

## 体温センサーTRPM2 チャネルによる代謝調節機構の解明

加塩 麻紀子

愛知医科大学生理学講座

### 概要

体温センサーTRPM2 は、体温付近の温度に感受性を有する非選択性陽イオンチャネルであり、体温に保たれた広範な組織に発現する。Adenosine diphosphate ribose 等が内因性リガンドとして知られるとともに、自身のチャネルポアを流入する  $\text{Ca}^{2+}$  が TRPM2 活性に対しポジティブフィードバックループを形成することから、内因性リガンド、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオン、体温といった有効刺激が相乗的に体温下 TRPM2 活性を制御していると考えられる。我々はこれまでの研究で、代謝状態を反映する生理的レベルの活性酸素 (レドックスシグナル) が体温センサーTRPM2 の活性化温度閾値を低下させ、TRPM2 の“体温”に対する感受性を上昇させることを証明した。内因性 TRPM2 リガンド産生の基質となる Nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ) は細胞内の代謝を反映して変化し、寿命の延長や代謝能亢進への寄与が知られる  $\text{NAD}^+$  依存性酵素サーチュイン1 (SIRT1) の活性を上昇させる。活性化した SIRT1 は転写調節因子の脱アセチル化により転写活性を上昇させ、ATP 産生等のミトコンドリア代謝能を亢進する。ミトコンドリアにおける ATP 産生能は、膵臓β細胞からのインスリン分泌能と直結する。また SIRT1 活性化は、インスリン抵抗性の改善とインスリン分泌亢進により高血糖を抑制することが報告されている。体温下 TRPM2 活性もまたインスリン分泌を促進すること、SIRT1 が酵素反応に伴い TRPM2 の内因性リガンド OAADPR を産生することから、本研究では TRPM2 と SIRT1 との機能連関および膵臓β細胞機能調節への関わりに注目し検討を行った。

膵臓β細胞において SIRT1 mRNA 発現が認められ、SIRT1 活性化剤処置によりカルシウムオシレーションの増大が確認された。したがって、SIRT1 活性はインスリン分泌を促進的に調節すると考えられた。TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降実験の結果、TRPM2 と SIRT1 との間に物理的相互作用が存在し、さらにその相互作用がプロテインキナーゼ C の活性化剤であるフォルボールエステル (PMA) 処置により増強することが明らかとなった。さらに、Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化タンパク検出により、PMA 処置により TRPM2 のリン酸化が上昇することが明らかとなった。TRPM2 リン酸化の上昇は物理的相互作用の上昇に先行して起こったことから、TRPM2 リン酸化が直接あるいは間接的に TRPM2/SIRT1 の相互作用を上昇させることで両者を近接させ、機能連関を効率化していると考えられた。また、ホールセルパッチクランプ測定の結果、SIRT1 活性化剤による TRPM2 の活性化が認められた。

これらの結果より、PKC の活性化をもたらす種々の受容体の活性化により TRPM2 のリン酸化が起こることが、TRPM2 と SIRT1 の機能連関のスイッチとなっている可能性が強く示唆される。本知見は、リン酸化による新たな体温下 TRPM2 活性調節機構を示唆するものであり、TRPM2 活性制御を目的とした薬理学的手法への応用が期待される。今後はさらに、TRPM2/SIRT1 連関による代謝調節およびインスリン分泌能調節機構についての検討を進める。

### 1. 研究目的

我々生物は、季節や昼夜変化に伴う環境温の変動、そして時に侵害性の熱刺激や冷刺激を受容する。侵害性の

温度には忌避行動をとり、非侵害性の環境温の変化にも適切に応答することで神経性、行動性の体温調節機構により体温を比較的一定に保ち生体内代謝を維持する。これらの広範な温度受容に温度感受性 Transient receptor potential (TRP) チャンネルが重要な働きをする。温度感受性 TRP チャンネルとして最初にクローニングされた TRPV1 (V; Vanilloid) は感覚神経に発現し、侵害性の熱刺激を受容して痛覚および忌避行動を惹起する。加えて、温度感受性 TRP チャンネルには、劇的な温度変化に暴露されない深部組織に発現し体温で活性化する TRP チャンネル(体温センサー)が存在し、TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4 および TRPM5 (M; Melastatin) が報告されている。これらの体温センサーの存在は、温度感受性 TRP チャンネルが“体温”を感じる生理的意義を強く示唆する。

