

## 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 4月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790198

研究課題名（和文） 膵臓外分泌細胞における、maxiK チャネルタンパク質の特異的な小胞輸送機構の研究

研究課題名（英文） Analysis of unconventional orientation of MaxiK proteins in pancreatic acinar ER membrane

研究代表者

村田 喜理（MURATA YOSHIMICHI）

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455780

研究成果の概要（和文）：膜に存在するタンパク質は、細胞内の小胞体で合成され、膜に対する向きを変えずに、細胞膜に運ばれるが、我々は、マウスの膵臓に存在する MaxiK タンパク質の小胞体膜中における向き（配向）が、通常考えられているものと逆であることを見いだした。本研究では、この現象の一般性を確認するため、MaxiK チャネルおよび Kv1.2 チャネルを一般的な培養細胞に発現させ、この2つのタンパク質の小胞体膜中での配向を調べた。その結果、この現象がある程度一般性を持つ現象であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We prepared nuclear envelopes (NEs) from mouse pancreatic acinar cells and observed MaxiK currents in the membrane subjected to the patch-clamp technique. The results indicate that the MaxiK channels are oriented in the ER membrane as their usual extracellular side faces to cytosol. These observations are inconsistent with the conventional understandings of the protein transport process.

Is this unconventional orientation common in other types of cell and channels? To approach this question, we used nuclear envelope (NE) of HEK293 cells expressing MaxiK or mKv1.2 channels. We measured K<sup>+</sup> currents by the patch-clamp technique. MaxiK channel activity was changed by luminal Ca<sup>2+</sup> and both channels were activated by luminal depolarization. These results indicate that the channels have unconventional orientation in HEK293 NEs similar to pancreatic acinar NEs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜、イオンチャネル

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室では、マウスの膵臓腺房細胞から、小胞体膜を含む nuclear envelope を単離し、それに patch clamp 法を適用することにより、小胞体中のイオンチャネルから電流を記録する独自の技術が確立されている。その系を用いた研究の途上、マウス膵臓腺房細胞に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の電位依存性  $\text{K}^+$  (maxiK/BK) チャネルの、小胞体膜中における向き (配向) が、通常考えられているものと逆であることを見出した (Maruyama ら、2003, 2005)。今までの研究から、我々が用いている nuclear envelope 標本から、リアノジンレセプターの電流が記録されること (Maruyama ら、2003)、形質膜では 12 週齢以降から記録される maxiK 電流が、この標本では、8 週齢前後から記録されることなど (Maruyama ら、2005)、この標本が小胞体膜であることを示すデータが得られている。

通常、小胞体膜で合成され、形質膜に運ばれる膜タンパク質群は、小胞体の内側 (lumen 側) に細胞外領域、小胞体の外側 (cytoplasm 側) に細胞内領域を向けた状態で小胞体膜に埋め込まれる。また、その後の COPII タンパク質複合体が関与する、小胞体からゴルジ体を経て形質膜へ至る輸送においては、膜の出芽、融合を繰り返す輸送の全過程において、脂質二重膜に対する膜タンパク質の配向は不変である事が知られている。我々が見出したマウス膵臓腺房細胞中の maxiK チャネルの、小胞体膜における配向は、現在知られる小胞輸送機構では説明できず、未知の小胞輸送機構の存在が疑われる。

## 2. 研究の目的

小胞体膜を含む nuclear envelope を単離し、小胞体膜のイオンチャネルから電流を記録する独自の技術を用いて、maxiK チャネルタンパク質の特異的な小胞輸送機構の研究を行う。

膵臓腺房細胞の小胞体膜における maxiK チャネルの脂質二重膜に対する向き (配向) が、現在までの知見とは逆になっているにも関わらず、形質膜には通常通りの向きで発現するメカニズムについて検討し、新しい小胞輸送機構が存在する可能性を検証するため、まず、(1) nuclear envelope に対して免疫染色法、および patch clamp 法を適用し、小胞体膜に存在する maxiK チャネルが、lumen 側

に細胞内領域、細胞外領域を向けたものの両方が存在しているのか、それともすべて lumen 側に細胞内領域を向けているのかどうかを検討する。

以上の結果をふまえて、(2) RT-PCR 法などを用いた maxiK チャネル分子のスプライスバリエーションの探索と、(3) -① サブタイプごとの細胞内における配向の相違を確認することにより、形質膜、小胞体膜それぞれで機能する maxiK チャネルが、別種類のものである可能性について検討を行う。(3) -① についてはさらに、小胞体内における動態を変化させる分子内の因子を同定するために、(3) -② 種々の maxiK チャネル変異体を用いて、小胞体内での動態の変化を観察することにより、形質膜に発現するものと小胞体膜にとどまる maxiK チャネル分子の分子構造を解析する。

次に、全く新しい、小胞輸送様式が存在する可能性について、(4) yeast two hybrid 法、または質量分析法を用いて、maxiK チャネルの特異的な輸送に関与するタンパク質因子を同定する。最後に、(5) 膵臓腺房細胞以外の細胞でも同様の輸送機構が存在するのかどうか、その他の外分泌細胞、培養細胞などを用いて検討し、この現象の一般性を検証する。

## 3. 研究の方法

まず、免疫染色法により、膵臓腺房細胞の小胞体膜に存在する maxiK タンパク質の配向の確認を試みた。しかし、maxiK をうまく染色することができなかった。これはこの細胞における maxiK タンパク質の発現量が少ないことが原因と考えられた。

そこで、膵臓腺房細胞以外の細胞でも同様の輸送機構が存在するのかどうか、培養細胞を用いて検討を行う実験を前倒しで行った。具体的には、maxiK もしくは Kv1.2 チャネルを発現させた HEK (human embryonic kidney) 293 cell から nuclear envelope を調整し、patch clamp 法により、小胞体膜から電流記録を取得し、発現するチャネルタンパク質の配向を検討した。

上記の実験から、HEK 細胞の nuclear envelope においても、チャネルタンパク質の特異的な配向が確認されたことから、以降の実験は HEK293 細胞を用いて行った。

次に、電気生理学実験以外の手法を用いて、チャネルタンパク質の配向を確認するために、免疫組織学的手法、生化学的手法により、

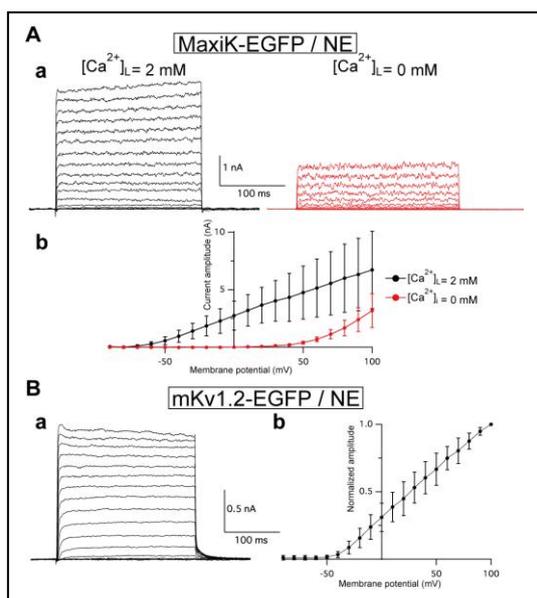
小胞体膜中のチャネルタンパク質の配向の確認を試みた。

具体的には、HEK293 細胞から調整した nuclear envelope において、免疫染色を行った。

特異的な配向を示すために必要な maxiK タンパク質分子内の領域を同定するために、maxiK の N 末端領域を段階的に削除した変異体を HEK 細胞に発現させ、その nuclear envelope に patch clamp 法を適用して小胞体膜から電流記録を取得し、発現するチャネルタンパク質の配向を検討した。

#### 4. 研究成果

maxiK もしくは Kv1.2 チャネルを発現させた HEK (human embryonic kidney) 293cell から nuclear envelope を調整し、patch clamp 法により、Whole nuclear envelope 電流を測定した。その結果、maxiK 電流は、ER lumen 側 (pipet 内) の  $Ca^{2+}$  濃度に依存して、チャネル活性が変化した。また、MaxiK、Kv1.2 ともに、ER lumen 側の脱分極により活性化した。(下図参照)



以上の結果から、マウス膵臓腺房細胞だけでなく HEK293 細胞の小胞体膜においても、また、maxiK のみならず、Kv1.2 チャネルタンパク質においても、通常考えられているものと逆の配向で小胞体膜中に埋め込まれていることが示唆された。

以降の実験は HEK293 細胞を用いて行った。

HEK293 細胞の nuclear envelope に免疫染色法を適用し、ArrayScan を用いた解析によ

りチャネルタンパク質の配向の確認を試みたが、抗体の反応性、膜の透過性などの問題により、配向を決定するに至っていない。現在は、そのほかの生化学的手法を用いて、チャネルタンパク質の小胞体膜中における配向の確認を行っている。

次に、特異的な配向を示すために必要な maxiK タンパク質分子内の領域を同定するための実験を行った。

通常、膜タンパク質を小胞体膜に埋め込むためにタンパク質の N 末端側の配列が重要であるとされていることから、maxiK の N 末端領域を段階的に削除した変異体を HEK 細胞に発現させ、その nuclear envelope に patch clamp 法を適用して小胞体膜から電流記録を取得し、発現するチャネルタンパク質の配向を検討した。

maxiK の N 末端側を削除したもの (N-del 変異体) および N 末端から 1 つめの膜貫通領域 (S0) までを削除した変異体 (S0-del 変異体) の 2 つを用いて実験を行った。(どちらの変異体も、野生型に比べて、形質膜での電流量が極端に減少していたが、野生型と同様の配向を保持していた。)

この 2 つの変異体をそれぞれ発現した HEK293 細胞から nuclear envelope を調整し、Whole nuclear envelope 電流を測定した。

その結果、どちらの変異体も、小胞体膜中において、野生型と同様に、通常の輸送機構から推測されるものと逆の配向で小胞体膜中に埋め込まれていることが示唆されたことから、小胞体膜に対して特異的な配向で埋め込まれるために必要な maxiK タンパク質分子内の配列、もしくは領域は N 末端領域以外の部位に存在することが示唆された。

#### 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 1 件)

1. 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理  
Voltage-dependent biphasic effects of chloroquine on delayed rectifier  $K^+$ -channel currents in murine thymocytes  
Journal of Physiological Science、2012年、印刷中 (DOI: 10.1007/s12576-012-0195-x)、査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫  
Orientation of  $K^+$  channel proteins in the peri-nuclear ER membrane of HEK293 cells  
Part2  
第 89 回日本生理学会大会、2012年3月

29日、松本市

2. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫

Orientation of K<sup>+</sup> channel proteins in the peri-nuclear ER membrane of HEK293 cells  
第34回日本神経科学大会、2011年9月17日、横浜市

3. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫

Orientation of MaxiK channels in the peri-nuclear ER membrane: comparison of HEK293 cells and pancreatic acinar cells  
第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011年3月28日、Journal of Physiological science 誌上(東日本大震災による)

4. 風間逸郎、村田喜理、丸山芳夫

Effects of membrane amphipath on delayed rectifier K<sup>+</sup>-channel currents in megakaryocytes  
第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011年3月29日、Journal of Physiological science 誌上(東日本大震災による)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 喜理 (MURATA YOSHIMICHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455780

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：