

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790208

研究課題名（和文）小児てんかん原因遺伝子候補 TRPP3 の機能解明

研究課題名（英文）The functional analysis of epilepsy related gene TRPP3

研究代表者

沼田 朋大（NUMATA TOMOHIRO）

京都大学・地球環境学堂・助教

研究者番号：20455223

研究成果の概要（和文）：小児てんかんは、100 から 150 人に 1 人の割合で起こり、その一因としてイオン輸送タンパク質の遺伝子異常が挙げられている。本研究では、遺伝子異常の候補として見出した TRPP3 の機能解明および小児てんかん患者から見出された TRPP3 内の変異体の機能異常を探った。その結果、小児てんかん患者から見出された変異体の機能評価では、17 種の変異体の機能異常を突き止めた。

研究成果の概要（英文）：Juvenile myoclonic epilepsy is the most frequently encountered and most common of the generalized epilepsy syndromes. In this research, mutations of the TRPP3 gene were detected in patients with Juvenile myoclonic epilepsy. Heterologous expression and functional analysis revealed abnormality in the 17 kinds of mutant channels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：TRPP3 TRP チャンネル 小児てんかん

1. 研究開始当初の背景

これまで、細胞容積調節、遺伝子疾患に関わる Ca^{2+} 透過性イオンチャネルのメカニズムを明らかにしてきた[Suzuki et al. 2004 Nat. Genet., Numata et al. 2007 Am J Physiol Cell Physiol., Miyagi et al. 2009 J Biol Chem.]. それらのイオンチャネルの生理的、病態生理的役割を解明する上で、関連する TRP (Transient Receptor Potential)チャネルの詳細な機能解析の必要性が高まってきた。そのため応募者は TRPM7 におけるプロ

トンの透過機構と二価カチオンの透過に関する報告[Numata & Okada. 2008 J Biol Chem., Numata & Okada 2008 Channels]や TRPC3 と TRPP2 の多量体化に関する報告をしてきた[Miyagi et al. 2009 J Biol Chem.]. 今回、小児てんかん患者から見出した遺伝子疾患の候補は、TRPP3 の変異体である。TRPP3 は、1998 年に多発性嚢胞腎の原因候補として発見[Nomura et al., 1998 J Biol Chem.]された PKD2L1(TRPP3)である。TRPP3 は、脳、心臓、骨格筋など広範に発

現しており [Wu et al. 1998 Genomics, Nomura et al. 1998 J Biol Chem.], 機能解析は、電位依存性の有無や活性化機構 [Nilius et al. 2005 J Physiol., Liu et al. 2002 FEBS Lett., Shimizu et al. 2008 Pflugers Arch.], 細胞内 Ca^{2+} 依存性 [Chen et al. 2000 Nature, Shimizu et al. 2008 Pflugers Arch.], 酸性やアルカリ性 pH 依存性 [Inada et al. 2008 EMBO Rep., Shimizu et al. 2008 Pflugers Arch.] の点で一致した見解は得られずに議論の余地があった。そこで、様々な刺激で活性化される TRPP3 に関して機能解析を行い、活性化機構の解明をする。その後、機能解析の結果を元に小児てんかん原因遺伝子候補 TRPP3 の変異体の機能解析を行うこと、マウスにおける TRPP3 の生理的役割を解明することで小児てんかんの原因解明を目指す。

2. 研究の目的

小児てんかんは、100 から 150 人に 1 人の割合で起こり、その一因としてイオンチャネルの遺伝子異常が挙げられている。主に神経活動を担うイオンチャネルは電位依存性を持つが、今回、候補として見出したイオンチャネルは、非電位依存性と考えられている Transient Receptor Potential (TRP) ファミリーに属する TRP Polycystin3 (TRPP3) チャネルである。そこで、未だ性質があまり理解されていない TRPP3 の機能解明を行い、小児てんかん患者から見出された TRPP3 内の変異についての性質を野生型 TRPP3 と比較する。また、マウス脳における TRPP3 の生理的役割を見出し、小児てんかんの原因を探る。

