カルシウム放出チャネルとしての TRPM2 の β 細胞における役割

山本伸一郎^{1), 2)}, 森 泰生¹⁾

要約: Transient receptor potential (TRP) チャネルの melastatin (M) ファミリーに属する TRPM2 はカルシウムイオン (Ca^{2+}) 透過性のカチオンチャネルであり, 単球/マクロファージや好中球などといった免疫系細胞や膵臓の β 細胞において豊富な発現が認められている. TRPM2 は過酸化水素などの酸化ストレスによって活性化される特徴を有しており, 筆者らはこれまで酸化ストレスによる TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が細胞死やサイトカイン産生を引き起こすことを明らかにしてきた. また, 酸化ストレスと同様に TRPM2 を活性化する ADP-ribose は細胞内・外の両方で産生される. 細胞内における ADP-ribose は形質膜上に発現する TRPM2 を活性化し Ca^{2+} 流入を惹起するが, それ以外にどのような Ca^{2+} シグナリングを引き起こしうるかについては未踏の領域であった. 一方, 細胞外における ADP-ribose はホスホリパーゼ C の活性化を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を引き起こすことが明らかにされているが, その詳細については明らかにされていなかった. 近年, 筆者らの研究グループは TRPM2 の発現が確認されている膵臓の β 細胞を用いて細胞内・外における ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングの詳細について検討を行った. 細胞外において ADP-ribose は P2Y purinergic 受容体の活性化を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を引き起こすことが明らかになった. また β 細胞において TRPM2 が細胞内小器官であるライソソームにも発現しており, 形質膜上の Ca^{2+} 流入チャネルとしてだけでなく Ca^{2+} 放出チャネルとしても機能していることが明らかになった. 本稿では細胞内小器官イオン動態として, 膵臓の β 細胞における ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングおよび

Ca^{2+} 放出チャネルとしての TRPM2 の機能の詳細を述べ, 膵臓の β 細胞の疾患として糖尿病と TRPM2 の関与について考察したい.

はじめに

血液中の糖の濃度は厳密に制御されている. 膵臓の β 細胞から産生・遊離されるインスリンは上昇した血液中の糖濃度を下げることができる唯一の分子であり, β 細胞からのインスリンの遊離機構についてはよく知られている. β 細胞において糖取り込みに伴い産生された ATP は K_{ATP} チャネルを閉口させ, 脱分極を惹起する. 脱分極刺激によって L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルが活性され, 細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされ, インスリンが遊離される. このように細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$) 上昇が重要な役割を担っており, 非常に確立された機構が存在する. β 細胞の機能低下や障害はインスリンの産生および遊離能の低下を引き起こし, 糖尿病へと至る. 1 型糖尿病は β 細胞の破壊性変性によってインスリンの欠乏が生じる糖尿病として知られている. その原因として自己免疫による β 細胞の細胞死が考えられている. 一方, 耐糖能異常および β 細胞の機能低下によるインスリン分泌低下などを起因としておこる糖尿病は 2 型糖尿病に分類され, 遺伝的要素に加え生活環境がその発症に関与していることが知られている.

TRPM2 は ADP-ribose などといった細胞内メッセンジャーによって活性化される Ca^{2+} 透過性のカチオンチャネルである (1). また筆者らは過酸化水素などの酸化ストレスによっても TRPM2 が活性化されることを明らかにした (2). Ca^{2+} 透過性チャネルである

キーワード: TRPM2, 酸化ストレス, β 細胞, ライソソーム, 細胞死

¹⁾ 京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 分子生物化学分野 (〒615-8510 京都市西京区京都大学桂 A4 棟 218 号室)
E-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp 原稿受領日: 2011 年 1 月 24 日, 依頼原稿

²⁾ 京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

E-mail: yamashin@pharm.kyoto-u.ac.jp

Title: Function of TRPM2 as a Ca^{2+} -release channel in β cells. Author: Shinichiro Yamamoto, Yasuo Mori

