



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
報告番号	甲第1651号
学位記番号	第334号
氏名	松木 克仁
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	3型リアノジン受容体機能と細胞内Ca <sup>2+</sup> 濃度制御機構の解析
論文審査担当者	主査： 木村 和哲 副査： 今泉 祐治, 松永 民秀, 平嶋 尚英, 朝霧 成挙

名古屋市立大学学位論文

## 3型リアノジン受容体機能と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御機構の解析

29年度（2018年3月）

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  
松木克仁

一、本論文は2018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 木村 和哲 教授  
副査 今泉 祐治 教授  
副査 平嶋 尚英 教授  
副査 松永 民秀 教授  
副査 朝霧 成挙 准教授

二、本論文は、学術誌に掲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. Matsuki K, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y.  
Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy.  
Pflügers Arch., 469 (2), 313-326, (2017)
2. Matsuki K, Kato D, Takemoto M, Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, Takeshima H, Imaizumi Y.  
Negative regulation of cellular Ca<sup>2+</sup> mobilization by ryanodine receptor type 3 in mouse mesenteric artery smooth muscle.  
American Journal of Physiology-Cell Physiology, 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1章 序論.....	1
1. 細胞内カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )動態.....	1
2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストア (筋小胞体)からの $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構.....	1
3. リアノジン受容体.....	2
4. 平滑筋組織におけるリアノジン受容体の役割.....	2
5. RyR3 とスプライスバリエント体.....	3
6. 妊娠に伴う子宮平滑筋の変化.....	4
7. $\text{Ca}^{2+}$ による血管平滑筋の張力制御.....	5
8. 本研究について.....	6
第2章 実験方法.....	7
1. 実験動物.....	7
2. RNA 抽出及び RT-PCR 法.....	7
3. リアルタイム PCR 法.....	7
4. ウェスタンブロッティング法.....	8
5. 収縮力測定.....	9
6. 単離平滑筋細胞の調整.....	9
7. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )測定.....	10
8. 膜電流測定.....	11
9. 非観血的血圧測定.....	11
10. 腸間膜動脈床を用いた灌流圧測定.....	12
11. 溶液組成.....	12
12. 使用薬物.....	13
13. 統計処理.....	13
第3章 結果及び考察.....	14
3-1 子宮平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明.....	14
3-1-1. マウス子宮平滑筋細胞における自発収縮及び自発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に対する RyR の寄与.....	14
3-1-2. マウス子宮平滑筋における Caffeine 感受性の測定.....	16
3-1-3. マウス子宮平滑筋の自発収縮における VDCC の寄与.....	17
3-1-4. マウス子宮平滑筋における VDCC 発現の解析.....	17

3-1-5.	マウス子宮平滑筋における CICR 活性の解析.....	18
3-1-6.	マウス子宮平滑筋における BK チャネル発現の解析.....	19
3-1-7.	マウス子宮平滑筋における STOC の解析.....	21
3-1-8.	マウス子宮平滑筋における Ca <sup>2+</sup> spark の解析.....	22
3-1-9.	非妊娠・妊娠時におけるマウス子宮平滑筋の RyR mRNA 及びタンパク質発現変化.....	23
3-1-10.	RyR3 遺伝子欠損による出産への影響.....	24
3-1-11.	RyR3 遺伝子欠損による非妊娠子宮平滑筋自発収縮への影響.....	24
3-1-12.	RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析.....	25
3-1-13.	RyR3 遺伝子欠損による Oxytocin 感受性への影響.....	27
3-1-14.	要約及び考察.....	28
3-2	腸間膜動脈平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明.....	33
3-2-1.	マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR3 mRNA 及びタンパク質発現解析.....	33
3-2-2.	RyR3 遺伝子欠損による Caffeine 感受性への影響.....	35
3-2-3.	RyR3 遺伝子欠損による Ca <sup>2+</sup> spark への影響.....	36
3-2-4.	RyR3 遺伝子欠損による STOC への影響.....	37
3-2-5.	RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析: VDCC 機能発現.....	38
3-2-6.	RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析: BK チャネル機能発現.....	39
3-2-7.	非観血的血圧測定.....	40
3-2-8.	腸間膜動脈床灌流標本を用いた灌流圧測定.....	40
3-2-9.	要約及び考察.....	42
第4章	総括.....	46
第5章	謝辞.....	47
第6章	引用文献.....	48

本論文では以下の略語を用いた。

BK チャネル: Large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel  
CICR:  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release  
DBP: Diastolic blood pressure  
DHPR: Dihydropyridine receptor  
DMSO: Dimethyl sulfoxide  
DTT: Dithiothreitol  
DN-RyR3: Dominant-negative isoform of RyR3  
 $\text{EC}_{50}$ : Half maximal effective concentration  
EGTA: *O,O*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid  
FL-RyR3: Full-length RyR3  
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GPCR: G protein-coupled receptor  
HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid  
 $\text{IP}_3\text{R}$ : Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor  
 $\text{IP}_3\text{R}1$ : Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1  
ICR:  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release  
 $\text{IC}_{50}$ : Half maximal inhibitory concentration  
 $\text{K}_v$  チャネル: Voltage-dependent  $\text{K}^+$  channel  
 $\text{Na}_v$  チャネル: Voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channel  
NCX:  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger  
NCLX: Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger  
NP: Non-pregnant  
n.s.: Not significant  
MBP: Mean blood pressure  
MCU: Mitochondrial calcium uniporter  
Oxy: Oxytocin  
Pax: Paxilline  
PSS: Physiological salt solution  
P: Pregnant  
PG: Prostaglandin  
RyR: Ryanodine receptor  
RyR1: Ryanodine receptor type 1  
RyR2: Ryanodine receptor type 2  
RyR3: Ryanodine receptor type 3

RyR3<sup>+/+</sup>: wild type mice (C57BL/6)

RyR3<sup>-/-</sup>: Homozygous RyR3 gene deficient mice

SR: Sarcoplasmic reticulum

SERCA: Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase

SK チャネル: Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel

STOC: Spontaneous transient outward current

SBP: Systolic blood pressure

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction

TIRF: Total internal reflection fluorescence

Uri: Urinary bladder

VDCC: Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration

### 3型リアノジン受容体機能と細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御機構の解析

松木 克仁

平滑筋細胞において細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 変化は筋収縮や分泌、細胞死など多くの生命現象に関与している。今回着目したリアノジン受容体 (RyR) は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部である筋小胞体 (SR) 上に発現し、SR から  $\text{Ca}^{2+}$ を放出することで、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御を担っている。平滑筋において RyR は興奮時には  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 (CICR) 機構の起点となり収縮を引き起こす。一方で、静止時には局所的な自発的  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 ( $\text{Ca}^{2+}$  spark) によって、自発一過性外向き電流 (STOC) を引き起こし、過分極させることで静止膜電位の安定化に寄与しており、RyR による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御は平滑筋の筋張力調節において重要な役割を果たしている。本研究では、子宮平滑筋、腸間膜動脈平滑筋という異なる平滑筋における 3型 RyR (RyR3) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御機構を明らかとした。子宮平滑筋では、これまでに、妊娠期に RyR3 の発現が増大し、収縮力を高めるという報告がなされていた。しかしながら、本研究により、子宮平滑筋では RyR の活性が低く、筋興奮 (脱分極) 時の SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出や筋収縮、および静止時の  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC による膜電位調節機構の寄与が極めて少ないことを明らかにした。また、妊娠期には発現が減少していることも明らかとなった。腸間膜動脈平滑筋では、主にドミナントネガティブ型の RyR3 スプライスバリエント体 (DN-RyR3) によって RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が抑制的に制御されており、①  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC 活性の抑制による静止膜電位の制御と、② CICR 活性の抑制による興奮性の抑制という 2 つの機能により、血管平滑筋の張力調節機構に関与していることが明らかとなった。本研究により、平滑筋では RyR2 や FL-RyR3、DN-RyR3 の発現比率によって細胞の興奮性が調節されていると考えられ、平滑筋の興奮性制御及び、筋張力制御機構を解明する上で、重要な知見を提示した。



# 第1章 序論

## 1. 細胞内カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )動態

$\text{Ca}^{2+}$ は、すべての細胞や細胞外液に分布しており、その濃度変化により受精や神経伝達物質などのエキソサイトシス、遺伝子発現、筋収縮、細胞死、細胞増殖、記憶形成といった様々な生理機能に情報伝達物質（セカンドメッセンジャー）として関与している。この細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )を調節する機構として、細胞内外に種々のイオンチャネル・トランスポーターが発現している。平滑筋での細胞外からの主要な  $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路としては、細胞膜上の電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル (VDCC)や、排出経路には  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX)や細胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) がある。細胞内では細胞内小器官である筋小胞体 (SR) に発現するリアノジン受容体 (RyR) やイノシトール三リン酸受容体( $\text{IP}_3\text{R}$ )が刺激によって  $\text{Ca}^{2+}$ を放出し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる。SR への  $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みには筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) が関わっている。また、ミトコンドリアに発現する  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCLX)や  $\text{Ca}^{2+}$ ユニポーター (MCU)によって  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離や貯蔵が行われている。これらのイオンチャネル及び、トランスポーターにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時には約 100 nM 程度、収縮時には1～数  $\mu\text{M}$  に制御されている (図 1)。

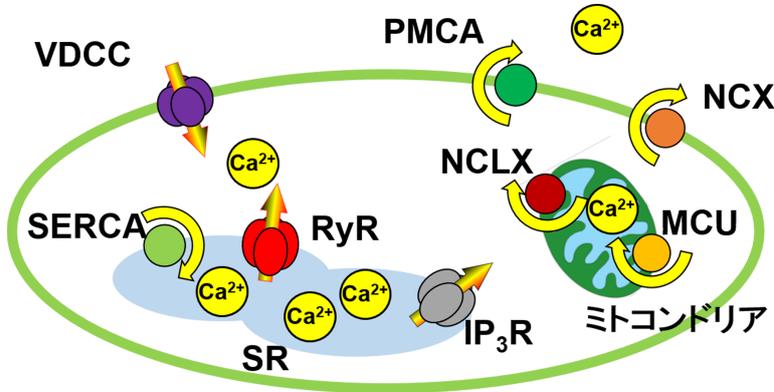


図 1 平滑筋組織の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 制御機構に関わるイオンチャネル及び、トランスポーター

平滑筋細胞の細胞膜、SR膜、ミトコンドリアに発現し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 制御機構に関わる主要なイオンチャネル及び、トランスポーターを示した。

## 2. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストア (筋小胞体)からの $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構

SR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機構には、主に RyR と  $\text{IP}_3\text{R}$  を介した 2 つの経路が存在する。RyR は、細胞膜上の VDCC を介して細胞内へ流入した  $\text{Ca}^{2+}$ によって活性化し、SR から細胞質へ  $\text{Ca}^{2+}$ を供給する ( $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 (CICR)機構)[10, 39, 61]。一方で  $\text{IP}_3\text{R}$  は、G タンパク質共役型受容体 (GPCR)の活性化により産生されたイノシトール 3 リン酸によって活性化し、SR 内からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出を起こす ( $\text{IP}_3$  誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 (IICR)機構)[27, 39]。

### 3. リアノジン受容体

RyR は SR 膜上で 4 量体を組むことでチャンネル孔を形成するイオンチャンネルである。哺乳類では骨格筋型の 1 型 (RyR1)、心臓型の 2 型 (RyR2)、脳型の 3 型 (RyR3) の 3 つのサブタイプが同定されている[43, 51]。各サブタイプ間の相動性は 65%程度になる。平滑筋においては、3 つのサブタイプすべての発現が報告されているが、その発現は組織や種によりさまざまである[96]。

骨格筋において、RyR1 はジヒドロピリジン受容体 (DHPR) と物理的にカップリングし、筋収縮に重要な役割を担っている[88]。運動神経の興奮による活動電位の伝搬は、横行小管上の電位センサーである DHPR の構造を変化させる。これにより物理的にカップリングしている RyR1 が開口して、SR から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されることで筋収縮が起こる[4, 74]。RyR1 遺伝子欠損マウスでは、横隔膜筋の機能不全による呼吸不全が生じ、新生致死の表現型を示す[85]。

RyR2 は平滑筋[35]や心筋[24]での CICR に必須であり、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングの増幅機構として中心的な役割を担う。RyR2 遺伝子欠損マウスでは、未発達の SR に過剰に  $\text{Ca}^{2+}$  が蓄積することで小胞体やミトコンドリアの機能不全が生じ、胎生 10 日頃に心拍動が停止することで胎生致死を示すことが報告されている[87]。

RyR3 は脳だけでなく、平滑筋や骨格筋、免疫細胞など多くの組織に発現している[33]。しかし、その発現量は低く、他のサブタイプの RyR と比較して  $\text{Ca}^{2+}$  感受性は低いことが報告されている[89]。そのため、筋細胞においては細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入ではなく、RyR2 から CICR によって遊離された  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化されて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増幅に関与すると考えられている。また、新生児の骨格筋では横行小管が発達していないため、RyR3 が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の伝播を強めていることが報告されている[99]。RyR3 遺伝子欠損マウス (RyR3<sup>-/-</sup>) は致死には至らないが、自発的運動量の異常 [86] や記憶学習の異常[3, 30, 41]を生じる。また、脳の RyR3 遺伝子発現を抑制させることにより、うつ症状が改善することが報告されている[31]。免疫系細胞においても RyR3 が発現しており、Jurkat T-cell では RyR3 遺伝子を発現抑制することで、自発的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇 ( $\text{Ca}^{2+}$  oscillation) が減少することが報告されている[42]。十二指腸平滑筋細胞においても、RyR3 発現をノックダウンすることで  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation が消失することが報告されており[19]、RyR3 が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の制御に関与すると考えられている。

### 4. 平滑筋組織におけるリアノジン受容体の役割

膀胱や精管などの興奮性の高い平滑筋において、活動電位や神経伝達物質、機械刺激などにより膜電位が脱分極し、VDCC が活性化されて細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する。これにより VDCC 直下の SR 膜上に局在する RyR が刺激され、局所的な  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇 ( $\text{Ca}^{2+}$  hotspot) が引き起こされる。この  $\text{Ca}^{2+}$  hotspot を起点として更なる CICR が誘発されて

細胞全体の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇して筋収縮が起こる。この際、細胞膜上の大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{K}^+$  (BK)チャネルが活性化され、過分極を引き起こすことで活動電位の再分極相の形成と同時に VDCC に対して負帰還機構として働く [35, 36, 59, 64] (図 2A)。また、RyR は静止時の膜電位および筋張力の維持にも寄与する。静止時には、RyR からの一過性の局所的な  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 ( $\text{Ca}^{2+}$  spark)が発生し [13, 61]、近傍の細胞膜上に局在する BK チャネルを活性化させる。これにより自発一過性外向き電流 (STOC) が発生し [71, 103]、静止膜電位を過分極方向へと導くことで VDCC の活性を抑制し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑えることで、筋張力を安定化させている [9, 36, 64] (図 2B)。このように、RyR と BK チャネルの機能的共役は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に対する負帰還機構として平滑筋張力の制御に重要な役割を担っている [36]。

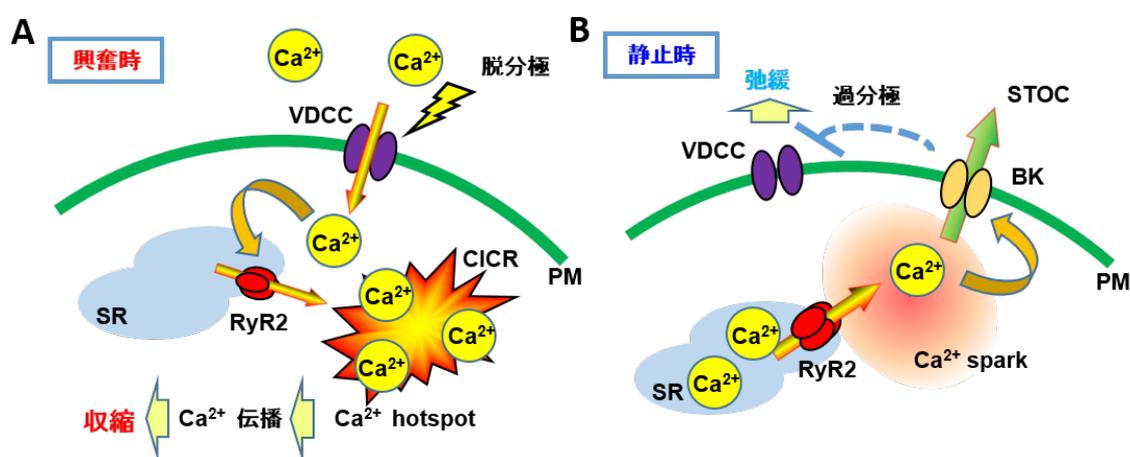


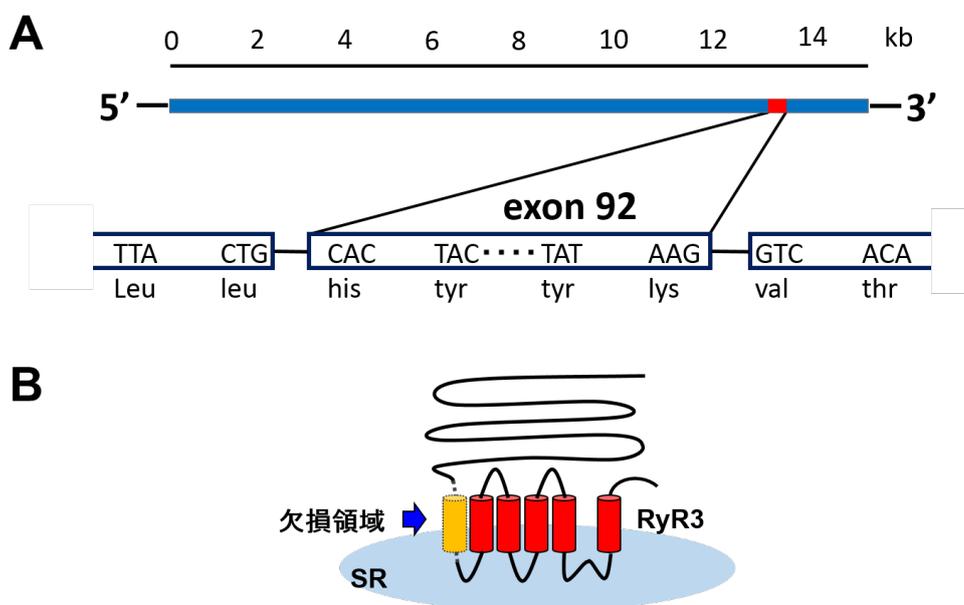
図 2 平滑筋組織における RyR2 の機能

A: 脱分極により細胞膜上の VDCC が活性化して細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$ が流入する。この  $\text{Ca}^{2+}$ が SR 膜上の RyR2 を活性化し、SR からの局所的な  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 ( $\text{Ca}^{2+}$  hotspot)を起こす。その後、更なる CICR が引き起こされて細胞全体の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、筋が収縮する。B: 静止時には RyR からの自発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 ( $\text{Ca}^{2+}$  spark)により、細胞膜上の BK チャネルが活性化され、膜が過分極して VDCC 活性を低下させることで、平滑筋が弛緩方向へ導かれる。

## 5. RyR3 とスプライズバリエーション

RyR3 には複数のスプライズバリエーションの存在が報告されている [38]。この中でも、エキソン 92 の膜貫通部位を含む 87 塩基が欠如した short-length 体の (図 3A,B)、ホモ 4 四量体は  $\text{Ca}^{2+}$ 放出機能を持たず、野生型 RyR3 (full-length RyR3: FL-RyR3)や RyR2 とヘテロ 4 量体を組むことでこれらの活性を抑制的に制御するドミナントネガティブ型スプライズバリエーション (DN-RyR3)として働くことが報告されている [19, 20, 38]。また、DN-RyR3 は平滑筋に特に多く発現している。DN-RyR3 は DN-RyR3 アルツハイマー病やパーキンソン病では、RyR からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出が病態形成に関与していることが報告されている [7, 28, 70]。アルツハイマー病モデル動物での RyR3 の発現増加 [82]やアミロイド  $\beta$  タンパク質による RyR3 の発現増加や機能亢進 [81]、RyR3 からの  $\text{Ca}^{2+}$ 放出が関連した神経細胞死 [15]が報告されており、RyR3 が脳神経系疾患に関わる

ことが示唆されている。興味深いことに、健常なヒトの脳組織には、マウスでは確認されていない DN-RyR3 の発現が確認されており、アルツハイマー病患者由来の脳組織では、DN-RyR3 の相対的発現量が減少することで RyR3 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出能の亢進を引き起こすと考えられている[11]。



**図 3 DN-RyR3 の構造**

DN-RyR3 のホモ 4 量体は  $\text{Ca}^{2+}$  放出能を欠失している。DN-RyR3 は FL-RyR3 や RyR2 とヘテロ 4 量体を形成して、機能を低下させる。A : DN-RyR3 は膜貫通領域の exon 92 を 87 塩基欠損している。B : DN-RyR3 の構造模式図を示した。膜貫通部位 S1 領域を欠損している。

## 6. 妊娠に伴う子宮平滑筋の変化

子宮平滑筋は妊娠の維持や、陣痛・分娩などにおいて重要な役割を担う。子宮平滑筋は自発能を有する興奮性の高い平滑筋であり、一定リズムで収縮と弛緩を繰り返している[97]。また、妊娠期には細胞自体が大きく肥大化して収縮力が増大することから、多くの細胞内小器官やタンパク質発現が変化すると推測される。分娩開始の機序として、以下に示す通りいくつかの説がある。

- 1) プロゲステロン消退説：ラットやマウスでは、プロゲステロンが膜過分極や  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性の阻害により筋収縮を抑えている。妊娠末期にプロゲステロンが消退すると筋収縮の抑制が解除されて分娩が引き起こされると考えられている。プロゲステロン受容体 (PR) には 2 つのサブタイプ (PR-A, PR-B) があり、分娩時には抑制性のサブタイプである PR-A の発現比率が増加することで相対的にプロゲステロンの作用が減少すると考えられている[47]。
- 2) オキシトシン説：オキシトシンは分娩促進薬として用いられている。妊娠後期にはオキシトシンの血中濃度が増加や、血中オキシトシン濃度のパルス状変化の頻度が増大するといった報告[29]があり、分娩を引き起こしているとされている。また、胎盤や脱

落膜からもオキシトシンが産生されることから、局所での濃度変化も重要であると考えられている[104]。一方で、妊娠後期にオキシトシンの血中濃度が変化しないという報告や[44, 66, 73]、オキシトシンを遺伝子操作により欠損させたマウスでも分娩・出産が可能なことが報告されており[62]、意見が分かれている。

3) プロスタグランジン (PG)説：胎盤、絨毛膜、脱落膜などで PG は産生され、分娩時に PG 濃度が増加することが報告されている[54]。経膈分娩症例の羊膜では帝王切開症例の羊膜に比べ PG 量が多いとされており、分娩の促進に関わると想定されている[12]。また、早産の原因としても関わると考えられており、細菌など何らかの感染により炎症が起きることで PG が産生され、早期に分娩が開始されることが原因の 1 つと考えられている。

4) イオンチャネル発現変化説：子宮平滑筋細胞は妊娠に伴い体積を増加させ、細胞内小器官や、イオンチャネル発現が大きく変化することが報告されている[93]。特に、収縮に関係する  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルや、静止膜電位の安定化に関与する  $\text{K}^{+}$ チャネル等の発現が変化し、分娩が開始される可能性が示唆されている。例えば、小コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{K}^{+}$ (SK)チャネルのうち 3 型 (SK3)は、マウス子宮平滑筋において妊娠後期から末期に発現が減少して膜電位を脱分極させて、筋収縮を増強させる。一方、SK3 を過剰発現させると分娩遅延が引き起こされる[72]。このようにイオンチャネルの発現変動による膜電位の変化が子宮平滑筋の収縮力を制御すると考えられている。

子宮平滑筋に発現する RyR の主要なサブタイプは 3 型であり、非妊娠子宮 (NP) において  $\text{Ca}^{2+}$ 過剰負荷時に  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離チャネルとして機能することが報告されている[53]。また、妊娠時に FL-RyR3 の発現が増大し、収縮力を高め、分娩を促進しているという報告もある[18]。一方で、RyR の活性化薬である Caffeine により、子宮平滑筋は収縮せずむしろ弛緩するという報告もされており[76]、子宮平滑筋における RyR3 の生理的意義については不明な点が多い。

## 7. $\text{Ca}^{2+}$ による血管平滑筋の張力制御

血管平滑筋は伸展刺激や神経終末・血管内皮細胞・血漿中からの様々な生理活性物質により制御を受けている。興奮性の低い弾性動脈である胸部大動脈平滑筋の筋収縮は、主に GPCR 刺激による IICR 機構によって引き起こされる。一方で、興奮性の高い抵抗血管 (例えば、腸間膜動脈など)では、VDCC 発現量が高くなるため膜電位変化が筋収縮性の制御に重要となる[92]。先述した  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC 経路 (図 2B)は、血管平滑筋の膜電位形成に重要であり、VDCC 活性を制御することで筋張力の維持に関与する。実際に、BK チャネル阻害薬である Paxilline や RyR 阻害薬である Ryanodine 存在下では血管が収縮する[61]。

BK チャネルが生理的な膜電位の範囲内で活性化するには、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が数 $\mu\text{M}$ まで上昇する必要がある。血管平滑筋では  $\text{Ca}^{2+}$ マイクロドメインと呼ばれる  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルと

その効果器が局所に集約し  $\text{Ca}^{2+}$ 動態が密接に制御された領域が細胞内に形成されており [2, 69]、その中で BK チャネルは RyR (loose-coupling)[16]や VDCC (tight-coupling)[83]と複合体を形成して効率的に活性化される。これらの複合体の形成により、膜脱分極後の再分極相の形成や、筋静止時の  $\text{Ca}^{2+}$  spark と連携した STOC 発生が可能となる。

大動脈平滑筋では DN-RyR3 が発現していること[38]や、自然発症型高血圧ラットの血管平滑筋において Caffeine 誘発性の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が亢進していること[60]、モノクロタリン誘発性肺高血圧モデルラットの肺動脈平滑筋で RyR3 発現が上昇すること[98]などから、RyR3 が正常時および病態時の血管平滑筋の筋張力制御に関わっている可能性がある。血管平滑筋における RyR3 の機能を解明することは、血管張力調節機構の理解や新たな治療ターゲットの発見につながると期待される。

## 8. 本研究について

RyR3 は平滑筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御機構として筋張力の制御を担う重要なイオンチャンネルである。しかしながら、多くの組織において生理的意義は明らかとなっていない。本研究では、RyR3 による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御機構を明らかにすることを目的とし以下の2点の研究を行った。

- ① RyR3 による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度制御機構が重要であると考えられている子宮平滑筋における生理的意義の解明を目的とし、非妊娠・妊娠マウス及び RyR3 遺伝子ホモ欠損マウスを用いて実験を行った。(3-1 子宮平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明)
- ② 腸間膜動脈平滑筋における RyR3 による筋張力制御機構を解明するために RyR3 遺伝子ホモ欠損マウスを用いて実験を行った。(3-2 腸間膜動脈平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明)

## 第 2 章 実験方法

### 1. 実験動物

C57BL/6 由来 RyR3 遺伝子欠損マウス (RyR3<sup>-/-</sup>)は京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野 竹島浩教授らが作製したものを用いた[86]。対照動物として日本 SLC から購入した野生型 C57BL/6 マウス (RyR3<sup>+/+</sup>)を用いた。子宮平滑筋を使用した実験では、8~20 週齢の雌マウスを使用し、8~26 週齢の雄マウスと交配することで妊娠マウスを作製した。妊娠子宮平滑筋は 18 日目の初産マウスから摘出した。血管平滑筋を用いた実験では 8~12 週齢の雄マウスを使用した。すべての実験は名古屋市立大学倫理委員会による承認を受けており、実験動物に関する日本薬理学会指針に従った。

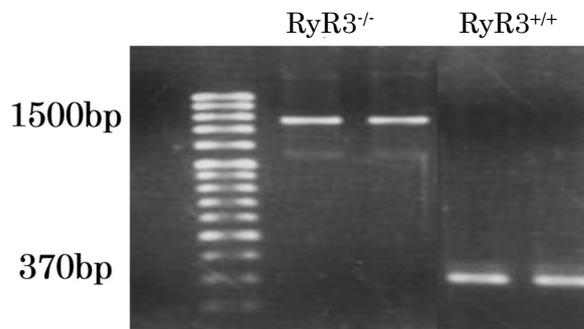


図 4 RyR3<sup>-/-</sup>の遺伝子型判別

マウスからゲノム DNA を抽出して遺伝子型の判別を行った。RyR3<sup>-/-</sup>は約 1500bp に、RyR3<sup>+/+</sup>は約 370bp にバンドが出るようにプライマーを設定した。

### 2. RNA 抽出及び RT-PCR 法

頸椎脱臼により屠殺したマウスを開腹し、組織を摘出した。Acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (AGPC 法)[14]により total RNA を抽出し、OD260 から RNA 濃度を計算した。RNA 10.5  $\mu$ g から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて cDNA を合成した[65]。得られた cDNA に対して、目的の遺伝子を特異的に検出するように設計したプライマーを用いて PCR を 35 cycle 行い、電気泳動後にエチジウムブロマイドで染色してバンドの確認をした。

### 3. リアルタイム PCR 法

上述の方法で cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を行った。リアルタイム PCR 法は LightCycler 96 System (Roche, Basel, Switzerland)を用いた。SYBR Green 法 (SYBR Premix Ex taq; TaKaRa, Shiga, Japan)により、標的遺伝子の mRNA 発現量を内在性標準物質 (GAPDH)の mRNA 発現量に対する比として表した。使用したプライマー配列は以下に示す通りである。

total RyR3 (NM\_177652.2)

(forward: AACCTGAGTTCACGACAAGCTACA)

(reverse: CTTCGTGCACAAAAGCCAAGT)  
FL-RyR3 (NM\_177652.2)  
(forward: CCTGAGGTTCCCTTGCTCTGTTT)  
(reverse: CATCCTCTGTCTCTTCCTCTAAAGGT)  
DN-RyR3 (NM\_177652.2)  
(forward: TGAGAAGCCAGAAGCCTTTATG)  
(reverse: GGTTCCTCAGTGACCAATAACTTG)  
RyR1 (NM\_009109.2)  
(forward: ATTACAGAGCAGCCCGAGGAT)  
(reverse: AGAACCTTCCGCTTGACAAACT)  
RyR2 (NM\_023868.2)  
(forward: CCATTCAAGTGCGGAAGCA)  
(reverse: CATGAAGGAAGCCCACAACA)  
GAPDH (NM\_001289726.1)  
(forward: CATGGCCTTCCGTGTTCT)  
(reverse: CCTGCTTCACCACCTTCTTGA)  
BK (NM\_001253358.1)  
(forward: GCATTGGTGCCCTCGTAATATAC)  
(reverse: CGTTGAAAGCCATGTTCGATCT)  
VDCC (NM\_009781.4)  
(forward: ACCTGGAACGAGTGGAGTATCTCTT)  
(reverse: TCCAACCATTGCGGAGGTAA)  
SERCA2 (NM\_001110140.3)  
(forward: AGTTCATCCGCTACCTCATCTCA)  
(reverse: CACCAGATTGACCCAGAGTAACTG)  
IP<sub>3</sub>R1 (NM\_010585.5)  
(forward: GGACCGGACAATGGAACAGAT)  
(reverse: CATCCCGCTCTGTGGTGTAAAT)  
NCX (NM\_011406.3)  
(forward: CAGCTTCAAGAACATCCGTACTAG)  
(reverse: CTAGGACGAGCTGCAAGATGAC)

#### 4. ウェスタンブロッティング法

抽出した組織を、プロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)を加えたホモジェナイズバッファー中で破碎した。遠心により核分画を除去したタンパク質溶液を取得した。タンパク質濃度はタンパク質定量キット (Bio-Rad, Hercules, USA)により測定した。タンパク

質試料 (30~50  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )を 7.5% SDS-PAGE により分画化し、PVDF 膜 (GE Healthcare, Tokyo, Japan)に転写した。PVDF 膜は PBS/0.1% Tween20 (Tween-PBS)に 2% アルブミンを加えた溶液で 4°C、1晩ブロッキングした後、それぞれ特異的な一次抗体を加えた Tween-PBS に浸して 24 時間インキュベートした (4°C)。それぞれの PVDF 膜に対して Tween-PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、各一次抗体に対応した二次抗体で 1 時間インキュベートした (4°C)。その後、さらに Tween-PBS で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、ECL 検出システム (GE Healthcare)、Image Reader (Las3000; FUJIFILM, Tokyo, Japan)を用いて可視化した。

一次抗体は次のような希釈倍率で使用した。

抗 RyR 抗体 (GeneTex inc., CA, USA); 1:500

抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma-Aldrich); 1:4000

二次抗体として下記のものを用いた。

抗マウス IgG-HRP 標識抗体 (Chemicon International Inc., Temecula, USA); 1:5000

## 5. 収縮力測定

頸椎脱臼により屠殺したマウスを開腹し、子宮を取り出した。Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>除去 Krebs 溶液中に浸し、子宮角中央部を取り出した。子宮角に沿って縦に開き、内膜の除去を行った。そして、長さ 1 cm 程度、幅 1 mm 程度の組織標本を作製した。組織標本の一端を Krebs 溶液で満たした容量約 5 ml のバス内に固定した。もう一端を本研究室で作製したトランスデューサー [37]に接続して、300 mg の張力をかけて固定した。その後、張力が安定化するまで 30 分以上静置し、張力が安定してから測定を開始した。トランスデューサーにより測定した収縮力変化は増幅器を介して、ペンレコーダー (FBR-2510; 東亜電波工業, Tokyo, Japan) に記録した。バス内の灌流液の温度は 36 $\pm$ 1°C に調整した。薬物はすべてバス内液に滴下して投与した。また、自発収縮の測定は、薬品投与前後における収縮力の大きさを計測し、その平均を示した。

## 6. 単離平滑筋細胞の調整

### (1) 子宮平滑筋細胞

内膜を除去した子宮角中央部を 4°C の Ca<sup>2+</sup>除去 PSS 溶液中で 10 分間冷却し、続いて 0.1% Papain (Sigma-Aldrich)、0.1% dithiothreitol (DTT)(Wako, Tokyo, Japan) を含んだ 4°C の Ca<sup>2+</sup>除去 PSS 溶液で 30 分間酵素処理した。その後、0.1% Collagenase (Wako)を含んだ 37°C の 100  $\mu\text{M}$  Ca<sup>2+</sup> PSS 溶液で 25 分間酵素処理した。酵素を含まない Ca<sup>2+</sup>除去 PSS 溶液で数回洗浄し、先を丸めたガラス管で数回ピペッティングして細胞懸濁液を得た。得られた細胞は単離後 2 時間以内に使用した。

## (2) 膀胱平滑筋細胞

マウスより取り出した膀胱を  $\text{Ca}^{2+}$ 除去 PSS 溶液中に浸し、脂肪等の余分な組織を切除した後、切り開いて内膜を除去した。これを  $37^{\circ}\text{C}$ で 10 分間保温したのち、0.1% Papain (Sigma-Aldrich)、0.1% DTT (Wako)、0.1% BSA (Sigma-Aldrich)を含んだ  $37^{\circ}\text{C}$ の  $\text{Ca}^{2+}$ 除去 PSS 溶液で 20 分間酵素処理した。その後、0.2% Collagenase (Wako)、0.1% BSA (Sigma-Aldrich)を含んだ  $37^{\circ}\text{C}$ の  $100\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$  PSS 溶液で 10~15 分間酵素処理した。酵素を含まない  $\text{Ca}^{2+}$ 除去 0.1% BSA (Sigma-Aldrich)入り PSS 溶液で数回洗浄し、先を丸めたガラス管で数回ピペッティングして細胞懸濁液を得た。得られた細胞は単離後 2 時間以内に使用した。

## (3) 腸間膜動脈平滑筋細胞

マウスより取り出した腸間膜動脈を  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 除去 Hanks'溶液中に浸し、脂肪等の余分な組織を切除した。これを  $37^{\circ}\text{C}$ の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 除去 Hanks'溶液中で 10 分間保温した後、0.1% Papain (Sigma-Aldrich)、0.4% Collagenase (Wako)を含んだ  $37^{\circ}\text{C}$ の  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 除去 Hanks'溶液で 45 分間酵素処理した。その後、酵素を含まない  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 除去 Hanks'溶液で数回洗浄し、先を丸めたガラス管で数回ピペッティングして細胞懸濁液を得た。得られた細胞は単離後 2 時間以内に使用した。

## 7. 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )測定

### (1) Caffeine 感受性の測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  の測定には高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム (ARGUS/HiSCA) (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示薬 fura-2 AM の蛍光変化を観察した。測定用のバス中の細胞懸濁液に対して、fura-2 AM を最終濃度が  $10\ \mu\text{M}$  になるように加え、30 分間色素を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 緩衝溶液により色素を洗浄した後、測定を行った。実験は  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$ で行った。細胞内の fura-2 AM を  $340\ \text{nm}$  及び  $380\ \text{nm}$  の光で励起させ、各々の  $510\ \text{nm}$  の蛍光をカメラで 2.27 s 毎に取得し、蛍光強度比 ( $F_{340}/F_{380}$ )を算出して  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を解析を行った。

### (2) CICR 機構の測定

高速走査型共焦点レーザー顕微鏡 (A1R/Ti-E; Nikon, Tokyo, Japan)を用いて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を行った。 $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光指示薬として  $100\ \mu\text{M}\ \text{fluo-4}$  を使用した。 $\text{fluo-4}$  を含む記録電極内液を用いて平滑筋細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞内に  $\text{fluo-4}$  を導入した。60 倍の油浸対物レンズ (Plan Apo  $60\times 1.40$  oil immersion; Nikon) を通してアルゴンレーザー ( $488\ \text{nm}$ )により励起した。光電子倍增管を用いて  $515\ \text{nm}$  以上の蛍光を取得した後、NIS Element ソフト (AR 3.2; Nikon)上で蛍光画像を再構築して表示した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は刺激前の蛍光強度を  $F_0$  とし、刺激時の蛍光強度との比 ( $F/F_0$ ) で示した。本実験系ではバンドスキャンモードを用いて  $1/4$  の画面を  $120\ \text{frames/s}$  ( $512$

pixels×128 pixels, 0.13 μm/pixel)で走査した。焦点面は細胞の面積が1番広く見る面で記録した。解析はNIS Elementで行い、蛍光画像は擬似カラー表示した。

### (3) Ca<sup>2+</sup> spark の測定

全反射蛍光 (TIRF)顕微鏡 (TE200-U; Nikon)を用いて[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定を行った。Ca<sup>2+</sup> 蛍光指示薬として fluo-4 AM を使用した。測定用のバス上で細胞懸濁液に最終濃度が 10 μM になるように fluo-4 AM を加え、10 分間細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 緩衝溶液で洗浄した後、測定を行った。実験はすべて室温 (23±1°C) で行った。測定では、倒立型顕微鏡 (ECLIPSE TE2000-U; Nikon)と油浸対物レンズ (CFI Apo TIRF 60×/1.45, oil immersion; Nikon)、EM-CCD カメラ (C9100-12; Hamamatsu Photonics)を用いて、488 nm のアルゴンレーザーで励起させた fluo-4 の蛍光を B-2A フィルター (DM505, BA520; Nikon)を介して取得した。子宮および膀胱平滑筋細胞の実験では、蛍光画像を 27 ms 毎に取得した。得られた蛍光画像を AQUACOSMOS software (version 2.6; Hamamatsu Photonics)上で再構築して表示した。腸間膜動脈の実験では 30 ms 毎に画像を取得し、NIS-Elements (AR 4.5; Nikon)上で再構築して表示した。蛍光強度変化を直径約 2 μm の範囲で平均値を測定し、Ca<sup>2+</sup> spark が起きていない状態を F<sub>0</sub>として規格化した。

## 8. 膜電流測定

平滑筋単離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[34]。記録電極には外径 1.04 ~ 1.06 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, Tokyo Japan)又はマイクロピペットプラー (P-1000; Sutter Instrument, Novato, 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 μm、細胞内液充填時の電極抵抗が 2~5 MΩ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単離細胞懸濁液を用意し、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動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。

測定した電流は微小電流用増幅器 (EPC-7; HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany 及び CEZ-2400; 日本光電, Aichi, Japan)を用いて増幅し、A-D 変換器 (Digidata 1440A; Molecular Devices, San Jose, USA)、Clampex ソフトウェア (Ver 10.2; Molecular Devices)を用いてコンピュータ上に記録した。データの解析は Clampfit ソフトウェア (Ver 10.2; Molecular Devices)及び Origin (Ver 6.0J; Microcal Software, Northampton, USA)を用いて行った。使用した細胞内液、細胞外液は「11. 溶液組成」に記述した。

## 9. 非観血的血圧測定

マウスを布製のホルダーで固定し、尻尾を非観血式血圧測定器 (Softron BP-98A)の測定部位に挿入し、保温された (37±1°C)槽内に静置した。本実験では、マウスが静止し、脈拍が安定するのを待ってから測定を3回行い、平均値を取得した。

## 10. 腸間膜動脈床を用いた灌流圧測定

頸椎脱臼により屠殺したマウスを開腹し、直腸付随の血管と盲腸へと向かう血管を結紮した。そして、腸間膜を切断しながら腸間膜動脈を腸管から引き離し、腹部大動脈の一部とともに切り取り、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>除去 Krebs' 溶液に浸した。腹部大動脈部位の周辺組織を取り払い、腸間膜動脈第一分枝結合部分とは反対側から腹部大動脈を切り開き、そこから腸間膜動脈第一分枝にカニューレとして注射針 (23G・TERUMO, Tokyo, Japan) を挿入し、結紮した。そして、圧トランスデューサーへと接続し、Krebs' 溶液を流すことにより灌流圧を測定した。神経遮断には以下の薬物を使用した (μM): 1 atropine, 1 phentolamine, 1 propranolol, 10 suramin。圧トランスデューサー (MP5100 (TW); Edwards Lifescience, CA, USA) を介した昇圧反応はペンレコーダー (FBR-2510; 東亜電波工業) に記録した。灌流液の温度は 36±1°C に調整して行った。

## 11. 溶液組成

- 細胞単離用

Ca<sup>2+</sup>除去 PSS 溶液: 60 mM NaCl, 6 mM KCl, 85 mM Na<sup>+</sup> glutamate, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES (pH 7.3 with NaOH) [32]

Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>除去 Hanks' 溶液: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.17 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub> and 5.6 mM glucose

- 収縮力、灌流圧測定用

Krebs 溶液: 112 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 14 mM glucose (pH 7.4 with 95% O<sub>2</sub> & 5% CO<sub>2</sub>)

- 膜電流測定、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定用の細胞外液

HEPES 緩衝溶液: 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH)

- STOC 測定用の細胞内液

140 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.05 mM EGTA (pH 7.2 with KOH)

- Ca<sup>2+</sup>チャネル電流測定用

細胞外液: 92 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 30 mM BaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH),

細胞内液: 120 mM CsCl, 20 mM tetraethylammonium Cl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 30 mM BAPTA, 2 mM Na<sub>2</sub>ATP (pH 7.2 with CsOH)

・ BK チャネル電流測定用

細胞外液 : 137 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM glucose, 10 mM HEPES, 0.1 mM CdCl<sub>2</sub> (pH 7.4 with NaOH)

細胞内液 : 140 mM KCl, 2.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 2 mM Na<sub>2</sub>ATP, 5 mM EGTA (pH 7.2 with KOH) pCa 6.0

・ 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度・膜電流同時測定用の細胞内液

140 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM Na<sub>2</sub>ATP, 0.1 mM fluo-4 (pH 7.2 with KOH)

## 12. 使用薬物

試薬の購入・入手先一覧を示した。

Caffeine, Ryanodine, Cadmium chloride (Wako)

Tetracaine, Atropine, Phentolamine, Propranolol, Suramin, Nifedipine (Sigma-Aldrich)

EGTA, HEPES, BAPTA (同仁化学研究所, Kumamoto, Japan)

Oxytocin (PEPTIDE INSTITUTE, Osaka, Japan)

Paxilline (Tocris Bioscience, Bristol, UK)

BayK8644 (Funakoshi, Tokyo, Japan)

## 13. 統計処理

実験結果はすべて平均値±標準誤差として表記した。二群の平均値の差を検定するときには F 検定後に Student 及び Welch の t 検定を用いた。多群比較には ANOVA 後 Tukey 検定を用いた。\*は 5%、\*\*は 1%で有意差があることを示す。また、n.s.は有意差がないことを示す。用量・作用曲線の作成には、収縮力の最大値及び蛍光強度の最大値 (F<sub>max</sub>)を 1 として規格化し、それぞれを Hill の式;  $y=1/[1+(D/[EC_{50}])^n]$ または  $y=1/(1+[D/[IC_{50}])^n]$ でフィッティングを行った。D は薬物濃度。EC<sub>50</sub> は半数効果濃度。IC<sub>50</sub> は半数阻害濃度。n は Hill 係数。

## 第3章 結果及び考察

### 3-1 子宮平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明

#### 3-1-1. マウス子宮平滑筋細胞における自発収縮及び自発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する RyR の寄与

マウス非妊娠子宮平滑筋(NP)と妊娠子宮平滑筋 (P)におけるリアノジン受容体 (RyR)の機能を調べるため、自発収縮をしている子宮筋条片に対し、RyR 阻害薬である 50  $\mu$ M Ryanodine の作用を検討した。図 5A には薬物の投与前後での自発収縮を示した。一定の自発収縮を起こしている子宮条片に対し Ryanodine を 10 分間作用させた。また、Ryanodine は最終濃度が 5 mM となる Dimethyl Sulfoxide (DMSO) に溶解したため、5 mM の DMSO 投与時を対照として比較した。収縮力の大きさ・頻度について解析した結果を図 5B, C に示した。Ryanodine と DMSO を投与する直前 10 分間の状態を 1 として計測した。その結果、NP・P の両群において自発収縮の大きさに有意な差は見られなかった (NP: DMSO  $0.93\pm 0.05$ ,  $n=4$ ; Ryanodine  $0.97\pm 0.04$ ,  $n=4$ ; P : DMSO  $1.29\pm 0.27$ ,  $n=4$ ; Ryanodine  $1.28\pm 0.07$ ,  $n=4$ ; n.s.:  $p>0.05$ , 図 5B)。また収縮頻度についても解析を行ったところ有意な差は見られなかった (NP: DMSO  $0.87\pm 0.05$ ; Ryan  $1.00\pm 0.06$ ; P: DMSO  $1.14\pm 0.10$ ; Ryanodine  $1.05\pm 0.09$ ; n.s.:  $p>0.05$ , 図 5C)。

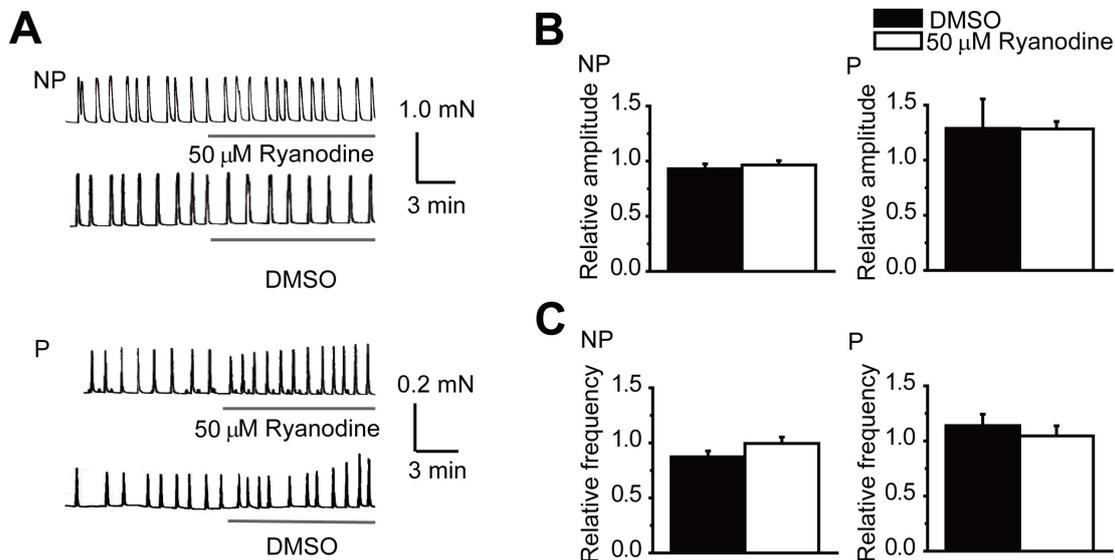
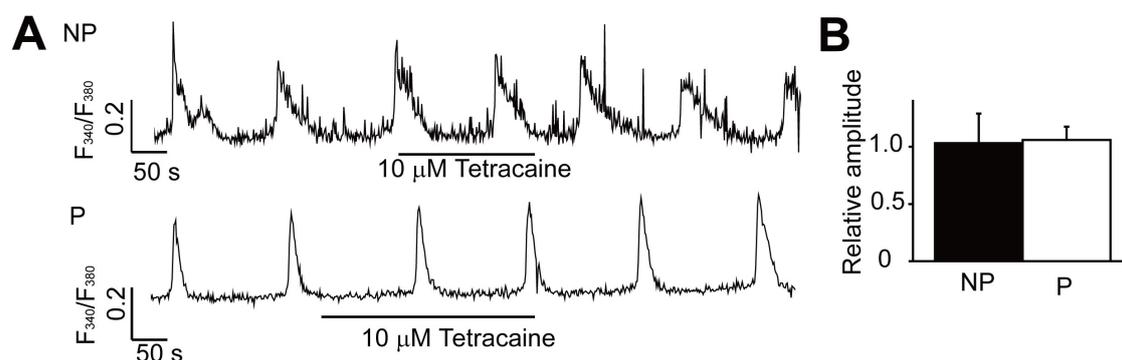


