



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1437号
学位記番号	第298号
氏名	大城 隼也
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現
論文審査担当者	主査： 湯浅 博昭 副査： 今泉 祐治，藤井 聡，大澤 匡弘，山村 壽男

名古屋市立大学学位論文

# 門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現

2014 年

大城 隼也

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学  
(指導：今泉 祐治 教授)

名古屋市立大学学位論文

# 門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現

2014 年

大城 隼也

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学  
(指導：今泉 祐治 教授)

## Functional expression of TMEM16 family in murine portal vein

Junya Ohshiro

Department of Molecular and Cellular Pharmacology,  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Nagoya City University  
(Thesis Adviser: Professor Yuji Imaizumi)

一、 本論文は 2014 年 3 月 名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 湯浅 博昭 教授  
副査 今泉 祐治 教授  
副査 藤井 聡 教授  
副査 大澤 匡弘 准教授  
副査 山村 寿男 准教授

二、 本論文は、学術誌に収載された次の報文を基礎とするものである。

基礎となる報文

1. J. Ohshiro, H. Yamamura, T. Saeki, Y. Suzuki, Y. Imaizumi

The multiple expression of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels via homo- and hetero-dimer formation of TMEM16A splicing variants in murine portal vein

*Biochemical and Biophysical Research Communications* **443** 518-23 (2014)

2. J. Ohshiro, H. Yamamura, Y. Suzuki, Y. Imaizumi

Modulation of TMEM16A channel activity as  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{Cl}^-$  conductance via the interaction with actin cytoskeleton in murine portal vein

*J Pharmacol Sci.* (in press)

三、 本論文の基礎となる研究は、今泉祐治 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

# 目次

## 第Ⅰ章 序論 . . . . . -1-

- I-1 Cl<sup>-</sup>チャネル
- I-2 Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネル (CaCC)
- II-3 TMEM16 family
- II-4 TMEM16A
- II-5 TMEM16A と生理機能
- II-6 細胞骨格とイオンチャネル
- II-7 門脈平滑筋と CaCC

## 第Ⅱ章 実験方法 . . . . . -7-

- II-1 マウス門脈平滑筋細胞の単離
- II-2 RNA 抽出及び cDNA 合成
- II-3 マウス TMEM16A のクローニング
- II-4 リアルタイム定量 PCR 法
- II-5 免疫抗体染色法
- II-6 電気生理学的記録法
- II-7 TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)イメージング
- II-8 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)解析
- II-9 一分子 photobleaching-step 法
- II-10 溶液組成
- II-11 使用試薬
- II-12 統計処理

## 第Ⅲ章 結果及び考察 . . . . . -13-

- III-1 門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現
  - III-1-1 TMEM16 family の発現解析

- Ⅲ-1-2 門脈平滑筋単離細胞における CaCC 活性
- Ⅲ-1-3 門脈平滑筋に発現する TMEM16A スプライスバリエント体の同定
- Ⅲ-1-4 TMEM16A スプライスバリエント体のホモ二量体形成
- Ⅲ-1-5 TMEM16A スプライスバリエント体のヘテロ二量体形成
- Ⅲ-1-6 要約と考察

## Ⅲ-2 アクチン骨格による門脈平滑筋 CaCC 活性の制御

- Ⅲ-2-1 門脈平滑筋 CaCC 活性に対するアクチン関連薬の効果
- Ⅲ-2-2 TMEM16A 発現細胞における cytochalasin D の作用
- Ⅲ-2-3 要約と考察

## 第Ⅳ章 総括 . . . . . -32-

## 第Ⅴ章 謝辞 . . . . . -33-

## 第Ⅵ章 引用文献 . . . . . -34-

本文では以下の略語を用いた。

CFTR：嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子

CaCC：Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネル

IP<sub>3</sub>：イノシトール三リン酸

RyR：リアノジン受容体

BK チャネル：大コンダクタンス Ca<sup>2+</sup>活性化 K<sup>+</sup>チャネル

VDCC：電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル

SCAN チャネル：小コンダクタンス Ca<sup>2+</sup>活性化非選択的陽イオンチャネル

SNPs：一塩基多型

DRG：後根神経節

CaM：カルモジュリン

ICC：カハールの間質細胞

NFA：ニフルミ酸 (CaCC 阻害薬)

AGPC 法：酸グアニジニウム・フェノール・クロロホルム法

RT：逆転写

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応

HEK293 細胞：ヒト胎児腎臓由来 293 細胞

GAPDH：グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素

PBS：リン酸緩衝液

TIRF 顕微鏡：全反射蛍光顕微鏡

YFP：黄色蛍光タンパク質

CFP：青色蛍光タンパク質

FRET：蛍光共鳴エネルギー移動

GFP：緑色蛍光タンパク質

TEA：テトラエチルアンモニウム (BK チャネル・電位依存性 K<sup>+</sup>チャネル阻害薬)

ERM：エズリンーラディキシンーモエシン

# 第 I 章 序章

## I-1 Cl<sup>-</sup>チャネル

生体内において Cl<sup>-</sup>イオンは、最も多量に存在するイオンの一つであり、そのため Cl<sup>-</sup>チャネルは静止膜電位の形成や、水・イオンの輸送、細胞容量の調節など、細胞の基本的機能に深く関与しており、チャネルタンパクの変異などによる様々な疾患との関連が報告されている。哺乳類において Cl<sup>-</sup>チャネルは、その活性化機構によって① cAMP 依存的なリン酸化型、②細胞内 Ca<sup>2+</sup>依存性、③電位依存性、④リガンド結合型、⑤細胞容量性、の 5 種類に分類され、複数のタンパク質がその分子実体として既に同定されている [1] (表 1)。

嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF)は、イオンチャネル異常が原因であることが示された最初の遺伝子疾患であり、常染色体劣性の疾患である。外分泌腺が粘稠な液を分泌し、エクリン汗腺における Na<sup>+</sup>及び K<sup>+</sup>の再吸収障害のため、Na<sup>+</sup>や Cl<sup>-</sup>濃度の高い汗を分泌する。CF の頻度としては、黒人や東洋人では少ないのに対し、白人における保因者は 25 人に 1 人と、白人の先天性代謝疾患の中で最も頻度の高い疾患である。慢性閉塞性肺疾患や膵外分泌腺障害などを引き起こす要因となり、非常に重篤な疾患であ

タンパク質	制御機構	生理的役割	関連疾患
CFTR	cAMP依存的なリン酸化	気管、粘膜下線、膵臓、腸、精巣上皮細胞におけるCl <sup>-</sup> 分泌 汗腺のCl <sup>-</sup> 吸収	嚢胞性線維症
ClC-1	脱分極	骨格筋Cl <sup>-</sup> conductance 活動電位後の再分極相形成	筋緊張症
ClC-2	細胞の膨張	ニューロンのCl <sup>-</sup> homeostasis 細胞容量の制御	てんかん?
ClC-4,5	?	エンドソーム、シナプス小胞酸性化促進	ClC-5 : Dent病 (蛋白尿、腎結石)
ClC-7	OSTM1の膜発現	骨吸収におけるCl <sup>-</sup> 輸送 リソソーム酸性化	大理石骨症 リソソーム蓄積症
ClC-Ka,Kb	弱い電位依存性 barttin	腎尿細管、内耳の経上皮Cl <sup>-</sup> 輸送	ClC-Kb : Bartter症候群 (barttin異常による聴覚障害)
GABA受容体	GABA	脳のシナプス伝達の抑制	てんかん
Glycine受容体	glycine, β-alanine, taurine	脊髄のシナプス伝達の抑制	過剰驚愕症
Bestrophins	細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度の上昇	網膜色素上皮のCl <sup>-</sup> 輸送 上皮のCa <sup>2+</sup> 依存的Cl <sup>-</sup> 分泌	Best病

表 1 Cl<sup>-</sup>チャネルの種類及びその特性



るといえる。この疾患の原因は、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) をコードする遺伝子の異常であり、CFTR の遺伝子を気道上皮に導入するアデノウイルスベクターやリポソームを用いた遺伝子治療が試みられている。

この他にも Cl<sup>-</sup>チャネルに関連した疾患として、破骨細胞の機能不全により骨のリモデリングとモデリングに異常が起き、びまん性の骨硬化を生じる大理石病や、高 Ca<sup>2+</sup>尿症や腎石灰化などを引き起こす Dent 病、イオンの再吸収能低下とそれに伴う水分喪失によりレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の亢進を引き起こす Bartter 症候群なども報告されており、Cl<sup>-</sup>チャネルの生理学的な重要性を伺い知ることができる。

## I-2 Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネル (CaCC)

上述した Cl<sup>-</sup>チャネルの一つである Ca<sup>2+</sup>活性化 Cl<sup>-</sup>チャネル (CaCC) は、セカンドメッセンジャーの一つとして知られている細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇により活性化される Cl<sup>-</sup>チャネルであり、様々な種類の細胞において広く発現しており、液体分泌や神経の興奮性、平滑筋収縮などの生理現象に深く関与している。特に平滑筋組織に着目すると、CaCC

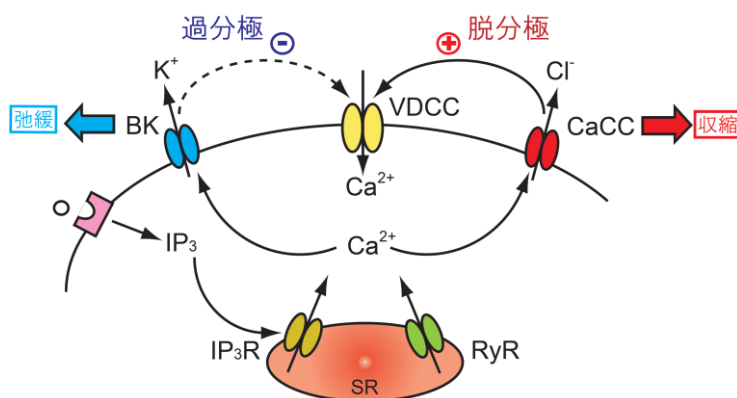


図1 平滑筋における膜電位調節機構

BKチャネルとCaCCは、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度依存的な膜電位調節機構において重要な因子である。平滑筋細胞におけるCl<sup>-</sup>の平衡電位は、静止膜電位に比べ浅く、そのためCaCCの開閉はCl<sup>-</sup>流出により膜を脱分極方向へシフトさせる。

の活性化は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度依存的な細胞膜の脱分極因子として重要である。イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>)受容体やリアノジン受容体 (RyR)からの放出などにより上昇した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は、細胞膜上に存在する大コンダクタンスCa<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル(BKチャネル)やCaCCを活性化する。その結果、BKチャネルによる過分極とCaCCによる脱分極が、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル (VDCC) を介したCa<sup>2+</sup>流入を間接的に制御し、それにより筋緊張を調節していると考えられている (図1)。血管平滑筋における定常的緊張度上昇は高血圧症に直結するなど、CaCCの機能解明は生理現象の解明のみならず、病態解明や新たな創薬ターゲットの観点において非常に重要であると考えられる。このようにCaCCはその重要性が報告される一方で、詳細な分子実体につい

ては、これまでに様々な候補分子が提唱されてきたにも関わらず、明らかとされてこなかった。

### I-3 TMEM16 family

近年、TMEM16 family メンバーの 1 つである TMEM16A が CaCC 活性を持つことが報告された [2,3,4]。また TMEM16A と比較的相同性の高い TMEM16B に関して、同様に CaCC 活性が報告されたことから、TMEM16 family が新たな CaCC の候補分子として、注目を浴びることとなった。

TMEM16 family は、TMEM16A~16H、16J、16K の 10 種類のメンバーからなる family であり、それぞれが 8 回膜貫通構造を有すると考えられている (図 2)。TMEM16A と TMEM16B ではアミノ酸の相同性は 60% 程度であるのに対し、他の TMEM16 family メンバーでは 40% 程度もしくはそれ以下と低い。イオンチャネルの観点から見ると、TMEM16A 及び 16B は CaCC を形成するのに対し、TMEM16F は Cl<sup>-</sup>チャネルとしての報告や、Ca<sup>2+</sup>活性化非選択的陽イオンチャネル (SCAN チャネル) としての報告などがあり、統一した見解は得られていない [5,6,7,8]。また TMEM16C は Na<sup>+</sup> 感受性 K<sup>+</sup>

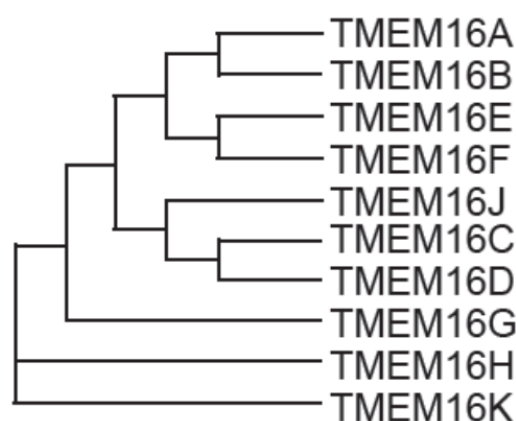


図 2 TMEM16 family

TMEM16 family は 10 種類のメンバーから構成される family である。TMEM16A と TMEM16B は相同性が高く、どちらも CaCC 活性を有することが知られている。

	発現分布	CaCC活性	生理的機能	文献
TMEM16A	気管、ICC、分泌組織、DRGニューロン、平滑筋	○	気管軟骨環形成 唾液分泌 平滑筋収縮・自発運動能?	[9-19]
TMEM16B	網膜、皮質、嗅球、脳、網膜色素上皮	○	嗅覚繊毛細胞でのシグナル増強 光受容体におけるCaCC活性	[20-22]
TMEM16C	神経組織、DRGニューロン		痛覚の抑制 Na <sup>+</sup> 活性化K <sup>+</sup> チャネル?	[23, 24]
TMEM16D	神経組織に広く発現			[24]
TMEM16E	骨格筋、骨組織、甲状腺		顎骨骨幹異形成症に関連 筋緊張性筋ジストロフィーに関連	[25, 26]
TMEM16F	普遍的に存在	?	カルシウム依存的なリン脂質 スクランプリング Cl <sup>-</sup> チャネル? 陽イオンチャネル?	[5, 6, 24, 27]
TMEM16G	前立腺 前立腺癌細胞、胃	?		[24, 28, 29]
TMEM16H	胚性幹細胞、胎児脳、神経組織			[30]
TMEM16J	軟骨		p53誘発性遺伝子	[24, 31]
TMEM16K	普遍的に存在			[24]

表2 TMEM16 familyの発現と機能

チャンネル (Slack チャンネル)の一部を形成するという報告もあり、他の TMEM16 family メンバーにおけるイオンチャンネル活性の有無についても、現在注目されている [23]。さらに疾患との関連もいくつか報告されており、TMEM16B では、一塩基多型 (SNPs) がパニック障害に関係しているという報告や、血友病に似た血液凝固阻害を引き起こすフォンウィルブランド病の原因になるという報告がある [32,33]。また TMEM16E は、顕著な骨の脆弱性、骨性異形成症を原因とする難治性の顎骨骨髓炎を引き起こす疾患である顎骨骨幹異形成症の罹患者においてこの遺伝子の変異が見られることや、TMEM16E の劣性変異により筋緊張性筋ジストロフィーが生じるなどの報告もある [25,26]。生理的役割としては、細胞膜リン脂質の非対称性に関わるスクランブラーゼに TMEM16F が関与していることが報告されている [27]。この TMEM16F によるスクランブラーゼ活性は、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存的なものであることから、非常に興味深い。以上のように、TMEM16 family は生理機能や病態形成に大きく関与しており、TMEM16 family の生理学的及び病態生理学的な重要性が伺われる (表 2)。

