

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590267

研究課題名(和文)小胞体膜における、KCa1.1チャンネルの特異的な配向を決定する因子の同定

研究課題名(英文) Analysis of unconventional orientation of MaxiK channels in the peri-nuclear ER membrane

研究代表者

村田 喜理 (Murata, Yoshimichi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60455780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HEK293細胞から調整したnuclear envelope標本中のKCa1.1チャンネルタンパク質の膜中における向き(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。本研究は、この現象に関する細胞内因子の同定を行う目的で行われた。

その結果、nuclear envelope膜内に含まれるKCa1.1チャンネルが、lumen側に細胞内領域を向けた1種類の配向のみからなっていることが示唆された。また、KCa1.1チャンネルのβ-サブユニット(KCNMB1)は、KCa1.1チャンネルが通常と異なる配向を示すメカニズムに関与していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We prepared nuclear envelopes (NEs) from HEK293 cells expressing KCa1.1 and observed KCa1.1 currents in the membrane subjected to the patch-clamp technique. The results indicated that the KCa1.1 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.

Pharmacological and electrophysiological experiments indicated that KCa1.1 channels in our NE preparation didn't oriented bidirectional. They consisted of unconventional orientation. Electrophysiological experiments showed that KCNMB1 wasn't involved in this phenomenon.

研究分野：イオンチャンネル

キーワード：イオンチャンネル 小胞体

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 Ca^{2+} 依存性の電位依存性 K^+ (maxiK/BK: $K_{Ca}1.1$) 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)。

さらに、HEK (human embryonic kidney) 293 細胞から nuclear envelope を調整し、patch clamp 法により、Whole nuclear envelope 電流を測定した結果、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 ($K_{Ca}1.1$) 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。

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、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、maxiK ($K_{Ca}1.1$) 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

本申請で明らかにしようとする事柄は以下のとおりである。

1) $K_{Ca}1.1$ チャネルの小胞体膜中における配向を、電気生理学的手法以外の方法で確認する。

2) 小胞体膜中で、通常と異なる配向を持ちながら、形質膜では通常の配向を示す、 $K_{Ca}1.1$ チャネルの小胞体膜への配向、形質膜への輸送のメカニズムについて考察する。

3) 2) のメカニズムに必要とされる、タンパク質因子の探索を行う。

4) 3) で同定されたタンパク質因子の機能解析を行う。

この現象はマウスの膵臓腺房細胞で最初に見出されたものであるが、HEK293 細胞で再

現されることが分かっているので、 $K_{Ca}1.1$ を強制発現させた HEK293 細胞を用いて、研究を進めていく。

具体的には、まず、1) nuclear envelope 中での、 $K_{Ca}1.1$ チャネルの膜に対する配向を、免疫染色法、および糖鎖修飾部位を同定することにより確認する。

次に、2) 小胞体膜中で、通常と異なる配向を持ちながら、形質膜では通常の配向を示す、 $K_{Ca}1.1$ チャネルの配向、または輸送のメカニズムを解き明かすために、まず 2-1) nuclear envelope で patch clamp を行い、膜の内側、外側から適用したブロッカーの $K_{Ca}1.1$ チャネルに対する有効性を評価することにより、小胞体膜に存在する $K_{Ca}1.1$ チャネルが、A) 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するのか、それとも B) 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。ここで、A) 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た場合、形質膜、小胞体膜それぞれで機能する $K_{Ca}1.1$ チャネルが、別々のものである可能性が疑われる。また、B) lumen 側に細胞内領域を向けている $K_{Ca}1.1$ のみが存在した場合、全く新しい、小胞輸送様式が存在する可能性が考えられる。次に 2-1) の実験の結果が A) であった場合、一つの遺伝子からどのように膜への配向が異なるタンパク質分子を作り出しているのかを明らかにするため、 $K_{Ca}1.1$ の deletion 変異体、点変異体を作成し、それらの変異体の小胞体膜における配向の変化を解析し、変則的な膜への配向を生み出す、 $K_{Ca}1.1$ タンパク質内の責任部位を同定する。

