

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2008～2010
課題番号：20249004
研究課題名(和文) 新規小胞体チャネルに関する研究
研究課題名(英文) Roles of novel intracellular ion 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

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが新規小胞体イオンチャネルとして分子同定した TRIC チャネルとミツグミン 23 (MG23)に関する構造-機能相関と生理機能の全容解明に向けた実験が計画された。TRIC チャネルに関しては、2 種サブタイプの電気生理学的相違点が明らかにされ、肺胞上皮細胞と骨格筋における小胞体 Ca^{2+} シグナルへの寄与が究明された。一方、MG23 に関しては、多量体形成によるボウル様粒子として生体膜上に分布して、一価および二価陽イオン透過性チャネルとして機能することが示された。

研究成果の概要(英文)：Our group recently identified the TRIC channel and mitsugumin 23 (MG23) as novel intracellular ion channels, and focused on their structure-function relationships and physiological roles in this study. We defined electrophysiological characteristics of TRIC channel subtypes in single channel measurements and their essential physiological functions in alveolar epithelial and skeletal muscle cells using knockout mice. Moreover, we also clarified the three-dimensional volume and cation-specific channel feature of MG23 in single-particle imaging and single channel monitoring, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	19,200,000	5,760,000	24,960,000
2009 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
総計	34,200,000	10,260,000	44,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：TRIC チャネル、ミツグミン 23、小胞体、細胞内 Ca^{2+} ストア

1. 研究開始当初の背景

小胞体は分泌性または膜内在性タンパク質の合成や成熟の場であり、脂質生合成や小胞体ストレス反応を担う多機能オルガネラである。さらに、細胞内 Ca^{2+} ストアとしての機能も重要であり、小胞体の Ca^{2+} 放出は筋収縮、内外分泌、遺伝子転写、膜電位調節などの多彩な細胞機能に直接リンクしており、その破綻は各種疾患の原因ともなる。一方で、小胞体の荷電状態や浸透圧調節のために、 Ca^{2+} 放出・汲み取り機構の背後には K^{+} や Cl^{-} の膜透過が推論されているが、その分子実体や機能の詳細はまったく不明である。本研究

開始当初には研究代表者らは小胞体膜内在性イオンチャネル候補タンパク質、すなわち TRIC チャネルとミツグミン 23 (MG23) を分子同定した。そこで、2 種の新規小胞体チャネル候補に着目し、以下に示す主要な研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、TRIC チャネルと MG23 の構造-機能と生理機能の解析を進めて、小胞体の恒常性に関わるイオン動態の理解に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TRIC チャンネル：2種のサブタイプのうちで TRIC-A については、電気生理学的性質がほぼ解明されていた。単一チャンネル測定と cDNA 機能発現により、TRIC-B チャンネル特性や TRIC チャンネル構造-機能相関の解明を目指した。一方、TRIC チャンネルの生理機能解明では、胎生致死となる TRIC-A & B 同時欠損マウスの心筋細胞における Ca^{2+} シグナルの破綻は既に検討済みであった。新生致死となる TRIC-B 欠損マウスの死亡要因の究明、致死性のない TRIC-A 欠損マウスの骨格筋等の末梢組織を用いてその生理的役割を解明することが立案された。

(2) ミツグミン 23 (MG23)：研究代表者らが分子同定した MG23 は小胞体膜と核膜に分布する膜貫通タンパク質である。予備的成果からは、MG23 は新規チャンネル候補分子であることが強く示唆されていた。タンパク化学や電気生理学解析、cDNA 機能発現やノックアウトマウスの解析を MG23 において遂行し、その小胞体 Ca^{2+} ストア機能への生理的貢献を解明することが計画された。

4. 研究成果

(1) TRIC チャンネル：酵母 cDNA 発現系より高純度のアフィニティー精製した TRIC-A および TRIC-B タンパクを人工脂質二重膜に再構築した電気生理学的検討において、両サブタイプは一価陽イオン選択的チャンネル活性を示した。TRIC-A は膜電位依存性の活性化を示すのに対して、TRIC-B では Ca^{2+} 依存性の活性化が観察され、小胞体上での機能分担も示唆された。TRIC-B 欠損マウスは呼吸不全により新生致死となり、その呼吸器の観察からは肺胞膨潤に不可欠なサーファクタントの合成と分泌の顕著な低下が示された。TRIC-B 欠損肺胞上皮細胞では、小胞体 Ca^{2+} 放出と細胞質 Ca^{2+} 濃度が低下しており、 Ca^{2+} シグナル感受性のサーファクタント合成と分泌が障害されることが示唆された。一方、致死性のない TRIC-A 欠損マウスにおける各細胞系の Ca^{2+} シグナル異常も注目された。TRIC-A 欠損骨格筋細胞では、 Ca^{2+} 放出チャンネルとして機能するリアノジン受容体の機能抑制による小胞体 Ca^{2+} 過剰負荷に起因すると考えられる alternan 収縮反応と小胞体膨潤が観察された。古くから Ca^{2+} 放出に際して小胞体内腔に発生する負荷電を瞬時に消去することが、 Ca^{2+} 放出の効率化に必須であると予想されており、カウンターイオンによる荷電の中和が想定されてきた。上記の結果は、TRIC チャンネルが小胞体 Ca^{2+} 放出と同調して K^+ を小胞体内腔に導くカウンターイオンチャンネルとしての機能していることを強く示唆する。

(2) MG23：MG23 は小胞体膜上で多量体を形成することが化学架橋剤による実験から明

らかになり、その立体構造やイオンチャンネル活性の有無も注目されていた。精製試料による電子顕微鏡像の単粒子解析からは MG23 はボウル様形状の粒子を構成しており、脂質二重膜再構築実験においては一価および二価陽イオン透過性チャンネルとして機能し得ることが示された。新規イオンチャンネルとして同定された MG23 の小胞体上での生理機能が今後注目される。MG23 欠損免疫系細胞による予備的観察として DNA 損傷誘発性アポトーシスの減弱が観察されているが、今後とも MG23 遺伝子欠損マウスの解析実験を進めて、小胞体イオン動態における MG23 の役割を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線) [雑誌論文] (計 20 件)

1. Li, H., Ding, X., Lopez, J. R., Takeshima, H., Ma, J., Allen, P. D. & Eltit, J. M. Impaired Orai1-mediated resting Ca^{2+} entry reduces the cytosolic $[Ca^{2+}]$ and SR Ca^{2+} loading in quiescent junctophilin1 knockout myotubes. *J. Biol. Chem.* **285**, 39171-39179, 2010.

査読 (有)

2. Zhao, X., Yamazaki, D., Park, K-H., Komazaki, S., Tjondrokoesoemo, A., Nishi, M., Lin, P., Hirata, Y., Brotto, M., Takeshima, H. & Ma, J. Ca^{2+} overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **285**, 37370-37376, 2010.

査読 (有)

3. Pitt, S. J., Park, K-H., Nishi, M., Urashima, T., Aoki, S., Yamazaki, D., Ma, J., Takeshima, H. & Sitsapesan, R. Charade of the SR K^+ -channel: two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K^+ -channel. *Biophys. J.* **99**, 417-426, 2010. 査読 (有)

4. Cao, C-M., Zhang, Y., Weisleder, N., Ferrante, C., Wang, X., Lv, F., Zhang, Y., Song, R., Hwang, M., Jin, L., Guo, J., Peng, W., Li, G., Nishi, M., Takeshima, H., Ma, J. & Xiao, R-P. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning. *Circulation* **121**, 2565-2574, 2010. 査読 (有)

5. Yamazaki, T., Sasaki, N., Nishi, M. & Takeshima, H. Facilitation of DNA damage- induced apoptosis by endoplasmic reticulum protein mitsugumin23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 196-200, 2010. 査読 (有)

6. 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. 査読 (有)

7. Masumiya, H., Asami, Y., Nishi, M., Minamisawa, S., Adachi-Akahane, S., Yoshida, M., Kangawa, K., Ito, K., Kagaya, Y., Yanagisawa, T., Yamazaki, T., Ma, J. & Takeshima, H. Mitsugumin 53-mediated maintenance of K^+ currents in cardiac myocytes. *Channels* **3**, 6-11, 2009. 査読 (有)

8. Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Pan, Z., Nishi, M., Ko, J-K., Komazaki, S., Takeshima, H.* & Ma, J.* (*co-corresponding authors) MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 3314-3322, 2009. 査読 (有)

9. Cai, 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. 査読 (有)

10. 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 Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med.* **14**, 738-747, 2008. 査読 (有)

11. Stewart, 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. 査読 (有)

12. Shimura, M., Minamisawa, S., Takeshima, H., Jiao, Q., Bai, Y., Umemura, S. & Ishikawa, Y. Sarcalumenin alleviates stress-induced cardiac dysfunction by improving Ca^{2+} handling of the sarcoplasmic reticulum. *Cardiovasc. Res.* **77**, 362-370, 2008. 査読 (有)

[学会発表] (計 12 件)

1. Takeshima, H. "TRIC channel subtypes and SR/ER Ca^{2+} release." Gordon Research Conference; Muscle Excitation-Contraction Coupling (Jun 18, 2009 in Waterville Valley, USA.).

2. Takeshima, H. "Molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} release: roles of junctophilin and TRIC channel in cardiac Ca^{2+} release." JST Japan-Mexico Scientific Workshop (Feb 25, 2009 in Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM), Mexico City)

[図書] (計 1 件)

1. トランスポートソームの世界(471 ページ、京都廣川書店、2011 年 3 月) 金井好克、竹島造、森泰生、久保義弘編集

[産業財産権] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
所得年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
所得年月日：
国内外の別：

[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 (TAKESHIMA HIROSHI)
京都大学・薬学研究科・教授
研究者番号：70212024

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし