

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08543

研究課題名(和文) CALHMチャネル極性ソーティングの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of basolateral CALHM channel sorting in epithelial cells

研究代表者

加塩 麻紀子 (Kashio, Makiko)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：20631394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CALHM1/3チャネルは甘味・うま味・苦味の受容を行う型味細胞から味神経への神経伝達に関わるATP透過性イオンチャネルである。本研究では、味細胞を含む上皮細胞において、CALHMチャネルが基底膜へと極性輸送される分子基盤を明らかにした。さらに、CALHM1/3チャネルが味神経とコンタクトする領域に限局的に集積するメカニズム解明を目的とし、CALHM1のC末端領域をBaitタンパクとしたYeast two-hybrid systemにより、機能未知のタンパクを同定した。両分子の相互作用が、ATP遊離を介した味神経伝達を効率的に行う機能モジュールの形成に重要な機能を持つ可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CALHM1/3チャネルは甘味・うま味・苦味の受容を行う味細胞が神経へと情報伝達を行うために機能するイオンチャネルである。味の受容によって活性化したCALHM1/3チャネルがATPを遊離することで伝達が可能となっている。本研究では、味細胞においてCALHM1/3チャネルが神経と接する領域に限局的に配置されるメカニズムの解明を試みた。結果として、CALHM1/3分子内に細胞内での輸送を規定するシグナルが存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CALHM1/3 channel serves as a ATP-permeable ion channel which is necessary for neurotransmission from type 2 taste cells to taste nerve endings. CALHM1/3 channels selectively localize in basolateral membrane in epithelial cells including taste cells. This study has revealed the molecular mechanism enabling polarized transport of CALHM channels in epithelial cells which is embedding in the internal loop and C-terminal regions of CALHM1 and CALHM3. In addition, yeast two-hybrid study has identify a functionally unknown protein interacting with CALHM1 protein. These results suggest that CALHM1/3 channels are selectively localized to vicinity of taste nerve endings by multiple mechanisms.

研究分野：生理学

キーワード：味細胞 ATP イオンチャネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Calcium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1) は遅発性アルツハイマー病発症関連遺伝子の1つとして近年発見された電位依存性イオンチャネルである (*Cell* **133:1149,2008**; *PNAS* **109:E1963,2012**)。CALHM1 は大きなポア (直径 14.2Å) をもつためイオン選択性が低く、Ca²⁺ および ATP 透過性を有する。CALHM1 は高度な極性 (構造的かつ機能的非対称性) を有する細胞で重要な機能を担うことが明らかとなってきた。

味蕾において、CALHM1 は甘味・苦味・うま味受容を担う型味細胞に選択的に発現し、ATP を神経伝達物質とするプリン作動性味覚神経伝達を担う (*Nature* **495:223, 2013**)。神経上皮細胞ともいわれる味細胞の細胞膜は、密着結合を介して頂端膜と基底膜に分かれ、両膜領域間で膜タンパクの拡散が制限されている。そのため、各膜領域にはその機能に必要な分子を選択的にソーティングする必要があり、口腔内に面する味細胞頂端膜には味物質の受容体分子、求心性神経とコンタクトする基底膜では味情報の処理・神経伝達に関わる分子が配置されていると考えられる。CALHM1 は、プリン作動性神経伝達を担うことから基底膜で機能すると予想されるが、味細胞において CALHM1 が頂端膜と基底膜のいずれの膜領域にソーティングされるのか、またそのメカニズムは不明であった。

上述の通り、極性を有する上皮細胞において、CALHM1 の選択的極性ソーティングは、生理機能およびその調節のために必須の機構といえる。さらには、CALHM1 のチャネル活性は Ca²⁺ の過流入、大きなポアを介した ATP・アミノ酸など細胞内分子の流出、さらには脱分極を惹起するため、異所性発現は細胞障害を引き起こす (予備実験結果および *J Neurosci* **33:12275, 2013**)。このように、CALHM1 の機能コンパートメントを限局化させることは、CALHM1 活性による細胞障害をコントロールするためにも必須である。

さらに最近、CALHM 遺伝子ファミリーに属する CALHM3 が、CALHM1 とヘテロメリックチャネルを形成することによりチャネルの細胞膜発現量を増加させ、CALHM1 電流の生物物理学的特性を大きく変化させる修飾サブユニットであること、CALHM1 と CALHM3 が味細胞に共発現しており、CALHM1/3 ヘテロメリックチャネルが味細胞のプリン作動性神経伝達機構の分子実体であることが明らかになった (*Neuron* **98:547-561, 2018**)。したがって、修飾サブユニット CALHM3 が CALHM1/3 チャネルの細胞内トラフィッキングに大きく影響すると考えられた。

2. 研究の目的

予備検討の結果 CALHM1/3 チャネルは MDCKII 細胞を用いた上皮細胞モデルにおいて基底膜への選択的極性輸送されることを見出していた (後述)。本研究では、CALHM1/3 チャネルの極性輸送機構の分子基盤を明らかにするとともに、型味細胞における局在を解析することにより、味細胞から味神経への効率的かつ正常なプリン作動性神経伝達機構を可能とする分子機構を明らかにすることを目的とし、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) プラスミドベクター

膜ソーティングの解析に用いたキメラタンパクは In Fusion クローニングを用いて以下の通り作製した。それぞれ C 末端および N 末端を細胞内領域に持つヒト CD4 およびヒト Invariant chain (Ii) 分子に 3xFLAG タグ付加したものをコントロールとして用いた。CD4 および Ii の細胞膜~細胞外ドメインに CALHM1 および CALHM3 の細胞内領域を融合させることで極性輸送の評価に用いるとともに (図 2A)、さらに同様のキメラタンパク中の基底膜ソーティングシグナル配列にアラニン置換を導入し、各領域のシグナル配列の同定に用いた。

(2) Madin-Darby canine kidney (MDCKII) 細胞

Madin-Darby canine kidney (MDCKII) 細胞は、10% FBS、1x Antibiotic-Antimycotic (Gibco) 含有 DMEM 中、5% CO₂、37°C にて培養した。膜輸送を検討するための免疫染色および特異的表面ピオチン化法は、Transwell filter insert (Coaster) 上に十分培養の上で単相培養し、極性形成した後に実験に用いた。

極性形成単相培養 MDCKII 細胞への一過性遺伝子発現は、極性形成後の MDCKII 細胞を、低濃度カルシウム (5 μM) 含有 DMEM 中でさらに 2 日間培養したのち、1 mM MgCl₂ 含有 PBS(-) で 15 分インキュベート後に Lipofectamine 3000 を用いて目的遺伝子を導入することで行った。

定常発現 MDCKII 細胞の樹立には、Lipofectamine 3000 を用いて目的遺伝子を導入後、限界希釈後に G418 処置することでセレクションを行い、目的遺伝子を定常発現するクローン細胞を得た。

(3) 免疫細胞染色

Transwell filter insert (Coaster) 上の極性形成単相培養 MDCKII 細胞をシクロヘキシミド処置後 (100 μg/mL, 2h)、頂端膜あるいは基底膜側の一方をピオチン処理した。グリシン処置によりピオチン化を停止させ、PFA 処置により固定後、免疫細胞染色に供した。

(4) SDS-PAGE

免疫細胞染色と同様に、頂端膜あるいは基底膜特異的表面ピオチン化を行った後、Transwell filter insert 上の細胞を可溶化し、アビジンアガロースを用いてピオチン化タンパクのプルダウン

ンを行った。プルダウンサンプルおよびインプットサンプルを変性の後、**SDS-PAGE** 泳動し、ウェスタンブロットにより定量化した。

(5) マウス味細胞免疫組織染色

PFA 固定したマウス舌より作製した薄切標本を用い、免疫細胞染色に準じる方法にて免疫組織染色を行った。モルモット **CALHM1** 抗体は、**CALHM1** の **C** 末端領域をエピトープとして作製し、アフィニティーカラムを用いた精製を行うことで得た。

(6) **Yeast two-hybrid** 法を用いた **CALHM1** 相互作用分子の探索

CALHM1 の **C** 末端領域を **Bait** タンパクとした **Yeast two-hybrid** 法 (Matchmaker™ Gold **Yeast Two-Hybrid System**, **Clontech**) により相互作用タンパクを同定した。

4. 研究成果

(1) **CALHM1/3** チャンネル上皮基底膜ソーティングを決定する分子基盤

極性形成 **MDCKII** 細胞における **CALHM1** の局在を解析したところ、頂端膜にはほとんどシグナルが認められず、基底膜に特異的に輸送されることが明らかとなった (図 1 A, B)。一方で **CALHM** チャンネルと同様に **ATP** 透過チャンネルとして機能する **Pannexin1** は、頂端膜への特異的輸送が認められ (図 1 C)、**CALHM** チャンネルと **Pannexin1** は極性を有する味細胞において異なる機能を持つことが示唆された。

基底膜へ極性ソーティングされる分子は、細胞内ドメインに基底膜ソーティングシグナル配列を有し、特異的アダプター分子との結合を介して極性ソーティングを担う輸送小胞に振り分けられる (*J Cell Biol*, 204:7, 2014)。そこで **CALHM** チャンネルの基底膜への極性輸送を規定する分子基盤を明らかとするべく、膜貫通領域を1つのみ持つ **CD4** および **Ii** 分子と **CALHM** チャンネル細胞内領域のキメラタンパクを定常発現する **MDCKII** 細胞を樹立した。得られた **MDCKII** 細胞を単相培養し、頂端膜・基底膜選択的ピオチン化法により、それぞれの膜領域への輸送率を検討した。その結果、コントロールとして用いた **CD4** および **Ii** 分子は両膜領域へ均等に分布したものの、**CALHM1** および **CALHM3** の細胞内ループおよび **C** 末端領域を **CD4** に付加したキメラタンパクは、基底膜への輸送が有意に増加したことから (図 2 B, C)、**CALHM1** および **CALHM3** の細胞内ループおよび **C** 末端領域に内在性の基底膜輸送シグナルが存在することが示唆された。基底膜ソーティングシグナルに相同する配列を探索したところ、**CALHM1** と **CALHM3** 間に保存される配列が存在した。キメラタンパク中の基底膜ソーティングシグナル配列をアラニン置換した効果を解析したところ、いくつかの配列のアラニン置換により基底膜への極性輸送が消失することが確認された (データ未掲載)。しかしながら同様の点変異を全長の **CALHM1** および **CALHM3** に導入後、**MDCKII** 細胞に遺伝子導入したものの、**CALHM1/3** ヘテロメリックチャンネルの基底膜輸送は保持されたままであった (データ未掲載)。これらの結果から、**CALHM1/3** チャンネルでは本研究で同定された1次構造に存在する基底膜ソーティングシグナル配列のみならず、3次構造で形成されるソーティングシグナルによっても極性輸送が規定されていることが示唆された。

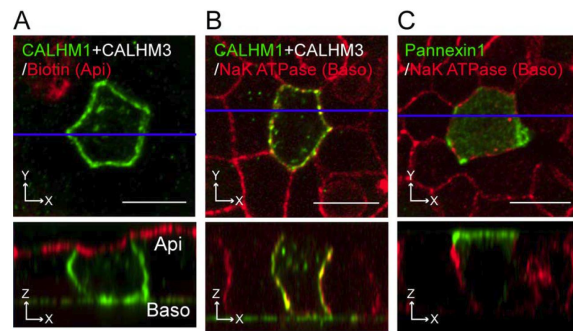


図1 (A, B) **CALHM1/3** 発現 **MDCKII** 細胞における **CALHM1** の基底膜ソーティング、頂端膜 (Api) ピオチン (A, 赤)、基底膜 (Baso) マーカー (B, 赤; NaK ATPase) と **CALHM1** (緑) の局在を示す (C) 比較として頂端膜ソーティングされる **Pannexin1** を示す (Scale bars, 5 μm)

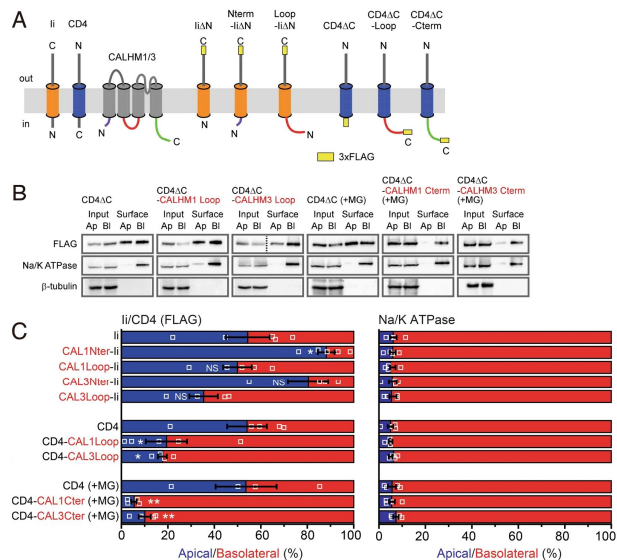


図2 (A) **CALHM1-liΔN**, **CD4ΔC-CALHM1** キメラの模式図、**Ii** および **CD4** 分子の細胞内領域を欠失させた **liΔN** および **CD4ΔC** に **CALHM1** の **N** 末 (Nter)、細胞内ループ (Loop) および **C** 末端 (Cter) を融合させた。(B) **CD4-CALHM1/3** キメラタンパクの **MDCKII** 細胞における頂端膜 (Ap)/基底膜 (Bi) ソーティング、**CALHM1** の細胞内ループおよび **C** 末端付加により **CD4ΔC** の頂端膜への輸送率が減少し、基底膜への輸送率が増加した。基底膜マーカー **NaK ATPase**、細胞質マーカー β -tubulin をコントロールとして示す。(C) **SDS-PAGE** 定量化データ、Mean \pm S.D. (N=4~5、白四角で各データを示す) ^{NS}p>0.05, *p<0.05 and **p<0.01 (vs. control, Bonferroni post-hoc test)。

(2) マウス 型味細胞内 CALHM1 局在

ATP 遊離チャネルとしての機能から、CALHM1/3 は 型味細胞においても基底膜に存在すると予想された。実際の味細胞における局在解析を目的とし、CALHM1 の C 末端をエピトープとした抗体を作製した。マウス味蕾を用いた免疫組織染色の結果、CALHM1 は 型味細胞マーカーである PLCβ2 および TRPM5 陽性味細胞に発現しており、さらに ATP を神経伝達物質として受容する P2X2 受容体陽性

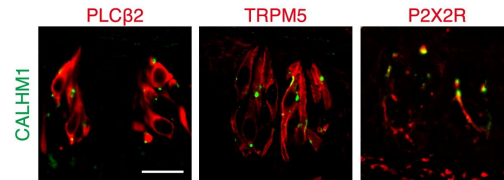


図3 味細胞における CALHM1 局在
マウス味蕾における 型味細胞マーカー (PLCβ2, TRPM5; 赤) および ATP 受容体 (P2X2; 赤) と CALHM1 (緑) の局在を示す

味神経と接する部分に限局的に位置することが確認された (図3)。したがって、マウス 型味細胞においては CALHM1 が基底膜に輸送されるのみならず、味神経とコンタクトする部位に選択的にソートされるメカニズムが存在することが示唆された。

(3) CALHM1 の C 末端領域と相互作用を有する分子の探索

上記の通り、味細胞においては何らかの機構により神経とコンタクトする部位に CALHM1 を限局させる機構が存在すると考えられたため、CALHM1 の C 末端領域を Bait タンパクとした Yeast two-hybrid system により、CALHM1 との相互作用を有するタンパクの探索を行った。その結果、機能未知のタンパクを同定した。免疫沈降実験によっても両蛋白の共免疫沈降が再現され、両分子間に物理的相互作用が存在することが確認された。味神経がコンタクトする味細胞領域には、ATP の供給源と考えられるミトコンドリアも集積していることが報告されており、ATP 遊離を介した味神経伝達を効率的かつ細胞毒性を最小に担保するための機能モジュールを形成していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kashio M, Wei-Qi G, Ohsaki Y, Kido MA, Taruno A	4. 巻 9
2. 論文標題 CALHM1/CALHM3 channel is intrinsically sorted to the basolateral membrane of epithelial cells including taste cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39593-5	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 Ota W, Nakane Y, Kashio M, Suzuki Y, Nakamura K, Mori Y, Tominaga M, Yoshimura T	4. 巻 9
2. 論文標題 Involvement of TRPM2 and TRPM8 in temperature-dependent masking behavior	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3706
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40067-x	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 Taruno A and Kashio M	4. 巻 1950
2. 論文標題 AAV-Mediated Gene Delivery to Taste Cells of the Tongue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 299-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-9139-6_18	査読の有無 無
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 Wang X, Li T2, Kashio M, Xu Y, Tominaga M, Kadowaki T.	4. 巻 5
2. 論文標題 HsTRPA of the Red Imported Fire Ant, <i>Solenopsis invicta</i> , Functions as a Nocisensor and Uncovers the Evolutionary Plasticity of HsTRPA Channels.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 ENEURO.0327-17.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0327-17.2018	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 Kashio Makiko, Tominaga Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 The TRPM2 channel: A thermo-sensitive metabolic sensor	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Channels (Austin)	6. 最初と最後の頁 426 ~ 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19336950.2017.1344801	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kashio Makiko, Tominaga Makoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Subcellular localization of TRPM2 determines the fate of cancer cells, apoptosis or survival	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transl Cancer Res	6. 最初と最後の頁 S409 ~ S411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tcr.2017.03.09	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Makiko Kashio, Makoto Tominaga, Satoru Masubuchi
2. 発表標題 Functional coupling of metabolic sensors, TRPM2 and Sirtuin
3. 学会等名 FAOPS2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加塩麻紀子
2. 発表標題 感覚・免疫連関における体温センサーTRPM2の生理的意義
3. 学会等名 第2回感覚免疫研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makiko Kashio
2. 発表標題 Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2), a thermo-sensitive metabolic sensor
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makiko Kashio and Makoto Tominaga
2. 発表標題 Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2), a thermo-sensitive metabolic sensor, regulates insulin secretion from the pancreatic β -cells
3. 学会等名 2018 Keystone Symposia Conference (J4: Bioenergetics and Metabolic Disease) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makiko Kashio, Makoto Tominaga, Satoru Masubuchi
2. 発表標題 Functional Coupling of Metabolic Sensors, TRPM2 and Sirtuin.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Makiko Kashio and Makoto Tominaga	4. 発行年 2017年
2. 出版社 INTECHOPEN.COM	5. 総ページ数 203-223
3. 書名 Redox-Sensitive TRP Channels: TRPA1 and TRPM2	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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