

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790186

研究課題名 (和文)

細胞死を制御する TRP チャネルの性質とその役割

研究課題名 (英文)

The role of TRP channel in cell death

研究代表者

沼田 朋大 (NUMATA TOMOHIRO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20455223

研究成果の概要 (和文)：本研究により、細胞死に関わる酸刺激により活性化するイオンチャネルは TRPM7 ということが分かり、同時にその酸透過の分子メカニズムを解明した。一方、アルカリ (アンモニア) 刺激に関わる細胞死には、TRPM2 チャネルが深く関与することを強制発現系および内在性のチャネルを調べることによって示した。さらにノックアウトマウスを用いた機能解析を行った結果、アンモニア血しょうに深く関わっている可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文)：In the present study, I identified that TRPM7 is involved in acid-induced cell death. Furthermore, permeation mechanism of proton in TRPM7 was also revealed. On the other hand, it was revealed that TRPM2 is involved in alkali (ammonia)-induced cell death in heterologously expression system and endogenously expressed TRPM2. Moreover, functional analysis for TRPM2 KO mice suggested that TRPM2 is involved at the ammoniemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：分子・細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

動物細胞は、たとえ異常環境や刺激物質による物理化学的な細胞容積変化を強いられ、それでも細胞容積を一定に保つ細胞容積調節能

を持っている。最近まで、低浸透圧性細胞膨張後の調節性容積減少 (Regulatory Volume Decrease: RVD) をトリガーする膜伸展活性化カチオンチャネルの分子実体は、不明であ

ったが、日本学術振興会 (DC2) の期間 (研究期間 H17-18 年度) にその分子実体を Transient receptor potential (TRP) チャネルファミリーのメンバーである TRPM7 であることを発見した (沼田ら, Am J Physiol. 2007)。一方、高浸透圧性細胞縮小後の調節性容積増大 (Regulatory Volume Increase: RVI) 機構では、主に PKC を介した高浸透圧誘導性カチオンチャネルの活性化により達成されることを明らかにしてきた (Wehner ら, Cell Physiol Biochem. 2007)。これらの細胞容積調節能は、細胞にとって必要不可欠な機能の一つであり、細胞増殖、分化、細胞死といった生理的、病理的過程に関与している。一度、イオンチャネルの暴走でこの細胞容積調節能が破綻すると細胞膨張や細胞縮小といった細胞容積変化を伴った細胞死を招くということが分かってきている (図 1 参照)。即ち、等浸透圧条件下において容積感受性 Cl^- チャネル (VSOR) が異常亢進すると持続的な細胞縮小 (AVD) を伴いアポトーシスが起ること (清水ら, PNAS. 2003) や、酸性条件下において酸感受性 Cl^- チャネル (ASOR) が異常亢進すると持続的な細胞膨張 (NVI) を伴い、ネクローシスが起ることから明らかになってきている (Wang ら, Pflugers Arch. 2007)。このようなイオンチャネルの暴走が招く細胞死はカチオンチャネルでも起こる可能性が高い。その候補分子として挙げられるのは、浸透圧、pH、温度変化、化学物質や細胞内代謝状態などの細胞内外の物理的・化学的な環境変化によって活性化される TRP チャネルカチオンチャネルのファミリーである。最近、RVD に関わる TRPM7 が直接的な膜進展刺激 (沼田ら, Cell Physiol Biochem 2007) だけでなく、細胞外酸性刺激 (Jiang ら, J Gen Physiol. 2005) やアンモニア刺激 (Kozak ら, J Gen Physiol. 2005) などによって活性化すること

が分かってきている。従って、これらの活性化刺激による TRPM7 の異常活性化によってカチオン流入が起き、細胞容積増大を示すネクローシス性細胞死を引き起こす可能性が高い。よって、本タンパク質が導くネクローシス性細胞死のメカニズムとその役割とその機構について明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

イオンチャネルの機能の詳細を検討した上で、細胞レベルでの検討、個体レベルでの検討を行う。予備的な実験において、現在知られている TRPM7 の活性化刺激を与えた場合に生じるチャネル活性の変化を内在的に TRPM7 が発現している細胞を用いて電気生理学的に検討を行ってみた。その結果、生体内で病理的な虚血・再灌流時の血液などで傷害が起こるような酸刺激により TRPM7 電流が増大することを見出した (図 2 参照、沼田、未発表)。そのため酸による TRPM7 の異常亢進により、細胞死が導かれている可能性が高い。そこで、1. 酸刺激時の TRPM7 チャネルそのものの活性化メカニズムを発現系を用いた実験系で点変異を用いた解析と合わせて、詳細な電気生理学的な解析を行いたい。予備的な実験で TRPM7 電流の増大を確認したが、興味深いことに TRPM7 は酸、つまり、プロトンそのものを透過することも見出している (沼田、未発表) ので、この酸透過および活性化機構についても同様に検討を行いたい。2. アポトーシスやネクローシスと細胞容積には、図 1 で示しているように密接な繋がりがあることが分かっているので、細胞容積測定を行いたい。3. 種々の生化学的な手法により、アポトーシス死、ネクローシス死の検出を行いたい。4. 現在まで TRPM7 は広範に発現しており、細胞の生存や増殖に関与しておりノックアウトマウスの作成は困難であると言われて

いる。そこで、1.の実験でイオン透過や活性を変化させたような TRPM7 の変異体を用いてノックインマウスの作成をすることによって TRPM7 の生体内での役割の解明に挑戦したい。

一方で、生体内ではアンモニア濃度が高値で持続すると脳症、いわゆるアンモニア血症が起こることが知られている。このことから、大脳グリアの初代培養細胞を用いてアンモニア投与実験を行った。その結果、興味深いことにある種の TRP チャネル (TRPX) の発現と電流の増大を見出した (沼田ら、未発表)。そこで 1. さらに定量的に TRPX の mRNA、タンパクレベルでの発現の増加を調べたい。2. 細胞容積の変動、細胞内 Ca^{2+} や活性酸素種などのシグナル分子の変動を測定したい。3. 電気生理学的にアンモニア投与時のイオンチャネル電流の性質と変化を調べたい。4. 生化学的手法によって細胞死を検出したい。5. アンモニアは、TRPM7 の活性化因子であることが知られているので TRPM7 と TRPX との間には何らかの関係があることが予想された。そこで実際に TRPM7 の他の活性化因子である機械刺激を与えた際の TRPX の発現の変化を確かめた。この結果、興味深いことにアンモニア刺激と同様に機械刺激においても TRPX の発現が増大することを見出した (沼田ら、未発表)。よって、今後この TRPM7-TRPX の関係を詳細に調べていきたい。6. 現在、TRPX のノックアウトマウスを手に入れる予定なので、上記の細胞レベルの解析、in vivo での役割を明らかにしていきたい。

3. 研究の方法

平成 20 年度：酸誘導性細胞死の機構と TRP チャネルの役割の解明

1. 酸刺激時の TRPM7 チャネルそのものの活性化メカニズム、透過メカニズムを発現系を

用いた実験系で点変異を用いた解析と合わせて、詳細な電気生理学的な解析を行う。

2. 酸刺激による細胞死のメカニズムを解明したい。細胞死は細胞容積調節のバランスを崩すことにより導かれる。酸によって TRPM7 の異常活性化が起こり、急激なカチオンの流入が起きて細胞死が起こることが予想される。そこで、薬理的、分子生物学的手法を用いて TRPM7 の異常活性化を防ぐことにより細胞死が救済されるかを電気生理学的手法、生化学的手法、分子生物学的手法を用いて検討する。さらに、1. の実験でイオン透過や活性を変化させた TRPM7 変異体を作成することによって、ノックインマウスの作成を行う。

平成 21 年度：アンモニア刺激による細胞死機構と TRP チャネルの役割の解明

1. アンモニア刺激によって発現が増大するある種の TRP チャネル (TRPX) の mRNA、タンパクの発現、電流の増加を定量的に調べる。

2. さらにこの際の TRPX の活性化に細胞内セカンドメッセンジャー系やリン酸化シグナルが関与しているかについて検討する。

3. アンモニア刺激による細胞死のメカニズムを解明したい。予備実験においてアンモニア刺激そのものが TRPX を直接活性化して細胞死が起きるわけではないが、発現量の増大と何らかのシグナルによって細胞死が起こることを示唆する結果を得ている。そこで、TRPX の発現を薬理的、分子生物学的手法を用いて抑えることによりアンモニアによる細胞死からの救済を行う。さらに、TRPX のノックアウトマウスを用いることにより、細胞死における TRPX の役割を確定させる。

4. アンモニアは TRPM7 の活性化因子であること (Kozak ら, J Gen Physiol. 2005) から

TRPM7 と TRPX との間には何らかの関係があることが予想される。よって、TRPM7-TRPX の関係を TRPM7 と TRPX の双方から研究を進めることによって解明する。

以上を総括しての酸刺激やアンモニア刺激による細胞死を制御する TRP チャネルの性質とその役割を解明したい。

4. 研究成果

細胞は時々刻々と変化する環境に適応しながら生きるために、多様な刺激に対応して恒常性を保っている。本研究では、細胞の恒常性を保つための機構である細胞容積調節能を基盤に TRP チャネルの暴走による破綻が招く細胞死を解明する。TRP は、細胞外環境を感知するイオンチャネルであることから細胞容積調節能に深く関わっている候補として挙げられる。実際に生体内で起こりうる異常環境や刺激物質を用いると TRP チャネルは異常活性化、不活性化、さらには遺伝子発現の変化を引き起こす。今まで細胞容積調節機構に TRPM7 が大きく関与することは報告してきた。そこで、TRPM7 その実体の性質をよりよく知るためにイオン透過機構および活性化メカニズムを検討した。HEK293T 細胞に TRPM7 を発現した細胞にパッチクランプ法ホールセルモードを適用して電流を測った結果、TRPM7 は 1 価カチオンおよび 2 価カチオンを透過させるチャネルであるという今までの報告に加えて、内向き整流性のプロトン電流を観察した。また、このプロトン電流に対する生理的濃度の Ca^{2+} と Mg^{2+} の影響から、pH 5.5 付近でプロトンは 2 価カチオンと同じ結合サイトを競合して透過することが分かった。そこで、TRPM7 におけるプロトンの通り道と考えられるポア領域の負電荷アミノ酸を中性化する点変異 (E1047A, E1052A,

D1054A, D1059A) を導入した結果、D1054A では、電流が大きく抑制され、E1052A, D1059A では、部分的に抑制された。これらのことより、プロトンは TRPM7 のポア領域における負電荷アミノ酸部位を介して流入していることが明らかとなった。今後、異常環境下にした場合の、TRP チャネルの暴走から容積調節能の破綻、細胞死に至るまでの機構を解明する。

細胞は時々刻々と変化する環境に適応しながら生きるために、多様な刺激に対応して恒常性を保っている。本研究では、細胞の恒常性を保つための機構である細胞容積調節能を基盤に TRP チャネルの暴走による破綻が招く細胞死の研究を行った。Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは、細胞外環境を感知するイオンチャネルであることから細胞容積調節能に深く関わっている候補として挙げられた。実際に生体内で起こりうる異常環境や刺激物質を用いると TRP チャネルは異常活性化、不活性化、さらには遺伝子発現の変化を引き起こす。本研究においては、アンモニア血しょう時における細胞死機構と TRP チャネルの役割の解明を目的とした。

まず、マウスから単離したグリア細胞よりアンモニア負荷によって増大する TRPM2 の活性をパッチクランプ法で、mRNA の増大をリアルタイム PCR で、タンパク質の増大をウェスタンブロットで確認した。次に、TRPM2 の活性化に関与するシグナルは、細胞内 Ca^{2+} 、cAMP、活性酸素種といったセカンドメッセンジャー系を介すると今までの報告より、予想できたので各種蛍光プローブを用いたイメージングシステムを用いて行い、TRPM2 活性を確認した。さらに、アンモニア負荷による細胞死は、前年度と同様、細胞容積測定、種々の細胞死検出法によりアポトーシス死、ネクロ

ーシス死であることを確認した。さらにノックアウトマウスを用いてコントロール同様の検討を行った結果、TRPM2 がアンモニア血しょうに関与する可能性を示唆した。

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 8 件)

1. Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, Koyasu T, Ueno S, Funabiki K, Tani A, Ueda H, Kondo M, Mori Y, Tachibana M, Furukawa T. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 107, 332-337. (2010)
2. Okada, Y., Sato, K. & Numata, T. Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. **J. Physiol. (London).** 587, 2141-2149. (2009).
3. Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., Numata, T., Ishii, M., Takemoto, H., Ojida, A., Watanabe, K., Uemura, A., Kurose, H., Morii, T., Kobayashi, T., Sato, Y., Sato, C., Hamachi, I. & Mori, Y. Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 106, 5400-5405. (2009).
4. Numata T, Kozai D, Takahashi N, Kato K, Uriu Y, Yamamoto S, Kaneko T, Shinmoto T, Mori Y., Structures and variable functions of

TRP channels **Seikagaku.** 81, 962-983. (2009)

5. Miyagi K, Kiyonaka S, Yamada K, Miki T, Mori E, Kato K, Numata T, Sawaguchi Y, Numaga T, Kimura T, Kanai Y, Kawano M, Wakamori M, Nomura H, Koni I, Yamagishi M, Mori Y. A pathogenic C-terminus-truncated polycystin-2 mutant enhances receptor-activated Ca²⁺ entry via association with TRPC3 and TRPC7. **J. Biol. Chem.** 284, 34400-34412. (2009).
6. Numata, T. & Okada, Y. Proton conductivity through the human TRPM7 channel and its molecular determinants. **J. Biol. Chem.** 283, 15097-15103. (2008).
7. Numata, T., Sato, K., Okada, Y. & Wehner, F. Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis. **Apoptosis.** 13, 895-903. (2008).
8. Numata, T. & Okada, Y. Molecular determinants of sensitivity and conductivity of human TRPM7 to Mg²⁺ and Ca²⁺. **Channels.** 2, 283-286. (2008).

[学会発表] (計 3 件)

1. Numata T, Wehner F, Sato K, Okada Y. Cation channel activity determines cell death in human epithelial cells PAT-CVR Joint Symposium 2009 年 8 月 3 日-6 日自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター
2. Numata T, Okada Y Expression of TRPM7 channels switches acidosis-induced cell death from apoptosis to necrosis in human epithelial cells The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences 2009 年 7 月 27 日-8 月 1 日国立京都国際会館

3. **Numata T** & Okada Y. Proton conductivity through the human TRPM7 channel FASEB Summer Research Conference 2008 年 7 月 16 日-21 日 Snowmass,Colorad,USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田朋大 (NUMATA TOMOHIRO)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：20455223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし