

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：82648

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 チャンネ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

研究成果の概要（和文）：

(1) 海馬神経細胞において TRPV4 が体温下で恒常的に活性化して静止膜電位の形成を介して神経興奮性に重要な役割を担っていることを明らかにした。(2) 体温下での膀胱伸展を TRPV4 が感知して、その情報を ATP を介して感覚神経に伝達するという新しい感覚メカニズムを発見した。(3) ケラチノサイトでは主に TRPV3 が温度を感知して、その温度情報を ATP を介して感覚神経に伝達していることを見いだした。(4) 低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析によって TRPV4 の3次元構造を 3.5 nm レベルで明らかにした。(5) 皮膚ケラチノサイトでは、環境温度を TRPV4 で感知して細胞内に Ca^{2+} を流入させてアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション構造を強めて細胞接着性バリア機能を果たしていることを見いだした。(6) ニシツメガエル TRPV3 遺伝子をクローニングし、温かい温度で活性化する哺乳類 TRPV3 と異なり、ニシツメガエル TRPV3 は 17 度以下の冷たい温度で活性化することが分かり、進化の過程で活性化温度が逆転したものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

(1) We found that TRPV4 in hippocampal pyramidal neurons is activated at body temperature and involved in the formation of resting membrane potential which could regulate neuronal excitability. (2) We found that TRPV4 in bladder epithelial cells detects wall extension under body temperature and that the Ca^{2+} influx through TRPV4 activation causes ATP release through which the stretch information is transmitted to sensory neurons. (3) We found that mainly TRPV3 detect ambient temperature in skin keratinocytes and that the temperature information is transmitted to sensory neurons through ATP. (4) Single particle analysis with cryoEM revealed 3-dimensional structure of TRPV4 at 3.5 nm level. (5) Activation of TRPV4 in skin keratinocytes causes Ca^{2+} influx, strengthening the junctional structure of adherence and tight junctions, which could cause enhancement of the skin barrier functions. (6) We cloned western clawed-frog TRPV3 gene and found that western clawed-frog TRPV3 is activated by cold temperature below 17 degree C, which is quite different from the warm temperature activation of mammalian TRPV3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,900,000	0	20,900,000
2007年度	17,100,000	0	17,100,000
2008年度	27,550,000	0	27,550,000
2009年度	27,930,000	0	27,930,000
2010年度	17,500,000	0	17,500,000
総計	110,980,000	0	110,980,000

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・TRP チャンネル

1. 研究開始当初の背景

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは、ショウジョウバエの光受容シグナル伝達系の構成成分として最初に同定された陽イオンチャネルである。TRP チャネルは、6つの膜貫通領域と1つのポア形成領域を持つサブユニットから構成され、4量体で機能的なチャネルを形成すると考えられている。現在までにショウジョウバエから線虫、哺乳類に至るまで30をこえるTRPチャネル遺伝子が同定されている。哺乳類ではTRPチャネルは6つのサブファミリー (TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP および TRPA) に分類され、大きな遺伝子ファミリーを形成している。

TRPチャネルは実に様々な身体の生理機能に関与しており、その多くが複数の刺激を受容する多刺激受容体として機能する。例えば、TRPV1は唐辛子の辛み成分であるカプサイシンの受容体として同定されたが、酸刺激や43度以上の熱刺激によっても活性化される。また、ミントの主成分メントールの受容体として同定されたTRPM8は25以下の冷刺激によっても活性化される。生体内におけるTRPチャネルの機能は主に、(1)細胞センサーとして細胞内外の刺激受容、(2)非興奮性細胞の活性化、(3)体内イオン環境の恒常性維持に分類される。例えばTRPV1およびワサビの主成分アリルイソチオシアネートの受容体TRPA1は侵害刺激の受容に広く関与していることが、遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究によって明らかにされており、TRPM5は甘味・旨味・苦味の受容に関与していることが報告されている。また、TRPP3 (PKD2L1) はPKD1L3とともに酸受容複合体を形成している。TRPV3とTRPV4は皮膚において温度受容に関与すると考えられている。これら細胞センサー分子としてのTRPチャネルの特徴は、それらの多くが顕著な温度感受性を示すことである。現在までに9つの温度感受性TRPチャネルが報告されており、これは全体のほぼ1/3を占める。温度感受性TRPチャネルは、感覚神経のみならず様々な臓器で発現が観察され、このことは体温による生理機能制御の重要性を反映しているのかもしれない。

2. 研究の目的

上記のように9つのTRPチャ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ネルの活性化のメカニズムはほとんど明らかにされておらず、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。

3. 研究の方法

(1) マウス海馬錐体細胞に発現するTRPV4の機能をCa²⁺-imaging法、パッチクランプ法等を用いて解析した。野生型マウスとTRPV4欠損マウスの海馬錐体細胞を比較検討した。(2) マウス膀胱上皮におけるTRPV4の遺伝子・蛋白質発現を観察し、機能もCa²⁺-imaging法を用いて確認した。マウス膀胱上皮からのATP放出を解析した。野生型マウスとTRPV4欠損マウスの膀胱上皮細胞を比較検討した。(3) マウス表皮からの熱刺激によるATP放出を、P2X2を強制発現させたHEK293細胞をバイオセンサーとして用いて解析した。野生型マウス、TRPV3欠損マウス、TRPV4欠損マウスの表皮ケラチノサイトを用いて、ケラチノサイトでの温度受容にどのチャネルが最も強く関与しているかを比較検討した。(4) cryoEMを用いてTRPV4の単粒子解析を行った。(5) TRPV4のケラチノサイトでの発現を観察して、結合蛋白質を探索した。種々の方法でケラチノサイトのバリア機能を解析し、野生型マウス、TRPV4欠損マウス、TRPV3欠損マウスで比較検討した。(6) ニシツメガエルのTRPV3遺伝子をクローニングし、その温度感受性を含めたチャネル機能をアフリカツメガエル2電極電位固定法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 「海馬神経細胞におけるTRPV4の発現と機能解析」

温度センサーTRPチャネルは、一般には感覚神経や表皮ケラチノサイトで温度受容に関わっていると考えられているが、TRPV1等中枢神経系での発現がみられるものがある。そこで、知られている温度センサーTRPチャネルの発現を検討したところ、海馬でTRPV4が強く発現していることを見いだした。海馬錐体細胞にTRPV4は発現しており、温度刺激のみならずTRPV4の有効刺激である低浸透圧刺激や4 α -PDDによって活性化することが分かった。野生型マウスとTRPV4欠損マウスで海馬神経細胞の形態やシナプス機能を解析したが、有意な差は認められなかった。しかし、静止膜電位を解析したところ、25度では約-61 mVで差は認められなかったが、

37度では、野生型マウスの海馬神経細胞は約5 mV有意に脱分極しており、電流注入による活動電位の発生も野生型マウスの海馬神経細胞で有意に多かった。これらの事実は、海馬神経細胞においてTRPV4が体温下で恒常的に活性化して静止膜電位の形成を介して神経興奮性に重要な役割を担っていることを示している。その生理学的意義を明らかにする目的で、野生型マウスとTRPV4欠損マウスでの記憶・学習能力を含めた行動解析、脳波解析、海馬神経細胞での長期増強の解析を進めている。

(2)「膀胱の機械伸展刺激感知に關与するTRPV4」

TRPV4は温かい温度で活性化してCa²⁺やNa⁺の流入をもたらす。膀胱移行上皮でのTRPV4の発現を抗TRPV4抗体を用いて検討したところ、野生型マウスの膀胱上皮でのTRPV4蛋白質の発現が確認され、TRPV4欠損マウスでは発現がなかった。TRPV4の野生型膀胱移行上皮での機能的発現は刺激物質である4 α -PDDに対する応答によっても確認された。野生型マウスとTRPV4欠損マウスから調整された膀胱上皮細胞に機械伸展刺激を加えたところ、野生型マウスから得られた細胞でのみ細胞内Ca²⁺濃度の上昇が観察された。また、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いて膀胱上皮細胞からのATPの放出を検討したところ、野生型マウスから得られた細胞で機械伸展刺激に対して有意に大きなATPの放出が観察された。これらの実験事実は、膀胱が尿貯留による拡張に対してTRPV4を活性化させてATPを放出することを示しており、ATPによってその伸展情報が感覚神経に伝達される可能性を示唆している。放出されたATPの受容体候補であるP2X3受容体欠損マウスで膀胱機能異常が認められるとする報告と合致する。体温下での膀胱伸展をTRPV4が感知して、その情報をATPを介して感覚神経に伝達するという新しい感覚メカニズムを示したと言える。

(3)「皮膚ケラチノサイトでのTRPV3による温度感知メカニズム」

TRPV3、TRPV4は表皮に強く発現し、温かい温度で活性化される。この事実は、皮膚が最初の温度感知組織である可能性を示唆する。そこで、マウス表皮ケラチノサイトと感覚神経細胞の共培養系を確立して、ケラチノサイトに温度刺激を加えてケラチノサイトと感覚神経細胞での細胞内Ca²⁺濃度変化を検討した。温度刺激に対してケラチノサイト、感覚神経細胞の両方で細胞内Ca²⁺濃度が上昇したが、感覚神経細胞での細胞内Ca²⁺濃度上昇が約1.2秒遅延した。これは、ケラチノサイトから感覚神経細胞

へ情報が伝達された可能性を示唆する。そこで、2種類のATP受容体阻害剤を用いたところ、感覚神経細胞でのみ温度刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度上昇が消失した。これは、ATPによってケラチノサイトから感覚神経細胞に情報が伝達されたことを示す。そこで、HEK293細胞にイオンチャンネル型ATP受容体P2X2を強制発現させたバイオセンサーを用いてケラチノサイトからのATP放出の検出を試みたところ、温度刺激に応じて内向き整流性というP2X2チャンネルに特徴的な電圧電流関係を示す電流の活性化が観察された。野生型マウス、TRPV3欠損マウス、TRPV4欠損マウスから調整したケラチノサイトを用いて実験したところ、TRPV3欠損ケラチノサイトを用いたときにP2X2チャンネル電流が有意に小さかったことから、温度刺激に応じて主にTRPV3チャンネルの活性化によってケラチノサイトからATPが放出されているものと考えられた。そして、このATPがケラチノサイトで感知された温度情報を感覚神経に伝達しているものと推定した。私たちの身体は神経と皮膚という2つの環境温度をセンスするメカニズムがあると考えられる。

(4)「TRPV4チャンネルの構造解析」

岡崎統合バイオサイエンスセンターナノ形態生理研究部門(永山教授、重松研究員)との共同研究で、低温電子顕微鏡を用いた単粒子解析によってSf7昆虫細胞に発現させたラットTRPV4の3次元構造が3.5 nmレベルで明らかとなった。一次構造上の長いN末端、C末端を反映した大きな細胞内ドメイン構造(ドーム構造)を持つことが判明した。

(5)「表皮ケラチノサイトに発現するTRPV4による細胞間接着を介したバリア機能」

表皮ケラチノサイトには2つの温かい温度で活性化するTRPチャンネル、TRPV3、TRPV4が発現している。TRPV3は皮膚で温度感知に携わっていると以前に報告したので、皮膚におけるTRPV4の機能を明らかにする目的で、TRPV4と結合する分子を探索したところ、 β カテニンと結合することが明らかとなり、さらにカドヘリンと複合体を形成することが判明した。アドヘレンスジャンクション機能に関わるものが推定された。TRPV4欠損マウスでは角化層が野生型マウスより厚いことが分かり、細胞接着性バリアの機能低下のために角化層による疎水性バリア機能を亢進させたのではないかと考えた。それを支持するように、角化層を除くとTRPV4欠損マウス皮膚の水分透過性が亢進し、色素浸入や水分蒸散が野生型マウス皮膚より有意に多くなった。それを裏付けるように、電子顕微鏡観察に

よって、TRPV4 欠損皮膚では細胞接着構造が乱れていた。新生仔マウスケラチノサイトを培養すると TRPV4 ケラチノサイトで細胞接着構造の完成や有意に遅くなることが分かった。皮膚では、環境温度を TRPV4 で感知して細胞内に Ca^{2+} を流入させてアドヘレンスジャンクションを強め、続いてタイトジャンクション構造を強めて細胞接着性バリア機能を果たしているものと考えられた。

(6)「カエル TRP チャネルの遺伝子クローニングと機能解析」

TRPV3 は両棲類で出現することから、ニシツメガエル TRPV3 を遺伝子クローニングしたところ、哺乳類 TRPV3 と N 末端、C 末端のアミノ酸配列が大きく異なることが分かった。ニシツメガエル TRPV3 をアフリカツメガエル卵母細胞に強制発現させて 2 電極電位固定法で解析したところ、哺乳類では温かい温度で活性化する TRPV3 が約 17 度の低温刺激で活性化することが明らかとなった。進化の過程で活性化温度閾値を逆転（モーダルシフト）させたことになる。2-APB 感受性は同様であった。ニシツメガエル TRPV3 mRNA は哺乳類 TRPV3 と同じように皮膚での発現が観察され、皮膚で侵害性冷刺激受容に関与しているものと考えられた。

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 8 件)

- ① Kida N, Sokabe T, Kashio M, Haruna K, Mizuno Y, Suga Y, Nishikawa K, Kanamaru A, Hongo M, Oba A, Tominaga M. Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* 463:715-25,2012,査読有
- ② Mihara H, Boudaka A, Sugiyama T, Moriyama Y, Tominaga M. Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse esophageal keratinocytes. *J. Physiol.* 589: 3471-3482,2011,査読有
- ③ Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M. Evolution of vertebrate transient receptor potential vanilloid 3 channels: opposite temperature sensitivity between mammals and western clawed frogs. *PLoS Genet.* 7:e1002041,2011,査読有
- ④ Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M. The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 285:18749-18758, 2010,査読有

- ⑤ Shigematsu H, Sokabe T, Danev R, Tominaga M, Nagayama K. A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by zernike phase-contrast cryo-EM. *J. Biol. Chem.* 285:11210-11218,2010,査読有
- ⑥ Mandadi S, Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, Patapoutian A, Fukumi-Tominaga T, Mizumura K, Tominaga M. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol.* 458:1093-1102,2009,査読有
- ⑦ Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M. The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca^{2+} influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J. Biol. Chem.* 284:21257-21264:2009,査読有
- ⑧ Shibasaki K., Suzuki M, Mizuno A, 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

[学会発表] (計 24 件)

- (1) Tominaga M. Physiological significance of thermosensitive TRP channels. 7th FAOPS Congress, 平成 23 年 9 月 12 日 (National Taiwan University Hospital 台北、台湾)
- (2) Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M. Functional Evolution of Thermosensor TRPV3 Channels: Opposite Temperature Sensitivity Between Mammals And Western Clawed Frogs. 2011 Annual Meeting of Society for Molecular Biology and Evolution, 平成 23 年 7 月 28 日 (Kyoto University Kyoto, Japan)
- (3) Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M. Evolution of Thermosensor TRPV3 Channels: Opposite Temperature Sensitivity between Mammals and Western Clawed Frogs. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 平成 23 年 6 月 2 日 (Nagoya Congress Center Nagoya, Japan)
- (4) Tominaga M. ATP-mediated information transmission downstream of TRP channel activation. 第 84 回日本薬理学会年会、平成 23 年 3 月 (紙上開催) (パシフィコ横浜 神奈川県)
- (5) 三原弘、富永真琴、消化管機能と TRPV チャネル、第 88 回日本生理学会大会、平成 23 年 3 月 (紙上開催) (パシフィコ横浜 神奈川県)
- (6) 富永真琴、感覚器官としての上皮—上皮に発現する TRP チャネルの機能、第 88 回日本生理学会大会、平成 23 年 3 月 (紙上開催) (パシフィコ横浜 神奈川県)
- (7) 齋藤茂、新貝御蔵、富永真琴、温度受容体 Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) イオンチャネルの機能進化：哺乳類とニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における逆向きの温度感受、第 57 回中部日本生理学会、平成 22 年 10 月 15 日 (藤田保健衛生大学 愛知県)

- (8)Tominaga M. TRP ion channels – novel sensor molecules for temperature and chemical stimuli. 第17回日本排尿機能学会、平成22年9月30日(山梨大学 山梨県)
- (9)齋藤茂、新貝鋤蔵、富永真琴、温度受容体 Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) イオンチャネルの機能進化：哺乳類とニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における逆向きの温度感受性、日本遺伝学会第82回大会、平成22年9月22日(北海道大学 北海道).
- (10)Tominaga M. Purinergic chemical transmission in the non-synaptic connection in periphery Neuro2010、平成22年9月2日(神戸コンベンションセンター 兵庫県)
- (11)Saito S, Shingai R, Tominaga M. Evolution of the temperature sensor TRPV3 channel: shift in the temperature sensitivity between mammals and western clawed frog. SMBE-2010- Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution、平成22年7月5日(Lyon Convention Center Lyon, France)
- (12)富永真琴、ケラチノサイトとニューロンの微妙な関係、第32回日本疼痛学会、平成22年7月3日(国立京都国際会館 京都府)
- (13)Boudaka A, Mihara H, Mizuno A, Tominaga M TRPV4-dependent stretch-evoked calcium influx and ATP release in esophageal keratinocytes. 第87回日本生理学会大会、平成22年5月20日(盛岡市民文化ホール 岩手県)
- (14)齋藤茂、新貝鋤蔵、富永真琴、温刺激受容体 transient receptor potential vanilloid 3 チャネルの脊椎動物における進化：無尾両棲類と哺乳類の比較解析、第87回日本生理学会大会、平成22年5月19日(盛岡市民文化ホール 岩手県)
- (15)Tominaga M. TRP channel functions in the skin keratinocytes. 5th International Workshop for the Study of ITCH、平成21年10月27日(Chinzan-so Tokyo, Japan)
- (16)Tominaga M. Monitoring of the released substances with a biosensor-patch method. 第32回日本神経科学大会、平成21年9月18日(名古屋国際会議場 愛知県)
- (17)Tominaga M. Physiological significance of the thermosensitive TRP channels. 40th NIPS International Symposium in conjunction with PAT-CVR2009、平成21年8月5日(Okazaki Conference Center Okazaki, Japan)
- (18)Tominaga M. Physiological significance of thermosensitive TRP channels. 36th International Congress of Physiological Sciences、平成21年8月1日(Kyoto International Conference Center Kyoto, Japan)
- (19)Sokabe T. Fukumi-Tominaga T. Yonemura S. Tominaga M. The TRPV4 channel participates in intercellular adhesion-dependent skin barrier function in mice. 36th International Congress of Physiological Sciences、平成21年7月28日(Kyoto International Conference Center Kyoto, Japan)
- (20)重松秀樹、曾我部隆彰、富永真琴、永山國昭、ゼルニケ位相差低温電子顕微鏡法によるラット

- TRPV4の構造解析、第31回日本神経科学大会 平成20年7月11日(東京国際フォーラム 東京都)
- (21)柴崎貢志、富永真琴、アストロサイトに発現するTRPV4が神経細胞との機能連関に関わる可能性、第30回日本神経科学大会、平成19年9月10日(パシフィコ横浜 神奈川県)
- (22)柴崎貢志、富永真琴、TRPV4の活性化を介したアストロサイトの興奮性向上、第84回日本生理学会大会、平成19年3月21日(大阪国際交流センター 大阪府)
- (23)曾我部隆彰、水野敦子、鈴木誠、富永真琴、福見-富永知子、ケラチノサイト細胞間接着と皮膚バリアに果たすTRPV4チャネルの生理的役割、第84回日本生理学会大会、平成19年3月20日(大阪国際交流センター 大阪府)
- (24)富永真琴、マンダデイ・スラバン、曾我部隆彰、柴崎貢志、水野敦子、鈴木誠、福見-富永知子、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、第84回日本生理学会大会、平成19年3月20日(大阪国際交流センター 大阪府)

[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)・教授

研究者番号：90260041

(2) 研究分担者

福見 知子 (FUKUMI TOMOKO)

生理学研究所・細胞器研究系・准教授

研究者番号：00280507

稲田 仁 (INADA HITOSHI)

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)・特任助教

研究者番号：60419893

曾我部 隆彰 (SOKABE TAKAAKI)

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)・特別協力研究員

研究者番号：70419894