#### I-4 TMEM16A

TMEM16A は 8 回膜貫通構造を有しており、CaCC を形成する (図 3)。また TMEM16A は N 末端領域に存在する segment a 及び b、細胞内第一ループに存在する segment c 及び d の計 4 箇所の segment をそれぞれ含有・欠損することにより生じる複数のスプライスバリエント体が報告されており、様々な電気生理学的特徴に影響を与えることが知られている [34]。

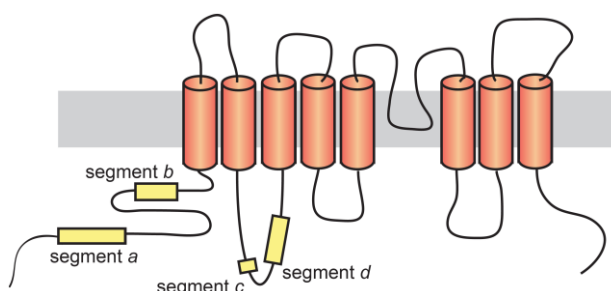


図 3 TMEM16A の推定される二次元構造

TMEM16A は 8 回膜貫通構造を有しており、細胞内 N 末端領域に 2 箇所(segment a 及び b)、細胞内第 1 ループに 2 箇所(segment c 及び d)の計 4 箇所のエキソンの含有・欠損によるスプライスバリエント体が存在する。

segment b は  $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質であるカルモジュリン (CaM) との結合が推定される配列の一部を含んでおり、 $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に影響すると考えられている [35,36]。一方で TMEM16A の活性化に CaM が必要でないという報告もなされており、CaM との結合能や活性化との関連性については未だ結論に至っていない [37]。また segment c は電位依存性や外向き整流性、segment d は活性化・脱活性化のキネティクスに影響を及ぼすとそれぞれ報告されており [34,38]、スプライスバリエント体により多様な CaCC 活性を持つことが想定されている。

また TMEM16A はホモ二量体を形成する可能性が高いと報告されており、細胞内 N 末端領域に二量体形成に必要なドメインが存在するとされている [39,40]。スプライスバリエント体同士における多量体形成について報告はないが、TMEM16A と同様に CaCC 活性を持つ TMEM16B とヘテロ二量体を形成する可能性が高いと報告されており [41]、その組み合わせによっても様々な性質の CaCC 活性を生み出すことが考えられる。このように TMEM16A の性質については次第に明らかとされてきているが、スプライスバリエント体を含めた発現パターン等、未だ不明な点が多い。

### **I-5 TMEM16A と生理機能**

TMEM16A は 2008 年における CaCC 活性の報告 [2,3,4] 以来、様々な組織においてその発現が報告されており、その生理機能と深く関与している。TMEM16A は唾液腺腺房細胞において発現が認められ、唾液分泌に寄与しているという報告がある [17]。またヒト心臓線維芽細胞に発現し、アンジオテンシン II により活性化される CaCC 電流に寄与していることも明らかとされている [42]。さらに平滑筋組織に着目すると、大動脈や肺動脈、大脳動脈などの血管平滑筋や、腸管平滑筋などの自発運動を制御しているとされているカハールの間質細胞 (ICC) での発現が報告されている [9,11,12,13,18,19,43]。大動脈平滑筋では、アゴニスト誘発性収縮に対し、TMEM16A 特異的阻害薬が弛緩作用を示すことから、TMEM16A のチャネル活性が収縮因子として機能していると考えられる。また、平滑筋細胞の増殖にも関与しているという報告もあり、血管リモデリングにおける機能も重要であると考えられる [44]。一方で ICC において、自発収縮やペースメーカー活性に大きく寄与していると考えられているが、その詳細な分子機構はこれまで明らかとはされていない。

### **I-6 細胞骨格とイオンチャネル**

細胞骨格 (cytoskeleton) は、マイクロフィラメント (アクチンなど)、中間フィラメント (ビメンチンなど)、微小管 (チューブリンなど) から成り、細胞の形態や運動性だけでなく、他のタンパク質の機能修飾などにおいて重要な役割を果たしている。細胞骨格の一つであるマイクロフィラメントを担っているアクチンは、シグナル伝達や膜タンパク質との相互作用が一般に広く知られている。イオンチャネルとアクチンとの相互作用には様々な様式がこれまでに報告されている。上皮性 Na<sup>+</sup>チャネルや、Cl<sup>-</sup>チャネルの一つである ClC-2 チャネルなどはアクチンと相互作用することにより活性が制御されている [45,46]。これらのイオンチャネルはそれぞれ N 末端領域、C 末端領

域にアクチンと相互作用する配列を持ち、アクチンと直接相互作用することにより、チャンネル活性が制御される。またアクチン重合を阻害することにより、CFTR Cl<sup>-</sup>チャンネル電流は減弱するのに対し[47]、BK チャンネル電流や ClC-2 チャンネル電流は活性化される [45,48]。それに加え、BK チャンネルの動態はアクチンフィラメントにより制御されているという報告もある [49]。このようにアクチン骨格は、イオンチャンネル活性に密接に関わり、その機能を調節している重要な因子である。

### I-7 門脈平滑筋と CaCC

門脈は消化管で吸収された栄養分を肝臓へ運ぶ非常に重要な役割を果たしている。また門脈平滑筋は自動収縮能を持つ非常に興奮性の高いユニークな組織であり、この自発収縮は低圧系にある門脈において効率よく血液を消化管から肝臓へ輸送するために重要であると考えられている。門脈では、以前より CaCC の発現が報告されている [11,50,51]。門脈平滑筋において CaCC は、平滑筋の収縮機構やペースメーカー活性に深く関与していると考えられており、自発収縮が L 型 VDCC 阻害薬だけでなく CaCC 阻害薬であるニフルミ酸 (NFA) の投与によっても抑制されることから、その関与が伺われる [51]。

門脈における重篤な疾患として門脈圧亢進症が挙げられる。門脈系血管の循環障害が生じ、常に 15 mmHg 以上に上昇した状態が門脈圧亢進症と定義されている [76]。門脈圧亢進症の原因は主に肝前性、肝内性、肝後性と分類され、肝前性では門脈血栓症、肝内性では肝硬変、肝後性では Budd-Chiari 症候群によるものが多い。また原因不明の特発性門脈圧亢進症もあり、厚生労働省が定める難病に指定されている。門脈圧亢進症の進行は、食道や胃静脈瘤を含む側副血行路の形成を生じ、肝性脳症などの重篤な合併症を引き起こすことがある。治療法も合併症により多様であり、側副血行路の発達部位が原疾患の違いによって一意的に定まらないため、統一した治療は難しいとされている。こうした理由から、門脈平滑筋における収縮機構や自発運動能の分子機構解明は非常に重要な課題であるといえる。

## 第Ⅱ章 実験方法

### Ⅱ-1 マウス門脈平滑筋細胞の単離

雄性マウス (C57BL/6, 8~12 週齢)から門脈を摘出し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's 溶液を用いて 37°C 10 分間のプレインキュベーションを行った後、3 mg/mL collagenase type IA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2 mg/mL trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich), 2 mg/mL bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), 0.1 mg/mL protease type XIV (Sigma-Aldrich)を含む  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hanks 溶液で 37°C 10 分間の酵素処理を行った。酵素処理後、熱加工により先を丸めたガラス管を用いて数回ピペッティングすることにより、門脈平滑筋単離細胞を得た。

### Ⅱ-2 RNA 抽出及び cDNA 合成

門脈から AGPC (Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol Chloroform)法により総 RNA を抽出し、OD<sub>260</sub> から RNA 濃度を計算した。Gibco BRL 社のプロトコールに従い、SUPERScript II 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, USA)及び Oligo (dT)<sub>12-18</sub> プライマー (Invitrogen)を用い、逆転写 (RT)酵素反応を経て cDNA を合成した [52]。

### Ⅱ-3 マウス TMEM16A のクローニング

上述により得られた門脈 cDNA を用い、マウス TMEM16A 遺伝子をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)法によって得た後、ライゲーションにより発現ベクター pcDNA3.1(+)/Neo (Invitrogen)に導入した。また蛍光ベクター pEYFP-N1, pECFP-N1 (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)にマウス TMEM16A 遺伝子を導入したのも同様に作製した。ヒト胎児腎臓由来 293 細胞 (HEK293 細胞)への一過性発現には 2 µg DNA 及び LipofectAmine 2000 (Invitrogen)を用い、12-72 時間後に各種実験に用いた。

### Ⅱ-4 リアルタイム定量 PCR 法

リアルタイム定量 PCR 法には、PCR 検出定量システム (ABI7000, Applied Biosystems, Foster City, USA)を用いて行った。サイバーグリーンアッセイ法を用いてサイクルごとの蛍光を測定し、その蛍光強度から、あらかじめ作成した検量線をもとにして、グリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (GAPDH) mRNA 発現量を内在性

標準として相対的な mRNA 発現量を GAPDH に対する比として表した。

用いたプライマー配列は表 3 に示した。

Primer name	Sequence	GenBank Accession No.	Primer site
for Real-time PCR			
mGAPDH Fw	5' -CATGGCCTTCCGTGTTCT- 3'	NM_008084	730-833
mGAPDH Rv	5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTGA- 3'		
mTMEM16A Fw	5' -GATCTCCTTCACGTCTGACTTCATC- 3'	NM_178642	2649-2781
mTMEM16A Rv	5' -TGCTGTGCCATTCTGGAAG- 3'		
mTMEM16B Fw	5'-CTTTATCCCCCGCCTTGTGTA-3'	BC033409	2374-2494
mTMEM16B Rv	5' -TTCAGGCTGTGTTCCCTCCTT- 3'		
mTMEM16C Fw	5'-AATTGCCTAAAGGGCTATGTCAAC-3'	NM_001128103	2575-2686
mTMEM16C Rv	5'-TCCAAGGTGGGCCTCTATAGTCT-3'		
mTMEM16D Fw	5'-ACTGCAGTTCTGGCATGTTCTC-3'	NM_178773	2109-2221
mTMEM16D Rv	5'-CTTTCGGGAGGTCTGGTATCAG-3'		
mTMEM16E Fw	5'-GCCCTTGAGTGGATACGTCAATA-3'	NM_177694	2286-2386
mTMEM16E Rv	5'-TGCAGGTGACGAAGTCTTTTTTC-3'		
mTMEM16F Fw	5'-CCCATACATTGGGCTTGGTAA-3'	NM_175344	2388-2493
mTMEM16F Rv	5'-CACGTGCCAATAGTAGATGTTGTG-3'		
mTMEM16G Fw	5'-TTCCTGCCACGTGTCTACTACAG-3'	NM_207031	2179-2283
mTMEM16G Rv	5'-GTTGTGTGCGGAGGTGAAAGT-3'		
mTMEM16H Fw	5'-CAGGACTACCAGGAGATGTTCTGT-3'	NM_001164679	2221-2328
mTMEM16H Rv	5'-TCGGATCTCAATCAGGTTGTTG-3'		
mTMEM16J Fw	5'-GGTACCGGGACTACCGAAATG-3'	NM_178381	2009-2112
mTMEM16J Rv	5'-GGCAAAATGCTCAAAGAGGATAAC-3'		
mTMEM16K Fw	5'-CCTTGAAAATGTGCAGGGTCTT-3'	NM_133979	1601-1702
mTMEM16K Rv	5'-CCACGGATATAACGCTCATCGT-3'		
for RT-PCR			
segment b Fw	5'-TTTCGACAGCAAAACCCGGAGCA-3'	NM_178642	877-1030
segment b Rv	5'-GTCACCCTCATAGTCCCCATCGT-3'		
segment c Fw	5'-TGGGCTGCCACTTTCATGGAGCA-3'	NM_178642	1412-1532
segment c Rv	5'-AGACTCTGGCTTCATACTCTGCT-3'		
segment d Fw	5'-GAAGTCACTGAGAAAAGAATCCA-3'	NM_178642	1537-1641
segment d Rv	5'-AAGATGATGGAGACAAGATTGGT-3'		

表 3 本研究で用いたプライマー配列



## II-5 免疫抗体染色法

門脈平滑筋単離細胞を、まず 4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液で約 15 分間固定した。PBS 溶液で十分に洗浄した後、抗 TMEM16A ポリクローナル抗体 (ab16293、抗体認識部位: EHWKRKQMRLNYRWDLTGFEEDDAAVK DHPRAEY EARVLEKSLKKESRNKEKRRHIPEESTNKW、1:50; Abcam, Cambridge, USA) を懸濁した 0.2% Triton X-100、1% 正常ヤギ血清 (NGS) 含有 PBS 溶液を 4℃、約 12 時間遮光条件で適用した。その後 PBS 溶液により洗浄し、Alexa Fluor 488 標識抗チキン IgG 抗体 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, USA) を懸濁した 1% NGS 含有 PBS 溶液で常温 1 時間インキュベーションした。PBS 溶液で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (A1R/Ti-E, ニコン、東京、日本) を用いて観察した。

## II-6 電気生理学的記録法

門脈平滑筋単離細胞及び HEK293 細胞における膜電流測定には、Hamil らにより確立された Whole-cell patch clamp 法を用いた [53]。記録電極には外径 1.04 ~ 1.08 mm の芯入りガラス管から 2 段式電極製作機 (PB-7; 成茂科学器械研究所、東京、日本) 又はマイクロピペットプラー (P-1000; Sutter Instrument, USA) を用いて作製し、顕微鏡下で先端を熱加工した。実験には先端の直径が約 1  $\mu\text{m}$ 、細胞内液充填時の電極抵抗が 2 ~ 5  $\text{M}\Omega$  の記録電極を用いた。倒立顕微鏡のステージ上に設置したチャンバーに培養細胞を定着させたガラス片を用意もしくは単離細胞懸濁液を滴下し、実験溶液を灌流し、電位固定下において電流の記録を行った。電流測定時における記録電極の操作には水圧式微動マニピュレータ (MMW-203; 成茂科学器械研究所) を用いた。

測定した電流はパッチクランプ用増幅器 (EPC-7; HEKA Electronics, Darmstadt, Germany) を用いて増幅し、アナログ-デジタル変換器 (Digidata 1440A; Axon Instruments, Foster City, USA)、Clampex ソフトウェア (Ver 8.2; Axon Instruments) を用いてコンピュータ上に記録した。データの解析は Clamp fit ソフトウェア (Ver 10.2; Axon Instruments) 及び Origin (Ver 6.0J; Microcal Software Inc., USA) を用いて行った。

## II-7 TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) イメージング

一分子可視化法は TIRF イメージングシステム (ニコン) を用いて行った。蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U; ニコン)、対物レンズ (CFI Apo TIRF 60 $\times$ /1.45, 油浸レン