体温センサーの一つである TRPM2 は、体温付近の温度に感受性を有する非選択性陽イオンチャンネルであり、広範な組織に発現する<sup>[1]</sup>。Adenosine diphosphoribose 等が内因性リガンドとして知られるとともに<sup>[2]</sup>、自身のチャンネルポアを流入する  $Ca^{2+}$  が TRPM2 活性に対しポジティブフィードバックループを形成することから<sup>[3]</sup>、内因性リガンド、細胞内  $Ca^{2+}$  イオン、体温といった有効刺激が相乗的に体温下 TRPM2 活性を制御していると考えられる<sup>[4]</sup>。また、我々はこれまでの研究で、代謝状態を反映する生理的レベルの活性酸素(レドックスシグナル)が体温センサー TRPM2 の活性化温度閾値を低下させ、TRPM2 の“体温”に対する感受性を上昇させることを証明した<sup>[5]</sup>。レドックスシグナルの機能分子として知られる過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 処置により、濃度依存性かつ処置時間依存性に TRPM2 の活性化温度閾値が低下する。つまり、代謝状態に伴い産生されるレドックスシグナルに応じ、深部組織に発現する TRPM2 の体温下 (~37°C) 活性が調節されることを意味する。このようにレドックスシグナルにより調節を受ける体温下 TRPM2 活性が、マクロファージに発現する TRPM2 の活性が平熱と発熱域のわずかな温度変化を細胞内  $Ca^{2+}$  シグナルに変換し、発熱域での食能上昇に寄与すること、体温下 TRPM2 活性がマクロファージからのサイトカイン遊離量を上昇させることを示すとともに<sup>[5]</sup>、体温下 TRPM2 活性が膵島からのグルコース誘発インスリン分泌を温度依存性かつレドックスシグナル依存性に促進するこ

とを証明した<sup>[6]</sup>。その後上記報告を契機に、TRPM2 が体温調節中枢である視床下部視索前野、感覚・自律神経に発現し、全身性の代謝とも言える体温調節に関与すること<sup>[7,8]</sup>、外気温によるマウスの行動制御へも関与することが明らかとなり<sup>[9]</sup>、体温を基軸とした代謝機能調節への TRPM2 の寄与が強く示唆される。

TRPM2 は活性酸素により活性化することから、細胞死や炎症性疾患など、病態との関連が数多く報告されてきたものの<sup>[1]</sup>、生理機能に関する報告は現在のところ免疫機能やインスリン分泌等に限られている。一方で、TRPM2 は恒温動物を含む多くの真核生物で保存されていることから、体温下 TRPM2 活性が我々生物の生存にとり利益をもたらすものであることは疑いようもない。TRPM2 内因性リガンドの産生源としてミトコンドリア、核が知られるが<sup>[10]</sup>、細胞死といった病態ではなく“生理的”条件で産生される内因性リガンドの細胞質濃度が細胞膜に存在する TRPM2 の活性化に十分な濃度に達し、TRPM2 活性を調節しうるのであるという点で疑問が残る、何らかの“効率化”メカニズムの存在が示唆される。内因性 TRPM2 リガンド産生の基質となる Nicotinamide adenine dinucleotide ( $NAD^+$ ) は細胞内の代謝を反映して変化し、寿命の延長や代謝能亢進への寄与が知られる  $NAD^+$  依存性酵素サーチュイン1 (SIRT1) の活性を上昇させる。活性化した SIRT1 はタンパク中のアセチル化リジン脱アセチル化する酵素として機能し、Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR), PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 等の転写調節因子の転写活性を上昇させ、ATP 産生等のミトコンドリア代謝能を亢進する<sup>[11]</sup>。ミトコンドリアにおける ATP 産生能は、膵臓 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌能と直結する。また SIRT1 活性化は、インスリンの標的組織である骨格筋等における炎症抑制を介してインスリン“抵抗性”を抑制し<sup>[12]</sup>、 $\beta$ 細胞における uncoupling protein 2 (UCP2) の発現抑制を介してインスリン“分泌量”を増加させることで<sup>[13]</sup>、高血糖を抑制することが報告されている。体温下 TRPM2 活性がインスリン分泌を促進すること<sup>[6]</sup>、SIRT1 が酵素反応に伴い TRPM2 の内因性リガンド OAADPR を産生することから<sup>[14]</sup>、本研究では TRPM2 と SIRT1 との機能関連および膵臓 $\beta$ 細胞機能調節への関わりに注目し検討を行った。

## 2. 研究方法

### 2. 1. 細胞培養

HEK293T 細胞は理研 BRC より入手し, 10% FBS および 100 units/mL Penicillin G, 100  $\mu$ g/mL Streptomycin (Wako)を添加した DMEM 培地(Sigma)を用い, 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内にて培養した。プラスミド DNA の導入には Lipofectamine 3000(Invitrogen)を用い, 手順は使用説明書に従った。遺伝子導入後の細胞で実験を行う場合は全て, 導入後 20 ~ 36 時間で実験を実施した。マウス膵臓 $\beta$ 細胞は, コラゲナーゼおよび EGTA 処置により単離したのち, FBS および Penicillin G, Streptomycin 添加 RPMI1640 培地中で培養 12 ~ 36 時間後, 各種実験に供した<sup>6)</sup>。

### 2. 2. プラスミド

HA タグ付加 TRPM2 および 3 x FLAG タグ付加 SIRT1 は, PCR により増幅し, pcDNA3.1(+)プラスミドにクローニングした。TRPM2 へのアミノ酸変異は QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) に準じて導入した。

### 2. 3. RT-PCR

培養膵臓 $\beta$ 細胞より RNA を抽出し, 逆転写反応後 PCR 増幅を行うことで mRNA 発現を検出した。なお, プライマーはイントロンを挟む領域とし, mRNA 配列を特異的に検出するように設計した。

### 2. 4. ホールセルパッチクランプ法

細胞外液: 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 (in mM) および, 細胞内液: 140 CsCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 4.47 CaCl<sub>2</sub> (遊離 Ca<sup>2+</sup>イオン ~1  $\mu$ M,

<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/max>

chelator/CaEGTA-TS.htm) pH 7.4 (in mM)を用い, 膜電位固定下 (V<sub>m</sub> = -60 mV), 室温にてホールセルパッチクランプ測定を行った。パッチクランプシステムは Axopatch 200B/ Digidata 1321A/ pCLAMP8 (Molecular Devices)を用い, 電流は 5 kHz の filter をかけ 10 kHz でサンプリングした。

### 2. 5. 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度測定

パッチクランプ法と同様の細胞外液 (37°C) および蛍光 Ca<sup>2+</sup>指示薬 Fura-2 を用い, 340/380 nm 励起蛍光 (510 nm) の蛍光強度比の変化として細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を測定した。

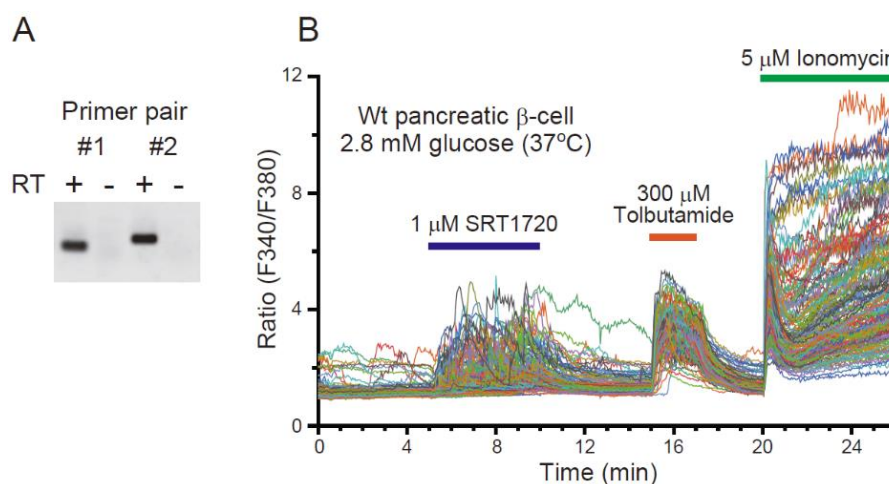
### 2. 6. 生化学実験

目的遺伝子を発現させた HEK293T 細胞を 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail (Nacalai) を含む Phosphate-Buffered Saline (SDS-PAGE) あるいは Tris-Buffered Saline (Phos-tag SDS-PAGE) で溶解後, 一般的なプロトコールによる共免疫沈降法, SDS-PAGE 法 および Phos-tag SDS-PAGE 法による電気泳動に供し, ウェスタンブロット法による解析を行った。

## 3. 研究結果

### 3. 1. 膵臓 $\beta$ 細胞における機能的 SIRT1 発現

RT-PCR 法により野生型膵臓 $\beta$ 細胞における SIRT1 mRNA 発現が検出された (図1A)。さらに, インスリン分泌を惹起しない低濃度グルコース (2.8 mM) 存在下, 野生型膵臓 $\beta$ 細胞への SRT1720 処置により顕著な Ca<sup>2+</sup>オシレーションの増大が確認され (図1B), SIRT1 活性化は遺伝子発現を介さない Ca<sup>2+</sup>シグナルへの即時的効果によってインスリン分泌亢進に寄与する可能性が示唆された。



## 図1 膵臓β細胞における機能的 SIRT1 発現

A;膵臓β細胞におけるSIRT1 mRNA発現,逆転写反応あり(RT+)において2種のプライマーペアによる遺伝子の増幅が認められた

B;膵臓β細胞を用いた細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定,低濃度グルコース存在下,37°CにおいてSIRT1活性化剤(SRT1720,1 μM)処置により顕著なCa<sup>2+</sup>オシレーションの増大が認められた Tolubutamide (K<sub>ATP</sub>阻害剤),Ionomycin(Ca<sup>2+</sup>イオノフォア)は陽性対照として使用した

### 3. 2. TRPM2/SIRT1 機能連関の分子基盤

#### 3. 2. 1. TRPM2/SIRT1 機能連関のTRPM2リン酸化による効率化機構

TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降実験を行ったところ,TRPM2とSIRT1の共免疫沈降が認められ,両者間に物理的相互作用が存在することが明らかとなった(図2A,B)。さらには,プロテインキナーゼC(PKC)の活性化および細胞膜へのトランスロケーションを惹起するホルボールエステル(PMA,100 nM,20 min)処置後,両分子の共免疫沈降に持続的な増加が認められた。一方でプロテインキナーゼAの活性化剤であるフォルスコリン(FK,10 μM,20 min)処置では持続的な共免疫沈降の増加は認められなかった。タンパクのリン酸化レベルに応じて移動度が低下する Phos-tag SDS-PAGE 法を用いて,同様の条件にて PMA および FK 処置によるリン酸化 TRPM2 および SIRT1 タンパク量の変化を検討したところ,SIRT1 のリン酸化レベルには変化が認められなかったが,TRPM2 のリン酸化レベルが PMA 処置により増加することが明らかとなった(図2C,D)。また,PMA 処置後6 hで認められるリン酸化 TRPM2 量の増加は,リン酸化セリン,スレオニン,チロシン残基を脱リン酸化するプロテインホスファターゼ(λPP)処置により完全に消失したことから,TRPM2 タンパク中のセリンあるいはスレオニン残基が PKC 活性によりリン酸化されていることが推察された(図2E)。