図5 マウス子宮平滑筋自発収縮に対する RyR の寄与

自発収縮を行っている子宮平滑筋条片に対し RyR 遮断薬である 50  $\mu$ M Ryanodine を投与し、RyR の寄与を検討した。

A : 自発収縮を行っている子宮平滑筋条片に対し Ryanodine とコントロールとして溶媒である DMSO を投与した際の原図を示した。上段には NP、下段には P を示した。B : 薬物投与前を 1 として投与後の自発収縮の大きさを DMSO 投与群と Ryanodine 投与群で比較した。C : 薬物投与前を 1 として投与後の自発収縮の頻度を DMSO 投与群と Ryanodine 投与群で比較した。

図 6A では単離した子宮平滑筋細胞に対して fura-2 AM を取り込ませ、自発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇( $Ca^{2+}$  oscillation)を測定した。これらの細胞に対し RyR 阻害薬である  $10 \mu M$  Tetracaine を作用させ、その反応性を調べた。薬物を投与する直前の状態を 1 として計測した。その結果、NP と P において Tetracaine による薬理作用は見られなかった (NP:  $1.03 \pm 0.26$ ,  $n=3$ ; P:  $1.06 \pm 0.12$ ,  $n=3$ , 図 6B)。以上より、自発収縮および  $Ca^{2+}$  oscillation は RyR の阻害薬によっては抑制されなかったことから、RyR はこれらの現象に寄与が極めて少ないことが示された。



**図 6 マウス子宮平滑筋細胞における自発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する RyR の寄与**

$Ca^{2+}$  oscillation を行っている子宮平滑筋細胞に対し RyR 遮断薬である  $10 \mu M$  Tetracaine を投与し、RyR の寄与を検討した。

A: 自発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を行っている子宮平滑筋細胞に対し Tetracaine を投与した際の原因を示した。上段には NP、下段には P を示した。B: 薬物投与前を 1 として投与後の自発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の大きさを NP、P 両群で比較した。

### 3-1-2. マウス子宮平滑筋における Caffeine 感受性の測定

マウス子宮平滑筋細胞に発現する RyR の Caffeine 感受性について検討した。比較対象として膀胱平滑筋 (Uri) を用いた。Uri は、Caffeine の投与により図 7A のような  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察されたが、子宮平滑筋細胞ではほとんど  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察されなかった。10 mM Caffeine により  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が観察された細胞の割合 (図 7B) を測定した。ここでは、Caffeine 投与後に 140 mM  $K^+$  HEPES 緩衝溶液に反応を示した細胞のみを解析対象とした。その結果、Uri では、90%の細胞が反応を示したのに対し、NP では3%の細胞でのみ反応を示した。P では全ての細胞で反応を示さなかった。以上より、マウス子宮平滑筋に発現する RyR には Caffeine 感受性が極めて低いことが示された。

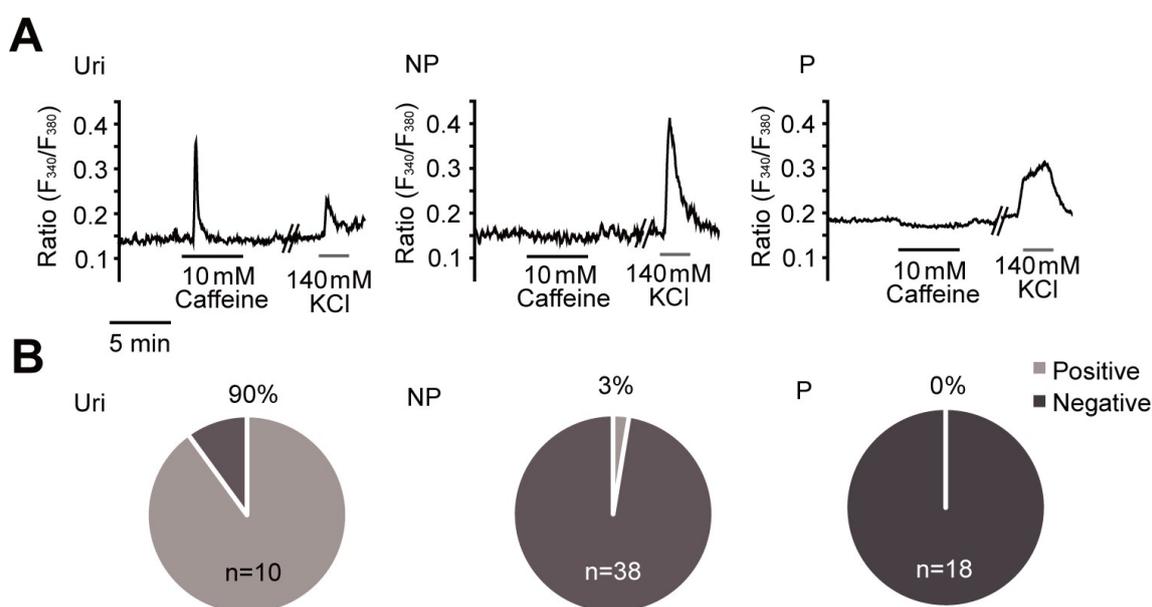


図 7 マウス子宮平滑筋細胞における Caffeine の感受性

子宮平滑筋細胞に対し RyR 活性化である 10 mM Caffeine を投与し、反応した細胞数を算出して Caffeine 感受性について検討した。140 mM  $K^+$  HEPES 溶液を測定後に反応させることで反応性を有する細胞を選択した。左から膀胱平滑筋 (Uri)、非妊娠子宮平滑筋細胞 (NP)、妊娠子宮平滑筋細胞 (P) を示した。

A : Caffeine による  $[Ca^{2+}]_i$  変化の原図を示した。140 mM  $K^+$  HEPES 溶液により脱分極させ、反応した細胞を解析対象とした。B : Caffeine で反応した細胞の割合を示した。

### 3-1-3. マウス子宮平滑筋の自発収縮における VDCC の寄与

妊娠による、主要な  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路である電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (VDCC) 機能の変化について検討するために、自発収縮をしている子宮筋条片に対し VDCC 遮断薬である Nifedipine を投与した。1 nM から 100 nM まで Nifedipine を累積投与し、自発収縮に対する作用を検討した (図 8A)。薬物投与前の収縮力の大きさを 1 として薬物の作用を規格化した。得られた結果から用量-作用曲線を作成して  $\text{IC}_{50}$  の値を算出し、NP と P で Nifedipine の感受性を比較した。その結果、NP と P の両群において自発性収縮は Nifedipine の濃度依存的に抑制された。しかし、Nifedipine 感受性について両群に有意な差は見られなかった ( $\text{IC}_{50}$ : NP  $20.0 \pm 2.8$  nM,  $n=3$ ; P  $25.0 \pm 9.8$  nM,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; Hill 係数: NP  $1.20 \pm 0.36$ ; P  $1.34 \pm 0.35$ ; n.s.:  $p > 0.05$ , 図 8B)。

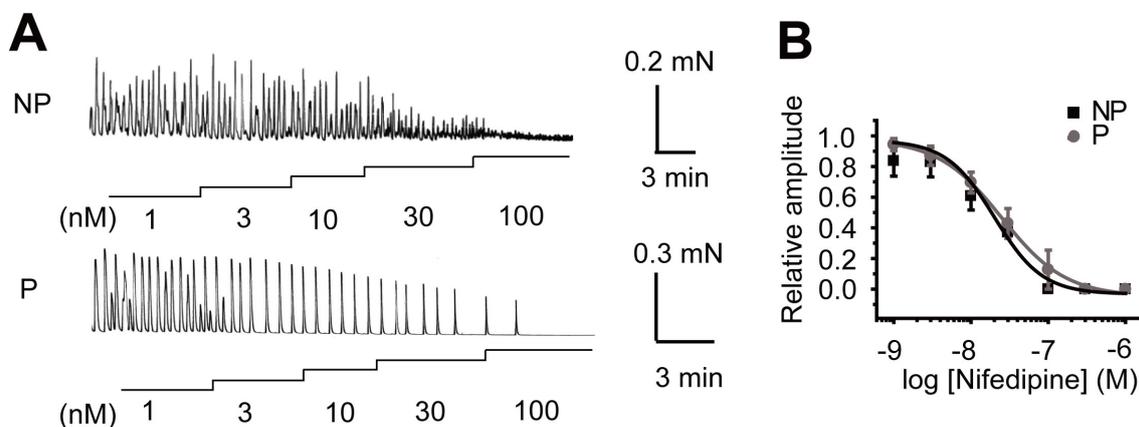


図 8 マウス子宮平滑筋の自発収縮に対する Nifedipine の作用

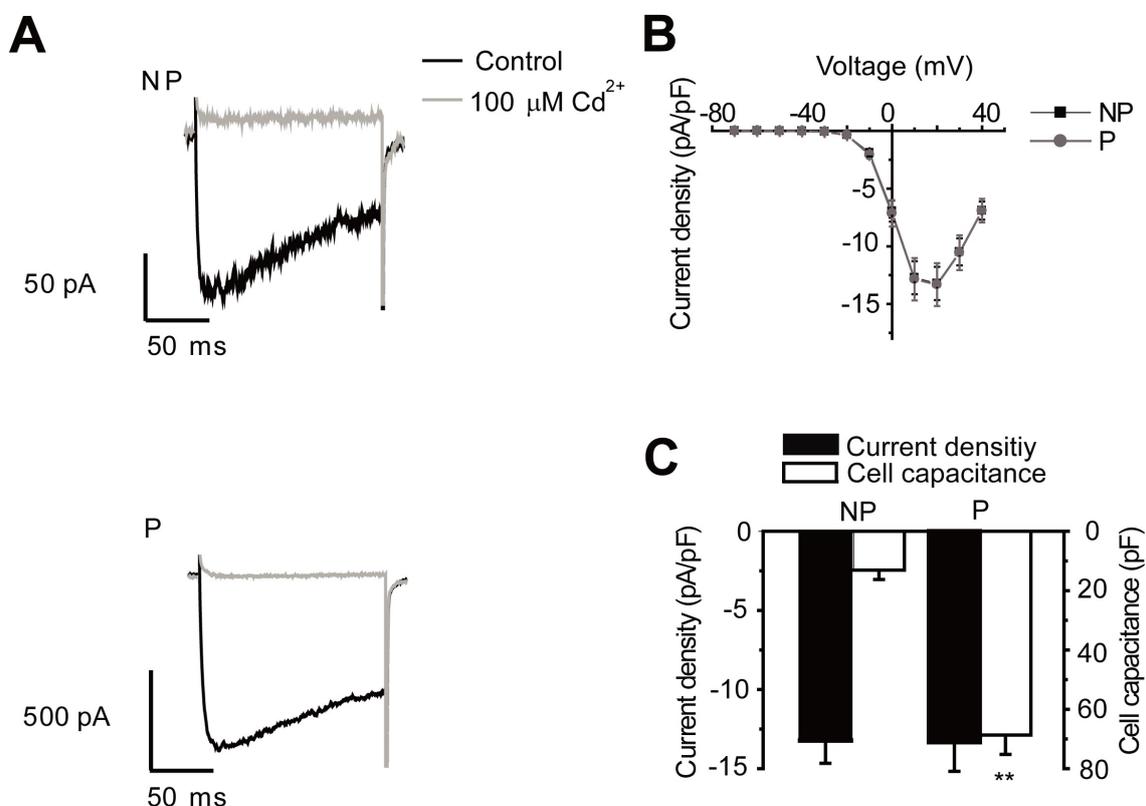
自発収縮を行っている子宮平滑筋条片に対し、VDCC 特異的阻害薬である Nifedipine を投与して、自発収縮に対する VDCC を介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の寄与について検討した。

A: 自発収縮を行っている子宮平滑筋条片に対し、1 nM から 100 nM まで Nifedipine を累積投与した際の収縮原図を示した。B: 投与前の収縮力の大きさを 1 として作成した用量-作用曲線を示した。

### 3-1-4. マウス子宮平滑筋における VDCC 発現の解析

単離した子宮平滑筋細胞に対しホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下で膜電流の測定を行った。細胞内液は  $\text{K}^+$  を  $\text{Cs}^+$  に置換し、さらに  $\text{K}^+$  チャンネル阻害薬である TEA-Cl を加えることで  $\text{K}^+$  電流を阻害した。細胞外液は  $\text{Ca}^{2+}$  を  $\text{Ba}^{2+}$  に置換することで電流を増強し測定を行った。測定した電流と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの阻害薬である 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$  を作用させた際の電流の典型原図を図 9A に示した。 $\text{Cd}^{2+}$  感受性電流の電流密度-電圧曲線を図 9B、流れた電流の最大値がみられた +20 mV における電流密度及び細胞容量を図 9C に示した。P では VDCC 電流量は NP と比較して有意に増大するものの、細胞容量も同時に増大するため、電流密度としては有意な変化は見られなかった

(電流密度: NP  $-13.2 \pm 1.4$  pA/pF,  $n=3$ ; P  $-13.3 \pm 1.9$  pA/pF,  $n=5$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; 細胞容量: NP  $13.1 \pm 3.2$  pF; P  $68.7 \pm 6.6$  pF;  $p < 0.01$ , 図 9C)。



**図 9 マウス子宮平滑筋における VDCC 機能解析**

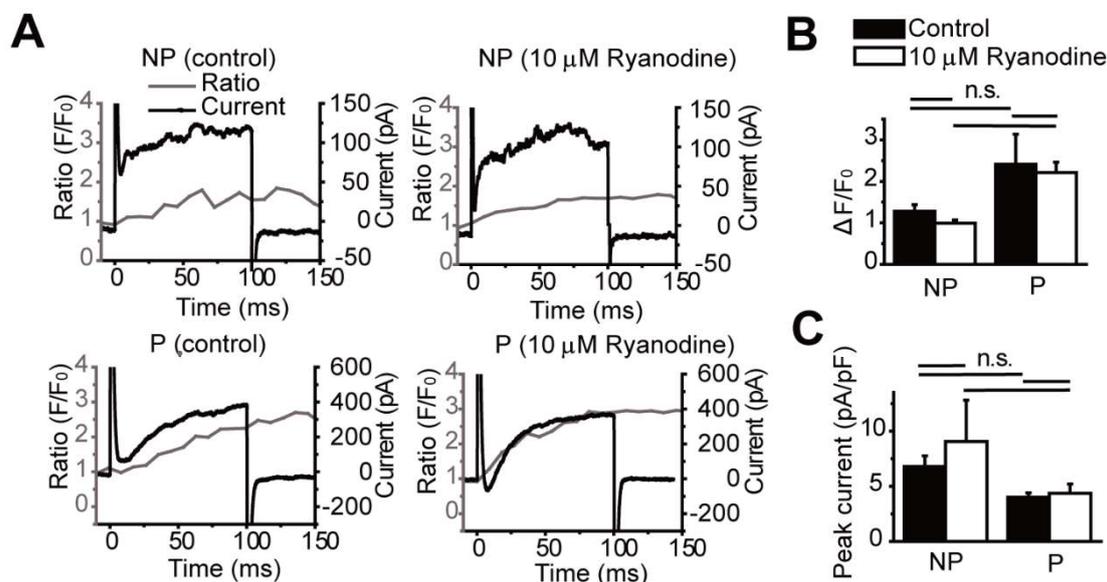
ホールセルパッチクランプ法を用いて、妊娠に伴うマウス子宮平滑筋細胞の VDCC 電流量の変化を検討した。

A: +20 mV における VDCC 電流及び、 $\text{Cd}^{2+}$ 投与後の電流の典型例を示した。保持電位-60 mV で-70 mV から+40 mV まで 20 s ごとに+10 mV ずつ電位を変化させた。B: 得られた電流の電流密度-電圧曲線を示した。C: +20 mV における NP、P の電流密度及び、細胞容量の比較を示した。\*\* $p < 0.01$  vs. NP.

### 3-1-5. マウス子宮平滑筋における CICR 活性の解析

脱分極刺激時の  $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離 (CICR)活性に対する RyR の寄与について検討した。ホールセルパッチクランプ法により膜電流を測定すると同時に、記録電極内に fluo-4 を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて脱分極刺激時の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化を測定した。また、電極内液に 10  $\mu$ M Ryanodine を投与することで RyR を阻害し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に対する RyR の寄与調べた。図 10A には非妊娠・妊娠時のコントロールと Ryanodine 存在下の、膜電流および fluo-4 の蛍光強度変化の原図を示している。図 10B,C には+10 mV での蛍光強度変化及び最大電流を示している。その結果、非妊娠・妊娠時を比較した際にコントロールの蛍光強度 (NP:  $1.28 \pm 0.16$ ,  $n=5$ ; P:  $2.41 \pm 0.72$ ,  $n=4$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ) 及び最大電流 (NP:  $6.79 \pm 0.10$  pA/pF,  $n=5$ ; P:  $4.00 \pm 0.39$  pA/pF,  $n=4$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ) 到有

意な変化は見られなかった。また、Ryanodine 負荷による蛍光強度 (NP:  $0.99 \pm 0.08$ ,  $n=3$ , P:  $2.21 \pm 0.25$ ,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ) および、最大電流値 (NP:  $9.06 \pm 3.74$  pA/pF,  $n=3$ ; P:  $4.36 \pm 0.83$  pA/pF,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ) に有意な変化は見られなかった。



**図 10 マウス子宮平滑筋における CICR の解析**

マウス子宮平滑筋細胞における CICR と妊娠による変化を、膜電流と  $[Ca^{2+}]_i$  変化を同時測定することで検討した。

A: 保持電位 -60 mV で +10 mV への脱分極刺激を与えた際の膜電流及び、 $[Ca^{2+}]_i$  変化の典型例を示した。細胞内液に Ryanodine を付加することで RyR を阻害した。B: 得られた蛍光強度変化の最大値の比較を示した。C: +10 mV における外向き電流の大きさを比較した。n.s.  $p > 0.05$ 。

### 3-1-6. マウス子宮平滑筋における BK チャネル発現の解析

大コンダクタンス  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  (BK) チャネル電流の測定を行った。子宮平滑筋細胞に対しホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下で膜電流の測定を行った。BK チャネルを活性化するために細胞内液の  $[Ca^{2+}]_i$  を 1  $\mu$ M (pCa 6.0) に固定し、VDCC を介した細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を 100  $\mu$ M  $Cd^{2+}$  で阻害した。BK チャネル特異的阻害薬である Paxilline (Pax) の感受性電流を BK チャネル由来の電流として測定した。図 11A には外向き電流、Pax 感受性電流、Pax 非感受性電流の電流原図、及びそれぞれの電流密度-電圧曲線を示した。各電流について +10 mV における電流密度を比較した (図 11B)。その結果、P では NP と比較して、外向き電流 (NP:  $6.8 \pm 0.8$  pA/pF; P:  $3.7 \pm 0.8$  pA/pF;  $p < 0.05$ ) 及び Pax 非感受性電流 (NP:  $5.3 \pm 0.7$  pA/pF; P:  $2.0 \pm 0.3$  pA/pF;  $p < 0.05$ ) が有意に減少していたが、Pax 感受性電流には有意な差は見られなかった (NP:  $1.5 \pm 0.5$  pA/pF,  $n=4$ ; P:  $1.7 \pm 0.6$  pA/pF,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ )。しかしながら、高電位側の +60 mV での Pax 感受性電流密度は P で有意に減少していた (NP:  $49.0 \pm 10.9$  pA/pF,  $n=4$ ; P:  $6.7 \pm 0.9$  pA/pF,  $n=3$ ;  $p < 0.01$ , 図 11C)。これらの結果から、子宮平滑筋

では BK チャネルは機能発現しているものの、脱分極刺激による RyR からの  $Ca^{2+}$  遊離の寄与は小さく、CICR を介した BK チャネルの活性化も極めて寄与が低いことが示された。

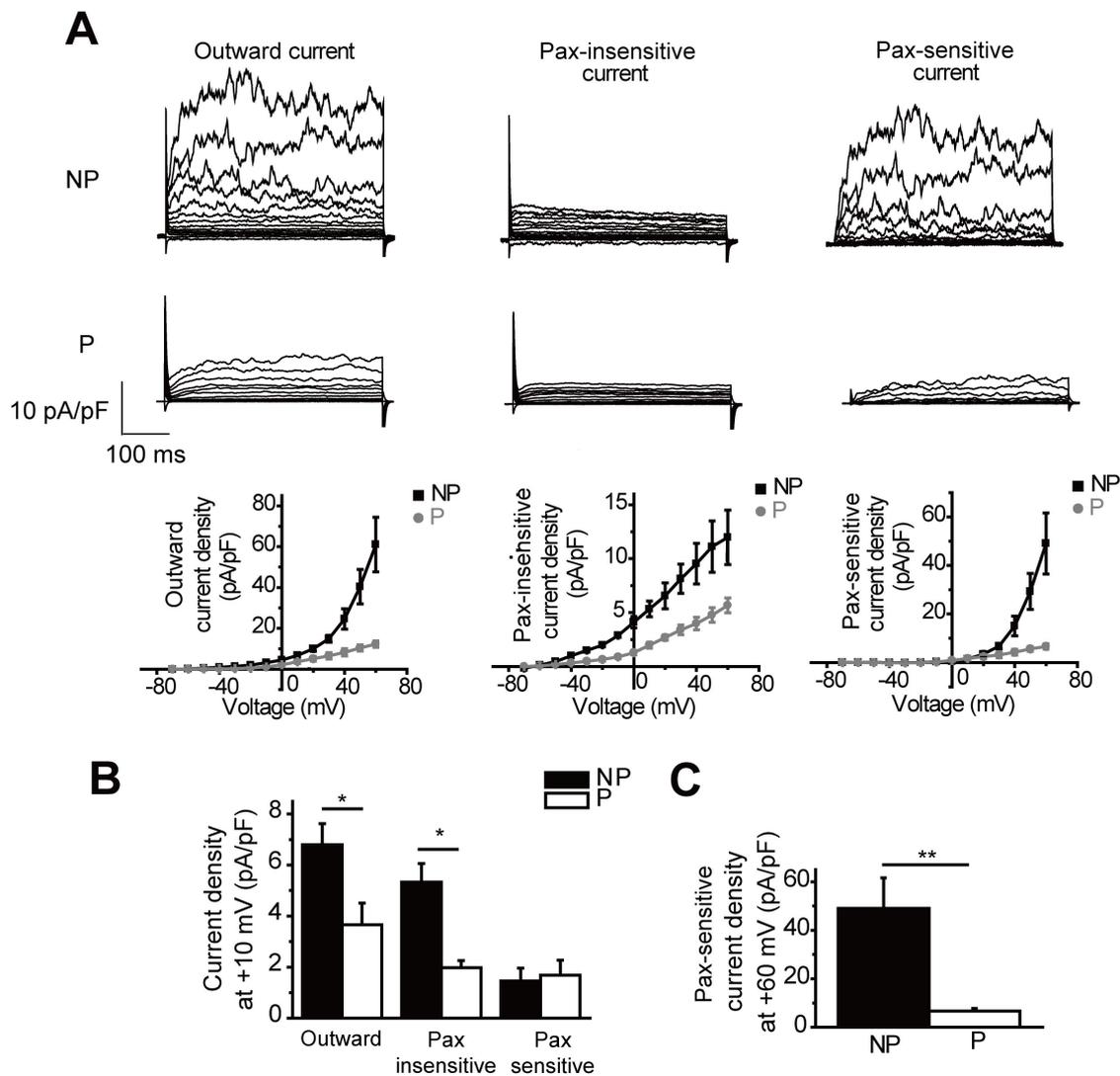


図 11 マウス子宮平滑筋細胞における BK チャネル電流の解析

ホールセルパッチクランプ法により、マウス子宮平滑筋細胞における BK チャネル電流量の妊娠に伴う変化を解析した。BK チャネル由来の電流を得るために、BK チャネル特異的阻害薬である Paxilline (Pax) を適用した。A : 左から外向き電流、Pax 非感受性電流、Pax 感受性電流を示した。上段には NP、中段には P、下段には電流密度-電圧曲線を示した。保持電位-60 mV で-70 mV から+60 mV まで 20 s ごとに+10 mV ずつ電位を変化させた。B : 得られた各電流成分について、+10 mV における電流密度の比較を示した。\* $p < 0.05$ 。C : Pax 感受性電流について+60 mV における電流密度の大きさを比較した。\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-1-7. マウス子宮平滑筋における STOC の解析

