

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02597

研究課題名(和文) TRICおよびMG23チャンネルに関する研究

研究課題名(英文) Study on TRIC and MG23 channels

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)：小胞体Ca<sup>2+</sup>ストアにおけるTRICまたはMG23の解析実験にて、以下に示す細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルに関する主要な成果が得られた。1)TRIC-Aによるリアノジン受容体の機能亢進は正常な心機能維持に不可欠であり、その機能亢進は両者の直接相互作用に起因することが示唆された。2)TRIC-Bでは協調的なチャンネル間同時開口が高確率で観察され、IP<sub>3</sub>受容体の活性化に寄与する可能性が考察される。3)成長板軟骨細胞と腹腔マクロファージにおいてTRPファミリーチャンネルによる自発的Ca<sup>2+</sup>流入機序を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルは多様な機能を制御するため、その分子機序の解を目指す本研究のは学術的意義は高い。また、本研究により明らかになったCa<sup>2+</sup>シグナルを構築する分子機序は、新たな創薬標的を提供し、医薬領域への波及効果を有する。

研究成果の概要(英文)：In our analyzing TRIC and MG23 proteins in intracellular Ca<sup>2+</sup> stores, we detected several new findings including major issues as described below. 1) TRIC-A-mediated activation of ryanodine receptors is essential for normal cardiac functions, and this activation is likely caused by direct protein-protein interaction between them. 2) In contrast to TRIC-A, TRIC-B frequently shows cooperative gating, and the unique may contribute to the support of IP<sub>3</sub> receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> release. 3) We found spontaneous Ca<sup>2+</sup> entry mediated by TRP family channel members in growth plate chondrocytes and peritoneal macrophages.

研究分野：細胞生理学

キーワード：小胞体 Ca<sup>2+</sup>ストア Ca<sup>2+</sup>シグナリング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は生理反応のスイッチとなっており、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ストアより放出される  $\text{Ca}^{2+}$ は神経伝達物質やホルモンの放出、筋細胞の収縮、細胞増殖や細胞死など多彩な細胞機能を制御する。小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出チャネルとして  $\text{IP}_3$  受容体とリアノジン受容体のサブタイプが細胞種特異的に分布し、様々な刺激に応答して多様な  $\text{Ca}^{2+}$ 放出シグナルを形成する。しかしながら、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ストアの機能維持や  $\text{Ca}^{2+}$ 放出反応をサポートする機構については不明な点が多く残されている。一方で、小胞体タンパク質群においては機能不明な分子が現在でも存在しており、それらの  $\text{Ca}^{2+}$ ストア機能への関与を検討することの学術的意義は高い。

研究代表者のグループは小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ハンドリングの分子機構の理解に多大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  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングを規定する MG29 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 MG53 の発見と機能解析などがある。また、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出と同調したカウンターイオンを供給すると考察される TRIC チャネル、脂質二重膜再構成系で陽イオン選択的なチャネルを形成する MG23 も分子同定している。本研究においては、主に TRIC チャネルと MG23 の機能解明に関する実験を立案した。

### 2. 研究の目的

#### (1)TRIC チャネルに関する研究

TRIC チャネルには、興奮性細胞に高発現する TRIC-A と、組織普遍的に分布する TRIC-B が存在する。サブタイプ間におけるチャネル活性の相違を明らかにするために、cDNA 発現と人工脂質膜チャネル活性測定を組み合わせた解析を計画した。TRIC-A 欠損マウスにおいては既に平滑筋と骨格筋のリアノジン受容体による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の減弱を明らかにしており、本研究では心筋における解析を立案した。TRIC-B 欠損マウスでは肺胞上皮細胞や骨芽細胞の  $\text{IP}_3$  受容体による小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の減弱を既に報告している。TRIC-B については、遺伝子変異によるヒト家族性骨形成不全症の症例報告があり、骨組織における TRIC-B の生理機能の詳細をさらに検討することを立案した。

