

10) 平滑筋における CRAC チャネル構成タンパク質  
ORAI1 の機能と制御分子の解明

研究代表者 宮津 基

[背景と目的]

Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) チャネルは小胞体 (ER) Ca<sup>2+</sup> 貯蔵からの Ca<sup>2+</sup> 放出により活性化される形質膜中の Ca<sup>2+</sup> 透過性のチャネルであり、T-細胞の活性化に必須である。この CRAC チャネルの主要な構成蛋白質である Orai1 蛋白質は、301アミノ酸からなる膜 4 回貫通型の膜蛋白質で、既知の電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネルや TRP 陽イオンチャネルとはまったく異なる構造を持つ新規の蛋白質であることが報告された。

本研究計画は、自律神経系の効果器である平滑筋に注目し、交感神経刺激、あるいは副交感神経刺激に応じて収縮する平滑筋において、Orai1 ファミリー蛋白質と CRAC チャネルとの関連、その制御機構の分子実体の解明を目指す。

[研究成果]

1. 毛様体筋細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> に対するカフェインの効果

カフェイン (5-20 mM) の細胞外灌流とともに、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> はピーク状に上昇し、30秒以内にプラトー相に移行した。細胞外液 Ca<sup>2+</sup> 除去後も前者は観察されたが、後者は消失した。

2. 毛様体筋細胞のカフェインによって誘起されるホールセル電流

-50 mV の膜電位固定下でのカフェイン灌流は持続的な内向き電流を惹起したが、ノイズ解析により、この電流はムスカリン刺激によって活性化される2つの非選択性陽イオンチャネルの中で、コンダクタンスの小さい NSCCS のみの開口によるものであることがわかった。

### 3. RT-PCR による Stim1 と Orai1 の mRNA の発現

筋組織から抽出したトータル RNA を用いた RT-PCR により、Stim1、Orai1 の蛋白質翻訳領域の全長 mRNA を検出した。Orai1 の 5' 側約170塩基は GC 含有量が極めて高く (GC : 80%)、通常の PCR では増幅されてこなかったが、DMSO を 5% の濃度で反応液に加えることにより、Orai1 のバンドが検出された。また、定量的 PCR 法を用いてその発現量を検討すると、Stim1 の mRNA の発現が Orai1 より多かった。

### 4. 免疫細胞蛍光染色法による STIM1 と Orai1 タンパク質の発現

毛様体筋細胞を免疫染色するためにジギトニン 0.0005% 溶液を用いて膜透過性処理をした後、無固定下で免疫細胞染色を行った。STIM1 タンパク質、Orai1 タンパク質の両者が平滑筋マーカーである  $\alpha$ -アクチン陽性細胞に発現していることがわかった。STIM1 と IP<sub>3</sub> 受容体に特異的に結合する抗体を用いて 2重免疫蛍光染色を施すと、両蛋白が細胞内のベシクル状の構造中に共局在していた。また、底面側の形質膜標本を使用して Orai1 の免疫染色を行うと、 $\alpha$ -アクチン陽性形質膜中にその発現が観察された。

### 5. 蛋白質翻訳領域全長のクローニングと異所発現系への導入

Stim1、Orai1 の蛋白質翻訳領域をクローニングし、GFP タグ付加哺乳類発現用ベクターに挿入した。これらの発現ベクターを CHO 細胞に導入し、その発現を観察した。Stim1 は細胞内に網目状に分布し (図 1)、Orai1 は形質膜に分布した。

### 6. siRNA による Stim1、Orai1 の mRNA のノックダウン

Stim1、Orai1 の siRNA 30 nM の濃度で処理し、72時間後ウェスタンブロット法にてその発現を確認すると、Stim1 蛋白質発現量の減少が観察された。

### [考 察]

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度と単一細胞全電流の測定から、カ

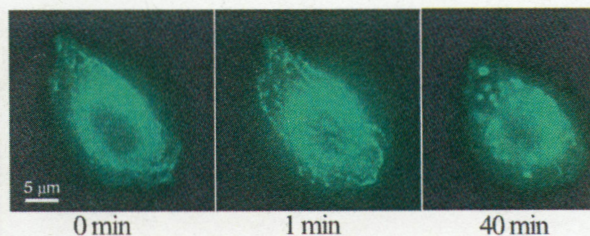


図 1 STIM1-GFP の CHO 細胞における分布とジギトニン処理の効果

フェイン処理により活性化されるチャネルが毛様体筋に存在し、ムスカリン刺激によって活性化されるチャネルの一つが筋小胞体の Ca<sup>2+</sup> 枯渇を介した信号経路により活性化されることが示唆された。また、CRAC チャネルを構成する分子である Orai1、その調節分子である STIM1 蛋白質の両者が毛様体平滑筋に非常に豊富に発現していることがわかった。今後、毛様体平滑筋における筋小胞体の Ca<sup>2+</sup> 枯渇とその過程における STIM1 と Orai1 の関与を明らかにしていきたい。

### [まとめ]

副交感神経の効果器であるウシ毛様体平滑筋に STIM1 と Orai1 が豊富に発現することから、免疫 T-細胞のみならず、平滑筋においても STIM1・Orai1 から構成される CRAC チャネルが持続的筋収縮の維持などの生理的役割を担っていることが期待される。