

の開発の手がかりとなることを期待している。

脱稿後、別グループからの同様な *Xenopus* 卵抽出物と ICL 基質 DNA を用いた *in vitro* 系の解析結果が報告された¹⁷⁾。2つの論文では異なる ICL 基質を用いているが、本稿で解説した Raschle 等の論文¹⁵⁾では p27^{Kip} による複製開始阻害で ICL 修復が抑制されたのとは対照的に、この文献¹⁷⁾では Geminin とロスコビチン (roscovitine) 処理による DNA 複製開始阻害に ICL 修復反応は抵抗性であると報告している。つまり、ICL 修復は DNA 複製に依存する系としない系が存在する。他にも、ICL 損傷はチェックポイント・シグナルを生じさせ、それは DNA 複製フォークの形成やヘリカーゼ、DNA ポリメラーゼとは独立であること、FA は ICL 損傷の修復だけでなくチェックポイントへの寄与も大きいこと、FA は RPA-ATR-Chk1 チェックポイント・シグナルの上流であることなどが報告されている¹⁷⁾。細胞周期などの細胞の特性、DNA 損傷による基質 DNA の構造変化、用いるアッセイ系の特徴などの様々なパラメーターを考慮に入れたデータの比較・検証が必要であるが、他の論文データとの整合性を含め、しばらく目が離せない状況である。

- 1) Dronkert, M.L.G. & Kanaar, R. (2001) *Mutation Res.*, 486, 217-247.
- 2) McHugh, P.J., Spanswick, V.J., & Hartley, J.A. (2001) *Lancet Oncol.*, 2, 483-490.
- 3) Lehoczký, P.L., McHugh, P.J., & Chovanec, M. (2007) *FEMS Microbiol. Rev.*, 31, 109-133.
- 4) Grillari, J., Katinger, H., & Voglauer, R. (2007) *Nucleic Acids Res.*, 35, 7566-7576.
- 5) Ciccica, A., McDonald, N., & West, S.C. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 259-287.
- 6) Wang, W. (2007) *Nature Rev. Genetics*, 8, 735-748.
- 7) Takata, M., Ishiai, M., & Kitao, H. (2009) *Mutation Res.*, 668, 92-102.
- 8) Ishiai, M., Kimura, M., Namikoshi, K., Yamazoe, M., Yamamoto, K., Arakawa, H., Agematsu, K., Matsushita, N., Takeda, S., Buerstedde, J.-M., & Takata, M. (2004) *Mol. Cell Biol.*, 24, 10733-10741.
- 9) Nojima, K., Hochegger, H., Saberi, A., Fukushima, T., Kikuchi, K., Yoshimura, M., Orelli, B.J., Bishop, D.K., Hirano, S., Ohzeki, M., Ishiai, M., Yamamoto, K., Takata, M., Arakawa, H., Buerstedde, J.-M., Yamazoe, M., Kawamoto, T., Araki, K., Takahashi, J.A., Hashimoto, N., Takeda, S., Sonoda, E. (2005) *Cancer Res.*, 65, 11704-11711.
- 10) Hanada, K., Budzowska, M., Davis, S.L., van Drunen, E., Onizawa, H., Beverloo, H.B., Maas, A., Essers, J., Hickson, I.D., & Kanaar, R. (2007) *Nature Struct. Mol. Biol.*, 14, 1096-1104.
- 11) Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B. C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., & Harper, J.W. (2009) *Cell*, 138,

63-77.

