

活性酸素で活性化される TRP チャンネル

清中茂樹

Shigeki KIYONAKA

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学
専攻，地球環境学学術准教授

高橋重成

Nobuaki TAKAHASHI

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学
専攻，先端医工学研究ユニット特定助教

森 泰生

Yasuo MORI

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学
専攻，地球環境学学術教授

はじめに

活性酸素によるシグナル伝達に重要な役割を果たす「活性酸素種」は、好気性生物の生体内でミトコンドリア電子伝達系が常に産生している。通常、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)，過酸化水素(H_2O_2)，ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)を活性酸素種は意味するが、広義においては、一酸化窒素(NO)，ペルオキシナイトライト($ONOO^-$)も含む。生体内が正常な状態では、抗酸化機構によって速やかに活性酸素種が除去されるが、その産生が抗酸化機構を超えると酸化ストレスとなる。従来、酸化ストレスは神経疾患、自己免疫疾患、虚血性疾患、がんなど様々な疾患にかかわる悪性因子として考えられてきた。しかし近年、サイトカイン、接着分子、酵素の産生などを制御するシグナル分子としても認知されるようになった。酸化ストレス応答においては、細胞内のカルシウムイオン(Ca^{2+})濃度調節が重要な役割を果たすことが知られていた。未解明な状態であった Ca^{2+} 流入経路の分子実体は、現在では、少なくとも部分的には transient receptor potential (TRP) チャンネルであると認識されている。

活性酸素種で活性化される TRP チャンネル

trp 遺伝子は、1989年にショウジョウバエの光受容変異株の原因遺伝子として発見された。¹⁾ *trp* 変異株においては、光刺激による光受容応答変化が一過的(transient)であることから、このように名付けられた。その後の遺伝子解析の結果、脊椎動物において約30種類のホモログが発見され、遺伝子の相同性から6つのファミリー(TRPC, TRPV, TRPM,

TRPP, TRPML, TRPA)に分類されている(図1)。TRPチャンネルの基本構造は、電位依存性 K^+ チャンネルと同様に6回膜貫通構造であり、ホモ4量体あるいはヘテロ4量体を形成しイオンチャンネルとして機能する。TRPCやTRPMファミリーを介した Ca^{2+} シグナルは、細胞増殖や生存・細胞死において重要な役割を担っていることが知られつつある。

TRPMファミリーに属するTRPM2は、ピロホスファターゼに広く保存されるNudixモチーフをそのカルボキシ末端に持つ Ca^{2+} 透過性カチオンチャンネルである。単球、マクロファージ、好中球などの免疫細胞、膵 β 細胞、脳において豊富な発現が認められる。当初、細胞内に存在するADP-リボースがTRPM2のNudixモチーフに作用して活性化することが報告された²⁾が、我々は過酸化酸素などの活性酸素種によりTRPM2が活性化されることを明らかにした。³⁾ 活性酸素種によるTRPM2の活

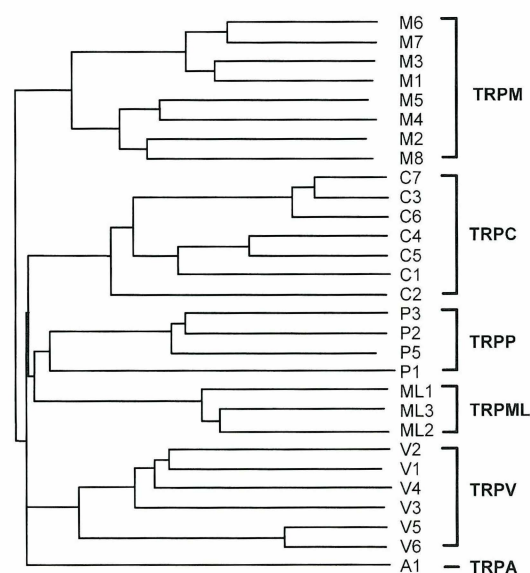


図1 TRPチャンネルの進化系統樹

性化機構に関しては、酸化ストレスによってミトコンドリアから産生したADP-リボースが関与すると考えられている。⁴⁾ 一方、ADP-リボースを介さないTRPM2活性化様式の可能性も報告された。⁵⁾ TRPM2には幾つかのスプライス変異体が存在するが、その1つはNudixモチーフの一部を欠損している。このスプライス変異体はADP-リボースでは活性化されないが、高濃度の過酸化水素により活性化されるため、⁵⁾ TRPM2の活性化機構に関しては今後も詳細な機能解明が望まれる。

TRPM7は広範囲における発現分布を示し、細胞内Mg²⁺濃度を感知するイオンチャンネルとして同定された。⁶⁾ TRPM7は、機械刺激、pHなど様々な刺激によりその活性が調節されるが、虚血再環流時に産生されるスーパーオキシド、ペルオキシナイトライトによっても活性化し、神経細胞死にかかわることが示されている。⁷⁾

TRPM2およびTRPM7を介した細胞死

TRPM2は活性酸素種により活性化されるが、我々はTRPM2を介したCa²⁺流入が、酸化ストレスによる細胞死において重要な役割を果たすことを見いだした。³⁾ TRPM2を過剰発現させたHEK293細胞は、過酸化水素による細胞死を受けやすくなる。その際の細胞死は、DNAフラグメンテーションやカスパーゼの活性化を伴わない。TRPM2が内在的に発現するインスリノーマRIN-5F細胞株や単球U937細胞株においても、過酸化水素刺激に伴うTRPM2を介した細胞死を確認した。また、膵β細胞においては、内因的に活性酸素種を産生させるTNF-α刺激によりTRPM2を介した細胞死が引き起こされた。膵β細胞を用いてADP-リボースによるCa²⁺シグナリングを詳細に解析したところ、TRPM2は形質膜だけでなく細胞内小器官であるリソソームにも発現しており、リソソームからのTRPM2を介したCa²⁺放出も細胞死に関与していた。⁸⁾

TRPM2は脳内において発現が認められ、大脳皮質や線条体から単離された神経細胞においてTRPM2様の電流が観測されている。⁹⁻¹¹⁾ また、大

脳皮質においては、過酸化水素により惹起される細胞死にTRPM2を介したCa²⁺流入が関与することが示唆されている。¹¹⁾ 海馬CA1領域は酸化ストレスに対して脆弱であるため、虚血再環流による神経細胞死を受けやすい。我々は、海馬CA1錐体細胞においても、TRPM2が機能的に発現していることを見いだした。¹²⁾ また、海馬CA1錐体細胞におけるTRPM2の活性化は、ADP-リボースだけでは不十分であり、電位依存性Ca²⁺チャンネルやNMDA受容体を介したCa²⁺流入と共役していた。このことは、虚血再環流時の神経細胞死において、従来のNMDA受容体を介した興奮性神経毒性とは別の経路の存在を示唆する。

Aartsらは、虚血再環流時に産生される活性酸素種によって惹起される神経細胞死に、TRPM7がかかわることを報告した。⁷⁾ 大脳皮質の培養神経において、TRPM7の発現抑制により神経細胞死が抑制された。またTRPM7は、脳虚血障害時に海馬神経細胞において見られる細胞外の2価カチオン濃度低下を感知してその活性が増強された。¹³⁾ TRPM7は細胞の生存に必須な遺伝子であることが知られており、¹⁴⁾ マウス個体でのTRPM7欠損は胎生致死である。そこでウイルスベクターを用いて、海馬のTRPM7を特異的にノックダウンさせたところ、神経活動や長期増強(long term potentiation; LTP)などのシナプス可塑性に影響を与えることなく、脳虚血時の遅延性神経細胞死が抑制された。¹⁴⁾ また、虚血時に伴うLTPや恐怖・空間記憶などの機能損失も抑制された。このことは、脳虚血によって惹起される遅延性神経細胞死において、TRPM7を介したシグナル伝達が重要な役割を担っていることを示唆している。

TRPM2依存的なケモカイン産生による炎症性疾患

炎症部位では免疫応答細胞の集積がみられる。その際には炎症性サイトカインの1つであるケモカインが重要な役割を果たす。従来、活性酸素種は炎症組織に対して直接的に作用し、強い障害を与えると考えられていた。しかし近年では、活性酸素種はNF-κBなどの転写因子を活性化することで、炎症

性サイトカインの産生を引き起こすシグナル伝達分子としても着目されている。我々は、単球細胞株であるU937細胞において、TRPM2を介したCa²⁺流入が好中球遊走浸潤を誘導するケモカインであるインターロイキン8(CXCL8)産生に重要であることを見いだした。¹⁵⁾ 過酸化水素によって惹起されたTRPM2によるCa²⁺流入は、Ca²⁺依存的なチロシンキナーゼであるPyk2を活性化し、Pyk2はRas依存的にErkを活性化し、活性化したErkはNF-κBの核内移行を惹起してCXCL8の発現誘導を行った(図2)。さらに、野生型(WT)マウスの末梢血から単離した単球において認められた過酸化水素による細胞内Ca²⁺濃度上昇は、TRPM2遺伝子欠損(KO)マウス由来の単球では消失していた。ヒトCXCL8に相当するマウスの機能的ホモログであるCXCL2の産生誘導についても、TRPM2 KOマウス由来の単球においては、その産生誘導は抑制された。また、好中球の遊走に対してはWTマウス由来とTRPM2 KO由来のものとの差が見られなかった。以上の結果から、CXCL2の産生量の差が好中球の遊走に影響を及ぼすことが明らかになった。

炎症部位では様々な細胞から活性酸素種が産生されている。このような病態生理条件下では、単球および炎症組織に浸潤したマクロファージのTRPM2が活性化され、ケモカイン産生誘導が引き起こされ

ると考えられる。そこで、潰瘍性大腸炎を惹起した炎症モデルマウスを用いて、病態生理的意義に関する検討を行った。2.5%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を含有させた飲料水で、WTおよびTRPM2 KO両マウスに潰瘍性大腸炎を惹起させると、WTマウスの単球および大腸においてCXCL2の産生が認められたが、TRPM2 KOマウスにおいてはその産生が抑制された。また、マクロファージの浸潤はWTおよびTRPM2 KOマウスともに同程度認められたが、好中球の浸潤はTRPM2 KOマウスにおいて著しく抑制された。CXCL2による好中球の遊走能に関しては、WTとTRPM2 KOマウス間で違いが認められなかった。すなわち、マクロファージにおけるTRPM2依存的なCXCL2産生誘導が炎症部位への好中球の浸潤を引き起こしていると考えられる。大腸における好中球の集積は、潰瘍性大腸炎の病態を悪化させる原因である。そこで、DSS処置後の大腸における病的診断を行ったところ、WTマウスの大腸では広い範囲に潰瘍形成が認められたが、TRPM2 KOマウスにおいてはその形成が強く抑制された。

以上のことから、TRPM2は単球およびマクロファージにおけるケモカイン産生を増強することで好中球を炎症部位へ集積させ、潰瘍形成などの炎症を悪化させていることが示された。一方、Knowles

