

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790166

研究課題名（和文） 交感神経刺激による L 型カルシウム電流増大現象への Rad の関与

研究課題名（英文） The relationship between Rad and L-type calcium current under sympathetic stimulus.

研究代表者

小林 武志 (KOBAYASHI TAKESHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80363688

研究成果の概要：本研究の目的は、正常の心臓において観察される交感神経刺激による心筋細胞の L 型  $Ca^{2+}$ 電流増大現象に Rad が関与することを明らかにすることであったが、今回行った研究においては、それを証明することが出来なかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

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：細胞生理学

## 1. 研究開始当初の背景

正常の心臓においては、交感神経刺激により心筋細胞の L 型  $Ca^{2+}$ 電流が増大し、心機能上昇が認められる。この現象の主たる機構として cAMP 依存性リン酸化酵素(PKA)による L 型  $Ca^{2+}$ チャネル subunit 自体のリン酸化が想定されていたが、今研究の立案時、これを否定する研究が報告された。他方、交感神経刺激に対する反応性低下を呈するうっ血性心不全心の一部で Rad(Ras Associated with Diabetes)と言われる GTP 結合蛋白質の遺伝子異常(Q66P)が確認された。Rad は  $Ca^{2+}$ チャネル subunit に結合可能な分子であり、Rad の過剰発現は L 型  $Ca^{2+}$ 電流の減少を引き起こす。各分子のリン酸化反応には各分子に特異的な AKAP(A-kinase

anchoring protein)が寄与しているのが報告されていた。

## 2. 研究の目的

交感神経刺激時に AKAP15/18 を介した Rad のリン酸化が生じ、結果、遊離した L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの subunit が subunit に結合し、L 型  $Ca^{2+}$ 電流が増大するという仮説の証明を今研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)再構成系を用いた検討(2007年度-平成19年度)

~ AKAP15/18 のクローニング ~

L 型  $Ca^{2+}$ 電流の再構成系を構築するためには、L 型  $Ca^{2+}$ チャネルの責任遺伝子である  $1C$  subunit・ $2C$  subunit・ $2$  subunit が必要となる。また、それ以外に交感神経刺激に関与していると今回我々が想定している Rad および AKAP15/18 を培養細胞である BHK 細胞に導入する必要がある。この研究を開始する時点で AKAP15/18 以外はクローニング済みであったため、最初に AKAP15/18 のクローニングを行った。

~  $1C$  subunit- $2$  subunit-stable-expressed-BHK 細胞の作成 ~

$1C$  subunit・ $2C$  subunit・ $2$  subunit・Rad・AKAP15/18 を一度に BHK 細胞に導入することは困難であるため、 $1C$  subunit と  $2$  subunit が恒常的に発現している  $1C$  subunit- $2$  subunit-stable-expressed-BHK 細胞を作成した。

~  $2C$  subunit・Rad・AKAP15/18 のサブクローニングおよび BHK 細胞への導入 ~

この BHK 細胞には  $2C$  subunit が発現していないため、ほんの僅かの L 型  $Ca^{2+}$ 電流しか観察できない。そこで、 $2C$  subunit と AKAP15/18 を pIRES vector へ、また、Rad を pIRES2-DsRed-Express vector へそれぞれサブクローニングした。コントロールとしては Rad をサブクローニングしていない pIRES2-DsRed-Express vector を用いた。そして、それぞれを脂質二重膜法を用いて  $1C$  subunit- $2$  subunit-stable-expressed-BHK 細胞へ導入した。こうすることで、赤い蛍光を発する細胞で L 型  $Ca^{2+}$ 電流が観察される細胞はすべての遺伝子の導入が成功していると考えられた。

~ forskolin 投与に対する L 型  $Ca^{2+}$ 電流の変化の観察 ~

BHK 細胞には交感神経受容体であるアドレナリン受容体が存在しない。そのため、交感神経刺激時に細胞内で活性が上昇する PKA を直接的に活性化させる forskolin を投与する事とした。まず、パッチクランプ法を用いて、forskolin 投与前(PKA 刺激前)の L 型  $Ca^{2+}$ 電流を記録する。その後、forskolin 投与後(PKA 刺激後)の L 型  $Ca^{2+}$ 電流を記録する事とした。

