

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460302

研究課題名 (和文) TRPM7チャネルにおける酸化ストレスセンサーの同定

研究課題名 (英文) Identification of oxidative stress sensors in TRPM7 channel

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

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : TRPM7は全身の細胞に普遍的に発現する陽イオンチャネルである。TRPM7のノックアウトマウスは胎生致死であることから、発生・発達において重要な役割を果たすと考えられている。本研究ではTRPM7の酸化ストレスによる活性制御機構を明らかにすることを目的とし、酸化ストレスがTRPM7を抑制すること、その抑制は細胞内のエネルギー環境によって程度が異なることを明らかにした。またTRPM7分子のZn finger motifがTRPM7の機能的発現に重要であり、酸化ストレスのターゲットとなっている可能性を見出した。

研究成果の概要 (英文) : TRPM7 is a non-selective cation channel harboring an alpha-kinase domain in its carboxyl terminal, expressed ubiquitously in animal cells. Since TRPM7 gene-deficient mice are embryonic lethal, it has been considered that TRPM7 plays an important role in development. In the present study, we explored mechanisms for the regulation of TRPM7 channel activity by oxidative stress. Using patch-clamp technique, it was revealed that the current of TRPM7 was inhibited by oxidative stress induced by an application of hydrogen peroxide in a free $[Mg^{2+}]_i$ - and total $[ATP]_i$ -dependent manner. The current of a kinase-deficient TRPM7 mutant was similarly inhibited by hydrogen peroxide, therefore the kinase activity of TRPM7 was not involved in the current inhibition. Moreover, site-directed mutagenesis revealed that cysteine residues (C1809 and C1813) located in the zinc finger motif at the carboxyl terminal of TRPM7 was the most plausible candidate that senses oxidative stress.

研究分野：生理学

キーワード：TRPM7 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

Transient receptor potential melastatin 7 (TRPM7) TRPM7 チャンネルは、細胞生存(Nadler et al., Nature 2001, 411: 590-595) 細胞接着(Clark et al., EMBO 2006, 25:290-301) 細胞内 Mg^{2+} 濃度の維持(He et al., Circ Res 2005, 96:207-215) シナプス小胞の放出制御(Krapivinsky et al., Neuron 2006, 52:485-496) 膜伸展センサー(Bessac & Fleig, J Physiol 2007, 582:1073-1086, Numata et al., Cell Physiol Biochem 2007, 19:1-8) T細胞の成熟(Jin et al., Science 2008, 322:756-760) など、様々な生理機能に参与していることが報告されている。TRPM7 のノックアウトマウスは胎生致死であることから、TRPM7 チャンネルの重要性がうかがえる(Jin et al., Science 2008, 322:756-760, Ryazanova et al., Nature Communications 2010, 1:109)。一方で最近では病態下での活性も注目されており、癌や脳虚血などで病態の悪化に働くことが報告されている(Aarts et al., Cell 2003, 115:863-877, Sun et al., Nature Neuroscience 2009, 1300-1307, Zhang et al., JBC 2011, 286:20194-20207, Guilbert et al., AJP Cell Physiol 2009, 297:C493-502)。研究代表者は若手研究(B)(H22-24)において、脂肪細胞の Ca^{2+}/Mg^{2+} 透過チャンネルを探索し、マウスから単離した白色脂肪細胞に TRPM7 チャンネルが発現していることを見出した。これまでに、TRPM7 チャンネルは酸化ストレスによって活性化され、神経細胞死を引き起こすことが報告されている(Aartset et al., Cell 2003, 115:863-877, Sun et al., Nature Neurosci 2009, 1300-1307)。酸化ストレスは脂肪細胞のインスリン抵抗性の誘導に参与すると考えられていることから、研究代表者は白色脂肪細胞の TRPM7 電流が、酸化ストレスによって活性化されるかどうかを検討した。驚いたことに、細胞外液への過酸化水素添加による酸化ストレスは、脂肪細胞の TRPM7 電流を抑制した。前述の中樞神経細胞での報告と相反するこの観察は、TRPM7 の酸化ストレス感受性が組織もしくは細胞の種類によって異なること可能性を示唆する。TRPM7 の酸化ストレスによる活性調節メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

TRPM7 の活性調節メカニズムを明らかにすることは、TRPM7 の生理的/病的役割を理解する上で、大変重要と考えられる。本研究では、TRPM7 を活性化すると報告されている酸化ストレスによる活性制御機構を明らかにすることを目的とする。我々のこれまでの研究によると、白色脂肪細胞に発現する TRPM7 は酸

化ストレスによって抑制される。これが細胞種特異的なものなのか、あるいは酸化ストレスは条件によって TRPM7 を活性化したり抑制したり変化するものなのかを明らかにすることで、その活性調節メカニズムを解明する。そのために、まず TRPM7 の酸化ストレスセンサーを同定する。酸化ストレスセンサーは TRPM7 の分子内にある場合、ことある分子がセンサーとなって TRPM7 にシグナルを伝える場合が想定される。何が(どこが)酸化ストレスを感知して、TRPM7 の活性を調節しているのかを明らかにする。

そしてそのセンサーが、どういった条件下で TRPM7 を正に制御し(活性化し) 負に制御する(抑制する)のかを明らかにすることで、TRPM7 の酸化ストレスによる活性調節メカニズムの全貌を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

TRPM7 をクローニングし異所性に発現させて TRPM7 電流の酸化ストレス感知メカニズムを明らかにする。まず TRPM7 分子が直接酸化されると仮定し、酸化的修飾をうけやすいアミノ酸残基の変異体を作成して酸化ストレスに対する電流の変化を、パッチクランプ法を用いて観察する。TRPM7 以外の分子が第一次の酸化ストレスセンサーである可能性もあるため、既に酸化的修飾を受けて細胞機能を調節することが報告されているものを中心に、TRPM7 に作用して酸化ストレス応答を調節する分子を探索する。

また、ホールセルパッチクランプ法の利点を生かし、細胞内に小分子を投与することで TRPM7 の酸化ストレス応答の変化を観察し、条件によって TRPM7 の活性制御の variation が生じる理由を検討する。

4. 研究成果

ホールセルパッチクランプ条件下で様々な細胞内液を検討した結果、TRPM7 は細胞内環境によって、酸化ストレスによる抑制の程度が異なることを明らかにした。酸化ストレスによる抑制は細胞内の free Mg^{2+} 濃度に依存しており、細胞内 Mg^{2+} 濃度が高ければ高いほど抑制の度合いが強くなる。TRPM7 はもともと細胞内 Mg^{2+} によって抑制される性質があるので、酸化ストレスはそれを増強したと考えられる(図1)。それを裏付けるものとして TRPM7 の Mg^{2+} 非感受性変異体(S1107E)は、

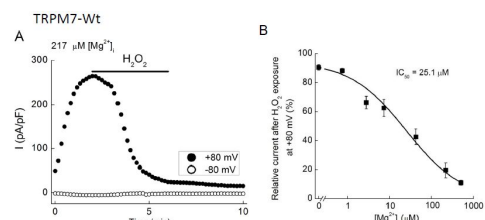


図1 TRPM7 (wild type) は酸化ストレスによって抑制される。A: 酸化ストレスとして過酸化水素を投与した時の電流の経時変化。B: 細胞内 Mg^{2+} 濃度を増加させると過酸化水素投与による電流抑制が強くなる。(Inoue et al. FRBM 2014をFigure 1を改変引用)

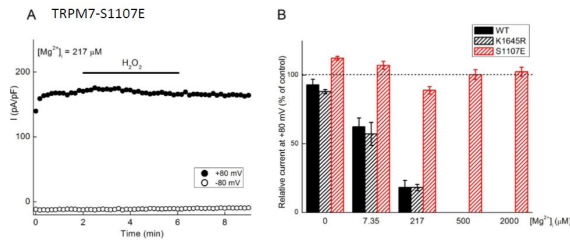


図2 マグネシウム非感受性変異体 (TRPM7-S1107E) は酸化ストレスによって抑制されない (A)。Wild typeおよびkinase inactive変異体 (TRPM7-K1645R) は細胞内Mg²⁺濃度が高くなるにつれて酸化ストレスによる電流の抑制がみられるが、S1107変異体は細胞内Mg²⁺濃度が高くても酸化ストレスによって抑制されない (B)。

酸化ストレスによって抑制されないことを確認した (図2)。すなわち、酸化ストレスはTRPM7の細胞内Mg²⁺感受性を増強することで活性を抑制することが明らかとなった。

PIP₂はTRPM7の活性維持に重要であることが報告されている。それはPIP₂がTRPM7近傍のMg²⁺をスクリーニングしているためだと考えられている。そこで本研究では酸化ストレスがPIP₂を枯渇させることによってTRPM7を抑制しているのかがどうかを明らかにするために、細胞内にPIP₂を投与する実験を行った。PIP₂は酸化ストレスの効果を抑制しないことから、TRPM7の酸化ストレスによる抑制はPIP₂を介していないことが明らかとなった。

細胞内にATPが生理的濃度 (mM オーダー) 存在する場合は、TRPM7は酸化ストレスによって抑制されない。この効果は加水分解されないATPアナログを細胞内に投与しても同様なことから、ATPの結合が酸化ストレスによる制御を調節することを示唆する。以上の結果から、TRPM7の酸化ストレスによる活性調節は、細胞内のATPおよびMg²⁺の濃度によって変化するが明らかとなった。

TRPM7の酸化ストレスセンサーを同定するために、分子内に存在するredox sensitiveなアミノ酸であるシステインの変異体を作製し、酸化ストレスの効果を観察した。マウスTRPM7とヒトTRPM7のどちらも酸化ストレスによってよくせいされることから、これらに共通のシステイン残基に絞って変異体を作製した。C末端に存在するZn finger motif内の2つのシステイン残基の変異体は、発現せず解析できていないが、それ以外のシステイン33残基については、変異させても酸化ストレス応答に変化がないことを明らかにした (図3)。このZn finger motif内のシステイン残基はアラニン置換でもセリン置換でも発現せず、Zn finger motifそのものをdeleteした変異体でも細胞膜に発現しないことから、TRPM7の構造維持に非常に重要であることが示唆される。おそらくこのZn finger motif内のシステイン残基が酸化ストレスのターゲットとなっており、ここが酸化されるとTRPM7の構造が大きく変化してMg²⁺感受性が高まるのではないかと考えられる。

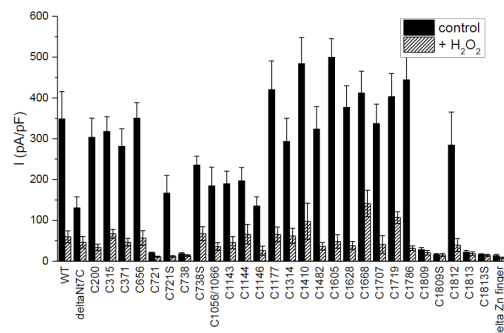


図3 TRPM7変異体の酸化ストレス感受性。TRPM7分子のシステイン残基のdeletion (deltaNt7Cおよびdelta Zn finger)およびAlanine置換 (C200~C1813)、Serine置換 (C721S、C738S、C1809S、C1813S)変異体のTRPM7電流を測定し (黒)、過酸化水素の効果 (斜線)を検討した。C1809とC1813はZn finger motif内のシステイン残基で、アラニンに置換してもセリンに置換しても、Zn finger motif以降をdeleteしても (delta Zn finger)機能的発現が見られない。

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 1件)

Inoue H., Murayama T., Tashiro M., Sakurai T., Konishi M. Mg²⁺- and ATP-dependent inhibition of transient receptor potential melastatin 7 by oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine 72 (2014) 257-266 査読あり

[学会発表](計 3件)

Inoue H., Murayama T., Konishi M. Oxidative stress-induced inhibition of TRPM7 is resulted from enhancement of its sensitivity to intracellular Mg²⁺. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会 2015年3月21日 神戸国際会議場・展示場 兵庫県神戸市

Inoue H., Murayama T., Konishi M. TRPM7 kinase is not necessary for oxidative stress-induced current inhibition. 第91回日本生理学会大会 2014年3月17日 鹿児島大学 郡元キャンパス 鹿児島県鹿児島市

Inoue H., Murayama T., Konishi M. Inhibition of TRPM7 by oxidative stress is dependent on intracellular magnesium. International Union of Physiological Sciences 25 July 2013 Birmingham, UK

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：出願年月日：

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()