

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22681033

研究課題名（和文）化合物ライブラリーを用いたレドックス感受性イオンチャネルの機能解明に関する研究

研究課題名（英文）Functional characterization of redox-sensitive ion channels using chemical library

研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA SHIGEKI)

京都大学・地球環境学堂・准教授

研究者番号：90422980

研究成果の概要（和文）：動物は常に様々な酸化ストレスにさらされており、それを厳密に感知することが生命維持に必須である。近年、TRP チャネルが感覚受容に必須であることが知られつつある。本研究では、固有の酸化還元電位を持つレドックスケミカルライブラリーを構築し、化合物の特性から各種 TRP チャネルの酸化・還元に対する機能を網羅的に解析した。その結果、TRPA1 チャネルが酸化および還元に対して極めて高感受的であることを同定した。また、マウス個体内においては、TRPA1 チャネルが体内の酸素濃度を感知することを見いだした。

研究成果の概要（英文）： In mammals, it is essential for our life to sense intracellular redox status. Recently, a class of TRP channels has been demonstrated to act as cell sensors for various environmental changes. In this research, we constructed chemical library having various redox properties to precisely characterize the redox sensitivity of TRP channels. Our characterization identified that TRPA1 is a highly sensitive channel for oxidation and reduction. Importantly, TRPA1 channel is activated by molecular oxygen, and critically contributes to oxygen-sensing mechanisms in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2011 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：TRP チャネル、レドックス、カルシウムチャネル、ケミカルライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

動物は、環境の変化や外敵をすばやく感知して適応する。これは生命を維持する上で必要な現象であり、そのメカニズムの解明に多くの研究者の興味が集まっていた。近年、TRP チャネルと呼ばれるタンパク質群が分子同定され、感覚受容に必須であることが認められつつある。TRP チャネル群は約 30 種類知

られており、温度、pH、浸透圧など様々な物理化学的な変化を感知することが知られる（図 1）。温度に関して言えば、TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 が高温を感知して活性化され、それぞれのチャネルタンパク質が固有の活性化温度を有する。一方、TRPM8, TRPA1 は低温で活性化される (T. Voets *et al*, *Nat. Chem. Biol.*, 2005)。すなわち、動物は、

感知温度が異なる複数の TRP チャンネルを用いて厳密な温度感知を行っていると言える。

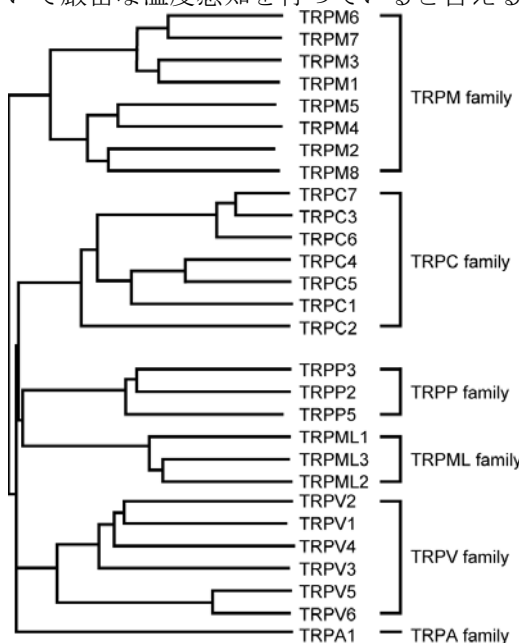


図 1. TRP チャンネルの進化系統樹

動物は常にさまざまな酸化ストレスにさらされており、それを厳密に感知することが生命維持に必須である。我々のグループは一酸化窒素 (NO) などの酸化剤によって、数種類の TRP チャンネル (TRPC5, TRPV1, TRPA1) が活性化されることを見出した (T. Yoshida *et al*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006; N. Takahashi *et al*, *Channels*, 2008)。また、他のグループは、TRPM7, TRPC5 が還元条件下で活性化されることを報告した (M. Aarts *et al*, *Cell*, 2003; S.Z. Xu *et al*, *Nature*, 2008)。以上の研究状況から、酸化・還元 (レドックス) に関しても、温度感知と同様に、それぞれの TRP チャンネルが固有の活性化領域を有し、生体内のレドックス状態を厳密に感知しているのではないかと着想し、研究を遂行した。

## 2. 研究の目的

本研究では、レドックス活性を有する化学物質の特徴を利用して、TRP チャンネルのレドックス感受性を網羅的かつ定量的に解明することを目的とした。我々は、TRPC5 が活性ジスルフィド化合物によって活性化されることを報告している。その際には、システインの酸化的修飾を介して TRPC5 は活性化される。その知見を基に、以下の方法で TRP チャンネルのレドックス感受性を解明することとした。

- レドックスケミカルライブラリーを構築し、各々の化合物の酸化還元電位を算出する。
- (A) で得てきたケミカルライブラリーを用いて、各 TRP チャンネルに対するレドッ

クス感受性を網羅的に評価する。

- 各 TRP チャンネルに対して、化合物の酸化還元電位とチャンネル活性をプロットし、TRP チャンネルの活性化電位を算出する。
- 新たな酸化感受性および還元感受性な TRP チャンネルを見いだした場合は、その生理機能解明を行う

## 3. 研究の方法

ジスルフィド型化合物 (5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid, DTNB) を基にした酸化型ケミカルライブラリー、ジチオール型化合物 (ジチオスレイトール, DTT) を基にした還元型ケミカルライブラリーを構築し、直線走査ボルタンメトリーを用いて酸化還元電位を算出した。

TRP チャンネルに対するケミカルライブラリーの効果は、HEK293 細胞に各 TRP チャンネルを過剰発現させた後に、蛍光性  $Ca^{2+}$  指示薬である Fura-2 を用いた蛍光  $Ca^{2+}$  イメージング法により評価した。この方法を用いると、TRP チャンネルの活性と化合物の特性を網羅的に評価できる。その結果に基づき、それぞれの TRP チャンネルが有する酸化還元電位を算出した。

上記の方法で同定した酸化および還元で活性化する TRP チャンネルの生理的意義の解明を行った。特に、TRPA1 は非常に酸化を受けやすいことが判明したので、TRPA1 欠損マウスを用いてその生理的意義を解明した。還元側についても、還元で活性化される TRP チャンネルの分子同定と生理的意義の解明を行った。

## 4. 研究成果

DTNB が有するジスルフィド結合周囲の置換基構造を変えて、酸化能が異なるレドックス

Reactive disulfide	Structure	Redox potential ( $E_{1/2}$ value)
5-nitro-2-pyridyl disulfide (5-nitro-2-PDS)		-1,064 mV
4-nitrophenyl disulfide		-1,088 mV
3-nitrophenyl disulfide		-1,316 mV
4-chlorophenyl disulfide		-1,754 mV
4-tolyl disulfide		-1,966 mV
phenyl disulfide		-1,990 mV
2-pyridyl disulfide		-2,071 mV
4-methoxyphenyl disulfide		-2,085 mV
4-aminophenyl disulfide		-2,252 mV
diallyl disulfide		-2,950 mV
dipropyl disulfide		-3,050 mV

図 2. 酸化側のケミカルライブラリーとその参加還元電位

スライブラリーを構築した (図 2)。また、DTT などのチオール種に基づく還元側のライブラリーも構築した。得られたケミカルライブラリーの酸化還元電位は直線走査ボルタンメトリーを用いて評価し、ケミカルライブラリーの電子密度に応じた酸化還元能を示すことを確認した。

次にこれらの酸化型ケミカルライブラリーを用いて、酸化に対する各 TRP チャンルの応答を検討した。各 TRP チャンルを一過的に発現させた HEK293 細胞を用いて蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法により評価した結果、酸化型ケミカルライブラリーが複数の TRP チャンルを活性化することを見いだした。中でも、TRPA1 チャンルは弱い酸化剤に対しても応答することを見いだした。このことは、TRPA1 チャンルが酸化に対する強い感受性を持っていること意味する。酸化感受性を示した各種 TRP チャンルの酸化還元電位を算出した結果、TRPA1 チャンルの酸化還元電位は酸素よりも低電位側であることを見いだした (図 3)。

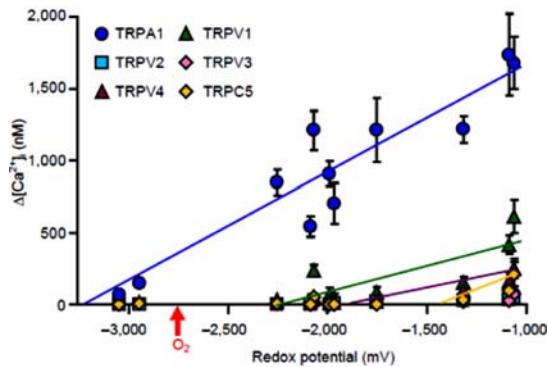


図 3. 酸化感受性 TRP チャンル群の酸化還元電位

次に、TRPA1 チャンルの酸素による活性化について評価した。酸素を一定時間バブリングした溶液を TRPA1 チャンルを発現する HEK293 細胞に投与したところ、TRPA1 チャンルの活性化を確認した (図 4)。一方、他の酸化感受性 TRP チャンルは酸素分子では全く活性されなかった。酸素による活性化においては、活性酸素種による二次的な効果が懸念される。そこで、活性酸素種阻害剤を用いて活性を評価したが、酸素による TRPA1 チャンルの活性化は阻害されなかった。すなわち、TRPA1 チャンルが酸素で直接活性化されることが示唆された。次に TRPA1 チャンルのどのアミノ酸残基が酸素感受性に寄与するのかを同定するために、TRPA1 チャンルのシステイン残基の変異体を作成した。その変異体を用いて酸素感受性を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法で評価したところ、TRPA1 チャンルのアミノ末端領域に存在するアンキリンリピート内の 633 番目および第 4 膜貫通領域後の細胞内領域に存在する 856 番目のシステイン残基が

