

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03417

研究課題名(和文) TRPチャンネル複合体のカチオン透過とは異なる新奇機能とその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Non-permeation function of TRPM2 channel complexes and its physiological relevance

研究代表者

森 泰生 (Mori, Yasuo)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：80212265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：TRPタンパク質は生体内外環境変化を感知して活性化開口する陽イオンチャンネルである。この従来の理解を超えるべく、H2O2により活性化開口するTRPM2の「非チャンネル機能」の機構的基盤と生物学的意義を追究した。TRPM2相互作用タンパク質の網羅的探索により得られたSTAT3はTRPM2活性を強く阻害し、お互いの発現レベルを激減させた。TRPM2 KOマウスにおいては、担癌内腫瘍関連マクロファージのSTAT3シグナルが亢進しVEGFを介して新生血管が過剰形成されたが、薬物誘導性炎症は抑制された。このように、STAT3シグナル抑制によるマクロファージの機能分極調整というTRPM2の新機能を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球的規模で自然環境や生態の大きな変化が起きようとしている。ヒトがこういった変化にどう適応するべきかの方策を考えていくためには、生物体が備える環境対応能力を理解する必要がある。本研究が対象としたTRPチャンネルは、生体内外環境の化学的・物理学的変化のセンサーとして働くことが知られた陽イオンチャンネルであることから、このような課題の解明に最もふさわしい題材を提供する。また、生態系の破壊により顕在化する未体験のウイルスや病原微生物も問題になっており、これらからの生体防御の理解にも本研究は重要なきっかけを与える。

研究成果の概要(英文)：TRP proteins form cation-permeable channels activated in response to different environmental cues. To transcend this conventional understanding of so-called channel proteins, we studied mechanistic bases and physiological significance of "non-channel function" of TRPM2 activated by H2O2. STAT3 proteins, which were found to interact directly with TRPM2 through an exhaustive screening of associated proteins, nearly abolished TRPM2 activity when co-expressed, and these two proteins severely suppressed the expression levels of each other. In a tumor-bearing model applied to TRPM2 KO mice, the STAT3 signaling cascade was promoted in tumor-associated macrophages and excessive angiogenesis was elicited, while in the drug-induced inflammation model, inflammatory phenotypes were suppressed in TRPM2 KO mice. Thus, we discovered a novel function of TRPM2 that regulates polarization of macrophages via inhibition of STAT3 signals.

研究分野：分子生理学

キーワード：イオンチャンネル TRPチャンネル シグナル伝達 マクロファージ 炎症 カルシウム 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

形質膜越えの Ca^{2+} 流入を担う Ca^{2+} チャンネルは多様であり、その一翼を担う TRP タンパク質群においては 28 種類の遺伝子がコードするアイソフォームが存在する。 Ca^{2+} チャンネルどれもが共通に細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇を惹起するが、同一細胞に存在する個々の TRP チャンネルは特定の生理応答や病態を司ることを、研究成果は示してきた。これは、単純な Ca^{2+} 透過機能だけで各 TRP チャンネルの生理的特殊性は説明できないことを意味する。その合理的な説明として、個々の TRP アイソフォームがタンパク質複合体を形成し、特定の他タンパク質分子に会合・作用することにより特定のシグナル経路を作動させることが考えられる。その際に各 TRP チャンネルはイオン(Ca^{2+})透過だけでなく、それとは異なる「非チャンネル機能」を発揮すると考えられる。

近年、TRP アイソフォーム特有の「非チャンネル機能」を示唆する知見が得られ始めた。その端緒が、TRPM2 (本計画の研究対象)、TRPM6、及び TRPM7 に関する研究である。TRPM2、TRPM6、TRPM7 はどれも C 末端ドメインに弱いながらも明確な酵素活性があり、Chanzyme (Channel+enzyme) と呼ばれている。特に、TRPM7 に関しては、チャンネル形成部分から切り離された C 末端ドメインが、ヒストンリン酸化を介するクロマチンリモデリング或いは細胞死を引き起こすことが示されている。また、TRPM2 に加えて TRPM8 に関して、タンパク質間相互作用を介した非チャンネル機能を有するという考えが提案されているが、それとチャンネル機能との区別は判然としない。研究に取り組みを開始した時点では、5000 報以上の TRP チャンネルを主研究対象にする論文の中で、「非チャンネル機能」に正面から取り組んだ論文は 6 報にしか過ぎず、TRP タンパク質の「非チャンネル機能」の研究は始まったばかりであった。

免疫細胞マクロファージ($\text{M}\phi$)が多彩な生物学的役割を生体応答において担うための基盤として、異なる機能的特徴を備えた複数種類 $\text{M}\phi$ の存在が示されてきた。しかし、 $\text{M}\phi$ を特定種類に機能分極させる機構は未解明である。また、実際のところ $\text{M}\phi$ の分類においては、起源(骨髄由来の浸潤型 vs 組織常在型)、役割(異物除去の M1 型 vs 組織修復の M2 型)、病態(癌抑制 vs 促進 tumor-associated $\text{M}\phi$ = TAM)等、様々な基準によりなされており、特定種類の $\text{M}\phi$ の生物学的意義を混乱なく解明するためには、分類基準の整理統合に向けた分子基盤の確立が枢要である。 $\text{M}\phi$ は TRPM2 発現の最も豊富な細胞種であり、 $\text{M}\phi$ の研究に TRPM2 の「非チャンネル機能」の観点から取り組むというのも、本研究の重要な方向性である。

2. 研究の目的

TRPM2 タンパクが、タンパク質間相互作用を介して発揮する「非チャンネル機能」を通して、 $\text{M}\phi$ をどのようにして機能分極させ、生物学的意義を発揮するかを追究する。そして、TRPM2 タンパク質による複合体の形成から、イオンチャンネルの「非チャンネル機能」という概念を検証し、チャンネル研究に新たな視座を与えていくことを究極的には目指していく。

3. 研究の方法

まず、TRPM2 における非チャンネル機能を仲介する相互作用タンパク質の同定を目指し、網羅的な相互作用タンパク質のスクリーニングを遂行した。次いで、TRPM2 タンパク質複合体の解析を行うとともに、その機能、細胞内動態、分解過程を細胞生物学的・生理学的手法により解析した。また、 $\text{M}\phi$ における TRPM2 タンパク質複合体によるシグナル伝達、M1 及び M2 型への $\text{M}\phi$ 機能分極の調節を培養細胞系を用いて、個体レベルにおけ

る TRPM2 タンパク質複合体による M ϕ 分極と炎症応答の調節を TRPM2 KO マウス等を用いて追究した。

4 . 研究成果

TRPM2 における非チャネル機能を仲介する TRPM2 細胞質ドメインに相互作用するタンパク質を網羅的に検索し、複数のタンパク質を同定した。特に、Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が TRPM2 N-末端側細胞質ドメインに結合するタンパク質であることがわかった。TRPM2 チャネルに対する STAT3 の作用を組み換え発現系を用いて検討したところ、TRPM2 チャネル電流が及び TRPM2 発現レベルが強く減弱することが分かった。

次いで、本複合体の生物学的役割を評価する系として、最も TRPM2 発現が豊富であるとともに STAT3 の重要性が知られている M ϕ に着目し、TRPM2-STAT3 複合体がどのように、シグナル伝達、及び感染防御・炎症に関係する M1 型と創傷治癒に関係する M2 型への機能分極を調節するかを解析したところ、M1/M2 分類マーカータンパク質だけでなく、マクロファージの特徴的機能に重要なタンパク質の発現変化がみられることが分かった。また、担癌させた TRPM2 KO マウスの腫瘍関連マクロファージを解析したところ STAT3 の発現及びシグナル伝達能が亢進しており、下流遺伝子の血管内皮細胞増殖因子 VEGF の上昇がみられ、新生血管の過剰な形成が誘導されるとともに血管の発達が未成熟に留まる様子も観察された。さらに、TRPM2 KO マウスにおいては、薬物誘導性の炎症下で誘導される炎症マーカータンパク質が減少していた。このように、TRPM2 において、会合体形成により STAT3 シグナルを抑制し、マクロファージの炎症型と創傷治癒型の機能的分極を調整するという「非チャネル機能」を見出した。

TRPM2 と同様に高い H₂O₂ 感受性を示す TRPA1 についても検討を進めた。TRPA1 の N-末端側細胞質ドメインがユビキチンリガーゼ NEDD4-1 の足場として働くことにより、膜タンパクの形質膜から細胞内膜へと移行を調節する機構を示唆する知見が得られつつあり、TRP における「非チャネル機能」が高い普遍性を有する考え方に発展する兆しが見えつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masamune A, Kotani H, Sorgel FL, Chen JM, Hamada S, Sakaguchi R, Mori Y, Witt H, Shimosegawa T	4. 巻 158
2. 論文標題 Variants that affect function of calcium channel TRPV6 are associated with early-onset chronic Pancreatitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1626-1641
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchiyama M, Nakao A, Kurita Y, Fukushi I, Takeda K, Numata T, Tran HN, Sawamura S, Ebert M, Kurokawa T, Sakaguchi R, Stokes AJ, Takahashi N, Okada Y, Mori Y	4. 巻 30
2. 論文標題 O2-dependent protein internalization underlies astrocytic sensing of acute hypoxia by restricting multimodal TRPA1 channel responses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 3378-3396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2020.06.047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zong PY, Feng JL, Yue ZC, Li YF, Wu GX, Sun BN, He YL, Miller B, Yu AS, Su ZP, Xie, J, Mori Y, Hao B, Yue LX	4. 巻 110
2. 論文標題 Functional coupling of TRPM2 and extrasynaptic NMDARs exacerbates excitotoxicity in ischemic brain injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1944-1958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2022.03.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zong P, Feng J, Yue Z, Yu AS, Vacher J, Jellison ER, Miller B, Mori Y, Yue L	4. 巻 1
2. 論文標題 TRPM2 deficiency in mice protects against atherosclerosis by inhibiting TRPM2-CD36 inflammatory axis in macrophages.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Cardiovasc. Res.	6. 最初と最後の頁 344-360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s44161-022-00027-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳における新しい酸素センシング機構の発見
<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-07-21>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	ミュンヘン工科大学			
米国	ハワイ大学	コーネル大学		