

# 細胞死を引き起こすイオンチャンネル

## 原雄二

総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻3年／岡崎国立共同研究機構生理科学研究所

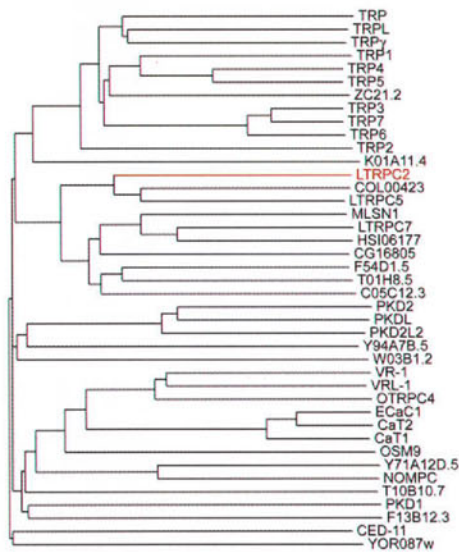
活性酸素などによる酸化ストレスが加わることで、カルシウムイオン濃度の均衡を破綻させ、最終的に細胞死を引き起こすイオンチャンネルが存在することが明らかになった。このチャンネルの発見は、深刻化の一途をたどるがんやエイズ、アルツハイマー病などの病態を改善する薬剤開発につながる可能性を秘めており、熱い視線が注がれている。

### 細胞内外で厳密に制御されているイオン濃度

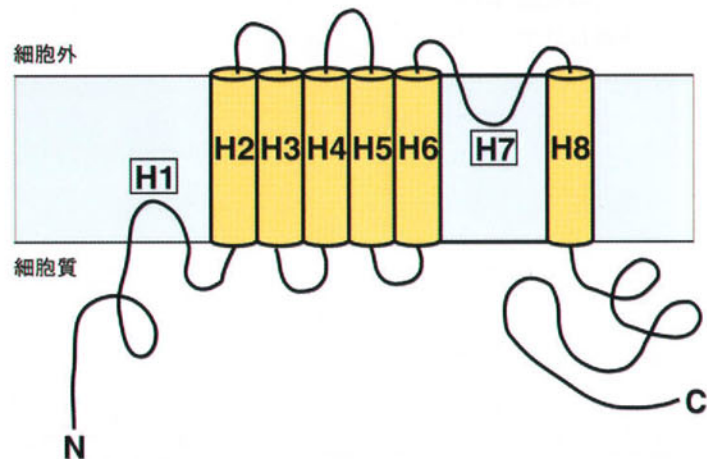
私たちの生体は、寒冷や化学物質、細菌、ウイルス、精神的緊張といった、さまざまな種類のストレスにさらされている。そのようなストレスに満ちた日常の中で何事もなく生活できるのは、生体内の多様な防御機構のおかげである。生体の防御機構というと免疫が思い浮かぶが、細胞内外のイオン濃度の厳密な制御もまた重要な生体防御機構の一つである。

真核生物の細胞は、ナトリウムイオンや塩素イオン、カルシウムイオンを多く含む細胞外液に浸された環境に置かれている。それに対し通常の細胞内において、これらのイオンは細胞外環境が変化しても一定の濃度に保たれるようになっている。これは、細胞が細胞膜の脂質二重層に存在するイオンチャンネルやトランスポーターを使って、ナトリウムイオン、塩素イオン、カルシウムイオンなどの濃度を厳密にコントロールしているからである。

細胞膜に存在するイオンチャンネルは、いくつかのサブユニットタンパク質から構成され、一つの細胞の膜上には何万というオーダーのイオンチャンネルが存在する。その形状は脂質二重層を貫通する中空のポア（孔）のようであり、文字どおり、細胞の内と外をつなぐ通り道（チャンネル）になっている。イオンチャンネルは必要に応じて開いたり閉じたりしており、この開閉調節はゲーティングとよば



①A Trp遺伝子およびその類似遺伝子の系統樹



①B TRPタンパク質の推定上のチャンネル構造  
TRPタンパク質はアミノ末端、カルボキシル末端が細胞質に存在し、中央領域に膜貫通領域が存在すると考えられている。



