

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790173

研究課題名 (和文) 小胞体膜における、イオンチャネルの生理的役割の解明

研究課題名 (英文) Analysis of physiological roles of ion channels in ER membrane

研究代表者

村田 喜理 (MURATA YOSHIMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455780

研究成果の概要 (和文)：膜に存在するタンパク質は、細胞内の小胞体で合成され、膜に対する向きを変えずに、細胞膜に運ばれるが、我々は、マウスの膵臓に存在するイオンチャネルが、小胞体膜中における向き (配向) が、通常考えられているものと逆であることを見だし、その生理学的な意義を見いだすための研究を行った。

まず、現在までに得られている実験結果を、別の手法によりさらに確認する実験を行い、現在は、通常と逆の配向を示すイオンチャネル遺伝子の性質を詳細に調べるため、塩基配列の同定を行っている。

研究成果の概要 (英文)：We prepared nuclear envelopes (NEs) from mouse pancreatic acinar cells and observed MaxiK currents in the membrane subjected to the patch-clamp technique. The results indicate that the MaxiK channels are oriented in the ER membrane as their usual extracellular side faces to cytosol. These observation is inconsistent with the conventional understandings of the protein transport process. In this study, we examined the orientation of MaxiK channel in the ER membrane of the pancreatic acinar cells.

We performed an immunofluorescent staining in our NE preparation using anti-Calnexin antibodies. Calnexin, an ER resident membrane protein, directs C-terminus to the cytosol and N-terminus to the lumen. The antibody which binds to N-terminus of Calnexin showed the signal only when NE membrane was permeabilized. It supports the notion that the orientation of our NE preparation itself would be intact. Collectively, we suggest that MaxiK channels of the mouse pancreatic acinar cells have unconventional orientation in the ER membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：生体膜、イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室独自の技術として、マウスの膵臓腺房細胞から、小胞体膜を含むnuclear envelopeを単離し、それにpatch clamp法を適用することで、小胞体膜中のイオンチャネルの電流を記録する技術が確立されている。本申請では、その技術を用いて小胞体膜中に埋め込まれたCa²⁺依存性の電位依存性K⁺チャネル (maxiK/BK) が、小胞体で果たす生理的役割についての解析を行うものである。

nuclear envelopeを用いた研究の途上、マウス膵臓腺房細胞に存在するCa²⁺依存性の電位依存性K⁺チャネル (maxiK/BK) の、小胞体膜中における向き (配向) が、通常考えられているものと逆 (通常は細胞質中に細胞内領域を持つ向きに入っているが、我々の系では細胞質側に細胞外領域を向けている) であることを見出した (Maruyamaら、2003, 2005)。それまでの研究から、この標本から、リアノジンレセプターの電流が記録されること (Maruyamaら、2003)、形質膜では12週齢以降から記録されるmaxiK電流が、この標本では、8週齢前後から記録されることなど (Maruyamaら、2005)、この標本が小胞体膜であることを示すデータが得られていた。膜蛋白質の合成から、形質膜への膜蛋白質の輸送については非常に良く研究されており、全ての膜蛋白質は、同一の機構で輸送されている (小胞輸送) と考えられているので、我々が見出した現象は、今までの知見とは一致しない、非常に興味深いものであった。例外的とも言える小胞体膜中のmaxiKチャネルの配向には、生理的に何らかの意味があるものと考えられた。また一般に、形質膜に発現するイオンチャネルが、小胞体膜で何らかの役割を持つとは考えられておらず、今回の我々の知見は、一つのイオンチャネルが、細胞内の異なる部位で、異なる役割を担うという、新しい可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請においては、まず小胞体膜におけるmaxiKチャネルの配向が、現在までの知見とは逆になっているにも関わらず、形質膜には通常通りの向きで発現するメカニズムについて考察し、その後、maxiKチャネルが小胞

体膜で果たす生理的役割について、明らかにする。

まず、小胞体膜に逆向きの配向になるメカニズムについて、以下の二つの可能性について検討する。1) 全く新しい、膜輸送様式が存在する可能性。通常、小胞体膜の外側 (cytoplasm側) が細胞内であり、小胞体の内側 (lumen側) は、細胞外と同義であると考えられ、実際に、小胞体膜で合成され、形質膜に運ばれる膜蛋白質群は、lumen側に細胞外領域、cytoplasm側に細胞内領域を向けた状態で、ゴルジ体などを経て、形質膜へ輸送されていく。小胞体からゴルジ体への膜輸送においては、COPIIと呼ばれる蛋白質が、膜の出芽、融合に重要であることが示されており、この輸送メカニズムにおいては、膜の出芽、融合を繰り返す輸送の全過程において、脂質二重膜に対する膜蛋白質の配向は一定である事が知られている。また、膜蛋白質が合成され、小胞体膜に組み込まれる過程は一定であり、同じ種類の蛋白質は全て同じ向きに配置されると考えられてきた。我々が発見した現象は、これらの今までの知見では説明できないものである。我々は、maxiKチャネルが、今まで知られているものとは異なった方法で、形質膜に輸送されている可能性を検討する。