(2)Rad の発現が抑制された native の心筋細胞を用いた検討(2008年度-平成20年度)

~ Rad 発現抑制用 Rad-siRNA プラスミドベクターの作成 ~

本年度は siRNA を用いてラットの native の心筋細胞で発現している Rad を抑制し、L 型  $Ca^{2+}$ 電流の変化を観察することを計画した。まず、Rad を抑制するとされる配列を決定し、それを psiSTRIKE<sup>TM</sup>hMGFP プラスミドベクターに組み込み、Rad 発現を抑制するプラスミドベクター(Rad-siRNA プラスミドベクター)を構築した。同時に、コントロール用としてラットの他の遺伝子発現を抑制しない scramble-siRNA プラスミドベクターも作成した。

~ Rad-siRNA プラスミドベクターの native 心筋細胞への導入 ~

新生仔ラットより心室筋細胞を単離し、培養液にて24時間培養した。その後、脂質二重膜法にて Rad-siRNA プラスミドベクターおよび scramble-siRNA プラスミドベクターを細胞内に導入した。

~ isoproterenol 投与に対する L 型  $Ca^{2+}$ 電流の変化の観察 ~

本年度用いた細胞は native の心筋細胞で、これらには交感神経受容体であるアドレナリン受容体が存在している。よって、isoproterenol を投与する事とした。まず、パッチクランプ法を用いて、isoproterenol 投与前(PKA 刺激前)の L 型  $Ca^{2+}$ 電流を記録する。その後、isoproterenol 投与後(PKA 刺激後)の L 型  $Ca^{2+}$ 電流を記録する事とした。

~ Rad 発現抑制用 Rad-siRNA アデノウイルスベクターの作成 ~

脂質二重膜法では心筋細胞へのプラスミドベクターの導入効率が低かったため、Rad-siRNA アデノウイルスベクターを作成することとした。具体的には、Rad-siRNA プラスミドベクターから Rad-siRNA-GFP 部を切り出し、pAxcwit へサブクローニングし、COS-TPC 法にて Rad-siRNA アデノウイルスベクターを作成した。同時に、コントロールである scramble-siRNA アデノウイルスベクターも作成した。

~ Rad-siRNA アデノウイルスベクターの native 心筋細胞への導入 ~

新生仔ラットより心室筋細胞を単離し、培養液にて24時間培養した。その後、Rad-siRNA アデノウイルスベクターを2時間感染させ、48~72時間後に前述のパッチクランプ法にて L 型  $Ca^{2+}$ 電流を測定した。

#### 4. 研究成果

「(1)再構成系を用いた検討」(2007 年度-平成 19 年度)に関して

~ Rad の L 型  $Ca^{2+}$ 電流抑制効果 ~  
 Rad だけが発現していない、つまり、 $\alpha_{1c}$  subunit・ $\beta_{2c}$  subunit・ $\alpha_{2\delta}$  subunit・AKAP15/18 が発現している場合は、大きな L 型  $Ca^{2+}$ 電流を観察することが出来た(図 1- Radなし:黒線)。それに対し、Radも共発現させた場合、L 型  $Ca^{2+}$ 電流は僅かしか観察されないか(図 1- Radあり:黒線)、または、全く観察されないか(図 1- Radあり:黒線)のどちらかであった。

~ PKA 刺激に対する反応について ~  
 図 1 の赤線は forskolin 投与後つまり PKA 刺激後の L 型  $Ca^{2+}$ 電流であるが、Rad が存在しても存在していなくても、PKA 刺激によって L 型  $Ca^{2+}$ 電流が増大することは無かった。

以上の結果となった原因の考察としては、  
 native 細胞で観察される交感神経刺激による L 型  $Ca^{2+}$ 電流増大現象に Rad and/or AKAP15/18 が関与していない、  
 Rad および AKAP15/18 以外の未知の分子が交感神経刺激による L 型  $Ca^{2+}$ 電流増大現象に関与している、  
 などが考えられた。

