

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670290

研究課題名(和文) マウスTRPA1スプライスバリエントの病態生理学的意義は何か？

研究課題名(英文) Pathophysiological significance of the splice variant of mouse TRPA1

研究代表者

富永 真琴 (Tominaga, Makoto)

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・教授

研究者番号：90260041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス感覚神経にfull lengthのTRPA1 (TRPA1a)より30アミノ酸だけ小さいsplice variant (TRPA1b)が存在することを見いだした。神経細胞でTRPA1aとTRPA1bが結合することによって、細胞膜にTRPA1a/TRPA1b複合体量が増えることがわかった。TRPA1a, TRPA1bの共発現によってTRPA1電流の著しい増大が観察された。炎症性疼痛モデルマウス、神経障害性疼痛モデルマウスの後根神経節ではTRPA1b遺伝子の経時的増大が観察され、TRPA1活性も増大した。TRPA1bの増加によってTRPA1活性が増大して痛み増強につながっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a nonselective cation channel. Although many studies suggest that TRPA1 is involved in inflammatory and neuropathic pain, its mechanism remains unclear. We identified an alternative splicing variant of the mouse *Trpa1* gene. TRPA1a (full-length) and TRPA1b (splicing variant) physically interacted with each other, and TRPA1b increased the expression of TRPA1a in the plasma membrane. TRPA1a and TRPA1b co-expression significantly increased current density in response to different agonists. Exogenous overexpression of *Trpa1b* gene in wild-type DRG neurons also increased TRPA1a-mediated AITC responses. Moreover, expression levels of *Trpa1a* and *Trpa1b* mRNAs changed dynamically in two pain models (complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain and partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain models). These results suggest that TRPA1 may be regulated through alternative splicing under these pathological conditions.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：疼痛学

1. 研究開始当初の背景

ワサビ受容体 TRPA1 は 2003 年に侵害性冷刺激の受容体として報告され、以降様々な侵害性の化学物質によって活性化して侵害刺激受容に關与することが明らかになっている。2006 年に 2 つのグループから欠損マウスの表現型が報告されたが、侵害性冷刺激受容に關与する、しない、と結果が分かれた。哺乳類 TRPA1 は温度感受性を持たないとする考え方もある。確かに、私たちはワサビやシナモン (いずれも TRPA1 の活性剤) を口にしても冷感を感じることはない。一方、白金製剤に屬する抗がん剤オキサリプラチンは冷環境で痛みを起こすことが知られており、TRPA1 を活性化する。

このようにヒトやマウスでは、TRPA1 の冷刺激感受性に結論は出ていないが、ショウジョウバエ TRPA1 は 28 度くらいの熱刺激で活性化し、私たちも TRPA1 に相当するミツバチ TRPA チャンネル(HmAsTRPA)を遺伝子クローニングし、34 度以上の熱刺激で活性化することを報告した。昆虫では、哺乳類のように TRPV チャンネルや TRPM チャンネルではなく、複数の TRPA チャンネルを利用して環境温度を感知することが明らかになっている。化学物質感受性は哺乳類 (ヒトおよび齧歯類) TRPA1 と昆虫 TRPA1 で大きな差はない。この事実は、昆虫と哺乳類で TRPA1 の温度感受性が逆転したことを意味する。

私たちはアフリカニシツメガエルの TRPV3 の遺伝子クローニングを行い、哺乳類で温かい温度を感知する TRPV3 がアフリカニシツメガエルでは侵害性冷刺激のセンサーとして働き、温度感受性が進化過程で逆転する例を既に報告している。2010 年に赤外線獲物や敵を感知する毒蛇のピット膜で三叉神経終末に発現する TRPA1 がピット膜の温度上昇を感知して活性化する熱刺激センサーとして機能することが報告されて注目を浴びた。そこで、私たちは脊椎動物 TRPA1 の温度感受性に興味をもち、アフリカニシツメガエル (両生類) とグリーンアノールトカゲ (爬虫類) の TRPA1 遺伝子をクローニングして機能解析を行い、それぞれ活性化温度閾値が 40 度、34 度の熱刺激センサーとして機能していることを明らかにした。

多量体として機能するイオンチャンネル分子では、splice variant はその code する蛋白質の機能を制御する大きな因子となる。侵害刺激受容に關わるもう一つの重要な分子、カプサイシン受容体 TRPV1 にもいくつかの splice variant が報告されているが、病態生理学的に大きな意味をもつものは明らかになっていない。Dominant negative に働くと報告されている TRPV1 splice variant が存在する。ワサビ受容体 TRPA1 には splice variant が報告されていないことから、PCR による遺伝子部分断片の増幅を行ったところ、2 つの molecular weights の bands が観察され、sequence 解析から splice variant であることが確認された。

2. 研究の目的

最大の疑問は、「なぜ、哺乳類 TRPA1 が他の動物の TRPA1 と異なる温度感受性を持つか？」ということである。そこで、マウス TRPA1 に splice variant がないかどうかを検討して、異なる温度感受性の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス TRPA1 splice variant の発現解析 (mRNA および蛋白質レベル)

(2) マウス TRPA1 splice variant のヘテロマー形成解析 (共沈実験)

(3) マウス TRPA1 splice variant がヘテロマーを形成するかどうかを HEK293 細胞に共発現させて、whole-cell patch-clamp 法、inside-out patch での単一電流記録法で TRPA1 電流解析を行う。

(4) マウス感覚神経に varinat を強制発現させて、機能変化を Ca-imaging 法で解析する (野生型マウスと TRPA1 欠損マウスを用いる)

(5) マウス TRPA1 splice variant のヘテロマー形成の生理的意義を、炎症性疼痛モデルマウス及び神経傷害性疼痛モデルマウスの行動薬理的解析と TRPA1 splice variant mRNA の発現変化解析から検討する。

4. 研究成果

マウス DRG での TRPA1 遺伝子 PCR 解析で 2 つ PCR products があることが分かり、シーケンス解析から、既に報告されている full length (TRPA1a) の他に Exon20 を欠いた splice variant (TRPA1b) が存在することが明らかになり、それは、感覚神経のほかに腸組織でも確認された。また、Single-cell RT-PCR を行ったところ、TRPA1a mRNA が発現する全ての TRPA1a mRNA 発現細胞で TRPA1b mRNA の発現が観察された。加えて、マウス後根神経節で、western blot 法による解析で、2 つの遺伝子産物によると思われる分子量の異なる 2 つの bands が確認された。このことから、感覚神経のみならず、これまで TRPA1 の発現が報告された細胞で共通して splice variant が発現するものと結論した。

2 つのタンパク質を別々に認識する抗体がないので、タグタンパク質、TRPA1a-EGFP、TRPA1b-FLAG を HEK293T 細胞に共発現させて、抗 EGFP 抗体、抗 FLAG 抗体による免疫組織化学解析を行った。両タンパク質の細胞膜での共発現を確認した。そこで、TRPA1a、TRPA1b が物理的に結合しているかどうかを、共免疫沈降法で解析し、両タンパク質が複合体を形成していることがわかった。Heteromer を形成している可能性が考えられたが、native page 電気泳動法では、非常に分子量の大きな band が観察され、四量体+四量体の大きな複合体を形成している可能性が示唆された。これまで、四量体を形成するとされるイオンチャンネルで、splice variant が囲むような格好で

多量体を形成することは報告されておらず、新しいチャネル複合体形成の例かもしれない。形質膜ピオチン化法によって形質膜でのタンパク質発現を解析したところ、TRPA1a, TRPA1b を共発現させたときに、TRPA1a の形質膜での発現量が2倍以上に増えており、TRPA1b が TRPA1a と結合することによって、形質膜への発現（膜への移送の増大が膜へのとどまりの延長）を増強していることが分かった。

パッチクランプ法によって、TRPA1a 単独発現細胞、TRPA1b 単独発現細胞、TRPA1a, TRPA1b 共発現細胞で TRPA1 刺激物質 allyl isothiocyanate (AITC) への応答を観察した。TRPA1b 単独発現細胞では AITC に対する応答電流が観察されなかったが、TRPA1a, TRPA1b 共発現細胞で AITC 応答電流の著しい増強が観察された。この TRPA1 電流の増強は、AITC のみならず、2-APB, carvacrol, thymol 等の活性化機構の異なる他の TRPA1 刺激剤でも観察された。そして、それらの刺激剤の濃度依存性の解析から EC_{50} 値を変化させることなく絶対応答量を増大させていることが分かった。つまり、potency を変えるのではなく、efficacy を変えているのである。これは、形質膜でのタンパク質発現量だけが変化していることで説明できる。この結果をさらに確かめるために、inside-out 法による単一チャネル電流解析を行い、共発現によって AITC で活性化される TRPA1 チャネル電流の unitary amplitude、キネティクスに変化はなく、open probability が増大することが確かめられた。これも、形質膜上に発現する TRPA1a タンパク質の量的増大だけで説明可能である。

上記の電気生理学的解析での共発現による形質膜 TRPA1a 電流の増大を感覚神経でも確認すべく、マウス後根神経節細胞を用いた Ca-imaging 法による解析を行った。野生型マウスから調整した後根神経節細胞に TRPA1b を強制発現させたところ、capsaicin による細胞内 Ca 濃度増加に変化はなく、AITC による細胞内 Ca 濃度が有意に増大した。また、AITC, capsaicin への応答細胞割合に変化がないことから、TRPA1b 強制発現は TRPV1 機能に影響を与えず、TRPA1 機能を増強（おそらく形質膜の TRPA1a 発現を増大させて）しているものと考えられた。TRPA1 欠損マウスから調整した後根神経節細胞に TRPA1a, TRPA1b を段階的に発現させていっても、その効果は野生型マウスの後根神経節細胞を用いた実験と変わりなかった。

この TRPA1b による TRPA1 機能増強の病態生理学的意義を解析する目的で、マウスの後肢に CFA を注入による炎症性疼痛モデルおよび座骨神経部分結紮による神経障害性モデルを作成した。両モデルで2週間にわたって疼痛機械刺激閾値の低下（機械刺激過敏）が観察された。この疼痛機械刺激閾値の低下は、TRPA1 欠損マウスでは有意に小さかったことから、TRPA1 が両モデルでの機械刺激痛

覚過敏に関わっていることが分かった。両モデルマウスから調整した後根神経節細胞では AITC 投与に対する細胞内 Ca 濃度上昇が有意に増大していた。また、両モデルで TRPA1a mRNA, TRPA1b mRNA の量を経時解析したところ、TRPA1b mRNA が日を追って増大していることが分かった。

上記の実験から、炎症性疼痛、神経障害性疼痛時には、TRPA1 splice variant (TRPA1b) の発現が有意に増大し、TRPA1a の形質膜発現を増大させて痛み増強に寄与しているものと考えられた。残念ながら、ヒト TRPA1 遺伝子には、同じ部位の splice variant は確認できなかった。しかし、ヒト TRPA1 でも、他の部位の splice variant が同じように働いている可能性は残る。また、炎症時や神経障害時にどのようなメカニズムで splice variant が増えてくるのかを明らかにすることが、今後の大きな研究課題だと考えられる。

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3件)

Kurganov Erkin, Zhou Yiming, Saito Shigeru, Tominaga Makoto. Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. *Pflüger Archiv Eur J Physiol* 2014. 466(10):1873-1884. doi:

10.1007/s00424-013-1420-z (査読あり)

Saito Shigeru, Banzawa Nagako, Fukuta Naomi, Saito T. Claire, Takahashi Kenji, Imagawa Toshiaki, Ohta Toshio, Tominaga Makoto. Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Molec Biol Evol* 31(3):708-722. 2014. doi: 10.1093/molbev/msu001 (査読あり)

Zhou Yiming, Suzuki Yoshiro, Uchida Kunitoshi, Tominaga M. Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. *Nat. Commun.* 4: 2408, 2013. doi: 10.1038/ncomms3399 (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

Saito Shigeru, Tominaga Makoto. Molecular basis for the species difference of TRPV1 channel property related to temperature adaptation in *Xenopus* species. 第91回日本生理学会大会、平成26年3月17日、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島市）

Kurganov Erkin, Tominaga Makoto (2014.3.17) Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. 第91回日本生理学会大会、平成26年3月17日、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児島市）

エルキン クルガノフ、富永 真琴。グリーンアノールトカゲ TRPA1 の温度・化学物質に対するチャネル特性。第 60 回中部日本生理学会、平成 25 年 10 月 25 日 岐阜大学（岐阜県・岐阜市）

齋藤 茂、富永 真琴。温度・化学物質受容体の脊椎動物種間の機能的多様性と分子基盤。日本動物学会第 84 回大会、平成 25 年 9 月 27 日 岡山大学（岡山県・岡山市）

齋藤 茂、富永 真琴。侵害性の温度・化学物質受容体 TRPA1 チャネルの機能的多様性とその分子基盤。日本進化学会第 15 回大会、平成 25 年 8 月 30 日 筑波大学（茨城県・つくば市）

Saito Shigeru, Tominaga Makoto. Functional evolution of noxious temperature and chemical receptors, TRPA1 and TRPV1, in vertebrates. SMBE2013 annual meeting of Society for Molecular Biology and Evolution, 2013.7.8, (Chicago, USA)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/cs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 真琴 (Tominaga, Makoto)

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・教授

研究者番号：90260041

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし