

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590266

研究課題名(和文) ムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルとその調節系の分子実体解明

研究課題名(英文) Molecular entity of regulatory mechanism of muscarinic receptor operated cation channel

研究代表者

高井 章 (TAKAI, Akira)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：50126869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：眼内平滑筋における、ムスカリン受容体作動性の非選択性陽イオンチャネル(NSCC)およびその調節系の分子実体を解明することを目標として実施した。

ウシ毛様体筋を用い、コラゲナーゼ処理により分散させてから非連続Percoll濃度勾配中で遠心分離にかけ、濃度界面に集まった部分を取り出してセルソータで分離するという方法を開発した。他の細胞や組織断片など夾雑物のない状態で得られた細胞を用いた実験により、M3型アセチルコリン受容体とA型エンドセリン受容体が、同一の毛様体筋細胞の細胞膜に共存し、Gq/11と共役する共通の信号伝達経路を介して、NSCCの開口を調節することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In bovine ciliary muscle (BCM), stimulation of M3-muscarinic receptors (M3R) opens two types of non-selective cation channel with different unitary conductances. In this work we developed a new method to obtain BCM cells with unprecedented quality and amount. The ciliary body dissected from bovine eye were treated with collagenase, and the dispersed cells were subjected centrifugation through discontinuous Percoll density-gradient of 1.050 and 1.060 g/mL. Cells were then collected from the 1.050/1.060 interface and cultured for 1-3 days. In the cultured BCM cells, carbachol (2 μ M) evoked a phasic and tonic increase of $[Ca^{2+}]_i$. Caffeine (20 mM) caused a phasic rise of $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of extracellular Ca^{2+} . These responses were clearly observed in 5×10^6 cells obtained by the single-step centrifugation procedure. Immunological staining revealed abundant expression of TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 and Orai1 (as well as of M3R) in the plasma and endoplasmic membranes.

研究分野：生理学

 キーワード：ムスカリン受容体 細胞内信号伝達 GTP結合蛋白 非選択性陽イオンチャネル 毛様体筋 副交感神経
平滑筋 貯蔵量作動性カルシウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

われわれは、ウシ毛様体から単離した平滑筋細胞における電気生理学の実験により、毛様体筋の細胞膜には M3 型ムスカリン受容体 (M3R) 刺激に伴って開口する単位コンダクタンスの大きく異なる 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (100 fS と 35 pS) を同定し、NSCCS および NSCCL と呼んだ。これらのチャネルは筋の収縮持続相に必要な細胞外からの Ca^{2+} 流入の主要経路路として機能していることがわかってきた [文献 1, 2]。

しかし、NSCCS と NSCCL の分子実体、ならびに受容体からそれらのチャネルへの信号伝達経路については不明であった。

また、細胞内 Ca^{2+} の作用については、一般の平滑筋では、主としてミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) によるミオシンリン酸化を介する経路が知られているが、毛様体筋においては、この重要な経路の実体についてこれまで具体的に調べられていなかった。

2. 研究の目的

(1) NSCCS と NSCCL の分子実体を明らかにする。特に、いわゆる受容作動性、容量作動性イオンチャネルの候補として注目されている TRP チャネルや Orai 1 と、NSCCS/NSCCL との関連性を検討する。

(2) ① M3R からの信号の、NSCCS/NSCCL 以外への流れにも注目し、RhoA/Rho kinase などの収縮調節への役割についても検討する。

②特に、眼内平滑筋についてはこれまでほとんど直接的な検討がなされていないフォスファターゼの関与について特異的阻害剤を用いた検討をおこなう。

(3) ウシでは不可能な遺伝子改変を使った実験を可能にするため、マウスの眼内平滑筋組織を実験材料として用いるための技術確立する。ウシに比べ体積比で 1/300000 と格段に小さいマウス眼内筋での実験が可能になれば、他の微小組織を用いた実験におけるマウス利用のモデルケースとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 眼内平滑筋細胞を色素細胞や線維芽細胞など由来の夾雑物ができるだけ混ざらないように分離するため、今回の研究では、コラゲナーゼ酵素処理で分散したウシ毛様体組織試料を Percoll 密度勾配により分離したあと、さらにセルソーターによる分離を行った。分離した細胞の評価は Fluo-4 蛍光法による細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定と、抗 α -アクチン抗体による免疫蛍光顕微鏡法を使用した。(詳細については下記「研究成果」に記述)

(2) マウス眼球から、瞳孔括約筋を摘出し、従来、ウシ材料でおこなってきたのと同様の方

法で、収縮記録、細胞内 Ca^{2+} 測定、パッチクランプによる全細胞電流記録をおこなった。暗順応させたマウスの目に LED ライトを照射することにより誘発される縮瞳をビデオ記録した。自家開発のソフトを用い、ビデオ映像から瞳孔を辺縁を自動的に抽出して、楕円でフィットし長径を算出、時間に対してプロットして時間経過の解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 毛様体の筋組織切片を免疫組織染色法で観察すると、 α -アクチン陽性の平滑筋細胞とは別に、黒色のメラニン細胞様細胞、 α -アクチン陰性の線維芽細胞の少なくとも 3 種類の細胞が多数存在することがわかり、組織全体から抽出した遺伝子および蛋白質は毛様体平滑筋とは異なる細胞由来のものを多く含んでいることが明らかであった。

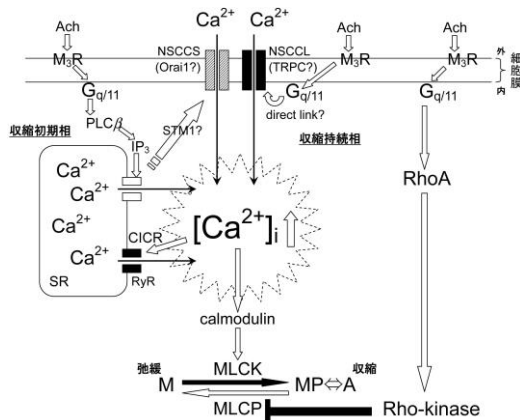
そこで 3 層の Percoll 不連続密度勾配 (1.050, 1.060, 1.082 g/mL) 中に分散した細胞を重層し遠心すると、メラニン細胞様細胞は密度 1.082 の下層に、その他の細胞は 1.082 と 1.060 の界面、1.060 と 1.050 の界面に主に分布することがわかった。

この 2 界面に存在する細胞を回収し、カルバコール (CCh) に対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を測定すると、約 70% の細胞が一過性の Ca^{2+} 上昇を示した。また、免疫蛍光顕微鏡法により抗 α -アクチン抗体を用いて観察すると α -アクチン陽性細胞が大多数を占めることがわかった。これらの結果から、Percoll 密度勾配法により 1 回の調製で 10^6 個オダの毛様体平滑筋細胞を取得できることがわかった。CCh の作用は、アトロピン-DAMP などのムスカリン受容体阻害剤、Gq/11 α 阻害剤である YM-254890 により濃度依存性に抑制されることを確認した。今後、試料の純度を更に高め、例えばマイクロアレイ法を用いることにより、毛様体平滑筋細胞の網羅的遺伝子発現を解析できると期待される。

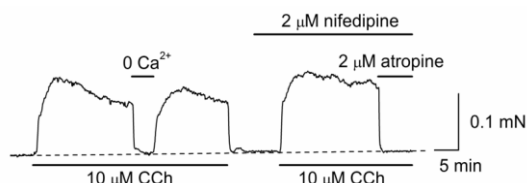
(2) プロテインフォスファターゼ (PP) 阻害剤の 1 つであるオカダ酸 (OA) は、消化管や血管平滑筋に対し、高濃度 (>5 μM) ではミオシン軽鎖リン酸化を伴う収縮を起こすが、低濃度 (0.5-5 μM) では逆に弛緩を起こすことが知られている。OA は、主要 PP である、1 型 (PP1) と 2A 型 (PP2A) に対し、後者により圧倒的に高い親和性を示す (PP1 と PP2A についての K_i 値は、それぞれ、153 μM と 34 pM) ため、OA の平滑筋収縮に対する抑制作用については PP1 の、抑制作用については PP2A の酵素活性阻害を介するものであることが予想されているが、特に抑制作用のメカニズムに関しては明快な説明がなされていない。今回、OA のウシ毛様体筋に対する効果を調べたところ、carbachol (CCh) によるムスカリン受容体刺激により誘発される収縮に OA が低濃度でもまったく抑制作用を示さないことが判明した。これまで調べられた限り、低濃度 OA が

収縮抑制を起こさない平滑筋は他には知られていない。PP2A に特異的で PP1 にはほとんど親和性を示さないことが知られている rubratoxin A (10 μM) は、ウシ毛様体筋および比較のため用いたモルモット盲腸紐で CC 誘発収縮をほぼ完全に抑制した。また、 Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin で誘発した収縮に対しては、ウシ毛様体筋でも他の平滑筋と同じく低濃度 OA は明かな抑制作用を示した。これらの知見は、PP2A による脱輪参加により平滑筋収縮を強める働きのある蛋白の存在を示唆するが、その本体は不明である。ウシ毛様体筋で低濃度 OA が収縮抑制を示さないのは、他の平滑筋とはそのような蛋白の質的 and/or 量的違いによるものかもしれない。

