

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077012

研究課題名（和文） 温度センサーTRP チャンルの機能制御機構と生理学的意義の検討

研究課題名（英文） Regulation mechanisms and physiological significance of thermosensitive TRP channels

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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：温度・TRPM チャンネル

1. 研究計画の概要

目的

細胞や個体は様々な温度環境の中で生きており、その温度という環境外情報を感知してよりよい生存応答へと細胞・個体を導いている。著しく高いあるいは低い温度は侵害刺激として細胞や個体に忌避行動をとらせる。カプサイシン受容体 TRPV1 が 1997 年にクローニングされ、温度受容体として機能することが明らかになってからこれまでに哺乳類では 9 つの温度センサー (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1) が報告されてきた。このように 9 つの TRP チャンネルが温度刺激によって活性化することが明らかになったが、温度によるイオンチャンネルの活性化のメカニズムは TRPV1, TRPM8, TRPM4, TRPM5 においてしか報告されておらず、感覚神経以外に発現する温度センサー TRP チャンネルの機能も明らかでない。そこで、本研究では、感覚神経での発現が少なく表皮ケラチノサイトや視床下部に発現しており、その温度感受性を私たちが見いだした TRPV4 と、同じくケラチノサイトに発現する TRPV3 に焦点をあて、それら温かい温度を受容する温度センサー TRP チャンネル活性化の分子メカニズムを明らかにすることを主目的とする。そのために、TRPV3, V4 チャンネルの温度活性化の構造機能解析、TRPV3, TRPV4 の結合蛋白質との相互作用による温度センシング機能制御の解析、TRPV3 欠損マウス、TRPV4 欠損マウス用いたセンサー分子の個体への作用解析、複数の種の TRPV4 チャンネルの活性化温度閾値の違い (モーダルシフト) から異なる活性化温度閾値の構造基盤解析を行うものである。

計画

(1) 新生仔マウスケラチノサイトの初代培養系を確立し、TRPV3, TRPV4 の機能的発現を確認する。(2) マウスケラチノサイトが TRPV3, TRPV4 を発現していることを *in situ* hybridization 法、免疫組織化学法を用いて検討する。(3) TRPV4 の温度活性化機構 (電流の大きさや活性化温度閾値) がリン酸化によって制御を受けていないか、種々の蛋白質リン酸化酵素およびその刺激剤、阻害剤を投与して TRPV4 膜電流を検索する。(4) Yeast Two-hybrid 法を用いて TRPV3, TRPV4 の N 末あるいは C 末と結合する蛋白質を探索する。さらに、HEK293 細胞あるいは CHO 細胞に共発現させて、刺激物質による TRPV3, TRPV4 活性が TRPV3 あるいは TRPV4 単独発現細胞と違いがあるかを電気生理学的に検討する。(5) TRPV4 の体温調節機構における役割を検討するためにマウス腹腔内に温度プローブを埋め込み、自由行動下で体温と行動量を観察する。(6) 各種の TRPV4 の活性化温度閾値を定量化するとともに、アラインメントやキメラ体の解析も加えて TRPV4 の温度センシング機構に関わるドメインを同定する。(7) 視床下部神経細胞における TRPV4 の意義を明らかにする目的で、種々の蛋白質との多重染色を行い、TRPV4 発現細胞の characterization を行う。また、GFP-TRPV4 transgenic mouse を作成して、TRPV4 発現細胞の詳細な電気生理学的 characterization を行う。(8) 温度感知は生物にとっても最も基本的な感覚である。温度センサー TRPV4 のインシリコ解析によって、両生類で複数種 (5 種類) の TRPV4 が存在すること、およびカエル TRPV4 のアミノ末端に進化上いくつかの変異が生じてきたことが明らかになっている。そこで、両生類の

TRPV4 の中で活性化温度閾値に違いがないかを検討して関与するアミノ酸同定を試みるとともに、進化で生じた変異を人為的に哺乳類 TRPV4 に導入して活性化温度閾値を測定して、その変異アミノ酸の温度受容への関与を解析する。

2. 研究の進捗状況

(1) ケラチノサイトと感覚神経の共培養系において、温度刺激を行うとケラチノサイト、感覚神経細胞の両方で細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された。両細胞の応答に時間差があり、まずケラチノサイトで反応がみられたことから、温度刺激に応じてなんらかのケラチノサイトから神経細胞への情報伝達が行われていることが推察された。次に、知られたイオンチャンネル型神経伝達物質受容体 (P2X₂, 5HT₃, NMDA) を HEK293 細胞に発現させ、ケラチノサイトと共培養して、パッチクランプ法を適用してイオンチャンネル型神経伝達物質受容体をバイオ分子センサーとして用いて、伝達物質の同定を行った。(2) 温度感受性 TRP チャンネルの TRPV4, TRPV3 は表皮ケラチノサイトに強く発現しているが、TRPV3 がより主に表皮での温度感知に関わっていることを観察している。TRPV4 の温度感知以外のケラチノサイトでの機能を明らかにする目的でケラチノサイト cDNA ライブラリーを用いて TRPV4 の細胞内ドメインと結合する蛋白質のスクリーニングを行い、興味深い結合蛋白質を得た。その結果、TRPV4 がアドヘレンスジャンクションでコンプレックスを形成してケラチノサイトの細胞接着能を制御して、皮膚のバリアー機能に影響を及ぼしていることが明らかとなった。TRPV4 欠損マウスの皮膚では、水分がタイトジャンクションを越えて野生型マウスより速やかに移動すること、それを防ぐために角質層が肥厚していることが判明した。電子顕微鏡による観察で、TRPV4 欠損マウスの皮膚では、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションの形成が未熟であることが分かった。(3) 海馬神経細胞温度感受性 TRP チャンネル TRPV4 が発現していることを明らかにした。野生型海馬錐体細胞は TRPV4 欠損海馬錐体細胞と比較して、室温での静止膜電位に差はなかったが、37 度では野生型海馬錐体細胞で約 5mV 有意に脱分極がみられ、また、野生型海馬錐体細胞の発火頻度は有意に多かった。海馬神経細胞の TRPV4 は深部体温において恒常的に活性化して神経細胞を脱分極させ、神経の興奮性の制御に関わっていることが推測された。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。特に、TRPV4 チャンネルについて、その発現が皮膚、海馬錐体細胞など多く、興味深い結果が次々と明らか

になっていく。欠損マウスも保有しており、個体での生理学的意義の検討が比較的容易に行える。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 表皮ケラチノサイトと脳のライブラリーから同定した TRPV4 結合蛋白質と TRPV4 の結合様式・構造基盤について、詳細な解析を進める。(2) 海馬神経細胞の TRPV4 の生理的意義を明らかにする目的で、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスを用いた行動解析、脳波解析を行う。また、海馬スライス標本にスライスパッチクランプ法を適用して、長期増強の有無を確認する。

5. 代表的な研究成果

(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)

Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T and Tominaga M. Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 127: 654-659, 2007. (査読有)

Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A and Tominaga M. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by TRPV4. *J. Neurosci.* 27: 1566-1575, 2007. (査読有)

Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T and Nabeshima Y. AlphKlotho as a regulator of calcium homeostasis. *Science* 316: 1615-1618, 2007. (査読有)

[学会発表](計6件)

富永真琴. 脳におけるセルセンサーとしての TRP チャンネル. 第 31 回日本神経科学大会 2008 年 7 月 11 日(東京).

Tominaga M. TRP channels with high calcium permeability. FASEB Summer Research Conference: Calcium and cell function 2008 年 7 月 9 日(Colorado, USA).

Tominaga M. Physiological significance of the thermosensitive TRP channels. 2007 Keystone Symposium, The Transient Receptor Potential Ion Channel Super Family. 2007 年 9 月 20 日(Colorado, USA).

Tominaga M. TRP channels in itch and pain. 4th International Workshop for the Study of Itch. 2007 年 9 月 9 日(San Francisco, USA).

富永真琴. ケラチノサイトに発現する TRPV3 の活性化を介した ATP の放出によって温度情報が感覚神経に伝達される. 2007 年 3 月 21 日. 第 84 回日本生理学会大会 (大阪).