

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590275

研究課題名(和文) TRPM2の新規活性化機構とその機能異常が導く細胞死の解明

研究課題名(英文) The new activation mechanisms in TRPM2 channel and role of cell death

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫に深く関わることがよく知られているTRPM2たんぱく質は、活性酸素刺激によって活性化されるが、活性化機構に関わる報告は、全く知られていない。本研究では、TRPM2に結合し、活性を調節する2種類のたんぱく質を発見した。一つは、高浸透圧刺激を与えた際にCD38と協調して活性化し、細胞容積調節に関与すること、もう一つは、てんかんに深く関わるたんぱく質であるEFHC1がTRPM2の活性を増強することを発見した。

研究成果の概要(英文)：TRPM2 is activated by oxidative stress and is a key player in immune system. However, there are no report that the accessory protein can regulate the TRPM2 activity. Here, we found two kinds of protein which regulate TRPM2 activity, EFHC1, CD38, in this project. In hypertonic solution, the TRPM2 is regulated by CD38 and, that is involved in volume regulation mechanisms. In the brain, the TRPM2 activity is enhanced by EFHC1, that is related to epilepsy. Together, we successfully found new activation mechanisms for TRPM2 activation.

研究分野：細胞生理

キーワード：TRPM2 TRP イオンチャネル 細胞容積調節 てんかん

1. 研究開始当初の背景

これまで、申請者は細胞死、てんかんに関わるイオンチャネルの役割を明らかにしてきた[Numata, T. et al. 2007 Apoptosis., Suzuki, T. et al. 2004 Nat. Genet.]. それらの研究において、生理的、病態生理的条件下におけるイオンチャネルの活性化機構を知る上で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 TRP(Transient Receptor Potential)M7 における酸性刺激における活性化機構とその透過機構[Numata, T. & Okada, Y. 2008 J Biol Chem., Numata, T. & Okada, Y. 2008 Channels], TRPC3 と TRPP2 の多量体化による活性増強機構[Miyagi, K. et al. 2009 J Biol Chem.], 定常状態で活性化している TRPM1 の G タンパクによる活性制御機構[Koike, C et al. 2010 Proc Natl Acad Sci U S A.], 酸素による TRPA1 の活性化機構[Takahashi, N. et al. 2011 Nat Chem Biol.] や電位依存性 Ca²⁺ チャネルの RIM(Rab3-interacting molecule) との相互作用による活性増強機構[Yasuda, T. et al. 2010 Cell Metabolism.] など様々なイオンチャネルの活性化機構に関する報告をしてきた。今回、細胞死、てんかんに関与する可能性を見出したイオンチャネルの分子の候補は、TRPM2 である。TRPM2 は、1989 年ショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子として発見された *trp* 遺伝子群の 1 つであり [Montell, C. et al.(1989) Neuron], *trp* をコードするタンパク質(TRP)は、カチオンチャネルを形成している。現在ではこの TRP チャネルスーパーファミリーは、哺乳類においては少なくとも 29 種類の遺伝子から構成され、6 つのサブファミリーを構成している [Clapham, D.E. 2003 Nature, Moran, M.M. et al. 2004 Curr. Opin. in Neurobiol.]. TRP チャネルの生理的役割として、周囲環境を感知する機能が浮かび上がってきている [Clapham, D.E. 2003 Nature]. TRPM2 は脳、膵臓や血球などに発現しており主に酸化ストレスによって活性化され [Perraud, A.L. et al. 2003 Cell Calcium], 虚血再灌流障害などの神経変性における活性酸素種による神経などの細胞死 [Kaneko, S. et al. 2006 J Pharmacol Sci., Hara, Y et al. 2002 Mol Cell.] に関わっている。申請者は、高浸透圧条件下における細胞容積調節の破綻が導くアポトーシス死に関わるイオンチャネルに着目して研究を展開している [Numata, T et al. 2007 Apoptosis.] 過程で、高浸透圧刺激で活性化する陽イオンチャネル(HICC: Hypertonicity Induced Cation Channel)の分子実体を探索してきた結果、イオンチャネルの電流電圧特性、薬理学的な特徴と siRNA を用いた実験のデータから TRPM2 チャネルが、その分子実体である可能性が高いことを突き止めている。現在のところ、TRPM2 の活性化機構や細胞死に関わる報告は、活性酸素種による研究が主に行われているが、高浸透圧刺激による活性化機構に関わる報告は全くない。