A

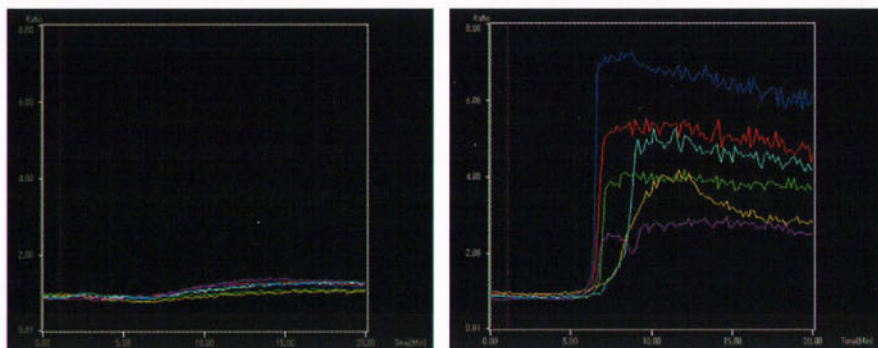


## ②LTRPC2の細胞内カルシウム濃度測定

### A 細胞内カルシウム濃度測定機器

顕微鏡上に細胞を培養したガラス片をのせ、反応液を適用する。

B



### B LTRPC2チャンネルを発現させた細胞に過酸化水素を加えたときの細胞内カルシウム濃度変化

左はコントロール細胞。右はLTRPC2チャンネルの発現細胞における細胞内カルシウム濃度上昇（過酸化水素は測定開始1分後から添加）を表している。

実際には、カルシウムイオン指示薬が発する蛍光強度の変化によって、その濃度を測定している。

れる。イオンチャンネルごとに「どの種のイオンを通すか」が決まっており、あるものはほぼ種類のイオンのみを通過させ、またあるものは何種類ものイオンを通過させる。一般的には、そのチャンネルが何のイオンを通しやすいかによって、ナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、カルシウムチャンネルなどとよばれている。こうしたチャンネルのゲーティングはさまざまな刺激（シグナル）により調節されている。その中で、膜電位の変化がシグナルとなるものは電位依存性チャンネル、神経伝達物質などの細胞外リガンドがシグナルになるものはリガンド依存性チャンネルとよばれる。ほかに、イノシトール三リン酸やサイクリックヌクレオチドなどの細胞内シグナル伝達分子によって活性化されるチャンネルもある。

### イオン濃度制御の破綻が引き起こす細胞死

こうしたイオンチャンネルによる細胞内イオン濃度の制御は、生体に過剰なストレスが加わることによって細胞内に活性酸素種が急増すると破綻してしまうことが知られている。さまざまな内因あるいは外因によって生じる活性酸素種を、生体内に存在する抗酸化物質が処理しきれ

なくなり、細胞内酸化還元状態を維持できなくなるためである。活性酸素種とは、過酸化水素やスーパーオキシドアニオン、ヒドロキシラジカルなどのように、通常の分子状の酸素に比べて、たいへん反応性の高い分子種の総称である。いずれもきわめて高い毒性をもち、核酸やタンパク質、脂質などの生体構成分子を傷つけることで、最終的に細胞死をもたらす。

細胞死は、細胞みずからが能動的に死を引き起こすアポトーシスと、外的要因によって細胞が破壊されるネクローシスに区別されている。アポトーシスでは、細胞内の核の染色体凝集、核の断片化、細胞質の凝縮などの形態変化がみられる。細胞は萎縮して、内容物が細胞外に放出されることなくマクロファージなどに取り込まれる。一方のネクローシスは、火傷やけがといった細胞の置かれた環境悪化により引き起こされる。この場合はひどい炎症がおき、細胞の内容物が放出されて死に至る。活性酸素種は、アポトーシスとネクローシスの両者を引き起こすことがわかってきている。

活性酸素種を発生させるようなストレスをまとめて酸化ストレスとよぶが、酸化ストレスは、がんやエイズ、アルツハ

イマー病、動脈硬化、老化などに密接に関与している。活性酸素種は核内のDNAに傷をつけたり、タンパク質を変性させることによって、臓器や組織中の異常な細胞増殖や細胞死を引き起こす。

