

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15H04676
研究課題名(和文) TRICチャンネルとミツグミン56に関する研究

研究課題名(英文) Study on TRIC channel and MG56

研究代表者

竹島 浩 (Takeshima, Hiroshi)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：70212024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋小胞体はCa²⁺ストア機能に特化した細胞内小器官であり、その構成タンパク質として同定したTRICチャンネルとMG56の生理機能の解明を目指した本研究により、以下の代表的事例を含む成果が得られた。TRICチャンネルの遺伝子変異は先天性骨形成不全症の原因であることが近年報告され、本研究により骨芽細胞の小胞体Ca²⁺ストア機能不良に起因する骨基質生成の障害が発症メカニズムであることが判明した。一方、MG56欠損マウスは骨格筋小胞体の形態異常を伴い、授乳障害による致死性を示すことも判明した。

研究成果の概要(英文)：The muscle sarcoplasmic reticulum (SR) is a unique organelle specialized for Ca²⁺ handling, and we have identified TRIC channels and MG56 as SR component proteins. This research project has been designed to examine the physiological roles of the SR components, and yielded several novel results partly described below. We identified the pathological mechanism underlying TRIC-B-mutated osteogenesis imperfecta; the loss of TRIC-B impairs bone matrix synthesis due to compromised Ca²⁺ store functions in osteoblasts. On the other hand, MG56-knockout mice develop morphological abnormalities in the muscle SR and die during lactation stages due to suckling failure.

研究分野：生化学

キーワード：TRICチャンネル ミツグミン56

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者のグループは、神経・筋細胞における電気シグナル-Ca²⁺シグナルの変換反応のメカニズムや小胞体 Ca²⁺ハンドリングの関連機構の理解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 Ca²⁺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に関する様々な成果発表がある。

本研究代表者らは小胞体 Ca²⁺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 チャンネルを約 10 年前に発見している。二種の TRIC サブタイプ (TRIC-A と TRIC-B) 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、近年新たに分子同定した MG56 に注目して、その遺伝子欠損マウスの致死性から筋小胞体機能に不可欠な分子であることも特定している。これらの成果に基づき立案した「TRIC チャンネルとミツグミン 56 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 MG66 の生理機能解明を目的に遺伝子欠損マウスの解析実験を計画した。

2. 研究の目的

(1) TRIC チャンネルに関する研究

表 1 TRIC チャンネルサブタイプ

サブタイプ	遺伝子座	発現組織	遺伝子欠損マウス	ヒト疾患
TRIC-A	マウス 8B3.3 ヒト 19p13.1	神経・筋組織にて高発現	致死性なし 骨格筋 alternan 応答 高血圧、心肥大 (未発表)	高血圧リスク SNP (本邦集団)
TRIC-B	マウス 4B2 ヒト 9q31	組織普遍的に発現	新生致死 肺胞上皮機能不全 骨形成不良 (未発表) 肝糖代謝異常 (未発表)	骨形成不全症 (アラブ家系)

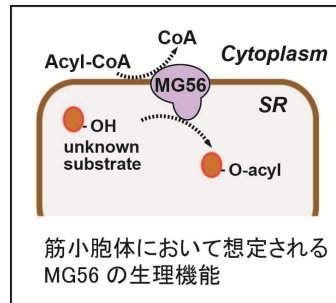
両サブタイプ同時欠損: 胎生致死
心不全

細胞内 K⁺透過性チャンネルとしての機能が想定される TRIC チャンネルでは、細胞内ストアの Ca²⁺放出を促進する細胞レベルでの機能が以前の研究成果から推定されている。今後の重要課題としては、器官や個体レベルにおける生理機能、様々な疾患病態との機能関連の詳細解明が望まれる。表 1 は本研究の開始当時に論文発表された成果を簡潔に取りまとめたものである。赤字表記された TRIC 欠損マウスが示す臓器機能異常に着目して、異常発生メカニズムの解明により TRIC サブタイプの生理機能の究明とともに、疾患治療戦略の確立に向けた基礎的貢献を本研究では目指した。

これまでに分子同定されたイオンチャンネルとの相同性のない TRIC チャンネルでは、陽イオン透過性や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も望まれる。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て、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研究も並列して計画した。

(2) ミツグミン 56 (MG56) に関する研究



膜貫通型脂肪酸転移酵素である MBOAT ファミリー分子は、特異的基質である lyso リン脂質や分泌性ペプチドをアシル化する機能が特定されている。筋細胞小胞体において想定される MG56 の機能を上図で示している。MG56 欠損マウスは生後の発育過程で致死となるため、その詳細解析を試みた。また、MG56 に想定されるアシル化機能の重要性は自明であるが、その基質分子と生成分子が不明である。脂質分子や小胞体内腔タンパク質が基質分子候補に成り得るが、チャレンジングなその基質同定を目指した研究が計画された。

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、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 (イギリス・オックスフォード大グループとの共同研究)、高時空間分解能蛍光イメージングによる細胞内 Ca²⁺とタンパク質挙動の検討 (アメリカ・オハイオ州大グループとの共同研究)、さらには解剖組織学 (宮崎医大グループとの共同研究)、細胞生物学 (学内グループとの共同研究)、細胞生理学的実験 (阪大グループとの共同研究) などを総動員した変異マウスの解析が遂行された。また、遺伝子解析実験と組織化学実験の一部については、アウトソーシング業務委託に依った。

4. 研究成果

(1) TRIC チャンネルに関する研究

TRIC-B 遺伝子において点変異や欠失変異を伴う骨形成不全症における骨ミネラル化障害のメカニズムを明らかにするため、Tric-b 欠損マウスの骨組織に注目した様々な解析を遂行した。詳細なデータの記述は割愛するが、TRIC-B 欠損骨では破骨細胞は正常に機能すると考察されたが、骨芽細胞は重篤な機能障害が観察された。すなわち、TRIC-B 欠損骨芽細胞では小胞体ストアにて過剰 Ca²⁺貯留が観察され、その異常により小胞体内腔におけるコラーゲン合成のプロセッシングが障害され、プロコラーゲンが小胞中に過剰蓄積される結果、骨基質コラーゲン量が低下することを明らかにした (文献 9)。

骨格筋では両サブタイプが共発現しているが、TRIC-A が圧倒的に高発現している。TRIC-A 欠損マウス骨格筋ではリアノジン受容体による Ca^{2+} 放出が抑制されることが以前観察されたことに基づき、その単一チャンネル電気生理学測定実験を遂行した。この変異マウスより調製した小胞体より再構成されるリアノジン受容体は、通常溶液中での開口確率が顕著に低下していることが判明した。リアノジン受容体は Ca^{2+} により活性化、 Mg^{2+} による不活性化の活性調節が知られているが、TRIC-A 欠損による開口確率の低下は Ca^{2+} による活性化効果の抑制ではなく、 Mg^{2+} による阻害効果の亢進に起因するものと考察されるデータが得られた。一方、リアノジン受容体は cAMP 依存性キナーゼのリン酸化により活性化するが、野生型と TRIC-A 欠損マウスより調製された小胞体でのリアノジン受容体のリン酸化に変動は確認されなかった。さらに、チャンネル計測中の cAMP 依存性キナーゼのリン酸化処理は、TRIC-A 欠損による Mg^{2+} の阻害亢進を解除する作用を示さなかった。これら電気生理学的解析にて判明した TRIC-A 欠損によるリアノジン受容体の不活性化は、TRIC チャンネル分子による K^{+} 透過性の減弱では説明不可能である。従って、TRIC-A の直接または介在分子を介した間接的な相互作用によるリアノジン受容体を活性化する新規な機構の存在が示唆された (文献 12)。

(2) ミツグミン 56 (MG56) に関する研究

MG56 欠損マウスは離乳期に授乳障害と発達遅延を伴い、死亡する。MG56 の発現組織である骨格筋と心筋の形態観察では骨格筋特異的に授乳障害と平行して小胞体の膨潤化の増悪が認められ、生化学解析では骨格筋にて小胞体ストレス応答の亢進が検出された。また、骨格筋収縮測定では小胞体の膨潤化とともに、収縮能の発達が停止することも明らかになった。得られた結果からは、MG56 欠損により肢体骨格筋にて小胞体ストレスが生じ、筋発達の停止に伴い授乳障害が発生するため、変異マウスは衰弱死することが示唆された (論文 1)。

推定される MG56 酵素機能に立脚すると、その基質への脂肪酸転移の障害が小胞体ストレスを引き起こすことが示唆される。MG56 が局在する筋小胞体終末部に分布して、遺伝子欠損により致死性となるタンパク質としては、リアノジン受容体 (新生致死) とカルセクエストリン (ストレス誘導性致死) が知られている。培養細胞への共発現系での検討では、MG56 による両タンパク質への脂肪酸付加は観察されなかった。従って、MG56 基質の分子同定については今後の重要課題として依然として残されている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Van, B., Nishi, M., Komazaki, S., Ichimura, A., Kakizawa, S., Nakanaga, K., Aoki, J., Park, K., Ma, J., Ueyama, T., Ogata, T., Maruyama, N. & Takeshima, H. Mitsugumin 56 (hedgehog acyltransferase-like) is a sarcoplasmic reticulum-resident protein essential for postnatal muscle maturation. *FEBS Lett.* 589, 1095-1104, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.03.028.
2. Nakao, A., Miki, T., Shoji, H., Nishi, M., Takeshima, H., Miyakawa, T. & Mori, Y. Comprehensive behavioral analysis of voltage-gated calcium channel beta-anchoring and regulatory protein knockout mice. *Front. Behav. Neurosci.* 9, 141, 2015. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00141.
3. Matyjaszkiewicz, A., Venturi, E., O'Brien, F., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Tsaneva-Atanasova, K. & Sitsapesan, R. Subconductance gating and voltage sensitivity of sarcoplasmic reticulum KD channels. *Biophys. J.* 109, 265-276, 2015. doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.020.
4. Fujii, T., Takahashi, Y., Takeshima, H., Saitoh, C., Shimizu, T., Takeguchi, N. & Sakai, H. Inhibition of gastric H^{+},K^{+} -ATPase by 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB), an inhibitor of volume-regulated anion channel. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 34-41, 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.011.
5. Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takeshima, H., Suzuki, J. & Nagata, S. A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. *Mol. Cell. Biol.* 36, 645-659, 2015. doi: 10.1128/MCB.00919-15.
6. Nagre, N., Wang, S., Kellett, T., Kanagasabai, R., Deng, J., Nishi, M., Shilo, K., Oeckler, R., Yalowich, J., Takeshima, H., Christman, J., Hubmayr, R. & Zhao, Z. TRIM72 modulates caveolar endocytosis in repair of lung cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 310, L452-464. doi: 10.1152/ajplung.00089.2015.
7. Wool, J.-S., Srikanth, S., Nishi, M., Ping, P., Takeshima, H. & Gwack, Y. Junctophilin-4, a component of the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions regulates Ca^{2+} dynamics in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113, 2762-2777, 2016. doi: 10.1073/pnas.1524229113.
8. Fujii, T., Watanabe, M., Shimizu, T., Takeshima, H., Kushiro, K., Takai, M. & Sakai, H. Positive regulation of the enzymatic activity of gastric H^{+},K^{+} -ATPase by sialylation of its β -subunit. *Biochim Biophys Acta.* 1858, 1228-1235, 2016. doi: 10.1016/j.bbame.2016.02.029.
9. Zhao, C., Ichimura, A., Qian, N., Iida, T., Yamazaki, D., Noma, N., Asagiri, M., Yamamoto, K., Komazaki, S., Sato, C., Aoyama, F., Sawaguchi, A., Kakizawa, S., Nishi, M. &

Takeshima, H. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci. Signal.* 9, ra49, 2016. doi: 10.1126/scisignal.aad9055.

10. Pignoni, M., Johanna Wanngren, J., Kuhn, J-H., Munro, K. M., Jenny M. Gunnarsen, J. M., Takeshima, H., Feederle, R., Voytyuk, I., Strooper, B. D., Lévassieur, M. D., Hrupka, B. J., Stephan, A., Müller, S. A. & Lichtenthaler, S. F. Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are physiological substrates of BACE1 in neurons. *Mol. Neurodegener.* 11, 67, 2016. doi: 10.1186/s13024-016-0134-z

11. Matsuki, K., Takemoto, M., Suzuki, Y., Hisao Yamamura, H., Ohya, S., Takeshima, H. & Imaizumi, Y. Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy. *Pflugers Arch.* 469, 313-326, 2017. doi: 10.1007/s00424-016-1900-z.

12. El-Ajouz, S., Venturi, E., Witschas, K., Beech, M., Wilson, A. D., Lindsay, C., Eberhardt, D., O'Brien, F., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H. & Sitsapesan, R. Dampened activity of ryanodine receptor channels in mutant skeletal muscle lacking TRIC-A. *J. Physiol.* 595, 4769-4784, 2017. doi: 10.1113/JP273550.

13. Takei, D., Nishi, M., Fukada, S., Doi, M., Okamura, H., Uezumi, A., Yoshida, M., Miyazato, M., Ichimura, A. & Takeshima, H. Gm7325 is MyoD-dependently expressed in activated muscle satellite cells. *Biomed. Res.* 38, 215-219, 2017. doi: 10.2220/biomedres.38.215..

14. Reilly-O'Donnell, B., Robertson, G. B., Karumbi, A., McIntyre, C., Bal, W., Nishi, M., Takeshima, H., Stewart, A. J. & Pitt, S. J. Dysregulated Zn²⁺ homeostasis impairs cardiac type-2 ryanodine receptor and mitsugumin 23 functions, leading to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leakage. *J. Biol. Chem.* 292, 13361-13373, 2017. doi: 10.1074/jbc.M117.781708.

15. Zhong, X., Vallmitjana, A., Sun, B., Xiao, Z., Guo, W., Wei, J., Ni, M., Yongxiang Chen, Y., O'Brien, E. R., Gillis, A. M., Hoshijima, M., Takeshima, H., Hove-Madsen, L., Benitez, R., Belke, D. & Wayne Chen, S. R. Reduced expression of cardiac ryanodine receptor protects against stress-induced ventricular tachyarrhythmia, but increases the susceptibility to cardiac alternans. *Biochem. J.* 475, 169-183, 2018. doi: 10.1042/BCJ20170631.

〔学会発表〕(計1件)

1. Sitsapesan, R. and Takeshima, H. "Intracellular TRIC channels: electrophysiological and pathophysiological characterization. Gordon Research Conference; Organellar channels & transporters (July 2, 2017 in Mount Snow, Vermont, USA.)

〔図書〕(計1件)

1. 竹島浩 ミツグミン53の生理機能と医療応用への可能性 *医学のあゆみ* vol. 258, 800-801, 2016.

〔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 (Hiroshi Takeshima)

京都大学大学院薬学研究科・教授

研究者番号：70212024