

令和元年6月18日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04698

研究課題名(和文)コンディショナルTRIC-B欠損マウスの作製と機能解析

研究課題名(英文)Conditional TRIC-B knockout mice production and functional analysis

研究代表者

山崎 大樹 (Yamazaki, Daiju)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長

研究者番号：40467428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺胞形成不全により呼吸困難で出生直後に死亡してしまうコンベンショナルTRIC-B欠損マウスに代わり、各種細胞特異的(コンディショナル)TRIC-B欠損マウスを作製し、TRIC-Bの機能的役割の解明を目指した。特に心臓でのTRIC-Bの機能解明を目指して心臓特異的TRIC-B欠損マウスの作製を行った。また、マウスTric-b欠損ES細胞を作製してニューロスフェア法による中枢神経系細胞系譜への分化誘導を行った。タモキシフェン処置による心臓特異的TRIC-Bの発現低下が観察された。また、TRIC-B欠損が中枢神経系細胞系譜への分化過程に寄与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、心臓特異的TRIC-B欠損マウスを作製し、機能解析を目指した。残念ながら機能解析は行えなかったが、今後、心臓におけるTRIC-Bの機能が明らかになると期待される。また、中枢神経系を始めとした他の組織・細胞においてもTRIC-Bは多くの生理的役割を担っていることが推測されることから、TRIC-Bの生物学的意義の解明にとどまらず、TRIC-Bが原因となる疾患の発症機序解明や治療薬開発など臨床的な応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：To investigate the TRIC-B function in various cells and tissues, we generated conditional TRIC-B deficient mice instead of conventional TRIC-B knockout mice which died immediately after birth due to impairment of pulmonary alveolous. First, we generated heart-specific TRIC-B deficient mice. Second, we generated mTRIC-B deficient ES cells and differentiated to the central nervous system cell lineage using with the neurosphere method. In heart-specific TRIC-B deficient mice, treatment of tamoxifen decreased gene expression of Tric-b in the heart. In addition, it was suggested that lack of TRIC-B may contribute to the differentiation process to the central nervous system cell lineage.

研究分野：薬理学、生理学

キーワード：TRICチャンネル 小胞体 カウンターイオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇は小胞体からの Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入により構成され、筋収縮、神経伝達物質の放出、膜電位調節など様々な細胞機能を制御する。細胞内小器官の1つである小胞体はタンパク質及び脂質合成・修飾の場であるとともに、主要な Ca^{2+} ストアとして機能している。小胞体 Ca^{2+} 放出を担う分子には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇により活性化するリアノジン受容体 (RyR) と、リン脂質代謝の亢進で生成されるイノシトール三リン酸 (IP_3) により活性化する IP_3R (受容体) が知られている。微小閉鎖空間である小胞体から RyR や IP_3R を介して Ca^{2+} が放出されると、小胞体内腔に負電荷が発生し、その後の Ca^{2+} 放出が阻害されることが推測される。効率的な Ca^{2+} 放出が持続するための機構として、発生した負電荷を中和するためのカウンターイオンを透過するカウンターイオンチャンネルが必要であると推測されてきた。しかしながら、カウンターイオンチャンネルの実体については最近まで不明であった。