「(2)Rad の発現が抑制された native の心筋細胞を用いた検討」(2008 年度-平成 20 年度)に関して

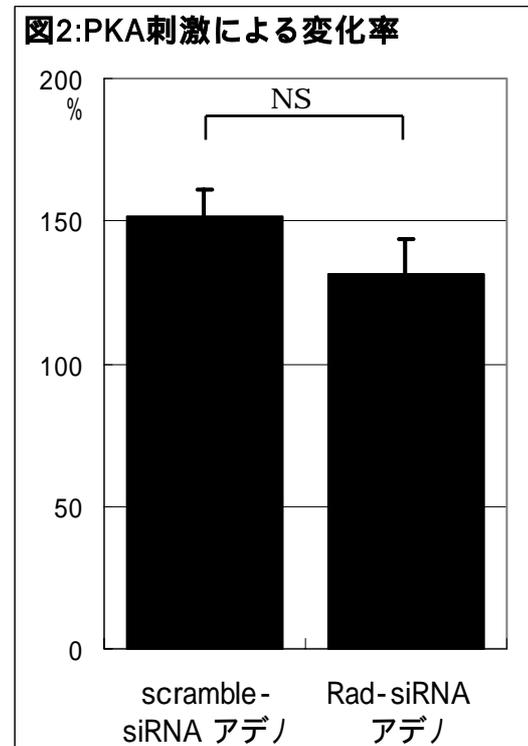
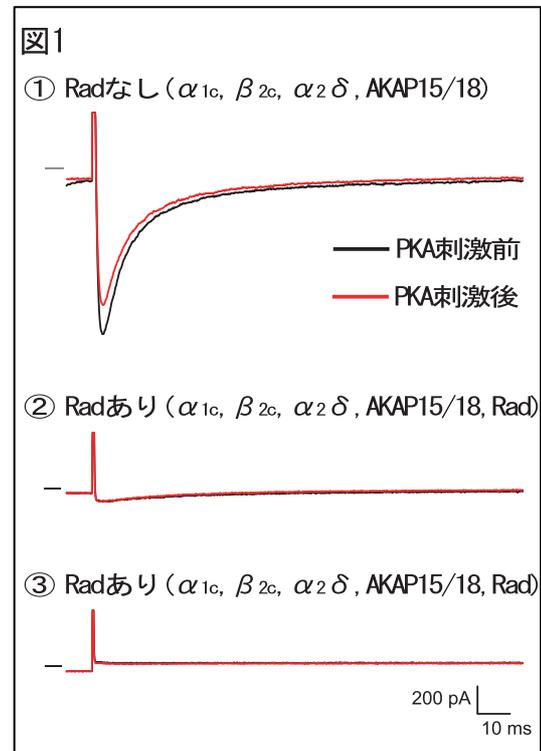
前年度の研究結果から導き出された考察の正しいとすると、native の心筋細胞で発現している Rad を抑制した場合、観察される L 型  $Ca^{2+}$ 電流は交感神経刺激で増大しないことが推測される。そのため、今年度は、siRNA を用いた研究を実施した。

~ Rad-siRNA プラスミドベクターを用いた検討 ~  
 本年度は当初、Rad-siRNA プラスミドベクターを導入した native の心筋細胞を用いて研究を行っていたが、導入効率が低く、解析可能なデータを取得することが困難であった。そのため、Rad-siRNA プラスミドベクターを元に、Rad-siRNA アデノウイルスベクターを作成し、検討を行うこととした。

~ Rad-siRNA アデノウイルスベクターを用いた検討 ~  
 Rad-siRNA アデノウイルスベクターを導入した心筋細胞で観察された L 型  $Ca^{2+}$ 電流(図 2 グラフ右:Rad-siRNA アデノ)は、scramble-siRNA アデノウイルスベクターを導入した心筋細胞で観察さ

れた L 型  $Ca^{2+}$ 電流(図 2 グラフ左: scramble-siRNA アデノ)と同様に isopreterenol 投与による交感神経刺激で増大した。

以上より、L 型  $Ca^{2+}$ 電流増大現象に Rad が関与することを証明することは出来なかった。



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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 武志 (KOBAYASHI TAKESHI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 80363688