

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2009
課題番号：18590789
研究課題名 (和文) 心筋におけるプロテインキナーゼ C とカルモデュリン依存性キナーゼのカップリング
研究課題名 (英文) Coupling of protein kinase C and Ca/calmodulin dependent protein kinase II in cardiac muscle
研究代表者
小武海 公明 (KOMUKAI KIMIYAKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60360145

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学
キーワード：エンドセリン, カルシウム電流, 心筋, シグナル伝達

1. 研究計画の概要

(1)心筋の興奮・収縮は細胞内情報伝達により制御されており, なかでもカルモデュリン依存性キナーゼ (CaMKII) は重要な役割を果たしている. 我々は以前の研究から, α 受容体刺激時にプロテインキナーゼ C (PKC) が活性化され, それに伴い CaMKII が活性化され, L 型 Ca 電流が増大することを明らかにした. 本研究ではそれをさらに発展させ, 心筋に PKC-CaMKII の系が普遍的に存在することを示すことである.

(2)本研究では, 心筋において, α 受容体と同様 PKC を活性化するといわれている, エンドセリン(ET-1)の L 型 Ca 電流に対する効果およびその細胞内情報伝達系を中心に検討した.

2. 研究の進捗状況

(1)ラット単離心筋に穿孔パッチクランプ法を適用し, L 型 Ca 電流を測定した. この方法は, アンホテリシン B を用いて, パッチ膜に 1 価のイオンのみが通過する小孔をあけて細胞にアクセスする方法である. ピペット内液に Ca バッファーを用いないので, Ca を介した反応を検討することができ, より生理的である. 保持電位を -40mV に固定し, 0mV への脱分極パルスをも 10 秒毎に与え, Ca 電流を測定した.

(2)ET-1(10 nM)は一相性に電流を上昇させた. 電流は $1.21\pm 0.17\text{ nA}$ から $1.53\pm 0.19\text{ nA}$ に, 28.9% 上昇した. ET-1 投与後 15 分と 20 分の値に有意差はなく, 15 分の時点で定常状態に達すると考え, 以降の実験では 15

分値を測定した.

(3)まず, ET-1 の効果がエンドセリン受容体のどのサブタイプを介するかを検討するため, ETA 受容体, および ETB 受容体の選択的阻害薬である, BQ-123 および BQ-788 存在下で ET-1 の効果を検討した. BQ-123 存在下では, ET-1 の作用は消失したが, BQ-788 存在下では非存在下と同様の電流の上昇を認めた.

(4)ラット心室筋の膜分画を用い, ウェスタンブロットを行い, ETA および ETB 蛋白の発現を検討した. ETA は心室筋に発現していたが, ETB は発現していなかった. 膜電流の結果とあわせ, ET-1 の効果は ETA 受容体を介すると考えられた.

(5)次に PKC 阻害薬であるキレリスリン存在下で ET-1 の効果を検討したところ, ET-1 の作用が消失した.

(6)次に, CaMKII の選択的阻害薬である, KN-93 およびその不活化アナログである KN-92 存在下で検討を行った. KN-93 存在下では ET-1 の効果は消失したが, KN-92 存在下では ET-1 は L 型 Ca 電流を上昇させた.

(7)これらの結果から, ET-1 は, ETA 受容体-PKC-CaMKII を介して L 型 Ca 電流を上昇させていると考えられた. これらは, α 受容体刺激時の細胞内情報伝達系と同一であり, 心筋細胞に普遍的に PKC-CaMKII のカップリングがあることが示唆された

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初、アンジオテンシンの効果も検討する予定であったが、予備実験により、アンジオテンシンはL型電流を変化させないことがわかった。また、ラット右室乳頭筋において収縮を検討したが、アンジオテンシンは収縮も変化させないことがわかった。過去の文献と照らしあせても、ラットにおいてはアンジオテンシンのAT1受容体あるいはその下位のカスケードの発現が十分でない可能性があり、エンドセリンに関する実験に集約させた。

本来、実験をエンドセリンに集約させた分、進行はすすんでなければならぬが、生化学的実験が困難を極め、CaMKII活性の上昇をとらえるには至っていない。

生理学的実験に関しては概ね完結に近づいている。

4. 今後の研究の推進方策

今回の主たる目的であるCaMKIIの関与について、CaMKIIの阻害薬を現在KN-93しか検討していないので、他の阻害薬 (autocamtide-related inhibitory peptide, AIP) などを使用して、KN-93と同様な結果が得られるかどうかを検討する。

蛋白レベルにおいて、CaMKII活性を測定する。実際には、CaMKIIが自己リン酸化されているときにのみ結合する抗体、および、自己リン酸化の有無にかかわらず結合する抗体を併用し、自己リン酸化を活性の指標とする。ET-1投与によりCaMKII自己リン酸化が増えるかを検討する。

これらの成果を2009年7月に京都で開催される国際生理学会大会で発表予定であり、また、アメリカ心臓学会にも演題を提出中である。学会などにおけるdiscussionを踏まえて、海外欧文雑誌に投稿する。

5. 代表的な研究成果

(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 17 件)

1) Kawai M, Hongo K, Komukai K, Morimoto S, Nagai M, Seki S, Taniguchi I, Mochizuki S, Yoshimura M. Telmisartan predominantly suppresses cardiac fibrosis, rather than hypertrophy, in renovascular hypertensive rats. *Hypertension Res* 2009;32:604-10. 査読有

2) Date T, Yamashita T, Iwasaki Y, Aizawa T, Aramaki Y, Komukai K, Taniguchi I, Yoshimura M. Infiltration of macrophages

through the atrial endocardium in inflammation-induced rats: the contribution of fractalkine. *Circ J* 2009;75:923-7. 査読有

3) Komukai K, Yagi H, Ogawa T, Date T, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Taniguchi I, Yoshimura M. Inhibition of the renin-angiotensin system prevents re-hospitalization in heart failure patients with preserved ejection fraction. *Circ J* 2008;72:2004-8. 査読有

4) O-Uchi J, Sasaki H, Morimoto S, Kusakari Y, Shinji H, Obata T, Hongo K, Komukai K, Kurihara S. interaction of alpha1-adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca²⁺ channel. *Circ Res* 2008;102:1378-88. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

1) Komukai K, O-Uchi J, Morimoto S, Kawai M, Hongo K, Yoshimura M, Kurihara S. Endothelin-1 increases L-type Ca current via an activation of Ca/calmodulin dependent protein kinase II in rat ventricular myocytes. 日本循環器学会学術集会 2008年3月28日, 福岡