- 12) Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.-Q., Ruse, C., Yates III, J.R., Russell, P., Fuchs, R.P., McGowan, C.H., & Gaillard, P.-H. (2009) *Cell*, 138, 78-89.
- 13) Muñoz, I.V., Hain, K., Déclais, A.-C., Gardiner, M., Toh, G. W., Sanchez-Pulido, L., Heuckmann, J.M., Toth, R., Macartney, T., Eppink, B., Kanaar, R., Ponting, C.P., Lilley, D.M.J., & Rouse, J. (2009) *Mol. Cell*, 35, 116-127.
- 14) Andersen, S.L., Bergstrahl, D.T., Kohl, K.P., LaRocque, J.R., Moore, C.B., & Sekelsky, J. (2009) *Mol. Cell*, 35, 128-135.
- 15) Raschle, M., Knipsheer, P., Enou, M., Angelov, T., Sun, J., Griffith, J.D., Ellenberger, T.E., Schärer, O.D., & Walter, J.C. (2008) *Cell*, 134, 969-980.
- 16) Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S.J., & Takata, M. (2008) *Nature Struct. Mol. Biol.*, 15, 1138-1146.
- 17) Ben-Yehoyada, M., Wang, L.C., Kozekov, I.D., Rizzo, C.J., Gottesman, M.E., & Gautier, J. (2009) *Mol. Cell*, 35, 704-715.

石合 正道

(京都大学放射線生物研究センター晩発効果研究部門

DNA 損傷シグナル研究分野)

DNA interstrand crosslink repair in vertebrate cells
Masamichi Ishiai (Laboratory of DNA Damage Signaling,
Department of Late Effect Studies, Radiation Biology Center,
Kyoto University, Yoshidakonoe-cho, Sakyou-ku,
Kyoto, Kyoto 606-8501, Japan)

TRIC チャネルの生理的機能

1. はじめに

細胞質の Ca²⁺濃度上昇は、細胞外からの Ca²⁺流入と細胞内ストアからの Ca²⁺放出により構成される。多機能オルガネラである小胞体はタンパク質合成・修飾、脂質合成、小胞体ストレス反応などに加えて、細胞内 Ca²⁺ストアとしても機能しており、Ca²⁺シグナル形成に深く寄与する。小胞体が Ca²⁺ストアとしての機能を発揮するためには、Ca²⁺取り込み、Ca²⁺貯蔵、Ca²⁺放出を担当する分子群とともに、その分子群の働きを調節または支援する分子機構が必要となる。小胞体 Ca²⁺放出を担うチャネルとしては、一般的に細胞質側の Ca²⁺濃度上昇を感知して活性化するリアノジン受容体チャネル (RyR) と、リン脂質代謝

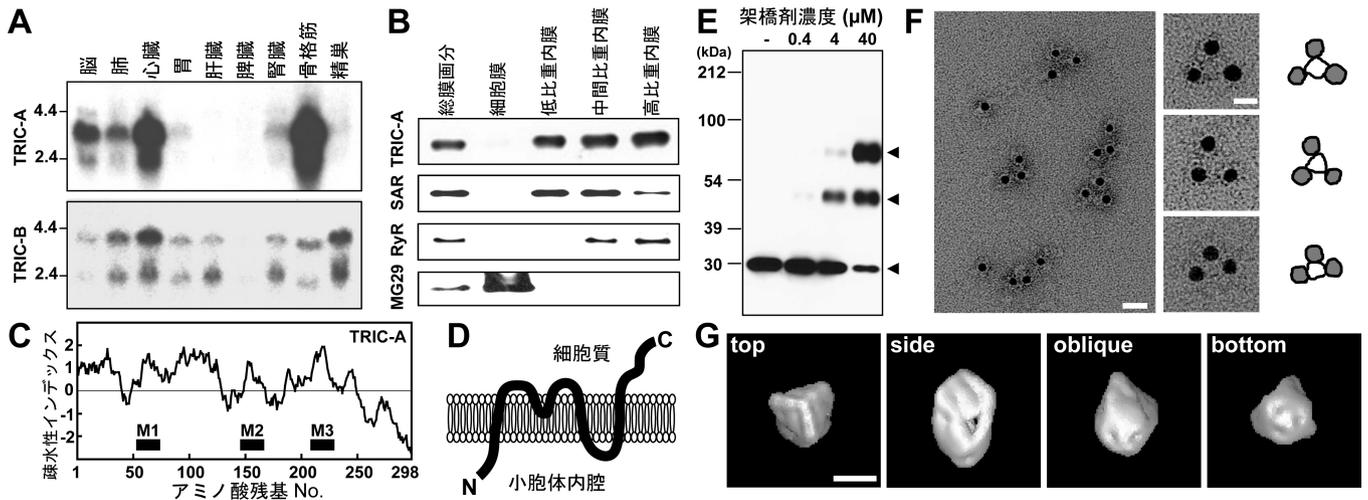


図1 TRICチャンネルの生化学解析

(A) マウス組織における TRIC サブタイプのノーザンプロット実験。(B) 骨格筋膜画分における TRIC-A のウェスタンプロット実験。骨格筋より総膜画分を調製後、密度勾配遠心法により横行管に富む細胞膜画分、筋小胞体縦走部に富む低比重内膜、中間比重内膜と小胞体終末部に富む高比重内膜に分画してプロット実験に用いた。(C) Kyte-Doolittle 法による TRIC-A の疎水性プロファイル。(D) 膜小胞のタンパク質分解酵素による部分消化実験から想定された TRIC チャンネルの膜貫通トポロジーモデル。(E) 化学架橋試薬 (1, 11-bis-maleimidotetraethyleneglycol) による TRIC-A タンパク質の多量化体の形成。矢尻は単量体、二量体と三量体を示す。(F) 金コロイド標識抗体で修飾した TRIC-A チャンネルの電子顕微鏡像。スケールバー、20 nm (左パネル) 10 nm (右パネル)。(G) 単粒子解析法により推定される TRIC-A チャンネルの三次元構造。スケールバー、5 nm。

亢進で生成するイノシトール三リン酸 (IP_3) により活性化する IP_3 受容体チャンネル (IP_3R) が知られている。両チャンネルが仲介する小胞体 Ca^{2+} 放出は、細胞質側のみならず小胞体内腔側からの生理的調節を受けて成立しており、筋収縮、膜電位調節、伝達物質放出、遺伝子発現など多彩な細胞機能を制御することが明らかにされている。

微小閉鎖空間である小胞体から陽イオンである Ca^{2+} が放出されると、内腔側に局所的な負電荷が発生し、その後の Ca^{2+} 放出が阻害されるものと考えられる。通常観察される数十ミリ秒も持続する効率的な小胞体 Ca^{2+} 放出が成立するためには、発生した負電荷を中和するカウンターイオンチャンネルが必要であることが古くから予見されてきた¹⁾。しかしながら、この仮説の検証やカウンターイオンチャンネルの分子同定については、まったく進められてはいない。最近、 Ca^{2+} ストア膜上に分布する新規膜タンパク質として TRIC (trimeric intracellular cation) チャンネルが分子同定された。その電気生理学的特性やノックアウトマウスから得られた所見からは、TRIC チャンネルが RyR や IP_3R による Ca^{2+} 放出に同期して機能するカウンターイオンチャンネルである可能性が強く示唆されている。本稿では、TRIC チャンネルに関する我々の研究成果を紹介する。

2. TRIC チャンネルの分子同定²⁾

単クローン抗体の調製と筋組織の免疫化学染色を組み合わせた手法により、我々のグループは Ca^{2+} ストア機能への寄与が推定されるタンパク質の検索を手掛けている³⁾。この検索で分子同定された TRIC-A は約 300 アミノ酸残基から構成されており、データベースでの相同解析によりサブタイプである TRIC-B も見出された。種々のマウス組織におけるノーザンプロット解析では、TRIC-A は骨格筋、心臓、脳などの興奮性組織に強い発現が認められ、TRIC-B は組織普遍的に分布することが示された (図 1A)。骨格筋における免疫化学解析では、TRIC チャンネルは筋小胞体と核膜に存在することが示された (図 1B)。疎水性プロット解析では、TRIC チャンネルは 3 本の膜貫通セグメントを有することが予想され (図 1C)、筋小胞体膜の限定タンパク質分解実験では、N 末端が小胞体内腔に、C 末端が細胞質内に配向する膜貫通トポロジーモデルが支持された (図 1D)。一方、約 30 kDa のタンパク質として検出される TRIC-A チャンネルは、様々な化学架橋試薬の処理により二量体と三量体を形成する (図 1E)。また、金粒子標識した単クローン抗体を用いて TRIC チャンネルを修飾し、その抗原-抗体複合体を電子顕微鏡により観察した結果、TRIC

