

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11306

研究課題名（和文）筋小胞体と筋収縮

研究課題名（英文）Sarcoplasmic reticulum and contraction

研究代表者

西 美幸（Nishi, Miyuki）

京都大学・薬学研究科・研究員

研究者番号：60183894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：今回の実験は、TRICチャンネルが陽イオン、陰イオンの両方を透過する非選択的イオンチャンネルである可能性を示唆している。陰イオンと陽イオン両方の経路として機能する能力は、これまでのTRICは陽イオンを透過させるチャンネルという考えを発展させ、より多様な細胞タイプに適したより柔軟なカウンターイオン電流を提供するチャンネルであると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を反映して心機能に問題を抱える人は多く、心疾患は死因では第1位の悪性腫瘍について第2位である。心臓の収縮を制御するのはカルシウムの規則正しい循環であり、その役割の1つを担っているのが小胞体からカルシウムを放出するリアノジン受容体である。従って、リアノジン受容体の研究は広く心臓研究者、臨床医の関心の的である。今回のリアノジン受容体とTRICの関係は全く新しい知見であり、閉塞感のあったリアノジン受容体研究の新たな展望で、治療につながれば社会的意義も計り知れない。

研究成果の概要（英文）： Trimeric intracellular cation channels (TRIC-A and TRIC-B) are thought to provide counter-ion currents to enable charge-equilibration across the sarco/endoplasmic reticulum (SR) and nuclear membranes. We co-expressed TRIC-A or TRIC-B with RyR2 in HEK293 cells to examine if the presence of TRIC affects RyR2 function, and to characterise the permeability and gating properties of the TRIC channels. We found that both TRIC-A and TRIC-B altered the gating behaviour of RyR2 and its response to cytosolic Ca²⁺ but that TRIC-A exhibited a greater ability to stimulate the opening of RyR2. The reversal potentials of bilayers fused with high numbers of vesicles containing TRIC-A or TRIC-B, revealed both Cl⁻ and K⁺ fluxes suggesting that TRIC channels are relatively non-selective ion channels. Our results indicate that the physiological roles of TRIC-A and TRIC-B may include direct, complementary regulation of RyR2 gating in addition to provision of counter-ion currents of both cations and anions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：カルシウム 小胞体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TRIC チャンネルは、2007 年に我々が精製し命名した小胞体からのカルシウム放出を補助すると推察されるタンパク質である。チャンネルとしての性質は従来のチャンネルと構造に類似性が低く、さらに精製の難しさから進んでいない。従って、最近では detergent を使った精製をせず解析を行っている。この方法での解析を難しくしているのは、TRIC-A もしくは TRIC-B のみを高発現している組織がないか、あっても少量で実験に使う量が得られないことである。TRIC-A が興奮性細胞で発現し TRIC-B は広範にほとんどの組織で発現しているため、TRIC-A のみを発現している組織を得るためには TRIC-B ノックアウト(KO)マウスしかないが、TRIC-B KO マウスは新生致死であるため、約 100 匹のマウスから筋肉を取り出したが解析できる量は得られなかった。そこで今回 HEK 細胞に TRIC-A, TRIC-B を強制発現しチャンネル活性を検討した。

2. 研究の目的

TRIC-A, TRIC-B のチャンネル活性を比較検討する。今までに報告された TRIC チャンネル活性は、精製過程で損傷した不完全な活性を反映している可能性がある。TRIC-B の活性は成獣まで問題なく発育する TRIC-A KO マウスの筋肉を使用して報告したが、TRIC-B KO マウスは新生致死のため、組織が充分量得られず TRIC-A チャンネル解析は進んでいない。今回は培養細胞に TRIC-A, TRIC-B それぞれを発現させその性質を比較検討する。

3. 研究の方法

RyR2 を誘導的に発現する HEK293 細胞を Flp-In T-REx システムを用いて作製し、バキュロウイルス感染により TRIC-A または TRIC-B チャンネルを一過性に発現させた。RyR2 を発現する HEK293 細胞を 150 mm ディッシュで培養した。70~80% コンフルエント状態で、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ドキシサイクリンにより RyR2 の発現を開始した。誘導時に TRIC-A または TRIC-B のバキュロウイルス溶液を培地に添加した。(i) RyR2 のみの細胞、(ii) RyR2+TRIC-A 細胞、(iii) RyR2+TRIC-B 細胞、のそれぞれについて 150 mm ディッシュ 10 個を使用した。これらの細胞は誘導後 24 時間で収穫し、PBS で 2 回洗浄後、液体窒素中で急速冷凍し -80 で保存し、マイクロソーム膜小胞を調製した。

4. 研究成果

RyR2 のみを発現する HEK 細胞からの小胞によるチャンネル活性は、主に RyR2 チャンネルの発現と考えられたが、他の電流変動も観察された。これは、HEK 細胞に発現している内因性イオンチャンネルが存在するためで予想されたことである。RyR2 のみを発現させた HEK 細胞小胞を融合させた場合、76% で内因性と思われるチャンネルによる電流は観察されなかった。しかし、RyR2+TRIC-A 細胞では、RyR2 のみと思われる電流は 35% に過ぎず、RyR2+TRIC-B 細胞の場合は 11.5% に過ぎなかった。これらの違いは有意であり、RyR2+TRIC-A および RyR2+TRIC-B 細胞で観察された余剰な電流の多くが TRIC チャンネルによるものであることを示唆している。

電圧ランププロトコルを用いて、これらのバックグラウンド電流の E_{rev} 値を計測した。図 1 上は、RyR2 のみの場合で何が起こるかを示している。RyR2 チャンネルが二重膜に組み込まれ、他の電流がない場合、 E_{rev} は常に -32 mV 付近であった (黒いトレース)。これは、740 mM KCl サイトゾル : 210 mM KCl ルミナル溶液における K^+ の E_{rev} として計

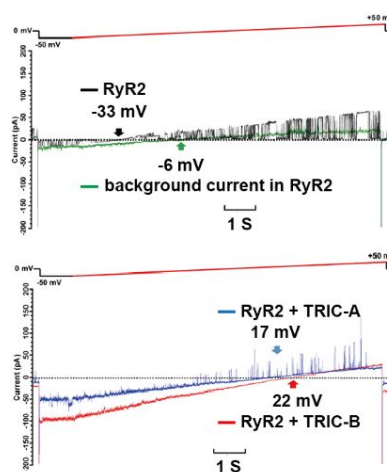


図 1 : 電圧ランプで誘起される電流に対する TRIC-A または TRIC-B と RyR2 の共発現の影響

算された値で、RyR2 は理想的にカチオンに選択的である。内因性チャネルの電流の E_{rev} は様々だが、通常 -32 mV より正の値であり、HEK 細胞には少なくとも Cl^- に対する透過性を示す内因性イオンチャネルが存在することがわかる。時には、RyR2 とバックグラウンド電流の両方が二重膜に取り込まれ、 -32 mV より正の E_{rev} 値が変化することがあった。

一方、RyR2+TRIC-A 細胞と RyR2+TRIC-B 細胞から得られた E_{rev} は、著しく異なっていた。図 1 下は、RyR2+TRIC-A 細胞と RyR2+TRIC-B 細胞でのランプ電流の典型的な例を、青矢印 (RyR2+TRIC-A) または赤矢印 (RyR2+TRIC-B) で示した。全体のバックグラウンド電流が大きく、RyR2 も取り込まれるため、 E_{rev} に大きなばらつきが生じせることに注意。しかし、最も重要な特徴は、RyR2+TRIC-A と RyR2+TRIC-B の両細胞の E_{rev} 値が、この条件での K^+ の計算 E_{rev} である -32 mV より正であることである。したがって、取り込まれた TRIC チャネルは、 K^+ と共に一部の Cl^- も通過させているはずである。

HEK 細胞でのこれらの結果は、小麦胚芽発現系を用いて得られたランプ電流と一致する (図 2)。この発現系がもたらした重要な利点は、タンパク質翻訳時にリポソームを添加することで detergent を一切使用せず TRIC-B を精製できたことである。これらのデータから、TRIC-B は使用する発現系に関わらず同様の E_{rev} を示し、主に Cl^- に対して透過性を持つことが確認された。

さらに、RyR2 チャネルが存在しない小麦胚芽由来の TRIC-B チャネルは、HEK 細胞で RyR2 とともに発現させた TRIC-B と非常に類似した透過特性を示し、TRIC チャネルの完全な機能発現に RyR2 の存在は必要ないことを示した。今回の実験は、TRIC チャネルがアニオンとカチオンの両方を透過する非選択的イオンチャネルである可能性を示唆している。この特性は今まで我々が主張していた TRIC チャネルが SR を横断するカウンターイオン電流の効率的な経路となるということを否定するものではない。何故なら、陰イオンと陽イオン両方の経路として機能する能力は、より多様な細胞タイプに適した、より柔軟なカウンターイオン電流を提供することが期待されるからである。

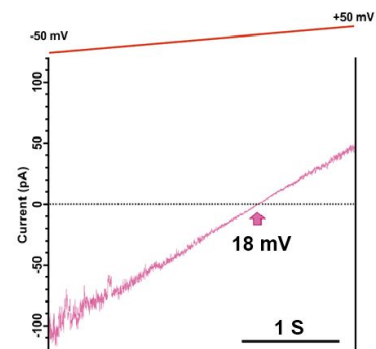


図 2：小麦胚芽発現系由来 TRIC-B を用いた電圧ランプで誘起される電流

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki Yuu, Ichimura Atsuhiko, Kitayama Ryo, Okamoto Naoki, Yasue Tomoki, Liu Feng, Kawabe Takaaki, Nagatomo Hiroki, Ueda Yohei, Yamauchi Ichiro, Hakata Takuro, Nakao Kazumasa, Kakizawa Sho, Nishi Miyuki, Mori Yasuo, Akiyama Haruhiko, Nakao Kazuwa, Takeshima Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca ²⁺ entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.71931	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 -

1. 著者名 Murakami Manabu, Toyama Yuichi, Yonekura Manabu, Ohba Takayoshi, Matsuzaki Yasushi, Sawamura Daisuke, Murakami Agnieszka M., Nishi Miyuki, Itagaki Shirou, Tomita Hirofumi, Takeshima Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Decreased cardiac pacemaking and attenuated α -adrenergic response in TRIC-A knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0244254	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 -

1. 著者名 Liu Feng, Xu Luxin, Nishi Miyuki, Ichimura Atsuhiko, Takeshima Hiroshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Enhanced Ca ²⁺ handling in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102381~102381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceca.2021.102381	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 大学院薬学研究科 生体分子認識学分野
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/index.html>
京都大学大学院薬学研究科生体分子認識学分野
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>

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