

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590254

研究課題名(和文) 外分泌腺細胞核・ミトコンドリアでの膜の可塑性とイオンチャネル連関

研究課題名(英文) Ion channel coupling and membrane plasticity in nucleus and mitochondria

研究代表者

丸山 芳夫 (MARUYAMA, Yoshio)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00133942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：核膜標本管腔カルシウム濃度を数十マイクロモル(10-200マイクロモル)に固定すると、緩徐な膜容量の増加がみられ、当反応は管腔カルシウム濃度に依存していた。一方パッチ膜局所領域では、膜容量の振幅揺らぎが顕著であり、膜の可塑性が明らかとなった。われわれの核標本は支持体である細胞骨格系から開放されており、膜の自由な配置が許されている。標本にはイオンおよび水チャネルが豊富であった。イオン組成の変化に対応して、標本容積が変化することから、これらは核形態の維持を司っていると考えられた。共焦点顕微画像には、数個の点状塊となった膜の重畳構造があり、小胞体膜の核孔への陥入と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Fixing the lumen  $Ca^{2+}$ -concentration at over 10 micro molar concentration in a nuclear/endoplasmic reticulum preparation (nuclear envelope: NE), which is subjected into whole-NE configuration of the patch-clamp recording techniques, I observed increases of membrane electrical capacitance, the measurement of the membrane area. The membrane capacitance, recorded under in situ patch-clamp condition, fluctuated microscopically. The result suggests that the NE membrane system shows a characteristic undulation reflecting temporal membrane vesiculation and collapse, and the process is under control of the lumen  $Ca^{2+}$  concentration. The NE membrane is rich in ion- and water- channels. Those active membrane may component contribute to maintain NE assembly, the structure of the lumen and the nuclear membranes. Further, I observed with laser confocal microscopy in the NE preparation, a thick membrane accumulation, stacking into layers at a small spot, assumingly corresponding to the nucleic pore.

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：核膜・小胞体膜 イオンチャネル 膜容量 膜可塑性 膵外分泌腺

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類正常分泌細胞での外側核膜への電気的アプローチは、膵腺腺房細胞核膜における Maxi-K チャネルの同定 (Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channels in the nuclear envelope isolated from single pancreatic acinar cells. Pflugers Archiv, 430:148-150 (1995)) に始まる。パッチクランプ法に適した標本作成法の漸次改良を経て、近年ルーチン操作での核膜 (外側核膜) パッチクランプ法が可能となった。実際、申請者の研究グループにおいて、現在、1) 200 pS Maxi-K channel, 2) 80 pS K-channel, 3) 30pS cation-channel, 4) 7 pS Cl-channel, 5) 300 pS IP3R-channel (type 3), 6) 55 pS cADPR or NAADP-dependent channel, が膵腺腺房細胞外側核膜において同定できた (20 - 21 年度特定領域「膜輸送複合体」による)。そのうち、200 pS Maxi-K channel の細胞膜上への発現については著しい週令依存性があり、マウス7週令以前には msl0 RNA は存在せず、機能的にも膜での発現は認められなかった (Delayed expression of large conductance K<sup>+</sup> channels reshaping agonist-induced currents in mouse pancreatic acinar cells. Journal of Physiology, 2005, 563:379-391)。核膜においてもこの遅れは存在し、細胞内膜系の発達 (核・小胞体の容積の増加) との関連が考えられる。このように細胞膜上のイオンチャネルと核膜上のそれとは、その発現において相関を持つ (20 - 21 年度特定領域「膜輸送複合体」による)。

上記イオンチャネルの発現部位とその時期には、生理学的な意義と制御機構があるはずである。核膜とその内腔は生成蛋白ペプチドを収容するための溶液系コンパートメントとしての側面があり、この空間の容積維持には、水チャネルとともに、溶質の移動を担う K-チャネル (Maxi-K チャネルを含む) そして Cl-チャネルを必要とするはずである。事実、核膜標本において K および Cl イオンをチャネル不透過の Cs および methansulfonate に置換すると標本は縮小する (20 - 21 年度特定領域「膜輸送複合体」: Nuclear-envelope Maxi-K channels regulating volume increases in endoplasmic reticulum, in preparation)。

