

氏 名 富樫 和也

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 973 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body
temperature is involved in insulin secretion

論文審査委員 主 査 教授 井本 敬二
教授 富永 真琴
教授 岡田 泰伸
教授 矢田 俊彦(自治医科大学)

論文内容の要旨

題目：TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion

これまで哺乳類においては 8 種類のイオンチャネル型温度受容体が報告されている。これらは全て TRP (transient receptor potential) スーパーファミリーに属しており、カプサイシン受容体 TRPV1 と相同性の高い TRPV サブファミリーの 4 種 (TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4)、メンソールの受容体でもある TRPM8 の属する TRPM サブファミリー 3 種 (TRPM4、TRPM5、TRPM8) およびアリルイソチオシアネート (ワサビの辛み成分) の受容体でもある TRPA1 である。本研究の開始当初、TRPV サブファミリーは詳しく解析が進んでいたが、TRPM サブファミリーの多くはチャネル分子の遺伝子配列以外、生体内の分布、機能さえも未知のままとなっていた。このような背景から、冷刺激受容体の一つである TRPM8 の属する TRPM ファミリーに焦点を当て、細胞の近傍を 0~60°C まで任意の温度に制御可能なパッチクランプ装置及び細胞内 Ca^{2+} イメージングのシステムを構築し、これを用いて新規温度受容体の探索を行った。HEK293T 細胞を用いた強制発現系で、電気生理学的手法を中心に温度受容体としての機能を解析した結果、TRPM2 は熱単独で活性化される温度受容体であることが明らかとなった。これまでに TRPM2 は β -NAD⁺、ADP-ribose (以下 ADPR) および過酸化水素などの酸化ストレスによって活性化することが知られている。また、既に報告のある温度受容体ではリガンド存在下で温度刺激を加えたとき、リガンド単独刺激よりも著しく活性が増強され、温度閾値が変化することも報告されている。これらの事実を踏まえ、TRPM2 において同様の実験を行ったところ、 β -NAD⁺、ADPR 存在下では TRPM2 の電流応答が著しく増強されることが観察された。更に、これまでの報告では β -NAD⁺ の代謝産物である cyclic ADP-ribose (以下 cADPR) は TRPM2 を活性化しないとされていたが、37°C の温刺激を加えると β -NAD⁺ や ADPR と同時に熱を加えた場合と同等の活性化がもたらされることも発見した。近年、cADPR は細胞内カルシウムシグナルカスケードにおいて重要な役割を果たす物質として注目を集めているが、小胞体膜上のリアノジン受容体に作用する可能性が示唆されている。しかし、明らかな標的分子は未だ報告されていない。本研究は細胞膜上で cADPR 受容体として機能する分子を初めて明らかにした。TRPM2 のチャネルレベルの分子機構は以上のように解明されたが、これまで TRPM2 の生体内の分布は mRNA レベルのみでその生理的な役割についてもほとんど報告されていない。このため、マウスに対して免疫組織学的手法を用いて組織レベルでの発現分布を調べた。既知の温度受容体は全て感覚神経や皮膚、視床下部体温調節中枢、舌の味細胞といった外界からの温度刺激を直接検出する部位に発現するのに対し、TRPM2 は膵ランゲルハンス島に強く発現することを見いだした。更に、ランゲルハンス島における TRPM2 陽性細胞はインスリン陽性細胞と一致し、グルカゴン陽性細胞とは一致しないことを明らかにした。これを受けてラットインスリンノーマ細胞株 RIN-5F 細胞を用いた系で電気生理学的手法により解析したところ、 β -NAD⁺、ADPR のみならず、熱単独刺激および、温熱刺激下の cADPR 刺激に対して HEK293T 細胞と同様の応答が観察された。そこで更に詳細な生理的役割の解明に近づくため、ラット膵島の初代培養系で実験を試みた。細胞内 Ca^{2+} イメージング法を用いて熱刺激を加えたところ、膵島細胞の約 50% に熱感受性があることを見いだした。この値は免疫細胞染色において TRPM2 とインスリンに共に陽性な細胞の割合と一致することか

ら、熱感受性のある膵島細胞は TRPM2 陽性細胞であることが示唆される。cADPR はインスリン分泌にも関与する Ca^{2+} シグナルのセカンドメッセンジャーであることが示唆されているが、膵 β 細胞においてその標的分子は明らかになっていない。また、cADPR とは別に、膵島のグルコース負荷試験を室温で行うとインスリンの分泌量が著しく減少することが以前から知られている。本研究における結果とこれらの報告に鑑みて、膵 β 細胞におけるインスリン分泌には体温下での cADPR による TRPM2 の活性化が強く関与していることが示唆された。これを受け、ラット膵島を用いてグルコース負荷試験によるインスリン分泌を定量したところ、インスリン分泌の温度依存性が確認された。更に TRPM2 に対する特異的な siRNA (以下 siTRPM2) を導入した膵島ではこの温度依存性のインスリン放出が有意に抑制された。しかしながら、膵臓は恒常的深部に体温に暴露されているため、環境温度の変化に依存したインスリン放出は考えにくい。そこで温度変化に依存しない TRPM2 の活性化機構を追求した。これまで主要なインスリン分泌機構として K_{ATP} チャネル-電位作動性 Ca^{2+} チャネルを介した経路の存在が知られているが、この経路で重要な役割を担うチャネルをそれぞれノックアウトしてもそれほど深刻な糖尿病は引き起こさないことが報告されている。これは K_{ATP} チャネル経路以外のインスリン分泌機構の存在を示唆するものであるが、その一つとして cAMP 依存的経路が報告されている。そこで K_{ATP} チャネル-電位作動性 Ca^{2+} チャネル系を薬理的に遮断した状態で cAMP を賦活し、TRPM2 の関与を調べた。この結果、細胞内 cAMP 濃度を上昇させた場合、一般的なグルコース負荷試験と同様の条件下においても siTRPM2 を導入した膵島では細胞内 cAMP 濃度の上昇によるインスリン分泌が有意に抑制された。以上のことから、TRPM2 は K_{ATP} チャネル-電位作動性 Ca^{2+} チャネル系非依存的、かつ cAMP 依存的にインスリン分泌を担っていることが明らかとなった。HEK293T 細胞を用いた強制発現系で、cADPR と温刺激の同時刺激を行ったところ、TRPM2 の電流応答はフォルスコリン投与により、更に著しく増大することも観察された。しかも、この増強は PKA の阻害剤で消失するという結果が得られたことから、上記の cAMP 依存的なインスリン放出には TRPM2 の PKA を介したリン酸化が関与していることが示唆される。これまで、cADPR の産生酵素の一つである CD38 に対し自己抗体を産生する自己免疫疾患の患者は糖尿病を発症することが知られている。CD38 は $\beta\text{-NAD}^+$ から cADPR または ADPR の産生を触媒する 2 種類の活性を兼ね備えた酵素である。このため、CD38 の異常によって起こる糖尿病は β 細胞内 cADPR 産生能低下によるものと考えられる。現在までのところ、TRPM2 の変異による糖尿病の報告はないが、以上のような TRPM2 の機能に異常を来す変異体が存在する場合、インスリン分泌の異常、即ち糖尿病の原因となりうることも示唆される。よって本研究は糖尿病の新たな分子機構の解明に寄与するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

TRP (transient receptor potential) は、元々シヨウジョウバエ網膜で同定されたカルシウム透過性非選択性カチオンチャネルであり、類似のチャネル蛋白がこれまでに多く同定され、TRP スーパーファミリーを構成していることが知られている。これらの蛋白は、様々な刺激に対するセンサーとして機能することが明らかとなってきており、なかでも温度に対して8種類のTRPメンバーが強い感受性を示す。TRPチャネルメンバーの生理的機能は徐々に明らかになりつつあるが、比較的最近発見されたTRPMサブファミリーのメンバーに関しては、生理的意義を含め多くの点が未解明である。本研究では、TRPMサブファミリーのメンバーであるTRPM2について、チャネル・センサー特性を解析するとともにその生理的機能の検討を行った。

TRPM2はこれまでの研究により、 β -NAD⁺、ADP-ribose (以下ADPR) および過酸化水素などの酸化ストレスによって活性化することが知られていた。同じサブファミリーに属するTRPM8が冷刺激感受性を有することから、TRPM2の温度感受性をパッチクランプ法とCa²⁺イメージングにより検討した。その結果、TRPM2は37°C付近の温刺激単独で活性化されること、温刺激により β -NAD⁺、ADPRに対するTRPM2の電流応答が著しく増強されること、また温刺激とともに与えると室温では活性化を起さないと報告されていたcyclic ADP-ribose (以下cADPR)によりTRPM2が活性化することが示された。

免疫組織学的手法を用いてTRPM2の発現分布を調べたところ、TRPM2は膵ランゲルハンス島インスリン陽性細胞に強く発現することが見いだされた。ラット由来インスリノーマ細胞株RIN-5F細胞でもTRPM2が発現しており、 β -NAD⁺、ADPRのみならず、熱単独刺激および、温熱刺激下のcADPR刺激に対して応答が観察された。更にラット膵島の初代培養系では、膵島細胞の約50%に熱感受性があり、TRPM2に対する特異的なsiRNA (以下siTRPM2)を導入した膵島ではこの温度依存性のインスリン放出が有意に抑制された。主要なインスリン分泌機構としてK_{ATP}チャネル-電位作動性Ca²⁺チャネルを介した経路がよく知られているが、その他にcAMP依存的経路が報告されている。K_{ATP}チャネル-電位作動性Ca²⁺チャネル系を薬理的に遮断した条件で、cAMP依存的経路はsiTRPM2により有意に抑制された。

以上の結果より、TRPM2が温度感受性を有し、膵 β 細胞に発現してインシュリン分泌に関与していることが示された。インシュリン分泌にcADPRがどの程度関与しているかは議論のあるところであるが、本研究が示したTRPM2がcADPRの標的分子であるという事実は、この分野の研究に新たな展開を惹起するものと期待される。

本論文は、未だ未解明の点が多いTRPMファミリーのTRPM2に関して、温度感受性、cADPR感受性のみならず、インシュリン分泌への関与という臨床的にも極めて重要な実験結果を報告するものであり、優れた論文であると結論付けられる。よって、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。