平滑筋において RyR は収縮時、静止時の両群でその機能に寄与している。しかしながら、前述の「3-1-1, 3-1-5」でマウス子宮平滑筋の収縮に対して RyR の寄与が少ないことが示唆された。次に、静止時における RyR の寄与を調べるため、RyR からの  $\text{Ca}^{2+}$  spark により誘発される自発一過電流 (STOC) について解析を行った。単離した細胞に対しホールセルパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下で膜電流の測定を行った。比較対象として Uri を用いた。図 12A には各細胞での -10 mV における STOC の電流原図を示している。膀胱平滑筋細胞では、図の上段のように STOC が観測された (平均電流量  $109.3 \pm 28.6$  pA、平均頻度  $1.83 \pm 0.87$  Hz、 $n=4$ )。それに対し、NP、P ともに STOC が検出されなかった (Uri:  $79.4 \pm 14.4$  pC,  $n=4$ ; NP:  $15.2 \pm 9.5$  pC,  $n=4$ ; P:  $7.7 \pm 2.6$  pC,  $n=5$ ; Uri v.s. NP,  $p < 0.01$ , Uri v.s. P,  $p < 0.01$ , NP v.s. P, n.s.:  $p > 0.05$ , 図 12B)。以上の結果から、マウス子宮平滑筋細胞では静止膜電位および静止張力の安定化機構の 1 つである STOC の寄与が極めて少ないことが示された。

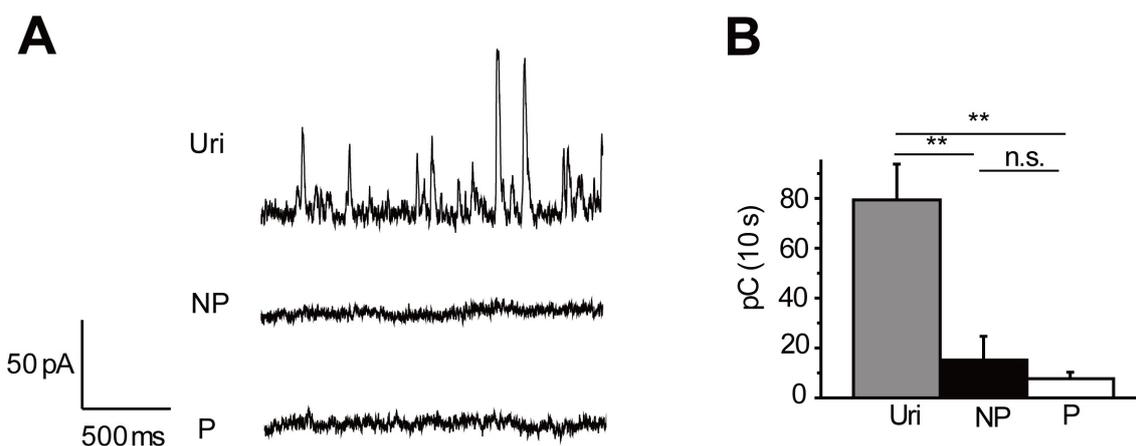


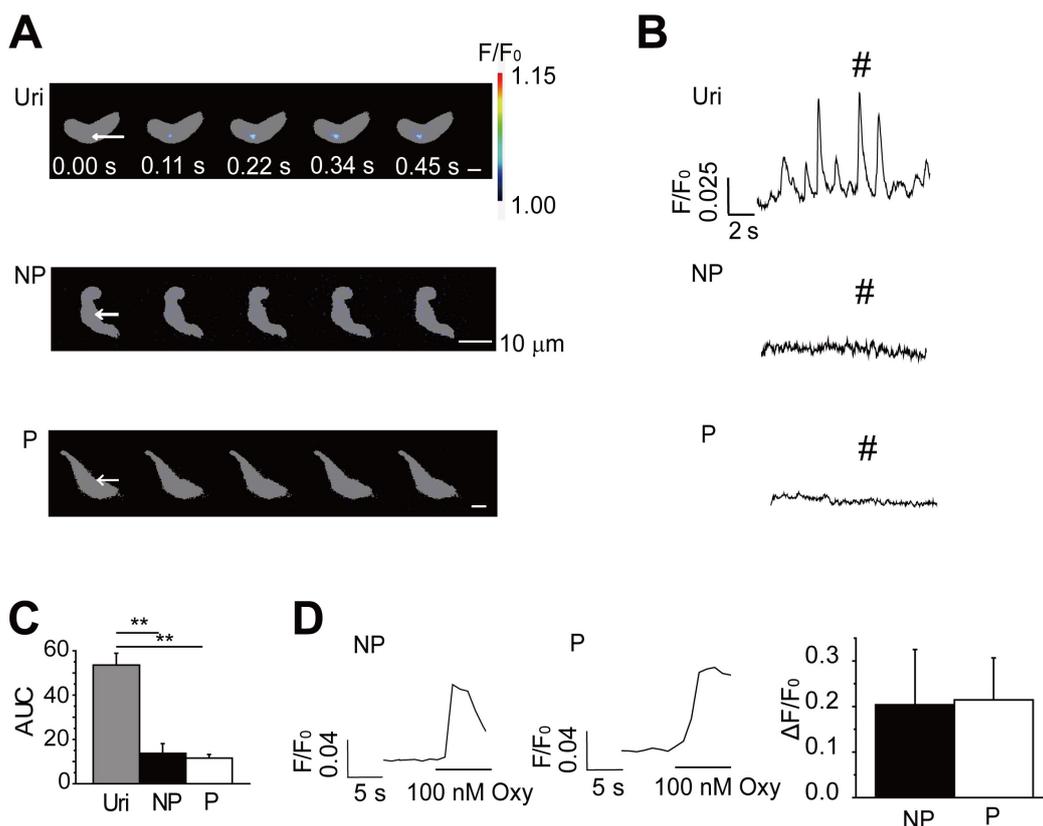
図 12 マウス子宮平滑筋細胞における STOC 解析

Uri、NP、P 由来の単離細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、保持電位 -10 mV における STOC を測定した。

A: Uri、NP 及び P における STOC の電流原図を示した。B: 測定 10 秒間における電流積分値について示した。\*\* $p < 0.01$ .

### 3-1-8. マウス子宮平滑筋における $\text{Ca}^{2+}$ spark の解析

マウス子宮平滑筋において STOC の寄与が少ない要因として考えられるのが、STOC の起点となる  $\text{Ca}^{2+}$  spark が発生しないことである。そこで、TIRF 顕微鏡を用いて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化の測定を行った。比較対象として Uri を用いた。単離した平滑筋細胞に対し fluo-4 AM を 10 分間適用し細胞に取り込ませた。図 13A には上段から Uri、NP、P の二次元  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング画像、図 13B には図 13A 中の矢印部分の直径約  $2\ \mu\text{m}$  範囲での蛍光強度変化、図 13C では蛍光強度変化の積分値の比較を示した (Uri:  $53.4 \pm 5.3$ ,  $n=5$ ; NP:  $13.7 \pm 4.4$ ,  $n=5$ ; P:  $11.6 \pm 1.7$ ,  $n=11$ ;  $p < 0.01$  vs. Uri)。その結果、膀胱平滑筋細胞でみられる様な  $\text{Ca}^{2+}$  spark は NP 及び P では検出されなかった。なお、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージング画像取得後に  $100\ \mu\text{M}$  Oxytocin を投与し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を確認することで、細胞の生存を確認した (図 13D)。また、 $100\ \mu\text{M}$  Oxytocin による  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は NP と P において差は見られなかった。以上のことから、マウス子宮平滑筋では BK チャネルの機能発現は見られるものの、 $\text{Ca}^{2+}$  spark がほとんど生じないために STOC の寄与が少ないことが示された。



**図 13 マウス子宮平滑筋細胞における  $\text{Ca}^{2+}$  spark 解析**

Uri、NP、P 由来の単離細胞に fluo-4 AM を負荷し、TIRF 顕微鏡で蛍光画像を取得して、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化を解析した。

A: Uri、NP 及び P における、蛍光画像の時間経過の原図を示した。白矢印は測定した  $2\ \mu\text{m}$  の領域を示している。B: 測定した領域での蛍光強度変化の原図を示した。#は A で示した  $\text{Ca}^{2+}$  spark が、時間経過のどの位置に当たるかを示している。C: 測定した 10 秒間における積分値を示した。\*\* $p < 0.01$ 。D: Oxytocin (図中では Oxy) を投与した際の蛍光強度変化ならびに最大値の比較を示した。

### 3-1-9. 非妊娠・妊娠時におけるマウス子宮平滑筋の RyR mRNA 及びタンパク質発現変化

これまでの報告では、妊娠期に 3 型 RyR (RyR3) の発現が増大し、収縮力を高める方向に働いているとされてきた [18]。しかしながら、これまでの機能解析の結果、RyR が機能していない可能性が示された。そこで非妊娠期と妊娠 18 日目のマウス子宮平滑筋における RyR の mRNA 発現を検討した (図 14A)。1 型 RyR (RyR1)・2 型 RyR (RyR2)・RyR3 の 3 つのサブタイプの発現についてリアルタイム定量 PCR 法を用いて検討を行った。その結果、RyR1・RyR2 の mRNA は RyR3 と比較して極めて少なかった (NP: RyR1  $0.0013 \pm 0.0005$ ; RyR2  $0.0008 \pm 0.0002$ ,  $n=4$ ; P: RyR1  $0.0005 \pm 0.0001$ , RyR2  $0.0008 \pm 0.0002$ ,  $n=4$ ;  $p > 0.05$ , 図 14A)。また、RyR3 (total RyR3) は妊娠期に有意に発現が減少していた (NP:  $0.013 \pm 0.003$ ,  $n=4$ ; P:  $0.003 \pm 0.001$ ,  $n=4$ ;  $p < 0.05$ )。野生型 RyR3 (full-length RyR3: FL-RyR3) およびドミナントネガティブ型 RyR3 (DN-RyR3) に特異的なプライマーを作成し定量を行ったところ、total-RyR3 (FL-RyR3+DN-RyR3) mRNA と同様に妊娠期において FL-RyR3・DN-RyR3 mRNA の発現は低下していた (NP: FL-RyR3  $0.004 \pm 0.001$ ; DN-RyR3  $0.008 \pm 0.002$ ,  $n=4$ ; P: FL-RyR3  $0.0009 \pm 0.0001$ ; DN-RyR3:  $0.0013 \pm 0.0004$ ,  $n=4$ ;  $p < 0.05$  vs. NP)。

ウェスタンブロット法により RyR3 タンパク質発現の検討も行った。その結果、妊娠期において RyR3 タンパク質の発現は低下していた (NP:  $0.028 \pm 0.009$ ,  $n=3$ ; P:  $0.001 \pm 0.002$ ,  $n=3$ ;  $p < 0.05$ , 図 14B)。以上のことから、これまでの報告とは異なり妊娠期に RyR3 mRNA・タンパク質の発現が低下し、子宮収縮には関与していない可能性が示された。

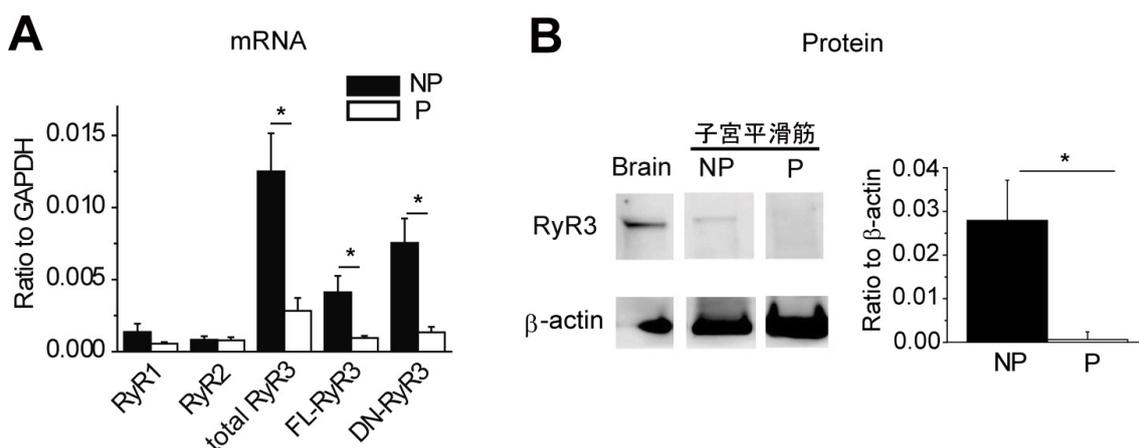


図 14 妊娠によるマウス子宮平滑筋の RyR mRNA 及びタンパク質の発現変化の解析

NP 及び P の RyR の発現についてリアルタイム定量 PCR 法及びウェスタンブロット法により解析した。

A: RyR 各サブユニットの mRNA 発現量を比較した。GAPDH の発現を 1 として規格化した。\* $p < 0.05$ 。

B: ウェスタンブロット法によって取得した原図及び、解析結果を示した。 $\beta$ -actin を 1 として規格化した。\* $p < 0.05$ 。

### 3-1-10. RyR3 遺伝子欠損による出産への影響

RyR3 遺伝子欠損による妊娠・出産への影響を検討した。使用した動物は 20 週齢以下の初産マウスで、出産した匹数の計測を行った。その結果、出産匹数に有意差は認められなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: 8.3±0.4, n=9; RyR3<sup>-/-</sup>: 8.1±0.5, n=9; p>0.05, 図 15A)。胎生期も RyR3<sup>+/+</sup>・RyR3<sup>-/-</sup>共に 19 日程度で影響は見られなかった。以上のことから、子宮平滑筋では RyR3 は妊娠・出産に極めて寄与が少ないことが示された。

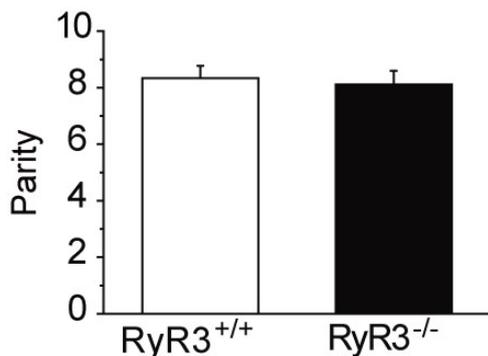


図 15 RyR3 遺伝子欠損による妊娠・出産への影響  
RyR3<sup>+/+</sup>および RyR3<sup>-/-</sup>における 20 週齢以下の初産マウスの出産匹数を比較した。

### 3-1-11. RyR3 遺伝子欠損による非妊娠子宮平滑筋自発収縮への影響

RyR3 が収縮に寄与しているとする遺伝子欠損により、異常が出るものと考えられる。そこで RyR3 の自発収縮への寄与について検討を行うことで RyR3 の子宮平滑筋への寄与について検討を行った。RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の非妊娠子宮筋条片の収縮力及び収縮頻度を比較した。その結果、RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>において収縮力に有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup> 0.31±0.04 mN, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.44±0.08 mN, n=4; n.s.: p>0.05)。また、収縮頻度においても有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: 10.5±3.7/min; RyR3<sup>-/-</sup>: 11.3±3.0/min; n.s.: p>0.05, 図 16)。以上の結果から、RyR3 は子宮平滑筋の収縮において極めて寄与が少ないことが示された。

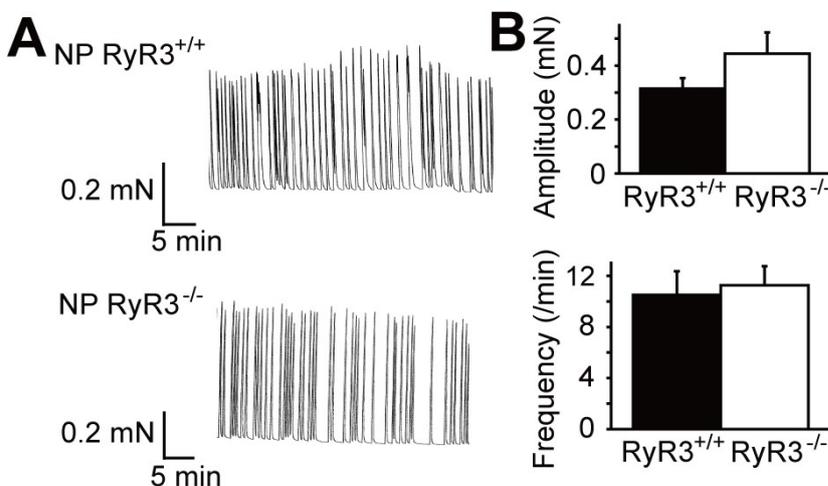


図 16 RyR3<sup>-/-</sup>における子宮平滑筋自発収縮の解析  
RyR3 遺伝子欠損による自発収縮への影響を検討した。  
A: 上段に RyR3<sup>+/+</sup>、下段に RyR3<sup>-/-</sup>の収縮力測定の原因図を示した。B: RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の自発収縮の大きさ (上段)及び頻度 (下段)の比較を示した。

### 3-1-12. RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析

RyR3<sup>-/-</sup>では代償的に Ca<sup>2+</sup>に関連するイオンチャネル及びトランスポーターの発現が変化し、子宮収縮を補完している可能性が考えられた。そこで Ca<sup>2+</sup>関連遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法により検討した。Ca<sup>2+</sup>関連遺伝子として RyR の 1 型及び 2 型、同じ SR 膜上の Ca<sup>2+</sup>放出チャネルである 1 型イノシトール三リン酸受容体(IP<sub>3</sub>R1)、細胞外の Ca<sup>2+</sup>流入を担う VDCC と膜の再分極・静止時における膜電位調節担う BK チャネルのポアサブユニット (BK $\alpha$ )、Ca<sup>2+</sup>排出を担う Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体 (NCX)、2 型筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2)について比較を行った。その結果、すべての遺伝子群において WT と RyR3<sup>-/-</sup>で有意な差は見られなかった (RyR1: RyR3<sup>+/+</sup> 0.0008 $\pm$ 0.0002, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.0008 $\pm$ 0.0002, n=4; RyR2: RyR3<sup>+/+</sup> 0.0014 $\pm$ 0.0006, n=3; RyR3<sup>-/-</sup> 0.0005 $\pm$ 0.0001, n=4; IP<sub>3</sub>R1: RyR3<sup>+/+</sup> 0.05 $\pm$ 0.01, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.039 $\pm$ 0.007, n=4; VDCC: RyR3<sup>+/+</sup> 0.15 $\pm$ 0.07, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.11 $\pm$ 0.04, n=4; BK: RyR3<sup>+/+</sup> 0.034 $\pm$ 0.008, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.031 $\pm$ 0.001, n=4; NCX: RyR3<sup>+/+</sup> 0.07 $\pm$ 0.03, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.04 $\pm$ 0.01, n=4; SERCA2: RyR3<sup>+/+</sup> 0.23 $\pm$ 0.07, n=4; RyR3<sup>-/-</sup> 0.13 $\pm$ 0.01, n=4; 図 17)。上のことから、RyR3<sup>-/-</sup>の子宮平滑筋では Ca<sup>2+</sup>関連のイオンチャネル、トランスポーターの発現変化による代償機構は働いていない可能性が示唆された。

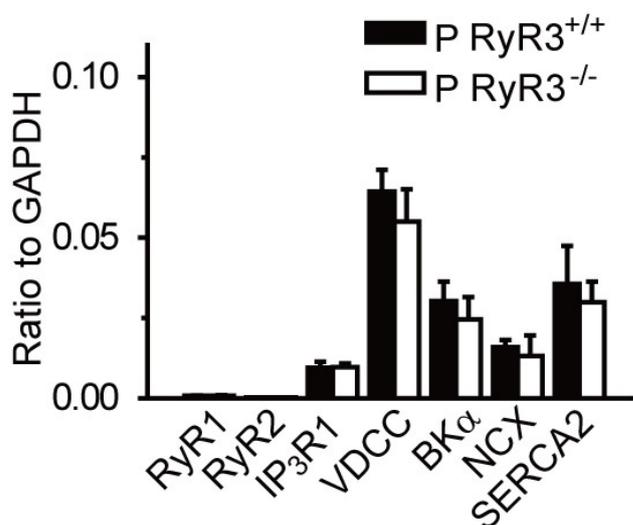
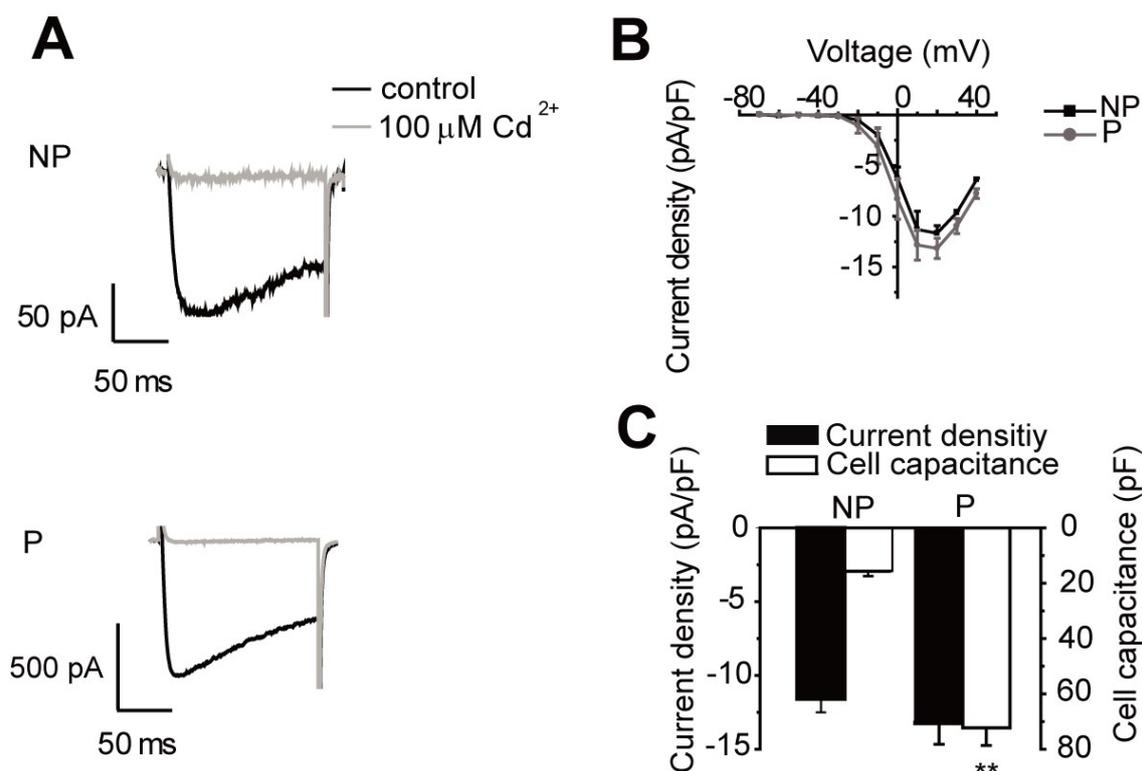


図 17 RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析

リアルタイム定量 PCR 法により、RyR3<sup>-/-</sup>における Ca<sup>2+</sup>関連遺伝子の発現を解析した。

VDCC の機能発現についてホールセルパッチクランプ法を用いて測定を行った。測定は上記の「3-1-4」と同様の条件下で行った。その結果、WT と同様に妊娠期では電流量は増大しているものの、同時に細胞容量が増大することで電流密度としては有意な差は見られなかった（電流密度: NP  $-11.7 \pm 0.7$  pA/pF,  $n=3$ ; P  $-13.2 \pm 1.0$  pA/pF,  $n=5$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; 細胞容量: P  $73.8 \pm 5.8$  pF; NP  $16.1 \pm 0.2$  pF;  $p < 0.01$ , 図 18A, B, C)。以上のことから、 $RyR3^{-/-}$  の子宮平滑筋では VDCC の機能変化による代償機構の寄与は極めて少ないことが示唆された。



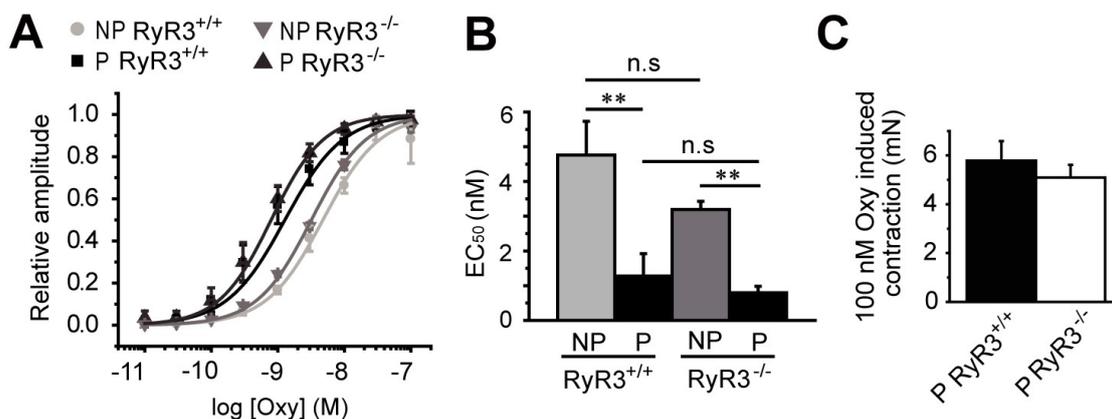
**図 18 RyR3<sup>-/-</sup>におけるVDCCの機能的発現量の解析**

RyR3<sup>-/-</sup>由来子宮平滑筋細胞のVDCC電流を測定し、遺伝子欠損による影響を検討した。

A: +20 mV におけるVDCC電流及び、Cd<sup>2+</sup>投与後の電流の典型例を示した。保持電位-60 mVで-70 mVから+40 mVまで20 sごとに+10 mVずつ電位を変化させた際の原因を示した。B: 得られた電流の電流密度-電圧曲線を示した。C: +20 mVにおけるNP、Pの電流密度及び、細胞容量の比較を示した。\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-1-13. RyR3 遺伝子欠損による Oxytocin 感受性への影響

RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の NP、P 計の 4 群について Oxytocin の感受性を比較した。子宮平滑筋条片に対し、1 μM Nifedipine を投与することで自発収縮を抑制し Oxytocin による収縮を 10 pM から 100 nM まで段階投与することで用量-作用曲線を作成した (図 19A)。NP と比較して P では Oxytocin の感受性は増大していた。これは RyR3<sup>-/-</sup>においても同様であった。しかしながら、RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の間には有意な差は見られなかった (EC<sub>50</sub>; RyR3<sup>+/+</sup>: NP 4.76±0.97 nM, n=3; P 1.28±0.64 nM, n=5; p<0.01; RyR3<sup>-/-</sup>: NP 3.2±0.24nM, n=6, P 0.79±0.02 nM, n=5, p<0.01, Hill 係数; RyR3<sup>+/+</sup>: NP 1.02±0.10, P 1.00±0.04; RyR3<sup>-/-</sup>: NP 1.06±0.03, P 1.11±0.10, 図 19A,B)。また、100 nM Oxytocin 投与による NP の最大収縮に RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>では差が見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup> NP: 5.66±0.77 mN, n=5; RyR3<sup>-/-</sup> P: 4.99±0.51 mN, n=5; n.s.: p>0.05, 図 19C)。以上のことから、子宮平滑筋においては妊娠期に Oxytocin の感受性は増大するが、RyR3 遺伝子欠損による影響は極めて少ないことが示された。



**図 19 マウス子宮平滑筋における Oxytocin の感受性の比較**

マウス子宮平滑筋の Oxytocin (図中では Oxy)感受性について、RyR3<sup>+/+</sup>および RyR3<sup>-/-</sup>の非妊娠・妊娠子宮筋条片の収縮力を測定し検討した。自発収縮を抑制するために 1 μM Nifedipine を前処置し、Oxytocin を段階投与した。

A: Oxytocin を 10 pM から 100 nM まで段階投与した際の用量-作用曲線を示した。B: 用量-作用曲線から EC<sub>50</sub> の値を求めた。\*\*p<0.01。C: 100 nM Oxytocin を投与した際の収縮力を比較した。

### 3-1-14. 要約及び考察

これまで子宮平滑筋においては、妊娠末期に RyR3 の発現が増大して筋収縮力を高めることで、分娩が可能になるのではないかと報告されていた[18]。しかしながら、当研究室で共同研究の為に繁殖を行っている RyR3<sup>-/-</sup>は、分娩異常等の問題を示さなかった。そのため、これまでの報告とは異なり RyR3 は妊娠・出産において重要ではない可能性が考えられた。そこで本研究では、電気生理学的手法や筋張力測定、 $[Ca^{2+}]_i$  解析を用いた機能解析と、リアルタイム定量 PCR 法やウェスタンブロット法による発現解析を行った。

子宮平滑筋は自発運動能が高く、自発収縮及びそれに同期した  $Ca^{2+}$  oscillation を起こしている[97]。この  $Ca^{2+}$  oscillation は Jurkat T-cell や十二指腸などでも観察され、RyR3 の抑制により  $Ca^{2+}$  oscillation が抑制または減弱することが報告されている[19, 42]。RyR3 と  $Ca^{2+}$  oscillation は関わりが深いことから、本研究では自発的な  $Ca^{2+}$  濃度上昇が観察されるマウス子宮平滑筋に対し、RyR 阻害薬である 50  $\mu$ M Ryanodine を投与した。その結果、自発収縮ならびに  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は阻害されず、子宮平滑筋の自発収縮に RyR の関与は極めて少ないことが示された。これに対し、自発収縮を行っている子宮平滑筋に対し Nifedipine を投与したところ、濃度依存的に自発収縮は減弱し 100 nM では完全に消失した。本文中では示していないが、細胞外の  $Ca^{2+}$  を除去した際にも自発収縮の消失は観察され、VDCC を介した細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が重要性であることが示唆された (図 8, [45])。また、ラットにおいては妊娠期に VDCC のタンパク質発現が増大する[90]ことから、マウスにおいても妊娠により VDCC 活性に変化が生じている可能性が考えられた。しかし、ホールセルパッチクランプ法により VDCC 電流を測定したところ、P では電流量自体が増大したが、同時に細胞が肥大化することで細胞膜容量が 7 倍近くに増加したため、電流密度としては NP と P で有意な差は見られなかった (図 9)。

RyR は活性化薬である Caffeine により開口し、図 7 の Uri で観察された様な一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を引き起こす。しかし、NP 及び P において Caffeine による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇はほとんどの細胞で観察されなかった (図 7A,B)。ヒトやラットの非妊娠子宮における研究でも、本研究と同様に RyR 活性化薬の自発収縮への影響が少ないことが報告されている[77, 84]。反対にラット妊娠子宮平滑筋では Ryanodine に対する感受性が検出されることが報告されている[48, 53, 84]。これら RyR の活性化薬あるいは阻害薬に対する感受性の違いは種の違いによるものと推測される。

膀胱や精管などの興奮性の高い平滑筋では、脱分極時に細胞膜上の VDCC を介して細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入する。この流入した  $Ca^{2+}$  により RyR が活性化され CICR が起きる。これにより平滑筋細胞全体の  $Ca^{2+}$  濃度が上昇することで筋収縮が引き起こされる [36, 64]。本研究ではパッチクランプ法と  $[Ca^{2+}]_i$  二次元画像解析を組み合わせることで、記録電極を介した脱分極刺激に応じた  $[Ca^{2+}]_i$  変化と膜電流の同時測定を行った。

その結果、非妊娠・妊娠マウス子宮平滑筋ともに、脱分極刺激による上昇に対して RyR 阻害薬 Ryanodine は影響を及ぼさなかった。従って、マウス子宮平滑筋において CICR の寄与が少ないことが示された (図 10B)。以上より、マウス子宮平滑筋に対して RyR 活性化薬 Caffeine や脱分極刺激による  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離は極めて寄与が少ないこと明らかとなった。他の興奮性の高い平滑筋組織とは異なり、マウス子宮平滑筋の自発収縮においては、RyR の寄与は低いことが示された。一方で、VDCC を介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が自発収縮に重要な役割を持つものの、妊娠期において VDCC のタンパク質発現が増大しているラット[90]とは異なり、マウスでは妊娠期での VDCC を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 流入は非妊娠期と比較して有意差は見られず、妊娠による電流密度の変化は極めて少ないことが示唆された。

平滑筋における膜電位調節機構として、 $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC 連関が知られている。SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  spark が、近傍の細胞膜上に局在する BK チャネルを活性化することで STOC が発生し、膜電位が過分極することが報告されている [71, 103]。子宮では妊娠期において RyR3 の発現量が増加することで、STOC 活性に変化が生じ、妊娠期の筋張力安定化や、分娩の開始時及び分娩中の膜電位・筋張力の調節に寄与することが予想された。しかしながら、fluo-4 AM による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定の結果、子宮平滑筋細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  spark が検出できなかった (図 13)。解析対象の細胞では、100 nM Oxytocin によって  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が起きた為、 $\text{Ca}^{2+}$  ストアである SR 内には十分な  $\text{Ca}^{2+}$  が貯蔵されていたと考えられる。この結果と一致してマ NP 及び P では Uri で観察されたような STOC は検出されなかった (図 12)。STOC が起きない可能性として BK チャネルが機能発現していないことが考えられたが、ホールセルパッチクランプ法により BK チャネルが機能発現していることが示された (図 11)。また、NP と比較して P ではこれまでの報告[5]と同様に、BK チャネル電流密度が有意に低下することも示された。以上のことから、マウス子宮平滑筋では  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC による膜電位調節機構の寄与が極めて少ないことが示された。その代わり、妊娠期における 2 ポアドメイン  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{2p}$ ) チャネル[58]や内向き整流性  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{ir}$ ) チャネル[49]の発現増大が報告されており、これらの  $\text{K}^+$  チャネルが妊娠期の子宮平滑筋の静止膜電位維持に寄与すると推測される。BK チャネルは RyR から放出された  $\text{Ca}^{2+}$ ではなく、VDCC や  $\text{IP}_3\text{R}$  など他のチャネルを介して細胞質内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$ によって活性化されて、膜電位を過分極させることで VDCC に対して負帰還機構として働くと考えられる。

また、RyR3<sup>+/+</sup>では RyR3<sup>+/-</sup>と比較して出産匹数に違いは見られず、正常な妊娠・出産が可能であったことから、マウスの妊娠・出産及び子宮収縮機能に RyR3 は必須でないと考えられる。

これまでの報告ではマウス子宮平滑筋において、妊娠後期に FL-RyR3 の発現が増大し、子宮平滑筋の筋収縮力を増大させることで、分娩時の強い収縮が可能となると報告されていた[18]。しかし、リアルタイム定量 PCR 法およびウェスタンブロット

法による発現解析の結果、PではむしろRyR3の発現が低下することを明らかにした(図14)。FL-RyR3はDN-RyR3とヘテロ4量体を組むことで強く機能が抑制されることが報告されている。NPではDN-RyR3の発現がFL-RyR3に比べて高く、RyR活性を抑制しており、PではRyR3全体の発現が低下するので、マウス子宮平滑筋ではRyRの寄与が極めて少ないと考えられる(図20)。

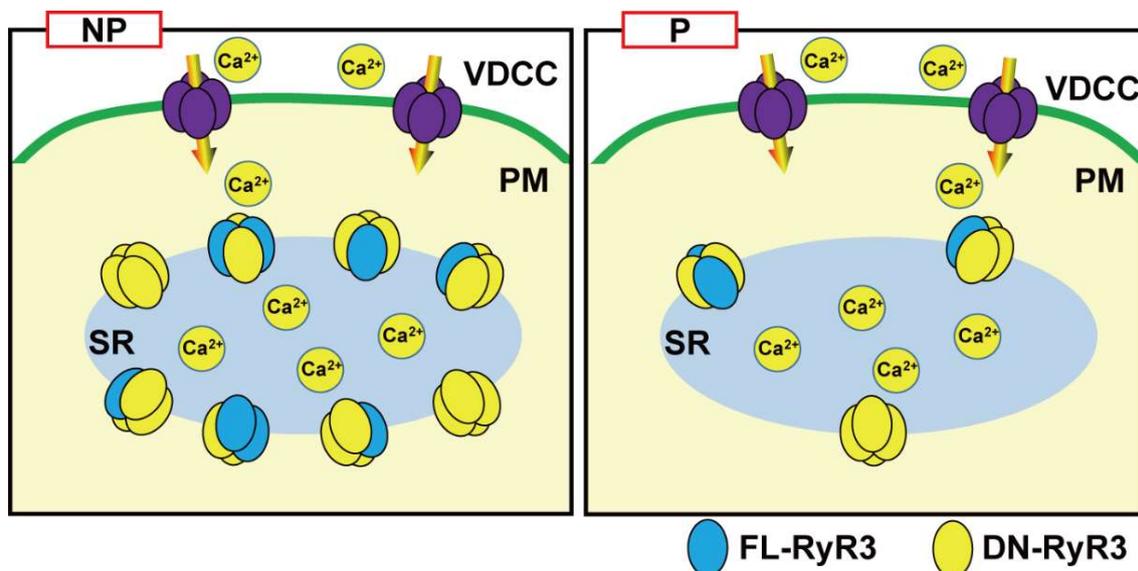


図20 マウス子宮平滑筋におけるRyR発現変化

非妊娠期ではDN-RyR3の発現比量がFL-RyR3に比べて高く、FL-RyR3の機能が抑制されてCa<sup>2+</sup>放出能を示さない。妊娠期では、両RyR3サブタイプの発現が低下し、RyR機能が消失する。

また、RyRの細胞内分布はサブタイプによって異なっており、RyR1やRyR2は細胞内でクラスターを形成し密度高く発現するのに対し、RyR3は細胞内に広く分布し、びまん性の発現分布を示す[96]。このことは、RyR3が自発的あるいはCICR時のCa<sup>2+</sup>放出に必要な機能的クラスターを形成できないことを示唆している[46, 79, 80]。また、肺動脈平滑筋ではRyR2は細胞膜周辺、RyR3は核周辺、RyR1は両者に分布するという報告があり[100]、サブタイプ特異的な分布様式も子宮平滑筋でRyRの寄与が少ない一因ではないかと考えられる。

これまでの報告と異なる結果を得た理由として、実験環境や条件の違いが影響しているの可能性がある。Dabertlandらの検討では初代培養の子宮平滑筋細胞を用いている[18]。平滑筋のRyR2やRyR3発現は、培養により増大することが報告されている[6, 91]。また、RyR1の発現がエストロゲンにより抑制されることが報告されており[102]、性ホルモンによる制御がない培養条件では、RyR発現が増大した可能性がある。これらの違いによって既報とは異なる結果を得たと推測している。

RyR3遺伝子欠損による代償機構については、mRNAの発現変化及び、VDCCの機能解析を行った。その結果、RyR3<sup>-/-</sup>では、Ca<sup>2+</sup>関連のイオンチャネル、トランスポーターの発現変化による代償機構は働いていない可能性が示唆された。妊娠期の変化とし

では RyR3 の発現は前述の様に大きく減少している。この発現変化は、分娩時の強い収縮を引き起こすための変化としては相反する。これらを補う機構として、マウスでは妊娠期に電位依存性  $K^+$  ( $K_v$ ) チャネルの発現減少[78]や電位依存性  $Na^+$  ( $Na_v$ ) チャネルの発現増加[40]や、 $Ca^{2+}$ 関連のイオンチャネルの 3 型小コンダクタンス  $Ca^{2+}$ 活性化  $K^+$  チャネル (SK3)の発現減少[72]、ラットでの  $IP_3R$ [52]や VDCC の発現増大[90]が報告されている。RyR3 の発現は減少するものの、これらのイオンチャネルの代償的な発現変化により平滑筋の興奮性の増加や $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起き、分娩時の収縮の発生に寄与していると考えられる。

本研究の結果から、妊娠期における子宮平滑筋での強い収縮力の発生には、①細胞外からの  $Ca^{2+}$ 流入、②アゴニスト受容体誘発性の  $IP_3R$  からの  $Ca^{2+}$ 放出、という 2 つの  $Ca^{2+}$ 動員機構が重要であると考えられる。しかしながら、本研究では VDCC の電流量は妊娠期において増大するものの、細胞容量の増大を伴い、電流密度としては非妊娠期と比較して有意差は見られないことが示された。この変化は細胞の中心部の  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を妨げることとなるため、収縮力の増大に働くとは考えにくい。一方で、妊娠期の子宮平滑筋では、収縮タンパク質の  $Ca^{2+}$ 感受性の増大 [1, 50, 68, 94]や、収縮タンパク質の発現増大 [26, 95]が報告されている。また、前述のイオンチャネルの発現変化や細胞間の結合及び電気的コミュニケーションを担うコネクシン (Cx43)の増大により、電気伝達がスムーズになることが報告されている [67]。これらの変化により電流密度の変化が伴わなくとも分娩時の強い収縮の発生が可能となると考えられる。また、図 19A, B でみられる様に、妊娠期において Oxytocin の感受性が増大することも分娩時の収縮力増強に寄与していると考えられる。

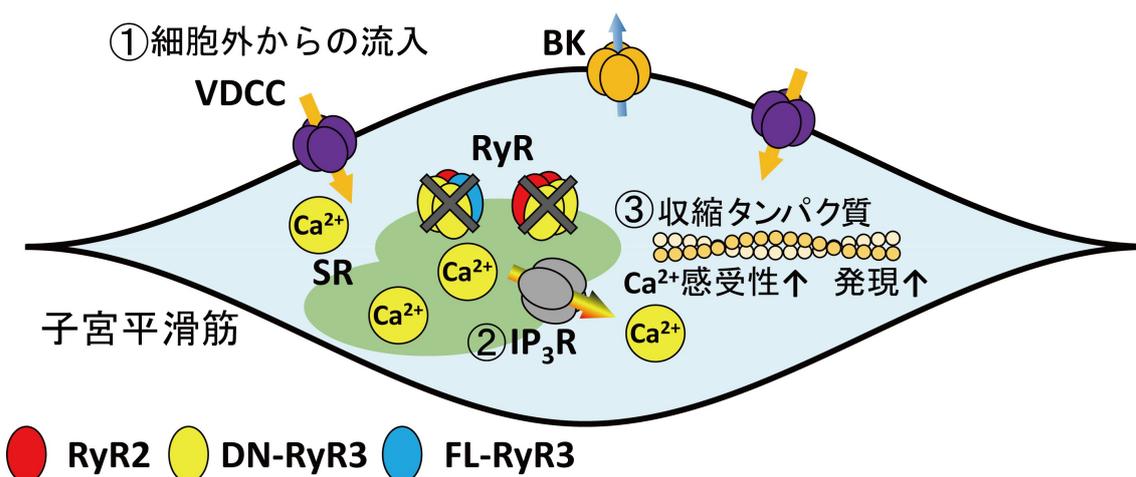


図 21 マウス子宮平滑筋における RyR の機能

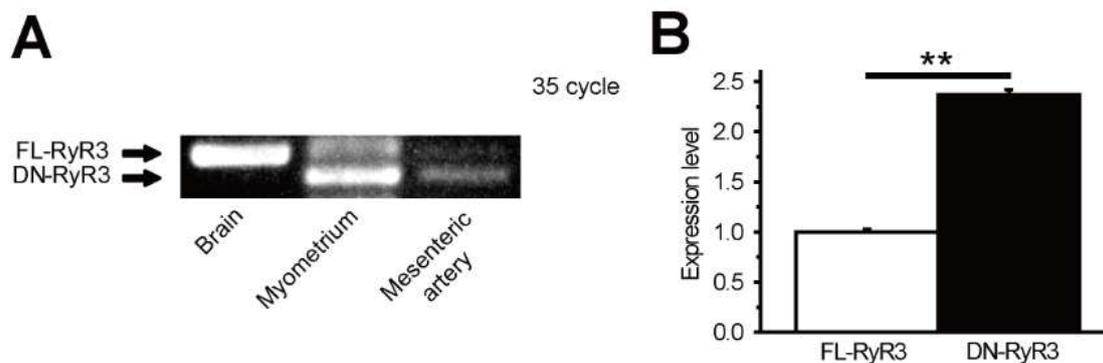
子宮平滑筋の細胞内  $Ca^{2+}$ 調節機構において RyR3 は重要な役割を果たしておらず、VDCC を介した  $Ca^{2+}$ 流入及び  $IP_3R$  からの  $Ca^{2+}$ 遊離でほとんどの収縮が引き起こされている。妊娠期には、アゴニスト感受性の亢進や、収縮タンパク質の  $Ca^{2+}$ 感受性や発現量の亢進などが起こり、分娩に必要な強力な収縮が可能となると考えられる。

子宮平滑筋では興奮性の高い平滑筋で見られる静止時の  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC という  $\text{Ca}^{2+}$  制御負帰還機構、興奮時やアゴニスト刺激時の RyR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能の寄与が極めて少ないことが明らかとなった。また、これまでの報告とは異なり妊娠期における RyR3 の発現低下を示唆した。子宮平滑筋では多くの興奮性の高い平滑筋とは異なり、SR からの RyR を介した  $\text{Ca}^{2+}$  遊離に依存しない  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を制御していることが明らかとなった。分娩時の強い収縮の発生には、①VDCC を介した細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入や、②アゴニスト刺激を介した③IP<sub>3</sub>R からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、及び収縮タンパク質の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増大が関与していると考えられる(図 21)。

## 3-2 腸間膜動脈平滑筋における RyR3 の生理的意義の解明

### 3-2-1. マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR3 mRNA 及びタンパク質発現解析

マウス腸間膜動脈における FL-RyR3 及び DN-RyR3 の発現について RT-PCR 法によって増幅産物の検出を行った。DN-RyR3 の欠損領域を挟むようにプライマーを設計し、FL-RyR3 及び DN-RyR3 を同時に検出した。図 22A, B に示すようにマウス腸間膜動脈において FL-RyR3 及び DN-RyR3 が発現していることが示された。得られたバンドの濃度を比較したところ、DN-RyR3 が FL-RyR3 に比べて相対的に多く発現している可能性が示唆された (FL-RyR3:  $1.00 \pm 0.03$ , N=6; DN-RyR3:  $2.34 \pm 0.05$ , N=6;  $p < 0.01$ , 図 22A, B)。



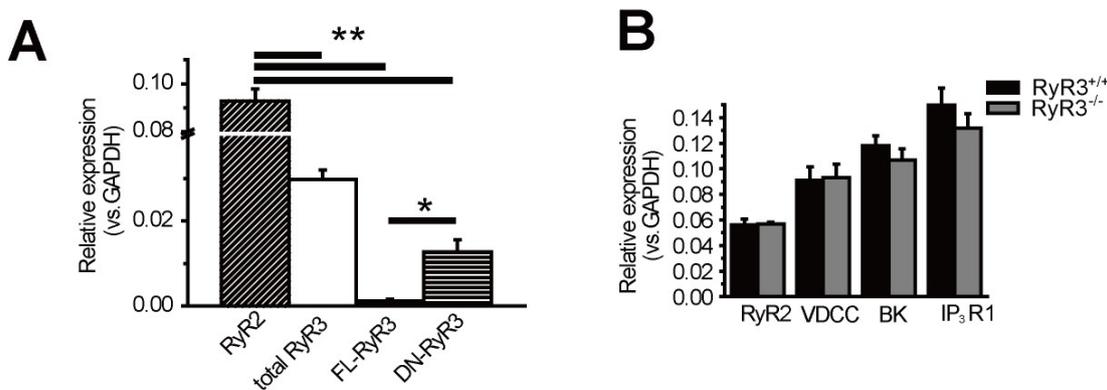
**図 22 マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR 発現解析**

マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR3 の発現について、RT-PCR 法により検討した。

A: 欠損領域を挟むようにして作成したプライマーを用いて RT-PCR 法を行った際の増幅産物の原図を示した。コントロールとして FL-RyR3 のみ発現する脳と DN-RyR3 が豊富に発現する子宮平滑筋を用いた。B: RT-PCR 法によって得られた増幅産物の量を、FL-RyR3 を 1 として規格化して比較した。  
\*\* $p < 0.01$ .

