

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590258

研究課題名(和文) 洞房結節CaV1.3におけるRNA編集の可能性とIstの分子基盤に関する検討

研究課題名(英文) Investigation on possible link between Ist and CaV1.3 RNA editing

研究代表者

豊田 太 (Toyoda, Futoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：90324574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：洞房結節細胞の持続性内向きナトリウム電流(Ist)は、ペースメーカー活動への寄与が示唆されているが、それを担うチャネル分子が同定されていない。本研究は、L型カルシウムチャネルのCaV1.3とIstの機能的発現の相関を調べるとともに、RNA編集の可能性のあるCaV1.3バリエーションの検出を試みた。洞房結節細胞におけるIstの発現はL型カルシウム電流の大きさと正の相関があり、CaV1.3遺伝子欠損マウスにおいてIstは消失した。次世代高速シーケンサーを用いた網羅解析の結果、イオン選択性に影響しうるCaV1.3レアバリエーションを検出した。以上より、CaV1.3バリエーションがIstを担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The sustained inward Na⁺ current (Ist) in sinoatrial node (SAN) pacemaker cells has been suggested to contribute to the pacemaker activity, although unknown molecular correlates of this current limits the understanding of its significance in the pacemaker activity. The purpose of this study was 1) to examine the relationship between L-type Ca²⁺ channel CaV1.3 subunit and Ist in their functional expression levels, and 2) to identify the RNA editing-mediated CaV1.3 variants. The density of Ist was positively correlated with the magnitude of L-type Ca²⁺ current (I_{Ca,L}). In knock-out mice with disruption of CaV1.3, I_{Ca,L} was significantly reduced, which was accompanied by a complete loss of Ist. Comprehensive analysis of CaV1.3 transcripts using the second generation sequencer revealed the presence of rare variants with residue changes in the Ca²⁺ selectivity filter. These findings suggest that Ist is mediated by CaV1.3 variants Ist in SAN pacemaker cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：心臓 ペースメーカー 洞房結節 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

(1) 心臓の拍動リズムは洞房結節における自発的な電気活動(ペースメーカー活動)に由来する。洞房結節細胞において特異的に観察される持続性内向キナトリウム電流(I_{st})は、ペースメーカー電位の形成(心拍リズムを決定する細胞膜の電気的な変化)への寄与が示唆されている。しかしながら、 I_{st} を担うチャネル分子は未だ同定されておらず、この電流の生理的意義の解明は進んでいない。

(2) I_{st} は生理的にナトリウムイオンの流れに応じて発生するイオンチャネル電流として示唆されているものの、一般的なナトリウムチャネルの阻害剤である tetrodotoxin に感受性を示さず、L型カルシウム電流($I_{Ca,L}$)を阻害する古典的なカルシウム拮抗薬により抑制される。このような薬理的性質から、 I_{st} を担うチャネル分子はL型カルシウムチャネル(LTCC)のバリエーションである可能性が示唆される。

(3) 洞房結節には Cav1.2 ならびに Cav1.3 の2種類の LTCC ポア形成サブユニットが発現している。前者は心臓に広く分布しているが、後者は洞房結節を含む心房領域に特異的に発現しており、発現分布の類似性から I_{st} との関連が疑われる。

2. 研究の目的

(1) 洞房結節細胞において LTCC サブユニット Cav1.3 と I_{st} の発現相関を解析し、両者の分子レベルでの因果関係について検証する。

(2) 洞房結節における Cav1.3 のバリエーションの検索とその RNA 編集の可能性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 洞房結節細胞の単離: マウスならびにモルモットから心臓を摘出し、洞房結節組織を切離した。その後、パッチクランプ法に供するために、酵素処理により洞房結節細胞を単離した。

(2) Cav1.3 ノックアウトマウスならびに Cav1.2 T1066Y ノックインマウスを用いた検証: 両遺伝子改変モデルマウスはオーストリア、インスブルック大学の Dr. Striessnig らが確立し、フランス CNRS (国立科学研究センター) の Dr. Mangoni の研究室で飼育維持された個体を用いた。

(3) パッチクランプ法における電流記録: 顕微鏡下で単離洞房結節細胞にガラス電極をあて、膜電位固定下で I_{st} 、 $I_{Ca,L}$ ならびに I_f の記録を行った。

(4) 次世代高速シーケンサーによる Cav1.3 バリエーションの検出: ラット洞房結節から RNA を抽出し、Cav1.3 遺伝子転写産物の増幅を行った。その後、イルミナ HiSeq により配列決定を網羅的に行い、一塩基置換 (SNP) の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 主な研究の成果

モルモット洞房結節細胞における I_{st} と $I_{Ca,L}$ の機能的発現レベルの相関

洞房結節から単離した細胞は、機能的にヘテロ(不均一)であることから、その形態にもとづき Spindle (細胞端が先細りした形)、Spider (クモ様に細胞体から分岐した突起がある)、Elongated (Spindle タイプと類似した形で長軸が 80 μm 以上の長さをもつ)ならびに Atrial-like (心房筋細胞に類似した形)の4種類に分類した。いずれのタイプの細胞も(全ての細胞ではないが)生食中で自発性収縮を示し、洞房結節に特異的な電流としてよく知られている I_f を発現していた。一方、 I_{st} は Spindle や Spider タイプの細胞においてよく観察され、その電流密度は Elongated タイプに比べ有意に大きかった。一方、Atrial-like 細胞においては I_{st} が検出できなかった(図1参照)。したがって、 I_{st} の発現分布は I_f に比べ限局的であるといえる。

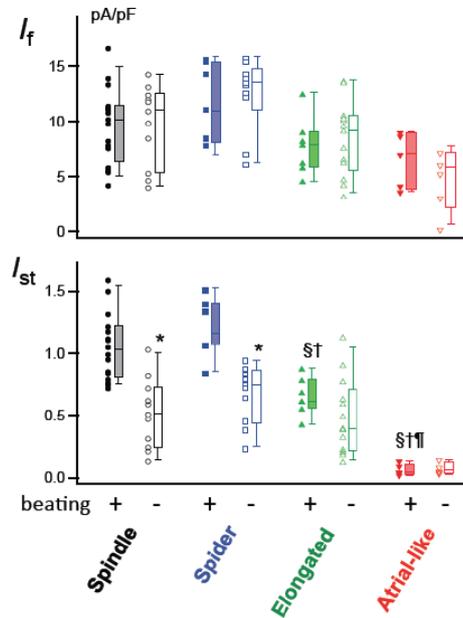


図1 各細胞タイプにおける I_f と I_{st} の電流密度

また、Spindle や Spider タイプの細胞などの I_{st} を強く発現している細胞において、 I_{st} と $I_{Ca,L}$ の電流密度に正の相関が観察された。しかしながら、この両電流の相関は Elongated タイプで弱くなり、 I_{st} を発現していない Atrial-like 細胞において相関は当然みとめられなかった。一方、 $I_{Ca,L}$ の半最大活性化電位は、Spindle = Spider < Elongated < Atrial-like の順に過分極側にあった。Cav1.3 は Cav1.2 に比べ、より過分極側で活性化されることから、細胞タイプによる $I_{Ca,L}$ の膜電位依存性の違いは LTCC サブユニットの構成比の差に起因することが示唆された。すなわち、Spindle や Spider タイプの細胞は比較的多く Cav1.3 を発現しており、 I_{st} は Cav1.3 と発現分布において強く相関している可能性が考えられた。

Cav1.3 ノックアウトマウスにおける I_{st} の消失

Cav1.3 と I_{st} の分子レベルの因果関係を直接的に検証するために、Cav1.3 遺伝子欠損 (Cav1.3^{-/-}) マウスを用いた (図2 参照)。当該マウスは洞房結節機能の低下に起因する著しい徐脈を呈する。単離洞房結節細胞から $I_{Ca,L}$ を記録すると、その電流密度は野生型のそれに比べ 30%程度減弱するとともに、膜電位依存性の脱分極シフトが観察された。したがって、Cav1.3 が洞房結節細胞の $I_{Ca,L}$ の一部を構成することが確認された。一方、 I_{st} はパッチクランプ実験に供したいずれの細胞からも検出されることはなかった。これらの結果から、Cav1.3 は洞房結節細胞において $I_{Ca,L}$ のみならず I_{st} も関与することが強く示唆された。