#### 3. 2. 2. SIRT1 活性による TRPM2 電流の活性化

TRPM2 および SIRT1 との間に物理的相互作用が存在することから,SIRT1 活性により産生される OAADPR を介した TRPM2 活性化が効率化されていると考えられる。したがって TRPM2/SIRT1 共発現 HEK2932T 細胞を用いたホールセルパッチクランプ測定により,SIRT1 活性による TRPM2 活性化を検討した。SIRT1 活性化剤である SRT1720(10 μM)処置による電流の活性化が認められ,その電流が TRPM2 阻害剤(Flufenamic acid)により抑制さ

れることが確認されたことから(図3),SIRT1 活性により TRPM2 が活性化していると考えられた。

#### 3. 2. 3. PKC による TRPM2 リン酸化部位の同定

TRPM2 の細胞内領域に存在する PKC リン酸化セリン,スレオニン残基候補を探索し,アラニン置換を導入した。PMA 処置によるリン酸化 TRPM2 量の変化を Phos-tag SDS-PAGE により検討したところ,スレオニン残基(T290)のアラニン置換によりリン酸化 TRPM2 の増加が消失したことから,T290 が PKC によるリン酸化部位候補として同定された(図4A)。ヒト TRPM2 の結晶構造解析の結果から,該当するスレオニン残基の立体構造配置を解析したところ,OAADPR と構造類似する内因性 TRPM2 リガンド ADPR の結合部位(TRPM2 の N 末端)に近接して位置することが明らかとなった(図4B)。

### 4. 考 察

本研究により,膵臓β細胞において SIRT1 が機能的に発現しており,SIRT1 の活性化が細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルを増強させることによりインスリン分泌を促進的に調節する可能性が示唆された。また,TRPM2 と SIRT1 分子間に物理的相互作用が存在するとともに,PKC の活性化により TRPM2 のリン酸化と物理的相互作用が顕著に増強することが明らかとなった。これらの機構により SIRT1 が産生する TRPM2 の内因性リガンド OAADPR による TRPM2 の活性化が効率化されていると考えられる。両者の物理的相互作用の増強は,TRPM2 リン酸化の上昇に続いて起こったことから,TRPM2 リン酸化が直接あるいは間接的に相互作用を上昇させていると考えられる。また,TRPM2 のリン酸化および物理的相互作用は,PMA 除去後も持続的に上昇したことから,TRPM2 活性による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇がポジティブフィードバック機構を形成していると考えられる。これらの結果より,PKC の活性化をもたらす種々の受容体の活性化により TRPM2 のリン酸化が起こることが,TRPM2 と SIRT1 の機能連関のスイッチとなっている可能

