

カリウム透過性細胞内 TRIC チャンネルと骨ミネラル化

竹島 浩, 市村 敦彦, 趙 成珠

京都大学大学院薬学研究科

概要 TRIC チャンネルサブタイプ (TRIC-A と TRIC-B) はホモ三量体を形成して小胞体や核膜に分布し、ユニークな細胞内 K^+ 透過性チャンネルである。遺伝子欠損マウスの種々の細胞系で小胞体 Ca^{2+} 放出の減弱が観察されることから、TRIC チャンネルには Ca^{2+} 放出を促進するカウンターイオンの膜透過に寄与する生理的機能が想定されている。近年、TRIC-B チャンネルをコードする *TRIC-B/TMEM38B* 遺伝子において点変異や欠失変異を伴う骨形成不全症 (OI, osteogenesis imperfecta) の症例が報告されているが、その全身性の骨ミネラル化障害のメカニズムは不明であった。本研究においては、OI 様異常を示す *Tric-b* 欠損マウスに注目し、その骨芽細胞では小胞体 Ca^{2+} ハンドリング異常に起因して骨基質コラーゲンの生合成が障害されることを明らかにした。

1. はじめに

細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は様々な生理反応のスイッチとなっており、筋細胞の収縮、伝達物質やホルモンの放出、細胞増殖・細胞死など多彩な細胞機能を制御することにより、組織発生、免疫応答や神経可塑性などの高次生物機能をも規定する。この細胞内 Ca^{2+} シグナルは、細胞膜の Ca^{2+} チャンネルの開口に伴う Ca^{2+} 流入のみならず、小胞体に分布する Ca^{2+} 放出チャンネルの活性化による Ca^{2+} 放出により形成される事例も多く報告され、細胞内 Ca^{2+} ストアとして普遍的に機能する小胞体の生理的重要性が確立するに至っている。しかしながら、小胞体 Ca^{2+} ハンドリングに関する基本原理には不明な点が未だに山積しており、その解決が細胞生理学領域では切望されている。例えば、小胞体の浸透圧や膜電位を調節すると考えられる K^+ 、 Cl^- や H^+ の膜透過が現象論的に古くから観察されているが、それら膜透過を担うチャンネルやトランスポーターの分子実体は明らかではない。これら膜輸送体の分子同定や生理的機能の理解、さらには、機能異常に基づく疾患病態の解明などが今後の最重要課題として残されている。

我々のグループでは骨格筋小胞体膜タンパク質の新規同定に取り組み、TRIC チャンネルを見出した。TRIC サブタイプ (TRIC-A と TRIC-B) はホモ三量体を形成する膜タ

ンパク質であり、小胞体や核膜に分布する一価陽イオン透過性チャンネルであると考えられる。これまでの TRIC サブタイプ遺伝子欠損マウスを用いた解析では、イノシトール三リン酸受容体およびリアノジン受容体による Ca^{2+} 放出の不良が種々の細胞系で観察されている。小胞体から細胞質への Ca^{2+} 放出においては、 Ca^{2+} 流出により発生する小胞体内腔の膜電位を解消される機構、すなわち、 Ca^{2+} 放出と並行したカウンターイオンの膜透過により荷電中和のメカニズムが古くから想定される。従って、TRIC サブタイプは多彩な機能を制御する小胞体 Ca^{2+} 放出を支えるカウンターイオン透過性の一翼を担うことにより、種々の細胞系で Ca^{2+} 動態に関与していると示唆される (文献 1)。

骨形成不全症 (OI, osteogenesis imperfecta) は重篤な骨密度低下を特徴とする遺伝疾患である。大半の OI 症例では I 型コラーゲン遺伝子に変異が確認され、骨芽細胞が合成する骨基質の量的減少または機能的不良により骨石灰化が障害される。また、コラーゲンの翻訳後修飾酵素や骨芽細胞特異的な転写因子などの変異に起因する OI 家系も報告されている。近年の遺伝子解析の成果として *TRIC-B/TMEM38B* 遺伝子変異を伴う常染色体劣性タイプの OI 家系が確認され、タンパク質中央部でのナンセンス点変異や N 末端コード領域のエクソン欠失を含む 5 種類

