

## カルシウムストアの分子構築に関する研究

### A study on the molecular basis of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores

竹島 浩 (Hiroshi Takeshima)

京都大学・大学院薬学研究科・教授



#### 研究の概要

興奮性細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナリングの包括的理解に向け、(i)筋細胞におけるリアノジン受容体の活性調節機構の解明、(ii)興奮性細胞系におけるジャンクトフィリンの生理機能の解明、(iii)筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>ストアのタンパク質の新規同定とその機能解析を遂行した。

研究分野： 医歯薬学(生化学、細胞生理学、細胞生物学)

科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般(6905)

キーワード： リアノジン受容体、ジャンクトフィリン、Ca<sup>2+</sup>放出、Ca<sup>2+</sup>ストア

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

細胞質の Ca<sup>2+</sup>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。生理反応に先立ち生じる興奮性細胞での脱分極の電気シグナルから Ca<sup>2+</sup>シグナルへの変換反応においては、通常の場合には表層膜上の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネルと細胞内ストア膜上の Ca<sup>2+</sup>放出チャネル(リアノジン受容体)の機能共役が普遍的に観察される。興奮性細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナリングの包括的理解のために、その分子的基盤を整備することが求められている。

#### 2. 研究の目的

神経・筋細胞の Ca<sup>2+</sup>ストアの作動原理の分子基盤の解明に向けて学術的に貢献するために、具体的な課題として、(i)筋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、(ii)興奮性細胞系におけるジャンクトフィリンの生理機能の解明、(iii)筋小胞体 Ca<sup>2+</sup>ストアのタンパク質の新規同定とその機能解析を立案した。

#### 3. 研究の方法

本研究の推進方略は、まず、骨格筋小胞体に対する単クローン抗体の作製、その蛍光組織染色による分別、抗原分子の同定という工程にて、オリジナル分子を見つけ出す。構造や細胞内分布から Ca<sup>2+</sup>シグナリングへの関与が期待される分子については、機能発現実験やノックアウトマウスの作製

と解析などから、その生理機能の同定を目指す。この実験計画を遂行するために、細胞内 Ca<sup>2+</sup>イメージング装置を導入するとともに、必要とされる実験技術を有する国内外の優れた研究者と緊密に連携関係を構築した。

#### 4. 研究の主な成果

リストした発表論文の成果について、以下に解説する。

TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78-82, 2007

約 300 アミノ酸残基により成る TRIC チャネル A 型と B 型と命名した 2 つの相同な膜タンパク質が見出された。化学架橋剤や電子顕微鏡による解析で、そのホモ 3 量体構造の形成が示された。脂質二重膜での電気生理学実験では、K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> = 1.5 の選択性を示す一価陽イオン透過性 TRIC-A チャネルの性質が示された。一方、TRIC チャネルを完全に欠損する変異(TRIC-DKO)マウスは受精後 10 日目程度の胎児期に心拍停止により死亡した。心停止直前の心筋細胞では、過剰 Ca<sup>2+</sup>貯留に起因する小胞体の膨張が TRIC-DKO に認められた。心筋細胞 Ca<sup>2+</sup>シグナルの観察では、自発心臓拍動に対応する Ca<sup>2+</sup>強度が受精後 8.5 日の TRIC-DKO 胎児で極端に減弱していた。高濃度カフェインによりリアノジン受容体チャネル仲介性の小胞体 Ca<sup>2+</sup>放出を活性化させた際には、逆に TRIC-DKO マウス心筋細胞で Ca<sup>2+</sup>放出量が逆に増加していた。

さらに、TRIC-A(-/-)TRIC-B(+/-)の遺伝型の変異マウス(TRIC-MT マウス)は生後ほぼ正常に生育することが判り、次にそのTRIC チャンネルが欠乏している変異骨格筋についても解析した。TRIC-MT マウスの骨格筋小胞体膜では、K<sup>+</sup>イオン透過率が低下して過剰な膜電位が生じ、リアノジン受容体チャンネルのCa<sup>2+</sup>放出が部分的に障害されていることも判明した。以上の結果を総合すると、心筋および骨格筋のTRIC チャンネルは、生理的条件下でリアノジン受容体チャンネルのCa<sup>2+</sup>放出に連動して、小胞体内へK<sup>+</sup>を導くカウンターイオンチャンネルとして機能することが考察された。

Calumin, a novel Ca<sup>2+</sup>-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 42, 83-90, 2007

広範な細胞系に分布するカルミンは、Ca<sup>2+</sup>結合活性を有するN末端小胞体内腔領域、小胞体膜貫通領域と、C末端細胞質領域から構成される。カルミン欠損繊維芽細胞では、小胞体Ca<sup>2+</sup>貯蔵量と容量依存性Ca<sup>2+</sup>流入機構(SOCE)の低下が観察され、小胞体ストレス状況下での細胞死の顕著な亢進が示された。従って、カルミンには、小胞体のCa<sup>2+</sup>保持性に深く寄与するとともに、SOCE機構に寄与する小胞体Ca<sup>2+</sup>センサーとしての機能が示唆される。

Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* 26, 1924-1933, 2007; Functional uncoupling between Ca<sup>2+</sup> release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10811-10816, 2006

中枢ジャンクトフィリン欠損(JP-DKO)マウスは記憶学習や運動学習が顕著に障害されていた。JP-DKOマウスの海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞にて、シナプス伝達の脱分極において後過分極が欠失していた。両細胞において、NMDA受容体または電位依存性チャンネルを仲介するCa<sup>2+</sup>流入→リアノジン受容体による小胞体Ca<sup>2+</sup>放出→細胞膜上のSKチャンネル活性化→後過分極相の形成という機序が薬理実験から示唆された。一方、JP-DKOマウスでは、その機構が破綻していた。さらに、JP-DKOマウスでは、海馬可塑性であるCA1長期増強、小脳可塑性である長期抑圧が障害されていることも示された。従って、JP-DKOマウスの神経細胞では、結合膜構造の不形成により、SKチャンネルの正常機能が発揮されず、可塑性障害が発生し、個体レベルにおける記憶、運動学習などの異常が引き起こされるものと考察された。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

上記の課題(i)においては、リアノジン受容体を介する骨格筋Ca<sup>2+</sup>スパーク解析法を共同開発した。そのソフトウェアは複数の有力研究グループへ配布しており、この研究領域でのスタンダード手法になりつつある。課題(ii)においては、2型ジャンクトフィリンの点変異が家族性肥大型心筋症の原因となることが示され、その分子診断法も確立することが出来た。さらに、課題(iii)において新規同定されたTRICチャンネルとカルミンに関しては、今後もCa<sup>2+</sup>ストアの分子基盤に深く寄与する生理機能が注目される。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1) Yazawa, M., Ferrante, C., Feng, J., Mio, K., Ogura, T., Zhang, M., Lin, P-H., Pan, Z., Komazaki, S., Kato, K., Nishi, M., Zhao, X., Weisleder, N., Sato, C., Ma, J. & **Takeshima, H.** TRIC channels are essential for Ca<sup>2+</sup> handling in intracellular stores. *Nature* 448, 78-82, 2007.

2) Zhang, M., Yamazaki, T., Yazawa, M., Treves, S., Nishi, M., Murai, M., Shibata, E., Zorzato, F. & **Takeshima, H.** Calumin, a novel Ca<sup>2+</sup>-binding transmembrane protein on the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 42, 83-90, 2007.

3) Kakizawa, S., Kishimoto, Y., Hashimoto, K., Miyazaki, T., Furutani, K., Shimizu, H., Fukaya, M., Nishi, M., Sakagami, H., Ikeda, A., Kondo, H., Kano, M., Watanabe, M., Iino, M. & **Takeshima, H.** Junctophilin-mediated channel crosstalk essential for cerebellar synaptic plasticity. *EMBO J.* 26, 1924-1933, 2007.

4) Moriguchi, S., Nishi, M., Komazaki, S., Sakagami, H., Miyazaki, T., Masumiya, H., Saito, S., Watanabe, M., Kondo, H., Yawo, H., Fukunaga, K. & **Takeshima, H.** Functional uncoupling between Ca<sup>2+</sup> release and afterhyperpolarization in mutant hippocampal neurons lacking junctophilins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10811-10816, 2006.

5) 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 Ca<sup>2+</sup> store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcocalumenin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 280, 3500-3506, 2005.

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/>