

## 大コンダクタンス $\text{Ca}^{2+}$ 活性化 $\text{K}^+$ チャネル新規修飾サブユニットによる 気管支平滑筋機能の制御と気管支病態形成への関与

鈴木 良明, 野田 さゆり, 山村 寿男, 今泉 祐治

名古屋市立大学大学院薬学研究科

**概要** 【目的】 気道平滑筋(ASM)の過剰収縮やリモデリングは気管支狭窄を引き起こし、慢性閉塞性肺疾患や喘息などの発症に関与する。現在これらの治療には、ムスカリン受容体拮抗薬や $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬などの気管支拡張薬(BD)が用いられる。また、リモデリングは反復的収縮による機械刺激のみで生じるため、BDによるASMの過剰収縮の抑制は、リモデリングによる重症化・難治化の予防にも有効である。しかし、これらのBDには副作用のため使用制限があり、ASM特異的分子を標的としたBDの開発が強く望まれる。大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{K}^+$ (BK)チャネルは、BDの有望な標的であることが知られている。最近新たな修飾サブユニットとして  $\text{BK}\gamma$ が同定されたが、ASMにおける機能や病態との関係について不明である。そこで本研究では、 $\text{BK}\gamma$ によるASMの張力制御機構と、気管支病態への関与と新規治療標的としての可能性の解明を目的とした。

【方法】 分子生物学的手法と蛍光イメージング法により、マウス気管支平滑筋(mBSM)における $\text{BK}\gamma$ 発現を解析した。また、マウス気管支平滑筋細胞(mBSMC)を単離し、ホールセルパッチクランプ法により $\text{BK}\gamma$ の機能的発現を解析した。

【結果】 mBSMにおいて $\text{BK}\gamma$ サブタイプ( $\text{BK}\gamma 1-4$ )のうち、 $\text{BK}\gamma 1$ が高発現していた。一方、大動脈など他の平滑筋では $\text{BK}\gamma 1$ 発現は検出できなかった。 $\text{BK}\gamma 1$ はmBSMCの細胞膜上でポアサブユニット( $\text{BK}\alpha$ )と複合体を形成していた。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を10 nMと低い条件にし、 $\text{BK}\gamma 1$ 由来のBKチャネル電流を測定した結果、低電位(-20 mV〜)から活性化されるBKチャネル電流が観察された。薬理的解析と $\text{BK}\gamma 1$ の特異的ノックダウンにより、この電流成分は $\text{BK}\gamma 1$ によるものであることが判明した。

【考察】 本研究により、mBSMCにおいて $\text{BK}\gamma 1$ がBKチャネル活性を正に制御することが明らかになった。これにより、mBSMの静止膜電位を過分極させて気道の過度の収縮を抑えらる。と推察される。 $\text{BK}\gamma 1$ はBSM特異的発現とBKチャネル活性化作用を有することから、副作用の少ない優れたBDの標的分子となりうると推察される。

### 1. 研究目的

気道平滑筋(ASM)は自律神経支配を受けて気管支の径を調節する。ASMの過剰収縮や肥厚(リモデリング)は気管支の狭窄を引き起こし、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や喘息などの発症に関与する。現在、これらの治療には、ムスカリン受容体拮抗薬や $\beta_2$ アドレナリン受容体刺激薬( $\beta_2$ アゴニスト)などの気管支拡張薬(BD)が用いられる。また、ASMのリモデリングは、反復的な収縮による機械刺激のみで生じるため<sup>(1)</sup>、BDによるASMの過剰収縮の抑制は、リモデリングによる重症化・難治化の予防にも有効

である。しかし、これらのBDは前立腺肥大や緑内障患者への使用制限や、不整脈の危険性などの欠点があるため、よりASM特異的な分子を標的としたBDの開発が強く望まれる。

大コンダクタンス  $\text{Ca}^{2+}$ 活性化  $\text{K}^+$ (BK)チャネルは、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )上昇と脱分極によって活性化する $\text{K}^+$ チャネルであり、BDの有望な標的であることが知られている<sup>(2)</sup>。BKチャネルは、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル(VDCC)からの $\text{Ca}^{2+}$ 流入、またはリアノジン受容体(RyR)や $\text{IP}_3$ 受容体を介した筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$

濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇によって活性化される。これにより筋が収縮すると同時に、BK チャンネルが活性化されて膜電位を過分極させることで VDCC 活性に対して負帰還機構として働き、筋が弛緩する<sup>(3)</sup>。また、BK チャンネルは静止状態においても RyR からの自発的な  $Ca^{2+}$  遊離 ( $Ca^{2+}$  spark) によって活性化され、膜電位を過分極方向に保つことで筋張力の安定化に寄与している<sup>(4)</sup>。

最近、平滑筋型修飾サブユニット (BK $\beta$ 1) に加えて新たなサブユニット BK $\gamma$  が同定され、 $[Ca^{2+}]_i$  感受性を劇的に増大させることが明らかになった<sup>(5)</sup>。しかし、BK $\gamma$ 1 の BSM における発現や機能、喘息・COPD との関係について不明である。そこで本研究では、BK $\gamma$ 1 による BSM の張力制御機構と気管支病態への関与と新規治療標的としての可能性の解明を目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 マウス気管支平滑筋細胞 (mBSMCs) 及び大動脈平滑筋細胞 (mASMCs) の調整

C57BL/6 雄性マウス (8-14 週齢) を日本 SLC から購入した。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、動物実験に関する日本薬理学会の指針に従って行った。C57BL/6 から気管支、および胸部大動脈を摘出し、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  除去 Hank's 溶液中で平滑筋以外の部分を除去した。これを  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  除去 Hank's 溶液中にて 37°C で 10 分間保温した。0.3% コラゲナーゼ (Wako)、0.2% ノパイン (Sigma-Aldrich)、0.2% ジチオトレイトール (Wako)、0.1% BSA を含んだ  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  除去 Hank's 溶液中で 35 分間酵素処理した。洗浄後、数回ピペッティングして細胞懸濁液を得た。

### 2.2 アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた BK $\gamma$ 1 のノックダウン

標的遺伝子の shRNA (shBK $\gamma$ 1: 5'-CGGTCTCTTTCC TTGCTAGTT-3', shControl: 5'-GCAAGCTGACCCTGA AGTTCAT-3') を設計し、pAAV-U6 ベクター (タカラバイオ) に挿入した。続いて、Lenti-X 293T 細胞 (タカラバイオ) を 10 cm ディッシュに播種し、pAAV-U6 と pHelper および piRC ベクターを PEI MAX (Polysciences) により導入した。72 時間後に、AAVs を 300  $\mu$ L AAVpro Extraction Solution (タカラバイオ) にて抽出した。DMEM 培地 (10 mg/ml ペニシリン、10 mg/ml ストレプトマイシン含有) を

含む 24 ウェルプレートで培養した気管支平滑筋 (BSM) に対して、30  $\mu$ L AAV を加えて 12 時間感染させた。48-96 時間後に実験を行った。

### 2.3 定量的 PCR 法による mRNA 発現解析

C57BL/6 雄性マウス (8-14 週齢) から組織を摘出し、RNAiso (タカラバイオ) を用いて total RNA を抽出し、Rever Tra Ace (TOYOBO) にて cDNA 合成を行った。定量的 PCR 解析は、LightCycler96 (Roche) を用いて行った。SYBR Green 法 (タカラバイオ) を用いて、サイクル毎の蛍光強度を測定し、相対的な mRNA 発現量を内在性標準遺伝子 (GAPDH) の mRNA 発現量で規格化した。

### 2.4 Western blot 法

BSM の膜分画を調整し、タンパク質試料を 7.5% SDS-PAGE (Bio-Rad) により分画化して、ニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に転写した。Blocking buffer (Beacle) にて 4°C で 12 時間ブロッキングした後、各一次抗体 (BK $\alpha$ : APC-107, 1:200, Alomone; BK $\beta$ 1: APC-036, 1:200, Alomone; BK $\gamma$ 1: sc-132325, 1:100, Santa cruz) と 4°C で 12 時間反応させた。その後、HRP で標識された二次抗体 (1:10,000) と 4°C で 1 時間反応させた。洗浄後、ECL 検出システム (Amersham Pharmacia), Image Reader (Las 3000, FUJIFILM) を用いて可視化した。

### 2.5 免疫染色法

急性単離した mBSMCs および mASMCs を 2% パラホルムアルデヒドで固定した後、PBS (-) で洗浄した。上述の BK $\alpha$  抗体 (1:100) あるいは BK $\gamma$ 1 抗体 (1:50) と 4°C で 12 時間反応させた。一次抗体溶液を洗浄した後、Alexa488 あるいは Alexa405 で標識した二次抗体溶液 (1:200) を加え、共焦点顕微鏡あるいは全反射顕微鏡にて蛍光画像を取得した。

### 2.6 全反射蛍光顕微鏡 (TIRF 顕微鏡) による 1 分子イメージング

蛍光標識したイオンチャンネルの 1 分子可視化には、TIRF 顕微鏡システム (Nikon) を用いた。画像解析は AQUACOSMOS ソフトウェア (浜松ホトニクス) を用いた。画像解像度は、71~107 nm/pixel、Z 軸方向に 200 nm 以内に存在する蛍光粒子を観察した<sup>(3,6)</sup>。

### 2.7 電気生理学的手法

急性単離した平滑筋細胞の膜電流測定には、Whole-cell patch clamp 法を用いた。測定には増幅器

(CEZ-2400; 日本光電), アナログ-デジタル変換器 (Digidata 1440A; Axon Instrument), pCLAMPソフトウェア (version 10; Axon Instruments)を用いた。実験には, 細胞内液を充填した時の電極抵抗が 2~4 MΩの電極を使用した。

## 2. 8 溶液組成

実験に使用した溶液組成を以下に示した (mM)。  
 $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -freeHank's 溶液: 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.17  $Na_2HPO_4$ , 0.44  $KH_2PO_4$ , 4.2  $NaHCO_3$ , 5.6 Glucose。電極内液: 140 KCl, 0.265  $CaCl_2$ , 2.8  $MgCl_2$ , 5 EGTA, 10 HEPES, 2  $Na_2ATP$  (pCa 8.0, pH 7.2 with KOH)。細胞外液: 137 NaCl, 5.9 KCl, 2.2  $CaCl_2$ , 1.2  $MgCl_2$ , 14 glucose, 10 HEPES (pH 7.4 with NaOH)

## 2. 9 使用薬物

paxilline (PAX)は Toctris Bioscience より, mallotoxin (MTX)は Sigma-Aldrich より入手した。

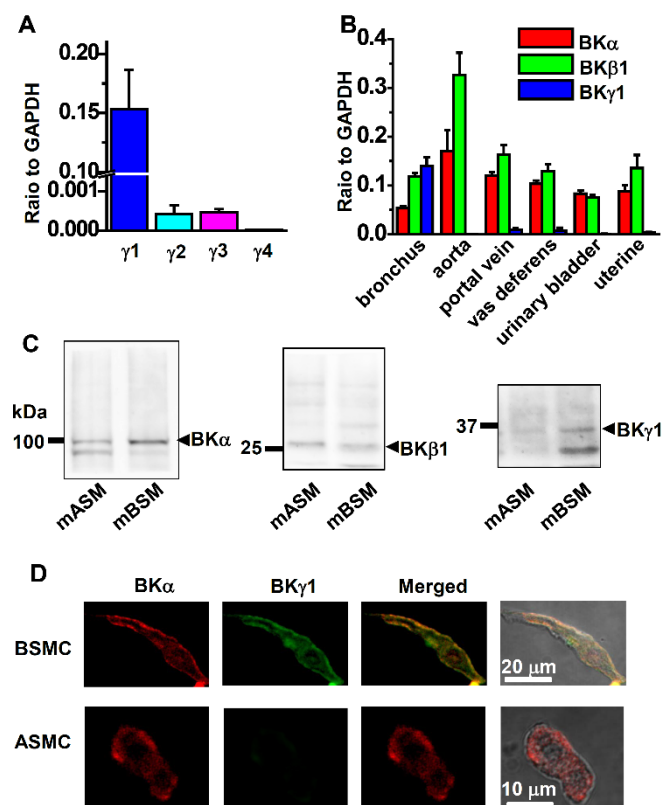
## 2. 10 統計処理

実験により得られた数値は, 平均値±標準誤差で表記した。2群の有意差検定には, t検定を用い, 3群以上の検定にはチューキーの多重比較法を用いた。図中の\*及び\*\*は, それぞれ危険率 5%及び 1%での群間の分布が有意に異なることを示した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 $BK\gamma_1$ の発現解析

Real-Time PCR 法の結果, BSM において  $BK\gamma$ サブユニットのうち  $BK\gamma_1$  の mRNA が特異的に発現していた (Fig. 1A)。さらに, マウス各種平滑筋組織における  $BK\gamma_1$  の発現解析を行ったところ,  $BK\gamma_1$  の発現はBSMに特異的であった (Fig. 1B)。Western blot 法の結果から, BSMにおいて  $BK\gamma_1$  が発現し (Fig. 1C), さらに免疫染色法の結果から, 細胞膜上で  $BK\alpha$  (赤)と  $BK\gamma_1$  (緑)が共局在することが明



**Fig. 1.  $BK\gamma_1$  is specifically expressed in mouse bronchial smooth muscle (BSM)**

(A) Real-time PCR analysis of  $BK\gamma$  subunits ( $BK\gamma_1$ -4) in BSM (N=3). (B) Real-time PCR analysis of  $BK\alpha$ ,  $BK\beta_1$  and  $BK\gamma_1$  in several types of smooth muscle tissues (N=4-5). (C) Western blotting using specific antibodies against  $BK\alpha$ ,  $BK\beta_1$  and  $BK\gamma_1$ , respectively. (D) Immunostaining was performed to reveal intracellular localization of  $BK\alpha$  and  $BK\gamma_1$ . Images were acquired using a confocal microscope. In Fig. 1C and D, representative pictures from three independent experiments are shown. Aorta was used as a control in this study because of little  $BK\gamma_1$  expression.

らかになった (Fig. 1D)。一方、大動脈平滑筋細胞 (mASMCs) ではBK $\gamma$ 1 の mRNA 及びタンパク質発現は見られなかったため、以後 mASMCs を対照群として用いた。また、共免疫沈降法と TIRF 顕微鏡による 1 分子イメージングから、mBSMCs において BK $\alpha$  と BK $\gamma$ 1 が分子複合体を形成することも明らかになった。

### 3. 2 気管支平滑筋における BK $\gamma$ 1 の機能解析

mBSMCs において、BK $\gamma$ 1 が機能発現していることを明らかにするために、急性単離した mBSMCs に対して Whole-cell patch clamp 法を用いて BK チャネル電流を測定した。電極内液の Ca<sup>2+</sup>濃度を 10 nM (pCa 8.0) に固定し、BK $\gamma$ 1 と複合体を形成している BK チャネルのみが活性化される条件で測定を行った<sup>(6)</sup>。mBSMCs において観察された電流は、BK チャネル阻害薬である 1  $\mu$ M paxilline (PAX) の適用により有意に抑制された (Fig. 2A)。一方、BK $\gamma$ 1 の発現量が少ない mASMCs では、1  $\mu$ M PAX 感受性電流はほとんど観察されなかった (Fig. 2A)。PAX 感受性電流の

電流-電圧曲線から、mBSMCs では BK チャネルが低電位 (-20 mV $\sim$ ) から活性化されることが明らかになった (Fig. 2B-C)。

### 3. 3 気管支平滑筋における mallotoxin の薬物感受性

mBSMCs において BK $\gamma$ 1 が機能発現するかを調べるために、BK チャネル活性化薬である mallotoxin (MTX) の感受性を調べた。MTX は、BK $\gamma$ 1 が共発現する時には BK チャネル活性化作用が減弱する<sup>(7)</sup>。よって、mBSMCs において BK $\gamma$ 1 が発現している場合、mASMCs よりも MTX 感受性が低くなると仮定した。mBSMCs および mASMCs に MTX を 0.1 $\sim$ 3  $\mu$ M の範囲で投与した際の BK チャネル電流を測定した (Fig. 3)。その結果、mASMCs では 0.1  $\mu$ M から活性化作用が現れたが、mBSMCs では、3  $\mu$ M MTX を投与してもほとんど活性化作用が観察されなかったため、mBSMCs において BK $\gamma$ 1 が機能発現することが示唆された。

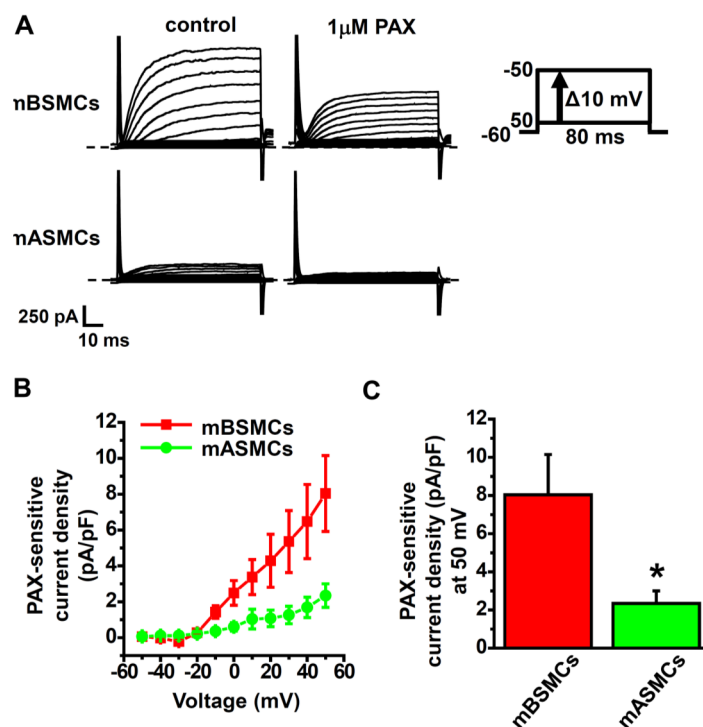
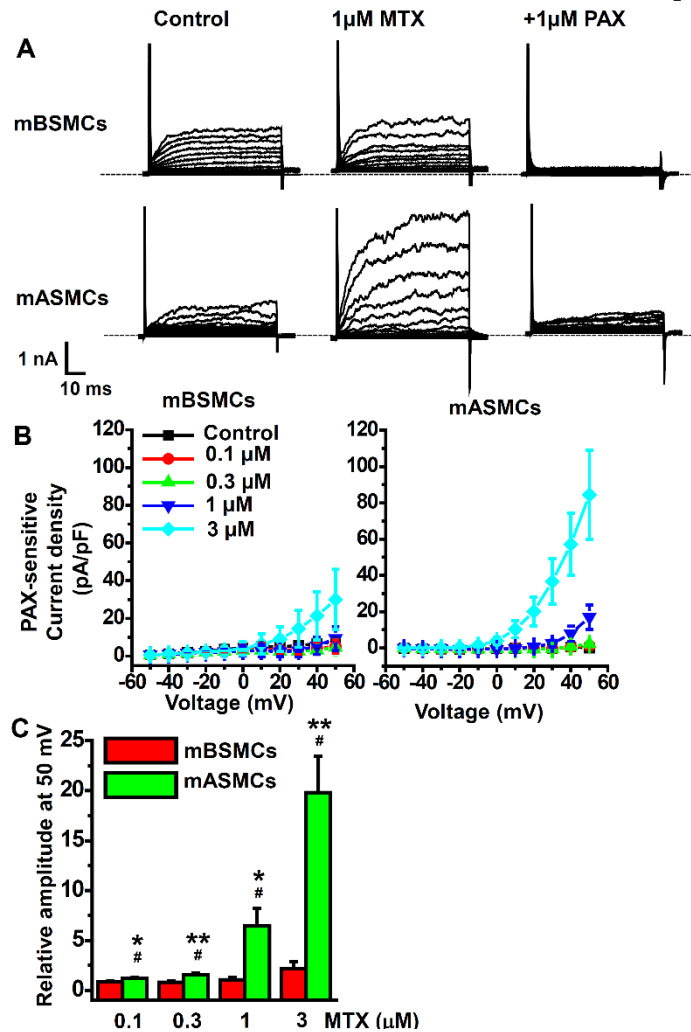


Fig. 2. BK channel in mBSMCs is activated at physiological membrane potential and pCa 8.0

The outward currents in mBSMCs and mASMCs were obtained using a whole-cell patch-clamp technique. (A) Current traces acquired from mBSMCs or mASMCs before and after the treatment with 1  $\mu$ M PAX, a specific BK channel blocker. Voltage steps from -50 to +50 mV in 10-mV increments were given to myocytes. (B) PAX-sensitive current-voltage relationships in mBSMCs (n=6) and mASMCs (n=4). (C) PAX-sensitive current density at 50 mV in mBSMCs (n=6) and mASMCs (n=4). \*p<0.05. Intracellular Ca<sup>2+</sup> level was fixed at pCa 8.0.



**Fig. 3. MTX does not activate BK<sub>Ca</sub> currents in mBSMCs at pCa 8.0**

(A) MTX was cumulatively applied to mBSMCs and mASMCs. After treatment with MTX, PAX was applied to determine BK channel current components. Voltage steps from -50 to +50 mV in 10-mV increments were given to myocytes. (B) PAX-sensitive current-voltage relationship measured with or without MTX (n=4 in mBSMCs and n=4 in mASMCs).

