

平成21年5月25日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18590213
 研究課題名 (和文) 平滑筋細胞における T 型カルシウムチャネルの生理学的意義
 研究課題名 (英文) Physiological Significance of the T-type Ca channels in smooth muscle cells.
 研究代表者
 北村 憲司 (KITAMURA KENJI)
 福岡歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：30112345

研究成果の概要：

平滑筋細胞の収縮はCaチャネルから流れ込むCa²⁺量に依存し、収縮に必要なCa流入に関与するL型とL型の制御を行うT型に分けられる。平滑筋細胞には $\alpha 1G$ 及び $\alpha 1H$ の2種のT型Caチャネルが存在し、妊娠経過や病態によって発現量が変化する。両T型Caチャネルは近似したチャネル特性を持つが、クモ毒であるProTx-IIは $\alpha 1G$ に特異的な抑制を示す。このことから、両T型Caチャネルが共存することで、毒物等の侵入による機能不全を回避するシステムを構成していると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

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、Caチャネル、シグナル伝達、電流、発現

1. 研究開始当初の背景

平滑筋細胞に T 型電位依存性 Ca チャネルが存在しているが、平滑筋細胞は T 型 Ca チャネルの活性化には適していない環境下にあると信じられてきたため、その存在意義については疑問視されてきた。T 型 Ca チャネルのうち $\alpha 1H$ は消化管や心筋などの末梢組織に多く分布することが知られており、 $\alpha 1G$ や $\alpha 1I$ とは組織分布に大きな違いがある。特

定の平滑筋組織において特定のサブタイプが発現するという事実は、平滑筋組織における T 型 Ca チャネルの役割を十分推測させるものである。 $\alpha 1H$ の電気生理学的な性質も静止膜電位の浅い平滑筋細胞で機能しやすい特徴を持っており、何らかの役割を持つと思われる。

子宮筋を用いた私たちのこれまでの研究でも妊娠時期によって T 型チャネル亜型の発

現パターンが異なることがわかり、細胞のライフサイクルに何らかの役割を果たすことを強く示唆している。

2. 研究の目的

興奮性の強い消化管及び内臓平滑筋細胞を用いて、RNA干渉およびアンチセンスによるT型Caチャンネル発現阻害効果及びチャンネルクローニングによる平滑筋細胞特異的T型チャンネルの同定とその機能を測定し、平滑筋細胞におけるT型Caチャンネルの役割を明らかにし、その生理学的意義を検討する。

3. 研究の方法

1. RNAi (RNA interference; RNA干渉) によるT型Caチャンネル発現阻害効果

RNAiは、配列のわかっている遺伝子を破壊することができる為、遺伝子機能の解析に有効であり、また、細胞への導入量が少量の割に比較的長時間効果が持続する特徴を持つため、今回の研究遂行の手段として最適と考えた。まず、ラット $\alpha 1H$ 及び $\alpha 1G$ T型Caチャンネルの遺伝子配列データベース (Genbank) よりダウンロードし、をそれぞれのサブタイプ特異的なsiRNAオリゴヌクレオチド配列の分子設計をTuschlらの方法に従って行う。その配列と相補的な配列と合わせて二本鎖DNAを作り、これをBD Knockout RNAi System (Clontech社)を用いて、pSIRENベクターにライゲーションする。構築したベクターを大腸菌に導入して陽性プラスミドクローンを取得し精製する。その後、アデノウィルスの発現システムを用いて(同社)この配列をAdeno-X Expression ベクターに移す。組み換えアデノウィルスDNA精製後、PacIで消化した後、HEK293細胞に導入しウィルス産生後回収して、siRNAオリゴヌクレオチド配列をもつ組み換えアデノウィルスを作製する。

2. アンチセンスオリゴヌクレオチドによるT型Caチャンネル発現阻害効果

$\alpha 1H$ 及び $\alpha 1G$ T型Caチャンネルのそれぞれのサブタイプ特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の分子設計を定法に従って行う。ネガティブコントロールとして、センス配列、ミスマッチ配列を用いる。合成オリゴヌクレオチドは、Fugene6トランスフェクション試薬を用いて、平滑筋組織の初代培養細胞に導入し、電気生理学的手法によって、T型Caチャンネルの機能を検