ズ; ニコン)、EM-CCD カメラ (C9100-12; 浜松ホトニクス、浜松、日本)、AQUACOSMOS ソフトウェア (Ver. 2.6; 浜松ホトニクス)を用いた。YFP と CFP はそれぞれ 488-nm アルゴンレーザー及び 405-nm レーザー (Coherent, Santa Clara, CA, USA)を用いて励起させた。YFP、CFP の蛍光はダイクロイックミラーとデュアルバンドパスフィルター (454-479/523-567 nm; Omega Optical, Brattleboro, VT, USA)により検出した。

また実験に用いた HEK293 細胞は、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS 溶液により、10 分間細胞固定を行い、その後 PBS 溶液で過剰なパラホルムアルデヒドを取り除いた後、実験に用いた [49]。

## **II-8 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 解析**

FRET 効率の評価は acceptor photobleaching analysis を用いて行った。CFP をドナー、YFP をアクセプターとして用い、YFP photobleaching 前後における CFP の蛍光強度を比較した。CFP の蛍光は HQ-CFP フィルター (DM450/BA460-510; ニコン)、YFP の蛍光は HQ-YFP フィルター (DM510/BA520-560; ニコン)を用いて測定した。YFP photobleaching には水銀ランプ (100W, C-SHG1; ニコン)及び G-2A フィルター (EX510-560/DM575/BA590; ニコン)を用い、HEK293 細胞に対して 2 分間照射することにより行った。YFP photobleaching 前後において 405 及び 488 nm それぞれのレーザーにより励起した TIRF 画像を撮影した。露光時間を 465 ms とし、10 枚撮影したものを平均化したものに対して FRET 解析を行った。

FRET 効率 ( $E_{\text{FRET}}$ )は以下の式により算出した。

$$E_{\text{FRET}}(\%) = \left( \frac{CFP_{\text{after}} - CFP_{\text{before}}}{CFP_{\text{after}}} \right) \times 100$$

ここで  $CFP_{\text{before}}$  及び  $CFP_{\text{after}}$  は YFP photobleaching 前後における CFP 蛍光を表す [49]。

## **II-9 一分子 photobleaching-step 法**

蛍光スポット中に存在する GFP 標識したイオンチャネル数を、一分子 photobleaching-step 法により測定した [49]。GFP の励起には 488 nm アルゴンレーザーを用い、B-2A フィルター (DM505/BA520; ニコン)を用いて観察した。TIRF 画像は 100 ms 間隔で 2 分間取得した。画像解析は AQUACOSMOS ソフトウェアを用いた。各蛍光粒子の蛍光強度は、各々の粒子を 3×3 ピクセルで囲んだ領域の蛍光強度

から、周囲の 16 ピクセルの蛍光強度をバックグラウンドとして減算し求めた。消光段階は目視により計測した。

## II – 10 溶液組成

本研究で用いた溶液の組成を以下に示す。

### PBS(-)溶液 (mM)

137 NaCl, 8.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.68 KCl, 1.47 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 単離用溶液 (mM)

#### Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free Hank's 溶液

137 NaCl, 5.4 KCl, 0.17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 NaHCO<sub>3</sub>, 5.6 glucose

### 細胞外液 (mM)

137 NaCl, 5.9 KCl, 2.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 14 glucose, 10 HEPES, 10 TEA-Cl  
(pH 7.4 with 10 N NaOH)

### 細胞内液 (mM)

120 CsCl, 20 TEA-Cl, 4.25 CaCl<sub>2</sub>, 2.8 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 ATPNa<sub>2</sub>  
(pH 7.2 with 1 N CsOH, pCa=6.0)

遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度は WEBMAXC STANDARD (<http://www.stanford.edu/~cpatt on/webmaxc/webmaxcS.htm>)を用いて算出した。

## II – 11 使用試薬

niflumic acid : Sigma-Aldrich

T16A<sub>inh</sub>-A01 : Sigma-Aldrich or Tocris Bioscience (Bristol, UK)

tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) : Sigma-Aldrich.

cytochalasin D : Invitrogen

jasplakinolide : Molecular Probes

## II-12 統計処理

実験結果は全て平均値±標準誤差として表示した。有意差の検定には 2 群間では Student の t 検定を、多群間における平均値の比較には Tukey-Kramer の多重比較法を用いた。\*, \*\*はそれぞれ危険率 5%、1%で有意な差があることを示した。

## 第Ⅲ章 結果及び考察

### Ⅲ-1 門脈平滑筋におけるTMEM16 familyの機能的発現

門脈平滑筋細胞はCaCC活性を持つ平滑筋としてこれまでに知られている [11,24,51,54]。このCaCC活性は、門脈における自発収縮能やペースメーカー活性に非常に重要であると考えられているため、その詳細な分子実体の解明はCaCCを含めた収縮機構やペースメーカー機構の解明において重要な知見となり得る。

本研究では、門脈平滑筋におけるTMEM16Aを含むTMEM16 familyの発現を解析し、そのCaCC活性やTMEM16Aスプライスバリエーション体の発現解析を行うことにより、門脈平滑筋CaCC活性に対するTMEM16 familyの寄与を解明することを目的とした。

#### Ⅲ-1-1 TMEM16 familyの発現解析

まず門脈平滑筋におけるTMEM16 familyの発現について検討するためにリアルタイム定量PCR法による解析を行った。その結果、TMEM16 familyのうち特にTMEM16A、TMEM16F、TMEM16Kの3つのメンバーにおいてmRNAレベルでの強い発現が認められたのに対し、他のメンバーではほとんど認められなかった（16A:  $0.027 \pm 0.003$ 、16F:  $0.018 \pm 0.003$ 、16K:  $0.036 \pm 0.005$ ,  $n=3$ ; 図4A)。この門脈平滑筋におけるTMEM16 familyの発現パターンは、以前より報告されている他の血管平滑筋における発現パターンと類似している [19,55]。今回mRNAレベルでの発現が認められたTMEM16 familyメンバーのうち、TMEM16Fに関してはイオンチャネル活性が報告されているが、小コンダクタンスCa<sup>2+</sup>活性化非選択的陽イオンチャネル（SCANチャネル）としての報告や、外向き整流性Cl<sup>-</sup>チャネルとしての報告など、そのチャネル活性については意見が分かれており、未だ不明な点が多い [5,6,56]。特にCaCC活性に着目すると、TMEM16Fの活性化にはTMEM16Aに比べ非常に高い細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を必要とすることが報告されているため、生理条件下における門脈CaCCに対する寄与はかなり低いものと考えられる [8,57]。またTMEM16Kに関しては、血管平滑筋だけでなく神経組織や分泌組織など、様々な組織において普遍的に発現していることが知られているが、イオンチャネル活性を含め、その機能はほとんど明らかとされていない。そのため本研究では、TMEM16 familyの中で特にCaCC活性に寄与している分子としてTMEM16Aに焦点を当て、次に抗体染色法による検討を行った。その結果、門脈平滑筋単離細胞において細胞膜上に限局した蛍光が見られた（図4B）。以上の結果より、

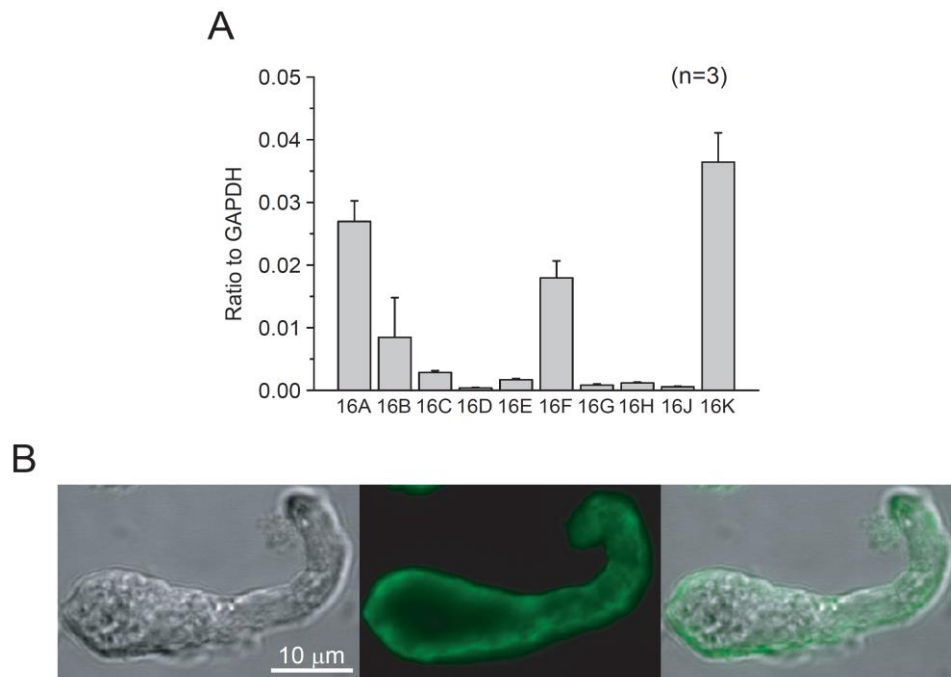


図4 マウス門脈平滑筋における TMEM16 family の発現

A: リアルタイム定量PCR法によりTMEM16 familyメンバーの発現について解析した。その結果、TMEM16A及びTMEM16F、TMEM16KのmRNAレベルでの発現が認められた。

B: TMEM16Aについて免疫染色法により検討した。門脈平滑筋単離細胞において細胞膜に局限した蛍光が観察された。

TMEM16Aは細胞膜上でイオンチャネルとして機能している可能性が考えられる。

### III-1-2 門脈平滑筋単離細胞におけるCaCC活性

次に、マウス門脈平滑筋細胞におけるCaCC活性に対するTMEM16Aの寄与を検討するために、ホールセルパッチクランプ法によりCaCC電流の測定を行った。この際、 $K^+$ 電流を取り除くため、ピペット内液の $K^+$ イオンを $Cs^+$ イオンに置換し、細胞内外にBKチャネル及びKvチャネル阻害薬であるTEA-Clを加えた。またCaCCを活性化させるために細胞内遊離 $Ca^{2+}$ 濃度が $1 \mu M$ となるように調製し、実験を行った。保持電位を $-60 mV$ として $-80 mV$ から $+120 mV$ まで $20 mV$ 間隔で脱分極刺激を1秒間、15秒毎に与えた後、再び $-60 mV$ に戻すことで末尾電流を測定した。その結果、大きな遅延整流性外向き電流とそれに続く内向き末尾電流が観測された ( $I_{+120mV}=36.4 \pm 5.8 pA/pF$ ,  $n=3$ ; 図5A, C)。この電流に対して、CaCC阻害薬である $100 \mu M$  NFAを投与することにより、ピーク電流、末尾電流共に有意に抑制されたことから、測定された電流がCaCC電流であることが示された (relative amplitude: peak,  $0.30 \pm 0.04$ ; tail,  $0.35 \pm 0.04$ ,  $p < 0.01$ ,  $n=6$ ; 図5Ba, Da)。さらにTMEM16Aの特異的阻害薬として報告されている

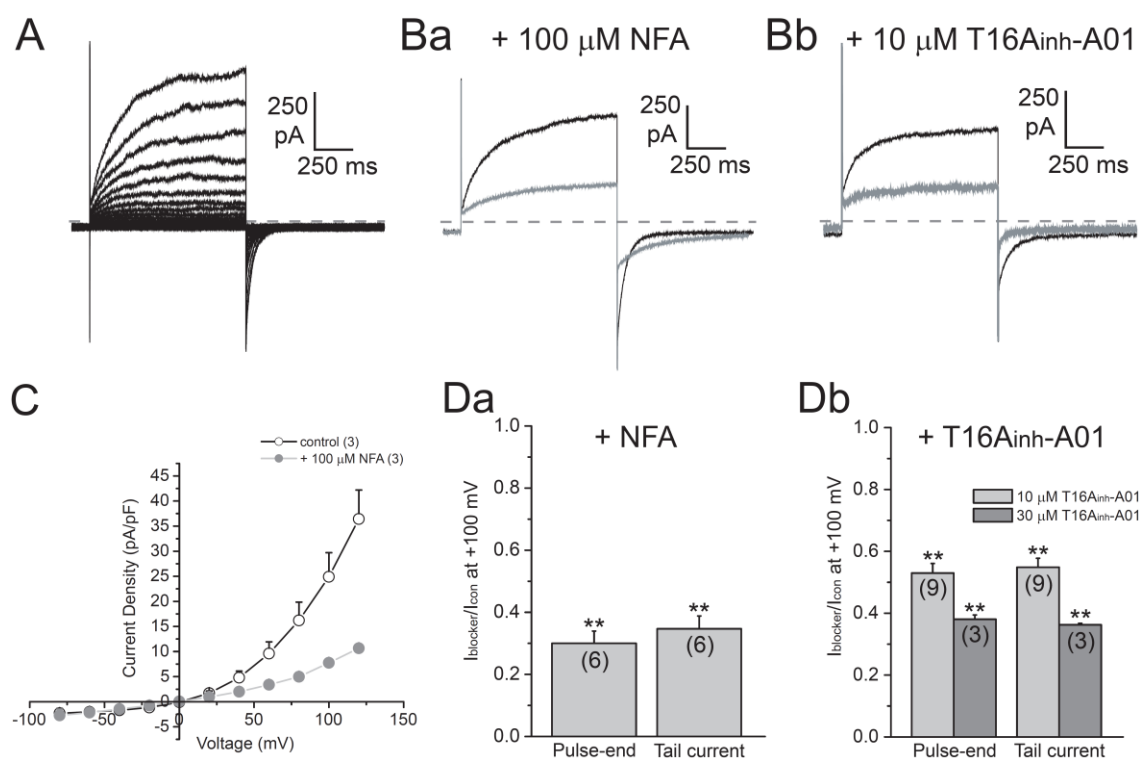


図5 門脈平滑筋単離細胞における CaCC 電流

マウス門脈平滑筋単離細胞に対し、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、CaCC 電流を測定した。A: 保持電位を-60 mV とし、-80mV から 20 mV ステップで+120 mV までの脱分極刺激を与えた際に観察された代表的な電流トレースを示した。B: +100 mV の脱分極刺激を与えた際の、control 条件下 (black) と 100 μM NFA 投与時 (gray, a) 及び 10 μM T16A<sub>inh</sub>-A01 (gray, b) の代表的なトレースを示した。点線は Zero current level を示している。C: コントロール及び 100 μM NFA 投与群におけるピーク電流の電流密度・電圧曲線を示した。D: 100 μM NFA 投与における pulse-end 及び tail current の抑制率をまとめた。E: 10, 30 μM T16A<sub>inh</sub>-A01 投与における pulse-end 及び tail current の抑制率をまとめた。括弧内には例数を示した。\*\*:  $p < 0.01$  vs control

T16A<sub>inh</sub>-A01を用いた検討を行ったところ、10, 30 μMの投与により濃度依存的な有意な抑制が認められた(relative amplitude: 10 μM, peak,  $0.53 \pm 0.03$ ; tail,  $0.55 \pm 0.03$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 9$ ; 30 μM, peak,  $0.38 \pm 0.01$ ; tail,  $0.36 \pm 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ; 図5Bb, Db)。この T16A<sub>inh</sub>-A01はTMEM16Aの他にもTMEM16BによるCaCC電流に対しても電位非依存的な阻害作用を示すことが報告されている [58]。しかしながらリアルタイム定量PCR法においてTMEM16Aの発現が認められる一方でTMEM16Bの発現は低かった。それに加え、TMEM16AとTMEM16Bでは異なったCaCC活性を示すことが報告されており、TMEM16Bでは1 μMの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度において活性は低い。また活性化・脱活性化に関して門脈平滑筋単離細胞 ( $163.7 \pm 12.6$  ms,  $71.7 \pm 5.9$  ms ( $n = 16$ ))に比べ、時定数の値として約10倍程度小さい値を示す [59]。従って、門脈CaCC電流に対するT16A<sub>inh</sub>-A01の阻害作用は、主にTMEM16Aを阻害することによるものであると考え

られる。

### III-1-3 門脈平滑筋に発現するTMEM16Aスプライスバリエント体の同定

TMEM16Aは4箇所のsegmentをそれぞれ含有・欠損することによる複数のスプライスバリエント体が報告されている。そのため、門脈平滑筋において発現するTMEM16Aスプライスバリエント体を同定するために、RT-PCR法を用いた解析を行った。ここでは特に、チャネル特性に影響を与えることが報告されているsegment *b*, *c*, *d*に着目し、検討した。それぞれのsegmentを挟むようにプライマーを設計し、RT-PCRを行った。その結果、門脈平滑筋において、segment *b* 及びsegment *d*を含有もしくは欠損しているものが認められた (図6)。一方で、segment *c*は単一のバンドが得られた。この結果より、門脈平滑筋では複数のスプライスバリエント体が発現していることが示された。

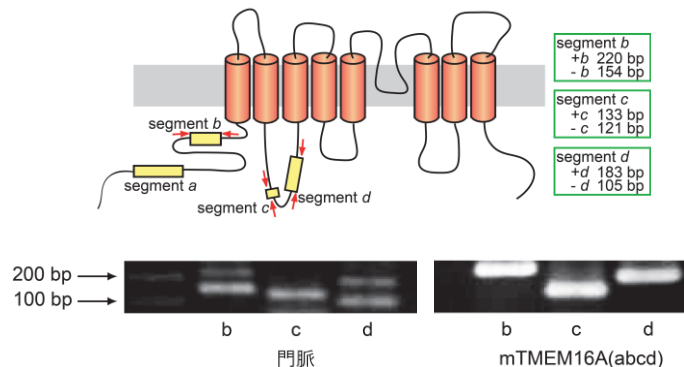


図6 門脈平滑筋におけるスプライスバリエント解析

segment *b*, *c*, *d*それぞれの配列を挟むようなプライマー (上)を用い、PCRを行った。その結果、segment *b* 及び segment *c* において複数のバンドが確認された (下)。またマウス TMEM16A の全長配列をテンプレートとした結果をコントロールとして示した。

次に、segment *a-d*のうち、どのような組み合わせを持ったスプライスバリエント体が発現しているかについて検討するため、segment *a-d*全てを挟むようにプライマーを設計しPCRを行い、得られたクローンの配列を同定した (図7A)。得られた62クローンのシーケンス配列を解析したところ、segment *a*, *b*, *c*を有するスプライスバリエン

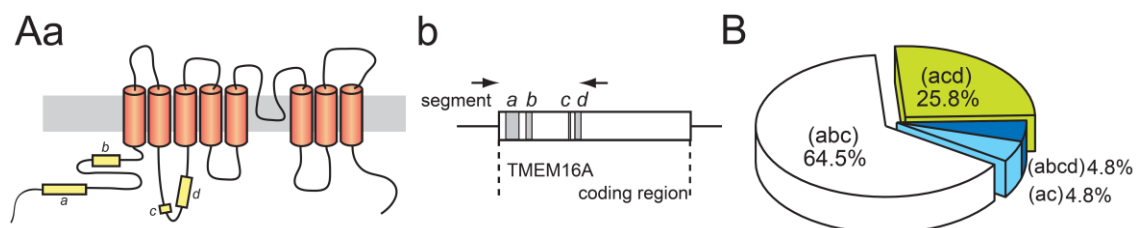


図7 TMEM16A スプライスバリエント体の同定

Aa: マウスTMEM16Aの構造を示した。細胞内N末端領域に存在するsegment *a*, *b*及び細胞内第一ループに存在するsegment *c*, *d*をそれぞれ含有・欠損することによるスプライスバリエント体が報告されている。Ab: segment *a-d*の全ての領域を挟むようにプライマーを設計しクローニングを行い、得られたクローンのシーケンス解析を行った。B: シーケンス解析の結果をまとめた。segment *a*, *b*, *c*及びsegment *a*, *c*, *d*を含むもの ((*abc*)体及び(*acd*)体) が全体の9割を占めていた。

ト体 ((*abc*)体)がクローン数として最も多く得られ (64.5 %)、またsegment *a, c, d*を有するスプライスバリエント体 ((*acd*)体) (25.8 %)と合わせて全体の約9割を占めていることが明らかとなった (図7B)。また少数ではあるが、segment *a-d*全てを有するもの及びsegment *a, c*を含むものも得られ、この結果は図6に示した結果とよく一致した。

そこで、門脈平滑筋に特に高発現していると推定された(*abc*)体及び(*acd*)体をマウス門脈平滑筋cDNAからクローニングした。それぞれのスプライスバリエント体を発現ベクターに組み込み、リポフェクション法を用いてHEK293細胞に一過性に遺伝子導入し、ホールセルパッチクランプ法によりCaCC電流を測定した。その結果、門脈平滑筋細胞と類似した遅延整流性の外向き電流及び末尾電流が観測された (*abc*,  $I_{+60\text{mV}}=37.2\pm6.4$  pA/pF,  $n=9$ ; *acd*,  $I_{+60\text{mV}}=72.8\pm10.3$  pA/pF,  $n=4$ ; 図8)。

今回CaCC活性を確認した2つのスプライスバリエント体、(*abc*)体と(*acd*)体では、

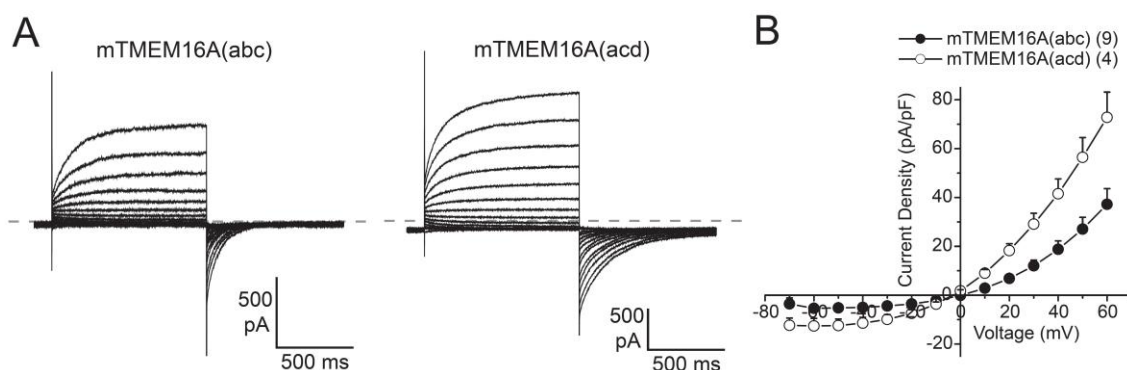


図8 TMEM16A スプライスバリエントの CaCC 活性

TMEM16A スプライスバリエント体を HEK293 細胞へ一過性発現させ、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより CaCC 電流を測定した。A: 保持電位を-60 mV とし、-70mV から+10 mV ステップで+60 mV までの脱分極刺激を 1 秒間、15 秒毎に与えた際に観察された代表的な電流原図を示した。点線は zero current level を示している。B: 外向き電流の最大値における電流の電流密度-電圧曲線を示した。括弧内には例数を示した。

segment *c*は共通して有しており、segment *b*及び*d*は一方しか含まない。segment *b*については、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質であるカルモジュリンの推定される結合ドメインの一部を担っているという報告がある一方で、Ca<sup>2+</sup>感受性は(*ac*)体の方が(*abc*)体に比べ高いという報告がある [34,35]。この報告は(*acd*)体の方が(*abc*)体よりも大きなCaCC電流が観測されたという結果に一致するものである。

### III-1-4 TMEM16Aスプライスバリエント体のホモ二量体形成

TMEM16Aはホモ二量体を形成する可能性が高いという報告があるが、細胞内においてホモ二量体を形成するという報告はない。そこで蛍光標識したTMEM16Aスプラ



イスバリアント体を作製し、TIRF顕微鏡を用いた一分子可視化解析により、多量体形成能について検討することにした。TMEM16Aの細胞内N末端領域には二量体形成に重要であると推定されているドメインが報告されている [41]ため、(abc)体のC末端にYFP、CFP、GFPをそれぞれ結合させた(abc)-YFP、(abc)-CFP、(abc)-GFP、及び(acd)体のC末端にYFP、CFP、GFPをそれぞれ結合させた(acd)-YFP、(acd)-CFP、(acd)-GFPを作製した。

まず同一スプライスバリアント体におけるホモ多量体形成について検討するために、一分子 photobleaching-step解析を行った [60]。この方法はGFP等の蛍光分子が、強い励起光を照射することで蛍光中心に不可逆的なコンホメーション変化が生じ、褪色する性質を利用し、複合体中に存在するGFP標識体の数を特定するものである。ここではTMEM16Aスプライスバリアント体が二量体を形成すると仮定した場合の模式図を図9に示した。GFP標識したTMEM16Aスプライスバリアント体を一過性発現させたHEK293細胞に対し、GFPの強い励起光を照射する場合を考える。細胞全体の蛍光強度を測定すると、時間経過による緩やかな蛍光強度の減少を示すことになる (図9A)。それに対しTIRF顕微鏡を用いて一分子レベルの粒子で解析する場合、複合体分子は最初GFP二分子相当の蛍光を示すことになる。それに対し強い励起光を照射し続けることにより、確率的にGFP分子が消光することになり、そのため多くの複合体では一分子が消光したGFP一分子相当の蛍光を示す段階を経て、褪色することになる。この時、複合体分子において時間に対する蛍光強度をプロットすると、段階的な蛍光強度の減

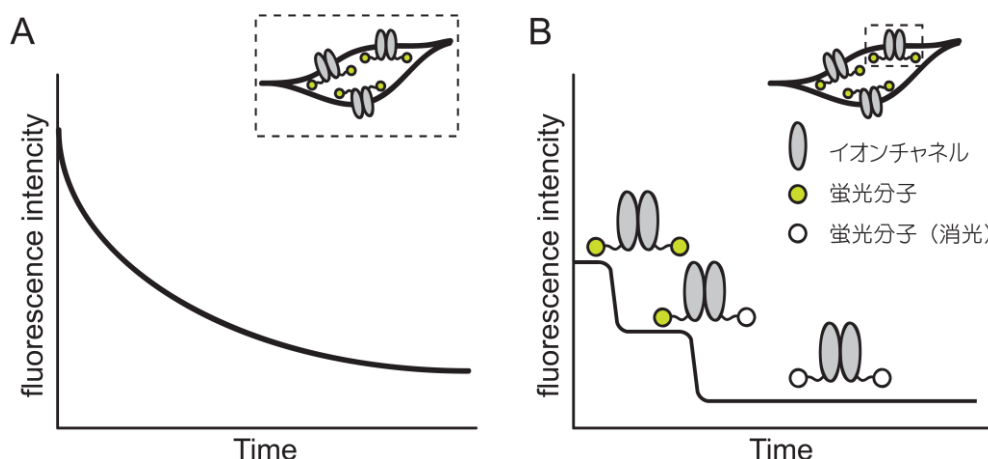


図9 一分子 photobleaching-step解析の原理

一分子 photobleaching-step解析の原理について模式図に示した。GFP標識体を細胞へ発現させ、細胞全体の蛍光強度を測定する場合(A)、及びTIRF顕微鏡を用いた1分子レベルの蛍光強度を測定する場合(B)を示した。A: 強い励起光を照射した場合、細胞全体の蛍光強度を測定すると、緩やかな減衰曲線を描くことになる。B: 一つの蛍光粒子に着目して蛍光強度を測定した場合、粒子内に存在する蛍光分子の数に対応した段階的な消光を観察することができる。この段階的な消光を測定することにより、複合体を形成する分子数を推定することができる。

弱が見られる (図9)。したがってこの消光段階を解析することにより、複合体分子中に存在するGFP分子の数、すなわちGFP蛍光標識体の数を特定することができる。

(*abc*)-GFP 体を一過性発現させた HEK293 細胞において、一分子 photobleaching-step解析を行った結果、3 stepsや4 stepsに比べ1 step及び2 stepsの消光段階を示す粒子が多く存在した (1 step, 31.2%; 2 steps, 58.4%; 3 steps, 6.4%; 4 steps, 4%, 125 particles, 27細胞; 図10)。(acd)-GFP体を一過性発現させたHEK293細胞においても、同様の傾向が見られた (1 step, 28.4%; 2 steps, 58.6%; 3 steps, 8.3%; 4 steps, 4.7%, 169 particles, 31 細胞; 図10)。したがって、(*abc*)体と(*acd*)体は多量体形成においてほぼ同様の性質を持つと考えられる。

多量体形成において分子間相互作用が一定の場合、bleaching-stepsの分布は下を示す二項分布の式に従うものと考えられる [61]。

$$q_n = \left( \frac{M!}{n!(M-n)!} \right) P^n (1-P)^{M-n}$$

ここで $q_n$ : n stepの消光段階を示す確率, M: サブユニットの合計数, n: 観察された消光段階数, P: GFPの蛍光確率を示す。

今回得られた(*abc*)体及び(*acd*)体におけるbleaching-stepsの分布は、GFPの蛍光確率を75%として [62]、二量体形成する場合の二項定理により導かれる分布とよく一致することが示された (0 step, 6.25%, 1 step, 37.5%, 2 steps, 56.25%, 図10B)。また(*abc*)体、(*acd*)

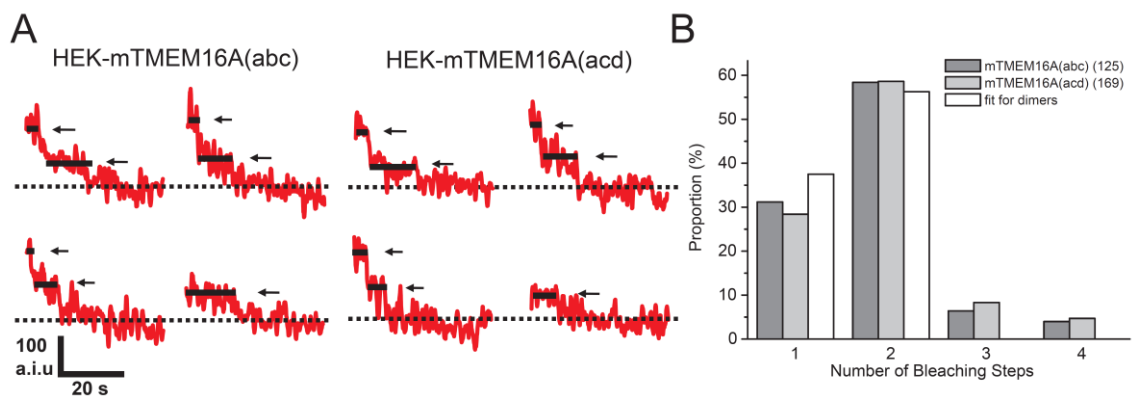


図10 一分子 photobleaching-step 解析による TMEM16A 二量体形成の解析

GFP 蛍光標識した(*abc*)体及び(*acd*)体を HEK293 細胞へそれぞれ一過性発現させた細胞において GFP の励起光を照射させた際の、時間に対する各粒子の蛍光強度変化を記録した。A: (*abc*)-GFP 体(左)、(*acd*)-GFP 体(右)発現細胞において観察された代表的な原図を示した。実線及び矢印はそれぞれの消光段階を示した。点線は完全に褪色した基線を示した。B: それぞれの消光段階を示した粒子の割合をまとめたもの示した。また GFP の蛍光確率を75%として、多量体が二項分布に従ったものとし、TMEM16A スプライスバリエーション体が二量体を形成すると仮定した場合の想定される分布も同時に示した。括弧内には粒子数を示した。

