小胞体膜タンパク質 TRIC チャネルの
分子機能解析

2016

飯田　綱規

小胞体膜タンパク質 TRIC チャネルの
分子機能解析

博士論文

京都大学大学院薬学研究科

飯田　綱規

目次

研究背景 1-2

略語 3

第一章

要約 4-5

序論 6

結果 7-11

考察 12-13

実験方法 14-15

第二章

要約 16-17

序論 18-19

結果 20-27

考察 28-31

実験方法 32-33

総括 34

謝辞 35

論文目録 36

参考文献 37-41

研究背景

小胞体からの Ca^{2+}放出およびそれに伴う細胞内 Ca^{2+}濃度上昇は、筋収縮をはじめとする多彩な生命現象に関与する。筋小胞体 (Sarcoplasmic Reticulum, SR)膜上に存在する SR K^+ チャネル群には Trimeric intracellular cation channel (TRIC-A, -B)と呼ばれる 2 つのサブタイプが存在する可能性が報告されてきた [1–3]。TRIC チャネルは約 30 kDa 程度の単量体からなる三量体構造を形成する。SR K^+ チャネル群は、リアノジン受容体 (RyR)またはイノシトール 1, 4, 5 トリスリン酸受容体 (IP_3R)を介した SR Ca^{2+}放出に対する電荷の補償機構、すなわちカウンターイオン電流の制御において重要な役割を果たすことが想定されてきた [4–6]。

SR K^+ チャネル群は人工平面脂質膜再構成法を用いた解析から一価のカチオン選択的であることが報告されている [7–15]。また、人工平面脂質膜に再構成された TRIC チャネルは、ウサギ骨格筋由来 SR 小胞から発見された SR K^+ チャネル群と類似したチャネル性質を示す [1,2]。しかし、生体内での SR K^+ チャネル群の開口挙動については未知の部分が多い。その理由の一つは、SR K^+ チャネル群が複雑なサブコンダクタンス開口を示すことから、広範な電位における解析が行われていないためである [2,3]。

一方 TRIC チャネルの生理的機能については、主として遺伝子欠損 (KO)マウスを用いた解析が行われてきた。*Tric-a, Tric-b* 両欠損マウス (DKO)は心停止による胎生致死を呈する [1] ことから、両サブタイプが正常な心臓形成に必須であることが示唆されている。また、TRIC DKO マウスの心筋細胞では、SR の膨潤化および Ca^{2+}の異常な集積が観察される。さらに、対照群と比較して自発的な Ca^{2+}放出が減少しているのに対して、細胞内 Ca^{2+}ストアからのカフェイン惹起性 Ca^{2+}放出は増加していた [1]。これらの知見から、TRIC DKO マウスの心筋細胞において SR Ca^{2+}放出の障害と SR Ca^{2+}濃度の増大が示唆される。さらに、骨格筋 [1,16]、血管平滑筋 [17,18]、肺胞上皮細胞 [19] な

ど他の細胞種においても、細胞内 Ca^{2+}動態における TRIC チャネルの重要性が明らかになってきた。TRIC-A は興奮性細胞において局所的に高発現しており、TRIC-B は全身の細胞に遍在的に発現している。TRIC-B の発現量は筋組織における TRIC-A と比較して低いが、その機能はいくつかの組織にとっては必須である。例えば、*Tric-b* KO マウスはⅡ型肺胞上皮細胞の肺サーファクタント分泌異常を原因とする肺の構造形成不全により新生致死する [19]。また、*TRIC-B* 遺伝子は遺伝性骨形成不全症 (Osteogenesis Imperfecta)との関連が報告されており [20–24]、これらの病態では IP_3R を介した SR Ca^{2+}放出が障害されていることが示唆されている。一方、*Tric-a* KO マウス骨格筋においては疲労刺激下で見られる異常収縮および、RyR を介した SR Ca^{2+}放出障害が報告されている [16]。しかし、TRIC チャネルによる SR Ca^{2+}放出の制御の分子機序の実態は確認されていない。

そこで、本研究においては、TRIC チャネルの生理的意義をイオンチャネル機能および RyR の制御機構の両観点から解明するために、人工平面脂質膜再構成法を用いて TRIC チャネルおよび RyR の単分子チャネル活性解析を行った。野生型 (WT)マウスの骨格筋において TRIC-A, -B は共局在しており、両サブタイプを機能的に区別することは困難である。そこで、成獣時点まで生存する *Tric-a* KO マウス骨格筋から SR 小胞を単離し、TRIC-B 単分子チャネル活性の各電位における最大コンダクタンス状態とサブコンダクタンス状態の開口挙動について解析した (第一章)。また、TRIC-A の RyR 活性制御機構を明らかにするため、WT マウスおよび *Tric-a* KO マウス由来 SR 小胞を用いて TRIC-A 非存在下での RyR チャネル活性について解析した (第二章)。

略語

TRIC (channel)	trimeric intracellular cation (channel)	トリック、細胞内三量体陽イオン (チャネル)
SR	sarcoplasmic reticulum	筋小胞体
RyR	ryanodine receptor	リアノジン受容体
IP_3R	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor	イノシトール 1,4,5 トリスリン酸受容体
Po	Open probability	開口確率
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	フッ化フェニルメチルスルホニル
DTT	dithiothreitol	ジチオトレイトール
HEK293 cells	Human embryonic kidney 293 cells	ヒト胎児由来腎臓培養細胞株
PKA	protein kinase A	プロテインキナーゼ A
PP1	phosphoprotein phosphatase 1	ホスホプロテインホスファターゼ 1

第一章 TRIC-B におけるサブコンダクタンス開口と電位依存性

要約

SR K^+ チャネル群は一価カチオン選択性の電位依存性イオンチャネルである。SR K^+ チャネル群は電気生理学的特徴の一つとしてサブコンダクタンス開口状態を示すが、その生理的膜電位における総電流への相対的寄与については不明であった。一方、SR K^+ チャネル群に含まれるTRIC-AとTRIC-Bは筋組織において共局在しており、電気生理学的機能により区別することは困難である。そこで、本研究では、この技術的問題を解決しつつ生理的条件下におけるサブコンダクタンス開口の意義を明らかにするために、*Tric-a* KOマウス由来SR小胞を用いて人工平面脂質膜再構成法を行い、TRIC-Bのサブコンダクタンス開口と最大コンダクタンス開口の関係および総電流への寄与について調べた。

Tric-a KOマウスのSR小胞由来のTRIC-Bは、最大コンダクタンス電流の約53 %のサブコンダクタンス電流を示した。時間軸を拡大したところ、複数のサブコンダクタンスレベルの存在が確認された。次に、サブコンダクタンス開口および最大コンダクタンス開口の電位依存性について調べるために、各電位における両状態の開口確率 (Open probability, Po)を測定した。その結果、TRIC-Bは負電位 (以下、小胞体内腔側を基準電位とする)において低Poを示し、サブコンダクタンスPoが最大コンダクタンスPoに対して優位となることが示唆された。一方、最大コンダクタンスPoは+10 ~ +20 mV間で急激に上昇することが示唆された。

さらに、総電流におけるサブコンダクタンス開口と最大コンダクタンス開口の寄与を求めるために、各電位における両状態の平均電流を測定し、全電流に対する比を算出した。その結果、生理的膜電位の想定値である0 mVにおいて、サブコンダクタンス開口による総電流への寄与が約75 %となり、最大コンダクタンス開

口に対して優位であることが示唆された。以上の一連の結果から、SR膜電位が0 mVであるとき、TRIC-Bのサブコンダクタンス開口が優位にK^+電流を通過させることが示唆された。また、最大コンダクタンス開口の総電流への寄与は、小胞体内腔の負電荷の増加に伴って増加することが示唆された。この性質は、SRからのCa^{2+}放出時にSR膜内外に生じる電荷の分布に対するSR K^+ チャネルの補償容量の増加に寄与すると考えられる。

序論

TRIC チャネルの生理的役割を分子レベルで理解するためには、イオンチャネルとしての単分子的性質、およびチャネル活性化制御機構の解明が求められる。TRIC-A と TRIC-B は多くの組織で共局在するので、組織由来の TRIC チャネルの各サブタイプについて単分子的性質を検討するのは困難である。したがって、TRIC-B チャネルの活性化、電位依存性、サブコンダクタンス開口についての相互関係が、成獣が生存する *Tric-a* KO マウスから単離し骨格筋 SR 小胞を電位固定下の人工脂質膜へ膜融合させることにより検討されてきた[3]。TRIC-B の開口挙動については、最大コンダクタンス開口に加えて 4 種のサブコンダクタンスレベルが存在し、両開口は小胞体内腔負電荷に反応して活性化することが示唆されている[3]。しかし、0 mV 近傍と想定される生理的膜電位における解析は行われておらず、生体内の開口挙動は未知であった。

そこで、本研究では生理的膜電位における開口状態について明らかにするため、人工平面脂質膜再構成法を用いて TRIC-B の単分子チャネル活性について解析を行った。各電位における最大コンダクタンス開口とサブコンダクタンス開口の Po を測定し、続いて両開口の総電流への寄与について平均電流を算出して検討した。

結果

TRIC-B のチャネル開口には以下に示すような顕著な特徴がある。1) 電位依存性開口、2) 最大開口状態の前後に発生する連続したサブコンダクタンス開口、3) 最大コンダクタンス開口を伴わないサブコンダクタンス開口である [3]。強度のフィルタリングおよび圧縮処理を施した TRIC-B の開口記録からは、最大コンダクタンスの約 53 % の単一サブコンダクタンス開口が観察された (Fig. 1A)。しかし、トレースを時間軸に沿って拡大したところ、TRIC-B が複数の独立したサブコンダクタンス開口状態に留まることが観察された (Fig. 1B)。また、TRIC-B は最大コンダクタンス開口を伴わない長期サブコンダクタンス開口を示した (Figs. 1B (iii) and (v))。4 つの主要なサブコンダクタンスレベル (S1-S4)への開口は既に報告されている [3] が、複雑かつ連続したサブコンダクタンスを定量化することは困難である。したがって、本研究ではデータを理想化するために、サブコンダクタンスレベル (S1-S4)を単一の状態へと統合したマルコフモデルを用いて解析を行った。

まず、単一チャネル分子が脂質膜上に存在するときの各電位における Po の変化について調べた。およそ 11 %のチャネルの開口は電位に非依存的であり、これらのチャネルは Po-電位プロットには含めなかった。上記モデルを用いて開口記録の理想化を行い、最大コンダクタンス状態とサブコンダクタンス状態の Po について比較した (Fig. 2)。チャネルごとに Po は大きく分散したが、電位依存性 TRIC-B は負電位において非常に低い Po を示し、サブコンダクタンス状態へ優位に開口することが示唆された。また、最大コンダクタンス状態の Po は+10 ~ +20 mV において急激に上昇し、それ以上の電位では停滞した。一方、サブコンダクタンス状態の活性化が顕著に生じる電位は最大コンダクタンス状態と同程度、もしくはわずかに低電位 (0 ~ +10 mV) であることが観察された。しかし、<10 mV の電位において、サブコンダクタンス状