(C) Concentration-response relationships for MTX in mBSMCs and mASMCs, respectively. The peak outward current amplitudes at 50 mV in the presence with each concentration of MTX were normalized to those without MTX (n=4 in mBSMCs and n=6 in mASMCs). \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. mBSMCs, #p<0.05 vs. non-treated Control.

### 3. 4 shRNA ノックダウン法による BSM での BK<sub>γ1</sub> 機能発現の解析

更に詳細に BK<sub>γ1</sub> の mBSMCs における活性を調べるために、ノックダウン実験を行った。ここでは AAV により shRNA を導入した。まず、AAV による BSM における shRNA 発現を GFP の蛍光で確認した (Fig. 4A)。定量的 PCR 法と Western blot 法により shBK<sub>γ1</sub> によって BK<sub>γ1</sub> が特異的にノックダウンされたことを確認した (Fig. 4B-C)。

次に、培養した BSM から細胞を単離し、Whole-cell patch clamp 法を適用し、静止膜電位を測定したところ、shBK<sub>γ1</sub> 導入細胞では脱分極する傾向にあった。1 μM

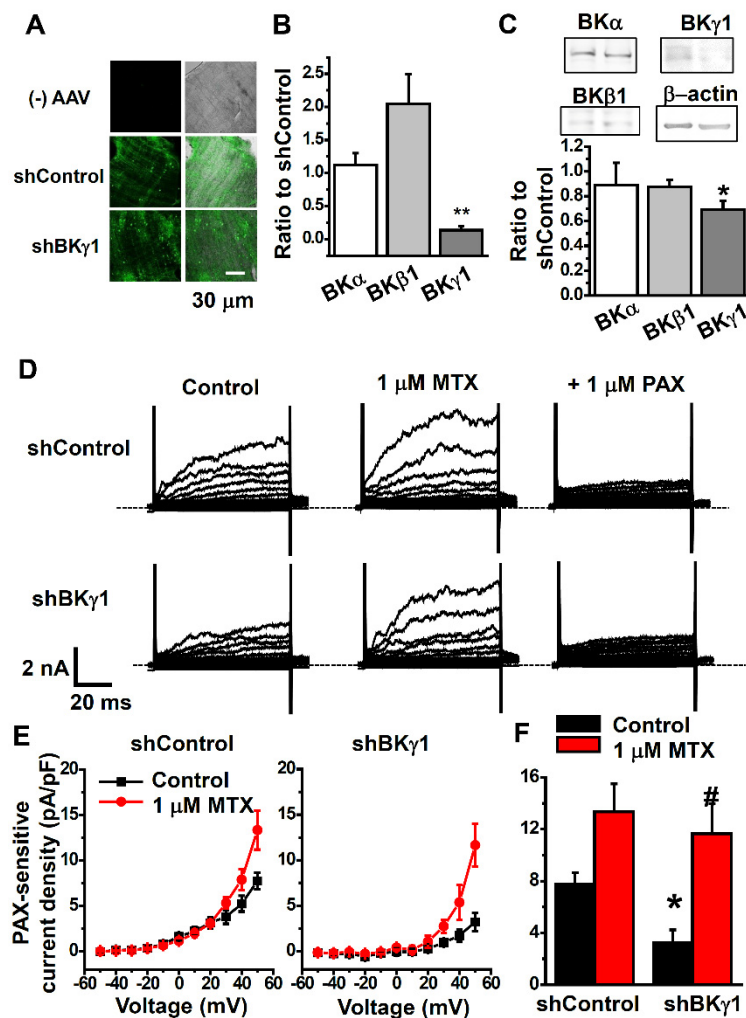
PAX による脱分極を調べたところ、shBK<sub>γ1</sub> 導入細胞ではその脱分極幅が有意に減少していた。BK チャネル電流測定を行ったところ (Fig. 4D-F)。shControl に比べ、shBK<sub>γ1</sub> 導入細胞では 1 μM PAX 感受性電流が有意に減少した。shControl では MTX による活性化作用はほとんど観察されなかったが、shBK<sub>γ1</sub> では MTX による活性化作用が観察された。

### 4. 考察

本研究により、BK<sub>γ1</sub> が BSM に特異的に発現することが明らかになった。更に、Western blot 法や免疫染色法によ

り, BK $\gamma$ 1はBK $\alpha$ と共に細胞膜上で分子複合体を形成することを明らかにした。mBSMCsでは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が10 nMとごく低い状態でもBKチャンネル電流が観測された。この状態ではmASMCsなどの一般的な平滑筋細胞ではBKチャンネル電流は観測されない。このmBSMCsに特徴的な電流成分がBK $\gamma$ 1によるものであることは、①MTXを用いた薬理的解析と②shBK $\gamma$ 1によるノックダウンの2つの異なる手法で明らかにした。BK $\gamma$ 1はその強力なBKチャンネル活性化作用により、定常状態でのチャンネル活性を増大させて膜電位を過分極させると考えられる。実際にBK $\gamma$ 1をノッ

クダウンしたBSMCsではBKチャンネルによる過分極成分が有意に減少していた。BSMに対する機械刺激あるいはムスカリン受容体刺激は膜電位を脱分極させて、①VDCCを介してCa<sup>2+</sup>を流入させ、更に②VDCCの構造を変化させることで、VDCCと物理的に結合したM<sub>3</sub>受容体<sup>(8)</sup>やRyR1<sup>(9)</sup>を活性化させて、SRからのCa<sup>2+</sup>遊離を引き起こす。すなわち、BKチャンネル活性による過分極が極めて効率的にBSMを弛緩させて、気管支張力を安定化させるため、BDの有望な標的であると期待できる。実際に、 $\beta_2$ アゴニストがBDの作用を発揮するには、PKAおよびG $\alpha_s$ の活



**Fig. 4. BK $\gamma$ 1 knockdown decreased BK $\alpha$  channel activity in mBSMCs**

(A) Infection of AAV was confirmed by GFP fluorescence in organ cultured mBSM for 48 h. (B and C) mRNA and protein level of BK $\alpha$ , BK $\beta$ 1 and BK $\gamma$ 1 in mBSM treated with shBK $\gamma$ 1 were analyzed by real-time PCR (N=3, B) and Western blotting analyses (N=4, C). mRNA and protein expression was normalized to that of shControl. \*p<0.05, \*\*p<0.01. (D) MTX (1  $\mu$ M) was applied to mBSMCs treated with shControl or shBK $\gamma$ 1. Voltage steps from -50 to +50 mV in 10-mV increments were given to myocytes. (E) PAX-sensitive current-voltage relationship measured with or without MTX (n=4 in shControl and n=4 in shBK $\gamma$ 1). (F) The PAX-sensitive current density at +50 mV after treatment with 1  $\mu$ M MTX is compared. (n=4 in shControl and n=4 in shBK $\gamma$ 1). \*p<0.05 vs. shControl, #p<0.05 vs. non-treated control.

性化によりBKチャネルを活性化することが重要である<sup>(2)</sup>。

これまでに気道上皮細胞において、①BK $\gamma$ 1 が気道表面液の分泌や繊毛運動に関与すること、②インターフェロン $\gamma$ やTGF- $\beta$ 1などの炎症性物質により、BK $\alpha$ 及びBK $\gamma$ 1の発現が低下して上皮細胞機能が阻害されることが報告されている<sup>(10)</sup>。つまり、BK $\gamma$ 1 標的型のBDは気道上皮のBKチャネルも活性化させて、複合的に喘息やCOPDの症状を改善すると期待できる。

## 5. 今後の課題

これまでは主に細胞を用いた実験系であったため、今後は組織標本やマウス個体を用いて気管支張力制御に対するBK $\gamma$ 1の関与を総合的に解明する必要がある。ASMにはBK $\beta$ 1が機能的に発現することが知られている<sup>(11)</sup>。しかし、BK $\gamma$ 1とBK $\beta$ 1が同じ細胞に発現する（もしくは同一のBKチャネル分子内にある）場合、両者がBKチャネルの細胞内局在や性質（薬物/Ca<sup>2+</sup>感受性）に及ぼす影響が、相加的なのか、あるいは相互作用して変化するのか不明である。今後、各サブユニットの細胞内局在や電気生理学的性質、及びこれらのBD投与による変化を解明する必要がある。また、喘息モデルマウスにおけるBKチャネルの機能的発現量の変化を詳細に解析し、BK $\gamma$ 1が喘息の治療法として有効か検討する予定である。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