TRPM2は β 細胞に豊富に発現しており, インスリン遊離に関与するのではないかと考えられてきた. 最近, TRPM2 knock out (KO) マウスを用いた研究により TRPM2 とインスリン遊離について非常に興味深いことが報告された(3). TRPM2 KO マウスから単離した膵島細胞ではグルコースによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇およびインスリン分泌が低下しており, TRPM2 KO マウスでは糖負荷による血中インスリン濃度上昇の低下そして耐糖能異常が観察された. このようにこれまで考えられてきたインスリン分泌機構に加え TRPM2 が生理的条件下においてインスリン分泌に関与することが明らかにされ, また病態生理的条件下では2型糖尿病における新規創薬のターゲット分子になりえる可能性が示された. また筆者らは, 膵臓 β 細胞株を用いた実験で過酸化水素刺激や内因的に活性酸素種を産生させる tumor necrosis factor α (TNF- α) 刺激により惹起される TRPM2 を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入が細胞死を引き起こすことを明らかにした(2).

今回筆者らの研究グループは膵臓 β 細胞における ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングについて詳細な検討を行った(4). 本稿ではその結果明らかになったライソソームにおける Ca^{2+} 放出チャネルとしての TRPM2 の機能, およびその Ca^{2+} 放出による細胞死について詳述する. また, β 細胞の破壊性変性としての性質を有する1型糖尿病と TRPM2 による細胞死の関連についても考察し, 1型糖尿病の原因分子としての TRPM2 の可能性を提示したい.

1. TRPM2 の活性化機構

TRPM2 は細胞内に位置するカルボキシル末端に pyrophosphatase に広く保存されている Nudix モチーフを有する(弱いながらも pyrophosphatase 活性を有する) Ca^{2+} 透過型のカチオンチャネルである. 当初, TRPM2 は細胞内の ADP-ribose が Nudix モチーフに作用することで活性化されることが明らかにされた(1). 筆者らは, 過酸化水素などの酸化ストレスによって TRPM2 が活性化されることを見出した(2). また筆者らは nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) も TRPM2 を活性化することを見出したが, その後の研究によって, NAD^+ による TRPM2 の活性化は NAD^+ が ADP-ribose に変換されることで引き起こされていると考えられるようになってきた.

TRPM2 の活性化に関わる ADP-ribose は, 酸化ストレスにより2つの経路から産生されると現在考えられている. 1つがミトコンドリアであり, 酸化ストレス刺激により産生・遊離されることが示されている

(5). また, ADP-ribose のもう1つの産生源として核が知られている. 核内には酵素 poly (ADPR) polymerase-1 (PARP-1) が存在し, 酸化的ストレスを含む様々な侵害刺激による DNA の損傷の修復に重要な役割を担っている. 損傷された DNA に PARP-1 が結合し, NAD^+ を基質として nicotinamide と ADP-ribose に代謝する. 産生された ADP-ribose は様々な核タンパク質にポリマー化され, DNA 修復機構が活性化される. そして poly (ADPR) glycohydrolase (PARG) により重合化された poly (ADP-ribose) が代謝され, 遊離 ADP-ribose が産生される. 過酸化水素による TRPM2 の活性化は PARP を薬理学的および分子生物学的に阻害することによって抑制される(6, 7). さらに, ADP-ribose による TRPM2 の活性化は PARP を阻害しても影響を受けないことから, 過酸化水素による TRPM2 の活性化において ADP-ribose が TRPM2 の Nudix モチーフに作用する前段階である ADP-ribose 産生に, PARP-1/PARG 経路が関与することが示されている. このように現在は酸化ストレスによる TRPM2 の活性化はミトコンドリアまたは核からの ADP-ribose の産生を介して引き起こされると考えられている. しかし, この酸化的ストレスによる TRPM2 の活性化に ADP-ribose が関与しない可能性も示唆されている. この詳細については日薬理誌 2009 年 9 月号の著者らの稿(8)を参考にしてもらいたい(図1).

図1 膵臓 β 細胞における ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリング

PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PLC: phospholipaseC, ER: endoplasmic reticulum, ROS: reactive oxygen species.

2. 細胞外 ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリング

ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングについては不明な点が存在する。細胞内における ADP-ribose は形質膜上に発現する TRPM2 を活性化し Ca^{2+} 流入を惹起するが、それ以外にどのような Ca^{2+} シグナリングを引き起こしうるかについては明らかにされていない。また、細胞外における ADP-ribose は inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) の産生を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を引き起こす(9) が、その詳細については明らかにされていない。そこで筆者らの研究グループはまず ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングの詳細について検討を行った。まず TRPM2 強制発現および発現させていない HEK293 細胞を用いて検討を行った。 Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で ADP-ribose を添加すると細胞内からの Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が TRPM2 強制発現細胞および発現させていない細胞で共に認められ、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は TRPM2 非依存的に引き起こされていることを確認できた。また、この ADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は P2Y purinergic 受容体のアンタゴニスト suramin, PLC 阻害薬 U73122, および IP_3 受容体のアンタゴニストを処置することで抑制された。よって、ADP-ribose によって引き起こされる小胞体からの Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はこれまで明らかにされていた PLC の活性化に伴った IP_3 産生に加え、P2Y purinergic 受容体を介していることが明らかになった。次に TRPM2 強制発現系ではなくマウスから単離した膵臓 β 細胞を用いて検討を行った。まず β 細胞の形質膜上における ADP-ribose による TRPM2 の活性化をパッチクランプ法にて確認した。ADP-ribose をパッチピペットを介して細胞内に注入することで経時的な電流の増大が認められ、TRPM2 に特徴的な直線的な電流-電圧関係を示した。また、TRPM2 KO マウスから単離した β 細胞においては ADP-ribose による電流の増大が認められないことから、 β 細胞の形質膜上において TRPM2 が機能的に発現していることを確認できた。 Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で ADP-ribose を添加すると細胞内からの Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。また、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は P2Y purinergic 受容体のアンタゴニスト suramin を処置することで抑制された。よって、 β 細胞における ADP-ribose 添加による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇も P2Y purinergic 受容体を介していることが明らかになった。細胞外において ADP-ribose は細胞外に酵素活性領域を有するエクトエンザイムである CD38 によって NAD^+ を基質として cyclic ADP-ribose (cADP-

ribose) を経由して産生される。続いて NAD^+ および cADP-ribose 添加による Ca^{2+} シグナリングについても検討を行った。TRPM2 発現を有さない HEK293 細胞において、高濃度の NAD^+ および cADP-ribose を添加したが $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められなかった。このことより NAD^+ および cADP-ribose は P2Y purinergic 受容体のアゴニストにはならないことが示された。さらにマウスから単離した膵臓 β 細胞においては cADP-ribose 添加による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は認められたが、 NAD^+ 添加による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は認められなかった。そこでこの cADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が CD38 により cADP-ribose から ADP-ribose に変換されて引き起こされているのかを確かめるために、CD38 KO マウスから単離した膵臓 β 細胞を用いて検討を行った。その結果、ADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は認められたが、cADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は認められなかった。従って cADP-ribose 添加による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は CD38 による ADP-ribose の産生を介して引き起こされていることが明らかになった。しかし、CD38 の基質であるこの NAD^+ による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はなぜ認められないのかという疑問が生じた。そこで NAD^+ 自体が ADP-ribose による P2Y purinergic 受容体の活性化を抑制しているのではないかと考えさらに検討を行った。P2Y purinergic 受容体を有する β 細胞および HEK 細胞において ADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は NAD^+ を添加することにより抑制された。よって NAD^+ 自体が ADP-ribose による P2Y purinergic 受容体の活性化をアンタゴニストとして抑制しているため NAD^+ による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が引き起こされないことが示された(図 1)。

3. 細胞内 ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリング

次に細胞内 ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングについて検討を行った。TRPM2 強制発現細胞において Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で ADP-ribose を細胞内に注入すると Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。また ADP-ribose による TRPM2 の活性化に対してアンタゴニストとして働く AMP を添加すると、ADP-ribose 注入による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は抑制された。TRPM2 を発現させていない細胞ではこの ADP-ribose 注入による細胞内 Ca^{2+} 上昇は認められなかった。よって、TRPM2 強制発現細胞において TRPM2 は Ca^{2+} 放出チャネルとして機能していることが示された。次に β 細胞株 INS1 を用いて同様な検討をおこなった。 Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で ADP-ribose を注入すると Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた。また

過酸化水素についても検討を行ったところ, Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で過酸化水素処置をすると, ADP-ribose と同様に Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められ, これらは IP_3 受容体のアンタゴニストでは抑制されなかった. さらに TRPM2 siRNA を処置することでこの ADP-ribose による Ca^{2+} 放出が抑制されたことから, TRPM2 が Ca^{2+} 放出チャネルとして機能していることが明らかになった. そこでこの TRPM2 依存的な Ca^{2+} 放出がどの細胞内小器官から引き起こされているのかを明らかにするために免疫組織染色を行った. その結果, TRPM2 がライソソームに局在することを確認することができた. そこでライソソームから TRPM2 を介して Ca^{2+} の放出が引き起こされているかについて検討を行った. Ca^{2+} はライソソーム中にプロトンの濃度勾配を利用して取り込まれることが知られている. ライソソームに存在する V 型プロトンポンプを抑制することでライソソーム中の Ca^{2+} を枯渇することができる. V 型プロトンポンプ阻害薬であるバフィロマイシンを処置することで ADP-ribose による Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められなくなった. またカルバコールによる小胞体からの Ca^{2+} 放出はバフィロマイシン処置により抑制されなかった. さらにマウスから膵臓 β 細胞を単離し, 同様な検討を行ったところ ADP-ribose を注入すると Ca^{2+} 放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められた. しかし, TRPM2 KO マウスから単離した β 細胞においては ADP-ribose による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が認められなかった. よって TRPM2 はライソソームに発現し, Ca^{2+} 放出チャネルとして機能しうることが明らかになった (図 1).

4. TRPM2 を介した Ca^{2+} 放出による細胞死誘導

筆者らは, 膵臓 β 細胞株を用いた実験で過酸化水素刺激や内因的に活性酸素種を産生させる TNF- α 刺激により惹起される TRPM2 を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入が細胞死を引き起こすことを明らかにした(2). そこでライソソームからの TRPM2 を介した Ca^{2+} 放出も細胞死を引き起こすかについて β 細胞株 INS1 を用いて検討を行った. 細胞外液中に Ca^{2+} 存在下, INS1 に過酸化水素処置を行うと細胞死が認められた. またこの細胞死は TRPM2 siRNA を処置することで抑制されたことから, 細胞外からの TRPM2 を介した Ca^{2+} 流入が細胞死に関与することを確認することができた. また, Ca^{2+} が存在しない細胞外液中で過酸化水素処置を行うと, 細胞外液中に Ca^{2+} 存在するときと比べて低いものの細胞死が認められた. さらにこの細胞死は TRPM2 siRNA を処置することで抑制された. 従って,

ライソソームからの TRPM2 を介した Ca^{2+} 放出も細胞死に関与することが明らかになった.

5. 今後の展望

今回著者らの研究グループは膵臓 β 細胞を用いて細胞内外の ADP-ribose による Ca^{2+} シグナリングの詳細について検討を行った. その結果, TRPM2 が細胞内小器官のライソソームにも発現しており, ADP-ribose および過酸化水素刺激によって Ca^{2+} 放出チャネルとして機能していることが明らかになった. さらにそのライソソームからの Ca^{2+} 放出は TRPM2 を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入と同様に細胞死を引き起こすことも明らかになった.

1 型糖尿病は β 細胞の破壊性変性という性質を有する疾患である. その原因として自己免疫が考えられており, さらに膵臓 β 細胞の周辺には炎症性細胞の浸潤が認められ, 炎症性疾患としての側面も有している(10). 著者らは TRPM2 KO マウスを用いた研究で, 炎症部位において集積した炎症性細胞から産生された活性酸素種が単球/マクロファージに発現した TRPM2 を活性化し, サイトカイン産生誘導に関与していることを明らかにした(11). β 細胞周辺に集積した炎症性細胞も TRPM2 を活性化する活性酸素種や TNF- α を産生・遊離しており, それらは β 細胞の破壊性変性に関与している(10). また, 1 型糖尿病の研究を行うに当たり, アロキサンやストレプトゾトシン投与によるモデルマウスが使用されている. アロキサンとストレプトゾトシンは共にグルコーストランスポーターである GLUT2 を介して β 細胞に選択的に取り込まれる. アロキサンは活性酸素種の産生そしてストレプトゾトシンは DNA のアルキル化を介して β 細胞の破壊性変性を引き起こす(12). ストレプトゾトシンによる DNA のアルキル化は DNA 修復機構の 1 つとして PARP 経路の活性化を引き起こす. またストレプトゾトシンによる β 細胞の破壊性変性には NADPH オキシターゼの活性化を介して産生された活性酸素種も関与していることが報告されている(13).

このように 1 型糖尿病および薬物による 1 型糖尿病モデルにおいて活性酸素種, TNF- α および PARP 経路などといった TRPM2 を活性化しうる因子が β 細胞の破壊性変性に関与することが示されている. そのような病態生理条件下, β 細胞において TRPM2 が活性化されていることが考えられる. そして今回明らかにした TRPM2 による細胞死誘導機構が β 細胞の破壊性変性に関与している可能性がある (図 2). 今後は TRPM2 KO マウスを使用した in vivo の研究により, 1

図2 TRPM2 調節性インスリン分泌と1型糖尿病へのTRPM2 調節性細胞死の関与の可能性

正常な膵臓β細胞においてはグルコースの取り込みによってTRPM2の活性化が引き起こされる。そしてTRPM2を介した Ca^{2+} 流入は細胞外へのインスリン分泌を惹起する(3)。一方、1型糖尿病およびアロキサンやストレプトゾトシンによる1型糖尿病モデルにおいてTRPM2を活性化する因子が産生されている。それらの因子がβ細胞においてTRPM2調節性の細胞死を引き起こし、破壊性変性に結びついている可能性が考えられる。

型糖尿病へのTRPM2の関与を明らかにすることが期待される。

謝辞：本研究は Laboratory of Cell and Molecular Signaling, Center for Biomedical Research at The Queen's Medical Center and John A. Burns School of Medicine at University of Hawaii との共同研究として行われたものであり、Dr. Ingo Lange, Dr. Andrea Fleig, そして Dr. Reinhold Penner に改めて感謝する次第である。

文 献

- 1) Perraud AL, et al. Nature. 2001;411:595-599.
- 2) Hara Y, et al. Mol Cell. 2002;9:163-173.
- 3) Uchida K, et al. Diabetes. 2011;60:119-126.
- 4) Lange I, et al. Sci Signal. 2009;2:ra23.
- 5) Perraud AL, et al. J Biol Chem. 2005;280:6138-6148.
- 6) Fonfria E, et al. Br J Pharmacol. 2004;143:186-192.
- 7) Buelow B, et al. J Biol Chem. 2008;283:24571-24583.
- 8) 山本伸一郎, 他. 日薬理誌. 2009;134:122-126.
- 9) Ishii M, et al. J Pharmacol Sci. 2006;101:174-178.
- 10) Kaneto H, et al. Antioxid Redox Signal. 2007;9:355-366.
- 11) Yamamoto S, et al. Nat Med. 2008;14:738-747.
- 12) Lenzen S. Diabetologia. 2008;51:216-226.
- 13) Xiang FL, et al. Diabetes. 2010;59:2603-2611.