

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08504

研究課題名(和文) ほ乳類の網膜桿体経路におけるTRPM1チャネルの機能的役割

研究課題名(英文) Functional roles of TRPM1 channels in rod pathway of the mammalian retina

研究代表者

田丸 文信 (Tamalu, Fuminobu)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：70337541

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)：灌流液を22 から34 に上げると網膜桿体双極細胞は約20mV脱分極した。そのシナプス後細胞であるAIIアマクリン細胞では、灌流液の温度を上げることでEPSCの頻度と振幅が増大し、34 におけるEPSCの電荷量は22 の4.3倍になった。温度上昇によるAIIアマクリン細胞のEPSCの頻度の増加分はTRPブロックで完全に抑制されたが、振幅の増加分は一部しか抑制されなかった。TRPM1欠損マウスにおいては、振幅だけが温度で有意に増加した。これらの結果は、体温付近ではTRPM1が桿体双極細胞からのグルタミン酸の放出頻度に一役買っていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の結果から、TRPM1チャネルの開閉確率が体温付近で増加することで、桿体双極細胞からのグルタミン酸の放出頻度が上がり、その結果、光に対するグルタミン酸放出のダイナミックレンジが広がられていることが考えられる。桿体双極細胞は暗所視に寄与しているので、我々の研究結果は先天性の夜盲性疾患の解明などに役立つ可能性が考えられる。ただ、TRPM1チャネル単体には温度感受性がないため、細胞内リガンドやその他の細胞内因子が関連していると考えており、この点について今後明らかにしていきたい。

研究成果の概要(英文)：Retinal rod bipolar cells (RBCs) depolarized approximately 20 mV as the temperature was raised from 22 to 34 . Both the frequency and amplitude of EPSCs observed in the AII amacrine cells, that are post-synaptic to RBCs, increased at a higher temperature, and that the electric charge of EPSCs at 34 was about 4.3 times greater than that at 22 . The increased frequency of EPSCs at 34 decreased by adding ruthenium red (RR), which is a TRP channel inhibitor. Similarly, the EPSC amplitude increased at a higher temperature, but was partially inhibited by RR. In TRPM1 KO mice, only the amplitude increased significantly at a higher temperature. Our findings indicate that the TRPM1 plays a role in the glutamate release frequency from RBCs at physiological temperature. It is likely that the body temperature may expand the dynamic range of glutamate release from RBCs by increasing the open probability of TRPM1 channel contributing to scotopic vision.

研究分野：神経生理学

キーワード：網膜 TRPM1 桿体双極細胞 AIIアマクリン細胞 パッチクランプ EPSC 温度 グルタミン酸放出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類の網膜では、桿体視細胞からの光情報は桿体双極細胞へ伝達され、その後 AII アマクリン細胞 (AII 細胞) を介して、網膜出力細胞である神経節細胞に送られ脳へ伝達される。桿体視細胞と桿体双極細胞は、活動電位を発生せず緩電位で情報伝達を行う。すなわち、膜電位変化分に応じてアナログ様式で神経末端からグルタミン酸が放出される。桿体視細胞のグルタミン酸放出のメカニズムや細胞内カスケードは詳しく調べられているが、桿体双極細胞に関しては不明な点が多く残っていた。桿体双極細胞の樹状突起には代謝型グルタミン酸受容体である mGluR6 が発現しており、光を受けると G 蛋白系カスケードを介して下流の非選択性陽イオンチャンネルが開くことはわかっていたが、主要なセカンドメッセンジャーや非選択性陽イオンチャンネルそのものが何であるかは長い間不明であった。

その後、2009 年から 2010 年にかけて、TRP チャンネルの 1 つである TRPM1 が桿体双極細胞の樹状突起に発現していること、及び、TRPM1 を欠損させたマウスでは暗所視における網膜電図の b 波 (桿体双極細胞由来) が消失してしまうことから、TRPM1 チャンネルが桿体双極細胞の非選択性陽イオンチャンネルであることが明らかになった。1997 年に TRP ファミリーの 1 つである TRPV1 に温度感受性があることが初めて報告され、現在では 11 種類の TRP チャンネルが温度感受性を持っていることがわかっているが、TRPM1 は温度感受性を示さないことが報告されている。

報告者は、予備実験で桿体双極細胞のシナプス後細胞である AII 細胞からシナプス電流を記録し、温度との関係を調べた。その結果、灌流液の温度を室温から体温付近にまで上げると、AII 細胞の興奮性シナプス後電流 (EPSC) の振幅と頻度が劇的に増大した。ほ乳類から網膜電図を記録する際、体温付近でないと桿体双極細胞由来の b 波が観察できないことは古くから知られており、これは報告者の予備実験の結果と合致する。すなわち、少なくともほ乳類の網膜桿体双極細胞では、体温が神経伝達物質放出における極めて重要な因子の 1 つであることが考えられた。

2. 研究の目的

桿体双極細胞の膜電位の温度依存性を定量的に解析することを第 1 の目的とした。第 2 に、桿体双極細胞からの神経伝達物質 (グルタミン酸) 放出が温度によってどのように変わるのか調べるため、AII 細胞からパッチクランプ法を適用して EPSC を定量的に解析した。さらに、TRP ブロッカーや TRPM1 KO マウスを用いて、これらの温度依存性グルタミン酸放出機構と TRPM1 チャンネルとの関連を調べることを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

桿体双極細胞にパッチクランプ法を適用し、室温 (22) と体温 (34) で膜電位を測定した (麻酔下のマウス眼球内に温度計のプロープを入れて計測したところ 34 であった)。さらに、TRP ブロッカーであるルテニウムレッドを灌流液に加えた時の桿体双極細胞の膜電位、および AII 細胞の EPSC の電荷量と頻度、そして振幅を比較し解析した。また、TRPM1 KO マウスを用い、同様の実験をおこなった。

4. 研究成果

(1) 桿体双極細胞の膜電位は温度で有意に上昇する

灌流液の温度を 22 から 34 まで上昇させたところ、野生型マウスでは桿体双極細胞の膜電位が 19.6 ± 1.2 mV 上昇した (n=10)。灌流液に TRP ブロッカーであるルテニウムレッドを加えたところ、桿体双極細胞の膜電位が 12.4 ± 1.2 mV 上昇した (n=5)。さらに TRPM1

KO マウスでも同様の実験をおこなったところ、膜電位が 12.3 ± 2.3 mV 上昇した ($n=6$)。温度による上昇分を多重比較した結果、野生型の上昇分が他の 2 群と比べて有意に大きかった ($p < 0.05$)。これらの結果から、野生型における杆体双極細胞が温度に依存して脱分極するのは、TRPM1 チャンネルを介している可能性が示唆された。

(2) 野生型マウスの AII 細胞から記録される EPSC の頻度と振幅は温度で増え、TRP ブロッカーで頻度の温度増加分だけが抑制される

杆体双極細胞の膜電位が温度によって上昇するという事は、そのシナプス後細胞である AII 細胞への神経伝達物質放出にも影響があると考えられる。この点を明らかにするため、パッチクランプ法を用いて AII 細胞からシナプス電流を記録した。電気生理学および薬理学的解析から、AII 細胞で記録されるシナプス電流は、そのほとんどが杆体双極細胞からの EPSC であった。AII 細胞の EPSC は灌流液を 22 から 34 に上げると劇的に上昇し、ルテニウムレッドで一部抑制された (図 1 a-c)。EPSC のイベント間隔と振幅を累積度数分布で表した (図 1 d-e, 黒線が 22 , 赤線が 34 , 青線が 34 + ルテニウムレッド)。これらを定量的に解析したところ、EPSC の頻度と振幅は温度によって有意に増加したことがわかった。ルテニウムレッドによって頻度の温度増加分は完全に抑制されたが、振幅の増加分は一部しか抑制されなかった (図 1 d-e の挿入図) (*, $p < 0.05$)。

