

総説

温度感受性 TRP チャネルと亜鉛による制御

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門 富永真琴

要 約

TRP チャネルは様々な細胞で細胞外センサーとして機能し、ヒトに存在する 6 サブファミリー 27 の TRP チャネルのうち 11 (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5) は、温度によって活性化することから温度感受性 TRP チャネルと呼ばれている。この 11 の温度感受性 TRP チャネルのうち、カプサイシン受容体 TRPV1, ワサビ受容体 TRPA1, 温かい温度で活性化する TRPM2, TRPM5 は亜鉛による活性制御が報告されている。TRPM5 について、私たちは亜鉛によって TRPM5 活性化が抑制される (IC_{50} $4.3 \mu M$) ことを明らかにし、その抑制に関わる 3 つのアミノ酸残基を同定した。温度感受性 TRP チャネルは様々な生理機能に関わることが明らかにされつつあり、その生理機能と亜鉛イオンによる制御との研究の進展が期待される。

KEY WORDS 亜鉛, 温度感受性 TRP チャネル, TRPV1, TRPA1, TRPM2, TRPM5

はじめに

細胞は、それを取り巻く環境の変化の中で、その環境情報を他のシグナルに変換し、細胞質・核や周囲の細胞に伝達することによって環境変化にダイナミックに対応している。さらに、細胞で得られた感覚情報は生物個体の生存適応に必要不可欠な個体の感覚情報へと統合される。特に、視覚、聴覚、味覚、嗅覚等では細胞で得られる感覚情報はそのまま個体の感覚情報となる。細胞外環境情報は大きく化学物質情報と物理情報に分けられており、化学物質にはイオン、アミノ酸、蛋白質、脂質等に加えて、匂い、フェロモン、味物質などの低分子有機化合物からガス(一酸化窒素や二酸化炭素)にいたるまで多岐にわたる物質が含まれ、物理情報には電位変化、容積変化、光、浸透圧、

機械刺激、温度刺激等が含まれる。細胞外環境に直接接する膜蛋白質は細胞膜センサーとして細胞感覚に重要な役割を果たしているが、特に TRP チャネルは化学物質刺激・物理刺激のセンサーとして注目を浴びている。

trp 遺伝子は 1989 年にショウジョウバエの光受容応答変異株の原因遺伝子として発見され、*trp* 変異株において光刺激に対する受容器電位 (receptor potential) 変化が一過性 (transient) であることから命名された。*trp* がコードする蛋白質 (TRP) の多くはカルシウム透過性の高い非選択性陽イオンチャネルを形成している。遺伝子解析の結果、図 1 に示すように多くの TRP ホモログが同定され、TRP イオンチャネルスーパーファミリーは 7 つのサブファミリー: TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV

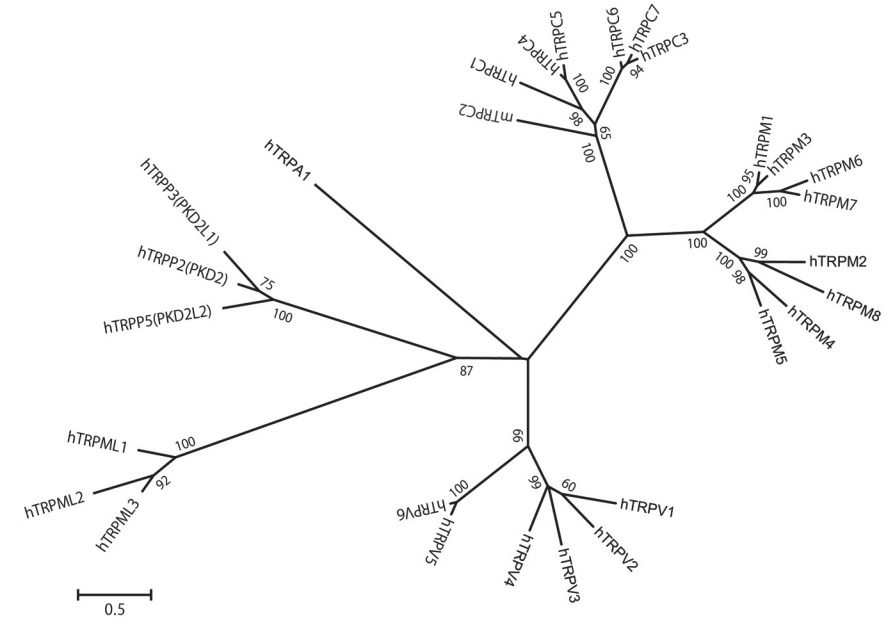


図 1 ヒト TRP チャネルの分子系統樹

アミノ酸置換数を JTT 法により推定し、最小進化法により分子系統樹を作成した。各枝の数値は統計的な信頼性 (ブートストラップ値) を表している。ヒトでは TRPC2 が偽遺伝子となっているので、マウス TRPC2 を用いた。scale: 遺伝的距離 (アミノ酸置換率)。

表 1 温度感受性 TRP チャネルの発現部位、有効刺激と亜鉛による制御

	発現部位	主な活性化刺激 (温度以外)	亜鉛の効果
TRPA1	主に感覚神経	アリルイソチオシアネート (ワサビ)、シナモアルデヒド (シナモン)、アクロレイン (タバコの煙) 等の侵害刺激	活性化
TRPV1	感覚神経ほか	カプサイシン, プロトン, 43 度以上の熱刺激等の侵害刺激	抑制
TRPM2	感覚神経, 脳神経, 睪臓, マクロファージほか	cADP, cADPR, 細胞内 Ca^{2+}	抑制
TRPM5	睪臓, 味細胞ほか	細胞内 Ca^{2+}	抑制

(vanilloid), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin), TRPA (ankyrin), TRPN (nompC) に分けられるが、哺乳類には TRPN サブファミリーはなく 28 のチャネルが、そしてヒトでは TRPC2 が偽遺伝子となっており 27 のチャネルが 6 つのサブファミリーを構成している²⁾ (図 1)。

それまで「カルシウム・ナトリウム透過性チャ

ネル」と電気生学的に括られていた一群のチャネルの分子実体が明らかになったことで、その生理的意義が細胞、種を越えて議論できるようになってきた。カルシウム透過性が高いためにチャネル開口によるカルシウム流入が細胞内の様々なカルシウム依存性経路を活性化し、神経細胞においては脱分極から細胞興奮をもたらす。特に、感覚神

経では侵害刺激を受容する(侵害刺激を電気信号に変換する)最も簡単で有効なメカニズムは陽イオンの流入がもたらす脱分極によって電位作動性ナトリウムチャネルを活性化させて活動電位を発生させることであり、その陽イオンの流入を司る陽イオン透過性のイオンチャネルの中心的分子群の1つがTRPイオンチャネルである⁴⁾。そして、11のTRPチャネル(TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5)に温度感受性があることが報告されている(表1)。

1. TRPV1

1997年に遺伝子クローニングされたトウガラシの主成分であるカプサイシンの受容体TRPV1は、主に無髄のC線維に発現しており、カプサイシンと同様に痛みを惹起する熱や酸(プロトン)によっても活性化する⁴⁾。このTRPV1の性質はカプサイシン感受性の侵害受容神経が複数の刺激に応答する(polymodal nociceptors)ことと合致する。TRPV1の熱による活性化の温度閾値は約43度で生体に痛みを引き起こす温度閾値とほぼ一致している。カプサイシン、プロトン、熱という3つのTRPV1の有効刺激に加えて、複数のTRPV1の内在性リガンドの候補が報告されている。TRPV1を発現した細胞を用いた電気生理学的解析に加え、TRPV1欠損マウスの行動解析によって個体レベルでもTRPV1が複数の侵害刺激の受容体として機能していることが確認されているが、TRPV1欠損マウスの最も顕著な表現型は熱性痛覚過敏の減弱であり、TRPV1が炎症性疼痛の発生に強く関わっていることと合致する。TRPV1を介して流入したCa²⁺が複合体を形成するCa²⁺活性化クロライドチャネルanoctamin 1を活性化してクロライドイオン流出からさらなる脱分極を引き起こすことが明らかになっており、新たな痛み増強メカニズムとして注目されている¹⁰⁾。2013年に低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析からTRPV1のほぼ全体の構造が3.4Åの解像度で明らかにされた⁷⁾。さらに、2016年には脂

