

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460295

研究課題名(和文) 洞房結節におけるCav1.3レアバリエーションと持続性内向き電流の関連性の検討

研究課題名(英文) Involvements of Cav1.3 in the generation of a sustained inward Na⁺ current in sinoatrial node cells

研究代表者

豊田 太 (Toyoda, Futoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90324574

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)：心臓の洞房結節細胞に観察される持続性内向きナトリウム電流(Ist)は、心拍リズムの形成に寄与することが示唆されているものの、この電流を担うチャネル分子は同定されていない。本研究は、L型Caチャネル(Cav1.3)がIstの発生に関与する可能性について検討してきた。その結果、Cav1.3遺伝子を欠損したマウスではIstが完全に消失していることを見出した。そこで、次世代シーケンシングを用いてCav1.3のRNA編集あるいはスプライスを検討したが、ナトリウム透過性をもたらすバリエーションの存在は確認できなかった。Cav1.3と機能的に連関した何らかのNaチャネルがIstの発生に関与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The sustained inward Na⁺ current has been recorded in sinoatrial node cells and put forward as a potential pacemaker current in the heart. However, molecular determinants for Ist remain unknown. The present study has investigated the involvement of Cav1.3 L-type Ca²⁺ channels in the generation of Ist. We found that genetic ablation of Cav1.3 resulted in total abolition of Ist. Then we applied a next-generation sequencing approach to examine potential splicing and RNA editing of Cav1.3 in sinoatrial node, but failed to provide evidence for the presence of variants that can produce a Na current. These results raise the possibility that Cav1.3 is functionally coupled to unknown Na-permeable pathway to mediate Ist in cardiac pacemaker cells.

研究分野：生理学一般

キーワード：心臓 ペースメーカー活動 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の自律的な拍動リズムは、洞房結節に存在するペースメーカー細胞の自発的な電氣的興奮により規定される。また、この洞房結節細胞の電気活動(活動電位)は、細胞膜に存在する種々のイオンチャネル・トランスポーターが発生する微弱な膜電流により引き起こされることが知られている。ペースメーカー細胞に特異的に観察される持続性内向きナトリウム電流(Ist)は、自発性活動電位の発生ならびにその発火頻度の形成に関与することが示唆されているが、この電流を担うチャネル分子は同定されていない。

(2) Ist はナトリウムイオンによって運ばれる膜電流であるものの、その薬理学的性質はL型カルシウム電流のそれとほぼ同一であり(Toyoda et al., Br J Pharmacol. 2004) Ist を担うイオンチャネルはL型カルシウムチャネルと構造的に類似したナトリウムチャネルと考えられる。Ist の分子が明らかにされれば、心臓機能を制御する創薬の標的として重要な発見となることが期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、心臓のペースメーカー領域(洞房結節)に強く発現するL型カルシウムチャネルのイソフォーム(Cav1.3)がIstの発生に関わる可能性を検討する。

(2) Cav1.3 のバリエーションフォームを網羅的に検索し、ナトリウム透過性を付与する転写後編集(RNA編集もしくはスプライシング)の存在を確認することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) モルモット、ラットならびにマウスから心臓を取り出し、洞房結節組織を切り出した。酵素処理により細胞を単離し、生理的な電解質溶液(Tyrode液)中で自律的に拍動を示すペースメーカー細胞を同定した。

(2) 単離したペースメーカー細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下で脱分極刺激によりIstを誘発した。細胞外カルシウム濃度0.1 mM下で、カルシウムチャネル遮断薬(ニフェディピンなど)で抑制される内向き電流成分をIstとした。

(3) 先端径10-30 μmのガラス管をマイクロマニピュレーターを用いて操作し、顕微鏡下で単一のペースメーカー細胞を回収した。Cellamp wholetranscriptome amplification kit(タカラバイオ)を用いて、Cav1.3ならびにCav1.2の定量PCRを行った。

(3) 新鮮な洞房結節組織から全RNAを抽

出し、逆転写酵素処理を行いcDNAを得た。Cav1.3の5'-UTRから3'-UTRにかけて様々な部位に特異的なプライマーを設計し、Cav1.3全長にわたってPCR増幅を行なった。増幅したPCR産物を次世代シーケンシングならびにフラグメント解析に供し、配列決定を行った。

(4) Cav1.3のバリエーション配列をIn-fusion cloningにより、プラスミドベクターに組み込み、HEK細胞に異種性発現した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、機能解析を行なった。

4. 研究成果

(1) モルモットの洞房結節から単離したペースメーカー細胞をその形態的特徴に基づき分類し(図1参照)、ホールセルパッチクランプ法により膜電流の記録を行なった。

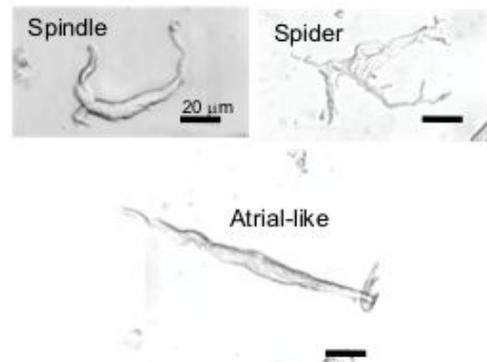
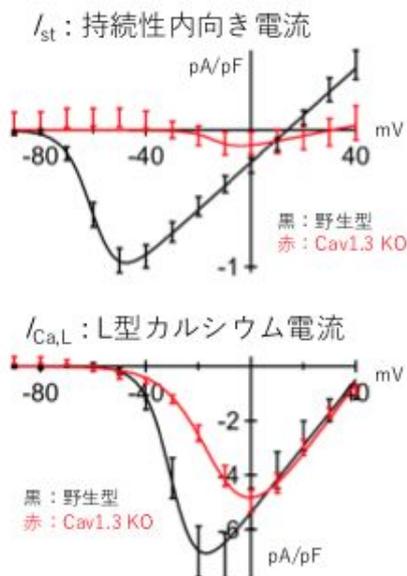


図1 モルモット洞房結節から単離したペースメーカー細胞

Istは大型で横紋のはっきりした心房筋細胞様の潜在性ペースメーカー細胞(atrial-like cell)では誘発されず、比較的小さく、横紋が不明瞭であり、細胞端が紡錘形あるいはクモのように分岐した真のペースメーカー細胞群(spindle or spider-shaped cells)においてのみ観察された。これらspindleやspiderタイプのペースメーカー細胞において、Istの大きさは不均一性を示したが、L型カルシウム電流の大きさと正の相関を示した。一方、Istと過分極誘発性内向き電流の大きさにおいて相関はみとめられなかった。また、各タイプの細胞においてL型カルシウム電流の電気生理学的特徴を調べると、Istの機能的発現レベルの高いspindleやspiderタイプの細胞ではL型カルシウム電流がより過分極側で活性化していることがわかった。またL型カルシウム電流を構成するCav1.2ならびにCav1.3の発現を調べたところ、spindleタイプの細胞はIstが観察されないatrial-like細胞に比べて、Cav1.3の発現が有意に高いことが判明した。以上のことより、Istの発生

には Cav1.3 の発現レベルが深く関与すると考えられた。これらの成果は、学術専門誌に発表した（雑誌論文）。

(2) 次に、上記の仮説を直接的に検証するために、Cav1.3 ノックアウト (KO) マウスを用いた。Cav1.3 KO マウスは野生型マウスに比べ、徐脈、伝導障害などの洞房結節機能低下を呈する。当該マウスから単離した洞房結節細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して記録した Ist と L 型カルシウム電流



の大きさを図 1 に示す。
図 2 雑誌論文 より改変

対照 (野生型) マウスの洞房結節細胞では、-70 mV 付近から -40 mV にかけて内向きに増加する Ist が観察されたが、Cav1.3 KO マウスの細胞では Ist がほぼ完全に消失していた。興味深いことに、Cav1.3 KO マウスでは、L 型カルシウム電流の低下もみとめられた。すなわち、Cav1.3 は、カルシウム電流とナトリウム電流、チャージキャリアの異なる二つ電流の発生に関係することがわかった。また、本実験の結果は、この Cav1.3 遺伝子欠損にともなう洞房結節機能低下に Ist の消失が関与することが示唆された。これらの成果は、学術専門誌に発表した（雑誌論文）。

(3) 上記の結果は、Cav1.3 がカルシウムだけでなくナトリウムイオンも透過する可能性を示唆している。そこで、既知の Cav1.3 クローンを異種性に再構築し、カルシウム選択性を HEK293 細胞における異種性発現系で検討した。細胞外はカルシウム、細胞内はナトリウムイオンを主たるチャージキャリアとし、逆転電位の計測から両イオンの透過性の比 (PCa/PNa) を算出した。

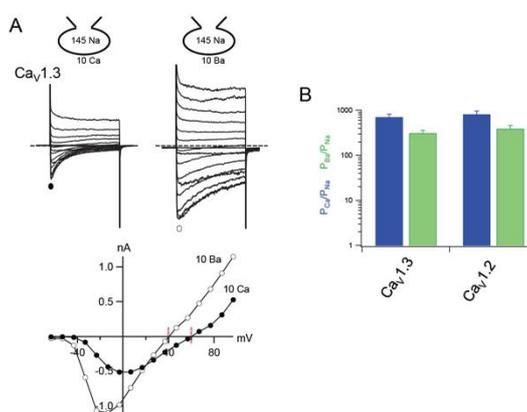


図 3 Cav1.3 のカルシウム選択性

ホールセルパッチクランプ法により記録した Cav1.3 電流の PCa/PNa は 800 近くあり、カルシウムイオン選択性が極めて高いことが判明した。このことは、Cav1.3 にナトリウム透過性を付与する何らかの機構が洞房結節細胞の Ist の発生に関与することが期待された。

(4) そこで、洞房結節に発現する Cav1.3 のバリエーションを次世代シーケンサーならびにフラグメント解析により網羅的に検索した。その結果、Cav1.3 のポア構造を変化させる可能性のあるいくつかの一塩基置換ならびに数種類のスプラズバリエーションの存在が確認された (図 4 参照)。前者は RNA 編集の可能性が期待されたが、サンガー法での配列決定により再現性が乏しく、アーチファクトである可能性が否定できなくなった。また、後者のスプラズバリエーションはいずれもイオン選択性に変化がないことが確認された。

RNA splicing between E8 and E14 in rat SAN Cacna1d

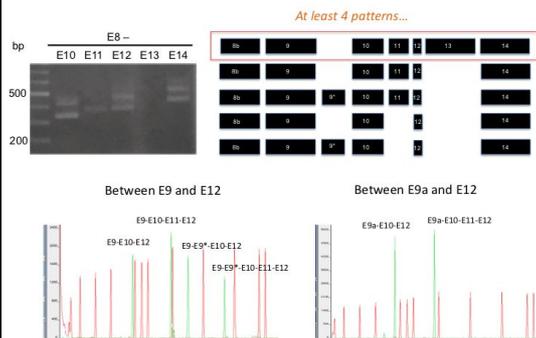


図 4 フラグメント解析によるラット Cav1.3 (Cacna1d) スプラズバリエーションの検索結果の 1 例

これらの結果から、Cav1.3 が Ist を発生させるメカニズムには、Cav1.3 の発現あるいは機能 (おそらくカルシウム流入) に依存した別のナトリウムチャネルが関与する可能性が出てきた。

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2件)

Toyoda F, Ding WG and Matsuura H. Heterogeneous functional expression of the sustained inward Na⁺ current in guinea pig sinoatrial node cells. *Pflüger Archiv* 470: 481-490. 2018 (査読有)

DOI:[10.1007/s00424-017-2091-y](https://doi.org/10.1007/s00424-017-2091-y)

Toyoda F, Mesirca P, Dubel S, Ding WG, Striessnig J, Mangoni ME and Matsuura H. Cav1.3 L-type Ca²⁺ channel contributes to the heartbeat by generating a dihydropyridine-sensitive persistent Na⁺ current. *Sci Rep* 7: 7869. 2017 (査読有)

DOI:[10.1038/s41598-017-08191-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08191-8)

[学会発表](計6件)

Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. A potential link between L-type Cav1.3 channel and TRPM4 Ca²⁺-activated nonselective cation channel in cardiac pacemaker cells (心臓ペースメーカー細胞におけるL型 Cav1.3 チャンネルと Ca²⁺ 活性化 TRPM4 チャンネルの機能連関の可能性). 第95回日本生理学会(高松市) 2018年3月

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博
心臓ペースメーカー細胞のL型Ca²⁺チャンネルはNa⁺電流を誘発して拍動リズムの形成に寄与する. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(神戸市) 2017年12月

Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. Does TRPM4 Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediate the sustained inward Na⁺ current in mouse sinoatrial node cells? (マウス洞房結節細胞における持続性内向き電流を担うチャンネル分子はTRPM4か?). 第94回日本生理学会(浜松市) 2017年3月

Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. Dihydropyridine-sensitive Na⁺ current contribute to the diastolic depolarization in cardiac pacemaker cells (心臓ペースメーカー細胞の緩徐脱分極相におけるジヒドロピリジン感受性

ナトリウム電流の寄与). 第93回日本生理学会(札幌市) 2016年3月

Toyoda F, Mesirca P, Dubel S, Ding WG, Striessnig J, Mangoni ME, Matsuura H. Cav1.3 mediates calcium currents and a sustained inward Na⁺ current in mouse sinoatrial node cells. 2nd European Calcium Channel Conference (アルプバツハ、チロル州、オーストリア) 2015 May

Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. Functional relationship between L-type Ca²⁺ channels and the sustained inward Na⁺ current in cardiac pacemaker cells (心臓ペースメーカー細胞におけるL型Ca²⁺チャンネル(Cav1.3)と持続性内向きNa⁺電流の機能相関). 第92回日本生理学会(神戸市) 2015年3月

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqphysi2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊田 太 (TOYODA, Futoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90324574

(2)研究分担者

松浦 博 (MATSUURA, Hiroshi)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 60238962

林 維光 (DING, Wei-Guang)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80242973