

研究種目：特定領域研究
研究期間：2006～2010
課題番号：18077008
研究課題名（和文） 容積センサーアニオンチャンネルとメカノセンサーカチオンチャンネルの動作変換と相互連関
研究課題名（英文） Molecular interaction and modal shift of volume-sensor anion channel and mechano-sensor cation channel
研究代表者
岡田 泰伸（OKADA YASUNOBU）
生理学研究所・所長
研究者番号：10025661

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：容積センサー、メカノセンサー、アニオンチャンネル、カチオンチャンネル、分子連関、モーダルシフト

1. 研究計画の概要

細胞の生存メカニズムのみならず細胞死の誘導メカニズムにも本質的な役割を果たす細胞容積調節機構には、メカノセンサーとしての細胞膜伸展感受性カチオンチャンネルと、容積センサーとしての容積感受性外向整流性アニオンチャンネル(VSOR)の働きが重要な役割を果たしている。VSORは、アクチンなどの細胞骨格系と相互関係を持ちながら容積増を検知していることが知られているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では、容積センサーでもあり、時にはROSセンサーとしても働くVSORと、メカノセンサーでもあり、同時にオスモセンサーでもあるカチオンチャンネルの多機能性とその動作変換の分子基盤、分子連関を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) 上皮細胞の膨張後の容積調節は、容積センサーCl⁻チャンネルVSORとCa²⁺依存性K⁺チャンネル(IK1)の活性化によるKCl流出によって達成される。IK1活性化のための細胞内Ca²⁺増は、細胞膨張初期の膜伸展を検知してCa²⁺流入させるメカノセンサーカチオンチャンネルの開口による。ヒト上皮細胞におけるこのメカノセンサーカチオンチャンネルはTRPM7であることを証明した。これによってメカノセンサーTRPM7は容積センサーVSORと機能協働しながらRVDを実現させていることを示した。
(2) TRPM7の一個カチオン透過性はCa²⁺やMg²⁺でブロックされるが、外液酸性下においてはその効果は減弱化する。TRPM7のボア領域の4個の負電荷アミノ酸(アスパラギン酸 Asp

とグルタミン酸 Glu)を1つ1つ中性アミノ酸アラニンに置換する点変異体でチャンネル電流を観察したところ、Asp-1054がプロトンセンサーとして働き、酸性下ではTRPM7はプロトンチャンネルへとモーダルシフトすることを示した。

(3) TRPM7の選択性フィルター部位に存在するAsp-1054とGlu-1052がCa²⁺とMg²⁺に対する結合サイトを与え、Asp-1054が二価カチオン伝導性を決定することを明らかにした。

(4) VSORは細胞体膨張を検知して活性化されるが、大脳皮質ニューロンはグルタミン酸被曝による過興奮下において、VSORは細胞辺縁部局所的膨張をも検知して活性化されることを示した。

(5) VSORの容積センサー機序に関与するシグナルの薬理的検討を行い、これまで示唆されてきたRas-Raf-MEK-ERK経路、PI3K-NADPH oxidase (NOX)-H₂O₂経路、Scr-PLCγ-Ca²⁺経路のいずれもが直接関与するものではないことを示した。

(6) プラジキニン刺激によってアストロサイトはROSを産成し、このときVSORは容積センサーからROSセンサーへとモーダルシフトして、グルタミン酸放出通路を与えることを証明した。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

(理由)

(1) まずメカノセンサーTRPM7については次のように多くの成果が得られている：

TRPM7は細胞膨張初期膜伸展を検知するメカノセンサーである(Am J Physiol 2007 論

文発表)。

TRPM7は細胞膨張初期に細胞内へCa²⁺流入をもたらす、VSORと機能協働して容積調節をもたらす (Am J Physiol 2007 論文発表)。

TRPM7のメカノセンサー機序には、このカチオンチャンネル開確率の膜伸展に対するS状依存性と、電位依存性消失によるオープンロックの2つが関与する (Cell Physiol Biochem 2007 論文発表)。

TRPM7のボア領域選択性フィルター部位の2つの負電荷アミノ酸 (Asp-1054, Glu-1052) がCa²⁺とMg²⁺の結合サイトを与え、Asp-1054が二価カチオン伝導性を決定する (Channels 2008 論文発表)。

TRPM7のAsp-1054は酸性条件下ではプロトンセンサーに変化して、TRPM7をプロトンチャンネルにモーダルシフトさせる (J Biol Chem 2008 論文発表)。

(2)容積センサー-VSORについては次のように重要な成果が得られている：

VSORは脳ニューロンにも発現しており、過興奮時において樹状突起上に形成される varicosity上でも局所容積増をセンスして活性化される (J Neurosci 2007 論文発表)。

VSORの容積センサーシグナルにチロシキナーゼによる磷酸化は関与するが、Ras-Raf-MEK-ERK、PI3K-NOX-H₂O₂、Scr-PLCγ-Ca²⁺のいずれの経路も直接関与しない (J Physiol 2009 論文発表)。

VSORはアストロサイトにも発現しており、炎症メディエータであるブラジキニンによる刺激に対しては、容積センサーからROSセンサーにモーダルシフトしてグルタミン酸放出の通路を与えてグリア-ニューロン間シグナル伝達に重要な役割を果たす (J Physiol 2009論文発表)。

VSORの容積センサー分子メカニズムには、ABCF2が関与し、それがVSORからはずれてACTN4と結合することによってVSORの活性化をもたらされる (国際生理学会2009発表予定)。

(3)更には、TRPM7-VSOR相互分子連関についても次のようにいくつかの成果が得られており、論文作成に向けて実験中である：

HeLa細胞におけるTRPM7の分子発現をsiRNAでノックダウンするとVSORの機能発現が著しく抑制され、逆にHEK293T細胞へTRPM7を大量発現させるとVSOR電流も増大する。従って、TRPM7の発現がVSORの発現に不可欠であると考えられる。

TRPM7と共沈してくる主要タンパク質の1つはABCF2である。従って、TRPM7はABCF2を介してVSORと相互作用する可能性がある。

4. 今後の研究の推進方策

(1)以下の点の解明を残された2年間でなされなければならない：

VSORの容積センサー分子メカニズムに

ABCF2-ACTN4相互作用が関係していることが明らかになったが、それには両タンパク質のどの領域が関与しているのかを解明。

VSORがROSセンサーとして働く際の分子メカニズムに果たすABCF2、ACTN4、アクチンなどの役割。

TRPM7はオスモセンサーとしても働くことが私達によって明らかにされているが、これがセンスするのは細胞外浸透圧なのか、細胞内浸透圧なのか、それともそれらの差なのかの解明。

TRPM7-VSOR相互連関の詳細な分子メカニズムの解明。

(2)容積センサーであるVSORの分子同定がなされるまでは、分子実体がTRPM7として同定されているメカノセンサー側からの解明が中心となるが、残り2年間でできることはすべて成し遂げたい。そしてVSOR分子同定の暁には、この容積センサー側からの解明へと歩を進めたい。

5. 代表的な研究成果

(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18件)

H.-T. Liu, T. Akita, T. Shimizu, R.Z. Sabirov & Y. Okada. Bradykinin-induced astrocyte-neuron signaling: glutamate release is mediated by ROS-activated volume-sensitive outwardly rectifying anion channels. J. Physiol. (London) 587, 2197-2209 (2009) 査読有

T. Numata & Y. Okada. Molecular determinants of sensitivity and conductivity of human TRPM7 to Mg²⁺ and Ca²⁺. Channels 2, 283-286 (2008) 査読有

T. Numata & Y. Okada. Proton conductivity through the human TRPM7 channel and its molecular determinants. J. Biol. Chem. 283, 15097-15103 (2008) 査読有

T. Numata, T. Shimizu & Y. Okada. TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol 292, C460-C467 (2007) 査読有

[学会発表](計25件)

[図書](計2件)

Y. Okada (2006) Cell volume-sensitive chloride channel: Phenotypic properties and molecular identity. In, "Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation" (ed. F. Lang), pp 9-24, Karger, Basel