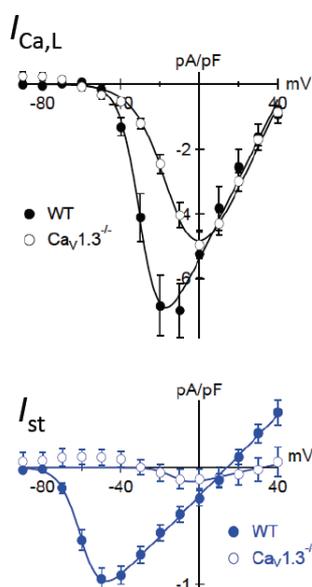


図2 Cav1.3ノックアウトが洞房結節 $I_{Ca,L}$ ならびに I_{st} におよぼす影響

一方、洞房結節に発現するもう一つの LTCC サブユニット (Cav1.2) の I_{st} への関与は、Cav1.2 変異 (T1066Y) ノックインマウスを用いて検討した。T1066Y 変異は Cav1.2 の dihydropyridine (DHP) 系 Ca^{2+} 拮抗薬に対する親和性を著しく低下させる。当該変異ノックインマウスの洞房結節細胞において DHP 化合物の効果を検討したところ、 $I_{Ca,L}$ の一部 (~36%) が 1 μ M nifedipine に抵抗性を示した。同じ濃度の nifedipine は野生型マウスの $I_{Ca,L}$ をほぼ完全に抑制したことから、洞房結節細胞の $I_{Ca,L}$ は Cav1.2 と Cav1.3 の両方により構成されることが確認された。一方、 I_{st} の nifedipine 感受性は Cav1.2 の T1066Y 変異に影響を受けなかったことから、Cav1.2 が I_{st} の構成に関与する可能性は低いと考えられた。

このように、Cav 遺伝子改変マウスの検討により、 I_{st} に関与する LTCC サブユニットは Cav1.3 であることが強く示唆された。

次世代シーケンサーを用いた Cav1.3 レアバリエーションの同定

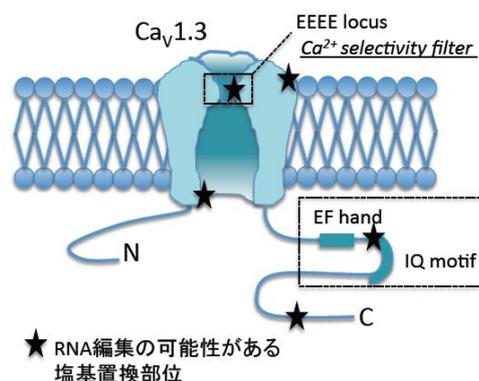


図3 次世代高速シーケンサーで同定した Cav1.3 レアバリエーション

異種性に発現した Cav1.3 が心筋 $I_{Ca,L}$ に類似のカルシウム電流を構成することは確立しているが、 I_{st} のようなナトリウム電流を誘発するという事実は確認されていない。このことは、これまでクローニングされていない Cav1.3 の未知のバリエーションが I_{st} を担っている可能性がある。そこで、ラットの洞房結節から全 RNA を回収し、次世代高速シーケンサーを用いて Cav1.3 遺伝子産物の網羅解析を行った。その結果、哺乳動物における RNA 編集の一般的な修飾パターンであるアデニンからグアニンへの置換をいくつか検出した (図3 参照)。各部位での塩基置換率は 3% 以下であったが、 Ca^{2+} 選択性フィルターや IQ モチーフのような機能的に重要なアミノ酸配列を変化させるものが含まれていた。興味深いことに、IQ モチーフにおける塩基置換は、脳においても同様に確認されており、Cav1.3 は高頻度に観察される RNA 編集のひとつの標的分子であることが最近報告されている。このことは、RNA 編集が Cav1.3 の機能的多様性をもたらす普遍的なメカニズムであること示唆するものあり、 I_{st} との関連が期待された。

