京都大学	博　士　　（ 薬科学 ）	氏 名	飯田　　綱規
論文題目	小胞体膜タンパク質TRICチャネルの分子機能解析		

（論文内容の要旨）

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始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とTRIC-Bの2つのサブタイプが含まれる。*Tric-a, -b*-double-knockout (KO) miceにおいて、心臓形成異常とその原因と考えられるCa^{2+}放出異常が観察されることから、TRICチャネルがCa^{2+}放出補助機能を有すことが示唆されている。その機構の一つの可能性としては、Ca^{2+}放出時に生じ得る小胞体内外の電荷の分布に対し、カチオンを流出入させてこれを補償することにより効率的なCa^{2+}放出を維持するカウンターイオンチャネルとしての役割が想定されてきた。しかし、TRICチャネルの詳細なチャネル機能およびCa^{2+}放出補助機構の実態については十分な研究が行われていなかった。そこで、本研究において主に電気生理学的手法を用いてTRICチャネルの分子機能解明を試みた。

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

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, -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とするため、*Tric*-a-KO mice由来SR小胞を用いて人工脂質二重膜再構成法を行い、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 mice由来SR小胞から検出されたTRIC-Bは、最大コンダクタンス電流の~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、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~+20mV間で急激に増加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および最大コンダクタンス開口の寄与を求めるため、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~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。

第二章 *Tric-a*-KO mice由来骨格筋におけるRyRの活性低下

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、申請者は人工脂質二重膜再構成法および[^{3}H]ryanodine binding assayを用いて、*Tric-a*-KO mice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 mice由来RyR (以下KO RyR)は、人工脂質二重膜下において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、生体膜下におけるKO RyRの制御リガンドへの反応性を調べるため、[^{3}H]ryanodine binding assayを行った。その結果、KO RyRはWT mice由来RyR (以下WT RyR)と比較してCa^{2+}に対する正常な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、caffeine, adenineについ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、単分子において上記Mg^{2+}によるRyR制御の変化を調べるため、人工脂質二重膜再構成法を用いた。細胞質側Ca^{2+}単体によるRyR活性化状態においては、RyRのPoは非常に低く分子間で多様な値を示す。この問題を解決するため、WTおよびKO RyR間で感受性に差異がない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測定した。その結果、Mg^{2+}/ATP存在下においてKO RyRは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、phosphatase1 (PP1)によるPoへの影響を調べた。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処理を行ったところ、前後で顕著なPo変化は観察されなかった。したがって、Mg^{2+}/ATP添加前においてPP1によって脱リン酸化されるもの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において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である可能性が示された。

以上の研究により、TRICチャネルにおける自身のチャネル活性の性質および、TRICチャネルによるRyR制御機能の一端が示された。本研究結果は、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チャネルの生理機能の全容解明に役立つことが期待される。

（続紙　２　）

（論文審査の結果の要旨）

小胞体と核膜に分布するTRICチャネルは、その遺伝子欠損によるマウス致死性やヒト家族性疾患から、極めて生理学的に重要であることが判明している。しかしながら、TRICサブタイプが形成するチャネルの開閉様式や他の小胞体チャネルとの共役機構などに関してはまったく不明である。本研究では *Tric-a* 欠損マウス骨格筋に残存するTRIC-Bチャネルの電気生理学的性質を明らかにするとともに、*Tric-a* 欠損骨格筋におけるリアノジン受容体(RyR1)の性質変動も見出した。得られた成果はTRICチャネルの機能解明に貢献するものであり、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文審査発表会後に副査から寄せられたコメントも含めて、平成29年2月20日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：　2017年　6月　15日以降