

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590291

研究課題名(和文) CIC-3のアイソフォーム間における機能的差異に関する分子生理学的研究

研究課題名(英文) Molecular physiological studies on functional differences among isoforms of CIC-3

研究代表者

岡田 俊昭 (Okada, Toshiaki)

生理学研究所・細胞器官研究系・特任准教授

研究者番号：00373283

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)：Cl-チャンネル/トランスポーターファミリーに属するCIC-3は、CIC-3aから3fの6つのイソ型が存在すると考えられているが、CIC-3dについては詳細が不明だった。本研究では我々がクローニングしたCIC-3dを用いて電気生理学的解析を行い、CIC-3dがCd²⁺感受性の外向き整流性アニオン電流を生じるチャンネルで、その性質はCIC-3aとよく似ていることを明らかにした。またCIC-3dは酸感受性又は容積感受性アニオンチャンネルの分子実体とは異なることを示した。CIC-3の電気生理学的特性については未だ不明な点も多いが、本研究の成果はそれらを解明するための一助となるだろう。

研究成果の概要(英文)：CIC-3, a member of the Cl-channel/transporter family, is predicted to have six isoforms, CIC-3a to -3f, with distinct N- and C-terminal amino acid sequences, however amino acid sequences of CIC-3d was derived from genomic sequence, but there was no experimental evidence for mRNAs. We recently cloned a cDNA containing the full coding region of CIC-3d. In this study, we analyzed the channel properties of CIC-3d by whole-cell patch-clamp recordings and identified basic properties of this channel. We identified that CIC-3d, like CIC-3a, mediates Cd²⁺-sensitive outwardly rectifying anion currents and that CIC-3d is distinct from the molecular entities of acid- and volume-sensitive anion channels. Electrophysiological properties of CIC-3 have long been investigated but are still unclear. Our results may help elucidate them.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャンネル 電気生理 分子クローニング

1. 研究開始当初の背景

(1) CIC-3 は 1994 年にクローニングが報告された Cl⁻チャネル/トランスポーターファミリーの一つで、これまでに多くの研究、解析が行われてきた。CIC-3 蛋白は少なくとも強制発現系においては、その殆どが細胞内膜構造に局在し、エンドソームやシナプス小胞の酸性化に働く Cl⁻/H⁺ exchanger として機能することが示されている。一方で、蛋白の一部は細胞膜に発現し Cl⁻チャネルとして働くという説も根強いが、その性質については複数の研究グループから全く異なる主張がなされコンセンサスが得られた状態とはいえなかった。

(2) CIC-3 にはそれぞれ異なる N 末、C 末アミノ酸配列を持つ a-f の 6 つのイソフォームが存在すると考えられている。しかしながら、CIC-3d と CIC-3f については NCBI のデータベースに mRNA の登録が無く、機能解析は全く行われていなかった。我々は新規に CIC-3d をマウスの肝臓からクローニングし発現ベクターを作成した。

2. 研究の目的

(1) 本研究を開始する前に予備的に、CIC-3 発現ベクターを用いた電気生理学の実験をおこなったが、CIC-3 に由来する電流を記録することができなかった。過去にそのような研究報告も存在することから我々の場合も仕方がないと考えていたが、研究期間中に CIC-3 電流が記録できることが判明した。このことから CIC-3、特に新規にクローニングした CIC-3d のチャネルとしての基本的な機能を電気生理学的に解析することを目的に据えた。

(2) CIC-3a は細胞に強制発現させるとリソソーム様の構造を多数形成し自身の蛋白は、その膜上に局在するが、他のイソフォームにはそのような作用は見られない(図 3 参)。CIC-3 は CIC ドメインと 2 つの CBS ドメインから構成されるが、これらは全てのアイソフ

ォームに備わっており、CIC-3a と他のアイソフォームが異なるのは N 末、C 末のアミノ酸配列だけである。CIC-3a と比較したときに、CIC-3b, CIC-3c はそれぞれ N 末に 58、31 アミノ酸が付加されているが C 末端側は CIC-3a と等しい。一方、CIC-3d は N 末のアミノ酸配列は CIC-3a と同じだが、2 番目の CBC ドメインの C 末のアミノ酸配列が CIC-3a-c とは少し異なり、さらに CBC ドメイン 2 よりも C 末端側の配列は CIC-3a-c が 13 アミノ酸からなるのに対して、CIC-3d は 61 アミノ酸であり、配列的にも全く異なっている。本研究はそのような CIC-3a とは異なる配列の中からリソソーム形成に差異が生じる原因となるアミノ酸配列を特定しそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HEK293T 細胞に CIC-3d 及び点変異分子 E224A を発現させ、パッチクランプにより CIC-3d チャネルの基本的な性質を調べた。検出された電流に対し種々のアニオンチャネルブロッカーの効果を調べた、これまでに他の CIC-3 アイソフォームで報告されている電気生理学的な性質について確認する実験を行った。さらに分子実体が未同定なアニオンチャネル群と CIC-3d との関係についても強制発現や siRNA を用いたノックダウン実験等を通じて検証した。

(2) リソソーム形成能の差異に関係する配列を特定するために、CIC-3a、CIC-3b、CIC-3c、CIC-3d を用いて N 末、C 末のアミノ酸配列を削る、デリーション分子を作成した。また CIC-3a と CIC-3d の間では C 末の配列を互いに入れ替えるキメラ分子も作成した。リソソーム形成能及び蛋白の細胞内局在については主として GFP または HA のタグを CIC 蛋白に付加し、リソソームマーカーとの共局在を観察することで調べた。

4. 研究成果

(1)本実験では我々が新規にクローニングした CIC-3d を電気生理学的に解析した。またこれまでに解析報告の多い CIC-3a と比較しながら実験を進めた。

CIC-3d を HEK293T 細胞に強制発現させ、パッチクランプにより解析を行ったところ、小さくはあるが、mock コントロールでは観察されない電流が記録された。電流は+40 mV 以上で惹起される急峻な外向き整流性を示した。E224A ミュータントを発現させた場合には、外向き電流は著しく小さくなり逆に内向き電流が増加した。次に CIC-3d 電流に対して数種の Cl⁻ チャンネルブロッカーの効果を調べたが、NPPB が約 20% の抑制を示した他は殆ど効果が観察されなかった。一方で、CIC ファミリーに属する CIC-2 電流に対して抑制的な効果を示すことが知られる Cd²⁺ が、CIC-3d 電流に対して最大約 40% の抑制効果を示すことを新規に見出した。比較対象とした CIC-3a に由来する電流も CIC-3d と殆ど同じ性質を示したが、電流の大きさは小さい傾向にあった (図 1)。

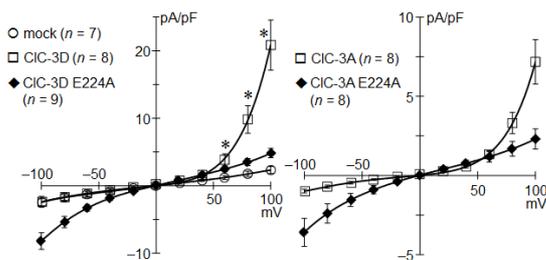


図 1

次に他の CIC-3 アイソフォームにおいてこれまでに報告されている種々の電気生理学的性質について、CIC-3d がどうであるかを検討した。本研究代表者が所属する研究室では、容積感受性外向整流性アニオンチャンネル (VSOR)、マキシアニオンチャンネル (Maxi-Cl)、酸感受性外向整流性アニオンチャンネル (ASOR) 等の分子実態が未確定なアニオンチャンネルの機能を長年解析してきた。CIC-3、特に CIC-3a は、様々な異論はあるにしても、以前から VSOR であるとして提唱され、また

近年は ASOR としての機能を持つと報告されている。CIC-3d は CIC-3a と唯一同じ N 末端アミノ酸配列を持つアイソフォームであるため、本研究では CIC-3d が VSOR や ASOR としての性質を示すか否かについて検討した。しかし CIC-3d の強制発現によって VSOR、ASOR の電流に何らかの影響が生じることはなかった (図 2)。またこれまでに検討されたことのなかった CIC-3 と Maxi-Cl の関係についても CIC-3 に対する siRNA を用いて調べたが、CIC-3 の発現と Maxi-Cl 電流の間には特に関連性は見られなかった。さらに CIC-3 は PKC の活性化によって抑制される、CaMK により活性化される等の報告もある。我々はこの点についても主に CIC-3d を用いて実験を行ってみたが、これらの性質は確認されなかった。また CIC-3d 電流は Ca²⁺ 枯渇条件下でも特に影響を受けなかった。

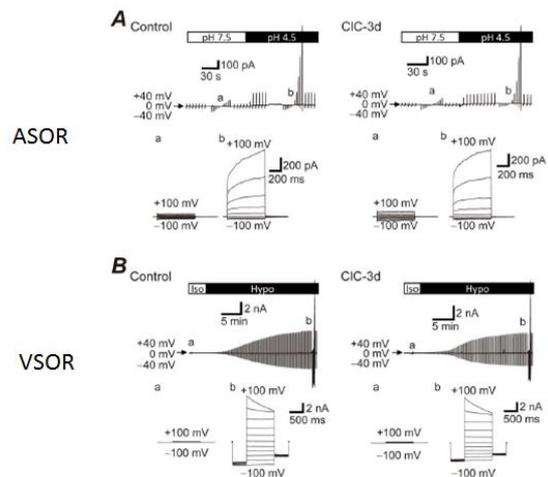


図 2

結論として、CIC-3d の強制発現は Cd²⁺ 感受性の外向き整流性アニオン電流を生じるが、VSOR、ASOR、Maxi-Cl のような未同定アニオンチャンネルの分子実体とは異なっていた。CIC-3 のイオンチャンネルとしての性質には未だ統一的な見解が無いと言ってよく、本研究で我々が調べた PKC や CaMK が電流に与える影響や各種ブロッカーの効果等についてもそれぞれ異なる結果が報告されている。本研究で我々の示した結果は基礎的ではあるが

詳細であり、CIC-3 チャンネルの機能を考える上で今後議論の基盤になり得ると考える。

(2)

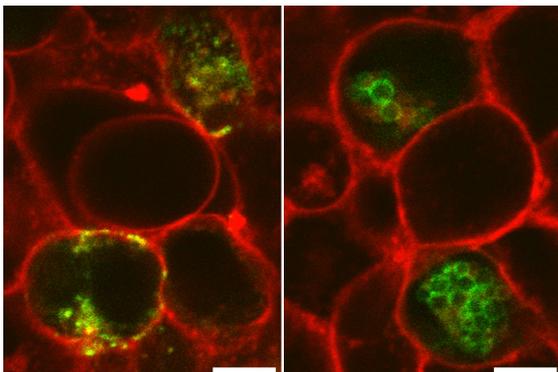


図3 CIC-3d-GFP fusion CIC-3a-GFP fusion

CIC-3a と他のアイソフォームにおけるリソソーム形成能の違いを生じるアミノ酸配列を探索するため、CIC-3b と CIC-3c に対して各 3 種類及び両分子に共通な 1 種類の N 末デリーション分子を作成した。また CIC-3a、CIC-3d については C 末デリーション分子を各 1 種類、C 末キメラ分子を計 7 種類作成した。CIC-3C に関してはデリーションの程度に応じてリソソームの形成能が現れることを観察した。しかし研究期間中に原因となるアミノ酸を特定するまでには至らなかった。CIC-3a と CIC-3d のキメラ分子については、全てを作成できたのが研究期間の終了間際であったこともあって、その効果は未だはっきりと確認できていない。CIC-3b に関しては予備実験の段階ではリソソーム形成能をほとんど示さなかったのに対し、実験期間中特に後期には高いリソソーム形成能を示すようになった。おそらくこれは細胞のコンディションによるのだと思われるが、うまく調節できなかった。他にもこの実験については各変異分子の作成に非常に時間がかかってしまった、リソソームマーカー等と CIC-3 蛋白が予想したほどには共局在せずリソソーム形成能についての判断に難しい点があった等、全体的に困難な点が多く、現段階では結果を纏めるに至っていない。

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) 査読有

Okada T, Akita T, Sato-Numata K, Islama MR, Okada Y: A newly cloned CIC-3 isoform, CIC-3d, as well as CIC-3a mediates Cd²⁺-sensitive outwardly rectifying anion currents. Cell Physiol Biochem 2014; 33:539-556

[学会発表] (計 1 件)

Toshiaki Okada Analysis of basic electrophysiological properties of a new isoform of CIC-3, CIC-3d. 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 03 月 27 日 ~ 2013 年 03 月 29 日 東京都 江戸川区 タワーホール 船堀

[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
無し

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 俊昭 (Okada, Toshiaki)
生理学研究所・細胞器官研究系・特任准教授
研究者番号 : 00373283

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :