

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K01845
研究課題名(和文) 筋小胞体膜タンパク質MG23とMG56の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of MG23 and MG56

研究代表者

西 美幸 (Nishi, Miyuki)

京都大学・薬学研究科・特定研究員

研究者番号：60183894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：MG23は我々がクローニングし、1998年に小胞体膜に発現し広範な組織分布をしているということ、2011年に陽イオン透過性のチャネル活性を報告した。小胞体膜上に発現しカルシウムも透過するチャネル活性を見出したことから、何らかの重要な機能を有していると期待されたがその生理的機能はほとんど不明であった。

本研究費での一番の実績は、イギリスのDr. Pittとの共同研究により、MG23は亜鉛により活性化するチャネルであり、心臓が病的な状態(心不全など)に陥ったとき細胞内の亜鉛が上昇することでMG23を活性化してカルシウムの漏出を引き起こすことを報告したことである(JBC 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心疾患による死亡は日本人の死因の第2位に上っている。心臓の正常な機能にはカルシウムの制御が必須であり、細胞内カルシウム貯蔵庫である小胞体からカルシウムを放出するリアノジン受容体はこれまで多くの研究対象となってきた。我々が提唱している、MG23は心臓の拡張期におけるカルシウム漏出を担っている、との仮設が正しいならば、心疾患の治療戦略を大きく広げることになり、学術的にも社会的にもその意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Mitsugumin 23 (MG23) is a 23 kDa transmembrane protein localized to the sarcoplasmic reticulum (SR) and nuclear membranes in a variety of cells. After reconstitution into phospholipid bilayers, MG23 behaved as a voltage-dependent cation channel, permeable to both K⁺ and Ca²⁺. Under voltage-clamp conditions, Zn²⁺ (>2 nM) caused dysregulated RyR2 openings and also revealed that RyR2 are not the only SR Ca²⁺-permeable channels regulated by Zn²⁺. Elevating the cytosolic Zn²⁺ concentration to 1 nM increased the activity of the MG23. The current amplitude of the MG23 full-open state was consistent with that previously reported for RyR2 sub-conductance gating, suggesting that in heart failure in which Zn²⁺ levels are elevated, RyR2 do not gate in a sub-conductance state, but rather MG23-gating becomes more apparent. These data suggest that dysregulated Zn²⁺ homeostasis alters the function of both RyR2 and MG23 and that both ion channels play a key role in diastolic SR Zn²⁺ leakage.

研究分野：生化学

キーワード：カルシウム 骨格筋 小胞体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MG23 は、1998 年に我々が骨格筋を抗原として作製したモノクローナル抗体ライブラリーの抗原タンパク質として精製、遺伝子のクローニングを行い、広範な組織に発現、細胞内分布は小胞体膜、核膜であるということを報告した。2011 年に人工脂質二重膜上に精製 MG23 を再構築し、カルシウムを含む陽イオン透過性電位依存性のチャネル活性、構造はホモ 6 量体のボウル状であることを見出した。小胞体膜上に発現しカルシウムも透過するチャネル活性を検出したが、ノックアウト(KO)マウスの表現型も顕著ではなく、その生理的機能はほとんど不明であった。

2. 研究の目的

小胞体膜上に発現しカルシウムも透過するチャネル活性があることから、何らかの重要な機能を有していると期待された。イギリスの共同研究者(Dr. Pitt)が、心不全時の異常なカルシウム漏出機構に MG23 が関わっている可能性を見出したため、そのさらなる検証を目的とした。Dr. Pitt は MG23 のチャネル活性を測定した研究者で、そのため MG23 チャネル活性数値を記憶しており、従来の説：心臓での異常なカルシウム漏出時に検出されるカルシウム電流はリアノジン受容体と考えられる電流に加えて微弱な電流も存在し、この微弱な電流はリン酸化型修飾リアノジン受容体による、に対して、この微弱電流は MG23 によるものであるとの考えを提唱した。その検証と、マウスを使つての実験として、Mg23 KO マウスに心負荷(具体的にはドキシソルピシン投与)を与え、心機能に変化はないかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