#### (2)ミツグミン 23(MG23)に関する研究

MG23 は小胞体膜と核膜に分布する膜貫通タンパク質であり、多くの細胞系で発現が確認されるものの、骨格筋、心筋や中枢系などの興奮性組織での高発現が確認されている。本研究では、ほぼ正常に生育する MG23 欠損マウスにおいて興奮性組織を中心に小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ ストア機能の変動を解析して、MG23 の生理機能の実体に迫ることを目的とした。

### 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ネルの電気生理学的検討(英国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  $\text{Ca}^{2+}$ とタンパク質挙動の検討(米国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・細胞生物学・細胞生理学手法などを総動員した変異マウスや cDNA 発現細胞の解析実験を遂行した。

### 4. 研究成果

#### (1)TRIC チャネルに関する研究

脂質二重膜チャネル計測にて、TRIC-B は協調的に複数のチャネルが同時に開口する特徴的な性質があることが示された(論文 2)。TRIC-A 欠損マウスの心臓では、ペースメーカー細胞に起因する心拍異常(論文 8)、ストレス状況下での心筋細胞死と線維化の亢進(論文 5)などの異常が確認された。これらの心機能異常の主因は、TRIC-A によるリアノジン受容体  $\text{Ca}^{2+}$ 放出の減弱と、そのために誘導される筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ 過剰負荷であると考察された。また、このリアノジン受容体の活性化には TRIC-A の C 末端ペプチドの直接相互作用の可能性が示唆された(論文 5)。また、心臓リアノジン受容体の機能減弱は肺高血圧症を誘引することが示された(論文 7)。一方では、TRIC-B 欠損骨の解析実験では、未固定骨試料による電子顕微鏡解析手法が開発され(論文 4)、成長板軟骨細胞が TRPM7 チャネルの自発的活動による  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが発生することも判明した(論文 1)。

#### (2)ミツグミン 23(MG23)に関する研究

ほぼ正常に生育する MG23 欠損マウスでは、抗癌薬ドキソルビシン心毒性に抵抗性が観察された。この心毒性には直接的な心筋細胞への薬物作用とともに、マクロファージを仲介する間接作用も関与すると考えられおり、MG23 欠損による心毒性軽減にはマクロファージの機能変容が寄与する可能性が示唆されている。この検討実験において、3 種の TRP チャネルがマクロファージ

の Ca<sup>2+</sup>流入に寄与していることが副次的に判明した (論文 9)。

<発表論文リスト>

1. Qian, N., Ichimura, A., Takei, D., Sakaguchi, R., Kitani, A., Nagaoka, R., Tomizawa, M., Miyazaki, Y., Miyachi, T., Numata, T., Kakizawa, S., Nishi, M., Mori, Y. & Takeshima, H. TRPM7 channels mediate spontaneous Ca<sup>2+</sup> fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Sci. Signal.* **12**, eaaw4847, 2019. doi: 10.1126/scisignal.aaw4847.
2. O'Brien, F., Eberhardt, D., Witschas, K., El-Ajouz, S., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sitsapesan, R. & Venturi, E. Cooperative gating between TRIC-B channels; an ER/SR mechanism to enhance counterion currents. *J. Physiol.* **597**, 2691-2705, 2019. doi: 10.1113/JP277241.
3. Eckhardt, J., Bachmann, C., Sekulic-Jablanovic, M., Enzmann, V., Park, K-H., Ma, J., Takeshima, H., Zorzato, F. and Treves, S. Extraocular muscle function is impaired in ryr3<sup>-/-</sup> mice. *J. Gen. Physiol.* **151**, 929-943, 2019. doi: 10.1085/jgp.201912333.
4. Sato, C., Yamazaki, D., Sato, M., Takeshima, H., Memtily, N., Hatano, Y., Tsukuba, T. and Sakai, E. Calcium phosphate mineralization in bone tissues directly observed in aqueous liquid by atmospheric SEM (ASEM) without staining: microfluidics crystallization chamber and immuno-EM. *Sci. Rep.* **9**, 7352, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-43608-6..
5. Zhou, X., Park, K. H., Yamazaki, D., Lin, P. H., Nishi, M., Ma, Z., Qiu, L., Murayama, T., Zou, X., Takeshima, H., Zhou, J. & Ma, J. TRIC-A channel maintains store calcium handling by interacting with type 2 ryanodine receptor in cardiac muscle. *Circ. Res.* **126**, 417-435, 2020. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316241.
6. Tedoldi, A., Ludwig, P., Fulgenzi, G., Takeshima, H., Pedarzani, P. & Stocker, M. Calcium-induced calcium release and type 3 ryanodine receptors modulate the slow afterhyperpolarising current, sLAHP, and its potentiation in hippocampal pyramidal neurons. *PLOS One* **15**, e0230465, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0230465. eCollection 2020..
7. Mei, L., Zheng, Y-M., Song, T., Yadav, V. R., Joseph, L., Truong, L., Barroso, M. M., Hoshijima, M., Takeshima, H., Kotlikoff, M. L., Judson, M. A. & Wang, Y-X. Rieske iron-sulfur protein induces remodeling of FKBP12.6/RyR2 complex and subsequent pulmonary arterial hypertension through NF-κB/cyclin D1 pathway. *Nature Commun.* **11**, 3527, 2020. doi: 10.1038/s41467-020-17314-1.
8. Murakami, M., Toyama, Y., Yonekura, M., Ohba, T., Matsuzaki, Y., Sawamura, D., Murakami, A. M., Nishi, M., Itagaki, S., Tomita, H. & Takeshima, H. Decreased cardiac pacemaking and attenuated b-adrenergic response in TRIC-A knockout mice. *PLOS One* **15**, e0244254, 2020. Doi: 10,137/journal.pone.0244254.
9. Liu, F., Xu, L., Nishi, M., Ichimura, A. & Takeshima, H. Enhanced Ca<sup>2+</sup> handling in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages. *Cell Calcium* in press. doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102381.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhou, X., Park, K. H., Yamazaki, D., Lin, P. H., Nishi, M., Ma, Z., Qiu, L., Murayama, T., Zou, X., Takeshima, H., Zhou, J. & Ma, J.	4. 巻 126
2. 論文標題 TRIC-A channel maintains store calcium handling by interacting with type 2 ryanodine receptor in cardiac muscle.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ. Res.	6. 最初と最後の頁 417-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.316241.	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 該当する
1. 著者名 O'Brien, F., Eberhardt, D., Witschas, K., El-Ajouz, S., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sitsapesan, R. & Venturi, E.	4. 巻 597
2. 論文標題 Cooperative gating between TRIC-B channels; an ER/SR mechanism to enhance counterion currents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Physiol.	6. 最初と最後の頁 2691-2705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP277241.	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 該当する
1. 著者名 O'Brien, F., Eberhardt, D., Witschas, K., El-Ajouz, S., Iida, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sitsapesan, R. & Venturi, E.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Cooperative gating between TRIC-B channels; an ER/SR mechanism to enhance counterion currents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Physiol.	6. 最初と最後の頁 xx
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP277241	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 該当する
1. 著者名 Qian, N., Ichimura, A., Takei, D., Sakaguchi, R., Kitani, A., Nagaoka, R., Tomizawa, M., Miyazaki, Y., Miyachi, T., Numata, T., Kakizawa, S., Nishi, M., Mori, Y. & Takeshima, H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 TRPM7 channels mediate spontaneous Ca <sup>2+</sup> fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Signal.	6. 最初と最後の頁 xx
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aaw4847	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹島浩
2. 発表標題 心臓におけるTRICチャンネルの機能
3. 学会等名 日本生理学会年会シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/">http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/</a>
---

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
---------	---------