

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590312

研究課題名(和文) カチオンチャンネルタンパク質の分解制御とその破綻による細胞異常

研究課題名(英文) Degradation of cation channel and the dysfunction

研究代表者

村木 克彦 (Muraki, Katsuhiko)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20254310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：TRP型カチオンチャンネルのタンパク分解、転写発現調節および機能変化について検討し、炎症性刺激でTRPA1型カチオンチャンネルが発現誘導されることを明らかにした。その発現には炎症性刺激の下流で一般的に働く転写因子でなく、低酸素刺激時に活性化される転写因子が関与すること、さらにはTRPA1型カチオンチャンネルのプロモーター領域にその特異的な結合配列が存在することを見出した。TRPA1型カチオンチャンネルは炎症時の痛み伝達に関与することが明らかになっており、炎症時の疼痛を軽減する治療薬の開発に寄与する重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we have found that TRPA1 channel, a subfamily of TRP cation channel, is substantially induced by inflammatory stimuli in channel-expression and channel-function levels; a transcription factor, which is activated in hypoxia, is involved in the induction and TRPA1 gene promoter has a specific binding site of the factor. Because TRPA1 channel is involved in nociception, the present finding may contribute to development of novel drugs for inflammatory nociception.

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：チャンネル タンパク発現制御 炎症

1. 研究開始当初の背景

生体機能の主要な決定因子のひとつであるタンパク質は、核内に格納された設計図である遺伝情報(DNA)が読み取られ(転写)、その情報を元にアミノ酸鎖が合成され(翻訳・タンパク合成)、化学修飾を受けながら発現部位に運ばれ(タンパク質輸送)、機能する。さらにタンパク質は、役割を終えた後、速やかに分解されるが、その一部はタンパク質輸送され、貯蔵後、再び機能部位に運搬され、機能発現する。このように多岐にわたる制御を受けるため、タンパク質の働きは極めて多くの因子・要因により変化する。イオンの輸送を担うタンパク質であるイオンチャネルもその例外ではない。しかしイオンチャネルタンパク質の分解機構の詳細やその異常にともなう疾患などについては、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

イオンチャネルタンパク質の分解については、その異常が Liddle 症候群として知られる腎臓のナトリウムチャネル(ENaC)の発現異常を引き起こすことが明らかになっているが、その他のイオンチャネル、とくに Ca 透過性カチオンチャネル(TRP チャネル)では、ほとんど不明である。そこで本研究では、TRP チャネルについて、その分解機構の詳細および疾患との関わりを明らかにする。とくに本研究では、TRPV2 および TRPV4 チャネルについて、その分解機構の詳細および疾患との関わりを明らかにする。また TRP 型カチオンチャネルのひとつである TRPA1 チャネルについてもその発現制御機構と炎症との関わりが解明できたので併せて報告する。

3. 研究の方法

3.1 細胞培養

ヒト滑膜細胞(SW982 を含む)は Cell Applications より、HEK293 細胞(ヒト胎児

腎細胞株)はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。滑膜細胞は、滑膜細胞増殖培地に 100 U/ml ペニシリン G、100 µg/ml ストレプトマイシン及び 10%非働化 FBS を加えて、5% CO₂存在下 37°C で培養した。293 細胞は DMEM に 100 U/ml ペニシリン G、100 µg/ml ストレプトマイシン及び 10% 非働化 FBS を加えて、5% CO₂存在下 37 °C で培養した。

3.2 RNA 抽出と逆転写酵素反応および PCR 法・定量的 PCR 法

AGPC 法により total RNA を抽出し(0.2 µg/µl に調製)、標準のプロトコール(Applied Biosystems 社)により逆転写反応を行った。

PCR 法による遺伝子の増幅には各ターゲット遺伝子特異的なプライマー(human)を用いた。

定量的 PCR 法は SYBR Green を用いたインターカレーター法により検討した。-actin を内部標準として使用し、各遺伝子の発現を相対値で表した。

3.3 発現プラスミド

pCMV-gal は Dr. Jeffery L. Wrana (Samuel Lunenfeld Research Institute, Canada) より供与された。pGL4.14 ベクターは promega 社より購入した。pCMV -p300、pCMV-p65 は岡本尚教授(名古屋市立大学)より供与された。それぞれのイオンチャネルプロモーター領域を PCR により増幅し、pGL4.14 ベクターに挿入した。すべてのコンストラクトは DNA シークエンサー(ABI3130-Avant Genetic Analyzer, ABI)にて配列を確認した。

3.4 ルシフェラーゼ法

293 細胞を 24 well プレートに 5x10⁴cells/well になるよう調製し、各種レ

ポータープラスミド、pCMV- gal 及び目的の遺伝子を発現するプラスミドをコ・トランスフェクションし、その後各刺激を行い、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼによる発光は DTX880 Multimode Detectors (Beckman Coulter) にて測定した。ルシフェラーゼ活性は -galactosidase 活性を用いて補正した。

3.5 細胞内 Ca 濃度の測定

細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定には、蛍光指示薬として fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2 AM) を用いた。細胞内色素を 340 nm 及び 380 nm の励起光で励起し、放出された 510 nm の各々の蛍光を高感度カメラで取得し、その蛍光強度比を算出した。

4 . 研究成果

4.1 TRPV4 チャネルの機能増強とタンパク分解抑制

我々はすでにヒト滑膜細胞に TRPV4 チャネルが機能発現することを報告している (Itoh et al. , 2009) 。そこで滑膜細胞に様々な刺激を与え、TRPV4 チャネルのタンパク発現が変化するか検討した。その結果、滑膜細胞を低酸素状態に曝露すると TRPV4 チャネルの機能が増強することを発見した (図 1 参照) 。この機能増強には、TRPV4 チャネル遺伝子の発現増加が一部関与するが、その割合は低いことも見出している。すなわちこの TRPV4 チャネルの機能増強には転写レベルでの調節よりもタンパク質レベルでの調節機構が重要であることを示唆している。現在、TRPV4 チャネルタンパク質の分解の関与を薬理的ツールや分子生物学的手法を用いて検討している (投稿準備中) 。

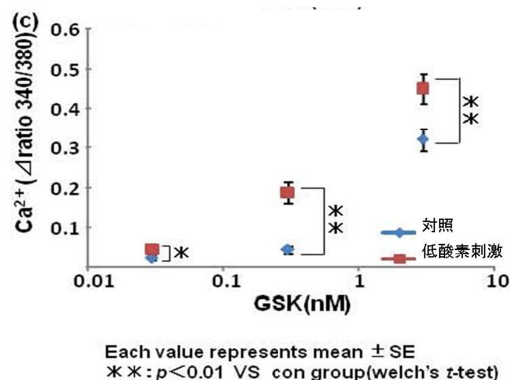


図 1 . 滑膜細胞における TRPV4 の機能発現変化。対照群と低酸素処理群の比較

4.2 TRPA1 チャネルの機能増強と転写調節機構の解明

TRP 型カチオンチャネルの一種である TRPA1 チャネルは TRPV2 および TRPV4 チャネルと同様、おもに感覚神経に発現する。TRPA1 は侵害受容に関わることが多数報告され、とくに炎症時の疼痛に関与することから、その拮抗薬の開発が精力的に進められている。偶然、我々はヒト滑膜細胞を炎症性刺激に曝露すると TRPA1 チャネルが劇的に発現増加することを見出した (発表論文 3、学会発表 9、10、招待講演 1) 。

ヒト滑膜細胞を TNF や IL1 で刺激すると、24 時間後にはその mRNA 発現が 100 倍以上増加した。またその機能変化を細胞内 Ca 測定法で確認したところ、対照群では TRPA1 アゴニストのマスタードオイル (MO) に非感受性であったが、刺激群では MO で細胞内 Ca 濃度が上昇した (発表論文 3) 。

細胞を TNF や IL1 で刺激すると、その下流では、一般に転写因子の NF- κ B が働く。そこでヒト滑膜細胞における TRPA1 チャネルの発現増加に NF- κ B が転写因子として関わっているかフシフェラーゼ法により TRPA1 チャネルのプロモータ活性を解析したが、NF-

B の関与は否定的であった（発表論文 3）。最近、炎症反応は低酸素応答とクロストークすることが明らかとなってきた。そこで次に、ヒト滑膜細胞における炎症時の TRPA1 の発現増加に低酸素応答因子が関わっているか検討した。

ヒト滑膜細胞を炎症性メディエーターで刺激すると、低酸素応答因子の HIF1 がタンパク質レベルで増加した。一方、他の低酸素応答因子である HIF2 は変化しなかった（発表論文 3）。つぎに炎症シグナルをバイパスして直接ヒト滑膜細胞にヒト型再構成 HIF1 を遺伝子導入すると、TRPA1 チャネルの遺伝子発現が増加するとともに M0 感受性の細胞内 Ca 濃度変化が観察されるようになった（発表論文 3）。

ヒト滑膜細胞における TRPA1 チャネルの発現増加に HIF1 が転写因子として関わっているかフシフェラーゼ法により TRPA1 チャネルのプロモータ活性を解析した。その結果、TRPA1 チャネル遺伝子の第一エクソンに HIF1 が結合する配列領域（hypoxia response element; HRE）を見出した（発表論文 3）。またこの配列は HRE の第一塩基が通常の HRE とは異なることから、HREL（hypoxia response element like motif; HREL）と名付けた。さらに HIF1 による転写活性強度は HREL の下流の 20 塩基に依存することも明らかとなった。各生物種における TRPA1 チャネル遺伝子の相同性をデータベースで比較したところ、ヒト以外の哺乳類の TRPA1 チャネル遺伝子上にも HREL が存在することが明らかとなった。しかし HREL の下流の 20 塩基はヒト以外の種ではヒトの 35% 程度しか保存されておらず、HIF1 による TRPA1 転写調整は弱い可能性が示唆された（発表論文 3）。

4.3 炎症時における内因性の TRPA1 チャネル活性化因子の探索

TRPA1 チャネルを活性化する多くの内因性および外因性物質が報告されている。しかし炎症時の TRPA1 チャネルを介した疼痛誘発に直接関わる内因性物質はほとんど明らかになっていない。炎症性刺激でヒト滑膜細胞に発現誘導された TRPA1 チャネルは自発的に活性化していることを見出した。そこで、この実験系を用いて、内因性の活性化因子の探索を行った。

検討の結果、炎症性刺激に曝露したヒト滑膜細胞では過酸化水素の産生が増加していることを見出した。さらに細胞内の遊離亜鉛濃度も増加しており、炎症時にはこの両者が TRPA1 チャネルを自発的に活性化させることを突き止めた（発表論文 3、学会発表 5、論文準備中）。

4.4. まとめ

今回、我々が見出した炎症性刺激による TRPA1 チャネルの発現調節機構および内因性物質によるその活性化を図 2 にまとめた。今後は神経系の TRPA1 チャネルも同様な発現調節機構をもつか検討する予定である。また TRPV4 だけでなく TRPA1 チャネルのタンパク質分解機構についても詳細に検討し、疾病の発症や進展との関係を明らかにしたいと考えている。

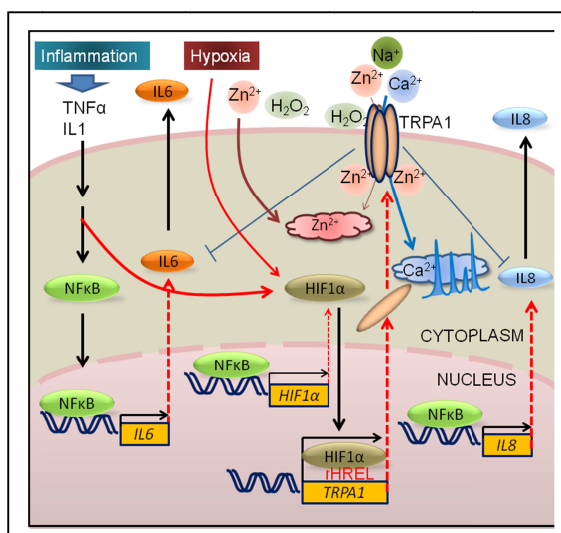


図 2 . 炎症時の滑膜細胞における TRPA1 の発

現調節機構とその活性化

(http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html) .

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 7 件)

1. N. Hatano, H Suzuki, Y. Itoh & K. Muraki. TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. *Life Sci.*, 92, 317-324 (2013)
2. N Hatano, H Suzuki, Y Muraki & K Muraki. Stimulation of human TRPA1 channels by clinical concentrations of the anti-rheumatic drug, auranofin. *Am. J. Physiol., Cell-Physiol.*, 304, C354-C361 (2013).
3. N Hatano, Y Itoh, H Suzuki, Y Muraki, H Hayashi, K Onozaki, IC Wood, DJ Beech & K Muraki. HIF1 α switches on TRPA1 gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release. *J. Biol. Chem.*, 287, 31962-31972 (2012).
4. Yamamura H, S Ohya, K Muraki & Y Imaizumi. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in the voltage-dependent regulation of the Ca²⁺ concentration in porcine coronary arterial smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 342, 486-486 (2012).
5. Majeed, Y., S Tumova, B Green, V Seymour, D Woods, A Agarwal, J Naylor, S Jiang, H Picton, K Porter, D O'Regan, K Muraki, C Fishwick & D Beech. Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by

progesterone. *Cell Calcium*, 55, 1-11 (2012).

6. J Naylor, E Shawaf, P Manna, L McKeown, P Manna, K. Porter, D O'Regan, K Muraki, D Beech, TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbens. *J. Biol. Chem.*, 286, 5078-5086 (2011)
7. Y Majeed, M Amer, A Agarwal, L McKeown, K Porter, D O'Regan, J Naylor, C Fishwick, K Muraki, D Beech, Stereo-selective inhibition of TRPC5 channels by neuroactive steroids. *B. J. Pharmacol.*, 162, 1509-1520 (2011)

[学会発表] (計 11 件)

1. Katsuhiko Muraki
Transcriptional regulation of TRPA1 channel: Links between inflammation and channel expression
Finish Pharmacological Society, Annual meeting 2014. 2014 年 4 月 7 日 (Tampere, Finland, Invited Plenary Lecture)
2. 波多野紀行、鈴木裕可、村木由起子、大矢進、村木克彦
ヒト脳毛細血管内皮細胞において histamine により惹起される Cl⁻ 電流における anoctamin チャネルの寄与の検討
第 123 回日本薬理学会近畿部会 . 2013 年 7 月 12 日 (名古屋); B-5
3. 波多野紀行、伊藤友香、鈴木裕可、村木由起子、林秀敏、小野寄菊夫、Wood Ian ,Beech David、村木克彦
低酸素誘導因子 HIF1 α による TRPA1 チャネル発現制御機構
平成 25 年度日本薬学会東海支部総会・大会. 2013 年 7 月 6 日 (名古屋); H1510
4. 鈴木裕可、波多野紀行、村木由起子、伊藤友香、林秀敏、小野寄菊夫、村木 克彦
NADPH オキシダーゼ阻害剤は TRPA1 チャネルを活性化する
日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-123.

5. 波多野紀行、鈴木裕可、村木由起子、伊藤友香、林秀敏、小野寄菊夫、Wood Ian ,Beech David、村木克彦

炎症性刺激により誘導される TRPA1 は細胞内亜鉛濃度を制御する

日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-117.

6. 波多野紀行、伊藤友香、鈴木裕可、村木由起子、林秀敏、小野寄菊夫、Wood Ian ,Beech David、村木克彦

滑膜線維芽様細胞における TRPA1 発現誘導を介したサイトカイン分泌制御機構

日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日(横浜); 29amp-118.

7. Hiroka Suzuki、Noriyuki Hatano、Yukiko Muraki, Yuka Itoh, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki

Potent activation of TRPA1 channel by NADPH oxidase inhibitors.

第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日 (福岡); P1-151

8. Noriyuki Hatano、Hiroka Suzuki、Yuka Itoh, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Katsuhiko Muraki

TRPA1 channel is a key regulator of intracellular Zn^{2+} in inflammatory synoviocytes.

第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 22 日 (福岡); P2-98

9. Noriyuki Hatano、Yuka Itoh, Hiroka Suzuki、Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Ian Wood, David Beech, Katsuhiko Muraki

Transcriptional regulation of transient receptor potential ankyrin 1 channel gene expression by hypoxia inducible factor-1 α .

第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 23 日 (福岡); P3-89

10. Noriyuki Hatano、Yuka Itoh, Hiroka Suzuki、Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi,

Kikuo Onozaki, Ian Wood, David Beech, Katsuhiko Muraki

Inflammatory stimulation induces expression of TRPA1 channel to regulate cytokine release.

第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日 (福岡); P1-99

11. Noriyuki Hatano、Erika Kusugami, Erina Kamiya, Hiroka Suzuki、Yukiko Muraki, Katsuhiko Muraki

Selective and potent activation of human TRPA1 by a disease modifying anti-rheumatic drug, auranofin.

第 85 回日本薬理学会年会 2012 年 3 月 15 日 (京都); P2-19-3.

〔その他〕
ホームページ等

http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村木克彦 (MURAKI KATSUHIKO)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号：20254310

(2)研究分担者

波多野紀行 (HATANO NORIYUKI)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号：50454319

鈴木裕可 (SUZUKI HIROKA)

愛知学院大学・薬学部・助教
研究者番号：00581026