討する。

3. T型Caチャンネル特異的チャンネル遮断薬による機能阻害効果

ジヒドロピリジン系Ca拮抗薬はL型Caチャンネル阻害薬としての特異性が高く、平滑筋細胞における概略的にL型Caチャンネルの機能を評価する方法として、最も簡便な機能評価法である。現在のところ、T型Caチャンネルに特異的な遮断薬は報告されていないため、薬理的な機能評価法を用いることができない。そのため、今後の研究の進展を考えると、T型Caチャンネル特異的阻害薬の開発が求められる。既存のT型Caチャンネルに高親和性を持つチャンネル遮断薬の特異性を検討し、T型Caチャンネルの機能評価を目的とした研究への有用性について検討する。

T型Caチャンネルの機能評価は電気的特性を指標とするのが最も合理的である。また、他のCaチャンネルが大量に発現する平滑筋等の興奮性細胞では測定誤差が発生し、T型Caチャンネルの機能評価が困難であるため、本研究ではXenopus Oocytesに $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ cRNAを注射し、十分なT型Caチャンネル電流が出現する状態を作成し、実験を行った。また、 $\alpha 1G$ - $\alpha 1H$ キメラチャンネルを作成し、より詳細な検討を行った。

4. 研究成果

平滑筋細胞にT型電位依存性Caチャンネルが存在しているが、平滑筋細胞はT型Caチャンネルの活性化には適していない環境下にあると信じられてきたため、その存在意義については疑問視されてきた。T型Caチャンネルのうち $\alpha 1H$ は消化管や心筋などの末梢組織に多く分布することが知られており、 $\alpha 1G$ や $\alpha 1I$ とは組織分布に大きな違いがある。特定の平滑筋組織において特定のサブタイプが発現するという事実は、平滑筋組織におけるT型Caチャンネルの役割を十分推測させるものである。妊娠ラット子宮筋におけるCaチャンネル発現の計時的変化を調べた研究(Ohkubo et al., Gynecol. Obstet. Invest., 59:80-85, 2005)でも、よく知られているL型Caチャンネルの妊娠末期の変化と連動してT型Caチャンネルの変動も起こること、また、妊娠中期ではL型Caチャンネルとは独立に変動することを見つけた。また、T型Caチャンネルのサブタイプについては、 $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ 、 $\alpha 1I$ の3種のうち、 $\alpha 1G$ 、 $\alpha 1H$ の2種が発現し、 $\alpha 1I$ の発現は無視できた。しかし、ラット妊娠

子宮縦走筋は $\alpha 1G$ 及び $\alpha 1H$ は平行して発現量の変化が起こるのに対し、輪走筋では $\alpha 1G$ の発現量のみが変化し、 $\alpha 1H$ 発現量は妊娠時期に影響されないなど、両サブタイプは独立した機能を持つよりは、むしろ統合的に働く可能性が考えられた。

こうした発現サブタイプの変化は、高電位依存性 Ca チャネル間でも確認することができ、機能変化に結びついていることを確認することができる。本研究ではストレプトゾトシンで知覚過敏症状を誘発した糖尿病ラットを用いて、脊髄後根部の $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ サブタイプの発現変化を調べた。その結果、ラット脊髄後根では $\alpha 1A$ サブユニットの発現量が有為に増加しているが、 $\alpha 1B$ の発現量には統計的な有為さが見られないことがわかった。また、脊髄細胞では $\alpha 1A$ 、 $\alpha 1B$ とも統計的な発現量増加は認められなかった。また、これらの変化は細胞の種類とも密接に関連しており、脊髄後根細胞を大きさによって3群に分類して計測したところ、大細胞(25 μm 以上)数は減少し、小細胞(15 μm 以下)数が増加することが判明した。(Umeda et al., Life Sci., 79: 1995-2000, 2006)。これらの結果は、Ca チャネルサブタイプの発現量変化が機能異常と密接に関連していることを示している。また、細胞種(大細胞、小細胞)の変化を伴うことから、Ca チャネル発現量の変化は細胞の形質変化(形態変化及び機能変化)に伴って誘導される可能性が示唆された。

そこで、T型Caチャネルサブタイプの発現をRNA干渉およびアンチセンス法を用いて実施することを企図したが、 $\alpha 1G$ と $\alpha 1H$ チャネルの電気生理学的特性が類似していることから、機能検出法の確立が必要と考え、まず、両チャネルの特性の違いを薬理学的手法を用いて検出することとした。mibefradilをはじめとする従来のT型Caチャネル遮断薬はT型チャネル抑制作用が他のCaチャネル抑制作用よりも強いことが報告されているが、 $\alpha 1C$ を始めとする高電位依存性Caチャネル特性作用も有しており、薬理学的検索には利用できなかった。また、T型Caチャネルサブタイプである $\alpha 1G$ と $\alpha 1H$ に対する親和性は同等であり、T型Caチャネルサブタイプの機能を検討する本実験には利用できなかったが、T型Caチャネルに高い選択的抑制作用を有するクモ毒(ProTx-I)が発見され、T型Caチャネルサブタイプの機能評価を行える可能性が考えられたため、まず、ProTx-Iの両サブタイプ($\alpha 1G$ および $\alpha 1H$) に対する効果を検討した

cRNA を enopus Oocytes に注射して得られ

た $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ チャネル電流はともに、負の電位側で最大開口となり、典型的な電流-電圧曲線を示す電流を惹起した(保持電位-110mV)。 $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ チャネル電流は類似の電流特性を示し、得られた電流特性から両者を区別することは困難であった。ProTx-I は 10nM 以上の濃度で $\alpha 1G$ 電流を濃度依存性に抑制した。しかし、高濃度(1 μM)のProTx-Iを投与しても、急激な $\alpha 1G$ 電流抑制作用は認められず、薬物除去を行っても、電流量の回復は部分的であった。一方、 $\alpha 1H$ 電流は1 μM 以上の濃度で抑制効果が認められた。 $\alpha 1G$ 電流抑制と比較し、効果の出現は迅速であり、薬物除去後の回復は完全であった。 $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ 電流に対するProTx-Iの相対的抑制効果は $\alpha 1G$ に140倍高い親和性を示した。

この親和性の違いは薬理学的な機能検索がProTx-Iを用いることによって可能となることを示しており、RNA干渉法やアンチセンス法と比較して、概略評価の方法として簡便であり、確実な方法と思われた。低濃度のProTx-I(0.1 μM 以下)では $\alpha 1G$ の機能を抑制された変化の中に見つけることが可能であり、高濃度のProTx-I(10 μM)で $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ を抑制した後、ProTx-Iを除去することによって $\alpha 1H$ の機能が評価できることが示唆された。 $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ キメラチャネルを作成して、更に検討したところ、ProTx-Iの $\alpha 1G$ 選択的な抑制作用はDomain IV S3-S4 linker部を取り替えることによって消失することから、ProTx-Iのチャネル結合にはこの部位が不可欠であると思われた。

細胞は所属する組織に応じて、発現するCaチャネルのサブタイプを変化させている。しかし、それらのCaチャネルの一義的な役割は細胞内へのCa流入装置としてであり、電流特性が類似するチャネルを複数種用意する意義は不明である。しかし、今回のクモ毒であるProTx-Iを用いた研究から示唆されることは、 $\alpha 1G$ および $\alpha 1H$ T型Caチャネルが共存することで、毒物等の侵入による機能不全を回避するシステムを構成しているのではないかと考えられることである。

本研究は当初RNA干渉法やアンチセンス法を用いて欠損実験を行い、期待される機能消失の中から、チャネル機能を推定することを考えていたが、妊娠中期、後期に大量に産生されるタンパク質の中にチャネル毒性を持つものがあるかを検索し、生命機能を維持するためのSafety netの構成という観点から、T型Caチャネルの生理学的意義を再度検討していく。

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)

Umeda M., Ohkubo T., Ono J., Fukuizumi T. & Kitamura K. Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca channels in dorsal root gangria from streptozotocin-induced diabetic mice. Life Science, 79: 1995-2000, 2006

Ohkubo, T. and Kitamura K. Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca²⁺ channels Cav3.1 and Cav3.2. submitted.

[学会発表] (計 2件)

Ohkubo T. The ProTx-1 receptor site of T-type Ca²⁺ channels. 日本薬理学会 横浜 2008.3.18

Ohkubo T. and Kitamura K. Tarantula toxin ProTx-1 differentiates between voltage-gated T-type Ca²⁺ channels hCav3.1 and hCav3.2. 36th International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, Japan, 2009.7.27-2009.8.1

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 憲司 (KITAMURA KENJI)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：30112345

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

大久保 つや子 (OHKUBO TSUYAKO)