

平成 2 6 年 6 月 1 3 日現在

機関番号： 1 4 3 0 1

研究種目： 基盤研究(A)

研究期間： 2011 ~ 2013

課題番号： 2 3 2 4 0 0 5 5

研究課題名（和文）小胞体チャネルに関する研究

研究課題名（英文）Study of TRIC and MG23 channels

研究代表者

竹島 浩（Takeshima, Hiroshi）

京都大学・薬学研究科（研究院）・教授

研究者番号： 7 0 2 1 2 0 2 4

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 38,000,000 円、（間接経費） 11,400,000 円

研究成果の概要（和文）： TRIC-A欠損マウスでは、血管収縮性が上昇するために高血圧を発症することを見出した。TRIC-A過剰発現マウスも含めた詳細検討により、平滑筋ではTRIC-A発現はCa²⁺スパーク頻度を規定し、緊張性を規定することが判明した。

一方、小胞体に分布する膜タンパク質ミツグミン23は多量体を形成し、薄いお椀様の複合体を構築することが明らかにされた。また、不安定な陽イオン選択的チャネル電流も検出され、小胞体上でミツグミン23は状況依存的にイオンチャネルとして機能することが示された。

研究成果の概要（英文）： TRIC-A-knockout mice develop hypertension due to elevated myogenic tonus in resistance artery. By analyzing TRIC-A-knockout and overexpression mice, we found that TRIC-A density restricts Ca²⁺ spark frequency in vascular smooth muscle.

Mitsugumin 23 is an unknown membrane protein in the endo/sarcoplasmic reticulum. Our studies revealed that mitsugumin 23 forms an homo-multimer with a bowl-like stereostructure and exhibits unstable cation channel activity.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学 医化学一般

キーワード： TRICチャネル 小胞体Ca²⁺放出 血管平滑筋 ミツグミン23

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は生理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(図1)。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 Ca^{2+} シグナルへ変換され、その際には、表層膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと細胞内ストア膜上の Ca^{2+} 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筋小胞体の Ca^{2+} ストアとしての機能が極めて特化しており、大量調製可能な筋小胞体ではその構成タンパク質群の解析が進んでいる。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でも、今なお機能不明な分子が山積している。

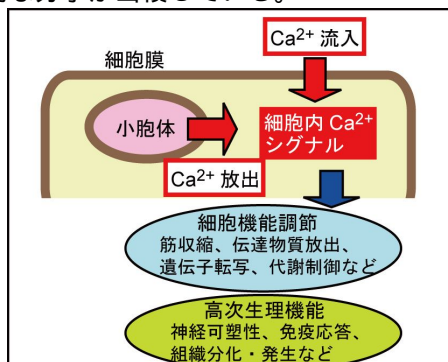


図1 Ca^{2+} シグナルの生物学的重要性

細胞内 Ca^{2+} シグナルは細胞外からの流入と小胞体からの放出成分より構成され、その破綻は様々な疾患の直接成因となる。申請者は主に神経・筋細胞系の小胞体 Ca^{2+} ストアに着眼した研究を手掛けており、期待される成果は基礎生物学のみならず、医療や応用薬学分野の発展に必須な基盤情報を提供する。

我々のグループは、神経・筋細胞における電気シグナル- Ca^{2+} シグナルの変換機構や小胞体 Ca^{2+} ハンドリングの関連機構の理解に多大に貢献した実績を有する。代表的な成果としては、リアノジン受容体サブタイプの分子同定と生理機能の解析、骨格筋特殊膜構造の形成に寄与して Ca^{2+} シグナリングを規定するミツグミン 29 の発見と機能解明、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、筋細胞膜修復に寄与するミツグミン 53 の発見と機能解析などがある。一方では、小胞体 Ca^{2+} 放出と同調して発生すると想定されるカウンターイオンの膜透過を担う TRIC チャンネルを発見し、二種の TRIC サブタイプの電気生理学的相違を解析し、心筋、骨格筋および肺胞上皮細胞における機能を解明した。さらに、以前発見したものの機能解析が手つかずであった MG23 に再注目して、脂質二重膜再構成系で MG23 が陽イオン選択的なチャンネルを形成することも見出した。最近これらの成果に基づき立案した「小胞体チャンネルに関する研究」と題した本研究においては、

主に TRIC チャンネルと MG23 の機能解明に関する実験を計画した。

2. 研究の目的

(1)TRIC チャンネルに関する研究

他のチャンネルとの相同性のない TRIC チャンネルでは、チャンネルポアと陽イオン選択性を規定する部位や、チャンネル開閉を規定する部位を特定することが望まれる。酵母 cDNA 発現系より調製した組み換えタンパク質を用いて、人工脂質二重膜での単一チャンネル測定系の構築を目指し、チャンネル機能部位を決定して、TRIC チャンネルの作動原理に迫る計画である。致死性のない TRIC-A 欠損マウスでは若年性の高血圧や薬物誘導の心筋症が、新生致死となる TRIC-B 欠損マウスでは肺胞上皮のみならず肝細胞の異常が観察されている。両変異マウスの解析を推し進めて、TRIC チャンネルの生理機能の多様性を解明する予定である。また、臨床グループとの共同研究により、TRIC チャンネル遺伝子多型または変異とヒト循環器疾患との因果関係の有無も検討する。

(2)ミツグミン 23(MG23)に関する研究

MG23 は小胞体膜と核膜に分布する膜貫通タンパク質であり、多くの細胞系で発現が確認されるものの、骨格筋、心筋や中枢系での高発現が確認されている。最近単一チャンネル測定系にて得られた成果から、MG23 は一価および二価陽イオン透過性チャンネルであることが判明した。変異導入 MG23 を同様の実験系に供してチャンネルポア領域を特定するとともに、タンパク化学実験と単粒子解析により MG23 オリゴマー構成を解明する。さらに、MG23 欠損マウスの骨格筋の異常を解析して、その筋小胞体または核膜の機能への生理的貢献を解明する。

3. 研究の方法

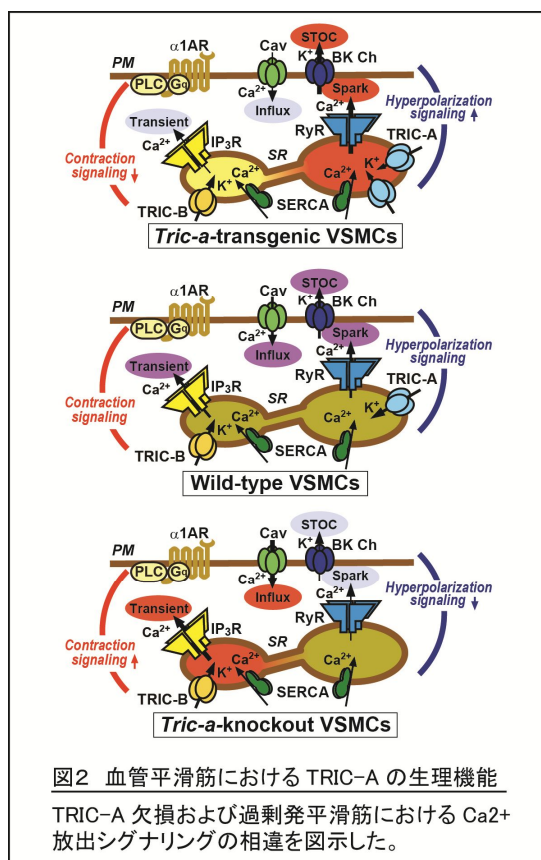
分子生物学手法による組換えタンパク質の調製や変異マウスの作製、電子顕微鏡単粒子イメージによるタンパク質三次元構造解析、人工脂質二重膜での単一チャンネルの電気生理学的検討、高時空間分解能蛍光イメージングによる細胞内 Ca^{2+} とタンパク質挙動の検討、さらには解剖組織学・細胞生物学・細胞生理学手法などを総動員した変異マウスの解析が遂行された。

4. 研究成果

(1)TRIC チャンネルに関する研究

TRIC-A 欠損マウス由来の筋小胞体試料を活用することで、単一 TRIC-B チャンネルの電流を人工脂質二重膜系にて計測することにも成功し、TRIC サブタイプの機能的相違点が明らかにされた。一方、cDNA 機能発現系の構築は遅延したが、酵母発現系とコムギ胚芽発現系を相補的に活用して、 Ca^{2+} 依存性開口機構の有無などの部分的な TRIC サブタイプの電気生理学的特性の差異も明らかにされた。

TRIC-A 欠損マウスは、抵抗血管の収縮亢進により高血圧を発症することを見出した。詳細な検討の結果、TRIC-A 欠損血管平滑筋ではリアノジン受容体による小胞体 Ca^{2+} スパークが抑制されて、膜電位上昇により電位依存性 Ca^{2+} 流入の亢進し、血管収縮性が上昇するものと結論された。また、平滑筋特異的 TRIC-A 過剰発現マウスは低血圧を示し、上記の機構と反対に、電位依存性 Ca^{2+} 流入が抑制されて血管収縮性が低下していることが判明した。従って、TRIC-A 発現は平滑筋緊張性を規定する(図2)。



(2) ミツグミン 23(MG23)に関する研究

ミツグミン 23 は化学架橋剤の処理により多量体を形成し、脂質二重膜再構成実験において不安定な陽イオン選択的チャネルを形成することが明らかになった。また、電子顕微鏡の粒子イメージの三次元再構築実験では、ミツグミン 23 は側壁が薄いお椀様の複合体を形成することが明らかにされた。従って、典型的なイオンチャネルの構造とは大きく異なるものの、小胞体上でミツグミン 23 は状況依存的に陽イオンチャネルを形成し得ることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Venturi, E., Mio, K., Nishi, M., Ogura, T., Moriya, T., Okuda, K., Kakizawa, S., Sitapeasan, R., Chikara Sato, C. & Takeshima, H. Mitsugumin 23 forms massive bowl-shaped assembly and cation-selective channel. *Biochemistry* **50**, 2623-2632, 2011.

2. 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 Metab.* **14**, 231-241, 2011.

3. Jiao, Q., Takeshima, H., Ishikawa, Y. & Minamisawa, S. Sarcalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* **51**, 31-39, 2012.

4. Mosca, B., Bergamelli, L., Vukcevic, M., Lopez, R., Treves, S., Nishi, M., Takeshima, H., Paolini, C., Martini, M., Rispoli, G., Protasi, F. & Zorzato, F. Enhanced dihydropyridine receptor calcium channel activity improves skeletal muscle strength. *Nat. Commun.* **4**, 1541, 2013.

5. Nishi, M., Aoyama, F., Kisa, F., Zhu, H., Sun, M., Lin, P., Ohta, H., Yamamoto, S., Kakizawa, S., Sakai, H., Ma, J., Sawaguchi, A. & Takeshima, H. TRIM50 regulates vesicular trafficking for acid secretion in gastric parietal cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 33523-33532, 2012.

6. Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., Kakizawa, S., Imaizumi, Y. & Takeshima, H. Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle overexpressing TRIC-A channels. *J. Biol. Chem.* **288**, 15581-15589, 2013.

7. Venturi, E., Sitsapesan, R., Yamazaki, D. & Takeshima, H. TRIC channels supporting efficient Ca^{2+} release from intracellular stores. *Pflugers Arch.* **465**, 187-195, 2013.

8. Venturi, E., Matyjaszkiewicz, A., Pitt, S. J., Tsaneva-Atanasova, K., Nishi, M., Yamazaki, D., Takeshima, H. & Sitsapesan, R. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch.* **465**, 1135-1148, 2013.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Takeshima, H. “TRIC channel subtypes, willing partners with Ca^{2+} release channels in intracellular stores” Gordon Research Conference; Ca^{2+} signaling (Jun 27, 2011 in Waterville Valley, USA).

2. Takeshima, H. “TRIC channels are essential partners for Ca^{2+} release” European Calcium Channel Conference (May 19, 2012 in Alpbach, Austria).

3. Takeshima, H. “TRIC channels supporting physiological Ca^{2+} release” Gordon Research Conference; muscle E-C coupling (June 4, 2012 in Les Diablerets, Switzerland)

〔図書〕(計 1 件)

山崎大樹、陶晟辰、竹島浩 TRIC チャネルと高血圧 *Clinical Calcium* vol. **23**, 543-550, 2013.

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

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

6．研究組織

(1)研究代表者

竹島浩（京都大学大学院薬学研究科・教授）

研究者番号：70122024

(2)研究分担者

山崎大樹（京都大学学際融合教育研究推進センター・特定助教）

研究者番号：40467428

西美幸（京都大学大学院薬学研究科・研究員）

研究者番号：60183894