

京都大学	博士 (薬学)	氏名	陶晟辰
論文題目	循環器における小胞体タンパク質TRICに関する研究		
<p><b>【序論・目的】</b></p> <p>細胞内小器官の一つである小胞体にはタンパク質合成、Ca<sup>2+</sup>貯蔵やCa<sup>2+</sup>放出などの機能が備わっており、中でも様々な刺激に応じたCa<sup>2+</sup>放出は筋収縮、神経伝達物質の放出、細胞増殖、細胞死など種々の生命現象を制御している。当研究室において数年前に同定されたTRIC (<u>t</u>rimeric <u>i</u>ntracellular <u>c</u>ation) チャンネルは、小胞体Ca<sup>2+</sup>放出に同調して機能するカウンターイオンチャンネルである。</p> <p>動物組織にはTRIC-A 及びTRIC-B の2 種類のサブタイプが独自パターンで分布し、多くの細胞系で両者の共発現が観察される。心筋、骨格筋、平滑筋に大別される筋組織では、その生理機能上の特性から小胞体膜上のCa<sup>2+</sup>放出チャンネルであるリアノジン受容体 (RyR) 及びイノシトール三リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) の発現量や機能的役割が大きく異なることが知られている。平滑筋では、受容体アゴニスト刺激によりIP<sub>3</sub>が産生され、IP<sub>3</sub>Rを介したCa<sup>2+</sup>放出により平滑筋が収縮する収縮シグナルとRyRからの自発的・局所的Ca<sup>2+</sup>放出であるCa<sup>2+</sup>スパークの発生により静止膜電位が過分極し、血管の弛緩を引き起こす過分極シグナルが存在する。TRIC-A 欠損マウスでは血管平滑筋細胞において過分極シグナルが障害されたことにより高血圧を示すことがすでに報告されている。本研究では平滑筋特異的TRIC-A過剰発現 (TRIC-A TG) マウスを作製し、その血圧変化と血圧調節機構について詳細な解析を行った。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p><b>血圧測定</b>：血圧測定は、圧センサーカテーテルを麻酔下で頸動脈から挿入し、24時間連続的に血圧を測定する血圧テレメトリーと、尻尾で血圧を測定するテールカフ法を行った。</p> <p><b>細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定</b>：腸間膜動脈第一分枝を摘出し、脂肪を除去した。血管を開き、内皮細胞を除去後、Fura-PE3 AMを負荷し、ガラスボトムディッシュ上のピンに張り付け、Ca<sup>2+</sup>イメージング装置を用いて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を計測した。</p> <p><b>血管平滑筋細胞の単離</b>：腸管から切り離れた腸間膜動脈より脂肪を除去し、第一及び第二分枝を除いた血管を用いてコラゲナーゼにより血管平滑筋を単離した。</p> <p><b>Ca<sup>2+</sup>スパーク測定</b>：単離血管平滑筋細胞をガラスボトムディッシュに撒き、Fluo-4 AMを負荷し、全反射顕微鏡にてCa<sup>2+</sup>スパークを測定した。定常状態での蛍光強度をF<sub>0</sub>とし、Ca<sup>2+</sup>スパークの振幅はΔF/F<sub>0</sub>を算出してデータを集計した。</p> <p><b>STOCs (自発的一過性外向き電流) 測定</b>：単離血管平滑筋細胞にパッチ電極を用いてホールセルパッチクランプ法を適用し、STOCsを測定した。</p> <p><b>静止膜電位測定</b>：摘出し脂肪を除去した腸間膜動脈の平滑筋面を表にして一定温度に保温されたチャンバー内のピンに張り付け、高抵抗のガラス微小電極を用いて静止膜電位を測定した。</p>			

## 【結果・考察】

テレメトリー法において、TRIC-A TGマウスがTRIC-A欠損マウスとは正反対に常に低血圧であることが明らかとなった。TRIC-A欠損マウスが高血圧を発症する原因は血管平滑筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>スパーク頻度の減少であることがすでに報告されている。そこでTRIC-A TGマウスにおける低血圧の発症原因がCa<sup>2+</sup>スパークであるかを単離血管平滑筋細胞において検討した。その結果、TRIC-A TG血管平滑筋細胞においてCa<sup>2+</sup>スパーク頻度及びスパーク発生部位の増加が明らかとなった。平滑筋では、Ca<sup>2+</sup>スパーク発生により細胞膜上の大コンダクタンスCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>チャンネルを活性化し、STOCsを発生する。そこで次に、ホールセルパッチクランプ法によりSTOCsの測定を行った。TRIC-A TGマウス血管平滑筋細胞において、STOCsの振幅の大きさ、頻度とも野生型より亢進していることが明らかになった。STOCs頻度の増大は平滑筋細胞の静止膜電位を過分極させることから、微小電極法により静止膜電位を測定した。その結果、野生型の静止膜電位が約-60 mVであったのに対して、TRIC-A TGマウスでは5 mV程度の過分極が観測された。またTRIC-A欠損マウスでは6 mV程度の脱分極が観測され、以前の報告と同様の結果が得られた。静止膜電位変化は電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの活性に影響することから、血管平滑筋におけるCa<sup>2+</sup>動態を蛍光可視イメージングにより測定した。TRIC-A TG血管平滑筋における定常状態Ca<sup>2+</sup>レベルは野生型より有意に低下することが明らかとなった。以上をまとめると、TRIC-A TGマウスにおいて血管平滑筋におけるTRIC-Aの過剰発現によりCa<sup>2+</sup>スパークの発生が亢進し、それによりSTOCsの発生増加に伴う過分極が起き、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルの活性が抑制され、定常状態Ca<sup>2+</sup>レベルが低下したことにより恒常的な血管弛緩が生じ低血圧に至ったと結論された。

本研究結果と以前の研究結果から、TRIC-A発現量の減少により高血圧に、また過剰発現によって低血圧を示したことから血管平滑筋におけるTRIC-Aの発現量が血圧を制御する可能性が示唆された。つまり血管平滑筋におけるTRIC-Aはリアノジン受容体を介するCa<sup>2+</sup>スパーク頻度を規定し、過分極シグナルを介して血圧調節に寄与するものと推察された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

提出された論文は、TRIC-Aチャンネルが血管平滑筋の小胞体Ca<sup>2+</sup>スパーク頻度を規定することで、個体レベルの血圧を制御すること解明しており、またTRIC-Aチャンネルの創薬標的としての有用性も示すものと評価された。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年2月24日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。