では、具体的にどのようなイオンの制御不全が、どのようにして細胞傷害や細胞死を引き起こすのだろうか。すでに述べたように、細胞内外のイオン濃度は厳密に調節されている。調節因子となるのは、細胞外からの刺激（シグナル）である。細胞内外のイオン濃度は、シグナルに応じて劇的に変化する。そのようなシグナルのセカンドメッセンジャーとしてきわめて重要であると考えられている物質に、カルシウムイオンがある。カルシウムイオンは、静止状態における細胞内では100nM程度の濃度に保たれている。細胞内のカルシウムイオンは外界からの刺激などによって濃度変化が引き起こされ、それが筋肉収縮、神経伝達物質の放出、シグナル伝達、細胞分化、細胞周期制御などの引き金になることが知られている。しかし、カルシウムイオンが細胞内に急激に流入すると、さまざまな情報伝達のカスケードが過剰に活性化されることにより、細胞死が誘導される。



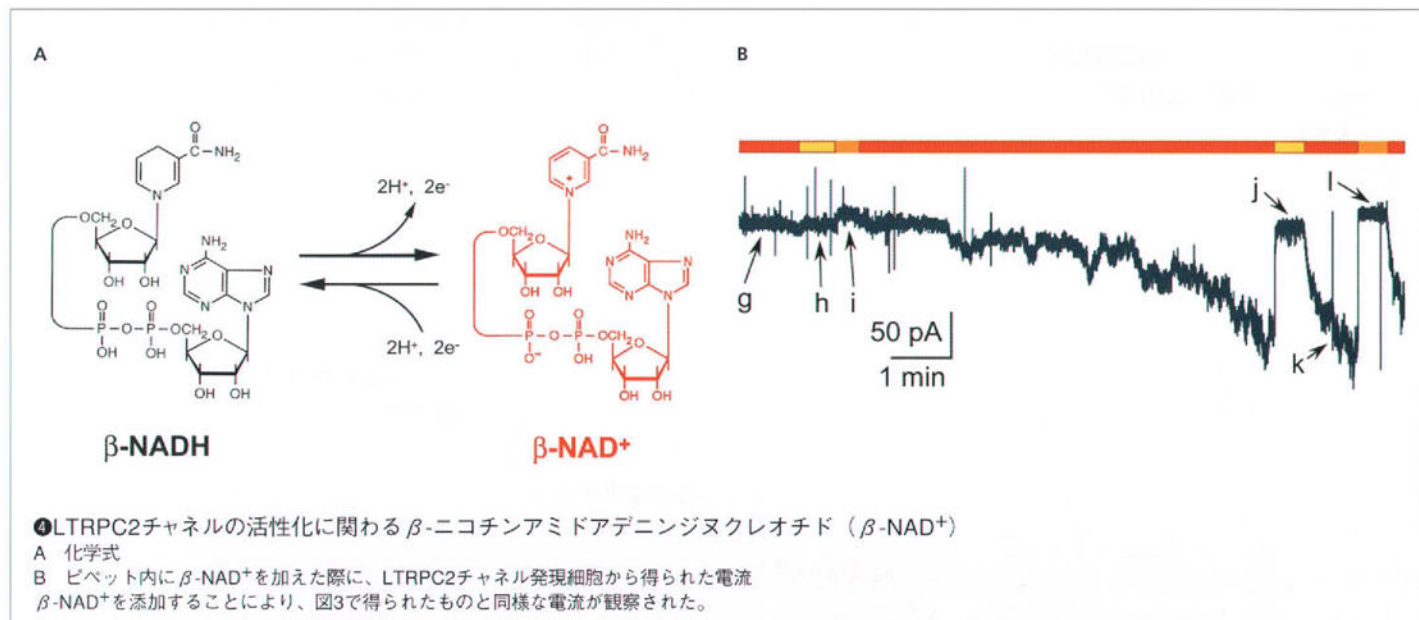
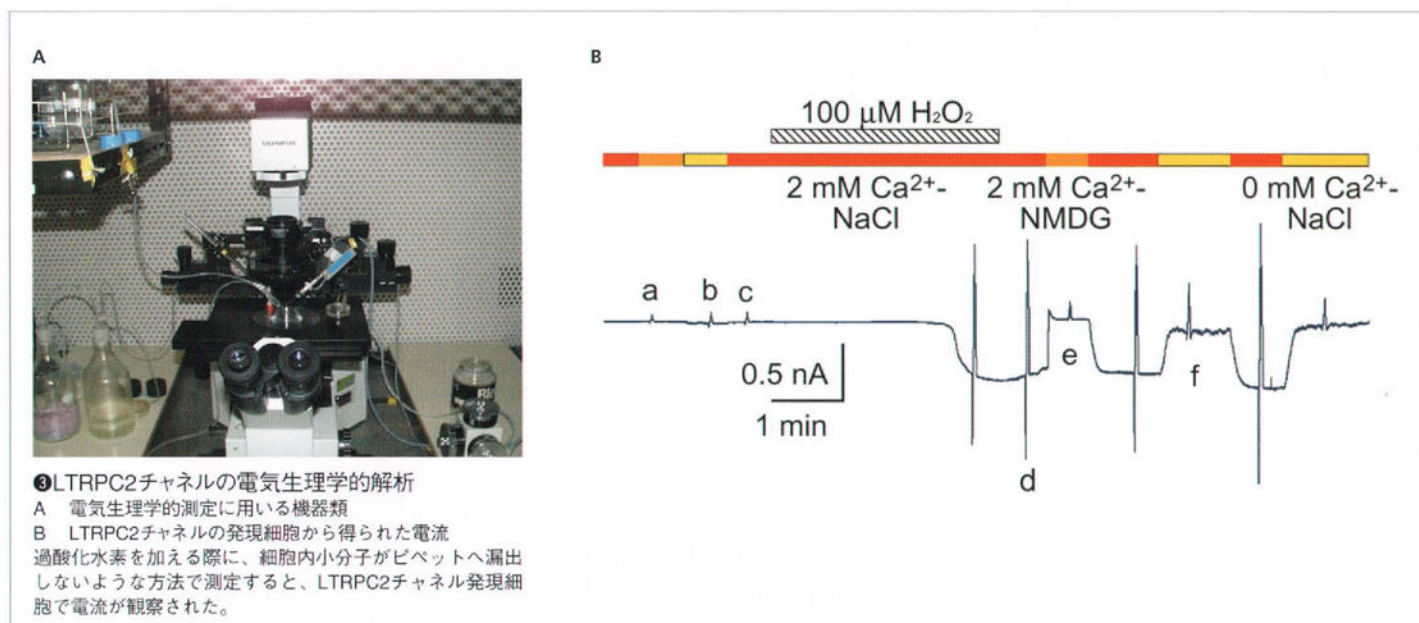
## 細胞死に関わるイオンチャネルの同定

以上の経緯を踏まえ、私たちは細胞外からのカルシウムイオン流入を担うイオンチャネルに着目し、特に細胞の生存と死に深く関与するイオンチャネルの同定を試みた。カルシウムチャネルは当初、細胞外からのカルシウムイオンの流入経路としての電位依存性カルシウムチャネルとリガンド依存性カルシウムチャネルが知られていた。しかし、生理的に重要なカルシウム流入経路はこれらだけにとどまらなかった。特に最近、Gタンパ

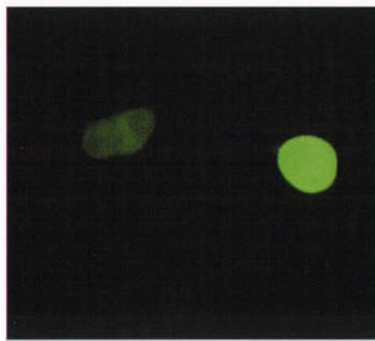
ク質共役型受容体などの活性化により作動する受容体活性化チャネルが、新たなカルシウムイオン流入経路として注目を集めている。

私たちも、候補分子を探索するにあたって、受容体活性化カルシウムチャネル群として知られる Transient Receptor Potential 遺伝子群 (*Trp*) に着目した。*Trp* はショウジョウバエの光受容器異常の原因遺伝子として同定され、後の研究によって、遺伝子産物である TRP タンパク質がカルシウムイオン透過型のチャネルであることが明らかになったものである。

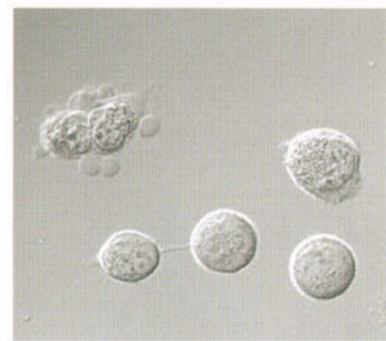
現在では、●に示すように、哺乳類の TRP 類似遺伝子が多数発見されている。このファミリーには、多発性嚢胞腎の原因である PKD (Polycystic Kidney Disease) 遺伝子や、細胞外の浸透圧の変化により活性化される OTRPC4 遺伝子、トウガラシの辛み成分であるカプサイシン受容体で、痛覚刺激に関与すると考えられている Vanilloid 受容体の遺伝子などが存在する。いずれの TRP 類似遺伝子も、さまざまな刺激に反応して細胞内にカルシウムイオンなどを透過することで、生体内において重要な役割を果たしているものと