(3) これまでの知見から予想されるウシ毛様体筋の収縮調節に関わる信号伝達経路を图示する：



(4) マウス眼球は非常に小さく(体積比にしてヒト眼球の 1/1000、ウシ眼球の 1/30000)、これまで眼内筋の生理学的研究に使用されたという記録を見ない。今回われわれは、正常マウスの瞳孔括約筋をリング状に切出した標本を等尺性張力トランスデューサに繋いで収縮の記録を試みた。CCh (10 μM) を投与すると絶対値はウシ毛様体筋の 1/10 位で弱いものの、はっきりとした張力発生が記録できた(図)。



この CCh 誘発収縮は、(a) 収縮持続相が細胞外の Ca^{2+} に依存性を示す、(b) 2 μM の nifedipine に感受性を示さない、(c) 2 μM の atropine で完全に抑制される、という特徴を示した(図)。これは、マウス瞳孔括約筋にも、ウシ毛様体筋と同様の NSCCS/NSCCL が存在し、収縮持続相における Ca^{2+} 経路として機能していることを強く示唆するものである。細胞内 Ca^{2+} 測定、パッチクランプ実験な

どが十分可能であることも確認している。(5) Intact なマウス個体において瞳孔括約筋の収縮を、瞳孔のビデオ観察により実時間記録する方法を開発した。これは、実験に用いるのに有用な遺伝子改変マウスを手早くスクリーニングする有用な方法を提供するものと期待される。

この方法により、NSCCS/NSCCL との関連に興味を持たれている TRPC3 と TRPC6 のノックアウトマウス (NIH の L. Birnbaumer 教授、生理研の西田基宏教授から供与されたもの) の縮腫速度を測定したが、wild type との間で有意差は見られなかった。今後、Orai1 など、他の候補チャネル蛋白のノックアウトマウスでも同様の測定をおこない、wild type との間に有意差が見られたものについては、上記(4)に述べた方法により、さらに検討を進める。

<引用文献>

- ① Takai et al (2004) *J Physiol* 559: 899 - 922, 2004.
- ② Yasui et al (2008) *Br J Pharmacol* 154: 890 - 900.

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 1 件)

- ① Ishida M, Takeya K, Miyazu M, Yoshida A & Takai A (2015) Force-inhibiting effect of Ser/Thr protein phosphatase 2A inhibitors on bovine ciliary muscle. *J Smooth Muscle Res* 51:10-21. doi: 10.1540/jsmr.51.10

[学会発表] (計 8 件)

- ① Miyazu M, Kaneko T & Takai A, An new method for isolation of bovine ciliary muscle cells using Percoll gradient centrifugation, 第 92 回日本生理学会、2015 年 03 月 21 日～2015 年 03 月 23 日、神戸市
- ② 高井 章 マウス瞳孔括約筋収縮調節にかかわる信号伝達経路の検討 第 56 回日本平滑筋学会総会 2014 年 08 月 07 日～2014 年 08 月 08 日 横浜市
- ③ Ishida M, Takeya K, Akao T, Miyazu M & Takai A Force-inhibiting effect of phosphatase inhibitors on bovine ciliary muscle 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 03 月 16 日～2014 年 03 月 18 日 鹿児島市
- ④ Takeya K & Takai A Myosin phosphorylation dependent and independent smooth muscle contraction 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 03 月 16 日～2014 年 03 月 18 日 鹿児島市
- ⑤ 赤尾鉄平, 宮津基, 竹谷浩介, 高井章 毛様体筋の収縮持続相における主要 Ca^{2+} 流入経路としての容量依存性 Ca^{2+} チャネル 第 55 回日本平滑筋学会総会 2013 年 08 月

06日～2013年08月08日 旭川市

- ⑥ 石居信人、宮津基、高井章 ウシ毛様体筋のエンドセリン1刺激に対する収縮応答に関わる信号伝達機構の検討 第55回日本平滑筋学会総会 2013年08月06日～2013年08月08日 旭川市
- ⑦ 宮津基、竹谷浩介、赤尾鉄平、高井章 ウシ毛様体筋のムスカリン受容体作動性陽イオンチャンネルに対する 2-aminoethyl diphenylborinate (2- APB)の効果 第55回日本平滑筋学会総会 2013年08月06日～2013年08月08日 旭川市
- ⑧ 竹谷浩介、高井章 平滑筋収縮・弛緩制御の分子機序の解明を目指したリン酸化シグナル解析 第55回日本平滑筋学会総会 2013年08月06日～2013年08月08日 旭川市

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/physl/profiles/takai.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 章 (TAKAI, Akira)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：50126869

(2) 研究分担者

宮津 基 (MIYAZU, Motoi)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：40396346

竹谷 浩介 (TAKEYA, Kosuke)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：20586862