

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689006

研究課題名(和文) PIPsとCa<sup>2+</sup>を軸にしたCaチャンネル制御機構の解明研究課題名(英文) PIPs and Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation on Ca channels

研究代表者

森 誠之(Masayuki, Mori)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80342640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：自律神経系から放出される伝達物質や血流に放出されたホルモンを感知し、血圧調節に関わるTRPC3/6/7イオンチャンネル群がある。今回、このイオンチャンネルの制御機構について特に、ホスホイノシチドの一種PIP2に関し検討を行った。電位作動性ホスホイノシチド分解酵素(VSP)を用いて実験を行った結果、PIP2がTRPC3/6/7チャンネル群において共通してその活性化を支える重要な因子であることを見出した。また、PIP2とジアシルグリセロールによる二重支配の重要性を提唱し、この仮説に基づいたTRPC電流とPIP2の変動モデル作成及びシミュレーションを行い、実験結果との整合性を見出した。

研究成果の概要(英文)：TRPC3/C6/C7 channels, a subgroup of classical/canonical TRP channels, are activated by diacylglycerol produced via activation of phospholipase C (PLC)-coupled receptors. The critical importance of PIPs to various ion-transporting molecules is well documented, but their function in relation to these channels remains controversial. We used voltage-sensing phosphatase (DrVSP) to study TRPC3/C6/C7 regulation and found that the channel activity was controlled by PIP2-DAG signaling in a self-limiting manner. We also simulated the channel dynamics based on this self-limiting hypothesis. Overall, our studies demonstrate a fundamental regulatory mechanism of TRPC3/6/7 activation by PIP2-DAG signal.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：生理学 ホスホイノシチド カルシウム TRP channel PIP2 平滑筋 蛍光共鳴エネルギー移動 シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

血管、消化器、脳や心臓といった様々な臓器において、伝達物質により惹起される受容体活性型(運動型)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  電流が知られている。近年の研究から、この受容体活性型  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  電流を形成する分子実態の一つとして、ショウジョウバエ TRP ホモログ TRPC チャンネル群が明らかとなってきた。特に、TRPC3/6/7 チャンネル群は平滑筋における受容体作動性分子実態として、いち早く発見されるなど自律神経系の支配下に置かれるものとして代表的なイオンチャンネル群である。特に TRPC6 は腎疾患の最終段階、糸球体硬化症の原因遺伝子としても報告がなされていることから、有益な治療の標的とも考えられている。TRPC3/6/7 チャンネル群は G 蛋白質共役型受容体刺激-ホスホリパーゼ C 活性化により PIP<sub>2</sub> から産生されるジアシルグリセロール(DAG)で直接的に活性化される。然しながら PIP<sub>2</sub> による制御については明らかではなかった。これらのイオンチャンネルにおける PIP<sub>2</sub> の役割を探る必要があると考えられていた。

## 2. 研究の目的

2 - 1 TRPC3/6/7 群は血管トーン調節や、血管や心臓のリモデリング、消化器における蠕動運動、更には神経細胞における EPSPs の発生や樹状突起伸長など、様々な生理的応答に関わることが報告されている。しかし、受容体活性型 TRPC チャンネル群がどのような分子機構により制御されることで、細胞内カルシウムの上昇を経た細胞興奮機構に関与するのか、詳細については未だ多くの点で不明であった。TRPC3/6/7 群の直接的アゴニストは、G タンパク質共役型受容体(GPCR)を介したホスホリパーゼ C(PLC)の活性化によりホスホイノシチドの一種  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  から産生される、脂質性活性物質ジアシルグリセロール(DAG)であると考えられていた。我々はこのスキームにおいて、DAG の基質である  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  そのものの作用について、TRPC3/6/7 群に与える影響について検討する必要があると考えた。

2 - 2 1の研究からホスホイノシチドのうち、特に  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の減少が TRPC 電流の抑制機構に重要な鍵を握っていることが示された。しかしながら、受容体を活性化したときの TRPC 電流と  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の運動(変動)性については明らかではない。そこで、両者の変化を定量的に同時測定し、TRPC チャンネルの制御機構について見当を加えた。しかしながら、受容体を活性化したときの代謝、全てを実験的に捉えきくことは非常に難しい。そこで、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  を中心とした、イノシトール代謝系の単純化モデルと、これに連動した TRPC チャンネルのモデルを構築することで、全体像を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

3 - 1 PIP<sub>2</sub> の作用を測る研究ツールとして電位作動性ホスホイノシチド(PIP<sub>s</sub>)脱リン酸化酵素 Voltage-Sensing Phosphatase(VSP)を用いることにした。VSP の活性化には強い脱分極が必要であるが、電位依存性の弱い TRPC3/6/7 チャンネルに及ぼす影響は小さいと考えた。TRPC6 チャンネルとゼブラフィッシュ由来 VSP を共発現させた細胞(HEK293)において、脱分極刺激による VSP 活性化に伴った TRPC6 電流の一過性抑制を得た。

3 - 2 TRPC6/C7 チャンネルを強制発現した HEK293 細胞、及びこれらを内因的に発現するラット大動脈平滑筋由来 A7r5 細胞を用いて、電流と  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  あるいは DAG の同時測定を行った。電流はパッチクランプ法(全細胞記録モード)によって、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  量および DAG 量は蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いたイメージングによって記録した。これらの細胞には、必要に応じて、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  や DAG に対する FRET プローブあるいは  $\text{M}_1$  ムスカリン受容体や  $\text{V}_1$  バゾプレッシン受容体を共発現した。カルバコール(ムスカリン受容体作動薬)やバゾプレッシン(バゾプレッシン  $\text{V}_1$  受容体作動薬)を実験槽内に急速投与して電流を惹起した。

## 4. 研究成果

4 - 1 HEK293 細胞に TRPC6 と VSP を共発現させ、全細胞型パッチクランプ法により記録したところ、脱分極刺激による TRPC6 電流の一過性抑制(DrVSP-mediated inhibition/VMI)が観察された。TRPC3/C7 においても TRPC6 と同様に VMI を示したが、その強度や回復時間はチャンネルサブタイプ別に異なり、TRPC3 < TRPC6 < TRPC7 の順であった。更に、薬物や VSP 変異体を用いた検討によって、この抑制には  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の急速な脱リン酸化が深く関与していることを見出した。また、ムスカリン受容体(muscarinic type-1 receptor/M1R)を過剰発現させてカルバコール(CCh)刺激を加えると、先に記した VMI の強度順に TRPC 電流が速く不活性化(減衰)することが分かった。また、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  枯渇による抑制は、胸部大動脈平滑筋由来 A7r5 細胞から得られる TRPC6 様電流においても重要な機構であることが VSP 等を用いた実験から明らかとなった。以上より、VMI と受容体刺激による電流の不活性化には共通の分子機構の存在があり、また  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  は TRPC3/C6/C7 チャンネルにおいて活性化・不活性化双方に作用し、チャンネルサブタイプ別に異なる  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  との親和性により自律(自己)的制御機構が作動していることが示唆された。

4 - 2 受容体刺激により DAG の増加に伴った TRPC6 電流の増大が観察された。しかし TRPC6 電流が減少していく不活性化相

でも DAG 量は増加し続けることから、DAG 量の変化のみによってチャネル不活性化を説明することは困難であった。そこで次に  $PIP_2$  量と TRPC 活性の相関について検討したところ、電流の活性化相のみならず、不活性化相においても、 $PI(4,5)P_2$  の減少速度や減少量との間に正の相関が認められた。更に、受容体刺激時の主要な  $PI(4,5)P_2$  代謝物の量と TRPC6/TRPC7 チャネル活性の関係の動的特性を定量的に理解するため、TRPC6/C7 チャネルに対する  $PI(4,5)P_2$  の見かけ上の解離定数を求め、 $PI(4,5)P_2$ -PLC-DAG 代謝と連動した TRPC チャネル活性化・不活性化の数理モデルを作成した。このモデルを用いてシミュレーションを行い実測データと比較した。

実験結果とシミュレーションの結果は有意に似ており、TRPC6/C7 電流と  $PI(4,5)P_2$  量の変動との間に高い相関がえられた確認できた。以上の結果より、 $PI(4,5)P_2$ -PLC-DAG シグナル系を介した動的な二重制御機構（自己制御機構）が受容体刺激で惹起される TRPC6/C7 電流の活性化・不活性化過程においての重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 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 5 件)

Mori MX, Imai Y, Itsuki K, Inoue R. Quantitative measurement of  $Ca(2+)$ -dependent calmodulin-target binding by Fura-2 and CFP and YFP FRET imaging in living cells. *Biochemistry*. 2011, 50, 4685-4696.

Imai Y, Itsuki K, Okamura Y, Inoue R, Mori MX. A self-limiting regulation of vasoconstrictor-activated TRPC3/C6/C7 channels coupled to  $PI(4,5)P_2$ -diacylglycerol signalling. *J Physiol*. 2012, 590, 1101-1119.

Itsuki K, Imai Y, Okamura Y, Abe K, Inoue R, Mori MX. Voltage-sensing phosphatase reveals temporal regulation of TRPC3/C6/C7 channels by membrane phosphoinositides. *Channels (Austin)*. 2012, 6, 206-209.

Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*., 2013 2, 6:19.

Itsuki K, Imai Y, Hase H, Okamura Y, Inoue R, Mori MX. PLC-mediated  $PI(4,5)P_2$  hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels. *J Gen Physiol*. 2014, 143, 183-201.

〔学会発表〕(計 12 件)

1 Masayuki X. Mori, Kyohei Itsuki, Yuko Imai, Hideharu Hase, Yasushi Okamura, Yasuo Mori, Ryuji Inoue, INHIBITION BY REDUCTION OF  $PIP_2$  ACCELERATES INACTIVATION OF RECEPTOR-OPERATED TRPC6/7 CURRENTS  
北米生物物理学会年会 2014 年 2 月

2 Masayuki X. Mori Kyohei Itsuki, Yuko Imai, Hideharu Hase, Yasushi Okamura, Yasuo Mori, Ryuji Inoue Dominant inhibition by reduction of  $PI(4,5)P_2$  accelerates inactivation of receptor-operated TRPC6/7 currents. LabEx meeting. (フランス) 2013 年 11 月

3 森 誠之、齋 郷平、今井 裕子、井上隆司 ホスホイノシチドと連動する TRPC 電流のキネティクス解析日本平滑筋学会 2013 年 8 月

4 Kyohei Itsuki, Yuko Imai, Kihachiro Abe, Ryuji Inoue, Masayuki X. Mori  
Kinetic analysis of receptor-operating TRPC channel accelerated by phospholipase C activity  
日本生理学会 2013 年 3 月

5 Kyohei Itsuki, Yuko Imai, Yasushi Okamura, Ryuji Inoue, Masayuki X. Mori.  $PIP_2$  DYNAMICS UNDERLYING MUSCARINIC OR VASOPRESSIN RECEPTOR-ACTIVATED TRPC3 C6 and C7 CURRENTS 北米生物物理学会 2013 年 2 月

6 Yuko Imai, Kyohei Itsuki, Yasushi Okamura, Ryuji Inoue, Masayuki X. Mori  
Autonomic Regulation of TRPC3/C6/C7-channels Coupled with  $PI(4,5)P_2$ -DAG Signalling  
FEDERATION OF THE ASIAN AND OCEANIAN PHYSIOLOGICAL SOCIETIES,台湾(台北) 2012 年 9 月

7 Yuko Imai, Kyohei Itsuki, Yasushi Okamura, Ryuji Inoue, Masayuki X. Mori. A SELF-LIMITING REGULATION OF TRPC3 C6 C7 CHANNELS LINKED WITH  $PI(4,5)P_2$ -DIACYLGLYCEROL SIGNALING. 北米生物物理学会年会 2012 年 2 月

8 今井裕子, 齋郷平, 岡村康史, 森誠之, 井上隆司 DrVSP、収縮作動薬による  $PIP_2$  枯渇に対する TRPC3/C6/C7 チャネルの抑制的作用  
日本平滑筋学会 2012 年 8 月

9 Masayuki Mori, Yuko Imai, Kyohei Itsuki, Yasushi Okamura, and Ryuji Inoue A Self-limiting Regulation of TRPC3/C6/C7 Channels Linked with  $PIP_2$ -PLC-DAG Signalling 日本生理学会 2012 年 3 月

1 0 Yuko Imai, Kyohei Itsuki, Yasushi Okamura, Ryuji Inoue, Masayuki X. Mori. A SELF-LIMITING REGULATION OF TRPC3 C6 C7 CHANNELS LINKED WITH PI(4,5)P2-DIACYLGLYCEROL SIGNALING 北米生物物理学会 2012年3月

1 1 森誠之、今井裕子、斎郷平、岡村康史、井上隆司 TRPC3/6/7 チャネル、PIP2 枯渇による抑制的作用とその感受性の相違について 循環薬理学会 2011年12月

1 2 Yuko Imai, Kyohei Itsuki, Yasushi Okamura, Ryuji Inoue, and Masayuki X. Mori Autonomic Regulations in TRPC3/C6/C7 channels coupled with PI(4,5)P2-Diacylglycerol Signaling. 日本生理学会 2011年3月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森誠之 (Masayuki Mori) 京都大学・大学院  
工学研究科・准教授  
研究者番号：80342640

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

井上隆二 (Inoue, Ryuji)

福岡大学 医学部・教授

研究者番号：30232573

岡村康司 (Okamura, Yasushi)

大阪大学・医学部・教授

研究者番号：80201987

森泰生 (Mori, Yasuo)

京都大学・地球環境学童・教授

研究者番号：80212265