3. 研究の方法

TRPP3 の機能に関する報告は様々な刺激によって活性が調節されるという報告はあるが、一致した理解は得られていない。そこで、1 年目は TRPP3 の電位依存性、細胞内 Ca^{2+} 感受性、pH 依存性のそれぞれ 3 つの刺激に対する活性を中心に発現系で機能解析を行う。そして 2 年目は、小児てんかん原因候補の変異体作製、発現評価、機能評価を行い、一方で、マウス脳における TRPP3 の生理的役割を見出し、小児てんかんの原因解明に迫る。

(1) TRPP3 の機能評価 (1 年目)

① 電位依存性 TRPP3 は、脱分極パルスで活性化される電位依存性チャネルであることを HEK293T 細胞に TRPP3 を強制発現した細胞を用いて確認している。さらに電位依存的不活性化など電位パルスの時間や強さを検討していくことで電位依存性とチャネル活

性の関係を検討する。さらに興味深いことに TRPP3 は典型的な電位センサーを持つ電位依存性 K^{+} チャネルや電位依存性 Ca^{2+} チャネルの第 4 膜貫通領域 (S4) のアミノ酸配列に相同性があり、典型的な電位センサーに見られるように規則正しく正電荷アミノ酸が配置されていることを確認している。そこで、電位依存性について TRPP3 の電位センサーと推測される S4 内の正電荷のアミノ酸を電荷の持たないアミノ酸に置換することで、TRPP3 の電位依存性について検討を行う。

② 細胞内 Ca^{2+} 感受性 予備的な実験において、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるとチャネル活性が上昇することを見出している。そこで、細胞内 Ca^{2+} 濃度を变化させた際のチャネル活性の変化を評価する。さらにその細胞内 Ca^{2+} 濃度感受性部位として、TRPP3 内のモチーフを探索したところ、種々の Ca^{2+} 感受性イオンチャネルでチャネル活性を調節すると報告のある EF-hand motif が TRPP3 の C 末端に存在することが分かった。そこで、この EF-hand motif を欠損させた変異体を用いて細胞内 Ca^{2+} 感受性の機能評価を行う。

③ pH 依存性 PKD1L3 とコンプレックスを形成すると一時的な pH2.5 の強酸性から通常状態に戻すと活性化すること [Inada et al. 2008 EMBO Rep.] や TRPP3 単独で、塩基性 pH によって活性化すること [Shimizu et al. 2008 Pflugers Arch.] が報告されている。予備的な実験において細胞外液を酸性および塩基性 pH に変えると活性が変化することを確認している。そこで、様々な pH に対する TRPP3 の活性の変化を評価する。さらにその感受性部位について、TRPP3 と同じ遺伝子ファミリーに属する PKD1L3 では、細胞外領域に存在する S1 と S2 の間のループに領域が pH を感受していると報告がある [Inada et al. 2008 EMBO Rep.] ので、TRPP3 の推定上の S1 と S2 の間のループに存在するポリシスチンモチーフを欠損させた変異体の機能評価を行う。また pH が与えるチャネル活性の変化はポア領域のイオン選択性の変化 [Numata & Okada. 2008 Channels] および電位センサーの動き [DeCoursey. 2003 Physiol Rev.] へも影響を与える可能性も考えられるので、これらの可能性についても順次検討を行う。

①-③を総合して、様々な刺激に対して TRPP3 の電位依存性をそれぞれ評価することでこれらの活性化機構が TRPP3 の電位依存性に対してどのような影響を与えるのか、それぞれの刺激の組み合わせが TRPP3 にどのような影響を与えるのかを考察する。

(2)小児てんかん患者から見出された TRPP3の変異体の評価とその役割 (2年目)

①小児てんかん患者から見出された TRPP3の変異体候補の評価 現在、小児てんかんの原因の候補として TRPP3 内に 17 か所の変異体を見出している。これらの変異体作製および発現確認を行った後に 1 年目に得たデータを元に TRPP3 変異体と機能を比較して機能評価を行う。

② マウスを用いた TRPP3 の生理的役割の解明 TRPP3 は、マウスの脳に発現している [Nomura et al. 1998 J Biol Chem.]. そこで、大脳皮質および海馬などの単離細胞を用いて TRPP3 の発現確認および機能評価を行う。これらを確認した後に神経活動への TRPP3 の関与を調べる。

(2) ①-②を総合して、TRPP3 の変異体の機能異常が小児てんかんを引き起こす原因となるか考察をする。

4. 研究成果

遺伝子疾患に関する研究は、表現型が顕著であるものは多くなされているが、小児てんかんのよう表現型が緩和なものや、症状が大人になると改善されるものに対する研究はあまりなされていない。そのため、本研究で焦点を当てた小児てんかん患者からの原因遺伝子の探索およびイオンチャネルの変異体の研究は、独創的である。一般的に TRP チャネルは、典型的な電位センサーを持たないために電位非依存性であると知られている。しかしながら、本研究で行う TRP チャネルは、電位センサー様のアミノ酸配列を有し、電位依存性を持つことが予想されることから今までの概念を覆し、TRP チャネルの新たな活性化機構という概念を与えるだろう。また、TRP チャネルは複合的な刺激によって活性が見られるため活性化機構を理解するには、一つの視野から解析を進めたのでは解析が困難である。しかしながら、本研究のように複数の視点を総合して機能解明を遂行することで、複雑な活性化機構を持つように見える他の TRP チャネルの解析への道筋を提案することになるかもしれない。小児てんかん患者から見出された変異体に小児てんかんの原因となり得る機能が認められた場合、将来的にはノックインマウスを作製し、その機能解析を行うことで小児てんかん患者の原因解明、新薬開発や治療への手掛かりを与えることになるだろう。

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 11 件)

- ① Katano M, Numata T, Aguan K, Hara Y, Kiyonaka S, Yamamoto S, Miki T, Sawamura S, Suzuki T, Yamakawa K, & Mori Y. The juvenile myoclonic epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death. *Cell Calcium* 51(2):179-185 (2012) DOI: 10.1016/j.ceca.2011.12.011
- ② Numata T, Sato K, Christmann J, Marx R, Mori Y, Okada Y, Wehner F. The Δ C splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation *J Physiology* 590:1121-1138 (2012) DOI: 10.1113/jphysiol.2011.220947
- ③ Ando-Akatsuka Y, Shimizu T, Numata T & Okada Y Involvements of the ABC protein ABCF2 and α -actinin-4 in regulation of cell volume and anion channels in human epithelial cells. *J Cell Physiol* (2012) DOI: 10.1002/jcp.24050
- ④ Numata T, Murakami T, Kawashima F, Morone N, Heuser JE, Takano Y, Ohkubo K, Fukuzumi S, Mori Y, Imahori H. Utilization of Photoinduced Charge-Separated State of Donor-Acceptor Linked Molecules for Regulation of Cell Membrane Potential and Ion Transport. *J Am Chem Soc.* 134:6092-6095 (2012) DOI:10.1021/ja3007275
- ⑤ Sato K, Numata T, Saito T, Ueta Y, & Okada Y. V2 Receptor-Mediated Autocrine Role of Somatodendritic Release of AVP in Rat Vasopressin Neurons Under Hypo-Osmotic Conditions. *Sci Signal.* 4: ra5. (2011) DOI: 10.1126/scisignal.2001279
- ⑥ Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O(2). *Nat Chem Biol.* 7: 701-711. (2011) DOI: 10.1038/nchembio.640.
- ⑦ Aritomi S, Wagatsuma H, Numata T, Uriu Y, Nogi Y, Mitsui A, Konda T, Mori Y, & Yoshimura M. Expression of N-type calcium channels in human adrenocortical cells and their contribution to corticosteroid synthesis. *Hypertension Research.* 34, 193-201 (2011) DOI: 10.1038/hr.2010.191
- ⑧ Koike C, Numata T, Ueda H, Mori Y, & Furukawa T. TRPM1: A vertebrate TRP

channel responsible for retinal ON bipolar function. *Cell Calcium*. 48, 95-101. (2010)
DOI: 10.1016/j.ceca.2010.08.004