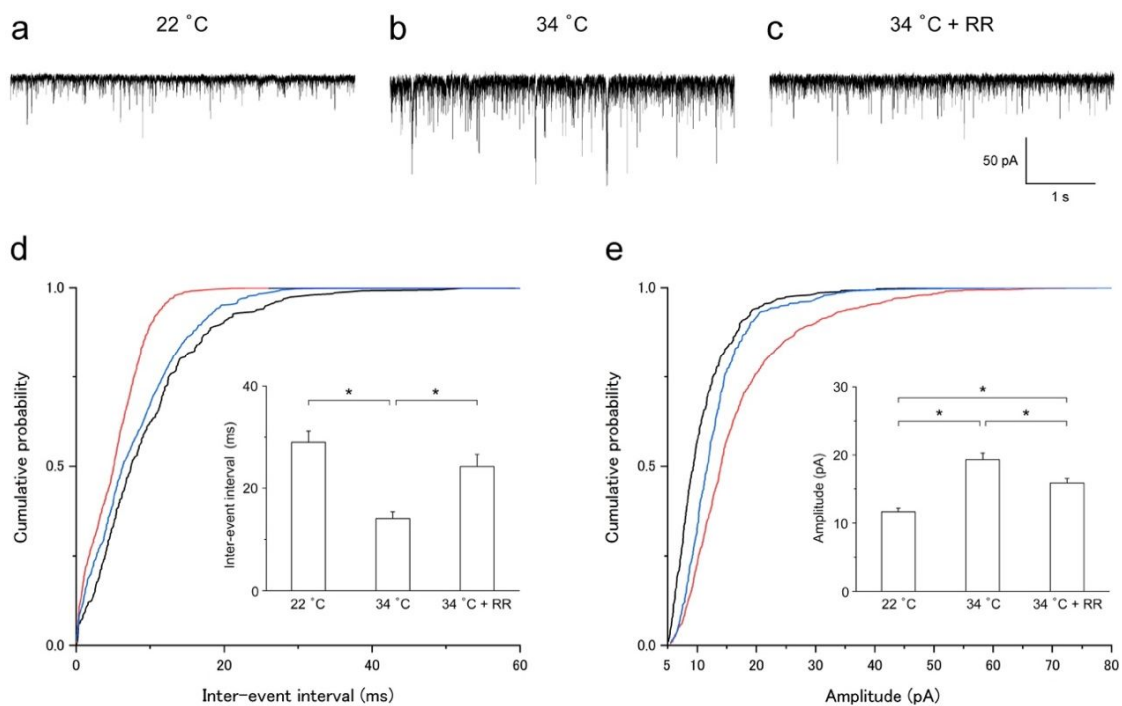


図 1 . AII 細胞で観察された EPSC の温度依存性とルテニウムレッドの効果

(3) TRPM1 KO マウスの AII 細胞から記録される EPSC の振幅は温度で増加するが頻度は変わらない

TRPM1 KO マウスを用いて AII 細胞の EPSC の温度による影響を調べたところ、温度上昇によって EPSC が増加した (図 2 a-b)。TRPM1 KO マウスでは記録した全ての AII 細胞で 3 ~5 Hz の自発的なオシレーションが見られ、温度を上げるとオシレーションの振幅が小さくなった ($n=4$)。さらに、TRPM1 KO マウスでは EPSC が重なって観察されることが多かった (図 2 a-b の矢印)。増加した EPSC を解析したところ、温度によって有意に増えたのは振幅のみであった (図 2 c-d, 累積度数分布の黒線が 22 , 赤線が 34 ; 挿入図の*, $p < 0.05$)。

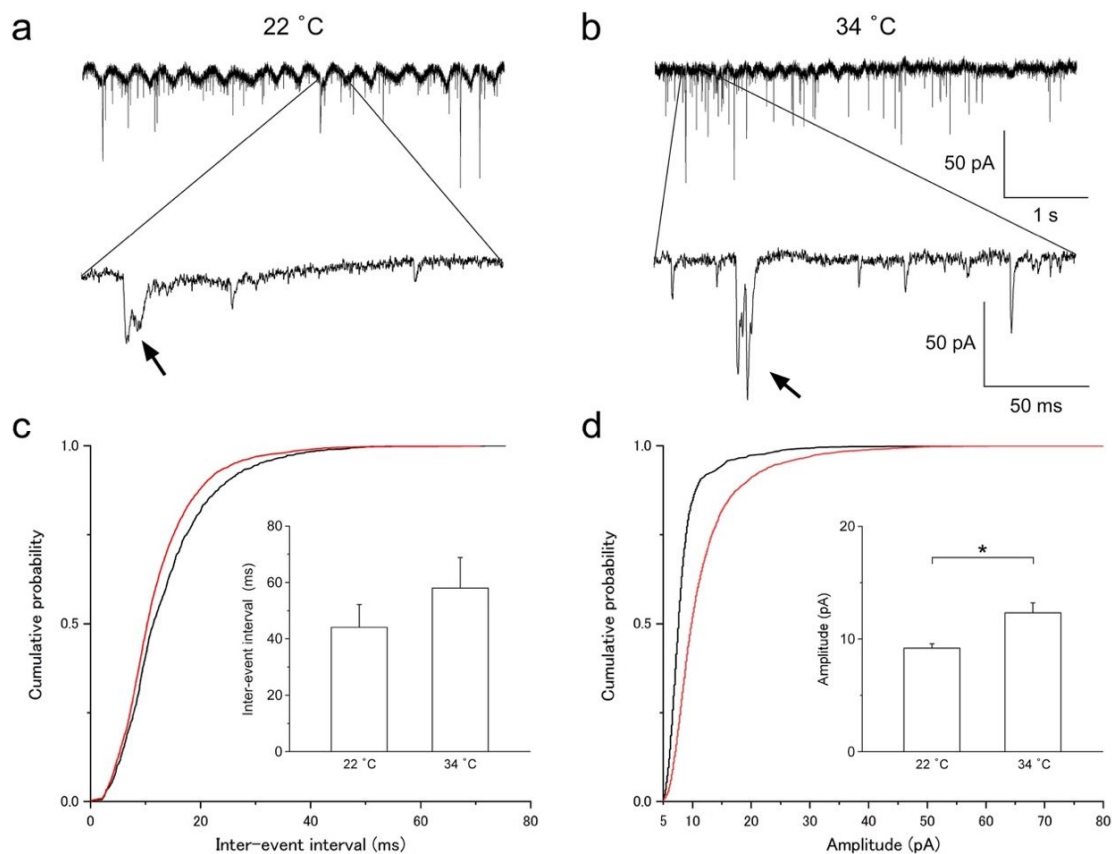


図 2 . TRPM1 KO マウスの AII 細胞で観察された EPSC の温度依存性

(4) 杆体双極細胞と AII 細胞との正常シナプスの構築には TRPM1 チャンネルが必要である
 TRPM1 KO マウスから AII 細胞の EPSC を記録をしている時に、AII 細胞の樹状突起が少ないことに気付いた。TRPM1 KO マウスの提供元である大阪大学の古川貴久教授と話し合い、TRPM1 が杆体双極細胞と AII 細胞のシナプス形成に関連しているのではないかと仮説を立て、共同研究を始めることにした。この点については研究当初予期していなかったため、新たに時間を割いて実験を進めることにした。さまざまな遺伝子を欠損させたマウスを用いて詳細な解析をおこなった結果、TRPM1 が開口シグナルの放出が起こることが、発達段階における杆体双極細胞と AII 細胞の正常なシナプス形成に必要であることが明らかになった (図 3 A TRPM1 と VGlut1 を欠損させたマウスでは膜容量が有意に小さい、すなわち細胞の容積が小さい、B 実際に共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した AII 細胞の蛍光像)。我々の研究から派生した、この新たな知見は、2018 年に Journal of Neuroscience に発表した。

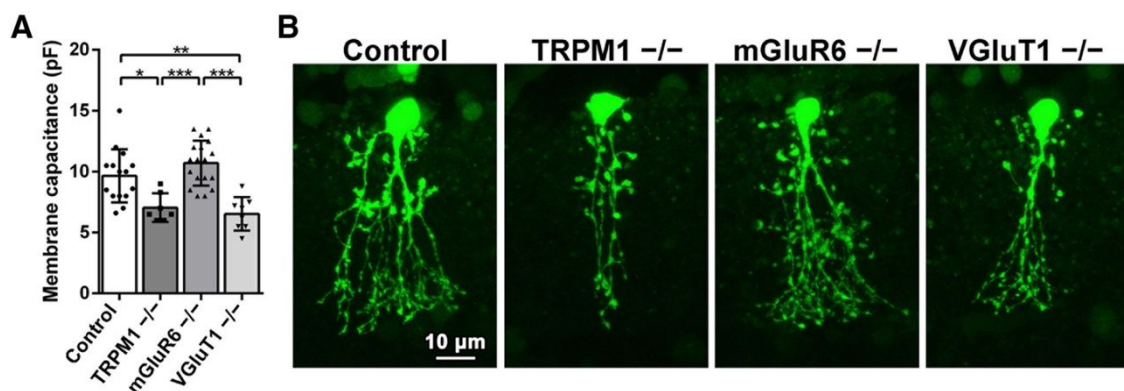


図 3 . さまざまな遺伝子を欠損させたマウスにおける AII 細胞の膜容量と形態

(5) まとめ

TRPM1 チャンネルは杆体双極細胞と AII 細胞の正常なシナプス形成に必要不可欠であることを明らかにした。また、TRPM1 チャンネルは杆体双極細胞からのグルタミン酸放出頻度に関与していることがわかった。体温付近において TRPM1 チャンネルの開口確率が上がることによって、杆体双極細胞からのグルタミン酸放出頻度が増え、その結果、杆体経路における視覚情報のダイナミックレンジが広げられ、より精細な視覚情報を得ることができると考えられる。しかしながら、TRPM1 チャンネル単体では温度感受性は認められていないことから、細胞内リガンドなどの細胞内分子が TRPM1 チャンネルに影響を与えている可能性が高い。今後は、これらの分子メカニズムを明らかにしていきたい

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kozuka Takashi, Chaya Taro, Tamalu Fuminobu, Shimada Mariko, Fujimaki-Aoba Kayo, Kuwahara Ryusuke, Watanabe Shu-Ichi, Furukawa Takahisa	4. 巻 37
2. 論文標題 The TRPM1 Channel Is Required for Development of the Rod ON Bipolar Cell-All Amacrine Cell Pathway in the Retinal Circuit	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 9889 ~ 9900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0824-17.2017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 F. Tamalu and S.-I. Watanabe
2. 発表標題 Temperature-dependent synaptic transmission between rod bipolar and All amacrine cells in the mouse retina
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Kozuka, M. Shimada, F. Tamalu, T. Chaya, S. Mikusa, T. Furukawa
2. 発表標題 Role of TRPM1 channel in retinal circuit development
3. 学会等名 XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research: ISER2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

田丸文信の研究内容

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/seiri2/research-retina.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----