体両者において、3 steps及び4 stepsの消光段階を示す粒子が少数存在した (図11)が、これらは蛍光を測定した領域内に複数の分子が会合または凝集によって存在した結果生じたものであると考えられる。以上の結果より、(abc)体同士、及び(acd)体同士でホモ二量体を形成することが示された。

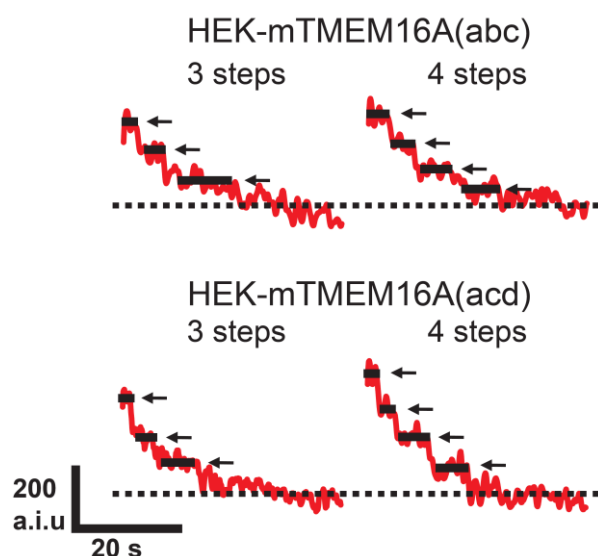


図 11 一分子 photobleaching-step 解析において観測された 3 - 4 段階の消光

(abc)-GFP 体(上)、(acd)-GFP 体(下)発現細胞において 3 steps、4 steps の消光段階が観察された。実線及び矢印はそれぞれの消光段階を示した。点線は完全に褪色した基線を示した。

### III-1-5 TMEM16Aスプライスバリエント体のヘテロ二量体形成

そこで次に、異なるTMEM16Aスプライスバリエント体間において多量体を形成することができるかについて検討するために、acceptor photobleaching analysisを用いた解析を行った。

acceptor photobleaching analysisの概略について図12に示した。YFP標識したTMEM16AとCFP標識したTMEM16Aを一過性発現させたHEK293細胞に対しCFPの励起光を照射する。この際、YFP標識体とCFP標識体が多量体を形成することによりYFPとCFPが近傍に存在する場合、FRETが生じることによりCFPからYFPへエネルギー転移が起こり、結果としてYFPの蛍光強度の増大が起こる。一方、強い励起光をYFPに照射することにより、YFPのphotobleachingを生じさせた後に再びCFPの励起光を照射しても、FRETは生じず結果としてCFP蛍光強度はYFP photobleaching前に比べて増大する。このYFP photobleaching前後におけるCFP蛍光強度の変化を測定することで、FRET効率( $E_{FRET}$ )を算出した。

まず、(abc)-YFPと(abc)-CFP、(acd)-YFPと(acd)-CFPの同じスプライスバリエント体の蛍光標識体を一過性発現させ、TIRF顕微鏡下でFRETを測定したところ、CFP蛍光強度の増強が認められた ((abc)-YFP and (abc)-CFP,  $E_{FRET}=7.4\pm1.9\%$ , 40 particles, 11細胞,

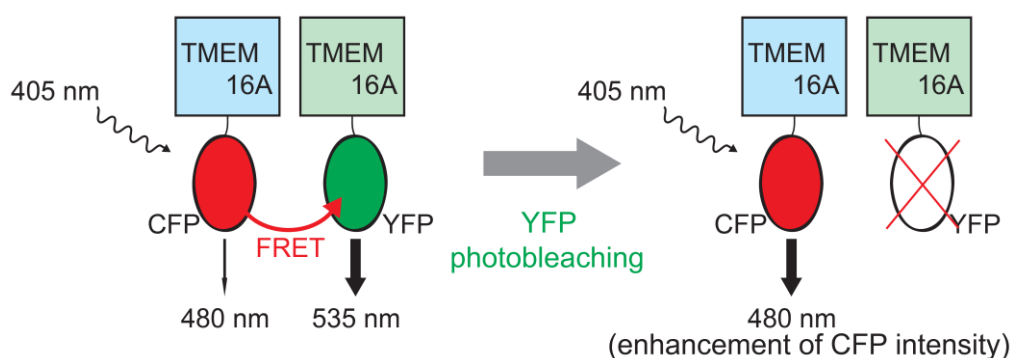


図12 Acceptor photobleaching法の原理

YFP及びCFP蛍光標識したTMEM16Aスプライスバリエント体を作製し、その相互作用をacceptor photobleaching法を用いて検討した。スプライスバリエント体間で相互作用が生じる場合、CFP (Donor) の励起光を照射することで、FRETによりYFP (Acceptor)の蛍光増大が生じる。そこでYFPに対し強い励起光を照射しphotobleachingを起こさせた後、再びCFPの励起光を照射すると、CFPの蛍光が増強し、その変化量からFRET効率を算出することができる。

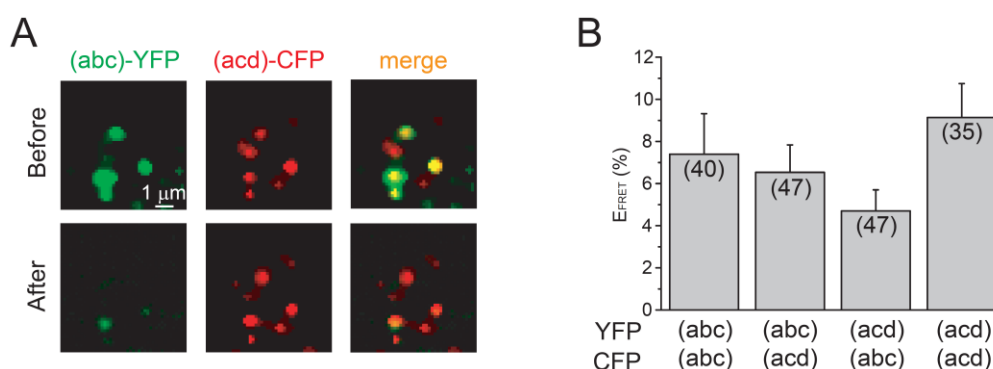


図13 FRET 解析による TMEM16A 多量体形成の解析

YFP 及び CFP 蛍光標識した(abc)体及び(acd)体を作製し、それぞれの組み合わせを HEK 細胞へ一過性発現させた細胞において TIRF 顕微鏡下で FRET 効率 ( $E_{FRET}$ )を測定した。A: (abc)-YFP と(acd)-CFP を発現させた際の典型的な TIRF 画像を示した。YFP photobleaching の前(上段)と後(下段)における YFP(左)、CFP(中央)、merge(右)のイメージ画像を示した。B: それぞれの組み合わせにおける FRET 効率をまとめたものを示した。括弧内には粒子数を示した。

$p < 0.01$ ; (acd)-YFP and (acd)-CFP,  $E_{FRET} = 9.1 \pm 1.6$  %, 35 particles, 10細胞,  $p < 0.01$ ; 図13B)。

この結果は、先に述べた結果と矛盾しない。よって同スプライスバリエント体間では二量体を形成することが支持された。さらに、異なるスプライスバリエント体間においてFRET効率を測定したところ、同スプライスバリエント体間に比べ若干の減少傾向は見られたが、同様にCFP蛍光強度の増大が認められた ((abc)-YFP and (acd)-CFP,  $E_{FRET} = 6.5 \pm 1.3$  %, 47 particles, 12細胞,  $p < 0.01$ ; (acd)-YFP and (abc)-CFP,  $E_{FRET} = 4.7 \pm 1.0$  %, 47 particles, 10細胞,  $p < 0.01$ ; 図13)。またそれぞれの細胞におけるYFPとCFPの共局在率は、(abc)-YFP and (abc)-CFP: 46.0 %、(abc)-YFP and (acd)-CFP: 56.0 %、(acd)-YFP and

(*abc*)-CFP: 57.3 %、(*acd*)-YFP and (*acd*)-CFP: 57.4 %と全て50%前後であり、同一スプライスバリエント体だけでなく、異なるスプライスバリエント体においても、同程度に共局在することが示された。以上の結果より、同スプライスバリエント体間のみならず、異なるスプライスバリエント体間においても同様に二量体を形成することが示唆された。

### III-1-6 要約と考察

門脈平滑筋は CaCC 活性を持つ平滑筋として広く知られており、複数のタンパク質がその候補分子として提唱されてきた。門脈平滑筋において CLCA1 の発現が認められたが、電気生理学的性質や薬理的性質が門脈平滑筋における CaCC 活性と異なり、CaCC 活性を担う主要なイオンチャネルではないことが報告された [50]。また bestrophin-3 が平滑筋において CaCC 活性を担うことが示されたが、cGMP 依存性の CaCC 電流のみに寄与しており、以前より報告されていた CaCC 電流と性質が異なっていた [63]。そうした中で近年報告された TMEM16A は、その特徴的な電気生理学的性質や薬理的性質が、以前より報告されていた CaCC の性質に類似しており、分子実体であると期待されている。

本研究において、TMEM16A スプライスバリエント体は、ホモ及びヘテロ二量体を形成することが示唆された。イオンチャネルにおいて、異なるスプライスバリエント体での多量体形成はこれまでも報告されている。例えば小胞体に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離チャネルの一つである 3 型 RyR 受容体では、スプライスバリエント体がドミナントネガティブ機能を有しており、四量体に組み込まれることによって活性低下が引き起こされる [64,65]。そのため、組織に発現するスプライスバリエント体の種類の同定及びその割合の決定は、チャネル機能の解明に非常に重要な情報である。ホモ体、ヘテロ体の詳細なチャネル活性については今後検討していく必要はあるが、TMEM16A において異なる電気生理学的性質を持ったスプライスバリエント体間で複合体を形成した結果、より多様な CaCC 活性を有する可能性が考えられる。CaCC 活性は様々な組織において発現が報告されている一方で、その性質については組織によって異なる例も報告されている [54]。そのため、スプライスバリエント体の発現解析によりこのような CaCC 活性の相違を説明できることも考えられる。

門脈平滑筋では全長 TMEM16A は発現する TMEM16A のうちのごくわずかであり、多くは(abc)体や(acd)体であった。これらスプライスバリエント体で欠損する segment *b* 及び segment *d* はそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$  感受性及び活性化・脱活性化キネティクスに関与することが報告されている [35,38]。各組織における TMEM16A スプライスバリエント体の詳細な発現分布についてはほとんど報告されていないが、segment *b-d* それぞれにおける欠損・含有は組織によって異なることが報告されている [34]。そのためスプライスバリエント体の分布の違いが、各々の組織固有の CaCC 活性を生み出し、平滑筋収縮のみならず自発収縮能や細胞興奮性の制御、液体分泌など多岐にわたった生理機能を担っていることが予想される。それに加え、スプライスバリエント体の発現変化が病態形成に関与している可能性も考えられる。門脈平滑筋においては、今後門脈圧亢進症モデルマウスなどを用いたスプライスバリエント体発現解析などを行うことにより、病態の機構解明などにおける重要な知見に繋がる可能性がある。

自発収縮を示す平滑筋組織は門脈平滑筋以外にも存在するが、よく知られている組織として腸管平滑筋が挙げられる。腸管平滑筋における自発収縮能は、平滑筋細胞単独によって行われているものではなく、消化管筋層に存在するペースメーカー細胞である ICC が重要な役割を果たしていることが知られている。TMEM16A は消化管に存在する ICC において発現が報告されている一方で、その収縮自体を担う腸管平滑筋では TMEM16A は発現していない [14,66]。現在想定されている自発収縮の分子機構として、①ICC における自発的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇、②CaCC の活性化による自発性一過性脱分極、③ギャップ結合を介した平滑筋への脱分極の伝播、④平滑筋細胞における VDCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入、⑤平滑筋細胞の収縮、という機構が提唱されている [67]。自発収縮に対してこうした分子機構が提唱される一方で、TMEM16A の自発収縮に対する関与についてはこれまでに複数報告されている。TMEM16A ノックアウトマウスにおいて小腸の律動的な一過性脱分極が消失することが報告されている [15]。また糖尿病性胃不全麻痺患者の ICC において、segment *a-d* 以外のエクソンにおいて生じる TMEM16A スプライスバリエント体が発見され、加えてスプライスバリエント体の発現が変動するという報告がある [38]。このスプライスバリエント体は全長 TMEM16A に比べ、電流量の減少や活性化時定数及び脱活性化時定数の延長といった特徴を持っており、こうした電気生理学的性質の違いが、病態形成などに関与している可能性が考えられる。以上の報告から、TMEM16A は ICC を含めた自発収縮機構に深く関与していることが強く示唆されている。一方で、上述した ICC 様細胞の存在は

門脈平滑筋を含む複数の平滑筋組織においても報告されている [68,69,70,71]。しかしながら腸管平滑筋とは異なり、門脈平滑筋は CaCC 活性を有しており、このことから門脈平滑筋の ICC 様細胞の自動収縮能に対する寄与は ICC と異なる機構を持つ可能性が考えられ、今後さらなる検討が必要であると思われる。

本研究により、主に 2 種類の TMEM16A スプライスバリエント体、(abc)体と(acd)体が門脈平滑筋における CaCC 活性を担っていることが示された。門脈平滑筋の CaCC 活性に対する TMEM16A の寄与は、以前より推測されている [11]。本研究における TMEM16A 特異的阻害薬を用いた電気生理学的解析や、主要な TMEM16A スプライスバリエント体の同定を含む詳細な検討を行うことにより、TMEM16A の門脈平滑筋における CaCC 活性への寄与をより強く示唆するものである。また、これら TMEM16A スプライスバリエント体がホモ二量体だけでなくヘテロ二量体を形成する可能性を示した。TMEM16A の二量体形成についてはこれまでに報告されているが、本研究では細胞内においてイメージング解析した。異なるスプライスバリエント体間の二量体形成は、門脈平滑筋の CaCC 分子実体の解明という点において、重要な知見であるといえる。

### Ⅲ-2 アクチン骨格による門脈平滑筋CaCC活性の制御

イオンチャネルの活性は、サブユニットや細胞骨格、足場タンパク、オルガネラなどを含む様々な細胞内タンパク質と直接的に、もしくは機能的カップリングすることにより調節されている。これら制御タンパク質の中で、アクチンフィラメントのような細胞骨格は、様々な種類の膜タンパク質と相互作用し、生理機能を修飾することが一般に知られている。血管平滑筋において TMEM16A が担う CaCC 活性は生理学的に非常に重要であるにもかかわらず、制御タンパク質による活性制御については明らかとされていない。

