

氏 名	や ざわ まさ ゆき 矢 澤 真 幸
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 612 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	TRIC channels essential for Ca^{2+} handling in intracellular stores. (細胞内に貯蔵されるカルシウムイオンの調節に必要な TRIC チャネルの解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 島 浩 教 授 中 山 和 久 教 授 伊 藤 信 行

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋及び心筋の興奮収縮連関において、細胞膜上のジヒドロピリジンレセプターの活性化に伴い、筋小胞体膜上に発現しカルシウムチャネルとして機能するリアノジンレセプターが開きカルシウムが小胞体から細胞質に放出されることが知られている。その際に、急激な Ca^{2+} の移動に伴い小胞体内に負の電位が生じ、そうした一過性の電位変化を中和すべく K^{+} がカウンターイオンとして寄与している可能性が考えられてきた。これまで人工脂質膜への再構築実験において骨格筋や心筋から得られた小胞体膜画分にイオンチャネル活性が認められたという報告があるが、それら分子の同定はこれまで成功していない。したがって、本研究はその分子の同定及びその機能解析を目的として以下の研究を進めた。

ウサギ骨格筋から得られた小胞体膜画分におけるタンパク質のスクリーニングの結果、複数の膜貫通領域を有し多量体を形成すると思われる分子量33 kDa のタンパク質がクローニングされた（以下に TRIC: trimeric intracellular cation channel と表記する）。BLAST 検索によりショウジョウバエや線虫においてもホモログが存在していること、また哺乳動物では (TRIC-A, TRIC-B と名づけた) 二つの相同性の高い分子が存在することがわかった。ウサギ TRIC-A のカルボキシル末端に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、長指伸筋の免疫染色、免疫電顕及びショ糖密度勾配法により得られた膜画分のウェスタンブロットから TRIC が小胞体膜に発現していることが示唆された。さらに TRIC サブタイプの臓器ごとの発現を調べるためにノーザンブロットを行い、TRIC-A は筋肉・神経といった興奮性細胞に発現し、一方、TRIC-B はほとんどの細胞に発現していることが明らかになった。

生化学的な解析では、TMHMM といった膜貫通領域を推測するプログラムと hydrophobicity plot (Kyte & Doolittle, 1982) より TRIC-A が 3 回膜貫通であると仮定して、親水性の高い領域にエピトープタグを挿入し HEK293 細胞に発現させ、その膜画分にプロテアーゼ処理を行いウェスタンブロットにより解析することで TRIC-A の membrane topology を検討した。また、マウス TRIC-A アミノ末端及びカルボキシル末端それぞれを認識するウサギポリクローナル抗体を作製し、マウス骨格筋の膜画分に同様のプロテアーゼ処理を行い各末端が ER 内腔側もしくは細胞質側にあるのかをウェスタンブロットにより調べた。その結果、TRIC は 3 回膜貫通でアミノ末端が ER 内腔側、カルボキシル末端が細胞質側にあることが示された。

TRIC 分子の機能解析として、マウスモノクローナル抗体を用いてウサギ骨格筋から TRIC-A タンパク質の精製を行い、人工脂質膜へ TRIC 分子を再構築しイオンチャネル活性の測定を行った。また、精製の際に他の微量なタンパク質が混入しそれがイオンチャネル活性を有する場合はその活性が検出されてしまう可能性があることから、組換え TRIC-A タンパク質を大腸菌に発現させ精製した試料においても同様の実験を行った。以上の実験から、人工脂質膜の再構築系においてウサギ骨格筋・大腸菌の発現系から得られた TRIC-A タンパク質が主に K^{+} を、また Na^{+} も通すカチオンチャネルを形成することが示された。また、TRIC-A カルボキシル末端に結合するモノクローナル抗体を再構築系の溶液中に加えるとイオンチャネル活性が失われることから、検出された活性が TRIC-A 分子由来であることが示された。

TRIC の構造解析においては、精製した TRIC-A をクロスリンカーで処理するとウェスタンブロットで三量体を示唆するバンドが検出された。さらに精製した TRIC-A に負染色を施し電子顕微鏡で得られた粒子イメージの 3 次元構造解析を行ったところ、TRIC-A が bullet-like structure であることが示された。さらには金コロイドと結合した anti-TRIC Fab を、精製した TRIC-A タンパク質と反応させ負染色を施したのちに電子顕微鏡で観察すると、3 つの金コロイドに囲まれた TRIC 粒子が多数認められた。以上のことから、TRIC 分子が三量体を形成していることが示された。

TRIC の生体内での生理的な役割を調べるためにノックアウトマウスを作製した。TRIC-A(-/-)マウスは生殖能力を有し、顕著な発達障害などは認められないが、TRIC-B(-/-)マウスは生後すぐに呼吸不全のために死亡する。また、TRIC-A(-/-)-B(-/-)マウス (DKO) は胎生10日目後に死亡することが認められた。観察により DKO 心臓の収縮が脆弱であることが認められたことから、その心機能低下の原因を追究すべく、胎生8.5日目及び9.5日目の DKO 心筋の電子顕微鏡による観察及びカルシウムイメージングを行った。顕微鏡・電顕観察により DKO 心筋において vacuole が認められ、それらが小胞体によるもの、またカルシウム沈殿法により DKO の vacuole 化した小胞体内にカルシウムが非常に多く含まれることが明らかになった。さらに胎生8.5日目及び9.5日目のマウスより心臓を摘出し Fluo-4 を用いてカルシウムイメージングを行ったところ、8.5日の心臓においてはカルシウムオシレーションの低下及びカフェインに対する高い応答が認められた。9.5日目ではウェスタンブロットを行ったところ多くのタンパク質が分解しており、心臓の収縮は僅かにしか認められずカルシウムイメージングではカフェインに対する応答も認められなかった。カフェインは筋小胞体膜に存在するリアノジンレセプターを開く作用があることから、胎生8.5日目 DKO のカフェインに対する高い応答は、先の電顕で認められたカルシウムの沈殿とともに、小胞体内に多くのカルシウムが存在していたことを示すものと思われる。また、生理的な溶液下で DKO 心筋細胞内のカルシウムオシレーションが低下していたことは、カウンターイオンチャネルとして機能すると思われる TRIC が欠損していることでリアノジンレセプターを介した小胞体からのカルシウム放出が効果的に行えなかったためと考えることも可能である。以上のことから、TRIC が欠損したことにより小胞体にカルシウムが蓄積し細胞内の恒常性が失われた結果、多くのタンパク質が分解し心筋の収縮能が失われ DKO は胎生致死に至ったものと考えられる。

したがって、本研究によってクローニングされた新規小胞体膜タンパク質 TRIC は三量体を形成し、生理的にはカチオンチャネルとしての機能を有し小胞体からのカルシウム放出に寄与する分子であることが示された。

論文審査の結果の要旨

骨格筋及び心筋の興奮収縮連関において、細胞膜上のジヒドロピリジンレセプターの活性化に伴い、筋小胞体膜上に発現しカルシウムチャネルとして機能するリアノジンレセプターが開きカルシウムが小胞体から細胞質に放出されることが知られている。その際に、急激な Ca^{2+} の移動に伴い小胞体内に負の電位が生じ、そうした一過性の電位変化を中和すべく K^{+} がカウンターイオンとして寄与している可能性が考えられてきた。これまで人工脂質膜への再構築実験において骨格筋や心筋から得られた小胞体膜画分にイオンチャネル活性が認められたという報告があるが、それら分子の同定はこれまで成功していない。したがって、本研究はその分子の同定及びその機能解析を目的として以下の研究を進めた。

ウサギ骨格筋から得られた小胞体膜画分におけるタンパク質のスクリーニングの結果、複数の膜貫通領域を有し多量体を形成すると思われる分子量33 kDa のタンパク質がクローニングされた（以下に TRIC: trimeric intracellular cation channel と表記する）。BLAST 検索によりショウジョウバエや線虫においてもホモログが存在していること、また哺乳動物では (TRIC-A, TRIC-B と名づけた) 二つの相同性の高い分子が存在することがわかった。ウサギ TRIC-A のカルボキシル末端に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、長指伸筋の免疫染色、免疫電顕及びシヨ糖密度勾配法により得られた膜画分のウェスタンブロットから TRIC が小胞体膜に発現していることが示唆された。さらに TRIC サブタイプの臓器ごとの発現を調べるためにノーザンブロットを行い、TRIC-A は筋肉・神経といった興奮性細胞に発現し、一方、TRIC-B はほとんどの細胞に発現していることが明らかになった。

生化学的な解析では、TMHMM といった膜貫通領域を推測するプログラムと hydrophobicity plot (Kyte & Doolittle, 1982) より TRIC-A が 3 回膜貫通であると仮定して、親水性の高い領域にエピトープタグを挿入し HEK293 細胞に発現させ、その膜画分にプロテアーゼ処理を行いウェスタンブロットにより解析することで TRIC-A の membrane topology を

検討した。また、マウス TRIC-A アミノ末端及びカルボキシル末端それぞれを認識するウサギポリクローナル抗体を作製し、マウス骨格筋の膜画分に同様のプロテアーゼ処理を行い各末端が小胞体内腔側もしくは細胞質側にあるのかをウェスタンブロットにより調べた。その結果、TRIC は 3 回膜貫通でアミノ末端が小胞体内腔側、カルボキシル末端が細胞質側にあることが示された。

TRIC 分子の機能解析として、マウスモノクローナル抗体を用いてウサギ骨格筋から TRIC-A タンパク質の精製を行い、人工脂質膜へ TRIC 分子を再構築しイオンチャネル活性の測定を行った。また、精製の際に他の微量なタンパク質が混入しそれがイオンチャネル活性を有する場合はその活性が検出されてしまう可能性があることから、組換え TRIC-A タンパク質を大腸菌に発現させ精製した試料においても同様の実験を行った。以上の実験から、人工脂質膜の再構築系においてウサギ骨格筋および大腸菌の発現系から得られた TRIC-A タンパク質が主に K^+ を、また Na^+ も通すカチオンチャネルを形成することが示された。また、TRIC-A カルボキシル末端に結合するモノクローナル抗体を再構築系の溶液中に加えるとイオンチャネル活性が失われることから、検出された活性が TRIC-A 分子由来であることが示された。

TRIC の構造解析においては、精製した TRIC-A をクロスリンカーで処理するとウェスタンブロットで三量体を示唆するバンドが検出された。さらに精製した TRIC-A に負染色を施し電子顕微鏡で得られた粒子イメージの 3 次元構造解析を行ったところ、TRIC-A が bullet-like structure であることが示された。さらには金コロイドと結合した anti-TRIC-A Fab を、精製した TRIC-A タンパク質と反応させ負染色を施したのちに電子顕微鏡で観察すると、3 つの金コロイドに囲まれた TRIC 粒子が多数認められた。以上のことから、TRIC 分子が三量体を形成していることが示された。

TRIC の生体内での生理的な役割を調べるためにノックアウトマウスを作製した。TRIC-A(-/-) マウスは生殖能力を有し、顕著な発達障害などは認められないが、TRIC-B(-/-) マウスは生後すぐに呼吸不全のために死亡する。また、TRIC-A(-/-)-B(-/-) マウス (DKO) は胎生 10 日目前後に死亡することが認められた。観察により DKO 心臓の収縮が脆弱であることが認められたことから、その心機能低下の原因を追究すべく、胎生 8.5 日目及び 9.5 日目の DKO 心筋の電子顕微鏡による観察及びカルシウムイメージングを行った。光顕・電顕観察により DKO 心筋において vacuole が認められ、それらが小胞体によるもの、またカルシウム沈殿法により DKO の vacuole 化した小胞体内にカルシウムが非常に多く含まれることが明らかになった。さらに胎生 8.5 日目及び 9.5 日目のマウスより心臓を摘出し Fluo-4 を用いてカルシウムイメージングを行ったところ、8.5 日の心臓においてはカルシウムオシレーションの低下及びカフェインに対する高い応答が認められた。9.5 日目ではウェスタンブロットを行ったところ多くのタンパク質が分解しており、心臓の収縮は僅かにしか認められずカルシウムイメージングではカフェインに対する応答も認められなかった。カフェインは筋小胞体膜に存在するリアノジンレセプターを開く作用があることから、胎生 8.5 日目 DKO のカフェインに対する高い応答は、先の電顕で認められたカルシウムの沈殿とともに、小胞体内に多くのカルシウムが存在していたことを示すものと思われる。また、生理的な溶液下で DKO 心筋細胞内のカルシウムオシレーションが低下していたことは、カウンターイオンチャネルとして機能すると思われる TRIC が欠損していることでリアノジンレセプターを介した小胞体からのカルシウム放出が効果的に行えなかったためと考えることも可能である。以上のことから、TRIC が欠損したことにより小胞体にカルシウムが蓄積し細胞内の恒常性が失われた結果、多くのタンパク質が分解し心筋の収縮能が失われ DKO は胎生致死に至ったものと考えられる。

以上、本研究によって、新規小胞体膜タンパク質 TRIC は三量体を形成しイオンチャネルとしての機能を有すること、また、生理的にはカルシウム放出の際に小胞体内腔に発生する負電位を K^+ を透過させることで中和するという役割を担っていることが示された。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。

さらに、平成 19 年 2 月 22 日論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果優秀と認定した。