
細胞骨格による容量性 Ca^{2+} 流入制御
のメカニズムの解明

(課題番号 : 16590165)

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 18 年 6 月

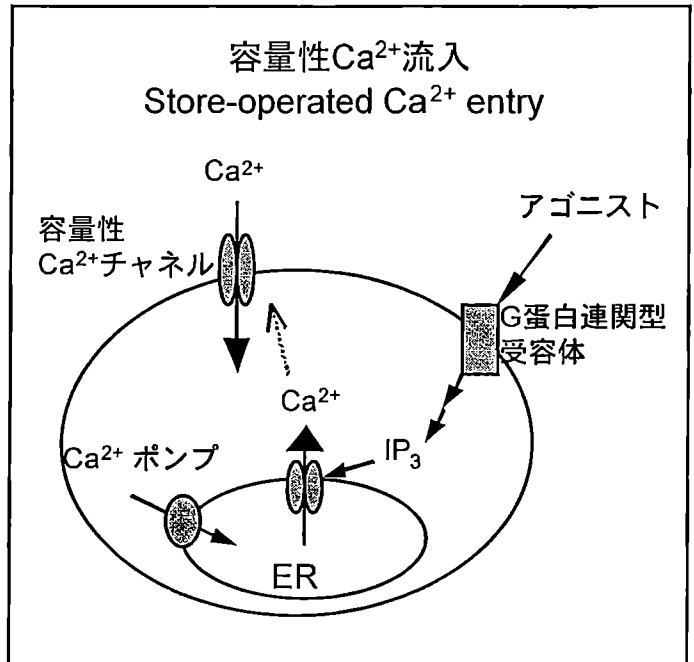
研究代表者 尾松万里子
(滋賀医科大学医学部助教授)



2005014944

はしがき

細胞質の遊離 Ca^{2+} 濃度 (細胞内 Ca^{2+} 濃度) 上昇は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入の2種類の経路によって引き起こされる。ストアからの Ca^{2+} 放出を起こす主要なセカンドメッセンジャーは、G 蛋白連関型受容体刺激により phospholipase C が活性化して生成したイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP_3) である。一方、電位依存性チャネルを持たない多くの非興奮性細胞における細胞外からの Ca^{2+} 流入は、Putney (1986) が提唱した「容量性 Ca^{2+} 流入 (store-operated Ca^{2+} entry)」経路が主であると考えられている。即ち、細胞内ストアが枯渇すると何らかのメカニズムによって細胞膜の Ca^{2+} チャネルが開口し、ストアを充填するために Ca^{2+} 流入が起こるという機構である (右図)。実験的に容量性 Ca^{2+} 流入を引き起こすためには G 蛋白連関型受容体のアゴニストの他に小胞体 (ER) の Ca^{2+} ポンプ阻害剤である thapsigargin などが広く用いられている。



申請者らは、ラット褐色脂肪細胞を用いて容量性 Ca^{2+} 流入の制御機構を調べた結果、(1) 細胞外 ATP は P2 受容体を介して容量性 Ca^{2+} 流入をほぼ完全に抑制すること、(2) P2 受容体刺激によって細胞骨格蛋白アクチンの細胞膜近傍への特異的重合促進が起こること、及び (3) 細胞骨格を壊すと P2 受容体による容量性 Ca^{2+} 流入抑制が見られなくなることを見いだした。ATP は交感神経終末から noradrenaline と共に神経伝達物質として放出されることが知られている。これらのことから、褐色脂肪組織に豊富に分布する交感神経末端から放出された ATP が P2 受容体に結合し、細胞骨格制御系の情報伝達機構の活性化を経て細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節している可能性があると考えられた。

本研究では、ラット褐色脂肪細胞において (i) アクチン重合・脱重合反応の容量性 Ca^{2+} 流入機構に対する影響の細胞内メカニズムを解明し、(ii) これに関わる P2 受容体サブタイプを同定することによって、(iii) 細胞骨格による容量性 Ca^{2+} 流入制御の細胞内メカニズムとその生理的意義を検討した。

研究組織

研究代表者： 尾松万里子 (滋賀医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,200	0	2,200
平成17年度	900	0	900
総計	3,100	0	3,100

研究発表

(1) 学会誌等

Omatsu-Kanbe, M., Shibata, M., Yamamoto, T., Isono, T. & Matsuura, H. (2004)

Actin filaments play a permissive role in the inhibition of store-operated Ca^{2+} entry by extracellular ATP in rat brown adipocytes.

Biochem. J. **381**, 389-396, 2004.

Hirano T., Nonaka, Y., Inoue, K., Yamamoto, T., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Gohda, K. & Fujita N.

Identification of endogenous surrorate ligands for human P2Y receptors through an in Silico search.

J. Pharmacol. Sci. **95**, 81-93, 2004.

Sanada, M., Matsuura, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Kashiwagi, A. & Yasuda, H.

Cytosolic Ca^{2+} under high glucose with suppressed Na^{+}/K^{+} pump activity in rat sensory neurons.

Neuroreport **15**, 197-201, 2004.

Mariko Omatsu-Kanbe, Kazuko Inoue, Yusuke Fujii, Takefumi Yamamoto, Takahiro Isono, Norihisa Fujita and Hiroshi Matsuura. Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *Biochem. J.* **393**, 171-180, 2006.

Abdelalim, E. M., Takada, T., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Tooyama, I. and Torii, R.

Invitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **340**, 689-695, 2006.

Zankov, D. P., Omatsu-Kanbe, M., Isono, T., Toyoda, F., Ding, W.-G., Matsuura, H. and Horie, M.

Angiotensin II potentiates the slow component of delayed rectifier K^{+} current via the AT 1 receptor in guinea pig atrial myocytes.

Circulation **113**, 1278-1286, 2006.

Yamashita A, Takada T, Omatsu-Kanbe M, Nemoto K, Matsuura H, Yamamoto G & Torii R.

Monkey embryonic stem cells differentiate into adipocytes in vitro. *Cloning Stem Cells* **8**, 3-9, 2006.

Tahara, M., Omatsu-Kanbe, M., Sanada, M., Maeda, K., Koya, D., Matsuura, H., Kashiwagi, A. & Yasuda, H.

Effect of PKC β inhibitor on Ca²⁺ homeostasis in diabetic sensory neurons. *NeuroReport* in press

(2) 口頭発表

Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujita, N. & Matsuura, H.

Effect of extracellular ATP on adipocyte differentiation.

Japanese Journal of Physiology 54, S81, 2004. (第81回日本生理学会大会)

Toyoda, F., Ding, W.-G., Omatsu-Kanbe, M. & Matsuura, H.

Properties of the rapidly activating delayed rectifier K⁺ channels in HL-1 mouse atrial myocytes.

Japanese Journal of Physiology 54, S127, 2004. (第81回日本生理学会大会)

Omatsu-Kanbe, M., Fujii, Y & Matsuura, H.

Comparison of activation mechanisms of store-operated Ca²⁺ entry induced by phospholipase C-coupled receptor agonist and SERCA inhibitor.

Japanese Journal of Physiology 55, S71, 2005. (第82回日本生理学会大会)

Hayase, F., Matsuura, H., Toyoda, F., Hamada, K., Sanada, M., Omatsu-Kanbe, M. & Yasuda, H.

Inhibition of the tetrodotoxin (TTX)-resistant Na⁺ current by the protein kinase C beta inhibitor LY333531 in small dorsal root ganglion (DRG) neurons of diabetic rats.

Japanese Journal of Physiology 55, S126, 2005. (第82回日本生理学会大会)

Kubo T., Ding, W.-G., Toyoda, F., Fujii, Y., Omatsu-Kanbe, M., Miura, Y & Matsuura, H.

Modulation of the HERG channel by M₁-muscarinic receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase.

Japanese Journal of Physiology 55, S129, 2005. (第82回日本生理学会大会)

Toyoda, F., Ding, W.-G., Zankov, D., Omatsu-Kanbe, M. & Matsuura, H.

Differential sensitivity of native I_{ks} and heterologously expressed KCNQ1/KCNE1 channel to mefenamic acid.

Japanese Journal of Physiology 55, S135, 2005. (第82回日本生理学会大会)

Omatsu-Kanbe, M., Fujii, Y & Matsuura, H.

P2Y receptor-induced increase in sensitivity of adipogenic hormones to preadipocytes

Journal of Physiological Sciences 56, S67, 2006. (第83回日本生理学会大会)

Fujii, Y., Omatsu-Kanbe, M. & Matsuura, H.

Gq/PLC-coupled receptor-induced transient reduction in plasma membrane phosphatidylinositol-1,4,5-bisphosphate (PIP₂).

Journal of Physiological Sciences 56, S118, 2006. (第83回日本生理学会大会)

Hayase, F., Matsuura, H., Toyoda, F., Kitada, K., Sanada, M., Omatsu-Kanbe, M. & Yasuda, H.

Difference in the sensitivity of the TTX-resistant Na⁺ channel to the PKC β inhibitor LY333531 in small dorsal root ganglion neurons of control and diabetic rats.

Journal of Physiological Sciences 56, S149, 2006. (第83回日本生理学会大会)

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下の通りである。一部の詳細は添付した論文に記載する。

ラット褐色脂肪細胞において、容量性 Ca^{2+} 流入の制御と細胞骨格アクチン構築との関係を細胞内 Ca^{2+} 濃度測定法および蛍光標識した phalloidin によるアクチン染色法を用いて検討した。Noradrenaline はや小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害剤である thapsigargin は小胞体の Ca^{2+} ストアを枯渇させることにより容量性 Ca^{2+} 流入を活性化する。これらの薬剤投与中に細胞骨格アクチンの分布が変化しているかどうかを調べたところ、大きな変化はないことがわかった。細胞をアクチンの脱重合剤である cytochalsin D や latrunculin A によって処理しても noradrenaline ならびに thapsigargin による細胞外からの Ca^{2+} 流入は阻害されなかったことから、容量性 Ca^{2+} 流入の活性化と維持にはアクチン骨格の影響が少ないと考えられた。一方、細胞外 ATP は P2 受容体を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を引き起こすとともに noradrenaline や thapsigargin によって活性化された容量性 Ca^{2+} 流入を阻害する。ATP を細胞に投与するとアクチンは細胞膜近傍に強く集積し、細胞形態も大きく変化すること、およびこれらの効果は P2 受容体を介していること、がわかった。cytochalsin D や latrunculin A 存在下では、ATP によるアクチン重合は観察されず、容量性 Ca^{2+} 流入阻害も起こらなかった。以上のことから、細胞 ATP による細胞骨格アクチンの再構築は容量性 Ca^{2+} 流入阻害と関連している可能性が高いことが推察された。また、前駆脂肪細胞においては ATP 受容体刺激による細胞骨格アクチン再構築が脂肪細胞分化に対して正方向への効果を有する事がわかった。

今後、P2 受容体刺激からアクチン重合に至る細胞内情報伝達機構の解明を行い、関連蛋白を同定することによって、この現象が褐色脂肪細胞に特異的であるかどうかを明らかにしていきたい。