

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790236

研究課題名（和文）エンドセリン受容体作動性 TRPC チャンネルの機能制御機構及び病態生理的役割の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms and pathophysiological role of endothelin receptor-operated TRPC channels.

研究代表者

堀之内 孝広（HORINOUCI TAKAHIRO）

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20307771

研究成果の概要（和文）：本研究では、エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) 作動性チャンネルとして機能する TRPC チャンネルの機能制御機構について検討した。その結果、(1) TRPC3 及び TRPC6 が ET_AR 作動性 Ca²⁺チャンネルとして機能すること、(2) G_{q/11} タンパク質、ホスホリパーゼ C、Src、PI3 キナーゼ、カルモジュリン (CaM) 及び CaM/IP₃ 受容体結合ドメインが TRPC3/6 を介した受容体作動性 Ca²⁺流入に関与すること、(3) プロテインキナーゼ A による TRPC6 の 28 番目のセリン残基のリン酸化によって、TRPC6 の機能が抑制されること、を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to elucidate transient receptor potential canonical (TRPC) channels functioning as endothelin type A receptor (ET_AR)-operated Ca²⁺ channel and its regulatory mechanism. The results obtained from molecular pharmacological studies indicate that (1) both TRPC3 and TRPC6 contribute to ET_AR-operated Ca²⁺ entry, (2) G_{q/11} protein, phospholipase C, Src, phosphoinositide 3-kinase, calmodulin (CaM), and CaM/IP₃ receptor binding domain at the C terminus of TRPC3 and TRPC6 are involved in ET_AR-mediated Ca²⁺ entry via TRPC3 and TRPC6, and (3) TRPC6 is negatively regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser²⁸.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：エンドセリン受容体・TRPC チャンネル・受容体作動性 Ca²⁺流入・ストア作動性 Ca²⁺流入・カルモジュリン・プロテインキナーゼ A・リン酸化

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) がエンドセリン-1 (ET-1) によって活性化されると、一過性及び持続性の細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 上昇反応が生じる。一般に、一過性の [Ca²⁺]_i 上昇反応は小胞体からの Ca²⁺の遊離、一方、持続性の [Ca²⁺]_i 上昇反応は、ストア作動性 Ca²⁺チャンネル (store-operated Ca²⁺ channel: SOCC) や受容体作動性 Ca²⁺チャンネル (receptor-operated Ca²⁺ channel: ROCC) を介した細胞外からの Ca²⁺流入によるものと考えられている。最近、SOCC や ROCC の実体分子として、電位非依存性チャンネルとして機能する 7 種類の TRPC (transient receptor potential canonical) チャンネルアイソフォーム (TRPC1-7) が単離・同定されたが、ET_AR 作動性 Ca²⁺流入に関与する TRPC の種類及びその機能制御機構については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ET_AR 作動性 Ca²⁺チャンネルとして機能する TRPC アイソフォームを同定し、その機能制御機構を解明することである。

3. 研究の方法

ET_AR と野生型 TRPC もしくは変異型 TRPC を安定的に共発現する HEK293 細胞を作製し、細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定実験、共焦点レーザー顕微鏡を用いた TRPC の局在の可視化、ビオチンラベリング法を用いた細胞膜 TRPC 発現量の解析及び in vitro kinase assay を行った。

4. 研究成果

ROCC を介した受容体作動性 Ca²⁺流入のみを評価するため、Ca²⁺-ATPase 阻害薬である thapsigargin を用いて SOCC を活性化させた条件下、ET-1 による ET_AR 刺激を行った。その結果、ET_AR と GFP 融合 TRPC を共発現する HEK293 細胞において、TRPC3 及び TRPC6 が、ET-1 によって惹起される受容体作動性 Ca²⁺流入に関与していることが明らかになった。ま

た、これらチャンネルの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化したところ、TRPC3 は主に細胞質、一方、TRPC6 は細胞膜に局在していることを見出した。

次に、阻害薬や TRPC 変異体を用いて、TRPC の活性化機構を検討したところ、ET_AR 刺激により惹起される TRPC3 及び TRPC6 を介した受容体作動性 Ca²⁺流入に、G_{q/11} タンパク質、ホスホリパーゼ C、Src、PI3 キナーゼ、カルモジュリン (CaM) が関与していることが明らかになった。また、TRPC の C 末端に存在する CaM/IP₃ 受容体結合 (CIRB) ドメインを欠損させると、TRPC3 及び TRPC6 を介した受容体作動性 Ca²⁺流入が消失することを見出した。ビオチンラベリング法を用いて細胞膜に局在する CIRB 欠損 TRPC 変異体の発現量を測定したところ、CIRB 欠損 TRPC 変異体は細胞膜に発現していることが明らかになった。即ち、CIRB 欠損 TRPC 変異体における受容体作動性 Ca²⁺流入の消失は、細胞膜 TRPC 発現量の減少によるものではなく、CIRB ドメインと CaM との相互作用の欠失によるものであると考えられた。

さて、受容体作動性 TRPC6 のチャンネル活性は、プロテインキナーゼ C やプロテインキナーゼ G といった様々なタンパク質リン酸化酵素によるリン酸化によって制御されることが報告されている。しかしながら、プロテインキナーゼ A (PKA) による TRPC6 の機能制御については不明な点が多い。そこで、本研究では、PKA による TRPC6 のリン酸化が TRPC6 を介した ET_AR 作動性 Ca²⁺流入に及ぼす影響を解析すると共に、PKA によってリン酸化される TRPC6 のアミノ酸の同定を試みた。

ET_AR 刺激によって誘発される TRPC6 を介した受容体作動性 Ca²⁺流入は、アデニル酸シクラーゼ活性化薬 (forskolin)、PKA 活性化薬 (8-Br-cAMP) 及び非選択的ホスホジエステラーゼ阻害薬 (papaverine) の前処理によって顕著に抑制され、一方、PKA 阻害薬 (Rp-8-Br-cAMP) の前処理によって増強された。TRPC6 の点変異体を用いた [Ca²⁺]_i 測定実

験において, forskolin 及び papaverine による ET_AR 作動性 Ca²⁺流入の抑制は, TRPC6 の細胞内 N 末端領域に存在する 28 番目のセリン (Ser²⁸) をアラニンに置換することによって抑制された。Phos-tag™ biotin を用いた in vitro kinase assay において, PKA による TRPC6 のリン酸化は, TRPC6 の Ser²⁸ 及び 69 番目のトレオニン (Thr⁶⁹) をアラニンに置換することによって抑制された。これらの結果から, TRPC6 を介した ET_AR 作動性 Ca²⁺流入は, PKA によって抑制的に制御されること, また, この抑制性機能制御において重要な役割を担っている PKA リン酸化部位は, Thr⁶⁹ ではなく, Ser²⁸ であること, が明らかになった。

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 5 件)

1. Horinouchi, T., Higa, T., Aoyagi, H., Nishiya, T., Terada, K., Miwa, S.: Adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca²⁺ entry mediated via transient receptor potential canonical 6 channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 340, 143-151 (2012). 査読有.
2. Horinouchi, T., Terada, K., Higa, T., Aoyagi, H., Nishiya, T., Suzuki, H., Miwa, S.: Function and regulation of endothelin type a receptor-operated transient receptor potential canonical channels. *J. Pharmacol. Sci.*, 117, 295-306 (2011). 査読有.
3. Higa, T., Horinouchi, T., Aoyagi, H., Asano, H., Nishiya, T., Nishimoto, A., Muramatsu, I., Miwa, S.: Endothelin type B receptor-induced sustained Ca²⁺ influx involves G_{q/11}/phospholipase C-independent, p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Pharmacol. Sci.*,

113, 276-280 (2010). 査読有.

4. Nishimoto, A., Lu, L., Hayashi, M., Nishiya, T., Horinouchi, T., Miwa, S.: Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 391, 1616-1622 (2010). 査読有.
5. Horinouchi, T., Asano, H., Higa, T., Nishimoto, A., Nishiya, T., Muramatsu, I., Miwa, S.: Differential coupling of human endothelin type A receptor to G_{q/11} and G₁₂ proteins: the functional significance of receptor expression level in generating multiple receptor signaling. *J. Pharmacol. Sci.*, 111, 338 – 351 (2009). 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

1. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 青柳裕之, 寺田晃士, 西屋禎, 三輪聡一: PKA リン酸化によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャネルの抑制性制御機構. 第 85 回日本薬理学会年会 (国立京都国際会館, 京都), (2012 年 3 月 14 日 ~ 16 日).
2. 堀之内孝広, 寺田晃士, 比嘉綱己, 青柳裕之, 西屋禎, 三輪聡一: エンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャネルの抑制性機能制御に関与する PKA リン酸化部位の同定. 第 39 回薬物活性シンポジウム (福岡大学 福大メディカルホール, 福岡), (2011 年 11 月 21 日 ~ 22 日).
3. 堀之内孝広・比嘉綱己・青柳裕之・西屋禎・寺田晃士・三輪聡一: Phos-tag™ biotin を用いたエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャネルの PKA によるリン酸化部位の同定. 第 62 回日本薬理学会北部会 (江陽グランドホテル, 仙台), (2011 年 9 月 29 日 ~ 30 日).
4. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 西屋禎, 青柳裕之, 鈴木□浩之, 西本新, 三輪聡一:

- アデニル酸シクラーゼ/cAMP/PKA 系によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの負の制御機構. 第 84 回日本薬理学会年会 (震災のため, 誌上開催), (2011 年 3 月 22 日~24 日).
5. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 西屋禎, 青柳裕之, 鈴木浩之, 西本新, 三輪聡一: エンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの多様な機能制御機構. 第 40 回日本心脈管作動物質学会 (かがわ国際会議場・サンポートホール高松, 香川), (2011 年 2 月 4 日~5 日).
 6. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 青柳裕之, 鈴木浩之, 西屋禎, 西本新, 三輪聡一: cAMP/PKA 系によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの抑制性機能制御. 第 61 回日本薬理学会北部会 (札幌コンベンションセンター, 札幌), (2010 年 9 月 10 日).
 7. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西本新, 西屋禎, 三輪聡一: TRPC3 及び TRPC6 チャンネルを介したエンドセリン A 型受容体作動性 Ca^{2+} 流入の分子機構. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪国際会議場, 大阪), (2010 年 3 月 16 日~18 日).
 8. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西屋禎, 西本新, 三輪聡一: 蛍光タンパク質再構成法によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC3/6 チャンネルの分子間相互作用の可視化. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪国際会議場, 大阪), (2010 年 3 月 16 日~18 日).
 9. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西本新, 西屋禎, 三輪聡一: エンドセリン A 型受容体作動性 Ca^{2+} 流入に関する TRPC チャンネルの活性化機構. 第 19 回日本循環薬理学会 (京都大学百周年時計台記念館, 京都), (2009 年 11 月 27 日).
 10. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西本新, 西屋禎, 三輪聡一: エンドセリン A 型受容体作動性 TRPC チャンネルの活

性制御機構. 第 37 回薬物活性シンポジウム (東北薬科大学, 宮城県, 仙台), (2009 年 10 月 9 日~10 日).

11. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西本新, 西屋禎, 三輪聡一: 蛍光タンパク質再構成法を用いたエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC チャンネルの分子間相互作用の可視化. 第 60 回日本薬理学会北部会 (富山国際会議場, 富山), (2009 年 9 月 26 日).
12. 堀之内孝広, 比嘉綱己, 朝野拓史, 西本新, 西屋禎, 三輪聡一: エンドセリン A 型受容体作動性 Ca^{2+} 流入に関する TRPC チャンネルの同定と機能解析. 第 2 回北大若手研究者交流会 (北海道大学, 札幌), (2009 年 7 月 17 日).

[その他]

ホームページ等

<http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀之内 孝広 (HORINOUCI TAKAHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20307771

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: