

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06872

研究課題名(和文) チャネルパシーによるカルシウム制御破綻とポドサイト機能連関

研究課題名(英文) Calcium dysregulation by channelopathy and pathological role in kidney podocyte

研究代表者

森 誠之 (Mori, Masayuki)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80342640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：尿蛋白等のネフローゼ症を呈する腎疾患の一つ、巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)に受容体作動性Ca(カルシウム)チャネルをコードするTRPC6遺伝子が関与するが、その発症メカニズムに関して明らかでなかった。本研究により、FSGS変異型TRPC6チャネルにおいて顕著なカルシウム依存的不活性化の破綻が存在していることを明らかにした。本研究はFSGS発症メカニズムにおける重要な知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究グループは、カルシウムチャネルの一つTRPC6の活性にブレーキをかける、Ca(2+)依存的不活性化(Ca(2+)-dependent inactivation: CDI)と呼ばれる機構に関する研究を行い、その分子の基盤を得た。解析した5種類のFSGS型TRPC6全てにおいて分子構造体の異常を伴ったCDIの破綻を認めた。これらは、TRPC6のCDI分子機構を明らかにすると共にこのブレーキ機構の破綻がFSGS発症原因であるという新しい概念を提唱するもので、TRPC6の分子基盤、FSGSの診断、治療へ向けた重要な足がかりになると考えられた。

研究成果の概要(英文)：TRPC6 is a nonselective cation channel, and mutations of this gene are associated with FSGS. These mutations are associated with TRPC6 current amplitude amplification and/or delay of the channel inactivation (gain-of-function phenotype). However, the mechanism of the gain-of-function in TRPC6 activity has not yet been clearly solved. We performed electrophysiologic, biochemical, and biophysical experiments to elucidate the molecular mechanism underlying calmodulin (CaM)-mediated Ca²⁺-dependent inactivation (CDI) of TRPC6. The FSGS-associated TRPC6 mutations within the coiled-coil severely delayed CDI and often increased TRPC6 current amplitudes. The gain-of-function mechanism found in FSGS-causing mutations, TRPC6 can be explained by impairments of the CDI, caused by disruptions of TRPC's coiled-coil assembly and CaM bridge binding. The resulting excess Ca²⁺ may contribute to structural damage in the podocytes.

研究分野：分子生理学、生理化学

キーワード：イオンチャネル チャネルパシー カルシウム依存的不活性化 糸球体硬化症 TRPC6 Calmodulin ポドサイト ネフローゼ症候群

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体作動性 Ca^{2+} チャネル分子実態の一つに TRPC6 チャネルがある。TRPC6 には細胞内 Ca^{2+} による負のフィードバック制御, Ca^{2+} 依存的不活性化 (Ca^{2+} -dependent inactivation: CDI)が存在する。研究当初 TRPC6 の Ca^{2+} 依存的ゲート機構に関する研究から, カルシウム結合タンパク質 Calmodulin (CaM) や TRPC6 のコイルド・コイルドメインを介した分子複合体構造が CDI の発生に重要であることの構造学的知見を得ていた。他方, TRPC6 のチャネルパシーとして遺伝性腎不全に見られる病変の一つ, 巣状糸球体硬化症 (Focal segmental glomerulosclerosis, FSGS) がある。FSGS 病変に關与する TRPC6 変異体のうちコイルド・コイルドメインに変異が見られる機能解析を行ったところ, CDI が顕著に破綻していることを見出していた。これは FSGS 病変において TRPC6 の CDI が關連することを示す結果である。FSGS 病変解明のため他の TRPC6 変異体での解析が急務になった。

2. 研究の目的

1. TRPC6, CDI に必要な分子構造基盤の解析

CDI において重要な分子基盤を明らかにする。Calmodulin によるサブユニット間のブリッジ構造, コイルド・コイルドメイン相互作用によるサブユニット間の近接等を検討する。Calmodulin の結合様式を二次元 NMR, コイルド・コイルドメインの結合様式を明らかにする。

2: FSGS を示す TRPC6 変異体の CDI 定量的解析

FSGS 病変を示す TRPC6 の変異体は多数報告されていたことから, 特にコイルド・コイルドメインを中心として FSGS 変異体の機能明らかにする。その機能を培養細胞を用いた電気生理学的に解析し, CDI との關連性を明らかにする。

3. TRPC6, CDI と連動するポドサイトの解析

培養ポドサイト細胞に Calmodulin 変異体や FSGS 由来の TRPC6 変異体がどのような影響を及ぼすのか検討する。特に細胞骨格の変性は糸球体におけるフィルター機能異常に影響を及ぼすことが考えられる。細胞骨格の形態維持に重要なアクチン繊維を観察し, CDI の細胞形態への關与を明らかにする。

3. 研究の方法

FSGS の TRPC6 変異体における CDI の電気生理学的解析を実施した。変異を導入したプラスミドを HEK 発現細胞に導入し, 不活性化速度や電流密度等機能的解析を行った。Inside-out recording による定量的不活性化の解析を実施した。Calmodulin の結合様式について NMR を用いて解析を行った。更にコイル

ド・コイルドメインの結合様式について細胞内FRETによる分子間相互作用解析を行いCDI分子構造基盤の構築を計った。細胞骨格は蛍光標識-アクチンマーカ- (ファロイジン) を用いて評価した。

4 . 研究成果

CDIの発生機構として,新たに Calmodulin の N 末領域と C 末領域のそれぞれが,TRPC6 の異なるサブユニットにおける Calmodulin 結合領域にと結合することが引き金となっていることを明らかにした。また,その際に TRPC6 の C 末領域に存在するコイルド・コイルドメインが Calmodulin 結合領域を近接させる効果があり,安定化結合に関与していることを明らかにした。

