

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：82648

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08199

研究課題名(和文)ケラチノサイトPiezo1による機械刺激受容とその役割の解明

研究課題名(英文)Physiological role of Piezo1 in mechanosensation in keratinocytes

研究代表者

鈴木 喜郎 (SUZUKI, Yoshiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・助教

研究者番号：40348503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Piezo1は生体内の様々な組織において外界からの機械刺激への応答に関与することが報告されているイオンチャネルであるが、表皮における生理機能は不明である。それを明らかにするために本研究ではまず表皮におけるPiezo1の局在部位を明らかにした。Piezo1はケラチノサイト(角化細胞)に存在していた。高い発現が認められた顆粒層最表層を単離し、電気生理学的手法により膜電流を測定した。また同時にケラチノサイト特異的Piezo1ノックアウトマウスの作製を行っている。今後それらを組み合わせることによってPiezo1の表皮における生理機能を明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：Piezo1 is a mechanosensitive Ca²⁺ permeable cation channel that has been reported to be important for mechanosensation in various tissues in our body. However, the physiological role of Piezo1 in the skin was still unknown. To reveal it, first we tried to identify the localization of Piezo1 in the epidermis and found that Piezo1 was predominantly expressed in keratinocytes. Next, we isolated keratinocytes from the superficial layer of the epidermis and succeeded the patch-clamp recordings. We also breed mice to generate the keratinocyte-specific Piezo1 knockout mice. By combining these, future studies should reveal the functional significance of Piezo1 in the epidermal keratinocytes.

研究分野：生理学

キーワード：表皮ケラチノサイト パッチクランプ Piezo1 機械刺激応答

1. 研究開始当初の背景

Piezo1 は 24-36 回膜貫通型の Ca^{2+} 透過性非選択性陽イオンチャネルであり、元々細胞への機械刺激に対するセンサーとして同定された。これまでの研究によって、赤血球における機械刺激受容とその後の細胞内電解質調節に関与すること、血管内皮細胞によるシェアストレスの受容とその後の血管形成に重要な役割を果たすなど、機械刺激受容を伴う様々な生理現象に関与することが示唆されている。皮膚においては Piezo1 の役割は不明であるが、相同性のある Piezo2 がメルケル細胞および一次感覚神経に発現し、外界からの light touch の受容とその伝達に関与することが報告された。しかしながら、主に弱い触覚感覚に機能する Piezo2 だけで皮膚における機械刺激の様々な応答を説明するには不十分であり、Piezo1 がそれを補完する鍵分子であると考え研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、皮膚の機械刺激受容におけるケラチノサイトのチャネル Piezo1 の役割を明らかにすることである。Piezo1 が皮膚において接触や感染などの刺激をどのような生理応答の情報へ変換するのか、分子レベルから個体レベルでの解析によりその具体的な役割を明らかにする。

3. 研究の方法

全ての動物実験は自然科学研究機構動物実験委員会の承認を得て行った。また全ての遺

伝子組換え実験は生理学研究所組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て行った。

Quantitative PCR, in situ hybridization, Western blotting, および免疫組織染色は定法において行った。抗体は Alomone anti-mPiezo1 抗体を用いた(1/500)。

4. 研究成果

まず Piezo1 がマウスの皮膚において強く発現していることを Quantitative PCR によって確認した。発現は皮膚が最も強く、次いで腎臓、肺、膀胱の順であった(data not shown)。次にマウス表皮ケラチノサイトにおける発現を in situ hybridization、Western blotting および免疫組織染色によって解析した。受精後 18 日のマウス胎仔の whole body in situ hybridization では Piezo1 mRNA のシグナルは表皮で最も強かった(図 1)。

Piezo1 抗体を用いた Western blotting において生後 1 日齢のマウス皮膚および単離ケラチノサイトにおいて Piezo1 タンパク質のバンドが検出され、そのシグナルは単離ケラチノサイトにおいてより強くなっていた。それらのバンドは抗原ペプチドを用いた吸収実験において消失した(data not shown)。さらに同じ抗体を用いた免疫組織染色において、成体マウス表皮において Piezo1 タンパク質の強いシグナルが検出された(図 2)。Piezo1 シグナルは表皮の最表層付近において強く発現していた。表皮ケラチノサイトの

