

## 財団法人 日中医学協会

2009 年度共同研究等助成金報告書—在留中国人研究者—

2010年 3月11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

中国人研究者氏名：朱 海 雷  
指導責任者名：寺 本 憲 功  
所属部署名：九州大学 大学院  
所在地：福岡市東区馬出3-1-1  
電 話：092-642-6077  
職名：講師  
内線：



1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

Na<sub>v</sub>1.6 をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャンネルの生理学的役割の解明

3. 成果の概要

NaV1.6 をコードする Scn8a の遺伝子欠損マウス (NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス) およびその野生型マウス

(NaV1.6<sup>+/-</sup>マウス) を用い、NaV1.6 の有無にて互いに異なる輸精管平滑筋の機能的特性に

ついて比較し平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャンネルの生理学的役割を明らかにし、英文論文発表した。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無・ (学会名・演題)

第51回 日本平滑筋学会・Functional roles of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, NaV1.6, in murine vas deferens myocytes.

FASEB Summer Research Conferences 2009・Biophysical properties of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in smooth muscles.

第83回 日本薬理学会年会・Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated resurgent Na<sup>+</sup> currents in mouse vas deferens myocytes.

(2) 発表した論文 無・ (雑誌名・題名)

Journal of Cellular Physiology・Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated Na<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens.

-日中医学協会助成事業-

## Nav1.6 をコードする遺伝子欠損マウスを用いた平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルの生理学的役割の解明

研究者氏名	朱 海雷
中国所属機関	第四軍医科大学解剖学教研室
日本研究機関	九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学
指導責任者	講師 寺本 憲功
共同研究者	柴田 篤志

### 要 旨

興奮性細胞の活動電位における速い立ち上がり成分はフグ毒の投与にて可逆的に消失することから、主に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (voltage-gated Na<sup>+</sup> channels : NaV) の活性化にて引き起こされ、細胞の興奮発生に重要な生理的役割を果たしていると考えられてきた。本研究において平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルのチャネル主要タンパク質でかつチャネル孔を形成する  $\alpha$  サブユニットタンパク質 (Nav1.6) をコードする *Scn8a* の遺伝子欠損マウス (Nav1.6<sup>-/-</sup>マウス) およびその野生型マウス (Nav1.6<sup>+/+</sup>マウス) を用い、Nav1.6 の有無にて両輸精管平滑筋において機能的特性の違いを組織および細胞レベルで比較した。平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネル (Nav1.6) は膜電流における内向き電流を活性化させる電位の閾値を下げ、より負極側で内向き電流が活性化されやすい状態に遷移させるという生理学的な役割を有することを明らかにした。また平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルの補助的制御を行っている  $\beta$  サブユニットについて分子生物学的手法を用いて検索し、 $\beta 1$  サブユニットのみが検出された。これらの結果から平滑筋型 Na<sup>+</sup>チャネルを構成する  $\alpha$  サブユニットタンパク質と  $\beta$  サブユニットタンパク質の組み合わせは Nav1.6 (*Scn8a* 遺伝子にてコード) /  $\beta 1$  サブユニット (*Scn1b* 遺伝子にてコード) であることが初めて明らかとなった。

**Key Words** 電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル, 平滑筋,  $\alpha$  サブユニット,  $\beta$  サブユニット, 活動電位

### 緒 言 :

興奮性細胞において活動電位における速い立ち上がり成分はフグ毒 (tetrodotoxin : TTX) 投与にて可逆的に消失することから、主に電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネル (voltage-gated Na<sup>+</sup> channels : NaV チャネル) の活性化にて引き起こされ、興奮の発生に重要な生理的役割を果たしている。さらに近年、NaV チャネルは、神経回路の形成および痛覚伝達にも主要な役割を果たしていることも新たに解明された。

電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルの分子構造は、大きな  $\alpha$  サブユニット (約 260kDa) と小さな 2つの  $\beta$  サブユニット (30-40kDa) から構成される 3 量体であることが明らかとなった (図 1)。 $\alpha$  サブユニットは、チャネルポアを形成し、TTX 結合部位、膜電位感受性および Na<sup>+</sup>透過性等の Na<sup>+</sup>チャネルの主な機能を有する。現在までに  $\alpha$  サブユニットタンパク質をコードする遺伝子として 10 個の遺伝子 (*Scn1a*~*Scn10a* 遺伝子) が明らかとなり、 $\alpha$  サブユニットタンパク質は選択的な Na<sup>+</sup>透過性を示すことから Nav1.X (voltage-