質nanodisc内での構造が明らかにされ、温度によるチャネル開口に膜脂質が関与するモデルが提唱されている¹⁾。ラットの気管支に分布するTRPV1の酸による活性化が亜鉛によって抑制されるとする報告がある¹⁵⁾(表1)。

2. TRPA1

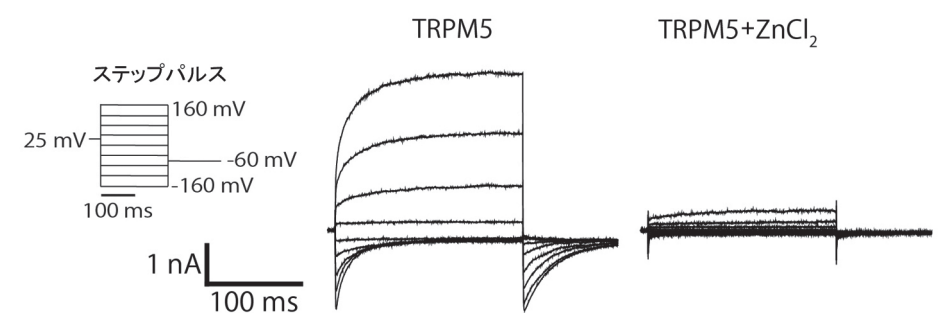
17度以下の侵害性冷刺激によって活性化される新たな温度感受性TRPチャネルとして2003年に報告されたTRPA1は、主に感覚神経細胞に発現しTRPV1との共発現が観察され、侵害刺激受容に深く関わっている⁴⁾。また、マスタード、シナモン、生ニンニクの成分であるそれぞれallyl isothiocyanate, cinnamaldehyde, allicinなどによってTRPA1が活性化されることが報告された。このことはマスタードオイル等による炎症や熱性痛覚過敏の発症のメカニズムとして考えられる。加えて、tetrahydrocannabinol(THC)、2-APB, acrolein, formaldehyde等のaldehydes, methyl paraben, Ca²⁺イオンなど非常に多くの物質によって活性化することが報告されている。その多くは痛みを惹起する物質として知られており、TRPA1が侵害刺激受容に関与することは明らかである。最近ではヒスタミン非依存性の痒みの発生やオキサリプラチンのような抗がん剤による痛みにも関与することが報告されている。TRPA1が侵害刺激受容体として機能することは、TRPA1欠損マウスの行動解析によっても確かめられている。しかし、明らかになったTRPA1刺激物質は冷感をもたらさない。また、TRPA1が冷刺激によって活性化しないとする報告もあり、TRPA1欠損マウスの解析からもTRPA1の冷刺激感受性に結論は得られていない。昆虫から鳥類までのTRPA1は熱センサーとして機能する⁸⁾。亜鉛イオンはTRPA1チャネルのポアを通過して細胞内に流入し、細胞内ドメインに結合してTRPA1を活性化することが明らかになっている³⁾。亜鉛による疼痛のメカニズムの一つと考えられる(表1)。

3. TRPM2

TRPM2は種々の温度依存的な生理応答に重要であり²⁾、さらに、最近、感覚神経や視床下部神経に発現するTRPM2が温かい温度感知やそれに基づく生理機能に関わることが報告されて注目を浴びている^{9,11)}。TRPM2はカルボキシル末端に刺激物質 β -NADやADPリボースの結合部位があり、温度とリガンドの同時刺激で活性が増強する。膵臓の細胞では深部体温下で常に活性化し、インスリン分泌に寄与することが示されており、TRPM2欠損マウスは耐糖能異常を示す¹²⁾。TRPM2欠損マウスでは、小腸から分泌されるインスリン放出を促すインクレチンホルモンによる膵臓からのインスリン分泌が阻害されており、膵臓の機能に大きく関わることは明らかになっている。TRPM2は、レドックス感受性を持つTRPチャネルのひとつであるが、リンパ球からミクログリアまで免疫細胞に広く発現することから、炎症との関連が数多く報告されている。私たちはこれまでに、過酸化水素がアミノ末端のメチオニン残基(Met214)を酸化してTRPM2の活性化温度閾値を低下させて熱刺激に対する応答性を増強させることを明らかにした⁵⁾。つまり、活性酸素が産生

される炎症環境においては、TRPM2チャネルが体温レベルの温度で活性化することになることで細胞内のカルシウム濃度を上昇させて免疫応答を増強すると考えられる。実際に、TLR2リガンドであるザイモサン刺激で惹起されるサイトカイン遊離はTRPM2欠損マクロファージで減弱しており、ザイモサン貪食能もTRPM2の発現と温度に依存して増強した。炎症は血管拡張による局所温度の上昇を伴うが、炎症部位の冷却が症状の軽減に有効であることはこの現象からも理解しやすい。また、マクロファージに発現するTRPM2は、ケモカイン遊離およびそれに伴う炎症部位への好中球の遊走を亢進すること、脊髄ミクログリアに発現するTRPM2の活性が炎症性疼痛モデルおよび神経障害性疼痛モデルにおいて機械刺激痛覚過敏を増悪させることが示されている。一方で、TRPM2は活性酸素の産生を抑制するネガティブフィードバック機構にも関わることを報告されていることから、レドックスシグナルとTRPM2機能が協調的に免疫機能を調節しており、そのバランスの破綻が炎症の慢性化に関わると思われる。このTRPM2のレドックスセンサーとしての機能は、膵臓でのグルコース依存性のインスリン放出にも関わっている⁶⁾。TRPM2チャネル活性

図2 TRPM5チャネル電流のZnCl₂による抑制



HEK293細胞に発現させたmouse TRPM5のステップパルスによる電流(ステップパルスプロトコールは左に示す)は、25度で20 μ M ZnCl₂によって著しく抑制された。細胞内Ca²⁺ 500nM。

は細胞外から亜鉛によって抑制されると報告されている¹⁴⁾(表1)。

4. TRPM5

TRPM5 は 15 ～ 35 度の温度帯で活性が上昇する²⁾。活性化には温度に加えて細胞内 Ca^{2+} の上昇 (500nM 以上) が必須である。TRPM5 チャネルは Na^{+} 透過性があるが、 Ca^{2+} を通さない。TRPM5 欠損マウスもインスリン分泌が障害されて耐糖能異常を示すことが知られている。また、TRPM5 は II 型味細胞に発現が見られ、TRPM5 欠損マウスでは甘味応答の温度依存的増強が見られなかったことから、「温かいと甘味が増す」現象に味覚受容体下流での TRPM5 活性化が関わっていると考えられている。しかし、ヒト疾患での TRPM5 遺伝子異常は明らかになっていない。

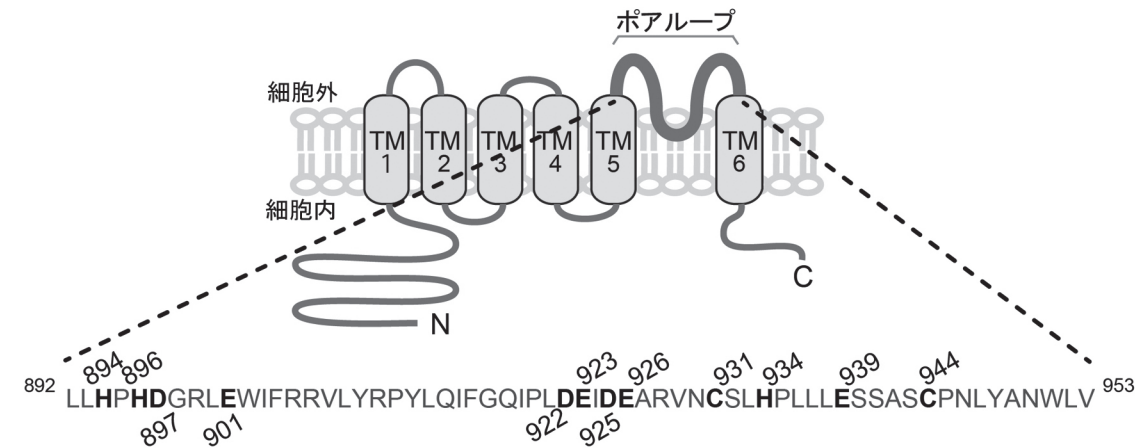
HEK293 細胞に発現させた TRPM5 電流は 20 μM の細胞外亜鉛イオンによってほぼ完全に抑制された¹³⁾(表1)(図2)。この亜鉛による

TRPM5 電流の抑制は電位依存性がなく、-80 mV で観察される TRPM5 電流抑制の IC_{50} 値は 4.3 μM であった。TRPM5 のチャネル活性は温度上昇に伴って増強したが、その増強も亜鉛によって著しく抑制された(図3)。細胞外のマイナス電荷をもつアミノ酸に作用すると推定して点変異体を用いて解析したところ、TRPM5 のポアリングにある His896, Glu926, Glu939 が亜鉛による抑制に関わることが明らかとなった(図4)。TRPM5 は、味覚のみならず膵臓からのインスリン放出等、さまざまな生理機能に関わることが報告されており、それら生理機能と亜鉛との関連の解析が待たれる。

おわりに

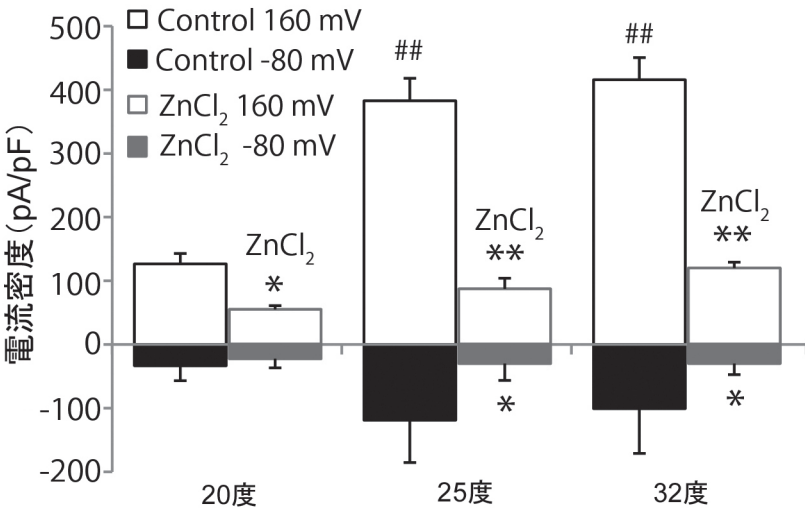
温度感受性 TRP チャネルは様々な生理機能に関わることが明らかにされつつあり、その生理機能と亜鉛イオンによる制御との研究の進展を願っている。

図4 ZnCl_2 による TRPM5 抑制に関わるポアリングのアミノ酸



TRPM5 の膜トポロジーモデルとポアリング (第 5,6 膜貫通ドメイン間の細胞外ループ) のアミノ酸配列。ヒスチジン 896, グルタミン酸 926, グルタミン酸 939 が亜鉛による TRPM5 抑制に関与する。TM (trans membrane)

図3 複数の温度における TRPM5 チャネル電流の ZnCl_2 による抑制



HEK293 細胞に発現させた mouse TRPM5 のステップパルスによる電流は、20 度、25 度、32 度において電位非依存的に 30 μM ZnCl_2 によって著しく抑制された。(-80mV と +160mV での抑制を示す)。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs. Control. ##, $p < 0.01$ vs. 20 $^{\circ}\text{C}$ 。細胞内 Ca^{2+} 500nM。

◆文 献

1) Gao Y, Cao E, Julius D, et al : TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. Nature 534 : 347-351, 2016

2) Gees M, Owsianik G, Nilius B, et al : TRP channels. Comp Physiol 2 : 563-608, 2012

3) Hu H, Bandell M : Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. Nat Chem Biol. 5 : 183-190, 2009

4) Julius D : TRP channels and pain. Annu Rev Cell Dev Biol 29 : 355-384, 2013

5) Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, et al : Redox signal-mediated sensitization of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. Proc Natl Acad Sci USA 109 : 6745-6750, 2012

6) Kshio M, Tominaga M : Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets. J Biol Chem 290 : 12435-12442, 2015

7) Liao M, Cao E, Julius D, et al : Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. Nature 504 : 107-112, 2013

8) Saito S, Tominaga M : Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. Cell Calcium 57 : 214-221, 2015

9) Song K, Wang H, Kamm GB, et al : The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. Science 353 : 1393-1398, 2016

10) Takayama Y, Uta D, Furue H, et al : Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. Proc Natl Acad Sci USA 112 : 5213-5218, 2015

11) Tan CH, McNaughton PA : The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. Nature 536 : 460-463, 2016

12) Uchida K, Tominaga M : The role of TRPM2 in pancreatic beta-cells and the development of diabetes. Cell Calcium 56 : 332-339, 2014

13) Uchida K, Tominaga M : Extracellular zinc ion regulates TRPM5 activation through its interaction with a pore loop domain. J. Biol. Chem. 288 : 25950-25955, 2013

14) Yang W, Manna PT, Zou J, et al : Zinc inactivates melastatin transient receptor potential 2 channels via the outer pore. J Biol Chem. 286 : 23789-23798, 2011

15) Vysotskaya ZV, Moss CR, Gu Q : Differential regulation of ASICs and TRPV1 by zinc in rat bronchopulmonary sensory neurons. Lung. 192 : 927-934, 2014

Regulation of TRP channel function by zinc

Makoto Tominaga

Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience
(National Institute for Physiological Sciences), National Institutes of Natural Sciences

The transient receptor potential (TRP) channel superfamily includes a large number of proteins that constitute 7 subfamilies (TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPN, TRPA and TRPP), and there are 27 ion channels in 6 families in humans. These channels have been strongly conserved evolutionarily. The family was first cloned from a mutant Drosophila strain in which receptor potentials in the eye were transient upon light stimulation. Some of the TRP channels respond to a wide variety of sensory stimuli, including chemicals and temperature changes. Thus, they are termed “thermosensitive” TRP channels (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5). Among the 11 thermosensitive TRP channels, TRPV1, TRPA1, TRPM2, TRPM5 are known to be regulated by Zn^{2+} . TRPA1 is activated by zinc while TRPV1, TRPM2 are inhibited by Zn^{2+} . TRPM5 channel is a monovalent cation channel activated by intracellular Ca^{2+} , and was inhibited by physiological concentrations of extracellular Zn^{2+} . The inhibition involves His896, Glu926 and Glu939 in the pore loop between the 5th and 6th transmembrane doamins. Zn^{2+} is a TRPM5 inhibitor and the inhibition might be related to its physiological functions.

Key words : zinc, thermosensitive TRP channel, TRPV1, TRPA1, TRPM2, TRPM5

◆富永真琴略歴

1984 年	愛媛大学医学部卒業，京都大学附属病院内科 研修医，浜松労災病院循環器内科医
1992 年	京都大学大学院医学研究科博士課程修了
1993 年	自然科学研究機構生理学研究所助手
1996 年	カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士 研究員
1999 年	筑波大学基礎医学系講師
2000 年	三重大学医学部教授（生理学第一講座）
2004 年	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンス センター（生理学研究所）教授