

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15024

研究課題名（和文）細胞内温度と細胞膜温度活性化TRPチャネル電流の同時計測

研究課題名（英文）Simultaneous measurement for intracellular temperature and activity of thermosensitive TRP channel

研究代表者

宇治澤 知代（Ujisawa, Tomoyo）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特別研究員

研究者番号：10816515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：正確な温度感受性TRPチャネルの活性化温度閾値の決定はなされていない。というのは、一般に細胞から少し離れた溶液の温度を測定しているからである。そこで、細胞内温度を蛍光温度プローブを用いて計測して、細胞内温度と膜電流の同時計測を行うシステムを立ち上げた。まず、室温からTRPV1活性化閾値付近までの細胞内温度の変化を解析した。同時計測システムとして、赤外線レーザー搭載の共焦点顕微鏡とパッチクランプ法による電流計測システムを組み合わせ、HEK293細胞のrat TRPV1定常発現株において周辺ノイズを極力低減させてチャネル電流を記録することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度感受性TRPチャネルの活性化温度閾値は膜電流とパッチクランプされた細胞近傍の外溶液温度の同時計測から決定されている。しかし、細胞外からの熱刺激による細胞内温度、さらにはTRPチャネルが発現する形質膜付近の温度変化とチャネル応答を同時記録した研究はない。さらには、IRレーザーを用いて局所温度変化を与えた際の分子の活性変化を報告したものはなく、今後cell-attached法による単一チャネル電流解析から、チャネルgatingへの影響も解析可能であり、細胞膜温度変化からチャネル開口に至る過程の解明に寄与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：It is hard to determine the accurate temperature thresholds for activation of thermosensitive TRP channels since people measure the temperature in the bath solution closed to the patch-clamped cell expressing thermosensitive TRP channels. Therefore, we attempted to develop the system for the simultaneous measurement of the intracellular temperature and membrane currents using a fluorescent temperature probe. We introduced the fluorescent temperature probe into the HEK293 cells and analyzed the changes in fluorescent ratio upon local stimulation with infrared laser. Then, we combined the patch-clamp system on the confocal microscope with the infrared laser. We clearly observed rat TRPV1-mediated membrane currents with this system upon laser stimulation. Thus, we could establish the system for the simultaneous measurement of intracellular temperature and thermosensitive TRP channel currents.

研究分野：生理学

キーワード：TRP channel 細胞内温度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度を感知する分子として温度感受性 TRP チャンネルが知られている。温度感受性 TRP チャンネルは、その最初の分子 TRPV1 の発見(1997 年)から 24 年、これまでに 11 (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5)が明らかになっており、そのいくつかは単一チャンネル電流記録や人工脂質二重膜による解析から、温度により直接活性化されることが示されている。2013 年に低温電子顕微鏡を用いた精製蛋白質の単粒子解析から、3.4Å の解像度で TRPV1 の原子レベルでの構造が明らかにされてゲーティングモデルが提唱され、2016 年に脂質 nanodisc に埋め込んだ精製 TRPV1 蛋白質の構造解析から、熱刺激により膜脂質の translocation が起こってチャンネルが開くモデルが提唱されたが、未だ確定には至っていない。

2. 研究の目的

現在、膜電流とパッチクランプされた細胞近傍(10-20 μm 以内)の溶液温度の同時計測から温度依存的な活性化電流の Arrhenius plot を作成し、その変曲点をもって活性化温度閾値が決定されている。一方、2010 年以降、生細胞への応用を目的にした温度計測プローブの開発が急速に進み、これによって細胞内温度計測が可能になった。TRP チャンネルの動態が温度変化に応じてどう変わるのかを精密に定量化することは、温度感受性 TRP チャンネルの開きメカニズムを解析する上で欠かせない。そこで、細胞内温度計測プローブを用いて、細胞内温度を正確に計測しながらパッチクランプ法による膜電流解析を同時におこなうシステムを開発し、細胞(形質膜)温度と膜電流解析から、温度感受性 TRP チャンネルの正確な温度閾値を決定することを目的とした。

3. 研究の方法

正確な温度測定が可能になる 2 蛍光型(1 波長励起、2 蛍光吸収波長)で膜透過型の温度プローブを用いる。この温度プローブが HEK293T 細胞内へ導入される最適条件を検討する。細胞外温度を変化させたときに、それに伴った細胞内(形質膜)温度の変化が計測できることを確認する。この蛍光温度プローブが導入された細胞を用いて、既に所有する細胞内蛍光シグナルイメージング装置とパッチクランプ法による膜電位計測装置を組み合わせたシステムを適用して、温度と電流の同時計測ができることを確認する。溶液温度情報、細胞膜電流情報、そして温度計測プローブによる細胞内温度情報を同時にデータ取得して、それぞれ Arrhenius plot を作成し、従来の測定法から得た結果と温度プローブを用いた測定法との比較から活性化温度閾値を決定する。

4. 研究成果

蛍光温度計測プローブを細胞へ導入し、ステージトッピングインキュベーターを用いて、室温から

TRPV1 活性化閾値付近である約 40°Cまで温度上昇させた際のレシオ値(細胞内温度)の変化を解析した。また、同時計測を行う際に使用する加熱装置には赤外線レーザーを用いるため、赤外線レーザーの出力調整をおこなう必要があった。赤外線レーザーの出力値を等間隔で上昇させ、照射中の温度プローブを導入させた細胞の画像取得をおこない、そのレシオ値を上記のステージトッピンキュベーターを用いた際のレシオ値と対応させることで、赤外線レーザーの出力値と加熱能力を求めた。

同時計測システムとして、赤外線レーザー搭載の共焦点顕微鏡にパッチクランプシステムを組み合わせた。ところが、付属のステージチャンバーでは細胞へのアプローチが困難であったため、新たにチャンバーを作製した。そのうえで、HEK293 細胞の rat TRPV1 定常発現株において周辺ノイズを極力低減させてチャンネル電流を記録することに成功した。このように、システムの改良に時間を要したが、細胞内温度と膜電流の同時計測をおこなう環境を整えることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Tomoyo Ujisawa, Kunitoshi Uchida, Kohki Okabe, Takeharu Nagai, Makoto Tominaga |
| 2. 発表標題 Simultaneous intracellular temperature imaging during patch-clamp recording of TRPV1 activity |
| 3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoyo Ujisawa, Kunitoshi Uchida, Kohki Okabe, Makoto Tominaga |
| 2. 発表標題 Simultaneous measurement of thermosensitive TRP channels activity and intracellular temperature |
| 3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|