2. 研究の目的

TRPM2 の活性化機構や細胞死に関わる報告は、活性酸素種による研究が主に行われているが、高浸透圧刺激による活性化機構に関わる報告は全くない。そこで細胞に高浸透圧刺激を与えた際に活性化する TRPM2 の分子同定、活性化シグナルおよびその分子機構の解明と細胞死への関与の解析を行った。一方、TRPM2 と相互作用することを見出した若年性てんかんの原因遺伝子である EFHC1 による TRPM2 の活性制御およびその制御によって引き起こされる細胞死に関して解析を進めた。

そこで、以下の二点について研究を遂行した。

1. 細胞に高浸透圧刺激を与えた際に活性化するイオンチャネルの分子同定、活性化シグナルおよびその分子機構の解明と細胞死への関与の解析を行う。
2. EFHC1 による TRPM2 の活性制御およびその制御によって引き起こされる細胞死に関して解析。

これらの課題を遂行することで、TRPM2 の新規活性化機構とてんかんの原因解明を目指す。

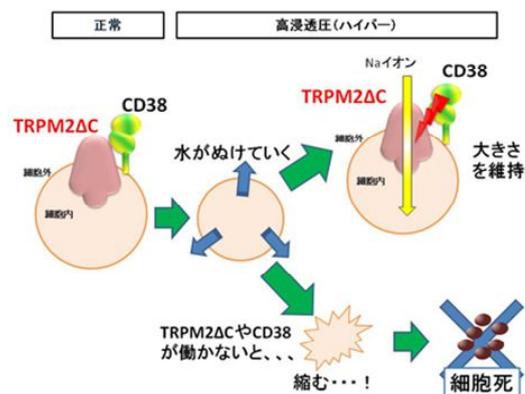
3. 研究の方法

TRPM2 の物性は、生化学的手法を用いた。具体的にはクローニング、免疫染色による局在確認、免疫沈降法による相互作用確認を行った。発現部位に関しては、*in situ* ハイブリダイゼーション、PCR、ウェスタンブロッティングを用いた。機能解析は強制発現系を用いて Ca イメージング、電気生理学で行った。また、生化学、機能解析において電流特性、阻害剤に対する感受性を調べることと siRNA を用いて詳細に検討をした。

4. 研究成果

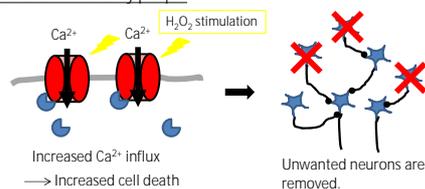
TRP(Transient Receptor Potential)ファミリーは、1 つのサブユニットが 6 回膜貫通型でこれが 4 量体を形成することによりイオンチャネルを形成する非選択的カチオンチャネルである。中でも免疫に深く関わるのがよく知られている TRPM2 たんぱく質は、チャネルの C 末端に酵素活性ドメインを持っており、イオンチャネル活性と酵素活性の両方を持つユニークなイオンチャネルである。イオンチャネルの活性化機構の詳細はまだすべてが分かっているわけではないが、活性酸素刺激や細胞内 ADP リボース濃度変化によって活性化されることが知られている。本研究では、はじめに TRPM2 の活性を変化させるたんぱく質に着目して研究を展開した。その結果、TRPM2 に結合し、活性を調節する 2 種類のたんぱく質を発見した。一つは、活性化した

T 及び B 細胞、NK 細胞、単球、形質細胞及び胸腺髄質細胞に発現しており、細胞の分化と活性状態に関与していると考えられている CD38 を見つけた。CD38 は、高浸透圧刺激を与えた際に TRPM2 と協調して活性化することを siRNA の投与で CD38 および TRPM2 をノックダウンし、電気生理学的解析で活性を測定することで発見した。また、たんぱく質の相互作用は、ウェスタンブロットングおよび FLIM を用いて証明した。さらに、高浸透圧を細胞に与えた際に縮んだ細胞が自ら元の細胞容積へと復帰するメカニズム（調節性細胞増大）に関与することをまとめて、J Physiology (London) に論文発表をした。(下図)

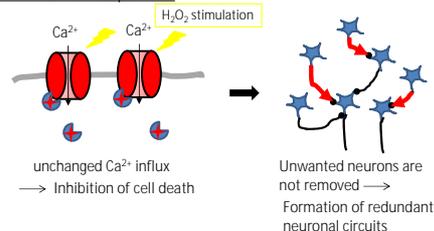


もう一つは、若年性ミオクロトーてんかんの原因遺伝子である EFHC1 が TRPM2 の活性調節を行うことを見つけた。EFHC1 と TRPM2 を共発現した HEK293 細胞の機能解析を Ca 測光および電気生理学的解析によって行った。その結果、EFHC1 を共発現すると TRPM2 の活性が増強することを発見した。また、お互いの物理的相互作用を行うことを免疫沈降法によって証明した。さらに、脳内における両方のタンパク質が共局在していることを in situ hybridization 法にて示した。これらのことにより、EFHC1 と TRPM2 が相互作用し活性を調節する理由は、脳の発達段階において神経細胞に細胞死をおこしやすくすることで余計な神経ネットワークが取り除き、てんかんを起こしにくくしていることが考えられ、逆に若年性ミオクロトーてんかんと同じ EFHC1 の変異の場合には、TRPM2 の活性の増強は見られず、細胞死が起きにくくなっていた。このことより、先ほどとは逆に脳の発達段階において、余計な神経ネットワークを構築することでてんかんになりやすくなる可能性があるという新たな説を Cell Calcium に発表を行った。(下図)

Development of brain in healthy people



Development of brain in JME patients



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 4 件)

1. Nakao A, Miki T, Shimono K, Oka H, Numata T, Kiyonaka S, Matsushita K, Ogura H, Niidome T, Noebels JL, Wakamori M, Imoto K, Mori Y Compromised maturation of GABAergic inhibition underlies abnormal network activity in the hippocampus of epileptic Ca²⁺ channel mutant mice, tottering. Pflugers Arch. 467:737-752 (2015) (査読: 有)
2. Kozai D, Kabasawa Y, Ebert M, Kiyonaka S, Man F, Otani Y, Numata T, Takahashi N, Mori Y, Ohwada T. Trans-nitrosylation Directs TRPA1 Selectivity in N-Nitrosamine Activators. Mol Pharmacol. 85:175-185 (2014) (査読: 有)
3. Sato-Numata K, Numata T, Okada Y Temperature sensitivity of acid-sensitive outwardly rectifying (ASOR) anion channels in cortical neurons is involved in hypothermic neuroprotection against acidotoxic necrosis. Channels (Austin). 8: 278-283. (2014) (査読: 有)
4. Qian X, Numata T, Zhang K, Li C, Hou J, Mori Y, Fang X Transient Receptor Potential Melastatin 2 Protects Mice against Polymicrobial Sepsis by Enhancing Bacterial Clearance. Anesthesiology 121, 336-351 (2014) (査読: 有)

[学会発表](計 6 件)

1. 沼田 朋大、銭 小偉、井上 隆司、方向 明、森 泰生、TRPM2 の細菌クリアランス促進による敗血症に対する保護効果、

日本生理学会、2015年3月21-23日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県神戸市）

2. 佐藤(沼田) かつお理、沼田 朋大、岡田 泰伸、酸感受性外向整流性アニオンチャンネル（ASOR）における温度感受性と新阻害剤の探究、日本生理学会、2015年3月21日、神戸国際会議場・展示場（兵庫県神戸市）
3. 沼田 朋大、神経細胞酸毒性死防御における酸感受性アニオンチャンネル制御、福岡薬理・生理系研究会、2014年12月9日、福岡大学（福岡県福岡市）
4. 沼田 朋大、清水 俊一、井上 隆司、森 泰生、虚血・再灌流傷害因子 TRPM2 の心臓における役割、日本循環薬理学会、2014年12月5日、山形テルサ（山形県山形市）
5. 沼田 朋大、XiaoWei Qian、Yasuo Mori、XiangMing Fang、TRPM2 の細菌クリアランス促進による敗血症に対する保護作用、2014年10月23日、琉球大学研究者交流施設 50周年記念館（沖縄県中頭郡）
6. 沼田 朋大、森 泰生、神経系の新規酸素受容体、日本神経科学学会、2014年、9月12日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/physiol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：