

3) 平滑筋における CRAC チャンネル構成タンパク質 ORAI 1 の機能と制御分子の解明

研究代表者 宮津 基

[背景と目的]

Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) チャンネルは小胞体 (ER)Ca²⁺ 貯蔵からの Ca²⁺ 放出により活性化される形質膜に存在する Ca²⁺ 透過性のチャンネルであり、T-細胞の活性化に必須である。この CRAC チャンネルの主要な構成蛋白質である Orail 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 Ca²⁺ チャンネルや TRP 陽イオンチャン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。

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、Orail ファミリー蛋白質と CRAC チャンネルとの関連、その制御機構の分子実体の解明を目指す。

[研究方法]

平滑筋は副交感神経系の効果器であるウシ毛様体から摘出した。酵素処理で単離後、短期培養した毛様体筋細胞を用い、Fluo-4 蛍光法により細胞内濃度 ([Ca²⁺]_i) の変動を記録した。上記と同様のウシ毛様体筋において電位固定法により全膜電流を測定した。Orail、STIM1 の発現の検討には RT-PCR 法と免疫細胞蛍光顕微鏡法を用いた。小胞体 Ca²⁺ 貯蔵の枯渇との関連性について、小胞体の Ca²⁺ 放出薬 caffeine と小胞体 Ca²⁺ ポンプ阻害薬である thapsigargin の効果について検討した。

[結果]

機能的な CRAC チャンネルがウシ毛様体平滑筋に存在するかどうかを検討するために、小胞体のライアノジン受容体作動薬である caffeine の効果について検討した。最初に、単離した毛様体筋の [Ca²⁺]_i に対する caffeine の効果について検討すると、caffeine (5-20 mM) の細胞外灌流とともに、[Ca²⁺]_i 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

Ca²⁺ 除去後も前者は観察されたが、後者は消失した。また、非選択性陽イオンチャネルのブロッカーである La³⁺ により後者は抑制され、細胞外からの Ca²⁺ 流入の関与が示唆された。

毛様体筋細胞を -50 mV の膜電位固定下で caffeine 灌流すると、内向き電流が惹起された。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、この電流は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。

小胞体 Ca²⁺ ポンプ阻害薬である thapsigargin を 0.3-1 μM の濃度で 2 - 5 分間処理し、続いて caffeine で刺激すると、caffeine の洗い流した後も NSCCS 電流が維持された。同様な実験を [Ca²⁺]_i 測定で検討すると、持続性の Ca²⁺ 上昇が caffeine の洗い流した後も維持された。同様に、ムスカリン刺激後において NSCCS 電流、[Ca²⁺]_i の上昇が維持された。

筋組織から抽出したトータル RNA を用いた RT-PCR により、STIM1、Orail の蛋白質翻訳領域の全長 cDNA を増幅した。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 Orail より多く検出された。

毛様体筋細胞を免疫染色するためにジギトニンにより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、Orail タンパク質の両者が平滑筋マーカーである α-アクチン陽性細胞に発現していることがわかった。また、底面側の形質膜標本を使用して Orail の免疫染色を行うと、α-アクチン陽性形質膜中にその発現が観察された (図 1)。

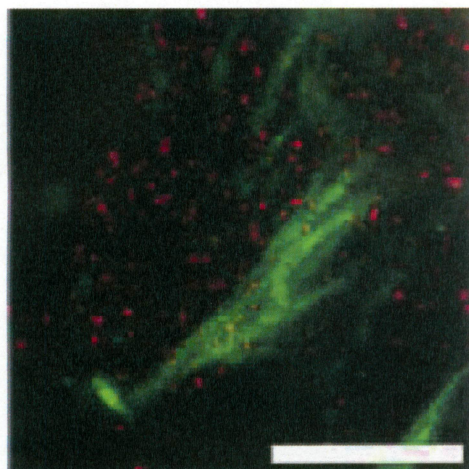


図 1 毛様体平滑筋の形質膜中における Orail の局在
Orail (赤) α-アクチン (緑) スケール、10 μm

[考 察]

ウシ毛様体平滑筋において [Ca²⁺]_i と単一細胞全電流の測定から、caffeine により活性化され、thapsigargin によりその活性化が維持される CRAC チャネル電流が確認された。興味深いことに、ムスカリン刺激によって活性化される非選択性陽イオンチャネルの一つ (NSCCS) が CRAC チャネルである可能性が強く示唆された。また、CRAC チャネルを構成する分子である Orail、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。

[まとめ]

副交感神経の効果器であるウシ毛様体平滑筋においても STIM1・Orail 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。