

助成番号 0634

食塩感受性高血圧における two-pore 型カリウムチャネルの発現変化と 発現調節機構の解明

今泉 祐治, 大矢 進, 山村 寿男

名古屋市立大学大学院薬学研究科

概要 本態性高血圧症の発症、進展には、様々な環境因子や遺伝因子が複雑に相互作用しており、約 3 割を占める食塩感受性高血圧症では、遺伝素因により大部分が規定される。血管平滑筋において、 K^+ チャネルは静止膜電位の維持に寄与していることから、高血圧症の発症、進展の重要因子となりうる。本研究で注目した新しい K^+ チャネルサブファミリーである two-pore 型 K^+ チャネル (K_{2p} チャネル) は、電位非感受性の電流特性を有する背景電流を形成し、15 遺伝子サブタイプは、それぞれ pH、伸展、脂肪酸、麻酔薬により活性制御される。しかしながら、血管張力への寄与や高血圧症発症に伴う K_{2p} チャネルの発現変化については明らかとなっていない。

本研究では、食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl/S) に 8% 食塩食を 4 週間負荷したときの各種血管平滑筋 (大動脈、腸間膜動脈、腎動脈、大腿動脈 等) における K_{2p} チャネルサブタイプ遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法により定量解析した。また、電気生理学実験、収縮実験により、血管平滑筋の静止膜電位、張力に及ぼす K_{2p} チャネル発現変化の影響について解析した。さらに、 K_{2p} チャネル定常発現 HEK293 株を作成し、オキシノール系膜電位感受性色素を利用した高効率作用薬探索系の構築を試みた。

現在まで報告されている 15 遺伝子サブタイプのうち、大動脈、腸間膜動脈、腎動脈、大腿動脈において、TASK1 遺伝子の有意な発現が観察された。低食塩食群と比較して有意な血圧上昇と心肥大が観察された高食塩食群において、腎動脈 TASK1 遺伝子の有意な増大 (約 2 倍) と腹部大動脈 TASK1 遺伝子の有意な減少 (約 50%) が観察された。また、ラット大動脈由来 TASK1 をクローニングしたところ、N 末端が異なる 2 種類のスプライスバリエーションを単離した。我々は、自然発症性高血圧ラット (SHR) の大動脈において、正常血圧ラット (WKY) と比較して TASK1 発現が減少することを報告しており (Kiyoshi *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2006)、本研究結果と一致した。しかし、TASK1 発現変化による腎動脈、大動脈平滑筋における両群間での機能的な差異を見出すことはできなかった。さらに、ヒト TASK1 定常発現細胞株を樹立し、パッチクランプ法と膜電位感受性色素を用いた蛍光観察法により確認した。

食塩感受性高血圧症ラット血管平滑筋において、 K_{2p} チャネルのうち TASK1 が比較的高発現することを見出したが、病態生理学的意義についてはヒト検体での検討を含めて、今後の詳細な解析が必要である。また、本研究で構築した TASK1 定常発現細胞株は TASK1 作用薬を探索する上で有用なツールになると思われる。

1. はじめに

高血圧症は原因不明の本態性高血圧と二次性高血圧に分類され、全高血圧症のうち 90%以上が本態性高血圧である。本態性高血圧は複数の遺伝子的素因をもとに、食塩の過剰摂取、ストレス、肥満などの環境因子が作用して発症する多因子疾患である。多様な高血圧関連遺伝子の発見により高血圧の発症機序が分子レベルで明らかとなり、その情報を元に新規高血圧症治療薬、治療法が開発されている。食塩感受性高血圧症は本態性高血圧症の約 3 割を占めている。現在、レニン-アンジオテンシン

系に関する遺伝子異常をはじめとして、50 以上の高血圧関連遺伝子が発見されている (Hamet *et al.*, 1998)。

血管平滑筋において、 K^+ チャネルは静止膜電位の維持に寄与していることから、高血圧症の発症、進展の重要因子となりうる。本研究で注目した新しい K^+ チャネルサブファミリー two-pore 型 K^+ チャネル (K_{2p} チャネル) は、膜 4 回貫通型の推定構造を有しており、電位非感受性の電流特性を有する背景電流を形成する (図 1A)。遺伝子サブタイプは、それぞれ pH、伸展、脂肪酸、麻酔薬により活性制御される (図 1B)。最近、RT-PCR 実験により肺動脈、腸

間膜動脈をはじめとする血管平滑筋にいくつかの K_{2P} チャネルサブタイプが発現することが明らかになっている (Bryanm *et al.*, 2006; Gardener *et al.*, 2004; Gurney *et al.*, 2003)。しかしながら、血管平滑筋における K_{2P} チャネルの生理学的意義や高血圧症発症に伴う K_{2P} チャネルの発現変化については明らかとなっていない。

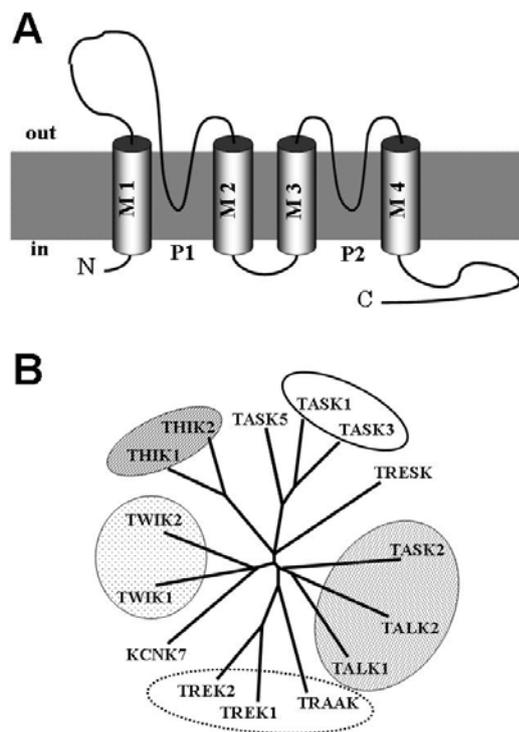


図1. K_{2P} チャネルの構造(A)と K_{2P} チャネルサブタイプ(B)

本研究では、食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl/S) に8%食塩食を4週間負荷したときの各種血管平滑筋(大動脈、腸間膜動脈、腎動脈、大腿動脈等)における K_{2P} チャネルサブタイプ遺伝子発現変化をリアルタイムPCR法により定量解析した。また、電気生理学実験、収縮実験により、血管平滑筋の静止膜電位、張力に及ぼす K_{2P} チャネル発現変化の影響について検討した。さらに、 K_{2P} チャネル定常発現 HEK293 株を作成し、オキソノール系膜電位感受性色素を利用した高効率作用薬探索系の構築を試みた。

2. 実験方法

2.1 RNA抽出, cDNA合成, RT-PCR, クローニング

動物実験を計画、実施するに際しては、「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守した。SD系雄性ラットま

たは Dahl ラット(食塩感受性:DS, 食塩耐性:DL)から各種血管(大動脈(胸部、腹部)、腸間膜動脈、腎動脈、門脈、頸動脈、大腿動脈)を摘出し、ホモジナイザーにより粉碎した後、AGPC法(Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol Chloroform Method)によりRNAを抽出した。逆転写反応プロトコールに従い、Rever Tra AceTM(東洋紡)とオリゴdTプライマー(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した(Kiyoshi *et al.*, 2006)。PCR増幅装置としてGeneAmp2700 (Applied Biosystems)、Taq DNA polymeraseとしてAmpliTaq Gold(Applied Biosystems)を用いた。PCR反応物はアガロースゲル電気泳動により分画し、pcDNA3.1(+)(Invitrogen)にサブクローニングし、目的産物のDNA配列をBig Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)、キャピラリーシーケンサー(3100 Avent Genetic Analyzer, Applied Biosystems)を用いて解析した。

2.2 食塩感受性モデルラットの作出

6週齢DSラット及びDRラットを高食塩食群(8%:DS-H, DR-H)、低食塩食群(0.3%:DS-L, DR-L)に分けて4週間飼育し、経時的に血圧(tail-cuff法)の測定を行った。また、体重(BW)と心重量(HW)を測定し、体重に対する心重量の割合(HW/BW)を算出し、心肥大の目安とした。

2.3 リアルタイムPCR実験

PCR検出システム(ABI 7000, PE Biosystems)、Power SYBR Green PCR MasterMix (Applied BioSystems)を用いて定量的PCR実験を行った(Kiyoshi *et al.*, 2006)。単一PCR産物が精製しているかどうかを「解離曲線」を解析して確認した。また、PCRプライマーによるPCR反応増幅効率については、すべてのプライマーに対して「検量線」を作成し、増幅効率に有意差がないことを確認した。 β -アクチン転写物の発現量を内在性標準として、対象となる転写物の発現量を β -アクチンに対する比として算出した。それぞれ2サンプルずつ測定し、その平均値を1例とした。用いたPCRプライマー情報は次のとおり。

- KCNK1 (TWIK1) (NM_0211688, 739-839)
- KCNK2 (TREK1) (NM_172042, 806-906)
- KCNK3 (TASK1) (AF031384, 564-664)
- KCNK4 (TRAAK) (NM_053804, 453-554)
- KCNK5 (TASK2) (NM_001039516, 141-246)
- KCNK6 (TWIK2) (NM_053806, 749-856)
- KCNK9 (TASK3) (AF192366, 726-826)
- KCNK10 (TREK2) (NM_023096, 1194-1294)

KCNK12 (THIK2) (NM_022292, 831-981)
 KCNK13 (THIK1) (NM_022293, 760-865)
 KCNK15 (TASK5) (AF294353, 68-169)
 Large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel α subunit
 (KCNMA1) (AF135265, 524-625)
 β -actin (NM_031144, 338-438)

2.4 ウェスタンブロッティング法

各種血管組織より膜タンパクを抽出したタンパク試料 (20-50 μ g/lane) を SDS-PAGE (10.0%) により分画化し、PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写した。PVDF 膜は 1% BSA を添加した PBS/0.1% Tween20 (Tween-PBS) で 4°C、一晩ブロッキングした。Tween-PBS で希釈した抗 TASK1 抗体 (Alomone Labs) に浸して 4°C、一晩インキュベートし、Tween-PBS で 5 分間、4 回洗浄した。次に、抗ウサギ IgG-HRP 標識ヤギ抗体 (Chemicon) で 1 時間インキュベートし、同様に洗浄した。ECL Advance Western Blotting kit (Amersham Biosciences)、Image Reader (LAS 1000, FUJIFILM) を用いて可視化した。

2.5 TASK1 発現 HEK293 細胞の作成

リン酸カルシウム法によりヒト TASK1 チャンネルを HEK293 細胞にトランスフェクションし、G418 含有 MEM 培地で培養することにより、TASK1 定常発現 HEK293 細胞を作成した。パッチクランプ法 (後述) により機能発現を確認した。

2.6 収縮測定法

腎動脈及び腹部大動脈を摘出し、Kreb's 溶液中にて脂肪組織を除去後、2~3 mm のリング標本を作製し、管内にステンレス針を 2 本通した。下端を固定し、上端をトランスデューサーへつなぎ、Kreb's-HEPES 溶液で満たしたマグナス装置に懸垂した。収縮測定前、腎動脈、腹部大動脈にそれぞれ 150 mg、500 mg の張力をかけ、各種薬物の収縮応答を測定した。

- Kreb's 溶液 (mM) : NaCl 112, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.2, $MgCl_2$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, Glucose 14
(Adjusted to pH7.4 by bubbling with 95% O_2)
- Kreb's-HEPES 溶液 (mM) : NaCl 120, KCl 4.8, $CaCl_2$ 1.2, $MgSO_4$ 1.3, $NaHCO_3$ 12.6, KH_2PO_4 1.2, Glucose 5.8
(Adjusted to pH 7.4 by NaOH)

2.7 電気生理実験

単離平滑筋細胞の膜電流測定には、ホールセルパッチクランプ法を用いた。TASK 電流を測定するために、細胞内外の K^+ 濃度を 140 mM に固定し、 Ca^{2+} 電流、ATP 感

受性 K^+ 電流、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ 電流成分を抑制するために 300 μ M Cd^{2+} 、1 μ M グリベンクラミド、1 μ M ペニトレム A を外液に添加した。-100 mV において観察される背景電流を測定した。データ解析法は文献 (Kiyoshi *et al.*, 2000) 参照。

細胞外液: HEPES 溶液 (mM)

137 NaCl, 5.9 KCl, 2.2 $CaCl_2$, 1.2 $MgCl_2$, 14 Glucose, 10 HEPES

(NaOH により pH 7.4, pH 8.0, HCl により pH 6.5 に調整)

電極内液

140 KCl, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 2 Na_2ATP , 0.05 EGTA
(KOH により pH 7.2 に調整)

3. 実験結果

3.1 高食塩食による血圧増大と心肥大

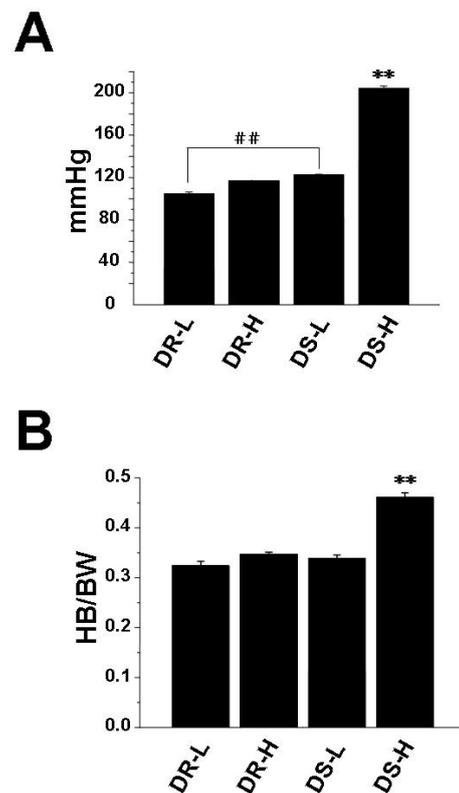


図2. 高食塩食摂取による収縮期圧変化(A)と体重 (body weight, BW) に対する心重量 (heart weight, HB) 変化(B)。

高食塩食群 (8%, : DS-H, DR-H) 及び低食塩食群 (0.3%: DS-L, DR-L) の 4 週間飼育終了時における収縮期圧及び体重に対する心重量の割合 (HB/BW) を図2に示した。DS-H 群では DS-L 群と比較して有意な収縮期圧

の増大と心臓重量の増大が観察された体重については有意な差は観察されなかった(データ省略)。一方、DR-H群はDR-L群と比較して有意な収縮期圧や心臓重量の増大を示さなかった。

3.2 各種平滑筋における K_{2P} チャネルサブタイプ発現

4群の各種血管由来 cDNA を作成し、リアルタイム PCR 法により、ラットホモログが登録されている 11 種類の K_{2P} チャネルサブタイプの遺伝子発現について検討した。 β -アクトチンで規格化した定量解析データの結果、全ての群の各種血管平滑筋において TASK1 の有意な発現が観察され、その他のサブタイプについては高発現するものは見られなかった。DS-H 群の腹部大動脈において TASK1 遺伝子発現は他群と比較して有意に減少し(約 50%)、一方、DS-H 群の腎動脈において TASK1 遺伝子発現の有意な増大(約 2 倍)が観察された。我々は、自然発症性高血圧ラット(SHR)の大動脈において、正常血圧ラット(WKY)と比較して TASK1 発現が減少することを報告しており(Kiyoshi *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2006)、本研究結果と一致した。また、血管平滑筋において、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル遺伝子は、TASK1 遺伝子の 5-10 倍程度高発現しており、各群間での有意な差異は観察されなかった。現在、単離細胞を用いた細胞免疫抗体染色実験や膜タンパク質標本を用いたウェスタンブロット実験により、血管細胞膜における TASK1 タンパク質発現について検討しているところである。

3.3 ラット大動脈由来新規 TASK1 クローニングと結合タンパク質の探索

RT-PCR 法を用いて、ラット大動脈平滑筋 TASK1 の PCR クローニングを行った。シーケンス解析の結果、これまで報告されている TASK1 以外に、N 末端でフレームシフトし、開始コドンが 100 残基下流にシフトする TASK1c と N 末端の途中 19 アミノ酸が欠失する TASK1b を単離した。遺伝子発現解析の結果、TASK1b, 1c とともに大動脈での発現は低く、機能不全体として機能する可能性は低いと思われる。ラット TASK1b 及び TASK1c を GanBank 遺伝子データベースに登録した(TASK1b, AB048823; TASK1c, AB048824)。

次に、酵母 two-hybrid 法によりラット TASK1 の C 末端ポリペプチド(242-394)と相互作用する新規タンパク質をヒト脳 cDNA ライブラリーから探索した。シーケンス解析と β -ガラクトシダーゼ活性解析の結果、TASK1 は C 末端においてプロトンポンプと相互作用する可能性が示された。

3.4 ヒト TASK1 定常発現 HEK293 細胞の作成と機能解析

ヒト脳より TASK1 をクローニングし、定常発現 HEK293 細胞株を作成した。TASK1 電流を観察するために、ホールセルパッチクランプ法を適用して K^{+} 電流を測定し、酸性 pH と TASK1 阻害薬メタアナンダミドに対する作用について検討した。保持電位 -60 mV から +40 mV に脱分極刺激したところ、2 nA 程度の外向き電流が観察された。(native HEK293 細胞ではこのような大きな外向き電流は観察されない。)この電流は、細胞外 pH を 6.5 に酸性化することにより約 50% 抑制された ($47.9 \pm 7.1\%$, $n = 5$)。また、3 μ M メタアナンダミドの投与により、80% 弱 ($76.8 \pm 4.0\%$, $n = 5$) 抑制された。一方、3 μ M メタアナンダミドは TASK2 電流を約 35% ($35.3 \pm 11.0\%$, $n = 4$) しか抑制せず、メタアナンダミドによる TASK1 及び TASK2 抑制作用の相違はこれまでの報告と一致した。

また、オキシノール系電位感受性色素 DiBAC4(3)を用いた場合にも、TASK1 チャネル阻害薬メタアナンダミドや活性化薬ハロタンの作用は電気生理学実験の結果とよく関連した。したがって、本研究において作成した細胞は膜電位感受性色素を利用した高効率作用薬探索に有用であると思われる。

3.5 腹部大動脈及び腎動脈における TASK1 チャネルの機能解析

上記 3.3 のリアルタイム PCR 実験の結果より、腹部大動脈及び腎動脈において有意な TASK1 遺伝子発現と DS-H 群における有意な発現変化が観察された。そこで、酸性 pH (pH 6.4) や TASK1 チャネル阻害薬メタアナンダミド (10 μ M) 投与による収縮反応、ノルエピネフリン収縮時における塩基性 pH (pH 8.4) や TASK1 チャネル活性化薬ハロタンによる弛緩反応を観察した。現在のところ、DS-L 群、DS-H 群間における収縮反応については有意な差が認められていない。実験条件の設定の改善が必要であることも考えられるが、パッチクランプ法による単離細胞からの電流記録においても背景 K^{+} 電流の有意な差は認められなかった。

4. 考察

自然発症性高血圧ラット(SHR)の大動脈や腸間膜動脈平滑筋において、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル活性の増大や電位依存性 K^{+} チャネル活性の減少に関する報告がある (Cox *et al.*, 2001)。また、肺性高血圧

症の血管でも電位依存性 K^+ チャネル活性の減少が報告されている(Michelakis & Weir, 2001)。我々は、SHRにおいて観察される酸性誘発性収縮の増大が大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル発現、活性の増大によるものであることを報告すると同時に(Kiyoshi *et al.*, 2006)、TASK1チャネルが血管平滑筋の静止張力に影響することを示した。本研究では、食塩感受性高血圧モデルラットの血管平滑筋においてTASK1発現が変化する可能性を示したが、食塩高血圧症との因果関係を議論する上では更に詳細な機能解析を行う必要がある。高血圧に伴う二次的な動脈硬化が生じる患部ではアシドーシスを起こす可能性があり、血管平滑筋におけるpH感受性 K^+ 電流の機能解析は重要である。

K_{2P} チャネルに特徴的な性質は、4-アミノピリジンやテトラエチルアンモニウムなどの古典的 K^+ チャネル阻害薬による抑制がほとんど見られず、特異的な阻害薬も発見されていないことである。本研究で使用したアナンダミドやアラキドン酸をはじめとする生体内物質による K_{2P} チャネル修飾に関する論文がいくつか報告されているが、 K_{2P} チャネル研究を進展させる上で選択性の高い阻害薬、活性化薬の開発が望まれている。本研究では、ヒトTASK1定常発現HEK293細胞をはじめ、各種 K_{2P} チャネルサブタイプ定常発現細胞株の樹立に成功した。

5. まとめ

食塩感受性高血圧症ラット血管平滑筋において、 K_{2P} チャネルのうちTASK1が比較的高発現することを見出したが、病態生理学的意義についてはヒト検体での検討を含めて、今後の詳細な解析が必要である。また、本研究で構築したTASK1定常発現細胞株はTASK1作用薬を探索する上で有用なツールになると思われる。

引用文献

- Bryan RM, You J, Philips SC, Anderson JJ, Lloyd EE, Rogers PA, Dryer SE, Marrelli SP. Evidence for two-pore domain potassium channels in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**, H770-H780 (2006).
- Cox RH, Folander K, Swanson R. Differential expression of voltage-gated K^+ channel genes in arteries from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*, **37**, 1315-1322 (2001).
- Gardener MJ, Johnson IT, Burnham MP, Edwards G, Heagerty AM, Weston AH. Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary artery. *Br J Pharmacol*, **142**, 192-202 (2004).
- Gurney AM, Osipenko ON, MacMillan D, McFarlane KM, Tate RJ, Kempson FEJ. Two-pore domain K channel-1, in pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res*, **103**, 93, 957-964 (2007)
- Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J. Hypertension: genes and environment. *J Hypertens*, **16**, 397-418 (1998).
- Kiyoshi H, Yamazaki D, Ohya S, Kitsukawa M, Muraki K, Saito SY, Ohizumi Y, Imaizumi Y. Molecular and electrophysiological characteristics of K^+ conductance sensitive to acidic pH in aortic smooth muscle cells of WKY and SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **291**, H2723-H2734 (2006).
- Michelakis ED & Weir ED. The pathology of pulmonary hypertension. Smooth muscle cells and ion channels. *Clin Chest Med*, **22**, 419-432 (2001).

No. 0634

Changes in Molecular Functions and Expressions of Two-Pore-Domain Potassium Channels in Salt-Sensitive Hypertension

Yuji Imaizumi, Susumu Ohya, Hisao Yamamura

Nagoya City University

Summary

Excess salt-intake is one of the major risks of hypertension, and salt-sensitivity is associated with the increased incidence of cardiovascular disease complications. K^+ channels are important regulators of vascular tone. Activation of K^+ channels in vascular smooth muscle leads to membrane hyperpolarization, and thereby results in vasodilation. A newly discovered, two-pore domain K^+ (K_{2P}) channel family has around 15 members, however, little is known about the contribution of K_{2P} channels to vascular tone regulation and changes in expression of the related subtypes in salt-sensitive hypertension.

In this study, we first examined the expression of 11 members of K_{2P} channels in several vascular smooth muscles of salt-sensitive Dahl (DS) rat by real-time PCR. In aorta, mesenteric artery, renal artery, and femoral artery, TWIK-like Acid Sensitive K^+ channel subtype 1 (TASK1) was significantly expressed. We next compared the expression levels of TASK1 between DS rats fed low-salt (0.4 %) (DS-L) or high-salt (8 %) (DS-H) diet. Significant hypertension and hypertrophy were observed in DS-H rats. In abdominal aorta, the expression of TASK1 transcripts was significantly down-regulated in DS-H, whereas in renal artery significantly down-regulated in DS-H. We have previously shown the similar results in aorta of spontaneous hypertensive rats (SHR) (Kiyoshi *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 2006). These suggest that TASK1 may be responsible for the pH-sensitive and voltage-insensitive K^+ conductance that sets the resting membrane potential in these vascular smooth muscles. However, significant functional differences were not detected between their arteries of DS-H and DS-L using both whole-cell patch clamp and measurement of contractile responses. We isolated novel two spliced isoforms of TASK1 with different N-terminal sequences in rat aorta.

In order to construct high-throughput screening system of TASK1 using voltage-sensitive oxonol dye assay, we prepared human TASK1-stably expressed HEK293 cell lines (HEK-hTASK1) using Geneticin-containing culture medium. Functional characterization of hTASK1 was then performed by whole-cell patch clamp and voltage-sensitive dye assay. HEK-hTASK1 transfectants may be a useful tool for screening TASK1 channel modulators.