

---

動脈管における  
膜電位依存性カリウムチャンネルの  
酸素感受性に関する基礎的研究

---

(研究課題番号 18591226)

平成18年度～平成19年度 科学研究費補助金  
(基盤研究(C)) 研究成果報告書



平成20年3月

研究代表者 中西 敏雄

東京女子医科大学医学部 准教授



### <はしがき>

動脈管は胎生期循環において血液を肺動脈から大動脈にバイパスし生後閉鎖する。動脈管の閉鎖は、生後間もなく収縮反応を生じ、後に管腔を閉じて器質的（解剖学的）に完結する。出生後の動脈管閉鎖の機序は、血中の酸素濃度の上昇が関与していることは知られているが、詳細は明らかにされておらず、動脈管開存症の発生の機序も明らかにされていない。酸素濃度が上昇すると、動脈管は収縮し、肺動脈は弛緩する。一般に血管のトーンは静止膜電位に依存するが、その膜電位は主にカリウム（K）チャンネルによって制御されている。Kチャンネルが開けば過分極となり血管は弛緩し、Kチャンネルが閉じれば脱分極となり血管は収縮する。酸素が動脈管のKチャンネルを制御し収縮弛緩を司っている可能性がある。本研究では、新生仔動脈管において酸素がKチャンネルの開閉制御をする機序を明らかにすることを目的とした。

### 研究組織

研究代表者 : 中西敏雄（東京女子医科大学医学部 准教授）  
研究分担者 : 羽山恵美子（東京女子医科大学医学部 助教）  
研究分担者 : 松岡瑠美子（東京女子医科大学医学部 講師）

### 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,000	0	2,000
平成19年度	1,500	450	1,950
総計	3,500	450	3,950

## 研究発表（研究成果）

### （１）学会誌等

1. 中西敏雄、羽山恵美子、松岡瑠美子、勝部康弘. 未熟血管の収縮弛緩に關与するカリウムチャンネルの分子生物学的研究. (財) 日本心臓血圧研究振興会（平成十八年度研究業績集） p.19-23 (2007)

### （２）口頭発表

1. 羽山恵美子、今村伸一郎、吳翠嬌、松岡瑠美子、中西敏雄. 新生仔ブタ血管におけるカリウムチャンネルの発現の検討. 第 42 回日本小児循環器学会 2006.7.13-7.15 名古屋
2. Emiko HAYAMA, Cuijiao WU, Fung SUN, Shin-ichiro IMAMURA, Rumiko MATSUOKA, Toshio NAKANISHI. Characteristic distribution of potassium channels in the ductus arteriosus of porcine neonates and fetuses. 2nd IREIIMS open symposium, 2006.12.3-5, Tokyo.
3. 羽山恵美子、今村伸一郎、吳翠嬌、松岡瑠美子、中西敏雄. 新生仔および胎仔ブタ肺動脈におけるKチャンネル発現の検討. 第 13 回日本小児肺循環研究会 2007.2.3 東京
4. 羽山恵美子、孫芳、松岡瑠美子、中西敏雄. 膜電位依存性カリウムチャンネル Kv1.5 および Kvβ1.2 の細胞内局在に関する検討. 第 43 回日本小児循環器学会 2007.7.4-7.6 東京
5. 羽山恵美子、中西敏雄. 肺動脈および動脈管のニトロチロシン化の検討. 第 14 回日本小児肺循環研究会 2008.2.2 東京

## 参考論文

1. Emiko Hayama, Shin-ichiro Imamura, Cuijiao Wu, Makoto Nakazawa, Rumiko Matsuoka, Toshio Nakanishi. Analysis of Voltage-gated potassium channel  $\beta$  1 subunits in the porcine neonatal ductus arteriosus. *Pediatric Research*, 59: 167-174, 2006.
2. Hiroshi Kanamaru, Kensuke Karasawa, Michio Miyashita, Mamoru Ayusawa, Naokata Sumitomo, Tomoo Okada, Kensuke Harada, Toshio Nakanishi. Successful multiple coils embolization for bilateral patent ductus arteriosus with isolate subclavian artery. *Pediatric International*, 48: 510-513, 2006.
3. Katsuaki Toyoshima, Atsuhito Takeda, Shin-ichiro Imamura, Toshio Nakanishi, Kazuo Momma. Constriction of the ductus arteriosus by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 in near-term and preterm fetal rats. *Prostaglandin & other Lipid Mediators*, 79: 34-42, 2006
4. Katsuaki Toyoshima, Kazuo Momma, Shi-ichiro Imamura, Toshio Nakanishi. In vivo dilatation of the fetal and postnatal ductus arteriosus by inhibition of phosphodiesterase 3 in rats. *Biology of the Neonate*, 89: 251-6, 2006.
5. Cuijiao Wu, Emiko Hayama, Shi-ichiro Imamura, Rumiko Matsuoka, Toshio Nakanishi. Developmental changes in the expression of voltage-gated potassium channels in the ductus arteriosus of the fetal rat. *Heart and Vessels*, Jan;22(1):34-40, 2007.
6. Hidemi Kajimoto, Kyoko Hashimoto, Sandra N. Bonnet, Alois Haromy, Gwyneth Harry, Rohit Moudgil, Toshio Nakanishi, Ivan Rebeyka, Bernard Thébaud, Evangelos D. Michelakis, Stephen L. Archer. Oxygen activates the Rho/Rho-kinase Pathway and induces RhoB and ROCK-1 expression in Human and Rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species. *Circulation*, 115: 1777-1788, 2007.
7. Takeshi Takami, Hitoshi Yoda, Tadashi Kawakami, Hideshi Yamamura, Toshio Nakanishi, Makoto Nakazawa, Yukito Takei, Tasuku Miyajima, Akinori Hoshika. Usefulness of indomethacin for patent ductus arteriosus in full-term infants. *Pediatric Cardiology*, 28: 46-50, 2007.

8. Katsuaki Toyoshima, Kazuo Momma, Shin-ichiro Imamura, Toshio Nakanishi. In vivo dilatation of the postnatal ductus arteriosus by atrial natriuretic peptide in the rat. *Neonatology*. 92:139-144, 2007.

## 研究成果の概要

新生仔動脈管や肺動脈に主に発現する膜電位依存性カリウムチャネル (Kv)  $\alpha$  サブユニットは Kv1.5、 $\beta$  サブユニットは Kv $\beta$  1.2 である。酸素濃度の変化をシグナルとして Kv を制御するメカニズムの研究のために、Kv1.5 (膜タンパク質) と Kv $\beta$  1.2 (細胞質可溶性タンパク質) の相互作用、翻訳後修飾および結合するタンパク質の検出・同定は重要である。このためヒト胎仔腎細胞 (HEK 293) に一過性に単独又は共発現、また Kv1.5 を恒常的に発現する HEK 293 を作製した。

Kv 遺伝子を導入した HEK 293 における Kv1.5 および Kv $\beta$  1.2 の細胞内局在を共焦点レーザー स्क্যান顕微鏡を用いて観察したところ、Kv1.5 は主に細胞膜上、Kv $\beta$  1.2 は細胞質に分布するが、共発現するとよく一致し主に細胞膜に局在した。

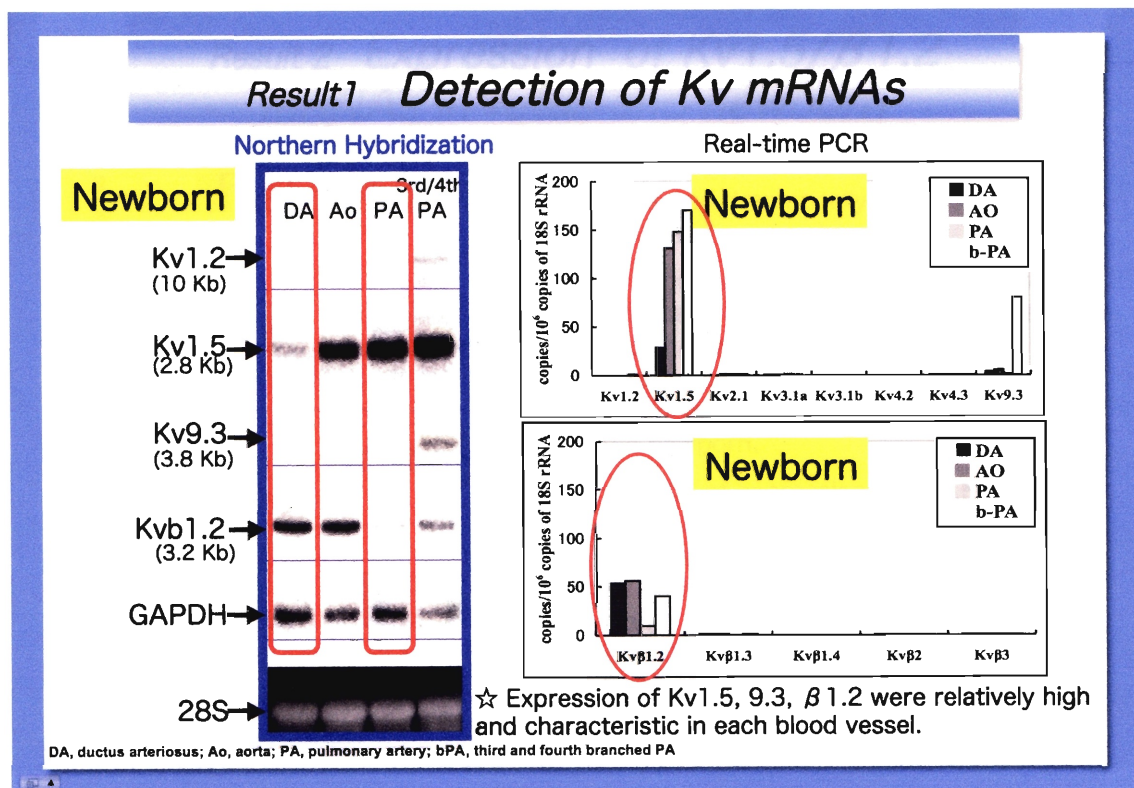
Kv を含む複合体を細胞膜から抽出、精製、濃縮し、Blue native 電気泳動法により巨大分子の状態泳動分離する方法を確立した。Kv1.5 複合体は 630 kDa、Kv $\beta$  1.2 複合体は 530 kDa、Kv1.5/Kv $\beta$  1.2 複合体は 800 kDa に分離された。Kv1.5 および Kv $\beta$  1.2 はいずれも 4 量体を形成するとされるが、アミノ酸配列から算出される 4 量体の分子量 (Kv1.5: 263 kDa, Kv $\beta$  1.2: 182 kDa) より本複合体は大きいことから、翻訳後修飾並びに相互作用するタンパク質の存在が示唆された。Kv1.5 多量体は還元型 SDS ゲル電気泳動では分子量 300~400kDa、単量体は 95 kDa および 90 kDa を示した。Kv1.5 に酵素的脱糖鎖を行ったところ N-結合型グリカン修飾が示されたが、脱糖鎖後も異なる分子量の Kv1.5 は残った。Kv $\beta$  1.2 単量体は分子量 45 kDa が主であった。Kv1.5 および Kv $\beta$  1.2 多量体の形成には S-S 結合が寄与する可能性が示された。アルキル化剤 (TCEP および AMS) を用いた実験から、Kv $\beta$  1.2 には分子内 S-S 結合が存在している可能性が示された。

低酸素条件にした動脈管および肺動脈のグルタチオン化およびニトロチロシン化の検討を行った。抗グルタチオン抗体では差はなかったが、抗ニトロチロシン抗体の結果から、DA では中膜の内腔側に特徴的な染色がみられ、低酸素条件の DA でやや濃かった。

研究成果の詳細は、既に発表したものについては論文および口頭発表要旨に記載した。主要な成果および未発表の成果について次頁以降に記載する。

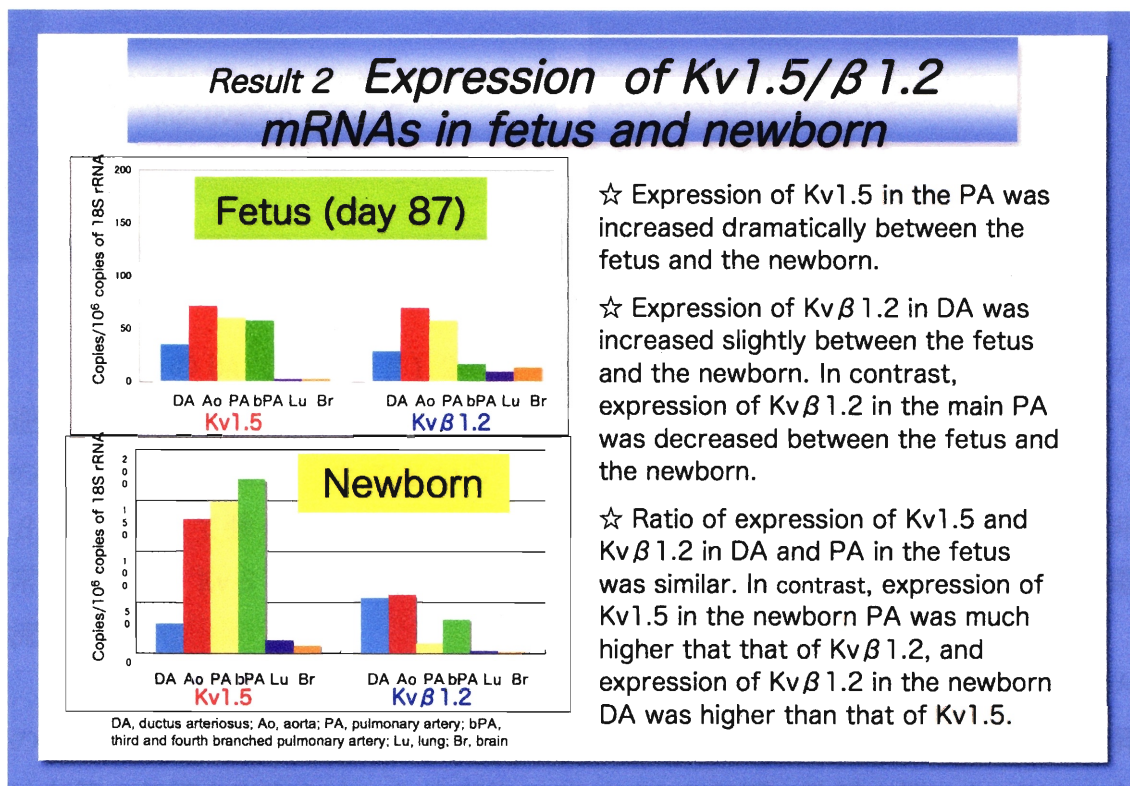
## 1. 新生児動脈管および肺動脈に発現する膜電位依存性カリウムチャンネルの検討

ブタ新生児および胎児（妊娠 87 日、ブタの妊娠期間はおよそ 114 日間）の動脈管 (DA)、大動脈 (Ao)、肺動脈 (PA)、第 3 および第 4 分岐肺動脈 (b-PA) 試料から全 RNA を調製し、Northern hybridization 法により Kv1.2、Kv1.5、Kv9.3、Kvβ1.2 および GAPDH プローブで検出した。結果は下図に示すように Kv1.2 および Kv9.3 はわずかに b-PA で発現を示した。いずれの血管でも Kv1.5 が発現していたが、DA では他と比べて低い発現であった。Kv1 のアクセサリチャンネルである Kvβ1.2 は DA および Ao で高発現しており b-PA で低い発現を示したが、主 PA ではほとんど発現していなかった。逆転写反応により cDNA を調製しリアルタイム PCR 法により、酸素感受性膜電位依存性カリウムチャンネル (Kv) の発現を新生児の DA、Ao、PA および b-PA 検討したところ、これらの血管で発現している酸素感受性 Kv は、Kv1.5 であることが示された。そこで Kv1 サブファミリーのアクセサリチャンネルである Kvβ の発現を Kvβ1.2, 1.3, 1.4, β2 および β3 について検討したところ、Kvβ1.2 であることが明らかとなった。



## 2. 新生仔および胎仔の動脈管および肺動脈における Kv1.5 および Kvβ1.2 発現検討

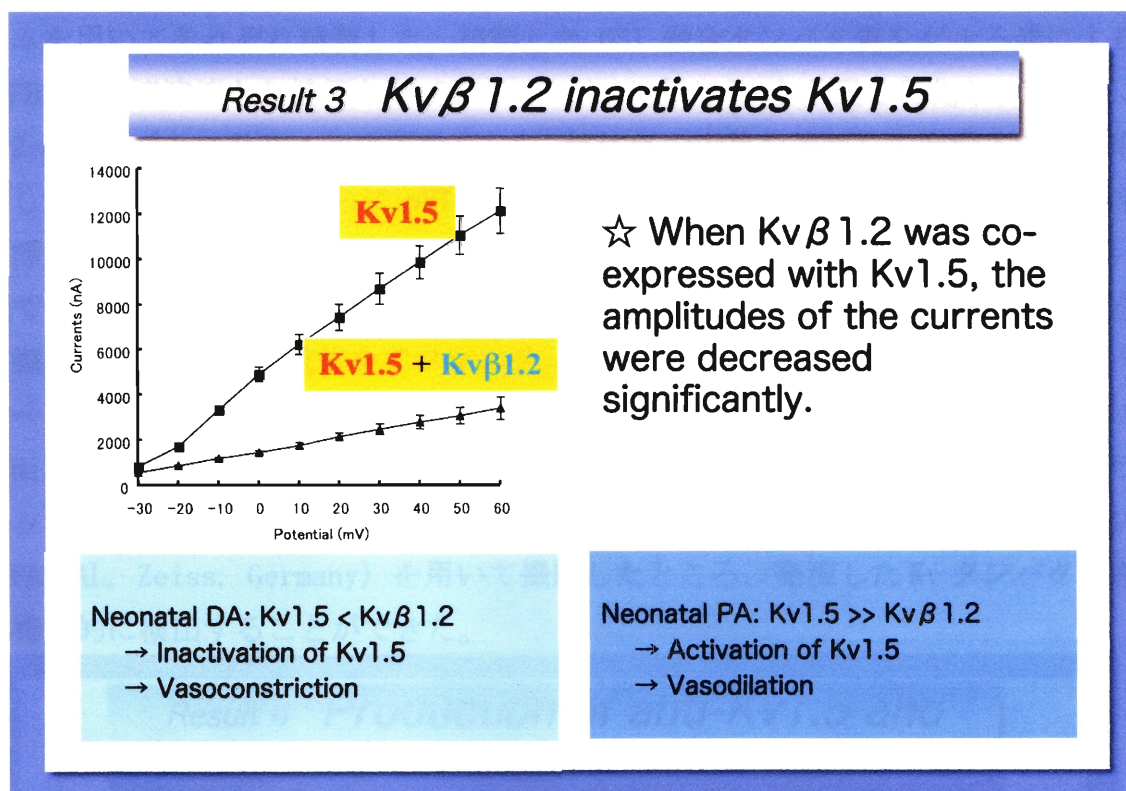
ブタ新生仔に加えて胎児（妊娠 87 日、ブタの妊娠期間はおよそ 114 日間）の DA および PA における Kv1.5 および Kvβ1.2 の発現をリアルタイム PCR 法により検討した。結果は下図に示すとおり、胎仔においては Kv1.5 と Kvβ1.2 の発現は大血管（Ao, PA, DA）においてほぼ 1 対 1 の割合を示した。新生仔の Ao と PA では Kv1.5 が Kvβ1.2 の 3、10 倍高く、DA では逆に Kvβ1.2 が Kv1.5 より高い発現を示した。Kv1.5 は新生仔の PA と Ao においては発現が著しく増加し、DA ではわずかに減少していた。Kvβ1.2 の発現量は胎仔と新生仔で大きくは変わらなかったが、新生仔の DA でやや増加し主 PA で減少した。





### 3. Kvβ1.2によるKv1.5電流の低下

Kv1.5 cRNA を注入したアフリカツメガエルの卵母細胞で、Kv 電流を測定した。Kvβ1.2 cRNA を Kv1.5 と一緒に注入すると、Kv1.5 の K 電流は強く阻害された。



生後直後の DA では、Kvβ1.2 の発現量が多く、Kv1.5 が少ない。PA ではその逆である。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験により Kvβ1.2 が Kv1.5 の K 電流が強く阻害したことから、新生児の動脈管では、Kv1.5 の K 電流は Kvβ1.2 によって強く阻害される可能性がある。肺動脈では、Kv1.5 の発現量が非常に多いが、Kvβ1.2 は少ないことから、Kvβ1.2 によって阻害される Kv1.5 電流は少ない。

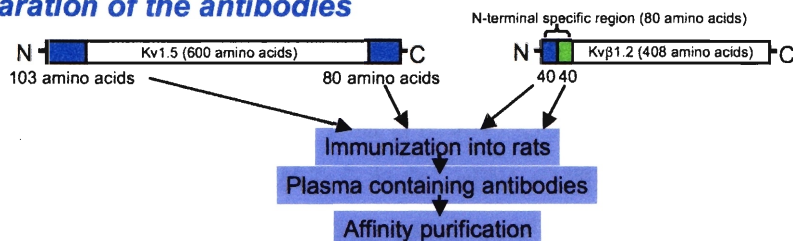
Kv が阻害され膜電位が脱分極するとカルシウムチャネルが活性化し、細胞内のカルシウム濃度が上昇する。血管平滑筋細胞の場合、カルシウム濃度の上昇は血管の収縮をもたらす。生後直後の DA と PA の収縮・弛緩の傾向を、Kv1.5 と Kvβ1.2 の発現量の違いが示している。生後直後の動脈管と肺動脈における Kv1.5 および Kvβ1.2 の発現が、極めて特徴的であることが示された。

#### 4. Kv1.5、Kvβ1.2 抗体の調製

抗ブタ Kv1.5 および Kvβ1.2 抗体を調製した。pGEX-6P2 発現ベクターにブタ Kv1.5 N末 103 アミノ酸、C末 80 アミノ酸、Kvβ1.2 N末の Kvβ1.2 特異部分 40 アミノ酸配列 2 ヲ所(N1, N2)をそれぞれ挿入し、発現用大腸菌 BL-21 を用いて IPTG 誘導により GST-Kv 融合タンパク質を発現、グルタチオンアフィニティカラムを用いてそれぞれ精製した。精製した GST 融合タンパク質をゲルろ過により PBS 緩衝液溶液とし抗原としてフロイントアジュバントと混合乳化し、ラットに 2-4 週間ごとに計 3-4 回皮下投与した。抗体価の上昇を確認して麻酔下全血採取し血漿を調製した。さらに pET43a 発現用ベクターに同様に Kv 部分塩基配列を挿入し、NUS-Kv 融合タンパク質 (6x His 配列含む) を発現し、Ni カラムを用いてアフィニティ精製した。この NUS 融合タンパク質を共有結合させたカラムを調製し、ラット Kv 抗体をアフィニティ精製した。pIRES 哺乳動物発現ベクターにブタ Kv1.5 および Kvβ1.2 をそれぞれ挿入し、HEK 293 細胞に HilyMax (Dojindo) を用いてトランスフェクションし、発現させた。精製したラット Kv 抗体を用いて蛍光免疫染色し、レーザースキャン共焦点顕微鏡 (510 PASCAL, Zeiss, Germany) を用いて撮影したところ、発現した Kv タンパク質を特異的に検出することができた。

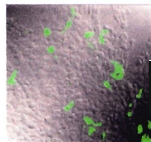
### Result 4 Production of anti-Kv1.5 and anti-Kvβ1.2 polyclonal antibodies

#### Preparation of the antibodies

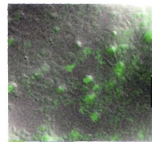


#### Confirmation of the antibodies

Anti-Kv1.5 N103 antibody

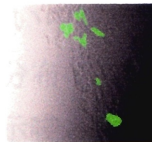


Anti-Kv1.5 C80 antibody

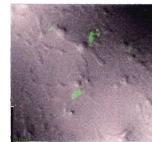


☆ Both antibodies could detect Kv1.5 transfected in HEK293.

Anti-Kvβ1.2 N1 antibody



Anti-Kvβ1.2 N2 antibody



☆ Both antibodies could detect Kvβ1.2 transfected in HEK293.

## 5. DA および PA における Kv1.5 および Kv $\beta$ 1.2 の分布

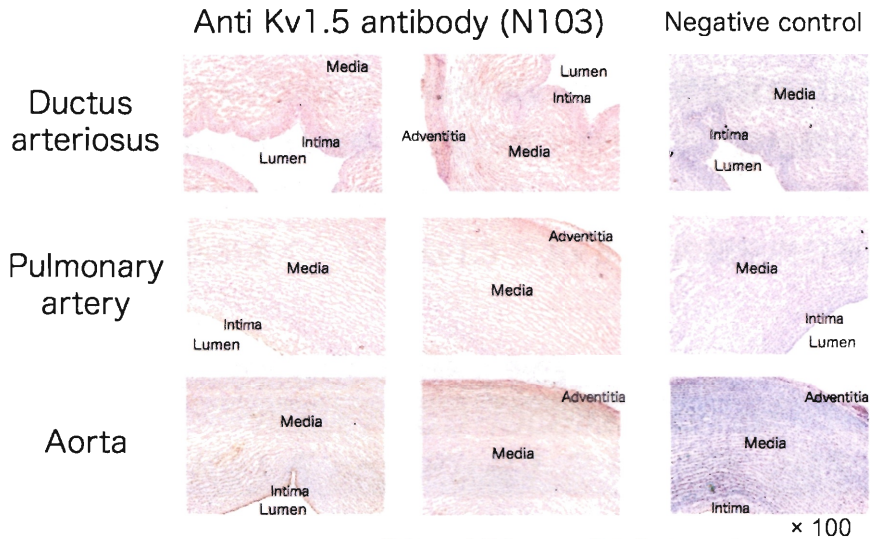
ブタ新生仔 DA、PA および Ao を採取後直ちに生理食塩液で洗った後、OCT compound を用いて包埋凍結し $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ライカマイクロトームを用いて凍結切片を作製した。切片を風乾し4%パラホルムアルデヒド-PBS で20分間固定し、スライドをPBSで洗った。0.2% Triton X-100-PBS で透過化を室温5分実施し、スライドをPBSで洗った。0.3% 過酸化水素-メタノール中で内在性の peroxidase の quenching を30分間を行い、スライドをPBSで洗った。希釈した blocking serum (ウサギ正常血清) で切片を20分間インキュベートした。前項で調製したラット抗 Kv1.5 およびラット抗 Kv $\beta$ 1.2 抗体をそれぞれ1.5% ウサギ正常血清-PBS で希釈し、室温30分間保湿下で切片とインキュベートした後PBSで洗った。陰性コントロールの切片ではラット抗 Kv 抗体を除いた。希釈したビオチン化抗ラット抗体と切片を室温30分間保湿下でインキュベートしPBSで洗った。希釈した Vectastain elite ABC reagent で切片を30分間インキュベートしPBSで洗った。その後、希釈した DAB-過酸化水素緩衝液で検出し、ヘマトキシリン液を用いてカウンター染色を行い封入した。結果の図は次頁に示した。

DA、PA、Ao の内膜および中膜に Kv1.5 はほぼ一様に発現していた。これらの血管の外膜にやや強い発現がみられた。Kv $\beta$ 1.2 は DA の内腔に近い中膜に強く発現しており、中膜内で分布に違いがみられた。PA および Ao で外膜およびその近くにやや強い分布がみられ、中膜全体にほぼ均一な発現がみられた。

Kv1.5 タンパク質はいずれの血管においても内膜および中膜にほぼ一様に発現しており、mRNA の結果より各血管における発現の差が少ない印象であった。また、外膜にやや強い発現がみられた。mRNA の調製に用いた試料では外膜を除去しているので、この強い発現は mRNA のデータには寄与していない。Kv1.5 の外膜における発現はラットの DA・PA においても同様の結果を得た。

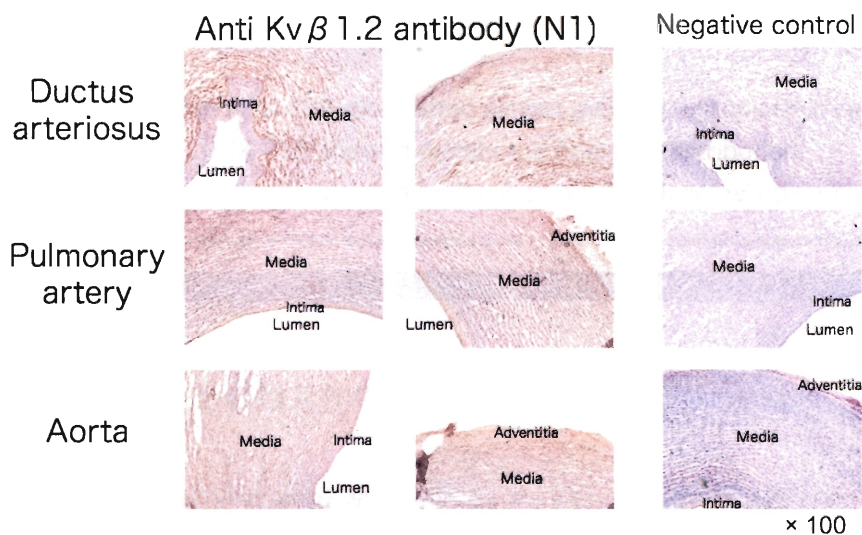
Kv $\beta$ 1.2 の DA における分布は内腔に近い中膜に強い。血流や血管内皮細胞からの刺激に速やかに反応するのに適当な分布であり、Kv $\beta$ 1.2 が血管トーンの維持に Kv1.5 と共に関与している可能性が示唆された。

## Result 5 Immunohistochemistry of Kv1.5 in the DA and PA



☆ Kv1.5 in the media of the DA and PA was distributed almost evenly.

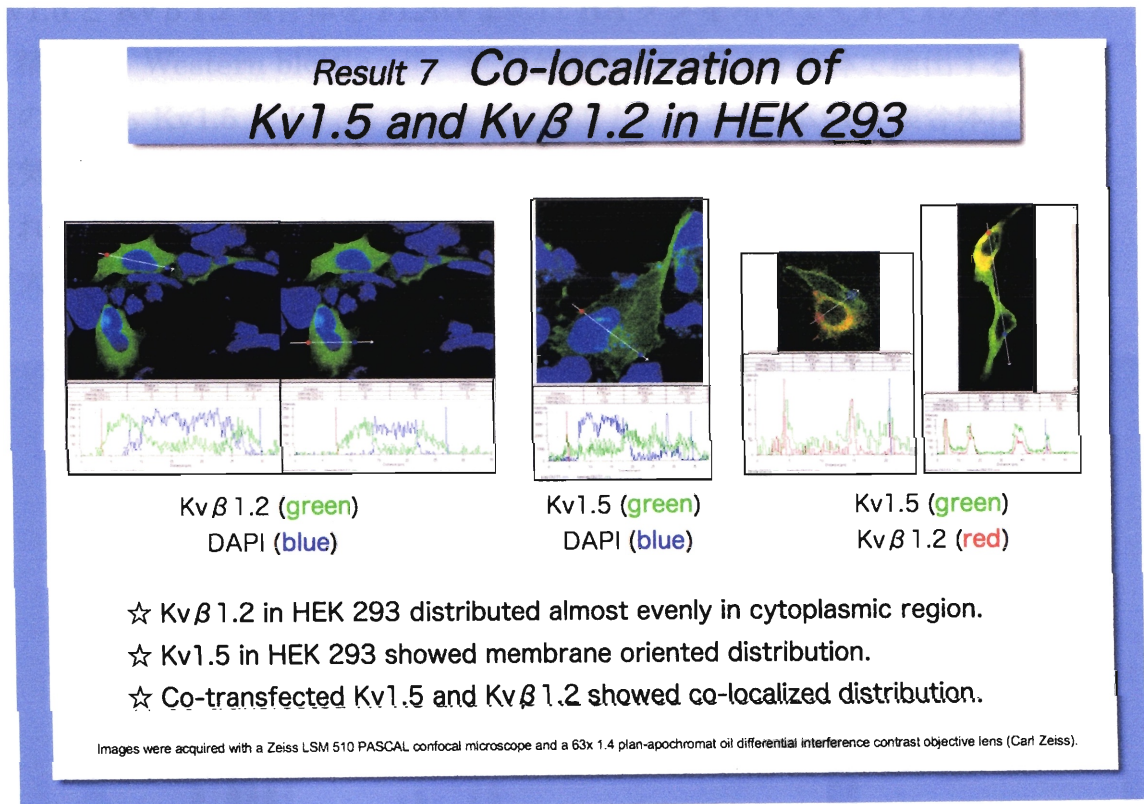
## Result 6 Immunohistochemistry of Kvβ 1.2 in the DA and PA



☆ Kvβ 1.2 was expressed strongly in the inner part of the media in the DA.

## 6. Kv1.5 および Kvβ 1.2 の細胞内局在

HEK 293 細胞に Kv1.5 および Kvβ 1.2 を発現させ、細胞内分布を検討した。Kv1.5 と Kvβ 1.2 をそれぞれ pIRES ベクターに挿入し、4 項で記載した方法でそれぞれトランスフェクションすると、Kvβ 1.2 は細胞質にほぼ均等に分布する傾向を示した。Kv1.5 は細胞質にも一部分布したが、細胞膜に集まる傾向を示した。Kv1.5 と Kvβ 1.2 を同時にトランスフェクションすると、両 Kv が一致して発現する細胞が多く、また Kv1.5 と Kvβ 1.2 の細胞内分布はよく一致していた。



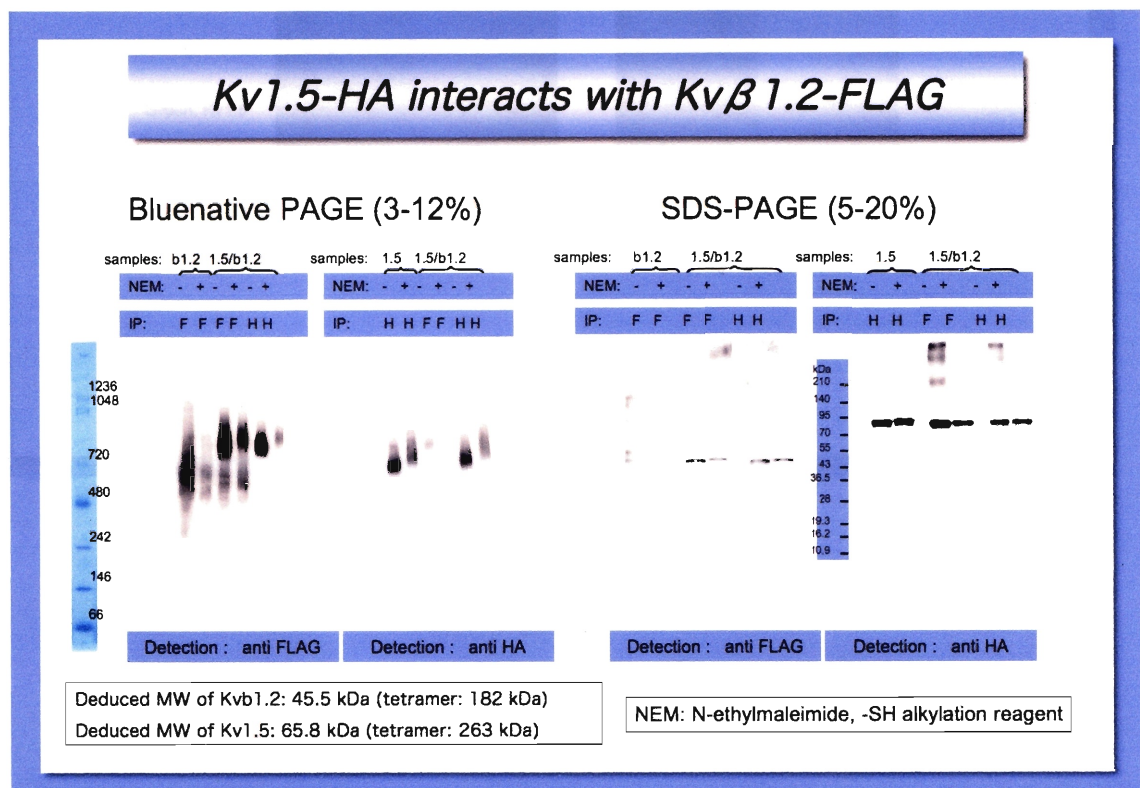
## 7. Kv1.5 と Kvβ 1.2 の相互作用

Kv1.5-HA (C 末に HA タグ入り) および Kvβ 1.2-FLAG (C 末に FLAG タグ入り) の相互作用を生化学的に検討するために、HEK 293 細胞に両 Kv を単独または同時にトランスフェクションし発現させた。発現した Kv タンパク質を非イオン性界面活性剤である Digitonin および DDM を含む緩衝液で抽出し、抗タグ抗体を用いたアフィニティ精製を行い、Blue-native 電気泳動法により複合

体として泳動分離した。Western blotting 法により、各 kv を検出したところ、Kv  $\beta$  1.2 複合体はおよそ 530 kDa、Kv1.5 複合体はおよそ 630 kDa、Kv1.5/Kv  $\beta$  1.2 複合体はおよそ 800 kDa の分子量を示した。Kv  $\beta$  1.2 の単量体の計算上の分子量は 45.5 kDa であり、四量体としても、182 kDa であり、Kv1.5 の単量体の分子量は 65.8 kDa であり、四量体の場合で 263 kDa である。Kv 複合体の blue-native 電気泳動による分子サイズはいずれもこれら理論値を上まわっており、翻訳後修飾や結合しているタンパク質が存在する可能性が示された。(下図左)

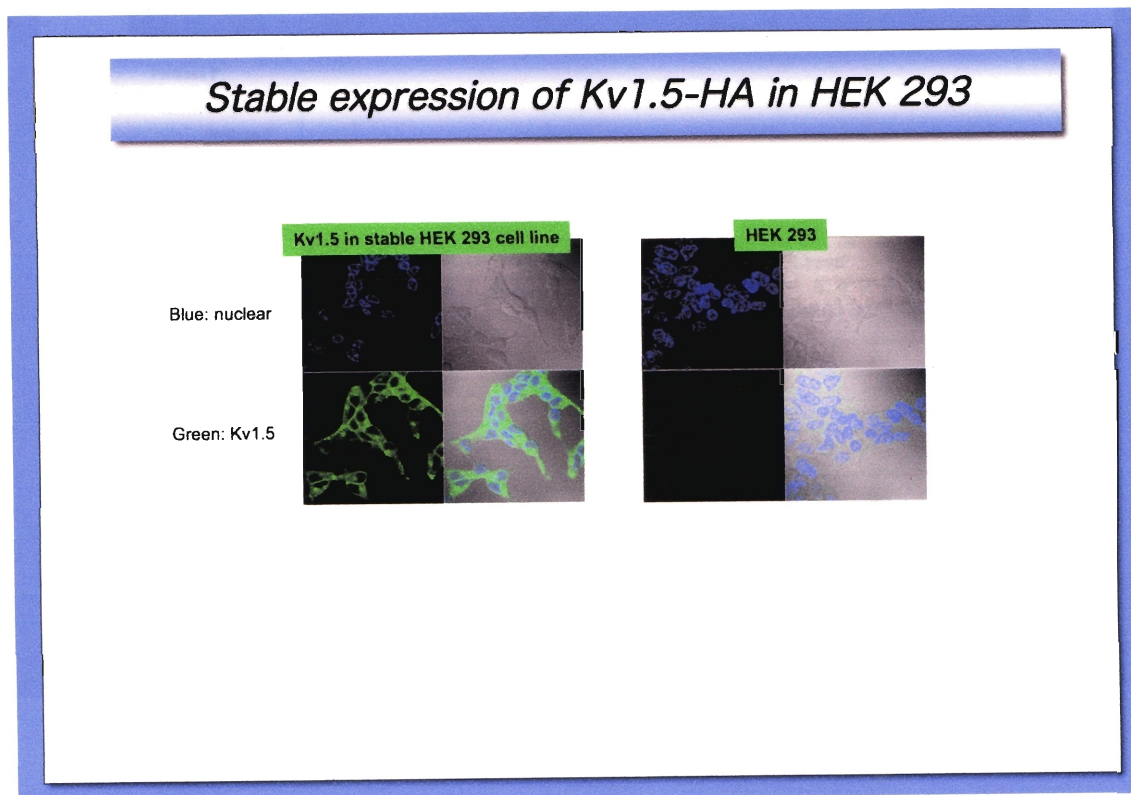
同じ試料を SDS 電気泳動法により分離した結果を下図右に示した。

Kv1.5 と Kv  $\beta$  1.2 複合体を FLAG または HA タグを用いてそれぞれアフィニティ精製し、Western blotting 後、抗 HA または抗 FLAG 抗体で検出するといずれの場合も Kv1.5 と Kv  $\beta$  1.2 を検出することができた。Kv1.5 複合体は、SDS 電気泳動法を用いても単量体の他に多量体と推定される複数のバンドを示した。これらの結果から、Kv1.5 および Kv  $\beta$  1.2 は HEK 293 細胞内で相互作用し、巨大 Kv 複合体を形成することが明らかとなった。



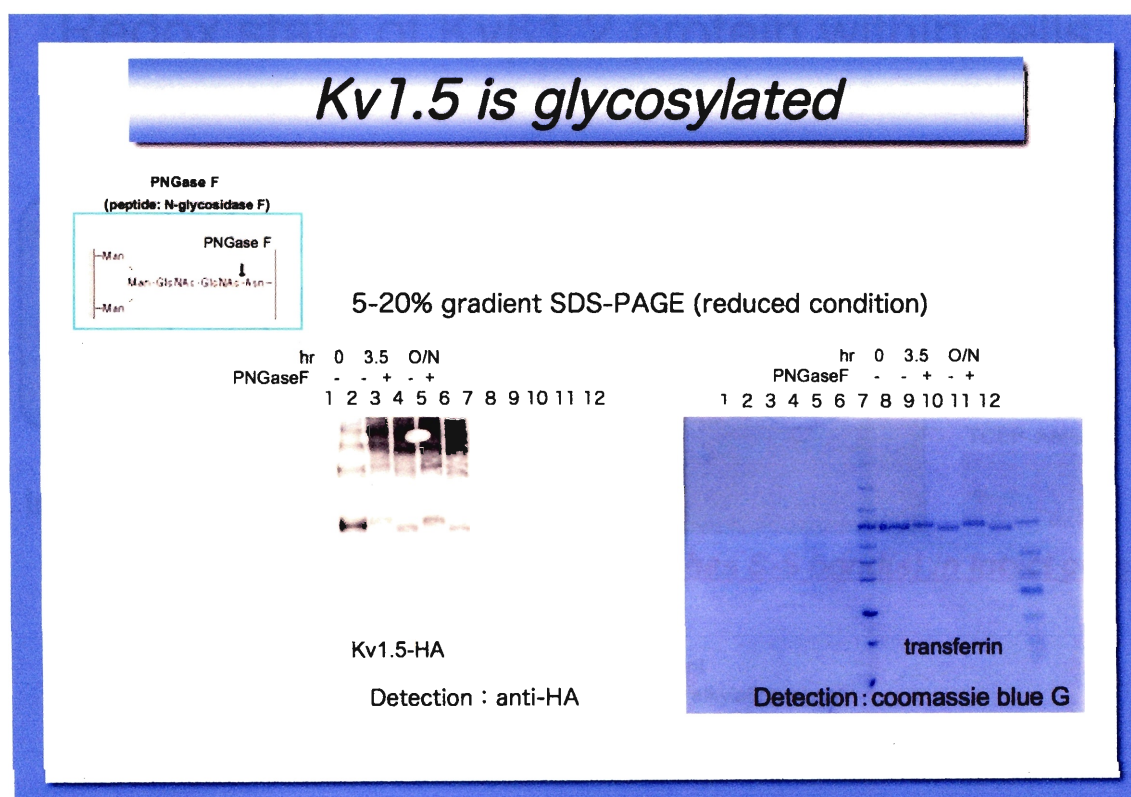
## 8. Kv1.5 を恒常的に発現する HEK 293 細胞の確立

Kv1.5 タンパク質を大量に得るために、Kv1.5 を安定に発現する HEK 293 細胞を作製した。Kv1.5-HA を前記の方法でトランスフェクションし、G418 1 mg/ml を含む培地により選択培養し、限界希釈法により Kv1.5 をよく発現する細胞をクローン化した。下図のように確立した Kv1.5 HEK 293 細胞に蛍光免疫染色を行うと、主として細胞膜に Kv1.5 が発現していることが示された（下図左の緑色部分）。下図右はネガティブコントロールの HEK 293 であり緑色の染色はみられない。



## 9. Kv1.5 糖化の検討

前項で確立した Kv1.5 発現 HEK293 細胞から Kv1.5 複合体を抽出し、PNGase F 処理を行ったところ、SDS 電気泳動後の Kv バンドの位置が変化した。コントロールとして同時に糖タンパク質として知られるトランスフェリンに同じ処理を施したが同様に泳動バンドの位置の変化がみられた。これらの結果から、Kv1.5 は HEK 293 細胞内で糖修飾されることが示された。

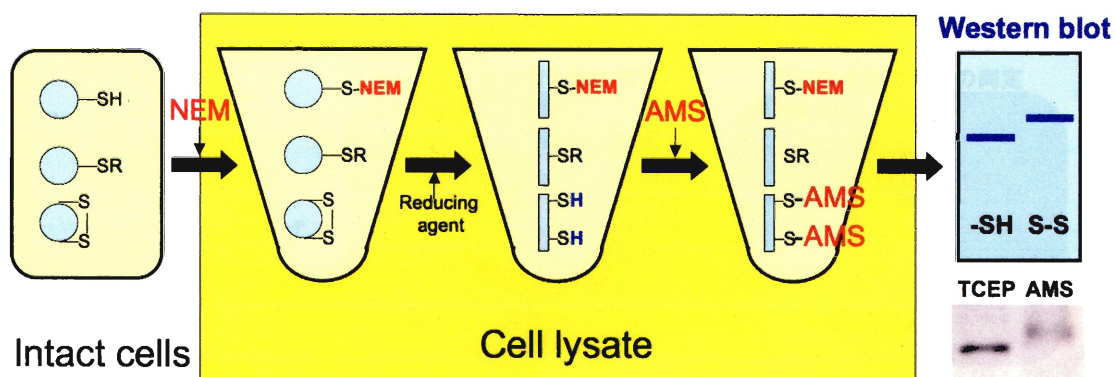




## 10. Kvβ 1.2 は細胞内で S-S 結合を持つ

下図に示すようにアルキル化剤 (TCEP および AMS) を用いた実験により、HEK 293 に発現させた Kvβ 1.2 には分子内 S-S 結合が存在している可能性が示された。

### Redox state of Kvβ1.2 protein within cells



***Kvβ1.2 has S-S bond(s) in intact cells***

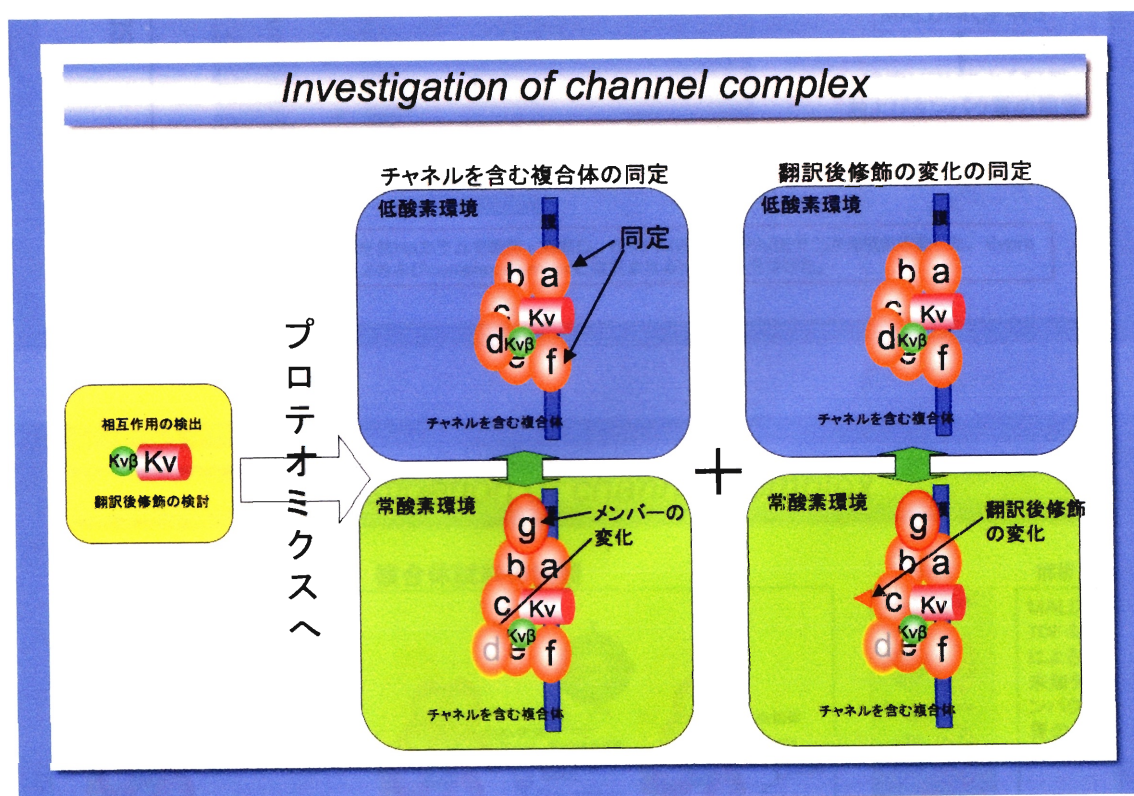
NEM: N-ethylmaleimide, membrane permeable alkylating agent

TCEP: Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, reducing agent

AMS: 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, larger alkylating agent

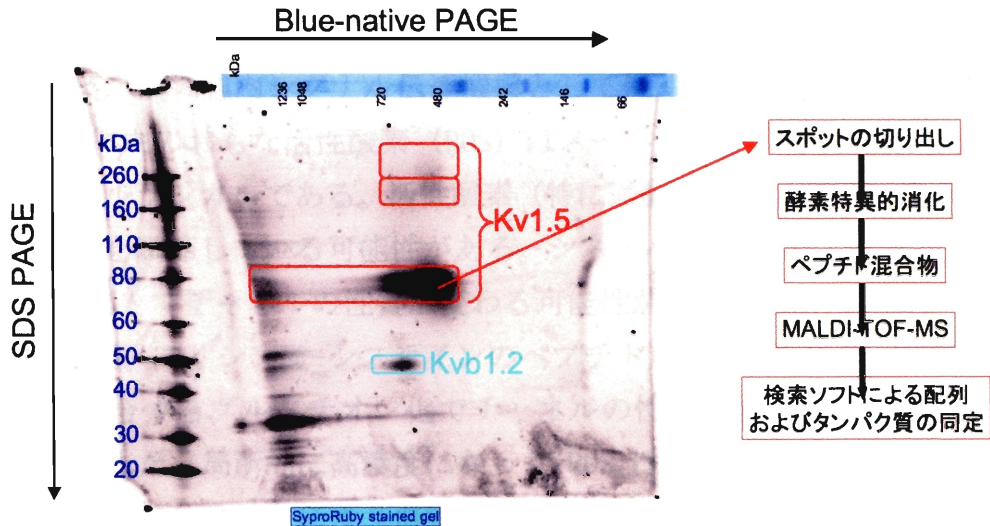
## 11. Kv 複合体のプロテオミクス

これまでの結果から Kv1.5 および Kvβ 1.2 が複合体を作って細胞内に存在していることが明らかとなった。下図に示すようにチャンネルを含む複合体のメンバーおよび翻訳後修飾を同定するために、TOF-MS による分析を行うために、Kv1.5 を恒常的に発現する HEK 293 細胞を大量に培養し、Kvβ 1.2 をトランスフェクションし、HA タグ抗体を用いたアフィニティ精製によりおよそ 3g の細胞を用いて Kv1.5-Kvβ 1.2 複合体の抽出を実施した。



次頁に抽出した Kv 複合体を一次元目に Blue-native 電気泳動、二次元目に SDS 電気泳動を用いて二次元電気泳動し、Sypro Ruby により染色したゲルの図を示した。Kv1.5 および Kvβ 1.2 と推定されるスポットが分離され、さらに複合体タンパク質と推定されるスポットが複数見つかった。(TOF-MS による分析に向けて作業中) 現在は細胞に発現させたチャンネル複合体の分析を実施しているが、将来は組織中に発現しているチャンネル複合体も次頁下の図に示した方法によって分析する計画である。

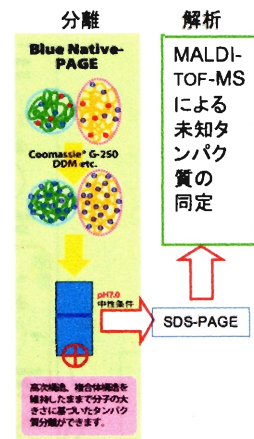
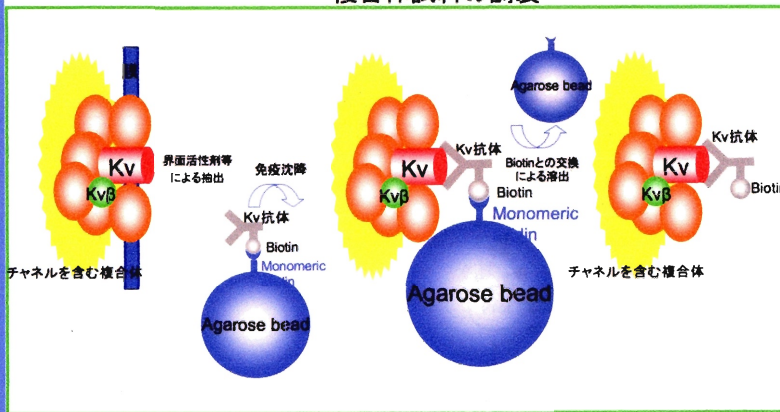
*Kv1.5/Kvb1.2 complex may contain unknown associated proteins*



☆ Kv1.5HA/Kvb1.2 complexを抗Haカラムで精製・濃縮し、BN PAGE/SDS PAGEで二次元電気泳動した。Sypro Ruby染色によりKv1.5、Kvb1.2およびcomplex memberと推定されるbandsを見つけた。

*Investigation of channel complex*

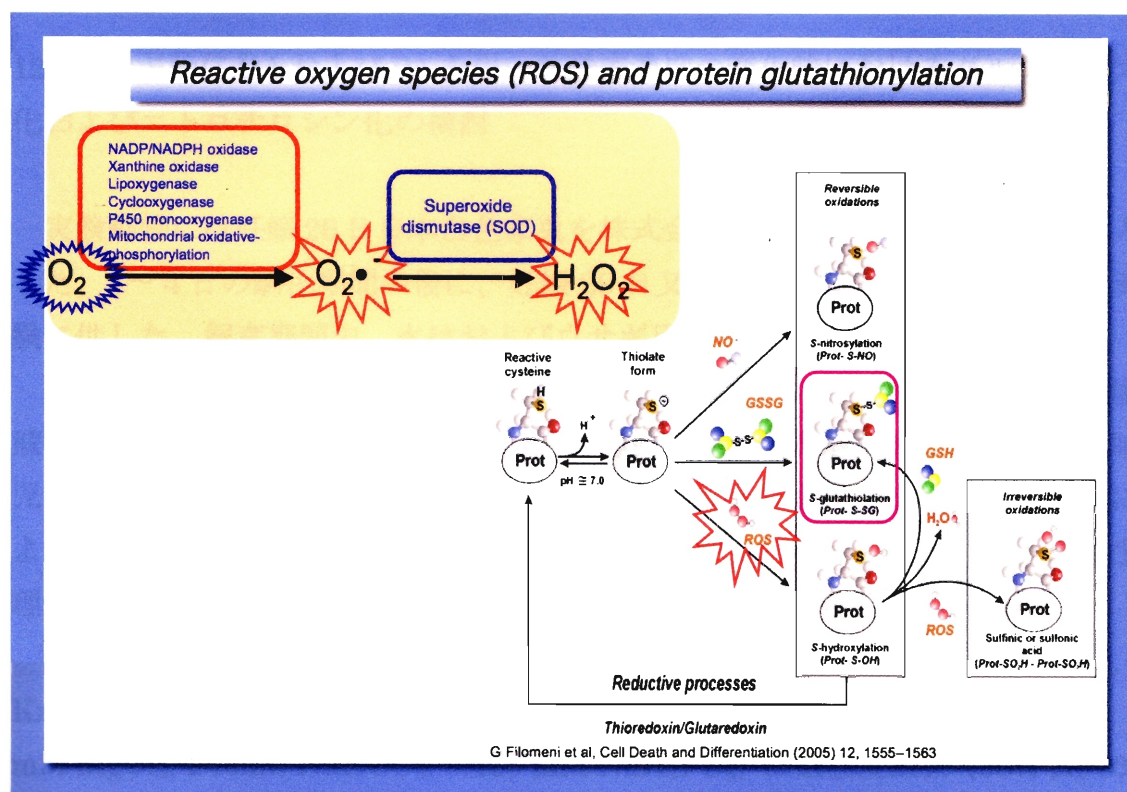
複合体試料の調製

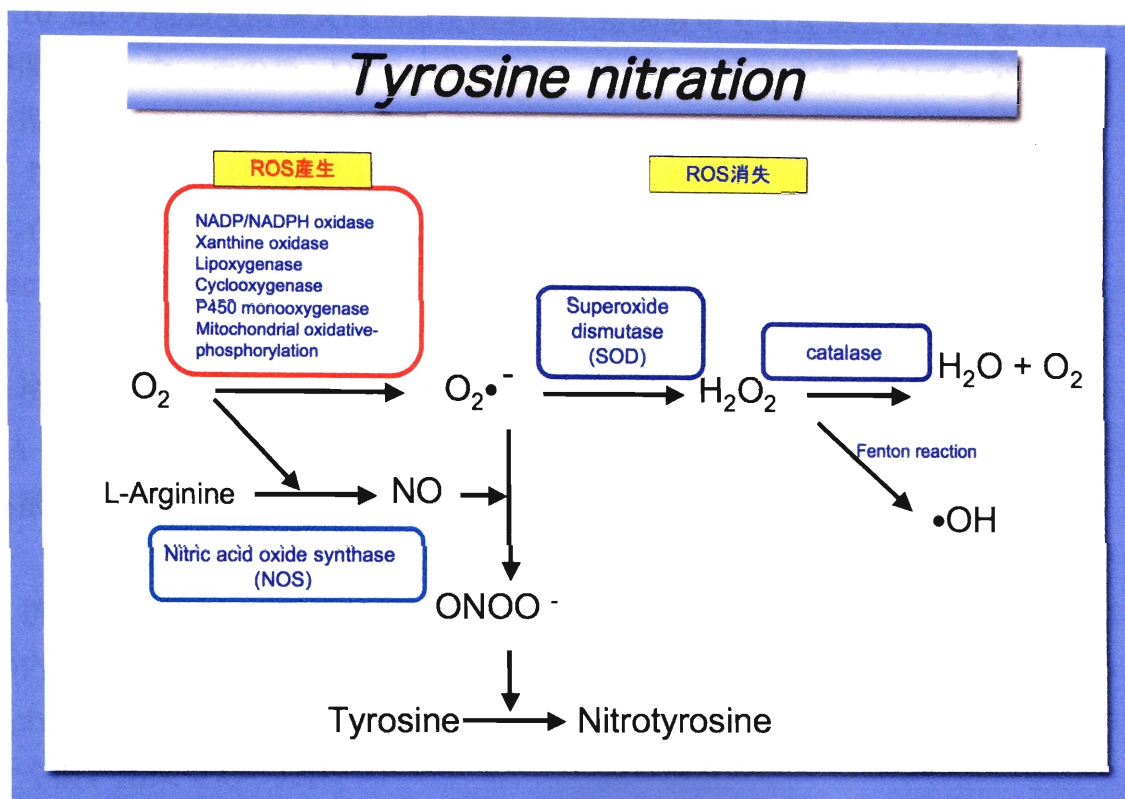


→ チャンネルを含む複体のプロテオーム

## 12. 酸素濃度の変化とグルタチオン化およびニトロチロシン化

生体組織における酸素濃度の変化は、活性酸素の産生を変化させ、細胞内の酸化還元状態（レドックス状態）を変化させる。生体分子（タンパク質など）の酸化還元反応が細胞内シグナル伝達機構として働く可能性がある（レドックス制御）。生体内のおもな活性酸素（ROS）はスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロオキシルラジカルである。活性酸素（特に過酸化水素）が、PA や DA のチャネルの開閉を調節している可能性がある。システイン残基中の SH 基が酸化され SS となることでチャネルの性質が変わる可能性がある。また、グルタチオン（グルタミン酸-グリシン酸-システインのペプチド）の SH 基が SS に酸化されタンパクに結合するグルタチオン化でチャネルの性質が変わる可能性もある。（下図参照）また、局所的に高濃度になった ROS は一酸化窒素を不活性化してチロシンに結合させることにより血管を収縮させることも知られている。ROS の局所における高濃度化の指標としてチロシンのニトロ化が用いられる。（次頁の図参照）





## 12. ウサギ胎仔 DA および PA を用いた酸素濃度の変化時におけるグルタチオン化およびニトロチロシン化の検討

実験動物には妊娠 26 日日本白色家兔を株式会社埼玉実験動物供給所より購入した。3~4 日の馴化期間の後に、妊娠 29 日又は 30 日 (体重 3.4~4.4 kg) で実験に供した。飼育期間中、水はおよびウサギ用固形飼料を自由摂取させた。

妊娠家兔にペントバルビタールナトリウム液 (ソムノペンチル) を生理食塩液で 1:5 希釈したものをおよそ 10 ml 耳静脈投与し全身麻酔した。開腹し、胎児を含む全子宮を採取し速やかに氷冷した。母獣は放血死させ、胎仔は断頭により直ちに放血死させた。実体顕微鏡 (model SMZ, NiKon, Tokyo) 下、氷冷生理食塩液中で胎児から DA、PA および Ao 試料を採取した。

低酸素、高酸素飽和緩衝液の調製は Nakanishi T. et al (1993) に従い、Krebs-Henseleit (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM  $CaCl_2$ , 6 mM glucose, 1 mM  $MgCl_2$ , 24 mM  $NaHCO_3$ , 0.436 mM  $NaH_2PO_4$ ) に低濃度酸素 (95%  $N_2$ -5%  $CO_2$ ) 又は高濃度酸素 (95%  $O_2$ -5%  $CO_2$ ) を飽和させ、pH7.4 に調整した。

10 ml の低濃度酸素又は高濃度酸素飽和緩衝液中で DA および PA を 37°C 1 時間培養した。その後、OCT compound で包埋し、液体窒素-イソプロパノールを用いて凍結し、-80°C で保存した。

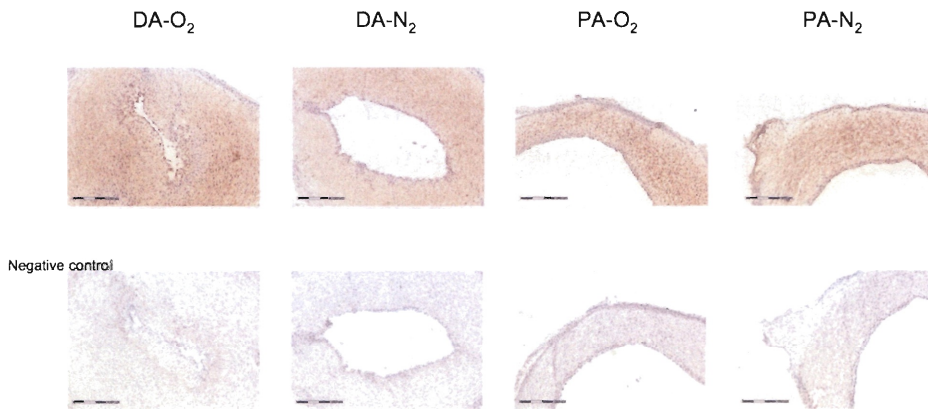
ミクロトーム (CM3050, Leica, Germany) を用い、免疫染色用には 5  $\mu$  m、マイクロダイセクション用には 7  $\mu$  m 厚の凍結切片を調製した。免疫染色には、Vectastain Elite ABC キット (Vector laboratories, CA, USA) を使用した。

抗グルタチオン抗体による免疫染色の結果を次頁上図に示した。DA および PA いずれにおいても外膜近傍に比べて中膜にやや高い染色を示したが、低酸素、高酸素濃度による染色の違いはみられなかった。

抗ニトロチロシン抗体による免疫染色の結果を次頁下図に示した。DA の中膜の内腔側に特徴的な染色がみられた。PA にも同じ傾向の染色がごくわずかにみられた。低酸素 (窒素 95%) でインキュベートした DA の内膜側中膜の染色がやや濃い結果であった。

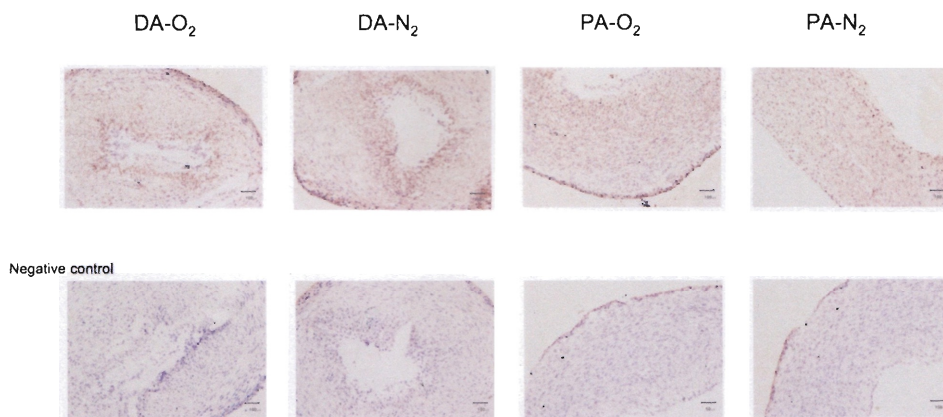
これらの翻訳後修飾と Kv ならびに Kv 複合体関連タンパク質との関係を、現在検討中である。

**Result 7** *Detection of glutathione in the rabbit fetal DA and PA after hypoxic incubation*



☆ Glutathione was detected mainly in the media in the DA and PA.

**Result 9** *Detection of nitrotyrosine in the rabbit fetal DA and PA after hypoxic incubation*



☆ Nitrotyrosine was detected mainly in the DA inner media.