

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659114

研究課題名（和文） TRPM7 による代謝制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of metabolic regulation by TRPM7

研究代表者

松下 正之 (MATSUSHITA MASAYUKI)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30273965

研究成果の概要（和文）：私たちは、TRPM7 の生理機能およびキナーゼ活性の意義を解明するために、TRPM7 キナーゼドメイン内の 1 アミノ酸置換によって ATP への結合をなくし、キナーゼ活性を全身で不活化した遺伝子改変マウスを作成した。この変異マウスは正常に発育するが、コレステロール代謝異常を示すことが明らかになった。さらに、このコレステロール代謝異常は、肝臓細胞からのコレステロールの分泌障害が原因であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have made the kinase dead knock-in mouse with replacement of the key residue for ATP binding in kinase domain to investigate a possible role of kinase activity of TRPM7. This mutant mouse grows normally, but show significant abnormality of cholesterol metabolism. In addition, we identified the cholesterol secretion from hepatocyte was severely defect in these mutant mouse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般・分子・細胞生理学

キーワード：TRPM7、チャンネル、キナーゼ、コレステロール代謝

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、既存のキナーゼと一次構造が全く異なるキナーゼファミリーを検索する過程で TRP チャンネル構造を持つ遺伝子 (TRPM7) を偶然に発見し、そのキナーゼドメインの結晶構造を明らかにしました (Yamaguchi et al., Mol. Cell 2001)。また、チャンネルの活性化メカニズムについても報告してきました (Matsushita et al., J. Biol. Chem 2005, Kozak et al., J. Gen. Physiol 2005)。これらの研究により、TRPM7 キナーゼ活性はチャンネル制御よりも新規の基質を標的としている可能性が示唆されました。TRPM7 の生理機能については、細胞レベルでは、鶏 B 細胞での遺伝子欠損によって細胞内  $Mg^{2+}$  の濃度低下が起こるとの報告がなされています (Schmit et al., Cell 2003)。

また、ヒトの遺伝学的研究により、同様のドメイン構造を持った TRPM6 については低マグネシウム血症との関係が報告されました (Schlingmann et al., Nat Genet 2002)。さらに、T 細胞特異的に TRPM7 遺伝子を破壊したマウスでは T 細胞分化障害が起こるが、細胞内  $Mg^{2+}$  濃度は正常であることが報告されています (Jin J et al., Science 2008)。これらの研究にも関わらず、TRPM7 の本質的な機能については、一般的なノックアウトマウスが胎生致死であること、特異的阻害剤が存在しないこと、研究グループ間でのデータ不一致などにより理解が進んでいません。私たちは、TRPM7 の生理機能およびキナーゼ活性の意義を解明するために、TRPM7 キナーゼドメイン内の 1 アミノ酸置換によって ATP への結合をなくし、キナーゼ活性を全身

で不活化した遺伝子変異マウスを作成しました。この変異マウスは正常に発育しますが、代謝異常を示すことが明らかになりました。本研究は、TRPM7 キナーゼ活性による代謝制御の分子基盤を構築することを目的としています。

## 2. 研究の目的

TRP ファミリーは、視覚、温度感覚など多様な感覚機能を司るチャネル分子として注目されています。TRP ファミリーの内でも、TRPM7 はイオンチャネル構造とキナーゼ活性を持つドメインより構成される特異な分子です。このチャネルの構造制御機構については詳細な報告がなされ理解が深まっていますが、キナーゼ活性の役割については未だ不明です。我々は、TRPM7 の生理機能とキナーゼ活性の意義を解明するために、TRPM7 のキナーゼ活性のみを1アミノ酸置換により不活化した遺伝子改変マウスを作成しました。この変異マウスは正常に発育しますが、意外なことに低コレステロールが認められました。本研究では、TRPM7 変異マウスによって明らかになったこれらの代謝異常より、全く新しい視点からの代謝制御メカニズム構築に向けた研究を推進します。

## 3. 研究の方法

### (1) TRPM7 改変マウスのチャネル機能解析計画

TRPM7 はどの細胞にも普遍的に存在します。変異マウスの初代培養(神経、血管内皮細胞)で TRPM7 チャネル活性を電気生理学的に解析し、未だ決着のついていないキナーゼ活性のチャネル活性への意義について結論を出しました。これまでの研究ではキナーゼ活性のチャネルへの意義について変異プラスミドの過剰発現の人工系で解析していたが、本変異マウスでは内在性の TRPM7 キナーゼ活性が不活化しているため生理的なキナーゼ活性の意義を解明できる。

### 方法

TRPM7 変異マウスや同腹のヘテロマウスより血管内皮細胞や神経細胞の初代培養を行う。その後、これまでチャネル機能解析の確立している系で、細胞内 ATP 濃度、pH やグルコース濃度変化に伴うチャネル活性の測定を行った。TRPM7 チャネル活性測定はこれまでに実績があり、変異マウスのアメ리카への輸送も行い解析した。

### (2) TRPM7 改変マウスでの代謝機能解析計画

TRPM7 変異マウスは発育異常は示しませんが、血液生化学検査により、低コレステロールになることが明らかになりました。高コレステ

ロール食や、糖負荷試験などの代謝変化を促す刺激を加えた時の血中濃度、尿中濃度変化などを代謝指標を生化学的に調べることでより明らかにした。

### 方法

TRPM7 変異マウスおよび野生型マウス/ヘテロマウスより以下の代謝性検査を行った。

- ① 糖負荷試験による血糖の変化やインシュリン濃度変化測定を行った。また、尿糖や便中コレステロール測定も行った。
- ② 高コレステロール食を与えた時の血中コレステロール変化を調べた。
- ③ 各種の代謝指標ホルモンなどを測定した(Dry-Chem)。

### (3) TRPM7 改変マウスの代謝機能異常の起こるメカニズム解明

#### 計画

低コレステロールの分子メカニズムを解明するためには、キナーゼ基質を明らかにする必要がある。キナーゼ活性の不活化により、代謝異常が起きているので分子メカニズムとしてはキナーゼの基質を明らかにすることが重要である。これまで基質としては Myosin Light Chain (Clark et al., EMBO J 2006) が報告されているが試験管内での結果であり、生体での基質は未だ不明である。また PI3K シグナルの活性化に関与している報告があるため、インシュリンから PI3K へのシグナル分子の関与や変異マウス細胞を利用したプロテオーム解析により新たな基質を明らかにする。また、分子メカニズム解明では TRPM7 のキナーゼ活性がどのような遺伝子の発現を調節しているかをゲノムワイドに調べることでより手がかりが得られる可能性がある。

### 方法

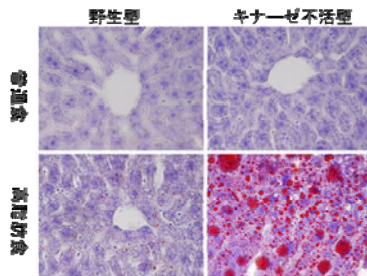
- ① 2次元電気泳動法によるキナーゼ基質検出を試みる。TRPM7 変異マウスと野生型より神経細胞培養を行った。各培養細胞を2次元電気泳動を行い、pro-Q ダイアモンド(molecular probe)染色で比較した。より、焦点を絞り PI3K シグナルに関与する蛋白質のリン酸化抗体を用いた基質検索も行った。変異型で蛍光シグナルの低いスポットをピックアップし質量分析で蛋白質を同定した。基質蛋白質の同定後、リン酸化抗体やその他一連の生化学的解析を実験の確立している方法で行い、TRPM7 キナーゼ活性の不活化が代謝異常を引き起こす分子メカニズムを説明できる。
- ② 結合蛋白質同定を試みた。Flag-TRPM7 を過剰発現させ免疫沈降法により結合蛋白質を共沈させる。その後、質量分析で共

沈蛋白質を同定した。

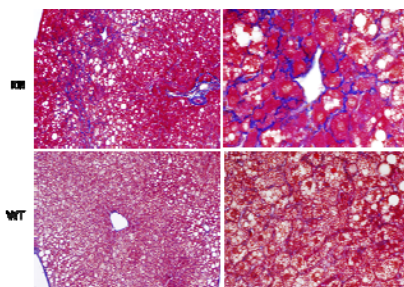
- ③ 酵母 2 hybrid-system による結合蛋白質検索を行い、キナーゼドメインに結合する蛋白質を同定する。これらの蛋白質の血糖やコレステロール値への関与について解析を深め、異常の起こる分子基盤を解明する。
- ④ 変異マウスので遺伝子発現変動解析を行った。TRPM7 変異マウスと野生型の肝臓、腎臓、脳より mRNA を抽出する。抽出 RNA より、microArray 解析を行い、変動遺伝子の中で代謝に関係する遺伝子について詳細に検討している。

#### 4. 研究成果

変異マウスは正常に発育しますが、血中コレステロール値の有意な低下があり、肝臓は激しい脂肪肝を示すことが明らかになりました（下図：高脂肪食を一週間与えたマウスの肝臓を Oil red 染色している）。



本来、TRP ファミリーは多様なセンサーの役割を担っています。TRPM7 についても細胞内の ATP 濃度変化によりチャネル活性が制御されるとの報告がなされています。また、PI3K の活性化維持に TRPM7 が必要との報告もあります (Sahni J et al., Cell Metab 2008)。我々の作成した変異マウスがコレステロールの代謝異常を示すのは、細胞内のエネルギー状態 (ATP) を感知する全く新しい機構や PI3K へのシグナルの関与を反映した結果の一面が浮かび上がってきている可能性もあります。さらに、TRPM7 のキナーゼ活性を不活化することにより肝臓の線維化が起こり NASH 様の病態を示すことが明らかになりました（青い染色が線維化を示す。WT: 野生型 KR: 変異マウス）。



生活習慣病の治療薬として TRPM7 のキナーゼ

活性制御分子は効果的な薬剤となる可能性があります。以上のように、斬新なアイデアを基に作成した TRPM7 変異マウスの生物学的特徴を最大限に活用し、分子から細胞、生体へと統合することで、従来、類例のなかったまったく新しいコレステロール代謝の分子メカニズム創成に結実することが期待されます。

#### 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 3 件）

- ① Kozuka C, Yabiku K, Sunagawa S, Ueda R, Taira S, Ohshiro H, Ikema T, Yamakawa K, Higa M, Tanaka H, Takayama C, Matsushita M, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H. Brown rice and its component,  $\gamma$ -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. *Diabetes* (2012)  
doi: 10.2337/db11-1767  
査読あり
- ② Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA. Sensitivity of TRPM7 channels to  $Mg^{2+}$  characterized in cell-free patches of Jurkat T lymphocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302: 1642-1651 (2012)  
doi: 10.1152/ajpcell.00037.2012  
査読あり
- ③ Chokshi R, Matsushita M, Kozak JA. Detailed examination of  $Mg^{2+}$  and pH sensitivity of human TRPM7 channels. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 302:1004-1011(2012)  
doi: 10.1152/ajpcell.00422.2011  
査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 松下正之 キナーゼ活性を持つ TRPM7 チャネルの機能解析（トランスポーター研究会）  
日時：平成 24 年 9 月 1 日（土）  
会場：福岡県歯科医師会館（福岡市中央区大名 1 丁目 12-43）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

[その他]  
ホームページ等  
<http://ryukyu-physiology.info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 正之 (MATSUSHITA MASAYUKI)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30273965

(2) 研究分担者

片桐 千秋 (KATAGIRI CHIAKI)  
琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00443664