更に FSGS で確認された TRPC6 変異のうち,コイルド・コイルドメインに変異を認めるものについて,核磁気共鳴(NMR),蛍光エネルギー移動,電気生理学等を用いた分子構造並びに機能的解析を実施した。

K874X,Q889K,R895C,R895L,E897K 何れの FSGS 変異において,コイルド・コイルドメインの会合状態の異常と,CDI の遅延を認めた。また,Calmodulin はコイルド・コイルの会合により近接した 2 つのサブユニット間の中に結合する様子が NMR,並びにクロスリンカーを用いた手法から明らかとなった。また,腎系球体上皮細胞 (培養型ポドサイト) において TRPC6 の CDI を遅延させることで,アクチンストレスファイバーに形態異常を引き起こすことを確認した。以上の内容を米国腎臓学会誌にて報告した(Polat, Uno et al., 2019, *JASN*)。更に,他から報告されているアンキリンドメインに変異を認める P112Q,M132T, TRP チャネル共通の TRP ボックス近傍における変異体 L780P について機能解析を行った。Patch-clamp 法を用いて測定したところ,最大電流密度は P112Q,M132T で野生型と比べ優位に上昇していたが,L780P では若干減少していた。一方,ピークからの不活性化過程は P112Q,M132T,L780P 何れの変異体において,野生型に比べ優位に遅延していた。これらの結果はコイルド・コイルドメイン同様,アンキリンドメインや TRP ボックスの FSGS 変異体では CDI の破綻が存在していること,一方でその破綻の度合いには違いがあることを示唆していた。

幼若期に FSGS を発症した変異と成人後に FSGS を発症する変異について,CDI の変化についてそれぞれ検討を加えたところ,発症年齢が幼若期の変異のほうが CDI の破綻の度合いがより進んでいることを見出した。このことから,CDI の破綻の程度と FSGS の発症年齢に関して相関性がある可能性を見出した (特許出願中)。これらの結果は CDI が FSGS 発症において基本的な分子基盤として存在していることだけでなく,FSGS 発症時期において重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

以上,本研究により TRPC6 の Calmodulin による CDI の分子機構が明らかになると共に,FSGS 発症メカニズムとして CDI の重要性に関する知見を得ることができた。これらはイオンチャネルが原因で疾病を引き起こすチャネロパシーの解明,治療に貢献するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Polat Onur K., Uno Masatoshi, Maruyama Terukazu, Tran Ha Nam, Imamura Kayo, Wong Chee Fah, Sakaguchi Reiko, Ariyoshi Mariko, Itsuki Kyohei, Ichikawa Jun, Morii Takashi, Shirakawa Masahiro, Inoue Ryuji, Asanuma Katsuhiko, Reiser Jochen, Tochio Hidehito, Mori Yasuo, Mori Masayuki X.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2018070756	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 Jouraku Akiya, Kuwazaki Seigo, Miyamoto Kazuhisa, Uchiyama Makoto, Kurokawa Tatsuki, Mori Emiko, Mori Masayuki X., Mori Yasuo, Sonoda Shoji	4. 巻 118
2. 論文標題 Ryanodine receptor mutations (G4946E and I4790K) differentially responsible for diamide insecticide resistance in diamondback moth, <i>Plutella xylostella</i> L.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103308 ~ 103308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2019.103308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawanabe A, Mizutani N, Polat OK, Yonezawa T, Kawai T, Mori MX, Okamura Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 J Gen Physiol. 2020 May 4;152(5):e201912491. doi: 10.1085/jgp.201912491.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Gen Physiol.	6. 最初と最後の頁 e201912491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201912491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Variants That Affect Function of Calcium Channel TRPV6 Are Associated With Early-Onset Chronic Pancreatitis.	4. 巻 6
2. 論文標題 Masamune A, Kotani H, Sorgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R...Bugert P, Mori MX...Matsubara Y, Aoki Y, Ferec C, Mori Y, Witt H, Shimosegawa T.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterology.	6. 最初と最後の頁 1626-1641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Yamauchi H, Yoshida M, Mori MX, Hida Y, Tran HN, Ohkura M, Abe M, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Hara K, Sakimura K, Nagamatsu S, Mori Y, Nakai J, Kakei M, Ohtsuka T.	4. 巻 5
2. 論文標題 ELKS/Voltage-Dependent Ca ²⁺ Channel- Subunit Module Regulates Polarized Ca ²⁺ Influx in Pancreatic Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep. 2019	6. 最初と最後の頁 1213-1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.106.	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森誠之、PolatOnur、岡田亮、鈴木彩日、大村紗代、井上隆司
2. 発表標題 FSGS関連TRPC6チャネルN末領域変異体におけるCa ²⁺ 依存的不活性化(CDI)メカニズム破綻の共通性
3. 学会等名 第97回日本生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森誠之
2. 発表標題 Impairment of Ca ²⁺ -dependent inactivation of Glomerular disease mutations
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tasuya Komaki, Ryo Okada, Onur K Polat, Takanori Kihara, Masayuki X. Mori
2. 発表標題 Ankyrin Repeat domain mutations found in FSGS patients lead to delay the Ca ²⁺ -dependent inactivation of TRPC6 channels
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田亮、小牧竜也、Onur K Polat、小林英幸、木原隆典、森誠之
2. 発表標題 非選択的カチオンチャンネルTRPC6の機能解析と腎疾患発症年齢の関係
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田亮、Onur K Polat、鈴木彩日、大村紗代、森誠之
2. 発表標題 Ankyrin-repeat domain mutations of TRPC6 channels impair Ca ²⁺ -dependent inactivation
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 臍状分節性糸球体硬化症の発症時期を推定する方法	発明者 森誠之 岡田亮 小 牧竜也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、発明	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関