

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 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790220

研究課題名（和文） 白色脂肪細胞における MIC/TRPM7 チャンネルの生理機能の解析

研究課題名（英文） Physiological functions of MIC/TRPM7 channels in white adipocytes

研究代表者

井上 華（INOUE HANA）

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390700

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスより単離した白色脂肪細胞において MIC/TRPM7 電流の機能的な発現、および TRPM7 の mRNA の発現を確認した。また、白色脂肪細胞において MIC/TRPM7 は過酸化水素による酸化ストレスによって抑制されることを見出した。また求電子剤である N-methylmaleimide (NMM) によっても抑制されることを見出した。これらの MIC 抑制効果を持つ薬剤は、白色脂肪細胞におけるインスリン依存性グルコース取り込みを阻害することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We revealed that white adipocytes isolated from mice as well as differentiated 3T3L1 adipocytes functionally expressed magnesium-inhibited cation (MIC) channel whose molecular identity is thought to be TRPM7. TRPM7 has been reported to be activated by oxidative stress, however, MIC current recorded in adipocytes were inhibited by oxidative stress induced by exposure to hydrogen peroxide and N-methylmaleimide. In the presence of these reagents as well as a conventional TRPM7 inhibitor, 2-aminopyridine, insulin-dependent glucose uptake was largely inhibited in 3T3L1 adipocytes. Thus, it is suggested that MIC/TRPM7 channel activity is required for the insulin-dependent glucose uptake in adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：イオンチャンネル、白色脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は先行する若手研究（B）（2008-2009 年度）において、それまで技術的に困難とされた白色脂肪細胞でのパッチクランプ実験を成功させた。その際、白色脂

肪細胞で機能的に発現が確認されたのは、容積感受性クロライドチャンネル、電位依存性カリウムチャンネル、および magnesium-inhibited non-selective cation (MIC) channel であった。白色脂肪細胞は、

種々のアディポカインを分泌する分泌細胞でもあるが、神経細胞や膵β細胞などの分泌細胞に見られる電位依存性カルシウムチャンネルを発現していなかった。カルシウムやマグネシウムなどの2価陽イオンは、分泌のトリガとなっているだけでなく、様々な細胞機能において重要であることは周知の事実であるが、白色脂肪細胞において、これらの2価イオンを透過させるチャンネルに関する研究は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では白色脂肪細胞に機能的発現を認める3つのイオンチャンネルのうち、カルシウムやマグネシウムに対して透過性をもつ MIC チャンネルに焦点を絞り、生理機能への関与について明らかにすることを目的とした。

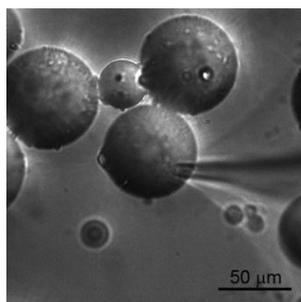
3. 研究の方法

白色脂肪細胞は、雄マウス精巣上体周囲脂肪組織よりコラゲナーゼを用いて分散し回収した。白色脂肪細胞は、細胞質に大きな油滴を持っているため、培養液中で浮遊する。パッチクランプを行うために、天井培養によってカバーガラスに白色脂肪細胞を張り付けた後、カバーガラスを反転させてパッチクランプ記録用チャンバーに置いた。ホールセルパッチクランプに用いるピペット内液（細胞内液）は、free Mg^{2+} 濃度を生理的濃度（ ~ 0.9 mM）よりも低い濃度にし、MIC 電流がブレイクインと同時に活性化されるようにした。さらに細胞外の2価陽イオンを除くことでMIC電流を活性化した。活性化されたMIC電流の薬剤（2-アミノピリジン、過酸化水素、NMM）に対する感受性や、細胞内外のマグネシウムイオンに対する感受性を検討した。

MIC/TRPM7 チャンネルの白色脂肪細胞での生理機能を明らかにするために、まず脂肪細胞のもっとも重要な機能の一つである、インスリン依存性グルコース取り込みについて検討を行った。グルコース取り込みは、トリチウムラベルした2-デオキシグルコースを用いて測定した。マウスから単離した白色脂肪細胞を用いてグルコースの取り込み測定を試みたが細胞の取り扱いが難しかったため、白色脂肪細胞の培養細胞株である3T3L1 adipocytesを用いて行うこととした。グルコース取り込みを検討する前に、3T3L1 adipocytesに単離した白色脂肪細胞と同様にMIC/TRPM7が機能的に発現しているかどうかを確認した。

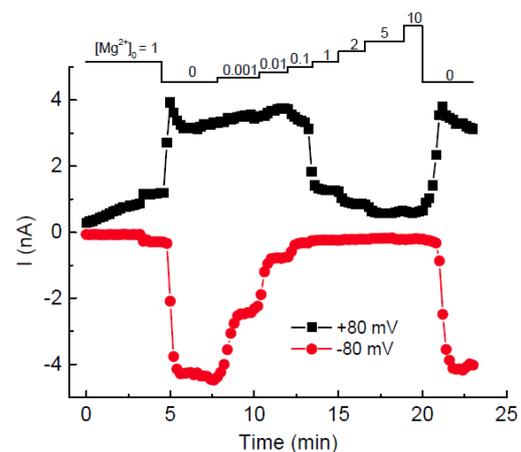
4. 研究成果

(1) 白色脂肪細胞におけるMIC電流は細胞内外のマグネシウムイオンによって抑制される。

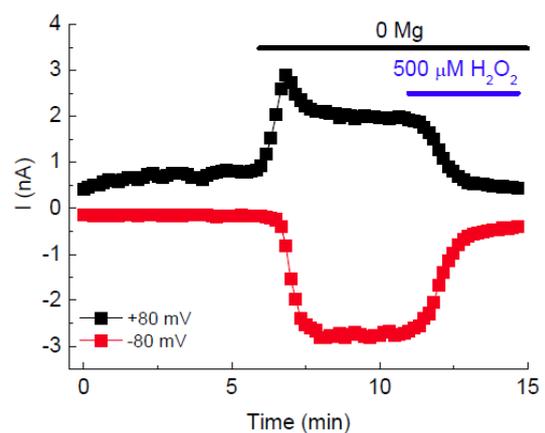


右図はパッチクランプ下の白色脂肪細胞である。低マグネシウム濃度のピペット内液を用いると、ブレイクイン直後から外向き整流性電流の活性化が観察される（下図）。細胞外2価陽イオンを除くとMIC電流は1価陽イオン電流として大きく活性化され、細胞外マグネシウムを増やすにしたがって電流の抑制が観察される。またピペット内の Mg^{2+} 濃度を高くすると、MIC電流は小さくなるという、TRPM7と同様な性質を示した。またこのMIC電流は、TRPM7を抑制するとされる2-アミノピリジンによって抑制されることを確認した。以上の観察から、脂肪細胞におけるMIC電流はTRPM7電流と考えられた。

(2) TRPM7は、神経細胞や異所発現系の細胞で活性酸素によって活性化されることが報告されている。そこで本研究では、活性酸



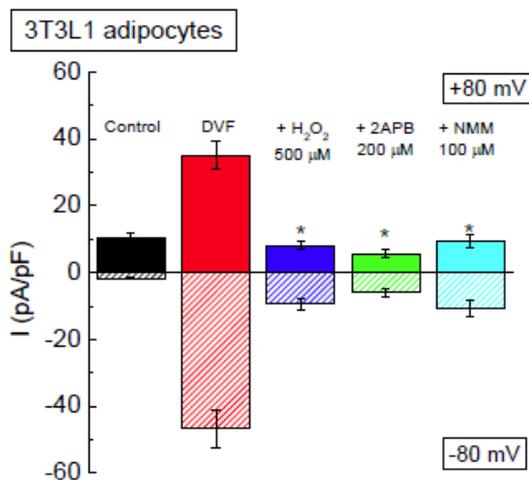
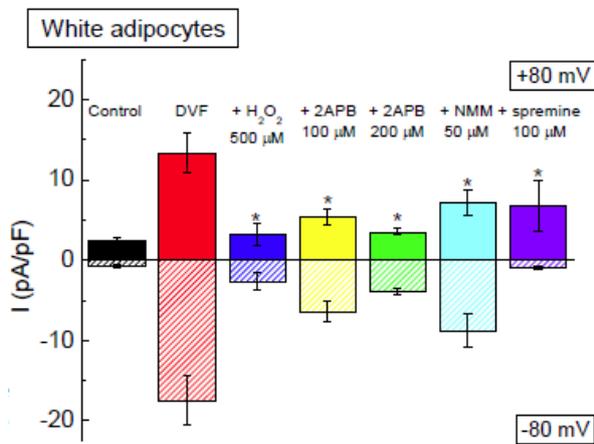
素によるMIC電流活性化を確認するために、パッチクランプ下の白色脂肪細胞に過酸化水素を投与した。すると、驚くべきことに、活性酸素はMIC電流を抑制することが明らかとなった（下図）。



過酸化水素は、タンパク質を酸化修飾する。そこで、システイン残基を酸化する求電子剤であるNMMを用いてMIC電流への効果を見たら、過酸化水素と同様に電流の抑制がみられた。これらの結果から、MIC/TRPM7は白色脂肪細胞では酸化ストレスによって活性

化ではなく、抑制されることが明らかとなった。そして MIC/TRPM7 チャンネルの酸化ストレスによる抑制は、細胞内 Mg^{2+} が重要であることを明らかにした。

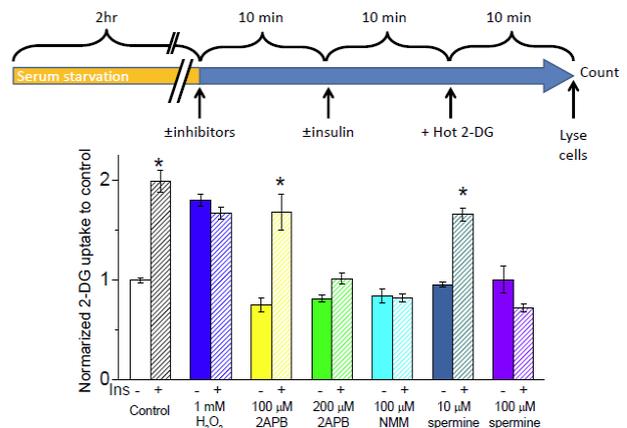
(3) 酸化ストレスは、白色脂肪細胞においてインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている。本研究によって MIC/TRPM7 が酸化ストレスによって抑制されることが明らかになったので、次に MIC/TRPM7 のインスリン依存性グルコース取り込みへの関与について検討することとした。マウスより急性単離した白色脂肪細胞では、グルコース取り込み測定が困難であったため、脂肪細胞の cell line である 3T3L1 細胞を脂肪細胞に分化させ実験に用いた。まず 3T3L1 adipocyte にも MIC/TRPM7 電流が機能的に発現していること、及び酸化ストレスによって抑制されることを確認し、単離脂肪細胞と同様であることを確認した (下図)。



グルコース取り込みにはアイソトープでラベルされた 2-デオキシグルコースを用いた。3T3L1 adipocyte をインスリンで刺激後、取り込まれた 2-デオキシグルコースをシンチ

レーションカウンターにて測定した。脂肪細胞において MIC/TRPM7 を抑制する過酸化水素、2-アミノピリジン及び NMM は、インスリン依存性のグルコース取り込みを抑制することが明らかとなった (下図)。

この結果は、MIC/TRPM7 のインスリン依存性グルコース取り込みへの関与を示唆するものであるが、どの薬剤も非特異的なため MIC/TRPM7 以外の分子への影響がインスリン抵抗性をもたらした可能性を除外できない。これを除外するために、遺伝子ノックダウンによる TRPM7 の抑制を行い、インスリン依存性を検討することが必須であり、今後の課題である。



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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Inoue H. "Inhibition of MIC/TRPM7 channel impairs insulin-dependent glucose uptake in adipocytes" 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 29 日 東京都
- ② Inoue H. "Hydrogen peroxide inhibits magnesium-inhibited cation channels in white adipocytes" 第 89 回日本生理学会大会 2012 年 3 月 29-31 日 松本市
- ③ Inoue H. "Magnesium-inhibited cation channel in white adipocytes" 第 88 回日本生理学会大会 2011 年 3 月 28-30 日 誌上開催

④ Inoue H. “Reduction of volume-sensitive chloride channel activity in white adipocytes from diabetic mice.” 11th International Congress on Obesity 2010年7月11日 Stockholm, Sweden

⑤ Inoue H. “Reduced expression level of volume-sensitive chloride channel in diabetic adipocytes.” 第87回日本生理学会大会 2010年5月19日 盛岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 華 (INOUE HANA)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20390700