランプ法により記録した。また、発生した電流に対する同チャネル遮断薬であるグリベンクラミドの効果についても検討した。その結果、平滑筋細胞にはK<sub>ATP</sub>チャネルが機能的に発現しており、クロマカリム>ピナシジル>ジアゾキサイドの順に高い感受性を示すことが明らかになった。また、同チャネルの活性は比較的高濃度のグリベンクラミドにより抑制されることが明らかになった。これらの特徴は血管平滑筋細胞に発現するKir6.1/SUR2BタイプのK<sub>ATP</sub>チャネルの性質と類似している。さらに、同チャネルの活性はTRPCチャネルの遮断薬として知られるSKF96365 (SKF) によっても抑制されることが明らかになった(図1)。

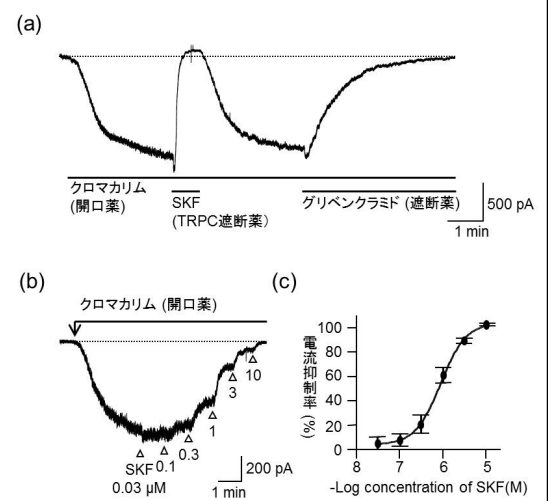


図1: K<sub>ATP</sub>電流に対するSKFの効果

(a) K<sub>ATP</sub>チャネルの選択的開口薬であるクロマカリムを適用すると、内向きの持続性K<sub>ATP</sub>電流が生じた。同電流は、TRPCチャネルの遮断薬であるSKFにより可逆的に抑制された。また、SKFを洗浄除去した後に回復した電流はK<sub>ATP</sub>チャネルの選択的遮断薬であるグリベンクラミドにより消失した。(b) SKFを累積適用するとK<sub>ATP</sub>電流は濃度依存的に抑制された。(c) SKFのK<sub>ATP</sub>電流に対する50%有効濃度はおよそ1 μMとTRPCチャネルに対するものにくらべ10倍程度、低濃度であった。

(2) チャネルの分子実態

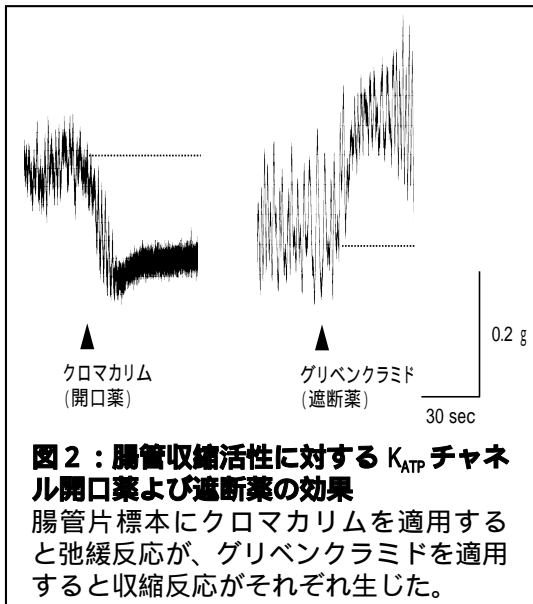
小腸平滑筋に発現するK<sub>ATP</sub>チャネルの分子実態を特定するために、野生型マウスから単離した小腸平滑筋細胞標本においてK<sub>ATP</sub>チャネルを構成するKir6およびSURの各アイソフォームの発現についてRT-PCRおよび蛍光免疫染色法により検討した。その結果、Kir6.1、Kir6.2、SUR1、SUR2Bの発現が示唆

された。

(1)および(2)において得られた結果より、小腸平滑筋に発現し、その機能を主に担っている  $K_{ATP}$  チャンネルは血管平滑筋のものと同様、Kir6.1 と SUR2B で構成されていると考えられる。

### (3) 腸管平滑筋収縮制御におけるチャンネルの役割

腸管平滑筋収縮制御における  $K_{ATP}$  チャンネルの役割について検討するために、野生型マウスにおける小腸内容輸送速度、同マウスから作製した小腸片標本における収縮活性(図2)および小腸平滑筋細胞標本における膜電位に対する  $K_{ATP}$  チャンネル開口薬または遮断薬の効果それぞれ検討した。その結果、小腸平滑筋細胞において  $K_{ATP}$  チャンネルは静止膜電位の形成に関与し、筋の興奮性を調節していることが明らかとなった。



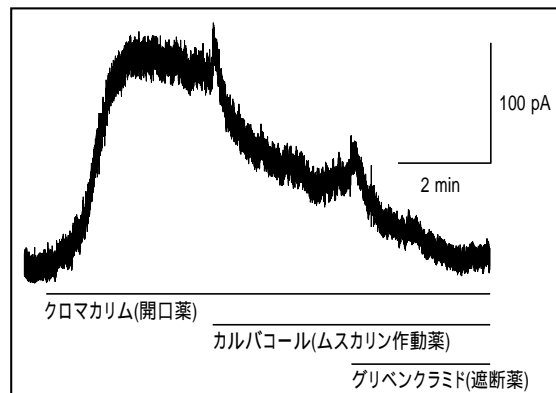
### (4) ムスカリン受容体によるチャンネル調節機構

#### ムスカリン作動性 $K_{ATP}$ チャンネル調節機構

腸管平滑筋において  $K_{ATP}$  チャンネルの活性がムスカリン受容体による制御を受けているか否かについて検討するために、野生型マウスから単離した小腸平滑筋細胞標本において、クロマカリムにより  $K_{ATP}$  電流を発生させながら、ムスカリン受容体作動薬であるカルバコールを適用した時の電流変化をホールセルパッチクランプ法により記録した。同細胞にカルバコールを適用すると、 $K_{ATP}$  電流のアンプリチュードが徐々に減少したことから、同チャンネルの活性はムスカリン受容体により抑制的に制御されていることが明らかとなった(図3)。

#### ムスカリン作動性 $K_{ATP}$ チャンネル抑制機構に関与する受容体サブタイプ

ムスカリン作動性  $K_{ATP}$  電流抑制反応に関与するムスカリン受容体サブタイプを特定す



### 図3：ムスカリン作動性 $K_{ATP}$ 電流抑制反応

小腸平滑筋細胞標本においてクロマカリムにより  $K_{ATP}$  電流を発生させながらムスカリン受容体作動薬であるカルバコールを適用すると同電流は持続的に抑制された。なお、この実験では、 $K_{ATP}$  電流が外向きに流れるような条件で行った。

るために、腸管平滑筋に発現することが知られている  $M_2$  および  $M_3$  サブタイプをそれぞれ欠損したマウスから単離した細胞において、カルバコール誘発性  $K_{ATP}$  電流抑制反応を記録した。その結果、同抑制反応には主に  $M_3$  サブタイプが関与していることが明らかになった。

#### $M_3$ 作動性 $K_{ATP}$ チャンネル抑制機構の細胞内情報伝達機構

同抑制機構における  $M_3$  サブタイプ以降の細胞内情報伝達機構について検討するために、 $Ca^{2+}$ 、G 蛋白質、PLC などの各種細胞内情報伝達分子に対する阻害薬をそれぞれ処置した細胞において、カルバコール誘発性  $K_{ATP}$  電流抑制反応を記録した。その結果、 $M_3$  作動性  $K_{ATP}$  チャンネル抑制機構には  $G_q$  蛋白質および PLC が関与しており、 $Ca^{2+}$  に対する依存性が低いことが示唆された。

(3)および(4)において得られた結果より、腸管平滑筋において、ムスカリン作動性  $K_{ATP}$  チャンネル抑制機構は陽イオンチャンネルの開口とともに膜の脱分極に寄与し、平滑筋の収縮制御に関与していると考えられる。

### 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4件)

Yasuyuki Tanahashi, Ban Wang, Yuri Murakami, Toshihiro Unno, Hayato Matsuyama, Hiroshi Nagano, Seiichi Komori. Inhibitory effects of SKF96365 on the activities of  $K^+$  channels in mouse small intestinal smooth muscle cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 査読有, 78(2), 2016, pp. 203-211, DOI: 10.1292/jvms.15-0346.

棚橋 靖行、海野 年弘、松山 勇人、

北澤 多喜雄、小森 成一、マウス小腸平滑筋のムスカリン作動性収縮調節機構におけるATP感受性K<sup>+</sup>チャンネルの役割とその情報伝達機構、日本病態生理学雑誌、査読無、22(3) 2013、pp. 36-38、DOI: 無

Yasuyuki Tanahashi, Yoshiro Ichimura, Kaori Kimura, Hayato Matsuyama, Satoshi Iino, Seiichi Komori, Toshihiro Unno. Cholinergic neuromuscular transmission mediated by interstitial cells of Cajal in the myenteric layer in mouse ileal longitudinal smooth muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 査読有, 387(4), 2013, pp. 377-388, DOI: 10.1007/s00210-013-0944-2.

Yasuyuki Tanahashi, Naoko. Waki, Toshihiro Unno, Hayato Matsuyama, Satoshi Iino, Takio Kitazawa, Masahisa Yamada, Seiichi Komori. Roles of M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.*, 査読有, 25, 2013, pp. e687-e697, DOI: 10.1111/nmo.12194.

〔学会発表〕(計5件)

Ban Wang, Yuri Murakami, Toshihiro Unno, Hayato Matsuyama, Seiichi Komori, Yasuyuki Tanahashi, The mechanism of M<sub>3</sub> muscarinic suppression of ATP sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channels in mouse ileal smooth muscle cells., 第88回日本薬理学会年会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015.3.18-20

棚橋 靖行, 王 班、村上 友梨、海野年弘、松山 勇人、小森 成一、マウス小腸平滑筋細胞に発現するK<sup>+</sup>チャンネルに対するSKF96365の抑制効果、第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道・札幌市) 2014.9.9-12

鈴木 香澄、松山 勇人、棚橋 靖行、北澤 多喜雄、山田 真久、Jurgen Wess、小森 成一、海野 年弘、マウス結腸輪走筋におけるコリン作動性神経 平滑筋間の情報伝達を仲介するムスカリン受容体サブタイプ、第157回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海道・札幌市) 2014.9.9-12

棚橋 靖行, 王 班、村上 友梨、海野年弘、松山 勇人、小森 成一、マウス小腸平滑筋細胞に発現する K<sup>+</sup>チャンネルに対するSKF96365の抑制効果、第56回日本平滑筋学会総会、新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市) 2014.8.6-8

棚橋 靖行、海野 年弘、松山 勇人、

北澤 多喜雄、小森 成一、マウス小腸平滑筋のムスカリン作動性収縮調節機構におけるATP感受性K<sup>+</sup>チャンネルの役割とその情報伝達機構、第23回日本病態生理学会サテライトセミナー&ディスカッション、東京慈恵医科大学(東京都・港区) 2013.8.2-4(招待講演)

〔その他〕

ホームページ等

京都産業大学専任教員紹介ページ  
<http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/nls/tanahashi-yasuyuki.html>

京都産業大学研究・技術シーズ集  
<http://www.kyoto-su.ac.jp/liaison/sankanaku/seeds/>

京都産業大学サイエンス&テクノロジー  
<http://www.kyoto-su.ac.jp/collaboration/s-t.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

棚橋 靖行 (TANAHASHI, Yasuyuki)  
京都産業大学・総合生命科学部・准教授  
研究者番号: 60582418

### (2) 研究協力者

Jurgen Wess (WESS, Jurgen)  
Laboratory of Bioorganic Chemistry,  
National Institute of Diabetes and  
Digestive and Kidney Diseases  
山田 真久 (YAMADA, Masahisa)  
沖縄科技研基盤整備機構・コモンリソース  
グループ

北澤 多喜男 (KITAZAWA, Takio)  
酪農学園大学・動物看護学ユニット・教授

海野 年弘 (UNNO, Toshihiro)  
岐阜大学・応用生物科学部・教授

小森 成一 (KOMORI, Seiichi)  
岐阜大学・応用生物科学部・名誉教授

松山 勇人 (MATSUYAMA, Hayato)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授

永野 宏 (NAGANO, Hiroshi)  
岐阜大学連合獣医学研究科・博士後期課程  
学生

竹内 実 (TAKEUCHI, Minoru)  
京都産業大学・総合生命科学部・教授

村上 友梨 (MURAKAMI, Yuri)  
京都産業大学・総合生命科学部・学部学生  
王 班 (WANG, Ban)

京都産業大学・総合生命科学部・学部学生  
小野 真日紀 (ONO, Maiki)

京都産業大学・総合生命科学部・学部学生