## 7. 文献等

1. C.L. Grainge, L.C. Lau, J.A. Ward, V. Dulay, G. Lahiff, S. Wilson, S. Holgate, D.E. Davies, P.H. Howarth, Effect of bronchoconstriction on airway remodeling in asthma, *N Engl J Med*, 364 (2011) 2006-2015.
2. H. Kume, I.P. Hall, R.J. Washabau, K. Takagi, M.I. Kotlikoff,  $\beta$ -adrenergic agonists regulate K<sub>Ca</sub> channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms, *J Clin Invest*, 93 (1994) 371-379.
3. Y. Suzuki, H. Yamamura, S. Ohya, Y. Imaizumi, Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes, *J Biol Chem*, 288 (2013) 36750-36761.
4. M.T. Nelson, H. Cheng, M. Rubart, L.F. Santana, A.D. Bonev, H.J. Knot, W.J. Lederer, Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks, *Science*, 270 (1995) 633-637.
5. J. Yan, R.W. Aldrich, LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium, *Nature*, 466 (2010) 513-516.
6. Y. Suzuki, S. Ohya, H. Yamamura, W.R. Giles, Y. Imaizumi, A New Splice Variant of Large Conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) Channel  $\alpha$  Subunit Alters Human Chondrocyte Function, *J Biol Chem*, 291 (2016) 24247-24260.
7. J. Almasy, T. Begenisich, The LRRC26 protein selectively alters the efficacy of BK channel activators, *Mol Pharmacol*, 81 (2012) 21-30.
8. Q.H. Liu, Y.M. Zheng, A.S. Korde, V.R. Yadav, R. Rathore, J. Wess, Y.X. Wang, Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (2009) 11418-11423.
9. W. Du, T.J. McMahon, Z.S. Zhang, J.A. Stiber, G. Meissner, J.P. Eu, Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle, *J Biol Chem*, 281 (2006) 30143-30151.
10. D. Manzanares, S. Krick, N. Baumlin, J.S. Dennis, J. Tyrrell, R. Tarran, M. Salathe, Airway Surface Dehydration by Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ) in Cystic Fibrosis Is Due to Decreased Function of a Voltage-dependent Potassium Channel and Can Be Rescued by the Drug Pirfenidone, *J Biol Chem*, 290 (2015) 25710-25716.
11. I. Semenov, B. Wang, J.T. Herlihy, R. Brenner, BK

channel  $\beta$ 1-subunit regulation of calcium handling and  
constriction in tracheal smooth muscle, *Am J Physiol*

*Lung Cell Mol Physiol*, 291 (2006) L802-810.



## The Role of a Novel Subunit of Large-Conductance $\text{Ca}^{2+}$ -Activated $\text{K}^+$ Channels in Normal and Pathological Airway Smooth Muscle Cells

Yoshiaki Suzuki, Sayuri Noda, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi

Department of Molecular & Cellular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Nagoya City University

### Summary

Excess contraction and remodeling of airway smooth muscle (ASM) are associated with airway diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Bronchodilators (BD) including muscarinic receptor antagonists and  $\beta_2$  adrenergic receptor agonists are used in the treatment of these diseases. Relaxing ASM using BD is also effective for prevention of severe and chronic airway diseases, because repetitive excess contraction causes irreversible bronchial remodeling. However, pre-existing BD cannot be used for patients in some cases due to side effects. Therefore BD more specific to ASM needs to be developed. Large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  (BK) channel is an attractive target for bronchodilator (BD), because BK channel hyperpolarizes membrane potentials and inhibits contraction in bronchial smooth muscle cells (BSMCs). Recently leucine-rich-repeat-containing (LRRC) proteins are identified as novel auxiliary ( $\gamma$ ) subunits. However, the roles of BK $\gamma$  subunits in SMCs are unclear. We found that LRRC26 (BK $\gamma$ 1) is highly and specifically expressed in mouse BSMCs (mBSMCs). Co-immunoprecipitation and single molecule imaging analyses showed direct interaction between BK $\alpha$  and BK $\gamma$ 1 in mBSMCs. Whole-cell patch-clamp analyses revealed that significant BK channel currents were evoked under the conditions where  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was fixed at 10 nM (pCa8.0) in mBSMCs, but not in mouse aortic SMCs (mASMCs). Mallotoxin, which activates BK channels that do not contain BK $\gamma$ 1, dose-dependently activated BK channel currents in mASMCs, but not in mBSMCs. Knock-down of BK $\gamma$ 1 in mBSMCs significantly reduced BK channel currents at pCa8.0 and recovered sensitivity to Mallotoxin. These results suggest that BK $\gamma$ 1 in mBSMCs increases BK channel activity and inhibits bronchial contraction in physiological conditions by keeping membrane potential negative range. BK $\gamma$ 1 may be a potential target for BSM-specific BD.