態は低 Po かつ複雑な開口挙動および小さな電流量を示し解析が困難であるため、活性化の臨界電位を正確に決定することは困難であった。

次に、TRIC-B サブコンダクタンス開口の SR 膜を介した生理的 K^+電流への寄与、およびフルコンダクタンス開口と比較した場合の重要性について検討するため、サブコンダクタンス状態およびフルコンダクタンス状態への開口結果から平均電流を算出した。この際に、単一チャネル分子の機能を評価し、かつサブコンダクタンス開口の解析を正確にするため、単一チャネル分子のみが脂質膜上に存在するときのデータを用いた。Fig. 3 には、各電位において最大コンダクタンス状態中に透過した平均電流 (Fig. 3A)、およびサブコンダクタンス状態中に透過した平均電流 (Fig. 3B)を示す。Fig. 3C には総電流へのサブコンダクタンス開口状態およびフルコンダクタンス開口状態の寄与を示す。これらの結果より、生理的膜電位の想定値である 0 mV において TRIC-B のサブコンダクタンス開口は電流の大部分 (約 75 %)を担うことが推定された。

Figure 1

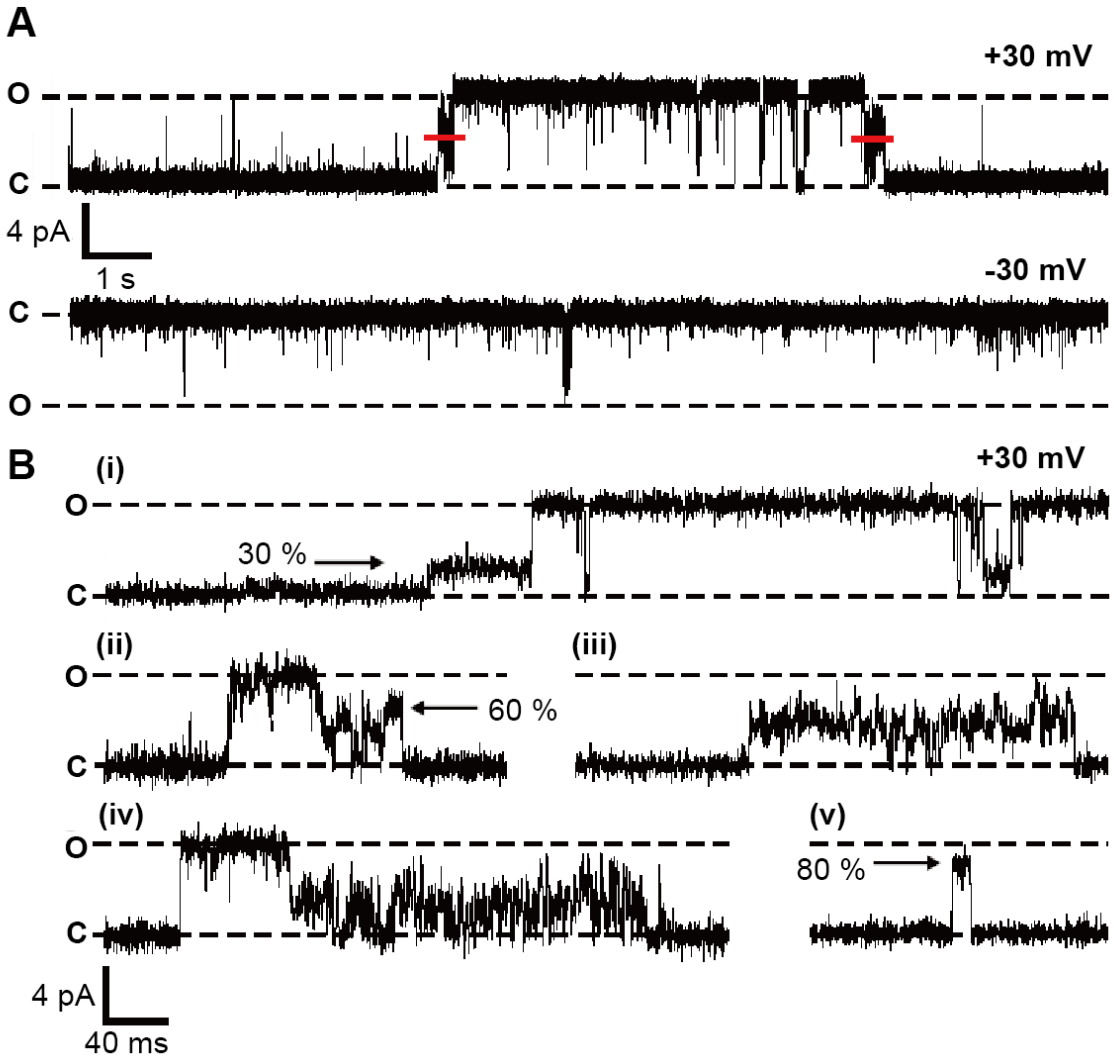

Figure 1. TRIC-B の典型的単一チャネル開口

(A) TRIC-B の単一チャネル分子活性測定において観察される代表的トレースを示す。小胞体内腔側を基準電位として+ 30 mV, - 30 mV における閉口状態から最大コンダクタンス状態への開口を示す。(B) 時間軸を拡大した際に観察される典型的なサブコンダクタンス開口について示す。赤線は重なったサブコンダクタンス開口の平均電流を示す。%で示したサブコンダクタンスレベルは既知のものと一致した。O, C としてそれぞれ開口状態 (Open)、閉口状態 (Closed)を示す。

Figure 2

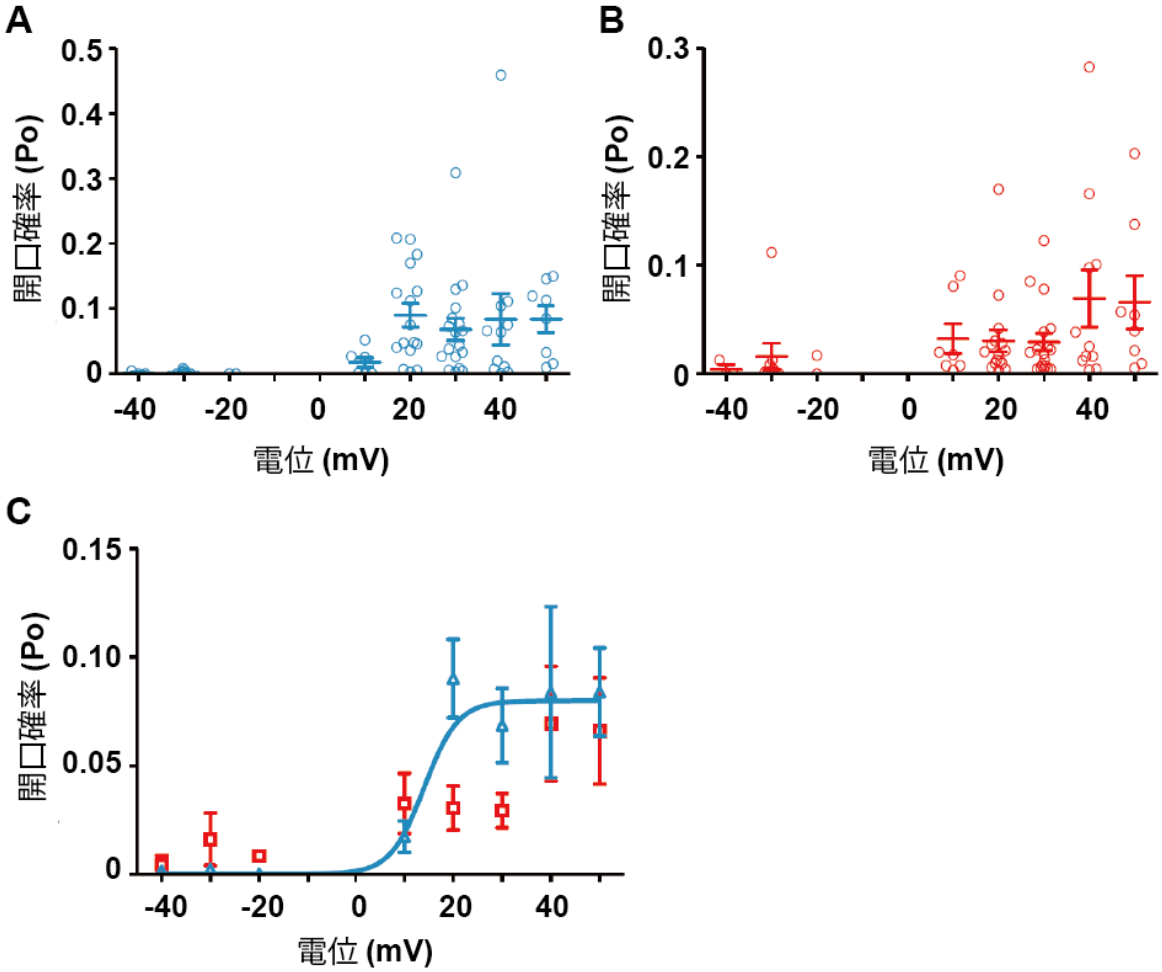

Figure 2. Po-電位相関

各実験における最大コンダクタンス開口の Po (A)とサブコンダクタンス開口の Po (B)を示す。(C) 最大コンダクタンス開口 (三角)、サブコンダクタンス開口 (四角)における Po の平均値を示す。時間軸を拡大した際に観察される典型的なサブコンダクタンス開口について示す。最大コンダクタンス開口については以下の式に従ってボルツマンフィッティングを行い曲線として示す。データを平均値±S.E.M.として示す。各電位においてそれぞれ-40 mV (3), -30 mV (8), -20 mV (2), 10 mV (7), 20 mV(12), 30 mV (17), 40 mV (10), 50 mV (8)のチャネル記録数を用いた。

Figure 3

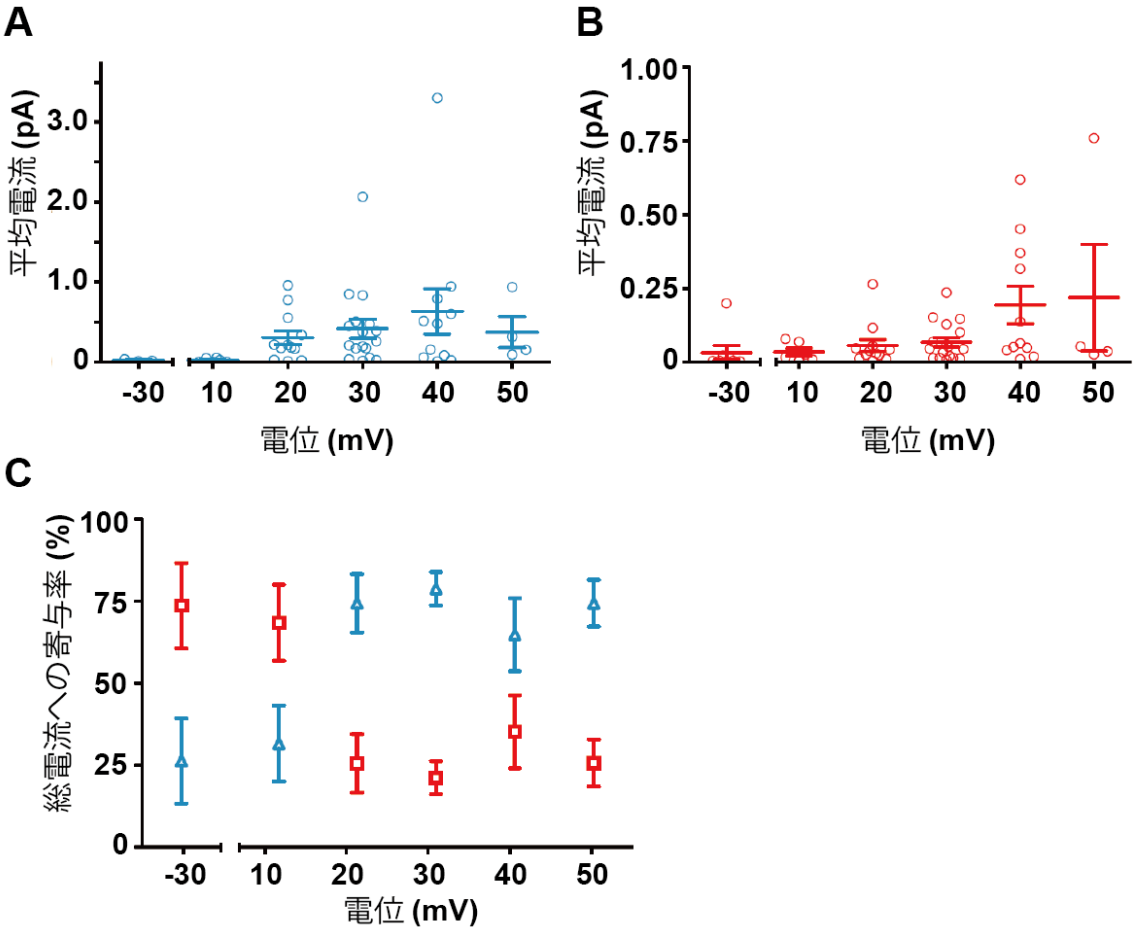

Figure 3. 最大コンダクタンス状態とサブコンダクタンス状態の総電流への寄与

最大コンダクタンス開口 (A)とサブコンダクタンス開口 (B)について、それぞれ平均電流と電位の相関を示す。(C) 最大コンダクタンス開口 (三角)、サブコンダクタンス開口 (四角)における Po の平均値を示す。各チャネルの平均電流を円として示す。データを平均値±S.E.M.として示す。各電位においてそれぞれ-30 mV (8), 10 mV (7), 20 mV(12), 30 mV (17), 40 mV (10), 50 mV (4)のチャネル記録数を用いた。

考察

本研究において、TRIC-B のサブコンダクタンス活性は 0 ~ +10 mV の間で電位依存性があることが示唆された。ただし、<10 mV では振幅が小さいために、サブコンダクタンス開口を明確に識別することは困難であった。一方、TRIC-B の最大コンダクタンス状態の Po は+10 ~ +20 mV 間において顕著な電位依存性を示した。+10 mV において、チャネルの開口状態がサブコンダクタンスレベルに滞留する時間は最大コンダクタンス開口と比較して長く、+20 mV においては両者の関係が逆転した。この結果は、最大コンダクタンス状態の優位な開口には膜を介した大規模な電荷の移動が必要であり、サブコンダクタンス状態への開口に必要な電荷よりも大きいことを示唆している。さらに、各チャネルが透過した K^+電流の平均値から、≦+10 mV におけるチャネル電流の大部分 (約 75 %)はサブコンダクタンス開口中に透過するのに対して、≧+20 mV においては電流の約 75 %が最大コンダクタンス開口中に透過することが示唆された。

サブコンダクタンス開口であっても、多数のチャネルが開口すれば、SR を介する一価カチオンの平衡化 [18]、および SR からの Ca^{2+}放出に対する電流を補償するための電荷移動に寄与することが可能と考えられる。本研究では電位依存性を示したチャネル群について解析したが、その他約 11 %のチャネル群は電位非依存性を示した。電位非依存性チャネル群は今回の検討した電位内でも高 Po を示した [3]。これらのチャネル群は今回解析対象とした電位依存性チャネル群とともに生理的条件下では機能的なチャネル分子群を構成し、0 mV において開口する可能性がある。

実際の SR 膜組成は今回用いた中性の脂質膜よりも複雑であり、膜脂質中の負電荷が SR K^+ チャネル群の機能に影響することが示唆されている [10,25,26]。したがって、今後は、負電荷を有するホスファチジルセリンの存在下でサブコンダクタンス開口およ

び最大コンダクタンス開口が変化するのかどうかを検討する必要がある。また、温度、pH、二価カチオンを含む諸要因についてもチャネル機能に重要である可能性がある[7,27,28]。例えば、サイトゾルおよび小胞体内腔側の Ca^{2+}濃度は、心筋・骨格筋において興奮収縮連関中に急速かつ大規模に変化することから、チャネル開口に影響する可能性がある。しかし、SR K^+ チャネル群に関するサイトゾルおよび小胞体内腔側 Ca^{2+} 濃度の影響について、これまでのところ統一された結果は報告されていない[27,29,30]。この理由の一つとして、分解能が低い測定条件ではサブコンダクタンス開口と Ca^{2+} に対する阻害効果の識別が困難であることがある。したがって、今後は高分解能かつ単一チャネル分子の存在下で SR K^+ チャネル群の挙動を検討する必要がある。

結論として、本研究では対称なイオン組成かつ 0 mV 下におけるチャネル開口を直接測定することは不可能であったが、電位とサブコンダクタンス Po の関係から、TRIC-B は 0 mV 付近において通常はサブコンダクタンス状態へと開口しており、最大コンダクタンス開口は低頻度に留まると推定された。細胞においては、定常状態における SR 膜の電位は小さいことが想定されるので、TRIC-B は SR 内腔側のサイトゾルに対する負電荷が増大しない限り、低 Po かつ優先的にサブコンダクタンス状態へ開口することが示唆された。一方、TRIC-B はサイトゾル側負電荷の増大によって優先的に最大コンダクタンス状態へと開口し、総 Po および透過する電流が顕著に増加することが示唆された。この性質は、SR Ca^{2+}放出に対する電荷補償に寄与し、カウンターイオンチャネルとしての機能を裏付けるものである。

実験方法

SR 小胞の単離および単分子チャネル活性測定

Light SR (LSR)膜小胞は、以前述べた通りに *Tric-a* KO マウス骨格筋から単離した[3,31]。LSR 小胞が人工平面脂質膜再構成法に結合したことを確認してから、210 mM KPIPES, 10 μM 遊離 Ca^{2+}, pH 7.2 の対称溶液での TRIC-B 電流を電位固定条件で記録した。本研究では、チャネルの開口と透過性 (コンダクタンス)に影響を与える可能性のある膜表面の電荷発生を最小限にするために、中性脂質であるホスファチジルエタノールアミンを膜成分として用いた。また、ホスファチジルセリンに代表される荷電性脂質の使用を避けることで、脂質膜への膜融合頻度を減らし、チャネル単分子のみが脂質膜に結合する機会を増やすことが可能である。*Trans* 槽は接地し、*cis* 槽は各電位に固定した。SR 小胞を *cis* 槽に加えたとき、SR 小胞は常にサイトゾル側が *cis* 槽に、小胞体内腔側が *trans* 槽に相当する配向性で脂質膜に融合することが知られている[27,28]。

TRIC-B の Po, 平均電流についてもこの条件で測定した。正電位を小時間高く保ちチャネルを活性化させることで、チャネル単分子のみが脂質膜上で開口していることを確かめた。本実験は室温 (22±2 °C)で行った。

チャネルの単分子解析

単分子チャネル活性測定の結果は 100 kHz でデジタル化し、WinEDR 3.05 ソフトウェア (John Dempster, Strath- clyde University, Glasgow, UK)を用いてコンピュータのハードディスク上に記録した。理想化前に、遮断周波数を 1 kHz に設定したガウシアンフィルターによってデジタルフィルタリングし、10 kHz において再サンプリングした。得られた単分子チャネル電流は QuB ソフトウェア (State University

of New York, Buffalo, NY)内蔵の segmental k-means algorithm[32] を用いて理想化した。理想化は既知の 4 つのサブコンダクタンス状態[3] を単一のコンダクタンス状態として統合したマルコフモデルモデル M2 を用いて行った。M2 におけるサブコンダクタンス状態の振幅は、最大コンダクタンスと閉口状態の中間に設定した。Po は 1-3 分間の開口記録から M2 を用いて算出した。Po の定義は理想化に用いた記録の全時間において各状態が占める割合である。平均電流については、各トレースを M2 によって理想化し、QuB ソフトウェアを用いて直接算出した。

第二章 *Tric-a* KO マウス由来骨格筋における RyR の活性低下

要約

TRIC-Aは心筋・骨格筋のSR膜・核膜に局在し、SR終末槽においてリアノジン受容体 (RyR)と共局在している。*Tric-a* KOマウスの骨格筋において、RyRを介したSRからのCa^{2+}放出の障害、およびその結果と考えられる過剰なCa^{2+}貯留およびSRの膨潤化が確認されているが、RyR制御Ca^{2+}放出障害についての単分子的解析は行われていなかった。そこで、本研究では人工平面脂質膜再構成法および[^{3}H]リアノジン結合アッセイを用いて、*Tric-a* KOマウス由来SR小胞中のRyRの電気生理学的性質の解明を試みた。

Tric-a KOマウス由来RyR (以下KO RyR)は、人工脂質膜においてATPおよび小胞体内腔側Ca^{2+}に対して正常な感受性を示した。次に、生体膜におけるKO RyRの制御リガンドに対する応答性を調べるため、[^{3}H] リアノジン結合アッセイを行った。その結果、KO RyRはWTマウス由来RyR (以下WT RyR)と同等のCa^{2+}応答性の活性化を示した一方で、高濃度のCa^{2+}による阻害感受性が高いことが観察された。また、カフェイン, アデニンに対しても正常な感受性を示したが、Mg^{2+}に対してはWT RyRと比較して顕著に高い阻害感受性を示した。そこで、単分子レベルで、上記のMg^{2+}によるRyR制御の変化を調べるために、人工平面脂質膜再構成法を用いた。サイトゾル側Ca^{2+}単体によるRyR活性化状態においては、RyRのPoは極めて低く分子ごとに多様な値を示す。この問題を解決するために、WTおよびKO RyR間で感受性に差がないATPの存在下でPoを上昇させ、Mg^{2+}による阻害感受性について調べた。その結果、KO RyRは、Mg^{2+}/ATP存在下においてWT RyRと比較して低いPoを示した。RyRのリン酸化は、Mg^{2+}による阻害感受性に影響を与えることが知られている。そこで、KO RyRにおいてリン酸化状態が亢進していた可能性について検討

するために、ホスホプロテインホスファターゼ1 (PP1)のPoに対する影響を調べた。その結果、Mg^{2+}/ATP非存在下においてPP1処理による顕著なPoの変化は観察されなかった。また、Mg^{2+}/ATP添加後にPP1処理を行っても、処理前後で顕著なPoの差は見られなかった。したがって、Mg^{2+}/ATP添加前後において、PP1によって脱リン酸化されるRyRのリン酸化部位のうちでは、リン酸化状態に顕著な亢進はないことが示唆された。以上の一連の結果から、TRIC-Aが二価陽イオン存在下で、RyRのチャネル活性に影響を与えることが示唆された。また、この制御機構には、従来想定されていた一価カチオン電流によるSR膜内外の電荷分布の補償以外の機序が含まれる可能性が示された。

序論

SR K^+ チャネル群の生理的意義については、RyR を介する SR Ca^{2+}放出により発生する電荷分布の偏りに対して、一価カチオンを流入させることで補償し持続的な SR Ca^{2+}放出を補助するという一連の機序が想定されてきた[4–6]。一方、近年 RyR がカウンターイオン電流の大部分あるいは全てを自ら透過させる可能性が指摘されている[33,34]。しかし、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、TRIC チャネルは SR Ca^{2+}放出に重要であることが示唆されている。例えば、*Tric-a, Tric-b* 両欠損マウス (DKO)は心不全によって胎生致死であり[1]、*Tric-b* KO マウスは呼吸不全によって新生致死となる[19]。また、*Tric-a* KO マウスの骨格筋では SR への過剰な Ca^{2+}貯留と Ca^{2+} スパーク頻度の低下、さらには疲労刺激下において alternan 様収縮が観察されている[16]。しかし、TRIC-A 非存在下での RyR 単分子チャネル活性についての解析は行われていないので、*Tric-a* KO マウスの病態について分子レベルの機序は分かっていない。

以上の報告で示された TRIC チャネルの各組織における重要性から、TRIC チャネルは SR を介した一価カチオン電流の透過に加えて、それ以外の機能を併せ持つ可能性が考えられる。組織における TRIC と RyR の化学量論の解析から、心筋や骨格筋などの興奮性組織において、SR 膜には RyR、および RyR と同等数の TRIC-B、そしてそれらよりも多数の TRIC-A が存在することが示唆されている[2,16]。これまでの生化学研究において、共精製した RyR と TRIC チャネルが用いられることはなかった[1]。しかし、SR 膜において高密度に存在するチャネル同士の可変的タンパク質間相互作用は、RyR 活性および SR Ca^{2+}放出の制御に重要な役割を果たす可能性がある。タンパク質間相互作用の存在を示唆する報告として、後になって TRIC-A と同一のタンパク質であることが発見された SPR-27 は RyR 巨大分子複合体の一部を形成することがある[35]。

そこで、本研究では、*Tric-a* KO マウスの病態における RyR の寄与の実態および TRIC-A による RyR 活性制御機構の解明を試みた。人工平面脂質膜再構成法を用いて WT マウスと *Tric-a* KO マウス由来の SR 小胞における RyR 単分子チャネル活性について比較し、TRIC-A 非存在下での RyR チャネル活性を評価した。骨格筋には RyR サブタイプのうちで RyR1 が優位に発現しており、RyR1 は生体内ではリガンドによる協奏的制御を受けるので[36]、各リガンド存在下でのチャネル開口挙動について検討した。

結果

Tric-a KO骨格筋において、小胞体内腔側のCa^{2+}は通常よりも高濃度であることが示唆されていることから[16]、RyR活性は増大することが想定される。しかし実際にはCa^{2+}放出が障害されていることから、*Tric-a* KO SRにおいてはRyRの小胞体内腔側Ca^{2+}に対する感受性が低下している可能性が考えられる。そこで、この仮説について検討するために、K^+を透過イオンとして用いて、WTおよび*Tric-a* KO SRを人工脂質膜に再構成したときのRyR (WT RyR, KO RyR)について単分子チャネル活性を比較した (Fig. 4)。この際に、WT RyRの測定はKO RyRよりも困難であった。その理由は、WT SRを用いた場合には、しばしば多数のK^+チャネルを含むSR小胞が脂質膜に融合し、それらのチャネルを介して多量のK^+電流が生じることによって、RyRが結合する前に脂質膜の破壊が起こるためである。一方、*Tric-a* KO SRを用いた場合には、RyRはほぼ1, 2分子のK^+チャネルのみを伴って脂質膜上に再構成された。測定の結果、WT RyRとKO RyRは小胞体内腔側およびサイトゾル側のCa^{2+}濃度が10 μMのときに同程度のPoを示した。サイトゾル側に1 mM ATPを加えたところ、WT RyRおよびKO RyRにおいて同程度のPoの増加が観察されたことから、*Tric-a* KO SRにおいてRyRのATPに対する感受性は変化しないことが示唆された。次に、サイトゾル側のCa^{2+}濃度を100 μM, 1 mMへと上昇させた場合には、KO RyRにおいてWT RyRと同程度のPoの増加が観察されたことから、*Tric-a* KO SRにおいてRyRの小胞体内腔側Ca^{2+}に対する感受性が障害されていないことが示唆された。Poの平均値をFig. 4Cおよび Fig. 4Dに示す。

次に、生理的脂質膜上における RyR 分子群の他の活性制御リガンドに対する感受性について検討するために[^{3}H]リアノジン結合アッセイを行った。Ca^{2+}濃度と活性化の関係について調べたところ、WT RyR と KO RyR 間には Ca^{2+}による活性化感受性について相違は見られなかったが、KO RyR は高濃度 Ca^{2+}に対して高い阻害感受性を示

した (Fig. 5A)。カフェインはサイトゾル側 Ca^{2+}に対する RyR の感受性を増大させる[37,38]。そこでカフェインに対する感受性について検討したところ、WT RyR と KO RyR はカフェイン投与によって同程度の活性化を示した (Fig. 5B)。次に、アデニンヌクレオチドに対する RyR の感受性をより詳細に調べるため、[^{3}H]リアノジンの結合に対する影響について検討した (Fig. 5C)。SR 小胞は ATP によって活性化される多量のリン酸化酵素を含むため、ATP を用いた場合には、RyR のアデニンヌクレオチド結合部位へ直接的に作用した効果と、RyR あるいは関連タンパク質に対するリン酸化効果を判別することは不可能である。しかし、アデニンは RyR 上で ATP と同じ部位に結合する[39–41]がタンパク質のリン酸化を促進することはないため、アデニンヌクレオチドの直接的な結合効果を評価することが可能である。アデニンは WT, KO RyR において同程度の[^{3}H]リアノジン結合を惹起したことから、Fig. 1 の結果と併せて KO RyR と ATP/アデニンヌクレオチドとの相互作用は WT RyR と比較して差異がないことが示唆された。一方、Mg^{2+}は KO RyR に対して WT RyR よりも強く[^{3}H]リアノジン結合を阻害する効果を持つことが示唆された (Fig. 5D)。

Figure 4

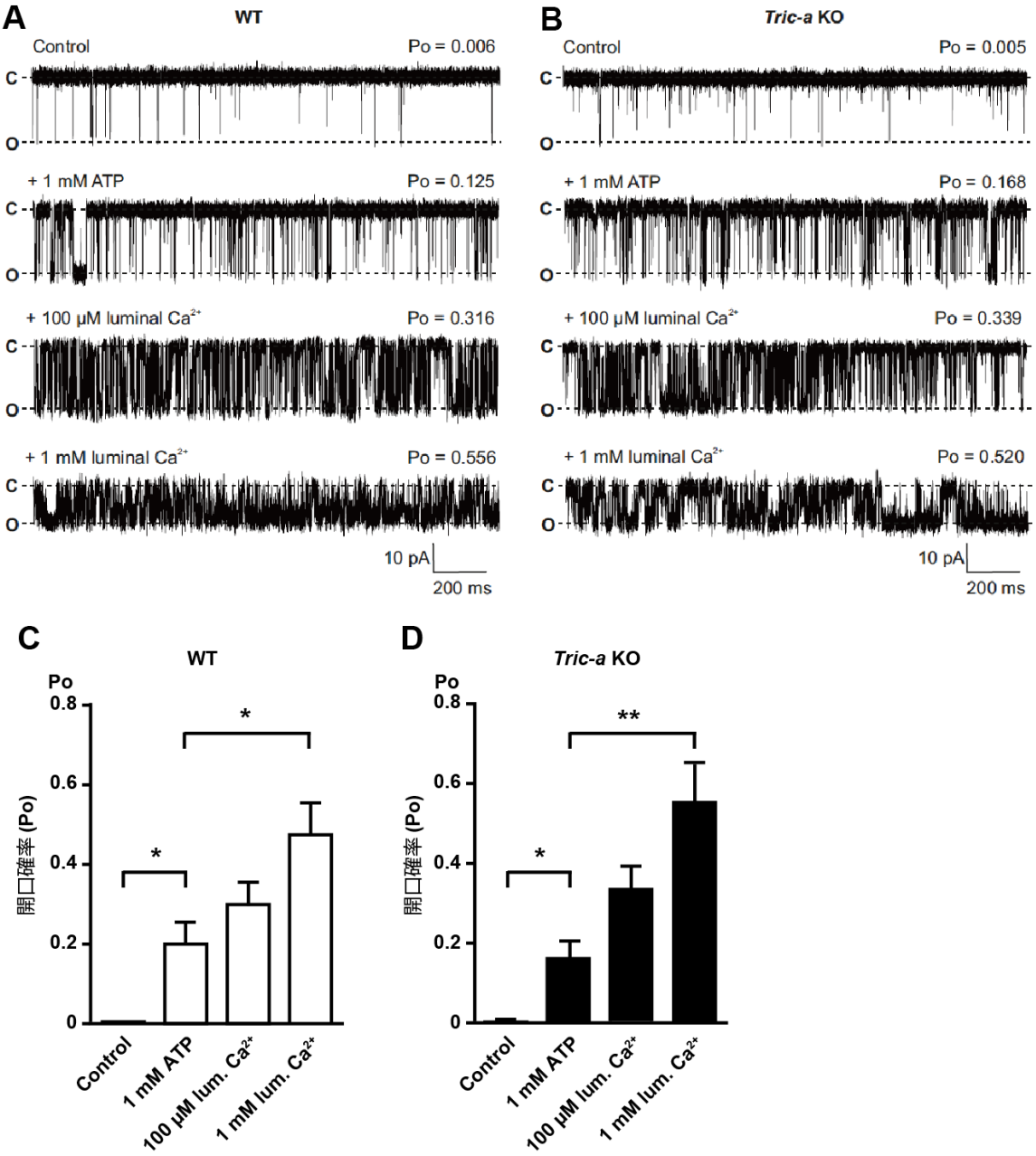

Figure 4. K^+ 透過時の、*Tric-a* KO マウス由来 RyR1 に対するサイトゾル側 ATP、小胞体内腔側 Ca^{2+}の影響
WT (A)および *Tric-a* KO (B)由来 RyR1 の単分子チャネル活性について、対照条件(サイトゾル側、小胞体内腔側 10 μM Ca^{2+})、サイトゾル側 1 mM ATP 添加時、小胞体内腔側 Ca^{2+} (100 μM, 1 mM)添加時のトレースを示す。(C), (D) WT および *Tric-a* KO 由来 RyR の Po について、対照条件、ATP 存在下、小胞体内腔側添加時の平均値を示す。データは平均値±S.E.M.として示す (n=6-10; * P<0.05, ** P<0.01)。電位は-30 mV に保持した。O, C としてそれぞれ開口状態 (Open)、閉口状態 (Closed)を示す。

Figure 5

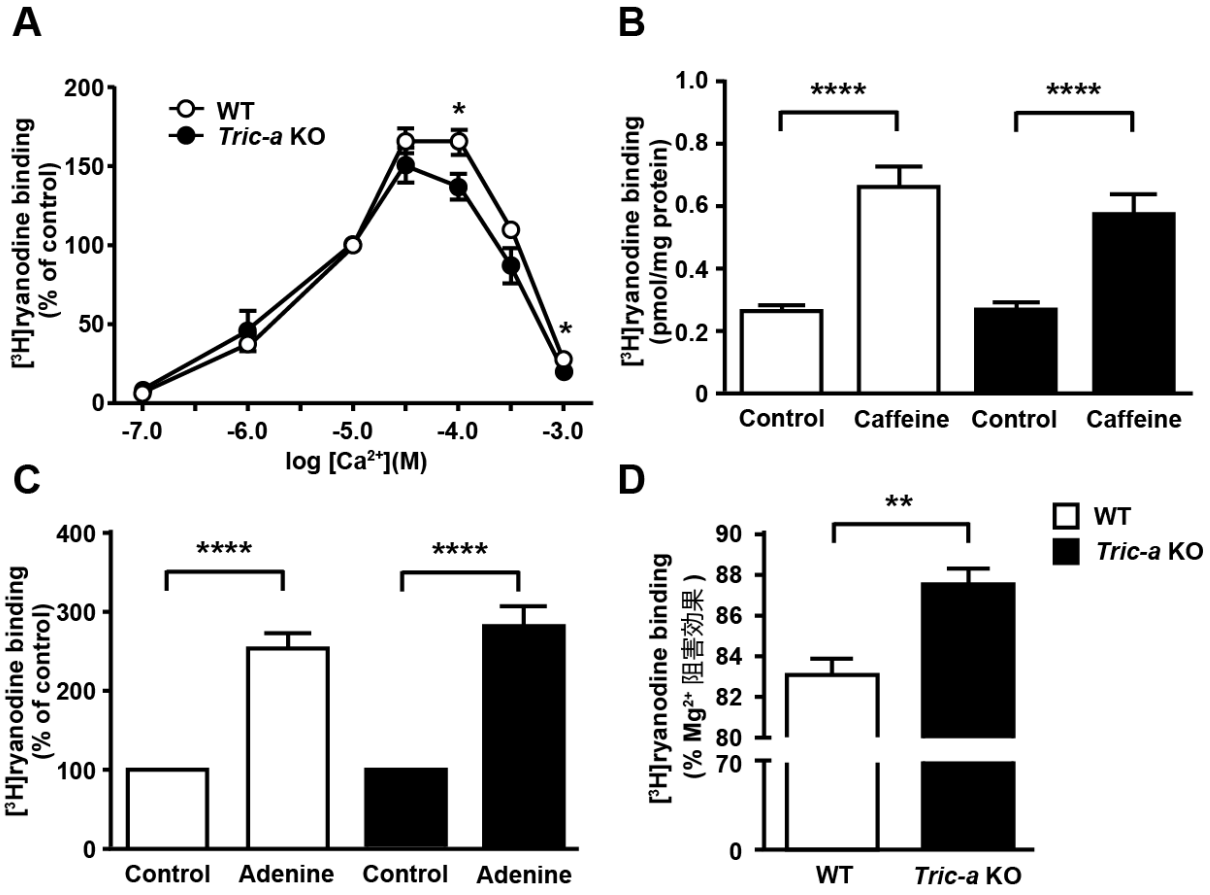

Figure 5. WT および *Tric-a* KO 骨格筋小胞に対する[^{3}H]リアノジン結合における Ca^{2+}, カフェイン, アデニンおよび Mg^{2+}の影響

(A) Ca^{2+}によって WT および *Tric-a* KO 骨格筋小胞への[^{3}H]リアノジン結合刺激を行った。 各点におけるデータは平均値±S.E.M. (n=7-9; * P<0.05)として示した。カフェイン (10 mM; n=5-6) (B)およびアデニン (1 mM; n=8) (C)による[^{3}H]リアノジン結合刺激は WT および *Tric-a* KO 骨格筋小胞において同程度の結果を示した (n=4; **** P<0.0001)。(A)、(C)におけるデータは 10 μM Ca^{2+}存在下における各遺伝子型の対照実験に対する割合を%で示す。(D) 100 μM Ca^{2+}存在下における 1 mM Mg^{2+}の阻害効果を示した。Mg^{2+}は WT 骨格筋と比較して *Tric-a* KO 骨格筋由来膜小胞において [^{3}H]リアノジン結合を顕著に阻害した (n=7; ** P<0.01)。

次に、Mg^{2+}による KO RyR に対する阻害効果増強が単分子チャネル活性においても存在するかどうかを調べた (Fig. 6)。サイトゾル側 Ca^{2+}のみを活性化剤として用いた場合には、RyR の Po は非常に低く、分散も大きいので、両群のチャネルについて Mg^{2+}に対する阻害感受性を比較することは難しい。そこで、ATP 存在下で Po が高い状態において Mg^{2+}の阻害効果を調べた。既に示したように (Figs. 4 and 5)、KO RyR のアデニンヌクレオチドに対する感受性は WT RyR と比較して差がない。至適チャネル活性を得るために、小胞体内腔側 Ca^{2+}濃度を 50 mM に設定して透過イオンとして用い、10 μM のサイトゾル側 Ca^{2+}を唯一の活性化剤として加えた場合に、WT RyR と KO RyR の Po は同程度であり、K^{+}を透過イオンとして用いた場合と同等であった。しかし、1 mM Mg^{2+}/3 mM ATP 存在下において KO RyR の Po は WT RyR と比較して顕著に低いことから、KO RyR における Mg^{2+}感受性増大が裏付けられた。また、サイトゾル側水槽から Mg^{2+}/ATP の洗浄除去を行ったところ、Po はそれぞれの対照群と同程度に戻った。この結果から、ATP による Po の増大は内在性リン酸化酵素によるチャネルのリン酸化によるものではないことが示唆された。

RyR1 の Mg^{2+}阻害感受性は RyR1 のリン酸化状態によって変化することが報告されている [42]。そこで、KO RyR において Po に影響を与えるリン酸化が既に発生していたのかを検討するために、ホスホプロテインホスファターゼ 1 (PP1)による脱リン酸化処理が KO RyR の開口に与える影響を調べた (Fig. 7)。PP1 溶液に含まれる Mn^{2+}も RyR 活性に影響を与える可能性があるので、10 μM Ca^{2+}存在下の脂質膜上にチャネルが再構成された状態で、PP1 (5 units)をサイトゾル側に加えて 10 分間インキュベートした後、PP1 を洗浄除去して対照条件へと戻した。その結果、WT, KO RyR のチャネル開口に顕著な差異は見られなかった (Figs. 7A and B)。以上の結果から、Mg^{2+}/ATP 存在下の KO RyR 開口に対して既存の PP1 感受性リン酸化が影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

さらに、Mg^{2+}/ATP 投与後のリン酸化について検討するために Mg^{2+}/ATP による RyR の可逆的活性化に対して PP1 が影響を与えるのかどうかを調べた。しかし、Mg^{2+}/ATP 存在下での RyR KO の低 Po は、PP1 処理によっても変化しなかった (Figs. 7C and D)。本結果からも、既存の PP1 感受性リン酸化が Mg^{2+}/ATP 存在下の KO RyR 開口に影響を与える可能性は低いことが示された。

Figure 6

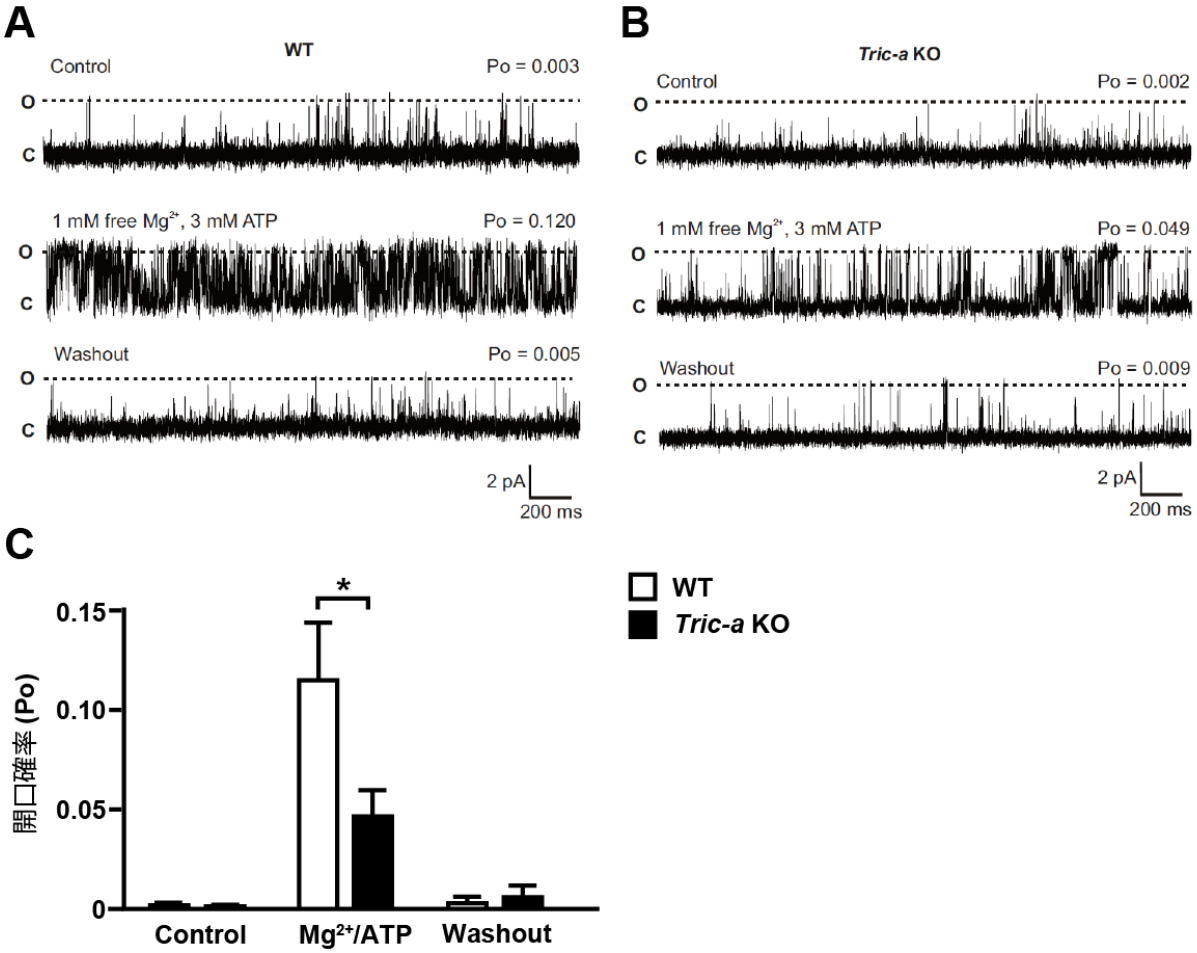

Figure 6. Ca^{2+} 透過時の *Tric-a* KO マウス由来 RyR1 チャネル開口に対する Mg^{2+}/ATP の影響
WT (A)および *Tric-a* KO (B)由来 RyR1 の単分子チャネル活性について、対照条件（上図、サイトゾル側 10 μM Ca^{2+})、1 mM Mg^{2+}/3 mM ATP/サイトゾル側 10 μM Ca^{2+} (中央図）および Mg^{2+}/ATP の洗浄後、対照条件（下図)下において測定した。電位は 0 mV に保持した。対照条件 (サイトゾル側、小胞体内腔側 10 μM Ca^{2+})、サイトゾル側 1 mM ATP 添加時、小胞体内腔側 Ca^{2+} (100 μM, 1 mM)添加時のトレースを示す。O, C としてそれぞれ開口状態 (Open)、閉口状態 (Closed)を示す。(C) WT および *Tric-a* KO マウス由来 RyR の Po について、対照条件、Mg^{2+}/ATP 存在下、小胞体内腔側添加時の平均値を示す。データは平均値±S.E.M.として示す（n=14 for WT, n=22 for KO; *p<0.05)。

Figure 7

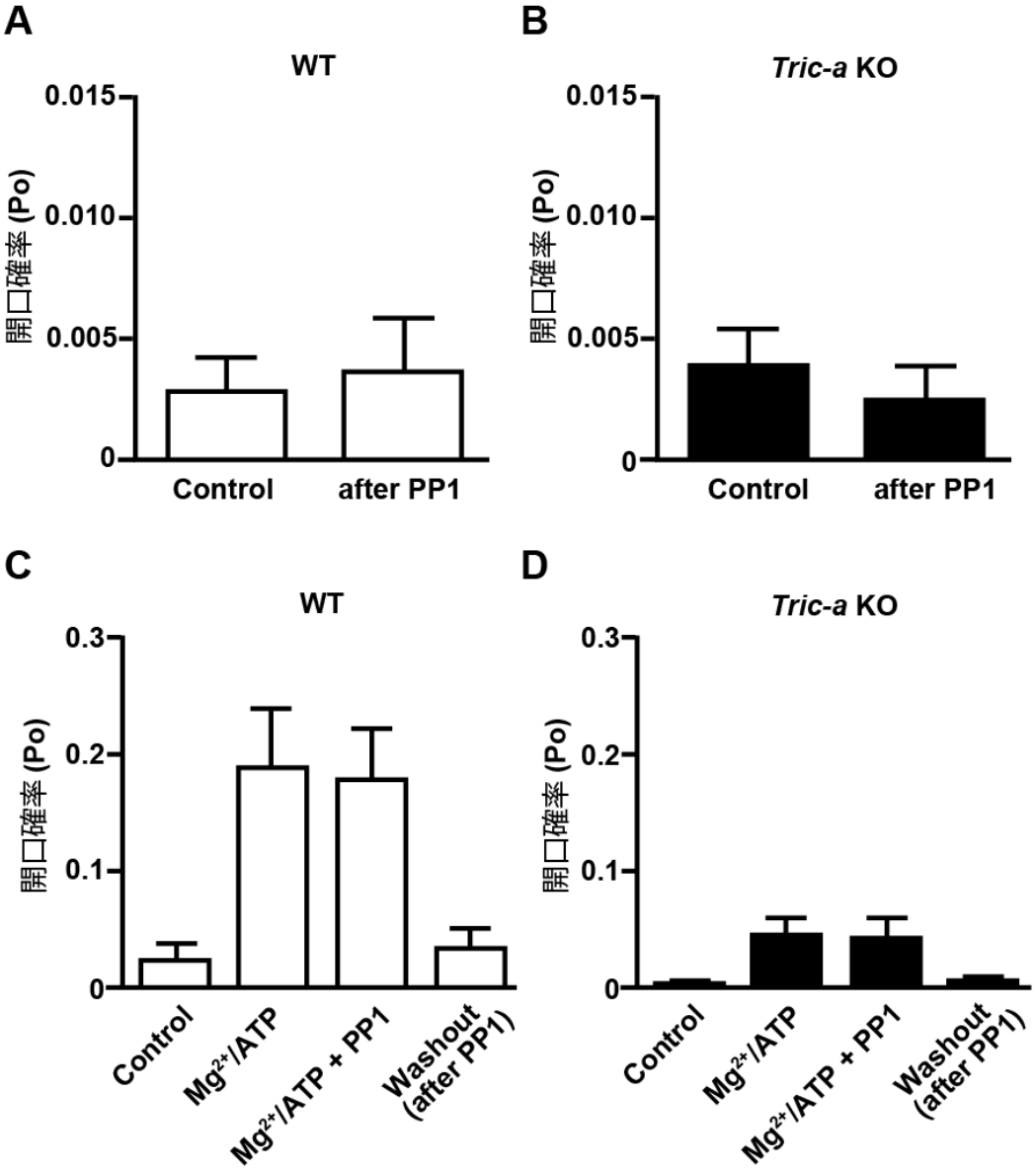

Figure 7. Ca^{2+} 透過時の、*Tric-a* KO マウス由来 RyR1 チャネル開口に対する PP1 処理の影響

サイトゾル側 10 μM Ca^{2+} 存在下における WT (A)および *Tric-a* KO (B)骨格筋由来 RyR1 チャネル活性について、PP1 5 units をサイトゾル側に加えた前後の Po について示す。また、PP1 を 1 mM Mg^{2+}/3 mM ATP/サイトゾル側 10 μM Ca^{2+}存在下においても加え、その前後および洗浄除去の後についても WT (C)および *Tric-a* KO (D)骨格筋由来 RyR1 チャネル活性について Po を示す。グラフ下の略記は、control (サイトゾル側 10 μM Ca^{2+})、Mg^{2+}/ATP (1 mM Mg^{2+}/3 mM ATP/サイトゾル側 10 μM Ca^{2+})、Mg^{2+}/ATP + PP1 (1 mM Mg^{2+}/3 mM ATP/サイトゾル側 10 μM Ca^{2+}存在下において PP1 を加えてから 10 分間インキュベート後)、Washout (after PP1) (洗浄後、サイトゾル側 10 μM Ca^{2+}) を示す。データは平均値±S.E.M.として示す (n=8-9)。電位は 0 mV に保持した。

考察

本研究結果より、*Tric-a* KO マウス骨格筋由来 RyR は特異的な開口異常を示すことが示唆された。Mg^{2+}非存在下では、KO RyR はサイトゾル側活性化リガンドとして Ca^{2+}, ATP, アデニン, カフェインを用いた場合には顕著な開口異常を示さなかった。また、小胞体内腔側 Ca^{2+}に対しても感受性の変化はなかった。しかし、[^{3}H]リアノジン結合および単分子チャネル活性の両方に関して、Mg^{2+}は KO RyR に対して WT RyR と比較して顕著な阻害効果を示した。また、[^{3}H]リアノジン結合に関して、低濃度 Ca^{2+}では RyR KO の活性化感受性に変化が見られないのに対して、高濃度 Ca^{2+}に対する阻害感受性は増加していた。このことから、低親和性二価カチオン結合部位における阻害効果が増加している可能性が示された。さらに、Mg^{2+}/ATP 両存在下および非存在下において、PP1 による脱リン酸化処理は KO RyR の Po に対して効果を示さなかった。この結果は、KO RyR における Mg^{2+}阻害感受性に影響する PP1 感受性リン酸化がないことを示している。しかし、リン酸化酵素および脱リン酸化酵素の標的となるリン酸化部位は多様であり [42]、PP1 処理の結果からはリン酸化・脱リン酸化に対する反応性の変化がないと一概に結論付けることは難しい。したがって、今後は PKA など他のリン酸化状態関連酵素に対する反応性についても検討する必要がある。

本研究によって示された KO RyR チャネル機能の変化からは、*Tric-a* KO マウス骨格筋の機能異常 [16] について新たに解釈を加えることが可能である。*Tric-a* KO マウスにおいて SR 内の Ca^{2+}貯留による電子密度増加および高頻度の空胞が観察されることから、SR 内 Ca^{2+}濃度が増大していることが示唆される [16]。さらに、*Tric-a* KO マウスから単離された短趾屈筋においてカフェイン惹起性 Ca^{2+}トランジェントが増大していることからも、SR 内 Ca^{2+}が高濃度になっていることが示唆されている。本研究によって示唆された RyR KO のチャネル活性低下は、SR 内 Ca^{2+}濃度の上昇を惹起する

可能性がある。また、RyR チャネル活性低下の観点から、*Tric-a* KO マウスにおける Ca^{2+} スパーク頻度低下[16]についても説明が可能である。哺乳類骨格筋において Mg^{2+} 濃度上昇は Ca^{2+} スパーク頻度を低下させることが報告されており[43]、したがって、本研究によって観察された KO RyR における Mg^{2+}阻害感受性の増大は、Ca^{2+} スパーク頻度の低下に寄与すると考えられる。Mg^{2+}存在下で ATP を用いてチャネルを活性化した場合に、WT RyR の平均閉口時間 (=7.72±3.38 ms; n=14)は、KO RyR の平均閉口時間 (=90.22±30.46; n=10)に対して顕著に短かった (P<0.01)。この結果から、KO RyR の開口頻度は、本来 Ca^{2+} スパーク数を増加させる ATP によって効果的に増加しないことが示された。以上に加えて、SR 内 Ca^{2+}濃度が過剰に高くとも RyR の小胞体内腔側 Ca^{2+}感受性は低下しているため、既に報告されている Ca^{2+} スパーク頻度低下[16]が惹起されると考えられる。また、小胞体内腔側 Ca^{2+}が十分に高い場合には、RyR Po に対する小胞体内腔側 Ca^{2+}の活性化効果は Mg^{2+}による阻害効果を上回る可能性がある。このことと併せて、Ca^{2+} スパーク頻度低下により SR/サイトゾル間の Ca^{2+}濃度勾配が通常と比較して大きい場合には、RyR を介した Ca^{2+} トランジェント中の Ca^{2+}流出量が増加すると考えられ、alternan 様収縮を惹起すると考えられる。この説を間接的に支持するものとして、*Tric-a* KO マウスにおける RyR 活性の低下と SR Ca^{2+} 貯蔵量の増加とは対照的な病態が、悪性高熱症を呈する RyR1 変異体 Y522S において報告されている[44]。この変異体においては WT と比較して RyR1 から Ca^{2+}が漏洩しやすく、休息状態の SR Ca^{2+}貯蔵量が顕著に低い。

骨格筋において Ca^{2+}放出の間に急速に失われる Ca^{2+}に対して、SR K^+ チャネル群が十分な電荷補償のために必須であることが広く提唱されてきた[4–6]。しかし、近年になって、RyR の数学モデル解析から、Ca^{2+}放出の間に生じる電荷の移動に対して補償するために十分な K^+電流を RyR 自身が透過する可能性が示唆されている[33]。したがって、SR K^+ チャネル群は Ca^{2+}放出間において電荷補償に寄与することなく、SR

膜内外での一価カチオン濃度の調節を行う可能性がある。本研究では、SR K^+ チャネル群のカウンターイオン電流への寄与については焦点を当てなかったが、その一方で SR Ca^{2+}放出に影響する他の機構の存在が示唆された。TRIC-B は多くの細胞種に低発現しているのに対して、TRIC-A は骨格筋や心筋において高発現している [1]。また、骨格筋の結合膜構造においては、1 分子の RyR に対して 5 分子の TRIC-A および 1 分子の TRIC-B が存在すると想定されている [2,16]。このように RyR および大量の TRIC チャネルが高密度に存在する状況においては、仮に可逆的に RyR 開口を制御するような直接の物理的相互作用が存在するとすれば、その発生頻度は高いと考えられる。TRIC-A と TRIC-B のそれぞれの機能の分担あるいは補償について、*Tric-a* KO マウス骨格筋において TRIC-B の発現量が補償的に増加していない [3] ことから、少なくとも TRIC-B の発現量調節によって TRIC-A 機能の欠損を補償する機構は存在しないと考えられる。一方、血管平滑筋および RyR2 過剰発現 HEK293 細胞では、TRIC-A が RyR 制御性 Ca^{2+}放出を、TRIC-B が IP_3R 制御性 Ca^{2+}放出を優先的に制御する可能性が示唆されている [17,45]。この結果は *Tric-a* KO マウスにおいて RyR 制御性 Ca^{2+}放出障害 [16,17]、および *Tric-b* KO マウスにおいて IP_3R 制御性 Ca^{2+}放出障害 [19,20] が報告されていることからも支持される。

Tric-a KO マウスにおいて、RyR が相互作用する可能性がある TRIC チャネルは TRIC-B のみであるが、TRIC-B は RyR 機能に影響を及ぼさないか、あるいはもしも相互作用があるとしても Ca^{2+}放出機能には影響しないと考えられる [45]。Fig. 1 の実験では K^+を透過イオンとして用いたが、この条件においては多数の K^+チャネルが脂質膜上に再構成された結果、大量の K^+電流を透過して脂質膜を破壊する場合があり、RyR 活性の測定は困難であった。そのため、SR K^+ チャネル群の電流が同時に存在しない条件下で RyR 活性を観察する機会は乏しかった。一方 Ca^{2+}を透過イオンとして用いた場合に K^+電流を検出することは不可能であるが、先述の理由から実際には多

数の K^+チャネルが脂質膜に存在して RyR 活性に影響を与えた可能性がある。しかし、この条件下では SR K^+ チャネル群を介する電流は実際に観察されておらず、また脂質二重膜は電位固定下にあり電位が維持されているために、カウンターイオン電流の意義は失われる。したがって、本研究において TRIC-B を透過した K^+電流は、少なくとも RyR のチャネル活性に影響を与える要因とはなり得ないと考えられる。

結論として、TRIC-A は RyR 活性を制御することが単分子レベルで示された。TRIC-A による RyR 制御は、小胞体内腔側およびサイトゾル側 Ca^{2+}, ATP/アデニン, カフェインに対する活性化感受性には影響しないが、Mg^{2+}および高濃度のサイトゾル側 Ca^{2+}に対する阻害感受性に寄与することが示された。したがって、*Tric-a* KO マウスにおける病態モデルとして、TRIC-A 非存在下での Mg^{2+}とサイトゾル側 Ca^{2+}に対する RyR 活性の阻害効果が増加することによって Ca^{2+} スパーク頻度が低下した結果、SR Ca^{2+}貯蔵量の増加によって Ca^{2+}トランジェント中の Ca^{2+}放出量が増加し、alternan 様収縮を惹起するという機序が考えられる。さらに、SR 膜を介する一価カチオン電流の透過以外の機構によって RyR の開口挙動に影響を与える可能性が示唆された。

実験方法

SR 小胞の単離

SR 小胞については、以前述べた方法[3]に変更を加えて、WT および *Tric-a* KO マウスから単離した。まずマウス骨格筋を採取し、液体窒素を用いて急速冷凍した。冷凍組織を破砕した後、300 mM ショ糖, 20 mM PIPES (pH 7.4)および protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich), 1 mM PMSF, 2.5 mM DTT を含む緩衝液内でホモジナイズした。ホモジネートは 4 °C, 6,000 xg の条件で 20 分間遠心した。得られた沈殿を 400 mM ショ糖, 5 mM HEPES (pH 7.2), 2.5 mM DTT を含む緩衝液に再懸濁し膜画分とした。膜画分は分注し、液体窒素を用いて急速冷凍したものを-80 °C に保存した。膜画分は単分子チャネル活性測定および[^{3}H]リアノジン結合アッセイに用いた。

単分子チャネル活性測定

WT および *Tric-a* KO 骨格筋から採取した RyR の活性測定については以前述べた[31]。RyR のチャネル電流は、透過イオンとして K^+もしくは Ca^{2+}を用いて電位固定条件下で記録した。単離 SR 小胞の配向性および基準電位に関しては、第一章で述べた通りである。Ca^{2+}を透過イオンとして用いた場合、*cis* 槽には 250 mM HEPES, 80 mM Tris, 10 μM 遊離 Ca^{2+}, pH 7.2, *trans* 槽には 250 mM グルタミン酸, 10 mM HEPES に加え、$Ca(OH)_2$ (およそ 50 mM 遊離 Ca^{2+})を用いて pH 7.2 に調整した溶液をそれぞれ使用した。K^+を透過イオンとして用いた場合には、210 mM KPIPES, pH 7.2 の対称溶液条件下で測定し、実験上の必要に応じて小胞体内腔側、サイトゾル側に Ca^{2+}を加えた。PP1 (New England Biolabs)処理は 5 units を加え、Mn^{2+}存在下で 10 分間行った。PP1 処理後、*cis* 槽は洗浄し対照条件に戻した。本実験は室温 (22±2 °C)において行った。

チャネルの単分子解析

単分子チャネル活性測定結果は 20 kHz でデジタル化し、pClamp ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)を用いてコンピュータのハードディスク上に記録した。理想化前に、Ca^{2+}を透過イオンとして用いた場合には 800 Hz、K^{+}を透過イオンとして用いた場合には 4 kHz でデジタルフィルタリングした。開口状態および閉口状態はマニュアル操作にて選択した。Po は 3 分間以上連続した開口記録から 50 % threshold method を用いて算出した [46]。

[^{3}H]リアノジン結合アッセイ

[^{3}H]リアノジン (PerkinElmer Inc.)の SR 小胞への結合は 200 µg protein/ml, 5 nM [^{3}H]リアノジン, 250 mM KCl, and 25 mM PIPES, 200 µM AEBSF, pH 7.2 を含む緩衝液中において 37 °C, 90 分間の条件で測定した。RyR 制御因子である Ca^{2+}, Mg^{2+}, カフェインおよびアデニンを必要に応じて加え、その場合各図の説明に記した。遊離 Ca^{2+}濃度 は Maxchelator software (http://maxchelator.stanford.edu/)による計算の元、EGTA と $CaCl_2$ 溶液を用いて調整した。非特異的結合は 1000 倍過剰の非標識リアノジン存在下において評価した。結合リアノジンと遊離リアノジンは Whatman GF/B ガラス繊維フィルターを用いた急速フィルタリングによって分離した。フィルター上に残留した[^{3}H]リアノジンは液体シンチレーション分光測定器によって定量した。測定は triplicate で行い、各実験には少なくとも 3 例の骨格筋膜画分を使用した。

総括

本研究成果の概要を以下に示した。

第一章

TRIC-B の単分子チャネル活性について、生理的膜電位を含む各電位における最大コンダクタンス、サブコンダクタンス開口挙動を示した。

第二章

単分子解析を用いて TRIC-A 非存在下における RyR チャネル活性低下を示した。

結論として、本研究では電気生理学的解析を用いて生理的条件下における TRIC-B の開口挙動を示し、さらにカウンターイオンチャネルとしての機能実態の一端を示した。また、TRIC-A の RyR 制御効果を示すとともに、カウンターイオン電流の透過以外の機能の存在について可能性を示した。本研究結果については、カウンターイオンチャネルとしての機能を含めた、小胞体 Ca^{2+}放出制御における TRIC チャネル生理機能の全容解明に役立つことが期待される。

謝辞

博士論文をまとめるにあたり、指導教官として研究の機会を与えて頂くとともに、ご指導とご鞭撻を下さった京都大学大学院薬学研究科竹島浩教授に深い謝意を表します。また、本研究に際し、終始ご指導とご助言を賜った竹島美幸特定准教授、市村敦彦特定助教に深く感謝いたします。

電気生理学的解析にあたり多大なご助力とご協力を頂きました Professor Rebecca Sitsapesan, Dr. Elisa Venturi, Dr. Sam El-Ajouz (Department of Pharmacology University of Oxford), Dr. Antoni Matyjaszkiewicz (Department of Engineering Mathematics, University of Bristol)、そして各研究室所属の方々に深く感謝いたします。

研究全般にわたり熱心なご指導を頂いた柿澤昌准教授、山崎大樹博士、帝京平成大学薬学研究科山本伸一郎講師に厚く御礼申し上げます。

日々、有意義な議論の場を提供して頂くとともに激励とご支援を下さった薬学研究科生体分子認識学分野の皆様に感謝いたします。

大学復帰にあたり激励とご助言を下さった高倉喜信教授、中山和久教授に感謝の意を表します。

最後に、絶えず暖かく励ましてくださった友人の方々、長年にわたり研究生活を辛抱強く支えて頂いた父母と妹に心より感謝申し上げます。

論文目録

第一章

Subconductance Gating and Voltage Sensitivity of Sarcoplasmic Reticulum K^+ Channels: A Modeling Approach

Antoni Matyjaszkiewicz, Elisa Venturi, Fiona O'Brien, Tsunaki Iida, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, Krasimira Tsaneva-Atanasova, and Rebecca Sitsapesan

平成 27 年 7 月発行

Biophysical Journal,

第 **109** 巻 265 頁～276 頁に掲載

第二章

Dampened activity of single ryanodine receptor channels from the skeletal muscle of mice devoid of TRIC-A

Sam El-Ajouz, Elisa Venturi, Katja Witschas, Matthew Beech, David Eberhardt, Fiona O'Brien, Tsunaki Iida, Miyuki Nishi, Hiroshi Takeshima, and Rebecca Sitsapesan

[投稿中]

参考文献

1. Yazawa, M., *et al.* TRIC channels are essential for Ca^{2+} handling in intracellular stores. *Nature* **448,** 78–83 (2007).
2. Pitt, S. J. *et al.* Charade of the SR K^+-channel: Two ion-channels, TRIC-A and TRIC-B, masquerade as a single K^+ -channel. *Biophys. J.* **99,** 417–426 (2010).
3. Venturi, E. *et al.* TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. *Pflugers Arch.* **465,** 1135–48 (2013).
4. Miller, C. & Rosenbcrg, R. L. A voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum. Effects of transition metal ions. *Biochemistry* **18,** 1138–1145 (1979).
5. Somlyo, A. V, *et al.* Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron probe study. *J. Cell Biol.* **90,** 577–594 (1981).
6. Fink, R. & Veigel, C. Calcium uptake and release modulated by counter-ion conductances in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **156,** 387–396 (1996).
7. Coronado, R., Rosenberg, R. & Miller, C. Ionic selectivity, saturation, and block in a K^+-selective channel from sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. ...* **76,** 425–446 (1980).
8. Labarca, P. P. & Miller, C. A K^+-selective, three-state channel from fragmented sarcoplasmic reticulum of frog leg muscle. *J. Membr. Biol.* **61,** 31–38 (1981).
9. Tomlins, B., Williams, A. & Montgomery, R. The characterization of a monovalent cation-selective channel of mammalian cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Membr. ...* **80,** 191–199 (1984).
10. Gray, M. A., Montgomery, R. A. P. & Williams, A. J. Asymmetric block of a

monovalent cation-selective channel of rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum by succinyl choline. *J. Membr. Biol.* **88,** 85–95 (1985).

11. Barbara Tomlins & Williams, A. J. Solubilisation and reconstitution of the rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum K^+ channel into liposomes suitable for patch clamp studies. *Pflügers Arch.* **407,** 341–347 (1986).
12. Hill Jr., J.A., Coronado, R., Strauss, H. C. Open-channel subconductance state of K^+ channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **258,** H159-164 (1990).
13. Rousseau, E., *et al.* Reconstitution and regulation of cation-selective channels from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biochem.* **114,** 109–117 (1992).
14. Shen, W. K., *et al.* Voltage and temperature dependence of single K^+ channels isolated from canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* **65,** 747–54 (1993).
15. Picher, M., Decrouy, A. & Rousseau, E. Conducting and voltage-dependent behaviors of potassium ion channels reconstituted from diaphragm sarcoplasmic reticulum: comparison with the cardiac isoform. *Biochim. Biophys. Acta.* **1279,** 93–103 (1996).
16. Zhao, X. *et al.* Ca^{2+} overload and sarcoplasmic reticulum instability in tric-a null skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **285,** 37370–37376 (2010).
17. Yamazaki, D. *et al.* TRIC-A Channels in Vascular Smooth Muscle Contribute to Blood Pressure Maintenance. *Cell Metab.* **14,** 231–241 (2011).
18. Tao, S. *et al.* Facilitated Hyperpolarization Signaling in Vascular Smooth Muscle-overexpressing TRIC-A Channels. *J. Biol. Chem.* **288,** 15581–15589 (2013).
19. Yamazaki, D. *et al.* Essential role of the TRIC-B channel in Ca^{2+} handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development* **136,** 2355–61 (2009).
20. Zhao, C. *et al.* Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. **9,** 1–12 (2016).

21. Shaheen, R., Alazami, A. M. & Alkuraya, F. S. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J. Med. Genet.* **49,** 630–635 (2012).

22. Volodarsky, M. *et al.* A Deletion Mutation in TMEM38B Associated with. *Hum. Mutat.* **34,** 582–586 (2013).

23. Rubinato, E. *et al.* A novel deletion mutation involving TMEM38B in a patient with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Gene* **545,** 290–292 (2014).

24. Ichimura, A. & Takeshima, H. TRIC-B Mutations Causing Osteogenesis Imperfecta. *Biol. Pharm. Bull.* **39,** 1743–1747 (2016).

25. Anzai, K., Takano, C. & Kirino, Y. Asymmetrical lipid charge changes the subconducting state of the potassium channel from sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199,** 1081–1087 (1994).

26. Bell, J. E. & Miller, C. Effects of phospholipid surface charge on ion conduction in the K^+ channel of sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* **45,** 279–287 (1984).

27. Miller, C. Voltage-gated cation conductance channel from fragmented sarcoplasmic reticulum: steady-state electrical properties. *J. Membr. Biol.* **40,** 1–23 (1978).

28. Labarca, P., Coronado, R. & Miller, C. Thermodynamic and Kinetic Studies of the Gating Behavior of a K^+-selective Channel from the Sarcoplasmic Reticulum Membrane. *J. Gen. Physiol.* **76,** 397–424 (1980).

29. Uehara, A., Yasukochi, M. & Imanaga, I. Calcium modulation of single SR potassium channel currents in heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26,** 195–202 (1994).

30. Liu, Q. Y. & Strauss, H. C. Blockade of cardiac sarcoplasmic reticulum K^+ channel by Ca^{2+}: two-binding-site model of blockade. *Biophys. J.* **60,** 198–203 (1991).

31. Sitsapesan, R. *et al.* Sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channels:

modification of conductance and gating by temperature. *J. Physiol.* **434,** 469–488 (1991).

32. Qin, F. Restoration of Single-Channel Currents Using the Segmental k-Means Method Based on Hidden Markov Modeling. *Biophys. J.* **86,** 1488–1501 (2004).

33. Gillespie, D. & Fill, D. Intracellular calcium release channels mediate their own countercurrent: the ryanodine receptor case study. *Biophys. J.* **95,** 3706–3714 (2008).

34. Gillespie, D., Giri, J. & Fill, M. Reinterpreting the anomalous mole fraction effect: the ryanodine receptor case study. *Biophys. J.* **97,** 2212–2221 (2009).

35. Bleunven, C. *et al.* SRP-27 is a novel component of the supramolecular signalling complex involved in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biochem. J.* **411,** 343–349 (2008).

36. Witherspoon, J. W. & Meilleur, K. G. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol. Commun.* **4,** 121 (2016).

37. Holmberg, S. & Williams, A. The cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel : modulation of ryanodine binding and single-channel activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1022,** 187–193 (1990).

38. Sitsapesan, B. Y. R. & Williams, A. J. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* **423,** 425–439 (1990).

39. Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q. Y. & Meissner, G. Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **267,** 75–86 (1988).

40. Chan, W. M., Welch, W. & Sitsapesan, R. Structural factors that determine the ability of adenosine and related compounds to activate the cardiac ryanodine receptor. *Br. J.*

Pharmacol. **130,** 1618–1626 (2000).

41. Chan, W. M., Welch, W. & Sitsapesan, R. Structural characteristics that govern binding to, and modulation through, the cardiac ryanodine receptor nucleotide binding site. *Mol. Pharmacol.* **63,** 174–182 (2003).

42. Hain, J. *et al.* H. Phosphorylation Modulates the Function of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle. *Biophys. J.* **67,** 1823–1833 (1994).

43. Zhou, J. *et al.* Regulation of Ca^{2+} sparks by Ca^{2+} and Mg^{2+} in mammalian and amphibian muscle. An RyR isoform-specific role in excitation-contraction coupling? *J. Gen. Physiol.* **124,** 409–428 (2004).

44. Manno, C. *et al.* Altered Ca^{2+} concentration, permeability and buffering in the myofibre Ca^{2+} store of a mouse model of malignant hyperthermia. *J. Physiol.* **18,** 4439–4457 (2013).

45. Zhou, X. *et al.* TRIC Channels and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. *Circ. Res.* **114,** 706–716 (2014).

46. Colquhoun, D. & Sigworth, F. J. Fitting and statistical analysis of single-channel records. *B. Sakmann, E. Neher (Eds.), Single-Channel Rec. Springer, NY* 483–587 (2009).