

機関番号：23903
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790087
 研究課題名（和文） 血管平滑筋カルシウムマイクロドメインを構成する新規分子群の一分子可視化解析
 研究課題名（英文） Molecular assembly in functional Ca^{2+} microdomain in vascular smooth muscle cells
 研究代表者
 山村 寿男（YAMAMURA HISAO）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
 研究者番号：80398362

研究成果の概要（和文）：

各種臓器を形成する平滑筋にカルシウム過負荷が生じているような病態（高血圧・気管支喘息・緊張性膀胱など）においては、その細胞内で局所的なカルシウム濃度の上昇、いわゆるカルシウムスパークが頻発している。本研究によって、カルシウムスパークドメインを構成する基盤分子群の空間的位置関係を全反射蛍光顕微鏡を活用して一分子可視化解析したことは、平滑筋生理機構の解明に重要な知見を与えると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Calcium sparks occur as spontaneous calcium release in subplasmalemmal regions under physiological and pathological conditions in smooth muscle cells. Spatiotemporal imaging of molecular assembly and calcium dynamics in functional calcium microdomain using a total internal reflection fluorescence microscope enables us to elucidate its physiological impact in the regulation of membrane excitability and myogenic tone in vascular smooth muscle cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：イオンチャネル・カルシウムシグナル・平滑筋・全反射蛍光顕微鏡・高血圧

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} 動態は、時間的・空間的に多様な挙動を示し、発生機序や生理機能から Ca^{2+} スパーク、 Ca^{2+} ホットスポット、 Ca^{2+} ウェーブなどと呼ばれている（今泉ら, 2008; Cheng & Lederer, 2008）。心筋で最初に発見された Ca^{2+} スパーク（半値幅50 msで最大径1 μm 程度の一過性の局所 Ca^{2+} 濃度上昇）は、心筋興奮

収縮連関時のCICRを反映している（Cheng et al, 1993; Lederer et al, 2004）。一方、平滑筋でも細胞膜直下に位置する特定の筋小胞体（SR）上のリアノジン受容体（RyR）を介して周期的に生じる Ca^{2+} スパークが観察された（Nelson et al, 1995; Ohi et al, 2001）が、心筋とは異なり、 Ca^{2+} スパークが近傍細胞膜上の大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ （ BK_{Ca} ）チャ

ネルを活性化することにより、自発一過性外向き電流 (STOCs) を発生させて、静止膜電位を保持することに寄与している (Imaizumi et al, 1999; Jaggar et al, 2000; Imaizumi et al., 2003)。多くの血管平滑筋は、生理的条件下で自発性緊張を有し、それは静止膜電位に強く依存することが知られている。BK_{Ca}チャネル遺伝子欠損マウスでは、高血圧や膀胱過緊張の様な平滑筋収縮異常が生じること (Brenner et al, 2000; Meredith et al, 2004) から、Ca²⁺スパークとBK_{Ca}チャネル活性の機能協関は、静止膜電位を維持する重要な因子として考えられている。これまでの平滑筋Ca²⁺スパークの研究結果 (Ohi et al, 2001) から、非常に興味深いことに、Ca²⁺スパーク発生領域は、組織によって若干の差異があるものの、細胞内の特定の数ヶ所から数十ヶ所程度であることが分かっている。それは細胞膜とSRが近接した特定の微細構造に由来すると推測されているが、生細胞でそのようなCa²⁺マイクロドメインを構成する機能タンパクを単一分子レベルで可視化した例は無い。局所Ca²⁺シグナルやチャネル活性と同時に機能分子を全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡下で1分子可視化することで、それらの生理的意義を直接的に証明できると考えられる。

2. 研究の目的

血管平滑筋の興奮性は、細胞内Ca²⁺動態と密接に関係している。活動電位発生や脱分極時においては、細胞膜に発現する電位依存性Ca²⁺チャネル (VDCC) によるCa²⁺流入とそれに続くSR上のRyRを介したCa²⁺誘発性Ca²⁺遊離 (CICR) によって、細胞内Ca²⁺濃度が上昇する。一方、静止時には、SRからの自発性局所Ca²⁺遊離であるCa²⁺スパークが、近傍細胞膜のBK_{Ca}チャネルの活性化を介して、筋緊張度を低下させる。現在までに、共焦点蛍光顕微鏡を用いたCa²⁺画像解析とパッチクランプ法による電気生理測定を同時に行った結果、活動電位発生及び脱分極によるCICR機構の可視化 (Ca²⁺ホットスポットと名付けた; Imaizumi et al, 1998; Morimura et al, 2006) や静止膜電位付近におけるCa²⁺スパークの画像解析 (Ohi et al, 2001)、Ca²⁺シグナルとチャネル活性の機能連関の証明 (Yamamura et al, 2001, 2002; Hotta et al, 2007) に成功し、それらの生理的意義を解明してきた (Imaizumi et al, 1999, 2003; 今泉ら, 2008)。本研究では、生理的環境下だけでなく、病態時における血管張力調節にも大きく寄与をしていることが明らかになりつつある血管平滑筋Ca²⁺スパークに着目する。Ca²⁺スパークが細胞内の特定部位から頻発することから、この部位に構造的かつ機能的なCa²⁺マイクロドメインが形成されていると推測される。そこで、ナノスケールの分解能で画像

解析可能なTIRF顕微鏡下で、Ca²⁺スパーク発生部位に集積する分子群 (BK_{Ca}チャネルやRyRなど) を直接1分子可視化する。以上より、血管平滑筋の興奮性を規定するCa²⁺マイクロドメインの分子基盤とそれらの機能協関を明らかにし、その生理機能解明の新たな展開を目指した。

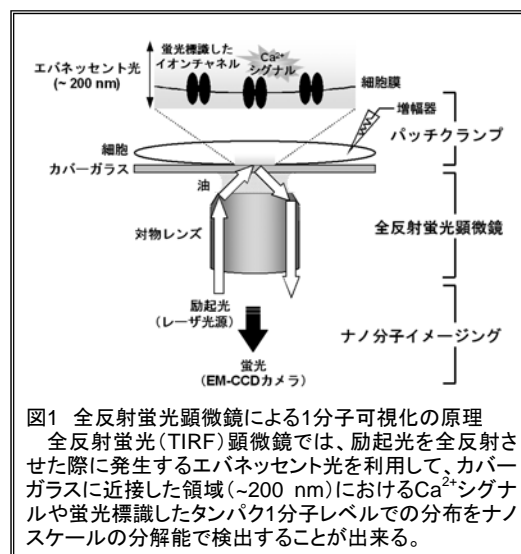
3. 研究の方法

TIRF顕微鏡システムを利用した1分子可視化技術を導入して、血管 (興奮性が非常に高く自発的に活動電位を発生する門脈と興奮性が低い胸部大動脈) から単離した平滑筋細胞で発生するCa²⁺スパークとそれを構造上・機能上構成する分子群 (BK_{Ca}チャネル、RyR、VDCC) を同時に可視化して、相互の構造的・空間的配置と機能協関を1分子レベルで画像解析した。パッチクランプ法も同時に適用して、イオンチャネル活性 (特にBK_{Ca}チャネル活性を反映するSTOCsや過分極) も記録した。機能分子群の可視化に必要な蛍光融合タンパク (標的分子のCFP/YFP融合体) は作製した。次に、細胞膜上及びその直下にCa²⁺マイクロドメインを形成する因子であると推測されている細胞膜ラフト構造 (カベオラ構造やカベオリン分子) や細胞骨格 (アクチンや微小管) を可視化して、細胞構造上の観点から血管平滑筋Ca²⁺スパークの支持基盤を新たに同定した。以上により、血管平滑筋Ca²⁺スパークを構造上・機能上規定する分子群を直接可視化して、その静止膜電位調節と血管緊張制御のより具体的かつ詳細な機構解明を行った。

4. 研究成果

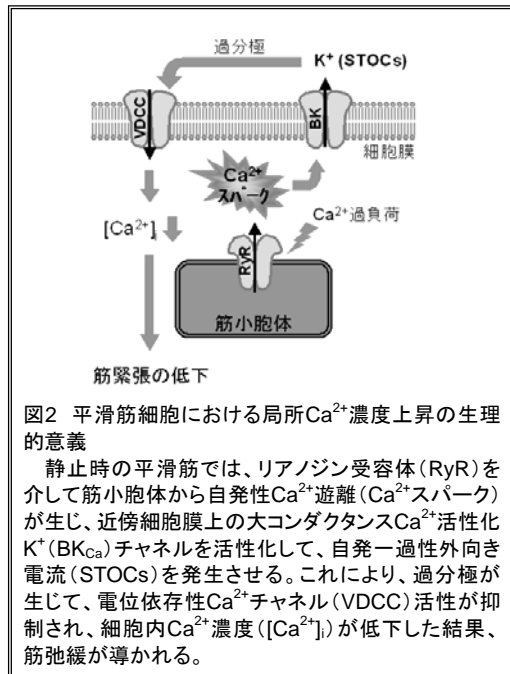
(1) TIRF 顕微鏡下における Ca²⁺スパークとイオンチャネル活性の同時測定

ウサギ門脈平滑筋から酵素処理によって単離平滑筋細胞を得た。その単一細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞膜電



流や膜電位を測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ を同時測定するため、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である $100 \mu M$ fluo-4 をパッチ電極より負荷した。血管平滑筋の静止膜電位付近である $-40 mV$ に保持電位を固定下、自発的かつ局所的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、いわゆる Ca^{2+} スパークが TIRF 領域（ガラス接着面より $200 nm$ 以内、すなわち細胞膜とその直下の領域；図 1）で観察された。また、同時記録した膜電流を解析した結果、 Ca^{2+} スパークだけが BK_{Ca} チャネル活性を反映する STOCs（図 2）と同期した。その Ca^{2+} スパークの強度と STOCs の強度はよく相関した。さらに、電流固定下では、 Ca^{2+} スパークと一過性過分極の同期も観察された。

以上より、血管平滑筋細胞の局所部位で発生する Ca^{2+} スパークのより詳細な解析とその近傍に存在する BK_{Ca} チャネルの生理的意義の解明に、TIRF 顕微鏡を用いた可視化画像解析が有用であることが分かった。



(2) Ca^{2+} スパークと RyR の分布解析

初代培養した血管平滑筋細胞で、細胞外液に $40 mM K^+$ 溶液を灌流して Ca^{2+} スパークを観察した。その後、同一細胞に $100 nM$ BODIPY FL-X ryanodine を添加し、RyR の分布解析を行った。その結果、 Ca^{2+} スパークの発生部位に RyR シグナルが集積していた。

(3) Ca^{2+} スパークと BK_{Ca} チャネルの分布解析

BK_{Ca} チャネルの細胞膜における発現分布を解析するために、ラット由来血管平滑筋型 BK_{Ca} チャネル α サブユニット (KCNMA1A；図 3) の C 末端に YFP を融合させた $BK_{Ca}\alpha$ -YFP を作製した。初代培養した血管平滑筋細胞にリポフェクション法により

$BK_{Ca}\alpha$ -YFP を一過性に遺伝子導入した。TIRF 画像解析は、遺伝子導入後、 $48\sim 72 hrs$ で行った。

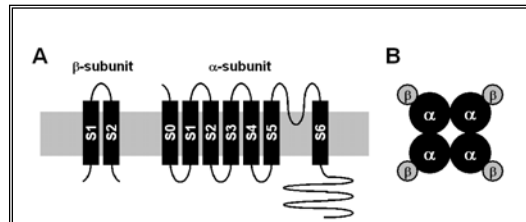


図 3 大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネルの分子構造

大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネルは、活性本体である 7 回膜貫通型タンパクの α サブユニットと機能的修飾を担う 2 回膜貫通型タンパクの β サブユニットで構成されている (A)。 α サブユニットと β サブユニットが、各 4 個の複合体を形成することで、機能的 BK チャネルを構成すると考えられている (B)。

BK_{Ca} チャネルの局在は Ca^{2+} スパーク発生部位と TIRF 面において完全に一致はしなかった。 BK_{Ca} チャネルは、 Ca^{2+} スパーク発生部位の中心から平均して $500 nm$ 程度離れていた。ただし、 Ca^{2+} スパークが局所的に広がる（半径 $1 \mu m$ 程度）ことによって、近傍の細胞膜に分布する BK_{Ca} チャネルの活性が惹起されたと考えられる。

(4) Ca^{2+} スパークとカベオリン分子の分布解析

まず、細胞膜ラフト構造の一種であるカベオラを構成するカベオリン分子（ヒト由来 Cav1）の C 末端に CFP を蛍光標識した Cav1-CFP を作製した。初代培養した血管平滑筋細胞に、Cav1-CFP をリポフェクション法により一過性に遺伝子導入した。Cav1 は、 Ca^{2+} スパーク発生部位付近に局在していた。

(5) BK_{Ca} チャネルと Cav1 の分子間相互作用

TIRF 顕微鏡下での蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法により、 BK_{Ca} チャネルの α サブユニットと Cav1 の分子間相互作用を検討した。その結果、一部の BK_{Ca} チャネルが、Cav1 と分子間相互作用してカベオラに集積することが示唆された。

細胞膜直下で起こる局所 Ca^{2+} 変動は、興奮収縮連関の引き金となることや生体の恒常性維持、病態時における帰還機構としても重要であると認識されている。本研究によって、限局された部位における Ca^{2+} 動態を直接可視化したことは、平滑筋生理機構の解明に重要な知見を与えると考えられる。血管平滑筋細胞に再構築した BK_{Ca} チャネルおよびそれと機能連関する分子群や Ca^{2+} スパークを TIRF 顕微鏡下で同時可視化した結果、カベオラを

構造基盤として集積し、機能的に共役する分子群の空間的位置関係が定量的に明らかになった。Ca²⁺スパークが効率的に発生するようなCa²⁺マイクロドメイン(トランスポートソーム; 図4)を構成すると考えられている分子集積及びそれらの相互作用による機能協働を検討する上でも、限局した領域を観察することが出来るTIRF顕微鏡を用いた1分子可視化技術が特段に寄与すると考えられる。Ca²⁺マイクロドメインの構造的かつ機能的な分子基盤が明らかとなれば、血管平滑筋におけるCa²⁺スパークの生理的意義の更なる解明と、それらを基盤としたイオンチャネル創薬や循環器系疾患治療法の開拓につながると考えられる。

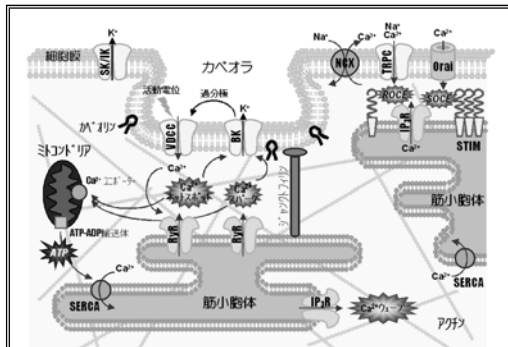


図4 平滑筋における細胞膜マイクロドメインと細胞内小器官によるCa²⁺動態制御機構とイオンチャネルの機能連関の概念図

細胞膜ラフト構造であるカベオラにイオンチャネルなどの機能タンパクが集積し、近接する筋小胞体との間で、Ca²⁺スパークなどの局所Ca²⁺動態を形成する可能性が示唆されている。局所で濃度上昇したCa²⁺は、筋小胞体Ca²⁺ポンプ(SERCA)やCa²⁺ユニポーターによって筋小胞体やミトコンドリアに取り込まれる。Ca²⁺動態制御には、受容体作動性Ca²⁺流入(ROCE)や容量依存性Ca²⁺流入(SOCE)を担う陽イオンチャネル(TRPC, Orai, STIM)、Na⁺/Ca²⁺交換体(NCX)も深く関与している。BK_{Ca}、大コンダクタンсCa²⁺活性化K⁺チャネル; SK_{Ca}/IK_{Ca}、小・中コンダクタンсCa²⁺活性化K⁺チャネル; VDCC、電位依存性Ca²⁺チャネル; RyR、リアノジン受容体; IP₃R、イノシトール-1,4,5-三リン酸受容体。(今泉ら、2008より改変)

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8件)

- ① Ohya S, Niwa S, Yanagi A, Fukuyo Y, Yamamura H, Imaizumi Y. Involvement of dominant-negative, spliced variants of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, K_{Ca}3.1 in immune function of lymphoid cells. *J Biol Chem*, in press. 【査読有】
- ② Yamazaki D, Kito H, Yamamoto S, Ohya S, Yamamura H, Asai K, Imaizumi Y.