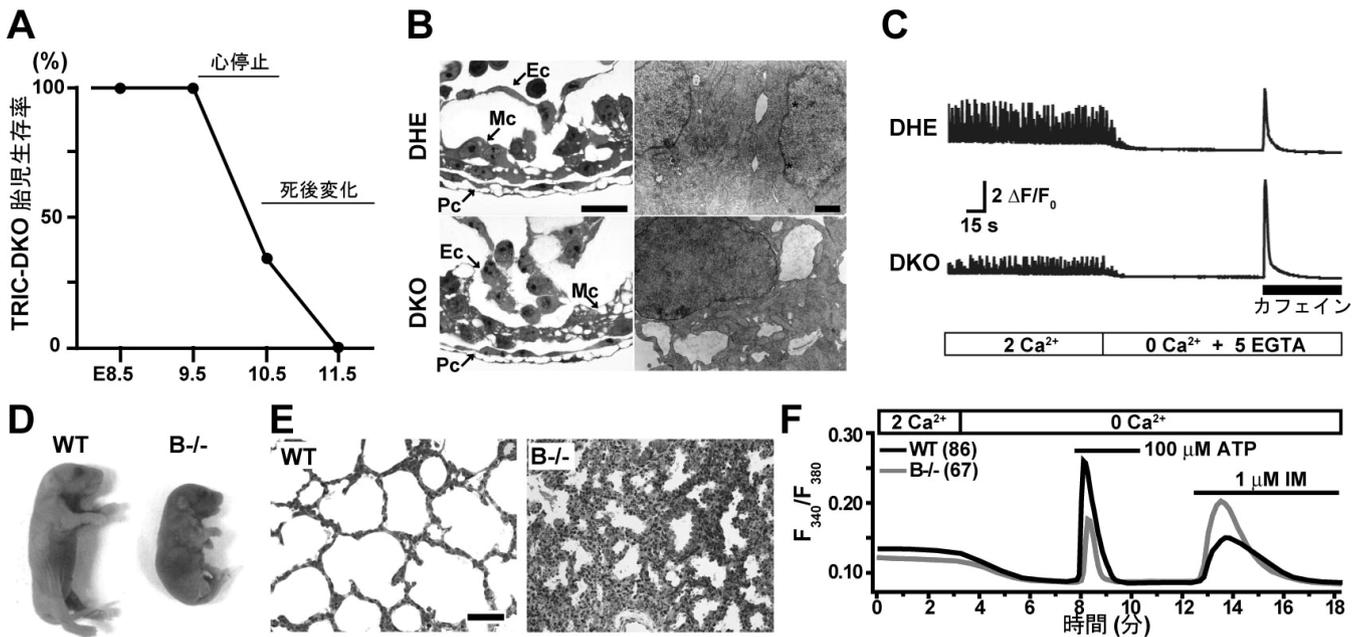


図2 TRIC欠損 (TRIC-DKO 及び TRIC-B KO) マウスの生理学解析

(A) TRIC-A, -B 同時欠損胎児の致死性. (B) 胎生 8.5 日における TRIC 欠損心筋の光学顕微鏡像 (左パネル) と電子顕微鏡像 (右パネル). Pc, pericardium; Mc, myocardium; Ec, endocardium. 電子顕微鏡観察にて, 膨潤化した小胞体は細胞質内の低電子密度部分 (白く抜けた袋状構造) として観察される. 対照実験として, TRIC-A (+/-) TRIC-B (+/-) の遺伝子型を有する TRIC-DHE 胎児の心臓を観察した. スケールバー, 20 (左) と 1 μm (右). (C) Fluo-4 による TRIC 欠損心筋細胞の Ca^{2+} イメージング. 胎児期 8.5 日の TRIC 欠損心筋細胞では, 自発 Ca^{2+} 振幅は小さいが, カフェイン誘導のリアノジン受容体 Ca^{2+} 放出は顕著に大きい. (D) 野生型 (WT) 及び TRIC-B 欠損マウス (B^{-/-}) の新生児. (E) 出生直後における野生型 (左) と TRIC-B 欠損マウス (右) 肺の組織学的観察. スケールバー, 40 μm . (F) Fura-2 による単離 II 型肺胞上皮細胞の Ca^{2+} イメージング. TRIC-B 欠損細胞では, プリン受容体刺激による IP_3 誘導 Ca^{2+} 放出が顕著に小さいものの, イオノマイシン (IM) 添加による小胞体からの Ca^{2+} 漏出量は増強していた.

チャンネル粒子を中心にほぼ正三角形に配置する金粒子が多数観察された (図 1F). さらに, 精製した TRIC チャンネルの電子顕微鏡写真像を多数取得し, コンピューターによりその集積および平均化を行ったところ, 弾丸状の三量体構造を有する立体構造が再構成された (図 1G). 従って, TRIC チャンネルはホモ三量体を形成しているものと結論される.

骨格筋と cDNA 導入大腸菌より高純度に TRIC-A を精製し, 人工脂質二重膜に精製タンパク質を組込むことで, 単一チャンネル電気生理学実験を行った. その結果, TRIC-A は一価の陽イオン選択的チャンネルを形成し, Na^+ よりも K^+ をやや選択的に透過する性質 ($\text{K}^+ > \text{Na}^+ = 1.5$) を有することが明らかとなった. また, C 末端を認識する単クローン抗体の適用により, 観察されるチャンネル活性は完全に消失することから, 混在タンパク質ではなく, TRIC-A 自身が一価陽イオンチャンネルを形成していることが再確認された. 以上の実験結果は, TRIC-A は細胞内膜系の新規イオンチャンネルであり, 細胞内環境では主に K^+ を透過す

ることを示している.

3. TRIC チャンネル完全欠損マウス²⁾

TRIC チャンネルが担う生理機能を解明するため, 我々はノックアウト (KO) マウスを作製した. TRIC-A KO マウスは致死性を伴わずにほぼ正常に発育するが, TRIC-B KO マウスは後述のように新生致死性を示す. 両サブタイプを完全に欠損する (TRIC-DKO) マウスは受精後 10 日程度の胎児期に心拍停止により死亡する (図 2A). この致死性の早期化は, 少なくとも胎児期心臓において, 両サブタイプが相互補完的に機能していることを示唆する.

心停止直前の TRIC-DKO 胎児心臓には組織学的な異常は認められないが (図 2B, 左パネル), 電子顕微鏡観察では心筋細胞の小胞体が異常に膨張していることが観察された (図 2B, 右パネル). 一方, この小胞体形状の異常は対照マウス (TRIC-A +/- B +/- の遺伝子型を有する TRIC-DHE マウス) では認められなかった. 以前報告されている研究成果からは, 筋細胞の膨潤化した小胞体は Ca^{2+} の

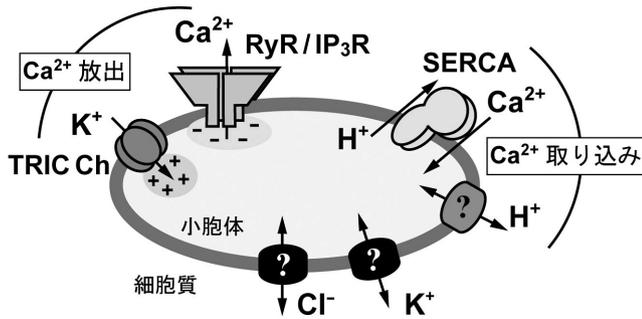


図3 TRICチャンネルの想定される生理機能

TRICチャンネルは Ca^{2+} ストア膜上に分布し、RyR及び IP_3R による Ca^{2+} 放出に同期してカウンターイオンを小胞体内腔に導き、効率的な Ca^{2+} 放出機構を支えていることが推定される。一方で、分子的にも機能的にも未同定なイオンチャンネルが未だに小胞体に存在することも、電気生理学実験から示唆されている。RyR, リアノジン受容体; IP_3R , IP_3 受容体; SERCA, 小胞体 Ca^{2+} ポンプ。

過剰貯留に起因することが示唆されており、TRIC-DKO心筋細胞でも同様の小胞体 Ca^{2+} ハンドリングの異常が想定された。

心筋細胞の収縮は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによる Ca^{2+} 流入と、それに続くRyRからの Ca^{2+} 放出により、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することで引き起こされる⁴⁾。蛍光 Ca^{2+} イメージング実験において、胎生8.5日のTRIC-DKO心筋細胞は心臓拍動に対応する Ca^{2+} シグナル強度が顕著に減弱しているが、RyR開口薬であるカフェインの適用により観察される小胞体 Ca^{2+} 放出は増強されていることが示された(図2C)。一方、胎生9.5日のTRIC-DKO胎児の心筋細胞からは、もはや明瞭な Ca^{2+} シグナルが観察されず、終末期の心不全状態を呈していた。従って、TRIC-DKO心筋細胞では、小胞体内に過剰に Ca^{2+} が蓄積されているにも関わらず、生理的条件化ではRyRによる小胞体 Ca^{2+} 放出が逆に阻害されているものと考えられる。つまり、両TRICチャンネルはRyRによる Ca^{2+} 放出に同期してカウンターイオンを小胞体内腔に導く機能を有していることが考察され(図3)、その完全欠損により Ca^{2+} 放出抑制、さらには小胞体機能全般を阻害する小胞体 Ca^{2+} 過剰負荷が生じるものと推察された。

4. TRIC-Bチャンネル欠損マウス⁵⁾

TRIC-B KOマウスは出生後チアノーゼを呈し(図2D)、血中pH、酸素分圧及び二酸化炭素分圧は呼吸性アシドーシス様の値を示した。また、TRIC-B KOマウスの肺は野生型に比べて明らかに小さく、組織学的観察では肺胞の拡

張が著しく障害されていることが示された(図2E)。従って、TRIC-B KOマウスは肺胞拡張障害に起因する呼吸不全により死亡する。一方、細胞マーカータンパク質の染色からは、肺胞での特定細胞種の欠落などの異常は、TRIC-B KOマウスで認められなかった。

肺胞上皮細胞としては、毛細血管を取り巻くI型細胞と、サーファクタントの合成・分泌を担当するII型細胞が存在する。界面活性作用を有するサーファクタントは、肺胞の表面張力を低下させることで肺胞拡張に必須である⁶⁾。サーファクタントはII型上皮細胞内でラメラ体として生合成され、90%がホスファチジルコリンを主成分とするリン脂質で、残り10%はサーファクタントプロテイン(SP)と呼ばれる分泌タンパク質で構成されている。電子顕微鏡解析において、過剰なグリコーゲン貯留及び未成熟ラメラ体の生成がTRIC-B KOマウスII型肺胞上皮細胞で観察された。また、TRIC-B KOマウス肺における細胞内及び細胞外リン脂質の有意な減弱も、質量分析解析により確認された。II型上皮細胞はグリコーゲンを一旦貯蔵し、解糖系や脂肪酸合成系によりリン脂質へ代謝的に転換するが、その経路にはグリコーゲンホスホリラーゼや脂肪酸合成酵素など Ca^{2+} 依存的なものが複数存在する。また、サーファクタント分泌はエキソサイトーシスであり、その際には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が必要となる⁷⁾。従って、上記の所見からはTRIC-B KO II型上皮細胞での Ca^{2+} シグナル障害の可能性も示唆される。

肺胞より上皮培養細胞を調製し、蛍光 Ca^{2+} イメージングを行った結果、1) 定常状態における Ca^{2+} レベルの低下、2) アゴニスト刺激による IP_3 誘導 Ca^{2+} 放出の低下、及び3) 小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の増加が観察された(図2F)。見出された全ての異常は、 IP_3R による Ca^{2+} 放出がTRIC-B欠損により阻害されていることで説明可能である。特に、 IP_3 誘導 Ca^{2+} 放出の低下と小胞体 Ca^{2+} 貯蔵量の増加は、TRIC-DKO胎児心筋細胞で観察された異常と極めて類似している点が注目される。従って、II型肺胞上皮細胞においても、TRICチャンネルは IP_3R による Ca^{2+} 放出に同期したカウンターイオンチャンネルとして機能しているものと考察される(図3)。

5. おわりに

これまでに得られた研究成果から、RyRおよび IP_3R の開口に際して内腔側に K^+ を供給することで効率的な Ca^{2+} 放出を成立させる機能が、TRICチャンネルサブタイプに与えられた。今後のTRICチャンネルに関する研究では、サブ

タイプの詳細な電気生理学的性質, TRIC-A KO マウスで観察され始めた循環機能の異常 (未発表データ), TRIC チャンネルの構造-機能相関, 遺伝子変異や発現異常と疾患との関連などを解明する必要がある。しかしながら, 上述の TRIC チャンネル欠損細胞において RyR および IP₃R による Ca²⁺ 放出は消失することはないので, 小胞体膜上には他のカウンターイオンチャンネルが存在する可能性も残されている。以前の電気生理学実験成果として, 小胞体上には未同定の K⁺ や Cl⁻ チャンネルが依然存在することも示唆されるので, 新規チャンネルの分子同定や機能解析に継続して挑戦することも不可欠である。小胞体 Ca²⁺ ストア機能の全容解明に向けて, Ca²⁺ 放出や Ca²⁺ 取り込み時におけるカウンターイオン動態の理解を深める必要がある。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は多くの共同研究者の尽力の賜物であり, 文部科学省科研費や民間研究助成財団の支援等により遂行された。この場を借りて関係者の方々に感謝の意を表したい。

- 1) Meissner, G. (1983) *Mol. Cell. Biochem.*, 55, 65-82.
- 2) 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. (2007) *Nature*, 448, 78-82.
- 3) Yamazaki, T., Yamazaki, D., & Takeshima, H. (2009) *Pharmacol. Ther.*, 121, 265-272.
- 4) Meissner, G. (1994) *Annu. Rev. Physiol.*, 56, 485-508.
- 5) Yamazaki, D., Komazaki, S., Nakanishi, H., Mishima, A., Nishi, M., Yazawa, M., Yamazaki, T., Taguchi, R., & Takeshima, H. (2009) *Development*, 136, 2355-2361.
- 6) Clements, J.A. (1977) *Am. Rev. Respir. Dis.*, 115, 67-71.
- 7) Haller, T., Ortmayr, J., Friedrich, F., Völkl, H., & Dietl, P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 1579-1584.

山崎 大樹, 山崎 哲男, 竹島 浩
(京都大学大学院薬学研究科)

Physiological functions of TRIC channels

Daiju Yamazaki, Tetsuo Yamazaki, and Hiroshi Takeshima
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida-shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)