近年、ERM タンパク質 (ezrin-radixin-moesin)の一つである moesin をノックダウンすることにより、TMEM16A の電流量が有意に減少することが報告された [72]。ERM タンパク質はアクチンと細胞膜との架橋構造形成に重要なタンパク質であるため、TMEM16A の CaCC 活性がアクチンをはじめとする細胞骨格等により制御されている可能性が考えられる。これらを背景として本研究では、門脈平滑筋における CaCC 活性に対するアクチン骨格の影響について薬理学的手法により解明することを目的とした。

#### Ⅲ-2-1 門脈平滑筋 CaCC 活性に対するアクチン関連薬の効果

まずアクチン重合阻害薬であるcytochalasin Dを用い、門脈平滑筋のCaCC電流に対する作用を検討した。保持電位を-60 mVとして-70 mVから+60 mVまで10 mV間隔で脱分極刺激を1秒間、15秒毎に与えた後、再び-60 mVに戻すことで末尾電流を測定した。

cytochalasin D (1  $\mu$ M, 4 h)を前処理することによる、電流密度や活性化時定数 ( $\tau_{act}$ ) の有意な変化は見られなかった (control,  $I_{+60mV}=4.7\pm0.6$  pA/pF,  $\tau_{act}=278\pm47$  ms,  $n=8$ ; cytochalasin D,  $I_{+60mV}=6.6\pm0.8$  pA/pF,  $\tau_{act}=257\pm23$  ms,  $n=14$ ; 図15B, C, E, 16)。しかしながら、脱活性化時定数 ( $\tau_{deact}$ )ではcontrol群に対して有意に大きな値を示した (control,  $\tau_{deact}=55.3\pm5.9$  ms; cytochalasin D,  $\tau_{deact}=85.3\pm5.9$  ms,  $p<0.01$  vs control, 図15D, E, 16)。この作用は、cytochalasin D処理前にアクチン重合促進薬であるjasplakinolide (1  $\mu$ M, 1 h)により処理することで、電流密度や活性化時定数 ( $I_{+60mV}=6.5\pm0.9$  pA/pF,  $\tau_{act}=216\pm39$  ms) に影響を与えることなく有意に抑制された ( $\tau_{deact}=61.5\pm4.5$  ms,  $n=6$ ,  $p<0.05$  vs cytochalasin D, 図15B-E, 16)。以上の結果より、門脈平滑筋のCaCC活性はアクチンにより一部制御されている可能性が示された。



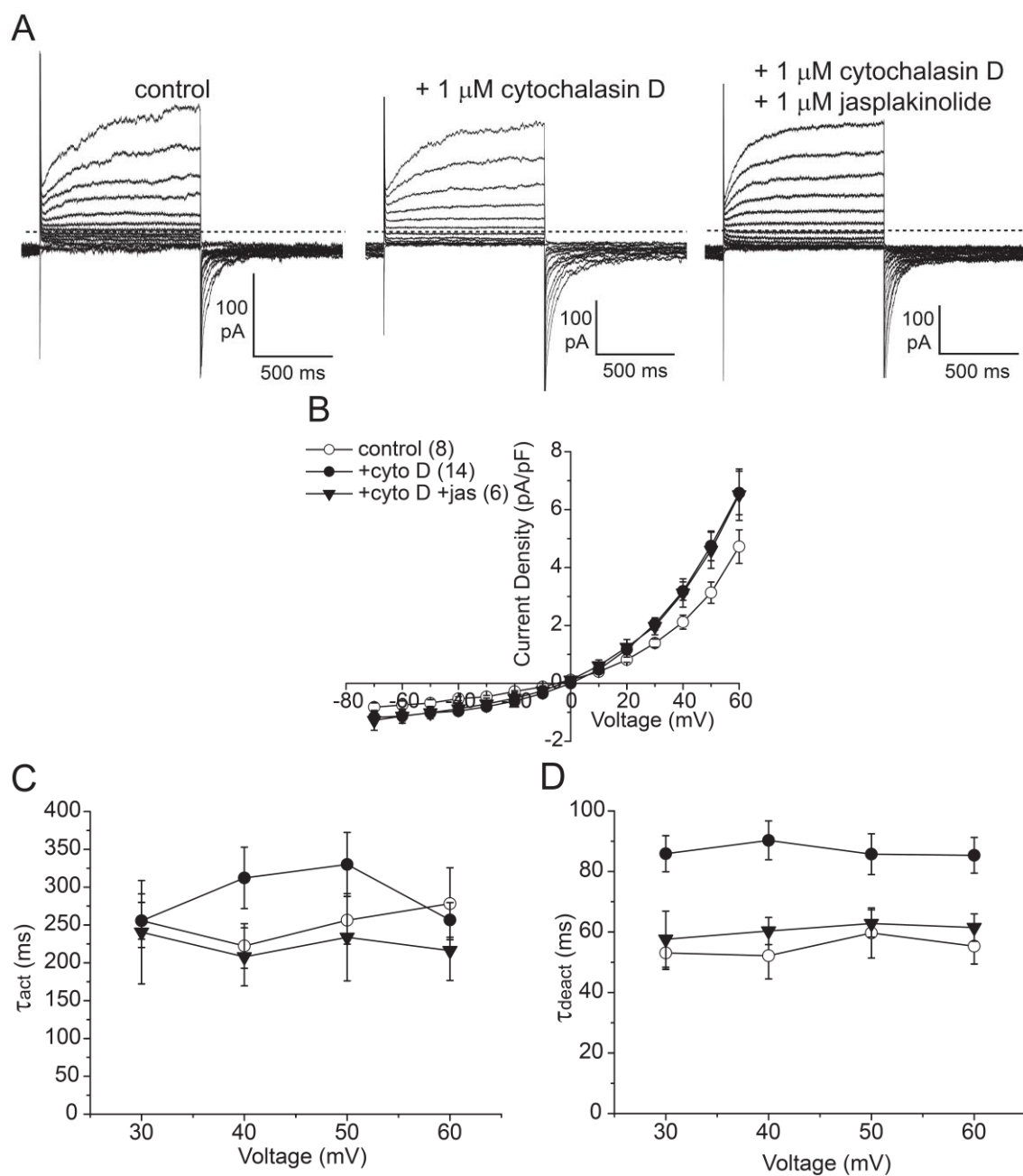


図 15 門脈平滑筋単離細胞におけるアクチン関連薬の作用

マウス門脈平滑筋単離細胞に対し、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、CaCC 電流を測定した。保持電位を  $-60\text{ mV}$  とし、 $-70\text{ mV}$  から  $10\text{ mV}$  ステップで  $+60\text{ mV}$  までの脱分極刺激を  $1\text{ 秒間}$ 、 $15\text{ 秒毎}$  与えることで電流を測定した。A:  $1\%$  DMSO (control、左)、 $1\text{ }\mu\text{M}$  cytochalasin D (中央)、 $1\text{ }\mu\text{M}$  jasplakinolide 後に  $1\text{ }\mu\text{M}$  cytochalasin D (右) を処理した際に観察された代表的な電流源図を示した。点線は zero current level を示している。B: 外向き電流における電流密度-電圧曲線を示した。細胞容量は 3 群間において有意な差はなかった。逆転電位は  $0\text{ mV}$  付近であった。括弧内には例数を示した。C:  $+30\sim+60\text{ mV}$  における活性化時定数を示した。D:  $+30\sim+60\text{ mV}$  における脱活性化時定数を示した。

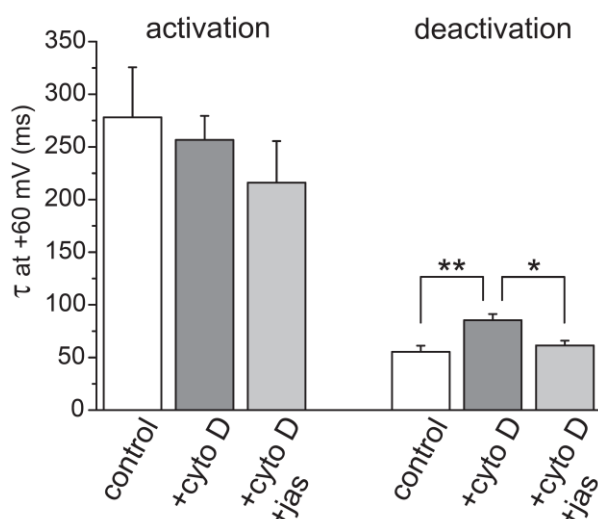


図 16 門脈平滑筋単離細胞の活性化時定数及び脱活性化時定数に対するアクチン関連薬の作用

+60 mV における活性化時定数・脱活性化時定数をまとめた。括弧内には例数を示した。\*, \*\*;  $p < 0.05, 0.01$

### III-2-2 TMEM16A発現細胞におけるcytochalasin Dの作用

次に、TMEM16Aスプライスバリエント体を一過性発現させたHEK293細胞におけるcytochalasin Dの作用について検討した。保持電位を-60 mVとして-70 mVから+60 mVまで10 mV間隔で脱分極刺激を1秒間、15秒毎に与えた後、再び-60 mVに戻すことで末尾電流を測定した。

まず、(abc)体について電流を測定したところ、大きな遅延整流性の外向き電流と末尾電流が観測された ( $I_{+60\text{mV}} = 22.0 \pm 7.3$  pA/pF,  $\tau_{\text{act}} = 181 \pm 30.5$  ms,  $\tau_{\text{deact}} = 116 \pm 30.0$  ms,  $n = 4$ ; 図17)。それに対して1  $\mu\text{M}$  cytochalasin Dで4 h処理した群では、CaCC電流に変化は見られなかった (cytochalasin D,  $I_{+60\text{mV}} = 27.0 \pm 11.3$  pA/pF,  $\tau_{\text{act}} = 168 \pm 25.2$  ms,  $\tau_{\text{deact}} = 113 \pm 27.3$  ms,  $n = 3$ ; 図17)。また、(acd)体についても同様に電流を測定したところ、(abc)体と同様の結果が得られ、cytochalasin D投与による差は見られなかった (control,  $I_{+60\text{mV}} = 40.4 \pm 10.3$  pA/pF,  $\tau_{\text{act}} = 222 \pm 63.3$  ms,  $\tau_{\text{deact}} = 157 \pm 4.2$  ms;  $n = 4$ , cytochalasin D,  $I_{+60\text{mV}} = 52.8 \pm 2.8$  pA/pF,  $\tau_{\text{act}} = 211 \pm 74.1$  ms,  $\tau_{\text{deact}} = 157 \pm 35.1$  ms,  $n = 4$ ; 図18)。以上の結果より、これらスプライスバリエント体単独発現HEK293細胞においてcytochalasin DはCaCC活性に影響を及ぼさないことが示された。

ここまで門脈平滑筋に主に発現する2つのスプライスバリエント体をそれぞれ単独発現させた細胞において検討したが、門脈平滑筋におけるこれら2種類のスプライスバリエント体の発現割合は、およそ2:1程度であることをこれまでに示している (図7B参照)。そこで、これら2種類のスプライスバリエント体を2:1 (1.33  $\mu\text{g}$ +0.67  $\mu\text{g}$ )の割合で混合し、HEK293細胞に一過性発現させ、同様にCaCC電流を測定した。その結果、単独発現細胞と同様に、cytochalasin DによるCaCC電流の変化は観測されなかった

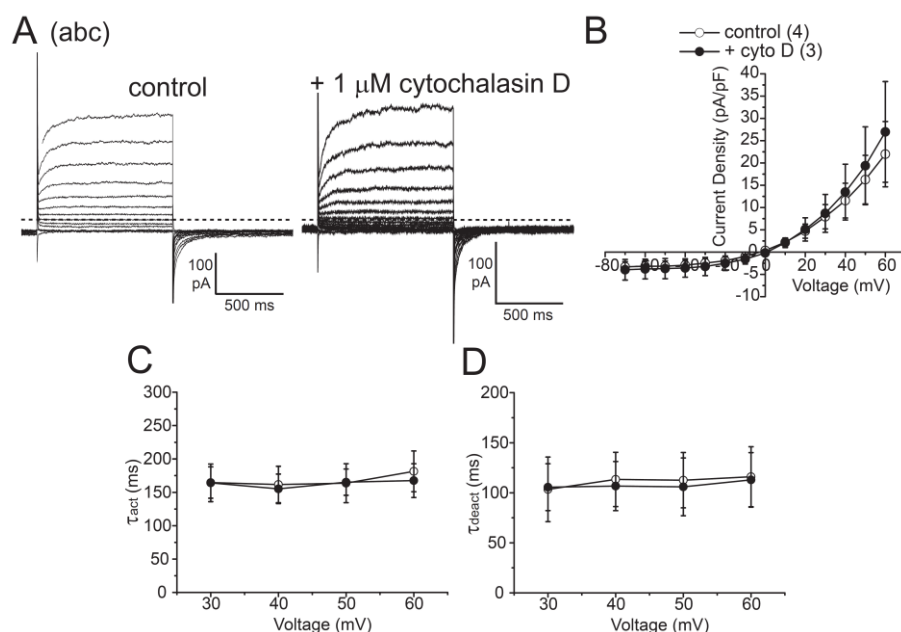


図 17 (abc)-HEK293 細胞における cytochalasin D の作用

TMEM16A(abc)体を一過性発現させた HEK293 細胞に対し、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、CaCC 電流を測定した。保持電位を $-60\text{ mV}$ とし、 $-70\text{ mV}$ から $10\text{ mV}$ ステップで $+60\text{ mV}$ までの脱分極刺激を $1\text{ 秒間}$ 、 $15\text{ 秒毎}$ に与え電流を測定した。A:  $1\%$  DMSO (左)及び $1\text{ }\mu\text{M}$  cytochalasin D 投与 (右) を処理した際に観察された代表的な電流源図を示した。点線は zero current level を示している。B: 外向き電流の最大値における電流密度－電圧曲線を示した。C:  $+30\sim+60\text{ mV}$ における、活性化時定数 ( $\tau_{\text{act}}$ )をまとめたものを示した。D:  $+30\sim+60\text{ mV}$ における、脱活性化時定数 ( $\tau_{\text{deact}}$ )をまとめたものを示した。括弧内には例数を示した。

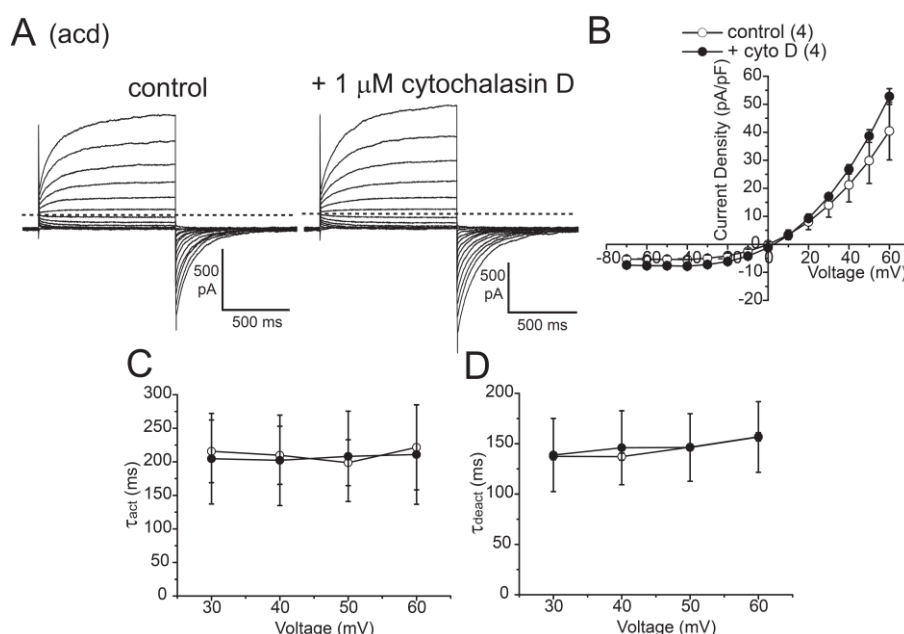


図 18 (acd)-HEK293 細胞における cytochalasin D の作用

TMEM16A(acd)体を一過性発現させた HEK293 細胞に対し、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、CaCC 電流を測定した。保持電位を $-60\text{ mV}$ とし、 $-70\text{ mV}$ から $10\text{ mV}$ ステップで $+60\text{ mV}$ までの脱分極刺激を $1\text{ 秒間}$ 、 $15\text{ 秒毎}$ に与え電流を測定した。A:  $1\%$  DMSO (左)及び $1\text{ }\mu\text{M}$  cytochalasin D 投与 (右) を処理した際に観察された代表的な電流源図を示した。点線は zero current level を示している。B: 外向き電流の最大値における電流密度－電圧曲線を示した。C:  $+30\sim+60\text{ mV}$ における、活性化時定数 ( $\tau_{\text{act}}$ )をまとめたものを示した。D:  $+30\sim+60\text{ mV}$ における、脱活性化時定数 ( $\tau_{\text{deact}}$ )をまとめたものを示した。括弧内には例数を示した。

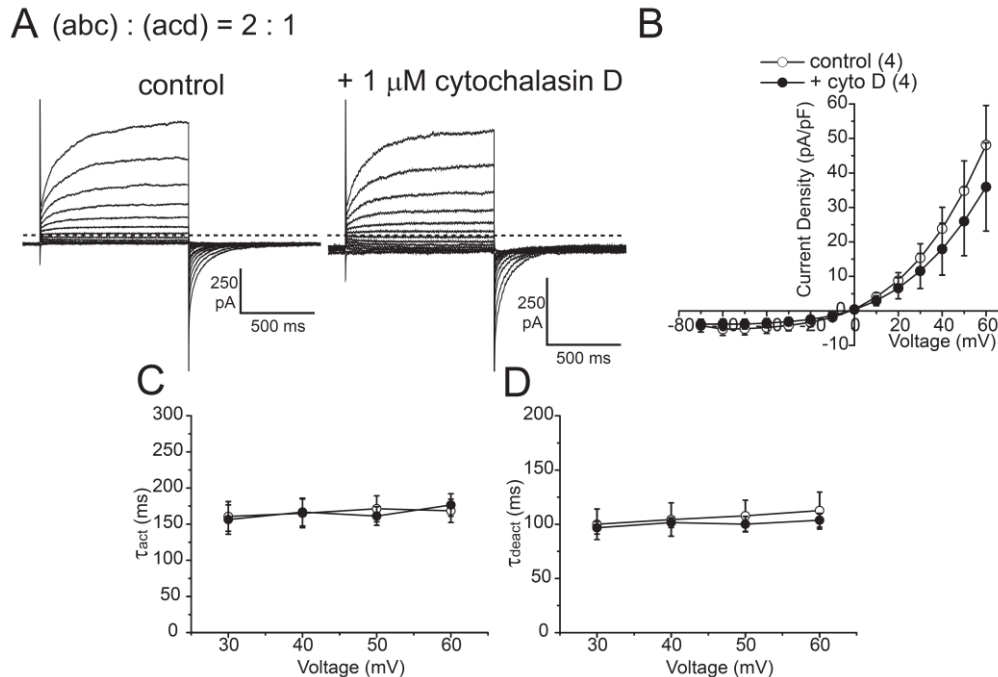


図 19 (abc)体、(acd)体共発現 HEK293 細胞における cytochalasin D の作用

(abc)体及び(acd)体を 2:1 の割合で混合し、一過性発現させた HEK293 細胞に対し、ホールセルパッチクランプ法を適用することにより、CaCC 電流を測定した。保持電位を -60 mV とし、-70mV から 10 mV ステップで +60 mV までの脱分極刺激を 1 秒間、15 秒毎に与え電流を測定した。A: 1% DMSO (左)及び 1 μM cytochalasin D 投与 (右) を処理した際に観察された代表的な電流源図を示した。点線は zero current level を示している。B: 外向き電流の最大値における電流密度—電圧曲線を示した。C: +30~+60 mV における、活性化時定数 ( $\tau_{act}$ )をまとめたものを示した。D: +30~+60 mV における、脱活性化時定数 ( $\tau_{deact}$ )をまとめたものを示した。括弧内には例数を示した。

(control,  $I_{+60mV}=48.1\pm11.5$  pA/pF,  $\tau_{act}=169\pm16.2$  ms,  $\tau_{deact}=113\pm17.0$  ms, n=4; cytochalasin D,  $I_{+60mV}=35.9\pm12.8$  pA/pF,  $\tau_{act}=177\pm15.5$  ms,  $\tau_{deact}=104\pm6.4$  ms, n=4; 図19)。

これまで、TMEM16A発現HEK293細胞に対して 10 μM cytochalasin D を処理することにより、電流量が有意に抑制されるという報告がある [35]。しかし今回の結果では電流量には影響を与えることなく、この作用の違いの理由としては、cytochalasin D の濃度の違いや、発現している TMEM16A のスプライスバリエント体の種類及び発現レベルの違いなどが考えられる。

一般に門脈平滑筋のような筋組織ではアクチンの発現が強いことが知られており、この門脈平滑筋単離細胞と HEK293 細胞との実験結果の違いは、アクチンの発現や重合状態の違いなどに由来するものであると推測される。

### III-2-3 要約と考察

CaCC 活性は平滑筋や神経・心臓細胞、分泌組織など、様々な組織において発現が認められている。現在 TMEM16A は CaCC の候補分子として非常に注目されているが、その電気生理学的性質や他のタンパク質との相互作用などについて未だ不明な点が多い。糖尿病性胃不全麻痺において、新規のスプライスバリエント体が報告されており、このスプライスバリエント体では、全長 TMEM16A に比較して有意な電流量の減少とキネティクスの変化が見られている [38]。本研究において、アクチン重合を阻害することにより、門脈平滑筋 CaCC のキネティクスの一部が変化することを明らかにした。これより、アクチン重合の状態の変化が起きることにより、CaCC 活性の変化が起こり、生理機能に影響を与える可能性が考えられる。一般に平滑筋の静止膜電位は -60 mV 付近であるのに対して、Cl<sup>-</sup> の平衡電位は -20~-30 mV 付近である。そのため、本研究で見られた脱活性化時定数の延長は、CaCC 活性を増強させることにより、平滑筋の興奮性を高め、収縮方向へ働くと想定される。

血管平滑筋では 2 つのフェノタイプ、分化型と増殖型が存在することが広く知られている。分化型は強い収縮能を持つ一般的な平滑筋細胞であるのに対して、増殖型では、収縮能は乏しい一方で、増殖能に優れている。このような分化型から増殖型へのスイッチによりアクチンを含む様々なタンパク質の発現量の変化が報告されている。また血管平滑筋におけるアクチン重合は、血管収縮により促進され、病態時などにおける血管リモデリングに関与するという報告もなされている [73]。加えて TMEM16A についても血管リモデリングへの関与が示唆されており、TMEM16A のダウンレギュレーションにより、血管平滑筋細胞の増殖が促進されることが報告されている [44]。これらの報告に加え、前述したようにアクチン重合阻害は脱活性化時定数を延長させることによる CaCC 活性の増強に繋がることを考慮すると、血管収縮が、アクチン重合を促進することにより、TMEM16A の活性低下を引き起こされ、その結果血管リモデリングが促進するという仮説が想定される。今後更なる検討が必要ではあるが、TMEM16A が病態形成等に寄与している可能性があるという点では、非常に重要な知見であるといえる。

アクチン結合ドメインの厳密な配列は、現在のところ明らかとされていない。しかし複数のチャネルにおいてアクチンと直接結合することが報告されている [45,46]。また、L/I-X-D/E-X-X-L/I の 6 塩基からなるモチーフがアクチン結合ドメインを担って

いるという報告があり、この配列はアクチンとの結合が確認されている ABP-120 やプロフィリン、及び BK チャネルにおいて存在する [48,74,75]. そこでこのモチーフを TMEM16A アミノ酸配列から検索したところ、<sup>192</sup>L-L-E-A-G-L と <sup>786</sup>I-I-E-I-R-L の 2 箇所の配列が確認された。非常に興味深いことに、前者は segment *a,b* や二量体形成ドメイン等を含む N 末端領域に、後者はチャネルポアやイオン選択性に重要であると考えられている P-loop 様配列の近傍に位置していた。一方でこのモチーフを持つことなくアクチンと相互作用することができるタンパク質も存在しており、詳細なアクチン結合ドメインの配列は明らかとされていない。アクチンと膜タンパク質との相互作用は様々な様式が報告されているため、TMEM16A におけるこのアミノ酸配列とアクチンとの相互作用を含めた、直接的・間接的なアクチンとの相互作用については今後検討していく必要があると考えられる。

本研究により、門脈平滑筋における CaCC 活性はアクチン骨格により一部制御を受けている可能性が示された。CaCC とアクチンとの相互作用は、これまでにほとんど報告されていない。門脈平滑筋の CaCC 活性は主に TMEM16A によって構成されていることから、本研究による TMEM16A とアクチンとの相互作用を示唆する結果は、血管平滑筋における収縮制御機構の解明や病態を理解する上で、非常に重要な知見であるといえる。

## 第IV章 総括

門脈平滑筋における CaCC 活性は、主に 2 種類の TMEM16A スプライスバリエーション体がホモ二量体及びヘテロ二量体を組むことにより形成されていることが分かった。また門脈平滑筋においては細胞骨格が CaCC 活性の制御に影響を与えていることが示された。

スプライスバリエーション体の機能解明は、CaCC 活性への寄与の解明に繋がり、また発現パターンの変化は病態などにも深く関与する可能性があることから、これらの発見は、TMEM16A の生理現象及び病態の理解において重要な知見になりうると考えられる。

## 第Ⅴ章 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤な御指導を賜りました名古屋市立大学 大学院  
薬学研究科、今泉 祐治 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言及び御高閲を頂きました  
名古屋市立大学 大学院薬学研究科、湯浅 博昭 教授、  
藤井 聡 教授、大澤 匡弘 准教授ならびに山村 寿男 准教授に  
深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導及び御助言を賜りました  
名古屋市立大学 大学院薬学研究科、  
鈴木 良明 助教に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益な御指導及び御助言を賜りました  
京都薬科大学 薬学部、  
大矢 進 教授に深謝致します。

本研究にあたり多大な御協力、御助言を頂きました名古屋市立大学 大学院  
薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野の卒業生、教室員諸氏に  
心より感謝致します

最後に、本研究に供せられた多くの実験動物の冥福を心から祈ります。



## 第VI章 引用文献

- [1] A.S. Verkman, L.J. Galiotta, Chloride channels as drug targets, *Nat Rev Drug Discov* 8 (2009) 153-171.
- [2] A. Caputo, E. Caci, L. Ferrera, N. Pedemonte, C. Barsanti, E. Sondo, U. Pfeffer, R. Ravazzolo, O. Zegarra-Moran, L.J. Galiotta, TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity, *Science* 322 (2008) 590-594.
- [3] B.C. Schroeder, T. Cheng, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit, *Cell* 134 (2008) 1019-1029.
- [4] Y.D. Yang, H. Cho, J.Y. Koo, M.H. Tak, Y. Cho, W.S. Shim, S.P. Park, J. Lee, B. Lee, B.M. Kim, R. Raouf, Y.K. Shin, U. Oh, TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance, *Nature* 455 (2008) 1210-1215.
- [5] J.R. Martins, D. Faria, P. Kongsuphol, B. Reisch, R. Schreiber, K. Kunzelmann, Anoctamin 6 is an essential component of the outwardly rectifying chloride channel, *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (2011) 18168-18172.
- [6] H. Yang, A. Kim, T. David, D. Palmer, T. Jin, J. Tien, F. Huang, T. Cheng, S.R. Coughlin, Y.N. Jan, L.Y. Jan, TMEM16F forms a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation, *Cell* 151 (2012) 111-122.
- [7] C.A. Juul, S. Grubb, K.A. Poulsen, T. Kyed, N. Hashem, I.H. Lambert, E.H. Larsen, E.K. Hoffmann, Anoctamin 6 differs from VRAC and VSOAC but is involved in apoptosis and supports volume regulation in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , *Pflugers Arch* (2014).
- [8] T. Shimizu, T. Iehara, K. Sato, T. Fujii, H. Sakai, Y. Okada, TMEM16F is a component of a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying  $\text{Cl}^-$  channel, *Am J Physiol Cell Physiol* 304 (2013) C748-759.
- [9] S. Bulley, Z.P. Neeb, S.K. Burris, J.P. Bannister, C.M. Thomas-Gatewood, W. Jangsangthong, J.H. Jaggar, TMEM16A/ANO1 channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries, *Circ Res* 111 (2012) 1027-1036.
- [10] H. Cho, Y.D. Yang, J. Lee, B. Lee, T. Kim, Y. Jang, S.K. Back, H.S. Na, B.D. Harfe, F. Wang, R. Raouf, J.N. Wood, U. Oh, The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons, *Nat Neurosci* 15 (2012)

1015-1021.

- [11] A.J. Davis, A.S. Forrest, T.A. Jepps, M.L. Valencik, M. Wiwchar, C.A. Singer, W.R. Sones, I.A. Greenwood, N. Leblanc, Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle, *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (2010) C948-959.
- [12] A.J. Davis, J. Shi, H.A. Pritchard, P.S. Chadha, N. Leblanc, G. Vasilikostas, Z. Yao, A.S. Verkman, A.P. Albert, I.A. Greenwood, Potent vasorelaxant activity of the TMEM16A inhibitor T16A<sub>inh</sub>-A01, *Br J Pharmacol* 168 (2013) 773-784.
- [13] R.E. Dixon, G.W. Hennig, S.A. Baker, F.C. Britton, B.D. Harfe, J.R. Rock, K.M. Sanders, S.M. Ward, Electrical slow waves in the mouse oviduct are dependent upon a calcium activated chloride conductance encoded by Tmem16a, *Biol Reprod* 86 (2012) 1-7.
- [14] P.J. Gomez-Pinilla, S.J. Gibbons, M.R. Bardsley, A. Lorincz, M.J. Pozo, P.J. Pasricha, M. Van de Rijn, R.B. West, M.G. Sarr, M.L. Kendrick, R.R. Cima, E.J. Dozois, D.W. Larson, T. Ordog, G. Farrugia, Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296 (2009) G1370-1381.
- [15] S.J. Hwang, P.J. Blair, F.C. Britton, K.E. O'Driscoll, G. Hennig, Y.R. Bayguinov, J.R. Rock, B.D. Harfe, K.M. Sanders, S.M. Ward, Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles, *J Physiol* 587 (2009) 4887-4904.
- [16] J.R. Rock, C.R. Futtner, B.D. Harfe, The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea, *Dev Biol* 321 (2008) 141-149.
- [17] V.G. Romanenko, M.A. Catalan, D.A. Brown, I. Putzier, H.C. Hartzell, A.D. Marmorstein, M. Gonzalez-Begne, J.R. Rock, B.D. Harfe, J.E. Melvin, Tmem16A encodes the Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells, *J Biol Chem* 285 (2010) 12990-13001.
- [18] H. Sun, Y. Xia, O. Paudel, X.R. Yang, J.S. Sham, Chronic hypoxia-induced upregulation of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel in pulmonary arterial myocytes: a mechanism contributing to enhanced vasoreactivity, *J Physiol* 590 (2012) 3507-3521.

