

平成21年4月3日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790640
 研究課題名（和文） インスリン分泌細胞における TRPM2 チャンネル活性化機構の解明と創薬への応用
 研究課題名（英文） The study of the mechanism of TRPM2 activation in insulin-secreting cells
 研究代表者
 石井 正和（Ishii Masakazu）
 昭和大学・薬学部・講師
 研究者番号：30307061

研究成果の概要:糖尿病が起こる一因として活性酸素による膵臓のβ細胞障害が知られている。本研究では、活性酸素によるβ細胞死の機構に関与していることが最近明らかとなった TRPM2 チャンネルの活性化機構の解明に着手し、これまでに報告されている活性化機構とは異なる機構（TRPM2 チャンネルの細胞質のC末端領域に存在する Nudix モチーフの ADP リボシル化反応）が関与している可能性について明らかとすることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：糖尿病学、チャンネル

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は糖尿病をはじめとする種々疾患に関与し、大量の活性酸素は細胞機能を破壊する。活性酸素による膵β細胞障害機構には細胞内のカルシウム濃度の増加が関与していることが明らかとなっていたが、その分子実態は不明だった。我々の研究により、その細胞内のカルシウム濃度上昇に TRPM2 チャンネルが関与していることが明らかとなり、TRPM2 チャンネルと糖尿病の発症および進展との関連が注目されている。さらに最近、TRPM2 チャンネルがインスリン分泌にも関与していることが報告され、TRPM2 チャンネルの生理的

な役割にも注目が集まっている。活性酸素による膵β細胞障害やグルコース刺激によるインスリン分泌には、電位依存性カルシウムチャンネルが関与していることが知られていたが、TRPM2 チャンネル活性化と電位依存性カルシウムチャンネル活性化との関連についての報告は見当たらない。

また TRPM2 チャンネルは、活性酸素やグルコースだけでなく細胞内の ADP リボース、サイクリック ADP リボース、NAD などでも活性化されるが、活性酸素やグルコースによる TRPM2 チャンネル活性化には細胞内で産生される ADP リボース、サイクリック ADP リボース、NAD が関与していると考え

られているものの、その活性化機構には不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では (1) 膵β細胞に存在する TRPM2 活性化と電位依存性カルシウムチャネルとの関連について明らかにする。さらに、TRPM2 活性化機構について、(2) TRPM2 チャンネルが Nudix モチーフの ADP リボシル化により活性化されるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養および遺伝子導入法

細胞はラット由来膵β細胞株 RIN-5F 細胞を使用する。遺伝子導入は、HEK293 細胞にリポフェクション法を用いて、各発現ベクターとともに膜タンパクである CD8 を共発現させ、CD8 に選択的に付着するマイクロビーズを用いて発現細胞をセクションした。

(2) 変異型 TRPM2 発現ベクターの構築およびその発現の確認方法

ヒト、マウス、ラットの Nudix モチーフには、2 つのアルギニン残基 (R1392 と R1400) が保存されている (Fig 1)。まず、Nudix モチーフのアルギニン残基をグルタミン残基へと変異させた TRPM2 の発現ベクターを構築する。次にこの発現ベクターを用いて HEK293 細胞に強制発現させ、TRPM2 の発現を、抗 Flag 抗体を用いてウエスタンブロッティング法にて確認する。

	▼	▼
Human	G	S
Mouse	G	S
Rat	G	S

Human	G S	R	E	P	G	E	M	L	P	R	K	I	K	R	I	L	R	Q	E	H	W	P
Mouse	GS	R	E	P	G	E	M	L	P	R	K	I	K	R	V	L	R	Q	E	F	W	V
Rat	GS	R	E	P	G	K	M	L	P	R	K	I	K	Q	V	L	Q	E	Y	W		

Fig 1. Nudix モチーフのアルギニン残基

(3) 細胞内カルシウム濃度測定

カルシウム蛍光指示薬である Fura-2 を用いて、過酸化水素刺激による細胞内へのカルシウム流入を測定する。

(4) 細胞死の測定

細胞障害はトリパングルー排除試験により評価した。

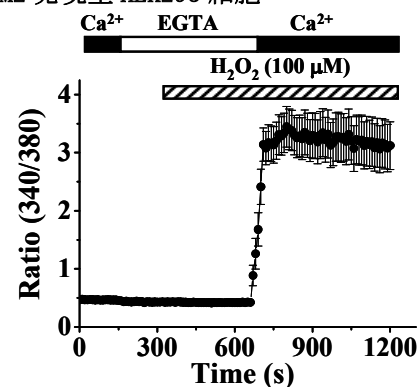
4. 研究成果

(1) TRPM2 チャンネル活性化と電位依存性カルシウムチャネルとの関連

電位依存性カルシウムチャネルを有し

ていない HEK293 細胞に TRPM2 チャンネルに TRPM2 を一過性に発現させた細胞を用いて過酸化水素刺激すると、一相性でかつ持続性のカルシウム応答が観察できた (Fig 2)。一方、native に TRPM2 チャンネルを発現し、電位依存性 L 型カルシウムチャネルも有している RIN-5F 細胞では、2 相性で持続性のカルシウム応答を示した (Fig 2)。この 2 相性のカルシウム応答は、細胞外からのカルシウム流入に依存していた。なお、RIN-5F 細胞では、グルコース刺激やアルギニン刺激によりカルシウム応答がほとんど認められなかったため、グルコース刺激による検討は断念した。

TRPM2 発現型 HEK293 細胞



RIN-5F 細胞

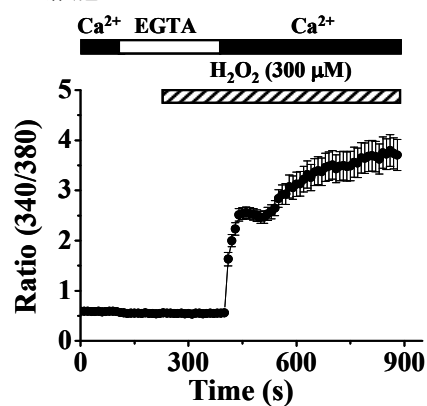
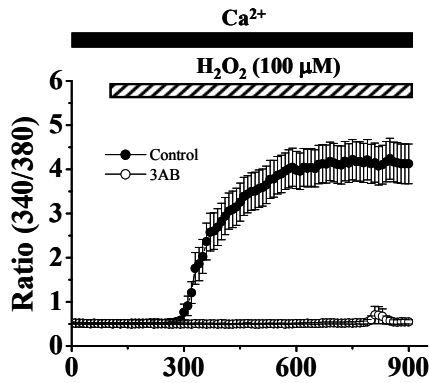


Fig 2. 過酸化水素刺激によるカルシウム応答

TRPM2 を強制発現させた HEK293 細胞および RIN-5F 細胞での過酸化水素刺激によるカルシウム応答は、TRPM2 チャンネル活性を抑制することが知られている 3-アミノベンザミドにより強力に抑制された (Fig 3)。一方、RIN-5F 細胞での過酸化水素によるカルシウム応答は、電位依存性 L 型カルシウムチャネル阻害剤であるニフェジピンやベラパミルにより部分的に抑制されたが、TRPM2 発現型 HEK293 細胞ではニフェジピン

やベラパミルによる抑制は認められなかった (Fig 4)。なお、RIN-5F 細胞を KCl (60 mM) 刺激した際に認められる電位依存性カルシウムチャネルを介したカルシウム応答はベラパミルやニフェジピンなどの電位依存性L型カルシウムチャネル阻害剤では抑制されたが、3-アミノベンザミドでは抑制されなかった。さらに、過酸化水素による RIN-5F 細胞死は、3-アミノベンザミドにより強く抑制されたが、L 型カルシウムチャネル阻害剤による抑制効果は小さかった (Fig 5)。また、3-アミノベンザミドによる細胞障害抑制効果はベラパミルやニフェジピンの併用により増強はされなかった。したがって、TRPM2 の細胞障害への寄与度が大きいことが明らかとなった。

TRPM2 発現型 HEK293 細胞



RIN-5F 細胞

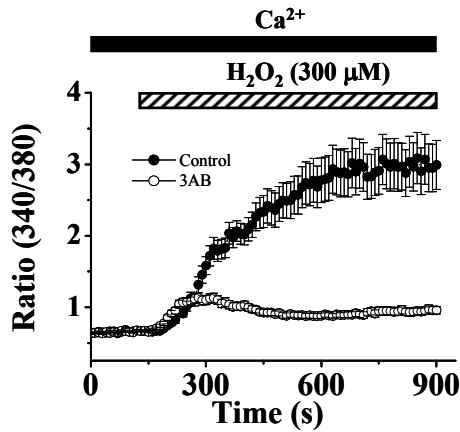
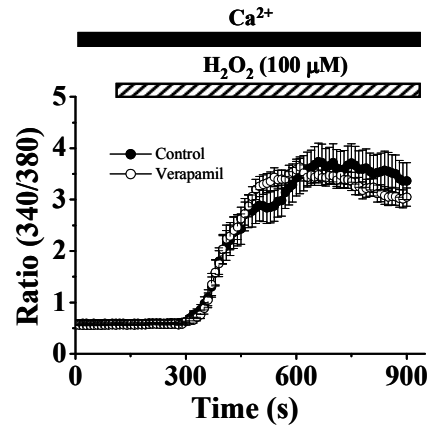


Fig 3. 過酸化水素刺激によるカルシウム応答への3-アミノベンザミド (3-AB) の影響

以上の結果より、過酸化水素刺激による RIN-5F でのカルシウム応答には TRPM2 チャネルと電位依存性カルシウムチャネルが関与し、TRPM2 を介した持続性のカルシウム流入が RIN-5F 細胞死に大きく寄与していることが明らかとなった。

TRPM2 発現型 HEK293 細胞



RIN-5F 細胞

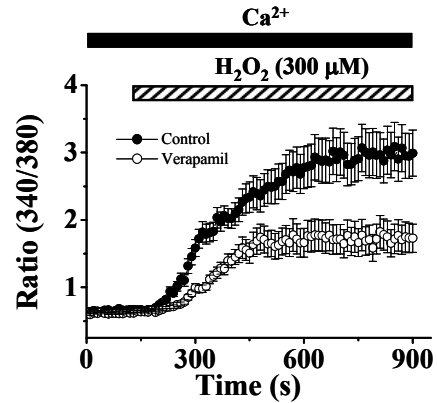


Fig 4. 過酸化水素刺激によるカルシウム応答へのニフェジピンの影響

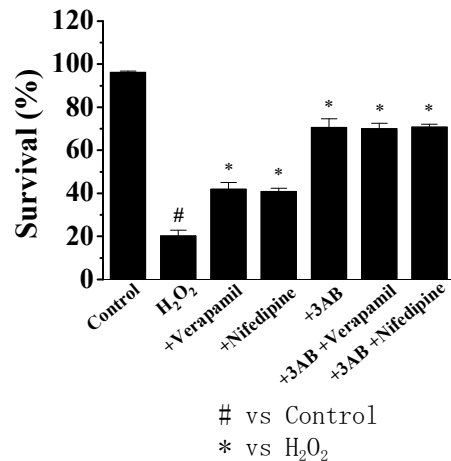


Fig 5. 過酸化水素刺激による RIN-5F 細胞障害への各種阻害剤の影響

(2) TRPM2 チャンネル活性化へのモノ ADP リボシル化の影響

Nudix モチーフにあるアルギニン残基をグルタミン残基に変異させた変異型 TRPM2 発現ベクター (R1392Q と R1400Q) を構築し、それを HEK293 細胞に一過性に発現させた。抗 Flag 抗体にて免疫沈降後、抗 Flag 抗体にて TRPM2 発現を確認したところ、その発現が確認できた (Fig 6)。さらにそれら細胞を用いて、過酸化水素 (250 μ M) 刺激による細胞内のカルシウムイオン濃度変化を測定したところ、R1392Q では wild タイプと同様に、TRPM2 を介した細胞内へのカルシウム流入が認められたが、R1400Q ではその活性は認められなかった (Fig 7)。また、wild タイプの TRPM2 を発現させた HEK293 細胞および TRPM2 を native に発現している RIN-5F 細胞での、過酸化水素刺激による細胞外からのカルシウム流入は、モノ ADP リボシルトランスフェラーゼ阻害剤である MIBG (500 μ M)、3-アミノベンザミド (300 μ M)、ノボピオシン (300 μ M) により濃度依存的に抑制された。したがって、過酸化水素による TRPM2 活性化には、Nudixモチーフに存在する 1400 番目のアルギニン残基のモノ ADP リボシル化が関与している可能性が示唆された。

ヒト臍 β 細胞にも TRPM2 チャンネルが存在していることはすでに報告されている。したがって、活性酸素を産生するような薬物・毒物により引き起こされる糖尿病の原因のひとつとして、Nudixモチーフのアルギニン残基の ADP リボシル化により TRPM2 が活性化される機構も関与していることが推察され、TRPM2 チャンネルが糖尿病治療薬の標的分子となり得る可能性が示唆された。

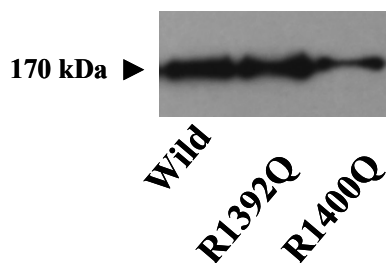


Fig 6. HEK293 細胞への変異型 TRPM2 導入

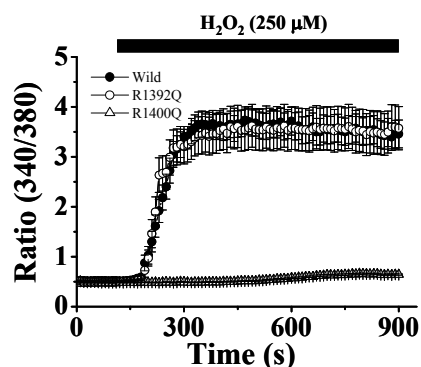


Fig 7. 変異型 TRPM2 における過酸化水素刺激によるカルシウム応答

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 正和 (Ishii Masakazu)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：30307061