

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790305

研究課題名(和文)心房特異的脂質結合蛋白質を介したカルシウムチャネルシグナロソームの制御

研究課題名(英文)Atrial-specific regulation of Ca²⁺ channel signalosome by a lipid-binding protein

研究代表者

中瀬古 寛子 (IZUMI-NAKASEKO, Hiroko)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80408773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：脂質結合蛋白質STARD10は心房特異的にL型Ca²⁺チャネルに結合している。心房のカルシウムチャネルシグナロソーム制御を明らかにするため、野生型とSTARD10ノックアウトマウスの心房筋組織標本および単離心房細胞を解析した。ノックアウトマウスの心房筋組織標本は野生型に比べ、伸展刺激に対し拍動数を増加し収縮張力の発達は減少した。またその心房細胞のCaV1.2型のL型Ca²⁺チャネル電流の密度と不活性化に対する細胞内Ca²⁺感受性は増大した。これらの結果よりSTARD10はL型Ca²⁺チャネルのCa²⁺感受性を抑制的に制御し、その結果心房の伸展刺激への反応性を制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A lipid-binding protein, STARD10 is expressed and bound to L-type Ca²⁺ channel in the atrium but not in the ventricle. To clarify the Ca²⁺ channel signalosome in the atria, we analyzed the atria and their myocytes in vitro which are isolated from wild-type and STARD10 knock-out mice. The loss of STARD10 increased the current density of CaV1.2-type L-type Ca²⁺ currents with the enhancement of Ca²⁺-dependent inactivation in the atrial myocytes, but it did not change the expression of alpha1 subunit CaV1.2. The response of the isolated atria to a mechanical stretch was an increase in the contraction force in wild-type mice, while it was an increase in the rate of its spontaneous firing with suppression of development in the contraction force in knock-out mice. The results suggested that STARD10 may regulate Ca²⁺-dependent inactivation of atrial L-type Ca²⁺ current, and that the mechanism may contribute the atrial contraction force development in response to mechanical stretch.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：心房 L型Ca²⁺チャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 心房細動においてL型Ca²⁺チャネル電流の減少が電気的リモデリング、機械的リモデリングの中心的な現象であり、正のフィードバックによって心房細動の維持に働く。よって心房細動の予防と抑制にはL型Ca²⁺チャネル電流の維持が重要であると考えられる。

(2) L型Ca²⁺チャネルCa_v1.2のC末端領域に結合するタンパク質として同定された脂質結合タンパク質STARD10は心臓では心房特異的に発現する。

(3) 脂質結合タンパク質がイオンチャネルに直接相互作用する報告は新規である。

2. 研究の目的

(1) 心房筋特異的なL型Ca²⁺チャネルの電流密度の維持に関する知見を得るため、脂質結合タンパク質STARD10を介したL型Ca²⁺チャネルの機能および発現調節を明らかにする。

(2) 心房筋細胞のCa²⁺動態を空間的・分子的に捕捉し、より精密な細動モデル構築に貢献し、臨床における心房細動の薬物治療効果を予測する上での重要な情報を得る。

3. 研究の方法

(1) 我々の研究室で確立した全身のSTARD10ノックアウト(KO)マウスと野生型マウスより、酵素によって洞房結節、心房筋、心室筋から急性単離した心筋細胞を用いて、パッチクランプ法によってL型Ca²⁺チャネルの電流を解析した。

単離心房筋細胞とパッチクランプ法によってL型Ca²⁺チャネルの電流密度およびチャネル動態を解析した。細胞内Ca²⁺は細胞内液に含まれるキレート剤によってバッファリングした。バッファリングのa) 弱い1 mM EGTA、b) 強い14 mM EGTA、5 mM BAPTA条件を用いた。

対照としてSTARD10の発現がない心室筋の急性単離細胞を同様の方法で解析した。バッファリングのc) 弱い0.5 mM EGTA、d) 強い14 mM EGTA、5 mM BAPTA条件を用いた。静止期の細胞内Ca²⁺濃度は100 nMとした。

野生型の心室筋細胞を用いて、細胞内のCa²⁺バッファリングによる電流密度の制御を明らかにするため、細胞内Ca²⁺により直接あるいは間接的に制御される脱リン酸化およびリン酸化酵素の阻害剤の効果を検討した。Ca²⁺依存性の脱リン酸化酵素PP2Bの抑制剤cyclosporin Aを0.1, 1 μM、心筋細胞に多く発現するCa²⁺抑制性アデニル酸シクラーゼAC5およびAC6の下流にあるリン酸化酵素PKAの阻害剤KT5720 3 μM、PKC阻害剤Gö6976

0.1, 1 μM、筋小胞体より放出されるCa²⁺トランジェントの関与を除くためにthapsigargin 3 μM、神経細胞でCa²⁺依存性のエンドサイトーシスに関与が報告されるdynaminの阻害ペプチドDIP 50 μMの作用を検討した。また細胞膜に発現するL型Ca²⁺チャネルのチャネル密度を明らかにするため、チャネルのゲート電流を測定した。

(2) KOマウスと野生型マウスの単離心房筋をマグナス中に吊りし、Krebs-Henseleit溶液(2.5 mM Ca²⁺含む)、37 °C、95% O₂/5% CO₂の通気条件下で、静止張力を0.05~0.6 gに加え、伸展刺激に対する自動能(心房拍動数)および心房筋収縮力の変化を解析した。

(3) 単離心房筋細胞に0.2 mM Ca²⁺を含むTyrode溶液中でfluo-4 AMを3 μM、30分負荷し、2 mM Ca²⁺を含むTyrode溶液中で細胞内Ca²⁺トランジェントの測定を行った。

(4) 心房と心室を摘出し、L型Ca²⁺チャネルのポア部分を形成する α_1 サブユニットCa_v1.2のタンパク質の発現量をwestern blotで解析した。

4. 研究成果

(1) 単離心房筋の収縮は脱分極によってL型Ca²⁺電流の活性化によって誘起された。心筋細胞の収縮はa)条件下では維持され、b)条件下では抑制されたため、後者では細胞内のCa²⁺上昇は抑制されたと考えられた。次にKOマウスと野生型マウス由来心房筋細胞のL型Ca²⁺チャネル電流を比較すると、a)の条件下では電流密度に差はないが、b)ではKOマウスにおいて電流密度が有意に約1.4倍増加した。また細胞内Ca²⁺バッファリングによる電流密度の増加はKOマウスでのみ観察され、野生型では見られなかった。更にKOマウスではa)でL型Ca²⁺電流のピークに達する時間が野生型より短縮する傾向であることから、

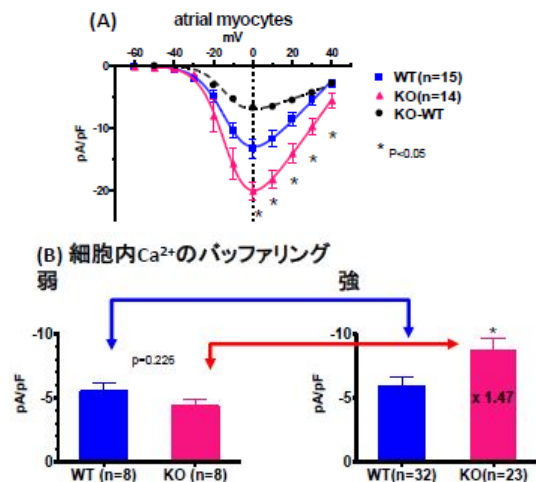


図1 心房筋細胞のL型Ca²⁺チャネル電流の電流密度 (A)電流-電位曲線 (B)細胞内Ca²⁺のバッファリングの強度による電流密度の変化

細胞内 Ca^{2+} による不活性化が野生型に比較し促進していることが示唆された。よって KO マウスの心房筋では細胞内 Ca^{2+} に依存性抑制への感度が増強していることが示された。

心室筋細胞における L 型 Ca^{2+} チャンネル電流の密度は KO マウスと野生型において、c), d) のいずれでも差は見られなかった。また心室筋では c) に比較して d) で電流密度の増大が見られた。よって心室筋細胞における細胞内 Ca^{2+} に対する電流応答の差異は STARD10 の欠損によること、また KO マウスの心房筋の L 型 Ca^{2+} チャンネル電流の細胞内細胞内 Ca^{2+} に対する反応は心室筋に類似していることが示唆された。

c) と d) の条件では、d) における強度の細胞内 Ca^{2+} バッファリングにより電流密度は増加するが、ゲート電流の解析により細胞膜にあるチャンネル密度に差は見られなかった。PKA、PKC および PP2B の阻害剤の効果は見られなかった。また thapsigargin による筋小胞体の Ca^{2+} ストアの枯渇は電流の Ca^{2+} 依存性不活性化を減少させたが、電流密度は変化させなかった。一方 DIP 処理は c) の条件下において電流密度を増加させた。c) と d) の条件でチャンネル密度に差がないことから、チャンネルのポアを形成する α_1 サブユニットではなく、dynamin によるエンドサイトーシスが報告される L 型 Ca^{2+} チャンネルの修飾サブユニットサブユニットを介した変化ではないかと推測された。

(2) 野生型マウスの心房筋は静止張力の増大に対し、拍動数は約 340 bpm でほぼ変化せず、収縮張力が約 0.12 g から 0.30 g まで発達した。一方、KO マウスは静止張力の増大に対し、拍動数が約 390 bpm に増加し、その増加は野生型マウスに対して有意差があった。一方、収縮張力は約 0.24 g までしか発達せず、その減少は有意差があった。単離心房筋において、洞房結節の変化が収縮張力の変化に対し優位であること、マウス心筋はネガティブステアケースを示し、収縮頻度の増加に対し収縮張力が減少する性質をもつことから、KO マウスでは伸展刺激に対し、拍動数が増加する性質があり、その結果、収縮張力が減少したと考えられた。また (1) の結果

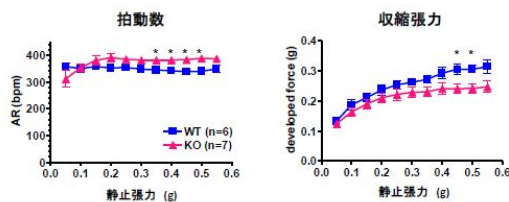


図2 静止張力の負荷に対する摘出心房筋の自動能(拍動数)と収縮張力の変化

より L 型 Ca^{2+} チャンネル電流の細胞内 Ca^{2+} 依存性不活性化が KO で亢進した結果、活動電位の再分極が速まり、拍動数の上昇につながっ

たとえられた。

(3) 単離心房筋細胞内の Ca^{2+} トランジエントの 50% 持続時間を比較したところ、KO マウスで持続時間が延長する傾向が見られた。

(4) L 型 Ca^{2+} チャンネルの $Ca_v1.2$ タンパク質の発現量に変化は見られなかった。

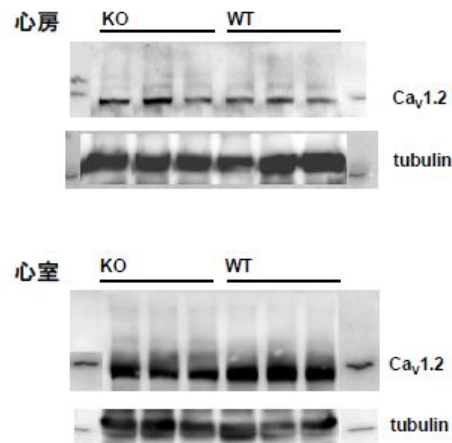


図3 心房筋L型 Ca^{2+} チャンネル $Ca_v1.2$ の α_1 サブユニットのウェスタンブロット

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2件)

中瀬古(泉)寛子、中村裕二、曹新、小原浩、安東賢太郎、杉山篤、超小型ミニブタの開発経緯と病態モデル・評価系としての応用例、J-ISCIP 会誌「心血管薬物療法」、査読無、Vol. 2、2014、pp. 43-48
Ito M, Yamanashi Y, Toyoda Y, Izumi-Nakaseko H, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Suzuki H, Takada T, Adachi-Akahane S, Disruption of *Stard10* gene alters the PPAR γ -mediated bile acid homeostasis, *Biochimica et biophysica acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 査読有、Vol. 1831, No2, 2013, pp. 459-468
DOI: 10.1016/j.bbailip.2012.11.008

[学会発表](計29件)

赤羽悟美、中瀬古(泉)寛子、心筋細胞における L 型 Ca^{2+} チャンネルの Ca^{2+} シグナルクロストークを介した制御機構、第 87 回日本薬理学会大会 シンポジウム『膜電位依存性 Ca チャンネルの時間・空間的制御の分子機構』、仙台、2014/03/20
中瀬古(泉)寛子、中村裕二、曹新、上田直也、小原浩、山崎有希子、安東賢太郎、杉山篤、E-4031 の電気生理学的特徴および不整脈作用の評価：八

ロセン麻酔および慢性房室ブロック犬モデルでの検討、第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014/03/20
曹新、中村裕二、小原浩、山崎有希子、中瀬古(泉)寛子、安東賢太郎、杉山篤、アマンタジンの電気薬理学的作用：ハロセン麻酔犬モデルでの評価、第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014/03/20
小原浩、中村裕二、曹新、横山浩史、中瀬古(泉)寛子、安東賢太郎、村越伸行、佐藤明、青沼和隆、高原章、池田隆徳、杉山篤、腎交感神経除去術の慢性房室ブロック犬の心血管系に対する作用：シルニジピンおよびアミオダロンとの比較、第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014/03/20
安東賢太郎、中村裕二、星合清隆、曹新、小原浩、中瀬古(泉)寛子、高原章、杉山篤、ST 部分低下により引き起こされた偽性 QT 間隔延長作用、第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014/03/20
中瀬古(泉)寛子、「単身赴任+子育て+親の援助を年数回での研究生活、第 91 回日本生理学会大会 男女共同参画推進委員会シンポジウム『安定した研究者ライフの実現に向けて』、鹿児島、2014/03/17
中瀬古(泉)寛子、中村裕二、曹新、小原浩、山崎有希子、上田直也、安東賢太郎、杉山篤、Effects of Selective Ikr Channel Blockade by E-4031 on Ventricular Electro-Mechanical Relationship in the Halothane-Anesthetized Dogs、第 5 回安全性薬理研究会学術年会、東京、2014/02/15
Adachi-Akahane S, Izumi-Nakaseko H, Sugiyama A, Ishikawa Y, Cross-communication between the L-type Ca^{2+} channel and α_1 -adrenergic receptor/adenylyl cyclase/cAMP pathway in mouse ventricular myocytes. 第 90 回日本生理学会大会、東京、2013/03/27
赤羽悟美、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、心筋興奮収縮連関における L 型 Ca^{2+} チャンネルの Ca^{2+} 依存性調節機構、第 86 回日本薬理学会年会、福岡、2013/03/22
中瀬古(泉)寛子、本田淳、心房の伸展刺激に対する反応制御機構の解明、第 141 回東邦医学会例会、東京、2013/02/08
伊藤雅方、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、赤羽悟美、Steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer (START) domain containing 10 (STARD10) is involved in the positive modulation of PPAR

