

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590202

研究課題名（和文）ムスカリン受容体作動性陽イオンチャンネルとその調節系の分子実体解明

研究課題名（英文）Search for the molecular entities of muscarine receptor-operated non-selective cation channels and their regulatory system

研究代表者

高井 章 (TAKAI AKIRA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号： 50126869

研究成果の概要：副交感神経支配の効果器の典型である毛様体筋において、受容体作動性非選択性陽イオンチャンネル (NSCC) の分子候補としての TRPC (4 種) と Orai1、およびそれらの調節に関与する可能性のある分子としての $G_{q/11}$ 、STIM1、RhoA/kinase、rhanodine 受容体などの存在と細胞内局在を明らかにした。さらに、それらの機能的意義を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：毛様体筋、ムスカリン受容体、TRP チャンネル、GTP 結合蛋白、非選択性陽イオンチャンネル、受容体作動性陽イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

本研究の主要テーマは、副交感神経刺激に応じて収縮する平滑筋や分泌を起す腺細胞などの効果器に存在し、ムスカリン受容体刺激に伴い開口するイオン選択性の低い陽イオンチャンネル (non-selective cation channel; NSCC と略す) であった。開口した NSCC (複数種のことが多い) は、ある種の腺細胞の場合のように脱分極を介して間接的に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開口を誘発したり、また毛様体筋の場合のようにそれ自身が直接に Ca^{2+} 流入経路を形成するなど、ムスカリン受容体を介する信号伝達の上で非

常に重要な役割を演ずるが、その分子実体については、いずれの組織においても、ほとんど不明であった。

近年、もともとショウジョウバエ複眼における光受容メカニズムの研究過程で発見された TRP 陽イオンチャンネルの類似体が哺乳動物でも続々と発見され、それらが単独または複合体としてさまざまな受容体作動性 NSCC を形成する可能性が注目を浴びていた。(現在でも浴び続けている。)

これに関して従来われわれは、実験動物(ウシ、ブタおよびモルモット)の毛様体筋、消化

管平滑筋、唾液腺など副交感神経支配下の組織における RT-PCR 実験によって、複数種の TRP チャンネル (特にその TRPC タイプ) の発現を確認し、それらの全 cDNA 配列を決定していた。

本研究では、これらの研究成果をさらに発展させ、副交感神経伝達における NSCC と TRP チャンネルとの関連および NSCC 活性化に至る信号伝達経路の分子実体の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 副交感神経支配の効果器の典型である毛様体平滑筋において、ムスカリン受容体(MR)の下流に三量体性 GTP 結合蛋白質(G 蛋白)を介して接続する多様な信号伝達系の分子実体を探索すること。(

(2) さらに、それらの機能的な相互作用を検討すること。

(3) 毛様体筋を採取するための材料として、北海道で有害外来種として多く捕獲され殺処分されているアライグマ眼球を利用する可能性を検討すること。

(4) TRPC などの機能を研究するための有用な天然毒素のスクリーニングを行うこと。

3. 研究の方法

(1) 等尺性張力においては、ウシ毛様体から摘出した平滑筋束の下端を、灌流槽(容積 0.5 mL)の底に固定、上端を U-ゲージトランスデューサにつないで記録した。毛様体筋の発生する張力は比較的微弱であるため、実験は、S/N をよくするため、槽内はペリスタポンプを用いて一定流速(1.2 mL/min)で灌流しながら行った。

(2) 電位固定法による全膜電流記録には、酵素処理で単離したのち、fibronectin 処理した硝子表面上で短期間 (1 晩ないし数日) 培養した毛様体筋細胞を用いた。

(3) Fluo-4 蛍光法による細胞内 Ca^{2+} 記録にも同様に調製した短期間培養細胞を用いた。

(4) mRNA の存在は、RT-PCR により検討した。mRNA 相対量は実時間 PCR によった。

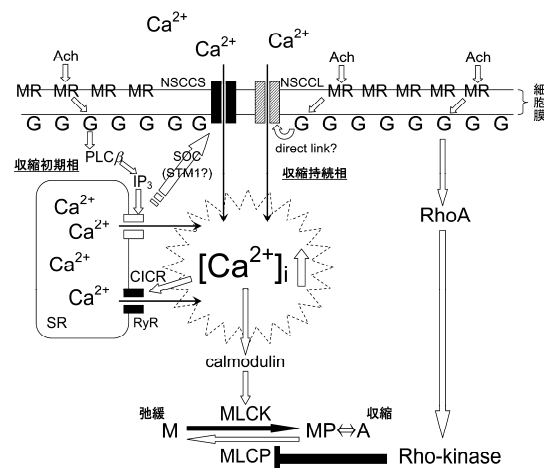
(5) 各種蛋白の発現と局在の検討は免疫蛍光染色方によった。抗体を可視化するための色素としては各種の Alexa-Fluor を利用した。細胞膜蛋白の染色においては、われわれの先に開発した、paraformaldehyde 固定を準備段階で行わない semi-intact 形質膜法を応用して、極力生理的条件に近い条件での蛋白の局在を見られるよう努めた。

4. 研究成果

(1) 培養細胞から semi-intact 形質膜標本を作成、免疫染色法により細胞膜において、 M_3 型ムスカリン受容体、 $G_{q/11}$ 、および TRP サブタイプが高密度(>1 個/ μm^2)に分布することを実証した (図 1)。

(2) $G_{q/11}$ の α サブユニットに特異的に結合し、その信号伝達能を失活させることが知られている細菌由来毒素 YM-254890 を用いた実験により、毛様体筋においてはムスカリン受容体からの信号が専ら $G_{q/11}$ を經由して下流に伝えられることを確定的に示した (図 1)。

図 1. 副交感神経による平滑筋収縮調節：本研究の成果をもとに描いた模式図



(3) M_3 受容体からの信号は、従来知られている、細胞内貯蔵部位からの遊離と非選択性陽イオンチャンネルを介する流入に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に加え、RhoA/Rho kinase 系を介する収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性の上昇も引き起こすことを示した (図 1)。

(4) 毛様体筋において持続的 M_3 受容体刺激により tonic な収縮が起る時には、いわゆる容量性 Ca^{2+} 流入経路(SOC)が活性化されることを示した。SOC の分子実体として注目されている、STIM1 および Orai1 蛋白が筋細胞膜/細胞内小胞体膜領域に多く発現していることを証明した (図 1)。

(5) 毛様体筋は、 M_3 ムスカリン受容体刺激のほか、endothelin-1(ET1)受容体の刺激によっても tonic な収縮を発生することが報告されている。われわれは、RT-PCR 実験により、ウシ毛様体筋にも、他の臓器で報告されているのと同じ ET1-mRNA が多く存在することを確かめた。また、免疫染色によって筋細胞膜に ET1 受容体蛋白が稠密に発現していることを証明した。さらに、ET1 刺激によって起る収縮、電気現象、細胞内 Ca^{2+} 変動と、それらに対する YM-254890 の効果を検討することにより、ET1 受容体からの信号も、少なくともその一部は、 M_3 受容体と同じ $G_{q/11}$ 共役経路を通して下流に伝えられることを強く示す知見を得た。ET1 は眼内に広く分布することが知られ、房水流出率ひいては眼内圧の調節因子としても注目されている。今回得られた知見は、ある種の緑内障の発生機序やその新しい治療法の開発に役立つことが期待される。

(6) 有害外来動物として特に北海道で多く捕獲され殺処分に付されているアライグマ眼球を、北大チームなどの好意で供与いただき、摘出した毛様体筋を用いて、予備的な実験を実施した。ウシ眼球にくらべ小さいので、張力トランスデューサを用いた実験は難しいものの、電気生理学的実験、 Ca^{2+} 測定、RT-PCR、蛍光抗体法などの実験には十分使用可能であるという感触を得た。

(7) TRP を含め、非選択性陽イオンチャンネルは SKF96365 などの薬剤により、相当高濃度(10-100 μM)を必要とするものの、抑制されることが知られている。研究代表者は、1986 年以来、天然物有機化学の専門家と共同で、プロテインフォスファターゼなどに高親和性に結合する天然毒素の研究を展開してきている。今回の研究においては多くの天然毒素のうち、SKF96365 と似た構造的モチーフをもつ物質を単離毛様体筋に投与し、 M_3 受容体刺激により惹起される膜電流や細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する影響を検討した。その結果、SKF96365 の 1-10 倍程度の抑制効果をもつ有望な物質をいくつか得た。

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 3 件)

1. Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K & Takai A (2008). Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the $G_{q/11}$ protein. *Br J Pharmacol* **154**, 890-900 (査読あり)
2. Sydnes MO, Kuse M, Kurono M, Shimomura A, Ohinata H, Takai A & Isobe M (2008). Protein phosphatase inhibitory activity of tautomycin photoaffinity probes evaluated at femto-molar level. *Bioorg Med Chem* **16**, 1747-1755. (査読あり)
3. Isobe M, Kurono M, Tsuboi K & Takai A (2007). Synthesis of [18,19,21,22- $^{13}C_4$]-labeled tautomycin as an NMR probe of protein phosphatase inhibitor. *Chemistry Asian J* **2**, 377-385 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. 高井章、宮津基、安井文智
演題：「 M_3 型ムスカリン受容体の下流に接続する信号伝達機構の分子実体」
学会名：2008 年度・生物物理/分子生物学合同シンポ
発表日：2008 年 11 月 21 日
場所：札幌
2. 高井章、宮津基
演題：「毛様体筋収縮調節にはムスカリン受容体- $G_{q/11}$ 下流に接続する複数の分子機構が関与する」
学会名：第 28 回日本眼薬理学会
発表日：2008 年 9 月 20 日
場所：岡山
3. 高井章、宮津基、安井文智
演題「ウシ毛様体筋の収縮調節に関与する複数の $G_{q/11}$ 共役経路」
学会名：第 50 回日本平滑筋学会
発表日：2008 年 7 月 3 日
場所：弘前

4. Yasui F, Miyazu M & Takai A:
演題 Examination of signalling mechanism
involved in muscarinic responses of bovine
ciliary muscle using a G_{q/11}-protein
inhibitor, YM-254890.
学会名：第 85 回日本生理学会大会
発表日：2008 年 3 月 25 日
場所：東京

5. Takai Y, Yasui F, Miyazu M, Takai A:
演題 Roles for G_{q/11}-mediated Signals in
the Muscarinic Regulation of Ciliary
Muscle Contraction.
学会名：The 22nd SICE Symposium on
Biological and Physiological Engineering
発表日：2008 年 1 月 14 日
場所：中国、ハルビン市

[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

[http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/
phys1/profiles/takai.htm](http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/phys1/profiles/takai.htm)

旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：50126869

(2) 研究分担者

吉田 晃敏 (YOSHIDA AKITOSHI)
旭川医科大学・医学部・学長
研究者番号：70125417

成瀬 恵治 (NARUSE KEIJI)
岡山大学・医歯(薬)総合研究科・教授
研究者番号：40252233

大日向 浩 (OHINATA HIROSHI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：20233257

宮津 基 (MIYAZU MOTOI)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：40396346

高井 佳子 (TAKAI YOSHIKO)
名古屋大学・医学部・講師
研究者番号：60396356

(H20 年 6 月に上記を退職、以降、
研究分担者から抹消)

(3) 連携研究者
(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 章 (TAKAI AKIRA)