

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06748

研究課題名（和文）体温と代謝をつなぐ体温センサーTRPM2機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Physiological roles of TRPM2 associating body temperature and metabolism

研究代表者

加塩 麻紀子（Kashio, Makiko）

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任准教授

研究者番号：20631394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：TRPM2は温度感受性の非選択的陽イオンチャネルである。本研究では、体温下TRPM2活性化制御機構の一つと考えられる細胞内Ca²⁺とTRPM2リン酸化によるTRPM2活性化温度閾値調節の分子基盤を明らかにした。細胞内Ca²⁺は濃度依存性にTRPM2の温度閾値を低下させ、TRPM2リン酸化は細胞内Ca²⁺の効果に拮抗することで温度閾値を上昇させた。PKCによるリン酸化部位として同定されたThr738のリン酸化不全変異（T738A）はPKCの効果消失させ、リン酸化模倣変異（T738D）はPKCの作用を再現したことから、TRPM2閾値調節におけるThr738リン酸化の重要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度感受性TRPM2は、脳、免疫細胞、膵臓等の体温下に保たれた広範な組織に発現しており、免疫機能やインスリン分泌調節への関わりが明らかになっている。一方で、過剰なTRPM2活性は細胞死や炎症を増悪させることも数多く報告されており、生理的環境においてTRPM2体温下活性が適切に調節されることで種々生理機能に寄与していると考えられる。生理的環境で変動しうる細胞内Ca²⁺とPKC活性によって体温下TRPM2活性が制御されることを示した本研究成果は、TRPM2機能の関わる生理機能・病態生理の解明、さらには温度によるTRPチャネル活性化の分子基盤の解明につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Transient receptor potential melastatin type 2 (TRPM2) is a non-selective cation channel with sensitivity to warm temperature. This study has revealed one molecular mechanism regulating TRPM2 activity at body temperature mediated by cytosolic Ca²⁺ and TRPM2 phosphorylation by protein kinase C activity. Cytosolic Ca²⁺ decreases temperature threshold for TRPM2 activation in concentration-dependent manner. TRPM2 phosphorylation counteracts the effect of cytosolic Ca²⁺ to decrease temperature threshold for TRPM2 activation. Alanine-scan mutagenesis identified a candidate threonine residue (Thr738) and its phospho-deficient mutation (T738A) abrogated the effect of PKC on temperature threshold for TRPM2. Moreover, phospho-mimic mutation (T738D) recapitulated the effect of PKC, confirming the roles of Thr738 phosphorylation regulating temperature threshold for TRPM2. The findings in this study could propel elucidation of machinery enabling temperature-dependent activation of TRP channels.

研究分野：生理学

キーワード：TRPM2 体温 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

TRP チャンネルは、外来物質に加え生体内の内因性物質など多刺激に応答するイオンチャンネルであり、そのうち 11 種が温度変化により活性化する温度感受性 TRP チャンネルとして知られる。感覚神経に発現する温度感受性 TRP チャンネルは、温度感覚や侵害性温度刺激の受容に関わる。一方で、温度感受性 TRP チャンネル機能の多くは恒温動物を含む多くの生物で保存され[1]、劇的な温度変化のない深部組織にも発現することから[2]、温度感受性 TRP チャンネルが体温を受容する生理的意義が強く示唆されるものの、その体温下活性制御機構および生理機能はほとんど明らかになっていない。

温度感受性 TRP チャンネルの一種である TRPM2 は、体温下に保たれた広範な組織に発現する[3]。TRPM2 は温度に加えて、細胞内の adenosine diphosphate ribose (ADPR) および Ca^{2+} や、酸化ストレスにより活性化する[4]。研究代表者は本研究以前に、培養細胞に強制発現させた TRPM2 の活性化温度閾値は約 47 °C と非常に高く保たれているものの、酸化還元(レドックス)シグナルの作用により活性化温度閾値が体温域まで低下することで体温下 TRPM2 活性が可能となり、その結果として免疫能・インスリン分泌能等の生理機能調節に寄与することを明らかにした[5,6]。したがってレドックスシグナル、ADPR、体温などの内在性因子により体温下 TRPM2 活性が調節されていると考えられる[7]。上記の通り、TRPM2 は活性酸素により活性化することから、細胞死や炎症性疾患など、病態との関連が数多く報告されて来たものの[3]、生理機能に関する報告は現在のところ免疫機能やインスリン分泌等に限定されている。一方で、TRPM2 は恒温動物を含む多くの真核生物で保存されていることから、体温下 TRPM2 活性が我々生物の生存にとり利益をもたらすものであることは疑いようもないが、研究代表者が明らかにしたレドックスシグナルを介する機構以外に、体温下 TRPM2 活性制御機構の解明は進んでいなかった。

2. 研究の目的

研究の背景に記載の通り、TRPM2 は種々の内因性因子により体温下活性が調節されることで、様々な生理機能を発揮していると考えられるが、その体温下活性制御機構についてはほとんど明らかになっていなかった。研究代表者は、予備検討によりプロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤であるホルボールエステル (PMA, 100 nM 20min) 処置後、持続的に TRPM2 のリン酸化が増加することを見出していた。したがって TRPM2 の活性化により自身のポアを介して細胞内へと流入する Ca^{2+} が、 Ca^{2+} の直接作用によるポジティブフィードバックループと同時に、 Ca^{2+} 依存性 PKC の活性化を介して間接的に TRPM2 活性調節にあたる可能性が示唆された。そこで本研究では PKC 活性による TRPM2 リン酸化に注目し、体温下 TRPM2 活性制御機構の探索および分子基盤解明を目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) PKC 活性化による TRPM2 リン酸化部位の同定

TRPM2 発現 HEK293T 細胞を用いた Phos-tag SDS-PAGE 法により、PMA 処置による TRPM2 リン酸化部位の同定を行った。リン酸部位予測プログラムにより抽出された TRPM2 細胞内領域に位置する候補セリン・スレオニン残基をアラニン置換し、Phos-tag SDS-PAGE で認められるリン酸化レベルの変化を検証した。

(2) TRPM2 リン酸化による TRPM2 活性化温度閾値調節機構の解明

TRPM2 発現 HEK293T を用いたホールセルパッチクランプ測定において、細胞内に ADPR (10 μ M) を添加、熱刺激により活性化する TRPM2 電流を測定した。細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度を各濃度にコントロールした電極内液 (5 mM EGTA) および Ca^{2+} を含まない細胞外液を用いることで、TRPM2 の活性化時においても細胞内 Ca^{2+} 濃度一定となる条件を実現させた。得られた温度依存性 TRPM2 電流 温度関係のアレニウスプロットにより活性化温度閾値を算出した。

(3) 低温電子顕微鏡解析による 3 次元構造を用いたリン酸化 TRPM2 部位の三次元配置解析

ヒト TRPM2 の 3 次元構造 (PDB ID: 6pus)[8] をもとに、PyMOL Molecular Graphics System (Version 2.0 Schrödinger, LLC) ソフトウェアを用いた解析を行った。

4. 研究成果

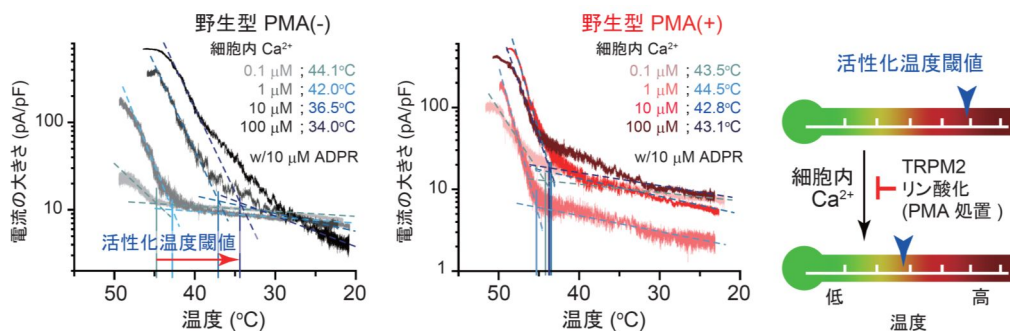


図1 TRPM2 リン酸化は、細胞内 Ca^{2+} による TRPM2 活性化温度閾値の低下作用に拮抗することで活性化温度閾値を上昇させる

(左) PMA 未処置条件下、各濃度の細胞内 Ca^{2+} 存在下における野生型 TRPM2 の活性化温度閾値 (アレニウスプロット); 低濃度 (10 μM) の内因性リガンド (ADPR) 存在下、PKC 活性化剤 (PMA) 未処置条件下で熱刺激活性化 TRPM2 電流を測定した。温度の上昇によるチャネルの活性化に伴い、温度-電流関係の屈曲点が認められる。各プロットの線形回帰を破線で、破線の交点における温度 (活性化温度閾値) を実線および数値で示す。細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性に活性化温度閾値の低下が生じた。

(中央) PMA 処置条件下、野生型 TRPM2 の活性化温度閾値 (アレニウスプロット); PMA 処置 (100 nM 20min, 処置後 2~3h) により細胞内 Ca^{2+} による TRPM2 の活性化温度閾値の低下が消失した。

(右) 細胞内 Ca^{2+} と TRPM2 リン酸化による TRPM2 活性化温度閾値調節機構の模式図; 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇による閾値の低下に TRPM2 リン酸化が拮抗することで閾値が上昇する。

TRPM2 発現 HEK293T を用いたホールセルパッチクランプ測定において、細胞内に ADPR (10 μM) を添加、細胞内 Ca^{2+} 濃度一定条件において、熱刺激により活性化する TRPM2 電流を解析した結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存して TRPM2 の活性化温度閾値が低下した (図 1 左)。PKC 活性化剤 (PMA) 処置は TRPM2 リン酸化を上昇させるとともに (データ未掲載)、 Ca^{2+} 依存性の活性化温度閾値の低下を消失させた (図 1 中央)。これらの結果は、TRPM2 リン酸化が細胞内 Ca^{2+} の効果に拮抗することで TRPM2 の活性化温度閾値を上昇させていることを示唆する (図 1 右)。

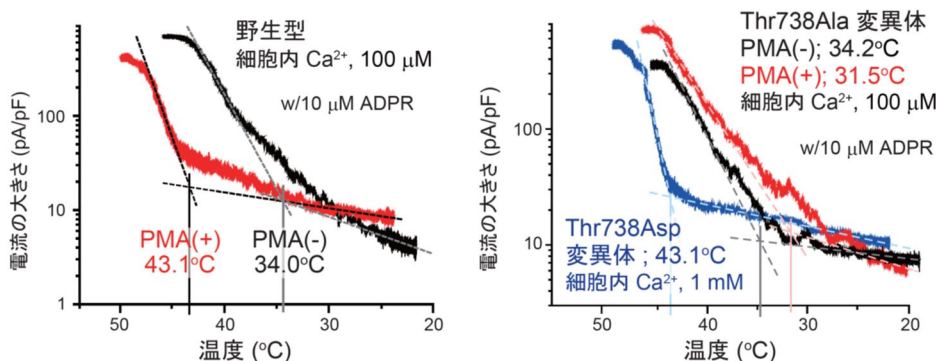


図2 TRPM2 リン酸化による活性化温度閾値上昇における Thr738 アミノ酸残基の関与

(左) PMA 未処置(-)群 (黒) および PMA 処置(+群) (赤) における野生型 TRPM2 の活性化温度閾値 (アレニウスプロット); 細胞内 Ca^{2+} (100 μM) および ADPR (10 μM) 存在下で測定された野生型 TRPM2 の熱刺激活性化電流の温度閾値が PMA 処置により上昇した。

(右) Thr738Ala 変異体および Thr738Asp 変異体の活性化温度閾値 (アレニウスプロット); スレオニン残基のアラニン変異 (Thr738Ala) により、PMA 処置による活性化温度閾値の上昇が消失した。さらに、同一アミノ酸残基のリン酸化模倣変異体 (Thr738Asp) は、野生型チャネル PMA 処置と同程度の高い活性化温度閾値 (青) を示した。

さらに、詳しい分子メカニズムを解析するために、phos-tag SDS-PAGE 法を用いたリン酸化タンパク検出により TRPM2 リン酸化のターゲットアミノ酸残基の探索を行った。その結果、TRPM2 の細胞内領域にある数個の候補アミノ酸が同定された (データ未掲載)。そのうち、野生型 TRPM2 で認められた PMA 処置による活性化温度閾値の上昇 (図 2 左、黒および赤トレース) は、一つのスレオニン残基へのリン酸化欠失変異 (Thr738Ala, Ala; アラニン) の導入により消失した (図 2 右、黒および赤トレース)。さらに同一アミノ酸残基のリン酸化模倣変異

(Thr738Asp, Asp;アスパラギン酸)は、リン酸化 TRPM2 と同程度の高い活性化温度閾値を再現した(図2右、青トレース)。これらの結果は、Thr738 が PKC 活性による TRPM2 の活性化温度閾値調節を担うアミノ酸である可能性を示唆する。

低温電子顕微鏡解析により報告されていたヒト TRPM2 の立体構造から、同定したアミノ酸残基(Thr738)は、TRPM2 の細胞膜領域に存在する Ca²⁺結合部位[8-10]近傍に位置し(図3)リン酸化により Thr738 部位に大きな負電荷をもつリン酸基が導入されることで、Ca²⁺結合部における Ca²⁺のアフィニティーが変化し、活性化温度閾値の変化が生じたと考えられる。

以上の結果より、体温下 TRPM2 活性制御における細胞内 Ca²⁺および TRPM2 リン酸化の役割が明らかとなった。さらにはリン酸化アミノ酸残基も同定することができた。近年飛躍的に進展している低温電子顕微鏡技術による立体構造解析により、多くの TRP チャンルの微細構造が明らかになってきている。しかしながら温度による活性化を可視化することは現在のところ困難であり、温度による TRP チャンルの活性化メカニズムの解明には至っていない。本研究成果は、細胞内 Ca²⁺および単一アミノ酸(Thr738)のリン酸化が TRPM2 の温度感受性を劇的に変化させる分子メカニズムを示した初めての報告であり、温度感受性 TRP チャンルが如何にして物理刺激である温度によって活性化を受けるのか、さらにその活性化温度閾値が決定する詳細なメカニズムの解明に道を開くものと期待する。

【参考文献】

1. Saito S, Shingai R: Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiol Genomics* 2006, **27**:219-230.
2. Kashio M: Thermosensation involving thermo-TRPs. *Mol Cell Endocrinol* 2021, **520**:111089.
3. Sumoza-Toledo A, Penner R: TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *The Journal of physiology* 2011, **589**:1515-1525.
4. Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, Bagley LA, Launay P, Schmitz C, Stokes AJ, Zhu Q, Bessman MJ, Penner R, et al.: ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 2001, **411**:595-599.
5. Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M: Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:6745-6750.
6. Kashio M, Tominaga M: Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets. *J Biol Chem* 2015, **290**:12435-12442.
7. Kashio M, Tominaga M: The TRPM2 channel: A thermo-sensitive metabolic sensor. *Channels (Austin)* 2017, **11**:426-433.
8. Huang Y, Roth B, Lu W, Du J: Ligand recognition and gating mechanism through three ligand-binding sites of human TRPM2 channel. *Elife* 2019, **8**.

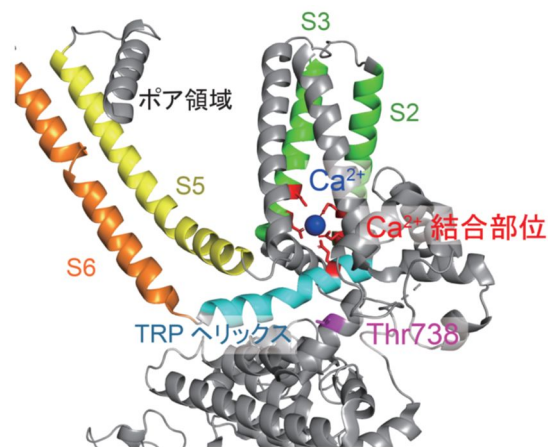


図3 TRPM2 リン酸化による活性化温度閾値調節への関与が示唆されたアミノ酸残基(Thr738)の立体構造配置

TRPM2 チャンル単一サブユニットの立体構造を示す。膜貫通セグメント(S1-S6)とその中央に形成されるポア領域を含む細胞膜領域、その下に示した細胞質領域(一部のみ表示)からなる(実際の機能的チャンネルは、4つのサブユニットの会合によって形成されている)。Thr738 残基(マゼンタ)は、細胞膜貫通領域(S2およびS3、緑)とTRPヘリックス(シアン)で形成されるCa²⁺(青)の結合部位(赤)近傍に位置する。

9. Wang L, Fu TM, Zhou Y, Xia S, Greka A, Wu H: **Structures and gating mechanism of human TRPM2.** *Science* 2018, **362**.
10. Huang Y, Winkler PA, Sun W, Lu W, Du J: **Architecture of the TRPM2 channel and its activation mechanism by ADP-ribose and calcium.** *Nature* 2018, **562**:145-149.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kashio Makiko, Masubuchi Satoru, Tominaga Makoto	4. 巻 600
2. 論文標題 Protein kinase C mediated phosphorylation of transient receptor potential melastatin type 2 Thr738 counteracts the effect of cytosolic Ca ²⁺ and elevates the temperature threshold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4287 ~ 4302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP283350	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 -
1. 著者名 Nguyen Thi Hong Dung, Chapman Stella, Kashio Makiko, Saito Claire, Strom Tatjana, Yasui Mio, Tominaga Makoto	4. 巻 298
2. 論文標題 Single amino acids set apparent temperature thresholds for heat-evoked activation of mosquito transient receptor potential channel TRPA1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102271 ~ 102271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102271	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 該当する
1. 著者名 Ujisawa Tomoyo, Sasajima Sachiko, Kashio Makiko, Tominaga Makoto	4. 巻 72
2. 論文標題 Thermal gradient ring reveals different temperature-dependent behaviors in mice lacking thermosensitive TRP channels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-022-00835-3	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 -
1. 著者名 Nishimoto R, Derouiche S, Eto K, Deveci A, Kashio M, Kimori Y, Matsuoka Y, Morimatsu H, Nabekura J, Tominaga M	4. 巻 118(17)
2. 論文標題 Thermosensitive TRPV4 channels mediate temperature-dependent microglia movement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2012894118	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 -

1. 著者名 Kashio Makiko	4. 巻 520
2. 論文標題 Thermosensation involving thermo-TRPs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111089 ~ 111089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2020.111089	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Makiko Kashio
2. 発表標題 A new perspective in the study of TRPM2, a body temperature sensor. 体温センサーTRPM2研究の新展開
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加塩麻紀子、Thi Hong Dung Nguyen、Stella Chapman、齋藤くれあ、Tatjana Strom、安井美桜、富永真琴
2. 発表標題 熱帯および温帯を生息域とする蚊におけるTRPA1活性化温度閾値の違いを決定づけるアミノ酸の同定
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加塩麻紀子、富永真琴、増淵悟
2. 発表標題 体温と代謝をつなぐ体温センサーTRPM2機能の解明
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

体温センサーが温度を感じるメカニズムを発見
https://www.nips.ac.jp/release/2022/09/_trpm2_1.html
蚊はどのようにして温度や痛みを感じるのか？
https://www.nips.ac.jp/release/2022/07/post_487.html

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