次に、リアルタイム定量 PCR 法を用いて各 RyR サブタイプの mRNA 発現について検討を行った (図 23A)。その結果、子宮平滑筋と比較し、腸間膜動脈平滑筋では RyR3 に対する RyR2 の発現が相対的に多いことが示された (RyR2:  $0.092 \pm 0.005$ ,  $n=4$ ; total RyR3:  $0.029 \pm 0.002$ ,  $n=5$ ;  $p < 0.01$ )。RyR1 については検出されなかった。また、RyR3 について FL-RyR3 と DN-RyR3 の発現比について解析したところ、DN-RyR3 の発現が相対的に多いことが示された (DN-RyR3:  $0.013 \pm 0.003$ ,  $n=5$ ; FL-RyR3:  $0.0012 \pm 0.0004$ ,  $n=5$ ;  $p < 0.05$ )。以上のことから、マウス腸間膜動脈では DN-RyR3 が比較的豊富に発現していることが示唆された。

また、RyR3<sup>-/-</sup>では代償的に Ca<sup>2+</sup>に関連するイオンチャネル及びトランスポーターが発現変化し、補完している可能性が考えられた。そこで Ca<sup>2+</sup>関連遺伝子について mRNA の発現量をリアルタイム定量 PCR 法により検討した。その結果、すべての遺伝子群において RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>で有意な差は見られなかった (RyR2: RyR3<sup>+/+</sup>  $0.06 \pm 0.005$ ,  $n=3$ ; RyR3<sup>-/-</sup>  $0.06 \pm 0.002$ ,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; VDCC□1c: RyR3<sup>+/+</sup>  $0.09 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ; RyR3<sup>-/-</sup>  $0.09 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; BK□: RyR3<sup>+/+</sup>  $0.12 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ; RyR3<sup>-/-</sup>  $0.11 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ; n.s.:  $p > 0.05$ ; IP<sub>3</sub>R1: RyR3<sup>+/+</sup>  $0.15 \pm 0.01$ ,  $n=3$ ; RyR3<sup>-/-</sup>  $0.13 \pm 0.01$ ,  $n=4$ ; n.s.:  $p > 0.05$ , 図 23B)。



**図 23 マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR 発現解析**

マウス腸間膜動脈平滑筋における RyR の各サブタイプの発現について、リアルタイム定量 PCR 法により検討した。

A: リアルタイム定量 PCR 法によって RyR2 ならびに各種 RyR3 の発現を比較した。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

B: RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>間で Ca<sup>2+</sup>関連遺伝子の発現量を比較した。

### 3-2-2. RyR3 遺伝子欠損による Caffeine 感受性への影響

RyR の活性化薬である Caffeine 感受性の検討を行った。単離した腸間膜動脈平滑筋細胞に対して  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬である fura-2 AM を付加することで、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を測定した。0.01 mM から 30 mM の Caffeine を投与し感受性を比較した (図 24A)。図 24 中には示していないが、静止状態における蛍光強度に差は見られなかった ( $F_{340}/F_{380}$ ; RyR3<sup>+/+</sup>:  $0.18 \pm 0.01$ , n=27; RyR3<sup>-/-</sup>:  $0.16 \pm 0.01$ , n=16;  $p > 0.05$ )。図 24B に示す用量-作用曲線から  $\text{EC}_{50}$  の値を求めたところ、RyR3<sup>-/-</sup>において RyR3<sup>+/+</sup>と比較して Caffeine 感受性は亢進していることが示された (RyR3<sup>+/+</sup>:  $2.0 \pm 0.2$  mM, n=27; RyR3<sup>-/-</sup>:  $1.1 \pm 0.1$  mM, n=16;  $p < 0.01$ , 図 24C)。以上のことから、RyR3<sup>-/-</sup>では Caffeine の感受性が亢進しており、RyR3<sup>+/+</sup>では DN-RyR3 がヘテロ 4 量体を組むことでその機能を抑制的に制御していることが推測された。

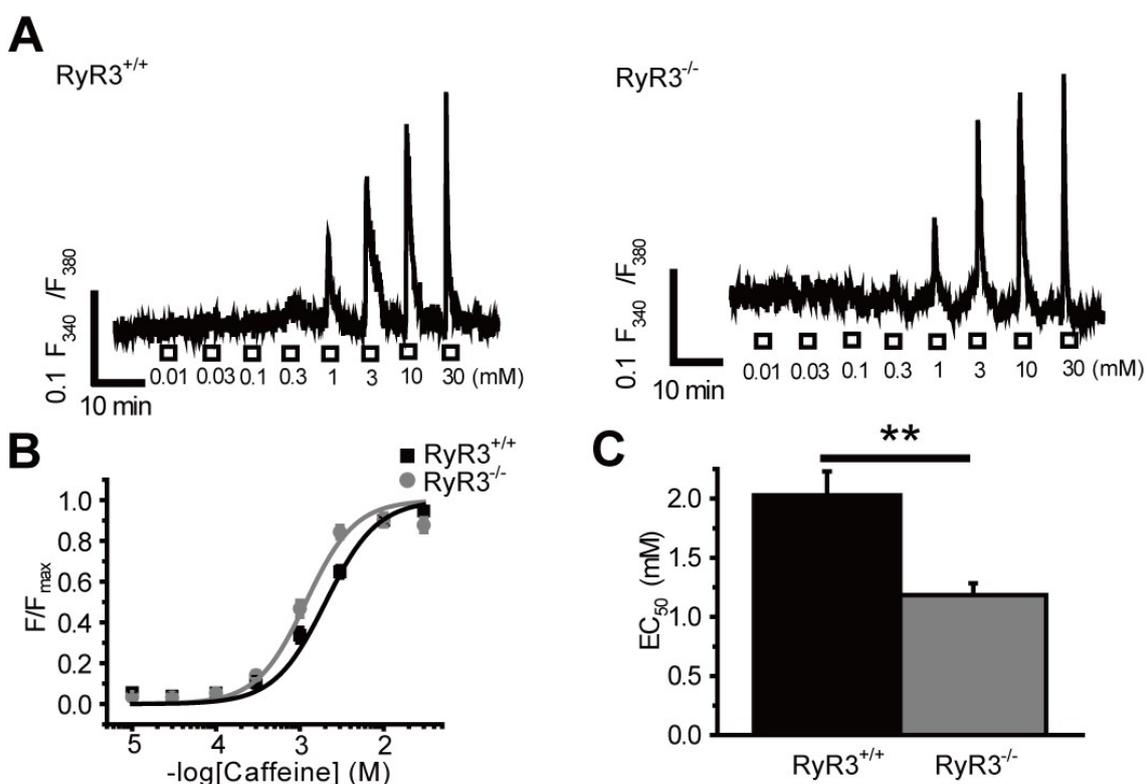


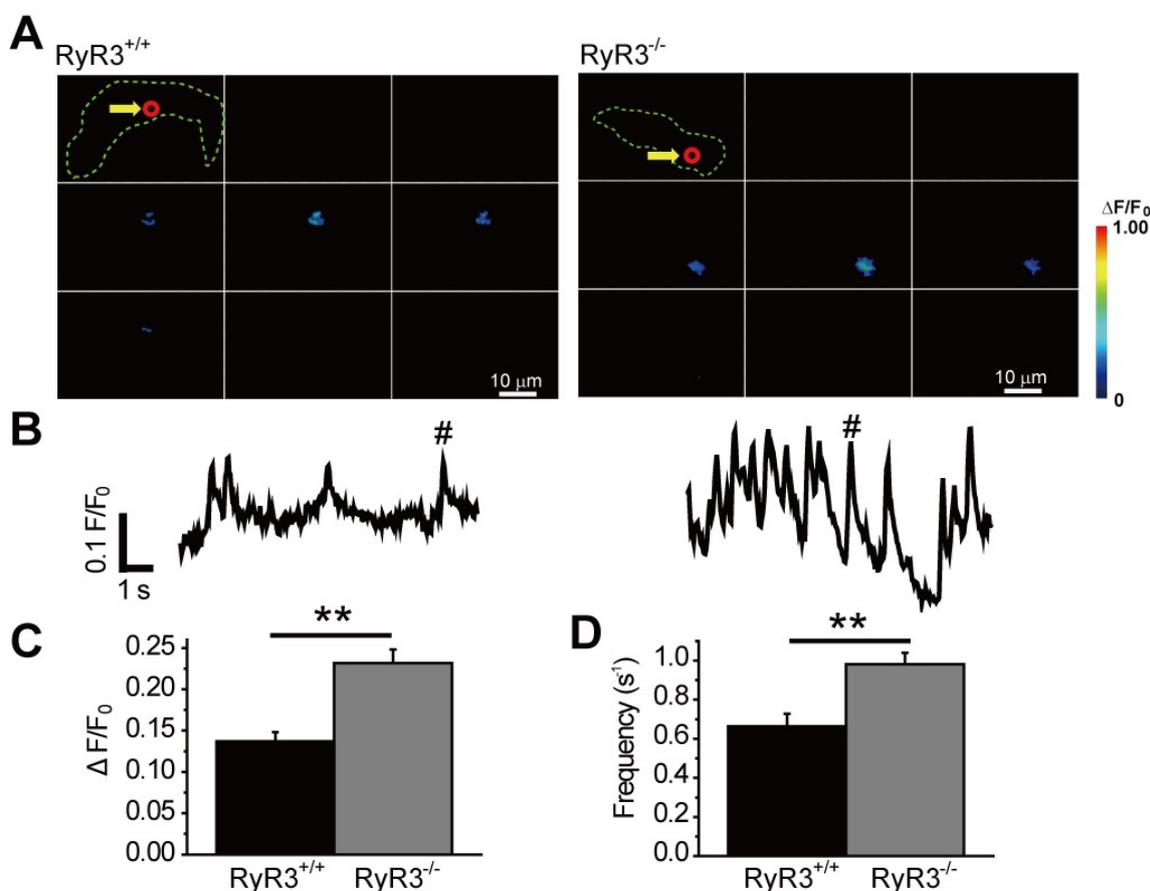
図 24 マウス腸間膜動脈平滑筋における Caffeine の感受性の解析

単離した腸間膜動脈平滑筋細胞に対し RyR 活性化薬 Caffeine を 0.01 mM から 30 mM まで累積投与し、Caffeine 感受性を検討した。

A : Caffeine を累積投与した際の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化の原図を示した。B : Caffeine の用量-作用曲線の比較を示した。C : 用量-作用曲線から求めた  $\text{EC}_{50}$  の比較を示した。\*\* $p < 0.01$ 。

### 3-2-3. RyR3 遺伝子欠損による Ca<sup>2+</sup> spark への影響

Ca<sup>2+</sup> spark-STOC による膜電位制御機構に対する RyR3 遺伝子欠損の影響を調べた。まず、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いて単離後 30 分以内の細胞から Ca<sup>2+</sup> spark を測定した。その結果、RyR3<sup>-/-</sup>では RyR3<sup>+/+</sup>と比較して Ca<sup>2+</sup> spark の Ca<sup>2+</sup>放出量及び発生頻度が有意に上昇していた (Amplitude: RyR3<sup>+/+</sup> 0.15±0.02, n=14; RyR3<sup>-/-</sup> 0.24±0.05, n=11; p<0.01, 図 25C; Frequency: RyR3<sup>+/+</sup> 0.66±0.06 Hz, n=14; RyR3<sup>-/-</sup> 0.97±0.06 Hz, n=11; p<0.01, 図 25D)。以上のことから、マウス腸間膜動脈において RyR3 は Ca<sup>2+</sup> spark を抑制的に制御していることが示された。



**図 25 マウス腸間膜動脈平滑筋細胞における Ca<sup>2+</sup> spark の解析**

単離した腸間膜動脈平滑筋細胞に fluo-4 AM を負荷し、TIRF 顕微鏡で蛍光画像を取得して [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化を検討した。

A : RyR3<sup>+/+</sup>及び RyR3<sup>-/-</sup>の腸間膜動脈平滑筋細胞における蛍光画像の時間経過の原図を示した。矢印は数値解析した 2 μm の○で示した測定領域を示している。B : A 中の赤い○内の測定領域における蛍光強度変化の原図を示した。#は A で示した Ca<sup>2+</sup> spark 解析画像が、どの時間の Ca<sup>2+</sup> spark に当たるかを示している。C : 蛍光強度変化の大きさを比較した。\*\*p<0.01. D : Ca<sup>2+</sup> spark の頻度を比較した。\*\*p<0.01.

### 3-2-4. RyR3 遺伝子欠損による STOC への影響

次に、単離した平滑筋にホールセルパッチクランプ法を行い、STOC を測定した。膜電流測定の際には、膜電位を-10mV に固定した。測定した電流成分は、BK チャネル特異的阻害薬である Pax により消失したことから、BK チャネル由来の STOC であることを確認した。その結果、RyR3<sup>-/-</sup>において RyR3<sup>+/+</sup>と比較して STOC の大きさが有意に増加していた (RyR3<sup>+/+</sup>: 25.6±2.1 pA, n=5; RyR3<sup>-/-</sup>: 35.0±2.6 pA, n=6; n.s.: p>0.05, 図 26B)。STOC の頻度についても有意に増加していた (RyR3<sup>+/+</sup>: 0.7±0.2 Hz, n=5; RyR3<sup>-/-</sup>: 1.9±0.2 Hz, n=6; p<0.01, 図 26C)。上記の 3-2-2, 3-2-3 の結果も踏まえ、マウス腸間膜動脈平滑筋では RyR2 や FL-RyR3 は発現が豊富な DN-RyR3 とヘテロ 4 量体を組むことでその機能を抑制的に制御されていることが明らかとなった。

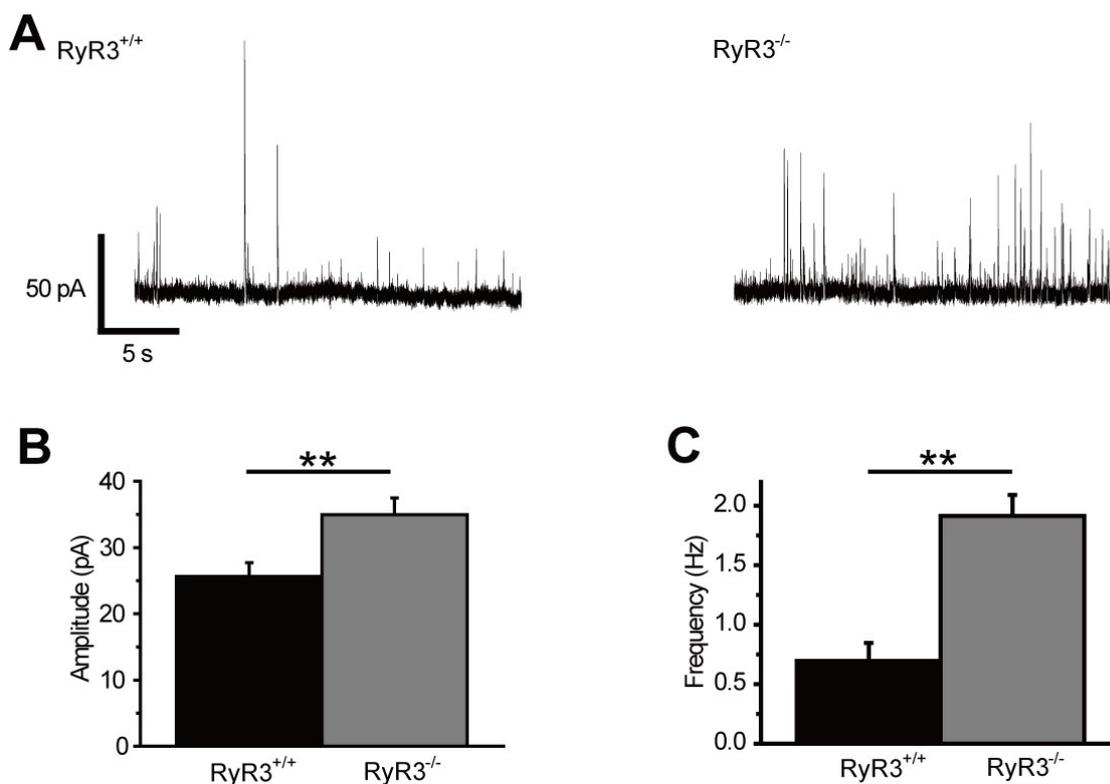


図 26 マウス腸間膜動脈平滑筋細胞における STOC の解析

A: RyR3<sup>+/+</sup>及び RyR3<sup>-/-</sup>の腸間膜動脈平滑筋細胞における STOC (保持電位-10 mV)の電流原図を示した。B: STOC の大きさの比較について示した。\*\*p<0.01. C: STOC の頻度の比較について示した。\*\*p<0.01.

### 3-2-5. RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析: VDCC 機能発現

RyR3<sup>-/-</sup>では代償的に VDCC や BK チャネルが発現変化し、Ca<sup>2+</sup> spark や STOC 活性に影響している可能性が考えられた。そこでホールセルパッチクランプ法を用いて機能的発現量の解析を行った。VDCC 電流を測定するために、細胞内液は K<sup>+</sup>を Cs<sup>+</sup>に置換し、K<sup>+</sup>チャネル阻害薬である TEA-Cl を加えることで K<sup>+</sup>電流を阻害した。細胞外液は Ca<sup>2+</sup>を Ba<sup>2+</sup>に置換することで電流を増強し測定を行った。Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬である 100 μM Cd<sup>2+</sup>投与前後の典型例な電流原図と、Cd<sup>2+</sup>感受性電流の電流密度-電圧曲線、+20mV における電流密度を示した (図 27A, B, C)。その結果、RyR3<sup>-/-</sup>の VDCC 電流密度は RyR3<sup>+/+</sup>と比較して有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: -7.5±1.2 pA/pF, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: -7.1±0.7 pA/pF, n=8; n.s.: p>0.05, 図 27D)。

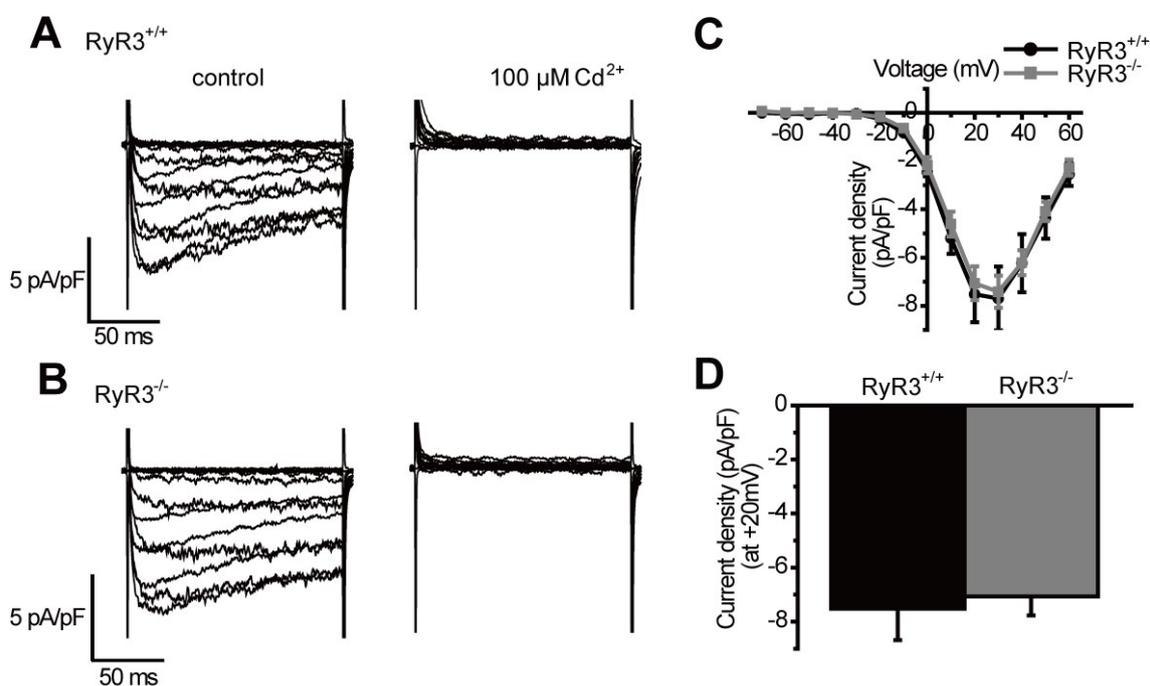


図 27 マウス腸間膜動脈平滑筋細胞における VDCC 機能解析

腸間膜動脈平滑筋細胞の VDCC 機能的発現量に対する RyR3 遺伝子欠損の影響を検討した。

A : RyR3<sup>+/+</sup> マウス由来の細胞に対し、保持電位 -60 mV で -70 mV から +60 mV まで 20 s ごとに +10 mV ずつ電位を変化させた際の際の原図を示した。左側に Control、右側に 100 μM Cd<sup>2+</sup> 投与後の電流の典型例を示した。B : A と同様の条件下で測定した RyR3<sup>-/-</sup> における測定原図を示した。C : 得られた電流から、Cd<sup>2+</sup> 感受性の電流成分についての電流密度 - 電圧曲線を示した。D : +20 mV における電流密度の比較を示した。

### 3-2-6. RyR3 遺伝子欠損による代償機構の解析: BK チャネル機能発現

また、同様に BK チャネルの測定を行った。BK チャネルを活性化するために細胞内液の  $[Ca^{2+}]_i$  を  $1 \mu M$  (pCa 6.0) に固定し、VDCC を介した細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を  $100 \mu M$   $Cd^{2+}$  で阻害した。BK チャネル特異的阻害薬である Pax を適用し、外向き電流、Pax 感受性電流、Pax 非感受性電流の電流原図 (図 28A, D, G) 及び電流密度-電圧曲線を示した (図 28B, E, H)。RyR3<sup>-/-</sup> の BK チャネル電流密度は RyR3<sup>+/+</sup> と比較して有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>:  $121.9 \pm 10.8$  pA/pF, n=5; RyR3<sup>-/-</sup>:  $134.4 \pm 7.7$  pA/pF, n=4; n.s.:  $p > 0.05$ , 図 28C, F, I)。以上の結果及び、「3-2-1」「3-2-5」の結果から RyR3<sup>-/-</sup> の腸間膜動脈平滑筋では  $Ca^{2+}$  関連のイオンチャネル、トランスポーターにおいて代償機構は働いていないことが示された。

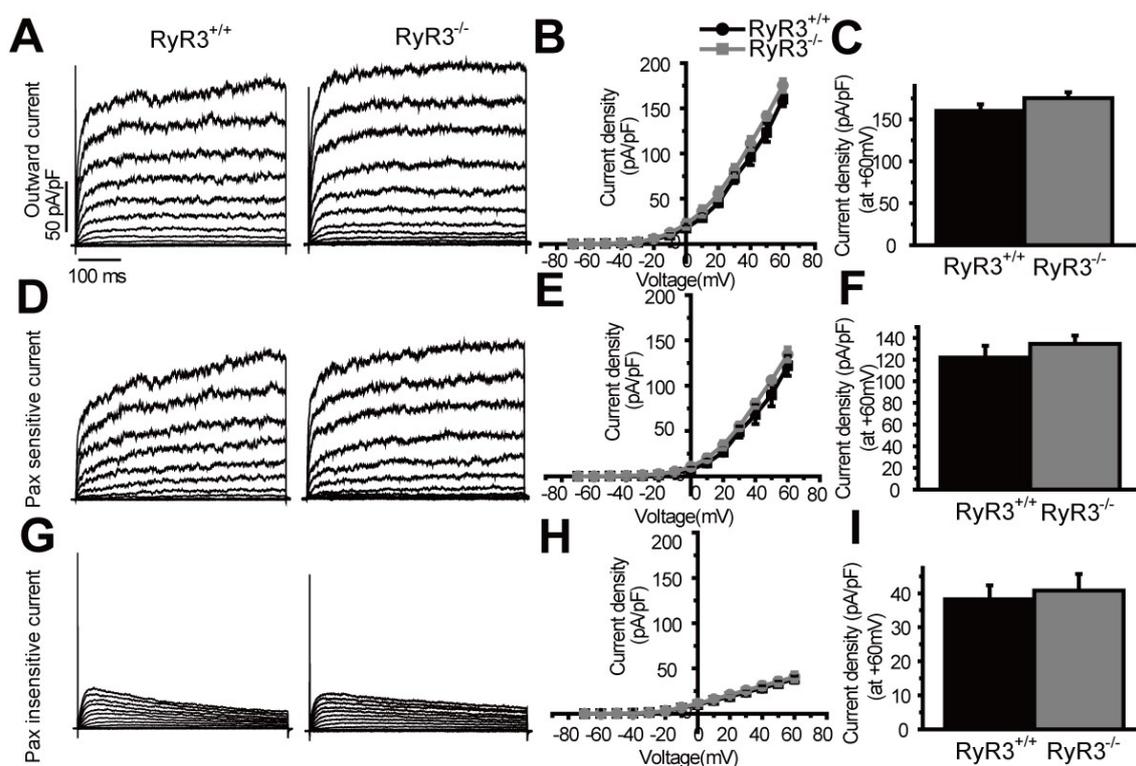


図 28 マウス腸間膜動脈平滑筋細胞における BK チャネル機能の解析

腸間膜動脈平滑筋細胞における BK チャネル電流量に対する RyR3 遺伝子欠損の影響を検討した。A, D, G: RyR3<sup>+/+</sup> 及び RyR3<sup>-/-</sup> における電流原図を示した。保持電位 -60 mV で -70 mV から +60 mV まで 20 s ごとに +10 mV ずつ電位を変化させた。外向き電流 (A)、Pax 感受電流 (D)、Pax 非感受性電流 (G) を示した。B, E, H: 得られた各電流成分について電流密度-電圧曲線を示した。外向き電流 (B)、Pax 感受電流 (E)、Pax 非感受性電流 (H)。C, F, I: 得られた各電流成分について +60 mV における電流密度の比較を示した。外向き電流 (C)、Pax 感受電流 (F)、Pax 非感受性電流 (I)。

### 3-2-7. 非観血的血圧測定

RyR3<sup>-/-</sup>において STOC 活性が増大していたことから、RyR3<sup>-/-</sup>の全身血圧に影響が出るものと考えられた。そこで非観血的血圧測定法である tail cuff 法を用いてマウスの全身血圧を測定した。その結果、予想とは異なり、RyR3<sup>+/+</sup> と RyR3<sup>-/-</sup>で収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧に有意な差は見られなかった (収縮期血圧 (SBP): RyR3<sup>+/+</sup> 107.2±2.7 mmHg, n=7; RyR3<sup>-/-</sup> 108.1±2.1 mmHg, n=15; n.s.: p>0.05; 平均血圧 (MBP): RyR3<sup>+/+</sup> 79.9±2.4 mmHg, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: 79.9±2.3 mmHg, n=15; n.s.: p>0.05; 拡張期血圧 (DBP), RyR3<sup>+/+</sup>: 66.2±2.9 mmHg, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: 65.9±2.8 mmHg, n=15; n.s.: p>0.05, 図 29A)。また、心拍数にも有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: 578±31, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: 573±20, n=15; n.s.: p>0.05, 図 29B)。以上のことから、腸間膜動脈における RyR3 は安静時血圧に対する影響が極めて少ないことが明らかとなった。

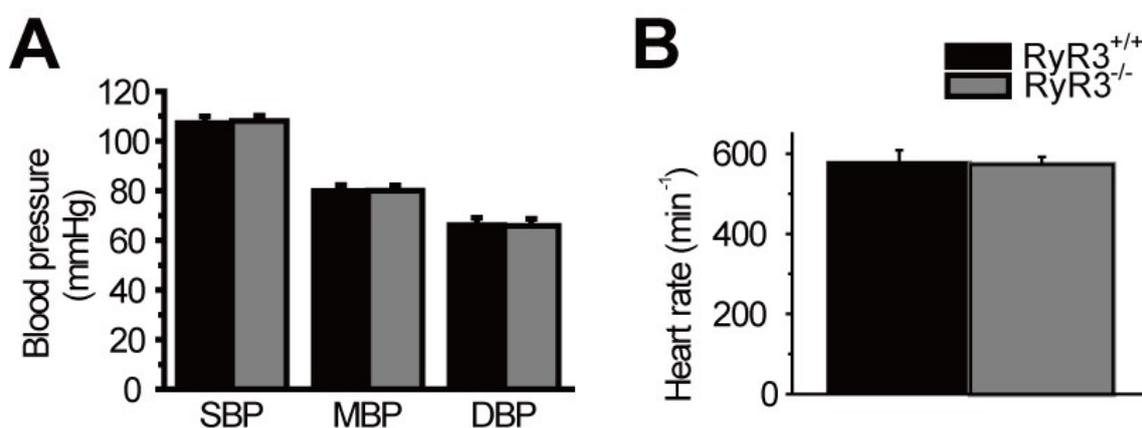


図 29 非観血的血圧測定

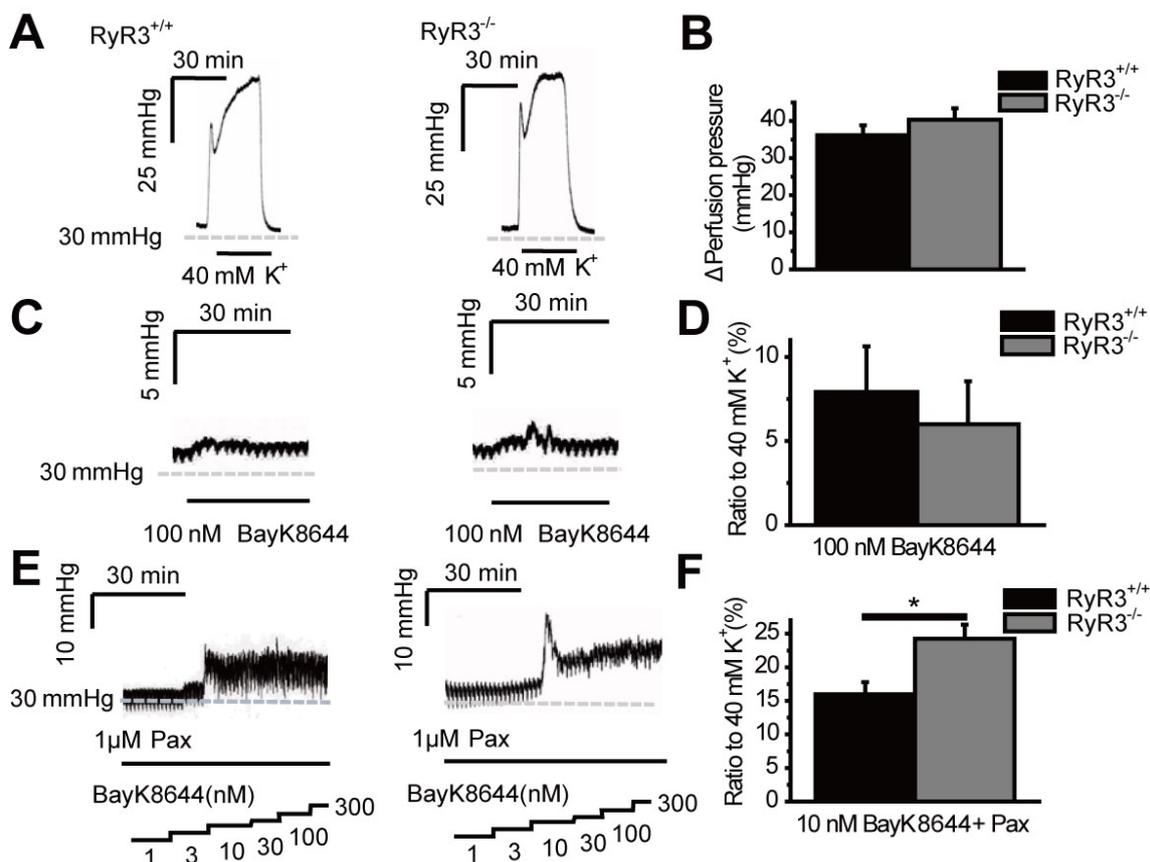
非観血的血圧測定 (tail cuff 法)を用いてマウスの血圧及び、心拍数の測定を行った。

A: 収縮期血圧 (SBP)、平均血圧 (MBP)、拡張期血圧 (DBP)の比較を示した。B: 心拍数の比較を示した。

### 3-2-8. 腸間膜動脈床灌流標本を用いた灌流圧測定

全身血圧の測定では神経性や反射性の応答等、外因的な影響が考えられた。そこで、より直接的に RyR3<sup>-/-</sup>の血管機能変化を明らかにするために、腸間膜動脈床の灌流圧測定を行った。摘出した腸間膜動脈床の第 1 枝から先端を切断した注射針を挿入し、圧トランスデューサーと接続して、電動ポンプで Krebs 溶液を標本に灌流させることで、末梢血管抵抗を測定した。その結果、40 mM K<sup>+</sup>溶液によって、脱分極刺激を行った際には RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>で有意な差は見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: 36.2±2.6 mmHg, n=14; RyR3<sup>-/-</sup>: 40.4±3.0 mmHg, n=12; n.s.: p>0.05, 図 30A, B)。また、VDCC 活性化薬である 100 nM BayK8644 の作用を調べたところ、灌流圧の変化はほとんど見られなかった (RyR3<sup>+/+</sup>: 7.9±2.7%, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: 6.0±2.6%, n=6; n.s.: p>0.05, 図 30C, D)。そこで、1 μM Pax で前処置を行い 1 nM から 300 nM BayK8644 を段階的に灌流したところ、灌流圧上昇が増大した。灌流圧の上昇がみられた 1 μM Pax +10 nM BayK8644 での灌流

圧上昇を比較したところ、RyR3<sup>+/+</sup>と比較してRyR3<sup>-/-</sup>において灌流圧上昇が有意に増加していた。(RyR3<sup>+/+</sup>: 16.0±1.8%, n=7; RyR3<sup>-/-</sup>: 24.2±2.1%, n=6; p<0.05, 図30E,F)。以上の結果からRyR3<sup>-/-</sup>ではBKチャネルによる負の帰還機構がRyR3<sup>+/+</sup>と比べて強く働いていることが示された。



### 図30 マウス腸間膜動脈床における灌流圧測定

摘出した腸間膜動脈床の第一枝にカニキュレを挿入し、灌流圧を測定した。

A: RyR3<sup>+/+</sup>及び RyR3<sup>-/-</sup>の腸間膜動脈床標本における灌流圧変化の原図を示した。40 mM K<sup>+</sup>による脱分極刺激により血管を収縮させた。B: 40 mM K<sup>+</sup>による脱分極刺激時の灌流圧変化の比較を示した。

C: 100 nM BayK8644 (図中では BayK)を作用させた際の灌流圧変化の測定原図を示した。D: 100 nM BayK8644 による灌流圧変化の比較を示した。

E: 1 μM Pax 存在下において BayK8644 を 1 nM から 300 nM まで累積投与した際の灌流圧変化の測定原図を示した。F: 1 μM Pax 存在下での 10 nM BayK8644 による灌流圧の上昇の比較を示した。\*p<0.05。

### 3-2-9. 要約及び考察

血管平滑筋の静止膜電位および筋張力を維持する機構として  $\text{Ca}^{2+}$  spark-STOC 連関が重要であり、RyR はその機構の中核を担うイオンチャネルである。平滑筋での RyR の主要なサブタイプは RyR2 であるが、RyR3 も平滑筋に広く発現し、RyR1 や RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出によって活性化され、さらなる  $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こす「増幅器」として機能していると考えられてきた [63, 99]。近年、DN-RyR3 の存在が明らかとなったが、血管平滑筋における機能は明らかになっていない。そこで本研究では RyR3<sup>-/-</sup>を用いて、パッチクランプ法による膜電流測定や筋張力測定、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定、血圧測定などの機能解析と、リアルタイム定量 PCR 法やウェスタンブロット法などによる発現解析を行った。

発現解析の結果、マウス腸間膜動脈平滑筋において RyR2 の発現が顕著に高く、RyR3 の発現も検出された。FL-RyR3 と DN-RyR3 の発現量を比較したところ、子宮平滑筋ほどではないものの、DN-RyR3 が FL-RyR3 よりも優位に発現していることが明らかとなった。本文中では示してはいないが、大腿動脈や腎動脈、門脈等の複数の血管平滑筋においても DN-RyR3 の発現を RT-PCR 法によって確認しており、部位によって FL-RyR3 と DN-RyR3 の比率も異なることから、広範な血管組織において DN-RyR3 が  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  制御に何らかの関わりを持つと考えられる。

RyR3 が腸間膜動脈平滑筋細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  放出機能にどのように関与するかを検討する為、RyR 活性化薬 Caffeine を累積投与し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を測定した。その結果、RyR3<sup>-/-</sup>では EC<sub>50</sub> の値が低濃度側にシフトし、Caffeine の感受性が亢進していることが明らかとなった。再構築系での報告によると Caffeine の感受性は RyR1 が 1~3 mM [75]、RyR2 が 1 mM [21]、RyR3 が 0.3~0.87 mM [38, 75] であり、DN-RyR3 と FL-RyR3 を共発現した場合には 2.4 mM と高濃度側にシフトすることが報告されている [38]。今回の値は RyR3<sup>-/-</sup>で約 1 mM と RyR2 の EC<sub>50</sub> に近く、RyR3<sup>+/+</sup>で約 2 mM と DN-RyR3 と FL-RyR3 を共発現した場合に近い値を示した。この結果から、マウス腸間膜動脈平滑筋では RyR3、特に DN-RyR3 が RyR2 や FL-RyR3 とヘテロ 4 量体を組むことで、RyR 機能を負に制御することが示唆された。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定やホールセルパッチクランプ法による解析の結果、RyR3<sup>-/-</sup>において  $\text{Ca}^{2+}$  spark の頻度及び、 $\text{Ca}^{2+}$  放出量が増大することが明らかとなった。それに関連し STOC の頻度及び大きさも RyR3<sup>-/-</sup>において増大していた。mRNA 発現解析の結果から、腸間膜動脈平滑筋では FL-RyR3 の発現量は極めて低く、DN-RyR3 の発現量が相対的に高いことが示唆されている。DN-RyR3 は RyR2 とヘテロ 4 量体を組むことにより、RyR2 の活性を抑制制御することが報告されていて [38]、腸間膜動脈平滑筋では RyR3<sup>+/+</sup>では、DN-RyR3 が RyR2 (および FL-RyR3) とヘテロ 4 量体を組むことで  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機能を抑制していると考えられる (図 31A)。RyR3<sup>-/-</sup>では、RyR3 の欠損により、DN-RyR3 の RyR2 に対する抑制機構が消失し、RyR2 がホモ 4 量体を形成することに

より、RyR3<sup>-/-</sup>由来の腸間膜動脈平滑筋細胞では Caffeine 感受性及び Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 活性が亢進した (図 31B) と考えられる。

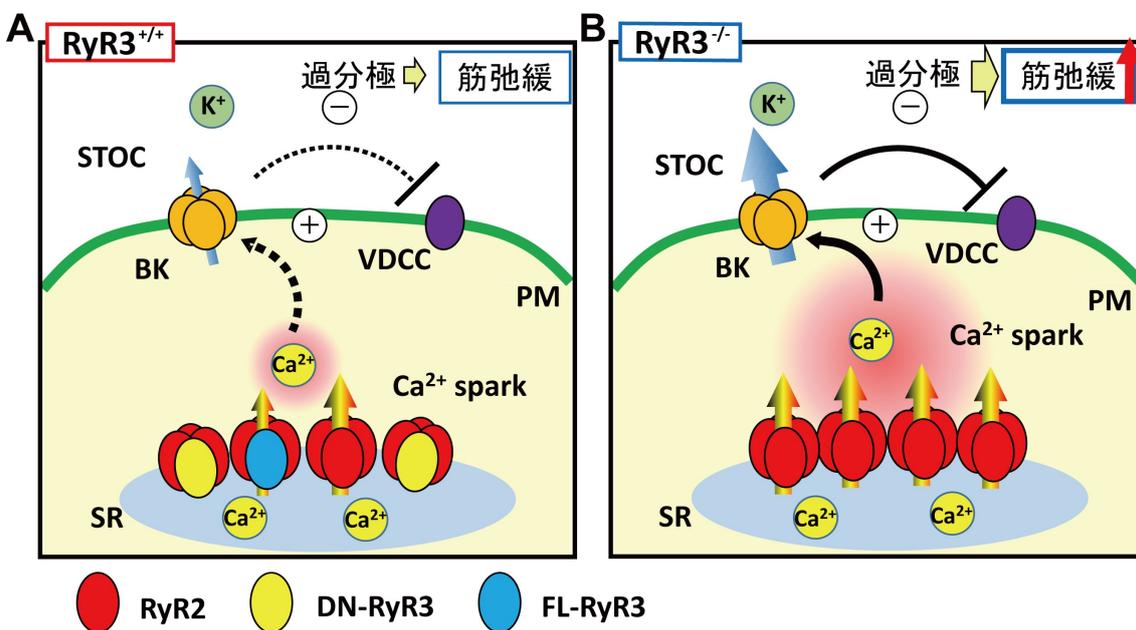


図 31 腸間膜動脈平滑筋における RyR3 の機能模式図

A : RyR3<sup>+/+</sup>における Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 連関の模式図。DN-RyR3 が RyR2 とヘテロ 4 量体を組むことで Ca<sup>2+</sup>遊離機能を抑制している。B : RyR3<sup>-/-</sup>における Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 連関の模式図。RyR3 の欠損により抑制が解除され、Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 活性が亢進する。

腸間膜動脈は血圧の制御に関わる抵抗血管に分類される。RyR3<sup>-/-</sup>において Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 活性が増大していたことから、全身血圧に何らかの異常が生じることが考えられた。しかし、非観血的血圧測定法でマウスの全身血圧を測定した結果、RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の間で収縮期血圧、平均血圧、拡張期血圧に有意な差は見られなかった。この原因として、RyR3 が中枢神経系に多く発現するため、血圧制御に関わる神経系に RyR3 遺伝子欠損の影響が表れた可能性がある[15, 33]。そこで、中枢神経系の影響を除いた腸間膜動脈床の灌流圧測定を行い RyR3 の寄与を検討した結果、RyR3<sup>+/+</sup>と RyR3<sup>-/-</sup>の間で脱分極刺激や VDCC 活性化薬 (BayK8644)、BK チャネル阻害薬 (Pax)による灌流圧上昇に有意な差は見られなかった。しかし、BK チャネル阻害薬存在下で VDCC 活性化薬を投与した際の灌流圧上昇について、RyR3<sup>-/-</sup>において有意に増加していた。この結果は、①RyR3<sup>-/-</sup>において Bayk8644 単独投与下では、増大した BK チャネル活性 (STOC の増加)により膜電位が過分極方向に保たれ、結果として VDCC 活性が抑えられたと考えられる。さらに、②Pax+BayK8644 投与下では、BK チャネルによる VDCC 活性への抑制機構がなくなり、RyR3<sup>+/+</sup>よりも大きい灌流圧上昇が起こったと考えられる。この際、RyR3<sup>-/-</sup>において灌流圧上昇が大きかったことから、RyR2 活性の上昇により、Ca<sup>2+</sup> spark のみならず CICR 機構も増強していた可能性がある。RyR3 遺伝子の欠損により、Ca<sup>2+</sup> spark-STOC 活性の増強 (血管平滑筋張力の減少に寄与する)と、RyR2

の CICR 活性の増強（血管平滑筋張力の増加に寄与する）という相反する機能変化が起きたことにより全身血圧に影響が見られなかったのではないかと考える。RyR、特に RyR3 と血圧の関係についてはほとんど研究されていない。自然発症型高血圧ラットの血管平滑筋において Caffeine 誘発性の  $Ca^{2+}$ 遊離が亢進している[60]ことから RyR の活性が亢進している可能性が考えられる。RyR2 や FL-RyR3 の発現変化ではなく、DN-RyR3 の発現が減少することで Caffeine 誘発性の  $Ca^{2+}$ 遊離が亢進している可能性が考えられる。将来的には、DN-RyR3 のスプライシング機構や発現制御に働きかける薬を開発することで、DN-RyR3 の発現を高め、血管の興奮性を制御し、血圧をコントロールすることができると考える。

FL-RyR3 はホモ 4 量体を組むことで機能的な  $Ca^{2+}$ 遊離チャネルとして働いており、骨格筋[8, 99]や海馬神経細胞[15]においては $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の伝播に寄与している。十二指腸では FL-RyR3 を発現抑制することで  $Ca^{2+}$ 遊離機能が低下することから、機能発現していることが報告されている[20]。一方で、門脈平滑筋では RyR3 の発現抑制で CICR や Caffeine 誘発性の  $Ca^{2+}$ 遊離に影響しないことから[17]、組織ごとに RyR3 の機能は異なっていると考えられる。

腸間膜動脈平滑筋において、DN-RyR3 は RyR2 や FL-RyR3 とヘテロ 4 量体を組むことで SR からの  $Ca^{2+}$ 遊離を抑制的に制御しており、細胞膜電位や血管張力の維持機構に対して負の制御因子として寄与していることを見出した。DN-RyR3 による RyR2 活性の阻害様式として以下の 2 つが考えられる。①DN-RyR3 が RyR2 とヘテロ 4 量体を形成することで、単一チャネルコンダクタンスや開口確率が減少した可能性がある。欠損した膜貫通部位 S1 領域は S2-S3 loop と相互作用していると考えられる[23]。この S2-S3 loop は細胞質側領域中心部のカルモジュリン感受性ドメインや C 末端領域に近接しており、これらの相互作用を介してコンフォメーション変化に関わると考えられる[101]。その為、S1 領域の欠損によりドメイン間の連携が崩壊し、機能が低下していると推測される。②DN-RyR3 とのヘテロ 4 量体形成により、細胞内外の  $Ca^{2+}$ 感受性の低下した可能性が考えられる。RyR の  $Ca^{2+}$ 感受性には欠損した S1 領域が関与している可能性が考えられている[22]。実際に、S1 領域の 4496 番目のアルギニンを変異させることで  $Ca^{2+}$  spark の活性が変化することから[25]、S1 領域の欠損により、RyR ヘテロ 4 量体の  $Ca^{2+}$ 感受性が低下した可能性がある。

本研究では単離細胞と摘出した組織を用いて検討を行ってきた。酵素による細胞単離法は古くから用いられており、酵素処理により収縮性を保った細胞が単離され、現代まで様々な細胞種で単離法が改良され使用されてきた[55-57]。しかしながら、単離細胞と生体内では機能が違うのではないかと議論されている。例えば、酵素処理により細胞膜上の受容体が傷害される可能性や、生体内で起きている細胞同士の結合による情報伝達やコミュニケーションが単離細胞では見られない等、生体内と異なる可能性が考えられる。このような意見もあるが、単離細胞を用いる利点としてはより単純な系で収縮機

構を計測できる点や、パッチクランプ法によりイオンの動態を検証できる点、 $[Ca^{2+}]_i$ の2次元画像解析法により  $Ca^{2+}$  spark 等の局所での現象をより高い解像度でとらえるのに適している点あげられる。その為、RyRによる細胞内  $Ca^{2+}$ 動態を明らかにする上で、細胞単離法は、適した手法である。さらに、細胞からの情報のみではなく、組織での検討、生体での検討を合わせて機能解析を行うことでより強く生理機能を解明できると考える。本研究の単離細胞で得られた結果は、組織を用いた検討でも、同様の知見を得ており、細胞と組織の両方から検証を行うことで、より強く RyR の生理的意義を示すことができたと考える。

従来の概念では、RyR3は  $Ca^{2+}$ 感受性が低いため、RyR2を起点として生じた CICR によって活性化されて  $Ca^{2+}$ 放出を起こす「増幅器」として働くと考えられてきた。しかし、本研究成果により、血管平滑筋において DN-RyR3が重要な意味を持ち、RyR2や FL-RyR3に対し「負の制御因子」としての役割を持つことが明らかになった。今後は各種の循環器疾患病態において血管平滑筋の性質が変化する際の、RyR3 (FL-RyR3および DN-RyR3)発現や RyR 機能の変化を詳細に解析することで、RyRによる血管の異常興奮性が関連した各種の循環器疾患病態の治療に役立つと考える。

## 第4章 総括

これまで3型リアノジン受容体 (RyR3) を介した  $\text{Ca}^{2+}$  放出が子宮平滑筋の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態に寄与すると考えられてきたが[18]、RyR3 遺伝子欠損マウス (RyR3<sup>-/-</sup>) を用いた本研究により RyR3 は子宮平滑筋機能に対する寄与が極めて少ないことが明らかになった。非妊娠期にはドミナントネガティブ型 RyR3 (DN-RyR3) が野生型 RyR3 (FL-RyR3) の機能を抑制しており、妊娠期には RyR3 の発現量自体が減少するため、RyR3 は子宮平滑筋の収縮に関与せず、むしろ電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル (VDCC) を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入及びイノシトール3リン酸受容体 (IP<sub>3</sub>R) からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が必須であると考えられる。

腸間膜動脈平滑筋においては、主に DN-RyR3 によって RyR2 からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が抑制的に制御されており、①  $\text{Ca}^{2+}$  spark-自発一過性外向き電流 (STOC) 活性の抑制による静止膜電位の制御と、②  $\text{Ca}^{2+}$  誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離 (CICR) 活性の抑制による興奮性の抑制という2つの機能により、血管平滑筋の張力調節機構に関与していると考えられる。

異なる2つの平滑筋から得られた知見から、2型 RyR (RyR2) や FL-RyR3、DN-RyR3 の発現比率によって細胞の興奮性を調節していると考えている。狭心症、心筋梗塞、脳血管攣縮などの原因の1つに動脈硬化があるが、その他に急性の血管収縮も原因の1つである。また、高血圧では慢性的な血管の収縮が起きており、血管の異常興奮性が種々の疾患に関与している。その為、DN-RyR3 の発現制御を治療ターゲットとすることで、血管平滑筋の興奮性を制御し、血管攣縮や血管狭窄を抑えることができると考えている。さらに、平滑筋以外にも RyR3 は脳や神経系で多く発現していて、アルツハイマー病やパーキンソン症候群などの治療法が確立されていない難治性の神経変性疾患でも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態の異常が関わることを報告されている。RyR3 もその一部に関与することが報告されていて[15, 81, 82]、特にアルツハイマー病患者の脳では健常者と比べて DN-RyR3 の発現量が低下し、FL-RyR3 の相対的発現量が高まることで、神経細胞の RyR からの異常な  $\text{Ca}^{2+}$  放出が亢進し、細胞死が進行すると考えられている[11]。その為、DN-RyR3 の発現やスプライシング機構の制御を治療ターゲットとすることで、神経の異常興奮の抑制に繋がり、神経変性疾患の治療に有用であると考えられる。また、遺伝子解析により、DN-RyR3 の発現解析が可能となれば、血管の収縮異常や神経変性疾患のリスク診断にもつながるのではないかと考える。

今回得られた知見が、DN-RyR3 による細胞の興奮性制御及び、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態制御を解明する上で、重要な知見になりうると考える。

## 第 5 章 謝辞

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

本論文の作成にあたり、有益な御助言および御校閲を頂きました名古屋市立大学大学院 薬学研究科 木村 和哲 教授、平嶋 尚英 教授、松永 民秀 教授ならびに朝霧 成挙 准教授に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、**RyR3** 遺伝子欠損マウスを提供していただき、また終始有益な御指導、御助言を賜りました京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野 竹島 浩 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、御助言を賜りました名古屋市立大学大学院 医学研究科 大矢 進 教授、名古屋市立大学大学院 薬学研究科 山村 寿男 准教授ならびに鈴木 良明 助教に深謝致します。

本研究にあたり、御協力を頂い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及び教室員諸氏に心より感謝致します。

本研究に供された多くの動物の冥福を心より祈ります。

## 第 6 章 引用文献

- [1] **Aguilar HN and Mitchell BF.** Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 16: 725-744, 2010.
- [2] **Augustine GJ, Santamaria F, and Tanaka K.** Local calcium signaling in neurons. *Neuron* 40: 331-346, 2003.
- [3] **Balschun D, Wolfer DP, Bertocchini F, Barone V, Conti A, Zuschratter W, Missiaen L, Lipp HP, Frey JU, and Sorrentino V.** Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. *EMBO J* 18: 5264-5273, 1999.
- [4] **Beam KG and Franzini-Armstrong C.** Functional and structural approaches to the study of excitation-contraction coupling. *Methods Cell Biol* 52: 283-306, 1997.
- [5] **Benkusky NA, Fergus DJ, Zuccherro TM, and England SK.** Regulation of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive domains of the maxi-K channel in the mouse myometrium during gestation. *J Biol Chem* 275: 27712-27719, 2000.
- [6] **Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, and Golovina VA.** Ca<sup>2+</sup> handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C779-790, 2008.
- [7] **Berridge MJ.** Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *J Physiol* 592: 281-293, 2014.
- [8] **Bertocchini F, Ovitt CE, Conti A, Barone V, Scholer HR, Bottinelli R, Reggiani C, and Sorrentino V.** Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *EMBO J* 16: 6956-6963, 1997.
- [9] **Bolton TB and Imaizumi Y.** Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell Calcium* 20: 141-152, 1996.

- [10] **Bolton TB, Prestwich SA, Zholos AV, and Gordienko DV.** Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol* 61: 85-115, 1999.
- [11] **Bruno AM, Huang JY, Bennett DA, Marr RA, Hastings ML, and Stutzmann GE.** Altered ryanodine receptor expression in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 1001 e1001-1006, 2012.
- [12] **Challis JR, Osathanondh R, Ryan KJ, and Tulchinsky D.** Maternal and fetal plasma prostaglandin levels at vaginal delivery and cesarean section. *Prostaglandins* 6: 281-288, 1974.
- [13] **Cheng H and Lederer WJ.** Calcium sparks. *Physiol Rev* 88: 1491-1545, 2008.
- [14] **Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, and Rutter WJ.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
- [15] **Chung KM, Jeong EJ, Park H, An HK, and Yu SW.** Mediation of autophagic cell death by type 3 ryanodine receptor (RyR3) in adult hippocampal neural stem cells. *Front Cell Neurosci* 10: 116, 2016.
- [16] **Collier ML, Ji G, Wang Y, and Kotlikoff MI.** Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J Gen Physiol* 115: 653-662, 2000.
- [17] **Coussin F, Macrez N, Morel JL, and Mironneau J.** Requirement of ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in vascular myocytes. *J Biol Chem* 275: 9596-9603, 2000.
- [18] **Dabertrand F, Fritz N, Mironneau J, Macrez N, and Morel JL.** Role of RYR3 splice variants in calcium signaling in mouse nonpregnant and pregnant myometrium. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C848-854, 2007.

- [19] **Dabertrand F, Mironneau J, Macrez N, and Morel JL.** Full length ryanodine receptor subtype 3 encodes spontaneous calcium oscillations in native duodenal smooth muscle cells. *Cell Calcium* 44: 180-189, 2008.
- [20] **Dabertrand F, Morel JL, Sorrentino V, Mironneau J, Mironneau C, and Macrez N.** Modulation of calcium signalling by dominant negative splice variant of ryanodine receptor subtype 3 in native smooth muscle cells. *Cell Calcium* 40: 11-21, 2006.
- [21] **Du GG, Imredy JP, and MacLennan DH.** Characterization of recombinant rabbit cardiac and skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channels (ryanodine receptors) with a novel [3H]ryanodine binding assay. *J Biol Chem* 273: 33259-33266, 1998.
- [22] **Du GG, Khanna VK, and MacLennan DH.** Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 275: 11778-11783, 2000.
- [23] **Efremov RG, Leitner A, Aebersold R, and Raunser S.** Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature* 517: 39-43, 2015.
- [24] **Fabiato A.** Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 85: 291-320, 1985.
- [25] **Fernandez-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, and Gomez AM.** Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 104: 201-209, 212p following 209, 2009.
- [26] **Fetalvero KM, Zhang P, Shyu M, Young BT, Hwa J, Young RC, and Martin KA.** Prostacyclin primes pregnant human myometrium for an enhanced contractile response in parturition. *J Clin Invest* 118: 3966-3979, 2008.
- [27] **Foskett JK, White C, Cheung KH, and Mak DO.** Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev* 87: 593-658, 2007.

- [28] **Frazier HN, Maimaiti S, Anderson KL, Brewer LD, Gant JC, Porter NM, and Thibault O.** Calcium's role as nuanced modulator of cellular physiology in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 483: 981-987, 2017.
- [29] **Fuchs AR, Romero R, Keefe D, Parra M, Oyarzun E, and Behnke E.** Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol* 165: 1515-1523, 1991.
- [30] **Futatsugi A, Kato K, Ogura H, Li ST, Nagata E, Kuwajima G, Tanaka K, Itohara S, and Mikoshiba K.** Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *Neuron* 24: 701-713, 1999.
- [31] **Galeotti N, Vivoli E, Bartolini A, and Ghelardini C.** A gene-specific cerebral types 1, 2, and 3 RyR protein knockdown induces an antidepressant-like effect in mice. *J Neurochem* 106: 2385-2394, 2008.
- [32] **Greenwood IA, Yeung SY, Tribe RM, and Ohya S.** Loss of functional K<sup>+</sup> channels encoded by ether-a-go-go-related genes in mouse myometrium prior to labour onset. *J Physiol* 587: 2313-2326, 2009.
- [33] **Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, and Imoto K.** Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 312: 229-235, 1992.
- [34] **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100, 1981.
- [35] **Hotta S, Morimura K, Ohya S, Muraki K, Takeshima H, and Imaizumi Y.** Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. *J Physiol* 582: 489-506, 2007.
- [36] **Imaizumi Y, Torii Y, Ohi Y, Nagano N, Atsuki K, Yamamura H, Muraki K, Watanabe M, and Bolton TB.** Ca<sup>2+</sup> images and K<sup>+</sup> current during depolarization in smooth muscle cells of the guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* 510 ( Pt 3): 705-719, 1998.

- [37] **Imaizumi Y and Watanabe M.** Effect of 4-aminopyridine on potassium permeability of canine tracheal smooth muscle cell membrane. *Jpn J Pharmacol* 33: 201-208, 1983.
- [38] **Jiang D, Xiao B, Li X, and Chen SR.** Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3 Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 278: 4763-4769, 2003.
- [39] **Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, and Sato K.** Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 49: 157-230, 1997.
- [40] **Knittle TJ, Doyle KL, and Tamkun MM.** Immunolocalization of the mNa<sub>v</sub>2.3 Na<sup>+</sup> channel in mouse heart: upregulation in myometrium during pregnancy. *Am J Physiol* 270: C688-696, 1996.
- [41] **Kouzu Y, Moriya T, Takeshima H, Yoshioka T, and Shibata S.** Mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 142-150, 2000.
- [42] **Kunerth S, Langhorst MF, Schwarzmann N, Gu X, Huang L, Yang Z, Zhang L, Mills SJ, Zhang LH, Potter BV, and Guse AH.** Amplification and propagation of pacemaker Ca<sup>2+</sup> signals by cyclic ADP-ribose and the type 3 ryanodine receptor in T cells. *J Cell Sci* 117: 2141-2149, 2004.
- [43] **Laporte R, Hui A, and Laher I.** Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 56: 439-513, 2004.
- [44] **Leake RD, Weitzman RE, Glatz TH, and Fisher DA.** Plasma oxytocin concentrations in men, nonpregnant women, and pregnant women before and during spontaneous labor. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 730-733, 1981.
- [45] **Lee SE, Ahn DS, and Lee YH.** Role of T-type Ca<sup>2+</sup> Channels in the Spontaneous Phasic Contraction of Pregnant Rat Uterine Smooth Muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* 13: 241-249, 2009.

- [46] **Lukyanenko V, Gyorke I, Subramanian S, Smirnov A, Wiesner TF, and Gyorke S.** Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks by ruthenium red in permeabilized rat ventricular myocytes. *Biophys J* 79: 1273-1284, 2000.
- [47] **Madsen G, Zakar T, Ku CY, Sanborn BM, Smith R, and Mesiano S.** Prostaglandins differentially modulate progesterone receptor-A and -B expression in human myometrial cells: evidence for prostaglandin-induced functional progesterone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 1010-1013, 2004.
- [48] **Martin C, Hyvelin JM, Chapman KE, Marthan R, Ashley RH, and Savineau JP.** Pregnant rat myometrial cells show heterogeneous ryanodine- and caffeine-sensitive calcium stores. *Am J Physiol* 277: C243-252, 1999.
- [49] **McCloskey C, Rada C, Bailey E, McCavera S, van den Berg HA, Atia J, Rand DA, Shmygol A, Chan YW, Quenby S, Brosens JJ, Vatish M, Zhang J, Denton JS, Taggart MJ, Kettleborough C, Tickle D, Jerman J, Wright P, Dale T, Kanumilli S, Trezise DJ, Thornton S, Brown P, Catalano R, Lin N, England SK, and Blanks AM.** The inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channel KIR7.1 controls uterine excitability throughout pregnancy. *EMBO Mol Med* 6: 1161-1174, 2014.
- [50] **McKillen K, Thornton S, and Taylor CW.** Oxytocin increases the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sensitivity of human myometrium during the falling phase of phasic contractions. *Am J Physiol* 276: E345-351, 1999.
- [51] **Meissner G.** Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56: 485-508, 1994.
- [52] **Mesonero JE, Tanfin Z, Hilly M, Colosetti P, Mauger JP, and Harbon S.** Differential expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1, 2, and 3 in rat myometrium and endometrium during gestation. *Biol Reprod* 63: 532-537, 2000.
- [53] **Mironneau J, Macrez N, Morel JL, Sorrentino V, and Mironneau C.** Identification and function of ryanodine receptor subtype 3 in non-pregnant mouse myometrial cells. *J Physiol* 538: 707-716, 2002.

- [54] **Mitchell MD.** Prostaglandins during pregnancy and the perinatal period. *J Reprod Fertil* 62: 305-315, 1981.
- [55] **Momose K and Gomi Y.** Studies on isolated smooth muscle cells. I. Continuous observation of contraction of single smooth muscle cells isolated from vas deferens of guinea pig. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 25: 2449-2451, 1977.
- [56] **Momose K and Gomi Y.** Studies on isolated smooth muscle cells. II. Potentiation of calcium contraction of isolated smooth muscle cells from vas deferens of guinea pig by cocaine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 26: 302-304, 1978.
- [57] **Momose K, Otsuka H, Higashikawa S, and Gomi Y.** Studies on isolated smooth muscle cells. VII. Response to agonists and the contraction velocity of taenia coli of guinea pig and the single smooth muscle cells. *J Pharmacobiodyn* 4: 670-676, 1981.
- [58] **Monaghan K, Baker SA, Dwyer L, Hatton WC, Sik Park K, Sanders KM, and Koh SD.** The stretch-dependent potassium channel TREK-1 and its function in murine myometrium. *J Physiol* 589: 1221-1233, 2011.
- [59] **Morimura K, Ohi Y, Yamamura H, Ohya S, Muraki K, and Imaizumi Y.** Two-step  $Ca^{2+}$  intracellular release underlies excitation-contraction coupling in mouse urinary bladder myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C388-403, 2006.
- [60] **Moriyama K, Osugi S, Shimamura K, and Sunano S.** Caffeine-induced contraction in arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 26: 280-289, 1989.
- [61] **Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ, and Lederer WJ.** Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270: 633-637, 1995.
- [62] **Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, and Matzuk MM.** Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11699-11704, 1996.
- [63] **Ogawa Y, Kurebayashi N, and Murayama T.** Putative roles of type 3 ryanodine receptor isoforms (RyR3). *Trends Cardiovasc Med* 10: 65-70, 2000.

- [64] **Ohi Y, Yamamura H, Nagano N, Ohya S, Muraki K, Watanabe M, and Imaizumi Y.** Local  $\text{Ca}^{2+}$  transients and distribution of BK channels and ryanodine receptors in smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *J Physiol* 534: 313-326, 2001.
- [65] **Ohya S, Takii T, Yamazaki HF, Matsumori M, Onozaki K, Watanabe M, and Imaizumi Y.** Molecular cloning of a novel gene involved in serotonin receptor-mediated signal transduction in rat stomach. *FEBS Lett* 401: 252-258, 1997.
- [66] **Otsuki Y, Yamaji K, Fujita M, Takagi T, and Tanizawa O.** Serial plasma oxytocin levels during pregnancy and labor. *Acta Obstet Gynecol Scand* 62: 15-18, 1983.
- [67] **Ou CW, Orsino A, and Lye SJ.** Expression of connexin-43 and connexin-26 in the rat myometrium during pregnancy and labor is differentially regulated by mechanical and hormonal signals. *Endocrinology* 138: 5398-5407, 1997.
- [68] **Ozaki H, Yasuda K, Kim YS, Egawa M, Kanzaki H, Nakazawa H, Hori M, Seto M, and Karaki H.** Possible role of the protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation. *Br J Pharmacol* 140: 1303-1312, 2003.
- [69] **Parekh AB.**  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains near plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channels: impact on cell function. *J Physiol* 586: 3043-3054, 2008.
- [70] **Paula-Lima AC, Adasme T, SanMartin C, Sebollela A, Hetz C, Carrasco MA, Ferreira ST, and Hidalgo C.** Amyloid beta-peptide oligomers stimulate RyR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. *Antioxid Redox Signal* 14: 1209-1223, 2011.
- [71] **Perez GJ, Bonev AD, Patlak JB, and Nelson MT.** Functional coupling of ryanodine receptors to  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J Gen Physiol* 113: 229-238, 1999.
- [72] **Pierce SL, Kresowik JD, Lamping KG, and England SK.** Overexpression of SK3 channels dampens uterine contractility to prevent preterm labor in mice. *Biol Reprod* 78: 1058-1063, 2008.

- [73] **Prevost M, Zelkowitz P, Tulandi T, Hayton B, Feeley N, Carter CS, Joseph L, Pournajafi-Nazarloo H, Yong Ping E, Abenhaim H, and Gold I.** Oxytocin in pregnancy and the postpartum: relations to labor and its management. *Front Public Health* 2: 1, 2014.
- [74] **Rios E, Pizarro G, and Stefani E.** Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 54: 109-133, 1992.
- [75] **Rossi D, Simeoni I, Micheli M, Bootman M, Lipp P, Allen PD, and Sorrentino V.** RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca<sup>2+</sup> signals in HEK 293 cells. *J Cell Sci* 115: 2497-2504, 2002.
- [76] **Savineau JP and Mironneau J.** Caffeine acting on pregnant rat myometrium: analysis of its relaxant action and its failure to release Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. *Br J Pharmacol* 99: 261-266, 1990.
- [77] **Shmigol AV, Eisner DA, and Wray S.** Properties of voltage-activated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. *J Physiol* 511 ( Pt 3): 803-811, 1998.
- [78] **Smith RC, McClure MC, Smith MA, Abel PW, and Bradley ME.** The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reprod Biol Endocrinol* 5: 41, 2007.
- [79] **Soeller C, Crossman D, Gilbert R, and Cannell MB.** Analysis of ryanodine receptor clusters in rat and human cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14958-14963, 2007.
- [80] **Soeller C, Jayasinghe ID, Li P, Holden AV, and Cannell MB.** Three-dimensional high-resolution imaging of cardiac proteins to construct models of intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling in rat ventricular myocytes. *Exp Physiol* 94: 496-508, 2009.
- [81] **Supnet C, Grant J, Kong H, Westaway D, and Mayne M.** Amyloid-beta-(1-42) increases ryanodine receptor-3 expression and function in neurons of TgCRND8 mice. *J Biol Chem* 281: 38440-38447, 2006.

- [82] **Supnet C, Noonan C, Richard K, Bradley J, and Mayne M.** Up-regulation of the type 3 ryanodine receptor is neuroprotective in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 112: 356-365, 2010.
- [83] **Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S, and Imaizumi Y.** Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) and  $\text{Ca}_v1.2$   $\text{Ca}^{2+}$  channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes. *J Biol Chem* 288: 36750-36761, 2013.
- [84] **Taggart MJ and Wray S.** Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. *J Physiol* 511 ( Pt 1): 133-144, 1998.
- [85] **Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, Takano H, and Noda T.** Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369: 556-559, 1994.
- [86] **Takeshima H, Ikemoto T, Nishi M, Nishiyama N, Shimuta M, Sugitani Y, Kuno J, Saito I, Saito H, Endo M, Iino M, and Noda T.** Generation and characterization of mutant mice lacking ryanodine receptor type 3. *J Biol Chem* 271: 19649-19652, 1996.
- [87] **Takeshima H, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T, and Iino M.** Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* 17: 3309-3316, 1998.
- [88] **Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, and et al.** Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445, 1989.
- [89] **Takeshima H, Yamazawa T, Ikemoto T, Takekura H, Nishi M, Noda T, and Iino M.**  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *EMBO J* 14: 2999-3006, 1995.

- [90] **Tezuka N, Ali M, Chwalisz K, and Garfield RE.** Changes in transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. *Am J Physiol* 269: C1008-1017, 1995.
- [91] **Thorne GD and Paul RJ.** Effects of organ culture on arterial gene expression and hypoxic relaxation: role of the ryanodine receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C999-C1005, 2003.
- [92] **Thorneloe KS and Nelson MT.** Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 215-242, 2005.
- [93] **Tong WC, Choi CY, Kharche S, Holden AV, Zhang H, and Taggart MJ.** A computational model of the ionic currents,  $Ca^{2+}$  dynamics and action potentials underlying contraction of isolated uterine smooth muscle. *PLoS One* 6: e18685, 2011.
- [94] **Woodcock NA, Taylor CW, and Thornton S.** Prostaglandin F<sub>2α</sub> increases the sensitivity of the contractile proteins to  $Ca^{2+}$  in human myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 195: 1404-1406, 2006.
- [95] **Word RA, Stull JT, Casey ML, and Kamm KE.** Contractile elements and myosin light chain phosphorylation in myometrial tissue from nonpregnant and pregnant women. *J Clin Invest* 92: 29-37, 1993.
- [96] **Wray S and Burdyga T.** Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* 90: 113-178, 2010.
- [97] **Wray S, Kupittayanant S, Shmygol A, Smith RD, and Burdyga T.** The physiological basis of uterine contractility: a short review. *Exp Physiol* 86: 239-246, 2001.
- [98] **Xie L, Lin P, Xie H, and Xu C.** Effects of atorvastatin and losartan on monocrotaline-induced pulmonary artery remodeling in rats. *Clin Exp Hypertens* 32: 547-554, 2010.
- [99] **Yang D, Pan Z, Takeshima H, Wu C, Nagaraj RY, Ma J, and Cheng H.** RyR3 amplifies RyR1-mediated  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in neonatal mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem* 276: 40210-40214, 2001.

- [100] **Yang XR, Lin MJ, Yip KP, Jeyakumar LH, Fleischer S, Leung GP, and Sham JS.** Multiple ryanodine receptor subtypes and heterogeneous ryanodine receptor-gated  $\text{Ca}^{2+}$  stores in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L338-348, 2005.
- [101] **Zalk R, Clarke OB, des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, Hendrickson WA, Frank J, and Marks AR.** Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517: 44-49, 2015.
- [102] **Zhou QG, Jiang R, and Huang CY.** [Estrogen reduces the expressions of ryanodine receptor type 1 and  $\text{Ca}_v1.3$  L-type calcium channel in the vaginal smooth muscle cells of rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 15: 511-516, 2009.
- [103] **ZhuGe R, Tuft RA, Fogarty KE, Bellve K, Fay FS, and Walsh JV, Jr.** The influence of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on  $\text{Ca}^{2+}$  sparks and spontaneous transient outward currents in single smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 113: 215-228, 1999.
- [104] **Zingg HH, Rozen F, Chu K, Larcher A, Arslan A, Richard S, and Lefebvre D.** Oxytocin and oxytocin receptor gene expression in the uterus. *Recent Prog Horm Res* 50: 255-273, 1995.