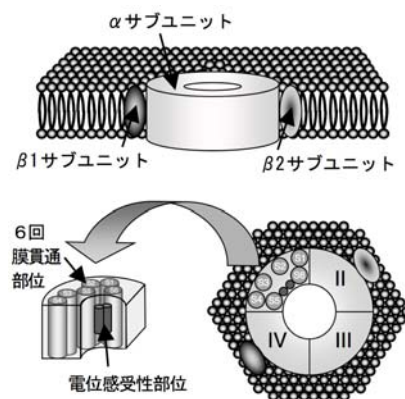


図 1 電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルの分子構造

gated Na<sup>+</sup> channel type 1.X) と呼ばれる一群のファミリーに分類されている (Goldin, 2001)。一方、βサブユニットはαサブユニットのアクセサリユニットとして細胞内輸送やチャネル開閉機能の補助的な調節機構に関与しており、これまでβサブユニットタンパク質をコードする遺伝子として4個の遺伝子 (*Scn1b*~*Scn4b* 遺伝子) が同定された。しかし平滑筋における NaV チャネルの特性やその分子実体に関する報告はほとんどなく、またその生理学的役割も未だ全く不明のままである。自律神経の機能終末 (神経終末及びバリコシティ等) から放出される興奮性及び抑制性神経伝達物質にてその収縮・弛緩反応が直接制御されている平滑筋において NaV チャネルの活性化にて引き起こされる活動電位の発生や興奮伝播機序を解明することは『効果器』としての平滑筋の運動・制御機序を理解する上で非常に生理学的に重要であると考えられる。本研究ではマウス輸精管平滑筋を標本として選んだ。その主な理由は、下記の理由からである。

- (1) 輸精管は主に交感神経にて支配され、その神経分布や神経制御機序が明らかであること、
- (2) マウス輸精管平滑筋の活動電位は TTX 感受性を示すこと (Holman *et al.*, 1995)、
- (3) マウス NaV チャネルのサブユニット遺伝子や蛋白質の遺伝子情報が全て明らかなこと、
- (4) 主な *Scn8a* 遺伝子欠損マウスが既に作成され、米国ジャクソンラボ社から購入可能なこと、

近年、我々は、様々な分子生物学および電気生理学的手法を用い、マウス輸精管平滑筋における NaV チャネルの主要構造を成すαサブユニットタンパク質は *Scn8a* にてコードされる NaV1.6 であると報告した (Zhu *et al.*, 2008)。さらにその野生型マウス (NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス) における輸精管平滑筋細胞では Na<sup>+</sup>電流は記録されたが、一方、NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋では Na<sup>+</sup>電流は全く記録されなかった (Zhu *et al.*, 2009)。以上の結果から平滑筋型 NaV チャネルのαサブユニットタンパク質の分子実体は NaV1.6 である可能性が強く示唆され、NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスを用い、両マウスにおける輸精管平滑筋の機能的な特性を比較することにて未だその生理学的役割が全く不明な平滑筋型 NaV チャネルの特性を明らかにすることが出来るのではないかと考えた。本研究では NaV1.6 の有無にて両輸精管平滑筋における異なる機能的特性を比較し、平滑筋型 NaV チャネルの生理学的役割について検討した。また NaV チャネルの補助的制御を行っているβサブユニットについて分子生物学的手法を用いて検索した。

### 対象と方法：

NaV1.6 をコードする *Scn8a* の遺伝子欠損マウス (NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス) およびその野生型マウス (NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス) のそれぞれの輸精管平滑筋を用いた。βサブユニット遺伝子の検出を行う

ため、特異的な primer を設計し、通法の RT-PCR 法による解析を行った。また特異的反応を示す抗 NaV1.6 抗体を用いてウエスタンブロット法および免疫組織化学染色法を行い、NaV1.6 蛋白質の同定およびその組織学的な局在について検討した。さらに膜電流の電気生理学的特性を明らかにするために通法のパッチクランプ法を適用した (Zhu HL *et al.*, 2010)。

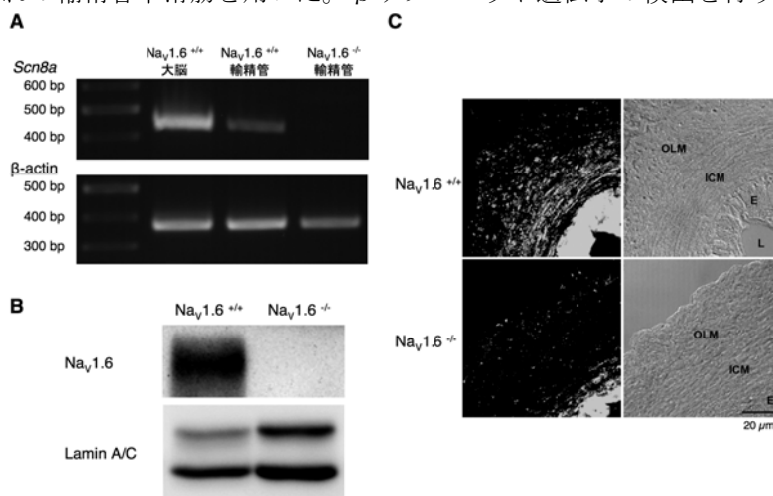


図2 NaV1.6 の分子生物学的特徴

**結果：**

1) NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスと NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスにおける分子生物学的特徴に関する比較

NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスを用い、両マウスにおける輸精管平滑筋の分子生物学的特性を比較した。RT-PCR 法にて NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスの大脳および輸精管平滑筋において NaV1.6 をコードする *Scn8a* 遺伝子が検出された。一方、NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスにおける輸精管平滑筋では *Scn8a* 遺伝子は検出されなかった (図 2 A)。NaV1.6 タンパク質に対して特異的な反応を示す抗 NaV1.6 抗体を用いてウェスタンブロット法を行うと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスの輸精管平滑筋のサンプルにおいては単一のバンドとして NaV1.6 タンパク質 (約 260 kDa) が検出された。しかし NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスの輸精管平滑筋のサンプルにおいては何も検出されなかった (図 2 B)。さらに同じ抗 NaV1.6 抗体を用いて免疫組織化学染色を行うと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスの輸精管平滑筋層に NaV1.6 タンパク質が特異的に同定された。一方、NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスの輸精管平滑筋層においては NaV1.6 タンパク質との反応は全く観察されなかった (図 2 C)。

2) パッチクランプ法を用いたランプ型脱分極電位波形にて活性化された膜電流の比較

NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス輸精管平滑筋単離細胞に対してパッチクランプ法を適用し、両マウスにおける電気生理学的特性を比較し、平滑筋型 NaV チャンネル (NaV1.6) の生理学的役割について調べた。図 3 に示すランプ型脱分極電位波形を与えると NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス輸精管平滑筋細胞において内向き膜電流が生じた (コントロール: 図 3 A)。フグ毒 (TTX) を投与すると膜電流は抑制され、さらにニフェジピン (L 型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断薬) および Cd<sup>2+</sup> (非選択的チャンネル遮断薬) を各々、追加投与すると膜電流はさらに抑制された (図 3 A)。コントロールの膜電流波形から全ての遮断薬が存在の時の膜電流波形を差し引くと全ての遮断薬で抑制された膜電流波形が得られ、またフグ毒存在下で膜電流波形を差し引くとフグ毒非感受性膜電流成分が得られた (図 3 B)。これらの結果からフグ毒感受性膜電流、ニフェジピン感受性膜電流およびニフェジピン非感受性膜電流成分が得られた (図 3 C)。また各々の膜電流成分の活性化閾値の

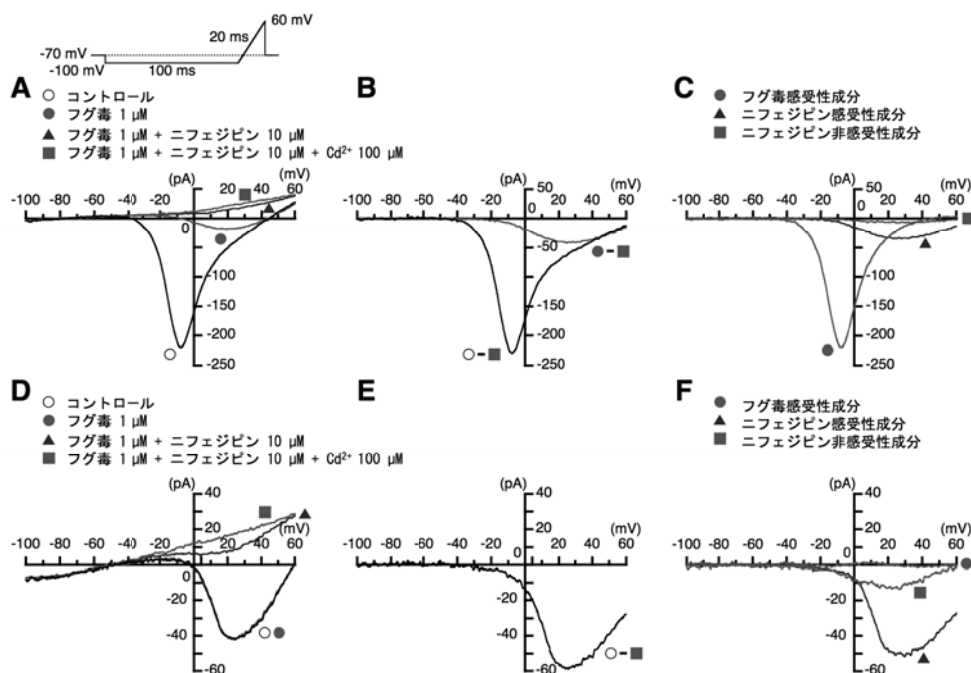


図 3 NaV1.6<sup>+/+</sup>および NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞における膜電流成分

結果を表1に示した。同様の実験プロトコールを NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞に対して行った(図3D、E)。NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞におけるニフェジピン感受性膜電流およびニフェジピン非感受性膜電流成分は NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス輸精管平滑筋細胞の結果と有意な差は見られなかったが、フグ毒感受性膜電流は全く記録されなかった。NaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞における各々の膜電流成分の活性化閾値の結果を表1に示した。

	Na <sub>v</sub> 1.6 <sup>+/+</sup>	Na <sub>v</sub> 1.6 <sup>-/-</sup>
膜電流 (コントロール)	-38.5 ± 4.6 mV (n = 6)	-30.4 ± 3.4 mV (n = 5)
膜電流 (+ フグ毒)	-31.2 ± 4.9 mV (n = 6)	-31.6 ± 5.1 mV (n = 5)
フグ毒感受性成分	-39.1 ± 4.0 mV (n = 6)	—————
ニフェジピン感受性成分	-31.3 ± 3.7 mV (n = 6)	-29.2 ± 4.0 mV (n = 5)
ニフェジピン非感受性成分	-32.2 ± 4.4 mV (n = 6)	-31.5 ± 5.1 mV (n = 4)

表1 NaV1.6<sup>+/+</sup>およびNaV1.6<sup>-/-</sup>マウス輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の活性化閾値

### 3) RT-PCR 法によるβサブユニット遺伝子の検出

NaV1.6と共発現しているβサブユニットの存在を調べるため、RT-PCR法にてマウス輸精管平滑筋および大脳におけるβサブユニット遺伝子(Scn1b~Scn4b)の検出を行った。遺伝子情報を基にして各々のβサブユニット(β1~4サブユニット)をコードするβサブユニット遺伝子に対して特異的に反応するprimerを設計した。大脳においてはβ1~4サブユニットの全てのβサブユニット遺伝子が検出された。一方、輸精管平滑筋においてはβ1サブユニット遺伝子のみが検出された。

