

受賞者

竹島 浩

京都大学大学院薬研究科生体分子認識学分野

研究テーマ

TRICチャンネルの構造と機能に関する研究

1. はじめに

Ca^{2+} は細胞内セカンドメッセンジャーとして、神経伝達物質やホルモン放出、筋収縮、増殖や細胞死など多彩な細胞機能に関与する。細胞内 Ca^{2+} 上昇は小胞体 Ca^{2+} 放出と細胞外からの Ca^{2+} 流入により構成され、前者の Ca^{2+} 放出はリアノジン受容体(RyR)と IP_3 受容体(IP_3R)が仲介することが知られている。小胞体内 Ca^{2+} 濃度は細胞質よりも約 10^4 倍高く、RyR/ IP_3R による Ca^{2+} 放出ではこの圧倒的な濃度勾配が駆動力となる。一方で、正荷電している Ca^{2+} の小胞体からの流出はその内腔に負電荷を与えるため、 Ca^{2+} の効率的な放出にはカウンターイオンの移動による電気的な中和が必要だと推測される。また、小胞体膜において K^+ や Cl^- を透過するイオンチャンネルは電気生理学的に観察されているが、現在のところ、遺伝子/分子同定やカウンターイオンチャンネルとしての活性の検討などには至っていない。

当研究室において、筋小胞体のRyRによる Ca^{2+} 放出と同調するカウンターイオンチャンネルであるTRIC (Trimeric intracellular cation) チャンネルが最近発見された。TRICチャンネルにはA型とB型の2種類のサブタイプがあり、TRIC-Bは組織普遍的に発現しているのに対して、TRIC-Aは脳や心臓、骨格筋などの興奮性組織で高発現している。TRICチャンネルは、約300アミノ酸により構成される3回膜貫通構造の単量体が、ホモ3量体を形成することにより構成される。また、人工脂質二重膜における電気生理学的実験で、TRIC-Aチャンネルは1価陽イオン選択的な新規小胞体チャンネルであることが判明した。さらに、TRIC-A及びBの同時欠損 (TRIC-DKO) マウスを作製したところ、受精後9.5日程で心停止することが明らかになった。TRIC-DKO胎児心筋細胞では、過剰な Ca^{2+} 蓄積のために小胞体が膨張しており、 Ca^{2+} イメージングにより自発拍動に対応する細胞内 Ca^{2+} 振幅が減弱していることが観察された。これはTRIC完全欠損により、RyRが仲介する生理的 Ca^{2+} 放出が障害されたものと考えられた。この推論は、TRIC-A(-/-)B(+/-)マウスの骨格筋における実験結果からも支持され、TRICチャンネルはRyRからの Ca^{2+} 放出に同期して 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機能していることが強く示唆されている

(Yazawa et al., *Nature*, 2007、図1)。

TRIC-A 単独欠損マウスでは異常が認められず、TRIC-B 単独欠損マウスは新生致死となる。本研究では、TRIC-B 欠損マウスの解析によるその生理機能の解明を目指した。

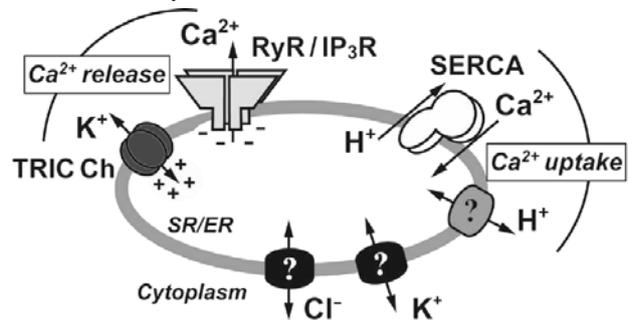


図1 小胞体における TRIC チャンネル

2. 方法

作製されたTRIC-B欠損マウスにて、電子顕微鏡観察などの解剖学的解析、蛍光 Ca^{2+} イメージングなどの細胞生理学的解析を遂行した。

3. 結果

新生児マウスを肉眼観察すると、野生型マウスは血色良好であるが、TRIC-B欠損マウスは血色不良であり、明らかなチアノーゼ症状を認めた。血液成分の分析では、TRIC-B欠損マウスにおいて顕著なO₂分圧の低下とCO₂分圧の上昇が認められ、pHが酸性に傾き呼吸性アシドーシス様症状も確認された。また、TRIC-B欠損マウスでは、肺重量は野生型マウスと同等にもかかわらず、肺体積は明らかに小さく、肺断面の組織観察から肺胞形成不全が示唆された。野生型マウスでは胎生17.5日より肺胞が形態的に成熟するのに対して、TRIC-B欠損マウスでは出生後においても成熟型の肺胞形成は認められない。さらに、II型肺胞上皮細胞の分化障害で報告されている顕著なグリコーゲン貯留も、TRIC-B欠損新生児肺において観察された。TRIC-B欠損II型肺胞上皮細胞は、野生型に比べてラメラ体（サーファクタントリン脂質の集合体）の形成が減弱しており、未成熟状態であることも示唆された。一方、II型肺胞上皮細胞のCa²⁺イメージングでは、TRIC-B欠損II型肺胞上皮細胞においてATP刺激によるCa²⁺濃度上昇の減弱と小胞体Ca²⁺貯蔵量の増加が観察された。この結果は、TRIC-B欠損によりIP₃受容体からのCa²⁺放出が障害され、小胞体にCa²⁺が過剰に蓄積したためと考えられた。

以上の結果は、TRIC-B欠損マウスのII型肺胞上皮細胞において、IP₃受容体からのCa²⁺放出の減弱、グリコーゲン分解の抑制、ラメラ体産生や形態面での肺胞上皮分化の障害などの異常が生じていることを示す。従って、TRIC-B欠損マウスの新生致死の原因は、小胞体からのCa²⁺放出障害に端を発する肺胞上皮の分化障害による肺胞形成不全であると結論された（論文投稿準備中）。

4. 考察

上述のように呼吸不全により新生期致死を示すTRIC-B欠損マウスには、副腎におけるミトコンドリアの膨張も観察された。呼吸不全による新生致死に至らなければ、副腎からのホルモン分泌の異常も生じる可能性は高い。TRIC-Bは普遍的に発現しているため、全身の非興奮性細胞においてはIP₃RによるCa²⁺放出と同調するカウンターイオンチャネルとして機能していることが想定される。この推論を検討するために、ほぼ正常に生育するTRIC-A(-/-) B(+/-)マウスの組織における生理学的な研究を計画している。

一方、構造的にも新規なファミリーとなるTRICチャネルでは、三量体形成、イオン透過性やチャネル開閉を制御する部位の特定も注目される。TRICチャネルの構造-機能相関に関する研究も今後の重要課題として残されている。

5. 発表論文

- 1) Stewart, R., Song, L., Carter, S. M., Sigalas, C., Zaccai, 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.
- 2) Weisleder, N., Takeshima, H. & Ma, J. Immuno-proteomic approach to excitation- contraction coupling in skeletal and cardiac muscle: molecular insights revealed by the mitsugumins. *Cell Calcium* **43**, 1-8, 2008.
- 3) Kakizawa, S., Moriguchi, S., Ikeda, A., Iino, M. & Takeshima, H. Functional crosstalk between cell-surface and intracellular channels mediated by junctophilins essential for neuronal functions. *Cerebellum* **7**, 385-391, 2008.
- 4) Huddleston, T., Tang, W., Takeshima, H., Hamilton, S. L. & Klann, E. Superoxide- induced Potentiation in the Hippocampus Requires Activation of Ryanodine Receptor Type 3 and ERK. *J. Neurophys.* **99**, 1565-1571, 2008.

- 5) Stewart, R., Song, L., Carter, S. M., Sigalas, C., Zaccai, 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.
- 6) 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 Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature Med.* **14**, 738-747, 2008.
- 7) Li, X. Q., Zheng, Y. M., Rathore, R., Ma, J., Takeshima, H. & Wang, Y. X. Genetic evidence for functional role of ryanodine receptor 1 in pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* in press.
- 8) Yamazaki, D., Yamazaki, T. & Takeshima, H. New molecular components supporting ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release: roles of junctophilin and TRIC channel in embryonic cardiomyocytes. *Pharmacol. Ther.* in press.
- 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. Mitsugumin 53 nucleates assembly of membrane repair in muscle cells. *Nature Cell Biol.* in press.