具体的には、(1) 再度、nuclear envelope中でのmaxiKチャネルの、膜対膜への輸送機構の検討のために、ゴルジ体などで免疫染色を行い、輸送段階を追って、膜に対する配向の変化を確認する。

次に、(2) 形質膜、小胞体膜それぞれで機能するmaxiKチャネルが、別種類のものである可能性。maxiKチャネルにはウサギにおいてrbslo2というスプライスバリエントが知られており (Gugginoら、2003)、この分子は、形質膜に発現することが出来ず、小胞体に留まる事が知られている。このスプライスバリエントの、小胞体膜での配向は知られていないが、マウスにおけるslo2類似のサブタイプが、小胞体に留まり、機能するmaxiKチャネルである可能性がある。膵臓腺房細胞では、形質膜にmaxiKチャネルが発現することが知られているため、同じ細胞内で、形質膜に発現するものと、小胞体膜に発現するものを使い分けている可能性がある。この可能性を検証するために、(2) -①ウェスタンブロー

ッティング法、RT-PCR 法などを用いて、膵臓腺房細胞に発現している maxiK チャンネルのサブタイプを同定する。(2) -②複数のスプライスバリエントが確認された場合、それぞれのスプライスバリエントに Green Fluorescent Protein (GFP) を融合させたキメラ蛋白質を作成し、その細胞内での局在を確認する。(2) -③小胞体に局在するスプライスバリエントについて、その小胞体膜での配向を、免疫染色法を用いて確認する。

次に (3) 小胞体に発現する maxiK チャンネルの生理的意義について検討する。まず、小胞体膜に対する配向が変わることにより、糖鎖の修飾などが変化している可能性があることから、小胞体膜上の maxiK チャンネルの電気生理学的性質 (電位依存性、カルシウム依存性、開確率、透過性、イオン選択性など) を詳細に検討する。次に、Iberiotoxin などの maxiK チャンネルのブロッカーペプチドを、膵臓腺房細胞由来の培養細胞 (266-6 cell) の細胞質中に強制発現させ、小胞体膜に発現する maxiK を特異的に阻害した細胞を作成し、小胞体の形態、容積、膜電位などに対する影響を検討する。

3. 研究の方法

まず我々が用いている、単離した nuclear envelope が、小胞体膜であることを再度確認した。小胞体膜に発現し、小胞体のマーカーとして用いられる、Calnexin に対する抗体を用いて、nuclear envelope で免疫染色を行い、小胞体膜であることを確認した。

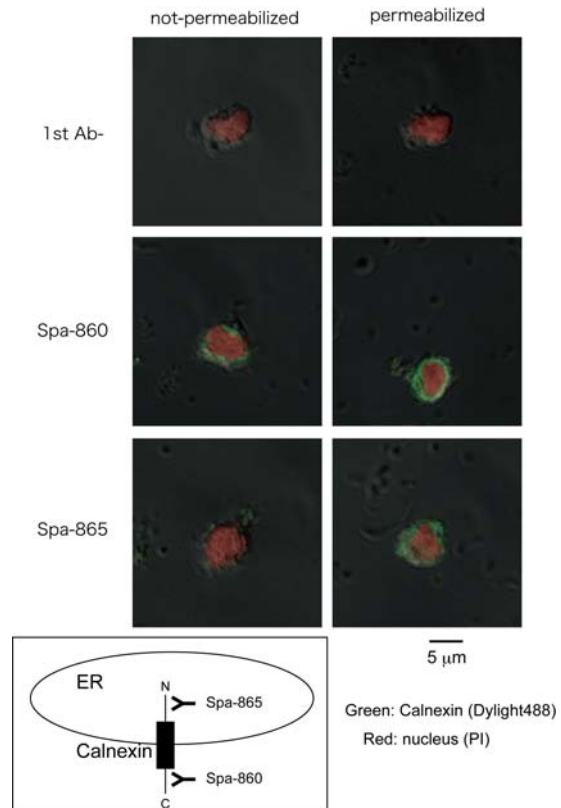
次に、maxiK の配向が、lumen 側に細胞内領域、細胞外領域を向けたものが混在する場合を考え、まず 2 種以上の maxiK が発現している可能性を検討した。膵臓腺房細胞において、スプライスバリエントの存在を、5' RACE 法、および RT-PCR 法により検証した。

その後、既にクローニングされている mslo 遺伝子に変異を導入し、膵臓外分泌細胞に発現する maxiK と同じ部分から翻訳が開始される変異体を作製し、HEK293 細胞に強制発現し、patch clamp 法により、電流測定を行った。

4. 研究成果

現在までに得られている電気生理学的実験による、maxiK チャンネルの配向を、組織学的手法により確認する実験を行った。小胞体膜に発現し、小胞体のマーカーとして用いられ

る、calnexin に対する抗体を用いて、nuclear envelope で免疫染色を行った結果、Calnexin タンパク質の C 末端領域を抗原とした抗体は、nuclear envelope 膜を permeabilize した場合、しない場合どちらでもシグナルが得られたが、N 末端領域を抗原とした抗体は、nuclear envelope 膜を permeabilize した場合のみ、シグナルが得られた。(下図)



Calnexin は、小胞体膜に存在し、N 末端領域を lumen 側、C 末端領域を cytosol 側に向けて存在しているため、このことから、我々が用いている nuclear envelope 標本における ER 膜が、intact な膜の配向を維持している事が確認された。

次に、通常と逆の配向を示す膵臓腺房細胞に発現する maxiK チャンネル遺伝子のクローニングを行うために、まず 5' RACE 法による、遺伝子の 5' 末端配列の同定と、RT-PCR による、3' 末端側配列の同定を行った。膵臓外分泌細胞と、顎下腺外分泌細胞から RNA 抽出を行い、それらを用いて 5' RACE および、RT-PCR を行った。その結果、5' RACE において、膵臓外分泌細胞に発現する maxiK 遺伝子は、顎下腺外分泌で発現するものよりも、5' 領域が短い事が示唆された。膵臓外分泌細胞

における maxiK チャネルは、一般的に知られる maxiK チャネルと比し、N 末端領域が極端に短く、maxiK チャネルに特徴的な S0 と呼ばれる膜貫通領域が存在しない事が示唆された。

この結果から、既にクローニングされている mslo 遺伝子に変異を導入し、膵臓外分泌細胞に発現する maxiK と同じ部分から翻訳が開始される変異体を作製し、HEK293 細胞に強制発現し、patch clamp 法により、電流測定を行った結果、この変異体は、野生型に比べて、形質膜への移動が極端に落ちているものの、明らかな電流発現が見られる事から、膜への移行能力は完全には失われていない事、および、野生型と同様の形質膜における配向を持っている事が示唆された。今後は、HEK293 細胞の nuclear envelope 膜の免疫染色により、この変異体の ER 膜における配向を確認する。また、RT-PCR の結果からは、少なくとも 2 種類の遺伝子の存在が示唆されている事から、今後はそれぞれのスプライスバリエントをクローニングし、それらがコードする maxiK タンパク質の、ER 膜、形質膜における配向を確認する予定である。

その後、小胞体に発現する maxiK チャネルの生理的意義について検討する。まず、小胞体膜に対する配向が変わることにより、糖鎖の修飾などが変化している可能性があることから、小胞体膜上の maxiK チャネルの電気生理学的性質（電位依存性、カルシウム依存性、開確率、透過性、イオン選択性など）を詳細に検討する。次に、Iberiotoxin などの maxiK チャネルのプロッカーペプチドを、膵臓腺房細胞由来の培養細胞 (266-6 cell) の細胞質中に強制発現させ、小胞体膜に発現する maxiK を特異的に阻害した細胞を作成し、小胞体の形態、容積、膜電位などに対する影響を検討する予定である。

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 1 件)

1. Ohsaga A., Murata Y., Kondo Y., Hira R., Maruyama Y.

Asymmetry of Rb⁺ conduction emerged under

bi-ionic conditions in epithelial Maxi-K⁺ channels

Journal of. Physiological Science 2008 年 58 巻、363-369 頁、査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. 丸山 芳夫、村田 喜理

A catalogue of nuclear membrane channels and their role in pancreatic acinar cells IUPS 第 36 回 国際生理学会、2009 年 7 月 30 日、京都

2. 大佐賀 敦、村田 喜理、平 理一郎、丸山 芳夫

K⁺-Rb⁺共イオン条件下での非対称性 Rb⁺電流コンダクタンス

東北生理談話会、2008 年 10 月 8 日、弘前大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 喜理 (MURATA YOSHIMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60455780

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：