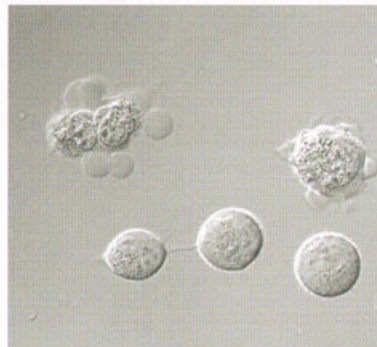




0



10



20



30

(分)

### ③ LTRPC2チャンネル発現細胞における細胞の形態変化

過酸化水素添加により、LTRPC2チャンネルの発現細胞は細胞質からの内容物の突出がみられる。(緑色の細胞: LTRPC2の発現マーカー)

考えられている。私たちが酸化ストレスに反応するチャンネルをTRPファミリーから探索した理由も、そこにある。

このようなTRPファミリーに属する遺伝子の一つに、ヒトゲノムプロジェクトの一環で発見されたLTRPC2遺伝子があった。私たちはまず、この遺伝子をデータベースで検索し、遺伝子産物のタンパク質(アミノ酸レベル)で13%の相同性をもつショウジョウバエ(*Drosophila*)のLTRPC2遺伝子のcDNAライブラリーを作成した。そこからcDNAクローニングによってターゲットの遺伝子を分離することに成功し、マウスの生体内で遺伝子を発現させてみた。その結果、脳、肺、脾臓、目においてLTRPC2遺伝子のmRNAが発現していることが、ノーザンブロットイングによって確認された。このことは、脳や肺などにおいてLTRPC2からなるチャンネル(LTRPC2チャンネル)が発現していた

ことを示している。

次に、LTRPC2チャンネルをヒトの胚腎細胞へ組換え発現させ、酸化ストレスを加えた時の細胞内カルシウムイオンの濃度測定を行った。その際、酸化ストレスのモデル系として、過酸化水素( $H_2O_2$ )を用いた。過酸化水素は酸素分子が2電子分還元された状態のもので、酸素毒の代表ともいえる化合物である。生体内においては、ある濃度まではペルオキシダーゼやカタラーゼなどによって処理される。一方で過酸化水素には、白血球内で殺菌のために利用されたり、甲状腺ホルモンの合成に用いられるという側面もある。LTRPC2チャンネルを発現させた細胞では、きわめて低濃度の過酸化水素によって、細胞膜を越える急激なカルシウムイオンの流入が引き起こされた。これほどの低濃度の過酸化水素で活性化されるカルシウムイオンチャンネルの存在は、こ

れまで知られていなかった。一方で、LTRPC2チャンネルを発現していない細胞では、そのような流入は起きなかった(②)。

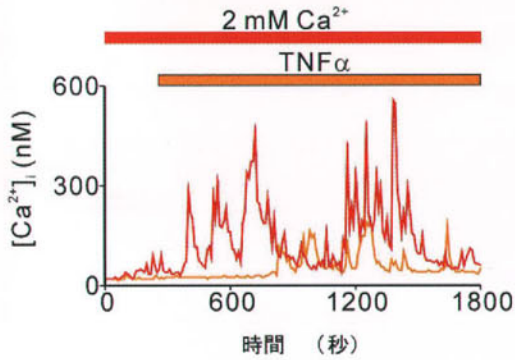
### LTRPC2チャンネルが活性化されるしくみ

過酸化水素はどのようにして、LTRPC2チャンネルを活性化したのであるか? 私たちは、イオンチャンネルの機能を直接測定できる電気生理学的解析を試みることにした。イオンチャンネルの中をイオンが透過することにより生じる電流を測定してみたのである。その際、細胞内の分子がピペット内に漏出することを防ぐために、細胞膜に小孔を開ける試薬をピペット内に加えておいた。そのうえでLTRPC2チャンネルを発現させた細胞に過酸化水素を加えて測定してみると、大きな電流が観察された(③)。しかし、ピペット内に細胞内小分子が漏出するよう