(2) 得られた成果のインパクト

洞房結節のペースメーカー活動の発生メカニズムは古典的な研究課題であるものの、未だ活発な議論が続いている。それは、この生命活動に不可欠な生理機能が複雑なシステムで成立していることを示唆している。洞房結節の自発活動を支配する緩徐脱分極 (ペースメーカー電位) の背景となる膜電流は、洞房結節のペースメーカー活動のしくみを理解する最も重要な関心事である。したがって、 I_{st} はその存在が 1995 年に発見されて以来、世界的に注目されてきた。このような背景のもと、本研究が見出した Cav1.3 と I_{st} の極めて密接な相関は、 I_{st} の分子基盤の解明に大きなヒントを与えると同時に、心臓のペースメーカー活動のしくみを理解する上で重要な知見となるだろう。

(3) 今後の展望

本研究は Cav1.3 の未知のバリエーションが I_{st} を担っている可能性を示唆しているが、次世代シーケンサーにより見出された一塩基置換と I_{st} の関連性は依然明らかでない。今後、本研究で見出した Cav1.3 レアバリエーションの存在の普遍性を様々な動物種で検証するとともに、イオン選択性を含む I_{st} との機能的な相関を精査することにより、 I_{st} の分子基盤の全容解明が期待される。

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6件)

Ding WG, Xie Y, Toyoda F, Matsuura H. Improved functional expression of human cardiac kv1.5 channels and trafficking-defective mutants by low temperature treatment. PLoS One 査読有、9巻、2014、e92923
DOI:10.1371/journal.pone.0092923.
eCollection 2014.

Mesirca P, Marger L, Toyoda F, Rizzetto R, Audoubert M, Dubel S, Torrente AG, Difrancesco ML, Muller JC, Leoni AL, Couette B, Nargeot J, Clapham DE, Wickman K, Mangoni ME. The G-protein-gated K^+ channel, I_{KACH} , is required for regulation of pacemaker activity and recovery of resting heart rate after sympathetic stimulation. J Gen Physiol. 査読有、142巻、2013、113-126
DOI:10.1085/jgp.201310996.

Kumagai K, Imai S, Toyoda F, Okumura N, Isoya E, Matsuura H, Matsusue Y. 17β -Oestradiol inhibits doxorubicin-induced apoptosis via block of the volume-sensitive Cl^- current in rabbit articular chondrocytes. Br J Pharmacol. 査読有、166巻、2012、702-720
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01802.x.

Tsujii-Wakisaka K, Akao M, Ishii TM, Ashihara T, Makiyama T, Ohno S, Toyoda F, Dochi K, Matsuura H, Horie M. Identification and functional characterization of KCNQ1 mutations around the exon 7-intron 7 junction affecting the splicing process. Biochim Biophys Acta. 査読有、1812巻、2011、1452-1459

[学会発表](計3件)

豊田 太, Mesirca Pietro, Dubel Stefan, 丁 維光, Striessnig Joerg, Mangoni E Matteo, 松浦 博, Cav1.3 is involved in I_{st}

in mouse SAN cells、第91回日本生理学会大会、鹿児島、2014年3月

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, Positive correlation between I_{st} and $I_{Ca,L}$ in

guinea-pig sinoatrial node cells、第90回日本生理学会大会、東京、2013年3月

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, Cellular heterogeneity of the sustained inward Na^+ current in guinea-pig sinoatrial node、第89回日本生理学会大会、松本市、2012年3月

[図書](計0件)

[産業財産権]

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

豊田 太 (TOYODA, Futoshi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90324574

(2) 研究分担者

松浦 博 (MATSUURA, Hiroshi)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：60238962

林 維光 (DING, Wei-Guang)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80242973