

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2005-2009 年度  
 課題番号：17081001

研究課題名（和文）結合膜構造とチャネルのミクロアセンブリ  
 研究課題名（英文）Channel micro-assembly in junctional membrane complexes

研究代表者  
 竹島 浩（Hiroshi Takeshima）  
 京都大学・薬学研究科・教授  
 研究者番号：70212024

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、細胞表層膜と小胞体が近接した結合膜構造におけるイオンチャネルの機能共役に関する分子的理解である。その目的に向けて、i) 結合膜形成因子ジャンクトフィリンの神経・筋細胞における基本的機能、ii) その欠損マウスにおける生理機能の障害、iii) その構造異常によるヒト疾患、さらには、iv) チャネル機能共役を支持する機構などに着目した研究を遂行した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this project is to understand the molecular basis of channel crosstalk in junctional membrane complexes between the plasma membrane and the endo-/sarcoplasmic reticulum. In particular, this project focused on i) biological roles of junctophilin subtypes as proteins producing junctional membrane complexes, ii) physiological abnormalities observed in knockout mice lacking junctophilins, iii) human diseases caused by mutated junctophilins, and iv) the new mechanisms supporting the junctophilin-mediated channel crosstalk.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	6,500,000	0	6,500,000
2006 年度	18,800,000	0	18,800,000
2007 年度	14,700,000	0	14,700,000
2008 年度	14,700,000	0	14,700,000
2009 年度	14,700,000	0	14,700,000
総計	69,400,000	0	69,400,000

研究分野：細胞生理学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般（6905）

キーワード：ジャンクトフィリン、結合膜構造、小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出

## 1. 研究開始当初の背景

神経・筋組織の興奮性細胞には、細胞表層膜と小胞体が密着した結合膜構造が電子顕微鏡により古くから観察されている。形態学的には骨格筋の triad junction や神経細胞の subsurface cistern などと命名されているが、極めて類似した特徴を示す結合膜構造の生物学的意義や形成の分子機構などについては、長い期間不明であった。近年の細胞

生理学の進展により、横紋筋細胞の結合膜構造は、細胞膜上の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル（ジヒドロピリジン受容体）と筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出チャネル（リアノジン受容体）の機能共役に重要な構造基盤であることが提唱されてきた。一方、本研究の開始直前には、我々のグループにおける筋小胞体タンパク質の検索実験にてジャンクトフィリン（JP）が見出され、その結合膜構造の形成活性が明らかにさ

れた。

上記の学術的背景の中で、結合膜構造に関して興奮性細胞横断的な構築原理の共通性やその中で形成されるイオンチャネル機能共役における生理学的な重要性が予見されたため、本研究が立案された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞表層膜と小胞体が近接した結合膜構造におけるイオンチャネルの機能共役に関する分子的理解を推し進めることと設定した。その目的達成に向けては、i) 結合膜形成因子として新規同定された JP の神経・筋細胞における生物機能を明らかにし、ii) JP サブタイプ遺伝子欠損マウスにおける神経・筋組織の生理機能の障害を検討し、iii) JP サブタイプの遺伝子変異や調節異常に起因するヒト神経・筋疾患を検索するとともに、iv) 結合膜構造中のチャネル機能共役を支持する新規機構についても解析することなどが立案された。

本研究開始時期では、我々のグループ以外には JP サブタイプに関する生化学的データは有しておらず、そのデータに基づき設定された上記の研究目的は極めて独自性や先見性の高いものとなった。

## 3. 研究の方法

(1) 分子生物学的実験：神経・筋組織に発現している 4 種の JP サブタイプについて、cDNA およびゲノム DNA クローニング、特異的抗体の調製、遺伝子欠損マウスの作成などを遂行した。また、イモリ初期胚や培養細胞における DNA 発現実験による JP の基本的な生物機能についても検討した。

(2) 形態学的実験：遺伝子欠損マウスの神経・筋組織の解析では、光学顕微鏡による一般組織学的観察、共焦点顕微鏡による免疫組織化学的観察や、電子顕微鏡による微細膜構造異常の検討が行われた。これらの実験では、埼玉医科大学駒崎准教授との共同研究が行われた。

(3) 細胞生理学的実験：遺伝子欠損マウスから分離された神経・筋組織や細胞については、張力測定、蛍光  $Ca^{2+}$  測光、パッチクランプ電流測定などが、米国 NJ 州立大 Ma 教授との部分的な共同研究にて行われた。また、遺伝子欠損マウスの個体レベルでの検討として、心電図や心カテーテル測定や行動薬理学実験も遂行された。

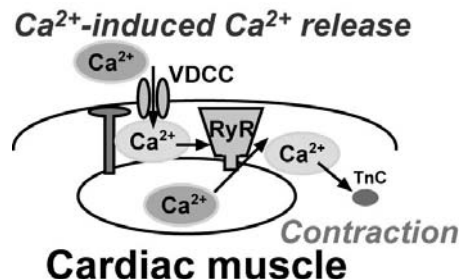
(4) ヒト遺伝子解析：心筋症、筋ジストロフィーやハンチントン病患者における JP 遺伝子変異の検索は、女子医科大学倫理委員会の承認を得て松岡教授や松下研究員との共同研究にて遂行された。

(5) 新規小胞体タンパク質の検索：我々は以

前より単クローン抗体と組織染色を組み合わせ、ウナギ骨格筋から小胞体膜タンパク質を新規同定する手法を確立している。同様の検索実験を継続した。

## 4. 研究成果

### (1) JP の基本的な生物学的機能



心筋細胞においては、細胞表層膜の脱分極が電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネル (VDCC) の開口を導き、細胞内へ流入する  $Ca^{2+}$  が小胞体リアノジン受容体チャネル (RyR) を活性化し、大量に放出される  $Ca^{2+}$  がトロポニンに作用することで収縮反応が開始する (上図参照)。この機構は  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release (CICR) と呼ばれ、結合膜構造が形成し、その構造中に VDCC と RyR が共局在・機能共役することにより成立している。JP は細胞表層膜と結合し、小胞体膜を貫通することで結合膜構造の形成に寄与しており、その膜構造形成が VDCC と RyR の機能共役による CICR の成立に不可欠であることが明らかにされた。

一方、各組織における cDNA クローニングにより、4 種の JP サブタイプの存在も明らかにされた。具体的には、骨格筋特異的な JP1、平滑筋、心筋と骨格筋に分布する JP2、神経細胞に共発現する JP3 と JP4 のサブタイプ群である。基本的な JP サブタイプの分子構造の共通性から、JP サブタイプはそれぞれの発現細胞群における結合膜構造の構築に寄与することが強く示唆された。

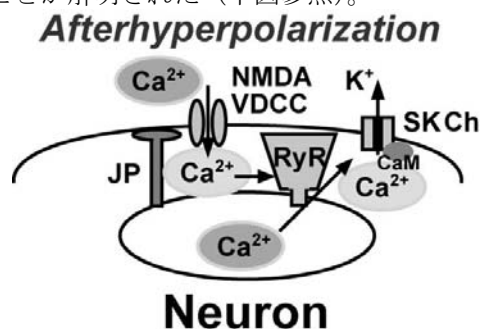
### (2) 興奮性細胞における JP の生理的機能

心筋細胞では JP2 が結合膜構造を構築し、上述の CICR を成立させている。JP2 欠損マウスは心拍動開始直後の初期胎生期に、CICR の破綻により心不全となり死亡することが判明した。本研究開始に先立ち観察された本結果は、様々な興奮性細胞において結合膜構造には極めて重要な生理機能が秘められていることを示すものである。

成熟した骨格筋細胞には triad junction と呼ばれる結合膜構造が形成され、JP1 と JP2 が共発現している。triad junction は生後の骨格筋成熟化とともに形成され、その形成と呼応するように JP1 発現が上昇する。心筋と類似の結合膜構造が JP2 により成立した後に、骨格筋では JP1 も参加することで、triad junction へと結合膜構造も成熟化すること

が示唆される。事実、JP1 欠損マウスは新生致死性を示し、その変異骨格筋においては triad junction の形成不良とチャネル共役の減弱と想定される収縮効率低下が観察され、その考察が支持された。

神経細胞においては、相補的な機能を有する JP3 と JP4 が結合膜構造を成立させていることが mRNAs の分布から示唆される。事実、JP3 と JP4 の単独遺伝子欠損マウスは致死性を示さないが、両者の同時欠損 (JP-DKO) マウスにより離乳時期の致死性が観察された。“練り餌”飼育によりこの致死性が回避されることが判明して、以下に示す中枢系における JP の生理機能が解明された。記憶学習能力が障害されている JP-DKO マウスでは、海馬領域の神経可塑性 (長期増強) が障害されていた。電気生理学解析により、RyR による  $Ca^{2+}$  放出で活性化する SK チャネルと呼ばれる  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネルが開口不全となっていることが、JP-DKO マウスで確認された。また、JP-DKO マウスは運動学習障害も示し、小脳プルキンエ細胞における神経可塑性 (長期抑圧) にも異常を示した。詳細検討の結果、RyR の  $Ca^{2+}$  放出で活性化する SK チャネルの機能が低下していることが再び示された。これらの実験により、神経細胞の JP と  $Ca^{2+}$  依存性のチャネル共役として、表層膜  $Ca^{2+}$  透過性チャネル (NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルや電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルなど)、小胞体 RyR チャネルと SK チャネルが機能共役していることが判明した。この結合膜中のチャネル機能共役は基本的な神経情報伝達を障害することはないが、神経興奮直後に発生する後過分極 afterhyperpolarization と呼ばれる非興奮相を形成して、可塑性の成立に寄与することが解明された (下図参照)。



平滑筋細胞に発現する JP2 の生理機能については、未だに明確でない点が多く残されている。上記の神経細胞と類似した様式のチャネル機能共役で、RyR による  $Ca^{2+}$  放出で活性化する BK チャネルと呼ばれる  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネルの開口による過分極性情報伝達が種々の平滑筋細胞系で報告されている。JP2 部分欠損の平滑筋細胞にて、BK チャネル活性低下による過分極入力の欠落が予見されたが、その仮説を支持するデータは膀胱平滑筋では得られなかった。今後、平滑筋特異的な

JP2 欠損マウスの作成による再検討が必要とされる。

### (3) JP の変異や機能異常とヒト疾患

ヒト神経・筋疾患への JP の関与に関する指針を得る目的で、各種の心筋症モデルマウスにおける JP2 発現を検討した。肥大型心筋症モデルである心室特異的活性化 H-ras TG マウスと拡張型心筋症モデルである筋特異的 LIM 欠損マウスにおいて、JP2 発現の顕著な発現低下が認められた。この結果に基づき、ヒト心筋症患者における JP2 遺伝子異常の検索を行った。エクソン部のシーケンスの結果、2つの独立した日本人肥大型心筋症家系において JP2 遺伝子に Gly505Ser の点変異が見出され、統計学的検証で心筋症原因変異と結論された。我々の論文報告の後、米国における孤発性肥大型心筋症患者に複数のアミノ酸置換を引き起こす遺伝子変異も報告されている。アミノ酸置換による JP2 機能変調の詳細は不明であるが、心筋症の原因として JP2 遺伝子変異が見出されたことは、新たな分子診断法や出生前診断法の確立を伴う医療貢献として意義深い。

一方、米国ジョンスホプキンス大学のグループからは、HDL2 というハンチントン病類似疾患の患者において triplet repeat 挿入変異による JP3 遺伝子の破壊症例が複数報告された。最近行われた我々の国際共同研究の成果として、若年の JP3 欠損マウスには顕著な中枢症状はないが、加齢とともに運動失調などの異常が増悪することが確認された。従って、JP3 遺伝子破壊と加齢による変調が、HDL2 の原因であることが示唆される。

### (4) チャネル共役を支持する新規機構

上述の結合膜構造でのチャネル機能共役の中心には、常に RyR による小胞体  $Ca^{2+}$  放出が存在する。RyR が大量に存在する筋小胞体から、その  $Ca^{2+}$  放出機能をサポートする膜タンパク質を検索することは合理的と言える。RyR による効率的な  $Ca^{2+}$  放出を可能とする小胞体カウンターイオンチャネルとして TRIC チャネルが数年前に同定された。最近の研究成果により、TRIC チャネルは RyR のみならず、 $IP_3$  受容体チャネルの  $Ca^{2+}$  放出の効率化にも不可欠であることも判明するに至っている。

## 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 34 件、総て査読有り)

① Yamazaki, D., Komazaki, S., Nakanishi, H., Mishima, A., Nishi, M., Yazawa, M., Yamazaki, T., Taguchi, R. & Takeshima, H. Essential role of TRIC-B channel in  $Ca^{2+}$ -handling of alveolar epithelium and perinatal lung maturation.

*Development* 136, 2355-2361, 2009.

②Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H.\* & Ma, J.\* (\*co-corresponding authors) MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nature Cell Biol.* 11, 56-64, 2009.

③Stewart, R., Song, L., Carter, S. M., Sigalas, C., Zaccari, N. R., Kanamarlapudi, V., Bhat, M. B., Takeshima, H. & Sitsapesan, R. Single-channel characterization of the rabbit recombinant RyR2 reveals a novel inactivation property of physiological concentrations of ATP. *J. Membr. Biol.* 222, 65-77, 2008.

④Ikeda, A., Miyazaki, T., Kakizawa, S., Okuno, Y., Tsuchiya, S., Myomoto, A., Saito, S., Yamamoto, T., Yamazaki, T., Iino, M., Tsujimoto, G., Watanabe, M. & Takeshima, H. Abnormal features in mutant cerebellar Purkinje cells lacking junctophilins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 835-839, 2007.

⑤Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin, P-H., Pan, Z., Komazaki, S., Kato, K., Nishi, M., Zhao, X., Weisleder, N., Sato, C., Ma, J. & Takeshima, H. TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78-82, 2007.

⑥Matsushita, Y., Furukawa, T., Kasanuki, H., Nishibatake, M., Kurihara, Y., Ikeda, A., Kamatani, N., Takeshima, H. & Matsuoka, R. Mutations of junctophilin type 2 associated with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Hum. Genet.* 52, 543-548, 2007.

⑦Zhang, M., Yamazaki, T., Yazawa, M., Treves, S., Nishi, M., Murai, M., Shibata, E., Zorzato, F. & Takeshima, H. Calumin, a novel Ca<sup>2+</sup>-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 42, 83-90, 2007.

⑧Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, H., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. & Takeshima, H. Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* 26, 1924-1933, 2007.

⑨Hirata, Y., Brotto, M., Weisleder, N., Chu, Y., Lin, P., Zhao, X., Thornton, A., Komazaki, S., Takeshima, H., Ma, J. & Pan, Z. Uncoupling of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and altered Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilins. *Biophys. J.* 90, 4418-4427, 2006.

⑩Moriguchi, S., Nishi, M., Komazaki, S., Sakagami, H., Miyazaki, T., Masumiya, H., Saito, S., Watanabe, M., Kondo, H., Yawo, H., Fukunaga, K. & Takeshima, H. Functional uncoupling between Ca<sup>2+</sup> release and

afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10811-10816, 2006.

[学会発表] (計 18 件)

①Takeshima, H. “Immuno-proteomic approach to E-C coupling: junctophilin and TRIC channel in cardiac Ca<sup>2+</sup> release” IUPS Whole-day Symposium (July 28, 2009 in Kyoto)

②Takeshima, H. “TRIC channel subtypes and SR/ER Ca<sup>2+</sup> release.” Gordon Research Conference; Muscle Excitation-Contraction Coupling (Jun 18, 2009 in Waterville Valley, USA.)

③Takeshima, H. “Ryanodine receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum” Gordon Research Conference; Muscle Excitation-Contraction Coupling (Jun 9, 2006 in New London, USA.)

④Takeshima, H. “Mitsugumins, a series of novel membrane proteins in skeletal muscle”, Muscle Symposium in Basel (May 5, 2006 in Basel, Switzerland)

⑤Takeshima, H. “Junctophilin-mediated channel coupling during muscle E-C coupling”, European Muscle Conference (Sep 17, 2005 in Debrecen, Hungary)

[図書] (計 6 件)

①Takeshima, H. Junctophilin. Encyclopedia of movement disorders. (Elsevier Limited, Oxford, UK.) pp.92-95, 2009.

②竹島浩、山崎哲男、池田篤史、興水崇鏡 医歯薬系学生のための基礎生命科学 (京都廣川書店) 総ページ 214, 2008.

③竹島浩 リアノジン受容体 イオンチャネル最前線(医学のあゆみ別冊), pp.171-175, 2005.

[その他]

ホームページ等

<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・薬学研究科・教授

研究者番号 : 70212024