

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08549

研究課題名(和文)人工脂質平面膜を用いたTRPM7活性制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of TRPM7 channel activity in the lipid bilayers

研究代表者

井上 華 (Inoue, Hana)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：TRPM7チャネルの活性制御機構を明らかにするために、人工脂質二重膜に精製したTRPM7チャネルタンパク質を組み込んでチャネル活性を測定し、その制御メカニズムを単一チャネルレベルで検討した。野生型TRPM7 (TRPM7-wt) は開確率0.75 (+100 mV)であり、シングルチャネルコンダクタンスは36 pS (+100 mV)であった。一方、TRPM7のC末端細胞質領域キナーゼドメインを欠損した変異体 (TRPM7-deltaK) は、コンダクタンスが野生型の1.5倍に増加していた。すなわちTRPM7のキナーゼドメインには、コンダクタンスを減少させる効果があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRPM7はロックアウトすると胎生致死であり、ヒトの原因不明の死産でもTRPM7変異が報告されており、個体の発生・生存に重要な分子であるといえる。TRPM7チャネルの立体構造は、キナーゼドメインを欠損したTRPM7-deltaKおよび膜貫通領域(チャネルドメイン)を持たないキナーゼドメインについてそれぞれ解かれている。本研究ではキナーゼドメインが細胞質マグネシウムイオンに対する感受性を制御すること、シングルチャネルコンダクタンスを減少させることを明らかにした。すなわち、全長TRPM7チャネルの構造は、TRPM7-deltaKと異なることが機能的に示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanisms underlying regulations of TRPM7 channel activity, the single channel current of purified TRPM7 was recorded in planer lipid bilayers. The Streptavidin-Binding Peptide (SBP)-tagged TRPM7 protein was overexpressed in HEK293 cells by baculovirus-mediated transfection, and was purified by Strep-Tactin column. The purified TRPM7 protein was incorporated into lipid bilayers consisting of a mixture of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine: 1-palmitoil-2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine at 3:1 ratio. The slope conductance and the open probability of TRPM7 wild type (TRPM7-wt) was 38 pS and 0.75 at +100 mV. Whereas, the conductance of TRPM7 lacking the kinase domain (TRPM7-dK) exhibited ~1.5 times higher than TRPM7-wt (56 at +100 mV). Moreover, the inhibition of TRPM7 by intracellular Mg²⁺ was augmented in TRPM7-dK. It was indicated that TRPM7 kinase domain regulates single channel conductance as well as intracellular Mg²⁺ sensitivity.

研究分野：細胞生理学

キーワード：TRPM7 平面膜 キナーゼドメイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

TRPM7 は、carboxyl 末端にキナーゼ活性を持つ陽イオンチャンネルで、全身の細胞に普遍的に発現している。ノックアウトすると胎生致死であることから、生命の維持および発生にとって非常に重要な分子であると言える。イオンチャンネルとしては1価陽イオンのみならず、2価陽イオンに対しても高い透過性があるため、細胞内への Ca^{2+} および Mg^{2+} の流入経路と考えられている。一方、キナーゼとしての生理機能は、いくつかの基質は報告されているもののよく分かっていない。キナーゼ活性を持たない TRPM7-K1645R (活性中心 K1645 の R 変異) の電流は wild type と同等であり、TRPM7-K1645R ノックインマウスは正常に発生・出生するため [Kaitsuka et al., Sci Rep 2014 4:5718; Ryazanova et al., Sci Rep 2014 4:7599]、生命維持・発生にとって決定的なのは、TRPM7 の陽イオンチャンネルとしての機能であると考えられる。これまでに、TRPM7 のイオンチャンネル活性を制御する因子として酸化ストレスが報告されているが、実験系によって応答が異なり、明確な制御メカニズムは明らかになっていない。

酸化ストレスは当初、中枢神経細胞において TRPM7 を活性化し神経細胞死を引き起こすと報告された [Aarts et al., Cell 2003 115:863]。しかしながら我々は白色脂肪細胞における TRPM7 電流は酸化ストレスによって抑制されることを見出した。そこで酸化ストレスによる TRPM7 の活性調節機構を明らかにするために、我々は TRPM7 およびその変異体を HEK293 細胞に過剰発現し詳しい検討を行った。その結果、以下のことを明らかにした [Inoue et al., Free Rad Biol Med 2014 72:257]。過剰発現系での TRPM7 電流は、酸化ストレスによって抑制される。その抑制は、1) 細胞内 Mg^{2+} 濃度に依存しており、細胞内 Mg^{2+} 濃度が高いほど抑制が強くなる、2) 細胞内 ATP 濃度に依存しており、細胞内 ATP が高いほど抑制は弱くなる、3) TRPM7 のキナーゼ活性の有無は関係がない。また非常に興味深いことに、ATP の TRPM7 活性を維持する効果は、過剰発現系ではみられるが白色脂肪細胞や HEK293 細胞に内在性に発現する TRPM7 電流にはなく、内在性 TRPM7 電流は ATP 存在下でも酸化ストレスによって抑制されることを見出した。これらのことから、酸化ストレスによるチャンネル活性制御は、未同定の因子も関与して複雑化していることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞種や発現量など用いる実験系によって酸化ストレスに対する応答が異なる TRPM7 を人工脂質平面膜に組み込むことによって実験系を単純化し、その活性調節メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 人工脂質二重膜実験設備の設置

人工膜実験は古くから行われている実験手法ではあるが、我々の研究室にはその設備はない。まず始めに、従来よく用いられているチェンバー法の実験設備を設置する。

(2) TRPM7 タンパク質の精製

アミノ末端に streptavidin-binding peptide (SBP) を付加した TRPM7 を HEK293 細胞に過剰発現するためのウイルスベクターを作製する。過剰発現した細胞から、TRPM7 タンパク質をカラムにて精製し、リポソームに挿入する。

(3) チャンネル活性の測定

脂質組成によってはチャンネル活性が測定できない可能性があるため、人工平面膜に使用する脂質の選定を行う。チャンネル-リポソームを平面膜に融合させてシングルチャンネル電流を測定する。

4. 研究成果

(1) 人工脂質二重膜実験設備の設置

当初予定していたチェンバー法実験設備は、古くから使用されている設備ではあるが、研究協力者の岩本らが開発した、はるかに低ノイズでリポソーム融合確率の高い人工膜実験法である contact bobble bilayer 法 (CBB 法、図1) を採用することにした。

(2) TRPM7 チャンネルタンパク質の精製

SBP タグを付加した mouse TRPM7 タンパク質を、Baculovirus vector を用いて HEK293 細胞に過剰発現させた。150 mm dish 20 枚分の HEK293 細胞を lysis buffer で溶解後、超遠心したのちに上清を streptactin カラムにアプライして SBP-TRPM7 を回収した。TRPM7 の分子量である 210 kDa 付近に単一のバンドとして検出できたことから、TRPM7 チャンネルタンパク質が分解されることなく、精製可能な条件を決定することができた (図2)。

(3) チャンネル活性の測定

イオンチャンネルの活性は、埋め込まれている脂質二重膜のリン脂質

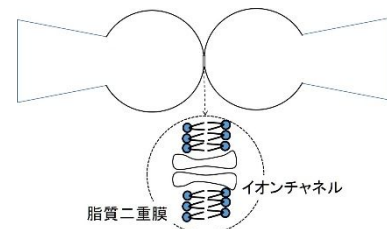


図1 CBB法の模式図



図2 SBP-TRPM7の精製

の構成に影響を受ける。例えば KcsA チャンネルはホスファチジルエタノールアミンがないと活性が阻害される。TRPM7 チャンネルに関しては必要なリン脂質組成に関する情報がなかったため、まずは安価な大豆由来アゾレクチン(ホスファチジルコリン 55 %、ホスファチジルエタノールアミン 20 %)を用いた。アゾレクチンの至適濃度を決定するため、チャンネルタンパク質を含まない二重膜を形成し、-200~+200 mV の電圧を連続的に印加して、膜の安定性を確認した。アゾレクチンは 2 mg/ml 以下では bobble を維持することが難しく、濃度を増加させると bobble は安定するが夾雑物の存在のせいか、チャンネル様 activity が観察された。そこで、精製リン脂質に変更し、ホスファチジルコリン:ホスファチジルエタノールアミン(PC:PE)が 3:1 になるように混和して膜の安定性を確認した。2 mg/ml のリン脂質で安定な膜が張れることが分かった。精製した TRPM7-wild type (TRPM7-wt) チャンネルタンパク質は PCPE 溶液に、10~20 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解し、チャンネルリポソーム溶液とした。TRPM7 チャンネルの活性に必要なと報告されている Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を 10 μM 添加した 200 mM KCl, 10 mM HEPES を先端径 50 μm のガラス電極内に充填し、チャンネルリポソーム溶液 1 μl をガラス電極先端に先詰めした。2 つの bobble を接触させて二重膜を形成させて電圧を印加し観察を続けると、接触から 5 分ほどでシングルチャンネル電流が出現した(図 3)、開確率は 0.75(+100 mV) 0.88(-100 mV)、シングルチャンネルコンダクタンスは、36 pS(+100 mV) 58 pS(-100 mV)であり、これまでに Jurkat T cell を用いて報告されている値におおよそ一致している(Chokshi et al., Am J Physiol Cell Physiol, 2012)。また、TRPM7 の C 末端キナーゼドメインを delete した変異体 TRPM7- ΔK を TRPM7-wt と同様に精製し、平面膜に挿入してチャンネル活性を測定したところ、マグネシウムイオンの存在しない条件下では TRPM7-wt と同等か大きなシングルチャンネルコンダクタンスが観察された(図 4)。プラス電位、マイナス電位、共に 1.5 倍程度のシングルチャンネルコンダクタンスの増加が確認された。

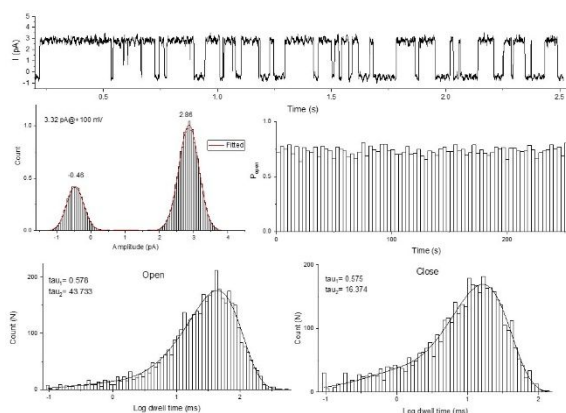
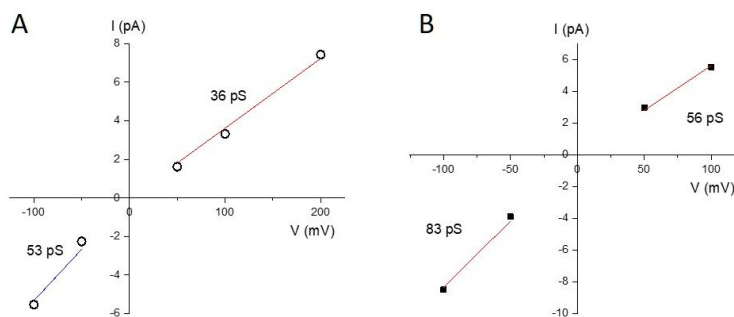


図3 TRPM7シングルチャンネル電流記録

ここで、精製リン脂質に変更し、ホスファチジルコリン:ホスファチジルエタノールアミン(PC:PE)が 3:1 になるように混和して膜の安定性を確認した。2 mg/ml のリン脂質で安定な膜が張れることが分かった。精製した TRPM7-wild type (TRPM7-wt) チャンネルタンパク質は PCPE 溶液に、10~20 $\mu\text{g/ml}$ となるように溶解し、チャンネルリポソーム溶液とした。TRPM7 チャンネルの活性に必要なと報告されている Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) を 10 μM 添加した 200 mM KCl, 10 mM HEPES を先端径 50 μm のガラス電極内に充填し、チャンネルリポソーム溶液 1 μl をガラス電極先端に先詰めした。2 つの bobble を接触させて二重膜を形成させて電圧を印加し観察を続けると、接触から 5 分ほどでシングルチャンネル電流が出現した(図 3)、開確率は 0.75(+100 mV) 0.88(-100 mV)、シングルチャンネルコンダクタンスは、36 pS(+100 mV) 58 pS(-100 mV)であり、これまでに Jurkat T cell を用いて報告されている値におおよそ一致している(Chokshi et al., Am J Physiol Cell Physiol, 2012)。また、TRPM7 の C 末端キナーゼドメインを delete した変異体 TRPM7- ΔK を TRPM7-wt と同様に精製し、平面膜に挿入してチャンネル活性を測定したところ、マグネシウムイオンの存在しない条件下では TRPM7-wt と同等か大きなシングルチャンネルコンダクタンスが観察された(図 4)。プラス電位、マイナス電位、共に 1.5 倍程度のシングルチャンネルコンダクタンスの増加が確認された。

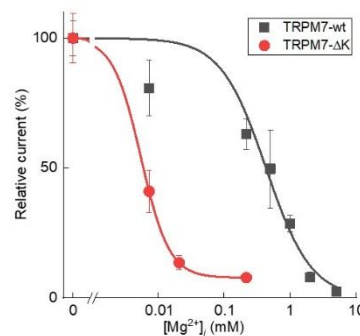
図4 TRPM7-wt(A)およびTRPM7- ΔK (B)のコンダクタンス



HEK293 細胞に TRPM7 およびその変異体を発現させて行ったパッチクランプ実験では、キナーゼドメインは TRPM7 チャンネルの細胞質マグネシウム感受性を制御することが明らかになった(図 5)、キナーゼドメインによるマグネシウム感受性の制御は、キナーゼ活性に依存せず、またキナーゼドメイン内にある zinc finger motif に依存していることが明らかになった。

本研究では、TRPM7 のキナーゼドメインは平面膜実験の結果から、シングルチャンネルコンダクタンスを増加させること、細胞を用いた発現実験によりマグネシウム感受性の制御すること、少なくともに関してはリン酸化に依存せず、おそらく zinc finger motif を介した構造的な相互作用によって制御が行われていること、を明らかにした。

図5 TRPM7-wtおよびTRPM7- ΔK の[Mg²⁺]依存性



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hana Inoue, Masato Inazu, Masato Konishi, Utako Yokoyama	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional expression of TRPM7 as a Ca ²⁺ influx pathway in adipocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hana Inoue, Takashi Murayama, Takuya Kobayashi, Masato Konishi
2. 発表標題 Regulation of TRPM7 channel activity by its kinase domain
3. 学会等名 9th FAOPS（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hana Inoue, Takashi Murayama, Masato Konishi
2. 発表標題 酸化ストレスによるTRPM7活性制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第3回イオンチャネル研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hana Inoue, Takashi Murayama, Masato Konishi
2. 発表標題 Screening of oxidative stress sensors in TRPM7 channel
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hana Inoue, Takashi Murayama, Masato Konishi
2. 発表標題 酸化ストレスによるTRPM7活性制御機構の解明
3. 学会等名 東京談話会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	村山 尚 (Murayama Takashi) (10230012)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
連携 研究者	岩本 真幸 (Iwamoto Masayuki) (40452122)	福井大学・医学部・教授 (13401)	