



Nagoya City University Academic Repository

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

氏名	おおしろ じゅんや 大城 隼也
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 298 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現
論文審査委員	(主査) 教授 湯浅 博昭 (副査) 教授 今泉 祐治・教授 藤井 聡・准教授 大澤 匡弘・准教授 山村 壽男

論文内容の要旨

【序論】

生体内において Cl⁻イオンは最も多量に存在するイオンの一つである。そのため Cl⁻チャネルは細胞の基本的機能に深く関与しており、様々な疾患との関連も報告されている。その中で Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネル (CaCC) は、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇により活性化される Cl⁻チャネルであり、分泌組織からの液体分泌や心臓・神経細胞の興奮性、血管緊張の制御など多くの重要な生理機能を担っているとされており、特に平滑筋に着目すると、脱分極を担うことによる平滑筋の収縮因子としての役割が挙げられる。血管平滑筋における定常的緊張度上昇は高血圧症に直結するなど、CaCC 機能の解明は病態解明や新たな創薬ターゲットの観点において非常に有用であると考えられるが、その分子実体についてはこれまで明らかとされてこなかった。

近年 TMEM16A と呼ばれる蛋白質が CaCC 活性を持つことが報告され、TMEM16A が属する TMEM16 family が新たな CaCC 候補分子として注目を浴びている。TMEM16A は 4 箇所のエキソン(segment *a, b, c, d*)をそれぞれ欠損・含有することによるスプライスバリエント体の存在が報告されており、その組み合わせにより様々な CaCC 活性を生み出すことが想定されている。またいくつかの TMEM16 family メンバーでは Cl⁻チャネル活性や、重篤な疾患との関連も報告されており、創薬標的としての重要性が伺われる。

一方 CaCC 活性が報告されている平滑筋組織として門脈平滑筋が挙げられる。門脈は消化管と肝臓を結ぶ静脈性血管であり、自動収縮能を持つ非常に興奮性の高い組織である。門脈において CaCC は、平滑筋の収縮機構とペースメーカー機構に深く関与していると考えられているが、その詳細な分子機構は明らかとされていない。また門脈における重篤な疾患として門脈圧亢進症が挙げられる。その一部は特発性門脈圧亢進症として難病に指定されており、原因は未だ不明な点が多いのが現状である。本研究では、門脈平滑筋における CaCC 活性に対する TMEM16 family の寄与を解明することにより、血管平滑筋緊張や自発運動能の制御などの生理的現象を理解するとともに疾患との関連及び創薬標的としての可能性を探求することを目的とした。

【本論】

1) 門脈平滑筋における TMEM16 family の機能的発現

まず門脈平滑筋における TMEM16 family の発現について検討した。その結果、複数の TMEM16 family メンバーの mRNA レベルでの発現及び TMEM16A の蛋白質レベルでの発現が認められた。次にマウス門脈平滑筋細胞における CaCC 活性に対する TMEM16A の寄与を検討するために、ホールセルパッチクランプ法により CaCC 電流の測定を行った。その結果、特徴的な遅延整流性の外向き電流及び末尾電流が観測され、これらの電流は CaCC 阻害薬である 100 μ M ニフルミ酸、及び TMEM16A 特異的阻害薬である 10 μ M T16A_{inh}-A01 どちらの投与によっても有意に抑制された。以上の結果より、門脈平滑筋 CaCC 電流に TMEM16A が大きく寄与していることが示された。

そこで門脈平滑筋において発現する TMEM16A スプライスバリエント体を解析したところ、segment *a, b, c* を有するスプライスバリエント体 (*abc*) 体が最も割合として多く (64.5 %)、また segment *a, c, d* を有するスプライスバリエント体 (*acd*) 体 (25.8 %) と合わせて全体の約 9 割を占めていることが明らかとなった。これら 2 つのスプライスバリエント体を門脈平滑筋 cDNA からクローニングし、HEK293 細胞に一過性に遺伝子導入し、ホールセルパッチクランプ法により CaCC 電流を測定したところ、門脈平滑筋単離細胞と類似した CaCC 電流が観測されたため、これらスプライスバリエント体が門脈平滑筋 CaCC 電流に大きく寄与していることが示された。また、一分子可視化解析を行うことにより、これらスプライスバリエント体がホモ二量体のみならずヘテロ二量体を組むことを明らかとした。

2) アクチン骨格による門脈平滑筋 CaCC 活性の制御

イオンチャネルの活性は、サブユニットや細胞骨格、足場タンパク、オルガネラなどを含む様々な細胞内タンパク質と直接的に、もしくは機能的カップリングすることにより調節されている。これまでに ERM 蛋白質と呼ばれる蛋白質が TMEM16A 活性を制御することが報告されており、ERM タンパク質はアクチンと細胞膜との架橋構造形成に重要なタンパク質であることが知られている。本研究では、門脈平滑筋における CaCC 活性に対するアクチン骨格の影響について薬理学的手法により解明することを目的とした。

アクチン重合阻害薬である cytochalasin D を用い、門脈平滑筋の CaCC 電流に対する作用を検討したところ、電流密度や活性化時定数には有意な変化が見られなかった一方で、脱活性化時定数では有意に大きな値を示し、この作用は cytochalasin D 処理前にアクチン重合促進薬である jasplakinolide により処理することで、電流密度や活性化時定数に影響を与えることなく有意に抑制された。一般に平滑筋の静止膜電位は -60 mV 付近であるのに対して、Cl⁻ の平衡電位は -20~-30 mV 付近である。そのため、本研究で見られた脱活性化時定数の延長は、CaCC 活性を増強させることにより、平滑筋の興奮性を高め、収縮方向へ働くと思定される。

【総括】

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

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

(基礎となる論文)

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

The multiple expression of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels via homo- and hetero-dimer formation of TMEM16A splicing variants in murine portal vein

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

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

Modulation of TMEM16A channel activity as Ca²⁺ activated Cl⁻ conductance via the interaction with actin cytoskeleton in murine portal vein

論文審査の結果の要旨

公開発表会および個別面接時の質疑や審査委員のコメントを反映させ、博士論文に関し十分な改訂を行った。最終試験において博士論文内容について口頭発表させたところ、論文全体及び改訂部分について十分な説明を行った。また口頭発表後に数々の質問を行ったところ、それぞれの質問に関して的確に返答をした。以上のことから、論文に関連した分野について十分な知識を持ち、研究の背景や展望についても十分に理解していることが明らかとなった。知識・見識・能力において博士号を授与するに十分な程度に達していると判断された。よって論文審査委員会では最終試験を合格と判定し、教授・准教授で構成される論文審査会において報告したところ、合格が認定された。