京都大学の竹島浩教授のグループは、小胞体及び核膜に局在する新規分子として TRIC (trimeric intracellular cation) チャンネルを2007年に同定した (Yazawa et al., Nature, 2007)。動物組織には TRIC-A (TMEM38A) 及び-B (TMEM38B) の2種類のサブタイプが独自パターンで分布しており、多くの細胞系で両者の共発現が観察される。TRIC チャンネルは分子量約33kDaでホモ三量体を形成する。また、電気生理学的解析から細胞内膜系において主に K^+ 透過性チャンネルとして機能することが示された。竹島浩教授のグループはこれまでに遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を精力的に行い、胎生致死を示す両サブタイプ完全欠損 (TRIC-DKO) マウス心筋細胞において RyR からの Ca^{2+} 放出が減弱することで心筋小胞体において Ca^{2+} オーバーロードが生じること (Yazawa et al., Nature, 2007)、TRIC-B 欠損マウス II 型肺胞上皮細胞での IP_3R からの Ca^{2+} 放出が減弱することで、最終的にサーファクタントの合成・分泌が障害され呼吸不全により新生致死を示すこと (Yamazaki et al., Development, 2009)、さらには TRIC-A 欠損マウス骨格筋において RyR を介した Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} スパーク頻度) が減少することで異常な筋収縮が観察されること (Zhao et al., J. Biol. Chem., 2010) などを明らかにした。以上より、TRIC チャンネルは小胞体からの Ca^{2+} 放出と連動して機能するカウンターイオンチャンネルであることが強く示唆されている (図1)。

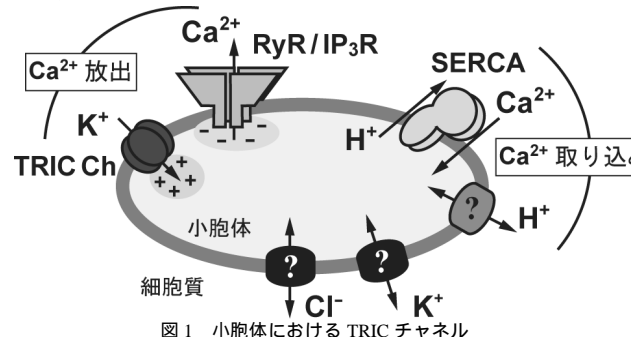


図1 小胞体における TRIC チャンネル

申請者はこれまで、TRIC チャンネルサブタイプ欠損マウスを用いて TRIC チャンネルの詳細な機能解析を行ってきた。TRIC-B は全身に普遍的に発現しており、その欠損マウスが致死性を有するのに対し、脳や心臓、骨格筋に豊富に発現している TRIC-A を欠損したマウスが致死性を示さないことから推測できるように、各組織・細胞において TRIC-A に比べて TRIC-B の方がより重要な役割を担っている可能性が高いことが考えられる。また TRIC-A 欠損マウスを用いた機能解析は骨格筋 (Zhao et al., J. Biol. Chem., 2010)、平滑筋 (Yamazaki et al., Cell Metab., 2011) 及び心筋 (Zhou et al., Circ. Res., 2014) など進展しているのに対して、TRIC-B 欠損マウスの解析は、上述したように II 型肺胞上皮細胞における IP_3R からの Ca^{2+} 放出障害によりサーファクタントの合成・分泌が抑制され肺胞形成不全の結果、呼吸困難で出生直後に死亡してしまう (Yamazaki et al., Development, 2009) ため、成獣での解析が困難な状況である。これを解決するためには、各種細胞特異的なコンディショナル TRIC-B 欠損マウスの作製が不可避である。

2. 研究の目的

申請者のグループにて見出された小胞体 TRIC チャンネルサブタイプ (A 及び B) は、RyR や IP_3R からの Ca^{2+} 放出と連動して機能するカウンターイオンチャンネルである。興奮性組織に豊富に発現する TRIC-A とは異なり組織普遍的に発現している TRIC-B は小胞体 Ca^{2+} 放出を多種多様な細胞において支え、様々な生命現象の基礎を成していることが推測される。本研究では、肺胞形成不全により呼吸困難で出生直後に死亡してしまうコンベンショナル TRIC-B 欠損マウスに代わり、各種細胞特異的 (コンディショナル) TRIC-B 欠損マウスを作製し、心臓機能における TRIC-B の機能的役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) コンディショナル Tmem38b 欠損マウスの作製

EuMMCR (European Mouse Mutant Cell Repository) より Tmem38b 遺伝子のコンディショナルポテンシャルを有する (図2上から2段目) ES細胞を購入し、実験動物中央研究所にて受精卵へのインジェクションおよび胚移植を行い、キメラマウスを得た。その後、ターゲッティングベクター上の FRT 配列に挟まれた LacZ および Neo 遺伝子を除去する目的でフリッパーゼ (Flp) のインジェクションを行い、flox マウスを得た (図2上から3段目)。各種遺伝子型は図2に

ある矢印の部分にて作成した。また PCR 産物の長さは図 2 の A~C の通りである。

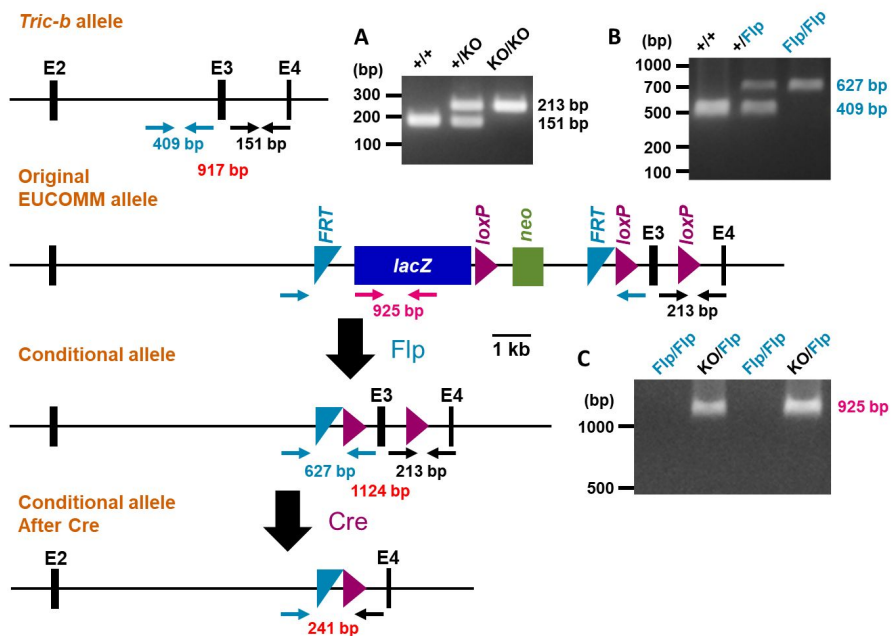


図 2 コンディショナル Tric-b 欠損マウスの作製方法

(2) 心臓特異的 Tmem38b 欠損マウスの作製

ジャクソンラボよりタモキシフェンの投与により心臓特異的に Cre を発現させることのできる雄マウス (Myh-Cre/+) を購入した。雄マウスより精子を採取し、Tmem38b flox/+マウスの雌マウスより採取した卵と人工授精し、胚移植を行った。出生したマウスの遺伝子型をゲノム DNA の PCR によって調べ、Tmem38b flox/+Myh Cre/+の個体を得た。その後、Tmem38b flox/+Myh Cre/+と Tmem38b flox/+のマウスを交配させて、Tmem38b flox/flox-Myh Cre/+のマウスを得た (図 3、1,2,5 の個体)。

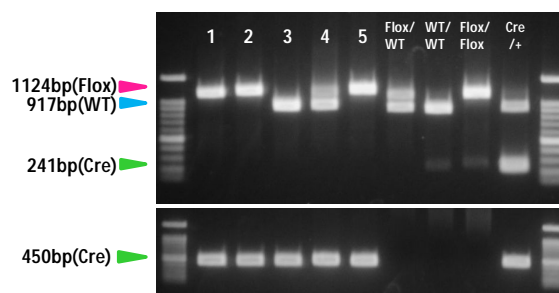


図 3 Tmem38b flox/flox-Myh6 Cre+/-マウスの遺伝子型判定

(3) Tmem38b 欠損 ES 細胞の作製

Tmem38b 欠損 ES 細胞株の作製にあたり、まず CRISPR/Cas9 システムを用いるための guide RNA (gRNA) の候補配列を決定した。決定したデザインに基づき、gRNA-Cas9 発現ベクターを構築し、HEK293T 細胞内でのターゲット配列切断活性評価を行った。次いで、ターゲット配列切断活性評価を行った gRNA-Cas9 発現ベクターをエレクトロポレーション法により ES 細胞 (C57BL/6N 由来 RENKA 株) に導入し、24 時間後から puromycin による薬剤選択培養 (2 日間) を行った後、ES 細胞コロニーを Tmem38b 欠損 ES 細胞コロニーとして単離しダイレクトシーケンシングにより目的とする遺伝子変異が導入されているか検出した。遺伝子変異検出の結果、目的の遺伝子配列が導入されているクローンを拡大培養した。

(4) ES 細胞の中枢神経系細胞系譜への分化誘導

マイトマイシン C を処理した STO 細胞をフィーダー細胞として使用し、フィーダー上に ES 細胞を播種し、LIF を添加した。セミコンフルエントになったら ES 細胞をトリプシンで剥離し、低接着シャーレに継代した。レチノイン酸 (0.01 μM) を添加して 4 日間培養することで、EB (Embryoid body) が形成される。一度 EB を分散し、FGF-2 および 2% B27 存在下で 1 週間浮遊培養した。1 週間後、形成されたニューロスフェアをマトリゲルコートしたディッシュに播種して、接着培養を行い播種翌日に FGF-2 除去培地に交換することで、中枢神経系細胞系譜への分化誘導を行った。

4. 研究成果

(1) コンディショナル Tmem38b 欠損マウスの作製

研究方法に記載したとおり、心臓特異的 Tmem38b 欠損マウスの作製を完了した。タモキシフェンにより Cre が誘導するシステムのため、タモキシフェン (50 mg/kg/日、3 日間、合計 150

mg/kg) を腹腔内投与し、投与 2 週間および 4 週間後に心臓特異的に TRIC-B の発現が低下したか確認を行った。発現量が変化しないネガティブコントロールとしては TRIC-B 発現量の多い、骨格筋を用いた。しかしながら、TRIC-B の発現低下は観察されなかった。タモキシフェンの効果が十分でないと考え、投与量を変更 (2 mg/マウス/日、5 日間、合計 10 mg/マウス) して実施した。その結果、タモキシフェン処置 5 日後の心臓において遺伝子レベルが 1/10 程度に減少していることを確認した。

(2) Tmem38b 欠損 ES 細胞を用いた中枢神経系細胞系譜への分化過程における TRIC-B の役割の解明

ニューロスフェアまでの分化過程において Tmem38b 欠損の影響がないかを検討するため、野生型および Tmem38b 欠損 ES 細胞を Neural stem cell へ分化した。その結果、Tmem38b 欠損 ES 細胞においてニューロスフェア形成障害が示唆された。特にサイズの大きなニューロスフェアの形成が障害されていることが明らかとなった。次いで、ニューロスフェアの継代を重ねていくことで、次第にグリア細胞へ分化する割合が多くなるニューロスフェア法により、それぞれマウス発生初期神経幹細胞、発生後期神経幹細胞、出生後神経幹細胞としての特徴を有している一次、二次、三次ニューロスフェアを作製した。それらを、神経幹細胞マーカーである Nestin、アウトロサイトマーカーである GFAP、神経細胞マーカーである tubulin、オリゴデンドロサイトマーカーである O4 で免疫染色し、野生型と Tmem38b 欠損 ES 細胞における各マーカー陽性細胞の割合を算出した。その結果、Tmem38b 欠損 ES 細胞では、神経幹細胞の割合が高く、神経細胞、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの割合が低いことが明らかとなった。このことは、Tmem38b の欠損により未分化状態が維持される、あるいは分化過程に異常をきたしている可能性を示唆している。

< 引用文献 >

- Yazawa M, Ferrante C, Feng J, Mio K, Ogura T, Zhang M, Lin PH, Pan Z, Komazaki S, Kato K, Nishi M, Zhao X, Weisleder N, Sato C, Ma J, Takeshima H. TRIC channels are essential for Ca²⁺ handling in intracellular stores. *Nature*. 2007 Jul 5;448(7149):78-82.
- Yamazaki D, Komazaki S, Nakanishi H, Mishima A, Nishi M, Yazawa M, Yamazaki T, Taguchi R, Takeshima H. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development*, 136, 2355-2361, 2009.
- Zhao X, Yamazaki D, Park K-H, Komazaki S, Tjondrokoesoemo A, Nishi M, Lin P, Hirata Y, Brotto M, Takeshima H, Ma, J. Ca²⁺ overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 37370-37376, 2010.
- Yamazaki D, Tabara Y, Kita S, Hanada H, Komazaki S, Naitou D, Mishima A, Nishi M, Yamamura H, Yamamoto S, Kakizawa S, Miyachi H, Yamamoto S, Miyata T, Kawano Y, Kamide K, Ogiwara T, Hata A, Umemura S, Soma M, Takahashi N, Imaizumi Y, Miki T, Iwamoto T, Takeshima H. TRIC-A Channels in Vascular Smooth Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. *Cell Metabolism*, 14, 231-241, 2011.
- Zhou X, Lin PH, Yamazaki D, Park KH, Komazaki S, Wayne Chen SR, Takeshima H, Ma J. TRIC Channels and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. *Circulation Research*, 114, 706-716, 2014.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 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.
2. 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. *Science Signaling*, 9, ra49, 2016.

[学会発表] (計 6 件)

1. 山崎大樹、血管平滑筋の小胞体カウンターイオンチャンネルを介した血圧調節機構、第 57 回日本平滑筋学会総会、2015 年 8 月 25 ~ 27 日、山口
2. 山崎大樹、張願書、駒崎伸二、竹内綾子、王朝弘、趙成珠、Ki Ho Park、西美幸、松岡達、Jianjie Ma、竹島浩、TRIC-A 欠損によるイソプロテレノール誘発性心臓線維化、生理学研究所研究会 2015 心臓・血管系の包括的な機能統合研究、2015 年 10 月 29 ~ 30 日、岡崎
3. Lin P, Cai C, Zhu H, Ko JK, Hwang M, Pan Z, Tan T, Yamazaki D, Takeshima H, Korichneva I, Ma J. Zinc binding to MG53 facilitates repair of injury to cell membrane. 60th

- Biophysical Society Annual Meeting, 2016年2月26日~3月2日、ロサンゼルス(米国)
4. Zhao C, Qian N, Ichimura A, Yamazaki D, Asagiri M, Yamamoto K, Komazaki S, Nishi M, Takeshima H. Compromised collagen production in Tric-b-knockout osteoblast. 60th Biophysical Society Annual Meeting, 2016年2月26日~3月2日、ロサンゼルス(米国)
 5. 山崎大樹、竹内綾子、趙成珠、西美幸、松岡達、竹島浩、TRIC-A欠損マウスにおける アドレナリン受容体刺激による心臓線維化機構、第93回日本生理学会大会、2016年3月22~24日、札幌
 6. Yamazaki D. Chronic isoproterenol stimulation induced different cardiac disorders in Tric-deficient mice. 9th FAOPS congress, 2019年3月

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：後藤元人

ローマ字氏名：Motohito Goto

研究協力者氏名：高橋利一

ローマ字氏名：Riichi Takahashi

研究協力者氏名：山本伸一郎

ローマ字氏名：Shinichiro Yamamoto

研究協力者氏名：山村寿男

ローマ字氏名：Hisao Yamamura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。