



## TRPC チャンネルと心肥大

### 1. はじめに

心臓は生後、分裂する能力を失う。しかし、高血圧や心筋梗塞などの負荷を受けると、心臓は肥大すること（心肥大）でそれに打ち勝とうとする。初期の心肥大は代償機構として働くものの、負荷が取り除かれず非代償性の心肥大を経て心臓は心不全に移行する。心不全は心臓が末梢組織の要求に見合った酸素（すなわち血液）を供給できなくなった状態で（すなわち特定の疾患を表すわけではない）、5年生存率は50%程度と低く、薬物治療は一定の効果をあげているものの十分ではない。またライフスタイルの欧米化および高齢化社会とあいまって、心不全と診断される患者は今後さらに増加するといわれている。患者のQOLおよび医療費抑制の観点からも、早急な治療法の確立が求められている。

### 2. $\text{Ca}^{2+}$ 依存性転写因子 NFAT と心肥大

心肥大は、生理的心肥大（運動などによって生じる心臓の肥大で心機能の低下を伴わない）と病的な心肥大（圧負荷や過剰な神経ホルモン刺激などにより引き起こされる心肥大で心機能の低下を伴わない代償性と心機能の低下する非代償性に分けられる）の二つに分類される。生理的な肥大は可逆的な過程であるのに対し、病的な肥大は負荷が除かれない限り心不全へと移行する。心肥大や心不全のメカニズムの解明は新たな治療薬に結びつくため、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを使った多くの報告がある。このうち  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の転写因子 nuclear factor of activated T cells (NFAT) は、生理的心肥大には関与せず病的な心肥大を引き起こす因子の一つとして考えられている<sup>1)</sup>。これまで NFAT の活性化は三量体 G タンパク質  $G_q$ -ホス

ホリパーゼ C (PLC) 系によって仲介されると考えられてきた。すなわち、アンジオテンシン受容体をはじめとする  $G_q$  共役型受容体刺激による PLC の活性化、PLC によるホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 ( $\text{PIP}_2$ ) の分解、 $\text{PIP}_2$  の分解により生成するジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール-1,4,5-三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) の産生、 $\text{IP}_3$  による細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  の遊離というスキームである。しかし、我々は NFAT の活性化には、 $\text{IP}_3$  ではなく DAG 依存性の TRPC (transient receptor potential canonical) チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が重要なことを見出した<sup>2)</sup>。我々の報告と前後して、四つのグループから心肥大に TRPC チャンネルが関与していることが報告された<sup>3-6)</sup>。研究グループ間で関与する TRPC チャンネルの種類などに違いはあるものの、TRPC チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が NFAT の活性化を介した心肥大に関与しているという点では一致している。ここでは我々の結果を中心に、新たな  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路による病的な心肥大に関与する NFAT の活性化メカニズムを紹介する。

### 3. NFAT の核移行メカニズム

はじめに NFAT の核移行および転写活性化を指標に、 $\text{IP}_3$  の役割を検討した。RGS (regulator of G protein signaling) ドメインは約 120 アミノ酸から成っており、活性型の  $G\alpha$  と結合し GTPase 活性を促進させる<sup>7)</sup>。したがって、 $G\alpha$  に選択的な RGS ドメインを発現させると、特定の  $G\alpha$  (たとえば  $G\alpha_q$ ) の作用のみを阻害できる。 $G\alpha_q$  に特異的な RGS ドメインを発現させると NFAT 核移行は阻害された。また、PLC 阻害剤や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤 BAPTA で処理した場合も NFAT の核移行は阻害された。したがって、NFAT の核移行に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、 $G\alpha_q$  による PLC の活性化を必要とすることが明らかになった。しかし、 $\text{IP}_3$  受容体を阻害するゼストスポンジン C の処理あるいは  $\text{IP}_3$  スポンジ ( $\text{IP}_3$  受容体の  $\text{IP}_3$  結合ドメインのみ) を発現させても、NFAT の核移行は影響を受けなかった。これに対し、DAG をホスファチジン酸に変える DAG キナーゼ  $\beta$  ( $\text{DGK}\beta$ ) を発現させると NFAT の核移行は阻害された。したがって、 $\text{IP}_3$  を介した  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ではなく、DAG を介した  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が NFAT の活性化に関与していることが明らかになった。すなわち、 $\text{PIP}_2$  より生じた  $\text{IP}_3$  ではなく、DAG が  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に重要な役割を果たしていることが明らかになった。DAG の重要性は、 $\text{DGK}\zeta$  を心筋に発現させたトランスジェニックマウスでは、アンジオテンシン II やフェニレフリンの持続注入による心肥大形成が抑制された

という結果からも支持される<sup>8)</sup>。

#### 4. NFATの核移行と細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇

単離した新生仔心室筋細胞は収縮・弛緩のサイクルを繰り返しているため、収縮時にはスパイク状のCa<sup>2+</sup>濃度上昇を示す。アンジオテンシンII刺激によるNFATの活性化は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を必要とするため、Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。その結果、受容体刺激によって引き起こされるCa<sup>2+</sup>濃度上昇は、刺激直後に観察されるIP<sub>3</sub>依存性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇とそれに続き繰り返し起こるスパイク状のDAG依存性を示すCa<sup>2+</sup>濃度上昇とに分けられることが、ゼストスポンジンCおよびDGKβを用いて明らかになった。DAG依存性を示すCa<sup>2+</sup>濃度上昇の頻度はアンジオテンシンII刺激により増加した。また、NFATの活性化にはIP<sub>3</sub>依存性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇ではなく、DAG依存性のCa<sup>2+</sup>濃度上昇が必要であった。

#### 5. TRPチャンネル

DAGによるCa<sup>2+</sup>濃度上昇で注目を浴びているのがTRPC (transient receptor potential canonical) チャンネルである<sup>9)</sup>。TRPCチャンネルはTRPチャンネルファミリーのメンバーである。TRPチャンネルは、もともとショウジョウバエの眼の光受容に異常を示す変異体の原因遺伝子として同定された。この遺伝子に変異が入ると、光への応答が一過性になり細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入が減弱する。このためこの遺伝子はtrp (transient receptor potential) と命名された。TRPは細胞膜を6回貫通するという共通の構造を持ち、現在までのところ、TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPMLの六つのサブファミリーに分類されている。このうち、受容体刺激と関連しているのはTRPCである。TRPCには7種が存在し、このうちTRPC3, TRPC6, TRPC7の活性がPLCの作用により生じたDAGの制御を受ける。

#### 6. TRPCチャンネルとNFATの核移行

パッチクランプおよびカレントクランプ実験を行うと、アンジオテンシン受容体刺激により、活動電位を生じる頻度の上昇ならびに膜電位の脱分極方向へのシフト (15mV程度) が起こり、さらにI-V曲線はTRPC様の曲線を示した<sup>2)</sup>。電気生理学的な手法では長期にわたる膜電位変化を測定できない。そこで、蛍光色素を用いて膜電位を長期的に測定すると、アンジオテンシン受容体刺激により膜電位は脱分極方向に変化した。この変化は、電気生理学的な

測定と一致して受容体刺激により15mV程度の膜電位変化を示していた。さらに、この膜電位変化はDAGアナログ(OAG)によっても生じた。DAG依存性を示すTRPCのうちどれが受容体刺激による膜電位変化を仲介しているのかを検討した。TRPC3とTRPC6を発現させると受容体刺激による効果は増強されたものの、TRPC7の発現では増強されなかった。したがって、TRPC3およびTRPC6が膜電位変化を仲介していることが明らかになった。さらに、TRPC3およびTRPC6のsiRNAを用いてノックダウンを行うと、受容体刺激による心肥大応答(タンパク質合成の促進、アクチン再構築)ならびにNFATの核移行が抑制された。したがって、TRPC3およびTRPC6が受容体刺激によるNFATの核移行、心肥大応答を仲介していることが明らかになった。

#### 7. L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルとTRPCチャンネルの関係

興味深いことに、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害剤ニトレンジピン処理によってもNFATの核移行は抑制された。そこで、問題となるのがTRPCとL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルとの関係である。受容体刺激による膜電位変化は、ニトレンジピン処理によって影響を受けなかった。したがって、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルはTRPCチャンネルとNFAT活性化の間に位置しているといえる。しかし、受容体刺激によって生じる15mV程度の膜電位変化(電気生理学的測定および蛍光色素による変化)では、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルの活性化を引き起こすのに十分ではないのも事実である。この点を明確に説明できるデータを現在までのところ得ていない。我々は、TRPCチャンネルの活性化により膜電位が脱分極しやすい状態になり、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介したCa<sup>2+</sup>流入が亢進されNFATの核移行が引き起こされると想定している。

心筋の収縮時にはL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介したCa<sup>2+</sup>流入が起こる。しかしながら、通常の収縮・弛緩サイクルの際に観察されるL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介したCa<sup>2+</sup>流入ではNFATの核移行は生じない。NFATの核移行は、L型Ca<sup>2+</sup>チャンネルによるCa<sup>2+</sup>流入とともにTRPCが活性化されると起きるのに対し、収縮の際に観察されるL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介したCa<sup>2+</sup>流入ではなぜ起きないのかについて、我々は明確に説明できない。実験に用いている新生仔心室筋細胞は、培養時には自発的な収縮と弛緩を繰り返している。細胞をアンジオテンシンIIで刺激すると、収縮・弛緩の頻度が増加する。当然、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度は収縮の際に上昇し弛緩の際に減少している。残念ながら、我々の用いている装置では収縮ごとに観察されるCa<sup>2+</sup>濃度の増加を

測定できないため、今回の結果以上の解析は困難である。我々の得た結果は、受容体刺激によるスパイク状の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は受容体刺激により頻度が増加すること、受容体刺激により膜電位は脱分極方向にシフトすること（ただしL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを脱分極させるほどではない）、またこれらの応答はTRPCチャンネルのDAGによる活性化を必要とすることを示しているという事実のみである。TRPCチャンネルとL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが相互作用し、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの活性化がより効率よく起きているのかもしれない。

### 8. $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を引き起こすメカニズムとNFATの活性化

運動によってもL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介した $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が観察される。しかし、運動では生理的心肥大は生じても病的心肥大は引き起こされない。したがって、アンジオテンシン刺激により生じたDAG依存性の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇が最終的にL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介した $\text{Ca}^{2+}$ 流入を引き起こさせるというスキームでは、運動によっては病的心肥大が形成されないことを説明できない。L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介した細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇以外に、TRPCチャンネルを介した何

か未知のシグナリング経路（分子）が病的心肥大を引き起こすには必要なのかもしれない。

細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアの枯渇によって細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入が促進されるストアー作動型の経路によっても生じる<sup>10</sup>。心筋細胞では、細胞内 $\text{IP}_3$ 受容体の発現量が低い。したがって、非常に大量に細胞内ストアの $\text{Ca}^{2+}$ が枯渇される（たとえば、thapsigarginで処理する）条件では細胞内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入は促進されるものの、通常受容体刺激では枯渇する量が少ないためにストアー作動型の $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路が細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に果たす役割は小さい。また、ストアー作動型の $\text{Ca}^{2+}$ 流入経路にTRPCチャンネルが関与しているかは明らかではなく、この点からもストアー作動型の $\text{Ca}^{2+}$ 流入による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇のNFAT活性化への寄与は小さいと考えている。

### 9. $\text{IP}_3$ との関係

それでは受容体刺激によって生じた $\text{IP}_3$ は何ら作用を示さないのだろうか？ それともNFATの核移行以外の応答に関与しているのだろうか？ 最近 $\text{IP}_3$ に関し興味

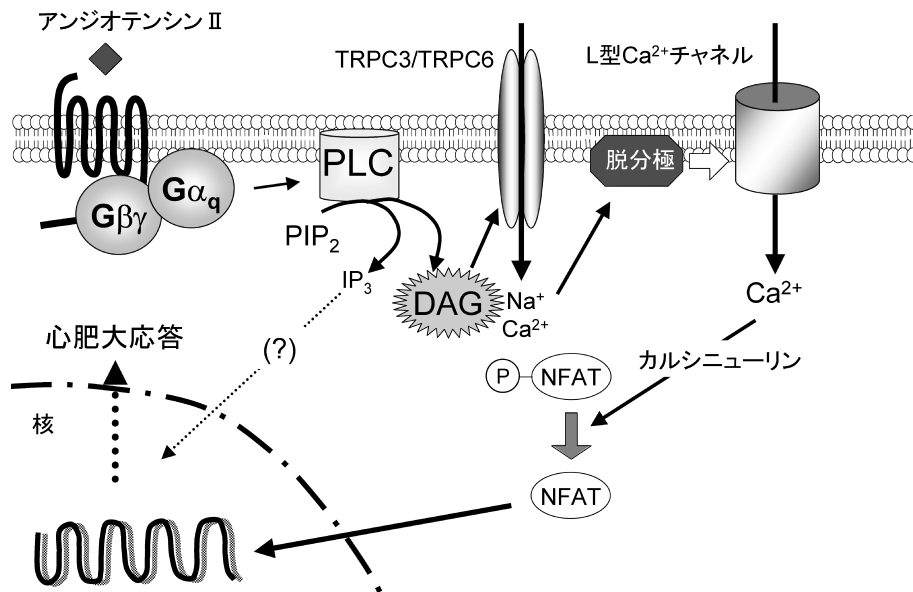


図1 アンジオテンシンIIで刺激したときのNFAT核移行のメカニズム

受容体刺激により $G_q$ -PLCが活性化され、 $\text{IP}_3$ とDAGが産生される。DAGがTRPC3およびTRPC6 (TRPC3/TRPC6)を活性化し陽イオンの流入を促進する。その結果、細胞は脱分極しやすい状態になりL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが活性化される。流入した $\text{Ca}^{2+}$ がカルシニューリンを活性化し、NFATの脱リン酸化を引き起こす。脱リン酸化されたNFATは核に移行し、心肥大に関与する遺伝子の転写を促進する。細胞質で産生した $\text{IP}_3$ が核内に移行するかは明らかではない。

ある報告がなされた。すなわち、細胞質の  $IP_3$  ではなく核内の  $IP_3$  産生および核内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が心肥大応答に重要であるという報告である<sup>11)</sup>。核内で上昇した  $Ca^{2+}$  がカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) を活性化し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) をリン酸化し、脱抑制をかけることで転写を促進し、心肥大応答へと至る経路が想定されている。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇に続く NFAT の活性化のみならず、核内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇も重要な役割を果たしていることは興味深い。しかしながら、どのような経路で核内  $IP_3$  産生が増加するのか、これまでに報告された細胞膜や細胞質で起きる反応との関連はあるのか、また TRPC チャンネルと核内  $IP_3$  産生との関係などは今後の課題である。さらに、我々の報告を含めいづれも TRPC を介して流入する  $Ca^{2+}$  の重要性を指摘しているものの、L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルとの関係あるいは生理的心肥大と病的な心肥大との違いをどのように説明するのかなどについても今後詳細に検討していかなければならない。

## 10. おわりに

我々は NFAT 活性化を引き起こす細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇経路について次のようなスキームを提唱した (図 1)。受容体刺激により  $G\alpha_q$  を介して PLC が活性化され、DAG が産生される。DAG は TRPC3/TRPC6 を活性化し膜電位を脱分極方向にシフトさせる。また、TRPC3/TRPC6 を介したイオン流入は脱分極しやすい状態を作り L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの活性化を引き起こす。L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルを介した  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が、NFAT の核移行さらには心肥大応答を引き起こす。TRPC を心筋に過剰発現させたトランスジェニックマウスは、細胞内への陽イオン流入が増加するため最終的に脱分極を引き起こし、L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルを介した  $Ca^{2+}$  流入が亢進するため心肥大を引き起こすことは想像できるし、実際のトランスジェニックマウスでも心肥大が形成された<sup>3,4)</sup>。これに対しノックアウトマウスでは、特定の TRPC をノックアウトすると他の TRPC の発現が亢進し機能を相補するため、それぞれの TRPC の機能を *in vivo* で解析するのは困難な状況である。TRPC のドミナントネガティブ体の発現あるいは選択的な阻害剤を用いた解析が必要なのかもしれない。いづれにしても、TRPC を介したシグナリングの重要性を個体レベルで示す必要があり、今後の進展が待たれる。

1) Heineke, J. & Molkenkin, J.D. (2006) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 589-600.

- 2) Onohara, N., Mishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., Mori, Y., Nagao, T., & Kurose, H. (2006) *EMBO J.*, 25, 5305-5316.
- 3) Nakayama, H., Wilkin, B.J., Bodi, I., & Molkenkin, J.D. (2006) *FASEB J.*, 20, 1660-1670.
- 4) Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Hill, J.A., & Olson, E.N. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 3114-3126.
- 5) Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., & Ito, H. (2007) *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 42, 498-507.
- 6) Bush, E.W., Hood, D.B., Papst, P.J., Chapo, J.A., Minobe, W., Bristow, M.R., Olson, E.N., & McKinsey, T.A. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 33487-33496.
- 7) Riddle, E.L., Schwartzman, R.A., Bond, M., & Insel, P.A. (2006) *Circ. Res.*, 96, 401-411.
- 8) Arimoto, T., Takeishi, Y., Takahashi, H., Shishido, T., Niizeki, T., Koyama, Y., Shiga, R., Nozaki, N., Nakajima, O., Nishimaru, K., Abe, J., Endoh, M., Walsh, R.A., Goto, K., & Kubota, I. (2006) *Circulation*, 113, 60-66.
- 9) Clapham, D.E. (2006) *Nature*, 426, 517-524.
- 10) Smyth, J.T., DeHaven, W.I., Jones, B.F., Mercer, J.C., Trebak, M., Vazquez, G., & Putney Jr., J.W. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1763, 1147-1160.
- 11) Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T.A., Dedman, J.R., Olson, E.N., Chen, J., Brown, J.H., & Bers, D.M. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 675-682.

黒瀬 等, 西田 基宏

(九州大学大学院薬学研究薬効安全性学分野)

TRPC channels and cardiac hypertrophy  
Hitoshi Kurose and Motohiro Nishida (Department of Pharmacology and Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

## 小胞型グルタミン酸トランスポーターの分子機構

### 1. はじめに

トランスポーターは物質輸送を通じて多様な生理現象に本質的に関わっており、トランスポーターの機能を知るとは生理現象の理解に必要不可欠である。しかし、哺乳類のトランスポーターの構造と機能には未知の部分が多く残されている。本稿では、最近の研究から明らかになってきた小胞型グルタミン酸トランスポーターのユニークな特性について紹介したい。