

平成 22 年 4 月 3 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～ 2009

課題番号：17081011

研究課題名（和文） Ca^{2+} チャネル分子複合体の生体膜集積機構とその生理的意義研究課題名（英文） Ca^{2+} channelplexes: assembly in the membrane and physiological significance

研究代表者

森 泰生 (MORI YASUO)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80212265

研究成果の概要（和文）：

Ca^{2+} はセカンドメッセンジャーとして多様な生体応答を制御することにより、或いは骨等の組織形成に寄与することにより、生体・組織・細胞の「恒常性」制御に中心的役割を果たす。本研究では、 Ca^{2+} 取り込み主要経路を形成する、電位依存性 Ca^{2+} チャネル及び transient receptor potential (TRP)チャネルに焦点をあて、 Ca^{2+} チャネル複合体の形成・膜集積機構及び、生理的意義の解明を目指した。 Ca^{2+} チャネルがどのようにして個々の生理応答が特異的に惹起するかの問題の解明に向けて大きく前進することができた。

研究成果の概要（英文）：

Ca^{2+} as a second messenger controls a wide variety of biological responses and contributes to formation of tissues such as bones, thereby playing a central role in regulating “homeostasis” at whole body, tissue, and cell levels. In my research, I have focused on voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) and transient receptor potential (TRP) channels to aim at understanding mechanisms, that underlie formation and assembly at the biomembrane of Ca^{2+} channel protein complexes (Ca^{2+} channelplexes), and their physiological significance. Firstly, I have unveiled several unique activation mechanisms, that regulate cellular signal transduction for TRP Ca^{2+} -permeable cation channels. Secondly, I have demonstrated that channel proteins act not only as Ca^{2+} -permeating apparatus but also as assembly centers for receptors, signal-regulating proteins, and scaffolding proteins. Thirdly, important roles of Ca^{2+} channel protein complexes via formation of feedback regulation pathways in signal transduction have been demonstrated. Finally, I have also shown physiological significance of Ca^{2+} channelplexes at tissue levels. TRPC3 channelplexes in B lymphocyte activation and P/Q type VDCCplexes in presynaptic vesicle fusion are examples of the outcome of this study. Thus, my study clarifies how individual Ca^{2+} channels play roles in unique cellular responses.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------|------------|
| 2005年度 | 7,200,000 | 0 | 7,200,000 |
| 2006年度 | 18,000,000 | 0 | 18,000,000 |
| 2007年度 | 17,100,000 | 0 | 17,100,000 |
| 2008年度 | 17,100,000 | 0 | 17,100,000 |
| 2009年度 | 17,100,000 | 0 | 17,100,000 |
| 総計 | 76,500,000 | 0 | 76,500,000 |

研究分野：分子生理学

科研費の分科・細目：518

キーワード：Ca²⁺チャネル、分子複合体、膜分子集積、シグナル伝達、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオン (Ca²⁺) は、セカンドメッセンジャーとして多様な生体応答を制御する。また、骨等の組織の主要構成物質である。細胞の主要 Ca²⁺取り込み経路である Ca²⁺チャネルの中でも、transient receptor potential (TRP)チャネル群は、生体・組織・細胞の「恒常性」制御の観点から注目されている。当研究室は、TRPチャネルを介して流入したCa²⁺が、様々の受容体活性化シグナル伝達全体を増幅・協調させ、広義の生体恒常性である「細胞の増殖や生存・死」をも調節すること、電位依存性Ca²⁺チャネルが神経機能を制御すること等を示してきた。また、Ca²⁺はこの様に膜輸送の直接対象である上に、他の多様なイオン・小分子のチャネル・トランスポーターを調節し、物質の生体膜輸送の中核であることも示してきた。

2. 研究の目的

本研究計画は、Ca²⁺チャネル複合体の形成・膜集積機構及び、それが特化する細胞シグナル/膜輸送と生理応答の解明を目指す。即ち、Ca²⁺チャネルが、シグナル経路の受容体・伝達タンパク質・酵素群、他チャネル・トランスポーター、「足場 (scaffolding)」タンパク質等と形成する、複合体 (トランスポートソーム) の分子解析を行う。また、各複合体が移行・集積する形質膜特定部位 (ラフト)、及び複合体に生理応答「特異性」を賦与するシグナル/膜輸送機構 (効率増強、過剰抑制等) を、遺伝学・生理学的手法により同定する。

3. 研究の方法

受容体・シグナル経路伝達タンパク質・酵素群、他チャネル・トランスポーター、「足場 (scaffolding)」タンパク質、adaptorタンパク質等と、Ca²⁺チャネルが形成する複合体 (トランスポートソーム) の分子解析を行う。ここでは、LC-MS等の質量分析に、膜タンパク質相互作用に特化した2-hybrid法であるsplit ubiquitin法を併用した。また、Ca²⁺チャネルを特定の細胞シグナル/膜輸送に特化させる複合体の形成・膜集積、及びそれと関連した生理応答特異性を明らかにするべく、マウスES細胞あるいはDT40 B細胞において、遺伝子ノックアウトを遂行した。

4. 研究成果

まず、Ca²⁺透過型カチオンチャネルであるTRPのいくつかのユニークな活性化機構を明らかにした。例えば、受容体活性化チャネル及び温度センサーチャネルとして分類されてきたTRPC5及びTRPV1 (カプサイシン受容体)等が、pore領域付近のシステイン残基のsulfhydryl基のニトロシル化や酸化的修飾により活性化されることが分かった。このような活性化機構における特性は後述のように細胞シグナル制御において重要である。第二に、チャネルタンパク質が単なるCa²⁺透過装置として働くだけでなく、様々な受容体、シグナル伝達タンパク質、scaffoldingタンパク質等をシグナル複合体として集積させる中心として働くことを明らかにした。具体的には、複合体形成における3種類のTRPチャネル群 (TRPC3、TRPC5、TRPM2) の役割を示した。更に、神経系presynapseにおいて、種々のタンパク質等を集積させるscaffoldingタンパク質RIM1により、電位依存性Ca²⁺チャネルが強く機能制御を受けることを明らかにした。この知見は、複合体形成に伴うタンパク質集積が結果として、Ca²⁺チャネルの機能特性を決定できることを示唆する。第三に、Ca²⁺チャネル複合体のシグナル制御における意義を明らかにできた。即ち、シグナル経路の構成シグナル伝達タンパク質がCa²⁺チャネルを中心に集積することによって、Ca²⁺チャネルを介したCa²⁺シグナルが、当該シグナル経路に対するFeedback制御をかける。この際にはCa²⁺依存的な細胞内から形質膜へのシグナル伝達タンパク質の移行が重要である。また、複合体形成はCa²⁺シグナルの発生源であるCa²⁺チャネルとCa²⁺受容タンパク質との間の距離も制御でき、その結果Ca²⁺シグナル伝達効率を変化させ細胞応答の強弱を変化させることができると考えられる。presynapseにおけるRab3-RIM1-電位依存性Ca²⁺チャネルによる、シナプス小胞とCa²⁺シグナルの発生源の調節を介した神経伝達物質放出制御は、その代表であるとも言える。第四に、Ca²⁺チャネル複合体の生理的意義を組織レベルで明らかにした。具体的には、TRPC3複合体によるB細胞活性化調節、TRPC5複合体によるNO産生を介した血管収縮の弛緩の調節、TRPM2複合体による単球・マクロ

ファージのケモカイン産生と好中球遊走を介した炎症増悪、及び電位依存性 Ca^{2+} チャネル複合体による神経シナプス伝達効率の調節（シナプス可塑性）が挙げられる。以上、カルシウムイオン (Ca^{2+}) 或いは、その膜越えの透過を担う Ca^{2+} チャネルは多様な生理的意義を有するが、どのようにして個々の生理応答が特異的に惹起されるかは依然として大きな謎であったが、この問題の解明に向けて大きく前進できた。

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 31 件）

1. Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Koehler R, Schwarz EC, Kozai D, Takahashi N, Peinelt C, Griesemer D, Bozem B, Mori Y, Hoth M & Niemeyer BA Differential redox regulation of ORAI channels: a mechanism to tune cellular calcium responses. **Science Signaling** (in press). 査読有
2. Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S, Kato K, Katano K, Mori E, Kurosaki T, Inoue R, Hikida T, Putney Jr JW & Mori Y Ca^{2+} influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC β and ERK activation in B cells. **J. Cell Sci.** (in press). 査読有
3. Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M & Furukawa T. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107, 332-337 (2010). 査読有
4. Watanabe H, Yamashita T, Saitoh N, Kiyonaka S, Iwamatsu A, Campbell KP, Mori Y & Takahashi T. Involvement of Ca^{2+} Channel Synprint Site in Synaptic Vesicle Endocytosis. **J. Neurosci.** 30, 655-660 (2010). 査読有
5. Sakaguchi R, Tainaka K, Shimada N, Nakano S, Inoue M, Kiyonaka S, Mori Y & Morii T. An in vivo fluorescent sensor reveals intracellular Ins(1, 3, 4, 5)P(4) dynamics in single cells. **Angew. Chem. Int. Ed.** 17, 7381-7386 (2010). 査読有
6. Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M & Mori Y. A pathogenic C-terminus-truncated Polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca^{2+} entry via association with TRPC3 and TRPC7. **J. Biol. Chem.** 284, 34400-34412 (2009). 査読有
7. Sun H-S, Jackson MF, Martin LJ, Jansen K, Teves L, Cui H, Kiyonaka S, Mori Y, Jones M, Forder JP, Golde TE, Orser BA, MacDonald JF & Tymianski M. Suppression of hippocampal TRPM7 protein prevents delayed neuronal death in brain ischemia. **Nature Neurosci.** 12, 1300-1307 (2009). 査読有
8. Fuller-Bicer GA, Varadi G, Koch SE, Ishii M, Bodi I, Kadeer N, Muth JN, Mikala G, Petrashevskaya NN, Jordan MA, Zhang SP, Qin N, Flores CM, Isaacsohn I, Varadi M, Mori Y, Jones WK, Schwartz A. Targetted disruption of the voltage-dependent Ca^{2+} channel α_2/δ -1 subunit. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 297, H117-124 (2009). 査読有
9. Inoue R, Jensen LJ, JianZ, Shi J, Hai L, Lurie AI, Henriksen FH, Salmonsson M, Morita H, Kawarabayashi Y, Mori M, Mori Y & Ito Y. Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via PLC/diacylglycerol and $\text{PLA}_2/\text{f}\omega\text{-hydroxylase}/20\text{-HETE}$ pathways. **Circ Res.** 104, 1399-1409 (2009). 査読有
10. Wang Y, Deng X, Zhou Y, Hendron E, Mancarella S, Ritchie MF, Tang XD, Baba Y, Kurosaki T, Mori Y, Soboloff J & Gill DL. STIM protein coupling in the activation of Orai channels.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 7391-7396 (2009). 査読有
11. Lange I, Yamamoto Y, Partida-Sanchez S, **Mori Y**, Fleig A & Penner R. TRPM2 functions as lysosomal Ca²⁺ release channel in β -cells. **Science Signaling** 2, ra23 (2009). 査読有
 12. Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Kato K, Kaneko T, Kiyonaka S, **Mori Y** & Sato C. Tetrameric Orail is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. **J. Biol. Chem.** 284, 13676-13685 (2009). 査読有
 13. Kiyonaka S, Kato K, Nishida M, Mio K, Numaga T, Sawaguchi Y, Yoshida T, Wakamori M, Mori E, Numata T, Ishii M, Takemoto H, Ojida A, Watanabe K, Uemura A, Kurose H, Morii T, Kobayashi T, Sato Y, Sato C, Hamachi I & **Mori Y**. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 5400-5405 (2009). 査読有
 14. Takeuchi K, Nakano Y, Kato U, Kaneda M, Aizu M, Awano W, Yonemura S, Kiyonaka S, **Mori Y**, Yamamoto D & Umeda M. Changes in temperature preferences and energy homeostasis in dystroglycan mutants. **Science** 323, 1740-1743 (2009). 査読有
 15. Olah ME, Jackson MF, Li H, Perez Y, Sun HS, Kiyonaka S, **Mori Y**, Tymianski M & Macdonald JF. Ca²⁺-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons. **J. Physiol.** 587, 965-979 (2009). 査読有
 16. Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K & **Mori Y**. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. **Channels** 2, 287-298 (2008). 査読有
 17. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H & **Mori Y**. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. **Nature Med.** 14, 738-747 (2008). 査読有
 18. Maruyama Y, Ogura T, Mio K, Kiyonaka S, Kato K, **Mori Y** & Sato C. The TRPM2 channel is a swelled, bell-shaped molecule with a protrusion on the cytoplasmic end. **J. Biol. Chem.** 282, 36961-36970 (2007). 査読有
 19. Wei W-L, Olah ME, Czerwinska E, Czerwinski W, **Mori Y**, Orser BA, Xiong Z-G, Jackson MF, Tymianski M & MacDonald JF. TRPM7 a possible extracellular divalent cation sensor in hippocampal neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 16323-16328 (2007). 査読有
 20. Miki T, Kiyonaka S, Uriu Y, De Waard M, Wakamori M, Beedle AM, Campbell KP & **Mori Y**. Mutation associated with an autosomal dominant cone-rod dystrophy CORD7 modifies RIM1-mediated modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels. **Channels** 1, 144-147 (2007). 査読有
 21. Nishida M, Onohara N, Sato Y, Suda R, Ogushi M, Tanabe S, Inoue R, **Mori Y** & Kurose H. G $\alpha_{12/13}$ -mediated upregulation of TPPC6 negatively regulates endothelin-induced cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis through NFAT activation. **J. Biol. Chem.** 282, 23117-23128 (2007). 査読有
 22. Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP & **Mori Y**. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. **Nature Neurosci.** 10, 691-701 (2007). 査読有

23. Onohara N, Nishida M, Inoue R, Kobayashi H, Sumimoto H, Sato Y, **Mori Y**, Nagao T & Kurose H
TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy.
EMBO J. 25, 5305-5316 (2006). 査読有
24. Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, **Wakamori M**, Numaga T, **Mori Y**, Iino M, Hikida M & Kurotaki T
Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 16704-16709 (2006). 査読有
25. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y & **Mori Y**
Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation.
Nature Chem. Biol. (Article) 2, 596-607 (2006). 査読有
26. Vazquez G, Bird GSJ, **Mori Y** & Putney JW
Native TRPC7 channel activation by an inositol trisphosphate receptor-dependent mechanism.
J. Biol. Chem. 281, 25250-25258 (2006). 査読有
27. Erxleben C, Liao Y, Gentile S, Chin D, Gomez-Alegria C, **Mori Y**, Birnbaumer L & Armstrong DL
Cyclosporin and Timothy syndrome increase mode 2 gating of Ca_v1.2 calcium channels through aberrant phosphorylation of S6 helices.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 3932-3937 (2006). 査読有
28. Togashi K, **Hara Y**, Higashi T, Konishi Y, Tominaga T, **Mori Y** & Tominaga M
TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion.
EMBO J. 25, 1804-1815 (2006). 査読有
29. Kang, MG, Chen CC, **Wakamori M**, **Hara Y**, **Mori Y** & Campbell KP
A functional AMPA receptor-calcium channel complex in the postsynaptic membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 5561-5566 (2006). 査読有
30. Shimizu S, Yoshida T, **Wakamori M**, Ishii M, Okada T, Takahashi M, Seto M, Sakurada K, Kiuchi Y & **Mori Y**
Ca²⁺/calmodulin dependent myosin light chain kinase is essential for activation of TRPC5 channels expressed in HEK cells.
J. Physiol. 570, 219-235 (2006). 査読有
31. Lievreumont J-P, Numaga T, Vazquez G, Lemonnier L, **Hara Y**, Mori E, Trebak M, Moss SE, Bird GS, **Mori Y** & Putney Jr JW
The role of canonical transient receptor potential 7 (TRPC7) in B-cell receptor-activated channels.
J. Biol. Chem. 280, 35346-35351 (2005). 査読有
6. 研究組織
(1) 研究代表者
森 泰生 (MORI YASUO)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80212265
- (2) 研究分担者
藤本 豊士 (FUJIMOTO TOYOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50115929
- 若森 実 (WAKAMORI MINORU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50222401
- 原 雄二 (HARA YUJI)
アイオワ大学・医学部・ポスドク
研究者番号：60362456
- (3) 連携研究者
なし