

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2021～2023
課題番号：21H02663
研究課題名(和文) TRICおよびMG23チャンネルと小胞体Ca²⁺ハンドリング

研究課題名(英文) TRIC and MG23 channels in store Ca²⁺ handling

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成不全症モデルのTric-b欠損マウス由来の成長板軟骨細胞では、小胞体ストレスセンサーPERKの活性化を伴うアポトーシス様の細胞死が発生することを見出した。一方、MG23欠損骨格筋のスキンドファイバー試料の解析では、Ca²⁺漏出の低下によると推定される小胞体Ca²⁺貯留が観察された。観察された結果は、小胞体陽イオンチャンネルとして機能するTRICおよびMG23は、細胞内ストアのCa²⁺ハンドリング機能に寄与することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体Ca²⁺ストアは細胞機能に不可欠であり、様々な細胞応答を制御する。一方で、Ca²⁺ストアのイオンバランスの分子機序は未開拓な学術分野であり、その疾患病態との関連も不明である。当研究遂行による成果は、TRICおよびMG23チャンネルのイオン透過性はCa²⁺ストア機能維持に不可欠であることを示し、TRIC-B欠損による骨形成不全症の発症メカニズムの解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Tric-b-knockout mice provide an animal model of osteogenesis imperfecta. We found atypical cell death in Tric-b-knockout growth plate chondrocytes, that is caused by hyperactivation of the ER stress sensor PERK. In the muscle skinned fiber preparations from Mg23-knockout mice, we detected altered store Ca²⁺ handling, that is likely caused by insufficient Ca²⁺ leakage. Our observations indicate that TRIC and MG23 channels function as cation channels in sarco/endoplasmic reticulum and physiologically contribute to store Ca²⁺ handling.

研究分野：細胞生理学

キーワード：Ca²⁺ストア 小胞体 イオンチャンネル

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が分子同定した TRIC および MG23 チャンネルは小胞体の陽イオンチャンネルとして機能する。脂質二重膜再構成系におけるチャンネル特性やロックアウトマウス由来細胞の Ca²⁺ハンドリング異常から、TRIC チャンネルは小胞体 Ca²⁺放出と連動するカウンターK⁺チャンネルとして機能することが判明している。TRIC チャンネル変異は先天的な骨形成不全症を引き起こすことも明らかにされたが、その疾患メカニズムを含めた病態との関連は不明な点が多く残されていた。また、TRIC サブタイプの小胞体 Ca²⁺放出チャンネルタイプ (イノシトール3リン酸受容体とリアノジン受容体) への配向性や TRIC 欠損により観察される肝臓でのグリコーゲン貯留などのメカニズムも注目された。一方、MG23 チャンネルは脂質二重膜再構成実験系で Ca²⁺透過性を示すことが確認されたが、その生理的役割は不明である。MG23 欠損マウスから得られた予備的実験結果からは、MG23 はストレス条件下で小胞体 Ca²⁺漏出に寄与すると作業仮説が得られていた。

2. 研究の目的

TRIC チャンネル研究では、骨形成不全症モデルマウスである Tric-b 欠損マウスの骨組織を標的とした解析を中心課題として、成長板軟骨細胞における TRIC 欠損による疾患病態の詳細解明を目的とした。一方、MG23 チャンネル研究では、Mg23 欠損マウスの骨格筋とマクロファージを解析標的に設定し、興奮性細胞と非興奮性細胞の小胞体 Ca²⁺ハンドリングへの MG23 チャンネルの寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

TRIC および MG23 チャンネルの機能解明を目指す本研究では、主にロックアウトマウスの骨や筋組織から調製された細胞において細胞生理学的イメージング解析、組織学的免疫染色解析、生化学的遺伝子・タンパク質発現解析などを遂行した。

4. 研究成果

本研究期間中に得られた TRIC および MG23 チャンネルに関する研究成果は、複数の論文にとりまとめて発表した。以下にそれぞれの代表的な成果を中心に記述するとともに、現在継続中のプロジェクトについても簡便に説明している。

(1) TRIC チャンネルに関する研究

TRIC-B 遺伝子変異はヒト骨形成不全症の原因であり、Tric-b 欠損マウスでは骨芽細胞のコラーゲン産生障害により骨密度が低下することを既に報告している。一方、他の遺伝子変異による症例と異なり、TRIC-B 変異の骨形成不全症患者では成長障害が報告されていたが、その病態メカニズムは不明であった。骨格の成長は成長骨の両端に形成される成長板軟骨部の伸長に大きく依存する。したがって、Tric-b 欠損マウスでは成長板伸長の障害、成長板軟骨細胞における機能不全などが推定された。Tric-b 欠損マウス胎児の大腿骨等の成長板では異常な軟骨細胞死が観察された。電子顕微鏡観察では核凝縮を伴うアポトーシス様の細胞死像が認められ、免疫化学解析では小胞体ストレスセンサー PERK の活性化が細胞死に寄与することが想定された。多面的な生化学分析により、TRIC-B の欠損により小胞体 Ca²⁺ストアの Ca²⁺放出が阻害されることに起因して、PERK 活性化により細胞内 Ca²⁺濃度が上昇することで、Ca²⁺依存性タンパク質分解酵素カルパインの活性化し、アポトーシス関連タンパク質分解酵素カスパーゼ 12 が部分分解により活性化して、Tric-b 欠損成長板では軟骨細胞死が誘導されることが推定された (発表論文: Ichimura et al. 2024)。

新生致死を示す Tric-b 欠損マウスの肝臓では、過剰なグリコーゲンが貯留していることが以前観察されている。本研究期間には肝臓特異的 Tric-b 欠損マウスを作製して、その解析にも着手した。新規作製された変異マウスにおいても肝細胞におけるグリコーゲン貯留が確認され、グリコーゲン合成の亢進またはグリコーゲン分解の抑制が想定される。一方、予想通り Tric-b 欠損肝細胞では小胞体 Ca²⁺貯留も Ca²⁺イメージングにて観察されており、Ca²⁺ハンドリング異常に起因する糖代謝異常のメカニズムの解明を目指した生化学解析を継続している。

(2) MG23 チャンネルに関する研究

MG23 の生理機能の解明に向けて、MG23 欠損マウスの骨格筋を主な解析標的として細胞生理学、生化学、組織学的実験を遂行した。MG23 欠損骨格筋において、小胞体 Ca²⁺取り込み効率の低下、Zn²⁺誘導による小胞体 Ca²⁺漏出の低下、反復電気刺激による筋疲労からの回復改善などの野生型筋とは異なる特性が観察された。これらの機能変化は MG23 による小胞体 Ca²⁺漏出機能の欠損によるものと推察された (発表論文: Watanabe et al. 2024)。

上述の研究成果に基づいて、ストレス条件下で発生する活性酸素種(ROS)が MG23 の多量体化による Ca²⁺漏出チャネル形成を促進し、小胞体 Ca²⁺含量を低下させるという作業仮説が導かれた。骨格筋への物理的ストレス負荷では、強度の収縮疲労、ROS の大量産生、筋損傷が計時的に観察される。得られた作業仮説の検証を目的に、MG23 欠損骨格筋に物理的ストレスを負荷した試料について、細胞生理学解析を現在継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujii, T., Katoh, M., Ootsubo, M., Nguyen, O. T. T., Iguchi, M., Shimizu, T., Tabuchi, Y., Shimizu, Y., Takeshima, H. & Sakai, H.	4. 巻 237
2. 論文標題 Cardiac glycosides stimulate endocytosis of GLUT1 via intracellular Na ⁺ , K ⁺ -ATPase 3-isoform in human cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 2980-2991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30762	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Liu, F., Xu, L., Nishi, M., Ichimura, A. & Takeshima, H.	4. 巻 96
2. 論文標題 Enhanced Ca ²⁺ handling in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceca.2021.102381.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki, Y., Ichimura, A., Kitayama, R., Okamoto, N., Yasue, T., Liu, F., Kawabe, T., Nagatomo, H., Ueda, Y., Yamauchi, I., Hakata, T., Nakao, K., Kakizawa, S., Nishi, M., Mori, Y., Akiyama, H., Nakao, K. & Takeshima, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca ²⁺ entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.71931.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe, D., Nishi, M., Liu, F., Bian, Y. & Takeshima, H.	4. 巻 326
2. 論文標題 Ca ²⁺ storage function is altered in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle lacking mitsugumin 23.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 C795-809:
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00440.2023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimura, A., Miyazaki, Y., Nagatomo, H., Kawabe, T., Nakajima, N., Kim, G-E., Tomizawa, M., Okamoto, N., Komazaki, S., Kakizawa, S., Nishi, M., & Takeshima,	4. 巻 14
2. 論文標題 Atypical cell death and insufficient matrix organization in long-bone growth plates from Tric-b-knockout mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death Dis.	6. 最初と最後の頁 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-023-06285-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野webページ
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/index.html>
 研究代表者の研究室ホームページ
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------