Contribution of Kir2 potassium channels to ATP-induced cell death in brain capillary endothelial cells and reconstituted HEK293 cell model. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300:C75-86 (2011). 【査読有】

- ③ Ohya S, Fujimori T, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Novel spliced variants of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺-channel β_2 -subunit in human and rodent pancreas. *J Pharmacol Sci*, 114:198-205 (2010). 【査読有】
- ④ Funabashi K, Fujii M, Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Contribution of chloride channel conductance to the regulation of resting membrane potential in chondrocytes. *J Pharmacol Sci*, 113:94-9 (2010). 【査読有】
- ⑤ Funabashi K, Ohya S, Yamamura H, Hatano N, Muraki K, Giles W, Imaizumi Y. Accelerated Ca²⁺ entry by membrane hyperpolarization due to Ca²⁺-activated K⁺ channel activation in response to histamine in chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298:C786-97 (2010). 【査読有】
- ⑥ Murata H, Hotta S, Sawada E, Yamamura H, Ohya S, Kita S, Iwamoto T, Imaizumi Y. Cellular Ca²⁺ dynamics in urinary bladder smooth muscle from transgenic mice overexpressing Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Pharmacol Sci*, 112:373-7 (2010). 【査読有】
- ⑦ Matsushita Y, Ohya S, Suzuki Y, Itoda H, Kimura T, Yamamura H, Imaizumi Y. Inhibition of Kvl.3 potassium current by phosphoinositides and stromal-derived factor-1 α in Jurkat T cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296:C1079-85 (2009). 【査読有】
- ⑧ Ohno A, Ohya S, Yamamura H, Imaizumi Y. Regulation of ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release in vas deferens smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci*, 110:78-86 (2009). 【査読有】

[学会発表] (計7件)

- ① Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Molecular assembly in functional Ca²⁺ microdomain in vascular smooth muscle cells. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (WorldPharm 2010). July 22, 2010. Copenhagen, DENMARK.
- ② 山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋細胞のCa²⁺マイクロドメインを構成する分子集積群の可視化解析. 日本薬学会第130年会. 2010年3月28日. 岡山.
- ③ 山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋Ca²⁺スパークドメインを構成する分子集積群の可視化解析. 第83回日本薬理学会年会. 2010年3月16日. 大阪.
- ④ 山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑

筋 Ca^{2+} スパークドメインに集積する分子群の一分子可視化解析. 特定領域研究「生体膜トランスポートゾームの分子構築と生理機能」平成21年度第1回班会議. 2009年8月26~27日. 熊本.

- ⑤ 山村寿男, 大矢進, 今泉祐治. 血管平滑筋カルシウムマイクロドメインを構成する分子群の一分子可視化解析. 生体機能と創薬シンポジウム 2009. 2009年8月26日. 東京. 【招待講演】
- ⑥ Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. TIRF imaging of Ca^{2+} spark microdomain in vascular smooth muscle cells. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). July 29, 2009. Kyoto, JAPAN.
- ⑦ Yamamura H, Ohya S, Imaizumi Y. Molecular assembly in Ca^{2+} microdomain of spark sites in vascular smooth muscle cells. Satellite Symposium of the IUPS2009 “Post-genomic Advances in the Physiology of Smooth Muscle” (ISSM2009). July 23, 2009. Nagoya, JAPAN.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用

発明者: 今泉祐治, 藤井将人, 大矢進, 山村寿男

権利者: 公立大学法人名古屋市立大学, 有限会社チャネロサーチテクノロジー

種類: 特許

番号: K10-191-JP

出願年月日: 平成22年6月28日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ysg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 寿男 (YAMAMURA HISAO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 80398362

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし