

TRIC-A チャンネルの循環器機能異常に関する研究

京都大学 学際融合教育研究推進センター
生理化学研究ユニット
山崎 大樹

1. はじめに

細胞内小器官の1つである小胞体には、タンパク質・脂質合成や Ca^{2+} 貯蔵・放出といった機能が備わっており、中でも各種刺激に応じた Ca^{2+} 放出は筋収縮や神経伝達物質放出、細胞増殖・細胞死など様々な細胞機能を制御している。小胞体膜上にはリアノジン受容体 (RyR) 及びイノシトール三リン酸受容体 (IP_3R) の2つの Ca^{2+} 放出チャンネルが存在する^{1,2)}。これらを介して細胞質中へ Ca^{2+} が放出されると、小胞体内腔に負電荷が発生する。負電荷の存在は Ca^{2+} 放出の妨げとなるため、効率的な Ca^{2+} 放出が障害されることが予想される³⁻⁵⁾。この負電荷を中和するための機構としてカウンターイオンチャンネルの存在が示唆されていたが、長い間その分子実体は不明であった。

我々は、2007年にカウンターイオンチャンネル機能の一翼を担う分子として **Trimeric intracellular cation (TRIC)** チャンネルを同定した^{6,7)}。TRIC チャンネルはA及びBの2つのサブタイプから構成され、TRIC-Aは脳や心臓、骨格筋などの興奮性組織に高発現しているのに対してTRIC-Bは組織普遍的な発現パターンを示す。我々は、これまでに遺伝子欠損マウスを用いた機能解析を行ってきた。TRIC-A及びBの両サブタイプ欠損マウスは、心筋細胞内の小胞体 Ca^{2+} オーバーロードにより心不全となって胎生9.5日程度で死亡する⁶⁾。TRIC-B欠損マウスはII型肺胞上皮細胞におけるサーファクタント合成・分泌障害により肺胞形成不全を生じ、呼吸困難により新生致死となる⁸⁾。一方で、TRIC-A欠損マウスは正常に成育・繁殖するが、骨格筋ではRyRを介した一過性かつ局所的な Ca^{2+} 放出である Ca^{2+} スパーク頻度の減少を発端とした小胞体 Ca^{2+} オーバーロードにより alternan 収縮を誘発する⁹⁾。またTRIC-Aは平滑筋において血圧調節に関わっており、RyRを介する Ca^{2+} スパーク頻度を調節することで過分極シグナルによる血管緊張を制御する¹⁰⁾。

上述のように骨格筋及び平滑筋におけるTRIC-Aの機能的役割は最近明らかとなったが、心筋についてはTRIC-Aのみの機能に着目した解析はなされていない。そこで我々はTRIC-A欠損マウスを用いて心臓におけるTRIC-A生理的役割の解明を試みた。

2. 方法

心電図測定 麻酔下のマウスに対して、電極を当て心電図を記録した。また、80 mg/kgの β 受容体刺激薬であるイソプロテレノール (Iso) を尾静脈から注射し、投与後の心電図を計測した。**心筋細胞単離** 野生型マウスあるいはTRIC-A欠損マウスより心臓をすばやく摘出し、ランゲンドルフ灌流法により単一心筋細胞を得た。**活動電位測定** 単離心筋細胞にナスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、活動電位の測定を行った。 **Ca^{2+} イメージング解析** 単離心筋細胞に5 μM Indo-1 AMを5分間負荷した。過剰な色素を洗浄後、 Ca^{2+} イメージング装置にて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。**ウェスタンブロッティング及び定量的PCR** マウスから心臓を摘出し、一部をタンパク抽出用にホモジナイズし、遠心分離により膜画分を得た後、タンパクを泳動・トランスファー・1次抗体反応を行った。VDCC β 2についてはPhos-tagを含んだゲルで泳動することによりリン酸化タンパクの検出

を行った。その後、適切な2次抗体を用いて、ECLにより検出した。また心臓の一部は Isogen により mRNA を抽出し、逆転写後に各種プライマーにて定量的 PCR を行った。

3. 結果

1. TRIC-A 欠損マウスは Iso 負荷によって不整脈様イベントを頻発する

TRIC-A 欠損マウスの個体レベルにおける心臓機能を検討するため、麻酔下での心電図測定を行った。無刺激条件下では特に顕著な異常は現れなかったが、尾静脈から Iso を投与したところ、WT では心電図に変化がなかったが、TRIC-A 欠損マウスでは不整脈様のイベントが頻発した。従って、TRIC-A 欠損マウスは強力な β 受容体刺激によって不整脈を引き起こし得る、つまり TRIC-A が不整脈基質となり得ることが示唆された。*in situ hybridization* により TRIC-A が左心室及び心室中隔に豊富に発現していたことから、不整脈の発生原因はペースメーカー細胞ではなく心室筋にあることが示唆された。

2. 単離心筋細胞における活動電位と Ca^{2+} イメージング

次に TRIC-A 欠損マウスにおける Iso 誘発性不整脈発生機序の解明のため、単一心筋細胞による検討を行った。各ジェノタイプのマウスより心筋細胞を単離し、ナスタチン穿孔パッチクランプ法により活動電位を、 Ca^{2+} 蛍光測光法により細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行った。活動電位のパラメーターである静止膜電位、action potential duration (APD) 30, 50, 90 には、野生型心筋細胞と TRIC-A 欠損心筋細胞の間で顕著な差はなかった。しかしながら Ca^{2+} イメージングにおいては、3つの顕著な異常が観察された。すなわち、①定常状態 Ca^{2+} 濃度の上昇、② Ca^{2+} トランジェントの振幅増大及び③ Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮である。Iso の適用により、定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルは TRIC-A 欠損心筋細胞においてさらに上昇し、野生型心筋細胞との差が広がったが、 Ca^{2+} トランジェントの振幅増大及び Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮については Iso により同程度変化した。従って、 Ca^{2+} トランジェントに関わる RyR からの Ca^{2+} 放出及びそれを取り込む小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA)、ホスホランパン (PLB) の機能は Iso 負荷によって TRIC-A 欠損心筋細胞のみで変化するものではなく、定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルについては TRIC-A 欠損心筋細胞特異的に Iso による感受性が上昇しているものと予想される。

3. Ca^{2+} ハンドリング分子のタンパク発現量及びリン酸化

Ca^{2+} イメージングにより①定常状態 Ca^{2+} 濃度の上昇、② Ca^{2+} トランジェントの振幅増大及び③ Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮という3つの異常が観察されたため、これらに関わる Ca^{2+} ハンドリング分子を含めたタンパク質の発現量及びリン酸化をウェスタンブロットにより検討した。 Ca^{2+} トランジェント振幅には RyR2 が、減衰には SERCA 及び PLB の関与が知られている¹¹⁾。RyR2 は PKA あるいは CaMKII の活性化によりそれぞれ S2808、S2814 がリン酸化される。また PLB は SERCA と相互作用しており、SERCA の取込み活性を抑制している。PLB は PKA あるいは CaMKII により S16、T17 がリン酸化されることにより SERCA から解離し、SERCA 活性が上昇する。これらのリン酸化検出抗体及び総タンパク検出抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、RyR2 及び PLB の発現量は野生型心筋と TRIC-A 欠損心筋で差がなかったものの、RyR2 S2808 及び PLB S16 のリン酸化が TRIC-A 欠損心筋において亢進していた。従って、TRIC-A 欠損心筋細胞における Ca^{2+} トランジェントの振幅増大及び減衰時間の短縮は RyR2 及び PLB のリン酸化亢進によるものと推測される。さらには定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルには電位依存性 Ca^{2+} チャネルである Cav1.2 及び β サブユニットである VDCC β 2 が関与することが報告されており¹²⁾、これら分子の発現量を検討したが野

生型と TRIC-A 欠損心筋で顕著な差はなかった。しかしながら RyR2 及び PLB と同様にリン酸化亢進の可能性が考えられたため、Phos-tag を用いたリン酸化の検出を試みた。この方法は、SDS-PAGE のゲル中に Zn^{2+} の配位可能な Phos-tag を含有させることでリン酸化タンパクが Phos-tag に結合しながら泳動されるため、非リン酸化タンパクとの分離が可能となる。Phos-tag によって分離された VDCC β 2 リン酸化タンパクは TRIC-A 欠損心筋において野生型よりも増加しており、これが定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇の原因である可能性が考えられた。

以上より、TRIC-A 欠損心筋細胞における定常状態 Ca^{2+} 濃度の上昇、 Ca^{2+} トランジェントの振幅増大及び Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮という 3 つの異常は、それぞれ VDCC β 2、RyR2 及び PLB のリン酸化亢進によるものであると示唆された。NCX や SERCA、IP $_3$ R などその他の Ca^{2+} ハンドリング分子のタンパク発現量については野生型と TRIC-A 欠損心筋で差がなかった。

4. 結論

TRIC-A 欠損マウスへの高濃度 Iso 投与は不整脈を容易に発生させる。この原因として心筋細胞における 3 つの Ca^{2+} ハンドリング異常（定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇、 Ca^{2+} トランジェント振幅の増大、 Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮）が挙げられる。3 つの異常のうち、定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇のみが Iso 投与により TRIC-A 欠損心筋細胞において感受性を増した。従って、不整脈様イベントの発生原因は定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇が最も有力である。3 つの異常とも Ca^{2+} ハンドリング分子のリン酸化が関与していることが示唆されており、それぞれ定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇には VDCC β 2、 Ca^{2+} トランジェント振幅の増大は RyR2、 Ca^{2+} トランジェント減衰時間の短縮は PLB が関与する。それぞれのリン酸化が亢進していることは明らかとなったが、リン酸化亢進のメカニズムの解明には至らなかった。また、Iso 投与による不整脈の発生と心筋細胞における定常状態 Ca^{2+} 濃度レベルの上昇を直接結びつけるような直接的な証拠はないため今後の進展が期待される。

5. 参考文献

- 1) Meissner G. (1994) *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 485–508.
- 2) Bezprozvanny I and Ehrlich BE. (1995) *J. Membr. Biol.* **145**, 205–216.
- 3) Coronado R and Miller C. (1980) *Nature* **288**, 495–497.
- 4) Somlyo AV et al., (1981) *J. Cell Biol.* **90**, 577–594.
- 5) Meissner G. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* **55**, 65–82.
- 6) Yazawa M et al., (2007) *Nature* **448**, 78–82.
- 7) Yamazaki D et al., (2009) *Pharmacol. Ther.* **121**, 265–272.
- 8) Yamazaki D et al., (2009) *Development* **136**, 2355–2361.
- 9) Zhao X et al., (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 37370–37376.
- 10) Yamazaki D et al., (2011) *Cell Metab.* **14**, 231–241.
- 11) Bers, DM. (2002) *Nature*, **415**, 198–205.
- 12) Koval OM et al., (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4996–5000.