の遺伝子変異が報告された(文献 2-4)。このような大幅なタンパク質構造の変異を伴うOI症例では、TRIC-Bチャネルの生理機能が重篤に障害されることが想定される。OI患者より樹立した線維芽細胞および骨芽細胞株を用いた実験からは、TRIC-B変異により骨基質コラーゲンの合成機能が障害されると示唆された(文献 5)。しかしながら、OI患者由来試料による限定的な解析では、その病理学的メカニズムの詳細は未解明な課題として残された。

2. 研究方法

2.1 研究リソース

我々のグループにて以前作製した *Tric-b* 欠損マウスを本研究に利用した(文献 6)。*Tric-b* 欠損マウスは新生致死となるため、ヘテロ欠損マウスの交配にて得られる *Tric-b* 欠損新生児の骨組織や骨関連細胞を、野生型マウス新生児を対照として用いて検討した。

2.2 解剖学的検討

新生マウスより大腿骨や頭蓋骨を単離し、光学顕微鏡解析にはパラホルムアルデヒド、電子顕微鏡解析にはグルタルアルデヒドにより固定して、定法に従い観察用切片を調製した。骨石灰化やコラーゲンなどの可視化解析には、市販のコッサ染色やシリウスレッド染色キットを利用した。

2.3 骨関連培養細胞

初代培養骨芽細胞はマウス新生児の頭蓋骨から定法に従い調製し、免疫染色、コラーゲン合成、細胞外基質ミネラル化および細胞内 Ca^{2+} イメージングの検討実験に用いた。初代培養破骨細胞はマウス新生児の肝臓由来の単

球系細胞より定法の分化誘導処理を施し調製し、免疫染色や骨分解能の検討実験に用いた。

3. 研究結果

3.1 *Tric-b* 欠損マウスの骨形成不全様異常

TRIC-B 変異を有するOI症例における呼吸機能障害の報告はないが、*Tric-b* 欠損マウスは肺胞上皮のサーファタント分泌不良による新生致死性を示すとともに(文献 1, 6)、OIモデル動物として主要な骨組織において骨密度低下を呈することが判明した。すなわち、コッサ染色による組織学検討およびマイクロCT骨密度定量にて、本変異マウスにて全身性の骨形成不良が観察された。従って、軟骨内骨化(大腿骨)とともに膜内骨化(頭蓋骨)も障害されている *Tric-b* 欠損マウスでは、骨芽細胞の機能低下または破骨細胞の機能亢進が強く疑われた(文献 7)。

3.2 *Tric-b* 欠損骨芽細胞におけるコラーゲン合成障害

初代培養細胞実験にて、*Tric-b* 欠損により骨芽細胞のコラーゲン合成が障害されることが示された。具体的な観察データとして、ミネラル化と細胞外基質コラーゲンが *Tric-b* 欠損細胞では顕著に減少しており、逆に、細胞内コラーゲンは明確に増加していることが図1にて示されている。すなわち、*Tric-b* 欠損骨芽細胞では小胞体が膨潤化するとともに、その内腔には未成熟コラーゲンが過剰に貯留する。そのためコラーゲン分泌量が減少して、*Tric-b* 欠損細胞培養における細胞外基質として沈着するコラーゲンが顕著に減少すると考えられる。図1に示された異常については、*Tric-b* cDNA 再導入により回復することも確認された。基質ミネラル化には細胞外基質が十分に存在す

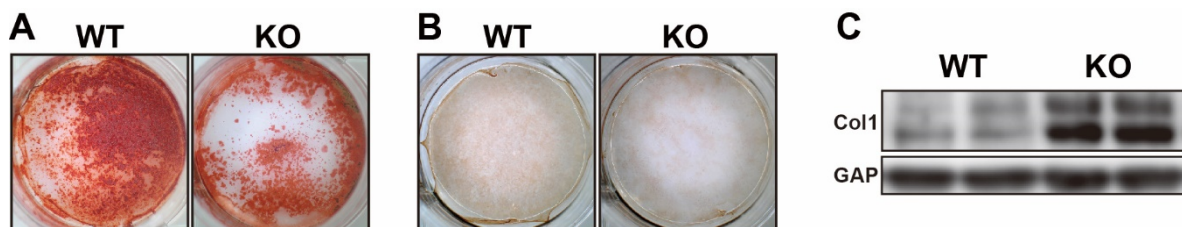


図1 初代培養 *Tric-b* 欠損骨芽細胞におけるミネラル化不良とコラーゲン合成障害

(A) 骨芽細胞培養におけるアリザニンレッド染色による石灰化の検討。野生型細胞 (WT) と比較して、*Tric-b* 欠損細胞にてミネラル沈着が減弱している (KO)。(B) 免疫染色によるI型コラーゲン分泌の検討。*Tric-b* 欠損細胞にて細胞外基質コラーゲン量が減少している。(C) 細胞内分画試料におけるI型コラーゲン (Col1) と対照の解糖系酵素 (GAP) のウエスタンブロットによる検討。*Tric-b* 欠損細胞ではプロコラーゲンが細胞内に貯留している。

ることが必須であることから、このコラーゲン分泌障害の二次的影響により *Tric-b* 欠損骨内のミネラル化が障害されるものと結論される。

3.3 *Tric-b* 欠損骨芽細胞における Ca^{2+} ハンドリング障害

蛍光 Ca^{2+} イメージング実験では、*Tric-b* 欠損培養骨芽細胞において小胞体 Ca^{2+} ハンドリングの異常が観察された。イオノマイシン(IM)は小胞体膜に Ca^{2+} 透過性チャネルを形成し、強制的に Ca^{2+} 放出を誘導するため、その応答は小胞体 Ca^{2+} 貯留量を反映する。図2に示されているように、*Tric-b* 欠損細胞では IM 応答が顕著に増強しており、小胞体 Ca^{2+} 貯留は過剰負荷状態にある。しかしながら、エンドセリン(ET-1)とATPに反応したイノシトール三リン酸受容体による小胞体 Ca^{2+} 放出は減弱している。類似した小胞体における Ca^{2+} 過剰貯留と生理的 Ca^{2+} 放出障害は、他の TRIC チャンネル欠損細胞系にて観察されている。従って、骨芽細胞において TRIC-B チャンネルはイノシトール三リン酸受容体 Ca^{2+} 放出と連動するカウンターイオンチャネルとして機能するものと想定される。

上記の蛍光イメージング実験と共に、コラーゲン翻訳後修飾を担う多くの小胞体内腔酵素群が Ca^{2+} 感受性であるという事実から、*Tric-b* 欠損による小胞体 Ca^{2+} 濃度上昇が直接コラーゲン生合成を障害する可能性が示唆される。遺伝子発現検討においては、未成熟コラーゲンが小胞体

内に貯留している *Tric-b* 欠損骨芽細胞では、それにより引き起こされる小胞体ストレス応答の亢進も観察された。

3.4 *Tric-b* 欠損破骨細胞における正常所見

初代培養破骨細胞を調製し、*Tric-b* 欠損による細胞分化、 Ca^{2+} ハンドリングや骨吸収活性への影響も検討した。しかしながら、*Tric-b* 欠損破骨細胞には異常所見が認められず、破骨細胞の機能異常は *Tric-b* 欠損骨形成不良に寄与していないと結論された。

4. おわりに

マウス実験系において TRIC-B チャンネル欠損は骨芽細胞の小胞体 Ca^{2+} ハンドリングを障害し、そのコラーゲン生合成を阻害することで、骨形成不全症様の異常を引き起こすことが本研究成果により判明した。*TRIC-B* 遺伝子変異に起因するヒト骨形成不全症においても、重篤な TRIC-B チャンネルの機能障害が推定されており、マウスモデル系での観察と同様の病態メカニズムが想定される。一方、*TRIC-B* 変異による骨形成不全症患者に対してビスホスホネート投薬により骨密度の改善効果が観察されたとの報告があるが(文献4)、極めて限定される症例における定量的解析データの取得は困難であるものと予想される。この希少疾患の治療のみならず、骨密度改善薬の開発に向けて、*Tric-b* 欠損マウスは有用なモデル実験系を提供することも期待される。

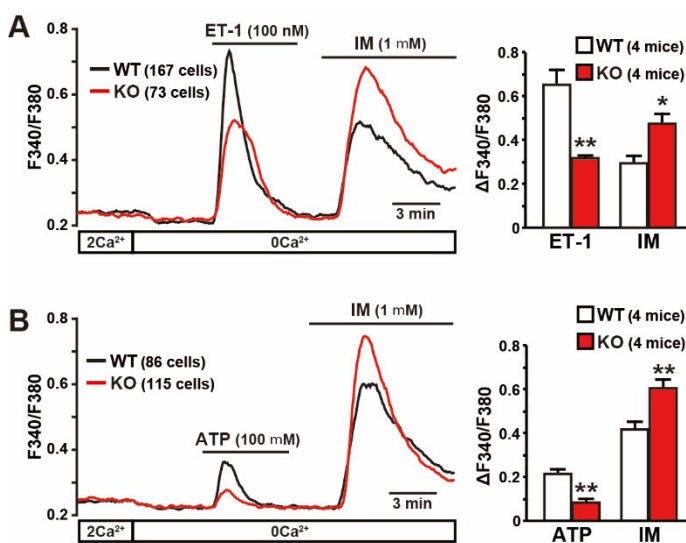


図2 *Tric-b* 欠損骨芽細胞における小胞体 Ca^{2+} ハンドリング障害

(A) Fura-2 蛍光イメージング実験における骨芽細胞のエンドセリン(ET-1)とイオノマイシン(IM)に対する Ca^{2+} 応答。野生型細胞(WT)との比較にて、*Tric-b* 欠損細胞(KO)はET-1誘発性小胞体 Ca^{2+} 放出は減弱している一方で、IM誘導性小胞体 Ca^{2+} 放出は増強している。(B) ATPとイオノマイシン(IM)に対する Ca^{2+} 応答。*Tric-b* 欠損細胞ではIM刺激による強制的な小胞体 Ca^{2+} 放出は増強しているにもかかわらず、P2Y受容体によるATP誘発性小胞体 Ca^{2+} 放出は減弱している。

5. 文献

- 1) Yazawa, M. et al. TRIC channels are essential for Ca²⁺ handling in intracellular stores. *Nature*, **448**: 78-82, 2007.
- 2) Shaheen, R. et al. Study of autosomal recessive osteogenesis imperfecta in Arabia reveals a novel locus defined by TMEM38B mutation. *J. Med. Genet*, **49**: 630-635, 2012.
- 3) Rubinato, E. et al. A novel deletion mutation involving TMEM38B in a patient with autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *Gene*, **545**: 290-292. 2014.
- 4) Lu, F. et al. Two novel mutations in TMEM38B result in rare autosomal recessive osteogenesis imperfecta. *J. Hum. Genet*, **61**: 539-545, 2016.
- 5) Cabral W. A. et al. Absence of the ER Cation Channel TMEM38B/TRIC-B Disrupts Intracellular Calcium Homeostasis and Dysregulates Collagen Synthesis in Recessive Osteogenesis Imperfecta. *PLoS Genet*, **12**: e1006156, 2016.
- 6) Yamazaki, D. et al. Essential role of the TRIC-B channel in Ca²⁺ handling of alveolar epithelial cells and in perinatal lung maturation. *Development*, **136**: 2355-2361, 2009.
- 7) Zhao, C. et al. Mice lacking the intracellular cation channel TRIC-B have compromised collagen production and impaired bone mineralization. *Sci. Signal*, **9**: ra49, 2016.

TRIC Channel and Bone Ossification

Hiroshi Takeshima, Atsuhiko Ichimura, Chengzhu Zhao

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Summary

TRIC channel subtypes, namely TRIC-A and TRIC-B, are mainly localized to the endoplasmic reticulum (ER) and nuclear envelope, and likely support Ca^{2+} release from intracellular stores by mediating K^+ flux in various cell types. Recently, deletion and point mutations in the *TRIC-B/TMEM38B* gene were identified in autosomal recessive osteogenesis imperfecta pedigrees. However, the mechanisms by which the mutations cause the human disease have yet to be addressed. In this study, we found that *Tric-b*-knockout mice exhibit poor bone ossification. The knockout bones maintained bone-related cell types in a near normal state, but collagen matrix contents were obviously decreased. Several lines of evidence suggested that weakened Ca^{2+} release induces store overloading and ER swelling, thus leading to impaired collagen production in *Tric-b*-knockout osteoblasts. On the other hand, no significant abnormality was suggested in *Tric-b*-knockout osteoclasts. The TRIC-B channel, therefore, is essential for the intensive collagen production in active osteoblasts towards bone mineralization.