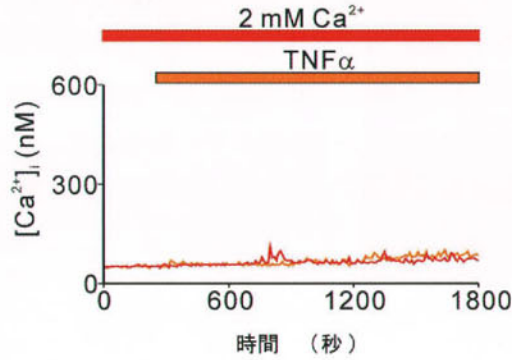


A

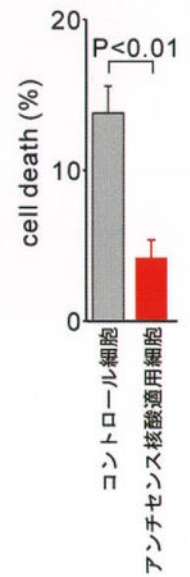
コントロール細胞



アンチセンス核酸適用細胞



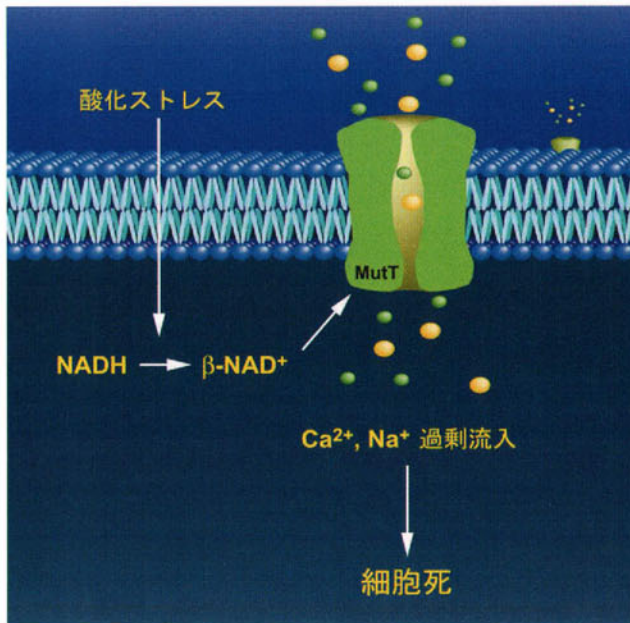
B



### ⑥ LTRPC2 アンチセンス核酸による細胞死の抑制

A 腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) によりもたらされたカルシウム流入と、LTRPC2 アンチセンス核酸適用による抑制効果

B TNF $\alpha$  により引き起こされた細胞死に対する LTRPC2 アンチセンス核酸による抑制効果



### ⑦ LTRPC2 チャンネルの活性化によりもたらされる細胞死のメカニズム

な通常の方法では、この電流は観察されなかった。

この結果は、何らかの細胞内小分子が LTRPC2 チャンネルの活性化に関与していることを示唆している。そして、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド ( $\beta$ -NAD $^+$ )こそが、LTRPC2 の活性化に

関与する分子であったことを突き止めた(4)。

NAD は微生物から高等生物までが広くもつ物質で、生体内の分子間、あるいは分子内の酸化還元反応を担っている。NAD には  $\alpha$ 、 $\beta$  の立体異性体が存在し、 $\beta$  型は補酵素としてのはたらきをもって

いる。実際に、今回の実験において、 $\beta$ -NAD $^+$  濃度が過酸化水素を加えることによって一時的に上昇することが確認できたことから、 $\beta$ -NAD $^+$  が過酸化水素による LTRPC2 チャンネルの活性化に介在しているのは確かであると思われる。さらに直接ピペット内に  $\beta$ -NAD $^+$  を加えて電流を測定したところ、LTRPC2 チャンネルを発現させた細胞では大きな内向き電流が見られた。

しかし、 $\beta$ -NAD $^+$  はどのようにして LTRPC2 に作用しているのだろうか？ LTRPC2 タンパク質のカルボキシル末端には、MutT モチーフとよばれるヌクレオチド結合モチーフが存在する。細胞に、MutT モチーフを欠失した LTRPC2 を発現させて調べた結果、MutT モチーフがチャンネル活性に必須であることが明らかになった。さらなる生化学的、電気生理学的解析により、 $\beta$ -NAD $^+$  が直接 MutT モチーフに作用することも明らかになった。

### 細胞死に関する LTRPC2 チャンネルの活性化

こうした一連の研究により、私たちは、LTRPC2 チャンネルが酸化ストレスによっ



原雄二 (はら・ゆうじ)

総合研究大学院大学・生命科学研究所・生理科学専攻3年。細胞の生存と死を制御する生体分子、シグナリングの解明を目指して研究を行っている。特に細胞外からのカルシウムイオン流入による生理的役割に着目している。



て活性化されることを証明することができた。しかし、さらなる謎が生まれた。LTRPC2チャンネルの活性化が細胞死をもたらすのかどうか、ということである。実験では、LTRPC2チャンネルを強制的に発現させた細胞に過酸化水素を加えると、細胞の内容物が外に吹き出すような形態が観察された(9)。また、細胞の生存数をトリパンブルー染色法により数えてみると、LTRPC2チャンネル発現細胞では生存数が明らかに減少していた。これらの結果は、LTRPC2チャンネル発現細胞において、比較的低濃度の過酸化水素によって細胞死が引き起こされたことを示唆するものとなった。

そこで次に、内在的にLTRPC2チャンネルを発現している細胞を用いて検討を行ってみた。アンチセンス核酸法を用いて、内在的に発現しているLTRPC2チャンネルの機能抑制を試みたのである。遺伝子から転写されたmRNA、あるいはmRNAからタンパク質へ翻訳されるためのtRNAは、ともに一本鎖である。アンチセンス核酸法は、こうした一本鎖領域に結合する核酸を設計し導入することで、遺伝子の材能発現を抑制する方法である。

LTRPC2チャンネルを発現している細胞としては、がん化インスリン分泌細胞株であるRIN-5Fを用いた。このRIN-5Fに

LTRPC2特異的なアンチセンス核酸を導入し、活性酸素種を加えてみた。アンチセンス核酸を導入していないコントロール細胞においては、活性酸素種を加えることにより、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と細胞死が引き起こされた。しかしアンチセンス核酸導入細胞では、コントロール細胞に比べて、有意に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と細胞死が抑制された。

これまでの実験系では細胞外から過酸化水素を加えてきたので、ミトコンドリアなどの細胞内から発生する活性酸素種でもLTRPC2チャンネルが活性化されるのかどうかを確認してみる必要があった。私たちは、腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )によって産生される活性酸素種によって、LTRPC2チャンネルが活性化される可能性を検討してみることにした。というのは、TNF $\alpha$ は細胞表面の特異的な受容体に結合し、さまざまな経路により細胞障害をもたらすことが知られており、その一つとして、ミトコンドリアなどから活性酸素種を過剰に放出させることがわかっているからである。

実際RIN-5FにTNF $\alpha$ を加えたところ、細胞内カルシウム濃度上昇が確認され、細胞死が引き起こされていることも確認された。ここでもLTRPC2チャンネルの発

現量を抑制するために、LTRPC2アンチセンス核酸を導入したところ、細胞内カルシウム濃度および細胞死は有意に抑制された(10)。さらに単球細胞株であるU937細胞においても同様の実験を行い、過酸化水素とTNF $\alpha$ 添加による細胞死が抑制されることを確かめた。このことからLTRPC2はさまざまな細胞株で、細胞死の誘導にはたらきうるということが明らかになった。

以上のような一連の研究によりLTRPC2は細胞内の酸化還元状態の破綻により活性化されるチャンネルであること、そして細胞死をもたらす分子の一つであることが、それぞれ明らかにされた(11)。このような研究は、単に学術的な成果としてだけではなく、医学分野に大きく貢献する可能性を秘めたものであるといえる。今後は、LTRPC2チャンネルの選択的な阻害剤の探索などにより、酸化ストレスが関与するさまざまな病態の改善に結びつく薬剤開発が期待される。

最後に、本研究におきまして御指導いただきました総合研究大学院大学生理学専攻(岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター)森泰生教授に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

[参考文献]

★カルシウムイオンとシグナル伝達(御子柴克彦、遠藤實、宮本英七編)共立出版

★細胞の誕生と死(長田重一、山本雅編)共立出版

★Mori, Y., Inoue, R., Ishii, M., Hara, Y., and Imoto, K. Dissecting receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> influx pathways: TRP channels and their native counterparts(2001).

Japanese Journal of Pharmacology, 87, 245-252.

★Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, M., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., and Mori, Y. LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death (2002). Molecular Cell, 9, 163-173.