

令和 6 年 4 月 11 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07255

研究課題名（和文）心調律における細胞内小胞体カウンターイオンチャンネル（TRIC）の重要性

研究課題名（英文）Decreased cardiac pacemaking in TRIC-A knockout mice

研究代表者

村上 学（Murakami, Manabu）

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80302090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：TRIC Aチャンネル遺伝子欠損マウスにおける心拍数の低下を確認した。交感神経遮断薬などの薬理的修飾下、心電図を測定した。心臓超音波、単離心臓における心筋活動電位、心筋収縮力などを検討した。自発性心筋活動電位を測定し、心臓のペースメーカーにおける自発能の低下、さらに交感神経刺激に対する反応性の低下を確認した。TRP遺伝子改変マウスを用い、交感神経系と陽イオンチャンネルとの解析を追加報告した。（PlosONE 2022）電位依存性カルシウムチャンネルサブユニット間の新規結合部位を自らが開発した手法を用いて同定した（Sci.Rep. 2023）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細胞内カウンターイオンチャンネルであるTRICが心臓の洞結節における活動電位発生に関与することが示された。したがって、TRICチャンネルを修飾する事により、心拍数を変化させることが可能と考えられた。このことは、TRICが新規抗不整脈薬の標的になり得ることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the importance of TRIC channels on cardiac pacemaking using TRIC-A-null mice. Although systolic blood pressure (SBP) was not significantly different between wild-type (WT), and TRIC-A-null mice, heart rate (HR) was significantly lower in TRIC-A-null mice than other lines. Isoproterenol (0.3 mg/kg) increased the HR in WT mice, whereas a decreased response in HR was observed in TRIC-A-null mice, suggesting decreased sympathetic responses. Electrocardiography revealed unstable R-R intervals in TRIC-A-null mice. Furthermore, TRIC-A-null mice sometimes showed sinus pauses, suggesting a significant role of TRIC-A channels in cardiac pacemaking. In isolated atrium contraction or action potential recording, TRIC-A-null mice showed decreased response to a β -adrenergic sympathetic nerve agonist (isoproterenol), indicating decreased sympathetic responses. Our study indicates the involvement of TRIC-A channels in cardiac rhythm formation and sympathetic responses.

研究分野：循環生理

キーワード：チャンネル マウス 遺伝子 心臓

1. 研究開始当初の背景

心臓は臓器固有の調律(心調律)を有し、電氣的に制御され、自律神経による制御を受けながら、収縮と弛緩を繰り返す。心調律の異常(心房細動など)は心不全の一因である。心調律は洞結節における膜電位の周期的変化(メンブレンクロック)と、細胞内カルシウム(Ca)濃度の周期的変化(Ca クロック)の二因子により決定される。Ca クロックは細胞内に存在する小胞体から Ca を放出するリアノジン受容体と、細胞内 Ca 濃度を低下させる Na/Ca 交換機構が重要である。洞結節で過分極活性化内向きチャネル(I_f)が開くと、膜電位が浅くなり、電位依存性 L 型 Ca チャネルが開き、細胞外から Ca が流入する(I_{CaL})。流入した Ca は、より大きな Ca プールである筋小胞体から、リアノジン受容体を介する Ca 放出をうながし、細胞内 Ca 濃度がさらに上昇する。

小胞体が Ca ストアの機能を発揮するためには、細胞外からの Ca 流入(I_{CaL})、小胞体への Ca 貯蔵(小胞体 Ca-ATPase)、小胞体からの Ca 放出(リアノジン受容体)を担当する分子群と、その分子群を支援する分子機構が必要である。小胞体から陽イオンである Ca を数十ミリ秒間も持続放出させるためには、Ca 放出により発生する負電荷を中和するカウンターイオンチャネルが必須である。本研究の主題である TRIC (trimeric intracellular cation)チャネルは、小胞体における Ca 放出を補佐するカウンターイオンチャネルと考えられている(Yazawa, Takeshima, Nature 2007)。TRIC チャネルには A と B があり、リアノジン受容体を支援するチャネルは TRIC A と考えられている。TRIC A は心筋に豊富に発現するが、心調律における TRIC A チャネルの関与については報告がない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内小胞体カウンターイオンチャネル(TRIC)の心調律における重要性を解明することである。本研究は TRIC A 遺伝子欠損マウスを用いて TRIC A の生体における機能を精査する。TRIC A 欠損マウスの研究では、心調律、及び交感神経刺激に対する心拍数の変動に焦点を当てる。

3. 研究の方法

竹島が作製した TRIC A 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、心筋および洞結節における遺伝子発現(陽イオンチャネル各種)、リン酸化(CREB)を生化学的に調べる。個体を用いる利点を活かし、TRIC A 欠損による血圧、心拍数、心電図への影響を検討する。心臓の自動能を指標に洞結節を単離し、活動電位を測定する。TRIC A 欠損による活動電位への影響を調べる。

4 . 研究成果

竹島が作製した TRIC A 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、心臓の洞結節における TRIC A の発現、心筋における交感神経受容体 (受容体) の発現を比較検討した。TRIC A 遺伝子欠損マウスの心筋において、交感神経受容体 (1 受容体) の発現が増加していることを見出した。TRIC A 遺伝子欠損マウスの心筋において、交感神経刺激 (イソプロテレノール) に対する CREB リン酸化の増加が認められなかった。個体を用いる利点を生かし、TRIC A 欠損による血圧、心拍数、心電図への影響を検討した。TRIC A 欠損マウスにおける心拍数の低下を確認した。

本研究の結果から、TRIC A 欠損マウスにおいて、すでに報告されている末梢血管抵抗の増加だけでなく、別の血圧制御機構の異常が存在する可能性を示唆する。また、TRIC A 欠損心筋における交感神経作動薬に対する反応性の低下を見出した。

摘出心における心収縮

右心房を用いて自発収縮能と活動電位を測定したところ、個体での心拍数同様、摘出心臓標本においても、交感神経刺激に対する反応性の低下を確認した。

摘出洞結節における活動電位

摘出した心臓から自動能 (自発収縮) を指標として、洞房結節を単離した。TRIC A 欠損における活動電位発生頻度の低下を認めた。

以上、TRIC A チャンネルが心臓の自律能、および交感神経情報伝達に関与することを見出した。

さらにTRP遺伝子改変マウスを用い、交感神経系と陽イオンチャンネルとの解析を追加報告した。(Murakami et al., PlosONE 2022) より簡便な遺伝子発現のために、大腸菌でも、哺乳類細胞でも同じ遺伝子を発現できる系を確立した(Murakami et al., PNASnexus 2023)。陽イオンチャンネルの一種類である電位依存性カルシウムチャンネルサブユニット間の新規結合部位を自らが開発した手法を用いて同定した(Murakami et al., Sci.Rep. 2023)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Murakami M, Murakami AM, Matsuzaki Y, Sawamura D, Ohba T, Miyoshi I, Itagaki S, Sakagami H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Attenuated α -adrenergic response in calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV-knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0249932-0249932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami M, Murakami AM, Itagaki S.	4. 巻 16
2. 論文標題 A dual prokaryotic (E. coli) expression system (pdMAX)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0258553-0258553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami M, Murakami AM, Nemoto T, Ohba T, Yonekura M, Toyama Y, Tomita H, Matsuzaki Y, Sawamura D, Hirota K, Itagaki S, Asada Y, Miyoshi I.	4. 巻 17
2. 論文標題 Enhanced α -adrenergic response in mice with dominant-negative expression of the PKD2L1 channel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0261668-0261668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami AM, Naruta N, Niisawa T, Murakami M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A new dual prokaryotic (E. coli) and mammalian expression system (pgMAXs).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Biology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niisawa T, Naruta N, Murakami AM, Yonekura M, Hirota K, Itagaki S, Murakami M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Molecular cloning of medaka orexin and orexin receptor and decreased spontaneous movement in response to an orexin inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hirosaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 55-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami M, Toyama Y, Yonekura M, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Murakami AM, Nishi M, Itagaki S, Tomita H, Takeshima H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Decreased cardiac pacemaking and attenuated beta-adrenergic response in TRIC-A knockout mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plos ONE	6. 最初と最後の頁 e0244254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244254. eCollection 2020.PMID: 33347504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami M, Xu F, Ohba T, Kobayashi T, Inoue Y, Murakami AM, Miyoshi I, Ono K, Tohse N.	4. 巻 145
2. 論文標題 Requirement of the Ca ²⁺ channel beta subunit for sympathetic PKA phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 253-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami AM, Yonekura M, Nagatomo K, Niwa Y, Itagaki S, Murakami M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid method for plasmid DNA recombination (Murakami-system)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 102167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mex.2023.102167 .	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami M, Murakami AM, Yonekura M, Miyoshi I, Itagaki S, Niwa Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 A simple, dual direct expression plasmid system in prokaryotic and mammalian cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad139.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami AM, Nagatomo K, Miyoshi I, Itagaki S, Niwa Y, Murakami M.	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel binding site between the voltage-dependent calcium channel CaV1.2 subunit and Cav 2 subunit discovered using a new analysis method for protein-protein interactions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-41168-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上 学、村上アグニエシュカ、板垣 史郎
2. 発表標題 大腸菌、および真核細胞での遺伝子発現システムの開発とカルシウムチャネル研究への応用
3. 学会等名 第71回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Murakami, Agnieszka M. Murakami, Shirou Itagaki
2. 発表標題 A dual prokaryotic (E. coli) expression system (pdMAX)
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上 学、村上アグニエシュカ、板垣 史郎
2. 発表標題 大腸菌を用いた新規遺伝子発現系の構築
3. 学会等名 第52回東北生理談話会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

陽イオンチャンネル研究遂行、論文発表のため、研究期間を延長した。
相当数の論文発表を行った。

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹島 浩 (Takeshima Hiroshi) (70212024)	京都大学・薬学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------