

学位論文題名

新規 Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルのクローニングと
その機能解析

学位論文内容の要旨

I. 背景

Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルは電位非依存性で、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化される K^{+} チャネルであり、機能的には単一チャネルの大中型のコンダクタンスの違いから BK, IK, SK に分類される。SK チャネルは人間の体内に幅広く分布しており、活動電位或いは受容体の活性化により細胞を刺激し、膜電位及び神経の興奮、分泌細胞からのホルモン放出、聴覚器官のコントロール、平滑筋緊張の制御等の興奮細胞及び非興奮細胞両方の機能の制御に関して重要な役割を果たしている。SK チャネルが開口すると膜の過分極が生じ、電位依存性カルシウムチャネルを介した Ca^{2+} 流入が減少し、平滑筋の弛緩が生ずる。動脈においては、SK3 は内皮細胞の細胞膜に高度に発現していると報告されているが、血管平滑筋に発現しているとの報告は殆ど無い。一方、心臓における SK チャネルの分子多様性及び機能的役割は殆ど分かっていない。

II. 目的

本研究では、心臓に発現した SK チャネルを同定し、その作用機構を解明するために、ラットの心臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、得られたチャネルの発現の分布及び機能的な特性について検討した。

III. 方法

^{32}P で標識したプローブを用いてラットの心臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、SK3 とその変異である SK3-b チャネルを得た。ラットの様々な組織におけるこれらのチャネルの発現の分布及び比率を検証するために、RT-PCR を施行した。3 匹のラットから心臓、脳、肝臓、肺、小腸のトータル RNA を単離し、SuperScript™ First-Strand Synthesis for RT-PCR Kit (Invitrogen) およびランダムヘキサマーを用いて、トータル RNA を cDNA へ逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、SK3 または SK3-b に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、最終的には塩基配列の確認を行った。次に、機能的な特性を解析するために、SK3 又は SK3-b の cDNA を pIRES2-EGFP ベクター(BD Biosciences Clontech, CA)へ組み込み、PolyFect Transfection Reagent (Qiagen) を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションを行い、ホールセル及びインサイドアウトパッチクランプ法を用いて細胞膜を介して流れる電流を計測した。これによりチャネルのプロトタイプ、 Ca^{2+} 、各種プロテインキナーゼに対する感受性を確認した。SK3 チャネルおよび SK3-b チャネルが、cDNA をトランスフェクションした細胞および心臓をはじめとするラットの組織において、蛋白質レベルで実際に発現しているかどうか、また、組織の場合にはどの細胞に発現しているかを確認するために、それぞれのチャネル特異的抗体を作製してウエスタンブロット解析および免疫組織化学も施行した。

IV. 結 果

ラットの心臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、SK3 及びその変異体である SK3-b のクローンを得た。RT-PCR を用いてラットの様々な組織における SK3 チャネルおよび SK3-b チャネルの mRNA の分布を解析したところ、SK3 の mRNA はラットの心臓、脳、肝臓、肺、小腸などの組織に存在したが、SK3-b の mRNA は心臓にのみ存在した。また、SK3 および SK3-b チャネルの機能的特性を解析するために、これらのチャネルを安定的に発現した HEK293 細胞にパッチクランプ法を行ったところ、SK3 及び SK3-b を介した電流はいずれもアパミン感受性であり、感受性の程度にも差は認められなかった。また、両チャネル共にカリブドトキシンに対しては抵抗性であった。アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリン、プロテインキナーゼ C 活性化薬である PDBu、グアニル酸シクラーゼ活性化薬であるニトロプルシドのいずれに対しても抵抗性であった。SK3-b の Ca^{2+} 感受性は SK3 よりも低値を示した。SK3 または SK3-b チャネルを安定的に発現している HEK293 細胞、ラット脳および心臓の蛋白質抽出液を用いて、ウェスタンブロットを行ったところ、予想される大きさである 85kDa にバンドが確認できた。抗 SK3 抗体による免疫組織化学を行ったところ、心筋細胞がび慢性に強く染色された。

V. 考 察

脱分極性電気刺激は活動電位を誘発して、L 型 Ca^{2+} チャネルを活性化する結果、心筋細胞内への Ca^{2+} 流入を惹起する。誘発された細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、SK3 や SK3-b などの SK チャネル群を活性化し、活動電位後の膜の再分極へ移行していく。アパミンなどの SK チャネルブロッカーが人間及びマウスの心筋細胞の活動電位終末部分を延長させる事実は、SK チャネルが活動電位後の膜の再分極に寄与していることを示唆している。

本研究では、RT-PCR を用いた mRNA の組織分布の解析から、SK3 チャネルは検討した全ての組織（心臓、脳、肝臓、肺、小腸）に存在しているが、一方、SK3-b チャネルは心臓においてのみ発現していることを示唆するとともに、その発現比率が SK3 チャネルの約 1/10 であることを明らかにした。また、パッチクランプクランプ手技を用いた電気生理学的解析から、SK3-b の細胞内 Ca^{2+} 濃度に対する感受性は、SK3 の感受性と比較して、より低いことも明らかとした。これらの結果から、生理的な条件下における心臓の活動電位後の再分極に関しては、SK3-b と比較して、SK3 はより大きな役割を果たしていると考えられる。しかしながら、病的な状況下では SK3-b と SK3 の存在比率に変化が起こり、心筋細胞の再分極に影響を及ぼす可能性も考えられる。

SK3 遺伝子はヒト染色体 1q21 領域に存在する。この領域は、ある種の家族性精神分裂病、小脳性運動失調症を伴う家族性片麻痺性偏頭痛、神経性食思不振症などの疾患に対する主要な感受性領域である。SK3 チャネルの N 端には高度な多形性を呈するグルタミンの繰り返し配列があり精神分裂病と関係があると考えられているが、この考えは議論のあるところでもある。SK3 の N 端の一部を欠損した変異体である SK3- Δ や、SK3 のスプライシング変異体である SK3-1B などの変異チャネルが、ニューロンの異常興奮や精神分裂病の病因に寄与している可能性が示唆されている。興味深いことに、SK3 の N 端領域の 19 個のグルタミン繰り返し配列は SK3-b においては 18 個のセリンおよび 1 個のアルギニンに置換されており、機能的な解析によると、SK3-b は SK3 と比較して Ca^{2+} 感受性が低いことが示唆されている。SK3-b はこの低 Ca^{2+} 感受性を利用することにより、正常な心機能及び代謝のみならず心筋細胞の異常興奮においても、SK3 ではカバーできない高 Ca^{2+} 濃度領域で、重要な役割を果たしているのかもしれない。さらに、機能的な SK チャネルは 4 量体として構成されることが考えられるが、SK3-b を含むヘテロ 4 量体が構成されると、心筋細胞の正常及び病的な機能の双方に影響を及ぼすのかもしれない。今後、正常及び病的状態での心機能における SK3 および SK3-b の機能と役割分担を解明することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

新規 Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルのクローニングと その機能解析

Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルは電位非依存性で、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化される K^{+} チャネルであり、機能的には単一チャネルの大中小のコンダクタンスの違いから BK, IK, SK に分類される。SK チャネルは人間の体内に幅広く分布しており、活動電位或いは受容体の活性化により細胞を刺激し、膜電位及び神経の興奮、分泌細胞からのホルモン放出、聴覚器官のコントロール、平滑筋緊張の制御等の興奮細胞及び非興奮細胞両方の機能の制御に関して重要な役割を果たしている。SK チャネルが開口すると膜の過分極が生じ、電位依存性カルシウムチャネルを介した Ca^{2+} 流入が減少し、平滑筋の弛緩が生ずる。動脈においては、SK3 は内皮細胞の細胞膜に高度に発現していると報告されているが、血管平滑筋に発現しているとの報告は殆ど無い。一方、心臓における SK チャネルの分子多様性及び機能的役割は殆ど分かっていない。

本研究では、心臓に発現した SK チャネルを同定し、その作用機構を解明するために、ラットの心臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、得られたチャネルの発現の分布及び機能的な特性について検討した。

スクリーニングの結果、SK3 及びその変異体である SK3-b のクローンを得た。RT-PCR を用いてラットの様々な組織における SK3 および SK3-b mRNA の分布を解析したところ、SK3 mRNA はラットの心臓、脳、肝臓、肺、小腸などの組織に存在したが、SK3-b mRNA は心臓にのみ存在し、その発現比率は SK3 チャネルの約 1/10 であった。また、SK3 および SK3-b の機能的特性を解析するために、これらのチャネルを安定的に発現した HEK293 細胞にパッチクランプクランプ手技を用いた電気生理学的解析を行ったところ、SK3 及び SK3-b を介した電流はいずれもアバミン感受性・カリブドトキシン抵抗性であり、感受性の程度にも差は認められなかった。アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリン、プロテイン

キナーゼ C 活性化薬である PDBu、グアニル酸シクラーゼ活性化薬であるニトロプルシドのいずれに対しても抵抗性であった。SK3-b の Ca^{2+} 感受性は SK3 よりも低かった。これらの結果から、生理的な条件下における心臓の活動電位後の再分極に関しては、SK3-b と比較して、SK3 はより大きな役割を果たしていると考えられる。しかしながら、病的な状況下では SK3-b と SK3 の存在比率に変化が起こり、心筋細胞の再分極に影響を及ぼす可能性も考えられる。

SK3 遺伝子はヒト染色体 1q21 領域に存在する。この領域は、精神分裂病などの疾患に対する主要な感受性領域である。SK3 の N 端には高度な多形性を呈するグルタミンの繰り返し配列があり精神分裂病と関係があるとも考えられているが、SK3 の N 端の一部を欠損した変異体である SK3-Δ や、SK3 のスプライシング変異体である SK3-1B などの変異チャネルが、ニューロンの異常興奮や精神分裂病の病因に寄与している可能性も示唆されている。興味深いことに、SK3 の N 端領域の 19 個のグルタミン繰り返し配列は SK3-b においては 18 個のセリンおよび 1 個のアルギニンに置換されており、機能解析によると、SK3-b は SK3 と比較して Ca^{2+} 感受性が低いことが示唆されている。SK3-b はこの低 Ca^{2+} 感受性を利用することにより、正常な心機能のみならず心筋細胞の異常興奮においても、SK3 ではカバーできない高 Ca^{2+} 濃度領域で、重要な役割を果たしているのかもしれない。さらに、機能的な SK チャネルは 4 量体として構成されるが、SK3-b を含むヘテロ 4 量体が構成されると、心筋細胞の正常及び病的な機能の双方に影響を及ぼすのかもしれない。今後、正常及び病的状態での心機能における SK3 および SK3-b の機能と役割分担を解明することが期待される。

口頭発表に際し、筒井教授から新規分子の役割および存在意義について質問がなされた。次いで吉岡教授から新規分子の存在の普遍性、ホモおよびヘテロ四量体における機能変化について質問がなされた。最後に三輪教授からポリグルタミンの疾患に対する寄与、新規分子と EDHF 反応の関係について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。

この論文は、新規 Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルの存在とその機能を明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。