- [19] C. Thomas-Gatewood, Z.P. Neeb, S. Bulley, A. Adebiyi, J.P. Bannister, M.D. Leo, J.H. Jaggar, TMEM16A channels generate  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  currents in cerebral artery smooth muscle cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301 (2011) H1819-1827.
- [20] C. Sagheddu, A. Boccaccio, M. Dibattista, G. Montani, R. Tirindelli, A. Menini, Calcium concentration jumps reveal dynamic ion selectivity of calcium-activated chloride currents in mouse olfactory sensory neurons and TMEM16B/anoctamin2-transfected HEK 293T cells, *J Physiol* (2010) 4189-4204.
- [21] A.B. Stephan, E.Y. Shum, S. Hirsh, K.D. Cygnar, J. Reisert, H. Zhao, ANO2 is the ciliary calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 11776-11781.
- [22] H. Stohr, J.B. Heisig, P.M. Benz, S. Schoberl, V.M. Milenkovic, O. Strauss, W.M. Aartsen, J. Wijnholds, B.H. Weber, H.L. Schulz, TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals, *J Neurosci* 29 (2009) 6809-6818.
- [23] F. Huang, X. Wang, E.M. Ostertag, T. Nuwal, B. Huang, Y.N. Jan, A.I. Basbaum, L.Y. Jan, TMEM16C facilitates  $\text{Na}^+$ -activated  $\text{K}^+$  currents in rat sensory neurons and regulates pain processing, *Nat Neurosci* 16 (2013) 1284-1290.
- [24] R. Schreiber, I. Uliyakina, P. Kongsuphol, R. Warth, M. Mirza, J.R. Martins, K. Kunzelmann, Expression and function of epithelial anoctamins, *J Biol Chem* 285 (2010) 7838-7845.
- [25] V. Bolduc, G. Marlow, K.M. Boycott, K. Saleki, H. Inoue, J. Kroon, M. Itakura, Y. Robitaille, L. Parent, F. Baas, K. Mizuta, N. Kamata, I. Richard, W.H. Linssen, I. Mahjneh, M. de Visser, R. Bashir, B. Brais, Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies, *Am J Hum Genet* 86 (2010) 213-221.
- [26] K. Mizuta, S. Tsutsumi, H. Inoue, Y. Sakamoto, K. Miyatake, K. Miyawaki, S. Noji, N. Kamata, M. Itakura, Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia, *Biochem Biophys Res Commun* 357 (2007) 126-132.
- [27] J. Suzuki, M. Umeda, P.J. Sims, S. Nagata, Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F, *Nature* 468 (2010) 834-838.
- [28] S. Das, Y. Hahn, D.A. Walker, S. Nagata, M.C. Willingham, D.M. Peehl, T.K. Bera, B.

- Lee, I. Pastan, Topology of NGEF, a prostate-specific cell:cell junction protein widely expressed in many cancers of different grade level, *Cancer Res* 68 (2008) 6306-6312.
- [29] M. Katoh, Characterization of human TMEM16G gene in silico, *Int J Mol Med* 14 (2004) 759-764.
- [30] M. Katoh, Identification and characterization of TMEM16H gene in silico, *Int J Mol Med* 15 (2005) 353-358.
- [31] K. Polyak, Y. Xia, J.L. Zweier, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A model for p53-induced apoptosis, *Nature* 389 (1997) 300-305.
- [32] T. Otowa, E. Yoshida, N. Sugaya, S. Yasuda, Y. Nishimura, K. Inoue, M. Tochigi, T. Umekage, T. Miyagawa, N. Nishida, K. Tokunaga, H. Tanii, T. Sasaki, H. Kaiya, Y. Okazaki, Genome-wide association study of panic disorder in the Japanese population, *J Hum Genet* 54 (2009) 122-126.
- [33] R. Schnepfenheim, G. Castaman, A.B. Federici, W. Kreuz, R. Marschalek, J. Oldenburg, F. Oyen, U. Budde, A common 253-kb deletion involving VWF and TMEM16B in German and Italian patients with severe von Willebrand disease type 3, *J Thromb Haemost* 5 (2007) 722-728.
- [34] L. Ferrera, A. Caputo, I. Ubbi, E. Bussani, O. Zegarra-Moran, R. Ravazzolo, F. Pagani, L.J. Galletta, Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing, *J Biol Chem* 284 (2009) 33360-33368.
- [35] Y. Tian, P. Kongsuphol, M. Hug, J. Ousingsawat, R. Witzgall, R. Schreiber, K. Kunzelmann, Calmodulin-dependent activation of the epithelial calcium-dependent chloride channel TMEM16A, *FASEB J* 25 (2011) 1058-1068.
- [36] J. Jung, J.H. Nam, H.W. Park, U. Oh, J.H. Yoon, M.G. Lee, Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeability by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 360-365.
- [37] K. Yu, J. Zhu, Z. Qu, Y.Y. Cui, H.C. Hartzell, Activation of the Ano1 (TMEM16A) chloride channel by calcium is not mediated by calmodulin, *J Gen Physiol* 143 (2014) 253-267.
- [38] A. Mazzone, C.E. Bernard, P.R. Strege, A. Beyder, L.J. Galletta, P.J. Pasricha, J.L. Rae, H.P. Parkman, D.R. Linden, J.H. Szurszewski, T. Ordog, S.J. Gibbons, G. Farrugia, Altered expression of ano1 variants in human diabetic gastroparesis, *J Biol Chem*

286 (2011) 13393-13403.

- [39] G. Fallah, T. Römer, S. Detoro-Dassen, U. Braam, F. Markwardt, G. Schmalzing, TMEM16A(a)/anoctamin-1 Shares a Homodimeric Architecture with CLC Chloride Channels, *Mol Cell Proteomics* 10 (2011) M110 004697.
- [40] K. Yu, C. Duran, Z. Qu, Y.Y. Cui, H.C. Hartzell, Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology, *Circ Res* 110 (2012) 990-999.
- [41] J. Tien, H.Y. Lee, D.L. Minor, Jr., Y.N. Jan, L.Y. Jan, Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC), *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 6352-6357.
- [42] A. El Chemaly, C. Norez, C. Magaud, J. Bescond, A. Chatelier, N. Fares, I. Findlay, C. Jayle, F. Becq, J.F. Faivre, P. Bois, ANO1 contributes to Angiotensin-II-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{Cl}^-$  current in human atrial fibroblasts, *J Mol Cell Cardiol* 68C (2014) 12-19.
- [43] A. Yamamura, H. Yamamura, A. Zeifman, J.X. Yuan, Activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels contributes to regulating receptor- and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human pulmonary artery smooth muscle cells, *Pulm Circ* 1 (2011) 269-279.
- [44] M. Wang, H. Yang, L.Y. Zheng, Z. Zhang, Y.B. Tang, G.L. Wang, Y.H. Du, X.F. Lv, J. Liu, J.G. Zhou, Y.Y. Guan, Downregulation of TMEM16A calcium-activated chloride channel contributes to cerebrovascular remodeling during hypertension by promoting basilar smooth muscle cell proliferation, *Circulation* 125 (2012) 697-707.
- [45] N. Ahmed, M. Ramjeesingh, S. Wong, A. Varga, E. Garami, C.E. Bear, Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton, *Biochem J* 352 (2000) 789-794.
- [46] C. Mazzochi, J.K. Bubien, P.R. Smith, D.J. Benos, The carboxyl terminus of the  $\alpha$ -subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to F-actin, *J Biol Chem* 281 (2006) 6528-6538.
- [47] R. Ganeshan, K. Nowotarski, A. Di, D.J. Nelson, K.L. Kirk, CFTR surface expression and chloride currents are decreased by inhibitors of N-WASP and actin polymerization, *Biochim Biophys Acta* 1773 (2007) 192-200.
- [48] S. Zou, S. Jha, E.Y. Kim, S.E. Dryer, A novel actin-binding domain on Slo1 calcium-activated potassium channels is necessary for their expression in the

- plasma membrane, *Mol Pharmacol* 73 (2008) 359-368.
- [49] H. Yamamura, C. Ikeda, Y. Suzuki, S. Ohya, Y. Imaizumi, Molecular assembly and dynamics of fluorescent protein-tagged single  $K_{Ca1.1}$  channel in expression system and vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 302 (2012) C1257-1268.
- [50] F.C. Britton, S. Ohya, B. Horowitz, I.A. Greenwood, Comparison of the properties of CLCA1 generated currents and  $I_{Cl(Ca)}$  in murine portal vein smooth muscle cells, *J Physiol* 539 (2002) 107-117.
- [51] S.N. Saleh, I.A. Greenwood, Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release, *Am J Physiol Cell Physiol* 288 (2005) C122-131.
- [52] S. Ohya, T. Takii, H.F. Yamazaki, M. Matsumori, K. Onozaki, M. Watanabe, Y. Imaizumi, Molecular cloning of a novel gene involved in serotonin receptor-mediated signal transduction in rat stomach, *FEBS Lett* 401 (1997) 252-258.
- [53] O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch* 391 (1981) 85-100.
- [54] I.A. Greenwood, J. Ledoux, N. Leblanc, Differential regulation of  $Ca^{2+}$ -activated  $Cl^-$  currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent kinase, *J Physiol* 534 (2001) 395-408.
- [55] B. Manoury, A. Tamuleviciute, P. Tammaro, TMEM16A/Anoctamin1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells, *J Physiol* 588 (2010) 2305-2314.
- [56] A. Adomaviciene, K.J. Smith, H. Garnett, P. Tammaro, Putative pore-loops of TMEM16/anoctamin channels affect channel density in cell membranes, *J Physiol* 591 (2013) 3487-3505.
- [57] S. Grubb, K.A. Poulsen, C.A. Juul, T. Kyed, T.K. Klausen, E.H. Larsen, E.K. Hoffmann, TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed  $Ca^{2+}$  activation, *J Gen Physiol* 141 (2013) 585-600.
- [58] W. Namkung, P.W. Phuan, A.S. Verkman, TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and

- intestinal epithelial cells, *J Biol Chem* 286 (2011) 2365-2374.
- [59] P. Scudieri, E. Sondo, E. Caci, R. Ravazzolo, L.J. Galletta, TMEM16A-TMEM16B chimaeras to investigate the structure-function relationship of calcium-activated chloride channels, *Biochem J* 452 (2013) 443-455.
- [60] M.H. Ulbrich, E.Y. Isacoff, Subunit counting in membrane-bound proteins, *Nat Methods* 4 (2007) 319-321.
- [61] N. Durisic, A.G. Godin, C.M. Wever, C.D. Heyes, M. Lakadamyali, J.A. Dent, Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting, *J Neurosci* 32 (2012) 12915-12920.
- [62] A. Reiner, R.J. Arant, E.Y. Isacoff, Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex, *Cell Rep* 1 (2012) 234-240.
- [63] V.V. Matchkov, P. Larsen, E.V. Bouzinova, A. Rojek, D.M. Boedtkjer, V. Golubinskaya, F.S. Pedersen, C. Aalkjaer, H. Nilsson, Bestrophin-3 (vitelliform macular dystrophy 2-like 3 protein) is essential for the cGMP-dependent calcium-activated chloride conductance in vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 103 (2008) 864-872.
- [64] F. Dabertrand, J.L. Morel, V. Sorrentino, J. Mironneau, C. Mironneau, N. Macrez, Modulation of calcium signalling by dominant negative splice variant of ryanodine receptor subtype 3 in native smooth muscle cells, *Cell Calcium* 40 (2006) 11-21.
- [65] D. Jiang, B. Xiao, X. Li, S.R. Chen, Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor), *J Biol Chem* 278 (2003) 4763-4769.
- [66] F. Huang, J.R. Rock, B.D. Harfe, T. Cheng, X. Huang, Y.N. Jan, L.Y. Jan, Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 21413-21418.
- [67] M.J. Berridge, Smooth muscle cell calcium activation mechanisms, *J Physiol* 586 (2008) 5047-5061.
- [68] M.I. Harhun, D.V. Gordienko, O.V. Povstyan, R.F. Moss, T.B. Bolton, Function of interstitial cells of Cajal in the rabbit portal vein, *Circ Res* 95 (2004) 619-626.
- [69] X. Huang, D. Zhao, Z.Y. Wang, M.L. Zhang, Z.Q. Yan, Y.F. Han, W.X. Xu, Z.L. Jiang, The properties of spontaneous transient inward currents of interstitial cells in rabbit portal vein, *Eur J Pharmacol* 643 (2010) 63-69.
- [70] E. Bradley, M.A. Hollywood, L. Johnston, R.J. Large, T. Matsuda, A. Baba, N.G.

- McHale, K.D. Thornbury, G.P. Sergeant, Contribution of reverse  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchange to spontaneous activity in interstitial cells of Cajal in the rabbit urethra, *J Physiol* 574 (2006) 651-661.
- [71] H. Hashitani, H. Suzuki, Properties of spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra in situ, *J Physiol* 583 (2007) 505-519.
- [72] P. Perez-Cornejo, A. Gokhale, C. Duran, Y. Cui, Q. Xiao, H.C. Hartzell, V. Faundez, Anoctamin 1 (Tmem16A)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride channel stoichiometrically interacts with an ezrin-radixin-moesin network, *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (2012) 10376-10381.
- [73] M.C. Staiculescu, E.L. Galinanes, G. Zhao, U. Ulloa, M. Jin, M.I. Beig, G.A. Meininger, L.A. Martinez-Lemus, Prolonged vasoconstriction of resistance arteries involves vascular smooth muscle actin polymerization leading to inward remodelling, *Cardiovasc Res* 98 (2013) 428-436.
- [74] A.R. Bresnick, V. Warren, J. Condeelis, Identification of a short sequence essential for actin binding by Dictyostelium ABP-120, *J Biol Chem* 265 (1990) 9236-9240.
- [75] J.S. Vandekerckhove, D.A. Kaiser, T.D. Pollard, Acanthamoeba actin and profilin can be cross-linked between glutamic acid 364 of actin and lysine 115 of profilin, *J Cell Biol* 109 (1989) 619-626.
- [76] 山口 徹 「今日の治療指針 2013 年版」 医学書院 2013 年発行