

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657133

研究課題名(和文)小胞体Ca<sup>2+</sup>取り込みと連動するカウンターイオン輸送体研究課題名(英文)Counter ion movement during Ca<sup>2+</sup> release

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：70212024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：機能的な小胞体Ca<sup>2+</sup>ストアが成立するためには、内腔側の陰荷電を効率的にカウンターイオンにて中和する機構が必要であると仮想されている。研究代表者らが分子同定したTRICチャネルはK<sup>+</sup>チャネルとしてカウンターイオン動態に寄与することが示唆されているが、他のチャネルやトランスポーターの寄与も強く示唆される。その検索を目的とした本研究にて、*in silico*または単クローン抗体によるスクリーニングにて筋小胞体膜タンパク質Tmem52とミツグミン56が新規に見出された。両タンパク質の小胞体Ca<sup>2+</sup>ストア機能への関与が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although counterion movement coupled with Ca<sup>2+</sup> release/uptake is probably required for physiologically functioning of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, the molecular basis is totally unknown. We recently identified TRIC channels, that likely mediate counter-K<sup>+</sup> currents facilitating Ca<sup>2+</sup> release. However, TRIC-knockout mice strongly suggest the existence of other channels/transporters mediating counter currents. We attempted to find new candidates for such channels/transporters in this project, and identified Tmem52 and mitsugumin 56 from the muscle sarcoplasmic reticulum.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：小胞体Ca<sup>2+</sup> カウンターイオン TRICチャネル

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質と小胞体内腔のイオン組成については、米国 Somlyo グループなどにより 1980 年代前半までに生化学的手法や電子顕微鏡 X 線元素分析法を駆使した定量実験により詳細に検討された。静止状態の骨格筋細胞においては、小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は細胞質と比較して 10,000 倍程高いものの、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$  や  $\text{Cl}^-$  などの主要イオン組成は両コンパートメントで極めて類似している。従って、小胞体では顕著な膜電位は発生しないことが判明している。一方、骨格筋収縮の電気刺激による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出時においては、小胞体内腔の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度減少とともに、 $\text{K}^+$  濃度上昇が観察されている (Somlyo et al. J Cell Biol. 1981)。このような実験結果に基づき、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出と取り込み時にはカウンターイオン電流が 20 年以上前に想定された。すなわち、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出と取り込みに伴う膜電位は両現象を抑制することから、その抑制を回避するために小胞体膜を横断する  $\text{K}^+$  移動により膜荷電が中和されるという仮説である (図 1)。しかしながら、推定される  $\text{K}^+$  膜輸送担体が分子的に不明であったことから、この仮説については検証不可能なままに時間が経過した。

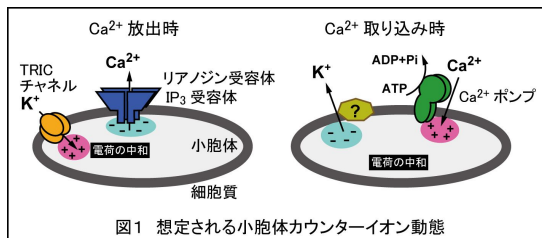


図1 想定される小胞体カウンターイオン動態

筋小胞体に着目する申請者のグループは、 $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネル (リノジン受容体) の分子同定と生理機能解析 (Takeshima et al. Nature 1989, Nature 1994, EMBO J. 1998 など) の後に、 $\text{Ca}^{2+}$  ストア機能に關与する新規な分子群の同定を目指しタンパク質検索法を開発して、単離された分子の生物学的機能の検討を開始した。この検索系で発見された TRIC チャンネルサブタイプ (TRIC-A と TRIC-B) は小胞体上で  $\text{K}^+$  透過性チャネルを形成し、その両サブタイプ欠損筋細胞ではリノジン受容体による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出が著しく障害されていることが示された (Yazawa et al. Nature 2007)。さらに、その後の遺伝子欠損マウスにおける検討から、TRIC チャンネルはリノジン受容体のみならず  $\text{IP}_3$  受容体による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出も支持することが肺胞上皮、骨格筋や血管平滑筋細胞などにおいて観察されている (Yamazaki et al. Development 2009, Cell Metab. 2011 など)。しかし、これらの小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構が著しく障害された TRIC チャンネル欠損細胞において、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み機構の障害が示唆されたことはない。この観察成果は、TRIC チャンネルは

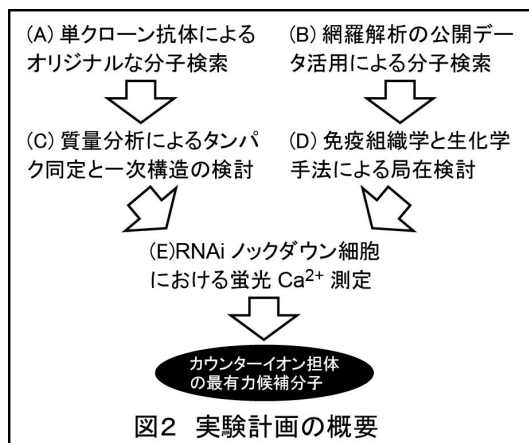
小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプと連動したカウンターイオン動態には貢献することはなく、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込み機構は TRIC チャンネル以外のイオン輸送担体が担当することを強く示唆する (図 1)。従って、TRIC チャンネルによる小胞体膜  $\text{K}^+$  透過性は、生理的な小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  放出を促進する機能を発揮することが強く示唆される。

### 2. 研究の目的

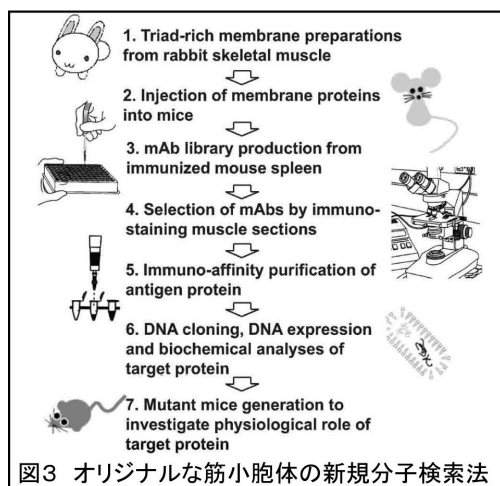
上述の成果は、TRIC チャンネルは小胞体  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプと連動したカウンターイオン動態には貢献することはなく、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込み機構は TRIC チャンネル以外のイオン輸送担体が担当することを強く示唆する。この仮説されるイオンチャネルまたはトランスポーターの同定は基礎生物学的には重要課題であり、その同定に向けた基礎研究の推進を本研究の目的とした。

研究代表者はこれまでに筋小胞体より分子同定したタンパク質群に関する研究は、当初の予想以上の波及効果を有するものも少なくない。例えば、骨格筋 triad junction に限局する抗原分子群から見出したジャンクトフィリンに関する研究は当初の予測を上回る波及効果を現在では示している。興奮性細胞には普遍的に結合膜構造 (小胞体膜と細胞膜が近接した微細構造で、イオンチャネル共役の場を提供する) が形成されるが、その基本構築は 4 種存在するジャンクトフィリンサブタイプ (JP1-4) の有する細胞膜への特異的結合能力と小胞体膜を貫通する分子構造に起因する。現在までに 4 種総てのノックアウトマウスの大まかな解析が終了しているが、その過程で中枢神経系に存在する JP3 と JP4 依存的な新規な  $\text{Ca}^{2+}$  伸性のチャネル機能共役の実体を見出している (Moriguchi et al. PNAS. 2006; Kakizawa et al. EMBO J. 2007)。また、ヒト家族性疾患における遺伝子解析により、JP2 変異に起因する日米両国の致死性の肥大型心筋症家系と、JP3 変異による米国ハンチントン舞踏病類似疾患 (HDL2) 家系が見出された (Holmes et al. Nature Genet. 2001; Seixas et al. Ann. Neurol. 2011)。現在では、東京女子医大にて心筋症家系について羊水採取による出生前 JP2 遺伝子診断も提供され始められた (Matsushita et al. J. Hum. Genet. 2007)。さらに、ジャンクトフィリンの有する細胞膜結合活性を利用して、タンパク性蛍光プローブにユニークな細胞内局在を付与する細胞工学応用も行なわれている (Yokoyama et al. 論文投稿中)。本研究の遂行により新たに同定される筋小胞体タンパク質においても、上述のジャンクトフィリンと同様の波及効果を有する研究進展により、基礎生物学や臨床医学への多大な貢献も十分に期待された。

