

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871061

研究課題名(和文) 温度感受性TRPチャネル活性化への温度依存的な細胞膜脂質流動性変化の関与

研究課題名(英文) Involvement of membrane lipids in temperature-dependent TRP channel activation

## 研究代表者

内田 邦敏 (Uchida, Kunitoshi)

生理学研究所・細胞器官研究系・助教

研究者番号：20581135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、温度センサーである温度感受性TRPチャネル活性化に対する細胞膜脂質の関与を検討し、温度感受性TRPチャネルが温度情報を電気信号に変換するメカニズム迫ることである。細胞膜流動性を変化させると温度依存的な活性化が変化するTRPチャネルと影響を受けないチャネルとに区分できることがわかった。脂質とTRPチャネルとの相互作用を解析するために、脂質平面膜法を構築し、TRPM3及びTRPM5の解析に成功した。その解析からこれらチャネルは温度刺激のみでは活性化されないこと、活性化にはPIP2が必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：First, we observed the effect of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) on thermosensitive TRP channel activation stimulated by temperature changes, in order to understand the interaction between TRP channel activation and membrane fluidity. Some TRP channel activation was changed by pretreatment of MCD, the others was not changed. Next, we tried to construct planar lipid bilayer systems. Because, in this system, channel protein are isolated from various biological resources and reconstituted into an artificial membrane that has a defined lipid composition. We succeeded to observed TRPM3 and TRPM5 channel currents by ligands in this system and application of PIP2 regulated these channels activation. In addition, we did not observed any temperature-dependent activation of these channels, indicating that these channel could not be activated by temperature itself.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：温度感受性TRPチャネル 細胞膜

## 1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルに代表される膜タンパク質は、脂質二重膜に埋め込まれることによって初めてその機能を発揮する。膜タンパク質は流動性を持った脂質二重膜にモザイク上に埋め込まれ、流体中を動きながら機能を発揮している(流動モザイクモデル)と考えられてきたが、現在では脂質二重膜は不均一であり流動的で特徴的なマイクロドメイン構造(脂質ラフト)に膜タンパク質が局在を持って分布していると考えられている。近年、ショウジョウバエの研究より糖タンパク質発現の低下している *atu* 変異体は膜の流動性が変化しており、結果として細胞内カルシウム濃度上昇が起こり低温選択行動を誘導することが報告され、また人工脂質二重膜を用いた研究より温度によってその流動性が大きく変化することも報告されるなど、温度依存的な細胞膜流動性の変化が温度受容に重要な役割を果たしている可能性が示唆され始めている。しかし、生体においてはこれら脂質の変化を電気信号やシグナル伝達に変換する必要があると考えられるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

生体・細胞が温度を感じるメカニズムは1997年に初めて温度センサーTRPV1チャンネルがクローニングされたことにより、その理解が飛躍的に進んだ。TRPV1以外にも温度によって活性化されるTRPチャンネルが同定され、その一群は温度感受性TRPチャンネルとも呼ばれている。温度感受性TRPチャンネルの特徴の1つとして、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)、lysophosphatidic acid や lysophosphatidylcholines などの脂質によりその活性が調節をうけることがいくつか報告されている。特にTRPM8は脂質ラフト内に密に存在していることが報告されており、ラフト構造を緩めるとTRPM8の活性化温度閾値がシフトすることを示している。また、TRPV1はその活性化の維持にコレステロールが重要であることが報告されている。このように温度感受性TRPチャンネルの活性化もしくはその調節に細胞膜脂質が重要な役割を担っている可能性を示唆するようなデータが示されつつある。さらに、酸化ストレスや最近申請者が報告したTRPA1チャンネルを活性化するアルコールは膜脂質の流動性を大きく変化させる物質である。これらの知見および申請者の実験結果より、温度感受性TRPチャンネルの温度による活性化に細胞膜脂質流動性の変化が密接に関わっているという仮説をたてるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、温度センサーである温度感受性TRPチャンネル活性化に対する細胞膜脂質の関与を検討し、温度感受性TRPチャンネルが温度情報を電気信号に変換するメカニ

ズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) カルシウムイメージング法

HEK293細胞にLipofectamineを用いて各温度感受性TRPチャンネル遺伝子を導入した。細胞内カルシウム濃度はカルシウム蛍光色素fura-2を用いて測定した。細胞膜コレステロールの除去にはメチル-β-シクロデキストリン(MCD)を使用した。各実験の最後に、コントロールとしてイオノマイシンを適用した。灌流液の組成は以下のとおりである。140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4。

### (2) ホールセルパッチクランプ法

前述と同様に、Lipofectamineを用いて各温度感受性TRPチャンネル遺伝子を導入したHEK293細胞を使用した。膜電位-60 mVに固定した時のチャンネル活性化電流をAXOPATCH 200B (Molecular Devices)を用いて測定した。灌流液はカルシウムイメージング法を同一のものを使用した。電極溶液の組成は以下のとおりである。140 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4。

### (3) 脂質二重膜法

各TRPチャンネルにmycタグを付加したタンパク質を定常的に発現するstable cell lineをHEK293JN細胞を用いて作製した。細胞を回収してタンパク質を可溶化したのち、myc抗体を用いた免疫沈降法によりTRPチャンネルタンパク質を精製した。その際、それぞれのTRPチャンネルタンパク質の精製に適した界面活性剤を検討して用いた。精製したタンパク質を人工的に貼った脂質二重膜に膜融合によって挿入し、膜によって隔てられたチャンパー間を流れる電流をAXOPATCH 200B (Molecular Devices)を用いて測定した。

## 4. 研究成果

まず、MCDの濃度、適用時間を検討した。0.1 -10 mM MCDを5、10、15、30並びに60分処置の検討を行った結果、10 mM、15分の処置でコレステロールを除去できることがわかったため、実験にはこの条件を使用した。まず、各温度感受性TRPチャンネルを強制発現したHEK293細胞のコレステロールを除いた時のそれぞれのアゴニスト並びに温度刺激に対する応答の変化をカルシウムイメージング法を用いて検討した。その結果、熱刺激によるTRPV1の活性化は減弱し、一方で冷刺激によるTRPM8の活性は増強した。さらに比較的高い温度で活性化されるTRPM2の活性化もコレステロールを除去することによって現弱した。このコレステロールを除去すると温度と温度感受性TRPチャンネル活性間に相関関係があることを示している。その一方で、温かい温度のセンサーであるTRPV4チャンネルの温度依存的な活性化はコレステロールの

除去の影響を受けなかった。これらの結果から、温度感受性 TRP チャンネルには脂質膜の流動性の影響を受けるものと、受けないものが存在することが示唆された。また、その可逆性もしくは流動性を変化させる目的でコレステロールを再添加して温度活性の変化を検討した結果、TRPM3 などいくつかのチャンネルはコレステロールを添加すると活性がみられなくなった。

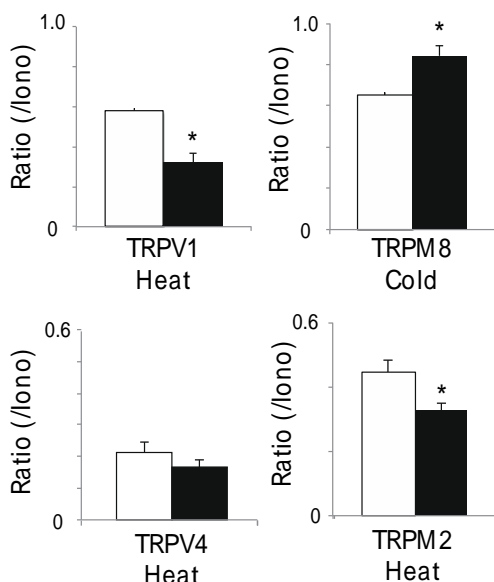


図1 各 TRP チャンネルの温度依存的活性化に対するコレステロール除去の作用。温度刺激による TRPV1、TRPM8、TRPV4 並びに TRPM2 チャンネル活性化を介した細胞内カルシウム濃度上昇 ( ) 及び温度刺激前に 10 mM MCD を 15 分処置した時の細胞内カルシウム濃度上昇 ( )。平均値 ± 標準誤差。\*: $P < 0.05$  Student' s t-test.

脂質が温度感受性 TRP チャンネルの活性にどう影響を与えるかを検討するために、脂質と精製したイオンチャンネルのみで構成される実験系である脂質平面膜法の確立を行った。これまでに、高温で活性化されると報告されている TRPM3 チャンネルタンパク質並びに温かい温度で活性化される TRPM5 チャンネルタンパク質の精製および膜への挿入に成功している。それぞれ界面活性剤を LMMD、FC-12 にすることで機能的なチャンネルの精製に成功した。電気生理学的手法を用いて TRPM3 の解析を行った結果、TRPM3 チャンネルは POPC と POPE で構成される脂質膜中という単純な環境下では温度によって活性化されないことを見いだした。脂質膜に陰イオン性の脂質である POPG を添加すると、TRPM3 の開口がみられなくなった。一方、陰イオン性ではあるが近年 TRP チャンネルの活性に関係すると報告されている PIP2 を添加すると、活性が増強されることがわかった。特に、nifedipine による活性化は PIP2 非存在下でもみられたが、神経ステロイドで TRPM3 チャンネルのアゴニストである硫酸プレグネロンによる活性化には PIP2 の添加が必須であることがわかった。さらに、nifedipine による活性化に対して、温

度上昇の影響を検討した。その結果、TRPM3 の開口確率は温度が上昇しても変化はなかったが、チャンネルのコンダクタンスは温度上昇に依存して増大した。その Q10 値はおよそ 2.0 であり、化学反応の一般的な温度依存性と同程度のものであることがわかった。TRPM3 は温度によって直接活性化される可能性は低いと考えられる。

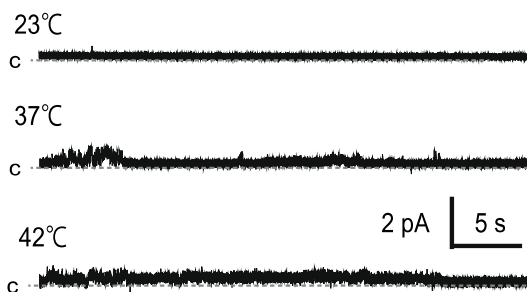


図2 脂質平面膜法における温度上昇に対する TRPM3 チャンネル電流の変化。精製 TRPM3 チャンネルタンパク質を POPC:POPE=3:1 の平面膜中に挿入し、温度を上昇させても TRPM3 チャンネル活性はみられなかった。

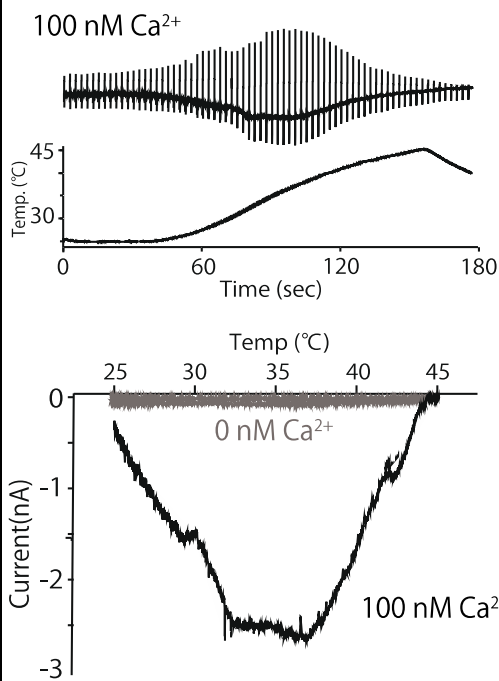


図3 TRPM5 チャンネルの温度依存的な活性化電流の変化。

上段、ホールセルパッチクランプ法を用いた TRPM5 チャンネルの温度依存的な活性化電流。細胞内カルシウム濃度は 100 nM。

下段、上段の電流を温度-電流でプロットした図。細胞内カルシウムを 0 nM にすると、温度依存的な活性化はみられない。

カルシウム透過性をもたない温度感受性 TRP チャンネルである TRPM5 の検討をホールセルパッチクランプ法及び脂質平面膜法を用いて行った。その結果、TRPM5 の活性化には細胞内カルシウムが必要ではあるが、温度上昇に伴い TRPM5 の活性は増強されることがわかった。しかし、37 度付近を越えると不活性

化が起こり、活性化電流はみられなくなった。この不活性化は 5 分後でも回復しなかった。脂質平面膜法の解析から、TRPM5 の温度依存的な活性化にもカルシウム並びに PIP2 は必要であり、PIP2 が温度依存的な TRP チャネル活性化に重要な役割を持っている可能性がある。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kunitoshi Uchida and Makoto Tominaga. Extracellular zinc ion regulates TRPM5 activation through its interaction with a pore loop domain. J. Biol. Chem. 288 25950-25955 (2013) 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

内田邦敏、Lusine Demirkhanyan、富永真琴、Eleonora Zakharian. 「脂質平面膜法を用いた TRPM3 チャネルの機能解析」第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21 日. 神戸国際会議場. 兵庫県神戸市.

内田邦敏、Lusine Demirkhanyan、富永真琴、Eleonora Zakharian. 「脂質平面膜法を用いた TRP チャネルの機能解析」第 61 回中部日本生理学会. 2014 年 11 月 8 日. 名古屋市立大学. 愛知県名古屋市.

内田邦敏、富永真琴. 「温度感受性チャネル TRPM2 の生理的役割」第 91 回日本生理学会大会. 2014 年 3 月 17 日. 鹿児島大学. 鹿児島県鹿児島市.

Kunitoshi Uchida. 「The functional analysis of a thermosensitive channel TRPM5: thermosensitivity and inhibition by Zinc ion」The 6<sup>th</sup> Nagoya Global Retreat. 2014/2/15. Aichi Health Plaza. Nagoya. Aichi

〔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 <http://www.nips.ac.jp/cs/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田邦敏 (Uchida, Kunitoshi)

生理学研究所・細胞器官研究系・助教

研究者番号: 20581135