

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500382

研究課題名（和文） 小胞体タンパク質ミツグミン23の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of SR protein, Mitsugumin 23.

研究代表者

西 美幸 (NISHI MIYUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号：60183894

研究成果の概要（和文）：申請者らが以前に発見し報告したミツグミン23 (MG23)は小胞体と核膜に発現する機能不明な23kDaの膜タンパク質である。MG23は様々な細胞系で検出され、骨格筋、心臓、脳といった興奮性組織で発現が顕著である。MG23の機能解明を目指して、イーストによる組み換えMG23タンパク質の大量培養、精製の系を立ち上げ、MG23は6回対称構造で中心に穴のあいたボウル様の構造をとることを予想した。さらに、精製タンパク質の電気生理的解析により、陽イオンチャンネルであることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Mitsugumin 23 (MG23) is a 23 kDa transmembrane protein localized to the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum and nuclear membranes in a wide variety of cells. Single-particle three-dimensional reconstruction revealed that MG23 forms a large bowl-shaped complex equipped with a putative central core. After reconstitution into planar phospholipid bilayers, purified MG23 behaved as a voltage-dependent cation-conducting channel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：カルシウム

1. 研究開始当初の背景

申請者らはウサギ骨格筋小胞体膜を抗原とするモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、蛍光抗体染色により未同定な膜タンパク質を見出してきた。この方法で見出したMG23は小胞体膜と核膜に分布していたが、機能は不明であった。

2. 研究の目的

機能不明なMG23の生理機能解析が研究目的である。小胞体膜上のMG23はN末にシグナルペプチドを有し、その切断により生じる成熟型は約19kDaで、複数回の膜貫通セグメントを有することが推定される。イオンチャンネル活性の有無は解析すべき重要な目

的であり、生理機能を調べる上でノックアウトマウス作製も急務である。細胞質のカルシウム濃度の上昇は生理的反応のスイッチとなっており、その制御は神経伝達物質やホルモンの放出、筋細胞の収縮、細胞増殖や細胞死など多彩な細胞機能に及んでいる。興奮性細胞における生理反応では、電気シグナルは例外なく細胞内カルシウムシグナルへ変換され、表層膜上の電位依存性カルシウムチャンネルと細胞内ストア上のカルシウム放出チャンネル（リアノジン受容体）の機能共役によるシグナル変換が普遍的に観察される。骨格筋においては興奮収縮連関のために小胞体のカルシウムストアとしての機能が極めて特化されており、大量調整可能な小胞体における構成タンパク質群の解析が最も進んでいる。しかしながら、その筋小胞体分画のタンパク質群においても、今なお機能不明な分子が山積みされており、それらの細胞内カルシウムシグナリングへの貢献を解明することが学術的に求められている。我々の研究室は興奮性細胞における電気シグナルーカルシウムシグナル変換、小胞体のカルシウム放出機構やカルシウムストア機能の分子レベルからの理解に多大に貢献しており、カルシウムシグナルに寄与すると推定される分子群の新規同定から分子基盤を整備する研究を継続している。私が参加した代表的な研究成果としては、骨格筋特殊膜構造の形態を維持して間接的にカルシウムシグナリングを調節するミツグミン29 (MG29)の発見と機能解析、細胞膜と小胞体を架橋するタンパク質であるジャンクトフィリンの発見と生理機能の解明、小胞体カルシウム容量を細胞質へ伝える機能が推定される新規膜タンパク質であるカルミンの発見、小胞体カルシウム放出と同調して発生するカウンターイオンとしてのカリウムの膜透過を担う TRIC チャンネルの発見などがある。

3. 研究の方法

(1)精製、チャンネル活性測定、構造解析：比較的容易に大量の筋肉を得られるウサギを材料としてMG23の精製を行う。ウサギ骨格筋より膜タンパク質を調整し、可溶化の後抗体カラムに吸着させ非特異的結合を洗浄した後、ペプチドを加え競合的に溶出する。得られた精製物はオリゴマーを形成していないかどうかを確認するクロスリンク実験や、人工脂質二重膜法によるチャンネル活性測定、構造解析を行う。構造解析は共同研究にて電子顕微鏡像の単粒子解析による三次元構造の再構築を行う予定である。同時に、酵母を用いて組換えMG23の精製も並行して行う。