### 3. 研究の方法



骨格筋小胞体には明確に微細形態的およびタンパク構成上のコンパートメントが形成されており、longitudinal 部に  $Ca^{2+}$  取り込み機能が、terminal 部に  $Ca^{2+}$  放出機能が集中している。カウンターイオン動態不良による  $Ca^{2+}$  取り込みの障害は、 $Ca^{2+}$  トランジェントの時間延長と振幅増強が想定される。筋小胞体  $Ca^{2+}$  取り込み時のカウンターイオン動態を担うチャネルまたはトランスポーターの分子同定を目指して、単クローン抗体と免疫組織染色を組み合わせた独自開発のスクリーニングと、他のグループより報告された遺伝子やタンパク質の網羅的解析データを活用した *in silico* スクリーニングを計画している (図 2)。



一方、研究代表者が 15 年ほど前に確立した筋小胞体タンパク質の検索法 (Takeshima et al. *Biochem J.* 1998) の概略を次ページ図 3 に示している。この単クローン抗体を用いた検索法を活用して、前述の TRIC チャネルのみならず、ミツグミン 29 (Nishi et al. *J Cell Biol.* 1999)、ジャンクトフィリン (Takeshima et al. *Mol Cell* 2000) やミツグミン 53 (Cai et al. *Nature Cell Biol.* 2009) などが現在までに発見されている。以前遂行したスクリーニングで機能不明な小胞体タンパク質が見出されたものの、未だに組織分布や機能解析などについて手付かずで放置されている分子がまだ実在している。免疫染色による longitudinal 部への局在、一次構造によるチャネルまたはトランスポーター

の可能性、ノックダウン培養筋細胞の  $Ca^{2+}$  トランジェント測定などによる検討により、最有力候補分子の絞り込みを計画した。

#### 4. 研究成果

単クローン抗体法による検索により、未解析な筋小胞体膜タンパク質としてミツグミン 56 が見出された。組織染色および膜分画法による局在検討の結果、リアノジン受容体と同様に  $Ca^{2+}$  放出部位である筋小胞体終末部に特異的に分布することが判明した。ミツグミン 56 は分子構造上膜貫通型脂肪酸転移酵素ファミリー (MBOAT ファミリー) に所属することが判明し、基質分子や酵素反応の実体は不明であるものの、筋小胞体内腔側にてタンパク質の脂肪酸修飾や脂質関連代謝に寄与するものと考えられる。従って、本研究の目的分子候補タンパク質としては不適合であると結論された。

一方、*in silico* 検索では膜タンパク質 Tmem52 が注目された。RT-PCR 法により組織分布を検討したところ、様々な組織で低発現しているものの、骨格筋のみで高発現していることが判明した。構造上は特徴として、Tmem52 には 1 本の膜貫通セグメントがあるが、特異的なモチーフは有していない。予備的な検討では、免疫化学実験にて筋小胞体の分布パターンが示唆されたが、培養 C2C12 細胞における siRNA ノックダウン実験では筋小胞体  $Ca^{2+}$  放出への寄与は確認できなかった。平行して遂行した遺伝子ノックアウトは順調に進展し、数か月以内に Tmem52 欠損マウスが得られるものと期待される。その小胞体  $Ca^{2+}$  ハンドリングへの関与が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 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.
- Zhou, X., Lin, P., Yamazaki, D., Park, K-H., Komazaki, S., Chen, R. S. W., Takeshima, H. & Ma, J. Trimeric intracellular cation channels and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium homeostasis. *Circ. Res.* 114, 706-716, 2014.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

竹島浩 リアノジン受容体を介するチャネル共役による神経機能 脳 21 vol. 16, 280-285, 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