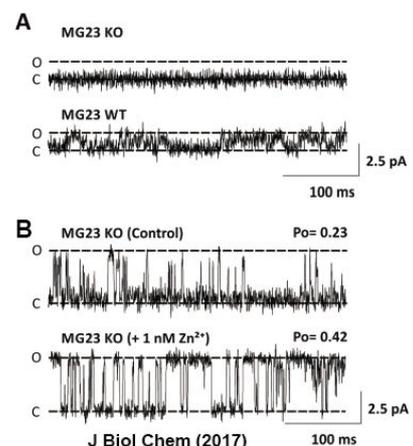
(1) 人工脂質二重膜上にチャネルを再構築し活性を測定する技術を有しているイギリスの共同研究先に Mg23 KO マウス心臓を送り Mg23 KO マウスにおけるリアノジン受容体チャネル活性を計測する。心不全時には細胞内亜鉛濃度が上昇しリアノジン受容体を活性化する。その時に観察される Ca 電流は通常観察される電流以外に弱い電流も観察される。従来はこの弱い電流はリアノジン受容体がリン酸化されて構造が変化したために生じていると考えられていたが、我々の仮説では Mg23 チャネルによるものである。従って、Mg23 KO マウスのリアノジン受容体チャネルを調べ野生型と比較すれば Mg23 チャネルの関与がわかるはずである。

(2) ドキシソルピシンは現在でも使用されている抗がん剤であるが、心毒性があるため生涯投与量の上限が厳密に決められている。そのため、この心毒性のメカニズムの解明や軽減ができれば臨床的には大いなる貢献となる。何種類かの濃度のドキシソルピシンを野生型マウスに腹腔内投与して、半数致死量(LD50)を決定した後、Mg23 KO マウスにも投与し生存率を比較する。さらに LD50 値の 80%量のドキシソルピシンを投与して 2 週間後の心臓の変化(重量、繊維化率)を比較する。明らかさが認められた場合は、心筋細胞を単離して詳細なカルシウム動態を比較する。

4. 研究成果

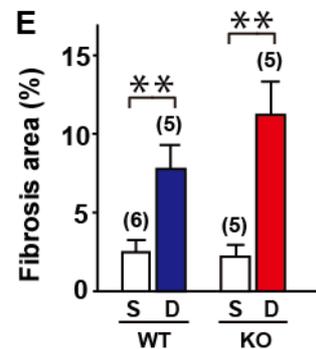
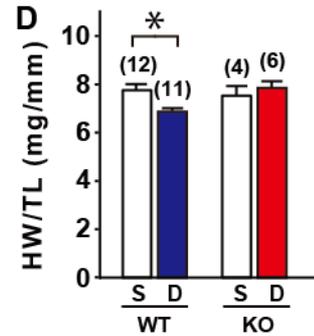
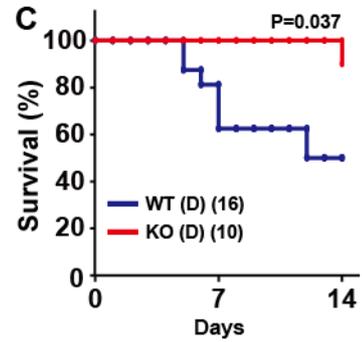
(1) 共同研究先に Mg23 KO マウスの心臓を送り人工脂質二重膜法にてチャネル活性を測定した。当然ながら Mg23 チャネル活性は消失しており(Fig. A)、リアノジン受容体は亜鉛で活性化させたところ、従来観察されていた微弱電流(サブコンダクタンス)はほとんど観察されず、心不全時に観察される微弱電流は Mg23 チャネルの関与が示唆された(Fig. B)。

(2) Mg23 KO マウスは通常飼育では顕著な表現型が見ら



れない。そのため、心毒性のあるドキシソルピシンを投与して生存率を比較検討した。我々の飼育環境下でのドキシソルピシン LD50 (15 mg/kg) を野生型、K0 マウスに投与して2週間経過観察をしたところ、野生型が半数死亡(16 匹中 8 匹)したのに対して K0 マウスは 10 匹中 1 匹のみの死亡と顕著な差が観察された(Fig. C)。次に、LD50 値の 80%量の 12 mg/kg を投与して2週間後の心臓の重量、繊維化率を比較した。心重量は脛骨長で割って補正してある。ドキシソルピシン投与後2週間後の野生型マウスの心重量(D) は生理的食塩水を投与した群(S)と比較して低下していたのに対して、Mg23 K0 マウスは心重量の低下が認められなかった(Fig. D)。さらに、心臓の繊維化率を比較したところ野生型、Mg23 K0 マウス共にドキシソルピシン投与群は生理的食塩水投与群と比較して繊維化率が上昇していたが野生型、K0 マウス間での差は観察されなかった。これらの結果から、MG23 は心臓にストレスがかかった時、本来放出してはならない拡張期にカルシウムを小胞体から放出することで病態を悪化させている可能性があることが示唆された。

次に MG23 チャンネルに対するドキシソルピシンの効果を検証するため、単離心筋細胞を使ってカルシウム動態の測定を試みている。心筋細胞の単離は確立され広く普及している手技であるが、実験室で独自に立ち上げるのに数ヶ月を要して現在進行中である。心重量、繊維化率を調べた実験と同様に 12 mg/kg のドキシソルピシンを野生型、K0 マウスに投与後、4日後、2週間後に心筋細胞を単離してカルシウム動態を比較する。投与後4日は体重減少が一番顕著な時期なので、この時期を選択した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Qian N, Ichimura A, Takei D, Sakaguchi R, Kitani A, Nagaoka R, Tomizawa M, Miyazaki Y, Miyachi H, Numata T, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Takeshima H.	4. 巻 12
2. 論文標題 TRPM7 channels mediate spontaneous Ca ²⁺ fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw4847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 O'Brien F, Eberhardt D, Witschas K, El-Ajouz S, Iida T, Nishi M, Takeshima H, Sitsapesan R, Venturi E.	4. 巻 597
2. 論文標題 Enhanced activity of multiple TRIC-B channels; an ER/SR mechanism to boost counterion currents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 2691-2705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Reilly-O'Donnell B, Robertson GB, Karumbi A, McIntyre C, Bal W, Nishi M, Takeshima H, Stewart AJ, Pitt SJ.	4. 巻 292
2. 論文標題 Dysregulated Zn ²⁺ homeostasis impairs cardiac type-2 ryanodine receptor and mitsugumin 23 functions, leading to sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ leakage.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 13361-13373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.781708.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 El-Ajouz S, Venturi E, Witschas K, Beech M, Wilson AD, Lindsay C, Eberhardt D, O'Brien F, Iida T, Nishi M, Takeshima H, Sitsapesan R.	4. 巻 595
2. 論文標題 Dampened activity of ryanodine receptor channels in mutant skeletal muscle lacking TRIC-A.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 4769-4784.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP273550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takei D, Nishi M, Fukada S, Doi M, Okamura H, Uezumi A, Zhang L, Yoshida M, Miyazato M, Ichimura A, Takeshima H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Gm7325 is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 215-219.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.38.215.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhou Xinyu, Park Ki Ho, Yamazaki Daiju, Lin Pei-hui, Nishi Miyuki, Ma Zhiwei, Qiu Liming, Murayama Takashi, Zou Xiaoqin, Takeshima Hiroshi, Zhou Jingsong, Ma Jianjie	4. 巻 126
2. 論文標題 TRIC-A Channel Maintains Store Calcium Handling by Interacting With Type 2 Ryanodine Receptor in Cardiac Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 417 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.119.316241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takei D, Nishi M, Fukada S, Doi M, Okamura H, Uezumi A, Zhang L, Yoshida M, Miyazato M, Ichimura A, Takeshima H.
2. 発表標題 GM7325 Transcription is regulated by nyoD in activated muscle satellite cells.
3. 学会等名 62nd annual meeting Biophysical society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Qian N, Ichimura A, Takei D, Zhu H, Nishi M, Takeshima H
2. 発表標題 Spontaneous Ca ²⁺ Fluctuations mediated by TRPM7 channels
3. 学会等名 62nd annual meeting Biophysical society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ang Li, Xuejun Li, Jianxun Yi, Xinyu Zhou, Ki Ho Park, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Jianjie Ma, Jingsong Zhou
2. 発表標題 TRIC-A Channel Modulates Ca ²⁺ Homeostasis in Mitochondria
3. 学会等名 64nd annual meeting Biophysical society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院生体分子認識学分野 http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考