二層の膜 (内外核膜) に挟まれた空間 (核膜腔) は、蛋白ペプチドの生合成部位であるとともに、カルシウムイオンの貯蔵部位でもある。実際、イノシトール3-リン酸は核膜受容体に作用し、核質でのカルシウム濃度上昇を促す (NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors. Journal of Cell Biology 162:271-282(2003))。申請者は核周辺管腔カルシウム濃度は、シャペロン蛋白に影響を与え、輸送小胞形成に関わり、また Maxi-K チ

ャンネル等、機能性蛋白活性を制御しようと考える。

核と核周辺複合体構造の理解には、統合的ないしは俯瞰的な方法論が不可欠であり、その適用に当たって、インタクトな核構造標本の必要性は強調されてよい。申請者は現在、現行の核膜・小胞体標本から外側核膜のみ取り去った内側膜・核質標本の作製を模索している。

## 2. 研究の目的

核を覆う二層の膜系 (内側および外側核膜) は、核膜腔および核膜各々に接する核質 (ヌクレオプラズム) と細胞質 (サイトプラズム) を含め、核周辺複合体を形成している。さらに、これを密に包囲するミトコンドリア集団の存在は、核信号と代謝系を結び連携空間の存在を示唆している。内側核膜、外側核膜、およびミトコンドリア膜 (ミトプラスト) を対象に、それらの特性を、(1) 内側核膜イオンチャネルと核質空間、(2) 膜の可塑性 (内外核膜とミトプラストの可塑性) (3) 核膜とミトコンドリア膜とのイオンチャネル連関、を中心に、正常細胞 (マウス膵腺外分泌細胞) において発見的に規定することを目的とする。本研究は、(1) 数種のオルガネラ膜を扱い、(2) イオンチャネルを対象とし、(3) 核領域構造体の統合機能を検討し、具体的には、水溶性環境中でのオルガネラ膜イオンチャネルの活動、オルガネラ膜の可塑性、特殊チャネルのオルガネラ膜への発現あるいは挿入 (核膜とミトコンドリア間) を研究対象とする

## 3. 研究の方法

膵腺腺房細胞から核およびミトコンドリアを取り出す (低浸透圧にて細胞膜を除去あるいはホモジェナイゼーションにて)。さらに低張クエン酸ナトリウム中で振盪を加え外側核膜あるいはミトコンドリア外膜を除去する。この時点で、(1) 外側核膜、(2) 内側核膜、(3) ミトコンドリア内膜、を保持した標本を得る。これらにパッチクランプ法 (通常の電流測定法とロックインアンプを組み合わせた位相差膜容量計測法) を適用する。膜の可塑性は膜容量計測法による膜表面積変化として評価する (膜の小胞化があれば容量は減少する)。内側核膜・核質標本へのパッチクランプ法の適用に当たっては、核質環境の人工的变化を促し、それを実験上の強制刺激とする。チャネル発現での核膜とミトプラスト相関をみるため、蛍光抗体法およびウェスタンブロッティングを暫時併用する。

申請者は膵腺腺房細胞から核標本を取り出し (低浸透圧にて細胞膜を除去) それにパッチクランプ法を適用し、外側核膜からのイオンチャネル電流の計測に成功している。ま

た核膜管腔に同法をもってアクセスすることができる。膜容量変化と膜蛍光色素(ANEPP系)画像との相関関係を評価し、核膜伸展可塑性の制御機構を管腔カルシウム、イオンチャンネルおよび水チャンネルの分布と活性化状態に求める。外膜除去ミトコンドリア(ミトプラスト)へのパッチクランプ法の適用は容易である。マトリックス内へのアクセスには、ベータエスチンによる穿孔法を用いる。ミトプラスト上のイオンチャンネルには、細胞によるバリエーションが大きい。Maxi-Kチャンネルの蛍光抗体染色、ウェスタンブロッティングおよび単一電流測定を核膜およびミトプラストにおいて平行して行う。以下、(1)外側核除去による内側核膜・核質標本の作製とそれへのパッチクランプ法の適用(丸山担当)(2)膜の可塑性評価のための膜容量測定法実施(丸山担当)(3)Maxi-Kチャンネルのウェスタンブロッティング(村田担当)(4)膜蛍光色素、蛍光抗体法による顕微画像の解析(丸山担当)(5)ミトプラスト調整とマトリックス内制御術法の確立(風間担当)分担する。

#### 4. 研究成果

##### H23 年度

核を覆う二層の膜系(内側および外側核膜)を対象に本年度は、(1)核膜イオンチャンネルを同定・分類すること、(2)膜の可塑性を可視化する方法を見いだすこと、を目的とした。

核膜イオンチャンネルの活動膵腺腺房細胞を単離し、それより核包(nuclear envelope)を調整した。それを集め、低張クエン酸ナトリウム(30 mM)中で1時間程度の振盪を加え、外側核膜を融解し、内側核膜標本作製を試みた。標本サイズは1/3以下となり、それらはことごとく DAPI 色素にて染色された。またそうした標本上にて、イノシトール三リン酸感受性イオンチャンネルの発現を観察した。

##### H24 年度

本年度は核膜の infoldings (皺; cleft) を可視化する方法を模索した。調整が容易な巨核球細胞を用い、その表面にある microvesicle 構造をモデルとして、新規蛍光法を開発した。膜の可塑性(曲率)を変えるサリチル酸およびクロロプロマジンの効果を水溶性蛍光色素(ルシファーイエロー)の存在下で評価した。サリチル酸は脂質二重膜の外膜に蓄積し、膜を細胞外へ向かって凸に曲げる。その結果、vesicle 構造の上部膜が融合し、外部と遮断されたかん入部を形成する。その分にルシファーイエロー色素は残存し、サリチル酸の効果により細胞洗滌後にも残ると解釈された。本方法は核包表面の cleft 構造探求に有効であると考えられ、次年度予定の「管腔側カルシウムイオンの作用と核膜可塑性」に利用できる。

膜の微小表面積変化を計測する方法に膜容量計測法がある。ここでのオルガネラ膜(ミトコンドリア内膜; 外側核膜; 内側核膜)は支持体である骨格系から開放されており、自由な可塑性・変形性が許されている。細胞質、管腔(マトリックス)核質など、膜と接触する空間の水溶液環境を変化させた場合、膜の実効表面積の変化が期待できる。膜容量もしくは膜表面積の変化を測定することで、オルガネラ膜の機能的可塑性とその意義を解明する。以上を踏まえ、本年度研究においては、核膜標本での膜容量計測を行った。ホール核包モードにて管腔カルシウム濃度を数マイクロモル(10-200 マイクロモル)に固定すると、数秒の遅れを伴い、見かけ上、膜容量の増加がみられた(膜コンダクタンスは一定であった)。カルシウム濃度1マイクロモル以下ではその上昇は観察されず、本反応は管腔カルシウム濃度に依存した反応であることが分かった。また、パッチ膜内での局所膜領域では、膜容量の振幅揺らぎが顕著であり、蛋白輸送に関わる膜小胞の出芽(budding)過程がこの現象の説明として妥当であろうと思われた。この時点で、これらを統一的に説明できる機序の解明が急務となった。つまり、管腔カルシウムの局所濃度が出芽の形成および崩壊機構の制御に与ることが示唆される。通常、管腔カルシウム濃度は1 - 2 mMとされている。総合的にこれらを勘案すれば、本研究における膜容量変化(膜表面積の変化)は、局所カルシウム濃度の減少がその部分の膜小胞形成を促し、かつその小胞構造の維持固定に関わるとの仮説を設定できる。

##### H25 年度

核を覆う二層の膜系(内側および外側核膜)は、それらの形成する核膜腔およびそれらに接する核質(ヌクレオプラズム)と細胞質(サイトプラズム)を含め、核周辺複合体を形成している。われわれの標本では、核は支持体である細胞骨格系から開放されており、自由な可塑性・変形性が許されている。レーザー共焦点顕微鏡システム本体(Digital Eclipse C1)をNikon社より貸借し、既得の蛍光画像と比較しつつ、蛍光断層画像を得た。われわれの標本(小胞体・核標本: マウス膵腺腺房細胞を単一細胞レベルにまで単離し、次いで低浸透圧処理を施す)では、色素(DiOC6: 小胞体膜指向性グリーン蛍光)の濃いスポット状部分と薄い平面上部分が識別され、前者は核を取り巻く小胞体の重畳構造(膜の点状塊あるいは核孔への陥入部分)に、後者は核全体を取り巻く一層の外側核膜に由来すると考えられた。その根拠として、膜の流動性および核孔構造の強い膜曲率部の存在が前者に、パッチクランプ法 giga-seal の形成可能性(現実に形成できる)が後者において考えられる。いっぽう、水溶性色素(lucifer yellow)を細胞内へ注入すると、核(核ヌク

レオプラズム)が選択的に染色され、通路としての核孔の関与が確認できるが、小胞体・核標本では同色素での染色はなく、この通路は閉鎖されている。また、周囲イオン環境をKClよりチャンネル不透過のCs-methansulfonateに変化させる(またその逆に)と、核ヌクレオプラズム領域の縮小(拡大)がある。このことは核孔が正常であれば起こりようがない。これらの知見により、核膜の核孔への陥入そしてそれによる核孔の閉鎖が強く疑われた。現在、この点をさらに明確にすべく、Lucifer yellowの標本核膜腔への注入を試みている。

#### 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 9件)

1. Flagellin/TLR5 signaling potentiates airway serous secretion from swine tracheal submucosal glands. (2013) Soshi Muramatsu, Tsutomu Tamada, Masayuki Nara, Koji Murakami, Toshiaki Kikuchi, Masahiko Kanehira<sup>1</sup>, Yoshio Maruyama, Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa and Masakazu Ichinose. *Am.J. Physiol* 305: L819-L830. 査読あり。

DOI:10.1152/ajplung.0053.2013

2. Kazama I, Matsubara M, Kanai Y, Hatano R, Asano S, Endo Y, Toyama H, Ejima Y, Kurosawa S, Maruyama Y. (2013) Decreased Expression of a Novel Prostaglandin Transporter, OAT-PG, Facilitates Renocortical PGE(2) Accumulation during Rat Pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 査読あり。

DOI: 10.1159/000353977.

3. Kazama I, Maruyama Y, Takahashi S, Kokumai T. (2013) Amphipaths differentially modulate membrane surface deformation in rat peritoneal mast cells during exocytosis. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31(4-5):592-600. 査読あり。

DOI: 10.1159/000350079.

4. Kazama I, Maruyama Y. (2013) Differential effects of clarithromycin and azithromycin on delayed rectifier K(+)-channel currents in murine thymocytes. *Pharm Biol. Jun*;51(6):760-5. 査読あり。

DOI: 10.3109/13880209.2013.764539.

5. Kazama I, Maruyama Y, Nakamichi S. (2012) Aspirin-Induced Microscopic Surface Changes Stimulate Thrombopoiesis in Rat Megakaryocytes. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012 Oct 17. 査読あり。

DOI: 10.1177/1076029612461845.

6. Kazama I, Maruyama Y, Matsubara M.

(2012) Benidipine persistently inhibits delayed rectifier K(+)-channel currents in murine thymocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 35(1):28-33. 査読あり。

DOI: 10.3109/08923973.2012.723011.

7. Kazama I, Maruyama Y. Inner mitochondrial maxi-K<sup>+</sup> channels in neonatal renal tubular cells: novel therapeutic targets to control apoptosis. (2012) *Med Hypotheses.* 78(6):800-1. 査読あり。

DOI: 10.1016/j.mehy.2012.03.013.

8. Kazama I, Maruyama Y, Murata Y. (2012) Suppressive effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac sodium, salicylate and indomethacin on delayed rectifier K<sup>+</sup>-channel currents in murine thymocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 34(5):874-8. 査読あり。

DOI: 10.3109/08923973.2012.666249.

9. Kazama I, Maruyama Y, Murata Y, Sano M. (2012) Voltage-dependent biphasic effects of chloroquine on delayed rectifier K(+)-channel currents in murine thymocytes. *J Physiol Sci.* 62(3):267-74. 査読あり。

DOI: 10.1007/s12576-012-0195-x.

[学会発表](計 0件)

[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

特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 芳夫 (MARUYAMA, Yoshio)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00133942

(2)研究分担者

村田 喜理 (MURATA, Yoshimichi)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60455780

風間 逸郎 (KAZAMA, Itsurou)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60593978

(3)連携研究者

なし

( )

研究者番号：