最後に、3) A または B のメカニズムに関与する細胞内因子の探索を行う。まず、3-1) $K_{Ca}1.1$ チャネルと相互作用し、その局在、機能に影響を与える β -サブユニットタンパク質の、この現象への影響を明らかにするため、 $K_{Ca}1.1$ チャネルと β -サブユニットを共発現した HEK293 細胞において、 $K_{Ca}1.1$ チャネルの小胞体膜における配向を電気生理学的、生化学的手法により検討する。次に、3-2) 小胞体内で $K_{Ca}1.1$ タンパク質と相互作用するタンパク質因子の同定を試みる。超遠心により小胞体を含む画分を濃縮し、そこからタンパク質を抽出し、Blue-Native PAGE により $K_{Ca}1.1$ と相互作用するタンパク質を単離し、質量分析により同定する。その後、4) 得られたタンパク質分子について機能解析を行う。

3. 研究の方法

1) 免疫染色法と細胞イメージアナライザ - Cellomics ArrayScan により、nuclear envelope 中での $K_{Ca}1.1$ チャネルの膜に対する配向の確認を試みた。しかし、nuclear

envelope の膜のシールの状態の影響により、明確な結果を得ることはできなかった。

次に、生化学的手法により、小胞体膜中の K_{Ca} 1.1 チャネルの配向の同定を試みた。まず、 K_{Ca} 1.1 の C 末端に TEV プロテアーゼの認識配列をリンカーとして EGFP を融合したコンストラクトを作成した。この遺伝子を、TEV プロテアーゼ遺伝子とともに HEK293 細胞に発現させ、TEV プロテアーゼ認識サイトが切断されるかどうかをウェスタンブロットにより確認した。(小胞体内の K_{Ca} 1.1 チャネルが通常と異なる配向を示す場合、小胞体膜により認識サイトが保護されるため、TEV プロテアーゼによる切断を受けない。)

実験の結果、切断を受けていない K_{Ca} 1.1 (+EGFP) のバンドが確認されたが、実験を繰り返すと、完全に切断されたバンドだけが検出される場合もあった。このような結果のばらつきの原因はよくわからなかったため、この実験によっても、明確な結果を得るには至らなかった。

現在は、免疫染色法と電子顕微鏡を用いた観察により、 K_{Ca} 1.1 チャネルの膜に対する配向の確認を行っている。

2) 小胞体膜中で、通常と異なる配向を持ちながら、形質膜では通常の配向を示す、 K_{Ca} 1.1 チャネルの配向、または輸送のメカニズムを解き明かすために、まず小胞体膜に存在する K_{Ca} 1.1 チャネルが、A) 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するのか、それとも B) 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した。

K_{Ca} 1.1 の特異的な阻害剤である Iberitoxin を、HEK293 細胞から調整した nuclear envelope 膜の内側、外側から添加し、電気生理学的記録を行った。その結果、Iberitoxin は、nuclear envelope の外側 (cytoplasm 側) からのみ、 K_{Ca} 1.1 チャネルに対する阻害効果を示した。

このことから、nuclear envelope 標本膜に存在するすべての K_{Ca} 1.1 チャネルは、lumen 側に細胞内領域を向けていることが示唆された (目的欄 2) における B) の結果に一致する。)

さらに、whole nuclear envelope patch clamp における外液 (bath 溶液) と内液 (電極内液) を入れ替えた状態で電流記録を行った。その結果からも、nuclear envelope 標本中に、cytosol 側に細胞内領域を向けた K_{Ca} 1.1 チャネルの存在は示唆されなかった。

3) 小胞体膜中で、 K_{Ca} 1.1 チャネルが通常と異なる配向を示すメカニズムに関する細胞内因子の探索を行った。

3-1) K_{Ca} 1.1 チャネルと相互作用し、その局在、機能に影響を与える β -サブユニットタンパク質の、この現象への影響を明らかにするため、 K_{Ca} 1.1 チャネルと β -サブユニットを共発現した HEK293 細胞において、 K_{Ca} 1.1 チャネルの小胞体膜における配向を電気生理学的手法により検討した。

K_{Ca} 1.1 と β -サブユニット (マウス KCNMB1) を共発現した HEK293 細胞から nuclear envelope を作成し、whole nuclear envelope patch clamp により、電流記録を行ったが、 β -サブユニットの有無により、 K_{Ca} 1.1 の nuclear envelope 内における配向が変化することはなかった。

4. 研究成果

1) K_{Ca} 1.1 チャネルの小胞体膜中における配向を、電気生理学的手法以外の方法で確認するという目的については、免疫染色法と細胞イメージアナライザー Cellomics ArrayScan を組み合わせた手法では、nuclear envelope の膜のシールの状態の影響により、明確な結果を得ることはできなかった。また、TEV プロテアーゼをツールとして用いた生化学的手法による試みにおいても、明確な結果を得るには至っていない。現在は、電子顕微鏡を用いて、小胞体膜中の K_{Ca} 1.1 チャネルの配向の同定を行っている。その途上で、nuclear envelope の中に、ミトコンドリアなどの細胞内小器官が混在していることが確認されるなど、標本の膜の様子の詳細が明らかになりつつある。

また、小胞体膜たんぱく質のトポロジーの同定に TEV プロテアーゼを用いた手法はこれまでに報告がなく、研究手法として確立できれば、当該分野の研究の発展に寄与できるものと考えられる。現在、本実験手法の改良に取り組んでいる。

2) 小胞体膜中で、通常と異なる配向を持ちながら、形質膜では通常の配向を示す、 K_{Ca} 1.1 チャネルの配向、または輸送のメカニズムを解き明かすために、まず小胞体膜に存在する K_{Ca} 1.1 チャネルが、A) 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するのか、それとも B) 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した。

電気生理学的手法、薬理学的手法を用いて、nuclear envelope 膜内に含まれる K_{Ca} 1.1 チャネルが、lumen 側に細胞内領域を向けた 1 種類の配向のみからなっていることが示唆された。この結果から、全く新しい小胞輸送様式が存在する可能性が考えられる。

3) 小胞体膜中で、 K_{Ca} 1.1 チャネルが通常と異なる配向を示すメカニズムに関する細胞内因子の探索を行った。

まず、 K_{Ca} 1.1 チャネルと相互作用し、その

局在、機能に影響を与えるβ-サブユニットタンパク質の、この現象への影響を明らかにするため、K_{Ca}1.1 チャンネルとβ-サブユニットを共発現した HEK293 細胞において、K_{Ca}1.1 チャンネルの小胞体膜における配向を電気生理学的手法により検討したところ、β-サブユニットの有無により、K_{Ca} 1.1 の nuclear envelope 内における配向が変化することはなかった。このことから、K_{Ca} 1.1 チャンネルのβ-サブユニット (KCNMB1) は、K_{Ca} 1.1 チャンネルが通常と異なる配向を示すメカニズムに関与していないことが示唆された。

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)

[学会発表](計6件)

1. 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理、馬場あすか

Overexpression of leukocyte Kv1.3-channels promotes renal fibrosis in rats with advanced chronic renal failure

第91回日本生理学会大会、2014年3月18日、鹿児島市・鹿児島大学郡元キャンパス

2. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫

Alanin scan analysis in the pore region of TRPV1 channel

第91回日本生理学会大会、2014年3月17日、鹿児島市・鹿児島大学郡元キャンパス

3. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫

HEK293 細胞の核周辺小胞体膜における、MaxiK チャンネルタンパク質の配向

第45回 東北生理談話会、2013年10月5日、仙台市・東北大学片平キャンパス

4. 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理

胸腺リンパ球 Kv1.3 チャンネル電流 に対するクロロキンの効果

第45回 東北生理談話会、2013年10月5日、仙台市・東北大学片平キャンパス

5. 村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫

Biochemical and histological identification of MaxiK channel orientation in the peri-nuclear ER membrane of HEK293 cells

第90回日本生理学会大会、2013年3月28日、東京・タワーホール船堀

6. 風間逸郎、丸山芳夫、村田喜理、中道聡史

Suppressive effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs diclofenac sodium, Salicylate and indomethacin on delayed rectifier K⁺-channel currents in murine

thymocytes

第90回日本生理学会大会、2013年3月28日、東京・タワーホール船堀

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・講師

研究者番号：60455780

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

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