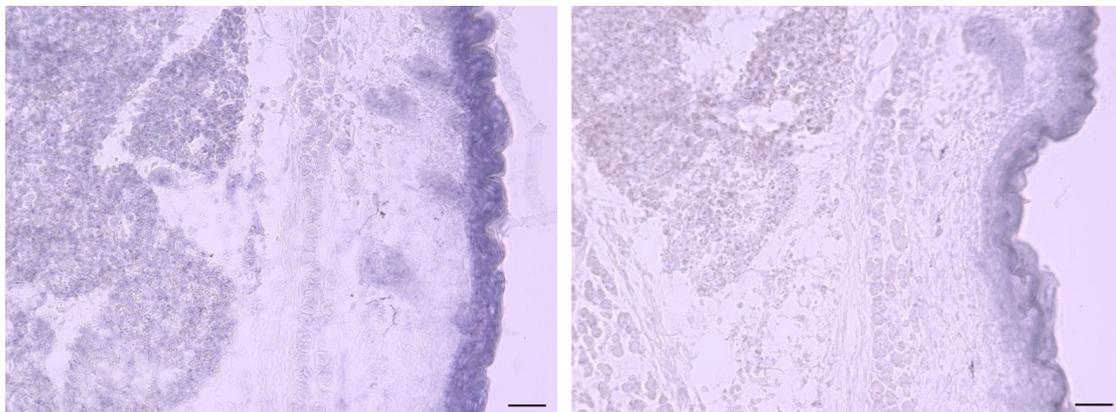


図 1 Piezo1 mRNA の表皮における分布 左: antisense 右: sense (bars= 50 μ m)

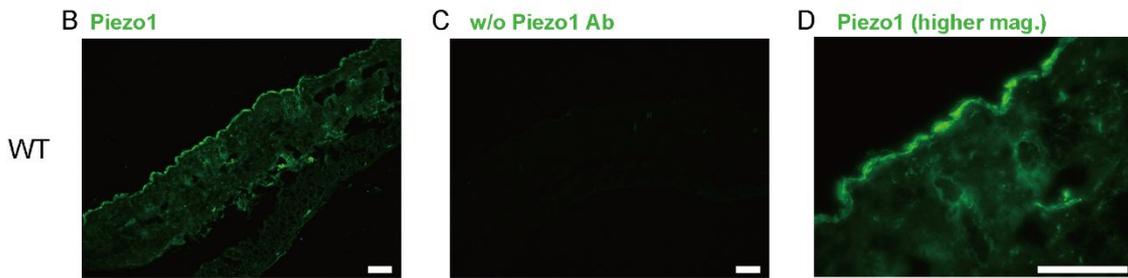


図2 Piezo1 タンパク質の表皮における分布 bars= 100 μm

最表層では顆粒層第一層の細胞が最終分化し角化することで角質層を形成するが、その顆粒層第一層において Piezo1 が強く発現していることが以上の結果から示唆された。

次にマウス表皮ケラチノサイトにおける Piezo1 の機能的な重要性を明らかにするためにケラチノサイトのうち顆粒層第一層の細胞の単離を試みた。しかしながら顆粒層の細胞を選択的に単離・培養したという報告は知り得る限り存在しなかった。そこで顆粒層第一層を EGFP でラベルしたマウスを理化学研究所との共同研究において用いることとした。また、細胞を単離した後で電気生理学的解析に用いることのできるような調整条件の検討を行い、試行錯誤の末、見出すことができた。Whole-cell patch-clamp 法を適用した結果、顆粒層第一層の細胞から初めて膜電流応答を記録することに成功した。角質層の形成に重要であると報告されている TRPV3 の顕著な活性が認められた一方で、tight junction 機能に重要であると報告されている TRPV4 の活性が消失していた。以上のことから、表層から 2 層目の細胞は tight junction 機能を担い、最表層の細胞は角質層の形成に重要な役割を担っていることが改めて示唆された。

さらにその知見を確かめるために単離角化細胞（最表層）において温度感受性電流の測定を行った。その結果、報告されている TRPV3 の活性化温度閾値である 31 度付近を

境に高温側で活性化する電流が観察された。細胞内 Ca 濃度の測定、およびノックアウトマウスを組み合わせた結果、TRPV3 の活性化単独では角化を誘導するシグナルとはならないが、TRPV3 がいないと角化のシグナルが進みにくいことが明らかになった。以上のことから TRPV3 が角化において重要であるが、それ以外の刺激によるシグナルが必要であることがわかり、間接的に Piezo1 による機械刺激受容の重要性が示唆された。

Piezo1 のケラチノサイトにおける機能的意義を明らかにするため、表皮特異的 Piezo1 マウスの作製を試みた。まず KOMP から Piezo1-loxP マウスの凍結精子を導入し、生理研・遺伝子改変動物作製室において個体化を行った。次にケラチノサイト特異的ノックアウトマウス作製のため、K5 (ケラチン 5) -Cre マウスを理化学研究所から入手した。しかしながら動物実験センターにうまく適応しなかったため、熊本大学 CARD より凍結精子を分与していただき、同様に生理研・遺伝子改変動物作製室において個体化を行った。その結果、マウスは動物実験センターの環境に適応した。現在、Piezo1-loxP と K5-Cre マウスを掛け合わせることによって表皮特異的 Piezo1 ノックアウトマウスを作製している。本マウス作成後、単離細胞における Piezo1 電流の測定、およびマウス皮膚バリア機能の解析などを行い、Piezo1 がケラチノサイトにおいて外界からの機械刺激への応答に関与しているかどうかを明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Fujita F, Uchida K, Takayama Y, Suzuki Y, Takaishi M, Tominaga M. “Hypotonicity-induced cell swelling activates TRPA1” Journal of Physiological Sciences in press. DOI: 10.1007/s12576-017-0545-9(査読有り)

Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. “Mouse anaphylactic hypotension is characterized by initial baroreflex independent renal sympathoinhibition followed by sustained renal sympathoexcitation.” Frontiers in Physiology 8: 16205, 2017 DOI: 10.3389/fphys.2017.00669(査読有り)

Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. “Biphasic renal sympathetic response of hemorrhagic hypotension in mice” Shock 48: 576-582, 2017 DOI: 10.1097/SHK.0000000000000889(査読有り)

Suzuki Y* (corresponding author), Watanabe M, Saito CT, Tominaga M*. “Expression of the TRPM6 in mouse placental trophoblasts; potential role in maternal-fetal calcium transport” Journal of Physiological Sciences 67: 151-162, 2017 DOI: 10.1007/s12576-016-0449-0 (査読有り)

Watanabe M, Suzuki Y* (corresponding

author), Uchida K, Miyazaki N, Murata K, Matsumoto S, Kakizaki H, Tominaga M*. “Trpm7 protein contributes to intercellular junction formation in mouse urothelium” Journal of Biological Chemistry 290, 29882-29892, 2015 DOI: 10.1074/jbc.M115.667899 (査読有り)

[学会発表](計1件)

Suzuki Y, Matsui T, Yamanoi Y, Atsugi T, Kubo A, Amagai M, Tominaga M “Functional expression of TRPV3 in the superficial layer of stratum granulosum of mouse epidermis” The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Takamatsu 2018.

[図書](計1件)

Peng JB, Suzuki Y, Gergely G, Hediger MA. “TRPV5 and TRPV6 calcium-selective channels” In Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells. Kozak JA and Putney JW eds. CRC Press pp. 241-274, 2017.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/member/suzuki/suzuki.html>

<https://researchmap.jp/yoshiro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 喜郎 (SUZUKI, Yoshiro)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイ
エンスセンター・助教

研究者番号：40348503