- ⑨ 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) DOI: 10.1073/pnas.0912730107
- ⑩ Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Numata T, Mori Y, Miyazaki J, Miki T, & Seino S Rim2 \square determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metabolism*. 4, 117-129. (2010)
DOI: 10.1016/j.cmet.2010.05.017
- ⑪ Chen X, Numata T (co-first author), Li M, Mori Y, Orser BA, Jackson MF, Xiong ZG, & Macdonald JF. The modulation of TRPM7 currents by nafamostat mesilate depends directly upon extracellular concentrations of divalent cations. *Mol Brain*. 3, 38 (2010) DOI: 10.1186/1756-6606-3-38

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高橋 重成、桑木 共之、清中 茂樹、沼田 朋大、森 泰生 TRPA1 は体内への酸素供給を制御する酸素センサーである第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29 日-31 日 長野県松本文化会館
- ② 中尾 章人、三木 崇史、下野 健、沼田 朋大、清中 茂樹、若森 実、森 泰生、Ca²⁺ チャネル点変異マウス tottering の海馬における癲癇様オシレーションの発生機序解明 第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29 日-31 日 長野県松本文化会館
- ③ 中村 友紀、石 秀玉、沼田 朋大、森 泰生、井上 隆司、廣瀬 伸一 熱性けいれん患者において発見された HCN2 変異は温度依存的な活性を変化させる第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29 日-31 日 長野県松本文化会館
- ④ 佐藤 かつお理、沼田 朋大、リー エルバート、岡田 泰伸 酸感受性外向整流性クロライドチャネル分子実体の探究 第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29 日-31 日 長野県松本文化会館
- ⑤ 沼田 朋大、高橋 重成、清中 茂樹、香西 大輔、森 泰生 TRPA1 チャネルの酸感受機構の解明 第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29 日-31 日 長野県松本文化会館
- ⑥ Tomohiro Numata The juvenile myoclonic

epilepsy-related protein EFHC1 interacts with the redox-sensitive TRPM2 channel linked to cell death 第一回多階層生体機能学 HD Physiology 国際シンポジウム 2012 年 1 月 20 日-21 日 東京大学武田先端知ビル武田ホール

- ⑦ Tomohiro Numata, Kaori Sato, Carsten Schmitz, Meredith C. Hermosura, Anne-Laure Perraud, Yasuo Mori, Yasunobu Okada TRPM7 is an essential regulator for the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel (VSOR) activity. The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) 2011 年 9 月 11 日-14 日 Taipei (Taiwan)
- ⑧ 中村 友紀、石 秀玉、沼田 朋大、森 泰生、井上 隆司、廣瀬 伸一 熱性けいれん患者において発見された HCN2 遺伝子変異は温度依存的な活性を変化させる第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 28 日-30 日パシフィコ横浜
- ⑨ 沼田 朋大、小池 千恵子、上田 浩、森 泰生、古川 貴久 TRPM1 は網膜 ON 型双極細胞の視覚伝達チャネルである第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 28 日-30 日パシフィコ横浜
- ⑩ 沼田 朋大、佐藤 かつお理, Carsten Schmitz, Meredith C. Hermosura, Anne-Laure Perraud, 森 泰生, 岡田 泰伸 低浸透圧条件下における VSOR Cl⁻チャネルと TRPM7 チャネルの機能連関 第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 28 日-30 日パシフィコ横浜
- ⑪ Numata T A pathogenic C terminus-truncated polycystin-2 mutation enhances receptor-activated Ca²⁺ entry via association with TRPC3 and TRPC7 Japan Canada Symposium 2010年5月12日-13日 Convergence Centre Boardroom, Windermere, London, Canada

[図書] (計 2 件)

- ① 森泰生, 沼田朋大, 高橋重成 (2-4-1 総論), 沼田朋大 (2-4-2 TRP チャネル)トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ-(金井好克, 竹島浩, 森泰生, 久保義弘 編) 京都廣川書店 (2011)
- ② Numata, T., Kiyonaka S, Kato K, Takahashi N, & Mori Y. Activation of TRP channels in mammalian systems. Taylor & Francis Group (2011).

[その他]

ホームページ等
<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/member/numata.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 朋大 (NUMATA TOMOHIRO)
京都大学・地球環境学堂・助教
研究者番号：20455223