(2)ノックアウトマウスの作製と解析：ノックアウト(KO)マウスを作製しその解析を行った。MG23KOマウスは明らかな表現系はなく交配も可能であったが、筋肉は質重量が減少し張力回復の異常が観察された。また組織学的以上として筋肉SRの膨潤が観察された。

認められた場合は早急にその解析を行う。組織学的解析は必須である。また明らかな表現系が認められない場合は、MG23が高発現している筋肉に焦点を絞り研究計画をたてる。具体的には、組織学的解析、張力測定、運動能力測定などをまずはじめに予定している。

4. 研究成果

(1)精製、チャンネル活性測定、構造解析：ウサギ骨格筋と酵母を用いた組換えMG23の精製を行った。これまでの検討で部分精製MG23を再現性よく回収することが可能となった。得られた精製MG23を化学架橋薬処理することにより、MG23はホモ6量体をとることが示唆された。

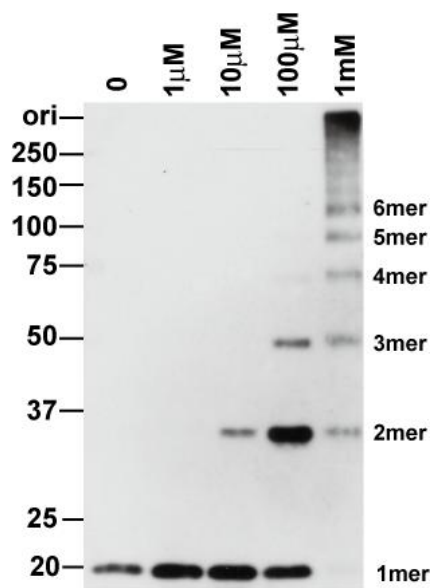


図1. 酵母から精製したMG23を使ったクロスリンク実験

この情報と精製タンパク質の電子顕微鏡観察像を用いて単粒子解析を行い、MG23は6回対称構造で中心に穴のあいたボウル様の構造をとることを予想した。さらに、精製タンパク質の電気生理的解析により、電位依存性のカリウム、カルシウム透過能を備えた陽イオンチャンネルであることを見出した。

(2)ノックアウトマウスの作製と解析：ノックアウト(KO)マウスを作製しその解析を行った。MG23KOマウスは明らかな表現系はなく交配も可能であったが、筋肉は質重量が減少し張力回復の異常が観察された。また組織学的以上として筋肉SRの膨潤が観察された。

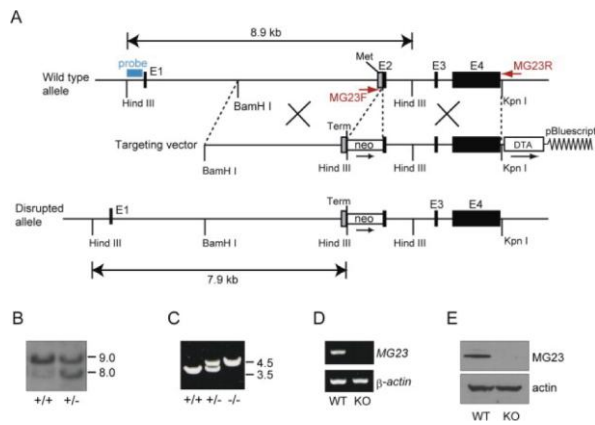


図2 MG23 ノックアウトマウス作製ストラテジー、及びサザンブロット、PCR、RT-PCR、ウエスタンブロット

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Delbono, O., Messi M. L., Wang, Z., Treves, S., Mosca, B., Bergamelli, L., Nishi, M., Takeshima, H., Shi H., Xue B. & Zorzato, F. Endogenously determined restriction of food intake overcomes excitation-contraction uncoupling in JP45KO mice with aging. *Exp. Gerontol.* 4, 304-316, 2012. 査読有

DOI : 10.1016/j.exger.2012.01.004

② Venturi, E., Mio, K., Nishi, M., Ogura, T., Moriya, T., Pitt, S.J., Okuda, K., Kakizawa, S., Sitsapasan R. Sato, C., & Takeshima, H. Mitsugumin 23 forms massive bowl-shaped assembly and cation-conducting channel. *Biochemistry*, 50, 2623-2632, 2011. 査読有

