

発表番号 59 (0342)

非選択性陽イオンチャネルの微量元素透過と細胞の
増殖、生存・死に関する分子生理

助成研究者：森泰生（京都大学大学院工学研究科 合成生物化学専攻）

共同研究者：原雄二（京都大学大学院工学研究科 合成生物化学専攻）

花野豊久（九州大学大学院医学研究院 情報薬理学専攻）

井上隆司（九州大学大学院医学研究院 情報薬理学専攻）

恒常的な Ca^{2+} 流入が、細胞増殖及び癌等の増殖異常を制御することは、数多くの証拠が裏付けている。しかしながら、本 Ca^{2+} 流入経路の分子の実態は明らかになっていない。

本研究において我々は、transient receptor potential (TRP) のメラスタチンファミリーの一つであり、微量金属元素透過の非選択陽イオンチャネルを形成する TRPM7 が、ヒト網膜芽細胞種 (RB) 細胞の増殖を調節することを明らかにした。RB 細胞において、外向き整流性及び $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 透過性を有する、自発性陽イオン電流 (Ispont) を電位固定法により観察した。Ispont は Ca^{2+} 測光法により測定した Ca^{2+} 流入のみならず、RB 細胞の増殖速度にも強い正の相関を示した。Ispont、 Ca^{2+} 流入及び、増殖速度のどれもが、 Gd^{3+} 、 La^{3+} 、LOE908、2-APB により同様の有効性で阻害された。また、RB 細胞形質膜を剥離し inside-out patch にしたところ、MgATP の除去によって誘導されるが、逆に Mg^{2+} あるいは MgATP 存在下で阻害される 70pS 単一チャネル活性が観察された。さらに、RT-PCR 及び免疫染色法により、RB 細胞において TRPM7 mRNA 及びタンパク質の豊富な発現が見られ、HEK293 細胞における TRPM7 の異所発現は Ispont の特徴を非常によく再現した。ところが、TRPM7 タンパク質発現および G1/S の進行を抑制するアンチセンスヌクレオチド、RNA 干渉法、及び機能破壊した TRPM7 変異体は、RB 細胞における自発性 Ca^{2+} 流入及び Ispont を顕著に抑制した。以上の結果は、TRPM7 が血清刺激下で見られる、自発性 Ca^{2+} 流入の構成因子として、RB 細胞の増殖を制御することを強く示唆している。

16

助成番号 0342

非選択性陽イオンチャネルの微量元素透過と細胞の増殖、生存・死に関する分子生理

森泰生、原雄二、花野豊久[#]、井上隆司[#]

〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 京都大学大学院工学研究科 合成生物化学専攻、

[#]〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1 九州大学大学院医学研究院 情報薬理学専攻

研究目的

Zn²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Co²⁺等の微量元素は、生体内の様々な酵素の補因子として必須であるが、微量元素がどのようにして細胞内に取り込まれるかということに関しては、ほとんど明らかになっていない。これは「微量元素の微量性が故の検出の困難さ」を反映しており、細胞の形質膜越えの、微量元素流入機構の研究に対する有効なアプローチがなかったことによる。また、一般に、微量元素は陽イオン流入を担う陽イオンチャネルを阻害し、生理活性を発揮すると考えられてきた面もある。ところが最近、私たちを初めとしたいくつかのグループにより[1]、細胞の増殖、生存・死等を含む細胞の恒常性に関する非選択性陽イオンチャネル TRPM 群 (Transient Receptor Potential Melastatin Family) が同定された。その機能的特徴の一つとして、微量元素の透過が高いことが示され [2]、TRPM チャネル群は Na⁺といった一価陽イオンとともに、Ca²⁺や Mg²⁺あるいは、微量元素を有効に取り込む経路であることが示された。

本研究計画においては、最新の知見に最先端の実験手法を組み合わせ、TRPM チャネルにおけるイオン透過の (1) 分子機構と (2) その生理的意義を明らかにすることを目的とし、TRPM チャネルを介した、細胞の増殖、生存・死の制御と微量元素との関連の解明を行う。

研究方法

TRPM7 cDNA のクローニングと発現

ヒト TRPM7 cDNA は RT-PCR 法により単離した(1) プライマーの組み合わせは: :
 5'-GTCGCACAATTATGAAAGACTCGG-3' (LT7-1, sense) 及 び
 5'-CCCACCCCTCAAATATAAGTGCCAC-3' (LT7-4, antisense) 、
 5'-GTTTTGAATAATCTGCATTCCCAT-3' (LT7-5, sense) 及 び
 5'-GACACGATCTCCAACCTTCTTAAT-3' (LT7-10, antisense) 、
 5'-AAACTTCATGATTTTGAAGAGCAG-3' (LT7-11, sense) 及 び
 5'-CGAGGGAAAAGTGACACAGTAACA-3' (LT7-14, antisense)。得られたフラグメント
 は 5'-CTTCTGCTGCTAGCGCCGGAGCTG-3' (LT7-3, sense) 及 び
 5'-CACAGGGACACCCTGGCCAATCCT-3' (LT7-2, antisense) 、

5'-AGAAGAGAACTTGAAAAACTATT-3' (LT7-7, sense) 及び
5'-CATCTGTTCCACTCTTTCAAAAGT-3' (LT7-8, antisense)、
5'-GACAAATTTCACTCTGGGAGTGAA-3' (LT7-13, sense) 及び
5'-GCAGGCAAAACCAATGATTCAGTA-3' (LT7-12, antisense)。TRPM7 cDNA は動物細胞発現用の pCI-neo に繋いだ[3]。

電気生理測定及び Ca^{2+} 測光法

whole cell 電流は conventional 法に nystatin 穿孔法を併用して観察した。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定には膜透過型の Ca^{2+} 指示薬である fura2-AM をもちいた。340 nm 及び 380 nm の励起による細胞内蛍光 (510±10 nm) の強度比 (F340/F380) は、式 $[Ca^{2+}]_i = b \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ (R は F340/F380) に、より求めた。

RB 細胞と遺伝子発現の抑制

RB 細胞は2歳半の女児由来のもので、10%のウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 培地中で培養した。干渉 RNA (siRNA) の TRPM7 標的配列は、5'-GTCTTGCCATGAAATACTC-3'。アンチセンス及びセンスオリゴヌクレオチドは、5'-GAGAATGTCCCAGAAATCCT-3' and 5'-AGGATTTCTGGGACATTCTC-3'。

免疫染色と RT-PCR による発現同定

抗 TRPM7 抗体は、TRPM7 の C 末端 (CRKCLKLPDLKRNDYTPDKII) に対して作成した。TRPM 及び GAPDH の RT-PCR 用プライマー: TRPM1 (5'-GCCAGACTCACTGCTCCATC-3')/(5'-ACGATGGACACCACGTTAGG-3')、TRPM2 (5'-TCACGGAAAGCAGGATTGTC-3')/(5'-ACTCAGGCTTGTTGGAGATGAG-3')、TRPM3 (5'-TCTACAATGCACCCATCGTG-3')/(5'-ACGAAGGATCATTCCGACAG-3')、TRPM4 (5'-TGGAATTGACATCCCTGTCC-3')/(5'-TCGAATTCCTCAGACCCATC-3')、TRPM5 (5'-AATGTGCTGCTCATGAACCTG-3')/(5'-CATCTTGCTCAGGAAGTTCTCC-3')、TRPM6 (5'-ACAATGACCTGCTGGTTTGG-3')/(5'-TCGAATTGCTCCAGTTCCTG-3')、TRPM7 (5'-GTCACCTTGAAACTGGAACC-3')/(5'-CGGTAGATGGCCTTCTACTG-3') あるいは (5'-TGGAATAATCGGAGGTCTGG-3')/(5'-TGCCTCTTCATAAGGCAAGC-3')、TRPM8 (5'-GATTTTCACCAATGACCGCCG-3')/(5'-CCCCAGCAGCATTGATGTCG-3') あるいは (5'-CCCATTATGGCCTGATGAAG-3')/(5'-TAGCTGATTCCGGAGCTTTG-3')、GAPDH (5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3')/(5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3')。

研究結果

RB 細胞は 10%ウシ胎児血清が含まれる通常の条件下では、2-3 日に一回の分裂速度で増殖する。ところが、1 mM EGTA の添加により、細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) を $1 \mu\text{M}$ より低くすると ($[\text{Mg}^{2+}]_o$ は約 1 mM になる)、増殖はほぼ即座に増殖が停止した (図 1A)。図 1 のように、RB 細胞の増殖は強く $[\text{Ca}^{2+}]_o$ に依存し、同様の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 依存性を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が示した。本データは、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び細胞増殖を制御する Ca^{2+} 流入機構を示唆する。

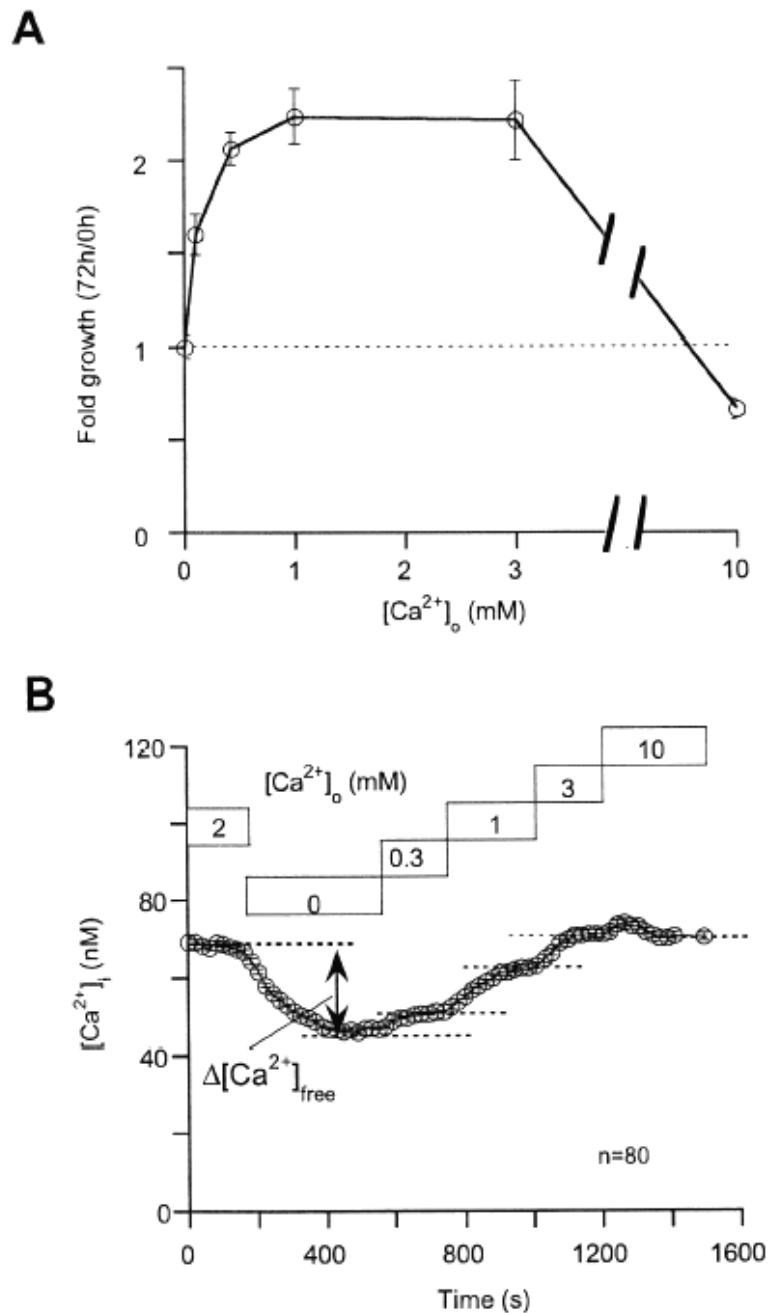


図1 Ca^{2+} 依存性 RB 細胞増殖と静止細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)
 A 細胞増殖の細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$)。B $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 依存性。

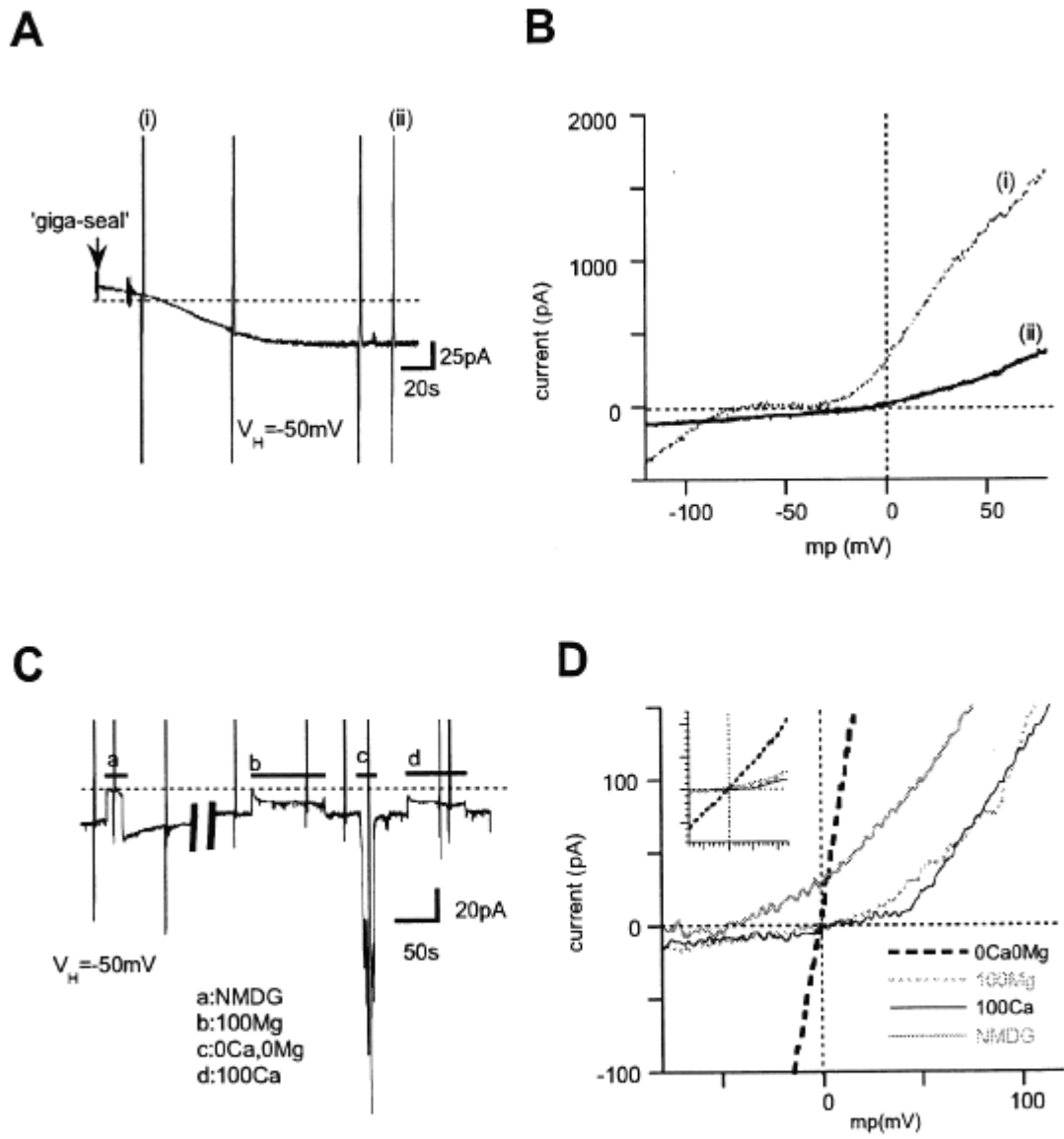


図2 Ispont の電流特性

そこで、RB細胞において、外向き整流性及びCa²⁺/Mg²⁺透過性を有する、自発性陽イオン電流 (Ispont) を電位固定法により観察した (図2)。Ispont はピペット内のCs⁺が細胞内に拡散し、整流性のK⁺電流が抑制されていくに従って、RB細胞に出現した。また、Ispont、Ca²⁺流入及び、増殖速度のどれもが、Gd³⁺、La³⁺、LOE908、2-APBにより同様の有効性で阻害された (図3)。また、RB細胞形質膜を剥離し inside-out patch にしたところ、MgATPの除去によって誘導されるが、逆にMg²⁺あるいはMgATP存在下で阻害され、コンダクタンスが70pSの単一チャネル活性が観察された (図4)。

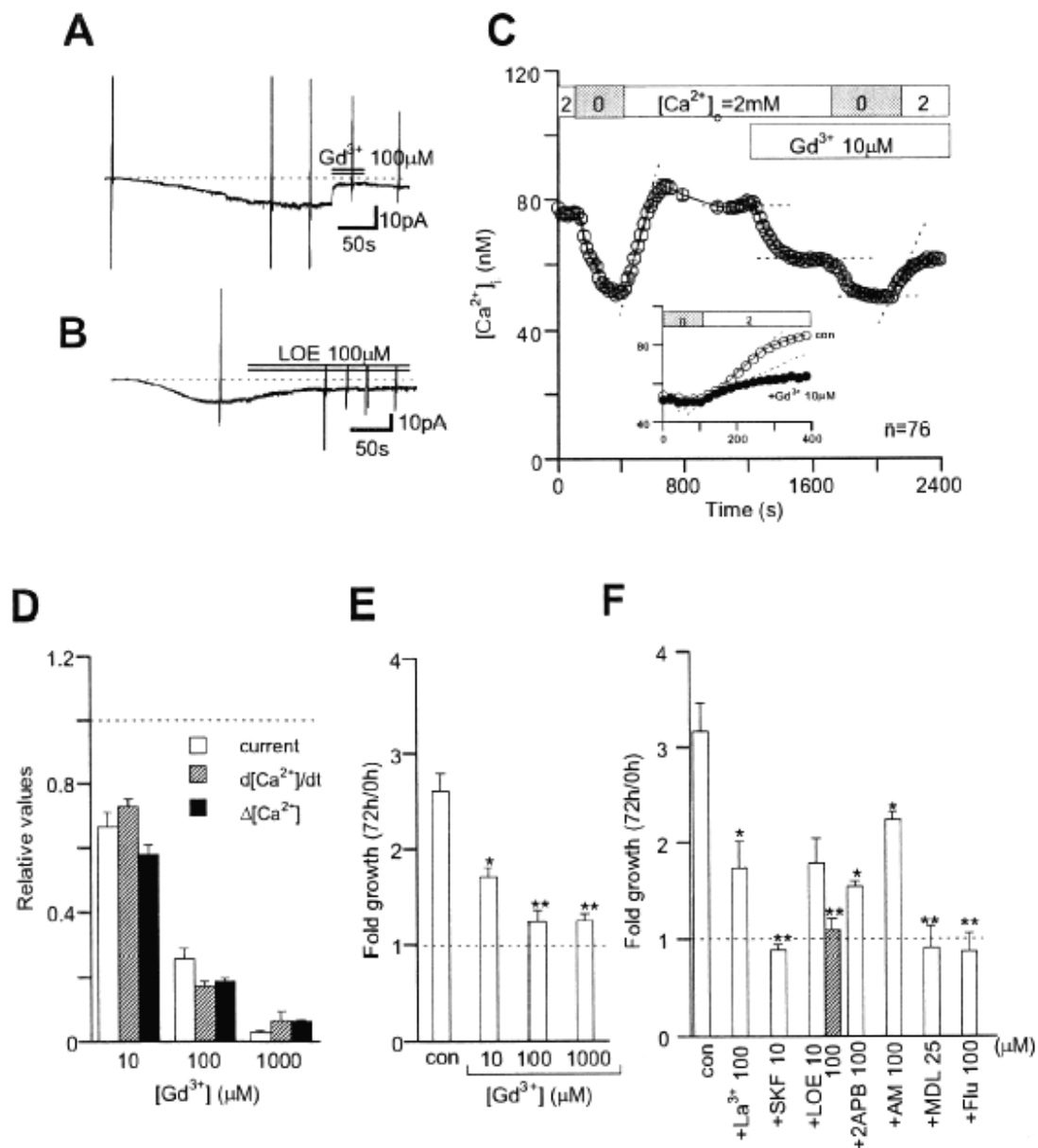


図3 Ispontの薬理特性

RT-PCR 及び免疫染色法により、RB 細胞における TRPM ファミリーの mRNA 及びタンパク質の発現を調べた (図 5)。RB 細胞においては、TRPM2 が最も豊富に発現しており、TRPM1 が次いで豊富であった。

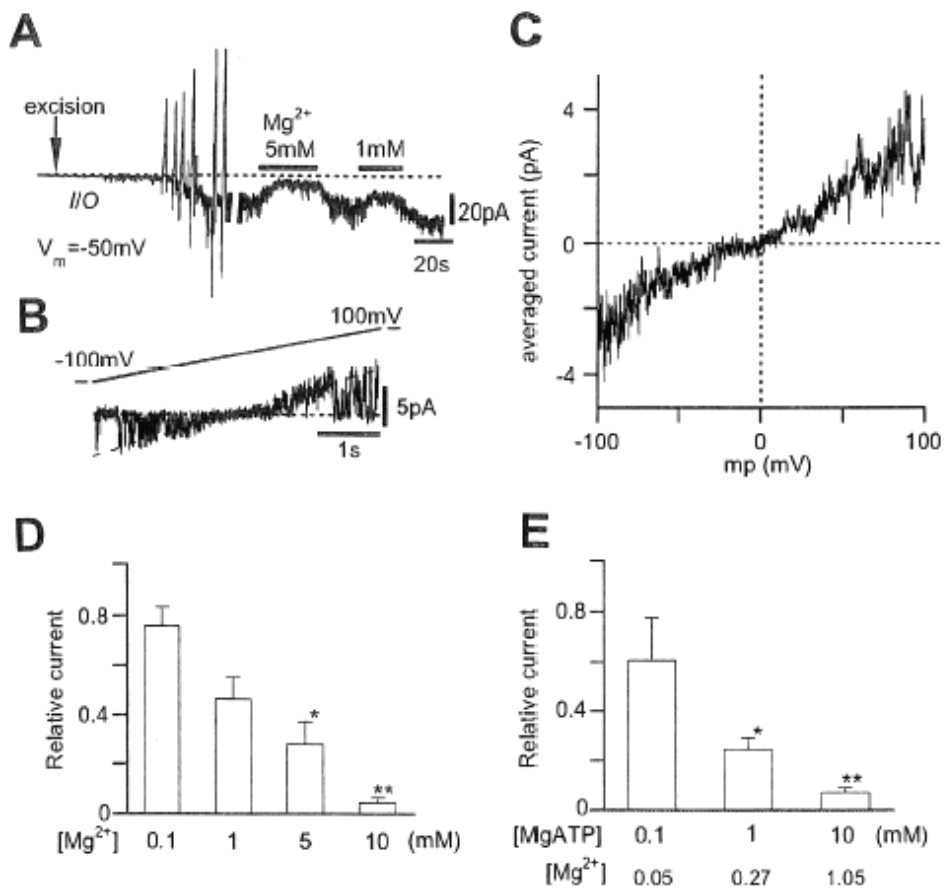
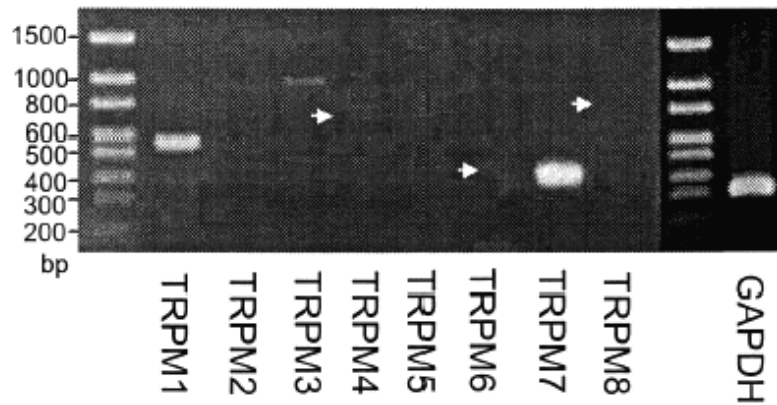


図 4 Ispont の Mg^{2+} 依存性

HEK293 細胞に TRPM7 の異所発現をさせ、電位固定法により電流特性を調べると、Ispont の特徴を非常によく再現できた (図 6)。ところが、TRPM7 タンパク質発現を抑制するアンチセンスヌクレオチド、RNA 干渉法、及び機能破壊した TRPM7 変異体は、RB 細胞における自発性 Ca^{2+} 流入及び Ispont を顕著に抑制し、G1/S の進行を阻害した (図 7)。以上の結果は、TRPM7 が血清刺激下で見られる、自発性 Ca^{2+} 流入の構成因子として、RB 細胞の増殖を制御することを強く示唆している。

A



B

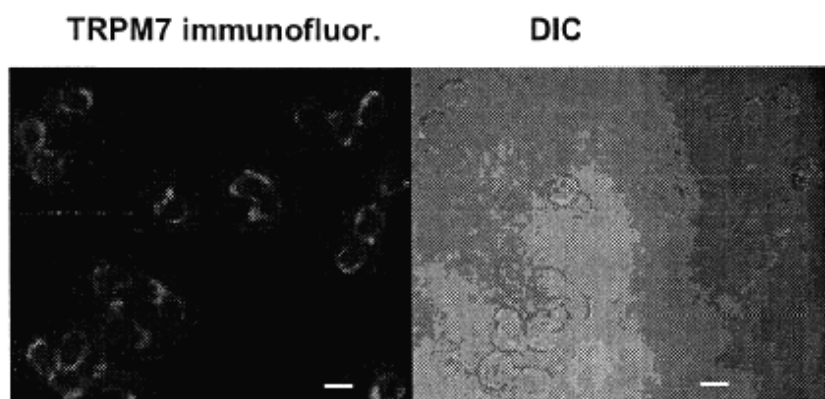


図 5 RB 細胞における TRP ホモログの発現

考察と今後の課題

恒常的な Ca^{2+} 流入が³、細胞増殖及び癌等の増殖異常を制御することは、数多くの証拠が裏付けてきた。しかし、本 Ca^{2+} 流入経路の分子の実体は明らかになっていなかった。本研究において我々は、TRP のメラスタチンファミリー [4] の一つであり、微量元素透過の非選択陽イオンチャネルを形成する TRPM7 が、ヒト網膜芽細胞種 (RB) 細胞の増殖を調節することを明らかにした。ところで、TRPM7 の Ca^{2+} (本研究) Mg^{2+} [5] 透過とその重要性は既に明らかとなったが、微量元素透過の生理的意義はまだ明らかになっていない。今後は、それを明らかにしていく必要がある。

既に、私たちは、遺伝子欠損細胞を用いたイオンチャネルの生理的意義の解明に成功している。今後は、TRPM7 の生理的意義を明らかにすべく、この経験を生かして、TRPM7 チャネルの遺伝子欠損細胞の作製を行いたい。特に、同位元素体を用い、本細胞における微量元素取り込みが、どの程度損なわれるかを定量的に確立し、遺伝子欠損の増殖、生存・死に対する影響を、細胞周期、様々な増殖因子・壊死因子や酸化ストレスに対する応答等、に関して検討したい。

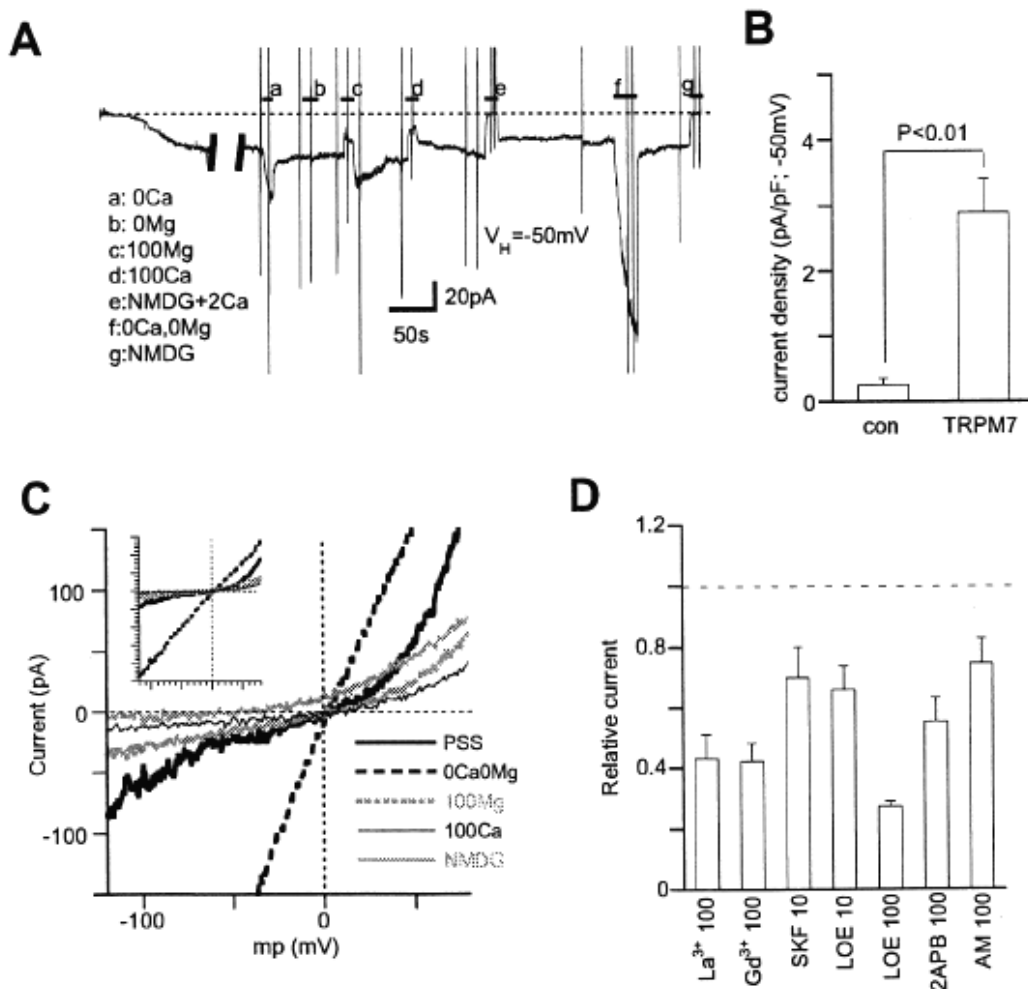


図6 HEK細胞に組み換え発現したTRPM7電流の特性

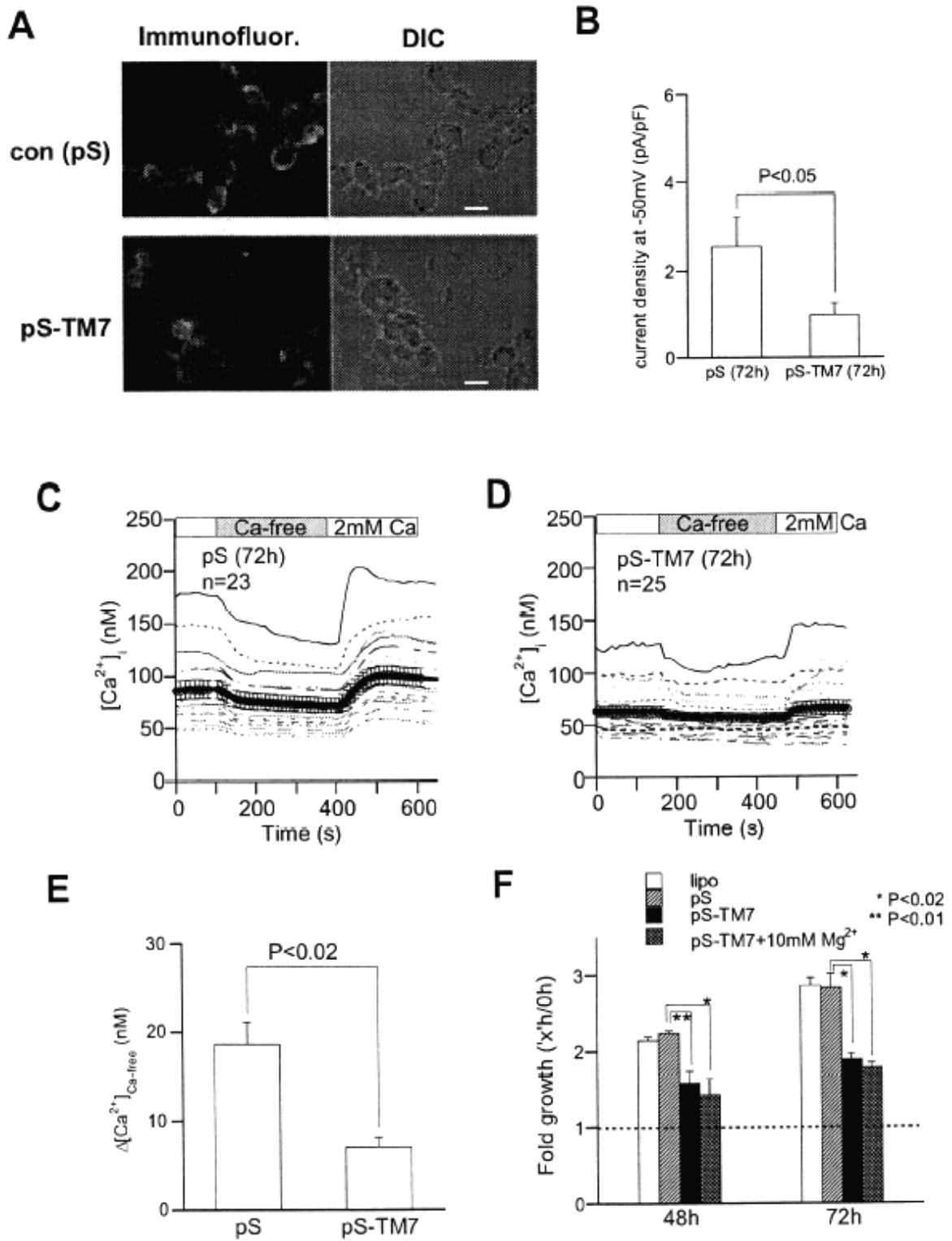


図7 アンチセンス法によるRB細胞におけるTRPM7発現抑制の効果

References

1. Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., and Mori, Y. (2002). *Mol. Cell* **9**, 163-173
2. Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A. J. *Gen. Physiol.* 121:49-60 (2003)
3. Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K. and Mori, Y. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 10279-87
4. Montell, C., Birbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Brudford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N. and Zhu, M.X. (2002). *Mol. Cell.* **9**, 229-231

Molecular physiology of nonselective cation channels
in metal permeation and cellular proliferation, survival, and death

Yasuo Mori, Yuji Hara, Toyohisa Hanano[#] & Ryuji Inoue[#].

Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto 615-8510, Japan and [#]Department of Pharmacology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan.

Summary

There is ample evidence that continuous Ca^{2+} influx critically controls the cell division cycle, and its abnormalities may be associated with aberrant cell growth such as tumors, hypertrophy and hyperplasia. However, few clues have been obtained for the molecular entity of the Ca^{2+} influx pathway. Here we show the evidence that a homologue of the melastatin subfamily of transient receptor potential protein TRPM7, which was previously shown to be an intracellular Mg^{2+} /ATP-regulated, rare metal-permeable cation channel and implicated in cell viability, likely contributes to the growth control of human retinoblastoma (RB) cell. In RB cells, under voltage-clamp with the nystatin-perforated recording, a spontaneous cation current (I_{spont}) having outward-rectifying and $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -inhibited but -permeating properties was recorded. The magnitude of I_{spont} appeared well correlated with that of spontaneous Ca^{2+} entry measured by Ca^{2+} fluorescent imaging technique, and the rate of proliferation of RB cell, all of which were depressed by serum deprivation and various cation channel blockers such as Gd^{3+} , La^{3+} , LOE908 and 2-APB with similar efficacies. Excision of RB cell membrane (inside-out) into MgATP-free solution induced a 70pS single channel activity, which was effectively inhibited by Mg^{2+} or MgATP complex in their millimolar range. RT-PCR and immunocytochemical experiments revealed abundant expression of TRPM7 mRNA and protein in RB cells and heterologous expression of TRPM7 in HEK293 cells reproduced the key features of I_{spont} . In contrast, elimination of this protein from RB cells by antisense oligonucleotides, RNA silencing, or co-transfection of loss-of function TRPM7 mutants markedly reduced the rate of spontaneous Ca^{2+} entry and the density of I_{spont} , which was paralleled by a decrease in TRPM7-immunoreactivity and a retardation of G_1/S cell cycle progression. These results strongly suggest the essential importance of TRPM7 in RB cell proliferation as a component or regulator of spontaneously activated Ca^{2+} influx pathway which turns active upon serum stimulation.