

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790222

研究課題名(和文) TRP チャンネルと相互作用分子の機能相関

研究課題名(英文) Binding molecules modify cold sensing activities of TRPM8 channel multimer complex

研究代表者

梅村 徹 (UMEMURA TORU)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：40533782

研究成果の概要(和文):本計画では温度受容体が温度を感知する仕組みについて調べた。主に受容体と他の分子との相互作用に着目した解析を行った。冷受容体 TRPM8 は、細胞膜上でたくさんの受容体が集合して網の目のような構造をとっている可能性を示唆する結果を得た。さらに、TRPM8 の遺伝子産物に通常よりも小さい物があり、全長の TRPM8 の細胞膜への移動を促進すること、および全長の TRPM8 に結合することで網目構造の大きさを変えて、より幅広い温度を感知できるようになっているであろうことが分かった。

研究成果の概要(英文): This project aims to reveal how thermoreceptors sense temperature. We found supporting evidence that cold receptors, TRPM8 form net structures in the raft. One of the TRPM8 short variants promoted TRPM8 to move to plasmamembrane. Additionally, it is strongly suggested that a TRPM8 short variant binds to original TRPM8, resulting in producing various sizes of TRPM8 aggregates. This may be the reason why cells co-expressing TRPM8 and TRPM8 short variant show wider range of temperature threshold.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医学薬学

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

温度感受のメカニズムについて多くの検討がなされてきたが、その実体は未だよく分かっていない。同じ刺激に対して逆の応答を示

す近縁の分子の点変異の解析により分子間の違いをもたらす残基が明らかになっている場合があるが、それらは単に温レセプターと冷レセプターの切り替えスイッチであった。よって、温度受容機構本体に迫るにはこ

れまでとは異なるアプローチが必要とされていた。

もっとも解析が進んでいるのは大腸菌の温度受容体である。特異的リガンド、温度、pH などに応答する多機能性を持った受容体であり、すでに結晶構造解析がなされている。しかし、活性化型構造と、非活性化型構造の違いは精々数Å程度であり、どのようにして温度を感知しているか不明であった。他方、受容体が多量体を形成するための構造があり、かつ受容体は菌体内で細胞の極に局在していることが報告されている。これらのことは受容体は何からの集合体を作っていることを示唆している。一方、TRPM8 はラフト中に存在することが知られており、ラフト内蛋白質と複合体を形成していることが分かっている。

そこでわれわれは、これら集合体構造の生成-解離が温度感受に関わっているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

我々は TRP チャンネルの内の一つの冷感覚受容体の TRPM8 受容体の複合体形成と温度感受性の関係に着目し、温度感受のメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウス DRG からのバリエント TRPM8 のクローニング。

Clontech 社の SMARTer cDNA library construction kit を用いてマウス DRG の cDNA ライブラリーを作成した。3'-race により決定した 3'末端とキット付属の 5'末端のプライマーを用いて TRPM8 のバリエントを単離した。これをほ乳類の発現ベクターにク

ローニングした。

(2) TRPM8 のチャンネル活性の測定

Fura-2 を用いた Ca^{2+} イメージング法およびパッチクランプ法でチャンネル活性を測定した。

4. 研究成果

(1) TRPM8 は細胞内において TRPM8 同士で集合体を作っている

TRPM8 はラフト中に存在することが知られており、ラフト蛋白質と複合体を作り、集合体を形成している。元来 TRPM8 は凝集しやすいので、TRPM8 複合体の構成要素の候補はラフト蛋白質に加えて TRPM8 のバリエントが考えられる。ヒトは TRPM8 のバリエントが幾つか報告されており、その中の α TRPM8 を HEK293T 細胞で発現させ SDS-PAGE で解析したところ 4 量体を形成していることが分かった。チャンネルポアを形成する四量体は、C 末で会合していることが知られているが、N 末側でどうなっているかわかっていなかった。このことは、TRPM8 チャンネル四量体は N 末において更にチャンネル四量体間で四量体を形成している、すなわちネット様構造を形成している事を示唆する。さらに、マウスについてもバリエントの存在を調べたところ、DRG 細胞に N 末端より 110 残基までをコードしたバリエントを見いだした。この蛋白質は SDS-PAGE による解析により、2 量体を形成していることが分かった。3 次元構造的には、N 末中央部分では 4 つの TRPM8 分子が会合していて、N 末端では隣の分子とくっついていると考えられる。

(2) バリエントと全長 TRPM8 の共発現による、温度閾値の変化

DRG を抗 TRPM8-N 末端および抗 TRPM8-C 末端の抗体で染色したところ両者の分布は一致した。このことは、DRG の細胞内で短いバリエントと全長の M8 が共発現していることを示唆する。単離 DRG 細胞を用いた Ca^{2+} イメージング法による解析では活性化温度閾値のばらつきがみられた。HEK293JN 細胞で共発現させたところ、同じく温度閾値がばらついた。このばらつきは、バリエントが全長 TRPM8 に結合することによって集合体の大きさが変わることによって考えられる。

(3) バリエントと全長 TRPM8 の共発現による、チャネル活性の増大

HEK293T 細胞で、共発現させたところ活性化温度閾値のばらつきと活性の増大が見られた。HEK293JN 細胞を用いての解析結果と異なるのは蛋白質の発現量の違いによると思われる。

(4) 細胞膜上の TRPM8 と ER 上の TRPM8 の違い

細胞内で TRPM8 はほとんどが ER に局在している。細胞外のカルシウム濃度を 0 にすると、冷刺激、メントール刺激共に細胞質へのカルシウム流入を引き起こさなかった。このことは、細胞膜上の TRPM8 による細胞内への Ca^{2+} の流入により、ER から Ca^{2+} が放出される (TRPM8 によるのか他のチャネルによるかは不明) 事を示唆する。理由として初期 ER 中では、糖鎖修飾が完全に進行しないので、TRPM8 が非活性型になっている可能性

が挙げられる。これらのことは、TRPM8 が活性を持つためには、一部でも ER から細胞膜上に移動することが必須であること、を示している

(5) バリエントと全長 TRPM8 の共発現による、チャネル活性の増大はどのようにして起こるのか

Myc-tag をつけた野生型のバリエントを HEK293 細胞で発現させると、N 末端抗体では ER、myc 抗体では細胞全体が染色された。N 末端抗体のエピトープにはリン酸化されると報告されている残基があるので、リン酸化により細胞内局在が制御されているかどうかを検討した。バリエントの S9 と T17 はリン酸化されると考えられているので、これらについて点変異を作成した。Western blotting で wt エピトープ外の T17A は N 末端抗体で認識されたが、S9A は認識されなかった。一方 Myc-tag を付加し、Myc 抗体で染色すると wt, S9A, T17A 全てが確認できた。さらに、wt は T17A と比較してバンドが薄かった。このことは S9 がリン酸化されていることを強く示唆する。全長 TRPM8 とバリエント点変異体 S9A, T17A を共発現させて Ca^{2+} イメージング法を用いて冷刺激に対する Ca^{2+} 細胞質内流入を調べたところ、S9A でのみが Ca^{2+} 流入増大が認められなかった。よって、S9 の位置に何らかの修飾が加わることで、バリエントの細胞内局在が決定されることが示唆された。

(6) まとめと展望

本研究は、生化学的な解析から細胞膜上で TRPM8 がネット様構造を取っていることを強く示唆する結果を得た。さらに新たな TRPM8 の短いバリエントを見つけ、それが

TRPM8 の活性及び温度閾値を修飾することを見いだした。加えて、TRPM8 の細胞膜上への移行は Ser9 のリン酸化によるであろう事を示した。多くの TRPM8 がなぜ、ER に存在していて、どのようにして細胞膜へ輸送されるか不明であったが、今回その原因と思われる残基を特定した。どれもこれまでにない新しい知見であり、かつ温度感覚メカニズムについて複合体の形成-解離という観点から、新たなモデルを提唱しており、十分にインパクトのある結果が得られている。バリエーションの存在で TRPM8 がこれまで考えられてきた温度より幅広い温度を感知しうることが示唆され、生体内のアイソフォームの発現調節機構を調べることで個体がどのように温度を感じているか解明できるのではないかと考えている。

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)

[学会発表] (計2件)

① 梅村 徹

TRP チャンネルと相互作用分子の機能相関
細胞生理若手の会
平成23年3月5日
京都府 京都大学医学部

② 梅村 徹

TRP チャンネルと相互作用分子の機能相関
細胞生理若手の会
平成22年2月19日
静岡県 リゾーピア熱海

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅村 徹 (UMEMURA TORU)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・特別協力研究員
研究者番号：40533782