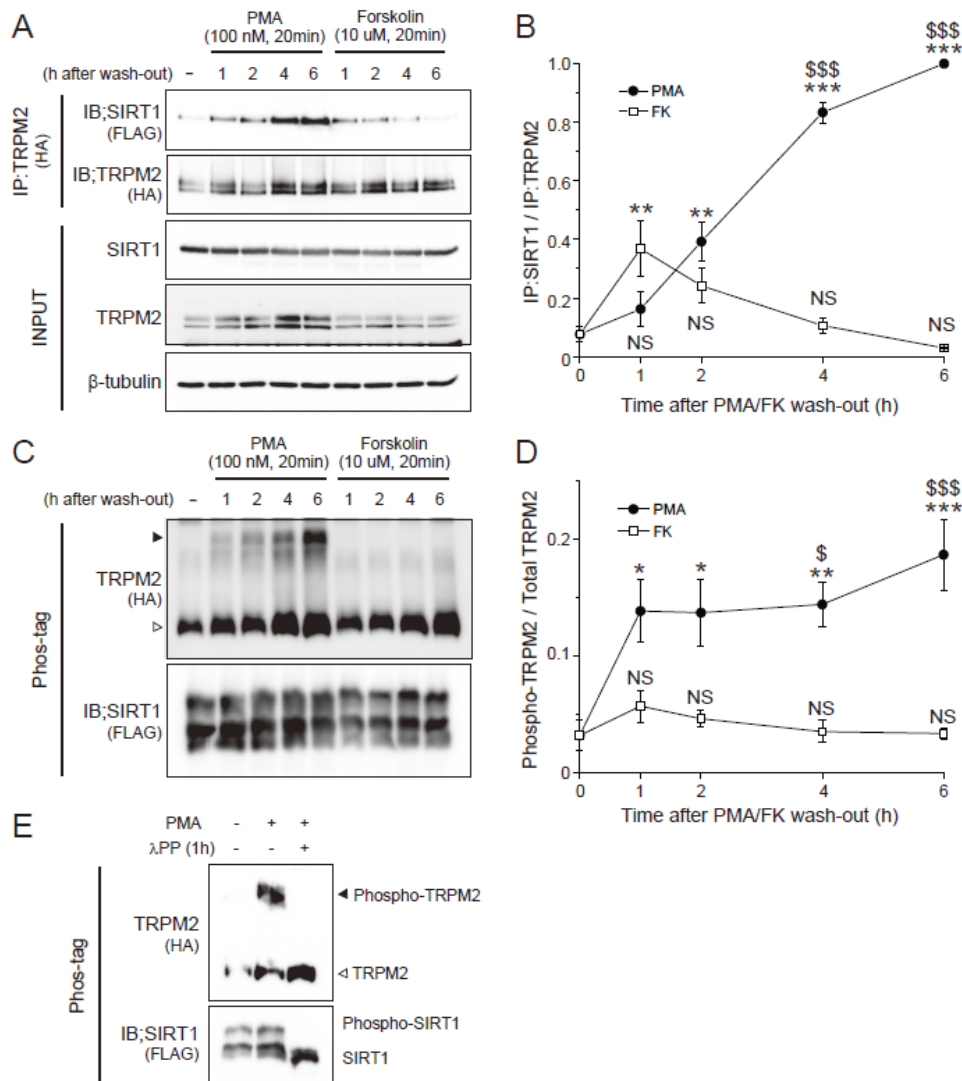


図2 TRPM2/SIRT1 物理的相互作用の TRPM2 リン酸化を介した増強作用

A; TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞を用いた共免疫沈降実験, 両者の共免疫沈降 (IP:TRPM2-IB:SIRT1) が PMA 処置により増加した B (定量化データ); N = 5, Mean ± S.E. PMA (6h) を1として標準化,  $^{NS}p \geq 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$  vs. 0h.  $^{$$$}p < 0.001$  vs. FK at corresponding time. C; TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞を用いた Phos-tag SDS-PAGE によるリン酸化タンパク検出, PMA 処置によりリン酸化 TRPM2 (黒三角) の量が上昇した, 白三角 (非リン酸化 TRPM2) D (定量化データ); N = 5, Mean ± S.E.  $^{NS}p \geq 0.05$ ,  $^{*}p < 0.05$ ,  $^{**}p < 0.01$ ,  $^{***}p < 0.001$  vs. 0h.  $^{§}p < 0.05$ ,  $^{$$$}p < 0.001$  vs. FK at corresponding time. E; TRPM2 および SIRT1 リン酸化への Lambda protein phosphatase (IPP) の効果 PMA 処置 (6h) を行った TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞のタンパク画分を IPP 処置 (1h), PMA 処置により増加したリン酸化 TRPM2 が IPP により完全に消失した

性が強く示唆される。本知見は、リン酸化による新たな体温下 TRPM2 活性調節機構を示唆するものであり、TRPM2 活性制御を目的とした薬理学的手法への応用が期待される。エネルギー通貨であるアデノシン三リン酸 (ATP) を産生し代謝調節の重要な場として働くミトコンドリ

アには、ATP 産生に関わる種々の酵素が存在する。そのうち TCA サイクルに関与するいくつかの酵素活性がミトコンドリア内腔の  $Ca^{2+}$  により活性増強<sup>[15]</sup>、細胞の代謝状態に応じた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇がミトコンドリア内腔に伝搬することで、細胞のエネルギー需要に対応して ATP 産生

を増加させる。先述の通り, SIRT1 は代謝関連遺伝子の発現調節を介してミトコンドリア代謝能を亢進させる。TRPM2 もまたミトコンドリア機能調節への寄与が報告されていることから<sup>116)</sup>, 代謝関連遺伝子の発現調節に加え, TRPM2/SIRT1 連関による TRPM2 活性を介して供給される  $\text{Ca}^{2+}$  がミトコンドリア機能調節に寄与し, 代謝調節に重要な働きを持つ可能性も示唆される。

## 5. 今後の課題

TRPM2 リン酸化による TRPM2/SIRT1 機能連関の効率化について, 引き続き電気生理学的手法による機能評価を行う。また, TRPM2/SIRT1 機能連関によるミトコンドリア機能調節 (ATP 産生能, ミトコンドリア酸素消費量等) とともに, 膵臓β細胞インスリン分泌能調節機構を検討する。本研究で得られた成果を更に発展させることで, 体温センサー TRPM2 チャンネルと代謝センサー SIRT1 が関わる代謝・インスリン分泌調節機構を明らかにしたい。

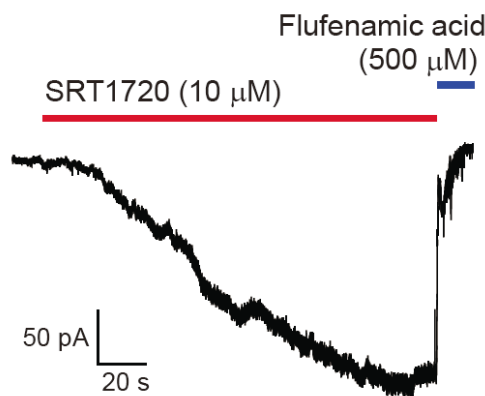


図3 SIRT1 活性化剤 (SIRT1720) による TRPM2 電流の活性化

TRPM2/SIRT1 共発現 HEK293T 細胞ホールセルパッチクランプ測定 ( $V_m = -60\text{mV}$ ), SIRT1720 (10 mM) 処置により活性化した電流が TRPM2 阻害剤 (Flufenamic acid, 500 mM) により抑制された

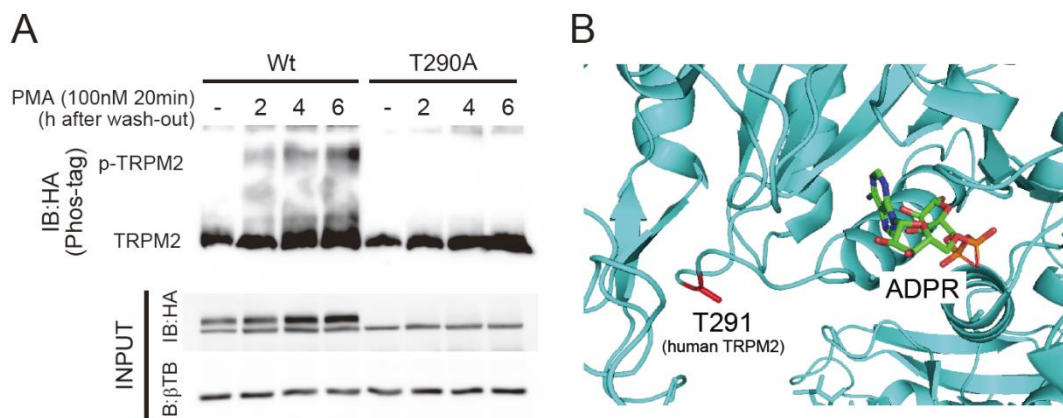


図4 PKC による TRPM2 リン酸化部位の同定

A; スレオニン残基 (T290) のアラニン置換により PMA 処置によるリン酸化 TRPM2 (p-TRPM2) の増加が消失した  
B; ヒト TRPM2 の T291 残基 (マウスの T290 に相当) と内因性 TRPM2 リガンド ADPR 結合部位の立体構造配置

## 6. 文献

- [1] Sumoza-Toledo, A. and Penner, R. (2011). TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling. *The Journal of physiology* 589, 1515-25.
- [2] Perraud, A.L. et al. (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* 411, 595-9.
- [3] McHugh, D., Flemming, R., Xu, S.Z., Perraud, A.L. and Beech, D.J. (2003). Critical intracellular Ca<sup>2+</sup> dependence of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel activation. *The Journal of biological chemistry* 278, 11002-6.
- [4] Kashio, M. and Tominaga, M. (2017). The TRPM2 channel: A thermo-sensitive metabolic sensor. *Channels (Austin)*, 1-8.
- [5] Kashio, M., Sokabe, T., Shintaku, K., Uematsu, T., Fukuta, N., Kobayashi, N., Mori, Y. and Tominaga, M. (2012). Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 6745-50.
- [6] Kashio, M. and Tominaga, M. (2015). Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets. *The Journal of biological chemistry* 290, 12435-42.
- [7] Tan, C.H. and McNaughton, P.A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536, 460-3.
- [8] Song, K., Wang, H., Kamm, G.B., Pohle, J., Reis, F.C., Heppenstall, P., Wende, H. and Siemens, J. (2016). The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* 353, 1393-1398.
- [9] Ota, W., Nakane, Y., Kashio, M., Suzuki, Y., Nakamura, K., Mori, Y., Tominaga, M. and Yoshimura, T. (2019). Involvement of TRPM2 and TRPM8 in temperature-dependent masking behavior. *Sci Rep* 9, 3706.
- [10] Faouzi, M. and Penner, R. (2014). Trpm2. *Handb Exp Pharmacol* 222, 403-26.
- [11] Canto, C. et al. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056-60.
- [12] Mitchell, S.J. et al. (2014). The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet. *Cell Rep* 6, 836-43.
- [13] Bordone, L. et al. (2006). Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 4, e31.
- [14] Grubisha, O., Rafty, L.A., Takanishi, C.L., Xu, X., Tong, L., Perraud, A.L., Scharenberg, A.M. and Denu, J.M. (2006). Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel. *J Biol Chem* 281, 14057-65.
- [15] Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 566-78.
- [16] Miller, B.A. et al. (2014). TRPM2 channels protect against cardiac ischemia-reperfusion injury: role of mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 289, 7615-29.

## Body Temperature Sensor, TRPM2, Involving in the Regulation of Metabolism.

Makiko Kashio

Aichi Medical University, Department of Physiology

### Summary

TRPM2 is a thermosensitive non-selective cation channel expressed in various tissues including brain, spleen and pancreatic  $\beta$ -cells where TRPM2 is continuously affected by core body temperature. TRPM2 activity at body temperature could be regulated along with metabolic state because its activity is affected by intracellular factors reflecting cellular metabolism such as  $\text{NAD}^+$  metabolites,  $\text{Ca}^{2+}$  and redox signal. Therefore, TRPM2 is suggested to function as body temperature/metabolic sensor.

Additional metabolic sensor, SIRT1, is a  $\text{NAD}^+$ -dependent enzyme to regulate energy homeostasis and longevity, etc. Because SIRT1 generates o-acetyl adenosine diphosphate ribose (OAADPR), a TRPM2 activator, along with its enzymatic activity, this study has focused functional coupling of TRPM2/SIRT1, and their involvement in the regulation of metabolism and b-cell functions.

Pancreatic  $\beta$ -cells functionally express SIRT1, and SIRT1 activator (SRT1720) enhances  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation in  $\beta$ -cell, suggesting that SIRT1 activity elevates insulin secretion. Immunoprecipitation studies have clarified physical interaction between TRPM2 and SIRT1 which is enhanced by phorbol ester (PMA)-treatment. Analysis of phosphoproteins using phos-tag SDS-PAGE has shown that PMA-treatment also increases TRPM2 phosphorylation, suggesting that PKC-mediated phosphorylation of TRPM2 enables effective coupling of TRPM2 and SIRT1. Moreover, whole-cell patch-clamp study has revealed TRPM2 activation by SRT1720.

These results indicate PKC activation down stream of several receptor activation could modify TRPM2 activity at body temperature. Future studies will reveal the physiological functions of TRPM2/SIRT1 coupling in the regulation of metabolism and insulin secretion.