酸素の感受性に重要であることがわかった。

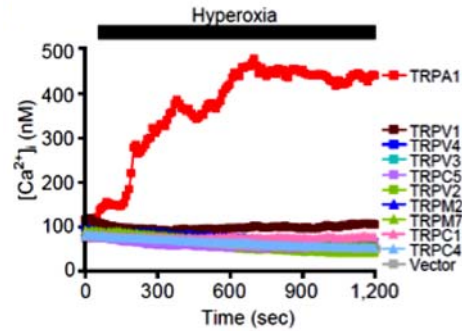


図 4. 各種 TRP チャンルの高酸素による活性化の評価

還元型ケミカルライブラリーを用いて、還元剤で活性化する TRP チャンルのスクリーニングを HEK293 を用いた過剰発現系で行った。その結果、弱い酸化剤で活性化された TRPA1 チャンルが、還元剤によっても活性化されることを見いだした。すなわち、TRPA1 は酸化側だけでなく、還元側でも活性化されることが示唆された。そこで窒素バブリングを行った低酸素溶液を用いて TRPA1 チャンルの活性化を評価した。すると、低酸素溶液と投与した場合にも TRPA1 チャンルは活性化された (図 5)。すなわち、TRPA1

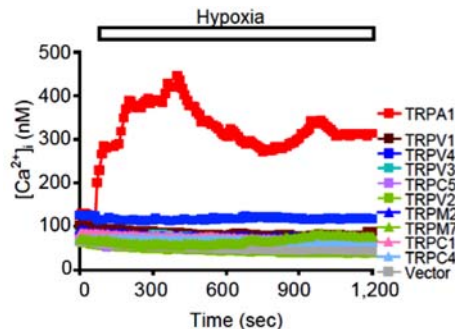


図 5. 各種 TRP チャンルの低酸素による活性化の評価

チャンネルは、高酸素濃度だけでなく、低酸素酸素濃度も感知することが示唆された。TRPA1 チャンルのアンキリンリピート内には、プロリン水酸化モチーフが存在する。実際、通常の酸素分圧下では酸素依存的なプロリン水酸化酵素 (PHDs) を介した 394 番目のプロリン残基の水酸化により TRPA1 チャンルの活性は抑えられていた。しかし、低酸素分圧下では PHD によるプロリン残基の水酸化が抑制されて TRPA1 チャンルが活性化された。以上が TRPA1 チャンルの低酸素感知の分子メカニズムだと考えられる。

TRPA1 チャンルの酸素感受性の生理的意義を解明するために、マウス個体における TRPA1 チャンルの発現分布を RT-PCR を用いて評価した。その結果、肺に投射する神経



である迷走神経に TRPA1 チャンネルが発現していることを確認した。迷走神経における TRPA1 チャンネルの発現は、ウェスタンブロットティングからも確認した。次に、迷走神経における TRPA1 チャンネルの機能について評価した。Ca<sup>2+</sup>イメージングで評価したところ、高酸素だけでなく低酸素でも Ca<sup>2+</sup>応答が見られた。一方、TRPA1 チャンネルを欠損させたマウスから単離した迷走神経では酸素に対する応答が見られなかった。電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いた評価からも同様の結果が得られた(図6)。すなわち、迷走神経においても酸素の違いにより TRPA1 チャンネルが活性化されていることが確認できた。

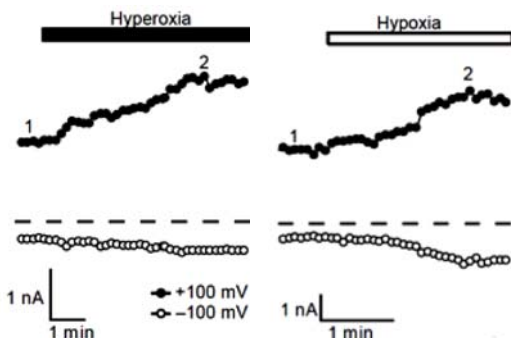


図6. 迷走神経における酸素濃度変化に対する TRPA1 チャンネルの活性化の評価

動物(マウス)個体における TRPA1 チャンネルの意義について評価した。迷走神経に発現している TRPA1 チャンネルが酸素濃度変化によってイオン電流を生じて神経活動を惹起することを確認した。この結果から、迷走神経に発現している TRPA1 チャンネルが酸素濃度を感知して呼吸を制御している可能性が示唆された。そこで、外部の酸素分圧を変えた際のマウスの呼吸回数の変化について評価した。野生型マウスと TRPA1 欠損マウスとで比較したところ、野生型マウスでは、高酸素下では呼吸回数が下がった。一方、低酸素下では呼吸回数が増加し、酸素濃度に依存した呼吸回数の変動が確認できた。しかし、TRPA1 欠損マウスでは、このような呼吸回数の変化が失われていた(図7)。すなわち、TRPA1 チャンネルが酸素濃度を感知する酸素センサーであることをマウス個体でも確認できたと言える。

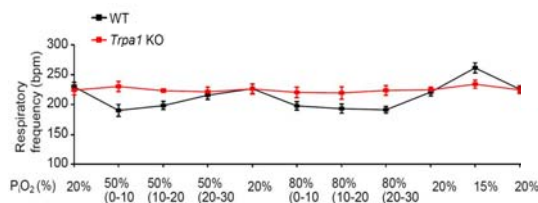


図7. マウス個体における酸素濃度変化に対する呼吸回数の変化

以上、本研究では、レドックスケミカルライブラリーを構築し、それを用いて酸化および還元感受性 TRP チャンネルの定量的な解析に成功した。また、その結果から TRPA1 チャンネルが酸素濃度変化を感知していることを見いだした。動物個体においては、TRPA1 チャンネルが酸素濃度変化を感知して動物の呼吸回数を厳密に制御していることを見いだした。

#### 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9件)

1. Shi J, Geshi N, Takahashi S, Kiyonaka S (他5人) Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II. *J. Physiol.* (in press). 査読有
2. Kiyonaka S (他8人) Physical and Functional Interaction of the Active Zone Protein CAST/ERC2 and the  $\beta$ -subunit of the Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> Channel. *J. Biochem.* **152**, 149-159 (2012). DOI: 10.1093/jb/mvs054 査読有
3. Tadmouri A, Kiyonaka S (他21人) Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.* **31**, 3730-3744 (2012). DOI: 10.1038/emboj.2012.226 査読有
4. Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S (他13人) TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 701-711 (2011). DOI: 10.1038/NCHEMBIO.640 査読有
5. Kim MS, Lee KP, Yang D, Shin DM, Abramowitz J, Kiyonaka S (他3人) Genetic and Pharmacologic Inhibition of the Ca<sup>2+</sup> Influx Channel TRPC3 Protects Secretory Epithelia From Ca<sup>2+</sup>-Dependent Toxicity. *Gastroenterology* **140**, 2107-2115 (2011). DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.052 査読有
6. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S (他7人) TRPC3-mediated Ca<sup>2+</sup> influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 108-113 (2011). DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.04.124 査読有
7. Numaga T, Nishida M, Kiyonaka S (他9人) Ca<sup>2+</sup> influx and protein scaffolding via TRPC3 sustain PKC $\beta$  and ERK activation in B cells. *J. Cell Sci.* **123**, 927-938 (2010). DOI: 10.1242/jcs.061051 査読有
8. Kinoshita H, Kuwahara K, Nishida M, Jiang Z, Rong X, Kiyonaka S (他12人) Inhibition

of TRPC6 Channel Activity Contributes to the Antihypertrophic Effects of Natriuretic Peptides-Guanylyl Cyclase-A Signaling in the Heart. *Circ. Res.* **106**, 1849-1860 (2010). DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208314 査読有

9. Uriu Y, Kiyonaka S (他 9 人) RIM  $\gamma$  isoforms lacking the Rab3-binding domain induce long-lasting currents but block neurotransmitter vesicle-anchoring in voltage-dependent P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.* **285**, 21750-21767 (2010). DOI: 10.1074/jbc.M110.101311 査読有

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 瓜生幸嗣、清中茂樹、浜地格、LDAI 化学の新展開：神経伝達物質受容体のケミカルラベル、日本化学会第 93 春季年会、2013.3.23、立命館大学 (滋賀県草津市)
2. Kiyonaka S, Mori Y. RIM family forms protein complexes with voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. 1st international meeting on ion channel signaling mechanisms. 2011.11.1, Marrakesh, Morocco.
3. 瓜生幸嗣、清中茂樹 (他 9 人)、Rab3 結合領域を持たない  $\gamma$ -RIM は P/Q 型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの電流を持続させ、小胞のアンカーリングを阻害する、第 83 回日本生化学会大会、2010.12.7、神戸国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清中 茂樹 (KIYONAKA SHIGEKI)  
京都大学・地球環境学堂・准教授  
研究者番号：90422980