

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08198

研究課題名(和文)細胞膜脂質 - 膜タンパク質相互作用から温度依存的TRPチャネル活性化機構を探る

研究課題名(英文)Mechanisms of TRP channel activation by temperature changes

研究代表者

内田 邦敏(Uchida, Kunitoshi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：20581135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：温度感受性TRPチャネルが環境温度情報を電気信号に変換するメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。温度感受性TRPチャネルの細胞膜局在は温度変化による大きな変化はみられなかった。また、温度感受性TRPチャネルの一つであるTRPM5チャネルは温度に依存した活性化並びに不活性化がみられた。また、TRPM5チャネルの水、イオン、脂質膜のみで構成される脂質平面膜への再構成して解析した結果、TRPM5チャネルの温度依存的活性化並びに不活性化は脂質平面膜でもみられたことから、TRPM5チャネルの温度依存性は細胞に存在する分子に依存しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：First, we observed the effect of cytochalasin D on thermosensitive TRP channel activation stimulated by temperature changes. Activation of TRP channels was not changed by pretreatment of cytochalasin D. Next, we observed the localization of thermosensitive TRP channel. All TRP channels are located on plasma membrane and its localization was not changed by temperature changes. Then, we tried to construct planar lipid bilayer systems. Because, in this system, channel proteins are isolated from various biological resources and reconstituted into an artificial membrane that has a defined lipid composition. We succeeded to observed TRPM5 channel currents by calcium in this system and application of PIP2 regulated its activation. In addition, although we did not observed any temperature-dependent currents in the absence of calcium, we observed temperature-dependent activation and inactivation of these channels in the presence of calcium.

研究分野：分子生理学

キーワード：温度感受性TRPチャネル 人工再構成系 細胞膜脂質

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する脂質膜の性質が温度に依存してダイナミックに変化するが、一方で細胞自身が温度変化に適応して脂質組成を変えていることも知られている。生体・細胞が温度を感じるメカニズムは 1997 年に初めて温度センサー TRPV1 チャンネルがクローニングされたのを機に飛躍的に理解が進みつつあるものの、未だ解明にはほど遠いのが現状である。それが明らかにされないのは、膜タンパク質である温度センサーは脂質膜に埋め込まれて初めてその機能を発揮するにもかかわらず、脂質膜と温度センサーとの関連に焦点をあてた検討が極めて少ないことが一因であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、温度変化により起こる細胞膜の変化と温度感受性 TRP チャンネル活性化との相互作用に着目し、温度感受性 TRP チャンネルが温度情報を電気信号に変換するメカニズムを明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

HEK293 細胞に Lipofectamine を用いて各温度感受性 TRP チャンネル遺伝子を導入した。細胞内カルシウム濃度はカルシウム蛍光色素 fura-2 を用いて測定した。細胞骨格の破壊には cytochalasin D を使用した。各実験の最後に、コントロールとしてイオノマイシンを適用した。灌流液の組成は以下のとおりである。140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4。

温度感受性 TRP チャンネルの膜局在の検討には、EGFP 標識したチャンネルタンパク質を強制発現させた HEK293 細胞を使用した。細胞膜脂質ラフトは CT-B Alexa588 を用いて染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて細胞を観察した。

前述と同様に、Lipofectamine を用いて各温度感受性 TRP チャンネル遺伝子を導入した HEK293 細胞を使用した。膜電位 -60 mV に固定した時のチャンネル活性化電流を AXOPATCH 200B (Molecular Devices) を用いて測定した。灌流液はカルシウムイメージング法を同一のものを使用した。変異体の作製は、QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (ストラタジーン社)の方法を用いた。

精製した TRPM5 チャンネルタンパク質を用いた人工再構成系を構築し、電気生理学的な解析を行った。Myc タグを付加した TRPM5 チャンネルを HEK293 細胞に強制発現させたのち DDM にて可溶化し、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降法により精製した。精製したタンパク質を 2 層のチャンパー間に貼った人工脂質二重膜 (POPC : POPE = 3 : 1) に埋め込み、チャ

ンパー間を流れる電流を AXOPATCH 200B もしくは 200A (Molecular Devices) を用いて測定した。

### 4. 研究成果

細胞膜脂質の細胞骨格を変化させた時の TRP チャンネル活性の違いについてカルシウムイメージング法を用いて検討した結果、cytochalasin D 処置により細胞骨格を破壊しても、TRPV1、TRPM8 とともにチャンネルの温度依存的な活性化に大きな変化はみられなかった。

温度感受性 TRP チャンネルの局在並びに温度依存的な局在変化を EGFP タグ付き温度感受性 TRP チャンネルを用いて検討した。その結果、TRPV1、TRPM8 及び TRPM5 いずれのチャンネルも脂質ラフトに主に局在していた。TRPM8 に関しては、細胞内小器官にも強い局在がみられた。また、温度を 42 度まで上昇させた時の局在の変化を検討した結果、TRPM8 は温度の上昇に伴ってその膜局在が変化した一方、TRPV1 並びに TRPM5 の局在は変化しなかった (図 1)。

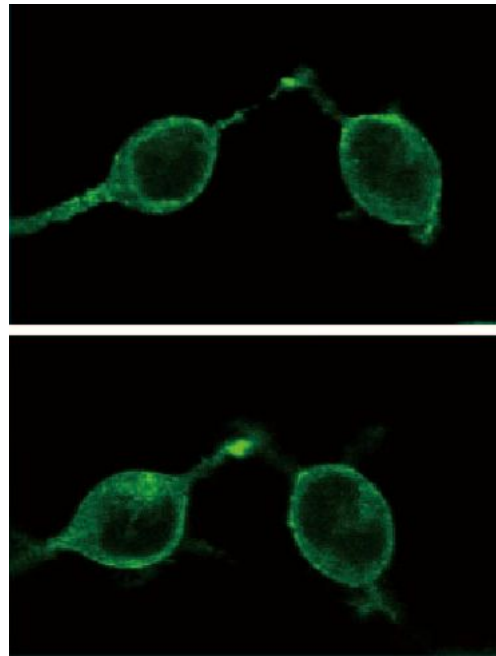


図 1 TRPM5 チャンネルの局在  
25 (上)並びに 42 (下)における、EGFP 標識した TRPM5 チャンネルの局在。

TRPM5 の電位依存性並びに温度依存性について、マウス TRPM5 を強制発現させた HEK293 細胞にパッチクランプ法を適用して検討した。TRPM5 は正の膜電位では遅い活性化が、負の膜電位では速い活性化と不活性化がみられた。活性化は細胞内カルシウム濃度に依存していたが、負の膜電位における不活性化は細胞内カルシウム非依存的であった。この電位依存的な不活性化は、イオンを通す穴を形成する pore loop 領域の pore helix の

変異体においてその速度が遅くなったことから、pore helix が電位依存的な不活性化に関与することが示唆された。

TRPM5 の温度依存性について HEK293 細胞にパッチクランプ法を適用して検討した結果、TRPM5 はカルシウム存在下で室温から 10 °C まで温度を低下させると活性化電流は減少し、40 °C 以上の温度まで上昇させると 35 °C 付近まで温度依存的に活性が増大し、35 °C 以上の温度では強い不活性化を示した (図 2)。繰り返し温度刺激を与えても、活性化電流はみられなかった。この温度依存的活性化並びに不活性化は、細胞内カルシウムを 100 nM から 500 nM の間で違いがあらわれず、カルシウム濃度には依存しなかった。

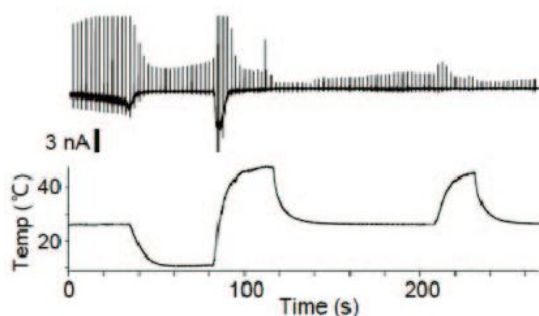


図 2 TRPM5 チャンネルの温度依存的活性化電流並びに不活性化電流

HEK293 細胞に TRPM5 を強制発現させ、ホールセルパッチクランプ法を用いて測定した。膜電位は -60mV に固定し、3 秒に 1 回 -100 から +100mV のランブパルスを与えた。

TRPM5 の精製並びに人工脂質二重膜への再構成に成功し、その解析を行なった。その結果、TRPM5 の活性化には PIP2 が必要であることがわかった。この実験系では、細胞を用いた解析結果とは異なり TRPM5 の活性化には 3μM のカルシウムが必要であり、3μM 以上の濃度で濃度依存的な開口確率の増大がみられた。一方、コンダクタンスはカルシウム濃度に関係なく 70 pS であった。温度を上昇させると温度依存的な活性増大が観察されるが、さらなる温度上昇に伴って不活性化がみられた。おそらく、TRPM5 の温度依存的活性化・不活性化には細胞に存在する酵素などの分子には依存しないことが示唆された。

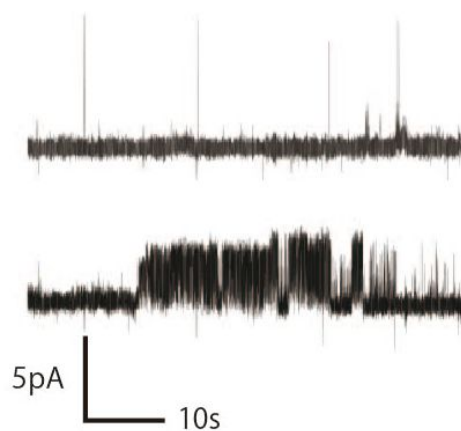


図 3 脂質平面膜法における TRPM5 チャンネルの開口

上) TRPM5 チャンネルタンパク質を含むが PIP2 を含まない脂質平面膜における電流。TRPM5 チャンネル活性化電流はみられなかった。

下) TRPM5 チャンネル、PIP2 を含む脂質平面膜における電流。TRPM5 チャンネルの開口がみられた。

溶液は TRPM5 活性化のために 10 μM のカルシウムを含んでいる。

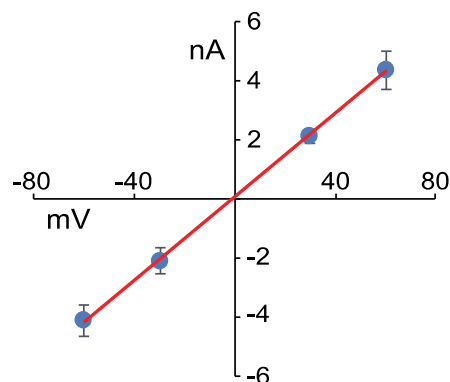


図 5 TRPM5 チャンネルのコンダクタンス  
脂質平面膜法における膜電位と TRPM5 チャンネル 1 分子の開口電流との関連。TRPM5 チャンネルのコンダクタンスは 71 pS であった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Uchida K, Demirkhanyan L, Asuthkar S, Cohen A, Tominaga M, Zakharian E. Stimulation dependent gating of TRPM3 channel in a planar lipid bilayer. FASEB J. 30. 1306-1316 (2016)

〔学会発表〕(計 6 件)

Uchida K. The functional analysis of a thermosensitive channel TRPM5. 16<sup>th</sup> ISMNTOP (国際シンポジウム「味覚嗅覚の

分子神経機構) 口頭発表. 2017年11月.  
福岡

内田 邦敏、富永 真琴、山崎 純. 人工再構成系を用いた温度感受性 TRP チャネルの機能解析. 2017年10月 福岡 第68回西日本生理学会 口頭発表.

内田 邦敏、喜多 知、笠 孝成、山崎 純. 温度感受性チャネル TRPM5 の機能解析. 第59回歯科基礎医学会学術大会 ポスター発表. 2017年9月. 長野

内田 邦敏. 人工再構成系を用いた温度感受性 TRP チャネルの機能解析. TRP研究会 特別講演. 2017年6月. 愛知

Uchida K. Single channel analysis of the thermosensitive TRP channels in bilayer lipid membrane. 第54回日本生物物理学会 シンポジウム 温度生物学の挑戦. 2016年11月. 筑波

Uchida K, Zakharian E, Tominaga M. Single channel analysis of the thermosensitive TRP channels in planar lipid bilayers. 第39回日本神経科学大会 シンポジウム 神経伝達受容体・チャネルの生物物理. 神奈川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 邦敏 ( UCHIDA, Kunitoshi )  
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師  
研究者番号：20581135