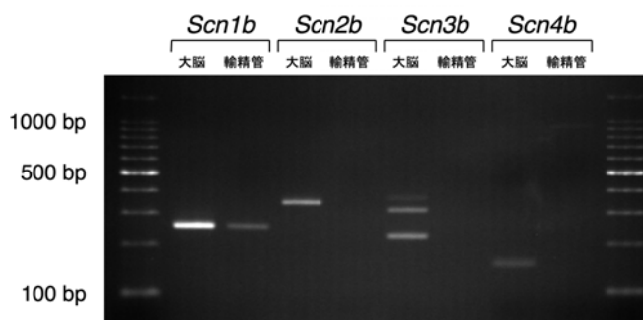


図4 マウス輸精管平滑筋細胞におけるβサブユニット遺伝子の検出

### 考 察 :

ラット子宮平滑筋においてβサブユニットに関してはScn1b~Scn4bの全ての遺伝子が検出された(Seda et al., 2007)。一方、本研究において特異的に反応するprimerを設計し、マウス大脳においてはScn1b~Scn4bの全ての遺伝子が検出され、マウス輸精管平滑筋においてはScn1bのみが検出された。この結果からマウス輸精管平滑筋におけるNaVチャネルを構成するαサブユニットタンパク質とβサブユニットタンパク質の組み合わせは、NaV1.6(Scn8a遺伝子にてコード) / β1サブユニット(Scn1b遺伝子にてコード)であることが強く示唆され、平滑筋型NaVチャネルの分子実体が明らかとなった。

また NaV1.6<sup>-/-</sup>マウスと NaV1.6<sup>+/+</sup>マウスの輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の電気生理学的特性、特にその活性化閾値を比較すると NaV1.6 を介する Na<sup>+</sup>電流はもっとも負極で活性化され、最大振幅値を示した。すなわち、NaV1.6 を介して生じる Na<sup>+</sup>電流は輸精管平滑筋細胞における膜電流成分の活性化をイニシエーションさせるという重要な生理学的役割を果たしていることが考えられる。

以上、本研究をまとめると野生型マウス (NaV1.6<sup>+/+</sup>マウス) 輸精管平滑筋細胞において NaV1.6 が唯一、機能的に発現している NaV チャンネルの  $\alpha$  サブユニットであることが明らかとなった。さらに NaV1.6 は脱分極刺激にて生じる最大の内向き電流成分を形成し、細胞の興奮性において重要な生理学的役割を果たしていることが示唆された。

#### 参考文献：

1. Goldin AL : Resurgence of sodium channel research. Annual Review of Physiology 63, 871-894 (2001).
2. Holman ME, Tonta MA, Parkington HC, Coleman HA : Tetrodotoxin-sensitive action potentials in smooth muscle of mouse vas deferens. Journal of the Autonomic Nervous System 52, 237-240 (1995).
3. Seda M, Pinto FM, Wray S, Cintado CG, Noheda P, Buschmann H, Candenas L : Functional and molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats. Biol Reprod 77, 855-863 (2007).
4. Zhu HL, Aishima M, Morinaga H, Wassall RD, Shibata A, Iwasa K, Nomura M, Nagao M, Sueishi K, Cunnane TC, Teramoto N : Molecular and biophysical properties of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in murine vas deferens. Biophysical Journal 94, 3340-3351 (2008).
5. Zhu HL, Shibata A, Inai T, Nomura M, Shibata Y, Brock JA, Teramoto N : Characterization of Na<sub>v</sub>1.6-mediated Na<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens. Journal of Cellular Physiology 233, 234-243 (2010).
6. Zhu HL, Wassall RD, Takai M, Morinaga H, Nomura M, Cunnane TC, Teramoto N : Actions of veratridine on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated Na<sup>+</sup> currents, Na<sub>v</sub>1.6, in murine vas deferens myocytes. British Journal of Pharmacology 157, 1483-1493 (2009).

注：本研究は、2009年7月22日『第51回日本平滑筋学会総会』にて特別選出演題として選ばれ口演発表、2009年7月22日『第51回日本平滑筋学会』、2009年8月3日『FASEB Summer Research Conferences 2009 Smooth Muscle』、2010年3月17日『第83回日本薬理学会年会』にてポスター発表、『Journal of Cellular Physiology』(2010年4月VOL223巻、234-243)に掲載。

作成日：2010年3月11日