mediated gene regulation、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012/12/13
赤羽悟美、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、心筋 L 型 Ca^{2+} チャンネルの Ca^{2+} 依存性調節機構、生理研研究会『イオンチャンネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解』、愛知、2012/11/21
Maruyama H, Izumi-Nakaseko H, Ito M, Sugiyama A, Adachi-Akahane S, Contribution of fatty acid metabolism to the regulation of cardiac pacemaker activity、第 29 回 国際心臓研究会 日本部会総会、福岡、2012/10/26
Izumi-Nakaseko H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S, The difference of ion selectivity between atrial L-type Ca^{2+} channel α_1 subunits, $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ 、第 29 回 国際心臓研究会 日本部会総会、福岡、2012/10/26
伊藤雅方、山梨義英、豊田優、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、鈴木洋史、高田龍平、赤羽悟美、脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節への関与、第 126 回日本薬理学会関東部会、東京、2012/07/14
伊藤雅方、山梨義英、豊田優、高田龍平、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、鈴木洋史、赤羽悟美、脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節への関与について、第 7 回トランスポーター研究会年会、京都、2012/06/09
中瀬古(泉)寛子、杉山篤、赤羽悟美、Uncharged amino acids at ascending limbs of the pore region are involved in the Ca^{2+} selectivity of the L-type Ca^{2+} channel $Ca_v1.3$ 、第 89 回日本生理学会年会、松本、2012/03/29
Izumi-Nakaseko H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S, L-type Ca^{2+} channel (LTCC) activity and the response to beta-AR stimulation are negatively regulated by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR) in cardiac myocytes. 第 85 回日本薬理学会年会、京都、2012/03/14
丸山 博子、中瀬古(泉)寛子、伊藤 雅方、杉山 篤、赤羽 悟美、心房の自動能制御に脂肪酸が及ぼす影響、第 85 回日本薬理学会年会、京都、2012/03/14
中瀬古(泉)寛子、リシャン ウル クライシュ、心房筋における脂質結合タンパク質を介した L 型 Ca^{2+} チャンネルの新規な制御機構、第 139 回東邦医学会例会、東京、2012/02/10
21 中瀬古(泉)寛子、杉山篤、赤羽悟美、L 型 Ca^{2+} チャンネルのポア入り口付近のアミノ酸が Ca^{2+} 選択性に重要である、

- 平成 23 年度「筋生理の集い」、東京、2011/12/17
- 22 伊藤雅方、山梨義英、高田龍平、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、鈴木洋史、赤羽悟美、脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節における役割、日光シンポジウム、日光、2011/12/17
- 23 伊藤雅方、山梨義英、高田龍平、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、鈴木洋史、赤羽悟美、脂質転移タンパク質 Stard10 欠損マウスにおける胆汁分泌と再吸収の変化、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011/12/14
- 24 Izumi-Nakaseko H、Ito M、Maruyama H、Sugiyama A、Adachi-Akahane S、A lipid binding protein participates in the regulation of Ca²⁺ signaling through modulation fo L-type Ca²⁺ channel Cav1.2 function in atria、The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section、東京、2011/12/03
- 25 Maruyama H、Ito M、Izumi-Nakaseko H、Sugiyama A、Adachi-Akahane S、Involvement of lipid binding protein in the modulation of parasympathetic receptor signaling in atria、The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section、東京、2011/12/02
- 26 Izumi-Nakaseko H、Sugiyama A、Adachi-Akahane S、Cross-regulation between Ca²⁺ and beta-AR signaling of LTCC in atrial and ventricular myocytes、7th Joint Seminar on Biomedical Sciences、HAT YAI、Thailand、2011/10/13
- 27 行方衣由紀、恒岡弥生、小川亨、中瀬古(泉)寛子、赤羽悟美、田中光、Efonidipine 光学異性体を用いた洞房結節緩徐脱分極に關与する Ca²⁺チャネル分子種(Cav1.2、Cav1.3、Cav3.1)の薬理的検討、生体機能と創薬シンポジウム 2011、東京、2011/09/02
- 28 伊藤雅方、山梨義英、高田龍平、中瀬古(泉)寛子、杉山篤、鈴木洋史、赤羽悟美、脂質転移タンパク質 Stard10/PCTP-L の胆汁調節における役割、第6回トランスポーター研究会年会、仙台、2011/06/11
- 29 田邊思帆里、伊藤雅方、中瀬古(泉)寛子、佐藤陽治、杉山篤、赤羽悟美、Stard10/PCTP-L ノックアウトマウスを用いた機能解析、日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会、東京、2011/05/24

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中瀬古(泉) 寛子 (IZUMI-NAKASEKO, Hiroko)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：80408773

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