



温度・化学刺激を感知するタンパク質の測定技術の開発 - TRP チャンネルを標的とした創薬に貢献 -

【発表のポイント】

- 細胞膜に存在する温度・化学刺激センサーの TRP チャンネルが活性化されると、細胞内のシグナル伝達を通じて膜貫通タンパク質 TGF α ^(注1)の細胞外ドメインが切断される現象を見出しました。
- この現象を利用して、TRP チャンネルに作用する化合物の効力を簡便に測定する手法を確立しました。
- 本手法を活用することで、TRP チャンネルを標的とした創薬に貢献することが期待されます。

【概要】

TRP チャンネルは、細胞膜に存在するイオンチャンネルであり、温度や機械刺激、化学物質の刺激により活性化型へと構造変化します。これにより細胞膜を貫通する穴（チャンネル）が開いて、カルシウムイオンなどの陽イオンが細胞内へと流入し、様々な細胞応答が生じます。TRP チャンネルは、多くの組織に分布しますが、特に神経細胞に高発現しており、痛みや温度の知覚に関与するほか、神経変性疾患や精神疾患などにも関連しています。そのため、TRP チャンネルを標的とした創薬研究は、疾患治療に有効である可能性があり、TRP チャンネルの活性化を検出するための簡便な手法が求められています。

東北大学大学院薬学研究科の辰己茉菜絵大学院生、井上飛鳥教授らのグループは、培養細胞を用いた実験により、TRP チャンネルが化合物刺激を受けると、膜貫通タンパク質である TGF α が切断されて細胞外へ放出されることを発見しました。この現象を利用して、TRP チャンネルを活性化する化合物の効力を TGF α の切断量を指標に、呈色反応として簡便に評価する手法を開発しました。従来の評価法は、高価で専門性の高い測定機器が必要でしたが、今回開発した手法は、様々な研究分野で広く利用される吸光プレートリーダーがあれば計測でき、呈色試薬も安価であることから、多くの研究者が手軽に実験可能な技術となります。

本研究成果は、2023年1月20日(現地時間)に PLoS ONE 誌にオンライン掲載されました。

【詳細な説明】

TRP チャンネル (TRP はティー アール ピーまたはトリップと読みます) は、主に神経細胞に発現し、細胞表面に存在する膜タンパク質です。TRP チャンネルは様々な刺激に応答してタンパク質構造が変化します (この過程を活性化と呼びます)。この結果、細胞膜を貫通する穴 (チャンネル) が開き、カルシウムイオンをはじめとする陽イオンが細胞外から細胞内へと流入します。これら陽イオンは細胞の機能を変化させる働きを有します。1997 年に、TRP チャンネルの一種である TRPV1 が、唐辛子の辛味成分であるカプサイシンの受容体であることが突き止められ、辛味や熱さの感覚を認識するための仕組みが明らかになりました。この発見を契機に TRP チャンネルの一群が外来化学物質や温度を感知するセンサーであることがわかってきました。この TRP チャンネルの先駆的な研究者に対して、2021 年にノーベル賞^(注2) が与えられました。現在では TRPV1 を含めて 28 種の TRP チャンネルが存在することが知られています。TRP チャンネルは、神経細胞以外にも、皮膚の表皮細胞や免疫細胞などにも発現し、様々な生理現象に関与することが報告されています。そのため、TRP チャンネルは疾患の治療標的としても注目されており、TRP チャンネルの活性化を評価するための簡便な手法が求められています。従来の TRP チャンネル活性化検出手法であるカルシウムアッセイやパッチクランプ法は、蛍光プレートリーダーやパッチクランプ装置といった高価な機器が必要でした。そこで本研究者らのグループは、より安価で簡便な TRP チャンネルの活性化検出手法の開発に取り組みました。

TRP チャンネルの活性化は、TRP チャンネルによって誘導される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を捉えることで評価できます。そこで、本研究者らのグループが以前に開発した、G タンパク質共役型受容体 (GPCR)^(注3) の活性化を検出する手法である TGF α 切断アッセイ (Inoue et al., Nat Methods, 2012) が有用である可能性が考えられました。TGF α 切断アッセイは、GPCR によって誘導される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によって、細胞膜に発現する TGF α の細胞外ドメインが切断されるという現象を利用したものです。この手法は、吸光プレートリーダーのみを必要とし、試薬も安価であるため、TRP チャンネルに応用可能であれば、幅広い分野の研究者が手軽に利用できる有用な技術となります。この仮説を検証するため、培養細胞株である HEK293 細胞に、TRPV1 とアルカリホスファターゼ^(注4) 融合 TGF α (AP-TGF α) をコードするプラスミド DNA を遺伝子導入し、両者のタンパク質を発現させました。TGF α にアルカリホスファターゼを遺伝子組み換えにより融合させることによって、切断を受けて細胞外に放出された TGF α の量を、呈色反応を用いて簡便に測定することが可能になります。この TRPV1 と AP-TGF α を発現する HEK293 細胞に、TRPV1 刺激薬のカプサイシンを添加し、TGF α の切断量を測定すると、カプサイシンの濃度が高くなるにつれ、TGF α の切断が強く誘導されました (図1)。すなわち、カプサイシンによる TRPV1 の活性化を細胞上清の呈色反応として計測することができました。一般則を調べるべく、別の 3 種類の TRP チャンネル (TRPA1、TRPM8、TRPV3) とその刺激薬を用いて実験したところ、同様に刺激薬処置で TGF α 切断が誘導され、典型的なシグモイド濃度応答曲線を示すことがわかりました。さらに、TRPV1 と AP-TGF α を発現する HEK293 細胞に、TRPV1 阻害薬であるカプサゼピンをあらかじめ処置すると、カ

プサイシンによる TGF α 切断が観察されなくなりました。このことから、本手法は、刺激薬の効果だけではなく、阻害薬の効果も評価可能であることが示されました。

次に、TRP チャンネルの活性化による TGF α の細胞外ドメイン切断が、どのような機構で引き起こされるのか調べました。その結果、TRP チャンネルの活性化によって、細胞膜に存在するプロテアーゼである ADAM10^(注5)と ADAM17^(注5)が TGF α 切断を担うことが分かりました。興味深いことに、GPCR の活性化時では、ADAM10 が用いられず、ADAM17 のみを介して TGF α 切断が誘導されることが判明しました(図 2)。TRP チャンネルと GPCR は、どちらも細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるにも関わらず、異なるプロテアーゼを介して TGF α の切断を誘導することから、両者による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇には、質的な違いが存在することが示唆されました。

TRP チャンネルが ADAM10 を活性化する機構は、アルツハイマー病の治療に役立つ可能性があります。ADAM10 が活性化すると、アルツハイマー病の原因となるアミロイド β ^(注6)の産生量が低下することが報告されています。そのため、ADAM10 を脳神経細胞で活性化させるという治療戦略が注目されています。しかし、ADAM10 の活性化をコントロールする方法は確立されておらず、この戦略は未だ治療薬開発へ繋がっていません。今回の研究成果から、TRP チャンネルを刺激する化合物は、ADAM10 の活性化を引き起こすことがわかりました。このことから、ADAM10 と同じ脳神経細胞に発現する TRP チャンネルを標的とし、ADAM10 の活性化という新しい機序によるアルツハイマー病治療の可能性を提唱することができます。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業(JP16H01377, JP21H04791, JP21H05113, JP22J10475, JPJSBP120213501, JPJSBP120218801)、科学技術振興機構創発的研究支援事業(JPMJFR215T)を始め多数の研究費支援を受けて実施されました。

説明図

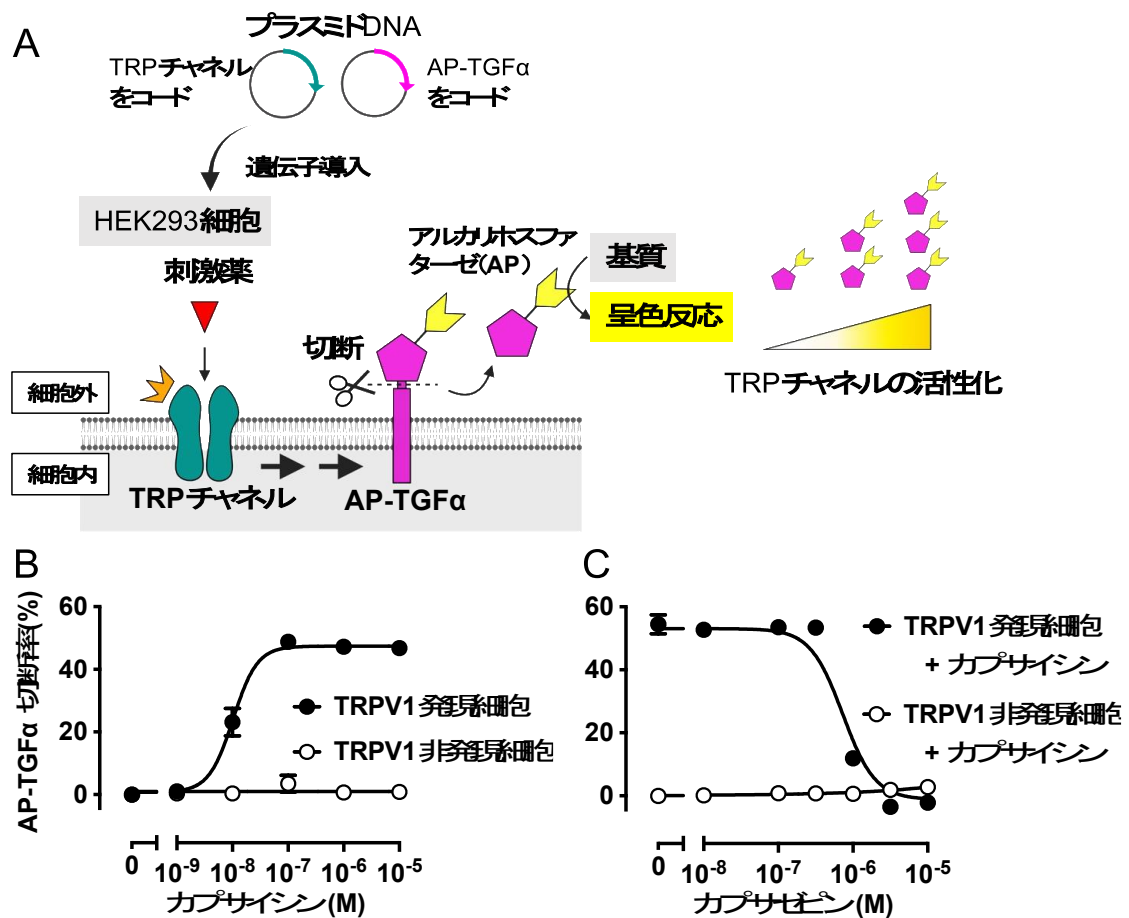


図1. 本手法によって TRP チャンネルの刺激薬および阻害薬の効果が検証可能である
 (A) 本手法の模式図。HEK293 細胞に TRP チャンネルと AP-TGFα をコードするプラスミド DNA を遺伝子導入し、両者を発現させた。この細胞に、評価対象となる化合物を添加し、切断された AP-TGFα の量を呈色反応によって測定した。
 (B) TRPV1 を発現させた HEK293 細胞に、刺激薬であるカプサイシンを添加し、切断された AP-TGFα を測定した。その結果、カプサイシン濃度依存的に AP-TGFα の切断が誘導され、シグモイド応答曲線を得ることが出来た。
 (C) TRPV1 の阻害薬であるカプサゼピンを TRPV1 発現 HEK293 細胞に添加し、その後一定濃度のカプサイシンを添加すると、カプサゼピンの濃度依存的にカプサイシンの TGFα 切断効果が抑制された。

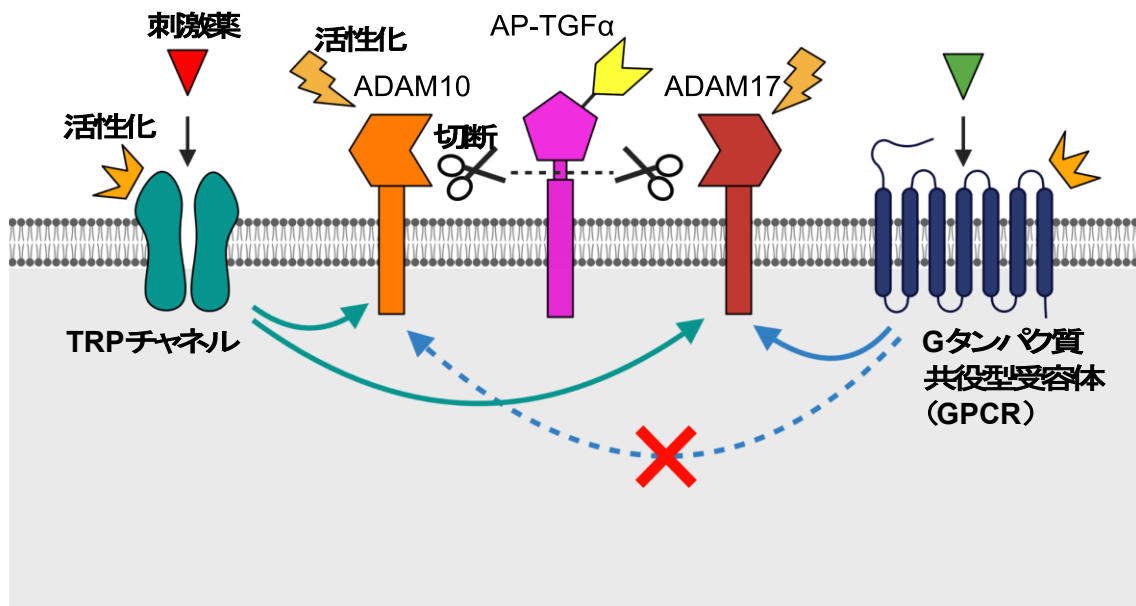


図 2. TRP チャンネルと GPCR による TGF α 切断機構

TRP チャンネルが活性化すると、プロテアーゼである ADAM10 および ADAM17 が活性化し、AP-TGF α が切断される。一方、GPCR の活性化は、ADAM10 を活性化せず、ADAM17 のみを介して AP-TGF α を切断する。

【用語説明】

注 1 TGF α (transforming growth factor α 、トランスフォーミング増殖因子アルファ) 上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合するリガンドの一つであり、一回膜貫通型の前駆体タンパク質として産生される。プロテアーゼである ADAM によって切断され、細胞外ドメインが放出される。

注 2 2021 年のノーベル生理学医学賞は、温度や触覚を感知する受容体の発見について、カリフォルニア大学の David Julius 教授及び米スクリプス研究所の Ardem Patapoutian 教授の両氏に授与された。David Julius 教授は、唐辛子の辛味成分であるカプサイシンによって痛みを感じる機構に着目し、痛覚神経細胞に発現するタンパク質を一つ一つ調べた結果、TRPV1 がカプサイシンに反応して、神経細胞を活性化させることを見出した。さらに、TRPV1 は熱温度刺激 (43°C) に応答して神経細胞を活性化させることが明らかになった。この発見以降、低温によって神経細胞を活性化させる TRPM8 (ミントの成分であるメントールにも反応する) など、様々な TRP チャネルが発見され、温度を感知するメカニズムが明らかとなった。

注 3 G タンパク質共役型受容体 (GPCR)

細胞膜に存在する受容体であり、細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造を有している。ヒトには約 800 種の GPCR が存在し、それぞれが特定のホルモンや代謝物などと結合する。この結合により、GPCR が活性化型へと構造変化し、細胞内のシグナル分子と結合することによって、カルシウムイオン濃度の上昇など、さまざまな細胞応答を引き起こす。

注 4 アルカリホスファターゼ (AP)

アルカリ性の条件下で、リン酸化合物を分解する酵素である。本手法では、アルカリホスファターゼの基質としてパラニトロフェニルリン酸を使用し、黄色を呈するパラニトロフェノールの生成量を吸光度測定によって評価している。これによって、細胞外に放出されたアルカリホスファターゼの活性を測定可能となる。

注 5 ADAM (a disintegrin and metalloproteinase)

膜結合型のタンパク質分解酵素である。21 種類存在する ADAM ファミリーメンバーの中でも、ADAM10 および ADAM17 は、強い TGF α 切断活性を示すことが知られている。

注 6 アミロイド β

アルツハイマー病患者の脳に沈着するタンパク質であり、アルツハイマー病と関連が深い。アミロイド前駆体タンパク質が、 β セクレターゼおよび γ セクレターゼによって切断されることにより産生されるが、ADAM10 はこの経路と拮抗する α セクレターゼであるため、ADAM10 が活性化されるとアミロイド β の産生が抑制される。

【関連する以前の研究のプレスリリース・成果発表】

G タンパク質共役型受容体の活性化を網羅的に検出する手法を確立～新しいくすりの開発に貢献～(2012年9月18日)

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2012/09/press20120913-02.html>

【発表論文】

掲載誌名: PLoS ONE

タイトル: Ectodomain shedding of EGFR ligands serves as an activation readout for TRP channels

(日本語訳: 上皮成長因子群の細胞外領域の切断は TRP チャネルの活性測定の指標となる)

著者: Manae Tatsumi, Takayuki Kishi, Satoru Ishida, Hiroki Kawana, Akiharu Uwamizu, Yuki Ono, Kouki Kawakami, Junken Aoki, Asuka Inoue

* (*責任著者)

DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0280448

URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280448>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 井上 飛鳥(いのうえ あすか)

電話 022-795-6861

E-mail iaska@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

電話 022-795-6801

E-mail ph-som@grp.tohoku.ac.jp