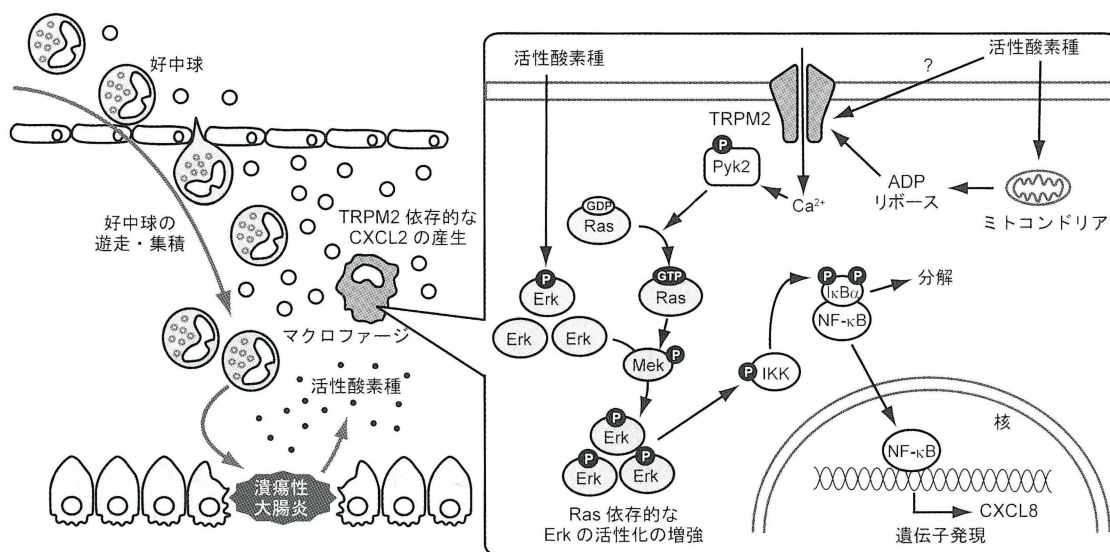


図2 単球およびマクロファージにおけるTRPM2依存的なケモカイン産生による好中球の浸潤と病態の悪化

らは、TRPM2 KO マウスが髄膜炎や脳炎等を引き起こす細菌種であるリステリア菌の感染を受けやすいことを報告した。¹⁶⁾ これらの結果から、活性酸素種産生を伴う自然免疫全般において、TRPM2 が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

システイン残基の酸化により 活性される TRP チャネル

タンパク質中のシステイン残基は酸化修飾を受けやすく、各種タンパク質においてシステイン残基の酸化修飾を介した活性制御が行われる。TRPC5 は G タンパク質共役型受容体の下流でイノシトールリン脂質代謝回転を介して活性化される Ca^{2+} チャネルであるが、¹⁷⁾ 我々は、TRPC5 が一酸化窒素によるシステイン残基のニトロシル化および酸化修飾によっても活性化されることを見いだした。¹⁸⁾ システイン残基の変異体を用いた標識実験および Ca^{2+} 濃度測定により、ポア領域に存在する 553 番目および 558 番目のシステイン残基が、一酸化窒素を介した TRPC5 の活性化に重要な役割を担っていることを確認した。還元剤であるアスコルビン酸は、ニトロシル化されたニトロソチオール基をチオール基に還元できるが、ジスルフィド結合をチ

オール基に還元力できない。一方、ジチオスレイトールは、ニトロソチオール基およびジスルフィド結合をチオール基に還元できる。興味深いことに、一酸化窒素供与剤により TRPC5 を活性化させた後にアスコルビン酸を処置しても、TRPC5 の活性は一部しか抑制されなかったが、ジチオスレイトール処置ではその活性は完全に抑制された。これらの結果から、一酸化窒素による TRPC5 の活性化には TRPC5 のニトロシル化および分子内ジスルフィド結合の形成が関与することが示唆された(図3)。

TRPファミリーの中で、TRPC1, TRPC4, TRPV1, TRPV3, TRPV4 は、TRPC5 の Cys 553 と Cys 558 に相当するシステイン残基を有しており、一酸化窒素に対して反応性を示した。また、TRPC5 を含めたこれらの TRP チャネルは、一酸化窒素以外のシステイン残基に対して酸化修飾を行う化合物群によっても活性化した。¹⁸⁾ 一方、TRPA1 は Cys 553 と Cys 558 に相当する残基を有していないが、一酸化窒素や酸化修飾により活性化される。^{19~21)} 以上の結果から、数種類の TRP チャネルは、システインの酸化修飾を介した酸化ストレスを感知しており、これらのチャネルが細胞内の酸化状態を厳密に制御している可能性が示唆された。

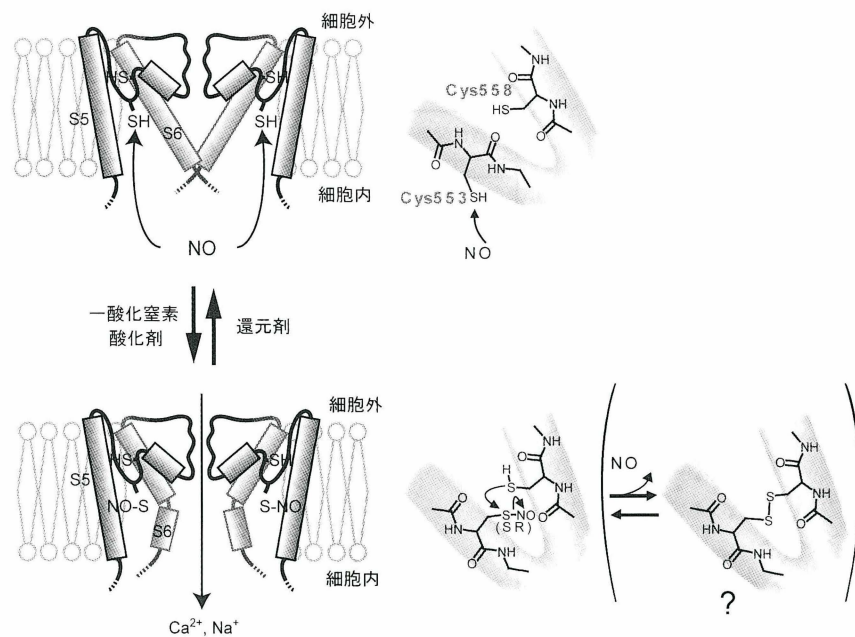


図3 一酸化窒素および酸化修飾を介した TRPC5 の活性化モデル

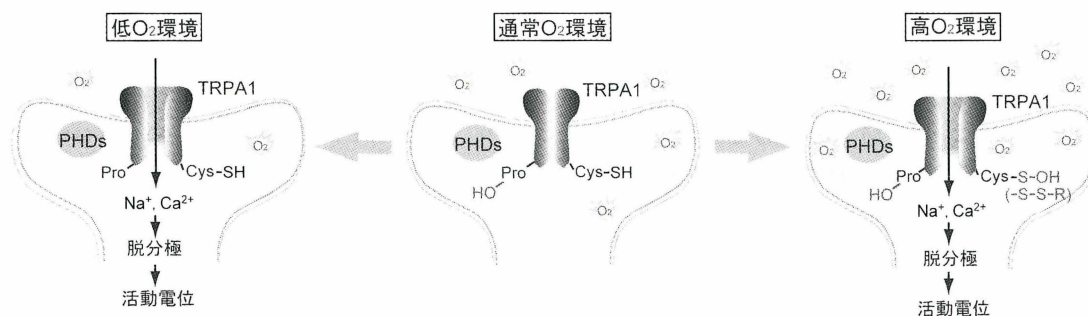


図4 O₂ センサー TRPA1 の活性化機構

生体内 O₂ センサーとしての TRPA1 チャンネル

ヒトなど好気性生物の生存において、「酸素(O₂; 分子状酸素)」は必要不可欠な物質である。しかし、体内に取り込まれた O₂ の一部は過酸化水素やスーパーオキシドなどの活性酸素種に変化し、時として生物に対し「酸素毒性」を示す。実際、高濃度の O₂ の吸引は呼吸器疾患や未熟児網膜症などの疾患を引き起こし、最悪の場合には死に至らしめる。このような O₂ が示す両義性に対応するために、好気性生物は体内に取り入れ可能な O₂ の分圧を感知し、組織への O₂ 供給を厳密に制御する仕組みを備えている。

我々は、数種類の TRP チャンネルがシステイン残基の酸化修飾を介して酸化物を直接的に感知することを明らかにした。次に、様々な還元電位を有する酸化型ケミカルライブラリーを用いて、各 TRP チャンネルの酸化感受性を網羅的かつ定量的に評価した。その結果、TRPA1 が酸化物に対して最も高い感受性を示し、O₂ のような弱い酸化物によっても活性化することを見いだした。²²⁾ システイン残基の変異体を用いた標識実験および Ca²⁺ 濃度測定により、TRPA1 のアミノ末端領域に存在するアンキリンリピート内の 633 番目および第 4 膜貫通領域後の細胞内領域に存在する 856 番目のシステイン残基が O₂ 感受性に重要であることが分かった(図 4)。また TRPA1 は、低 O₂ 濃度溶液でも活性化することを見いだした。TRPA1 のアンキリンリピート内には、プロリン水酸化モチーフが存在する。実際、通

常の O₂ 分圧下では O₂ 依存的なプロリン水酸化酵素 (PHDs) を介した 394 番目のプロリン残基の水酸化により TRPA1 の活性は抑えられていたが、低 O₂ 分圧下ではその水酸化が抑制されて TRPA1 が活性化した(図 4)。プロリンの水酸化を介した活性制御は、前例のないイオンチャンネルの新しい活性制御機構である。

TRPA1 は感覚神経細胞や迷走神経細胞などに発現しているが、活性化した TRPA1 はイオン電流を生じて神経活動を惹起した。また、TRPA1 KO マウスにおいては、高 O₂ および低 O₂ ガス吸入に伴う迷走神経の活動とそれに伴う呼吸反射が著しく損なわれていることを確認した。TRPA1 KO マウスは、通常 O₂ 濃度下において肺障害および肺高血圧症を示すが、これらの症状は高 O₂ 濃度および低 O₂ 環境下において、更に重篤化した。TRPA1 KO マウスでは、生体内 O₂ センサーとしての機能が失われているものと考察される。以上の結果から、TRPA1 が生体内の O₂ センサーとして機能し、O₂ の体内供給を厳密に制御することが示された。

おわりに

本稿では、酸化ストレスにより制御されている TRP チャンネルについて概観した。我々のグループを中心とした最近の研究成果は、酸化感受性 TRP チャンネルが様々な生理機能を制御することを明らかにしつつある。一方で、酸化感受性 TRP チャンネルの活性化の異常は病態を引き起こすため、酸化感受性 TRP チャンネルの活性制御薬は、酸化ストレスに

関する疾患に対する新たな創薬ターゲットとして位置付けることができる。例えば、遅延性神経細胞死はアルツハイマー病やハンチントン病といった神経疾患に関連しており、TRPM7を標的としたこれらの疾患に対する新しい治療薬の開発が期待される。また、TRPM2の活性抑制薬は抗炎症作用をもたらすと期待される。

酸素センサーであるTRPA1の意義としては、大気中の海拔ゼロ地点におけるO₂分圧変動を感知できるO₂センサーとしての高い性能が挙げられる。この点は、通常飼育下においてTRPA1 KOマウスが示す上述の病理学的表現型が支持しており、TRPA1の微妙なO₂感知の狂いが神経因性疼痛や呼吸器障害など様々な疾患に関与しているとも考えられる。また酸素センサーTRPA1の発見は、低O₂分圧センサー研究に比べ今まで見過ごされてきた、O₂毒性を避けるための高O₂分圧のセンサーにも光を当てることになった。すなわち微生物、線虫、昆虫などの原初的な生物に広く見られる「酸素忌避」に準じる機能を哺乳類も備えていることを示唆し、進化生物学的にも新しい論争の展開が期待される。

参考文献

- 1) Montel C. *et al.*, *Neuron*, 2, 1313–1323 (1989).
- 2) Perraud A. L. *et al.*, *Nature*, 411, 595–599 (2001).
- 3) Hara Y. *et al.*, *Mol. Cell*, 9, 163–173 (2002).
- 4) Perraud A. L. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 6138–6148 (2005).
- 5) Wehage E. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 277, 23150–23156 (2002).
- 6) Nadler M. J. *et al.*, *Nature*, 411, 590–595 (2001).
- 7) Aarts M. *et al.*, *Cell*, 115, 863–877 (2003).
- 8) Lange I. *et al.*, *Sci. Signal.*, 2, ra23 (2009).
- 9) Smith M. A. *et al.*, *J. Physiol.*, 547, 417–425 (2003).
- 10) Hill K. *et al.*, *Neuropharmacology*, 50, 89–97 (2006).
- 11) Kaneko S. *et al.*, *J. Pharmacol. Sci.*, 101, 66–76 (2006).
- 12) Olah M. E. *et al.*, *J. Physiol.*, 587, 965–979 (2009).
- 13) Wei. W. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 16323–16328 (2007).
- 14) Sun H. S. *et al.*, *Nature Neurosci.*, 12, 1300–1307 (2009).
- 15) Yamamoto S. *et al.*, *Nature Med.*, 14, 738–747 (2008).
- 16) Knowles H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 11578–11583 (2011).
- 17) Okada T. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273, 10279–10287 (1998).
- 18) Yoshida T. *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, 2, 596–607 (2006).
- 19) Hinman A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 19564–19568 (2006).
- 20) Macpherson L. J. *et al.*, *Nature*, 445, 541–545 (2007).
- 21) Takahashi N. *et al.*, *Channels*, 2, 287–298 (2008).
- 22) Takahashi N. *et al.*, *Nature Chem. Biol.*, 7, 701–711 (2011).