DOI:10.1021/bi1019447

③ Yamazaki, D., Tabara Y., Kita S., Hanada, H., Komazaki, S., Naitou D., Mishima, A., Nishi, M., Yamamura, H., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Miyachi, H.,

Yamamoto, S., Miyata, T., Kawano, Y., Kamide, K., Ogihara, T., Hata, A., Umemura, S., Soma, M., Takahashi, N., Imaizumi, Y., Miki, T., Iwamoto, T & Takeshima, H. TRIC-A Channels in Vascular Smooth Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. *Cell Metabolism* 14, 231-241, 2011. 査読有

DOI : 10.1016/j.cmet.2011.05.011

④ Pitt, S.J., Park, KH, Nishi M., Urashima, T., Aoki, S., Yamazaki, D., Ma, J., Takeshima, H. & Sitsapasan R. Charade of the SR K⁺-channel: two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K⁺-channel. *Biophys. J.* 99, 417-426, 2010. 査読有 DOI : 10.1016/j.bpj.2010.04.051

⑤ Zhao, X., Yamazaki, D., Park, KH., Komazaki, S., Tjondrokoesoemo, A., Nishi, M., Lin, P., Hirata, Y., Brotto, M., Takeshima, H & Ma, J. Ca²⁺ overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 285, 37370-37376, 2010. 査読有

DOI : 10.1074/jbc.M110.170084

⑥ Yamazaki, T., Sasaki, N., Nishi, M. & Takeshima, H. Facilitation of DNA damage-induced apoptosis by endoplasmic reticulum protein mitsugumin23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 196-200, 2010. 査読有 DOI : 10.1016/j.bbrc.2010.01.013

⑦ Cao, CM., Zhang, Y., Weisleder, N., Ferrante, C., Wang, X., Lv, F., Zhang, Y., Song, R., Hwang, M., Jin, L., Guo, J., Peng, W., Li, G., Nishi, M., Takeshima, H., Ma, J. & Xiao, RP. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning. *Circulation* 121, 2565-2574, 2010. 査読有

DOI : 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.954628

⑧ Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, JK., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H & Ma, J. MG53 is an essential component of the acute membrane repair machinery. *Nature cell biol.* 11, 56-64, 2009. 査読有

DOI : 10.1038/ncb1812

⑨ Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Pan, Z., Nishi, M., Komazaki, S., Takeshima, H & Ma, J. MG53 regulates membrane budding in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 284, 3314-3322, 2009. 査読有

DOI : 10.1074/jbc.M808866200

⑩ Cai, C., Weisleder, N., Ko, JK., Komazaki, S., Sunada, Y., Nishi, M., Takeshima, H. & Ma, J. Membrane repair defects muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3 and dysferlin. *J. Biol. Chem.* 284, 15894-15902, 2009. 査読有

DOI : 10.1074/jbc.M109.009589

⑪ Yamazaki, D., Komazaki, S., Nakanishi, H., Mishima, A., Nishi, M., Yazawa, M., Yamazaki, T., Taguchi, R & Takeshima H. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development* 136, 2355-2361, 2009. 査読有

DOI : 10.1242/dev.036798

[学会発表] (計 3 件)

① Barbara Mosca, Leda Bergamelli, Mirko Vukcevic, Susan Treves, Cecilia Paoloni, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Feliciano Protasi & Francesco Zorzato. Upregulation of calcium influx via Cav1.1 in skeletal muscle fibers from

JP-45 calsequestrin 1 double knock out mice. Biophysical Society 56th Annual meeting, February 25-29, 2012 San Diego, California (USA)

② Kazuhiro Mio, Miyuki Nishi, Toshihiko Ogura, Toshio Moriya, Samantha J. Pitt, Kazutaka Okuda, Rebecca Sitsapesan, Chikara sato & Hiroshi Takeshima. Mitsugumin23, a protein associated with intracellular calcium stores, behaves as an ion-channel that can conduct calcium. Biophysical Society 55th Annual meeting, March 5-9, 2011 Baltimore, Maryland (USA)

③ Daiju Yamazaki, Satomi Kota, Shinji Komazaki, Aya Mishima, Miyuki Nishi, Takahiro Iwamoto & Hiroshi Takeshima. Role of TRIC-A channel in circulatory function. Biophysical Society 54th Annual meeting, February 20-24, 2010 San Francisco, California (USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 美幸 (NISHI MIYUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号 : 21500382

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし