

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460296

研究課題名(和文) 脂質による受容体活性型チャネル制御とCaによるチューニング作用に関する研究

研究課題名(英文) Lipid regulation on receptor-operated ion channels and its tuning by Ca<sup>2+</sup>

研究代表者

森 誠之 (Masayuki, Mori)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80342640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：TRPC6の30箇所以上に変異体を作成し、イノシトールリン脂質PIP2作用点の探索を行った。その結果、PIP2の作用点について殆ど報告がないPre-S1ドメインの重要性を見出した。Pre-S1とPIP2の相互作用はイオンチャネルの活性、及びその活性化速度に関係することを明らかにした。またC末のTRPboxの下流領域が導入するとPIP2の減衰に対する応答の方向性(ポラリティー)の決定領域を発見した。この領域のプロリン残基は特に重要なポラリティースイッチとして働いていることを見出した。今後TRP分子のPIP2に対する制御の生理的意義を図るうえで、重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) has been recognized as a common regulator of TRP ion channels. However, the regulation diversification, the regulatory mechanism may not be identical because of complexity of its effective sites and functional outcome. By extensive mutational study to measure kinetics from open to close as an index of PIP2 association, we newly identified Pre-S1 segment as PIP2 dependent gating along with N-terminal PH like domain Ankyrin domain, TRP box and C-terminal PIPs sensing region. In addition, we also found a conserved polarity change elements which possess Proline residues near TRP box. These findings could lead to further study to understand fundamental mechanism of PIP2 regulation on ion channels and its physiological importance.

研究分野：生理学一般

キーワード：TRPチャネル PIP2 G蛋白質受容体 脂質 カルシウムシグナル 平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

受容体活性型  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  電流を形成する分子実態の一つとして、ショウジョウバエ TRP ホモログ TRPC チャンネル群が明らかとなってきた。特に、TRPC3/6/7 チャンネル群は平滑筋における受容体作動性分子実態として、いち早く発見されるなど (Inoue, 2001, *Cric. Res.*)、自律神経系の支配下に置かれるものとして代表的なイオンチャンネル群である。TRPC3/6/7 群の直接的アゴニストは、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を介したホスホリパーゼ C (PLC) の活性によりリン脂質の一種  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  から産生される、脂質性活性物質ジアシルグリセロール (DAG) であると考えられている。我々は、このスキームにおいて、DAG の基質である  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  が、単に基質として機能するだけでなく、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の枯渇・減少そのものが、独立的に TRPC3/6/7 群を抑制することを明らかにした (Imai et al., 2012 *J. Physiol.*)。この結果を踏まえ、TRPC3/6/7 チャンネル群における  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -PLC-DAG シグナルを介した自己制御機構の存在を提唱してきた (Imai et al., 2012, *J. Physiol.*, Itsuki et al., 2014, *J. Gen. Physiol.*)。しかし、この脂質による自己制御機構を支える分子基盤、自己制御機構の生理的機能との関連性については不明のままである。

## 2. 研究の目的

TRP チャンネル群における脂質作用部位を同定し、制御機構の分子基盤を明らかにする。これが生理的意義を探る上で重要な知見であると考えた。ヒトで多くの部位に発現の見られる、TRPC6 を題材に、アミノ酸残基に変異を導入し、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  作用部位の探索を行うことにした。一方、TRPC6 チャンネルはネフローゼ症候群の一つであり家族性巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) の原因遺伝子としての報告もなされている。TRPC6 の FSGS 変異体においても  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  作用との関連性についても検討した。 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  のイオンチャンネルに対する作用は一定 (static) ではなく、電流量や細胞内カルシウム濃度に応じ変化 (チューニング) する可能性を示すデータが得られている。そこで、カルシウム依存的なチューニング作用が存在するのか否か、詳細な検討を加える。

## 3. 研究の方法

電位依存的に一過的に  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  を分解する電位依存性酵素 VSP を用いる。細胞に TRPC6 と VSP を発現させ、脱分極刺激により VSP を活性化させる。重要なアミノ酸領域については、詳細な検討を行うため、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の FRET センサーを用いて、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  変化と電流を同時に測定した。 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の一過的效果による電流減衰、回復の速度論的解析 ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ )、 $K_d$  値の測定を行った。

## 4. 研究成果

30 以上のアミノ酸点変異による詳細な検討の結果、TRPC6 の N 末、アンキリンリピート、Pre-S1, TRPbox, CaM 結合部位など様々な領域が  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  相互作用に重要であることが明らかとなった。特に Pre-S1 領域の塩基性アミノ酸に変異を導入すると親和性は大きく減弱し、電流密度、膜輸送、Single-channel レベルでの開口確立の減少、活性化速度の遅延など、多岐に影響を及ぼした。興味深いことに  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の結合に関して  $k_{on}$  (結合速度) が遅い変異体は電流密度が増大する傾向にあり、 $k_{off}$  (解離速度) が早いものは電流密度の減少傾向を得た。これらの結果は他の TRP 分子でも明らかになっていない新たな知見であった。更に、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の枯渇に対し通常と異なる逆に活性化する領域が分子にも存在することを見出した。近年、この領域は他の TRP チャンネル群でも  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  制御のポラリティースイッチであることが報告されている (Ufret-Vincenty et al., 2015 *J. Gen. Physiol.*)。然しながら生理的意義については殆ど明らかでない。野生型 TRPC6 のポラリティーに関する検討を行った。最初にリン酸化酵素 PKA や PKC、JAK2 の影響を検討した。これらの酵素活性の上昇により、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の感受性は多少の変化は及ぼすが、ポラリティーが反転するほど大きな効果は得られなかった。一方、TRPC1~C7 サブタイプに共通して保存されている C 末領域のプロリン残基の影響について検討したところ、プロリン残基は重要なポラリティースイッチとして働いていることを見出した。今後  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  に対するポラリティーの生理的意義を図るうえで、重要な知見が得られた。また、FSGS 変異体についても検討を加えた。多くの変異体で  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  に対する感受性が変化していた。P112, M132T, S270T, L395, E896K, R895L といった FSGS 変異体では大きく変動していた。また、塩基性アミノ酸に変異を入れたときと同様、 $k_{off}$ 、 $k_{on}$  の上昇と電流密度の減少、増大の関係は保たれていた。特に  $k_{on}$  の上昇による電流密度の関係は、FSGS 病態発症機構の観点からも重要であると考えられる。FSGS 変異体は分子的に不安定で、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の結合に調和しにくいのが、ゲートそのものに大きな変動が生じていることが推測された。上記に加え細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  との関係性について検討を加えた。 $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の結合を促進する傾向が得られた。生理的状況で見られる早い不活性化は  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の解離では説明できないことが明らかとなった。事実、生理的状況において  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  と TRPC6 電流の同時測定を行ったところ、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  の減衰は必ずしも大きくない結果が得られ、我々が独自に開発したシュミレーションを行った結果とずれる傾向が得られた。生理

的狀況で觀察される早い TRPC6 の不活性化には PI(4,5)P<sub>2</sub> ではなく別の経路、Ca<sup>2+</sup> 依存性的な経路の重要性が浮上した。今後例えば、Ca<sup>2+</sup> Calmodulin による制御関しても研究を進める必要があると考えられた。

## 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8件)

1. Bridge between the channel and FRET of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sensor.

Mori MX. Channels (Austin). 2014;8(4):292-3.

2. New experimental trends for phosphoinositides research on ion transporter/channel regulation.

Mori MX, Inoue R.

J Pharmacol Sci. 2014;126(3):186-97.

3. TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P<sub>2</sub>.

Takahashi N, Hamada-Nakahara S, Itoh Y, Takemura K, Shimada A, Ueda Y, Kitamata M, Matsuoka R, Hanawa-Suetsugu K, Senju Y, Mori MX, Kiyonaka S, Kohda D, Kitao A, Mori Y, Suetsugu S.

Nat Commun. 2014 Sep 26;5:4994. doi: 10.1038/ncomms5994.

4. Dynamics of receptor-operated Ca<sup>2+</sup> currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P<sub>2</sub>-PLC signaling pathway. Mori MX, Itsuki K, Hase H, Sawamura S, Kurokawa T, Mori Y, Inoue R. Front Pharmacol. 2015 11;6:22.

5. Rab3 interacting molecule 3 mutations associated with autism alter regulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. Takada Y, Hirano M, Kiyonaka S, Ueda Y, Yamaguchi K, Nakahara K, Mori MX, Mori Y. Cell Calcium. 2015 Sep;58(3):296-306. doi: 10.1016/j.ceca.2015.06.007.

6. Screening of Transient Receptor Potential Canonical Channel Activators Identifies Novel Neurotrophic Piperazine Compounds. Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, Nishida M, Hu Y, Inoue R, Nagata R, Mori Y. Mol Pharmacol. 2016 Mar;89(3):348-63. doi: 10.1124/mol.115.102863.

7. Calmodulin and ATP support activity of the Cav1.2 channel through dynamic interactions with the channel. Minobe E, Mori MX, Kameyama M. J Physiol. 2017 15;595(8):2465-2477. doi: .1113/JP273736.

Epub 2017 Mar 13.

8. C-terminal splice variants of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel CaV2.1  $\alpha$ 1 subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins. Hirano M, Takada Y, Wong CF, Yamaguchi K, Kotani H, Kurokawa T, Mori MX, Snutch TP, Ronjat M, Waard M, Mori Y. J Biol Chem. 2017 Apr 4. pii: jbc.M117.778829.

[学会発表](計10件)

1. 森誠之 Gq 共役型受容体の活性化に伴うPIP<sub>2</sub>の変動がTRPC電流に及ぼす影響について 日本生化学会年会 2014年10月15日~2014年10月18日 京都府、京都市

2. 森誠之 Receptor-operated Ca<sup>2+</sup> currents of TRPC channels and phosphoinositides regulation. 生理研国際シンポジウム Cutting-edge approaches towards the functioning mechanisms of membrane proteins 2014年11月25日~2014年11月28日 愛知県、岡崎市

3. 森誠之 Ca<sup>2+</sup>, Calmodulin-mediated regulation in receptor-operated cation currents of TRPC6 channels 日本生理学会 2015年03月21日~2015年03月23日 兵庫県、神戸市

4. 森誠之 Ca<sup>2+</sup>- and Calmodulin regulation in receptor-operated cation currents of TRPC6 channels 北米生物物理学会 2015年02月07日~2015年02月11日 アメリカ、メリーランド州、ボルチモア

5. 宇野雅俊 森誠之 齊郷平 長谷英治 丸山晃和 今村香代 朽尾豪人, 森泰生 Functional role of Calmodulin and structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization on TRPC6 channels 日本生化学会年会 2015年12月02日 神戸

6. Hideharu Hase, Masayuki X. Mori, Kyohei Itsuki, Yasuo Mori KINETICAL ANALYSIS OF PI(4,5)P<sub>2</sub>-DEPENDENT GATING DOMAIN OF TRPC6 CHANNELS 北米生物物理学会 2016年02月29日 ロサンゼルス、米国

7. 長谷英治、森誠之、丸山晃和、齊郷平、森泰生 Critical PI(4,5)P<sub>2</sub>-gating residues in DAG-activated TRPC channels 日本生理学会 2016年03月23日 札幌

8. Masatoshi Uno, Masayuki X Mori, Kyouhei Ituki, Hideharu Hase, Terukazu

Maruyama ,Kayo Imamura , Mariko Ariyoshi,  
Masahiro Shirakawa, Hidehito Tochio , Yasuo  
Mori

Functional role of Calmodulin and structural  
basis for Ca<sup>2+</sup> -dependent desensitization on  
TRPC6 channels 第 27 回生体系磁気共鳴  
国際会議 ( 国際学会 ) 2016 8 月 21-8 月  
26 日 京都

9. Masatoshi Uno , Masayuki X Mori ,  
Kyouhei Ituki , Hideharu Hase ,Terukazu  
Maruyama ,Kayo Imamura , Mariko Ariyoshi,  
Masahiro Shirakawa, Hidehito Tochio , Yasuo  
Mori Functional role of Calmodulin and  
structural basis for Ca<sup>2+</sup> -dependent  
desensitization on TRPC6 分子生物学年会  
2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 02 日 横  
浜

10. Onur Polat, Masatoshi Uno , Maruyama  
Terukazu, Masayuki X Mori, Kayo Imamura ,  
Mariko Ariyoshi, Masahiro Shirakawa,  
Hidehito Tochio , Yasuo Mori Ca<sup>2+</sup>  
buffering alters lobe specificity of CaM  
regulation on TRPC6 channels 日本生理学  
年会 浜松 2017 年 03 月 28 日 ~ 2017 年 03  
月 30 日 浜松

〔 図書 〕 ( 計 件 )

〔 産業財産権 〕

○ 出願状況 ( 計 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○ 取得状況 ( 計 件 )

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森誠之 ( Masayuki, Mori )

京都大学 工学研究科・准教授

研究者番号 : 80342640

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

井上隆二 ( Inoue, Ryuji )

福岡大学 医学部・教授

研究者番号 : 30232573

森泰生 ( Mori, Yasuo )

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号 : 80212265

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )