

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな(ローマ字)		TAKESHIMA HIROSHI					
①研究代表者氏名		竹島 浩		②所属研究機関・部局・職 東北大学・大学院医学系研究科・教授			
③研究課題名	和文	カルシウムストアの分子構築に関する研究					
	英文	A study on the molecular basis of intracellular Ca ²⁺ stores					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		36,200	12,800	12,800	12,800	12,800	87,400
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名		所属研究機関・部局・職		現在の専門		役割分担（研究実施計画に対する分担事項）	
竹島 浩		東北大学・大学院医学系研究科・教授		生化学		研究の立案と統括、変異マウスの作製と解析実験の遂行 タンパク化学実験の遂行	
久米 秀明		東北大学・大学院医学系研究科・助手		生化学			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>細胞質の Ca²⁺濃度の上昇は生理的反応のスイッチとなっており、その制御は神経伝達物質やホルモンの放出、筋細胞の収縮、細胞増殖や細胞死など多彩な細胞機能に及んでいる。興奮性細胞における生理反応では、例外なく電氣的シグナルが細胞内 Ca²⁺シグナルへ変換され、通常の場合には表層膜上の電位依存性 Ca²⁺チャネルと細胞内ストア膜上の放出 Ca²⁺チャネル(リアノジン受容体)の機能共役による活性化が普遍的に観察される。我々のグループでは、興奮性細胞の脱分極-細胞内 Ca²⁺シグナル変換、小胞体 Ca²⁺放出機構や Ca²⁺ストアとしての機能を包括的に理解するため、それらの分子的基盤を整備することを目的とした研究を遂行している。近年の代表的な成果としては、リアノジン受容体サブタイプの生理機能を明らかにしたことに加え、細胞膜と小胞体を架橋するタンパク質であるジャンクトフィリンの分子同定と生理機能の解明などがある。これらの成果に立脚して本基盤研究(S)においては、(i)興奮性細胞におけるリアノジン受容体の活性調節の分子機構の解明と、(ii)ジャンクトフィリンの中枢神経系における生理機能の解明、(iii)Ca²⁺ストア機能に關与する小胞体のタンパク質の新規同定とその機能解析を目的とした研究を遂行している。細胞内 Ca²⁺シグナルや小胞体 Ca²⁺ストア機能の異常は様々な病態を引き起こすと考えられており、リアノジン受容体やジャンクトフィリンの遺伝子変異は心臓疾患や神経疾患などヒト遺伝病の原因であることも解明されている。本研究にて、単に興奮性細胞の Ca²⁺シグナリングの分子基盤に関する基礎生物学的貢献にとどまらず、病態解明や新たな創薬標的の同定に向けた医学・薬学領域の応用研究への貢献となる成果も期待される。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

上記の研究目的に則して以下の研究を平成 15-16 年度に遂行した。

(i)リアノジン受容体の活性調節の分子機構の解明:骨格筋細胞では1型リアノジン受容体(RyR1)は三つ組構造(細胞表層膜と小胞体膜が近接した結合膜構造)に局在しており、収縮反応を引き起こす Ca^{2+} 放出を担当している。一方、我々が数年前に見い出したミツグミン 29(MG29)と命名した分子は三つ組構造の細胞表層膜側に局在する膜タンパク質である。MG29 欠損マウスの骨格筋では興奮収縮連関の効率低下が観察されており、RyR の機能低下が推定されていた。培養細胞系における RyR1 と MG29 の共発現は、RyR1 の持続的活性化による小胞体 Ca^{2+} 含量の低下のため、細胞死を引き起こすことを見い出した。RyR1 の単独発現ではそのような現象は観察されず、人工脂質二重膜での RyR1 チャンネルは MG29 添加により活性化される。これらの結果は、骨格筋における MG29 による RyR1 活性化を示唆する(文献 10)。一方、骨格筋では大量に存在する RyR1 に加えて、少量の3型受容体(RyR3)も共存している。RyR1 欠損では興奮収縮連関が欠失し致死性を伴うのに対し、RyR3 欠損では骨格筋の顕著な収縮異常は認められない。しかしながら、RyR3 欠損筋においては浸透圧変化に対応して発生する Ca^{2+} スパーク(RyR チャンネルのクラスターが局所的な Ca^{2+} 放出をする現象を共焦点顕微鏡でとらえたもの)の頻度が顕著に上昇していることが最近明らかになった。従って、骨格筋においては、RyR3 共存により RyR1 の活性が抑制されていることが推定される(論文投稿中)。

(ii)ジャンクトフィリンの生理機能の解明:以前の研究において、3種のジャンクトフィリンサブタイプ(JP1,JP2,JP3)の存在が明らかになっており、中枢系ではJP3が特異的に発現していることが観察されていた。しかしながら、JP1 と JP2 の欠損マウスは致死性を示すのに対して、JP3 欠損マウスでは顕著な異常は観察されない。このノックアウトマウスの結果から新たな JP サブタイプの存在を予想して、中枢系に特異的に発現する JP4 を見い出した。分布解析からは JP3 と JP4 は神経細胞特異的に極めて類似した発現パターンを呈しており、それらの mRNA は細胞体のみならず樹状突起での分布も観察された。この事実は JP3 と JP4 の mRNAs が樹状突起方向へ選択的に輸送される機構が存在することを示唆しており、電子顕微鏡にて細胞体と樹状突起にて結合膜構造が観察されることの原因となっている可能性が高いと考察された(文献 6)。現在、JP4 欠損マウスと JP3,JP4 同時欠損マウスの作製に成功し、離乳時期に致死性を示す JP3,JP4 同時欠損マウスの解析を進めており、下肢反射の異常、運動協調性の低下など興味深い表現型が明らかになりつつある(未発表データ)。JP3 遺伝子変異はハンチントン舞蹈病と類似のヒト遺伝子疾患(HDL2)を引き起こすことも知られており、これらモデルマウスを用いて中枢系での JP 生理機能の解明に迫るため現在精力的に解析を遂行している。一方、骨格筋における JP1 と JP2 の共発現と三つ組形成の関連を明らかにするため、本来 JP2 のみを発現する心筋細胞で JP1 を人工的に発現される TG マウスの作製も遂行した(文献 3)。単に両者の共発現のみでは心筋細胞内で三つ組構造は観察されず、三つ組構築には骨格筋特異的な細胞機能が必須であると考えられた。病態心筋モデルマウスにて JP2 発現を検討した結果 mRNA とタンパク質レベルともに低下していることが明らかになり、心筋症や心不全では細胞表層膜の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルとリアノジン受容体の機能的共役が低下していることが示唆された(文献 1 3)。さらに、siRNA のマウス骨格筋への適用による JP knockdown 実験も行い、結合膜構造は骨格筋興奮収縮連関の Ca^{2+} シグナルに加えて、ストア容量依存性 Ca^{2+} 流入にも重要であることが示されている(論文投稿中)。

(iii)小胞体のタンパク質の新規同定と機能解析:我々は骨格筋膜タンパク質に対する単クローン抗体の作製と蛍光抗体染色による観察を組み合わせることにより、新規小胞体分子の検索を遂行している。その検索の中から、MG33 と MG53 とを最近見い出している。解明された一次構造から MG33 は膜貫通セグメントを複数有した筋小胞体膜内在性分子であり、架橋剤による実験では MG33 はホモオリゴマーとして存在することが示唆された。この実験事実から大胆ではあるが MG33 が小胞体上でチャンネルとして機能している可能性を考慮し、その検証を模索する実験を遂行中である。一方、骨格筋と心筋細胞に特異的な MG53 は膜貫通や脂質修飾に関するアミノ酸配列がないものの、各種の検討にて細胞表層膜またはその直下に存在する細胞内小胞に分布する分子と結論される。MG53 欠損マウスでは心電図測定により心臓機能異常が認められ、電気生理学解析で心筋細胞での K^{+} 電流の低下が明らかになっている。特殊条件ではあるが MG53 がユビキチン E3 リガーゼとして機能する可能性を示唆する結果も得られ、変異マウスの機能異常と MG53 の分子機能の関連を現在検討している。さらに、心筋と骨格筋の小胞体内腔タンパク質であるサルカルメニン(SAR)の生理機能の解明のため、SAR 欠損マウスの作製と解析を遂行した。SAR は筋小胞体の Ca^{2+} 緩衝能に貢献するとともに、 Ca^{2+} ポンプの安定性にも寄与していることが明らかになった。その欠損マウスにおいては、心エコーや心カテーテルにより心機能の低下や、張力測定において骨格筋の弛緩期延長が観察された(文献 16)。一方、SAR 骨格筋に持続的な電気刺激を与えて検討をしたところ、収縮疲労に対して野生型と比較して高い抵抗性を示した。この事実は収縮疲労と小胞体 Ca^{2+} 含量を関連付けるものとして注目される(論文投稿中)。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

本研究は特定の小胞体膜タンパク質に着目し、遺伝子欠損マウスの解析や遺伝子機能発現実験から生物現象へアクセスする典型的なボトムアップ型の研究手法を用いている。研究経過の欄にて解説したジャンクトフィリン、ミツグミン29、ミツグミン33、ミツグミン53等は我々が分子同定した分子群であり、現在までそれらを題材にした発表論文は当教室またはその共同研究教室以外からは見当たらない。従って、遂行中の研究課題は極めて独自性の高いものと考えられる。国内外からのリクエストに応じてジャンクトフィリンに関する実験材料(変異マウス、抗体、cDNA等)については配布を行っているので、今後予想を上回る研究成果が現れることも考えられる。

研究代表者は本研究課題と密接に関連した研究を約15年間継続しており、手掛けてきた研究成果が国外の筋細胞Ca²⁺シグナル研究領域の研究者に認識され始めたように感じている。特に同世代の研究者はかつてリアノジン受容体の分子生物学的研究においてはライバル関係であったが、現在では研究課題も独自の路線に進んでおり、お互いのバックグラウンドを共有する良き理解者となっている仲間も多い。その研究仲間の中で、2名の研究者が研究の遂行のため来日滞在し、現在順調にその共同研究が進展している。平成15、16年度には延べ4ヶ月以上の期間、Prof. Zorzato(スイス・バーゼル大学病院)がJP-45と命名された新規小胞体膜タンパク質のノックアウトマウスの作製実験やタンパク化学実験を遂行した。JP-45は骨格筋三つ組構造に特異的に発現する分子であり、Ca²⁺チャンネルやCa²⁺結合タンパク質との相互作用が試験管内検討にて確認されているが、生理的機能はまったく不明である。最近 germ-line transmission が確認され、近日中に作製される JP-45 欠損マウスの表現型が期待されている。平成16年度には以前より共同研究を行っている Prof. Ma(米国・Robertwood Johnson Medical School)がジャンクトフィリンに関する共同研究のために来日した。本研究課題における標的組織は興奮性細胞全般であり多岐に渡っているが、小胞体膜タンパク質の分子同定に関しては材料調達の側面から骨格筋を用いている。自然に骨格筋小胞体または密接に関連する心筋小胞体が研究課題となるケースが多いのであるが、残念ながらこの研究分野での我が国の研究者人口は近年減少傾向にある。今後は国外共同研究グループとの若手研究者の相互派遣を活性化し、優れた成果を得られるようさらに尽力したい。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

英文原著論文：

1. Houtani, T., Ikeda, M., Kase, M., Sato, K., Sakuma, S., Kakimoto, S., Ueyama, T., Munemoto, Y., Takeshima, H. & Sugimoto, T. A subset of nociceptin/orphanin FQ receptor-expressing neurons in the anterior hypothalamic area, as revealed in mice with lacZ reporter gene. *Neurosci. Lett.* **335**, 217-219, 2003.
2. Inoue, M., Kawashima, T., Takeshima, H., Calo, G., Inoue, A., Nakata, Y. & Ueda, H. In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 495-501, 2003.
3. Komazaki, S., Nishi, M. & Takeshima, H. Abnormal junctional membrane structures in cardiac myocytes expressing ectopic junctophilin type 1. *FEBS Lett.* **542**, 69-73, 2003.
4. Deper, U., Reinscheid, R. K., Takeshima, H., Brune, K. & Zeilhofer, H. U. Normal sensitivity acute pain, but increased inflammatory hyperalgesia in mice lacking the nociceptin precursor polypeptide or the nociceptin receptor. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2381-2387, 2003.
5. Kurebayashi, N., Takeshima, H., Nishi, M., Murayama, T., Suzuki, E. & Ogawa, Y. Changes in Ca²⁺ handling in MG29-deficient skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 1266-1272, 2003.
- 6. Nishi, M., Sakagami, H., Komazaki, S., Kondo, H. & Takeshima, H. Coexpression of junctophilin type 3 and type 4 in brain. *Mol. Brain Res.* **110**, 102-110, 2003.
7. Lutfy, K., Eitan, S., Bryant, C. D., Yang, Y. C., Saliminejad, N., Walwyn, W., Kieffer, B. L., Takeshima, H., Carroll, F. I., Maidment, N. T. & Evans, C. J. Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *J. Neurosci.* **23**, 10331-10337, 2003.
8. Koizumi, M., Midorikawa, N., Takeshima, H. & Murphy, N. P. Exogenous, but not endogenous nociceptin modulates mesolimbic dopamine release in mice. *J. Neurochem.* **89**, 257-263, 2004.
9. Uezu, K., Sei, H., Sano, A., Toida, K., Suzuki-Yamamoto, T., Houtani, T., Sugimoto, T., Takeshima, H., Ishimura, K. & Morita, Y. Lack of nociceptin receptor alters body temperature during the resting period in mice. *Neuroreport* **15**, 751-755, 2004.
10. Pan, Z., Hirata, Y., Nagaraj, R. Y., Zhao, J., Nishi, M., Hayek, S. M., Bhat, M. B., Takeshima, H. & Ma, J. Co-expression of mg29 and ryanodine receptor leads to apoptotic cell death-effect mediated by intracellular Ca²⁺ release. *J. Biol. Chem.* **279**, 19387-19390, 2004.
11. Sakakibara, T., Nemoto, Y., Nukiwa, T. & Takeshima, H. Identification and characterization of a novel Rho GTPase activating protein implicated in receptor-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* **566**, 294-300, 2004.
12. Andoh, T., Yageta, Y., Takeshima, H. & Kuraishi, Y. Intradermal nociceptin elicits itch-associated responses through leukotriene B4 in mice. *J. Invest. Dermatol.* **123**, 196-201, 2004.
13. Minamisawa, S., Oshikawa, J., Takeshima, H., Hoshijima, M., Wang, Y., Chien, K. R., Ishikawa, Y. & Matsuoka, R. Junctophilin type 2 is associated with caveolin-3 and is down-regulated in the hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 852-856, 2004.
14. Brotto, M. A., Nagaraj, R. Y., Brotto, L. S., Takeshima, H., Ma, J. & Nosek, T. M. Defective maintenance of intracellular Ca²⁺ homeostasis is linked to increased muscle fatigability in the MG29 null mice. *Cell Res.* **14**, 373-378, 2004.
15. Okabe, C., Takeshima, H. & Murphy, N. P. Methamphetamine sensitization in nociceptin receptor knockout mice: locomotor and c-fos expression. *Eur. J. Pharmacol.* **507**, 57-67, 2005.
- 16. Yoshida, M., Minamisawa, S., Komazaki, S., Shimura, M., Kume, H., Zhang, M., Matsumura, K., Nishi, M., Saito, M., Ishikawa, Y., Yanagisawa, T. & Takeshima, H. Impaired Ca²⁺ store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcoplasmic reticulum-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 3500-3506, 2005.
17. Taverna, F. A., Georgiou, J., McDonald, R. J., Hong, N. S., Kraev, A., Salter, M. W., Takeshima, H., Muller, R. U. & Roder, J. C. Defective place cell activity in nociceptin receptor knockout mice with elevated NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J. Physiol.* in press.

英文総説 :

1. Takeshima, H. Intracellular Ca^{2+} store in embryonic cardiac myocytes. *Front. Biosci.* 7, d1642-1652, 2003.
- 2. Takeshima, H. Knockout mice lacking ryanodine receptor and junctophilin subtypes. *Ryanodine receptors* (Chapter 14, pp.141-150), Wehrens, X. H. T. & Marks, A. R., Springer, 2004.

国際学会招待口演 :

1. Takeshima, H., “Junctophilins and muscle E-C coupling”, *Gordon Research Conference: Muscle Excitation-Contraction Coupling* (Jun 11, 2003 in New London, USA.).
2. Takeshima, H., “Junctional membrane complexes and muscle E-C coupling”, *European Muscle Conference* (Sep 20, 2004 in Elba Island).